



T.C.
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**RATLARDA OLUŞTURULAN KARACİĞER
TÜMÖR MODELİNDE OCTREOTİDE
KEMOTERAPÖTİK AJANININ, ISI ŞOK
PROTEİNLERİ , 8-HİDROKSİ DEOKSİGUANOZİN
VE OKSİDATİF STRES PARAMETRELERİ
DÜZEYLERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

VELİD UNSAL

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

KAHRAMANMARAŞ 2013

T.C.

**KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**RATLARDA OLUŞTURULAN KARACİĞER
TÜMÖR MODELİNDE OCTREOTİDE
KEMOTERAPÖTİK AJANININ, ISI ŞOK
PROTEİNLERİ, 8-HİDROKSİ DEOKSİGUANOZİN
VE OKSİDATİF STRES PARAMETRELERİ
DÜZEYLERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

VELİD UNSAL

Bu tez,

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında

YÜKSEK LİSANS

derecesi için hazırlanmıştır.

KAHRAMANMARAŞ 2013

T.C.

**KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**RATLARDA OLUŞTURULAN KARACİĞER
TÜMÖR MODELİNDE OCTREOTİDE
KEMOTERAPÖTİK AJANININ, ISI ŞOK
PROTEİNLERİ, 8-HİDROKSİ DEOKSİGUANOZİN
VE OKSİDATİF STRES PARAMETRELERİ
DÜZEYLERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

VELİD UNSAL

Bu Tez ,

**Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında Yüksek lisans
derecesi için hazırlanmıştır.**

KAHRAMANMARAŞ 2013

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü öğrencisi Velid UNSAL tarafından hazırlanan “Ratlarda oluşturulan karaciğer tümör modelinde octreotide kemoterapötik ajanının , ısı şok proteinleri, 8-hidroksi deoksiguanozin ve oksidatif stres parametreleri düzeylerine etkilerinin araştırılması” adlı bu tez, jürimiz tarafından / / tarihinde oy birliği / oy çokluğu ile Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans olarak kabul edilmiştir.

Ünvan, Ad ve Soyad (DANIŞMAN) Doç. Dr Ergül Belge KURUTAŞ
Anabilim Dalı, Üniversite Adı K.S.Ü Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya A.B.D

Ünvan, Ad ve Soyad (ÜYE) Prof.Dr Ertan BÜLBÜLOĞLU
Anabilim Dalı, Üniversite Adı K.S.Ü Tıp Fakültesi Genel Cerrahi A.B.D

Ünvan, Ad ve Soyad (ÜYE) Yrd.Doç Ahmet ÇELİK
Anabilim Dalı, Üniversite Adı K.S.Ü Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya A.B.D

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. M. Akif KILIÇ
Enstitüsü Müdürü

.....

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada orijinal olmayan her türlü kaynağa eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

(imza)

Velid Unsal

Bu çalışma Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından desteklenmiştir.

Proje No: 2013/1-3 YLS

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

RATLARDA OLUŞTURULAN KARACİĞER TUMÖR MODELİNDE OCTREOTİDE KEMOTERAPÖTİK AJANININ, ISI ŞOK PROTEİNLERİ,8-HİDROKSİ DEOKSİGUANOZİN VE OKSİDATİF STRES PARAMETRELERİ DÜZEYLERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

ÖZET

Bu çalışmada önemli karsinojenler Dietilnitrozamin (DEN) ve 2-Asetilamino floran (2-AAF) ratlar üzerinde karaciğer tümör modeli oluőturulmaya çalıőıldı. Modelde kemoterapötik ajan olan Octreotidenin (OCT) Oksidatif stres parametreleri ; Süperoksit dismutaz (SOD), Katalaz (CAT), Glutatyon peroksidaz (GSH-Px), Malondialdehit (MDA), Nitrik oksit (NO), 8-Hidroksi deoksiguanozin (8-OHdG) ve Isı Şok proteini 70 (Hsp 70) düzeyleri üzerine etkisini bakıldı.

Bu amaçla çalışmaya her grupta 8 rat olmak üzere 64 diőt Wistar- albino türü rat dahil edildi. 1.Grup kontrol grubu olarak düzenlendi. Grup 2 deki ratlara gavajla sadece 0,1 ml zeytinyağı verildi. Grup 3 deki ratlara 0,1ml DMSO (Dimetil sülfoksit) i.p verildi. Grup 4 deki ratlara DMSO da çözünmüş 300 µg octreotid i.p olarak verildi. Grup 5 teki ratlara DMSO da çözünmüş 175 mg/kg i.p olarak DEN verildi. Grup 6 daki ratlara 7 gün su+yem verildikten sonra sekizinci, dokuzuncu, onuncu günde DMSO da çözünmüş 20mg/kg oranında 0,1 ml 2-AAF gavajla zeytinyağı yardımıyla verildi. Grup 7 deki ratlara deney başlangıcında DMSO da çözünmüş 175 mg/kg DEN i.p olarak verildi. DEN uygulamasından 1 hafta sonra deneyin sekizinci, dokuzuncu, onuncu gününde DMSO da çözünmüş 20mg/kg oranında 2-AAF zeytinyağı yardımıyla 0,1 ml gavajla verildi. Grup 8 deki ratlara deney başlangıcında DMSO da çözünmüş 175mg/kg DEN i.p olarak verilmiş olup DEN uygulanmasından bir hafta sonra sekizinci, dokuzuncu,onuncu gününde DMSO da çözünmüş 20 mg/kg 2-AAF zeytinyağı yardımıyla 0,1 ml gavajla verildi. Deneyin onaltıncı, yirmi üçüncü, otuzuncu gününde DMSO da çözünmüş 300 µg /kg octreotid verildi. Deneyin beőtinci haftasında hayvanlar sakrifiye edilerek karaciğer dokuları alındı. SOD, CAT, GSH-Px aktiviteleri MDA, NO düzeyleri spektrofotometrik olarak belirlendi. Hsp 70 ve 8-OH dG düzeyleri eliza yöntemiyle ölçüldü.

Elde edilen bulgularda ; MDA düzeyinde Kontrol grubu ile 2., 3., 4., 5. Grupları arasında fark bulunmazken 7.grubun MDA düzeyinde önemli bir artış, 8.grubun düzeyinde önemli bir azalış kaydedildi.

Süperoksit Dismutaz aktivitelerinde Kontrol grubu ile 2. , 3. gruplar arasında fark bulunmazken 6. ve 8. grupta azalış , 7.grupta artış kaydedildi. GSH-Px aktivitesi, kontrol grubu ile 7.grup arasında önemli azalış, 8.grubun aktivitesinde artış kaydedildi. NO düzeyleri kontrol grubu ile 2., 3., 4. gruplar arasında fark bulunmazken 5., 6., 7., gruplarda artış 8.grupta azalış kaydedildi.CAT aktivitelerinde kontrole ile 2., 3., 4. Gruplar fark bulunmazken 5., 6., 7. grupta çok önemli azalış ,8.grupta önemli artış kaydedildi.Hsp 70 düzeylerinde Kontrol grubu ile 2., 4. grupta fark bulunmazken 3., 5., 6., 7. grupta artış kaydedilmiş 7.grubta ise azalış kaydedildi.

8- Hidroksi deoksiGuanozin düzeyleri incelendiğinde Kontrol grubu ile 2.grupta fark bulunmazken 3., 4., 5., 6., 7., 8. gruplarda artış kaydedildi. Ancak 8.grup 5.6.7.gruba göre azalış göstererek kontrol grubuna yaklaşmıştır.

Histopatolojik olarak ; Gruplar karşılaştırıldığında özellikle 7. Grupta daha fazla orta şiddette Portal inflamasyon oluşumu gibi patolojik bozukluk gözlendi.Bununla beraber 1., 2., 3., 4., 5., 6., 7., 8. gruplar karşılaştırıldığında anlamlı sayılmayacak hafif ve orta şiddete parankimal nekroz gözlendi. Çalışmamızda OCT' in antioksidan etkisinin olduğu ve bu konuda daha fazla araştırmaya gerekli olduğu sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Karaciğer Kanseri, Oksidatif stres, 8-OHdG, Hsp 70, Octreotide, Dietilnitrozamin, 2-Asetil-Aminofloran

**MODEL RATS INDUCED LIVER TUMOR OF OCTREOTIDE
CHEMOTHERAPEUTIC AGENT, HEAT SHOCK PROTEINS, 8-HYDROXY
DEOXYGUANOSINE AND OXIDATIVE STRESS LEVELS OF INVESTIGATING
THE EFFECTS OF PARAMETERS**

SUMMARY

Diethylnitrosamine (DEN) carcinogens in this study and 2-acetylaminofluorene (2-AAF) was made to create the model with rats, the liver tumor. Octreotide of model chemotherapeutic agent (OCT) Oxidative stress parameters, superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px), malondialdehyde (MDA), nitric oxide (NO), 8-hydroxy deoxyguanosine (8-OHdG) and heat shock protein 70 (Hsp 70) the effect on the levels of views.

8 rats in each group in this study, 64 female Wistar-Albino rats were included. Group 1 was held as a control group. Was only 0.1 ml of olive oil by gavage to rats in Group 2. Group 3 rats in 0.1 ml of DMSO (dimethyl sulfoxide) was given ip. Dissolved in DMSO in Group 4 rats were given ip 300 µg/kg octreotide. it's also dissolved in DMSO group 5 rats of 175 mg / kg ip was given DEN. Group 6 bait in the water rats 7 days after giving the eighth, ninth, tenth day, dissolved in DMSO in the olive oil with the help of 20mg/kg was given by gavage 0.1 ml of 2-AAF. Dissolved in DMSO at the beginning of the experiment the rats in Group 7 of 175 mg / kg was given ip DEN. Try one week after the administration of DEN eighth, ninth, tenth day of 20mg/kg dissolved in DMSO by the olive oil with the help of 2-AAF was given by gavage 0.1 ml. Dissolved in DMSO at the beginning of the experiment the rats in group 8 175mg/kg i.p DEN .

DEN were given as a week after application of the eighth, ninth, tenth day dissolved in DMSO for 20 mg / kg of olive oil with the help of 2-AAF were given 0.1 ml gavage. Try the sixteenth, the twenty-third, the thirtieth day dissolved in DMSO or 300 µ / kg was given octreotide. Try it the fifth week of the animals were sacrificed and liver tissues were taken. SOD, CAT, GSH-Px activities, MDA and NO levels were determined spectrophotometrically. Hsp 70 and 8-OH dG levels were measured by ELISA.

The findings, MDA level with the control group, 2, 3, 4, 5 there was no difference between the groups in 7.group a significant increase in the level of MDA, a significant decrease in the level of 8.group recorded.

Control group and 2 in SOD activities , 3 there was no difference between the groups 6 and 8 decrease in the group, recorded an increase in 7 group. GSH-Px activity decreased significantly between the control group and the 7.Group, 8.group increase in activity was recorded. NO levels in the control group 2, 3, 4 there was no difference between the groups 5, 6, 7, and control groups, with activities in recorded.CAT decrease in growth 8.group 2, 3, 4 There was no difference Groups 5, 6, 7 a very significant decrease in the group, a significant increase in 8.group recorded.Hsp 70 levels with the control group at 2, 4 there was no difference in the group 3, 5, 6, 7 group recorded an increase in the recorded decrease.

Analysis of 8-OH dG levels in group 2 there was no difference with the control group 3, 4, 5, 6, 7, 8 groups was increased. However, the control group, which decreased by 5.6.7.groups 8.group close.

Histopathologically, especially when compared Groups 7 , such as the formation of more moderate portal inflammation with pathological disorder observed.in addition to 1st, 2nd, 3rd, 4th, 5th, 6th, 7th, 8th Compared to groups are not considered significant parenchymal necrosis was observed in mild and moderate violence. In our study, the antioxidant activity of OCT's and that this matter is concluded that more research is needed

Key words: Liver cancer, Oxidative Stress, 8-Hidroxy deoxyiguanosine, Heat shock Protein 70 , Octreotide, Diethylnitrosamine, 2-Asetyl aminoflore

TEŞEKKÜR

Eğitimim süresi boyunca her türlü bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, tezimin her aşamasında ilgi ve desteğini aldığım ve fikirlerinden faydalandığım saygıdeğer hocam Doç. Dr. Ergül BELGE KURUTAŞ'a

Eğitimim sırasında ilgi ve yardımlarını esirgemeyen Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı hocam Prof. Dr. Metin KILINÇ ve Öğretim üyesi hocalarım Prof. Dr. Fatma İNANÇ TOLUN ve Yrd. Doç. Dr. Ahmet ÇELİK, değerli çalışma arkadaşlarım Betül KABAKÇI, Meltem GÜNGÖR, Safiye Şeyma TANER, Araş. Gör. Zeynep BAYAT, Araş. Gör. Dr. Elif ŞAHİN'e Tıbbi Biyokimya yüksek lisans öğrencisi arkadaşlarım ve tüm biyokimya laboratuvar çalışanlarına.

Tez çalışmamda çok değerli katkıları olan, Doç. Dr. Ertan BÜLBÜLOĞLU, Doç. Dr. Harun ÇIRALIK, hocalarımıza Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma laboratuvarı personelimiz arkadaşım Abdullah YILMAZ'a;

Her zaman yanımda olan desteğini ve fikirlerini aldığım saygıdeğer babam sevgili annem, arkadaşlarıma ve aileme en içten teşekkürü bir borç bilirim.

Araş. Gör. Velid UNSAL
Tıbbi Biyokimya AD

İÇİNDEKİLER

TEZ BİLDİRİMİ	I
ÖZET.....	II
SUMMARY	IV
TEŞEKKÜR	VI
İÇİNDEKİLER	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	X
ŞEKİLLER DİZİNİ	XII
ÇİZELGELER DİZİNİ	XIII
1. GİRİŞ AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2. Karsinogenez	3
2.1. Karaciğer Kanseri	5
2.1.1. Deneysel Hepatik Karsinogenez	5
2.1.2. DEN ve 2-AAF'nin Karaciğerde Tümör Oluşumundaki Rollerini	6
2.2.1. DEN 'in Tümör oluşumundaki Rolü	6
2.2.2. 2-AAF'nin Karaciğerde Tümör Oluşumundaki Rolü	7
2.3 Serbest Radikaller ve Reaktif Oksijen Türleri.....	8
2.3.1. Reaktif oksijen türleri	8
2.3.1.1. Süperoksit Radikali ($O_2^{\cdot-}$)	10
2.3.1.2. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)	11
2.3.1.3. Hidroksil Radikali ($OH\cdot$)	12
2.3.1.4. Singlet O_2 (1O_2)	12
2.3.1.5. Hidroperoksil Radikali ($HO_2\cdot$)	13
2.4. Karsinogenez ve Serbest Oksijen Radikalleri	13
2.4.1. DEN ve 2-AAF'nin Aktif Oksijen Türlerini Üreterek Tümör Gelişimine Etkisi	14
2.5. Oksidatif Stres ve Karsinogenez	14
2.5.1. DNA Hasarı ve Serbest Radikaller	15
2.5.2. 8-Hidroksi deoksiGuanizin (8-OHdG)	17
2.6. Isı Şok Proteinleri (Heat Shock Proteins: Hsp 70)	19
2.6.1. Kanserde Isı Şok Proteinlerinin Rolü	20
2.6.2. Kanser Tedavisinde Isı Şok Proteinleri	21

2.7. OCTREOTİDE	22
3. ANTİOKSİDANLAR	24
3.1. Antioksidan Savunma Sistemleri	24
3.1.1. Antioksidan etki tipleri	24
3.1.1.1. Doğal Antioksidanlar (Endojen)	25
3.1.1.2. Eksojen Antioksidanlar	25
3.1.2. Enzimatik Antioksidanlar	26
3.1.2.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)	26
3.1.2.2. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px)	27
3.1.2.3. Katalaz (CAT)	28
4. GEREÇ VE YÖNTEM	29
4.1. GEREÇ	29
4.1.1. Deney Grupları	29
4.1.2. Kullanılan Kimyasallar	29
4.1.3. Kullanılan Cihaz ve Malzemeler	30
4.2. YÖNTEM	31
4.2.1. Doz ve deney grupları	31
4.3. Karaciğer doku örneklerinin alınması ve hazırlanması	33
4.4. Karaciğer Dokusunda Protein Düzeyinin Tayini	34
4.5.1. Ayıraçlar	34
4.5.2. Standart Eğrinin çizimi	34
4.6. Karaciğer Dokusunda MDA Düzeyinin Tayini	36
4.6.1. Ayıraçlar	36
4.6.2. Standart Eğri Çizimi	37
4.6.3. Hesaplanması	39
4.7. Karaciğer Dokusunda SOD Aktivite Tayini	39
4.7.1. Ayıraçlar	39
4.7.2. Standart Eğri Çizimi	40
4.7.3. Hesaplama	41
4.8. Karaciğer Dokusunda GSH-Px Aktivite Tayini	43
4.9. Karaciğer Dokusunda CAT Aktivite Tayini	44
4.10. Karaciğer Dokusunda NO Düzeyinin Tayini	46
4.11. 8-OH dG ÖLÇÜMÜ	48
4.12. Hsp 70	48

4.13. İSTATİSTİK	48
5. BULGULAR	49
5.1.1. Sıçanların Vücut Ağırlıkları	49
5.1.2. Deney sonrası sıçanların karaciğer ağırlık ortalaması	50
5.1.3. Deney sonrası Sıçanların Hepato/ Somato indeksi istatistiksel sonuçları	51
5.2.1. Karaciğer Dokusunda SOD aktivitesi	52
5.2.2. Karaciğer Dokusunda CAT aktivitesi	54
5.2.3. Karaciğer Dokusunda GSH –Px aktivitesi	56
5.2.4. Karaciğer Dokusunda MDA düzeyi	58
5.2.5. Karaciğer Dokusunda NO düzeyi	60
5.2.7. Karaciğer Dokusunda Hsp 70 düzeyleri	64
5.3. Histopatolojik Analiz Sonuçları	66
6.TARTIŞMA VE SONUÇ	70
KAYNAKLAR DİZİNİ	75
ÖZGEÇMİŞ	88

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AAF	: Asetilaminofloren
ATP	: Adenozin Trifosfat
ADP	: Adenozin Difosfat
α	: Alfa
CAT	: Katalaz
DEN	: Dietilnitrozamin
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
FAD	: Flavın Adenin Dinükleotit
FB	: Fenobarbital
GSH	: Glutasyon
GSH-Px	: Glutasyon peroksidaz
GSH-R	: Glutasyon redüktaz
GSSG	: Okside glutasyon
Hsp	: Isı Şok Proteinleri
H₂O₂	: Hidrojenperoksit
HOCl	: Hipoklorik Asit
L•	: Lipit radikali
LOO•	: Lipid peroksil radikali
LOOH	: Lipit hidroperoksit
MDA	: Malondialdehit
ml	: Mililitre
mU	: Mili Ünit
NO	: Nitrik oksit
NADPH	: Redükte Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
SOR	: Serbest Oksijen Radikalleri
O₂•-	: Süperoksit Anyon Radikali
HOCl	: Hipoklorik Asit
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
TBA	: Tiyobarbütirik asit
TNF- α	: Tümör Nekroz faktör Alfa
XO	: Ksantin Oksidaz

OD	: Optik Dansite
RNA	: Ribonükleik Asit
ROR	: Reaktif Oksijen Radikalleri
KSÜ	: Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi
O₂	: Oksijen
HO₂·	: Perhidroksi Radikali
OH·	: Hidroksil Radikali
O₂·	: Singlet Oksijen
NO·	: Nitrik Oksit Radikali
H·	: Hidrojen Radikali
SOD	: Süperoksit Dismutaz
ROO	: Peroksil Radikali
NOS	: Nitrik Oksit Sentaz
ETS	: Elektron Transport Sistemi
-SH	: Tiyol
L·	: Yağ Asidi Zincir Radikali
Cd	: Kadmiyum
OCT	: Octreotide

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 2.1. Karsinogenezin evreleri	4
Şekil 2. 2. İnisiyatör bir kimyasal ajan olan dietilnitrozaminin (DEN) iki farklı gösterimi	7
Şekil 2.3. 2-Asetil aminofloranın kimyasal gösterimi	7
Şekil 2.4 Serbest radikal oluşumu	9
Şekil 2.5. Reaktif oksijen radikallerinin (ROS) kanser oluşumu üzerine etkileri	14
Şekil 2.6. DNA hasarı / DNA onarımı arasındaki dengenin önemi	17
Şekil 2.7. 8 - hidroksi - 2' – deoksiguanozin	18
Şekil 2.8. Isı şok proteinlerinin kanser tedavisindeki rolü	22
Şekil 2.9. Octreotidenin kimyasal yapı gösterimi	23
Şekil 4.1. Kontrol grubunun makroskopik görünümü	32
Şekil 4.2. 5.Grup (DEN) makroskopik görünümü	32
Şekil 4.3. 7.grup (DEN+ 2-AAF) makroskopik görünümü	33
Şekil 4.4. Protein standart eğrisi	35
Şekil 4.5. MDA (Malondialdehit) standart eğrisi grafiği	38
Şekil 4.6. SOD standart eğrisi	42
Şekil 4.7. NO standart eğrisi çalışması	48
Şekil 5.1. Sıçanların deney öncesi ve sonrası vücut ağırlıkları gösterimi	50
Şekil 5.2. Grupların SOD değerlerinin grafiksel gösterimi	53
Şekil 5.3. Grupların CAT değerlerinin grafiksel gösterimi	55
Şekil 5.4. Grupların GSH-Px değerlerinin grafiksel gösterimi	57
Şekil 5.5. Grupların MDA değerlerinin grafiksel gösterimi	59
Şekil 5.6. Grupların NO değerlerinin grafiksel gösterimi	61
Şekil 5.7. Grupların 8-OH dG değerlerinin grafiksel gösterimi	63
Şekil 5.8. Grupların Hsp 70 değerlerinin grafiksel gösterimi	65
Şekil 5.9. Normal portal mesafede (H&Ex100)	67
Şekil 5.14. Orta derecede parankimal nekroz(H&Ex100)	69
Şekil 5.11. Hafif dereceli portal inflamasyon (H&Ex200)	68
Şekil 5.12. Hafif dereceli parankimal nekroz (H&Ex200)	68
Şekil 5.13. Orta derecede portal inflamasyon (H&Ex100)	69
Şekil 5.10. Normal parankimal (H&Ex100)	67

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 2.1	Reaktif oksijen partikülleri	10
Çizelge 4.1.	Doz ve deney grupları	31
Çizelge 4.2.	Protein standart eğri çizimi için tüplerin hazırlanışı	35
Çizelge 4.3.	Doku örneğinde protein tayini için tüplerin hazırlanışı	36
Çizelge 4.4.	MDA standart eğri çizimi için tüplerin hazırlanışı	37
Çizelge 4.5.	Doku örneğinde MDA düzeyinin tayini için tüplerin hazırlanışı	38
Çizelge 4.6.	SOD standart eğri çizimi için tüplerin hazırlanışı	40
Çizelge 4.7.	Doku örneğinde SOD standart eğri çizimi için kuvars küvetlerin hazırlanışı	41
Çizelge 4.8.	Doku örneğinde SOD aktivite tayini için kuvars tüplerin hazırlanışı	42
Çizelge 4.9.	Doku örneğinde GSH-Px tayini için deney tüplerinin hazırlanışı	43
Çizelge 4.10.	Doku örneğinde CAT aktivite tayini için kuvars küvetlerinin hazırlanışı ...	45
Çizelge 4.11.	Doku örneğinde NO tayini için tüplerin hazırlanışı	47
Çizelge 5.1.	Sıçanların vücut ağırlık ortalama ve sapma değerleri	49
Çizelge 5.2.	Deney sonrası karaciğer ağırlık ortalama ve standart sapma değerleri	50
Çizelge 5.3.	Tüm gruplarda Hepato/ Somatik indeksi	51
Çizelge 5.4.	Tüm grupların karaciğer dokusunda SOD aktivitesi	52
Çizelge 5.5.	Tüm gruplarda CAT aktivitesi	54
Çizelge 5.7.	Tüm gruplarda MDA düzeyleri	58
Çizelge 5.8.	Tüm gruplarda NO düzeyi	60
Çizelge 5.10	Tüm gruplarda Hsp 70 düzeyleri	64
Çizelge 5.11.	Gruplarda Portal İnflamasyon ve Fokal nekroz değerleri	66

1. GİRİŞ AMAÇ

Kanser, hücrelerin kontrolsüz (otonom), normal dışı büyümesi olarak tarif edilebilir. Kansere neden olan maddelere “Karsinojen” adı verilir. Karsinojen madde, radyasyon gibi fiziksel, polisiklik hidrokarbon gibi kimyasal veya virüs gibi biyolojik ajan olabilir [1].

Günümüzün en önemli ölüm nedenlerinden olması sebebiyle kanser oluşumunun önlenmesi, üzerinde en çok çalışılan konulardan biridir [2].

Kanser üzerine yapılan araştırmalar yaklaşık 14. Yüzyıldan bu yana devam etmektedir. Söz konusu dönem içinde kanser ilaçlarının araştırılma ve geliştirilme çalışmalarında her zaman deneysel çalışmalara gereksinim duyulmuş ve çeşitli modeller kullanılmıştır [3].

Hepatosellüler karsinoma, dünyada, en yaygın kanserlerden biri olup, bunun oluşumunda DEN, 2-AAF, fenobarbital, alkol gibi kimyasallar, aflatoksin B1 metabolit ya da hepatit virüsleri (B ve C) gibi ajanların etkendir [4-6].

Çalışmamızda kullandığımız karsinojenden biri olan DEN’in metabolitleri, DNA’ya bir ya da iki oksidasyon sağlayan elektron ile kovalent bağlanarak tümör promotörlerinin bağlanmasına aracılık eder [7].

Dietilnitrozamin indükleyici, 2-AAF ise promotör olarak mesane ve karacigerde tümör oluşumunda rol alırlar [8].

Vücutta doğal metabolik yollarla oluşan serbest radikaller normalde radikal parçalayan antioksidan sistemlerle ortadan kaldırılmaktadır. Ancak, çeşitli nedenlerle reaktif oksijen türlerinin artması ve antioksidan mekanizmaların yetersiz kalması sonucu Oksidatif stres adı verilen bir dizi patolojik olay meydana gelmektedir. Oksidatif stresin, farklı mekanizmalar ile DNA üzerinde baz ve şeker modifikasyonları, tek ve çift zincir kırıkları, abazik bölgeler, DNA-protein çapraz bağlanması gibi bir takım lezyonlara neden olarak hasara yol açtığı bilinmektedir [9].

Genetik materyalin moleküler bütünlüğünde endojen veya ekzojen faktörlerin etkisiyle meydana gelen tüm değişiklikler DNA hasarı olarak adlandırılır [10].

DNA hasarı, hücrenin yaşamı boyunca yaygın olarak görülen ve mutasyon, kanser, yaşlanma ve sonuçta hücre ölümüne yol açabilen bir olaydır. DNA, yaşam boyunca hücrel metabolitler ve ekzojen ajanlar tarafından sürekli olarak değişimlere maruz kalır. Bu değişimler sonuçta tek hücreli organizmalarda hücrel ölüme veya çok hücreli organizmalarda dejenerasyon ve yaşlanmaya sebep olabilir.

Reaktif oksijen türleri DNA'da 20'den fazla oksidatif baz hasar ürününün oluşmasına yol açar. Bu hasara uğrayan bazlar arasında 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG) oldukça duyarlı ve en sık karşılaşılan oksidatif DNA hasarı belirteçidir [11].

Birçok biyolojik sistem içerisinde strese karşı tepki oluşmaktadır. Bu tepkinin en belirgin olanı, ilk defa yüksek ateşe bağlı olarak hücrelerde keşfedilen ve ısı şok proteinleri (Hsp) olarak adlandırılan bir grup protein ailesidir.

Stres proteinleri büyüme, farklılaşma, bölünme, hatta hücre ölümü dahil hücre metabolizmasının tüm evrelerinde hayati önem taşır. Hsp ailesinden olan Hsp 70; Sitoplazma, çekirdek, ER ve mitokondride protein taşınmasına katılır. Stres altında proteinleri korur kümeleşmelerini önler. Polipeptidleri birbirine bağlar [12].

Son yıllarda yapılan çalışmalarda Oksidatif stres fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler kanıtları içeren çoklu cevaplara neden olmaktadır. Oksidatif stres HSP ekspresyonuna sebep olur.

Çoğu kanser çeşidinde ısı şok proteinlerinin üretimi artar. HSP ler tümör hücrelerinin proliferasyonu, farklılaşması, invazyonu, metastazı, ölümü ve immün sistem tarafından tanınması ile ilişkilidir. Örneğin Göğüs Kanserinde HSP -70 kemoterapiye karşı olan direncin göstergesidir [13].

Bu araştırmada; Ratlara DEN ve 2-AAF verilmesiyle karaciğer tümör modeli oluşturularak karaciğer doku hücreleri tahribatının düzeylerini ve octreotide maddesinin biyokimyasal ve histopatolojik olarak karaciğer dokusu üzerine etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2. Karsinogenez

Karsinogenez (neoplastik transformasyon) karsinojenlerin çoğunlukla sinyal iletim yollarıyla etkileşimi sonucu belirli bir süreçte gelişen ve birbirini izleyen çok basamaklı hücresel değişikliklerin yer aldığı kontrolsüz hücre çoğalmasdır.

