

T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ECZACILIK BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**KARACİĞER SİROZ MODELİ
OLUŞTURULMUŞ SIÇANLARDA TGF- β TİP 1
RESEPTÖR KİNAZ İNHİBİTÖRÜ, SB431542’NİN
APOPTOZİS ÜZERİNE ETKİSİ**

Arş. Gör. Oğuz Emre GÜL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Necmiye CANACANKATAN

Bu tez, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından BAP-SBE BK
(OEG) 2010-2 YL nolu proje olarak desteklenmiştir.

Tez No: 207

MERSİN – 2012

Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Eczacılık Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde yürütülmüş olan **“Karaciğer siroz modeli oluşturulmuş sıçanlarda TGF- β tip 1 reseptör kinaz inhibitörü, SB431542'nin apoptozis üzerine etkisi”** başlıklı çalışma jürimiz tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 21.05.2012



Yrd. Doç. Dr. Necmiye CANACANKATAN
Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı

Jüri Başkanı



Doç. Dr. Serap YALIN
Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı

Jüri Üyesi



Prof. Dr. Lülüfer TAMER GÜMÜŞ
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı

Jüri Üyesi

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulu'nun 31.09.2012 tarih ve 2012 / 145 sayılı kararı ile kabul edilmiştir.



Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Ülkü CÖMELEKOĞLU



TEŞEKKÜR

Biyokimya Anabilim Dalındaki yüksek lisans eğitimim süresince, değerli bilgi ve tecrübelerini bana aktaran, her türlü desteğini sabırla gösteren, benim için en iyi çalışma ortamını hazırlayan, gerek akademik gerekse aile yaşamı ile örnek aldığım değerli hocam ve tez danışmanım Sayın Yrd. Doç. Dr. Necmiye CANACANKATAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerini yol gösterici bir şekilde paylaşarak ışık tutan, Anabilim Dalı başkanımız Sayın Doç. Dr. Serap YALIN'a teşekkür ederim.

Tez çalışmam süresince desteklerini gördüğüm, sevgili çalışma arkadaşlarım Arş. Gör. Gonca TEKE ve Uzman Ayşegül GÖRÜR'e teşekkür ederim.

Histopatolojik incelemelere katkılarından dolayı Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'ndan Sayın Prof. Dr. Figen DORAN ve Sayın teknisyen Kezban Bostaner'e, ayrıca istatistiksel verilerin değerlendirilmesine katkıda bulunan Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalı'ndan Sayın Öğr. Gör. Semra ERDOĞAN'a teşekkür ederim.

Deneysel çalışmalarım sırasında deney hayvanlarının temin ve bakımını üstlenen Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarı çalışanlarına katkılarından dolayı ayrı ayrı teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim süresince gerek maddi gerekse manevi desteklerini esirgemeyen annem Fikriye GÜL ve kardeşim Selçuk GÜL'e de destekleri, sevgileri ve güvenleri için sonsuz teşekkür ederim.

Tez çalışmamı BAP-SBE BK (OEG) 2010-2 YL nolu proje olarak destekleyen Mersin Üniversitesi Rektörlüğü'ne ve Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne ayrıca teşekkür ederim.

Arş. Gör. Oğuz Emre GÜL

MERSİN / 2012

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ÖZET	xv
ABSTRACT	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Karaciğer Sirozu.....	3
2.1.1. Karaciğer Sirozu Etiyolojisi.....	3
2.1.2. Karaciğer Sirozu Patogenezi ve Fibrozis.....	4
2.2. Apoptozis.....	6
2.2.1. Apoptozis Kavramı.....	6
2.2.2. Apoptozisin Morfolojisi.....	7
2.2.3. Apoptozis ve Nekrozis Arasındaki Farklar.....	8
2.2.4. Apoptozis Mekanizması ve Yol İzleri.....	9
2.2.4.1. Mitokondri Aracılı (İntrensek) Yol İzi	9
2.2.4.2. Ölüm Reseptörleri (Ekstrensek) Yol İzi	10
2.2.4.3. Endoplazmik Retikulum Yol İzi	11

2.2.5. Apoptozisin Genetik Kontrolü.....	12
2.2.5.1. Mediyatörler.....	12
2.2.5.1.1. Kaspaz-3.....	15
2.2.5.1.2. Kaspaz-8.....	16
2.2.5.1.3. Kaspaz-9	17
2.2.5.2. Kaspaz İnhibitörleri	17
2.2.5.3. Antiapoptotik Proteinler.....	19
2.2.5.3.1. Bcl-2 Ailesi	19
2.2.5.3.2. p53.....	20
2.2.5.3.3. c-Myc.....	21
2.2.5.4. Proapoptotik Proteinler.....	21
2.3. TGF - Dönüştürücü büyüme faktörü (Transforming Growth Factor).....	21
2.3.1 TGF- α	22
2.3.2. TGF- β Süper Ailesi.....	22
2.3.2.1. TGF- β Ailesi Reseptörleri ve Sinyal İletimi.....	23
2.3.2.2. Smad Proteinleri.....	25
2.3.2.2.1. Smad Proteinlerinin Sınıflandırılması.....	25
2.3.2.2.2. Smad Proteinlerinin Aktivasyonu ve İnhibisyonu.....	26
2.3.2.3. TGF- β / Smad Sinyal iletiminin Düzenlenmesi.....	27
2.4. SB-431542.....	27
2.5. Oksidatif Stres ve Antioksidan Sistem.....	28
3. GEREÇ VE YÖNTEM	30
3.1. Gereçler	30

3.1.1. Cihazlar	30
3.1.2. Sarf Malzemesi ve Kimyasal Maddeler	31
3.2. Deneý Hayvanlarının Seçimi ve Temini	32
3.3. Çalışma Grupları	32
3.4. Çalışma Örneklerinin Hazırlanışı	34
3.4.1. Doku Örnekleri	34
3.5. Analiz Yöntemleri	34
3.5.1. Biyokimyasal Analizler	34
3.5.1.1. Apoptozis Belirteçlerinin İncelenmesi	34
3.5.1.1.1. Kaspaz-3,8,9 Gen Ekspresyon Ölçüm Yöntemi	34
3.5.1.2. TGF- β Sitokin Ölçüm Yöntemi.....	35
3.5.1.3. Antioksidan Kapasitenin İncelenmesi	35
3.5.1.3.1. Doku GSH Ölçümü	35
3.5.1.3.2. Doku SOD Ölçümü	36
3.5.1.3.3. Doku CAT Ölçümü	40
3.5.1.3.4. Doku MDA Ölçümü	42
3.5.1.3.5. Lowry Yöntemi ile Protein Tayini	43
3.5.2. Histopatolojik İnceleme	45
3.5.3. İstatistiksel Analizler	45
4. BULGULAR	46
4.1. Biyokimyasal Bulgular	46
4.1.1. Apoptozis Belirteçlerine Ait Bulgular	46
4.1.1.1. Kaspaz-3 Gen Ekspresyon Düzeyi	46
4.1.1.2. Kaspaz-8 Gen Ekspresyon Düzeyi	48

4.1.1.3. Kaspaz-9 Gen Ekspresyon Düzeyi	48
4.1.2. TGF- β 1 Düzeyleri.....	50
4.1.3. Antioksidan Kapasite	51
4.1.3.1. Doku GSH Düzeyleri	51
4.1.3.2. Doku SOD Aktivitesi	53
4.1.3.3. Doku CAT Aktivitesi	54
4.1.3.4. Doku MDA Düzeyleri	56
4.2. Karaciğer Dokularına Ait Bulgular	57
4.2.1. Karaciğer Dokularına Ait Histopatolojik Bulgular	57
5. TARTIŞMA	62
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	69
7. KAYNAKLAR	70
ÖZGEÇMİŞ	79

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Normal ve fibrotik karaciğer hücre yapılarının ayrımı	5
Şekil 2.2. Apoptosis sırasında hücrede görülen morfolojik değişimler	8
Şekil 2.3. Apoptotik yol izleri	12
Şekil 2.4. Prokaspaz ve aktif kaspazın yapısı	14
Şekil 2.5. TGF- β Ailesi Reseptörleri ve Sinyal İletimi	24
Şekil 2.6. SMAD Ailesi	26
Şekil 2.7. SB-431542	27
Şekil 4.1. Apoptotik belirteçler olan kaspaz-3,8,9 gen ekspresyonlarının gruplar arası karşılaştırmada gösterdiği değişimlerin bar grafik olarak gösterimi.....	47
Şekil 4.2. TGF- β 1 düzeylerinin gruplar arası değişimlerinin bar grafik olarak gösterimi.....	51
Şekil 4.3. GSH düzeylerinin gruplar arası değişiminin bar grafik olarak gösterimi.....	52
Şekil 4.4 SOD enzim aktivitesinin gruplar arası değişiminin bar grafik olarak gösterimi.....	54
Şekil 4.5. CAT enzim aktivitesinin gruplar arası değişiminin bar grafik olarak gösterimi	55
Şekil 4.6. MDA enzim aktivitesinin gruplar arası değişiminin bar grafik olarak gösterimi	57
Şekil 4.7. Kontrol grubundaki sıçanların karaciğer dokularına ait HE boyamalarının fotomikrograf görüntüleri.....	58
Şekil 4.8. Siroz grubundaki sıçanların karaciğer dokularına ait HE boyamalarının fotomikrograf görüntüleri.....	58
Şekil 4.9. DMSO grubundaki sıçanların karaciğer dokularına ait HE boyamalarının fotomikrograf görüntüsü.....	59
Şekil 4.10. Siroz+SB431542 (I) grubundaki sıçanların karaciğer dokularına ait HE boyamalarının fotomikrograf görüntüleri.....	59

Şekil 4.11. Siroz+SB431542 (II) grubundaki sıçanların karaciğer dokularına ait HE boyamalarının fotomikrograf görüntüleri.....	60
Şekil 4.12. Siroz sonrasında+SB431542 (I) grubundaki sıçanların karaciğer dokularına ait HE boyamalarının fotomikrograf görüntüsü.....	60
Şekil 4.13. Siroz sonrasında+SB431542 (II) grubundaki sıçanların karaciğer dokularına ait HE boyamalarının fotomikrograf görüntüsü.....	61

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Karaciğer sirozunun nedenleri	3
Çizelge 2.2. Türkiye’de karaciğer sirozu nedenlerinin yüzde oranları	4
Çizelge 2.3. Apoptozis ve nekroz arasındaki farklar	9
Çizelge 4.1. Apoptotik belirteçlerden olan kaspaz-3 gen ekspresyon düzeyinin her bir gruba göre değişimi.....	47
Çizelge 4.2. Apoptotik belirteçlerden olan kaspaz-8 gen ekspresyon düzeyinin her bir gruba göre değişimi.....	48
Çizelge 4.3. Apoptotik belirteçlerden olan kaspaz-9 gen ekspresyon düzeyinin her bir gruba göre değişimi.....	49
Çizelge 4.4. TGF- β 1 düzeylerinin gruplar arasındaki değişimi.....	50
Çizelge 4.5. GSH düzeylerinin gruplar arasındaki değişimi.....	52
Çizelge 4.6. SOD enzim aktivitesinin gruplar arasındaki değişimi.....	53
Çizelge 4.7. CAT enzim aktivitesinin gruplar arasındaki değişimi.....	55
Çizelge 4.8. MDA düzeylerinin gruplar arasındaki değişimi.....	56

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

$\cdot\text{OH}$	Hidroksil radikali
$^1\text{O}_2$	Singlet oksijen
Ac-DEVD-pNA	N-asetil-Asp-Glu-Val-Asp paranitroanilin
Ac-IETD-pNA	N-asetil-Ile-Glu-Thr-Asp-paranitroanilin
Ac-LEHD-pNA	N-asetil-Leu-glu-His-Asp-paranitroanilin
AI	Apoptotik indeks (Apoptotic index)
AICD	<i>Activation induced cell death</i>
AIF	Apoptozis indükleyici faktör (<i>Apoptosis-inducing factor</i>)
ALK4	Aktivin reseptörü benzeri kinaz 4 (<i>activin-receptor-like kinase</i>)
ALK5	Aktivin reseptörü benzeri kinaz 5 (<i>activin-receptor-like kinase</i>)
ALK7	Aktivin reseptörü benzeri kinaz 7 (<i>activin-receptor-like kinase</i>)
Apaf-1	Apoptotik proteaz aktive edici faktör 1 (<i>Apoptotic protease activating factor 1</i>)
Bax	Bcl-2 ilişkili X proteini (<i>Bcl-2-associated X protein</i>)
Bcl-2	B hücreli lenfoma 2 (<i>B-cell leukemia/lymphoma 2</i>)
BH1	Bcl-2 homoloji alanı 1 (<i>Bcl-2 homology-1</i>)
Bid	Bcl-2 ile etkileşen protein (<i>Bcl-2 interacting protein</i>)
bp	Baz çifti (<i>Base Pairs</i>)
BT	Bilgisayarlı Tomografi
CAD	Kaspazla aktive olan DNaz (<i>Caspase Activated DNase</i>)
CARD	Kaspazları organize eden bölge

	<i>(Caspase recruitment domain)</i>
CAT	Katalaz (<i>Catalase</i>)
Crm A	Sitokin yanıtı değiştirici A (<i>Cytokine response modifier A</i>)
CTL	Sitotoksik T lenfositler (<i>Cytotoxic T lymphocytes</i>)
DD	Ölüm Bölgesi (<i>Death Domain</i>)
DED	Ölüme yardımcı olan bölge (<i>Death effector domain</i>)
DEN	N-nitrozodietilamin
DFF	DNA fragmantasyon faktörü (<i>DNA Fragmentation Factor</i>)
DISC	Ölümü uyaran sinyal kompleksi (<i>Death inducing signalling complex</i>)
DNA-PK _{cs}	DNA-bağımlı protein kinaz'ın katalitik alt ünitesi
DR	Ölüm Reseptörü (<i>Death Receptor</i>)
DR3	Ölüm Reseptörü 3 (<i>Death receptor-3, TRAMP/WSL-1/APO3/LARD</i>)
DR4	Ölüm Reseptörü 4 (<i>Death receptor4, TRAIL-R1</i>)
DR5	Ölüm Reseptörü 5 (<i>Death receptor-5, APOP2/TRAIL-R2/KILLER</i>)
DR6	Ölüm Reseptörü 6 (<i>Death receptor-6</i>)
<i>eNOS</i>	Endotelyal nitrik oksit sentaz (<i>Endothelial nitric oxide synthase</i>)
ER	Endoplazmik Retikulum (<i>Endoplasmic reticulum</i>)
<i>ESI MS</i>	Elektrosprayİyonizasyon Kütle Spektrometrisi (<i>Electrospray Ionisation MS</i>)
FADD	Fas ile ilişkili ölüm bölgesi (<i>Fas associated death domain</i>)
FasL	Fas ligand
GR	Glutasyon redüktaz (<i>Glutathione reductase</i>)

GSH	İndirgenmiş glutatyon (<i>Glutathione</i>)
GST	Glutatyon S transferaz (<i>Glutathione S-transferase</i>)
GSH-Px	Glutatyon peroksidaz (<i>Glutathione Peroxidase</i>)
GTP	Guanozin trifosfat
HE	Hematoksilen (<i>Hematoxylin</i>)
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit (<i>Hydrogen Peroxide</i>)
HBV	Hepatit B virüsü
HCA	Hepatosellüler adenom (<i>Hepatocellular adenoma</i>)
IAP	Apoptozisi inhibe eden protein (<i>Inhibitors of apoptosis protein</i>)
ICE	İnterlökin-1-beta dönüştürücü enzim (<i>Interleukin-1β-Converting Enzyme</i>)
IGF-1	İnsülin benzeri büyüme faktörü 1 (<i>Insulin-like growth factor-1</i>)
JAK	Janus kinaz (<i>Janus kinase</i>)
Kb	Kilo baz
MDA	Malondialdehit
Mdm2	<i>Murine double minute 2 protein</i>
MPTP	Mitokondriyal permeabilite geçiş poru (<i>Mitochondrial permeability transition</i>)
MR	Manyetik Rezonans
NF- κ B	Nükleer faktör kappa B
NGF-reseptör	Sinir büyüme faktör reseptörü (<i>Nerve Growth Factor receptor</i>)
NO [*]	Nitrik oksit radikali
NuMA	Nükleer Mitotik Protein Aparatı (<i>Nuclear Mitotic Apparatus Protein</i>)

O ₂	Moleküler oksijen
O ₂ ^{•-}	Süperoksit radikali
ONOO ⁻	Peroksinitrit
PARP	Poli ADP Riboz Polimeraz (<i>Poly ADP-ribose polymerase</i>)
pNA	p-nitroanilitin
PS	Fosfatidilserin (<i>Phosphatidyl serine</i>)
RNT	Reaktif nitrojen türleri (<i>Reactive nitrogen species</i>)
ROT	Reaktif oksijen türleri (<i>Reactive oxygen species</i>)
SARA	Reseptör aktivasyonu için SMAD çapası (<i>Smad anchor for receptor activation</i>)
Smac/DIABLO	İkinci mitokondri kaynaklı kaspaz aktivatörü/Doğrudan AIP'e bağlanan düşük pI'lı protein (<i>Second Mitochondrial derived Activator of Caspase/Direct inhibitor of Apoptosis- Binding protein with Low pI</i>)
SOD	Süperoksit dismutaz (<i>Superoxide dismutases</i>)
TGF-β	Transföme edici büyüme faktörü beta (<i>Transforming growth factor-beta</i>)
TNF-α	Tümör nekroz faktör alfa (<i>Tumour necrosis factor alpha</i>)
TRADD	TNF reseptörü ile ilişkili ölüm bölgesi (<i>TNF receptor associated death domain</i>)
TRAF2	TNF reseptörü ile ilişkili faktör2 (<i>TNF receptor associated factor2</i>)
TRAIL	TNF ilişkili apoptozis uyarıcı ligand (<i>TNF related apoptosis-inducing ligand</i>)
XOD	Ksantin oksidaz

ÖZET

Karaciğer Siroz Modeli Oluşturulmuş Sıçanlarda TGF- β Tip 1 Reseptör Kinaz İnhibitörü, SB431542'nin Apoptozis Üzerine Etkisi

Karaciğer sirozu gelişiminde, artmış hücre proliferasyonunun yanı sıra, azalmış apoptozis hızının katkısı olduğu da bilinmekte ve apoptozisi uyarıcı yönde yeni tedavi edici stratejiler geliştirilmektedir. Bu çalışmada, karsinojen bir ajan olan N-nitrozodietilamin ile deneysel karaciğer sirozu oluşturuldu. Karaciğer sirozunda apoptozis mekanizması ve TGF- β Tip I Reseptör Kinaz İnhibitörü, SB-431542'in karaciğer sirozu üzerindeki etkisinin araştırılması amaçlandı. Kontrol, Siroz, DMSO, Siroz+SB-431542 (I) (250 μ g/kg/hafta), Siroz+SB-431542 (II) (500 μ g/kg/hafta), Siroz sonrasında+SB431542 (I) (250 μ g/kg/hafta) ve Siroz sonrasında+SB431542 (II) (500 μ g/kg/hafta) olmak üzere 7 farklı çalışma grubu oluşturuldu. Çalışmada 13. hafta sonunda Kontrol, Siroz, DMSO, Siroz+SB-431542(I) (250 μ g/kg/hafta) ve Siroz+SB-431542(II) (500 μ g/kg/hafta) gruplarındaki sıçanlar öldürüldü. Siroz oluştuktan sonra+SB431542(I) (250 μ g/kg) ve Siroz oluştuktan sonra+SB431542(II) (500 μ g/kg/hafta) gruplarına ise 13. haftadan itibaren 9 hafta boyunca SB431542 verilmeye başlandı ve 22. hafta sonunda bu gruplardaki sıçanlarda öldürüldü. Karaciğer sirozunda apoptotik yol izinin belirteci olarak kaspaz -3, -8 ve -9 gen ekspresyon düzeyleri RT-PCR ve TGF- β 1 sitokin düzeyleri ise ELİSA yöntemi ile belirlendi. Antioksidan kapasiteyi araştırmak için ise süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) enzim aktiviteleri, redükte glutatyon (GSH) ve malondialdehit (MDA) düzeyleri kolorimetrik yöntemler ile belirlendi. Bu çalışmada karaciğer sirozu oluşumuyla apoptozisin azaldığı, siroz sonrası uygulanan SB431542 250 μ g/kg/hafta ile ise apoptozisi indüklediği saptandı. Karaciğer sirozunda oksidatif stresin ve TGF- β 1 sitokin düzeylerinin de arttığı ve bu parametrelerin siroz sonrası uygulanan SB431542 250 μ g/kg/hafta ile azaldığı gözlemlendi. Histopatolojik incelemeler sonucunda yine siroz sonrası uygulanan 250 μ g/kg/hafta SB431542 sirozu tedavi ettiği saptandı. Bu olumlu etkiler SB431542'nin diğer uygulamalarında gözlenmedi. Sonuç olarak; siroz sonrasında SB431542 250 μ g/kg/hafta uygulamasının karaciğer sirozu tedavisinde umut verici bir yaklaşım olabileceği öne sürülebilir.

Anahtar kelimeler: Karaciğer sirozu, apoptozis, kaspaz, SB-431542, TGF- β 1

ABSTRACT

Effect of TGF- β Type 1 Receptor Kinase Inhibitor, SB431542 on Apoptosis in Model of Liver Cirrhosis in Rats

It is well known that increased cell proliferation and as well as decreased apoptosis rate contributes to the development of liver cirrhosis and therefore new therapeutic strategies are being developed in stimulation of apoptosis. In this study, experimental liver cirrhosis had been developed by N-nitrozodietilamin, a carcinogenic agent. We aimed to determine the apoptotic mechanisms in liver cirrhosis and the effect of the TGF- β type I receptor kinase inhibitor, SB-431542's on liver cirrhosis. 7 groups were included as Control, Cirrhosis, DMSO, Cirrhosis+SB431542(I)(250 μ g/kg/week), Cirrhosis+SB-431542(II)(500 μ g/kg/week), after Cirrhosis +SB-431542(I) (250 μ g/kg/week), and after Cirrhosis +SB431542(II) (500 μ g/kg/week). Control, Cirrhosis, DMSO, Cirrhosis+SB431542(I) (250 μ g/kg/week), and Cirrhosis + SB-431542(II) (500 μ g/kg/week) groups were killed at the end of 13 week. After 13 weeks SB-431542 was administered for 9 weeks to rats included after Cirrhosis +SB-431542(I) (250 μ g/kg/week), and after Cirrhosis +SB431542(II) (500 μ g/kg/week) groups and these were killed at the end of 22th weeks. Apoptosis was evaluated by measurement of caspase -3, -8 and -9 gene expression by RT-PCR and cytokine TGF- β 1 levels were determined by ELISA kits. Antioxidant capacity was evaluated by measurement superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) enzyme activities and the levels of reduced glutathione (GSH) and malondialdehyde by colorimetric methods. In this study, suppressed apoptosis was altered by administration of SB431542 250 μ g/kg/week after cirrhosis. Oxidative stress and cytokine TGF- β 1 levels were increased in liver cirrhosis and it was decreased by administration of SB431542 250 μ g/kg/week after cirrhosis. And also histopathological findings indicated that administration of SB431542 250 μ g/kg/week after cirrhosis had recovery effect. These positive effects have not been observed in other application of SB431542. As a result; administration of SB431542 250 μ g/kg/week after cirrhosis may be a promising approach in liver cirrhosis therapy.

Key Words: Cirrhosis of the liver, apoptosis, caspase, SB-431542, TGF- β 1

1. GİRİŞ

Karaciğer sirozu, hepatositlerde meydana gelen inflamasyon, nekroz ve hücreler arası matriks materyalinin aşırı artmasıyla oluşan yaygın fibrozis ve nodül oluşumu ile karakterize, yaygın ve ilerleyici bir karaciğer hastalığıdır (1-5). Gerek ülkemizde gerek dünyada en büyük sağlık sorunlarından biri olan karaciğer sirozunun başlıca iki nedeni vardır; bunlar kronikleşen viral hepatitler ve alkoldür. Batı ülkelerinde karaciğer sirozuna yol açan en önemli neden alkolken uzakdoğu, ortadoğu ve bu kuşakta yer alan ülkemizde ise viral hepatitlerdir (6).

Apoptozis ilk kez 1972 yılında Kerr tarafından hücre ölümünün farklı bir morfolojisi olarak tanımlanmıştır. Memeli hücrelerinde apoptozis, hücre içi ya da dışı sinyallerle uyarılan ve birbirini takip eden olaylar zincirinden oluşan 2 farklı yol izini içeren bir süreçtir. Bunlardan birincisi olan ekstrinsek yol izi; Fas ligand (FasL), tümör nekroz faktör alfa (TNF- α) veya TNF ilişkili apoptozis indükleyen ligand (TRAIL) gibi hücre zarında bulunan reseptör aracılığı ile, ikincisi olan intrinsek yol izi ise mitokondriden salınan sitokrom c'nin tetiklediği kaspaz aktivasyon yol izi olarak tanımlanmaktadır (7,8).

TGF- β ailesi birçok alt gruba sahip olduğu için süperaille olarak isimlendirilir. Polipeptid bir yapı gösteren TGF- β süperaillesi ekstrasellüler matriks oluşumu, hücre siklusunun kontrolü, erken gelişimin regülasyonu, differansiyasyon, hematopoezis, anjiogenezis, immün fonksiyonlar, kemotaksis ve apoptozis gibi birçok mekanizmanın düzenlenmesinde rol oynayan çok işlevli bir sitokin ailesidir. TGF- β reseptör tip I aktivitesindeki aşırı artışlar başta karaciğer olmakla birlikte akciğer, böbrek ve diğer bazı organlarda dokulararası matriksin aşırı üretimine neden olur. Dokulararası matriksin aşırı artması dokularda fibroz oluşumuna, fibrozun ilerlemesi de karaciğer sirozuna neden olmaktadır (9-11).

Karaciğer sirozunda karaciğer dokularındaki değişimleri önlemek amacı ile farklı mekanizmalar ile apoptozisi uyarıcı yönde yeni tedavi olanakları geliştirilmektedir. Karaciğer sirozu oluşumunda hücre proliferasyonu ve apoptozis arasındaki denge çok önemlidir. Bu nedenden dolayı siroz patogenezinde yer alan apoptozis ile ilgili mekanizmanın, özellikle siroz gelişiminin de içinde bulunduğu

yaygın birçok yol izindeki genetik ve moleküler değişikliklerin bilinmesi, sirozun tanı ve tedavisi açısından oldukça önem arz etmektedir (8).

SB-431542 sentez maddesi, TGF- β Tip 1 reseptör kinaz inhibitörüdür. İnhibisyon mekanizmasını özellikle Aktivin reseptörü benzeri kinaz 5 (ALK5), Aktivin reseptörü benzeri kinaz 4 (ALK4) ve Aktivin reseptörü benzeri kinaz 7 (ALK7) üzerinden gerçekleştirir. ALK5, ALK4 ve ALK7'nin güçlü ve selektif bir inhibitörü olarak tanımlanabilmektedir. Elde edilen bazı verilere göre özellikle osteosarkom üzerinde antimikrobiyal ve antitümör aktiviteleri olduğu ortaya konmuştur (12). Çalışmamızda SB-431542'nin karaciğer sirozu üzerindeki etkisini inceleyerek yeni tedavi stratejilerine olanak sağlamayı amaçladık.

Bu çalışmada, kimyasal karsinogenezde karaciğerin primer indükleyicisi olan N-nitrozodietilamin (DEN) ile deneysel karaciğer sirozu oluşturmayı planladık. Sırasıyla Kontrol, Siroz, Siroz+DMSO, Siroz+SB431542 (I) (250 μ g/kg/hafta), Siroz+SB431542 (II) (500 μ g/kg/hafta), Siroz oluştuktan sonra+SB431542 (I) (250 μ g/kg/hafta) ve Siroz oluştuktan sonra+SB431542 (II) (500 μ g/kg/hafta) olmak üzere 7 farklı deney grubunun oluşturuldu. Bu çalışmamızda gerek karaciğer sirozu oluşum sürecinde gerekse karaciğer sirozu oluştuktan sonra uygulanan TGF- β Tip 1 Reseptör Kinaz İnhibitörü, SB431542'in apoptozis üzerine etkisini araştırmayı planladık. Bu amaçla, apoptotik mekanizmanın belirteçleri olan kaspaz-3, -8 ve -9 aktiviteleri ile TGF- β sitokin değerleri ve ayrıca oksidatif stresin karaciğer sirozunda arttığını kanıtlayan bilgiler ışığında antioksidan sistemde yer alan glutatyon (GSH) miktarı, süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) enzim aktiviteleri ile lipit peroksidasyonunun bir göstergesi olarak malondialdehit (MDA) düzeylerini saptamayı planladık.

