

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

**HEPATOSELLÜLER KARSİNOMDA APOPTOZİS
MEKANİZMASI VE BAZI BENZİMİDAZOL
TÜREVLERİNİN HEPATOSELLÜLER KARSİNOM
ÜZERİNE ETKİSİ**

Biyolog Ayşegül GÖRÜR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Necmiye CANACANKATAN

Bu tez, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından BAP-SBE BA
(AG) 2008-9 YL nolu proje olarak desteklenmiştir.

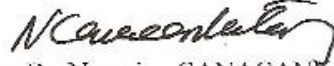
Tez No: 169

MERSİN – 2

Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Eczacılık Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde yürütülmüş olan “Hepatosellüler karsinomda apoptozis mekanizması ve bazı benzimidazol türevlerinin hepatosellüler karsinom üzerine etkisi” başlıklı çalışma, jürimiz tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi :17/06/2010



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

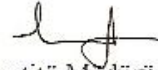
Jüri Üyesi



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

Jüri Üyesi

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulu'nun 24.06.2010... tarih ve 2010/145 sayılı kararı ile kabul edilmiştir.



Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Ulku TUĞELER KOĞLU



TEŞEKKÜR

Biyokimya Anabilim Dalındaki eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, eğitimimin yanı sıra her konuda desteğini gördüğüm, tez konumun oluşturulmasında bana ışık tutan ve hiçbir yardımı esirgemeyen, tez danışmanım Sayın Yrd. Doç. Dr. Necmiye CANACANKATAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, Anabilim Dalı başkanımız Sayın Doç. Dr. Serap YALIN'a teşekkür ederim.

Tez çalışmam süresince her zaman desteğini gördüğüm, birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum sevgili arkadaşım Arş. Gör. Oğuz Emre GÜL'e ve ayrıca tez çalışmamın en zorlandığım anlarında deneyimi ve eleştirileri ile bana yön veren Dr. Bahadır ERCAN'a teşekkür ederim.

Deneyisel çalışmalarımda kullandığım maddelerin sentezlenmesinde emeği geçen Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya Anabilim Dalı'ndan Sayın Doç. Dr. Öztekin ALGÜL'e ve Arş. Gör. Özden TARI'ya, 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.

Deneyisel çalışmalara katkılarından dolayı Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı'ndan Sayın Prof. Dr. Bahar TUNÇTAN, Yrd. Doç. Dr. Seyhan ŞAHAN FIRAT ve Yrd. Doç. Dr. Belma KORKMAZ'a ve deneysel çalışmamda kullandığım deney hayvanlarının temin ve bakımını üstlenen Mersin Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarı çalışanlarına ayrı ayrı teşekkür ederim.

Yaşamımın her anında olduğu gibi yüksek lisans eğitimim süresince de destekleri, sevgileri ve güvenleri ile daima yanımda olan canım aileme sonsuz teşekkürler...

Tez çalışmamı BAP-SBE BA (AG) 2008-9 YL nolu proje olarak destekleyen Mersin Üniversitesi Rektörlüğü'ne ve Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne ayrıca teşekkür ederim.

Biyolog Ayşegül GÖRÜR

MERSİN / 2010

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xii
ÖZET	xvi
ABSTRACT	xvii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Hepatosellüler Karsinom.....	4
2.2. Apoptozis.....	6
2.2.1. Apoptozis ve Tarihçesi	6
2.2.2. Apoptozisin Morfolojisi	7
2.2.3. Apoptozis ile Nekroz Arasındaki Farklar	9
2.2.4. Apoptozis Mekanizmaları	9
2.2.4.1. Mitokondri/Sitokrom c Aracılı Apoptotik Yol İzi.....	10
2.2.4.2. Ölüm Reseptörleri Yol İzi	11
2.2.4.3. Endoplazmik Retikulum Yol İzi	13
2.2.5. Apoptozisin Genetik Kontrolü	14
2.2.5.1. Apoptozis Mediyatörleri	15

2.2.5.1.1. Kaspaz-3	17
2.2.5.1.2. Kaspaz-8	19
2.2.5.1.3. Kaspaz-9	20
2.2.5.2. Kaspaz İnhibitörleri	21
2.2.5.3. Antiapoptotik Proteinler	24
2.2.5.3.1. Bcl-2 Gen Ailesi	24
2.2.5.3.2. <i>p53</i>	26
2.2.5.3.3. c-Myc	26
2.2.5.4. Proapoptotik Proteinler	27
2.3. Benzimidazol Türevi Bileşikler ve Apoptozis	28
2.4. Oksidatif Stres ve Antioksidan Sistem	31
3. GEREÇ VE YÖNTEM	34
3.1. Gereçler	34
3.1.1. Cihazlar	34
3.1.2. Sarf Malzemesi ve Kimyasal Maddeler	34
3.2. Deney Hayvanlarının Seçimi ve Temini	35
3.3. Çalışma Grupları	35
3.4. Çalışma Örneklerinin Hazırlanışı	37
3.4.1. Doku Örnekleri	37
3.5. Analiz Yöntemleri	37
3.5.1. Biyokimyasal Analizler	37
3.5.1.1. Apoptozis Belirteçlerinin İncelenmesi	37

3.5.1.1.1. Kaspaz-3 Enzim Aktivitesi Ölçüm Yöntemi	37
3.5.1.1.2. Kaspaz-8 Enzim Aktivitesi Ölçüm Yöntemi	38
3.5.1.1.3. Kaspaz-9 Enzim Aktivitesi Ölçüm Yöntemi	38
3.5.1.1.4. Fas Ekspresyonunun İmmünohistokimyasal Değerlendirilmesi	38
3.5.1.1.5. FasL Ekspresyonunun İmmünohistokimyasal Değerlendirilmesi	39
3.5.1.2. Antioksidan Kapasitenin İncelenmesi	40
3.5.1.2.1. Doku GSH Ölçümü	40
3.5.1.2.2. Doku SOD Ölçümü	41
3.5.1.2.3. Doku CAT Ölçümü	45
3.5.1.2.4. Doku Nitrit Ölçümü	47
3.5.1.2.5. Doku MDA Ölçümü	47
3.5.1.2.6. Lowry Yöntemi ile Protein Tayini	49
3.5.2. Histopatolojik İnceleme	51
3.5.3. İstatistiksel Analizler	51
4. BULGULAR	52
4.1. Biyokimyasal Bulgular	52
4.1.1. Apoptozis Belirteçlerine Ait Bulgular	52
4.1.1.1. Kaspaz-3 Enzim Aktivitesi	52
4.1.1.2. Kaspaz-8 Enzim Aktivitesi	56
4.1.1.3. Kaspaz-9 Enzim Aktivitesi	58
4.1.1.4. İmmünohistokimyasal Olarak Fas Ekspresyonu	60
4.1.1.5. İmmünohistokimyasal Olarak FasL Ekspresyonu	62
4.1.2. Antioksidan Kapasiteye Ait Bulgular	64

4.1.2.1. Doku GSH Düzeyleri	65
4.1.2.2. Doku SOD Aktivitesi	67
4.1.2.3. Doku CAT Aktivitesi	69
4.1.2.4. Doku Nitrit Düzeyleri	71
4.1.2.5. Doku MDA Düzeyleri	73
4.2. Karaciğer Dokularına Ait Bulgular	75
4.2.1. Karaciğer Dokularına Ait Makroskopik Bulgular	75
4.2.2. Karaciğer Dokularına Ait Histopatolojik Bulgular	76
5. TARTIŞMA	80
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	91
7. KAYNAKLAR	93
ÖZGEÇMİŞ	107

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Apoptotik yol izleri	11
Şekil 2.2. Fas ve Fas ilişkili ölüm bölgesi (FADD) yapısı	12
Şekil 2.3. DISC kompleksinin yapısı	12
Şekil 2.4. Prokaspaz ve aktif kaspazın yapısı	16
Şekil 2.5. İnsan kaspaz ailesi	17
Şekil 2.6. Apoptozom kompleksinin oluşumu	20
Şekil 2.7. FLIP inhibitör proteinlerinin yapısı	23
Şekil 2.8. Benzimidazol halkası ve benzimidazol türevi bileşiklerin kimyasal formülü	28
Şekil 2.9. 2-(3-Metoksibenzil)-1 <i>H</i> -benzimidazol (BB3) kimyasal formülü	30
Şekil 2.10. 2-(2,4-Diklorobenzil)-1 <i>H</i> -benzimidazol (BB4) kimyasal formülü	30
Şekil 2.11. Oksidatif stres ve antioksidan sistem	33
Şekil 4.1. Apoptotik belirteç olan kaspaz-3 enzim aktivitesinin her bir grubun kendi içinde zamana bağlı olarak değişiminin bar grafik olarak gösterimi	54
Şekil 4.2. Apoptotik belirteç olan kaspaz-3 enzim aktivitesinin gruplar arası karşılaştırmada 6., 12. ve 18. haftalarda gösterdiği değişimlerin bar grafik olarak gösterimi	56
Şekil 4.3. Apoptotik belirteç olan kaspaz-8 enzim aktivitesinin her bir grubun kendi içinde zamana bağlı olarak değişiminin bar grafik olarak gösterimi	57
Şekil 4.4. Apoptotik belirteç olan kaspaz-8 enzim aktivitesinin gruplar arası karşılaştırmada 6., 12. ve 18. haftalarda gösterdiği değişimlerin bar grafik olarak gösterimi	58
Şekil 4.5 Apoptotik belirteç olan kaspaz-9 enzim aktivitesinin her bir grubun kendi içinde zamana bağlı olarak değişiminin bar grafik olarak gösterimi	59

Şekil 4.6. Apoptotik belirteç olan kaspaz-9 enzim aktivitesinin gruplar arası karşılaştırmada 6., 12. ve 18. haftalarda gösterdiği değişimlerin bar grafik olarak gösterimi	60
Şekil 4.7. Karaciğer dokusuna ait immünohistokimyasal Fas ekspresyonunun fotomikrograf görüntüsü	61
Şekil 4.8. Karaciğer dokusuna ait immünohistokimyasal FasL ekspresyonunun fotomikrograf görüntüsü	62
Şekil 4.9. GSH düzeylerinin her bir grubun kendi içinde zamana bağlı olarak değişiminin bar grafik olarak gösterimi	66
Şekil 4.10. GSH düzeylerinin gruplar arası karşılaştırmada 6., 12. ve 18. haftalardaki değişimlerinin bar grafik olarak gösterimi	67
Şekil 4.11. SOD enzim aktivitelerinin her bir grubun kendi içinde zamana bağlı olarak değişiminin bar grafik olarak gösterimi	68
Şekil 4.12. SOD enzim aktivitelerinin gruplar arası karşılaştırmada 6., 12. ve 18. haftalardaki değişimlerinin bar grafik olarak gösterimi	69
Şekil 4.13. CAT enzim aktivitelerinin her bir grubun kendi içinde zamana bağlı olarak değişiminin bar grafik olarak gösterimi	70
Şekil 4.14. CAT enzim aktivitelerinin gruplar arası karşılaştırmada 6., 12. ve 18. haftalardaki değişimlerinin bar grafik olarak gösterimi	71
Şekil 4.15. Nitrit düzeylerinin her bir grubun kendi içinde zamana bağlı olarak değişiminin bar grafik olarak gösterimi	72
Şekil 4.16. Nitrit düzeylerinin gruplar arası karşılaştırmada 6., 12. ve 18. haftalardaki değişimlerinin bar grafik olarak gösterimi	73
Şekil 4.17. MDA düzeylerinin her bir grubun kendi içinde zamana bağlı olarak değişiminin bar grafik olarak gösterimi	74
Şekil 4.18. MDA düzeylerinin gruplar arası karşılaştırmada 6., 12. ve 18. haftalardaki değişimlerinin bar grafik olarak gösterimi	75
Şekil 4.19. 18. hafta sonunda sıçanların karaciğerlerine ait makroskopik görünüm	76
Şekil 4.20. Kontrol grubundaki sıçanların karaciğer dokularına ait HE boyamalarının fotomikrograf görüntüleri	77

Şekil 4.21. HCC grubundaki sıçanların karaciğer dokularına ait HE boyamalarının fotomikrograf görüntüleri	78
Şekil 4.22. HCC+BB3 grubundaki sıçanların karaciğer dokularına ait HE boyamalarının fotomikrograf görüntüleri	78
Şekil 4.23. HCC+BB4 grubundaki sıçanların karaciğer dokularına ait HE boyamalarının fotomikrograf görüntüleri	79
Şekil 4.24. HCC+DMSO grubundaki sıçanların karaciğer dokularına ait HE boyamalarının fotomikrograf görüntüleri	79

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. HCC'nin gelişimi ile ilgili major ve minor risk faktörleri	4
Çizelge 2.2. Farklı fizyolojik ve patolojik durumlarda apoptozisin rolü	7
Çizelge 2.3. Kaspazlara özgü substratlar ve kırılma bölgeleri	18
Çizelge 3.1. Deney prosedürüne göre çalışma gruplarının oluşturulması	36
Çizelge 4.1. Apoptotik belirteçler olan kaspaz-3, -8 ve -9 enzim aktivitelerinin her bir grubun kendi içinde zamana bağlı olarak değişimi	53
Çizelge 4.2. Apoptotik belirteçler olan kaspaz-3, -8 ve -9 enzim aktivitelerinin gruplar arası karşılaştırmada 6., 12. ve 18. haftalarda gösterdiği değişimler	55
Çizelge 4.3. Apoptozisi aktive eden fizyolojik mediyatörlerden Fas ekspresyonunun grupların kendi içinde zamana bağlı olarak değişimi	61
Çizelge 4.4. Apoptozisi aktive eden fizyolojik mediyatörlerden Fas ekspresyonunun gruplar arası karşılaştırmada 6., 12. ve 18. haftalarda gösterdiği değişimler	62
Çizelge 4.5. Apoptozisi aktive eden fizyolojik mediyatörlerden FasL ekspresyonunun grupların kendi içinde zamana bağlı olarak değişimi	63
Çizelge 4.6. Apoptozisi aktive eden fizyolojik mediyatörlerden FasL ekspresyonunun gruplar arası karşılaştırmada 6., 12. ve 18. haftalarda gösterdiği değişimler	63
Çizelge 4.7. Antioksidan kapasiteyi oluşturan GSH, SOD, CAT, Nitrit ve MDA düzeylerinin her bir grubun kendi içinde zamana bağlı olarak değişimi	64
Çizelge 4.8. Antioksidan kapasiteyi oluşturan GSH, SOD, CAT, Nitrit ve MDA düzeylerinin gruplar arası karşılaştırmada 6., 12. ve 18. haftalarda gösterdiği değişimler	65

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
AFP	Alfafetoprotein
AI	Apoptotik indeks (Apoptotic index)
AICD	<i>Activation induced cell death</i>
AIF	Apoptozis indükleyici faktör (<i>Apoptosis-inducing factor</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>)
BB3	<i>2-(3-Metoksibenzil)-1H-benzimidazol</i>
BB4	<i>2-(2,4-Diklorobenzil)-1H-benzimidazol</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>)
eNOS	Endotelyal nitrik oksit sentaz (<i>Endothelial nitric oxide synthase</i>)
ER	Endoplazmik Retikulum (<i>Endoplasmic reticulum</i>)
ESI MS	Elektrosprayıyonizasyon Kütle Spektrometrisi (<i>Electrospray Ionisation MS</i>)
FADD	Fas ile ilişkili ölüm bölgesi (<i>Fas associated death domain</i>)
FasL	Fas ligant (<i>Fas ligand</i>)
GR	Glutasyon redüktaz (<i>Glutathione reductase</i>)
GSH	İndirgenmiş glutasyon (<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>)
HCC	Hepatosellüler karsinom (<i>Hepatocellular carcinoma</i>)
HCV	Hepatit C virüsü
HOCl	Hipokloröz asit
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>)
iNOS	İndüklenebilir nitrik oksit sentaz (<i>inducible nitric oxide synthase</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 kapa B
NGF-reseptör	Sinir büyüme faktör reseptörü (<i>Nerve Growth Factor receptor</i>)

NO [•]	Nitrik oksit radikali
NuMA	Nuclear Mitotic Apparatus Protein
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>)
Smac/DIABLO	(<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	Transforme edici büyüme faktörü beta (<i>Transforming growth factor-beta</i>)
TNFR-1	TNF reseptör-1 (<i>Tumor necrosis factor receptor-1</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>)
UDCA	Ursodeoksikolik asit (<i>Ursodeoxycholic acid</i>)
US	Ultrasonografi
XOD	Ksantin oksidaz

ÖZET

Hepatosellüler Karsinomda Apoptozis Mekanizması ve Bazı Benzimidazol Türevlerinin Hepatosellüler Karsinom Üzerine Etkisi

Hepatosellüler karsinom (HCC), dünyada en sık görülen malign tümörlerdendir ve kanser ilişkili ölümlerde 3. sırada yer almaktadır. Kanser gelişiminde, artmış hücre proliferasyonunun yanı sıra, azalmış apoptozis hızının katkısı olduğu da bilinmekte ve apoptozisi uyarıcı yönde yeni tedavi edici stratejiler geliştirilmektedir. Kanser tedavisinde kullanmak amacı ile üzerinde çalışılan heterosiklik bileşiklerden biri benzimidazol türevleridir. Bu çalışmada, karsinojen bir ajan olan N-nitrozodietilamin ile oluşturulan deneysel HCC'de, apoptozis mekanizması ve benzimidazol türevi olan 2-(3-Metoksibenzil)-1H-benzimidazol (BB3) ile 2-(2,4-Diklorobenzil)-1H-benzimidazol (BB4) bileşiklerinin HCC üzerindeki etkisinin araştırılması amaçlandı. Kontrol (n=24), HCC (n=18), HCC+BB3 (n=18), HCC+BB4 (n=18) ve HCC+DMSO (n=6) olmak üzere 5 farklı çalışma grubu oluşturuldu. 18 hafta süresince 1 mg/kg/hafta i.p. BB3 ve BB4 uygulamaları yapıldı. Çalışmanın başlangıcında (0. hafta) kontrol grubundan 6 sıçan öldürüldü. Daha sonra her bir gruptan rastgele seçilen 6 sıçan 6., 12. ve 18. haftalarda öldürüldü. Gruplar hem kendi içinde zamana bağlı olarak, ayrıca 6., 12. ve 18. haftalarda birbirleri ile karşılaştırıldı. HCC'de apoptotik yol izinin belirteci olarak kaspaz-3, -8 ve -9 enzimleri kolorimetrik yöntemler ile Fas/FasL ekspresyonları ise immünohistokimyasal yöntemler ile belirlendi. Antioksidan kapasiteyi araştırmak için ise süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) enzim aktiviteleri, glutatyon (GSH), nitrit ve malondialdehit (MDA) düzeyleri kolorimetrik yöntemler ile belirlendi. Bu çalışmada HCC'de kaspaz-3 enzim aktivitesinin kontrol grubuna göre arttığı ve HCC+BB3'ün ise bu artışı daha fazla indüklediği saptanmıştır. Ayrıca kontrol grubu ile karşılaştırıldığında HCC, HCC+BB3 ve HCC+BB4 gruplarında Fas ve FasL ekspresyonlarının arttığı saptanmıştır. HCC'de oksidatif stres artmış ve bu etki kısmi olarak BB3 maddesi ile azaltılmıştır. Histopatolojik incelemelerde HCC gelişiminin BB3 tarafından engellendiği ancak BB4'ün aynı etkiyi göstermediği saptandı. Sonuç olarak BB3'ün HCC tedavisinde umut verici bir yaklaşım olabileceği öne sürülebilir.

Anahtar kelimeler: Hepatosellüler karsinom, apoptozis, kaspaz, benzimidazol, GSH

ABSTRACT

Mechanisms of Apoptosis in Hepatocellular Carcinoma and the Effects of Some Benzimidazole Derivatives on Hepatocellular Carcinoma

Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the most frequent malign tumors worldwide. Hepatocellular carcinoma is ranked third among cancer related mortality. It is known that decreased apoptosis rate contributes to carcinogenesis as much as increased cell proliferation, therefore new therapeutic strategies involve induction of apoptosis through different mechanism. In this study, we aimed to determine the mechanisms of apoptosis in HCC and the effect of the benzimidazol derivatives 2-(3-methoxybenzyl)-1*H*-benzimidazole (BB3) and 2-(2,4-Dichlorobenzyl)-1*H*-benzimidazole (BB4) on HCC. Experimental HCC had been developed by N-nitrozodietilamin, a carcinogenic agent. 5 groups were included as control (n=24), HCC (n=18), HCC+BB3 (n=18), HCC+BB4 (n=18), and HCC+DMSO (n=6). BB3 and BB4 were administered 1 mg/kg/week i.p. during 18 weeks. 6 control rats were killed at the beginning of the study. 6 rats were chosen randomly from each group and killed at the end of 6th, 12th and 18th weeks. All groups were evaluated time dependently in itself and also between each other. Apoptosis was evaluated by measurement of caspase -3, -8 and -9 enzymes by colorimetric methods and Fas/FasL expression by immunohistochemical staining method. Antioxidant capacity was evaluated by measurement superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) enzyme activities and the levels of reduced glutathione (GSH), nitrite and malondialdehyde by colorimetric methods. There was a statistically significant increase in caspase -3 enzyme in HCC group compared to the controls and this increase was induced by BB3. Additionally, Fas and FasL expressions were significantly increased in HCC, HCC+BB3 and HCC+BB4 groups compared to the controls. Oxidative stress increased in HCC and it was relatively decreased by BB3 and BB4. Histopathological findings indicated that HCC development was reduced by BB3 whereas BB4 failed to show the same effect. In conclusion, it may suggested that BB3 attempts to induce apoptosis may also serve as a promising approach in cancer therapy.

Key Words: Hepatocellular carcinoma, apoptosis, caspase, benzimidazole, GSH

1. GİRİŞ

Hepatosellüler karsinom (HCC), dünyada en sık görülen malign tümörlerdendir. Yılda 1,25 milyon insanın ölümüne neden olan HCC, kanser ilişkili ölümlerde 3. sırada yer alır. HCC'nin gelişiminde en önemli risk faktörü sirozdur. HCC'nin gelişmesine yol açan diğer nedenler ise Hepatit B virüsü (HBV) ile Hepatit C virüsü (HCV) ve bazı kimyasallardır (1). Hepatokarsinogenez, hücre çoğalması ve apoptozis arasındaki dengenin bozulması ile karakterizedir (2).

Apoptozis ilk kez 1972 yılında Kerr tarafından hücre ölümünün farklı bir morfolojisi olarak tanımlanmıştır. Memeli hücrelerinde apoptozis, hücre içinden ya da dışından gelen sinyallerle uyarılan ve birbirini takip eden olaylar zincirinden oluşan 2 farklı yol izini içeren bir süreçtir. Bunlardan birincisi hücre zarında bulunan reseptör aracılı sinyal yol izi, diğeri ise mitokondriden salınan sitokrom c'nin tetiklediği kaspaz aktivasyon yol izidir. Bu aktivasyon yol izlerinden ölüm reseptörleri ilişkili olana "ekstresek yol izi" denir. Fas ligand (FasL), tümör nekroz faktör alfa (TNF- α) veya TNF ilişkili apoptozis indükleyen ligand (TRAIL) ekstresek yol izinde kullanılan uyarılardır. Kaspaz aktivasyonu için gerekli kaspaz aktivatör proteinlerinin sitozole salınmasından sorumlu olan, mitokodrinin de katıldığı diğeri yol izi ise "intresek yol izi" olarak bilinir (3-5).

Gen kontrollü bir süreç olan apoptozis, farklı uyarılara cevap olarak normal doku turnoveri, doku ve organların şekillenmesi, immün sistem, embriyolojik gelişim, kanser ve farklılaşmış hücrelerin yaşam sürelerinin sona ermesi gibi farklı fizyolojik ve patolojik olaylarda görev almaktadır (6-8). Apoptozis hızının çok yavaş olduğu hastalıklardan birisi kanserdir. Kanser hücreleri normal hücrelerden daha hızlı bir şekilde çoğalır ve büyür. Bu kontrolsüz çoğalmaya izin veren ise hücrenin DNA'sında meydana gelen mutasyonlardır. Normal şartlar altında hasar görmüş hücreler apoptozise gider, fakat bu durum tümör hücrelerinde farklıdır. Tümör hücrelerinin en önemli özelliklerinden birisi artan yaşam kabiliyetleridir. Kanser gelişiminde, artmış hücre proliferasyonunun yanı sıra, azalmış apoptozis hızının da katkısı olduğu bilinmektedir (9).

Kanser dokularındaki gelişmeyi önlemek amacı ile farklı mekanizmalar ile apoptozisi uyarıcı yönde yeni tedavi olanakları geliştirilmektedir. HCC oluşumunda hücre proliferasyonu ve apoptozis arasındaki denge çok önemlidir. Bu nedenden dolayı HCC patogenezinde yer alan apoptozis ile ilgili mekanizmanın, özellikle HCC gelişiminin de içinde bulunduğu yaygın birçok yol izindeki genetik ve moleküler değişikliklerin bilinmesi, HCC'nin nasıl oluştuğu ve nasıl tedavi edilebileceği açısından oldukça önem arz etmektedir. Tümör hücrelerinin karakteristik özelliği olan sürekli ve kontrolsüz hücre çoğalması, kanserin ilerlemesinde ve hücre döngüsünün bozulmasında önemli bir rol oynar. Bu nedenle de karsinogenez, hücre döngüsünü etkileyecek ajanlarla kontrol edilir (10,11).

Son yıllarda kanser tedavisinde kullanılmaya başlanan araştırmaların yoğunlaştığı heterosiklik halkalardan biri de benzimidazol halkasıdır (12). Benzimidazol halkası, yaşam için gerekli olan bazı biyolojik moleküllerin yapısında yer almaktadır. Benzimidazol türevlerinin antimikrobiyal ve antitümör aktivitelerinin yanı sıra nükleik asit sentezini inhibe edici etkileri gibi pek çok farmakolojik özelliklerinin olduğu bilinmektedir (13). Daha önceki çalışmalarımızda apoptozisi arttırıcı yönde etki gösteren bazı benzimidazol türevi [2-(3-metoksibenzil)-1*H*-benzimidazol (BB3) (14) ve 2-(2,4-diklorobenzil)-1*H*-benzimidazol (BB4)] maddelerin HCC üzerindeki etkisini inceleyerek yeni tedavi stratejilerine olanak sağlamayı amaçladık.

Bu çalışmada, kimyasal karsinogenezde karaciğerin primer indükleyicisi olan N-nitrozodietilamin (DEN) ile deneysel HCC oluşturmayı planladık. Sırasıyla kontrol, HCC, HCC+BB3, HCC+BB4 ve HCC+DMSO olmak üzere 5 farklı deney grubunun oluşturulması ve bu gruplardan rastgele seçilen 6 adet sıçanın 0., 6., 12. ve 18. haftalarda öldürülerek, HCC oluşum sürecinde belli aralıklar ile apoptozis mekanizmasını ve BB3 ve BB4'ün bu oluşum sürecine etkisini araştırmayı planladık. Çalışma planına göre sıçanların karaciğer dokularında, apoptotik mekanizmanın belirteçleri olan kaspaz-3, -8 ve -9 aktiviteleri ile Fas ve FasL ekspresyonları ve ayrıca oksidatif stresin HCC'de arttığını kanıtlayan bilgiler ışığında antioksidan sistemde yer alan glutatyon (GSH) miktarı, süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) enzim aktiviteleri; endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) ve indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) aktivitesinin bir göstergesi olarak nitrit düzeyleri ile lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olarak malondialdehit (MDA) düzeylerini saptamayı amaçladık.

Bu çalışmadan elde edilecek bilgiler sonucunda HCC oluşumu sırasında apoptozis yol izi ve benzimidazol türevlerinin antitümoral etkisi araştırılarak bu maddelerin kanser tedavisinde kullanımı açısından bir n çalışma yapılmış olacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Hepatosellüler Karsinom

Karaciğerin primer malign tümörleri, hepatosit ve intrahepatik safra kanalları epitelyumu ile mezenkimal dokulardan gelişir (15). Hepatositlerden köken alan HCC, karaciğerin en sık görülen primer malign tümörüdür. Tüm maligniteler içinde HCC'nin görülme sıklığı % 2'dir (16). En sık görülen tümör tipleri arasında erkeklerde 5., kadınlarda ise 8. sıradadır. (1). Coğrafik bölgelere göre farklılık gösteren HCC, mortalitesi ve morbiditesi yüksek bir tümördür. İnsidansı Kuzey Amerika ve Batı Avrupa'da 1/100000'den az, Güney Afrika ve Güneydoğu Asya'da ise 60/100000'den fazladır (17). Ülkemiz düşük riskli ülkeler arasında yer almaktadır (18).

HCC etiyojisi multifaktöriyeldir ve tümör oluşumuyla ilişkisi olan major ve minör risk faktörleri bulunmaktadır (19). HCC patogeneğinde başta gelen nedenler HBV ile HCV enfeksiyonu ve alkoldür (20). Ayrıca, malnütrisyon, aflatoksin, sigara kullanımı, yağlı karaciğer, demir fazlalığı, kimyasal karsinojenler ve nitritler de HCC gelişimindeki diğer risk faktörlerini oluştururlar (19,21) (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1. HCC'nin gelişimi ile ilgili major ve minor risk faktörleri

İnfeksiyonlar	Siroz	Çevresel faktörler	Metabolik Hastalıklar
Hepatit B virüsü	Alkolik siroz	Andojenik steroidler	Hematokromatozis
Hepatit C virüsü	Otoimmün hepatit	Aflatoksinler	Wilson hastalığı
	Primer biliyer siroz	Sigara	Porfiriya kütentarda
	Kriptojenik siroz	N-nitrozo bileşikleri	Ailesel kolestatik siroz
		Pirrolizidin alkaloidler	Galaktozemi
			Sitrüllinemi
			Hereditör tirozinemi
			Glikojen depo hastalığı tip 1 ve 3

Dünyada yılda 1,25 milyon insanın ölümüne neden olarak, en sık görülen kanser ilişkili ölümlerden biri olan HCC'nin patolojisi henüz tam olarak bilinmemektedir (22).

Hepatosellüler karsinoma DNA tamir genlerinde, tümör baskılayıcı genlerde ve onkogenlerde mutasyona neden olan, genellikle kimyasal bileşikler ya da virüsler tarafından uyarılan çok basamaklı bir süreçtir (23). Bu süreç inflamasyon ve sirozu içerir. Hepatositlerde malign transformasyona neden olan çeşitli genetik değişikliklere yol açar. Bunların yanı sıra, HCC hafif karaciğer hastalığı sonrasında da oluşabilir (24). HCC'nin erken dönemdeki tipik özelliği sessiz olması ve yavaş büyüyerek ilerleyinceye kadar çok az belirti vermesidir. Bu özelliğinden dolayı primer tümörün küçük olduğu evrelerde dahi intravasküler veya intrabilyer sahada yayılım eğilimi vardır. HCC'nin bu özellikleri tedavi yaklaşımlarını kısıtladığı gibi ölüm oranını da arttırmaktadır (19,25,26).

Hastalığın seyri HCC'de tanı ve tedavi için önemli bir basamaktır (27). Karaciğer tümörlerinin erken dönemde ve kesin olarak tanımlanması, klinik olarak kuşkulandırmaya, tarama protokollerine, serolojik testlere ve radyolojik görüntüleme yöntemlerine dayanır (19).

Kötü diferansiye olmuş histoloji, fibroz kapsülün bulunmaması, tümör nodüllerinin büyük boyutları (>5cm), vasküler invazyon, erken metastaz ve alfa-fetoprotein (AFP) düzeylerinin yüksek olması HCC'nin önemli özelliklerindedir. (28). HCC'nin izlenmesi oldukça karmaşıktır çünkü tümör değişik radyolojik görüntülere sahiptir ve sıklıkla sirotik regeneratif ve displastik nodüllerle bir arada bulunurlar (29). HCC'nin tanımlanması için en sık başvurulan yöntemler Ultrasonografi (US), bilgisayarlı tomografi (BT) taraması ve manyetik rezonanstır (MR) (19). Karaciğerdeki tümörlerin histolojik incelemesi HCC tanısında altın standart olarak kabul edilmektedir. Ancak kanama ve biyopsi sırasında tümörün yayılması riskinden dolayı bu uygulama konusunda endişe duyulmaktadır. HCC'nin klinik olarak geçerliliği kabul edilmiş belirteçleri ve ayırt edici klinik bulguları olmadığından ancak ilerlemiş hastalık evresinde tanısı konmaktadır ve bu nedenle tedavisi oldukça güçtür. Bundan dolayı erken tanı ve tedaviyi sağlamak açısından genellikle tarama ve hasta takibi tercih edilir (29). İleri evredeki HCC hastaları için ise henüz etkili bir tedavi belirlenmemiştir (27). HCC için cerrahi işlemler dışında standart bir tedavi bulunmamaktadır (30).

2.2. Apoptozis

2.2.1. Apoptozis ve Tarihçesi

Apoptozis, ilk kez 1972 yılında Kerr ve ark. tarafından hücre ölümünün farklı bir morfolojisi olarak tanımlanmıştır. Apoptozis, gelişmiş organizmalarda hücrelerarası ilişkilerin gereği olarak gereksinim duyulmayan, hasar görmüş ya da virüs ile enfekte olmuş hücrelerin çevreye zarar vermeden genetik olarak kendi kendilerini yok etmesidir. Bu nedenle apoptozis hücre intiharı olarak da bilinir. Köken olarak ‘apopteo-sis’ den gelen ve Yunancada “sonbaharda ağaçların yaprak dökmesi” anlamına gelen apoptozis “mitozun karşıt anlamı” olarak kullanılmıştır (31).

Apoptozis, organizmada fizyolojik ve patolojik durumların her ikisinde de önemli bir rol oynar (32). Doğadaki birçok canlının normal gelişim sürecinde başlayan ve yetişkin hayat boyunca da devam eden sayısız biyolojik olayın ve hastalığın ortaya çıkmasında apoptozis mekanizması büyük önem taşır. Hücre çoğalması ve apoptozis arasındaki denge embriyolojik gelişimde doku ve organların şekillenmesinden sorumludur (33). Embriyolojik gelişim sürecinde fetüsün el ve ayak parmakları arasındaki zarın ortadan kaldırılması, cinsel gelişim sırasında duktus sistemlerinin gerilemesi, omuriliğin şekillenmesi gibi fizyolojik durumlarda gözlenirken; yetişkinlerde ise daha çok hormona bağlı involüsyonda örneğin; menstrual siklusda endometriyum hücrelerinin yıkımında, menopozda folikül atrezisi ve laktasyonunun sonlandırılmasıyla meme bezlerinin rejenerasyonunda gözlenir (34,35). Apoptozis, organogenezin yanı sıra vücudun bütünündeki hücre sayısının sabit tutulmasını da sağlar. Bağışıklık sisteminin önemli hücrelerinden biri olan timüslerde olgunlaşan T lenfositler ve B hücrelerinde olgunlaşan immünglobulinlerden, etkisiz olan veya kendi hücrelerine zarar verme potansiyeli bulunanlar da dolaşıma girmeden önce yine apoptozis ile uzaklaştırılır (36,37).

Çoğalmakta olan bir hücre topluluğunun büyüklüğü bölünme hızına bağlı olduğu kadar, ölüm hızına da bağlıdır (38). Doku homeostazisinin bir düzen içinde oluşu, apoptozis/proliferasyon dengesinin sağlıklı bir şekilde sürdürülmesine bağlıdır. Bu dengenin bozulması organ işlevlerinde bozulma ve neoplaziye neden olmaktadır

(33,39). Karsinogenezde artmış proliferasyon ve azalmış apoptozisin görülmesi buna örnek olarak gösterilebilir (39).

Son yıllarda, apoptozisin düzensizliği (artmış/azalmış apoptozis), henüz çok fazla bilgiye sahip olunmayan birçok hastalığın gelişimindeki önemli özellikleri açıklamak için yeni bir bakış açısı kazandırmıştır. Toksik nedenli karaciğer hasarı, miyokard infarktüsü, inme gibi iskemik hasarlar, Alzheimer ve Parkinson Hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklar ile AIDS artmış apoptozis ile ilişkili hastalıklardır (40,41). Bunlardan farklı olarak uygun olmayan azalmış apoptozis ise viral enfeksiyonların sebep olduğu karaciğer hastalıkları, birçok deri hastalığı, göz hastalıkları, akciğer hastalıkları, otoimmün hastalıklar, ateroskleroz ve kanser ile ilişkilidir (Çizelge 2.2) (41,42).

Çizelge 2.2. Farklı fizyolojik ve patolojik durumlarda apoptozisin rolü

Apoptozis ile ilişkili fizyolojik olaylar	Azalmış Apoptozis ile ilişkili olaylar	Artmış Apoptozis ile ilişkili olaylar
Fetusun implantasyonu	Kanserler	Nörodejeneratif bozukluklar
Menstruasyon	Blastom	Amyotrofik lateral skleroz
Embriyogenez	Karsinom	Parkinson Hastalığı
Organogenez	Lösemi	Alzheimer Hastalığı
Menepozda Folikül Atrezisi	Lenfoma	Huntington Hastalığı
Laktasyon sonrası meme bezleri regresyonu	Otoimmün hastalıklar	Spinocerebellar ataksi
	Latent virüs enfeksiyonları	AIDS
	Ateroskleroz	Aplastik anemi
	Metabolik Bozukluklar	Toksik karaciğer hasarı
	Premalign Hastalıklar	Miyokard infarktüsü
		Romatooid Artrit
		Multiple Skleroz
		İskemi-Reperfüzyon
		Skleroderma
		Sepsis

(Çizelge 2.2 41' nolu kaynaktan alınarak düzenlenmiştir).

2.2.2. Apoptozisin Morfolojisi

Apoptozis, kademeli olarak morfolojik değişikliklere sebep olan sitolojik ve biyokimyasal özellikler ile karakterizedir. Apoptotik morfoloji; hücre büzülmesi, kromatin yoğunlaşması, çekirdeğin parçalara ayrılması ve “apoptotik cisimcik” olarak adlandırılan aktin bağımlı sitoplazmik çıkıntılar oluşturarak hücreden ayrılması ve bu

apoptotik cisimciklerin makrofajlar tarafından fagosite edilmesi basamaklarını içerir (43).