Karsinogenez inisiyasyon (başlangıç), promosyon (gelişim) ve progresyon (ilerleme) olmak üzere herbiri kendine özgü üç safhaya ayrılmaktadır [14-17].(Şekil 2.1)

1) İnisiyasyon normal dokuda yer alan hücrenin genotoksik bir karsinojenle karşılaşması sonucu DNA hasarı oluşması evresidir. Bu evrede mutant preneoplastik bir hücre oluşur. “İnisiye” olmuş hücre “progenitör” olarak da adlandırılır. İnisiyasyon geri dönüşümsüz, doza bağımlı bir olaydır ve bu evrede kalıcı DNA hasarı (mutasyon) meydana gelmektedir [15, 16, 18].

İnisiyatör olan karsinojenler doğal veya sentetik olabilirler ve başlıca 2 gruba ayrılırlar. Direkt etkili olanlar karsinojenik etkilerini göstermeleri için kimyasal transformasyona ihtiyaç duymazlar. İndirekt etkililer ise metabolizmaları sonucunda karsinojen maddeye dönüşürler .

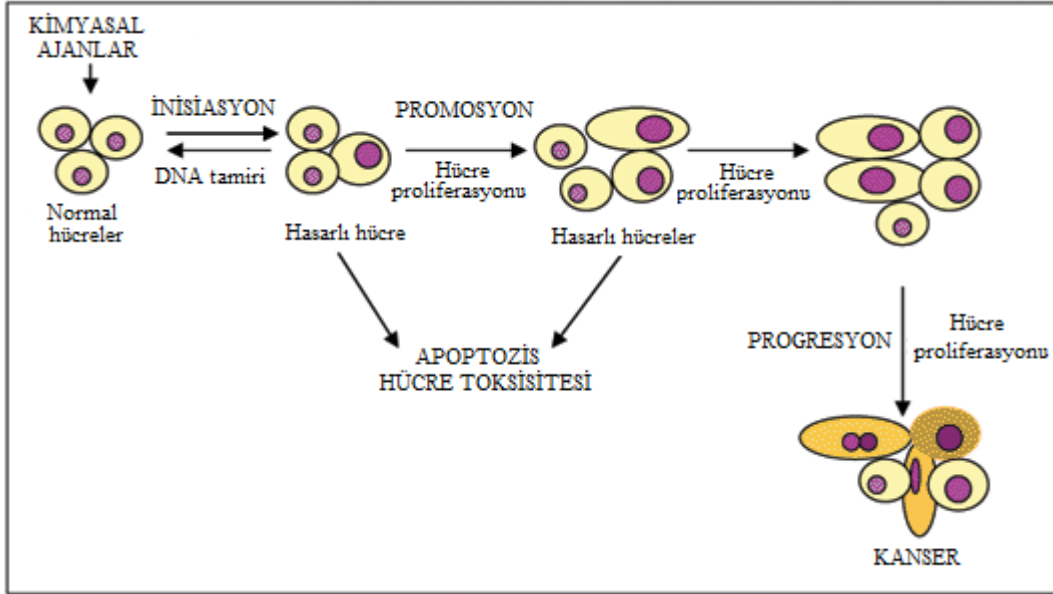
2) Promosyon evresi inisiye hücrenin “selektif klonal çoğalması”dır. Başka bir deyişle, sadece preneoplastik hasarlı hücre popülasyonunun aktif çoğalmasdır. Bu evreyi başlatan ajanlara “*promotör*” denir.

Promotörlerin ortak özelliği hücrede proliferasyonu indüklemeleridir. Promotörler DNA dizisinde değişiklik yapmadan posttranslasyonel modifikasyonlarla proteinlerin aktivitelerini değiştirirler. Böylece ya proliferasyonda görevli proteinler daha aktif hale geçer, ya da apoptoziste görevli olanların aktiviteleri azalır.

Sonuç olarak, önceden genetik hasar gelişmiş olan hücre klonunun çoğalması sağlanır. Promotörler tek başlarına tümör oluşturma gücüne sahip değildir, ancak inisiye olmuş hücrelerde tümöre neden olurlar. İnisiyatör uygulamasından oldukça uzun bir zaman geçtikten sonra bile promotör uygulandığında tümör gelişebilmektedir. Ancak, promotörler inisiyatörden önce uygulandıklarında tümöre neden olmazlar. Çünkü direkt olarak DNA’yı etkilemezler, yani genotoksik değildirler, etkileri doza bağımlı ve geri dönüşümlüdür [14-16].

3) Üçüncü evre olan progresyon ise hücresel ve moleküler değişikliklerin oluştuğu ve preneoplastik dönemden neoplastik döneme geçiş evresidir. Bu evre geri dönüşümsüzdür ve

bu evrede genetik instabilite, nükleer ploidi değişiklikleri ve kromozom bütünlüğünde bozulma meydana gelmektedir [14-16].



Şekil 2.1. Karsinojenin evreleri

Karsinojenez sürecinde kimyasal ajanlar farklı etkiler gösterdiklerinden “genotoksik” ve “epigenetik (nongenotoksik)” olarak ayrılmaktadırlar [14].

Genellikle inisiyatörler genotoksik, promotörler ise epigenetik ajanlardır. Bazı ajanlar hem genotoksik hem de epigenetik etki gösterebilirler.

Kanser genetik bir hastalıktır, yani “genetik hasar sonucu” oluşur. Ayrıca bazı kanser türleri kalıtsal bir özellik de gösterir. Bununla birlikte, her genetik hasar kanserle sonuçlanmaz. Kimyasal bir karsinojen veya metabolizması sırasında daha etkin hale gelmiş olan karsinojen eğer karaciğerde detoksifiye edilemezse DNA’yı değiştirebilir.

DNA’da tek veya çift zincir kırıklarına, pürin ve pirimidin bazlarında modifikasyonlara, deoksiriboz fosfat iskeletinde hasara, DNA-protein ve DNA-DNA çapraz bağlarına neden olabilir. Bu durumda DNA’yı ve hücreyi bekleyen başlıca üç seçenek vardır. Öncelikle DNA’daki hasar hücre bölünmeye başlamadan önce çeşitli tamir mekanizmaları ile onarılmaya çalışılır. Eğer hasar onarılamayacak kadar büyükse hücre apoptozise giderek kendini yok edebilir. DNA’sı onarılmadan hücre bölünmeye giderse hasar kalıcı hale gelir ve mutasyonlar oluşur.

Hücre döngüsü ve DNA hasarının onarımında görev alan proteinleri kodlayan bazı kritik genlerde oluşan mutasyonlar kansere neden olmaktadır [14, 15].

2.1. Karaciğer Kanseri

Karaciğer kanseri tüm dünyada özellikle Asya ve Afrika da en sık görülen malign tümörlerden birisidir [19]. Dünya çapında kanser türleri arasında 6.sıradadır ve 625,000 vaka kaydedilmiştir. Primer karaciğer kanserlerinin % 85-90'ı hepatoselüler karsinom (HSK) dır [20].

Hepatoselüler karsinom' lı hastalarda mortalite çok yüksek olup, 5 yıllık survi % 5'in altındadır [21].

HSK'nın sıklığı ve HSK'ya bağlı ölüm oranı cinsiyete ve coğrafik bölgelere göre farklılık göstermektedir. Erkeklerde kadınlardan 3-5 kat daha fazla olduğu bildirilmiştir [22, 23].

Alkol tüketimi , hepatit B, hepatit C , Karaciğer yağlanmasıyla ilişkili olan obezite , aflatoksin, karbon tetraklorür (CCl₄), Nitrozodietilamin gibi kimyasalların oranı artığından dolayı karaciğer kanseri hastalıklarında artış beklenmektedir [24].

2.1.1. Deneysel Hepatik Karsinogenez

Karaciğer kanseri deney hayvanlarına aromatik aminler, azot içeren boyalar, nitrozaminler ve aflatoksinler gibi çeşitli kimyasallar uygulanarak deneysel olarak oluşturulabilir [25]. İnisiyasyon fazının oluşturmak amacıyla en sık kullanılan ajanlar dietilnitrozamin (DEN) aflatoksindir. İnisiyasyon evresini takiben promosyon evresi fenobarbital (FB), asetaminofloren (AAF), 2,3,7,8-tetraklorodibenzo-p-dioksin, polihalojenli bifenil gibi kimyasallarla indüklenmektedir [25].

Karaciğerde promosyon fazı promotör ajan kullanmadan farklı şekillerde de gerçekleştirilebilmektedir. Buradaki amaç hücre bölünmesinin uyarılmasıdır. Higgins ve ark. [26] karaciğerde parsiyel hepatektomi uygulamasının, yetişkin hayvanlarda hücre proliferasyonunu indüklediğini ilk kez göstermiştir. Peraino ve ark.[27] hepatik hücre proliferasyonunun hızlı olduğu yenidoğan dönemindeki hayvanları kullanmıştır. Tomasi ve ark ise 4 günlük açlık süresinin hepatik hücre çoğalmasını indüklediğini, yeniden beslemeden 24 saat sonra “subnekrojenik” dozda inisiyatör bir ajan uygulandığında karaciğer kanseri oluştuğunu göstermiştir. Bununla birlikte, aç bırakma/yeniden besleme metodunun kısmi hepatektomi ve yenidoğan metodları gibi etkin olmadığını bildiren çalışmalar da vardır [28].

Bir başka yöntem ise DEN, aflatoksin gibi inisiyatör ajanların promotör kullanılmadan tek başına “nekrojenik” dozda kullanılmasıdır.

Nekrozla hücre ölümü proliferasyon yeteneği çok yüksek bir organ olan karaciğeri “ölenlerin yerine yenisini koymak üzere” proliferere olmaya yönlendirmektedir. Bu sayede hepatoselüler adenom veya HSK oluşumu sağlanır. Karaciğer karsinojenezinin uygulanabileceği transgenik fare modelleri de geliştirilmiştir.

2.1.2. DEN ve 2-AAF'nin Karaciğerde Tümör Oluşumundaki Roller

Dietilnitrozamin ve 2-AAF, biyolojik sistemde tümör oluşumuna neden olan kimyasallardır. Tümör oluşturmak için kullanılan ksenobiyotiklerden DEN, 2-AAF ve fenobarbital, fare, sıçan, hamster, tavşan, köpek, domuz ve maymun gibi hayvanlar için karsinojeniktir[29-32].

Dietilnitrozamin ve 2-AAF birlikte uygulanması kemirgenlerde hepatokarsinogenesisi başlatır ve hepatositlerde preneoplastik başlangıca neden olur [6, 29, 33-47].

Dietilnitrozamin indükleyici, 2-AAF ise promotör olarak mesane ve karaciğerde tümör oluşumunda rol alırlar [33, 35, 39, 40, 42]

Dietilnitrozamin ve 2-AAF gibi promotör olarak görev yapan FB ile yapılan bir çalışmada bunların, H-Ras'ın 61. kodonunda mutasyona neden olduğu belirtilmiştir [48].

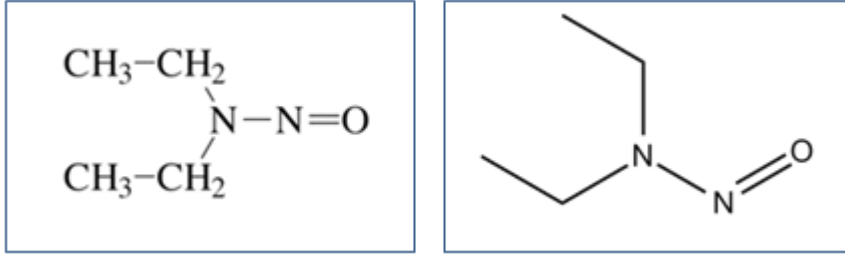
2.2.1 DEN 'in Tümör oluşumundaki Rolü

Kanser araştırmalarında tümör indükleyici olarak genellikle DEN kullanılmaktadır [33, 34, 36, 41, 42, 44, 49-58]

Dietilnitrozamin'in yapısında amid, üreaz ve karbon içeren bileşikler bulunur [59].Karsinojen bir madde olan DEN' in inteksititlerden, tarımda kullanılan kimyasallardan ve nitrattan şekillendiği , sigara dumanında bulunduğu ve aynı zamanda besinlerde bulunan nitratın midede sekonder ve tersiyer aminlerle sonucu da meydana geldiği bildirilmektedir [60].

Dietilnitrozamin, kanser oluşumunda direkt etkiye sahiptir. Bunun anlamı enzimlere bağlı olmaksızın DEN'in kendiliğinden hidrolize olmasıdır [31, 59]. İki hidroksilasyon reaksiyonu ile aktive olan DEN'in bu biyolojik aktivasyonu sitokrom p450 tarafından katalizlenir [31, 59, 61].

Dietilnitrozamin deneysel hayvan modellerinde karaciğer kanseri oluşturmada ve DNA hasarının tamir edilmesinde görev alan bazı enzimlere zarar vermede kullanıldığı bilinmektedir [62].



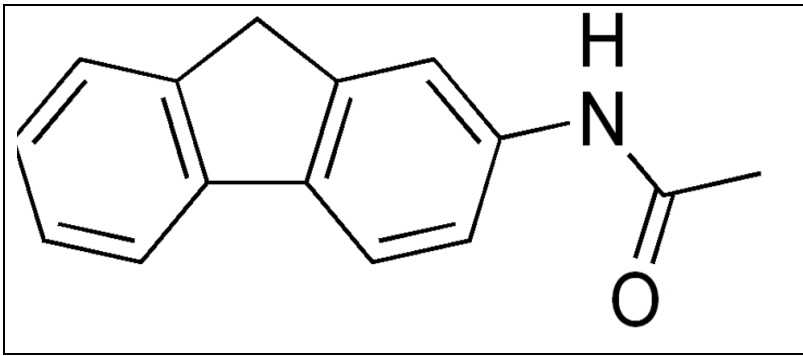
Şekil 2. 2. İnisiyator bir kimyasal ajan olan dietilnitrozaminin (DEN) iki farklı gösterimi [50]

2.2.2. 2-AAF'nin Karaciğerde Tümör Oluşumundaki Rolü

2-Asetilaminofloran, sentetik arylamin yapısında olan 2-aminofloranın biyolojik olarak asetillenmesi sonucu 2-AAF oluşur. 2-AAF, detoksifikasyon reaksiyonlarının ikinci fazında görev yaparak DEN'in birinci adımından sonra, ikinci adım olarak DNA'da guanin bazına bağlanıp toksik etki oluşturur. Bu toksik etki, mutasyonlara neden olarak, karaciğerde, sırasıyla preneoplastik, neoplastik, benign neoplazmi ve malign neoplazmi oluşur [33, 36, 38-41, 43, 50, 54, 63-65].

Dietilnitrozamin ve 2-AAF benzeri kimyasal tümör promotör ajanların birikimi sonucu, düz E.R.'de detoksifikasyon reaksiyonları için detoksifikasyon enzimleri sentezlenir [33, 40, 50, 66-68].

Bu enzimler topluca sitokrom P450 olarak bilinir. Sitokrom P450, karaciğer mikrozomlarında ve adrenal korteks mitokondrilerinde temel elektron transport zincirindeki en son enzimdir [69].



Şekil 2.3. 2-Asetil aminofloreinin kimyasal gösterimi [39]

2.3 Serbest Radikaller ve Reaktif Oksijen Türleri

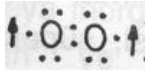
Serbest radikaller, bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron ihtiva eden atom veya moleküllerdir. Orbitali doldurup stabil hale gelmek için başka elektrona ihtiyaç duyduğundan ortaklanmamış elektronlar serbest radikalleri oldukça reaktif hale getirir. Bu bileşikler organizmada normal metabolik yolların işleyişi sırasında oluştuğu gibi, çeşitli dış etkenlerin etkisiyle de oluşmaktadır. Yaşam süreleri çok kısa olmasına rağmen, yapılarındaki dengesizlik nedeniyle çok aktif yapıda olan serbest radikaller tüm hücre bileşenleri ile etkileşebilme özelliğine sahiptirler. Aerobik metabolizması olan memelilerde serbest radikaller başlıca oksijenden türemektedir [70].

Oksijen, dış orbitalde iki tane eşleşmemiş elektronu ile biyolojik sistemlerde önemli bir yeri olan serbest radikaldir. O_2 ile reaksiyona giren moleküllerin oluşturduğu serbest radikaller de biyolojik sistemde önemli bir yere sahiptir [71].

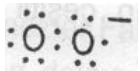
2.3.1 Reaktif oksijen türleri

Reaktif oksijen radikalleri; normal oksijen metabolizması sırasında az miktarda oluşan süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali (OH^{\cdot})'dir Reaktif oksijen türleri, çeşitli serbest radikallerin oluştuğu serbest radikal zincir reaksiyonlarını başlatabilirler. Aşağıda serbest radikal oluşumu gösterilmiştir. (Şekil 2.4)

O_2

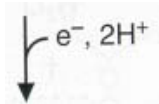


Moleküler oksijen



Süperoksit radikali

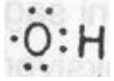
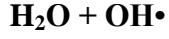
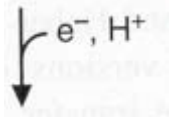
(süperoksit anyonu)



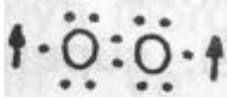
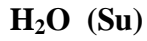
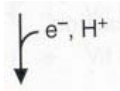
H_2O_2



Hidrojen peroksit



Hidroksil radikali



Şekil 2.4: Serbest radikal oluşumu [72]

Moleküler oksijen (O_2), paralel spin durumlu iki ortaklanmamış (eşleşmemiş) elektrona sahiptir [73].

Ortaklanmamış (eşleşmemiş) elektron içeren atom, atom grubu veya moleküller **serbest radikal** olarak tanımlanırlar. Ancak Fe^{3+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} ve Mo^{5+} gibi geçiş metalleri de ortaklanmamış elektronlara sahip oldukları halde serbest radikal olarak kabul edilmezler, fakat serbest radikal oluşumunda önemli rol oynarlar. Serbest radikaller pozitif yüklü (kasyon), negatif yüklü (anyon) veya elektriksel olarak nötral olabilirler.

Serbest radikal tanımına göre moleküler oksijen, bir biradikal (diradikal) olarak değerlendirilir. Biradikal oksijen, radikal olmayan maddelerle yavaş reaksiyona girdiği halde diğer serbest radikallerle kolayca reaksiyona girer [71].

Çizelge 2.1: Reaktif oksijen partikülleri [74]

Radikaller	Radikal Olmayanlar
Süperoksit anyon radikali (O_2^-)	Hidrojen peroksit (H_2O_2)
Hidroksil (HO^\cdot)	Singlet oksijen ($*O_2$)
Peroksi(ROO^\cdot)	Ozon (O_3)
Alkoksil (RO^\cdot)	Hipokloroz asit ($HOCl$)
Nitrik oksit(NO^\cdot)	Lipit hidroperoksit ($LOOH$)
Semikinon radikali (HQ^\cdot)	Peroksinitrit ($ONOO^\cdot$)

Moleküler oksijen her aşamada indirgenerek yukarıda tanımladığımız reaktif O_2^- metabolitlerinin oluşumuna yol açar. O_2^- tek başına hücre yıkımına neden olan reaksiyonları başlatabildiği gibi, esas olarak daha reaktif oksijen radikallerinin oluşumuna da yol açarak hücre toksisitesinde rol oynamaktadır [71].

Reaktif oksijen metabolitlerinden en sık karşılaşılanlar şunlardır.

2.3.1.1. Süperoksit Radikali ($O_2^{\cdot-}$)

Süperoksit radikali hemen tüm aerobik hücrelerde moleküler oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu oluşur. İndirgenmiş geçiş metallerinin otooksidasyonu, süperoksit radikali oluşumuna neden olur. Süperoksit radikalının kendisi direkt olarak zarar vermez. Bu radikal anyonun asıl önemi, hidrojen peroksit kaynağı olması ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır. Süperoksit radikali düşük pH değerlerinde daha reaktiftir [73].

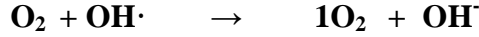
Süperoksit radikali, oksijen molekülüne bir elektron ilavesi ile oluşur ve serbest radikal hasarına karşı koruyucu antioksidan bir enzim olan ve oksidan hasar oluşumu ile birlikte artan süperoksit dismutaz aracılığı ile hidrojen peroksit'e indirgenir. Hidrojen peroksit eşlenmemiş elektron içermediği için tek başına radikal değildir [71].

Ortamda biriken süperoksit radikallerinin girebileceği başlıca tepkimeler aşağıdaki gibi özetlenebilir [75, 76].

1. Ortamdan bir proton alarak perhidroksi radikali (HO_2^\cdot) oluşturabilir.
2. H_2O_2 ile tepkimeye girerek hidroksil radikali (OH^\cdot) ve singlet oksijen (1O_2) oluşturabilir.

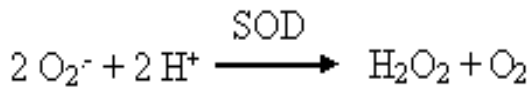


3. Hidroksil radikali ile tepkimeye girerek singlet oksijen yapımına neden olur.



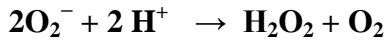
Serbest radikallere karşı organizmanın uzun süreli korunmasız kalması bu maddelerin düşük konsantrasyonlarında bile biyolojik açıdan önemli moleküllerin tahribatı ile sonuçlanır ve sonuçta DNA' da mutasyona, doku tahribatına ve hastalıklara yol açar [71, 73].

Süperoksit dismutaz, süperoksit radikalının hidrojen peroksite dönüşümünü katalize eden önemli bir enzimdir.



2.3.1.2. Hidrojen Peroksit (H₂O₂)

Hidrojen peroksit süperoksidin çevresindeki moleküllerden bir elektron alması veya moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden iki elektron alması sonucu oluşan peroksidin iki proton (H⁺) ile birleşmesi sonucu meydana gelir. Biyolojik sistemlerde hidrojen peroksidin asıl üretimi, süperoksidin dismutasyonu ile olur. İki süperoksit molekülü, süperoksidin dismutasyonu reaksiyonunda iki proton alarak hidrojen peroksit ve moleküler oksijeni şu şekilde oluştururlar:



Oksijen iki elektronla indirgenmesi sonucu H₂O₂ ortaya çıkar.

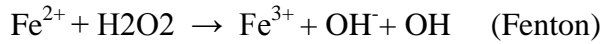


Bu reaksiyon; radikal olmayan ürünler meydana geldiğinden, dismutasyon reaksiyonu olarak bilinir, ya spontan gerçekleşir ya da süperoksit dismutaz enzimi tarafından katalizlenir. Spontan dismutasyon pH 4,8'de en hızlıdır, enzimatik dismutasyon ise spontan dismutasyonun nispeten yavaş olduğu nötral ya da alkali pH'da daha belirgindir. Hidrojen peroksit bir serbest radikal olmadığı halde reaktif oksijen radikali (ROR) kapsamına girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli bir rol oynar. H₂O₂ geçiş metallerinin varlığında en önemli serbest oksijen radikali olan OH[·] radikalının oluşumunu sağlar. H₂O₂'nin diğer önemli bir görevi de hücre içi sinyal molekülü olarak görev almasıdır. H₂O₂ oluştuktan sonra katalaz, glutatyon peroksidaz ve peroksiredoksinler adında üç enzim sistemi tarafından uzaklaştırılırlar [71].

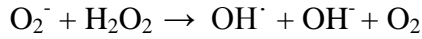
2.3.1.3. Hidroksil Radikali (OH.)

Hidroksil biyolojik sistemlere diğer ROS' lardan daha fazla hasar veren, biyomoleküllerle reaksiyona girebilen güçlü bir radikaldir. Oluşması için ortamda geçiş metalleri gereklidir. Şu yollarla oluşabilir [76].

1. Fe (Demir) Katalizli - Haber Weiss reaksiyonu (Fenton Reaksiyonu)



2. Katalize olmayan Haber Weiss reaksiyonunda ise, süperoksidin direk olarak hidrojen peroksitle reaksiyona girmesiyle oluşabilir.



Hidroksil radikali, Fenton reaksiyonu ve Haber-Weiss reaksiyonu sonucu hidrojen peroksitten oluşmaktadır. Ayrıca suyun yüksek enerjili iyonize edici radyasyona maruz kalması sonucunda oluşur. Hidroksil radikali son derece reaktif bir oksidan radikaldir, yarılanma ömrü çok kısadır. Hidroksil radikali olasılıkla reaktif oksijen radikallerinin en güçlüsüdür. Oluştığı yerde tiyoller ve yağ asitleri gibi çeşitli moleküllerden bir proton kopararak tiyil radikalleri (RS•), karbon merkezli organik radikaller (R•), organik peroksitler (RCOO•) gibi yeni radikallerin oluşmasına ve sonuçta büyük hasara neden olur [73].

2.3.1.4. Singlet O₂ (1O₂)

Enerji absorpsiyonu ile oksijenin paylaşılmamış dış elektronlarını değiştirerek aynı veya farklı orbitale yerledebilirler. Uyarılmış haldeki bu oksijene singlet oksijen denir. Reaktif olmayan ancak reaktif oksijen radikallerinden biri olan singlet oksijenin sigma ve delta diye iki tipi vardır [71, 77].

Sigma formu çok enerjik olduğundan yarı ömrü kısadır, hızlıca bozularak delta formuna dönüşür [71].

Singlet oksijen radyasyon sonucu oluşabileceği gibi *invivo* olarak sitokrom P-450, prostaglandin endoperoksit sentetaz ve miyeloproteksidaz reaksiyonlarıyla da oluşabilmektedir. Karotenler, bilirubin, histidin, methionin, 2-5 difenilfuran, 1,4 diazbisikloalefan, singlet oksijeni temizleme görevi yaparlar. Singlet oksijen, DNA, RNA, proteinler, lipitler ve

sterollerini kapsayan çok sayıda biyolojik hedeflerle reaksiyona girerek hücrede zararlı etkilere sebep olur [77].

2.3.1.5. Hidroperoksil Radikali (HO₂·)

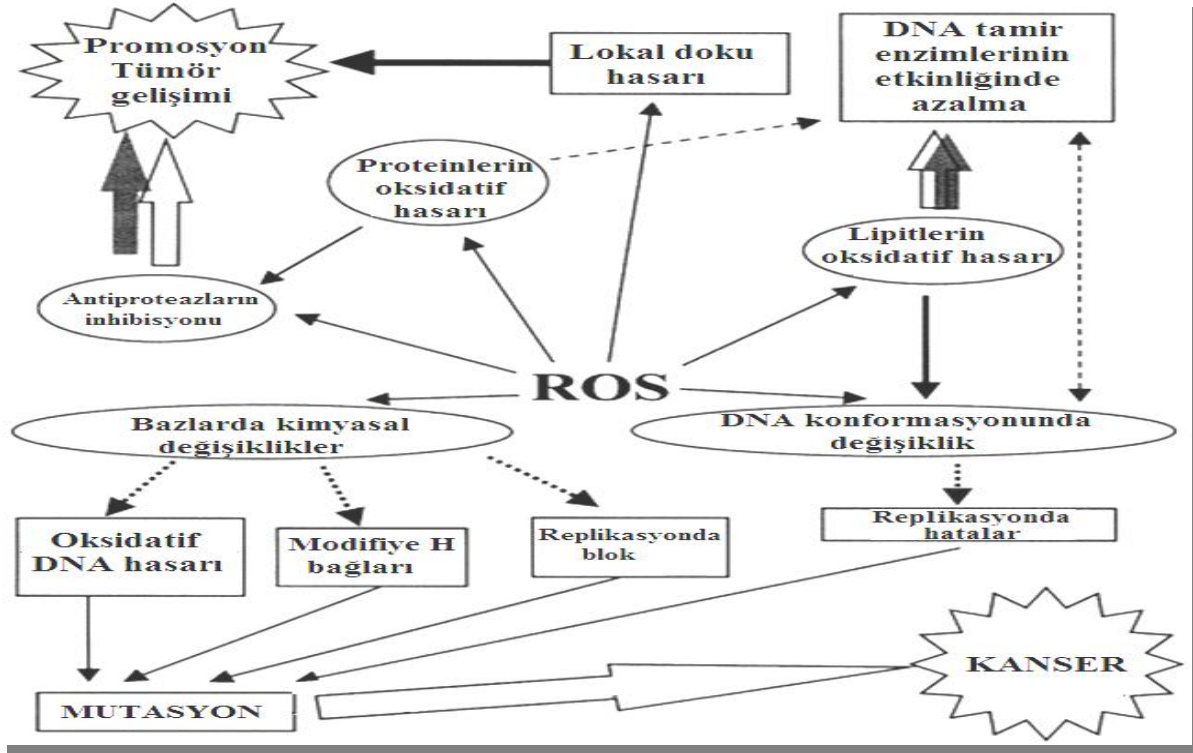
Süperoksit ve hidroperoksil relatif konsantrasyonları ortamdaki H⁺ konsantrasyonu üzerine dayanır. Çeşitli biyokimyasal ve inflamatuvar reaksiyonlar sonucu oluşumu önemli derecede artan süperoksit, asidik ortamda daha reaktif bir radikal olan hidroperoksile çevrilir. HO₂· nin dismutasyon hızı yüksek olduğu için H₂O₂ oluşumu da büyük oranda artar.