Bu çalışmadan elde edilecek bilgiler sonucunda karaciğer sirozu oluşumu süresince ve sonrasında, TGF- β Tip 1 Reseptör Kinaz inhibitörü, SB431542'nin antifibrotik etkisi araştırılarak bu maddenin siroz tedavisinde kullanımını açısından bir ön çalışma yapılmış olacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.Karaciğer Sirozu

Karaciğer sirozu, hepatositlerde meydana gelen inflamasyon ve nekroz, hücreler arası matriks materyalinin aşırı artmasıyla oluşan yaygın fibrozis ve nodül teşekkülü ile karakterize, yaygın ve ilerleyici bir karaciğer hastalığıdır (1-5). Siroz sözcüğü eski Yunancada turuncu anlamına gelen ‘‘scirrhus’’ kelimesinden türemiş ve İngilizce literatürlerde ‘‘cirrhosis’’ olarak kullanılmaya başlanmıştır. Sözcüğü ilk kullanan kişi Fransız bilim adamı René-Théophile-Hyacinthe Laennec’tir. Laennec sirozlu bir hastanın otopsi bulgularını makroskobik olarak incelediğinde karaciğerin normal boyutundan küçük olduğunu ve turuncumsu bir renk aldığını fark etmiş ve bunlara ek olarak bazı irili ufaklı nodüllerin varlığından bahsetmiştir. Karaciğer’in bu makroskobik görünümünden yola çıkan Laennec turuncu renginden dolayı hastalığı ‘‘scirrhus’’ olarak isimlendirmiştir (4,13).

2.1.1. Karaciğer Sirozu Etiyolojisi

Gerek ülkemizde gerek dünyada en büyük sağlık sorunlarından biri olan ölümcül karaciğer sirozunun başlıca iki nedeni vardır; bunlar kronikleşen viral hepatitler ve alkoldür. Batı ülkelerinde karaciğer sirozuna yol açan en önemli neden alkolken uzakdoğu, ortadoğu ve bu kuşakta yer alan ülkemizde ise viral hepatitlerdir (6). (Çizelge 2.1, Çizelge 2.2) (4).

Çizelge 2.1. Karaciğer sirozunun nedenleri

<ul style="list-style-type: none">• Kronik viral hepatitler (B,C,Delta)• Alkol• Otoimmün Hastalıklar• İlaç ve toksinler• Otoimmün hepatitler	<ul style="list-style-type: none">• Bilier sistem hastalıkları<ul style="list-style-type: none">- Primer biliyer siroz (PBC)- Ekstrahepatik biliyer obstrüksiyon- Sklerozan kolanjit- Venookluziv hastalık- Budd-Chiari sendromu- Sarkoidoz- Sifilis	<ul style="list-style-type: none">• Metabolik Hastalıklar<ul style="list-style-type: none">-Hemokromatozis-Wilson Hastalığı-Glikojen Depo Hastalığı-Kalp yetersizliği-Mikotoksinler Schistosomiazis-Kriptojenik Siroz
---	---	---

(Çizelge 2.1 4’ nolu kaynakatan alınarak düzenlenmiştir).

Çizelge 2.2. Türkiye’de karaciğer sirozu nedenlerinin yüzde oranları

Viral Hepatitler (B,C,Delta)	%60
Alkol	%11
Alkol ile birlikte viral hepatitler	%4
Diğer Nedenler	%9
Kriptojenik	%16

(Çizelge 2.2 4’ nolu kaynaktan alınarak düzenlenmiştir).

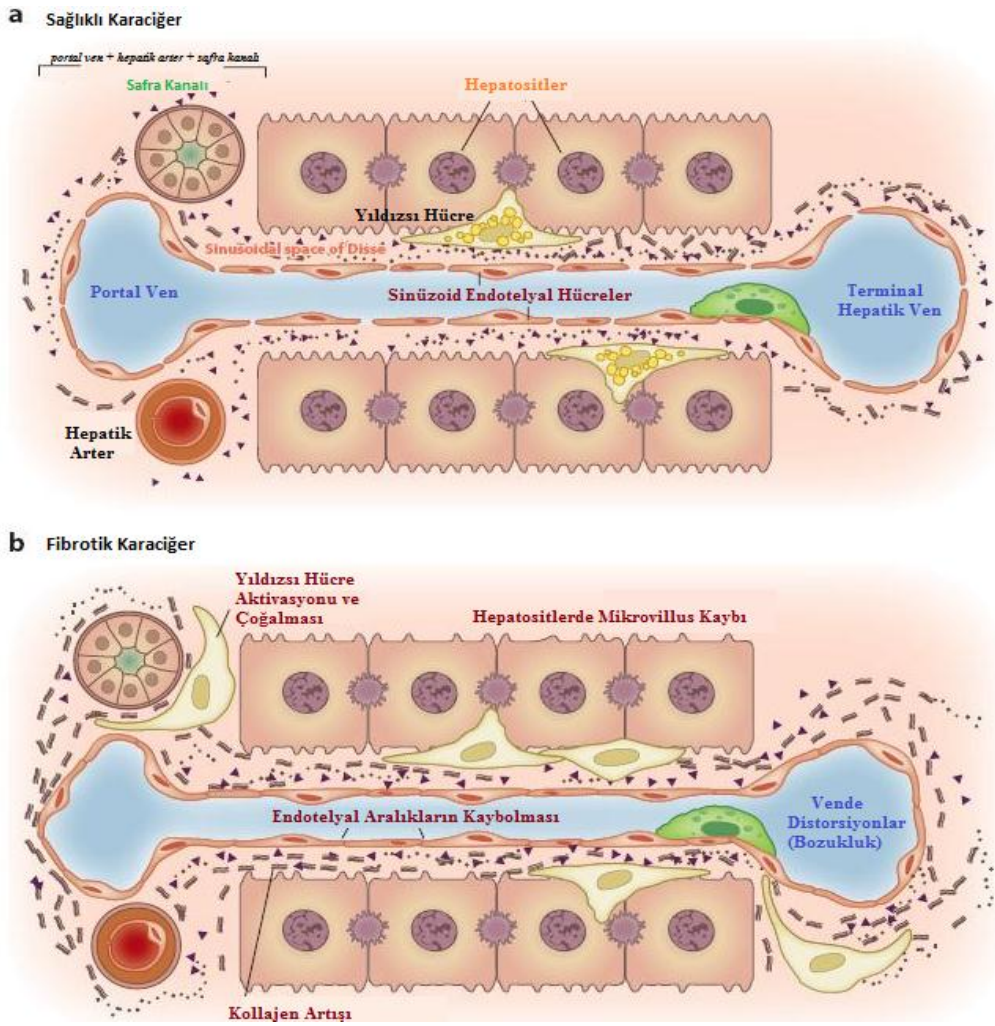
2.1.2. Karaciğer Sirozu Patogenezi ve Fibrozis

Çeşitli nedenlere bağlı olarak gelişen kronik karaciğer hastalıkları son dönemlerine girdiklerinde karaciğer sirozu gelişir (14). Karaciğer sirozu bazı karakteristik özelliklere sahiptir. İlk olarak karaciğer dokusunda bantlar veya lobüllerin yerini alan ve geniş nedbe dokusu halinde köprülesen fibröz bantların oluşumu gözlenir. Daha sonra fibrotik bantlar tarafından çevrelenmiş hepatositlerin rejenerasyonundan kaynaklanan mikronodüler veya makronodüler parenkimal nodüller ve tüm (total) karaciğerde genel yapı bozukluğu oluşur (1,2).

Çeşitli nedenlere bağlı olarak gelişen kronik karaciğer hasarı karaciğer sirozunun başlatıcı nedenidir. Oluşan bu hasara karaciğer dokusu kayıtsız kalmaz ve fibrozis olgusu gelişir (5). Sağlıklı bir karaciğerde Disse aralığında Tip IV kollajen ve diğer proteinlerden oluşan ince bir çatı yer alırken, sirozda ise bu bölgede Tip I ve Tip III kollajen ve diğer ekstraselüler matriks komponentleri birikir (Şekil 2.1.) (15). Karaciğerde oluşan fibröz bantlar hepatosit gruplarını nodüllere ayırır ve subendotelyal kollajen birikimi nedeniyle sinüzoidler ile hepatositler arası madde alışverişi bozulur. Perisinüzoidal yıldızlı hücreler karaciğer sirozunda artan kollajenin başlıca kaynağıdır (5,17,18). İşlevi A vitamini ve yağ depolamak olan bu hücreler, fibrozis gelişimi sırasında aktiflenerek miyofibroblast benzeri hücrelere dönüşür ve düz kas α -aktini gibi proteinleri eksprese etmeye başlar (18). Serbest radikaller, büyüme faktörleri, sitokinler, transforme edici büyüme faktörü- β (TGF- β), interlökinler, peroksizom proliferatör aktive reseptörü- γ (PPAR- γ) ve leptinin, yıldızlı hücrelerin aktivasyonunu ve kollajen sentezini başlatan uyarılar olduğu düşünülmektedir (5,17,18).

Gerek dünyada gerek ülkemizde ölümcül hastalıkların başında gelen karaciğer sirozunun önlenmesi ya da en azından ilerleyişinin durdurulması ve oluşan lezyonların

giderilebilmesi son derece önemlidir. Hastalığın genel klinik tedavi yaklaşımı alkol alımının engellenmesi, antiviral tedaviler gibi direk olarak hastalığa değil hastalığın altında yatan nedenlere yönelik bir tutum içindedir. Bununla birlikte karaciğer sirozunun son döneminde tek tedavi seçeneği olan karaciğer nakli de olumsuzluklarla sonuçlanabilmektedir (19,20). Bu nedenle karaciğer fibrozisinin daha erken dönemlerinde ekstraselüler matriks sentezini önlemeye yönelik tedavi yaklaşımları ile ilgili çalışmalar büyük önem arz etmektedir.



Şekil 2.1. Normal ve fibrotik karaciğer hücre yapılarının ayrımı (15'nolu kaynaktan alınarak düzenlenmiştir).

2.2. Apoptozis

2.2.1. Apoptozis Kavramı

İlk kez 1972 yılında Kerr ve arkadaşları tarafından hücre ölümünün farklı bir morfolojisi olarak tanımlanan apoptozis, programlanmış hücre ölümü olarakta bilinmektedir (21,22). Gelişmiş organizmalarda gereksinimi duyulmayan ve işlevleri bozulan hücrelerin çevreye zarar vermeden genetik olarak kendilerini yok etmesi esasına dayanan apoptozis kavramı bu sebepten ötürü hücre intiharı olarakta tanımlanabilmektedir (23). Apoptozis kelimesinin kökeni Yunancadan gelmektedir; Apo: ayrı, ptozis: düşen anlamındadır (24). Apoptozis mekanizması ağaçların yaprak dökmesine benzetilmiş ve mitoz karşıtı bir olgu olduğu vurgulanmaya çalışılmıştır (22,25).

Apoptozis, organizmalarda gerek fizyolojik gerekse patolojik durumlarda rol oynayan ve metabolizma açısından hayati önem taşıyan bir olgudur (26). Fizyolojik olarak embriyolojik gelişim sürecinde görülen fetüsün el ve ayak parmakları arasındaki zarın ortadan kalkması, cinsel gelişimde duktus sistemlerinin gerilemesi, omuriliğin olgunlaşması, yetişkinlerde menstrual döngüde endometrium hücrelerinin yıkımı, laktasyon sonrası meme bezlerinin rejenerasyonu gibi durumlar gözlenmektedir (27,28). Apoptozis, organogenezin yanısıra organizmadaki hücre sayısının da sabit tutulmasını sağlar. Yine T lenfositler ve B hücrelerinde olgunlaşan immünoglobulinlerden etkisiz olanlar yada zarar verebilecek potansiyele sahip olanlar dolaşıma girmeden yok edilirler (29).

Apoptozis/proliferasyon dengesinin sağlıklı bir şekilde sürdürülebilmesi ile doku homeostazinin düzeni sağlanır. Bu denge bozulursa neoplazi ve organ fonksiyonlarında bozulmalar meydana gelmektedir (24,30).

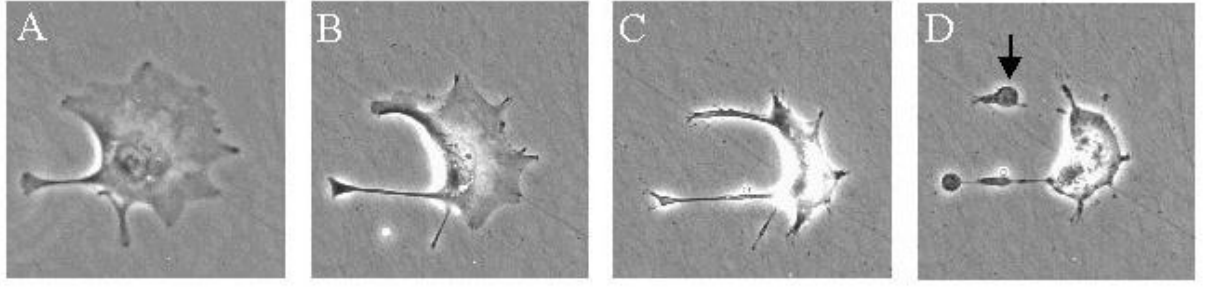
Apoptozis mekanizmasında görülen düzensizlikler son yıllarda birçok hastalık ile ilişkilendirilerek hastalıkların gelişimini açıklama anlamında yeni bir bakış açısı getirmiştir. Toksik nedenli karaciğer hasarları, Miyokard infarktüsü (MI), Alzheimer, Parkinson ve AIDS artmış apoptozisle ilişkili hastalıklardır (25). Apoptozis azalmasına bağlı olarak ise; viral enfeksiyonlar ile oluşan karaciğer hastalıkları, deri hastalıkları, göz hastalıkları, akciğer hastalıkları, otoimmün hastalıklar, ateroskleroz ve kanser arasında ilişki kurulmaktadır (25,31).

2.2.2. Apoptozisin Morfolojisi

Apoptozisi oluşturan morfolojik değişimler sitolojik ve biyokimyasal mekanizmaların yönetimi altındadır. Apoptotik morfolojiyi ; hücre büzülmesi, kromatin yoğunlaşması, çekirdeğin parçalanması ve apoptotik cisimcik olarak adlandırılan aktin bağımlı stoplazmik çıkıntılar oluşturarak hücreden ayrılması ile makrofajlar tarafından fagosite edilmesi basamaklarını içerir (32).

Apoptozis mekanizmasındaki süreç apoptotik yol izi, uyarım türü ve meydana geldiği hücrenin tipine bağlıdır. Ölüm mekanizmasındaki en önemli morfolojik değişim kromatin yoğunlaşması ve çekirdeğin parçalanmasıdır. Kromatin yoğunlaşması sonucu çekirdek, zar bütünlüğünü bozmadan karyoreksis olarak tanımlanan bir olay ile yapıdan ayrılır (33). Bu morfolojik özellikler kaspazlar tarafından farklı proteinlerin kırılması ile başlatılmaktadır. Apoptozisin en önemli özelliği çift iplikli DNA'nın internükleozomal bölgelerden 180-200 baz çifti (bp) uzunluğunda parçalara ayrılmasıdır. Bu parçalanmadan sorumlu proteinler; DNA'yı parçalara ayıran faktör 40 (DNA fragmentatiton factor, DFF 40) ve Kaspaz aktive edici DNaz'dır (Caspase-activated DNase, CAD) (34).

Apoptoziste temel mekanizmayı; nükleusun kondensasyonu ve parçacıklara ayrılması oluşturur. Normal şartlar altında mikst kondens yapıda olan kromatin apoptozis sürecine girildiğinde süperkondens bir hal alarak, normalde diffüz bir görünüme sahip olmasına rağmen yerini kresentik bir görünüme bırakır (23). Bu aşamada floresan boyama ile DNA'nın boncuklar şeklinde görülmesinin nedeni; endonukleaz ile özgül şekilde internükleozomal bölgelerden, 180-200 bp büyüklüğünde parçalara ayrılmasıdır (35). Apoptozisin başlangıç evrelerinde; hücreler birbirinden ayrılırlar bunu takiben yüzey organellerini kaybeder ve büzülmeye başlarlar. Daha sonraki evrede ise plazma membranında tomurcuklanmalar başlar ve hücre, stoplazma ile çevrili kromatin parçalarından oluşan apoptotik cisimcikleri oluşturur (Şekil 2.2) (36). Oluşan apoptotik cisimcikler de makrofajlar ve komşu hücreler tarafından tanınarak fagosite edilirler (23).



Şekil 2.2. Apoptosis sırasında hücrede görülen morfolojik değişimler (36'nolu kaynaktan alınarak düzenlenmiştir).

2.2.3. Apoptozis ve Nekrozis Arasındaki Farklar

Hücrelerin ölüm mekanizmaları apoptozis ve nekrozistir. Birbirinden farklı morfolojik, biyokimyasal ve moleküler özellik göstermelerine karşın her ikisinde de düzenli olarak birbirini izleyen bu olayların sonucunda hücre ölümü meydana gelir (37).

Her iki yolda hücreyi ölüme götürürken etkenleri ve mekanizmaları birbirinden farklıdır. Apoptozis mekanizmasının çalışabilmesi için hücre içi ATP seviyesinin yüksek olması gerekirken, nekrozda fazladan enerjiye gerek yoktur. Buna bağlı olarak hücrenin apoptozis veya nekroz ile öleceğine hücre içi ATP seviyesi karar verir (24). Apoptoziste yaşlanmış, fonksiyonunu yitirmiş fazla üretilmiş, düzensiz gelişmiş veya genetik olarak hasarlı hücrelerin organizma için güvenli bir şekilde yok edilmeleri sağlanarak genetik açıdan da kontrollü bir şekilde bu işlem tamamlanırken nekrozda ağır hipoksi, aşırı ısı değişiklikleri ve toksinler gibi çeşitli fiziksel ve kimyasal etkenler sonucunda travmatik bir hücre ölümü gerçekleşir (38).

Morfolojik açıdan apoptozis ve nekrozis keskin çizgilerle birbirinden ayrılırlar. Nekrozda hücre aşırı sıvı birikimi sonucu şişer, mitokondrisi genişler, organallerde çözünmeler meydana gelir, plazma zarı bütünlüğü bozulur ve inflamasyon meydana gelir (27). Apoptoziste ise inflamasyon meydana gelmez, genetik olarak kontrollü bir şekilde mekanizma sürdürülür (24,27). Bu süreçte ilk olarak hücreler büzülür, hacmi azalır, plazma zarında tomurcuklanmalar oluşur (Çizelge 2.3.) (39). Daha sonra ise hücre apoptotik cisimciklere parçalanır. Bu cisimcikler makrofajlar ve komşu hücreler tarafından tanınıp fagosite edildiğinden dolayı da inflamasyon yanıtı oluşmaz (23,30).

Çizelge 2.3. Apoptozis ve nekroz arasındaki farklar

Apoptozis	Nekroz
Kromatin Kondensasyonu	Çekirdeğin şişmesi
Hücre küçülmesi	Hücrenin büyümesi ve şişmesi
Organel ve hücre membranlarının bütünlüğü	Organelerin bütünlüğünün bozulması
Komşu hücreler tarafından fagositoz	Hücrelerin parçalanması ve içeriklerinin çevreye dağılması
DNA fragmentasyonu	Enflamasyon

(Çizelge 2.3 39'nolu kaynaktan alınarak düzenlenmiştir).

2.2.4. Apoptozis Mekanizması ve Yol İzleri

Apoptozis mekanizması çeşitli hücre içi veya hücre dışı sinyallerle başlamaktadır (23,40). Apoptozis mekanizması; memeli hücreleri açısından incelendiğinde, tanımlanmış olan iki yol izi olduğu ortaya konmuştur. Bunlardan birincisi hücre zarında bulunan reseptör aracılı sinyal yol izi, diğeri ise mitokondriden salınan sitokrom c'nin tetiklediği kaspaz aktivasyon yol izidir. Bu yol izlerinden ölüm reseptörleri ile ilişkili olana "ekstresek yol izi" denir. Kaspaz aktivasyonu için gerekli kaspaz aktivatör proteinlerinin sitozole salınmasından sorumlu olan, mitokondrinin de katıldığı diğeri ise "intrensek yol izi" olarak bilinir (7,8).

Bunların dışında literatürlerde son zamanlarda yer bulan ve giderek hakkında daha fazla bilgi edinilmeye başlanan Endoplazmik Retikulum (ER) aracılı apoptozis mekanizması da bulunmaktadır (41).

2.2.4.1. Mitokondri Aracılı (İntrensek) Yol İzi

Apoptozis mekanizmasının düzenlenmesinde mitokondri önemli bir rol oynamaktadır. Sitokrom c normal şartlarda, mitokondrinin zarlar arası bölgesinde yer almaktadır ve ATP oluşumunda işlevi vardır. Proton (H^+) ve diğeri iyonlar iç mitokondri zarının her iki tarafında bir elektriksel yük oluşturacak şekilde asimetrik olarak dağılmıştır. Oksidatif stres, DNA hasarı, hücre içi kalsiyum miktarında artış, glukokortikoidler, sitokinler, hormon ve büyüme faktörleri yoksunluğu, kemoterapötik ajanların yarattığı etkiler sonucunda hücresel stres meydana gelebilir. Hücresel stres sonrasında apoptozise giden bir hücrede, mitokondrinin dış zarında, transmembran

potansiyelindeki gerileme sonucu zar geçirgenliği azalır ve iç membranda geçirgen geniş bir por oluşumu olan PT por “*permeability transition pore (PT)*” meydana gelir. Bu olayla birlikte mitokondrinin dış zarı parçalanır ve sitokrom c zarlar arası boşluğa salınır (36). Mitokondriden sitozole salınan sitokrom c, apoptozis mekanizmasının başlayabilmesi açısından çok önemli bir basamağı oluşturmaktadır. Nükleotid trifosfat ile aktive olan sitokrom c apoptotik proteaz aktive edici faktör-1 (Apaf-1) ile etkileşime girer ve prokaspaz-9’un agregasyonuna neden olur. Daha sonra sitokrom c, Apaf-1 ve prokaspaz-9 birleşerek apoptozom adı verilen çoklu protein kompleksi oluşturur. Bu kompleksin oluşumuyla birlikte kaspaz-9 aktive olur ve kaspaz kaskadının başlamasını sağlar (30,42-45).

İntrasellüler sinyalleri sayesinde intrinsek yol izi aracılı apoptozis mekanizmasını harekete geçiren diğer bir önemli faktörde TGF- β ‘dır. Tip I ve Tip II reseptör kinazların fosforillenmesi ve fosforlanan kinazların SMAD proteinlerini uyarılmasıyla oluşan bu sinyallerle birlikte apoptozis mekanizması çalışmaya başlar. TGF- β sinyal yolundaki değişiklikler insanda çeşitli kalıtsal hastalıkların oluşmasına özellikle kansere yol açabilmektedir (46).

2.2.4.2. Ölüm Reseptörleri (Ekstresek) Yol İzi

Kaspaz aktivasyonunu sağlayan ikinci yol izi ölüm reseptörleri (*Death Receptor*, DR) yol izidir. Bu yol izi; hücre yüzeyindeki ölüm reseptörlerinin, apoptotik sinyalleri aracılığı ile uyarılır. Bunlar; Fas (CD95,APO-1), tümör nekroz faktör reseptörü-1 (TNFR1), ölüm reseptörü 3 (death receptor 3, DR3), ölüm reseptörü 4 (death receptor 4, DR4), ölüm reseptörü 5 (death receptor 5, DR5) ve ölüm reseptörü 6 (death receptor 6, DR6)’dır (24,28).

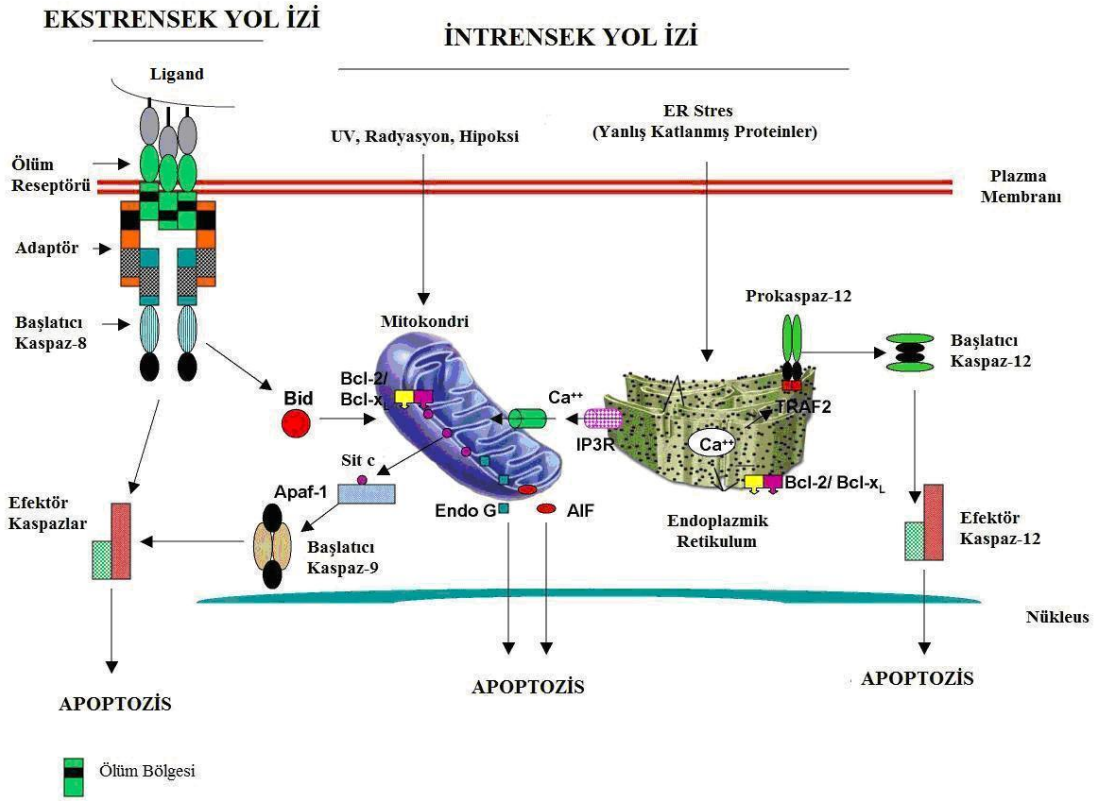
Ölüm reseptörleri yol izinin son çalışmalarda en çok yer alan iki üyesi Fas ve TNFR1’dir. Bu reseptör ailesinin bütün üyeleri C terminal uca yakın bulunan yaklaşık 80 aminoasitten oluşan bir bölge içerirler. Fas ve TNFR1’in mutasyon analizleri bu bölgenin apoptotik sinyal için gerekli olduğunu göstermiştir. Bu nedenle bu bölgeler korunmakta ve ölüm bölgesi (*Death Domain*, DD) olarak adlandırılmaktadır (29). Hücre zarında yerleşim gösteren protein yapıdaki bu ölüm reseptörleri, ligandları ile bağlanınca sitoplazma çevresindeki ölüm bölgelerinden birkaçı (3 veya daha fazla)

öncelikle bir araya gelir ve adaptör protein için bir bağlanma bölgesi oluştururlar. Reseptörlere özgün olan bu bağlanma bölgesi adaptör protein için çok önemlidir. Bunlar, Fas için; Fas ilişkili ölüm bölgesi (FADD), TNFR1 ve TNFR2 için ise TNF ilişkili ölüm bölgesidir (TRADD) (45). Fasligand'ın (FasL); sitotoksik T lenfositler, doğal katil hücreler veya TNF- α gibi inflamatuvar sitokinlerin varlığında ilgili ölüm bölgelerine bağlanması, reseptörün sitoplazmik bölgesinde bulunan birçok adaptör protein ve prokaspaz-8, -10 gibi proenzimlerin indüklenmesine ve böylece ölümü indükleyen sinyal kompleksi (DISC) oluşumuna neden olur (47).

