

**SU TERESİNİN (*Nasturtium Officinale*)
7,12-DİMETİLBENZ[a]ANTRAZEN İLE İNDÜKLENEN
OKSİDATİF STRES VE KARACİĞER DOKUSU HASARINA
KARŞI KORUYUCU ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Kübra ATAY

Biyokimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı

Dr.Öğr.Üyesi A. BURÇİN UYUMLU

Yüksek Lisans Tezi – 2019

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SU TERESİNİN (*Nasturtium officinale*)
7,12-DİMETİLBENZ[a]ANTRASEN İLE İNDÜKLENEN
OKSİDATİF STRES VE KARACİĞER DOKUSU HASARINA
KARŞI KORUYUCU ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Kübra ATAY

**Biyokimya Anabilim Dalı
Yüksek Lisans**

**Tez Danışmanı
Dr.Öğr.Üyesi A. Burçin UYUMLU**


Bu araştırma İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2015/84 proje numarası ile desteklenmiştir.

**MALATYA
2019**

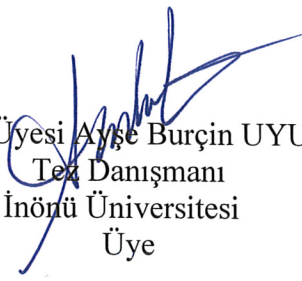
KABUL VE ONAY SAYFASI

İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde yürütülmüş olan; **Kübra ATAY**'ın "**Su Teresinin (*Nasturtium officinale*) 7,12-Dimetilbenz[a]Anstrasen ile İndüklenen Oksidatif Stres ve Karaciğer Dokusu Hasarına Karşı Koruyucu Etkisinin Araştırılması**" konulu bu çalışması, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 21/05/2019


Prof. Dr. Kadir BATÇIOĞLU
İnönü Üniversitesi
Jüri Başkanı


Prof. Dr. Mehmet Ferit GÜRSU
Fırat Üniversitesi
Üye


Dr. Öğr. Üyesi Ayşe Burçin UYUMLU
Tez Danışmanı
İnönü Üniversitesi
Üye

ONAY

Bu tez, İnönü Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından kabul edilmiş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../2019 tarih ve 2019/..... sayılı Kararıyla da uygun görülmüştür.

Prof. Dr. Yusuf TÜRKÖZ
Enstitü Müdürü

İÇİNDEKİLER

ÖZET	vi
ABSTRACT.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ.....	xiii
RESİMLER DİZİNİ	xiv
GRAFİKLER DİZİNİ.....	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Karaciğer Morfolojisi	4
2.1.1. Karaciğerin İşlevleri	5
2.1.2. Karaciğer Enzimleri	6
2.2. Ksenobiyotik Metabolizması	6
2.3. Serbest Radikaller	8
2.3.1. Oksijen ve Reaktif Oksijen Türleri	9
2.3.1.1. Süperoksit Radikali (O_2^{\bullet})	11
2.3.1.2. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)	11
2.3.1.3. Hidroksil Radikali ($\bullet OH$).....	12
2.3.1.4. Singlet Oksijen (1O_2)	12
2.3.1.5. Nitrik Oksit (NO^{\bullet})	12
2.3.2. Serbest Radikallerin Biyomoleküllere Etkileri	13
2.3.2.1. Serbest Radikallerin Nükleik Asitlere Etkileri	13
2.3.2.2. Serbest Radikallerin Lipidlere Etkisi	13
2.3.2.3. Serbest Radikallerin Proteinlere Etkileri	14
2.4. Antioksidan Savunma Sistemleri.....	14
2.4.1. Enzimatik Antioksidan Savunma Sistemi.....	15
2.4.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)	15
2.4.1.2. Katalaz (CAT).....	16
2.4.1.3. Glutasyon Peroksidaz (GPx)	16
2.4.1.4. Glutasyon Redüktaz (GSH-Red).....	16
2.4.1.5. Glutasyon-S-Transferazlar (GST)	16
2.4.2. Enzimatik Olmayan Antioksidan Savunma Sistemleri.....	17

2.5. Oksidatif Stres.....	19
2.6. Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlar (PAH)	20
2.6.1. 7,12-DMBA (7,12-Dimetilbenz[a]Antrasen)	21
2.7. Kemoprevensiyon	21
2.8. Fitokimyasallar	22
2.8.1. Fenolik Bileşikler.....	23
2.8.2. Karotenoidler	24
2.8.3. Kumarinler	25
2.8.4. Sülfidler	25
2.8.5. İzotiyosiyanatlar.....	25
2.9. Brassicaceae/Cruciferae Sebzeleri (Haçlı Çiçekliler, Turpgiller).....	25
2.9.1. Su Teresi (<i>Nasturtium officinale</i> R.Br.).....	26
2.9.1.1. Su Teresi'nin Sistematik Yeri.....	26
2.9.1.2. <i>Nasturtium officinale</i> R. Br.'nin İçeriği.....	28
2.10. Glukosinolatların Kimyasal Yapısı.....	28
2.10.1. Glukosinolatların Hidrolizi	30
2.10.2. Glukosinolatların Metabolik Fonksiyonları ve Sağlık Üzerine Etkileri	32
2.11. İzotiyosiyanatlar.....	32
2.11.1. ITC'nin Kimyasal Yapısı.....	33
2.12. Fenetil İzotiyosiyanat (PEITC).....	33
2.12.1. PEITC'nin Antikanser Aktivitesi.....	34
2.13. Nükleer Faktör E2 İle İlişkili Faktör 2.....	36
2.13.1. Nrf2'nin Yapısı	36
2.13.2. Keap-1/ Nrf2/ ARE Sinyal Yolağı.....	37
2.13.3. Keap 1/Nrf2/ARE Sinyal Yolağı Tarafından Aktive ve İnhibe Edilen Genler ..	39
2.13.4. Nrf2 Transkripsiyon Faktörünün Oksidatif Stres ve Hastalıklar ile İlişkisi	40
3. MATERYAL VE METOT	42
3.1. Gereçler.....	42
3.1.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Malzemeler	42
3.1.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar	43
3.1.3. Deney Hayvanlarının Temini ve Deneylere Hazırlanması	43
3.2. Metot.....	44
3.2.1. Deney Grupları	44
3.2.2. <i>Nasturtium officinale</i> (Su Teresi) Numunesinin Ekstraksiyon İşlemleri.....	44

3.2.3. Numune Alınması ve Hazırlık İşlemleri.....	45
3.3. Karaciğer Dokusunun Biyokimyasal Analizlere Hazırlanması.....	46
3.4. Biyokimyasal Analizler	46
3.4.1. Protein Miktar Ölçümü	46
3.4.2. Malondialdehit Düzeyinin Ölçümü	47
3.4.3. Süperoksit Dismutaz Aktivitesinin Ölçülmesi.....	48
3.4.4. Katalaz Aktivitesinin Ölçülmesi	50
3.4.5. Glutasyon Peroksidaz (GPx) Aktivitesinin Ölçülmesi.....	51
3.4.6. NAD(P)H Kinon Dehidrogenaz1 (NQO1) Aktivitesinin Ölçülmesi	53
3.4.7. Glutasyon S-Transferaz (GST) Aktivitesinin Ölçülmesi	54
3.4.8. Nükleer Faktör E2 İle İlişkili Faktör 2 (Nrf 2) transkripsiyon faktörünün Analizi	55
3.4.9. Serumda ALT (Alanin Transaminaz) Tayini.....	56
3.4.10. Su Teresindeki PEITC Miktarının HPLC ile Analiz Edilmesi.....	57
3.4.11. Karaciğer Dokusunun Histopatolojik İncelenmesi	58
3.5. İstatiksel Analiz	58
4. BULGULAR.....	61
4.1. Histolojik Bulgular	61
4.2. Biyokimyasal Bulgular	64
4.2.1. Grupların Serum ALT Düzeyleri.....	64
4.2.2. Grupların Nrf2 Transkripsiyon Faktörünün Bağlanma Yüzdesi	65
4.2.3. Grupların Karaciğer Dokusu NQO1 Aktiviteleri.....	66
4.2.4. Grupların Karaciğer Dokusu GST Enzim Düzeyleri	67
4.2.5. Grupların Karaciğer Dokusu MDA Düzeyleri.....	68
4.2.6. Grupların Karaciğer Dokusu SOD Aktiviteleri	69
4.2.7. Grupların Karaciğer Dokusu CAT Aktivitesi.....	70
4.2.8. Grupların Karaciğer Dokusu GPx Aktivitesi.....	71
4.3. Su Teresinde PEITC Analizi.....	72
5. TARTIŞMA.....	75
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	83
KAYNAKLAR	84
EKLER.....	106
Ek 1. Özgeçmiş	106
Ek 2. Deney Hayvanları Etik Kurul Kararı.....	107

TEŞEKKÜR

İnönü Üniversitesi Eczacılık Fakültesinde Biyokimya Anabilim Dalında yapmış olduğum tez çalışmam süresince bana destek olan, bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım çok değerli hocam Sayın Dr.Öğr.Üyesi Ayşe Burçin Uyumlu'ya teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek Lisans tez çalışmamda emeği geçen Uzm. Dr. Basri Satılmış'a, deney hayvanlarının temini ve yardımlarından dolayı Deneysel Araştırmalar Birimine ve personeline, teşekkürü bir borç bilirim. Tüm eğitim hayatım boyunca benden maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen her zaman yanımda olan sevgili aileme ve fedakârlıklarından dolayı eşime sevgi dolu teşekkürlerimi sunarım.

İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi Birimi'ne 2015/84 nolu projemize desteklerinden dolayı teşekkür ediyorum.

Kübra ATAY

ÖZET

Su teresinin (*Nasturtium officinale*) 7,12-dimetilbenz[a]antrasen ile indüklenen oksidatif stres ve karaciğer dokusu hasarına karşı koruyucu etkisinin araştırılması

Amaç: Nrf2, bir dizi antioksidan cevap elementine bağlı gen dizisinin ekspresyonunu aktive ederek oksidatif strese karşı hücrel savunmanın düzenlenmesinde kritik rol oynamaktadır. Bu *in vivo* çalışmada, DMBA ile indüklenen karaciğer hasarı ve oksidatif strese karşı Su teresinin (*Nasturtium officinale*) Nrf2 aracılığıyla koruyucu etkisinin incelenmesi amaçlanmaktadır.

Materyal-Metot: Çalışmada, 27 adet *Wistar Albino* sıçanlar üç gruba ayrıldı (her bir grupta 9 sıçan): Grup I, kontrol olarak değerlendirildi ve hiçbir uygulama yapılmadı. Grup II'deki ratlara intraperitoneal tek doz 20 mg/kg b.w. 7,12-DMBA i.p. uygulandı. Grup III'deki ratlara 4 hafta i.g. gavaj yoluyla 62.5mg/ml/gün Su teresi ekstresi verildi ve 20 mg/kg 7,12-DMBA i.p. uygulandı. Serum ALT, karaciğer dokularında histopatolojik analiz, SOD, CAT, GPx, NQO1, ve GST enzim aktiviteleri, MDA, Nrf2 transkripsiyon faktörünün analizleri gerçekleştirildi ve Su teresinde PEITC miktarı HPLC ile analiz edildi.

Bulgular: 7,12-DMBA uygulanan grupta, MDA ve ALT'nin arttığı ($p<0,05$), NQO1, GST, SOD, CAT, GPx enzim aktivitelerinin, ayrıca Nrf2 düzeylerinin sıçan karaciğer dokularında azaldığı gözlenmiştir ($p<0,05$). Su teresi'nin verildiği grupta ise bu biyokimyasal belirteçlerin seviyelerinin iyileştiği görülmüştür ($p<0,05$). Aynı zamanda, histopatolojik sonuçlar Su teresi'nin 7,12-DMBA aracılı karaciğer hasarına karşı koruduğunu desteklemiştir ($p<0,001$).

Sonuç: Çalışmamızdan elde ettiğimiz verilerde, Cruciferae familyasına ait Su teresinin, 7,12-DMBA ile indüklenen oksidatif stresi azalttığını ve karaciğer hasarını iyileştirdiğini gözlemledik. Buna ek olarak, su teresinin potansiyel bir kemopreventif ajan olabileceğini düşünmekteyiz.

Anahtar kelimeler: Su Teresi (*Nasturtium officinale*), DMBA, Faz II enzimleri, Nrf2, Hepatoprotektif etki.

ABSTRACT

Investigation of protective effect of Watercress (*Nasturtium officinale*) against oxidative stress and the liver tissue injury induced by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene

Objective: Nrf2 plays a critical role in regulating cellular defense against oxidative stress by activating the expression of a sequence of genes linked to a number of antioxidant response elements. In this study, it is aimed to investigate the protective effect of the watercress (*Nasturtium officinale*) via Nrf2 against 7,12-DMBA-induced liver damage and oxidative stress.

Material and Method: In this study, 27 Wistar Albino rats were divided into three groups (9 rats in per group): Group I was untreated and served as 'control'. Rats in group II were injected intraperitoneally each with a single dose of 20 mg/kg body-weight of 7,12-DMBA. Rats in Group III were treated 62.5 mg / ml / day of watercress by i.g. gavage for 4 weeks and were injected i.p. 7,12-DMBA. Serum ALT, histopathological analysis, SOD, CAT, GPx, NQO1, and GST enzyme activities, MDA, Nrf2 transcription factor were determined and PEITC amount on the watercress were analyzed by HPLC.

Results: In the 7,12-DMBA treated group, MDA and ALT increased ($p < 0,05$), NQO1, GST, SOD, CAT, GPx enzyme activities as well as Nrf2 levels decreased ($p < 0,05$). The level of these biochemical markers was found to be ameliorated by watercress ($p < 0,05$). At the same time, the histopathological results supported that the watercress protects against 7,12-DMBA-mediated liver damage ($p < 0,001$).

Conclusion: The data obtained from our study showed that the Cruciferae family has reduced oxidative stress induced by 7,12-DMBA and improved liver damage. In addition, we propose that the watercress may be a potential chemopreventive agent.

Key words: Watercress (*Nasturtium officinale*), 7,12-DMBA, Phase II enzymes, Nrf2, Hepatoprotective effect.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

°C	: Santigrad Derece
µL	: Mikrolitre
µmol	: Mikromol
¹ O ₂	: Singlet oksijen
NQO1	: Kinon Dehidrogenaz 1
ALT	: Alanin aminotransferaz
ARE	: Antioksidan Cevap Elementi
AST	: Aspartat aminotransferaz
BSA	: Sığır Serum Albumini
CAT	: Katalaz
rpm	: Dakikadaki Dönüş Sayısı
g	: Gram
mg	: Miligram
L	: Litre
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
nm	: Nanometre
nmol	: Nanomol
Sn	: Saniye
U	: Ünite
SOD	: Süperoksit dismutaz

GSH	: Redükte Glutatyon
GR	: Glutatyon redüktaz
GPx	: Glutatyon peroksidaz
GSSG	: Okside glutatyon
GST	: Glutatyon S-transferaz
ROT	: Reaktif Oksijen Türleri
H ₂ O ₂	: Hidrojen Peroksit
NADPH	: Redükte Nikotinamid adenin dinükledotid
NO·	: Nitrik Oksit
O ₂ · ⁻	: Süperoksit radikali
OH·	: Hidroksil radikali
H	: Hidrojen Atomu
Nrf2	: Nükleer faktör ile ilişkili faktör 2
Keap-1	: Kelch-like epicholorohydrin-associated protein-1
7,12-DMBA	: 7,12-dimetil benz[a] antrasen
PAH	: Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlar
PEITC	: Fenetilizotiyosiyonat
GLS	: Glukosinolat
NOS	: Nitrik Oksit Sentaz
GSH-Red	: Glutatyon Redüktaz
MDA	: Malondialdehit
ITC	: İzotiyosiyonat
NaCl	: Sodyum Klorür

KCl	: Potasyum Klorür
Na ₂ HPO ₄	: Disodyumhidrojenfosfat
KH ₂ PO ₄	: Potasyumdihidrojenfosfat
H ₃ PO ₄	: Fosforik Asit
HCl	: Hidroklorik Asit
TBA	: Tiyobarbitürik Asit
TMP	: Tetra Metoksi Propan
Na ₂ EDTA	: Disodyum Etilendiamin tetraasetik asit
NBT	: Nitro blue Tetrazolium Klorür
Na ₂ CO ₃	: Sodyum Karbonat
(NH ₄) ₂ SO ₄	: Amonyum Sülfat
NaOH	: Sodyum Hidroksit
nm	: Nanometre
M	: Molar
HO-1	: Hem oksijenaz-1

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa No
Şekil 2.1. Karaciğerin Genel Görünüşü.....	4
Şekil 2.2. Ksenobiyotik detoksifikasyonunun genel şeması.....	7
Şekil 2.3. Moleküler oksijenden ROT oluşumu	10
Şekil 2.4. Antioksidanların sınıflandırılması.....	15
Şekil 2.5. Redükte Glutasyon	17
Şekil 2.6. Bilirubin kimyasal yapısı	17
Şekil 2.7. α -tokoferol'ün kimyasal yapısı.....	18
Şekil 2.8. Askorbik asitin yapısı	18
Şekil 2.9. Ürik asitin yapısı	19
Şekil 2.10. 7,12- Dimetilbenz[a]antrasen(DMBA) molekülü ($C_{20}H_{16}$).....	21
Şekil 2.11. Fenolik bileşiklerin sınıflandırılması.....	23
Şekil 2.12. Flavonoid molekülünün genel yapısı	24
Şekil 2.13. Glukosinolatların genel kimyasal yapısı	29
Şekil 2.14. Glukosinolatların hidrolizi	31
Şekil 2.15. Glukosinolatların hidrolizi ve oluşan ürünleri.....	31
Şekil 2.16. Glukonasturtiinden PEITC eldesi.....	34
Şekil 2.17. Nrf2 domain yapısı	36
Şekil 2.18. Keap1 domain yapısı	37
Şekil 2.19. Nrf2 molekülünün nükleuse transloke olması.....	38
Şekil 3.1. <i>Nasturtium officinale</i> (Su Teresi) numuneleri için ekstraksiyon işlem basamakları.....	45
Şekil 4.1. Kontrol grubu, DMBA ve DMBA+ST deney gruplarının serum ALT düzeylerinin karşılaştırılması	65
Şekil 4.2. Kontrol grubu, DMBA ve DMBA+ST deney gruplarının Nrf2 transkripsiyon faktörünün bağlanma yüzdelilerinin karşılaştırılması	66
Şekil 4.3. Kontrol grubu, DMBA ve DMBA+ST deney gruplarının NQO1 aktivitelerinin karşılaştırılması.	67
Şekil 4.4. Kontrol grubu, DMBA ve DMBA+ST deney gruplarının GST enzim düzeylerinin karşılaştırılması.	68

Şekil 4.5. Kontrol grubu, DMBA ve DMBA+ST deney gruplarının MDA düzeylerinin karşılaştırılması.	69
Şekil 4.6. Kontrol grubu, DMBA ve DMBA+ST deney gruplarının SOD aktivitelerinin karşılaştırılması.....	70
Şekil 4.7. Kontrol grubu, DMBA ve DMBA+ST deney gruplarının CAT aktivitelerinin karşılaştırılması.....	71
Şekil 4.8. Kontrol grubu, DMBA ve DMBA+ST deney gruplarının GPx aktivitelerinin karşılaştırılması.....	72
Şekil 4.9. Farklı konsantrasyonlardaki PEITC standartlarına ve Su teresi numunesine ait HPLC kromatogramları.....	75

TABLULAR DİZİNİ

Tablo No	Sayfa No
Tablo 2.1. Karaciğerin İşlevleri	5
Tablo 2.2. Konjugasyonda Kullanılan Moleküller.....	8
Tablo 2.3. Bazı serbest radikal türleri	9
Tablo 2.4. Reaktif Oksijen türleri	10
Tablo 2.5. Fitokimyasalların sınıflandırılması	23
Tablo 2.6. Su Teresi (<i>N. officinale</i> R. Br.)'nin Sistematiği.....	27
Tablo 2.7. Bazı glukosinolatların kimyasal ve yaygın kullanılan isimleri.....	30
Tablo 2.8. Bazı glukosinolat türleri, içerdiği bitkiler ve hidroliz ürünleri.....	32
Tablo 2.9. ARE bölgesine bağlanan Nrf2 indükleyici gruplar ve etki mekanizmaları	39
Tablo 2.10. Nrf-2 / ARE sinyal yolağı tarafından aktive edilen genler	40
Tablo 3.1. Kontrol grubu, DMBA grubu ve DMBA + Su Teresi gruplarındaki biyokimyasal parametrelere ait ortalamalar, standart hata ve standart sapma sonuçları.....	59
Tablo 3.2. Gruplar arası karşılaştırmaların yapılmasında kullanılan ANOVA testi sonuçları	60
Tablo 3.3. Grup karşılaştırmalarında Kruskal Wallis varyans analizi	60
Tablo 4.1. DMBA' nın oluşturduğu karaciğer hasarı üzerine ST'nin etkileri.	62
Tablo 4.2. Serum örneklerindeki ALT'ın grup ortalamaları ve standart sapma verileri	65
Tablo 4.3. Karaciğer dokusu Nrf2 transkripsiyon faktörünün bağlanma yüzdelерinin grup ortalamaları ve standart sapma verileri.....	66
Tablo 4.4. Karaciğer dokusu NQO1 aktivitelerinin grup ortalamaları ve standart sapma verileri.....	67
Tablo 4.5. Karaciğer dokusu GST enziminin grup ortalamaları ve standart sapma verileri	68
Tablo 4.6. Karaciğer dokusu MDA'nın grup ortalamaları ve standart sapma verileri	69
Tablo 4.7. Karaciğer dokusu SOD aktivitelerinin grup ortalamaları ve standart sapma verileri.....	70
Tablo 4.8. Karaciğer dokusu CAT aktivitelerinin grup ortalamaları ve standart sapma verileri.....	71
Tablo 4.9. Karaciğer dokusu GPx aktivitelerinin grup ortalamaları ve standart sapma verileri.....	72

RESİMLER DİZİNİ

Resim No	Sayfa No
Resim 2.1. Malatya, Arguvan yöresine ait <i>Nasturtium Officinale</i> (L.) R.Br.	26
Resim 2.2. İnönü Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumu <i>Nasturtium Officinale</i> (L.) R.Br.	27
Resim 4.1. Kontrol grubuna ait karaciğer dokusu histolojik görüntüsü.....	62
Resim 4.2. DMBA grubuna ait karaciğer dokusu histolojik görüntüsü.	63
Resim 4.3. DMBA + ST grubuna ait karaciğer dokusu histolojik görüntüsü	64

GRAFİKLER DİZİNİ

Grafik No	Sayfa No
Grafik 3.1. Protein standart kalibrasyon grafiği	47
Grafik 3.2. Tetrametoksipropan'ın standart kalibrasyon eğrisi	48
Grafik 3.3. Süperoksit dismutaz enziminin standart kalibrasyon eğrisi	50
Grafik 3.4. PEITC'nin standart grafiği	58

1. GİRİŞ

Tarih öncesi çağlardan beri doğa, kanser dahil olmak üzere birçok hastalığı tedavi etmek için kullanılan birçok ilaç ve ilaç yolunun zengin bir kaynağı olmuştur. Newman ve Cragg'a göre, mevcut antikanser ajanlarının %74.8'i doğal kaynaklardan oluşmaktadır ve neredeyse %48.6'sı bu doğal kaynakların asıl doğal bileşeni veya doğrudan türevidir (1). Son yıllarda, diyet fitokimyasallarının kimyasal ve biyolojik fonksiyonları ve insan sağlığı üzerine etkileri yoğun bir şekilde araştırılmaktadır. En bilinen fitokimyasal bileşikler tanenler, saponinler, kumarinler, fenolik bileşikler, tokoferoller, terpenler, karotenler, izotiyosiyanatlar, sülfidler, sülforafanlar, terpenoidler, alkaloidler şeklinde sıralanabilir (2).

Dinamik ve uzun vadeli bir süreç olan kanser gelişimi, sonuçta metastaza, kontrolsüz yayılıma ve vücudun kanserli hücrelerinin büyümesine yol açan, genel olarak başlama, gelişme ve ilerleme aşamalarını içeren bir süreçtir (3). Kemoprevensiyon, neoplastik transformasyondaki hücrelerin gidişatını tersine çeviren veya geciktiren doğal ya da sentetik non-toksik kimyasal önleyici şeklinde açıklanmıştır (4). Epidemiyolojik çalışmalar, doğal diyet bileşiklerinin bu süreci değiştirebileceğini, kanser ve diğer kronik hastalıkları önleme becerisine sahip biyoaktif diyet bileşenlerinin kemopreventif etkinliğini ortaya çıkarmıştır (3). Son on yılda kanserin önlenmesi için yapılan geniş oranda preklinik ve insan müdahaleli çalışmalarda olumlu verilere dayanarak, kemoprevensiyona kanserle savaşmada gerçekçi ve stratejik alternatif olarak bakılmaktadır (5).

İn vivo transgenik ve deney hayvanları modellerinin ortaya çıkışıyla, hücresel, moleküler ve genomik deney sistemlerinin ve diyet fitokimyasallarının düzenlediği mekanizmaların muazzam bir şekilde anlaşılması sağlanmıştır. Bu fitokimyasallar hücrelere girdikten sonra, doğrudan serbest radikalleri temizleyebilir ve ayrıca çeşitli hücresel sinyal yolları ile ilgili proteinleri tetikleyen "kimyasal veya elektrofilik stres sinyalleri" üretebilir (6). Bu durum Nrf2 ile Keap1 kompleksinin aktivasyonunu içerir. Nrf2-Keap1 kompleksinin aktivasyonu ile birlikte hücresel savunma mekanizmaları olan faz 2 detoksifikasyon enzimleri, faz 3 transporterları, anti-oksidatif stres proteinleri ve diğer savunma mekanizmaları hücreye giren reaktif oksijen türleri ve karsinojenik reaktif türlerden hücreyi korur. Karsinogenezin başlatılmasını engelleyen bu koruyucu mekanizmalar, Wattenberg tarafından tanımlanan bir kavram olan kemoprevensiyon olarak tanımlanabilir (7).

Bu doğal dietetik bileşikler tarafından ortaya çıkarılan kanser kemopreventif etkilerinin, en azından kısmen detoksifiye edici ve antioksidan enzim sistemleri dahil olmak üzere hücre koruma sistemlerinin uyarılmasına ve aynı zamanda apoptozis ve / veya hücre döngüsü, anti-inflamatuar ve anti-hücre büyüme sinyalizasyonunun inhibisyonuna bağlı olduğunu öne sürmektedir. Doğal diyet bileşiklerinin kemopreventif potansiyelinin moleküler temeli ve hedef hücre sel sinyal molekülleri üzerine etkileri mevcut araştırmaların odak noktasıdır (8).

Ksenobiyotik ya da ilaç metabolize eden enzimler olarak da bilinen biyotransformasyon enzimleri, kimyasal karsinojenlerin toksik, mutajenik ve neoplastik etkilerinin düzenlenmesinde, aynı zamanda diğer ksenobiyotikler olan fitokimyasallar ve terapötik ilaçların metabolize edilmesinde majör rol oynamaktadır (9). Bir transkripsiyon faktörü olan Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2= eritroid nükleer faktör ile ilişkili faktör 2), fizyolojik şartlarda, Keap1 (Kelch-like epicholorohydrin-associated protein 1) veya INrf2 olarak adlandırılan sitozolik inhibitörü ile bulunmakla birlikte oksidatif stres arttığında Nrf2, ayrılarak çekirdeğe gelmekte ve burada antioksidan cevap elementine (ARE= Antioxidant Response Element) bağlanarak aktive etmektedir (10). ARE'nin aktive edilmesi ile birlikte, bu gen bölgesinin indüklediği süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx) gibi antioksidan enzimlerinin (11) ve ksenobiyotik metabolizmasında oluşan toksik reaktif ara ürünleri elimine eden NAD (P) H:quinine oxidoreductase 1 (NQO1) ve Glutathione S-transferase (GST) gibi faz II detoksifikasyon enzimlerinin aktivasyonuna neden olabilmektedir (12).

7,12-DMBA gibi polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH), birçok toksik ve karsinojenik etkileri olan çevresel kirletici bir ajandır (13). Otomobil eksozu, sigara dumanı, mangalda pişirilen yiyecekler başlıca kaynaklarıdır (14).

7,12-DMBA, Faz I ve II enzimleri ve antioksidatif enzimlerin düzenlenmesinde rol oynadığı iyi bilinen eksojen bir hepatotoksindir (15) ve aynı zamanda meme kanseri için majör risk faktörüdür (16). 7,12-DMBA, reaktif oksijen türlerinin (ROT) üretimini indükleyerek lipid peroksidasyonu, DNA hasarı ve antioksidan savunma enzimlerinin tükenmesine neden olur (17).

Birçok kronik hastalığın gelişmesinde serbest radikallerin rolü olduğundan fitokimyasallara olan ilgi giderek artmaktadır (18).

Bitkilerde bulunan fitokimyasallar, biyotransformasyon enzimlerini düzenlemektedir, özellikle Cruciferae (Brassicaceae) familyasındaki bitkiler başta olmak üzere bu mekanizma ile kanser riskini azaltabilmektelerdir (19).

Cruciferae familyasında başlıca brokoli, yaban turpu, lahana, karnabahar ve su teresi gibi bitkiler bulunmaktadır. Bu bitkiler yüksek miktarda glukosinolat bileşenine sahiptir. Glukosinolatlar, yemek hazırlanması, pişirilmesi ve çiğnenmesi esnasında fiziksel faktörler ile nonenzimatik olarak veya mirozinaz ile enzimatik olarak izotiyosiyanatlara (ITC) dönüştürülmektedir (20). Örneğin, su teresinde bulunan glukonasturtiin fenetilizotiyosiyanata hidrolize edilmektedir (21). Birçok epidemiyolojik çalışma göstermektedir ki Cruciferae bitkilerinin tüketilmesi ile akciğer (22), meme (23), prostat (24), mide (25) ve kolon/rektum (26) gibi kanser türlerinin gelişimi arasında ters orantılı bir ilişki bulunmaktadır.

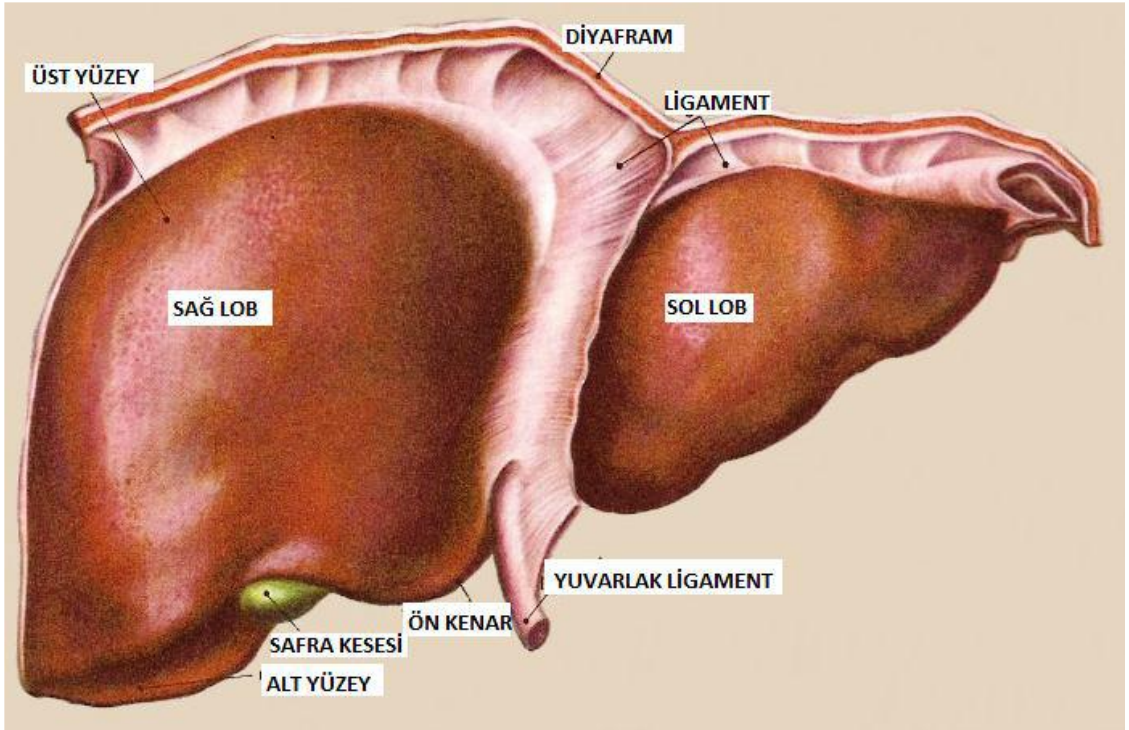
Mekanistik çalışmalarda, karsinojen metabolizması ve detoksifikasyon üzerindeki biyolojik etkilerinden sorumlu tutulan izotiyosiyanatların güçlü kemopreventif aktivitesi olduğu bildirilmektedir (19). Su teresinde bulunan fenetil izotiyosiyanat, en ümit verici kemopreventif bileşen olarak yoğun bir şekilde araştırılmaktadır (27).

Bu çalışmanın ana hedefi, Malatya yöresinde yetişen Su Teresi (*Nasturtium officinale*) bitkisinin, karsinojen bir ajan olan 7,12-DMBA'nın indüklediği oksidatif stres ve karaciğer dokusu hasarına karşı koruyucu etkisinin belirlenmesidir. Bununla birlikte bu çalışma, karaciğerde oluşan oksidatif hasar, antioksidan enzim aktiviteleri ve ksenobiyotik metabolizmasında görev alan faz II enzim düzeylerinin belirlenmesi ve bu enzim düzeylerinin düzenlenmesinde, oksidatif stres ile indüklenen bir transkripsiyon faktörü olan Nrf2'nin bu sürece etkilerinin ve su teresinin kemopreventif etkisinin araştırılması amaçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Karaciğer Morfolojisi

Sindirim sistemine ait yardımcı bir bez olarak kabul edilen karaciğer, vücudun deriden sonra en büyük organı ve en büyük bezidir (28). Vücut ağırlığının yaklaşık 1/50'sini oluşturan karaciğer ortalama ağırlığı yetişkinlerde 1400-1600 gr ağırlığında olup anatomik olarak Lobus dexter ve lobus sinister olmak üzere iki ayrı loba ayrılmıştır (29).



Şekil 2.1. Karaciğerin Genel Görünüşü (30)

Glikoproteinler, fibrinojen, protrombin, albumin, globulinler gibi proteinleri ve glikoz sentezlemesi ve bu maddeleri kana doğrudan doğruya vermesinden dolayı endokrin bir bez olan karaciğer, safra kanalları yoluyla safrayı duodenuma boşalttığından ekzokrindir (31).

2.1.1. Karaciğerin İşlevleri

Karaciğerin hayati önem taşıyan fonksiyonlarını aşağıdaki şekilde özetleyebiliriz.

- a) İlaç ve toksinlerin biyotransformasyonunda önemli bir rol oynayan karaciğer, vücuda girmiş birçok ilaçların ve zehirlerin meydana getirdiği toksik etkiyi azaltır veya arındırır.
- b) Diğer bir önemli fonksiyonu depo olarak görev alması olan Karaciğer, lipitleri trigliserid şeklinde depolarken kan glikozunun fazlasını kandan alıp glikojen olarak depolar.
- c) Kanda bulunan albumin, protrombin, fibrinojen ve lipoproteinler gibi çeşitli plazma proteinlerinin de sentezler
- d) Bakteri ve yıpranmış kırmızı kan hücrelerini fagosite etmektedir.
- e) Karaciğerin bir diğer önemli fonksiyonu safra salgısı salgılamaktır.
- f) Karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmasında, kanın pıhtılaşmasında, karaciğerin önemli rolleri vardır (32).

Tablo 2.1. Karaciğerin İşlevleri (33)

Filtrasyon (retikuloendoteial sistem)	
Süstrat ve vitaminlerin işlenmesi	
Metabolik Denge	
Temel mekanizmalar	
Yakalama	
Hücre içi metabolizmasının idamesi	
Depolama	
Salgılama	
Metabolik Süstratlar	
Karbonhidratlar- Glukozun değiştirilmesi	
Lipidler- serbest yağ asitlerinin değiştirilmesi	
Amino asitler- amino asit havuzu	
Özgül Proteinlerin Sentezi	
Koagülasyon	Fibrinojen Protrombin VII, IX, X
Taşıyıcı Proteinler	Albumin Transferrin Lipoprotein
Yağ Fazı Metabolizması	
İlaç metabolizması	
Safra Üretimi	
Lizozomal ve nonlizozomal taşınım	

2.1.2. Karaciğer Enzimleri

Karaciğer fonksiyon testi olarak bilinen bazı enzim ölçüm yöntemleri karaciğerdeki hücre hasarı veya kolestaz hakkında bilgi vermeye yöneliktir. Karaciğerde hasar olduğunda ALT, AST veya ALP ve GGT enzim aktivitelerinin tayin yöntemi ile anlaşılmaktadır ve karaciğerdeki hasarlar bu enzimlerin serum düzeylerinde yükselmeye sebep olurlar (34).