Hidroperoksil radikalının lipitte eriyebilirliği süperoksite göre daha fazladır ve daha kuvvetli bir oksidandır. Ayrıca hidroperoksil radikali asidik pH da süperoksite göre 108 kat daha hızlı olarak H₂O₂ 'e dönüşür [78].

2.4. Karsinogenez ve Serbest Oksijen Radikalleri

Karsinogenez; hücrelerde kimyasal, fiziksel, biyolojik ve genetik bir veya birden çok değişikliğin birleşmesi ile ortaya çıkan bir zedelenme sürecidir. Tümör oluşumunu etkileyen faktörlerin çoğu, hücrede radikal üretimine neden olur. Bu faktörler, karsinogenezin başlama, gelişme ve ilerleme aşamalarında da etkilerini göstererek tümör oluşumu ve gelişimini indüklerler. Bu konuda çeşitli hayvan model çalışmaları yapılmıştır, bunlar;

- Serbest oksijen radikali üreten bileşiklerin tümör promotörü olduğunu,
- Bu bileşiklerden bazılarının tümör promotörünün biyokimyasal fonksiyonunu taklit edebildiğini,
- Bazı promotörlerin serbest oksijen radikali üretebildiğini,
- Antioksidan mekanizmanın tümör promotörleri tarafından düzenlendiğini,
- Serbest oksijen radikali süpürücülerinin, antioksidantlar ve detoksifikasyondan sorumlu enzim ve moleküllerin tümörün ilerlemesini engellediğini göstermiştir [79].



Şekil 2.5. Reaktif oksijen radikallerinin (ROS) kanser oluşumu üzerine etkileri [14-15]

2.4.1. DEN ve 2-AAF'nin Aktif Oksijen Türlerini Üreterek Tümör Gelişimine Etkisi

Dietilnitrozamin'in metabolitleri, DNA'ya bir ya da iki oksidasyon sağlayan elektron ile kovalent bağlanarak tümör promotörlerinin bağlanmasına aracılık eder [80].

Tümör promotörü bir süperoksit anyonu indükleyicisi olarak görev yaparak reaktif oksijen molekülleri ve hidrojen peroksit oluşumunu sağlar. Bunun sonucunda süperoksit ve hidrojen peroksit birikimi gerçekleşir. Bu birikim, koruyucu antioksidant mekanizmanın azalmasını ve yüksek oranda reaktif hidroksil radikali oluşumunu sağlar. Bunun sonucunda DNA'nın yapısında kopma ve deoksiriboz parçalanması ortaya çıkar.

2.5. Oksidatif Stres ve Karsinogenez

Serbest radikaller hücrelerimizde DNA'ya, proteinlere ve lipidlere saldırarak zarar verir. Serbest radikallerin zararlı etkilerinden korunmak için hücreler bunları nötralize eden antioksidanlar üretmektedir. Serbest radikallerin oluşum hızı ve bunların antioksidanlar tarafından nötralize edilme hızı arasında bir denge bulunması beklenir. Böylece hücre serbest radikallerin olumsuz etkilerinden korunur. Eğer bu denge serbest radikaller lehine bozulursa, yani yapımdan daha yavaş nötralize edilirlerse, hücrede serbest radikaller artar. Serbest

radikallerin hücrede artışı ve hücre fonksiyonları üzerinde yaptıkları olumsuz etkiye (oksidatif hasara) ‘oksidatif stres’ denir [81].

Serbest radikallerin lipitler üzerindeki en önemli etkileri lipit peroksidasyonunun uyarılmasıdır. Lipit peroksidasyonu serbest radikaller tarafından başlatılan ve hücre membranlarında bulunan çok doymamış yağ asitlerinin oksidasyonuna yol açan kimyasal bir olaydır. Süperoksit radikali, hidroksil radikali, peroksil radikali ve alkoksil radikali, lipit peroksidasyonunu başlatan başlıca radikallerdir. Lipit peroksidasyonu çok doymamış yağ asidi (LH) zincirindeki - α -metilen gruplarından hidrojen atomunun uzaklaşması ile başlar ve böylece yağ asidi zinciri bir radikal niteliği kazanır. Bu lipit radikali (L.) dayanıksız bir bileşik olup bir dizi değişikliğe uğrar.

İlk önce , molekül içi çift bağ aktarılması (rezonans) ile dien konjugatı (DK) oluşur. Bu yağ asidi radikali oksijen eklenmesiyle hızlı bir şekilde peroksil radikaline (LOO-) dönüşür. Bu lipit peroksil radikalleri membran yapısındaki diğer çok doymamış yağ asidi moleküllerinden hidrojen atomlarını çıkartarak yeni reaksiyonları başlatır, kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipit hidroperoksitlerine (LOOH) dönüşür [82, 83].

Lipit hidroperoksitlerinin aldehit ve diğer karbonil bileşiklerine dönüşmesi ile lipit peroksidasyon reaksiyonları sona erer. Hücre membranlarında lipit peroksidasyonu sonucu transport sistemi etkilenir, hücre içi ve dışı iyon dengeleri bozulur. Bunun sonucunda hücre içi kalsiyum konsantrasyonu artar ve buna bağlı olarak proteazlar aktive olur. Bu olaylar hücre hasarında etkin bir rol oynar. Ayrıca lipit peroksidasyonun son ürünü olan aldehitler de sitotoksik etkilere sahiptir [82-84].

Serbest radikaller proteinler üzerinde doğrudan veya dolaylı etki gösterebilir. Peptid bağları, prolin ve lizin gibi amino asitler serbest radikallerden oldukça kolay etkilenir.

Protein oksidasyonu , özellikle histidin, tirozin, fenilalanin gibi amino asitlerde karbonil gruplarının oluşumu şeklinde olur. Lipit peroksidasyonun aldehit yapıdaki ürünleri, sistenin sülfidril grupları ile veya lizin ve histidinler ile kovalent bağlar oluşturarak proteinlerde fragmentasyon ve çapraz bağlanmalara yol açar. Bu olaylar proteinlerin yapı ve fonksiyonlarının bozulmasıyla sonuçlanır [82, 84-86].

2.5.1. DNA Hasarı ve Serbest Radikaller

Stabil bir molekül olan DNA da lipidler, karbohidratlar ve proteinler gibi spontan kimyasal oksidatif hasara uğrayabilmektedir. İnsan vücudunun her hücresinde DNA'nın günde 10^3 kez oksidatif hasara maruz kaldığı öne sürülmüştür [82].

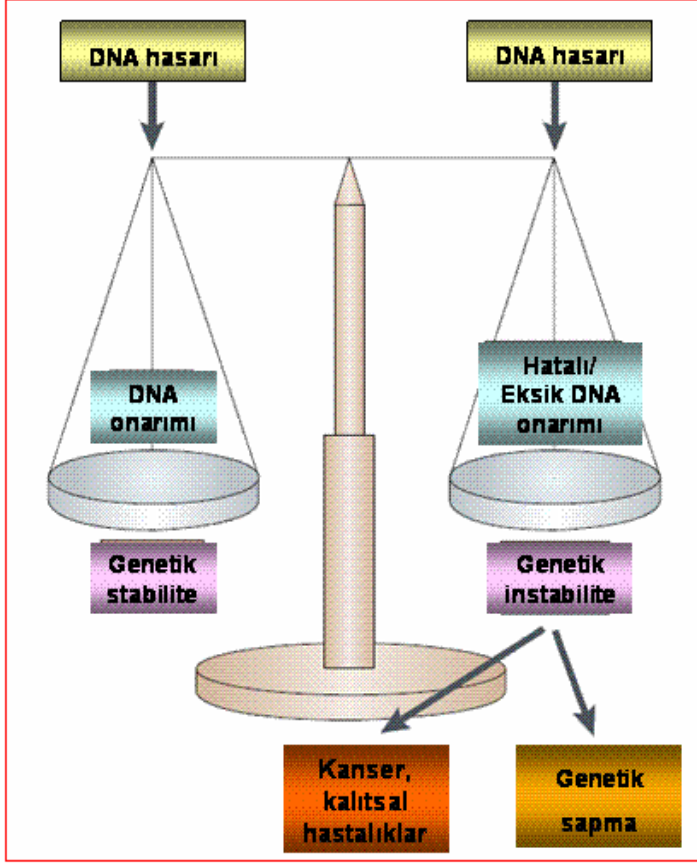
DNA hasarı ve onarımı arasındaki denge nedeniyle, çok düşük düzeylerde hasar, sağlıklı bireylerde de saptanmaktadır. Yeni doğan sıçanlarda dahi oksidatif baz modifikasyonunun (8OHdG) olduğu gösterilmiştir [87].

ROM oluşumundaki artma, antioksidan enzim düzeylerindeki azalma ve/veya DNA onarım mekanizmalarında defekt olması oksidatif DNA hasarının artmasına yol açmaktadır [88, 89].

Oksidatif hasara bağlı olarak DNA'da, tek ve çift dal kırıkları, abazik alanlar, baz modifikasyonları (baz katılımı, bazlarda yeniden düzenlenme), şeker hasarı meydana gelebilir veya DNA ile protein arasında çapraz bağlanma olabilir.

Bu lezyonlardan bazıları fizyolojik koşullarda da oluşabilmektedir. Örneğin pürin kaybı ile apürinik alanların oluşması insan genomunda gün içinde 10^4 kez meydana gelebilmektedir. Oksidatif modifikasyon sonucunda DNA antijenik karakter kazanmakta ve anti DNA antikoru oluşmaktadır.

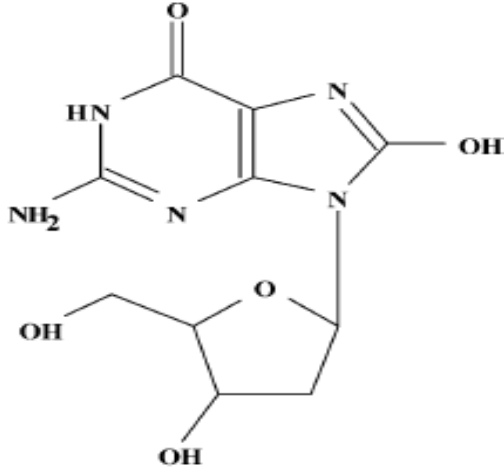
Son yıllarda yapılan araştırmalarda oksidatif DNA hasar göstergesi olarak sıklıkla baz hasarları analizlenmiştir. Cu^{2+} iyonları DNA'da G-C'den zengin bölgelerde yüksek oranda bulunduğundan oksidatif hasara en fazla maruz kalan baz guanindir. Bu nedenle en yaygın olarak ölçülen baz hasarı 8OHdG'dir. 8OHdG oksidatif DNA baz hasarının bir "biyomarker"ı olarak kabul edilmektedir [88-90].



Şekil 2.6. DNA hasarı / DNA onarımı arasındaki dengenin önemi [91]

2.5.2. 8-Hidroksi deoksiGuanizin (8-OHdG)

2-Deoksiganizin (2-dG), DNA'nın bileşenlerinden biridir ve oksijenle yükseltildiğinde 8-Hidroksi-2-deoksiganizin'e (8-OHdG) dönüşür. (Şekil 2.7) ki bu madde ROS'un DNA'da yaptığı yaklaşık 23 tane baz hasar ürününden en önemlisi ve biyolojik sistemlerdeki oksidatif DNA hasarında mutajenitesi en iyi bilinenidir. 8-OHdG ilk defa 1984 yılında Kasai ve Nishimura tarafından oksidatif DNA hasarının bir belirteci olarak tespit edilmiştir [92].



Şekil 2.7. 8 - hidroksi - 2' – deoksiguanozin [92]

8-Hidroksiguanin (8-OHG)'in deoksiriboza bağlanmış hali olan bir modifiye nükleosit olup, ekzonükleazlar olarak adlandırılan enzimlerin oksidatif hasara uğramış DNA'yı onardıklarında ekstrakte edilen bir baz modifikasyonudur. 8-OHdG normal oksidatif metabolizma sırasında üretilen ve reaktif oksijen türlerinden kaynaklanan, DNA'da şekillenen bir mutajendir [92].

Serbest oksijen radikal üretiminin artmasına sebep olan tüm etkenler, 8-OHdG oluşumuna yani oksidatif DNA hasarına katkıda bulunur. Oksijen radikali üreten ajanlar; (sigara dumanı, asbestos, x-ışınları, okside olmuş doymamış yağ asitleri), gama ışını, sigara dumanındaki polifenoller, paraquat, kainik asit, dietilbutilesterol, benzen, fecapenene, furocoumarin hydroperoxide, $H_2O_2 + UV$ ve Ni bileşikleri gibi maddeler tarafından, deoksiguanozin'den (dG) 8-OHdG oluşumu invitro olarak gösterilmiştir. Ayrıca kanserojen maddelerin verilmesinden sonra hayvan dokularında 8-OHdG düzeyinin arttığına dair bir çok araştırma mevcuttur. Metabolik aktiviteye bağlı artan oksijen tüketimi sonucu artmış OH üretimi, vücut moleküllerinde oksidasyona neden olur. Dokuların oksijen tüketimi ile 8-OHdG bazal düzeyi arasında doğrusal bir oran vardır. Oksidatif hasar ürünü olarak kabul edilen 'Deoksiguanozin-Malondialdehit'in idrardaki miktarı ile kg canlı ağırlık başına tüketilen oksijen miktarı arasında doğrusal bir ilişki bulunması ve böbreklerde diğer organlara göre daha yüksek düzeyde 8-OHdG tespit edilmiş olması bu fikri desteklemektedir [92].

Loft adlı bir araştırmacı tarafından sağlıklı kişilerde yapılan bir çalışmada, vücut kütle indeksi arttıkça idrar 8-OHdG ekstraksiyon düzeyinin azaldığı tespit edilmiştir. Erkeklerde (%29 fazla) ve zayıflarda 8-OHdG ekstraksiyon oranının yüksek çıkmasının olası nedeni olarak, metabolizmaya bağlı ROS üretimindeki artış sorumlu tutulmuştur [93].

Yapılan araştırmaların ağırlıklı olarak desteklediği başka bir nokta, yaşlanma ile oksidatif DNA hasarı arasında doğrusal bir ilişki olduğudur. Yaşa bağlı olarak DNA'da 8-OHdG birikiminin, mutasyon sıklılığının artmasında, organ fonksiyonlarının azalmasında, dejeneratif hastalıkların ortaya çıkmasında ve tümör oluşum ihtimalinin artmasında en önemli neden olduğu belirtilmiştir [92].

2.6. Isı Şok Proteinleri (Heat Shock Proteins: Hsp 70)

Ferruccio Ritossa 1962'de *Drosophila melanogaster*'ın tükürük salgısından yüksek ısıya bağlı bir protein sentezlendiğini gözlemlemiş, bu olayı deneysel ortamda tekrarladığında da elde ettiği bu proteinleri ısı Şok proteini (Hsp) olarak isimlendirmiştir [94].

Isı Şok yanıtı ise bu proteinlerin hızlı gen ifadeleri ile karakterizedir. Bu proteinler klasik olarak ısı stresine yanıt olarak sentezlenirken çok geniş ısı harici faktörler ve farmakolojik ajanlara karşı da sentezlenirler. Bu yüzden stres proteini ve stres yanıtı terimleri daha uygun olacaktır [95].

Bu proteinlerin moleküler ağırlıkları 7 ile 110 kDa arasındadır ve intraselüler, ekstraselüler, plazma membranı yerleşimli olabilirler. İntraselüler yerleşimli olanlar, hemen her hücrenin sitoplazma, mitokondri, çekirdek gibi kompartmanlarında bulunur [96, 97].

Isı Şok proteinleri hücre metabolizması kontrolünde anahtar rol oynarlar [98].

Hsp 90 hücre siklusu ve mitogenezin düzenlenmesinde, Hsp 70 de apoptozda görev alır ve bunu da birkaç anahtar proteinle etkileşime girerek gerçekleştirir. Bu moleküler şaperonlar, ısı Őoku boyunca protein kümelenmesi ve katlanmaları durumunda görev alırlar [99].

Çok sayıda proteinin agregasyonu ısı Şok proteinleri aracılığı ile engellenir. Hsp 27,70 ve 90'ın etkisi ile denatüre proteinler tanınır ve ardından şaperonlar yardımı ile tekrar katlanmış hale getirilir [100].

Proteinlerin denatürasyon ve agregasyonu apoptozu güçlü bir şekilde tetikler. Hsp'nin apoptozu engelleyici özellikleri ile güçlü antiapoptotik özellik geliştirirler ve böylece proteinlerin onarılması için zaman aralığı sağlanmış olur [101].

Hsp 'nin protein katlanmasındaki görevleri ve hücre koruyucu özellikleri, malign progresyon boyunca tümör hücrelerinin korunması ve yaşamını devam ettirmesinde büyük rol oynamaktadır [102].

2.6.1. Kanserde Isı Şok Proteinlerinin Rolü

Tümör gelişimi bir dizi moleküler ve morfolojik değişiklikleri içerir. Hanahan ve Weinberg hücre fizyolojisindeki değişiklikleri 6 grupta özetlemişlerdir [103].

- 1-Büyümede kendi kendine yeterlilik
- 2-Büyüme inhibisyonuna duyarsızlık
- 3-Programlı hücre ölümünden kurtulma
- 4-Sınırsız replikatif potansiyel
- 5-Devam eden anjiogenez
- 6-Doku inazyonu ve metastaz

Isı şok proteini ekspresyonundaki artışlar sadece bu tümör gelişim aşamalarında değil, ilaca dirençli fenotip gelişiminde de rol oynar. Hsp'leri kanser gelişimindeki etkilerini yaşlanma ve apoptoz gibi anti kanser mekanizmalarının baskılanmasına neden olmalarına ilaveten, immun sistem yoluyla tümör rejeksiyonunun arttırılması ve metastatik genlerin ekspresyonlarının hızlandırılması gibi mekanizmalarla da sağlamaktadır. Diğer yandan membran aracılı Hsp ve ekstrasellüler Hsp kanser immünterapisinde kullanılır [104].

Kanserde Hsp genlerinin artmış transkripsiyonu birkaç mekanizma ile açıklanabilir. Normal hücrelerde Hsp regülasyonu için temel mekanizma; tümör supresör p53 ve bununla ilişkili p63 proteinini içerir. Bu proteinler, Hsp geninin protomer bölgelerinde bulunan NF-Y transkripsiyon faktörüne bağlanarak Hsp genlerinin transkripsiyonunu baskılar.[105, 106] p53 mutasyonu, transformasyon boyunca genetik değişikliğe neden olur. Bu değişiklikler Hsp70'in artmış transkripsiyonuna neden olur [107, 108].

Tümör hücrelerindeki Hsp'lerinin indüksiyonu, p53 protein ailesinin tümör baskılayıcı özelliğinin tersine çevrilmesine ilave olarak Hsp yolağının sinyal elemanları aracılığı ile transkripsiyonu arttırıcı etkiye sahiptir [109].

Hsp yanıtı boyunca bütün Hsp genlerinin protomer bölgesinde bulunan ısı şok elementi (HSE) ile ısı şok faktörü 1'in (Hsf1) etkileşimi Hsp gen ifadesinin artışına neden olur [110-112].

Birkaç hücre türünde Hsp70'in fazla üretilmesi ile ilgili çalışmalar, tümör gelişimine doğru giden hücrelerde Hsp70'in arttığı fikrini desteklemektedir [113].

İnsan meme kanseri MCF-7 hücre kültürlerinde Hsp70'in aşırı ekspresyonunun G0/G1 fazının kısalması ile hücre çoğalmasının hızlanmasına neden olduğu bildirilmektedir [113].

Bu etki, Hsp 70'in fazla üretimi ile hücre siklus regülatörü olan D1 siklinin stabilizasyonunun sağlanmasına bağlı olabilir [114].

2.6.2. Kanser Tedavisinde Isı Şok Proteinleri

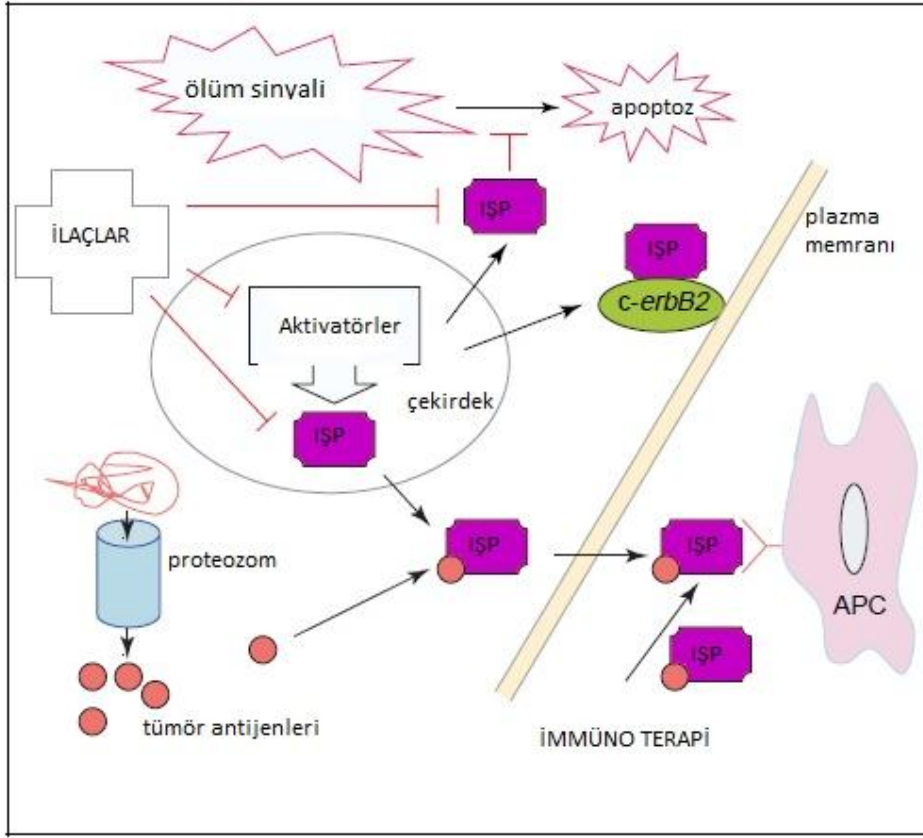
Başlangıçta Hsp'lerinin kanser tedavisi için hedef alınması pek mümkün görünmüyordu. Yakın zamanlarda Hsp90'ın ATPaz domaininin antikanser tedavisinde kullanılan oldukça etkili ve eşsiz bir hedef olduğu tesbit edildi [115].

Hsp 90'ı hedef alan ilaçların hem normal hem de kanser hücrelerine saldırması beklenirken, özellikle kanser hücrelerini etkilediği görüldü. Hsp 90 inhibitörü 17AAG de selektif olarak kanser hücrelerini inhibe ediyordu [116].

İlginç bir şekilde bu antikanser ilaçlar normal hücreleri koruyucu özellik gösteriyordu [117].

Isı şok protein 90'ı hedef alan inhibitör ilaçlar, onkogenler ve kanserden üretilen mutant proteinlerin gen ifadesinin artmasına neden olurlar. Bu inhibitörler kanserin özgün proteinlerini hedef almaları ve kanserin otonom büyümesini inhibe etmesi dolayısı ile kanser tedavisinde ümit verici gözükmetedirler [118-120].

Bu ilaçlara karşı muhtemel yan etki dirençli vakaların ortaya çıkması ile meydana gelir [121].



Şekil 2.8. Isı şok proteinlerinin kanser tedavisindeki rolü [95]

Kanserde Hsp'lerinin artması, bunların biyolojik adjuvan özelliğinden dolayı kanser immunterapisinde kullanılmasına olanak sağlamıştır [122].

Örneğin Hsp70 ve 110 tümör antijenleri ile ilişkili olup, kolayca ekstrakte edilerek otolog aşı olarak kullanılabilir [123, 124].

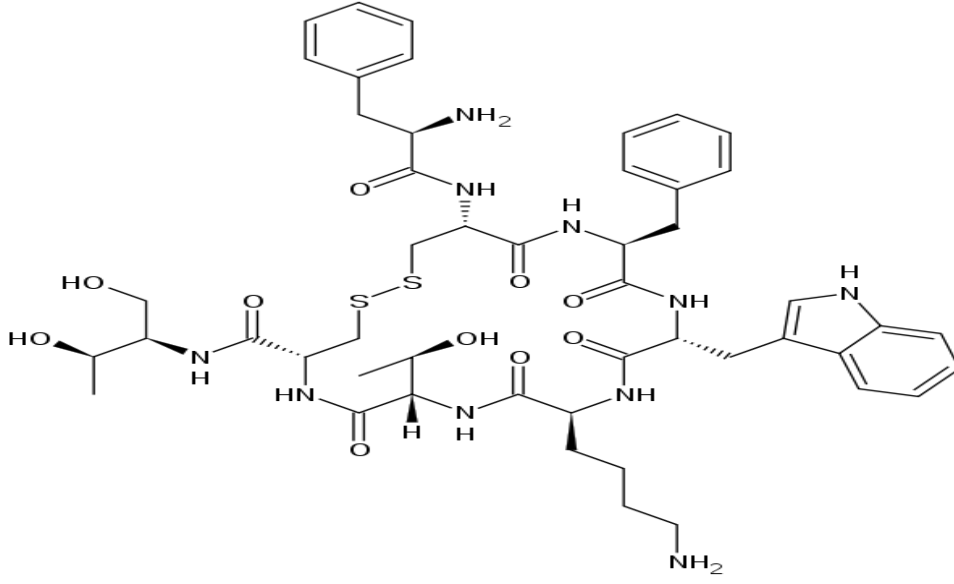
Hsp'leri kanser hücrelerinde nekrotik mekanizmalar aracılığı ile yıkıma uğrattılırken uzak bölgedeki hücreler, primer hücreden salınan Hsp'lerinin artmasına bağlı olarak spesifik immun yanıt tarafından yıkıma uğrattılırlar [125].

2.7. OCTREOTİDE

Farmakolojik olarak doğal somatostatin taklit eden bir oktapeptid olup kimyacı Wilfried Bauer tarafından 1979 yılında ilk kez sentezlenmiştir.

Octreotide, bir sandostatin analogu olup, tüm büyüme faktörlerini inhibe etmektedir. Yapılan çalışmalarda akut pankreatit, karsinoid tümör, VIPoma, Zollinger-Ellison sendromu, glukagonoma, AIDS'e bağlı diyare ve akromegali tedavisinde başarılı bir şekilde kullanılmaktadır [126-132].

Octreotide'nin son zamanlarda bazı klinik çalışmalarda ve çeşitli deneysel modellerde antioksidan özellikleri de bildirilmiştir [133-135].



Şekil 2.9. Octreotidenin kimyasal yapı gösterimi [136]

3. ANTİOKSİDANLAR

3.1. Antioksidan Savunma Sistemleri

Serbest radikaller, organizmada normal metabolik yolların işleyişleri sırasında sürekli oluşan ve endojen antioksidanlar adı verilen moleküller tarafından etkisizleştirilen maddelerdir. Oksidan moleküller belirli düzeyde kaldıkları sürece, organizmanın yabancı maddelere ve infeksiyon ajanlarına karşı önemli savunma molekülleridir. Ancak belirli düzeyin üzerinde oluştuklarında veya antioksidan sistemin yetersizliğinde serbest radikal molekülleri, organizmanın yapı elemanları olan protein, lipit, karbonhidrat, nükleik asitler ve enzimleri bozarak zararlı etkilere yol açarlar [137].

Hücrede oluşan serbest radikallerin detoksifikasyonu özellikle daha çok enzimatik mekanizmalarla gerçekleşir. Antioksidan savunmanın önemli bir kısmını O_2^{\cdot} radikalini ve H_2O_2 temizleyen özel enzimler oluşturur. Bunlar radikal süpürücü olarak adlandırılan SOD, CAT ve glutatyon peroksidaz enzimleridir [138].

3.1.1. Antioksidan etki tipleri

Antioksidanların ilk belirlenen etkileri, zar yapısında bulunan lipitlerin peroksidasyona karşı korunması olmuştur. Bunun sonucunda antioksidanlar başta lipit peroksidasyonunu engelleyen moleküller olarak tanımlanmışlardır. Günümüzde ise antioksidanların tanımı lipitlerin yanı sıra proteinler, nükleik asitler ve karbonhidratlar gibi diğer hedef molekülleri koruyucu etkilerini de içerecek şekilde genişletilmiştir [74, 139].

Antioksidanlar dört ayrı şekilde etki ederler:

1) Toplayıcı etki: Reaktif oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma veya daha zayıf yeni moleküle çevirme şeklindedir. Antioksidan enzimler bu tip etki gösterirler.

2) Bastırıcı etki: Reaktif oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltma veya inaktif şekle dönüştürme şeklindedir. Vitaminler, flavanoidler bu tarz bir etkiye sahiptirler.

3) Zincir kırıcı etki: Reaktif oksijen radikallerini bağlayarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyici etkidir. Hemoglobin, seruloplazmin ve mineraller zincir kırıcı etki gösterirler.

4) Onarıcı etki: Serbest radikallerin oluşturdukları hasarın onarılması şeklindedir.

3.1.1.1.Doğal Antioksidanlar (Endojen)

Antioksidanlar, endojen kaynaklı veya eksojen kaynaklı olabilirler. Eksojen antioksidanlar, vitaminler, ilaçlar ve gıda antioksidanları olmak üzere sınıflandırılabilirler. Endojen antioksidanlar ise enzim ve enzim olmayanlar olmak üzere iki sınıfa ayrılırlar.