Fas; TNRF ailesinin bir üyesidir ve FasL'ye bağlanarak ölümü aktive eder. Lenfoid hücrelerde, akciğerde, hepatositlerde ve bazı kanser hücrelerinde bulunur. Bu apoptotik yol izi, immün yanıtın sonra fazla miktarda üretilen ve kümelenen gereksiz lenfositlerin uzaklaştırılması gibi immün sistemin normal *down regülasyonu*'nda görev alır (48).

2.2.4.3. Endoplazmik Retikulum Yol İzi

Mekanizması tam olarak bilinmeyen üçüncü yol izi ise endoplazmik retikulum (ER) yol izidir. Bu yol izinin kaspaz-12'yi içerdiği ve kaspaz 9'u sitokrom c salınımına gerek kalmadan da aktive edebildiği bildirilmiştir (49). ER; protein sentezinin düzenlendiği ve protein katlanma bölgesi olarak bilinmesiyle birlikte, kalsiyum sentezi, hücre içi kalsiyum dengesi ve membran proteinlerinin katlanmasını içeren birçok kritik işlevde önemli bir rol oynamaktadır. ER'nin hasar görmesine sebep olan kalsiyum dengesindeki bozukluklar, serbest radikallere maruz kalma, hipoksi, glukoz yetersizliği gibi hücrel stresler protein sentezinin azalmasına ve protein katlanmalarının açılmasına neden olur. TNF reseptör ilişkili faktör-2 (TRAF2) normal hücrelerde bir adaptör proteindir. Görevi prokaspaz-12'ye bağlanmak ve onu inaktive etmektir. ER'nin strese maruz kalmasıyla TRAF2 ayrılır ve bu ayrılma kaspaz-12'nin aktive olmasına neden olur (50). Kaspaz-12, kaspaz yolunu devam ettirebilmek için prokaspaz-9'a bağlanır. Daha sonra aktif hale geçen kaspaz-9 apoptotik yolaktaki en önemli efektör kaspaz olan kaspaz-3'ü aktive etmek için prokaspaz-3'e bağlanır (49) (Şekil 2.3.) (36).



Şekil 2.3. Apoptotik yol izleri (44' nolu kaynaktan alınarak düzenlenmiştir).

2.2.5. Apoptozisin Genetik Kontrolü

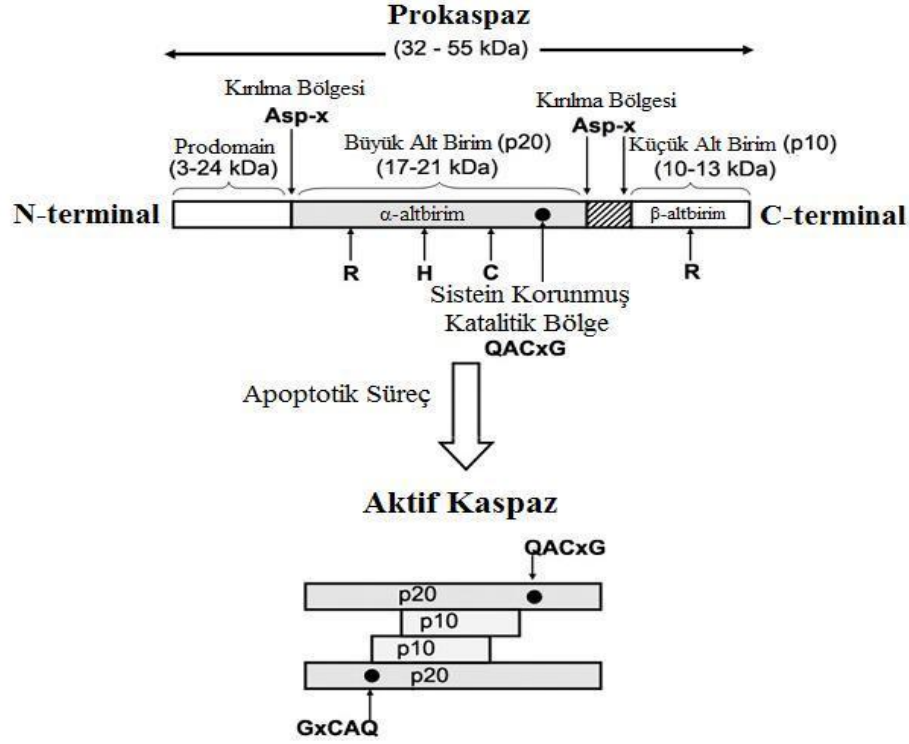
Apoptozisi baskılayarak ya da aktive ederek, apoptozisin sinyal iletimini kontrol eden birçok düzenleyici bulunmaktadır (30). Genetik ve çevresel düzenleyiciler gerek pozitif gerekse negatif olarak proapoptotik veya antiapoptotik yol izlerinin kontrolünü sağlamaktadırlar. Hücrenin kendi çevresinden gelen dış uyarılar genetik düzenlemeyi etkinleştirirken ölüm yoluna girmiş bir hücre kendisini apoptozisten kurtarabilecek yaşam sinyallerini kabul edebilmektedir (41). Genetik olarak başlıca 2 gruba ayrılan bu düzenleyiciler; antiapoptotik etkili olarak Bcl-2, Bcl-x, p53, c-myc ve proapoptotik etkili olan Bad, Bid gibi genetik düzenleyiciler olarak gruplandırılabilir (24,41).

2.2.5.1. Mediyatörler

Son yapılan çalışmalar göstermiştir ki serin proteaz, kalpainler ve proteazomları da içeren bir dizi farklı proteaz apoptozisdeki nükleaz rolü üzerinde etkindirler (51). Bir nematod türü olan *Caenorhabditis elegans*'da programlanmış hücre ölümünü

araştırmak üzere Horvitz ve ark. tarafından yapılmış bir çalışmada interlökin 1 β dönüştürücü enzim (ICE) zerine dikkatler çekilmiştir. Bu çalışmada elde edilen bulgularda Ced-9 proteininin memelilerde hücreyi ölümden koruyan Bcl-2 ile benzerlik gösterdiği, Ced-4 proteininin henüz memelilerde tanımlanmış bir homologu olmadığı, Ced-3 proteininin ise memelilerdeki ICE ile yüksek derecede benzerlik gösterdiği ortaya konmuştur. Bu sonuçlar doğrultusunda ve ICE'nin aşırı ekspresyonunun apoptozisi uyardığı gözlemlenen çalışmalar sonucunda ICE'nin apoptozisin uyarılmasında anahtar rol oynadığı ne srlmştir (52).

Kaspazlar; sistein proteaz ailesinden olup apoptozun oluşumunda esansiyel role sahiptirler. Sistein içeren aspartat spesifik proteazlar (*Cysteine containing aspartate specific proteases*, caspase) olarak adlandırılmaktadırlar (53). şu ana kadar memelilerde benzer özellikler gösteren 15 kaspaz tanımlanmıştır ve hepsinin nc molekülleri prokaspaz olarak bilinen zimojenlerdir. Bu proenzimlerin katalitik olarak dayanıklı ve 32-55 kDa ağırlığında 3 bölge içeren, tek zincirli bir polipeptit olarak sentezlendiği, X ışını kristal yapısı ve peptid dizileme çalışmaları ile gösterilmiştir. Bu proenzimler merkezinde katalitik aktif bölge içeren, 17-22 kDa ağırlığında bir internal bölge (p20), kk katalitik alt ünite olarak da adlandırılan 10-13 kDa ağırlığındaki kk C terminal bölge (p10) ve DD olarak adlandırılan 3-24 kDa ağırlığında NH₂ terminal bölgelerini içermektedirler (54). Birçok kaspazın p20 ve p10 alt birimleri kk bağlantı dizisiyle ayrılırlar. Kaspazların tam olarak fonksiyonel proteazlara dönüştürülmesi ard arda gerçekleşen iki kırılma olayıyla tamamlanır. Büyük ve kk kaspaz alt birimlerindeki zinciri ikiye ayıran ilk proteolitik kırılmayı takiben oluşan ikinci kırılma ile N-terminal predomaini uzaklaştırılır (55). Ayrılma işleminden sonra 2 kk 2 büyük alt birimden oluşan heterotetramerik yapıya sahip kompleks aktif bir kaspaz yapısı oluşur (54-56) (şekil 2.4.).



Şekil 2.4. Prokaspaz ve aktif kaspazın yapısı (54 'nolu kaynaktan alınarak düzenlenmiştir).

Prokaspazların büyük N terminal prodomainleri, 80-100 aminoasit uzunluğunda yapısal motif içerirler. Bu aminoasitler DD süper ailesi olarak bilinen apoptotik sinyallerin iletiminde görevlidir. DD'ler oldukça önemli 2 bölgeye sahiptir; bu bölgeler kaspazların aktivasyonundan önce plazma zarına salıverilmelerini sağlayan ve aynı zamanda apoptotik yolun *downstream*'inde önemli rol oynayan ölüme yardımcı olan bölge (DED) ve kaspazları organize eden bölge (CARD) olarak adlandırılan yapılardır (54).

Amino asit dizilerindeki benzerliklere göre kaspazlar 3 alt gruba ayrılır. Başlatıcı ve efektör kaspazlar bu gruplardan ilk ikisini oluşturmaktadırlar ve apoptotik süreçte görev almaktadırlar. Apoptotik süreçte içerisinde herhangi bir rol oynamayan fakat sitokinlerin olgunlaşmasına aracılık eden ve inflamatuvar yanıtta görev alanlar ise üçüncü grup kaspazları oluşturmaktadır (56). Apoptotik süreçte yer alan kaspazlar N terminal prodomainlerinin uzunluğuna göre 2 sınıfa ayrılırlar. Bu farklılık fonksiyonel olarak önemlidir (57). İnflamatuvar kaspazlar veya grup I kaspazlar olarak da adlandırılan kaspaz-1, kaspaz-4, kaspaz-5, kaspaz-12, kaspaz-13 ve kaspaz-14 uzun prodomaine sahip ve inflamatuvar yanıtta rol alan kaspazlardır. Başlatıcı kaspaz olarak

da bilinen grup II kaspazlar da uzun prodomaine sahip (>90 aminoasit) bir diğer kaspaz grubudur. Bu grupta yer alan kaspaz-8 ve kaspaz-10 DED içeren, kaspaz-2 ve kaspaz-9 ise CARD içeren kaspazlar olarak bu grubu oluşturmaktadırlar. Efektör, öldürücü veya grup III kaspazlar olarak da adlandırılan, 20-30 amino asit uzunluğunda kısa prodomaine sahip olan, kaspaz-3, kaspaz-6 ve kaspaz-7'de son grup kaspazları oluşturmaktadır. Apoptotik süreçte en önemli enzimler arasında kaspaz-3, kaspaz-8 ve kaspaz-9 bulunmaktadır (54).

2.2.5.1.1. Kaspaz-3

Kaspaz-3 apoptozis mekanizması içerisindeki efektör kaspazlardandır. Apoptozis sürecinde birçok anahtar proteinin (poli ADP Riboz polimeraz (PARP) vb) kısmen veya tamamen proteolitik kırılmasından sorumludur. CPP32 olarak da adlandırılan kaspaz-3'ün, Ced-3 ve kaspaz-1'in aktif bölgelerini kodlayan DNA dizileri kullanılarak yapısı aydınlatılmaya çalışılmış ve insan kromozomunun 4q33-q35.1 bölgesinde bulunan 32 kDa ağırlığında bir sistein proteaz olduğu gösterilmiştir (51,58). Kaspaz-3, CPP32 olarak adlandırılmasının yanı sıra, Yama ve apopain olarak da tanımlanmıştır. Bilindiği gibi PARP'ın kırılma bölgesi (DEVD↓G)'dir ve buna dayanarak, Ac-DEVD-AMC modeli substrat olarak, Ac-DEVDcho ise spesifik inhibitörü olarak sentezlenmiştir. Kaspaz-3 PARP'dakine benzer bir şekilde, apoptozis mekanizması süresince, daha ziyade Asp-Xaa-Xaa-Asp (DXXD) motiflerini içeren çok sayıda substratın, kısmen veya tamamen proteolitik olarak kırılmasından sorumludur (51).

Birçok protein normal hücre fonksiyonları ya da tamir mekanizması devam ederken, apoptozis sırasında kırılmaya uğrar. PARP ve DNA-bağımlı protein kinaz'ın katalitik altünitesi (DNA-PK_{cs}) DNA tamir mekanizmasını içermektedir. Apoptozis sürecinde kırılan yapısal proteinler; hücre iskeleti proteinleri (fodrin, aktin ve Gas2) ile çekirdek yapısının oluşmasına katkıda bulunan NuMa ve lamin A gibi proteinleri içermektedir. Henüz tam olarak tanımlanamayan diğer proteinlerle birlikte bu proteinlerin kırılması, çekirdek yoğunlaşması ve çekirdek zarı tomurcuklanması gibi apoptotik hücre için karakteristik olan birçok biyokimyasal ve morfolojik özellikten sorumlu olduğu gözlemlenmiştir (59).

Zheng ve arkadaşları apoptozis mekanizması içerisinde yaşanan olaylar çerçevesinde kaspaz-3'ün temel rolünü knockout fareler üzerinde yapılan hepatosit ve timosit çalışmalarlarıyla göstermişlerdir. Bu çalışmadan elde edilen verilere göre; kontrol hücreleri ile kaspaz-3^{-/-} hepatosit ve timositler aynı hızda ölmesine rağmen, yabancı tip hücrelerin, FasL'den ekprese olan 3T3 hücreleri ile bir kez daha kültüre edildiğinde, çekirdeklerinin yaklaşık 6 saat içinde parçalandığı ve sitoplazmada tomurcuk oluşumu gibi tipik apoptotik özellikleri gösterdiği, kaspaz-3^{-/-} hücrelerde ise bu özelliklerin oluşmadığı gözlenmiştir (60).

2.2.5.1.2. Kaspaz-8

Birçok ölüm reseptörü tarafından uyarılabilen ve apoptotik süreçte büyük önem arzeden kaspaz-8 insan kromozomunda 2q33-34 bölgesinde 2 band halinde lokalize olur ve FLICE olarak da adlandırılmaktadır (61). Kaspaz-8 ve kaspaz-3 bazı özellikleri bakımından birbirlerine benzerlik gösterirler. Bu özellikler aktif bölgelerinde sistein yer alması, katalitik bölgelerinin uzunlukları ve aktivasyonları için gerekli formun şekillenmesi gibi durumlardır. Ayırt edici özellikleri ise; kaspaz-8'deki 2 DED içeren N terminal bölgesinin uzunluğudur. Prokaspaz-8'in DED bölgeleri ile FADD ve TRADD'in DD'leri arasında dizi benzerlikleri vardır. Bundan dolayı DD proteinleri Fas ve TNFR ile ilişkilidir. Bu sayede TNF- α gibi birçok efektör tarafından uyarılan prokaspaz-8 direk sinyal iletiminde yer alır. Prokaspaz-8'in otokatalitik aktivasyonu yoluyla FasL veya TNF- α aktivasyonu oluşur. Aktif hale geçen kaspaz-8 daha sonra kısa prodomainleri içeren kaspaz-3 gibi diğer kaspazların *downstream*'ini sağlar. Bu mekanizması itibarıyla kaspaz-8'in Fas veya TNF aracılı apoptotik kaskatta ilk sırada bulunduğu belirtilmiştir. Kaspaz-8 bu fonksiyonu ve kaskat sırasından dolayı *upstream* kaspaz olarak tanımlanmıştır (62).

2.2.5.1.3. Kaspaz-9

Kaspaz-9 insan kromozomununun 1p36.1-p36.3 bölgesinde lokaliz olan, CED-3 ailesinin bir üyesidir. Kaspaz-9 geninin 8 intron ve 9 ekzon içerdiği tespit edilmiştir (63). Kaspaz-9 un en fazla eksprese edildiği dokular kalp, testis ve ovaryumlardır. Diğer kaspazlarla, kaspaz-9 arasındaki en önemli ayırt edici özellik, aktif bölgede bulunan pentapeptittedir (QACGG). Bu özelliğin nedeni kaspaz-9'da pentapeptid bölgesinde Arg'nin yerine Gly bulunmasıdır. Prokaspaz-9 uzun bir N-Terminal bölgeye sahiptir ve bu açıdan CED-3 ve Kaspaz-2 ile yüksek benzerlik gösterir. Prokaspaz-9 küçük ve büyük subunitleri arasında, iki potansiyel işlem bölgesi içerir. D³²⁷QLD↓A motifi, PARP'daki DEVD↓G bölgesi ile benzerlik gösterir. Bu durum kaspaz-3'ün kaspaz-9'u aktive ettiğini gösteren bir belirteçtir. P₃ bölgesindeki asidik kalıntı içeren Granzim B kırılma bölgesinin motifi ise P³¹²EPD↓A 'dır (51). Hücrel bir stresi takiben sitozolde bulunan proapoptotik proteinler aktive olur ve mitokondrinin geçirgenliğini bozarak por oluşumuna neden olur. Oluşan porlardan dışarıya sitokrom c salınımı başlar. dATP veya ATP varlığında, Apaf-1, sitokrom c ve prokaspaz-9 birleşerek apoptozom adı verilen kompleksi oluşturur. Bu kompleks varlığında aktif hale geçen kaspaz-9 daha sonra prokaspaz-3 ve -7'yi aktive eder (47). Apoptozom'un merkezi bileşeni olan Apaf-1; N ucunda CARD, daha arkada geniş nükleotit bağlayan bir bölge ve C ucunda ise 12-13 WD40 tekrarını içeren 3 bölgeden oluşur (64). Kaspaz-9'un prodomaini ile etkileşimi için CARD gereklidir. Apaf-1'in oligomerizasyonu sitokrom c ve dATP varlığında, CARD ve nükleotit bağlayan bölge tarafından sağlanmaktadır (65).

2.2.5.2. Kaspaz İnhibitörleri

Çeşitli proteinler, iyonlar ve apoptozisi inhibe eden proteinler (IAPs), Granzim B ve sitokin cevap değiştiricisi A (Crm A), Bcl-2 ailesi proteinleri, Calpain, Ca²⁺, gibi faktörlerle kaspazların aktivitesi artırılıp azaltılabilmektedir. Bu faktörler kaspazların düzenleyicisidirler (57).

IAP'ler, Bcl-2 ailesinden daha etkin bir şekilde apoptozisi inhibe etmektedir. Yapılan son çalışmalarda apoptozis mekanizması içerisinde rol oynayan önemli düzenleyiciler olduğu gösterilmiştir. IAP ailesini NAIP, cIAP1, cIAP2, X-

chromosome-linked IAP (XIAP), survivin, apollon ve livin oluşturmaktadır. Aile üyelerinin ortak bir özelliği vardır; 1-3 N terminal bölgelerinde Baculovirüs IAP tekrarları (BIR) olarak bilinen 20 aminoasitlik bir bölge ile C terminal bölgelerinde korunmuş bir “really interesting new gene” (RING) Zn bölgesi bulundurmaktadırlar (66).

Kaspazların işlevini inhibe eden diğer bir mekanizma ise baculovirüsleri ve poxvirüsleri gibi birçok virüsün gen ürünü olan doğal (viral) kaspaz inhibitörleridir. Crm A cowpox virüs tarafından üretilen en bilindik inhibitördür. Crm A 38kDa ağırlığında olup serpin benzeri bir moleküldür. Baculovirüsten elde edilen p35 proteini de yine apoptozisi kaspazları inhibe ederek azaltan 35 kDa ağırlığındaki diğer bir viral gen ürünüdür (53,57)

Granzim B, apoptoziste önemli rol oynayan bir sistein proteazdır. Perforinler ve granzimler, normal olarak sitotoksik T lenfositler (CTL) ve doğal katil hücrelerin sitoplazmik bölgelerinde bulunurlar (67).

Calpain, Ca^{2+} bağımlı bir sistein proteazdır ve papainaz ailesinden gelmektedir. Nekrozda ve apoptozisde genel olarak Calpain’ın arttığı bilinmektedir. Calpain ve kaspaz-3 fodrin, Ca^{2+} bağımlı protein kinaz ve ADP-ribozil transferaz/PARP gibi birçok ortak substratı paylaşırlar (67).

Nükleer faktör kappa B (NF- κ B) dimerik bir transkripsiyon faktörüdür. İnflamasyon ve apoptozis gibi patolojik olaylarda genlerin düzenlenmesinde görevlidir. NF- κ B aktivitesi hücre büyümesi, farklılaşması, gelişmesi, apoptozis ve hücrel redoks dengesindeki değişikliklere uyan yanıtları da içeren çok sayıda genin indüklenmesini içerir. NF- κ B’nin aktivasyonuna; sitokinler, patojenler, stres ve kemoterapötik ajanlar gibi uyarıcılar neden olmaktadır (68).

Equine herpesvirus-2, bovine herpesvirus 4 (BORFE2), herpesvirus saimiri (ORF71) ve insan herpesvirus 8 (ORF71) gibi birçok herpes virüsünden ekprese edilebilen FLICE inhibitör proteinleri (vFLIPs), ölüm reseptörleri yoluyla apoptozis sinyallerini engeller (69).

Mitokondrinin dış zarı çeşitli olaylar neticesinde geçirgenliği artırır ve seçiciliğini kaybeder bunun sonucunda mitokondriden sitokrom c, AIF, endonüklez G, HtrA2/Omi ve prokaspaz-2, -3 ve -9 gibi yapılar dışarıya salınmaya başlar. AIF’nin mitokondriden nükleusa göç etmesi, kaspaz bağımsız kromatin yoğunlaşması ve DNA

fragmentasyonunu tetikler. Endonükleaz G ise direk olarak kaspaz bağımsız DNA kırılmasına neden olur (41).

Apoptotik mekanizmada son yıllarda keşfedilen bir diğer önemli protein grubu da yine mitokondriden sitokrom c ile birlikte salınan Smac/DIABLO proteindir. Fonksiyon olarak bu protein IAP'lere bağlanmak ve onların antiapoptotik etkilerine katkıda bulunmak suretiyle işlev görmektedir. Sitokrom c bazı hücrel sistemlerde hücre ölümü için gerekli olmasına rağmen yeterli düzeyde değildir. Smac/DIABLO bu durumlarda devreye girerek yedek faktör olarak hücreyi ölüme götürür (55).

2.2.5.3. Antiapoptotik Proteinler

2.2.5.3.1. Bcl-2 Ailesi

Bcl-2 geni bir proto-onkogen olarak ilk kez folliküler lenfoma B hücrelerinde keşfedilmiştir. Ardından C. Elegans'ın apoptozis baskılayıcısı olan ced-9'un memeli hücrelerindeki homoloğu olarak tanımlanmıştır. Bu tarihten itibaren yaklaşık olarak 19 Bcl-2 aile üyesi olduğu ortaya çıkarılmıştır (55). Bcl-2 geni 230 kb bir protoonkogen olup, mitokondrial membranı içerisinde yer alan 24-26 kb'luk bir proteini kodlar. Bu proteinin GTP bağlayan bir protein olduğu bilinmektedir ancak henüz tam olarak anlaşılmayan bir mekanizma ile apoptozisi engellediği bilinmektedir (70).

Bcl-2 ailesinin üyeleri apoptozisin mitokondriye bağlı yolağının yani intrinsek yol izinin düzenlenmesinden sorumludurlar (7). Bcl-2 ailesinin proteinleri fonksiyonel ve yapısal olmak üzere 3 alt gruba ayrılır. Grup I antiapoptotik aktiviteye sahipken grup II ve grup III ise hücre ölümüne yardımcı bir rol oynayan yapıdadırlar (41).

Grup I antiapoptotik Bcl-2 ailesi: Apoptozisi inhibe eden proteinlerdir. Bu proteinler, transmembran domain ile birlikte, BH1, BH2, BH3 ve BH4 domainlerini içerirler. Bu grupta Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w ve Mcl-1 yer alır (71). Grup I'in BH1, BH2 ve BH3'e ek olarak BH4 içermesi antiapoptotik aktivitenin sağlanması açısından BH4'ün bu yapının olmazsa olmaz bir parçası olduğunu göstermektedir (72).

Grup II multidomain proapoptotik Bcl-2 ailesi: Apoptozisi uyarıcı özellik gösteren proteinlerdir. Bu grupta yer alan Bax, Bak, Bok/Mtd yapılarında BH4 hariç diğer bölgeleri içerirler (71).

Grup III BH3 only-Bcl-2 ailesi: Sadece BH3 bölgesi içerirler ve proapoptotik etki göstererek apoptozisi uyarıcı etki gösterirler. Bu grupta, Bad, Bid, Bim, Bik, Hrk, Bcl-X_S Noxa, Bcl-G, Nip3, Bmf ve PUMA yer alır. Bu proteinlerden Bid, Noxa, Bmf ve PUMA'da transmembran bölge gösterilmemiştir. Bunlar sadece BH3 bölge içerirler (71).

Bcl-2 ve Bcl-X_L çekirdek, ER membranı ve mitokondri zarında yer alırlar ve sentetik lipid membranlarında iyon kanallarının oluşumuna neden olurlar. Mitokondrideki Bcl-2 ve Bcl-X_L sitokrom c, Apaf ve AIF gibi moleküllerin mitokondriyal zarlar arası boşluktan sitoplazmaya geçmesini önler. Sitokrom c ve AIF sitoplazmaya geçtikten sonra direkt kaspazları aktive ederler. AIF'nin salınımı, zar geçirgenliği ve zar potansiyelinin düşmesi gibi mitokondriyal bozuklukların oluşmasına bağlıdır. Bcl-2/BclX_L, henüz açıklanmayan bir mekanizma ile mitokondriyal bozuklukları önler (72).

2.2.5.3.2. p53

p53 bir tümör baskılayıcı gen olarak, insan tümörlerinin yaklaşık % 70'ini inaktive etmekle görevli birçok organizmada oluşan kanser oluşumlarının baskılanmasında primer derecede öneme sahip bir proteindir (73). P53 geni 393 amino asitlik bir fosfoprotein sentezletir ve bu protein direk DNA'ya bağlandığı gibi birtakım hücrenel veya viral proteinlerle de bağlanabilmektedir. *p53* proteini apoptozis mekanizması içerisinde etkilerinin tanı sıra, hücre büyümesinin ve hücre bölünmesinin azaltılmasında, hücre farklılaşmasında ve DNA tamir mekanizmasında da görev almaktadır (70).

Normal bir hücrede çeşitli nedenlere bağlı olarak oluşan DNA hasarını takiben *p53* seviyesi hızlıca artar, *p53* stabilize olur ve hücre siklusunu G1 fazında durdurur. Bu sayede hücreye kendini tamir etmesi için zaman kazandırır. Şayet hücre hasarı tamir edilemeyecek boyutlarda ise hücre apoptozise gider (74).

Hücre siklusu hasarlı hücrelerde kontrol edilmeden ilerler. Bu durum fonksiyonel *p53*'ün bulunmamasından kaynaklanmaktadır. Bu amaç doğrultusunda düzeni sağlamak ve aşırı artışın önüne geçebilmek için çalışan *p53*'ün negatif düzenleyicisi Mdm2 adı ile bilinen proteindir. Mdm2 proteini, *p53*'ü kontrol altında

tutar ve hücre siklusunu G1/S safhasında durdurarak apoptozisi engeller. Bu mekanizma Mdm2'nin p53'e bağlanarak aktivitesini inhibe etmesi esasına dayanmaktadır. Çeşitli etkiler sonucunda (radyasyon vb. etkilerle) DNA'da bir hasar meydana geldiğinde, Mdm2 proteininin p53'e bağlanma bölgesinde yapısal değişiklikler meydana gelir. Bu nedenle Mdm2 p53'ü bağlayamaz ve serbest p53'ün aktivitesi hücre siklusunu G1 safhasında durdurup, Bax genini aktive ederek hücreyi apoptozise götürür (75).

