



**FENETİL İZOTİYOSİYANATIN RATLARDA YÜKSEK
YAĞ DIYETİ VE STREPTOZOTOSİN İLE İNDÜKLENEN
YAĞLI KARACİĞER HASTALIĞINA
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Buğrahan ATICI

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

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

Yüksek Lisans Tezi – 2021

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

**FENETİL İZOTİYOSİYANATIN RATLARDA YÜKSEK
YAĞ DIYETİ VE STREPTOZOTOSİN İLE İNDÜKLENEN
YAĞLI KARACİĞER HASTALIĞINA
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Buğrahan ATICI

**Biyokimya Anabilim Dalı
Yüksek Lisans**

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

Bu araştırma İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2019/1876 proje numarası ile desteklenmiştir.

**MALATYA
2021**

KABUL VE ONAY SAYFASI



İÇİNDEKİLER

| | |
|--|------|
| ÖZET | vi |
| ABSTRACT..... | vii |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ | viii |
| ŞEKİLLER DİZİNİ | xi |
| TABLolar DİZİNİ..... | xii |
| GRAFİKLER DİZİNİ..... | xiii |
| RESİMLER DİZİNİ | xiv |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER | 4 |
| 2.1. Karaciğer Morfolojisi..... | 4 |
| 2.1.1. Karaciğerin İşlevleri..... | 5 |
| 2.2. Nonalkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı (NAFLD)..... | 6 |
| 2.2.1. NAFLD Epidemiyolojisi ve Morfolojisi..... | 7 |
| 2.3. Serbest Radikaller | 8 |
| 2.3.1. Reaktif Oksijen ve Nitrojen Türleri | 9 |
| 2.3.2. Serbest Radikallerin Biyomoleküllere Etkileri | 9 |
| 2.4. Antioksidan Savunma Sistemi | 10 |
| 2.4.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)..... | 10 |
| 2.4.2. Katalaz (CAT)..... | 11 |
| 2.4.3. Glutasyon Peroksidaz (GPx) | 11 |
| 2.4.4. Glutasyon S-Transferazlar (GST)..... | 12 |
| 2.4.5. Glutasyon Redüktaz (GR) | 12 |
| 2.5. Nükleer faktör E2 ile ilişkili faktör 2 (Nrf2)..... | 12 |
| 2.5.1. Keap1/Nrf2/ARE Yolağı..... | 13 |
| 2.6. Sirtuinler ve Etki Mekanizmaları | 15 |
| 2.6.1. SIRT1 | 16 |
| 2.7. Fitokimyasallar ve Çeşitleri | 17 |
| 2.8. İzotiyosiyanatlar (ITC)..... | 19 |
| 2.8.1. Fenetilizotiyosiyanat (PEITC) | 20 |
| 3. MATERYAL VE METOT | 23 |
| 3.1. Gereçler..... | 23 |
| 3.1.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Malzemeler | 23 |

| | | |
|---------|--|----|
| 3.1.2. | Çalışmada Kullanılan Cihazlar | 24 |
| 3.2. | Deney Hayvanlarının Temini ve Deney Gruplarının Hazırlanması..... | 24 |
| 3.3. | Yüksek Yağlı Rat Yeminin Hazırlanması..... | 25 |
| 3.3.1. | Numune Alınması ve Hazırlık Aşaması..... | 26 |
| 3.4. | Karaciğer Dokusunun Hazırlanması | 26 |
| 3.5. | Biyokimyasal Analizler..... | 27 |
| 3.5.1. | Protein Miktar Ölçümü | 27 |
| 3.5.2. | MDA Düzeyinin Ölçümü..... | 28 |
| 3.5.3. | Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesinin Ölçümü..... | 28 |
| 3.5.4. | Katalaz (CAT) Aktivitesinin Ölçümü | 29 |
| 3.5.5. | Glutasyon Peroksidaz (GPx) Aktivitesinin Ölçümü..... | 30 |
| 3.5.6. | Serum ALT Aktivitesinin Ölçümü..... | 31 |
| 3.5.7. | Serum Trigliserit Düzeyinin Ölçümü..... | 32 |
| 3.5.8. | Serum Total Kolesterol, HDL ve LDL/VLDL Düzeylerinin Ölçümü..... | 33 |
| 3.5.9. | GST Düzeyinin Ölçümü..... | 33 |
| 3.5.10. | Nrf2 Aktivitesinin Ölçümü | 34 |
| 3.5.11. | SIRT1 Düzeyinin Ölçümü | 35 |
| 3.5.12. | NF- κ B Düzeyinin Ölçümü..... | 36 |
| 3.6. | Karaciğer Dokusunun Histopatolojik İncelenmesi | 37 |
| 3.7. | İstatistiksel Analiz..... | 37 |
| 4. | BULGULAR..... | 41 |
| 4.1. | MDA Düzey Ölçümünün Sonuçları..... | 41 |
| 4.2. | SOD Aktivite Ölçümünün Sonuçları | 42 |
| 4.3. | CAT Aktivite Ölçümünün Sonuçları | 43 |
| 4.4. | GPx Aktivite Ölçümünün Sonuçları | 44 |
| 4.5. | Serum ALT Aktivite Ölçümünün Sonuçları | 45 |
| 4.6. | Serum Trigliserit Düzey Ölçümünün Sonuçları..... | 46 |
| 4.7. | Serum Total Kolesterol, HDL, LDL/VLDL Düzey Ölçümünün Sonuçları..... | 47 |
| 4.8. | GST Düzey Ölçümünün Sonuçları | 48 |
| 4.9. | Nrf2 Aktivite Ölçümünün Sonuçları..... | 49 |
| 4.10. | SIRT1 Düzey Ölçümünün Sonuçları | 50 |
| 4.11. | NF- κ B Düzey Ölçümünün Sonuçları..... | 51 |
| 4.12. | Histolojik Bulgular..... | 52 |
| 5. | TARTIŞMA | 55 |

| | |
|---------------------------|----|
| 6. SONUÇ VE ÖNERİLER..... | 62 |
| KAYNAKLAR..... | 64 |
| EKLER..... | 84 |



TEŞEKKÜR SAYFASI

İnönü Üniversitesi Eczacılık Fakültesinde Biyokimya Anabilim Dalında yapmış olduğum bu çalışmamın yürütülmesi sırasında desteğini esirgemeyen, bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım hocam Sayın Dr.Öğr.Üyesi Ayşe Burçin UYUMLU' ya teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek Lisans tez çalışmamda emeği geçen Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda görev yapan Doç.Dr Aslı TAŐLIDERE' ye, deney hayvanlarının temini ve yardımlarından dolayı Deneysel Araştırmalar Birimine ve personeline teşekkürü bir borç bilirim. Eğitimim süresince benden desteklerini esirgemeyen, her zaman yanımda olan sevgili eşim Tuğba' ya ve oğlum Ayaz Demir' e sevgi dolu teşekkürlerimi sunarım.

İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi Birimi'ne 2019/1876 nolu projemize desteklerinden dolayı teşekkür ediyorum.

Buğrahan ATICI

ÖZET

Fenetil izotiyosiyanatın ratlarda yüksek yağ diyeti ve streptozotosin ile indüklenen yağlı karaciğer hastalığına etkilerinin incelenmesi

Amaç: Bu çalışmada, yüksek yağ diyeti ve streptozotosin ile oluşturulan deneysel diabetesin indüksiyonu sonucunda ortaya çıkan yağlı karaciğer hastalığında, oksidatif stres ve karaciğer hasarına karşı fenetil izotiyosiyanat'ın, SIRT1-Nrf2 yolağı üzerinden etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Materyal-Metot: 30 adet (150-250g, 6-8 haftalık, erkek) Wistar Albino sıçanlardan her grupta 10 sıçan olacak şekilde üç grup halinde gruplandırıldı: Kontrol, yüksek yağlı diyet + Streptozotosin (35mg / kg), yüksek yağlı diyet + Streptozotosin (35mg / kg) + Fenetil izotiyosiyanat (40 mg / kg). Serum ALT seviyeleri ve serum lipidleri (TG, TC, HDL ve LDL / VLDL), antioksidan enzim aktiviteleri (SOD, CAT, GPx), MDA, GST, SIRT1 ve NF- κ B seviyeleri, ayrıca Nrf2'nin DNA bağlanma seviyeleri belirlendi. Karaciğer dokularında histolojik incelemeler yapıldı.

Bulgular: Kontrol grubuna göre YYD+STZ grubunda, serum HDL düzeylerinin, karaciğer dokusunda antioksidan enzim aktivitelerinin (SOD, CAT, GPx), GST, SIRT1 and NF- κ B miktarının, aynı zamanda Nrf2'nin DNA'ya bağlanma aktivitesinin azaldığı, serum ALT, serum lipid (TG, TC, LDL/VLDL) ve MDA düzeylerinin ise arttığı gözlenmiştir ($p<0.05$). PEITC verilen gruptaki bu parametrelerde düzelmenin olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$). Histolojik incelemeler biyokimyasal analizleri desteklemiştir ($p<0.000.1$).

Sonuç: PEITC, SIRT1/Nrf2 yolağı üzerinden YYD ve STZ ile indüklenen NAFLD'yi iyileştirmiştir. PEITC'nin NAFLD'ye karşı gelecek vaat eden ve etkili bir aday ajan olabileceğini söyleyebiliriz.

Anahtar kelimeler: Fenetil izotiyosiyanat, Nrf2, SIRT1, Streptozotosin, Yüksek yağ diyeti.

ABSTRACT

Investigation of the effects of phenethyl isothiocyanate in fatty liver disease induced by high-fat diet and streptozotocin in rats.

Aim: In this study, it was aimed to investigate the effects of phenethyl isothiocyanate on the SIRT1-Nrf2 pathway against oxidative stress and liver damage in fatty liver disease caused by the induction of experimental diabetes induced by high fat diet and streptozotocin.

Materials and Methods: 30 Wistar Albino rats (150-250g, 6-8 weeks old, male) were divided into three groups (each of 10 rats): control, high fat diet+ Streptozotocin (35mg / kg), high fat diet+ Streptozotocin (35mg / kg) + Phenethyl isothiocyanate (40mg / kg). Levels of serum ALT, and serum lipids (TG, TC, HDL, and LDL / VLDL), activities of antioxidant enzymes (SOD, CAT, GPx), and levels of MDA, GST, SIRT1, and NF- κ B, also activity of DNA binding levels of Nrf2 were determined. Histological examinations were performed on the liver tissues.

Results: Compared to the control group, in the rats of the HFD+STZ group, serum HDL level, hepatic antioxidant enzyme activities (SOD, CAT, GPx), levels of GST, SIRT1, and NF- κ B, as well as DNA binding activity of Nrf2 decreased, serum ALT, serum lipids (TG, TC, LDL / VLDL) and MDA levels were observed to increase ($p < 0.05$). It was determined that there was an improvement in these parameters in the group of PEITC treatment ($p < 0.05$). Histological examinations supported biochemical analysis ($p < 0.001$).

Conclusion: PEITC improved NAFLD induced by HFD and STZ through the SIRT1-Nrf2 pathway. We can say that PEITC could be a promising and effective candidate agent against NAFLD.

Key words: Phenethyl isothiocyanate, Nrf2, SIRT1, Streptozotocin, High fat diet.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

| | |
|---|--|
| ADP | : Adenozin Di Fosfat |
| ALT | : Alanin Aminotransferaz |
| AMPK | : AMP ile Aktive Olan Protein Kinaz |
| ARE | : Antioksidan Tepki Elemanı |
| ATP | : Adenozin Tri Fosfat |
| CAT | : Katalaz |
| COX2 | : Siklooksijenaz-2 |
| Cul3 | : Cullin3 |
| DNA | : Deoksiribo Nükleik Asit |
| EGCG | : Epigallocatectin-3-Gallate |
| ER | : Endoplazmik Retikulum |
| ETS | : Elektron Taşıma Sistemi |
| GCL | : Gama-Glutamil Sentetaz |
| GPx | : Glutasyon Peroksidaz |
| GR | : Glutasyon Redüktaz |
| GST | : Glutasyon S-Transferaz |
| H₂O₂ | : Hidrojen Peroksit |
| HCC | : Hepatosellüler Karsinoma |
| HDL | : Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein |
| HO-1 | : Heme Oksijenaz 1 |
| IL | : İnterlökin |
| INOS | : Nitrik Oksit Sentaz |
| INS | : İnsülin |
| ITC | : İzotiyosiyanat |
| Keap1=INrf2 | : Kelch Benzeri ECH-İlişkili Protein 1 |
| LDL | : Düşük Yoğunluklu Lipoprotein |
| MDA | : Malondialdehit |
| NAD | : Nikotinamid Adenin Dinükleotid |
| NAFLD | : Nonalkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı |
| NASH | : Nonalkolik Steatohepatit |
| NF-$\kappa$$\beta$ | : Nükleer Faktör kapa β |

| | |
|----------------------------------|---|
| NO | : Nitrik Oksit |
| NO₂ | : Azot Dioksit |
| NQO1 | : NAD(P)H: Quinine Oksidoredüktaz |
| Nrf2 | : Nükleer Faktör E2 ile İlişkili Faktör 2 |
| O₂⁻ | : Süperoksit Radikali |
| OD | : Optik Dansite |
| OH | : Hidroksil Radikali |
| PEITC | : Fenetil İzotiyosiyanat |
| Pgc-1α | : Peroksisom Proliferatör ile Aktive Edilen Reseptör Gama Koaktivatör 1-Alfa |
| PI3K | : Fosfoinositid-3-Kinaz |
| RNT | : Reaktif Nitrojen Türleri |
| RO | : Alkoksil Radikali |
| ROO | : Peroksil Radikali |
| ROT | : Reaktif Oksijen Türleri |
| rRNA | : Ribozomal Ribo Nükleik Asit |
| SIRT1 | : Sirtuin-1 |
| SOD | : Süperoksit Dismutaz |
| STZ | : Streptozotosin |
| TC | : Total Kolesterol |
| TG | : Trigliserit |
| TGF-β | : β Tipi Transforme Edici Büyüme Faktörü |
| TNF-α | : Tümör Nekroz Faktör Alfa |
| VLDL | : Çok Düşük Yoğunluklu Lipoprotein |
| YYD | : Yüksek Yağlı Diyet |
| dk | : Dakika |
| dl | : Desilitre |
| g | : Gram |
| kg | : Kilogram |
| L | : Litre |
| M | : Molar |
| mg | : Miligram |
| ml | : Mililitre |

| | |
|-------------|---------------------------|
| mm | : Milimetre |
| mM | : Milimolar |
| ng | : Nanogram |
| nm | : Nanometre |
| nmol | : Nanomol |
| °C | : Santigrat Derece |
| pg | : Pikogram |
| rpm | : Dakikadaki Devri Sayısı |
| U | : Ünite |
| µg | : Mikrogram |
| µl | : Mikrolitre |
| µmol | : Mikromol |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| <u>Şekil No</u> | <u>Sayfa No</u> |
|--|-----------------|
| Şekil 2.2. NAFLD' nin klinik spektrumu | 6 |
| Şekil 2.3. Oksidatif dengenin bozulması | 8 |
| Şekil 2.4. Antioksidanlar | 10 |
| Şekil 2.5. Nrf2 Yapısı | 13 |
| Şekil 2.6. Keap1 Yapısı | 13 |
| Şekil 2.7. Nrf2 – Keap1 etkileşimi ve ayrılması..... | 14 |
| Şekil 2.8. Nrf2 – Keap1 – ARE | 15 |
| Şekil 2.9. SIRT1 – Nrf2 Yolağı | 17 |
| Şekil 2.10. Glukosinolatların genel yapısı | 19 |
| Şekil 2.11. Glukosinolatların hidrolizi ile ortaya çıkan ürünler | 20 |
| Şekil 2.12. Glukonasturtiin' in kimyasal yapısı | 21 |
| Şekil 2.13. PEITC' nin yapısı..... | 21 |

TABLolar DİZİNİ

| <u>Şekil No</u> | <u>Sayfa No</u> |
|---|-----------------|
| Tablo 2.1. Bölgesel NAFLD prevalansı..... | 7 |
| Tablo 2.2. Yaş dağılımına göre NAFLD prevalansı | 7 |
| Tablo 2.3. Sirtuinlerin yerleşim yerleri ve fonksiyonları | 16 |
| Tablo 3.1. Yüksek Yağ Diyeti Enerji Kompozisyonu | 25 |
| Tablo 3.2. Yüksek Yağ Diyeti Besin Kompozisyonu | 26 |
| Tablo 3.3. Kontrol, YYD+STZ ve YYD+STZ+PEITC gruplarındaki biyokimyasal parametrelere ait ortalamalar, standart hata ve standart sapma sonuçları.... | 37 |
| Tablo 3.4. Gruplar arası karşılaştırmaların yapılmasında kullanılan ANOVA testi sonuçları | 39 |
| Tablo 4.1. MDA' nın grup ortalamaları ve standart sapma verileri (p<0.05)..... | 41 |
| Tablo 4.2. SOD aktivitelerinin grup ortalamaları ve standart sapma verileri (p<0.05) . | 42 |
| Tablo 4.3. CAT aktivitelerinin grup ortalamaları ve standart sapma verileri (p<0.05). | 43 |
| Tablo 4.4. GPx aktivitelerinin grup ortalamaları ve standart sapma verileri (p<0.05).. | 44 |
| Tablo 4.5. Serum ALT' nin grup ortalamaları ve standart sapma verileri (p<0.05)..... | 45 |
| Tablo 4.6. Serum trigliserit' in grup ortalamaları ve standart sapma verileri (p<0.05)..... | 46 |
| Tablo 4.7. Serum TC, HDL, LDL/VLDL' nin grup ortalamaları ve standart sapma verileri (p<0.05) | 48 |
| Tablo 4.8. GST' in grup ortalamaları ve standart sapma verileri (p<0.05)..... | 49 |
| Tablo 4.9. Nrf2' nin DNA' ya bağlanma grup ortalamaları ve standart sapma verileri (p<0.05) | 50 |
| Tablo 4.10. SIRT1' in grup ortalamaları ve standart sapma verileri (p<0.05)..... | 51 |
| Tablo 4.11. NF- κ B' nin grup ortalamaları ve standart sapma verileri (p<0.05)..... | 52 |
| Tablo 4.12. Yüksek yağ diyeti ve STZ' nin neden olduğu hasar üzerine PEITC' nin karaciğerdeki iyileştirici etkileri. (Ort \pm SEM). | 54 |

GRAFİKLER DİZİNİ

| Grafik No | Sayfa No |
|---|----------|
| Grafik 3.1. Protein standart kalibrasyon eğrisi | 27 |
| Grafik 3.2. Tetrametoksiopropan' a ait standart kalibrasyon eğrisi | 28 |
| Grafik 3.3. SOD standart kalibrasyon eğrisi..... | 29 |
| Grafik 4.1. Kontrol, YYD+STZ ve YYD+STZ+PEITC deney gruplarının doku MDA düzeylerinin karşılaştırılması | 41 |
| Grafik 4.2. Kontrol, YYD+STZ ve YYD+STZ+PEITC deney gruplarının doku SOD aktivite düzeylerinin karşılaştırılması | 42 |
| Grafik 4.3. Kontrol, YYD+STZ ve YYD+STZ+PEITC deney gruplarının doku CAT aktivite düzeylerinin karşılaştırılması | 43 |
| Grafik 4.4. Kontrol, YYD+STZ ve YYD+STZ+PEITC deney gruplarının doku GPx aktivite düzeylerinin karşılaştırılması | 44 |
| Grafik 4.5. Kontrol, YYD+STZ ve YYD+STZ+PEITC deney gruplarının serum ALT aktivite düzeylerinin karşılaştırılması | 45 |
| Grafik 4.6. Kontrol, YYD+STZ ve YYD+STZ+PEITC deney gruplarının serum trigliserit düzeylerinin karşılaştırılması | 46 |
| Grafik 4.7. Kontrol, YYD+STZ ve YYD+STZ+PEITC deney gruplarının serum | 47 |
| Grafik 4.8. Kontrol, YYD+STZ ve YYD+STZ+PEITC deney gruplarının doku GST miktar düzeylerinin karşılaştırılması..... | 48 |
| Grafik 4.9. Kontrol, YYD+STZ ve YYD+STZ+PEITC deney gruplarının dokularında | 49 |
| Grafik 4.10. Kontrol, YYD+STZ ve YYD+STZ+PEITC deney gruplarının doku SIRT1 miktar düzeylerinin karşılaştırılması | 50 |
| Grafik 4.11. Kontrol, YYD+STZ ve YYD+STZ+PEITC deney gruplarının doku NF- κ B miktar düzeylerinin karşılaştırılması | 51 |

RESİMLER DİZİNİ

| Resim No | Sayfa No |
|--|----------|
| Resim 2.1. Karaciğer lobül kesiti | 4 |
| Resim 4.1. Kontrol grubuna ait karaciğer dokusu normal histolojik görünümde izlendi. VC: Vena sentralis. A:H-E; X20, B: H-E; X40. | 52 |
| Resim 4.2. YYD+STZ grubunda mononükleer hücre infiltrasyonu (oklar) (A, B, C), vasküler konjesyon (beyaz yıldız) (B, D), eozinofilik sitoplazmalı piknotik nükleuslu hepatositler (siyah yıldız) (D), hemoraji (siyah ince oklar) (E), vakuolizasyon (E) ve sinüzoidal dilatasyon (siyah oklar) (F) gözlendi. A: H- E; X10, B, C, D: H-E; X20, E, F: H-E; 40..... | 53 |
| Resim 4.3. YYD+STZ+PEITC grubunda karaciğer dokusunda histopatolojik hasarın belirgin derecede azaldığı gözlendi. Az miktarda mononükleer hücre infiltrasyonu (beyaz ok) (A, B), vasküler konjesyon (siyah ok) (A, B), eozinofilik sitoplazmalı piknotik nükleuslu hepatositler (siyah oklar) (C) izlendi. A: H-E; X20, B, C: H-E; X40. | 54 |

1. GİRİŞ

Nonalkolik yağlı karaciğer hastalığı (Non-alcoholic fatty liver disease=NAFLD), alkol kullanımından bağımsız olarak ortaya çıkan, steatoz, nekroz, fibrozis, inflamasyon gibi parametrelerin de eşlik edebildiği kronik bir karaciğer hastalığıdır. Metabolik, genetik, farmakolojik, cerrahi veya enfeksiyonel olarak ortaya çıkabildiği tespit edilmiştir (1). Ancak temel sebebi karaciğer yağlanması ya da basit steatoz adı da verilen, toplam karaciğer kütesinin %5' inden fazlasının lipitler tarafından işgal edilmesidir. Bu noktada yağlanmanın temel nedenleri arasında metabolik sendrom, diyabet, insülin direnci, obezite gibi faktörler yer alır.

Tek başına meydana gelen basit steatoz metabolik açıdan çok fazla problem yaratmazken, steatoza eşlik eden iltihabi infiltrasyon, nekroz, fibrozis gibi etmenler olayın çok daha ciddi boyutlara taşınmasına ve Nonalkolik steatohepatit (NASH) adı verilen hastalığın ortaya çıkmasına neden olmaktadır (2).

NAFLD gelişim basamaklarını açıklamak için kullanılan en temel görüş çift vuruş hipotezidir. Hipotezin ilk basamağı hepatosteatoz gelişimidir ve patogeneizde gösterilen en temel faktör insülin direncidir (1).

Hipotezin ikinci basamağı ise lipit peroksidasyonu ve bunun sonucunda ortaya çıkan oksidatif strestir. Peroksidasyon sonucunda ortaya çıkan ürünlerden birisi malondialdehit (MDA) olmakla beraber hücresel artışı sonucunda kemotaksis, kolajen üretiminde artış ve buna bağlı olarak fibrozis oluşumu gözlenir. Bu süreçte gözlenen oksidatif stres ise megamitokondria, hepatosit balonlaşması, Mallory cisimcikleri oluşması gibi yapısal bozuklukların yanı sıra nekroz, apoptoz, proinflamatuvar sitokinlerin salınımında düzensizlikler gibi metabolik bozuklukları da beraberinde getirmektedir (3, 4). Ayrıca süreç içerisinde NF- κ B' nin MDA tarafından aktivasyonu ile proinflamatuvar sitokinlerin (IL-6, IL-8, TNF- α , TGF- β) ve bazı hormonların (Leptin, Resistin, C-Selektin, Adiponektin) indüksiyonu tetiklenir. Bu indüksiyonun, inflamasyonu ve fibrozisi tetiklediği ve hatta hepatosit ölümünün temelinde yatan en önemli sebep olduğu düşünülmektedir (5, 6).

NAFLD' nin gelişim basamaklarından olan NASH, tek başına dahi oldukça ağır bir karaciğer patolojisine neden olurken patogenezin devamında siroz, hepatosellüler karsinoma (HCC) ve hatta oluşan hasara bağlı olarak ölüme neden olabilmektedir (7, 8).

Fitokimyasallar bitkilerde doğal olarak bulunan biyoaktif bileşiklerdir. Bu ailenin bir üyesi olan izotiyosiyanatlar genel itibari ile *Cruciferae* (*Brassicaceae*) familyasının üyeleri olan su teresi, karnabahar, brokoli, roka, mor lahana gibi sebzelerde bol miktarda bulunmaktadır. Aslında bitki bünyesi içerisinde izotiyosiyanat bileşikleri doğal olarak bulunmazken, bitkinin yapısında bulunan glukosinolatların fiziksel strese (kesilme, çiğnenme, vb) maruz kalmaları sonucu mirozinaz enziminin aktivitesi ile oluşmaktadır (9-11). İzotiyosiyanatlar ailesinin bir üyesi olan fenetilizotiyosiyanat (PEITC) özellikle su teresi ve brokolide bol miktarda bulunmakla beraber DNA hasarının engellenmesinde aktif rol oynayarak antikanserojenik etki gösterdiği bilinmektedir (11-13).

Nrf2 her zaman ekzojen ve in-situ sinyallere yanıt olarak sitoprotektif genlerin ekspresyonunu sıkı bir şekilde düzenleyen ve yaygın olarak ifade edilen bir transkripsiyon faktörüdür (14). Sitoplazma içerisinde, normal fizyolojik şartlar altında sitozolik inhibitörü olan Keap1 veya INrf2 olarak adlandırılan proteine bağlı olarak bulunur. Hücrel oksidatif stresin arttığı durumlarda Keap1' den ayrılarak çekirdeğe transloke olur ve burada ARE bölgesine bağlanarak birçok genin aktive edilmesini sağlar (15). Sonuç olarak ARE bölgesinin indüklendiği antioksidan ve detoksifikasyon genlerinin yukarı yönlü regülasyonu arttırılır. Süperoksit dismutaz (SOD), Hemeoksijenaz (HO-1), Katalaz (CAT), Glutasyon S-transferaz (GST), Glutasyon peroksidaz (GPx), NAD(P)H: quinone oksidoredüktaz (NQO1) gibi enzimler bu sitoprotektif genlerin aktivasyonu ile üretilen enzimlerin bir kısmıdır.

İlk kez *Saccharomyces cerevisiae* mayasında bulunan sirtuin genlerinin sentezlediği yedi adet sirtuin enzimi bulunmaktadır (16). Temel olarak nikotinamid adenin dinükleotid (NAD⁺) bağımlı histon ve/veya protein deasetilaz grubudur. Sirtuin ailesi içerisinde en çok üzerinde durulan ve bilimsel çalışmalara konu olan üye SIRT1' dir. SIRT1' in inflamasyonda aktif rol oynayan NF- κ B üzerinde baskılayıcı etki gösterdiği yapılan çalışmalar ile ortaya konulmuştur (17). Yine yapılan birçok çalışma ile SIRT1' in Nrf2 üzerinde yukarı yönlü regülasyonu tetikleyerek oksidatif strese karşı aktif korumada görev aldığı gösterilmiştir (18-20).

Çok sayıda çalışma, obezite ve hepatik insülin direncinin NAFLD' nin ortaya çıkmasında rol oynayan kritik patojenik faktörler olduğunu göstermektedir (21, 22). Bu faktörlerin neden olduğu sinyal ve düzenleme mekanizmalarındaki fonksiyon değişiklikleri hepatosellüler fonksiyonları bozarak NAFLD patogenezine yatkınlığı arttırmaktadır. NAFLD gelişimi ve ilerlemesi için kesin mekanizmalar tam olarak

anlaşılmasına rağmen, obezite, insülin direnci, oksidatif stres ve proinflamatuvar süreçleri içeren çok yönlü bir hipotezin sonucu olarak ortaya çıktığı kabul edilmektedir.

Bu nedenle, oksidatif stres için anahtar rol oynayan Nrf2 transkripsiyon faktörü üzerinden su teresinin etken maddesi olan PEITC' nin NAFLD mekanizması üzerinde etkisini incelemek ana hedefimizi ve hipotezimizi oluşturmaktadır. Çalışmamızdaki diğer hedefimiz ise, son yıllarda karaciğer hastalıkları hakkında yapılan araştırmalarda üzerinde sıkça durulan Sirt1' in Nrf2 üzerindeki olası etkisini araştırmaktır.

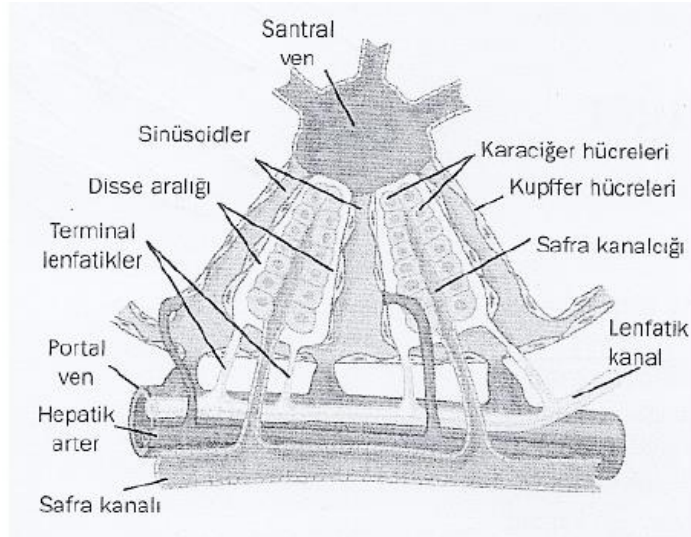
Bu amaçla çalışmamızda yüksek yağ diyeti ve streptozotosin ile oluşturulan deneysel diyabetin indüksiyonu sonucunda ortaya çıkan yağlı karaciğer hastalığında, lipid metabolizması, oksidatif stres ve karaciğerde meydana gelen hasarın azaltılmasında, PEITC' nin SIRT1 ve Nrf2 yolağı üzerinden antioksidan ve ksenobiyotik metabolizmasına etkilerini ve bu yolağın nonalkolik yağlı karaciğer hastalığının tedavisindeki potansiyel rolünü araştırdık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Karaciğer Morfolojisi

Karaciğer, insan vücudunda deriden sonra en büyük organ olup vücut ağırlığının ortalama %2' sini oluşturur (23). Erişkinlerdeki ağırlığı yaklaşık olarak 1.5 kg kadardır (24). Karında sağ üst kadranı doldurur ve karaciğerin büyük bir kısmı kaburga kafesi tarafından dış etkenlerden korunmaktadır. Karaciğer, peritonla kaplı bir organ olmakla birlikte safra kesesi yatağı, porta hepatis ve arka yüzeyde vena cava inferior' un sağ komşuluğundaki diyafram ile temas halinde olan bölgede periton bulunmamaktadır. Bu periton yapı kolajen liflerden oluşmuş olan güçlü bir bağ dokusu halindedir ve bu yapıya Glisson Kapsülü adı verilir (25).