Enzim olan endojen antioksidanlar şunlardır [72, 81, 140]

- 1) Süperoksit dismutaz (SOD),
- 2) Glutatyon peroksidaz (GSH-Px),
- 3) Glutatyon S-Transferazlar (GST),
- 4) Katalaz (CAT),
- 5) Mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi,
- 6) Hidroperoksidaz.

Enzim olmayan endojen antioksidanlar şunlardır [72, 81, 140]

- 1) Melatonin
- 2) Seruloplazmin
- 3) Transferin
- 4) Miyoglobin
- 5) Hemoglobin
- 6) Ferritin
- 7) Bilirubin
- 8) Glutatyon
- 9) Sistein
- 10) Metiyonin
- 11) Ürat
- 12) Laktoferrin
- 13) Albümin

3.1.1.2. Eksojen Antioksidanlar

İlaç olarak kullanılan eksojen antioksidanlar şunlardır [72, 81, 140]

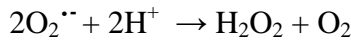
- 1) Ksantin oksidaz inhibitörleri (allopürinol, oksipürinol, pterin aldehit, tungsten)

- 2) NADPH oksidaz inhibitörleri (adenozin, lokal anestezikler, kalsiyum kanal blokerleri, nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar, diphenylene iodonium)
- 3) Rekombinant süperoksit dismutaz
- 4) Endojen antioksidan aktiviteyi artıranlar (GSH-Px aktivitesini artıran ebselen ve asetilsistein)
- 5) Trolox-C (vitamin E analogu)
- 6) Demir redoks döngüsü inhibitörleri (desferroksamin)
- 7) Nonenzimatik serbest radikal toplayıcılar (mannitol, albümin)
- 8) Nötrofil adezyon inhibitörleri
- 9) Sitokinler (TNF ve IL-1)
- 10) Demir şelatörleri
- 11) Barbitüratlar

3.1.2. Enzimatik Antioksidanlar

3.1.2.1 Süperoksit Dismutaz (SOD)

Süperoksit dismutaz, Oksijeni metabolize eden bütün hücrelerde bulunur, süperoksidin H_2O_2 dismutasyonunu katalizleyen bir metalloenzimdir. SOD süperoksit serbest radikalının hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü aşağıdaki reaksiyonla katalizleyen antioksidan enzimdir [141, 142].



Serbest radikallere karşı organizmada ilk savunma SOD enzimi ile gerçekleşir. SOD, $O_2^{\cdot -}$ radikalini metabolize eder ve daha zararlı olan hidroksil radikalının oluşumunu engeller.

$O_2^{\cdot -}$ radikalini H_2O_2 'ye ve moleküler O_2 'ye dönüştürür. Tepkime ürünü olan H_2O_2 tarafından inhibisyona uğrar [143].

SOD enzimi metalloprotein yapısındadır. Hücrelerde farklı şekillerde bulunmaktadır. Bunlar:

SOD-1:Cu-Zn SOD, stoplazmada bulunur.

SOD-2:Mn-SOD, mitokondride bulunur.

SOD-3 :Fe-SOD, Bazı bakterilerde rastlanmıştır.

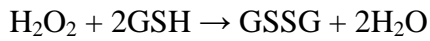
SOD-4 : Ni-SOD, Bazı bakteri türlerinde bulunur.

İnsanlarda ise SOD enzimi: Sitolitik Cu/Zn-SOD; mitokondrial Mn-SOD; plazma, lenf ve sinovyal sıvılarda bulunan ekstrasellüler SOD olmak üzere 3 formda bulunur [141]. SOD, O₂'molekülleri ile spontan olarak dismutasyona uğrayabilir. Sulu ortamda kendiliğinden ve hızlı bir şekilde dismutasyona uğrayarak O₂ ve H₂O₂ oluşturur. SOD varlığı dismutasyon hızını 10⁴ kat artırır. Böylece O₂'radikalinin potansiyel substratla reaksiyona girmesi ve OH[·] gibi daha toksik ürünlerin oluşması SOD tarafından önlenmiş olur. Organizmada oksidatif stresin ve dokuda pO₂'nin arttığı durumlarda SOD enzim aktivitesi artmaktadır.

Hidrojen peroksit, Fenton reaksiyonu veya Haber-Weiss reaksiyonları ile çok daha reaktif olan OH[·] radikali oluşturabilir. Oluşan H₂O₂'e karşı ikinci savunma CAT ve GPx enzimleriyle sağlanır [137].

3.1.2.2. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px)

Glutasyon sistemi, oksidatif hasarın azaltılmasında rol oynayan, serbest radikallerin hücre içinde detoksifikasyonuna neden olan ve lipid peroksidasyonunu önleyen en önemli endojen mekanizmalardandır. İntrasellüler glutasyon olarak bulunan en güçlü tiol bileşimidir. GPx enzimi, glutatyonun H₂O₂'yi suya dönüştürür, selenyuma bağlı sitoplazmik bir enzimdir, H₂O₂'yi detoksifiye ederek su ve okside glutatyonla dönüştürür [144].



Glutasyon peroksidaz'ın antioksidan aktivitesini göstermesi, hücre içinde yeterli konsantrasyonda glutasyon redüktaz, GSH ve nikotinamid adenin dinükleotid bulunmasına bağlıdır [144].

Glutasyon peroksidaz sitozolde bulunur, 4 selenyum atomu içerir, tetramerik yapıdadır. Glutasyon peroksidaz, hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumlu enzimdir. Ayrıca Fosfolipid hidroperoksit glutasyon peroksidaz (PLGSH-Px) adı verilen bir enzim monomerik yapıdadır ve esas olarak membran fosfolipid hidroperoksitlerini alkollere indirger.

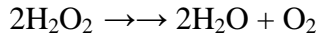


Fosfolipid hidroperoksit glutasyon peroksidaz membrana bağı en önemli antioksidan olan vitamin E yetersiz olduğunda membranı peroksidasyona karşı korur. GSH-Px'ın fagositik hücrelerde de önemli fonksiyonları vardır. Diğer antioksidanlarla birlikte GSH-Px, solunum patlaması sırasında serbest radikal peroksidasyonu sonucu fagositik hücrelerin zarar görmesini önler [72].

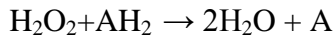
3.1.2.3. Katalaz (CAT)

Katalaz 60 kDa ağırlığında 4 tane aynı yapıda (tetramerik yapıda) hem grubu bulunan bir hemoproteindir. Görevi hidrojen peroksidi oksijen ve suya parçalamaktır. Peroksidaz aktivitesine sahip oluşuna ek olarak, katalaz enzimi bir molekül hidrojen peroksidi elektron verici bir substrat olarak, diğerini ise oksidan veya elektron alıcısı olarak kullanabilir [72, 145].

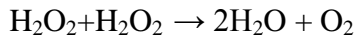
CAT



Katalaz enzimi peroksizomlarda yerleşmiş olup kan, kemik iliği, mukoz membranlar, karaciğer ve böbrekte yüksek miktarlarda bulunmaktadır. Katalaz önemli bir aktivite olarak düşük hızlarda hidrojen peroksidin olduğu durumlarda ya da ortamda yüksek miktarda elektron alıcısı bulunduğunda peroksidatif tepkime ile hidrojen peroksidi suya dönüştürür.



Hidrojen peroksit oluşum hızının yüksek olduğu durumlarda ise aşağıdaki katalitik tepkimeyle H_2O_2 yi suya dönüştürerek ortamdan uzaklaştırmış olur [142].



4. GEREÇ VE YÖNTEM

4.1. GEREÇ

4.1.1. Deney Grupları

Bu çalışma Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi etik kurulu onayı alınarak Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı tarafından, KSÜ Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirildi. Deneylerde kullanılan toplam 64 adet dişi Sprague-dawley cinsi sıçan KSÜ Tıp Fakültesi Deney hayvanları barınağından alındı. Sıçanlar 200 ± 50 gram ağırlığında 4-5 aylıktır. Sıçanlar $21 \pm 1^\circ$ C oda sıcaklığında 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık periyodunda tutularak standart rat yemi ve su verilerek beslendi. Bir hafta adaptasyon süresi beklendikten sonra başlangıç ağırlıkları kaydedilmiştir ve deneye başlanmıştır. Deney sonunda tekrar ağırlıkları kaydedilmiş ve sıçanlar sakrifiye edilerek karaciğer dokuları alınmıştır.

4.1.2. Kullanılan Kimyasallar

- 2-AAF (Sigma)
- Octreotide (Sigma)
- DMSO (Sigma)
- DEN (Sigma)
- % 30 H₂O₂ (Merck)
- . HCl (merck)
- Formaldehit (HCHO-Merck)
- Metanol (CH₄O)
- Na₂CO₃ (Sigma)
- . NaOH (Sigma)
- Na-K Tartarat (Sigma)
- Folin Cioacaltea (Sigma)
- Sodyum Dodesil Sülfat (SDS-Sigma)
- %20'lik Asetik Asit (Merck)
- Tiyobarbitürik Asit (Sigma)
- Bütanol (Sigma)

- Piridin (Sigma)
- Tris-Baz (Sigma)
- Tris-HCl (Sigma)
- Na₂ EDTA (Merck)
- Ksantin (Sigma)
- CAPS (Sigma)
- CuSO₄ (Sigma)

4.1.3. Kullanılan Cihaz ve Malzemeler

- Cam Kalem
- Enjektör
- Fotoğraf makinesi (Canon)
- Hassas Terazisi (Shimadzu)
- Hayvan Kafesi
- Homojenizatör düzeneği (Art Micra D-8)
- Kronometre (Clp)
- Lam
- Lamel
- Manyetik Karıştırıcı (IKA labortechnik)
- Mezür (25ml,50 ml,100 ml,250 ml,500 ml)
- Mikroskop
- Operasyon Takımı
- Otomatik pipet (Gilson)
- Pastör pipeti (İsolab)
- Pipet uçları (1000 ve 100)
- Soğutmalı santrifüj (Eppendorf)
- Spektrofotometre(Shimadzu UV-1601)
- Su Banyosu (Memmert)
- Vorteks (Velp)
- Buzdolabı (Arçelik)
- Buz Makinesi (BF85-A UK)
- Distile Su (Millipore)
- pH metre (Mettler Toledo)
- Mikro Elisa (Chemwell 2910)

4.2. YÖNTEM

4.2.1. Doz ve deney grupları

Çizelge 4.1. Doz ve deney grupları

Gruplar	N	Birinci doz ve rutin uygulamalar	İkinci uygulamalar
Grup 1:Kontrol	8	Su + Yem	-
Grup 2 : Zeytinyağı	8	Su + Yem	Deney sonuna kadar haftada 3 kez 0,1 ml/kg gavaj uygulandı.
Grup 3: DMSO	8	Su + Yem	Deney sonuna kadar haftada 3 kez 0,1 ml/kg i.p uygulandı.
Grup 4 : OCT	8	0,1 ml DMSO da çözülmüş 300 µg/kg OCT i.p olarak 1 kez uygulandı.	
Grup 5 : DEN	8	DEN, 175 mg/kg i.p 0,1 ml DMSO'da çözüldürülerek 1 kez uygulandı. Su + Yem	
Grup 6 : 2-AAF	8	Su + Yem	Deneyin başlamasından sonra 7. 8. ve 9.günde 20 mg 2-AAF /kg oranında DMSO'da çözüldürülerek 0.1 ml z.yağ içinde gavajla verildi
Grup 7: DEN+AAF	8	DEN, 175 mg/kg i.p 0,1 ml DMSO'da çözüldürülerek 1 kez uygulandı. Su + Yem	Deneyin başlamasından sonra 7. 8. ve 9.günde 20 mg 2-AAF /kg oranında DMSO'da çözüldürülerek 0.1 ml z.yağ içinde gavajla verildi
Grup8: DEN+AAF+OCT	8	DEN, 175 mg/kg i.p 0,1 ml DMSO'da çözüldürülerek 1 kez uygulandı. Su + Yem	Deneyin başlamasından sonra 7. 8. ve 9.günde 20 mg/kg 2-AAF oranında DMSO'da çözüldürülerek 0.1 ml z.yağ içinde gavajla verildi. 0,1 ml DMSO da çözülmüş 300 µg OCT DMSO da çözüldürülerek 16.23.ve 30.günde i.p olarak verildi



Şekil 4.1. Kontrol grubunun makroskopik görünümü



Şekil 4.2. 5.Grup (DEN) makroskopik görünümü



Şekil 4.3. 7.grup (DEN+ 2-AAF) makroskopik görünümü

4.3. Karaciğer doku örneklerinin alınması ve hazırlanması

Alınan karaciğer dokularının bir kısmı Histopatolojik inceleme için % 0.9 NaCl ile yıkanan karaciğer örnekleri % 10'luk tamponlanmış formalin çözeltisinde 3 gün süre ile fikse edildi, rutin doku takibinden geçirilen materyallerden hazırlanan parafin bloklardan elde edilen 5 µ kalınlığındaki kesitler hematoksilin eosin (H&E) boyası ile boyandı ve ışık mikroskopunda incelendi.

Biyokimyasal parametreler için ayrılan karaciğer dokuları -20 °C homojenize edilecek güne kadar muhafaza edildi. Homojenize edileceği gün erimeye bırakıldı. Daha sonra eriyen ve çalışmaya hazır olan doku örnekleri soğuklukları muhafaza edilerek teker teker tartıldı ve cam tüplere konuldu. Dokuların homojenize işlemine geçmeden önce dokulara 0,5 gr 10 hacim (hacim/ağırlık) %1,15 M KCl çözünme sağlamak amacıyla eklendi. Dokular 16.000 devir/dakika hızda 3 dk boyunca homojenize edildi. Enzim aktive kaybını önlemek amacıyla örnekler buz dolu küvete yerleştirildi. Daha sonra homojenatlar 4.000x rpm'de +4 °C 'de 60 dakika soğuk santrifüj edilerek süpernatantlar alındı ve ependorf tüplere ayrıldı bu ayrılan süpernatantlardan protein ve MDA, NO düzeyleri ile SOD, CAT ve GSH-Px enzim aktive ölçümleri yapıldı.

Bununla beraber 8-OH dG ve Hsp 70 için çalışılan doku örnekleri homojenize işlemine geçmeden önce dokulara 0,5 gr 10 hacim (hacim/ağırlık) (0,1 N pH= 7.2-7,4) fosfat

tamponuyla çözünme sağlamak amacıyla eklendi. Dokular 16.000 devir/dakika hızda 3 dk boyunca homojenize edildi. Daha sonra homojenatlar 4.000x rpm'de +4 °C 'de 60 dakika soğuk santrifüj edilerek süpernatantlar alındı ve ependorf tüplere ayrıldı bu ayrılan süpernatantlardan 8-OH dG ve Hsp 70 düzeyleri tayin edildi.

4.4. Karaciğer Dokusunda Protein Düzeyinin Tayini

Bu metot proteinlerin içerdiği trozin ve triptofan rezidülerinin fosfotungustik – fosfomolibdik asit ile verdiği renk reaksiyonunun spektrofotometrik yöntemle 750 nm'deki absorbans ölçümüne dayanır.

4.5.1. Ayıraçlar

1. A çözeltisi:

%2 Na₂CO₃ 2 g hazırlanır

0,1 N NaOH ile 100 ml'ye tamamlanır.

2. B Çözeltisi: B₁ ve B₂ çözeltilerinden oluşur.

a) B1 Çözeltisi:

% 1 CuSO₄.5H₂O 1g hazırlanır

Saf suyla 100 ml'ye tamamlanır.

b) B2 Çözeltisi:

%2 Na-K tartarat 2g hazırlanır

Saf suyla 100 ml'ye tamamlanır.

3. C Çözeltisi(Günlük hazırlanır)

50 ml A + 1 ml B (0,5 ml B₁+0,5 ml B₂) karıştırılır.

4. D Çözeltisi (Günlük hazırlanır)

Folin Cioacaltea 1: 1,5 (v/v) oranında saf su ile sulandırılır .

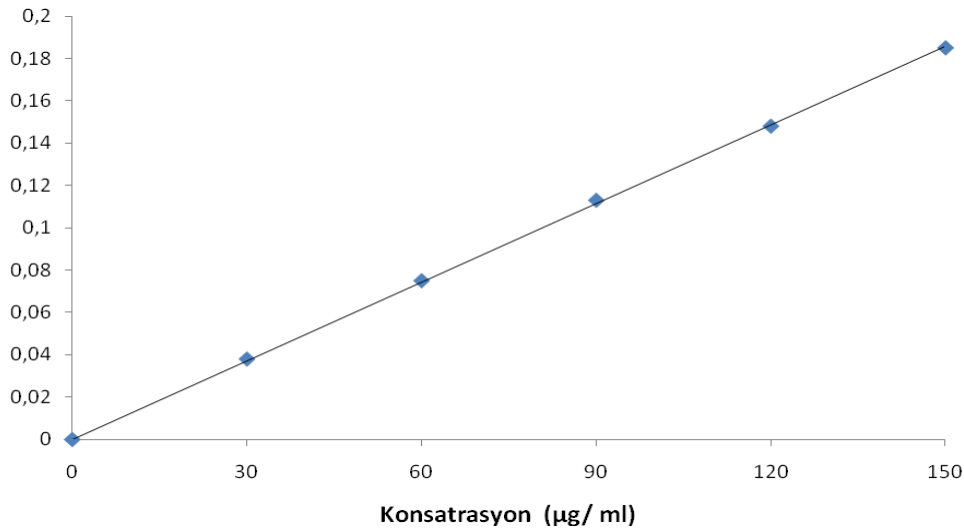
4.5.2. Standart Eğrinin çizimi

Stok standart için 0,3 g/dl bovin albumin hazırlanır. Hazırlanan stok standarttan 5 ml alınıp 100 ml 'ye serum fizyolojik ile tamamlandığında 150 µg/ml konsantrasyon elde edilir. Bundan seri sulandırma ile 150, 120, 90, 60, 30 µg/ml' lik konsantrasyonlar elde edilerek 750 nm'de verdikleri absorbanslar kaydedilir. Bu verilere göre konsantrasyon-absorbans eğrisi çizilir ve her numune ölçümünde standart eğri tekrarlanır (şekil 19)

Çizelge 4.2. Protein standart eğri çizimi için tüplerin hazırlanışı

Tüp no	Kör	1	2	3	4	5
Konsantrasyon ($\mu\text{g/ml}$)	0	30	60	90	120	150
Standart bovin albumin (ml)	-	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Serum fizyolojik (ml)	0.3	-	-	-	-	-
C Çözeltisi (ml)	3	3	3	3	3	3
15 dakika oda ısısında bekletilir						
D Çözeltisi (ml)	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3

Oda ısısında 30 dakika bekletilir ve 750 nm’de köre karşı okunur.



Şekil 4.4. Protein standart eğrisi

Doku Örnek Çalışması

Karaciğer dokularından hazırlanan süpernatantta protein tayinini yapmak için, süpernatant 1: 50 oranında serum fizyolojik ile sulandırılır ve protein tayini yapılır. Bunun için üç tüp alınır ve çözeltiler aşağıdaki şekilde tüplere konular.

Çizelge 4.3. Doku örneğinde protein tayini için tüplerin hazırlanışı

	Kör (ml)	Standart (ml)	Örnek (ml)
Serum fizyolojik	0.3	-	-
Standart	-	0.3	-
Süpernatant	-	-	0.3
C Çözeltisi	3	3	3
15 dakika oda ısısında bekletilir			
D Çözeltisi	0.3	0.3	0.3

Oda ısısında 30 dakika bekletilir ve 750 nm’de köre karşı okunur.

Hesaplanması

Doku örneğinin absorbansı standartın absorbansı ile karşılaştırılarak veya doğrudan standart eğrisinden değerlendirilir ve dilüsyon katsayısı ile çarpılarak sonuç verilir.

4.6. Karaciğer Dokusunda MDA Düzeyinin Tayini

Aerobik şartlarda pH 3.40’de tiyobarbitürik asit (TBA) ile örneğin 90-95 C°’de inkübasyonu sonucu oluşan lipit peroksidasyonunun sekonder ürünü olan MDA’nın TBA ile pembe renkli kompleks oluşturma esasına dayanır. Oluşan bu renk şiddeti ortamdaki MDA konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. 532 nm’de spektrofotometrik olarak değerlendirilir .

4.6.1. Ayıraçlar

1. SDS %8,1’lik

Sodyum Dodesil Sülfat(SDS)

2. Asetik Asit %20’lik (pH 3,5)

3. Tiyobarbitürik Asit(TBA) %0.8 lik

4. N-Butanol/Piridin Çözeltisi (14/1)(v/v)

5. Stok Standart

1.1.3.3 tetramethoksiopropan (yoğunluk =0.99 g/ml)

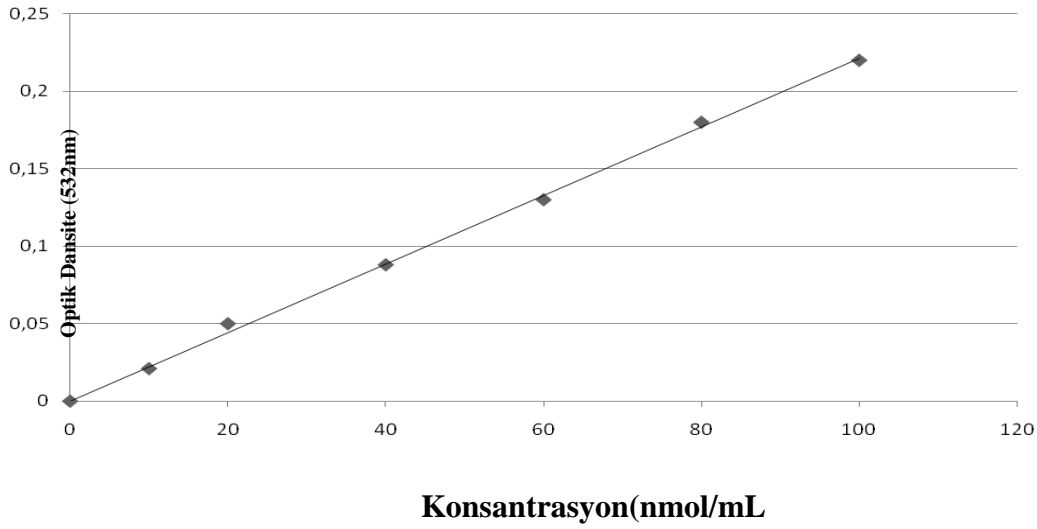
4.6.2. Standart Eğri Çizimi

Standart eğri çizimi yapılırken stok standarttan 6,6 µl alınıp 100 ml'ye saf su ile tamamlanarak günlük standart hazırlanır. Daha sonra 10, 20, 40, 60, 80 ve 100 nmol/ml konsantrasyonunda çalışma standartları hazırlanır. Ayraçlar tüplere aşağıda belirtildiği şekilde ilave edilirler.

Çizelge 4.4. MDA standart eğri çizimi için tüplerin hazırlanışı

Tüp No.	0 0	1	2	3	4	5	6
Konsantrasyon(nmol/ml)		100	80	60	40	20	10
Standart(ml)	-	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
SDS (ml)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Asetik Asit (ml)	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
TBA(ml)	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Saf su (ml)	0.8	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7
Vorteksle karıştırılır.60 dk 90 C°'de inkübe edildikten sonra musluk suyu altında soğutulur.							
Saf su(ml)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
N-Butanol/Piridin	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Vorteksle karıştırılır.4000 rpm 'de 10 dakika santrifüj edilir.							

Tüpler n-Butanol /Piridin ilavesinden sonra iyice karıştırılır. Daha sonra 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir, üstteki organik kısım (üst faz) alınarak 532 nm'de absorbans fotometrik olarak okunur ve standart eğri grafiği çizilir (Şekil 4.5)



Şekil 4.5. MDA (Malondialdehit) standart eğrisi grafiği

Dokuda MDA düzeyinin tayini için örnek çalışması yapılırken de yukarıdaki tabloda verildiği gibi tüpler belirli hacimde hazırlanır, doku örneği alınır ve MDA tayini yapılır. Ayrıntılı bilgi Çizelge 6’da gösterilmiştir.

Çizelge 4.5. Doku örneğinde MDA düzeyinin tayini için tüplerin hazırlanışı

	Örnek	Standart	Kör
Homojenat(Örnek)	0.1 ml	-	-
Standart	-	0.1 ml	-
%8.1 SDS	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
%20 Asetik Asit	1.5 ml	1.5 ml	1.5 ml
%0.8 TBA (sulu)	1.5 ml	1.5 ml	1.5 ml
Saf su (ml)	0.7 ml	0.7 ml	0.8 ml
Vorteksle karıştırılır.60 dk 90 C°’de inkübe edildikten sonra musluk suyu altında soğutulur.			
Saf su (ml)	1 ml	1 ml	1 ml
N-Butanol/Piridin (v:v 15/1 oranında)	5 ml	5 ml	5 ml

Tüpler n-Butanol /Piridin ilavesinden sonra iyice karıştırılır. Daha sonra 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir, üstteki organik kısım(üst faz) alınarak 532 nm'de absorbans fotometrik olarak okunur. Sonuç standart eğrisinden değerlendirilir.

4.6.3. Hesaplanması

nmol/ml olarak ölçülen MDA düzeyi nmol/mg protein olarak verilmiştir.

MDA Düzeyi (nmol/mg protein)-MDA Değeri (nmol/ml)/Protein (mg/ml)

4.7. Karaciğer Dokusunda SOD Aktivite Tayini

Süperoksit dismutaz, oksidatif enerji üretimi sırasında oluşan toksik süperoksit radikallerinin hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dismutasyonunu hızlandırır. Bu yöntem, ksantin ve ksantin oksidaz kullanılarak oluşturulan süperoksit radikallerinin, 2-[4-iyodofenil]-3-[4-nitrofenol]-5-feniltetrazolium klorid (piyodonitrotetra zolium viyolet: INT) ile meydana getirdiği kırmızı renkli formazan boyasının 505 nm dalga boyunda verdiği optik dansitenin (OD) okunması esasına dayanmaktadır. Örnekte bulunan SOD, süperoksit radikallerini ortamdan uzaklaştırarak 2 numaralı formazan reaksiyonunu inhibe eder. Sonuçta oluşan kırmızı rengin OD'si SOD yokluğunda oluşan renge göre azalır, buaradaki farkın belirlenmesiyle de SOD aktivitesi ölçülür [146].

4.7.1. Ayıraçlar

1. CAPS Tamponu(3-sikloheksilamino)-1-propan sülfonik asit) (pH: 10.2)

50.00 mM CAPS 1.1065 gr

0.94 mM EDTA 0,035 gr

Doymuş NaOH 11.1 µl

Saf su ile 100 ml 'ye tamamlanır.

2. Substrat Karışımı

0.05 mM Ksantin 0,00076 gr

INT 0,00060 gr

Bu karışım CAPS tamponuyla 100 ml'ye tamamlanır.

3. 80 Ü/L Ksantin oksidaz

50 Ü Ksantin oksidaz 3.04 µl

Saf su ile 1 ml'ye tamamlanır.

4. 0.01 M Fosfat tamponu (pH:7 ayarlanır)

Na ₂ PO ₄	54.91 mg
NaH ₂ PO ₄	3.58 mg

Saf su ile 100 ml 'ye tamamlanır.

5. Standart (S6): 5,6 Ü/ml SOD içeren Ransod kitinin standardıdır.

4.7.2. Standart Eğri Çizimi

Liyofilize (hızlı dondurulmuş, mikroorganizma içermeyen, steril) olarak hazırlanmış SOD standardı 10 ml bidistile su ile sulandırılır. Standart eğri çiziminde kullanılacak olan diğer SOD derişimleri fosfat tamponuyla Çizelge 4.6'deki gibi hazırlanır. 2-8 °C 'de saklandığında 2 hafta süreyle dayanıklıdır.

Çizelge 4.6. SOD standart eğri çizimi için tüplerin hazırlanışı

Kullanılacak Standartlar	Standart Solüsyonun Hacmi	M Fosfat Tamponunun Hacmi	SOD derişimi (Ü/ml)
S5	6 ml S6	5 ml	2.8
S4	5 ml S5	5 ml	1.4
S3	5 ml S4	5 ml	0.7
S2	3 ml S3	5 ml	0.23

S1: Kör (fosfat tamponu)

Yöntem de; süperoksit dismutaz aktive tayini yapılırken, böbrek doku hücrelerinden hazırlanan süpernatantlar %30 ile %60 arasında % inhibisyon aralığı olacak şekilde 0.01 M fosfat tamponu ile 1:65 (640 mikrolitre tampon,10 mikrolitre örnek) oranında sulandırılır ve aktivite tayini yapılır.

Çizelge 4.7. Doku örneğinde SOD standart eğri çizimi için kuvars küvetlerin hazırlanışı

	Kör (µl)	Standart(µl)
Standart	-	25
0.01 M Fosfat Tamponu	25	-
Substrat Karışımı	850	850
Küvetler iyice karıştırılır.		
Ksantin oksidaz	125	125

Ksantin oksidaz eklendikten sonra tekrar karıştırılır 30 saniye sonra çalışma körünün ve standardın 37 °C’de, 505 nm dalga boyunda havaya karşı başlangıç absorbanları (A₁) okunur. Aynı anda kronometre çalıştırılarak 3 dakika sonra son absorbanları (A₂) tekrar okunur.