2.2.5.3.3. c-Myc

Apoptozis mekanizmasını düzenleyici yapılardan bir diğeri c-Myc genidir. Kromozomun 8q24 bölgesine yerleşmiş olan c-Myc geni, hücre proliferasyonu, hücre dönüşümleri ve apoptozis ile ilişkili genlerin transkripsiyonlarını düzenler. Negatif düzenleyicilerin varlığında hücresel çoğalmayı sağlayan c-Myc, bu faktörlerin yokluğunda ise hücreyi apoptozise götürmektedir (76).

2.2.5.4. Proapoptotik Proteinler

Genlerin aktivasyonunu sağlayarak apoptozisi uyarıcı yönde etkileyen proapoptotik proteinlerden sadece BH3 bölgesini içeren protein grubu olan Bad'ın hedefi Bcl-2/Bcl-X_L gibi antiapoptotik proteinlerdir. Bad bu proteinlerle birleşerek onların ölüm reseptör aktivitesini antagonize eder. Bad'ın BH3 bölgesi Bcl-X_L ile etkileşiminde ve hücre ölüm aktivitesinde önemli yer tutmaktadır (77).

Bid'de yine Bcl-2 ile interaktif etkileşime giren proapoptotik bir proteindir. Sadece BH3 bölgesini içeren proteinlerden biri olarak da tanımlanan Bid'in mutasyon analizleri neticesinde Bcl-2 ile heterodimer oluşturma kabiliyeti ve hücre ölümünü indükleyici aktivitesi ortaya çıkarılmıştır. Buna ek olarak Bid- Bax etkileşimi de sitotoksiste ile ilişkilendirilmiştir (77).

2.3. TGF - Dönüştürücü Büyüme Faktörü (Transforming Growth Factor)

Hücrelerin büyümesini sağlayan transforme hücreler tarafından sentezlenen polipeptid yapıda büyüme faktörleridir. TGF- α (Alfa) ve TGF- β (beta) olmak üzere iki alt grubu vardır.

2.3.1 TGF- α

Çeşitli memeli epitelyal hücrelerince sentezlenen TGF- α , 160 öncü proteolitik yapıdan türetilmiş 50 aminoasitlik bir yapının 3 disülfid bağı ile kenetlenmesiyle oluşmuş olan bir büyüme faktörüdür. TGF- α ile yakından ilişkili bazı büyüme faktörleri epidermal büyüme faktörü (EGF), vaccinia büyüme faktörü ve fibrom virüs büyüme faktörüdür (78).

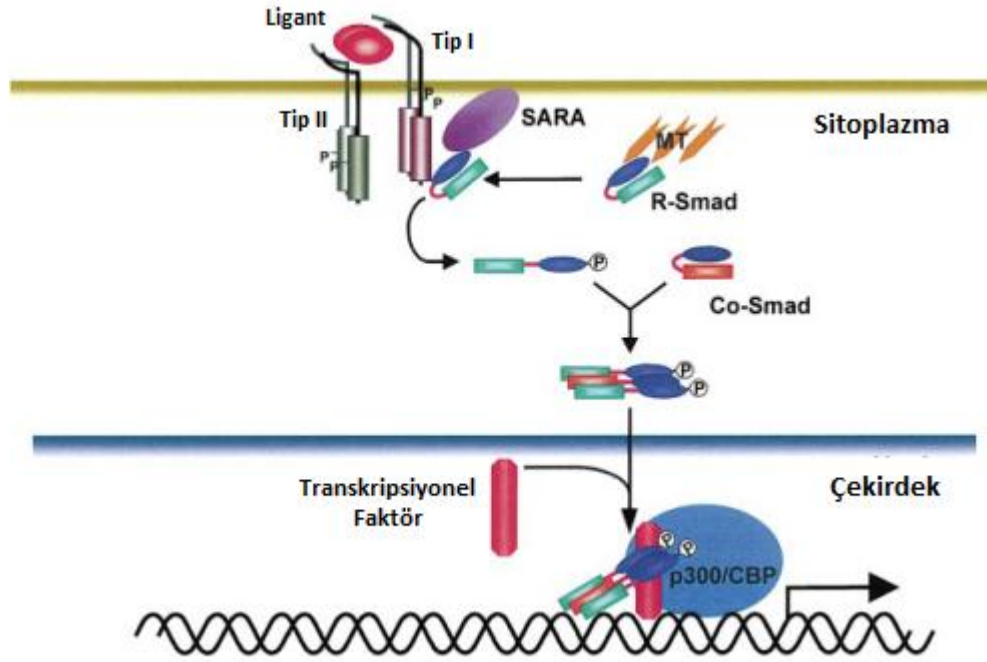
2.3.1. TGF- β Süper Ailesi

TGF- β ailesi birçok alt gruba sahip olduğu için süperaile olarak isimlendirilir. Polipeptid bir yapı gösteren TGF- β süperailesi ekstrasellüler matriks oluşumu, hücre siklusunun kontrolü, erken gelişimin regülasyonu, differansiyasyon, hematopoezis, anjiogenezis, immün fonksiyonlar, kemotaksis ve apoptozis gibi birçok mekanizmanın düzenlenmesinde rol oynayan multi fonksiyonel bir sitokin ailesidir (9-11). Omurgalılarda 35 den fazla üyesi olan TGF- β süperailesinin bazı önemli üyeleri TGF- β , Aktivin, inhibin, BMP, Glia Hücre Kaynaklı nörotrofik faktör (Glial cell linederived neurotrophic factor-GDNF), Müllerialin inhibe Edici Madde (Mullerian inhibiting substance-MIS) olarak sıralanabilmektedir (79). Erişkin dokularda homeostaziyi sağlayan TGF- β , embriyolarda da morfogenezis oluşumunu korur. TGF- β yanıtı hücre döngüsü üzerine de etki edilebilmektedir. Bu etki hücre döngüsünün geç G1 fazında “restriksiyon noktasında” durdurulması ile kendini göstermektedir (80). TGF- β sinyal yolundaki değişiklikler, özellikle kanser olmak üzere insanda çeşitli somatik ve kalıtsal hastalıklarla ilişkilidir (81). Smad’lar ve kofaktörler ile birlikte TGF- β , hücrelerde tümör baskılayıcı ve hücre metabolizmasını düzenleyici etki göstermekle birlikte kanserlerde tümör gelişimini indükleyici rol oynaması insan sağlığı açısından önemlidir (80-82). TGF- β ailesi içinde ilk belirlenen üye, normal sıçan böbrek hücrelerinden izole edilen, TGF- β 1 izoformu olmuştur (82). Bununla birlikte memelilerde TGF- β 1, TGF- β 2 ve TGF- β 3 olmak üzere 3 izoform tanımlanmıştır. Her izoform farklı bir gen ve kromozomdan üretilmektedir. TGF- β 1 19q kromozomundan üretilen 25kDa ağırlığında oldukça büyük homodimerik bir proteindir (9).

2.3.1.1. TGF- β Ailesi Reseptörleri ve Sinyal İletimi

Şu ana kadar memeli dokusunda TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, tavuk ve *Xenopus* larda ise TGF- β 4 ve TGF- β 5 olmak üzere 5 izoformu izole edilmistir. Memeli dokusundan izole edilebilen formlar mezenşim, bağ dokusu, endotelyum, plateletler, kemik ve immün sistem hücreleri gibi çeşitli doku ve hücrelerde sentezlenmektedir (82). TGF- β , hücre içindeki etkilerini bir çok molekül aracılığı ile (MAPKs, JNK, p38, p13K Kinazlar, PP2A fosfatazlar, Rho ailesi ve Smad ailesi) gösterir. Fakat Smad'lar dışında bu yolların moleküler düzeyde sinyal iletim mekanizması tam olarak bilinmemektedir (81).

TGF- β ailesi üyeleri serin/threonin kinaz reseptörlerinin 2 tipini aktive ederek etki gösterir (81-83). Sonrasında sitoplazmadan çekirdeğe kadar yerleşmiş olan Smad proteinlerinin akışını başlatır (11). TGF- β sinyal iletimi fosforilasyon mekanizması üzerine kuruludur. Sinyal iletiminin başlatılması için Tip II reseptörlere bağlanmış ligand kompleksinin Tip I reseptörleri fosforile etmesi gerekmektedir. Bu fosforillenme sonrasındaki aşamalar için, yani çekirdeğe sinyal iletimi amacıyla Co-Smad'lar, R-Smad'lar ile heterooligomerler oluşturur ve birlikte çekirdeğe girerler. Burada, hedef gen bölgesine bağlanarak transkripsiyonel faktörler yardımı ile transkripsiyonel cevabı oluştururlar (Şekil 2.5.) (83,84). Son zamanlarda fareler üzerinde yapılan çalışmalar ile TGF- β süperailisi sinyalinin anlaşılmasında mesafe kat edildiği görülmektedir (81,82).



Şekil 2.5. TGF- β Ailesi Reseptörleri ve Sinyal İletimi (83'nolu kaynaktan alınarak düzenlenmiştir).

Tip I (T β R-I; 53 kDa), Tip II (T β R-II; 70-100 kDa) ve Tip III (T β R-III; 200-400 kDa) reseptörler TGF- β ailesi reseptörlerini oluşturmaktadırlar (82). Sinyal iletiminden sorumlu olan reseptörler Tip I ve Tip II'dir. Tip I ve Tip II reseptörler GDNF dışında tüm TGF- β ailesi üyelerinin sinyal iletimine aracılık ederler (79). Yaklaşık 150 aminoasitten oluşan bu reseptörler içinde bu bölgenin katlanmasını sağlayan 10'dan fazla sistein aminoasidi bulunmaktadır. Tip I reseptörler için 30 aminoasitlik intrasellüler bölgede yüksek oranda korunmuş glisin ve serince zengin GS domainleri bulunmaktadır (81,82). TGF- β sinyali için fosforilasyon merkezi rol oynamaktadır. Sinyal iletimi için Tip II reseptörlere bağlanmış ligand kompleksinin Tip I reseptördeki GS domainlerini fosforile etmesi gerekmektedir. Tip I ve Tip II reseptörler kendilerine bağlanan ligandlara göre farklı isimler alırlar. İnsan genomunda 7 adet Tip I reseptör (ALKs 1-2-3-4-5-6-7), 5 adet Tip II reseptör (Act-IIA, Act-IIB, BMPR-II, AMHR-II, TBR-II) saptanmıştır (T3,T11). TGF β iletim yolunda önce Tip II reseptörlere direkt olarak bağlanma meydana gelir. Bunun ardından Tip I reseptörlerin aktivasyonu gerçekleşir. Buna karşın BMP reseptör ligandları, Tip I ve Tip II reseptörlerin her ikisine birden aynı anda bağlanarak kompleks oluşturur. TGF- β sinyalleri iletiminde

ALK 1 ve ALK 5'in de etkin olduğu endotelial hücre tiplerinde yapılan çalışmalarda ortaya çıkarılmıştır. Bunlardan ALK5 oldukça yaygın olarak sentezlenirken ALK1 ise daha çok endotelial hücreler ile epitelyal ve mezensimal hücreler arasındaki spesifik etkileşim bölgelerinde sentezlenirler. ALK 5 ve ALK 1 birbirlerine zıt etki göstererek bu mekanizma içinde yer alırlar. ALK 5, endotelial hücrelerdeki migrasyonu ve proliferasyonu inhibe ederken, ALK 1 ise stimüle eder ve bu zıt etkilerle mekanizmanın regülasyonunu sağlamaktadır (81-85). Daha sonra Tip I reseptörler sitoplazmadan çekirdeğe kadar sinyal akısını sağlayan Smad proteinlerinin fosforilasyonunu sağlar (10).

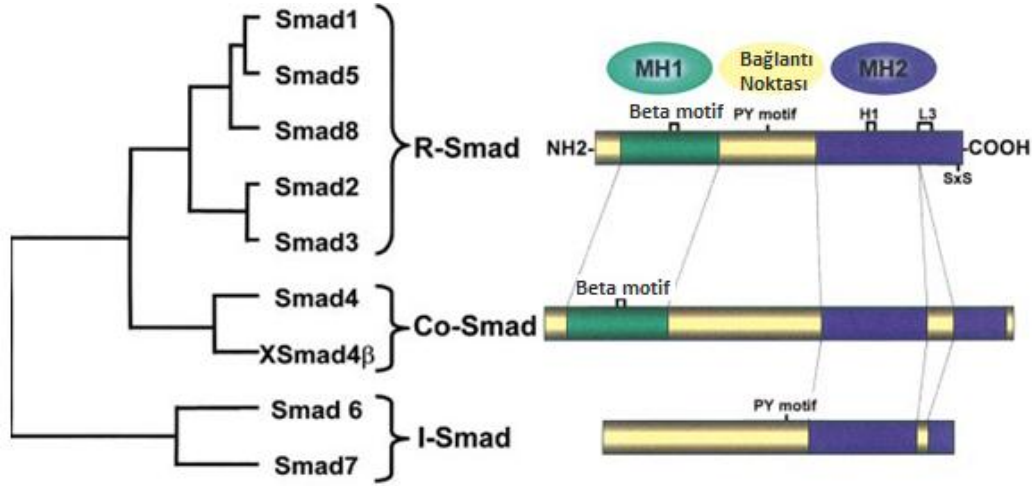
2.3.1.2. Smad Proteinleri

Sinyal ileme kapasitesine sahip Tip I reseptör kinazların substratı Smad ailesi proteinleridir. Smad proteinleri komplekslerin oluşturduğu sinyallerin çekirdekteki hedef genlere iletilmesinde çok önemli bir rol oynamaktadır (79,81,83). Bu ailenin ilk keşfedilen üyeleri sirke sineği olarak bilinen *Drosophila melanogaster* de bulunan 'Mad' proteini ve bir tür nematod olan *Caenorhabditis elegans*'lardan eksprese edilen 'Sma' proteindir. Memelilerde ise bu proteinlerin karşılığı Sma ve Mad kısaltmaları birleştirilerek Smad olarak isimlendirilmiştir ve bu zamana kadar yaklaşık olarak 10 adet Smad proteini tanımlanmıştır (79).

2.3.1.2.1 Smad Proteinlerinin Sınıflandırılması

Yapısal ve fonksiyonel özelliklerine göre Smad proteini ailesi 3 alt grupta incelenir. Bu gruplar "reseptör-regulated Smad" olarak isimlendirilen RSmad "Common-Smad" olarak isimlendirilen Co-smad ve "inhibitör Smad" olarak isimlendirilen I-Smad'tır (82,86). RSmad olarak isimlendirilen ilk grupta Smad1, 2, 3, 5, 8 üyeleri bulunmaktadır. Omurgalılarda, Co-Smad'ları oluşturan üye Smad 4, *C.elegans*'larda Sma 4'tür. Co-Smad'lar, R-Smad'lar ile heterooligomerler oluştururlar ve çekirdeğe sinyal iletimini aktive ederler (81,82). Üçüncü grup olan I-smad'ları ise omurgalılarda, Smad 6 ve Smad 7'nin *C.elegans*'larda Dad'ın dahil olduğu proteinler

olusturur. Bu gruptaki Smad'ların bilinen tek fonksiyonu, R-Smad'ların sinyal aktivitesini inhibe ederek TGF- β sinyal yolunu durdurmalarıdır (Şekil 2.6.) (81-83,86).



Şekil 2.6. SMAD Ailesi (83'nolu kaynaktan alınarak düzenlenmiştir).

2.3.1.2.2. Smad Proteinlerinin Aktivasyonu ve İnhibisyonu

TGF- β sinyal yolunun en önemli regülasyon noktaları Smad proteinleridir. Gerek pozitif gerekse negatif etki ederek sinyal iletimi üzerine etki edebilmektedirler. Bazı komponentler Smad sinyal yolu üzerindeki bölgeler ile etkileserek, Smad proteinlerinin fosforilasyonunu ve sinyalin başlamasını sağlarlar (81,86). Fosforilasyondan önce ve yine fosforilasyon sırasında Smad 2 ve 3 proteinleri önce T β RI ve SARA (*Smad anchor for receptor activation*) (*Reseptör aktivasyonu için SMAD çapası*) proteinlerine bağlanır sonrasında ise Smad 4 ile kompleks oluştururlar. Bu Smad kompleksi daha sonra T β RI ve SARA moleküllerinden ayrılır ve çekirdekte toplanır. Yapılan çalışmalar ile bu işlemlerin yarışmalı etkileşimler aracılığıyla gerçekleştiği gösterilmiştir (81,86,87).

TGF- β sinyal iletiminde, önemli role sahip olan Smad proteinlerinin inhibisyonu ile TGF- β sinyal cevabı negatif yönde düzenlenebilmektedir (81,88). Özellikle, R-Smad'ların inhibisyonunu sağlayarak TGF- β sinyal iletimini engelleyen proteinler inhibitör Smad (Smad 6, 7) grubudur. Yine Smad proteinlerinin defosforilasyonu sağlayan Ubiquitin Ligaz (Smurf 1, 2)'lar ile de inhibisyon gerçekleştirilir (89,90).

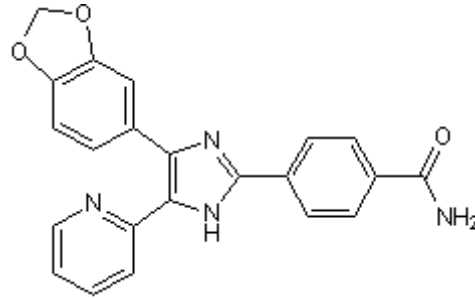
2.3.1.3. TGF-β / Smad Sinyal iletiminin Düzenlenmesi

TGF-β / Smad sinyali iletiminin düzenlenmesi iki farklı yolla kontrol edilir. Birinci yol, TGF-β'nın TGF-β reseptör tip I ve TGF-β reseptör tip II'yi aktive etmesi ile oluşan TGF-β-reseptör kompleksinin, SARA varlığında, endozom içinde Smad 2/3'ü aktive etmesidir. Smad 2/3 aktif hale geçtikten sonra Smad 4 ile bağlanır ve heteromerik bir kompleks oluşturur. Bu heteromerik kompleks çekirdeğe geçerek transkripsiyonu başlatan faktörleri aktive eder. İkinci yol ise kolesterol ve kaveolinin dahil olduğu TGF-β reseptörünün parçalanması esasına dayanan yoldur. İnhibitör özellikteki Smad 6 ve Smad 7 gibi bazı Smad proteinleri Smurf1 veya Smurf2 ile birleşerek daha önceden aktive olmuş olan TGF-β reseptör kompleksine bağlanarak reseptörü etkisiz hale getirirler (81,87).

2.4. SB-431542

Kimyasal ismi 4-[4-(1,3-benzodioxol-5-yl)-5-(2-pyridinyl)-1H-imidazol-2-yl]benzamide olan SB431542 maddesinin moleküler formülü $C_{22}H_{16}N_4O_3$ şeklindedir. SB431542 maddesinin moleküler ağırlığı ise 384.39 g/mol'dür (Şekil 2.7.).

SB-431542, TGF-β Tip 1 reseptör kinaz inhibitörüdür. Bu mekanizmayı özellikle ALK5 ve akrabaları ALK4 ve ALK7 üzerinden gerçekleştirir. ALK5, ALK4 ve ALK7'nin güçlü ve selektif bir inhibitörü olarak tanımlanabilmektedir. TGF-β'yı indükleyerek insanda osteosarkom hücrelerinin çoğalmasını bastırıldığı bildirilmiştir. 10 mM Etanol veya 100 mM DMSO içerisinde çözünür hale gelmektedir (12).



Şekil 2.7. SB-431542; 4-[4-(1,3-benzodioxol-5-yl)-5-(2-pyridinyl)-1H-imidazol-2-yl]benzamide

2.5. Oksidatif Stres ve Antioksidan Sistem

Hücre metabolizması, içerisinde birçok kimyasal reaksiyon ihtiva eder. Bu kimyasal reaksiyonlar sonucu ortaya çıkan, son yörüngeleri itibariyle bir veya birden fazla eşlenmemiş elektron bulunduran, kısa ömürlü ve kararsız, atom veya moleküllere serbest radikaller adı verilmektedir (91). Serbest radikaller hücre içerisinde özellikle solunum ve sinyal iletimi gibi çeşitli fizyolojik fonksiyonlar için kullanılmaktadır. Ancak bazı anormal durumlarda oksidan/antioksidan denge bozulur ve serbest radikaller başlıca lipit, protein, karbonhidrat, DNA gibi yapıların bozulmalarına sebep olurlar (92). Bu gibi durumların önüne geçebilmek zararı önlemek veya en az hasarla atlatabilmek için hücre, bazı savunma sistemleri geliştirmiştir.

Antioksidan savunma sistemi adı verilen bu sistemle serbest radikaller nötralize edilerek uzaklaştırılır. Antioksidan sistemi endojen ve eksojen kaynaklı üyeler oluşturmaktadır. Transferin, bilirubin, seruplazmin, ürik asit, albumin gibi proteinler ile SOD, CAT, glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon-S-transferaz (GST), glutatyon redüktaz (GR) gibi enzimatik antioksidanlar endojen kaynaklı antioksidan sisteme elemanlarını oluştururken C vitamini, E vitamini, alfa tokoferol, β -karoten gibi yapılar ise eksojen kaynaklı antioksidan sistem elemanlarını oluştururlar (91).

H_2O_2 hücredeki temel reaktif oksijen türevidir ve hücre için oldukça tehlikelidir. Öyleki düşük seviyelerdeyken apoptozis oluşumuna öncülük ederken, yüksek düzeyleri ise nekroz veya kaspaz bağımsız apoptozise neden olur (93). Antioksidan sistem içerisinde en önemli savunma mekanizmasını oluşturan enzimatik yapı GSH sistemidir. GSH'nin en önemli özelliği, H_2O_2 'i ve diğer peroksidazları indirgeme yeteneğine sahip GSH-Px içermesidir. Bu sırada GSH'da okside disülfid formu olan GSSG'a çevrilir ancak GSSG daha sonra glutatyon redüktaz ile tekrar GSH'a indirgenir (94). GSH-Px enziminin yanı sıra CAT enzimi ile de H_2O_2 toksik olmayan su ve moleküler oksijene dönüştürülebilmektedir. H_2O_2 türevi bu sistemler aracılığı ile yok edilemezse proteinler ve nükleik asitler gibi biyolojik moleküllerle etkileşerek onları hasara uğratan oldukça toksik $\cdot OH$ radikaline dönüşür (94).

Antioksidan/oksidan etkileri bilinen NO'nin mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Ancak bulunduğu ortamda $O_2^{\cdot -}$ ve lipit peroksit düzeylerinden daha fazla miktarda bulunduğu bu radikalleri etkisizleştirir ve SOD'u etkin hale getirerek antioksidan sistemi harekete geçirir (95).

Antioksidan sistem ve serbest radikal oluşumu arasında bir denge söz konusudur ve bu denge yardımıyla hücre koruması gerçekleşmektedir. Bu dengenin bozulması durumuna oksidatif stres adı verilir. Fazla miktarda serbest radikal oluşumu ya da yetersiz kalan antioksidan savunma sistemi oksidatif strese neden olurken ortaya çıkan bu durum sonucunda doku hasarı oluşmaktadır (91). Oksidatif stres; gen transkripsiyonu, sinyal iletimi başlatılması ve DNA hasarı gibi birçok biyolojik yanıtın oluşumunu uyarır. Bu uyarılar ile hücre ya nekroz, apoptozis veya yaşlanmaya doğru gider ya da antioksidan sistemin etkinliğinin artışı ile canlılığını korur ve çoğalır (92). Bu durum genetik alt yapı, reaktif oksijenlerin türü, oksidatif stresin şiddetine ve süresine bağlı olarak değişmektedir (96).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Cihazlar

1. Plate Okuma Cihazı (ELX800, Biotek, Tükiye)
2. Spektrofotometre (Analytikjena-SPECORD 50)
3. Su Banyosu (GFL-Wasserbad Water Bath)
4. Vorteks (Heidolph)
5. Hassas Terazı (Metler Toledo)
6. Mikropipet Seti (Gilson- Pipetman- P20-P100-P-1000)
7. Homojenizatör (Ultra)
8. Etüv (Binder)
9. pH Metre (Metler Toledo)
10. Soğutmalı Santrifüj (Sigma, 2-16K)
11. Distile Su Cihazı (Millipore)
12. Derin Dondurucu (Regal, RDD 1145)
13. Santrifüj (Sigma 16K)
14. Manyetik Karıştırıcı (Vert)
15. LightCycler 480 Real-Time PCR System (Roche Applied science)
16. 96 Well PCR Plate, Katalog No: 1402-9400 (USA Scientific)
17. PCR Plate Film, Katalog No: 2921-7800 (USA Scientific)
18. 8'li strip tüp
19. 8 kanallı pipet
20. Yüksek Kapasiteli RT-PCR Sistemi, Katalog No: BMK-PKG-MH
(Fluidigm, Biomark, USA)
21. Dynamic Array 96.96, Katalog No: BMK-M-96.96 (Fluidigm)
22. Sample&Assay Loading Kit, Katalog No: 85000802 (Fluidigm)

3.1.2. Sarf Malzemesi ve Kimyasal Maddeler

- 1.** Folin ciocalteu (Sigma)
- 2.** n-Butanol (Merck)
- 3.** Asetik asit (Sigma)
- 4.** Tiyobarbitürikasit (TBA) (Sigma)
- 5.** Sodyum dodesil sülfat (SDS) (Sigma)
- 6.** 1,1,3,3-tetrametoksiopropan (Sigma)
- 7.** 5,5'-ditiyo-bis [2-nitrobenzoyik asit](DTNB) (Sigma)
- 8.** Ksantin (Merck)
- 9.** Ksantin oksidaz (Sigma)
- 10.** 2-[4-iyodofenil] -3- [4-nitrofenol]-5-feniltetrazolium klorid (INT) (Sigma)
- 11.** 3-(sikloheksilamino)-1-propan sülfonik asit (CAPS) (Sigma)
- 12.** N-nitrozodietilamin (DEN) (Sigma)
- 13.** Ependorf tüpü
- 14.** Düz tabanlı, 96 kuyucuklu elisa plakları
- 15.** SB-431542, 4-[4-(1,3-benzodioxol-5-yl)-5-(2-pyridinyl)-1H-imidazol-2-yl) Benzamide
- 16.** TGF- β 1 Kit (Invitrogen Immunoassay Kit)
- 17.** cDNA kiti (mirVana™ PARIS™ Kit)
- 18.** 2-merkaptoetanol (Sigma)

3.2. Deneysel Hayvanlarının Seçimi ve Temini

Bu çalışmada MEÜ Tıp Fakültesi Deneysel Hayvanları Araştırma Laboratuvarı Üretim Birimi'nden temin edilen ortalama ağırlıkları 250-300 g olan, 59 adet yetişkin, erkek Wistar albino sıçanları kullanıldı. Sıçanlar toplam 7 kafeste muhafaza edildi. Sıçanlar deneysel çalışmalar süresince (13-22 hafta) sıcaklığı ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) ve nemi (55 ± 8) sabit tutulan odalarda muhafaza edildi. Havalandırma pencere tipi aspiratörle sağlanırken, odanın aydınlık-karanlık döngüsü otomatik denetleyici bir aygıt ile 12 saat aydınlık-12 saat karanlık olacak şekilde ayarlandı. Sıçanlar, temizliği düzenli olarak sağlanan plastik kafeslerde tutuldu ve beslenmeleri için hazır standart yem; su gereksinimleri için ise özel uygulamalar hariç, diğer sıçanlara çeşme suyu verildi.

3.3. Çalışma Grupları

Bu çalışmada kontrol, siroz, DMSO, siroz+SB-431542 (I) ($250\mu\text{g}/\text{kg}$), siroz+SB-431542 (II) ($500\mu\text{g}/\text{kg}$), siroz sonrasında+SB-431542 (I) ($250\mu\text{g}/\text{kg}$) ve siroz sonrasında+SB-431542 (II) ($500\mu\text{g}/\text{kg}$) olmak üzere 7 grup oluşturuldu. Daha önceki çalışmalarda elde edilen veriler ışığında siroz oluşumunun 10-12. haftada oluştuğu tespit edildiğinden 10. haftadan itibaren siroz oluşumunun takibi başlatıldı ve 10. haftanın sonunda 1 sıçan sakrifiye edildi. 10. haftada sakrifiye edilen sıçanda siroz bulguları tam olarak gözlenemediğinden 3 hafta daha çalışmaya devam edildi. 13. hafta sonunda siroz grubundan 2 sıçan daha sakrifiye edilerek siroz oluşumunun varlığı kanıtlandı. Deneysel çalışma protokolü tamamlanan tüm gruplarda ki sıçanlar anestezik madde (ketamin + xylazin) verilmek suretiyle, servikal dislokasyona tabi tutulup sakrifiye edilmiş ve hızlı bir şekilde dokuları diseke edilmiştir.