Apoptotik hücre ölümünün morfolojik değişiklikleri çekirdek ve sitoplazma ile ilgilidir. Apoptotik süreç; apoptotik yol izine, uyarının türüne ve hücre tipine bağlıdır. Hücre ölümünün başlaması ve hücre bölünmesinin sonlanması birkaç saat alır. Apoptozisin çekirdekteki en önemli morfolojik özelliği kromatin yoğunlaşması ve çekirdeğin parçalara ayrılmasıdır. Kromatin yoğunlaşması, çekirdek zarının çevresi boyunca bir halka şeklinde başlar. Kromatin yoğunlaşması sonucu çekirdek, zar bütünlüğünü bozmadan karyoreksis olarak tanımlanan bir olay ile yapıdan ayrılır (44). Bu morfolojik özellikler kaspazlar tarafından farklı proteinlerin kırılması ile başlatılabilir. Lamin A ve *Nuclear Mitotic Apparatus* (NuMA) gibi çekirdek içi proteinler çekirdeğin yapısal bütünlüğünü koruyabilirler. Apoptozisde bu proteinlerin her ikisi de aktif kaspaz-3 ve -6 tarafından kırılırlar (45). Apoptozisin en önemli özelliği çift iplikli DNA'nın internükleozomal bölgelerden 180-200 baz çifti (bp) uzunluğunda parçalara ayrılmasıdır. Bu parçalanmalardan sorumlu proteinler; DNA'yı parçalara ayıran faktör 40 (*DNA fragmentation factor*, DFF 40) ve kaspazla aktive olan DNaz' dır (*Caspase-activated DNase*, CAD) (46).

Apoptozisin erken evrelerinde, apoptotik hücrelerin çevrelerindeki komşu hücreler ile bağlantısı kesilir. Komşu hücrelerdeki aktin ve miyozin bağımlı mekanizma sinyallerini aktive eden bağlar ve hücre yüzeyindeki mikrovilluslar ortadan kalkar ve plazma membranında tomurcuk adı verilen yapılar oluşmaya başlar (47). Bu olayları takiben hücre büzülür ve son olarak hücre, sitoplazma ile çevrilmiş hücresel organelleri ve çekirdek parçalanmasını içeren, sıkı bir şekilde paketlenmiş apoptotik cisimcikleri oluşturur. Oluşan bu apoptotik cisimcikler daha sonra komşu hücreler ve makrofajlar tarafından tanınır ve fagositoz ile uzaklaştırılır (48). Plazma zarındaki değişiklikler apoptotik hücrelerin tanınması ile olur. Sağlıklı hücrelerde fosfatidilserin (PS) plazma zarının iç yüzeyinde bulunur. Sağlıklı hücrelerin tersine, apoptotik hücrelerde plazma zarının dış yüzeyinde bulunan PS fagositik hücrelerin apoptotik hücreleri tanınması için bir sinyal oluşturur. Fagositik hücrelerin reseptörleri PS'e bağlanır ve fagositozu uyarır. PS'e maruziyetin kaspaz bağımlı olduğu bildirilse de mekanizması henüz tam olarak bilinmemektedir (49).

2.2.3. Apoptozis ile Nekroz Arasındaki Farklar

Hücre ölümünün iki tipi vardır; bunlar apoptozis ve nekrozdur. Her iki hücre ölüm tipinde de düzenli olarak birbirini izleyen, fakat farklı morfolojik, biyokimyasal ve moleküler özellik gösteren olaylar sonucu hücre ölümü meydana gelir (50).

Hücre ölümüne neden olan bu iki önemli mekanizmanın başlatıcı etkenleri farklıdır. Apoptozisin gerçekleşebilmesi için hücre içi ATP seviyesinin yüksek olması gerekirken, nekroz için fazladan enerjiye gereksinim duyulmamaktadır. Hücre içi ATP seviyesi, hücrenin apoptozis veya nekroz ile öleceğine karar verir. Apoptoziste, hücre içinde ATP azalmasına neden olmayan fizyolojik veya patolojik bir uyarı olurken; nekrozda ise başlatıcı nedenler ağır hipoksi, toksinler ya da ATP eksikliğine neden olan faktörlerdir (33).

Nekroza uğrayan hücre içine aşırı sıvı girmesi sonucu şişer, mitokondri genişler, kromatin yapısı normal kalır, organeller çözünür, plazma zarı bütünlüğünü kaybeder, hücre içi materyali hücre dışına çıkar ve inflamasyon oluşur. Apoptozisin nekrozdan en önemli farkı dokuda bir inflamasyon meydana gelmemesi ve genetik olarak kontrol edilen fizyolojik olaylarla düzenlenmesidir (34). Apoptozise uğrayan hücreler büzülür, hacminin 1/3'ünü kaybeder, plazma zarında tomurcuklanmalar oluşur ve hücre sitoplazma ile çevrilmiş kromatin parçalarından oluşan apoptotik cisimciklere parçalanır. Apoptotik cisimcikler makrofajlar tarafından tanınıp fagosite edildiğinden inflamasyon yanıt oluşmaz ve çevrelerindeki komşu hücreler zarar görmezler (39,51).

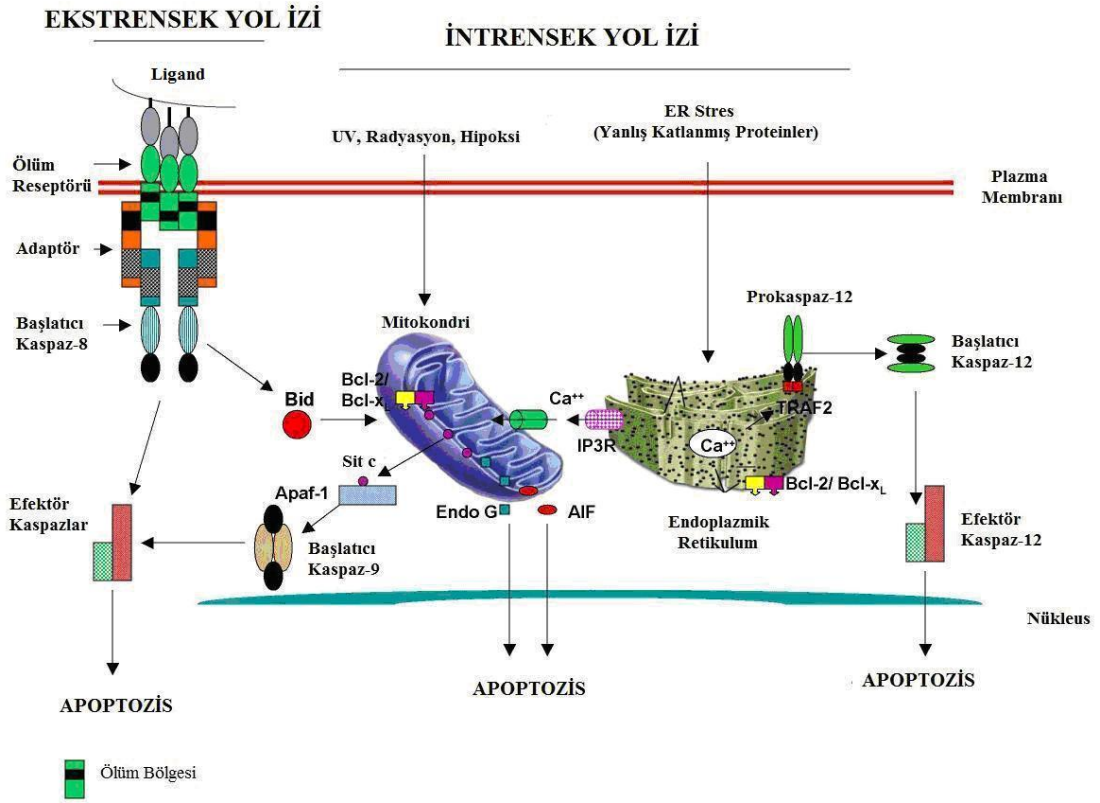
2.2.4. Apoptozis Mekanizmaları

Otonomik veya programlı hücre ölümü olarak da bilinen apoptoziste birbirini izleyen basamakların neler olduğu tam olarak bilinmemektedir. Mekanizması tam olarak bilinmese de apoptozis, çeşitli hücre içi veya hücre dışı sinyallerle başlamaktadır (52,53). Apoptozis mekanizması için, memeli hücrelerinde tanımlanmış olan iki yol izi bilinmektedir. Bunlardan birincisi hücre zarında bulunan reseptör aracılı sinyal yol izi, diğeri ise mitokondriden salınan sitokrom c'nin tetiklediği kaspaz aktivasyon yol izidir. Bu yol izilerinden ölüm reseptörleri ilişkili olana "ekstresek yol izi" denir. Kaspaz aktivasyonu için gerekli kaspaz aktivatör proteinlerinin sitozole salınmasından sorumlu olan, mitokodrinin de katıldığı diğeri ise "intrensek yol izi" olarak bilinir (3-5).

Ayrıca bunların dışında literatürlerde fazla tanımlanmayan ve nasıl oluştuğu tam olarak bilinmeyen Endoplazmik Retikulum (ER) aracılı apoptozis mekanizması da bulunmaktadır (54).

2.2.4.1. Mitokondri/Sitokrom c Aracılı Apoptotik Yol İzi

Hücre ölümünün düzenlenmesinde mitokondri önemli bir rol oynar. Normal şartlarda sitokrom c, mitokondrinin zarlar arası bölgesinde yer almaktadır ve ATP oluşumunda işlevi vardır. Proton (H^+) ve diğer iyonlar iç mitokondri zarının her iki tarafında bir elektriksel yük oluşturacak şekilde asimetrik olarak dağılmıştır. DNA hasarı, oksidatif stres, hücre içi kalsiyum miktarında artış, sitokinler, glukokortikoidler, kemoterapötik ajanlar, hormon ve büyüme faktörleri yoksunluğu sonucu hücresel stres meydana gelebilir. Hücresel stresi takiben apoptozise giden bir hücrede, mitokondrinin dış zarında, transmembran potansiyelinin düşmesi sonucu zar geçirgenliği azalır ve “*permeability transition pore (PT)*” adı verilen por oluşumu gözlenir. Mitokondrinin dış zarının parçalanmasıyla sitokrom c zarlar arası boşluğa salınır (38,55-57). Sitokrom c'nin mitokondriden sitozole salınımı apoptozisin başlaması için önemli bir olaydır. Nükleotid trifosfat (d-ATP veya ATP) 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 oluşumu kaspaz-9'un aktivasyonuna ve kaspaz kaskadının başlamasına yol açar (Şekil 2.1) (4, 52,55,58,59).

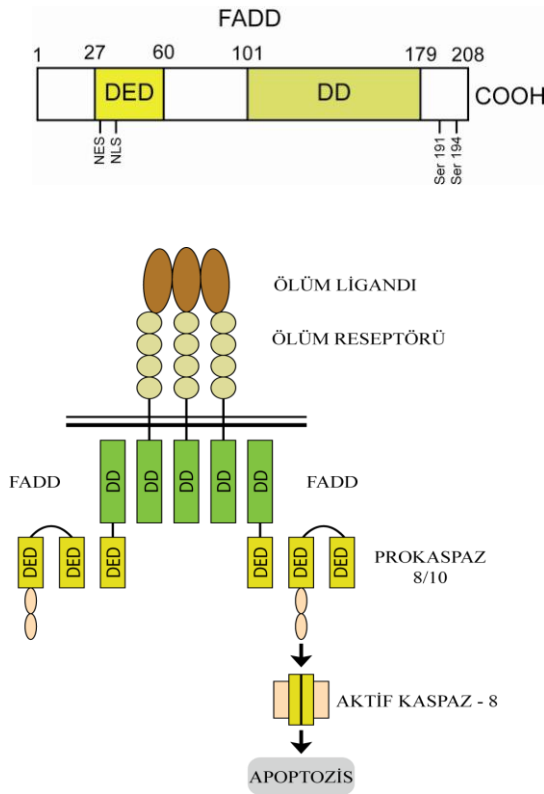


Şekil 2.1. Apoptotik yol izleri (59' nolu kaynaktan alınarak düzenlenmiştir).

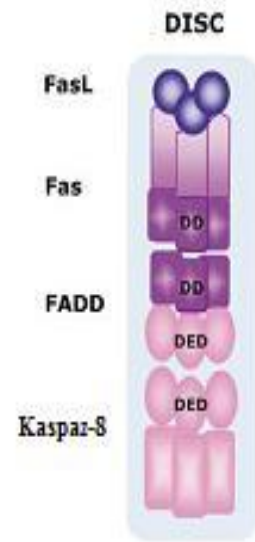
2.2.4.2. Ölüm Reseptörleri Yol İzi

Direk kaspaz aktivasyonuna neden olan ikinci yol izi ise ölüm reseptörleri (*Death Receptor*, DR) yol izidir. Bu apoptotik sinyal yol izi hücre yüzeyindeki DR'ler aracılığı ile uyarılır. Bunlar; Fas (CD95,APO-1), tümör nekroz faktör reseptörü-1 (TNFR1, p55, CD120a), DR3 (Apo3, WSL-1, TRAMP, LARD), DR4, DR5 (Apo2, TRAILR2, TRICK2, KILLER), ve DR6'dır. Bu DR'ler, TNFR ailesinin üyesidirler (36,60). DR yol izinin bilimsel 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 (61). 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 (36). Hücre zarında yerleşim gösteren protein yapıdaki bu DR'ler, ligandları ile bağlanınca sitoplazmik bölgelerindeki DD'lerden 3 veya daha fazlası öncelikle bir araya gelir ve

adaptör protein için bir bağlanma bölgesi oluştururlar. Bu adaptör protein, reseptörlere özgüdür. Bunlar, Fas için; Fas ilişkili ölüm bölgesi (*Fas associated death domain*, FADD) (Şekil 2.2.) (62) ve TNFR1 ve TNFR2 için ise TNF ilişkili ölüm bölgesidir (*TNF receptor associated death domain*, TRADD) (39). Fasligand'ın (FasL) doğal katil hücreler, sitotoksik T lenfositler veya TNF- α gibi inflamatuvar sitokinlerin varlığında ilgili DR'lere bağlanması, reseptörün sitoplazmik bölgesinde bulunan birçok adaptör protein ve prokaspaz-8, -10 gibi proenzimlerin indüklenmesine ve böylece ölümü indükleyen sinyal kompleksi (*Death inducing signalling complex*, DISC) oluşumuna neden olur (Şekil 2.3.) (63). Kaspazların aktivasyonu DISC'de sinyal oluşumu hücre tipine göre mitokondriye ihtiyaç duyan veya duymayan hücre ölümüne neden olur (54,60,64).



Şekil 2.2. Fas ve Fas ilişkili ölüm bölgesi (FADD) yapısı (62'nolu kaynaktan alınarak düzenlenmiştir)



Şekil 2.3. DISC kompleksinin yapısı (63'nolu kaynaktan alınarak düzenlenmiştir)

TNFR ailesinin bir üyesi olan Fas, FasL'ye bağlanarak ölümü aktive eder. Fas, lenfoid hücrelerde, hepatositlerde, bazı kanser hücrelerinde ve akciğerde bulunur. Bu apoptotik yol izi, immün yanıtta sonra fazla miktarda üretilen ve kümelenen gereksiz lenfositlerin uzaklaştırılması gibi immün sistemin normal *down regülasyonu*'nda görev alır (65). TNFR ailesinin diğer üyeleri ise; TNFR1, TNFR2, lenfotoksin beta, sinir büyüme faktör reseptörü (*Nerve Growth Factor Receptor*, NGF-reseptör), CD40, CD27 ve CD30'dur. TNF ligandı, reseptörleri olan TNFR1 veya TNFR2 ile bağlandığında apoptozisi aktive eder. TNFR1 pek çok dokuda bu sinyalin aktivasyonu ve iletiminden sorumlu iken TNFR2 timositlerde TNF bağımlı sinyalden sorumludur (39).

Hepatositlerdeki apoptotik olaylar hücre zarındaki ölüm reseptörlerine bağlanan farklı uyarıcılarla düzenlenir. Hepatositlerdeki ölüm yol izini aktive eden reseptörler, FasL, TNF- α veya TNF ilişkili apoptotik uyarıcı ligandır (TRAIL). Hepatositler, temel olarak Fas eksprese ederler ve FasL'ye bağlanmaya yüksek oranda duyarlıdır (66). TNF ailesinin diğer bir üyesi olan TGF- β ise ölüm reseptörlerine bağlanmaz ancak bunun intrasellüler sinyalleri intrinsek yol izi aracılı apoptozis mekanizmasının oluşumuna neden olur (67,68). TRAIL normal dokuların hepsinde olmasa da özellikle transforme edilmiş hücre dizilerinde apoptozisi indükler. Bu işlem TRAIL reseptörü 1 ve 2 (TRAILR 1 ve 2) tarafından düzenlenir. İnsan HCC'sinde çok fazla miktarda TRAILR'nin ekspresyonu gözlenir (64).

2.2.4.3. Endoplazmik Retikulum Yol İzi

Mitokondrial/sitokrom c ve ölüm reseptör aracılı apoptozisten farklı olan ve mekanizması tam olarak bilinmeyen üçüncü yol izi ise endoplazmik retikulum (ER) yol izidir (56). Bu yol izinin kaspaz-12'yi içerdiği ve mitokondriden bağımsız fonksiyon gösterdiği bildirilmektedir (69). Protein sentezinin düzenlendiği ve protein katlanma bölgesi olarak da bilinen ER; hücre içi kalsiyum dengesi, kalsiyum sentezi ve membran proteinlerinin katlanmasını içeren birçok işlevde kritik öneme sahiptir (60). Hipoksi, glukoz yetersizliği, kalsiyum dengesindeki bozukluklar ve serbest radikallere maruz kalma gibi hücrel stresler ER'nin hasar görmesine sebep olarak protein sentezinin azalmasına ve protein katlanmalarının açılmasına neden olur. Normal hücrelerde, bir adaptör protein olan TNF reseptör ilişkili faktör-2 (*TNF receptor associated factor 2*,

TRAF2) prokaspaz-12'ye bağlanır ve onu inaktive eder. ER'nin strese maruz kalmasıyla TRAF2 ayrılır ve bu ayrılma kaspaz-12'nin aktive olmasına neden olur (70-72). Aktive olan kaspaz-12, 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. Kaspaz-12'nin sitokrom c salınımına neden olarak intrinsek yol izini uyardığını gösteren kanıtlar olmasına rağmen bu mekanizma mitokondriden bağımsızdır (71).

2.2.5. Apoptozisin Genetik Kontrolü

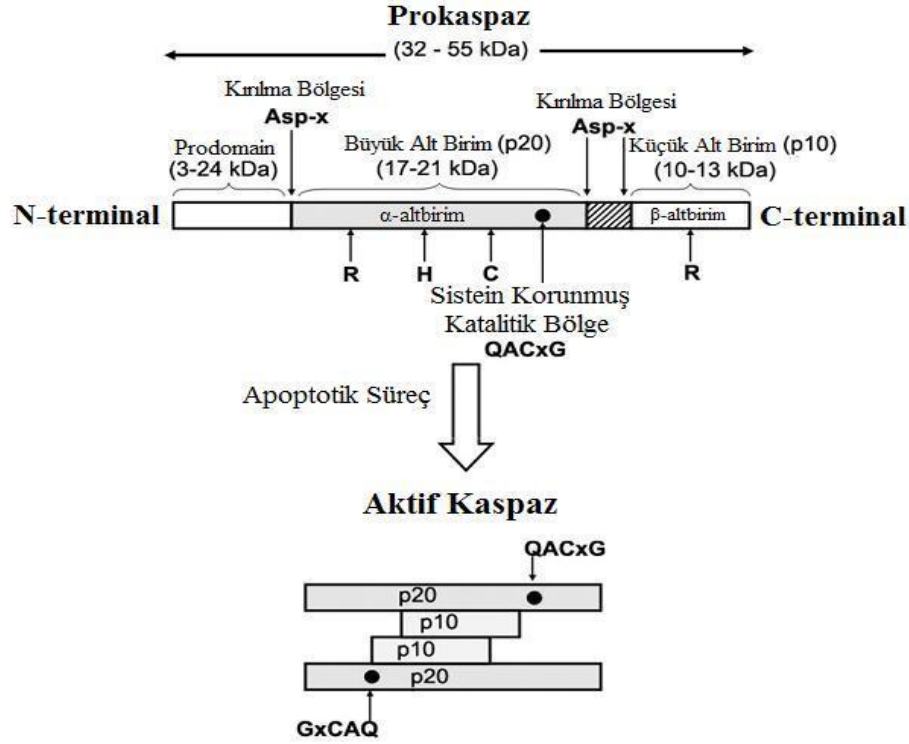
Apoptotik hücre ölümü genellikle kaspaz kaskadı aracılığı ile gerçekleşir. Birçok uyarıcı bulunmasına rağmen apoptozisin son basamağı olan hücre ölümü, yaygın birkaç efektör kaspaz tarafından yürütülür. Mitokondrinin başlatıcı kaspazlar ile downstream efektör kaspazlar arasında bir bağlantı sağladığı görülür. Mitokondriden sitokrom c ve apoptozis uyarıcı faktör (AIF) gibi proapoptotik moleküllerin serbest bırakılmasının sinir hücresi olmayan hücrelerde kaspazların aktivasyonlarını hızlandırdığı görülmüştür. Kaspaz enzimlerinin bazıları ile Bcl-2 ile etkileşen protein (*Bcl-2 interacting protein*, Bid) ve Bcl-2 ilişkili X proteini (*Bcl-2-associated X protein*, Bax) AIF ve sitokrom c gibi moleküllerin serbest bırakılmasını uyarırken, B hücreli lenfoma 2 (*B-cell leukemia/lymphoma 2*, Bcl-2) ise serbest bırakılmalarını engeller (73).

Apoptozisin sinyal iletimini kontrol eden yani apoptozisi baskılayan ya da aktive eden birçok düzenleyici mevcuttur (39). Proapoptotik veya antiapoptotik yol izlerinin kontrolü pozitif ve negatif olarak genetik ve çevresel düzenleyiciler ile gerçekleşir. Genetik düzenleme hücrenin kendi çevresinden gelen dış uyarıcılar tarafından değiştirilebilir. Ölüm yoluna girmiş veya ölüme başlamış bir hücre kendisini apoptozisten kurtarabilecek yaşam sinyallerini kabul edebilir (54). Bu düzenleyiciler genetik olarak başlıca 2 gruba ayrılır. Bunlar; Bcl-2 ailesi gibi protoonkogenler ile çoğunluğu proapoptotik olan *p53*, *c-myc* gibi tümör baskılayıcı genler, DR'ler ve kaspaz ailesi gibi genetik düzenleyicilerdir (33).

2.2.5.1. Apoptosis Mediyatörleri

Son yıllarda yapılan çalışmalar serin proteaz, kalpainler ve proteazomları da içeren bir dizi farklı proteazın apoptozisdeki nükleaz rolü üzerinde yoğunlaşmıştır (74). Horvitz ve ark. tarafından bir nematod olan *Caenorhabditis elegans*'da programlanmış hücre ölümünü araştırmak için yapılmış bir çalışmada interlökin 1 β dönüştürücü enzim (*Interlökin 1 β converting enzym*, ICE) üzerine dikkatler çekilmiştir. Ced-9, memelilerde hücreyi ölümden koruyan Bcl-2 ile benzerlik gösterir. Ced-4'ün henüz memelilerde tanımlanmış bir homologu yoktur. Ced-3 proteini ise memelilerdeki ICE ile yüksek derecede benzerlik gösterir. Bu sonuçlar doğrultusunda ve ICE'nin aşırı ekspresyonunun apoptozisi uyardığı gözlemlenen çalışmalar sonucunda ICE'nin apoptozisin uyarılmasında anahtar rol oynadığı öne sürülmüştür (75).

Sistein içeren aspartat spesifik proteazlara kaspaz (*Cysteine containing aspartate specific proteases*, caspase) adı verilmektedir (76). Günümüze kadar memelilerde benzer özellikler gösteren 14 kaspaz tanımlanmıştır. Bütün bu kaspazlar aspartat spesifik proteazlardır. Aktif bölgelerinde "QACXG" (X; R, Q veya D olabilir.) korunmuş pentapeptid içerirler ve hepsinin öncü molekülleri prokaspaz olarak bilinen zimojenlerdir (77). İnaktif proenzimler şeklinde bulunan bu kaspazlar, proteolitik hidroliz ile aktive edilmektedirler (41). X ışını kristal yapısı ve peptid dizileme çalışmaları, bu proenzimlerin katalitik olarak dayanıklı ve 32-55 kDa ağırlığında 3 bölge içeren, tek zincirli bir polipeptit olarak sentezlendiğini göstermişlerdir. Merkezinde katalitik aktif bölge içeren, 17-22 kDa ağırlığında bir internal bölge (p20), küçük katalitik alt ünite olarak da adlandırılan 10-13 kDa ağırlığındaki küçük C terminal bölge (p10) ve DD olarak adlandırılan 3-24 kDa ağırlığında NH₂ terminal bölgelerini içerir (Şekil 2.4) (77). Kaspazların birçoğunda p20 ve p10 alt birimleri küçük bağlantı dizisiyle ayrılırlar. Kaspazlar iki kırılma olayıyla tam olarak fonksiyonel proteazlara dönüştürülürler. İlk proteolitik kırılma, büyük ve küçük kaspaz alt birimlerinden zinciri ikiye ayırır, ikinci kırılma ise N-terminal predomaini uzaklaştırır (78). Ayrılma işleminden sonra 2 küçük 2 büyük alt birimden oluşan heterotetramerik yapıya sahip kompleks aktif bir kaspaz yapısı oluşur (79).

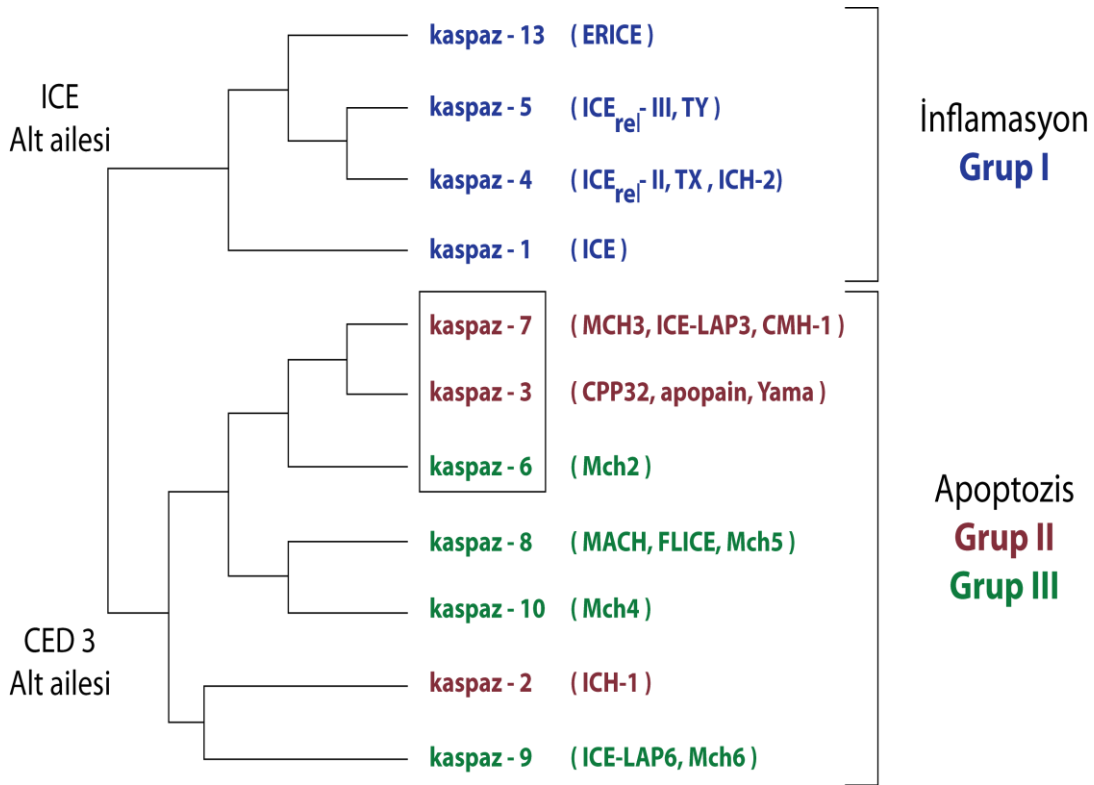


Şekil 2.4. Prokaspaz ve aktif kaspazın yapısı (77'nolu kaynaktan alınarak düzenlenmiştir).

Prokaspazların büyük N terminal prodomainleri, DD süper ailesi olarak bilinen apoptotik sinyallerin iletiminde görevli 80-100 aminoasit uzunluğunda yapısal motif içerirler. Bu DD'ler, aktivasyonundan önce kaspazların plazma zarına salıverilmesini sağlayan, apoptotik yol izinin *downstream*'inde önemli rol oynayan ölüme yardımcı olan bölge (*Death effector domain*, DED) ve kaspazları organize eden bölge (*Caspase recruitment domain*, CARD) olarak adlandırılan 2 bölgeye sahiptir (77).

Kaspaz ailesi amino asit dizilerindeki benzerliklere göre 3 alt gruba ayrılır (Şekil 2.5) (80). Bunlardan ilk ikisi başlatıcı ve efektör kaspazlardır ve apoptotik süreçte görev alırlar. Üçüncü grup ise apoptotik süreçte herhangi bir rol oynamayan fakat sitokinlerin olgunlaşmasına aracılık eden ve inflamatuvar yanıtta görev alan kaspazlardır (79). Apoptotik süreçte yer alan kaspazlar N terminal prodomainlerinin uzunluğuna göre 2 sınıfa ayrılırlar. Bu farklılık fonksiyonel olarak önemlidir (81). Prokaspaz-14 dışındaki bütün inflamatuvar kaspazlar ile apoptozis aktivatörü kaspazların hepsi uzun prodomainlere sahiptirler (82,83). Uzun prodomaine sahip kaspaz-1, kaspaz-4, kaspaz-5 ve kaspaz-12 inflamatuvar kaspazlar veya grup I kaspazlar olarak da adlandırılır ve inflamatuvar yanıtta rol alırlar. Uzun prodomaine sahip (>90 aminoasit) bir diğer kaspaz

grubu, DED içeren kaspaz-8 ve kaspaz-10 ile CARD içeren kaspaz-2 ve kaspaz-9 ise başlatıcı kaspaz olarak da bilinen grup II kaspazlardır. 20-30 amino asit uzunluğunda olan, efektör, öldürücü veya grup III kaspazlar olarak da adlandırılan kaspaz-3, kaspaz-6 ve kaspaz-7'yi içeren son grup ise kısa prodomaine sahip kaspazlardır. Apoptotik süreçte en önemli enzimler arasında kaspaz-3, kaspaz-8 ve kaspaz-9 bulunmaktadır (77).



Şekil 2.5. İnsan kaspaz ailesi (80' nolu kaynaktan alınarak düzenlenmiştir).

2.2.5.1.1. Kaspaz-3

Apoptozisin efektör kaspazlarından biri olan kaspaz-3, apoptozis sürecinde birçok farklı sistem tarafından kırılan nükleer enzim, poli ADP Riboz polimeraz (PARP) gibi birçok anahtar proteinin kısmen veya tamamen proteolitik kırılmasından sorumludur. Ced-3 ve kaspaz-1'in aktif bölgelerini kodlayan DNA dizileri kullanılarak yapısı aydınlatılan ve CPP32 olarak da adlandırılan kaspaz-3'ün, insan kromozomunun 4q33-q35.1 bölgesinde bulunan 32 kDa ağırlığında bir sistein proteaz olduğu

gösterilmiştir (84). Daha sonra yapılan bir çalışmada ise kaspaz-3 Yama ve apopain olarak tanımlanmıştır. PARP'ın kırılma bölgesinin (DEVD↓G) bilinmesine dayanarak, Ac-DEVD-AMC modeli substrat olarak, Ac-DEVD.CHO ise spesifik inhibitörü olarak sentezlenmiştir. Kaspazlara özgü substratlar ve kırılma bölgeleri Çizelge 2.3'de gösterilmiştir (85). Apoptozisin ölüm fazı sürecince kaspaz-3, PARP'dakine benzer olarak yaygın bir şekilde Asp-Xaa-Xaa-Asp (DXXD) motiflerini içeren çok sayıda substratın tamamen veya kısmen proteolitik kırılmasından sorumludur (74).

Tamir mekanizmasını ve normal hücre fonksiyonunu sürdüren birçok protein, apoptozis sürecinde kırılmaya uğrar. PARP ve DNA-bağımlı protein kinaz'ın katalitik altünitesi (DNA-PK_{cs}) DNA tamir mekanizması ile ilgilidir. Apoptozis sürecinde kırılan yapısal proteinler fodrin, aktin ve Gas2 gibi hücre iskeleti proteinleri ile NuMa ve lamin A gibi çekirdek yapısının oluşmasına katkıda bulunan proteinleri içerir. Bu proteinlerin veya henüz tam olarak tanımlanmayan diğer proteinlerin kırılması apoptotik hücre için karakteristik olan, çekirdek yoğunlaşması ve çekirdek zarını tomurcuklanması gibi gözlemlenmiş birçok biyokimyasal ve morfolojik özellikten sorumludur (86).

Çizelge 2.3. Kaspazlara özgü substratlar ve kırılma bölgeleri

Spesifik grup	P4-P1.		
	Uygun tanıma motifi	Amino asit dizisi	
Grup I	Kaspaz-1	WEHD	
	Kaspaz-4	WEHD	VEHD
	Kaspaz-5	WEHD	
	Kaspaz-13	WEHD	
Grup II	Kaspaz-2	DEHD	
	Kaspaz-3	DEVD	DEXD
	Kaspaz-7	DEVD	
Grup III	Kaspaz-6	VEHD	
	Kaspaz-8	LETD	(I/V/L) EXD
	Kaspaz-9	LEHD	
	Kaspaz-10	LEXD	

(Çizelge 2.3. 85' nolu kaynaktan alınarak düzenlenmiştir).

Kaspaz-3 gen hedefleriyle apoptozisde derin hasarlar oluşturulmuş fareler ile yapılan ilk çalışmada, mendel yasalarıyla beklenenden daha az sayıda fare doğmuştur.

Doğan fareler, aynı anneden doğan diğer farelerden daha küçük olup 1-3 haftalıkken ölmüşlerdir. Fenotipleri önemli ölçüde sınırlanmıştır. Embriyonik kalp, akciğer, karaciğer ve böbreklerde gözle görünür bir anormallik gözlenmezken en fazla sinir sisteminde etki göstermiştir (87, 88).

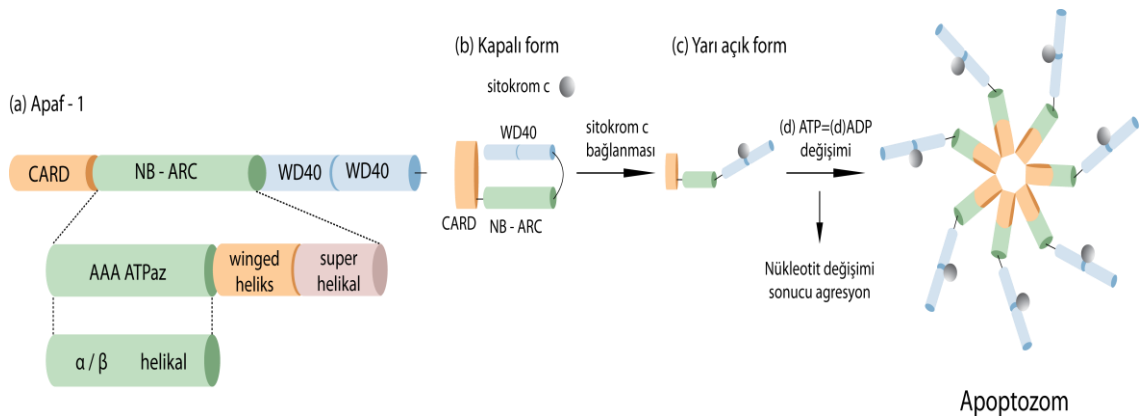
Kaspaz-3'ün apoptozis indüksiyonundaki temel rolü Zheng ve ark. tarafından knockout farelerinin hepatosit ve timositlerinde yapılan çalışma ile gösterilmiştir. Buna göre; kontrol hücreleri ile kaspaz-3^{-/-} hepatosit ve timositler aynı hızda ölmelerine rağmen, FasL'den ekprese olan 3T3 hücreleri ile yeniden kültüre edildiğinde, 6 saat içinde yabancı tip hücrelerin çekirdeklerinin parçalara ayrıldığı ve sitoplazmik tomurcuk oluşumu gibi tipik apoptotik özellikler gösterdiği fakat kaspaz-3^{-/-} hücrelerde bu özelliklerin gözlenmediği bildirilmiştir (89).

2.2.5.1.2. Kaspaz-8

FLICE olarak da bilinen kaspaz-8 insan kromozomunun 2q33-34 bölgesinde yer alır. Birçok ölüm reseptörü tarafından aktive olan bu proteaz, apoptotik süreçte oldukça önemlidir (90). Kaspaz-3 ve -8 katalitik bölgelerinin uzunlukları, aktif bölgelerinde sistein yer alması ve aktivasyonları için gerekli formun şekillenmesi bakımından yakın benzerlik gösterirler. Bu iki kaspaz arasındaki dikkat çekici farklılık ise, kaspaz-8'deki 2 DED içeren N terminal bölgenin uzunluğudur. Aktive olmuş DISC'lerin immünopresipitasyon deneyleri prokaspaz-8'in, aktive reseptör kompleksinin bir bileşeni olduğunu gösterir. Prokaspaz-8'in DED bölgeleri ile FADD ve TRADD'ın DD'leri arasındaki dizi benzerliklerinden dolayı DD proteinleri Fas ve TNFR ile ilişkilidir. Bundan dolayı aktive olmuş DISC'in bir bileşeni olarak TNF- α gibi birçok efektör tarafından uyarılan prokaspaz-8 direk sinyal iletiminde yer alır (Şekil 2.1). Fas veya TNF reseptörlerinin FasL veya TNF- α ile aktivasyonu prokaspaz-8'in otokatalitik aktivasyonu sonucu oluşur. Aktive kaspaz-8 daha sonra aktivasyonları ve otokatalitik işlevleri için yeterli desteğe sahip olmayan intrasellüler konsantrasyonlu kısa prodomainleri içeren kaspaz-3 gibi diğer kaspazların *downstream*'ine neden olur. Bu nedenle kaspaz-8'in Fas veya TNF aracılı apoptotik kaskatta ilk sırada bulunduğu belirtilmiştir ve *upstream* kaspaz olarak tanımlanmıştır (91).