4.7.3. Hesaplama

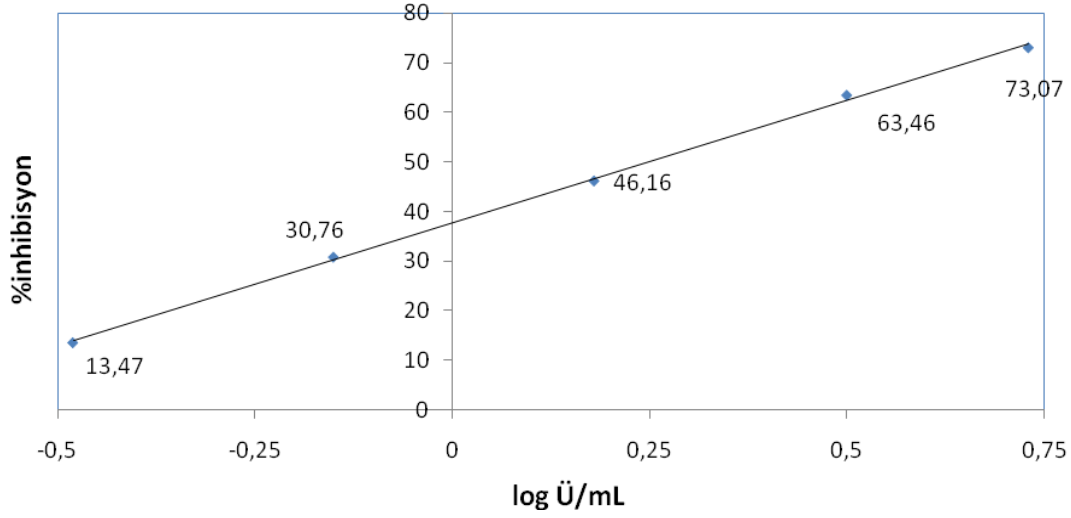
Çalışma körü SOD içermediği için inhibisyona uğramamış reaksiyon olarak kabul edilir ve değeri %100 olarak alınır. Tüm standartlar için % inhibisyon değeri bunlara ait çalışma körüyle oranlanarak hesaplama yapılır.

$$\Delta A/\text{dak. standart} = A_2 - A_1 / 3 \text{ dakika}$$

$$\% \text{ inhibisyon standart} = 100 - \frac{\Delta A/\text{dak. standart} \times 100}{\Delta A \text{ çalışma körü}}$$

$$\Delta A \text{ çalışma körü}$$

Hesaplama yapıldıktan sonra x yatay eksenine SOD derişimlerinin (Ü/ml) logaritmik dönüşüm değerleri, Y (dikey) eksenine standartlara ait % inhibisyon değeri yazılarak standart eğri elde edilir.



Şekil 4.6. SOD standart eğrisi

Örnek Çalışması

Çizelge 4.8. Doku örneğinde SOD aktivite tayini için kuvars tüplerin hazırlanışı

	Kör (µl)	Standart(µl)
Standart	-	25
0.01 M Fosfat Tamponu	25	-
Substrat Karışımı	850	850
Küvetler iyice karıştırılır.		
Ksantin oksidaz	125	125

Tüpler tekrar karıştırıldıktan 30 saniye sonra 37°C'de, 505 nm dalga boyunda havaya karşı başlangıç absorbans(A1) okunur. 3 dakika sonra absorbans (A2) tekrar okunur.

Hesaplama:

$$\Delta A/\text{dak. standart} = A_2 - A_1 / 3 \text{ dakika}$$

$$\% \text{ inhibisyon standart} = 100 - \frac{\Delta A/\text{dak. standart} \times 100}{\Delta A \text{ çalışma körü}}$$

ΔA çalışma körü

Örneğe ait hesaplanan yüzde inhibisyon değerine karşılık gelen SOD değeri standart eğri kullanılarak bulunur. Ü/ml biriminden ölçülen SOD aktivitesi Ü/mg protein birimi olarak verilmiştir.

$$\text{SOD spesifik aktivitesi}(\ddot{U}/\text{mg protein}) = \frac{\text{SOD aktivitesi} (\ddot{U}/\text{ml})}{\text{Protein (mg/ml)}}$$

4.8. Karaciğer Dokusunda GSH-Px Aktivite Tayini

Glutasyon peroksidaz aktivitesi süpernatantta Beutler yöntemiyle saptanmıştır. Aşağıda verilen reaktifler tabloda (Çizelge 4.9) gösterilen oranlarda tüplere konulur ve tüpler 37°C 'de 10 dakika inkübasyona bırakılır [147].

Kullanılan Reaktifler

1. 1M Tris-HCl (8.8 gr), 5 mM EDTA Tamponu (0.1861gr) (pH:8)
2. 0.1 M GSH (Glutasyon) 1,537 gr tartılır distile suyla 50 ml'ye tamamlanır.
3. 10 \ddot{U}/ml GR (glutasyon redüktaz) (günlük hazırlanır) 50 μl -1ml distile suda
4. 2mM NADPH (Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat) 0.1666 gr 100 ml'ye tamamlanır.
5. 7mM t-butil hidroperoksit (günlük hazırlanır)

Çizelge 4.9. Doku örneğinde GSH-Px tayini için deney tüplerinin hazırlanışı

Reaktifler	Örnek(ml)
1M Tris-EDTA	0,1 (100 μl)
Glutasyon	0,02 (20 μl)
Glutasyon redüktaz	0,1
NADPH	0,1
Örnek (homojenat veya hemolizat)	0,01 (10 μl)
Distile su	0,66 (660 μl)
37°C' de 10 dakika inkübasyon yapılır.	
t-bütildidroperoksit	0,01
Kinetik olarak 340 nm'de 2,5 dakika, optik dansite'deki azalış kaydedilir.	

İnkübasyon sonrası örnekler 1cm kuvars küvete konur üzerine 10 μl 7 mM t-bütildidroperoksit konulduktan sonra okuma başlatılır. Bu tepkime, 37 °C'de enzim tarafından

oksidlenen 1 µmol NADPH' ın 340 nm dalga boyunda ışık yolu 1 cm olan kuvars küvetlerde optik dansitedeki azalışı kinetik olarak 2,5 dakika süreyle okunur [147].

Hesaplama

$$\text{GSH-Px Aktivitesi (Ü/ml)} = \frac{\Delta\text{OD} \times V_T (1.0 \text{ ml})}{6.22 \times V_H (0,01 \text{ ml})}$$

ΔOD : Dakikadaki optik dansite değişimi (O.D farkı)

V_H : Örnek hacmi

V_T : Toplam hacmi

6,22 : 2mM NADPH yıkım hızının verdiği OD değeridir.

Ü/ml biriminden ölçülen GSH-Px aktivitesi örnekte saptanan protein değerine bölünerek enzim spesifik aktivite sonucu Ü/mg protein biriminden verilir.

$$\text{GSH-Px Spesifik Aktivitesi (Ü/mg protein)} = \frac{\text{GSH-Px Değeri (Ü/mg)}}{\text{Protein (mg/ml)}}$$

4.9. Karaciğer Dokusunda CAT Aktivite Tayini

Katalaz, H₂O₂' nin yıkımını katalize eder. H₂O₂' nin CAT tarafından yıkım hızı, H₂O₂'nin 230 nm'de ışığı absorbe etmesinden yararlanılarak spektrofotometrik olarak ölçülebilir [147].

Ayırıcılar

1M Tris-HCl, 5mM Na₂ EDTA tamponu, pH 8.0

Tris-Baz 5.358 gr

Tris-HCl 8.787 gr

Na₂ EDTA 0.1461 gr

Saf su ile 100 ml'ye tamamlanır.

1 M Fosfat tamponu, pH 7.0

K₂HPO₄ 6.723 gr

KH₂PO₄ 8.344 gr

Saf su ile 100 ml'ye tamamlanır.

10 mM H₂O₂ %30' luk peroksitten 10 µl alınır ve 9.990 ml saf suyla tamamlanır.

Etanol (%95'lik)

Yöntem

Katalaz aktivite tayini için, doku süpernatanı 1: 50 oranında saf su ile sulandırılır ve 1 ml'sine 20 µl saf etanol ilave edilir, karıştırılır ve aktivite tayini yapana kadar tüplerin ağzı kapalı bekletilir. Deneye başlamadan önce, günlük olarak hazırlanan 10 mM H₂O₂ konsantrasyonunun doğru ayarlanıp ayarlanmadığı fosfat tamponu ile kontrol edilir. Bunun için fosfat tamponu 1: 10 oranında saf su ile sulandırılabilir. Ayarlanma yapılırken 1ml'lik küvete 900 µl saf su 100 µl fosfat tamponu koyulur karıştırılır ve bu karışımın 900 µl' 230 nm'de fotometrik olarak okunur OD₁ olarak kaydedilir. Daha sonra aynı küvete hazırladığımız 10 mM 'lık peroksitten (H₂O₂) 100 µl koyulur ve tekrar okuma yapılır absorbans değeri OD₂ olarak kaydedilir. OD₂-OD₁= 0.071 olmalıdır. Bu değer bulunduktan sonra hazırlanan peroksidin konsantrasyonu tam 10 mM'dır denilir ve deneye aşağıda gösterildiği gibi başlanır.

Çizelge 4.10. Doku örneğinde CAT aktivite tayini için kuvars küvetlerinin hazırlanışı

	Kör (µl)	Numune (µl)
1M Tris-HCl, 5mM Na ₂ EDTA tamponu, pH 8.0	50	50
10 mM H ₂ O ₂	-	900
Saf su	930	30
37 °C'de 10 dakika inkübe edilir.		
Örnek (sulandırılmış)	20	20

Tüpler 37 °C'de 10 dakika inkübe edildikten sonra daha önce 1:5 0 oranında dilüe ettiğimiz örnekten 20 µl alınarak tüplere ilave edilir ve 230 nm'de 2,5 dakika kinetik okuma yapılır. Her numune teker teker çalışılarak kaydedilir [147].

Hesaplama

$$\text{CAT Aktivitesi (Ü/ml)} = \frac{\Delta\text{OD} \times V_T (1.0 \text{ ml})}{0.071 \times V_H (0.02 \text{ ml})}$$

Δ OD: Dakikadaki optik dansite değişimi

VH: Örnek hacmi

VT: Toplam hacim

0.071: 10mM H₂O₂ yıkım hızının verdiği OD değeridir.

Ü/ml biriminden ölçülen CAT aktivitesi örnekte saptanan protein değerine bölünerek dokudaki enzim spesifik aktivite sonucu Ü/mg protein biriminden verilir.

$$\text{CAT Spesifik Aktivitesi (Ü/mg protein)} = \frac{\text{CAT Değeri (Ü/ml)}}{\text{Protein (mg/ml)}}$$

4.10 Karaciğer Dokusunda NO Düzeyinin Tayini

Dokuda nitrit ve nitrat miktarı deproteinizasyondan sonra Griess reaksiyonu ile belirlenir. Total nitrit (nitrit + nitrat) konsantrasyonu modifiye kadmiyum redüksiyon metodu ile değerlendirilir. pH 9.7 glisin tamponunda bakır (Cu) kaplı kadmiyum granülleri deproteinize numune süpernatantı ile 90 dakikalık inkübasyon sonunda nitrat redüksiyonu sağlanır. Üretilen nitrit; sülfanilamid ve buna bağlı N-naphthylethylene diamin (NNDA) diazotizasyonu ile reaksiyon sonu oluşan pembe rengin 545 nm dalga boyunda spektrofotometrede okunması ile belirlenir. Sonuçta elde edilen nitrit konsantrasyonu ilk konsantrasyondan çıkarılarak nitrat miktarı belirlenir.

Kadmiyum granülleri (Cd)

pH 9.7 Glisin-NaOH tamponu

Sülfanilamid

N-Naphthylethylene diamine

5mmol/L CuSO₄ (0,79 gr tartılır , deiyonize su ile 1lt' ye tamamlanır)

0,1 mol/L H₂SO₄

Standart solüsyonu (0.1 mol/L NaNO₂)

10 mmol/L Na₂B₄O₇ (2,01 gr tartılır , deiyonize su ile 1 lt'ye tamamlanır.)

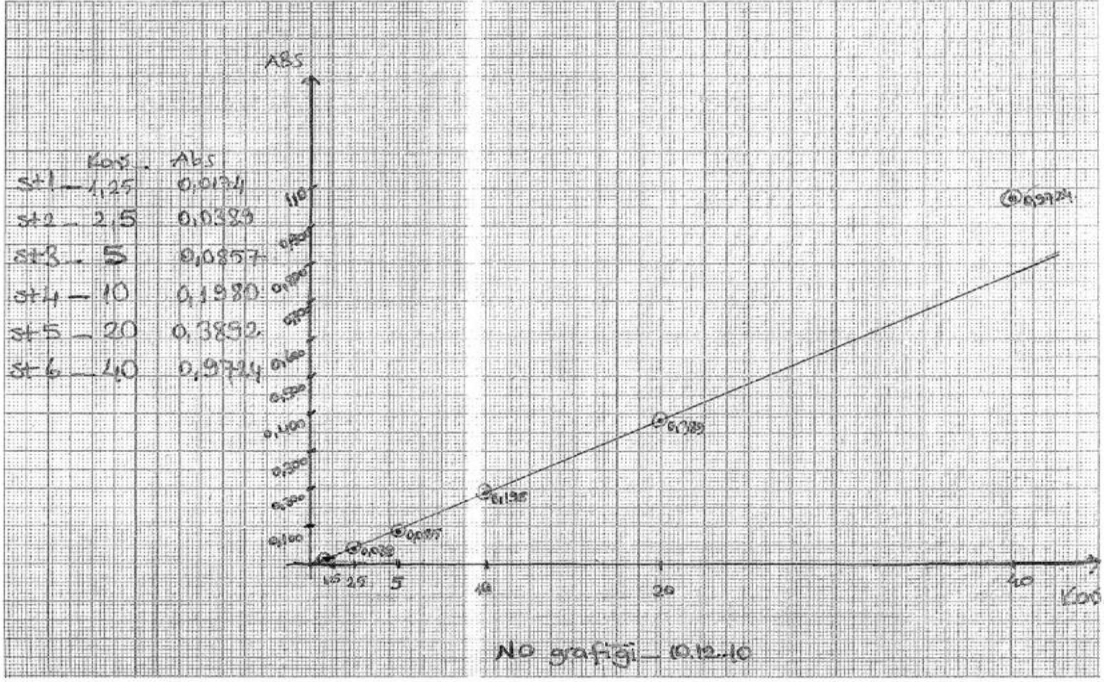
75 mmol/L ZnSO₄ (12,10 gr tartılır deiyonize su ile 1lt'ye tamamlanır.)

55 mmol/L NaOH (2,2 gr tartılır deiyonize su ile 1 lt'ye tamamlanır)

Çizelge 4.11. Doku örneğinde NO tayini için tüplerin hazırlanışı

	Kör (ml)	Örnek (ml)
Örnek	–	500 µl
ZnSO ₄	2ml	2 ml
	İyice Karıştırılır	
NaOH	1.250 ml	1.250 ml
	Karıştırılır. 3500xg'de 10 dakika santrifüj edilir. Süpernatant numune olarak kullanılır.	
Deiyonize su	2 ml	2 ml
	Kadmiyumlar 2.5-3 gr olarak 20 cc kapaklı plastik tüplere dağıtılır. Granüller deiyonize su ile yıkanır. 1-2 dakika CuSO ₄ solüsyonu içinde bekletilir ve solüsyon dökülür. Granüller glisin tamponu ile yıkanarak deneyde kullanılır. 90 dakika oda ısısında inkübe edilir.	
Deiyonize su	3 ml	2.5 ml
sülfanilamid	1 ml	1 ml
NNDA	1 ml	1 ml
	1 saat oda ısısında inkübe edilir.	

Organik kısım alınıp, 545 nm'de köre karşı okunur.



Şekil 4.7. NO standart eğrisi çalışması

Hesaplama: $\mu\text{mol/mg}$ olarak ölçülen NO düzeyi $\mu\text{mol/mg}$ protein olarak verilmiştir.

NO Düzeyi ($\mu\text{mol/mg}$ protein)-NO Değeri ($\mu\text{mol/mg}$)/Protein (mg/ml)

4.11. 8-OH dG ÖLÇÜMÜ

Awareness Tecnology firmasına ait Chemwell marka 2910 model E1a & Biochemistry cihazında 96 testlik sunredbio marka Katalog no ;201-11-0032 eliza kit adapte edilerek çalışılmıştır.

4.12. Hsp 70

Awareness Tecnology firmasına ait Chemwell marka 2910 model E1a & Biochemistry cihazında 96 testlik sunredbio marka Katalog no ;201-11-0523 eliza kit adapte edilerek çalışılmıştır.

4.13. İSTATİSTİK

Sonuçlar ortalama \pm SD olarak verildi ve istatistik değerlendirmeler için gruplar arasındaki karşılaştırmalarda Kruskal-Wallis testi, ikili karşılaştırmaların değerlendirilmesinde ise Mann-Whitney U testi kullanıldı, $p < 0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

5. BULGULAR

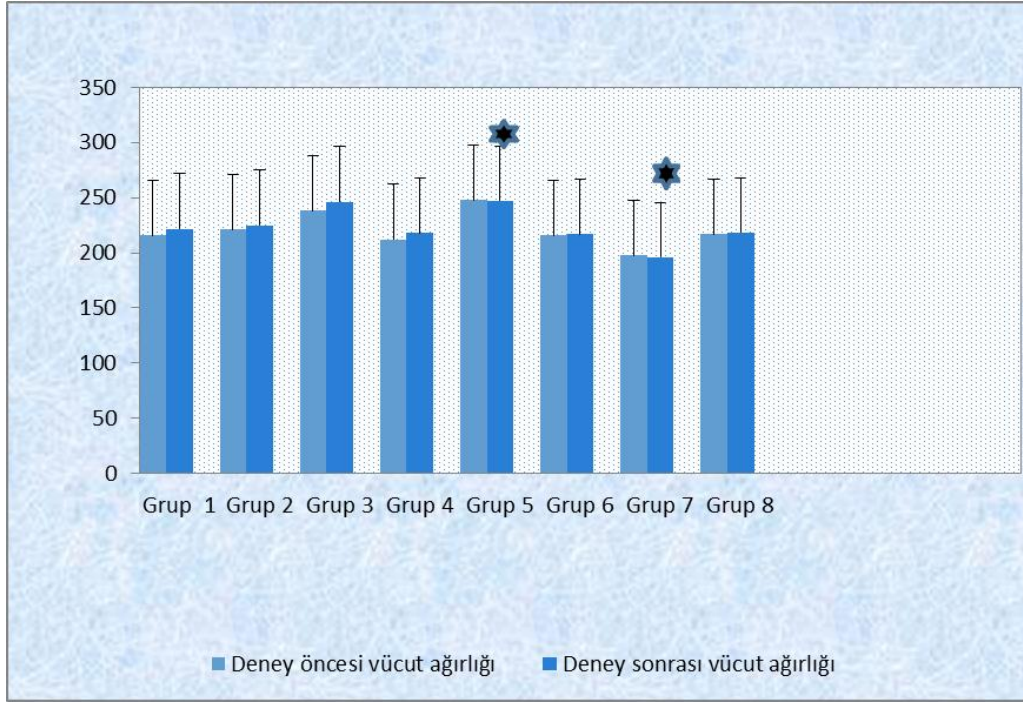
Çalışmaya her grupta 8 rat olmak üzere 64 dişi Wistar- albino türü rat dahil edilmiştir.

Grup 1 kontrol grubu olarak düzenlenmiştir. Grup 2 deki ratlara gavajla sadece 0,1 ml zeytinyağı verilmiştir. Grup 3 deki ratlara 0,1ml DMSO i.p verilmiştir. Grup 4 deki ratlara DMSO da çözülmüş 300 µg OCT i.p olarak verilmiştir. Grup 5 teki ratlara DMSO da çözülmüş 175 mg/kg i.p olarak DEN verilmiştir. Grup 6 daki ratlara 7 gün su+yem verildikten sonra 8.9.10 günde DMSO da çözülmüş 20mg/kg oranında 0,1 ml 2-AAF gavajla zeytinyağı yardımıyla verilmiştir. Grup 7 deki ratlara deney başlangıcında DMSO da çözülmüş 175 mg/kg DEN i.p olarak verilmiştir. DEN uygulamasından 1 hafta sonra deneyin 8.9.10 gününde DMSO da çözülmüş 20mg/kg oranında 2-AAF zeytinyağı yardımıyla 0,1 ml gavajla verilmiştir. Grup 8 deki ratlara deney başlangıcında DMSO da çözülmüş 175mg/kg DEN i.p olarak verilmiş olup DEN uygulanmasından bir hafta sonra 8.9.10 gününde DMSO da çözülmüş 20 mg/kg 2-AAF zeytinyağı yardımıyla 0,1 ml gavajla verilmiştir. Deneyin 16.23.30 gününde DMSO da çözülmüş 300 µg /kg OCT verilmiştir.

5.1.1 Sıçanların Vücut Ağırlıkları

Çizelge 5.1. Sıçanların vücut ağırlık ortalama ve sapma değerleri

	N	Deney öncesi vücut ağırlık Ort ± SD (gr)	Deney sonrası vücut ağırlık Ort ± SD(gr)
Grup 1	8	215,8 ± 11,6	221,5 ± 12,4
Grup 2	8	221 ± 18,3	224,7 ± 19,11
Grup 3	8	238 ± 24,7	246,1 ± 26,9
Grup 4	8	212 ± 17,7	218,0 ± 18,4
Grup 5*	8	248 ± 23,5	247,0 ± 25,4
Grup 6	8	216 ± 20,3	217,0 ± 22,9
Grup 7*	8	197,8 ± 22,1	195,8 ± 22,1
Grup 8	8	217,0 ± 20,6	218,2 ± 20,9



Şekil 5.1. Sıçanların deney öncesi ve sonrası vücut ağırlıkları gösterimi

*Deney sonunda 5. Ve 7. grubun vücut ağırlıklarında azalış saptandı.

5.1.2. Deney sonrası sıçanların karaciğer ağırlık ortalaması

Çizelge 5.2. Deney sonrası karaciğer ağırlık ortalama ve standart sapma değerleri

	N	Deney sonrası karaciğer ağırlık Ort ± SD(gr)
Grup 1	8	6,8 ± 0,4
Grup 2	8	6,7 ± 0,9
Grup 3	8	6,8 ± 0,8
Grup 4	8	6,2 ± 0,17
Grup 5	8	7,1 ± 0,7
Grup 6	8	6,75 ± 0,6
Grup 7	8	6,85 ± 0,7
Grup 8	8	6,3 ± 0,7

5.1.3. Deney sonrası Sıçanların Hepato/ Somato indeksi istatistiksel sonuçları

Çizelge 5.3. Tüm gruplarda Hepato/ Somatik indeksi

	N	Hepato/Somato indeksleri Ort ± SD
Grup 1	8	0,030 ± 0,0032
Grup 2	8	0,030 ± 0,0034
Grup 3	8	0,028 ± 0,005
Grup 4	8	0,029 ± 0,0027
Grup 5	8	0,029 ± 0,0040
Grup 6	8	0,032 ± 0,0049
Grup 7	8	0,0351 ± 0,006
Grup 8	8	0,029 ± 0,005

Sıçan karaciğer ağırlıklarının vücut ağırlığına bölünmesi ile hepato/somato indeks elde edilmektedir.

5.2.1. Karaciğer Dokusunda SOD aktivitesi

Çizelge 5.4. Tüm grupların karaciğer dokusunda SOD aktivitesi

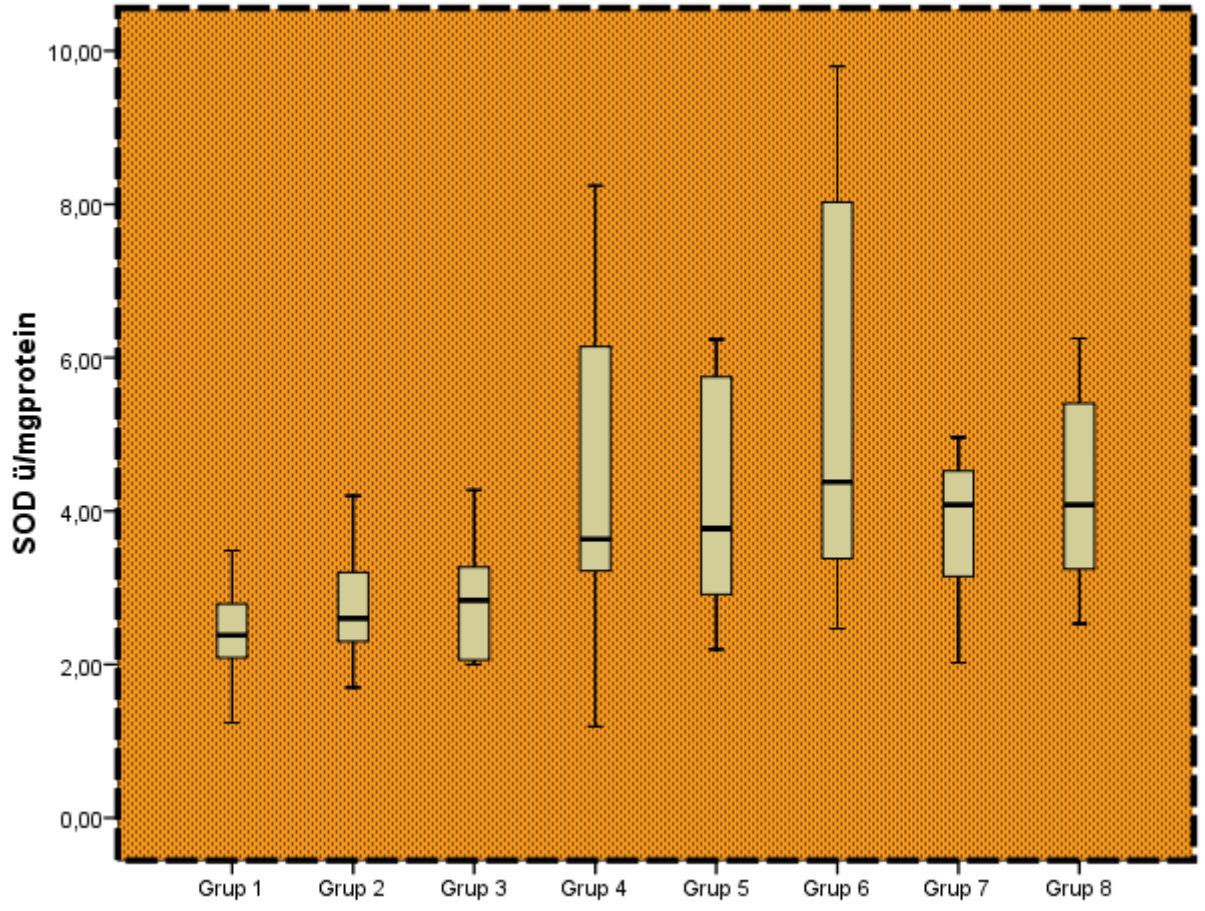
	N	SOD Ü/mgprotein	
		Ort ± SD	(min - max)
Grup 1 *	8	2,46 ± 0,6	(1,2- 3,4)
Grup 2 ‡	8	2,78 ± 0,8	(1,7- 4,2)
Grup 3 ¶	8	2,81 ± 0,81	(2,0 – 4,2)
Grup 4 ¶¶	8	4,42 ± 2,4	(1,1 -8,2)
Grup 5	8	4,16 ± 1,56	(2,1-6,2)
Grup 6	8	5,48 ± 2,48	(2,4 – 6,2)
Grup 7	8	3,81 ± 0,91	(2,0 - 4,9)
Grup 8	8	4,21 ± 1,32	(2,5 – 6,2)

*Kontrol grubuyla ile 6.grup ve 7.grup arasında SOD aktivitesi bakımından anlamlı farklılıklar saptandı. $p= 0,005$, $p=0,012$ ($p<0,05$)

‡ 2.grup ile 6.grup arasında SOD aktivitesi bakımından anlamlı farklılıklar saptandı. $p=0,003$ ($p<0,05$)

¶ 3.grup ile 6.grup arasında SOD aktivitesi bakımından anlamlı farklılıklar saptandı . $p=0,027$ ($p<0,05$)

¶¶ 4.grup ile 7. ve 8.grup arasında SOD aktivitesi bakımından anlamlı fark saptanmadı. $p=0,095$, $p=1,00$ ($p>0,05$)