Kontrol Grubu: Çalışma grubuna 8 adet sıçan dahil edildi ve beslenmeleri için hazır standart yem; su gereksinimleri için ise çeşme suyu verildi. 13 haftalık periyot sonunda kontrol grubundaki sıçanlar öldürüldü.

Siroz Grubu: Çalışma grubuna 11 adet sıçan dahil edildi ve son derişimi 100 ppm olacak şekilde DEN ilave edilen su, 13 hafta süresince içme suyu olarak verildi. 10. haftadan itibaren siroz oluşumunun takibi başlatıldı ve 10. haftanın sonunda 1 sıçan sakrifiye edildi. 10. haftada sakrifiye edilen sıçanda siroz bulguları tam olarak

gözlenemediğinden 3 hafta daha çalışmaya devam edildi. 13. hafta sonunda siroz grubundan 2 sıçan daha sakrifiye edilerek siroz oluşumunun varlığı kanıtlandı. Bu teyitin ardından 13. haftanın sonunda bu gruptaki sıçanlar öldürüldü.

DMSO Grubu: Çalışma grubuna 8 adet sıçan dahil edildi ve son derişimi 100 ppm olacak şekilde DEN içeren içme suyu ile birlikte, SB431542 maddesinin DMSO'da çözülerek sıçanlara verilmesinden dolayı çalışmalarda DMSO'nun etkisini araştırmak amacıyla 13 hafta boyunca intraperitoneal olarak çözücü olarak kullanılan miktarda DMSO uygulaması yapıldı. Bu gruptaki sıçanlar 13. haftanın sonunda öldürüldü.

Siroz+SB431542 (I) (250 µg/kg/hafta) Grubu: Çalışma grubuna 8 adet sıçan dahil edildi. TGF-β Tip 1 reseptör kinaz inhibitörü olan SB431542'nin siroz oluşumu üzerindeki etkilerini gözlemek amacıyla bu gruptaki sıçanlara son derişimi 100 ppm olacak şekilde DEN içeren içme suyu ile birlikte 250 µg/kg/hafta olacak şekilde 13 hafta boyunca intraperitoneal olarak SB431542 uygulaması yapıldı. Bu gruptaki sıçanlar 13. hafta sonunda öldürüldü.

Siroz+SB431542 (II) (500 µg/kg/hafta) Grubu: Çalışma grubuna 8 adet sıçan dahil edildi. TGF-β Tip 1 reseptör kinaz inhibitörü olan SB431542'nin siroz oluşumu üzerindeki etkilerini gözlemek amacıyla bu gruptaki sıçanlara son derişimi 100 ppm olacak şekilde DEN içeren içme suyu ile birlikte 500 µg/kg/hafta olacak şekilde 13 hafta boyunca intraperitoneal olarak SB431542 uygulaması yapıldı. Bu gruptaki sıçanlar 13. hafta sonunda öldürüldü.

Siroz sonrasında+SB431542 (I) (250 µg/kg/hafta) Grubu: Çalışma grubuna 8 adet sıçan dahil edildi. TGF-β Tip 1 reseptör kinaz inhibitörü olan SB431542'nin siroz oluşuktan sonraki etkilerini gözlemek amacıyla bu gruptaki sıçanlara ilk olarak son derişimi 100 ppm olacak şekilde DEN içeren içme suyu 13 hafta boyunca verildi. Daha sonra 9 hafta boyunca 250 µg/kg/hafta olacak şekilde intraperitoneal olarak SB431542 uygulaması yapıldı. Gruptaki sıçanlar toplam 22. haftanın sonunda öldürüldü.

Siroz sonrasında+SB431542 (II) (500 µg/kg/hafta) Grubu: Çalışma grubuna 8 adet sıçan dahil edildi. TGF-β Tip 1 reseptör kinaz inhibitörü olan SB431542'nin siroz oluşuktan sonraki etkilerini gözlemek amacıyla bu gruptaki sıçanlara ilk olarak son derişimi 100 ppm olacak şekilde DEN içeren içme suyu 13 hafta boyunca verildi. Daha sonra 9 hafta boyunca 500 µg/kg/hafta olacak şekilde intraperitoneal olarak SB431542

uygulaması yapıldı. Bu gruptaki sıçanlardan 4 tanesi 22. haftada öldü. Bunun üzerine kalan sıçanlarda sakrifiye edildi.

3.4. Çalışma Örneklerinin Hazırlanışı

3.4.1. Doku Örnekleri

Deneysel çalışma sonrasında çalışma planına göre sakrifiye edilen sıçanların karaciğerleri diseke edildi. Karaciğerlerden alınan örneklerin bir kısmı histopatolojik incelemeler yapılmak üzere %10'luk formaldehit içerisinde patoloji laboratuvarına gönderildi. Kalan karaciğer dokusunun bir bölümünden total RNA izolasyonu yapıldı bir kısmı ise diğer biyokimyasal analizler yapılınca kadar -80°C'de muhafaza edildi.

3.5. Analiz Yöntemleri

3.5.1. Biyokimyasal Analizler

3.5.1.1. Apoptozis Belirteçlerinin İncelenmesi

3.5.1.1.1. Kaspaz-3, 8 ve 9 Gen Ekspresyon Ölçüm Yöntemi

Total RNA izolasyonu; dokudan mirVana™ PARIS™ (Ambion, California, USA) izolasyon kiti ile yapıldı. İzole edilen total RNA'lar Reverse Transcription kit (Qiagen, USA) protokolü uygulanarak cDNA ya dönüştürüldü ve cDNA'lar analiz gününe kadar -20°C'de saklandı. Daha sonra miRNA TaqMan PreAmplifikasyon protokolü uygulanarak preamp cDNA'lar elde edildi. PreAmp cDNA'lardan aynı gün kullanılmayanlar -20°C de aynı gün kullanılacak olanlar +4°C de saklandı. Son olarak Dynamic Array Gen Ekspresyon Protokolü gereğince Load ve Mix işlemleri tamamlanarak BioMark Data Collection software yazılımı eşliğinde GE 96.96 PCR+Melt v1 thermal protokolü uygulanarak elde edilen sonuçlar bilgisayara kaydedildi.

3.5.1.2. TGF- β Sitokin Ölçüm Yöntemi

TGF- β 1 sitokin düzeyleri ELISA yöntemi ile kitte açıklandığı şekilde araştırılmıştır (Invitrogen Immunoassay Kit). TGF- β 1 düzeyleri, 450 nm'de mikrotiter plak okuma cihazında absorbanans değeri ölçülerek tayin edildi. Sonuçlar TGF- β 1 standart eğri grafiklerinden değerlendirildi.

3.5.1.3. Antioksidan Kapasitenin İncelenmesi

3.5.1.3.1. Doku GSH Ölçümü

Prensip: GSH halinde bulunan tüm nonprotein sülfidril gruplarının, bir disülfid bileşiği olan 5,5'-ditiyo-bis [2-nitrobenzoyik asit] (DTNB)'yi redükleyerek, 412 nm dalga boyunda absorbanans veren sarı renkli bir kompleks oluşturması esasına dayanmaktadır. Ölçülen absorbanans değeri GSH miktarını yansıtmaktadır (94).

Ayırıcılar:

1. Çöktürücü Çözelti
2. 0,3 M Na₂HPO₄
3. % 0,40 DTNB Çözeltisi

Yöntem

Kör ve örneğe ait deney tüpleri aşağıda verilen şekilde hazırlandı.

	Kör (mL)	Örnek (mL)
Doku homojenatı	-	2
Saf su	2	-
Çöktürücü	3	3
Karışım 5 dakika bekletilir, örnek filtre kağıdından süzüldü.		
Süzüntü	2	2
0,3 M Na ₂ HPO ₄	8	8
Örneğin absorbanans değeri 412 nm'de köre karşı ölçüldü (OD1). Tüplere		
%0,04 DTNB	1	1

ilave edildi ve örnek tüpte oluşan renk 412 nm’de köre karşı ölçüldü (OD2).

Hesaplama

Glutasyon derişimi $\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein olarak hesaplandı.

$$\frac{C (\mu\text{mol}/\text{mL})}{1000} = \frac{(\text{OD2}-\text{OD1})}{13,600} \times \frac{5}{2}$$

$$C (\mu\text{mol}/\text{mL}) = (\text{OD2}-\text{OD1}) \times 0,184$$

$$\mu\text{mol}/\text{mg protein} = \frac{C (\mu\text{mol}/\text{mL})}{\text{Protein (mg / mL)}}$$

13,600: GSH ile DTNB etkileşimi sırasında oluşan sarı rengin molar ekstinksiyon katsayısı

C: $\mu\text{mol} / \text{mL}$ Glutasyon

OD1: DTNB ilave edilmeden önce 412 dalga boyunda ölçülen optik dansite

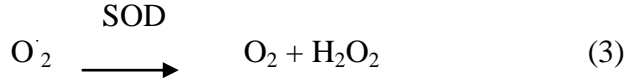
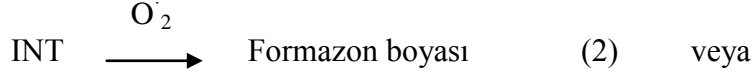
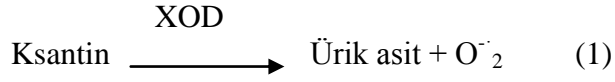
OD2: DTNB ilave edildikten sonra 412 dalga boyunda ölçülen optik dansite

1000 : μmol 'e dönüşüm katsayısı

5/2: seyreltme katsayısı

3.5.1.3.2. Doku SOD Ölçümü

Prensip: Aerobik organizmaların, O_2 varlığında oksidatif fosforilasyon ile enerji üretimi sırasında oluşan, endojen veya eksojen kaynaklı toksik süperoksit radikallerinin (O^{\cdot}_2) suya (H_2O) ve moleküler oksijene (O_2) dismutasyonunu hızlandıran SOD enzim aktivitesinin ölçüm prensibi, ksantin varlığında ksantin oksidaz'ın (XOD) açığa çıkardığı süperoksit radikallerinin 2-[4-iyodofenil]-3-[4-nitrofenol]-5-feniltetrazolium klorid (INT) ile 505 nm’de absorblanan kırmızı renkli formazon boyası oluşturmasının, ortamda bulunan SOD enzimi ile inhibisyonuna dayanmaktadır (95).



Ayır lar

1. CAPS (3-(sikloheksilamino)-1-propan sülfonik asit) Tamponu
2. Stok Substrat Karışımı
3. Günlük Substrat Karışımı
4. Ksantin Oksidaz (80 U/L)
5. 0,01 M Fosfat Tamponu (pH:7,0)
6. Standart (S6): 5,6 U/mL SOD içeren Ransod kitinin standartıdır.

SOD Standart Eğri  izimi

Liyofilize olarak hazırlanmış SOD standartı (S6) 10 mL distile su ile sulandırıldı. Standart eğri çiziminde kullanılacak olan diğer SOD derişimleri ise fosfat tamponuyla aşağıdaki tabloda verildiği şekilde hazırlandı.

Standartların Hazırlanışı

SOD Derişimi	Kullanılacak Standart	0,01 M Fosfat Tamponu
S5 (2,8 U/mL)	5 mL S6	5 mL
S4 (1,4 U/mL)	5 mL S5	5 mL
S3 (0,7 U/mL)	5 mL S4	5 mL
S2 (0,23 U/mL)	3 mL S3	6 mL

Standart eğri çizimi için 1mL'lik kuvars küvete ayıraçlar aşağıdaki şekilde ilave edildi.

Çözeltiler	Çalışma Körü	Standart
Standart (mL)	-	0,05
Fosfat tamponu (mL)	0,05	-
Günlük Substrat Karışımı (mL)	1,7	1,7
İyice karıştırılır.		
Ksantin Oksidaz (mL)	0,25	0,25

Küvetin ağzı parafilmle kapatılıp birkaç kez alt-üst edildikten sonra, 30. saniyede (A1) ve daha sonra 3. dakikada (A2) 37°C'da, 505 nm dalga boyunda havaya karşı absorbans değerleri okundu.

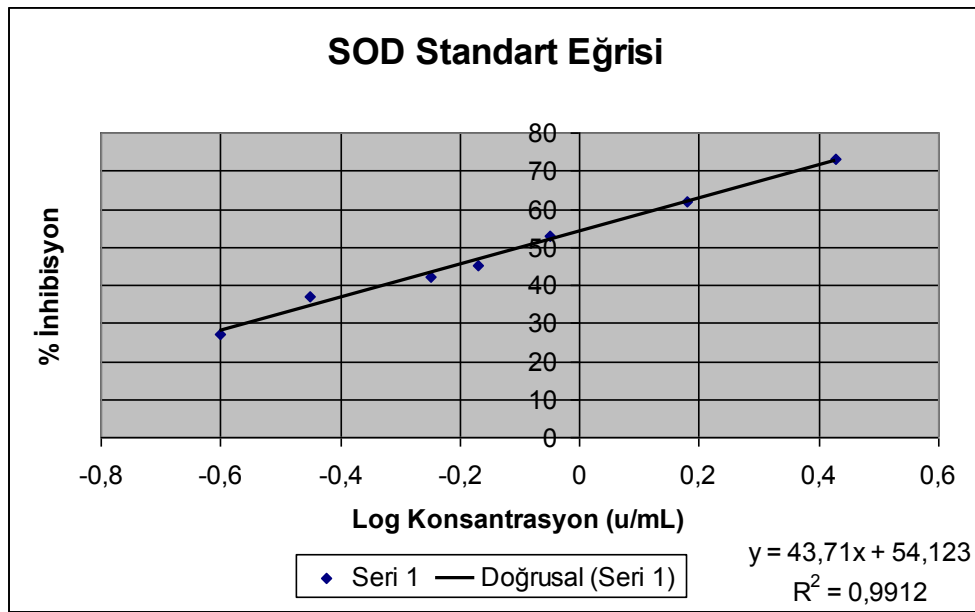
Hesaplama

Çalışma körü SOD içermediği için inhibisyona uğramamış reaksiyon olarak kabul edilir ve değeri % 100 olarak alınır. Tüm standartlar için % inhibisyon değeri bunlara ait değerlerin çalışma körüyle oranlanarak 100'den çıkarılması sonucu hesaplandı.

$$\Delta A/\text{dak}_{\text{standart}} = \frac{A2 - A1}{3 \text{ dakika}} \quad \Delta A/\text{dak}_{\text{çalışma körü}} = \frac{A2 - A1}{3 \text{ dakika}}$$

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

Her bir standart için hesaplama yapıldıktan sonra X (yatay) eksenine SOD derişimlerinin (U/mL) logaritmik dönüşüm değerleri, Y (dikey) eksenine standartlara ait % inhibisyon değeri yazılarak doğrusal bir standart eğri elde edildi.



Yöntem

Çalışma 1 mL'lik kuvars küvette yapıldı. Ayıraçlar, küvete aşağıdaki tabloda gösterildiği şekilde ilave edildi.

Çözeltiler	Çalışma Körü	Örnek
Doku homojenati (mL)	-	0,05
0.01 M Fosfat tamponu (mL)	0,05	-
Günlük Substrat Karışımı (mL)	1,7	1,7
İyice karıştırılır.		
Ksantin Oksidaz (mL)	0,25	0,25

Kuvars küvetin ağzı parafilmle kapatılıp birkaç kez alt-üst edildikten sonra oluşan rengin absorbans değerleri 30. saniyede (A1) ve daha sonra 3. dakikada (A2) 37°C, 505 nm dalga boyunda havaya karşı okundu.

Hesaplama

Çalışma körü ve örnek $\Delta A/\text{dak}$ cinsinden aşağıdaki şekilde hesaplandı.

$$\Delta A/\text{dak}_{\text{örnek}} = \frac{A2 - A1}{3 \text{ dakika}} \quad \Delta A/\text{dak}_{\text{çalışma körü}} = \frac{A2 - A1}{3 \text{ dakika}}$$

Hesaplanan $\Delta A/\text{dak}_{\text{örnek}}$ ve $\Delta A/\text{dak}_{\text{çalışma körü}}$ aşağıdaki formül uygulanarak değerlendirildi.

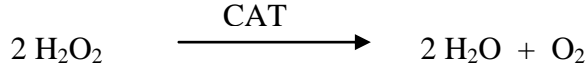
$$\% \text{ İnhibisyon}_{\text{örnek}} = 100 - \frac{\Delta A / \text{dak}_{\text{örnek}}}{\Delta A / \text{dak}_{\text{çalışma körü}}} \times 100$$

Örneğe ait hesaplanan yüzde inhibisyon değerine karşılık gelen SOD değeri ise standart eğri kullanılarak bulundu ve sonuçlar U/mg protein olarak değerlendirildi.

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

3.5.1.3.3. Doku CAT Ölçümü

Prensip: Bir antioksidan enzim olan CAT esas fonksiyonu, hücre için oldukça toksik olan singlet oksijen ve hidroksil radikalinin potansiyel kaynağı olan H_2O_2 'nin, su ve moleküler oksijene yıkımını katalizlemektir. Yöntem; H_2O_2 'nin ışığı absorbe etmesinden yararlanılarak 230 nm'de enzimin yıkım hızının spektrofotometrik olarak ölçümü esasına dayanmaktadır (94).

**Ayır a lar:**

1. 1 M Tris Tamponu (pH: 8,0)
2. 1 M Fosfat Tamponu (pH: 7.0)
3. 10 mM H₂O₂ (% 30'luk H₂O₂'den hazırlanır.)

1 M fosfat tamponu 1/10 oranında sulandırılır. Bunun 0.9 ml'sinin optik dansitesi saf su olan köre karşı 230 nm'de okundu (**OD₁**). Daha sonra 0.9 ml 1/10 oranında sulandırılmış 1 M fosfat tamponu üzerine 1/100 oranında sulandırılmış % 30'luk H₂O₂'den 0.1 ml eklenerek optik dansitesi okundu (**OD₂**). 1/100 sulandırılmış H₂O₂'nin derişimi **c = 141 x (OD₂-OD₁)** mM'dır. 10 mM H₂O₂ hazırlamak için, 1/100 seyreltilmiş H₂O₂'nin 1 mL'si derişimin 1/10'u  l s nde saf su ile tamamlanır.

Yöntem:

Ayır a lar 1 ml'lik kuvars küvete tabloda belirtilen oranlarda ilave edildi.

	K�r (�l)	�rnek (�l)
1 M Tris Tamponu	50	50
10 mM H ₂ O ₂	–	900
H ₂ O	930	30
37 �C'de 10 dakika inkübasyon		
Hemolizat	20	20

Hesaplama:

$$\text{CAT Aktivitesi (U/ml): } \frac{\Delta\text{OD/ dak}}{0,071} \times \frac{V_{\text{Toplam}}}{V_{\text{Örnek}}}$$

ΔOD = Optik Dansite Değişimi

0,071 = 1 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ 'nin 1 cm'lik ışık yolunda verdiği optik dansite değeri

V_{Toplam} = Toplam hacim

$V_{\text{Örnek}}$ = Hemolizat hacmi

$$\text{CAT (U/mg protein)} = \frac{\text{U/mL}}{\text{Protein (mg /mL)}}$$

3.5.1.3.4. Doku MDA Ölçümü

Prensip: Lipit peroksidasyonunun belirteci olan, sekonder bir ürün olarak oluşan aldehid grubundan MDA aerobik şartlarda pH 3,4'te tiyobarbitürik asit (TBA) ile 95 °C'de inkübasyonu sonucu oluşan pembe renkli kompleksin, 532 nm'deki absorbans değerinin ölçümü esasına dayanmaktadır (96).

Ayraçlar

1. % 8,1'lik SDS
2. % 20'lik Asetik Asit
3. % 0,8'lik Tiyobarbitürik asit (TBA)
4. n-Butanol / Piridin (nBu/Pri) Çözeltisi (15/1)
5. Stok Standart (1,1,3,3-tetrametoksipropan)

Yöntem

Çalışma için gerekli olan ayıraçlar aşağıda tabloda belirtildiği şekilde tüplere konuldu.

Çözeltiler	Kör	Standart	Örnek
Doku homojenatı (mL)	-	-	0,1
Standart (mL)	-	0,1	-
SDS (mL)	0,2	0,2	0,2
Asetik Asit (mL)	1,5	1,5	1,5
TBA (mL)	1,5	1,5	1,5
Saf Su (mL)	0,8	0,7	0,7
95 °C'de 30 dakika inkübe edilir ve tüpler çeşmenin altında soğutulur.			
Saf Su (mL)	1,0	1,0	1,0
nBu / pri	5,0	5,0	5,0

Tüplere konulan çözeltiler vortekslelendikten sonra 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi, üstteki organik kısım alınarak 532 nm'de absorbands değeri okundu. Sonuçlar nmol/mg protein olarak değerlendirildi.

$$\text{MDA (nmol/mg protein)} = \frac{\text{nmol / mL}}{\text{Protein (mg/mL)}}$$

3.5.1.3.5. Lowry Yöntemi ile Protein Tayini

Prensip: Alkali ortamda proteinlerin bakır sülfat ve fosfotungstik asit ile reaksiyona girerek oluşturduğu mavi renkli kompleksin 550 nm dalga boyunda absorbands değerinin ölçülmesi prensibine dayanmaktadır (97).

Ayıraçlar

1. % 2 (w/v) Na₂CO₃
2. % 1 (w/v) CuSO₄5H₂O

3. % 2 (w/v) Na-K tartarat

4. Folin-Ciocalteu Ayıracı

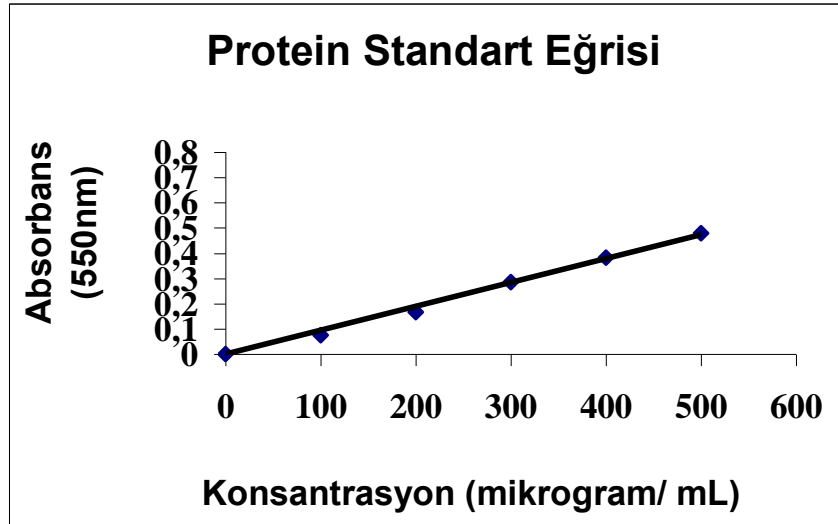
Günlük çözelti (Ayıraç C): 50 mL %2 (w/v) Na₂CO₃, 0,5 mL %1 (w/v) CuSO₄·5H₂O ve 0,5 mL %2 (w/v) Na-K tartarat ilave edilerek hazırlandı.

Protein Standart Eğri Çizimi:

Aşağıda verilen derişimlerde hazırlanan bovin serum albumin (BSA) kullanılarak standart eğri çizimi yapıldı.

Tüp No	Kör	1	2	3	4	5
BSA Standart Derişim (µg/mL)	-	100	200	300	400	500
İlgili BSA Standart çözeltisi (mL)	-	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Serum Fizyolojik (mL)	0,3	-	-	-	-	-
Ayıraç C (mL)	3	3	3	3	3	3
Karışım hazırlanıp oda ısısında 10 dk bekletildi.						
Folin-ciocalteu (mL)	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3

Tüplere ilave edildi ve 30 dk oda ısısında bekletildi. 550 nm'de köre karşı okundu ve standart konsantrasyonlarına karşı absorbans değerleri çizildi.



Yöntem

Çözeltiler tüplere aşağıdaki şekilde konuldu.

	Kör	Örnek
Saf su (mL)	0,3	-
Doku homojenatı (mL)	-	0,3
Günlük çözelti (mL)	3,0	3,0
Oda ısısında 10 dakika bekletildi		
Folin-ciocalteu ayıracağı (mL)	0,3	0,3

Oda ısısında 30 dakika bekletilen örneklerin, 550 nm’de köre karşı absorbanları okundu. Protein konsantrasyonu standart eğriden değerlendirildi.

3.5.2. Histopatolojik İnceleme

Çalışmaya dahil edilen tüm dokulardan elde edilen 5 µ kalınlığındaki parafin kesitler 55°C’deki sıcak su banyosundan lam üzerine alındı. 60°C etüvde 1 saat bekletildikten sonra oda ısısındaki ksilolde 30 dakika bekletildi. %50, %60, %70, %95 derecelik alkol serisinden geçirildi ve akar çeşme suyunda yıkandı. Hematoksilen solüsyonunda 5 dakika bekletildikten sonra tekrar akar çeşme suyunda yıkandı. %0,1 amonyaklı suda 1 saniye bekletildikten sonra tekrar akar çeşme suyunda yıkandı. %96’lık alkolde 1 saniye ve daha sonra eosin solüsyonunda 20 saniye bekletildi. Akar çeşme suyunda yıkandı. %50, %60, %70, %95 derecelik alkol serisinden geçirilen preparatlar kurutuldu. Oda ısısındaki ksilolde 10-20 dakika bekletilerek şeffaflaştırıldı ve entellan ile kapatıldı.

3.5.3. İstatistiksel Analizler

Veriler SPSS 11.5 paket programına girildikten sonra bütün parametreler için normallik testleri Shapiro-Wilk testi ile test edilmiştir ve normal dağılım gösterdiği belirlenmiştir. Varyans analizinin ön şartı olan homojenlik ön şart kontrolü yapılmış ve tüm parametrelerde bu ön şartın yerine gelmediği görülmüştür. Bu nedenle One Way Anova testi yerine Kruskal Wallis testi uygulanmıştır. Gruplar arası farklılıkların anlamlı olduğu durumlarda ikili karşılaştırmalar için Mann Whitney U testi kullanılmıştır. Tanımlayıcı istatistikler olarak minimum, maksimum, mean rank, medyan ve % 25-75 yüzdeler kullanılmıştır. Grafikler STATISTICA 8.0 paket programından elde edilmiştir. İstatistiksel anlamlılık sınırı $p < 0.05$ olarak alınmıştır.

4. BULGULAR

Bu çalışmaya toplam 59 adet yetişkin, erkek Wistar albino sıçan dahil edildi. Bu çalışmada kontrol, siroz, DMSO, siroz+SB-431542 (250µg/kg), siroz+SB-431542 (500µg/kg), siroz'dan sonra+SB-431542 (250µg/kg) ve siroz'dan sonra+SB-431542 (500µg/kg) olmak üzere 7 grup oluşturuldu.

Bu çalışmada, karaciğer sirozu üzerine TGF-β Tip I reseptör kinaz inhibitörü olan SB-431542'nin etkisini araştırmak amacı ile apoptozisin göstergesi olarak kaspaz-3, -8 ve -9 gen ekspresyonları ve TGF-β Tip I düzeyleri araştırıldı. Bunların yanı sıra karaciğer sirozunda oksidatif stresin arttığına bilinmesi nedeniyle antioksidan sistemde yer alan GSH miktarı, SOD ve CAT enzim aktiviteleri; ile lipid peroksidasyonunun göstergesi olarak MDA düzeyleri saptandı.