2.2.5.1.3. Kaspaz-9

İnsan kromozomunun 1p36.2 bölgesinde yer alan, yaklaşık 35 kb ağırlığında olan kaspaz-9 (ICE-LAP6/Mch6, APAF-3) (92) Ced-3 alt ailesinin bir üyesidir ve kaspaz-3 ile yüksek benzerlik gösterir. Kaspaz-9 ve ailenin diğer üyeleri arasındaki temel fark, aktif bölgede bulunan pentapeptittedir (QACGG). Öyle ki kaspaz-9'da Arg'nin yerine Gly bulunur. Prokaspaz-9 küçük ve büyük alt birimleri, P³¹² EPD↓A ve D³²⁷QLD↓A arasında iki potansiyel işlem bölgesi içerir. D³²⁷QLD↓A motifi, PARP'daki DEVD↓G bölgesi ile benzerlik gösterir. Bu da kaspaz-9'un kaspaz-3 ile aktive edildiğini gösterir. P³¹²EPD↓A motifi ise potansiyel P₃ bölgesindeki asidik kalıntı içeren Granzim B kırılma bölgesidir (74). DNA hasarı gibi hücrel bir stres olduğu zaman sitozolde bulunan proapoptotik proteinler aktive olur ve mitokondrinin geçirgenliğini bozarak MPT por oluşumuna neden olur. Bunun üzerine mitokondrinin içinde bulunan sitokrom c sitozole salınır. Sitolitik dATP veya ATP varlığında, Apaf-1, sitozolik sitokrom c ve prokaspaz-9 birleşerek apoptozom adı verilen kompleksi oluşturur. Aktive olmuş kaspaz-9 daha sonra prokaspaz-3 ve -7'yi aktive eder (63). Apoptozom'un merkezi bileşeni olan Apaf-1; N ucunda CARD, daha sonra geniş nükleotit bağlayan bir bölge ve C ucunda ise 12-13 WD40 tekrarını içeren 3 bölgeden oluşur (Şekil 2.6) (93). CARD kaspaz-9'un prodomaini ile etkileşimi için gereklidir. CARD ve nükleotit bağlayan bölge sitokrom c ve dATP varlığında Apaf-1'in oligomerizasyonundan sorumludur (94).



Şekil 2.6. Apoptozom kompleksinin oluşumu (93' nolu kaynaktan alınarak düzenlenmiştir).

2.2.5.2. Kaspaz İnhibitörleri

Kaspazların aktivasyonu ve inaktivasyonu çeşitli proteinler, iyonlar ve apoptozisi inhibe eden proteinler (*Inhibitors of apoptosis proteins*, IAPs), Bcl-2 ailesi proteinleri, Calpain, Ca^{2+} , Granzim B ve sitokin yanıt değiştircisi A (*Cytokine response modifier A*, Crm A) gibi faktörlerle düzenlenir (81).

IAP'ler hem filogenetik hem de fizyolojik açıdan geniş çapta exprese olan apoptotik inhibitörlerdir (95). IAP'ler apoptozisi Bcl-2 ailesi üyelerini de içine alan diğer apoptotik inhibitör ailelerinden daha etkin olarak inhibe eder. Son yıllarda IAP'lerin apoptozisin moleküler mekanizmasında rol oynayan önemli düzenleyiciler olduğu gösterilmiştir. Bugüne kadar, NAIP, cIAP1, cIAP2, X-chromosome-linked IAP (XIAP), survivin, apollon ve livin olmak üzere birbirine benzer 7 tane insan IAP tanımlanmıştır. Bütün aile üyeleri, 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 bulundurur (94,95). Bazı IAP'lerde RING Zn bölgesi bulunmamasına rağmen, bu bölgelerin varlığı antiapoptotik fonksiyonları için gereklidir. Bunların apoptotik baskılamadaki temel rolleri kaspaz-3 ve -7'nin direkt inhibisyonudur (96,97).

Baculovirüsleri ve poxvirüsleri gibi birçok virüsün gen ürünü olan ve görevleri kaspazların işlevlerini inhibe etmek olan doğal (viral) kaspaz inhibitörleri de bulunmaktadır. Bunlardan en çok bilinenleri cowpox virüs tarafından üretilen Crm A'dır. Cowpox virüsünden elde edilen 38 kDa ağırlığında bir gen ürünü olan Crm A serpin benzeri bir moleküldür (81) ve viral enfeksiyon yoluyla inflamatuvar yanıt inhibisyonunu ve apoptozis inhibisyonunu kolaylaştırdığı saptanmıştır. Kaspazları inhibe ederek apoptozisi azalttığı görülen diğer bir viral gen ürünü de baculovirüsten elde edilen ve 35 kDa ağırlığındaki p35 proteindir (76).

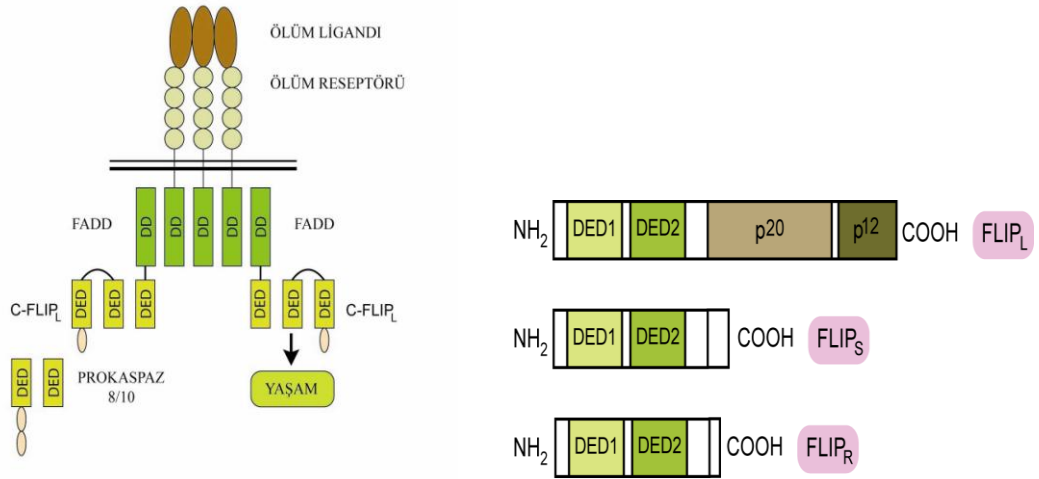
Granzim B, patojenle enfekte edilmiş hücrelerin veya tümör hücrelerinin ortadan kaldırılmasında etkin rol alırlar. Perforinler ve granzimler, normal olarak sitotoksik T lenfositler (CTL) ve doğal katil hücrelerin sitoplazmik bölgelerinde bulunurlar. CTL'lerin hedef hücreye bağlanmasıyla perforinler salgılanır ve hedef hücrenin membranına bağlanarak membranda porlar meydana getirirler. Oluşan bu porlar sitozolik Ca^{2+} düzeylerinin hızla artmasına yol açar. Perforinlerle birlikte salgılanan ve bir çeşit serin proteaz olan Granzim B de bu porlar aracılığı ile hücre içine girer.

Granzim B prokaspaz-3, -7, -8, -9 ve -10 gibi birçok prokaspazın aktivasyonuna neden olarak enfekte olmuş hücreleri apoptozise götürür (98).

Calpain, papainaz ailesinden Ca^{2+} bağımlı bir çeşit sistein proteazdır. Genel olarak Calpain'ın nekrozda ve apoptozisde arttığı bilinmektedir. Calpain ve kaspaz-3 fodrin, Ca^{2+} bağımlı protein kinaz ve ADP-ribozil transferaz/PARP gibi birçok ortak substratı paylaşırlar (98).

Nükleer faktör kappa B (NF- κ B) apoptozis ve inflamasyon gibi patolojik olaylarda genlerin düzenlenmesi ile ilgili olan dimerik transkripsiyon faktörüdür. NF- κ B aktivitesi hücre büyümesi, farklılaşması, gelişmesi, apoptozis ve hücrel redoks dengesindeki değişikliklere uyan yanıtları da içeren 150'den fazla genin indüklenmesini içerir. Sitokinler, patojenler, stres ve kemoterapötik ajanları da içeren birçok dış uyarıcı NF- κ B'nin aktivasyonuna neden olur (99).

Birçok herpes virüsünde bulunan FLICE inhibitör proteinleri (vFLIPs), ölüm reseptörleri yoluyla apoptozis sinyallerini engeller. vFLIP'in hücrel homologu 8 ayrı grup tarafından keşfedilmiş ve cFLIP/Casper/CASH/FLAME/I-FLICE/MRIT/CLARP/USurpin olarak adlandırılmıştır. cFLIP protein yoksun kaspaz homologudur. Bu inhibitör kaspaz-8'in çeşitli ölüm reseptörlerine bağlanmasını ve dolayısıyla ölüm reseptörlerinin aktivasyonunu engeller (100). cFLIP'in uzun formu (cFLIP_L) iki DED ve ilave olarak kaspaz-8'e homolog kaspaz benzeri bölge içerir. Fakat cFLIP_L, Cys-His içeren 2 atomlu katalitik molekülden yoksundur ve proteolitik aktiviteye sahip değildir. cFLIP_L, DD'lerle kaspaz-8 ve FADD'a bağlanır ve kaspaz kaskadı boyunca devam eden efektör kaspazların aktivasyonunu engelleyerek kaspaz-8 basamağında apoptozisi bloke eder (Şekil 2.7.) (62,83,100). cFLIP'in kaspaz-8'e oranı DISC'in oluşumu için önemlidir. DISC'in oluşumu cFLIP'in hedef molekülüne bağlanmasını gerektirir. cFLIP'in otoimmünite ve tümör gelişiminde önemli işlevi olduğunu belirtilmiştir. Diğer yandan cFLIP'in kaybı kardiyak infarktüs ve inflamatuvar miyopatiler gibi hastalık süreçlerinde önemli olabilir (53).



Şekil 2.7. FLIP inhibitör proteinlerinin yapısı (62' nolu kaynaktan alınarak düzenlenmiştir).

Mitokondrinin dış zarında geçirgenliğin artması mitokondriden sitokrom c, AIF, endonükleaz G, HtrA2/Omi ve prokaspaz-2, -3 ve -9 salınmasına neden olur. AIF'nin mitokondriden nükleusa göç etmesi, kaspaz bağımsız kromatin yoğunlaşması ve DNA fragmentasyonunu indükler. Endonükleaz G ise direk olarak kaspaz bağımsız DNA kırılmasına yol açar (54). Son çalışmalarda apoptotik süreçte mitokondriden salınan *Second Mitochondrial derived Activator of Caspase/Direct inhibitor of Apoptosis-Binding protein with LOw pI* (Smac/DIABLO) olarak adlandırılan yeni bir protein keşfedilmiştir. Bu proteinin işlevi apoptozis inhibitörlerinin sitoplazmik inhibitörü olan IAP'lere bağlanmak ve onların antiapoptotik etkilerine katkıda bulunmaktır. Smac/DIABLO ve sitokrom c'nin düzenli bir şekilde salındığı görülür. Sitokrom c, Apaf-1'i aktive ederken, Smac/DIABLO IAP'lere bağlanarak kaspaz inhibisyonuna yardım eder. Bazı hücre sistemlerinde hücre ölümü için sitokrom c gerekli olmasına rağmen yeterli düzeyde değildir. Bu sistemlerde, Smac/DIABLO ölüm için yeterli olacak ikinci bir faktördür (78).

2.2.5.3. Antiapoptotik Proteinler

2.2.5.3.1. Bcl-2 Gen Ailesi

İlk kez insan follüküler lenfomasında bulunan Bcl-2 geni, kromozomal translokasyondan kaynaklanan bir gen ürünü olarak tanımlanmıştır. Daha sonra yaşamsal bir faktör olarak rol aldığı keşfedilmiş ve bir onkogen olduğu düşünülmüştür. Bu genin apoptozisle direk ilişkisi *C. elegans*'ta apoptozis baskılayıcısı olan Ced-9'un insandaki homologu olması ile açıklanır (101). Son çalışmalarda Bcl-2'nin; büyüme faktörü yoksunluğu, radyasyona maruz kalma, c-myc veya anti kanser ilaçlar gibi birçok uyarı ile tetiklenmesi sonucu memelilerde apoptozisi baskıladığı bildirilmiştir (55). 230 kb bir protoonkogen olan Bcl-2, mitokondrial membranda yer alan 24-26 kb'luk bir proteini kodlar. Bu proteinin GTP bağlayıcı bir protein olduğu ve henüz tam anlaşılmayan bir mekanizma ile apoptozisi engellediği bilinmektedir (38). Bütün Bcl-2 gen ailesi üyeleri mitokondrinin dış zarında homo- veya heterodimerler halinde bulunurlar ve por oluşumu ve iyon kanallarının şekillenmesini sağlarlar (5,54).

Apoptozisin intrensek yol izi Bcl-2 ailesinin üyeleri ile düzenlenmektedir. İnsanlarda şu ana kadar Bcl-2 gen ailesinin 20 üyesi tanımlanmıştır (5). Bcl-2 ailesinin bütün üyeleri yapılarında bulunan Bcl-2 homoloji bölgelerinden (BH1-BH4) en az birini taşır. Bcl-2 ailesinin proteinleri yapısal ve işlevsel özelliklerine göre 3 alt gruba ayrılırlar. Grup I antiapoptotik aktiviteye sahipken grup II ve grup III ise proapoptotik aktiviteye sahiptir (54). Bu iki zıt etkili grubun işleyişi yapılarında bulunan hidrofobik cep ve amfipatik α -heliks bölgelerine bağlıdır. BH1, BH2 ve BH3 bölgeleri hidrofobik cepi oluşturur, amfipatik α -heliks ise BH3 bölgesinde yer alır. Proapoptotik ya da antiapoptotik üyeler birbirlerine hidrofobik cep üzerinde bulunan BH3 bölgesinden bağlanırlar. Bu bağlanma apoptozisin başlaması için BH3 bölgesinin gerekli olduğunu göstermektedir (102).

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 (102).

Grup II proapoptotik Bcl-2 ailesi: Apoptozisi uyarıcı özellik gösteren proteinlerdir. Bu grupta yer alan Bax, Bak, Bok/Mtd yapılarında BH4 hariç diğer bölgeleri içerirler (5, 102).

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 (5,102).

Antiapoptotik Bcl-2 proteinleri hücreyi birçok farklı uyarıdan korur ve hücrenin yaşamı için önemlidir. İlginç şekilde bazı durumlarda Bcl-2 ve Bcl-X_L kaspazlar tarafından kırılmaya uğrarlar ve kırılma ile bu proteinler prosurvival özelliğini kaybederek sitokrom c'nin mitokondriden salınımını indükleyen proapoptotik özelliğe sahip olur (102).

Bcl-2, Bcl-X_L ve Bax sentetik lipid membranlarında iyon kanallarının oluşumuna neden olurlar. Bcl-2 ve Bcl-X_L çekirdek, ER ve mitokondrial zarda yer alır. 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 (103).

Bir çeşit proteaz olan AIF, kaspazları aktive etme özelliğinin yanı sıra çekirdeğin apoptotik morfolojik değişikliklerini indükleme kabiliyetine de sahiptir. Sitokrom c'nin salınım mekanizması ve bu salınımın Bcl-2/BclX_L tarafından nasıl önlendiği henüz bilinmemektedir (103).

Bcl-2 ailesi proteinlerinin dikkat çekici özelliklerinden birisi de homodimer ve heterodimer oluşturabilme kabiliyetidir. Bu ailenin antiapoptotik ve proapoptotik üyeleri arasındaki heterodimerizasyon, birbirlerinin biyolojik aktivitelerini inhibe ettiğini düşündürüyor. Apoptotik aktivite için BH1, BH2 ve BH3'e ilave olarak BH4'ün olması gerekliken proapoptotik aktivite için BH3 olması gerekir (103).

2.2.5.3.2. p53

Bir tümör baskılayıcı gen olan *p53*, insan tümörlerinin % 70'ini inaktive eden hücre döngüsünü düzenleyen bir transkripsiyon faktörüdür (104). Birçok organizmada kanserin baskılanmasında görevi olan çok önemli bir proteindir. *p53* proteini hücre büyümesinin durdurulması, apoptozis, hücre farklılaşması ve DNA tamir mekanizmasında görev alır (105).

Hücre tipi, sitotoksik ilaçlar, gama radyasyon, ısı, şok, hipoksi, osmotik şok, DNA hasar ajanları gibi birçok çevresel uyarıcı bir hücrenin hücre siklusunda durması veya apoptozise devam etmesi yönünde etki gösterir (104,106). Normal bir hücrede DNA hasarını takiben *p53* seviyesi hızlıca artar, *p53* stabilize olur ve hücre siklusunu G1 fazında durdurarak hücreye kendini tamir etmesi için zaman kazandırır. Hücre hasarı tamir edilemeyecekse hücre apoptozise gider (106). *p53*'ün G1 evresini geçip hücrenin ölümünü nasıl sağladığı tam olarak bilinmemektedir (105).

Hasarlı hücrelerde fonksiyonel *p53* yoksa hücre siklusu kontrol edilmeden ilerler. *p53*'ün düzenleyici aktivitesi ise negatif düzenleyici *murine double minute 2* (Mdm2) proteini ile sağlanır. Mdm2 proteini, *p53*'ü kontrol altında tutar ve *p53*'ün G1/S geçişinde siklusu durdurur ve apoptozisi engeller. 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 transkripsiyonel aktivitesi hücre siklusunu G1 noktasında durur ve Bax genini aktive ederek hücreyi apoptozise götürür. Mdm2, *p53*'ün transkripsiyonunu azaltır veya *p53*'e bağlanarak aktivitesini inhibe eder (105,107).

2.2.5.3.3. c-Myc

c-Myc geni, kromozomun 8q24 bölgesine yerleşmiştir. c-Myc proteini Janus kinaz (JAK) ailesinin bir üyesidir. Hücre proliferasyonu, hücre farklılaşması ve apoptozis ile ilişkili genlerin transkripsiyonlarını düzenleyen bir fosfoproteindir (108). İnsülin benzeri büyüme faktörü-1 (*Insuline-like growth factor-1*, IGF-1) gibi antiapoptotik sitokinler veya Bcl-2 gibi apoptozisin negatif düzenleyicileri varlığında c-Myc hücresel çoğalmayı sağlarken bu faktörlerin yokluğunda ise c-Myc ailesi apoptozise neden olur (109). c-Myc geninin aşırı üretimi veya gen yapısındaki

değişiklikler hücre döngüsünün bozulmasına neden olur ve *p53*'e bağlı yoldan hücrenin apoptozise gitmesine neden olur (107).

2.2.5.4. Proapoptotik Proteinler

Proapoptotik proteinler genlerin aktivasyonunu sağlayarak apoptozisi uyarıcı yönde aktivasyon sağlarlar. Bu grupta BH4 bölgesi dışında diğer üç bölgeyi de içeren Bax, Bak ve Bok ile sadece BH3 bölgesi içeren proteinler olan Bad ve Bid de yer alır (102). Sadece BH3 bölgesini içeren protein grubundan olan Bad'ın hedefi Bcl-2/Bcl-X_L gibi antiapoptotik proteinlerdir. Bad Bcl-X_L'ye bağlanma kapasitesi ile Bcl-2 ve Bcl-X_L'nin ölüm baskılayıcı aktivitelerini antagonize eder. Bad'ın BH3 bölgesi Bcl-X_L ile etkileşiminde ve hücre ölüm aktivitesinde önemlidir. BH3 bölgesi Bcl-2 gibi ölüm baskılayıcılarına direkt bağlanır ve onların Bax ve Bak gibi proapoptotik aile üyeleri ile etkileşimini bloke ederler (109).

Bid; Bcl-2 ile interaktif etkileşime giren proapoptotik sadece BH3 bölgesini içeren proteinlerden biri olarak tanımlanır. Bid'in Bcl-2 ile heterodimer oluşturma kabiliyeti ve hücre ölümünü indükleyici aktivitesi mutasyon analizleri ile ortaya konmuştur. Bid'in Bax ile etkileşime girme kabiliyeti sitotoksiste ile ilişkilidir. Bid'in Bax ile etkileşimi sitokrom c'nin mitokondriden salınımına neden olan Bax'ın yapısal değişimi ile ilgilidir (109).

2.3. Benzimidazol Türevi Bileşikler ve Apoptozis

Benzimidazol halkası, benzen ve imidazol halkalarının birleşmesiyle oluşmaktadır. Benzimidazol halka sistemi, iki farklı yapıda azot atomu taşımaktadır. Bu halka sisteminde numaralandırma üzerinde hidrojen atomu taşıyan ve “imino azotu” veya “pirol azotu” olarak adlandırılan azot atomuna 1 numara verilerek başlanır. İmino azotunun taşıdığı hidrojen atomu ise, “imino hidrojeni” olarak adlandırılır. Numaralandırmaya tersiyer yapıdaki “piridin azotu” ya da “tersiyer azot” olarak tanımlanan azot atomuna 3 numara verilerek devam edilmektedir (Şekil 2. 8) (110).

Şekil 2.8. Benzimidazol halkası ve benzimidazol türevi bileşiklerin kimyasal formülü

Benzimidazoller bazik özelliği asidik özelliğinden daha fazla olan amfoterik karaktere sahip bileşikler olup metallerle tuz oluştururlar. Benzimidazollerin bazik özellikleri, ortaklanmamış elektron çiftine sahip olan tersiyer azot atomundan kaynaklanmaktadır. Asit özelliklerini ise taşıdıkları imino hidrojeni ile gösterirler. İmino hidrojeni ortama proton verir. Elektron çekici grupların süstitüsüyonu da asit özelliklerini artırır. (111)

Benzimidazol halkası, yaşam için gerekli olan bazı biyolojik moleküllerin yapısında yer almaktadır. “Hem” taşıyan hemoglobin molekülü, vitamin B₁₂ (siyanokobalamin) ve türevleri ile bazı metalloproteinler gibi biyolojik moleküllerin işlevlerinden sorumlu aktif bölgelerinde süstitüe imidazol ve benzimidazol halkaları yer almaktadır. (112). Benzimidazol türevi bileşiklerin; antihistaminik (113), antiülser (114), anti-inflamatuvar, analjezik (115), antioksidan (116), anti-HIV-1 (117), antibakteriyal (118), antiproliferatif (119), antiallerjik (120) antitümör (121-123) ve

potansiyel antitümör aktivitelere sahip oldukları bildirilmiştir (124-127). Son yıllarda yeni benzimidazol halka sistemleri farklı ilaç gruplarının etken maddesi olarak karşımıza çıkmaktadır (Omeprazol, astemizol, klemizol, droperidol) (128). Bu halka sistemleri pürin çekirdeğini taşıyan adenin ve guanin izosteri olup, pürin antimetaboliti olabilir. Bu nedenle, canlı sistemlerde benzimidazol halkasının biyopolimerlerle kolayca etkileşim gösterebileceği düşünülmektedir (12).

Kanser tedavisinde kullanmak üzere araştırmacıların üzerinde çalıştıkları heterosiklik halkalardan biri de benzimidazol halkasıdır. Son yıllarda benzimidazol türevlerinin antitümör aktiviteleri üzerine çok sayıda araştırma yapıldığı görülmektedir (129). Aynı zamanda, benzimidazol yapısı taşıyan bazı bileşiklerin apoptozis üzerine etkili olduğu da ortaya konmuştur (130).

Fringuelli ve ark.'nın yapmış olduğu bir çalışmada apoptozisin; fosfotidilkolin spesifik fosfolipaz C (PC-PLC) aktivasyonu, asidik sifingomiyelinaz (aSMase) aktivasyonu ve seramit oluşumu, kaspaz-8 ve kaspaz-3 aktivasyonunu da içeren karmaşık bir seri biyokimyasal olaylar ile meydana geldiği bildirilmiştir. Benzimidazol yapısı taşıyan bazı bileşiklerin apoptozis üzerine etkili olduğu ortaya konmuştur (130).

Hao ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, antikanserojen etkili bir bileşik olan, metil-2-benzimidazolkarbamatin (karbendazim) kanser hücrelerinde apoptozisi indüklediği bildirilmiştir (131).

Benzer olarak Zhang ve ark. Hoechst 33342 bileşiğinin, apoptozisi indüklediği ve *in vivo* koşullarda topoizomerez I'in aktivitesini inhibe ettiğini bildirilmiştir (132).

Bretner ve ark. yaptıkları çalışmada, malign hücrelerdeki hücre siklusunun düzenlenmesinde protein kinaz 2'nin (CK2) birçok hücresel olaydaki önemini vurgulamışlardır. Ayrıca araştırmacılar, 4,5,6,7-tetrabromobenzimidazol türevi bileşiklerin çeşitli hücre dizilerine uygulanması sonucu bu hücrelerde yaşamsallığı etkilediğini ve eş zamanlı olarak apoptozisi de başlattığını belirtmişlerdir (133).

Bu çalışmada kullandığımız 2-süstitüe benzimidazol türevi bileşiklerden; 2-(3-Metoksibenzil)-1*H*-benzimidazol (BB3) (Şekil 2.9) ve 2-(2,4-Diklorobenzil)-1*H*-benzimidazol (BB4) (Şekil 2.10) konvansiyonel ve mikrodalga sentez yöntemi ile sentezlenmiştir. Sentezlenen bileşiklerin ilk olarak hücre kültürü çalışmaları ile etkinliği tespit edilmiştir (14). Ayrıca şuan devam etmekte olan *in vivo* çalışmalar ile araştırmalarımız devam etmektedir.

Şekil 2.9. 2-(3-Metoksibenzil)-1*H*-benzimidazol (BB3) kimyasal formülü

Şekil 2.10. 2-(2,4-Diklorobenzil)-1*H*-benzimidazol (BB4) kimyasal formülü

2.4. Oksidatif Stres ve Antioksidan Sistem

Serbest radikaller son yörüngelerinde bir veya daha fazla eşlenmemiş elektron taşıyan, hücre metabolizmasındaki tepkimeler sırasında ortaya çıkan, kısa ömürlü, kararsız ve oldukça reaktif atom veya moleküllerdir (134). Biyolojik sistemlerdeki reaktif oksijen türleri (ROT) ve reaktif nitrojen türleri (RNT); hidroksil radikali ($\cdot\text{OH}$), hipokloröz asit (HOCl), peroksinitrit (ONOO^-), “singlet” oksijen ($^1\text{O}_2$), nitrik oksit radikali ($\text{NO}\cdot$) ve süperoksit radikali ($\text{O}_2\cdot^-$) ile radikal olmayan hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi serbest radikaller oksidatif stresin en önemli nedenlerinden birini oluştururlar (135). Fizyolojik şartlarda hücrede mitokondriyal solunum, hücrenin sinyal iletim sistemi ve bakteri fagositozu gibi görevler için kullanılan serbest radikaller oksidan/antioksidan dengenin bozulmasıyla hücrelerin lipid, protein, DNA, karbohidratlar gibi tüm önemli bileşiklerine etki ederler ve yapılarının bozulmalarına neden olurlar (136).

Hücre, serbest radikaller ve ilgili reaktanların oluşturduğu hasardan kendini korumak ve ROT’u hızlı ve etkili bir şekilde uzaklaştırmak için bazı savunma sistemleri geliştirmiştir. Serbest radikalleri nötralize ederek uzaklaştıran bu savunma sistemine antioksidan savunma sistemi denir. Vücudun endojen kaynaklı antioksidan savunma sistemi; transferin, bilirubin, seroplazmin, ürik asit, albumin gibi antioksidan proteinler ile vücudun asıl antioksidan savunma sistemini oluşturan SOD, CAT, glutayon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon-S-transferaz (GST), glutatyon redüktaz (GR) gibi enzimatik antioksidanlardan oluşmuştur. Eksojen kaynaklı antioksidan sistem ise C vitamini, E vitamini, alfa tokoferol, β -karoten gibi maddeleri içermektedir (134, 135).

Hücre içinde gerçekleşen en önemli savunma mekanizması GSH sistemidir. Bir tripeptit olan GSH’nin ($\gamma\text{-Glu-Cys-Gly}$) ROS süpürücüsü olmasının yanı sıra hücre içi redoks döngüsünün düzenlenmesinde de fonksiyonu vardır. Sistem; GSH, GSH-Px ve GR içerir. GSH-Px, H_2O_2 ’i ve diğer peroksidazları indirgeyerek GSH’ı okside disülfid formu olan GSSG’a çevirir. GSSG daha sonra glutatyon redüktaz ile GSH’a indirgenir. Hücrenin yeniden GSH oluşturma yeteneği, oksidatif stresin yönetiminde bu hücrenin verimi açısından önemli bir faktör olabilir (135,137).

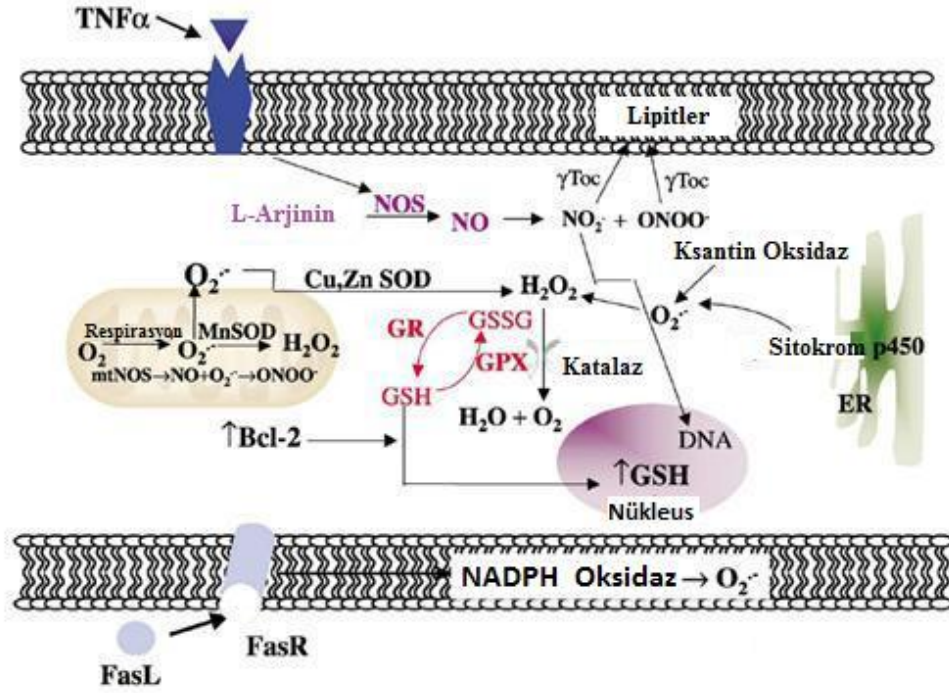
Süperoksit radikali ($\text{O}_2\cdot^-$) aerobik metabolizma sonucu moleküler oksijenin (O_2) bir elektron alarak indirgenmesi sonucu oluşur ve oksidan hasar sonucu artan SOD enziminin katalizlemesi ile yüksek derecede toksik olan hidrojen peroksite indirgenir (138). H_2O_2 hücredeki temel ROT’dur. Düşük düzeyleri apoptozise neden olurken,

yüksek düzeyleri ise nekroz veya kaspaz bağımsız apoptozise neden olur. H_2O_2 ya CAT veya GSH-Px enzimleri ile toksik olmayan su ve moleküler oksijene dönüştürülür ya da ferröz demir gibi geçiş metallerinin varlığında kendiliğinden oluşan bir reaksiyon ile lipitler, proteinler ve nükleik asitler gibi biyolojik moleküllerle etkileşerek onları hasara uğratan oldukça toksik $\cdot OH$ radikaline dönüşür (135,137).

Antioksidan/oksidan etkileri bilinen NO'nin mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Aşırı veya eşit derişimde $O_2^{\cdot -}$ radikali ile NO aynı yerde bulduklarında güçlü bir oksidan molekül olan ONOO⁻ oluşumuna neden olarak lipit peroksidasyonuna neden olur. Bunun yanı sıra aşırı miktardaki NO düzeyleri ise ortamda bulunan $O_2^{\cdot -}$ ve lipit peroksit radikallerini etkisizleştirir ve SOD'u etkin hale getirir ve NADPH oksidaz veya sitokrom P450 gibi $O_2^{\cdot -}$ kaynaklarını inhibe ederek oksidatif strese karşı koruma da sağlayabilir (139).

NF- κ B, p53 ve AP-1 gibi transkripsiyon faktörlerinin de yine reaktif oksijen radikalleri aracılığıyla düzenlendiği gösterilmiştir. Öldürücü düzeyin altındaki ROS üretimi sinyal ileti yol izlerine müdahale eder. ROS'lardan özellikle H_2O_2 angiotensin, inflamatuvar sitokinler ve büyüme faktörleri gibi birçok farklı fizyolojik uyarı için ikincil mesajcı olarak görev yaparlar (140).

Oksidatif stres, serbest radikal oluşumu ile antioksidan savunma sistemi arasındaki dengenin bozulması sonucunda ortaya çıkan ve doku hasarına neden olan bir durumdur (134). Artmış hücrel oksidatif stres hücre içi redoks dengesini değiştirir ve birçok reaksiyonu tetikler. Oksidatif stres; gen transkripsiyonu, sinyal ileti yol izlerinin başlatılması ve DNA hasarının tamiri gibi farklı birçok biyolojik yanıtın oluşumunu uyarır. Oksidatif stres altında mitokondriyal fonksiyonların durdurulduğu durumlar sonucu oluşan bu uyarılar ile hücre ya nekroz, apoptozis veya yaşlanmaya doğru gider ya da canlılığını korur ve çoğalır (136,141). Bu hücrel cevapların boyutu hücrel genetik alt yapıya, spesifik ROT'lara, oksidatif stresin şiddetine ve süresine bağlı olarak değişir (Şekil 2.11) (135,140).



Şekil 2.11. Oksidatif stres ve antioksidan sistem (135'nolu kaynaktan alınarak düzenlenmiştir).

Oksidatif stresin astım, Diabetes mellitus, romatoid artrit, hipertansiyon, hepatit, ateroskleroz, miyokard enfarktüsü gibi kardiyolojik hastalıklar, Alzheimer Hastalığı, Parkinson Hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklar ile kanser ve AIDS gibi pek çok hastalığın patogenezinde rol aldığı düşünülmektedir (142).

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)

3.1.2. Sarf Malzemesi ve Kimyasal Maddeler

1. Folin ciocalteu (Sigma)
2. n-Butanol (Merck)
3. Asetik asit (Sigma)
4. Tiyoarbitürikasit (TBA) (Sigma)
5. Sodyum dodesil sülfat (SDS) (Sigma)
6. 1,1,3,3-tetrametoksipropan (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. Pipet ucu
14. Efendorf tüp
15. Düz tabanlı, 96 kuyucuklu elisa plakları
16. Colorimetric Assay Kit (BioVision Research Products, USA)
17. Fas (Primer antikor, Santa Cruz Biotechnology)
18. FasL (Primer antikor, Santa Cruz Biotechnology)

3.2. Deney Hayvanlarının Seçimi ve Temini

Bu çalışmada MEÜ Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarı Üretim Birimi'nden temin edilen ortalama ağırlıkları 250-300 g olan, 84 adet yetişkin, erkek Wistar albino sıçanları kullanıldı. Her bir kafeste 6 sıçan muhafaza edildi. Sıçanlar deneysel çalışma süresince (18 hafta) sıcaklığı ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) ve nemi ($55 \pm 8\%$) 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, HCC, HCC+BB3, HCC+BB4 ve HCC+DMSO olmak üzere 5 grup oluşturuldu. Daha önceki çalışmalarımızda (143) HCC oluşum evreleri tespit edilmesinden dolayı, çalışma gruplarındaki sıçanlar çalışma planı dikkate alınarak 0., 6., 12. ve 18. haftalarda öldürüldü (Çizelge 3.1). Deney hayvanlarına ilk olarak yüksek doz anestetik madde (ketamin + ksilazin) verildi, hemen ardından servikal dislokasyon yapıldı ve çok hızlı bir şekilde dokular diseke edildi.

Çizelge 3.1. Deney prosedürüne göre çalışma gruplarının oluşturulması

	Kontrol (n=24)	HCC (n=18)	HCC+BB3 (n=18)	HCC+BB4 (n=18)	HCC+DMSO (n=6)
0. hafta	(n=6)				
6.hafta	(n=6)	(n=6)	(n=6)	(n=6)	
12.hafta	(n=6)	(n=6)	(n=6)	(n=6)	
18.hafta	(n=6)	(n=6)	(n=6)	(n=6)	(n=6)

Kontrol Grubu: Bu çalışma grubuna 24 adet sıçan dahil edildi ve beslenmeleri için hazır standart yem; su gereksinimleri için ise çeşme suyu verildi. Bu gruptaki sıçanlardan rastgele seçilen 6'şar sıçan 0., 6., 12. ve 18. haftanın sonunda öldürüldü (Çizelge 3.1).

HCC Oluşturulan Grup: Bu çalışma grubuna 18 adet sıçan dahil edildi ve son derişimi 100 ppm olacak şekilde DEN ilave edilen su, 18 hafta süresince içme suyu olarak verildi. Bu gruptaki sıçanlardan rastgele seçilen 6'şar sıçan 6., 12. ve 18. haftanın sonunda öldürüldü (Çizelge 3.1).

HCC+BB3 Uygulanan Grup: Bu gruba 18 adet sıçan dahil edildi. Benzimidazol türevi maddelerin HCC üzerindeki etkilerini gözlemek amacıyla bu gruptaki sıçanlara son derişimi 100 ppm olacak şekilde DEN içeren içme suyu ile birlikte 1 mg/kg/hafta olacak şekilde 18 hafta boyunca intraperitoneal olarak BB3 uygulaması yapıldı. Bu gruptaki sıçanlardan rastgele seçilen 6'şar sıçan 6., 12. ve 18. haftanın sonunda öldürüldü (Çizelge 3.1).

HCC+BB4 Uygulanan Grup: Bu gruba 18 adet sıçan dahil edildi. Benzimidazol türevi maddelerin HCC üzerindeki etkilerini gözlemek amacıyla sıçanlara son derişimi 100 ppm olacak şekilde DEN içeren içme suyu ile birlikte 1 mg/kg/hafta olacak şekilde 18 hafta boyunca intraperitoneal olarak BB4 uygulaması yapıldı. Bu gruptaki sıçanlardan rastgele seçilen 6'şar sıçan 6., 12. ve 18. haftanın sonunda öldürüldü (Çizelge 3.1).

HCC+DMSO Uygulanan Grup: Bu gruba 6 adet sıçan dahil edildi ve son derişimi 100 ppm olacak şekilde DEN içeren içme suyu ile birlikte, benzimidazol türevi maddeler DMSO'da çözülerek sıçanlara verilmesinden dolayı çalışmalarda DMSO'nun etkisini araştırmak amacıyla 18 hafta boyunca intraperitoneal olarak DMSO uygulaması yapıldı. Bu gruptaki sıçanlar 18. haftanın sonunda öldürüldü (Çizelge 3.1).

