

K. K. T.C.
YAKIN DOĞU ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ENGİNAR BİLEŞENİ CYNARIN'IN NORMAL, İMMORTALİZE VE KANSER
HÜCRELERİNE ETKİSİ

Uzman Diyetisyen Ceren GEZER

BESLENME VE DİYETETİK

DOKTORA TEZİ

LEFKOŞA
2014

K. K. T.C.
YAKIN DOĞU ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ENGİNAR BİLEŞENİ CYNARIN'IN NORMAL, İMMORTALİZE VE KANSER
HÜCRELERİNE ETKİSİ

Uzman Diyetisyen Ceren GEZER

BESLENME VE DİYETETİK
DOKTORA TEZİ

DOKTORA TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Sevinç YÜCECAN

LEFKOŞA
2014

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Beslenme ve Diyetetik Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı - Danışman: Prof. Dr. Sevinç Yücecan

Yakın Doğu Üniversitesi

Üye: Prof. Dr. Mine Yurttagül

Yakın Doğu Üniversitesi

Üye: Prof. Dr. Nedime Serakıncı

Yakın Doğu Üniversitesi

Üye: Yrd. Doç. Dr. Rüksan Çehrelı

Dokuz Eylül Üniversitesi

Üye: Yrd. Doç Dr. Özge Küçükerdönmez

Ege Üniversitesi

ONAY:

Bu tez, Yakın Doğu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğı'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. İhsan Çalış

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Çalışma süresince desteğinden dolayı sayın Prof. Dr. Sevinç Yücecan’a,
 Çalışma konusunun ilk başta belirlenebilmesi ve Aarhus’a gidiş sürecindeki desteğinden dolayı sayın Prof. Dr. Nedime Serakıncı’ya,
 Çalışma sürecindeki tüm aşamalarda içten anlayış ve desteğinden dolayı sayın Prof. Dr. Suresh Rattan’a,
 Çalışma süresince tüm paylaşım ve desteklerinden dolayı Aarhus Üniversitesi, Hücresel Yaşlanma Laboratuvarı çalışma grubu arkadaşlarım sevgili Bente Andersen, Dino Demirovic, Peter Jørgensen, Amalie Engstrøm ile konuk öğrenci olan Barbara Nardelli’ye ve laboratuvardaki diğer çalışma gruplarındaki tüm arkadaşlarıma,
 Türkçe kimyasal terminoloji konusundaki katkılarından dolayı sayın Prof. Dr. İhsan Çalış’a,
 Hep istediğim Avrupa’da moleküler beslenme alanında eğitim alma hayalimi gerçekleştirmek için gerekli ulaşım ve konaklama giderlerini destekleyen Avrupa Birliği, Avrupa Komisyonu’na,
 Adlarını buraya sığdıramadığım tüm ofis ve çalışma arkadaşlarıma,
 Aarhus’a gidiş için yazışma ve burs başvurusu sürecindeki tüm o heyecan ve mutluluk dolu paylaşımlarımız için sevgili Dyt. Emine Ömerağa’ya,
 Çalışma süreci ve her durumda içten paylaşımları ve destekleri ile yanımda olan sevgili Doç. Dr. Mesut Yalvaç ve Dyt. Servet Madencioğlu’na,
 Sonsuz, koşulsuz sevgileriyle her zaman yanımda olan anneme, babama ve ablama, enişteme, o saf ve masum teyze sevgileri ile bana verdikleri güç ve motivasyon için ailemin kıymetlileri 3 minik akıllı ve şirin çocuğuna,

Adlarını buraya sığdıramadığım tüm sevdiklerim ve dualarında olduklarıma,

En içten teşekkür ve sevgilerimi sunarım.

Uzm. Dyt. Ceren Gezer

“Bizi öldürmeyen şey, bizi güçlü kılar”

(The thing what does not kill us, makes us stronger)

Fredrich Nietzsche

ÖZET

Gezer, C. Enginar bileşeni Cynarin'in normal, immortalize ve kanser hücrelerine etkisi. Yakın Doğu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Beslenme ve Diyetetik Doktora Programı, Lefkoşa, 2014.

Obezite, kardiyovasküler hastalıklar, tip 2 diyabet ve kanser gibi yaşam tarzı ile ilintili kronik hastalık riskindeki artış, beklenen yaşam süresindeki azalışla ilişkilidir. Meyve, sebze, baharat ve diğer bitkilerde bulunan bazı fitokimyasalların bu hastalıkları düzenleyici etkileri olduğu bildirilmektedir. Enginar, besin ögesi içeriği ve bileşiminde bulunan fitokimyasallarla ilgili olarak gösterdiği olumlu potansiyel sağlık etkileri nedeniyle giderek önem kazanmaktadır. Enginarın baş ve yaprak kısımlarında bulunan temel kafeoilkinik asit türevlerinden Cynarin (CYN), koloretik ve kolesterol düşürücü, hepatoprotektif, anti-aterosklerotik, antioksidatif, vb. potansiyel sağlık etkileri göstermektedir. Bu çalışmada, farklı CYN konsantrasyonlarının normal deri hücreleri (FSF-1), telomeraz-immortalize mezenkimal kök hücreleri (hTERT-MSC) ve servikal kanser hücrelerinin (HeLa) proliferasyon, hayatta kalım, morfoloji ve stres yanıt belirteçleri hemoksigenaz-1 (HO-1) ve ısı şok protein-70 (HSP-70) üzerine olan etkileri araştırılmıştır. CYN'in hücre proliferasyonu ve morfolojisine olan etkileri doz ve hücre tipi ile ilişkilidir. Hücrelerin 75 µM CYN ile muamele edilmesi sonucu büyüme ve proliferasyonda azalma gözlenirken hayatta kalımın FSF-1 ve hTERT-MSC hücrelerinde HeLa hücrelerine kıyasla daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Ayrıca, hem deri hem de kök hücrelerde oksidatif stres belirteci olan HO-1, CYN tarafından bifazik olarak indüklenirken HSP70 sadece kök hücrelerinde hafif indüklenmiştir. Dolayısıyla, CYN'in potansiyel kanser hücrelerinin büyüme ve proliferasyonun önlenmesinde olumlu etkiler gösterebileceği ve stres yanıt proteinlerini indükleyerek normal hücrelerin yaşam süresinin uzamasında etkili olabileceği öngörülebilir. Sonuç olarak CYN ve enginarın potansiyel sağlık etkileri ile beslenme ve diyetetik bilimi kapsamında öneriler sunabilmek için bu konuda daha ileri moleküler, epidemiyolojik ve klinik araştırmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar kelimeler: cynarin, enginar, deri hücreleri, mezenkimal kök hücreler, HeLa, stres yanıtı

Destekleyen Kurumlar:

Laboratuvar uygulama giderleri: Aarhus Üniversitesi, Moleküler biyoloji ve Genetik Bölümü, Hücresel Yaşlanma Laboratuvarı.

Konaklama ve ulaşım giderleri: Avrupa Birliği 2013-2014 Yılı Kıbrıs Türk Toplumu Burs Programı, C Tipi Burs.

ABSTRACT

Gezer, C. The effects of artichoke compound cynarin on normal, immortalized and cancerous human cells. Near East University, Institute of Health Sciences, Nutrition and Dietetics Doctoral Program, Nicosia, 2014.

The high risk of lifestyle-related chronic diseases such as obesity, cardiovascular disease, type II diabetes, and cancer are associated with longer life expectancy. Several phytochemicals of fruits, spices, vegetables and other plants have been identified as modulators of these diseases. Among such plants, artichoke is becoming popular due to its beneficial health effects related with nutritional value and nutraceutical content. Cynarin (CYN) is the main derivative of caffeoylquinic acid, found in leaves and heads of artichoke. Potential health-beneficial effects of CYN include as being choloretic-cholesterol lowering, hepatoprotective, anti-atherosclerotic, and antioxidative. In this study, the effects of various doses of CYN on the proliferation, survival, morphology, and stress response markers heme oxygenase-1 (HO-1) and heat shock protein-70 (HSP70) in normal human skin fibroblasts (FSF-1), telomerase-immortalized mesenchymal stem cells (hTERT-MSC) and cervical cancer cells, HeLa have been tested. Effects of CYN on cell proliferation and morphology were dose- and cell type-dependent. While the growth and proliferation of cells decreased after exposure to 75 μ M CYN, overall survival of FSF-1 and hTERT-MSC was higher than that of HeLa cells. Furthermore, CYN induced oxidative stress response marker HO-1 in both fibroblasts and stem cells in a biphasic manner, but a slight induction of HSP70 was observed only in the stem cells. Thus, CYN may be useful as a protection against the growth and survival of potentially cancerous cells and may promote longevity of normal cells by induction of stress response proteins. There is a need for advanced molecular, epidemiological and clinical researches related with potential health effects of CYN and artichoke in a nutrition and dietetics manner for dietary recommendations.

Keywords: cynarin, artichoke, skin fibroblasts, bone marrow, mesenchymal stem cells, HeLa, stress response

Supported by

Laboratory application expenses: Aarhus University, Department of Molecular Biology and Genetics, Laboratory of Cellular Ageing.

Accommodation and transport expenses: European Union Scholarships for the Turkish Cypriot community Programme for the Academic Year 2013/14, Grant Type C.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	i
TEŞEKKÜR	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
İÇİNDEKİLER	v
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
1.1. Kuramsal Yaklaşımlar ve Kapsam	1
1.2. Amaç	2
1.3. Hipotez	3
1.4. Literatür	3
2. TEMEL KAVRAMLAR	4
2.1. Beslenme, Sağlıklı Yaşlanma ve Yaşam Süresi	4
2.2. Oksidatif Stres ve Yaşlanma	9
2.3. Hormesis	10
2.4. Enginar	13
2.4.1. Cynarin (CYN)	19
3. Gereç ve Yöntem	25
3.1. Gereç Listesi	25
3.1.1. Kimyasallar	25
3.1.2. Antikorlar	25
3.1.3. Kitler	26
3.1.4. Plaklar ve flasklar	26
3.1.5. Makineler	26

3.1.6. Yazılım programları	26
3.2. Yöntemler	27
3.2.1. Hücreler	27
3.2.2. Hücre Kültürü	28
3.2.3. Hücre Sayımı	28
3.2.4. Proliferasyon ve Hayatta Kalım	28
3.2.5. CYN Konsantrasyonları	29
3.2.6. Giemsa Boyama ile Morfoloji Analizi	29
3.2.7. Mikrofotoğraflama	29
3.2.8. MTT Testi ile Toksisite	29
3.2.9. Western Blotting	30
3.2.10. Yazılım Programları ve Veri Analizi	32
3.3. Laboratuvar Çalışmasının Yürütüldüğü Yer ve Zaman	33
3.4. Verilerin İstatistiksel Değerlendirilmesi	33
4. BULGULAR	34
4.1. CYN'nin Etkileri	34
4.1.1. Hücrelerin Morfolojisi	34
4.1.2. Proliferasyon ve Hayatta Kalım	46
4.1.3. Toksisite	48
4.1.4. Stress Yanıtı	50
5. TARTIŞMA	53
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	62
KAYNAKÇA	63
EKLER	
TEZDEN YAPILAN YAYINLAR, SUNULAR, POSTERLER	

SİMGELER VE KISALTMALAR

AAPH: 2,20-azobis(2-amidinopropan)dehidroklorit
ABTS: 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit)
AGE: İleri glikolize son ürünler
ARE: Antioksidan yanıt elementi
BSA: Bovin serum albumin
CAT: Katalaz
CYN: Cynarin
DDR: DNA hasar yanıtı
DMEM: Dulbecco's minimum elzem besiyeri
DMSO: Dimetil sülfoksit
DPBS: Dulbecco's fosfat tuz tamponu
DPPH: 1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil
DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü
EC: Epikateşin
EC₅₀: Yarı maksimal etkili konsantrasyon
EGKG: Epigallokateşin gallat
EGK-3-G: Epigallokateşin-3-gallat
eNOS: Endotelyal nitrik oksit sentaz
ERK: Ekstraselular-sinyal-düzenleyici kinaz
EPIC Study: Avrupa Kanseri ve Beslenme İnceleme Çalışması
etOH: Etanol
FBS: Fetal bovin serum
FSF-1: Normal diploid insan deri hücreleri
GPx: Glutasyon peroksidaz
GSH: Glutasyon
GSK3: Glikojen Sentaz 3β

HALE: Avrupa Uzunlamasına Sağlıklı Yaşlanma Çalışması

HIV: İnsan bağışıklık yetmezliği virüsü

HO-1: Hemoksigenaz-1

HSP70 (HSP1A): Isı şok protein-70

HSR: Isı şok yanıtı

hTERT-MSC: Telomeraz-immortalize normal kemik iliği insan mezenkimal kök hücreleri

IC₅₀: Yarı maksimal inhibitör konsantrasyonu

IUPAC: Uluslararası Kuramsal ve Uygulamalı Kimya Birliği

JNK: c-Jun NH₂ terinal kinaz

LD₅₀: Medyan öldürücü doz

MTT: Tiazoyil mavi tetrazolyum bromid

MT-2: İnsan T-hücre lökemi hücreleri

MAPK: Mitogen activated protein kinaz

MAPKK: Mitogen activated protein kinaz kinaz

MAPKKK: Mitogen activated protein kinaz kinaz kinaz

NHANES: Ulusal Beslenme ve Sağlık Araştırması

NF-κB: Nüklear faktör kappa B

NO: Nitrik oksit

Nrf-2: Nüklear faktör benzeri 2

P: Pasaj

PI3-K: Fosfotidilinositol-3-kinaz

PKC: Protein kinaz C

PMSF: Fenilmetilsülfonil florid

RB: Retinoblastoma

ROS: Reaktif oksijen türevleri

SENECA: Avrupa Beslenme ve Yaşlılık Araştırması

SOD: Superoksit dismutaz

t-BPH: tert-bütilhidroperoksit

UPR: Katlanmamış protein yanıtı

WB: Western blotting

ŞEKİLLER

	Sayfa
Şekil 2.4.1.1. Cynarin (1,3-O-dikaffeoylkuinik asit)	21
Şekil 4.1.1.1. Farklı CYN konsantrasyonlarının üçüncü günde FSF-1 hücre morfolojisine etkisi (10x objektif)	36
Şekil 4.1.1.2. Farklı CYN konsantrasyonlarının üçüncü günde FSF-1 hücre morfolojisine etkisi (20x objektif)	37
Şekil 4.1.1.3. Farklı CYN konsantrasyonlarının altıncı günde FSF-1 hücre morfolojisine etkisi (10x objektif)	38
Şekil 4.1.1.4. Farklı CYN konsantrasyonlarının altıncı günde FSF-1 hücre morfolojisine etkisi (20x objektif)	39
Şekil 4.1.1.5. Farklı CYN konsantrasyonlarının üçüncü günde hTERT-MSC hücre morfolojisine etkisi (10x objektif)	40
Şekil 4.1.1.6. Farklı CYN konsantrasyonlarının üçüncü günde hTERT-MSC hücre morfolojisine etkisi (20x objektif)	41
Şekil 4.1.1.7. Farklı CYN konsantrasyonlarının beşinci günde hTERT-MSC hücreleri morfolojisine etkisi (10x objektif)	42
Şekil 4.1.1.8. Farklı CYN konsantrasyonlarının beşinci günde hTERT-MSC hücre morfolojisine etkisi (20x objektif)	43
Şekil 4.1.1.9. Farklı CYN konsantrasyonlarının üçüncü günde FSF-1, hTERT-MSC ve HeLa hücreleri morfolojisine etkisi (10x objektif)	44
Şekil 4.1.1.10. Farklı CYN konsantrasyonlarının üçüncü günde FSF-1, hTERT-MSC ve HeLa hücreleri morfolojisine etkisi (20x objektif)	45
Şekil 4.1.2.1. Farklı CYN konsantrasyonlarının altı günlük muamele sonucu FSF-1 hücre sayısına etkisi	47
Şekil 4.1.2.2. Farklı CYN konsantrasyonlarının beş günlük muamele sonucu hTERT-MSC hücre sayısına etkisi	47

Şekil 4.1.2.3. Farklı CYN konsantrasyonlarının üç günlük muamele sonucu HeLa hücre sayısına etkisi	48
Şekil 4.1.3.1. hTERT-MSC hücrelerinin mitokondriyal aktivitesi	49
Şekil 4.1.3.2. HeLa hücrelerinin mitokondriyal aktivitesi	49
Şekil 4.1.4.1.1. Farklı CYN konsantrasyonlarının üç günlük muamelesi sonucu FSF-1 hücrelerinde HO-1 ifade seviyesi	50
Şekil 4.1.4.1.2. Farklı CYN konsantrasyonlarının üç günlük muamelesi sonucu hTERT-MSC hücrelerinde HO-1 ifade seviyesi	51
Şekil 4.1.4.2.1. Farklı CYN konsantrasyonlarının üç günlük muamelesi sonucu FSF-1 hücrelerinde HSP70 ifade seviyesi	52
Şekil 4.1.4.2.2. Farklı CYN konsantrasyonlarının üç günlük muamelesi sonucu hTERT-MSC hücrelerinde HSP70 ifade seviyesi	52

TABLÖLAR

	Sayfa
Tablo 2.3.1. İnsan hücrelerinde temel moleküler stres yanıtı yolları, ilgili göstergeler ve etkenler	13
Tablo 2.4.1. Enginar besin ögesi bileşimi (100 g)	15
Tablo 2.4.2. Enginarda bulunan besin ögeleri (TürKomp) (100 g)	15
Tablo 2.4.1.1. CYN'in potansiyel olumlu sağlık etkileri	24
Tablo 3.2.9.1. Liziz tamponu	30
Tablo 3.2.9.2. Towbin tamponu	31
Tablo 3.2.9.3. WB'ta kullanılan antikorlar	31

1. GİRİŞ

1.1. Kuramsal Yaklaşımlar ve Kapsam

Beklenen yaşam süresinin artmasıyla birlikte yaşlı populasyon günden güne giderek artmaya devam etmektedir (Kirkwood, 2008, s. 644-647). Yaşlı populasyon artışıyla birlikte sağlıklı yaşlanma ve yaşam kalitesi daha da önem kazanmaktadır. Yaşam süresi ve yaşlanma; genler, beslenme ve diğer yaşam tarzı faktörleri ile ilişkilidir (Green ve Rosenberg, 2013, s. 707-709). Obezite, kardiyovasküler hastalıklar, tip-2 diyabet ve kanser gibi yaşam tarzı ile ilintili kronik hastalıklara yakalanma riskindeki azalış, beklenen yaşam süresindeki artışla ilişkilidir. Meyve, sebze, baharat ve diğer bitkilerde bulunan bazı fitokimyasalların bu hastalıkları düzenleyici etkileri olduğu bildirilmektedir (Argyopoulou ve diğerleri, 2013, s. 1412-1437; Vallinas ve diğerleri, 2013, s. 585-599; Özkan ve Erdoğan, 2013, s. 405-413). Akdeniz Diyeti'nde geniş bir tüketim yelpazesi olan enginar (*Cynara scolymus*) da 4. yüzyıldan bu yana teröpatik bitki olarak bilinmektedir (Gouveia ve Castilho, 2012, s. 712-724). Ayrıca, İngiliz ve Avrupa Kodeksi (British and European Pharmacopeia), İngiliz Herbal Kodeksi (the British Herbal Pharmacopeia) ve Alman Komisyonu e-Monogramı (the Complete German Commission e-Monographs)'nda enginar yapraklarının uzun zamandır alternatif tıpta kullanıldığı bildirilmektedir (Nasser, 2012, s. 6-13). Buna ek olarak enginarın hepatoprotektif, koloretik ve kolesterol düşürücü, safra salgılatıcı ve ürinatif, antibakteriyel, antioksidatif, vb. potansiyel sağlık etkileri gösterdiği bildirilmektedir (Ernst ve Pittler, 2000, s. 70; Ebadi, 2007, s. 86; Barnes ve diğerleri, 2007, s. 67-71). Bu potansiyel sağlık etkileri ise genellikle enginarın baş ve yaprak kısımlarında bulunan temel kafeoilkinik asit türevlerinden Cynarin (CYN)'e atfedilmektedir (Negro ve diğerleri, 2012, s. 244-252). Bu çalışmada, farklı CYN konsantrasyonlarının normal insan deri hücreleri (FSF-1), telomeraz-immortalize mezenkimal kök hücreleri (hTERT- MSC) ve servikal kanser hücrelerinin (HeLa) proliferasyonu, hayatta kalımı ve morfolojisine etkisi ile normal hücre hasarı yaratmadan kanser hücre proliferasyonunu baskılayıcı potansiyel etkisi ve stres indüklü antioksidatif savunma yollarının aktivasyonu üzerine etkisi araştırılmıştır.

1.2. Amaç

Bu çalışmanın ilk amacı; farklı CYN konsantrasyonlarının normal insan deri hücreleri (FSF-1), telomeraz-immortalize mezenkimal kök hücreleri (hTERT-MSK) ve servikal kanser hücrelerinin (HeLa) proliferasyon, hayatta kalım ve morfolojisine etkisi ile normal hücre hasarı yaratmadan kanser hücre proliferasyonunu baskılayıcı ve hücrel yaşlanma üzerine etkisini değerlendirmektir.

İkinci amacı; farklı CYN konsantrasyonlarının stres indüklü antioksidatif savunma yollarının aktivasyonu üzerine etkisini değerlendirmektir.

Bu projenin ileriye yönelik amacı ise CYN'in yedi temel stres yanıtı yollarının aktivasyonuna etkisi ile bir besinsel hormetin olma potansiyelinin değerlendirilmesidir.

Bu çalışmada aşağıdaki değerlendirmeler yapılmıştır.

I. Farklı CYN konsantrasyonlarının normal insan deri hücreleri, immortalize olmuş mezenkimal kök hücreleri ve servikal kanser hücrelerine etkisi:

- morfoloji
- proliferatif potansiyel ve hayatta kalım
- toksisite

II. Farklı CYN konsantrasyonlarının normal insan deri hücreleri ve immortalize olmuş mezenkimal kök hücrelerinde antioksidan ve ısı şok proteinlerin yanıtı:

- hemoksigenaz-1 (HO-1) ifade seviyesi
- ısı şok proteini-70 (HSP70 ya da HSP1A) ifade seviyesi

III. Potansiyel hormetik etki gösteren CYN konsantrasyon aralığının görülmesi.

1.3. Hipotez

I. Farklı CYN konsantrasyonlarının normal insan deri hücreleri, telomeraz-immortalize mezenkimal kök hücreleri ve servikal kanser hücrelerinin proliferasyon, hayatta kalım, morfolojisine, hücresel yaşlanma üzerine olumlu etkileri vardır ve potansiyel antikanserojendir.

II. Farklı CYN konsantrasyonlarının normal insan deri hücreleri ve immortalize olmuş mezenkimal kök hücrelerinde antioksidan ve ısı şok yanıtı üzerine olumlu etkileri vardır. CYN, oksidatif yanıt enzimi olan HO-1 ve ısı şok proteini HSP70 ifade seviyesini artırmaktadır.

1.4. Literatür

Bu tez konusu ve çalışması için Türkçe ve yabancı literatür taraması gerçekleştirilmiştir. Taranan Türkçe ve yabancı veri tabanları aşağıda gösterilmiştir. Bunlar:

1. Türk Tıp Dizini
2. Yüksek Öğretim Kurulu Ulusal Tez Merkezi Arşivi
3. Science Direct
4. Pubmed
5. Medline

2. TEMEL KAVRAMLAR

2.1. Beslenme, Sağlıklı Yaşlanma ve Yaşam Süresi

İngilizcede sağlık anlamına gelen “health” sözcüğü eski İngilizcede “ses vermek, tam olmak” anlamına gelen “hoelth” sözcüğünden gelmektedir (*Boruchovitck ve Mednick*, 2002, s. 175-183). Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ-World Health Organisation (WHO))’nın tanımına göre “sağlık; fiziksel, zihinsel ve sosyal yönden tam bir iyilik halidir”. Hipokrat’a göre ise sağlık, kutsal bir hediyedir ve çevresel sanitasyon, kişisel hijyen ve dengeli beslenme ile ilişkilidir. Hipokrat, beslenmenin sağlık için önemini ise “bırakın besinler ilacınız, ilacınız besinleriniz olsun” sözü ile açıklamıştır (*Üstün ve Jakob*, 2005, s. 802). Beslenmenin yaşam süresince ortaya çıkacak olan sağlık sonuçlarını etkilediği bilinmektedir (*WHO*, 2002, s. 1-8).

DSÖ istatistiklerine göre 2050 yılında 65 yaş ve üzeri bireylerin sayısı yaklaşık 1.5 milyara ulaşacak ve bunun önemli bir kısmı gelişmekte olan ülkelerde olacaktır (*WHO*, 2011, s. 4). Dolayısıyla, beklenen yaşam süresi ve yaşlı populasyon gün geçtikçe dikkat çekici bir artış göstermektedir (*Kirkwood*, 2008, s. 644-647). Bu, toplum sağlığının gelişmesi, hijyenik içme suyunun bulunabilirliği, anne-çocuk hijyen ve sağlığının gelişmesi gibi çeşitli çevresel hijyen koşullarındaki artış, vb. birçok faktörle ilgilidir (*Michel*, 2009, s. 1-8). Buna göre, yaşlanma ve yaşam süresi ile ilgili fizyolojik ve biyokimyasal yollar birçok çevresel, davranışsal, sosyo-ekonomik ve besinsel faktörle ilişkilidir (*Chrysohoou ve Stefanadis*, 2013, s. 303-307). Yaşlı populasyon giderek artarken herhangi bir inaktivite ve hastalık olmaksızın geçirilen sağlıklı yaşam süresinin artması anlamına gelen “sağlıklı yaşlanma” ve bununla ilişkili “yaşam kalitesi” kavramlarının da önemi giderek artmaktadır (*Euro Health Net*, 2012, s. 9). Genetik yapı, metabolizma ve fizyoloji, sosyal ve çevresel faktörler ile yaşam tarzı gibi birçok etmen yaşam süresini etkilemektedir. Sağlıklı bir yaşam tarzı birçok hastalığın önlenmesi ve yaşam süresinin uzamasında önemli bir faktördür. Beslenme ve yaşam tarzı değişikliklerinin birçok hastalığın gecikmesi ve önlenmesi ile mortalitenin azalmasında etkili olduğu bildirilmektedir (*Academy of Nutrition ve Dietetics*, 2013, s. 972-979).

Sağlıklı Yaşam Tarzı:

Birçok klinik ve epidemiyolojik çalışma sağlıklı yaşam tarzının kronik hastalık riskinin azalması ile olan ilişkisini göstermiştir (*Kim ve diğerleri*, 2004, s. 160-171). Multi-etnik kohort bir çalışma sonucuna göre kronik hastalık risk indeksi puanı ile yaşam süresi arasında ters yönlü bir ilişki vardır. Yani kronik hastalık riski arttıkça yaşam süresi kısalmaktadır (*Meng ve diğerleri*, 1999, s. 296-304). Yaşam tarzı ve hayatta kalım ile ilgili çalışmalar, diyet kalitesi, sigara kullanımı ve fiziksel aktivite gibi sağlıklı yaşam tarzı davranışlarının uzun dönemli olumlu sağlık etkileri olduğunu göstermektedir. Dokuz Avrupa ülkesinde 70-75 yaş grubu 1091 kadın, 1109 erkek bireyin katıldığı 10 yıllık uzunlamasına bir çalışma olan Avrupa Beslenme ve Yaşlılık Araştırması (Survey in Europe on Nutrition and the Elderly; a Concerted Action-SENECA) sonuçlarına göre sigara kullanımı, düşük diyet kalitesi ve yetersiz fiziksel aktivite mortalite riskini 3-4 kat artırmaktadır. Ayrıca, beslenme, fiziksel aktivite ve sigara kullanılmaması gibi sağlıklı yaşam tarzı alışkanlıklarına dönüştürülebilen davranışlar, yaşam kalitesini artırarak morbiditenin gecikmesi üzerine de etkili olabilmektedir (*Nies ve diğerleri*, 2002, s. 962-968; *Nies ve diğerleri*, 2003a, s. 427-434; *Nies ve diğerleri*, 2003b, s. 318-323).