Vücutta birçok organ ve dokuda bulunan hücre içi bir enzim olan Aminotransferaz karaciğerde görev alan bir enzimdir. Öncelikle karaciğer ve böbreklerde bulunup, kalp ve iskelet kasında daha az miktarda mevcuttur. Karaciğer hasarının belirlenmesinde ayrı bir önem taşıyan Aminotransferazlardan ALT ve AST genellikle tüm karaciğer hastalıklarında, serum ALT ve AST düzeylerinde yükselme gözlenerek takip edilmektedir (35).

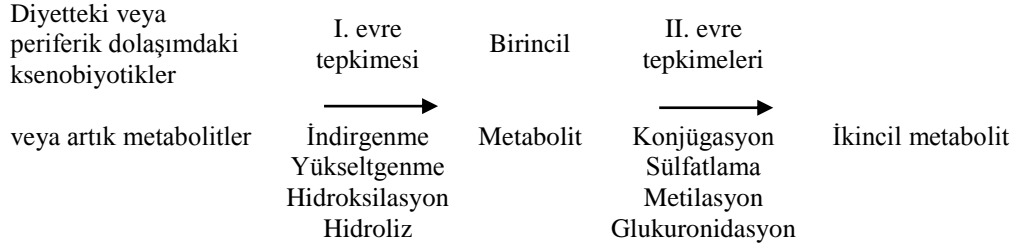
2.2. Ksenobiyotik Metabolizması

Vücuda çeşitli yollarla giren organik ve inorganik ilaçlar, besin katkı maddeleri, insektisit ve fungusit metabolitleri, havayı ve suyu kirleten atıklar, tarım ve endüstri kaynaklı kimyasal maddeler ve bitki kökenli ikiyüzbenden fazla maddeye ksenobiyotik adı verilmektedir (36).

Organizma ilaç kullanımı ile veya hava, gıda ve su kirliliği sonucu karşılaşılan toksik maddelere günlük yaşamda sıklıkla maruz kalmaktadır. Örneğin hazır gıdalarda bulunan koruyucu ve renklendirici kimyasallar, sanayi atıklarının çevreye karışması, çeşitli deterjan ve kozmetikler, tarım ilaçları ksenobiyotiklerin kaynakları arasında gösterilmektedir (37).

Gastrointestinal kanal, akciğer ve deri yolu ile ksenobiyotikler vücuda alınabilmektedir. Vücudumuzdan uzaklaştırılırken absorbe edilen bu maddelerin çoğu enzimler aracılığı ile metabolize edilerek, bir kısmı ise değişmeden veya spontan değişimle uzaklaştırılmaktadır. Ksenobiyotiklerin vücutta çeşitli enzimlerin etkisi ile uğradığı kimyasal değişikliklere biyotransformasyon denilmektedir. Ksenobiyotik bileşiklerin vücuttaki başlıca biyotransformasyon noktaları karaciğer, böbrek ve bağırsaktır. Vücuda çeşitli yollarla giren bu bileşiklerin başlıca yıkım noktası ise karaciğerdir (36).

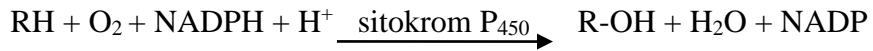
Ksenobiyotik metabolizması faz I ve faz II tepkimeleri olmak üzere 2 fazda incelenmektedir. Faz I tepkimelerinde vücuda giren bir madde detoksifiye edilmekte veya bir ilacın olumsuz etkisi sonlandırılmaktadır. Faz II tepkimeleri sırasında glukuronik asit, sülfat, asetat, glisin, glutamin veya glutatyon gibi hidrofilik bir molekül ile ksenobiyotik veya metaboliti konjuge edilmekte veya yapısına metil grubu eklenmektedir. Bu konjugasyon ile yabancı madde biyolojik aktivitesini kaybederek suda çözünerek atılabilir hale gelmektedir. Şekilde kısaca özetlenmektedir (37).



Şekil 2.2. Ksenobiyotik detoksifikasyonunun genel şeması (38)

Faz I tepkimelerinin çoğunu oksidasyon tepkimeleri (sıklıkla hidroksilasyon tepkimesi) oluşturmakta ve tepkimelerin büyük kısmının ise oksijen bağımlı olduğu belirlenmiştir.

Molekülün daha polar hale getirildiği hidroksilasyon tepkimeleri monooksijenazlar adı verilen sitokrom P₄₅₀ enzimi tarafından katalizlenmektedir. Bu tepkime ile glukuronik asit gibi bir molekülün konjuge edilebileceği hidroksil grubu yapıya katılmaktadır. Hidroksilasyon tepkimesinde sitokrom P₄₅₀ için ortamda moleküler oksijen ve NADPH bulunması gerekmektedir.



Yaklaşık 150 izoformdan oluşan ve ksenobiyotik metabolizmasında rol alan sitokrom P₄₅₀ enzimi hücre içerisinde düz endoplazmik retikulum membranlarında yer almaktadır. Oldukça geniş ve kısmen örtüşebilen bir substrat özgüllüğü gösteren sitokrom P₄₅₀ izoformları karaciğer ve ince bağırsakta yüksek miktarda bulunmaktadır.

Genellikle faz I tepkimesinin metabolitinin konjuge edilmesi ile metabolize olan ve vücuda girdikten sonra doğrudan konjuge edilebilen ksenobiyotikler, faz II tepkimelerinde konjugasyon ile daha polar ve suda çözünür hale getirildikten sonra vücuttan kolaylıkla atılabilmektedir (37).

Tablo 2.2. Konjugasyonda Kullanılan Moleküller (37).

Konjuge edilen molekül	Ksenobiyotikler	Ürün
Glukuronik asit	İlaçlar Morfin, sülfatiazol, dapsom, indometasin, salisilat, merkaptobenzotiyazol Diğerleri Anilin, benzoik asit, fenol,	Glukronidler
Glisin	Benzoik asit, fenilasetik asit	Glisin Konjugatları,
Glutasyon	Aromatik halojenlenmiş bileşikler, sülfat ve nitro bileşikleri, epoksidler	Merkaptürik asit
Sülfat	Alkoller, fenoller, arilamin bileşikleri	Sülfatlanmış bileşikler
Asetil	Sülfonamidler, isoniazid	Asetillenmiş bileşikler

2.3. Serbest Radikaller

Kimyasal bağlar, iki veya daha fazla atom arasında aynı yörüngeyi paylaşarak zıt yönde dönen çift elektronlardan oluşmuş yapılardır. Serbest radikal, dış yörüngesinde ortaklanmamış elektron içeren molekül veya iyonlara verilen genel addır. Vücutta doğal metabolik yollarla oluşabilen serbest radikallerin dış orbitalindeki tek sayıda ortaklanmamış bu elektronlar genelde reaktif ve kararsız olup dış yörüngelerindeki elektronu eşleştirebilmek için diğer moleküllerle etkileşerek reaksiyona girer. Oksijen ve nitrojen kaynaklı serbest radikaller, vücutta çeşitli reaksiyonlarla oluşabilen oksijen kaynaklı reaktif türlerinin (ROT) metabolizmaya önemli ölçüde olumsuz etkisi vardır (39).

Normal şartlarda metabolizma sonucu yaklaşık %1 oranında bulunan ROT, hava kirliliği, sigara, ilaç, ağır egzersiz, yaşlanma, radyasyona maruziyet gibi durumlarda artış gösterir.

Kimyasal olaylar ve çeşitli fiziksel etkenler nedeniyle sürekli bir radikal yapımı vardır. Serbest radikaller üç şekilde meydana gelir (40):

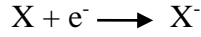
1- Kovalent bağların homolitik kırılması ile: Kovalent bağlı bir molekülün ayrışması ile bağı oluşturan elektronların her biri ayrı ayrı atomlar üzerinde kalır:



2- Kovalent bağlı bir molekülün ayrışması ile bağı oluşturan elektronların tümünün bir atomda kalarak ayrışması ile;



3- Moleküle bir iyon transferiyle;



Tablo 2.3. Bazı serbest radikal türleri (41)

Adı	Formülü	Tanımı
Hidrojen Atomu	H [•]	En basit serbest radikal
Süperoksit	O ₂ ^{•-}	Oksijen merkezli radikal, seçimli reaktif
Hidroksil	•OH	En fazla reaktif oksijen radikali, İnsan vücudundaki tüm moleküllere saldırır.
Triklorometil	CCl ₃	C merkezli radikal. CCl ₄ metabolizması sonucu üretilir ve genellikle O ₂ ile hızla reaksiyona girer.
Tiyil	RS [•]	Kükürt üzerinde eşleşmemiş elektron bulunduran türlerin genel adı
Peroksil, Alkoksil	RO ₂ [•] , RO [•]	Organik peroksitlerin yıkımı sırasında oluşan oksijen merkezli radikaller
Nitrik Oksit	NO [•]	L-arginin amino asidinden in vivo koşullarda üretilir.
Azotdioksit	NO ₂ [•]	NO [•] nun O ₂ ile reaksiyonunda oluşur. Kirli hava, sigara dumanında vb.bulunur.
Hidrojen peroksit	H ₂ O ₂	Reaktivitesi en düşük, moleküler hasar yeteneği düşük.
Singlet Oksijen	¹ O ₂	Oksijenin güçlü oksidatif formu.

2.3.1. Oksijen ve Reaktif Oksijen Türleri

Oksijenin dış yörüngede bulunan iki elektronu eşleşmemiş şekilde bir elektron dağılımına sahip olmasından dolayı oksijen bazen ‘biradikal’ olarak değerlendirilir ve kendisi çok reaktif değil ancak diğer radikallerle reaksiyona girme özelliğine sahiptir (42).

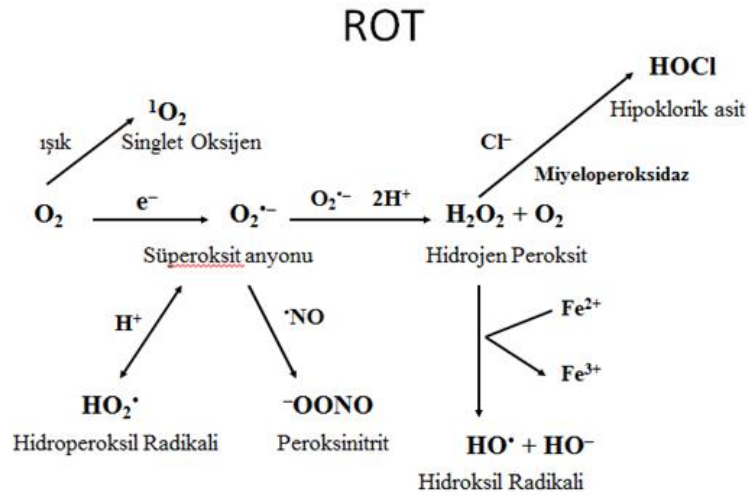


Kararlı yapıda bulunan, yapılarında eşlenmemiş elektronu bulunmayan ve diğer maddeler ile radikallerden daha zayıf bir şekilde reaksiyona giren moleküller ise nonradikaller olarak tanımlanmaktadır (43).

Tablo 2.4. Reaktif Oksijen türleri

Radikaller		Nonradikaller	
Süperoksit	O_2^-	Hidrojen Peroksit	H_2O_2
Hidroksil	OH^\cdot	Hipokloröz Asit	$HOCl$
Peroksil	ROO^\cdot	Hipobromöz Asit	$HOBr$
Alkoksil	RO^\cdot	Singlet Oksijen	1O_2
Hidroperoksil	HO_2^\cdot	Ozon	O_3
Lipid Peroksil	LOO^\cdot		

Serbest radikaller hücrede normal metabolizma reaksiyonları sonucu sürekli oluşabilmektedir (Şekil 2.3.) (45).

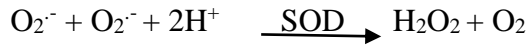


Şekil 2.3. Moleküler oksijenden ROT oluşumu

Şekil 2.3’de hidroksil radikali, süperoksit anyonu, nitrik oksit, lipid peroksit, hidrojen peroksit gibi reaktif ara ürünlerin moleküler oksijenden oluşumu görülmektedir. Hücrede oksijenin neredeyse %90’ı mitokondrilerde hücresel solunumda tüketilir. Oksijenin %2’si ise ROT oluşturur. ROT, lipidler, DNA, protein ve karbonhidrat gibi biyomoleküllere saldırır. Bunun sonucunda, lipid peroksidasyonu ile hücre membran hasarı, DNA hasarı, hücre bölünmesinin durması, kontrolsüz büyüme, kanser oluşumu ve ateroskleroz oluşumunun hızlanması gerçekleşir (46).

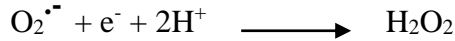
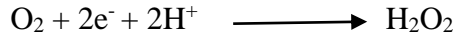
2.3.1.1. Süperoksit Radikali (O₂^{•-})

Bir serbest radikal olan süperoksit, kendisi direkt olarak fazla zarar vermez. Burada asıl önemli olan görevi, geçiş metal iyonlarının indirgeyicisi ve H₂O₂ kaynağı olmasıdır. Süperoksit radikali, vasküler fonksiyonların regülasyonu, nötrofillerin aktivitesi, inflamasyon ve apoptozis gibi süreçlerde rolü bulunmakla birlikte. Süperoksit radikalının miktarında azalma, bakteriyel enfeksiyonlara karşı yatkınlığın artmasına neden olabilir. Süperoksit düzeyi arttığında ise süperoksid dismutaz (SOD) enzimi ile H₂O₂ ve oksijene dönüştürülerek hücre korunur (42).

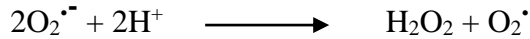


2.3.1.2. Hidrojen Peroksit (H₂O₂)

Süperoksidin bir elektron alması veya moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden iki elektron alması sonucu Hidrojen peroksit meydana gelir.



H₂O₂'nin asıl üretimi ise biyolojik sistemlerde süperoksidin nonenzimatik veya SOD katalizli dismutasyon reaksiyonu ile H₂O₂'ye dönüşmesiyle olur.



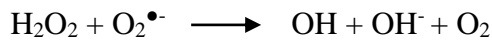
Hidrojen peroksit moleküler yapısında eşleşmemiş elektron olmadığından dolayı aslında radikal değildir. Hücre membranlarından kolayca difüze olan uzun ömürlü bir oksidandır (47).

2.3.1.3. Hidroksil Radikali ($\bullet\text{OH}$)

Hidrojen peroksit uzun ömürlü bir oksidandır ve geçiş metal iyonları varlığında hızlı bir şekilde reaksiyona girerek en reaktif radikal olan hidroksil radikalini ($\text{OH}\bullet$) oluşturur.

Hidrojen peroksit ve süperoksit radikalinin tepkimeye girmesi ile oluşan hidroksil radikali (Haber-Weiss reaksiyonu) demirle (Fe^{+2}) katalizlenir ise çok daha hızlı gerçekleşir (Fenton reaksiyonu) (48).

Haber-Weiss reaksiyonu;



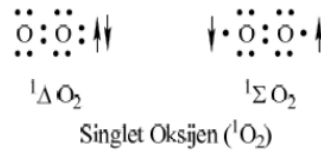
Fenton reaksiyonu;



Yarılanma ömrü çok kısa ve kararsız olan Hidroksil radikali, biyolojik sistemlerdeki en reaktif radikal türü olup hemen hemen tüm biyomoleküllerle tepkimeye girerek büyük hasara sebep olur (40).

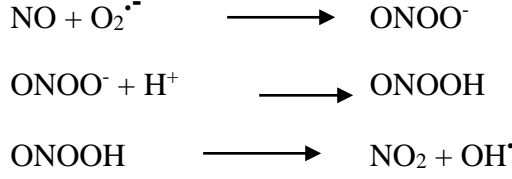
2.3.1.4. Singlet Oksijen ($^1\text{O}_2$)

Ortaklanmamış elektronu olmadığı için radikal olmayan bir reaktif oksijen türü olan singlet oksijen, radikal reaksiyonların başlamasına sebep olur. Moleküler oksijenin enerji alması ile singlet oksijen oluşur ve oksijen molekülünün daha reaktif bir türüdür (49).



2.3.1.5. Nitrik Oksit ($\text{NO}\bullet$)

NO (nitrik oksit); Nitrik oksit sentaz (NOS) olarak bilinen sitozolik bir enzimin aktivitesi sonucu oluşur. NO, damar tonusunun düzenlenmesinde guanilat siklazı aktive ederek major rol oynamaktadır. Süperoksitle reaksiyona girer ve bu reaksiyon sonucu bir prooksidan olan peroksinitrit oluşturur (42).



2.3.2. Serbest Radikallerin Biyomoleküllere Etkileri

2.3.2.1. Serbest Radikallerin Nükleik Asitlere Etkileri

OH^\bullet radikali, deoksiriboz iskeletinin yanı sıra hem pürin hem de pirimidin bazlarına zarar vererek DNA molekülünün bütün bileşenleri ile reaksiyona girmektedir (44).

DNA'nın kalıtsal değişiklikleri ile sonuçlanan bu zararlı etkiler mutasyonlara neden olmakta ve ayrıca somatik hücrelerde kanser oluşumu veya bakteri hücrelerinde fetal malformasyonla sonuçlanmaktadır (50).

2.3.2.2. Serbest Radikallerin Lipidlere Etkisi

Serbest oksijen radikallerinin hücre membranlarında bulunan çoklu doymamış yağ asitlerini, peroksitler, alkoller, aldehitler, hidroksi yağ asitleri, etan, pentan, MDA gibi ürünlere dönüştürme reaksiyonuna Lipit peroksidasyonu adı verilmektedir (51). Yağ asitlerinin peroksidasyonu zincir tepkimeler şeklinde sürer ve bu hücre sel zedelenmenin en önemli nedenlerinden birini oluşturur (52).

Lipit yapıdaki hücre membranı serbest radikal tepkimesi için kritiktir ve hücre dışında oluşan serbest radikaller, hücre bileşenleri ile tepkimeye girebilmesi için zarı geçmek zorundalardır. Oksijen molekülünün lipitlere karşı yüksek bir afinitesi bulunmakla birlikte oksijen molekülü hemoglobinden ayrıldıktan sonra plazmadaki lipoproteinler ve eritrosit zarındaki lipitlerde çözünmekte sonrasında dokularda kullanılmaktadır. Hidroksil radikalının doymamış yağ asitlerindeki çift bağlara bağlanması lipit peroksidasyonunu başlatmaktadır (53). Direkt olarak membran yapısına ve ürettiği reaktif aldehitlerle indirekt olarak diğer hücre bileşenlerine zarar veren nonenzimatik lipit peroksidasyonu hücre hasarına ve bir çok hastalığa sebep olan çok zararlı bir zincir reaksiyonudur.

MDA, lipit peroksidasyonu son ürünlerinden birisidir. Serbest radikaller oto katalitik etkiyle lipitlerin okside olmasına ve membran hasarına yol açmaktadır (54).

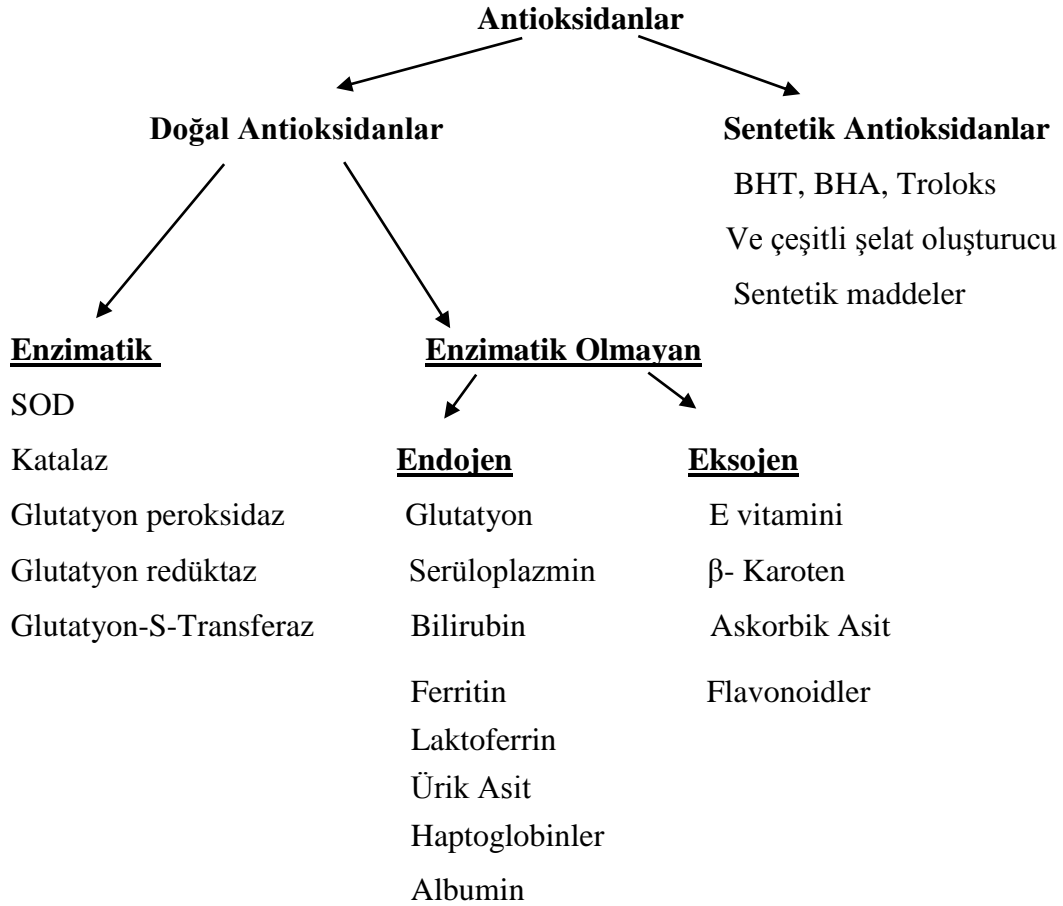
2.3.2.3. Serbest Radikallerin Proteinlere Etkileri

Proteinlerin amino asit içerikleri serbest radikallerin proteinleri doğrudan etkileme derecesini belirler. Triptofan, tirozin, fenil alanin, histidin, metionin ve sistein gibi amino asitler içeren proteinler doymamış bağ ve sülfür içerdiklerinden dolayı daha yüksek reaktiviteye sahip olduğundan serbest radikallerle daha kolay reaksiyona girer (40).

2.4. Antioksidan Savunma Sistemleri

Canlı hücrelerdeki n DNA, protein, lipid ve karbonhidrat gibi biyomoleküllerin oksidasyonunu engelleyebilen veya geciktirebilen maddelere antioksidanlar denir (55).

Doğal (endojen kaynaklı) ve eksojen kaynaklı antioksidanlar olarak veya enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar şeklinde sınıflandırmalar olmak üzere antioksidanların sınıflandırılması çeşitlilik göstermektedir (40).



Şekil 2.4. Antioksidanların sınıflandırılması

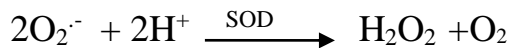
ROT'un vücutta meydana getirdiği hasarları önlemek üzere vücutta görev yapan savunma sistemlerine, antioksidan savunma sistemleri adı verilir (44).

2.4.1. Enzimatik Antioksidan Savunma Sistemi

Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutasyon peroksidaz(GPx) enzimatik antioksidan savunma sisteminin en önemli öğeleri arasında yer almaktadır (56).

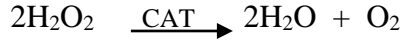
2.4.1.1. Süperoksid Dismutaz (SOD)

SOD, Mc Cord ve Fridovich'in tanımladığı bir metalloenzimdir (57). Süperoksit zincirleme radikal reaksiyonlarının güçlü bir başlatıcısı olduğundan dolayı oksidatif strese karşı ilk savunma SOD ile katalizlenen bu reaksiyon ile gelmektedir (58).



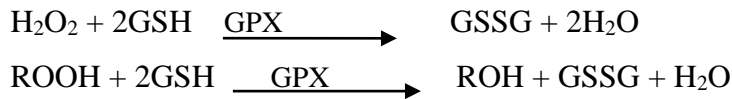
2.4.1.2. Katalaz (CAT)

Katalaz, hidrojen peroksitin detoksifikasyonundan sorumlu, karakteristik enzimatik bir antioksidandır (59).



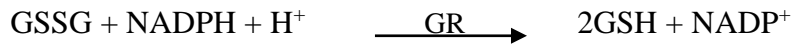
2.4.1.3. Glutasyon Peroksidaz (GPx)

Glutasyon Peroksidaz, organik hidroperoksitlerin veya hidrojen peroksit'in GSH aracılığıyla indirgendiği reaksiyonu kataliz etmektedir. İlk olarak 1957 yılında memeli eritrositlerinde bulunan GPx yapısında selenyum bulunmaktadır. Hem H₂O₂, hem lipid hidroperoksitlerini metabolize etmekteledir (60).



2.4.1.4. Glutasyon Redüktaz (GSH-Red)

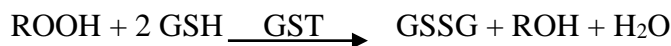
GSH-Red, bir flavoenzimdir ve aktivitesi NADPH'a bağlıdır. NADPH'tan bir elektronun GSSG'nin disülfid bağlarına aktararak okside glutasyonu (GSSG), redükte formu olan GSH 'a indirger.



Major kaynağı pentoz fosfat yolu olan NADPH serbest radikal hasarına karşı gereklidir (61).

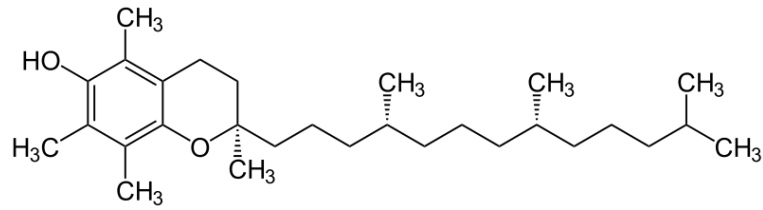
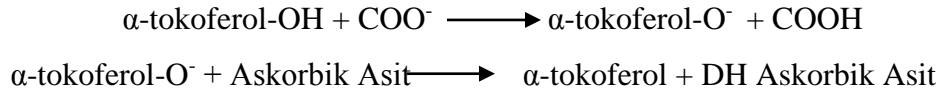
2.4.1.5. Glutasyon-S-Transferazlar (GST)

Glutasyon-s-transferazlar (GST); glutasyon ile ksenobiyotiklerin reaksiyonlarını katalizleyen faz II enzimlerinden biridir, özellikle lipid peroksil radikalleri ile etkileşerek glutasyonla (GSH) konjugasyon reaksiyonlarını katalizler (62).



E Vitamini (Tokoferoller)

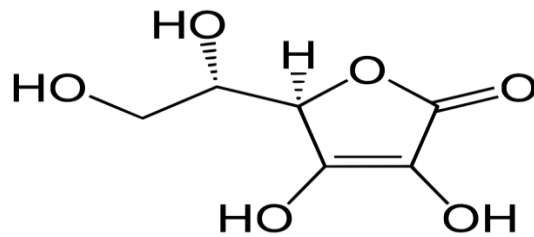
OH grubundaki H atomu kolayca uzaklaştırılabilinen α -Tokoferolün lipid peroksidasyonu sırasında oluşan peroksil ve alkoksil radikalleri doğrudan α -tokoferol ile birleşir. Zincir kırıcı bir antioksidan olarak α -Tokoferol, zincir reaksiyonunu sonlandırdığı için lipid peroksidasyonu da sonlandırmış olur. (68).



Şekil 2.7. α -tokoferol'ün kimyasal yapısı (69)

Vitamin C (Askorbik Asit)

Vitamin C, kuvvetli bir indirgeyici özelliğe sahiptir. Serbest radikallerin bir çoğu ile reaksiyona girmekte (Süperoksit, lipid peroksil radikalleri, hidroksil, v.s.) ve oksidatif hasara karşı etkin bir koruma sağlamaktadır (70).

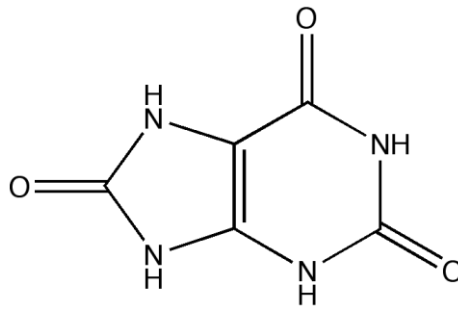


Şekil 2.8. Askorbik asitin yapısı (71)

β -Karoten: β -karoten, aktif A vitaminine dönüşebildikleri için provitamindir ve vücut A vitamininden yoksun kaldığı zaman vitamin A'ya çevrilir. Ayrıca, β -karoten, lipid peroksidasyonlarına karşı lipozomları koruma yeteneğindedir ve β -karotenin diğer karotenoidler gibi yağda çözünür antioksidan aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir. (72).

Albumin: Vücut içerisindeki farklı bölümler arasındaki sıvının dağılımında ve ozmotik basıncın düzenlenmesinde kilit bir proteindir ve güçlü bir antioksidan etkiye sahiptir (73).

Ürik asit: Ürik asit, insanda purin katabolizmasının son oksidasyon ürünüdür. Normal plazma konsantrasyonlarında bulunan ürat (160-450 $\mu\text{M/L}$) hidroksil, süperoksit, peroksit radikalleri ve singlet oksijeni gidermektedir ancak lipid radikalleri üzerinde etkisizdir (40).



Şekil 2.9. Ürik asitin yapısı (74)

2.5. Oksidatif Stres

Canlı sistemler, UV, kimyasal oksidanlar, hava kirliliği gibi dış etkenler ya da iç etkenler gibi çeşitli nedenlerle aşırı miktarlarda üretilen serbest radikaller ile bu radikallerin zararsızlaştırılmasından sorumlu endojen ve eksojen antioksidan sistemler arasında hassas bir dengeye bulunmakla birlikte bu dengenin oksidanlar yönünde bozulması oksidatif stres olarak tanımlanır ve bu stres birçok hastalığın oluşumu ve gelişiminde önemli rol oynamaktadır (75).

Hücresinin redoks durumunda değişikliğe neden olan serbest oksijen radikallerinin aşırı üretimi veya yetersiz indirgenmesi sonucu oksidatif stres durumu meydana gelmektedir. Metabolik reaksiyon sırasında açığa çıkan radikal oluşumunu kontrol altında tutmak ve organizmaya verilen zararı engellemek için antioksidan savunma sistemi gelişmiştir. Antioksidan savunma sisteminin radikallerin etkisini tamamen önleyemediği şartlarda ve radikallerin organizmada arttığı durumlarda organizmanın oksidatif dengesi bozulur, oksidatif stres görülür ve doku hasarı oluşmaktadır (76).

Son yıllarda, özellikle reaktif oksijen ve azot kaynaklı oksidatif stres üzerine yapılan çalışmalarda; kanser, diyabet, katarakt, romatoid artrit ve yaşlanma gibi çeşitli inflamatuvar ve dejeneratif hastalıklarda oksidatif stresin rol oynadığı kanıtlanmıştır (77).

Oksidatif stres, genelde lipit peroksidasyon son ürünü olan MDA, oksidatif DNA hasar göstergesi olan 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG), protein karbonil ürünleri, antioksidan enzimler, alfa-tokoferol, askorbik asit, glutatyon, ubikinon, sistein gibi antioksidanların ölçümü ile belirlenir (78).

2.6. Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlar (PAH)

Temel kaynakları otomobil eksozu, sigara, yanmış yağlar olan PAH'lar biyolojik sistemde birikerek kanser başlatıcıları olarak bilinen hepatotoksinlerdir (14). Polisiklik aromatik hidrokarbonlar iki ya da daha fazla benzen halkasına sahip hidrofobik karakterli organik bileşiklerdir (79).

Hidrofobik yapılarından dolayı sudaki çözünürlükleri oldukça az olan PAH'lar yüksek oranda lipofilik özelliğe sahiptirler. PAH'ların molekül ağırlıkları arttıkça toksik ve kanserojenik özellikleri artmaktadır (80).

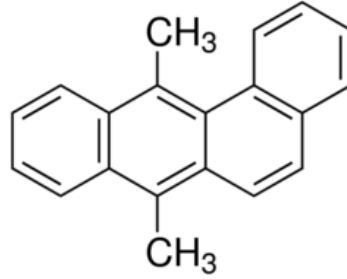
İlk olarak 1921 yılında PAH'ların kanserojen maddeler oldukları tespit edilmiştir. Laboratuvar çalışmalarında, bu maddelerin özellikle karsinogenezisin başlangıç aşaması ile ilgili role sahip olduğu üzerinde durulmuştur (81).

Bilinen en güçlü karsinojenler olan PAH'lar, deride papillom ve deri kanserleri, deri altına enjekte edildiklerinde sarkomlar, oral yolla alındıklarında bağırsak karsinomları ve bazı organ tümörlerinin oluşmasına neden olmaktadır (82). PAH'lar tümör başlatıcı, geliştirici ve ilerletici özellikleri olan potent karsinojenlerdir. Bu grupta yer alan ve deneysel onkolojide en çok kullanılan karsinojenler; dibenzantrasen, 3-metilkolantren ve 7,12-dimetilbenz(a)antrasen'dir (83).

PAH'ların enzimatik aktivasyonu, DNA bağlarının kopmasına sebep olan süperoksit anyon radikalleri ve peroksitler gibi aktif oksijen türlerinin oluşumuna yol açmaktadır (84).

2.6.1. 7,12-DMBA (7,12-Dimetilbenz[a]Antrasen)

7,12-DMBA, PAH sınıfına ait toksik bir maddedir ve kimyasal yapısında dört halka ve iki metil grubu içermektedir (85).



Şekil 2.10. 7,12- Dimetilbenz[a]antrasen(DMBA) molekülü (C₂₀H₁₆) (86)

2.7. Kemoprevensiyon

Egzersiz ile birlikte sağlıklı beslenme, kanser de dahil olmak üzere herhangi bir hastalığın önlenmesinde tedavi ile birlikte yada tedavi yerine tercih edilen bir yöntem olarak kabul edilmiştir. Bununla birlikte yakın zamana kadar, hastalıkların önlenmesi için bitki kökenli doğal ürünlerden elde edilen özütlerin ya da bileşiklerin kullanımına odaklanılmıştır. Hastalık oluşumunu önlemek veya geciktirmek için giderek daha popüler bir yaklaşıma neden olan fitokimyasalların kullanımına son zamanlarda yapılan çalışmalarda rastlanılmaktadır. Aslında bu bitki bileşenlerinin tıbbi özelliklerinin uzun yıllardır var olduğunu not etmek önemlidir. Bu nedenle hastalıkların tedavisi için doğal ürünlerin uygulanması yeni bir kavram değildir.

Günümüzde kemoprevensiyon kavramı ve terimi ilk olarak 1960'lı yılların sonunda tanımlanmış ve kullanılmaya başlanmıştır (4).

Kemoprevensiyon terimi, kanserin gelişimini ve ilerlemesini inhibe etmek, bastırmak veya tersine çevirmek için doğal veya sentetik bileşiklerin kullanımı olarak tanımlanmıştır. O zamandan beri, kanser kemoprevensiyon alanı hızla yayılarak kemoprevensiyon, kanser araştırması ve mutasyon araştırmasında en popüler araştırma alanlarından biri haline gelmiştir (87). Bu terim, kanser kemopreventif ilaçlarının mekanizmalarının anlaşılması yolu ile geliştirilmesinin yollarını açıklayan Kellof ve Steel tarafından genişletilmiştir (88). Çok sayıda fitokimyasalın kemopreventif etkinliğini ve bunların birçok kemopreventif madde sınıfı için sentetik analoglarını tanımlayan çok sayıda literatürün ışığında, kanser kemopreventif ajanlarının olası

mekanizmalarıyla bağlantılı olarak üç genel önleme seviyesini dikkate almaktadır. Klinik açıdan bakılırsa, kemoprevensiyon aşamaları birincil, ikincil ve üçüncül derecede kemoprevensiyon olarak sınıflandırmaktadır:

- Birinci dereceden kemoprevensiyon, sağlıklı katılımcılardan oluşan düşük risk gruplu popülasyonda karsinogenezin önlenmesini
- İkinci dereceden kemoprevensiyon ise premalign lezyonların tümöre dönüşmeden bloke edilmesini,
- Üçüncü dereceden kemoprevensiyon primer tümörlerin yok edilmesinden sonra tekrar yinelenmesinin bloke edilmesini kapsamaktadır (89).