3.4. Çalışma Örneklerinin Hazırlanışı

3.4.1. Doku Örnekleri

Deneysel çalışma sonrasında çalışma planına göre öldürülen sıçanların karaciğerleri diseke edildi. Karaciğerlerden alınan örneklerin bir kısmı histopatolojik incelemeler yapılmak üzere %10'luk formaldehit içerisinde patoloji laboratuvarına gönderildi. Kalan karaciğer dokusu ise biyokimyasal analizler yapılmaya kadar -70°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 Enzim Aktivitesi Ölçüm Yöntemi

Apoptozisin bir göstergesi olarak Kaspaz-3 enzim aktivitesi karaciğer dokularında kantitatif olarak Colorimetric Protease Assay Kit Yöntemi ile değerlendirildi. Kaspaz-3, Caspase-3/CPP32 Colorimetric Assay Kit (BioVision Research Products, USA) ile kit içeriğinde açıklandığı şekilde ölçüldü. Yöntemin prensibi, işaretlenmiş substratın (DEVD-*p*NA) kırılmasıyla açığa çıkan kromofor *p*-nitroanilitin (*p*NA) spektrofotometrik olarak ölçüm esasına dayanmaktadır. *p*NA miktarı 405 nm'de mikrotiter plak okuma cihazında (ELX 800, Biotek, Türkiye) absorbans değeri ölçülerek tayin edildi.

3.5.1.1.2. Kaspaz-8 Enzim Aktivitesi Ölçüm Yöntemi

Apoptozisin bir göstergesi olarak Kaspaz-8 enzim aktivitesi karaciğer dokularında kantitatif olarak Colorimetric Protease Assay Kit Yöntemi ile değerlendirildi. Kaspaz-8, FLICE/Caspase-8 Colorimetric Protease Assay Kit (BioVision Research Products, USA) ile kit içeriğinde açıklandığı şekilde ölçüldü. Yöntemin prensibi, işaretlenmiş substratın (IETD-*p*NA) kırılmasıyla açığa çıkan kromofor *p*-nitroanilitin (*p*NA) spektrofotometrik olarak ölçüm esasına dayanmaktadır. *p*NA miktarı 405 nm’de mikrotiter plate okuma cihazında (ELX 800, Biotek, Türkiye) absorbans değeri ölçülerek tayin edildi.

3.5.1.1.3. Kaspaz-9 Enzim Aktivitesi Ölçüm Yöntemi

Apoptozisin bir göstergesi olarak Kaspaz-9 enzim aktivitesi karaciğer dokularında kantitatif olarak Colorimetric Protease Assay Kit Yöntemi ile değerlendirildi. Kaspaz-9, Caspase-9 Colorimetric Assay Kit, (BioVision Research Products, USA) ile kit içeriğinde açıklandığı şekilde ölçüldü. Yöntemin prensibi, işaretlenmiş substratın (LEHD-*p*NA) kırılmasıyla açığa çıkan kromofor *p*-nitroanilitin (*p*NA) spektrofotometrik olarak ölçüm esasına dayanmaktadır. *p*NA miktarı 405 nm’de mikrotiter plak okuma cihazında (ELX 800, Biotek, Türkiye) absorbans değeri ölçülerek tayin edildi.

3.5.1.1.4. Fas Ekspresyonunun İmmünohistokimyasal Değerlendirilmesi

Çalışmaya dahil edilen 84 adet doku kasetlendikten sonra %10’luk formaldehitte bekletildi. Aynı gün akşam ototeknikon cihazında fiksasyon işlemi tamamlandı. Ertesi gün sabah parafin blok haline getirildi. Parafine gömülü dokulardan 4-5 µ kalınlığında kesitler polilizin kaplı lam üzerine alındı. Oda ısısında alkol ve ksilol serisinden geçirilerek deparafinizasyon işlemi tamamlandı. Daha sonra %0,3’lük H₂O₂ çözeltisi bulunan distile suda 5–7 dakika bekletilerek endojen peroksidaz aktivitesi bloke edildi. Saf suda yıkandıktan sonra mikrodalga fırında 600 W gücünde EDTA buffer solüsyonunda (pH 8) 15 dakika kaynatılarak antijen retrieval işlemi uygulandı. Kapağı açılmadan oda ısısına gelmesi için yaklaşık 45 dakika bekletildi. Saf su ve pH

7,2-7,4 fosfat tampon çözeltisinden (Phosphate buffer saline, PBS) geçirildi. Fas 1/300 oranında dilüe edilmiş olan primer antikor FAS (C 20) Rabbit polyclonal IgG (Santa Cruz Biotechnology) damlatıldı. 1,5–2 saat inkübe edildi. Saf su ve PBS den geçirildi. Biotin damlatılıp oda ısısında 30 dakika inkübe edildikten sonra saf su ve PBS den geçildi. Avidin damlatılıp oda ısısında 30 dakika inkübe edildikten sonra yine saf su ve PBS den geçirildi. AEC damlatıldıktan sonra 10-20 dakika içinde mikroskop altında kontrol edilen ve boyanma gözlenen preparatlar alınarak saf sudan geçirildi. Tüm kesitler zıt boyama sağlamak için hematoksilende 7-10 dakika bekletildi ve tekrar çeşme suyuna alındı. Daha sonra yaklaşık 10 dakika bekletildi ve yıkandı. Dokunun etrafı kurulanıp su bazlı kapama maddesi (DAKO) ile kapatıldı. Tüm inkübasyon işlemleri kapalı ve nemli bir ortamda yapıldı.

3.5.1.1.5. FasL Ekspresyonunun İmmünohistokimyasal Değerlendirilmesi

Çalışmaya dahil edilen 84 adet doku kasetlendikten sonra %10'luk formaldehitte bekletildi. Aynı gün akşam ototeknikon cihazında fiksasyon işlemi tamamlandı. Ertesi gün sabah parafin blok haline getirildi. Parafine gömülü dokulardan 4-5 µ kalınlığında kesitler polilizin kaplı lam üzerine alındı. Oda ısısında alkol ve ksilol serisinden geçilerek deparafinizasyon işlemi tamamlandı. Daha sonra %0,3'lük H₂O₂ çözeltisi bulunan distile suda 5–7 dakika bekletilerek endojen peroksidaz aktivitesi bloke edildi. Mikrodalga fırında 600 W gücünde EDTA buffer solüsyonunda (pH 8) 15 dakika kaynatılarak antijen retrieval işlemi uygulandı. Kapağı açılmadan oda ısısına gelmesi için yaklaşık 45 dakika bekletildi. Saf su ve PBS'den geçirildi. FasL 1/100 oranında dilüe edilmiş olan primer antikor FasL (C 20) Rabbit polyclonal IgG (Santa Cruz Biotechnology) damlatıldı ve 1,5–2 saat inkübe edildi. Daha sonra saf su ve PBS den geçirildi. Biotin damlatılıp oda ısısında 30 dakika inkübe edildikten sonra saf su ve PBS den geçildi. Avidin damlatılıp oda ısısında 30 dakika inkübe edildikten sonra yine saf su ve PBS den geçirildi. AEC damlatıldıktan sonra 10-20 dakika içinde mikroskop altında kontrol edilerek boyanma gözlenen preparatlar alınarak saf sudan geçirildi. Tüm kesitler zıt boyama sağlamak için hematoksilene alındı ve 7-10 dakika bekletilip tekrar çeşme suyuna alındı yaklaşık 10 dakika bekletildi ve yıkandı. Dokunun etrafı kurulanıp

su bazlı kapama maddesi (DAKO) ile kapatıldı. Tüm inkübasyon işlemleri kapalı ve nemli bir ortamda yapıldı.

3.5.1.2. Antioksidan Kapasitenin İncelenmesi

3.5.1.2.1. 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 absorbands veren sarı renkli bir kompleks oluşturması esasına dayanmaktadır. Ölçülen absorbands değeri GSH miktarını yansıtmaktadır (144).

Ayırıklar:

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 süzülür.		
Süzüntü	2	2
0,3 M Na ₂ HPO ₄	8	8
Örneğin absorbands 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.

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

$$C (\mu\text{mol}/\text{mL}) = (\text{OD2}-\text{OD1}) \times 0,185$$

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

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

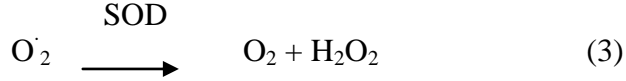
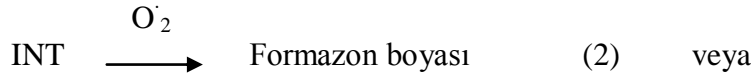
OD2: DTNB ilave edildikten sonra 412 dalga boyunda ölçülen optik dansite

1000 : μmol 'e dönüşüm katsayısı

5/2: seyreltme katsayısı

3.5.1.2.2. Doku SOD Ölçümü

Prensip: Aerobik organizmaların, O_2 varlığında oksidatif fosforilasyon ile enerji üretimi sırasında oluşan, endojen veya eksojen kaynaklı toksik süperoksit radikallerinin (O_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 (145).



Ayır a 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 1 mL'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 absorban değerleri okundu.

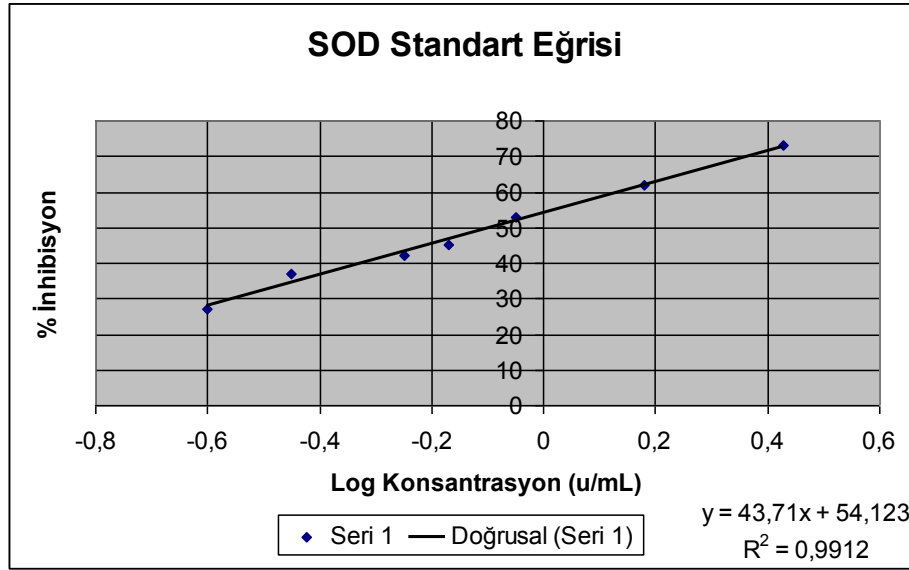
Hesaplama

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 $\Delta A/dak_{\text{örnek}}$ ve $\Delta A/dak_{\text{çalışma körü}}$ aşğıdaki formül uygulanarak değeriendirildi.

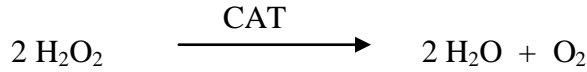
$$\% \text{ İnhibisyon}_{\text{örnek}} = 100 - \frac{\Delta A / dak_{\text{örnek}}}{\Delta A / dak_{\text{çalışma körü}}} \times 100$$

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

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

3.5.1.2.3. 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 (144).



Ayıracılar:

1. 1 M Tris Tamponu (pH: 8,0)
2. 1 M Fosfat Tamponu (pH: 7.0)
3. 10 mM H_2O_2 (% 30'luk H_2O_2 '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**'dir. 10 mM H₂O₂ hazırlamak için, 1/100 seyreltilmiş H₂O₂'nin 1 mL'si derişimin 1/10'u ölçüsünde saf su ile tamamlanır.

Yöntem:

Ayrıraçlar 1 ml'lik kuvars küvete tabloda belirtilen oranlarda ilave edildi.

	Kör (µl)	Örnek (µl)
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 µmol H₂O₂'nin 1 cm'lik ışık yolunda verdiği optik dansite değeri

V_{Toplam} = Toplam hacim

$V_{\text{Örnek}}$ = Hemolizat hacmi

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

3.5.1.2.4. Doku Nitrit Ölçümü

Prensip: NOS etkinliğinin bir göstergesi olarak NO'nun dayanıklı metabolitlerinden biri olan nitrit derişimleri, nitrit iyonlarına duyarlı olan Griess reaksiyonu temeline dayanan diazotizasyon yöntemi ile dolaylı olarak ölçüldü (146,147).

Yöntem

Doku homojenatlarından hazırlanan süpernatantlar ölçümden hemen önce 1:5 oranında distile su ile dilüe edildi. Standart olarak kullanılacak sodyum nitritin 2 mM derişimde distile suda hazırlanan stok çözeltisinden, distile su ile 1 ml hacimde seri dilüsyonları (0.25-100 µM) hazırlandı. Daha sonra düz tabanlı, 96 kuyucuklu elisa plaklarında doku homojenatı süpernatantlarından alınan 50 µl örnek ve toplamda 50 µl olan 25 µl sülfanilamit (SA) ve 25 µl N-1-Naftiletilediamin dihidroklorür (NED) çözeltileri karıştırıldı. Oda sıcaklığında 10 dakika bekleyen örneklerin verdikleri absorbanslar plak okuma cihazında 550 nm'de okundu. Sodyum nitrit miktarlarına karşı elde edilen absorbanslardan yararlanılarak, doğrusal regresyon yöntemi ile, sodyum nitritin kalibrasyon doğru denklemleri belirlendi. Bu denklemlerden yararlanılarak, örneklerde okunan absorbans değerlerinden nitrit düzeyleri hesaplandı. Sonuçlar µM/mg protein olarak değerlendirildi.

3.5.1.2.5. 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 (148).

Ayırıcılar

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 ayraçlar 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 beyazlaşmaya kadar vortekslendikten sonra 4000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi, üstteki organik kısım alınarak 532 nm’de absorbans değeri okundu. Sonuçlar nmol/mg protein olarak değerlendirildi.

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

3.5.1.2.6. 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 absorban değerinin ölçülmesi prensibine dayanmaktadır (149).

Ayıraçlar

1. % 2 (w/v) Na₂CO₃
2. % 1 (w/v) CuSO₄·5H₂O
3. % 2 (w/v) Na-K tartarat
4. Folin-Ciocalteu Ayıracı

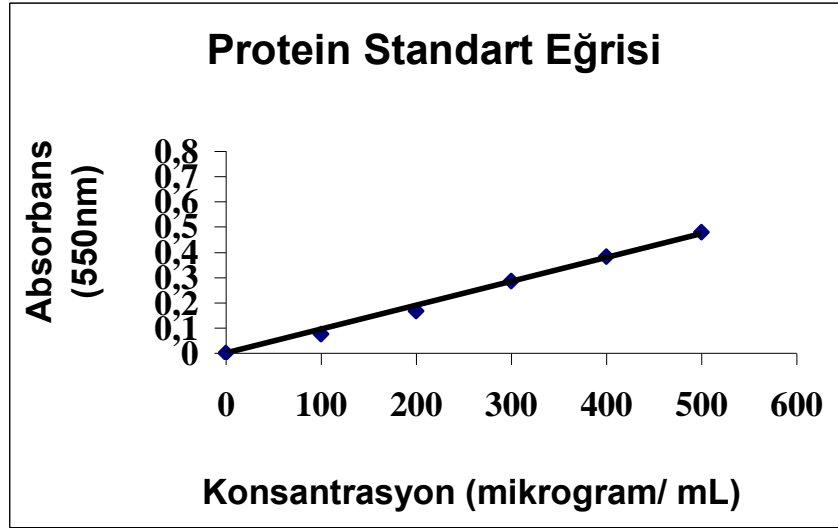
Günlük çözelti (Ayıraç C): 50 mL %2 (w/v) Na₂CO₃, 0,5 mL %1 (w/v) CuSO₄·5H₂O ve 0,5 mL %2 (w/v) Na-K tartarat ilave edilerek hazırlandı.

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
Karışımlar hazırlanıp oda ısısında 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 absorban 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 ayıracı (mL)	0,3	0,3

Oda ısısında 30 dakika bekletilen örneklerin, 550 nm'de köre karşı absorbansları 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

Verilerin normal dağılıp dağılmadıkları Shapiro-Wilk testi ile test edilmiştir. Verilere ait tanımlayıcı istatistikler sayı, yüzde, ortalama ve standart sapma olarak verilmiştir. Fas ve FasL eksprenyonları için gruplar arasındaki ve her grubun kendi içinde zamana göre farklılıkları pearson ki-kare testi ve likelihood ratio ki-kare testleri ile test edilmiştir. Biyokimyasal parametreler için gruplar arasındaki ve her grubun kendi içinde zamana bağlı farklılıkları ise One Way ANOVA testi ile test edilmiştir. Varyansların ön şartı kontrolü yapılmış ve varyanslar homojen olmayanlar için Welch testi ile test edilmiştir. Verilerin değerlendirilmesinde tanımlayıcı istatistiksel metodların yanı sıra grupların ikili karşılaştırmalarında homojen olanlar için Bonferonni testi varyansları; homojen olmayanlar için ise Games-Howell testi kullanılmıştır. Analizler SPSS 11.5 ve MedCalc 11.2.1 paket programı kullanılarak elde edilmiştir. Grafikler STATISTICA 8.0 paket programında yapılmıştır. İstatistiksel olarak 0,05'ten küçük *P* değerleri anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

Bu çalışmaya toplam 84 adet yetişkin, erkek Wistar albino sıçan dahil edildi. Sıçanlardan rastgele kontrol, HCC, HCC+DMSO uygulanan, HCC+BB3 uygulanan ve HCC+BB4 uygulanan olmak üzere 5 grup oluşturuldu.

Bu çalışmada, HCC oluşum sürecinde apoptotik mekanizmanın bir göstergesi olarak kaspaz-3, -8 ve -9 enzim aktiviteleri ve apoptozisi aktive eden fizyolojik mediyatörlerden Fas ve FasL düzeyleri ile BB3 ve BB4 bileşiklerinin HCC üzerine etkisi araştırıldı. Bunların yanı sıra HCC'de oksidatif stresin arttığının bilinmesi nedeniyle antioksidan sistemde yer alan GSH miktarı, SOD ve CAT enzim aktiviteleri; eNOS ve iNOS aktivitesinin bir göstergesi olarak nitrit düzeyleri ile lipid peroksidasyonunun göstergesi olarak ise MDA düzeyleri saptandı. Çalışmada araştırılan tüm parametreler her bir grubun kendi içinde zamana bağlı olarak gösterdikleri farklılıklar ve gruplar arasındaki farklılıklar dikkate alınarak incelendi.

4.1. Biyokimyasal Bulgular

4.1.1. Apoptozis Belirteçlerine Ait Bulgular

4.1.1.1. Kaspaz-3 Enzim Aktivitesi

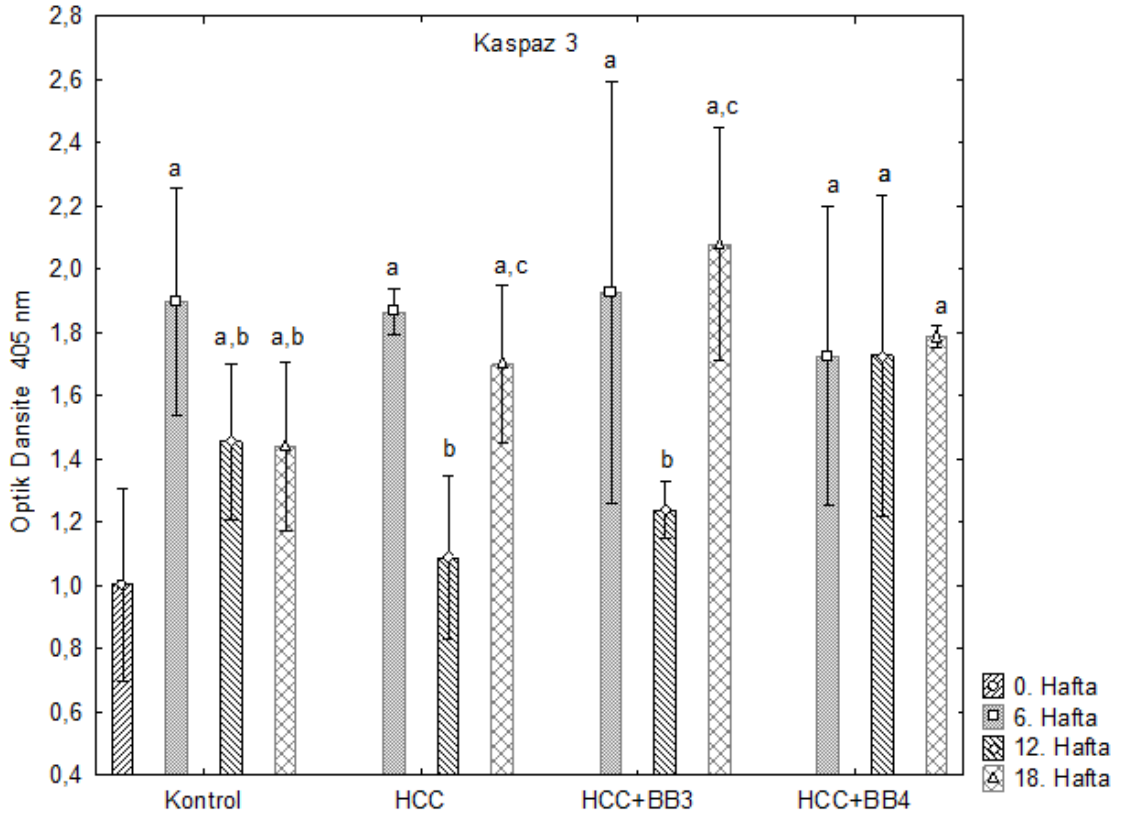
Grupları kendi içinde zamana bağlı olarak değerlendirdiğimizde kaspaz-3 enzim aktivitesi kontrol grubu da dahil olmak üzere tüm grupların 6. haftalarında 0. haftaya göre bir artış göstermiştir ($p=0.000$). Bu artışı HCC+BB4 grubu hariç, diğer grupların 12. haftalarında bir azalma takip etmiştir ($p<0.05$). Kaspaz-3 enzim aktivitesi HCC+BB4 grubunda 6. haftada artmış, 12. ve 18. haftalarda anlamlı bir değişim göstermemiştir. Çalışmamızın sonlandığı 18. haftada ise HCC ve HCC+BB3 gruplarında kaspaz-3 enzim aktivitesi artmaya devam etmiştir (sırasıyla $p=0.000$, $p=0.013$). Kaspaz-3 enzim aktivitesi kontrol grubunda diğer gruplarda olduğu gibi 6.

haftada artmış, 12. haftada azalmıştır ($p < 0.05$) 18. haftada ise kontrol grubu diğer gruplardan farklı olarak değişiklik göstermemiştir (Çizelge 4.1, Şekil 4.1).

Çizelge 4.1. Apoptotik belirteçler olan kaspaz-3, -8 ve -9 enzim aktivitelerinin her bir grubun kendi içinde zamana bağlı olarak değişimi

Grup	Zaman (Hafta)	Kaspaz 3	Kaspaz 8	Kaspaz 9
Kontrol	0.(n=6)	1.00 ± 0.29	1.31 ± 0.47	1.08 ± 0.22
	6. (n=6)	1.90 ± 0.34 ^a	1.84 ± 0.29 ^a	2.10 ± 0.33 ^a
	12. (n=6)	1.45 ± 0.24 ^{a,b}	1.49 ± 0.05	1.42 ± 0.24 ^b
	18. (n=6)	1.44 ± 0.21 ^{a,b}	1.32 ± 0.24 ^b	1.19 ± 0.24 ^b
	<i>P</i>	< 0.0001	0.025	< 0.0001
HCC	0. (n=6)	1.00 ± 0.29	1.31 ± 0.47	1.08 ± 0.22
	6. (n=6)	1.87 ± 0.07 ^a	2.32 ± 0.56 ^a	1.76 ± 0.61 ^a
	12. (n=6)	1.09 ± 0.21 ^b	1.28 ± 0.25 ^b	1.08 ± 0.28 ^b
	18. (n=6)	1.70 ± 0.16 ^{a,c}	1.76 ± 0.24 ^b	1.38 ± 0.19
	<i>P</i>	< 0.0001	< 0.001	< 0.017
HCC+BB3	0. (n=6)	1.00 ± 0.29	1.31 ± 0.47	1.08 ± 0.22
	6. (n=6)	1.93 ± 0.54 ^a	1.91 ± 0.20 ^a	1.40 ± 0.27
	12. (n=6)	1.24 ± 0.07 ^b	1.21 ± 0.26 ^b	1.04 ± 0.16
	18. (n=6)	2.08 ± 0.23 ^{a,c}	1.97 ± 0.34 ^{a,c}	1.38 ± 0.23 ^a
	<i>P</i>	< 0.001	< 0.002	< 0.019
HCC+BB4	0. (n=6)	1.00 ± 0.29	1.31 ± 0.47	1.08 ± 0.22
	6. (n=6)	1.72 ± 0.45 ^a	1.98 ± 0.40	1.54 ± 0.42
	12. (n=6)	1.73 ± 0.49 ^a	1.77 ± 0.49	1.54 ± 0.31
	18. (n=6)	1.79 ± 0.03 ^a	1.69 ± 0.21	1.48 ± 0.38
	<i>P</i>	< 0.005	0.074	0.086

Kaspaz-3, -8 ve -9 enzim aktivitelerinin ortalama ± ortalamaların standart hatası elde edildikten sonra, grupların kendi içinde zamana bağlı olarak gösterdikleri farklılıkların istatistiksel olarak karşılaştırılması gösterilmiştir. “n” kullanılan sıçan sayısını ifade etmektedir. ^a; 0. haftaya (başlangıç) göre, ^b; 6. haftaya göre, ^c; 12. haftaya göre istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) farklılıkları göstermektedir.



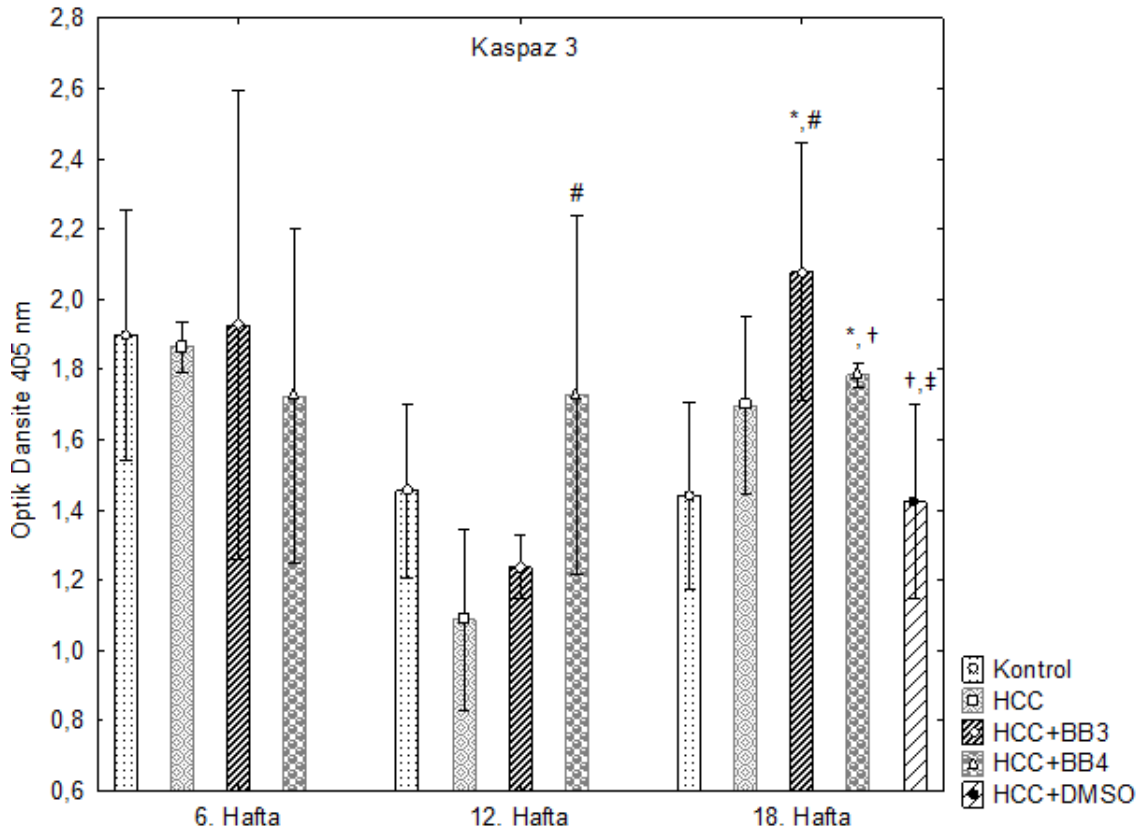
Şekil 4.1. Apoptotik belirteç olan kaspaz-3 enzim aktivitesinin her bir grubun kendi içinde zamana bağlı olarak değişiminin bar grafik olarak gösterimi. ^a; 0. haftaya, ^b; 6. haftaya, ^c; 12. haftaya göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) farklılıkları göstermektedir.

Kaspaz-3 enzim aktivitesinin gruplar arası karşılaştırmasında, 12. haftada HCC+BB4 grubu HCC grubuna göre anlamlı derecede artmıştır ($p=0.035$). Çalışmanın sonlandığı 18. haftada HCC+BB3 grubunun kaspaz-3 enzim aktivitesi kontrol ve HCC gruplarına göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). HCC+BB4 grubu kaspaz-3 enzim aktivitesi, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterirken ($p<0.05$), HCC+BB3 grubuna göre istatistiksel olarak azalmıştır ($p<0.05$). HCC+DMSO grubu ise HCC+BB3 ve HCC+BB4 gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır ($p<0.05$) (Çizelge 4.2, Şekil 4.2).

Çizelge 4.2. Apoptotik belirteçler olan kaspaz-3, -8 ve -9 enzim aktivitelerinin gruplar arası karşılaştırmada 6., 12. ve 18. haftalarda gösterdiği değişimler

Zaman (Hafta)	Grup	Kaspaz 3	Kaspaz 8	Kaspaz 9
6.	Kontrol (n=6)	1.90 ± 0.34	1.84 ± 0.29	2.10 ± 0.33
	HCC (n=6)	1.87 ± 0.07	2.32 ± 0.56	1.76 ± 0.61
	HCC+BB3 (n=6)	1.93 ± 0.54	1.91 ± 0.20	1.40 ± 0.27 [*]
	HCC+BB4 (n=6)	1.72 ± 0.45	1.98 ± 0.40	1.54 ± 0.42 [*]
	<i>P</i>	0.813	0.197	0.049
12.	Kontrol (n=6)	1.45 ± 0.24	1.49 ± 0.05	1.42 ± 0.24
	HCC (n=6)	1.09 ± 0.21	1.28 ± 0.25	1.08 ± 0.28 [*]
	HCC+BB3 (n=6)	1.24 ± 0.07	1.21 ± 0.26	1.04 ± 0.16 [*]
	HCC+BB4 (n=6)	1.73 ± 0.49 [#]	1.77 ± 0.49	1.54 ± 0.31 ^{#,†}
	<i>P</i>	0.035	0.054	0.009
18.	Kontrol (n=6)	1.44 ± 0.21	1.32 ± 0.24	1.19 ± 0.24
	HCC (n=6)	1.70 ± 0.16	1.76 ± 0.24 [*]	1.38 ± 0.19
	HCC+BB3 (n=6)	2.08 ± 0.23 ^{*,#}	1.98 ± 0.34 [*]	1.38 ± 0.23
	HCC+BB4 (n=6)	1.79 ± 0.03 ^{*,†}	1.69 ± 0.21	1.48 ± 0.38
	HCC+DMSO (n=6)	1.42 ± 0.17 ^{†,‡}	1.42 ± 0.24 [†]	1.39 ± 0.19
	<i>P</i>	< 0.0001	0.004	0.489

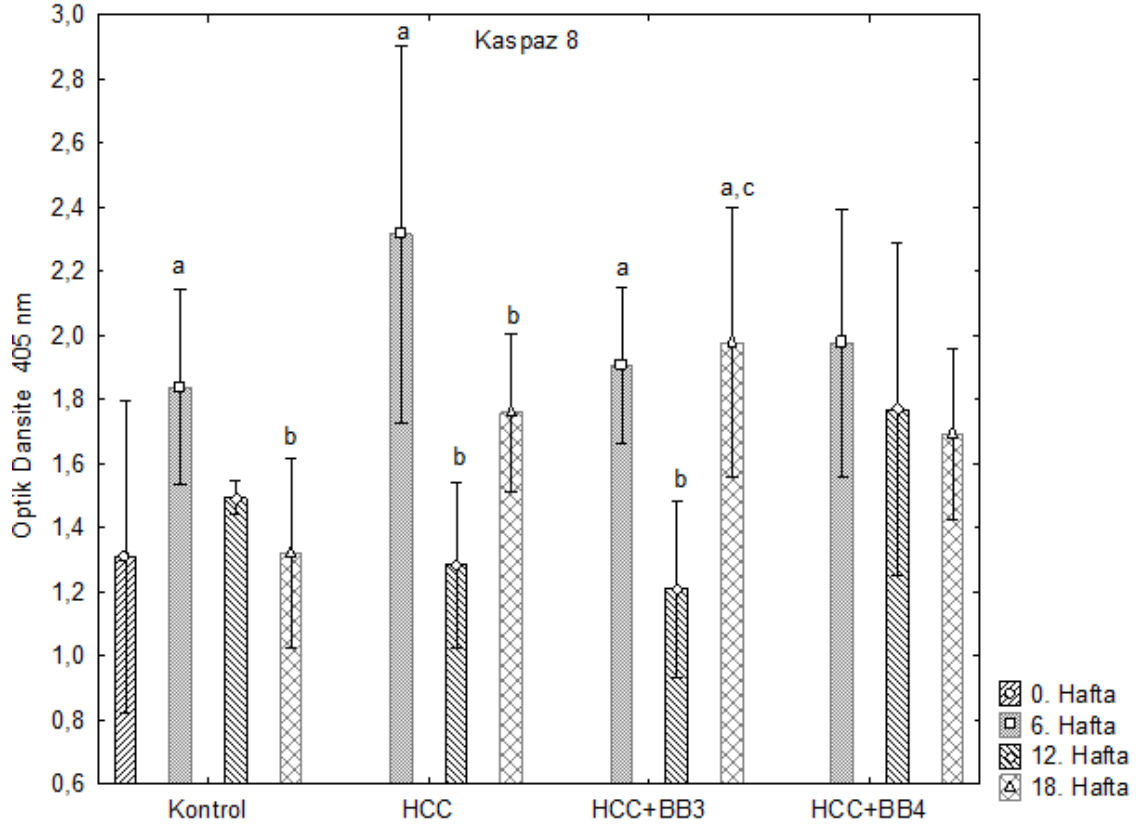
Kaspaz-3, -8 ve-9 enzim aktivitelerinin ortalama ± ortalamaların standart hatası elde edildikten sonra gruplar arası istatistiksel farklılıkların karşılaştırılması gösterilmiştir. “n” kullanılan sıçan sayısını ifade etmektedir. ^{*}; Kontrol grubuna, [#]; HCC grubuna, [†]; HCC+BB3 grubuna [‡]; HCC+BB4 grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) farklılıkları göstermektedir.



Şekil 4.2. Apoptotik belirteç olan kaspaz-3 enzim aktivitesinin gruplar arası karşılaştırmada 6., 12. ve 18. haftalarda gösterdiği değişimlerin bar grafik olarak gösterimi. *; Kontrol grubuna, #; HCC grubuna, †; HCC+BB3 grubuna ‡; HCC+BB4 grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) farklılıkları göstermektedir.

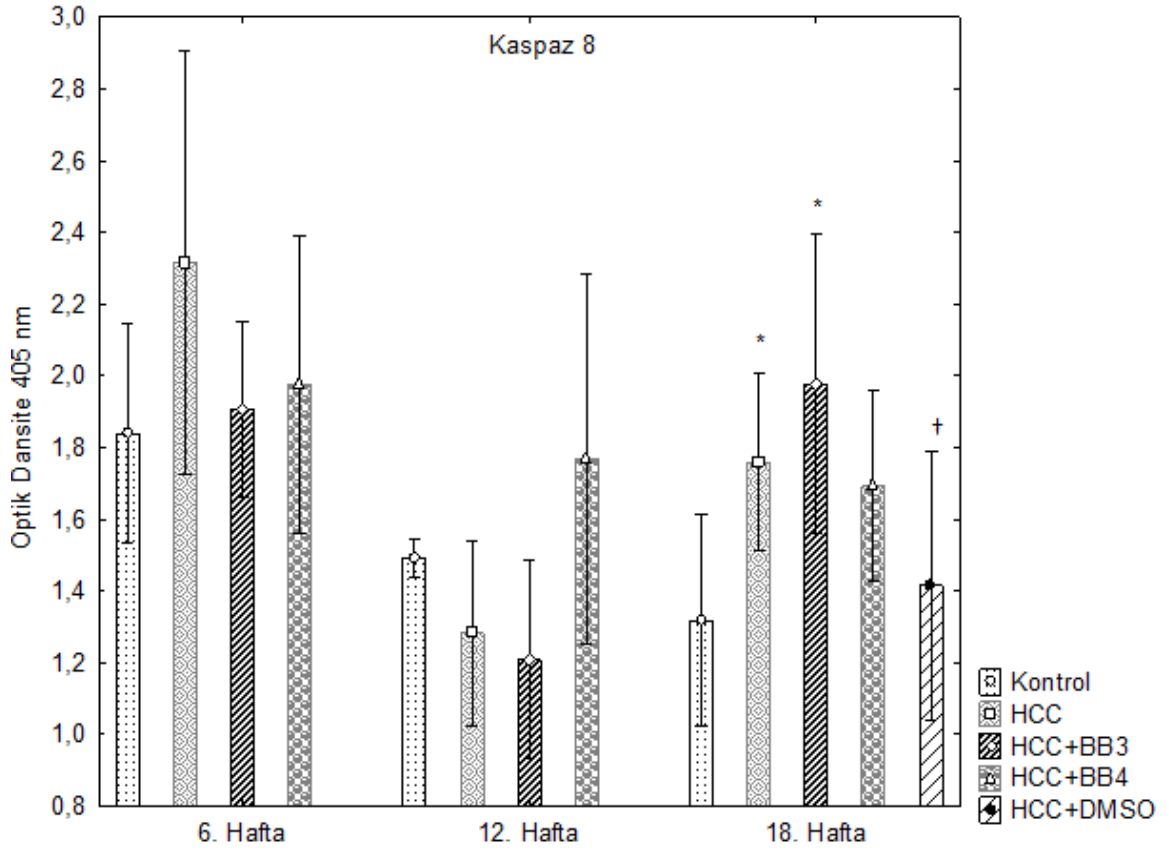
4.1.1.2. Kaspaz-8 Enzim Aktivitesi

Grupların kendi içinde zamana bağlı olarak kaspaz-8 enzim aktivitesini değerlendirdiğimizde HCC+BB4 hariç kontrol, HCC ve HCC+BB3 grupları çalışmanın başlangıcına göre 6. haftada artmıştır (sırasıyla $p= 0.041$, $p= 0.001$, $p=0.003$). 12. haftada ise HCC ve HCC+BB3 gruplarında kaspaz-8 enzim aktivitesinde azalma görülmüştür. Çalışmanın 18. haftasında ise kaspaz-3 enzim aktivitesine benzer bir şekilde HCC+BB3 grubunda kaspaz-8 enzim aktivitesi artmıştır ($p<0.05$). HCC+BB4 grubunda zamana bağlı olarak kaspaz-8 enzim aktivitesinde bir değişim saptanmamıştır (Çizelge 4.1, Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Apoptotik belirteç olan kaspaz-8 enzim aktivitesinin her bir grubun kendi içinde zamana bağlı olarak değişiminin bar grafik olarak gösterimi ^a; 0. haftaya, ^b; 6. haftaya, ^c; 12. haftaya göre istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) farklılıkları göstermektedir.

