

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**7,12-DMBA İLE İNDÜKLENEN RAT
KARACİĞER DOKUSUNDA ÇEŞİTLİ
SARIMSAK EKSTRELERİNİN KORUYUCU
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Ecz. F. ÖZLEM KARGIN SOLMAZ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Kadir BATÇIOĞLU**

MALATYA-2011

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

**7,12-DMBA İLE İNDÜKLENEN RAT
KARACİĞER DOKUSUNDA ÇEŞİTLİ
SARIMSAK EKSTRELERİNİN KORUYUCU
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Ecz. F. ÖZLEM KARGIN SOLMAZ

Danışman Öğretim Üyesi: Doç. Dr. Kadir BATÇIOĞLU

**Bu araştırma İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından 2009/21 proje numarası ile desteklenmiştir.**

MALATYA-2011

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Bu çalışma jürimiz tarafından Biyokimya Programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı

Prof. Dr. İsmet YILMAZ

İmza


Danışman

Doç.Dr. Kadir BATÇIOĞLU



Üye

Doç.Dr. Çağatay TAŞKAPAN



ONAY :

Bu tez, İnönü Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu...../...../2011 tarih ve 2011/.....sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ali OĞLU
Enstitü Müdürü

Annem'

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince ve tez çalışmamda bana her türlü desteklerini esirgemeyen tez danışmanım Doç. Dr. Kadir BATÇIOĞLU' na, laboratuvar çalışmamda emeği geçen Arş. Gör. Basri SATILMIŞ' a, projemizi destekleyen İnönü Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimine, teşekkürlerimi sunarım.

Bugünlere gelebilmemde çok büyük emek sahibi olan, desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen anneme, babama ve kardeşlerime teşekkürlerimi sunuyorum.

Bu vesileyle sevgisiyle hep yanımda olan sevgili eşime en derin sevgi ve şükranlarımı sunarım.

ÖZET

Bu araştırmada, yüksek antioksidan etkiye sahip olduğu bilinen sarımsağın (*Allium Sativum*) 3 farklı ekstratında; katalaz, süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz antioksidan enzimlerinin aktivitelerinin ölçülmesi, membran hasarını belirlemek üzere malondialdehit ve DNA hasarını belirlemek amacıyla 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin miktarı ölçülmüştür.

3 farklı sarımsak preparatı ile kontrol ve DMBA grubu olmak üzere toplam 50 rat üzerinde uygulama yapılmış olup, her bir rattan alınan karaciğer örneklerinin enzim aktiviteleri ölçülmüş ve 8-hidroksi,2'deoksiguanozin ile DNA hasarı ve MDA miktarı ölçümü ile membran hasarı belirlenmiş ve her bir grubun istatistiksel analizi yapılmıştır.

İstatistiksel değerlendirmelerin sonucunda, uygulanan tüm sarımsak preparatlarının etkili olduğu ancak, bazı parametreler açısından bekletilmiş sarımsak ekstralarının daha güçlü antioksidan aktiviteye sahip olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Sarımsak, Antioksidan, Serbest Radikal, Oksidatif Hasar, 8-hidroksi,2'deoksiguanozin

SUMMARY

In this study, three different extract of garlic, which have high antioxidant effect, were used for the measurement of activity of antioxidant enzymes such as catalase, superoxide dismutase and glutathione peroxidase, for the measurement of malondialdehyde and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine to detect membrane and DNA damage, respectively.

Totally fifty rats were used in three different garlic extract groups, control and DMBA group. Liver tissue of rats was resected after garlic administration and was used for the measurement of enzyme activities, membrane and DNA damage.

As a result of statistical evaluation, although all of the garlic extract has been found effective but in terms of some parameters aged garlic extract has been evaluated as more powerful antioxidant capacity than the other garlic extracts.

Keywords: Garlic, Antioxidant, Free radical, Oxidative damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine

	Sayfa
ONAY SAYFASI	iii
İTHAF	iv
TEŞEKKÜR	v
TÜRKÇE ÖZET	vi
İNGİLİZCE ÖZET	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
TABLolar DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Serbest Oksijen Radikalleri	2
2.1.1. Süperoksit Radikali	3
2.1.2. Hidrojen Peroksit	3
2.1.3. Hidroksil Radikali	4
2.1.4. Singlet Oksijen	5
2.1.5. Nitrik Oksit	5
2.1.6. Hipoklorik Asit	6
2.2. Antioksidan Savunma Sistemleri	6
2.2.1. Enzimatik Antioksidan Savunma Sistemi	7
2.2.1.1. Süperoksit Dismutaz	7
2.2.1.2. Katalaz	7
2.2.1.3. Glutasyon Redüktaz ve Glutasyon Peroksidaz	8
2.2.2. Enzimatik Olmayan Antioksidan Savunma Sistemi	9
2.2.2.1. Glutasyon	9
2.2.2.2. Diğer Enzimatik Olmayan Antioksidan Savunma Sistemleri	11
2.3. Oksidatif Stresin Biyomoleküllere Etkisi	12
2.3.1. Nükleik Asitlere Etkisi	12
2.3.2. Lipidlere Etkisi	12
2.3.3. Proteinlere Etkisi	15
2.4. Oksidatif Stres ve Kanser	15
2.5. 7,12-DMBA	16
2.6. Sarımsak	17

2.6.1. Sarımsak Bileşenleri	18
2.6.1.1. Allicin	18
2.6.1.2. Yağda Çözünebilen Organosülfür Bileşenleri	18
2.6.1.3. Suda Çözünebilen Organosülfür Bileşenleri	18
2.6.2. Sarımsak ve Preparatlarının Metabolizması	19
2.6.3. Sarımsağın Antitümör ve Sitotoksik Etkileri	19
3. GEREÇ VE YÖNTEM	21
3.1. Deney Hayvanları ve Sarımsak Uygulamaları	21
3.1.1. Deney Hayvanları	21
3.1.2. Sarımsak Uygulamaları	21
3.1.3. 7,12-DMBA Uygulaması	22
3.1.4. Ötenazi ve Karaciğerin Alınması	22
3.1.5. Biyokimyasal Analizlere Hazırlık	22
3.2. Biyokimyasal Parametrelerin Ölçülmesi	23
3.2.1. Protein Miktar Ölçümü	23
3.2.2. Malondialdehid Miktar Ölçümü	24
3.2.3. Süperoksit Dismutaz Aktivite Ölçümü	25
3.2.4. Katalaz Aktivite Ölçümü	27
3.2.5. Glutasyon Peroksidaz Aktivite Ölçümü	29
3.2.6. 8-hidroksi deoksiguanozin Miktar Ölçümü	33
3.3. İstatistiksel Analiz	33
3.3.1. MDA' ya ait istatistiksel veriler	33
3.3.2. CAT' a ait istatistiksel veriler	34
3.3.3. SOD' a ait istatistiksel veriler	35
3.3.4. GPx' e ait istatistiksel veriler	36
3.3.5. 8-OHdG' e ait istatistiksel veriler	37
4. BULGULAR	38
4.1. Malondialdehit Miktarı	38
4.2. Süperoksit Dismutaz Aktivitesi	38
4.3. Katalaz Aktivitesi	39
4.4. Glutasyon Peroksidaz Aktivitesi	39

4.5. 8-hidroksi deoksiguanozin Miktarı	40
5. TARTIŞMA	43
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	48
KAYNAKLAR	49
ÖZGEÇMİŞ	58

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

ADP	:	Adenozin di fosfat
°C	:	Santigrad derece
CAT	:	Katalaz
cGMP	:	Siklik guanozin monofosfat
cm	:	Santimetre
dL	:	Desilitre
dk	:	Dakika
DNA	:	Deoksiribo nükleik asit
e⁻	:	Elektron
g	:	Gram
GSH	:	Glutasyon
GPx	:	Glutasyon peroksidaz
GR	:	Glutasyon redüktaz
GST	:	Glutasyon S-transferaz
GSSG	:	Okside glutasyon
H₂O₂	:	Hidrojen Peroksid
kg	:	Kilogram
L	:	Litre
m	:	Metre
M	:	Molar
MDA	:	Malondialdehit
mg	:	Miligram
mL	:	Mililitre
µL	:	Mikrolitre
µmol	:	Mikromol
mmol	:	Milimol
nmol	:	Nanomol
nm	:	Nanometre
NAD	:	Nikotinamid adenin dinükleotid
NAD⁺	:	Yükseltgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid
NADP	:	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NADPH	:	Redükte Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NO[·]	:	Nitrik oksit radikali
O₂^{·-}	:	Süperoksit radikali
¹O₂	:	Singlet oksijen

OH[·]	:	Hidroksil radikali
RNA	:	Ribonükleik asit
ROO[·]	:	Peroksil radikali
ROT	:	Reaktif oksijen türleri
sn	:	Saniye
SOD	:	Süperoksit dismutaz
UV	:	Ultraviyole ışınlar
U	:	Ünite

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları	5
Şekil 2.2.	Singlet oksijenin Delta ve Sigma formları	5
Şekil 2.3.	Glutasyon peroksidaz ve Glutasyon redüktaz	9
Şekil 2.4.	Redükte glutasyon (GSH)	9
Şekil 2.5.	Okside glutayon (GSSG)	9
Şekil 2.6.	Glutasyon Sentezi ve döngüsü	10
Şekil 2.7.	Serbest Radikallerin Lipidler Üzerine Etkisi	14
Şekil 2.8.	Malondialdehit (MDA)	14
Şekil 2.9.	DMBA (7,12 dimetilbenz[a]antrasen)	16
Şekil 2.10.	Allinaz ile alliin alicine dönüşmesi	18
Şekil 3.1.	Lowry Standart Grafiği	24
Şekil 3.2.	SOD standart çalışması logaritmik grafiği	27
Şekil 3.3.	8-OHdG standart grafiği	33
Şekil 4.1.	Gruplar arasındaki MDA miktar dağılımı	38
Şekil 4.2.	Gruplar arasındaki SOD aktivite dağılımı	38
Şekil 4.3.	Gruplar arasındaki CAT aktivite dağılımı	39
Şekil 4.4.	Gruplar arasındaki GPx aktivite dağılımı	39
Şekil 4.5.	Gruplar arasındaki 8-OHdG miktar dağılımı	40
Şekil 4.6.	Kontrol grubuna ait 8-OHdG kromatogramı	40
Şekil 4.7.	DMBA grubuna ait 8-OHdG kromatogramı	41
Şekil 4.8.	DMBA+Taze Sarımsak ekstraktı grubuna ait 8-OHdG kromatogramı	41
Şekil 4.9.	DMBA+Bekletilmiş Sarımsak ekstraktı grubuna ait 8OHdG kromatogramı	41
Şekil 4.10.	DMBA+Sarımsak tablet ekstraktı grubuna ait 8-OHdG kromatogramı	42
Şekil 4.11.	Farklı konsantrasyonlarda 8OHdG standart kromatogramı	42

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2.1.	Reaktif oksijen türleri	2
Tablo 3.1.	MDA' ya ait grup ortalamaları ve standart sapma verileri	31
Tablo 3.2.	MDA' ya ait ANOVA verileri	31
Tablo 3.3.	MDA' ya ait ikili karşılaştırmalar	31
Tablo 3.4.	CAT'a ait grup ortalamaları ve standart sapma verileri	32
Tablo 3.5.	CAT' a ait ANOVA verileri	32
Tablo 3.6.	CAT' a ait ikili karşılaştırmalar	32
Tablo 3.7.	SOD' a ait grup ortalamaları ve standart sapma verileri	33
Tablo 3.8.	SOD' a ait ANOVA verileri	33
Tablo 3.9.	SOD' a ait ikili karşılaştırmalar	33
Tablo 3.10.	GPx' e ait grup ortalamaları ve standart sapma verileri	34
Tablo 3.11.	GPx'e ait ANOVA verileri	34
Tablo 3.12.	GPx' e ait ikili karşılaştırmalar	34
Tablo 3.13.	8OHdG' e ait grup ortalamaları ve standart sapma verileri	35
Tablo 3.14.	8OHdG' e ait ANOVA verileri	35
Tablo 3.15.	8OHdG' e ait ikili karşılaştırmalar	35

1.GİRİŞ

Aerobik organizmalarda oksijen kullanımının doğal sonucu olarak reaktif oksijen türleri (ROT) meydana gelmektedir (1). Radikal yapısındaki bu moleküllerin başlıcaları peroksil radikali (ROO), nitrik oksit radikali (NO), süperoksit anyon radikali (O_2^-) ve peroksinitrit (ONOO) tir (2).

Yüksek reaktif özellikteki bu radikaller membranlar ve DNA gibi biyolojik moleküllerle reaksiyona girerek oksidatif hasarlar oluştururlar ve en sonunda hücre ölümüne neden olurlar (3).

Sarımsak bir halk ilacı olarak eski çağlardan beri kullanılmaktadır. Bu konudaki bilimsel araştırmalar ise ilk defa Pasteur tarafından yapılmıştır (4). Sarımsak antioksidan, bakterisidal, antifugal, antikanserojen, hipolipidemik ve diğer pek çok etkiye sahiptir. Özellikle son 10-15 yılda sarımsağın antioksidan, antikanserojen özelliklerinin yanı sıra yaşlanma ve oksidatif stresle ilişkili pek çok patolojiyi önleyici etkisi üzerinde durulmaktadır (5).

Sarımsağın bu etkilerinden sorumlu bileşeni allicin adı verilen bir diallil tiyosülfamat bileşiğidir. Bu madde ezilmemiş sarımsakta bulunmaz. Sarımsağın ezilmesi, kesilmesi, çiğnenmesi sonucunda açığa çıkan allinaz enziminin dokuda bulunan alliin'e etkisi ile oluşmaktadır (4).

Allicin, vücutta çeşitli sebeplerden dolayı açığa çıkabilecek olan serbest radikalleri süpürücü etki yaparak ve lipid peroksidasyonunda zincir reaksiyonlarını kırarak antioksidan özellik gösterir.

Bu çalışmada sarımsağın 3 farklı formunun antikanserojen etkinliğinin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.Serbest Radikaller

Reaktif oksijen türleri, atomik veya moleküler yapılarında eşlenmemiş tek elektron içeren ve bu nedenle son derece reaktif özellik taşıyan moleküllerdir (6,7). Radikallerdeki eşlenmemiş elektron genellikle bir nokta ile temsil edilir (8).

Tablo 2.1. Reaktif oksijen türleri

Reaktif oksijen türleri	
Süperoksit radikali	$O_2^{\cdot-}$
Hidroksil radikali	$\cdot OH$
Peroksil radikali	$ROO\cdot$
Hidrojen peroksit	H_2O_2
Singlet oksijen	1O_2
Nitrik oksit	$NO\cdot$
Peroksinitrit	$ONOO^-$
Hipoklorik asit	$HOCl$

Hücrede normal metabolik yollardaki enzimatik reaksiyonlarda ara ürünler olarak devamlı şekilde serbest radikaller oluşabilir. Oluşan radikallerin oksijenli formlarına ise reaktif oksijen türleri (ROT) adı verilmektedir (9)

Serbest radikallerin üretildiği bir takım kaynaklar vardır ve bunların en önemlisi oksijenin suya kadar indirgendiği mitokondrilerdir. Bu sırada süperoksit ($O_2^{\cdot-}$) ve hidroksil radikali ($\cdot OH$) gibi kısa ömürlü moleküller üretilir. $O_2^{\cdot-}$ ve $\cdot OH$ radikallerinin her ikisi de en dıştaki yörüngelerinde paylaşılmamış bir elektron içeren yüksek derecede reaktif oksidanlardır. H_2O_2 de hücrelere karşı toksik olup $\cdot OH$ radikalini oluşturmasıyla serbest radikal üretimine neden olmaktadır. (10).

Serbest radikallerin biyolojik ve intrasellüler kaynakları vardır: Biyolojik kaynakları; aktive olmuş fagositler, antineoplastik ajanlar, radyasyon, alışkanlık yapan maddeler, çevresel ajanlar ve stres, intrasellüler kaynaklar ise; küçük moleküllerin otooksidasyonu, enzimler ve proteinler, mitokondrial elektron transport

sistemleri, peroksizomlar, plazma membranları ve oksidatif stres yapıcı durumlardır (ör: travma, iskemi) (11)

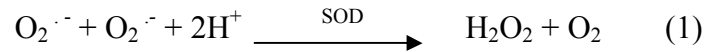
2.1.1. Süperoksit Anyon Radikali

Canlılarda oluşan ilk ve temel oksijen radikali süperoksit anyon radikalidir (Süperoksit Anyon radikali, $O_2^{\cdot-}$). Başlıca şu mekanizmalarla üretilmektedir:

a) İndirgeyici özellikteki biyomoleküler oksijene tek elektron verip kendileri oksitlenirken süperoksit radikali oluşur. Hidrokinonlar, flavonlar, tiyoller, ferrodoksinler, indirgenmiş nükleotidler gibi yüzlerce biyolojik molekül aerobik ortamda oksitlenirken süperoksit yapımına neden olurlar.

b) Başta çeşitli dehidrogenazlar ve oksidazlar olmak üzere, yüzlerce enzimin katalitik etkisi sırasında süperoksit radikali bir yan ürün olarak oluşabilir (12).

Süperoksit anyon radikali peroksite dönüşebilir, protonlanabilir ve hidrojen peroksit formu aşağıda şekilde gösterilebilir (8).



2.1.2. Hidrojen Peroksit

Moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden iki elektron alması veya süperoksidin bir elektron alması sonucu peroksit meydana gelir. Peroksit molekülü de iki hidrojen atomu ile birleşerek hidrojen peroksidi (H_2O_2) oluşturur (13).

H_2O_2 membranlardan geçebilen uzun ömürlü oksidandır. Kendisi bir serbest radikal olmadığı halde, reaktif oksijen türleri içine girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli bir rol oynar. Geçiş metal iyonları varlığında daha da hızla gerçekleşen bir reaksiyonla süperoksit anyon radikali ile birlikte en reaktif radikal olan hidroksil radikalini oluşturur (14).

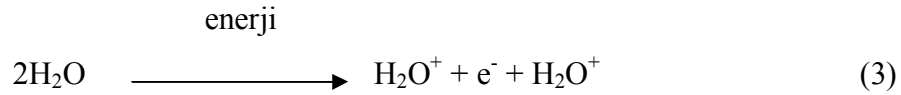


Süperoksit anyon radikalinin lipid çözünürlüğü sınırlı olduğu halde hidrojen peroksidin lipid çözünürlüğü yüksektir. Bu nedenle hidrojen peroksit olduğu yerden uzakta olan fakat Fe^{2+} içeren membranlar da hasar oluşturabilir. (15).