Diyet Kalitesi:

Obezite, kardiyovasküler hastalıklar, tip-2 diyabet ve kanser gibi beslenme ile ilintili kronik hastalıklara yakalanma riski ve yaşam süresi ilişkilidir (*Vallinas ve diğerleri*, 2013, s. 585-599). Diyet kalitesi, yaşam kalitesinin önemli bir parçasıdır ve yaşam süresi ile ilgilidir. Diyet Kalite İndeksi, genel beslenme örüntüsünün değerlendirilmesi ve kronik hastalık riski ile mortalite riskinin öngörülebilmesi amacı ile geliştirilmiş bir ölçektir (*Kim ve diğerleri*, 2003, s. 3476-3484; *Seymour ve diğerleri*, 2003, s. 980-988). Sağlıklı Diyet İndikatörü (DSÖ Beslenme Rehberi'ne dayalı) ve Yaşlılarda Beslenme İndeksi (Akdeniz Diyeti'ne dayalı) ile değerlendirilen 3328 yaşlı bireyin (60-79 yaş) katıldığı uzunlamasına bir çalışma sonucunda diyet kalitesinin tüm nedenlere bağlı mortalite ile ilişkili olduğu belirlenmiştir (*Atkins ve diğerleri*, 2014, s. 673-680). Uzunlamasına bir çalışma olup 65 yaş ve üzeri 972 birey ile yürütülmüş İngiliz Diyet ve Beslenme Araştırması'nda üç diyet kalite indeksi ile yapılan değerlendirmede Sağlıklı

Diyet Skoru mortalite için bir ön gösterge olarak saptanmazken, Önerilen Besin Skoru ve Akdeniz Diyeti Skoru tüm nedenlere bağlı mortalite ile ilişkili bulunmuştur (McNaughton, 2012, s. 320-325). Ayrıca, prospektif kohort bir çalışma olan Meme Kanseri Tarama Projesi sonuçlarına göre düşük diyet kalitesi, artmış mortalite riski ile ilişkilidir (*Kant ve diğerleri*, 2000, s. 2109-2115). Yine, Amerikan Kanser Derneği Kanserden Korunma Çalışması II Beslenme Kohort (American Cancer Society Cancer Prevention Study II Nutrition Cohort) araştırması sonuçları diyet kalitesinin tüm nedenlere bağlı mortalite ve dolaşım sistemi hastalıklarına bağlı mortalite ile ilişkili olduğunu göstermiştir (*Seymour ve diğerleri*, 2003, s. 980-988). Bunun yanında, Ulusal Beslenme ve Sağlık Araştırması I (National Health and Nutrition Examination Survey I-NHANES I)'de düşük besin çeşitliliğinin her iki cinsiyette de yüksek mortalite riski ile ilişkili olduğu saptanmıştır (*Kant ve diğerleri*, 1993, s. 434-440). İsveç'te kadınlar ile yapılmış bir diğer prospektif çalışmada ise fazla miktarda kırmızı et, rafine karbonhidrat, şeker ve doymuş-trans yağ içeriği yüksek besinler tüketen kadınlarda kansere bağlı mortalitenin az tüketenlere göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir (*Michels ve Wolk*, 2002, s. 847-854). Yine, 16 yıl süren Whitehall II Kohort Çalışması'nda kızarmış ve şekerli besinler, işlenmiş ve kırmızı etler, rafine tahıllar ve yüksek yağlı süt ürünleri tüketimi az olan bireylerin, hastalık olmadan aktif bir yaşlılık dönemi geçirme olasılığı yüksek bulunmuştur (*Akbaraly ve diğerleri*, 2013, s. 411-419). Ayrıca, Avrupa'da 452,717 katılımcı ile yapılan prospektif bir çalışma sonucuna göre posa alımındaki artış toplam mortalitedeki azalışla ilişkilidir ve bu etki tahıl ve sebze kaynaklı posada meyvelerdeki posaya kıyasla daha yüksektir (*Chuang ve diğerleri*, 2012, s. 164-174).

Akdeniz Diyeti:

Akdeniz Diyeti; sebze, meyve, kurubaklagil ve tahıllardan zengin, orta düzeyde balık, yüksek miktarda doymamış yağ asidi, düşük-orta düzeyde süt ürünleri, düşük düzeyde et ve orta düzeyde şarap tüketimi ile karakterizedir. Yapılan çalışmalarda Akdeniz Diyeti ve toplam mortalite arasında ters yönlü bir ilişki olduğu bildirilmiştir (*Trichopoulou ve diğerleri*, 2003, s. 2599-2608). On iki yıl boyunca (1988-2000) 2,339 sağlıklı, 70-90 yaş grubu bireyler ile yürütülen Avrupa Uzunlamasına Sağlıklı Yaşlanma Çalışması (The

Healthy Ageing: a Longitudinal study in Europe-HALE) sonuçlarına göre Akdeniz Diyeti ve sağlıklı yaşam tarzı tüm nedenlere bağlı ve belirli bir nedene bağlı mortaliteyi en az %50 oranında azaltmaktadır (*Knoops ve diğerleri*, 2004, s. 1433-1439). Ayrıca, dokuz Avrupa ülkesinde 60 yaş ve üzeri 74,607 bireyin katıldığı Avrupa Kanseri ve Beslenme İnceleme Çalışması'na (The European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition-EPIC) göre Akdeniz Diyeti, toplam ölüm oranındaki azalışla ilişkilendirilmiştir (*Trichopoulou ve diğerleri*, 2005, s. 1-7). Diğer taraftan, 60-69 yaş grubu Hollandalı kadınların katıldığı bir çalışmada geleneksel Hollanda Diyeti'nin Akdeniz Diyeti'ne kıyasla yaşam süresi üzerinde daha etkili olduğu belirlenmiştir (*Waijers ve diğerleri*, 2006, s. 1170-1176). İsveçli yaşlı bireylerle yapılan bir çalışmada ise tam tahıllar, çoklu doymamış yağ asitlerinden zengin besinler ve sınırlı miktarda alkol tüketimini kapsayan Akdeniz tipi beslenmenin yaşam süresini uzatabildiği bildirilmiştir (*Tognon ve diğerleri*, 2011, s. 439-450). Ayrıca, Akdeniz Diyeti'nin bir özelliği olan orta düzey şarap tüketiminin başta resveratrol olmak üzere şarabın bileşiminde bulunan fitokimyasallara bağlı olarak yaşam süresini uzattığı ve kardiyovasküler hastalık riskini azalttığı bildirilmiştir (*Giacosa ve diğerleri*, 2014, e-baskı). İsveç'te 30-49 yaş grubu kadın katılımcılarla yürütülen bir diğer çalışmada ise Akdeniz tipi beslenmenin mortaliteyi azalttığı belirlenmiştir (*Lagiou ve diğerleri*, 2006, s. 384-392). Bunun yanında, 40,622 bireyin yer aldığı EPIC-İspanya Çalışması'nda zeytinyağı tüketimi ile toplam mortalitenin %26 ve zeytinyağı tüketimindeki her 10 gramlık artışla toplam mortalitenin %7 oranında azaldığı saptanmıştır (*Buckland ve diğerleri*, 2012, s. 142-149).

Vejetaryen Diyet:

Derlenen altı çalışma sonucuna göre bu çalışmaların dördünde çok düşük et tüketimi ile ölüm riskinde anlamlı bir azalış olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, sağlıklı yetişkin bireylerle yapılan kohort bir çalışmaya göre uzun dönem (≥ 20 yıl) vejetaryen diyet tüketimi yaşam süresini 3.6 yıl artırmaktadır (*Singh ve diğerleri*, 2003, s. 526-532). Diğer taraftan, 17,611 bireyle yürütülmüş 1986-2010 yıllarını kapsayan NHANES III çalışma

sonuçlarına göre et tüketimi mortalite ile ilişkilendirilmemiştir (*Kappeler ve diğerleri*, 2013, s. 598-606).

Kalori Kısıtlaması:

Bu terim malnutrisyona neden olmadan yapılan enerji kısıtlaması anlamındadır. Kalori kısıtlamasının yaşam süresinin uzaması ile ilgili olduğunu gösteren ilk çalışmadan bu yana mayalar, sinekler, balıklar, fare ve sıçanlar gibi birçok canlı türü ile bu konuda birçok araştırma yapılmıştır. Memeli grubundan olan sıçanlar ve farelerle yapılan çalışmalarda, kalori kısıtlamasının yaşlanmayı geciktirdiği gösterilmiştir (*Heilbronn ve Ravussin*, 2003, s. 361-369; *Holloszy ve Fontana*, 2007; s. 709-712; *Fontana*, 2009, s. 144-150). Ayrıca, evrimsel olarak insana en yakın canlılar olan primatlardan Rhesus maymunları ile yapılan çalışmalarda %30 kalori kısıtlaması yaşa ve tüm nedenlere bağlı mortalitedeki azalışla ilişkilendirilmiştir (*Colman ve diğerleri*, 2014, s. 3557-3561). Dünyanın en uzun yaşayan insanları olarak bilinen Okinawanların, Amerikalılara göre %20-40 oranında daha düşük kalorili ve besin değeri yüksek geleneksel diyetleri nedeniyle 4-5 yıl daha uzun yaşadıkları bildirilmektedir (*Willcox ve diğerleri*, 2014, s. 148-162; *Everitt ve diğerleri*, 2010, s. 311-318). Ayrıca, yapılan uzun dönem insan çalışmaları sonuçlarına göre insulin-insulin benzeri büyüme faktörü ve interlökin-6, triiodotironin düzeyi ve vücut ısısındaki düşüş, oksidatif hasar, otonomik fonksiyon değişiklikleri gibi metabolik adaptasyondaki azalış tip-2 diyabet, hipertansiyon, kardiyovasküler hastalıklar ve kanserle ilişkilidir (*Meyer ve diğerleri*, 2006, s. 398-402; *Stein ve diğerleri*, 2012, s. 644-650; *Mercken ve diğerleri*, 2013, s. 645-651; *Rizza ve diğerleri*, 2014, s. 38-45). Dolayısıyla, metabolik ve moleküler yolların kalori kısıtlaması ve yaşam süresi ile olan ilişkisinin belirlenebilmesi için daha ileri araştırmalar gereklidir.

Özetle, mevcut araştırma sonuçları yeterli ve dengeli beslenme, fiziksel aktivite, sigara kullanmama gibi sağlıklı yaşam tarzı davranışları yaşam süresinin uzunluğu ile ilgilidir. Dolayısıyla, yaşlanma üzerine olumlu etkiler gösteren beslenme stratejileri fizyolojik fonksiyonlar ve yaşam kalitesinin sürdürülmesine olanak sağlamaktadır. Epidemiyolojik ve klinik çalışmalar, mikro besin öğelerinin yaşlılık döneminde immün,

bilişsel, kardiyovasküler ve kas-iskelet fonksiyonlarının artışı üzerine etkili olduğunu göstermektedir (Meydani, 2001, s. 226-235). Bunun yanısıra 75 yaş sonrasında dahil sigara kullanmamak, fiziksel aktivite yapmak gibi sağlıklı yaşam tarzı davranışlarının yaşam süresinin uzamasında (erkek: 6 yıl, kadın: 5 yıl) etkili olduğu bildirilmektedir (Rizutto, 2012, s. 1-10). Yani, amaç sadece uzun yaşamak değil aynı zamanda daha iyi, kaliteli yaşamak ve bunun için optimal yaşam kalitesinin yaşam boyunca sürdürülmesini sağlamaktır. Bu nedenle de sağlıklı beslenme ve diğer sağlıklı yaşam tarzı davranışlarının yaşam boyu benimsenmesi önemlidir. Genel olarak beslenme ve yaşlanma ilişkisi sadece diyet ve morbiditedeki azalışla ilgili mortalitedeki azalış değil aynı zamanda morbidite riskine bağlı olmaksızın sağlıklı yaşlanmakla da ilgilidir.

2.2. Oksidatif Stres ve Yaşlanma

Oksidatif stres kavramı her iki sözcüğün anlamını da kapsamaktadır. İlk kez Helmut Sies tarafından 1980'lerde olumsuz ve patolojik bir kavram olarak tanımlanmıştır (Lane, 2011, s. 1-17). Daha sonra ise oksidan ve antioksidanlar arasındaki dengesizlik "oksidatif stres" kavramı olarak açıklanmıştır. Reaktif oksijen türevleri (ROS), endojen ve ekzojen nedenlerden dolayı canlı organizmalarda normal hücre metabolizması sonucu oluşmaktadır. Süperoksit anyonu (O_2^-), hidroksil radikali ($\bullet OH$) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) bilinen temel endojen oksidanlarken, ultraviyole ışık, hiperoksi, iyonize radyasyon ve ağır metal iyonlar ise bilinen ekzojen oksidanlardır. Normal koşullarda hücreler oksidan ve antioksidan dengesini sağlayabilmektedir. Dolayısıyla, ROS'un aşırı birikimi ve/veya antioksidan yetersizliği sonucu oksidatif stres oluşmaktadır (Shackelford ve diğerleri, 2000, s. 1387-1404; Birben ve diğerleri, 2012, s. 9-19). Antioksidan savunma mekanizması, katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx)'ı içeren enzimatik ve askorbik asit, α - tokoferol, β -karoten, glutatyon (GSH), ürik asit, flavonoidler, selenyum, retinol, çinko, riboflavin, molibden ise enzimatik olmayan sistemleri kapsamaktadır (Finkel ve Holbrook, 2000, s. 234-247; Prior ve Cao, 2000, s. 588-592; Goodman ve diğerleri, 2011, s. 1068-1084). Oksidatif stres, protein, DNA ve lipidlerin oksidatif hasarı sonucu yaşlanma, kanser, kardiyovasküler hastalıklar, katarakt, diyabet, nörolojik hastalıklar, immun-inflamatuvar

hastalıklar ve oto-immun hastalıklar gibi kronik hastalık riskinin artmasına neden olmaktadır (*Ferrari ve Torres*, 2003, s. 251–260; *Ferrari*, 2007, s. 327–339). Oksidatif stresi önlemek veya azaltmak için enzimatik olmayan antioksidan bileşenler yeterli miktarda alınmalıdır. Böylelikle, hücreler oksidatif hasardan korunarak kronik hastalık riski azalmaktadır (*Liu*, 2003, s. 517-520). Yaşlanmaya neden olan oksidatif stres düzeyi organizma, doku ve hücre tipine göre farklılık göstermektedir. Memelilerde antioksidanların bilişsel fonksiyonlarda düşüş gibi yaşla ilintili disfonksiyon gelişimine karşı koruyucu olduğu bildirilmiştir (*Golden ve diğerleri*, 2002, s. 117-123). Yaşlanmada Serbest Radikal Teorisi'ne göre birincil olarak mitokondriyal ROS hasarı ve ilerlemiş hücre hasar sonucu fonksiyonlardaki azalış yaşlanmaya neden olmaktadır. Buna göre ROS'un, metabolik sağlık ve yaşam süresini etkileyen elzem sinyal molekülleri gibi görev aldıkları öngörülebilir (*de Grey*, 1999, s. 65-74; *Ristow ve Schmeisser*, 2011, s. 327–336).

2.3. Hormesis

Hormesis kavramı 1888 yılında Alman farmakolog Hugo Schulz'un zehirli maddelerin maya büyümesini stimüle ettiğini bildirdiği çalışmasına dayanmaktadır (*Kaiser*, 2003, s. 376-379; *Calabrese*, 2002, s. 181-189). Ancak bir terim olarak hormesis ilk kez 1941 yılında Chester Southam ve danışmanı John Erlich tarafından mantarlarla ilgili tezinde toksikotropizm olarak kullanılmış ve daha sonra 1943 yılında yayınladıkları makalede hormesis olarak tanımlanmıştır (*Calabrese*, 2008, s. 1451-1474). Dolayısıyla, hormesis terimi -çevresel etmenlerin düşük dozda stimule edici olup olumlu etkiler gösterirken, yüksek dozda inhibe edici olup toksik etki gösterdiği, bifazik doz yanıtı- şeklinde açıklanarak toksikolojiye dayanmaktadır (*Mattson*, 2008a, s. 1-7). Hormesis teriminin kapsamlı güncel tanımı ise “kimyasal ve çevresel faktörlerin bir organizmadaki hücrelere yüksek dozda zarar verirken düşük dozda yararlı etki göstermesi” şeklindedir (*Mattson ve Calabrese*, 2010, s. 1-14).

Yaşlanmada hormesis, hafif düzeyde stresin hücre ve organizmada koruyucu mekanizmaları indükleyerek biyolojik yararlı etkiler göstermesini ifade etmektedir (*Rattan*, 2008, s. 63-78). Dolayısıyla, moleküler düzeyde yaşlanma rastgele oluşan ve

ilerleyerek biriken moleküler hasarla ilişkilidir. Hemodinamik yapının bozulması, artmış moleküler heterojenite, değişmiş hücresel fonksiyon ve azalmış stress toleransı sağlık durumunu, hastalık riskini ve yaşam süresini belirleyen faktörlerdir (*Rattan*, 2012a, s. 83-91; *Rattan*, 2012b, s. 20). ROS geniş çerçevede hücresel yanıtlara neden olmaktadır ve bu yanıtlar hasar derecesi, hücre tipi, doz ve maruziyet süresi ile ilgilidir (*Martindale ve Holbrook*, 2002, s. 1-15). Buna göre stress yanıtı, hücre, doku ve organizmaların bir dizi biyolojik olayları başlatarak adaptasyon ve yaşam süresini etkileyen fiziksel, kimyasal ya da biyolojik faktör(ler)e gösterdiği yanıt olarak tanımlanabilir. Memeli hücrelerinde stress yanıtı, hücre içi ve moleküler düzeyde yedi temel yolak şeklinde sınıflandırılabilir (Tablo 2.3.1.) (*Demirovic ve Rattan*, 2013, s. 94-98). Hormetin olarak tanımlanan koşul ve faktörler, hafif düzey moleküler hasara neden olarak bir ya da birkaç stres yanıtı yolağını aktive etmekte ve hemodinamik yapıyı güçlendirmektedir. Ayrıca, hormetinler üç başlık altında toplanabilir: i) fiziksel hormetinler (egzersiz, termal şok ve iridasyon) ii) fizyolojik hormetinler (mental sorgulama ve odaklanma ya da meditasyon) iii) biyolojik ve besinsel hormetinler (enfeksiyonlar, mikro besin öğeleri, baharatlar ve diğer kaynaklar) (*Rattan*, 2012, s. 439-448).

Diyet, yaşla ilintili hastalıkların gecikmesi, sağlıklı yaşlanma ve yaşam süresini etkileyen önemli bileşenlerden biridir. Fonksiyonel besinler, bitkilerdeki besin öğeleri ve fitokimyasalların yaşla ilintili hastalıklarla ilişkili olduğu bilinmektedir (*Everitt ve diğerleri*, 2006, s. 11-31). Bunlardan, polifenoller, flavonoidler gibi çeşitli fitokimyasallar hafif düzeyde stres indukleyicidirler ve kinazlar ile transkripsiyon faktörlerinin stimülasyonuna neden olarak birçok gen ve antioksidan enzimler, faz-2 enzimleri ve protein şaperonlarının ifade edilmesinde rol almaktadırlar (*Son ve diğerleri*, 2008, s. 236-246; *Lee ve diğerleri*, 2014, s. 815-868). Kalori kısıtlaması ve resveratrol, kurkumin, kapsaisin, epikateşin, izotiyosiyanatlar ile bazı vitamin-mineraller gibi besin bileşenleri ise bilinen potansiyel besinsel hormetinlerdendir (*Hayes*, 2007, s. 147-159; *Mattson*, 2008b, s. 43-48; *Son ve diğerleri*, 2008, s. 236-246; *Demirovic and Rattan*, 2011, s. 437-444).

Hücreyi oksidatif hasara karşı koruyabilen moleküler antioksidan yanıt belirteçlerinden biri HO-1 enzimidir ve bu koruyucu etkisinden dolayı metabolik

hastalıkların patogeneğinde de önemli bir rol oynadığı öngörülmektedir (*Ryter ve diğerleri*, 2006, s. 583-650). Ayrıca, anti-inflamatuvar, antiproliferatif etkiler ile kardiyovasküler ve pulmoner hastalıklara karşı koruyucu etkiler gösterdiği bildirilmektedir (*Morse ve Choi*, 2002, s. 8-16). Hem'in, temel HO-1 indükleyicilerinden biri olması yanında ağır metaller, ısı şoku, ultraviyole A ışınları, hidrojen peroksit, nitrik oksit (NO) gibi hem olmayan faktörlerin de HO-1 enzim ifadesini indüklediği bilinmektedir (*Otterbein ve Choi*, 2000, s. 1029-1037). Bunun yanı sıra, resveratrol, kurkumin, epikateşin, epigallocateşin gallat (EGKG) ve rosmarinik asit gibi fitokimyasallar HO-1 indükleyici faktörlerdendir ve bu nedenle birer potansiyel besinsel hormetindirler (*Chen ve diğerleri*, 2005, s. 993-1000; *Rattan ve diğerleri*, 2009, s. 90-103; *Shah ve diğerleri*, 2010, s. 1951-1961; *Pullikotil ve diğerleri*, 2012, s. 1134-1145). Buna ek olarak, kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinde EGKG'nın osteogenezi indüklediği belirlenmiştir (*Chen ve diğerleri*, 2005a, s. 2039-2045).

Stres ya da ısı şok proteinleri, ısı şok yanıtın moleküler belirteçleridirler ve moleküler şaperonlar veya hücrel proteinler gibi davranan bu proteinler oldukça güçlü sitoprotektif etkilere sahiptir. Dolayısıyla, hafif düzey ısı şok; hücre içi antioksidan, tamir ve degradasyon aktivasyonu ile protein hasarı ve agregasyonunu azaltıcı etki göstermektedir (*Rattan*, 2005, s. 533-546). Bir ısı şok proteini olan HSP70'in indüklenmesi de iskemik kalp hastalıkları, diyabet, kanser ve nörodejeneratif hastalıklara karşı koruyucu etki göstermektedir (*Söti ve diğerleri*, 2005, s. 769-780; *Schmitt ve diğerleri*, 2007, s. 15-27). Ayrıca, ısı şok proteinleri kanser tanısında ilgili bir belirteç değilken bazı kanser türlerinde farklılaşma ve agresifleşme düzeyi sinyalcileridirler. Örneğin, HSP70 meme kanserinde kemoterapi direnci ile ilişkilendirilirken osteosarkoma kemoterapisinde artışı tedavi yanıtını olumlu yönde etkilemektedir (*Ciocca ve Calderwood*, 2005, s. 86-103). İnsan prostat kanserinde resveratrol HSP70 aracılı apoptozisi indüklediği ve aşırı ısı şok stresinden koruduğu bildirilmektedir (*Cardile ve diğerleri*, 2003, s. 4921-4926; *Putics ve diğerleri*, 2008, s. 65-76). Buna ek olarak ısı şok ve kurkumin birlikte hormetik etki göstermektedir (*Rattan ve diğerleri*, 2007, s. 112-121; *Rattan ve Ali*, 2007, s. 424-430). Ayrıca, resveratrol, diğer polifenoller, fenolik asitler, flavonoidler, ferulik asit, rosmarinik asit, kinetin ve çinko ısı

şok yanıtı gösterebilen potansiyel besinsel hormetinlerdir (*Putics ve diğerleri*, 2008, s. 65-75; *Rattan*, 2012c, s. 439-448).

Tablo 2.3.1. İnsan hücrelerinde temel moleküler stres yanıtı yolları, ilgili göstergeler ve etkenler

Yanıt	Stres faktörleri	Etkileyen faktörler	Moleküler belirteçler
Isı şok yanıtı	Isı, ağır metaller, antibiyotikler, protein denaturasyonu	Isı şok proteinler, proteozom ve diğer proteazlar	HSF-1'in nükleusa translokasyonu; HSP72 (HSPA1A) indüksiyonu
Katlanmamış protein yanıtı	Endoplazmik retikulumda katlanmamış ve yanlış katlanmış proteinler	Şaperonlar ve ko-şaperonlar	Transkripsiyon faktörü 6 (ATF-6); CHOP (GADD153) aktivasyonu
Otofajik yanıt	Besin kısıtlaması, hipoksi, hasarlı organeller	Otofagozom, lizozom	Değişmiş LC3-I ve LC3-II oranı; artmış lizozom sayısı; hasarlı mitokondri degradasyonu
DNA hasar yanıtı	Radyasyon, oksidanlar, serbest radikaller	DNA tamir enzimleri	ATRIP'in nükleusa translokasyonu; p53, p16, p21 kontrol noktası proteinleri, mortalin düzeyleri artışı
Antioksidan yanıt	Serbest radikaller, ROS, pro-oksidanlar	Nrf-2, hemoksinenaz, FOXO	HO-1; FOXO protein düzeyi
Sirtuin yanıtı	Enerji kısıtlaması	Sirtuins	Sirtuin-1 protein düzeyi; NAD/NADH oranı
İnflamatuvar yanıt	Patojenler, allerjenler, hasarlı makromoleküller	Sitokinler, NO sentaz, COX-2	NF-κB protein ve inflamatuvar interlökin düzeyi artışı

2.4. Enginar

Enginar (*Cynara cardunculus* var. *scolymus* L) ve yabancı enginar (*Cynara cardunculus* var. *altalis* DC) Akdeniz bölgesinde yetişen aynı zamanda Compositae olarak da bilinen Astraceae familyasındandır (*Christaki ve diğerleri*, 2012, s. 64-70). Akdeniz Diyeti'nde sıkça tüketilen enginar türleri yenilebilir taze yaprakları ve tablasından oluşan erken çiçeklenmiş enginar başı ya da capitula'sı fenolikler, inulin, posa, vitamin ve minerallerden zengindir (*Lattanzio ve diğerleri*, 2009, s. 131-144). Enginar, tüm dünyaya dağıtılmakla birlikte Akdeniz bölgesinde tarımsal ve ekonomik açıdan önemi oldukça fazladır ve İtalya en fazla enginar üretimini yapan ülkedir (510,141 ton/yıl) (*Ceccarelli ve diğerleri*, 2010, s. 197-201). Enginar üretiminin ülkemiz Kuzey Kıbrıs'ta da önemi artmakta ve tarımsal ekonomide önemli bir paya sahiptir (5,377

ton/yıl) (*Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti, Tarım ve Doğal Kaynaklar Bakanlığı, İstatistik ve Planlama Kurumu*, 2011, s. 42). Bunun yanında, besin ögesi ve fitokimyasal içeriği nedeniyle giderek önemi artan enginarla ilgili birçok bilimsel çalışma yapılmaya devam etmektedir. Enginarın temel besin ögesi içeriği ise Birleşik Devletler Tarım Bakanlığı (United States Department of Agriculture-USDA) veri tabanına göre tablo 2.4.1.'de ve Türkiye Ulusal Gıda Kompozisyon veri tabanına göre tablo 2.4.2.'de gösterilmiştir (USDA, 2014, s. 1-2; T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, 2014, s. 1-2). Enginarın mineral içeriği ile ilgili verilerin sınırlı olması yanında mevcut verilere göre mineral içeriği genotip, yetiştirilen bölge ve mevsimsel farklılıklardan etkilenmektedir (Pandino ve diğerleri, 2011a, s. 302-308). Bunun yanısıra, Astracea familyasının polifenol ve flavonoidlerden zengin olduğu bilinirken yine genotip, çevresel faktörler, işleme yöntemleri gibi etmenlerin bu fitokimyasalların miktar ve kalitesini etkilediği bildirilmektedir (Pandino ve diğerleri, 2012, s. 254-261). Gouveia ve Castilho (2012, s. 712-724), enginarın her 100 g'ındaki fenolik ve flavonoid içeriğini 233.6 ± 1.4 ve 97.0 ± 0.07 mg gallik asit eşdeğeri olarak saptamıştır. Ayrıca, enginar yapraklarının dış kısımlarında fenolik içerik çok düşük bulunup hidroksisinnamik asit bulunmazken tabla kısmında bulunduğu belirlenmiş; dolayısıyla fenolik içerik enginarın kısımları ile çeşidine göre farklılık göstermektedir (Pandino ve diğerleri, 2011b, s. 148-153). Buna ek olarak *Cynara carcondulus* L. ile yabani tiplerinin yaprak ve çiçek köklerinin antioksidan kapasitesi fenolik asit ve flavonoid içeriğine göre değişmektedir (Pandino ve diğerleri, 2011c, s. 417-422). Ayrıca, fenolik içerikteki farklılıktan dolayı bebek anzio enginarın antioksidan kapasitesi enginara göre daha yüksektir (Sohaimy, 2014, s. 15-20).

Enginar, çiğ, haşlanmış, buharda, kızarmış ve birçok farklı yemek tarifesinde kullanılarak sıklıkla tüketilmektedir. Üstelik, sadece sık tüketilen lezzetli bir besin değil aynı zamanda bileşiminde bulunan polifenoller, inulin ve flavonoidlerle ilişkili olarak bazı kronik hastalıklardan koruyucu etki göstermektedir. Ayrıca, taze ve kuru olarak hayvan yemi, alkollü içecek hazırlanmasında, kurutulmuş yaprak ekstraktları ile köklerinden elde edilen inulin ekstraktı tedavi amaçlı kullanılmaktadır (Pandino ve diğerleri, 2012, s. 254-261). Bunun yanısıra *Cynara carcondulus* L.'nin yaprak ve çiçek kökleri gereksiz atık kısımlar olarak kabul edilmekte ancak bu kısımlardan antioksidan

bileşikler ekstrakte edilerek değerlendirilebileceği öngörülmektedir (*Pandino ve diğerleri*, 2011c, p. 417-422).

Tablo 2.4.1. Enginarda bulunan besin öğeleri (USDA) (100 g)

Besin öğesi	Miktar	Besin öğesi	Miktar	Besin öğesi	Miktar
Su (g)	84.9	Vitamin C (mg)	11.7	Potasyum (mg)	370
Enerji (kcal)	47	Niasin (mg)	1.046	Fosfor (mg)	90
Protein (g)	3.27	Vitamin B6 (mg)	0.116	Sodyum (mg)	94
Yağ (g)	0.15	Tiamin (mg)	0.072	Kalsiyum (mg)	44
Karbonhidrat (g)	10.51	Riboflavin (mg)	0.066	Demir (mg)	1.28
Posa (g)	5.4	Folat (µg)	68		
		Vitamin A (IU)	13		
		Vitamin K (µg)	14.8		

Tablo 2.4.2. Enginarda bulunan besin öğeleri (TürKomp) (100 g)

Besin öğesi	Miktar	Besin öğesi	Miktar	Besin öğesi	Miktar
Su (g)	89.2	Vitamin C (mg)	9.6	Potasyum (mg)	425
Enerji (kcal)	32	Niasin (mg)	0.866	Fosfor (mg)	90
Protein (g)	2.46	Vitamin B6 (mg)	0.078	Sodyum (mg)	65
Yağ (g)	0.2	Tiamin (mg)	0.042	Kalsiyum (mg)	99
Karbonhidrat (g)	2.62	Riboflavin (mg)	0.040	Demir (mg)	0.88
Posa (g)	4.7	Vitamin A (IU)	13.3	Çinko (mg)	0.53
		Vitamin K ₁ (µg)	0.8		

Çok iyi bilinmektedir ki pişirme teknikleri tüm sebzelerde fiziksel ve kimyasal bazı değişikliklere neden olmaktadır. Dolayısıyla, çeşitli fitokimyasalları içeren enginardaki bileşenlerin miktarı da tarımsal uygulamalar ve pişirme tekniklerinden etkilenmektedir. Örneğin, enginarın buharda ve mikrodalga ile pişirmede antioksidan kapasitesinin arttığı, buharda pişirilen enginarların fenolik içeriğinin mikrodalgaya göre daha yüksek

olduğu belirlenmiştir (*Palermo ve diğerleri*, 2013, s. 7960-7968). Ayrıca, pişirme işlemi sonucu fenoliklerdeki artışın ısı etkisi ile serbestleşmeleri; azalışın ise degrade olmaları sonucu meydana geldiği öngörülmektedir. Yapılan bir çalışma sonucuna göre de pişmiş bebek enginarın total fenolik, kafeik asit, klorojenik asit ve CYN içeriği yüksek olduğundan serbest radikal yakalama kapasitesi de yüksektir (*Lutz ve diğerleri*, 2011, s. 49-54). Özetle, pişirme işlemleri fitokimyasalların biyoyararlılığını artırıcı etki gösterebilmektedir. Yapılan bir çalışma sonucuna göre enginarın coating yöntemi ile işlenmesi dipping yöntemine göre raf ömrünü daha olumlu etkilerken biyodegrade film, alüminyum kaynaklı çok katmanlı film ve polipropenil filmle paketlemeye kıyasla en uygun paketlemedir. Dolayısıyla enginarın minimum düzeyde işlenmesi, taşıma maliyetlerinin azalması, depolama alanı ve süresi ile ticarileştirilmesi için uygun olabilir (*Nobile*, 2009, s. 128-133). Pişmiş enginarın tüketildikten sonra bileşiminde bulunan biyoaktif moleküllerin emilim ve metabolizması üzerine yapılan pilot bir çalışmada hidroksisinnamik asit metabolitlerinin biyoyararlılığının besin matriksi, büyüklüğü, kimyasal bileşimi ve tüketilen miktar gibi faktörler ile sindirim enzimleri aktivitesi, safra salınımı ve karaciğer, böbrek, gastrointestinal epitel, barsak mikroflorasındaki biyodönüşüm ile ilgili olduğu bildirilmiştir (*Azzini ve diğerleri*, 2007, s. 963-969).