Karaciğerin temel yapı elemanı, karaciğer epitel hücreleri olan hepatositlerdir. Bu epitel hücreleri ışık mikroskobu altında lobül şeklinde görüntülenmektedir. Karaciğerin en küçük işlevsel birimi 0.8-2 mm çapında ve birkaç milimetre uzunluğunda olan "karaciğer lobülü" adı verilen yapılardır. Karaciğer lobülünün bu yapısı genellikle iki hücreden oluşur. Bu komşu hücreler arasında küçük safra kanalcıkları bulunur. Bu kanalcıklar safra kanallarına dökülür (Şekil 2.1).



Resim 2.1. Karaciğer lobül kesiti (24)

Karaciğere gelen kan hacminin 1050 ml'si portal venden, 450 ml'si ise hepatik arter yoluyla gelmekte olup karaciğer dakikada ortalama 1500 ml kan ile sulanmaktadır (25, 26). Hepatik arterler ile gelen kan ise bölümler arasındaki hepatik arteriollere, oradan da doğrudan hepatik sinüsoidlere son olarak santral vene dökülür. Karaciğerden çıkan kan hepatik ven ise vena cava inferior' a dökülmektedir. Portal kan akımı, tüm ince bağırsakların venöz drenajını sağlar. Böylece ince bağırsakta besin değeri zengin maddeleri ve beraberinde ilaçlarla zehirli maddeleri karaciğere taşır (27).

Venöz sinüsoidler, hepatik hücreler haricinde endotel hücreleri ve büyük Kupffer hücreleri ile de döşelidir. Kupffer hücreleri, makrofaj tipi hücreler olup retikuloendotelyal hücreler olarak da adlandırılır. Hepatik sinüs kanındaki bakteri ve öteki yabancı maddeleri fagosite ederler (28).

Viral enfeksiyon, fibrozis yada inflamasyona bağlı olmadan kısmi hepatektomi veya akut karaciğer hasarına bağlı oluşan hepatik doku kayıplarında karaciğer kendini yenileme potansiyeline sahiptir. Bu sırada hepatositlerin bir ya da iki kez bölündüğü tahmin edilmektedir (28). Karaciğerin yeniden oluşumunun mekanizması tam olarak anlaşılacakla birlikte, hepatosit büyüme faktörünün karaciğer hücresinin bölünmesi ve büyümesinde önemli bir faktör olarak görülmektedir. Ayrıca epidermal büyüme faktörü, Tümör Nekroz Faktör (TNF) ve interlökin-6 (IL-6) gibi sitokinler, karaciğer hücrelerinin yenilenmesini uyarmada rol alabilir.

2.1.1. Karaciğerin İşlevleri

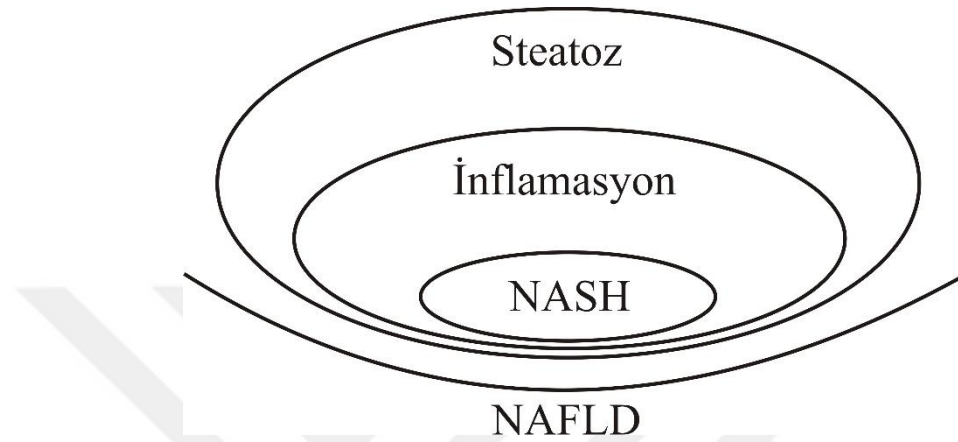
Karaciğerin Kan Depo İşlevi: Karaciğerin normal kan volümü 450ml dir. Bununla birlikte karaciğer genişleyebilen bir organ olduğundan sağ atriyumda basınç yükseldiğinde hepatik venler ve sinüsler-de büyük miktarlarda kan depolanabilir. Bundan da anlaşılacağı gibi karaciğer, kan hacmi azaldığında ek kan sağlama yeteneği olan, kan hacmi aşırı şekilde arttığında ise önemli bir kan deposu olabilen büyük venöz bir organdır.

Karaciğerin Kan Temizleme İşlevi: Barsak kapillerlerinden Portal venlere akan kan bağırsaklardan birçok bakteriyi de beraberinde karaciğere getirir. Karaciğere gelen bu kan venöz sinüsler içinden geçerken sinüsoidleri döşeyen Kupffer hücreleri tarafından son derece etkili bir şekilde temizlenmektedir.

Karaciğerin Metabolik İşlevleri: Karaciğer de vücudun diğer bölgelerinde kullanılacak birçok madde sentez edilip, işlenirken diğer birçok metabolik işlev de yürütülür. Bu metabolik işlevler karbonhidrat metabolizması, yağ metabolizması, protein metabolizması ve vitamin depolama (A, D, B12) şeklinde sıralanmaktadır.

2.2. Nonalkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı (NAFLD)

NAFLD, alkolik yağlı karaciğer hastalığına benzeyen ancak alkol kullanmayan bireylerde kendini gösteren bir karaciğer hastalığıdır. En basit haliyle karaciğer yağlanması ile başlayan inflamasyon, fibrozis ve hepatik steatozunda içerisinde yer aldığı geniş bir klinik spektruma sahiptir (29).



Şekil 2.1. NAFLD' nin klinik spektrumu (2)

NAFLD' nin temelinde yatan en basit neden steatoz olarak da adlandırılan basit karaciğer yağlanmasıdır. Karaciğer yağlanmasını kendi içerisinde ikiye ayırmak mümkündür. Bazı ilaçların kullanımı (kortikosteroidler, vb.) ile gebelik gibi nedenlere bağlı olarak ortaya çıkan akut karaciğer yağlanması ve temelinde birbirinden farklı çok fazla etkenin bulunduğu kronik karaciğer yağlanmasıdır. Kronik karaciğer yağlanmasının en temel sebepleri alkol, obezite, hiperlipidemi ve diyabet olmakla beraber AIDS, Wilson Hastalığı, Hepatit C gibi hastalıklarda da kendini gösterebilir (1).

Karaciğerde ekstrasellüler matris proteinlerinin belli bir bölgede çok fazla birikmesi durumuna karaciğer fibrozisi adı verilmektedir. Birçok kronik hastalık durumunda ortaya çıkabilen karaciğer fibrozu (metabolik sendrom, Wilson Hastalığı, aşırı alkol tüketimi, viral hepatitler, NAFLD, vb.) siroz ve sonrasında karaciğer yetmezliğine kadar devam edebilen bir mekanizmayı tetikler (30, 31).

Basit karaciğer yağlanmasının yanı sıra fibrozis, inflamasyon, hepatositlerde balonlaşmanın da görüldüğü durumlar nonalkolik steatohepatit (NASH) olarak tanımlanmaktadır. NAFLD kapsamında ortaya çıkan morbidite ve mortaliteden NASH'

in sorumlu olduğu belirtilmektedir (32, 33). NASH' in, kriptojenik siroz vakalarının yaklaşık %70' inden sorumlu olduğu düşünülmektedir (34).

2.2.1. NAFLD Epidemiyolojisi ve Morfolojisi

Yetişkin bireylerde (toplumsal olarak) yapılan tarama çalışmaları kapsamında NAFLD görülme sıklığı %17-33 olarak hesaplanmıştır. Obezitenin varlığında ise bu oran %75' e kadar çıkmaktadır. Bu hastalarda NASH görülme sıklığı ise %3 civarında kalmıştır (35).

Ülkemizde bu konu hakkında geniş çaplı araştırmalar olmamakla birlikte yapılan grup çalışmalarında; yetişkinlerin %19.8-42, genç yetişkinlerin %10.6-23.2, çocukların ise %6-11.8 arasında prevalansa sahip olduğu tespit edilmiştir (36).

Tablo 2.1. Bölgesel NAFLD prevalansı (37)

| Bölge | NAFLD Prevalansı (%) |
|---------------|----------------------|
| Afrika | 13.48 |
| Asya | 27.37 |
| Avrupa | 23.71 |
| Kuzey Amerika | 24.13 |
| Güney Amerika | 30.45 |
| Genel | 25.24 |

Tablo 2.2. Yaş dağılımına göre NAFLD prevalansı (37)

| Yaş | NAFLD Prevalansı (%) |
|-------|----------------------|
| 30-39 | 22.43 |
| 40-49 | 26.53 |
| 50-59 | 27.40 |
| 60-69 | 28.90 |
| 70-79 | 33.90 |

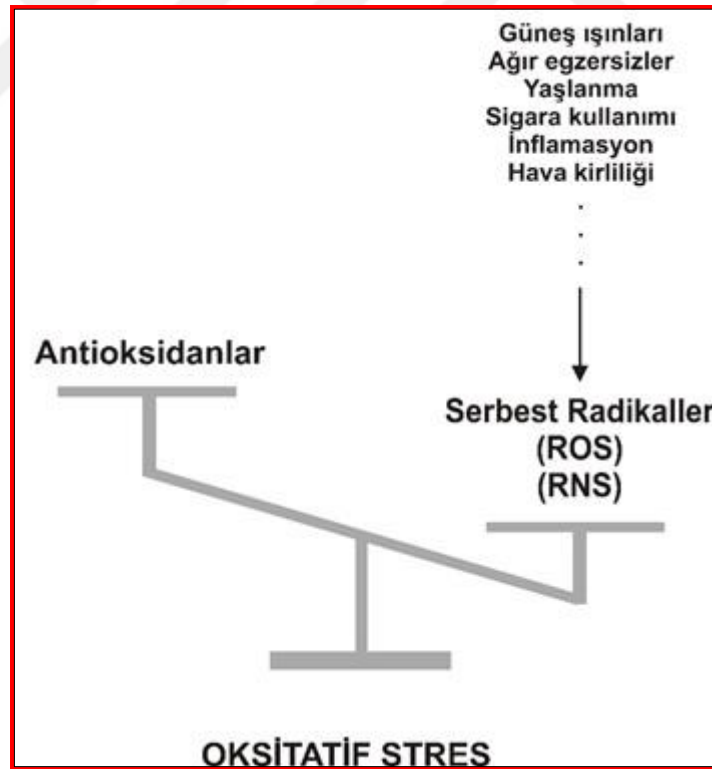
NAFLD hastalarında obezite %51.34, diyabet %22.51, hiperlipidemi %69.16, hipertansiyon %39.34, metabolik sendrom %42.54 görülme sıklığına sahipken hepatosellüler karsinoma (HCC) insidansı bin kişi için yaklaşık 0.44' tür (37).

2.3. Serbest Radikaller

En son orbitalinde ortaklanmamış elektron(lar) bulunduran ve bu nedenle diğer maddelerle kolaylıkla tepkimeye giren atom veya moleküllerdir. Serbest radikaller son yörüngedeki eşlenmemiş elektron(ların)dan dolayı oldukça kararsız bir yapıya sahiptir. Kararsız yapıdan kararlı hale geçebilmek için diğer atom ve moleküllerle reaksiyona girebilmek için oldukça saldırgan bir tavır gösterirler (38).

Serbest radikallerin büyük çoğunluğunun oksijen kaynaklı (Reaktif Oksijen Türleri = ROT) olmasına rağmen nitrojen kaynaklı (Reaktif Nitrojen Türleri = RNT) olanları da mevcuttur (39).

Vücudumuzda meydana gelen metabolik aktiviteler sonucunda serbest radikallerin oluşması doğaldır ve vücudumuzda son derece hayati öneme sahip antioksidan mekanizması tarafından kontrol altında tutulur. Ancak yaşlanma, sigara kullanımı, ağır egzersizler, hava kirliliği, güneş ışınları gibi iç ve dış faktörlere bağlı olarak vücudumuzdaki denge serbest radikallerin lehine değişim gösterir (40).



Şekil 2.2. Oksidatif dengenin bozulması

Organizmada; antioksidanlar ve serbest radikaller arasındaki dengenin bozulması oksidatif stres olarak tanımlanmakla birlikte oksidatif stres en temelde kanser olmak üzere birçok hastalığın patogenezinde aktif rol oynar (41, 42).

2.3.1. Reaktif Oksijen ve Nitrojen Türleri

Oksijenli solunum yapan canlılarda, solunumun doğal süreci olarak O₂ tüketilir. Üç aşamada gerçekleşen solunumun (Glikoliz, Krebs siklusu ve ETS) son aşaması olan elektron transport zinciri mitokondride gerçekleşir.

Elektron transport zinciri tepkimeleri sırasında enerji üretimi için elektronlar kademeli olarak her seferinde bir sonraki halkaya aktarılır. En son oksijen ile buluşur ve sonuçta su oluşur. Ancak gerçekleşen bu metabolik olaylar sırasında oksijenin tamamı suya dönüşmeyip yaklaşık %2-3 kadarı oksijen kökenli radikallerin oluşmasına neden olur. Ayrıca, bu metabolik yan ürünler diğer hücre organellerinde (ER, Lizozom, Peroksizom) ve sitozolik enzim faaliyetleri sonucunda da meydana gelebilir (38).

Oksijenin elektron alarak meydana getirdiği radikallere süperoksit (O₂⁻), hidroksil (OH[·]), alkoksil (RO[·]), peroksil (ROO[·]) örnek olarak verilebilir. Ayrıca hidrojen peroksit (H₂O₂) radikal olmadığı halde diğer radikallerin oluşum sürecinde prooksidan olarak rol oynadığı için ROT kapsamına girer (43-45).

Yine metabolik reaksiyonların doğal sonucu olarak ortaya çıkan nitrojen kökenli radikallere ise nitrik oksit (NO[·]) ve azotdioksit (NO₂[·]) verilebilir.

2.3.2. Serbest Radikallerin Biyomoleküllere Etkileri

Hücre zarlarında bulunan poliansatüre (çoklu doymamış) yağ asitlerinin reaktif oksijen türleri tarafından aldehit, alkol, etan, peroksit gibi çeşitli ürünlere yıkılması lipid peroksidasyonu olarak adlandırılır (45). Hücresel zedelenmenin en önemli sebeplerinden biri lipid peroksidasyonudur. Hücre ve organel zarlarında meydana gelen peroksidasyon, iyon geçirgenliğinde azalmaya ve zar akışkanlığının bozulmasına neden olur. Bu durum organel içeriklerinin hücre içerisine dağılmasına neden olurken ilerleyen süreçte hücresel ölümü beraberinde getirir (46).

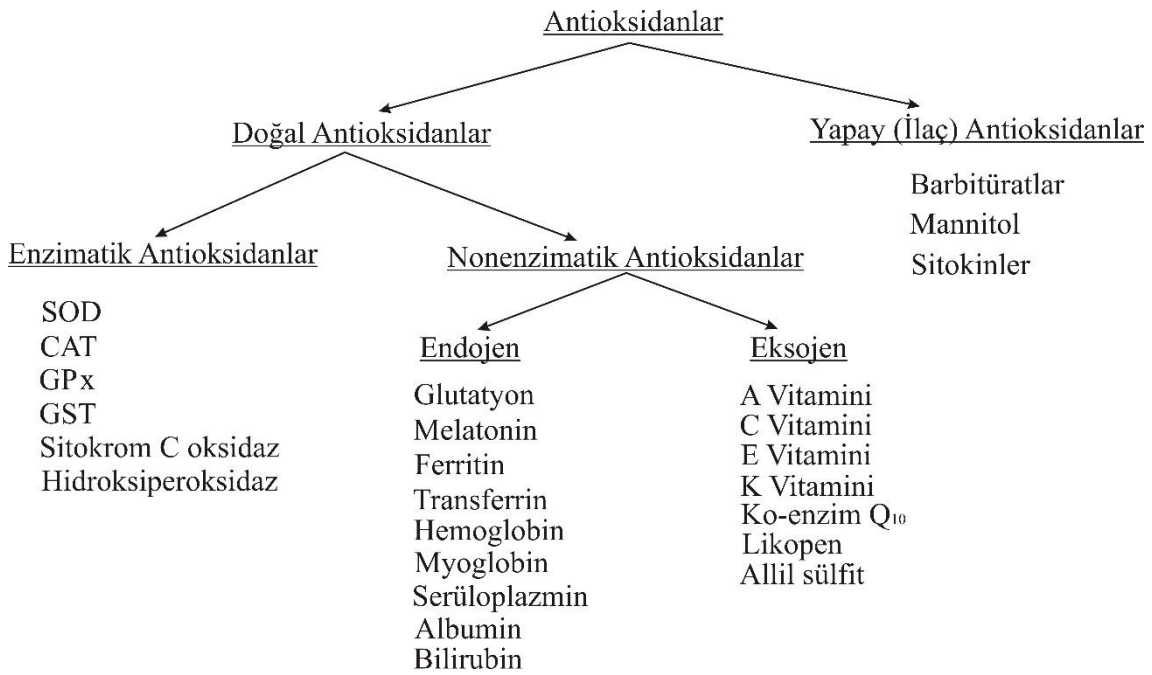
ROT, hücresel proteinler üzerinde oksidasyona neden olurlar. Meydana gelen oksidatif hasar özellikle enzimlerin yapısal ve fonksiyonel olarak modifikasyona uğramasına yol açarken aynı zamanda hücresel iskelet proteinlerinin yapılarının bozulmasını da sağlar (46).

Serbest radikallerden olan hidroksil, DNA' da bulunan pürin ve pirimidin bazlarındaki çift bağlara H atomu ilave ederken aynı zamanda bir pirimidin bazı olan timindeki metil gruplarının H' lerini koparır (47). Sonuç olarak DNA' da bağ yapılarına

zarar verirken baz kimyasını da değiştirerek mutasyonlara neden olur. Bu mutasyonların ve DNA' da ki konformasyonel değişimlerin karsinogenezde aktif olarak rol aldığı bilinmektedir.

2.4. Antioksidan Savunma Sistemi

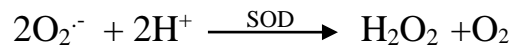
İnsan vücuduna dışarıdan alınan serbest radikallerin ve normal vücut metabolizması sonucunda ortaya çıkan reaktif oksijen / nitrojen türlerinin makromoleküllere zarar vermesinin engellenmesini ve detoksifiye edilmesini sağlayan maddelere antioksidan denir (48-50). Antioksidanların yapısal ve fonksiyonel olarak gruplandırılması aşağıdaki şekilde özetlenmiştir (40, 51-55).



Şekil 2.3. Antioksidanlar

2.4.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)

Hücre içerisinde ortaya çıkan süperoksit radikalini ($O_2^{\cdot-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve moleküler oksijene (O_2) katalizleyen enzimdir (56).



Yapısal olarak üç farklı formu bulunan SOD' un bakır (Cu) ve çinko (Zn) içeren formu (Cu/Zn SOD), manganez (Mn) içeren formu (Mn SOD) mitokondride yer alırken

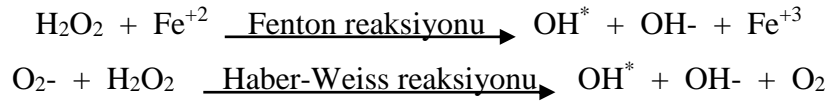
ayrıca ekstrasellüler matrikste bulunan (EC SOD) bir formu bulunmaktadır (57). Bunların içerisinde özellikle EC SOD ekstrasellüler matrikste bulunan tek antioksidan enzim olarak ayrı bir yere sahiptir ve özellikle akciğerlerde inflamasyon ve fibrozis gibi hastalıklardan korumada son derece önemli bir rol oynamaktadır (58).

2.4.2. Katalaz (CAT)

Aerobik canlılar için vazgeçilmez bir role sahip olan katalaz enzimi dört hem grubuna sahiptir. Birçok hücre tipinde bulunmasına rağmen özellikle karaciğer, kan, böbrek ve kemik iliğinde oldukça yüksek konsantrasyonlarda bulunmaktadır (59). Hücre içerisinde en yoğun olarak peroksizomlarda yerleşmiş olmakla beraber mitokondri ve endoplazmik retikulumlarda da yer yer almaktadır (60).



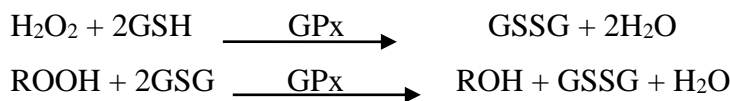
H_2O_2 normal şartlar altında serbest radikal kapsamına girmemekle beraber geçiş metallere varlığında (Fe^{+2} , Cu^+) Fenton tepkimesine girerek veya süperoksit ile Haber-Weiss tepkimesine girerek en tehlikeli serbest radikal olan hidroksil radikalinin oluşmasında aktif olarak rol oynar (57, 61, 62, 63).



Katalaz bu noktada devreye girerek hidroksil radikali oluşmadan H_2O_2 nin su ve moleküler oksijene parçalanmasını sağlayarak sitoprotektif etkisini ortaya koyar.

2.4.3. Glutatyon Peroksidaz (GPx)

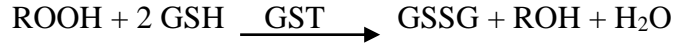
Büyük çoğunluğu sitozolde bulunmakla beraber (%60-75) mitokondride de (%25-40) yerleşim gösteren, dört protein alt biriminden oluşan, organik hiperoksitlerin (özellikle lipid peroksitleri) ve hidrojen peroksitin indirgenmesini sağlayan bir enzimdir (64, 65, 66).



Selenyuma bağlı olup olmamasına göre iki ana gruba ayrılmakla beraber toplam 8 adet izoenzim formu tanımlanmıştır (67, 56).

2.4.4. Glutasyon S-Transferazlar (GST)

Faz II detoksifikasyon enzimlerinden olan GST, özellikle elektrofilik bileşiklerin makromoleküller üzerindeki olumsuz etkisini ortadan kaldırmakla görevlidir ve bu görev esnasında Glutasyon (GSH) molekülünden faydalanır (68, 69).



Glutasyon; hücre içerisinde bir antioksidan gibi davranır, detoksifikasyonda görev alır, hücre içi sinyal iletiminin düzenlenmesinde ve apoptoziste aktif olarak rol oynar (70).

2.4.5. Glutasyon Redüktaz (GR)

GST ve GPx tarafından gerçekleştirilen tepkimeler sonucunda meydana gelen okside formdaki glutasyonun (GSSG), redükte formdaki glutatyonla dönüşmesini sağlayan enzimdir.



Tepkimenin gerçekleşebilmesi için ortamda NADPH (elektron vericisi olarak) varlığı gereklidir (71, 72).

2.5. Nükleer faktör E2 ile ilişkili faktör 2 (Nrf2)

Nrf2, CNC-bZIP (cap'n'collar family of basic leucine-zipper) yapısına sahip, sitoplazmada doğal inhibitörü olan Kelch benzeri ECH-ilişkili protein 1 (Keap1) ile beraber bulunan bir transkripsiyon faktörüdür (73).

Nrf2, ksenobiyotikler, elektrofiller, radyasyon ve en önemlisi oksidatif stres tarafından aktivasyona uğrayan ve bu stres koşullarına karşı aktif olarak görev alan hücresel koruma kalkanıdır (74). Endojen antioksidan ve indüklenebilir faz II enzim ifadesinden sorumludur (75). İnsan vücudunda özellikle karaciğerde, aynı zamanda sinir sistemi, böbrekler, akciğerler, kalp ve makrofajlar dahil olmak üzere çeşitli doku ve organlarda bulunur (76, 73). Hücre içerisinde antioksidan, antienflamatuar ve detoksifiye edici yanıtların oluşmasında sitoprotektif etki gösterir.



Şekil 2.4. Nrf2 Yapısı (77)

Nrf2 yapısal olarak 6 farklı Neh bölgeden oluşur. Her Neh bölgesinin farklı görevleri olmakla beraber Keap1 ile bağlantıyı sağlayan kısım Neh2 bölgesinde bulunan DLG ve ETGE motifleridir (Şekil 2.5) (77). Neh1 bölgesi küçük Maf (sMaf) proteini ile heterodimer oluşturarak DNA'ya bağlanmayı sağlar (78). Neh3 bölgesi üzerinde çok fazla çalışma yapılmamış olmasına rağmen, yapılan nadir çalışmalara göre Neh4 ve Neh5 alanları ile aynı doğrultuda görev yaptığı ve transaktivasyonda rol oynadığı tespit edilmiştir (79). Neh4 ve Neh5 bölgeleri transkripsiyonel aktivasyon alanları olarak vazgeçilmez bir görev üstlenirler (80). Neh6 ise Nrf2'nin stres şartları altında kararsız hale gelmesini sağlayan bölgedir (81).

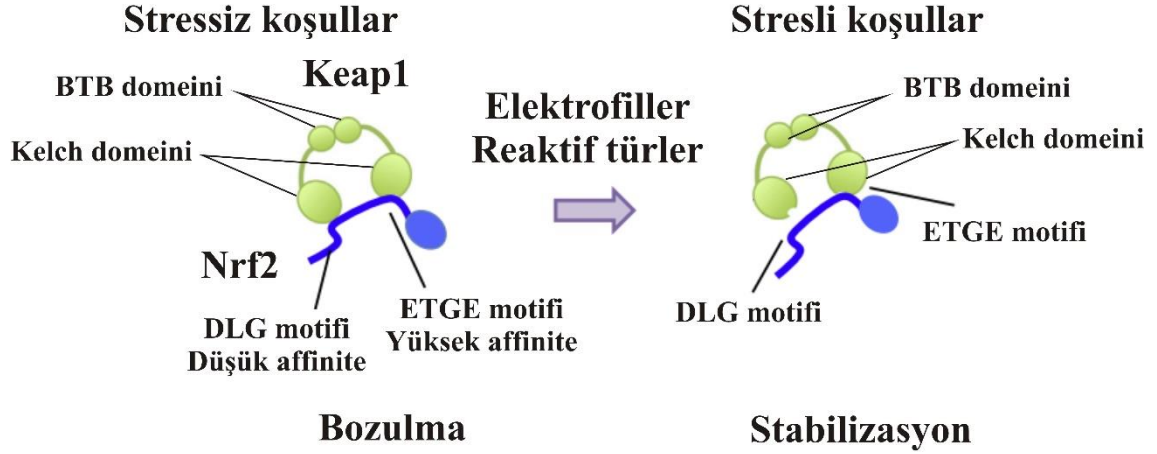
2.5.1. Keap1/Nrf2/ARE Yolağı

Keap1, Nrf2'nin doğal inhibitörü olarak görev yapan ve sitozolde yerleşik halde bulunan bir proteindir (82). Keap1 üç temel fonksiyonel alandan oluşur.



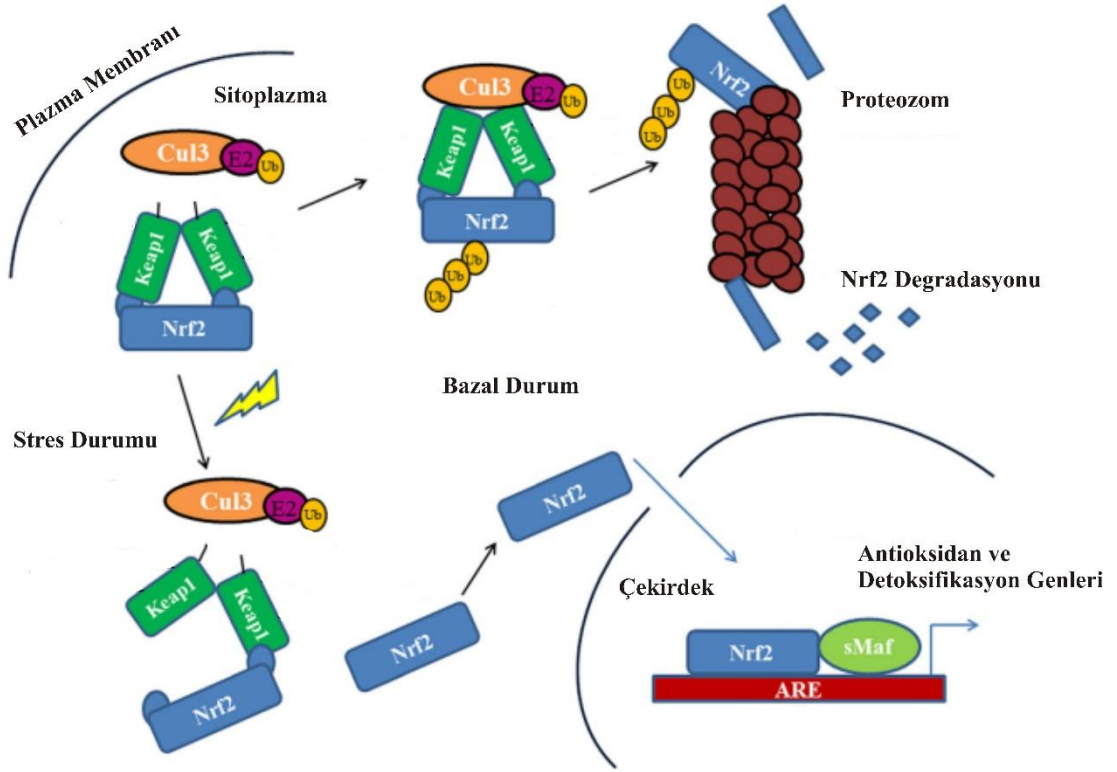
Şekil 2.5. Keap1 Yapısı (77)

Bu bölgelerden BTB alanı Keap1 homodimerizasyonu için vazgeçilmezdir. IVR bölgesi ile birlikte ubiquitinasyon ve proteozomal degradasyonun gerçekleşmesini sağlarlar (83, 84). Kelch bölgesi ise Nrf2'nin DLG ve ETGE motiflerine bağlanarak Nrf2'nin inhibe olmasını sağlar. Bu durumdaki Nrf2, Keap1 - Cul3 (Cullin 3) - ubiquitin E2 ligaz üçlüsü tarafından ubiquitinasyon yolu ile proteozomal degradasyona uğratılır (85). Ancak oksidatif stres, elektrofiller veya ksenobiyotiklerin varlığında Keap1-Nrf2 birbirinden ayrılırlar. Bu stres kaynaklarının varlığında Keap1 üzerinde bulunan reaktif sistein kalıntıları modifiye olur ve Keap1 konformasyonel değişime uğrar (86, 87). Bu değişime bağlı olarak, zaten düşük afinite ile Kelch bölgesine bağlı olan DLG motifi Keap1'den ayrılır ve Nrf2 aktif hale gelir (88).