Bu çalışmalar büyük ölçüde meme bezi, kolon, prostat, akciğer, cilt, pankreas ve özafagusun deneysel karsinogenez modelleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir (90).

2.8. Fitokimyasallar

Besin olarak tüketilmeyen ancak besin gibi faydaları ve işlevleri olan fonksiyonel, sağlıklı, düzenleyici, tıbbi ve özel beslenme amaçlı veya farmakolojik besinler adı altındaki yiyeceklerin yapısında bulunan, bitkisel kaynaklı biyolojik aktif bileşiklere fitokimyasallar denilmektedir (91). Fitokimyasallar bitkilerin kendilerine özgü renk, koku ve tatların oluşmasında etkili bir role sahiptir (92).

Dünya Sağlık Örgütü, insanların zamanlarının ve ekonomik imkanlarının önemli bir kısmını sağlıksız beslenmelerinden kaynaklanan sorunlarını çözebilmek için harcamakta olduğunu ve bitkisel ağırlıklı beslenenlerin kendilerini daha zinde hissettiklerini bildirilmekle birlikte, sağlıklı bir yaşam için taze sebze ve meyvelerden oluşan bir diyet önermektedir (91).

Fitokimyasallar insan vücudunda substrat, kofaktör, inhibitör, absorban ve hücre membranı ve hücre içinde bulunan reseptörlere bağlanan ligand olarak bazı etkilere sahiptir. Ayrıca sağlık üzerinde olumlu etkilerini, reaktif toksik ajanları yakalayıp, esansiyel besin öğelerinin absorpsiyon ve stabilitesini artırarak, yararlı gastrointestinal bakterilerin çoğalmasını artırarak, yararlı oral, gastrik ve intestinal bakteriler için substratları fermente ederek ve zararlı mikroorganizmaları inhibe ederek sağlamaktadır (93).

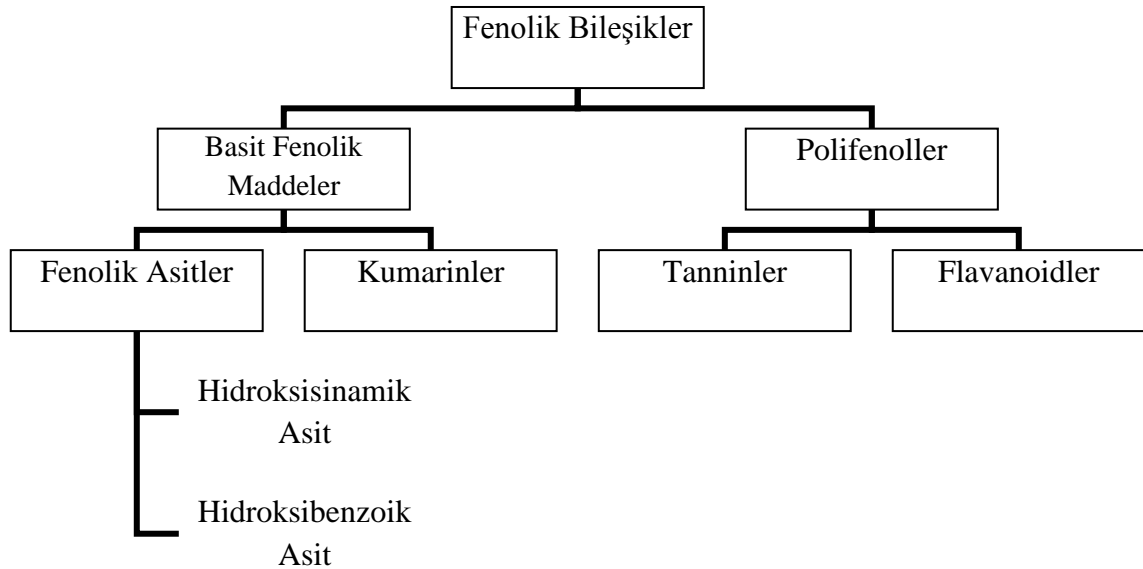
Tablo 2.5. Fitokimyasalların sınıflandırılması (94).

Fitokimyasalların sınıflaması				Kaynakları
Fenolikler	Fenolik asitler	Hidroksiben-zoik asitler	Gallik, vanillik, siringik	Kestane (haşlanmış veya kavrulmuş), güvercin ağacı, çay yaprakları, meşe kabuğu vb.
		Hidroksisi-namik asitler	p-kumarik, kafeik, ferulik, sinapik	Arpa, okaliptüs, kahve, ebegümeci vb.
	Flavonoidler	Flavonoller	Kuarsetin, kaemferol	Aloe vera, soya, domates, kırmızı soğan vb.
		Flavonlar	Apigenin, luteolin	Kereviz, papatya çayı, maydanoz, yeşil biber, kekik vb.
		Flavanoller (kateşinler)	Kateşin, epikateşin, epigallokateşin gallat	Beyaz çay, yeşil çay, Trabzon hunnası, nar, kakao vb.
		Flavanonlar Antosiyanidinler	Eriodisitol, hesperetin Siyanidin, pelargonidin, malvidin	Turunçgiller, kuşburnu vb. Üzüm, kırmızı meyveler, lahana, kırmızı soğan, barbunya vb.
Karatenooidler	Stilbenler Kumarinler Taninler	İsoflavonoidler	Genistein, glisitein	Bakla, soya, kahve vb. Üzüm vb Vanilya, çim vb Okaliptüs, sardunya vb
		Alkaloidler		Havuç, brokoli, ıspanak, kabak vb.
		Organosülfür bileşikler	İsotiosiyanatlar, indoller, alil sülfür bileşikleri	

2.8.1. Fenolik Bileşikler

Bitkilerin önemli sekonder aromatik metabolitleri olan fenolik bileşikler (polifenoller) benzen halkası içeren doğal antioksidanlardır (95).

Basit fenolik maddeler ve polifenoller olmak üzere fenolik bileşikler iki ana gruba ayrılmaktadır.



Şekil 2.11. Fenolik bileşiklerin sınıflandırılması (96).

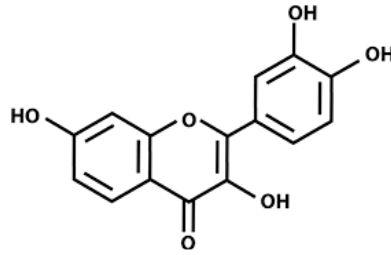
Diyetlerimizde mikrobesein ögesi olarak kabul edilen gıda fenolikleri gerek antioksidan özellikleri gerekse serbest radikalleri temizleme yeteneğinden dolayı

beslenmede önemli yer tutmaktadır. Antioksidan aktivitelerinin yanında, detoksifiye enzimleri uyararak tümör gelişimini başlatan ve destekleyen transkripsiyon faktörlerini inhibe edici, metal iyonlarını şelatlama gibi özelliklere sahiptir (97). Aynı zamanda dejeneratif hastalıkları önleyici, antialerjenik, antinflamatuar, antimikrobiyal, antitrombotik, antikanserojen, antiaterojen, antiülser ve vazodilatör ajan olarak görev yapmaktadır (98).

Şimdiye kadar, birçok bitkisel fenolik bileşik izole edilip tanımlanmış ve bu bileşikler fenolik asitler ve flavonoidler olmak üzere iki gruba ayrılmıştır.

Fenolik Asitler, aromatik karboksilik asitlerin hidroksi türevleri olmakla birlikte, aromatik zincirlerde bulunan hidroksil grubunun pozisyonları ve sayılarındaki fark nedeniyle yapıları da değişiklik göstermektedir. Çeşitli hastalıklara yol açan serbest radikallere ve diğer reaktif oksijen türlerine karşı güçlü antioksidan etki gösterirler (99).

Flavonoidler, doğada 4000'den fazla sayıda tanımlanmıştır ve bunlar halka yapılarına göre; flavonoller, flavonlar, flavanonlar, kateşinler, antosiyanidinler ve izoflavonoidler gibi isimler almaktadırlar (100). Flavonoidler genellikle sebze ve meyvelerde, aynı zamanda tahıllarda da yaygın olarak bulunmaktadır (101).



Şekil 2.12. Flavonoid molekülünün genel yapısı (102)

2.8.2. Karotenoidler

A vitaminin ön maddesi aktivitesine sahip olan karotenoidler içerisinde likopen, beta karoten, alfa karoten, lutein, zeaksantin ve beta kriptoksantin yer almaktadır. Başlıca domates, karpuz, havuç, kayısı ve bir çok sebze ve meyvede bulunmaktadırlar (103).

2.8.3. Kumarinler

Maydanoz yapraklarında bolca bulunan kumarinlere benzer etkiler gösteren; D vitamini, kalsiyum, koenzim Q, kereviz tohumu yağı, maydanoz yağı, izoflavonlar, lignanlar, proteaz inhibitörleri ve çay polifenolleri gibi doğal ürünler, fitokimyasallardır.

2.8.4. Sülfidler

Sarımsak, soğan, frenk soğanı, pırasa, ananas ve brokolide bolca bulunan sülfidler, GST, kinon redüktazlar gibi detoksifikasyon enzimlerinin aktivitesini arttırmaları ve antioksidan savunmada yer alırlar (104).

2.8.5. İzotiyosiyanatlar

İzotiyosiyanatlar en çok su teresi, turp, lahanalar gibi sebzelerde bulunmaktadır. En yaygın olarak bilinen etkisi DNA hasarına karşı önemli düzeyde korumaktadır. Çeşitli enzimlerin aktivitelerini düzenleyerek gerçekleştirirler.

2.9. Brassicaceae/Cruciferae Sebzeleri (Haçlı Çiçekliler, Turpgiller)

İnsan sağlığı açısından beslenmenin çok önemli rol oynadığı bazı kanser çeşitlerinin ve kalp damar hastalıkları gibi bazı hastalıkların önlenmesinde etkin rol oynadığı bilinmektedir. Meyve ve sebze alımıyla tümör oluşumu arasında ters bir ilişkinin olduğu epidemiyolojik, *in vivo* ve *in vitro* çalışmaları sonucunda bulunmuştur. Cruciferae (Brassicaceae, Turpgiller, Haçlıgiller) sebzeleri önemli antikanserojenik özelliği olan sebzelerden bir gruptur. Cruciferae familyası, mor lahanalar, beyaz lahanalar, karnabahar, savoy lahanası, brüksel lahanası, brokoli gibi sebzelerle kolza gibi yağlı tohumlar ve hardal gibi baharatları da kapsamaktadır. Yapılan çalışmalarla, Cruciferae familyasında bulunan sebzelerin tüketiminin böbrek, prostat, kolon, idrar kesesi, akciğer ve rektum kanseri riskini azalttığı saptanmıştır (105).

Cruciferae familyasında yer alan sebzelerdeki aktif bileşenleri ve koruyucu etkilerini sağlayan moleküler mekanizmalarını anlamak için son yıllarda birçok deneysel çalışma yapılmıştır. Cruciferae familyasında yer alan sebzeler arasında, kimyasal koruyucu etkilerinin en önemlisinin insan vücudunda faz I ve faz II enzimlerine etkileri ve faz I enzimlerinin inhibisyonu olduğu yapılan çalışmalar sonucunda ulaşılmıştır. Besinlerle ya da çevrenin kirletici unsurlarından maruz kalınan prokarsinojenler, örneğin, PAH'lar, heterosiklik aminler ve nitrozaminler, DNA hasarı ve kansere yol açabilmek için metabolik aktivasyona gereksinim duyarlar. Faz I

enzimleri tarafından bu prokarsinojenlerin aktivasyonu katalizlenir. Özetle, koruyucu etkilerini ya aktivasyon enzimlerini inhibe ederek ve kanserojen bileşiklerin atılması ve detoksifikasyonunu sağlayan faz II enzimlerini indükleyerek sağlamaktadırlar (106).

Faz II enzimlerinin (glutasyon transferaz, NAD(P)H: kinon redüktaz, UDP-glukuronozil transferaz gibi) elektrofillerin detoksifikasyonunda rol oynadığı bildirilmekle birlikte (107), faz II enzimlerinin reaktif elektrofilleri detoksifikasyonu veya indüktif etkisi “elektrofil karşı koyma tepkisi ” olarak adlandırılmıştır (108). Ortak özellikleri, sülfidril gruplarına kimyasal olarak reaktif olan indükleyiciler bağlayarak faz II enzimlerinin hücrel antioksidan aktivitesini arttırmaktır (107).

Faz II enzim indükleyicilerinin bir sınıfını oluşturan ve birçok organda tümör oluşumunu engellediği belirtilen yirmiden fazla izotiyosiyanat deney hayvanları ile yapılan çalışmalarda saptanmıştır ve faz II enzim indükleyicilerin bir sınıfını oluşturmaktadır (109).

2.9.1. Su Teresi (*Nasturtium officinale* R.Br.)

2.9.1.1. Su Teresi'nin Sistematik Yeri

Su teresi, *Nasturtium officinale*, kaynak sularında, yatağı değişmeyen sığ sularda, soğuk, temiz ve sürekli akan tatlı sularda gelişim gösteren bir makrohidrofittir (110). Yumuşak ve sulu yapıda, tüysü özellikle yaprakları, Nisan ile Mayıs aylarında açan salkım şeklinde, beyaz renkli çiçekleri bulunmaktadır. Bu bitkinin ana yurdu Batı Asya, Hindistan, Avrupa ve Afrikadır (111).



Resim 2.1. Malatya, Arguvan yöresine ait *Nasturtium Officinale* (L.) R.Br.

Sistemattikteki yeri bazı botanikçiler tarafından *Rorippa* ve *Radicula* gibi alternatif isimler de konulmuş olan su teresi (*N. officinale* R. Br.), *Nasturtium* cinsine ait çok yıllık, rizomlu, emers bir tatlı su bitkisidir.

Tablo 2.6. Su Teresi (*N. officinale* R. Br.)'nin Sistematiği

Alem	Plantae
Alt Alem	Embryophyta
Bölüm	Spermatophyta
Sınıf	Magnoliopsida
Alt Sınıf	Dilleniidae
Takım	Capparates
Aile	Brassicaceae- Cruciferae
Cins	<i>Nasturtium</i>
Tür	<i>Nasturtium officinale</i> R.Br.



Resim 2.2. İnönü Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumu *Nasturtium Officinale* (L.) R.Br.

Omega-3 yağ asitlerince zengin gıdalardan olan yeşil yapraklı bitkilerden su teresi (*Nasturtium officinale* R.Br.), ekolojik ve ekonomik öneme sahip tatlı su makrohidrofitlerinin en önemlilerinden birisidir. Uzun yıllardan beri insanlar tarafından gıda olarak kullanılmakla beraber tıbbi bir bitki olarak da değerlendirilmektedir (112).

2.9.1.2. *Nasturtium officinale* R. Br.'nin İçeriği

Su teresi zengin bir glukosinolat içeriğine sahip olmakla birlikte (113), hücre dokusuna zarar veren çiğneme, doğrama ya da pişirme gibi durumlarda mirosinaz (β -thioglucoside glucohydrolase; EC 3.2.3.1) enziminin aktivitesi sonucu glukosinolat, izotiyosiyyanatlara hidroliz olur. Bu gruptaki bitkiler biyoaktif bileşenlerinden dolayı acı bir tada sahiptir. Su teresinin yapısında bulunan glukonasturtiin (2-feniletil glukosinolat) alfatik ve indol yapısındaki glukosinolat sınıfında yer alan bileşendir (114).

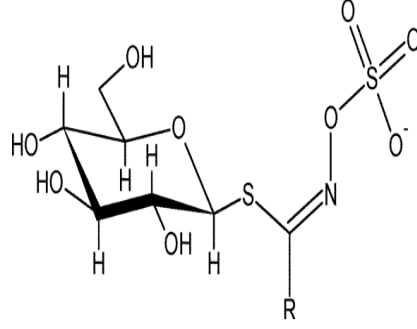
Su teresinde ayrıca yüksek konsantrasyonlarda β -karoten, lutein ve zeksantin gibi karotenoidler (115) ve kuersetin, kamferol ve isoremetin gibi flavanolik bileşenler bulunur (116).

Su teresi çok önemli vitamin ve detoksifikasyon kaynağı bir bitkidir. Bu bitki yapısında B1, B2, C vitamini ve A vitamini, folik asit, iyot, demir, protein ve özellikle karakteristik kokusunu etkileyen kalsiyum ve sülfür bileşiklerini de içerir ki bu bileşenler bitkinin besinsel faydalarını da artırır.

2.10. Glukosinolatların Kimyasal Yapısı

Glukosinolatlar (GLS, β -thioglucoside-Nhydroxysulfates) olarak bilinen kükürtlü bileşikler genellikle turpgiller (*Brassicaceae*, *Cruciferae*) familyasındaki sebzelerde yer alan, azot içeren ikincil bitki metabolitleridir (117). Glukosinolatlar suda çözünebilir, anyonik, uçucu olmayan ve ısıya karşı stabil bileşiklerdir (118).

Glukosinolatların temel yapısında, β -D-tiyoglukoz grubu, ayrıca sülfonlanmış oksim ($-C=NOH$) grubu ve metionin, triptofan, fenilalanin veya dallanmış zincirli amino asitlerden türemiş değişken bir yan zincir bulunmaktadır (119). Glukosinolatlar çekirdekte, tiyoglukoz grubuna ve ayrıca serbest radikal grubuna bağlı sülfatlanmış izotiyosiyyanat grubu ile karakterize edilmiştir. Glukosinolatların genel kimyasal yapısının gösterildiği şekilde (Şekil 2.13); yan zincir, alifatik, aromatik ve heterosiklik yapıdaki amino asitlerden türediği için GLS'lar bu yan zincirlere bağlı olan aminoasitlere göre aromatik GLS, alifatik GLS veya indoller olarak sınıflandırılmaktadır. Aromatik glukosinolatlar, fenilalanin veya tirozinden türemiştir. Alifatik glukosinolatlar, yapılarında alanin, lösin, izolösin, valin, metiyonin aminoasitlerini, İndol glukosinolatlar ise triptofan amino asiti içermektedir (120).



Şekil 2.13. Glukosinolatların genel kimyasal yapısı (121)

Glukosinolatlarda farklı yapıların ortaya çıkmasında hem glukoz hem de merkez karbon atomunun modifikasyonu, neden olmuştur ve yan zincir çift bağ, okso, hidroksil, metoksi, karbonil veya disülfid bağlar içerebilmektedir. 2001 yılında bitki türleri üzerinde yapılan araştırmalarda 120 adet glukosinolat tanımlanmaktadır (122).

Yaygın isimlendirmede 'gluko' ön ekine izole edilen bitkinin botanik tür isimleri eklenerek isimlendirme yapılmaktaydı ancak sayının artması ile bu terminolojiden vazgeçilmiştir. Daha sonraları glukosinolat kelimesine aglikon yapının kimyasal adının ön ek olarak kullanılması önerilmiştir. Bugün konu ile ilgili birçok araştırmada glukosinolatların, hem yaygın hem de kimyasal isimleri ile birlikte kullanıldığı görülmektedir. Bazı glukosinolatların kimyasal ve yaygın kullanılan isimleri Tablo 2.7'de verilmiştir.

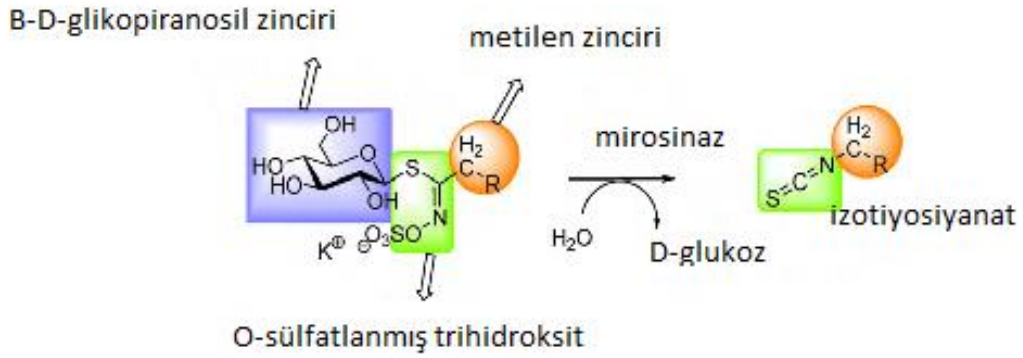
Tablo 2.7. Bazı glukosinolatların kimyasal ve yaygın kullanılan isimleri (118)

Kimyasal İsimleri	Yaygın Kullanılan İsimleri
2-Propenil glukosinolat	Sinigrin
Benzil glukosinolat	Glukotropaeolin
3- Butenil glukosinolat	Glukonapin
4- Hidroksil benzil glukosinolat	Sinalbin
2-Hidroksibenzil glukosinolat	Progoitrin
3,4- Dihidroksibenzil	Glukomatronalin
Indol-3-metil glukosinolat	Glukobrassicin
Metil glukosinolat	Glukokapparin
4-Metiltiyobutil glukosinolat	Glukoerusin
4-Metilsülfinilbutil glukosinolat	Glukorafenin
4-Pentenil Glukosinolat	Glukobrassikanapin
4-Oksopentil	Glukokappasalin
7-Metilsülfinil heptil	Glukoibarın
9-Metilsülfinil nonil	Glukoarabin
2-Hidroksi 2-feniletil	Glukobarbarin
8-Metilsülfiniloktil	Glukohirsutin
2-Feniletil	Glukonasturtiin
4-Metilsulfonilbutil	Glukoerisolin
5-Metiltiyoopentil	Glukoberteroin
3-Metiltiyopropil	Glukoiberverin

2.10.1. Glukosinolatların Hidrolizi

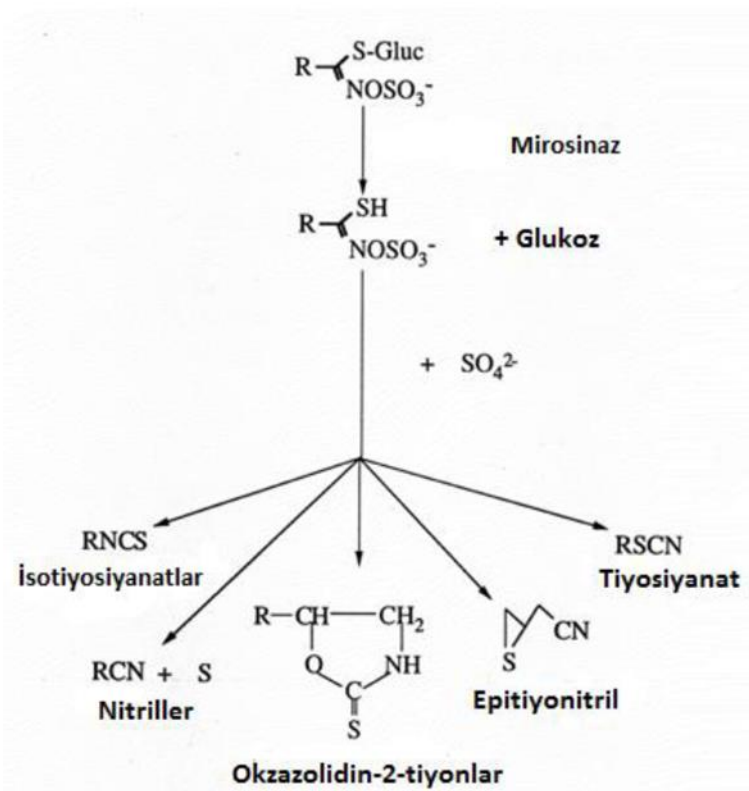
Endojen mirosinaz enzimi, turpgiller familyasındaki sebzelerde bulunur (thioglucoside glucohydrolase, EC 3.2.3.1) ve tüketim sonrası insan vücudunda glukosinolatların hidrolizini katalizler (123).

Doğrama, çiğneme, kesme gibi işlemlerle bitki dokusu parçalandığında veya zedelendiğinde, mirosinaz enzimi aktivitesini göstermektedir. Enzim, glukosinolatlarla temas ederek tiyoglukosidik bağları hidrolize eder ve glukosinolatları hidroliz ürünlerine dönüştürür. Hidroliz ürünlerinin yanı sıra glukoz ve sülfat grubu da açığa çıkar (124). (Şekil 2.14.).



Şekil 2.14. Glukosinolatların hidrolizi (125)

Reaksiyon koşullarına göre açığa çıkan ürünler farklılık göstermekle birlikte enzimatik aktivite sonucu oluşan izotiyosiyanatlar ve indoller glukosinolatların biyolojik olarak aktif formlarıdır (126).



Şekil 2.15. Glukosinolatların hidrolizi ve oluşan ürünleri (121).

Tablo 2.8. Bazı glukosinolat türleri, içerdiği bitkiler ve hidroliz ürünleri (118).

Glukosinolat Türü	Bitkiler	Hidroliz Ürünleri
Glukorafanin	Brokoli	Sülforafan
Glukotropaeolin	Tere	Tiyosiyonat, izotiyosiyonat
Sinigrin	Brüksel lahanası, lahana ve karnabahar	İzotiyosiyanat
Glukobrassicin	Cruciferous sebzeleri	İndol-3- Karbinol
Progoitrin	Yağlı tohumlu crambe	Crambene
Glukonasturtiin	Çin lahanası, turp, su teresi	Feniletıl izotiyosiyanat
Glukokamelinin	Ketencik	Kamelinin
Dehidroerusin	Daikon turbu	Bütıl izotiyosiyanat
Glukoerucin	Yer lahanası	İzotiyosiyanat
Glukobrassicin	Kıvırcık lahana	Sülforafan, indol-3-karbinol
Glukorafanin	Karalahana	Sülforafan, diindolmetan

2.10.2. Glukosinolatların Metabolik Fonksiyonları ve Sağlık Üzerine Etkileri

Son yıllarda özellikle turpgiller familyasında yer alan sebzelerdeki biyoaktif bileşenlerin sağlık açısından olumlu özelliklerini gösteren birçok çalışma yapılmıştır (127). Epidemiyolojik çalışmalar, bitkisel gıdalardan alınan bu bileşenlerin alımı ile bazı hastalıkların risklerini azaltıcı etkileri arasındaki ilişki üzerinde durmuş ve glukosinolatlar gibi fitokimyasallarla da ilgili veriler sunmaktadır.

Turpgiller yapısında bulunan glukosinolatların varlığı ile içerdiği biyoaktif bileşiklerden ve fenolik bileşikler gibi fitokimyasallara dayandırılan ve birçok fizyolojik fonksiyonları indükleyen bu etkilerin içerisinde kanser ve kalp hastalıklarına karşı koruyucu etkilere, antioksidan aktivite, enzimlerin aktivitesinin düzenlenmesi, apoptozis ve hücre dönüşümlerinin kontrol edilmesi gibi etkiler yer almaktadır (128).

2.11. İzotiyosiyanatlar

İzotiyosiyanatlar (ITC'ler; $R-N=C=S$), bitki dokularının parçalanmasıyla salınan bir enzim olan mirosinaz ile glukosinolatların hidrolizi sonucu açığa çıkan ikincil metabolitlerdir. Çeşitli patolojik mikroorganizmalara karşı engelleyici etkisi olan izotiyosiyanatların uçucu bileşenlere sahip antimikrobiyal kimlikleri vardır. Allil izotiyosiyanatların (AITC) Japonya'da gıda korumada kullanımını sağlayan antibakteriyel etkili doğal bir bitki kaynağı bulunmaktadır (129), ancak diğer izotiyosiyanatların antibakteriyel etkileri hakkında çok az bilgi vardır. Turpgiller familyasından olup genelde yiyeceklerde lezzetlendirici olarak kullanılan hardal, yaban turpu ve wasabidir (130). Bütün bunlara ek olarak izotiyosiyanatların antibakteriyel,

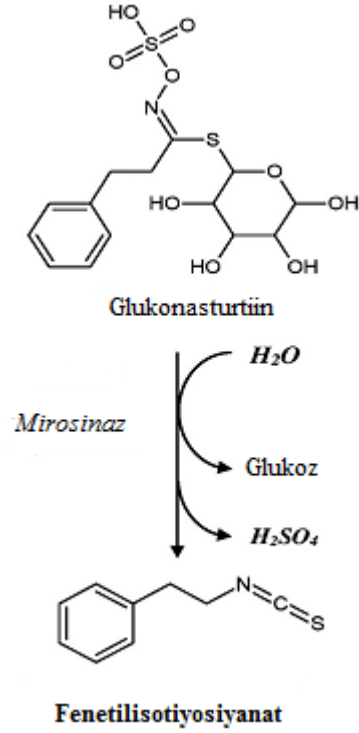
antifungal ve antikanser bileşenlerine sahip olması diyet takviyelerindeki ilgisini artırmaktadır (131).

2.11.1. ITC'nin Kimyasal Yapısı

Reaktif haldeki izotiyosiyanat *in vivo* şartlardaki biyokimyasal süreçlerde proteinlerde rastgele modifikasyonlara neden olabilir. ITC'ler tiyoller ve aminlere kolayca saldırır, ancak ITC aktivitesi esas olarak sülfhidril gruplarıyla olan tepkimeleri ile ilgilidir. ITC ($R-N=C=S$) grubundaki karbon atomu yüksek derecede elektrofiliktir ve amin, tiyol ve hidroksillerle tepkime vererek sırasıyla tiyoüre, tiyokarbamat ve karbamatlar üretir. Belirli aminlerin ve tiyollerin hedef proteinlerdeki reaktivitesi, çevreleyen amino asit kalıntılarında etkilenen pKa değerlerine de bağlıdır (132). Tüm sistein kalıntıları elektrofillere karşı reaktif değildir. Yakın kalıntılarla olan elektrostatik etkileşimlerden etkilenen pKa değeri, sisteinin protonlanma durumunu ve dolayısıyla ITC'ye karşı reaktivitesini yönlendirir. Çevrenin hidrofobikliği ve sterik engel, nükleofil kalıntılarının reaktivitesini de modüle edebilir. Tiyol ve amino grupları ayrılmış halde tepkimeye girdiklerinden, daha yüksek pH değerleri ITC ile olan etkileşimleri desteklemektedir. ITC'nin tioller veya amino gruplarını kendiliğinden bağlayan bu özelliği, çalışmalarda kullanılmak üzere oligonükleotidlerin amino grupları veya proteinlerin tiol gruplarıyla reaksiyona giren bir ITC-florofor (floresein ITC) gibi moleküler araştırma araçları yaratmak için üzerinde durulmuştur. Fenil ITC ve türevleri, N-terminal amin ile reaktiviteleri nedeniyle Edman reaksiyonu vasıtasıyla protein dizilimi için kullanılmıştır (133).

2.12. Fenetil İzotiyosiyanat (PEITC)

Mirosinaz enzimi aracılığı ile izotiyosiyanatlarına dönüşen glukosinolatın bir formu olan glukonasturtiin'den elde edilen PEITC, en yaygın incelenen aromatik izotiyosiyonattır (Şekil 2.16.).



Şekil 2.16. Glukonasturtiinden PEITC eldesi

PEITC, diğer izotiyosiyanatlar gibi, reaktivitesini, izotiyosiyanat grubunun elektrofilik karbonuna borçludur (134); izotiyosiyanatlar özellikle de sisteinde bulunan sülfidril grubu gibi nükleofillerle kovalent olarak etkileşerek, biyoaktif fitokimyasallar üretir ve sayısız biyolojik aktivitelere aracılık eden pleiotropik bir cevaba yol açabilir. İzotiyosiyanatlar, amino grupları ile temel şartlarda ve yavaş bir süreç ile etkileşime girer (135).

İzotiyosiyanatlar, kimyasal karsinojenin tüm aşamalarını uygun şekilde modüle ederek kemopreventif etkisini gösterir. DNA'nın kimyasal yapısının zarar görmesi sonucunda detoksifikasyon yollarının biyoaktivasyonunu içeren çoklu koruma mekanizmalarını kapsar. Buna ek olarak, izotiyosiyanatlar, hücrel proliferasyon, apoptoz ve anjiyogenez gibi başlatma sonrası süreçleri de etkilemektedir (136).

2.12.1. PEITC'nin Antikanser Aktivitesi

Yapılan birçok araştırma izotiyosiyanatların çeşitli kanser tipleri üzerinde anti kanser özelliği olduğunu göstermiştir (20). PEITC'nin antikanser aktivitesi kemopreventif ve kemoterapötik etki şeklinde ikiye ayrılabilir. ITC'lerin kemopreventif etkileri, çoklu kimyasal ile indüklenen kanser modellerinde değerlendirilmiştir. Genel olarak karsinogenez, faz I ilaç metabolize edici enzimler yoluyla oksidasyon,

redüksiyon veya hidroliz yoluyla kanserojenlerin biyoaktivasyonundan kaynaklanır. Dolayısıyla, faz I enzimlerinin modülasyonu kanserojen aktivasyon sürecini etkileyebilir. PEITC faz I enzimlerinin üzerinde ikili bir aktivite gösterir. Örneğin, PEITC bir yandan CYP1A1 ve CYP1A2'nin indüksiyonuna neden olurken; bununla birlikte, CYP2E1, CYP3A4 ve CYP2A3 gibi bazı sitokrom P450 enzimlerinin aktivitesini inhibe eder (137). Faz II enzimleri, transferazları içerir, ksenobiyotiklerin ve kanserojenlerinin detoksifiye edilmesinde önemli rol oynar (138). Faz II enzimi olan GST, PEITC'nin kemopreventif etkilerinde önemli bir rol oynamaktadır. PEITC ayrıca diğer faz II enzimlerini de etkilemektedir. Buna bağlı olarak Saw ve ark. ITC ve fitoindollerin bir kombinasyonu ile Nrf2 antioksidan cevap elementinin uyarılmasını gösteren bir çalışma yapmıştır (139). Kimyasal karsinogenez modelleri ve transgenik hayvan modelleri üzerine yapılan daha kapsamlı mekanistik çalışmalarda PEITC'nin anti-proliferatif etki, hücre bölünmesi ve hücre döngüsü üzerine etki, pro-apoptotik etki, otofaji, anti-anjiyojenik etki, anti-metastatik etki, anti-enflamatuar etki, immünomodülatör etki, PEITC'nin kanser hücrelerinin kinetiği ve metabolizması üzerine etkileri incelenerek kemoterapötik potansiyeli değerlendirilmiştir (140). PEITC'nin antikanser aktivitesi keşfedildiğinden beri, bu aktivite ile ilgili hücre döngüsünü durdurma ve apoptozisi indüklemeye olmak üzere iki temel mekanizma üzerinde durulmaktadır (141). PEITC'nin, reaktif oksijen türlerini üreterek özellikle kanser hücrelerine özgü sitotoksik etkilere yol açan genel bir etki mekanizması olduğu bilinmektedir (142).

Sürekli artan ROT seviyesi DNA'da mutasyonlara neden olarak karsinogenezisi başlatır (143). İnsan çalışmalarında kullanılan su teresinde bulunan PEITC önemli bir çalışma alanıdır. PEITC, artan ROT seviyesine karşı detoksifikasyon enzimlerinden GPx1, SOD1 ve SOD 2 aktivitelerini önemli miktarda artırarak tedavi eder (144).

ROT, hücre içerisinde ikili etkiye sahiptir. Normal hücrelerde ROT üretimi hücreyi apoptoza doğru sürükleyen DNA hasarına neden olur. Diğer taraftan, kanser hücrelerinde, ROT üretimi, hücre proliferasyonu, apoptozun baskılanması, hücre göçü ve invazyon gibi yolları indükleyerek hücrenin hayatta kalmasını teşvik eder. Oksidatif metabolizmanın artması ve besin takviyesinin eksikliği kanser hücrelerinde yüksek ROT üretimine neden olur. Artan ROT seviyesi apoptozisi uyararak kanser hücrelerini ölüme teşvik eder. İzotiyosiyanatlar, genel olarak, diyetle birlikte alındığında kemopreventif etki göstererek ROT seviyelerini azaltan doğal antioksidan olarak tanımlanır (145).

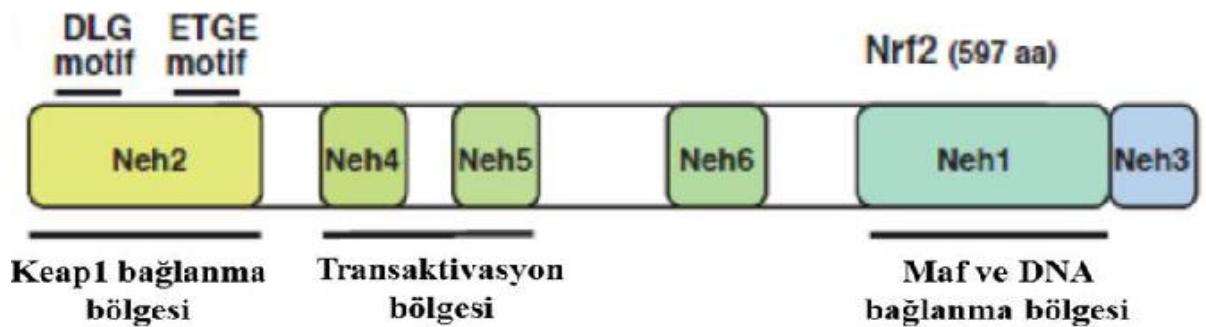
2.13. Nükleer Faktör E2 İle İlişkili Faktör 2

Bir transkripsiyon faktörü olan Nükleer faktör E2 ile ilişkili faktör 2 (Nrf2), elektrofiller, ksenobiyotikler, ağır metaller, UV radyasyon ve stres gibi birden fazla uyarılar tarafından aktive edilmektedir (146). Transkripsiyon faktörleri, genlerin transkripsiyonunu kısa DNA dizilerine bağlanarak, genetik bilginin DNA'dan RNA'ya akışını pozitif yada negatif olarak düzenlediği bilinen, spesifik proteinlerdir (147).