2.1.3. Hidroksil Radikali

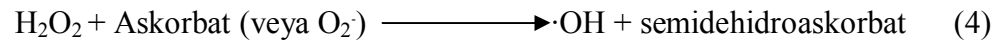
Biyolojik ve kimyasal sistemlerde üretilebilen hidroksil radikali ($\cdot OH$) canlılarda iki mekanizma ile oluşabilir:

- a) İyonlaştırıcı radyasyonun etkisiyle sulu ortamda su moleküllerinin iyonlaşması gerçekleşir:



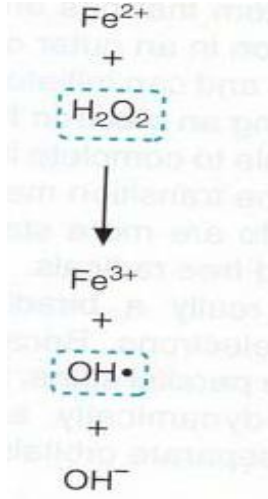
Uyarılmış su molekülü (H_2O^+) homolitik yıkım ile; H_2O^+ bir su molekülü ile tepkimeye girerek başlıca reaktif radikal olarak hidroksil radikallerini oluştururlar. Bu tepkimeler femtosaniye içinde gerçekleşir ve üretilen $\cdot OH$, radyasyonun canlılardaki toksik etkisinden sorumlu başlıca kimyasal türdür (16).

b) Hidrojen peroksidin eksik indirgenmesi ile $\cdot OH$ yapımı, vücutta bu radikalın en önemli kaynağıdır. Hidrojen peroksidin iki elektron ile indirgenmesiyle su oluşurken, tek elektron ile indirgenmesi $\cdot OH$ yapımına neden olur, bu tür indirgenme Fe, Cu gibi metal iyonları tarafından katalizlenir. Askorbik asit, süperoksit gibi indirgeyici bileşiklerin de bulunduğu ortamda oksitlenen metal iyonu tekrar indirgendiğinden hidrojen peroksit den $\cdot OH$ yapımı sürekli bir duruma gelir (10).

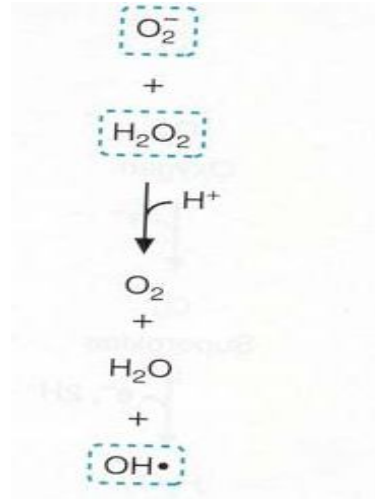


Suyun yüksek enerjili iyonize radyasyona maruz kalması sonucunda oluşan hidroksil radikalının yarılanma ömrü çok kısadır. Oluştugu yerde büyük hasara sebep olur. (14)

En reaktif ve toksik etkili radikal olan hidroksil radikali ($\cdot OH$) Haber-Weiss tepkimesi ile oluşmaktadır. Metallerin varlığında ise aynı tepkime geçiş metalleri aracılığıyla (Fenton tepkimesi) gerçekleştirilmektedir (9).



Fenton reaksiyonu

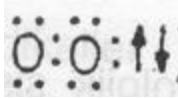
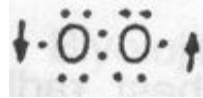


Haber-Weiss reaksiyonu

Şekil 2.1. Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları

2.1.4. Singlet Oksijen

Singlet oksijen, ortaklanmamış elektronu olmadığı için radikal değildir. Serbest radikal reaksiyonları sonucu meydana geldiği gibi, radikal reaksiyonların başlamasına da sebep olur. Yarılanma ömrü kısadır. Singlet oksijen, oksijen molekülünün daha reaktif bir türü olup, moleküler oksijenin enerji alması ile oluşur. Delta ve sigma olmak üzere iki tipi vardır. Sigma formunun enerjisi çok yüksektir ve hızla delta formuna dönüşür. Singlet oksijenin uyarılmış elektronlarının daha düşük enerji seviyesine inmesi, ışık yayılımına yol açar (17).

Delta O₂Sigma O₂

Şekil 2.2. Singlet oksijenin Delta ve Sigma formları

2.1.5. Nitrik Oksit

Otokrin ve parakrin bir hücrel ajan olan NO, normal fizyolojik koşullar ile birçok patofizyolojik durumda homeostazın sürdürülmesinde önemli bir etkidir.

Memelilerde nitrik oksidin varlığı ilk kez 1916 yılında gösterilmiş, 1985’de aktive olmuş makrofajların NO saldığı bulunmuştur.(18).

Bir serbest radikal olan NO birçok biyolojik sistemde, süperoksit gibi hücre içi içerikle reaktive olmasına bağılı olarak kısa yarılanma ömrüne sahiptir. NO ve süperoksit arasındaki reaksiyon, oldukça sitotoksik olan peroksinitrit anyon oluşumuna yol açar (19). Asetilkolin, bradikinin, glutamat, adenosin difosfat (ADP) gibi fizyolojik uyarılar endotel hücrelerinde nitrik oksit sentetazı (NOS) aktifleştirirler. Kalsiyum- Kalmoduleline bağımlı olan bu enzim aktifleşince L-Arjinin ve oksijenin reaksiyona girerek L-Sitrullin ve NO ‘e dönüşünü sağlar. NOS enzimini yarışmalı inhibe eden L-Arginin analoglarının bulunması ve çalışmalarda kullanılması sayesinde NO’ nun biyolojik rolünü araştırmaya imkân bulunmuştur. Bu reaksiyon sonucu oluşan NO damar düz kası hücrelerine difüze olur ve guanilat siklaz enziminin hem grubuna bağlanarak enzimi aktif hale getirir. Aktifleşen guanilat siklaz enzimi guanozin trifosfatı siklik guanozin monofosfata (cGMP) dönüştürür. cGMP ‘da kas gevşemesine neden olur (20).

2.1.6. Hipoklorik Asit

Canlı sistemde güçlü oksidan kaynaklarından birisi de, hidrojen peroksit tarafından klorid iyonlarının oksidasyonu yoluyla hipoklorik asit üretimini katalizleyen “Nötrofilik miyeloperoksidaz” enzimidir. Bu reaksiyonun toksisitesi savunma sisteminde bakterilerin öldürülmesine katkıda bulunur. Buna karşılık, oluşan hipoklorik asit aynı zamanda α 1-antiproteinaz’ı inaktive etmekte ve sağlıklı insan dokusunu zarara uğratarak inflamasyona neden olmaktadır (21).

2.2. Antioksidan Savunma Sistemleri

Antioksidanlar, hem direkt hem de dolaylı olarak serbest radikal reaksiyonlarının istenmeyen etkilerine karşı hücreleri koruyan maddelerdir (22).

Antioksidanlar endojen ve eksojen kaynaklı olmak üzere iki gruba ayrılabilirdiği gibi serbest radikalın oluşumunu önleyenler ve mevcut olanı etkisiz hale getirenler şeklinde de ikiye ayrılabilirler (23).

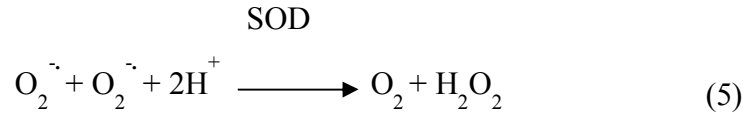
2.2.1. Enzimatik Antioksidan Savunma Sistemi

2.2.1.1. Süperoksid dismutaz (SOD)

Aerobik tüm hücreler SOD içerirler. Hem sitozol hem de mitokondriler de farklı izoformlarda bulunan bu enzim süperoksit radikallerini dismute ederek, hücreleri süperoksit radikalının zararlı etkilerinden korur (24).

İnsanda süperoksit dismutazın iki izomer tipi bulunmaktadır. Cu,Zn-SOD sitozolde bulunur, Cu ve Zn içerir, dimerik yapıdadır, siyanidle inhibe edilir. Mn-SOD mitokondride bulunur, Mn içerir, tetramerik yapıdadır, siyanidle inhibe olmaz. Genel olarak hücrede en bol bulunan izomer sitozolik Cu-Zn SOD'dır. Fe-SOD ise sadece prokaryotlarda bulunan SOD izoformudur (15).

Metalloprotein olan SOD bir süperoksit molekülünü moleküler O₂ molekülüne yükseltgeyip, diğer süperoksit molekülünü H₂O₂'e indirger.



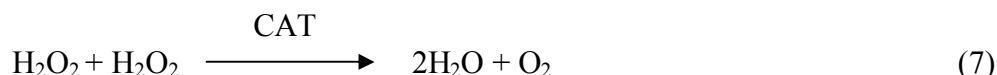
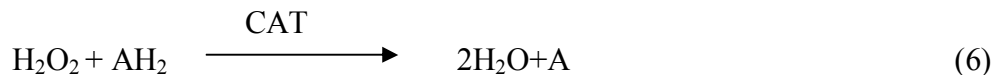
Bu dismutasyon reaksiyonu süperoksit radikalının anyon ve kation formlarının eşit oranda bulunduğu pH 4,8 de kendiliğinden de meydana gelir. Ancak fizyolojik şartlarda yani pH'nın 7,35- 7,45 arasında iken bu reaksiyon çok daha yavaş oluşmaktadır. SOD enzimi varlığında pH 7,4'te reaksiyon son derece hızlı gerçekleşir (25).

2.2.1.2. Katalaz (CAT)

Katalaz, hidrojen peroksitin detoksifikasyonundan sorumlu, karakteristik bir antioksidan enzimdir (26). Bir metalloenzim olarak bilinen katalaz enzimi redoks reaksiyonunu teşvik eden en etkili protein katalistlerinden birisidir (18).

CAT, tetramerik yapıya sahip molekül ağırlığı 240.000 olan aktif merkezinde 4 tane "ferrihem" içeren bir hemoproteindir. CAT somatik bir oksidan koruyucudur. (27).

H₂O₂'nin suya dönüşümünü sağlayan katalazın etkisi çoğu dokuda peroksizomlarla sınırlıdır (28).



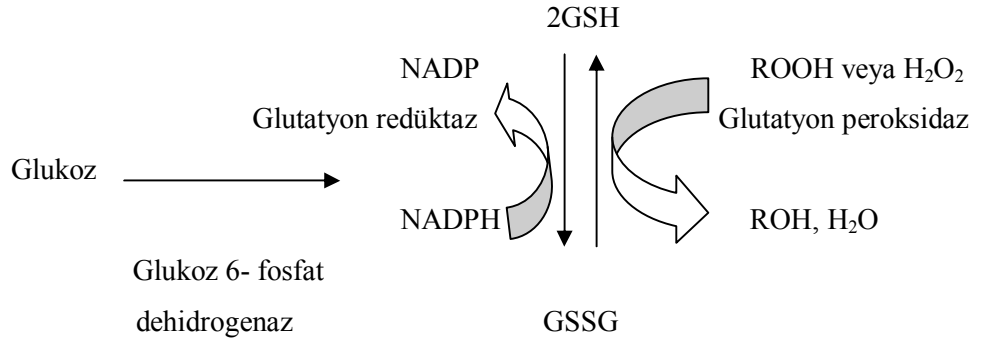
Enzim aktivitesi farklı dokularda değişkenlik gösterir. Karaciğer, böbrekler ve kırmızı kan hücrelerinde daha yüksek seviyede bulunur. Hepatositlerde peroksizomlarda yüksek katalaz aktivitesi görülmekle birlikte mikrozoimler ve sitozolde de enzim aktivitesi görülmektedir (29).

2.2.1.3. Glutasyon redüktaz (GR) ve glutasyon peroksidaz (GPx)

GPx bol bulunan bir selenoproteindir ve majör intrasellüler peroksid-süpürücü fonksiyonları olan bir enzimdir. GPx, yapısında bir metal olan selenyumu bulundurduğu için metalloenzim grubunda değerlendirilir. Bu enzim, redükte glutasyonun okside glutatyona çevrildiği reaksiyonda hidrojen peroksidi ve diğer organik peroksitleri yüksek spesifite ile detoksifiye etmektedir (30).

Glutasyon redüktaz, okside glutasyonun yüksek oranda redükte edilmesinden sorumlu kritik bir flavoproteindir (31). Flavin nükleotitlere bağımlı bir enzim olan GR, pentoz fosfat yolundan elde edilen NADPH varlığında, glutasyon disülfiti tekrar redükte glutatyona (GSH) çevirir (32).





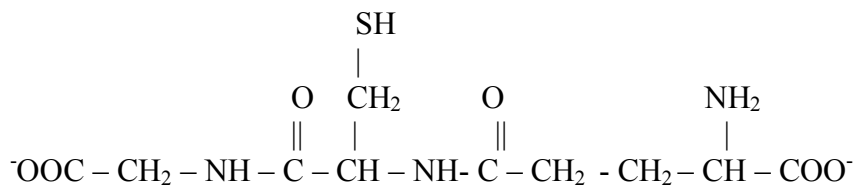
Şekil 2.3. Glutatyon peroksidaz ve Glutatyon redüktaz

2.2.2. Enzimatik Olmayan Antioksidan Savunma Sistemi

2.2.2.1. Glutatyon (GSH)

Glutatyon (GSH), hemen hemen her hücrede sitozolde öncül aminoasitleri olan sistein, glisin ve glutamattan sentezlenir. Glutatyon sentezi 2 enzim ile gerçekleşir. Gamaglutamil sistein sentetaz sentezin ilk basamağını katalizler. İkinci basamak ise glutatyon sentetaz ile gama glutamilsisteinilglisin (Glutatyon, GSH) oluşumudur (33).

Glutatyon redükte halde (GSH) ve disülfid/okside formda(GSSG) olmak üzere iki şekilde bulunur.(GSH formu daha fazla halde bulunur) (7).



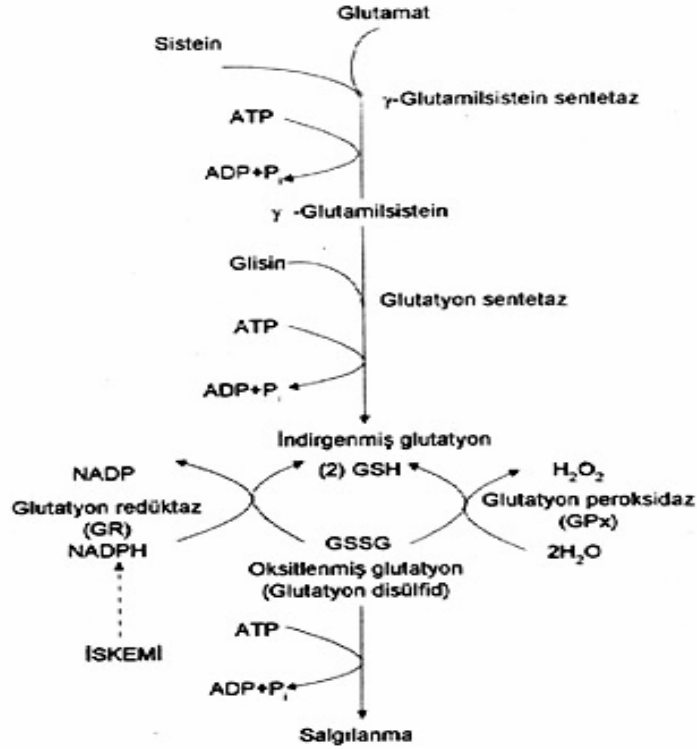
Şekil 2.4. Redükte glutatyon (GSH)

Glutamat- Sistein- Glisin



S
Glutamat- Sistein-Glisin

Şekil 2.5. Okside glutayon (GSSG)



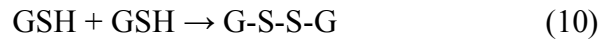
Şekil 2.6. Glutatyon Sentezi ve döngüsü

Hücre içi antioksidan sistemin en önemli bileşeni olan glutatyon (GSH), indirgenmiş durumdaki $-SH$ grupları aracılığı ile hücreyi serbest radikallere karşı korur. Bu işlem sırasında oksitlenen GSH, glutatyon redüktaz tarafından rejenere edilir (34).

Glutatyon;

- a) Proteinlerin sülfidril gruplarını indirgenmiş formda tutar.
- b) Protein disülfid redüktaz enzimi, glutatyon ve proteinler arasındaki sülfidril /disülfid değişimlerini katalizler.
- c) Hücre membranından aminoasit transportunu sağlar.
- d) Bazı enzimatik reaksiyonlar için kofaktördür.

- e) Glutatyonun sülfidril grubu, oksijen transportu sırasında oluşan peroksitlerin indirgenmesinde kullanılır.
- f) Glutatyon, peroksidaz tarafından katalizlenen reaksiyonda toksik potansiyeli olan hidrojen peroksidin dekompozisyonuna katılır.
- g) Enzimlerin çok önemli grupları olan -SH gruplarının redüklenmiş durumda kalmalarına yardım eden önemli bir intraselüler redüktördür. GSH redükleyici bir ajan olarak etkili olduğundan -SH grubu okside olur ve glutatyonun diğer bir molekülü ile aşağıdaki formülde görüldüğü gibi bir disülfit köprüsü oluşturur (35).



2.2.2.2. Diğer Enzimatik Olmayan Antioksidan Savunma Sistemleri

Bilirubin: Süperoksit ve hidroksil radikali toplayıcısıdır (35).

E vitamini: Antioksidan aktivitesi en yüksek olan tokoferol dialfa-tokoferoldür. İnsanlarda E vitamini plazma ve eritrositlerde bulunan yağda eriyen ve zincir kıran tek antioksidandır (35).

C Vitamini: Suda eriyen bir vitamin olan askorbat bir karbonhidrat türevidir. Zincir kıran bir antioksidan olan askorbat E vitamininden daha yavaş olarak peroksil radikallerini ortadan kaldırabilir (36).

Sistein: Süperoksit ve hidroksil radikali toplayıcısıdır (35).

Oksipürinol: Allopürinolün metabolitidir, doğrudan hidroksil radikali ve hipokloriti azaltıcı yönde etki eder (36).

Ebselen: Selenyumlu bir bileşiktir; GPx aktivitesini güçlendirir ve lipoksijenaz yolunu inhibe eder (35).

A vitamini: A vitaminin ön maddesi aktivitesine sahip olan karotenoidlerin damar sertliğini önlemesi, serbest radikalleri tutması, LDL'yi oksidasyona (*in vitro* şartlarda), DNA'yı kansere ve peroksidasyona karşı koruması, bağışıklık sistemine olumlu etkisi ve tümör önleme gibi çeşitli fonksiyonları vardır.(37).

2.3. Oksidatif Stresin Biyomoleküllere Etkisi

Serbest radikal oluşumu antioksidan kapasiteyi aşarsa, ortaya oksidatif stres çıkar. Oksidatif stres kanserden AIDS' e kadar birçok hastalığın patogenezinde yer alır (38).