Enginar yaprakları 4. yüzyıldan bu yana alternatif tıpta kullanılmakta ve teröpatik etkileri İngiliz ve Avrupa Kodeksi, İngiliz Herbal Kodeksi ve Alman Komisyonu e-Monogramı'nda bildirilmektedir (*Nasser*, 2012, s. 6-13). Son zamanlarda ise hepatoprotektif, dispeptik, antikarsinojenik, antioksidatif, antibakteriyel, koloretik, kolesterol düşürücü ve safra salınımı ile ürinatif etkileri olduğu bildirilmektedir (*Kraft*, 1997, s. 369-378).

Kolesterol düşürücü etkileri:

Hiperkolesterolemi, artmış kardiyovasküler hastalık riski ile ilgilidir ve enginar yaprağı ekstraktı (EYE) bunun için bir tedavi seçeneği olarak öngörülmektedir. Yapılan hayvan, vaka-kontrol ve klinik çalışmalara göre EYE kolesterol düşürücü etki göstermekte ve in vitro bir çalışmaya göre bu etkisini kolesterol biyosentezini azaltarak göstermektedir (*Pittler ve diğerleri*, 2006, s. 1-17). Ayrıca, sınırlı sayıda randomize çift kör klinik

çalışmaya göre total kolesterol (TK) düzeyi >210 mg/dl olan hiperlipidemili bireylerde EYE, TK'yı anlamlı bir şekilde düşürmüştür (*Petrowicz ve diğerleri*, 1997, s. 147). Yine, 143 hiperkolesterolemili (TK >280 mg/dl) birey ile yapılan randomize plasebo kontrollü çift kör çok merkezli bir çalışmada 6 hafta boyunca rastgele plasebo ve 1800 mg EYE verilmesi sonucu TK ve düşük dansiteli lipoprotein (LDL) düzeyleri EYE alan grupta anlamlı bir düşüş göstermiştir (*Englisch ve diğerleri*, 2000, s. 260-265). Bir diğer randomize çift kör plasebo kontrollü çalışmada ise 75 hiperkolesterolemili bireye (TK 230-300 mg/dl) 12 hafta boyunca rastgele 1280 mg EYE ve plasebo verilmiş, EYE verilen grupta plasebo verilen gruba göre TK düzeylerinde anlamlı bir düşüş gözlenirken LDL, yüksek dansiteli lipoprotein (HDL) ve trigliserit düzeyinde bir değişiklik gözlenmemiştir (*Bundy ve diğerleri*, 2008, s. 668-675). Randomize çift kör plasebo kontrollü bu üç çalışmanın analiz sonucuna göre EYE'nin hiperkolesterolemide bir tedavi seçeneği olarak önerilebilmesi için daha ileri çalışmalar gereklidir (*Wider ve diğerleri*, 2013, s. 1-28). Bunun yanında, EYE'de bulunan flavonoidlerin insan endotel hücrelerinde endotelyal tip nitrik-oksit sentaz (eNOS) gen ifadesini artırdığı belirtilmektedir (*Li ve diğerleri*, 2004, s. 926-932). Ayrıca, EYE'nin yanısıra enginar suyu ile yapılan bir çalışmada ise 6 hafta boyunca 28 hiperlipidemik bireyden 18'ine 20 ml/enginar suyu verilmiştir. Ancak TK ve LDL düzeylerinde bir düşüş saptanmazken endotel fonksiyonlar üzerine olumlu etkiler gösterdiği belirlenmiştir (*Lupatelli ve diğerleri*, 2004, s. 775-782).

Hepatoprotektif Etkileri:

Enginar ekstraktları alternatif tıpta karaciğer sorunlarına karşı ve kısmi hepatotektomiden sonra karaciğer rejenerasyonunu geliştirici bir etmen olarak kullanılmaktadır. İn vitro ve in vivo çalışma sonuçlarına göre enginar ekstraktları oksidatif stres indüklü hepatotoksisiteden koruyucu etki göstermekte ve bu bileşimlerinde bulunan fenolik bileşiklerle ilişkilidir (*Speroni ve diğerleri*, 2003, s. 203-211). Yine, tert-bütildidroperoksit (t-BPH) indüklü rat hepatosit hücre kültürü çalışma sonuçlarına göre EYE, GSH seviyesindeki azalışı önlemiştir (*Gebhardt*, 1997, s. 279-286; *Gebhardt ve Fausel*, 1997, s. 669-672). Ayrıca, karbon tetra klorid (CCl₄) indüklü

rat hepatositleri ile yapılmış in vivo çalışma sonuçlarına göre EYE, GSH seviyesini ve GPx aktivitesini artırmıştır (*Mehmetçik ve diğerleri*, 2008, s. 475-480). Rat hepatosit hücre kültürü ve insan hepatoma hücre (HepG2) kültürü ile yapılan bir diğer çalışmada da enginar ekstraktı GSH düzeyindeki azalışı önlerken HepG2 hücrelerinin viyabilitesini azaltmış ve apoptozisi indüklemiştir (*Miccadei ve diğerleri*, 2008, s. 276-283). Sonuç olarak, enginar ekstraktının antioksidan aktivitesine bağlı olarak hücreleri oksidatif strese karşı koruyarak potansiyel hepatoprotektif etki gösterdiği öngörülmektedir.

Koloretik ve Dispeptik Etkileri:

EYE, anti-dispeptik ve koloretik etkilerinden dolayı gastroenterolojide kullanılmaktadır. EYE'nin koloretik aktivitesine bağlı olarak kolorezis ve safra bileşiklerinin oluşumundaki artışı indüklediği bildirilirken dispepsi tedavisi için de önerilebileceği bildirilmektedir (*Kirchhoff ve diğerleri*, 1994, s. 107-115; *Rodriguez ve diğerleri*, 2002, s. 687-693). Reflü, ülser, dismotilite benzeri semptomlar genel dispeptik semptom şikayetleri olarak bilinmektedir ve bu tarz şikayetleri olduğunu beyan eden 454 sağlıklı birey ile yapılan bir çalışmada 2 ay boyunca rastgele 320 mg ve 640 mg EYE verilmiştir. Napean Dispepsi İndeksi (NDİ) değerlendirmesine göre EYE verilen her iki grupta da başlangıçtaki semptomlara kıyasla 2 ay sonundaki semptomlarda azalış olduğu belirlenmiştir (*Marakis ve diğerleri*, 2002, s. 694-699). Bir diğer plasebo kontrollü çift kör çok merkezli çalışmada fonksiyonel dispepsisi olan 244 bireye 6 hafta süresince 640 mg EYE ile plasebo verilmiş ve NDİ değerlendirmesinde plaseboya göre EYE verilen grupta semptomlarda daha iyi düzelmeler olduğu ve hastalıkla ilişkili yaşam kalitesinde artış olduğu belirlenmiştir (*Holtman ve diğerleri*, 2003, s. 1099-1105).

Antioksidatif Etkileri:

Oksidatif stress, kardiyovasküler hastalıklar, kanser gibi birçok kronik hastalığın ortak nedeni olarak kabul edilmektedir. Enginar ise bileşiminde bulunan fenolikler ve flavonoidlere bağlı olarak antioksidan aktivite gösterebilmektedir. Küçükgergin ve diğerleri (2010, s. 264-274), hiperkolesterolemik ratlarda kardiyak ve hepatik pro-oksidan ve antioksidan dengesinde olumlu etkileri olduğunu belirtmişlerdir. EYE'nin

oksidatif stresi doza bağımlı inhibe edici etki gösterdiği bildirilmektedir (*Garcia ve diğerleri*, 2000, s. 661-665). Örneğin, sulu ve etanolik enginar ekstraktları endotel ve monosit hücre kültürlerinde inflamatuvar belirteçleri ve okside-LDL indüklü oksidatif strese karşı doza bağımlı koruyucu etki göstermektedir (*Downar ve diğerleri*, 2002, s. 2897-2908). Bunun yanı sıra, in vitro çalışmalarda *Cynara carcondulus* L. ekstraktının doza bağımlı olarak antioksidan ve antimikrobiyal etki gösterdiği bildirilmektedir (*Kukić, ve diğerleri*, 2008, s. 861-868). Ayrıca, iki farklı enginar türünden elde edilen ekstraktlarla yapılan bir çalışmada da enginar ekstraktlarının DLD-1 kolorektal kanser hücre boyu üzerinde doza ve zamana bağımlı sitotoksik etki gösterdikleri belirlenmiştir (*Şimşek*, 2012, s. 1)

2.4.1. Cynarin (CYN)

Enginar ekstraktının sağlık etkileri ile ilgili çalışmalarda bu etkileri klorojenik asit, kafeik asit, CYN ve flavonoidler gibi antioksidan fenolik bileşenlerle ilişkilendirilirken çoğunlukla CYN'ye atfedilmektedir (*Gouveia ve Castilho*, 2012, s. 712-724; *Alonso ve diğerleri*, 2006, s. 267-270; *Lattanzio ve diğerleri*, 2009, s. 131-144). CYN, enginar, deve diken ve aspir gibi *Astraceae* familyasında yer alan bitkilerde bulunan bir dikafeoilkinik asit (dicaffeoylquinic acid) türevidir (*Slanina ve diğerleri*, 2001, s. 3383-3385). İlk kez enginardan 3,5-dimetoksi-1,4-dihidroksisikloheksan karboksilik asit olarak izole edilmiştir (*Panizzi ve Scarpati*, 1954, s. 1062). Daha sonra 1973 yılında kafeoilkinik asitler sınıflandırılmış ve 1976 yılında Uluslararası Kuramsal ve Uygulamalı Kimya Birliği (International Union of Pure and Applied Chemistry-IUPAC)'nin terminoloji değişikliğine göre 1,5-O-dikafeoilkinik asit olarak bilinen CYN, 1,3-O-dikafeoilkinik asit olarak değiştirilmiştir (*IUPAC-IUB CBN*, 1976, s. 23-31) (Şekil 2.4.1.1.). Başlıca kafeoilkinik asit türevlerinden olan CYN enginar yaprakları ve baş kısmında bulunmaktadır (*Negro ve diğerleri*, 2012, s. 244-252). Enginarın metanolik ekstraktlarında %1.5 oranında bulunurken enginar ekstraktlarının temel bileşenidir ve triptik sindirime, kaynamaya, aside karşı dayanıklıdır (*Gebhart*, 1997, s. 279-286; *Lattanzio ve diğerleri*, 2009, s. 131-144; *Adzet ve Puigmacia*, 1985, s. 447-453). Ayrıca, taze ve kurutulmuş enginar yapraklarında eser miktarda bulunmasına rağmen

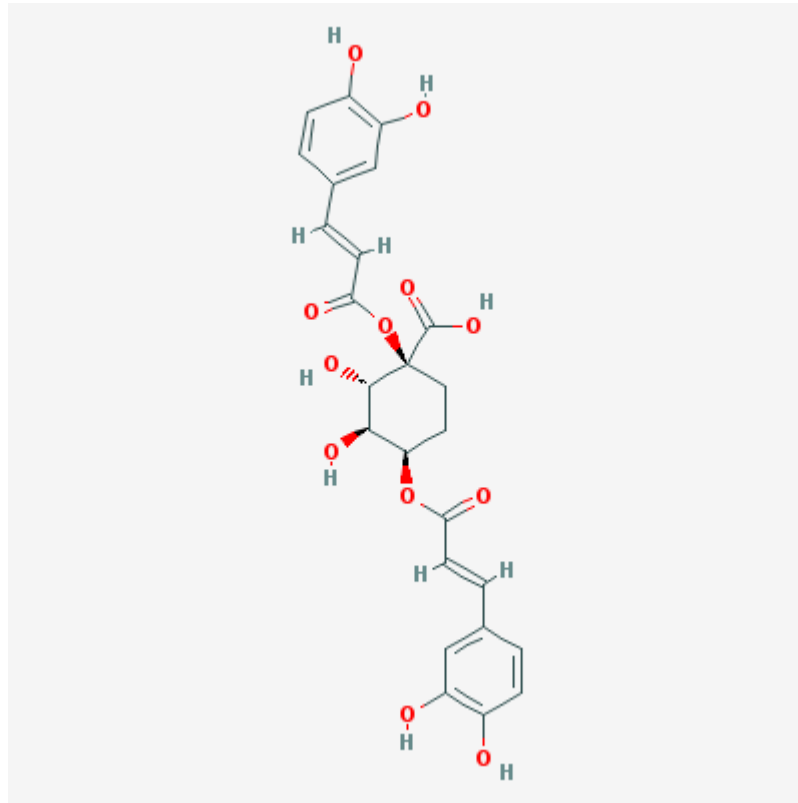
ekstraksiyon işlemi sırasında 1,5-O-dikafeoilkinik asit sıcak su içerisinde transesterifikasyona uğrayarak CYN'ye dönüşmektedir (Bradley, 2006, s. 34-36). Yapılan bir çalışmada ise pişirilmiş bebek enginarındaki CYN miktarının ısı etkisi ile dikafeoilkinik asit izomerizasyonu ve kafeik asit esterifikasyonu sonucu 2 katına çıktığı bildirilmiştir (Lutz, 2011, s. 49-54). CYN'nin potansiyel sağlık etkileri ise koloretik ve kolesterol düşürücü, hepatoprotektif, anti-aterosklerotik, anti-HIV, antioksidatif, anti-diyabetik, anti-karsinojenik, immunmodulator etkileri şeklinde özetlenebilir (Ernst, 2000, s. 71; Ebadi, 2007, s. 86; Barnes ve diğerleri, 2007, s. 67-69) (Tablo 2.4.1.1.).

Koloretik ve kolesterol düşürücü etkileri:

Ratlarla yapılan bir çalışmaya göre CYN, serum kolesterolü anlamlı bir şekilde düşürmüştür (Wojcicki, 1978, s. 143-145). Primer hiperlipidemili bireylerle yapılan bir çalışma sonucuna göre ise 750 mg ve 1500 mg CYN, toplam serum lipidleri, trigliserit ve fosfolipid konsantrasyonunu düşürmüştür (Bradley, 2006, s. 34-36). Ancak bir diğer çalışmada ailesel tip IIa ve tip IIb hiperlipidemili bireylere üç ay süresince verilen 250 mg ve 750 mg CYN, serum kolesterolü ve trigliserit seviyelerinde herhangi bir değişikliğe neden olmamıştır (Heckers ve diğerleri, 1977, s. 249-253). Ayrıca, klinik çalışma sonuçlarına göre 60-1500 mg/gün CYN alımının serum kolesterol ve trigliserit konsantrasyonlarının düşmesinde etkili olduğu belirtilmektedir (Barnes ve diğerleri, 2007, s. 67-69).

Anti-aterosklerotik etkileri:

eNOS, NO sentezinden sorumludur ve CYN'nin 100 μ M'a kadar eNOS aktivitesini artırıcı bir etkisi belirlenmemiştir (Li ve diğerleri, 2004, s. 926-932).



Şekil 2.4.1.1. CYN (1,3-O-dikafeoilkinik asit) (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Hepatoprotektif etkileri:

Adzet ve diğerleri (1987, s. 612-617), CYN'nin rat hepatositlerinde CCl_4 indüklü toksisteye karşı koruyucu etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Bir diğer çalışmada ise 3 μM CYN'nin t-BPH indüklü malondialdehit (MDA) üretimini azalttığı ve yarı maksimal etkili konsantrasyon (EC_{50}) değerinin 12.5 μM olduğu belirlenmiştir (Gebhart, 1997, s. 279–286; Gebhart ve Fasuel, 1997, s. 669-672).

Anti-HIV etkileri:

MT-2 insan T-hücre lökemi hücreleri ile yapılan bir çalışmada CYN'nin EC_{50} değeri 25 μM , büyümeyi inhibe edici medyan letal doz (LD_{50}) değeri ise 250 μM olarak saptanmıştır (Slanina ve diğerleri, 2001, s. 3383–3385).

Antioksidatif etkileri:

Fenolik bileşiklerin antioksidan aktivitesinin aromatik halkada bulunan hidroksil grupları ile ilişkili olduğu bildirilmektedir. Şöyle ki hidroksil gruplarının sayısındaki artış ve de ikinci hidroksil grubun orto ya da para pozisyonunda olması antioksidan aktivitedeki artışla ilgilidir. CYN'nin hidroksil grupları her iki özelliği de sağladığından klorojenik asit, 1-kafeoilkinik asit, cynorosit, luteolin rutinosit, apigenin rutinosit gibi enginarada bulunan bu bileşenlere kıyasla daha fazla antioksidan aktivite göstermektedir (Wang ve diğerleri, 2003, s. 601-608). Jun ve diğerleri (2007, s. 244-248), CYN'nin 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) ve 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) (ABTS) radikallerine karşı antioksidan aktivite gösterdiğini bildirmiştir. CYN'in ayrıca linoleik asit oksidasyonunu inhibe ettiği, hidroksil radikalleri ve süperoksit anyonlarını temizlediği belirtilmektedir. Bunun yanında, 3T3 deri hücrelerinde 51 µM CYN'nin demir (Fe^{2+}) indüklü ve 45-51 µM CYN'nin 2,20-azobis(2-amidinopropan)dehidroklorit (AAPH) indüklü oksidatif stresi inhibe ettiği bildirilmiştir (Danino ve diğerleri, 2009, s. 1273–1280). Özetle, CYN'nin antioksidan aktivite göstermesi ROS temizleme kapasitesi ile ilgilidir.

Antidiyabetik etkileri:

CYN'nin potansiyel antiglikatif etkileri BSA-glikoz sistemi ile gösterilmiştir. Buna göre CYN, ileri glikolize son ürünleri (AGE) doza bağımlı (3 µM – 40 µM) inhibe edici etki göstermektedir (Sun ve diğerleri, 2012, s. 3260–3265).

Antikarsinojenik:

Yapılan bir çalışmada CYN'nin HeLa hücrelerinde 400 µM'a kadar herhangi bir farklılığa neden olmadığı bildirilirken lökemik hücrelerde %20 oranında sitotoksik etki gösterdiği bildirilmiştir (Slanina ve diğerleri, 2001, s. 3383–3385; Atasever ve diğerleri, 2003, s. 143-150).

İmmunmodulator etkileri:

T-hücreleri dışardan gelen spesifik stimulusa yanıt olarak immün aktiviteyi başlatmaktadır. Ayrıca, pozitif immün yanıt ile negatif immün yanıt arasındaki denge, T hücrelerinin devamlılığı ve sağlık ile ilişkilidir. Dolayısıyla, aşırı yanıt ve yetersiz immün yanıt patolojik olmakla birlikte aşırı yanıtla ilgili gelişen birçok otoimmün hastalıklar mevcuttur. Bununla ilgili olarak yapılan bir çalışmada ise CYN, T-hücre reseptörü olan CD28'i bloke ederek immünmodulator etki gösterdiği bildirilmiştir (*Dong ve diğerleri*, 2009, s. 375-381).

Tablo 2.4.1.1. CYN'in potansiyel olumlu sağlık etkileri

Örneklem	Doz	Parametre	Potansiyel sağlık etkileri	Kaynak
Primer hipertrigliseridemili bireyler	750 mg 1500 mg	Toplam serum lipidleri ↓ Trigliserit ↓ Fosfolipidler ↓	Koloretik ve kolesterol düşürücü	Bradley, 2006
Ratlar		Serum kolesterol ↓		Wojcicki, 1978
Ailesel tip IIa ve IIb dirençli hiperlipoproteinemi	250 mg 750 mg	Serum kolesterol → Serum trigliserit →		Heckers ve diğlerleri, 1977
Rat hepatositleri	-	CCl ₄ toksisitesi ↓	Hepato-protektif aktivite	Adzet ve diğlerleri, 1987
Rat hepatositleri	3 µM	t-BPH indüklü MDA üretimi ↓		Gebhart, 1997
Rat hepatositleri	3 µM	t-BPH indüklü MDA üretimi ↓ LDH sızıntısı ↓		Gebhart ve Fasuel, 1997
İnsan umbilikal ven endotel hücreleri	1 µM - 100 µM	eNOS →	Anti-aterosklerotik	Li ve diğlerleri, 2004
MT-2 hücreleri	25 µM - 250 µM	HIV-1 replikasyonu ↓	Anti-HIV	Slanina ve diğlerleri, 2001
B- ve T- hücreleri	1 µM - 1000 µM	CD28 ilişkili T-hücre aktivasyonu ↓	Immunmodulator	Dong ve diğlerleri, 2009
BSA-glikoz sistemi	1.5 µM – 20 µM	AGE ↓	Antidiyabetik	Sun ve diğlerleri, 2012
HeLa hücreleri	400 µM	Non-sitotoksik	Antikarsinojenik	Slanina ve diğlerleri, 2001
Lökemik hücre dizileri ve akut lenfoblastik lökemik bireylerin blast hücreleri	500 µM	Sitotoksik		Atasever ve diğlerleri, 2003
ROS temizleme Trolox eşdeğeri antioksidan kapasite (TEAC)	14.09 µM 28.85 µM	DPPH karşıtı ABTS karşıtı	Antioksidatif	Jun ve diğlerleri, 2007
3T3 cells	51 µM 45 µM	%75 ↓ Fe ²⁺ indüklü oksidatif stress %72 ↓ AAPH indüklü oksidatif stres		Danino ve diğlerleri, 2009

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç Listesi

3.1.1. Kimyasallar

1 α ,25-Dihidroksivitamin D3 (Vit-D) (Calcitrol) (Sigma #D1530)
 β -Gliserofosfat (CALBIOCHEM #35675)
Alizarin Red S (Sigma-Aldrich #5533)
BSA (Sigma #A4503)
Criterion XT %12 Bis-Tris (BIO-RAD #345-0118)
CYN (Sigma-Aldrich #SLBB9809V)
DMEM (BioWhittaker #BE12-604F)
DMSO (BioWhittaker #BE17-512F)
DPBS (Dulbecco's Phosphate without Ca ve Mg) (BioWhittaker #BE17-512F)
Etanol (CCS Healthcare AB 1680643)
FBS (Thermo Scientific SV30143.03)
Giemsa's azur eosin metilen mavi solusyon (Bie & Berntsen #1.09204.0500)
Metanol (VWR #20837.320)
MTT (Sigma-Aldrich #M2128-1G)
Penisilin/streptomisin (BioWhittaker DE17-602E)
PMSF (Sigma #P7626)
SeeBlue (Invitrogen LC5925)
Triton X-100 (MP Biomedicals #194834)
Trizma base (Sigma-Aldrich #T1503)
Trypsin-EDTA (BioWhittaker #BE17-611E)

3.1.2. Antikorlar

Birincil Antikorlar

β -Aktin (A5441, Sigma-Aldrich)
HO-1 (OSA-110, Enzo LifeSciences)
HSP70 (SPA-810, Stressgen)

İkincil Antikorlar

Mouse-HRP (P0447, Dako)

Rabbit-HRP (P0399, Dako)

3.1.3. Kitler

Protein Assay (BIO-RAD #500-0006)

3.1.4. Plaklar ve flasklar

6-gözeli plak (TPP) (9.5 cm²)

12-gözeli plak (Thermo Scientific) (3.8 cm²)

96-gözeli plak (SARSTEDT) (0.38 cm²)

T75 (TPP) (75 cm²)

3.1.5. Makineler

Countess otomatik hücre sayım cihazı (Invitrogen)

CO₂ inkübatörü (Heraeus BBD6220)

Invert mikroskop (Zeiss Axiovert 25)

Mikroplak okuyucu (BIO-RAD model 550)

3.1.6. Yazılım programları

MRGrab versiyon 1.0.0.4 (Zeiss)

Axiovision versiyon 4.7.1.0 (Zeiss)

Mikroplak manager versiyon 5.2 (BIO-RAD)

3.2. Yöntemler

3.2.1. Hücreler

Bu araştırmada normal diploid insan deri hücreleri (FSF-1), telomeraz-immortalize mezenkimal kök hücreleri (hTERT-MSC) ve servikal kanser hücreleri (HeLa) ile çalışılmıştır.

FSF-1 hücreleri: Bu insan yüzü deri hücreleri dizisi, LVMH Research, St. Jean de Braye, Fransa'dan temin edilen ve birçok araştırmada kullanılan orta yaşlı, sağlıklı Fransız bir kadının göz kapağından izole edilmiştir. Bu hücrelerin proliferatif yaşam süresi 65 pasaj (P) olarak bilinmektedir ve <22 P genç FSF-1 hücreleri, P22-52 orta yaşlı FSF-1 hücreleri ve >P56 yaşlı FSF-1 hücreleri olarak tanımlanmaktadır (*Jørgensen ve diğerleri*, 2014, s. 105-110). Bu çalışmada ise P28-37 olan orta yaşlı FSF-1 hücreleri ile çalışılmıştır.

hTERT-MSC hücreleri: İnsan kemik iliği stromal hücrelerinden (hMSC) insan telomeraz katalitik subunit geninin retroviral transdüsyonu ile immortalize olmuş mezenkimal kök hücre (hTERT-MSC) dizisi elde edilmiştir. Bu hücre boyu normal hücre fonksiyonlarını yerine getirebilen sınırsız sayıda proliferasyon ve farklılaşma kapasitesi ile in vivo kemik oluşturma özelliğine sahiptir (*Simonsen ve diğerleri*, 2002, s. 592-596).

HeLa hücreleri: Bu hücre boyu Henrietta Lacks isimli bir kadının 1951 yılında agresif serviks adenokarsinoma hücrelerinden izole edilmiştir. John Hopkins (Baltimore, Maryland) laboratuvarında tanı için Dr. George O. Gey tarafından alınan biyopsi örneğinden hücre kültürüne aktarılmış olan ilk insan hücre boyudur. Şu anda tüm dünyada HeLa ismi ile araştırmalarda kullanılmaktadır (*Lucey ve diğerleri*, 2009, s. 1463–1467).

3.2.2. Hücre Kültürü

Bu çalışmada tüm hücreler T75 (75 m²) doku kültür flasklarında 12.5 ml L-glutamin, glukoz içeren ve %10 fetal bovin serum (FBS) ile 100 U/ml pensilin/streptomisin eklenmiş Dulbecco's minimum elzem besiyeri (Dulbecco's minimum essential medium-DMEM)'nde, 37 °C, %5 CO₂, %5 atmosferik hava ve %95 nem oranına sahip ortamda inkübe edilmiştir. Hücre yoğunluk oranı %90-95 oranında olduğu zaman pasajlama yapılmıştır. Bu işlem sırasında DMEM flasktan alındıktan sonra ortamı DMEM'den iyice temizleme için hücreler Dulbecco's fosfat tuz tampon (DPBS) ile yıkanmış ve 1.6 ml %0.25 tripsin/EDTA solusyonu ile flasktan ayrılmaları için 5 dakika muamele edilmiştir. Tekrar DMEM eklenip tripsin aktivitesi durdurularak 1:2 veya 1:4 oranında pasajlama işlemi yapılmıştır. Tüm bu işlemler steril hava akımlı ventilator içerisinde yürütülmüştür.

3.2.3. Hücre Sayımı

Tüm hücre sayım işlemleri Countess otomatik hücre sayım cihazı ile yapılmıştır. Hücre sayım işlemi her örnek için en az 2 kez tekrar edilmiş ve değerlerin ortalaması kullanılmıştır.

3.2.4. Proliferasyon ve Hayatta Kalım

Farklı CYN konsantrasyonlarının hücrelerin proliferasyon ve hayatta kalımı üzerine etkisi hücre sayımı yapılarak 6 güne kadar izlenmiştir. Hücreler, her gözede ~70,000 hücre (~7400 hücre/cm²) olacak şekilde 6-gözeli plaklara ekilerek 24 saat plaklara tutunması için beklendikten sonra ilgili CYN konsantrasyonları DMEM içerisinde eklenmiştir. Daha sonra birinci, üçüncü, beşinci veya altıncı günler hücre sayımı yapılmıştır.

3.2.5. CYN Konsantrasyonları

CYN (1,3-O-dikafeoilkinik asit) 5 mg'lık toz şeklinde Sigma-Aldrich firmasından temin edilerek 4°C'de muhafaza edilmiş ve her 5 mg toz CYN, 1 ml methanolde çözülerek 9680 µM olan stok CYN solusyonu hazırlanmıştır. Daha sonra bu stok solusyon DMEM ile dilue edilerek istenen konsantrasyonlar elde edilmiştir.