4.1. Biyokimyasal Bulgular

4.1.1. Apoptozis Belirteçlerine Ait Bulgular

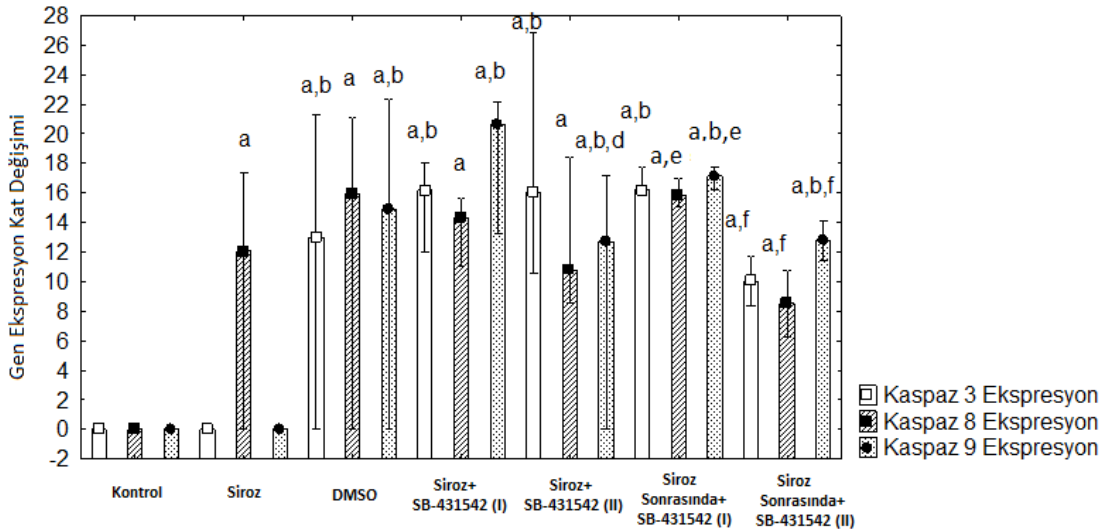
4.1.1.1. Kaspaz-3 Gen Ekspresyon Düzeyi

Kaspaz-3 gen ekspresyon düzeyleri kontrol ve siroz grupları arasında anlamlı bir değişim göstermemiştir. DMSO grubu kontrol ve siroz grubuna göre anlamlı bir artış göstermiştir (sırasıyla $p=0,016$ ve $p=0,010$). Siroz+SB431542 (I) grubu kontrol ve siroz grubuna göre anlamlı bir artış göstermiştir (sırasıyla $p=0,002$ ve $p=0,013$). Siroz+SB431542 (II) grubu, kontrol ve siroz grubuna göre anlamlı bir artış göstermiştir (sırasıyla $p=0,001$ ve $p=0,006$). Siroz sonrasında+SB431542 (I) grubu kontrol ve siroz grubuna göre anlamlı bir artış göstermiştir (sırasıyla $p=0,001$ ve $p=0,002$). Siroz sonrasında+SB431542 (II) grubu kontrol grubuna göre artarak, siroz sonrasında+SB431542 (I) grubuna göre ise azalarak anlamlı bir farklılık göstermiştir (sırasıyla $p=0,005$ ve $p=0,037$) (Çizelge 4.1, Şekil 4.1).

Çizelge 4.1. Apoptotik belirteçlerden olan kaspaz-3 gen ekspresyon düzeyinin her bir gruba göre değişimi

	Kaspaz-3 gen ekspresyonu		
	Min-max	Mean Rank	Medyan [% 25-75 yüzdellikler]
Kontrol	0,001-0,001	8,00	0,001 [0,001-0,001]
Siroz	0,001-15,207	11,00	0,001 [0,001-3,803]
DMSO	0,001-21,318	23,63 ^{a,b}	12,99518 [0,001-18,187]
Siroz+SB431542 (I)	12,024-18,049	30,00 ^{a,b}	16,19543 [12,730-17,500]
Siroz+SB431542 (II)	10,553- 26,877	30,38 ^{a,b}	16,04234 [11,798-21,784]
Siroz sonrasında+SB431542 (I)	12,772-17,737	31,25 ^{a,b}	16,19621 [15,975-17,240]
Siroz sonrasında+SB431542 (II)	8,372- 11,681	18,00 ^{a,f}	10,02675 [8,372-11,681]
P	0.0007		

a; Kontrol ile, b; Siroz ile, c; DMSO ile, d; Siroz+SB431542 (I) ile, e; Siroz+SB431542 (II) ile, f; Siroz sonrasında+SB431542 (I) ile farklılıkları göstermektedir. p < 0.05 istatistiksel olarak anlamlı.



Şekil 4.1. Apoptotik belirteçler olan kaspaz-3,8 ve 9 gen ekspresyonlarının gruplar arası karşılaştırmada gösterdiği değişimlerin bar grafik olarak gösterimi. *a; Kontrol ile, b; Siroz ile, c; DMSO ile, d; Siroz+SB431542 (I) ile, e; Siroz+SB431542 (II) ile, f; Siroz sonrasında+SB431542 (I) ile farklılıkları göstermektedir.*

4.1.1.2. Kaspaz-8 Gen Ekspresyon Düzeyi

Kaspaz-8 gen ekspresyonu siroz, DMSO, Siroz+SB431542 (I), Siroz+SB431542 (II), Siroz sonrasında+SB431542 (I), Siroz sonrasında+SB431542 (II) gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı bir artış göstermiştir (sırasıyla $p=0,017$, $p=0,004$, $p=0,001$, $p<0,001$, $p<0,001$, $p=0,003$). Siroz sonrasında+SB431542 (I) grubunda; Siroz+SB431542 (II) ve Siroz sonrasında+SB431542 (II) gruplarına göre de anlamlı bir artış göstermiştir (sırasıyla $p=0,027$ ve $p=0,037$) (Çizelge 4.2, Şekil 4.1).

Çizelge 4.2. Apoptotik belirteçlerden olan kaspaz-8 gen ekspresyon düzeyinin her bir gruba göre değişimi

	Kaspaz-8 gen ekspresyonu		
	Min-max	Mean Rank	Medyan [% 25-75 yüzdeler]
Kontrol	0,001-0,001	7,00	0,001 [0,001-0,001]
Siroz	0,001-17,344	21,57 ^a	12,05783 [0,001-15,728]
DMSO	0,001-21,130	29,50 ^a	15,93848 [2,574-17,805]
Siroz+SB431542 (I)	11,054-15,639	26,80 ^a	14,32046 [11,054-15,639]
Siroz+SB431542 (II)	8,579-18,417	24,25 ^a	10,80062 [8,785-15,159]
Siroz sonrasında+SB431542 (I)	11,686-16,985	34,50 ^{a,e}	15,83120 [15,172-16,525]
Siroz sonrasında+SB431542 (II)	6,249-10,772	17,00 ^{a,f}	8,51077 [6,249-10,772]
P	0.0023		

a; Kontrol ile, b; Siroz ile, c; DMSO ile, d; Siroz+SB431542 (I) ile, e; Siroz+SB431542 (II) ile, f; Siroz sonrasında+SB431542 (I) ile farklılıkları göstermektedir. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı.

4.1.1.3. Kaspaz-9 Gen Ekspresyon Düzeyi

Kaspaz-9 gen ekspresyonu kontrol ve siroz grupları arasında anlamlı bir değişim göstermemiştir. DMSO, Siroz+SB431542 (I), Siroz+SB431542 (II), Siroz sonrasında+SB431542 (I), Siroz sonrasında+SB431542 (II) grupları kontrol grubuna

göre anlamlı bir artış göstermiştir (*sırasıyla* $p=0,016$, $p=0,002$, $p=0,016$, $p=0,001$, $p=0,005$). DMSO, Siroz+SB431542 (I), Siroz+SB431542 (II), Siroz sonrasında+SB431542 (I) , Siroz sonrasında+SB431542 (II) grupları siroz grubuna göre de anlamlı bir artış göstermiştir (*sırasıyla* $p=0,016$, $p=0,002$, $p=0,016$, $p=0,001$, $p=0,005$). Siroz+SB431542 (II) grubu, Siroz+SB431542 (I) grubuna göre anlamlı bir azalma göstermiştir ($p=0,005$). Siroz sonrasında+SB431542 (I) grubu Siroz+SB431542 (II) ve Siroz sonrasında+SB431542 (II) gruplarına göre anlamlı bir artış göstermiştir ($p=0,027$, $p=0,016$) (Çizelge 4.3, Şekil 4.1).

Çizelge 4.3. Apoptotik belirteçlerden olan kaspaz-9 gen ekspresyon düzeyinin her bir gruba göre değişimi

	Kaspaz 9 ekspresyonu		
	Min-max	Mean Rank	Medyan [% 25-75 yüzdellikler]
Kontrol	0,001-0,001	10,50	0,001 [0,001-0,001]
Siroz	0,001-0,001	10,50	0,001 [0,001-0,001]
DMSO	0,001-22,342	27,31 ^{a,b}	14,91291 [0,001-20,502]
Siroz+SB431542 (I)	13,210-22,143	36,40 ^{a,b}	20,62202 [14,484-21,687]
Siroz+SB431542 (II)	0,001-17,155	21,44 ^{a,b,d}	12,70790 [0,001-16,011]
Siroz sonrasında+SB431542 (I)	14,376-17,709	33,63 ^{a,b,e}	17,14317 [16,356-17,629]
Siroz sonrasında+SB431542 (II)	11,419-14,132	23,50 ^{a,b,f}	12,77568 [11,419-14,132]
P	0.0002		

a; Kontrol ile, b; Siroz ile, c; DMSO ile, d; Siroz+SB431542 (I) ile, e; Siroz+SB431542 (II) ile, f; Siroz sonrasında+SB431542 (I) ile farklılıkları göstermektedir. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı.

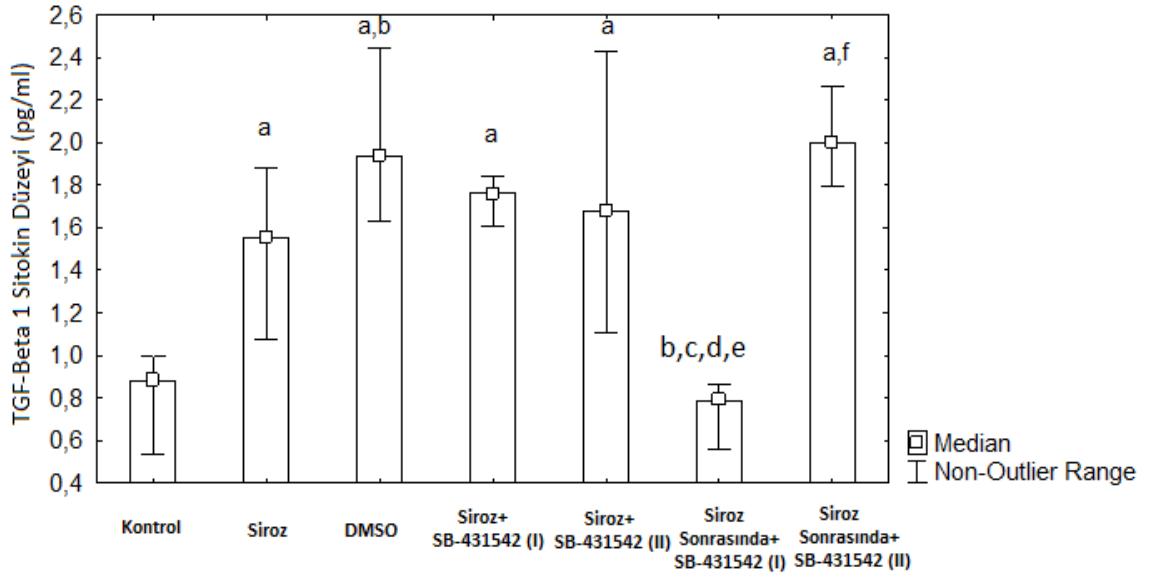
4.1.2. TGF-β1 Düzeyleri

TGF-β1'in çeşitli nedenlere bağlı olarak aşırı artışıyla birlikte karaciğer doku matriksinde düzensiz bir biçimde çoğalma ve karaciğerde önce fibroz, sonrasında ise siroz oluşumu meydana gelir. Bu çalışmada TGF-β1 sitokin düzeyleri Siroz, DMSO, Siroz+SB431542 (I), Siroz+SB431542 (II), Siroz sonrasında+SB431542 (II) gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı bir artış göstermiştir (*sırasıyla* $p=0,001$, $p=0,001$, $p=0,002$, $p=0,001$, $p=0,007$). DMSO grubu, siroz grubuna göre artarak anlamlı bir farklılık göstermiştir ($p=0,0018$). Siroz sonrasında+SB431542 (I) grubunda; siroz, DMSO, Siroz+SB431542 (I), Siroz+SB431542 (II) ve Siroz sonrasında+SB431542 (II) gruplarına göre anlamlı bir azalma gözlenmiştir (*sırasıyla* $p=0,001$, $p=0,002$, $p=0,001$, $p=0,007$, $p=0,002$) (Çizelge 4.4, Şekil 4.2).

Çizelge 4.4. TGF-β1 düzeylerinin gruplar arasındaki değişimi

	TGF-beta		
	Min-max	Mean Rank	Medyan [% 25-75 yüzdeler]
Kontrol	0,539-0,998	9,88	0,88150 [0,59625-0,984]
Siroz	1,077-1,879	26,86 ^a	1,55200 [1,098-1,863]
DMSO	1,634-2,441	37,71 ^{a,b}	1,93800 [1,799-2,107]
Siroz+SB431542 (I)	1,253-2,298	31,00 ^a	1,76150 [1,520-1,953]
Siroz+SB431542 (II)	1,103-2,431	31,50 ^a	1,67700 [1,482-2,234]
Siroz sonrasında+SB431542 (I)	0,561-0,864	7,13 ^{b,c,d,e}	0,78850 [0,608-0,853]
Siroz sonrasında+SB431542 (II)	1,795-2,260	37,50 ^{a,f}	1,99700 [1,802-2,238]
P	<0.001		

a; Kontrol ile, b; Siroz ile, c; DMSO ile, d; Siroz+SB431542 (I) ile, e; Siroz+SB431542 (II) ile, f; Siroz sonrasında+SB431542 (I) ile farklılıkları göstermektedir. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı.



Şekil 4.2. TGF- β 1 düzeylerinin gruplar arası değişimlerinin bar grafik olarak gösterimi. *a*; Kontrol ile, *b*; Siroz ile, *c*; DMSO ile, *d*; Siroz+SB431542 (I) ile, *e*; Siroz+SB431542 (II) ile, *f*; Siroz sonrasında+SB431542 (I) ile farklılıkları göstermektedir

4.1.2. Antioksidan Kapasite

Bu çalışmada antioksidan kapasiteyi değerlendirmek amacı ile antioksidan sistemde yer alan GSH miktarı, SOD ve CAT enzim aktiviteleri; ile lipit peroksidasyonunun göstergesi olarak ise MDA düzeyleri saptandı.

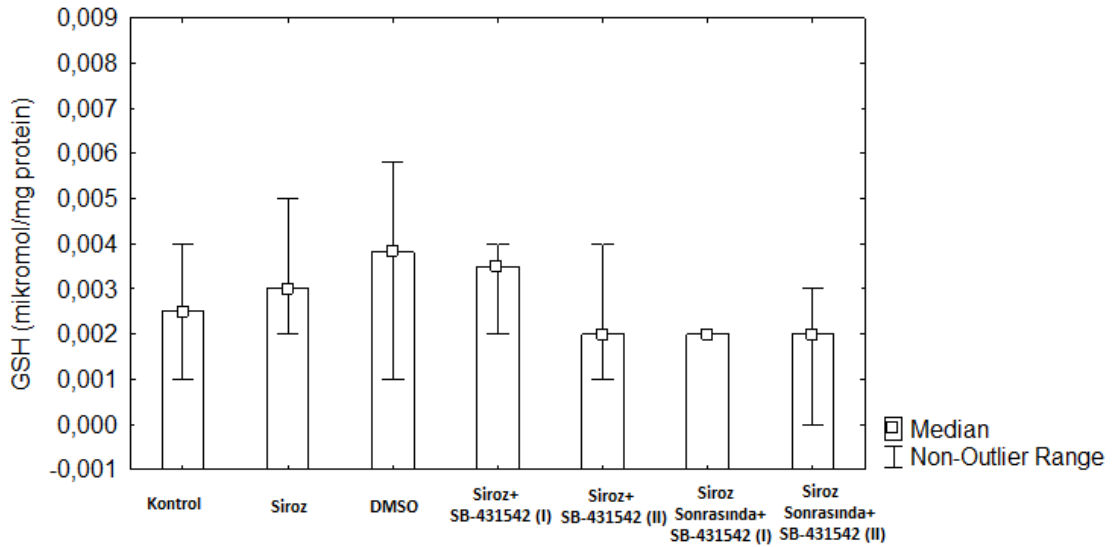
4.1.2.1. Doku GSH Düzeyleri

Bu çalışmada antioksidan kapasiteyi değerlendirmek amacı ile antioksidan sistemde yer alan GSH miktarları incelenmiş ancak hiçbir grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p=0,1254$) (Çizelge 4.5, Şekil 4.3).

Çizelge 4.5. GSH düzeylerinin gruplar arasındaki değişimi

	GSH		
	Min-max	Mean Rank	Medyan [% 25-75 yüzdeler]
Kontrol	0,001-0,009	24,25	0,00250 [0,002-0,004]
Siroz	0,002-0,005	28,06	0,00300 [0,002-0,005]
DMSO	0,001-0,008	31,20	,00600 [0,003-0,008]
Siroz+SB431542 (I)	0,002-0,009	30,17	0,00350 [0,002-0,005]
Siroz+SB431542 (II)	0,001-0,007	20,69	0,00200 [0,001-0,004]
Siroz sonrasında+SB431542 (I)	0,001-0,003	16,19	0,00200 [0,002-0,002]
Siroz sonrasında+SB431542 (II)	0,000-0,003	15,63	0,00200 [0,001-0,003]
P	0.1254		

$p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı.



Şekil 4.3. GSH düzeylerinin gruplar arası değişiminin bar grafik olarak gösterimi.

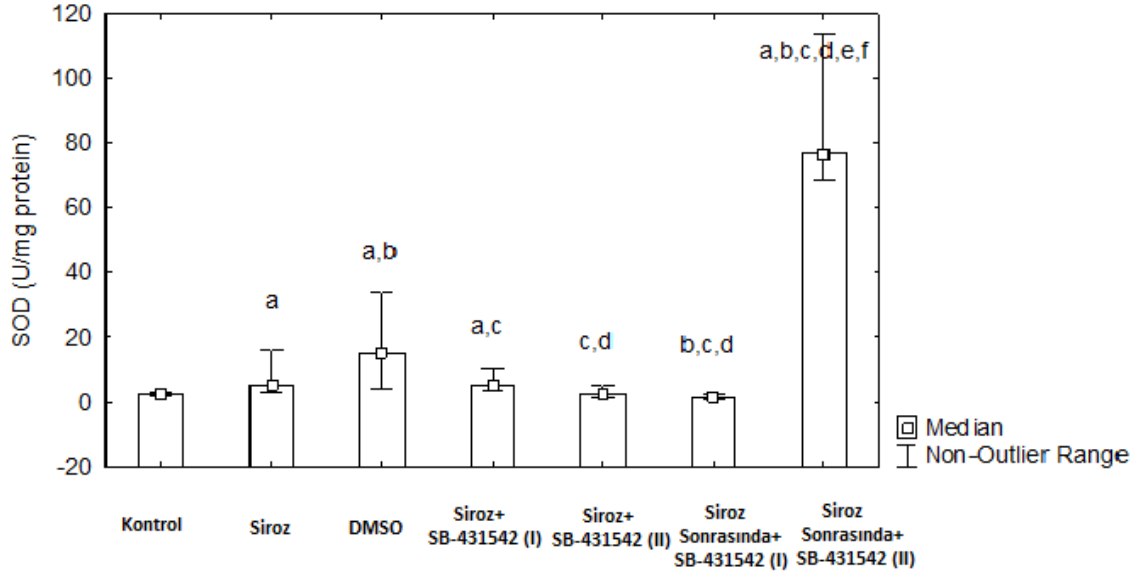
4.1.2.2. Doku SOD Aktivitesi

Siroz grubu; kontrol grubuna göre anlamlı bir artış göstermiştir ($p=0,033$). DMSO grubu; kontrol ve siroz grubuna göre anlamlı bir artış göstermiştir (sırasıyla $p=0,003$ ve $p=0,027$). Siroz+SB431542 (I) grubu; kontrol grubuna göre artarak, DMSO grubuna göre ise azalarak anlamlı farklılık göstermiştir (sırasıyla $p=0,045$, $p=0,040$). Siroz+SB431542 (II) grubu; DMSO ve Siroz+SB431542 (I) gruplarına göre anlamlı bir azalma göstermiştir (sırasıyla $p=0,010$, $p=0,045$). Siroz sonrasında+SB431542 (I) grubu; siroz, DMSO, Siroz+SB431542 (I) gruplarına göre anlamlı bir azalma göstermiştir (sırasıyla $p=0,001$, $p=0,001$, $p=0,004$). Siroz sonrasında+SB431542 (II) grubu diğer tüm gruplara göre anlamlı bir artış göstermiştir (sırasıyla $p=0,011$, $p=0,007$, $p=0,007$, $p=0,014$, $p=0,011$, $0,008$) (Çizelge 4.6, Şekil 4.4).

Çizelge 4.6. SOD enzim aktivitesinin gruplar arasındaki değişimi

	SOD		
	Min-max	Mean Rank	Medyan [% 25-75 yüzdeler]
Kontrol	0,400-7,350	14,08	2,46000 [1,660-4,140]
Siroz	2,660-16,020	25,19 ^a	5,01000 [3,110-8,627]
DMSO	4,020-33,780	33,63 ^{a,b}	15,15500 [6,480-22,932]
Siroz+SB431542 (I)	3,180-10,200	25,80 ^{a,c}	5,22000 [3,180-10,200]
Siroz+SB431542 (II)	1,270-5,100	14,67 ^{c,d}	2,63000 [1,315-4,643]
Siroz sonrasında+SB431542 (I)	0,900-2,270	6,86 ^{b,c,d}	1,56000 [1,030-1,810]
Siroz sonrasında+SB431542 (II)	68,330-113,470	42,50 ^{a,b,c,d,e,f}	76,74500 [68,515-106,208]
P			<0.001

a; Kontrol ile, b; Siroz ile, c; DMSO ile, d; Siroz+SB431542 (I) ile, e; Siroz+SB431542 (II) ile, f; Siroz sonrasında+SB431542 (I) ile farklılıkları göstermektedir. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı.



Şekil 4.4. SOD enzim aktivitesinin gruplar arası değişiminin bar grafik olarak gösterimi. *a*; Kontrol ile, *b*; Siroz ile, *c*; DMSO ile, *d*; Siroz+SB431542 (I) ile, *e*; Siroz+SB431542 (II) ile, *f*; Siroz sonrasında+SB431542 (I) ile farklılıkları göstermektedir.

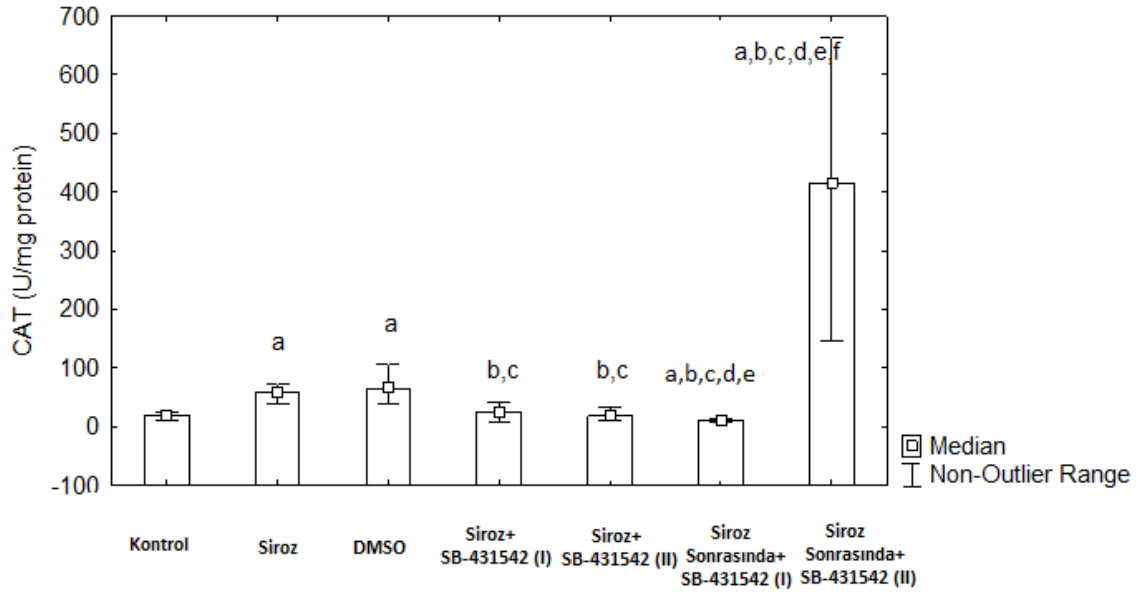
4.1.2.3. Doku CAT Aktivitesi

Siroz ve DMSO grupları kontrol grubuna göre anlamlı bir artış göstermiştir (sırasıyla $p=0,001$ ve $p=0,001$). Siroz+SB431542 (I) grubu siroz ve DMSO gruplarına göre anlamlı bir azalma göstermiştir (sırasıyla $p=0,010$ ve $p=0,005$). Siroz+SB431542 (II) grubu da siroz ve DMSO gruplarına göre anlamlı bir azalma göstermiştir (sırasıyla $p=0,001$ ve $p=0,001$). Siroz sonrasında+SB431542 (I) grubu tüm gruplara göre anlamlı bir azalma göstermiştir (sırasıyla $p=0,002$, $p=0,001$, $p=0,001$, $p=0,028$, $p=0,021$, $0,007$). Siroz sonrasında+SB431542 (II) grubu diğer tüm gruplara göre anlamlı bir artış göstermiştir (sırasıyla $p=0,007$, $p=0,007$, $p=0,007$, $p=0,011$, $p=0,008$, $0,007$) (Çizelge 4.7, Şekil 4.5).

Çizelge 4.7. CAT enzim aktivitesinin gruplar arasındaki değişimi

	CAT		
	Min-max	Mean Rank	Medyan [% 25-75 yüzdelikler]
Kontrol	11,511-25,223	17,88	19,79698 [14,68230-22,75391]
Siroz	37,894-72,343	35,69 ^a	58,15208 [42,25073-71,20158]
DMSO	37,894-106,103	38,56 ^a	65,10884 [55,46466-96,86066]
Siroz+SB431542 (I)	8,941-42,366	20,67 ^{b,c}	24,86796 [13,18635-41,19822]
Siroz+SB431542 (II)	10,304-31,760	17,14 ^{b,c}	18,18914 [10,40455-31,62020]
Siroz sonrasında+SB431542 (I)	7,992-12,665	6,75 ^{a,b,c,d,e}	10,62698 [9,10439-12,05138]
Siroz sonrasında+SB431542 (II)	144,686-663,146	47,50 ^{a,b,c,d,e,f}	414,46601 [183,11859-629,98840]
P	<0.001		

a; Kontrol ile, b; Siroz ile, c; DMSO ile, d; Siroz+SB431542 (I) ile, e; Siroz+SB431542 (II) ile, f; Siroz sonrasında+SB431542 (I) ile farklılıkları göstermektedir. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı.