Şekil 2.6. Nrf2 – Keap1 etkileşimi ve ayrılması (78)

Keap1 den ayrılarak aktif hale gelen Nrf2 nükleusa transloke olur. Çekirdekte Nrf2' nin Neh1 bölgesi sMaf proteinleri ile heterodimer oluşturarak DNA üzerinde antioksidan ve detoksifikasyon enzimlerinin transkripsiyonlarının aktive edildiği ARE (Antioksidan cevap elementi) bölgesine bağlanır (89). ARE bölgesi tarafından aktive edilen antioksidan sitoprotektif genler içerisinde SOD, CAT, GPx, NQO1, GST, GCL gibi enzimler yer alır (90).



Şekil 2.7. Nrf2 – Keap1 – ARE (77)

2.6. Sirtuinler ve Etki Mekanizmaları

Sirtuin genleri *Saccharomyces cerevisiae* mayasında tespit edilmiştir (16). Genel olarak yedi farklı özellikte varyantı bulunan sirtuin ailesinin, protein deasetilaz ve adenosin difosfat-ribozil transferaz etkinlikli protein ailelerinden olduğu tespit edilmiştir (91). Bu yedi sirtuin varyantının mono-ADP-ribozil transferaz veya NAD^+ bağımlı deasetilaz şeklinde rol oynayan NAD^+ bağımlı katalitik temel alanları vardır.

SIRT-7 için herhangi bir enzimatik aktivite tespit edilememiş olmakla birlikte SIRT1, SIRT2, SIRT3 ve SIRT5' in NAD^+ bağımlı deasetilaz, SIRT4 ve SIRT6' nın ADP-ribozil transferaz aktivitesine sahip olduğu tespit edilmiştir (92).

Tablo 2.3. Sirtuinlerin yerleşim yerleri ve fonksiyonları (93)

| Sirtuin | Yerleşim yeri | Etkinlik alanı |
|---------|---------------|---|
| SIRT1 | Çekirdek | Metabolizmanın düzenlenmesi, Oksidatif stres |
| SIRT2 | Sitoplazma | Hücre siklusu |
| SIRT3 | Mitokondri | Termogenez, ATP üretimi |
| SIRT4 | Mitokondri | İnsülin salgısı |
| SIRT5 | Mitokondri | Üre döngüsü |
| SIRT6 | Çekirdek | DNA-Baz onarımı, Metabolizmanın düzenlenmesi |
| SIRT7 | Çekirdekçik | rRNA transkripsiyonu |

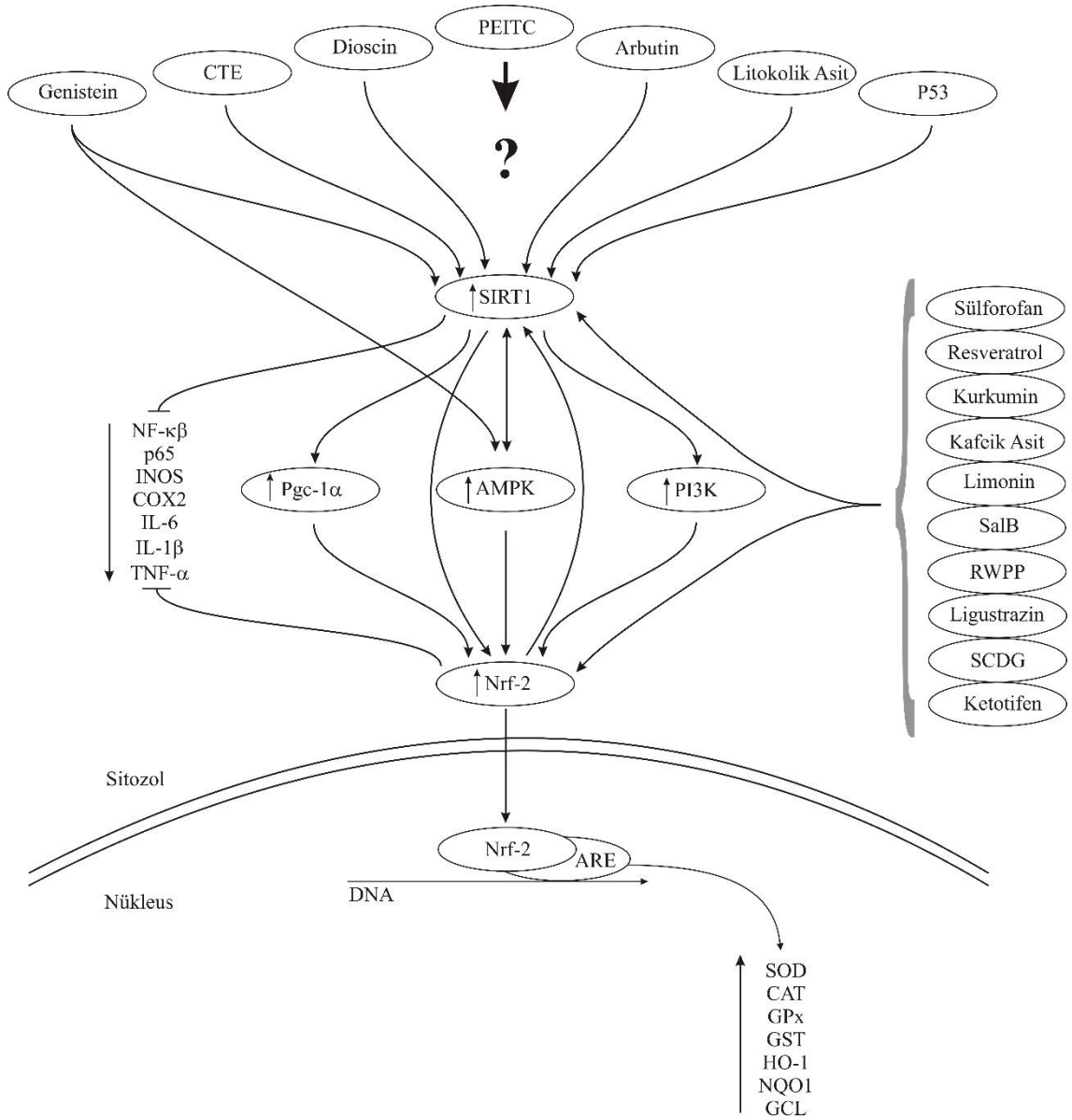
2.6.1. SIRT1

Sirtuin ailesinin yedi üyesi içerisinde üzerinde en çok çalışılan ve hücresel düzeyde etkinliği en çok ortaya konulan üyesi SIRT1' dir. SIRT1 proteini; hücre gen ifadesinin düzenlenmesi (histon deasetilasyonu ile) (94), üreme sisteminin aktivitesi (95), kanser önleme mekanizmaları (p53) (96), apoptozun düzenlenmesi (97), yaşlanmanın geciktirilmesi (98), metabolizmanın genel olarak düzenlenmesi (99), DNA onarımı (100), inflamasyonun azaltılması (17), hatta embriyonik gelişimin düzenlenmesi (101) gibi birçok olayda önemli rolünün olduğu bildirilmiştir.

Sirtuin ailesinin yedi farklı üyesinden biri olan ve üzerinde en fazla çalışma yapılan SIRT1, NAD⁺ bağımlı deasetilaz olarak görev yapar (102). Hücresel bazda birçok fonksiyonelliğinin yanı sıra en önemli görevlerinden biri de oksidatif strese karşı sitoprotektif görevidir. Bu görevi Nrf2' nin yukarı yönlü regülasyonu ile gerçekleştirir (20).

Nrf2 normal şartlar altında sitozolde, doğal inhibitörü olan Keap1' e bağlı olarak bulunur. ROT varlığı, SIRT1 ifadesinin artması ve bazı aktivatörler sayesinde Nrf2 aktive olur (85). Aktivasyondan sonra nükleusa transloke olan Nrf2, DNA üzerinde sitoprotektif enzimlerin transkripsiyonunu modüle eden ARE bölgesine bağlanır (90). Bu bağlanma HO-1, NQO1, SOD, CAT gibi hücresel savunma mekanizmalarının yukarı yönlü regülasyonuna neden olur.

SIRT1 - Nrf2 yolağı çok farklı aktivatörlerin etkisi altında faaliyet gösterir. Bu faaliyet sonucunda sitoprotektif enzimlerin aktivasyonu gerçekleşirken NF- κ B, TNF- α , IL-6, IL-1 β , INOS, COX2 gibi moleküllerin inhibisyonunda da aktif olarak rol oynarlar (Şekil 2.8. (18-20, 103-115)).



Şekil 2.8. SIRT1 – Nrf2 Yolağı

2.7. Fitokimyasallar ve Çeşitleri

Fitokimyasallar bitkisel gıdalarda doğal olarak bulunan, besinsel değeri olmayan aktif bileşiklerdir. Özellikle meyvelerde, sebzelerde, tahıllarda, baharatlarda ve baklagillerde bol ve çeşitli olarak bulunur (116). Sayıları binlerle ifade edilen bu

fitokimyasalların; insan vücudunda iyileşmeyi kolaylaştırıcı, kansere karşı koruyucu, doğal oksidatif düzeni dengede tutucu, bağıışıklığı tetikleyici, enzim düzenleyici gibi birçok etkileri mevcuttur.

Çok çeşitli türleri olmakla birlikte etkinlikleri bilimsel çalışmalarla kanıtlanmış fitokimyasallardan bazılarını özellikle belirtmekte fayda vardır.

Polifenoller geniş fitokimyasal çeşitliliğe sahip olan bir gruptur. Anti-kanser, antiinflamatuvar özelliklerinin yanı sıra antioksidan metabolizmasını, apoptozu, tümör metastazını, hücre bölünmesini düzenlemede görev alırlar (117, 118). Tümör baskılama ve metastazını düzenlemede rol oynayan, ayrıca SIRT1 aktivatörü olarak görev alan resveratrol (üzüm, kıvılcık, dut, şerbetçi otu); zerdeçal bitkisinin temel bileşeni olan ve hücre sağkalımı, apoptozisin düzenlenmesi, hücre içi sinyalizasyon düzeninin korunmasında aktif olarak görev alan kurkumin (119); siyah ve yeşil çaydan elde edilen, kanser riskini azaltan, DNA ve RNA sentezinin düzgün bir şekilde gerçekleşmesinde görevli olan epigallocatectin-3-gallate (EGCG) (120); antikanser özelliğı ile narenciye ve karabuğday bitkilerinde bol miktarda bulunan quercetin (121, 122) bu grupta yer alan sadece birkaç fitokimyasaldır.

İzoflavonlar baklagiller, özelliklede soya fasulyesinden elde edilen genistein bu grubun en çok çalışılmış üyesidir. İnsan kanser türlerinde kemopreventif özellikte olduğu gösterilmiştir (123, 124).

Flavonoidler hücrelerde lipit peroksidasyonunun düzenlenmesinde görev almakla beraber inflamasyona neden olan enzimler üzerinde inhibe edici özellikleri vardır. Özellikle çay türlerinde, brokolide, çilek, havuç, lahana, domates, kabak gibi bitkilerde bol miktarda bulunurlar (125).

Karotenoidler oksidatif hasarın giderilmesinde ve vücutta kanser önleyici olarak görev alırlar. Havuç ve domates bu fitokimyasal açıısından en değerli besinler olmakla birlikte turp çeşitlerinde, ananas, üzüm, karnabahar, kereviz, patlıcan ve rezenede de bulunmaktadır (126).

Likopenler antioksidan, antikanser ve hormonal düzenleyici olarak etki ederler (127). Likopen en çok domateste bulunmaktadır (128).

Sülfidler diğeri adıyla organosülfür bileşikleri kan şekerini düzenleyici, antioksidan, antimikrobiyal etki gösterirler. Özellikle soğanlı bitkilerde (soğan, sarımsak, pırasa) ve brokolide bol miktarda bulunmaktadır (129).

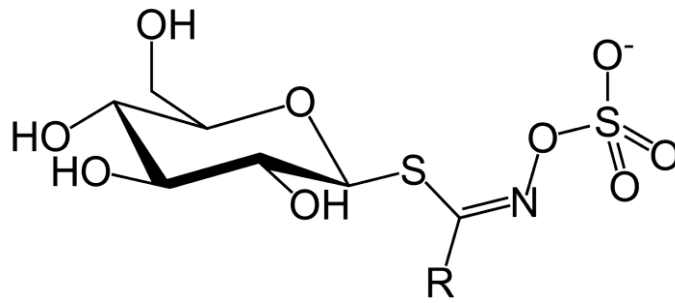
Ellagitanninler antioksidan, antiviral, antitumörjenik, antiinflamatuar, antikanser ve antimikrobiyal özellikler sergileyen ellagitanninler badem, ceviz, üzüm, nar, fındık gibi besinlerde bulunur (130).

İndoller hipoglisemi ve hipotansiyon oluşturma etkilerinin yanında antioksidan ve merkezi sinir sistemi üzerinde düzenleyici etkileri olan bir fitokimyasal grubudur. Lahana, şalgam, karnabahar, brokoli gibi bitkiler indoller açısından oldukça zengindir (131).

Fitatlar oksidatif stresin engellenmesinde rol oynayan fitatlar özellikle kepekli tahıllarda (mısır, pirinç, yulaf, buğday) ve soya fasulyesinde önemli miktarda bulunur (132).

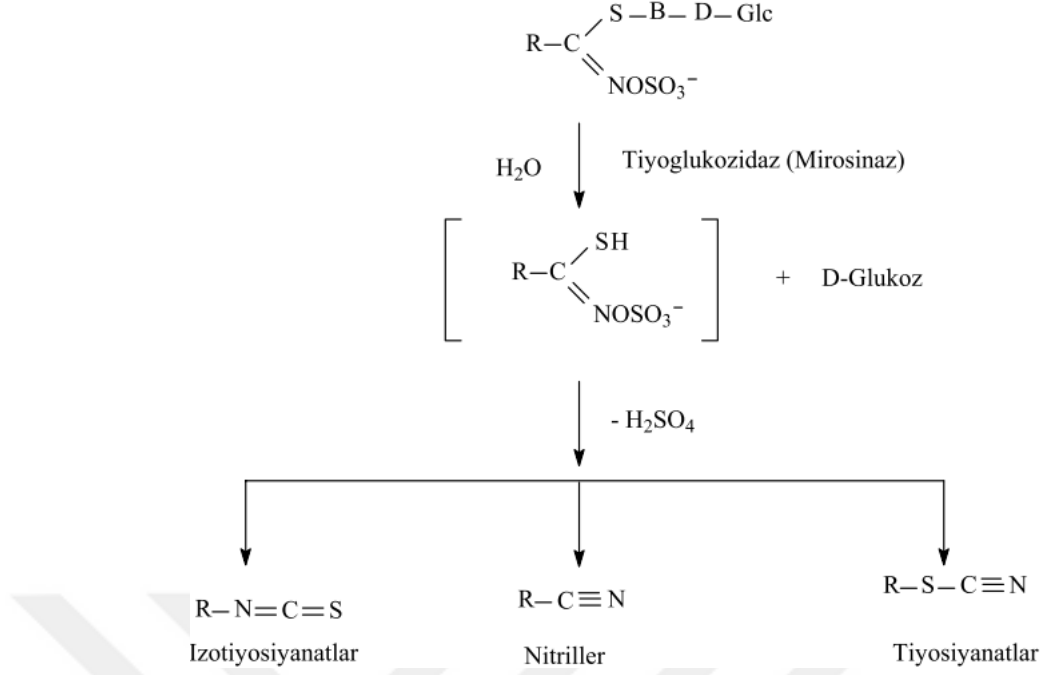
2.8. İzotiyosiyanatlar (ITC)

İzotiyosiyanatlar, fitokimyasallar içerisinde kendi başlarına bir grup olmayıp glukosinolatların enzimatik hidrolizleri sonucunda ortaya çıkarlar.



Şekil 2.9. Glukosinolatların genel yapısı

Glukosinolatlar, *Cruciferae* (= *Brassicaceae*) familyasına ait tere, lahana, brokoli, karnabahar gibi sebzelerde bol miktarda bulunan bir fitokimyasaldır (133). Haçlı sebzeler olarak da adlandırılan bu sebzelerin mekanik bir strese uğramaları (kesilme, doğranma, ezilme, çiğnenme) yapılarında yer alan mirozinaz enziminin salınmasına neden olur (134). Aynı zamanda bağırsaklar içerisinde bulunan bakterilerin mikrobiyal mirozinaz salınımı da ITC'lerin serbest kalmasına yardımcı olur (135). Ancak mirozinaz enziminin ısıya duyarlı olduğu, sebzelerin pişirilmesinin ITC içeriğini azalttığı bilinmekle beraber sebzelerin çiğ olarak tüketilmesi sonucunda pişirilmiş sebze göre çok daha fazla ITC serbest kalmaktadır (134). Mirozinaz enzimi, glukosinolatların enzimatik olarak hidrolize edilmesini ve sonuçta izotiyosiyanatların açığa çıkmasını sağlar (136).



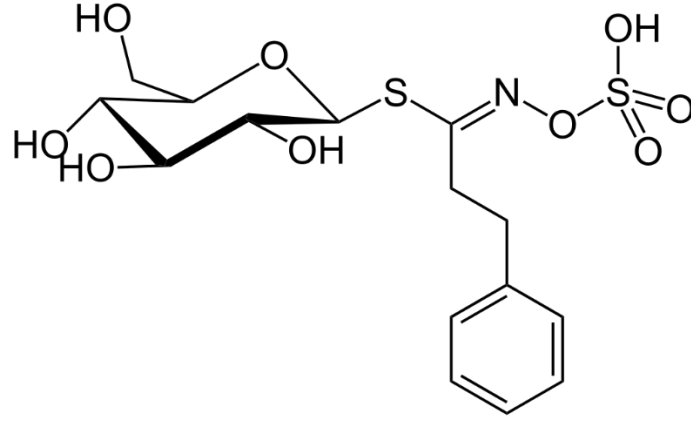
Şekil 2.10. Glukosinolatların hidrolizi ile ortaya çıkan ürünler (137)

İzotiyosiyanatlar ($\text{R}-\text{N}=\text{C}=\text{S}$) genel olarak DNA hasarını engelleyerek anti-kanser özellik gösterirler (135). Ayrıca yapılan çalışmalarda ITC'lerin antibakteriyel, antifungal, insektisidal ve nematosidal etkilere de sahip olduğu gösterilmiştir (138, 139).

ITC'ler kendi içerisinde birçok gruba ayrılır. Üzerinde en çok bilimsel çalışma yapılanları ise Sülfurofan, Fenetilizotiyosiyanat (PEITC), allil izotiyosiyanat, benzil izotiyosiyanat bileşikleridir (140).

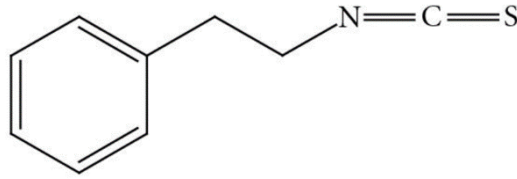
2.8.1. Fenetilizotiyosiyanat (PEITC)

Değerli bir fitokimyasal grubunu oluşturan glukosinolatlardan birisi olan glukonasturtiin' in mirozinaz enzimi ile hidrolize edilmesi sonucu oluşan bir izotiyosiyanattır (141).



Şekil 2.11. Glukonasturtiin' in kimyasal yapısı

Özellikle su teresi (*Nasturtium officinale*) bitkisinde fazla bulunmasına rağmen turp, lahana, brokoli, karnabahar gibi bitkilerde de mevcuttur (133). İnsanlarda yapılan çalışmalarda alınan 100g' lık brokoli miktarının yaklaşık 200 µmol PEITC salınımı sağladığı tespit edilmiştir (134, 142).



Şekil 2.12. PEITC' nin yapısı

Yapılan birçok çalışma PEITC' nin vücut içerisinde çok önemli görevlerde rol oynadığını ispatlamıştır. Bu çalışmalardan; kimyasal kanserojenlerin etkinliğinin engellenerek kemopreventif etki gösterdiği (143, 144), apoptozisin uyarılmasını ve hücre döngüsünün engellenmesi ile kemoterapötik bir ajan olarak rol oynadığı (145-148), metastazı ve anjiyogenezi baskılayarak kanser yayılımını durdurduğu (149, 150), kanser hücrelerinde otofajiyi tetiklediği (151), T lenfositlerin, naturel killer hücrelerin ve makrofajların aktivasyonuna neden olduğu (152), ROT seviyesindeki artışa bağlı olarak Faz II enzimlerinin yukarı yönlü regülasyonunu sağladığı (153) tespit edilmiştir.

NF-κβ, karsinogenezin gelişmesinde apoptozu engelleyerek rol oynar (154). Yapılan birçok çalışma NF-κβ seviyesinin yükselmesinin farklı kanser türleri [Melanom

(155), Kolon (156), Meme (157), Prostat (158), Pankreas (159)] için bir kriter olduğunu göstermiştir. Ayrıca hücre farklılaşması ve inflamasyon süreçlerinde de aktif rol oynar (160). PEITC' nin yukarıda verilen aktivite alanlarının haricinde çok önemli bir özelliği de kemoteröpotik ajan olarak faaliyet göstermesidir. PEITC' nin, NF- κ B transkripsiyon faktörünü inhibe ettiğini ve bu şekilde anti-kanser özelliği gösteren bir fitokimyasal olduğu ortaya konulmuştur (161, 162).



3. MATERYAL VE METOT

3.1. Gereçler

3.1.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Malzemeler

1. Rat ALT (Alanin Aminotransferaz) Assay Kiti - Bioassay Technology Laboratory
2. Rat Glutatyon-S-Transferaz ELISA Kit - Bioassay Technology Laboratory
3. Rat Sirtuin 1 ELISA Kit - Bioassay Technology Laboratory
4. Trigliserit (TG) Kolorometrik Assay Kit - Elabscience
5. Rat INS (İnsülin) ELISA Kit - Elabscience
6. HDL ve LDL/VLDL Miktar Tayin Kiti - Biovision
7. NF- κ B p65 ELISA Kiti - Elabscience
8. Nrf2 Transkripsiyon Faktör Assay Kit - Abcam
9. Nükleer Ekstraksiyon Kiti - Abcam
10. NaOH (Sodyum Hidroksit) - Merck
11. NaCl (Sodyum Klorür) - Sigma
12. KCl (Potasyum Klorür) - Sigma
13. K_2HPO_4 (Dipotasyum Fosfat) - Sigma
14. KH_2PO_4 (Potasyumdihidrojenfosfat) - Sigma
15. TBA (Tiyobarbitürik Asit) - Sigma
16. H_3PO_4 (Fosforik Asit) - Sigma
17. $C_4H_{10}O$ (n-Bütanol) – Lab-Scan
18. Na_2EDTA (Disodyum Etilendiamintetraasetik Asit) - Sigma
19. NBT (Nitro Blue Tetrazolium Klorür) - Sigma
20. Na_2CO_3 (Sodyum Karbonat) - Merck
21. Ksantin - Sigma
22. $(NH_4)_2SO_4$ (Amonyum Sülfat) – Alfa Aesar
23. $CuCl_2$ (Bakır Klorür) – Alfa Aesar
24. H_2O_2 (Hidrojen Peroksit) – Carlo-Erba
25. EDTA (Etilendiamintetraasetik Asit) – Sigma Aldrich
26. GSH (Glutatyon) – Sigma Aldrich
27. Albümin - Sigma
28. Bradford Reaktifi - Sigma

29. Fenetilzotiyosiyanat -Sigma Aldrich

3.1.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

1. Hassas Terazi - Radwag
2. Homojenizatör - IKA Ultra Turrax
3. Derin Dondurucu - Sanyo
4. Su Banyosu - Nüve
5. pH metre - Thermo Scientific
6. Termometreli ısıtıcılı karıştırıcı - IKA C-MAG HS7
7. Multimod mikroplate okuyucu - Biotek Synergy H1
8. Soğutmalı santrifüj - Eppendorf 5415R
9. Biomedical freezer - Sanyo MDF-U333
10. Vorteks - Nüve
11. UV Spektrofotometre - Shimadzu
12. Otomatik Pipet - Eppendorf
13. Mezür (25ml, 50ml, 100ml, 250ml) - Isolab
14. Beher (50ml 100ml, 250ml, 500ml) - Isolab

3.2. Deney Hayvanlarının Temini ve Deney Gruplarının Hazırlanması

İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'ndan alınan onay ile (16.04.2019 tarih ve 2018/A-49 protokol numaralı), İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi, İnönü Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarında ve İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirildi. Çalışmada kullanılan deney hayvanları, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi'nden temin edilmiştir ve 'Hayvan Kullanımı Etik kuralları'na uygun olarak çalışılmıştır. Çalışmada 30 adet erkek, 150-250 g ağırlığında, 6-8 haftalık *Wistar albino* rat kullanıldı. Çalışma süresi boyunca deney hayvanları 22-24 °C sıcaklık, 12 saat aydınlık / 12 saat karanlık siklusuna uygun olan odalarda, polipropilen kafeslerde tutularak ad libitum yem ve musluk suyu ile beslendi.

Toplam 30 adet erkek rat, her bir grupta 10 adet olacak şekilde tesadüfi olarak 3 eşit gruba ayrıldı.

I. Grup 1 (Kontrol Grubu): 2 hafta boyunca standart yem ile ad libitum beslenen grup (n=10).

II. Grup 2 (YYD+STZ): 2 hafta boyunca yüksek yağ diyeti ile beslenen ve 14. günün sonunda intraperitoneal olarak 35 mg/kg STZ (Streptozotosin) enjeksiyonu yapılan grup (n=10).

III. Grup 3 (YYD+STZ+PEITC): 2 hafta boyunca yüksek yağ diyetine ek olarak oral gavaj yolu günlük 40 mg/kg PEITC verilen ve 14. günün sonunda intraperitoneal olarak 35 mg/kg STZ enjeksiyonu yapılan grup (n=10).

3.3. Yüksek Yağlı Rat Yeminin Hazırlanması

Deney hayvanlarının beslenmesi için hazırlanan yüksek yağ diyetine ait besin kompozisyonu aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Tablo 3.1. Yüksek Yağ Diyeti Enerji Kompozisyonu

| Besin Çeşidi | Enerji (%) |
|--------------|------------|
| Nişasta | 38.70 |
| Sakkaroz | 5.21 |
| Yağ | 41.41 |
| Protein | 14.69 |
| TOPLAM | 100 |

Tablo 3.2. Yüksek Yağ Diyeti Besin Kompozisyonu

| Besin Çeşidi | Miktar (g) |
|--------------|------------|
| Nişasta | 409 |
| Sakkaroz | 50.1 |
| Yağ | 183.1 |
| Protein | 166.9 |
| Ham Kül | 39.5 |
| Lizin | 9.7 |
| Metionin | 3.1 |
| Selüloz | 27.4 |
| Fosfor | 6.1 |
| Kalsiyum | 6.2 |
| Potasyum | 7.5 |
| Sodyum | 0.2 |
| Klor | 0.8 |
| Nem | 90.4 |
| TOPLAM | 1000 |

3.3.1. Numune Alınması ve Hazırlık Aşaması

Ratların STZ enjeksiyonundan sonra günlük açlık kan şekeri ölçümü yapılmış, kan şekeri değeri 300 mg/dl ve üzerinde çıkanlar diyabet olarak değerlendirilmiştir. Daha sonra ksilazin / ketamin anestezisi uygulanan hayvanların kanları alınarak sakrifiye edildi. Alınan kan örneklerinden 1000 rpm' de 15 dk süreyle santrifüj edilerek serum elde edildi ve sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere -30 °C de muhafaza altına alındı.

Ratlardan alınan karaciğer doku örnekleri ise iki gruba ayrıldı. Birinci grup %10'luk formaldehit içerisinde alınarak histopatolojik incelemelerde kullanılmak üzere ayrıldı. Diğer grup ise biyokimyasal analizlerde kullanılmak üzere -80 °C de muhafaza edildi.

3.4. Karaciğer Dokusunun Hazırlanması

pH 7.4 50 mM fosfat tamponunu hazırlamak için 6.059 g K_2HPO_4 ve 2.07 g KH_2PO_4 alınarak 800 ml distile su içerisinde çözdürüldü. Çözeltinin pH ayarlaması yapılarak distile su ile 1000 ml ye tamamlandı.

Biyokimyasal analizlerde kullanılmak üzere -80 °C de muhafaza ettiğimiz karaciğer dokularından 1/10 (w/v) oranında olmak üzere alınan karaciğer doku parçası üzerine fosfat tamponundan ilave edilerek 5 dk süreyle 6000 rpm/dk da homojenizatörde homojenize edildi. Elde ettiğimiz homojenatlar 15000 g de +4 °C sıcaklıkta 15 dk süre ile santrifüj edildi ve süpernatantları ayrıldı. Hazırlanan bu süpernatantlar GST, SIRT1, SOD, CAT ve GPx ölçümlerinde kullanıldı. Yine karaciğer dokusundan hazırlanan nükleer ekstraktlar ile Nrf2 ve NF- κ B ölçümleri gerçekleştirildi.

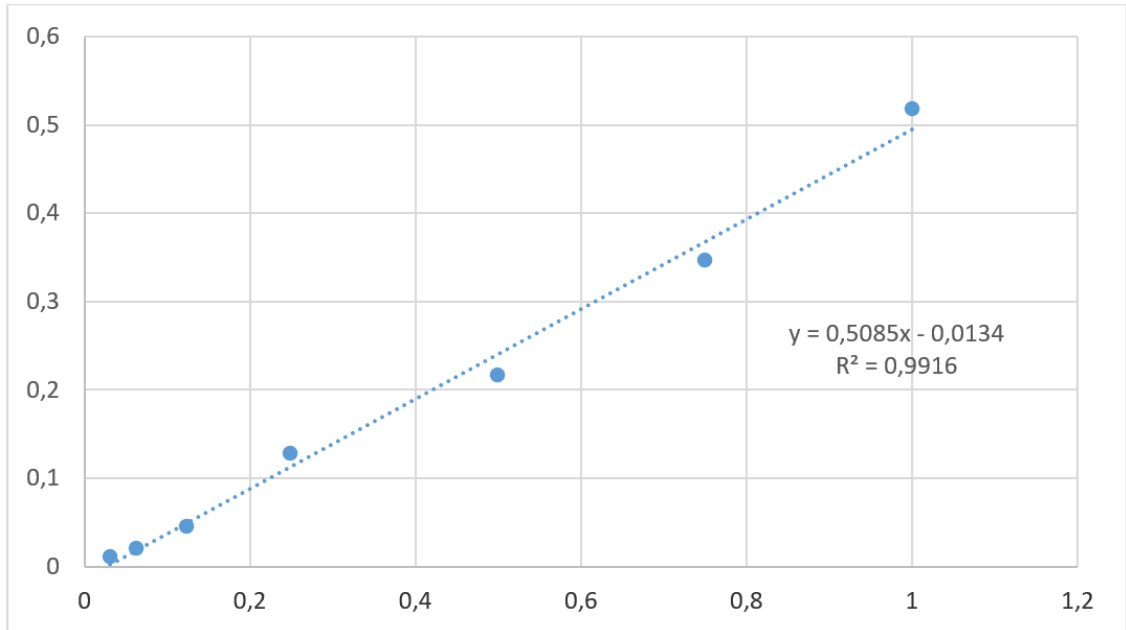
3.5. Biyokimyasal Analizler

3.5.1. Protein Miktar Ölçümü

Çalışma süresince gerçekleştirilen bütün biyokimyasal analizlerde Bradford protein miktar tayin yöntemi kullanılmıştır (163).