Şekil 5.2. Grupların SOD değerlerinin grafiksel gösterimi

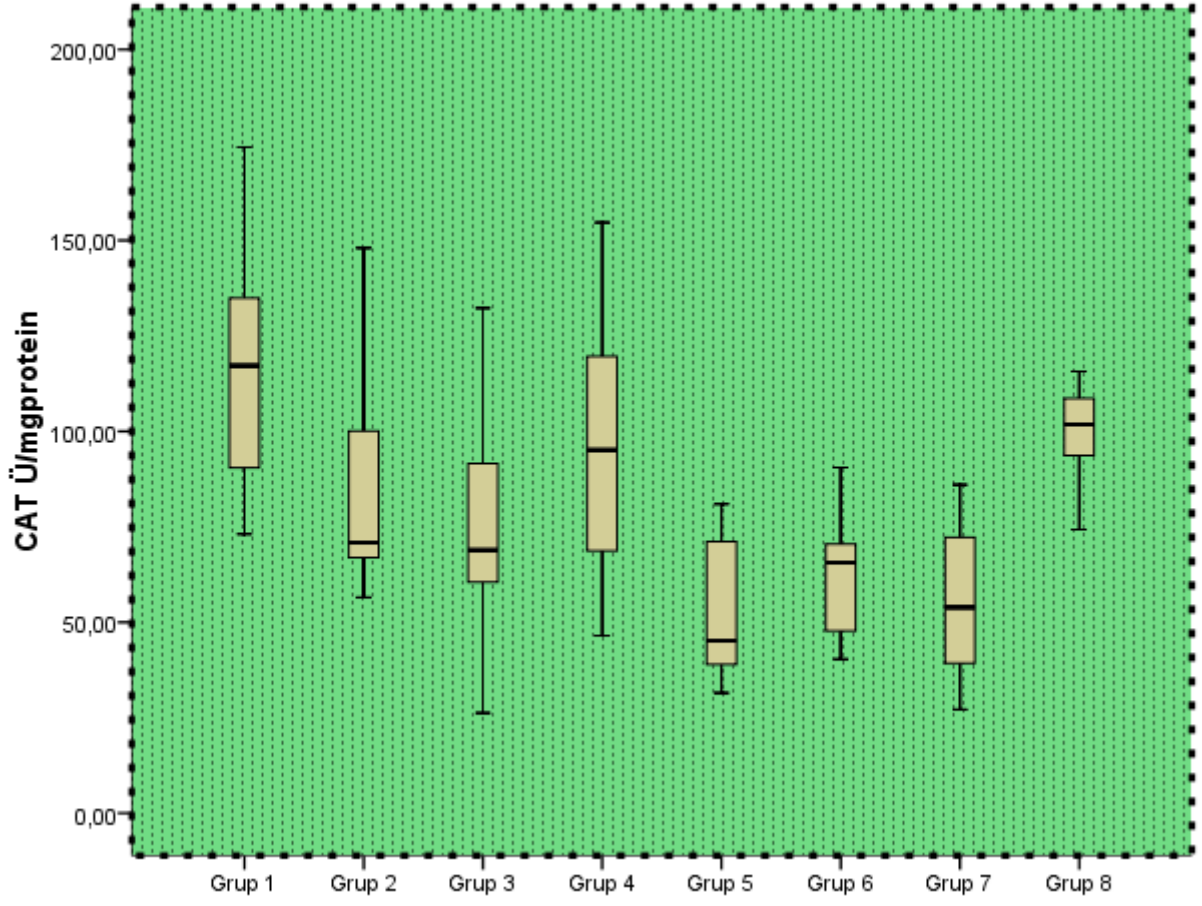
5.2.2 Karaciğer dokusunda CAT aktivitesi

Çizelge 5.5. Tüm gruplarda CAT aktivitesi

	N	CAT Ü/mgprotein	
		Ort ± SD	(min-max)
Grup 1*	8	116,5 ± 32,6	(73,1-174,5)
Grup 2	8	87,06 ± 31,8	(56,4-147,9)
Grup 3	8	75,05 ± 32,80	(26,2 - 132,2)
Grup 4	8	95,9 ± 36,1	(46,5 -154,6)
Grup 5	8	52,8 ± 18,9	(31,4-80,9)
Grup 6	8	62,3 ± 16,57	(40 -90,5)
Grup 7 ‡	8	55,4 ± 20,2	(27,1-86,0)
Grup 8	8	99,75 ± 12,8	(74,2 -115,7)

*Kontrol grubu ile CAT aktivitesi bakımından 5., 6., 7. Gruplar arasında anlamlı farklılıklar saptandı. $p=0,002$, $p=0,0019$, $p=0,002$ ($p<0,05$)

‡ 7.grub ile 8.grup arasında CAT aktivitesi bakımından anlamlı farklılıklar saptandı. $p=0,017$ ($p<0,05$)



Şekil 5.3. Grupların CAT değerlerinin grafiksel gösterimi

5.2.3 Karaciğer Dokusunda GSH –Px aktivitesi

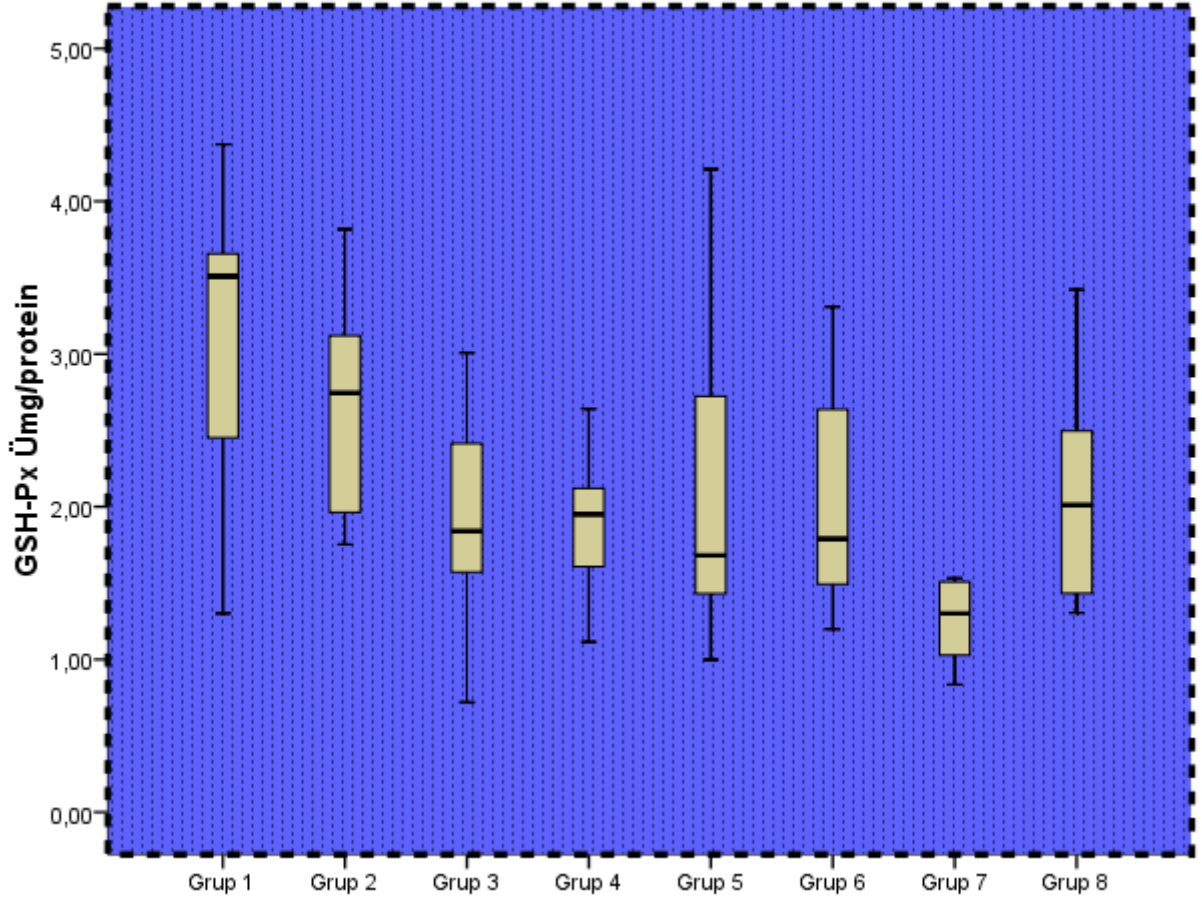
Çizelge 5.6. Tüm gruplarda GSH-Px aktivitesi

	N	GSH-PX	
		Ort ± SD	(min-max)
Grup 1*	8	3,11 ± 1,00	(1,30-4,37)
Grup 2 ‡	8	2,6 ± 0,7	(1,75 – 3,82)
Grup 3	8	1,9 ± 0,7	(0,72 -3,01)
Grup 4 ¶	8	1,8 ± 0,47	(1,11-2,64)
Grup 5	8	2,1 ± 1,00	(1,00 – 4,22)
Grup 6	8	2,04 ± 0,75	(1,2 – 3,3)
Grup 7	8	1,25 ± 0,2	(0,84 – 1,53)
Grup 8	8	2,2 ± 1,00	(1,3 – 3,4)

*Kontrol grubu ile 7. grup arasında GSH-Px aktivitesi bakımından anlamlı farklılıklar saptandı. $p=0,03$ ($p<0,05$)

‡ 2.grup ile 7.grup arasında GSH-Px aktivitesi bakımından anlamlı farklılıklar saptandı. $p=0,010$ ($p<0,05$)

¶ 4.gruba göre 7.grup arasında GSH-Px aktivitesi bakımından anlamlı farklılıklar saptandı. $p=0,016$ ($p<0,05$)



Şekil 5.4. Grupların GSH-Px değerlerinin grafiksel gösterimi

5.2.4 Karaciğer Dokusunda MDA düzeyi

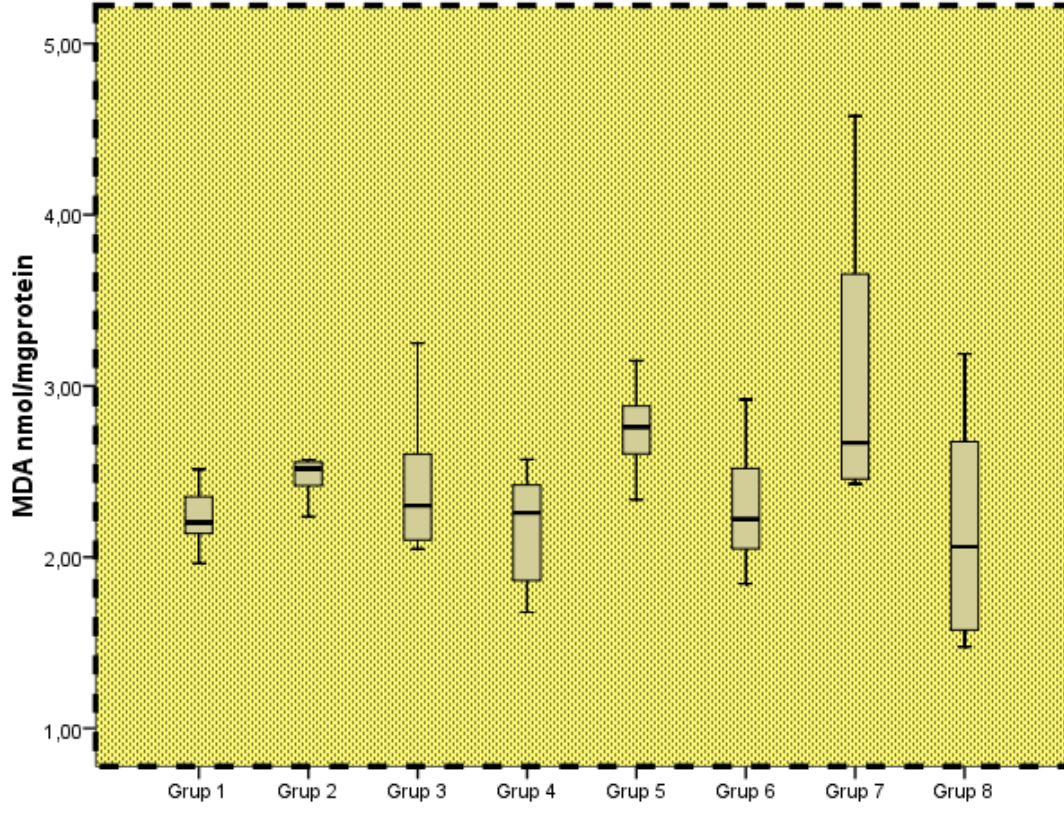
Çizelge 5.7. Tüm gruplarda MDA düzeyleri

	N	MDA nmol /mgprotein Ort \pm SD (min- max)
Grup 1*	8	2,21 \pm 0,17 (1,9-2,5)
Grup 2	8	2,46 \pm 0,12 (2,2 – 2,5)
Grup 3	8	2,41 \pm 0,40 (2,0 – 3,2)
Grup 4 †	8	2,16 \pm 0,33 (1,6 -2,5)
Grup 5	8	2,74 \pm 0,24 (2,3-3,1)
Grup 6	8	2,29 \pm 0,35 (2,8- 2,9)
Grup 7 ‡	8	3,07 \pm 0,85 (2,4- 4,5)
Grup 8	8	2,16 \pm 0,65 (1,4- 3,19)

*Kontrol grubuyla ile 7. grup arasında MDA düzeyi bakımından anlamlıdır .
p= 0,013 (p< 0,05)

† 4.grup ile 7.grup anlamlıdır. (p=0,006) p< 0,05

‡ 7.grup ile 8.grup karşılaştırıldığında anlamlı değildir.(p=0,059) p>0,05



Şekil 5.5. Grupların MDA değerlerinin grafiksel gösterimi

5.2.5 Karaciğer dokusunda NO düzeyi

Çizelge 5.8. Tüm gruplarda NO düzeyi

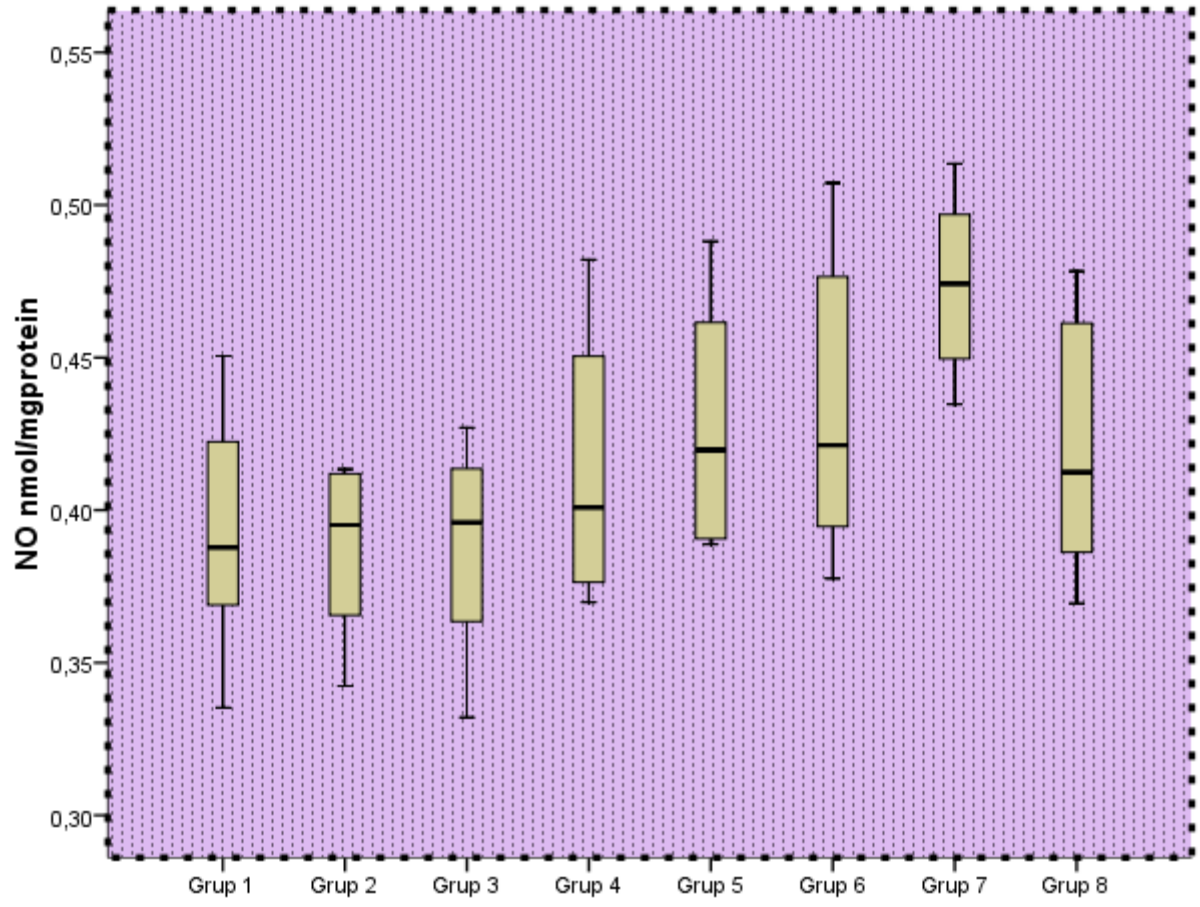
	N	NO Ü/mgprotein Ort ± SD (min –max)
Grup 1*	8	0,39 ± 0,037 (0,34-0,45)
Grup 2 ‡	8	0,38 ± 0,030 (0,34-0,41)
Grup 3 †	8	0,38 ± 0,033 (0,33 – 0,43)
Grup 4	8	0,41 ± 0,044 (0,37- 0,48)
Grup 5	8	0,42 ± 0,038 (0,39- 0,49)
Grup 6	8	0,43 ± 0,049 (0,38 -0,51)
Grup 7 [¶]	8	0,47 ± 0,028 (0,43-0,51)
Grup 8	8	0,42 ± 0,042 (0,37 – 0,48)

*Kontrol grubu ile 7.grup arasında NO düzeyleri bakımından anlamlı farklılıklar saptandı. p=0,006 (p<0,05)

‡ 2.grup ile 7.grup NO düzeyleri bakımından anlamlı farklılık saptandı.
p= 0,008 (p<0,05)

† 3.grup 7.grup arasında NO düzeyleri bakımından anlamlı farklılıklar saptandı. p=0,005
(p<0,05)

¶ 7.grup ile 8.grup arasında NO düzeyleri bakımından anlamlı farklılıklar saptanmadı p
=0,115 (p<0,05)



Şekil 5.6. Grupların NO değerlerinin grafiksel gösterimi

5.2.6. Karaciğer dokusunda 8-OH dG Düzeyleri

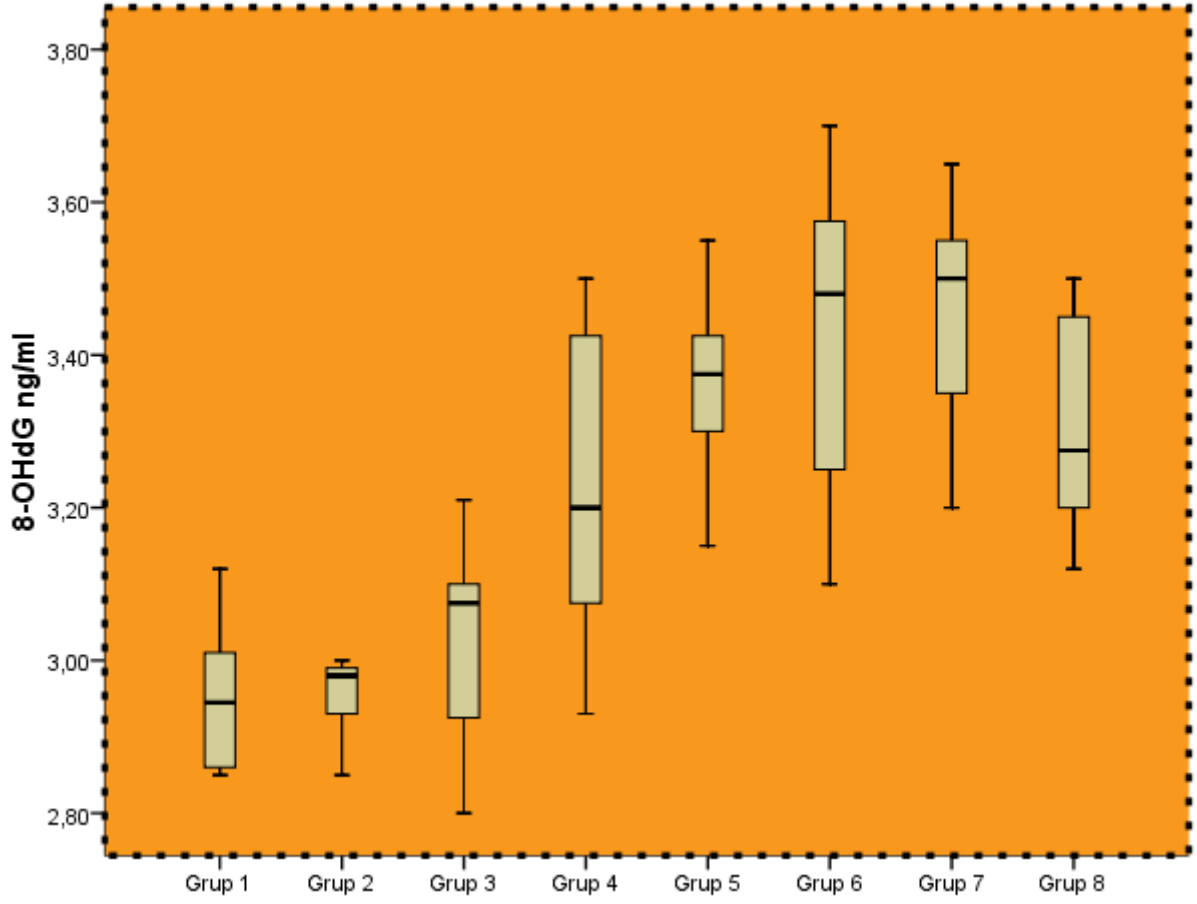
Çizelge 5.9. Tüm gruplarda 8-OH dG düzeyleri

	N	8-OH dG ng/ml	
		Ort ± SD	(min-max)
Grup 1*	8	2,95 ± 0,09	(2,85-3,12)
Grup 2	8	2,95 ± 0,05	(2,85-3,00)
Grup 3	8	3,03 ± 0,13	(2,80-3,21)
Grup 4	8	3,22 ± 0,207	(2,93-3,50)
Grup 5	8	3,36 ± 0,11	(3,15-3,55)
Grup 6	8	3,42 ± 0,22	(3,10 -3,65)
Grup 7	8	3,45 ± 0,15	(3,20-3,65)
Grup 8	8	3,30 ± 0,14	(3,12- 3,50)

* Kontrol grubu ile 4.,5.6.,7.,8., gruplar arasında 8-OHdG düzeyi bakımından anlamlı farklılıklar saptandı.

p= 0,01 , p=0,001 , p=0,002 , p=0,001 , p=0,001 (p< 0,05)

7.grup ile 8. grub 8-OH dG düzeyleri arasında anlamlı farklılıkla saptanmadı.(p>0,05)



Şekil 5.7. Grupların 8-OH dG değerlerinin grafiksel gösterimi

5.2.7 Karaciğer dokusunda Hsp 70 düzeyleri

Çizelge 5.10 Tüm gruplarda Hsp 70 düzeyleri

	N	Hsp 70 ng/ml Ort ± SD (min-max)
Grup 1*	8	67,9 ± 18,97 (44,9-88,65)
Grup 2 ‡	8	68,19± 18,31 (44,9-86,6)
Grup 3	8	91,41± 15,34 (66,5-110,7)
Grup 4 ††	8	67,65 ± 27,34 (33,4-121,7)
Grup 5	8	129,95 ± 55,97 (55,0-199,0)
Grup 6	8	117,45± 42,41 (44,4-165,8)
Grup 7	8	154,86 ± 44,17 (99,5-221,0)
Grup 8	8	103,67 ± 33,93 (55,0-154,9)

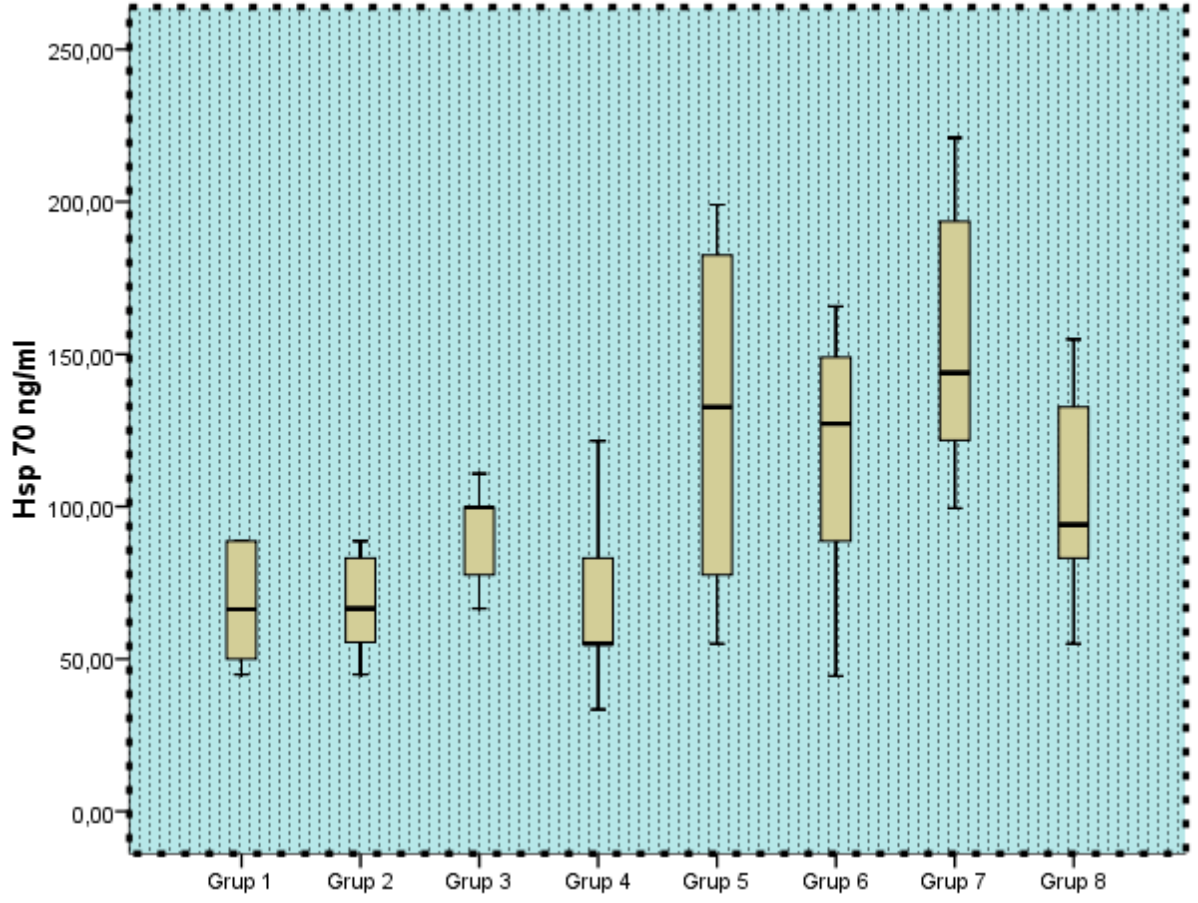
*Kontrol grubu ile 5. ve 7. grup Hsp 70 düzeyleri bakımından arasında anlamlı farklılıklar saptandı. $p= 0,030$ $p= 0,01$ ($p < 0,05$)

‡ 2. grup ile 5. ve 7.grup Hsp 70 düzeyleri bakımından anlamlı farklılıklar saptandı.
 $p= 0,036$ $p=0,001$ ($p < 0,05$)

†† 4.grup ile 5. ve 6. Grup arasından Hsp 70 düzeyi bakımından anlamlı farklılıklar saptandı.
 $P=0,021$ $p=0,001$ ($p < 0,05$)

6. grup ile diğer gruplardan hiçbiri arasında anlamlı farklılıklara saptanılmadı. ($p > 0,05$)

8. grup ile diğer gruplardan hiçbiri arasında anlamlı farklılıklara saptanılmadı. ($p > 0,05$)



Şekil 5.8. Grupların Hsp 70 değerlerinin grafiksel gösterimi

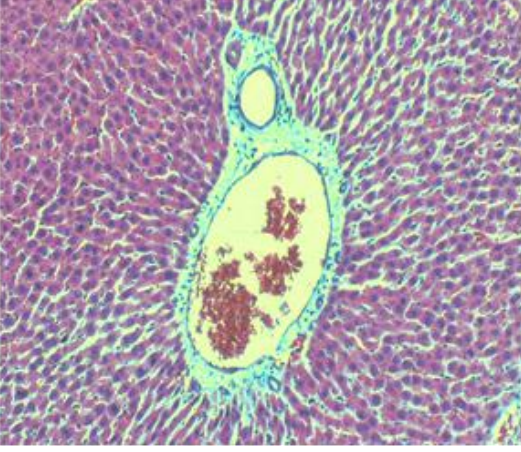
5.3. Histopatolojik Analiz Sonuçları

Çizelge 5.11. Gruplarda Portal İnflamasyon ve Fokal nekroz değerleri

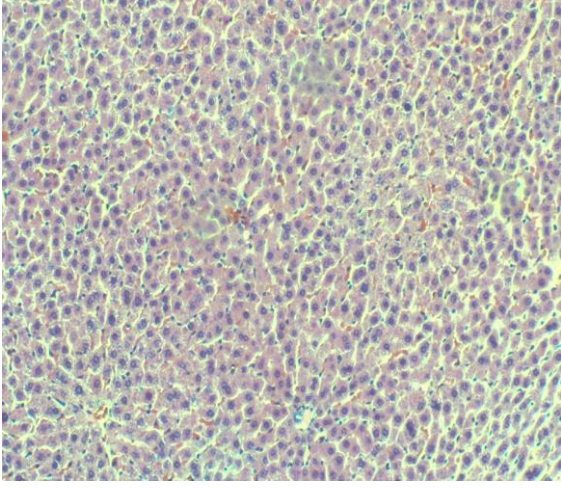
	Portal inflamasyon	Fokal Nekroz
Grup 1	0,0, 0,0,0,0,0,0	0, 0, 0,0,0,0,0,0
Grup 2	0, 0 ,0,0,0,0,0,0	0, 1,0,1,0,0,0,0
Grup 3	0,1,1 ,2,0,1,0,0	0,1,1,2,0,0,0,0
Grup 4	0,1,1,1,0,0,0,0	0,0,0,0,0,0,0,0
Grup 5	1,0,1,0,1,2,1,1	1,0,1,0,2,2,0,1
Grup 6	0,0,1,0,1,1,0,1	0,0,0,0,0,0,0,0
Grup 7	1,2,0,2,2,2,2,1	0,0,0,0,0,1,1,1
Grup 8	0,1,1,2,2,2,0,1	0,1,1,1,1,0,1,1

