

**RATLARDA 7,12-DİMETİLBENZ[A]ANTRASEN İLE İNDÜKLENEN  
LÖSEMİDE *Lycium barbarum* POLİSAKKARİTLERİNİN  
KARACİĞER VE DALAK KASPAZ VE NİTRİK OKSİT DÜZEYLERİ  
ÜZERİNE ETKİSİ**

**AYLİN BAŞARAN**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİYOLOJİ**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TEMMUZ 2013  
ANKARA**

Aylin BAŞARAN tarafından hazırlanan “RATLARDA 7,12-DİMETİLBENZ[A]NTRASEN İLE İNDÜKLENEN LÖSEMİDE *Lycium barbarum* POLİSAKKARİTLERİNİN KARACİĞER VE DALAK KASPAZ VE NİTRİK OKSİT DÜZEYLERİ ÜZERİNE ETKİSİ” adlı bu tezin yüksek lisans tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Doç. Dr. K. Barbaros BALABANLI .....  
Tez Danışmanı, Biyoloji Ana Bilim Dalı

Bu çalışma jürimiz tarafından oy birliği ile Biyoloji Ana Bilim Dalında yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Nurten TÜRKÖZKAN .....  
Tıbbi Biyokimya, Gazi Üniversitesi

Doç. Dr. K. Barbaros BALABANLI .....  
Biyoloji, Gazi Üniversitesi

Prof. Dr. Şule COŞKUN CEVHER .....  
Biyoloji, Gazi Üniversitesi

Tez Savunma Tarihi: 19.07.2013

Bu tez ile G.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Yüksek Lisans derecesini onamıştır.

Prof. Dr. Şeref SAĞIROĞLU .....  
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## **TEZ BİLDİRİMİ**

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

Aylin BAŞARAN

**RATLARDA 7,12-DİMETİLBENZ[A]ANTRASEN İLE İNDÜKLENEN  
LÖSEMİDE *Lycium barbarum* POLİSAKKARİTLERİNİN KARACİĞER VE  
DALAK KASPAZ VE NİTRİK OKSİT DÜZEYLERİ ÜZERİNE ETKİSİ  
(Yüksek Lisans Tezi)**

**Aylin BAŞARAN**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
Temmuz 2013**

**ÖZET**

Lösemi hematopoetik hücrelerin malign hastalığıdır. 7,12-Dimetilbenz[a]antrazen (DMBA) deneysel lösemi oluşturmak amacıyla kullanılan bir polibenzen olup, DMBA ile indüklenen lösemide serbest radikal üretimi artmaktadır. Nitrik oksit (NO) bu serbest radikaller arasında çok yönlü etkiye sahip olup, L-arjininin oksidasyonu ile sentezlenen hidrofobik bir radikaldir. Nitrik oksit kaspazların ekspresyonunu düzenleyerek proapoptotik veya antiapoptotik etki gösterir. *Lycium barbarum*'un (LB) immün düzenleyici, antidiyabetik ve antikanserojen etkileri çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Bu bilgilere dayanarak çalışmanın amacı DMBA ile lösemi oluşturulan ratlarda *Lycium barbarum* sulu ekstresinin nitrik oksit ve kaspaz düzeyleri üzerine etkisini araştırmaktır. Çalışmada 18 adet dişi Wistar albino rat kullanıldı. Ratlar kontrol lösemi (DMBA) ve tedavi (DMBA+LB) olmak üzere rastgele üç gruba ayrıldı (n=6). Lösemi oluşturmak amacıyla lösemi ve tedavi gruplarına DMBA susam yağında çözülerek gavaj ile verildi. 8 DMBA uygulaması sonunda tedavi grubuna 10 gün boyunca *Lycium barbarum* sulu ekstresi gavaj ile verildi. 10 gün sonunda ratlar anestezi altında feda edilip karaciğer ve dalak dokularında nitrik oksit ve kaspaz parametreleri çalışıldı. Çalışmada elde edilen bulgulara göre

karaciğer ve dalak dokularında nitrik oksit düzeyleri lösemi ve tedavi gruplarında kontrole göre anlamlı şekilde düşük bulundu. Karaciğer dokusunda kaspaz seviyeleri lösemi ve tedavi gruplarında kontrole göre anlamlı şekilde düşük bulundu. Sonuç olarak *Lycium barbarum* karaciğer koruyucu ve antiapoptotik etki yaparak karaciğerde kaspaz-3 ve NOx seviyelerinde azalmaya neden olmuştur.

**Bilim Kodu** : 203.1.020

**Anahtar Kelimeler** : DMBA, Lycium barbarum, Nitrik oksit, Kaspaz

**Sayfa Adedi** : 77

**Tez Yöneticisi** : Doç. Dr. K. Barbaros BALABANLI

THE EFFECT OF *Lycium barbarum* POLYSACCHARIDES ON LIVER  
AND SPLEEN CASPASE AND NITRIC OXIDE LEVELS IN  
7,12-DIMETHYLBENZA[A]NTHRACENE INDUCED RAT LEUKEMIA  
(M. Sc. Thesis)

Aylin BAŞARAN

GAZİ UNIVERSITY  
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES  
July 2013

ABSTRACT

Leukemia is a malign disease of hematopoetic stem cells. 7,12-Dimethylbenza[a]ntracene (DMBA) is a chemical agent for constitute experimental leukemia. DMBA induced leukemia and cause free radical imbalanced and triggers oxidative stress. Nitric oxide (NO) is a hydrophobic molecule and a free radical, generated through oxidation of l-arginine by a family of constitutive, the NO synthases. NO changes in the expression shows proapoptotic and antiapoptotic effects on caspase-3-like protease activation. Immun stimulator, antidiabetic and anticancerogen effects of *Lycium barbarum* has shown in a various study. In the light of above information, the aim of this study is to research the anticarcinogenic mechanism of *Lycium barbarum* (LB) polysaccharides using caspase and NO parameters. In the study was used 18 number female Wistar albino rats. Rats were seperated randomly to three groups as control, leukemia (DMBA) and treatment (DMBA+LBP) group (n=6). DMBA and treatment group was administered DMBA dissolved sesame oil for induce leukemia. After 8 DMBA administration treatment group rats was feeded water extract of *Lycium barbarum* by oral gavage for 10 days. Rats sacrificed under anesthesia and spleen and liver tissues were examined by nitric oxide

and caspase-3 parametres. In liver and spleen tissue nitric oxide decreased in DMBA and treatment groups according to control group. Caspase-3 levels in liver decreased DMBA and treatment group according to control group. As a consequence *Lycium barbarum* shows hepatoprotective and antiapoptotic effect by decreasing caspase-3 and NOx levels in liver tissue.

**Science Code : 203.1.020**

**Key Words : DMBA, Lycium barbarum, Nitric oxide, Caspase**

**Page Number : 77**

**Adviser : Assoc. Prof. Dr. K. Barbaros BALABANLI**

## TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca değerli yardım ve katkılarıyla beni yönlendiren hocam Doç. Dr. K. Barbaros BALABANLI'ya, yine Hematoloji konusunda kıymetli tecrübelerinden faydalandığım Prof. Dr. Tülin Revide ŞAVLI'ya, çalışmamın bir kısmında laboratuvar imkanlarından faydalandığım Prof Dr. Nurten TÜRKÖZKAN ve Prof. Dr. Hatice PAŞAOĞLU'na, çalışmalarım boyunca yardımlarını esirgemeyen değerli arkadaşlarım Filiz Sezen BİRCAN, Sibel ÇONGARALI ve Özge Tuğçe PAŞAOĞLU'na ve çalışmalarım boyunca her türlü yardımına koşan değerli laboratuvar arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim. Ayrıca eğitim hayatım boyunca desteklerini benden esirgemeyen kıymetli aileme ve yüksek lisans öğrenimim sürecince bana sağladığı manevi destek için nişanlım Güner EROĞLU'na da bu vesile ile teşekkür ederim.