Organizmada serbest oksijen radikallerinin oluşturduğu reaksiyonlar radikalın bir diğer radikalle veya radikal olmayan biyomoleküller ile etkileşmesi sonucu oluşur. Böylece serbest radikallerin neden olduğu ve oksidatif hasar olarak adlandırılan sürecin ilk basamağı gerçekleşmiş olur. ROT' ların biyomoleküller üzerindeki major etkileri;

1. D N A hasarı
2. Proteinlerin yıkımı ve enzim aktivitelerinde değişiklikler
3. Hücre ve hücre altı organellerin membran lipitlerinin oksidasyonu
4. Karbonhidratların oksidasyonu (36) şeklinde sıralanabilir.

Serbest radikaller vücutta önemli moleküllere zarar veren bir seri reaksiyonu başlatabilir, ve sonuçta hücre ölümüne neden olabilirler (39)

2.3.1. Nükleik Asitlere Etkisi

OH[•] radikalının DNA molekülünün bütün bileşenleri ile reaksiyona girdiği bilinmektedir, deoksiriboz iskeletinin yanı sıra hem pürin hem de pirimidin bazlarına zarar verir (40).

Bu zararlı etkiler, DNA'da kalıtsal değişikliklerle sonuçlanan mutasyonlara neden olur, somatik hücrelerde kanser oluşumu veya bakteri hücrelerinde fõtal malformasyonla sonuçlanır (41).

Guanin, DNA bileşenleri içerisinde en düşük iyonizasyon potansiyeline sahip olan ve oksidasyona en yatkın olan bazdır (McDorman ve ark., 2005). Modifiye bir baz olan 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin, reaktif oksijen türlerinin DNA'da yaptığı 20'den fazla oksidatif baz hasar ürününden biri olup guaninin 8. karbon atomuna hidroksil radikali atakları sonucu oluşan, oksidatif DNA hasarının duyarlı bir göstergesidir (42).

8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG), ROT'un DNA'da yaptığı yaklaşık 23 tane oksidatif baz hasar ürününden en sık karşılaşılan ve mutajenitesi en iyi

bilinendir. Diğer DNA baz hasar ürünlerinin ise daha az mutajenik oldukları ileri sürülmektedir (43).

Reaktif oksijen türevleri, DNA çift sarmalının ayrılmasına veya nükleik asit baz değişimlerine neden olabilir. Hatalı onarım ya da onarımın sağlanamaması DNA kırıkları, baz kaybı, yer değiştirme ve asentrik veya disentrik kromozomların meydana gelmesi, ayrıca kromozomal kırık ve antienflamatuvar parça oluşumu, hızlı çoğalan hücrelerde mikronükleus artığı olarak gözlenir. Sonuçta bu süreç gen düzeyinde ciddi mutasyonlar ve sitotoksosite ile sonuçlanır (44). ROT'ların yaptığı baz hasarları;

O ₂ , ROO:	Guanin oksidasyonu
OH:	Dört bazda görülen değişimlerin çoğu
O ₂ , H ₂ O ₂ :	Baz değişimi yok
ONOO:	Ksantin, hipoksantin, 8-nitroguanin

2.3.2. Lipidlere Etkisi

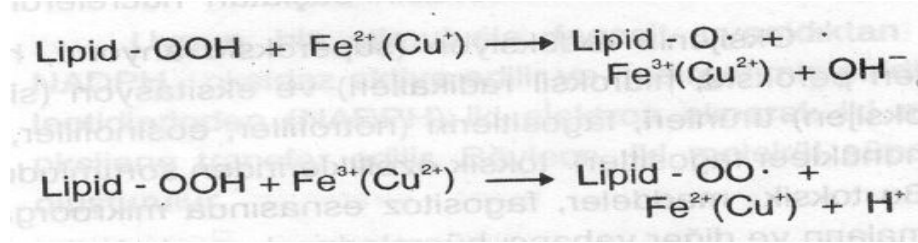
Lipidler ROT'ların bir kısmı ile okside olur, klorlanır ve nitratlanır. Nitratlanmış ve klorlanmış lipidlerin ölçülmesi için yeni teknikler geliştirilmiştir ve nitrat linoleat insan kan plazma ve doku örneklerinde belirlenmiştir (45).

Serbest radikallere bağlı doku hasarı oluşumunda en önemli mekanizma, hücre zarındaki lipidlerin peroksidasyona uğramasıdır. Oksidanlar, çoklu doymamış yağ asitleriyle reaksiyona girerek lipid peroksidasyonunu başlatırlar (46).

Doymamış yağ asitlerinin havanın moleküler oksijeni (O₂) ile oksitlenmeleri genel olarak çok karışıktır; çift bağlara O₂ girmesiyle peroksit, enodiol, epoksit, ketohidroksit gibi çeşitli gruplar ortaya çıkar. Ortaya çıkan grupların özellikle yüksek ısı derecelerinde parçalanmaları ile çoğunlukla asit ve aldehitlerden oluşan çok çeşitli ürünler meydana gelir (47).

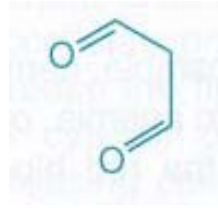
Serbest radikal etkisi ile yağ asidi zincirinden hidrojen atomunun uzaklaşması,

bu yağ asidi zincirinin radikal niteliği kazanmasına neden olmaktadır. Oluşan lipid radikali (L^{\cdot}) dayanıksız bir bileşik olup, bir dizi değişikliğe uğramaktadır (48).



Şekil 2.7. Serbest Radikallerin Lipidler Üzerine Etkisi (11)

Malondialdehit (MDA), non-enzimatik oksidatif lipid peroksitlerinin parçalanması sonucu oluşan toksik etkili son ürünlerden birisidir. İki'den fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin otooksidasyonunda veya eikozanoid sentezinde serbestleşen siklik endoperoksitler MDA'nın asıl kaynağını oluşturmaktadır (49).



Şekil 2.8. Malondialdehit (MDA)

Plazma MDA konsantrasyonu enzimatik olmayan oksidatif lipid peroksidlerin parçalanması sonucu oluşmaktadır. MDA proteinlerin amino gruplarına, fosfolipidler veya nükleik asitlere bağlanarak toksik etkilerini gösterir. Oksidatif stresin arttığı durumlarda doku MDA düzeyi de artmaktadır (50). MDA, DNA bünyesindeki bazlarla reaksiyona girerek mutajenik bir karakter kazanmasına neden olmaktadır (51).

2.3.3. Proteinlere Etkisi

Hücrenin protein yapıları, serbest radikallerin özellikle duyarlı aminoasitler ile doğrudan etkileşimi sonucunda hasara uğramaktadır. Metionin, sistein gibi terminal sülfidril grubu bulunduran aminoasitler ile triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin gibi aromatik aminoasitler ve prolin oksidasyona en fazla maruz kalan aminoasitlerdir (52).

Reaktif türler ya peptit bağları ile yada aminoasit yan zincirleri ile reaksiyona girer. Bu reaksiyonlar, redoks reaksiyonlarına giren demir ve bakır gibi metal kasyonlardan etkilenir. Oksidatif modifikasyona uğramış proteinler ya düşük molekül ağırlıklı ürünlere ayrılır yada çapraz bağlı yüksek molekül ağırlıklı ürünleri oluşturur (53).

Protein oksidasyonunun saptanmasında HPLC, ELISA, izotop dilüsyon gaz kromatografisi-kütle spektrofotometrisi, Western blot ve spektrofotometri teknikleri kullanılmaktadır (54).

2.4. Oksidatif Stres ve Kanser

Kanser, hücrelerin aşırı ve zamansız çoğalmalarına, immün sistemin gözetiminden kaçmalarına ve sonuç olarak uzaktaki dokuları da istila ederek metastazlar oluşturmalarına yol açan çok basamaklı bir süreçtir (55).

Karsinojenlerin iyonize radyasyon, ultraviyole ışınları, kimyasallar ve virüsleri içerdiği bilinmektedir (56).

Oksidatif stresin biyolojik fonksiyonları ve kanser gelişimi ve ilerlemesindeki rolü son birkaç on yıldır araştırılmaktadır. Kanser oksidatif stres ile ilişkili olduğu, tümör dokularında özellikle ROT'ların düzeyinin anlamlı bir şekilde yükseldiği ve GP_x, CAT ve SOD gibi antioksidan enzimlerin aktivitelerinin anlamlı bir şekilde azaldığı yapılan çalışmalarda rapor edilmiştir (57).

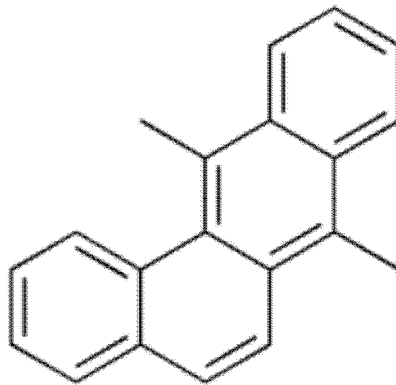
Son yıllarda artan bulgular, aerobik metabolizmalarda ROT'un pek çok sinyal iletim yolağını, hücre proliferasyonunu, hücre ölümünü (apoptoz veya nekroz), gen ekspresyonunu ve mitojen-aktif-protein-kinazlar (MAPK) gibi pek çok hücre sinyal iletim kaskadını ikincil haberciler gibi davranarak etkileyebildiklerini ortaya koymaktadır (58).

Hidroksil radikali bilinen en reaktif radikaldır ve tüm biyomoleküller ile etkileşime girebilmektedir. Yapılan çalışmaların sonuçları göstermiştir ki, DNA sarmalında yer alan dört bazda da hidroksilasyon meydana gelmektedir (59). Bu şekilde oksidanlara maruziyet sonucunda DNA, malign transformasyona uğrayarak kazandığı potansiyeli, mutasyonlarla birlikte kolon, pankreas ve akciğer kanserleri gibi ağır klinik tablolara dönüşebilir (59).

2.5. 7,12-DMBA (7,12 dimetilbenz[a]antrasen)

Polisiklik aromatik hidrokarbonların (PAH) ilk olarak 1921 yılında kanserojen maddeler oldukları tespit edilmiştir. Bu maddelerin özellikle karsinogenezin başlangıç aşaması ile ilgili role sahip olduğu üzerinde durulmuştur (60).

PAH'lar değişik dokularda ve hayvan türlerinde tümör meydana getirebilmektedirler. Bu etkilerini immün sistemin aktivitelerinin inhibe ederek, immün sistemi baskılayarak, immünotoksik etki göstererek ve serbest radikalleri oluşturarak da yapabilmektedirler (61).



Şekil 2.9. DMBA (7,12 dimetilbenz[a]antrasen)

7,12- dimetilbenz[a]antrasen (DMBA) kanserojen bir madde olup, deneysel meme tümörleri oluşumu ve deri kanseri çalışmalarında kullanılmaktadır (62).

İndirek etkili bir karsinojen olarak, DMBA'nın sitokrom p450 enzim sistemi tarafından metabolize edilerek diol epoksit ve artmış intrasellüler oksidasyona neden olduğu bilinen diğer reaktif oksijen türlerine dönüşümünü gerektirmektedir (63).

DMBA gibi maddeler, DNA'nın yapısını bozarak ve lipit peroksidasyonuna neden olarak, hücrede hidroksil ve süperoksit anyon radikalleri gibi radikallerin oluşmasına neden olur (64).

2.6. Sarımsak

Sarımsak belki de tıbbi potansiyelinden dolayı tıbbi literatürde en yaygın olarak adı geçen bitkidir. Bilinen en eski tıbbi kayıtlarda, Mısır Papiruslarında, sarımsağın tıbbi kullanımından bahsedilmektedir (65).

Antik çağlardan beri, sarımsak ve diğer Allium türlerinin sağlıkla ilişkili olduğundan bahsedilir. Sarımsağın diğer özellikleri arasında, kanseri önleme, antimikrobiyal, antibiyotik, antihipertansif, hipoglisemik ve kolesterol düşürücü özellikleri belirtilmiştir (66).

Sarımsak, biyolojik aktivitesinin çoğunu oluşturan ve karakteristik tat ve kokusunu veren, değerli organosülfür bileşenleri içerir (67).

Bozulmamış sarımsak soğanında meydana gelen en önemli ilk sülfür bileşeni allindir. Soğanlar daha az miktarda ayrıca γ -glutamil-S-allilsistein (GSAC), S-metilsistein sülfoksit (methin), S-trans-1-propenilsistein sülfoksit, S-2-karboksipropilglutasyon ve S-allilsistein içerir (68).

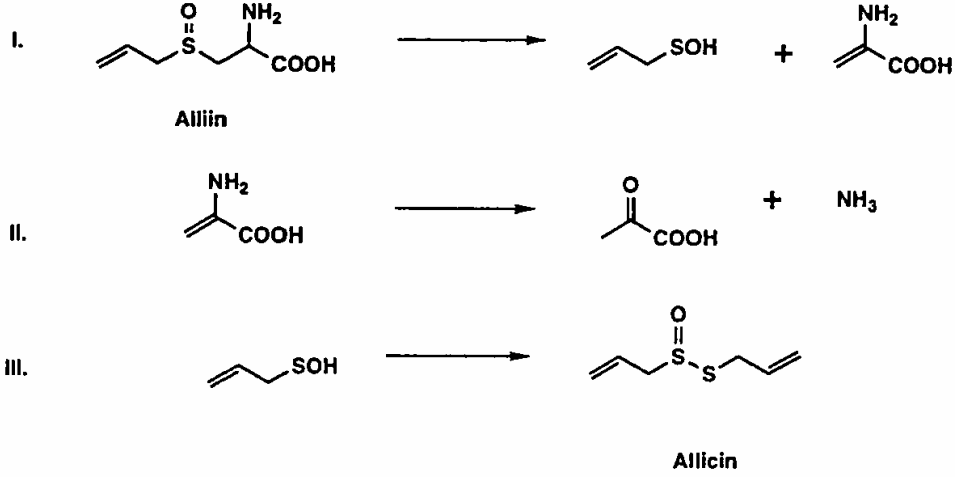
Sarımsak soğanı parçalandığında, doğrandığında veya başka türlü mekanik uygulamalar yapıldığı zaman, alliin kompartımanlardan salgılanır ve vakuollerdeki alliaz enzimiyle etkileşir ve alliaz aktivitesi sonucu allinden antikarsinojenik etkili allicin oluşur (69).

2.6.1. Sarımsak Bileşenleri

2.6.1.1. Allicin

Allicin sarımsaktaki antibakteriyel bileşen olarak bilinir, sarımsağın karakteristik kokusunu verir. Ratlarda, serum ve karaciğerde kolesterol düzeyini düşürdüğü belirtilmiştir (70).

Allicinin antioksidan özellikleri, sarımsak ve çiğ sarımsağın sulu ekstratlarının temel bileşeni, çiğ sarımsak ve sarımsak ekstratlarının reaktif oksijen türlerinin süpürücü etkisi ile açıklanabilir (71).



Şekil 2.10. Allinaz ile allinin alicine dönüşmesi

2.6.1.2. Yağda Çözünabilen Organosülfür Bileşenleri

Allicin kolaylıkla yağda çözünabilen polisülfidlere dönüşebilir, çoğunlukla diallil disülfid (DADS), ayrıca diallil sülfide (DAS), diallil trisülfid (DATS) ve diallil tetra sülfide dönüşür. Yağda çözünabilen organosülfür bileşenleri antioksidan etki gösterirler (72).

2.6.1.3. Suda Çözünabilen Organosülfür Bileşenleri

Alkollü ve sulu sarımsak ekstratları aslında γ -glutamil-S-l-allil-sisteinden türeyen S-allil-L-sistein içerir. S-allil-L-sistein ve trans-S-l-propenil-L-sistein her ikisinde S-metil-L-sisteinle birlikte küçük miktarlarda sarımsak ekstratında bulunur. Bu sistein türevleri kristalize, kokusuz ve katı formda stabildirler (73).

Bekletilmiş sarımsak (AGE) ayrıca fenolik bileşikler içerir, özellikle allixin, N-fruktosil glutamat, N-fruktosil arginin ve selenyum, organosülfür bileşenleri gibi. Bu bileşikler fenolik grupları üzerinden antioksidan etki gösterirler (74).

2.6.2. Sarımsak ve Preparatlarının Metabolizması

Sarımsağın kimyası ve biyolojisi üzerine yapılan çalışmalar çok geniş bir bileşen yelpazesine sahip olduğunu ortaya koymasına rağmen, sarımsak alımı sonrasında ortaya çıkan metabolitleri üzerine çok az araştırma vardır (75).

Minami ve arkadaşlarının (76) yaptığı GS-MS çalışmaları göstermiştir ki, insanlarda sarımsak alımı sonrası alil merkaptan ve DADS öncelikle oluşmakta ve bu metabolitler nefesle atılarak nefeste sarımsak kokusunun görülmesine neden olmaktadır. Bir diğer çalışmada, Rosen ve arkadaşları (77) allil metil sülfatın (AMS) sarımsak alımı sonrası kokulu havanın ana uçuğu metaboliti olarak ölçmüşler, DAS ve DADS düzeylerini ise daha az miktarlarda belirlemişlerdir (78).

Sarımsak yağının kimyasal analizi total sülfidrillerin %54.5 nin diallil monosülfid, diallil disülfid ve diallil trisülfidten oluştuğunu göstermektedir. Öte yandan pek çok çalışmada DAS ve DADS'nin antimikrobiale etkisi üzerinde durulmaktadır (79).

2.6.3. Sarımsağın Antitümör ve Sitotoksik Etkileri

Birkaç epidemiyolojik çalışma açıklamıştır ki, sarımsak tüketimi ölümcül bazı malign hastalıkların azalmasında önemli rol oynamaktadır (80).

Allicin, AGE deki önemli flavonoidlerden biridir ve LDL'nin oksidatif modifikasyonunu ve tümör ilerlemesini, aflotoksinin indüklediği DNA hasarını ve *Salmonella typhimurium* mutajenitesini önlemektedir. Ayrıca indüklenmiş sitokrom P₄₅₀ aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir (81).

Sarımsağın kanser önleyici birkaç mekanizma ile açıklanabilir ve diğer *Allium* türlerinin organsülfür bileşenleri ile ilgilidir. Mutagenesizin inhibisyonu, enzim aktivitesinin modülasyonu, DNA bileşenlerinin oluşum inhibisyonu, serbest

radikallerin süpürülmesi, hücre proliferasyonuna etkisi ve tümör gelişimini içerir (82).

Yağda çözünen organosülfür bileşenleri hayvan modellerinde bazı kimyasal karsinojenler ile indüklenen kanserin baskılanmasında yüksek etkiye sahiptir. Örneğin; fare ön midesinde benzopren ile indüklenen karsinogenezis DAS ve DATS tarafından anlamlı şekilde inhibe edilmiştir (83).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanları ve Sarımsak Uygulamaları

3.1.1. Deney Hayvanları

Bu çalışma, İnönü Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Laboratuvarı'nda, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurulu tarafından alınan izinle önerilen kurallara uygun olarak gerçekleştirildi. Ortalama 200-250 gram ağırlığında dişi Wistar albino sıçanlar, deneysel çalışmaya alınmak üzere temin edilerek üçerli gruplar halinde kafeslere yerleştirildi. Deney hayvanlarının 2 hafta laboratuvar koşullarına uyumları sağlandı ve tüm uygulamalar süresince ad libitum standart sıçan yemi ve musluk suyu ile beslendi. İki haftanın sonunda deneysel uygulamalara başlandı.