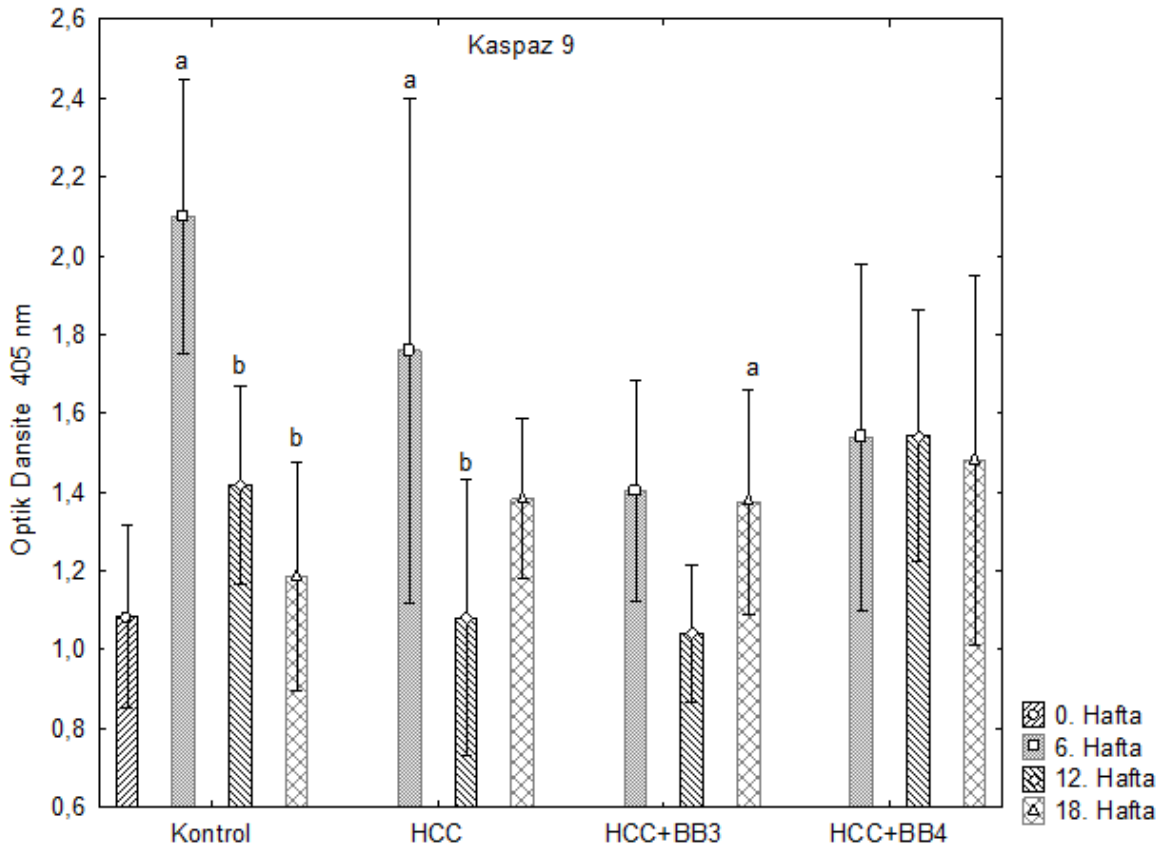
Kaspaz-8 enzim aktivitesinin gruplar arası karşılaştırması yapıldığında çalışmanın sonlandığı 18. haftada HCC grubu ve HCC+BB3 grubu kontrol grubuna göre anlamlı derecede artmıştır (sırasıyla $p=0,042$, $p=0.005$). Kaspaz-8 enzim aktivitesi HCC+DMSO grubunda HCC+BB3 grubuna göre anlamlı derecede azalmıştır ($p < 0.05$) (Çizelge 4.2, Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Apoptotik belirteç olan kaspaz-8 enzim aktivitesinin gruplar arası karşılaştırmada 6., 12. ve 18. haftalarda gösterdiği değişimlerin bar grafik olarak gösterimi. * ; Kontrol grubuna, †; HCC+BB3 grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) farklılıkları göstermektedir.

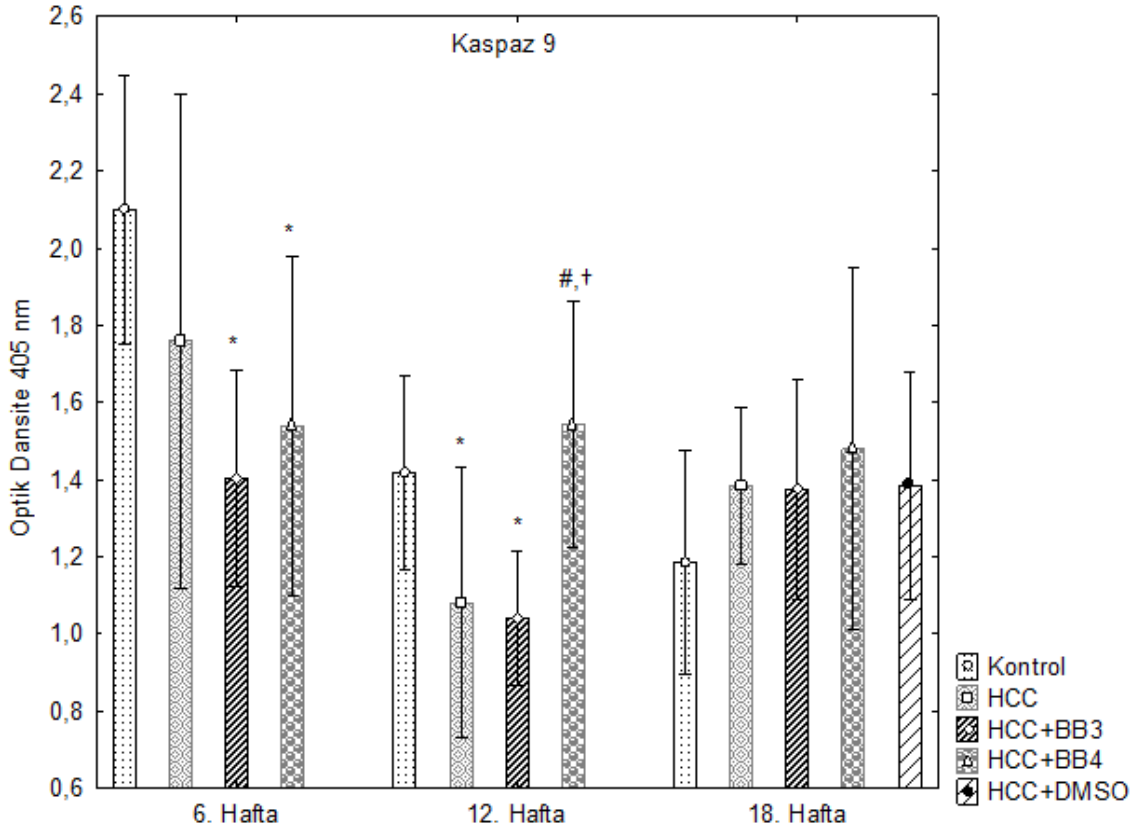
4.1.1.3. Kaspaz-9 Enzim Aktivitesi

Kaspaz-9 enzim aktivitesi kontrol ve HCC gruplarında 6. haftada istatistiksel olarak artmış, 12. haftada ise azalmıştır. Kontrol grubunda 12. ve 18. hafta kaspaz-9 enzim aktivitesi 6. haftaya göre anlamlı derecede azalmıştır ($p<0.000$). HCC grubunda 18. haftadaki kaspaz-9 enzim aktivitesi 12. haftaya göre artmış fakat bu istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. HCC+BB3 grubunda 18. haftada kaspaz-9 enzim aktivitesi sadece 0. haftaya göre istatistiksel olarak artmıştır ($p<0.05$) HCC+BB4 grubunda tüm haftalarda kaspaz-9 enzim aktivitesinde bir değişiklik belirlenmemiştir (Çizelge 4.1, Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Apoptotik belirteç olan kaspaz-9 enzim aktivitesinin her bir grubun kendi içinde zamana bağlı olarak değişiminin bar grafik olarak gösterimi ^a; 0. haftaya, ^b; 6. haftaya göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) farklılıkları göstermektedir.

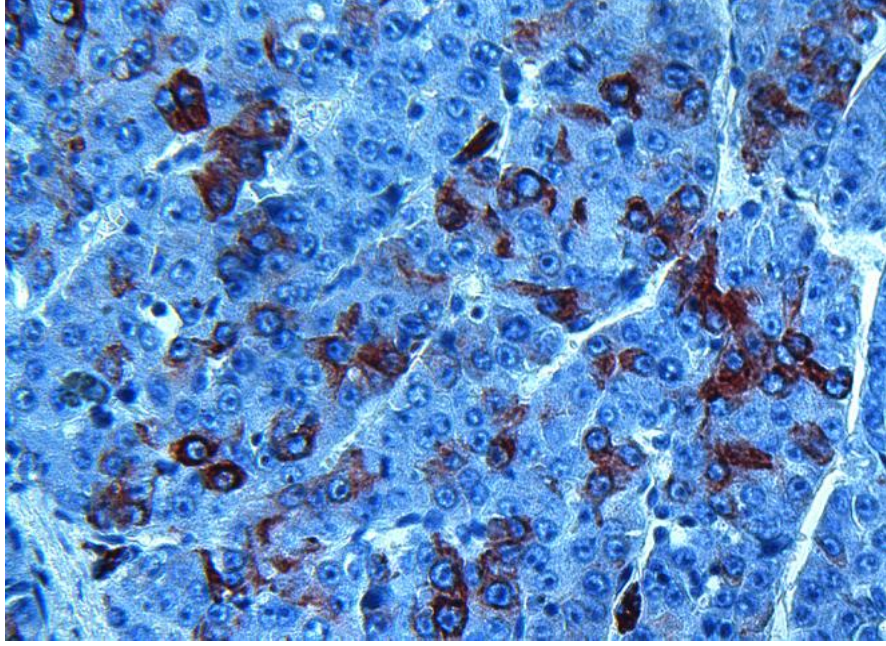
Gruplar arası karşılaştırma yapıldığında 6. haftada kaspaz-9 enzim aktivitesi HCC+BB3 ve HCC+BB4 gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalmıştır ($p<0.05$). 12. haftada HCC ve HCC+BB3 gruplarında kontrol grubuna göre daha düşük (sırasıyla $p<0.05$, $p=0.048$), HCC+BB4 grubunda ise HCC ve HCC+BB3 grubuna göre daha yüksek kaspaz-9 enzim aktivitesi gözlenmiştir ($p<0.05$). 18.haftada kaspaz-9 enzim aktivitesinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (Çizelge 4.2, Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Apoptotik belirteç olan kaspaz-9 enzim aktivitesinin gruplar arası karşılaştırmada 6., 12. ve 18. haftalarda gösterdiği değişimlerin bar grafik olarak gösterimi. *; Kontrol grubuna, #; HCC grubuna, †; HCC+BB3 grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) farklılıkları göstermektedir.

4.1.1.4. İmmünohistokimyasal Olarak Fas Ekspresyonu

Fas ekspresyonu immünohistokimyasal boyama ile semikantitatif olarak değerlendirildi. Buna göre; 0-10 hücrede boyanma görülmesi negatif (-), 10-25 hücrede boyanma görülmesi (+), 25-50 hücrede boyanma görülmesi (++) ile 50 ve üzeri hücrede boyanma görülmesi durumunda (+++) olarak değerlendirildi. Her bir grubun kendi içinde zamana bağlı olarak gösterdiği farklılıklar ve gruplar arası farklılıklar gösterilmiştir (Çizelge 4.3, Çizelge 4.4). Şekil 4.7’de Fas ekspresyonu değerlendirilmelerinin yapıldığı karaciğer dokularına ait fotomikrograf görüntüsüne bir örnek verilmiştir.



Şekil 4.7. Karaciğer dokusuna ait immünohistokimyasal Fas ekspresyonunun fotomikrograf görüntüsü

Çizelge 4.3. Apoptozisi aktive eden fizyolojik mediyatörlerden Fas ekspresyonunun grupların kendi içinde zamana bağlı olarak değişimi

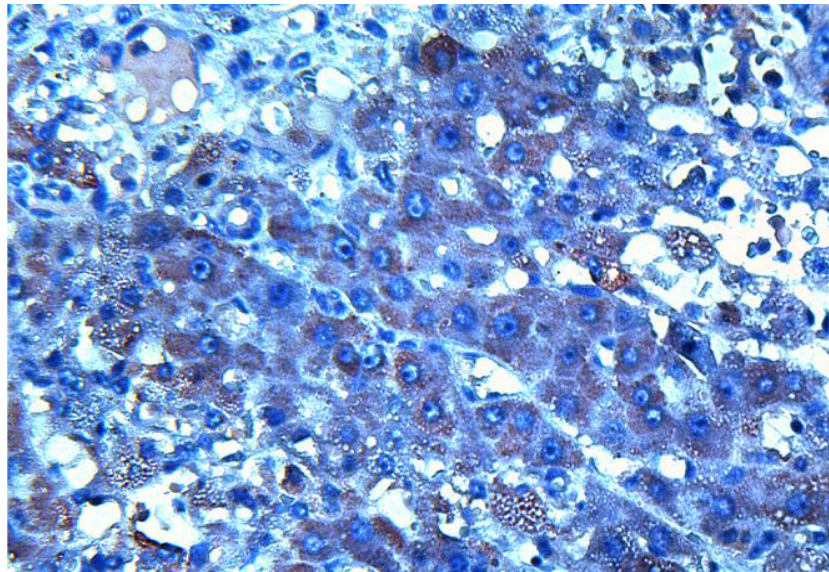
Gruplar	Zaman (Hafta)	Fas				P
		Negatif	+	++	+++	
Kontrol	0	100,0				-
	6	100,0				
	12	100,0				
	18	100,0				
HCC	0	100,0				0,001
	6	16,7	83,3	0,0	0,0	
	12	0,0	83,3	16,7	0,0	
	18	0,0	50,0	33,3	16,7	
HCC+BB3	0	100,0	0,0			< 0.0001
	6	0,0	100,0			
	12	0,0	100,0			
	18	0,0	100,0			
HCC+BB4	0	100,0	0,0	0,0		< 0.0001
	6	0,0	100,0	0,0		
	12	0,0	80,0	20,0		
	18	0,0	100,0	0,0		
HCC+DMSO	18	0,0	100,0	0,0		

Çizelge 4.4. Apoptozisi aktive eden fizyolojik mediyatörlerden Fas ekspresyonunun gruplar arası karşılaştırılmasında 6., 12. ve 18. haftalarda gösterdiği değişimler

Fas						
Zaman (Hafta)	Gruplar	Negatif	+	++	+++	P
6.	Kontrol	100,0	0,0			< 0,0001
	HCC	16,7	83,3			
	HCC+BB3	0,0	100,0			
	HCC+BB4	0,0	100,0			
12.	Kontrol	100,0	0,0	0,0		< 0,0001
	HCC	0,0	83,3	16,7		
	HCC+BB3	0,0	100,0	0,0		
	HCC+BB4	0,0	80,0	20,0		
18.	Kontrol	100,0	0,0	0,0	0,0	< 0,0001
	HCC	0,0	50,0	33,3	16,7	
	HCC+BB3	0,0	100,0	0,0	0,0	
	HCC+BB4	0,0	100,0	0,0	0,0	
	HCC+DMSO	0,0	100,0	0,0	0,0	

4.1.1.5. İmmünohistokimyasal Olarak FasL Ekspresyonu

FasL'nin immünohistokimyasal boyanması semikantitatif olarak değerlendirildi. Buna göre; 0-10 hücrede boyanma görülmesi negatif (-), 10-20 hücrede boyanma görülmesi (+), 20-50 hücrede boyanma görülmesi (++) ile 50 ve üzeri hücrede boyanma görülmesi durumunda (+++) olarak değerlendirildi. Her bir grubun kendi içinde zamana bağlı olarak gösterdiği farklılıklar ve gruplar arası farklılıklar gösterilmiştir (Çizelge 4.5, Çizelge 4.6). Şekil 4.8'de FasL ekspresyonu değerlendirilmelerinin yapıldığı karaciğer dokularına ait fotomikrograf görüntüsüne bir örnek verilmiştir.



Şekil 4.8. Karaciğer dokusuna ait immünohistokimyasal FasL ekspresyonunun fotomikrograf görüntüsü

Çizelge 4.5. Apoptozisi aktive eden fizyolojik mediyatörlerden FasL ekspresyonunun grupların kendi içinde zamana bağlı olarak değişimi

FasL						
Gruplar	Zaman (Hafta)	Negatif	+	++	+++	P
Kontrol	0	100,0				-
	6	100,0				
	12	100,0				
	18	100,0				
HCC	0	100,0	0,0	0,0		< 0,0001
	6	16,7	83,3	0,0		
	12	0,0	83,3	16,7		
	18	0,0	50,0	50,0		
HCC+BB3	0	100,0	0,0	0,0	0,0	< 0,0001
	6	0,0	0,0	83,3	16,7	
	12	0,0	20,0	80,0	0,0	
	18	0,0	40,0	60,0	0,0	
HCC+BB4	0	100,0	0,0	0,0		< 0,0001
	6	0,0	66,7	33,3		
	12	0,0	20,0	80,0		
	18	0,0	40,0	60,0		
HCC+DMSO	18	0,0	0,0	100,0		-

Çizelge 4.6. Apoptozisi aktive eden fizyolojik mediyatörlerden FasL ekspresyonunun gruplar arası karşılaştırmada 6., 12. ve 18. haftalarda gösterdiği değişimler

FasL						
Zaman (Hafta)	Gruplar	Negatif	+	++	+++	P
6.	Kontrol	100,0	0,0	0,0	0,0	< 0,0001
	HCC	16,7	83,3	0,0	0,0	
	HCC+BB3	0,0	0,0	83,3	16,7	
	HCC+BB4	0,0	66,7	33,3	0,0	
12.	Kontrol	100,0	0,0	0,0		< 0,0001
	HCC	0,0	83,3	16,7		
	HCC+BB3	0,0	20,0	80,0		
	HCC+BB4	0,0	20,0	80,0		
18.	Kontrol	100,0	0,0	0,0		< 0,0001
	HCC	0,0	50,0	50,0		
	HCC+BB3	0,0	40,0	60,0		
	HCC+BB4	0,0	40,0	60,0		
	HCC+DMSO	0,0	0,0	100,0		

4.1.2. Antioksidan Kapasiteye Ait Bulgular

Bu çalışmada antioksidan kapasiteyi değerlendirmek amacı ile antioksidan sistemde yer alan GSH miktarı, SOD ve CAT enzim aktiviteleri; eNOS ve iNOS aktivitesinin bir göstergesi olarak nitrit düzeyleri ile lipid peroksidasyonunun göstergesi olarak ise MDA düzeyleri saptandı. Tüm parametreler her bir grubun kendi içinde zamana bağlı olarak gösterdikleri farklılıklar ve gruplar arasındaki farklılıklar dikkate alınarak incelendi (Çizelge 4.7, Çizelge 4.8).

Çizelge 4.7. Antioksidan kapasiteyi oluşturan GSH, SOD, CAT, Nitrit ve MDA düzeylerinin her bir grubun kendi içinde zamana bağlı olarak değişimi

Grup	Zaman (Hafta)	GSH (µmol/mg protein)	SOD (U/mg protein)	CAT (U/mg protein)	Nitrit (µM/mg protein)	MDA (nmol/ mg protein)
Kontrol	0. (n=6)	0.0008 ± 0.0003	1.13 ± 0.45	0.94 ± 0.15	1.89 ± 0.42	0.80 ± 0.16
	6. (n=6)	0.0010 ± 0.0007	1.45 ± 0.56	0.82 ± 0.35	1.89 ± 0.89	0.83 ± 0.25
	12. (n=6)	0.0016 ± 0.0002 ^a	0.64±0.22 _{a,b}	0.85 ± 0.26	1.16 ± 0.20	0.65 ± 0.09
	18. (n=6)	0.0017 ± 0.0004 ^a	0.11 ± 0.04 _{a,b}	0.62 ± 0.34	1.52 ± 0.38	0.73 ± 0.12
	<i>P</i>	0.003	< 0.0001	0.324	0.088	0.255
HCC	0. (n=6)	0.0008 ± 0.0003	1.13 ± 0.45	0.94 ± 0.15	1.89 ± 0.42	0.80 ± 0.16
	6. (n=6)	0.0006 ± 0.0003	2.19±0.75 ^a	1.70± 0.14 ^a	2.67± 0.67 ^a	1.17 ± 0.20 ^a
	12. (n=6)	0.0008 ± 0.0003	0.72± 0.19 ^b	1.23±0.39 ^b	1.28±0.23 _{a,b}	0.60 ± 0.08 ^b
	18. (n=6)	0.0005 ± 0.0002	1.46 ± 0.84	1.39± 0.31 ^a	1.93±0.42 ^b	1.12±0.31 _{a,c}
	<i>P</i>	0.376	0.011	0.004	0.001	< 0.001
HCC+ BB3	0. (n=6)	0.0008 ± 0.0003	1.13 ± 0.45	0.94 ± 0.15	1.89 ± 0.42	0.80 ± 0.16
	6. (n=6)	0.0005 ± 0.0003	2.69±0.70 ^a	1.98 ± 0.74 ^a	2.58 ± 0.74	1.06± 0.19 ^a
	12. (n=6)	0.0014 ± 0.0005 ^b	0.77 ± 0.32 ^b	0.68 ± 0.11 ^b	1.17±0.48 _{a,b}	0.64 ± 0.12 ^b
	18. (n=6)	0.0013 ± 0.0006 ^b	0.25±0.12 _{a,b}	0.57± 0.36 ^b	1.91 ± 0.22 ^b	0.80 ± 0.18
	<i>P</i>	0.006	< 0.0001	< 0.001	0.002	0.005
HCC+ BB4	0. (n=6)	0.0008 ± 0.0003	1.13 ± 0.45	0.94 ± 0.15	1.89 ± 0.42	0.80 ± 0.16
	6. (n=6)	0.0006 ± 0.0004	2.67± 0.85 ^a	1.59± 0.36 ^a	2.36± 0.21 ^a	1.05 ± 0.14
	12. (n=6)	0.0013 ± 0.0007	0.99± 0.40 ^b	0.60± 0.20 ^b	1.58 ± 0.50 ^b	0.79 ± 0.32
	18. (n=6)	0.0011 ± 0.0005	0.17±0.04 _{a,b,c}	0.72± 0.44 ^b	1.67 ± 0.22 ^b	0.72 ± 0.12
	<i>P</i>	0.105	< 0.0001	0.001	0.008	0.064

Sonuçlar ortalama ± ortalamaların standart hatası olarak gösterilmiştir. “n” sıçan sayısını ifade etmektedir. GSH; indirgenmiş glutatyon, SOD; Süperoksit dismutaz, CAT; Katalaz, MDA; Malondialdehit, ^a; 0. haftaya, ^b; 6. haftaya, ^c; 12. haftaya göre istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) farklılıkları göstermektedir.

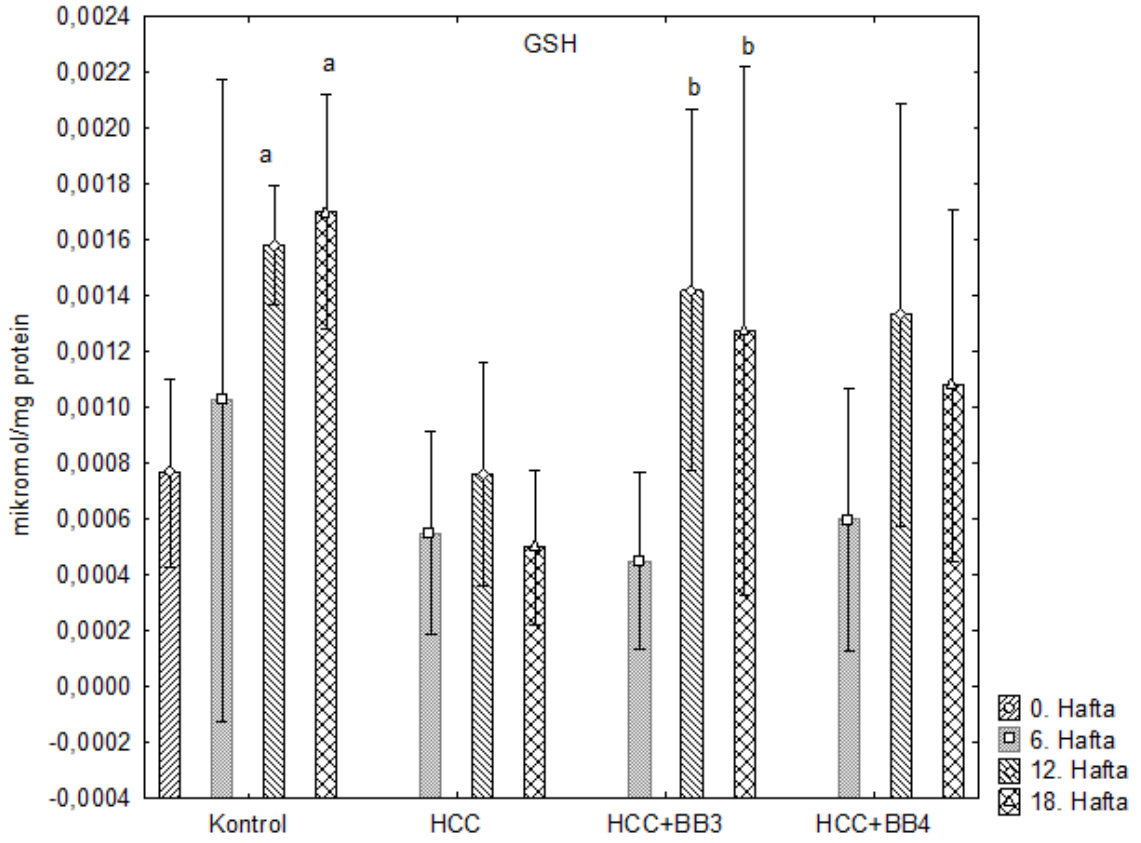
Çizelge 4.8. Antioksidan kapasiteyi oluşturan GSH, SOD, CAT, Nitrit ve MDA düzeylerinin gruplar arası karşılaştırmada 6., 12. ve 18. haftalarda gösterdiği değişimler

Zaman (Hafta)	Grup	GSH (µmol/mg protein)	SOD (U/mg protein)	CAT (U/mg protein)	Nitrit (µM/mg protein)	MDA (nmol/ mg protein)
6.	Kontrol (n=6)	0.0010 ± 0.0007	1.45 ± 0.56	0.82 ± 0.35	1.89 ± 0.89	0.83 ± 0.25
	HCC (n=6)	0.0006 ± 0.0003	2.19 ± 0.75	1.70±0.14 *	2.67 ± 0.67	1.17 ±0.20*
	HCC+BB3 (n=6)	0.0005 ± 0.0003	2.69± 0.70 *	1.98±0.74 *	2.58 ± 0.74	1.06 ± 0.19
	HCC+BB4 (n=6)	0.0006 ± 0.0004	2.67± 0.85 *	1.59 ± 0.36	2.36 ± 0.21	1.05 ± 0.14
	<i>P</i>	0.267	0.049	0.005	0.236	0.050
12.	Kontrol (n=6)	0.0016 ± 0.0002	0.64 ± 0.22	0.85 ± 0.26	1.16 ± 0.20	0.65 ± 0.09
	HCC (n=6)	0.0007 ±0.0003 *	0.72 ± 0.19	1.23 ± 0.39	1.28 ± 0.23	0.60 ± 0.08
	HCC+BB3 (n=6)	0.0014 ± 0.0005 [#]	0.77 ± 0.32	0.68±0.11 [#]	1.17 ± 0.48	0.64 ± 0.12
	HCC+BB4(n=6)	0.0013 ± 0.0007 [#]	0.99 ± 0.40	0.60 ± 0.21	1.58 ± 0.50	0.79 ± 0.32
	<i>P</i>	0.036	0.433	0.015	0.232	0.751
18.	Kontrol (n=6)	0.0017 ± 0.0004	0.11 ± 0.04	0.62 ± 0.34	1.52 ± 0.38	0.73 ± 0.12
	HCC (n=6)	0.0005 ±0.0002 *	1.46 ±0.84 *	1.39 ±0.31 *	1.93 ± 0.42	1.12 ±0.31 *
	HCC+BB3 (n=6)	0.0013 ± 0.0006 [#]	0.25±0.12 ^{*,#}	0.57± 0.36 [#]	1.91 ± 0.22	0.80 ± 0.18
	HCC+BB4 (n=6)	0.0011± 0.0005 ^{*,#}	0.17±0.04 ^{*,#}	0.72±0.44 [#]	1.67 ± 0.22	0.72 ±0.1 [#]
	HCC+DMSO (n=6)	0.0008 ±0.0003 *	0.81± 0.25 ^{*,†,‡}	1.68 ± 0.39 ^{*,†,‡}	1.98 ± 0.44	2.22 ±1.15 ^{*,#,†,‡}
	<i>P</i>	0.002	< 0.0001	< 0.0001	0.130	0.001

Sonuçlar ortalama ± ortalamaların standart hatası olarak gösterilmiştir. “n” sıçan sayısını ifade etmektedir. GSH; indirgenmiş glutatyon, SOD; Süperoksit dismutaz, CAT; Katalaz, MDA; Malondialdehit, *; Kontrol grubuna, #; HCC grubuna, †; HCC+BB3 grubuna ‡; HCC+BB4 grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) farklılıkları göstermektedir.

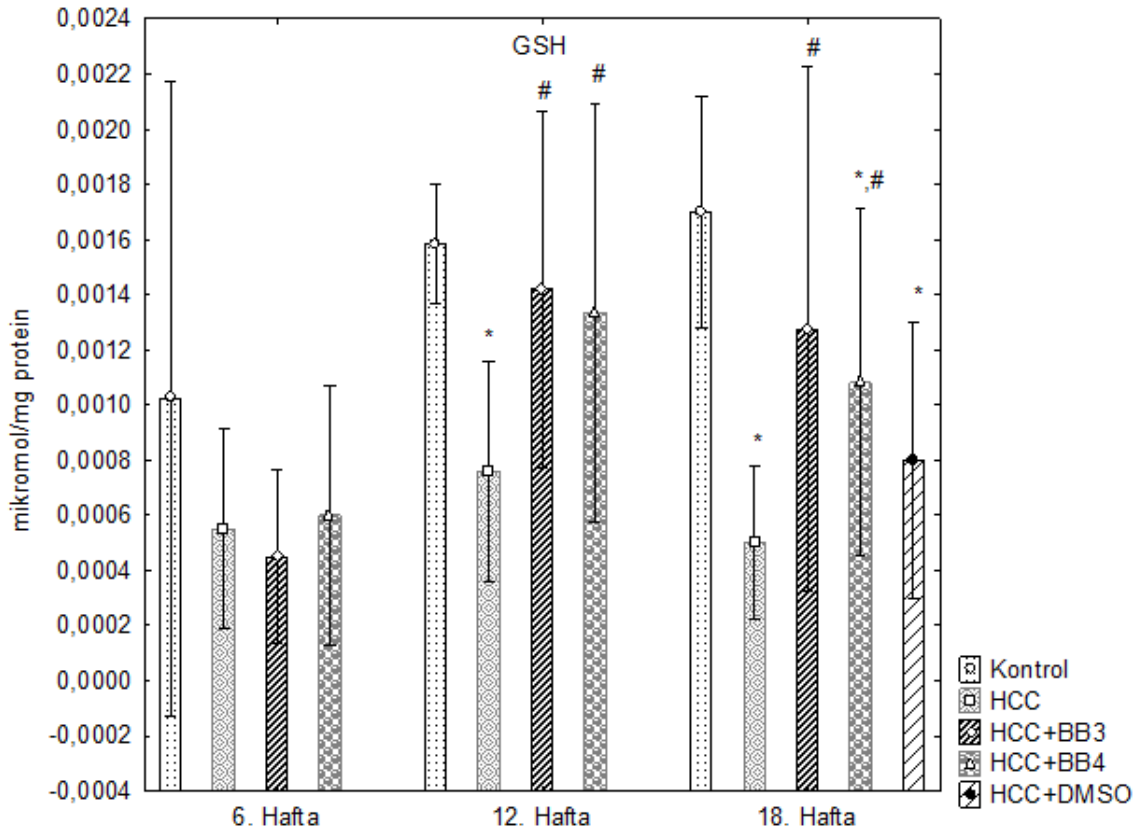
4.1.2.1. Doku GSH Düzeyleri

GSH düzeylerinin zamana bağlı olarak grupların kendi içerisindeki değişimi Çizelge 4.7’de gösterilmiştir. Kontrol grubunda GSH düzeyleri zamanla yükselmiştir. 12. ve 18. haftada elde edilen GSH düzeyleri çalışma başlangıcına göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermiştir (sırasıyla $p=0.019$, $p=0.006$). HCC+BB3 grubunda 12. ve 18. haftalarda 6. haftaya göre bir artış gözlenmiştir (sırasıyla $p=0.005$, $p<0.05$). Diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. GSH düzeylerinin her bir grubun kendi içinde zamana bağlı olarak değişiminin bar grafik olarak gösterimi. GSH; indirgenmiş glutatyon, ^a; 0. haftaya, ^b; 6. haftaya göre istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) farklılıkları göstermektedir.

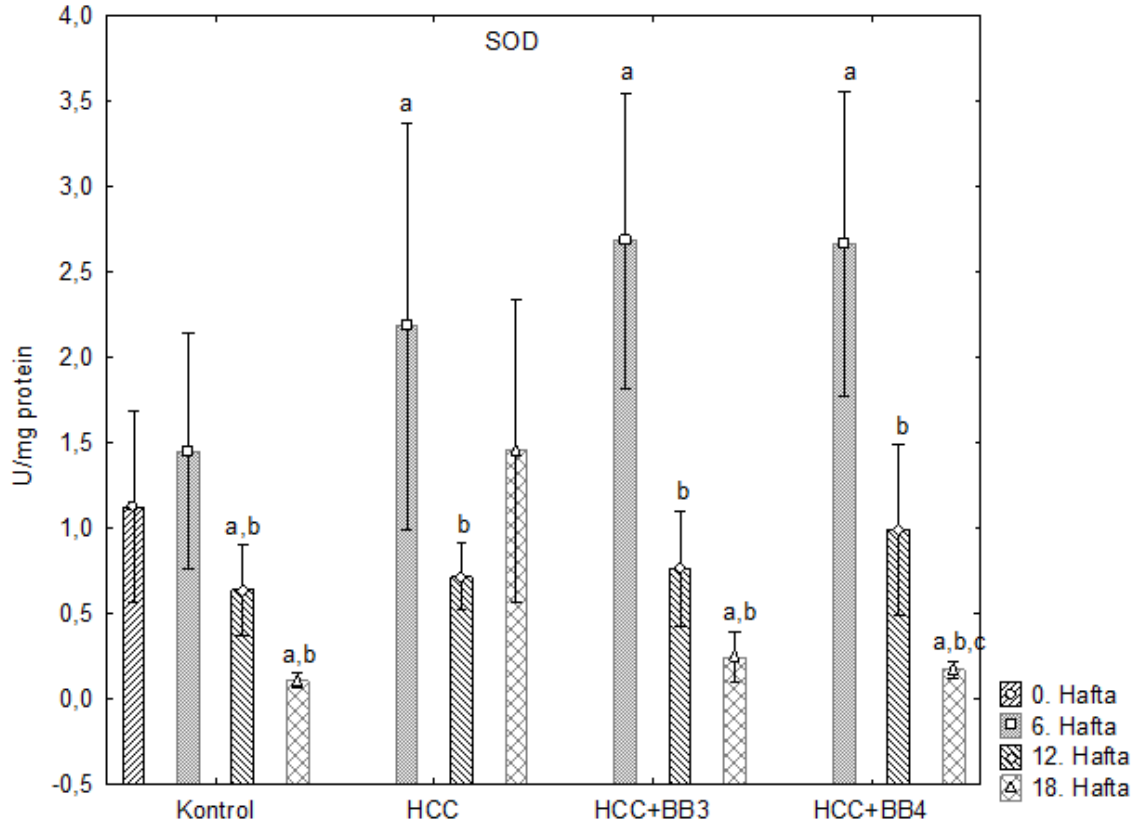
Gruplar arası GSH düzeylerini karşılaştırdığımız da ise 6. haftada gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir. 12. haftada HCC grubu GSH düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde azalma göstermiştir ($p=0.047$). HCC+BB3 ve HCC+BB4 grubu GSH düzeyleri 12. haftada HCC grubuna göre artmıştır ($p < 0.05$). Çalışmanın sonlandırıldığı 18. haftada ise HCC+BB3 ve HCC+BB4 grubu GSH seviyeleri HCC grubuna göre artmıştır ($p < 0.05$). HCC+BB4 grubu GSH seviyelerinde aynı zamanda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenmektedir ($p < 0.05$). 18. haftada hem HCC hem de HCC+DMSO grubu GSH düzeyleri kontrole göre azalma göstermiştir ve bu farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı olarak bulunmuştur (sırasıyla $p=0.000$, $p=0.010$) (Çizelge 4.8, Şekil 4.10).



Şekil 4.10. GSH düzeylerinin gruplar arası karşılaştırmada 6., 12. ve 18. haftalardaki değişimlerinin bar grafik olarak gösterimi. * ; Kontrol grubuna, # ; HCC grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) farklılıkları göstermektedir.