**İÇİNDEKİLER**

|   | <b>Sayfa</b> |
|---|--------------|
| ÖZET .....  | iv           |
| ABSTRACT.....   | vi           |
| TEŞEKKÜR.....   | vii          |
| İÇİNDEKİLER.....                                      | ix           |
| ÇİZELGELERİN LİSTESİ .....                            | xi           |
| ŞEKİLLERİN LİSTESİ .....                              | xii          |
| RESİMLERİN LİSTESİ.....                               | xiv          |
| SİMGELER VE KISALTMALAR .....                         | xv           |
| 1. GİRİŞ .....  | 1            |
| 2. GENEL BİLGİLER.....                                | 3            |
| 2.1. Hematopoez ve Kan Hücrelerinin Morfolojisi.....  | 3            |
| 2.2. Lösemi.....                                      | 6            |
| 2.2.1. Kronik lösemiler.....                          | 6            |
| 2.2.2. Akut lösemiler.....                            | 9            |
| 2.3. Benzen, DMBA ve Lösemi.....                      | 14           |
| 2.3.1. Benzen ve lösemi.....                          | 14           |
| 2.3.2. DMBA.....                                      | 18           |
| 2.4. Serbest Radikaller ve Nitrik Oksit.....          | 22           |
| 2.4.1. Nitrik oksit.....                              | 22           |
| 2.5. Hücre Döngüsü ve Apoptoz.....                    | 31           |
| 2.5.1. Hücre döngüsünün gelişimi ve düzenlenmesi..... | 33           |
| 2.5.2 Apoptoz.....                                    | 35           |

|   | <b>Sayfa</b> |
|---|--------------|
| 2.5.3. Nitrik oksidin apoptozdaki etkileri.....                 | 43           |
| 2.6. <i>Lycium barbarum</i> .....                               | 46           |
| 3. MATERYAL ve METOT.....                                       | 51           |
| 3.1. Deney Hayvanları.....                                      | 51           |
| 3.2. Deney Gruplarının Oluşturulması.....                       | 51           |
| 3.3. Yöntemler.....   | 52           |
| 3.3.1. DMBA preparatlarının hazırlanışı.....                    | 52           |
| 3.3.2. <i>Lycium barbarum</i> sulu ekstresinin hazırlanışı..... | 53           |
| 3.3.3. % 5'lik Giemsa Stain hazırlanışı.....                    | 53           |
| 3.3.4. Dokuda NOx tayini.....                                   | 53           |
| 3.3.5. Dokuda kaspaz-3 tayini.....                              | 54           |
| 3.4. İstatistiksel Değerlendirme.....                           | 56           |
| 4. BULGULAR.....  | 57           |
| 4.1. Karaciğer Dokusu NOx Düzeyleri.....                        | 59           |
| 4.2. Karaciğer Dokusu Kaspaz-3 Düzeyleri.....                   | 60           |
| 4.3. Dalak Dokusu NOx Düzeyleri.....                            | 60           |
| 4.4. Dalak Dokusu Kaspaz-3 Düzeyleri.....                       | 61           |
| 5. SONUÇ VE TARTIŞMA.....                                       | 62           |
| KAYNAKLAR.....  | 68           |
| ÖZGEÇMİŞ.....   | 77           |

## ÇİZELGELERİN LİSTESİ

| <b>Çizelge</b>   | <b>Sayfa</b> |
|--|--------------|
| Çizelge 2.1. DMBA uygulaması sonucu oluşan lösemi tipleri.....                                   | 22           |
| Çizelge 2.2. Atmosferde ve biyolojik sistemlerde bulunabilen başlıca nitrojen oksit türleri..... | 24           |
| Çizelge 2.3. Başlıca NOS formlarının dağılımı ve aktivatörleri.....                              | 31           |
| Çizelge 2.4. Apoptoz ile nekroz arasındaki farklar.....  | 38           |
| Çizelge 2.5. Nitrik oksitin proapoptotik ve antiapoptotik etkilerinin mekanizmaları.....         | 45           |
| Çizelge 4.1. DMBA ile lösemi yapılan ratların kan sayımı sonuçları.....                          | 57           |
| Çizelge 4.2. Karaciğer dokusunda NOx ve kaspaz-3 düzeyleri.....                                  | 58           |
| Çizelge 4.3. Dalak dokusunda NOx ve kaspaz-3 düzeyleri.....                                      | 59           |

## ŞEKİLLERİN LİSTESİ

| Şekil   | Sayfa |
|---|-------|
| Şekil 2.1. Kemik iliğinde hematopoez.....   | 3     |
| Şekil 2.2. Kemik iliği mikroçevresi.....  | 4     |
| Şekil 2.3. Hematopoezle oluşan kan hücreleri.....   | 5     |
| Şekil 2.4. KML periferik kan yayması.....   | 7     |
| Şekil 2.5. KLL periferik kan yayması.....   | 9     |
| Şekil 2.6. ALL periferik kan yayması.....   | 11    |
| Şekil 2.7. Philadelphia Kromozomu.....  | 11    |
| Şekil 2.8. AML' de hematopoez.....  | 13    |
| Şekil 2.9. AML periferik kan yayması.....   | 13    |
| Şekil 2.10. DMBA' nın moleküler yapısı.....   | 18    |
| Şekil 2.11. DMBA'nın karaciğerde metabolize edilmesi.....   | 19    |
| Şekil 2.12. DMBA uygulaması sonucu oluşan N-ras mutasyonu.....  | 19    |
| Şekil 2.13. Nitrik oksit molekülünün elektronik kongigürasyonu.....                                       | 22    |
| Şekil 2.14. Nitrik oksit sentaz tarafından katalizlenen arjinin amino asidinden nitrik oksit sentezi..... | 27    |
| Şekil 2.15. İndükleyici ajanlarla iNOS aktivasyon mekanizması.....  | 30    |
| Şekil 2.16. Hücre döngüsü evreleri ve kontrol noktaları.....  | 33    |
| Şekil 2.17. Kaspazların yapısı.....   | 40    |
| Şekil 2.18. Kaspazların aktivasyon basamakları.....   | 41    |
| Şekil 2.19. Bax gen ailesinin aktivasyonu.....  | 42    |
| Şekil 2.20. Memeli hücrelerindeki iki ana apoptotik yolak ve işleyişi.....                                | 43    |
| Şekil 2.21. Nitrik oksidin antiapoptotik etkilerinin mekanizması.....                                     | 46    |

| <b>Şekil</b>   | <b>Sayfa</b> |
|--|--------------|
| Şekil 2.22. <i>Lycium barbarum</i> 'un filogenetik sınıflandırılması.....                      | 47           |
| Şekil 2.23. <i>Lycium barbarum</i> meyveleri.....  | 48           |
| Şekil 2.24. <i>Lycium barbarum</i> meyve ve yapraklarındaki karotenoidler.....                 | 49           |
| Şekil 2.25. <i>Lycium barbarum</i> meyvesindeki C vitamini prekursorleri ve glukolipidler..... | 50           |
| Şekil 3.1. Kaspaz-3 standart eğrisi.....   | 55           |
| Şekil 4.1. Karaciğer dokusu NOx düzeyleri.....   | 59           |
| Şekil4.2. Karaciğer dokusu kaspaz-3 düzeyleri.....   | 60           |
| Şekil 4.3. Dalak dokusu NOx düzeyleri.....   | 61           |
| Şekil 4.4. Dalak dokusu kaspaz-3 düzeyleri.....  | 61           |
| Şekil 5.1. Nitrik Oksit Sentaz ve Arjinaz ilişkisi.....  | 64           |
| Şekil 5.2. Nitrik oksidin kaspaz enzimlerini inhibisyon yolları.....                           | 64           |

**RESİMLERİN LİSTESİ**

| <b>Resim</b>   | <b>Sayfa</b> |
|--|--------------|
| Resim 4.1. DMBA ile lösemi oluşturulan ratların periferik kan yayması..... | 57           |
| Resim 4.2. DMBA ile lösemi oluşturulan ratlarda splenomegali.....          | 58           |

## SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

| <b>Simgeler</b>               | <b>Açıklama</b>      |
|-------------------------------|----------------------|
| °C                            | Santigrat derece     |
| Å                             | Angström             |
| atm                           | Atmosfer             |
| C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> | Benzen               |
| cm <sup>3</sup>               | Santimetreküp        |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | Hidrojen Peroksit    |
| HOCl                          | Hipokloröz Asit      |
| kDa                           | Kilodalton           |
| kg                            | Kilogram             |
| kPa                           | Kilopaskal           |
| L                             | Litre                |
| mg                            | Miligram             |
| mM                            | Milimolar            |
| mmol                          | Milimol              |
| N <sub>2</sub>                | Azot gazı            |
| ng                            | Nanogram             |
| nm                            | Nanometre            |
| nM                            | Nanomolar            |
| NO•                           | Nitrik oksit         |
| O <sub>2</sub> •              | Süperoksit radikali  |
| ONOO <sup>-</sup>             | Peroksinitrit anyonu |
| ONOOH                         | Peroksinitröz asit   |
| µg                            | Mikrogram            |
| µL                            | Mikrolitre           |

| <b>Kısaltmalar</b> | <b>Açıklama</b>                         |
|--------------------|---|
| <b>ALL</b>         | Akut Lenfoid Lösemi                     |
| <b>AML</b>         | Akut Miyeloid Lösemi                    |
| <b>APC</b>         | Anafaz Uyarıcı Kompleks                 |
| <b>BFU-E</b>       | Eritrosit Kök Hücre Faktörü             |
| <b>CD5</b>         | Lenfositler yüzey antijeni              |
| <b>CDK</b>         | Siklin Bağımlı Proteazlar               |
| <b>CFU-EO</b>      | Eozinofil Kök Hücre Faktörü             |
| <b>CFU-GM</b>      | Granülosit Kök Hücre Faktörü            |
| <b>CFU-MEG</b>     | Megakaryosit Kök Hücre Faktörü          |
| <b>CSF</b>         | Kök Hücre Faktörü                       |
| <b>DMBA</b>        | 7,12-Dimetilbenz[a]antrasen             |
| <b>eNOS</b>        | Endotelial Nitrik Oksit Sentaz          |
| <b>Epo</b>         | Eritropoetin                            |
| <b>FasL</b>        | Fas Ligand                              |
| <b>G-CSF</b>       | Granülosit Koloni Uyarıcı Faktör        |
| <b>GSH</b>         | İndirgenmiş Glutasyon                   |
| <b>IARC</b>        | Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı    |
| <b>IL-1,2,3</b>    | İnterlökin-1,2,3                        |
| <b>iNOS</b>        | İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz      |
| <b>KLL</b>         | Kronik Lenfoid Lösemi                   |
| <b>KML</b>         | Kronik Miyeloid Lösemi                  |
| <b>LBP</b>         | <i>Lycium barbarum</i> polisakkaritleri |
| <b>LDL</b>         | Düşük Yoğunluklu Lipoprotein            |
| <b>LPS</b>         | Lipopolisakkarit                        |
| <b>MDA</b>         | Malondialdehit                          |
| <b>MPO</b>         | Miyeloperoksidaz                        |
| <b>NOS</b>         | Nitrik Oksit Sentaz                     |
| <b>nNOS</b>        | Nöronal Nitrik Oksit Sentaz             |



## 1. GİRİŞ

Lösemi kan hücrelerinin çoğalması ve farklılaşması arasındaki dengenin bozulması sonucu ortaya çıkan bir hastalıktır [1]. Lösemnin nedeni kesin olarak bilinmemekle birlikte hastalığın etyolojisindeki lökomojenik etkenler radyasyon, çeşitli kimyasal maddeler, bazı kemoterapi ilaçları, virüsler, konjenital hastalıklar ve immün yetmezliklerdir [2]. Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) tarafından birinci dereceden insan kanserojeni olarak tanımlanan benzen ve bir polibenzen türevi olan 7,12-Dimetilbezantasen (DMBA) da lösemi etyolojisinde önemli rol oynamaktadır [15]. Bu özellikleri ile DMBA kemirgenlerde deneysel lösemi oluşturmak amacıyla kullanılmaktadır [13, 14]. DMBA doğrudan bir kanserojen olmayıp, kanserojen özelliğini göstermesi için metabolize edilmesi gerekmektedir ve metabolizması esnasında yüksek miktarda serbest radikal salınımına da yol açmaktadır [5, 13]. Organizmada oluşan serbest radikal türevlerinden en önemlisi nitrik oksit olup, organizmada çok yönlü etkilere sahiptir. Bu çok yönlü etkileri ile hücre döngüsü, apoptoz enzimleri ve yolaklarını da düzenler [8]. Hücre döngüsünün önemli düzenleyicilerinden biri kaspaz enzimleri olup, bu mekanizmadaki herhangi bir aksaklık kontrolsüz hücre bölünmesine yani kansere yol açmaktadır [4].

Son yıllarda kanser tedavisine yardımcı olarak tıbbi bitkilerin kullanılması ilgi çeken bir konu haline gelmiştir [42]. *Lycium barbarum* Solanaceae familyasının bir üyesi olup tıbbi bitki olarak kabul görmüş, kırmızı meyveleri olan çalı formunda bir bitkidir. Bitkinin özellikle meyveleri Çin ve Hint Tıbbi' nde yapısındaki flavonoidler sebebiyle çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır [50]. Yapılan ekstraksiyon ve izolasyon çalışmalarında bitkinin yaprak ve meyvelerinde başta rutin, gentisik asit, kuvarsetin, zeaksantin dipalmitat ve  $\beta$ -karoten olmak üzere çok sayıda fenolik bileşik ve flavonoid bulunduğu saptanmıştır [20, 22, 27, 60, 62, 63, 66]. Bitkinin özellikle meyveleri yapısındaki polisakkarit-flavonoid kombinasyonu ile antioksidan ve radikal süpürücü etki göstererek, oksidan parametreler

üzerinde düşürücü etki yapmaktadır [17, 18, 19, 23, 24, 25, 26, 28, 61, 65]. Bitkinin bilinen diğer etkileri iskemik hasarlarda reperfüzyonu hızlandırıcı, göz hücrelerini koruyucu, fertilizasyonu arttırıcı, yaşlanma karşıtı, antidiyabetik ve immün düzenleyici etkileridir [16, 51, 64, 68, 71, 73, 76, 77, 79, 81, 82, 84].

*Lycium barbarum* bu özellikleri sebebiyle kanser tedavisinde ve kanser tedavisine yardımcı olarak da etki göstermektedir [30, 75]. Bitkinin kanser hücrelerinin çoğalmasını durdurucu etkisi açısından özellikle lösemide antikanserojen olarak kullanımı ilgi çeken bir konu haline gelmiştir.

L1210 fare lenfoid lösemi hücre hattı üzerinde yapılan çalışmada *Lycium barbarum*'un radikal süpürücü ve lösemi hücrelerinin proliferasyonunu durdurucu etki gösterdiği rapor edilmiştir [11].

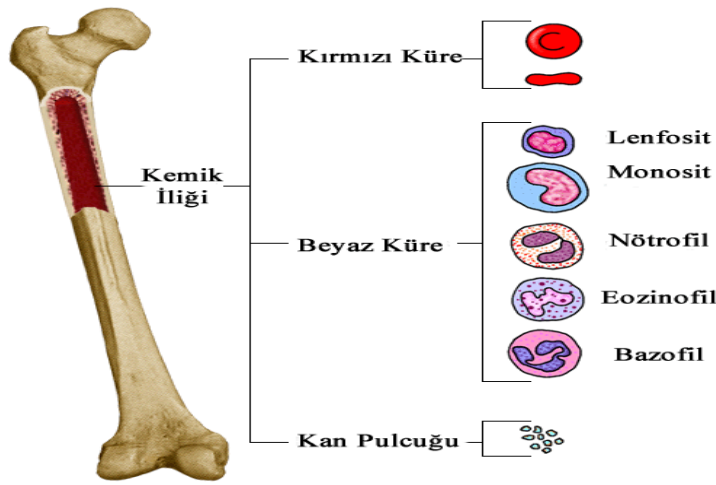
HL-60 insan premyeloid lösemi hücre hattı üzerinde yapılan çalışmada ise artan LBP dozlarında lösemi hücrelerinin çoğalmasının durduğu bildirilmiştir [12].