Hücreler, normal yaşam boyunca, sürekli olarak serbest radikallere maruz kalmakta ve bu maruziyete karşı antioksidan savunma mekanizmaları büyük önem arz etmektedir. Hücreler, faz I ve faz II olarak adlandırılan enzim sistemlerini kullanarak savunma mekanizmalarını kullanmaktadır. Örneğin, sinir hücreleri esas olarak faz II ve antioksidan enzimleri (SOD, CAT, GPx, GST, GR) kullanarak kendilerini korumaktadırlar (148).

Özellikle detoksifikasyon reaksiyonlarının gerçekleştiği dokularda Nrf2, oldukça fazla eksprese edilmektedir. Hücrel savunma mekanizmasının en önemli düzenleyicisi olan Nrf2, beyin, akciğer, mesane, böbrek, karaciğer, ovaryum, makrofajlar ve eritrositleri de içeren birçok dokuda bulunmaktadır (149). Nrf2 aktivasyonunun oksidatif strese karşı hücre koruma da en önemli koordinasyon yollarından biri olduğu bildirilmektedir (150). Nrf2 sistemi, reaktif oksijen türleri, egzoz gazları, inflamasyon, kalsiyum bozukluğu, UV ve sigara dumanının toksik etkilerinden dokuların korunmasında önemli bir rol oynadığı yayınlanan çalışmalarda bildirilmektedir (151).

2.13.1. Nrf2'nin Yapısı



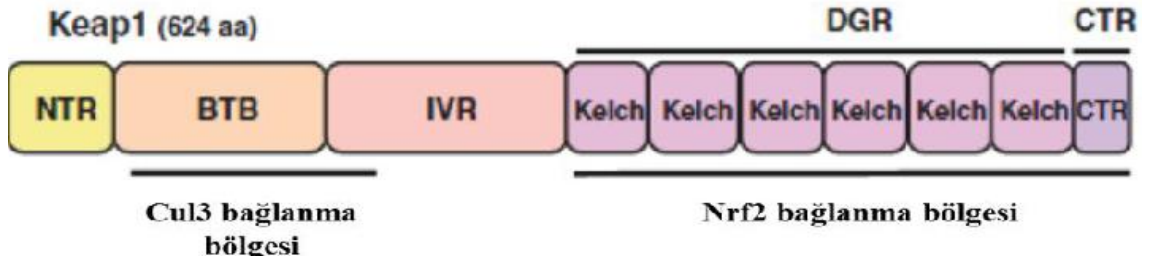
Şekil 2.17. Nrf2 domain yapısı (152)

Transkripsiyon faktörü olan Nrf2, ARE ile ilişkili gen ekspresyonunda ve immün cevapta merkezi bir düzenleyicidir (153). Önemli bir antioksidan cevap olan Nrf2

transkripsiyon faktörü çoğu transkripsiyonel faktörler gibi bölmeli bir dizilime sahiptir. Nrf2, Keap1, küçük Maf proteinler ve ARE yada elektrofil cevap elementi (EpRE) gibi cis-acting düzenleyicileri içeren temel bileşenlerin kombinasyonudur (154). CNC-bZIP (cap'n'collar family of basic leucine-zipper) transkripsiyon faktörlerin bir üyesi olan Nrf2 sitoplazmadaki Kelch-like ECH ilişkili proteine bağlıdır (155).

Nrf2'nin moleküler araştırmasında 6 adet Neh domaini tarif edilmiştir (Şekil 2.17). Bunlar arasında Neh1 domaini, Nrf2'nin küçük Maf proteinlerinin ZIP domaini ile heterodimer oluşturmasını sağlayan CNC-Bzip domainidir (156). Neh 2 domaini Nrf2-Keap1'in sitozolik represörüdür. Neh2 domaini degran ve ubikuitin bağlı bozulmayı içerir. Neh4 ve Neh5 domainleri ise Nrf2'nin aktivasyonuna aracılık eden transaktivasyon bölgesidir (157). Nrf2'nin karboksil terminalinin ucunda bulunan Neh3 domaini, Nrf2'nin transaktivasyonunda önemli rol oynar (158). Neh6 domaini, Neh5 ve Neh1 domainleri arasında bağlantıyı sağlayan bölgedir (159).

2.13.2. Keap-1/ Nrf2/ ARE Sinyal Yolağı

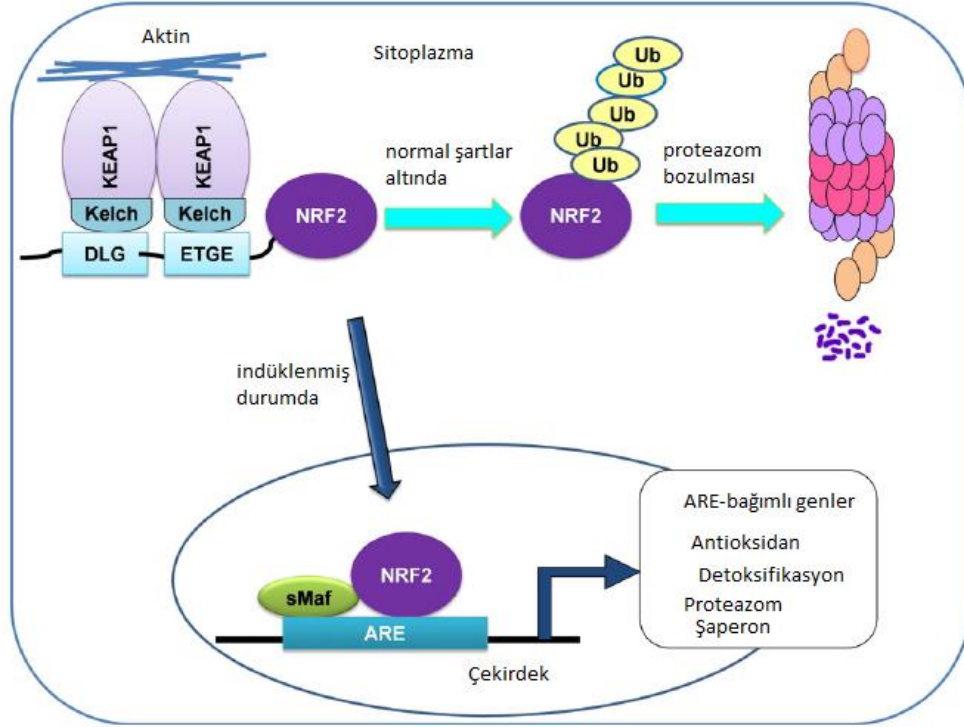


Şekil 2.18. Keap1 domain yapısı (152)

625 amino asit içeren Keap1: bir aminoterminal alanı (NTR, amino asit. 1-66), bir Bric-a-brac/Tramtrack/Broad domaini (BTB, amino asit. 67-178), bir ara bölge (IVR amino asit. 179-321), bir Kelch/ çift glisin tekrarı (DGR, amino asit. 322-608) ve bir karboksil terminal bölgesi (CTR, amino asit. 609-625; Şekil 2.18) olmak üzere 5 domainden oluşur (160).

Keap-1 üzerindeki Kelch /DGR bölgesi ile Keap-1, hücre iskeletine tutunur ve Nrf2 ile birleşir. Keap-1-Nrf2 kompleksi ile Nrf2 inhibe olur, aynı zamanda Keap1, poliubikitinleri yönlendirerek de Nrf2'nin proteazomal yıkımını sağlayarak bloke eder (161). Keap-1 molekülünün redoks sensörü olarak davrandığı düşünülmekte ve sistein rezidülerinin bir kısmı reaktif olan Keap-1 molekülü hücre oksidatif strese ve çevresel kirletici ajanlara maruz kaldığında sistein aminoasitleri arasında disülfid bağı oluşmaktadır. Bunun sonucunda, konformasyonel değişikliğe uğrayan Keap1, Nrf2

molekülünü serbest bırakır (162). Keap1'den ayrılan Nrf2, çekirdeğe ulaşarak burada DNA'nın ARE bölgesine bağlanır (Şekil 2.19). İlk kez 1980'lerin sonlarına doğru tanımlanmış olan ARE bölgesi, özellikle hücrede oksidatif stres oluştuğunda detoksifikasyonda görevli enzimlerin ve antioksidan enzimlerin gen transkripsiyonlarının aktivasyonunu sağlar (163).



Şekil 2.19. Nrf2 molekülün nükleuse transloke olması (164)

ARE bölgesinin indükleyicileri toplam 10 ana gruba ayrılır ve yapısal olarak farklı birçok molekül ARE bölgesini aktive edebilir (Tablo 2.9) (165). Ayrıca hem kompleksi, okside lipoproteinler, serbest radikaller v.b. gibi bazı faktörler ARE bölgesine bağlanarak aktifleştirirler. Bu moleküller, elektrofilik özellikte olmalarından dolayı EpRE “electrophile response element” olarak da adlandırılır (165).

Tablo 2.9. ARE bölgesine bağlanan Nrf2 indükleyici gruplar ve etki mekanizmaları

İndükleyici grupları	Moleküller		Etki mekanizmaları
	Ksenobiyotikler ve metabolitleri	Endojen bileşikler	
Difenoller, kinonlar, fenilendiaminler	tBHQ , BHT, BHA, zerdeçal, resveratrol, kuersetin, etoksikuin, probukol, epigallokateşin-3-gallat	Dopamin, 4-hidroksiesterol, 2-hidroksiestradiol, 4-hidroksiestradiol, Estradiol-3,4-kinon	Kinonlar Keap-1'deki SH-gruplarına bağlanır veya okside eder, hücre içi H ₂ O ₂ üretimini artırır.
Michael alıcıları	EPA, DHA, krotonik aldehit, metilakrilat, metil propionat	4-hidroksi-2,3-nonenal, PGA ₂ , 15d-PGJ ₂ , J ₂ -izoprostan	Keap-1'deki SH-gruplarına bağlanır
İzotiyosiyanatlar	Sulforafan, 3-morfolino-propil izotiyosiyanat	-	Keap-1'deki SH-gruplarına bağlanır
1,2-ditiyol-3-tionlar	1,2-ditioltiyon, oltipraz, 5-(parametoksipfenil)-1,2-ditiyol-3-tiyon	-	Hücre içi H ₂ O ₂ üretimini artırır.
Hidroperoksitler	<i>Tert</i> -butil hidroperoksit, cumol hidroperoksit, H ₂ O ₂	H ₂ O ₂ , lipid hidroperoksitler	Keap-1'deki SH-gruplarını okside eder
Trivalan arsenik bileşikler	As ₂ O ₃ , AsO ₂ ⁻ , As ³⁺ , CH ₃ As(OH) ₂	-	Keap-1'deki SH-gruplarına bağlanır, hücre içi H ₂ O ₂ üretimini artırır.
Ağır metal iyonları	Cd ²⁺ , Co ²⁺ , Cu ²⁺ , Hg ²⁺ , Pb ²⁺	-	Hücre içi H ₂ O ₂ üretimini artırır.
Komşu dimerkaptanlar	(±)-2,3-dimerkaptan-1-propanol, 1,2-etan ditiyol	-	Saptanmamıştır.
Karotenoidler	3-hidroksi-B-damaskon, likopen	-	Saptanmamıştır.
Selenyum içeren bileşikler	Ebselen, dialkil diselenitler, seleninik asid, fenil selenol	-	Saptanmamıştır.

2.13.3. Keap 1/Nrf2/ARE Sinyal Yolu Tarafından Aktive ve İnhibe Edilen Genler

Memeli hücrelerinde ARE ile ilişkili çok sayıda gen vardır. Yapılan birçok çalışma, Keap-1/ Nrf2/ ARE sinyal yolağının, genlerimizin yaklaşık %1-10'unu düzenlediğini bildirmektedir (165). Ayrıca Nrf2, hücrede oksidatif stres olmadığı durumda bile bazal aktivitesini devam ettirerek antioksidan savunma sisteminin hem bazal hem de indüklenebilen aktivitesinin kontrolünü sağlamış olur (166). Nrf2 / ARE yolağının düzenlediği genlerin ekspresyonları sonucu birçok enzimin ve proteinlerin sentezlenmesinde görev almaktadırlar (Tablo 2.10.).

Tablo 2.10. Nrf-2 / ARE sinyal yolağı tarafından aktive edilen genler (165)

Gen	Fonksiyonu
HO-1	Hem yıkımında anahtar enzim,biliverdin oluşumu,anjyogenez ve vasküler hücre korunması
NQO1	Kinonun hidrokinona redüksiyonunu katalizler, ksenebiyotiklerin detoksifikasyonunda rol oynar,membran fosfolipidlerini(koenzim Q'nun redüksiyonu yolu ile) hasardan korur
GST	Detoksifiye edici enzim, GSH konjugasyonunu katalizler.
GCLC	GCL'nin katalitik subünitidir, glutatyon sentezinin hız kısıtlayıcı enzimidir.
GCLM	GCL'nin düzenleyici subünitidir.
xCT	Sistin- glutamat transporter'ıdır, hücre içi sistin düzeyinin idamesini sağlar, bu yollarla GSH sentezinde hız sınırlayıcı rol oynar.
AKR	Toksik aldehitleri detoksifiye eder, hücreyi karbonil streten korur.
GR	GSH/GSSH dönüşümünde ve GSH siklusunda anahtar enzimidir.
TrxR	Trx'in disülfid formunun redüksiyonu
Trx	Redoks homeostazisini devam ettirmek için redükte Trx okside Prx ile reaksiyona girer
Prx 1	Peroksitleri temizler ve redoks homeostazisini devam ettirir.

2.13.4. Nrf2 Transkripsiyon Faktörünün Oksidatif Stres ve Hastalıklar ile İlişkisi

Oksidatif strese karşı oluşan savunma sisteminin Nrf2 eksenli olduğu kabul edilmekte olup (167) Nrf2, bu oksidatif strese karşı cevapta merkezi rol oynamaktadır (168). Oksidatif stres, kanser dışında malign olmayan bir çok hastalığın oluşumunda da yer almaktadır . Yapılan çalışmalarda, bazı akciğer hastalıkları modelleri olan astım, amfizem gibi patolojik durumların *nrf2^{-/-}* farelerde daha şiddetli olarak ortaya çıktığı bildirilmektedir (169). Buna ek olarak, Parkinson hastalığı ve Alzheimer hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklara karşı Nrf2'nin koruduğu da çalışmalarda gösterilmektedir (170, 171).

Yapılan deneysel çalışmalar ışığında, Nrf2 aktivasyonunun hastalıklara karşı koruyucu ve de tedavi sürecinde etkili olabileceği düşüncesi ortaya atılmaktadır (168). Kolit modeli uygulanan *nrf2^{-/-}* farelerde, daha şiddetli inflamasyonun oluştuğu, aynı zamanda antioksidan gen düzeylerinin ise önemli oranda azaldığını gözlemlemişler (172). Başka bir çalışmada ise ateroskleroz ve metabolik sendrom oluşturulan farelere, rosiglitazon verilmiş ve Nrf2'yi aktive ederek, antioksidan enzimlerin vasküler ekspresyonlarının arttığı gözlenmiştir (173).

Deneylerde kullanılan *nrf2^{-/-}* farelerde, kimyasal indükleyiciler ile veya ksenebiyotiklerle oksidatif hasar meydana geldiğinde organizmada inflamasyonun ve doku hasarının arttığı, okside DNA, lipit ve protein son ürün miktarının ve kanser

gelişiminin fazla olduğu yapılan araştırmalar sonucunda saptanmış ve *nrf2*^{-/-} olan memelilerin oksidatif hasara açık olduğu belirlenmiştir (157).

Oksidatif stres diyabetik nöropati patofizyolojisinde önemli bir role sahiptir. Bu durumun dayanak noktasını diyabetik nöropati patofizyolojisi ile Nrf2 yolağı arasındaki ilişki oluşturmaktadır. Nrf2'nin yapılan deneysel çalışmalarla diyabet başta olmak üzere serebral iskemi, kanser, nörodejenerasyon, ateroskleroz ve çok sayıda diğer inflamatuvar durumlar için koruyucu etkilerinin olduğu bildirilmiştir (174). Diyabet ve diyabetle ilişkili komplikasyonlarda önemli bir hedef olarak gösterilmiş ve diyabette, Nrf2 ve HO-1 ekspresyon düzeyinin azaldığı tespit edilmiştir. Retina ganglionlarında Nrf2'nin nöroprotektif etkilere sahip olduğu gösterilmiştir (175). Nrf2'nin, beyin de oluşan oksidatif stres ve inflamasyona karşı korumada rolünün olduğu saptanmıştır. Astrositlerde Nrf2 yüksek ekspresyon düzeyleri ile oksidatif stres etkilerinden nöronları koruduğu tespit edilmiştir (174).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Gereçler

3.1.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Malzemeler

1. Metanol- Merck
2. Sodyum Hidroksit (NaOH)- Merck
3. Rat ALT (Alanin Transaminaz) Elisa Kiti- Elabscience
4. Glutasyon-S-Transferaz Assay Kit -Cayman Chemical
5. NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 (NQO1) Assay Kit -Abcam
6. Süperoksit dismutaz (SOD)-Sigma
7. Nrf 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2= eritroid nükleer faktör ile ilişkili faktör 2) Assay Kit - Cayman Chemical
8. Katalaz (CAT) -Sigma
9. Glutasyon peroksidaz (GPx) -Sigma
10. 7,12-dimetilbenz[a]antrasen (7,12-DMBA) – Sigma Aldrich
11. Sodyum Klorür (NaCl)-Sigma
12. Potasyum Klorür (KCl)-Sigma
13. Na₂HPO₄ (Disodyumhidrojenfosfat)- Sigma
14. KH₂PO₄ (Potasyumdihidrojenfosfat)- Sigma
15. Fosforik Asit (H₃PO₄)-Sigma
16. Hidroklorik Asit (HCl)- Sigma
17. Tiyobarbitürik Asit (TBA)- Sigma
18. Tetra Metoksi Propan - Aldrich
19. Disodyum Etilendiamintetraasetik asit -Sigma
20. Nitro blue Tetrazolium Klorür - Sigma
21. Sodyum Karbonat -Merck
22. Ksantin
23. Amonyum Sülfat (NH₄)₂SO₄
24. Ketamin
25. Ksilazin
26. Fenetilisotiyosiyanat -Sigma Aldrich

27. Asetonitril-VWR Chemicals ProLabo
28. Proteaz inhibitör kokteyl -Amresco
29. Nuclear ekstraksiyon kiti-Abcam
30. Myrosinase (25 U)-Sigma
31. Glasiyel Asetik Asit- Merck
32. Albumin- Sigma
33. Ksantin Oksidaz- Sigma
34. Bradford Reaktifi-Sigma

3.1.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

1. Hassas Terazi-Radwag
2. Homojenizatör- IKA Ultra Turrax
3. Sonifikatör- Bandelin SONO Plus
4. Derin Dondurucu-Sanyo
5. Su Banyosu
6. pH metre-Thermo Scientific
7. High-Performance liquid chromatography-Agilent 1100
8. Termometreli ısıtıcı karıştırıcı- IKA C-MAG HS7
9. Multimod mikropate okuyucu- Biotek Synergy H1
10. Mikropate yıkayıcı- Biotek Elx50
11. Soğutmalı santrifüj- Eppendorf 5415R
12. Liyofilizatör - Christ Alpha 1-2 LD Plus
13. Biomedical freezer- Sanyo MDF-U333
14. Vorteks-Nüve
15. Shimadzu UV Spektrofotometre
16. Otomatik Pipet-Eppendorf
17. Kronometre
18. Mezür (25ml, 50ml, 100ml, 250ml)

3.1.3. Deney Hayvanlarının Temini ve Deneylere Hazırlanması

Bu çalışma, İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezi, Deneysel Araştırmalar Birimi'nde, İnönü Üniversitesi Hayvan Etiği Komitesi tarafından öngörülen kurallara uygun olarak yapıldı. Çalışmada 27 adet dişi, ortalama 150-250 g ağırlığında, 6-8 haftalık *Wistar albino* rat kullanıldı. Çalışma süresince deney hayvanları 22–24 °C

sıcaklıkta ve 12 saat aydınlık/ karanlık periyodu olan odalarda polipropilen kafeslerde tutularak standart yem ve musluk suyu ile beslendi.

3.2. Metot

3.2.1. Deney Grupları

Toplam 27 adet dişi rat, her grupta 9 adet olmak üzere 3 gruba ayrıldı.

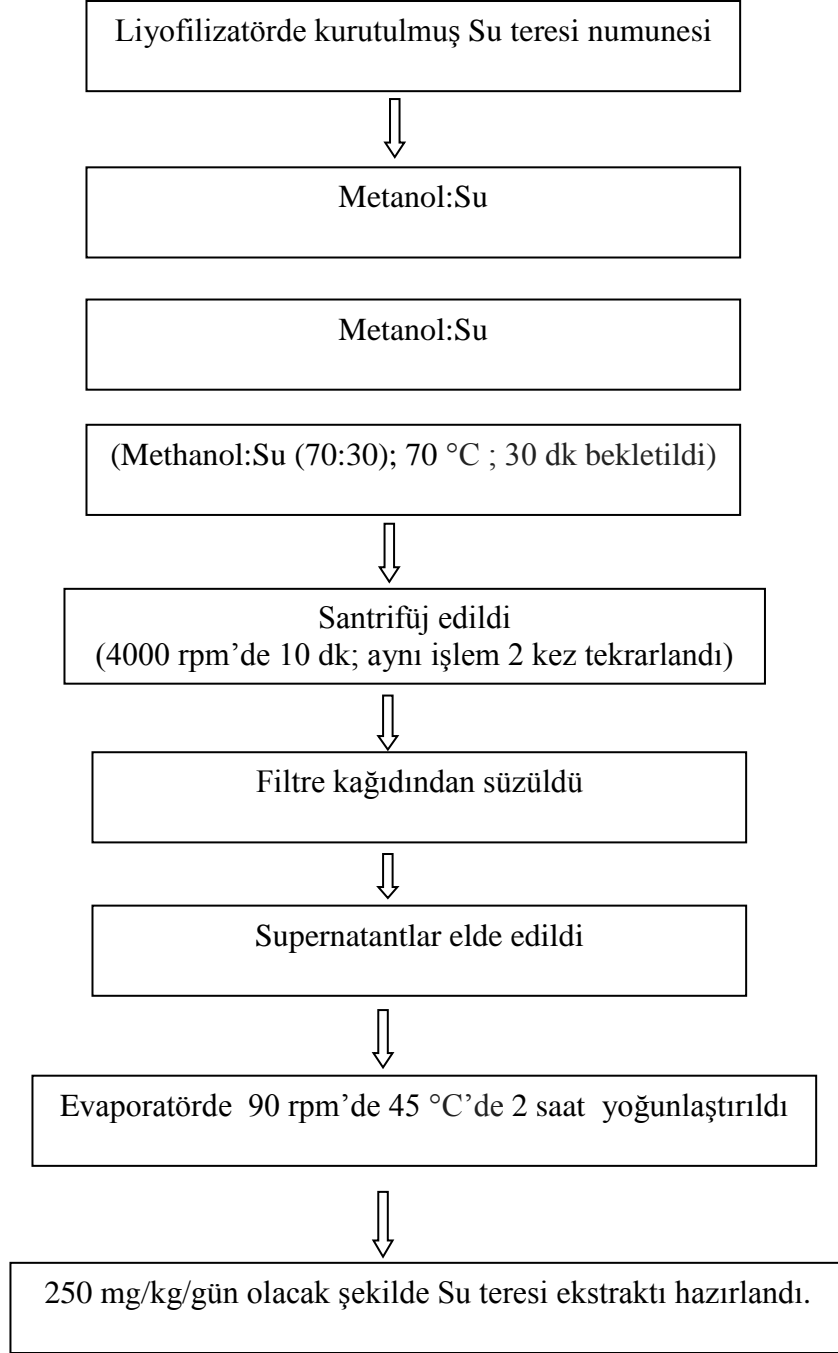
I. Grup 1 (Kontrol Grubu): 6-8 haftalık Dişi Wistar Albino ratlar, 22-24 °C sıcaklık ve 12 saat ışık-12 saat karanlık siklusuna uygun standart koşullar sağlanarak 4 hafta boyunca polipropilen kafeslerde tutuldu, ad libitum standart yem ve su ile beslendi,

II. Grup 2 (DMBA Grubu): 4 hafta ad libitum standart yem ve su ile beslenen ratlara mısırozü yağı içerisinde çözülen 7,12-DMBA, 20 mg/kg dozda i.p. olarak enjekte edildi.

III. Grup 3 (DMBA + Su Teresi ekstraktı): 7,12-DMBA enjeksiyonundan 4 hafta önce ad libitum beslenen ratlara aynı zamanda Su Teresi bitki ekstraktı 62.5mg/ml/gün dozda i.g gavaj yoluyla verildi.

3.2.2. *Nasturtium officinale* (Su Teresi) Numunesinin Ekstraksiyon İşlemleri

Malatya, Arguvan İlçesi Dolaylı Mahallesiinde 25 Mart 2016 tarihinde su kenarlarından topladığımız *Nasturtium officinale* (L.) R.Br. (Su teresi) bitki numuneleri liyofilizatörde kurutuldu. Liyofilizatörde kurutulmuş Su teresi bitkisi havanda dövülerek toz haline getirildi. Numuneden 1g/20 mL oranında olacak şekilde alınarak üzerine Metanol: Su karışımı (70:30) eklendikten sonra, 70°C sıcaklıkta 30 dk bekletildi. İşlem sonunda karışım 10 dk, 4000 rpm de santrifüj edildi. Süpernatantlar ayrılarak işlem iki kere daha gerçekleştirildi. Santrifüj işlemleri sonucunda toplanan süpernatantlar filtre kağıdından süzüldü ve sonra 90 rpm hızda 45°C de 1,5-2 saat boyunca evaporatörde yoğunlaştırıldı. Evaporatörden alınan Su Teresi bitki ekstraktları daha sonra distile suda çözümlenerek 250 mg/kg/gün olacak şekilde deney hayvanlarına verildi. Yapılan tüm bu işlemler Şekil 3.1’de özetlenmiştir.



Şekil 3.1. *Nasturtium officinale* (Su Teresi) numuneleri için ekstraksiyon işlem basamakları.

3.2.3. Numune Alınması ve Hazırlık İşlemleri

7,12-DMBA enjeksiyonundan 30 gün sonra ketamin/ksilazin anestezisi altında, kanlarının alınması suretiyle ratlar sakrifiye edildi. Alınan kanlar, serum eldesi için 1000 rpm'de 15 dk santrifüj edildi. Serumlar, ALT ölçümü gerçekleştirilene kadar - 30°C' de saklandı.

Ratlardan alınan karaciğer dokuları iki kısma ayrıldı. Birinci kısım histopatolojik çalışmalar için %10'luk formaldehit çözeltisi içinde bekletildi, diğer kısım biyokimyasal analizler için -80 C°'de muhafaza edildi.

3.3. Karaciğer Dokusunun Biyokimyasal Analizlere Hazırlanması

Karaciğer dokularından her bir cam tüpe 0.2 g ve üzerine 1:10 w/v oranda olacak şekilde fosfat tamponu (pH 7.4, 50 mM) eklenerek homojenizatörde 5 dakika 6000 dev/dak homojenize edildi. Daha sonra homojenatlar, 20 saniye aralıklarla 10 saniye 3 defa olacak şekilde sonifikatöre tabi tutuldu. Sonifikasyonun ardından homojenatlar, 15 dk 13500 g'de 4°C'de santrifüj edilerek süpernatantlar alındı ve protein miktar ölçümü ve SOD, CAT, GPx aktivite ölçümleri için kullanıldı. MDA düzeyinin ölçümü için 0.2 g karaciğer dokuları cam tüpe alınarak üzerine %1.15'lik KCl'den ilave edilip homojenize edilerek ölçüme hazırlandı. NQO1, GST enzim aktiviteleri ve Nrf2 transkripsiyon faktör ölçümleri için kit prosedüründe belirtilen şartlara göre doku homojenatları hazırlandı.

3.4. Biyokimyasal Analizler

3.4.1. Protein Miktar Ölçümü

Çalışmamızdaki biyokimyasal analizlerin tüm protein tayinleri Bradford yöntemine göre yapıldı. Bu yöntemde organik bir boyar madde olan Commassie brilliant blue G-250'nin proteindeki renklendirme özelliğinden yararlanıldı. Commassie brilliant blue G-250, negatif yüklü olan ve proteindeki (+) yüklü gruplara bağlanan bir boyadır. Yöntemde boyaya bağlanmış protein 595 nm dalga boyunda maksimum absorbans vermektedir (176).

Çözeltiler

Standart bovine serum albumin (2 mg/ml)

Distile Su

Bradford çözeltisi

0,15 M NaCl

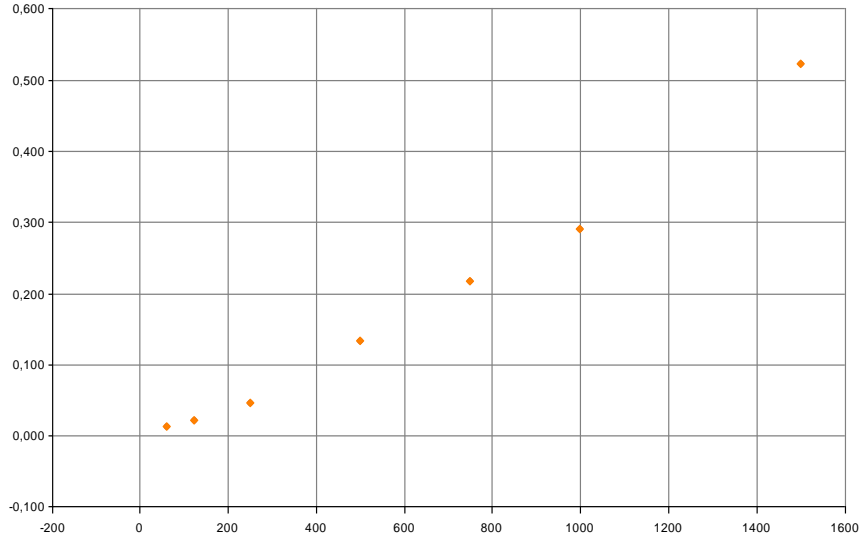
Deneyin Yapılışı

0,15 M NaCl ile hazırlanan 2 mg/ml albumin stok çözeltisinden 2, 1.5, 1, 0.75, 0.5, 0.25, 0.125, 0,0625 mg/ml konsantrasyonlarda standartlar hazırlandı. Kör,

standartlar ve örneklerden 5 µl kuyucuklara eklendi ve üzerine 250 µl Bradford reaktifi ilave edilerek 10 dk beklendi. Süre sonunda 595 nm’de okuma yapıldı.

Hesaplama

2 mg/ml stok albumin çözeltilerinden hazırlanan standart eğriye göre örneklerin konsantrasyonları hesaplandı. Oluşturulan kalibrasyon eğri denkleminde örneklerin protein konsantrasyonları hesap edilerek sonuçlar mg/ml olarak ifade edildi.



Grafik 3.1. Protein standart kalibrasyon grafiği

3.4.2. Malondialdehit Düzeyinin Ölçümü

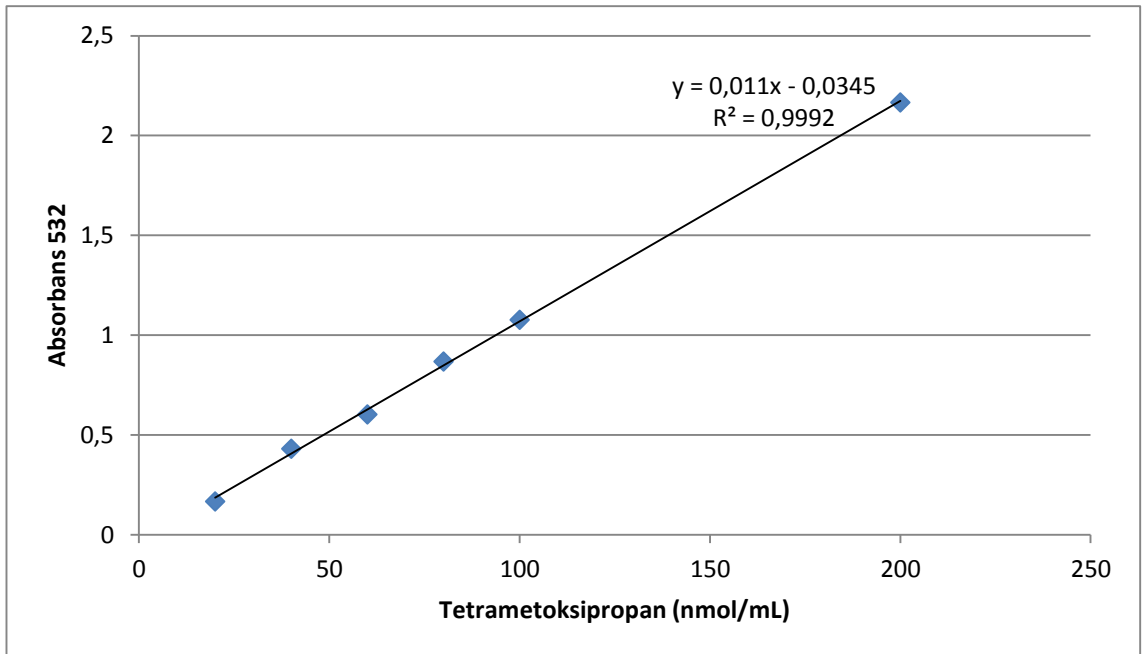
Mihara ve Uchiyama metoduna göre MDA ölçümü gerçekleştirildi. Bu metotta, asidik ortamdaki TBA ile 95 °C’de reaksiyona giren MDA pembe renkli kompleks oluşturmaktadır. Oluşan renkli kompleks n-bütanol fazına ekstrakte edilerek 535 nm’deki absorbansı ölçülmektedir. Oluşan rengin şiddeti ortamdaki MDA konsantrasyonuyla orantılı olmaktadır (177).

Kullanılan reaktifler

1. % 1.5 KCl
2. % 1 H₃PO₄
3. % 0.6 tiyobarbitürik asit
4. n-Bütanol
5. 2 mM Tetrametoksipropan
6. Glasiyel asetik asit
7. Distile su

Deneyin Yapılışı

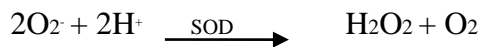
MDA ölçümü için dokuların %1.5'lik KCl ile % 5 lik homojenatları hazırlandı. Homojenatı yapılan örneklerden 500 µl alınarak 3 ml %1'lik H₃PO₄ çözeltisi ve % 0.6'luk TBA solüsyonundan 1 ml ilave edilerek vortekste karıştırıldı ve kaynar su banyosunda 45 dk inkübasyona bırakıldı. Daha sonra soğutulan örnekler üzerine 4 ml n-bütanol eklenerek karıştırıldı. Bir gün karanlıkta inkübasyondan sonra 4000 g'de 5 dakika santrifüj edilerek ayrılan organik fazın spektrofotometrede 532 nm'de absorpsanları ölçüldü. Standart olarak 2 mM stok tetrametoksipropan'ın 20, 40, 60, 80, 100 ve 200 nmol/mL olacak şekilde çözeltileri kullanıldı. Standartlardan elde edilen eğri denklemine göre örneklerin MDA düzeyleri hesaplandı ve sonuçlar nmol/mg protein cinsinden ifade edildi.



Grafik 3.2. Tetrametoksipropan'ın standart kalibrasyon eğrisi

3.4.3. Süperoksit Dismutaz Aktivitesinin Ölçülmesi

Önemli hücrel antioksidan savunma sistemi olan Süperoksit dismutaz (SOD) metalloenzimlerdenir. Süperoksit radikallerinin dismutasyonunda görev alıp süperoksit anyonunu moleküler oksijene ve hidrojen peroksitine çevirmektedir (178).