3.2.6. Giemsa Boyama ile Morfoloji Analizi

Hücreler, her gözede ~70,000 hücre (~ 7400 hücre/cm²) olacak şekilde 6-gözeli plaklara ekilerek 24 saat plaklara tutunması için beklendikten sonra ilgili CYN konsantrasyonları DMEM içerisine eklenmiştir. İlgili CYN konsantrasyonları ile üç gün muamele edildikten sonra DMEM ortamdan uzaklaştırılarak hücreler iki kez DPBS ile yıkandıktan sonra buz soğukluğunda %100 metanol ile fikse edilerek 20 dakika -18°C'de inkübe edildikten sonra methanol ortamdan uzaklaştırılarak her gözeye 1 ml giemsa boya solusyonu (pH 6.0-7.0) eklenmiştir. Bu şekilde oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildikten sonra her göze 6 kez dH₂O ile yıkanmış ve plaklar ters çevrilerek bir gece kurumaya bırakılmıştır.

3.2.7. Mikrofotograflama

Giemsa boyama yapılmış hücreler ve yaşayan hücrelerin morfolojisi faz-kontras mikroskop (Zeiss Axiovert 25) ile fotoğraflanarak analiz edilmiştir. Hücreler 2.5x objektif, 10x objektif, 20x objektif ve manuel faz-kontras ayarlar ile fotoğraflanmıştır. Ayrıca tüm fotoğraflar en yüksek çözünürlükte (1300x1030 piksel) ve her büyütme oranında ölçek çubuğu eklenerek kaydedilmiştir.

3.2.8. MTT Testi ile Toksisite

MTT Testi çözünebilir sarı tetrazolyum tuzunun indirgenerek çözünmez mor formazan kristallerinin birikmesi prensibine dayanmaktadır. Bu reaksiyon hücre viyabilitesine bağlı olarak mitokondriyal redüktaz aktivitesinin göstergesidir. Oluşan formazan kristallerinin absorbanı ölçülerek miktar tayini yapılmaktadır. Dolayısıyla, farklı

konsantrasyonların mitokondriyal aktivitesi ve toksisitesi belirlenebilmektedir (*Kasımoğulları ve diğerleri*, 2014, s. 1-8).

Bu çalışmada, CYN toksisitesini belirlemek için iç kısımdaki gözelere her gözede ~1700 hücre (~450 hücre/cm²) olacak şekilde ekilerek dış kısımdaki gözelere ise sadece DMEM eklenerek 96-gözeli plaklarda 24 saat beklenmiştir. Daha sonra sekiz farklı CYN konsantrasyonu 150 µL olacak şekilde altışar gözeye eklenerek üç gün inkübe edilmiştir. Bundan sonra hücrelerin olduğu gözelerin her birine 25 µL MTT solusyonu (3.5 mg/mL) eklenerek 2-3 saat 37°C’de inkübe edilip mevcut DMEM ortamdan uzaklaştırılarak her bir gözeye 150 µL olacak şekilde 1:1 DMSO:EtOH solusyonu eklendikten sonra mikropalaklar 10-15 dakika karıştırıcı üzerinde bekletilerek A_{595nm} ve A_{650nm} referans ile model 550 (Bio-Rad) mikropalak okuyucuda ölçüm yapılmıştır.

Ayrıca, sitotoksosite indeksi aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır (*Atasever ve diğerleri*, 2003, s. 143-150).

$$\text{Sitotoksosite İndeksi (\%)} : \frac{(1 - \text{ortalama konsantrasyon absorbanısı})}{\text{ortalama kontrol absorbanısı}} \times 100$$

3.2.9. Western Blotting

İmmunoblotting ya da protein blotting olarak da bilinen Western Blotting (WB) metodu üç temel adımda uygulanmaktadır. Bunlar: i) protein karışımında proteinlerin büyüklüklerine göre jel elektroforezle ayrılması ii) ayrıştırılmış proteinlerin membrana aktarılması iii) hedef proteinin özel antikolar ile muamele edilerek bu protein bantlarının X-ray filmde görünür hale getirilmesi

Bu çalışmada, flasklardaki DMEM uzaklaştırıldıktan sonra hücreler önce buz soğukluğunda DPBS ile yıkanıp yine aynı soğuklukta 1 ml DPBS ile özel kazıma çubuğu kullanılarak flasklardan kazınarak ependorf tüplerine aktarılıp 3500 rpm’de santrifüjlenerek pelletler elde edilip -80°C’de daha sonra kullanılmak üzere saklanmıştır.

Pelletler, 50-100 µL lizis tamponunda (Tablo. 3.2.9.1.) çözündürülerek 3 saat buz içerisinde bekletilmiştir. Daha sonra 13000 rpm’de santrifüjlenerek supernatant başka

bir tüpe aktararak protein miktar tayini için bovin serum albumin (BSA) referans kabul edilerek Bradford analizi yapılmıştır. Bunun için doğrusal bir eğri elde etmek amacıyla 0.05-0.5 mg/ml aralığında referans protein dilusyonları (1:5 dilue) hazırlanmış 96-gözeli plağa tüm referans solusyonlardan ve de örnek solusyonlardan 10 µl eklendikten sonra bu gözelerin her birine 200 µl Bradford ayracı eklenerek 15 dakika muamele edilmiştir. Daha sonra ise 595_{nm}'de mikropalak okuyucu ile absorbans ölçülerek standart eğri çizilip örnek solusyonların protein miktarları saptanmıştır.

Bundan sonra ise her bir örnek solusyon lizis tampon ile dilue edilerek 14 µl'de 1 mg/ml protein içerecek şekilde hazırlanıp üzerine örnek tampon (4x), XT indirgeyici ayraç (20x) eklenerek 5 dakika 100°C'de ısıtılmış ve 5 µl molekül ağırlığı belirteci olan SeeBlue eklenip her 20 µl örnek %12 Bis-Tris SDS PAGE jele yüklenerek 200 voltajlık elektroforezde 500 ml XT-MES tampon içerisinde 35-45 dakika yürütülmüştür. Bu işlem tamamlandıktan sonra ise jel, soğuk towbin tampon (Tablo 3.2.9.2.) içerisinde nitroselüloz membrana (BIO-RAD) aktarılacak üzere 90 dakika 100 voltaj, 5°C'de Criterion Blotter ile blotlama yapıldıktan sonra tüm membran yüzeyi immün boyama işlemi için %4'lük yağsız süt tozu solusyon ile en az 1 saat oda sıcaklığında veya 24 saat 4°C'de inkübe edilmiştir. Daha sonra ise birincil antikor ile her antikora özel miktar ve sürede (Tablo 3.2.9.3.) inkübe edildikten sonra 3x 5 dakika PBS ile tüm yüzey yıkanarak ikincil antikor ile yine her antikora özel miktar ve sürede (Tablo 3.2.9.3.) inkübe edildikten sonra 3x 5 dakika PBS ile tüm yüzey yıkanıp floresan bileşik ECL (GE-Healthcare) ile tüm yüzey 5 dakika boyunca yıkanarak muamele edilmiş ve membran karanlık odada AGFA Curix 60 ile filme (Kodak Medical Film) aktarılmıştır.

Tablo 3.2.9.1. Lizis tampo

Tris-HCl	40 µL
Inhibitör	40 µL
Triton X-100	20 µL
PMSF	20 µL
dH ₂ O	880 µL

Tablo 3.2.9.2. Towbin tamponu

Trizma baz	4.5 g
Glisin	21.6 g
%96 EtOH	300 mL
dH ₂ O	1.2 L

Tablo 3.2.9.3. WB işleminde kullanılan antikorlar

Antikor	Konsantrasyonlar	İnkübasyon süresi
Birincil antikorlar		
β-Actin (42 kDa)	1:10000	15-30 dakika
HO-1 (32 kDa)	1:500	3 saat
HSP 70 (70 kDa)	1:1000	3 saat
İkincil antikorlar		
Mouse-HRP	1:500-1:10000	15 dakika-3 saat
Rabbit-HRP	1:500-1:1000	1-18 saat

3.2.10. Yazılım Programları ve Veri Analizi

WB sonuçları eldesinde ilgili proteinlerin ifade seviyelerini nicelleştirmek için imaj analiz programı Image J kullanılmıştır. Bunun için ilk olarak WB filmleri en az 600 dpi çözünürlükte tarayıcı ile taranarak online yönerge (<http://lukemiller.org/index.php/2010/11/analyzing-gels-and-western-bLOTS-with-image-j/>) doğrultusunda nicelleştirme işlemleri yapılmıştır. Bu işlemle özetle, immunoblot bantlarının etrafı manuel olarak kare kutu ile seçilmekte ve bu alan içerisindeki bandın renk yoğunluğu ve kalınlığına göre ilgili programla histogramları çizilmektedir. Daha sonra ise bu nicel veriler Excel'de grafikler çizilerek analiz edilmektedir.

3.3. Laboratuvar Çalışmasının Yürütüldüğü Yer ve Zaman

Bu araştırmanın laboratuvar uygulama çalışmaları Ekim 2013 - Nisan 2014 tarihleri arasında Aarhus Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Hücresel Yaşlanma Laboratuvarı'nda yürütülmüştür.

3.4. Verilerin İstatistiksel Değerlendirilmesi

Konsantrasyon ve hücre tipine göre yapılan gruplar arasındaki istatistiksel farklılıklar Tek-Yön ANOVA analizi ve Tukey'in Çok-Yönlü Karşılaştırma Testi veya Kruskal Wallis Testi ile değerlendirilmiştir. İstatistiksel farklılık önemlilik derecesi (p) 0.05 olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. CYN'nin Etkileri

Bu çalışmada, CYN'nin FSF-1, hTERT-MSC ve HeLa hücrelerinin morfolojisi, proliferatif potansiyeli, hayatta kalımı ve FSF-1, hTERT-MSC hücrelerinin stres yanıtına etkileri değerlendirilmiştir. Bu çalışmanın bulgu ve sonuçları CYN'nin etkileriyle ilgili alt yapı oluşturarak gelecekte yeni çalışmaların planlanmasında yol gösterici olması bakımından önemlidir.

4.1.1. Hücrelerin Morfolojisi

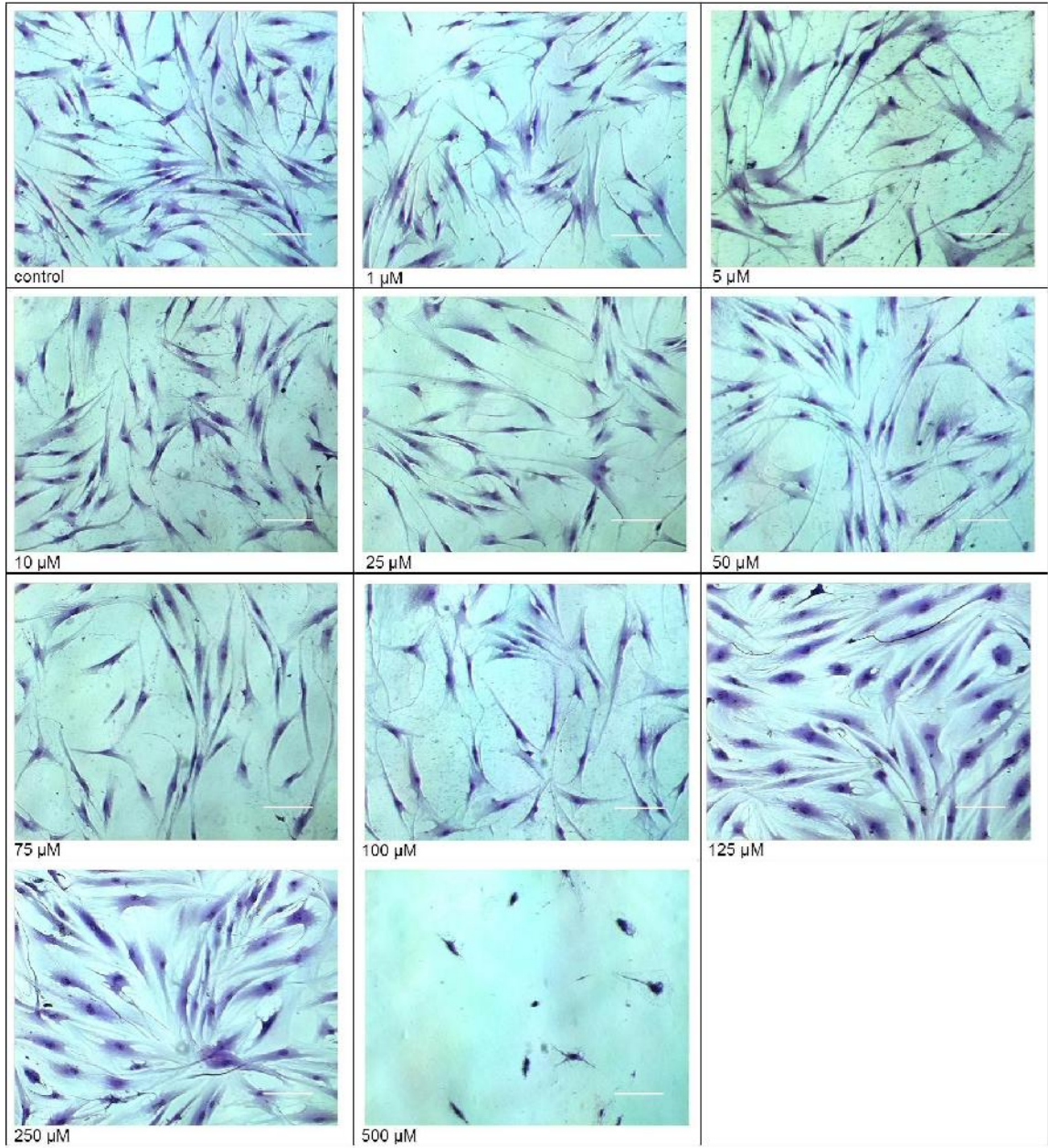
Farklı CYN konsantrasyonlarının hücre morfolojisine olan etkileri Giemsa-boyama veya hücre kültürü içerisinde mikrofotografılama ile analiz edilmiştir.

Şekil 4.1.1.1. ve şekil 4.1.1.2. iki farklı objektifte FSF-1 hücrelerinin üç gün süresince farklı CYN konsantrasyonları ile muamelesi sonucu oluşan morfolojik değişiklikleri göstermektedir. Buna göre, 75 μ M CYN ve üzeri konsantrasyonlarda hücre yoğunluğu azalırken ince, uzun ve yay şeklinde olan normal FSF-1 hücre morfolojisi, 125 μ M CYN ve üzerinde bozulmuş, düzleşmiş bir şekle dönüşmeye başlamıştır. Ayrıca altı gün süresince farklı CYN konsantrasyonları muamelesi sonucu tüm CYN konsantrasyonlarında hücreler yassılaşmaya başlamış ancak genel hücre morfolojisi korunmuştur. Dolayısıyla, FSF-1 hücrelerinin CYN tolerasyonunda artış gözlenmiştir (Şekil 4.1.1.3. ve Şekil 4.1.1.4.).

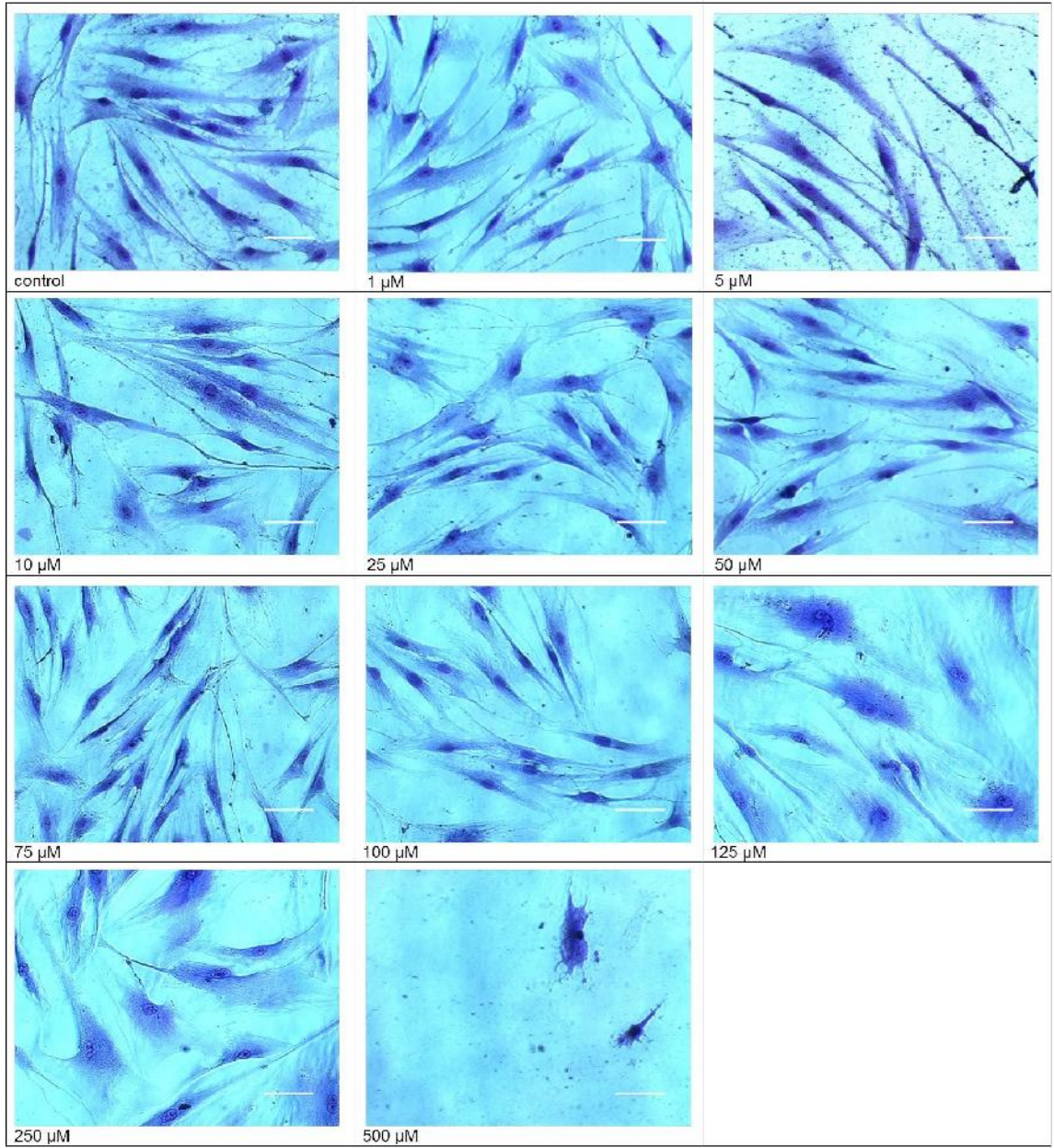
Şekil 4.1.1.5. ve şekil 4.1.1.6. ise iki farklı objektifte hTERT-MSC hücrelerinin üç gün süresince farklı CYN konsantrasyonları ile muamelesi sonucu oluşan morfolojik değişiklikleri göstermektedir. Buna göre, hücre morfolojisi konsantrasyonlara ve muamele süresi ile ilişkili olarak değişim göstermiştir. Yetmiş beş μ M CYN konsantrasyonu ve üzerinde hücre yoğunluğu azalırken morfolojileri daha poligonal bir şekil almaya başlamıştır. Bunun yanında 75 μ M CYN konsantrasyonu ve üzerinde hücreler normalden büyük ve genişlemiş olduğu gözlenmiştir. Ayrıca beş günlük farklı CYN konsantrasyonlarının hücre morfolojisine olan etkisi üç gün ile benzer bulunurken 125 CYN konsantrasyonunda büyümüş ve genişlemiş daha fazla hücre görülmüştür.

Bunlara ek olarak hücre boyutlarının heterojenitesi 75 μ M CYN konsantrasyonu ve üzerinde konsantrasyona bağı olarak artmıştır (Şekil 4.1.1.7. ve Şekil 4.1.1.8.).

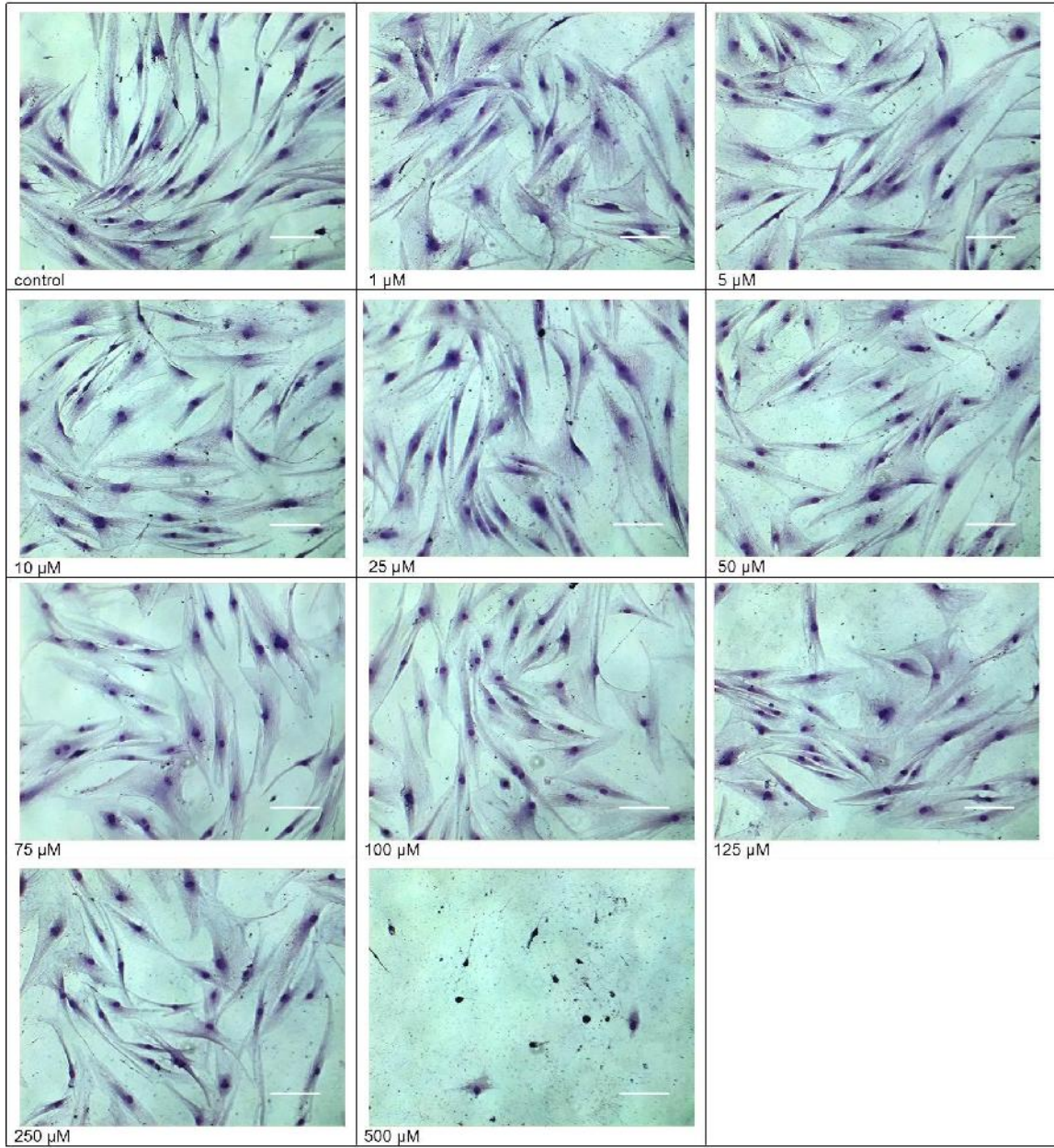
Şekil 4.1.1.9. ve Şekil 4.1.1.10. iki farklı objektifte farklı CYN konsantrasyonlarının üç günlük muamelesi sonucu FSF-1, hTERT-MSC ve HeLa hücrelerinin morfolojisine olan etkisini göstermektedir. Tüm hücrelerin normal morfolojisi genel olarak tüm konsantrasyonlarda korunurken HeLa hücrelerinde 25 μ M ve üzerinde yassılaşma görülmüştür. Bu sonuçlar, farklı hücrelerin farklı CYN konsantrasyonlarından farklı şekillerde etkilendiğini gösteren ilk belirteçlerdir bu nedenle proliferasyon ve toksisite belirteci olarak mitokondriyal aktivite testi yapılarak daha fazla veri ile desteklenmiştir.



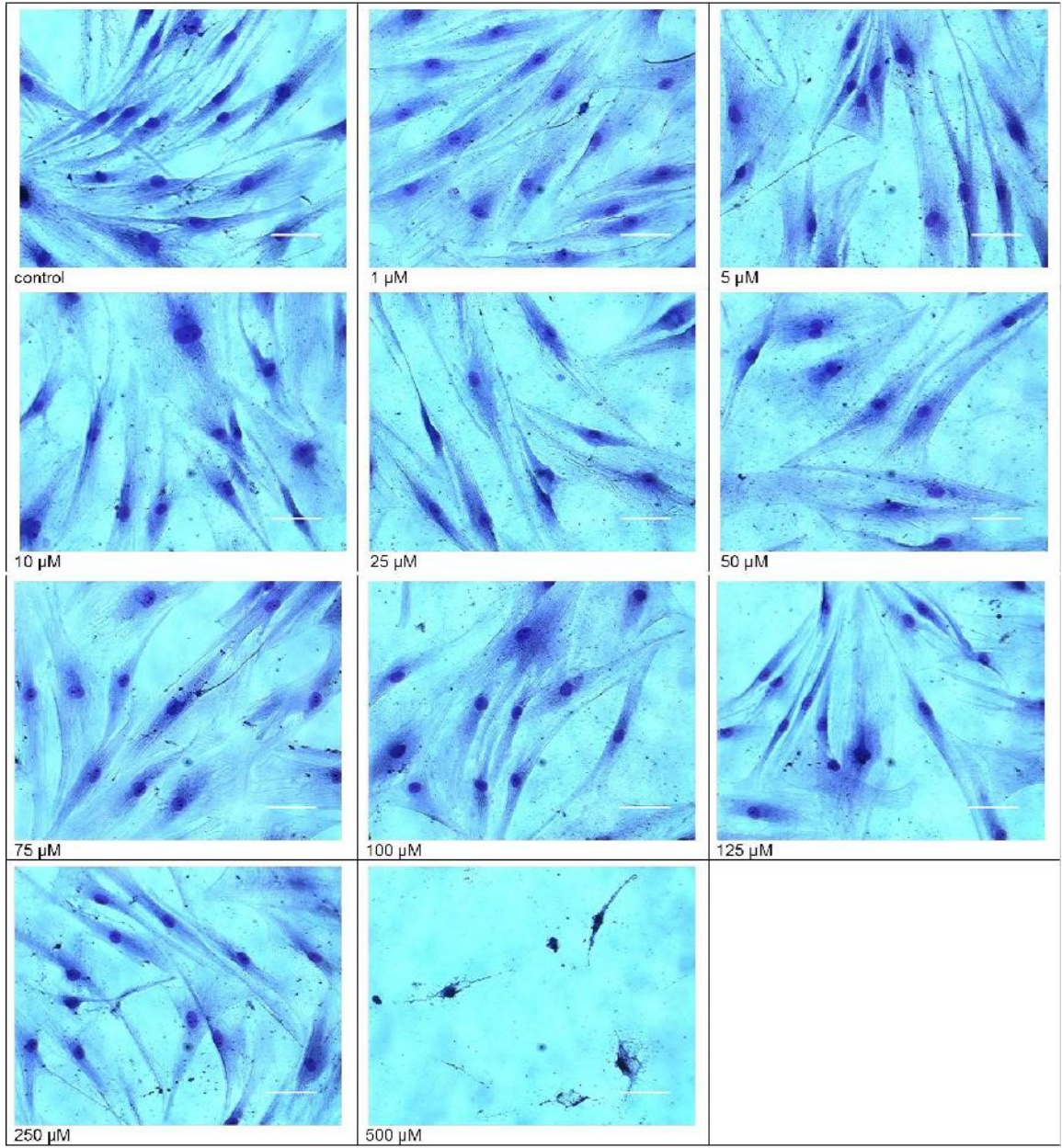
Şekil 4.1.1.1. Farklı CYN konsantrasyonlarının üçüncü günde FSF-1 hücre morfolojisine etkisi (10x objektif)