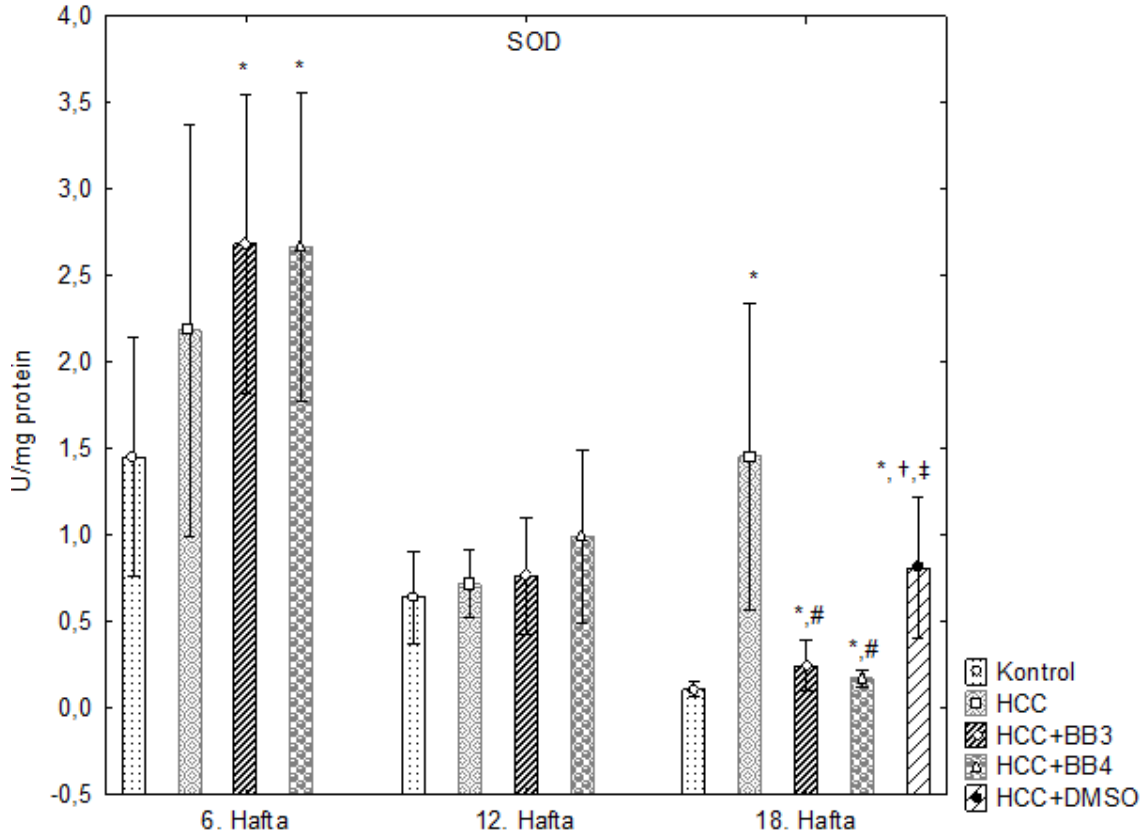
4.1.2.2. Doku SOD Aktivitesi

SOD aktivitesi zamana bağlı olarak değerlendirildiğinde kontrol grubu hariç tüm gruplarda 6. haftada 0. haftaya göre anlamlı derecede artmıştır ($p < 0.05$). Kontrol grubu SOD aktivitesi, 12. ve 18. haftada 0. ve 6. haftalara göre anlamlı derecede azalma göstermiştir. HCC grubunda 6. haftadaki SOD aktivitesi 0. haftaya göre anlamlı derecede artarken ($p < 0.05$), 12. haftada ise 6. haftaya göre anlamlı derecede azalmıştır ($p = 0.011$). HCC+BB3 grubunda SOD aktivitesi 6. haftada 0. haftaya göre anlamlı derecede artarken, 12. ve 18. haftada 6. haftaya göre önemli miktarda azalmıştır ($p < 0.000$). HCC+BB4 grubunda 6. haftada 0. haftaya göre önemli miktarda artan SOD aktivitesi, 12. haftada 6. haftaya göre anlamlı miktarda azalmıştır. 18. haftada ise 0., 6. ve 12. haftaya göre anlamlı derecede azalmıştır ($p < 0.000$) (Çizelge 4.7, Şekil 4.11).



Şekil 4.11. SOD enzim aktivitelerinin her bir grubun kendi içinde zamana bağlı olarak değişiminin bar grafik olarak gösterimi. SOD; Süperoksit dismutaz, ^a; 0. haftaya, ^b; 6. haftaya, ^c; 12. haftaya göre istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) farklılıkları göstermektedir.

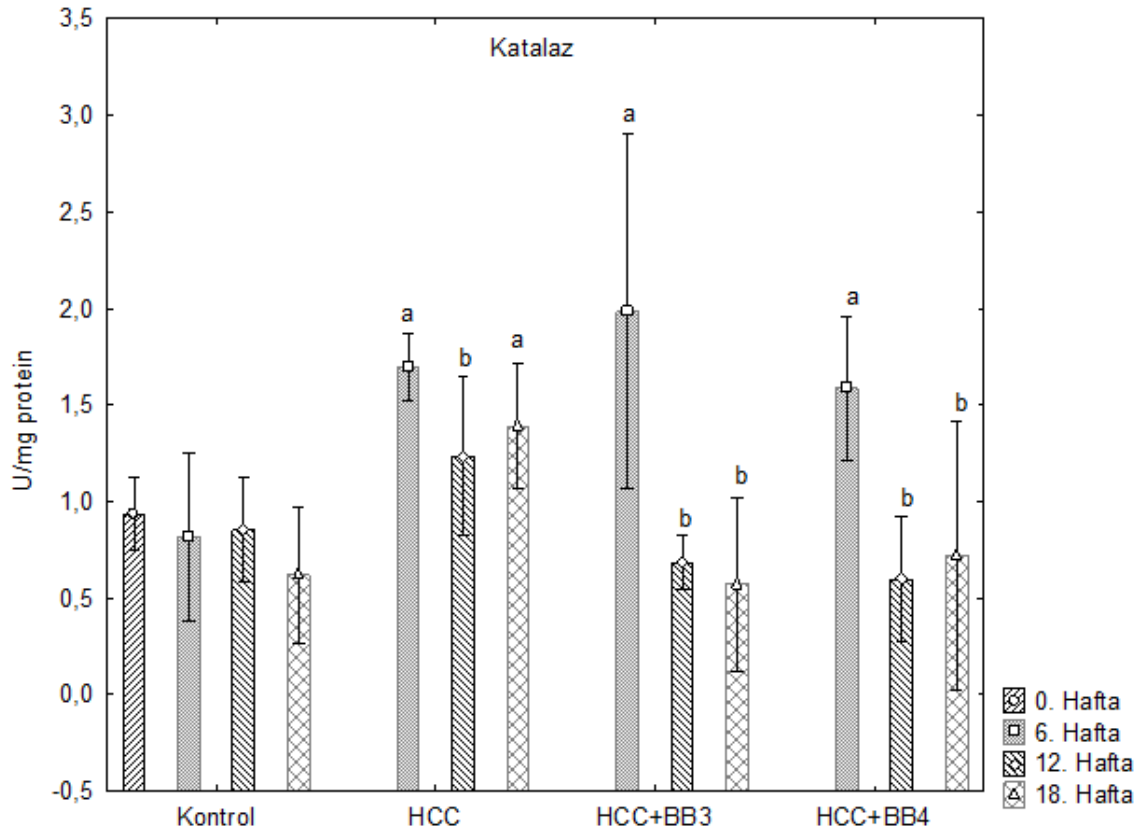
SOD aktivitesini gruplar arasında karşılaştırdığımızda 12. hafta hariç diğer haftalarda SOD aktivitesinde anlamlı farklılıklar gözlenmiştir. 6. haftada HCC+BB3 ve HCC+BB4 grupları kontrol grubuna göre anlamlı derecede artmıştır ($p < 0.05$). HCC sürecinin tamamlandığı 18. hafta sonunda ise HCC grubu SOD aktivitesi kontrol grubuna göre anlamlı derecede artmıştır ($p = 0.002$). HCC+BB3 ve HCC+BB4 grupları kontrol grubuna göre anlamlı derecede artarken, HCC grubuna göre anlamlı derecede azalmıştır ($p < 0.05$). HCC+DMSO grubu ise kontrol, HCC+BB3 ve HCC+BB4 grubuna göre anlamlı derecede artmıştır ($p < 0.05$) (Çizelge 4.8, Şekil 4.12).



Şekil 4.12. SOD enzim aktivitelerinin gruplar arası karşılaştırmada 6., 12. ve 18. haftalardaki değişimlerinin bar grafik olarak gösterimi. SOD; Süperoksit dismutaz, * ; Kontrol grubuna, #; HCC grubuna, †; HCC+BB3 grubuna ‡; HCC+BB4 grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) farklılıkları göstermektedir.

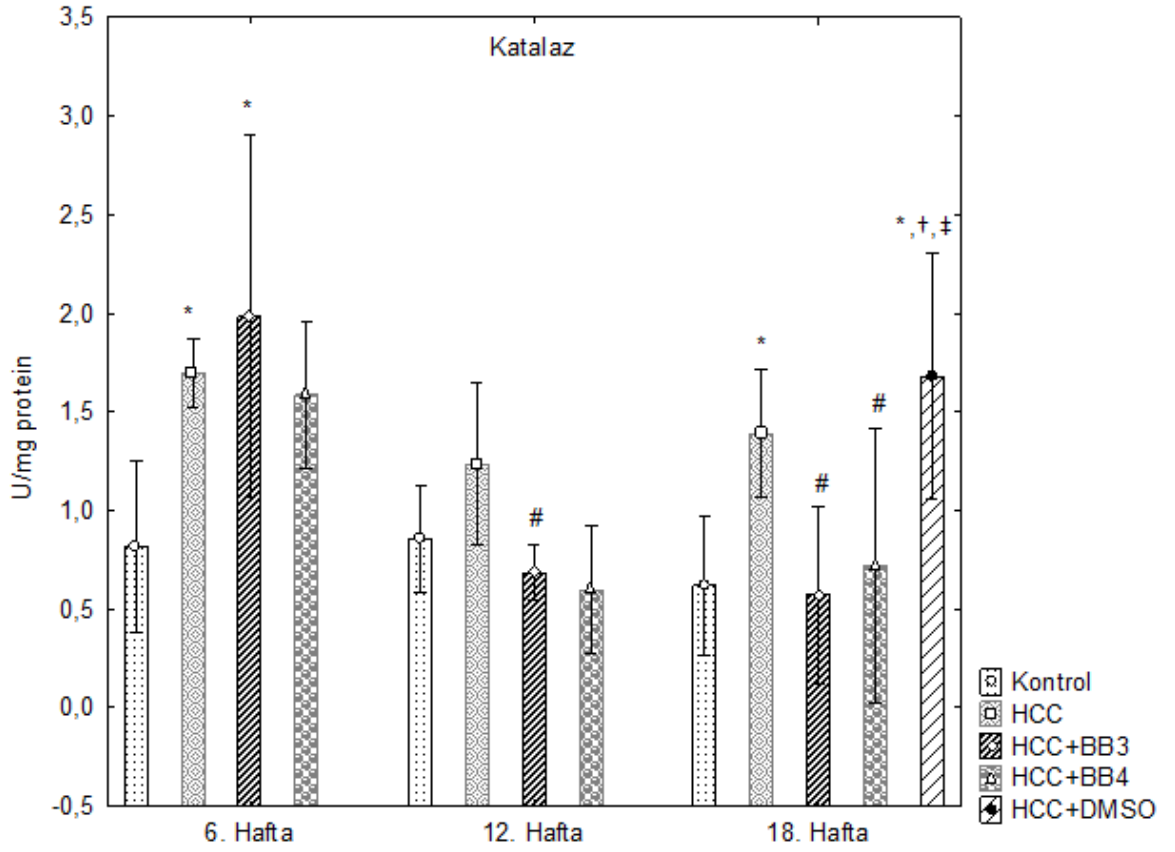
4.1.2.3. Doku CAT Aktivitesi

Zamana bağlı olarak grupların kendi içindeki CAT enzim aktivitesi incelendiğinde, kontrol grubunda ($p=0.324$) istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir. HCC grubunda 6. ve 18. haftada başlangıç CAT aktivitesine göre anlamlı bir artış, 12. haftada ise 6. haftaya göre anlamlı bir azalma gözlenmiştir ($p<0.05$). HCC+BB3 grubunda 6. haftada 0. haftaya göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir ($p<0.05$). 12. haftada ($p=0.003$) ve 18. haftada ($p=0.002$) ise 6. haftaya göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenmiştir. Benzer olarak HCC+BB4 grubunda da 6. haftada 0. haftaya göre anlamlı bir artış ($p<0.05$) ile 12. ve 18. haftalarda 6. haftaya göre bir azalma gözlenmiştir (sırasıyla $p=0.003$, $p=0.008$) (Çizelge 4.7, Şekil 4.13).



Şekil 4.13. CAT enzim aktivitelerinin her bir grubun kendi içinde zamana bağlı olarak değişiminin bar grafik olarak gösterimi. ^a; 0. haftaya, ^b; 6. haftaya göre istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) farklılıkları göstermektedir.

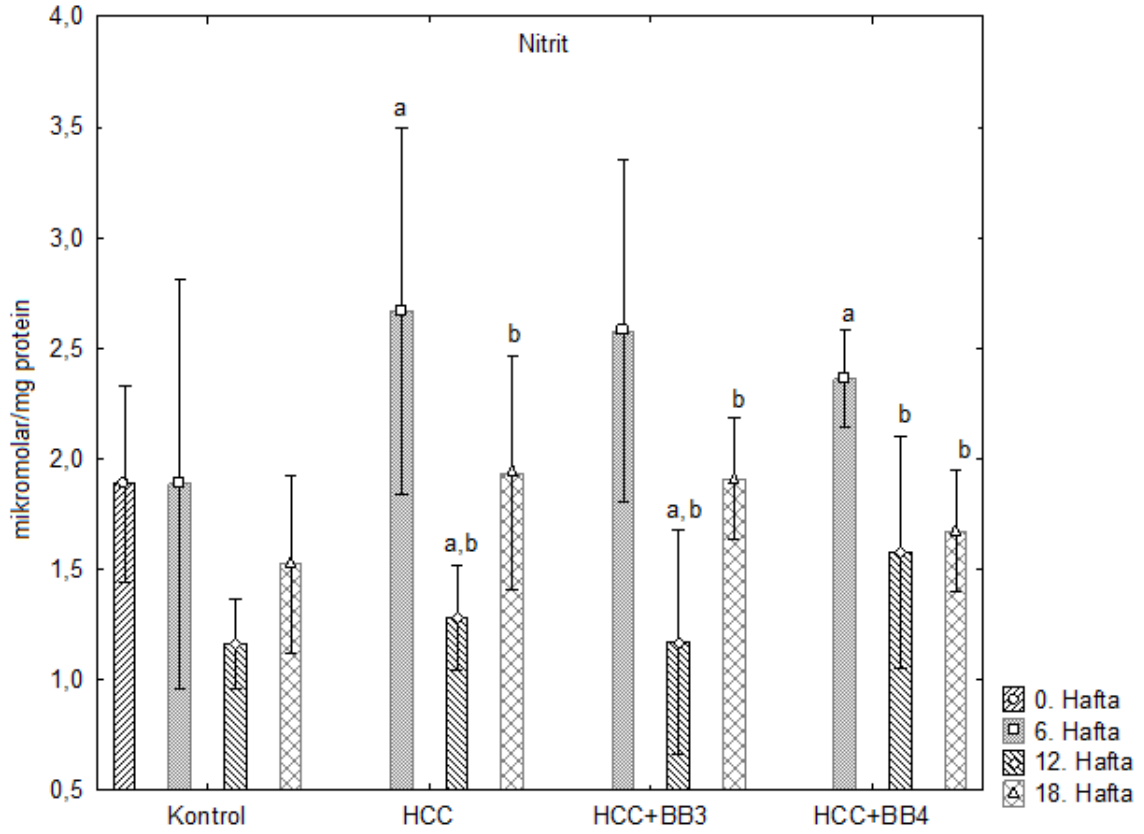
Gruplar arası karşılaştırmada; 6. hafta HCC ($p=0.038$) ve HCC+BB3 ($p=0.004$) gruplarında CAT enzim aktivitesinde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış saptanmıştır. 12. haftada ise HCC+BB3 grubunda HCC grubuna göre anlamlı derecede bir azalma gözlenmiştir ($p=0.026$). 18. haftada HCC grubu CAT enzim aktivitesi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermiştir ($p < 0.05$). 18. haftada HCC+BB3 ve HCC+BB4 grubu CAT aktiviteleri de HCC ($p < 0.05$) grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma göstermektedir. 18. haftada HCC+DMSO grubu kontrol grubuna ($p=0.020$), HCC+BB3 ve HCC+BB4 gruplarına göre anlamlı derecede artmıştır ($p < 0.05$) (Çizelge 4.8, Şekil 4.14).



Şekil 4.14. CAT enzim aktivitelerinin gruplar arası karşılaştırmada 6., 12. ve 18. haftalardaki değişimlerinin bar grafik olarak gösterimi. CAT; Katalaz, *; Kontrol grubuna, #; HCC grubuna, †; HCC+BB3 grubuna ‡; HCC+BB4 grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) farklılıkları göstermektedir.

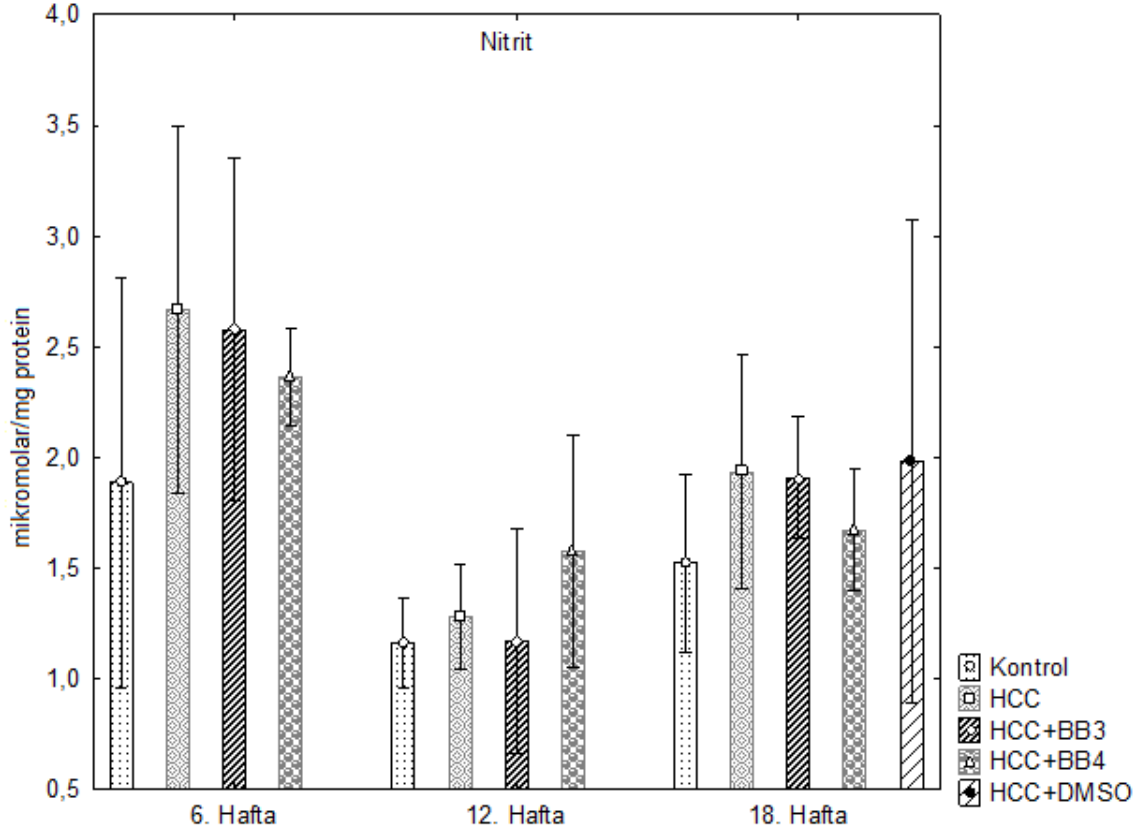
4.1.2.4. Doku Nitrit Düzeyleri

Nitrit düzeyleri kontrol grubunda çalışma sürecinde anlamlı bir değişiklik göstermemiştir ($p=0,088$). HCC grubunda 6. haftada başlangıç nitrit düzeyine göre anlamlı bir artış gözlenirken ($p<0,05$), 12. haftada ise başlangıç ve 6. hafta düzeylerine göre anlamlı derecede azalmıştır ($p<0,05$, $p=0,001$). 18. haftada ise 6. haftaya göre anlamlı derecede azalmıştır ($p<0,05$). HCC+BB3 grubun nitrit düzeyleri 12. haftada 0. ve 6. haftaya göre; 18. haftada ise 6. haftaya göre anlamlı derecede azalmıştır ($p<0,05$). HCC+BB4 grubunda ise 6. haftada başlangıç nitrit düzeyine göre anlamlı bir artış gözlenirken, 12. ve 18. hafta nitrit düzeyleri de 6. haftaya göre düşük bulunmuştur ($p<0,05$). (Çizelge 4.7, Şekil 4.15).



Şekil 4.15. Nitrit düzeylerinin her bir grubun kendi içinde zamana bağlı olarak değişiminin bar grafik olarak gösterimi. ^a ; 0. haftaya, ^b; 6. haftaya göre istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) farklılıkları göstermektedir.

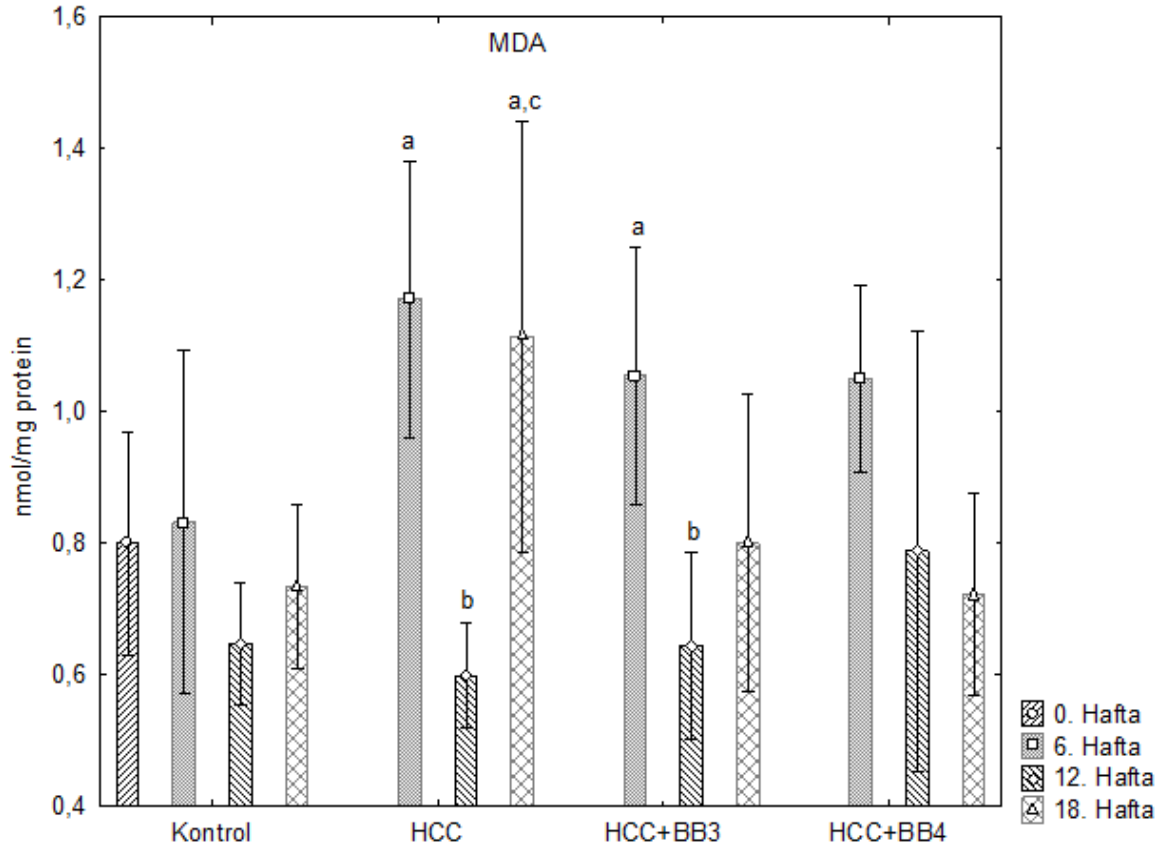
Gruplar arası değerlendirme yaptığımızda nitrit düzeylerinde hiçbir haftada istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (Çizelge 4.8, Şekil 4.16).



Şekil 4.16. Nitrit düzeylerinin gruplar arası karşılaştırmada 6., 12. ve 18. haftalardaki değişimlerinin bar grafik olarak gösterimi.

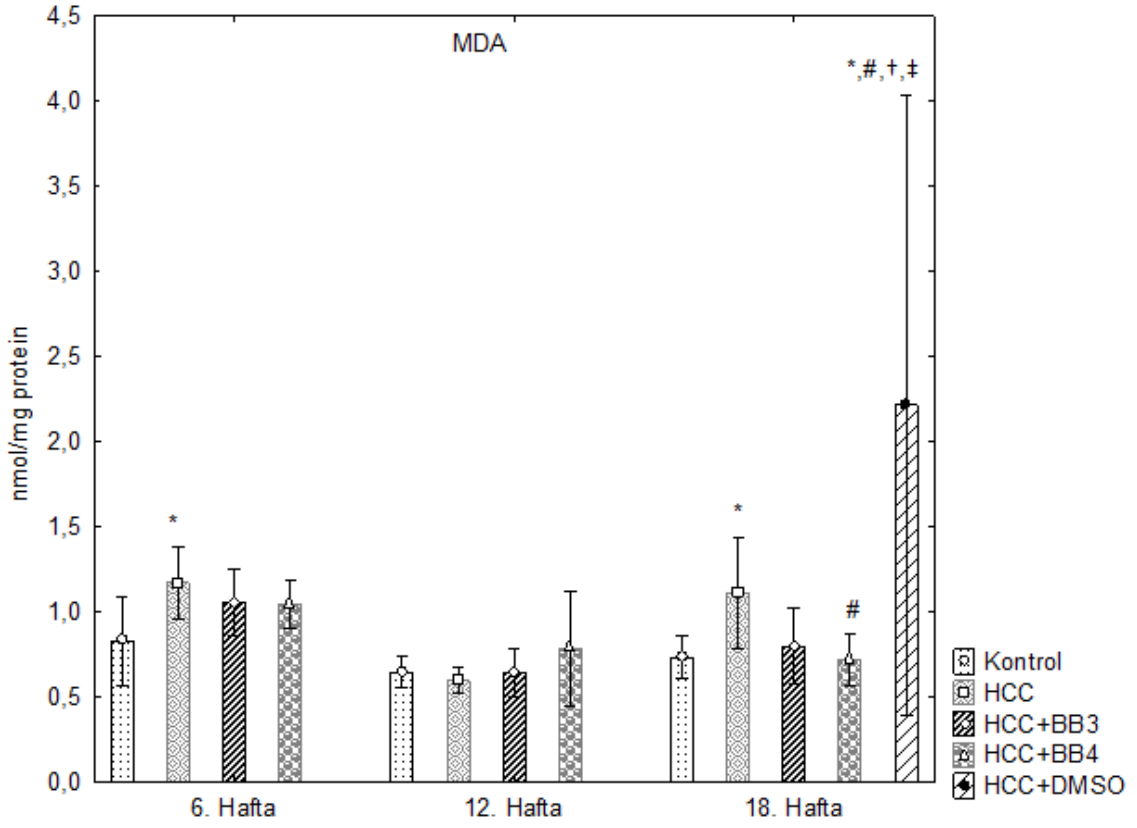
4.1.2.5. Doku MDA Düzeyleri

Lipit peroksidasyonunun son ürünü olan MDA düzeyleri kontrol grubunda zamana bağlı olarak bir değişim göstermemiştir. HCC grubunda ise 6. haftada artmış 12. haftada ($p=0.001$) azalmış ve 18. haftada tekrar bir artış göstermiştir ($p=0.003$). HCC+BB3 grubun MDA düzeylerinde 6. haftada başlangıca göre anlamlı bir artış ($p<0.05$) gözlenirken, 12. haftada ise 6. haftaya göre bir azalma gözlenmiştir ($p=0.004$). HCC+BB4 grubunda ise HCC oluşum sürecinde hiçbir haftada istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir ($p=0.064$) (Çizelge 4.7, Şekil 4.17)



Şekil 4.17. MDA düzeylerinin her bir grubun kendi içinde zamana bağlı olarak değişiminin bar grafik olarak gösterimi. MDA; Malondialdehit, ^a; 0. haftaya, ^b; 6. haftaya, ^c; 12. haftaya göre istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) farklılıkları göstermektedir.

Doku MDA düzeyleri, gruplar arasında karşılaştırıldığında 6. haftada HCC grubu kontrol grubuna göre anlamlı derecede artış gösterirken ($p=0.044$) 12. hafta hiçbir grupta anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. 18. haftada HCC grubu kontrol grubuna göre anlamlı derecede artarken ($p < 0.05$), HCC+BB4 grubu da HCC grubuna göre anlamlı derecede azalmıştır ($p < 0.05$). HCC+DMSO grubunda ise kontrol ($p=0.001$), HCC ($p=0.013$), HCC+BB3 ($p < 0.05$) ve HCC+BB4 ($p=0.001$) gruplarına göre istatistiksel olarak daha yüksek MDA düzeyleri gözlenmiştir (Çizelge 4.8, Şekil 4.18).

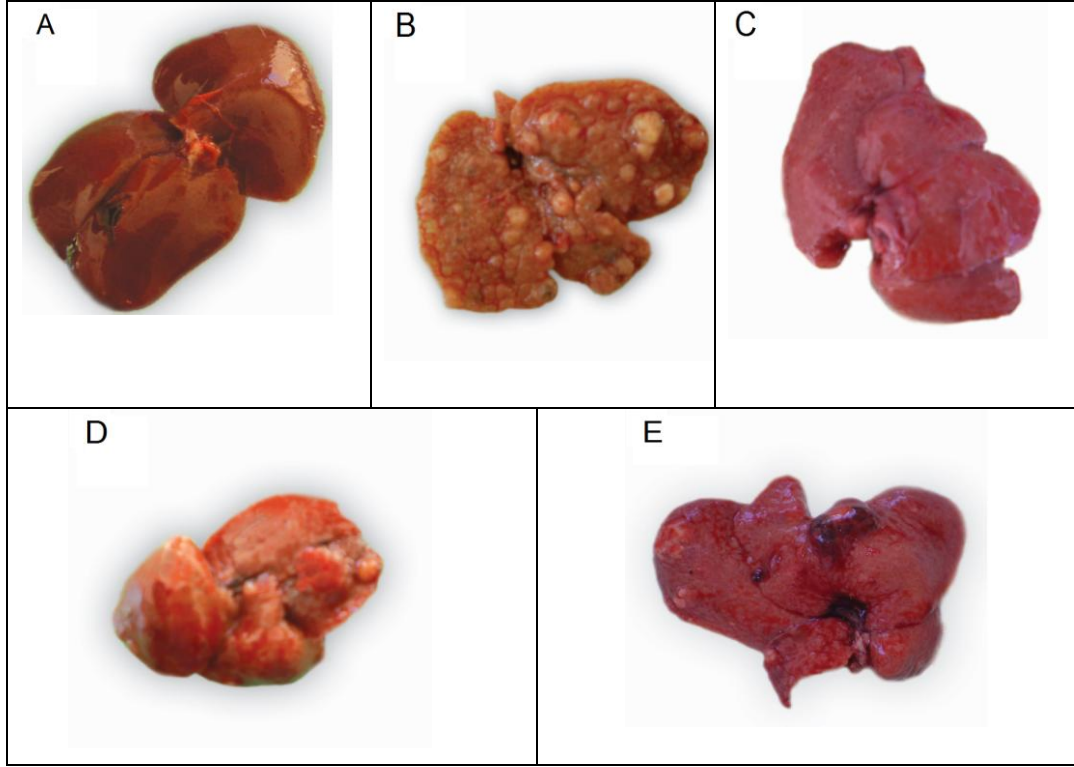


Şekil 4.18. MDA düzeylerinin gruplar arası karşılaştırmada 6., 12. ve 18. haftalardaki değişimlerinin bar grafik olarak gösterimi. MDA; Malondialdehit, * ; Kontrol grubuna, #; HCC grubuna, †; HCC+BB3 grubuna ‡; HCC+BB4 grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) farklılıkları göstermektedir.

4.2. Karaciğer Dokularına Ait Bulgular

4.2.1. Karaciğer Dokularına Ait Makroskopik Bulgular

Daha önce yaptığımız çalışmalarda sıçanlarda HCC oluşum sürecinin yaklaşık olarak 18 hafta olduğunu saptamış bulunmaktayız (143). Bu nedenle HCC oluşumunu gözlemlemek amacıyla rastgele seçilen sıçanlar 0. hafta (başlangıç), 6. hafta, 12. hafta ve 18. haftada sakrifiye edilerek bu gelişim takip edilmiştir. 18. haftanın sonunda öldürülen kontrol, HCC, HCC+BB3, HCC+BB4 ve HCC+DMSO gruplarındaki sıçanlara ait karaciğer dokularının makroskopik görüntüleri Şekil 4.19'de gösterilmiştir.



Şekil 4.19. 18. hafta sonunda sıçanların karaciğerlerine ait makroskopik görünüm. A: Kontrol grubu, B: HCC grubu, C: HCC+BB3 grubu, D: HCC+BB4 grubu, E: HCC+DMSO grubu.

4.2.2. Karaciğer Dokularına Ait Histopatolojik Bulgular

Histopatolojik incelemeler sonucunda kontrol gruplarındaki sıçanlarda normal karaciğer dokusu gözlemlendi (Şekil 4.20).

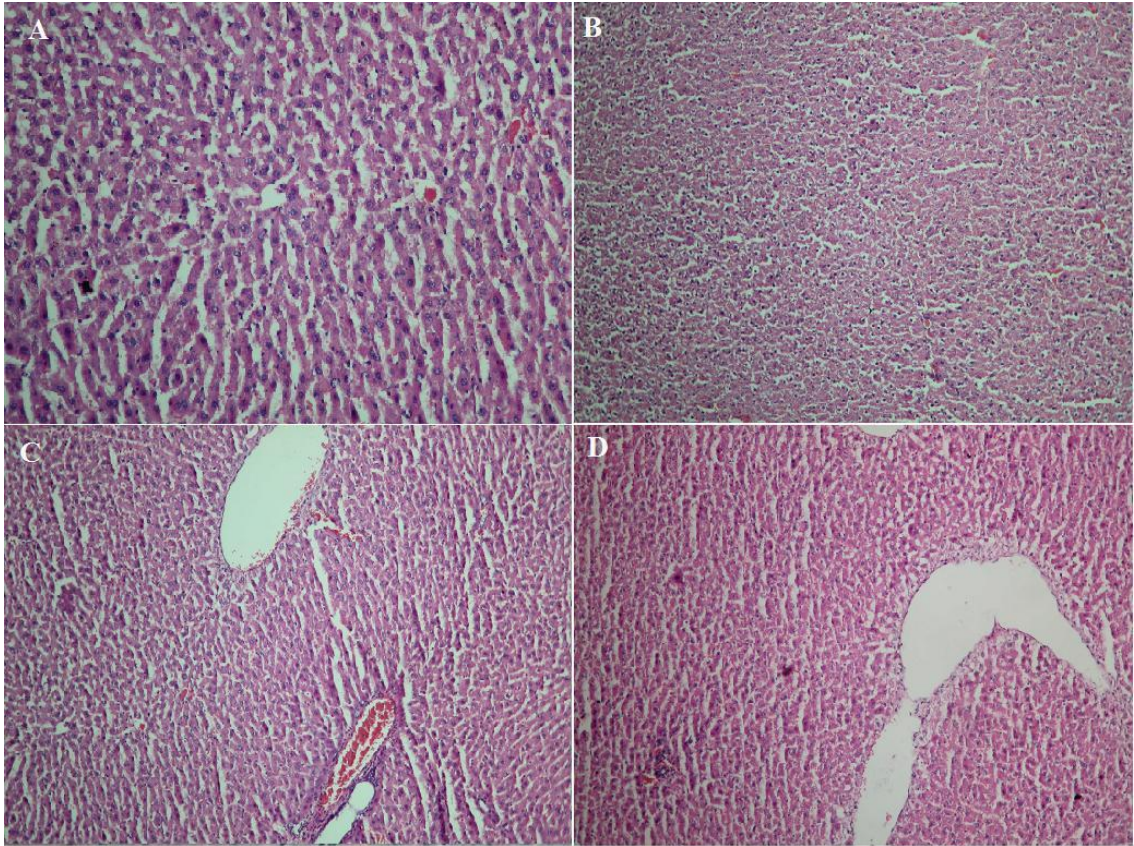
HCC grubunda 6. haftanın sonunda kurban edilen sıçanların karaciğer dokusunda ise portal alanlarda dağınık mononükleer iltihabi hücre infiltrasyonu, fibroz ve dejenerasyon yer yer displastik değişiklikler gözlemlendi. 12. haftanın sonunda portal alanlarda, parankimde portal-portal ya da portal-santral köprüleşmeler yapan ve karaciğeri nodüllere ayıran ya da nodüllere ayırma eğilimi gösteren fibroz, parankimde aşırı displastik değişiklikler ve siroz gözlemlenmiştir. 18. haftanın sonunda ise karaciğer dokusunda large-cell displazi alanlarında komşu geniş tümör odakları gözlemlendi. Tümörün genişçe eozinofilik sitoplazmalı, oval-hiperkromik nükleuslu neoplastik hepatositlerden oluştuğu gözlemlendi (Şekil 4.21).