Bu bilgiler ışığında çalışmamızda, DMBA ile deneysel lösemi oluşturulmuş ratlarda, *Lycium barbarum* sulu ekstresinin karaciğer ve dalak dokularında kaspaz-3 ve NOx parametreleri üzerindeki etkisini araştırmak amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

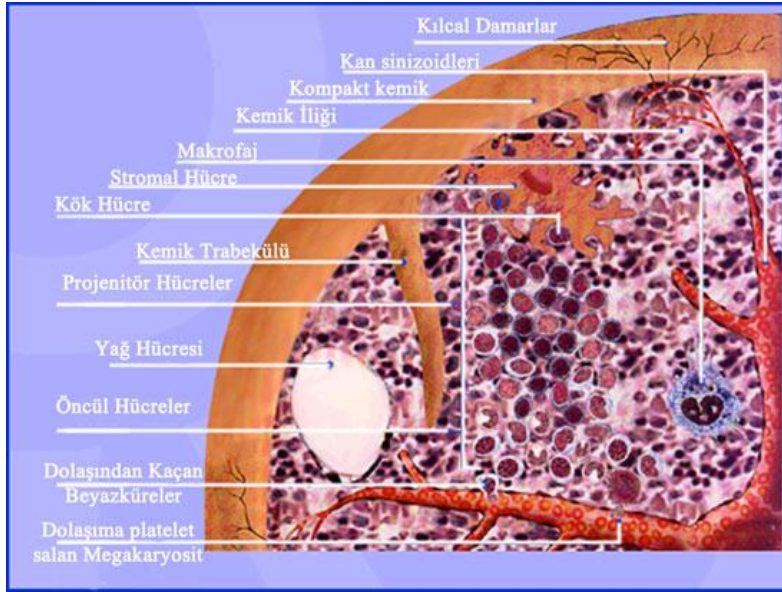
### 2.1. Hematopoez ve Kan Hücrelerinin Morfolojisi

Periferal kan hücrelerinin, kemik iliğindeki pluripotent bir kök hücreden çoğalması ve farklılaşmasına hematopoez denir [4].



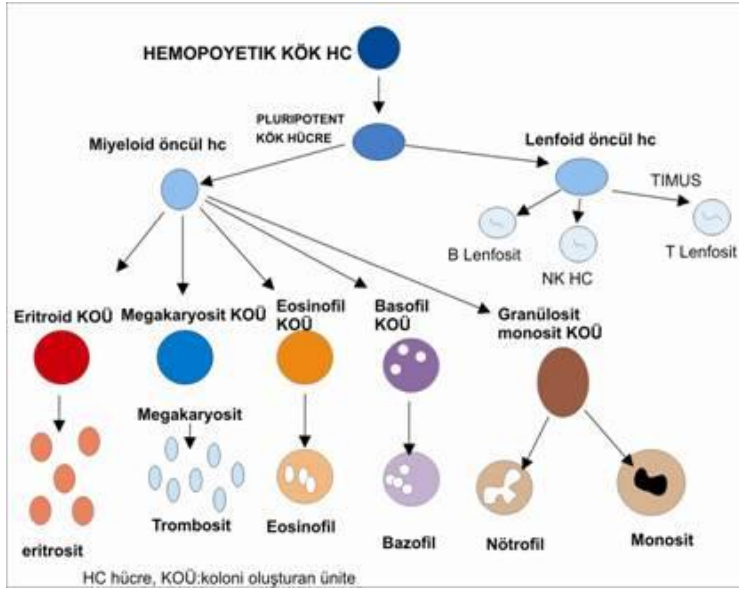
Şekil 2.1. Kemik iliğinde hematopoez [31]

İmmunolojik uyarı olmadan stromal hücrelerden salınan sitokinler adhezyon molekülleri ile birlikte hematopoezden sorumludur. Sitokinler hematopoetik hücrelerin hücre döngüsü gelişimlerini, proliferasyon ve diferansiyasyonunu uyarmakta ve apoptozunu inhibe etmekle görevlidirler. Hematopoezi düzenleyen sitokinler arasında granüsit koloni uyarıcı faktör (G-CSF), makrofaj koloni uyarı faktör (M-CSF), çeşitli interlökinler (IL-3 gibi), kök hücre faktörü (CSF), granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-CSF), eritropoetin (Epo) ve trombopoetin (Tpo) bulunmaktadır [4, 9, 10].



Şekil 2.2. Kemik iliği mikroçevresi [32]

Sağlıklı bir kimsede meydana gelen hematopoezde IL-3, GM-CSF, CSF, Epo ve diğerleri hematopoetik öncül hücrelerin büyümelerine, miyeloid, lenfoid ve eritroid hücrelere farklılaşmalarına kök hücreler aracılık etmektedir. Kemik iliğinde pluripotent bir kök hücreden perifer kan hücrelerinin oluşumu şu sıra ile gerçekleşmektedir. Kendiliğinden çoğalan pluripotent kök hücre ikiye bölünerek myeloid ve lenfoid kök hücreleri oluşturur. Myeloid ve lenfoid kök hücreler ortamdaki sitokinlere göre çeşitli progenitor hücreleri üretmektedir. Bu üretilen ve kendiliğinden çoğalamayan hücrelerin (CFU-GM, CFU-MEG, BFU-E, CFU-Eo ile immün sistemin T ve B lenfositleri) görevi farklılaşarak diğer kan hücrelerini oluşturmaktır. Bu hücrelerden CFU-GM iki farklı sitokinle uyarılıp iki farklı hücre kolonisi oluşturma yeteneğine sahiptir. CFU-GM, G-CSF ile uyarıldığında granülositer koloniyi, M-CSF ile uyarıldığında monositer koloniyi oluşturur. CFU-MEG, SCF, TPO, IL-3, GM-CSF ile uyarıldığında megakaryositlerden trombosit oluşumunu başlatır. BFU-E; Epo, SCF, GM-CSF ve IL-3 ile uyarıldığında eritrosit oluşumu başlatılır. CFU-Eo; IL-3 ve GM-CSF tarafından uyarılıp eozinofil yapımını başlatır. T ve B lenfositler ise lenfoid kök hücreden sitokine bağımsız farklılaşarak işlev görürler [4,10].



Şekil 2.3. Hematopoezle oluşan kan hücreleri [33]

Kan hücreleri kemik iliğinde çeşitli olgunlaşma basamaklarından geçtikten sonra kana karışırlar. Bu olgunlaşma basamaklarının ilki blastlardır ve her seride (eritroid, miyeloid ve lenfoid seriler) farklı adlandırılırlar (pronormoblast, miyeloblast, lenfoblast) ve farklı özellikler gösterirler. Blastlar genellikle kemik iliğinde tanımlanabilen en küçük hücreler olup sağlıklı bireylerde periferik kanda bulunmazlar. Blastlar genel olarak henüz görevini tam olarak yerine getiremeyen olgunlaşmanın ilk basamağındaki hücreler olarak tanımlanır. Kemik iliğinde maturasyon eritroid seride pronormoblast, bazofilik normoblast, polikromatofilik normoblast, ortokromatofilik normoblast, retikülosit ve eritrosit şeklinde devam eder ve periferik kanda olgunlaşmış oksijen tutma kapasitesi en üst düzeye ulaşmış, eritrositlerin bulunması gerekir. Miyeloid seri maturasyon basamaklarında miyeloblasttan sonra promiyelosit, miyelosit ve metamiyelosit şeklinde devam eder. Lenfoid seride ise lenfoblast, lenfosit ve plazma hücresi şeklinde maturasyon basamakları ilerler [9, 10].