Deneyin Yapılışı

Hazırlanan 0.15 M NaCl çözeltisi ile 1 mg/ml BSA (sığır serum albumin) çözeltisinden farklı konsantrasyonlarda (1, 0.75, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.031 mg/ml) standartlar hazırlandı. Hazırlanan standartlardan ve numunelerden plaka kuyucuklarına 5 μ l konularak üzerine 250 μ l Bradford çözeltisi ilave edildi. 10 dk'lık inkübasyon süresinden sonra 595 nm dalga boyunda okuma işlemi gerçekleştirildi. Albümin çözeltisinden elde edilen standart kalibrasyon eğrisine göre numunelerin konsantrasyonları hesaplandı ve sonuçlar mg/ml cinsinden ifade edildi.



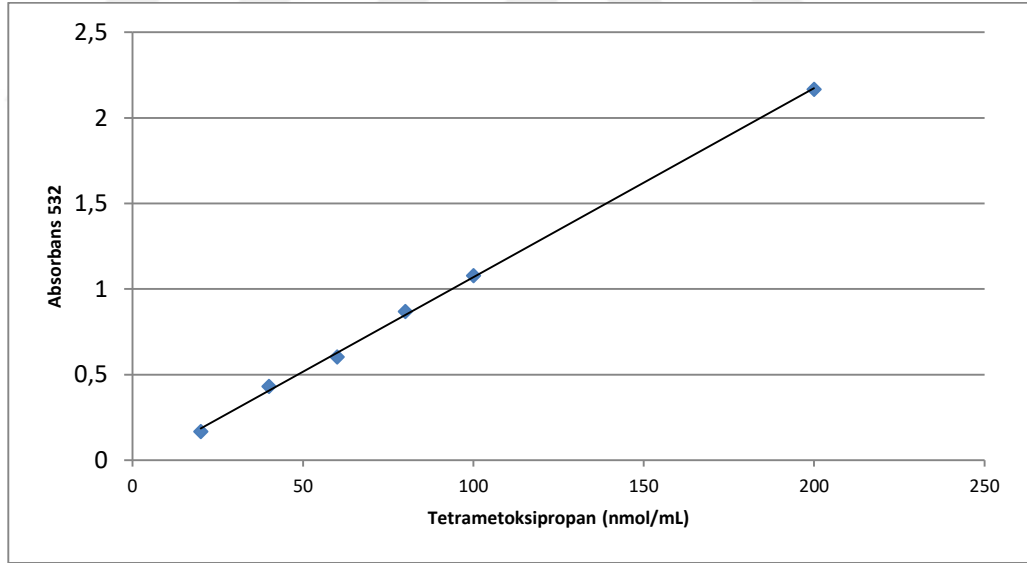
Grafik 3.1. Protein standart kalibrasyon eğrisi

3.5.2. MDA Düzeyinin Ölçümü

Malondialdehit düzey ölçüm analizi Uchiyama ve Mihara' nın kullandığı metoda göre gerçekleştirildi. Ölçüm karaciğer doku homojenatlarında gerçekleştirildi (164).

Deneyin Yapılışı

Deney prosedüründen önce %1.15 KCl içerisinde %10 luk karaciğer doku homojenatları hazırlandı. Homojenatın üzerine 3 ml %1 lik fosforik asit ve 1 ml %0.6 lik TBA solüsyonu ilave edildi ve karışım vorteks yardımı ile iyice karıştırıldı. Hazırlanan karışım 45 dakika kaynar su banyosunda inkübe edildi. Süre sonunda karışımın soğuması beklenildi ve üzerine 4 ml n-bütanol ilave edilerek iyice karıştırıldı. Karışım 24 saat karanlık ortamda inkübe edildi ve n-bütanol fazının ayrılması sağlandı. Organik fazın spektrofotometrede 532 nm dalga boyunda absorbanası ölçüldü. Deneyimizde standart olarak 2 mM tetrametoksiopropan' ın 20, 40, 60, 80, 100 ve 200 nmol/L lik çözeltileri kullanıldı. Elde edilen standart kalibrasyon eğri denklemine göre numunelerin MDA düzeyleri hesaplandı ve ölçümler nmol/yaş doku ağırlık cinsinden ifade edildi.



Grafik 3.2. Tetrametoksiopropan' a ait standart kalibrasyon eğrisi

3.5.3. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesinin Ölçümü

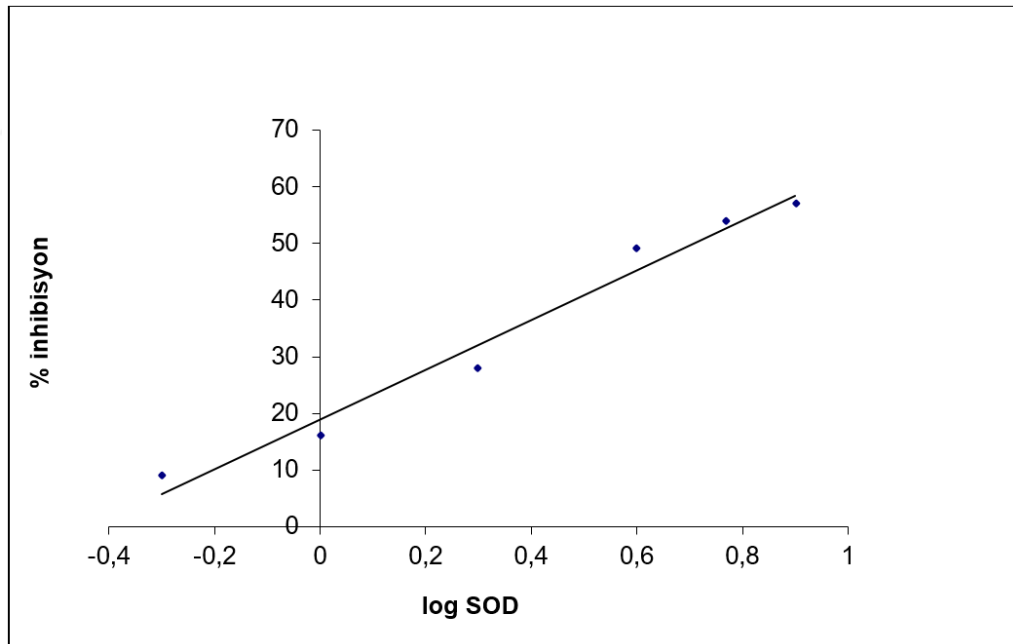
Hücrel antioksidan sisteminin önemli enzimlerinden olan SOD, süperoksit radikallerinin hidrojen peroksit (H_2O_2) ve oksijene dönüştürülmesini sağlar. Karaciğer

dokusunda SOD aktivitesinin ölçümünde Sun ve ark. Tarafından geliştirilen metot kullanıldı (165, 166).

Deneyin Yapılışı

Deney tüplerine 100 µl süpernatant konuldu ve üzerine 2.85 ml reaktif karışımı 0.3 mmol/L Ksantin, 0.6 mmol/L Na₂EDTA, 150 mmol/L NBT, 400 mmol/L Na₂CO₃ ve 1 g/L BSA içerecek şekilde hazırlanan çözelti eklendi. 2M (NH₄)₂SO₄ ile 167 U/L olacak şekilde hazırlanan Ksantin oksidaz enzim çözeltisi her tüpe 100 µl ilave edilerek 20 dk boyunca karanlık ortamda inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda tüplere 0.8 mmol/L CuCl₂ çözeltisinden 1 ml ilave edilerek 560 nm dalga boyunda absorbans okuma işlemi gerçekleştirildi. Numunelerin SOD aktivitesi, standart SOD enziminin % inhibisyon grafiği ile hesaplandı ve sonuçlar U/mg protein cinsinden ifade edildi.

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



Grafik 3.3. SOD standart kalibrasyon eğrisi

3.5.4. Katalaz (CAT) Aktivitesinin Ölçümü

Aerobik solunum yapan hücrelerde doğal bir tepkime ürünü olarak oluşan hidrojen peroksiti (H₂O₂) su ve moleküler oksijene parçalayan enzimdir. Karaciğer dokusunda

CAT aktivitesini ölçmek için Aebi tarafından belirlenen aktivite tayin metodu kullanılmıştır (167).

Deneyin yapılışı

Deneye başlamadan önce 1/15 mmol/L pH 7 fosfat tamponu hazırlandı. Tampon için 3.522 g KH_2PO_4 ve 7.268 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ distile suda çözüldü. pH ayarı yapılan çözelti distile su ile 1 L hacme tamamlandı. Hazırladığımız fosfat tamponuna %30 luk H_2O_2 ekleyerek 10 mmol/L olacak şekilde çözelti hazırlandı. Spektrofotometrede 240 nm dalga boyunda absorbansı 0.5 olarak ölçüldü. Küvetin içerisine 950 μl H_2O_2 ve 50 μl numune konulup ve hızlıca karıştırılan çözeltinin cihaza ilk konulduğu anda yapılan ölçümü başlangıç absorbans ölçümü olarak kaydedildi. 1 dakika boyunca absorbans değişimi incelendi. Süre sonundaki absorbansı kaydedilerek absorbans farkı hesaplandı. Molar absorpsiyon katsayısı kullanılarak aşağıdaki formüle göre hesaplandı. Sonuçlar U/mg protein şeklinde ifade edildi.

Hesaplama

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

ΔAbs : Okunan absorbans değişimi

t : Ölçüm süresi (1 dak)

V_t : Total hacim (1 ml)

V_s : Kullanılan numune hacmi (0.05 ml)

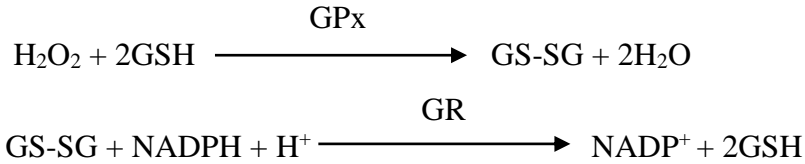
E : Molar absorpsiyon katsayısı ($39,4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

L : Işık yolu (1 cm)

10^6 : Molün mikromole çevirmek için kullanılan çarpan

3.5.5. Glutatyon Peroksidaz (GPx) Aktivitesinin Ölçümü

GPx, H_2O_2 in suya dönüşmesini sağlayan enzimdir. Redükte glutatyon (GSH) varlığında gerçekleşen bu tepkimenin devam edebilmesi için okside glutatyonun (GS-SG) indirgenmesini sağlayan Glutatyon Redüktaz (GR) enziminde ihtiyaç duyulmaktadır. Karaciğer dokusunda GPx aktivite ölçümü Paglia ve Valentine' in prosedürüne göre gerçekleştirildi (168).



Deneyin Yapılışı

Öncelikle fosfat tamponu (50 mM, pH 7, 5 mM EDTA içeren) hazırlandı ve diğer bileşikler bu tamponun içerisinde çözülerek hazırlandı. Her bir tüpe 2.65 ml fosfat tamponu, 0.1 ml NADPH (3 mM), 0.1 ml GSH-Red (500 U/ml), 0.1 ml GSH (150 mM) ve 20 µl numune eklenerek 10 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. Süre sonunda her numune tüpüne 0.1 ml H₂O₂ (50 mM) eklenerek spektrofotometrede 340 nm dalga boyunda başlangıç değerleri ölçüldü ve 1 dakikalık absorbans değişiklikleri not edildi. Veriler aşağıda verilen formülden yararlanılarak hesaplandı ve sonuçlar U/mg protein cinsinden verildi.

Hesaplama

$\Delta A/t$ = 1 dakikalık zamanda absorbans farkı

V_t = Tüm reaksiyon hacmi

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

V_s = Tüm reaksiyondaki numune hacmi

L = Işık yolu

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

3.5.6. Serum ALT Aktivitesinin Ölçümü

Serum ALT aktivitesi, Alanin Aminotransferaz Test Kiti (Bioassay Technology Laboratory) ile kolorometrik olarak ölçüldü.

Deneyin Yapılışı

- 5 µl tampon ve 20 µl substrat solüsyonu karıştırılarak kör elde edildi.
- Standartlar aşağıdaki tabloya uygun olarak karıştırıldı ve her birinin üzerine 5 µl tampon eklendi. Sonuçta 5 farklı konsantrasyonda standart elde edildi.

| | S ₁ | S ₂ | S ₃ | S ₄ | S ₅ |
|--------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Substrat solüsyonu | 18 | 16 | 14 | 12 | 10 |
| Sodyum piruvat | 2 | 4 | 6 | 8 | 10 |

3. Örnek tüplerine 20 µl substrat çözeltisi ve 5 µl numune eklendi. Hafifçe karıştırılarak 37°C de 30 dakika inkübasyona bırakıldı.
4. Süre sonunda kuyucuklara 20 µl DNPH çözeltisi ilave edildi, hafifçe karıştırıldı ve 37°C de 20 dakika inkübasyona bırakıldı.
5. İnkübasyondan sonra kuyucuklara 1:9 oranında seyreltilmiş 0.4 mol/l NaOH çözeltisinden 200 µl ilave edildi, iyice karıştırılarak 25°C de 15 dakika inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda 510 nm dalga boyunda optik dansite ölçümleri yapıldı.

Hesaplama

$$\Delta OD = OD_{\text{örnek}} - OD_{\text{kontrol}}$$

Hesaplanan ΔOD değeri ile tespit edilen standart eğriye göre ALT aktiviteleri hesaplandı.

$$\text{ALT etkinliği (U/l)} = \frac{\text{Standart eğriden hesaplanan ALT aktivitesi (U/l)}}{\text{Test edilen protein konsantrasyonu}}$$

3.5.7. Serum Trigliserit Düzeyinin Ölçümü

Çalışmada, Trigliserit ölçümü için Trigliserit Kolorometrik Test Kiti (Elabscience) kullanıldı.

Deneyin Yapılışı

1. Kandan serum örnekleri ayrıştırılarak gerekli gruplandırma işlemi yapıldı.
2. Kör kuyucuğuna 2.5 µl distile su, standart kuyucuğuna 2.5 µl standart çözeltisi ve örnek kuyucuklarına sırası ile 2.5 µl serum örnekleri yerleştirildi. Her bir kuyucuğa 250 µl çalışma solüsyonu ilave edildi.
3. Hazırladığımız plaka iyice karıştırarak 37°C 10 dakika inkübe edildi ve 510 nm dalga boyunda optik dansiteleri okundu.

Hesaplama

$$\text{TG Konsantrasyonu} = \frac{OD_{\text{örnek}} - OD_{\text{blank}}}{OD_{\text{standart}} - OD_{\text{blank}}} \times \text{Standart Solüsyon (mmol/l)}$$

3.5.8. Serum Total Kolesterol, HDL ve LDL/VLDL Düzeylerinin Ölçümü

HDL-LDL/VLDL Kolesterol Kantifikasyon Kiti (Biovision) kullanılarak serum total kolesterol, HDL ve LDL/VLDL düzeyleri belirlendi.

Deneyin Yapılışı

1. Öncelikle deneyde kullanılacak reaktifler hazırlandı.
2. Her bir numuneden 100 µl alındı ve üzerine 100 µl çökeltme tamponu ilave edilerek 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Elde edilen süpernatant kısmı HDL fraksiyonu olarak ayrı tüplere alındı. Altta kalan çökelti kısmına 200 µl PBS (pH 7.4) ilave edilerek tekrar santrifüj edildi ve dipte kalan çökelti kısmı LDL/VLDL fraksiyonu olarak ayrı tüplere alındı.
3. Kolesterol standardından 20 µl alınıp üzerine 140 µl kolesterol test tamponu eklenerek seyreltildi. Standartları elde etmek için kuyucuklara 0, 4, 8, 12, 16, 20 µl çözelti yerleştirildi ve her biri 50 µl olacak şekilde üzerlerine kolesterol test tamponu eklendi (kör için sadece kolesterol test tamponu kullanıldı).
4. Numune kuyucuklarına 20 µl HDL fraksiyonu yerleştirildi ve kolesterol test tamponu ile 50 µl/kuyucuk olacak şekilde ayarlama yapıldı.
5. Standart ve numune kuyucuklarına 50 µl reaksiyon karışımı eklendi ve iyice karıştırıldı.
6. Hazırladığımız plaka 37°C de karanlıkta 60 dakika inkübe edildi ve 570 nm dalga boyunda absorbansları okundu.
7. Aynı deney prosedürü LDL/VLDL fraksiyonu için tekrar gerçekleştirildi.

Hesaplama

Standart kalibrasyon eğrisi çizilerek elde edilen grafiğe göre numunelerin kolesterol miktarları tespit edildi.

$$C = A/V \text{ (}\mu\text{g/}\mu\text{l)}$$

A: Standart eğriden hesaplanan örnek kolesterol miktarıdır (µg).

V: Numune reaksiyon kutusuna eklenen orijinal numune hacmidir (µl).

3.5.9. GST Düzeyinin Ölçümü

Çalışmamızda karaciğer dokusunda GST düzeyinin ölçümünde Rat Glutatyon S-Transferaz ELISA kiti (Bioassay Technology Laboratory) kullanıldı.

Deneyin Yapılışı

1. Tüm reaktifler deneyden önce oda sıcaklığına getirildi.
2. 120 µl standart (240 ng/ml) 120 µl standart seyreltme solüsyonu ile seyreltilerek 120 ng/ml standart stok solüsyonu hazırlandı. Stok solüsyondan

seri dilüsyon yapılarak 120, 60, 30, 15, 7.5 ng/ml konsantrasyonlarında beş standart elde edildi. Kör olarak standart seyreltme solüsyonu kullanıldı.

3. Standart kuyucuklarına 50 µl olacak şekilde standartlar eklendi.
4. Numune kuyucuklarına 40 µl numune, 10 µl anti-GSTS antikoru eklendi.
5. Hem numune hem de standart kuyucuklarına (kör hariç) 50 µl streptavidin-HRP eklendi. Plaka film ile kapatılarak 37°C de 60 dakika inkübasyona bırakıldı.
6. 60 dakika sonra 0.35 ml yıkama tamponu ile her seferinde 30-60 saniye arasında olacak şekilde 5 sefer yıkama işlemi gerçekleştirildi.
7. Her kuyucuğa 50 µl substrat solüsyonu A eklendi. Hemen arkasından 50 µl substrat solüsyonu B ilave edildi ve plaka tekrar kapatılarak 37°C 10 dakika inkübe edildi.
8. Her kuyucuğa 50 µl durdurma solüsyonu eklenerek mavi rengin sarıya dönüşmesi sağlandı ve 10 dakika içerisinde 450 nm dalga boyunda ölçüm yapılarak optik dansite tespit edildi.

Hesaplama

Standartlardan elde edilen optik dansite ve konsantrasyon değerleri kullanılarak çizilen standart kalibrasyon eğri denklemine göre hesaplamalar yapıldı. Sonuçlar ng/mg protein şeklinde verildi.

3.5.10. Nrf2 Aktivitesinin Ölçümü

Nrf2' nin DNA' ya bağlanma aktivitesini ölçmek için Nrf2 Transkripsiyon Faktörü assay kiti (Abcam) kullanıldı. Ölçüm karaciğer dokusu nükleer ekstraktları ile gerçekleştirildi.

Deneyin Yapılışı

1. Numune olarak kullanılacak nükleer ekstraktlar nükleer ekstraksiyon kiti (Abcam) kullanılarak hazırlandı. Nükleer ekstraktların protein ölçümleri Bradford metodu ile gerçekleştirildi.
2. Deneyimizde kullanılacak tüm reaktifler oda sıcaklığına getirildi ve deney prosedüründe belirtildiği şekilde hazırlandı.
3. Kompetitif bağlanma kontrol kuyucuklarına wt/mutant oligonükleotid içeren CBB, diğer kuyucuklara ise 40 µl CBB solüsyonu eklendi.
4. 10 µl pozitif kontrol ve kör uygun kuyucuklara eklendi.
5. Plaka sızdırmaz bant ile kapatılarak ve 1 saat 100rpm' lik çalkalamayla oda sıcaklığında inkübe edildi.

6. Süre sonunda 200 µl yıkama tamponu ile 3 kez yıkama işlemi gerçekleştirildi.
7. Bütün kuyucuklara 100 µl Nrf2 antikoru eklendi, plaka tekrar kapatıldı ve oda sıcaklığında 1 saat inkübasyona bırakıldı.
8. Aynı şekilde 200 µl yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkama işlemi yapıldı.
9. Tüm kuyucuklara 100 µl seyreltilmiş anti-tavşan HRP antikoru eklendi, plaka kapatıldı ve oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi.
10. Süre sonunda 200 µl yıkama tamponu ile 4 kez yıkama işlemi gerçekleştirildi.
11. Her kuyucuğa 100 µl geliştirme solüsyonu ilave edildi ve yaklaşık 15 dakika oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edildi.
12. Süre sonunda her kuyucuğa 100 µl durdurma solüsyonu eklendi ve 5 dakika içinde 450 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçüm gerçekleştirildi.

Hesaplama

Ölçümü gerçekleştirilen örnek absorbans değerlerinin, pozitif kontrolün absorbans değerine oranlanması ile yüzde hesaplanması yapıldı.

3.5.11. SIRT1 Düzeyinin Ölçümü

Karaciğer dokusunda SIRT1 miktar tayininde Rat NAD-Dependent Protein Deasetilaz Sirtüin-1 ELISA kiti (Bioassay Technology Laboratory) kullanıldı.

Deneyin Yapılışı

1. pH 7.4 PBS ile homojenize edildi ve hazırlanan süpernatantlar önceden gruplandırılan ephendorf tüplerine alındı.
2. Bütün reaktifler deneyden önce oda sıcaklığına gelene kadar bekletildi.
3. 120 µl standart (40 ng/ml) 120 µl standart seyreltme solüsyonu ile seyreltilerek 20 ng/ml standart stok solüsyonu hazırlandı. Stok solüsyonundan 1:2 oranında seri dilüsyon yapılarak 5 farklı standart solüsyonu (20, 10, 5, 2.5, 1.25 ng/ml) elde edildi. Kör olarak sadece standart seyreltme solüsyonu kullanıldı.
4. Standart kuyucuklarına 50 µl standartlar eklendi.
5. Örnek kuyucuklarına 40 µl numune ve üzerine 10 µl anti-SIRT1 antikoru eklendi.
6. Kör hariç bütün kuyucuklara 50 µl streptavidin-HRP ilave edildi. Sızdırmaz film ile kapatılarak 37°C de 60 dakika inkübe edildi.
7. Süre sonunda 0.35 ml yıkama tamponu ile her seferinde 30-60 saniye bekletilerek 5 sefer yıkama işlemi yapıldı.

8. Her kuyucuğa önce 50 µl substrat solüsyonu A ve ardından 50 µl substrat solüsyonu B eklendi. Plaka tekrar kapatıldı ve karanlıkta 37°C de 10 dakika inkübasyona bırakıldı.
9. Son olarak bütün kuyucuklara 50 µl durdurma solüsyonu ekleyerek mavi rengin sarıya dönüşmesi izlendi. 10 dakika içerisinde 450 nm dalga boyunda ölçüm yapılarak optik dansite tespit edildi.

Hesaplama

Standartlardan elde edilen optik dansite ve konsantrasyon değerleri kullanılarak çizilen standart eğrisinin grafiğine göre hesaplamalar yapıldı. Sonuçlar ng/mg protein olarak ifade edildi.

3.5.12. NF-κβ Düzeyinin Ölçümü

NF-κβ ölçümü için Nükleer Faktör Kappa β p65 ELISA kiti (Elabscience) kullanıldı. Ölçümde karaciğer doku nükleer ekstraktları kullanıldı.

Deneyin Yapılışı

1. Deneyde kullanılacak reaktiflerin tamamı oda sıcaklığına gelene kadar bekletildi.
2. 5000 pg/ml standartın üzerine 500 µl çalışma solüsyonu eklendi ve 2500 pg/ml lik stok standardımız elde edildi. Daha sonra bu stok standart ile seri dilüsyon yapılarak 6 farklı standart solüsyonu (2500, 1250, 625, 312.5, 156.25, 78.13 pg/ml) hazırlandı. Kör olarak çalışma solüsyonu kullanıldı.
3. İlk 7 kuyucuğa kör ve sırasıyla standart solüsyonlarından 100 µl eklendi. Diğer kuyucuklara da sırasıyla örnekler 100 µl olacak şekilde eklendi.
4. Plaka sızdırmaz film ile kapatılarak 37°C de 90 dakika bekletildi.
5. Süre sonunda plaka aspire edildi ve her kuyucuğa 100 µl biyotinlenmiş Ab solüsyonu eklendi. Plaka tekrar kapatılarak hafifçe çalkalandı ve 37°C de 60 dakika inkübe edildi.
6. Plaka aspire edildi ve kuyucuklar 350 ml yıkama solüsyonu ile her seferinde yaklaşık 1-2 dakika bekleme olacak şekilde 3 sefer yıkandı.
7. Her kuyucuğa 100 µl HRP konjugat solüsyonu ilave edildi, plaka tekrar kapatıldı ve 37°C de 30 dakika inkübasyona bırakıldı.
8. Solüsyon boşaltıldı ve kuyucuklar aynı şekilde 3 kez yıkandı.
9. Her kuyucuğa 90 µl substrat reaktifi eklendi, plaka kapatıldı ve karanlık ortamda 37°C de 15 dakika inkübe edildi.

10. Bütün kuyucuklara 50 µl durdurma solüsyonu eklendi ve hemen 450 nm dalga boyunda optik dansite tespit edildi.

Hesaplama

Standart konsantrasyon X eksenine ve OD değerleri Y eksenine gelecek şekilde grafik çizildi ve ortaya çıkan standart eğriye göre örnek hesaplamaları yapıldı. Sonuçlar pg/mg protein olarak ifade edildi.

3.6. Karaciğer Dokusunun Histopatolojik İncelenmesi

1. Grup: Kontrol grubu

2. Grup: Yüksek yağ diyeti +STZ grubu (YYD+STZ)

3. Grup: Yüksek yağ diyeti + STZ + Fenetilzotiyosiyanat grubu (YYD+STZ+PEITC)

Çalışmanın sonunda ketamin/ksilazin anestezisi altında sıçanlardan karaciğer doku örnekleri histolojik değerlendirmeler için alındı. Histopatolojik incelemeler için alınan karaciğer doku örnekleri %10'luk formaldehit içerisinde tespit edildi. Tespit edilen dokulara rutin doku takip işlemleri uygulandı ve doku örnekleri parafin bloklar içine gömüldü. Hazırlanan bloklardan 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Histolojik olarak ışık mikroskopik değerlendirme için Hematoksilen-Eozin (H-E) boyama yöntemi kullanıldı. Kesitler Leica DFC 280 Işık mikroskobu ve Leica Q Win Görüntü Analiz sistemi kullanılarak incelendi ve fotoğraflandı.

3.7. İstatistiksel Analiz

Çalışmamızdan elde edilen verilerin analizinde IBM SPSS Statistics 22.0 for Windows paket programı kullanıldı. Sonuçlar aritmetik ortalama ve standart sapma olarak ifade edildi. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testi ile incelendi. Parametrik testlerin gruplar arası karşılaştırmalarında ANOVA varyans analizi ve grupların ikili karşılaştırmalarında ise LSD testi kullanıldı. İstatistiksel değerlendirmelerde anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ kabul edildi.