Kullanılan reaktifler

1) Reaktifi Karışımı

Reaktif bileşenleri aşağıda belirtilen konsantrasyonlarda çözücü olarak distile su kullanılarak hazırlandı ve reaktifler belirtilen miktarlarda karıştırılarak ölçüm reaktifi elde edildi.

1. 0.3 mmol/L Ksantin
2. 0.6 mmol/L Na₂EDTA
3. 150 mmol/L NBT
4. 400 mmol/L Na₂CO₃
5. 1 g/L BSA

Reaktif karışımı için 100 ml'lik bir erlen içerisine 40 ml ksantin çözeltisi, 20 ml EDTA çözeltisi, 20 ml NBT çözeltisi, 12 ml Na₂CO₃ çözeltisi ve 6 ml sığır albumini çözeltisi konuldu ve iyice karıştırıldı.

2) Enzim Çözeltisi: 2 M (NH₄)₂SO₄ ile Ksantin Oksidaz aktivitesi 167 U/L şeklinde hazırlandı.

3) CuCl₂ Çözeltisi: 0.08 mmol/L distile su ile hazırlandı.

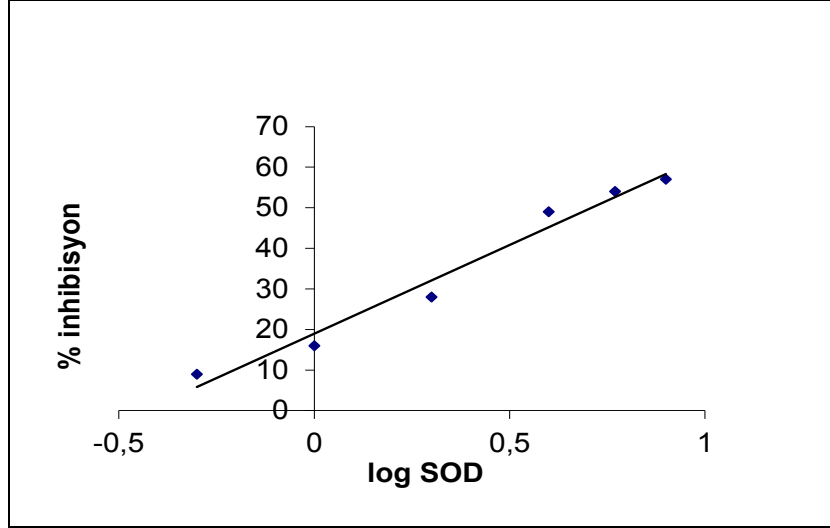
Deneyin Yapılışı

Deney tüplerine 2.85 ml ölçüm çözeltisi ve 100 µl süpernatant, kör tüpüne de distile su eklenerek vortekslendi. Ardından 100 µl ksantin oksidaz çözeltisi eklenerek karanlık ortamda oda sıcaklığında 20 dakika bekledikten sonra 1 ml CuCl₂ çözeltisi eklendi ve 560 nm'de spektrofotometrede absorbanları okundu

Hesaplama

% inhibisyonların hesaplanması için aşağıdaki formül kullanıldı.

$$\% \text{ inhibisyon} = \frac{A(\text{kör}) - A(\text{numune})}{A(\text{kör})} \times \% 100$$

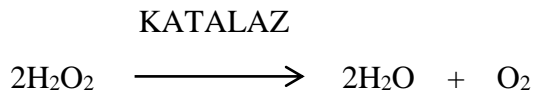


Grafik 3.3. Süperoksit dismutaz enziminin standart kalibrasyon eğrisi

Sonuçlar standart SOD enziminin % inhibisyon değerleri ile elde edilen grafikten hesaplanarak U/mg protein şeklinde ifade edildi.

3.4.4. Katalaz Aktivitesinin Ölçülmesi

Çoğu aerobik hücrelerde önem arz eden katalaz enzimi tüm organlarda bulunur. Katalaz enzimi, H₂O₂'yi de katalitik aktivitesi sonucunda su ve moleküler oksijene yıkmaktadır.



240 nm dalga boyunda maksimum absorbans veren H₂O₂ katalaz tarafından katalitik aktivite sonucu su ve oksijene dönüştürülmektedir. Bundan dolayı ortamda katalaz enzimi varsa 240 nm'de H₂O₂ in absorbansında azalma görülecektir. Absorbanstaki bu azalma mevcut katalaz aktivitesi ile doğru orantılı olacaktır (179).

Çözeltiler

1. Fosfat tamponu (1/15 mmol/L; pH'sı 7.0): 3.522 g KH₂PO₄ ve 7.268 g Na₂HPO₄.2H₂O distile suda çözüldü ve pH 7.0'a ayarlanarak hacmi 1 litreye tamamlandı.

2. Fosfat tamponunda H₂O₂ çözeltisi (10 mmol/L): %30 'luk H₂O₂ çözeltisinden 0.16 ml alınarak daha önce hazırlanmış olan fosfat tamponunun 100 ml'sinde seyreltili. Bu karışım 240 nm'deki absorbansı 0.5'di.

Deneyin Yapılışı

240 nm dalga boyunda spektrofotometre cihazının sıfır ayarı fosfat tamponu ile yapıldı. 1 ml'lik küvet içine 950 µl hidrojen peroksit çözeltisi ve 50 µl numune eklenerek hızlıca karıştırıldıktan sonra absorbanı okundu. Okunan bu absorban değeri başlangıç absorban değeri olarak kaydedildi. Daha sonra 60 saniye süreyle absorban azalması takip edildi. Sürenin sonunda okunan absorban değeri kaydedildi. Sonuçlar U/mg protein cinsinden ifade edildi.

Hesaplama

$$U/L = \frac{\Delta \text{ Abs } / t \times V_t \times 10^6}{E \times L \times V_s}$$

$\Delta \text{ Abs}$: Okunan absorban değışımi

t : Ölçüm süresi (1 dak)

V_t : Total hacim (1 ml)

V_s : Kullanılan numune hacmi (0.05 ml)

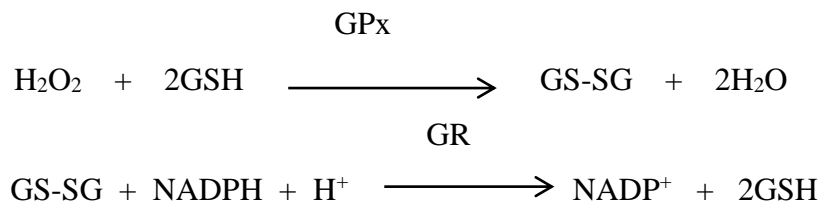
E : Molar absorpsiyon katsayısı ($39,4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

L : Işık yolu (1 cm)

10^6 : Molün mikromole çevirmek için kullanılan çarpan

3.4.5. Glutasyon Peroksidaz (GPx) Aktivitesinin Ölçülmesi

GPx, hidrojen peroksit'in suya dönüşümünü katalizlemektedir. Bu katalitik aktivitesi için redükte glutatyon (GSH) ihtiyaç duymaktadır. Reaksiyon sonucunda okside forma dönüşen glutatyonun tekrardan redüklenerek enzim aktivitesinin devamlılığını sağlaması gereklidir. Okside glutatyonun (GS-SG) indirgenmesi ise, glutatyon redüktaz (GR) enziminin aktivitesi ve redükte NADP (NADPH)'ın aracılığı ile gerçekleşmektedir. Sonuç olarak, NADPH, NADP'a yükseltgenirken okside glutatyon tekrardan redükte formuna indirgenmektedir.



GPx aktivitesinin ölçülmesinde deney ortamına eklenen GSH-Red enziminin aktivitesi sonucu NADPH'in miktarındaki değişiklik izlenmektedir. NADPH 340 nm dalga boyunda maksimum absorbans vermektedir. Ortamda GPx aktivitesi varsa NADPH'in miktarı ve buna paralel olarak absorbansında azalma gözlenecektir. Sonuç olarak GPx aktivitesi, NADPH absorbansında gözlenen azalma ile doğru orantılı olacaktır (178).

Çözeltiler

1. 5 mM EDTA içeren 50 mM pH 7'lik fosfat tamponu hazırlandı. Aşağıdaki bileşenler bu fosfat tamponunda çözülerek hazırlandı.

2. 150 mM GSH

3. 3 mM NADPH

4. 50 mM H₂O₂

5. 500 U/ ml GSH-Red.

Deneyin Yapılışı

Reaksiyon karışımından her bir tüpe 2.65 ml fosfat tamponu, 0.1 ml GSH, 0.1 ml NADPH, 0.1 ml GSH-Red ve 20 µl örnek eklenerek 10 dk oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra spektrofotometrede 340 nm dalga boyunda her bir örnek tüpüne 0.1 ml H₂O₂ ilave edilerek başlangıç absorbansı ölçüldü ve 1 dk absorbanstaki değişiklik izlendi. Dakikada NADPH'in okside olan miktarı µmol cinsinden hesaplanarak sonuçlar, spesifik aktivite olarak U/mg protein şeklinde ifade edildi.

Hesaplama

$$U/L (\mu\text{mol/dk/L}) = \frac{\Delta A/t \times V_t \times 10^3}{E \times V_s \times L}$$

E = NADPH'in molar absorbtivite katsayısı (6.22 10³ M⁻¹ cm⁻¹)

V_t = Tüm reaksiyon hacmi

V_s = Tüm reaksiyondaki numune hacmi

L = Işık yolu

ΔA/t = 1 dakikada absorbanstaki değişim

10⁶ = Molün mikromole çevirmek için kullanılan çarpan

3.4.6. NAD(P)H Kinon Dehidrogenaz1 (NQO1) Aktivitesinin Ölçülmesi

Doku homejanatlarının NQO1 ölçümünde Abcam's NQO1 Assay kiti kullanıldı.

Prensip

NQO1'in en fazla bilinen fonksiyonu, kinonların indirgenmesi reaksiyonudur. Enzim tek basamakta 2 elektron indirgenmesini sağlayarak reaktif ve toksik semikinon ara metabolitinin oluşumunu önler (180). NQO1 tarafından gerçekleştirilen iki elektron indirgenmesi reaksiyonu ile hücrel tek elektron indirgenme reaksiyonu yarış halindedir (181).

NQO1 aktivitesi, NADH kofaktör ile Menadion'un indirgenmesi ve WST1'in aynı anda indirgenmesi, 440 nm'de absorbansın artması takip edilerek belirlenir. NQO1 aktivitesi enzim miktarıyla kontrol edilir. Dikoumarol, NQO1'in oksitlenmiş formuna bağlanma için NAD(P)H ile rekabet eden yaygın kullanılan bir NQO1 inhibitörüdür. Dikoumarol, bu kittede kullanılan Menadione dahil olmak üzere çeşitli hedeflerin azalmasını önler. NAD(P)H/WST1 kombinasyonu ayrıca, OXPHOS'daki Kompleks 1 aktivitesi gibi diğer redüktaz aktivitesini de içerir, bu nedenle NQO1 aktivitesi, Dicoumarol duyarlı aktivitesi olarak sunulur.

Doku homejanatlarından ekstratların hazırlanması

1. 200 mg şeklinde küçük parçalara ayrılmış dokuların üzerinden kanı uzaklaştırmak için PBS (fosfat tamponu) ile yıkandı.
2. 20 dk süre ile buz üzerinde bekletilerek 18000x g'de 20 dk 4 °C'de santrifüj edildi.
3. Numuneler supleman tamponu ilavesi ile son konsantrasyona seyreltildi.
4. Örneklerin protein miktarları Bradford metodu ile belirlendi.

Deneyin Yapılışı

1. Tüm materyaller ve hazırlanan örnekler kullanmadan önce oda sıcaklığına getirildi.
2. Supleman tamponu ile dilüe edilen her bir örnekten NQO1 inhibitörlü ve inhibitörsüz çiftleri şeklinde 50 µL kuyucuklara konuldu.
3. Reaksiyon tamponu + inhibitor veya reaksiyon tamponu uygun eş kuyucuklara ilave edildi.
4. Örneklerin 440 nm'de 5 dk boyunca absorbansları ölçüldü.

Hesaplama

440 nm’de absorbanstaki lineer artış hızı incelendi. NQO1 aktivitesi, Dikumarol-duyarlı aktivite olarak ölçüldü. Bundan dolayı, NQO1 aktivitesi, çiftlerin inhibitörsüz olanın absorbens değerinden inhibitörlü olanın absorbens değerinin çıkarılması ile hesaplandı. Aktivite, kuyucuklara yüklenen her bir örneğin dakikadaki absorbens değişimi olarak ifade edildi.

3.4.7. Glutasyon S-Transferaz (GST) Aktivitesinin Ölçülmesi

Doku homojenatlarında GST düzeyi ölçümünde Cayman’s Glutasyon S-Transferaz Assay kiti kullanıldı.

Prensip

GST, glutasyon ile ksenobiyotiklerin reaksiyonlarını katalizlemektedir (182). Cayman’s Glutasyon S- Transferaz ölçüm kiti toplam GST aktivitesini 1-kloro-2,4-dinitrobenzen’in (CDNB) glutasyon ile konjugasyonundaki azalma miktarından ölçer (183). Bu konjugasyon 340 nm’de absorbens değerinde artış gösterir. Bu artış miktarı direkt olarak örnekteki artış miktarını verir.

Doku homojenatlarından ekstratların hazırlanması

1. Karaciğer dokusundan 0,2 g kadar alınıp pH 7.4 olan fosfat tamponuyla kanı uzaklaştırmak için yıkandı.
2. Her bir gram doku için 5-10 ml soğuk tampon (100 mM, pH 7.04, 2 mM EDTA içeren fosfat tamponu) homojenize edildi.
3. +4 °C’de 15 dk boyunca 10,000x g’de santrifüj edildi.
4. Süpernatantlar buz üzerinde bekletildi.
5. Santrifüjden sonra süpernatantlar ependorf tüplerine aktarılarak çalışma prosedürüne devam edildi.
6. Dokuların protein düzeyleri Bradford metodu ile ölçüldü.

Deneyin Yapılışı

1. Kör olarak 170 µl Assay tamponu ve 20 µl Glutasyon 3 kuyucuğa eklendi.
2. Pozitif Kontrol olarak 150 µl Assay tamponu, 20 µl Glutasyon ve 20 µl dilüe edilmiş GST kontrol 3 kuyucuğa eklendi.

3. Örnek Kuyucuklara 150 µl Assay tamponu, 20 µl Glutasyon ve 20 µl örnek 3 kuyucuğa eklendi.
4. Tüm kuyucuklara 10 µl CDNB eklenerek reaksiyonu başlatıldı.
5. Dikkatli bir şekilde tüm kuyucuklar birkaç saniye karıştırıldı
6. 340 nm'de en az 5 kez olmak üzere her bir dakikada bir absorbans değeri ölçüldü.

Hesaplama

GST aktivitesini hesaplariken aşağıdaki formül kullanıldı. Enzim aktivitesi, elde edilen protein konsantrasyonları ile nmol/dk/mL/mg protein olarak ifade edildi.

$$\text{GST Aktivitesi(nmol/dk/ml)} = \frac{\Delta A_{340} / \text{min.}}{0.00503 \mu \text{ M}^{-1}} \times \frac{0.2 \text{ ml}}{0.02 \text{ ml}} \times \text{dilüe edilme katsayı} =$$

3.4.8. Nükleer Faktör E2 İle İlişkili Faktör 2 (Nrf 2) transkripsiyon faktörünün Analizi

Cayman's Nrf2 transkripsiyon faktör test kiti kullanılarak ölçüldü. Normalde Nrf2, Keap-1 ile inaktif kompleks halinde bulunur. Oksidatif hasar olduğunda, Keap-1'de konformasyonel değişiklik ortaya çıkar ve Nrf2'yi bırakır. Serbest kalan Nrf2 çekirdeğe ulaşarak ARE'ye özgün olarak bağlanır.

Nrf2, Nrf2'ye karşı yönlendirilen spesifik bir birincil antikorun eklenmesiyle tespit edilir. 450 nm'de hassas bir kolorimetrik okuma sağlamak için HRP'ye konjuge edilmiş bir ikincil antikor eklenir.

Doku homojenatlarından ekstratların hazırlanması

Nrf2 ölçümü için kullanılacak olan Nükleer ekstratların hazırlanması için Abcam'in kiti kullanıldı. Hazırlanan nükleer ekstratların protein ölçümünde Bradford yöntemi kullanıldı.

Deneyin yapılışı

1. Örnek başına 90 µl CTFB eklenir (competitor dsDNA ekleniyorsa 80 µl), 100 µl Blk (Blank) NSB kuyucuklara eklenir.
2. Kitin içindeki prosedürde belirtilen tabloda uygun kuyucuklara Competitor dsDNA, pozitif kontrol ve örnekler eklendi.
3. Oda ısısında 1 saat bekledikten sonra 200 µl yıkama tamponu ile 5 kez yıkama yapıldı.
4. Blank hariç her bir kuyuya 100 µl dilüe edilmiş Nrf2 birincil antikör eklendi.
5. Prosedürde belirtilen inkübasyon ve yıkama işlemlerinden sonra Blank hariç dilüe edilmiş ikincil antikörden 100 µl eklendi.
6. Prosedürde belirtilen inkübasyon ve yıkama işlemlerinden sonra her bir kuyuya 100 µl Developing solüsyon eklenir.
7. 15 ile 45 dk kadar inkübe edilerek her bir kuyuya 100 µl Stop solüsyon eklendi ve 450 nm’de ölçüldü.

Hesaplama

Sonuçlar A/ µg protein olarak hesaplandı. Daha sonra örneklerin absorbans değerlerinin pozitif kontrolün absorbans değerine oranlanarak yüzdesinin hesaplanması ile ifade edildi.

3.4.9. Serumda ALT (Alanin Transaminaz) Tayini

Serumda ALT düzeyleri Elabscience’in Elisa Kiti ile ölçüldü. Sandwich-ELISA metodu kullanılan bu kittede ALT’ye spesifik bir antibodi ile kaplanmış plate kuyucuklarına standart ve örnekler uygun şekilde eklenir. Ardından biotinlenmiş ALT’ye özgü spesifik antibody ve Avidin Horseradish Peroksidaz’ın her bir mikropate’e eklenip konjuge olması sağlanır. Serbest bileşenlerin yıkanması ve Substrat Solüsyonunun her bir kuyucuğa eklenmesi işleminin ardından renk değişiminin gözlenmesi ve rengin maviye dönmesi beklenmektedir. Ortama sülfürik asid solüsyonu ilave edildiğinde renk sarıya döner. Spektrofotometrede 450±2 nm dalga boyunda okuma yapılır.

Deneyin Yapılışı

- 1) 100 µl standart, kör ve örnekten eklendi. 90 dk boyunca 37 °C’de inkübe edildi

- 2) 100 µl Biotinylated Detection Ab her bir kuyucuğa eklendi ve 37 °C’de 1 saat boyunca inkübe edildi.
- 3) Yıkama işleminden sonra HRP Konjugat 100 µl çalışma örneklerine eklendi ve 37 °C’de yarım saat boyunca inkübe edildi.
- 4) Yıkama işleminden sonra her bir kuyuya 90 µl Substrat Solüsyon eklenir. 37 °C’de 15 dk boyunca inkübe edildi.
- 5) Her bir kuyuya stop solüsyonu 50 µl eklendi
- 6) 450 nm dalga boyunda ölçüm yapıldı.

Hesaplama: Hazırlanan standart stok solüsyonundan 100ng/ml (0.1 mg/l) seri dilüsyonlar 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,563; 0 ng/ml. konsantrasyonlarda olacak şekilde hazırlandı ve standart eğrisinden örneklerin konsantrasyonları hesaplandı. Sonuçlar ng/mL olacak şekilde hesaplandı.

3.4.10. Su Teresindeki PEITC Miktarının HPLC ile Analiz Edilmesi

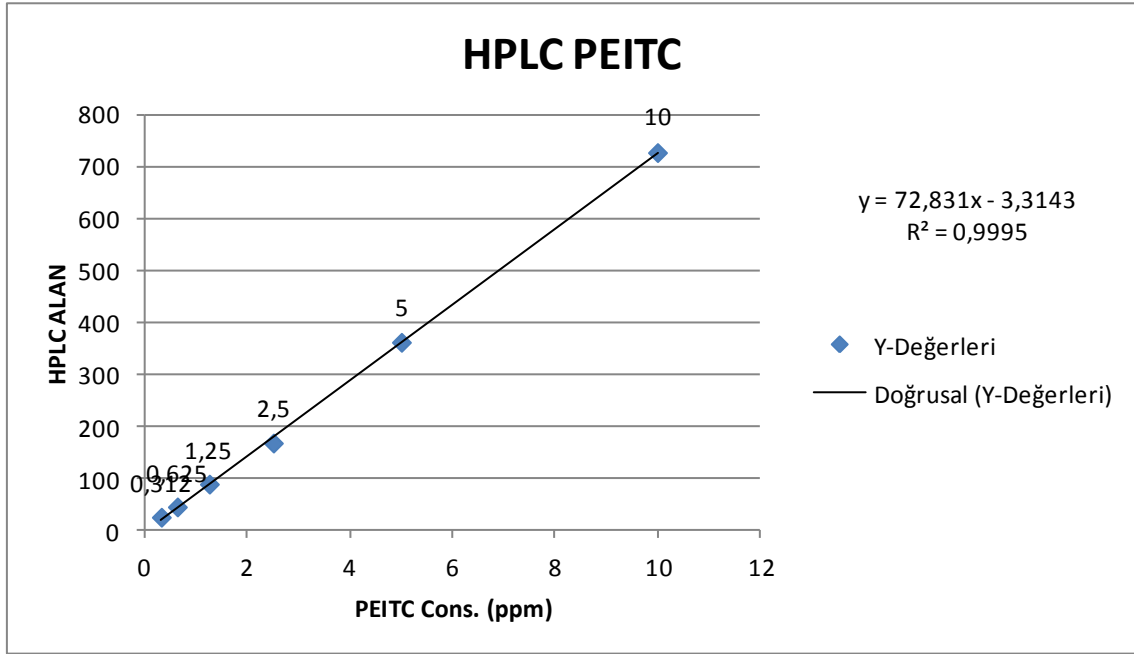
Standart Solüsyonların Hazırlanması: PEITC standartları 0.312, 0.625, 1.25, 2.5, 5 ve 10 ppm konsantrasyonlarında asetonitril ile hazırlandı. 100 µL siklokondenzasyon çalışma ayırıcından (600 µL izoproponal içinde çözünen 10 mM 1,2 benzenditiyol ve 500 µL pH 8.5 fosfat tamponu) eklenerek bu karışım 65 °C 2 saat inkübe edildi.

Örneklerin Hazırlanması: 2 mg kuru su teresi toz haline getirilerek 2 ml deiyonize suda çözüldü. pH 7.0 tamponunda çözünen 5 mg myrosinaz enzim çözeltisi eklendikten sonra 2 saat 37 °C’de inkübe edildi ve 875 g’ de 15 dk boyunca santrifüj edildi. 100 µl süpernatant siklokondenzasyon çalışma ayırıcı ile karıştırıldı ve 65 °C de 2 saat inkübe edildi.

Numunelerin HPLC Analizleri manuel enjeksiyonlu Agilent 1100 cihazı kullanılarak gerçekleştirildi.

Kromatografi koşulları: Kolon;150 x 4,60 mm-5µm boyutlarında ters faz C18 kolon (ACE HPLC Columns), Mobil faz; Metanol-Su karışımı (90:10, v/v), Akış hızı; 1,1 mL/dak, Dedektör; 365 nm, Enjeksiyon hacmi; 20 µL, Basınç; kgf, Sıcaklık; 25 °C.

Hesaplama: Standartların pik alanları ile oluşturulan kalibrasyon eğrisine ait grafik denkleminde yararlanılarak su teresinin içerdiği PEITC miktarı hesaplandı (184).



Grafik 3.4. PEITC'nin standart grafiği

3.4.11. Karaciğer Dokusunun Histopatolojik İncelenmesi

Histopatolojik incelemeler için alınan karaciğer doku örnekleri %10'luk formaldehit içerisinde tespit edildi. Tespit edilen dokulara rutin doku takip işlemleri uygulandı ve doku örnekleri parafin bloklar içine gömüldü. Hazırlanan bloklardan 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Alınan kesitler Hematoksilen- Eozin boya metodu ile boyandı. Kesitler Leica DFC 280 Işık mikroskobu ve Leica Q Win Görüntü Analiz sistemi kullanılarak incelendi. Karaciğer hasarının şiddetinin derecesi için, piknotik nükleus hücreleri, nekroz, hemoraji, mononükleer hücre infiltrasyonu, vasküler konjesyon, sinüzoidal dilatasyon parametrelerine göre değerlendirildi. Buna göre, 0; yok, 1; hafif, 2; orta, 3; şiddetli olarak skorlandı.

3.5. İstatiksel Analiz

Araştırmadan elde edilen veriler SPSS22.0 ile değerlendirildi. Ölçek sonuçları için aritmetik ortalama ve standart sapma değerleri kullanıldı. Verilerin normal dağılım aralığında olup olmadığını tespit etmek amacı ile One Sample Kolmogorov-Smirnov testini uyguladıktan sonra, normal dağılım aralığında olan verilerde ANOVA varyans analizi, LSD testi, normal dağılım aralığına uymayan verilerde Mann-Whitney U ve Kruskal Wallis testleri kullanıldı. İstatistiksel değerlendirmelerde anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ kabul edildi.

Tablo 3.1. Kontrol grubu, DMBA grubu ve DMBA + Su Teresi gruplarındaki biyokimyasal parametrelere ait ortalamalar, standart hata ve standart sapma sonuçları.

		N	Ortalama	Standart Sapma	Standart Hata	95% Güven aralığı		Minimum	Maximum
						Alt sınır	Üst Sınır		
NQO1	1,00	9	126,3021	11,116,95	3,70565	117,7568	134,8473	101,21	139,09
	2,00	9	104,3943	5,17830	1,72610	100,4139	108,3747	97,36	111,27
	3,00	9	198,2112	4,13741	1,37914	195,0309	201,3915	194,72	207,07
	Total	27	142,9692	41,46251	7,97946	126,5672	159,3712	97,36	207,07
GST	1,00	9	52,5831	3,48058	1,16019	49,9076	55,2585	48,52	57,94
	2,00	9	40,9301	1,98093	,66031	39,4074	42,4528	37,62	43,59
	3,00	9	65,9214	2,31226	,77075	64,1440	67,6987	63,20	69,97
	Total	27	53,1448	10,71641	2,06237	48,9056	57,3841	37,62	69,97
SOD	1,00	9	38,3983	11,70219	3,90073	29,4032	47,3934	24,70	55,23
	2,00	9	19,2723	6,01641	2,00547	14,6476	23,8969	7,96	27,79
	3,00	9	67,6917	14,90059	4,96686	56,2381	79,1453	44,98	87,72
	Total	27	41,7874	23,09377	4,44440	32,6518	50,9230	7,96	87,72
CAT	1,00	9	7550,4250	582,03592	194,01197	7103,0326	7997,8174	7062,11	8727,73
	2,00	9	6642,2070	521,69258	173,89753	6241,1986	7043,2154	5508,59	7257,25
	3,00	9	7425,3899	262,54312	87,51437	7223,5814	7627,1984	7137,30	7854,35
	Total	27	7206,0073	613,95534	118,15576	6963,1347	7448,8799	5508,59	8727,73
GPx	1,00	9	130,1175	2,73682	,91227	128,0138	132,2212	126,63	133,76
	2,00	9	108,2336	4,59745	1,53248	104,6997	111,7675	98,06	114,23
	3,00	9	118,6626	3,91759	1,30586	115,6513	121,6739	111,10	124,21
	Total	27	119,0046	9,82234	1,89031	115,1190	122,8901	98,06	133,76
MDA	1,00	9	134,9695	9,41828	3,13943	127,7300	142,2091	118,89	149,22
	2,00	9	212,4603	8,57141	2,85714	205,8717	219,0489	203,82	225,89
	3,00	9	152,9876	3,07031	1,02344	150,6275	155,3476	150,65	159,64
	Total	27	166,8058	34,51434	6,64229	153,1524	180,4592	118,89	225,89
ALT	1,00	9	21,6250	1,62634	,54211	20,3749	22,8751	20,05	24,22
	2,00	9	71,6754	3,76757	1,25586	68,7794	74,5715	68,21	79,84
	3,00	9	43,5053	1,62219	,54073	42,2584	44,7523	41,14	46,03
	Total	27	45,6019	21,01997	4,04530	37,2867	53,9172	20,05	79,84
Nrf2	1,00	9	48,9889	3,62162	1,20721	46,2051	51,7727	45,40	56,70
	2,00	9	38,2111	3,37100	1,12367	35,6199	40,8023	31,70	41,70
	3,00	9	80,3444	7,36599	2,45533	74,6824	86,0064	67,90	87,10
	Total	27	55,8481	18,86546	3,63066	48,3852	63,3111	31,70	87,10

Tablo 3.2. Gruplar arası karşılaştırmaların yapılmasında kullanılan ANOVA testi sonuçları

		Kareler Toplamı	Df	Ortalama kare	F	p
GST	Gruplar arası	2814,798	2	1407,399	197,437	,000
	Gruplar içi	171,080	24	7,128		
	Total	2985,878	26			
CAT	Gruplar arası	4361607,456	2	2180803,728	9,623	,001
	Gruplar içi	5438862,780	24	226619,282		
	Total	9800470,236	26			
GPx	Gruplar arası	2156,642	2	1078,321	73,565	,000
	Gruplar içi	351,794	24	14,658		
	Total	2508,436	26			

Tablo 3.3. Grup karşılaştırmalarında Kruskal Wallis varyans analizi

	Ki-Kare (t)	Df	P
NQO1	21,628	2	0,000
SOD	20,646	2	0,000
MDA	23,143	2	0,000
ALT	23,150	2	0,000
Nrf2	23,178	2	0,000

4. BULGULAR

Bu çalışmada ratlarda oksidatif strese bağı olarak gelişen karaciğer doku hasarında *Nasturtium officinale R.Br.* (su teresi) bitki ekstresinin koruyucu etkilerinin saptanması amacıyla 7,12-DMBA indüksiyonu sonucu oluşan karaciğer hasarı, faz II ve antioksidan enzim aktiviteleri araştırıldı. Bu çalışmada, 6-8 haftalık 27 adet *Wistar albino* türü dişi ratların serum örneklerinde ALT düzeyleri, karaciğer doku örneklerinde Nrf-2 transkripsiyon faktör seviyesi ve Nrf-2'nin indüklediği faz II enzimlerinden NQO1 ve GST, antioksidan enzimlerinden SOD, CAT ve GPx enzim aktiviteleri, lipid peroksidasyon son ürünü olan MDA düzeyleri incelenmiştir. Aynı zamanda, karaciğer doku hasarı histopatolojik olarak değerlendirilmiştir.

Analizler sonucunda elde edilen veriler tablolar (Tablo 4.1-9) ve grafikler (Şekil 4.1-9) şeklinde sunulmuştur.

4.1. Histolojik Bulgular

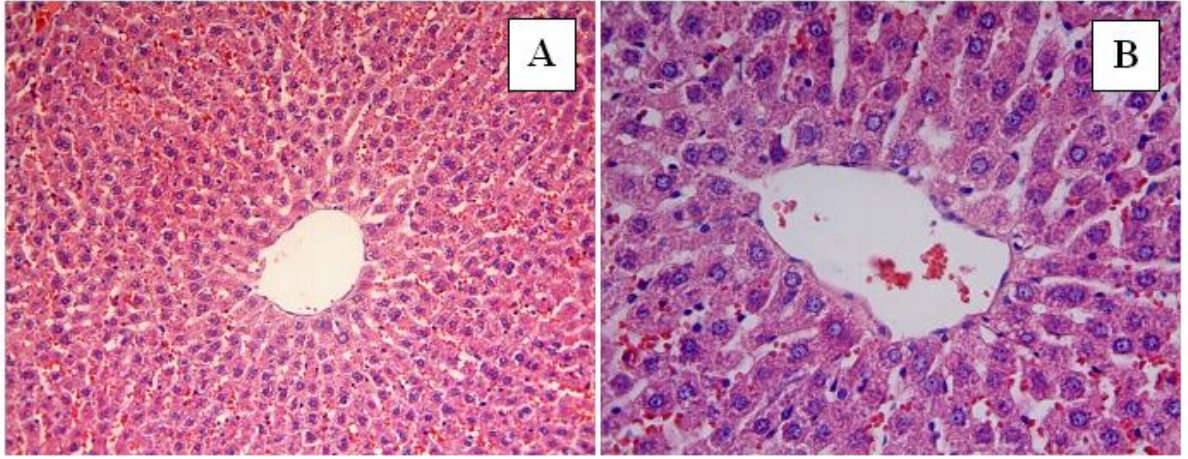
Tablo 4.1'de belirtilen histopatolojik analiz sonuçlarına baktığımızda kontrol grubunun karaciğer dokusunda normal parankimal yapı gözlenirken DMBA'nın karaciğer doku örneklerinde belirgin histopatolojik hasar oluşturduğu tespit edildi ($p<0.0001$). DMBA ile birlikte ST uygulanan grupta karaciğerde ise histopatolojik hasarda azalma olduğu tespit edildi ve az miktarda mononükleer hücre infiltrasyonu, hemoraji, eozinofilik boyanmış piknotik nükleuslu hücreler gözlendi ($p<0.0001$). Kontrol, DMBA ve DMBA+ST gruplarına ait histopatolojik görüntüler sırasıyla Resim 4.1, 4.2 ve 4.3'de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. DMBA' nin oluşturduğu karaciğer hasarı üzerine ST'nin etkileri.

GRUPLAR	HİSTOPATOLOJİK HASAR (Mean±SE)
KONTROL	0,39 ± 0,59 ^a
DMBA	2,11 ± 0,88 ^b
DMBA+ST	1,30 ± 0,80 ^c

Aynı sütundaki a,b,c,d küçük harfleri gruplar arasındaki farklılıkları göstermektedir. (p<0.0001)

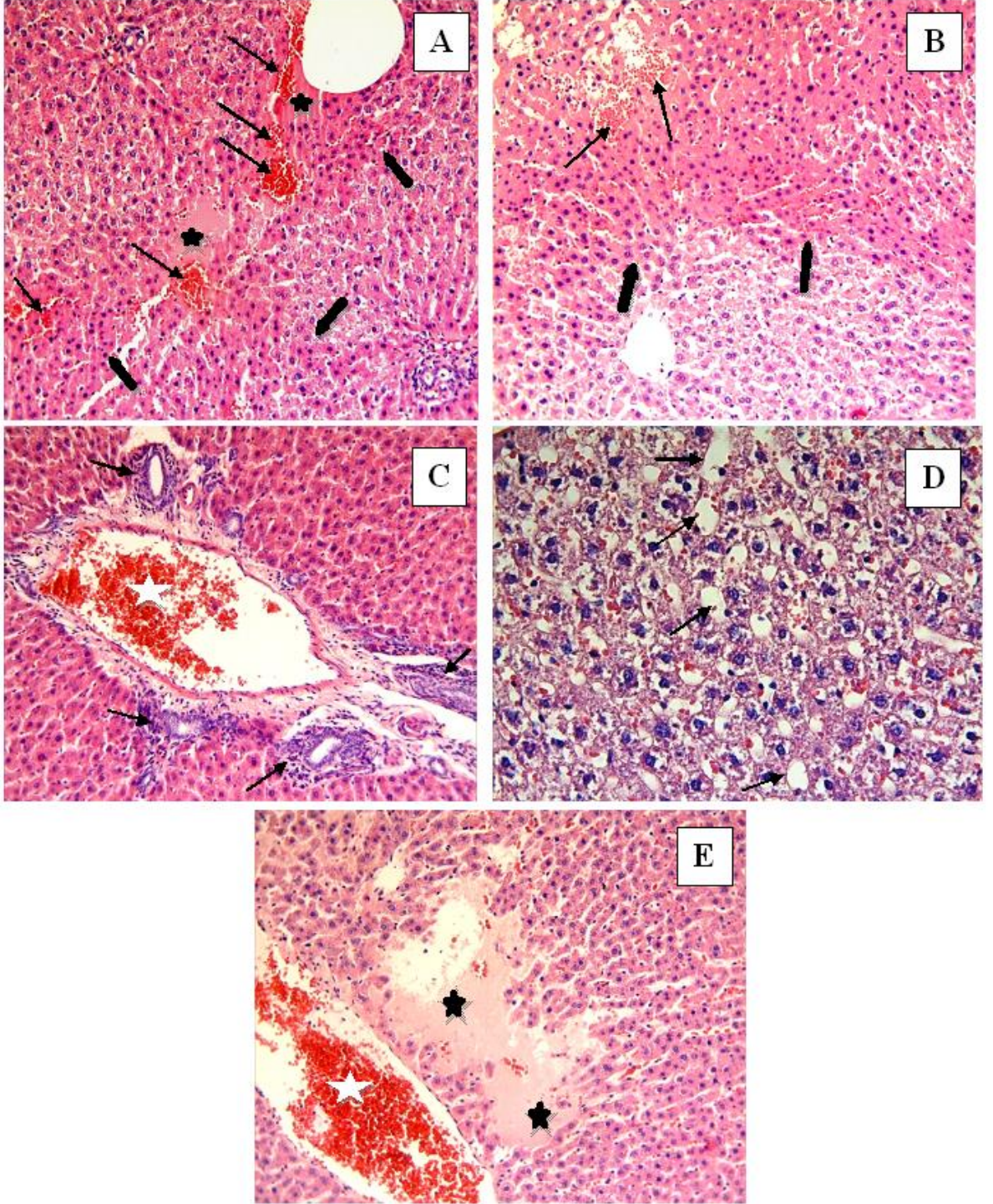
KONTROL



Resim 4.1. Kontrol grubu. Kontrol grubunda karaciğer dokusu normal histolojik görünümde olup, vena centralis çevresinde kordonlar tarzında düzenlenmiş hepatositler gözlenmektedir. A: H-E; X 20, B: H-E; X 40.