## 2.2. Lösemi

Lösemi, hücre proliferasyonu ve maturasyonu arasındaki dengenin bozulması sonucu oluşan kan hücrelerinin veya hematopoetik kök hücrelerin malign hastalığıdır [1].

Lösemi klinik ve patolojik olarak kronik ve akut lösemi olmak üzere ikiye ayrılır [2].

### 2.2.1. Kronik lösemiler

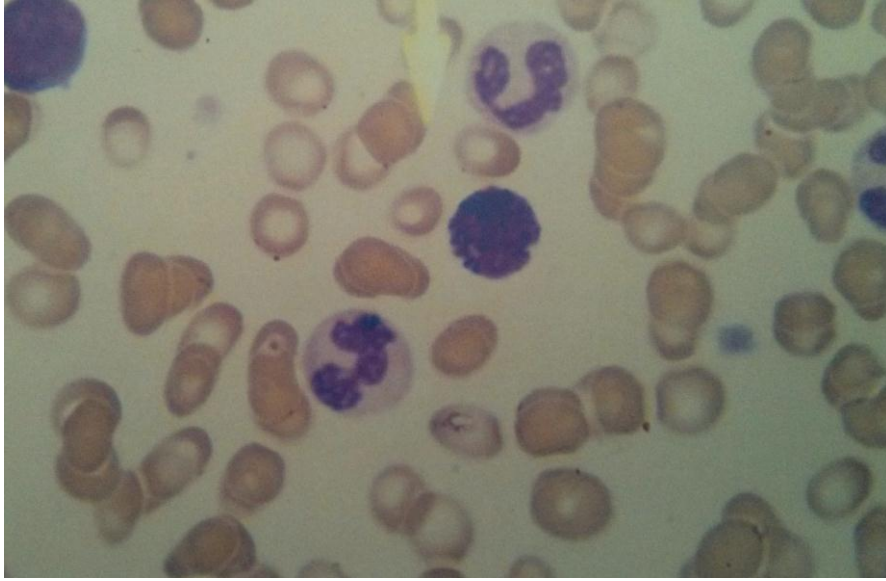
Kronik lösemiler diferansiyasyonun her basamağındaki miyeloid ve lenfoid elemanların proliferasyonunun artması (apoptozun azalması ile birlikte) ve adhezif özelliklerinin kaybı ile karakterize klonal bir hematopoetik kök hücre malignitesidir. Kronik lösemiler kendi aralarında kronik miyeloid lösemi (KML) ve kronik lenfoid lösemi (KLL) olarak ikiye ayrılır [2].

#### Kronik miyeloid lösemi

Kronik miyeloid lösemi (KML) en sık görülen miyeloproliferatif hastalık olup tüm lösemilerin %15-20'sini oluşturur ve yıllık görülme sıklığı 1-1,5 / 100000'dir. Küçük yaşlarda da görülebmesine rağmen sıklıkla orta ve ileri yaşların hastalığıdır [3].

Klinik seyrine göre kronik, akseler ve blastik dönemleri vardır. Kronik fazda hücrelerin çoğalması kan, kemik iliği, dalak ve karaciğerde görülürken akseler ve blastik fazda ise bunlara ilaveten lenf nodu, deri, yumuşak dokular, santral sinir sistemi gibi ekstramedüller yerlerde de hematopoez vardır. Birçok hastaya tanı kronik fazda konur. Hastaların % 20-40'ında tanı tesadüfen lökosit sayısı yüksekliği ile konulup, hastalarda başlangıçta halsizlik, kilo kaybı, gece terlemeleri ve splenomegali görülür. Philadelphia (Ph) kromozomu genellikle pozitifdir. Akseler ve blastik dönemde anemi,

trombositopeni, masif splenomegali ve genel durumun bozulması kliniğe eşlik eder. Kronik dönemdeki hastalarda en belirgin özellik lökositoz görülmesidir. Lökositozda miyelosit ve nötrofiller sıklıkla artmıştır. Blast oranı % 2-5 arasındadır [1-3].



Şekil 2.4. KML periferik kan yayması [9]

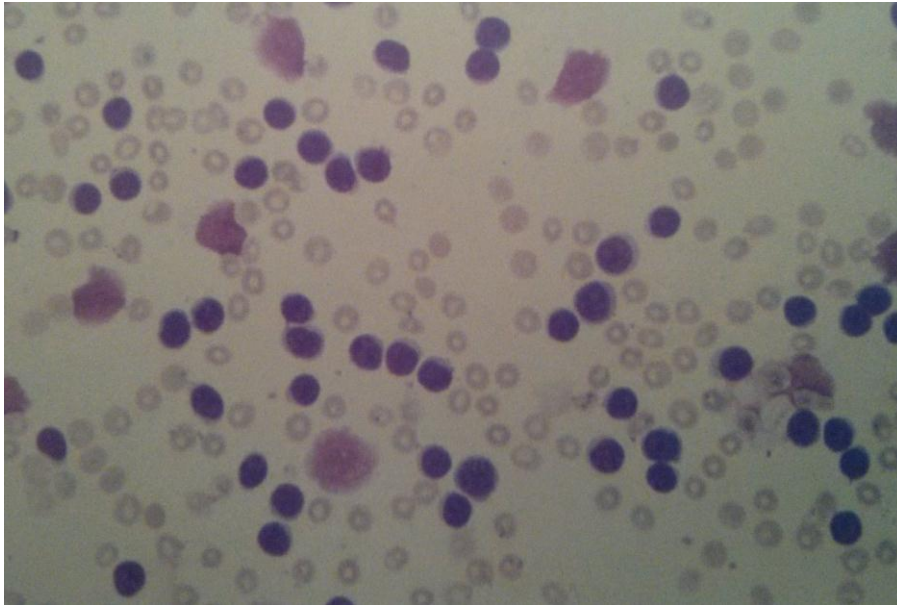
KML'nin tanıtıcı sitogenetik özelliği 9. ve 22. kromozomların uzun kolları arasında karşılıklı translokasyondur; (t (9;22) (q34; q11)). Ph kromozomunda değişen gen bölgesi Bcr-Abl kısımlarını biraraya getirdiğinden Bcr-Abl füzyon geni ismini alır. Söz konusu füzyon geni Bcr-Abl proteinini kodlar. Bu protein, bir enzim-tirozin kinaz-aktivitesi göstermektedir ve anormal olarak aktivitesinin kontrolü olmamaktadır. Normalde kontrol edilebilir özellikte tirozin kinaz aktivitesine sahip Abl proteinine Bcr dizisi eklendiğinde aktivitesi kontrolsüz hale geçmekte ve p210 Bcr-Abl'nin lökomojenik özelliği ortaya çıkmaktadır. Bcr onkoproteinlerin dimerizasyonu ile iki Bcr-Abl molekülü kendilerine uyan kinaz aktivasyonu bölümünde tirozin eklerini fosforlar. Bundan sonraki basamaklar normal Abl enziminin bir seri proteinle etkileşmesi basamaklarıdır. Sonuç kontrolsüz hücre çoğalması, lösemik hücrelerin mutajenik uyarılara apoptoz şeklinde yanıt verilmesi olgusunun azalmasıdır. Bcr-Abl'de adenozin trifosfat (ATP), tirozin kinaz kısmına (SH1)

kısmı onkojenik dönüşümde başlıca rolü oynamasından dolayı moleküler bir hedefdir. Araştırmalar ATP ya da SH1 kısmına bağlanan substrat ile yarışabilecek, sentetik bir bileşik elde edilmesine yöneliktir. KML'de tedavi hematolojik ve sitogenetik remisyona sağlamak için verilir. Hematolojik remisyona için kemoterapötik ajanlar, sitogenetik remisyona sağlamak amacıyla de tirozin kinaz inhibitörleri ve kök hücre nakli tedavisi uygulanabilir [1-3, 92].