Tablo 3.3. Kontrol, YYD+STZ ve YYD+STZ+PEITC gruplarındaki biyokimyasal parametrelere ait ortalamalar, standart hata ve standart sapma sonuçları

| | N | Ortalama | Standart Sapma | Standart Hata | 95% Güven Aralığı | | Minimum | Maximum | |
|-----|-------|----------|----------------|---------------|-------------------|-----------|---------|---------|-------|
| | | | | | Alt Sınır | Üst Sınır | | | |
| ALT | grup1 | 10 | 18.5311 | .32757 | .10359 | 18.2968 | 18.7654 | 17.99 | 19.15 |
| | grup2 | 10 | 29.3527 | .48879 | .15457 | 29.0030 | 29.7024 | 28.69 | 30.31 |
| | grup3 | 10 | 19.0747 | .21939 | .06938 | 18.9177 | 19.2316 | 18.73 | 19.44 |
| | Total | 30 | 22.3195 | 5.07534 | .92663 | 20.4243 | 24.2147 | 17.99 | 30.31 |

| | | | | | | | | | |
|----------------|-------|----|----------|-----------|----------|----------|-----------|--------|---------|
| Triglisericid | grup1 | 10 | 52.5905 | .57168 | .18078 | 52.1815 | 52.9994 | 51.80 | 53.38 |
| | grup2 | 10 | 87.1343 | 1.31568 | .41605 | 86.1932 | 88.0755 | 85.16 | 89.20 |
| | grup3 | 10 | 54.2493 | .81868 | .25889 | 53.6636 | 54.8349 | 53.29 | 55.79 |
| | Total | 30 | 64.6580 | 16.20565 | 2.95873 | 58.6067 | 70.7093 | 51.80 | 89.20 |
| TC | grup1 | 10 | 113.7572 | 1.52799 | .48319 | 112.6642 | 114.8503 | 110.40 | 115.72 |
| | grup2 | 10 | 130.3064 | .92132 | .29135 | 129.6473 | 130.9654 | 128.66 | 131.67 |
| | grup3 | 10 | 108.9306 | 2.37537 | .75116 | 107.2314 | 110.6299 | 105.14 | 112.94 |
| | Total | 30 | 117.6647 | 9.45602 | 1.72642 | 114.1338 | 121.1957 | 105.14 | 131.67 |
| HDL | grup1 | 10 | 49.4566 | .65570 | .20735 | 48.9876 | 49.9257 | 48.66 | 50.46 |
| | grup2 | 10 | 37.4104 | 2.05328 | .64930 | 35.9416 | 38.8792 | 34.21 | 40.40 |
| | grup3 | 10 | 48.8208 | 1.27839 | .40426 | 47.9063 | 49.7353 | 46.12 | 50.17 |
| | Total | 30 | 45.2293 | 5.80002 | 1.05893 | 43.0635 | 47.3951 | 34.21 | 50.46 |
| LDL/VLDL | grup1 | 10 | 64.3006 | 1.41673 | .44801 | 63.2871 | 65.3140 | 61.73 | 65.78 |
| | grup2 | 10 | 92.8960 | 2.16134 | .68348 | 91.3498 | 94.4421 | 90.40 | 95.95 |
| | grup3 | 10 | 60.1098 | 1.75611 | .55533 | 58.8536 | 61.3661 | 57.40 | 62.77 |
| | Total | 30 | 72.4355 | 14.91950 | 2.72392 | 66.8644 | 78.0065 | 57.40 | 95.95 |
| GST | grup1 | 10 | 655.6948 | 23.36276 | 7.38795 | 638.9821 | 672.4075 | 614.20 | 698.17 |
| | grup2 | 10 | 326.0523 | 29.78629 | 9.41925 | 304.7444 | 347.3601 | 289.79 | 367.26 |
| | grup3 | 10 | 539.1041 | 20.76466 | 6.56636 | 524.2499 | 553.9582 | 515.90 | 571.49 |
| | Total | 30 | 506.9504 | 140.88474 | 25.72192 | 454.3431 | 559.5576 | 289.79 | 698.17 |
| SIRT1 | grup1 | 10 | 70.3010 | 1.28768 | .40720 | 69.3799 | 71.2222 | 68.05 | 71.90 |
| | grup2 | 10 | 45.5690 | 1.91706 | .60623 | 44.1976 | 46.9404 | 42.14 | 47.95 |
| | grup3 | 10 | 65.7130 | 1.44016 | .45542 | 64.6827 | 66.7432 | 62.91 | 67.89 |
| | Total | 30 | 60.5277 | 11.03028 | 2.01384 | 56.4089 | 64.6464 | 42.14 | 71.90 |
| Nf- κ B | grup1 | 10 | 778.6883 | 40.04570 | 12.66356 | 750.0413 | 807.3353 | 710.04 | 815.99 |
| | grup2 | 10 | 988.7351 | 35.46650 | 11.21549 | 963.3639 | 1014.1063 | 941.08 | 1042.32 |
| | grup3 | 10 | 857.5564 | 31.22221 | 9.87333 | 835.2214 | 879.8915 | 817.07 | 892.23 |
| | Total | 30 | 874.9933 | 94.62925 | 17.27686 | 839.6581 | 910.3284 | 710.04 | 1042.32 |
| Nrf2 | grup1 | 10 | 49.9107 | 2.08121 | 0.65814 | 48.4219 | 51.3995 | 46.43 | 52.68 |
| | grup2 | 10 | 36.0714 | 1.69408 | 0.53571 | 34.8596 | 37.2833 | 33.04 | 38.39 |
| | grup3 | 10 | 47.3214 | 2.72772 | 0.86258 | 45.3701 | 49.2727 | 42.86 | 51.79 |
| | Total | 30 | 44.4345 | 2.16767 | 0.68548 | 42.8839 | 45.9852 | 40.78 | 47.62 |
| MDA | grup1 | 10 | 523.2800 | 3.62179 | 1.14531 | 520.6891 | 525.8709 | 517.40 | 528.30 |
| | grup2 | 10 | 667.2700 | 14.60267 | 4.61777 | 656.8239 | 677.7161 | 650.10 | 689.20 |
| | grup3 | 10 | 548.9000 | 19.53794 | 6.17844 | 534.9234 | 562.8766 | 522.80 | 575.50 |
| | Total | 30 | 579.8167 | 65.25176 | 11.91329 | 555.4513 | 604.1821 | 517.40 | 689.20 |
| SOD | grup1 | 10 | 15.6367 | 1.05514 | .33367 | 14.8819 | 16.3915 | 14.26 | 16.85 |
| | grup2 | 10 | 9.4322 | .70719 | .22363 | 8.9264 | 9.9381 | 8.62 | 10.55 |
| | grup3 | 10 | 13.3406 | .83853 | .26517 | 12.7407 | 13.9404 | 12.18 | 14.42 |
| | Total | 30 | 12.8032 | 2.73961 | .50018 | 11.7802 | 13.8262 | 8.62 | 16.85 |

| | | | | | | | | | |
|-----|-------|----|-----------|-----------|----------|-----------|-----------|--------|---------|
| CAT | grup1 | 10 | 1169.2333 | 92.80061 | 29.34613 | 1102.8477 | 1235.6189 | 994.36 | 1274.57 |
| | grup2 | 10 | 814.0235 | 76.11498 | 24.06967 | 759.5741 | 868.4728 | 711.19 | 953.07 |
| | grup3 | 10 | 1030.7334 | 96.25453 | 30.43836 | 961.8771 | 1099.5898 | 927.79 | 1185.76 |
| | Total | 30 | 1004.6634 | 171.61487 | 31.33245 | 940.5814 | 1068.7454 | 711.19 | 1274.57 |
| GPx | grup1 | 10 | 104.1647 | 5.96681 | 1.88687 | 99.8963 | 108.4331 | 96.13 | 113.22 |
| | grup2 | 10 | 65.7171 | 3.91459 | 1.23790 | 62.9168 | 68.5175 | 60.92 | 70.45 |
| | grup3 | 10 | 101.2081 | 5.84733 | 1.84909 | 97.0252 | 105.3910 | 95.44 | 112.31 |
| | Total | 30 | 90.3633 | 18.49630 | 3.37695 | 83.4567 | 97.2700 | 60.92 | 113.22 |

Tablo 3.4. Gruplar arası karşılaştırmaların yapılmasında kullanılan ANOVA testi sonuçları

| | | Kareler Toplamı | df | Ortalama Kare | F | Sig. |
|----------------------|----------------|-----------------|----|---------------|----------|------|
| ALT | Between Groups | 743.465 | 2 | 371.732 | 2827.913 | .000 |
| | Within Groups | 3.549 | 27 | .131 | | |
| | Total | 747.014 | 29 | | | |
| Trigliserid | Between Groups | 7591.515 | 2 | 3795.758 | 4174.148 | .000 |
| | Within Groups | 24.552 | 27 | .909 | | |
| | Total | 7616.067 | 29 | | | |
| TC | Between Groups | 2513.638 | 2 | 1256.819 | 427.201 | .000 |
| | Within Groups | 79.434 | 27 | 2.942 | | |
| | Total | 2593.071 | 29 | | | |
| HDL | Between Groups | 919.045 | 2 | 459.523 | 219.512 | .000 |
| | Within Groups | 56.521 | 27 | 2.093 | | |
| | Total | 975.567 | 29 | | | |
| LDLVLDL | Between Groups | 6367.293 | 2 | 3183.647 | 978.336 | .000 |
| | Within Groups | 87.862 | 27 | 3.254 | | |
| | Total | 6455.155 | 29 | | | |
| GST | Between Groups | 558828.889 | 2 | 279414.445 | 449.650 | .000 |
| | Within Groups | 16777.914 | 27 | 621.404 | | |
| | Total | 575606.803 | 29 | | | |
| SIRT1 | Between Groups | 3461.681 | 2 | 1730.841 | 700.999 | .000 |
| | Within Groups | 66.666 | 27 | 2.469 | | |
| | Total | 3528.347 | 29 | | | |
| Nf- κ β | Between Groups | 225158.931 | 2 | 112579.465 | 88.036 | .000 |
| | Within Groups | 34527.212 | 27 | 1278.786 | | |
| | Total | 259686.143 | 29 | | | |
| Nrf2 | Between Groups | 1082.642 | 2 | 541.211 | 110.913 | .000 |
| | Within Groups | 131.776 | 27 | 4.881 | | |
| | Total | 1214.419 | 29 | | | |

| | | | | | | |
|-----|----------------|------------|----|------------|---------|------|
| MDA | Between Groups | 118003.205 | 2 | 59001.602 | 291.085 | .000 |
| | Within Groups | 5472.777 | 27 | 202.695 | | |
| | Total | 123475.982 | 29 | | | |
| SOD | Between Groups | 196.809 | 2 | 98.404 | 127.435 | .000 |
| | Within Groups | 20.849 | 27 | .772 | | |
| | Total | 217.658 | 29 | | | |
| CAT | Between Groups | 641064.835 | 2 | 320532.418 | 40.624 | .000 |
| | Within Groups | 213033.407 | 27 | 7890.126 | | |
| | Total | 854098.242 | 29 | | | |
| GPx | Between Groups | 9155.222 | 2 | 4577.611 | 161.338 | .000 |
| | Within Groups | 766.063 | 27 | 28.373 | | |
| | Total | 9921.286 | 29 | | | |

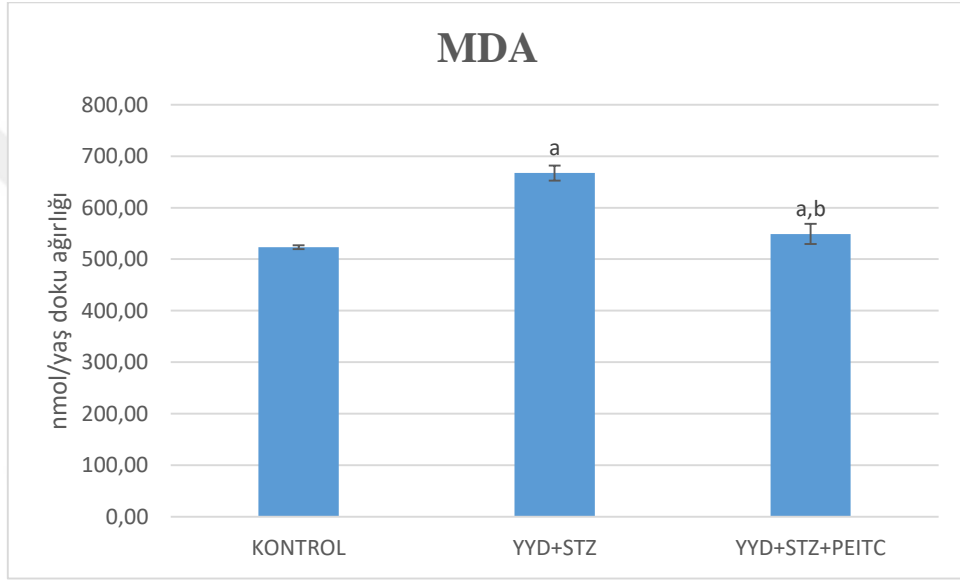
Histolojik incelemede istatistiksel analizler SPSS 13 ve MedCalc programı ile yapıldı. Tüm grupların ortalama değerleri nonparametrik Kruskal- Wallis testi ile karşılaştırıldı. Gruplar arasındaki farklılığın önemli olup olmadığı Mann-Whitney U testi ile ikili karşılaştırmalar yapılarak değerlendirildi. Tüm sonuçlar ortalama \pm standart hata (SE) olarak ifade edildi ve $p < 0.0001$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

İstatistiksel olarak kesitler mononükleer hücre infiltrasyonu, vasküler konjesyon, eozinofilik sitoplazmalı piknotik nükleuslu hepatositler, hemoraji, vakuolizasyon ve sinüzoidal dilatasyon açısından değerlendirildi. Mikroskobik hasar her bir kriter için yok (0), hafif (1), orta (2) ve şiddetli (3) olarak tanımlandı. Total skor bu parametrelere göre hesaplanmıştır.

4. BULGULAR

4.1. MDA Düzey Ölçümünün Sonuçları

Çalışma sonucunda elde ettiğimiz verilere göre, YYD+STZ verilen grupta istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artan MDA seviyeleri gözlemlenirken ($p<0.05$) YYD+STZ+PEITC verilen grupta MDA seviyesinin anlamlı bir şekilde azaldığı tespit edilmiştir ($p<0.05$).



Grafik 4.1. Kontrol, YYD+STZ ve YYD+STZ+PEITC deney gruplarının karaciğer doku MDA düzeylerinin karşılaştırılması

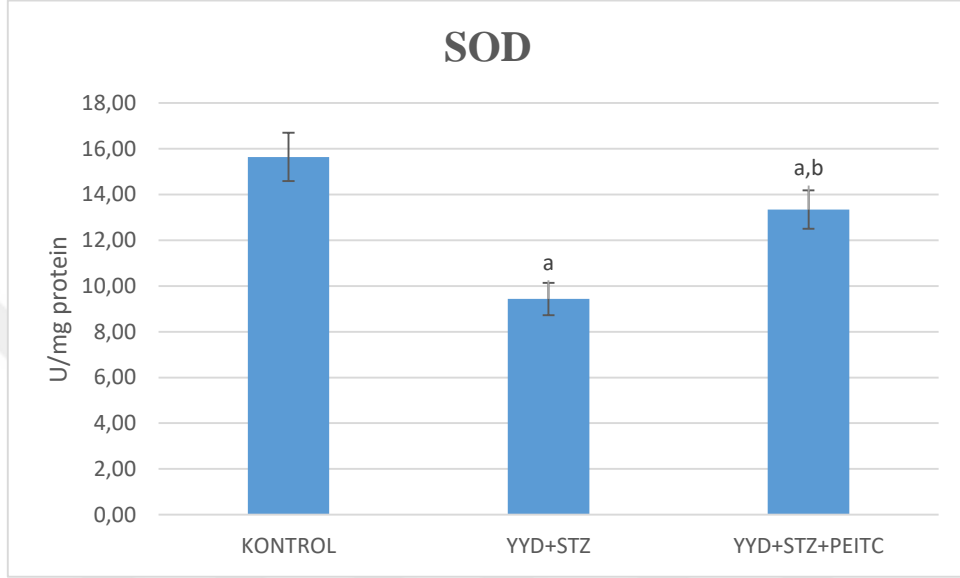
- a) Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında $p< 0.05$
- b) YYD+STZ grubuyla karşılaştırıldığında $p< 0.05$

Tablo 4.1. MDA' nın grup ortalamaları ve standart sapma verileri ($p<0.05$)

| | ÖRNEK SAYISI (n) | MDA (nmol/ yaş doku ağırlığı) ORT±SS |
|----------------------|---------------------|--|
| KONTROL | 10 | 523.2800 ± 3.62179 |
| YYD+STZ | 10 | 667.2700 ± 14.60267 ^a |
| YYD+STZ+PEITC | 10 | 548.9000 ± 19.53794 ^{a,b} |

4.2. SOD Aktivite Ölçümünün Sonuçları

Elde edilen verilere göre YYD+STZ verilen grupta istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalan SOD enzim aktivitesi tespit edildi ($p<0,05$). YYD+STZ+PEITC verilen grupta ise SOD aktivitesinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı tespit edildi ($p<0,05$).



Grafik 4.2. Kontrol, YYD+STZ ve YYD+STZ+PEITC deney gruplarının karaciğer doku SOD aktivite düzeylerinin karşılaştırılması

(a) Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında $p< 0.05$

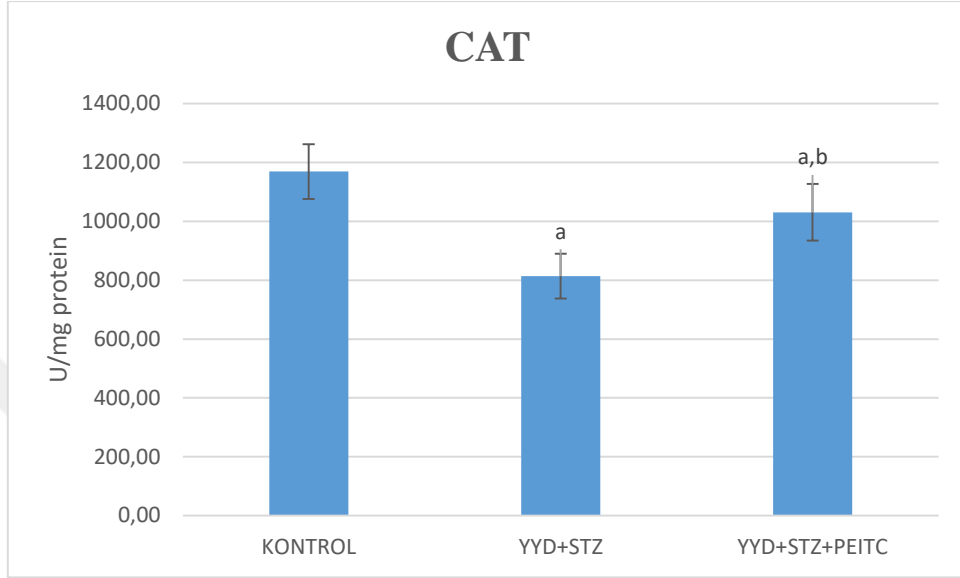
(b) YYD+STZ grubuyla karşılaştırıldığında $p< 0.05$

Tablo 4.2. SOD aktivitelerinin grup ortalamaları ve standart sapma verileri ($p<0.05$)

| | ÖRNEK SAYISI (n) | SOD (U/mg protein) ORT±SS |
|----------------------|---------------------|----------------------------------|
| KONTROL | 10 | 15.6367 ± 1.05514 |
| YYD+STZ | 10 | 9.4322 ± 0.70719 ^a |
| YYD+STZ+PEITC | 10 | 13.3406 ± 0.83853 ^{a,b} |

4.3. CAT Aktivite Ölçümünün Sonuçları

Çalışmadan elde ettiğimiz verilerde, YYD+STZ verilen grupta CAT enzim aktivitesinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı gözlenirken ($p<0,05$) YYD+STZ+PEITC uygulanan grupta ise anlamlı bir şekilde artış tespit edildi ($p<0,05$).



Grafik 4.3. Kontrol, YYD+STZ ve YYD+STZ+PEITC deney gruplarının karaciğer doku CAT aktivite düzeylerinin karşılaştırılması

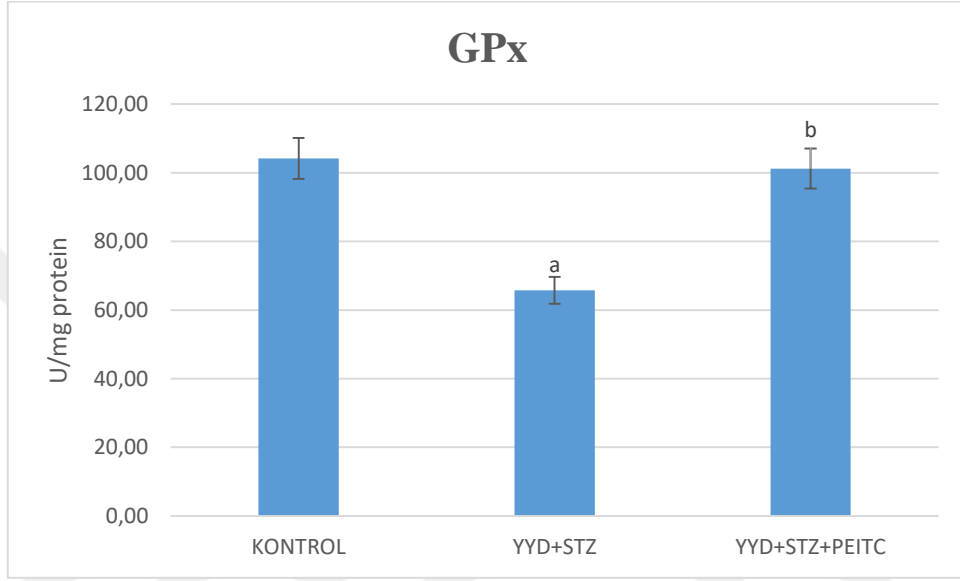
- (a) Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında $p < 0.05$
(b) YYD+STZ grubuyla karşılaştırıldığında $p < 0.05$

Tablo 4.3. CAT aktivitelerinin grup ortalamaları ve standart sapma verileri ($p < 0.05$).

| | ÖRNEK SAYISI (n) | CAT (U/mg protein) ORT±SS |
|----------------------|---------------------|-----------------------------------|
| KONTROL | 10 | 1169.2333 ± 92.80061 |
| YYD+STZ | 10 | 814.0235 ± 76.11498 ^a |
| YYD+STZ+PEITC | 10 | 1030.7334 ± 96.25453 ^b |

4.4. GPx Aktivite Ölçümünün Sonuçları

Deney sonucunda elde edilen verilere göre YYD+STZ verilen grupta istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalan GPx enzim aktiviteyi tespit edildi ($p < 0,05$). YYD+STZ+PEITC uygulanan grup, Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artan GPx enzim aktivitesi gözlenemezken ($p > 0,05$) YYD+STZ verilen gruba göre anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($p < 0,05$).



Grafik 4.4. Kontrol, YYD+STZ ve YYD+STZ+PEITC deney gruplarının karaciğer doku GPx aktivite düzeylerinin karşılaştırılması

(a) Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında $p < 0,05$

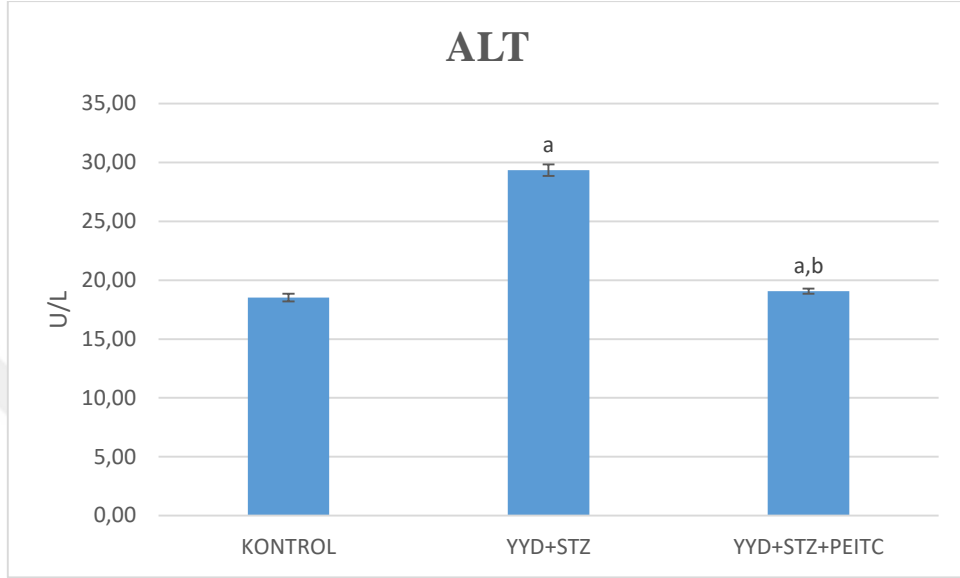
(b) YYD+STZ grubuyla karşılaştırıldığında $p < 0,05$

Tablo 4.4. GPx aktiviteyi grup ortalamaları ve standart sapma verileri ($p < 0,05$).

| | ÖRNEK SAYISI (n) | GPx (U/mg protein) ORT±SS |
|----------------------|---------------------|---------------------------------|
| KONTROL | 10 | 104.1647 ± 5.96681 |
| YYD+STZ | 10 | 65.7171 ± 3.91459 ^a |
| YYD+STZ+PEITC | 10 | 101.2081 ± 5.84733 ^b |

4.5. Serum ALT Aktivite Ölçümünün Sonuçları

Yaptığımız deney sonucunda, YYD+STZ uygulanması sonucunda rat serumlarında ALT aktivitesinin arttığı gözlenmiştir ($p<0,05$). YYD+STZ+PEITC verilen grupta ise istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş gözlenmiştir ($p<0,05$).



Grafik 4.5. Kontrol, YYD+STZ ve YYD+STZ+PEITC deney gruplarının serum ALT aktivite düzeylerinin karşılaştırılması

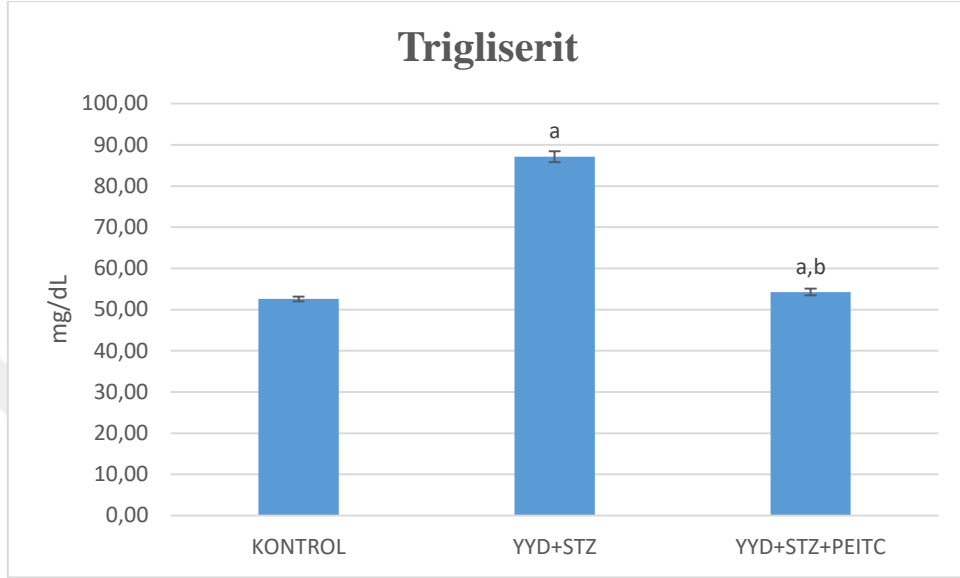
- (a) Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında $p< 0.05$
- (b) YYD+STZ grubuyla karşılaştırıldığında $p< 0.05$

Tablo 4.5. Serum ALT aktivitesinin grup ortalamaları ve standart sapma verileri ($p<0.05$)

| | ÖRNEK SAYISI (n) | ALT (U/L) ORT±SS |
|----------------------|---------------------|----------------------------------|
| KONTROL | 10 | 18.5311 ± 0.32757 |
| YYD+STZ | 10 | 29.3527 ± 0.48879 ^a |
| YYD+STZ+PEITC | 10 | 19.0747 ± 0.21939 ^{a,b} |

4.6. Serum Trigliserit Düzey Ölçümünün Sonuçları

Çalışmamızdan elde ettiğimiz verilere göre, YYD+STZ uygulanması sonucunda rat serumlarında trigliserit miktarının arttığı gözlenmiştir ($p<0.05$). YYD+STZ+PEITC verilen grupta ise istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş gözlenmiştir ($p<0.05$).



Grafik 4.6. Kontrol, YYD+STZ ve YYD+STZ+PEITC deney gruplarının serum trigliserit düzeylerinin karşılaştırılması

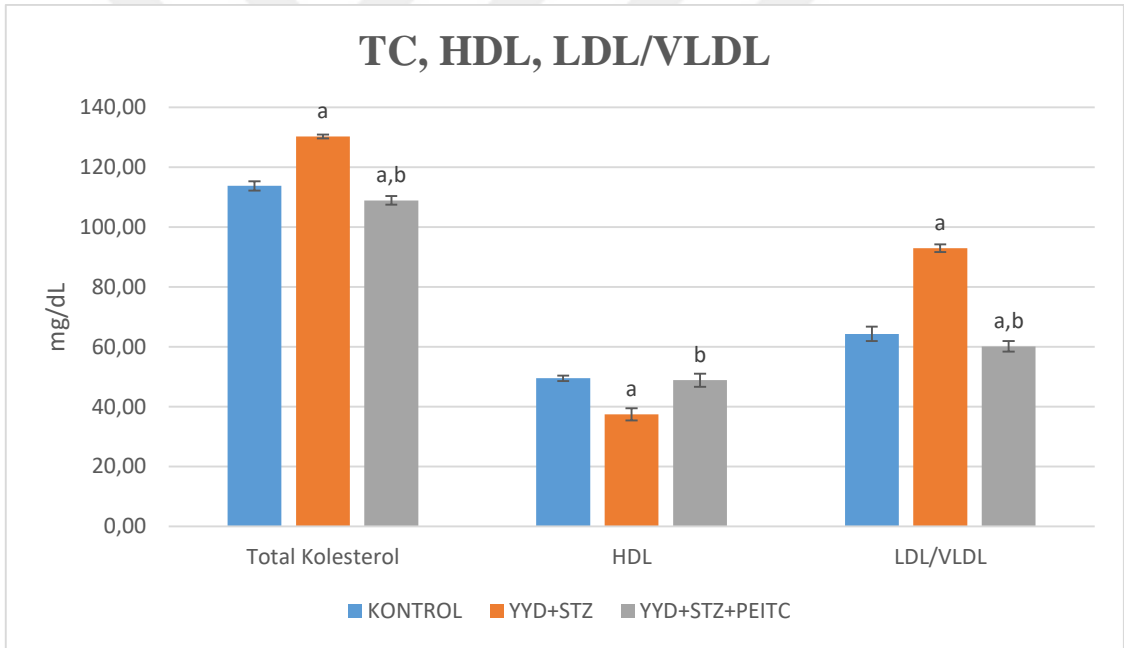
- (a) Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında $p<0.05$
(b) YYD+STZ grubuyla karşılaştırıldığında $p<0.05$

Tablo 4.6. Serum trigliserit' in grup ortalamaları ve standart sapma verileri ($p<0.05$)

| | ÖRNEK SAYISI (n) | Trigliserit (mg/dl) ORT±SS |
|----------------------|---------------------|----------------------------------|
| KONTROL | 10 | 52.5905 ± 0.57168 |
| YYD+STZ | 10 | 87.1343 ± 1.31568 ^a |
| YYD+STZ+PEITC | 10 | 54.2493 ± 0.81868 ^{a,b} |

4.7. Serum Total Kolesterol, HDL, LDL/VLDL Düzey Ölçümünün Sonuçları

Çalışmamızda, YYD+STZ uygulanması sonucunda rat serumlarında TC miktarının arttığı gözlenmiştir ($p<0.05$). YYD+STZ+PEITC uygulanan grupta ise istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş gözlenmiştir ($p<0.05$). YYD+STZ uygulanması sonucunda rat serumlarında HDL miktarının düştüğü gözlenmiştir ($p<0.05$). YYD+STZ+PEITC verilen grupta Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenememişken ($p>0.05$) YYD+STZ uygulanan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı bir artışın varlığı tespit edilmiştir ($p<0.05$). YYD+STZ uygulanması sonucunda rat serumlarında LDL/VLDL miktarının arttığı gözlenmiştir ($p<0.05$). YYD+STZ+PEITC verilen grupta ise istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş tespit edilmiştir ($p<0.05$).



Grafik 4.7. Kontrol, YYD+STZ ve YYD+STZ+PEITC deney gruplarının serum TC, HDL, LDL/VLDL düzeylerinin karşılaştırılması

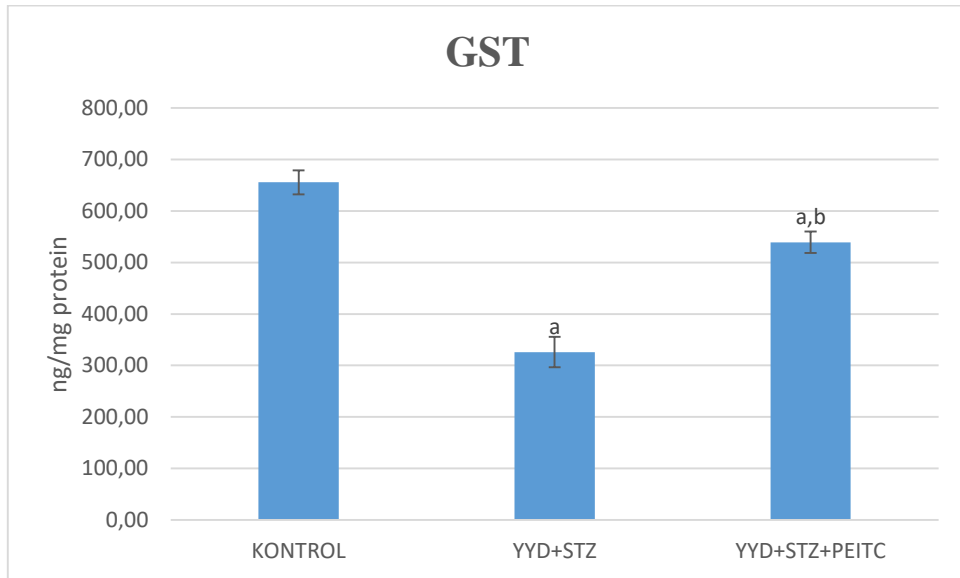
- (a) Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında $p< 0.05$
- (b) YYD+STZ grubuyla karşılaştırıldığında $p< 0.05$

Tablo 4.7. Serum TC, HDL, LDL/VLDL' nin grup ortalamaları ve standart sapma verileri (p<0.05)

| | ÖRNEK SAYISI (n) | TC (mg/dl) ORT±SS | HDL (mg/dl) ORT±SS | LDL/VLDL (mg/dl) ORT±SS |
|----------------------|-------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|
| KONTROL | 10 | 113.7572 ± 1.52799 | 49.4566 ± 0.65570 | 64.3006 ± 1.41673 |
| YYD+STZ | 10 | 130.3064 ± 0.92132 ^a | 37.4104 ± 2.05328 ^a | 92.8960 ± 2.16134 ^a |
| YYD+STZ+PEITC | 10 | 108.9306 ± 2.37537 ^{a,b} | 48.8208 ± 1.27839 ^b | 60.1098 ± 1.75611 ^{a,b} |

4.8. GST Düzey Ölçümünün Sonuçları

Çalışmamızda, YYD+STZ uygulanması sonucunda rat karaciğer dokularında GST miktarının düştüğü gözlenmişken (p<0.05) YYD+STZ+PEITC verilen grupta ise istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilmiştir (p<0.05).