Kontrol grubunda karaciğer dokusunda normal parankimal yapı gözlenmiştir. (Resim.4.1). Hepatositler vena sentralis çevresinde ışınal olarak kordonlar tarzında düzenlenmiş olup, portal alanlarda değişim bulunmamaktadır.

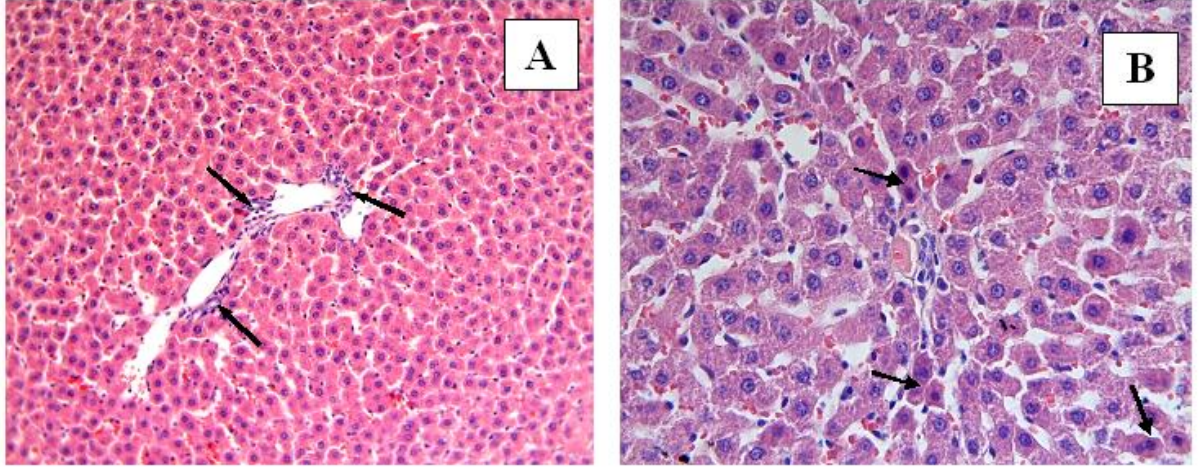
DMBA GRUBU



Resim 4.2. DMBA grubu. DMBA grubunda karaciğer dokusunda nekroz (siyah yıldız) (A, E), eozinofilik boyanmış piknotik nükleuslu hepatositler (kalın siyah oklar) (A, B), hemoraji (siyah ince oklar) (A, B), mononükleer hücre infiltrasyonu (siyah ince oklar) (C), vasküler konjesyon (beyaz yıldız) (C, E) ve sinüzoidal dilatasyon (ince siyah oklar) (D) gözlendi. A, B, C, E: H-E; X 20, D: H-E; X 40.

DMBA grubunda (Resim 4.2 A, B, C, D, E) ise karaciğer doku örneklerinde belirgin histopatolojik hasar olduğu tespit edildi. Karaciğerde nekroz (Resim 4.2 A, E), eozinofilik sitoplazmalı piknotik nükleuslu hepatositler (Resim 4.2 A, B), hemoraji (Resim 4.2 A, B), mononükleer hücre infiltrasyonu (Resim 4.2 C), vasküler konjesyon (Resim 4.2 C, E), ve sinüzoidal dilatasyon (Resim 4.2 D) olduğu gözlemlendi.

DMBA + ST GRUBU



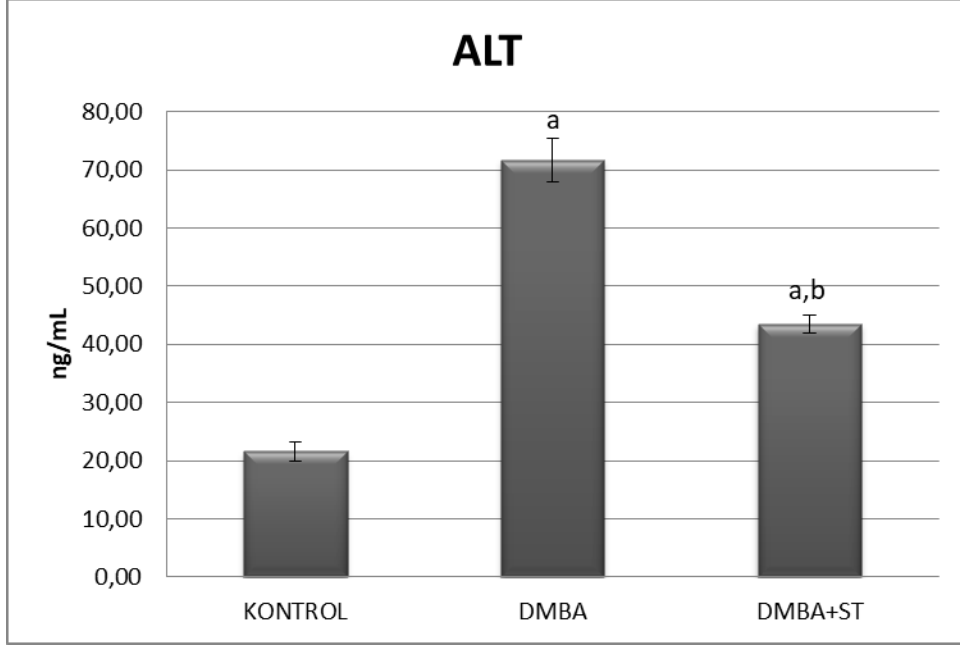
Resim 4.3. DMBA + ST grubu. DMBA + ST grubunda karaciğer dokusunda mononükleer hücre infiltrasyonu (siyah oklar) (A), hemoraji (A), eozinofilik boyanmış piknotik nükleuslu hücreler (siyah oklar)(B) gözlemlendi. A: H-E; X 20, B: H-E; X 40.

DMBA ile birlikte Su Teresi uygulanan grupta karaciğerde ise histopatolojik hasarda azalma olduğu tespit edildi. DMBA + ST grubunda karaciğer dokusunda az miktarda mononükleer hücre infiltrasyonu (siyah oklar), hemoraji (Resim 4.3 A), eozinofilik boyanmış piknotik nükleuslu hücreler (siyah oklar) (Resim 4.3 B) gözlemlendi.

4.2. Biyokimyasal Bulgular

4.2.1. Grupların Serum ALT Düzeyleri

Çalışmamızda, DMBA uygulanması sonucunda rat serumlarında ALT düzeylerinin arttırdığı gözlemlenmiştir ($p < 0,05$). Su teresi verilen grupta ise istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş gözlemlenmiştir ($p < 0,05$).



Şekil 4.1. Kontrol grubu, DMBA ve DMBA+ST deney gruplarının serum ALT düzeylerinin karşılaştırılması

(a) Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında $p < 0.05$

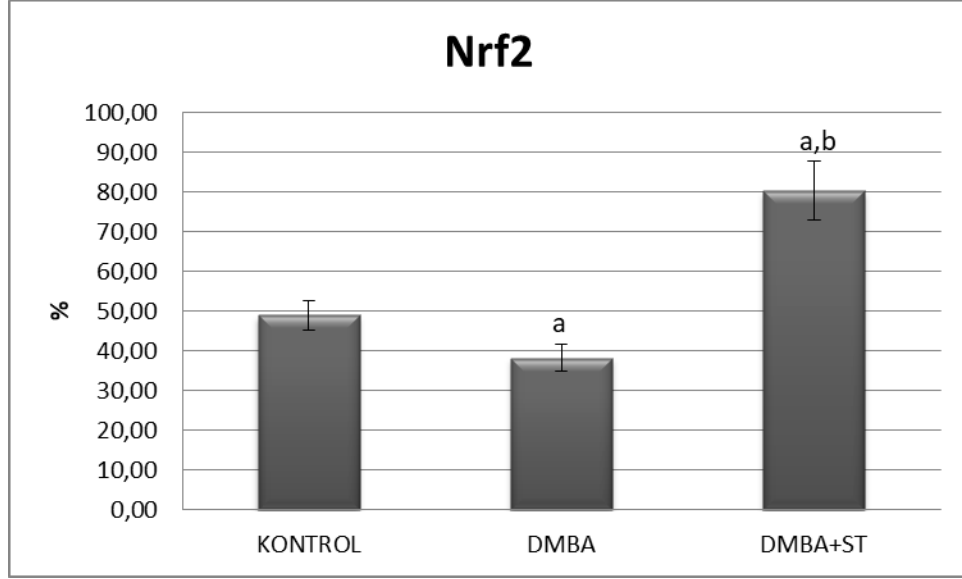
(b) DMBA grubuyla karşılaştırıldığında $p < 0.05$

Tablo 4.2. Serum örneklerindeki ALT'nin grup ortalamaları ve standart sapma verileri ($p < 0.05$).

	ÖRNEK SAYISI (n)	ALT (ng/mL) X ± SS
KONTROL	9	21,6250 ± 1,62634
DMBA	9	71,6754 ± 3,76757 ^a
DMBA+ST	9	43,5053 ± 1,62219 ^{a,b}

4.2.2. Grupların Nrf2 Transkripsiyon Faktörünün Bağlanma Yüzdesi

Çalışmamızda, DMBA uygulanmasını takiben Nrf2 transkripsiyon faktör düzeyi istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gösterirken ($p < 0,05$), ST verilen grupta ise istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artış gözlenmiştir ($p < 0,05$).



Şekil 4.2. Kontrol grubu, DMBA ve DMBA+ST deney gruplarının Nrf2 transkripsiyon faktörünün bağlanma yüzdelerinin karşılaştırılması

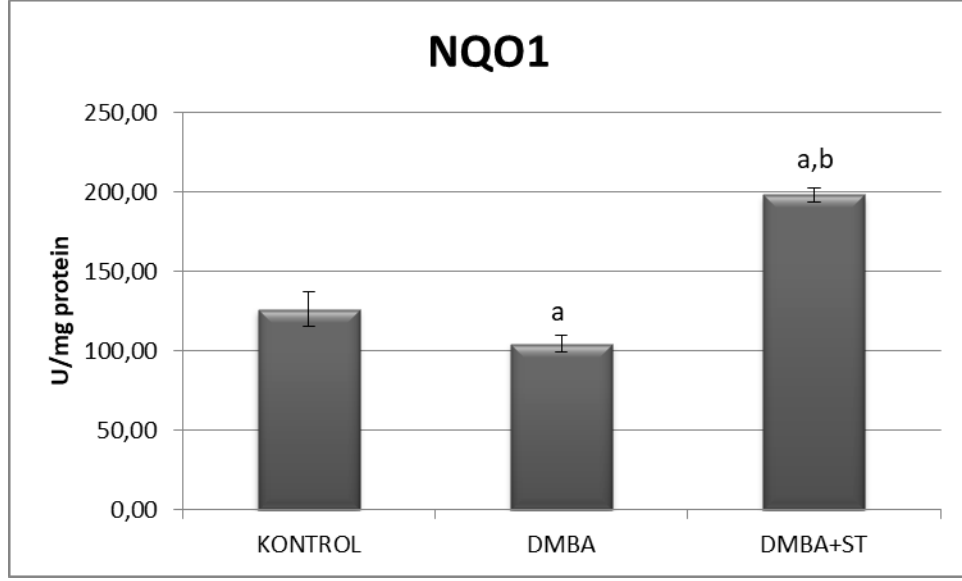
- a) Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında $p < 0.05$
- b) DMBA grubuyla karşılaştırıldığında $p < 0.05$

Tablo 4.3. Karaciğer dokusu Nrf2 transkripsiyon faktörünün bağlanma yüzdelerinin grup ortalamaları ve standart sapma verileri ($p < 0.05$)

	ÖRNEK SAYISI (n)	Nrf2 düzeyi (%) $\bar{X} \pm SS$
KONTROL	9	48,9889 ± 3,6216
DMBA	9	38,2111 ± 3,3710 ^a
DMBA+ST	9	80,3444 ± 7,366 ^{a,b}

4.2.3. Grupların Karaciğer Dokusu NQO1 Aktiviteleri

Çalışmamızda, DMBA ile indüklenen karaciğer dokularında NQO1 aktivitelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş gözlenmektedir ($p < 0.05$). Su teresi uygulanması sonrası NQO1 enzim düzeyi istatistiksel olarak anlamlı şekilde artmıştır ($p < 0.05$).



Şekil 4.3. Kontrol grubu, DMBA ve DMBA+ST deney gruplarının NQO1 aktivitelerinin karşılaştırılması.

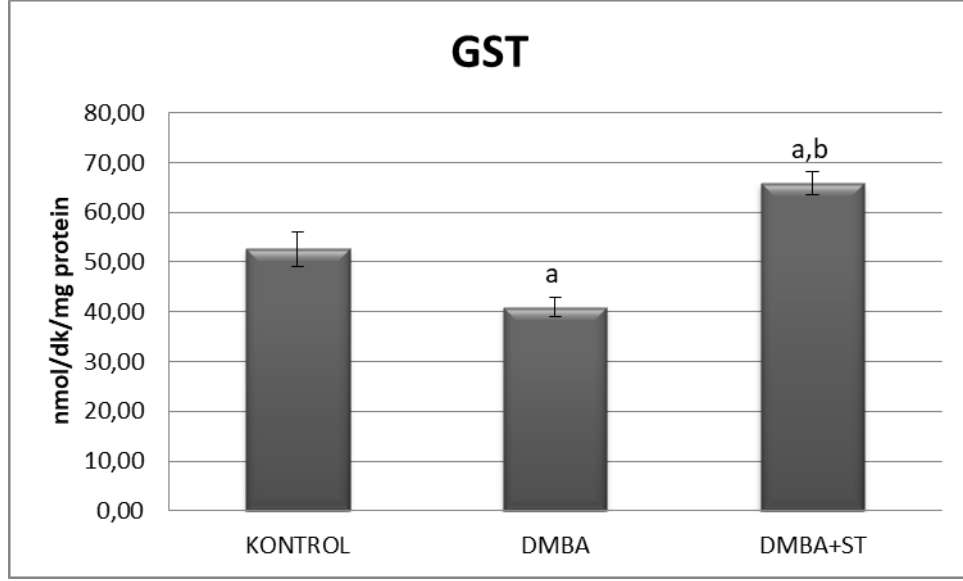
- a) Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında $p < 0.05$
- b) DMBA grubuyla karşılaştırıldığında $p < 0.05$

Tablo 4.4. Karaciğer dokusu NQO1 aktivitelerinin grup ortalamaları ve standart sapma verileri ($p < 0.05$)

	ÖRNEK SAYISI (n)	NQO1 (U/mg protein) X ± SS
KONTROL	9	126,3021 ± 11,116,95
DMBA	9	104,3943 ± 5,17830 ^a
DMBA+ST	9	198,2112 ± 4,13741 ^{a,b}

4.2.4. Grupların Karaciğer Dokusu GST Enzim Düzeyleri

Çalışmamızda, DMBA ile indüklenen karaciğer dokularında GST enzim düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş gözlenmektedir ($p < 0.05$). Su teresi uygulanması GST enzim düzeyi istatistiksel olarak anlamlı şekilde artmıştır ($p < 0.05$).



Şekil 4.4. Kontrol grubu, DMBA ve DMBA+ST deney gruplarının GST enzim düzeylerinin karşılaştırılması.

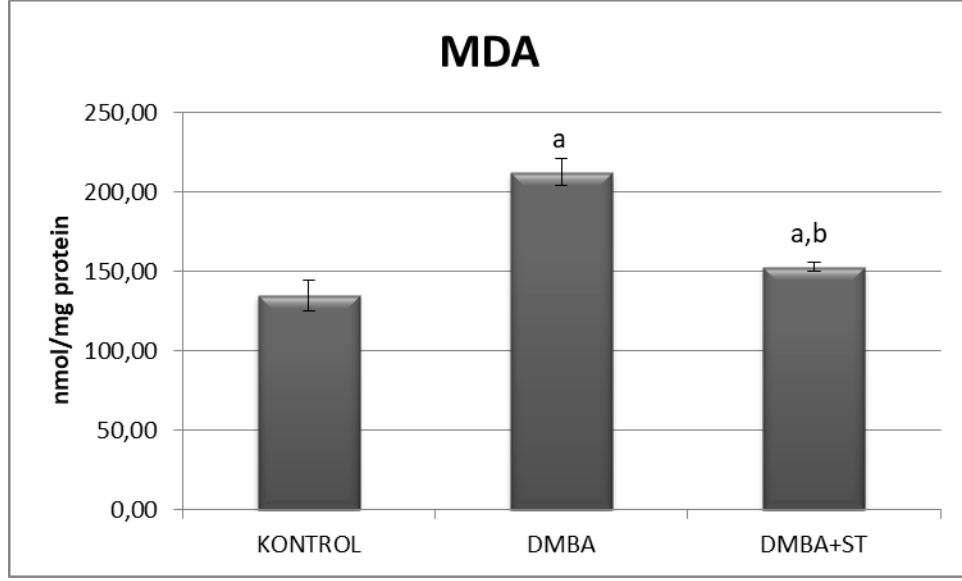
- a) Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında $p < 0.05$
- b) DMBA grubuyla karşılaştırıldığında $p < 0.05$

Tablo 4.5. Karaciğer dokusu GST enziminin grup ortalamaları ve standart sapma verileri ($p < 0.05$)

	ÖRNEK SAYISI (n)	GST (nmol/dk/mg protein) $\bar{X} \pm SS$
KONTROL	9	52,5831 ± 3,48058
DMBA	9	40,9301 ± 1,98093 ^a
DMBA+ST	9	65,9214 ± 2,31226 ^{a,b}

4.2.5. Grupların Karaciğer Dokusu MDA Düzeyleri

Bu çalışmadan elde ettiğimiz verilerde, DMBA verilen grupta istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artan MDA seviyeleri gözlemlendi ($p < 0.05$). Su Teresi uygulanan grupta ise istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalan MDA seviyeleri tespit edildi ($p < 0.05$).



Şekil 4.5. Kontrol grubu, DMBA ve DMBA+ST deney gruplarının MDA düzeylerinin karşılaştırılması.

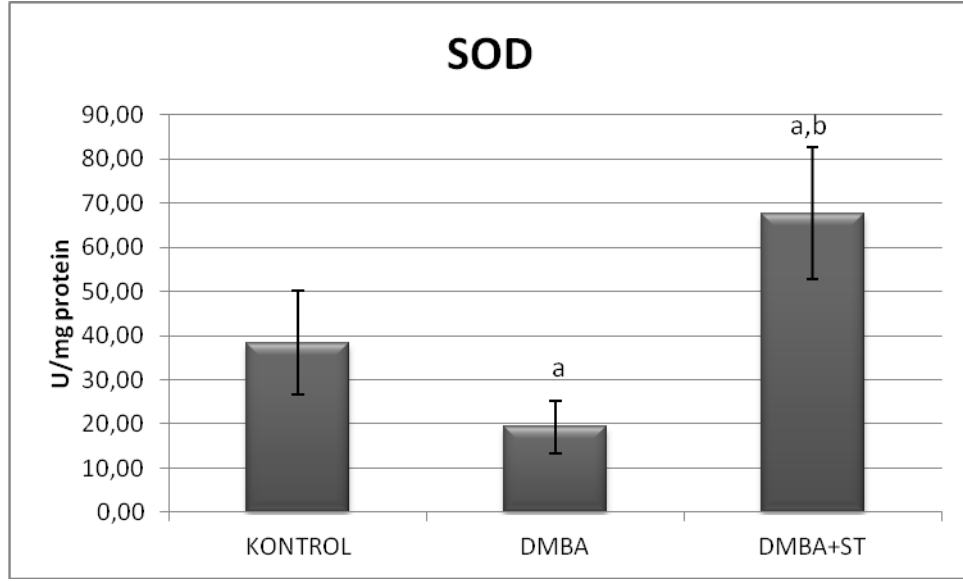
- a) Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında $p < 0.05$
- b) DMBA grubuyla karşılaştırıldığında $p < 0.05$

Tablo 4.6. Karaciğer dokusu MDA'nın grup ortalamaları ve standart sapma verileri ($p < 0.05$)

	ÖRNEK SAYISI (n)	MDA (nmol/mg protein) X ± SS
KONTROL	9	134,9695 ± 9,41828
DMBA	9	212,4603 ± 8,57141 ^a
DMBA+ST	9	152,9876 ± 3,07031 ^{a,b}

4.2.6. Grupların Karaciğer Dokusu SOD Aktiviteleri

Bu çalışmadan elde ettiğimiz verilerde, DMBA verilen grupta istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalan SOD enzim aktivitesi tespit edildi ($p < 0,05$). ST uygulanan grupta ise istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artan SOD aktivitesi tespit edildi ($p < 0,05$).



Şekil 4.6. Kontrol grubu, DMBA ve DMBA+ST deney gruplarının SOD aktivitelerinin karşılaştırılması

(a) Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında $p < 0.05$

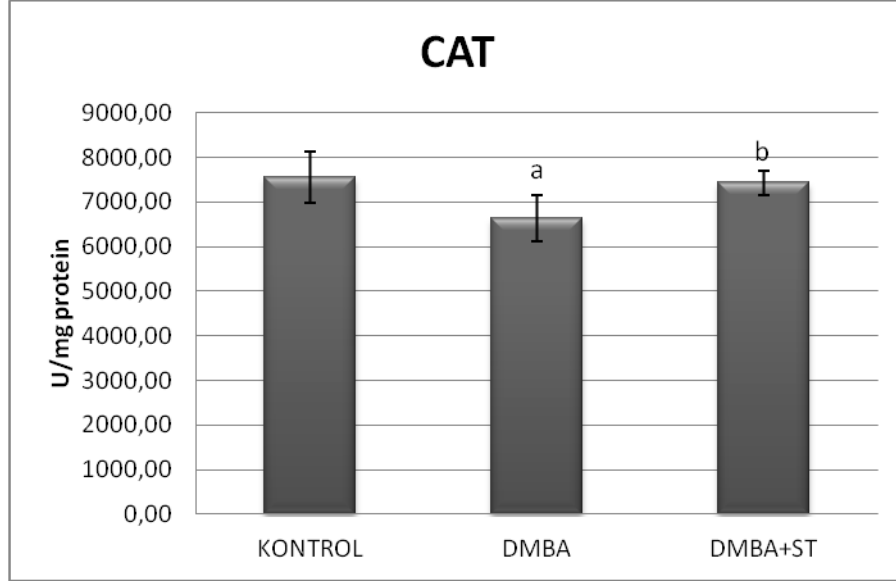
(b) DMBA grubuyla karşılaştırıldığında $p < 0.05$

Tablo 4.7. Karaciğer dokusu SOD aktivitelerinin grup ortalamaları ve standart sapma verileri ($p < 0.05$).

	ÖRNEK SAYISI (n)	SOD (U/mg protein) X ± SS
KONTROL	9	38,3983 ± 11,70219
DMBA	9	19,2723 ± 6,01641 ^a
DMBA+ST	9	67,6917 ± 14,90059 ^{a,b}

4.2.7. Grupların Karaciğer Dokusu CAT Aktivitesi

Çalışmadan elde ettiğimiz verilerde, DMBA verilen grupta istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalan CAT enzim aktivitesi gözlemlendi ($p < 0,05$). ST uygulanan grupta ise istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artan CAT enzim aktivitesi tespit edildi ($p < 0,05$).



Şekil 4.7. Kontrol grubu, DMBA ve DMBA+ST deney gruplarının CAT aktivitelerinin karşılaştırılması.

(a) Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında $p < 0.05$

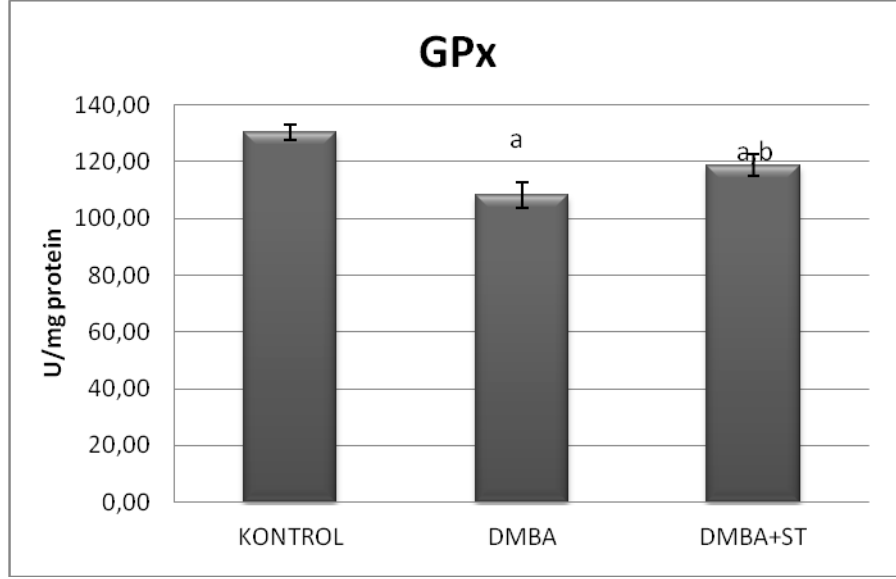
(b) DMBA grubuyla karşılaştırıldığında $p < 0.05$

Tablo 4.8. Karaciğer dokusu CAT aktivitelerinin grup ortalamaları ve standart sapma verileri ($p < 0.05$).

	ÖRNEK SAYISI (n)	CAT (U/mg protein) X ± SS
KONTROL	9	7550,4250 ± 582,03592
DMBA	9	6642,2070 ± 521,69258 ^a
DMBA+ST	9	7425,3899 ± 262,54312 ^b

4.2.8. Grupların Karaciğer Dokusu GPx Aktivitesi

Çalışmadan elde ettiğimiz verilerde, DMBA verilen grupta istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalan GPx enzim aktiviteleri tespit edildi ($p < 0,05$). ST uygulanan grupta ise istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artan GPx enzim aktivitesi tespit edildi ($p < 0,05$).



Şekil 4.8. Kontrol grubu, DMBA ve DMBA+ST deney gruplarının GPx aktivitelerinin karşılaştırılması

(a) Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında $p < 0.05$

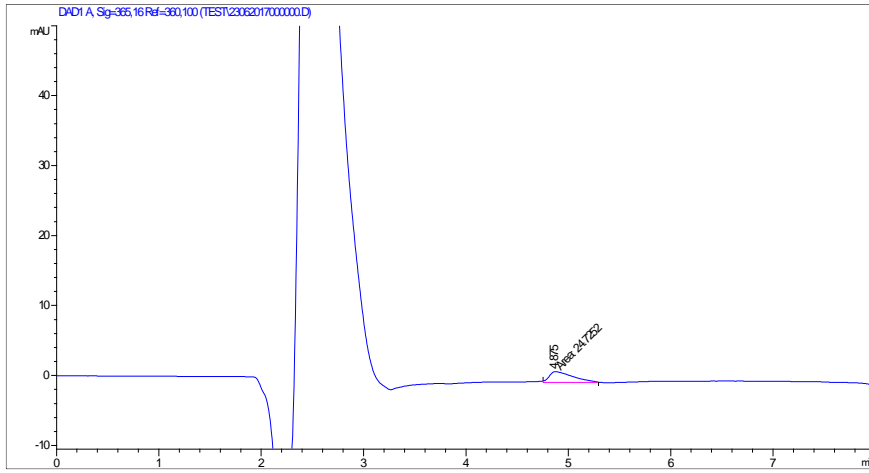
(b) DMBA grubuyla karşılaştırıldığında $p < 0.05$

Tablo 4.9. Karaciğer dokusu GPx aktivitelerinin grup ortalamaları ve standart sapma verileri ($p < 0.05$).

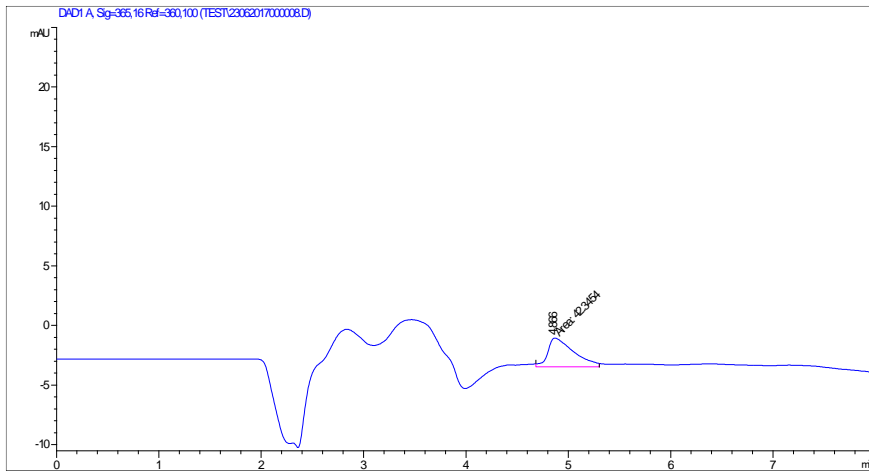
	ÖRNEK SAYISI (n)	GPx (U/mg protein) X ± SS
KONTROL	9	130,1175 ± 2,73682
DMBA	9	108,2336 ± 4,59745 ^a
DMBA+ST	9	118,6626 ± 3,91759 ^{a,b}

4.3. Su Teresinde PEITC Analizi

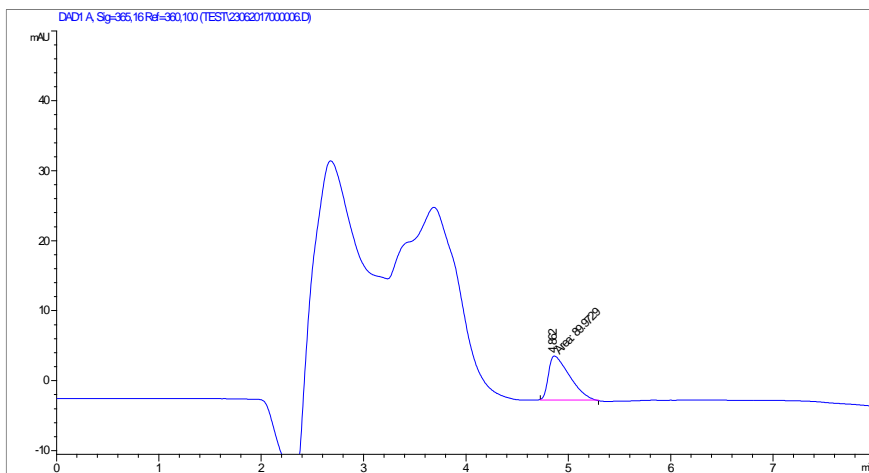
Şekil 4.9'de farklı konsantrasyonlardaki PEITC standartlarının ve Malatyada yetişen *Nasturtium officinale* bitkisinin HPLC kromatogramları gösterilmektedir. Standartların pik alanından oluşturulan eğri denkleminde su teresi bitkisinin içerdiği PEITC miktarı hesaplandı.



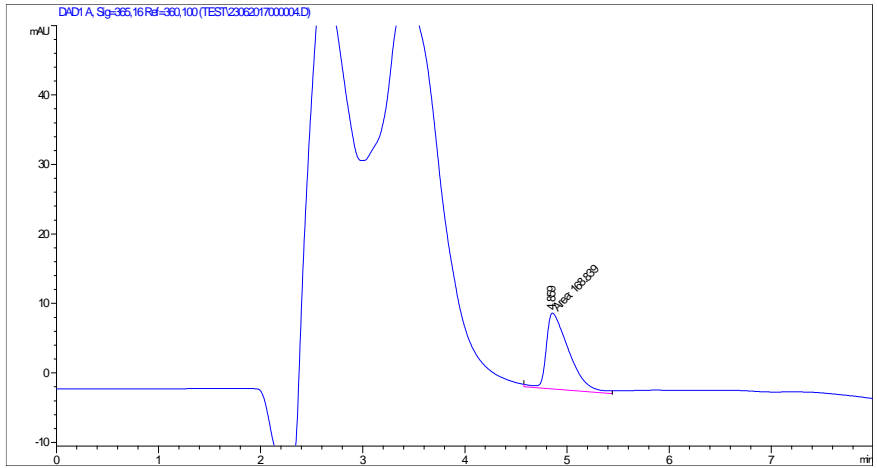
0.312 ppm PEITC



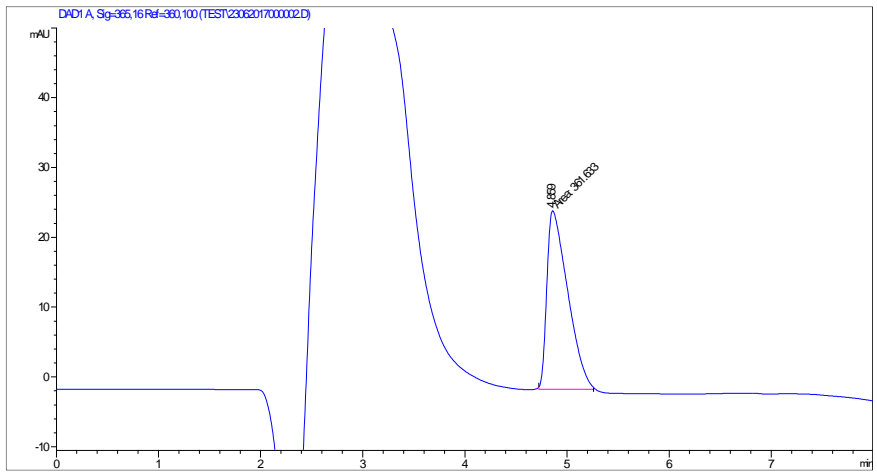
0.625 ppm PEITC



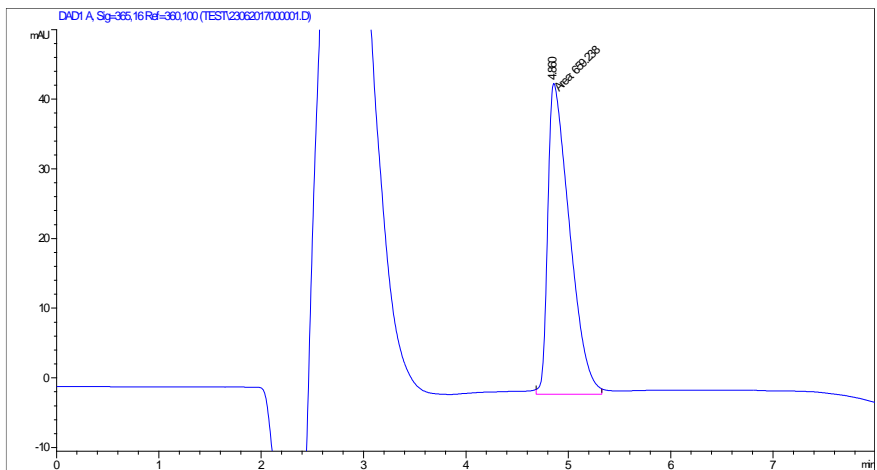
1.25 ppm PEITC



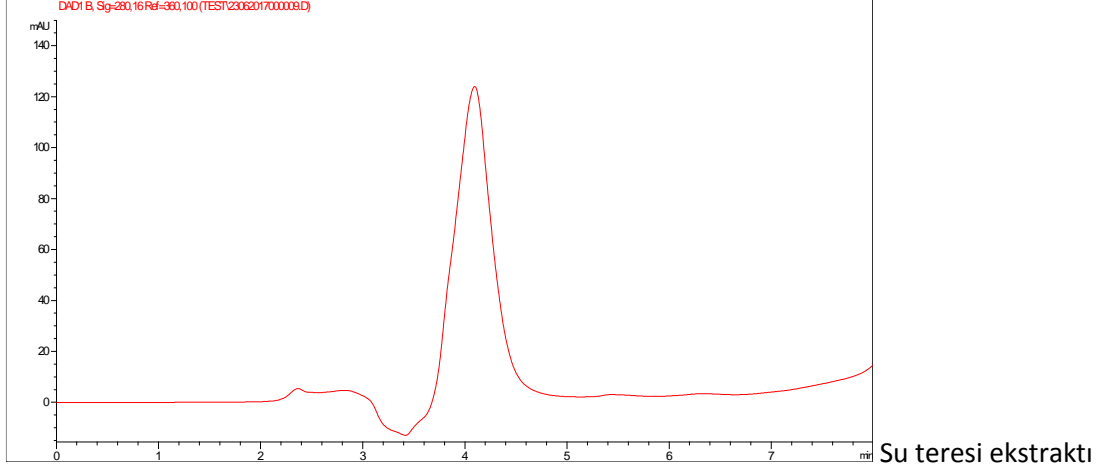
2.5 ppm PEITC



5 ppm PEITC



10 ppm PEITC



Şekil 4.9. Farklı konsantrasyonlardaki PEITC standartlarına ve su teresi numunesine ait HPLC kromatogramları

Su Teresindeki PEITC Miktarı, numunemizin pik alanı değerinin (pik alanı:45.763) standart kalibrasyon eğri denklemi ile 0,674 ppm olarak hesaplandı.