### Kronik lenfositik lösemi

Kronik lenfositik lösemi (KLL) küçük olgun immunolojik olarak yetersiz B lenfositlerin aşırı artışı, kemik iliği kan dalak ve karaciğeri infiltre etmesi ile karakterize malign lenfoproliferatif bir hastalıktır. Hastalık genellikle B lenfositlerin klonal çoğalması ile meydana gelirken, hastaların % 1-2'sinde ise T lenfositlerin artışı görülür. Akut lenfoblastik lösemilerden olgun hücrelerin artması ile ayrılır. Orta ve ileri yaşlarda sık görülür. Ortalama görülme yaşı 55-60'dır. Erkeklerde kadınlara göre 1,5-2 kat daha sık görülür. KLL etyolojisinde yavaş fakat durmaksızın lenfosit birikmesi söz konusudur. KLL lenfositlerinde apoptozu baskılayan bcl-2 onkogeni mevcuttur ve hücreler immunolojik olarak yetersizdir. CD5 pozitif B-lenfositleri normalde %10 oranında görülürken, KLL' de hastalığı başlatan hücrelerdir. Hastalarda sık görülen otoimmün komplikasyonların nedeni de artmış CD5 pozitif lenfositlerdir. KLL'nin doğal seyri hastalığa tanı konulduğunda tespit edilen evre ile yakından ilişkilidir. Klinik belirtiler lösemik lenfositlerin lenf düğümlerinde dalak, karaciğer, periferik kan ve kemik iliğinde birikmesi ile ortaya çıkar [2, 4].





Şekil 2.5. KLL periferik kan yayması [9]

Hastalarda lenfadenopati, hepatomegali, splenomegali en sık görülen muayene bulgularıdır. Hastalığın seyri sırasında anemi, trombositopeni, akciğer infiltrasyonları, plevral sıvı, böbrek ve deri tutulumu görülebilir. Hastalık büyük hücreli lenfoma (Richter Sendromu), prolenfositik lösemi, Hodchkin lenfoma, akut lenfoblastik lösemi ve multipl miyeloma dönüşebilir. Herpes zoster, bakteriyel enfeksiyonlar ve diğer enfeksiyonlar hücresel ve humoral immunité bozukluğa bağılı görülür. Hastalarda ölüm enfeksiyonlar, kanama ve KLL'nin başka hastalığa dönüşmesi sonucu olur. Hastalığın tedavisinde kemoterapi ve allojenik kök hücre nakli sıklıkla uygulanan tedavi çeşitlerindedir [1, 2, 4].

### 2.2.2. Akut lösemiler

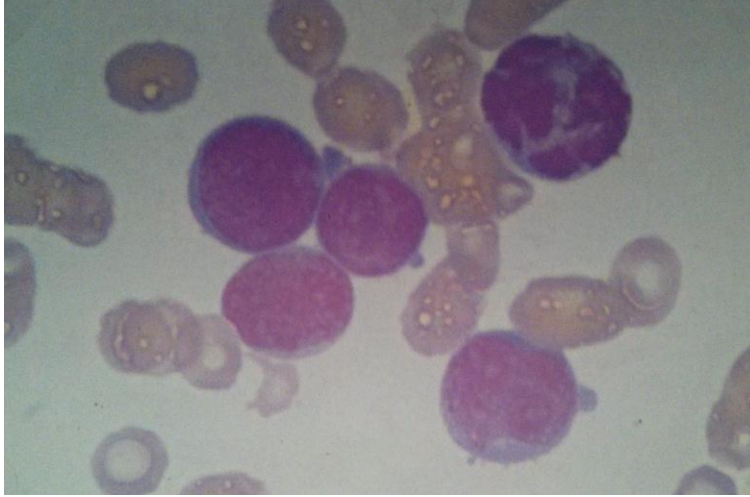
Akut lösemi hematopoetik kök hücrelerini içeren bir klonal hastalıktır. Akut lösemilerin etyolojisi kesin olarak bilinmemektedir. Genetik predispozisyon, ilaçlar, kimyasal maddeler, çevresel ve mesleksel faktörler, çocuk ve erişkinlerde sıklıkla suçlanan lökomojenik etkenlerdir. Akut lösemiler kendi

içerisinde, akut miyeloid lösemi (AML) ve akut lenfoid lösemi (ALL) olmak üzere ikiye ayrılırlar [2].

### Akut lenfoid lösemi

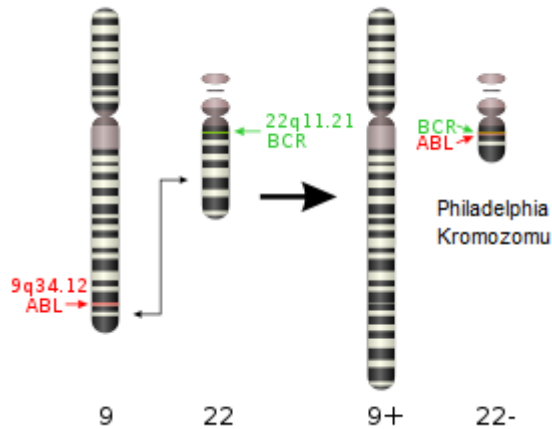
Akut lenfoid lösemi (ALL) agresif lenfoid kökenli hematolojik malignitedir. Olgunlaşmamış T veya B-lenfoblastların kemik iliği periferik kan ve ekstramedüller sahalara geniş yayılımı söz konusudur. Çeşitli deneysel çalışmalar istenmeden intrauterin radyasyona maruz kalma veya timik büyüme için yapılan radyoterapinin ALL riskini arttırdığı ortaya konulmuştur. 2-5 yaş grubunda tanı konmuş ALL vakalarının neonatal kan örneklerinde retrospektif olarak ETV-6 translokasyonunun saptanması ALL'nin intrauterin mutasyonla başlayabileceği düşüncesini güçlendirmektedir. ALL' ye neden olan etkenler arasında prenatal sigara kullanımı, enfeksiyonlar, diyet, elektromanyetik alan ve hidrokarbonların payı çok azdır. ALL çocukluk çağında predominant olup, vakaların 2/3'ü çocukluk çağında görülür. 1960'lara kadar fetal olan hastalığın kemoterapideki gelişmelere bağlı olarak günümüzde % 80'inde kür elde edilmektedir. Bununla birlikte erişkin ALL' de prognoz kötüdür. Prognozu belirlemede önemli faktörler tutulan lenfoid hücrelerin T veya B lenfoblast oluşu ve yüksek riskli sitogenetik belirteçlerden (t(9;22), (Bcr-Abl)) translokasyonunun bulunup bulunmamasıdır. ALL' de klinik belirtiler genellikle kemik iliği yetersizliğinin bir sonucu olup bunlar anemi, enfeksiyonlara karşı hassasiyet ve kanama şeklindedir. Hastalar uzun süre devam eden anemi semptomlarından şikayetçi olup, solukluk, çarpıntı, nefes darlığı, göğüs ağrısı ve halsizlik gibi sekonder semptomlar anemiye bağlıdır. Ateş sıklıkla görülür ve nedeni genellikle nütropeniye bağlı enfeksiyondur. Lenfadenopati, splenomegali ve hepatomegali gibi organomegaliler ALL'de sıklıkla görülür. Hastada ALL şüphesi varsa tam kan sayımı, görüntüleme yöntemleri, kemik iliği aspirasyon biyopsisi ve periferik kan yayma preparatı yapılmalıdır. Tam kan sayımı ve yayma preparat lenfoblast içeren lökositozu gösterecektir. Hastanın biyokimyasında hiperürisemi, hipokalsemi, hiperfosfatemi, LDH yüksekliği ve tümör

belirteçleri yüksekliği görülebilir. Kemik iliği aspirasyonunda hipersellüler kemik iliğinde homojen lenfoblast sahaları görülür [1-3, 35].



Şekil 2.6. ALL periferik kan yayması [9]

Hastaların sitogenetik incelemesinde Philadelphia kromozomu (t(9;22) (q34;p11)), yetişkinlerde %40, çocuklarda ise %5 oranında pozitifdir. Philadelphia kromozomu pozitif ALL genellikle kötü prognoza sahiptir [1, 2].