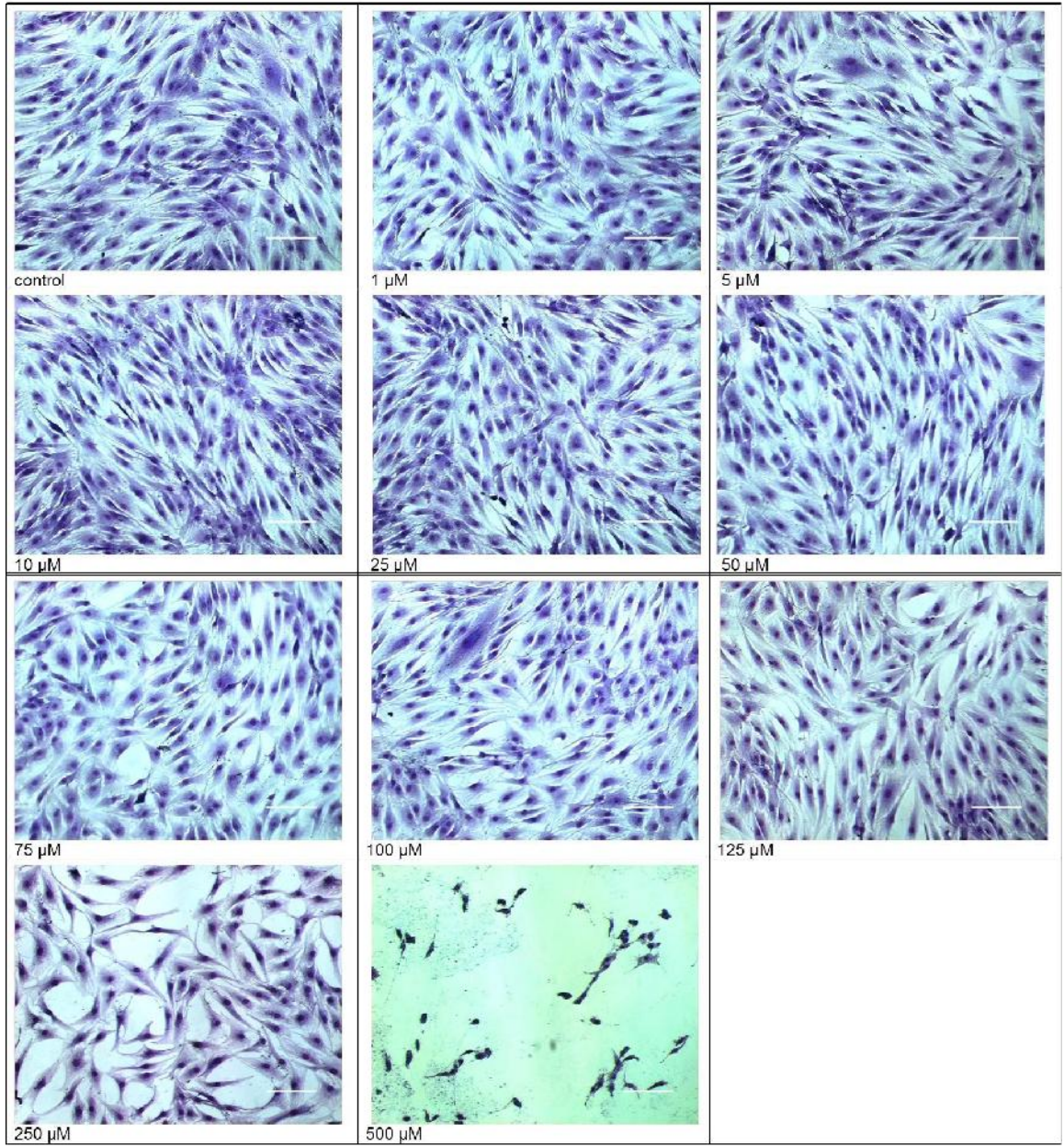
Şekil 4.1.1.2. Farklı CYN konsantrasyonlarının üçüncü günde FSF-1 hücre morfolojisine etkisi (20x objektif)



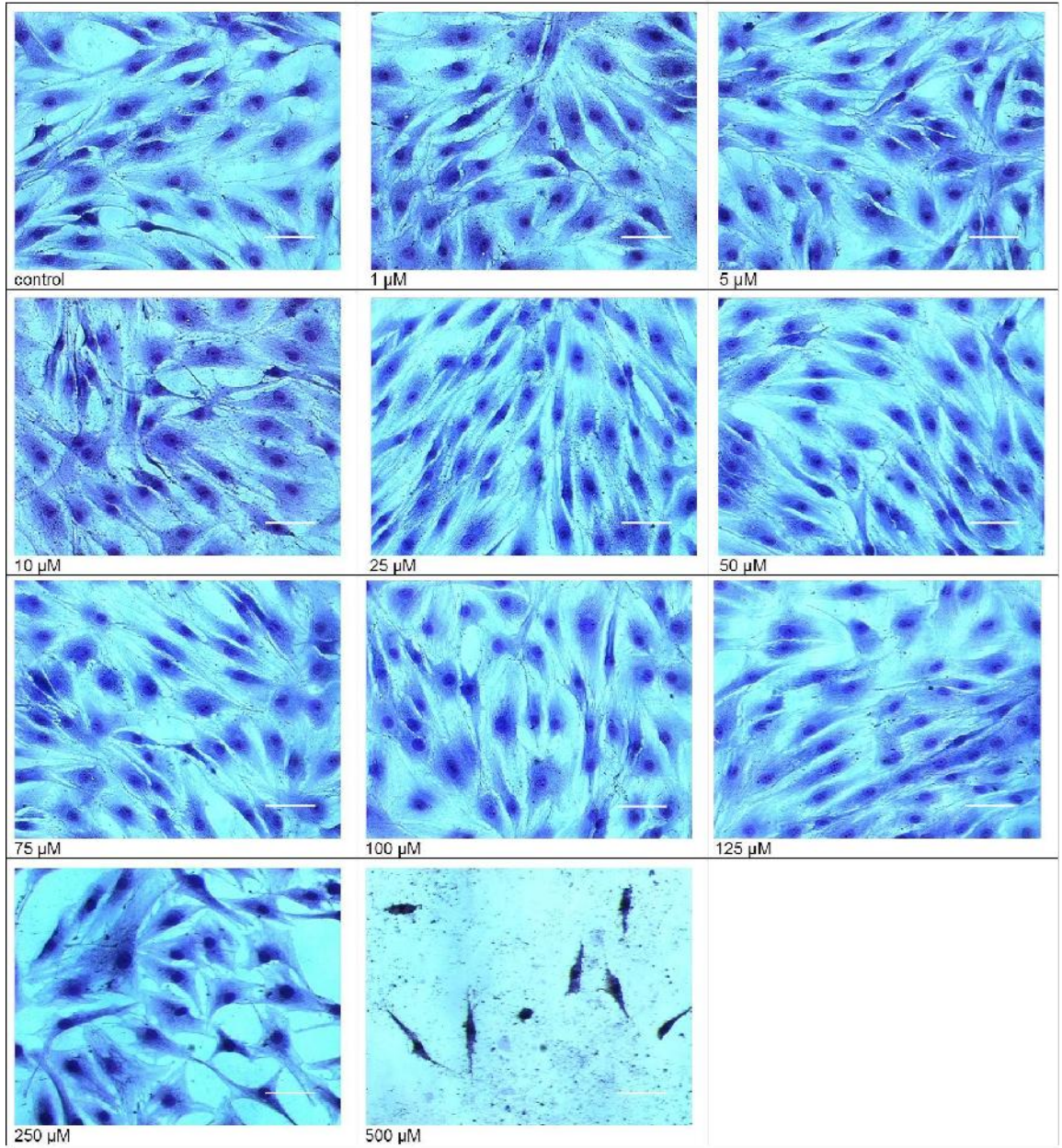
Şekil 4.1.1.3. Farklı CYN konsantrasyonlarının altıncı günde FSF-1 hücre morfolojisine etkisi (10x objektif)



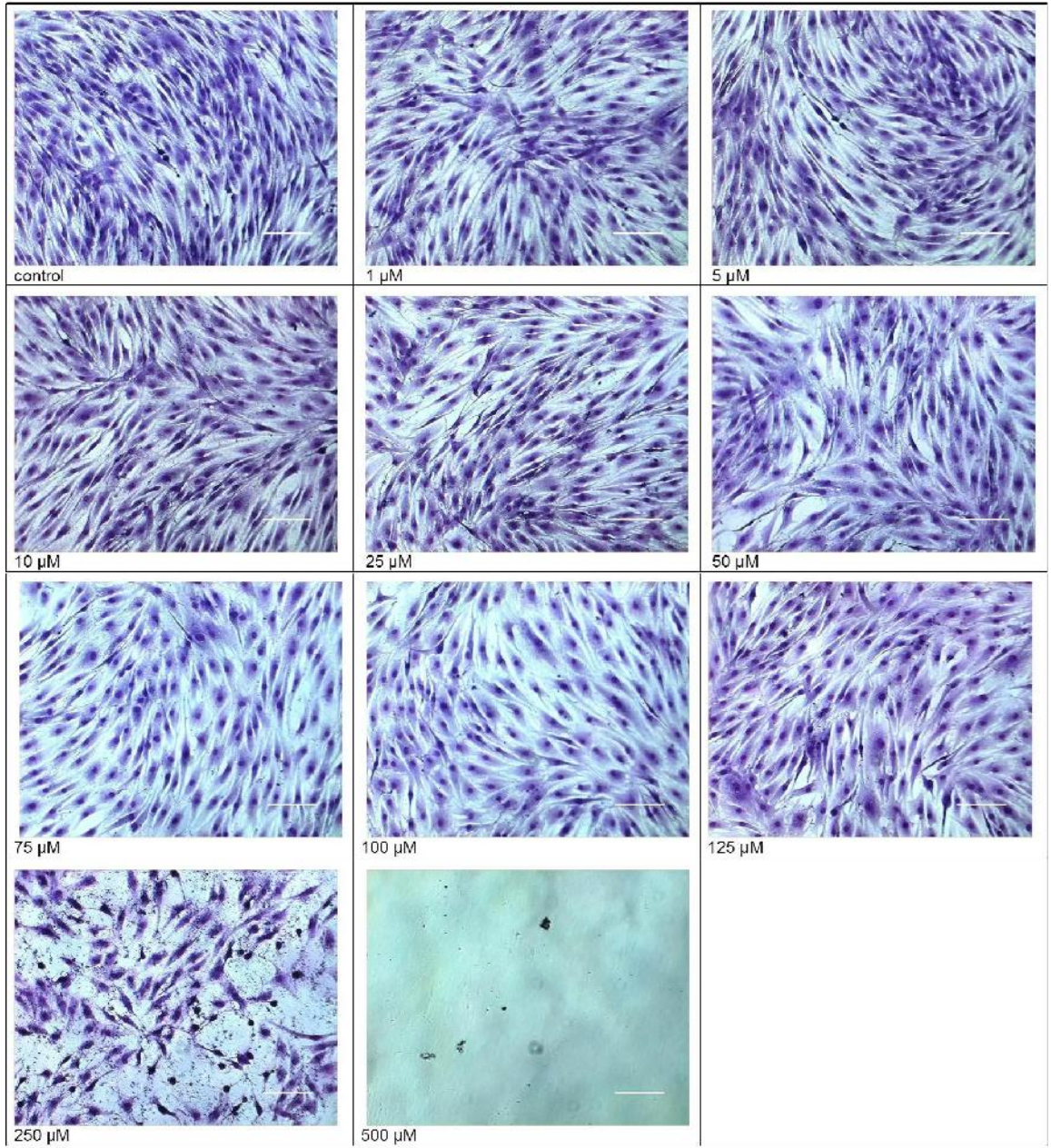
Şekil 4.1.1.4. Farklı CYN konsantrasyonlarının altıncı günde FSF-1 hücre morfolojisine etkisi (20x objektif)



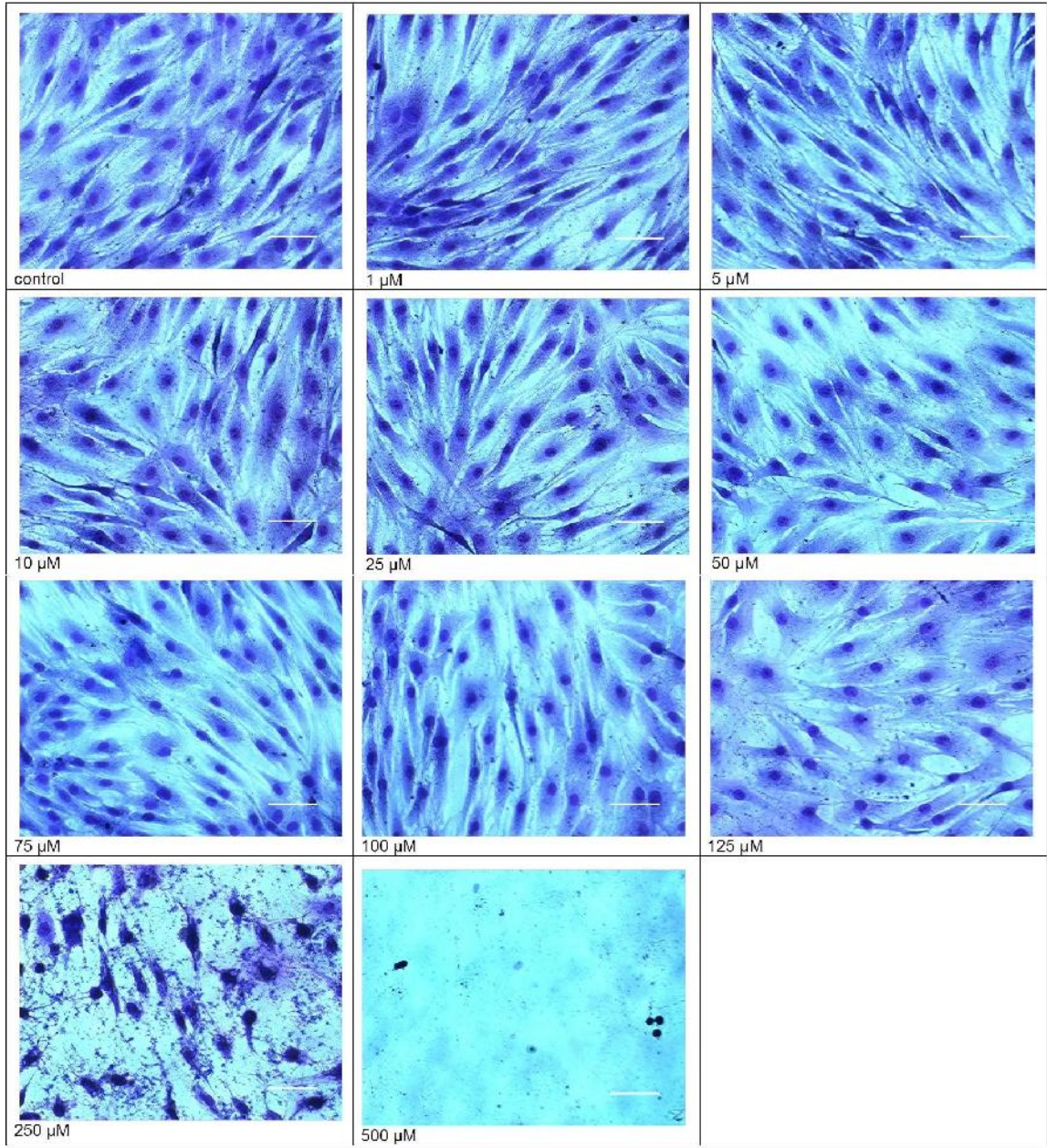
Şekil 4.1.1.5. Farklı CYN konsantrasyonlarının üçüncü günde hTERT-MSC hücre morfolojisine etkisi (10x objektif)



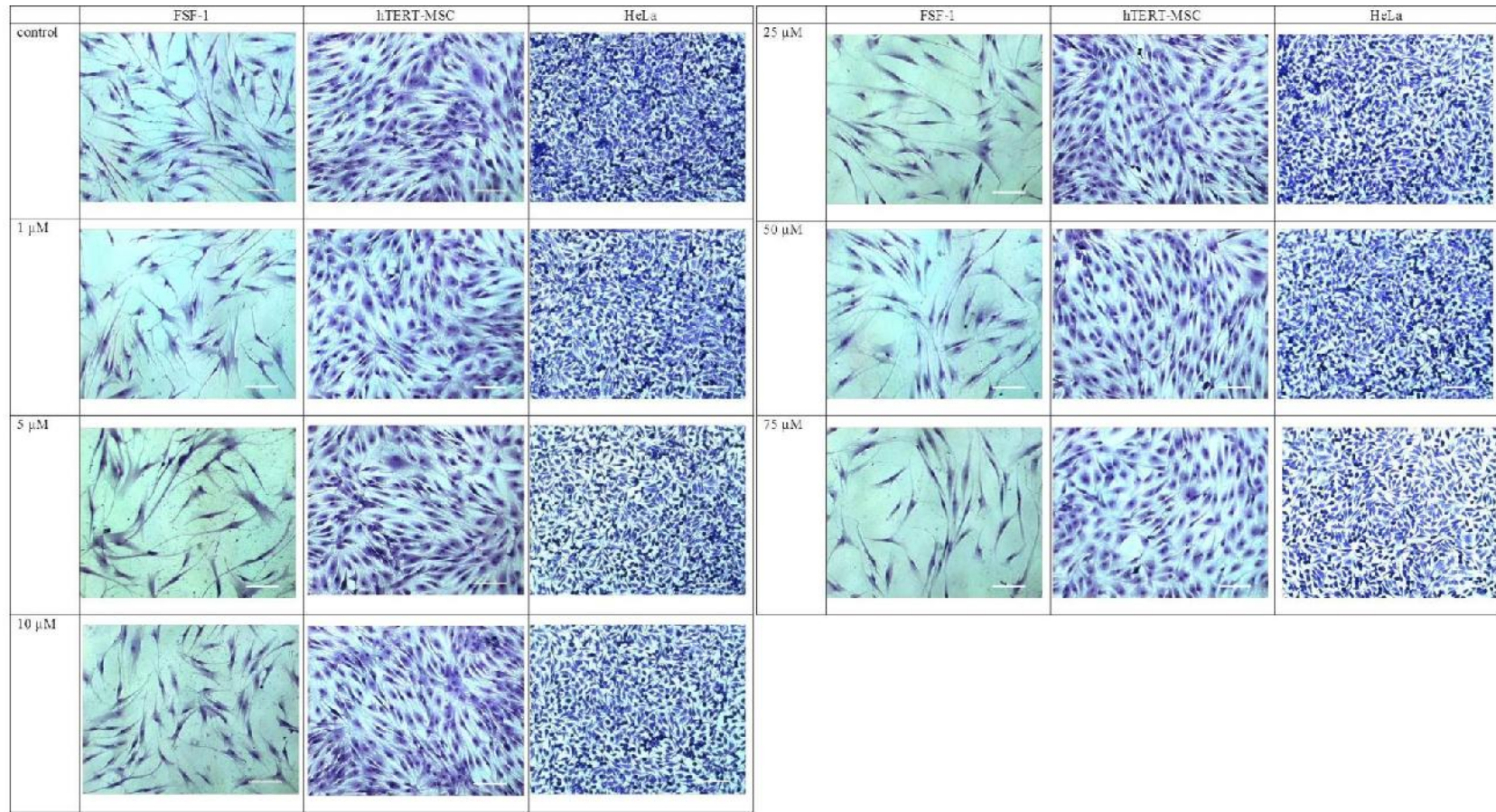
Şekil 4.1.1.6. Farklı CYN konsantrasyonlarının üçüncü günde hTERT-MSC hücre morfolojisine etkisi (20x objektif)



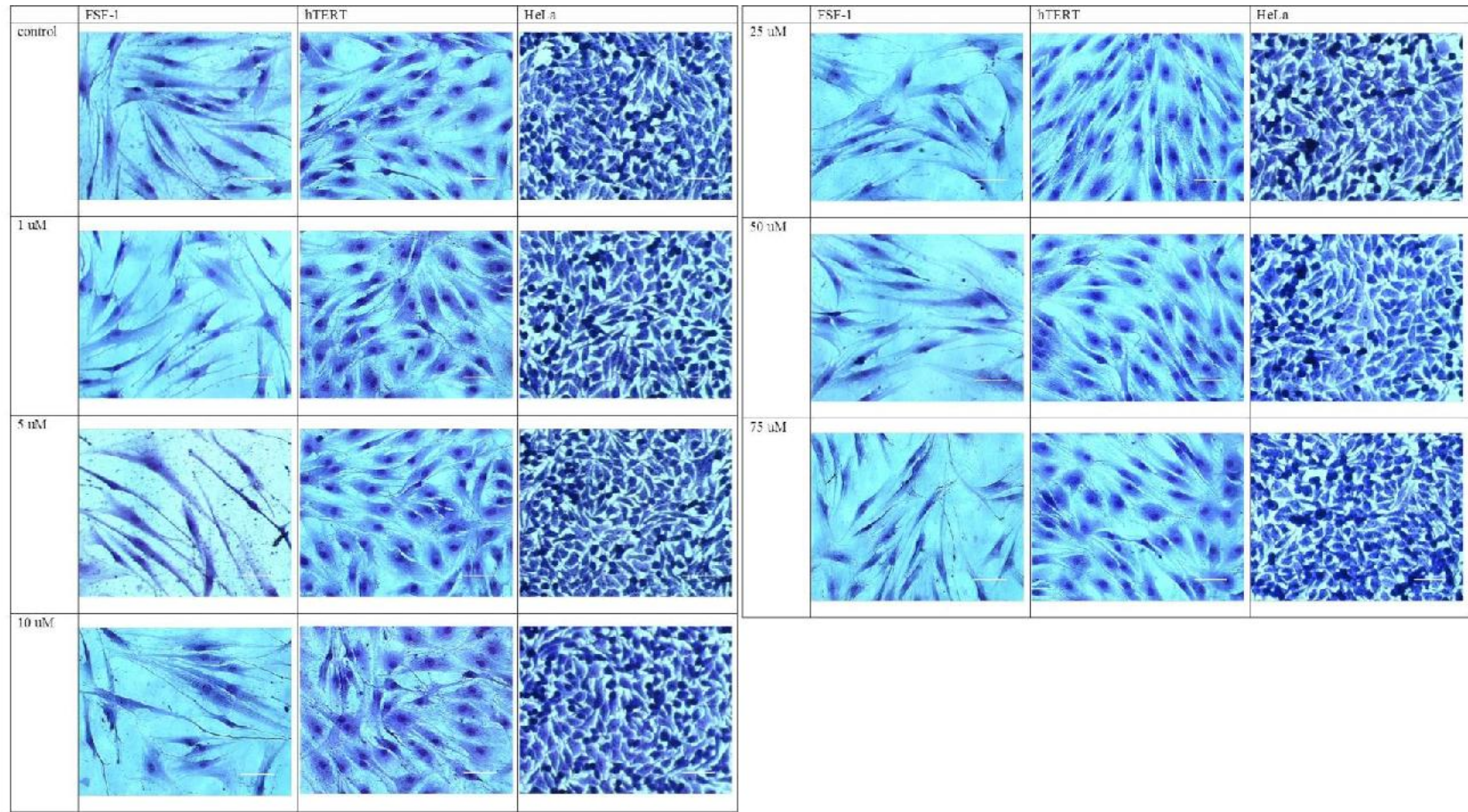
Şekil 4.1.1.7. Farklı CYN konsantrasyonlarının beşinci günde hTERT-MSC hücre morfolojisine etkisi (10x objektif)



Şekil 4.1.1.8. Farklı CYN konsantrasyonlarının beşinci günde hTERT-MSC hücre morfolojisine etkisi (20x objektif)



Şekil 4.1.1.9. Farklı CYN konsantrasyonlarının üçüncü günde FSF-1, hTERT-MSC ve HeLa hücreleri morfolojisine etkisi (10x objektif)



Şekil 4.1.1.10. Farklı CYN konsantrasyonlarının üçüncü günde FSF-1, hTERT-MSK ve HeLa hücreleri morfolojisine etkisi (20x objektif)

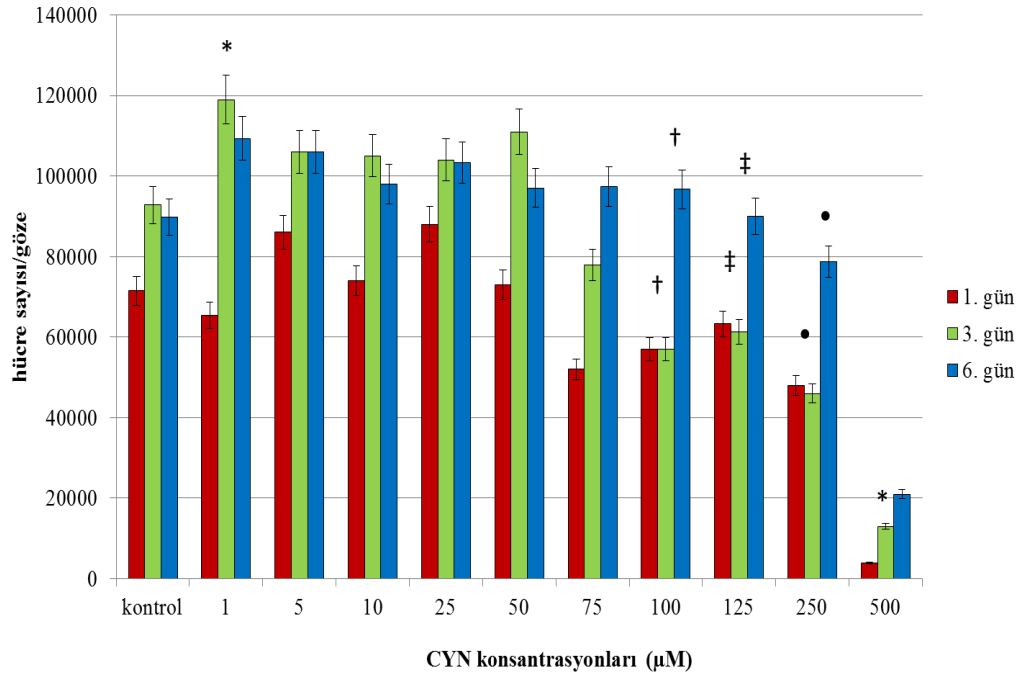
4.1.2. Proliferasyon ve Hayatta Kalım

Farklı CYN konsantrasyonlarının hücre proliferasyonu ve hayatta kalım üzerine etkileri beş ve altı günlük izlem ile değerlendirilmiştir.

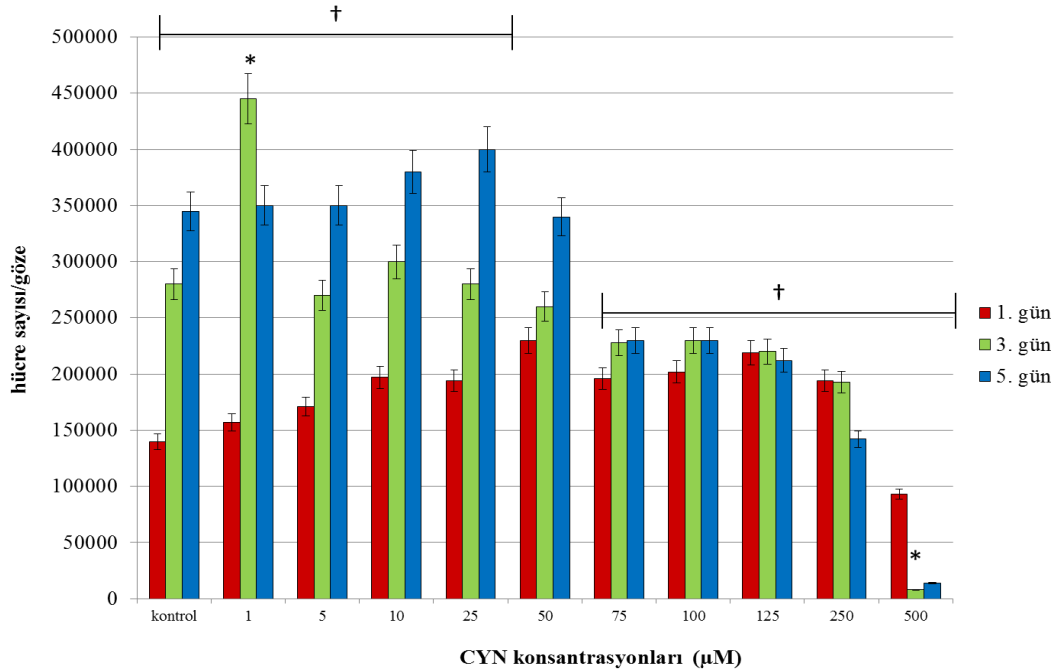
Şekil 4.1.2.1.'de görüldüğü gibi farklı CYN konsantrasyonlarına bağlı olarak FSF-1 hücrelerinin büyüme ve hayatta kalımı bifazik yanıt göstermiştir. Üçüncü günde en düşük CYN konsantrasyonu olan 1 μM 'da proliferasyon en fazla iken en yüksek CYN konsantrasyonu olan 500 μM 'da proliferasyon inhibe edilmiştir ($p<0.05$). Ayrıca, proliferasyon, 1 μM 'da 75 μM ve üzerine kıyasla istatistiksel yönden anlamlı bir şekilde daha fazladır. Bunun yanında altıncı günde proliferasyon ve hayatta kalım oranı, 75 μM ve üzerinde daha düşük konsantrasyonlar ile benzer seviyeye ulaşmıştır ($p<0.05$).

Farklı CYN konsantrasyonlarına bağlı olarak hTERT-MSC proliferasyon ve hayatta kalımı da bifazik yanıt göstermiş ve üçüncü günde proliferasyon en düşük CYN konsantrasyonu olan 1 μM 'da en fazla iken en yüksek CYN konsantrasyonu olan 500 μM 'da inhibe olmuştur ($p<0.05$). Ayrıca proliferasyon 50-500 μM arasında konsantrasyona bağlı olarak değişim gösterirken 75 μM ve üzerinde proliferasyonda anlamlı bir azalış gözlenmiştir ($p<0.05$) (Şekil 4.1.2.2.). Buna ek olarak beşinci günde 50 μM 'a kadar proliferasyon devamlılık gösterirken bu konsantrasyonun üzerinde bir değişiklik gözlenmemiştir.