0 ; yok
1 ;Hafif

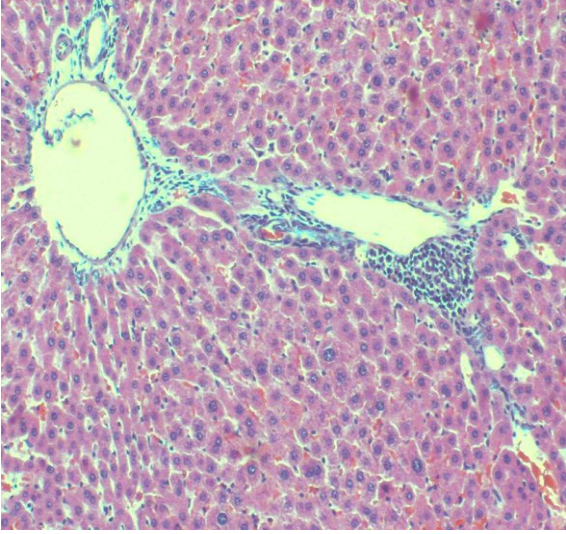
2 ; Orta şiddette
3 ; Şiddetli



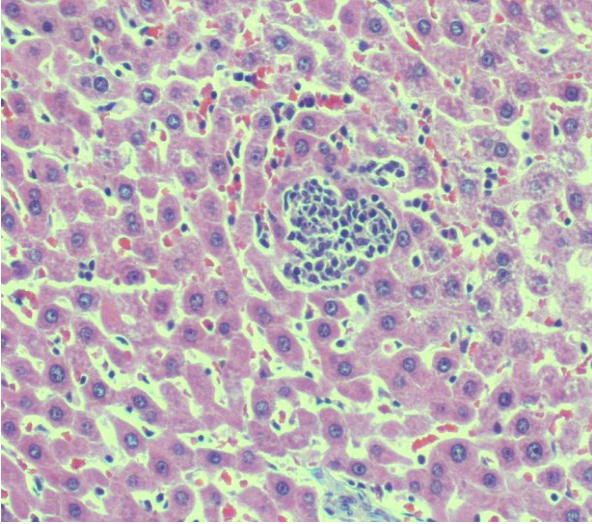
Şekil 5.9. Normal portal mesafede (H&Ex100)



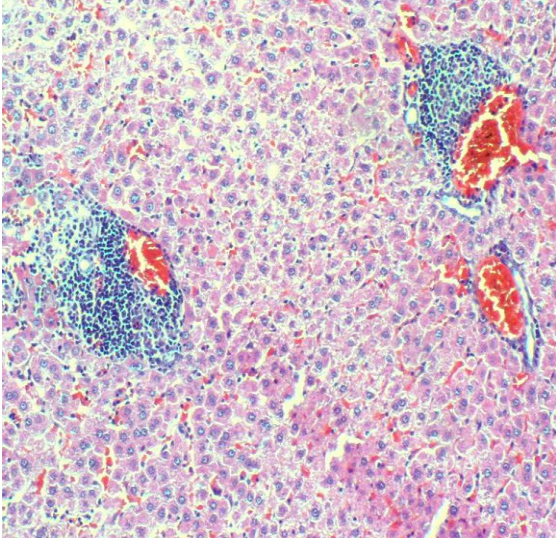
Şekil 5.10. Normal parankimal (H&Ex100)



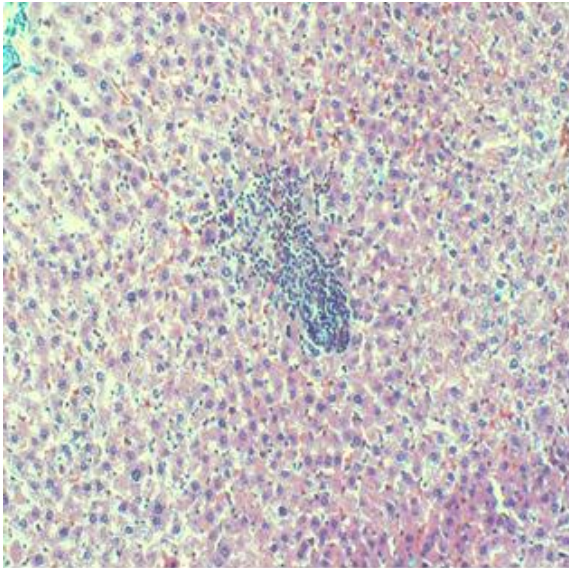
Şekil 5.11. Hafif dereceli portal inflamasyon (H&Ex200)



Şekil 5.12. Hafif dereceli parankimal nekroz (H&Ex200)



Şekil 5.13. Orta derecede portal inflamasyon (H&Ex100)



Şekil 5.14. Orta derecede parankimal nekroz(H&Ex100)

6.TARTIŞMA VE SONUÇ

Kanser araştırmalarında tümör modelleri oluşturmak güncel bir konudur. Yapılacak araştırmalar ile tümör proliferasyonu, progresyonu ve apoptoz gibi tümör biyolojisi hakkında bilgi elde etmek, kanser etyopatogenezisini incelemek, tümör oluşumunu inhibe etmek, metastaz biyolojisini anlamak, antikanser ilaçların etki mekanizmalarını, etkinlik ve güvenliği üzerine bilgi sahibi olmaktır.

Kanserojenik maddelerle karaciğer kanseri oluşumu çok basamaklı bir olaydır. Bu çok basamaklı olayın en önemli göstergelerinden biri makroskopik lezyonlardır. Bu lezyonları tanımlayabilmek için çok sayıda biyolojik ve biyokimyasal parametrelerdir [148].

Nitrozaminler oldukça tanınmış karsinojenik bileşiklerdir, fakat onların sitotoksik ve karsinojenik aktiviteleri metabolik aktivasyonlarını kullanmaları için gereklidir.

Dietilnitrozamin hepatik karsinomaya neden olan bir nitrozamin bileşiğidir. Özellikle karaciğer DNA' sında DEN' in doz bağımlı davranışı ile yükselen 8-OH 2' deoksiguanozin (8-OH dG) düzeylerinin DNA'nın oksidatif hasarını belirttiği rapor edilmiştir. 8-OHdG miktarı erken dönemde DEN verilmesinden 6 saat sonra yükselmektedir. Tümör oluşumundan sorumlu olan lipid peroksidasyonu ile DEN aktivasyonu ile çevresel serbest radikaller arasında ilişki gösterilmektedir [149].

2-Asetilaminofloran , sentetik arilamin yapısında olan 2-aminofloranın biyolojik olarak asetillenmesi sonucu 2-AAF oluşur. 2-AAF, detoksifikasyon reaksiyonlarının ikinci fazında görev yaparak DEN'in birinci adımından sonra, ikinci adım olarak DNA'da guanin bazına bağlanıp toksik etki oluşturur. Bu toksik etki, mutasyonlara neden olarak, karaciğerde, sırasıyla preneoplastik, neoplastik, benign neoplazmi ve malign neoplazmi oluşur [33, 36, 38-41, 43, 50, 54, 63-65].

Hsp 70 nekroza uğramış hücrelerden salınır ve ekstrasellüler alana kaçarak dolaşıma geçer. Ekstrasellüler Hsp70 makrofaj ve monositlerden inflamatuvar sitokin ve NO salınımı ve inflamatuvar hücre reseptörleri ile etkileşime girerek güçlü bir proinflamatuvar etki gösterir [122, 150].

Ekstrasellüler Hsp 70 tümör büyümesi üzerine hem pozitif hem de negatif etki gösterir. Orta derecedeki nekrozda Hsp 70'in bu inflamatuvar etkileri stromal ve tümör hücrelerinde tümör büyüme ve yayılımını artıran birkaç proteinin normalden fazla ekspresyonunu düzenleyen NF-κB nükleer faktörünün aktivasyonu yolu ile tümör migrasyonunu arttırıyor olabilir [151].

Octreotide'nin son zamanlarda bazı klinik çalışmalarda, çeşitli deneysel modellerde karsinoid tümör hücrelerini inhibe etmesinin yanında antioksidan özellikleri de olduğu bildirilmiştir [133-135].

Sıçanlarda karaciğer tümörü oluşunda ,karsinojen metabolizma süresince oksidatif stresin etkili olduğu bilinmektedir.

Çalışmamızda sıçanların vücut ağırlıkları incelendiğinde Çizelge 5.1 Şekil 5.1'de gösterildiği gibi 5.ve 7. Grubun vücut ağırlık ortalamasının düştüğünü görebiliriz.

Tessitore L ve ark.(2000) ve Atakişi ve ark.(2005) DEN verilmesinin ardından sıçanların vücut ağırlığının azaldığını tespit etmişlerdir. Bu durumun, verilen maddenin toksik etkisinden dolayı gıda alımında azalma olacağını düşünmüşlerdir [152, 153].

Bizim çalışmamızla paralellik göstermektedir. DEN+2-AAF nin verildiği bir çalışma bulunmadığından karşılaştırma yapılamamıştır.

Çalışmamızda Çizelge 5.7 ve Şekil 5.5' de görüldüğü gibi Lipit peroksidasyonun ikinci ürünü olan MDA bakımından değerlendirildiğinde Kontrol grubu ile 2., 3., 4., 6. gruplar arasında fark bulunmazken 5. grup (DEN) ve 7.grup (DEN+2-AAF) ta MDA düzeyleri açısından artış , 8.grupta azalış ise gözlemlendi.Ancak 7.grup ile 8.grup karşılaştırıldığında fark anlamlı değildir.

Üstüner ve ark. (2006) DEN ve 2-AAF uyguladıkları sıçanlarda karaciğer doku hücrelerinde radikal oluşumu sonucu kontrol grubu ile karşılaştırdıklarında DEN ve 2-AAF gruplarının MDA düzeylerinde artış belirlemişlerdir [154].

Al-Rejaie ve ark. (2009) DEN uyguladıkları sıçanların karaciğer doku hücrelerinde Kontrol grubuna göre DEN grubunun MDA düzeylerinde artış belirlemişlerdir [155].

Malondialdehit doymamış yağ asitleri metabolizmasında lipit peroksidasyonunun bir ürünüdür ve mutajenik ve karsinojenik bir olaydır [156] .Bunun nedenini Ogina K ve ark.(2007) şu şekilde açıklamışlardır ; Lipit peroksidasyonun aldehit yapıdaki ürünleri, sisteinin sülfidril grupları ile veya lizin ve histidinler ile kovalent bağlar oluşturarak proteinlerde fragmentasyon ve çapraz bağlanmalara yol açar. Bu olaylar proteinlerin yapı ve fonksiyonlarının bozulmasıyla sonuçlanır [86]. Grup 8 (DEN+2-AAF+ OCT) de karaciğer doku hücrelerinin MDA düzeylerinde azalış tespit edildi.

Çelebi ve ark.(2002) oluşturdukları retinal İ/R modelindeki oksidatif hasarda vitamin E, melatonin ve OCT'nin sırasıyla 150 mg/kg, 10 mg/kg ve 22 µg/kg dozlarında koruyucu etkilerini araştırdı ve her üç ilacın da MDA düzeylerinde belirgin azalma sağladığı gösterildi [157].

Seydanođlu ve ark.(2010) Bir somatostatin analogu olan (OCT) in deneysel sepsis modelinde oksidan-antioksidan durum ve akciğer histopatolojisi üzerine etkilerini araştırdı. Sıčanların plazma örneklerinde farklı dozajlarda uyguladıkları (50 µg -100 µg) OCT nin sepsis grubuna göre MDA düzeylerine azalış tespit etti [158].

Bu bulgulara göre bizim çalışmamızda da olduğu gibi OCT'nin MDA düzeylerini azalttığı belirlenmiştir.

Çalışmamızda Çizelge 5.4 ve Şekil 5.2 gösterildiği gibi grupların SOD aktiviteleri değerlendirildiğinde Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 5.6.7 ve 8.grupta artış gözlenmiştir. 6.,7.gruptaki artış kontrol grubuna anlamlı bulunurken ($p<0,05$) 8.gruptaki artış anlamlı değildir.

Üstüner ve ark. (2006) DEN ve 2-AAF uyguladıkları sıçanlarda karaciğer doku hücrelerinde DEN+ 2-AAF grubunda SOD % inhibisyon değerlerinde azalma yani aktivitelere artış olduğunu tespit etmişlerdir [154].

Chakraborty ve ark.(2003) yaptıkları farklı bir çalışmada, DEN ve 2-AAF'nin sıçan karaciğeri hücrelerinde SOD aktivitesini artırdığını belirlemişlerdir [50].

Çalışmamızda Grup 6 ve Grup 8 deki SOD aktive artışlarının karsinojenlerin aşırı şekilde ürettiği serbest radikallere cevap olarak savunma sisteminde görev yaptığı düşünülebilir.

Ortamdaki süpürücü enzim olan SOD'nin fazla şekilde üretildiği ortamdaki serbest radikalleri temizleyerek ortamı antioksidan lehine döndürmesi olarak düşünülebilir.

Çalışmamızda grupların GSH-Px aktiviteleri karşılaştırıldığında Çizelge 5.6 ve şekil 5.4'de gösterildiği gibi Kontrol grubu ile 4. , 5. , 6. , 7. Grup karşılaştırıldığında grupların aktivitelerinde bir azalış tespit edilmiştir. 7. Grubun aktivitesindeki azalış kontrol grubuna göre anlamlıdır. ($p<0,05$) Grup 8. ise anlamlı olmasa da artış söz konusudur.

Bingül ve ark.(2011) iki gün boyunca DEN uyguladıkları sıçanların karaciğer doku hücrelerinin GSH-Px aktivitelerinde Kontrol grubuna göre DEN grubunda azalma belirlemişlerdir [159].

Al-Rejaie ve ark.(2009) DEN uyguladıkları sıçanların karaciğer doku hücrelerinde Kontrol grubuna göre DEN grubunun GSH-Px aktivitelerinde azalış belirlemişlerdir [155].

Bizim çalışmamızda bu tür çalışmalarla paralellik göstermektedir. Grup 8 (DEN+2-AAF+OCT) in GSH-Px aktivitelerinin Grup 7 (DEN+2-AAF) e göre değerlendirilmesinde ilk kez denenmesi nedeniyle herhangi bir çalışmayla karşılaştırma yapılamamıştır. Ancak GSH-Px in grup 7 e göre Grup 8 deki artış nedeninin OCT 'nin antioksidan veya karsinoid tümör inhibe etme özelliğinden kaynaklandığı düşünülebilir.

Grupların NO düzeyleri incelendiğinde Çizelge 5.8 ve Şekil 5.6'de gösterildiği gibi ; Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 5. ,6. ,7. Grubta artış gözlenirken 8.grubun NO düzeyinde 7.gruba göre anlamlı bir azalış tespit edilmiştir. (p <0,05)

Nitrik Oksit , Proteinlerin DNA' larında oluşan tahribatın tamirini inhibe edebildiği bilinmektedir.ve NO fizyolojik ve patolojik bozukluklarda biyolojik bir habercidir [160, 161].

Al-Rejaie ve ark.(2009) DEN uyguladıkları sıçanların karaciğer doku hücrelerinde Kontrol grubuna göre DEN grubunun NO düzeylerinde azalış belirlemiştir [155].

Dietil nitrozamin ve 2-Asetil aminofloran yada sadece 2-AAF sıçanları uygulanmış karaciğer doku hücrelerindeki NO düzeylerini gösteren bir çalışma olmamasına rağmen daha önce yapılan farklı çalışmalarda serbest radikallerin NO düzeyini arttırdığına dair çalışmalar mevcuttur [161]. Grup 8 deki NO düzeylerinde 7.gruba göre anlamlı azalış OCT' nin antioksidan veya karsinoid tümör inhibe etme özelliğinden kaynaklandığı düşünülebilir.

Çalışmamızda grupların CAT aktiviteleri karşılaştırıldığında Çizelge 5.5 ve Şekil 5.3' de gösterildiği gibi ; Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 5., 6., ve 7. grupların aktivitelerinde bir azalış tespit edilmiştir. 5.,6.,7. grupların aktivitesindeki azalış kontrol grubuna göre anlamlı (p<0,05) dir. 7.grup ile 8.grup karşılaştırıldığında CAT akvititelerindeki artışın anlamlı olduğu tespit edilmiştir.

Üstüner ve ark.(2006) DEN ve 2-AAF uyguladıkları sıçanlarda karaciğer doku hücrelerinde DEN, 2-AAF ve DEN+2-AAF gruplarının CAT aktivitelerinde azalış olduğunu tespit etmişlerdir [154].

Al-Rejaie ve ark.(2009) DEN uyguladıkları sıçanların karaciğer doku hücrelerinde Kontrol grubuna göre DEN grubunun CAT aktivitelerinde azalış belirlemiştir [155].

Bu tür çalışmalar yaptığımız çalışma ile paralellik göstermektedir.

Grupların Hsp 70 düzeyleri karşılaştırıldığında Çizelge 5.10 ve Şekil 5.8'de gösterildiği gibi Kontrol grubuna göre 5. Ve 7. Grubun Hsp 70 düzeylerindeki artış anlamlıdır. (p<0,05)

Grup 7'e göre Grup 8'de azalış tespit edilmiştir fakat anlamlı değildir. (p>0,05)

Philips ve ark.(2007) fareler üzerinde oluşturduğu pankreatik kanser hücrelerinin Hsp 70 düzeylerini incelediklerinde normal pankreatik hücre grubuna göre artış gösterdiğini tespit etmişlerdir [162]. Birkaç hücre türünde Hsp 70' in fazla üretilmesi ile ilgili çalışmalar ,tümör gelişimine doğru giden hücreler de Hsp 70' in arttığı fikrini desteklemektedir. Kaldı ki Isı şok proteinleri en küçük dış faktörlerden etkilenmektedir. Ancak Grup 8 deki Hsp 70 düzeyinde ki artışı karşılaştıracak bir çalışma bulunmadığından daha önce bahsettiğimiz gibi OCT'nin karsinoid tümör inhibe edici özelliğinin yanında antioksidan özelliğinden kaynaklandığı düşünülebilir.

Çalışmamızda Çizelge 5.9 ve Şekil 5.7' de gösterildiği gibi grupların 8-OHdG düzeyleri kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında 5. , 6. ,7. , 8 grubun düzeylerinde anlamlı artış tespit edilmiştir.($p<0,05$)

Fakat grup 7'nin 8-OHdG düzeyi grup 8 ile karşılaştırıldığında anlamlı değildir. ($p>0,05$)

Reaktif oksijen türleri DNA'da 20'den fazla oksidatif baz hasar ürününün oluşmasına yol açar [163].

Bu hasara uğrayan bazlar arasında 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG) oldukça duyarlı ve en sık karşılaşılan oksidatif DNA hasarı belirticidir [164].

Kimyasal bir karsinojen veya metabolizması sırasında daha etkin hale gelmiş olan karsinojen eğer karaciğerde detoksifiye edilemezse DNA'yı değiştirebilir.DNA'da tek veya çift zincir kırıklarına, pürin ve pirimidin bazlarında modifikasyonlara, deoksiriboz fosfat iskeletinde hasara, DNA-protein ve DNA-DNA çapraz bağlarına neden olabilir.Çalışmamızda sıçanların karaciğer doku hücrelerinde 8-OH dG düzeyinin artışında kimyasal karsinojenler DEN ve 2-AAF 'in neden olduğu düşünülebilir.

Sonuç olarak, Çalışmamızda OCT' in antioksidan etkisi olduğu düşünülmüştür.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- [1] Chan D.W.Sell S.: Tumor Markers. n: "Tietz Textbook of Clinical Chemistry. 2th Edition. Ed. Burtis C.A. and Ashwood E.R. W.B. Soundes Company, Philadelphia.: p.897-927 (1996)
- [2] Kumar V. Cotran R.S. Robbins S.L.: Neoplasia Ln: Robbins SI (ed),Basic Pathology, WB Saunders – Philadelphia.171-216 (1996)
- [3] Manson M.M., Gecher A., Hudson E.A. and et al.: Blocking and Supressing Mechanisms of Chemoprevention by Dietary Constituents. *Toxiology Letters.*; 112-113: 449-505 (2000)
- [4] <http://www.bioanalytical.com/info/poster/pdf/Zhu-08.pdf>: Tianyi Z, Yongxin Z, Chandran G: Rapid Quantitative Determination of Multiple Cytochrome P450 Probe Substrates by Gradient Liquid Chromatography/Electrospray Ionization Ion Trop Mars.
- [5] Kurado H.,Ohtsuru A, Futakuchi M, Kawashita Y. Nagayama Y , Fukuda E., Namba H., Shirai T., Kanematsu T. Yamashita S Distinctive Gene Expression of Receptor-type Tyrosine kinase Families during Rat Hepatocarcinogenesis. *International Journal of Molecular Medicine.* 9: 473-480(2002)
- [6] Wood G. A, Sarma D. S. R. Archer M. C. Inheritance of Resistance to Promotion of Preneoplastic Liver Lesions in Copenhagen Rats. *Exp. Biol. Med.*, 26(9): 831-835(2001)
- [7] Max . D. ,Max., Sui Y. F., Wang W. L., Wang C. M.: Signal Transduction of Gap Junctional Genes, Connexin 32, Connexin 43 In *Human Hepatocarcinogenesis.* *World J. Gastroenterol*, 9(5): 946-950 (2003)
- [8] Arora A., Shukla Y.: Induction of Preneoplastic Altered Hepatic Foci Following Dietary Sulphur Supplementation. *Human&Experimental Toxicology*, 23: 229-234 (2004)
- [9] Williams GM, Jeffrey AM Oxidative DNA damage: Endogenous and chemically induced. *Regul Toxicol Pharmacol*, 32 (3): 283-92 (2000)
- [10] Kulaksız G, Sancar A Nükleotid eksizyon onarımı ve kanser. *Turk J Biochem* , 32 (3): 104-111 (2007)
- [11] Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Ünsal-Kaçmaz K, Linn S Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the damage checkpoints. *Annu Rev Biochem*, 73: 39-85 (2004)

- [12] Moseley P: Stress proteins and the immune response. Erişim adresi: www.elsevier.com/locate/immpharm, Erişim Tarihi:09.02.2006.
- [13] Landry J: Protein Interactions and Moleküler Chaperones. Erişim adresi: <http://www.tulane.edu/~biochem/med/hsp.htm>, Erişim Tarihi: 09.01.1998.
- [14] Klauning JE, Kamendulis LM, Hocevar BA. Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis. *Toxicol Pathol* 2010; 38: 96-109.
- [15] Klaunig JE, Wang Z, Pu X, Zhou S. Oxidative stress and oxidative damage in chemical carcinogenesis. *Toxicol Appl Pharmacol* 254: 86-99 (2011)
- [16] Oliviera PA, Colaco A, Chaves R, Guedes-Pinto H, De-La Cruz LF, Lopes C. Chemical carcinogenesis. *Ann Acad Bras Cienc* ; 79: 593-616 (2007)
- [17] Öner P. Kanser Biyokimyası. Biyokimya, (Eds) Gürdöl F, Ademoğlu E. 2. Baskı, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul s. 653 (2010)
- [18] Schulte-Hermann R, Grasl-Kraup B, Bursch W. Tumor development and apoptosis. *Int Arch Allergy Immunol* , 105: 363-367 (1994)
- [19] Noore A, Monica R, Deborah B. Epidemiology of primary liver cancer. *Cancer Forum* 33:1-5(2009)
- [20] El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology* 132: 2557-2576 (2007)
- [21] El-Serag HB, Mason AC. Rising incidence of hepatocellular carcinoma in the United States. *N Engl J Med* , 340: 745 -750 (1999)
- [22] Bosch FX, Ribes J, Diaz M, Cleries R. Primary liver cancer: worldwide incidence and trends. *Gastroenterology* ,127 (5 suppl): s5-s16 (2004)
- [23] Naugler WE, Sakurai T, Kim S, Maeda S, Kim K, Elsharkawy AM, Karin M. Gender disparity in liver cancer due to sex differences in MyD88-dependent IL-6 production. *Science* 317: 121-124 (2007)
- [24] Asmaa IG, Shahid AK, Mireille BT, Imam W, Simon D, Robinson T. Hepatocellular carcinoma: Epidemiology, risk factors and pathogenesis. *World J of Gastroenterol* 14:4300-8 (2008)
- [25] Glauert HP, Calfee-Mason K, Stemm DN, Tharappel JC, Spear BT. Dietary antioxidants in the prevention of hepatocarcinogenesis: A review. *Mol Nutr Food Res* ,54: 875 -896 (2010)
- [26] Higgins GF, Anderson RM. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch Path* 12: 186–202 (1931)

- [27] Peraino C, Staffeldt EF, Carnes BA, Ludeman VA, Blomquist JA, Vesselinovitch SD. Characterization of histochemically detectable altered hepatocyte foci and their relationship to hepatic tumorigenesis in rats treated once with diethylnitrosamine or benzo(a)pyrene within one day after birth. *Cancer Res*, 44: 3340-3347 (1984)
- [28] Espandiari P, Robertson LW, Srinivasan C, Glauert HP. Comparison of different initiation protocols in the resistant hepatocyte model. *Toxicology* 206: 373-38 (2005)
- [29] Ahn B., Han B. S., Kim D. J., Ohshima H.: Immunohistochemical Localization of Inducible Nitric Oxide Synthase And 3-Nitrotyrosine in Rat Liver Tumors Induced by N-Nitrosodiethylamine. *Carcinogenesis*, 20(7): 1337-1344 (1999)
- [30] Barbason H., Mormont C., Massart S., Bouzahzah B.: Anti- Carcinogenic Action of Phenobarbital Given Simultaneously with Diethylnitrosamine in The Rat. *Eur J Cancer Clin Oncol*, 22(9): 1073-1078 (1986)
- [31] Mitsumori K., Onodera H., Shoda T., Uneyama C., et al: Liver Tumour-promoting Effects of Oxfendazole in Rats. *Food and Chemical Toxicology*, 35: 799-806 (1997)
- [32] Thullberg M., Kraupp G. B., Högberg J., Garberg. P.: Changes in Liver Fatty Acid-Binding Protein in Rat Enzyme-Altered Foci. *Cancer letters* , 128:1-10, (1998)
- [33] Arora A., Shukla Y.: Induction of Preneoplastic Altered Hepatic Foci Following Dietary Sulphur Supplementation. *Human&Experimental Toxicology*, 23: 227-232, 2005.
- [34] Barbisan L. F., Scolastici C., Miyamoto M., Salvodari D. M. F., et al: Effects of Crude Extracts of *Agaricus Blazei* on DNA Damage and on Rat Liver Carcinogenesis Induced by Diethylnitrosamine. *Genetics and Molecular Research* , 2(3): 295-308 (2003)
- [35] Barbisan Spinardi A. L. T., Kaneno R., Rodrigues M. et al. V.: Lymphoproliferative Response And T Lymphocyte Subsets in a Medium- Term Multi-Organ Bioassay for Carcinogenesis in Wistar rats. *Cancer Letters* , 154: 121-129 (2000)
- [36] Finnberg N., Silins I., Stenius U., Hogberg. J.: Characterising The Role of MDM2 in Diethylnitrosamine Induced Acute Liver Damage and Development of Pre-Neoplastic Lesions. *Carcinogenesis*, 25: 113-122 (2004)
- [37] He R. K., Barre G. M.: Influence of The Vitamin D Status on The Early Hepatic Response to Carcinogen Exposure in Rats. *the Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* , 281: 464-469 (1997)
- [38] Ito N.: Marriage of Surogate Markers with Medium Term Tests for Carcinogenicity and Modification Potential. *Asian. Pacific Journal of Cancer Prevention* ,1: 349-355 (2000)