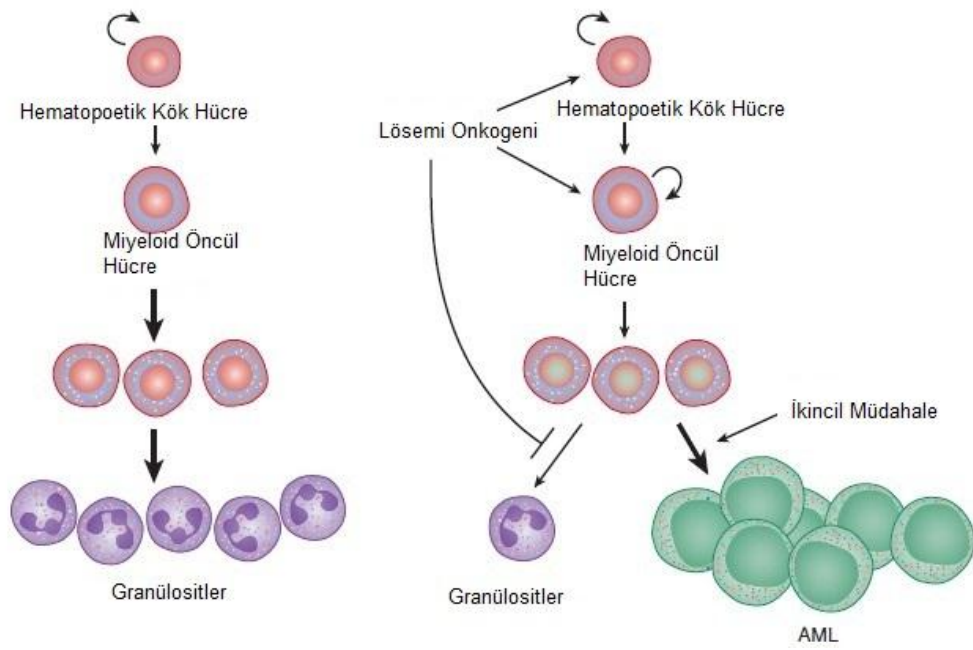
Şekil 2.7. Philadelphia Kromozomu [34].

Bununla beraber ETV-6 translokasyonları ve hiperdiploidi ile birlikte kromozom sayısı hücre başına > 50 ise iyi prognoza sahip gruba girmektedir.

ALL tedavisinin ana unsuru kemoterapidir. Tedavi tipinin seçiminde immünofenotip ve risk faktörleri önemli rol oynar. ALL'li çocuklar standart protokol ile % 98 remisyona girerler ve en az % 80'i 5 yıl yaşar. ALL tedavisinde remisyon indüksiyonda amaç kan sayımı ve kemik iliği görünümünü normale getirmek, blast sayısını %5'in altına indirmek ve ekstramedüller hastalığı elimine etmektir. ALL tedavisi esas olarak üç aşamadan oluşmaktadır. Bu aşamalar remisyon indüksiyon tedavisi, konsolidasyon ve idame tedavisi, santral sinir sistemi profilaksisidir. Remisyon indüksiyon tedavisinde amaç kanserli hücrelerin üremesini durdurmak ve blast sayısını azaltmaktır. Bu amaçla hastalara hastanın yaşına, cinsiyetine, hastalığın durumuna göre çeşitli kemoterapotikler verilir. Konsolidasyon ve idame tedavisinde ise hasta remisyona sokulduktan sonra durumun stabil kalması için gerekli tedavi yapılır. Konsolidasyon tedavisi daha yüksek dozda ilaçların kullanıldığı bir tedavi olup, daha dirençli blastların yok edilmesini amaçlar. Santral sinir sistemi profilaksisi bazı vakalarda kemoterapi ve santral sinir sisteminin ışınlanması aşamalarından oluşmaktadır. Kemoterapi ile birlikte verilen 2400 Rad kranial ışınlama tedavisinin hastalarda sinir sistemi relapsını önemli ölçüde önlediği bilinmektedir [1-3].

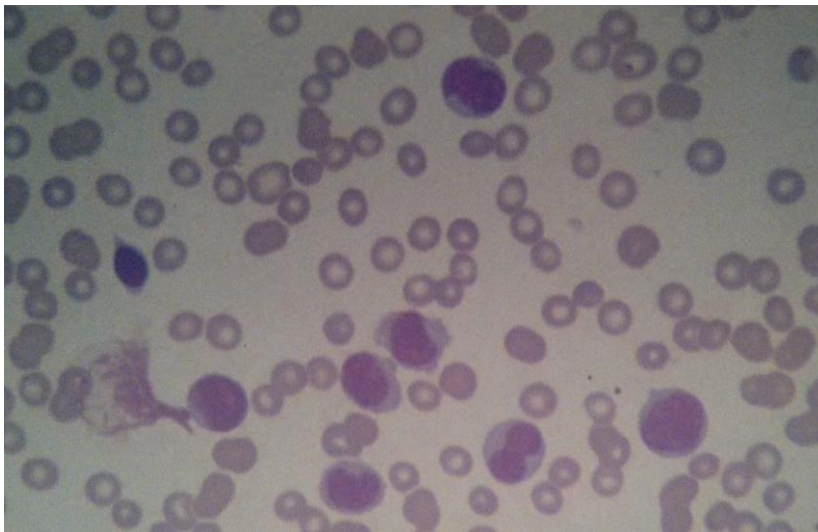
### Akut miyeloid lösemi

Akut miyeloblastik lösemi (AML) hematopoetik dokunun klonal malign hastalığıdır. AML kemik iliğinde myelositler, eritrositler ve megakaryositer serinin hücrelerinde mutasyon defekti ve kontrolsüz çoğalma ile meydana gelen klonal hematolojik, heterojen bir grup hastalıktır. Bu malign hücreler eitroid, myeloid ve megakaryositik prekürsörlerin normal gelişim ve maturasyonunu ortadan kaldırmaktadır. AML' li hastalardaki miyeloid hücreler aşırı sayıda miyeloblast oluşumuna yol açarak, normal bir şekilde olgunlaşmazlar. Miyeloblastlar hemotopoetik yetersizlikle sonuçlanacak şekilde kemik iliğindeki normal hücrelere baskın gelirler [3, 4].



Şekil 2. 8. AML' de hematopoez [1]

Hücre popülasyonu ağırlıklı olarak, eosinofiller, basofiller, monositler, eritrositler, megakaryositler veya nötrofillerden veya bunların kombinasyonlarından meydana gelmiş olabilir. Tek hücreler köken bozukluğu sergileyebilirler ve lenfoid belirteçleri açığa çıkarırlar [3, 4].



Şekil 2.9. AML periferik kan yayması [9]

AML genellikle yaş ortalaması altmış civarında olan kişilerde görülür. Polisitemi vera ve miyelofibrosis gibi miyelodisplastik ve miyeloproliferatif bozukluklar AML' ye dönüşebilir. Lösemi riski Down Sendromlu hastalarda sağlıklı bireylere oranla yirmi misli daha fazladır. AML' nin semptomları genellikle yorgunluk ve kanama olup, bu semptomlar pek çok hastada birkaç hafta gibi kısa bir sürede ortaya çıkabilir. Tam kan sayımı, periferik kan yaymasının incelenmesi, kemik iliği aspirasyon biyopsisi akut lösemnin tanısını koymada esastır. Periferik kan yayması incelendiğinde miyeloblastlar ayrı nükleuslara, dar sitoplazmalara ve azurofilik granüllere sahip olduğu gözlenir. Karakteristik Auer çomakları, lizozomlar içindeki azurofilik granüller tarafından oluşturulurlar. Histokimyasal boyamalar tanıda yardımcı olabilir; örneğin, akut monositik lösemi non spesifik esteraz boyası ile ayırt edilebilir. Akış sitometrisi (Flow Sitometri) ile immünofenotipleme, tanımlayıcı bir tanı koymaya ve AML'yi akut lenfositler lösemiden ayırt etmeye yardım eder. Tam kan sayımında akyuvar sayısı, normal, yüksek veya düşük olabilir. Anemi ve trombositopeni sebebiyle kan yaymasının incelenmesi zordur ancak olgunlaşmamış kan hücreleri görülebilir [3, 4, 35].