Grafik 4.8. Kontrol, YYD+STZ ve YYD+STZ+PEITC deney gruplarının karaciğer doku GST miktar düzeylerinin karşılaştırılması

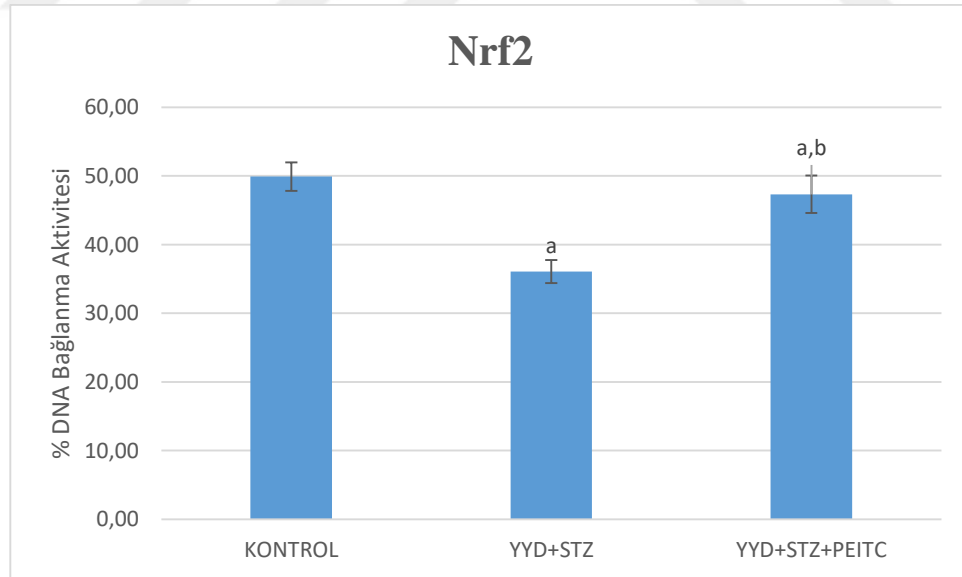
- (a) Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında $p < 0.05$
(b) YYD+STZ grubuyla karşılaştırıldığında $p < 0.05$

Tablo 4.8. GST' in grup ortalamaları ve standart sapma verileri ($p < 0.05$)

| | ÖRNEK SAYISI (n) | GST (ng/mg protein) ORT±SS |
|----------------------|---------------------|------------------------------------|
| KONTROL | 10 | 655.6948 ± 23.36276 |
| YYD+STZ | 10 | 326.0523 ± 29.78629 ^a |
| YYD+STZ+PEITC | 10 | 539.1041 ± 20.76466 ^{a,b} |

4.9. Nrf2 Aktivite Ölçümünün Sonuçları

Çalışmamızda, YYD+STZ uygulanması sonucunda rat karaciğer dokularında (nükleer ekstrakt) Nrf2' nin DNA' ya bağlanma aktivitesinin düştüğü gözlenmiştir ($p < 0.05$). Buna karşın, YYD+STZ+PEITC verilen grupta ise istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir ($p < 0.05$).



Grafik 4.9. Kontrol, YYD+STZ ve YYD+STZ+PEITC deney gruplarının karaciğer dokularında Nrf2' nin DNA' ya bağlanma aktivite düzeylerinin karşılaştırılması

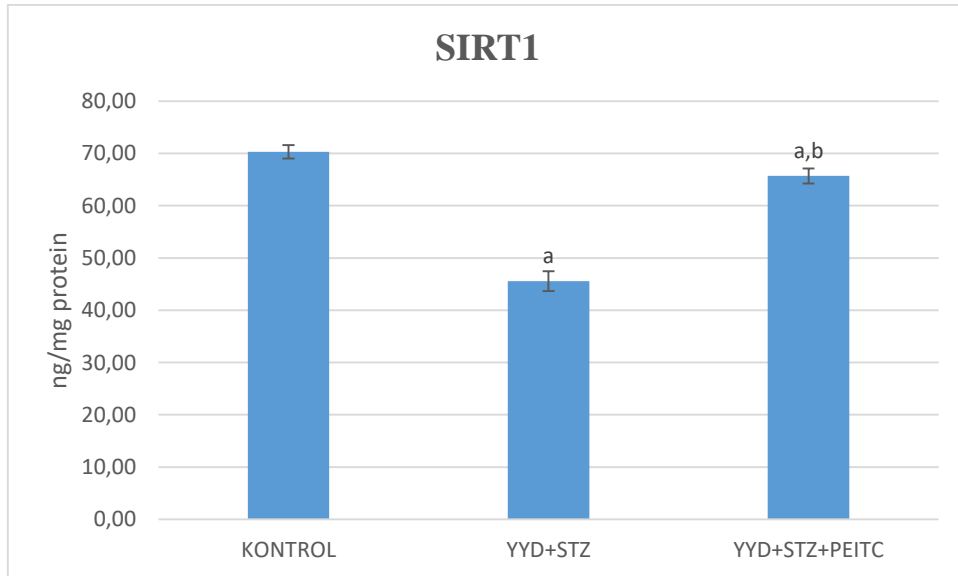
- (a) Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında $p < 0.05$
(b) YYD+STZ grubuyla karşılaştırıldığında $p < 0.05$

Tablo 4.9. Nrf2' nin DNA' ya bağlanma grup ortalamaları ve standart sapma verileri
($p < 0.05$)

| | ÖRNEK SAYISI (n) | Nrf2 (% DNA Bağlanma Aktivitesi) ORT±SS |
|----------------------|---------------------|--|
| KONTROL | 10 | 49.9107 ± 2.08121 |
| YYD+STZ | 10 | 36.0714 ± 1.69408 ^a |
| YYD+STZ+PEITC | 10 | 47.3214 ± 2.72772 ^{a,b} |

4.10. SIRT1 Düzey Ölçümünün Sonuçları

Yapılan deney sonucunda elde edilen verilere göre, YYD+STZ uygulanması yapılan rat karaciğer dokularında SIRT1 miktarının düştüğü gözlenmiştir ($p < 0.05$). YYD+STZ+PEITC verilen grupta ise istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir ($p < 0.05$).



Grafik 4.10. Kontrol, YYD+STZ ve YYD+STZ+PEITC deney gruplarının karaciğer doku SIRT1 miktar düzeylerinin karşılaştırılması

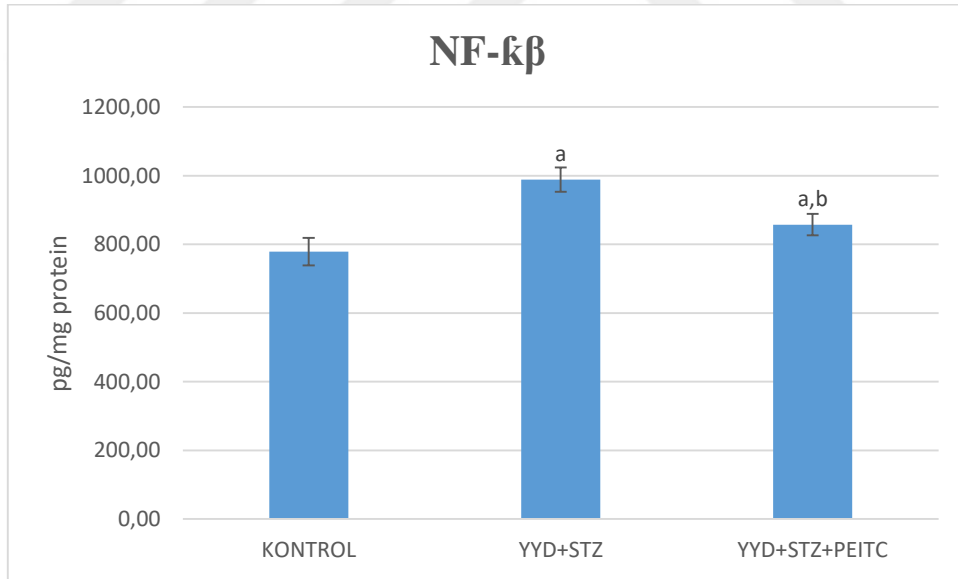
- (a) Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında $p < 0.05$
(b) YYD+STZ grubuyla karşılaştırıldığında $p < 0.05$

Tablo 4.10. SIRT1' in grup ortalamaları ve standart sapma verileri ($p < 0.05$)

| | ÖRNEK SAYISI (n) | SIRT1 (ng/mg protein) ORT±SS |
|----------------------|---------------------|----------------------------------|
| KONTROL | 10 | 70.3010 ± 1.28768 |
| YYD+STZ | 10 | 45.5690 ± 1.91706 ^a |
| YYD+STZ+PEITC | 10 | 65.7130 ± 1.44016 ^{a,b} |

4.11. NF- κ B Düzey Ölçümünün Sonuçları

Elde edilen sonuçlara göre, YYD+STZ uygulanması yapılan rat karaciğer dokularında NF- κ B miktarının arttığı gözlenmiştir ($p < 0.05$). YYD+STZ+PEITC verilen grupta ise istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş gözlenmiştir ($p < 0.05$).



Grafik 4.11. Kontrol, YYD+STZ ve YYD+STZ+PEITC deney gruplarının karaciğer doku NF- κ B miktar düzeylerinin karşılaştırılması

- (a) Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında $p < 0.05$
(b) YYD+STZ grubuyla karşılaştırıldığında $p < 0.05$

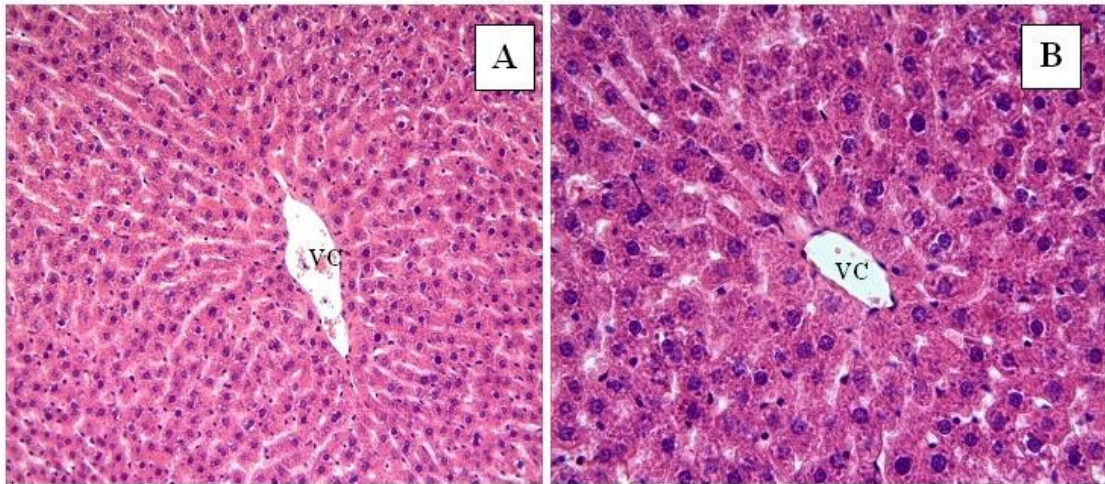
Tablo 4.11. NF- κ B' nin grup ortalamaları ve standart sapma verileri (p<0.05)

| | ÖRNEK SAYISI (n) | NF- κ B (pg/mg protein) ORT \pm SS |
|----------------------|---------------------|---|
| KONTROL | 10 | 778.6883 \pm 40.04570 |
| YYD+STZ | 10 | 988.7351 \pm 35.46650 ^a |
| YYD+STZ+PEITC | 10 | 857.5564 \pm 31.22221 ^{a,b} |

4.12. Histolojik Bulgular

Kontrol (Resim 4.1.A, 4.1.B) grubunu oluşturan sıçanların karaciğer doku örnekleri ışık mikroskopik incelemelerinde normal histolojik görünümde olduğu gözlemlendi. YYD+STZ grubunda mononükleer hücre infiltrasyonu (oklar) (Resim 4.2.A, 4.2.B, 4.2.C), vasküler konjesyon (beyaz yıldız) (Resim 4.2.B, 4.2.D), eozinofilik sitoplazmalı piknotik nükleuslu hepatositler (siyah yıldız) (Resim 4.2.D), hemoraji (siyah ince oklar) (Resim 4.2.E), vakuolizasyon (Resim 4.2.E) ve sinüzoidal dilatasyon (siyah oklar) (Resim 4.2.F) gözlemlendi. YYD+STZ+PEITC grubunda ise karaciğer dokusunda histopatolojik hasarın belirgin derecede azaldığı gözlemlendi. Az miktarda mononükleer hücre infiltrasyonu (beyaz ok) (Resim 4.3.A, 4.3.B), vasküler konjesyon (siyah ok) (Resim 4.3.A, 4.3.B), eozinofilik sitoplazmalı piknotik nükleuslu hepatositler (siyah oklar) (Resim 4.3.C) izlendi.

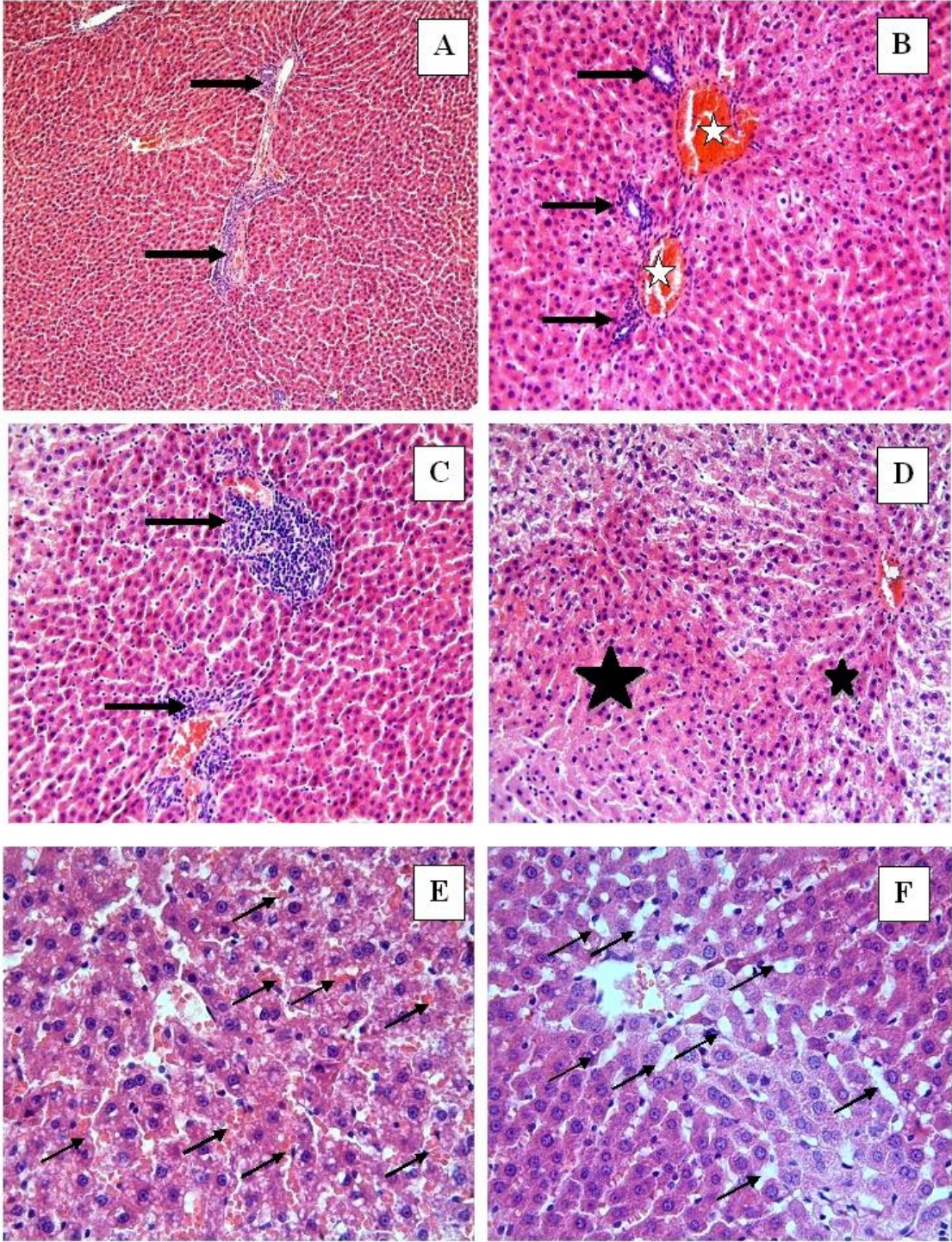
KONTROL GRUBU



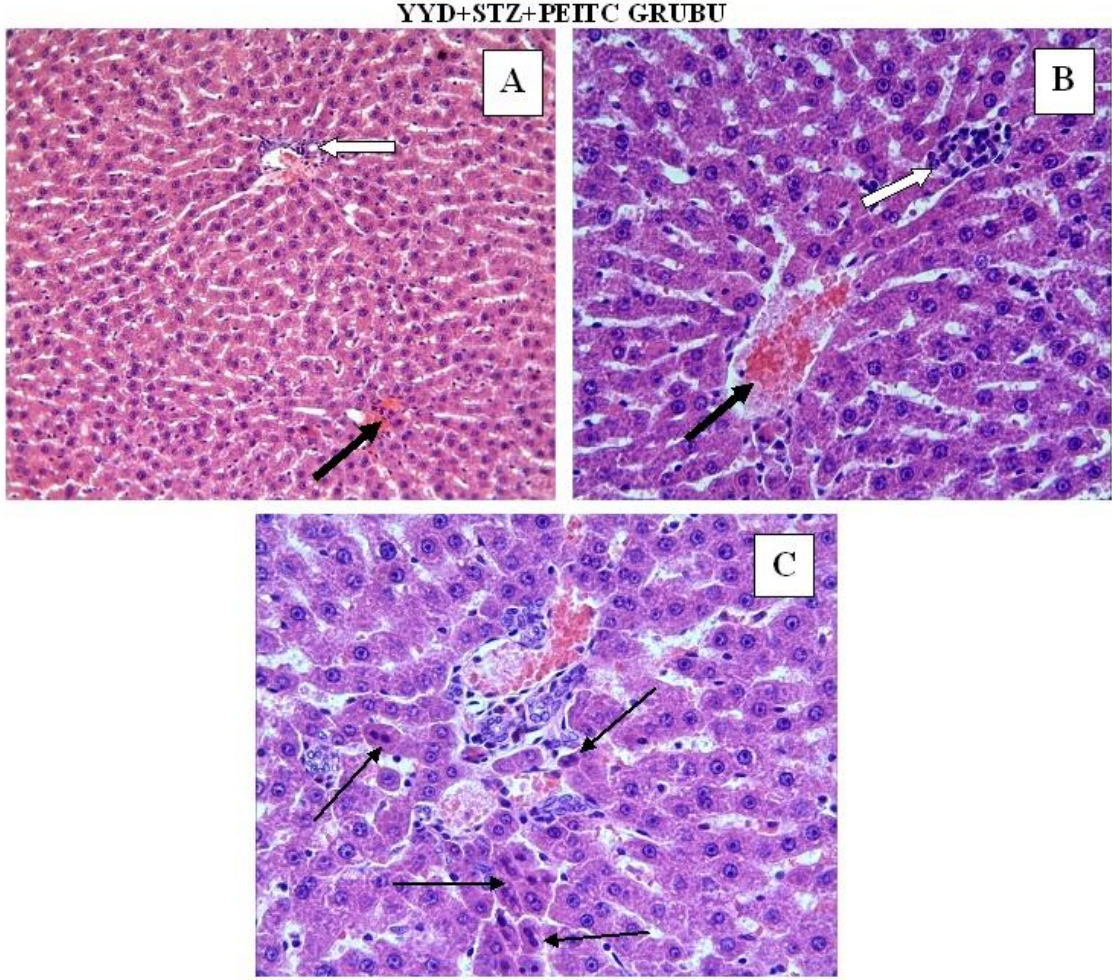
Resim 4.1. Kontrol grubuna ait karaciğer dokusu normal histolojik görünümde izlendi.

VC: Vena sentralis. A:H-E; X20, B: H-E; X40.

YYD+STZ GRUBU



Resim 4.2. YYD+STZ grubunda mononükleer hücre infiltrasyonu (oklar) (A, B, C), vasküler konjesyon (beyaz yıldız) (B, D), eozinofilik sitoplazmalı piknotik nükleuslu hepatositler (siyah yıldız) (D), hemoraji (siyah ince oklar) (E), vakuolizasyon (E) ve sinüzoidal dilatasyon (siyah oklar) (F) gözlemlendi. A: H-E; X10, B, C, D: H-E; X20, E, F: H-E; 40.



Resim 4.3. YYD+STZ+PEITC grubunda karaciğer dokusunda histopatolojik hasarın belirgin derecede azaldığı gözlemlendi. Az miktarda mononükleer hücre infiltrasyonu (beyaz ok) (A, B), vasküler konjesyon (siyah ok) (A, B), eozinofilik sitoplazmalı piknotik nükleuslu hepatositler (siyah oklar) (C) izlendi. A: H-E; X20, B, C: H-E; X40.

Tablo 4.12. Yüksek yağ diyeti ve STZ'nin neden olduğu hasar üzerine PEITC'nin karaciğerdeki iyileştirici etkileri. (Ort±SEM n=7).

| GRUPLAR | Karaciğer |
|----------------------|--------------------------|
| Kontrol | 0.49 ± 0.07 ^a |
| YYD+STZ | 2.39 ± 0.09 ^b |
| YYD+STZ+PEITC | 1.86 ± 0.08 ^c |

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

5. TARTIŞMA

NAFLD, yaygın bir kronik karaciğer hastalığı olup dislipidemi, insülin direnci, obezite ve tip II diyabetik hastalıklar gibi yüksek metabolik sağlık sorunları riski ile ilişkilidir. Metabolik sendrom prevalansına paralel olarak, NAFLD; karaciğer steatozu, nonalkolik steatohepatit (NASH) ve fibroz dahil olmak üzere üç tipik patolojik alt tipi kapsayan bir yağlı karaciğer spektrumundan oluşmaktadır. En az şiddetli olduğu aşama ise, karaciğer hücresinde büyük ölçüde yağ birikiminin neden olduğu basit karaciğer steatozudur (169). Steatozun ilerlemesi, yaşam tarzı değişiklikleri ve fiziksel egzersiz ile yavaşlatılabilir veya tersine çevrilebilir. Fibrozun geç aşaması olarak siroz, karaciğer fonksiyonunu geri döndürülemez bir şekilde bozabilir ve nihayetinde hastalarda hepatoselüler karsinom gelişme riskini artırabilir. Şu anda, NAFLD tedavisinde resmi olarak onaylanan herhangi bir farmakolojik ajan bulunmamaktadır. NAFLD' ye önerilen ilk müdahale, enerji alımının kısıtlanması ve fiziksel aktivite geliştirmeyi içeren yaşam tarzı değişikliğidir. Yaşam tarzı değişikliği vücut ağırlığını azaltabilir ve vücut ağırlığının orta derecede azalması hepatik patolojik sendromu iyileştirebilir ve hepatik yağ birikimini azaltabilir. Öte yandan antioksidanlar, insülin sensitizerleri ve lipid düşürücü ilaçlar olarak sınıflandırılan bazı farmakolojik tedaviler uygulanmıştır. Örneğin, yapılan bir klinik deneyde, diyabetik olmayan NASH hastalarının Vitamin E gibi antioksidan reaktif ile tedavi edilebileceği önerilmiştir (170). E vitamininin, TNF- α (tümör nekroz faktörü alfa)' yı baskılayarak inflamasyonu azalttığı, karaciğer enzim düzeylerinde düşüş sağladığı ve insülin direncini düzenlediği tespit edilmiştir (171,172).

Günümüzde uygulanan ilaç tedavileri, karaciğer yağlanması engellenmesi ve varolan yağlanmanın geriletilmesi, fibrozisin önlenmesi ve inflamasyonun baskılanmasına yöneliktir (173). NAFLD hastalarının tedavisinde çoğunlukla lipid düşürücü ve antidiyabetik ilaçlar kullanılmaktadır (174, 175). Yapılan çalışmalarda, metforminin ALT – AST düzeylerinde düzelmeye neden olduğu (176), anjiotensin reseptör blokerlerinin ALT – AST seviyesinde azalmayı ve fibroziste gerilemeyi sağladığı (177), pentoksifilin kullanımının steatoz ve fibroziste azalmaya sebep olduğu gösterilmiştir (178).

Tıpta gelişmeler olmasına rağmen, bitkisel ilaçlara kolayca ulaşılabilmesi ve sentez gerektirmemesinden dolayı bitkisel tedavi, NAFLD'nin etkili tedavi yönetimi için

oldukça ilgi görmektedir. Bütün tıbbi bitkiler ve tıbbi özelliklere sahip saflaştırılmamış bitki özleri olarak tanımlanan bitkisel ilaçlar, geleneksel olarak dünyanın farklı ülkelerinde karaciğer rahatsızlıklarını iyileştirmek için kullanılmaktadır.

PEITC bir glukosinolat çeşidi olan glukonasturtinin hidrolizi ile oluşan, brokoli, lahana, su teresi, karnabahar gibi bitkilerde bulunan etkinliği yüksek bir fitokimyasaldır (179). En önemli biyolojik etkileri arasında antikanser özelliği ön plana çıkmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda özellikle kemopreventif ve kemoteröpotik etkilerinin olduğu bildirilmiştir. Wang ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışma PEITC' nin, birçok kanser türünün (yumurtalık, testis, rahim ağzı, kolorektal, vb.) tedavisinde kullanılan cisplatine karşı kanser hücrelerinin duyarlılığını arttırdığını ortaya koymuştur (161). Başka bir çalışmada ise PEITC' nin baş-boyun kanserlerini önlemede ve tedavi sürecinde etkili olduğu tespit edilmiştir (180). PEITC, antikanser özelliğinin yanında güçlü antiinflamatuvar ve antioksidan özelliklere de sahiptir (181). Son zamanlarda yapılan bir çalışmada ise, PEITC'nin yüksek yağ diyeti ile indüklenen obez farelerde hepatosteatozu çeşitli lipojenik faktörleri baskılayarak ve adiposit farklılaşmasını bloke ederek inhibe ettiği rapor edilmiştir (182).

Bu çalışmamızda, PEITC'nin YYD ve STZ ile indüklenen NAFLD oluşum mekanizmaları üzerine etkisini ve oksidatif stres için anahtar rol oynayan SIRT1/Nrf2 yoluyla ilişkisini incelemeyi amaçladık. Bu amaçla, deney gruplarımızda, serum ALT, serum kolesterol ve trigliserit seviyelerini, karaciğer oksidatif stres parametrelerini, faz II enzimlerinden GST düzeyini, aynı zamanda oksidatif stres ve inflamasyonda rol oynadığı bilinen SIRT 1 düzeyini, Nrf2 transkripsiyon faktörünün aktivitesini ve inflamasyonda rol alan NF- κ B düzeylerini inceledik.

NAFLD' nin temel başlangıç noktası hepatositlerde lipit damlacıklarının birikmesidir. Lipit birikimine birçok farklı etkenin neden olduğu bilinmekle beraber obezite, diyabet, insülin direnci bu etkenlerin başlıcalarıdır (183). Obezite varlığında NAFLD sıklığının arttığı (184) ve diyabetin NAFLD için bir gösterge olduğu (185) yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir. Dünya genelinde artış gösteren obezite ve diyabet seviyelerine bakıldığında zaman NAFLD' nin dünyada en sık görülen karaciğer hastalığı olması hiç şaşırtıcı değildir.

Hastalığın tanısında kullanılan temel laboratuvar bulguları ALT (alanin aminotransferaz) ve AST (aspartat aminotransferaz) değerleridir. Bunların yanı sıra ALP (alkalen fosfataz) ve GGT (gama-glutamil transferaz) enzimlerinde de yükselme gözlemlenebilir (186). Ancak yapılan çalışmalarda bazı hastalarda ALT – AST düzeylerinde

hastalığa bağlı olarak anlamlı bir yükseliş gözlenirken (187), bazı hastalarda aminotransferaz ölçümlerinde anlamlı bir artış gözlenmemiştir (188). ALT düzeyinin T2DM hastalarında NAFLD gelişimini tahmin etmek için bir belirteç olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (189). Çalışma gruplarımızı karşılaştırdığımızda, kontrol grubuna göre YYD+STZ uygulanan gruptaki ALT düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir yükselme gözlenirken, PEITC uygulanan grupta ise ALT düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı gözlenmiştir ($p<0.05$).

Aşırı lipid, hepatik steatozu tetikleyen temel nedendir. Adipoz dokudan karaciğere aşırı serbest yağ asitleri (SYA) iletilir ve SYA'ler trigliserid formunda intrahepatik havuzun genişlemesine neden olur. Yağ birikimi, karaciğer hücrelerinin proinflamatuvar sitokinleri salmasına, oksidatif stresi ve hepatik stellat hücre aktivasyonunu tetikleyen, sonuçta hepatik inflamatuvar hasara yol açan hepatik lipotoksisiteye neden olur. Yağ asidi metabolizmasının iyileştirilmesi, NAFLD tedavisinde etkili bir önlemdir ve yağ asidi metabolizmasını hedefleyen bitkisel ilaçlar, NAFLD' nin hem klinik öncesi hem de klinik araştırmalarında incelenmiştir. Bitkisel ilaçların, karaciğer dislipidemisi olan hastalar üzerindeki yararlı etkileri, trigliserit (TG), toplam kolesterol (TC) ve düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL-C), alanin aminotransferaz (ALT) düzeylerini düşürmek gibi lipid metabolik parametreleri iyileştirebilmesinin yanı sıra yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL-C) üretimini arttırmasıdır (190). Araştırmamızda kontrol grubu ile kıyasladığımızda, YYD+STZ grubundaki deney hayvanlarında serum TC, TG, LDL/VLDL-C seviyelerinin istatistiksel olarak anlamlı arttığı ve HDL-C seviyelerinin ise azaldığı tespit edildi ($p<0.05$). PEITC uygulanan deney grubunda ise bu parametrelerin iyileştiği bir tablo karşımıza çıkmaktadır. PEITC'nin, hasta grubuna göre TC, TG, LDL/VLDL-C düzeylerini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalttığını ve HDL-C seviyelerini ise arttırdığını belirledik ($p<0.05$). PEITC'nin hipolipidemik etkisine yönelik çalışmaların sayısı artmakla birlikte çalışma bulgularımıza benzer olarak, Gwon ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada PEITC' nin, vücutta lipit birikimini azalttığı, aterosklerotik plak oluşumunu önlediği, obezite de faydalı etkileri olduğu ve inflamasyonun baskılanmasında aktif rol oynadığı ortaya koyulmuştur (191). Başka bir çalışmada, yüksek yağ alımına bağlı olarak gelişen steatozu ve adiposit farklılaşmasını engellediğini göstermiştir (182).