Çalışmada kullanılan 50 adet deney hayvanı, 10 hayvan içerecek şekilde 5 deney grubuna; 1.Grup Kontrol, 2.Grup DMBA, 3.Grup DMBA+Taze Sarımsak Ekstraktı, 4.Grup DMBA+Bekletilmiş Sarımsak Ekstraktı, 5.Grup DMBA+Sarımsak Tablet Ekstraktı, ayrıldı.

3.1.2. Sarımsak Uygulamaları

Bütün sarımsak uygulamaları ratlara birer gün arayla gerçekleştirildi. 7,12-DMBA uygulamasının 2 hafta öncesinde ve sonrasında ratlara sarımsak ekstraktı verildi. Taze sarımsak ekstraktı uygulamanın hemen öncesinde hazırlandı. Uygulama dozu 100 mg/mL olacak şekilde tartılıp, havanda ezildikten sonra gerekli hacimde su ile homojenize edilen sarımsak örneği santrifüj edildikten sonra süpernatandan 1 mL ratlara gavaj yoluyla verildi. Bekletilmiş sarımsak ekstraktı 100 mg/mL konsantrasyona uygun şekilde, tartılıp havanda ezilen sarımsağa su eklendikten sonra renkli şişe içinde +4 °C' de 6 ay bekletildi. Uygulama öncesinde ekstrakt santrifüj edilip süpernatantın 1 mL' si ratlara gavaj ile verildi. Sarımsak tablet ekstraktının içeriği ve uygulama dozu göz önüne alınarak havanda ezilip suda çözülen tablet örnekleri santrifüj edildikten sonra süpernatant alınarak ratlara gavaj ile 1 mL verildi.

3.1.3. 7,12-DMBA Uygulaması

Kontrol dışındaki gruplara, 20 mg/kg vücut ağırlığı dozunda 7,12-DMBA, mısırözü yağı içinde çözülerek tek seferde, intraperitoneal olarak 0,5 mL hacim içinde enjekte edildi.

3.1.4. Ötenazi ve Karaciğerin Alınması

Ötenaziden önce ratlara 50 mg/kg doz propofol (Propofol, Abbott Laboratuvarı Anonim Şirketi, İstanbul, Türkiye) kullanılarak intraperitoneal uygulama ile anestezi yapıldı. Ötenazi, % 0.9' luk sodyum klorür ile transkardiyak perfüzyon uygulanarak yapıldı. Biyokimyasal analizlerde kullanılmak üzere çıkarılan karaciğer, kuru buz bulunan bir kap ile muhafaza edilerek laboratuvara getirildi.

3.1.5. Biyokimyasal Analizlere Hazırlık

İki kısma ayrılan karaciğer dokularından ilki cam tüp konulduktan sonra, dokuların üzerine soğuk 1 mL fosfat tamponu (50mM, pH 7.4) eklendi. Daha sonra dokuların soğukluğu muhafaza edilerek Ultra-Turrax T25 (IKA Werke GmbH, Staufen, Almanya) homojenizatöründe 6000 dev/dak hızla 5 dakika süreyle homojenize edildi. Elde edilen homojenatlar vortekslendikten sonra eppendorf tüplerine aktarıldı.

Homojenatların 15 dakika süreyle 13500 g'de 4 C° de soğutmalı santrifüjde (Centrifuge 5415R, Eppendorf AG, Hamburg, Almanya) santrifüj edilmesi ile süpernatant elde edildi. Ayrılan süpernatantlar, protein miktar tayini, SOD, CAT, GSHPx aktivite tayinleri için – 40 C° de derin dondurucuda (SANYO Biomedical Co., Ltd., MDF-U537, Osaka, Japonya) saklandı.

İkinci kısım karaciğer dokusu da yine cam tüpe alınarak % 1.5 KCl çözeltisi ile homojenize edilerek malondialdehid ölçümleri için hazırlandı.

3.2. Biyokimyasal Parametrelerin Ölçülmesi

3.2.1. Protein Miktar Ölçümü

Protein miktarı ölçümü Lowry metoduna göre yapıldı. Bu metod, proteinin yapısında bulunan tirozin ve triptofan aminoasitlerinin fosfotungstat kompleksini molibden mavisine indirgemesi prensibine dayanır. Reaksiyon bakır (Cu^{2+}) ile belirginleştirilir (84).

Kullanılan Reaktifler:

A Çözeltisi: %2'lik Na_2CO_3 'ın 0.1 N NaOH'teki çözeltisi

B Çözeltisi: %1'lik CuSO_4 çözeltisi

C Çözeltisi: %2'lik Sodyum Potasyum tartarat çözeltisi

D Çözeltisi: 98 hacim A çözeltisi + 1 hacim B çözeltisi + 1 hacim C çözeltisi karışımı

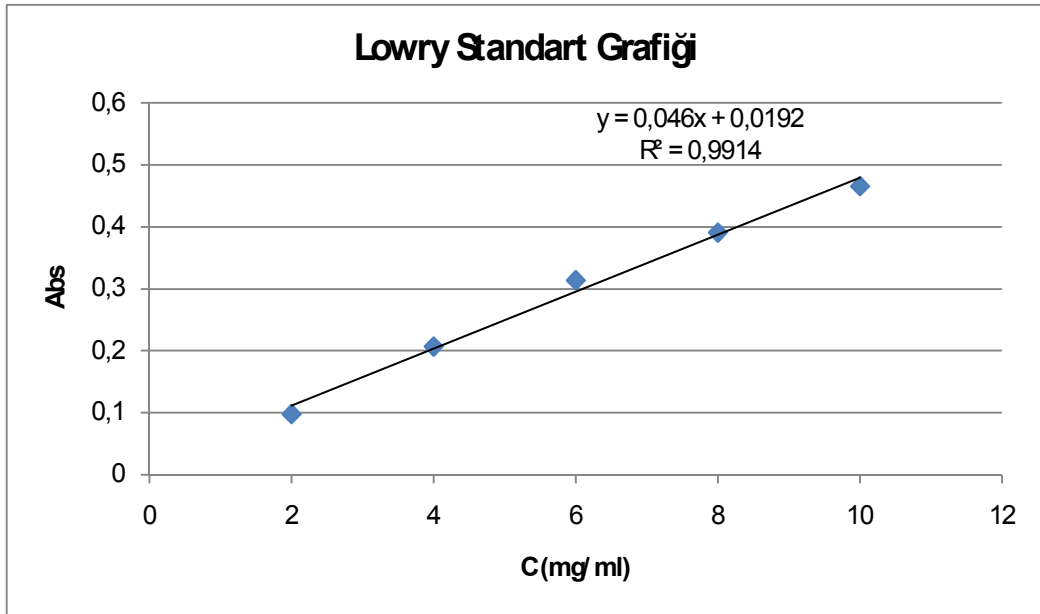
E Çözeltisi: 1 hacim Folin Fenol belirteci + 1 hacim distile su karışımı

Bovin Serum Albumin (BSA) Çözeltisi: Standart protein çözeltisi olarak kullanılan BSA 10 mg/ml konsantrasyondaki stok çözeltiden 1, 2, 3, 5, 7.5, 10 mg/ml'lik çözeltileri hazırlandı.

Deneyin Yapılışı:

Test ve standart tüplerine 490 µl, kör tüpüne 500 µl distile su kondu. 2,5 ml D çözeltisi tüm tüplere ilave edildikten sonra, test tüplerine 10 kat dilüe edilmiş numuneden 10 µl; standart tüplerine de 10 µl her bir standarttan ilave edildi ve tüpler vorteks ile iyice karıştırıldı. Oda ısısında karanlıkta 10 dk bekledikten sonra, tüm tüplere 250 µl E çözeltisi eklendi. 25 °C'de 30 dk bekledikten sonra, spektrofotometrede 650 nm'de köre karşı sıfırlanarak okuma yapıldı.

Standart BSA çözeltileri ile hazırlanan çalışma grafiğinden yararlanarak her örnek tüpündeki süpernatanın 1 ml'sindeki protein miktarı hesaplandı (Şekil 11).



Şekil 3.1. Lowry Standart Grafiği

3.2.2. Malondialdehid (MDA) Miktar Ölçümü

Lipid peroksidasyon son ürünü olan MDA'nın tiyobarbitürik asit (TBA) ile sıcak ve asit ortamda reaksiyona girmesi sonucu oluşan renk spektrofotometrik olarak ölçülür (85).

Kullanılan Reaktifler:

1. %8.1'lik Sodyum dodesil sülfat (SDS)
2. %20'lik Asetik asit (NaOH ile pH 3.5'e ayarlandı)
3. %0.8'lik tiyobarbitürik asit (TBA)
4. n-Butanol/Piridin (15:1)

Deneyin Yapılışı:

0.2 ml 10 kat dilüe edilmiş doku homojenatı, 0.2 ml %8.1'lik SDS, 1.5 ml %20'lik asetik asit, 1.5 ml %0.8'lik TBA ve 0.6 ml distile su karıştırıldı. Karışım 95 °C' deki sıcak su banyosunda 1 saat tutuldu. Musluk suyu ile soğutulduktan sonra üzerine 1 ml distile su ve 5 ml butanol/piridin (15:1) eklenerek; vorteksle 1 dakika karıştırıldı. Organik faz 4000 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek ayrıldı. Absorbanslar homojenat içermeyen ayıraç körüne karşı 532 nm dalga boyunda spektrofotometrede okundu. Sonuçlar nmol MDA/mg protein olarak ifade edildi.

Sonuçların Hesaplanması:

$$C \text{ (nmol/ml)} = \frac{\text{Abs} \times V_t \times 10^9}{E \times V_s \times L \times 10^3}$$

Abs = Absorbans

E = Molar absorpsiyon katsayısı ($1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

V_t = Total reaksiyon hacmi

V_s = Total reaksiyon içindeki numune hacmi

L = Küvet çapı

10^9 = Molün nanomole çevrilmesi

10^3 = Litrenin mililitreye çevrilmesi

3.2.3. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivite Ölçümü

Hücrel oksidatif savunma mekanizmasının en önemli enzimi olan SOD, süperoksit radikallerinin dismutasyonunda görev almaktadır. Ksantin-ksantin oksidaz sisteminde üretilen süperoksit radikallerinin sitokrom c' yi indirgemesinin SOD tarafından inhibisyonu temeline dayanan enzim aktivite deneyidir (86).

Kullanılan Reaktifler:

A Çözeltisi: 5 µmol ksantin'in 25 ml 0.001 N NaOH'daki çözeltisi ve 2 µmol sitokrom C'nin 250 ml 50 mM pH 7.8 ve 0.1 mM EDTA içeren fosfat tamponundaki çözeltisi karıştırılır. Bu çözelti + 4 °C'de 3 gün kararlıdır.

B Çözeltisi: Taze hazırlanan ksantin oksidazın 0.1 mM EDTA'daki çözeltisi 0.2 U/ml. Bu çözelti ortamda SOD enzimi olmaksızın dakikada 0,025 absorbans değişikliğini yapabilmelidir.

Deneyin Yapılışı:

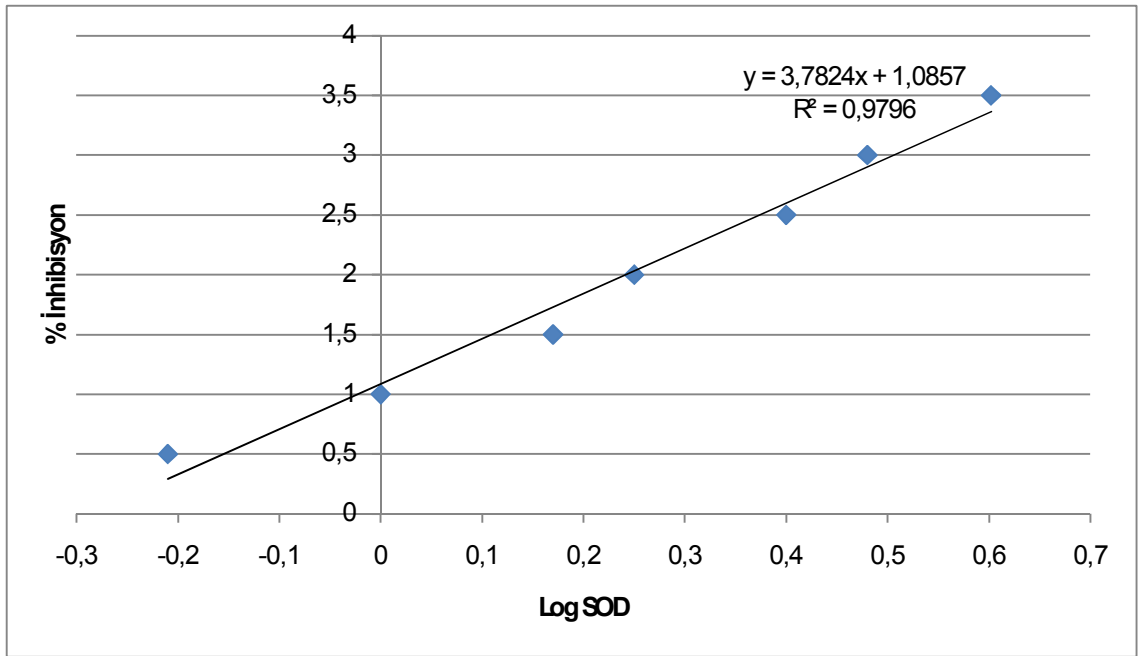
3 ml'lik küvete 2.9 ml A çözeltisinden, 50 µl 50 kat dilüe edilmiş numune ve 50 µl B çözeltisinin eklenmesiyle reaksiyon başlatılır. Hızlı bir şekilde 550 nm'de 1 dakika süresince absorbans değişimi okunur. Kör okunurken örnek yerine 50 µl bidistile su eklenir. Standart grafiği çizmek için aynı şekilde saf SOD enzimiyle çalışıldı.

Sonuçların Hesaplanması:

Önce aşağıdaki formülden % inhibisyonlar hesaplandı.

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

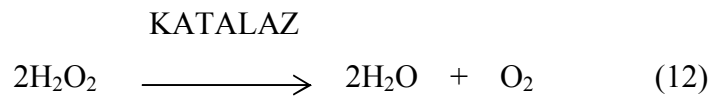
Standart çalışmalardan elde edilen SOD aktivitesine karşı % inhibisyon değerleri grafiğe geçirildi. Çizilen hiperbolik SOD çalışma grafiği lineer olmadığından logaritmik transformasyon uygulanarak grafik yeniden çizildi (Şekil 12). Bu grafikte x eksenine standart SOD değerlerinin (U/ml) logaritmik dönüşüm değerleri, y eksenine standartlara ait % inhibisyon değerleri konuldu. Grafikten yararlanarak % inhibisyona denk gelen numunelere ait SOD değerleri bulundu. Sonuçlar U/mg protein şeklinde ifade edildi.



Şekil 3.2. SOD standart çalışması logaritmik grafiği

3.2.4. Katalaz (CAT) Aktivite Ölçümü

Katalaz, katalitik aktivitesiyle hidrojen peroksiti, dekompoze ederek su ve moleküler oksijene dönüştürmektedir.



Hidrojen peroksit (H_2O_2) ultraviyole spektrumunda absorpsiyon veren bir maddedir. Maksimal absorbans 240 nm'de meydana gelmektedir. Deney ortamına ilave edilen H_2O_2 'nin katalaz tarafından su ve oksijene parçalanması 240 nm'de absorbans azalması ile kendini gösterir. Absorbansta gözlenen bu azalma ortamdaki katalaz enzim aktivitesi ile doğru orantılı bir eğilim göstermektedir (87).

Kullanılan Reaktifler:

1. 50 mM pH 7.0 olan fosfat tamponu hazırlanır.

2. Hidrojen peroksitli ve absorbansı 0.500 olan fosfat tamponu: Spektrofotometre 240 nm'ye ayarlandı ve fosfat tamponu ile aletin sıfır absorbans okuması sağlandı. Hidrojen peroksitli fosfat tamponu, absorbans 0.500 oluncaya kadar damla damla hidrojen peroksit eklenerek ayarlandı.

Deneyin Yapılışı:

Spektrofotometre 240 nm'ye ayarlandı ve fosfat tamponu ile sıfır absorbansa ayarlandı. 3 ml'lik küvete 2.99 ml hidrojen peroksitli fosfat tamponu ve 0.01 ml 50 kat dilüe edilmiş numune ilave edilerek hızla karıştırıp absorbansı okundu, bu başlangıç absorbans değeridir. Daha sonra 60 saniye süreyle absorbans azalması takip edildi. Sürenin sonunda okunan absorbans değeri kaydedildi. Sonuçlar U/mg protein şeklinde ifade edildi.

Sonuçların Hesaplanması:

$$U = \frac{\Delta \text{ Abs } \times t \times V_t}{E \times L \times V_n}$$

$\Delta \text{ Abs}$: Okunan absorbans değişimi

t : Ölçüm süresi (1 dak)

V_t : Total hacim (3 ml)

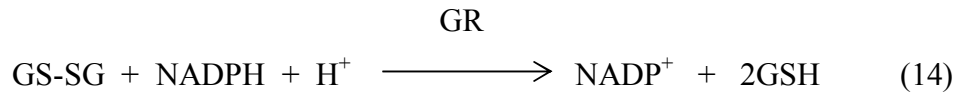
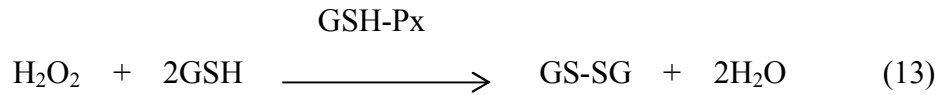
V_n : Kullanılan numune hacmi (0.1 ml)

E : Molar absorpsiyon katsayısı ($0,036 M^{-1} cm^{-1}$)

L : Işık yolu (1 cm)

3.2.5. Glutasyon Peroksidaz (GPx) Aktivite Ölçümü

GPx, redükte glutasyonu kullanarak hidrojen peroksidin suya dönüşümünü katalizleyen bir enzimdir. Reaksiyon sonunda redükte glutasyon (GSH) okside forma dönüşürken, hidrojen peroksid ise suya katalizlenir. Oluşan okside glutasyonun (GS-SG) tekrar kullanılabilmesi (başka bir hidrojen peroksid molekülünün suya katalizi) için okside glutasyonun redükte glutatyona dönüşmesi gerekir. Bu dönüşüm, ortamda redükte NADP (NADPH) ve glutasyon redüktaz (GR)enzimi varlığında gerçekleştirilir. Bu durumda redükte NADP okside NADP'ye çevrilirken okside glutasyon redükte forma dönüşür.