Şekil 4.5. CAT enzim aktivitesinin gruplar arası değişiminin bar grafik olarak gösterimi. *a; Kontrol ile, b; Siroz ile, c; DMSO ile, d; Siroz+SB431542 (I) ile, e; Siroz+SB431542 (II) ile, f; Siroz sonrasında+SB431542 (I) ile farklılıkları göstermektedir.*

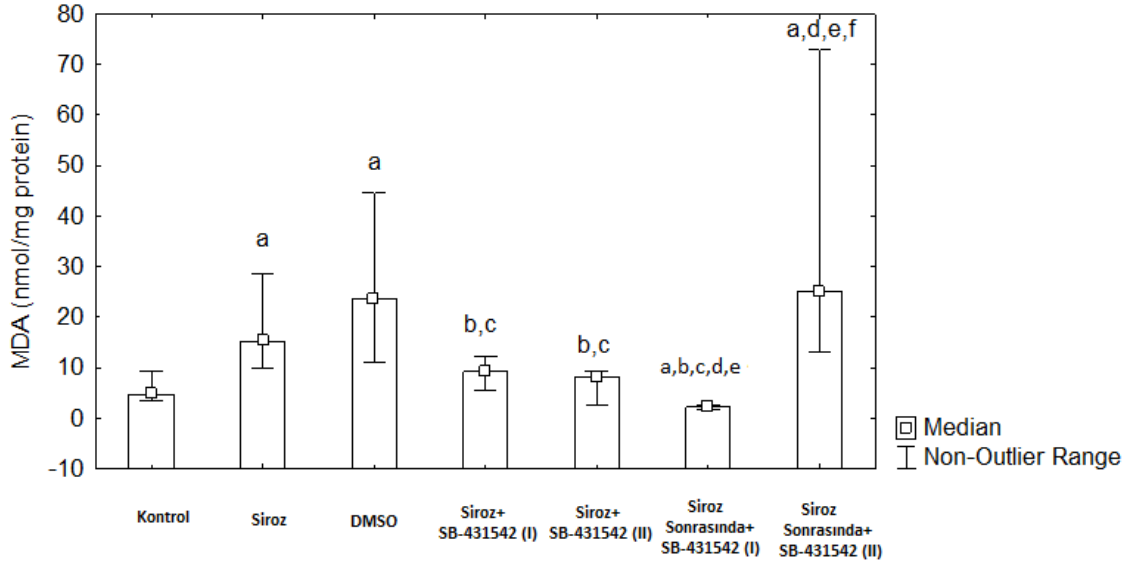
4.1.2.5. Doku MDA Düzeyleri

Siroz ve DMSO grupları kontrol grubuna göre anlamlı bir artış göstermiştir (sırasıyla $p=0,001$ ve $p=0,001$). Siroz+SB431542 (I) grubu, siroz ve DMSO gruplarına göre anlamlı bir azalma göstermiştir (sırasıyla $p=0,028$ ve $p=0,008$). Siroz+SB431542 (II) grubu da siroz ve DMSO gruplarına göre anlamlı bir azalma göstermiştir (sırasıyla $p=0,001$ ve $p=0,001$). Siroz sonrasında+SB431542 (I) grubu tüm gruplara göre anlamlı bir azalma göstermiştir (sırasıyla $p=0,002$, $p=0,001$, $p=0,001$, $p=0,003$, $p=0,002$, $0,007$). Siroz sonrasında+SB431542 (II) grubu; kontrol, Siroz+SB431542 (I), Siroz+SB431542 (II) ve Siroz sonrasında+SB431542 (I) gruplarına göre anlamlı bir artış göstermiştir (sırasıyla $p=0,007$, $p=0,014$, $p=0,007$) (Çizelge 4.8, Şekil 4.6).

Çizelge 4.8. MDA düzeylerinin gruplar arasındaki değişimi

	MDA		
	Min-max	Mean Rank	Medyan [% 25-75 yüzdeler]
Kontrol	3,390-9,280	16,56	4,81000 [3,68750-8,25000]
Siroz	10,020-28,480	35,75 ^a	15,23500 [10,65500-19,18250]
DMSO	10,950-44,660	41,13 ^a	23,59000 [13,83000-32,16750]
Siroz+SB431542 (I)	5,440-12,320	24,60 ^{b,c}	9,20000 [5,53500-11,38000]
Siroz+SB431542 (II)	2,730-9,410	18,25 ^{b,c}	8,05500 [3,63500-8,81500]
Siroz sonrasında+SB431542 (I)	1,780-3,740	5,06 ^{a,b,c,d,e}	2,25000 [2,00250-2,65000]
Siroz sonrasında+SB431542 (II)	13,050-73,110	42,00 ^{a,d,e,f}	25,00000 [13,58500-63,53500]
P			<0.001

a; Kontrol ile, b; Siroz ile, c; DMSO ile, d; Siroz+SB431542 (I) ile, e; Siroz+SB431542 (II) ile, f; Siroz sonrasında+SB431542 (I) ile farklılıkları göstermektedir. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı.



Şekil 4.6. MDA düzeylerinin gruplar arası değişiminin bar grafik olarak gösterimi. *a*; Kontrol ile, *b*; Siroz ile, *c*; DMSO ile, *d*; Siroz+SB431542 (I) ile, *e*; Siroz+SB431542 (II) ile, *f*; Siroz sonrasında+SB431542 (I) ile farklılıkları göstermektedir.

4.2. Karaciğer Dokularına Ait Bulgular

4.2.1. Karaciğer Dokularına Ait Histopatolojik Bulgular

Histopatolojik incelemeler sonucunda kontrol gruplarındaki sıçanlarda normal karaciğer dokusu gözlemlendi (Şekil 4.7).

Siroz grubunda kurban edilen sıçanların karaciğer normal yapının bozulduğu, karaciğerin ince fibröz septalarında mikronodüllere ayrıldığı, portal alanlarda ve fibroz septalar üzerinde mononükleer iltihabi hücre ile duktuler proliferasyonun varlığı, parankimde belirgin rejenerasyon bulguları, yer yer displastik değişiklikler ve siroz gözlemlenmiştir (Şekil 4.8).

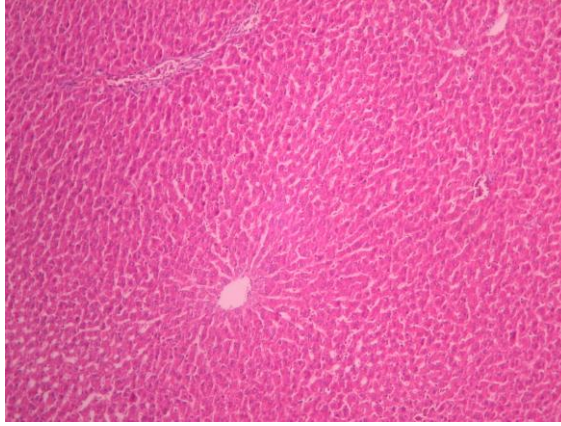
DMSO grubunda siroz, displastik nodüller ve tümör hücreleri görüldü (Şekil 4.9).

Siroz+SB431542 (I) grubunda presiroz+siroz, siroz, ağır displastik nodülde belirgin nükleus ve şeffaflaşma gösteren hepatositler gözlemlendi (Şekil 4.10). Siroz+SB431542 (II) grubunda ise siroz, displastik nodüller gözlemlendi (Şekil 4.11).

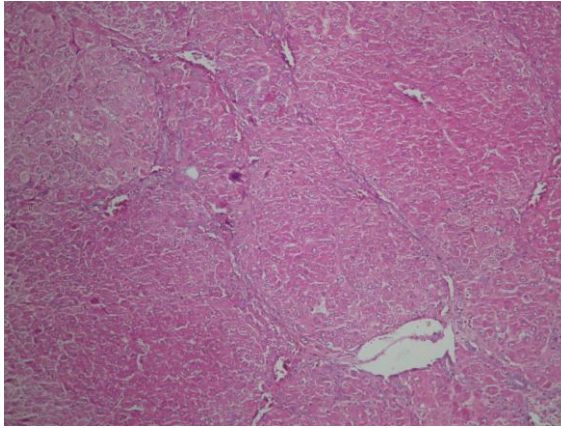
Siroz sonrasında+SB431542 (I) grubundaki sıçanlarda ise karaciğer dokularının portal alanlarda minimal mononükleer iltihap hücresi ve fibroz doku artımı, parankimde

hidropik dejenerasyon, fokal balonlaşma dejenerasyonu ve rejenerasyon bulguları görüldü (Şekil 4.12).

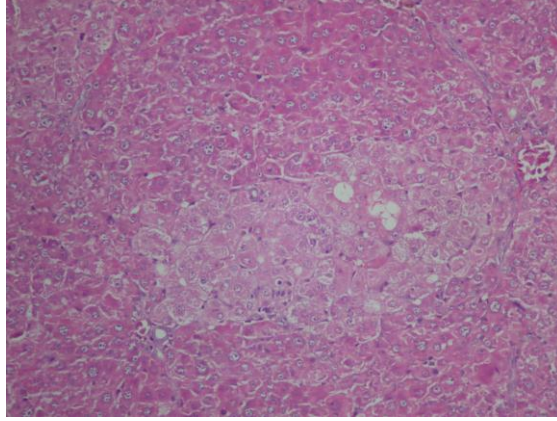
Siroz sonrasında+SB431542 (II) grubunda siroz ve displastik nodüller ve tümör hücreleri gözlemlendi (Şekil 4.13).



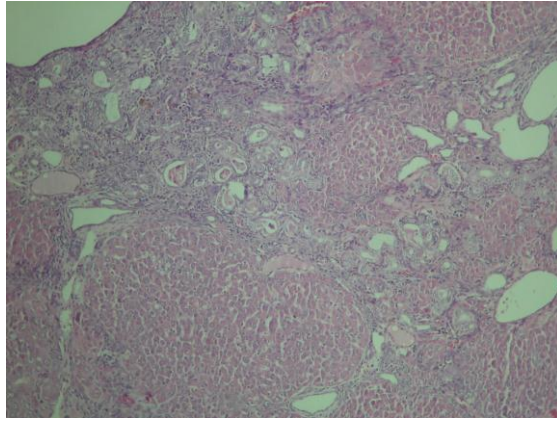
Şekil 4.7. Kontrol grubundaki sıçanların karaciğer dokularına ait HE boyamalarının fotomikrograf görüntüsü (*HEX100*).



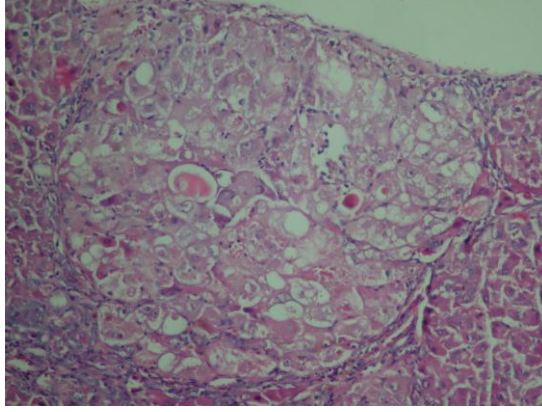
Şekil 4.8. Siroz grubundaki sıçanların karaciğer dokularına ait HE boyamalarının fotomikrograf görüntüsü (*HEX100*).



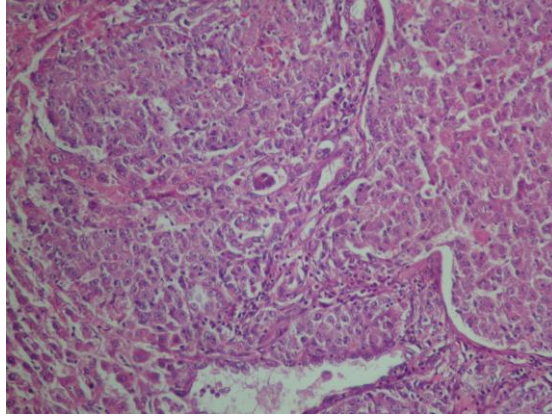
Şekil 4.9. DMSO grubundaki sıçanların karaciğer dokularına ait HE boyamalarının fotomikrograf görüntüsü (*HEX100*).



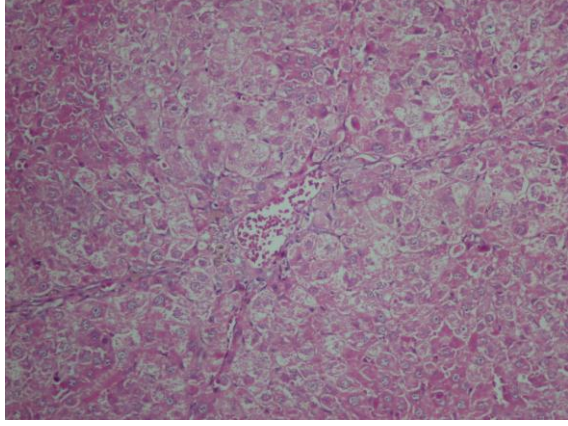
Şekil 4.10. Siroz+SB431542 (I) grubundaki sıçanların karaciğer dokularına ait HE boyamalarının fotomikrograf görüntüsü (*HEX100*).



Şekil 4.11. Siroz+SB431542 (II) grubundaki sıçanların karaciğer dokularına ait HE boyamalarının fotomikrograf görüntüsü (*HEX100*).



Şekil 4.12. Siroz sonrasında+SB431542 (I) grubundaki sıçanların karaciğer dokularına ait HE boyamalarının fotomikrograf görüntüsü (*HEX100*).



Şekil 4.13. Siroz sonrasında+SB431542 (II) grubundaki sıçanların karaciğer dokularına ait HE boyamalarının fotomikrograf görüntüsü (*HEX100*).

5. TARTIŞMA

Sürekli ve kontrolsüz hücre çoğalmasının, karaciğer sirozu gibi hastalıkların ilerlemesinde ve hücre döngüsünün bozulmasında önemli bir rol oynadığı ve proliferasyon/apoptozis arasındaki dengenin proliferasyon yönünde olduğu bilinmektedir (15). Karaciğer sirozu oluşumundan sonraki 9 haftalık süreçte uygulanan 250µg/kg/hafta'lık SB431542 maddesinin azalmış olan apoptozis mekanizmasını indüklediği ve apoptotik belirteç sonuçlarına göre proliferasyon/apoptozis arasındaki dengeyi apoptozis tarafına kaydırarak siroz oluşumunun önüne geçtiği saptandı. TGF-β1 sitokin düzeyleri incelendiğinde yine siroz sonrasında 250 µg/kg/hafta SB431542 uygulanan gruptaki sıçanlarda, siroz oluşumunda aşırı artan TGF-β1 düzeyinin normal seviyeye düştüğünü, siroz oluşumunun önüne geçildiğini ve böylece siroz tedavisine katkıda bulunduğunu belirtebiliriz.

Gerek ülkemizde gerek dünyada en büyük sağlık sorunlarından biri olan ölümcül karaciğer sirozunun başlıca iki nedeni vardır; bunlar kronikleşen viral hepatitler ve alkoldür. Batı ülkelerinde karaciğer sirozuna yol açan en önemli neden alkolken uzakdoğu, ortadoğu ve bu kuşakta yer alan ülkemizde ise viral hepatitlerdir (6).

Bu çalışmada nitrozaminler arasındaki en önemli çevresel karsinojenlerden biri ve karaciğer tümörünün primer indükleyicisi olan DEN, 13 hafta boyunca sıçanlara günlük dozu 100 ppm olacak şekilde içme suyu ile verilerek deneysel karaciğer sirozu oluşturuldu. Daha önce yaptığımız çalışmalarda içme suyuna ilave edilen DEN'in 10-12 hafta boyunca tüketilmesi sonucunda karaciğer sirozu oluşumunun gözlenmesi ve sonrasında ise 18-20. hafta itibariyle hepatoselüler karsinom oluşumu tespit ettiğimizden dolayı bu çalışmada da DEN kullandık (98). DEN, mutasyona uğramış karaciğer hücrelerinin sayısının artmasına katkıda bulunarak karaciğer çalışmalarında model olarak kabul edilir (99).

Tessitore ve Bollita da karaciğere 200mg/kg DEN uygulamasının fibroz ve nekroza sebep olduğunu bildirmişlerdir (100). Finnberg sıçanlarda yaptığı çalışmada DEN uygulaması ile akut karaciğer hasarı oluştuğunu bildirmiştir (101). Gang-Hong Lee fareler üzerinde vücut ağırlıklarına göre intraperitoneal enjeksiyonlar ile uyguladığı DEN ile kısa sürede karaciğer tümörlerini oluşturduğunu bildirmiştir (102).

Kaspazlar pek çok hücre tipinde apoptozise neden olurlar. Kaspazların birçoğu inaktif proenzimler olarak sentezlenirler ve apoptozise giderken kırılarak aktif forma dönüşürler. Günümüze kadar 14 kaspaz enziminin apoptotik yol iziyle ilişkili olduğu bildirilmiştir (54). Çok sayıda farklı kaspaz enzimi keşfedilmesine ve birçok molekül bunların aktivitesini düzenlemesine rağmen, moleküler apoptotik yol izi ile kaspazların organizmadaki fizyolojik ve patolojik rolleri arasında temel bir bağlantı vardır (103).

Bu çalışmamızda apoptotik yol izlerinin her ikisinin de ortak efektör kaspazı olan kaspaz-3 enziminin gen ekspresyonları kontrol ve siroz grupları arasında anlamlı bir değişim göstermemiştir. DMSO grubu, Siroz+SB431542 (I) grubu, Siroz+SB431542 (II) grubu ve Siroz sonrasında+SB431542 (I) grubu; kontrol ve siroz grubuna göre anlamlı derecede bir artış göstermişlerdir. Siroz sonrasında+SB431542 (II) grubu kontrol grubuna göre artarak, siroz sonrasında+SB431542 (I) grubuna göre ise azalarak anlamlı bir farklılık göstermiştir.

Bantel ve ark. apoptozisten sorumlu efektör enzim olan kaspaz-3 ölçümünün, ilerleyen karaciğer fibrozu ve sirozu ile sonuçlanan karaciğer hasarının tanımlanmasında hassas bir belirteç olduğunu vurgulamışlardır (104).

Sun ve ark. yapmış oldukları çalışmada karaciğer sirozunun hücre apoptozisi ile kaspaz-3 enziminin gen ekspresyonu arasında bir korelasyon olmamasına rağmen kaspaz-3 enziminin gen ekspresyonu azalmasının apoptozis mekanizmasını negatif yönde etkileyip hasarlı hücrelerin ortadan kaldırılmasını azalttığı için karaciğer sirozu oluşumuna katkıda bulunabileceğini bildirmişlerdir (105).

Apoptozis, DNA'nın parçalara ayrılmasına neden olan *downstream* kaspazların aktivasyonu ile sonuçlanan intrensek ya da ekstrensek yol izlerinden birinin uyarılması ile başlatılır. Ölüm reseptörü yol izi olarak da bilinen ekstrensek yol izi, hücre yüzeyinde bulunan reseptöre ligandının bağlanması sonucu uyarılır ve bu uyarılma daha sonra kaspaz-8'in aktivasyonuna neden olur (54).

Bu çalışmada ekstrensek yol izinin *downstream* efektör kaspazı olan kaspaz-8 enziminin gen ekspresyonu; siroz, DMSO, Siroz+SB431542 (I), Siroz+SB431542 (II), Siroz sonrasında+SB431542 (I), Siroz sonrasında+SB431542 (II) gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı derecede bir artış göstermiştir. Siroz sonrasında+SB431542 (I) grubunda; Siroz+SB431542 (II) ve Siroz sonrasında+SB431542 (II) gruplarına göre de anlamlı derecede bir artış göstermiştir.

Memelilerde apoptozisin ana kontrol noktası mitokondridir. Sitokrom c'nin mitokondriden sitozole salınması ile mitokondrinin aktive olması apoptotik süreçte geri dönüşümsüzdür. Mitokondrinin aktivasyonuna yol açan en önemli faktör Bcl-2 ailesidir. Hem proapoptotik hem de antiapoptotik üyeleri olan bu ailenin üyelerinin mitokondri üzerindeki etkileriyle apoptozis başlar ya da baskılanır. Mitokondriyal intrensek yol izinde sitokrom c'nin mitokondriden sitozole salınımı, latent sitozolik bir protein olan apaf-1'in sitokrom c ile bağlanarak apoptotik kompleks oluşumuna neden olur. Bu kompleks daha sonra intrensek yol izinin başlatıcı kaspazı olan kaspaz-9'un aktivasyonuna neden olur (72).

Kaspaz-9 gen ekspresyonu kontrol ve siroz grupları arasında anlamlı bir değişim göstermemiştir. DMSO, Siroz+SB431542 (I), Siroz+SB431542 (II), Siroz sonrasında+SB431542 (I) , Siroz sonrasında+SB431542 (II) grupları kontrol ve siroz gruplarına göre anlamlı derecede bir artış göstermişlerdir. Siroz+SB431542 (II) grubu, Siroz+SB431542 (I) grubuna göre anlamlı bir azalma göstermiştir. Siroz sonrasında+SB431542 (I) grubu Siroz+SB431542 (II) ve Siroz sonrasında+SB431542 (II) gruplarına göre anlamlı derecede bir artış göstermiştir.

Bao ve Shi de yapmış oldukları çalışmada hücrel bir stresi takiben sitozolde bulunan proapoptotik proteinlerin aktive olmasıyla mitokondrinin geçirgenliğini bozarak por oluşumuna neden olduğunu, oluşan porlardan dışarıya sitokrom c salınımı başladığını Apaf-1, sitokrom c ve prokaspaz-9'un birleşerek apoptozom adı verilen kompleksi oluşturduğunu bu kompleksin varlığında da aktif hale geçen kaspaz-9'un daha sonra prokaspaz-3 ve -7'yi aktive ettiğini ortaya koymuşlardır (47). Bizim çalışmamızda da özellikle SB431542 uygulanan gruplardaki kaspaz-9 gen ekspresyonu artışları, uyguladığımız SB-431542 maddesinin mitokondride de bir uyarım başlatarak apoptozis döngüsünü stimule ettiğini düşündürmektedir.

TGF- β sinyal yolundaki değişiklikler, özellikle kanser olmak üzere insanda çeşitli somatik ve kalıtsal hastalıklarla ilişkilidir (81). Smad'lar ve kofaktörler ile birlikte TGF- β , hücrelerde tümör baskılayıcı ve hücre metabolizmasını düzenleyici etki göstermekle birlikte kanserlerde tümör gelişimini indükleyici rol oynaması insan sağlığı açısından önemlidir (80-82). TGF- β ailesi içinde ilk belirlenen üye, normal sıçan böbrek hücrelerinden izole edilen, TGF- β 1 izoformu olmuştur (82).

TGF- β 1'in çeşitli nedenlere bağlı olarak aşırı artışıyla birlikte karaciğer doku matriksinde düzensiz bir biçimde çoğalma ve karaciğerde önce fibroz sonrasında ise siroz oluşumu meydana gelir (106). Bu çalışmada TGF- β 1 sitokin düzeyleri Siroz, DMSO, Siroz+SB431542 (I), Siroz+SB431542 (II), Siroz sonrasında+SB431542 (II) gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı derecede bir artış göstermiştir. DMSO grubu, siroz grubuna göre artarak anlamlı bir farklılık göstermiştir. Siroz sonrasında+SB431542 (I) grubunda; siroz, DMSO, Siroz+SB431542 (I), Siroz+SB431542 (II) ve Siroz sonrasında+SB431542 (II) gruplarına göre anlamlı derecede bir azalma gözlenmiştir.

Fynan ve Reiss onkojenesis üzerine yapmış oldukları çalışmada TGF- β 1 aktivitesi artışının akciğer, böbrek, karaciğer ve diğer organlarda dokular arasındaki matriks materyalinin aşırı bir şekilde artışı ile karakterize fibrotik hastalıklarda merkezi bir rol oynadığını ortaya koymuşlardır (107).

Border ve Ruoslahti deri üzerine yaptıkları çalışmada skarlaşma saptadıkları bireylerde TGF- β 1 ekspresyonunda büyük artış olduğunu bildirmişlerdir (108).

Broekelmann ve ark. akciğerlerinde idiopatik fibrozis gelişmiş olan insanlar ile yapmış oldukları çalışmalarında TGF- β 1 ekspresyonunun çok fazla miktarda artmış olduğunu tespit etmişlerdir (109).

G. Inman yapmış olduğu çalışma sonucunda SB431542 maddesinin TGF- β 1 reseptör kinaz inhibitörü olduğunu ortaya koymuştur (110). Ayrıca Hasegawa ve ark. da yapmış oldukları çalışmada TGF- β 1 kaynaklı epidermal kollajen artışının SB431542 maddesi ile durdurulduğunu göstererek SB431542 maddesinin TGF- β 1 reseptör kinaz inhibitörü olduğunu belirtmişlerdir (111).

Wei ve ark. yapmış oldukları çalışmada SB431542 maddesinin hastalığın erken dönemlerinde ya da öncesinde kullanılmasıyla yarar gösteremediğini belirtmiş hatta zararlı etki gösterdiğini ortaya koymuşlardır (112). Bizim çalışmamızda da bulunan verilerden gerek apoptotik belirteçler gerekse TGF- β 1 sitokin düzeylerinden hareketle erken evrelerde uygulanan SB431542 nin siroz tedavisine profilaktik açıdan etkisiz kalabileceği hastalık sonrasında ise etkili bir tedavi göstererek fibroz ve siroz oluşumunu engelleyebileceği hem biyokimyasal hemde histopatolojik incelemelerimizle ortaya konulmuştur.

Oksidatif stres hidrojen peroksit, hidroksil radikali, süperoksit anyonu gibi ROT'ların artması sonucu oluşur. ROT'un yüksek düzeyleri kanseri de içeren birçok hastalığın oluşmasıyla sonuçlanan mitokondriyal hasar, DNA modifikasyonları ve lipit peroksidasyonuna neden olur (113).

DEN ile karaciğer sirozu oluşturduğumuz bu çalışmada önemli bir antioksidan olan GSH düzeyi incelendiğinde hiçbir grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır.

Karahan ve ark. ayrıca bir serbest radikal temizleyicisi olan ve hücre bütünlüğünün korunması için önemli bir bileşik olan GSH düzeyinin DEN verilen grupta kontrol grubuna göre azaldığı fakat bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığını belirtmişlerdir ($p>0.05$) (114).

Meister ve Anderson yapmış oldukları çalışmayla GSH'nin elektrofilik ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu ve ROS'un hücrelerden uzaklaştırılması gibi çok sayıda hücre fonksiyona sahip olduğunu ortaya koymuşlardır (115). Ayrıca karaciğerin GSH içeriği böbrek ve testislerden yaklaşık iki kat, akciğerden yaklaşık üç kat daha fazladır (116). Bu nedenle çalışmamızda kullandığımız SB431542 maddesinin ksenobiyotik olarak detoksifiye edilmiş olması ihtimali, gruplar arası GSH aktivitesi karşılaştırmalarında herhangi bir anlam farkı olmadığı sonucunu ortaya çıkarmış olabilir.

SOD aktivitesini incelediğimizde Siroz grubu; kontrol grubuna göre anlamlı derecede artış göstermiştir. DMSO grubu; kontrol ve siroz grubuna göre anlamlı derecede artış göstermiştir. Siroz+SB431542 (I) grubu; kontrol grubuna göre artarak, DMSO grubuna göre ise azalarak anlamlı farklılık göstermiştir. Siroz+SB431542 (II) grubu; DMSO ve Siroz+SB431542 (I) gruplarına göre anlamlı derecede bir azalma göstermiştir. Siroz sonrasında+SB431542 (I) grubu; siroz, DMSO, Siroz+SB431542 (I) gruplarına göre anlamlı derecede bir azalma göstermiştir. Siroz sonrasında+SB431542 (II) grubu diğer tüm gruplara göre anlamlı derecede bir artış göstermiştir.

Banakar ve ark. SOD'un savunma sistemi için çok önemli olduğunu ortaya koymuşlardır. SOD, antioksidan olarak görev yaparak, zar ve sitozolde serbest radikallerin neden olduğu hasara karşı savunma yaptığını belirtmişlerdir. SOD ve katalaz, oksijen radikalini hidrojen peroksit ve su haline dönüştürdüğünü ve oluşan hidrojen peroksidin glutatyon peroksidaz tarafından yakalanarak, katalaz veya diğer

enzim sistemleri tarafından yok edildiğini bildirmişlerdir. Sirotik hücrelerde, normal hücreye göre SOD miktarının daha yüksek olmasının nedeni olarak, tümör hücrelerinde serbest oksijen radikallerinin aşırı derecede üretilmesi olduğunu belirtmişlerdir (117).

Chakraborty ve ark. yaptıkları farklı bir çalışmada, DEN kullanımıyla birlikte oluşturulan deneysel karaciğer sirozu oluşmuş sıçan karaciğeri hücrelerinde SOD aktivitesinin arttığını belirlemişlerdir (118). Bizim çalışmamızda da deneysel karaciğer sirozu oluşturulan grupta SOD aktivitesinin arttığını, Siroz sonrasında+SB431542 (I) grubunda ise SOD aktivitesi azalma saptanmıştır.