5. TARTIŞMA

Kanser gelişimi başlama, ilerleme ve gelişme aşamalarından oluşan çok faktörlü ve çok aşamalı bir süreçtir (185). Kanser tedavisinde kullanılan kemoterapötik ilaçların çoğu bir çok yan etkilere sahiptir. Bu nedenle minimal yan etkileri olan yeni tedavi yöntemlerine zorunlu olarak ihtiyaç duyulmaktadır. Wattenberg tarafından tanımlanan bir kavram olan kemoprevensiyon, karsinogenезin başlamasını engelleyen önleme stratejisi olarak karşımıza çıkmaktadır (7). Kanser kemoprevensiyonu, normal veya neoplastik dokularda kanserin gelişimini önlemek, inhibe etmek veya tersine çevirmek için kimyasal bileşikler, diyet bileşenleri, fitokimyasallar veya bitki ekstraktlarının kullanılması olarak tanımlanmaktadır (186). Kanserojenезin tüm ana aşamalarına yönelik mekanizmalar ile işlev gören bir çok sayıda potansiyel kemopreventif ajan tanımlanmış olup bu alanda yapılan laboratuvar çalışmaları, farklı kanser gelişim mekanizmalarının aracılık ettiği çok sayıda fitokimyasalların antikanser özelliklerini ortaya çıkarmıştır (187). Kanser kemoprevensiyonu, umut verici yeni bir strateji olup, bitkisel bileşiklerin tamamlayıcı ve alternatif ilaçlar gibi kullanımı, kanserli hastalar arasında giderek daha popüler hale gelmektedir.

Bütün bunlara ek olarak epidemiyolojik ve deneysel çalışmalar sülforafan, resveratrol, genistein, kurkumin gibi diyet fitokimyasallarının karsinogenезin kontrolü ve önleyici rolünde görev aldığı bildirilmektedir (188).

Brassicaceae familyası/Cruciferae familyasından elde edilen birçok bitkisel ürünün özellikle içerdiği glikosinolat bileşeninden dolayı potansiyel antikarsinogenik özellikler gösterdiği literatürde belirtilmektedir. Hayes ve arkadaşlarının yapmış oldukları derlemede belirtildiği üzere birçok in vitro ve in vivo çalışma, brassicaceae familyası kaynaklı fitokimyasalların enflamatuvar yolları önleyebileceğini, kemopreventif aktivite gösterdiğini ve bu yararlı etkilere, antioksidan ve faz I/II genlerinin uyarılması ve epigenetik modifikasyonlar ve miRNA'lar tarafından daha fazla kontrol edilebilen çeşitli transkripsiyon faktörlerinin düzenlenmesi yoluyla proinflamatuvar sinyal yollarının inhibisyonunun aracılık ettiğini öne sürmektedir (189).

Epidemiyolojik çalışmalar, yüksek miktarda brassica sebze alımı ile farklı tür kanser türleri üzerinde düşük risk düzeylerini ilişkilendirmektedir (19). Brassica

sebzelelerinin sağlığa önemli etkileri neredeyse sadece Brassicaceae familyasının bitkilerinde bulunan kükürt içeren bileşikler olan glukozinolatlara bağlanmıştır. Bununla birlikte, bu kemopreventif etkiler başlı başına glukosinolatlar tarafından değil, esas olarak mirosinaz enziminin başlıca hidroliz ürünlerinden biri olan izotiyosiyanatlar aracılığıyla gerçekleşir (190).

Su teresi, uzun yıllar boyunca yararlı olduğu bilinmekle beraber birçok epidemiyolojik çalışma su teresinden zengin bir diyet ile diyabet, kardiyovasküler hastalıklar ve kanser gibi kronik hastalık riskinin azaltılması arasında pozitif bir ilişki kurmuştur (191). Su teresi ekstresinin aktif bileşenleri, bağışıklık sisteminin çeşitli parametreleri ile etkileşime girerek bağışıklık tepkisini güçlendirebilir veya uyarabilir. Yayınlanan araştırma bulgularına göre, zengin glikozinolat kaynağı olan su teresi, fenetil izotiyosiyanat üretmek için hidrolize edilebilmektedir. İzotiyosiyanatlar, sitokrom P 450 (192) gibi faz I enzimlerinin inhibe edilmesi ve kinon redüktaz, oksidoredüktaz, glutatyon-S-transferaz (GST), glukuronosiltransferazlar gibi faz II enzimlerinin tetiklenmesi yoluyla kanserojen aktivasyonunu önleyebilir ve sonuçta potansiyel kanserojenlerin atılımına neden olur (193). Ek olarak, antioksidan özelliklere sahip su teresi ekstresinin verilmesi fibrozu (194), enflamasyonu (195), P450 aktivitesini (196) ve lipit peroksidasyonunu (197) inhibe edebilir.

Araştırma alanları, bitki metabolitlerinin sinerjistik etkileri üzerine ve kemoprevensiyondaki birçok farklı yollara yönelik bitki ekstraktlarının kullanılmasına odaklanmaktadır. Kemopreventif bileşikler, kanserin başlama ve gelişim aşamalarını, oksidatif stres, inflamasyon ve hücrel çoğalma dahil birçok sinyal yollarına etki ederek baskılayabilmektedir (198). Oksidatif stres ve meme karsinogenez süreci arasındaki bağlantı kanıtlanmış olup oksidatif dengesizlik, hücre büyümesi, anjiyogenez, apoptozis, çoğalma, invazyon, DNA tamiri v.s. gibi bir çok önemli gen ve farklı sinyal yollarını değiştiren proteinlerin ekspresyonunu düzenlemektedir. Oksidatif dengenin endojen bozulması, antioksidatif tamir mekanizmalarının ve NF-kB, Nrf-2 gibi spesifik sinyal yolları aracılığı ile oluşan savunma sistemlerinin aktivasyonuna sebep olmaktadır (199).

Yapılan son çalışmalarda, DMBA ile indüklenen oksidatif stres ve doku hasarında Nrf-2'nin anahtar rol oynadığı bildirilmektedir. Temel kaynakları otomobil eksozu, sigara, yanmış yağlar olan PAH'lar biyolojik sistemde birikerek kanser başlatıcıları olarak bilinen hepatotoksinlerdir (14). Sentetik PAH olan 7,12-DMBA,

insan kanserlerini morfolojik ve histolojik olarak taklit eden kemirgenlerde kansere neden olan serbest radikallerin üretimine başlar (200). Bu nedenle 7,12-DMBA ile indüklenen meme karsinogenezi, deney hayvanlarında doğal ve sentetik ajanların terapötik etkisini incelemek için ideal bir modeldir (201).

Çalışmamızda Malatya yöresinde yetişen su teresi (*Nasturtium officinale*) bitkisinin 7,12-DMBA ile indüklenen oksidatif stres ve karaciğer dokusu hasarına karşı koruyucu etkisini ve Nrf-2'nin bu süreçteki rolünü belirlemeyi amaçladık. Bu amaçla, kontrol, DMBA ve DMBA+su teresi (ST) olmak üzere üç grup şeklinde dizayn ettiğimiz çalışmamızda deney hayvanlarının serum örneklerinde ALT düzeyleri, karaciğer doku örneklerinde Nrf-2 transkripsiyon faktör seviyesi ve Nrf-2'nin indüklediği faz II enzimlerinden NQO1 ve GST, antioksidan enzimlerinden SOD, CAT ve GPx enzim aktiviteleri, lipid peroksidasyon son ürünü olan MDA düzeyleri incelenmiştir. Aynı zamanda, karaciğer doku hasarı histopatolojik olarak değerlendirilmiştir.

Kemirgenlerde sentetik PAH olan DMBA'nın güçlü kanserojenitesi ana hedef bölgeler olan deri ve meme bezlerini ve bir dereceye kadar da karaciğer ve böbrekleri etkilemektedir (202). Karaciğerin kimyasal ajanlar tarafından zarar görmeye daha fazla duyarlı olması ksenobiyotik metabolizmasındaki birincil rolünün bir sonucudur. DMBA'ya maruz kalan karaciğer dokusunda oksidatif stres ve karsinojenik metabolitler başlayarak toksikolojik değişikliklere yol açar. DMBA ile karaciğer toksisitesinin değerlendirilmesinde büyük ölçüde serum AST, ALT ve GGT gibi enzim seviyeleri kullanılmaktadır (203). DMBA uygulanan grupta gözlenen AST, ALT ve GGT'nin artmış aktiviteleri DMBA'nın neden olduğu hepatik hasarın ve bu enzimlerin dolaşımdaki müteakip sirkülasyonunun göstergesi olarak kabul edilmektedir. Çalışmamızda, DMBA uygulanması sonucunda sıçan serumlarında ALT düzeylerinin artırdığı gözlenmiştir ($p<0,05$). Su teresi verilen grupta ise istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş gözlenmiştir ($p<0,05$).

ALT düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir düşüşe neden olan su teresi histopatolojik sonuçları ile benzer sonuçlar oluşturmuştur. Histopatolojik analiz sonuçlarına baktığımızda kontrol grubunun karaciğer dokusunda normal parankimal yapı gözlenirken DMBA'nın karaciğer doku örneklerinde belirgin histopatolojik hasar oluşturduğu tespit edildi ($p<0.0001$). DMBA ile birlikte ST uygulanan grupta karaciğerde ise histopatolojik hasarda azalma olduğu tespit edildi ve az miktarda

mononükleer hücre infiltrasyonu, hemoraji, eozinofilik boyanmış piknotik nükleuslu hücreler gözlemlendi ($p < 0.0001$). Bizim sonuçlarımıza benzer olarak Rajakumar ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir çalışmada DMBA'nın karaciğerde hasar oluşturduğunu ve uyguladıkları allilizotiyosiyanat bileşiğinin oluşan bu karaciğer hasarını azalttığını göstermişlerdir (204). Karami ve arkadaşları da radyasyonla indüklenen karaciğer hasarına karşı Su teresinin hepatoprotektif bir etkisi olduğunu bulmuşlardır (205). Natanzi ve arkadaşlarının asetaminofen ile indükledikleri karaciğer hasarını su teresinin önlediğini göstermişlerdir (206). Çalışmamızdaki histopatolojik analiz sonuçları ve ALT düzeylerine baktığımızda DMBA ile karaciğerde oluşan hasara karşı su teresinin koruyucu etkisinin olduğunu söyleyebiliriz.

In vivo transgenik ve deney hayvanları modellerinin ortaya çıkışıyla birlikte hücresel, moleküler ve genomik deney sistemleri ve diyet fitokimyasallarının düzenlediği mekanizmaların anlaşılması sağlanmıştır. Bu fitokimyasallar hücrelere girdikten sonra, doğrudan serbest radikalleri temizleyebilir ve ayrıca çeşitli hücresel sinyal yolları ile ilgili proteinleri tetikleyen “kimyasal veya elektrofilik stres sinyalleri” üretebilir (207). Bu durum Nrf2 ile Keap1 kompleksinin aktivasyonunu içerir. Nrf2-Keap1 kompleksinin aktivasyonu ile birlikte hücresel savunma mekanizmaları olan faz II detoksifikasyon enzimleri, faz III transporterları, antioksidatif stres proteinleri ve diğer savunma mekanizmaları hücreye giren reaktif oksijen türleri ve karsinojenik reaktif türlerden hücreyi korur.

Nrf2, faz II ve antioksidan enzimleri indükleyen ARE'yi aktive etmektedir (208). Genel olarak, fizyolojik koşullar altında, Keap1, Nrf2'nin sitozolik inhibitörü, ubiquitine bağlı proteasomal bozulmasını indüklemektedir. Bununla birlikte, oksidatif uyarıcılar ile aktivasyon üzerine, Nrf2 çekirdeğe lokalize olarak ARE'ye bağlanmaktadır. Bu bağlanma, SOD, CAT ve GPx gibi antioksidan enzimlerinin ve faz II detoksifikasyon enzimlerinin aktivasyonuna yol açmakta ve böylece ksenobiyotik metabolizmasıyla üretilen toksik reaktif ara maddelerin giderilmesine yardımcı olmaktadır (11).

Çalışmamızda, DMBA uygulanmasını takiben Nrf2 transkripsiyon faktörünün bağlanma yüzdesi istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gösterirken ($p < 0,05$), ST verilen grupta ise istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artış gözlenmiştir ($p < 0,05$). Bizim bulgularımıza paralel olarak Kwak ve arkadaşlarının Nrf2-null fareler kullanarak yaptıkları *in vivo* çalışmada Nrf2'nin faz II ve antioksidatif enzimlerini indükleyerek

kemopreventif etki gösterdiğini ve bundan dolayı kanserden korunmada kritik rolünün olduğunu göstermişlerdir (209). Aynı zamanda Saw ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada ITC ve fitoindollerin bir kombinasyonu ile Nrf2-ARE'ın uyarıldığını göstermişlerdir (139). Yine bizim çalışma bulgularımıza paralel olarak La Marca ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada primer sıçan hepatositlerinin PEITC da dahil olmak üzere izotiyosiyonatlara maruz kalması nükleer Nrf2 seviyelerinde bir artışa neden olmuştur (210).

In vivo ve in vitro bir çok çalışmada kullanılan PEITC'ın öncülü olan glukonasturtiin'in en zengin kaynağı su teresidir. Literatürde, su teresi ekstraktının insan kanser hücre hatlarında antikarsinojenik etki gösterdiğini bildiren bazı çalışmalar mevcut olmakla birlikte özellikle, Rose ve arkadaşlarının yaptıkları çalışma ilgi çekici olup insan meme kanseri hücrelerinde kimyasal olarak indüklenen kanser hücrelerinin çoğalması üzerindeki etkilerini değerlendirmek için kullandıkları su teresi ekstraktının, artan invaziv ve metastatik potansiyel ile ilişkili olan ve meme kanseri hücrelerinin invaziv potansiyelini baskılayan bir metaloproteinaz-9 etkisinin inhibitörü olduğunu ortaya koymuşlardır (211). Gupta ve arkadaşları tarafından hazırlanan derlemede ise, saf PEITC'ın, meme, prostat, akciğer, karaciğer, over, multipl myeloma gibi birçok kanser tiplerine karşı farklı mekanizmalar ile kanser hücrelerinde kemopreventif etkili olduğunu göstermişlerdir (212).

Karaciğer, endojen, eksojen veya ksenobiyotik kimyasalların ve ilaçların detoksifikasyonunda kritik bir rol oynamaktadır. Karaciğer hücreleri, vücuttan toksik metabolitin ayrıştırılması ve ortadan kaldırılması için faz I ve faz II detoksifikasyon işlemlerini yürütmektedir (213). Nrf2-Keap1 sinyalizasyonu, ksenobiyotik ve ROT'ların detoksifikasyon ve nötralizasyonunda sorumlu olan NQO1, GST, HO1 gibi faz II enzimlerini düzenler ve oksidatif stres sonucu oluşan hastalıklara karşı korur (214). Çalışmamızda, DMBA ile indüklenen karaciğer dokularında NQO1 ve GST enzim düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş gözlenmektedir ($p<0.05$). Su teresi uygulanması sonrası bu proteinlerin enzim düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı şekilde artmıştır ($p<0.05$).

Sıçanlara diyet yoluyla uygulanan PEITC'nin, NQO1 aktivitesi ve ekspresyonunu belirgin şekilde artırırken GST aktivitesini de iki katına çıkardığı gözlemlendi (215). NQO1 ve GST gibi bazı sitoprotektif detoksifikasyon enzimlerinin up

regülasyonunu sağlayan PEITC, ARE/ Nrf2/ Keap sistemi için önemli bir kanser kemoprevensiyon bileşenidir (216).

Son yıllarda oksidatif stresin biyolojik fonksiyonları ve kanser gelişimi arasındaki rolü üzerine yapılan araştırmalar sonucunda kanserin oksidatif stres ile ilişkili olduğu belirlenmiş olup tümör dokularında özellikle ROT'ların düzeyinin yükseldiği ve GPX, CAT ve SOD gibi antioksidan enzimlerin aktivitelerinin azaldığı yapılan çalışmalarda rapor edilmiştir (217). DMBA'nın uygulanması sonucu yüksek miktarda serbest radikaller oluşur ve antioksidan enzimler serbest radikal aracılı mutajenez veya tümör oluşumunu önlemektedir. Reaktif serbest radikallerin artan üretimi, karsinogenez ile ilişkilendirilebilir (199). ROS'un aşırı üretimi, artan MDA seviyeleri ile ilgili çeşitli hücrelerde ciddi hasarı tetikler (218). MDA, lipid peroksidasyonunun önemli bir belirteçidir ve hücre membranlarında hasar ve yıkım olduğunu gösterir (219). Süperoksit radikalının seviyesinin artması, aynı zamanda hücreSEL SOD ve CAT antioksidan aktivitelerinin azalması ile ilişkilidir (220). Ksenobiyotiklerin, karsinogenlerin, hücreSEL peroksitlerin temizlenmesine esas olarak aracılık eden GPx enziminin tükenmesi ise, hücre içi peroksit birikmesine ve bunun sonucu olarak vücutta çoklu doymamış yağ asidi bozulmasına ve lipitlerin, proteinlerin ve nükleik asitlerin çapraz bağlanmasına neden olmaktadır (221). Bu çalışmadan elde ettiğimiz verilerde, DMBA verilen grupta istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artan MDA seviyeleri ve azalan SOD, CAT ve GPx enzim aktivitelerinin gözlemlendi ($p < 0,05$). ST uygulanan grupta ise istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalan MDA seviyeleri ve artan SOD, CAT ve GPx enzim aktiviteleri tespit edildi ($p < 0,05$). Elde edilen bu bulgular, antioksidan enzim düzeylerinin karsinogen indüksiyonu sonrası azaldığını gösteren Dakrory ve arkadaşları tarafından yapılan çalışma bulguları ile benzerlik göstermektedir (222). Gill ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada insanlar su teresini diyet ile birlikte aldıklarında kandaki antioksidan seviyesini arttırdığı ve DNA hasarlarını iyileştirmeye yönelik etkileri olduğu görülmüştür (112). Slocum ve arkadaşları, Keap-1 up-regülasyonu ve Nrf-2 ekspresyonunun down-regülasyonunun hücreSEL ROT'u arttırdığı bunun da karsinogenezin başlama sürecine etki ettiğini bildirmektedir (223).

Nrf2 aracılı antioksidan sinyal yollarının oksidatif stres kaynaklı hücre hasarının önlenmesinde kritik bir önemi olduğunu gösteren çalışmaların sayısı gittikçe artmaktadır ve aynı zamanda Nrf2'nin detoksifikasyon enzimleri üzerindeki rolü de

yoğun bir şekilde araştırılmaktadır. Nrf2-Keap1 kompleksi Nrf2 aracılı gen transkripsiyonu için anahtar bir oynamaktadır. Bundan dolayı Nrf2-Keap1 arasındaki etkileşimi bozarak ayrılmalarını sağlayan çeşitli fitokimyasalların veya bunların sentetik bileşiklerinin kullanımına yönelik araştırmalara odaklanılmıştır. Çalışmamızda kullandığımız su teresi bitkisi Malatya ve çevresinde yetişen *Nasturtium officinale* R. Br olup Nrf2'nin ARE bölgesine bağlanma aktivitesini indüklemiş, GST, NQO1 gibi faz II enzim aktivitelerini ve SOD, CAT, GPx gibi antioksidan enzim aktivitelerini arttırarak oksidatif stresi ve karaciğer doku hasarını azaltmıştır. Su teresinin bu etkisi içerdiği majör bileşen olan PEITC den kaynaklanabilir. Buna ek olarak antioksidan etkisine içerdiği polifenoller ve askorbik asit sinerjistik bir etki göstererek katkıda bulunmuş olabilir. Sonuçta, su teresi DMBA ile indüklenen meme karsinogenezinde Nrf2-ARE sinyal yolağını etkileyerek kanser kemopreventif etkisini göstermiştir. Aras ve arkadaşları da yaptıkları çalışmalar sonucunda bizimkine benzer bir sonuç olarak su teresi bitkisinin kemopreventif ve antikanser etkisinin olduğunu öne sürmektedir (224).

İnsan hücrelerini kanserojen sinyalleme toksik etkilerinden korumak için dikkate değer yaklaşımlardan biri detoksifikasyon enzimlerinin ekspresyonunu inhibe etmek ve antioksidan durumunu arttırmaktır. Bu sinyalin düzenlenmesini hedefleyen fitokimyasallar, ileriki zamanlarda meme kanseri riskini azaltmak için toksik olmayan, ideal ve yeni ajanlar olacaktır. Güncel prelinik çalışmalar birçok fitokimyasalın antikanser mekanizmasını göstermekle birlikte bazıları için klinik çalışmalara başlanmıştır. Bununla birlikte, daha ileri düzeyde insan çalışmaları için düzenlenebilecekleri bu ajanların güvenlik ve etkinlik profillerini oluşturmak için daha ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç vardır. Sonuç olarak, su teresi yüksek oranda potansiyel antioksidatif ve kemopreventif aktiviteye sahip olup mevcut verilere dayanarak antikanser aktivitesine sahip olabileceği ise açıktır, ancak gelecekteki klinik yararlarını garanti altına almak için daha ayrıntılı toksisite ve klinik çalışmalar gerekmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda, Malatya ve çevresinde yetişen *Nasturtium officinale* bitkisinin PEITC etken maddesini içerdiğini ve miktarını belirledik. PEITC ile yapılan daha önceki çalışmalarda kemopreventif etkili olduğu gösterilmiştir. Kemoprevensiyon, kanseri çeşitli bitkisel ürünler, fitokimyasallar gibi bileşikler kullanarak önleme stratejisidir. Çalışmamızdan elde ettiğimiz verilerde, Cruciferae familyasına ait Su teresinin, DMBA ile indüklenen oksidatif stresi azalttığını ve karaciğer hasarını iyileştirdiğini gözlemledik. Buna ek olarak, DMBA kanserojen bir ajan olmakla birlikte oksidatif stres ve kanser arasında sıkı bir bağlantının olmasından dolayı su teresinin potansiyel kemopreventif bir ajan olabileceğini söyleyebiliriz. Aynı zamanda yüksek antioksidan kapasitesine de sahip olması nedeniyle ileriki çalışmalarda antikanser aktivitesinin değerlendirilmesi açısından önem taşımaktadır. Çalışma bulgularımız, sağlığı geliştirme ve koruma açısından umut verici özelliklere sahip bir diyet bileşeni olarak su teresi tüketimini desteklemektedir. Ancak etkilerinin, her zaman türlerine, kökenine ve büyüme koşullarına, kompozisyonuna, kullanılan dozlarına, kullanan canlının özelliklerine, analiz edilen dokuya ve etkene maruz kalma süresine bağlı olduğunu vurgulamak önemlidir.

Meme kanseri, dünya genelinde kansere bağlı ölümlerin önde gelen bir nedenidir. Mevcut tedavi seçenekleri, yan etkilerinin çok olması nedeniyle yeni destekleyici alternatif tedavi seçenekleri bulmaya teşvik etmektedir. Kanser kemopreventif veya kemoterapötik etkisi açısından fitokimyasallar, prelinik ve klinik çalışmalarda yoğun bir şekilde araştırılmaktadır. Çalışmamızın bundan sonraki aşamalarında, Su teresi ve içerdiği PEITC etken maddesinin antikanser etkisi ve yolakları üzerine ve aynı zamanda daha ayrıntılı toksisite, güvenlik ve doz ayarlama testlerinin yapılması ve sentetik analoglarının sentezlenmesine yönelik araştırmalar yapılması planlanmaktadır.

KAYNAKLAR

1. David J. Newman, Gordon M. Cragg, Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. *Nat. J. Prod.* 2012, 75: 311-35.
2. Dündar Y. Phytochemicals And Healthy Live. *The Medical Journal of Kocatepe*, 2, 2001,131-8.
3. Pan MH, Ho CT. Chemopreventive effects of natural dietary compounds on cancer development. *Chemical Society Reviews* 2008, 37: 2558-74.
4. Sporn MB, Dunlop NM, Newton DL, Smith JM. *Prevention of chemical carcinogenesis*, by vitamin A and its synthetic analogs(retinoids). *Fed Proc* 1976, 35:1332-8.
5. Aggarwal BB, Shishodia S., Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. *Biochemical pharmacology* 2006, 71: 1397-421.
6. Finley JW, Kong AN, Hintze KJ, Jeffery EH, Li Li Ji, and Xin Gen Lei *Journal of Agricultural*, Antioxidants in foods: state of the science important to the food industry, *J. Agric. Food Chem* 2011, 59 (13) :6837–46.
7. Wattenberg LW. Cancer Research, *Chemoprophylaxis of carcinogenesis: a review*, 26 part 1, 1966,1520- 6.
8. Fuentes F, Paredes-Gonzalez X, Kong ANT. Dietary glucosinolates sulforaphane, phenethyl isothiocyanate, indole-3-carbinol/3,3'-diindolylmethane: antioxidative stress/inflammation, Nrf2, epigenetics/epigenomics and in vivo cancer chemopreventive efficacy. *Curr Pharmacol Rep* 2015, 1:179- 96
9. Langoue T.S., Furge LL, Kerriguy N, Nakamura K, Guillouzo A, Guengerich FP. Inhibition of human cytochrome P450 enzymes by 1,2-dithiole-3-thione, oltipraz and its derivatives, and sulforaphane. *Chem Res Toxicol* 2000, 13: 245– 52.
10. Kaspar JW, Niture SK, Jaiswal, AK. Nrf2:INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2009, 47: 1304- 9.
11. Li Y, Paonessa JD, Zhang, Y. Mechanism of chemical activation of Nrf2. *PLoS ONE* 2012, 7: e35122.

12. Baird L, Dinkova-Kostova AT. The cytoprotective role of the Keap1–Nrf2 pathway. *Arch Toxicol* 2011, 85: 241–72.
13. Katz ISS, Albuquerque LL, Suppa AP, de Siqueria DM, Rossato C, Da Silva GB, Jensen JR, Starobinas N, Cabrera WHK, De Franco M, Borelli P, Ibanz OM, Ribeiro OG. 7,12-dimethylbenz (a) anthracene -induced myelotoxicity differs in mice selected for high or low acute inflammatory response: relationship with aryl hydrocarbon receptor polymorphism. *International Journal of Toxicology* 2014, 33: 130– 42.
14. Gelboin HV. Benzo[alpha]pyrene metabolism, activation and carcinogenesis: role and regulation of mixed-function oxidases and related enzymes. *Physiol. Rev.*, 1980, 60: 1107–66.
15. Kumar R, Kaur R, Singh AP, Arora S. Diminution of hepatic response to 7, 12-dimethylbenz(α)anthracene by ethyl acetate fraction of *Acacia catechu* Willd. Through modulation of xenobiotic. *PLoS ONE* 2014, 9, no. 2, Article ID e90083.
16. Nandakumar N. and Balasubramanian MP. Hesperidin a citrus bioflavonoid modulates hepatic biotransformation enzymes and enhances intrinsic antioxidants in experimental breast cancer rats challenged with 7, 12-Dimethylbenz (a) anthracene. *Journal of Experimental Therapeutics and Oncology* 2012, 9: 321–35.
17. Bharali R, Tabassum J, Azad MRH. Chemomodulatory effect of moringa oleifera, lam, on hepatic carcinogen metabolising enzymes, antioxidant parameters and skin papillomagenesis in mice. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 2003, 4: 131–9.
18. Coskun O, Kanter M, Korkmaz A, Oter S. Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and β -cell damage in rat pancreas. *Pharmacological research* 2005, 51: 117-23.
19. Verhoeven DT, Verhagen H. Goldbohm RA, Van Den Brandt PA, Van Poppel. GA. review of mechanisms underlying anticarcinogenicity by brassica vegetables. *Chem Biol Interact* 1997, 103:79–129.
20. Talalay P, Fahey JW. Phytochemicals from cruciferous plants protect against cancer by modulating carcinogen metabolism. *J Nutr* 2001, 131: 3027–33.

21. Conaway CC, Jiao D, Kohri T, Liebes L, Chung, FL. Disposition and pharmacokinetics of phenethyl isothiocyanate and 6-phenylhexyl isothiocyanate in F344 rats. *Drug Metab. Dispos* 1999, 27: 13–20.
22. Lam TK, Gallicchio L, Lindsley K, Shiels M, Hammond E, Tao X, Chen L, Robinson KA, Caulfield LE, Herman JG, Guallar E, Alberg AJ. Cruciferous vegetable consumption and lung cancer risk: A systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009, 18:184–95.
23. Ambrosone CB, McCann SE, Freudenheim JL, Marshall JR, Zhang Y, Shields PG. Breast cancer risk in premenopausal women is inversely associated with consumption of broccoli, a source of isothiocyanates, but is not modified by GST genotype. *J Nutr* 2004, 134:1134–8.
24. Steinbrecher A, Nimptsch K, Husing A. Dietary glucosinolate intake and risk of prostate cancer in the EPICHeidelberg cohort study. *Int J Cancer* 2009, 125:2179–86.
25. Hansson LE, Nyren O, Bergström R. Diet and risk of gastric cancer: A population-based case-control study in Sweden. *Int J Cancer* 1993, 55:181–9.
26. Epplein M, Wilkens LR, Tiirikainen M. Urinary isothiocyanates; glutathione S-transferase M1, T1, and P1 polymorphisms; and risk of colorectal cancer: The Multiethnic Cohort Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009, 18:314–20.
27. Young-Sam K, Edward D, Owuor, Bok-Ryang K, Rong H, Tony Kong AN. Involvement of Nrf2 and JNK1 in the Activation of Antioxidant Responsive Element (ARE) by Chemopreventive Agent Phenethyl Isothiocyanate (PEITC). *Pharmaceutical Research*, 2003, 20: 1351-5.
28. Ross Mh, Kaye GI, Pawlina W. Histology: A text and atlas. 4nd Ed. Lippincott Williams and Wilkins; 2003:533-51.
29. Akşit D, Yıldız ÇH, Sargon M. *Karın II: Karın Boşluğu, Klinik Anatomi*, Ed., M. Yıldırım, İstanbul, Yüce Yay., 5. Baskı, 1998:216-219,
30. Aslan D. Tietz, *Klinik Kimyada Temel İlkeler*, 5. Baskıdan Çeviri, Palme Yayıncılık, 2005:748-760.

31. Sangameswaran B, Deshraj C, Balakrishnan BR, Jayakar B. Hepatoprotective effects of *Thespesia lampas dalz & gibs* in CCl₄ induced liver injury in rats, *Dhaka University Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2008,7 :11-3.
32. Adewusi EA, Afolayan AJA. Review of natural products with hepatoprotective activity, *Journal of Medicinal Plants Research*, 2010, 4: 1318-34 .
33. Clark JH III, Wood RP. Hepatik physiology In Miller TA (ed). *Physiology Basis of Modern Surgical Care* (2nd ed). St. Louis: CV Mosby, 1998: 491-511.
34. Roderick P. Liver function tests: defining what's normal. *British Medical Journal* 2004: 328- 987.
35. Lima, C.F., Fernandes-Ferreira, M., Pereira-Wilson, C. Drinking of *Salvia officinalis* teaincreases CCl₄-induced hepatotoxicity in mice, *Food and Chemical Toxicology*, 2007, 45: 456-64.
36. Dildar K. *Sorularla Konu Anlatımlı Tıbbi Biyokimya*, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 2016: 296
37. Onat T, Emerk K, Eser YS. *İnsan Biyokimyası*, 2. baskı. Ankara, Palme Yayıncılık, 2006: 736
38. İnal ME, Atik U, Aksoy N, Haşimi A. *Marks' Temel Tıbbi Biyokimyası Klinik Yaklaşım*, 2. Baskı. Ankara, Güneş Tıp Kitabevleri, 2007: 846
39. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry, *Brit Med Bulletin*, 1993, 149: 481-93.
40. Akkuş İ. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri, Mimoza Yayınları, Konya, 1995
41. Yeum KJ, Russell MR, Krinsky IN, Adlini G. Biomarkers of antioxidant capacity in hydrophilic and lipophilic compartments of human plasma. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2004, 430: 97-103.
42. Vincent AM, Russell JW, Low P, Feldman EL. Oxidative Stress in the Pathogenesis of Diabetic Neuropathy. *Endocrine Reviews*. 2004, 25: 612–28.
43. Halliwell B. Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3ed: New York: *Oxford University Press*, 1999: 936,

44. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2007, 39: 44-84.
45. Banerjee SK, Mukherjee P, Maulik K. Garlic as an Antioxidant: The Good, The Bad and The Ugly. *Phytother Res* 2003,17: 97–106.
46. Halliwell, B.: Oxidants and the central nervous system: some fundamental questions. *Acta Neurol Scand* 1989, 126: 23-33.
47. Halliwell B. Free radicals and antioxidants: A personal view. *Nutrition Reviews* 1994, 52(8):253-65.
48. Freeman BA, Crapo JD. Free Radicals and Tissue Injury. *Lab Invest*, 1982, 47:412-25.
49. Chen S, Schopfer P. *European Journal of Biochemistry*, - *Wiley Online Library*, 1999, 260: 726-35.
50. Erdal N, Altunkaynak Y, Altunkaynak E, Öztürk M, Mutluay B, Köksal A, Baybaş S. Migrenli Hastalarda Oksidatif Stresin Göstergesi Olarak Lipid Peroksidasyonunun İncelenmesi. *Düşünen Adam* 2005, 18(3):129-35.
51. Ayala A, Munoz MF, Arguelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev*. 2014, 360438:1-31
52. Repetto M, Semprine J, Boveris A. Chapter 1 Lipid peroxidation: chemical mechanism, biological implications and analytical determination, *Lipid Peroxidation*, Dr. Angel Catala (Ed), ISBN 978-953-51-0716-3, Published: 2012 under CC BY 3.0 license. <http://dx.doi.org/10.5772/45943>.
53. Wong-ekkabut J, Xu Z, Triampo W, Tang I-M, Tieleman DP, Monticelli L. Effect of lipid peroxidation on the properties of lipid bilayers: a molecular dynamics study. *Biophys J* 2007, 93(12):4225-36
54. Stringer MD, Gorog PG, Freeman A, Kaskar VV. Lipid peroxides and atherosclerosis. *BMJ* 1989, 298: 281-4.

55. Mayne ST. Antioxidant nutrients and chronic disease: use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research. *J Nutr* 2003,133: 933–40.
56. Berger MM. Can oxidative damage be treated nutritionally. *Clinical Nutrition* 2005, 24: 172-83.
57. McCord JM, MA Edeas. SOD, oxidative stress and human pathologies: a brief history and a future vision. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2005, 59: 139–42.
58. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem* 1969, 244:6049–55.
59. Çimen Ç, Çiğdem Ö, Demir H. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Rat eritrositlerinden elde edilen katalaz enziminin karakterizasyonu ve kinetiğinin incelenmesi. *YYÜ Vet Fak Derg* 2005, 16 (1):15-20.
60. Knapena MFCM, Petersb WHM, C, Mulderb TPJ, Merkusa HMWM, Jansenb JB. MJ and Steegersa EA P. Glutathione and Glutathione-related Enzymes in Decidua and Placenta of Controls and Women with Pre-eclampsia. *Placenta* 1999,20: 541-6.
61. Young IS, Woodside JV. Antioxidants in health and disease. *Clin Pathol* 2001,54:176–86.
62. Akgul SU, Oguz FS, Çaliskan YC, Kekik H, Gürkan A, Türkmen Nane I, Aydın F. The Effect of Glutathion S-Transferase Polymorphisms and Anti-GSST1 Antibodies on Allograft Functions in Recipients of Renal Transplant. *Transplantation Proceedings* 2012:1679-84.
63. Memişoğulları, R. Diyabette Serbest Radikallerin Rolü ve Antioksidanların Etkisi. *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi*, 2005, 3: 30-9.
64. Aydılek N, Aksakal M. Testosteronun tavşanlarda karaciğer antioksidan sistemi üzerine etkisi. *YYÜ Vet Fak Derg*. 2003,142: 22-5.
65. Masella R, Di Benedetto R, Vari R. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathionerelated enzymes. *J Nutr Biochem* 2005, 1610: 577-86.