Yukarıda da belirtildiği üzere NAFLD gelişiminin temelinde karaciğer lipit miktarının artması yer almaktadır. Ancak diyetteki yağ çeşitlerinin (doymuş/doymamış) farklı oranlardaki kompozisyonuna bağlı olarak ortaya çıkardığı sonuçlarda farklılık

göstermektedir (192). Özellikle doymuş yağ oranı fazla olan diyetle ilgili olarak oksidatif stres oluşumunda, lipid peroksidasyonunda ve insülin direncinde artış olduğu bildirilmiştir (193).

Hücrelerde normal solunum süresince solunumun doğal mekanizmasının sonucu olarak ROT üretilmektedir (194). Oluşan bu ROT, hücreler için toksiktir ve bu nedenle, GST, SOD, GPx ve CAT'den oluşan homeostatik antioksidan savunma sistemi tarafından etkisiz hale getirilmektedir (195, 196). ROT oluşumu ve nötralizasyonu arasındaki orantısızlık şiddetli oksidatif strese yol açabilir ve ardından bu reaktif türlerin birikmesi proteinleri oksitleyerek sonuçta hücre zarlarını ve organelleri bozarak onları işlevsiz hale getirebilir (197). Çalışmamızda YYD+STZ uygulanan sıçanların karaciğer dokularında SOD, GPx ve CAT gibi antioksidan enzimlerin aktivitesinde önemli bir azalma ve MDA düzeyinde ise artış gözlemlendi ($p<0.05$). Bu sonuçlar, indüklenen oksidatif stresin oluşumunu göstermektedir. YYD+STZ' nin neden olduğu hepatotoksisitenin, ROS üretimini artırma ve homeostatik antioksidan sistemi tüketme kabiliyetinden kaynaklandığı önceki araştırmalardan bilinmektedir (198).

Nrf2, oksidatif stres hasarına karşı savunma ile ilişkili bir nükleer transkripsiyon faktörü olup, NAD (P) H: kinon oksidoredüktaz 1 (NQO1), hem oksijenaz-1 (HO-1), ve GST enzimi dahil olmak üzere antioksidan enzimlerin ekspresyonunu kontrol etmektedir (199). Artan sayıdaki çalışmalar, Nrf2'nin antioksidan savunmayı artırarak ve serbest radikalleri yok ederek oksidatif stres hasarını hafiflettiğini kanıtlamıştır (200). Nrf2 aynı zamanda birçok sitoprotektif genin önemli bir düzenleyicisidir ve çeşitli karaciğer hastalıklarının tedavisi için potansiyel bir hedef olarak kabul edilmektedir (201). Çalışmamızdaki grupları Nrf2'nin DNA'ya bağlanma aktivitesi açısından karşılaştırdığımızda, YYD+STZ ile indüklenen gruptaki azalmanın ve PEITC verilen grupta ise gerçekleşen artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlemlenmiştir ($p<0.05$). Çalışma bulgularımızla benzer olarak, Naidu ve arkadaşlarının yaptığı çalışma ile PEITC'nin sistein aminoasitleri ile etkileşime girme yeteneğine bağlı olarak Nrf2'nin aktivasyonunda çok önemli bir rol üstlendiğini göstermiştir (202). Diğer bir çalışmada ise yine PEITC'nin Nrf2 transkripsiyon faktörünün etkinliğini artırarak faz II enzim metabolizmasını aktive edildiği tespit edilmiştir (203). Çalışmadan elde edilen bu sonuçlara bakıldığında, PEITC'nin Nrf2 aktivasyonu sağlayarak sitoprotektif etki sağladığını söyleyebiliriz. Nrf2'nin koruyucu etkileri, akut hepatoksisite, karaciğer fibrozu, NAFLD ve viral hepatit dahil olmak üzere çeşitli karaciğer hastalıklarında

tanımlanmıştır (204). Bu nedenle, Nrf2 sinyal yolu, karaciğer hasarının tedavisi için potansiyel bir hedef olabileceği düşünülmektedir.

PEITC' nin antikarsinojenik etkisi, kanserojenlerin aktivasyonunu inhibe etme ve ayrıca GST gibi gelişmiş detoksifikasyon sistemlerini artırma kabiliyetinden kaynaklı olduğu öne sürülmektedir (205). GST, bir dizi mutajenik elektrofilin, indirgenmiş glutatyon ile konjugasyonlarını katalize ederek detoksifiye eden çok işlevli bir enzim ailesidir (206). Bu çalışmada, GST düzeyinin PEITC tarafından önemli ölçüde indüksiyonu, Seo KW ve arkadaşlarının PEITC ile tedavinin karaciğer GST aktivitesinde artışa neden olduğunu gösteren çalışma sonuçlarıyla benzerlik göstermiştir (207). Öte yandan, Lieshout ve arkadaşları, PEITC' nin diyetle alımının Wistar sıçanında hepatik GST aktivitesini önemli ölçüde artırmadığını bildirmişlerdir. Bu farklılıklar, türe özgü bir etkiden ve konsantrasyona veya süreye bağlı etkilerden kaynaklanıyor olabileceğini düşündürmektedir (208).

Nükleer bir transkripsiyon faktörü olan NF- κ B, immün, inflamatuvar ve anti-apoptotik yanıtlara göre sitokinlerin ekspresyonunu düzenlemektedir (209). Daha da önemlisi, NF- κ B, inflamatuvar gen ekspresyonunu düzenlemede baskın faktör olarak kabul edilmektedir (210). NF- κ B' nin sitozolden nükleer translokasyonu, inflamatuvar sitokin üretimini indükleyebilmekte ve inflamasyonu tetikleyebilmektedir (211). TNF- α , interlökin (IL) -6 ve interlökin (IL) -1 β gibi çok sayıda inflamatuvar sitokin, lokal inflamatuvar yanıtları tetikleyip büyüttüğü ve karaciğer hasarından sorumlu olduğu iyi bilinmektedir (212). Sonuç olarak, NF- κ B aktivasyonunun inhibe edilmesi, karaciğer hasarında anti-inflamatuvar terapötik uygulama için umut verici bir hedef olabilir. Çalışmamızda, nükleer fraksiyondaki NF- κ B düzeylerinin kontrol grubu ile karşılaştırıldığında YYD+STZ grubundaki artışının ve PEITC verilen gruptaki NF- κ B düzeylerindeki azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlenmiştir ($p < 0.05$). Çalışmamız ile benzer olarak Wang ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada da NF- κ B aktivitesinin PEITC tarafından inhibe edildiği gösterilmiştir (161).

Nikotinamid adenin dinükleotid- (NAD-) bağımlı protein deasetilazlar olan sirtuinler, memeli organizmalarının metabolizmasında, kardiyovasküler hastalıklarda ve yaşlanma sürecindeki birçok yola aracılık ettiğini göstermiştir (213). Birçok deneysel modelde, sirtuinlerin oksidatif hasara karşı çok önemli rol oynadıkları kanıtlanmıştır (214). Örneğin, bir çalışmada, sirtuinlerin, mitokondriyal matrikste antioksidan bir enzim olan Mn-SOD' u deasetile ederek ROT' un süpürülmesinde artışa neden olduğu ileri sürülmüştür (215).

SIRT1, hepatik lipit metabolizmasının düzenlenmesinde, oksidatif stres ve yağlı karaciğer hastalıklarının ilerlemesine aracılık eden hepatik inflamasyona karşı bazı transkripsiyon düzenleyicilerini deasetile ederek yararlı bir rol oynamaktadır (216). SIRT1'in, Nrf2 yoluyla hücreleri oksidatif stres hasarından önemli ölçüde koruduğu (217), öte yandan, araştırmalar ile artan kanıtlar, SIRT1'in inflamatuvar yanıtlarla güçlü bir şekilde ilişkili olduğunu ve NF- κ B aktivasyonunu inhibe ederek inflamatuvar yanıtları düzenlediğini göstermektedir (218). Bu nedenle, SIRT1'in upregülasyonu, Nrf2'yi aktive ve NF- κ B'yi inhibe ederek oksidatif stres ve inflamasyona karşı etkin bir şekilde rol oynayabilir.

Çalışmamızda karaciğer dokusunun histopatolojik analizleri, kontrole göre YYD+STZ uygulanmasının, mikroskobik olarak mononükleer hücre infiltrasyonu, vasküler konjesyon, eozinofilik sitoplazmalı piknotik nükleuslu hepatositler, hemoraji, vakuolizasyon ve sinüzoidal dilatasyon oluşumunu ortaya çıkarmıştır. YYD+STZ grubundaki bu değişiklikler, YYD+STZ uygulamasının karaciğerde, hemorajiye, inflamasyona ve nekrotik hücrelerin oluşumuna neden olduğunu bildiren Kurek ve arkadaşlarının bulgularına benzerdir (219). Dahası, Dwivedi ve arkadaşlarının çalışmasına göre YYD+STZ uygulamasının, normal karaciğer hücrenin bozulmasına, makro ve mikro vasküler steatoz ve ılımlı inflamasyona neden olduğu gösterilmiştir (220). YYD+STZ grubundaki bu değişiklikler, PEITC uygulaması ile anlamlı olarak azaldığı görülmekle birlikte elde edilen bu histopatolojik sonuçlar, biyokimyasal analiz bulgularımızı desteklemektedir.

Bu çalışmada, PEITC'nin YYD+STZ ile indüklenen NAFLD oluşum mekanizmalarına etkisini araştırmayı amaçladık. Çalışmamızdan elde ettiğimiz tüm veriler ele alındığında, PEITC'nin hastalığın oluşum risklerinden olan yüksek lipid seviyelerini kontrol altına alabileceğini, oksidatif stres ve inflamasyon prosesinin şiddetini azaltarak karaciğerde oluşan hasarı azaltabileceğini ön görmekteyiz. Nrf2 yolağının hepatik steatoza karşı koruyucu bir rolünün olduğu düşünülmekle birlikte adiposit farklılaşması, adipogenez veya beta-oksidasyon gibi lipid metabolizmasındaki yollar üzerindeki etkisinin moleküler mekanizmalarını aydınlatacak çalışmaların yapılması ilerdeki çalışmalarımızın temelini oluşturmuştur. Sonuç olarak, Cruciferae bitkilerinde biyoaktif bir bileşik olan PEITC, Nrf2 antioksidan yolunu ve SIRT1'in upregülasyonunu aktive ederek, aynı zamanda NF- κ B inflamatuvar cevabın inhibisyonuyla YYD ve STZ ile indüklenen NAFLD'yi iyileştirmiştir. Bu nedenle, bu çalışmadan elde edilen bulgulara göre PEITC'nin NAFLD'ye karşı, gelecek vaat eden ve

etkili bir aday ajan olabileceğini söyleyebiliriz. Bu bağlamda, PEITC'nin farklı metabolik yollar ve parametreler üzerine etkisinin incelenmesine, ayrıca moleküler yapı modelleme çalışmalarının yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Günümüzde NAFLD, artan obezite ve diyabet prevalansına bağlı olarak ciddi bir sorun olarak artmaya devam etmektedir. Basit steatozdan başlayan klinik bulgular gerekli tedbirler alınmadığı zaman inflamasyon, nekrozis, fibrozis, NASH, siroz, HCC (hepatosellüler karsinoma) ve hatta ölüme kadar götürebilen çok sıkıntılı süreçlerin habercisi olarak karşımıza çıkmaktadır. NAFLD hastalığına özgü herhangi bir ilaç maalesef ki hala bulunamamıştır. Hali hazırda bulunan tedavi seçeneklerinin yeterli etkinliğe sahip olmaması, hastalığın tedavisi için alternatif seçeneklerin araştırılmasını zorunlu hale getirmiştir.

Çalışmamızda, NAFLD'ye karşı, fitokimyasallar ailesi üyelerinden bir izotiyosiyanat çeşidi olan PEITC' nin koruyucu etkisini inceledik. PEITC'nin, özellikle antikanser ve antioksidan etkileri ön plana çıkmış olmakla birlikte bu etkilerinin sorumlusu olarak Nrf2-ARE yolağı olduğu bildirilmiştir.

Çalışmamız sonucunda elde edilen verilere göre oluşturulan deneysel diyabet ve dolayısıyla NAFLD' ye karşı PEITC' nin faydalı olabileceğini gösterdik. NAFLD oluşumu ile ortaya çıkan hepatosit hasarını azaltması nedeni ile hepatoprotektif etkinliği olabileceğini ortaya koymuştur. Bunun yanı sıra, normal serum seviyelerinin üzerine çıkan TG, TC, LDL/VLDL seviyelerinin ve karaciğer dokusunda yükselen MDA seviyesinin PEITC kullanımına bağlı olarak düşüş göstermesi obezite, diyabet, metabolik sendrom, kardiyovasküler hastalıklar, hiperlipidemi gibi hastalıklar üzerinde de düzenleyici bir etki sağlayabileceğini düşünmekteyiz. Çalışmamızdan elde ettiğimiz diğer sonuç ise PEITC'nin, hepatoprotektif, antioksidatif ve lipid düşürücü etkilerinin SIRT1/Nrf2 Aktivasyonu ve NF- κ B inhibisyonu yoluyla olabileceğini göstermesidir.

Yaptığımız çalışma sonucunda elde ettiğimiz veriler, PEITC' nin NAFLD' ye karşı koruyucu ve karaciğer hasarını azaltıcı yönde etkilemesidir. PEITC' nin, SIRT1/Nrf2 ve NF- κ B ile ilişkisinin etki mekanizmalarının temelini aydınlatılması ve moleküler modelleme teknikleri ile desteklenmesi gereklidir. Ayrıca kullanılan PEITC' nin diğer doku ve organlar üzerinde olumsuz etki yaratıp yaratmayacağı gibi sorularında cevaplanması gerekmektedir. Bu çalışmamızın devamı niteliğindeki yeni çalışmalarda özellikle PEITC' nin yapı-etki mekanizmalarının ve metabolik yollardaki etkilediği basamakların aydınlatılması amacıyla ve bunun yanında diğer dokular üzerinde toksik

etki oluşturup oluşturmayacağının kontrol edilmesine y6nelik çalışmalar yapılması planlanmaktadır.



KAYNAKLAR

1. Çolak Y, Tuncer İ. Nonalkolik Karaciğer Yağlanması ve Steatohepatit. *İstanbul Tıp Fakültesi dergisi*. 2010, 73: 86.
2. Sonsuz A, Baysal B. Karaciğer Yağlanması ve Non Alkolik Steatohepatit. *Güncel Gastroenteroloji*. 2011, 15: 98-106.
3. Curzio M, Esterbauer H, Dianzani MU. Chemotactic activity of hydroxyalkenals on rat neutrophils. *International Journal of Tissue Reactions*. 1985, 7: 137-42.
4. Letteron P, Fromenty B, Terris B, Degott C, Pessayre D. Acute and chronic hepatic steatosis lead to in vivo lipid peroxidation in mice. *Journal of Hepatology*. 1996, 24: 200-8.
5. Baeuerle PA, Henkel T. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annual Reviews*. 1994, 12: 141-79.
6. Saibara T, Onishi S, Ogawa Y, Yoshida S. Bezafibrate for Tamoxifen Induced Non-Alcoholic Steatohepatitis. *The Lancet*. 1999, 353: 1802.
7. Lee RG. Nonalcoholic Steatohepatitis: A Study of 49 Patients. *Human Pathology*. 1989, 20: 594-8.
8. McCullough AJ. The Clinical Features, Diagnosis and Natural History of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Karaciğer Hastalığı Klinikleri*. 2004, 8: 521-33.
9. Fahey JW, Talalay P. Antioxidant Functions of Sulphoraphane: A Potent Inducer of Phase II Detoxication Enzymes. *Food and Chemical Toxicology*. 1999, 37: 973-9.
10. Stoewsand GS. Bioactive Organosulfur Phytochemicals in Brassica Oleracea Vegetables - A Review. *Food and Chemical Toxicology*. 1995, 33: 537-43.
11. Talalay P, Fahey JW. Phytochemicals from Cruciferous Plants Protect Against Cancer by Modulating Carcinogen Metabolism. *The Journal of Nutrition*. 2001, 131: 3027-33.
12. Stoner GD, Morse MA. Isothiocyanates and Plant Polyphenols as Inhibitors of Lung and Esophageal Cancer. *Cancer Letters*. 1997, 114: 113-9.
13. Steinkellner H, Rabot S, Freywald C, Nobis E, Scharf G, Chabicovsky M, Knasmüller S, Kassi F. Effects of Cruciferous Vegetables and Their Constituents

- on Drug Metabolizing Enzymes Involved in The Bioactivation of DNA-Reactive Dietary Carcinogens. *Mutation Research*. 2001, 480-481: 285-97.
14. Marzec JM, Christie JD, Reddy SP, Jedlicka AE, Vuong H, Lancken PN, Aplenc R, Yamamoto T, Yamamoto M, Cho HY, Kleeberger SR. Functional Polymorphisms in The Transcription Factor Nrf2 in Humans Increase The Risk of Acute Lung Injury. *The Faseb Journal*. 2007, 21: 2237-46.
 15. Kaspar JW, Niture SK, Jaiswal AK. Nrf2:INrf2 (Keap1) Signaling in Oxidative Stress. *Free Radical Biology and Medicine*. 2009, 47: 1304-9.
 16. Klar AJ, Fogel S, Macleod K. MAR1-a Regulator of The HMa and HMalpha Loci in Saccharomyces Cerevisiae. *Genetics*. 1979, 93: 37-50.
 17. Yeung F, Hoberg JE, Ramsey CS, Keller MD, Jones DR, Frye RA, Mayo MW. Modulation of NF-kappaB-Dependent Transcription and Cell Survival by The SIRT1 Deacetylase. *The Embo Journal*. 2004, 23: 2369-80.
 18. Wang G, Xie X, Yuan L, Qiu J, Duan W, Xu B, Chen X. Resveratrol Ameliorates Rheumatoid Arthritis Via Activation of SIRT1-Nrf2 Signaling Pathway. *Biofactors*. 2019, 46: 441-53.
 19. Wang L, Li A, Liu Y, Zhan S, Zhong L, Du Y, Xu D, Wang W, Huang W. Genistein Protects Against Acetaminophen-Induced Liver Toxicity Through Augmentation of SIRT1 with Induction of Nrf2 Signalling. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2020, 527: 90-7.
 20. Abdelzaher WY, Sayed AH, Ali A, El-Tahawy NFG. Mast Cell Stabilizer Modulates Sirt1/Nrf2/TNF Pathway and Inhibits Oxidative Stress, Inflammation and Apoptosis in Rat Model of Cyclophosphamide Hepatotoxicity. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*. 2020, 42: 101-9.
 21. Oral A, Şahin T. Karaciğer Biyopsi ile Nonalkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı Tanısı Alan 220 Hastanın Retrospektif Değerlendirilmesi. *International Anatolia Academic Online Journal*. 2020, 6: 50-64.
 22. Yki-Järvinen H. Nutritional Modulation of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and Insulin Resistance. *Nutrients*. 2015, 7: 9127-38.
 23. Sielaff TD, Curley SA. Liver. In: Anderson DK, Billiar TR In Bruchinardi FC. *Schwartz's Principles of Surgery (8th ed)*. Philadelphia, McGraw-Hill, 2004, 1139-86.
 24. Junqueira LC, Caneiro J. *Basic Histology, 10th ed*. New York, McGraw-Hill Companies Inc, 2003: 332-44.

25. Sauders WB. *Cecil Essential of Medicine*. İstanbul, Talat Matbaası, 1995: 320-2.
26. Kierszenbaum AL. *Histoloji ve Hücre Biyolojisi, Patolojiye Giriş*. Ankara, Palme Yayıncılık, 2006: 459-69.
27. Wanless IR. Anatomy, Histology, Embryology and Developmental Anomalies of the Liver. In: Friedman LS, Brandt LJ, Feldman M. *Sleisenger and Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease, 8th ed*. Philadelphia, Saunders Elsevier, 2006: 1543-85.
28. Güzel C. Bir Organ Olarak Karaciğer. In: Hall JE. *Guyton AC*. Ankara, Nobel Tıp, 2007: 859-64.
29. Younossi ZM, Gramlich T, Liu YC, Matteoni C, Petrelli M, Goldblum J, Rybicki L, McCullough AJ. Nonalcoholic fatty liver disease: assessment of variability in pathologic interpretations. *Mod Pathol*. 1998, 11: 560-5.
30. Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *The Journal of Clinical Investigation*. 2005, 115: 209-18.
31. Kayadibi H, Sertoğlu E. Karaciğer Fibrozisinin İnvazif Olmayan Dolaylı Biyokimyasal Belirteçleri. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*. 2014, 23: 427-42.
32. Abbas Z, Anania F, Ferenci P, Khan AG, Goh KL, Hamid SS, Isakov V, Lizarzabal M, Pernaranda MM, Ramos JFR, Sarin S, Stimac D, Thomson ABR, Umar M, Krabshuis J, LeMair A. Nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Gastroenterol*. 2012, 48: 467-73
33. Aqel B, DiBaise KJ. Role of the Gut Microbiome in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Nutrition in Clinical Practice*. 2015, 30: 780-6.
34. Dancygier H. Nonalcoholic fatty liver. *Versicherungsmedizin*. 2002, 54: 11-5.
35. Wigg AJ, Roberts-Thomson IC, Dymock RB, McCarthy PJ, Grose RH, Cummins AG. The role of small intestinal bacterial overgrowth, intestinal permeability, endotoxaemia, and tumour necrosis factor alpha in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Gut*. 2001, 48: 206-11.
36. *Türkiye Diyabet Vakfı*. NASH Çalışmayı Sonuç Raporu. 2018: 10.
37. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease—Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*. 2016, 64: 73-84.
38. Büyüksulu N, Yiğitbaşı T. Reaktif Oksijen Türleri ve Obezitede Oksidatif Stres. *Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*. 2015, 5: 197-202.

39. Rayner BS, Hua S, Sabaretnam T, Witting PK. Nitric oxide stimulates myoglobin gene and protein expression in vascular smooth muscle. *Biochemical Journal*. 2009, 423: 169-77.
40. Özcan O, Erdal H, Çakırca G, Yönden Z. Oksidatif stres ve hücre içi lipit, protein ve DNA yapıları üzerine etkileri. *Journal of Clinical and Experimental Investigations*. 2015, 6: 331-6.
41. Aydın M, Selcoki Y, Nazlı Y, Çolak N, Yalçın KS, Canbal M, Dekirçelik B, Yiğitoğlu R, Eryonucu B. Relationship between total antioxidant capacity and the severity of coronary artery disease. *Journal of Clinical and Experimental Investigations*. 2012, 3:22-8.
42. Motor S, Öztürk Ş, Özcan O, Gürpınar AB, Can Y, Yüksel R, Yenin JZ, Seraslan G, Öztürk OH. Evaluation of total antioxidant status, total oxidant status and oxidative stress index in patients with alopecia areata. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*. 2014, 7: 1089-93.
43. Yerer MB, Aydoğan S. Oksidatif Stres ve Antioksidanlar. *Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*. 2000, 9: 49-53.
44. Jomova K, Valko M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*. 2011, 283: 65-87.
45. Ayala A, Muñoz MF, Argülles S. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2014, 2014: 1-31.
46. Catala A. An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of photoreceptors and the chemiluminescence assay. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2006, 38: 1482-95.
47. Breen AP, Murphy JA. Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free Radical Biology and Medicine*. 1995, 18: 1003-77.
48. Shinde A, Ganu J, Naik P. Effect of Free Radicals & Antioxidants on Oxidative Stress: A Review. *Journal of Dental and Allied Sciences*. 2012, 1: 63-6.
49. Sen S, Chakraborty R, Sridhar C, Reddy YSR, De B. Free radicals, antioxidants, diseases and phytomedicines: Current status and future prospect. *International Journal*. 2010, 3: 91-100.
50. Şener G, Yeğen BÇ. İskemi reperfüzyon hasarı. *Klinik Gelişim Dergisi*. 2009, 22: 5-13.

51. Sayan H, Çetin E, Yarım İ, Gönül B. Yüksek irtifada antrenman yapan kayakçılarda C vitamini eritrosit süperoksit dismutaz enzim aktivitesi ve lipid peroksidasyonu düzeylerine etkisi. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*. 2000, 20: 5-10.
52. Pellegrini N, Miglio C, Rio DD, Salvatore S, Serafini M, Brighenti F. Effect of domestic cooking methods on the total antioxidant capacity of vegetables. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 2009, 60: 12-22.
53. Ratnam DV, Ankola DD, Bhardwaj V, Sahana DK, Kumar MNVR. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *Journal of Controlled Release*. 2006, 113: 189-207.
54. Cemeli E, Baumgartner A, Anderson D. Antioxidants and the comet assay. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. 2009, 681: 51-67.
55. Stahl W, Berg HVD, Arthur J, Bast A, Dainty J, Faulks RM, Gratner C, Haenen G, Hollman P, Holst B, Kelly FJ, Polidori MC, Evans CR, Southon S, Vliet TV, Ribes JV, Williamson G, Astley SB. Bioavailability and metabolism. *Molecular Aspects of Medicine*. 2002, 23: 39-100.
56. Karabulut H, Gülay MŞ. Antioksidanlar. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. 2016, 1: 65-76.
57. Young IS, Woodside JV. Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinical Pathology*. 2001, 54: 176-86.
58. Gao F, Kinnula VL, Myllärniemi M, Oury TD. Extracellular superoxide dismutase in pulmonary fibrosis. *Antioxid Redox Signal*. 2008, 10: 343-56.
59. Scibior D, Czczot H. Catalase: Structure, properties, functions. *Advances in Hygiene and Experimental Medicine*. 2006, 60: 170-80.
60. Pacheco JL, Gonsbatt ME. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2009, 674: 137-47.
61. Al-Omar MA, Beedham C, Alsarra IA. Pathological roles of reactive oxygen species and their defence mechanisms. *Saudi Pharmacy Journal*. 2004, 12: 1-18.
62. Cheung CC, Zheng GJ, Li AM, Richardson BJ, Lam PK. Relationships between tissue concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons and antioxidative responses of marine mussels, *Perna viridis*. *Aquatic Toxicology*. 2001, 52: 189-203.
63. Larson RA. The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry*. 1988, 27: 969-78.

64. Fattman CL, Schaefer LM, Oury TD. Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine. *Free Radical Biology and Medicine*. 2003, 35: 236-56.
65. Knapen MFCM, Peters WHM, Mulder TPJ, Merkus HMWM, Jansen JBMJ, Steegers EAP. Glutathione and glutathione-related enzymes in decidua and placenta of controls and women with pre-eclampsia. *Plasenta*. 1999, 20: 541-46.
66. *American Chemical Society*. The Role of Antioxidants in Human Health. 2011: 1-37.
67. Aslankoç R, Demirci D, İnan Ü, Yıldız M, Öztürk M, Öztürk A, Çetin M, Savran EŞ, Yılmaz B. Oksidatif stres durumunda antioksidan enzimlerin rolü - süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx). *Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*. 2019, 26: 362-69.
68. Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR. Glutathione transferases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 2005, 45: 51-88.
69. Akgül SU, Oğuz FS, Çalışkan Y, Kekik C, Gürkan H, Türkmen A, Nane I, Aydın F. The effect of glutathion S-transferase polymorphisms and anti-GSTT1 antibodies on allograft functions in recipients of renal transplant. *Transplantation Proceedings*. 2012, 44: 1679-84.
70. Townsend DM, Tew KD, Tapiero H. The importance of glutathione in human disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2003, 57: 145-55.
71. Akyol Ö. Şizofrenide oksidatif stres. *Kocatepe Tıp Dergisi*. 2004, 5: 15-25.
72. Özkan A, Fışkın K. Serbest oksijen radikalleri, karsinogenez ve antioksidan enzimler. *Türk Hematoloji Onkoloji Dergisi*. 2004, 14: 52-60.
73. Chan JY, Cheung MC, Moi P, Chan K, Kan YW. Chromosomal localization of the human NF-E2 family of bZIP transcription factors by fluorescence in situ hybridization. *Human Genetics*. 1995, 95: 265-69.
74. Zhang DD. Mechanistic studies of the Nrf2-Keap1 signaling pathway. *Drug Metabolism Reviews*. 2006, 38: 769-89.
75. Chan JY, Han XL, Kan YW. Cloning of Nrf1, an NF-E2-related transcription factor, by genetic selection in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993, 90: 11371-5.
76. Surh YJ, Kundu JK, Na HK. Nrf2 as a master redox switch in turning on the cellular signaling involved in the induction of cytoprotective genes by some chemopreventive phytochemicals. *Planta Medica*. 2008, 74: 1526-39.

77. Deshmukh P, Unni S, Krishnappa G, Padmanabhan B. The Keap1-Nrf2 pathway: promising therapeutic target to counteract ROS-mediated damage in cancers and neurodegenerative diseases. *Biophys Rev.* 2017, 9: 41-56.
78. Uruno A, Yagishita Y, Yamamoto M. The Keap1–Nrf2 system and diabetes mellitus. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 2015, 566: 76-84.
79. Nioi P, Nguyen T, Sherratt PJ, Pickett CB. The carboxy-terminal Neh3 domain of Nrf2 Is required for transcriptional activation. *Molecular and Cellular Biology.* 2005, 25: 10895-906.
80. Katoh Y, Itoh K, Yoshida E, Miyagishi M, Fukamizu A, Yamamoto M. Two domains of Nrf2 cooperatively bind CBP, a CREB binding protein, and synergistically activate transcription. *Genes to Cells.* 2001, 6: 857-68.
81. McMahon M, Thomas N, Itoh K, Yamamoto M, Hayes JD. Redox-regulated turnover of Nrf2 is determined by at least two separate protein domains, the redox-sensitive Neh2 degron and the redox-insensitive Neh6 degron. *Journal of Biological Chemistry.* 2004, 279: 31556-67.
82. Sun Z, Wu T, Zhao F, Lau A, Birch CM, Zhang DD. KPNA6 (Importin α 7)-mediated nuclear import of Keap1 represses the Nrf2-dependent antioxidant response. *Molecular and cellular Biology.* 2011, 31: 1800-11.
83. Canning P, Cooper CDO, Krojer T, Murray JW, Pike ACW, Chaikuad A, Keates T, Thangaratnarajah C, Hojzan V, Ayinampudi V, Marsden BD, Gileadi O, Knapp S, Delft FV, Bullock AN. Structural basis for Cul3 protein assembly with the BTB-Kelch family of E3 ubiquitin ligases. *Journal of Biological Chemistry.* 2013, 288: 7803-14.
84. Cleasby A, Yon J, Day PJ, Richardson C, Tickle IJ, Williams PA, Callahan JF, Carr R, Concha N, Kerns JK, Qi H, Sweitzer T, Ward P, Davies TG. Structure of the BTB domain of Keap1 and its interaction with the triterpenoid antagonist CDDO. *Plos One.* 2014, 9: 1-10.
85. Taguchi K, Motohashi H, Yamamoto M. Molecular mechanisms of the Keap1–Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. *Genes to Cells.* 2011, 16: 123-40.
86. Kobayashi M, Li L, Iwamoto N, Takagi YN, Kaneko H, Nakayama Y, Eguchi M, Wada Y, Kumagai Y, Yamamoto M. The antioxidant defense system Keap1-Nrf2 comprises a multiple sensing mechanism for responding to a wide range of chemical compounds. *Molecular and Cellular Biology.* 2009, 29: 493-502.