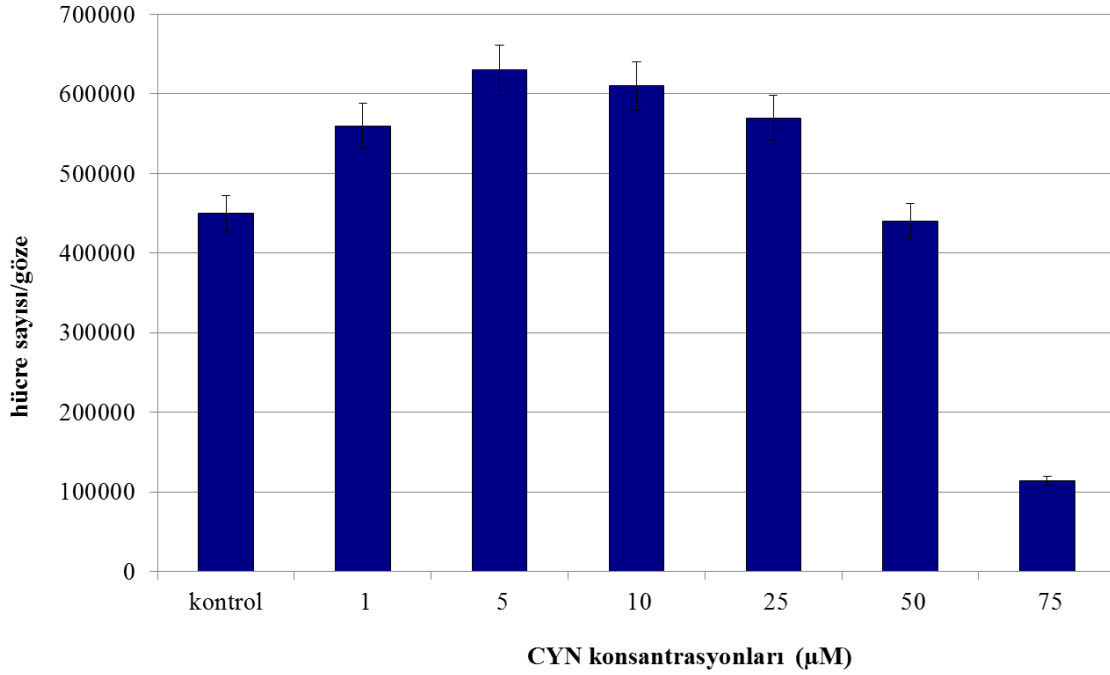
Sonuç olarak, hem FSF-1 hem de hTERT-MSC hücreleri proliferasyon, hayatta kalım ve morfolojik olarak CYN'ye bifazik yanıt göstermiştir. Yine her iki hücre tipi için 1 μM 'da proliferasyon en fazla, 500 μM 'da toksik iken 75 μM ve üzerinde proliferasyon ve hayatta kalım FSF-1 hücrelerinde hTERT-MSC hücrelerine kıyasla daha fazladır. Buna göre, normal hücrelerin CYN tolerasyonu immortalize olmuş hücrelere göre daha yüksektir. Dolayısıyla CYN, immortalize olmuş hücrelerin ve potansiyel kanser hücrelerinin proliferasyonunu normal hücrelere zarar vermeyen düşük konsantrasyon seviyelerinde inhibe ederek kansere karşı koruyucu veya tedavi edici bir ajan olabilir. Bundan hareketle HeLa hücreleri üç gün süresince CYN ile muamele edilmiş ve 75 μM CYN konsantrasyonunun hücre çoğalmasını inhibe edici olduğu görülmüştür (Şekil 4.1.2.3.).



Şekil 4.1.2.1. Farklı CYN konsantrasyonlarının altı günlük muamele sonucu FSF-1 hücre sayısına etkisi (*, †, ‡, • p<0.05)



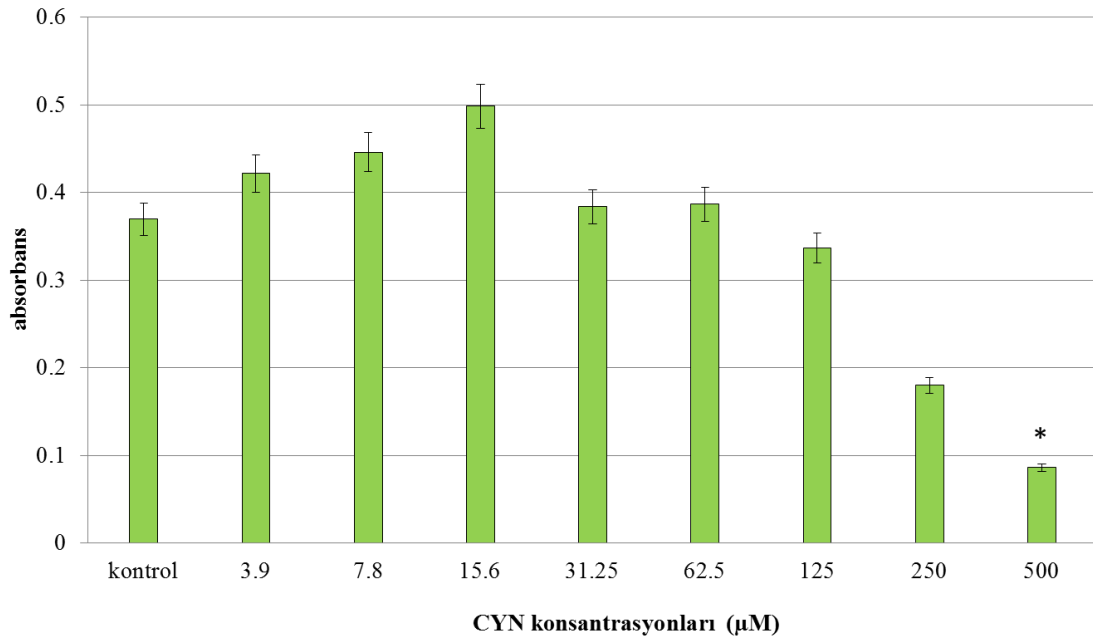
Şekil 4.1.2.2. Farklı CYN konsantrasyonlarının beş günlük muamele sonucu hTERT-MSK hücre sayısına etkisi (*, † p<0.05)



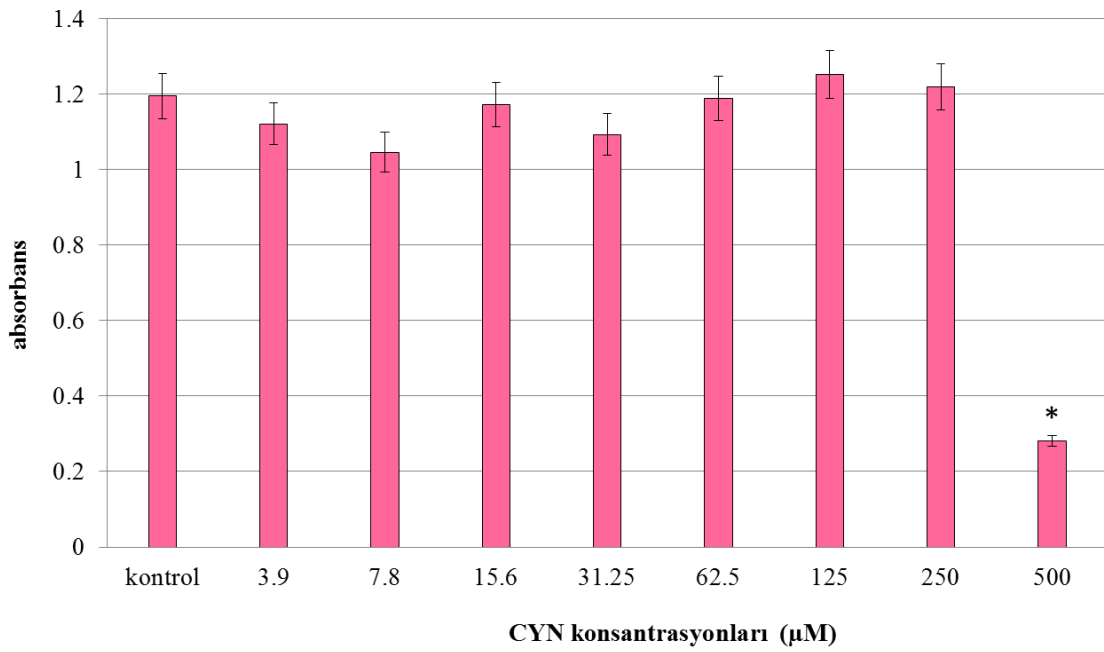
Şekil 4.1.2.3. Farklı CYN konsantrasyonlarının üç günlük muamele sonucu HeLa hücre sayısına etkisi

4.1.3. Toksisite

CYN'nin toksisitesini belirlemek amacıyla MTT Testi ile mitokondriyal aktivite ve hücrelerin viyabilitesi belirlenmiştir. Hücre proliferasyonu ve hayatta kalım, hem hTERT-MSC hem de HeLa hücrelerinde 500 µM CYN konsantrasyonu inhibe edici olarak saptanmış ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$). Ayrıca, CYN'nin HeLa hücrelerindeki sitotoksite indeks değeri %65.46 (± 19.3) olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.1.3.1. hTERT-MSC hücrelerinin mitokondriyal aktivitesi (* $p < 0.05$)



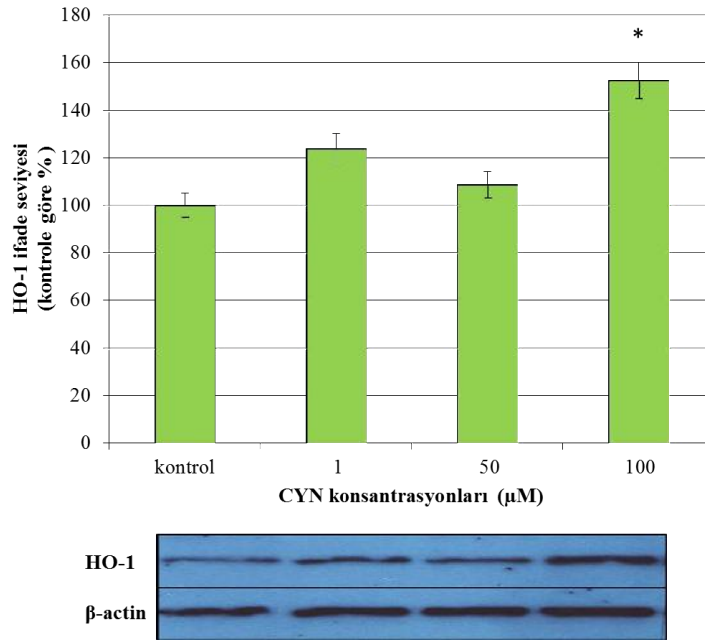
Şekil 4.1.3.2. HeLa hücrelerinin mitokondriyal aktivitesi (* $p < 0.05$)

4.1.4. Stress Yanıtı

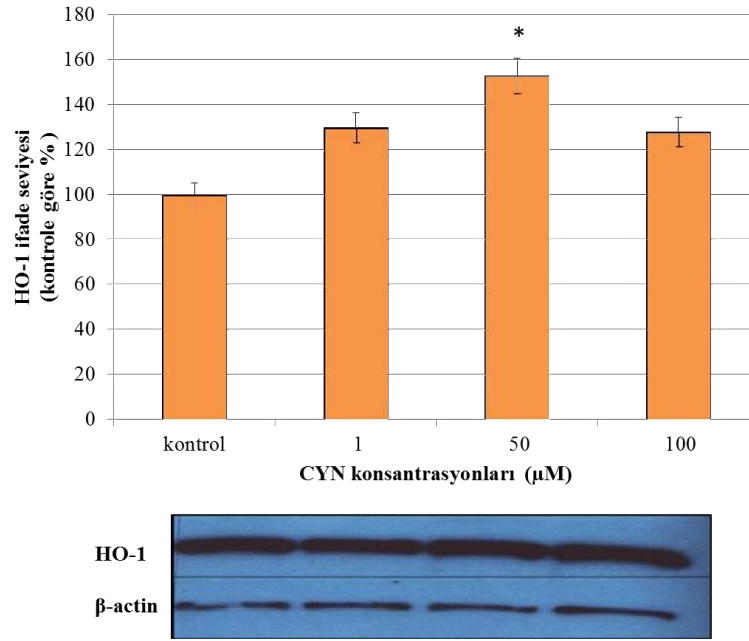
Bu çalışmada, farklı CYN konsantrasyonlarının FSF-1 ve hTERT-MSC hücrelerinin antioksidan ve ısı şok yanıtı etkisi değerlendirilmiştir.

4.1.4.1. Oksidatif Stres Yanıtı

Şekil 4.1.4.1.1. ve 4.1.4.1.2., immunoblotlardan nicelleştirilmiş HO-1 ifade seviyelerini göstermektedir. HO-1 ifadesi, 100 μ M CYN ile muamele edilmiş FSF-1 hücrelerinde ve 50 μ M CYN ile muamele edilmiş hTERT-MSC hücrelerinde yaklaşık %50 oranında daha fazla olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$).



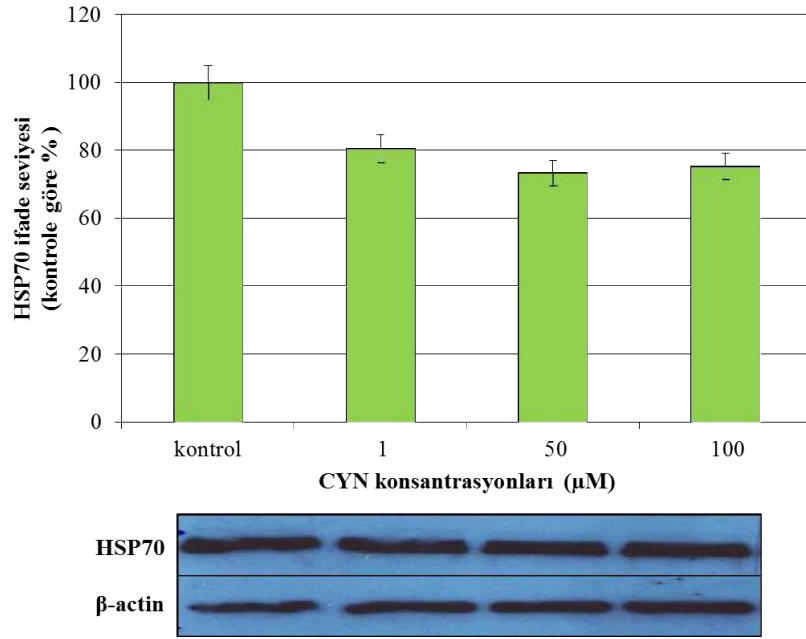
Şekil 4.1.4.1.1. Farklı CYN konsantrasyonlarının üç günlük muamelesi sonucu FSF-1 hücrelerinde HO-1 ifade seviyesi (* $p<0.05$)



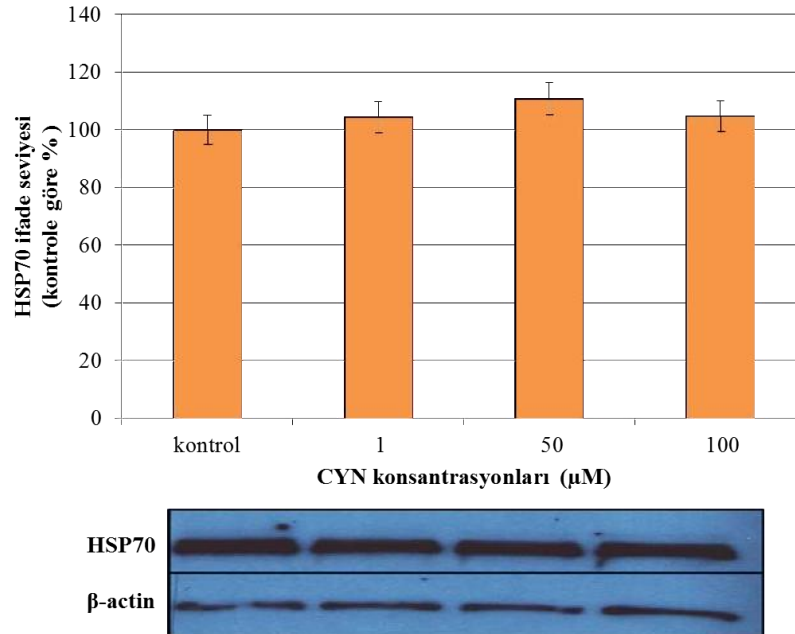
Şekil 4.1.4.1.2. Farklı CYN konsantrasyonlarının üç günlük muamelesi sonucu hTERT-MSC hücrelerinde HO-1 ifade seviyesi (* $p < 0.05$)

4.1.4.2. Isı Şok Yanıtı

Şekil 4.1.4.2.1. ve 4.1.4.2.2., immunoblotlardan nicelleştirilmiş HSP70 ifade seviyelerini göstermektedir. Buna göre, FSF-1 hücrelerinde HSP70 ifade seviyesinde herhangi bir değişiklik gözlenmezken hTERT-MSC hücrelerinde düşük oranda artış eğilimi gözlenmektedir.



Şekil 4.1.4.2.1. Farklı CYN konsantrasyonlarının üç günlük muamelesi sonucu FSF-1 hücrelerinde HSP70 ifade seviyesi



Şekil 4.1.4.2.2. Farklı CYN konsantrasyonlarının üç günlük muamelesi sonucu hTERT-MSK hücrelerinde HSP70 ifade seviyesi

5. TARTIŞMA

CYN'nin etkileri doz ve hücre tipi ile ilişkilidir. Yetmiş beş μM ve üzeri CYN konsantrasyonu tüm hücre tiplerinin proliferasyonunu etkilerken FSF-1 ve hTERT-MSC hücrelerinin hayatta kalımı HeLa hücrelerine kıyasla daha yüksektir. Buna göre, normal insan hücrelerinde CYN'nin proliferasyonu inhibe edici özelliği kanser hücrelerine kıyasla daha düşük, tolerasyonu daha yüksektir. Atasever ve diğerleri (2003, s. 143-150), CYN'in lökemik hücre dizileri ve akut lenfoblastik lökemi hastalarının blast hücrelerinde farklı sitotoksik etkiler gösterdiği ve sitotoksikite indeks değerinin $\%20.45 (\pm 12.3)$ olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada ise CYN'nin HeLa hücrelerindeki sitotoksikite indeks değeri $\%65.46 (\pm 19.3)$ olarak saptanmıştır. Dolayısıyla, CYN'nin HeLa hücrelerine olan sitotoksik etkisi lökemi hücrelerine göre daha yüksektir ve bu etki hücre tipine göre farklılık gösterebilmektedir. Ancak bu çalışmada 500 μM tüm hücre tiplerinde proliferasyon ve hayatta kalımı inhibe edici toksik doz olarak belirlenmiştir. Slanina ve diğerleri (2001, s. 3383–3385) ise CYN'nin HeLa hücrelerinde 400 μM 'a kadar toksik etki göstermezken 250 μM CYN'nin MT-2 hücrelerinde proliferasyonu inhibe ettiğini bildirmiştir. Diğer taraftan Dong ve diğerleri (2009, s. 375-381) de CYN'nin 1000 μM 'a kadar Jurkat T-hücrelerinde toksik etki göstermediğini bildirmiştir.

Yapılan çalışmalar göstermiştir ki bazı fitokimyasallar ve endojen mediyatörler HO-1 ifade seviyesini artırabilmektedir (*Son ve diğerleri*, 2008, s. 236-246). Bu çalışmada da enginarda bulunan bir fitokimyasal olan CYN, FSF-1 ve hTERT-MSC hücrelerinde bifazik etki göstererek HO-1 ifade seviyesini artırmıştır. Resveratrol ile yapılan çalışmalar, resveratrolün rat adrenal medulla hücreleri olan PC12 ve insan aortik yumuşak kas hücrelerinde doza bağımlı olarak HO-1 ifade seviyesini artırdığını göstermiştir (*Chen ve diğerleri*, 2005b, s. 993-1000; *Juan ve diğerleri*, 2005, s. 41-48). Ayrıca, epigallokateşin-gallat (EGKG) ve epigallokateşin-3-gallat (EGK-3-G) endotelial hücrelerde HO-1 ifade seviyesini artırırken EGK-3-G doza ve süreye bağımlı olarak HO-1 ifade seviyesini artırmaktadır (*Pullikotil ve diğerleri*, 2012, s. 1134–1145; *Wu ve diğerleri*, 2006, s. 2889–2897). Bunun yanında, kurkumin de HO-1 ifade seviyesini deri hücreleri, astrositler ve endotelial hücrelerde doza ve süreye bağlı olarak artırmaktadır (*Rattan ve diğerleri*, 2009, s. 90-103; *Balogun ve diğerleri*, 2003, s. 887-895;

Scapagnini ve diğçerleri, 2002, s. 554-561). Dolayısıyla resveratrol, EGKG, EGK-3-G ve kurkumin endotelyal, nöronal ve deri hücrelerini çeşitli stres yanıt yolaklarını aktive ederek HO-1 ifade seviyesini doza ve süreye bağlı olarak artırmaktadır. Bu çalışmada da CYN, normal deri ve immortalize olmuş mezenkimal kök hücrelerde HO-1 ifade seviyesini doza bağımlı olarak artırmıştır. Ancak CYN'nin süreye bağımlı etkisi ve stres yanıt yolaklarına bağlı mekanizmaların belirlenebilmesi için daha ileri çalışmalar gereklidir.

Kinazları ve transkripsiyon faktörlerini kapsayan sirtuin-FOXO, nüklear faktör kappa B (NF- B) ve nüklear faktör benzeri 2 (Nrf-2) gibi hormetik yolaklar birçok fitokimyasal ile aktive edilerek sitoprotektif etki gösterebilmektedir (*Son ve diğçerleri*, 2008, s. 236-246). Oksidatif strese karşı önemli hücresel savunma mekanizması oluşturan transkripsiyon faktörü Nrf-2 bazal koşullarda hücre sitoplazmasında Keap1 proteinine bağlı olarak bulunmaktadır. Ancak oksidatif stres ve kemokoruyucu faktörler ile Nrf2 Keap-1'den serbestleşerek nükleusa geçmekte ve antioksidan yanıt elementini (ARE) aktive ederek glutasyon redüktaz, GPx ve HO-1 gibi faz II detoksifikasyon enzimlerinin sentezlenmesine neden olmaktadır. Dolayısıyla Nrf-2 hücre savunma mekanizmasıyla ilişkili gen regülasyonu ile oksidatif stres sonucu oluşan doku dejenerasyonu, erken yaşlanma, kanser, nörodejeneratif hastalıklar, kardiyovasküler hastalıklar, akut ve kronik akciğer hastalıkları, otoimmün ve inflamatuvar hastalıklara karşı koruyucu etki gösterebilmektedir (*Hine ve Mitchell*, 2012, s. 1-16; *Junk ve Kwak*, 2010, s. 7266-7291; *Kaspar*, 2009, s. 1-6; *Zhang*, 2006, s. 769-789).

Flavanoidler (EGKG, kersetin, vb.), stilbenler (resveratrol, vb.), diferuloilmetanlar (kurkumin, vb.) ve organosülfür bileşikler (allisin, vb.) gibi birçok fitokimyasalın Nrf-2'yi aktive ettiği bilinmektedir. Bu hormetik fitokimyasallar Nrf-2'yi i) fitokimyasallar hafif düzey oksidatif stresle indüklenebilen fosfotidilinositol-3-kinaz (PI3-K) ve mitogen-activated protein kinaz (MAPK) gibi kinazları aktive ederek Nrf-2 fosforilasyonu ya da Keap-1 sistein tiyollerin oksidasyonu ii) Keap-1 sisteinleri ile kovalent bağ yaparak Nrf-2'yi aktifleştirmektedirler (*Surh*, 2012, s. 217-219; *Surh ve diğçerleri*, 2008, s. 1526-1539). Nrf-2, Keap-1'den ayrıldıktan sonra sistein ve teronin resid lerinden PI3K, protein kinaz C (PKC), c-Jun NH -terminal kinaz (JNK) ve ekstrasel lar-sinyal-düzenleyici kinaz (ERK) ve p38 MAPK gibi kinazlarla fosforlanarak nükleusa geçmektedir (*Surh*, Nature, 2003, s. 768-780). PI3-K gelen çeşitli

uyaranlarla aktive olduktan sonra hücre membranında bulunan fosfotidilinositol-4,5-bifosfatın ikincil mesajcı olan fosfotidilinositol-3,4,5-trifosfata dönüşmesini sağlamakta ve bu ikincil mesajcı da Akt'nin ilgili bölgesine bağlanarak Akt'yi aktive etmektedir. Akt, hücre proliferasyonunun ve hayatta kalımının regülasyonu ile ilgili olan p21, glikojen sentaz 3 β (GSK3), mTOR, Bad, Mdm2 gibi proteinlerin regülasyonunda yer almaktadır (*Vara ve diğerleri*, 2004, s. 193-204).

HO-1 ifadesi ERK ve/veya JNK aracılı AP1, NF- κ B ve Nrf-2 gibi birçok transkripsiyon faktörü tarafından regüle edilebilmektedir. Nrf-2 regülasyonunda rol alan hücre proliferasyonu ve hayatta kalımı ile ilgili kinazlar ((MAPKs- ERK, JNK, p38) ve PI3-K) hücre tipi ve indükleyen faktörlerle ilişkilidir (*Andreadi ve diğerleri*, 2006, s. 1033-1040).

Bu sinyalizasyon yollarından PI3-K/Akt aracılı Nrf-2 bağımlı HO-1'in ifadesi iki mekanizma ile açıklanabilir. Birincisi, GSK3, Nrf-2'nin nükleustan sitozole geçişini sağlamakta, Akt ise GSK3'ü inhibe ederek Nrf-2'nin nükleusta kalmasını sağlamaktadır. İkincisi Akt ubikuitin ligazları inhibe edebilmektedir ve buna göre Nrf-2'nin proteozomal degradasyonunu azaltarak aktivitesini desteklemektedir (*Pugazhenthı ve diğerleri*, 2007, s. 645-655). ASF-2 insan fibroblastları ile yapılan bir çalışmada kurkuminin PI3-K/Akt aracılığıyla HO-1 ifadesini artırdığı gösterilmiştir (*Lima ve diğerleri*, 2011, s. 430-442). Fare β -hücreleri ile yapılan başka bir çalışmada ise kurkuminin Nrf-2 bağımlı HO-1 ifadesini PI3-K/Akt aracılığıyla artırdığı bildirilmiştir (*Pugazhenthı ve diğerleri*, 2007, s. 645-655). Endotelyal hücrelerle yapılan bir çalışmada EGKG, PI3-K/Akt ve ERK aracılığıyla Nrf-2'nin nükleusta artışını sağlayarak HO-1 sentezini artırmıştır (*Wu ve diğerleri*, 2006, s. 2889-2897). *Caesalpinia sappan* L. ağacının meyvesinde bulunan temel bileşik olan brazilin de immortalize HEI-OC1 fare kohlea hücrelerinde HO-1 ifadesini PI3-K/Akt ve ERK yolları üzerinden artırmıştır (*Choi ve Kim*, 2008, s. 12-18). Rat pheochromocytoma PC12 hücreleri ile yapılan bir çalışmada fenolik bir bileşik olan karnasolun Nrf-2'nin ARE'ye bağlanarak HO-1 promoter aktivasyonu ile HO-1 sentezini indüklerken hücrenin hayatta kalımıyla ilgili olan PI3-K/Akt, ERK, p38 ve JNK yollarını aktive ettiği gösterilmiştir. Ayrıca PI3-K inhibisyonunun Nrf-2 düzeyinde ve HO-1 promoter aktivasyonunda azalışa neden olduğu bildirilmiştir (*Martin ve diğerleri*, 2004, s. 8919-8929).

HO-1 ifadesinde yer aldığı bildirilen diğer sinyalizasyon faktörleri ise mitogen-activated protein kinaz kinaz (MAPKK)'dır. Bu kinazlar birçok ekstraselular faktörle stimule olarak hücre proliferasyonu, hücre farklılaşması ve apoptozis regülasyonunda rol almaktadırlar. Memelilerde biyokimyasal etkileri olan üç MAPK; ERK, JNK ve p38 MAPK'dir. ERK birincil olarak büyüme faktörleri gibi mitojenik stimulasyonlarla aktive olurken JNK ve p38 MAPK ise hidrojen peroksit, DNA hasarı, ısı ve ozmotik şok gibi hücrel stres faktörlerine duyarlıdırlar. Ayrıca, mitogen-activated protein kinaz kinaz kinaz (MAPKKK)'ın aşırı uyarılması durumunda HO-1 ifadesinin indüklendiği ancak Nrf-2 olmadığında HO-1'in indüklenemediği belirtilmiştir (*Hu ve Kong, 2004, s. 83-88*). Kurkumin ve EGKG ile yapılan bir çalışmada, kurkuminin fibroblast ve epitel hücrelerinde, EGKG'nın ise fibroblast ve B-lenfoblast hücrelerinde nükleer Nrf-2 seviyesi ile HO-1 ifadesini artırdığı ve bunu p38 MAPK, Nrf-2 ve NFκ-B aracılı olduğu bildirilmiştir (*Andeadi ve diğerleri, 2006, s. 1033-1040*). Renal epitel hücreleri ile yapılan bir çalışmada kurkuminin Nrf-2 bağımlı HO-1 ifadesini p38 MAPK aracılığıyla indüklediği bildirilmiştir (*Balogun ve diğerleri, 2003, s. 887-895*). Endotelial hücrelerle yapılan bir diğer çalışmada ise EGKG'nın Nrf-2 bağımlı HO-1 sentezini p38 MAPK aracılığı ile artırdığı bildirilmiştir (*Pullikotil ve diğerleri, 2012, s. 1134-1145*). Endotelial hücreler ve 3-O-kafeoil-1-metilkinik asit ile yapılan bir çalışma sonucunda Nrf-2 bağımlı HO-1 ifadesinin JNK aracılı olduğu saptanmıştır (*Kweon ve diğerleri, 2006, s. 1349-1361*). Neonatal rat kardiyomiyositleri ile yapılan bir çalışmada EGKG ve theaflavin-3,3'-digallat'ın Akt ve p38 MAPK'yi aktive ettiği ve EGKG'nın HO-1 düzeyini artırdığı saptanmıştır (*Dreger ve diğerleri, 2008, s. 427-433*). Rubiaceae familyasında bulunan biyoaktif bileşik mollugin'in insan oral squamous karsinoma hücrelerinde (OSCC) Nrf-2 bağımlı HO-1 ekspresyonunu indüklediği ve MAPK aktivasyonu ile p38, ERK ve JNK'ı aktive ettiği bildirilmiştir. Özetle, mollugin OCSS hücrelerinde MAPK aktivasyonu ile stress bağımlı sinyalizasyon yollarını aktive ederek transkripsiyon faktörlerinden antiapoptotik etki gösteren NFκ-B'nin azalması ve Nrf-2 artışı ile HO-1 ifadesinde artış ile p21, p53'ün artışı ve Bcl-2/Bcl-XL'nin azalış sonucu apoptozise neden olarak kemoteröpatik etki göstermektedir (*Lee ve diğerleri, 2013, s. 1-15*). Rat vasküler kas hücreleri ile yapılan bir çalışmada ise kurkuminin Nrf-2 bağımlı HO-1 sentezini indüklediği ve HO-1'in siklin bağımlı p21'i artırarak proliferasyonu önleyebildiği

bildirilmektedir (*Pae ve diğçerleri*, 2007, s. 267-277). Birçok kemoteröpatik faktörün JNK ve p38 MAPK'yi aktive ederek apoptozisle ilgili olduğı bilinmektedir (*Hu ve Kong*, 2004, s. 83-88). Örneğın, EGKG ile yapılan çalışmalarda insan hepatoma HepG2 hücreleri, insan kolon adenkarsinoma HT-29 ve insan servikal kanser HeLa hücrelerinde JNK1, p38 ve ERK2 kinazları aktive ettiğı bildirilmektedir (*Chen ve diğçerleri*, 2003, s. 1369-1378; *Chen ve diğçerleri*, 2000, s. 605-612). MAPK kinaz sinyalizasyonu ise hücrenin hayatta kalımı bu yolakları indükleyebilen fitokimyasalların konsantrasyonları ile ilişkilidir (*Hu ve Kong*, 2004, s. 83-88). Diğçer taraftan bazı kanserlerde HO-1'in aşırı artışı ile tedaviye direnci artırdığı ve dolayısıyla bu kanser türlerinde HO-1 inhibisyonun tedavi seçenekleri arasında olabileceğı bildirilmektedir (*Na ve Surh*, 2008, s. 1271-1278). Bu çalışmada da normal ve immortalize hücrelerde CYN'nin doza ve hücre tipine bağılı olarak HO-1'i indüklediğı belirlenmiştir. Buna göre daha sonraki çalışmalarda nüklear Nrf-2 düzeyleri ve Nrf-2'nin hangi sinyalizasyon yolakları üzerinden aktive olduğunun ve CYN'nin HeLa hücrelerinde bu proteinler ve yolaklarla olan ilişkisinin araştırılması CYN'nin HO-1 ile ilişkili potansiyel sağıık etkilerini açıklamaya yardımcı olacaktır.