66. Gutteridge JM. Lipid Peroxidation and Antioxidants as Biomarkers of Tissue Damage. *Clin Chem* 1995, 41: 1819-28.
67. <https://tr.wikipedia.org/wiki/Bilir%C3%BCbin>, erişim tarihi: 15.12.2016
68. Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV. Antioxidants, Oxidative Damage and Oxygen Deprivation Stress: A Review. *Ann. Bot.*, 2003, 91: 179–94.
69. http://www.wikiwand.com/id/Vitamin_E 15.12.2016.
70. Kra-Kud M, Dusin M, Valach M. Products of DNA protein and lipid oxidative damage in relation to vitamin C plasma concentration. *Physiol Res* 2006, 552: 227-31.
71. https://tr.wikipedia.org/wiki/C_vitamini erişim tarihi: 15.12.2016.
72. Woodall AA, Britton G, Jackson MJ. Carotenoids and protection of phospholipids in solution or in liposomes against oxidation by peroxy radicals: Relationship between carotenoid structure and protective ability. *Biochim Biophys Acta* 1997, 1336: 575–86.
73. Roche M, Rondeau P, Singh NR, Tarnus E, Bourdon E. The antioxidant properties of serum albumin. *FEBS Letters* 2008, 582: 1783–7.
74. https://tr.wikipedia.org/wiki/%C3%9Crik_asit 15.12.2016.
75. Macdonald-Wicks K, Wood L, Garg LG. Methodology for the determination of biological antioxidant capacity *in vitro*: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2006, 86: 2046–56.
76. Yılmaz İ. Antioksidan içeren bazı gıdalar ve oksidatif stres, *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 2010, 17 (2): 143-53.
77. Büyüktuncel E. Toplam fenolik içerik ve antioksidan kapasite tayininde kullanılan başlıca Spektrofotometrik Yöntemler, *Marmara Pharmaceutical Journal*, 2013, 17: 93-103.
78. Eken A. Rat Kan ve Doku Örneklerinde Oksidatif Stres Parametreleri, *Journal of Clinical and Analytical Medicine*, 2012: 69-73.

79. Wang XY Li, QB Luo, YM, Ding Q, Xi LM, Ma JM, Li Y, Liu YP, Cheng CL Characteristics and sources of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in Shanghai, China. *Environmental Monitoring and Assessment*, 2010, 165: 295–305.
80. Wenzl T, Simon R, Anklam E, Kleiner J. Analytical methods for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in food and the environment needed for new food legislation in the European Union. *Trends in Analytical Chemistry*, 2006, 25: 716-25.
81. Özben T. Oxidative Stres and Apoptosis: Impact on Cancer Therapy. *J Pharm Sci* 2006, 96(9): 2181-96.
82. Davila DR, Mounho BJ, Burchiel SW. Toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons to the human immune system: models and mechanisms. *TEN*, 1997, 4: 5-9.
83. Erer H, Kıran MM. Tümörlerin meydana gelis sebepleri, Veteriner Onkoloji Kitabı, Konya, Damla Ofset A.S., ISBN 975-97120-0-8, 2000: 35-8.
84. Öztürk F. Öztürk IC, Batcioğlu K, Vardi N, The effect of melatonin on 7,12-dimethylbenz[a]anthracene injury in comparison with vitamin E + selenium in mouse kidneys. *Fundamental & Clinical Pharmacology* 2006, 20: 359–64.
85. Bayram A, Muezzinoglu A. Environmental aspects of polycyclik aromatik hydrocarbons (PAHs) originating mainly from coal-fired combustion systems and their monitoring requirements. In: M. Richardson (ed.), *Environmental Xenobiotics*, 1996: 333-54. London, UK: Taylor & Francis.
86. www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma Erişim:05.01.2017.
87. Surh YJ, Ferguson LR. (Eds.), Dietary and medicinal antimutagens and anticarcinogens: molecular mechanisms and chemopreventive potential, *Mutat. Res.* 2003,1–278: 523–4.
88. Kelloff G, Steel V. Development of cancer chemopreventive drugs based on mechanistic approaches. *Mutat Res* 2005, 591: 16–23.
89. Flora S De, Ferguson LR. Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents. *Mutation Research/Fundamental and Molecular* 2005, 591:18-25.

90. Naithani R, Huma L, Moriarty R, Mc Cormick DL, Mehta RG. Comprehensive review of cancer chemopreventive agents evaluated in experimental chemoprevention models and clinical trials. *Current Med Chem* 2008,15: 1044–71.
91. Sarah B. Fruits of the Earth. *Resurgence*, 2001, 205: 14-5.
92. Balch JF, Balch PA. Prescription for Nutritional Healing. 2nd edition, Avery Publication, USA, 1997:5-9.
93. Dillard CJ, German JB. Phytochemicals: nutraceuticals and human health. *J Sci Food Agric* 2000, 80:1744-56.
94. Petric RC, Braicu C, Raduly L, Zanoaga O, Dragos N, Monroig P, Dumitrascu D, Berindan-Neagoe I. Phytochemicals modulate carcinogenic signaling pathways in breast and hormone-related cancers. *Onco Targets Ther* 2015, 8:2053.
95. Castillo-Sanchez JX, Garcia-Falcon MS, Garrido J, Martinez-Carballo E, Martins-Dias LR, Mejuto XC. Phenolic compounds and colour stability of vinho wines: influence of wine-making protocol and fining agents. *Food Chemistry* 2008,106 (1): 18-26.
96. Giada MLR. Food phenolic compounds: main classes, sources and their antioxidant power. *Oxidative stress and chronic degenerative diseases* 2013, doi: 10.5772/51687.
97. Verma B, Huci P, Chibbar RN. Phenolic acid composition and antioxidant capacity of acid and alkali hydrolysed wheat bran fractions. *Food Chemistry* 2009,116: 947-54.
98. Halliwell B. Dietary polyphenols: Good, bad or indifferent for your health? *Cardiovascular Research* 2007, 73: 341-7.
99. Andreasen MF, Kroon PA, Williamson G, Garcia-Conesa MT. Intestinal release and uptake of phenolic antioxidant diferulic acids. *Free Radical Biology and Medicine* 2001, 31: 304–14.
100. Hollman PCH, Hertog MGL, Katan MB, Analysis and Health Effects of Flavonoids. *Food Chem* 1996, 57 (1): 43-6.

101. Koca N, Karadeniz F. Gıdalardaki Doğal Antioksidan Bileşikler. *Gıda*, 2005, 30 (4): 229-36.
102. Meral R, Doğan İS, Kanberoğlu GS. Fonksiyonel Gıda Bileşeni Olarak Antioksidanlar. *Iğdır Üniv. Fen Bilimleri Enst. Derg.*, 2012, 2 (2): 45-50.
103. Osganian KS, Stampfer MJ, Rimm E, Spiegelman D, Manson JE, Willett, WC. Dietary carotenoids and risk of coronary artery disease in women. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2003a, 77: 1390-9.
104. Fahey JW, Zhang Y, Talalay P. Broccoli sprouts an exceptionally rich source of inducers of enzymes that protect against chemical carcinogens. *Proc Nat Acad Sci* 1997, 94(19): 10367-72.
105. Bonnesen C, Eggleston I.M. and Hayes J. D. Dietary Indoles and isothiocyanates that are generated from *Cruciferous* vegetables can both stimulate apoptosis and confer protection against DNA damage in human colon cell lines. *Cancer Research* 2001, 61:6120-30.
106. Steinkellner H, Rabot S, Freywald C, Nobis E, Scharf G, Chabicovsky M, Knasmüller S, Kassie F. Effect of *Cruciferous* vegetables and their constituents on drug metabolizing enzymes involved in bioactivation of DNA-reactive dietary carcinogens. *Mutation Research* 2001, 480-481:285-97.
107. Fahey JW, Talalay P. Antioxidant functions of sulphoraphane: a potent inducer of phase II detoxication enzymes. *Food and Chemical Toxicology* 1999, 37:973-9.
108. Jin Yi, Mingfu W, Rosen R, Chi-Tang H. Thermal Degredation of sulphoraphane in aqueous solution. *J Agric and Food Chem* 1999, 47: 3121-3.
109. Hect SS. Chemoprevention of Cancer by isothiocyanates, Modifiers of Carcinogen metabolism. Symposium on Phytochemicals: Biochemistry and Physiology. *The Journal of Nutrition* 1999, 129: 768-74.
110. Rose P, Faulkner K, Williamson G, Mithen R. 7-Methylsulfinylheptyl and 8-methylsulfinyloctyl isothiocyanates from watercress are potent inducers of phase II enzymes. *Carcinogenesis* 2000, 21:1983-8.
111. Cruz RMS, Vieira MC, Silva CLM. Effect of heat and thermosonication treatments on watercress (*Nasturtium officinale*) vitamin C degradation kinetics. *Innov Food Sci Emerg Technol* 2008, 9:483-8.

112. Gill CI, Haldar S, Boyd LA, Bennett R, Whiteford J, Butler M, Pearson JR, Bradbury I, Rowland IR. Watercress supplementation in diet reduces lymphocyte DNA damage and alters blood antioxidant status in healthy adults. *Am J Clin Nutr* 2007, 85:504–10.
113. Luke B, Carol Wagstaff JA., Glucosinolates, Myrosinase Hydrolysis Products, and Flavonols Found in Rocket (*Eruca sativa* and *Diplotaxis tenuifolia*). *J Agric Food Chem* 2014, 62 (20): 4481–92.
114. Boyd LA, Mccann MJ, Hashim Y, Bennett RN, Gill CI, Rowland IR. Assessment of the anti-genotoxic, anti-proliferative, and anti-metastatic potential of crude watercress extract in human colon cancer cells. *Nutr Cancer* 2006,55:232–41.
115. Hart DJ, Scott KJ. Development and evaluation of an HPLC method for the analysis of carotenoids in foods, and the measurement of the carotenoid content of vegetables and fruits commonly consumed in the UK. *Food Chem* 1995, 54:101–11.
116. Martínez-Sánchez A, Gil-Izquierdo A, Gil MI, Ferreres FA. Comparative study of flavonoid compounds, vitamin C, and antioxidant properties of baby leaf brassicaceae species. *J Agric Food Chem* 2008, 56: 2330–40.
117. Vig A, Rampal G, Thind T, Arora S. Bio-protective effects of glucosinolates- A Review. *LWT-Food Science and Technology* 2009: 42(10):1561-72.
118. Fahey JW, Zalcmann AT and Talalay P. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry* 2001,56:5-51.
119. Gross H, Dalebout T, Grubb C, Abel S. Functional detection of chemopreventive glucosinolates in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science* 2000, 159:265-72.
120. Sonderby I, Geu-Flores F. and Halkier B. Biosynthesis of glucosinolates gene discovery and beyond. *Trends in Plant Science* 2010,15:283-90.
121. Holst B, Williamson G.A. Critical review of the bioavailability of glucosinolates and related compounds. *The Royal Society of Chemistry* 2004, 21:425-47.
122. Clarke DB. Glucosinolates, structures and analysis in food. *Analytical Methods* 2010, 2:301-416.

123. Lee K, Wai Cheuk M, Chan W, Ming Lee A, Zhao Z, Jiang Z, Cai Z, Determination of glucosinolates in traditional Chinese herbs by high-performance liquid chromatography and electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 2006, 386: 2225-32.
124. Mohn T, Cutting B, Ernst B, Hamburger M. Extraction and analysis of intact glucosinolates—A validated pressurized liquid extraction/liquid chromatography–mass spectrometry protocol for *Isatis tinctoria*, and qualitative analysis of other cruciferous plants. *Journal of Chromatography A* 2007, 1166:142-51.
125. Rollin P, Tatiboue A. Glucosinolates: The synthetic approach. *C R Chimie* 2010, 14:194-210.
126. Kushad M. Brown A, Kurilich A. Juvik J, Klein B, Wallig M, Jeffery E. Variation of glucosinolates in vegetable crops of *Brassica oleracea*. *J Agric Food Chemistry* 1999,47:1541-48.
127. Cartea M, Velasco P. Glucosinolates in Brassica foods: bioavailability in food and significance for human health. *Phytochem Rev* 2008, 7:213-29.
128. Francisco M, Moreno D, Cartea M, Ferreres F, Viguera C, Velasco P. Simultaneous identification of glucosinolates and phenolic compounds in a representative collection of vegetable *Brassicarapa*. *Journal of Chromatography A* 2009, 1216: 6611-9.
129. Nadarajah D, Han JH, Holley RA. Use of mustard flour to inactivate *Escherichia coli* O157: H7 in ground beef under nitrogen flushed packaging. *Int J Food Microbiol* 2005, 99: 257–67.
130. Delaquis PJ, Sholberg PL. Antimicrobial activity of gaseous allyl isothiocyanate. *J Food Prot* 1997, 60:943.
131. Singh SV, Singh K. Cancer chemoprevention with dietary isothiocyanates mature for clinical translational research. *Carcinogenesis* 2012, 33: 1833–42.
132. Podhradsky' D, Drobica L, Kristian P. Reactions of cysteine, its derivatives, glutathione coenzyme A, and dihydrolipoic acid with isothiocyanates. *Experientia* 1979, 35: 154–5.
133. Virginie D, Martin S. Christine BM. The antibacterial properties of isothiocyanates 2015, 161: 229–43,

134. Mi L, Wang X, Govind S. The role of protein binding in induction of apoptosis by phenethyl isothiocyanate and sulforaphane in human non-small lung cancer cells. *Cancer Res* 2007, 67: 6409–16.
135. Hanschen FS, Bruggemann M, Brodehl A, et al. Characterization of products from the reaction of glucosinolate-derived isothiocyanates with cysteine and lysine derivatives formed in either model systems or broccoli sprouts. *J Agric Food Chem* 2012, 60:7735–45.
136. Gupta P, Wright SE, Kim S-H, Srivastava SK. Phenethyl isothiocyanate: A comprehensive review of anti-cancer mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 2014b, 1846:405–24.
137. Nakajima M, Yoshida R, Shimada N, Yamazaki H, Yokoi T. Inhibition and inactivation of human cytochrome P450 isoforms by phenethyl isothiocyanate, *Drug Metab. Dispos.* 2001, 29:1110–3.
138. Cheung KL, Kong AN. Molecular targets of dietary phenethyl isothiocyanate and sulforaphane for cancer chemoprevention. *AAPS J* 2010,12: 87–97.
139. Saw CL, M Cintron, Wu TY, Guo Y, Huang Y, Jeong WS, Kong AN. Pharmacodynamics of dietary phytochemical indoles I3C and DIM: induction of Nrf2-mediated phase II drug metabolizing and antioxidant genes and synergism with isothiocyanates. *Biopharmaceutics & Drug Disposition* 2011, 32:289-300.
140. Singh SV, Kim SH, Sehrawat A, Arlotti JA, Hahm ER, Sakao K, Beumer JH, Jankowitz RC, Chandra-Kuntal K, Lee J, Powolny AA, Dhir R. Biomarkers of phenethyl isothiocyanate-mediated mammary cancer chemoprevention in a clinically relevant mouse model. *J Natl Cancer Inst* 2012,104:1228–39.
141. Keum YS, Jeong WS, Kong ANT. Chemoprevention by isothiocyanates and their underlying molecular signaling mechanisms. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 2004, 555:191-202.
142. Zhang Y, Talalay P. Mechanism of differential potencies of isothiocyanates as inducers of anticarcinogenic Phase 2 enzymes. *Cancer Res* 1998, 58: 4632–9.
143. Waris G, Ahsan H. Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions. *J Carcinog* 2006, 5:14.

144. Hofmann T, Kuhnert A, Schubert A, Gill C, Rowland IR, Pool-Zobel BL, Gleis M. Modulation of detoxification enzymes by watercress: in vitro and in vivo investigations in human peripheral blood cells. *Eur J Nutr* 2009, 48: 483–91.
145. Barrera LN, Cassidy A, Johnson IT, Bao Y, Belshaw NJ. Epigenetic and antioxidant effects of dietary isothiocyanates and selenium: potential implications for cancer chemoprevention. *Proc Nutr Soc* 2012, 71: 237–45.
146. Zhang DD. Mechanistic studies of the Nrf2-Keap1 signaling pathway. *Drug metabolism reviews* 2006, 38: 769-89.
147. Latchman DS. Transcription Factors: An Overview. *Int J Biochem Cell Biol* 1997, 29:1305-12.
148. Kobayashi M, Yamamoto M. Nrf2-Keap1 regulation of cellular defense mechanisms against electrophiles and reactive oxygen species. *Adv Enzyme Regul* 2006, 46: 113-40.
149. Surh YJ, Kundu JK, Na HK. Nrf2 as a master redox switch in turning on the cellular signaling involved in the induction of cytoprotective genes by some chemopreventive phytochemicals. *Planta Med* 2008, 74: 1526-39
150. Sahin K, Tuzcu M, Orhan C, Gencoglu H, Ulas M, Atalay M, Sahin N, Hayirli A, Komorowski JR. The Effects of Chromium Picolinate and Chromium Histidinate Administration on NF- κ B and Nrf2/HO-1 Pathway in the Brain of Diabetic Rats. *Biol Trace Elem Res* 2012, 150:291–6.
151. Lee JM, Johnson JA, An important role of Nrf2–ARE pathway in the cellular defense mechanism. *J Biochem Mol Biol* 2004, 37:139–43.
152. Taguchi K, Motohashi H, Yamamoto M. Molecular mechanisms of the Keap1–Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. *Genes To Cells* 2011, 16: 123-40.
153. Chan K, Kan Y. Nrf2 is essential for protection against acute pulmonary injury in mice. *Proc Natl Acad Sci* 1999, 96:12731-6.
154. Rushmore TH, Morton MR, Pickett CB. The antioxidant responsive element. Activation by oxidative stress and identification of the DNA consensus sequence required for functional activity. *J Biol Chem* 1991,266:11632–9.

155. Wakabayashi N, Itoh K, Wakabayashi J, Motohashi H, Noda S, Takahashi S, Imakado S, Kotsuji T, Otsuka F, Roop DR, Harada T, Engel JD, Yamamoto M. Keap1-null mutation leads to postnatal lethality due to constitutive Nrf2 activation. *Nat Genet* 2003, 35: 238-45.
156. Moi P, Chan K, Asunis I, Cao A, Kan YW. Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;9.
157. Ramos-Gomez M, Kwak MK, Dolan PM, Itoh K, Yamamoto M, Talalay P, Kensler TW. Sensitivity to carcinogenesis is increased and chemoprotective efficacy of enzyme inducers is lost in nrf2 transcription factor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001, 98:3410–5.
158. Aoki Y, Sato H, Nishimura N, Takahashi S, Itoh K, Yamamoto M. Accelerated DNA adduct formation in the lung of the Nrf2 knockout mouse exposed to diesel exhaust. *Toxicol Appl Pharmacol* 2001,173:154–60.
159. Iida K, Itoh K, Kumagai Y, Oyasu R, Hattori K, Kawai K, Shimazui T, Akaza H, Yamamoto M. Nrf2 is essential for the chemopreventive efficacy of oltipraz against urinary bladder carcinogenesis. *Cancer Res* 2004,64:6424–31.
160. Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Ishii T, Igarashi K, Engel JD, Yamamoto M. Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev* 1999,13:76–86.
161. Cullinan SB, Gordan JD, Jin J, Harper JW, Diehl JA. The Keap1-BTB protein is an adaptor that bridges Nrf2 to a Cul3-based E3 ligase: oxidative stress sensing by a Cul3-Keap1 ligase. *Mol Cell Biol* 2004,24:8477–86.
162. Li W, Kong AN. Molecular mechanisms of Nrf2-mediated antioxidant response. *Mol Carcinog* 2009, 48:91–104.
163. Prochaska HJ, Talalay P. Regulatory mechanisms of monofunctional and bifunctional anticarcinogenic enzyme inducers in murine liver. *Cancer Res* 1988,48:4476-82.

164. Namani A, Li Y, Wang XJ, Tang X. Modulation of NRF2 signaling pathway by nuclear receptors: Implications for cancer. *Biochimica ve Biophysica Acta* 2014, 1843:1875-85.
165. Tkachev VO, Menshchikova EB, Zenkov NK. Mechanism of the Nrf2/Keap1/ARE signaling system. *Biochem (Moscow)* 2011,76:407-22.
166. Motohashi H, Yamamoto M. Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism. *Trends Mol Med* 2004,10:549–57
167. Negi G, A Kumar SS. Melatonin modulates neuroinflammation and oxidative stress in experimental diabetic neuropathy: effects on NF-kappaB and Nrf2 cascades, *J. Pineal Res*, 2011, 50: 124–31.
168. Sykiotis GP, Bohmann D. Stress-activated cap'n'collar transcription factors in aging and human disease. *Sci Signal* 2010,3:3.
169. Rangasamy T, Guo J, Mitzner WA, Roman J, Singh A, Fryer AD, Yamamoto M, Kensler TW, Tuder RM, Georas SN, Biswal S. Disruption of Nrf2 enhances susceptibility to severe airway inflammation and asthma in mice. *J Exp Med* 2005, 202:47-59.
170. Burton NC, Kensler TW, Guilarte TR. In vivo modulation of the Parkinsonian phenotype by Nrf2. *Neurotoxicology* 2006,27:1094-100.
171. Kanninen K, Malm TM, Jyrkkänen HK, Goldsteins G, Keksa-Goldstein V, Tanila H, Yamamoto M, Ylä-Herttuala S, Levonen AL, Koistinaho J. Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 protects against beta amyloid. *Mol Cell Neurosci* 2008, 39: 302-13.
172. Khor TO, Huang MT, Kwon KH, Chan JY, Reddy BS, Kong AN. Nrf2-deficient mice have an increased susceptibility to dextran sulfate sodium-induced colitis. *Cancer Res* 2006, 66:11580-4.
173. Collins AR, Lyon CJ, Xia X, Liu JZ, Tangirala RK, Yin F, Boyadjian R, Bikineyeva A, Pratico D, Harrison DG, Hsueh WA. Age-accelerated atherosclerosis correlates with failure to upregulate antioxidant genes. *Circ Res* 2009, 104: 42-54.

174. Innamorato NG, Rojo AI, Garcia-Yague AJ, Yamamoto M, Ceballos ML, Cuadrado A. The transcription factor Nrf2 is a therapeutic target against brain inflammation. *J Immunol* 2008, 181: 680–9.
175. Koriyama Y, Chiba K, Yamazaki M, Suzuki H, Muramoto K, Kato S, Longacting genipin derivative protects retinal ganglion cells from oxidative stress models in vitro and in vivo through the Nrf2/antioxidant response element signaling pathway, *Journal Of Neurochemistry* 2010, 115: 79–91.
176. Robyt JF, White BJ. 1987. *Biochemical Techniques: Theory and Practice*, Prospect Heights, IL, Waveland Press. 237-8.
177. Mihara M, Uchiyama M. Determination of Malondialdehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem* 1978, 86:271-8.
178. Jung K, Henke W. Developmental changes of antioxidant enzymes activity in kidney and liver from rats. *Free Radic Biol Med* 1996, 20:613-7.
179. Luck H. *Methods in Enzymatic Analysis*, second ed., Academic press, New York, Bergmeyer, 1974, 85.
180. Xu LL, Wain JC, Miller DP, Thurston SW, Su L, Lynch TJ, Christiani DC The NAD(P)H:quinone Oxidoreductase 1 Gene Polymorphism and Lung Cancer: Differential Susceptibility Based on Smoking Behavior *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 2001, 10: 303–9.
181. Cenas N, Nivinskas H, Anusevicius Z, Sarlauskas J, Lederer F, Arner ESJ. 2004. Interaction of quinone with thioreoxin reductase. A challenge to the antioxidant role of the mammalian selenoprotein. *The Journal of Biological Chemistry* 2004, 279(4): 2583-92.
182. Hayes JD, Pulford DJ. The Glutathione S-Transferase Supergene Family: Regulation of GST and the Contribution of the Isoenzymes to Cancer Chemoprotection and Drug Resistance Part I. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 2008, 30(6): 445-520
183. Habig WH, Pabst MS, Jakoby WB. Glutathione S- Transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 1974, 249: 7130-9

184. Janchawee B, Wongsakul A, Prutipanlai S, Ruangrut P. Effect of Betong Watercress and Phenethyl Isothiocyanate on N-Demethylation of Caffeine in Rats. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 2014, 13(4): 559-66.
185. Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev* 2002, 3: 415-28.
186. Neergheen VS, Bahorun T, Taylor EW, Jen LS, Aruoma OI. Aruomae Targeting specific cell signaling transduction pathways by dietary and medicinal phytochemicals in cancer chemoprevention. *Toxicology* 2010, 278(2): 229-41.
187. Pan MH, Ghai G, Ho CT. Food bioactives, apoptosis, and cancer. *Mol Nutr Food Res* 2008, 52: 43-52.
188. Surh YJ. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nature Reviews Cancer* 2003, 3: 768-80.
189. Hayes JD, Kelleher MO, Eggleston I M. The cancer chemopreventive actions of phytochemicals derived from glucosinolates. *European Journal of Nutrition* 2008, 47(2): 73-88.
190. Dinkova-Kostova AT, Kostov RV. Glucosinolates and isothiocyanates in health and disease. *Trends in Molecular Medicine* 2012, 18: 337-47.
191. Higdon JV, Delage B, Williams DE, Dashwood RH. Cruciferous vegetables and human cancer risk: epidemiologic evidence and mechanistic basis. *Pharmacological Research* Volume 2007, 55(3), 224-36.
192. Conaway CC, Jiao D, Chung FL. Inhibition of rat liver cytochrome P450 isozymes by isothiocyanate and their conjugates, a structure activity relationship study. *Carcinogenesis* 1996, 17(11): 2423-7.
193. Wallig, M.A., Kingston, S., Staack, R., Jeffery, E.H. 1998. Induction of rat pancreatic glutathione -S- transferase and quinone reductase activities by a mixture of glucosinolate break down derivatives found in Brussel sprouts. *Food Chem. Toxicol.* 36, 365-73.
194. Abu-Zinadah O. Effects of Watercress Oil on the Thermal and Chemical Burn Injuries in Rabbits. *JKAU Med Sci* 2008,15(4): 3-17.

195. Goda Y, Hoshino K, Akiyama H, Ishikawa T, Abe Y, Nakamura T, Otsuka H, Takeda Y, Tanimura A, Toyoda M. Constituents in Watercress, Inhibitors of Histamine Release from RBL-2H3 Cells Induced by Antigen Stimulation. *Biol Pharm Bull* 1999, 22: 1319-26.
196. Chung FL, Morse MA, Eklind KI, Lewis J. Quantitation of human uptake of the anticarcinogen phenethyl isothiocyanate after a watercress meal. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1992, 1(5): 383-8.
197. Bianchet MA, Foster C, Faig M, Talalay P, Amzel LM. Structure and mechanism of cytosolic quinone reductases. *Biochem Soc Trans* 1999, 27(4): 610-5.
198. Cheung KL, Kong AN. Molecular Targets of Dietary Phenethyl Isothiocyanate and Sulforaphane for Cancer Chemoprevention. *The AAPS Journal* 2010, 12(1): 87-97.
199. Kumar A, Jha S, Pattanayak SP. Daphnetin ameliorates 7, 12-dimethylbenz [a] anthracene-induced mammary carcinogenesis through Nrf-2-Keap1 and NF-kappaB pathways. *Biomed Pharm* 2016, 82: 439-48.
200. Costa I, Solanas M, Escrich E. Histopathologic characterization of mammary neoplastic lesions induced with 7,12-dimethylbenz(a)anthracene in the rat: a comparative analysis with human breast tumors. *Arch Pathol Lab Med* 2002, 126: 915-27.
201. Rastogi S, Shukla Y, Paul BN, Chowdhuri DK, Khanna SK, Das M. Protective effect of *Ocimum sanctum* on 3-methylcholanthrene, 7,12-dimethylbenz (a) anthracene and aflatoxin B1 induced skin tumorigenesis in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2007, 224(3), 228-40.
202. Izzotti A, Camoirano C, Cartiglai C, Grubbs CJ, Lubet RA, Kelloff GJ, Flora SD. Patterns of DNA adduct formation in liver and mammary epithelial cells in rats treated with 7,12-dimethylbenz(a)anthracene, and relative effects of chemopreventive agents. *Cancer Res* 1999, 59: 4285-90.
203. Vijayabaskaran M, Yuvaraja KR, Babu G, Sivakumar P, Perumal P, Jayakar B. Hepatoprotective and antioxidant activity of *Symplocos racemosa* bark extract on DMBA induced hepatocellular carcinoma in rats. *International Journal of Current Trends in Science and Technology* 2010, 1(3): 147-58.

204. Rajakumar T, Pugalendhi P, Thilagavathi S, Ananthkrishnan D, Gunasekaran K. Allyl isothiocyanate, a potent chemopreventive agent targets AhR/ Nrf2 signaling pathway in chemically induced mammary carcinogenesis. *Mol Cell Biochem* 2018, 437:1-12.
205. Karami M, Nosrati A, Naderi M, Makhloogh M, Shahani S. Protective effects of *Nasturtium officinale* against gamma-irradiation-induced hepatotoxicity in C57 mice. *Research Journal of Pharmacognosy (RJP)* 2015, 2(2):19-25.
206. Natanzie AE, Ghahremani MH, Monsef-Esfahani HR, Minaei B, Nazarian H, Sabzevari O. An Experimental Model for Study of the Hepatoprotective Activity of *Nasturtium Officinale* (Watercress) Against Acetaminophen Toxicity using in Situ Rat Liver System European. *Journal of Scientific Research* 2009, 38(4): 556-64.
207. Kong A N, Yu R, Hebbar V, Chen C, Owuor E, Hu R, Ee R, Mandlekar S. Signal transduction events elicited by cancer prevention compounds. *Mutat Res* 2001, 480–481: 231–41
208. Flocryk U, Lobodam A, Stachurska A, Jozkowicz A, Dulak J. Role of Nrf2 transcription factor in cellular response to oxidative stress. *Postepy Biochem* 2010, 56: 147-55.
209. Kwak MK, Itoh K, Yamamoto M, Sutter TR, Kensler TW. Role of Transcription Factor Nrf2 in the Induction of Hepatic Phase 2 and Antioxidative Enzymes in vivo by the Cancer Chemoprotective Agent, 3H-1, 2-Dithiole-3-thione. *Molecular Medicine* 2001, 7(2): 135-45.
210. La Marca M, Beffy P, Della Croce C, Gervasi PG, Iori R, Puccinelli E, Longo V. Structural influence of isothiocyanates on expression of cytochrome P450, phase II enzymes, and activation of Nrf2 in primary rat hepatocytes. *Food Chem* 2012, 50: 2822-30.
211. Rose P, Huang Q, Ong CN, Whiteman M. Broccoli and watercress suppress matrix metalloproteinase-9 activity and invasiveness of human MDA-MB-231 breast cancer cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2005, 209(2): 105-13.
212. Gupta P, Kim B, Kim SH, Srivastava SK. Molecular targets of isothiocyanates in cancer: recent advances. *Mol Nutr Food Res* 2014, 58 (8): 1685-707.

213. Dasgupta T, Rao AR, Yadava PK. Modulatory effect of Henna leaf (*Lawsonia inermis*) on drug metabolizing phase I and phase II enzymes, antioxidant enzymes, lipid peroxidation and chemically induced skin and forestomach papillomagenesis in mice. *Mol Cell Biochem* 2003, 245:11-22.
214. Malhotra D, Portales-Casamar E, Singh A, Srivastava S, Arenillas D, Happel C, Shyr C, Wakabayashi N, Kensler TW, Wasserman WW, Biswal S. Global mapping of binding sites for Nrf2 identifies novel targets in cell survival response through ChIP-Seq profiling and network analysis. *Nucleic Acids Res* 2010, 38: 5718-34.
215. Konsue N, Ioannides C. Tissue differences in the modulation of rat cytochromes P450 and phase II conjugation systems by dietary doses of phenethyl isothiocyanate. *Food Chem Toxicol* 2008, 46:3677–683.
216. Gross-Steinmeyer K, Stapleton PL, Liu F, Tracy JH, Bammler TK, Quigley SD, Farin FM, Buhler DR, Safe SH, Strom SC, Eaton DL. Phytochemical induced changes in gene expression of carcinogen-metabolizing enzymes in cultured human primary hepatocytes. *Xenobiotica* 2004, 34:619-32
217. Kayalı R, Çakatay U. Protein Oksidasyonunun Ana Mekanizmaları. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi* 2004, 35(2): 83-9.
218. Pattanayak SP, Sunita P, Mazumder PM. Restorative effect of *Dendrophthoe falcata* (L.f.) Ettingsh on lipids, lipoproteins, and lipid-metabolizing enzymes in DMBA-induced mammary gland carcinogenesis in Wistar female rats. *Comp Clin Pathol* 2014, 23:1013-22.
219. Haque MW, Pattanayak SP. Taxifolin inhibits 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced breast carcinogenesis by regulating AhR/CYP1A1 signaling pathway. *Pharmacogn Mag* 2018, 13: 749-55.
220. Rajadurai M, Prince PSM. Preventive effect of naringin on lipid peroxides and antioxidants in isoproterenol-induced cardiotoxicity in Wistar rats: biochemical and histopathological evidences. *Toxicology* 2006, 228: 259-68.
221. Jagetia GC, Reddy TK, Venkatesha V, Kedlaya R. Influence of naringin on ferric iron induced oxidative damage in vitro. *Clin Chim Acta* 2004, 347: 189–97.

222. Dakrory AI, Fahmy SR, Soliman AM, Mohamed AS, Amer SAM. Protective and Curative Effects of the Sea Cucumber *Holothuria atra* Extract against DMBA-Induced Hepatorenal Diseases in Rats. *BioMed Research International* 2014, 2015, 1-11.
223. Slocum SL, Kensler TW. Nrf2: control of sensitivity to carcinogens. *Arch. Toxicol* 2011, 85: 273–84.
224. Aras U, Gandhi YA, Masso-Welch PA, Morris ME. Chemopreventive and anti-angiogenic effects of dietary phenethyl isothiocyanate in an *N*-methyl nitrosourea-induced breast cancer animal model. *Biopharmaceutics&Drug Disposition* 2013, 34(2), 98-106.

EKLER

Ek 1. Özgeçmiş

2012 yılında, İnönü Üniversitesi Kimya Bölümünden mezun oldum. 2014 yılında aynı üniversitenin Eczacılık Fakültesi Biyokimya A.D.'da Yüksek lisansa başladım. Maski Genel Müdürlüğü Çevre Laboratuvarında kimyager olarak çalışmaktayım. Evliyim.

Ek 2. DeneY Hayvanları Etik Kurul Kararı



İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
DENEY HAYVANLARI ETİK KURULU KARARI

Toplantı Tarihi : 20-02-2015
Toplantı Yeri : Tıp.Fak.Toplantı Salonu-Malatya
Araştırma Protokol no.su : 2015/A-25
DeneYde Kullanılacak Hayvanın Türü : Rat
DeneYde Kullanılacak Hayvanın Soyü : *Wistar albino*
DeneYde Kullanılacak Hayvanın Cinsiyeti : E D Farketmez
DeneYde Kullanılacak Hayvanın Sayısı : 30 Adet
DeneYde Kullanılacak Hayvanın Yaşı ve Ağırlığı : 6-8 haftalık/150-250 g

Eczacılık Fakültesi Öğretim Üyelerinden Yrd.Doç.Dr. A. Burçin UYUMLU'nun yürütücüsü olduğu "Su teresinin (*Nasturtium officinale*) 7,12-dimetilbenz[a]antrasen ile indüklenen oksidatif stres ve karaciğer dokusu hasarına karşı koruyucu etkisinin araştırılması." isimli 2015/A-25 Protokol no.lu çalışmanın dosyası incelendi.

Adı geçen araştırmanın; araştırma protokolüne tamamen uyulmak, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi DeneY Hayvanları Etik Kurul Yönergesi'nde belirtilen hususlar yerine getirilmek ve sorumluluk araştırcılara ait olmak üzere çalışmanın yapılmasında herhangi bir etik sakınca bulunmadığına oy birliği ile karar verildi.

 Doç.Dr.M.Arif ALADAĞ Başkan	 Prof. Dr. Nigar VARDI Üye	 Doç. Dr. Yılmaz ÇİĞREMİŞ Üye
 Vet.Hek.M.Zafer BOZDAĞ Üye	 Yrd.Doç.Dr.Mehmet KARATAŞ Üye	 Yrd.Doç.Dr. Mustafa KARAKAPLAN Üye
 Katılmadı Salih AVCI Sivil Üye	 Ahmet GÖNÜLLÜOĞLU Sivil Üye	