Redükte NADP 340 nm'de maksimal absorbans gösteren bir maddedir. Glutasyon redüktaz katalizi devam ettikçe, ortamdaki NADPH miktarı giderek azalacak ve buna paralel olarak 340 nm'de absorbans azalması meydana gelecektir. Absorbanstaki bu azalma hızı ortamdaki glutasyon peroksidaz aktivitesi ile doğru orantılı olacaktır (88).

Kullanılan Reaktifler:

1. 5 mM EDTA içeren 50 mM pH 7'lik fosfat tamponu
2. 150 mM GSH EDTA'lı fosfat tamponunda çözüldü (kullanımdan hemen önce hazırlandı).
3. 1 M NaN₃ EDTA'lı fosfat tamponunda çözüldü (kullanımdan hemen önce hazırlandı).
4. 3 mM NADPH EDTA'lı fosfat tamponunda çözüldü (kullanımdan hemen önce hazırlandı).
5. 50 mM H₂O₂ EDTA'lı fosfat tamponunda çözüldü (kullanımdan hemen önce hazırlandı).
6. 1 U/10 µl GSH-Redüktaz olacak şekilde fosfat tamponunda dilüe edildi.

Deneyin Yapılışı:

Kör tüpüne 2.680 ml, test tüplerine 2.670 ml EDTA'lı fosfat tamponu, 0.1 ml redükte glutatyon, 0.1 ml NADPH, 0.01 ml glutatyon redüktaz, 0.01 ml NaN₃ ve 0.01 ml 10 kat dilüe edilmiş numune ilave edildikten sonra 30 dk oda ısısında inkübe edildi. Spektrofotometre 340 nm'de fosfat tamponu ile sıfırlandı. Sürenin sonunda her tüpe 100 µl H₂O₂ ilave edilip reaksiyon başlatıldı ve hemen kuvvetler spektrofotometreye konarak 3 dk süreyle absorbans azalması takip edildi. Absorbans azalmasının bu süre içerisinde tam olarak lineer olduğu görüldü.

Sonuçların Hesaplanması:

1 U GPx Aktivitesi: 1 dakikada okside olan NADPH'm µmol cinsinden miktarıdır. Spesifik aktivite için bulunan sonuçlar U/mg protein olarak ifade edildi.

$$U/ml (\mu\text{mol/dk/ml}) = \frac{\Delta A/t \times V_t \times 10^6}{E \times V_s \times L}$$

$E = \text{NADPH}'\text{in tüketim katsayısı (} 6.22 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}\text{)}$

$V_t = \text{Total reaksiyon hacmi}$

$V_s = \text{Total reaksiyon içindeki numune hacmi}$

$L = \text{Küvet çapı}$

$\Delta A/t = \text{Dakikadaki absorbans değişimi}$

$10^6 = \text{Molün mikromole çevrilmesi}$

3.2.6. 8-hidroksi deoksiguanozin (8-OHdG) Miktar Ölçümü

8-OHdG miktar tayini Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile fotodiyod array dedektör (DAD) kullanılarak belirlenmektedir. Bu amaçla dokulardan DNA izolasyonu gerçekleştirildikten sonra izole DNA örneklerinde 8-OHdG miktar tayini yapılmaktadır.

Kullanılan Reaktifler:

1. % 1 SDS ve 1 mM EDTA içeren homojenizasyon çözeltisi
2. Proteinaz K (500 µg/mL)
3. 1 M Tris-HCl, pH 7.4
4. Kloroform : İzomil alkol (24:1, v:v) içeren ekstraksiyon çözeltisi
5. Absolü etanol
6. % 70'lik etanol
7. 1.5 mM NaCl, 150 µM Na-Sitrat ve 1 mM EDTA içeren çözelti
8. RNaz T₁ (50 U/mL)
9. RNaz A (100 µg/mL)
10. 5 M NaCl
11. 20 mM CH₃COONa, pH 4.8
12. Nükleaz P₁
13. Alkalen fosfataz
14. Asetonitril (HPLC saflıkta)
15. Asetik asit (HPLC saflıkta)

DNA İzolasyonu:

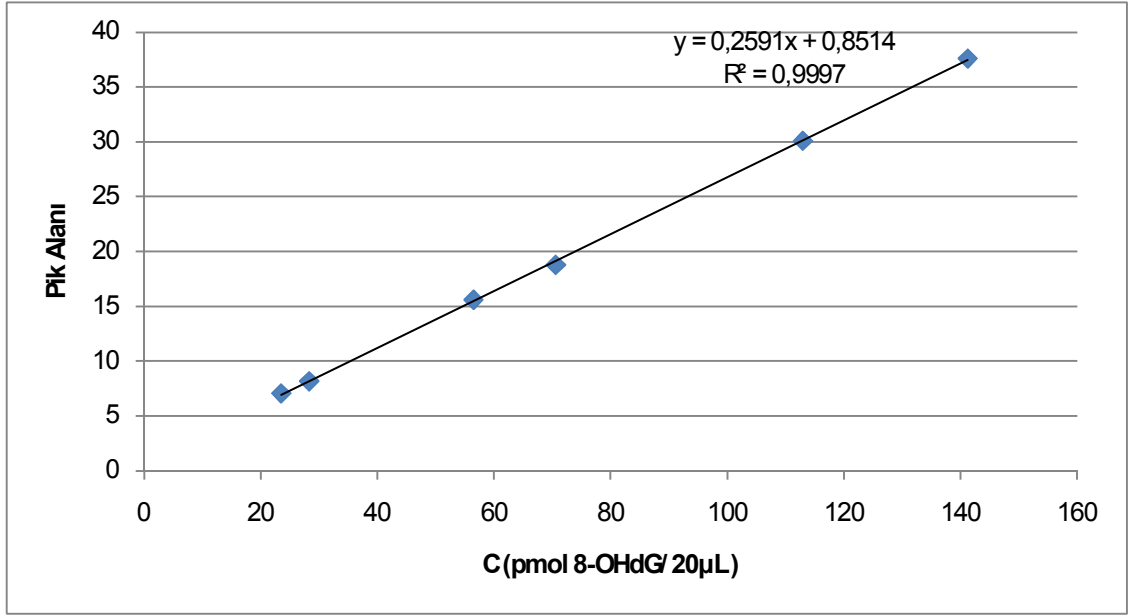
Deney tüpüne alınan 1 g karaciğer dokusu 10 mL % 1 SDS ve 1 mM EDTA içeren çözelti ile Ultra-Turrax T25 (IKA Werke GmbH, Staufen, Almanya) homojenizatöründe 6000 dev/dak hızla 5 dakika süreyle homojenize edildi. Homojenatlar 37 °C' de 30 dak. Proteinaz K ile inkübe edildi. 0.5 mL pH 7.4 1 M Tris-HCl eklendikten sonra 1 hacim Kloroform:İzoamil alkol (24:1, v:v) ile ekstraksiyon yapıldı. Fazlar santrifüj ile ayrıldıktan sonra aküöz fazlar toplandı. DNA 0.1 hacim -20 °C' de bekletilen absolü etanol ile presipite edildi. Santrifüj sonrası % 70' lik etanol ile yıkanan DNA 2 ml 1.5 mM NaCl, 150 µM Na-Sitrat ve 1 mM EDTA içeren çözelti ile çözünür hale getirildi. Çözelti 37 °C' de 30 dak. RNaz T₁ ve RNaz A ile inkübe edildi. DNA çözeltisi tekrar Kloroform:İzoamil alkol çözeltisi ile ekstrakte edilip 5M NaCl ile presipite edildi (89).

Presipite edilen DNA pelletleri 0.5 mL 20 mM CH₃COONa ile çözüldükten sonra 37 °C' de 30 dak. 63 mg Nükleaz P₁ ile inkübe edilip 50 µL 1M Tris-HCl eklenerek 37 °C' de 60 dak. 6.3 U Alkalen fosfataz ile inkübe edildi (90).

HPLC Analizi:

HPLC analizleri manuel enjeksiyonlu Agilent 1100 (Agilent Technologies, Inc. Headquarters, Santa Clara, United States) cihazı ile yapıldı. İzole edilen DNA örneklerinin 20 µL' lik kısımları 3 µm partikül büyüklüğüne sahip 4.6 mm iç çaplı, 75 mm uzunluğundaki C18 HPLC kolonuna (ACE, Aberdeen, Scotland) yüklendi. Analiz, %3 (v:v) Asetonitril içeren % 0.01 (v:v) Asetik asit mobil fazı ile 2 mL/dak akış hızı ile izokratik olarak yapıldı, UV 297 nm' de gerçekleştirildi (91).

8-OHdG standardı ile hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki çözeltilerin aynı kromatografik koşullar altında yapılan analizleri sonucu elde edilen pik alanlarına karşılık gelen konsantrasyonla grafiğe geçirildi. Oluşturulan grafiğin doğru denkleminde yararlanılarak numunelere ait 8-OHdG içerikleri belirlenip, nmol/mg DNA olarak ifade edildi.



Şekil 3.3. 8-OHdG standart grafiği

3.3. İstatistiksel Analiz

Veriler SPSS 15.0 istatistik programı kullanılarak analiz edildi. Tek yönlü varyans analizi ile gruplar arasında fark bulunup bulunmadığı incelendi. Fark olanlarda LSD testi ile farkın hangi ikili karşılaştırmalardan kaynaklandığı belirlendi. İstatistiksel anlamlılık düzeyi 0,05 olarak kabul edildi.

3.3.1. MDA' ya ait istatistiksel veriler

Tablo 3.1. MDA' ya ait grup ortalamaları ve standart sapma verileri

	Örnek sayısı	Aritmetik Ort.	Std. Sapma
Kontrol	10	15,4747	1,50327
DMBA	9	19,0502	3,57558
DMBA+Taze S.	9	17,9871	3,70816
DMBA+Bekl. S.	9	15,1738	3,44663
DMBA+Tablet	10	13,9438	3,67426
Toplam	47	16,2571	3,66091

Tablo 3.2. MDA' ya ait ANOVA verileri

	Kareler toplamı	Serbestlik derecesi	Ortalama kare	F	Sig.
Gruplar arası	167,348	4	41,837	3,912	,009
Gruplar içi	449,156	42	10,694		
Toplam	616,504	46			

Tablo 3.3. MDA' ya ait ikili karşılaştırmalar

	Kontrol	DMBA	DMBA+ Taze S.	DMDA+ Bekl. S.	DMBA+ Tablet
Kontrol	*****	0,022	AD	AD	AD
DMBA		*****	AD	0,016	0,001
DMBA+Taze S.			*****	AD	0,010
DMBA+Bekl. S.				*****	AD
DMBA+Tablet					*****

3.3.2. CAT' a ait istatistiksel veriler

Tablo 3.4. CAT'a ait grup ortalamaları ve standart sapma verileri

	Örnek sayısı	Aritmetik Ortalama	Std. Sapma
Kontrol	10	4324,1621	754,28497
DMBA	9	3556,4844	433,76658
DMBA + Taze S.	9	3592,2422	641,03189
DMBA +Bekl. S.	9	4191,2411	681,56843
DMBA +Tablet	10	3406,0760	702,72938
Total	47	3816,2147	732,18722

Tablo 3.5. CAT' a ait ANOVA verileri

	Kareler toplamı	Serbestlik derecesi	Ortalama kare	F	Sig.
Gruplar arası	6586657,713	4	1646664,428	3,827	,010
Grup içi	18073856,370	42	430329,914		
Toplam	24660514,084	46			

Tablo 3.6. CAT' a ait ikili karşılaştırmalar

	Kontrol	DMBA	DMBA + Taze S.	DMBA + Bekl. S	DMBA + Tablet
Kontrol	*****	0.015	0.020	AD	0.003
DMBA		*****	AD	0.046	AD
DMBA + Taze S.			*****	AD	AD
DMBA +Bekl. S.				*****	0.013
DMBA +Tablet					*****

3.3.3. SOD' a ait istatistiksel veriler

Tablo 3.7. SOD' a ait grup ortalamaları ve standart sapma verileri

	Örnek sayısı	Ortalama	Std. Sapma
Kontrol	10	2,7024	,50854
DMBA	9	2,1031	,25296
DMBA + Taze S.	9	2,4190	,48529
DMBA +Bekl. S.	9	1,8737	,54451
DMBA +Tablet	10	1,4655	,41222
Total	47	2,1115	,61944

Tablo 3.8. SOD' a ait ANOVA verileri

	Kareler toplamı	Serbestlik derecesi	Ortalama kare	F	Sig.
Gruplar arası	9,026	4	2,256	10,988	,000
Grup içi	8,625	42	,205		
Toplam	17,650	46			

Tablo 3.9. SOD' a ait ikili karşılaştırmalar

	Kontrol	DMBA	DMBA + Taze S.	DMBA + Bekl. S.	DMBA + Tablet
Kontrol	*****	0.006	AD	0.000	0.000
DMBA		*****	AD	AD	AD
DMBA + Taze S.			*****	0.014	0.000
DMBA +Bekl. S.				*****	AD
DMBA +Tablet					*****

3.3.4. GPx' e ait istatistiksel veriler

Tablo 3.10. GPx' e ait grup ortalamaları ve standart sapma verileri

	Örnek sayısı	Ortalama	Std. Sapma
Kontrol	10	1,1177	,19425
DMBA	9	,8397	,15889
DMBA + Taze S.	9	1,0552	,15828
DMBA +Bekl. S.	9	,9837	,19922
DMBA +Tablet	10	,9374	,12340
Total	47	,9885	,18820

Tablo 3.11. GPx'e ait ANOVA verileri

	Kareler toplamı	Serbestlik derecesi	Ortalama kare	F	Sig.
Gruplar arası	,433	4	,108	3,797	,010
Grup içi	1,197	42	,028		
Toplam	1,629	46			

Tablo 3.12. GPx' e ait ikili karşılaştırmalar

	Kontrol	DMBA	DMBA + Taze S.	DMBA + Bekl. S.	DMBA + Tablet
Kontrol	*****	0.001	AD	AD	0.021
DMBA		*****	0.010	AD	AD
DMBA + Taze S.			*****	AD	AD
DMBA +Bekl. S.				*****	AD
DMBA +Tablet					*****

3.3.5. 8OHdG' e ait istatistiksel veriler

Tablo 3.13. 8OHdG' e ait grup ortalamaları ve standart sapma verileri

	Örnek sayısı	Ortalama	Std. Sapma
Kontrol	10	28,1545	3,11928
DMBA	9	40,0869	10,41823
DMBA + Taze S.	9	30,7567	3,39235
DMBA +Bekl. S.	9	20,1097	8,79716
DMBA +Tablet	10	15,7844	6,07500
Toplam	47	26,7653	10,79811

Tablo 3.14. 8OHdG' e ait ANOVA verileri

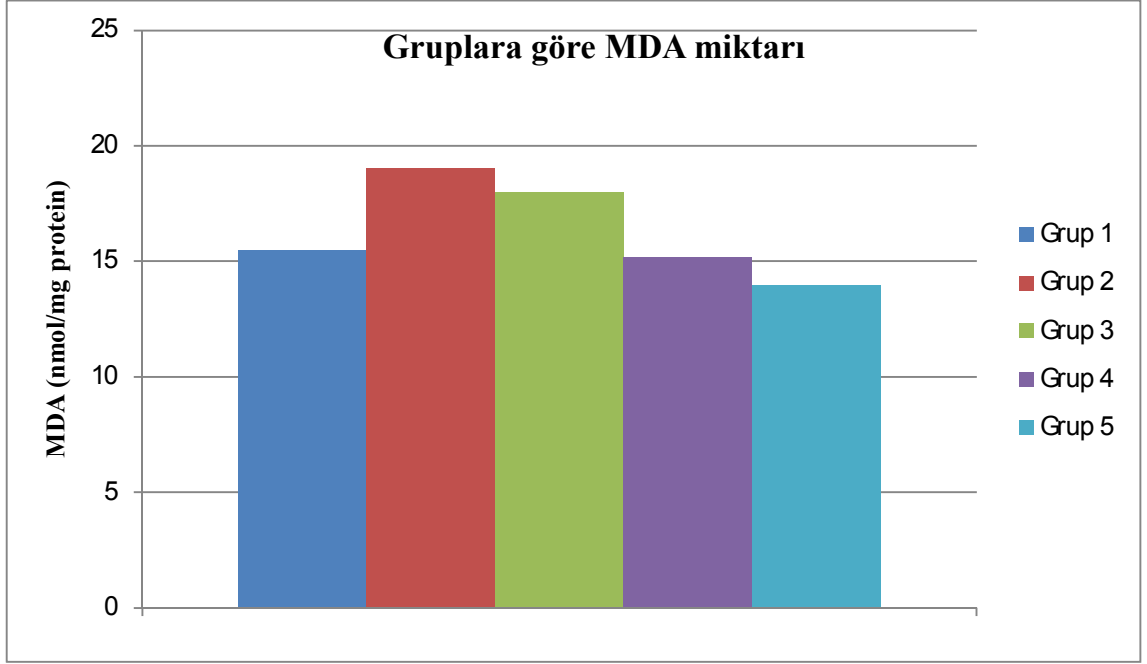
	Kareler toplamı	Serbestlik derecesi	Ortalama kare	F	Sig.
Gruplar arası	3364,339	4	841,085	17,670	,000
Grup içi	1999,220	42	47,600		
Toplam	5363,559	46			

Tablo 3.15. 8OHdG' e ait ikili karşılaştırmalar

	Kontrol	DMBA	DMBA + Taze S.	DMBA + Bekl. S.	DMBA + Tablet
Kontrol	*****	0.001	AD	0.015	0.000
DMBA		*****	0.006	0.000	0.000
DMBA + Taze S.			*****	0.002	0.000
DMBA +Bekl. S.				*****	AD
DMBA +Tablet					*****