Oksidatif stres ve inflamasyon normal hücrelerin kanser hücrelerine dönüşümünü tetiklemektedir. Bu safhada Nrf-2 bağımlı antioksidan enzimler hücrenel savunma mekanizması için önemlidir (*Kou ve diğçerleri*, 2013, s. 22-28). Bu safhada fitokimyasallar antioksidan enzim sentezini indükleyerek kanser gelişimini önleyebilmektedir. Ancak bu safhada hücrenel savunma mekanizmaları yeterli olmamış ve hücre hasarı gerçekleşmişse hücre döngüsünün durması ve apoptozis indüklenerek kanser gelişiminin ilerlemesi durdurulabilir. Burada yine çeşitli fitokimyasallar ERK, JNK/c-Jun, Akt, PI3-K, PTEN gibi hücre büyüme faktörleri sinyalizasyon yolaklarına etki ederek antiproliferatif etki veya hücre döngüsünde yer alan siklinler (siklin D1, siklin B1, vb.), p16, p21 gibi proteinlerle ilişkili olarak hücre döngüsünü durdurarak ya da Bcl-2/Bax oranı, kaspazlar, Hsp70 gibi proteinlerle ilişkili olarak apoptozisi indükleyerek kanser ilerlemesini önleyici etki gösterebilmektedir (*Lee ve diğçerleri*, 2013, s. 153-171; *Vallinas ve diğçerleri*, 2013, s. 585-599). Hücre döngüsünün kontrolü hücre bölünmesinde oldukça önemlidir çünkü döngüdeki bir regölasyon bozukluğu çeşitli karsinogenik süreçlerle ilişkilidir. Çoğı kanser türünde meydana gelen gen ekspresyonundaki

değişiklikler normal hücre döngüsündeki kontrol noktalarında bozukluklara neden olmaktadır. Retinoblastoma (RB) ve tümör baskılayıcı p53 proteinin birçok kanser türünde aktivitesini göstermediği ve hücre döngüsünde G1-S fazı ile G2-M fazındaki kontrol noktalarındaki aksaklıklar sonucu kanser gelişiminin söz konusu olduğu bilinmektedir. Kurkumin, resveratrol ve kateşinler gibi kemokoruyucu etki gösteren çeşitli fitokimyasalların hücre döngüsünün kontrolünde rol alarak kanserde potansiyel teröpatik ajan oldukları gösterilmiştir (*Dorai ve Aggarwal, 2004, s. 129-140*). HCT-116 insan kolon kanser hücreleri ile yapılan bir çalışmada kurkuminin p53 ve p21'den bağımsız olarak hücre döngüsünü G2-M fazında durdurduğu belirlenmiştir (*Jaiswal ve diğerleri, 2002, s. 8414-8427*). Moser insan kolon kanser hücreleri ile yapılan bir diğer çalışmada kurkuminin hücre döngüsünde rol alan siklin D1 ekspresyonunu baskıladığı saptanmıştır (*Chen ve Xu, 2005, s. 447-456*). Diğer bir çalışmada ise kurkuminin insan prostat ve meme kanser hücrelerinde doza ve süreye bağımlı olarak siklin E ekspresyonunu azaltarak ve de siklin bağımlı kinaz inhibitörü olan p21, p27 ve tümör baskılayıcı p53'ün ekspresyonunu artırarak hücre döngüsünü G1-S fazında durdurduğu belirlenmiştir (*Aggarwal ve diğerleri, 2007, s. 1024-1032*). Yine yapılan çalışmalarda resveratrolün de siklin bağımlı kinaz inhibitörü olan p21 ve p27 ekspresyonunu indükleyerek hücre döngüsünün G1-S fazında durmasını sağlayarak antiproliferatif etki gösterdiği bildirilmektedir (*Shankar ve diğerleri, 2007, s. 4839-4854*). EGKG ile yapılan çalışmalarda ise androjen duyarlı LNCaP ve DU 145 insan prostat kanser hücrelerinde G0-G1 fazında doza ve süreye bağımlı olarak siklin bağımlı kinaz inhibitörleri olan p21, p27, p16 ekspresyonunu artırıp siklin D1, siklin E, CDK2, CDK4 ekspresyonunu azaltarak hücre döngüsünün durmasına ve apoptozise neden olduğu bildirilmiştir (*Gupta ve diğerleri, 2003, s. 177-185*). Özetle, kurkumin, resveratrol ve EGKG'nın p21 ve p27 ekspresyonunu indükleyerek siklin bağımlı kinazların forforillenmesini önleyip hücre döngüsünün G1-S ve S-G2 fazında durdurabilmektedirler. Ayrıca apigenin, kurkumin, genistein ve silmarinin hücre döngüsünü G2-M fazında, durdurabildiği bildirilmektedir. Dolayısıyla, kanser hücre döngüsü regülasyonunda rol alan fitokimyasallar p21, p27 gibi kinazları artırarak siklin bağımlı kinazların azalmasını, siklinlerin azalması ile hücre döngüsünün durmasını ya da apoptozisi sağlayabilen potansiyel teröpatik ajanlardır (*Meeran ve Katiyar, 2008, s.2191-2202*).

Hücresel senesens, ilk kez 1961’de Hayflick tarafından tanımlanmıştır. Hücrelerin geri dönüşsüz olarak hücre döngüsünün durması senesens olarak tanımlanmaktadır. Buna göre, hücreler belirli sayıda bölünerek hayatta kalım sürelerini tamamlamaktadırlar ve bu replikatif senesens olarak bilinmektedir. Diğer taraftan DNA hasarı, oksidatif stress, onkogen aktivasyonu gibi faktörlere bağlı olarak normalden daha kısa sürede hücreler senesense girebilir ki bu stress indüklü premature senesens olarak tanımlanmaktadır (*Campisi*, 2013, s. 685-705; *Porath ve Weinberg*, 2004, s. 8-13). Hücresel senesens potansiyel kanser hücrelerinin proliferasyonunun önlenmesinde önemli bir mekanizma olarak kabul edilirken bir yandan da salgıladıkları sitokinler, büyüme faktörleri gibi senesensle ilgili sekretuar fenotip adı verilen proteinlerin normal hücrelerle etkileşimi sonucu yaşlanma ile de ilişkilendirilmektedir. Senesense girmiş hücrelerin bilinen bazı özellikleri ise şöyledir: i) Senesens hücreler, senesens bağımlı β -galaktosidaz aktivitesi göstermekte ve lizozomal kütlede artış gözlenmekte ii) Birçok senesens hücresinde CDK4 inhibitörü olan p16 ekspresyonu artmakta ve RB fosforlanmadığı için hücre döngüsü G1-S fazında durmakta iii) Senesens hücrelerin hacimlerinde artış ve yassılaşma gibi karakteristik hücre morfolojisi değişiklikleri oluşmaktadır (*Rodier ve Campisi*, 2011, s. 547-556). İyi bilinen senesens sinyalizasyon yolları ise p16’nın yanısıra p21’deki artışla hücre döngüsünün durması ve de p53 inhibitörü olan MDM2’nin ARF tarafından inhibe edilmesi sonucu p53’ün aktive olması hücre döngüsünün regülasyonunda önemlidir (*Lee ve Seon Lee*, 2014, s. 51-59). Hücrede hasar oluşturan stres faktörüne ve hasar derecesine göre hücre senesense girerek veya apoptoza giderek tümör gelişimini baskılayıcı etki göstermektedir (*Ewald ve diğerleri*, 2010, 1536-1546). Tümör hücrelerinin senesense girmesi diğer normal hücrelerin ve kök hücrelerin yaşlanmasına neden olabilmesine rağmen tümör hücrelerinde apoptoza karşı gelişen direnç alternatif bir tedavi seçeneği olarak düşünülmektedir (*Naylor ve diğerleri*, 2013, s. 105-116; *Kong ve diğerleri*, 2011, s. 1-15). Bu çalışmada, 50 μ M CYN immortalize hücrelerde HO-1 seviyelerinde artışa neden olurken 50 μ M üzerinde üçüncü ve beşinci günlerde proliferasyonu durdurduğu, hücre sayısının benzer düzeylerde kaldığı ve 250 μ M ve üzerinde hücre sayısının azaldığı belirlenmiştir. Ayrıca immortal ve kanser hücrelerinde senesens hücre morfolojisine benzer değişiklikler görülmektedir. Dolayısıyla bu CYN konsantrasyonlarında hücre döngüsü durmuş ve senesens indüklenmiş olabilir. Bunun için β -

galaktsosidaz aktivitesine bakılması ve p16 ile p21 düzeyinin değerlendirilmesi CYN'nin senesens, apoptozis, yaşlanma ve kanserle ilişkisini açıklayıcı sonuçlar verecektir. Ayrıca, PI3K/Akt, JNK, ERK gibi sinyalci kinaz yolları, hücre döngüsü ve apoptozisle olan ilişkisi de değerlendirilmelidir. Dolayısıyla, daha ileri çalışmalar yapılması HO-1 ifadesinde artışa neden olan CYN'nin bu etkiyi hangi yollar üzerinden yaptığının gösterilebilmesi ve kemokoruyucu/kemoteröpatik etkilerinin değerlendirilmesi için de önemlidir.

Ayrıca bazı fitokimyasallar ısı şok proteinlerin ifadesini de artırmaktadır. Örneğin, resveratrol hücre dizilerinde ve insan periferik lenfositlerinde HSP70 proteinin ifade seviyesini artırırken hafif-orta derece ısı şoku ile sinerjik etki göstererek ileri derece ısı hasarına karşı koruyucu olabilmektedir (*Putics ve diğerleri*, 2008, s. 65-75). Bunun yanı sıra kurkuminin de HeLa hücrelerinde doza ve süreye bağımlı olarak HSP70 ifade seviyesini artırdığı bildirilmiştir. Ayrıca, normal deri hücreleri ve immortalize olmuş mezenkimal kök hücrelerinde HSP70 ifade artışını indüklemeyen hafif derece ısı şoku ile sinerjik etki göstererek HSP70 ifade seviyesinin artışında rol aldığı gösterilmiştir (*Dunsmore ve diğerleri*, 2001, s. 2199-2204; *Rattan ve Ali*, 2007, s. 424-430; *Demirovic ve Rattan*, 2011, s. 94-98). Diğer taraftan yapılan çalışmalar çok fonksiyonel stresle indüklenebilen protein degradasyonu ve devamlılığında rolü olan HSP70'in ekspresyonunun meme, kolon, prostat kanser hücrelerinde arttığı ve hücrelerin apoptozunu önleyip hayatta kalımlarını destekleyerek kanser tedavisine karşı direnci artırdığı bildirilmektedir. Bu amaçla HSP70 inhibitörü olabilecek çeşitli moleküllerle HSP70'i hedef alan kanser tedavileri geliştirilmesi de öngörülebilmektedir (*Leu ve diğerleri*, 2009, s. 15-27; *Galluzzi ve diğerleri*, 2009, s. 176-177; *Nylandsted ve diğerleri*, 2000, s. 122-125). Bu çalışmada ise CYN, normal deri hücrelerinde HSP70 ifade seviyesini indüklemeyen immortalize olmuş mezenkimal kök hücrelerinde hafif düzeyde indüklemeye potansiyeli göstermiştir. Buna göre, CYN de hafif düzeyde ısı şok ile sinerjik etki gösterebileceği öngörülebilir bunun için de CYN muamelesi ve sonrasında hafif düzeyde ısı şok muamelesi veya CYN ve ısı şok muamelesinin birlikte uygulanacağı çalışmaların yanı sıra kanser hücrelerinde HSP70'in düzeyi ve CYN gibi fitokimyasalların HSP70 inhibitörü olarak kanser hücrelerindeki sitotoksik etkilerini araştıran çalışmalar planlanmalıdır.

Sonuç olarak hücresel ROS yanıtları hasar düzeyine bağlı olmakla birlikte hücre tipi, doz ve muamele/maruziyet süresine bağlı olarak değişmektedir (*Martindale ve Holbrook*, 2002, s. 1-15). Bu çalışmada, normal ve immortalize olmuş mezenkimal kök hücrelerin antioksidan ve ısı şok yanıtları CYN konsantrasyonu ve hücre tipine göre farklılık göstermiştir. Dolayısıyla, yaşlanma ve kanser ile ilişkili olan oksidatif stres düzeyi organizmal, dokusal ve hücresel farklılıklara bağlı olarak değişmektedir (*Golden ve diğerleri*, 2002, s. 117–123).

SONUÇ VE ÖNERİLER

1. CYN'nin hücre proliferasyonu ve morfolojisi üzerine olan etkileri doz ve hücre tipine bağlı olarak değişmektedir. Normal insan deri hücrelerinin CYN tolerasyonu diğer hücrelere göre daha yüksektir.

Dolayısıyla, düzenli enginar tüketimi ve bileşiminde bulunan CYN, vücuttaki potansiyel kanser hücrelerinin büyüme ve çoğalmasına karşı koruyucu olabilir.

2. Antioksidatif HO-1 bağımlı yolağı CYN'nin potansiyel olumlu etki mekanizması olabilir.

Dolayısıyla, CYN'nin diğer antioksidatif proteinler ve diğer stres yanıt yolak aktivasyonu ve potansiyel hormetin olma olasılığını belirlemek için daha fazla çalışma gereklidir.

3. Bu çalışmada zaman ve bütçe sınırlılığı nedeniyle Sigma-Aldrich firmasından temin edilen CYN ekstraktı kullanılmıştır.

Ancak, çevresel faktörler besinlerin besin ögesi ve fitokimyasal bileşimini etkilediğinden Kuzey Kıbrıs'ta yetiştirilen enginarların CYN içeriğinin belirlenmesi ve araştırmalarda bu enginarlardan ekstrakte edilen CYN'nin kullanılması daha doğru tüketim önerilerinin geliştirilmesine olanak sağlayacaktır.

4. CYN ve enginarla ilgili beslenme önerilerinin geliştirilebilmesi için daha ileri moleküler, epidemiyolojik ve klinik çalışmalara ihtiyaç vardır.

Daha ileri moleküler beslenme araştırmalarının aşağıdaki özelliklere sahip olması önemlidir:

- Besin bileşenlerinin biyolojik etkilerinin daha iyi anlaşılabilmesi için –omik teknolojilerin (nutrigenomik, nutriproteomik, nutrimetabolomik) uygulanması
- Besin bileşenlerinin epigenetik etkilerinin ve insan sağlığı ile ilişkisinin analiz edilmesi
- Besin bileşenlerinin kronik hastalıklar üzerine potansiyel etkilerinin belirteçlerinin tanımlanması ve geçerliliğinin saptanması
- Moleküler çalışma sonuçlarından yola çıkarak klinik müdahale çalışmalarının planlanması

KAYNAKÇA

Academy of Nutrition and Dietetics. (2013). Position of the Academy of Nutrition and Dietetics: The role of nutrition in health promotion and chronic disease prevention. *Journal of Academy of Nutrition and Dietetics*, 113, 972-979.

Adzet, T. ve Puigmacia, M. (1985). High-performance liquid chromatography of caffeoylquinic acid derivatives of *Cynara scolymus* L. leaves. *Journal of Chromatography*, 348, 447-453.

Adzet, T., Camarasa, J., Laguna, J. C. (1987). Hepatoprotective activity of polyphenolic compounds from *Cynara scolymus* against CCl₄ toxicity in isolated rat hepatocytes. *Journal of Natural Products*, 50(4), 612-617.

Aggarwal, B. B., Banerjee, S., Bharadwaj, U., Sung, B., Shishodia, S. ve Sethi, G. (2007). Curcumin induces the degradation of cyclin E expression through ubiquitin-dependent pathway and up-regulates cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p27 in multiple human tumor cell lines. *Biochemical Pharmacology*, 73, 1024-1032.

Akbaraly, T., Sabia, S., Johnson, G. H., Tabak, A. G., Shipley, M. J., Jokela, M. ve diğerleri. (2013). Does overall diet in midlife predict future aging phenotypes? A cohort study. *The American Journal of Medicine*, 126, 411-419.

Alonso, M. R., García, M. D. C., Bonelli, C. G., Ferraroi G. ve Rubio, M. (2006). Validated HPLC method for cynarin determination in biological samples. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, 25(2), 267-270.

Andreadi, C. K., Howells, L. M., Atherfold, P. A. ve Manson, M. M. (2006). Involvement of Nrf2, p38, B-Raf, and nuclear factor- κ B, but not phosphatidylinositol 3-kinase, in induction of hemeoxygenase-1 by dietary polyphenols. *Molecular Pharmacology*, 69, 1033-1040.

Argyropoulou, A., Aligiannis, N., Trougakos, I. P. ve Skaltsounis, A. L. (2013). Natural compounds with anti-ageing activity. *Natural Product Reports*, 30, 1412-1437.

Atasever, B., Dar, K. A., Kuruca, S. E., Turan, N., Seyhanlı, V. ve Meriçli, A. (2003). Effects of flavonoids obtained from *Cynara syriaca* on leukemic cells. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*, 32(3), 143-150.

Atkins, J. L., Whincup, P. H., Morris, R. W., Lennon, L. T., Papacosta, O. ve Wannamethee S. G. (2014). High diet quality is associated with a lower risk of cardiovascular disease and all-cause mortality in older men. *Journal of Nutrition*, 144, 673–680.

Azzini, E., Bugianesi, R., Romano, F., Di Venere, D., Miccadei, S., Durazzo, A. ve diğerleri. (2007). Absorption and metabolism of bioactive molecules after oral consumption of cooked edible heads of *Cynara scolymus* L. (cultivar Violetto di Provenza) in human subjects: a pilot study. *British Journal of Nutrition*, 97, 963–969.

Balogun, E., Hoque, M., Gong, P., Killeen, E., Green, J. C., Foresti, R. ve diğerleri. (2003). Curcumin activates the heme oxygenase-1 gene via regulation of Nrf2 and the antioxidant responsive element. *Biochemical Journal*, 371, 887-895.

Barnes, J., Anderson, L. A. ve Philipson, J. D. (2007). Herbal Medicines. London: Pharmaceutical Press.

Birben, E., Sahiner Ü. M., Sackesen, C., Erzurum, S. ve Kalayci, Ö. (2012). Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organisation Journal*, 5, 9–19.

Boruchovitch, E. ve Mednick, B. R. (2002). The meaning of health and illness: some considerations for health psychology. *Psico-USF*, 7(2), 175-183.

Bradley, P. (2006). *British Herbal Compendium (Volume 2) A handbook of scientific information on widely used plant drugs*. Bournemouth: British Herbal Medicine Association.

Bundy, R., Walker, A. F., Middleton, R. W., Wallis, C. ve Simpson, H. C. R. (2008). Artichoke leaf extract (*Cynara scolymus*) reduces plasma cholesterol in otherwise healthy hypercholesterolemic adults: A randomized, double blind placebo controlled trial. *Phytomedicine* 15, 668–675.

Buckland, G., Maye'n, A. L., Agudo, A., Travier, N., Navarro, C., Mari'a, J. ve diğeri. (2012). Olive oil intake and mortality within the Spanish population (EPIC-Spain). *American Journal of Clinical Nutrition*, 96, 142-149.

Calabrese, E. J. (2002). Hormesis: Changing view of dose-response, a personal account of the history and current status. *Mutation Research*, 511, 181-189.

Calabrese, E. J. (2008). Hormesis: Why it is important to toxicology and toxicologists. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27(7), 1451-1474.

Cardile, V., Scifo, C., Russo, A., Falsaperla, M., Morgia, G., Silvestre, G. ve diğeri. (2003). Involvement of HSP70 in resveratrol-induced apoptosis of human prostate cancer. *Anticancer Research*, 23, 4921-4926.

Ceccarelli, N., Curadi, M., Picciarelli, P., Martelloni, L., Sbrana, C. ve Giovannetti, M. (2010). Globe artichoke as a functional food. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism*, 3, 197–201.

Chen, A. ve Xu, J. (2005). Activation of PPAR γ by curcumin inhibits Moser cell growth and mediates suppression of gene expression of cyclin D1 and EGFR. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*, 288, 447-456.

Chen, C. H., Ho, M. L., Chang, J. K., Hung, S. H. ve Wang, G. J. (2005a). Green tea catechin enhances osteogenesis in a bone marrow mesenchymal stem cell line. *Osteoporos International*, 16, 2039–2045.

Chen, C., Shen, G., Hebbar, V., Hu, R., Owuor, E. D. ve Kong, A. N. T. (2003). Epigallocatechin-3-gallate-induced stress signals in HT-29 human colon adenocarcinoma cells. *Carcinogenesis*, 24(8), 1369-1378.

Chen, C. Y., Jang, J. H., Li, M. H. ve Surh, Y. J. (2005b). Resveratrol upregulates heme oxygenase-1 expression via activation of NF-E2-related factor 2 in PC12 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 331; 993-1000.

Chen, C., Yu, R., Owuor, E. D. ve Kong, A. N. (2000). Activation of antioxidant-response element (ARE), mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and caspases by major green tea polyphenol components during cell survival and death. *Archives of Pharmacal Research*, 23(6):605-612.

Christaki, E., Bonos, E. ve Paneri, P. F. (2012). Nutritional and functional properties of cynara crops (globe artichoke and cardoon) and their potential applications: A review. *International Journal of Applied Science and Technology*, 2(2), 64-70.

Choi, B. M. ve Kim, B. R. (2008). Upregulation of heme oxygenase-1 by brazilin via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and ERK pathways and its protective effect against oxidative injury. *European Journal of Pharmacology*, 580, 12–18.

Chrysoshoou C. ve Stefanadis C. (2013). Longevity and diet. Myth or pragmatism?. *Maturitas* 76, 303–307.

Chuang, S. C., Norat, T., Murphy, N., Olsen, A., Tjønneland, A., Overvad, K. ve diğerleri. (2012). Fiber intake and total cause-specific mortality in the European prospective investigation into cancer and nutrition cohort. *American Journal of Clinical Nutrition*, 96, 164–174.

Ciocca, D. R. ve Calderwood, S. K. (2005). Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell Stress & Chaperones*, 10(2), 86–103.

Colman, R. J., Beasley, T. M., Kemnitz J. W., Johnson, S. C., Richard Weindruch, R. ve Anderson, R. M. (2014). Caloric restriction reduces age-related and all-cause mortality in rhesus monkeys. *Nature Communications*, 5, 3557-3561.

de Grey, A. D. N. J. (1999). The mitochondrial free radical theory of aging. U.S.A.: R. G. Landes Company.

Danino, O., Gottlie, H. E., Grossman, S, ve Bergman, M. (2009). Antioxidant activity of 1,3-dicaffeoylquinic acid isolated from *Inula viscosa*. *Food Research International*, 42, 1273–1280.

Demirovic, D. ve Rattan, S. I. S. (2011). Curcumin induces stress response and hermetically modulates wound healing ability of human skin fibroblasts undergoing ageing in vitro. *Biogerontology*, 12, 437–444.

Demirovic, D. ve Rattan, S. I. S. (2013). Establishing cellular stress response profiles as biomarkers of homeodynamics, health and hormesis. *Experimental Gerontology*, 48, 94–98.

Dong, G. C., Chuang, P. H., Chang, K. C., Jan, P. S., Hwang, P. I., Wu, H. B. ve diğeri. (2009). Blocking effect of an immuno-suppressive agent, cynarin, on CD28 of T-cell receptor. *Pharmaceutical Research*, 26(2), 375-381.

Dorai, T. ve Aggarwal, B. B. (2004). Role of chemopreventive agents in cancer therapy. *Cancer Letters*, 215, 129–140.

Downar, D. Z., Downar, A. Z., Naruszewicz, M., Siennicka, A., Krasnode, B. ve Kolodziej, B. (2002). Protective properties of artichoke (*Cynara scolymus*) against oxidative stress induced in cultured endothelial cells and monocytes. *Life Sciences*, 71, 2897–2908.

Dreger, H., Lorenz, M., Kehrer, A., Baumann, G., Stangl, K. ve Stangl, V. (2008). Characteristics of catechin- and theaflavin-mediated cardioprotection. *Experimental Biology and Medicine*, 233(4), 427-33.

Dunsmore, K. E., Chen, P.G. ve Wong, H. R. (2001). Curcumin, a medicinal herbal compound capable of inducing the heat shock response. *Critical Care Medicine*, 29(11), 2199-2204.

Ebadi, M. (2007). *Pharmacodynamic Basis of Herbal Medicine*. Boca Raton: CRC Press.

Englisch, W., Beckers, C., Unkauf, M., Ruepp, M. ve Zinserling, V. (2000). Efficacy of artichoke dry extract in patients with hyperlipoproteinemia. *Arzneimittelforschung*, 50(3), 260-265.

Ernst, E. ve Pittler, M. H. (2000). Safety issues in phytotherapy. Edzard Ernst (Ed.). *Herbal medicine: A concise overview for professionals*. (p. 70-71). Oxford: Butterworth-Heinemann.

EuroHealthNet. (2012). *Healthy and active ageing*. Brussels: The Federal Centre for Health Education.

Everitt, A. V., Heilbronn, L. K., Morris, J. B., Borg, H. M. B., Merry, B. J., Simpson, S. J. ve diğerleri. (2010). Conclusion: Human calorie restriction and anti-ageing therapy. Arthur V. Everitt, Suresh I.S. Rattan, David G. Le Courteur, Rafael de Cabo (Ed.). *Calorie Restriction, Aging and Longevity* (p.311-318). London: Springer.

Everitt, A. V., Hilmer, S. N., Miller, J. C. B., Jamieson, H. A., Truswell, A. S., Sharma, A. P. ve diğerleri. (2006). Dietary approaches that delay age-related diseases. *Clinical Interventions in Aging*, 1(1), 11–31.

Ewald, J. A., Desotelle, J. A., Wilding, G. ve Jarrard, D. F. (2010). Therapy-induced senescence in cancer. *Journal of National Cancer Institute*, 102, 1536-1546.

Ferrari, C. K. B. (2007). Functional foods and physical activities in health promotion of aging people. *Maturitas*, 58, 327–339.

Ferrari, C. K. B. ve Torres, E. A. F. S. (2003). Biochemical pharmacology of functional foods and prevention of chronic diseases of aging. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 57, 251–260.

Finkel, T. ve Holbrook, N. J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408, 234-247.

Fontana, L. (2009). The scientific basis of caloric restriction leading to longer life. *Current Opinion in Gastroenterology*, 25,144–150.

Galluzzi, L., Giordanetto, F. ve Kroemer, G. (2009). Targeting HSP70 for cancer therapy. *Molecular Cell*, 36, 176-177.

Garcia, F. P., Adzet, T. ve Canigual, S. (2000). Activity of artichoke leaf extract on reactive oxygen species in human leukocytes. *Free Radical Research*, 33, 661-665.

Gebhardt, R. (1997). Antioxidative and protective properties of extracts from leaves of the artichoke (*Cynara scolymus L.*) against hydroperoxide-induced oxidative stress in cultured rat hepatocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology* 144, 279–286.

Gebhardt, R. ve Fausel, M. (1997). Antioxidant and hepatoprotective effects of artichoke extracts and constituents in cultured rat hepatocytes. *Toxicology in Vitro*, 11, 669-672.

Giacosa, A., Barale, R., Bavaresco, L., Faliva, M. A., Gerbi, V., La Vecchia C. ve diğerleri. (2014). Mediterranean way of drinking and longevity. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, e-publish. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25207479> [Erişim tarihi: 14th September 2014].

Golden, T. R., Hinerfeld, D. A. ve Melov, S. (2002). Oxidative stress and aging: beyond correlation. *Aging Cell*, 1, 117–123.

Goodman, M., Bostick, R. M., Küçük, Ö. Ve Jones, D. P. (2011). Clinical trials of antioxidants as cancer prevention agents: Past, present, and future. *Free Radical Biology & Medicine*, 51, 1068–1084.