HCC+BB3 grubunda 6. haftanın sonunda kurban edilen sıçanların karaciğer dokusunda fibroz, siroz ve neoplastik hücrelerde nükleer boyut değişikliği gözlemlendi. 12. haftanın sonunda siroz, ağır displastik nodülde belirgin nükleus ve şeffaflaşma gösteren

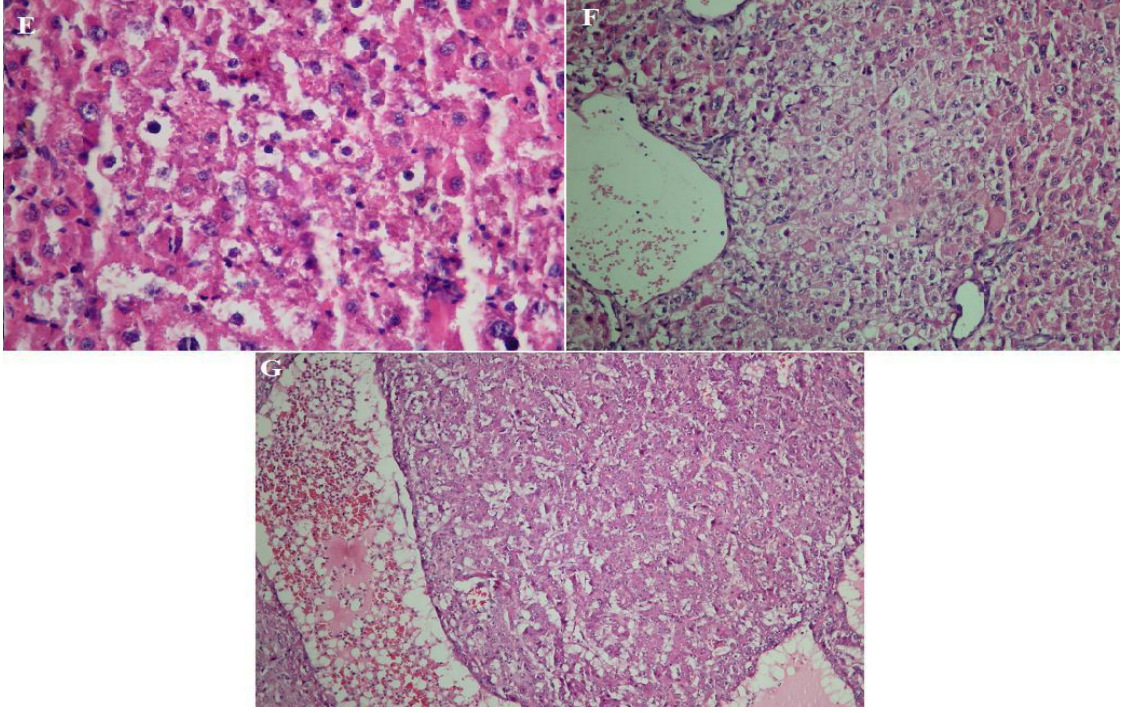
hepatositler gözlemlendi. 18. haftanın sonunda ise karaciğer dokuları rejenere olarak portal fibroz, prefibroz ve siroz gözlemlendi (Şekil 4.22).

HCC+BB4 grubunda 6. haftanın sonunda sakrifiye edilen sıçanların karaciğer dokusunda portal fibroz, displazi ve neoplastik hücreler gözlemlendi. 12. haftanın sonunda siroz, displastik nodüller ve tümör hücreleri gözlemlendi. 18. haftanın sonunda ise karaciğer dokularında siroz, displazi ve trabeküler yapılar oluşturmuş tümör hücreleri gözlemlendi (Şekil 4.23).

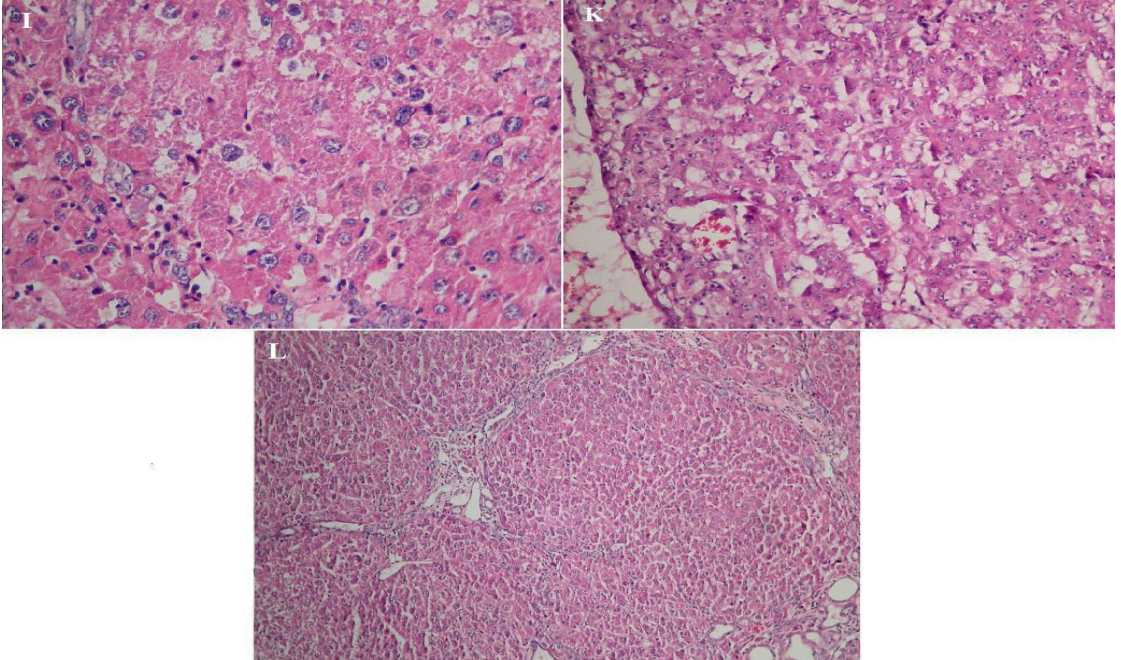
HCC+DMSO grubundaki sıçanlarda 18. haftanın sonunda karaciğer dokusunda trabeküler yapılar oluşturmuş neoplastik karaciğer hücreleri gözlemlendi (Şekil 4.24).



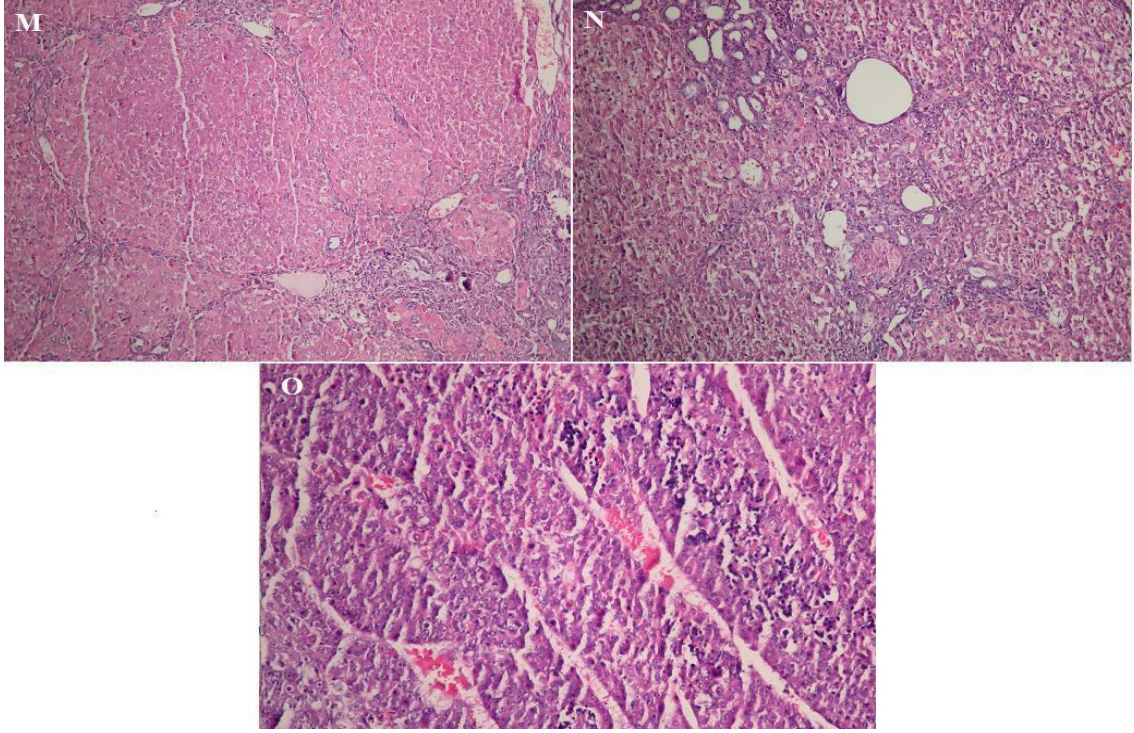
Şekil 4.20. Kontrol grubundaki sıçanların karaciğer dokularına ait HE boyamalarının fotomikrograf görüntüleri. (A) Kontrol grubunun 0. haftasında normal karaciğer dokusunun görüntüsü (HEX100). (B) Kontrol grubunun 6. haftasında normal karaciğer dokusunun görüntüsü (HEX80). (C) Kontrol grubunun 12. haftasında normal karaciğer dokusunun görüntüsü (HEX80). (D) Kontrol grubunun 18. haftasında normal karaciğer dokusunun görüntüsü (HEX80).



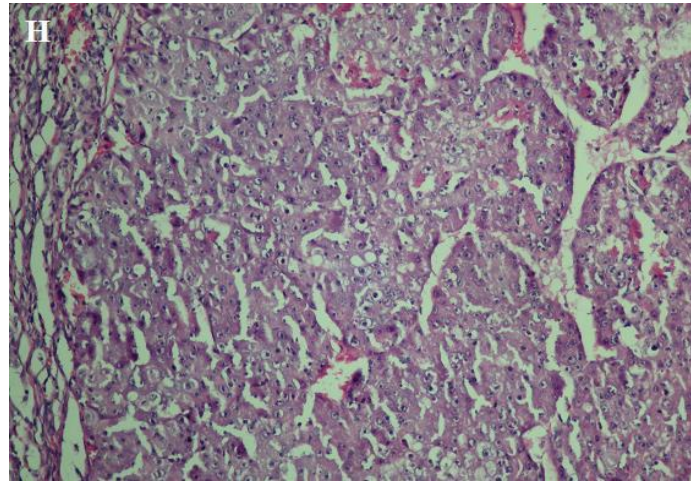
Şekil 4.21. HCC grubundaki sıçanların karaciğer dokularına ait HE boyamalarının fotomikrograf görüntüleri. (E) HCC grubunun 6. haftasında dejenere yer yer displastik değişiklikler gösteren karaciğer dokusu (HEX150). (F) HCC grubunun 12. haftasında displastik değişiklikler gösteren karaciğer dokusu (HEX100). (G) HCC grubunun 18. haftasında karaciğer dokusunda displastik nodül oluşumu (HEX100).



Şekil 4.22. HCC+BB3 grubundaki sıçanların karaciğer dokularına ait HE boyamalarının fotomikrograf görüntüleri. (I) HCC+BB3 grubunun 6. haftasında neoplastik hücrelerde nükleer boyut değişikliği ve nükleus belirginliği (HEX150). (K) HCC+BB3 grubunun 12. haftasında ağır displastik nodülde belirgin nükleus ve şeffaflaşma gösteren hepatositler (HEX100). (L) HCC+BB3 grubunun 18. haftasında fibrotik değişiklikler gösteren karaciğer dokusu (HEX80).



Şekil 4.23. HCC+BB4 grubundaki sıçanların karaciğer dokularına ait HE boyamalarının fotomikrograf görüntüleri. (M) HCC+BB4 grubunun 6. haftasında diplastik ve neoplastik hücre grupları (HEX100). (N) HCC+BB4 grubunun 12. haftasında diplastik ve neoplastik hücre grupları (HEX100). (O) HCC+BB4 grubunun 18. haftasında trabeküler yapılar oluşturmuş tümör hücreleri (HEX100).



Şekil 4.24. HCC+DMSO grubundaki sıçanların karaciğer dokularına ait HE boyamalarının fotomikrograf görüntüleri. (H) HCC+DMSO grubunun 18. haftasında trabeküler yapılar oluşturmuş neoplastik karaciğer hücreleri (HEX100).

5. TARTIŞMA

Gelişmiş ülkelerdeki en önemli sağlık problemlerinden birisi HCC'dir ve insidansı bölgelere göre değişmektedir (150). Etiyolojisi birden çok faktöre bağlı olan HCC'nin tedavisi oldukça güçtür. HCC hepatositlerde malign transformasyona neden olan genetik değişiklikleri kapsayan çok basamaklı bir süreçtir. (151). HCC gelişimine neden olan moleküler mekanizma henüz tam olarak bilinmediği için prognozu oldukça zayıftır (150,152). Mortalitesi ve morbiditesi oldukça yüksek olan HCC'nin nedeni sıklıkla HBV ile HCV'nin oluşturduğu karaciğer hastalıkları ve sirozdur. Bunların yanı sıra alkol, sigara, yağlı karaciğer, demir fazlalığı, yüksek AFP, aflatoksin ve çeşitli kimyasallar da HCC'ye neden olan risk faktörleri arasında yer almaktadır (19).

Bu çalışmada nitrozaminler arasındaki en önemli çevresel karsinojenlerden biri ve karaciğer tümörünün primer indükleyicisi olan DEN, 18 hafta boyunca sıçanlara günlük dozu 100 ppm olacak şekilde içme suyu ile verilerek HCC oluşturuldu. Çalışmamızda kimyasal karsinojen olarak DEN'i kullanmamızın nedeni içme suyuna ilave edilen DEN'in 10-18 hafta boyunca tüketilmesi sonucunda HCC oluşumunun gözlenmesidir (143). DEN, mutasyona uğramış karaciğer hücrelerinin sayısının artmasına katkıda bulunan postnekrotik hepatosellüler çoğalmayı uyarır ve bu nedenle karaciğer çalışmalarında model olarak kabul edilir (153). Tessitore ve Bollita da karaciğere 200mg/kg DEN uygulamasının fibroz ve nekroza sebep olduğunu bildirmişlerdir (154). Bu çalışmada, apoptotik mekanizmanın bir belirteci olan kaspaz -3, -8, -9 enzim aktiviteleri ile apoptozisin fizyolojik uyarıcılarından Fas ve FasL düzeyleri; antioksidan kapasiteyi gözlemek amacıyla ile CAT ve SOD enzim aktiviteleri ile GSH, nitrit ve MDA düzeylerini saptadık.

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 (77). Çok sayıda farklı kaspaz enzimleri keşfedilmiş ve birçok molekülün bunların aktivitesini düzenlediği saptanmıştır. Moleküler apoptotik yol izi ile kaspazların organizmadaki fizyolojik ve patolojik rolleri arasında temel bir bağlantı vardır (155).

Bu çalışmamızda kaspaz bağımlı; mitokindriyal yol izi ya da kaspaz bağımsız; ölüm reseptörleri yol izi apoptotik yol izlerinin her ikisinin de ortak efektör kaspazı olan kaspaz-3 enzim aktivitesi kontrol, HCC ve HCC+BB3 gruplarında 6. haftada başlangıç kaspaz-3 enzim aktivitesine göre artmış, 12. haftada ise azalmıştır. 18. haftada HCC ve HCC+BB3 gruplarında anlamlı derecede artarken kontrol ve HCC+BB4 gruplarında ise bir farklılık gözlenmemiştir. Grupları kendi arasında karşılaştırdığımızda kaspaz-3 enzim aktivitesinde 12. haftada, sadece HCC+BB4 grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir. HCC'nin sonlandığı 18. haftada ise HCC+BB3 ve HCC+BB4 gruplarındaki kaspaz-3 enzim aktivitesi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır. Bu artış HCC+BB3 grubunda HCC+BB4 grubuna göre daha fazladır. BB3'ün BB4'e oranla apoptozisi daha fazla indüklediği düşünülebilir. Ayrıca kaspaz-3 enzim aktivitesinin HCC+BB3 grubunda HCC grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artışı saptanmıştır. HCC+DMSO grubunda HCC+BB3 ve HCC+BB4 gruplarına göre daha düşük kaspaz-3 enzim aktivitesi saptanmıştır. Bu sonuç ise BB3 ve BB4'ün apoptotik etkisinin, bu maddeleri çözmek için kullandığımız DMSO'dan kaynaklanmadığını göstermektedir.

Granado-Serrano ve ark'nın potansiyel bir hepatotoksik, karsinojen ve mutajen bir kimyasal olan DEN uygulayarak karaciğer toksisitesi oluşturdukları sıçanlarla yapmış oldukları çalışmalarında, bu çalışmamıza benzer şekilde kaspaz-3 aktivitesinde önemli bir artış saptamışlardır. DEN ile karaciğer hasarı oluşturulmuş grup, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında kaspaz-3 enzim aktivitesinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede arttığını gözlemlemişlerdir (156).

Bantel ve ark. apoptozisten sorumlu en önemli enzim olan kaspaz-3 ölçümünün, ilerleyen karaciğer fibrozu ile bir tutulan karaciğer hasarının tanımlanmasında hassas bir belirteç olduğunu vurgulamışlardır (157). Kang ve ark.'na benzer olarak Schmitz ve ark. da çalışmalarında karaciğer kanserinde yüksek apoptozis hızını göstermişlerdir (158).

Kang ve ark. DEN ile uyarılmış *in vivo* olarak hepatokarsinogenez oluşturulmuş yabanıl tip farelerde başlangıç dozu uygulanan kısa dönemli çalışmalarında apoptotik indeks (AI) yani TUNEL pozitif hücrelerin sayısı, kaspaz-3 mRNA ve Bax mRNA'sının karaciğerde arttığını gözlemlerken CYP2E1 eksik farelerde bu parametrelerde herhangi bir artış saptanmamıştır. DEN'in yüksek doz uygulamalarında

ise, DNA hasarının ve mutasyonların uyarıldığı ve HCC'nin ve hepatosellüler adenom'un (HCA) indüklendiği gözlenmiştir. Yabani tip farelerde CYP2E1 eksik farelerdekinden daha yüksek olan AI, DNA hasarının yabani tip farelerde daha fazla olduğunu göstermektedir. Bu olayların sonuçta malign veya benign tümörlerin oluşması ile sonuçlanan hepatokarsinogenezin başlaması ve ilerlemesinden sorumlu ilk adımlar olabileceğini vurgulamışlardır (153).

Grasl-Kraupp ve ark. yaşa bağlı kendiliğinden gelişen karaciğer kanseri çalışmalarında DNA replikasyon ve apoptozis hızlarının normal karaciğer (kontrol) < varsayılan preneoplastik odaklar < HCA < HCC olacak şekilde arttığını saptamışlardır. Araştırmacılar yapmış oldukları bu çalışma ile HCC oluşmuş sıçanlarda kontrol grubuna göre apoptozisin arttığını gözlemlemişlerdir (159).

Persad ve ark. farklı hepatoma hücre kültürlerinde ve cerrahi müdahale yapılan HCC'li hastalardan elde ettikleri dokularda yaptıkları çalışmada kaspaz-3'ün aşırı eksprese olduğunu bildirmişlerdir (160).

Sun ve ark. yapmış oldukları çalışmada HCC'de hücre apoptozisi ile kaspaz-3 ekspresyonu arasında bir korelasyon olmamasına rağmen, kaspaz-3 ekspresyon azalmasının HCC'nin oluşumuna katkıda bulunabileceğini bildirmişlerdir. Ayrıca kaspaz-3 ekspresyonunun HCC'deki AI'yi tek başına etkilemediğini gözlemlemişlerdir. Bu çalışmalarında 39 hastanın 21'inin (%53,8) kaspaz-3 transkriptlerini eksprese ettiklerini geriye kalanların ise kaspaz-3 ekspresyonu açısından başarısız olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca karaciğer dokularına komşu kanserli olmayan dokular HCC ile karşılaştırıldığı zaman daha fazla pozitif kaspaz-3 aktivitesi gösterdiğini saptamışlardır (161).

Apoptozis, DNA'nın parçalara ayrılmasına neden olan *downstream* kaspazların aktivasyonu ile sonuçlanan intrinsek ya da ekstrinsek yol izlerinden birinin uyarılması ile başlatılır. Ölüm reseptörü yol izi olarak da bilinen ekstrinsek yol izi, hücre yüzeyinde bulunan reseptöre liganının bağlanması sonucu uyarılır ve bu uyarılma daha sonra kaspaz-8'in aktivasyonuna neden olur (77).

Bu çalışmada ekstrinsek yol izinin *downstream* efektör kaspazı olan kaspaz-8 enzim aktivitesi zaman göre ele alınacak olursa, kaspaz-8 enzim aktivitesi 6. haftada kontrol, HCC ve HCC+BB3 gruplarında, başlangıç kaspaz-8 enzim aktivitesi olan 0. haftaya göre istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır. HCC ve HCC+BB3

gruplarında bu artışı 12. haftada bir azalma takip etmiştir. 18. haftada ise HCC+BB3 grubunda bir artış gözlenmiştir. Gruplar arası karşılaştırma yaptığımızda 6. ve 12. haftalarda kaspaz-8 enzim aktivitesinde gruplar arasında anlamlı bir fark gözlenmemektedir. 18. haftada kaspaz-8 enzim aktivitesi HCC ve HCC+BB3 grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede artarken HCC+DMSO grubunda ise HCC+BB3 grubuna göre anlamlı derecede azalmıştır. Bu bulgular ışığında kaspaz-8 aktivasyonunun bir çözücü olarak kullandığımız DMSO' dan değil benzimidazol türevi madde olan BB3'den ileri geldiğini belirtebiliriz.

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 intrinsek 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 intrinsek yol izinin başlatıcı kaspazı olan kaspaz-9'un aktivasyonuna neden olur (103).

Bu çalışmada kaspaz-9 enzim aktivitesi 6. haftada kontrol ve HCC grubunda en yüksek düzeye ulaşırken, bu artışı 12. haftada bir azalma takip etmiştir. Kontrol grubunda 12. ve 18. haftalarda 6. haftaya göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenmiştir. HCC+BB3 grubunda 18. haftada 0. haftaya göre anlamlı bir artış gözlenmiştir. HCC+BB4 grubunda 18 hafta süresince kaspaz-9 enzim aktivitesi değişmemiştir. Grupları kendi arasında karşılaştırdığımızda 6. haftada HCC+BB3 ve HCC+BB4 grupları kaspaz-9 enzim aktivitesi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır. 12. haftada HCC ve HCC+BB3 gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma gözlenirken, HCC+BB4 grubunda ise HCC ve HCC+BB3 gruplarına göre anlamlı bir artış gözlenmiştir. HCC gelişiminin tamamlandığı 18. haftada en yüksek kaspaz-9 aktivitesi HCC+BB4 grubunda gözlenmesine rağmen gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. HCC+BB4 grubunda HCC+BB3'e göre daha yüksek kaspaz-9 enzim aktivitesi bulunması intrinsek yol izinde BB4'ün BB3'den daha çok etkili olduğunun bir göstergesi olabilir.

HCC'de Fas/FasL sistemi ile apoptozis yol izinin önemi henüz tam olarak bilinmemektedir. TNF reseptör ailesinin transmembran reseptörlerinden biri olan Fas, ligandı olan FasL'ye bağlandığı zaman apoptotik sinyali hücelere iletir (162). HCC'nin de içinde bulunduğu kanser hücrelerinde Fas ve FasL ekspresyonu önemli bir rol oynamaktadır ve kanserli hastaların prognozuyla ilişkilidir. Fas ekspresyon düzeyi, zayıf farklılaşma gösteren ve büyük boyutta HCC hücrelerinde önemli bir azalma gösterir. Karsinoma hücrelerindeki FasL ekspresyonu sadece kısmen veya zayıf farklılaşma gösteren durumlarda gözlenmektedir (163). İyi farklılaşmış tümörlerde görülen belirgin Fas ekspresyonunun, artmış apoptozisin göstergesi olarak, tümörün büyümesini yavaşlattığı düşünülmektedir. Buna uygun davranmayan tümörlerde ise bu durum kendiliğinden oluşan apoptozise bağlı olabileceği düşünülmektedir (164).

Bu çalışmada 0., 6., 12. ve 18. haftalarda kontrol grubunda Fas ekspresyonu % 100 negatif, HCC grubunda sırasıyla % 83.3, % 83.3 ve % 50 Fas (+) pozitif, HCC+BB3 grubunda tüm haftalarda Fas ekspresyonu % 100 (+) pozitif, HCC+BB4 grubunda sırasıyla Fas ekspresyonu % 100, % 80 ve % 100 (+) pozitif olarak saptanmıştır. DMSO grubunda ise 18. haftada % 100 (+) olarak gözlenmiştir. Gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında ise fas ekspresyonu HCC, HCC+BB3 ve HCC+BB4 grupları kontrole göre artmıştır. Fas ekspresyonu hem HCC'de hem de BB3 ve BB4 uygulanan sıçanlarda arttığı gözlenmiştir. Özellikle 18. haftada HCC grubundaki sıçanlarda Fas ekspresyonu % 33,3 (++) pozitif ve % 16,7 (+++) pozitif olarak saptanmıştır.

FasL ekspresyonu da kontrol grubunda tüm haftalarda % 100 negatiftir. HCC, HCC+BB3 ve HCC+BB4'de FasL ekspresyonu zaman içerisinde artmıştır. Gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında FasL ekspresyonu HCC, HCC+BB3 ve HCC+BB4 gruplarında kontrole göre artmıştır.

Fukuzawa ve ark.'ları yapmış oldukları bir çalışmada normal karaciğer dokularında Fas ve FasL ekspresyonunu gözlemlememişlerdir. HCV ile enfekte olmuş kronik hepatitli hastalarda ve karaciğer sirozunda Fas ekspresyonu hücre zarında veya hepatositlerin sitoplazmada gözlemişlerdir. Fas ekspresyonu inflamasyonun genişliği ile arttığını saptamışlardır. Diğer taraftan hem Fas hem de FasL'nin sadece kanserli karaciğer hücrelerinde değil, aynı zamanda çevredeki çok zayıf değişim gösteren HCC hücrelerinin haricindeki hücrelerde de ifade olduğu görülmüştür. HCC'de apoptozis,

Fas/FasL ekspresyonunun baskılanmasıyla ya da bazen de FasL ekspresyonunun artmasıyla düzenlenebileceğini savunmuşlardır (165). Bugüne kadar yapılan bazı çalışmalarda ise Fas reseptör ekspresyonuna rağmen HCC'li hücrelerin Fas aracılı apoptozise karşı dirençli olduğu bulunmuştur (166).

Ito ve ark. HCC hastalarındaki yükselmiş Fas ve FasL ekspresyonu bu iki belirtecin prognostik açıdan değerli olduğunu bildirmişlerdir (167). Fas/FasL baskılanmasının; metastaz, malignansi ve HCC oluşumu ile ilişkili olduğu saptanmıştır (165). Chen ve ark. yapmış oldukları çalışmada, insan hepatoma hücrelerinde FasL'nin apoptozisi indüklediği ve bu hücrelerin Fas/FasL yoluyla apoptotik aktivite gösterdikleri vurgulanmıştır (162).

Kubo ve ark. yapmış oldukları çalışmada HCC dokularında Fas, FasL ekspresyonunun bu dokulara komşu olan ve tümörlü olmayan karaciğer dokularındaki Fas, FasL ekspresyonundan önemli derecede düşük olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmaları ile Fas sisteminin HCC apoptozisinde önemli olmadığını vurgulamışlardır. Fas ve FasL ekspresyonunun tümörlü olmayan karaciğer dokuları ile karşılaştırıldığında HCC'de baskılandığını ve ekspresyondaki bu farkın HCC progresyonu ile ilişkili olabileceği vurgulanmıştır (168).

Higaki ve ark. yapmış oldukları çalışmada, Tsugena ve ark'na (169) benzer olarak, normal karaciğer dokusu, kronik hepatit veya kronik sirozlu dokular gibi HCC'li olmayan bütün dokularda Fas ekspresyonu olduğunu ve bu ekspresyonun sadece sitoplazmada değil aynı zamanda yüzeyde de olduğunu gözlemlemişlerdir. Tsugeno ve ark.'nın HCC dokularında Fas ekspresyonunu gözlemlemeleri ilk çalışma olsa da Higaki ve ark.'nın bulmuş oldukları sonuçlar bunu onaylamaktadır. Bu bulgulara göre; HCC dokularında Fas ekspresyonu olsa da bu ekspresyon yoğunluğu ve sıklığı HCC'li olmayan dokulardakine göre daha düşük düzeyde ve genellikle sitoplazmada olmaktadır (170).

Fas/FasL sisteminin karaciğer apoptozisinde, kaspaz-3 aktivasyonuna neden olan en önemli yol izlerinden biri olduğunu ileri sürmüştür (171). Bunların yanı sıra primer hepatosit kültüründe yapılan çalışmada, Fas/FasL sisteminin hepatositlerde kaspaz-3, -7 ve -9'un aktivasyonunu tetikleyerek kaskadın ilerlemesine ve apoptozise neden olduğu gösterilmiştir (172,173).

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 (174).

DEN ile HCC oluşturduğumuz bu çalışmada önemli bir antioksidan olan GSH düzeyi incelendiğinde kontrol grubunda HCC oluşum sürecinde zaman içinde GSH düzeyinin arttığını görüyoruz. HCC ve HCC+BB4 grubunda zaman içinde GSH düzeyi değişmezken, HCC+BB3 grubunda 12. ve 18. haftalarda 6. haftaya göre bir artış gözlenmiştir. Gruplar arası GSH düzeylerini karşılaştırdığımızda ise 6. haftada gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. 12. haftadan itibaren HCC grubu GSH düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalmıştır. HCC+BB3 ve HCC+BB4 grubu GSH düzeyleri ise HCC grubuna göre artmıştır. Çalışmanın sonlandığı 18. hafta ise HCC+BB3 ve HCC+BB4 grubu GSH düzeyleri HCC grubuna göre artmış bulunurken, HCC+BB4 grubu GSH düzeyleri ayrıca kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalmıştır. 18. haftada HCC ve HCC+DMSO grupları ise kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır.

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 ($p>0.05$). Lipit peroksidasyonunun artması sonucu GSH'nin konjuge bileşiklerinin oluşması ve glutatyon redüktaz aktivitesinin azalmasına sebep olabilir. Bazı araştırmacılar yapmış oldukları çalışmalarında oksidatif strese bağlı olarak dokularda GSH düzeylerinde azalma gözlemlerken, bazı araştırmacılar ise oluşan hasarın GSH düzeylerini değiştirmede hatta arttırabileceğini belirtmişlerdir. GSH düzeylerindeki bu azalmalar istatistiksel olarak anlamlı olmasa da, bu azalma dokuların oksidatif strese karşı bir tepkisi olabileceğini düşünmüşlerdir (175).

Granado-Serrano ve ark.'nın yapmış oldukları çalışmada DEN uygulanmış grupta bir serbest radikal temizleyicisi olan GSH miktarı kontrol grubuna göre önemli oranda azalmıştır (156).

SOD aktivitesini HCC sürecinde tüm grupları kendi içinde zamana bağlı olarak değerlendirdiğimizde HCC, HCC+BB3 ve HCC+BB4 gruplarında 6. haftada 0. haftaya göre anlamlı bir artış gözlenmiştir. Kontrol grubunda 12. ve 18. haftalarda 0. ve 6.

haftalara göre anlamlı bir azalma saptanmıştır. HCC grubunda 6. haftadaki SOD aktivitesi 0. haftaya göre anlamlı derecede artarken, 12. haftada ise 6. haftaya göre anlamlı derecede azalmıştır. HCC+BB3 grubunda 6. haftada 0. haftaya göre anlamlı derecede artarken, 12. haftada 6. haftaya ve 18. haftada ise 0. ve 6. haftaya göre önemli bir azalma saptanmıştır. HCC+BB4 grubunda 6. haftada 0. haftaya göre önemli miktarda artan SOD aktivitesi, 12. haftada 6. haftaya göre anlamlı miktarda azalmıştır. 18. haftada ise 0., 6. ve 12. haftalara göre anlamlı derecede azalmıştır. Gruplar arasında SOD aktivitesini karşılaştırdığımızda 12. haftada SOD aktivitesinde anlamlı farklılıklar gözlenmemiştir. 6. haftada HCC+BB3 ve HCC+BB4 grupları başlangıç miktarına göre anlamlı derecede artmıştır. HCC sürecinin tamamlandığı 18. hafta sonunda ise HCC grubu SOD aktivitesi kontrol grubuna göre anlamlı derecede artmıştır. HCC+BB3 ve HCC+BB4 grupları kontrol grubuna göre anlamlı olarak artarken, HCC grubuna göre anlamlı derecede azalmıştır. HCC+DMSO grubu ise kontrol, HCC+BB3 ve HCC+BB4 grubuna göre anlamlı derecede artmıştır. ROT hidrolizini sağlayan SOD enzim aktivitesinin BB3 ve BB4 maddesi uygulanan sıçanlarda düşük bulunması bu maddelerin ortamdaki ROT'ları azalttığı yönündedir. DMSO grubundaki artış ise bu etkilerin BB3 ve BB4'ün kendilerine özgü olduğunu düşündürmektedir.

Karaciğer dokularında çok miktarda bulunan CAT, hidrojen peroksidin oksijen ve suya indirgenmesinde önemli, birincil antioksidan enzimlerden biridir. Karahan ve ark. özellikle karaciğer dokusunda ve DEN verilen grupta kontrol grubuna göre CAT aktivitesinin istatistiksel olarak önemli düzeyde ($p<0,01$) azaldığını tespit etmişlerdir. CAT aktivitesindeki bu azalma, dokularda katalazın reaktif oksijen radikallerine karşı koruyucu bir etkinlik oluşturduğunu savunmuşlardır (175). Benzer olarak Granada-Serrano ve ark.'nın yapmış oldukları çalışmada DEN uygulanmış grupta CAT aktivitesi kontrol grubuna göre önemli derecede azalmıştır (156).

Bu çalışmada zamana bağlı olarak grupların kendi içindeki CAT enzim aktivitesi incelendiğinde, kontrol grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir. HCC grubunda 6. ve 18. haftada başlangıç CAT aktivitesine göre anlamlı bir artış var iken, 12. haftada ise 6. haftaya göre anlamlı bir azalma gözlenmiştir. HCC+BB3 grubunda 6. haftada 0. haftaya göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir. 12. haftada ve 18. haftada ise 6. haftaya göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenmiştir. Benzer olarak HCC+BB4 grubunda da 6. haftada 0. haftaya göre anlamlı

bir artış ile 12. ve 18. haftalarda 6. haftaya göre bir azalma gözlenmiştir. Gruplar arası karşılaştırmada 6. hafta HCC ve HCC+BB3 grubu CAT enzim aktiviteleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. 12. haftada ise HCC+BB3 grubunda HCC grubuna göre anlamlı düzeyde bir azalma gözlenmiştir. 18. haftada HCC grubu CAT enzim aktiviteleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermiştir. 18. haftada HCC+BB3 ve HCC+BB4 grubu CAT aktiviteleri ise HCC grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma göstermektedir. 18. haftada HCC+DMSO grubu kontrol grubuna, HCC+BB3 ve HCC+BB4 gruplarına göre anlamlı derecede artmıştır.

Suda çözünen ve dayanıklı olmayan renksiz bir gaz olan NO'nun yarılanma ömrü çok düşüktür. Bu nedenle kanda hızlıca nitrit ve nitrata dönüşür. Kandaki asıl dayanıklı metaboliti nitrat olan NO, bir serbest radikal olmasından dolayı oldukça reaktiftir ve oksijen radikalleri ile etkileşerek onları etkisizleştirebilir. Bu özelliği ile bir antioksidan gibi davranan NO hücre koruyucusu olarak görev yapmaktadır. Bunun yanı sıra; O₂⁻ anyonu ile NO'nun etkileşmesi sonucunda biyolojik moleküller olan nükleik asit, lipitler ve proteinler üzerinde toksik etki gösteren güçlü bir oksidan olan ONOO⁻ oluşur. Peroksinitrit ve onun parçalanma ürünleri lipit peroksidasyonu sonucu hücre hasarının oluşumuna neden olur (139).

Bu çalışmada nitrit düzeyleri kontrol grubunda çalışma sürecinde anlamlı bir değişiklik göstermemiştir. HCC grubunda 6. haftada başlangıç nitrit düzeyine göre anlamlı bir artış gözlenirken, 12. haftada ise başlangıç ve 6. haftadakine göre anlamlı derecede azalmıştır. 18. haftada ise 6. haftaya göre anlamlı derecede azalmıştır. HCC grubunda gözlenen sonuçlara benzer şekilde HCC+BB3 grubu nitrit düzeyleri 12. haftada 0. ve 6. haftaya göre anlamlı derecede azalırken, 18. haftada da 6. haftaya göre anlamlı derecede azalmıştır. HCC+BB4 grubunda ise 6. haftada başlangıç nitrit düzeyine göre anlamlı bir artış gözlenirken, 12. ve 18. hafta nitrit düzeyleri de 6. haftaya göre düşük bulunmuştur. Gruplar arası değerlendirme yaptığımızda nitrit düzeylerinde hiçbir haftada istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır.

DEN uygulanmasının lipit peroksidasyonunu arttırdığı ve buna bağlı olarak fare karaciğerinde apoptotik yanıtın arttığını bildiren çalışmalarda mevcuttur (174).

Chodon ve ark. yapmış oldukları çalışmada DEN uygulanmış sıçanlarda karaciğerdeki lipit peroksidasyonu'nun kontrol grubuna göre önemli derecede arttığını

bildirmişlerdir ($p<0.001$). Sıçanlara DEN uygulaması lipit peroksidasyonu ile sonuçlandığı ve karaciğerin proneoplastik nodüllerinde kemoluminesansı arttığı ve aktive oksijen türlerinin oluşumuna neden olduğu bildirilmiştir (176).

Lipit peroksidasyonunun bir göstergesi olarak incelediğimiz MDA düzeyleri kontrol ve HCC+BB4 gruplarında zaman içinde değişiklik göstermemiştir. HCC grubunda ise 6. haftada artmış 12. haftada azalmış ve 18. haftada tekrar bir artış göstermiştir. HCC+BB3 grubu MDA düzeylerinde ise 6. haftada 0. haftaya göre anlamlı bir artış gözlenirken, 12. haftada ise 6. haftaya göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenmiştir. Doku MDA düzeyleri, gruplar arasında karşılaştırıldığında 6. haftada HCC grubu kontrol grubuna göre anlamlı derecede artış gösterirken, 12. hafta hiçbir grupta farklılık bulunmamıştır. 18. haftada HCC grubu kontrol grubuna göre anlamlı derecede artarken, HCC+BB4 grubu da HCC grubuna göre anlamlı derecede azalmıştır. HCC+DMSO grubunda ise kontrol, HCC, HCC+BB3 ve HCC+BB4 gruplarına göre istatistiksel olarak daha yüksek MDA düzeyleri gözlenmiştir.