- [39] Kuroda H., Ohtsuru A., Futakuchi M., Kawashita Y., et al.: Distinctive Gene Expression of Receptor-type Tyrosine Kinase Families during Rat Hepatocarcinogenesis. *International Journal of Molecular Medicine* 9: 473-480 (2002)
- [40] Liu L.L., Gong L. K., Qi X. M., et al.: Altered Expression of Cytochrome P450 and Possible Correlation with Preneoplastic Changes in Early Stage of Rat Hepatocarcinogenesis. *Acta Pharmacologica Sinica*, 26(6): 737-744 (2005)
- [41] Spinardi A. L. T., Kaneno R., Rodrigues M.A., Salvadori D et al.: Natural Killer Activity in a Medium-term Multi-organ Bioassay for Carcinogenesis. *Jpn. J. Cancer Res.* 90 : 101-107 (1999)
- [42] Thirynakarasu C., Sakthisekaran D.: Stabilization of Membrane Bound Enzyme Profiles by Sodium Selenite in Nitrosodiethylamine Induced and Phenobarbital Promoted Hepatocarcinogenesis in Rats. *Biomedicine a Pharmacotherapy*, 57: 117-123 (2003)
- [43] Tryphonas H., Lacroix F., Lok E., Jee. P., et al.; The Effect of Butylated Hydroxytoluene on Selected Immune Surveillance Parameters in Rats Bearing Enzyme-altered Hepatic Preneoplastic Lesions. *Food and Chemical Toxicology*, 37: 671-681(1999)
- [44] Waddell W. J.: Threshold for Carcinogenicity of N-Nitrosodiethylamine for Esophageal Tumors in Rats. *Food and Chemical Toxicology*, 41: 739-741 (2003)
- [45] Walker N. J., Tritsher A. M., Sills R. C., Lucier G. W., : Hepatocarcinogenesis in Female Sprague-Dawley Rats following Discontinuous Treatment with 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p dioxin. *Toxicological Sciences*, 54: 330-337 (2000)
- [46] Westhuizen L. V. D., Gelderblom W. C. A., Shephard G. S.,: Disruption of Sphingolipid Biosynthesis in Hepatocyte Nodules: Selective Proliferative Stimulus Induced by Fumonisin B1. *Toxicology*, 200: 69-75 (2004)
- [47] XuY. H., Maronpot R., Pitot H.C.: Quantitative Stereologic Study of the Effects of Varying the Time Between Initiation and Promotin on Four Histochemical Markers in Rat Liver During Hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis*, 11: 267-272 (1990)
- [48] Aydınlık H., Nguyen T. D., Moennikes O., Buchmann A., Schwarz M.: Selective Pressure During Tumor Promotion by Phenobarbital Leads to Clonal Outgrowth of -Catenin-Mutated Mouse Liver Tumors. *Oncogene*, 20: 7812-7816 (2001)
- [49] Bager Y., Kato Y., Kenne K., Warnarg L.: The Ability to Alter The Gap Junction Protein Expression Outside GST-P Positive Foci in Liver of Rats was Associated to

- The Tumour Promotion Potency of Different Polychlorinated Biphenyls. *Chemio-Biological Interactions*, 103: 199-212 (1997)
- [50] Chakraborty T., Ghosh S., Datta S., Chakraborty P., Chatterjee M.: Vanadium Suppresses Sister-Chromatid Exchange and DNA-Protein Crosslink Formation and Restores Antioxidant Status and Hepatocellular Architecture during 2-Acetylaminofluorene Induced Experimental Rat Hepatocarcinogenesis. *Journal of Experimental Therapeutics and Oncology*. 3:346-362 (2003)
- [51] Dragan Y. P., Xu Y. H., Pitot H.C.: The Effect of The Dose of Diethylnitrosamine on The Initiation of Altered Hepatic Foci in Neonatal Female Rats. *Carcinogenesis*, 14: 385-391 (1993)
- [52] Lee G. H.: Correlation between Bcl-2 Expression and Histopathology in Diethylnitrosamine-Induced Mouse Hepatocellular Tumors. *American Journal of Pathology*, 151: 957-961 (1997)
- [53] Luebeck G., Buchman A., Stinchcombe S., Mollgavkar S. H., Schwarz M.: Effects of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin on Initiation and Promotion of GST-P-Positive Foci in Rat Liver: A Quantitative Analysis of Experimental Data Using a Stochastic Model. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 167: 63-73 (2000)
- [54] Park D. Y., Lee C. H., Sol M. Y., Suh K. S., et al.: Expression and Localization of the Transforming Growth Factor-Type I Receptor and Smads in Preneoplastic Lesions during Chemical Hepatocarcinogenesis in Rats. *J. Korean Med. Sci.*, 18: 510-519 (2003)
- [55] Pitot B.: Models of Liver Cancer, Non Genotoxic Carcinogens. *Toxicologic Pathology*, 24: 18-20 (1996)
- [56] Tee G. J.G., Dragon Y. P., Singh J., et al.: Quantitative Analysis of Dose- and Time-Dependent Promotion of Four Phenotypes of Altered Hepatic Foci by 2,3,7,8 Tetrachlorodibenzo-p-dioxin in Female Sprague-Dawley Rats. *Toxicological Sciences*, 51: 211-223 (1999)
- [57] Tritscher A. M., Goldstein J. A., Portier C. J., et al.: Dose-Response Relationships For Chronic Exposure to 2,3,7,8- Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin in a Rat Tumor Promotion Model: Quantification and Immunolocalization of CYP1A1 and CYP1A2 in the Liver. *Cancer Research*, 52: 3436-3442 (1992)
- [58] Wood G. A., Archer M. C.: Matrix Metalloproteinases-2 And 9 do not Play a Role in the Growth of Preneoplastic Liver Lesions in F344 Rats. *Exp. Biol. Med.*, 226 (8): 799-803 (2001)

- [59] <http://class.fst.ohio-state.edu/FST201/lectures/IFTCa.htm1>: A Scientific Status Summary by the Institute of Food Technologists Expert panel on Food Safety&Nutrition.
- [60] Akyüz F, İnal M, Bayçu C, Kanbak G. Changes in antioxidant status and lipid peroxidation at liver and kidney tissues of the rats that were given diethylnitrosamine. *Ann. Med. Sci.* 10 (2), 50-54 (2001)
- [61] Thirunavukkarasu C., Sakthisekaran.: Effect of Dietary Selenite on N Nitrosodiethylamine-Induced And Phenobarbital Promoted Multistage Hepatocarcinogenesis in Rat: Reflection in Some Minerals. *Biomedicine&pharmacotherapy*, 57: 416-421(2003)
- [62] Bhosale P, Motiwale L, Ingle AD, Gadre RB, Rao KVK. Protective effect of Rhodotorula glutinis NCIM3353 on the development of hepatic preneoplastic lesions. *Curr Sci*,83: 303-308 (2002)
- [63] <http://feql.wsu.edu/esrp532/ESRP532Lecture7PPT.pdf>: FEISOT A. Overview of Contemporary Toxicological Hazards.
- [64] <http://www.oehha.ca.gov/prop65/pdf/hid2amin.pdf>.
- [65] Pietrowska M., Canuszewska J., Walter Z., et al.: The Dedection and Characterization of Rat Protein Recognizing DNA Damaged by N-Acetoxy-Acetylaminofluorene. *Cellular&Molecular Biology Letters*, 5: 423-431(2000)
- [66] emet M. M, Deniz F., Şimsek E ., Taskın E.O., Deveci A.: Psikotrop İlaç Yazılma Sıklığı ve ilaç Etkileşimleri: Sitokrom P450 Sistemi.*Klinik Psikofarmakoloji Bülteni*, 13: 43- 49(2003)
- [67] Mino K., Watanabe J., Kanamura S.: Effect of 3-Methylcholanthrene Administration on Expression of Cytochrome P-450 Isoforms Induced by Phenobarbital in Rat Hepatocytes. *The Journal of Histochemistry a Cytochemistry* , 46(10): 1151-1160 (1998)
- [68] Pinto L. F. R., Moraes E., Albano M. R., Silva C. M., Godoy W., et al.: Rat Oesophageal Cytochrome P450(CYP) Monooxygenase System: Comparison to the Liver and Relevance in NNitrosodiethylamine Carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 22: 1877-1888(2001)
- [69] Üstüner D.: Fluoksetinin Kromozomlar ve Mitotik indeks Üzerine In Vitro ve In Vivo Etkilerinin incelenmesi, Doktora Tez, Eskisehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Bilim Dalı, Eskisehir (2004)

- [70] Schiller HJ, Andreoni KA, Bulkley GB: Free radical ablation for the prevention of post-ischemic renal failure following renal transplantation. *Klin Wochenschr* 69: 1083-1094 (1991)
- [71] Yüzer H. Ketamin, tiyopental, propofol, etomidat ve intralipidin Böbrek iskemii reperfüzyon hasarına etkileri. Uzmanlık Tezi, K.Maraş Sütçü imam Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Bölümü, Kahramanmaraş (2008)
- [72] Akkuş İ. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik etkileri. 1. Baskı Konya: Mimoza Yayınları:3-95.(1995)
- [73] Özdamar M.Y. Renal İskemi Reperfüzyon Hasarında Grape Seed Proanthocyanidin (Üzüm Çekirdeği Proantosiyanidin) Ekstresinin Etkisi. Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi, Konya- (2008)
- [74] Rangan U, Bulkley GB: Prospects for treatment of free radicalmediated tissue injury. *British Med Bulletin* 49: 700-718 (1983)
- [75] Cheeseman KH. Slater TF. An Introduction to radical biochemistry. *Br. Med. Bull* , 49: 481-493 (1993)
- [76] Sarı S. Farelerde Ehrlich Asit Solid Tümör Modelinde Thymus Sipyelus Ve Taurinin, Böbrek Mda, Glutasyon, Aopp Düzeylerine Ve Sod Aktivitesine Etkileri Gazi Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Anabilimdalı Yüksek Lisans Tezi Ankara (2008)
- [77] Davies MJ. Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences. *Biochem Biophys Res Commun* ,305: 761-70 (2003)
- [78] Fıçıcılar H. Yavuzer S. Ersöz G. Yorgancıoğlu R. Pasin M. Çelebi M. Travmatik Spinal Lezyonlu Olgularda İntrasellüler Antioksidan Enzim Aktiviteleri, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası Cilt 49, Sayı 4; 191-195 (1996)
- [79] Özkan A., Kayahan F.: Serbest Oksijen Radikalleri, Karsinogenez ve Antioksidant Enzimler. *Thod* , 1, 56: (2004)
- [80] Ma X. D. , Ma X. , Sui Y. F.,et al.: Signal Transduction of Gap Junctional Genes, Connexin 32, Connexin 43 In Human Hepatocarcinogenesis. *World J. Gastroenterol*, 9(5): 946-950 (2003)
- [81] Çavdar C, Sifil A, Çamsarı T. Reaktif Oksijen Partikülleri ve Antioksidan Savunma. Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi/Office *Journal of the Turkish Nephrology, Association* 3-4: 92-95 (1997)
- [82] Halliwell B, Gutteridge JM. Free Radicals in Biology and Medicine, Oxford, Oxford University Press (1999)

- [83] Uysal M. Serbest radikaller ve oksidatif stres. Biyokimya, Editörler F. Gürdöl ve E. Ademoğlu. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul , p. 647-652 p. (2010)
- [84] Kehrer JP, Smith CV. Free radicals in Biology: Sources, reactivities, and roles in the etiology of human diseases. In: Frei B (ed). Natural Antioxidants in Human Health and Disease. Academic Press, San Diego , p. 25-62 p.(1994)
- [85] Nakazawa H, Fukuyama N, Takizawa S, Tsuji C, Yoshitake M, Ishida H. Nitrotyrosine formation and its role in various pathological conditions. *Free Radic Res Commun* , 33: 771-784 (2000)
- [86] Ogino K, Wang D. Biomarkers of oxidative/nitrosative stress: an approach to disease prevention. *Acta Med Okayama* , 61: 181-189 (2007)
- [87] Randerath K, Zhou GD, Monk SA, Randerath E. Enhanced levels in neonatal rat liver of 7, 8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine (8-hydroxydeoxyguanosine), a major mutagenic oxidative DNA lesion. *Carcinogenesis* ,18: 1419-1421 (1997)
- [88] Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. Oxidative DNA damage: *Mechanisms, mutation, and disease*. *FASEB J* ,17: 1195-1214 (2003)
- [89] Evans MD, Cooke MS. Factors contributing to the outcome of oxidative damage to nucleic acids. *BioEssays* , 26: 533-542 (2004)
- [90] Halliwell B. Oxygen and nitrogen are pro-carcinogens. Damage to DNA by reactive oxygen, chlorine and nitrogen species: Measurement, mechanism and the effects of nutrition. *Mutat Res* , 443: 37-52 (1999)
- [91] DNA Hasarı, Onarımı ve Hastalıklarla İlişkisi Kursu (CD-ROM)Dizdaroğlu M. Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü , 1. İzmir: Dokuz Eylül Üniversitesi (2007)
- [92] Yokuş B, Çakır D, Biomarker of InVivo Oxidative DNA Damage; 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine, *T.Klin J.Med Sci* , 22, 535-543, (2002)
- [93] Loft S., Vistisen K., Ewertz M., Tjønneland A., Overvad K. ve Poulsen H.E., Oxidative DNA damage estimated by 8-hydroxydeoxyguanosine excretion in humans: influence of smoking, gender and body mass index, *Carcinogenesis*, 13; 2241–2247 (1992)
- [94] Ritossa F. Discovery of the heat shock response. *Cell stress chaperones* ,1(2):978 (1996)
- [95] Derek SW, Hector RW. Heat shock response and acute lung injury. *Radical Biology & Medicine* , 42: 1–14 (2007)
- [96] Calderwood SK, Khaleque A, Sawyer DB, Ciocca DR. Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis. *Trends in Biochemical Sciences* , 3(31):164-72 (2006)

- [97] Kiang JG, Tsokos GC. Heat Shock Protein 70 kDa: Molecular Biology, *Biochemistry and Physiology Pharmacol Ther* , 2(80):183–201 (1998)
- [98] Pratt WB, Toft DO. Regulation of Signaling Protein Function and Trafficking by the hsp90/hsp70- Based Chaperone Machinery. *Exp Biol Med* , 228(2): 111-33 (2003)
- [99] Schlesinger MJ. How the cell copes with stress and the function of heat shock proteins. *Pediatr Res* ,36: 1–6 (1994)
- [100] Hut HMJ, Kampinga HM, Sibon OCM. Hsp70 protects mitotic cells against heat-induced centrosome damage and division abnormalities. *Mol Biol Cell* , 16: 3776–85 (2005)
- [101] Beere HM. ‘The stress of dying’: the role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis. *J Cell Sci* ,117:2641–51 (2004)
- [102] Ciocca DR, Calderwood SK. Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell Stress Chaperones* ,10:86–103 (2005)
- [103] Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* ,100:57–70 (2000)
- [104] Sherman M, Multhoff G. Heat Shock Proteins in Cancer. *Ann NY Acad Sci*,1113:192–201 (2007)
- [105] Sen T, Sen N, Brait M. et al. DNp63a Confers Tumor Cell Resistance to Cisplatin through the AKT1 Transcriptional Regulation. *Cancer Res* , 71(3):1167-76 (2011)
- [106] Taira T, Sawai M, Ikeda M, Tamai K, Iguchi-Arigo SM, Arigo H. Cell cycle-dependent switch of up- and down-regulation of human hsp70 gene expression by interaction between c-Myc and CBF/NF-Y. *J Biol Chem* , 274(34): 24270-9 (1999)
- [107] Tsutsumi-Ishii Y, Tadokoro K, Hanaoka F, Tsuchida N. Response of heat shock element within the human HSP70 promoter to mutated p53 genes. *Cell Growth Differ* , 6(1): 1-8 (1995)
- [108] Agoff SN, Hou J, Linzer DI, Wu B. Regulation of the human hsp70 promoter by p53. *Science* , 259 ; (5091): 84-7 (1993)
- [109] Khaleque MA, Bharti A, Sawyer D. And et al. Induction of heat shock proteins by heregulin beta1 leads to protection from apoptosis and anchorage-independent growth. *Oncogene* , 24 (43): 6564-73 (2005)
- [110] Lindquist S, Craig EA. The heat shock proteins. *Annu Rev Genet* , 22: 631–7 (1988)
- [111] Jolly C, Morimoto RI. Role of the Heat Shock Response and Molecular Chaperones in Oncogenesis and Cell Death. *Jour Nat Cancer Institute* , 92(19): 1564-72 (2000)
- [112] Pirkkala L, Nykanen P, Sistonen L. Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond. *FASEB J* ; 15: 1118-31 (2001)

- [113] Barnes JA, Dix DJ, Collins BW, Luft C, Allen JW. Expression of inducible Hsp70 enhances the proliferation of MCF-7 breast cancer cells and protects against the cytotoxic effects of hyperthermia. *Cell Stress & Chaperones* , 6(4):316–32 (2001)
- [114] Diehl JA, Yang W, Ronald A, Xiao RH, Emili A. Hsc70 Regulates Accumulation of Cyclin D1 and Cyclin D1- Dependent Protein Kinase. *Mol Cell Biol* , 23(5): 1764- 74 (2003)
- [115] Workman P. Altered states: selectively drugging the Hsp90 cancer chaperone. *Trends Mol Med* 10: 47–51 (2004)
- [116] Vishal C, Kumar JU, Swamy CVB, Nandini R et al. Repercussion of Mitochondria Deformity Induced by Anti- Hsp90 Drug 17AAG in Human Tumor Cells. *Drug Target Insights* 5: 11–32 (2011)
- [117] Peng X, Guo X, Borkan SC et al. Heat shock protein 90 stabilization of ErbB2 expression is disrupted by ATP depletion in myocytes. *J Biol Chem* , 280: 13148-52 (2005)
- [118] Neckers L. Hsp90 inhibitors as novel cancer chemotherapeutic agents. *Trends Mol Med* , 8: 55–61 (2002)
- [119] Marissa V, Powers, Clarke PA, Workman P. Dual Targeting of HSC70 and HSP72 Inhibits Hsp 90 Function and Induces Tumor-Specific Apoptosis. *Cancer Cell* 14: 250–262 (2008)
- [120] Smith JR, Workman P. Targeting the cancer chaperone HSP90. *Cancer* , 4 (4): 219-227 (2007)
- [121] Calderwood SK. Heat shock proteins in breast cancer progression a suitable case for treatment? *Int J Hyperthermia* , 26(7): 681–5 (2010)
- [122] Calderwood SK, Theriault JR, Gong J. Message in a bottle: Role of the 70-kDa heat shock protein family in anti-tumor immunity. *Eur J Immunol* , 35: 2518–27 (2005)
- [123] Manjili MH, Wang XY, Chen X et al. HSP110-HER2/neu Chaperone Complex Vaccine Induces Protective Immunity Against Spontaneous Mammary Tumors in HER-2/neu Transgenic Mice. *J Immunol* , 171: 4054-61 (2003)
- [124] Srivastava P. Interaction of heat shock proteins with peptides and antigen presenting cells: chaperoning of the innate and adaptive immune responses. *Annu Rev Immunol* , 20: 395–425 (2002)
- [125] Calderwood SK. Chaperones and slow death-immunotherapy. *Trends Biotechnol* , 23 (2): 57 (2005)

- [126] Falconi M, Vesentini S, Bassi C. Exocrine pancreatic response to SMS 2001-995. *Ital J. Gastroenterol* ,23 (3): 156(1991)
- [127] Fort E, Sauterau D, Silvain C, et al. A randomized trial of glypressin plus transdermal nitroglycerin versus octreotide in the control of acute variceal hemorrhage. *Europ J Gastroenterol Hepatol* , 3(1) :25 (1991)
- [128] Vinciguerra L, Contillo A, Bussci R, Parente A. Efficacy of octreotide 5 fluorouracil therapy in one patient with carcinoid syndrome. *J Endoc Invest* , 13 (1): 235 (1990)
- [129] Brunani A, Crespi C, De Martin M, et al. Four year treatment with a long acting somatostatin analogue in a patient with Verner-Morrison syndrome. *J Endoc Invest* 14:685-9 (1991)
- [130] Annibale B, Corleto V, Gamboni G. Efficacy of somatostatin analog (SMS 201-995) on exocrine endocrine gastric cells in Zollinger-Ellison syndrome (ZES) and antral G cell hyperfunction (AGHC). *Europ J Gastroenterol Hepatol* , 3(1):34 (1991)
- [131] Amoric JC, Dreno B, Mourreaux P, Litoux P. Syndrome du glucagonoma. Interet de L'association dacarbazine-somatostatine. *Sem Hop. Paris* vol 67:1069-72 (1991)
- [132] Cello JP, Grendell JH, Basuk P, Simon D, et al. Effect of octreotide on refractory AIDS-associated diarrhoea: a prospective, multicenter clinical trial. *Ann Intern Med* ,115:705-10 (1991)
- [133] Lata J, Dite P, Julinkova K, Precechtelova M, Prasek J. Effect of octreotide on the clinical course of acute pancreatitis and levels of free oxygen radicals and antioxidants. *Vnitr Lek* , 44(9):524-7 (1998)
- [134] Wenger FA, Kilian M, Jacobi CA. Effects of octreotide on lipid peroxidation in pancreas and plasma in acute hemorrhagic necrotizing pancreatitis in rats. *Pancreatology* 2 (3):211-6 (2002)
- [135] Sener G, Cetinel S, Erkanli G, Gedik N, Yegen BC. Octreotide ameliorates sepsis-induced pelvic inflammation in female rats by a neutrophil-dependent mechanism. *Peptides* , 26(3):493-9 (2005)
- [136] <http://en.wikipedia.org/wiki/Octreotide>.
- [137] Yalçın SA. Antioksidanlar. *Klinik Gelişim* , 2: 342-7 (1998)
- [138] Gilgun-Sherki Y, Rosenbaum Z, Melamed E, Offen D. Antioxidant therapy in acute central nervous system injury: current state. *Pharmacol Rev* , 54(2):271-84 (2002)
- [139] Yalçın A.S. Antioksidanlar. *Klinik Gelişim* , 11: 342 –334 (1998)
- [140] Slater TF. Free radical mechanisms in tissue injury. *J Biochem* 1984; 222:1-15.

- [141] Atlı Y. İntestinal iskemi Reperfüzyon Hasarının Önlenmesinde Alfa Lipoik Asit Ve Quersetin'in Koruyucu etkilerinin Araştırılması Uzmanlık Tezi, K.Maraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilimdalı , Kahramanmaraş (2009)
- [142] Sözman E.Y. Yaşlanma Biyokimyası. Onat T, Emerk K, Sözman ET (editörler). İnsan Biyokimyası. 1.Baskı, Ankara: 667–672 (2002)
- [143] Cuzzocrea S, Reiter RJ. Pharmacological action of melatonin in shock, inflammation and ischemia/reperfusion injury. *Eur J Pharmacol* , 426(1-2):1-10 (2001)
- [144] Oral T. İnsan biyokimyası. Ankara: Palme Yayıncılık , 665-74 (2002)
- [145] Lopez-Neblina F, Paez-Rollys AJ, Toledo-Pereyra LH. Mechanism of Protection of Verapamil by Preventing Neutrophil Infiltration in the Ischemic Rat Kidney. *J SurgRes* , 61: 469-472 (1996)
- [146] Fridovich I: Superoxide dismutase. *Adv Enzymol* , 4: 35-97 (1974)
- [147] Beutler E: Red Cell Metabolism. A manual of biochemical methods. 2nd edition, Grune and Stratton Inc New York; (1984)
- [148] Türközkan. N, Ciliv. G. : Dietil nitrozaminle ratlarda başlatılan karaciğer kanserojenезisi sırasında (Na⁺, K⁺) ATP az aktivitesindeki değişimler .Biyokimya Dergisi, XIII(1);29-35 (1988)
- [149] Ken-ichi Yamada, Ikvo Yanamiya, Hideo Utsumi. İnvivo detection of free radicals induced by diethylnitrosamine in rat liver tissue (2005)
- [150] Asea A, Kraeft SK, Kurt-Jones EA et al. HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. *Nat Med* , 6(4): 435-42 (2002)
- [151] Giffard RG, Han R-Q, Emery JF, Duan M, Pittet JF. Regulation of apoptotic and inflammatory cell signaling in cerebral ischemia - the complex roles of Heat Shock Protein 70. *Anesthesiology* ,109(2): 339–48 (2008)
- [152] Emine Atakişi ., Ayla Özcan ;Dietilnitrozamin Verilen Ratlarda Omega-3 Yağ Asitlerinden Zengin Balık Yağının Koruyucu Rolünün Araştırılması.*Turk J Biochem* , 30 (4); 279-284.(2005)
- [153] Tessitore L. Apoptosis and cell proliferation are involve in the initiation of liver carcinogenesis by a subnecrogenic dose of diethylnitrosamine in refeed rats. *J. Nutr.* , 130: 104-110 (2000)
- [154] Üstüner Cengiz. M Karaciğerde tümör oluşmasına neden olan dietilnitrozamin ve 2-asetilaminofloran uygulanmış sıçanlara demetoksiviridin ve 1- α hidroksi

- demetoksiviridin'in etkileri Doktora Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık bilimleri enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilimdalı , Eskişehir (2006)
- [155] Salim S Al-Rejaie, Abdulaziz M Aleisa, Abdulaziz A Al-Yahya et al; Progression of diethylnitrosamine-induced hepatic carcinogenesis in carnitine-depleted rats. *World J Gastroenterol* March 21; 15(11): 1373-1380 (2009)
- [156] Marnett LJ. Oxy radicals lipid peroxidation and DNA damage. *Toxicology* , 181–2:219–22 (2002)
- [157] Celebi S, Dilsiz N, Yilmaz T, Kukner AS. Effects of melatonin, vitamin E and octreotide on lipid peroxidation during ischemia-reperfusion in the guinea pig retina. *Eur J Ophthalmol* , 12(2):77-83 (2002)
- [158] Abdüsselam Seydanoğlu, Mehmet Gül, Sami Erdem et al; Deneysel Sepsis Modelinde Oksidan-Antioksidan Sistem ve Akciğer Histopatolojisi Üzerine Oktreotid'in Doza Bağımlı Etkileri. *Selçuk Üniv. Tıp Derg* ,26(3):90-94 (2010)
- [159] İlknur Bingül. Deneysel Karaciğer kanserinde bazı antioksidan bileşiklerin etkisinin incelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Ens. Biyokimya Y.Lisans Tezi ,İstanbul (2011)
- [160] Watanabe K, Hess A, Bloch W, Michel O. Expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS/NOS II) in the vestibule of guinea pigs after the application of cisplatin. *Anticancer Drugs* , 11: 29-32 (2000)
- [161] Wink DA, Cook JA, Christodoulou D, Krishna MC, Pacelli R, Kim S, DeGraff W, Gamson J, Vodovotz Y, Russo A, Mitchell JB. Nitric oxide and some nitric oxide donor compounds enhance the cytotoxicity of cisplatin. *Nitric Oxide* , 1: 88-94 (1997)
- [162] Phoebe A. Phillips, Vikas Dudeja, Joshua A. McCarroll et al. Triptolide Induces Pancreatic Cancer Cell Death via Inhibition of Heat Shock Protein 70. *Cancer Res* 67: (19) (2007)
- [163] Dizdaroglu M . Facts about the artifacts in the measurement of oxidative DNA base damage by gas chromatography-mass spectrometry. *Free Radic Res* , 29 (6): 551-63(1998)
- [164] De Martinis BS, De Lourdes Pires Bianchi M . Methodology for urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine analysis by hplc with electrochemical detection. *Pharmacol Res*, 46 (2): 129-31 (2002)

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı, soyadı : Velid UNSAL
Uyruğu : T.C.
Doğum tarihi ve yeri : 10.19.1981 Adana
Medeni hali : Evli
GSM : 05302205045
e-posta : velidunsal@hotmail.com

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Yüksek lisans	KSÜ / Tıbbi Biyokimya	2013
Lisans	YYÜ/ Eğitim Fakültesi Kimya Bölümü	2009
Lise	Adana 5 Ocak Lisesi	2001

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2012-2013	KSÜ	Araştırma Görevlisi

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

1. Arıcan O, Ozturk P, Kurutas EB, **Unsal V.** ‘Status of oxidative stress on lesional skin surface of plantar warts ‘J Eur Acad Dermatol Venereol. 2012 Jan 2. doi: 10.1111/j.1468-3083.2011.04419
2. **Unsal Velid** , Kurutaş Belge Ergül, Öztürk Perihan, Arıcan Özer ‘Kutanöz leişmanyazis ve oksidatif stres ilişkisi.KSÜ Tıp Fakültesi Dergisi 2010;7(2)
3. **Unsal V**, Toroğlu S, Kakakçı B, Miraloğlu M, Atalay F, Belge Kurutaş E. Türkiye’nin Kahramanmaraş ilinde arum discoridis (Tirşik)’in farklı formlarında ve yemeğinde antioksidan ve antibakteriyal aktivitedeki değişimler. XXIII. Ulusal Biyokimya Kongresi, Adana. (Sözel Bildiri).

4. Kabakci B, Kahraman H, **Unsal V**, Altunoluk B, Atalay F, Belge Kurutaş E. Metoreksat ile indüklenmiş sıçanlarda karaciğer ve böbrek hasarı üzerine eritropoetinin etkisi. XXIII. Ulusal Biyokimya Kongresi, Adana. (**Sözel Bildiri**).

5. **Velid Unsal** , Ergül Belge Kurutaş, Perihan Öztürk, Metin Kılınç ‘Kronik İdiopatik Ürtikerli Hastalarda H1-Reseptör Blokerlerinin Oksidan/Antioksidan Durum, Adenozin deaminaz ve eser elementler üzerine etkileri ‘XXIV. Ulusal Biyokimya Kongresi, Konya, 25-28 Eylül 2012 (**Sözel Bildiri-S16**)

Hobiler

Kitap