Gouveia, S. C. ve Castilho, P. C. (2012). Phenolic composition and antioxidant capacity of cultivated artichoke, Madeira cardoon and artichoke-based dietary supplements. *Food Research International*, 48, 712–724.

Green, H. ve Rosenberg, I. (2013). Nutrition and the biology of human ageing: ageing in the human population. *The Journal of Nutrition, Health & Aging*, 17(8), 707-709.

Gupta, S., Hussain, T. ve Mukhtar, H. (2003). Molecular pathway for (-)-epigallocatechin-3-gallate-induced cell cycle arrest and apoptosis of human prostate carcinoma cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 410, 177–185.

Hayes, D. P. (2007). Nutritional Hormesis. *European Journal of Clinical Nutrition*, 61, 147–159.

Heckers, H., Dittmar, K., Schmahl, F.W. ve Huth, K. (1977). Inefficiency of cynarin as therapeutic regimen in familial type II hyperlipoproteinaemia. *Atherosclerosis*, 26, 249-253.

Heilbronn, L. K. ve Eric Ravussin, E. (2003). Calorie restriction and aging: review of the literature and implications for studies in humans. *American Journal of Clinical Nutrition*, 78,361–369.

Hine, C. M. ve Mitchell, J. R. (2012). Nrf2 and the phase ii response in acute stress resistance induced by dietary restriction. *Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 4, 1-16.

Holloszy, J. O. ve Fontana, L. (2007). Calorie restriction in humans. *Experimental Gerontology*, 42(8), 709-712.

Holtmann, G., Adam, B., Haag, S., Collet, Gruünewald, W. E. ve Windeck, T. (2003). Efficacy of artichoke leaf extract in the treatment of patients with functional dyspepsia: a six-week placebo-controlled, double-blind, multicentre trial. *Aliment Pharmacology & Therapeutics*, 18, 1099–1105.

Hu, R. ve Kong, A. N . T. (2004). Activation of MAP kinases, apoptosis and nutrigenomics of gene expression elicited by dietary cancer-prevention compounds. *Nutrition*, 20, 83-88.

IUPAC and IUPAC-IUB Commision. (1976). Nomenclature of cyclitols. *Biochemical Journal*, 153, 23-31.

Jaiswal, A. S., Marlow, B. P., Gupta, N. ve Narayan, S. (2002). β -Catenin-mediated transactivation and cell-cell adhesion pathways are important in curcumin (diferuylmethane)-induced growth arrest and apoptosis in colon cancer cells. *Oncogene*, 21, 8414-8427.

Jørgensen, P., Lidija Milkovic, L., Neven Zarkovic, N., Waeg, G. ve Rattan, S. I. S. (2014). Lipid peroxidation-derived 4-hydroxynonenal-modified proteins accumulate in human facial skin fibroblasts during ageing in vitro. *Biogerontology*, 15, 105–110.

Juan, S. H., Cheng, T. H., Lin, H. C., Chu, Y. L. ve Lee, W. S. (2005). Mechanism of concentration-dependent induction of heme oxygenase-1 by resveratrol in human aortic smooth muscle cells. *Biochemical Pharmacology*, 69(1), 41-48.

Jun, N. J., Jang, K. C., Kim, S. C., Moon, D. Y., Seong, K. C., Kang, K. H. ve diğerleri. (2007). Radical scavenging activity and content of Cynarin (1,3-dicaffeoylquinic acid) in artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Journal of Applied Biological Chemistry*, 50(4), 244-248.

Junk, K. A. ve Kwak, M. K. (2010). The Nrf2 system as a potential target for the development of indirect antioxidants. *Molecules*, 15, 7266-7291.

Kaiser, J. (2003). Sipping from a poisoned chalice. *Science*, 302, 376-379.

Kant, A. K., Schatzkin A., Graubard, B. I. ve Schairer, C. (2000). A prospective study of diet quality and mortality in women. *Journal of American Medical Association*, 283, 2109-2115.

Kant A. K., Schatzkin A., Harris T. B., Zeigler R. G. ve Block G. (1993). Dietary diversity and subsequent mortality in the First National Health and Nutrition Examination Survey epidemiologic follow-up study. *American Journal of Clinical Nutrition*, 57, 434-440.

Kappeler, R., Eichholzer, M. ve Rohrmann, S. (2013). Meat consumption and diet quality and mortality in NHANES III. *European Journal of Clinical Nutrition*, 67, 598–606.

Kasımoğulları, S. Ç., Oran, S., Arı, F., Ulukaya, E., Aztopal, N, Sarımahmut, M. ve diğerleri. (2014). Genotoxic, cytotoxic, and apoptotic effects of crude extract of *Usnea filipendula* Stirt. in vitro. *Turkish Journal of Biology*, 38, 1-8.

Kaspar, J. W., Niture, S. K. ve Jaiswal, A. K. (2009). Nrf2:INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine* 47(9), 1304–1309.

Kim S., Haines P. S., Riz A. M. S. ve Popkin B. M. (2003). The Diet Quality Index-International (DQI-I) provides an effective tool for cross-national comparison of diet quality as illustrated by China and the United States. *Journal of Nutrition*, 133, 3476–3484.

Kim S., Popkin B. M., Riz A. S., Haines P. S. ve Arab L. (2004). A cross-national comparison of lifestyle between China and the United States, using a comprehensive cross-national measurement tool of the healthfulness of lifestyles: the Lifestyle Index. *Preventive Medicine*, 38, 160– 171.

Kirchhoff, R., Beckers, C. H., Kirchhoff, G. M., Gartner, H. T., Petrowicz, O. ve Reimann, H. J. (1994). Increase in choleresis by means of artichoke extract. *Phytomedicine*, 1, 107-115.

Kirkwood, T. B. L. (2008). A systematic look at an old problem. *Nature*, 451, 644-647.

Knoops, K. T. B., Groot, L. C. P. G. M., Kromhout, D., Perrin, A. E., Varela, O. M., Menotti, A. ve diğerleri. (2004). Mediterranean diet, lifestyle factors, and 10-year mortality in elderly European men and women. *Journal of American Medical Association*, 292(12), 1433-1439.

Kong, Y., Cui, H., Ramkumar, C. ve Zhang, H. (2011). Regulation of senescence in cancer and aging. *Journal of Aging Research*, 2011, 1-15.

Kou, X., Kirberger, M., Yang, Y. ve Chen, N. (2013). Natural products for cancer prevention associated with Nrf2–ARE pathway. *Food Science and Human Wellness*, 2, 22–28.

Kraft, K. (1997). Artichoke leaf extract - Recent findings reflecting effects on lipid metabolism, liver and gastrointestinal tracts. *Phytomedicine*, 4 (4), 369-378.

Kukić, J., Popović, V., Petrović, S., Mucaji, P., Ćirić, A., Stojković, D. ve diğerleri. (2008). Antioxidant and antimicrobial activity of *Cynara cardunculus* extracts. *Food Chemistry*, 107, 861–868.

Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti, Tarım ve Doğal Kaynaklar Bakanlığı, İstatistik ve Planlama Kurumu (2011). Tarımsal Yapı ve Üretim 2010. Lefkoşa: İstatistik ve Planlama Kurumu.

Küçükgergin, C., Aydın, A. F., Erata, G. Ö., Mehmetçik, G., Toker, N. K. ve Uysal, M. (2010). Effect of artichoke leaf extract on hepatic and cardiac oxidative stress in rats fed on high cholesterol diet. *Biological Trace Element Research*, 135, 264–274.

Kweon, M. H., Park, I. Y., Sung, H. C. ve Mukhtar, H. (2006). The novel antioxidant 3-O-caffeoyl-1-methylquinic acid induces Nrf-2 dependent phase II detoxifying genes and alters intracellular glutathione redox. *Free Radical Biology and Medicine*, 1349-1361.

Lagiou, P., Trichopoulos, D., Sandin, S., Logiou, A., Mucci, L., Wolk, A. ve diğerleri. (2006). Mediterranean dietary pattern and mortality among young women: a cohort study in Sweden. *British Journal of Nutrition*, 96, 384–392.

Lane, N. (2011). The evolution of oxidative stress. K. Pantopoulos, H. M. Schipper (Ed.). *Principles of Free Radical Biomedicine* (p. 1-17). New York: Nova Science Publishers.

Lattanzio, V., Kroon, P. A., Linsalata, V. ve Cardinali, A. (2009). Globe artichoke: A functional food and source of nutraceutical ingredients. *Journal of Functional Foods*, 1, 131-144.

Lee, J. H., Khor, T. O., Shu, L., Su, Z. Y., Fuentes, F. ve Kong, A. N. T. (2013). Dietary phytochemicals and cancer prevention: Nrf2 signaling, epigenetics, and cell death mechanisms in blocking cancer initiation and progression. *Pharmacology and Therapeutics*, 137, 153–171.

Lee, J., Jo, D. G., Park, D., Chung, H. Y. ve Mattson M. P. (2014). Adaptive cellular stress pathways as therapeutic targets of dietary phytochemicals: Focus on the nervous system. *Pharmacological Reviews*, 66, 815-868.

Lee, M. ve Lee Seon, J. (2014). Exploiting tumor cell senescence in anticancer therapy. *BMB Reports*, 47(2), 51-59.

Lee, Y. M., Auh, Q., Lee, D. W., Kim, J. Y., Jung, H. J., Lee, S. H. ve diğerleri. (2013). Involvement of Nrf2-mediated upregulation of heme oxygenase-1 in mollugin-induced growth inhibition and apoptosis in human oral cancer cells. *BioMed Research International*, 2013, 1-14.

Leu, J. I. J., Pimkina, J., Frank, A., Murphy, M. E. ve George, D. L. (2009). A small molecule inhibitor of inducible Heat Shock Protein 70. *Molecular Cell*, 36, 15-27.

Li, H., Xia, N., Brausch, I., Yao, Y. ve Förstermann, U. (2004). Flavonoids from artichoke (*Cynara scolymus* L.) up-regulate endothelial-type Nitric-Oxide Synthase gene expression in

human endothelial cells. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 310, 926-932.

Lima, C. F., Wilson, . P. ve Rattan, S. I. S. (2011). Curcumin induces heme oxygenase-1 in normal human skin fibroblasts through redox signaling: Relevance for anti-aging intervention. *Molecular Nutrition and Food Resource*, 55, 430–442.

Liu, R. H. (2003). Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *American Journal of Clinical Nutrition*, 3, 78, 517S–520S.

Lucey, B. P., Rees, W. A. N. ve Hutchins, G. M. (2009). Henrietta Lacks, HeLa cells, and cell culture contamination. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 133, 1463–1467.

Lupattelli, G., Marchesi, S., Lombardini, R., Roscini, A. R., Trinca, F., Gemelli, F. ve diğerleri. (2004). Artichoke juice improves endothelial function in hyperlipemia. *Life Sciences*, 76, 775–782.

Lutz, M., Henriquez, C. ve Escobar, M. (2011). Chemical composition and antioxidant properties of mature and baby artichokes (*Cynara scolymus* L.), raw and cooked. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24, 49–54.

Marakis, G., Walker, A. F., Middleton, R. W., Booth, J. C. L., Wright, J., ve Pike, D. J. (2002). Artichoke leaf extract reduces mild dyspepsia in an open study. *Phytomedicine*, 9, 694–699.

Martin, D., Rojo, A. I., Salinas, M., Diaz, R. Gallardo, G., Alam, J. ve diğerleri. (2004). Regulation of heme oxygenase-1 expression through the phosphatidylinositol 3-kinase/akt pathway and the Nrf2 transcription factor in response to the antioxidant phytochemical carnosol. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 8919-8929.

Martindale, J. L. ve Holbrook, N. J. (2002). Cellular response to oxidative stress: Signaling for suicide and survival. *Journal of Cellular Physiology*, 192, 1–15.

Mattson, M. P. (2008a). Hormesis defined. *Ageing Research Reviews*, 7(1), 1–7.

Mattson, M. P. (2008b). Dietary factors, hormesis and health. *Ageing Research Reviews*, 7(1), 43-48.

Mattson, M. P. ve Calabrese, E. J. (2010). Hormesis: What it is and why it matters. Mark P. Mattson, Edward J. Calabrese (Ed.). *Hormesis a revolution in Biology, Toxicology and Medicine* (p. 1-14). New York: Springer.

McNaughton S. A., Chris J. Bates C. J. ve Mishra G. D. (2012). Diet quality is associated with all-cause mortality in adults aged 65 years and older. *Journal of Nutrition* 142, 320–325.

Meeran, S. M. ve Katiyer, S. K. (2008). Cell cycle control as a basis for cancer chemoprevention through dietary agents. *Frontier Bioscience*, 13: 2191-2202.

Mehmetçik, G., Özdemirler, G., Toker, N. K., Çevikbaş, U. ve Uysal, M. (2008). Effect of pretreatment with artichoke extract on carbon tetrachloride-induced liver injury and oxidative stress. *Experimental and Toxicology Pathology*, 60, 475-480.

Meng L., Maskarinec G., Lee J., ve Kolonel L. N. (1999). Lifestyle Factors and Chronic Diseases: Application of a Composite Risk Index. *Preventive Medicine* 29, 296–304.

Miccadei, S., Di Venere, D., Cardinali, A., Romano, F., Durazzo, A., Foddai, M. S. ve diğerleri. (2008). Antioxidative and apoptotic properties of polyphenolic extracts from edible part of artichoke (*Cynara scolymus* L.) on cultured rat hepatocytes and on human hepatoma cells. *Nutrition and Cancer*, 60(2), 276–283.

Michel J. P. (2009). Nutrition – Ageing and Longevity. Bruxelles: Institut Danone.

Michels, K. B. ve Wolk, A. (2002). A prospective study of variety of healthy foods and mortality in women. *International Journal of Epidemiology*, 31, 847-854.

Mercken, E. M., Crosby, S. D., Lamming, D. W., JeBailey, L., Walker, K. S., Villareal, D. T. ve diğerleri. (2013). Calorie restriction in humans inhibits the PI3K/AKT pathway and induces a younger transcription profile. *Aging Cell*, 12, 645–651.

Meydanı, M. (2001). Nutrition interventions in aging and age-associated disease. *Annals New York Academy of Sciences*, 226-235.

Meyer, T. E., Kovács, S. J., Ehsani, A. A., Klein, S., Holloszy, J. O. ve Fontana, L. (2006). Long-term caloric restriction ameliorates the decline in diastolic function in humans. *Journal of the American College of Cardiology*, 47(2), 398-402.

Morse, D. ve Choi, A. M. K. (2002). Heme Oxygenase-1: The “emerging molecule” has arrived. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 27, 8-16.

Na, H. K. ve Surh, Y. J. (2008). Modulation of Nrf2-mediated antioxidant and detoxifying enzyme induction by the green tea polyphenol EGCG. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 1271-1278.

Nasser A. M. A. G. (2012). Phytochemical study of *Cynara scolymus* L. (Artichoke) (Asteraceae) cultivated in Iraq, detection and identification of phenolic acid compounds cynarin and chlorogenic acid. *Iraq Journal of Pharmaceutical Sciences*, 21(1), 6-13.

Naylor, R. M., Baker, D. J. ve van Deursen, J. M. (2013). Senescent cells: A novel therapeutic target for aging and age-related disease. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 93(1), 105-116.

Negro, D., Montesano, V., Grieco, S., Crupi, P., Sarli, G., De Lisi, A. ve diğerleri (2012). Polyphenol compounds in artichoke plant tissues and varieties. *Journal of Food Science*, 77(2), 244-252.

Nies, A. H., Groot, L. C. P. G. M., Burema, J., Cruz, J. A. A., Osler, M., ve Staveren, W. A. (2002). Dietary Quality and Lifestyle Factors in Relation to 10-Year Mortality in Older Europeans. *American Journal of Epidemiology*, 156(10), 962-968.

Nies, A. H., Groot L. C. P. G. M., Staveren, W. A. (2003a). Dietary quality, lifestyle factors and healthy ageing in Europe: the SENECA study. *Age and Ageing*, 32, 427–434.

Nies, A. H., Groot, L. C. P. G. M., ve Staveren, W. A. (2003b). Relation of dietary quality, physical activity, and smoking habits to 10-year changes in health status in older Europeans in the SENECA Study. *American Journal of Public Health*, 93, 318–323.

Nobile, M. A. D., Conte, A., Scrocco, C., Laverse, J., I. Brescia, I., Conversa, G. ve diğerleri. (2009). New packaging strategies to preserve fresh-cut artichoke quality during refrigerated storage. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 10, 128–133.

Nylandsted, J., Brand, K. ve Jäätelä, M. (2000). Heat Shock Protein 70 is required for the survival of cancer cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 926, 122-125.

Otterbein, L. E. ve Choi, A. M. K. (2000). Heme oxygenase: colors of defense against cellular stress. *American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology*, 279, 1029-1037.

Özkan, A ve Erdoğan, A. (2013). Membrane and DNA damaging/protective effects of eugenol, eucalyptol, terpinen-4-ol, and camphor at various concentrations on parental and drug-resistant H1299 cells. *Turkish Journal of Biology*, 37, 405-413.

Pae, H. O., Jeong, G. S., Jeong, S. O., Kim, H. S., Kim, S. A., Kim, Y. C. ve diğerleri. (2007). Roles of heme oxygenase-1 in curcumin-induced growth inhibition in rat smooth muscle cells. *Experimental and Molecular Medicine*, 39(3)267-277.

Palermo, M., Colla, G., Barbieri, G. ve Fogliano, V. (2013). Polyphenol metabolite profile of artichoke is modulated by agronomical practices and cooking method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 7960-7968.

Pandino, G., Lombardo, S., Williamson, G. ve Mauromicale, G. (2012). Polyphenol profile and content in wild and cultivated *Cynara cardunculus* L. *Italian Journal of Agronomy* 2012, 7, 254-261.

Pandino, G., Lombardo, S. ve Mauromicale, G. (2011a). Mineral profile in globe artichoke as affected by genotype, head part and environment. *Journal of the Science Food and Agriculture*, 91(2), 302-308.

Pandino, G., Lombardo, S., Mauromicale, G. ve Williamson, G. (2011b). Profile of polyphenols and phenolic acids in bracts and receptacles of globe artichoke (*Cynara cardunculus* var. *scolymus*) germplasm. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24, 148–153.

Pandino, G., Lombardo, S., Mauromicale, G. ve Williamson, G. (2011c). Phenolic acids and flavonoids in leaf and floral stem of cultivated and wild *Cynara cardunculus* L. genotypes. *Food Chemistry* 126, 417–422.

Panizzi, L. ve Scarpati, M. L. (1954). Constitution of Cynarine, the active principle of the artichoke. *Nature*, 174, 1062.

Petrowicz, O., Gebhardt, R., Donner, M., Schwandt, M. ve Kraft, K. (1997). Effects of artichoke leaf extract (ALE) on lipoprotein metabolism in vitro and in vivo. *Atherosclerosis*, 129, 147.

Pittler, M. H., Thompson, C. J. ve Ernst, E. (2006). Artichoke leaf extract for treating hypercholesterolaemia. *The Cochrane Library*, 1, 1-17.

Prior, R. L. ve Cao, G. (2000). Antioxidant phytochemicals in fruits and vegetables: Diet and health implications. *HortScience*, 35(4), 588-592.

Pullikotil, P., Cheni H., Muniyappa, R., Greenberg, C. C., Yang, S., Reiter, C. E. N. ve diğerleri. (2012). Epigallocatechin gallate induces expression of heme oxygenase-1 in endothelial cells via p38 MAPK and Nrf-2 that suppresses pro-inflammatory actions of TNF- α . *Journal of Nutritional Biochemistry*, 23(9), 1134–1145.

Pugazhenth, S., Akhov, L., Selvaraj, G., Wang, M. ve Alam, J. (2007). Regulation of heme oxygenase-1 expression by demethoxy curcuminoids through Nrf2 by a PI3-kinase/Akt-mediated pathway in mouse β -cells. *American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism* 293, 645-655.

Putics, A., Végh, E. M., Csermely, P., Söti, C. (2008). Resveratrol induces the heat-shock response and protects human cells from severe heat stress. *Antioxidans & Redox Signaling*, 10(1), 65-75.

Rattan, S. I. S. (2005). Hormetic modulation of aging and longevity by mild heat stress. *Dose-Response*, 3, 533-546.

Rattan, S. I. S. ve Ali, R. E. (2007). Hormetic prevention of molecular damage during cellular aging of human skin fibroblasts and keratinocytes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1100: 424–430.

Rattan, S. I. S., Sejersen, H., Fernandes, R. A. ve Luo, W. (2007). Stress-mediated hormetic modulation of aging, wound healing, and angiogenesis in human cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1119, 112–121.

Rattan, S. I. S. (2008). Hormesis in ageing. *Ageing Research Reviews*, 7, 63–78.

Rattan, S. I. S., Fernandes, R. A., Demirovic, D. Dymek, B. ve Lima, C. F. (2009). Heat stress and hormetin-induced hormesis in human cells: Effects on aging, wound healing, angiogenesis, and differentiation. *Dose-Response*, 7, 90–103.

Rattan, S. I. S. (2012a). Biogerontology: from here to where? The Lord Cohen medal lecture-2011. *Biogerontology*, 13, 83–91.

Rattan, S. I. S. (2012b). Healthy ageing – from molecules to hormesis. *New Biotechnology*, 29S, 20.

Rattan, S. I. S. (2012c). Rationale and methods of discovering hormetins as drugs for healthy ageing. *Expert Opinion and Drug Discovery*, 7(5), 439–448.

Ristow, M. ve Schmeisser, S. (2011). Extending life span by increasing oxidative stress. *Free Radical Biology & Medicine* 51, 327–336.

Rizza, W., Veronese, N. ve Fontana, L. (2014). What are the roles of calorie restriction and diet quality in promoting healthy longevity?. *Ageing Research Reviews* 13, 38–45.

Rizzuto, D., Orsini, N., Qiu, C., Wang, H. X. ve Frtiglioni, L. (2012). Lifestyle, social factors, and survival after age 75: population based study. *British Medical Journal*, 345, 1-10.

Rodier, F. ve Campisi, J. (2011). Four faces of cellular senescence. *Journal of Cell Biology*, 192(4), 547-556.

Rodriguez, T. S., Giménez, D. G., ve Vázquez, R. P. (2002). Choleretic activity and biliary elimination of lipids and bile acids induced by an artichoke leaf extract in rats. *Phytomedicine*, 9, 687–693.

Ryter, S. W., Alam, J. ve Choi, A. M. K. (2006). Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. *Physiological Reviews*, 86, 583–650.

Scapagnini, G., Foresti, R., Calabrese, V., Stella, A. M. G., Green, C. J., ve Motterlini, R. (2002). Caffeic acid phenethyl ester and curcumin: A novel class of heme oxygenase-1 inducers. *Molecular Pharmacology*, 3, 554-561.

Schmitt, E., Gehrmann, M., Brunet, M., Multhoff, G. ve Garrido, C. (2007). Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy. *Journal of Leukocyte Biology*, 81, 15-27.

Seymour J. D., Calle E. E., Flagg E. W., Coates R. J., Ford E. S. ve Thun M. J. (2003). Diet Quality Index as a Predictor of Short-term Mortality in the American Cancer Society Cancer Prevention Study II Nutrition Cohort. *American Journal of Epidemiology*, 157, 980–988.

Shackelford, R. E., Kaufmann, W. K. ve Paules, R. S. (2000). Oxidative stress and cell cycle checkpoint function. *Free Radical Biology & Medicine*, 28(9), 1387–1404.

Shah, Z. A., Li, R., Ahmad, A. S., Kensler, T. W., Yamamoto, M., Biswal, S. ve diğerleri. (2010). The flavanol (-)-epicatechin prevents stroke damage through the Nrf2/HO1 pathway. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 30, 1951–1961.

Shankar, S., Singh, G., Srivastava, R. K. (2007). Chemoprevention by resveratrol: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Frontiers in Bioscience*, 12:4839-4854.

Simonsen, J. L., Rosada, C., Serakinci, N., Justesen, J., Stenderup, K., Rattan, S. I. S. ve diğerleri. (2002). *Nature Biotechnology*, 20, 592-596.

Singh, P. N., Sabaté, J. ve Fraser, G. E. (2003). Does low meat consumption increase life expectancy in humans?. *American Journal of Clinical Nutrition*, 78, 526S-532S.

Slanina, J., Taborská, E., Bochořáková, E., Slaninová, I., Humpa, O., Robinson, W. E., ve Schram, K. H. (2001). New and facile method of preparation of the anti-HIV-1 agent, 1,3-dicaffeoylquinic acid. *Tetrahedron Letters*, 42, 3383–3385.

Sohaimy, S. A. E. (2014). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial potential of artichoke. *The Open Nutraceuticals Journal*, 2014, 7, 15-20.

Son T. G., Camandola S. ve Mattson M. P. (2008). Hormetic Dietary Phytochemicals. *Neuromolecular Medicine*, 10(4), 236–246.

Söti, C., Nagy, E., Giricz, Z., Vigh, L., Csermely, P. ve Ferdinandy, P. (2005). Heat shock proteins as emerging therapeutic targets. *British Journal of Pharmacology*, 146, 769–780.

Speroni, E., Cervellati, R., Govoni, P., Guizzardi, S., Renzulli, C. ve Guerra, M. C. (2003). Efficacy of different *Cynara scolymus* preparations on liver complaints. *Journal of Ethnopharmacology*, 86, 203–211.

Stein, P. K., Soare, A. Meyer, T. E., Cangemi, R., Holloszy, J. O. ve Fontana, L. (2012). Caloric restriction may reverse age-related autonomic decline in humans. *Aging Cell*, 11, 644–650.

Sun, Z., Chen, J., Ma, J., Jiang, Y., Wang, M., Ren, G. and ve diğerleri. (2012). Cynarin-rich sunflower (*Helianthus annuus*) sprouts possess both antiglycative and antioxidant activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 3260-3265.

Surh, Y.J. (2003). Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nature*, 3, 768-780.

Surh, Y. J., Kundu, J.K. ve Na, H. K. (2008). 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*, 74(13), 1526-1539.

Surh, Y. J.(2012). Nrf2, an essential component of cellular stress response, as a potential target of hormetic phytochemicals. *Journal of Food and Drug Analysis*, 20(Suppl. 1), 217-219.

Şimşek, E. N. (2012). *İki enginar türünden elde edilen bitkisel ekstraktların kolorektal kanser hücre dizisi üzerinde etkilerinin araştırılması*. Yüksek Lisans tezi, Selçuk Üniversitesi, Konya.

Tognon, G., Rothenberg, E., Eiben, G., Sundh, V., Winkvist, A. ve Lissner, L. (2011). Does the Mediterranean diet predict longevity in the elderly? A Swedish perspective. *AGE*, 33, 439–450.

Trichopoulou, A., Costacou, T., Christina B. C. ve Trichopoulos, D. (2003). Adherence to a Mediterranean diet and survival in a Greek population. *The New England Journal of Medicine*, 348(26), 2599-2608.

Trichopoulou, A., Orfanos, P., Norat, T., Mesquita, B. B, Ocké, M., Peeters, P. H. ve diğerleri, (2005). Modified Mediterranean diet and survival: EPIC-elderly prospective cohort study. *British Medical Journal*, 1-7.

T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı. Ulusal Gıda Kompozisyon Veri Tabanı (TürKomp). <http://www.turkomp.gov.tr/food/241?pf=1> [Erişim tarihi: 25. 9. 2014]

United States Department of Agriculture. National Nutrient Database for Standard Reference Release 26 Basic Report 11007, Artichokes, (globe or french), raw. <http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/2869> [Erişim tarihi: 27. 8. 2014].

Üstün, B. ve Jakob, R. (2005). Calling a spade a spade: meaningful definitions of health conditions. *Bulletin of the World Health Organisation*, 83, 802.

Vallinas, M. G., Castejon, M. G., Casado, A. R. ve de Molina, A. R. (2013). Dietary phytochemicals in cancer prevention and therapy: A complementary approach with promising perspectives. *Nutrition Reviews*, 71(9), 585-599.

Vara, J. A. F., Casado, E., de Castro, J., Cejas, P., İniesta, C. B. ve Baron, M. G. (2004). PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treatment Reviews*, 30, 193–204.

Waijers, P. M. C. M., Ocké, M. C., Rossum, C. T. M, Peeters, P. H. M., Bamia, C., Chloptsios, Y. ve diğerleri. (2006). Dietary patterns and survival in older Dutch women. *American Journal of Clinical Nutrition*, 83, 1170–1176.

Wang, M., Simon, J. E., Aviles, I. F., He, K., Zheng, Q., ve Tadmor, Y. (2003). Analysis of antioxidative phenolic compounds in artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 51, 601-608.

Wider, B., Pittler, M. H., Thompson, J., C. ve Ernst E. (2013). Artichoke leaf extract for treating hypercholesterolaemia. *The Cochrane Library*, 3, 1-28.

Willcox, D. C., Scapagnini G., Willcox, B. J. (2014). Healthy aging diets other than the Mediterranean: A focus on the Okinawan diet. *Mechanisms of Ageing and Development*, 136-137, 148–162.

Wojcicki, J. (1978). Effect of 1,5-dicaffeoylquinic acid (Cynarine) on cholesterol levels in serum and liver of acute ethanol-treated rats. *Drug and Alcohol Dependence*, 3, 143–145.

World Health Organisation. (2002). Globalization, diets and noncommunicable diseases. <http://whqlibdoc.who.int/publications/9241590416.pdf> [Erişim tarihi: 30 August 2014]

World Health Organisation (2011). Global health and ageing. http://www.nia.nih.gov/sites/default/files/global_health_and_aging.pdf [Erişim tarihi: 30 August 2014]

Wu, C. C., Hsu, M. C., Hsieh, C. W., Lin, J. B., Lai, P. H. ve Wung, B. S. (2006). Upregulation of heme oxygenase-1 by epigallocatechin-3-gallate via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and ERK pathways. *Life Sciences*, 78(25), 2889–2897.

Zhang, D. D. (2006). Mechanistic studies of the Nrf2-keap1 signaling pathway. *Drug Metabolism Reviews*, 38, 769-789.