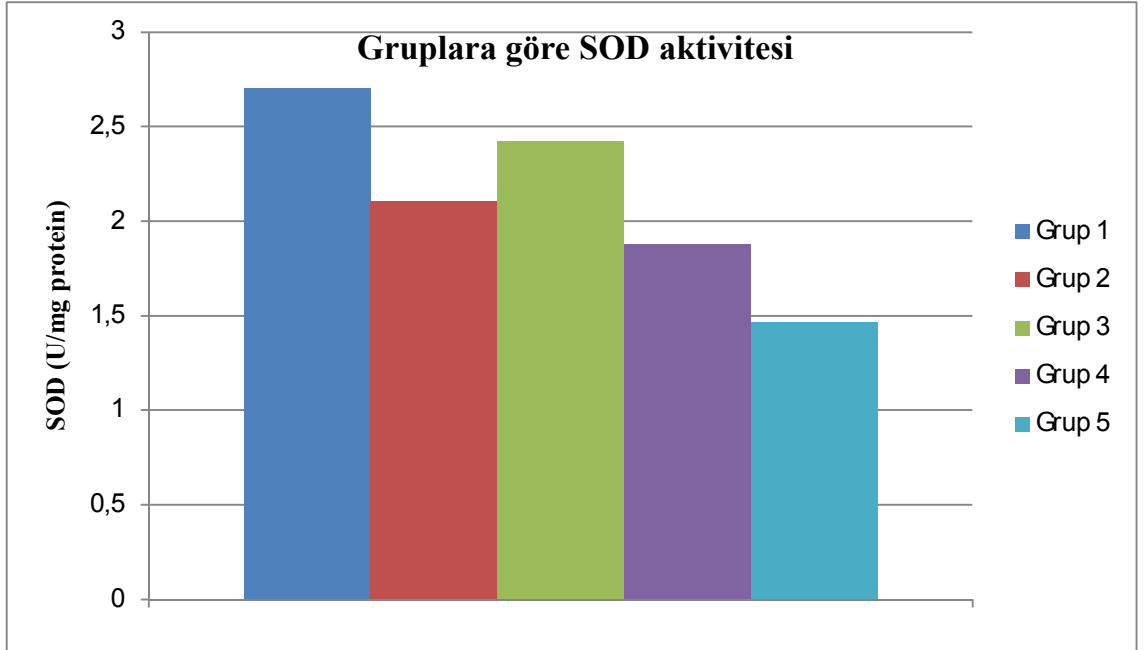
4. BULGULAR

4.1. Malondialdehit Miktarı



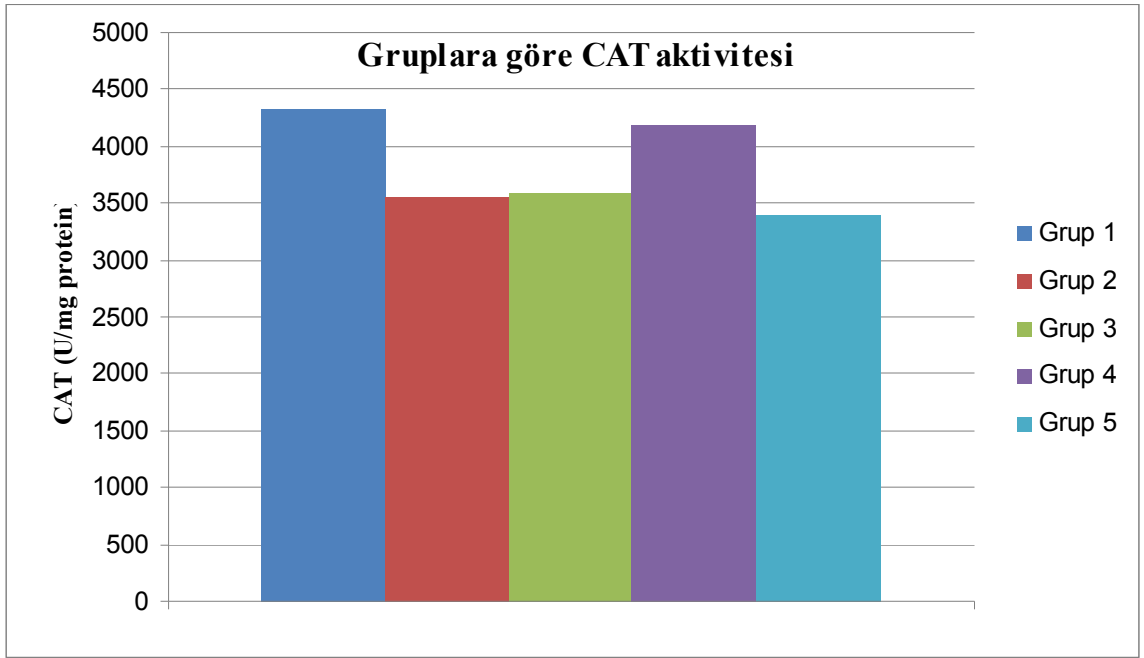
Şekil 4.1. Gruplar arasındaki MDA miktar dağılımı

4.2. Süperoksit Dismutaz Aktivitesi



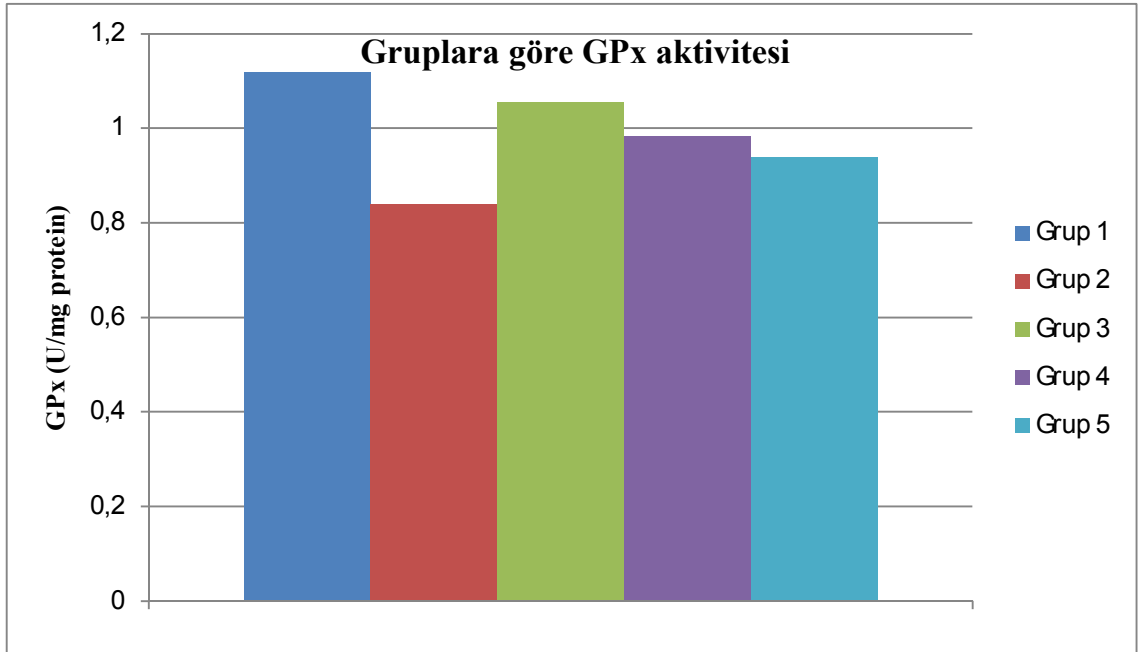
Şekil 4.2. Gruplar arasındaki SOD aktivite dağılımı

4.3. Katalaz Aktivitesi



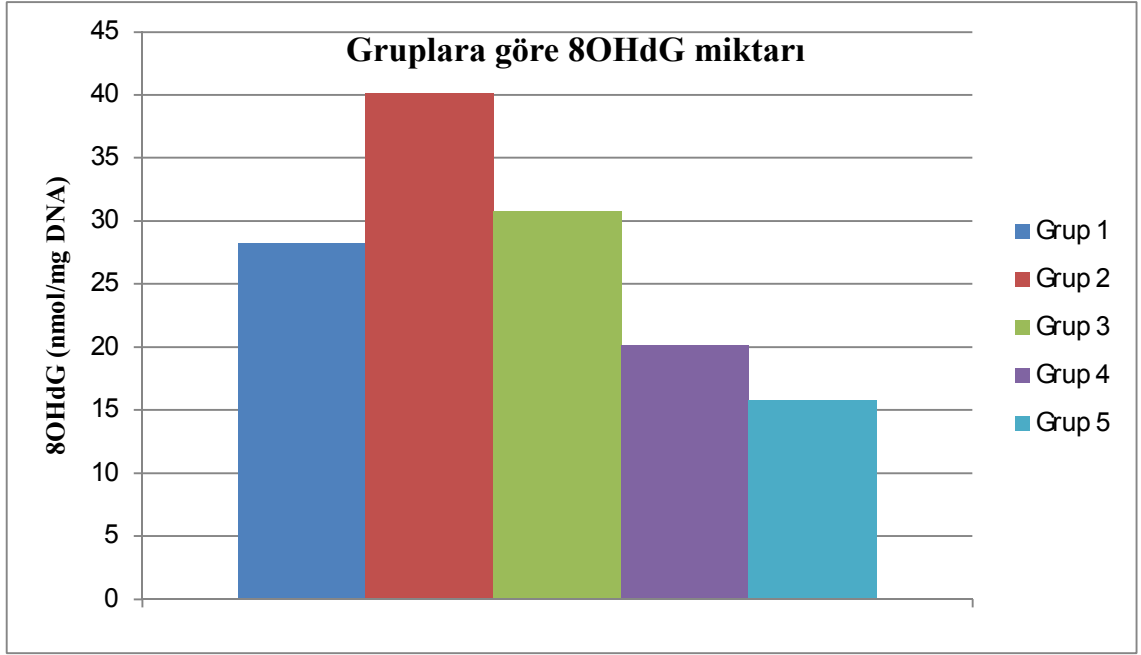
Şekil 4.3. Gruplar arasındaki CAT aktivite dağılımı

4.4. Glutatyon Peroksidaz Aktivitesi

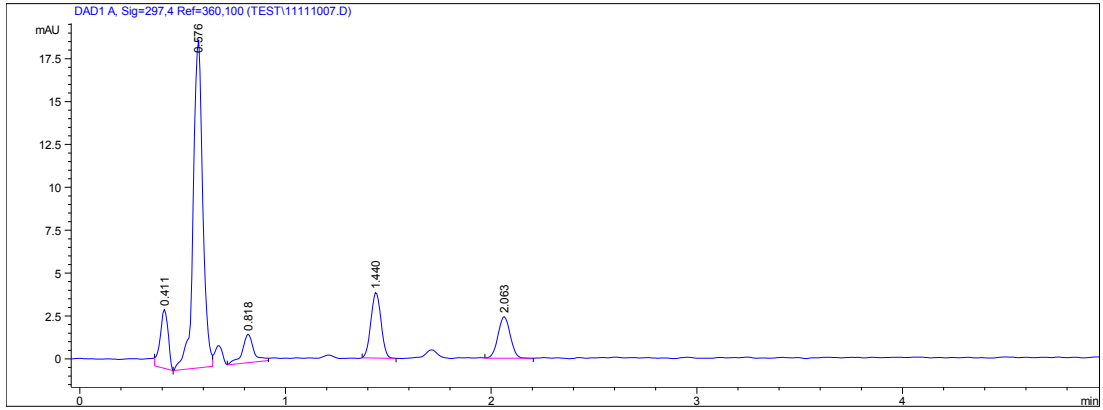


Şekil 4.4. Gruplar arasındaki GPx aktivite dağılımı

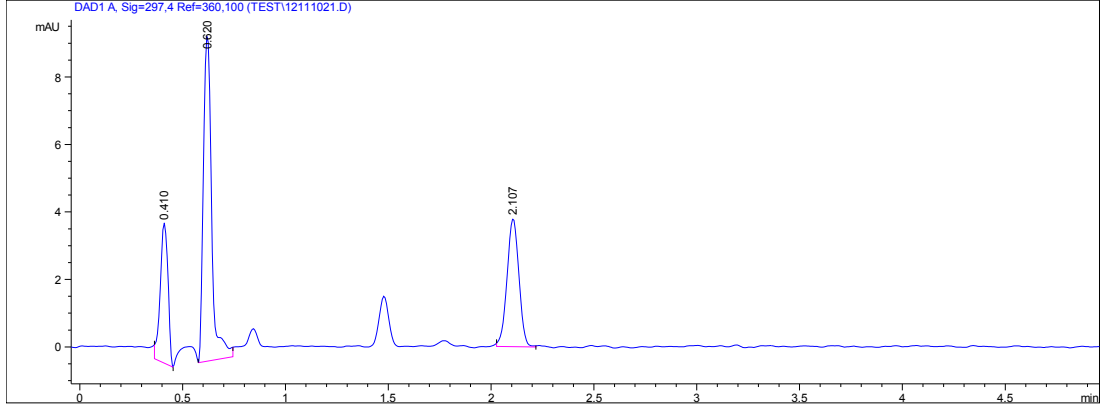
4.5. 8-hidroksi deoksiguanozin Miktarı



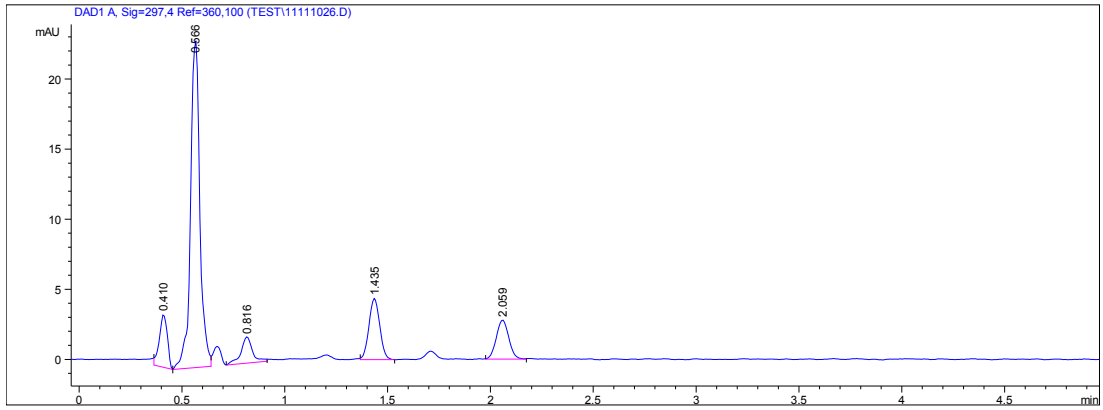
Şekil 4.5. Gruplar arasındaki 8-OHdG miktar dağılımı



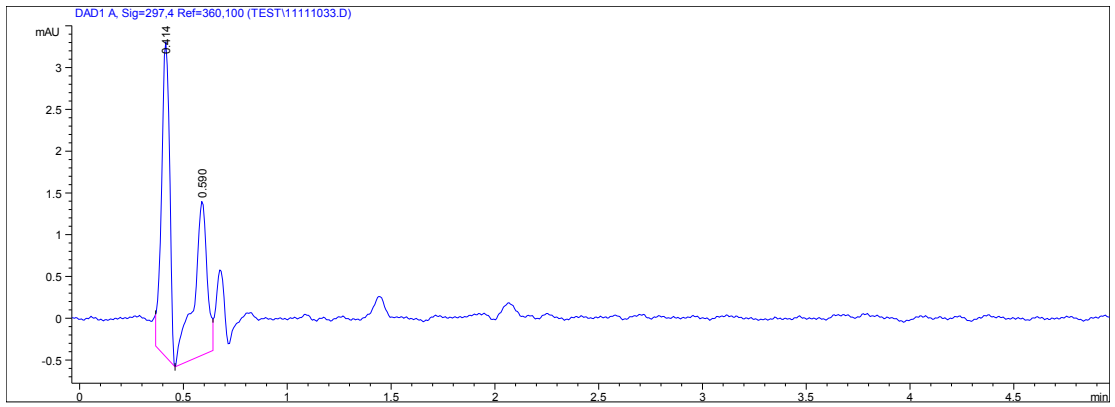
Şekil 4.6. Kontrol grubuna ait 8-OHdG kromatogramı



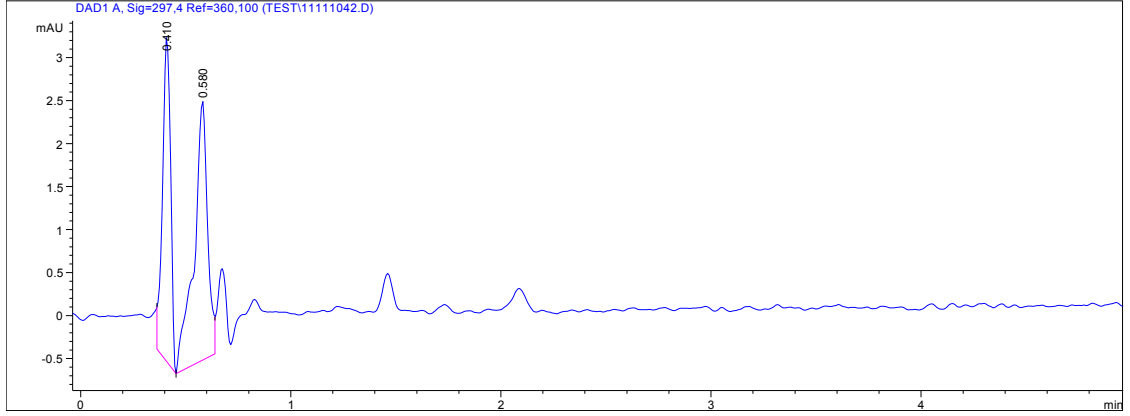
Şekil 4.7. DMBA grubuna ait 8-OHdG kromatogramı



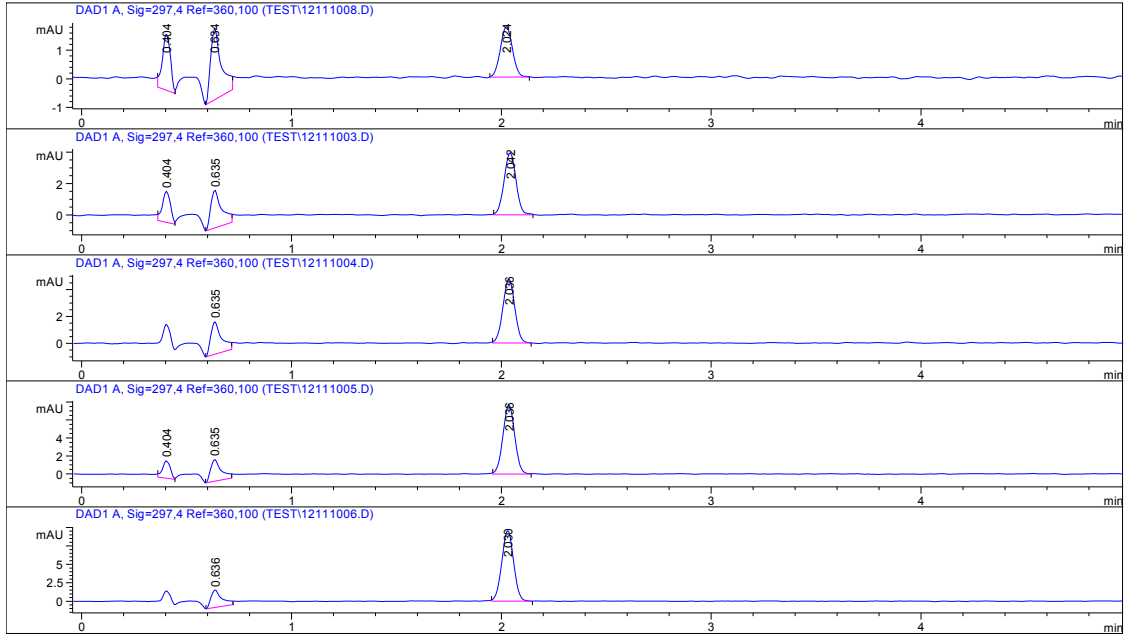
Şekil 4.8. DMBA+Taze Sarımsak ekstraktı grubuna ait 8-OHdG kromatogramı



Şekil 4.9. DMBA+Bekletilmiş Sarımsak ekstraktı grubuna ait 8OHdG kromatogramı



Şekil 4.10. DMBA+Sarımsak tablet ekstraktı grubuna ait 8-OHdG kromatogramı



Şekil 4.11. Farklı konsantrasyonlarda 8OHdG standartlarının çıkışma kromatogramı

5. TARTIŞMA

Kanser hastalığı tüm dünyada bütün ölüm nedenleri arasında koroner arter hastalıklarının ardından ikinci sırada yer almaktadır. Bu nedenle sağlık bilimleri alanında gerçekleştirilen bilimsel çalışmalar arasında, kanser uzun yıllardır ilk sıralardaki yerini korumaktadır. Yapılan araştırmalar sonucunda, tüm kanserlerin oluşum sürecinde çevresel etkenler, genetik ve diyetin önemli rol oynadığı ortaya koyulmuştur. Bu faktörler arasında çevresel etkenler çoğunlukla doz olarak sınırlayamadığımız ve genellikle maruziyet süresinin uzun olması sebebiyle en büyük riski oluşturmaktadır.

Polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH), potent karsinojen bileşiklerdir. Bu grubun bir üyesi olan 7,12-DMBA güçlü bir karsinojen ajan olup, metabolik aktivasyon sonrası mutajenik metabolitleri aracılığıyla ve immunotoksik etkileri ile kanser gelişiminde özellikle promotör etki göstermektedir. Hayvan modellerinde spesifik olarak meme, cilt ve kolon kanseri oluşturulması amacıyla sıklıkla kullanılmaktadır. Öte yandan, insanların normal yaşam süreçlerinde bu karsinojenler ile sıklıkla teması ve maruziyeti söz konusudur. Literatürde, PAH'ların, egzost dumanları, zift materyalleri, sigara dumanı, kömür gazları, tütsülenmiş ya da direkt ateşte ızgaralanmış yiyecekler ile uzun süreli maruziyet sonrası karsinojenik etki gösterebilecek düzeylerde bulunduğu rapor edilmiştir. Bu noktada, özellikle sanayileşmiş şehirlerde yaşayan insanların günlük yaşamları sırasında PAH' lara maruz kalması kaçınılmazdır.

Kanser gelişiminde rol oynayan faktörlerden bir tanesi de beslenme alışkanlıklarıdır. Bazı kanser türlerinin bazı bölgelerde yaşayan insanlarda yüksek ya da düşük insidansa sahip olması çevresel etkenlerin ve/veya beslenme alışkanlıklarının sonucudur. Örneğin evlerin dış yüzeyinin kaplamasında asbest içerikli kaplama malzemeleri kullanılan bölgelerde akciğer kanseri sıklıkla görülürken, Çin' de tütsülenmiş et tüketiminin yoğun olması nedeniyle mide ve gastrointestinal sistemle ilişkili kanser türleri daha sık görülmektedir. Buna karşın diyetlerinde sebze ağırlıklı besinlere önem veren, antioksidan içerikli gıdaları daha yoğun tüketen bölgelerde kanser ve oksidatif stres ile ilişkili hastalıklar daha nadir

görülmekle birlikte bu bölgelerde ortalama yaşam süreleri de daha uzundur. Ülkemizde Ege Bölgesi bu yaklaşıma uygun bir örnektir.

Sarımsak, yüzyıllardan beri tıbbi bitkiler arasındaki yerini ve önemini koruyan, pek çok toplumda koruyucu ve tedavi edici etkileri nedeniyle yaygın bir şekilde tüketilen, antioksidan içeriği zengin bir besin maddesidir. İçeriğinde pek çok hidrofilik ve hidrofobik karakterli antioksidan bileşen barındırmaktadır. Bu bileşenlerin radikal süpürücü etkilerinin yanı sıra immün sistemi destekleyici ve stimüle edici etkilerini rapor eden pek çok çalışma bulunmaktadır (55,60). Ancak, medikal amaçlı kullanılan bitkisel ürünlerin kullanıma hazırlanışı ve kullanım şekli hedeflenen etkinliğin elde edilebilmesi açısından son derece önemlidir. Bu nedenle, biz bu çalışmada sarımsağın üç farklı formunun 7,12-DMBA' nın hepatotoksik etkilerine karşı koruyuculuğunu araştırdık. Bu formlar, taze sarımsak ekstresi, altı ay bekletilmiş sarımsak ekstresi ve eczanelerde satışı sunulmuş olan sarımsak tabletleridir. Sarımsağın en etkin bileşenlerinden biri olan allisin, yine sarımsakta bulunan kokusuz, kükürlü amino asit türevi olan alliin'den alliinaz enziminin etkisi ile açığa çıkmaktadır. Sarımsak ekstrelerini altı ay bekletmemizdeki temel amacımız mümkün olduğu kadar çok alliin'in allisin'e dönüşümünü sağlayabilmektir. Ancak çalışma bulgularımızdan da anlaşılacağı üzere bekletilmiş sarımsak ekstrelerinde gözlenen etkiye paralel bir etki taze hazırlanmış sarımsak ekstrelerinde de gözlenmiştir. Bu bize, homojenize edilen sarımsak örneklerinde mekanik parçalanma sonucu açığa çıkan alliinaz enziminin alliin üzerine çok hızlı katalitik etki gösterdiğini ve kısa sürede ekstre içeriğindeki alliin'in büyük bölümünün allisin'e dönüştüğünü düşündürmektedir. Ancak, özellikle peroksidatif hasardan sorumlu hidrojen peroksit'in detoksifikasyonundan rol oynayan CAT aktivitesindeki kaybın önlenmesinde en dramatik etkiyi bekletilmiş sarımsak ekstreleri göstermiştir ($p<0.05$).

Oksidatif stres, reaktif oksijen türlerinin konsantrasyonlarında ve hücresel bileşenlerde oluşturduğu hasarlardaki artış ile karakterize bir durumdur. Son yıllarda geliştirilen birtakım ölçüm teknikleriye serbest radikal düzeyleri in vitro olarak doğrudan ölçülebilse bile bu ölçümlerin in vivo gerçekleştirilebilmesi oldukça

güçtür. Bu nedenle, oksidatif stresin organizmada oluşturduğu hasarın değerlendirilmesi amacıyla genellikle SOD, CAT, GPx, GST gibi antioksidan enzim düzeyleri ile MDA, NOx, Okside nükleobaz gibi serbest radikallerin etkileşim ürünlerinin düzeyleri ölçülmektedir. Bu bağlamda, bu çalışmada kanserojen bir ajan olan 7,12-DMBA ile indüklenen oksidatif karaciğer hasarının ve farklı sarımsak preparatlarının koruyucu etkilerini değerlendirebilmek amacıyla karaciğer doku homojenatlarından SOD, CAT, GPx, MDA ve 8-OHdG düzeyleri ölçüldü.

Sonuçlarımız, genel bir değerlendirme ile ele alındığında beklendiği üzere 7,12-DMBA enjekte edilen grupta kontrole kıyasla tüm parametreler istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde ($p<0.05$) değişime uğramıştır. Antioksidan sistem parametrelerinin karsinojen bileşiklerin enjeksiyonları sonrası değişime uğraması literatür bulgularıyla örtüşmektedir (92,93). 7,12- DMBA grubunda kontrole kıyasla MDA ve 8-OHdG düzeyleri anlamlı bir şekilde artmış antioksidan enzimler olan SOD, CAT ve GPx ise anlamlı bir şekilde azalmıştır ($p<0.05$).

Lipid peroksidasyonunun değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılan bir biyomarkör olan MDA, 7,12-DMBA grubunda kontrole kıyasla önemli düzeyde artarken, 7,12-DMBA ile birlikte bekletilmiş sarımsak ve tablet verilen gruplarda bu artış anlamlı bir şekilde inhibe edilmiştir. Frenkel ve arkadaşları (74,75), 7,12-DMBA'nın karaciğerde serbest oksijen radikallerinin yanı sıra önemli ölçüde hidrojen peroksit oluşumuna neden olduğunu rapor etmişlerdir. Artan reaktif oksijen türleri MDA'daki artışı açıklarken, bekletilmiş sarımsak ekstrelerinin ve sarımsak tabletinin lipid peroksidasyonunun önlenmesinde etkili olduğu görülmektedir. Bekletilmiş sarımsak ekstrelerinde zamanla bir miktar allisin'in, S-allilsistein ve S-allilmerkaptosistein'e dönüştüğü ve bu bileşenlerin lipid peroksidasyonuna karşı son derece koruyucu olduğu rapor edilmiştir (94,95).

Antioksidan sistemin enzimatik bileşenlerinin oksidatif strese karşı yanıtı değişiklik göstermektedir. Literatürde, birbiriyle çelişen bulgular göze çarpmaktadır. Ancak, genel olarak oluşturulan oksidatif stres kısa süreli ve çok şiddetli değil ise organizma yanıt olarak antioksidan enzim sentezini upregülasyon ile arttırmakta ve

yüksek enzimatik aktivite değerleri elde edilmektedir. Öte yandan, uzun süreli ve şiddetli stres altında özellikle antioksidan enzimlerin aktif merkezinde reaktif radikaller nedeniyle oluşan oksidatif hasarlar hem enzimin konformasyonel yapısında değişime neden olmakta hem de katalitik aktivitesini azaltmaktadır. Artmış oksidatif hasar nedeniyle turnover'ı azalan enzimler, düşük enzimatik antioksidan kapasite olarak rapor edilmektedir. Çalışma bulgularımız, 7,12-DMBA enjeksiyonuna bağlı olarak antioksidan enzim aktivitelerinde azalma olduğunu göstermektedir. CAT ve GPx, hidrojen peroksit ve organik peroksitler kaynaklı peroksidatif hasarın önlenmesinde rol oynayan iki temel enzimdir ve 7,12-DMBA grubunda kontrole kıyasla anlamlı düzeyde inhibe olmuşlardır ($p < 0.05$). CAT aktivitesindeki düşüş, bekletilmiş sarımsak ekstresi uygulanması ile anlamlı şekilde önlenmiştir. Bu durum, bekletilmiş sarımsak ekstralarının lipid peroksidasyonunu da inhibe etmesiyle uyumluluk göstermektedir. GPx'deki aktivite kaybı ise taze sarımsak ekstralarının uygulandığı grupta anlamlı düzeyde önlenmiştir. Bu noktada, taze sarımsak ekstralarında alliin ve allisin'in hidrojen peroksit'in yanı sıra organik peroksitler üzerine oldukça etkili olduğunu, bekletilmiş sarımsak ekstralarında sistein türevi yapıların ise büyük oranda hidrojen peroksit ve hidroksil radikallerini detoksifiye ettiğini söyleyebiliriz.

Süperoksit radikalleri tek başına toksik etkiler göstermesinin yanısıra nitrik oksit varlığında son derece toksik bir radikal olan peroksinitrit ve hidrojen peroksit varlığında ise Haber-Weiss reaksiyonu üzerinden hidroksil radikali oluşumuna neden olmaktadır. Süperoksit radikallerinin dismutasyonundan sorumlu olan SOD enzimi aktivitesi 7,12-DMBA enjeksiyonu sonrası azalma göstermiştir. Bu aktivite kaybı farklı sarımsak preparatları verilen grupların hiçbirinde geri döndürülemediği görülmüştür. Sarımsak ekstralarının peroksidatif ajanlara karşı göstermiş olduğu detoksifiye edici etki süperoksit radikallerine karşı elde edilememiştir. Benerjee ve arkadaşları (Benerjee, 2002) yapmış oldukları çalışmada düzenli sarımsak kullanımının endojen antioksidan moleküllerin ve antioksidan enzimlerin sentezini gen düzeyinde uyardığını rapor etmişlerdir. Çalışma bulgularımız CAT ve GPx açısından sözü edilen çalışmayla paralellik gösterirken SOD enzim sonuçlarımız uyumlu görünmemektedir. Borek ve arkadaşları (1997) sarımsak ekstralarının kalp, böbrek

ve karaciğerde SOD, CAT, GPx aktivitelerini ve redükte glutatyon düzeylerini artırdığını rapor etmişlerdir.

Oksidatif stres ile kanser gelişimi arasındaki en kritik bağlantı serbest radikallerin DNA bünyesindeki nükleobazlar üzerinde oluşturduğu modifikasyonlar ve bu modifikasyonların yarattığı mutajenik etkiler üzerinden kurulmaktadır. Nükleobazlar üzerinde en sık meydana gelen ve en fazla mutajenik etki gösteren oksidatif dönüşümlerden bir tanesi deoksiguanin'in 8-OH-deoksiguanin'e dönüşümüdür (Dizdaroğlu M 1998). Bu modifiye bazın oluşumu hidroksil radikalının guanin üzerinde C-8 pozisyonundaki karbon atomuna saldırması ile oluşur. 8-OH-dG, DNA replikasyonu sırasında G-C'den A-T'ye dönüşüme neden olarak mutasyon eğilimini artırır (McDorman ve ark.2005). Çalışmamızda 7,12-DMBA rat karaciğer dokusunda 8-OH-dG miktarını anlamlı şekilde artırmış ve koruyucu amaçlı kullandığımız sarımsak preparatlarından her üçü de bu artışı önemli ölçüde inhibe etmiştir ($p < 0.05$). Lee-Yan Sheen (96) ve arkadaşları aflatoxin B1 ile rat karaciğerinde oluşturulan DNA hasarına karşı sarımsağın koruyucu etkisini rapor etmişlerdir.

Sonuç olarak, çalışma bulgularımızın tümü göz önüne alındığında güçlü bir karsinojen ajan olan 7,12-DMBA enjeksiyonu rat karaciğerinde önemli ölçüde oksidatif strese neden olmaktadır. Bu durum, antioksidan sistemle doğrudan ilişki parametrelere istatistiksel olarak anlamlı değişimler şeklinde yansımıştır. Koruyucu amaçlı kullanmış olduğumuz sarımsak preparatları arasında bekletilmiş sarımsak ekstresi formu en güçlü etkiyi göstermiştir. Öte yandan özellikle peroksidatif hasara karşı taze sarımsak ekstresinin bekletilmiş ekstrelerle paralel etki göstermesi alliin-allisin dönüşümünün çok hızlı gerçekleştiğini düşündürmektedir. Preparatların tümü süperoksit radikale karşı, diğer reaktif oksijen türlerine oranla etkisiz kalmıştır. Bu durum beklediğimiz bir sonuç değildir. Ancak özellikle 8-OH-dG oluşumu üzerine tüm sarımsak preparatlarının inhibe edici etkisi kanserden korunmak amacıyla besin seçimi konusunda sarımsağın özel bir yere sahip olması gerektiğini düşündürmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Kanser hastalığı tüm dünyada bütün ölüm nedenleri arasında koroner arter hastalıklarının ardından ikinci sırada yer almaktadır. Yapılan araştırmalar sonucunda, tüm kanserlerin oluşum sürecinde çevresel etkenler, genetik ve diyetin önemli rol oynadığı ortaya konmuştur. Özellikle sanayileşmiş şehirlerde yaşayan insanların günlük yaşamları sırasında farkında olmadan güçlü kimyasal etkilere sahip kimyasal maddelere maruziyeti söz konusudur. Sigara, asfalt buharı, eksoz dumanı, çok kere kullanılmış kızartma yağları içerisinde tespit edilen 7,12-DMBA, PAH gurubu karsinojen ajanlardan bir tanesidir ve pek çok insan günlük yaşamları sırasında bu kimyasala maruz kalmaktadır.

Kanserden korunmada en etkili faktörlerden bir tanesi beslenme alışkanlıklarıdır. Diyetlerinde sebze ağırlıklı besinlere önem veren, antioksidan içerikli gıdaları daha yoğun tüketen bölgelerde yaşayan insanlar kanser ve oksidatif stres ile ilişkili hastalıklara daha az yakalanmakta ve bu bölgelerde insanları ortalama yaşam süreleri de daha uzun olmaktadır. Sarımsak, yüzyıllardan beri tıbbi bitkiler arasındaki yerini ve önemini koruyan, pek çok toplumda koruyucu ve tedavi edici etkileri nedeniyle yaygın bir şekilde tüketilen, antioksidan içeriği zengin bir besin maddesidir. Antioksidan sistemi desteklediği pek çok bilimsel çalışma ile ortaya konmuştur.