87. Sekhar KR, Rachakonda G, Freeman ML. Cysteine-based regulation of the CUL3 adaptor protein Keap1. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2010, 244: 21-6.
88. Tong KI, Katoh Y, Kusunoki H, Itoh K, Tanaka T, Yamamoto M. Keap1 recruits Neh2 through binding to ETGE and DLG motifs: characterization of the two-site molecular recognition model. *Molecular and Cellular Biology*. 2006, 26: 2887-900.
89. Prochaska HJ, Talalay P. Regulatory mechanisms of monofunctional and bifunctional anticarcinogenic enzyme inducers in murine liver. *Cancer Research*. 1988, 48: 4776-82.
90. Kansanen E, Kuosmanen SM, Leinonen H, Levonen AL. The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. *Redox Biology*. 2013, 1: 45-9.
91. Bitterman KJ, Anderson RM, Cohen HY, Esvetes ML, Sinclair DA. Inhibition of silencing and accelerated aging by nicotinamide, a putative negative regulator of yeast sir2 and human SIRT1. *Journal of Biological Chemistry*. 2002, 277: 45099-107.
92. Yu W, Fu YC, Zhou XH, Chen CJ, Wang X, Lin RB, Wang W. Effects of resveratrol on H₂O₂-induced apoptosis and expression of SIRT1 in H9c2 cells. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2009, 107: 741-7.
93. Haigis MC, Sinclair DA. Mammalian sirtuins: biological insights and disease relevance. *Annu Rev Pathol*. 2010, 5: 253-95.
94. Bae NS, Swanson MJ, Vassilev A, Howard BH. Human histone deacetylase SIRT2 interacts with the homeobox transcription factor HOXA10. *The Journal of Biochemistry*. 2004, 135: 695-700.
95. McBurney MW, Yang X, Jardine K, Hixon M, Boekelheide K, Webb JR, Lansdrop PM, Lemieux M. The mammalian SIR2alpha protein has a role in embryogenesis and gametogenesis. *Molecular and Cellular Biology*. 2003, 23: 38-54.
96. Vakhrusheva O, Smolka C, Gajawada P, Kostin S, Boettger T, Kubin T, Braun T, Bober E. Sirt7 increases stress resistance of cardiomyocytes and prevents apoptosis and inflammatory cardiomyopathy in mice. *Circulation Research*. 2008, 102: 703-10.
97. Vaziri H, Dessain SK, Eaton EN, Imai SI, Frye RA, Pandita TK, Guarente L, Weinberg RA. hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell*. 2001, 107: 149-59.

98. Alcentor RR, Gao S, Zhai P, Zablocki D, Holle E, Yu X, Tian B, Wagner T, Vatner SF, Sadoshima J. Sirt1 regulates aging and resistance to oxidative stress in the heart. *Circulation Research*. 2007, 100: 1512-21.
99. Frescas D, Valenti L, Accili D. Nuclear trapping of the forkhead transcription factor FoxO1 via Sirt-dependent deacetylation promotes expression of glucogenetic genes. *Journal of Biological Chemistry*. 2005, 280: 20589-95.
100. Mostoslavsky R, Chua KF, Lombard DB, Pang WW, Fisher MR, Gellon L, Liu P, Mostoslavsky G, Franco S, Murphy MM, Mills KD, Patel P, Hsu JT, Hong AL, Ford E, Cheng HL, Kennedy C, Nunez N, Bronson R, Frendevey D, Auerbach W, Valenzuela D, Karow M, Hottiger MO. Genomic instability and aging-like phenotype in the absence of mammalian SIRT6. *Cell*. 2006, 124: 315-29.
101. Takata T, Ishikawa F. Human Sir2-related protein SIRT1 associates with the bHLH repressors HES1 and HEY2 and is involved in HES1- and HEY2-mediated transcriptional repression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2003, 301: 250-57.
102. Anderson KA, Green MF, Huynh FK, Wagner GR, Hirschev MD. SnapShot: Mammalian Sirtuins. *Cell*. 2014, 159: 956.
103. Gu L, Tao X, Xu Y, Han X, Yan Q, Xu L, Yin L, Peng J. Dioscin alleviates BDL- and DMN-induced hepatic fibrosis via Sirt1/Nrf2-mediated inhibition of p38 MAPK pathway. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2016, 292: 19-29.
104. Yang R, Song C, Chen J, Zhou L, Jiang X, Cao X, Sun Y, Zhang Q. Limonin ameliorates acetaminophen-induced hepatotoxicity by activating Nrf2 antioxidative pathway and inhibiting NF- κ B inflammatory response via upregulating Sirt1. *Phytomedicine*. 2020, 69: 1-13.
105. Zhang X, Wu Q, Lu Y, Wan J, Dai H, Zhou X, Lv S, Chen X, Zhang X, Hang C, Wang J. Cerebroprotection by salvianolic acid B after experimental subarachnoid hemorrhage occurs via Nrf2- and SIRT1-dependent pathways. *Free Radical Biology and Medicine*. 2018, 124: 504-16.
106. Gerardi G, Saiz MC, Perez MDR, Sanjose MLG, Muniz P. Modulation of Akt-p38-MAPK/Nrf2/SIRT1 and NF- κ B pathways by wine pomace product in hyperglycemic endothelial cell line. *Journal of Functional Foods*. 2019, 58: 255-65.

107. He M, Long P, Yan W, Chen T, Guo L, Zhang Z, Wang S. ALDH2 attenuates early-stage STZ-induced aged diabetic rats retinas damage via Sirt1/Nrf2 pathway. *Life Sciences*. 2018, 215: 227-35.
108. Ye J, Guan M, Lu Y, Zhang D, Li C, Zhou C. Arbutin attenuates LPS-induced lung injury via Sirt1/ Nrf2/ NF- κ Bp65 pathway. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*. 2019, 54: 53-9.
109. Tian Y, Wen Z, Lei L, Li F, Zhao J, Zhi Q, Li F, Yin R, Ming J. Coreopsis tinctoria flowers extract ameliorates D-galactose induced aging in mice via regulation of Sirt1-Nrf2 signaling pathway. *Journal of Functional Foods*. 2019, 60: 1-8.
110. Chen Z, Yu J, Fu M, Dong R, Yang Y, Luo J, Hu S, Li W, Xu X, Tu L. Dipeptidyl peptidase-4 inhibition improves endothelial senescence by activating AMPK/SIRT1/Nrf2 signaling pathway. *Biochemical Pharmacology*. 2020, 177: 1-8.
111. Li Y, Zhu Z, Zhang T, Zhou Y. Ligustrazine attenuates inflammation and oxidative stress in a rat model of arthritis via the Sirt1/NF- κ B and Nrf-2/HO-1 pathways. *Archives of Pharmacal Research*. 2019, 42: 824-31.
112. Yao B, He J, Yin X, Shi Y, Wan J, Tian Z. The protective effect of lithocholic acid on the intestinal epithelial barrier is mediated by the vitamin D receptor via a SIRT1/Nrf2 and NF- κ B dependent mechanism in Caco-2 cells. *Toxicology Letters*. 2019, 316: 109-18.
113. Ma F, Wu J, Jiang Z, Huang W, Jia Y, Sun W, Wu H. P53/NRF2 mediates SIRT1's protective effect on diabetic nephropathy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2019, 1866: 1272-81.
114. Tang P, Liu H, lin B, Yang W, Chen W, Lu Z, Li P, Gui S, Zhan Y, Lin B. Spatholobi Caulis dispensing granule reduces deep vein thrombus burden through antiinflammation via SIRT1 and Nrf2. *Phytomedicine*. 2020, 77: 1-9.
115. Lv H, Liu Q, Zhou J, Tan G, Deng X, Ci X. Daphnetin-mediated Nrf2 antioxidant signaling pathways ameliorate tertbutyl hydroperoxide (t-BHP)-induced mitochondrial dysfunction and cell. *Free Radical Biology and Medicine*. 2017, 106: 38-52.
116. Dündar Y. Fitokimyasallar ve sağlıklı yaşam. *The Medical Journal of Kocatepe*. 2001, 2: 131-8.
117. Fuhrman B, Buch S, Vaya J, Belinky PA, Coleman R, Hayek T, Aviram M. Licorice extract and its major polyphenol glabridin protect low-density lipoprotein against

- lipid peroxidation: in vitro and ex vivo studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 1997, 66: 267-75.
118. Shankar S, Kumar D, Srivastava RK. Epigenetic modifications by dietary phytochemicals: Implications for personalized nutrition. *Pharmacology & Therapeutics*. 2013, 138: 1-17.
 119. Teiten MH, Eifes S, Dicato M, Diederich M. Curcumin—the paradigm of a multi-target natural compound with applications in cancer prevention and treatment. *Toxins*. 2010, 2: 128-62.
 120. Siddiqui IA, Adhami VM, Saleem M, Mukhtar H. Beneficial effects of tea and its polyphenols against prostate cancer. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2006, 50: 130-43.
 121. Gibellini L, Pinti M, Nasi M, Montagna JP, Biasi SD, Roat E, Bertoncelli L, Cooper EL, Cossarizza A. Quercetin and cancer chemoprevention. *Evid Based Complement Alternat Medicine*. 2011, 2011: 1-15.
 122. Priyadarsini RV, Vinothini G, Murugan RS, Manikandan P, Nagini S. The flavonoid quercetin modulates the hallmark capabilities of hamster buccal pouch tumors. *Nutr Cancer*. 2011, 63: 218-26.
 123. Barnes S. Effect of genistein on in vitro and in vivo models of cancer. *The Journal of Nutrition*. 1995, 125: 777-83.
 124. Fang MZ, Chen D, Sun Y, Jin Z, Christman JK, Yang CS. Reversal of hypermethylation and reactivation of p16INK4a, RARbeta, and MGMT genes by genistein and other isoflavones from soy. *Clinical Cancer Research*. 2005, 11: 7033-41.
 125. Ren S, Lien EJ. Natural products and their derivatives as cancer chemopreventive agents. *Progress in Drug Research*. 1997, 48: 147-71.
 126. Hammond BR, Jhonson EJ, Russel RM, Krinsky NI, Yeum KI, Edwards RB, Snodderly DM. Dietary modification of human macular pigment density. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 1997, 38: 1795-801.
 127. Kaur S, Grover IS, Kumar S. Antimutagenic potential of ellagic acid isolated from *Terminalia arjuna*. *Indian J Exp Biol*. 1997, 35: 478-82.
 128. Fraser GE, Sumbureru D, Pribis P, Neil RL, Frankson MA. Association among health habits, risk factors, and all-cause mortality in a black California population. *Epidemiology*. 1997, 8: 168-74.

129. Fahey JW, Zhang Y, Talalay P. Broccoli sprouts: an exceptionally rich source of inducers of enzymes that protect against chemical carcinogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1997, 94: 10367-72.
130. Heber D. Multitargeted therapy of cancer by ellagitannins. *Cancer Letters*. 2008, 269: 262-68.
131. Ahn YO. Diet and stomach cancer in Korea. *International Journal of Cancer*. 1998, 71: 7-9.
132. Cook JD, Reddy MB, Burri J, Juillerat MA, Hurrell RF. The influence of different cereal grains on iron absorption from infant cereal foods. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 1997, 65: 964-69.
133. Bonnesen C, Eggleston IM, Hayes JD. Dietary indoles and isothiocyanates that are generated from cruciferous vegetables can both stimulate apoptosis and confer protection against DNA damage in human colon cell lines. *Cancer Research*. 2001, 61: 6120-30.
134. Shapiro TA, Fahey JW, Wade KL, Stephenson KK, Talalay P. Chemoprotective Glucosinolates and Isothiocyanates of Broccoli Sprouts. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 2001, 10: 501-8.
135. Shapiro TA, Fahey JW, Wade KL, Stephenson KK, Talalay P. Human metabolism and excretion of cancer chemoprotective glucosinolates and isothiocyanates of cruciferous vegetables. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 1998, 7: 1091-1100.
136. Mokhtari RB, Baluch N, Homayouni TS, Morgatskaya E, Kumar S, Kazemi P, Yeger H. The role of Sulforaphane in cancer chemoprevention and health benefits: a mini-review. *J Cell Commun Signa*. 2018, 12: 91-101.
137. Yemiş O, Artık N. Glukosinolatlar ve insan sağlığı. *Gıda*. 2007, 32: 293-303.
138. Singh SV, Singh K. Cancer chemoprevention with dietary isothiocyanates mature for clinical translational research. *Carcinogenesis*. 2012, 33: 1833-42.
139. Yılmaz D, Demirel ZB. Glukosinolatlar ve Sağlık. *Beslenme ve Diyet Dergisi*. 2012, 40: 170-7.
140. Onsekizoğlu P, Acar J. İzotiyosiyanatlar ve insan beslenmesindeki önemi. *Gıda Mühendisliği Dergisi*. 2013, 15: 37-42.
141. Getahun SM, Chung FL. Conversion of glucosinolates to isothiocyanates in humans after ingestion of cooked watercress. *Cancer Epidemiol Biomark Prev*. 1999, 8: 447-51.

142. Chung FL, Morse MA, Eklind KI, Lewis J. Quantitation of human uptake of the anticarcinogen phenethyl isothiocyanate after a watercress meal. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 1992, 1: 383-8.
143. Morse MA, Amin SG, Hecht SS, Chung FL. Effects of aromatic isothiocyanates on tumorigenicity, O6-methylguanine formation, and metabolism of the tobacco-specific nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in A/J mouse lung. *Cancer Research*. 1989, 49: 2894-7.
144. Singh SV, Kim SH, SehraWat A, Arlotti JA, Hahm ER, Sakao K, Beumer JH, Jankowitz RC, Kuntal KC, Lee J, Powolny AA, Dhir R. Biomarkers of phenethyl isothiocyanate-mediated mammary cancer chemoprevention in a clinically relevant mouse model. *Journal of the National Cancer Institute*. 2012, 104: 1228-39.
145. Keum YS, Jeong WS, Kong AN. Chemoprevention by isothiocyanates and their underlying molecular signaling mechanisms. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2004, 555: 191-202.
146. Chen YR, Wang W, Kong AN, Tan TH. Molecular mechanisms of c-Jun N-terminal kinase-mediated apoptosis induced by anticarcinogenic isothiocyanates. *Journal of Biological Chemistry*. 1998, 273: 1769-75.
147. Saw CL, Cintron M, Wu TY, Guo Y, Huang Y, Jeong WS, Kong AN. Pharmacodynamics of dietary phytochemical indoles I3C and DIM: induction of Nrf2-mediated phase II drug metabolizing and antioxidant genes and synergism with isothiocyanates. *Biopharmaceutics & Drug Disposition*. 2011, 32: 289-300.
148. Moon YJ, Brazeau DA, Morris ME. Dietary phenethyl isothiocyanate alters gene expression in human breast cancer cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2011, 2011: 1-8.
149. Wu X, Zhu Y, Yan H, Liu B, Li Y, Zhou Q, Xu K. Isothiocyanates induce oxidative stress and suppress the metastasis potential of human non-small cell lung cancer cells. *BMC Cancer*. 2010, 10: 1-11.
150. Xiao D, Singh SV. Phenethyl isothiocyanate inhibits angiogenesis in vitro and ex vivo. *Cancer Research*. 2007, 67: 2239-46.
151. Powolny AA, Bommareddy A, Hahm ER, Normolle DP, Beumer JH, Nelson JB, Singh SV. Chemopreventative potential of the cruciferous vegetable constituent phenethyl isothiocyanate in a mouse model of prostate cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 2011, 103: 571-84.

152. Gupta P, Wright SE, Kim SH, Srivastava SK. Phenethyl isothiocyanate: A comprehensive review of anti-cancer mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. 2014, 1846: 405-24.
153. Hofmann T, Kuhnert A, Schubert A, Gill C, Rowland IR, Zobel BLP, Glei M. Modulation of detoxification enzymes by watercress: in vitro and in vivo investigations in human peripheral blood cells. *European Journal of Nutrition*. 2009, 48: 483-91.
154. White DW, Roy A, Gilmore TD. The v-Rel oncoprotein blocks apoptosis and proteolysis of I kappa B-alpha in transformed chicken spleen cells. *Oncogene*. 1995, 10: 857-68.
155. Devalaraja MN, Xang DZ, Ballard DW, Richmond A. Elevated constitutive I kappa B kinase activity and I kappa B-alpha phosphorylation in Hs294T melanoma cells lead to increased basal MGSA/GRO-alpha transcription. *Cancer Research*. 1999, 59: 1372-7.
156. Dejardin E, Deregowski V, Chapelier M, Jacobs N, Gielen J, Merville MP, Bours V. Regulation of NF-kappa B activity by I kappa B-related proteins in adenocarcinoma cells. *Oncogene*. 1999, 18: 2567-77.
157. Bours V, Dejardin E, Letawe FG, Merville MP, Castronovo V. The NF-kappa B transcription factor and cancer: high expression of NF-kappa B- and I kappa B-related proteins in tumor cell lines. *Biochemical Pharmacology*. 1994, 47: 145-9.
158. Sumitomo M, Tachibana M, Nakashima J, Murai M, Miyajima A, Kimura F, Hayakawa M, Nakamura H. An essential role for nuclear factor kappa B in preventing TNF-alpha-induced cell death in prostate cancer cells. *Journal Urology*. 1999, 161: 674-9.
159. Wang W, Abbruzzese JL, Evans DB, Larry L, Cleary KR, Chiao PJ. The nuclear factor-kappa B RelA transcription factor is constitutively activated in human pancreatic adenocarcinoma cells. *Clinical Cancer Research*. 1999, 5: 119-27.
160. Karin M. Nuclear factor-kappa B in cancer development and progression. *Nature*. 2006, 441: 431-6.
161. Wang X, Govind S, Sajankila SP, Mi L, Roy R, Chung FL. Phenethyl isothiocyanate sensitizes human cervical cancer cells to apoptosis induced by cisplatin. *Mol Nutr Food Res*. 2011, 55: 1572-81.
162. Cheung KL, Kong AN. Molecular Targets of Dietary Phenethyl Isothiocyanate and Sulforaphane for Cancer Chemoprevention. *The AAPS Journal*. 2010, 12: 87-97.

163. Bradford MM. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976, 72: 248-54.
164. Uchiyama M, Mihara M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Analytical Biochemistry.* 1978, 86: 271-8.
165. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem.* 1988, 34: 497-500.
166. Bilici M. Detection of some antioxidant enzyme activities in apricot fruit grown in Van region from Turkey. *MANAS Journal of Engineering.* 2020, 8: 17-21.
167. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984, 105: 121-6.
168. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterisation of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med.* 1967, 70: 158-69.
169. Clapper JR, Hendricks MD, Gu G, Wittmer C, Dolman CS, Herich J, Athanacio J, Villescaz C, Ghosh SS, Heilig JS, Lowe C, Roth JD. Diet-induced mouse model of fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis reflecting clinical disease progression and methods of assessment. *Gastrointestinal and Liver Physiology.* 2013, 305: 483-95.
170. Sanyal AJ, Chalasani N, Kowdley KV, Mccullough A, Diehl AM, Bass NM, Neuschwander BA, Lavine JE, Tonascia J, Ünalp A, Natta MV, Clark J, Brunt EM, Kleiner DE, Hoofnagle JH, Robuck PR. Pioglitazone, vitamin E, or placebo for nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med.* 2010, 362: 1675-85.
171. Yakaryılmaz F, Guliter S, Savaş B, Erdem O, Ersoy R, Erden E, Akyol G, Boskaya H, Özenirler S. Effects of vitamin E treatment on peroxisome proliferator-activated receptor-alpha expression and insulin resistance in patients with non-alcoholic steatohepatitis: results of a pilot study. *Internal Medicine Journal.* 2007, 37: 229-35.
172. Federico A, Trappoliere M, Tuccillo C, Sio ID, Leva AD, Blanco CDV, Loguercio C. A new silybin-vitamin E-phospholipid complex improves insulin resistance and liver damage in patients with non-alcoholic fatty liver disease: preliminary observations. *Gut.* 2006, 55: 901-2.
173. (AISF), Italian Association for the Study of the Liver. AISF position paper on nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD): Updates and future directions. *Digestive and Liver Disease.* 2017, 49: 471-83.

174. German MN, Lutz MK, Pickhardt PJ, Bruce RJ, Said A. Statin use is protective against hepatocellular carcinoma in patients with nonalcoholic fatty liver disease: A case-control study. *Journal Clinical Gastroenterology*. 2020, 54: 733-40.
175. Brunner KT, Henneberg CJ, Wilechansky RM, Long MT. Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Obesity Treatment. *Curr Obes Rep*. 2019, 8: 220-8.
176. Wang RT, Koretz RL, Yee HF. Is weight reduction an effective therapy for nonalcoholic fatty liver? A systematic review. *The American Journal of Medicine*. 2003, 115: 554-9.
177. Hirose A, Ono M, Saibara T, Nozaki Y, Masuda K, Yoshioka A, Takahashi M, Akisawa N, Iwasaki S, Oben JA, Onishi S. Angiotensin II type 1 receptor blocker inhibits fibrosis in rat nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2007, 45: 1375-81.
178. Satapathy SK, Sakhuja P, Malhotra V, Sharma BC, Sarin SK. Beneficial effects of pentoxifylline on hepatic steatosis, fibrosis and necroinflammation in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2007, 22: 634-8.
179. Vahid F, Zand H, Mirshekarlou EN, Najafi R, Hekmatdoost A. The role dietary of bioactive compounds on the regulation of histone acetylases and deacetylases: A review. *Gene*. 2015, 562: 8-15.
180. Eastham LL, Howard CM, balachandran P, Pasco DS, Claudio PP. Eating green: Shining light on the use of dietary phytochemicals as a modern approach in the prevention and treatment of head and neck cancers. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2018, 18: 182-91.
181. Fofaria NM, Ranjan A, Kim SH, Srivastava SK. Mechanisms of the Anticancer Effects of Isothiocyanates. *Enzymes*. 2015, 37: 111-37.
182. Chuang WT, Liu YT, Huang CS, Lo CW, Yao HT, Chen HW, Lii CK. Benzyl Isothiocyanate and Phenethyl Isothiocyanate Inhibit Adipogenesis and Hepatosteatosis in Mice with Obesity Induced by a High-Fat Diet. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2019, 67: 7136-46.
183. Cankurtaran M, Arslan S. Nonalkolik steatohepatit etyopatogenezinde oksidatif stres, lipid peroksidasyonu, mitokondriyal hasar, sitokinler ve endotoksinlerin rolü. *Güncel Gastroenteroloji*. 2002, 6: 5-8.
184. Fassio E, Alvarez E, Dominguez N, Landeira G, Longo C. Natural history of nonalcoholic steatohepatitis: a longitudinal study of repeat liver biopsies. *Hepatology*. 2004, 2004: 820-6.

185. Angulo P, Keach J, Batts K, Lindor K. Independent predictors of liver fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 1999, 30: 1356-62.
186. Adams LA, Talwalkar JA. Diagnostic evaluation of nonalcoholic fatty liver disease. *Journal of Clinical Gastroenterology*. 2006, 40: 34-8.
187. Adams LA, Sanderson S, Lindor KD, Angulo P. The histological course of nonalcoholic fatty liver disease: a longitudinal study of 103 patients with sequential liver biopsies. *Journal of Hepatology*. 2005, 42: 132-8.
188. Argo CK, Northup PG, Al-Osaimi AM, Caldwell SH. Systematic review of risk factors for fibrosis progression in non-alcoholic steatohepatitis. *Journal of Hepatology*. 2009, 51: 371-9.
189. Wong CA, Araneta MR, Barrett-Connor E, Alcaraz J, Castaneda D, Macera C. Probable NAFLD, by ALT levels, and diabetes among Filipino-American Women. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2008, 79: 133-40.
190. Li WS, Wu Y, Ge WZ, Fan L, Sun W. A herbal formula Erchen decoction for non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*. 2017, 10: 9110-6.
191. Gwon MH, Im YS, Seo AR, Kim KY, Moon HR, Yun JM. Phenethyl Isothiocyanate Protects against High. *Nutrients*. 2020, 12: 1-17.
192. Warden CW, Fisler JS. Comparisons of diets used in animal models of high-fat feeding. *Cell Metab*. 2008, 7: 277.
193. Leamy AK, Egnatchick RA, Young JD. Molecular mechanisms and the role of saturated fatty acids in the progression of non-alcoholic fatty liver disease. *Progress in Lipid Research*. 2013, 52: 165-74.
194. Small DM, Coobmes JS, Bennett N, Johnson DW, Gobe GC. Oxidative stress, anti-oxidant therapies and chronic kidney disease. *Nephrology*. 2012, 17: 311-21.
195. Bras ML, Clement MV, Pervaiz S, Brenner C. Reactive oxygen species and the mitochondrial signaling pathway of cell death. *Histology and Histopathology*. 2005, 20: 205-19.
196. Avery SV. Molecular targets of oxidative stress. *Biochemical Journal*. 2011, 434: 201-10.
197. Abdel-Daim MM, Abd Eldaim MA, Hassan AGA. Trigonella foenum-graecum ameliorates acrylamide-induced toxicity in rats: Roles of oxidative stress,

- proinflammatory cytokines, and DNA damage. *Biochemistry and Cell Biology*. 2015, 93: 192-8.
198. Yang XX, Wang X, Shi TT, Dong JC, Li FJ, Zeng LX, Yang M, Gu W, Li JP, Yu J. Mitochondrial dysfunction in high-fat diet-induced nonalcoholic fatty liver disease: The alleviating effect and its mechanism of Polygonatum kingianum. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2019, 117: 109083.
199. Suzuki T, Yamamoto M. Stress-sensing mechanisms and the physiological roles of the Keap1-Nrf2 system during cellular stress. *Journal of Biological Chemistry*. 2017, 292: 16817-24.
200. Mittal M, Siddiqui MR, Tran K, Reddy SP, Malik AB. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxid Redox Signal*. 2014, 20: 1126-67.
201. Jadeja RN, Upadhyay KK, Devkar RV, Khurana S. Naturally occurring Nrf2 activators: Potential in treatment of liver injury. *Oxidative Medicine and Cell Longevity*. 2016, 2016: 1-13.
202. Naidu SD, Suzuki T, Yamamoto M, Fahey JW, Dinkova-Kostova AT. Phenethyl Isothiocyanate, a Dual Activator of Transcription Factors NRF2 and HSF1. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2018, 62: 1-9.
203. Lee JH, Khor TO, Shu L, Su ZY, Fuentes F, Kong AT. Dietary phytochemicals and cancer prevention: Nrf2 signaling, epigenetics, and cell death mechanisms in blocking cancer initiation and progression. *Pharmacology & Therapeutics*. 2013, 137: 153-71.
204. Cover C, Liu J, Farhood A, Malle E, Waalkes MP, Bajt ML, Jaeschke H. Pathophysiological role of the acute inflammatory response during acetaminophen hepatotoxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2006, 216: 98-107.
205. Smith TJ, Guo Z, Li c, Ning SM, Thomas PE, Yang CS. Mechanisms of inhibition of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone bioactivation in mouse by dietary phenethyl isothiocyanate. *Cancer Research*. 1993, 53: 3276-82.
206. Mannervik B, Danielson UH. Glutathione transferases, structure and catalytic activity. *CRC Crit Rev Biochem*. 1988, 23: 283-337.
207. Seo KW, Kim JG, Park M, Kim TW, Kim HJ. Effects of phenethylisothiocyanate on the expression of glutathione S-transferases and hepatotoxicity induced by acetaminophen. *Xenobiotica*. 2000, 30: 535-45.
208. Lieshout EMV, Peters WH, Jansen JB. Effect of oltipraz, alpha-tocopherol, beta-carotene and phenethylisothiocyanate on rat oesophageal, gastric, colonic and

- hepatic glutathione, glutathione S-transferase and peroxidase. *Carcinogenesis*. 1996, 17: 1439-45.
209. Gilmore TD. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene*. 2006, 25: 6680-4.
210. Verstperen L, Carpentier I, Verhelst K, Beyaert R. ABINs: A20 binding inhibitors of NF-kappa B and apoptosis signaling. *Biochem Pharmacology*. 2009, 78: 105-14.
211. Poynter ME, Irvin CG, Janssen-Heininger YMW. A prominent role for airway epithelial NF- κ B activation in lipopolysaccharide-induced airway inflammation. *The Journal of Immunology*. 2003, 170: 6257-65.
212. Reyes-Gordillo K, Segovia J, Shibayama M, Vergara P, Moreno MG, Muriel P. Curcumin protects against acute liver damage in the rat by inhibiting NF- κ B, proinflammatory cytokines production and oxidative stress. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- General Subjects*. 2007, 1770: 989-96.
213. Corbi G, Conti V, Scapagnini G, Filippelli A, Ferrara N. Role of sirtuins, calorie restriction and physical activity in aging. *Frontiers in Bioscience*. 2012, 4: 768-78.
214. Corbi G, Conti V, Russomanno G, Longobardi G, Furgi G, Filippelli A, Ferrara N. Adrenergic signaling and oxidative stress: a role for sirtuins? *Frontiers in Physiology*. 2013, 4: 324.
215. Fu Y, Kinter M, Hudson J, Humpries KM, Lane RS, White JR, Hakim M, Pan Y, Verdin E, Griffin TM. Aging promotes sirtuin 3-dependent cartilage superoxide dismutase 2 acetylation and osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatology*. 2016, 68: 1887-98.
216. Fiorino E, Giudici M, Ferrari A, Mitro N, Caruso D, De Fabiani E, Crestani M. The sirtuin class of histone deacetylases: regulation and roles in lipid metabolism. *IUBMB Life*. 2014, 66: 89-99.
217. Li Y, Xu W, McBurney MW, Longo VD. Sirt1 Inhibition Reduces IGF-I/IRS-2/Ras/ERK1/2 Signaling and Protects Neurons. *Cell Metabolism*. 2008, 8: 38-48.
218. Yang H, Zhang W, Pan H, Feldser HG, Lainez E, Miller C, Leung S, Zhong Z, Zhao H, Sweitzer S, Considine T, Riera T, Suri V, White B, Ellis JL, Vlasuk GP, Loh C. SIRT1 activators suppress inflammatory responses through promotion of p65 deacetylation and inhibition of NF- κ B activity. *PLoS One*. 2012, 7: 46364.
219. Kurek JM, Król E, Krejpcio Z. Steviol glycosides supplementation affects lipid metabolism in high-fat fed STZ-induced diabetic rats. *Nutrients*. 2020, 13: 112.

220. Dwivedi DK, Jena GB. LRP3 inhibitor glibenclamide attenuates high-fat diet and streptozotocin-induced non-alcoholic fatty liver disease in rat: studies on oxidative stress, inflammation, DNA damage and insulin signalling pathway. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 2020, 393: 705-16.



EKLER

EK.1. Etik Kurul Kararı



EK.2. Özgeçmiş

23/08/1980 Malatya doğumluyum. İlkokulu Edirne/Keşan’da, ortaokulu Konya/Akşehir, Lise öğrenimimi Konya/Bozkır’da tamamladım. 1999 yılında Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü kazandım ve 2003 yılında mezun oldum. 2007 yılında Aksaray İl Emniyet Müdürlüğü’nde polis memuru olarak göreve başladım. 2017/2018 Eğitim-Öğretim yılı Güz döneminde İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalında yüksek lisansa başladım. Evli ve bir çocuk babasıyım.