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 artma, GSH düzeyleri ile CAT gibi antioksidan enzim aktivitelerinde ise azalma olduğunu görmüşlerdir. Karaciğer MDA düzeylerinin DEN verilen grupta kontrol grubuna göre önemli oranda ($p<0.001$) arttığı bildirilmiştir (175). Pek çok çalışmada farklı nitrozaminlerin karaciğer başta olmak üzere çeşitli dokularda lipit peroksidasyonuna neden olduğu bildirilmektedir (177,178).

Farklı kimyasal karsinojenler, karaciğerin farklı bölgelerinde aktive olurlar ve HCC gelişiminden önce farklı hücrel çoğalma şekillerine neden olur. Bu farkın temeli, çoğunlukla farklı karsinojenlerin karaciğer lobüllerinin farklı bölgelerinde aktive olmasına dayanır. Doğada çeşitli ve yaygın olarak bulunan karsinojenik bileşiklerden biri olan DEN büyük çoğunlukla karaciğer lobüllerinin bölge III (perisentral) bölgede etkisini gösterir. (179)

Histopatolojik incemeler sonucunda kontrol gruplarındaki sıçanlarda normal karaciğer dokusu gözlemlendi. HCC grubunda 6., 12. ve 18. hafta süresince progresif bir

şekilde HCC oluşturğu gözlemlendi. HCC+BB3 grubunda 6. haftanın sonunda kurifiye edilen sıçanların karaciğer dokusunda fibroz, siroz ve neoplastik hücrelerde nükleer boyut değışikliğı gözlemlendi. 12. haftanın sonunda, siroz ve displastik nodüller gözlemlendi. 18. haftanın sonunda ise karaciğer dokuları rejenere olarak portal fibroz, prefibroz ve siroz gözlemlendi. BB3 maddesinin HCC oluşumunu engellediğı ve bu gruptaki sıçanların siroz aşamasında durduğı saptandı. HCC+BB4 grubunda 6., 12. ve 18. haftada siroz, displastik nodüller ve tümör hücreleri gözlemlendi. BB4 maddesinin tümör oluşumunu engellemediğı saptandı. HCC+DMSO grubundaki sıçanlarda 18. haftanın sonunda trabeküler yapılar oluşturmuş neoplastik karaciğer hücreleri gözlemlendi. Bu bulgular DMSO çözücüsünün HCC oluşumunda etkin bir işleve sahip olmadığını göstermektedir.

Benzimidazolu de içine alan heterosiklik bileşiklerin sentezi ve biyolojik değeriendirilmesi son dönemlerde yapılan çalışmaların önemli bir kısmını oluşturmaktadır (180). Benzimidazol türevleri, antitümör ve antiinflamatuar aktiviteler göstermektedir. Abdelwareth ve ark *N*-acetylaminothiazolo[3,2- α]benzimidazole-2-carbonitrile maddesi ile yapmış oldukları çalışmada, bu benzimidazol türevi maddenin antitümör etkisini apoptozisi aktive etmesi yoluyla gösterdiğini bildirmişlerdir. Yapılan çalışmada bu maddenin önemli derecede antiproliferatif etkisi olduğunu ve hücre döngüsünü G2/M fazında durdurup zamana bağılı olarak apoptozisi indüklediğini göstermişlerdir (129).

Bu çalışmamızda, BB3 maddesinin HCC oluşumunu engellediğini histopatolojik incelemeler sonucunda saptamış bulunmaktayız.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

HCC oluşumu sırasında apoptozis yol izi ve bazı benzimidazol türevlerinden BB3 ve BB4'ün bu oluşum üzerine etkilerini gözlemek amacı ile gerçekleştirdiğimiz bu çalışmamızda; gruplar hem kendi içinde zamana bağlı olarak; hem de 6., 12. ve 18. haftalarda birbirleri ile karşılaştırıldı.

HCC grubunda, apoptotik yol izinin göstergesi olan kaspaz-3, -8 ve -9 enzim aktivitelerinin HCC oluşum sürecinde 6. haftada artarken, 12. haftada azaldığı gözlemlendi. HCC sürecinin tamamlandığı 18. haftada kaspaz-3 enzim aktivitesinde 0. ve 12. haftaya göre yüksek bir değer elde edildi. 0. hafta ile karşılaştırıldığında Fas ve FasL ekspresyonunun zamana bağlı olarak arttığı saptandı. Tümör hücrelerinin karakteristik özelliği olan sürekli ve kontrolsüz hücre çoğalmasının, kanserin ilerlemesinde ve hücre döngüsünün bozulmasında önemli bir rol oynadığı ve proliferasyon/apoptozis arasındaki dengenin proliferasyon yönünde olduğu bilinmektedir. Bu çalışmamızda farklı olarak her ne kadar HCC oluşum sürecinde apoptozis artsa ve daha sonra azalsa da son aşamada, 18. haftada kaspaz-3 enzimi 0. ve 12. haftadan yüksek bulunmuştur. HCC oluşum sürecinde ROT ekspresyonunun 6. haftada arttığı, 12. haftada azaldığı, daha sonra ise tekrar arttığı gözlenmiştir.

BB3 zamana bağlı olarak kaspaz-3 ve -8 enzim aktivitelerini 6. haftada arttırmış 12. haftada azaltmış ve 18. haftada ise tekrar arttırmıştır. Benzer artış ve azalmalar kaspaz -9'da da saptandı fakat bu değerler istatistiksel olarak anlamlı değildi. BB3, kontrol ile karşılaştırıldığında Fas ve FasL ekspresyonunu arttırmıştır. Apoptozis belirteçlerindeki bu artma ve azalmalar HCC grubuna benzer şekilde olmasına rağmen HCC ile karşılaştırıldığında HCC+BB3 grubunda bu artış daha fazlaydı. BB3 18. haftada HCC'de artan oksidatif stres ve lipid peroksidasyonunu; GSH düzeyini arttırarak, SOD ve CAT enzim aktivitelerini azaltarak ve MDA düzeyini düşürerek kısmi bir şekilde azaltmıştır.

BB4 maddesi ise zamana bağlı olarak sadece kaspaz-3 enzimini kontrol grubuna karşı arttırmıştır. Kontrol ile karşılaştırıldığında Fas ve FasL ekspresyonunu arttırmıştır. HCC grubu ile karşılaştırıldığında 12. haftada kaspaz -3 ve -9'u arttırmıştır. HCC

oluşum sürecinde SOD ve CAT enzim aktiviteleri ile nitrit düzeyleri 6. haftada artmış 12. haftada azalmıştır. BB4, 18. haftada HCC'de artan oksidatif stres ve lipid peroksidasyonunu GSH düzeyini arttırarak ve SOD ve CAT enzim aktivitelerini azaltarak ve MDA düzeyini düşürerek kısmi bir şekilde azaltmıştır.

BB3 ve BB4'ün çözünürlüğünü sağlamak amaçlı kullanılan DMSO'nun bu maddelerin etkileri üzerine bir katkısı olmadığı saptanmıştır.

Histopatolojik incelemeler sonucunda, deneysel HCC oluşumunun sağlandığı ve progresif bir şekilde gelişen HCC'nin BB3 ile engellendiği gözlenmiştir. HCC+BB3 grubundaki sıçanlarda 12. haftada gözlenen ağır displastik nodüller, belirgin nükleus ve şeffaflaşma gösteren hepatositler, 18.haftada ise fibrotik değişikliklere veya siroza dönüşmüştür. BB4 ve DMSO ise HCC oluşumunu engelleyememiştir.

Bu sonuçlar ışığında; BB3'ün HCC oluşumunu engellemesi, apoptozisi indüklemesi ve antioksidan kapasiteyi arttırması, BB3'ün HCC tedavisinde umut verici bir yaklaşım olabileceği öne sürülebilir.

7. KAYNAKLAR

1. **Marrero JA.** Hepatosellüler karsinom. *Curr Opin Gastro*, **2006**; 22: 248-253.
2. **Calvisi DF, Pinna F, Pellegrino R, Sanna V, Sini M, Daino L, Simile MM, De Miglio MR, Frau M, Tomasi ML, Seddaiu MA, Muroli MR, Feo F, Pascale RM.** Ras-driven proliferation and apoptosis signaling during rat liver carcinogenesis is under genetic control. *Int J Cancer*, **2008**; 123(9): 2057-64.
3. **Kaufmann SH, Gores GJ.** Apoptosis in cancer: cause and cure. *BioEssays*, **2000**; 22: 1007-1017.
4. **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.
5. **Reed JC.** Mechanisms of Apoptosis. *Am J Pathol*, 2000; 157: 1415-1430.
6. **Vaux DL, Haecker G, Strasser A.** An evolutionary perspective on apoptosis. *Cell*, **1994**; 76: 777-9.
7. **Thompson CB.** Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, **1995**; 267:1456-62.
8. **Alles A, Alley K, Barrett JC, Buttyan R, Columbano A, Cope FO, Copelan EA, Duke RC, Farel PB, Gershenson LE, et al.** Apoptosis: a general comment. *Faseb J*, **1991**; 5: 2127-8.
9. **Cabadak H.** Hücre siklusu ve kanser. *ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, **2008**; 9(3): 51-61
10. **Lopez-Saez JF, de la Torre C, Pincheire J, Gimenez-Martin G.** Cell proliferation and cancer. *Histopathol*, **1998**; 13: 1197-1214.
11. **Rew DA, Wilson GD.** Cell production rates in human tissues and tumours and their significance. Part II: clinical data *Eur. J. Surg. Oncol*, **2000**; 26(4): 405-417.
12. **Boiani M, Gonzalez M.** Imidazole and benzimidazole derivatives as chemotherapeutic agents. *Mini-Rev Med Chem*, **2005**; 5: 409.
13. **Spasov AA, Yozhitsa IN, Bugaeva LI, Anisimova VA.** Benzimidazole derivatives: Spectrum of pharmacological activity and toxicological properties (a review). *Pharmaceutical Chemistry Journal*, **1999**; 33:6-17.

14. **Karabulut A.** Bazı 2-sübstitüe benzimidazol türevi bileşiklerin sentezi ve anjiyojenez üzerine olan etkilerinin araştırılması. Yüksek lisans tezi, Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mersin, **2009**.
15. **Göksoy E, Kapan M.** Karaciğerin primer habis tümörleri. *Hepato-Bilier Sistem ve pankreas Hastalıkları Sempozyum dizisi*, **2002**; 28: 159-182.
16. **Nazlıgül Y, Uzuköy A.** Karaciğer primer malign tümörlerine genel bakış. *Genel Tıp Dergisi*, **2006**; 16(1): 43-48.
17. **Demirci S, Çakmaklı S, Çetin R.** Karaciğer tümörleri ve cerrahi tedavi prensipleri. *Temel Klinik Tıp Bilimleri*, **1993**; 15.
18. **Ökten A.** Türkiye’de kronik hepatit, siroz ve hepatosellüler karsinoma etiyojisi. *Güncel Gastroenteroloji*, **2003**; 7/3.
19. **Gish RG.** Hepatosellüler karsinom: hastalığın tedavisinde zorlukların aşılması. *Clin Gastroenterol H*, **2006**; 1: 61-72.
20. **Panga R, Tsea E, Poon RTP.** Molecular pathways in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett*, **2006**; 240(2): 157-169.
21. **DeVita VT, JrS Hellman, Rosenberg SA.** *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. 5th Edition, Lippincott-Raven, Philadelphia, **1997**; section 5 Hepatobiliary cancers.
22. **Quaglia A, Bhattacharya S, Dhillon AP.** Limitation of the histopathological diagnosis and prognostic assessment of hepatocellular carcinoma. *Histopathology*. **2001**; 38: 167-174.
23. **Czekaj P.** Molecular and cellular mechanisms of chemically induced hepatocarcinogenesis. *Pol J Environ Stud*, **2004**;13: 477-486.
24. **Moradpour D, Blum HE.** Pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, **2005**; 17: 477-483.
25. **Lippincott Williams and Wilking.** A Wolters cancer, principles and partige of oncology. 6th ed. Kluwer Company, **2001**; 52 treatment of metatstatic cancer section 3: 1162-1187.
26. **Little SA, Fong Y.** Hepatocellular carcinoma: current surgical management. *Semin Oncol*, **2001**; 28(5): 474-86.
27. **Yıldırım Y, Özyılkan Ö, Karakayalı H, Haberal M.** Hepatosellüler karsinomda tedavi yaklaşımları. *International Journal of Hematology and oncology*, **2008**; 4 (18): 248-253.

28. **Bialecki ES, DiBisceglie AM.** Clinical presentation and natural course of hepatocellular carcinoma. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, **2005**;17:485-489.
29. **Coakley FV, Schwartz LH.** Imaging of hepatocellular carcinoma: a practical approach. *Semin Oncol*, **2001**; 28(5): 460-73.
30. **Bergsland EK.** Molecular mechanisms underlying the development of hepatocellular carcinoma. *Semin Oncol*, **2001**; 28(5): 521-31.
31. **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.
32. **Kountouras J, Zavos C, Chatzopoulos D.** Apoptosis in hepatitis C. *J Viral Hepatitis*, **2003**; 10: 335-342.
33. **Sarioğlu S, Ataman Ş.** Apoptoz. *T Klin FTR*, **2003**; 3: 37-44
34. **Özcan A, Atakişi E.** Apoptozisin Biyokimyasal Önemi. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.* **2003**; 9(1): 95-100.
35. **Tomatır AG.** Apoptoz: Programlı Hücre Ölümü. *T Klin Tıp Bilimleri*, **2003**; 23: 499-508.
36. **Nagata S.** Fas ligand-induced apoptosis. *Annu Rev Genet*, **1999**; 33: 29-55.
37. **Toubi E, Shoenfeld Y.** Protective autoimmunity in cancer. *Oncol Rep*, **2007**; 17(1): 245-51.
38. **Ovalı E.** Apoptozis. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. *Güneş Kitabevi*, **1999**; 197-203.
39. **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>.
40. **Akşit H, Bildik A.** Apoptozis. *YYÜ. Vet. Fak. Derg.* **2008**; 19(1): 55-63.
41. **Yıldırım-Sözmen E.** Bölüm XII: Hücre büyümesi, farklılaşması ve kanser. İnsan Biyokimyası Kitabı. 2. baskı, Ankara: NobelTıp, **2006**: 547-587.
42. **Russo GL, Russo M.** Ins and outs of apoptosis in cardiovascular diseases. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis*, **2003**; 13: 291-300.

43. **Abbro L, Dini L.** Common morphological features of apoptotic cell blebs. *Ital J Zool*, **2003**; 70(4): 297-299.
44. **Majno G, Joris I.** Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol*, **1995**; 146: 3–15.
45. **Rao L, Perez D, White E.** Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis. *J Cell Biol*, **1996**; 135: 1441–1455.
46. **Ziegler U, Groscurth P.** Morphological features of cell death. *News Physiol Sci*, **2004**; 19: 124-8.
47. **Rosenblatt J, Raff MC, Cramer LP.** An epithelial cell destined for apoptosis signals its neighbors to extrude it by an actin- and myosin-dependent mechanism. *Curr Biol*, **2001**; 11: 1847–1857.
48. **Hengartner MO.** Apoptosis: corralling the corpses. *Cell*, **2001**; 104: 325–328.
49. **Fadok VA, Bratton DL, Frasch SC, Warner ML, Henson PM.** The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death Differ*, **1998**; 5(7):551-562.
50. **Fink SL, Cookson BT.** Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect Immun*. **2005**;73(4):1907-16.
51. **Öktem S, Özhan MH, Özol D.** Apoptozisin Önemi. *Toraks Dergisi*, **2001**;2(1):91-95.
52. **Green DR.** Apoptotic pathways: the roads to ruin. *Cell*. **1998**; 18; 94(6): 695-8.
53. **Gastman BR.** Apoptosis and its clinical impact. *Head Neck*, **2001**; 23(5): 409-25.
54. **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.
55. **Dash P.** Basic Medical Sciences, *St. George's, University of London*. www.sgul.ac.uk/dept/immunology/~dash
56. **Grutkoski PSCC, Albina J, Biffi W.** Apoptosis in the critically ill, In: Fink MP, Vincent JL, Kochanek PM, eds. *Textbook of Critical Care*, 5th ed. **2005**;195–201.
57. **Vander Heiden MG, Chandel NS, Williamson EK.** Bcl-xL regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. *Cell*, **1997**;91: 627–637.
58. **Hengartner MO.** The biochemistry of apoptosis. *Nature*, **2000**; 407(6805):770-6.

59. **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.
60. **Ashkenazi A, Dixit VM.** Death receptors: signaling and modulation. *Science*, **1998**; 281:1305-8.
61. **Itoh N, Yonehara S, Ishii A, Yonehara M, Mizushima S.** The ploypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell*, **1991**; 66: 233-43.
62. **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.
63. **Bao Q, Shi Y.** Apoptosome: a platform for the activation of initiator caspases. *Cell Death and Differentiation*, **2007**; 14: 56–65.
64. **Ganten TM, Koschny R, Haas TL, et al.** Proteasome inhibition sensitizes hepatocellular carcinoma cells, but not human hepatocytes, to TRAIL. *Hepatology*, **2005**; 42: 588–97.
65. **Takehara T, Hayashi N.** Fas and fas ligand in human hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol*. **2001**; 36(10): 727-8.
66. **Ogasawara J, Watanabe-Fukunaga R, Adachi M.** Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. *Nature* **1993**; 364: 806–9.
67. **Guicciardi ME, Gores GJ.** Apoptosis: a mechanism of acute and chronic liver injury. *Gut*, **2005**; 54: 1024–33.
68. **Breitkopf K, Godoy P, Ciucian L, et al.** TGF-beta/Smad signalling in the injured liver. *Z Gastroenterol*, **2006**; 44: 57–66.
69. **Szegezdi E, Fitzgerald U, Samali A.** Caspase-12 and ER-stressmediated apoptosis: the story so far. *Ann NY Acad Sci*, **2003**; 1010:186–194.
70. **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.
71. **Morishima NNK, Takenouchi H, Shibata T.** An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. *J Biol Chem*, **2002**; 277(37):34287–34294.
72. **Ito Y, Pandey P, Mishra N.** Targeting of the c-Abl Tyrosine kinase to mitochondria in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *Mol Cell Biol*, **2001**; 21(18):6233–6242.

73. **Cho SG, Choi EJ.** Apoptotic signaling pathways: caspases and stress-activated protein kinases. *J Biochem Mol Biol.* **2002**; 35(1): 24-7.
74. **Cohen GM.** Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J*, **1997**; 326 :1-16.
75. **Ellis RE, Yuan JY, Horvitz HR.** Mechanisms and functions of cell death. *Annu Rev Cell Biol*, **1991**; 7: 663-98.
76. **Nicholson DW, Thornberry NA.** Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci.* **1997**; 22(8): 299-306.
77. **Chowdhury I, Tharakan B, Bhat GK.** Caspases - an update. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* **2008**; 151(1): 10-27.
78. **Zimmermann KC, Bonzon C, Green DR.** The machinery of programmed cell death. *Pharmacol Ther*, **2001**; (92): 57-70.
79. **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.
80. **Nicholson DW.** Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ*, **1999**;6(11):1028-42.
81. **Villa P, Kaufmann SH, Earnshaw WC.** Caspases and caspase inhibitors. *Trends Biochem Sci*, **1997**; 22(10): 388-93.
82. **Krajewska M, Kim H, Shin E, Kennedy S, Duffy MJ, Wong YF, Marr D.** Tumor-associated alterations in caspase-14 expression in epithelial malignancies. *Clin Cancer Res*, **2005**, 11: 5462-5471.
83. **Yuan CQ, Ding ZH.** Structure and function of caspases. *Guowai Yixue Fenzi Shengwuxue Fence*, **2002**; 24: 146-151.
84. **Tiso N, Pallavicini A, Muraro T, Zimbello R, Apolloni E, Valle G, Lanfranchi G, Danieli GA.** Chromosomal localization of the human genes, CPP32, Mch2, Mch3, and Ich-1, involved in cellular apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*, **1996**; 225(3):983-9.
85. **Grütter MG.** Caspases: key players in programmed cell death. *Curr Opin Struct Biol.* **2000**; 10(6): 649-55.
86. **Thornberry NA.** The caspase family of cysteine proteases. *Br Med Bull*, **1997**; 53(3): 478-90.

87. **Kuida K, Zheng TS, Na S, Kuan C, Yang D, Karasuyama H, Rakic P, Flavell RA.** Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice. *Nature*. **1996**; 384(6607): 368-72.

88. **Woo M, Hakem R, Soengas MS, Duncan GS, Shahinian A, Kägi D, Hakem A, McCurrach M, Khoo W, Kaufman SA, Senaldi G, Howard T, Lowe SW, Mak TW.** Essential contribution of caspase 3/CPP32 to apoptosis and its associated nuclear changes. *Genes Dev*, **1998**; 12(6): 806-19.

89. **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.

90. **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.

91. **Watt W, Koeplinger KA, Mildner AM, Heinrichson RL, Tomasselli AG, Watenpaugh KD.** The atomic-resolution structure of human caspase-8, a key activator of apoptosis. *Structure*, **1999**; 7(9): 1135-43.

92. **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.

93. **Riedl SJ, Salvesen GS.** The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nature reviews molecular Cell Biology*, **2007**; 8: 405-413.

94. **Shi Y.** Activation of Initiator Caspases: History, Hypotheses and Perspectives. *Journal of Cancer Molecules*, **2005**; 1(1): 9-18.

95. **Deveraux QL, Reed JC.** IAP family proteins suppressors of apoptosis. *Genes Dev*, **1999**; 13: 239-52.

96. **Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC.** X-linked IAP is a direct inhibitor of cell death proteases. *Nature*, **1997**; 388: 300-4.

97. **Roy N, Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC.** The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *Embo J*, **1997**; 16: 6914-25.

98. **Fan TJ, Han LH, Cong RS, Liang J.** Caspase family proteases and apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, **2005**; 37(11): 719-27.

99. **Baeuerle PA, Baltimore D.** NF- κ B: ten years after. *Cell*, **1996**; 87: 13-20.

100. **Tschopp J, Irmeler M, Thome M.** Inhibition of fas death signals by FLIPs. *Curr Opin Immunol*, **1998**; 10: 552–558.
101. **Pegoraro L, Palumbo A, Erikson J, Falda M, Giovanazzo B, Emanuel BS, Rovera G, Nowell PC, Croce CM.** A14; 18 and an 8; 14 chromosome translocation in a cell line derived from an acute B-cell leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1984**; 81: 7166-7170.
102. **Gustafsson AB, Gottlieb RA.** Bcl-2 family members and apoptosis, taken to heart *Am J Physiol Cell Physiol*, **2007**; 292(1): C45-51.
103. **Tsujimoto Y.** Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria? *Genes Cells*, **1998**; 3(11): 697-707.
104. **Zörnig M, Hueber A, Baum W, Evan G.** Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta*, **2001**; 1551(2): F1-37.
105. **Lowe SW, Lin AW.** Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis*, **2000**; 21: 485–495.
106. **Levine JL.** p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*, **1997**; 88: 323-331.
107. **Lakin ND, Jackson SP.** Regulation of p53 in response to DNA damage. *Oncogene*, **1999**; 18:7644-7655.
108. **Savaş İ.** Onkogenler. *T Klin Tıp Bil*, **1995**; 15: 374-377.
109. **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.
110. **Hoffmann K.** Imidazole and its derivatives. *Interscience Publishers, INC, New York*, **1953**.
111. **Wright JB.** The chemistry of the benzimidazoles. *Chem Rev*, **1951**; 48: 397-541.
112. **Gümüş F, Algül Ö.** Benzimidazol-Metal Kompleksleri Üzerinde Yapılan Biyolojik Aktivite Çalışmaları. *FABAD J Pharm Sci*, **1995**; 20: 29-40.
113. **Grassmann S, Sadek B, Ligneau X, Elz S, Ganellin CR, Arrang JM, Schwartz JC, Stark H, Schunack W.** Progress In The Proxifan Class: Heterocyclic Congeners As Novel Potent And Selective Histamine H-3-Receptor Antagonists. *Eur J Pharm Sci*, **2002**; 15: 367.
114. **Richter JE.** Delayed gastric emptying in reflux patients: To be or not to be? *Am J Gastroenterol*, **1997**; 92: 34.

115. **Sondhi SM, Singh N, Johar M, Kumar A.** Synthesis of acridinyl-thiazolino derivatives and their evaluation for anti-inflammatory, analgesic and kinase inhibition activities. *Bioorg Med Chem*, **2005**; 13: 6158.
116. **Can-Eke B, Puskullu MO, Buyukbingol E, Iscan M.** A study on the antioxidant capacities of some benzimidazoles in rat tissues. *Chem Biol Interact*, **1998**; 113: 65.
117. **Evans TM, Gardiner JM, Mahmood N, Smis M.** Structure-activity relationships of anti-HIV-1 N-alkoxy- and N-allyloxy-benzimidazoles. *Bioorg Med Chem. Lett*, **1997**; 7: 409.
118. **Kumar BV, Vaidya SD, Kumar RV, Bhirud SB, Mane RB.** Synthesis and anti-bacterial activity of some novel 2-(6-fluorochroman-2-yl)-1-alkyl/acyl/aroyl-1H-benzimidazoles. *Eur J Med Chem*, **2006**; 41: 599.
119. **Garuti L, Roberti M, Malagoli M, Rossi T, Castelli M.** Synthesis and antiproliferative activity of some benzimidazole-4,7-dione derivatives. *Bioorg Med Chem Lett*, **2000**; 10: 2193.
120. **Beaulieu C, Wang Z, Denis D, Greig G, Lamontagne S, O'Neill G, Slipetz D, Wang J.** Benzimidazoles as new potent and selective DP antagonists for the treatment of allergic rhinitis. *Bioorg Med Chem Lett*, 2004; 14: 3195.
121. **White AW, Curtin NJ, Eastman BW, Golding BT, Hostomsky Z, Kyle S, Li J, Maegley KA, Skalitzky DJ, Webber SE, Yu X.-H, Griffin R.** Potentiation of cytotoxic drug activity in human tumour cell lines, by amine-substituted 2-arylbenzimidazole-4-carboxamide PARP-1 inhibitors. *J Bioorg Med Chem Lett*, **2004**; 14: 2433.
122. **Lukevics E, Arsenyan P, Shestakova I, Domracheva I, Nesterova A, Pudova O.** Synthesis and antitumour activity of trimethylsilylpropyl substituted benzimidazoles. *Eur J Med Chem*, **2001**; 36: 507.
123. **Huang X, Suleman A, Skibo EB.** Rational design of pyrrolo[1,2-a] benzimidazole-based antitumor agents targeting the DNA major groove. *Bioorg Chem*, **2000**; 28: 324.
124. **Demirayak S, Abu Mohsen U, Karaburun CA.** Synthesis and anticancer and anti-HIV testing of some pyrazino[1,2-a]benzimidazole derivatives. *Eur J Med Chem*, **2002**; 37: 255.
125. **Huang ST, Hsei IJ, Chen C.** Synthesis and anticancer evaluation of bis(benzimidazoles), bis(benzoxazoles), and benzothiazoles. *Bioorg Med Chem*, **2006**; 14: 6106.
126. **Kumar CC, Malkowski M, Yin Z, Tanghetti E, Yaremko B, Nechuta T, Varner J, Liu M, Smith EM, Neustadt B, Presta M, Armstrong L.** Inhibition of angiogenesis and tumor growth by SCH221153, a dual $\alpha(v)\beta(3)$ and $\alpha(v)\beta(5)$ integrin receptor antagonist. *Cancer Res*, **2001**; 61: 2232.

127. **White AW, Almassy R, Calvert AH, Curtin NJ, Griffin RJ, Hostomsky Z, Maegly K, Newell DR, Srivivivasan S, Golding BT.** Resistance-modifying agents.9 Synthesis and biological properties of benzimidazole inhibitors of the DNA repair enzyme poly(ADP-ribose) polymerase. *J Med Chem*, **2000**; 43: 4084.
128. **Preston PN.** Synthesis Reaction and Spectroscopic Properties of Benzimidazoles. *Chem Rev*, **1974**; 74: 279-341.
129. **Sarhan AAO, Al-Dhfyhan A, Al-Mozaini MA, Adra CN, Aboul-Fadl T.** Cell cycle disruption and apoptotic activity of 3-aminothiazolo[3,2-a]benzimidazole-2-carbonitrile and its homologues. *Eur J Med Chem*, **2010**; 45(6): 2689-94.
130. **Fringuelli R, Schiaffella F, Navarro MPU, Milanese L, Santini C, Rapucci M, Marchetti C, Riccardi C.** 1,4-Benzothiazine Analogues and Apoptosis: Structure-Activity Relationship. *Bioorgan Med Chem*, **2003**; 11: 3245-3254.
131. **Hao D, Rizzo JD, Stringer S, Moore RV, Marty J, Dexter DL, Mangold GL, Camden JB, Von Hoff DD, Weitman SD.** Preclinical antitumor activity and pharmacokinetics of methyl-2-benzimidazolecarbamate. *Invest New Drug*, **2002**; 20: 261-270.
132. **Zhang XB, Kiechie F.** Hoechst 33342- induced apoptosis is associated with decreased immunoreactive topoisomerase I and topoisomerase I-DNA complex formation. *Ann Clin Lab Sci*, **2001**; 31(2): 187-198.
133. **Bretner M, Nejda-Bernatowicz A, Lebska M, Muszynska G, Kilanowicz A, Sapota A.** New inhibitors of protein kinase CK2, analogues of benzimidazole and benzotriazole. *Mol Cell Biochem*, **2008**; 316: 87-89.
134. **Eşrefoğlu M.** Cell Injury and Death: Oxidative Stress and Antioxidant Defense System: Review. *Turkiye Klinikleri J Med Sci*, **2009**; 29(6): 1660-76.
135. **Curtin JF, Donovan M, Cotter TG.** Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. *J Immunol Methods*, **2002**; 265(1-2): 49-72.
136. **Kannan K, Jain SK.** Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiology*, **2000**; 7(3): 153-163.
137. **Griffith OW, Meister A.** Origin and turnover of mitochondrial glutathione. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1985**;82(14):4668-72.
138. **Okado-Matsumoto A, Fridovich I.** Subcellular Distribution of Superoxide Dismutases (SOD) in Rat Liver: Cu, Zn-SOD in mitochondria. *J Biol Chem*, **2001**; 276(42): 38388-93.
139. **Pacher P, Beckman JS, Liaudet L.** Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev*, **2007**; 87(1): 315-424.

140. **Clutton S.** The importance of oxidative stress in apoptosis. *Br Med Bull*, **1997**;53(3):662-8.
141. **Ozben T.** Oxidative stress and apoptosis: impact on cancer therapy. *J Pharm Sci.* **2007**; 96(9): 2181-96.
142. **Altan N, Sepici-Dinçel A, Koca C.** Diabetes Mellitus ve Oksidatif Stres. *Turk J Biochem*, **2006**; 31 (2); 51–56.
143. **Canacankatan N.** Karaciğer Tümöründe Antioksidan Sistem ve Kolşisinin Etkisi. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana, **2000**.
144. **Beutler E.** Red Cell Metabolism 3rd Ed. Grune & Stratton. New York. **1984**: 72-73,105-106.
145. **Mc Cord JM, Fridovich I.** Superoxide dismutase An enzymatic function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol Chem.* **1969**; 244: 6049-6055.
146. **Tunctan B, Yaghini FA, Estes A, Malik KU.** İnhibition by nitric oxide and cyclooxygenase of cytochrome p450 4A expression and activity contributes to endotoxine-induced hypotension in rats. *Nitric Oxide: Biol Chem*, **2006**; 14: 51-57.
147. **Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR.** Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal Biol Chem*, **1982**; 126: 131-138.
148. **Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K.** Assay for Lipid Peroxidase in Animal Tissues by Thiobarbituric Acid Reaction. *Anal Biochem*, **1979**; 351-358.
149. **Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall JR.** Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*, **1961**; 193: 265-275.
150. **Huang H, Zhang XF, Zhou HJ, Xue YH, Dong QZ, Ye QH, Qin LX.** Expression and prognostic significance of osteopontin and caspase-3 in hepatocellular carcinoma patients after curative resection. *Cancer Sci.* **2010**; 101(5): 1314-9.
151. **Oyama K, Shiota G, Ito H, Murawaki Y, Kawasaki H.** Reduction of hepatocarcinogenesis by ursodeoxycholic acid in rats. *Carcinogenesis*, **2002**; 23(5): 885-92.
152. **Zhang ZM, Zhong N, Gao HQ, Zhang SZ, Wei Y, Xin H, Mei X, Hou HS, Lin XY, Shi Q.** Inducing apoptosis and upregulation of Bax and Fas ligand expression by allicin in hepatocellular carcinoma in Balb/c nude mice. *Chin Med J (Engl)*. **2006**; 119(5): 422-5.
153. **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.

154. **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.
155. **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.
156. **Granado-Serrano AB, Martín MA, Bravo L, Goya L, Ramos S.** A diet rich in cocoa attenuates N-nitrosodiethylamine-induced liver injury in rats. *Food Chem Toxicol*. **2009** ; 47(10): 2499-506.
157. **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.
158. **Schintz KJ, Wohlschlaeger J, Lang H, Sotiropoulos GC, Malago M, Steveling K, Reis H, Cicinnati VR, Schmid KW, Baba HA.** Activation of the ERK and AKT signaling pathway predicts poor prognosis in hepatocellular carcinoma and ERK activation in cancer tissue is associated with hepatitis virus infection. *J Hepatol*, **2007**; 48: 83–90.
159. **Grasl-Kraupp B, Ruttkay-Nedecky B, Müllauer L, Taper H, Huber W, Bursch W, Schulte-Hermann R.** Inherent increase of apoptosis in liver tumors: implications for carcinogenesis and tumor regression. *Hepatology*, **1997**; 25(4): 906-12.
160. **Persad R, Liu C, Wu TT, Houlihan PS, Hamilton SR, Diehl AM, Rashid A.** Overexpression of caspase-3 in hepatocellular carcinomas. *Mod Pathol*, **2004**; 17(7): 861-7.
161. **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.
162. **Chen J, Su XS, Jiang YF, Gong GZ, Zheng YH, Li GY.** Transfection of apoptosis related gene Fas ligand in human hepatocellular carcinoma cells and its significance in apoptosis. *World J Gastroenterol*, **2005**; 11(17): 2653-5.
163. **Qin LX, Tang ZY.** The prognostic molecular markers in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*, **2002**; 8(3): 385-92.
164. **Murtazaoglu M.** Kolkteral adenokarsinomlarda CD95 ekspresyonu ile EGFR amplifikasyonunun prognostik önemi ve diğer prognostik parametreler ile ilişkisi. Uzmanlık tezi, T.C. Sağlık bakanlığı Dr. Lütfi Kırdar Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İstanbul, **2005**.
165. **Fukuzawa K, Takahashi K, Furuta K, Tagaya T, Ishikawa T, Wada K, Omoto Y, Koji T, Kakumu S.** Expression of fas/fas ligand (fasL) and its involvement in infiltrating lymphocytes in hepatocellular carcinoma (HCC). *J Gastroenterol*, **2001**; 36(10): 681-8.

166. **Shin EC, Shin JS, Park JH, Kim H, Kim SJ.** Expression of Fas ligand in human hepatoma cell lines: role of hepatitis-B virus X (HBX) in induction of Fas ligand. *Int J Cancer*, **1999**; 82: 587-591.
167. **Ito Y, Monden M, Takeda T, Eguchi H, Umeshita K, Nagano H, Nakamori S, Dono K, Sakon M, Nakamura M, Tsujimoto M, Nakahara M, Nakao K, Yokosaki Y, Matsuura N.** The status of Fas and Fas ligand expression can predict recurrence of hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer*, **2000**; 82: 1211-1217.
168. **Kubo K, Matsuzaki Y, Okazaki M, Kato A, Kobayashi N, Okita K.** The Fas system is not significantly involved in apoptosis in human hepatocellular carcinoma. *Liver*, **1998**; 18(2): 117-23.
169. **Tsugeno H, Yamada G, Takatani M, Kishi F, Doi T, Takaguchi K, Manabe K, Yonehara S, Tsuji T.** Immunohistochemical study of Fas antigen in human liver tissues. *Hepatology*, **1994**; 20: 145A.
170. **Higaki K, Yano H, Kojiro M.** Fas antigen expression and its relationship with apoptosis in human hepatocellular carcinoma and noncancerous tissues. *Am J Pathol*, **1996**; 149(2): 429-37.
171. **Chodon D, Banu MS, Padmavathi R, Sakthisekaran D.** Inhibition of cell proliferation and induction of apoptosis by genistein in experimental hepatocellular carcinoma. *Molecular and Cellular Biochemistry*, **2007**; 297: 73-80.
172. **Jones RA, Johnson VL, Buck JN, Dobrota M, Hinton RH, Chow SC, Kass GN.** Fas-mediated apoptosis in mouse hepatocytes involves the processing and activation of caspases. *Hepatology*, **1998**; 27: 1632-1642.
173. **Bajt ML, Lawson JA, Vonderfecht SL, Gujral JS, Jaeschke H.** Protection against Fas receptor-mediated apoptosis in hepatocytes and nonparenchymal cells by a caspase-8 inhibitor in vivo: evidence for a postmitochondrial processing of caspase-8. *Toxicol Sci*, **2000**; 58: 109-117.
174. **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.
175. **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.
176. **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.

177. **Sanchez-Perez Y, Carrasco-Legleu C, Garcia-Cuellar C.** Oxidative stress in carcinogenesis. Correlation between lipid peroxidation and induction of preneoplastic lesions in rat hepatocarcinogenesis. *Cancer Lett*, **2005**; 217, (1): 25-32.
178. **Vendemiale G, Grattagliano I, Caruso ML.** Increased oxidative stress in dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis in the rat: effect of N-acetylcysteine and interferon-alpha. *Toxicol Appl Pharmacol*, **2001**; 175, (2): 130-139.
179. **Sell S.** Cellular origin of hepatocellular carcinomas. *Semin Cell Dev Biol*, **2002**; 13(6): 419-24.
180. **Sondhi SM, Rani R, Singh J, Roy P, Agrawal SK, Saxena AK.** Solvent free synthesis, anti-inflammatory and anticancer activity evaluation of tricyclic and tetracyclic benzimidazole derivatives. *Bioorg Med Chem Lett*, **2010**; 20(7): 2306-10.

ÖZGEÇMİŞ

02.04.1982 yılında Adana'da doğdu. İlköğrenimini Adana Şakirpaşa İlkokulu'nda, orta öğrenimini Mersin Pozcu Ortaokulunda, lise öğrenimini Mersin Dumlupınar Lisesi'nde (YDA), tamamladıktan sonra 2001 yılında Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji bölümünü kazandı. 2006 yılında lisans eğitimini tamamladıktan sonra, 1 yıl özel sağlık sektöründe çalıştıktan sonra 2007 yılında Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı. 2007 yılından bu yana aynı bölümde yüksek lisansa devam etmektedir.