Çalışma bulgularımızın tümüyle göz önüne alındığında güçlü bir karsinojen ajan olan 7,12-DMBA enjeksiyonu rat karaciğerinde önemli ölçüde oksidatif strese neden olmaktadır. Koruyucu amaçlı kullanmış olduğumuz sarımsak preparatlarının tümü oluşan oksidatif hasarı önleyici etki göstermiştir ancak bekletilmiş sarımsak ekstresi bazı parametreler açısından en güçlü antioksidan koruyuculuğa sahiptir. Bu bağlamda kanserden korunmak amacıyla sarımsak içerikli besin maddelerinin düzenli olarak tüketilmesi hem antioksidan enzim sistemini destekleyerek hem de DNA bünyesinde oluşan oksidatif baz hasarlarını önleyerek etkili olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Burçak, G., Andican G. (2004). Oksitativ DNA Hasarı ve Yaşlanma. *İstanbul Üniversitesi Çapa Tıp Fakültesi Dergisi*, 35(4), 159
2. Diplock, A. T., J.-L. Charleux, G. Crozier-Willi, F. J. Kok, Rice-Evans, C., Roberfroid, M., Stah, W., Viiia-Ribes, J. (1998). Functional food science and defence against reactive oxidative species. *Brit J Nutr*, 80, Suppl. 1, S77-S112.
3. Chung, LY., (2006). The Antioxidant Properties of Garlic Compounds: Allyl Cysteine, Alliin, Allicin, and Allyl Disulfide. *J Med Food*, 9 (2), 205–213.
4. Taşkın, R., Özgen, U., Babacan, M., Tuncel, E., Koyuncu, M. (1997). *Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 26 (2), 77-82.
5. Atmaca, G.,(2003). Sarımsağın ve Tiol İçeren Bazı Bileşiklerin Antioksidatif Etkileri. *Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 20(1-3), 54-60
6. Sies, H. (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol*, 82, 291-295.
7. Onat, T., Emerk, K., Sözman, E. (2006). *İnsan Biyokimyası*. Ankara:Palme Yayıncılık.
8. Fantel, A. (1996). Rective Oxygen Species in Developmental Toxicity: *Review and Hypothesis Teratology*, 53: 196-217
9. Banerjee, S.K., Mukherjee., P., Maulik K. (2003). Garlic as an Antioxidant: The Good, The Bad and The Ugly. *Phytother Res*, 17, 97–106.
10. Yaraloğlu Gürgöze, S., Şahin, T., Durak., M.H. (2007). Memelilerde Ortalama Yaşam Süresi ve Yaşlanma Sürecinde Serbest Radikallerin Rolü. *İstanbul Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 33(1), 43-49.
11. Keskin, D., Karsan, O., Ezirmik, N., Çiftçioğlu, N. (1999). *Turkish Journal of Arthroplasty And Arthroscopic Surgery*, 10(2), 207-210.
12. Akkuş, İ. (1995). Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. Konya:Mimoza Yayınları.
13. Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (1999). Free Radicals in Biology and Medicine, 3ed: New York: *Oxford University Press*, pp. 936,

14. Koppenol, W.H. (2001). The Haber- Weiss cycle-70 years later. *Redox Report* 6, (4), 229-234
15. Antioksidanlar. Erişim tarihi: 05 Aralık 2010. <http://www.zayim.com/?p=16>
16. Kılınç, K., Kılınç, A. (2002). Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri. *Hacettepe Tıp Dergisi*, 33(2), 110–118.
17. Chen, S., Schopfer, P.: Hydroxyl-radical production in physiological reactions: a novel function of peroxidase. *Eur J Biochem* 260, 726-735, 1999
18. Kuyumcu, A., Polat Düzgün, A., Özmen, M.M., Besler, H.T. (2004). *Turkish Journal of Trauma & Emergency Surgery* , 10(3):149-159.
19. Min, D.B., Boff, J.M. (2002). Chemistry and reaction of singlet oxygen in foods. *Comprehensive reviews in food science and food safety* 1, 58-72
20. Essizoglu, A.,Yıldırım, Akgün E. (2009) Ruhsal bozuklukların psikobiyolojisinde nitrik oksit. *Dicle Tıp Dergisi*, Cilt:36, Sayı:1, 67-74.
21. Güray, A., Samancı, N., Ovalı, F., Dağoğlu, T.(1997). Nitrik Oksit: Fizyolojisi ve Klinik Önemi. *T Klin Tıp Bilimleri*, 17, 115-119.
22. Koca, N., Karadeniz, F. Serbest Radikal Oluşum Mekanizmaları ve Vucüttaki Antioksidan Savunma Sistemleri. *Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği dergisi*. Erişim tarihi:31 Kasım 2010, http://www.gidamo.org.tr/resimler/ekler/7b16ecf8ca53723_ek.pdf?dergi=16
23. Mercan, U. (2004). Toksikolojide Serbest Radikallerin Önemi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 15 (1-2):91-96.
24. Durmuş, A., Ünsaldı, E. (2005). Serbest Oksijen Radikalleri, Antioksidanlar ve Kırık İyileşmesi. Doğu Anadolu Bölgesi Araştırmaları
25. Memişoğulları, R. (2005). Diyabette Serbest Radikallerin Rolü ve Antioksidanların Etkisi. *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi*, 3, 30-39.
26. Çimeni Ç., Öter, Ç., Demir, H., Savran, A. (2005). Rat Eritrositlerinden Elde Edilen Katalaz Enziminin Karakterizasyonu ve Kinetiğinin İncelenmesi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 16 (1), 15-20.
27. Bay Karabulut, A., Özerol, E., Temel, İ., Gözükara, E. M., Akyol, Ö. (2002). *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 9(2), 85-88.

28. Eşrefoğlu, M. (2009). Hücre Hasarı ve Ölümü: Oksitatif Stres ve Antioksidan Savunma Sistemi. *Türkiye Klinikleri*, 29(6):1660-76.
29. Öztürk, Ç., Gözükara, M., Uysal, A. (1997). Kronik lösemili hastalarda eritrosit içi katalaz aktiviteleri. *Turgut Özal Tıp Merkezi Dergisi*, 4(1)
30. Yılmaz, S., Sofuoğlu, K., Delikara, N., Çetinkaya, T., Yılmaz, E. (2008). Semende Reaktif Oksijen Türevleri ve Antioksidanlar. *Zeynep Kamil Tıp Bülteni*, 39(3), 131-135
31. Demir, H., Erat, M., Şakiroğlu, M. (2006). In Vitro Effects of Some Antibiotics on Glutathione Reductase Obtained from Chicken Liver. *Turk. J. Vet. Anim. Sci*, 30, 513-519.
32. Çaylak, E., Halifeoğlu, İ. (2010). Kurşunun Çocuklardaki Antioksidan Enzim Üzerine Etkileri ve Antioksidanların Tedavi Edici/ Koruyucu Rolü. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*, 53, 159-173.
33. Burk R.F., Nishiki K., Lawrence R.A., Chance, B. (1978). Peroxide removal by selenium-dependent and seleniumin-independent glutathione peroxidases in hemoglobin-free perfused rat liver. *The Journal of Biological Chemistry* 253, (1), 43-46,
34. Konukoğlu, D., Akçay, T. (1995) Glutatyon Metabolizması ve Klinik Önemi. *T Klin Tıp Bilimleri* 1995, Cilt:15 214-218.
35. Dinçer, Y., Saygılı, E.İ., Akçay, T. (2003). Sigaranın DNA Hasarı ve Kan Glutatyon Düzeyi Üzerine Etkisi. *T Klin Tıp Bilimleri*, 23, 108-111.
36. Oztürk, M., Güzelhan, Y., Sayar, K., Tüzün, U. (2001). Yaygın gelişimsel bozukluğu olan çocuklarda plazma malondialdehit ve glutatyon düzeylerinin araştırılması. *Klinik Psikofarmakoloji Bülteni* 11, (3), 155-159
37. Şener, G., Yeğen, B.Ç. İskemi Reperfüzyon Hasarı. Erişim tarihi: 20 Aralık 2010, http://www.klinikgelisim.org.tr/eskisayi/kg22_3/2.pdf
38. Şimşek, F. (1999). Serbest Oksijen Radikalleri, Antioksidanlar ve Lipit Peroksidasyonu. *T Klin Pediatrik*, 8,42-47.
39. Okcu, Z., Keleş, F. (2009). Kalp-Damar Hastalıkları ve Antioksidanlar. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 40(1), 153-160.

40. Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., Telser, J. (2007). Free Radicals and Antioxidant in Normal Physiological Functions and Human Disease. *Int J Biochem Cell B*, 39, 44-84
41. Erdal, N., Altunkaynak, Y., Altunkaynak, E., Öztürk, M., Mutluay, B., Köksal, A., Baybaş, S. (2005). Migrenli Hastalarda Oksidatif Stres Göstergesi Olarak Lipid Peroksidasyonunun İncelenmesi. *Düşünen Adam Dergisi*, 18(3), 129-135.
42. Kozluca, O. (1993). Serbest Radikaller ve Kanser. *Kartal Eğitim ve Araştırma Klinikleri*, 4, 1-4.
43. Devasagayam, TPA., Tilak, JC., Bloor, KK., Sane, KS. (2004). Free Radicals and Antioxidants in Human Health: Current Status and Future Prospects. *Japi*, 52, 794-803.
44. Atmaca, E., Aksoy, A. (2009). Oksidatif DNA Hasarı ve Kromatografik Yöntemlerle Tespit Edilmesi. *YYU Veteriner Fakültesi Dergisi*, 20(2), 79-83.
45. Ozan, E., Çolakoğlu, N., Sönmez, M.F., Ozan, S., Yılmaz, S., Taşdemir, B., Ozan, G. (2005). Sigara İnhalasyonunun Trakea'da Oluşturduğu Yapısal Değişiklikler Üzerine Melatonin ve C Vitamininin Etkileri. *Fırat Tıp Dergisi* 10(2), 40-44.
46. Yokuş, B., Çakır, D.Ü. (2002). In vivo Oksidatif DNA Hasarı Biyomarkeri; 8-hidroksy-2'-deokxyguanosine. *T Klin Tıp Bilimleri*, 22, 535-543.
47. Kılçksız, S., Demirel, C. (2008). Oksidatif Stres, Radyasyona Bağlı Hasar ve Radyokoruyucu Olarak N-asetil-sistein'in Potansiyel Rolü. *Türk Onkoloji Dergisi* 23(4), 200-207.
48. Lipidler. Erişim tarihi: 12 Kasım 2010. <http://www.mustafaaltinisik.org.uk/89-1-08.pdf>
49. Halliwell, B., Whiteman, M. (2004). Measuring Reactive Species and Oxidative Damage in vivo and in Cell Culture: How Should You do it and What do the Result Mean? *Brit J Pharmacol*, 142, 231-255.
50. Mihmanlı, A., Güneylüoğlu, D., Özşeker, F., Arslan, S., Özgel, M., Akkaya, E. (2003). Astımlı Hastalarda Serbest Oksijen Radikalleri ve Antioksidan Aktiviteleri. *Toraks Dergisi*, 4(3):264-268.

51. Marnett, L.J. (2002). Oxy radicals, lipid peroxidation and DNA damage. *Toxicology* 181-182, 219-222.
52. Montine, T.J., Neely, M.D., Quinn, J.F., Markesbery, W.R., Roberts, L.J., Morrow, J.D. (2002). Lipid peroxidation in aging brain and Alzheimer's disease. *Free Radical Biology & Medicine* 33, (5), 620-626.
53. Çelik, H. (2008) Ankilozan Spondilitli Hastalarda Serum Leptin, Sitokin ve Oksitatif Stres Düzeylerinin Araştırılması. Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta.
54. Çelikezen, F.Ç., Ertekin, A. (2008). Ratlarda Akciğer Fibrozisinde Lipid Peroksidasyonu (MDA), Antioksidan Madde (Glutatyon, Seruloplazmin) ve Bazı Antioksidan Vitamin (B-Karoten, Retinol) Deneylerinin İncelenmesi. *Yüzüncüyıl Veteriner Fakültesi Dergisi* 2, 17-20.
55. Akkoç, H. (2008). Miyokardiyal İskemi Reperfüzyon Hasarı. *Dicle Tıp Dergisi*, 35(3),211-215.
56. Kayalı, R., Çakatay, U. (2004). Protein Oksidasyonunun Ana Mekanizmaları. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*; 35(2), 83-89.
57. Çakatay, U., Kayalı, R. (2004). Protein Oksidasyonunun Klinik Önemi. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*; 35(3), 140-149.
58. Kanser Gelişim Mekanizmaları. Erişim tarihi: 05 Aralık 2010. http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789283204237_tur_p189-260.pdf
59. Kanarığ Gürel, Derya. (2007). Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesi Erişkin Onkoloji, Hematoloji Kliniklerinde Kemoterapi Uygulanan Hastaların Yaşam Kalitesi ve Bunu Etkileyen Faktörlerin İncelenmesi. Çukurova Üniversitesi, Adana.
60. Özben, T. (2006). Oxidative Stres and Apoptosis: Impact on Cancer Therapy. *J Pharm Sci*, 96(9), 2181-96.
61. Ertekin, A., Türel, İ., Oto, G., Çelikezen, F.Ç., Yaşar, S. (2008). Isırgan Otunun Dimetilbenzantrazen Uygulanan Tavşanlarda Lipit Peroksidasyonu, Antioksidan Maddeler ve Nitrit-Nitrat Düzeyleri Üzerine Etkisi. *Y.Y.Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2, 11-15

62. Koçtürk, S.(Ekim 2009). **Oksitadif Stresin Sinyal İletim ve Apoptoz Mekanizmalarında Önemi** [Poster]. XXI. Ulusal Biyokimya Kongresi, İstanbul.
63. Lim, V., Korourian, S., Todorova, V.K., Kaufmann, Y., Klimberg, V.S. (2008). Glutamine Prevents DMBA-induced Squamous Cell Cancer. *Oral Oncology*, 45, 148-155.
64. Özelçi Kavas, G. (1994). Reaktif Oksijen Metabolitlerine Fیزیopatolojik Yaklaşım. *Ankara Tıp Mecmuası*; 47, 579-592
65. Curnutte, J.T.B. (1987). Chronic Granulomatous Disease, *Adv Hum Genet* 16, 229
66. Özkaya, A., Çelik, S., Yılmaz, Ö. (2009). 7,12-Dimetilbenz[a]antrasen Verilen Kobayların Beyin Lipit Bileşenleri Üzerine α -Lipoik asit'in Etkisi. *Fırat Üniv. Fen Bilimleri Dergisi* 21 (1), 61-65
67. Batcioglu, K., Karagözler, AA., Ozturk, IC., Genc, M., Bay, A., Öztürk, F., Aydogdu N. (2005). Comparison of Chemopreventive Effects of Vitamin E Plus Selenium Versus Metatonin in 7,12-Dimethyl Benz[a]anthracene-induced Mouse Brain Damage. *Cancer Detection and Prevention*, 29, 54-58
68. Agarwal, KC. (1996). Therapeutic Actions of Garlic Constituents. *Medicinal Research Reviews*, Vol. 16(1) 111-124
69. Asdaq, S.M., Inamdar, M.N. (2010). Potential of garlic and its active constituent, S-allyl cysteine, as antihypertensive and cardioprotective in presence of captoril. *Phytomedicine*, 17, 1016-1026.
70. Cantweel, M. (2000). Alliin in Garlic. *Perishables Handling Quarterly Issue* No:102, 5-6
71. Iciek M, Kwiecień I, Włodek L. (2009). Biological Properties of Garlic and Garlic-Derived Organosulfur Compounds. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. Apr;50(3),247-65.
72. Lau, BHS. (2001). Suppression of LDL Oxidation by Garlic. *Journal of Nutrition* 131, 958-988.

73. Pedraza- Chaverri, J., Medina-Campos, O.N., Avila-Lombardo, R., Zuniga-Bustos, A.B., Orozco-Ibarra, M. (2006). Reactive Oxygen Species Scavenging Capacity of Different Cooked Garlic Preparations. *Life Sciences*, 78, 761-770.
74. Ayaz, E., Alpsoy, C.H. (2007). Sarımsak (*Allium sativum*) ve Geleneksel Tedavide Kullanımı. *Türk Parazitoloji Dergisi*; 31(2), 145-149.
75. Borek, C. (2001). Antioxidant Health Effects of Aged Garlic Extract. *The American Society for Nutritional Sciences*. Erişim tarihi: 07 Haziran 2010, <http://jn.nutrition.org/content/131/3/1010S.abstract>
76. Amagase, H. (2006). Clarifying the Real Bioactive Constituents of Garlic. *American Society for Nutrition*; 136(3), 716-725.
77. Tsao, S., Yin, M. (2000). In vitro Activity of Garlic Oil and Four Diallyl Sulphides against Antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*; 47(5), 665-670.
78. Minami, T., Boku, T., Inada, K., Morita, M., Okazaki, Y., (1989) Odor components of human breath after the ingestion of grated raw garlic. *J Food Sci.*,54:763–765.
79. Rosen, R.T., Hiserodt, R.D., Fukuda, E.K., Ruiz, R.J., Zhou, Z., Lech, J., Rosen, S.L., Hartman, T.G., (2001). Determination of allicin, s-allylcysteine and volatile metabolites of garlic in breath, plasma or simulated gastric fluids. *J Nutr.*, 131:968–971.
80. Atasayar Sabuncuoğlu, S., Baydar, T., Giray, B., Şahin, G. (2008). Mikotoksinler: Toksik Etkileri, Degredasyonları, Oluşumlarının Önlenmesi ve Zararlı Etkilerinin Azaltılması. *Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Dergisi*; 28(1), 63-92.
81. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Ronndall, R.J. (1951). Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193, 265-271.
82. Mihara, M., Uchiyama, M.: (1978). Determination of Malondialdehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem*, 86, 271-278.
83. McCord, J.M., Fridovich, I. (1969). Superoxide Dismutase: An enzymatic function of erythrocyte protein (hemocyanin). *J Biol Chem*, 244(22), 6049-6055.

84. Omar, S.H., Al-Wabel, N.A. (2010). Organosulfur Compounds and Possible mechanism of Garlic in Cancer. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 18, 51-58.
85. Luck, H. (1963). Catalase. Edited by: Bergmeyer HU: *Methods of enzymatic analysis* (885-888). New York: Academic Press.
86. Lawrence, R.A., Burk, R.F. (1976). GSHPx activity in rat liver *Biochem. Biophys Res Comm*, 71, 952-958.
87. Gupta, R. C. (1984). Nonrandom binding of the carcinogen N-hydroxy-2-acetylaminofluorene to repetitive sequence of rat liver DNA in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA*, 81, 6943-6947.
88. Das, D.K., Engelman, R.M. (1990). Mechanism of free radical generation during reperfusion of ischemic myocardium. In: Das, D.K., Essman, W.B: *Oxygen Radicals: Systemic Events and Disease Process* (97-121). Basel: Karger
89. Noblitt, S.D., Huehls, A. M., Morris Jr, D. L. (2007). The role of metal ion binding in generating 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine from the nucleoside 2'-deoxyguanosine and nucleotide 2'-deoxyguanosine-5'-monophosphate. *J Inorg Biochem*, 101, 536-542.
90. Thanusu, J., Kanagarajan, V., Nagini, S., Gopalakrishnan, M. (2010). Chemopreventive potential of 3-[2,6-bis(4-fluorophenyl)-3-methylpiperidin-4-ylidenamino]-2-thioxoimidazolidin-4-one on 7,12-DMBA induced hamstre buccal pouch carcinogenesis. *J Enyme Inhib Med Chem*. 25(6), 836-843.
91. Koul, A., Arora, N., Tanwar, L. (2010). Lycopene mediated modulation of 7,12 Dimethylbenz (a) anthracene induced hepatic clastogenicity in male Balb/c mice. *Nutr Hosp*, 25(2), 304-310.
92. Frenkel, K. (1993). The role of active oxygen species in biological damage and the effect of some chemopreventive agents. In: Troll, W., Kennedy, A.R. (Eds), *Protease Inhibitors as Cancer Chemopreventive Agents* (227-249). New York: Plenum Press.
93. Frenkel, K., Grunberger, D., Kasai, H., Komura, H., Nakanishi, K. (1981). Identification of novel 7,12-dimethylbenz[a]anthracene adducts in cellular ribonucleic acid. *Biochemistry*, 20(15), 4377-4381.

94. Carmia, B. (2001). Antioxidant health effects of aged garlic extract. *Journal of Nutrition*, 131, 1010-1015.
95. Zenga, T., Guob, FF., Zhanga, CL., Zhaoa, S., Doua, DD., Gaoa, XC., Xiea, KQ. (2008). The anti-fatty liver effects of garlic oil on acute ethanol-exposed mice. *Chem Biol Interact*, 176, 234-242
96. Sheen, L.Y., Wu, C.C., Lii, C.K., Tsai, S.J. (2001). Effect of diallyl sulfide and diallyl disulfide, the active principles of garlic, on the aflatoxin B(1)-induced DNA damage in primary rat hepatocytes. *Toxicol Lett*, 122(1), 45-52.

ÖZGEÇMİŞ

1983 yılında Uşak'ta doğdum. İlk, orta ve lise eğitimimi Malatya'da tamamladım. Lisans eğitimimi İnönü Üniversitesi Eczacılık Fakültesinde 2007 yılında bölüm üçüncüsü olarak tamamladım. 2008 yılında yüksek lisans eğitimine başladım. Halen Ağrı Devlet hastanesinde eczacı olarak çalışmaktayım.