Karaciğer dokularında çok miktarda bulunan CAT, hidrojen peroksidin oksijen ve suya indirgenmesinde önemli, birincil antioksidan enzimlerden biridir. CAT enzim aktivitesi incelendiğinde siroz ve DMSO gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı bir artış olmuştur. Siroz+SB431542 (I) ve Siroz+SB431542 (II) gruplarında siroz ve DMSO gruplarına göre anlamlı bir azalma görülmüştür. Siroz sonrasında+SB431542 (I) grubunda Siroz sonrasında+SB431542 (II) grubu dışındaki tüm gruplara karşı anlamlı bir azalma meydana gelmiştir. Siroz sonrasında+SB431542 (II) grubunda diğer tüm gruplara göre anlamlı bir artış gerçekleşmiştir.

Banakar ve ark. göre katalazın savunma sistemi için çok önemli olduğu ve toksik etki sonucunda oluşan serbest oksijen radikallerini SOD ile beraber hidrojen peroksite ve suya dönüştürdüğünü ortaya koymuşlardır (117). Bizim çalışmamızda da özellikle serbest oksijen radikallerinin arttığı gruplar olan siroz ve DMSO gruplarında CAT enzim aktivitesinin arttığı Siroz sonrasında+SB431542 (I) grubunda ise oluşan pozitif etkiyle birlikte CAT aktivitesinin kontrol grubundan bile daha alt düzeylere indiği saptanmıştır.

DEN uygulanmasının lipit peroksidasyonunu arttırdığı ve buna bağlı olarak fare karaciğerinde apoptotik yanıtın arttığını bildiren çalışmalarda mevcuttur (113).

Sıçanlara uygulanan DEN belirli bir süre içinde lipit peroksidasyonuna neden olur ve karaciğerin proneoplastik nodüllerinde kemoluminesansı arttırarak aktive oksijen türlerinin oluşumuna neden olduğu saptanmıştır. Chodon ve ark. yapmış oldukları çalışmada DEN uygulanmış sıçanlarda karaciğerdeki lipit peroksidasyonunun kontrol grubuna göre önemli derecede arttığını bildirmişlerdir ($p<0.001$) (119).

Lipit peroksidasyonunun bir göstergesi olarak incelediğimiz MDA düzeyleri incelendiğinde, siroz ve DMSO grupları kontrol grubuna göre anlamlı bir artış

göstermiştir. Siroz+SB431542 (I) ve Siroz+SB431542 (II) gruplarında siroz ve DMSO gruplarına göre anlamlı bir azalma görülmüştür. Siroz sonrasında+SB431542 (I) grubunda; Siroz sonrasında+SB431542 (II) grubu dışındaki tüm gruplara karşı anlamlı bir azalma meydana gelmiştir. Siroz sonrasında+SB431542 (II) grubunda; kontrol, Siroz+SB431542 (I), Siroz+SB431542 (II) ve Siroz sonrasında+SB431542 (I) gruplarına göre anlamlı bir artış gerçekleşmiştir.

Karahan ve ark. DEN'in de içinde bulunduğu farklı nitrozaminlere uzun süre maruz kalan sıçanlarda kanda, karaciğer ve böbrekte oksidatif hasarı araştırmışlardır. Bu çalışmaya göre; uzun süreli DEN verilmesi sonucu nitrozaminlerin oluşturduğu reaktif oksijen radikallerinin artmasıyla karakterize oksidatif stres sonucu lipit peroksidasyonunun bir göstergesi olan MDA düzeylerinde artış gözlenmiştir (114).

Conklin hazırlamış olduğu derlemede MDA'nın lipit peroksidasyonunun ikinci ürünü olduğunu ve onun belirleyicisi niteliğini taşıdığını belirtmiştir (120).

Banakar ve ark. da DEN uyguladıkları sıçanların karaciğer doku hücrelerinde, MDA'da artış olduğunu belirtmişlerdir (117). Bu sonuçlar, bizim çalışmamızda tespit ettiğimiz MDA düzeyinin artışı ile benzerlik göstermektedir.

Histopatolojik inceleme sonucunda kontrol gruplarındaki sıçanlarda normal karaciğer dokusu gözlemlendi. Siroz grubunda siroz olduğu gözlemlendi. Siroz sonrasında+SB431542 (I) grubundaki sıçanlarda ise karaciğer dokularının rejenere olarak düzelme eğilimi gösterdiği görüldü. Siroz+SB431542 (I) grubunda siroz, ağır displastik nodülde belirgin nükleus ve şeffaflaşma gösteren hepatositler gözlemlendi. Siroz+SB431542 (II) grubunda siroz, displastik nodüller ve tümör hücreleri gözlemlendi. Histopatolojik incelemeler sonucunda siroz süresince verilen SB431542'nin profilaktik açıdan belirgin bir tedavi seçeneği olmadığı ancak siroz oluşumundan sonra verilen 250 µg/kg/hafta dozunun siroz oluşumunu engellediği görülmüştür.

Bu çalışmamızda, DEN kullanılarak oluşturulmuş deneysel karaciğer sirozunun, siroz oluştuktan sonra 9-10 hafta boyunca SB431542 250 µg/kg/hafta uygulaması ile tedavi edilebileceğini, apoptozisin önemli belirteçleri olan kaspaz -3,-8 ve -9 gen ekspresyonlarının indüklenmesi, TGF-β 1 düzeylerinin azalması, antioksidan kapasitenin artışı ve histopatolojik incelemelerde siroz oluşumunun yerini prefibroz da görülebilecek bulguların alması ile saptamış bulunmaktayız.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Deneysel karaciğer sirozu oluşturduğumuz bu çalışmamızda apoptozis yol izi ve TGF- β Tip I Reseptör Kinaz İnhibitörü olan SB431542'in karaciğer sirozu üzerindeki etkisi araştırıldı. Bu çalışmada TGF- β Tip I Reseptör Kinaz İnhibitörü olan SB431542'nin 250 μ g/kg/hafta ve 500 μ g/kg/hafta dozları karaciğer siroz oluşum süresince ve karaciğer siroz oluştuktan sonra uygulandı.

Bu çalışmada karaciğer sirozu üzerine tedavi açısında en etkin yanıtlar apoptotik yol izinin göstergesi olan kaspaz-3, -8 ve -9 gen ekspresyonlarını arttırması, TGF- β 1 sitokin düzeylerini azaltması, SOD ve CAT enzim aktiviteleri ile MDA düzeylerini azaltması ile Siroz sonrasında+SB-431542 (I) (250 μ g/kg/hafta) uygulamsında gözlemlendi. Ayrıca Siroz sonrasında+SB-431542 (I) (250 μ g/kg/hafta) grubunun histopatolojik incelemelerinde de yine siroz oluşumunun yerini prefibroz da görülebilecek bulguların alması da biyokimyasal bulgularla paralellik göstermektedir.

Bu sonuçlar ışığında; siroz sonrasında 9 hafta boyunca 250 μ g/kg/hafta uygulanan SB431542 maddesinin, oluşan karaciğer sirozunu tedavi etmesi, apoptozisi indüklemesi ve antioksidan kapasiteyi arttırması, tedavide umut verici bir yaklaşım olarak öne sürülebilir.

7. KAYNAKLAR

1. **Popper H.** Pathologic aspects of cirrhosis. *Am J Pathol.* **1977**; 87(1): 228–264.
2. **Anthony PP, Ishak KG, Nayak NC, Poulsen HE, Scheuer PJ, Sobin LH.** The morphology of cirrhosis. Recommendations on definition, nomenclature, and classification by a working group sponsored by the World Health Organization. *J Clin Pathol.* **1978**; 31(5): 395–414.
3. **Hohenester S, Oude- Elferink R.P.J, Beuers U.** Primary Biliary Cirrhosis. *Semin immunopathol.* **2009**;31:283-307.
4. **Sonsuz A.** Karaciğer Sirozunun Etiyolojisi ve Patogenezi. *Sempozyum Dizisi.* **2002**;28: 87-91.
5. **Friedman SL.** Liver fibrosis -- from bench to bedside. *J Hepatol.* **2003**;38:38-53.
6. **Ökten A.** Türkiye’de Kronik Hepatit, Siroz ve Hepatosellüler Karsinoma Etiyolojisi. *Gastroenteroloji.* **2001**;23;34-35.
7. **Reed JC.** Mechanisms of Apoptosis. *Am J Pathol,* **2000**; 157: 1415–1430.
8. **Kaufmann SH, Gores GJ.** Apoptosis in cancer: cause and cure. *BioEssays,* **2000**; 22: 1007-1017.
9. **Chin D, Boyle GM, Parsons PG, Coman WB.** What is transforming growth factor-beta (TGF- β). *BAPS,* **2004**; 57:215-221.
10. **Soyöz M, Özçelik N.** TGF- β (Transforming Growth Factor – β) And Signal Transduction: Medical Education. *Tür K J Med Sci.* **2007**; 27:426-433.
11. **Shi Y, Massagué J.** Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell,* **2003**; 113(6):685-700.
12. **Inman GJ, Nicolás FJ, Callahan JF, Harling JD, Gaster LM, Reith AD, Laping NJ, Hill CS.** SB-431542 is a potent and specific inhibitor of transforming growth factor-beta superfamily type I activin receptor-like kinase (ALK) receptors ALK4, ALK5, and ALK7. *Mol Pharmacol.* **2002**; 62(1):65-74.
13. **Duffin JM.** Why does cirrhosis belong to Laennec? *CMAJ.* **1987**;137(5): 393–396.
14. **Brenner DA.** Molecular Pathogenesis of Liver Fibrosis. *Trans Am Clin Climatol Assoc.* **2009**; 120: 361–368.

15. **Hernandez-Gea V, Friedman SL.** Pathogenesis of Liver Fibrosis. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **2011**; 6: 425-456.
16. **Madani H, Talebolhosseini M, Asgary S, Naderi GH.** Hepatoprotective Activity of Silybum marianum and Cichorium intybus Against Thioacetamide in Rat. *Pakistan Journal of Nutrition.* **2008**; 7 (1): 172-176.
17. **Parola M, Robino G.** Oxidative stress-related molecules and liver fibrosis. *J Hepatol.* **2001**; 35(2):297-306.
18. **Guzman G.** On The Origin of Hepatic Fibrosis. *Arch Pathol Lab Med.* **2004**; 128: 1212-1214.
19. **Asmuth DM, Nguyen HH, Melcher GP, Cohen SH, Pollard RB.** Treatments for Hepatitis B. *Clinical infectious Diseases.* **2004**; 39: 1353-62.
20. **Li D, Friedman S.** Liver fibrogenesis and the role of hepatic stellate cells: New insights and prospects for therapy. *J of Gastro and Hepatol.* **1999**; **14**:618–633.
21. **Ferreira CG, Epping M, Kruyt FA, Giaccone G.** Apoptosis: target of cancer therapy. *Clin Cancer Res.* **2002** Jul;8(7):2024-34.
22. **Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR.** Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer,* **1972**; 26: 239-57.
23. **Öktem S, Özhan MH, Özol D.** Apoptozisin Önemi. *Toraks Dergisi,* **2001**;2(1):91-95.
24. **Sarioğlu S, Ataman Ş.** Apoptoz. *T Klin FTR,* **2003**; 3: 37-44.
25. **Akşit H, Bildik A.** Apoptozis. *YYÜ. Vet. Fak. Derg.* **2008**; 19(1): 55-63.
26. **Kountouras J, Zavos C, Chatzopoulos D.** Apoptosis in hepatitis C. *J Viral Hepatitis,* **2003**; 10:335-342.
27. **Özcan A, Atakişi E.** Apoptozisin Biyokimyasal Önemi. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.* **2003**; 9(1): 95-100.
28. **Tomatır AG.** Apoptoz: Programlı Hücre Ölümü. *T Klin Tıp Bilimleri,* **2003**; 23:499-508.
29. **Nagata S.** Fas ligand-induced apoptosis. *Annu Rev Genet,* **1999**; 33: 29-55

30. **Ulukaya E.** Bölüm III: Hücre Siklusu ve Apoptozis. Akciğer Kanseri Tanı ve Tedavide Temel İlkeler ve Uygulamalar, 1-15.
Erişim: <http://biyokimya.uludag.edu.tr/CellCycleApoptosis.pdf>.
31. **Yıldırım-Sözmen E.** Bölüm XII: Hücre büyümesi, farklılaşması ve kanser. *İnsan Biyokimyası Kitabı*. 2. baskı, Ankara: NobelTıp, **2006**: 547-587.
32. **Abbro L, Dini L.** Common morphological features of apoptotic cell blebs. *Ital J Zool*, **2003**; 70(4): 297-299.
33. **Majno G, Joris I.** Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol*, **1995**; 146: 3-15.
34. **Ziegler U, Groscurth P.** Morphological features of cell death. *News Physiol Sci*, **2004**; 19: 124-8.
35. **Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA.** Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol*. **1992**;119(3):493-501.
36. **Phil Dash.** Apoptosis. *Basic Medical Sciences, St.George's, University of London* 1-6. Erişim: www.sgul.ac.uk/dept/immunology/~dash.
37. **Fink SL, Cookson BT.** Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect Immun*. **2005**;73(4):1907-16.
38. **Thompson CB.** Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, **1995**; 267:1456-62.
39. **Yıldırım A, Bardakçı F, Karataş M, Tanyolaç B.** Moleküler Biyoloji Kitabı. 1. baskı, Ankara: Nobel Basım Yayın, **2007**: 425.
40. **Gastman BR.** Apoptosis and its clinical impact. *Head Neck*, **2001**; 23(5): 409-25.
41. **O'Brien MA, Kirby R.** Apoptosis: A review of pro-apoptotic and anti-apoptotic pathways and dysregulation in disease. *J Vet Emerg Crit Car*, **2008**; 18(6): 572-585.
42. **Green DR.** Apoptotic pathways: the roads to ruin. *Cell*. **1998**; 18; 94(6): 695-8.
43. **Kaufmann SH, Lee SH, Meng XW, Loegering DA, Kottke TJ, Henzing AJ, Ruchaud S, Samejima K, Earnshaw WC.** Apoptosis-associated caspase activation assays. *Elsevier*, **2008**; 44: 262-272.
44. **Gupta S, Agrawal A, Agrawal S, Su H, Gollapudi S.** A paradox of immunodeficiency and inflammation in human aging: lessons learned from apoptosis. *Immun Ageing*, **2006**; 3: 5.

45. **Pasquini L, Petrucci E, Riccioni R, Petronelli A, Testa U.** Sensitivity and resistance of human cancer cells to TRAIL: mechanisms and therapeutical perspectives. *Cancer Therapy*, **2006**; 4: 47-72.
46. **Massagué J, Gomis RR.** The logic of TGFbeta signaling. *FEBS Lett.* **2006**;580(12):2811-20.
47. **Bao Q, Shi Y.** Apoptosome: a platform for the activation of initiator caspases. *Cell Death and Differentiation*, **2007**; 14: 56–65.
48. **Takehara T, Hayashi N.** Fas and fas ligand in human hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol.* **2001**; 36(10): 727-8.
49. **Morishima NNK, Takenouchi H, Shibata T.** An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. *J Biol Chem*, **2002**; 277(37):34287–34294.
50. **Yoneda TIK, Oono K, Yui D.** Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor associated factor 2-dependent mechanism in response to er stress. *J Biol Chem*, **2001**; 276(17):13935–13940.
51. **Cohen GM.** Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J*, **1997**; 326 :1-16.
52. **Horvitz HR.** Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cancer Res.* **1999**;(59):1701-1706.
53. **Nicholson DW, Thornberry NA.** Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci.* **1997**; 22(8): 299-306.
54. **Chowdhury I, Tharakan B, Bhat GK.** Caspases - an update. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* **2008**; 151(1): 10-27.
55. **Zimmermann KC, Bonzon C, Green DR.** The machinery of programmed cell death. *Pharmacol Ther.* **2001**; (92): 57-70.
56. **Ventimiglia R, Lau LF, Kinloch RA, Hopkins A, Karran EH, Petalidis LP, Ward RV.** Role of Caspases in Neuronal Apoptosis. *Drug Develop Res*, **2001**; 52:515-533.
57. **Villa P, Kaufmann SH, Earnshaw WC.** Caspases and caspase inhibitors. *Trends Biochem Sci*, **1997**; 22(10): 388-93.
58. **Estrov Z, Thall PF, Talpaz M, Estey EH, Kantarjian HM, Andreeff M, Harris D, Van Q, Walterscheid M, Kornblau SM.** Caspase 2 and caspase 3 protein levels as predictors of survival in acute myelogenous leukemia. *Blood.* **1998**;92(9):3090-7.
59. **Thornberry NA.** The caspase family of cysteine proteases. *Br Med Bull*, **1997**; 53(3): 478-90.

60. **Zheng TS, Schlosser SF, Dao T, Hingorani R, Crispe IN, Boyer JL, Flavell RA.** Caspase-3 controls both cytoplasmic and nuclear events associated with Fas-mediated apoptosis in vivo. *Proc Natl Acad Sci*, **1998**; 95(23): 13618-23.
61. **Grenet J, Teitz T, Wei T, Valentine V, Kidd VJ.** Structure and chromosome localization of the human CASP8 gene. *Gene*, **1999**; 226(2): 225-32.
62. **Watt W, Koeplinger KA, Mildner AM, Henrikson RL, Tomasselli AG, Watenpaugh KD.** The atomic-resolution structure of human caspase-8, a key activator of apoptosis. *Structure*, **1999**; 7(9): 1135-43.
63. **Hadano S, Nasir J, Nichol K, Rasper DM, Vaillancourt JP, Sherer SW, Beatty BG, Ikeda JE, Nicholson DW, Hayden MR.** Genomic organization of the human caspase-9 gene on Chromosome 1p36. 1-p36.3. *Mamm Genome*, **1999**; 10(7): 757-60.
64. **Riedl SJ, Salvesen GS.** The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nature reviews molecular Cell Biology*, **2007**; 8: 405-413.
65. **Shi Y.** Activation of Initiator Caspases: History, Hypotheses and Perspectives. *Journal of Cancer Molecules*, **2005**; 1(1): 9-18.
66. **Deveraux QL, Reed JC.** IAP family proteins suppressors of apoptosis. *Genes Dev*, **1999**; 13: 239-52.
67. **Fan TJ, Han LH, Cong RS, Liang J.** Caspase family proteases and apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, **2005**; 37(11): 719-27.
68. **Baeuerle PA, Baltimore D.** NF-kB: ten years after. *Cell*, **1996**; 87: 13-20.
69. **Tschopp J, Irmeler M, Thome M.** Inhibition of fas death signals by FLIPs. *Curr Opin Immunol*, **1998**; 10: 552-558.
70. **Ovalı E.** Apoptozis. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. *Güneş Kitabevi*, **1999**; 197-203.
71. **Gustafsson AB, Gottlieb RA.** Bcl-2 family members and apoptosis, taken to heart *Am J Physiol Cell Physiol*, **2007**; 292(1): C45-51.
72. **Tsujimoto Y.** Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria? *Genes Cells*, **1998**; 3(11): 697-707.
73. **Zörnig M, Hueber A, Baum W, Evan G.** Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta*, **2001**; 1551(2): F1-37.

74. **Levine JL.** p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*, **1997**; 88: 323-331.
75. **Lakin ND, Jackson SP.** Regulation of p53 in response to DNA damage. *Oncogene*, **1999**; 18:7644-7655.
76. **Dang CV.** c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism. *Mol Cell Biol*. **1999**;19(1):1-11.
77. **Lutz RJ.** Role of the BH3 (Bcl-2 homology 3) domain in the regulation of apoptosis and Bcl-2-related proteins. *Biochem Soc Trans*, **2000**; 28(2):51-6.
78. **David CT, Rosemary R, George JT, Lui PV.** Developmental Expression of Rat transforming Growth factor- α mRNA. *Molecular and Cellular Biology*, **1985**:3644-3646.
79. **Chang H, Brown CW, Matzuk MM.** Genetic Analysis of the Mammalian Transforming Growth Factor- β Superfamily, *Endocrine Reviews*. **2002**; 23 (6): 787-823.
80. **Alexandrow MG, Moses HL.** Transforming Growth Factor β and Cell Cycle Regulation. *Cancer Research*, **1995**; 55:1452-1457.
81. **Massagué J, Gomis RR.** The logic of TGF beta signaling. *FEBS Lett.*, **2006**; 580(12):2811-20.
82. **Böttner M, Krieglstein K, Unsicker K.** The Transforming Growth Factor- β s: Structure, Signaling and Roles in Nervous System Development and Functions. *J. Neurochem*, **2000**; 75:2227-2240.
83. **Itoh S, Itoh F, Goumans MJ, Dijke PT.** Signaling of transforming growth factor-beta family members through Smad proteins. *Eur. J. Biochem*, **2000**; 267: 6954-6967.
84. **Cheifetz S, Bassols A, Stanley K, Ohta M, Greenberger J, Massagué J.** Heterodimeric transforming growth factor beta. Biological properties and interaction with three types of cell surface receptors. *J Biol Chem*, **1988**; 263(22):10783-9.
85. **Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventura F, Massagué J.** Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature*, **1994**; 370(6488):341-7.
86. **Attisano L, Lee-Hoeflich ST.** The Smads. *Genome Biology*, **2001**; 2(8): 20-28.
87. **Massagué J, Chen YG.** Controlling TGF-beta signaling. *Genes Dev*, **2000**; 14(6):627-44.
88. **Xu L.** Regulation of Smad activities. *Biochim Biophys Acta*, **2006**; 1759(11-12):503-13.
89. **Wotton D, Lo RS, Lee S, Massagué J.** A Smad transcriptional corepressor. *Cell*. **1999**; 97(1):29-39.

90. **Massagué J, Seoane J, Wotton D.** Smad transcription factors. *Genes Dev*, **2005** (23):2783-810.
91. **Eşrefoğlu M.** Cell Injury and Death: Oxidative Stress and Antioxidant Defense System: Review. *Turkiye Klinikleri J Med Sci.* **2009**;(6):1660-76.
92. **Kannan K, Jain SK.** Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiology*, **2000**; 7: 153-163.
93. **Okado-Matsumoto A, Fridovich I.** Subcellular Distribution of Superoxide Dismutases (SOD) in Rat Liver. *The Journal of Biological Chemistry*, **2001**; 276: 38388- 38393.
94. **Beutler E.** Red Cell Metabolism. 2nd Ed. *Grune & Stratton. New York.* **1995**: 74-76,131-132.
95. **Mc Cord JM, Fridovich I.** Superoxide dismutase An enzymatic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem.* **1969**; 244: 6049-6055.
96. **Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K.** Assay for Lipid Peroxidase in Animal Tissues by Thiobarbituric Acid Reaction. *Anal Biochem*, **1979**; 351-358.
97. **Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall JR.** Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*, **1961**; 193: 265-275.
98. **Canacankatan N.** Karaciğer Tümöründe Antioksidan Sistem ve Kolşisinin Etkisi. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana, **2000**.
99. **Kang JS, Wanibuchi H, Morimura K, Gonzalez FJ, Fukushima S.** Role of CYP2E1 in diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in vivo. *Cancer Res.* **2007**; 67(23): 11141-6.
100. **Tessitore L, Bollito E.** Early induction of TGF- β 1 through a fasting-re-feeding regimen promotes liver carcinogenesis by a sub-initiating dose of diethylnitrosamine. *Cell Prolif*, **2006**; 39: 105-116.
101. **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*, **2004**; 25: 113-122.
102. **Lee GH.** Correlation between Bcl-2 Expression and Histopathology in Diethylnitrosamine-Induced Mouse Hepatocellular Tumors. *American Journal of Am J Pathol.* **1997**; 151(4): 957-961.
103. **Bantel H, Ruck P, Gregor M, Schulze-Osthoff K.** Detection of elevated caspase activation and early apoptosis in liver diseases. *Eur J Cell Biol.* **2001**; 80(3): 230-9.

104. **Bantel H, Lügering A, Heideman J, Volkmann X, Poremba C, Strassburg C, Manns M, Schulze-Osthoff K.** Detection of apoptotic caspase activation in sera from patients with chronic HCV infection is associated with fibrotic liver injury. *Hepatology*, **2004**; 40: 1078–1087.
105. **Sun BH, Zhang J, Wang BJ, Zhao XP, Wang YK, Yu ZQ, Yang DL, Hao LJ.** Analysis of in vivo patterns of caspase 3 gene expression in primary hepatocellular carcinoma and its relationship to p21(WAF1) expression and hepatic apoptosis. *World J Gastroenterol*, **2000**; 6(3): 356-360.
106. **Kanzler S.** TGF-beta1 in liver fibrosis: an inducible transgenic mouse model to study liver fibrogenesis. *Am J Physiol*. **1999**;276:1059-68.
107. **Fynan TM, Reiss M.** Resistance to inhibition of cell growth by transforming growth factor-beta and its role in oncogenesis. *Crit Rev Oncog*. **1993**;4:493-540.
108. **Border WA, Ruoslahti Erkki.** Transforming Growth Factor-Beta in Disease: The Dark Side of Tissue Repair . *Journal of Clinical Investigation*. **1992**; 90:1: 1-7.
109. **Broekelmann TJ, Limper AH, Colby TV, McDonald JA.** Transforming growth factor beta 1 is present at sites of extracellular matrix gene expression in human pulmonary fibrosis. *PNAS*. **1991**; 88:6642-6646.
110. **Inman GJ, Nicolás FJ, Callahan JF, Harling JD, Gaster LM, Reith AD, Laping NJ, Hill CS.** SB-431542 is a potent and specific inhibitor of transforming growth factor-beta superfamily type I activin receptor-like kinase (ALK) receptors ALK4, ALK5, and ALK7. *Mol Pharmacol*. **2002**; 62(1):65-74.
111. **Hasegawa T, Nakao A, Sumiyoshi K, Tsuchihashi H, Ogawa H.** SB-431542 inhibits TGF-beta-induced contraction of collagen gel by normal and keloid fibroblasts. *J Dermatol Sci*. **2005** Jul;39(1):33-8.
112. **Wei W, Ma B, Li HY, Jia Y, Lv K, Wang G, Zhang J, Zhu S, Tang H, Sheng Z, Xia Z.** Biphasic effects of selective inhibition of transforming growth factor beta1 activin receptor-like kinase on LPS-induced lung injury. *Shock*. **2010**;33(2):218-24.
113. **Maeda S, Kamata H, Luo JL.** IKK α couples hepatocyte death to cytokine-driven compensatory proliferation that promotes chemical hepatocarcinogenesis. *Cell*, **2005**; 121: 977–90.
114. **Karahan İ, Yılmaz S.** Ratlarda bazı nitrosoaminlerin düşük miktarda-uzun süreli verilmesinin kan, karaciğer ve böbreklerde oksidatif stres üzerine etkileri. *F.Ü. Sağlık Bil. Dergisi* **2006**; 20(1): 73-78.
115. **Meister A, Anderson ME.** Glutathione. *Annual Review of Biochemistry*, **1983**;52: 711-760.

116. **Reed DJ.** Mechanisms of Chemically Induced Cell Injury and Cellular Protection. *Introduction to Biochemical Toxicology*. **2000**;1: 221-253.
117. **Banakar MC et al.** 1,25-Dihydroxyvitamin D3 Prevents DNA Damage and Restores Antioxidant Enzymes in Rat Hepatocarcinogenesis Induced by Diethylnitrosamine and Promoted by Phenobarbital. *World J. Gastroenterol*, **2004**;10(9):1268-1275.
118. **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*. **2003**;3:346-362.
119. **Chodon D, Arumugam A, Rajasekaran D, Dhanapal S.** Effect of genistein on modulating lipid peroxidation and membrane-bound enzymes in N-Nitrosodiethylamine-induced and Phenobarbital-promoted Rat Liver Carcinogenesis. *Journal of Health Science*, **2008**; 54(2): 137-142.
120. **Conklin KA.** Dietary Polyunsaturated Fatty Acids: Impact on Cancer Chemotherapy and Radiation. *Altern Med Rev*. **2002**;7(1): 4-21.

ÖZGEÇMİŞ

08.11.1983 yılında Kocaeli/Gölcük'te doğdu. İlköğrenimini Mersin Pirireis İlkokulu, orta öğrenimini Ankara Elmadağ Ortaokulu, lise öğrenimini Ankara Gazi Anadolu Lisesi ve Mersin Dumlupınar Lisesi'nde (YDA), tamamladıktan sonra 2002 yılında Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi bölümünü kazandı. 2008 yılında lisans eğitimini tamamladı. 2009 yılında Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı. 2009 yılından bu yana aynı bölümde yüksek lisansa devam etmektedir.