### **2.3. Benzen, DMBA ve Lösemi**

#### **2.3.1. Benzen ve Lösemi**

Aromatik hidrokarbon bileşiklerinin bir türevi olan benzen ( $C_6H_6$ ) hoş kokulu, renksiz, sıvı halde bulunan bir maddedir. Benzenin erime noktası  $5,5^\circ C$ , yoğunluğu  $0,87 \text{ g/cm}^3$ , kaynama noktası  $80,1^\circ C$  olup, oda sıcaklığında yüksek buhar basıncına ( $20^\circ C$ 'de  $9,95 \text{ kPa}$ ) sahip olduğundan hızla buharlaşabilir. Suda kolaylıkla çözünebilen benzen ( $25^\circ C$ 'de  $1,8 \text{ g/L}$ ) organik çözücülerle de karışım oluşturabilir. Toluen (metil benzen), ksilen (dimetil benzen), benzin, aseton, eter, stiren, anilin ve hekzan gibi birçok bileşik, benzenin bilinen türevleridir. Benzen ve türevleri; kömür katranı distilasyonu, alifatik hidrokarbonların yüksek basınç ve ısı altında aromatize edilmesi ve petrolden sentez yoluyla elde edilirler [15, 59].

Benzen, hem fiziksel özellikleri hem de benzerlerine göre çok daha ucuz olması sebebiyle endüstride yaygın olarak kullanılan çözücülerden biridir. Bu amaçla; kundura, çanta vb. deri eşyalar ile karton kutu imalatında yapıştırıcı olarak, kuru temizleme, madeni aletleri temizleme, matbaacılıkta kullanılan boya eritmede, oto ve yıldız boya eritmede ve seyreltme işlemlerinde sıklıkla kullanılır. Ayrıca kauçuk ve film sanayinde de geniş çapta kullanıma sahiptir. Benzen, enerjetik değeri yüksek olması sebebiyle bazen doğrudan bazen de benzine karıştırılarak yakıt olarak da kullanılmaktadır. Benzen türevleri de sanayide yaygın olarak kullanılan maddelerdir. Örneğin; toluen, ksilen boya ve yapıştırıcı sanayinde, anilin boya sanayinde, benzenin halojenli bileşikler olan klorlu hidrokarbonlar ise pestisid olarak kullanılmaktadır. Benzen yaygın kullanım alanı ile iş yaşamı ve günlük hayatta da sıklıkla maruz kalınan kimyasal maddeler arasındadır. Bu sebeple maruz kalınan benzen miktarı ve vücuda alınış şekli büyük önem arz etmektedir. Benzen vücuda daha ziyade solunum yolu ile alınır. Vücuda alınan benzenin yaklaşık %50'si çeşitli dokularca absorbe edilirken, geri kalanı yine solunum yolu ile dışarı atılır. Yiyecekler ve su ile sindirim yoluna alınan benzen miktarı minimal düzeydedir. Deri yoluyla vücuda alınan benzen ise organizmaya ciddi zararlar verecek kan konsantrasyonlarına ulaşamaz. Bununla birlikte deri yoluyla absorpsiyonun ciddiyeti, maruziyet süresinin kısaltılması ve maruz kalan deri yüzey alanının küçültülmesi sağlanarak azaltılabilir. Absorbe edilen benzen, özellikle yağdan zengin dokular başta olmak üzere tüm vücuda dağılır. Tüm diğer kimyasal maddeler gibi benzen de karaciğerde, sitokrom P-450 2E1 sistemi içinde oksidatif olarak metabolize edilir. İnsandaki yarılanma ömrünün 28 saat olduğu bildirilmiştir. Benzen metabolize olmadan idrarla atılabileceği gibi primer veya sekonder metabolitlerine (benzen oksit, benzen dihidrodol, fenol, benzokinon, sfenilmerkaptirik asit (S-PMA), mukonik asit ve katekol) dönüştürülerek idrarla da atılabilir. İdrarda S-PMA'nın tayini benzen maruziyetinin belirteci olarak kullanılabilir. Benzenin karaciğerde metabolize edilmesi ile oluşan hidrokinon, fenol ve redox reaksiyonuna girebilen diğer bileşikler reaktif oksijen türevlerinin oluşmasına sebep olabilirler [15].

### Benzenin nörotoksik etkileri

Benzene kısa sürede ve yüksek dozda maruziyet sonucu oluşan akut tablo nadir görülmekle beraber, bu durumda merkezi sinir sisteminin etkilenmesi söz konusudur. Akut maruziyet sonucu uyku hali, yorgunluk, baş ağrısı, bilinç bulanıklığı, denge bozukluğu görülebilir. Çok yüksek dozlara maruz kalma söz konusu ise solunum durması sonucu ölüm meydana gelebilir. Yapılan çalışmalarda uzun süre organik çözücülere maruz kalmış olan emekli boyacılarda kontrol grubuna göre nörolojik ve depresif semptomların daha fazla görüldüğünü bildirilmiştir [15].

### Benzenin hematolojik etkileri

Uzun süreli benzen maruziyetinin miyelotoksik etkisi, nörovejetatif etkisine göre daha ön plandadır. Benzenin etki mekanizması kesin olarak bilinmemekle birlikte, kemik iliğinde benzenden, benzol epoksit adı verilen ara bir metabolit oluştuğu, bunun da hematopoezi inhibe ettiği yaygın bir düşüncedir. Benzen, kemik iliğindeki hematopoetik kök hücreyi etkilemekte ve hematopoezdeki üç fonksiyonu da (eritroid, lökoid, miyeloid ve megakaryositer serileri) bozarak pansitopeniye neden olmaktadır. Benzen zehirlenmesinde (Benzolizm) eritroid serinin bozulması ile aplastik anemi görülür, lökoid serinin bozulması sonucu oluşan lökopeni ve lenfopeni nedeniyle sık tekrarlayan enfeksiyonlar meydana gelir ve trombositopeni oluşması peteşiyal tarzda (hafif kanama) kanamalara sebep olur. Periferik kan hücrelerinde baskılanma benzenin hematotoksitesisi için iyi bir göstergedir [15].

### Benzenin kanserojenik etkileri

Benzen, Uluslararası Kanseri Araştırma Ajansı (IARC) tarafından birinci dereceden insan kanserojeni olarak tanımlanmış bir maddedir. Uzun süre benzene maruz kalan kişilerde lösemi gelişebileceği Aksoy ve arkadaşları



tarafından 1967–1973 yılları arasında, İstanbul’da, benzenli materyal kullanan işçiler üzerinde yaptıkları çalışmada ortaya konmuştur. Bu çalışma benzenin lökomojenik etkisinin gösterildiği ilk epidemiyolojik araştırma olarak tıp literatürüne geçmiştir. Aksoy ve arkadaşlarının çalışmasından sonra çeşitli ülkelerde benzen ve lösemi arasındaki ilişkiyi ortaya koyan çok sayıda çalışma yayınlanmıştır. Benzen maruziyeti sonucu gelişen lösemi olgularının çoğu AML olmakla birlikte benzenin neden olduğu AML, teorik bilgiler ve sınırlı kohort gözlemler tabanında AML’nin sekonder formu olarak kabul edilmektedir. Yapılan bir meta analiz çalışmalarında, benzen ile AML arasında pozitif bir doz-cevap ilişkisi olduğunu ve özellikle lastik, ayakkabı ve boya sanayinde çalışan işçilerde AML riskinin arttığını bildirilmiştir. Bununla beraber bazı kohort çalışmalarda benzene maruziyet sonucu kronik lenfositler lösemi (KLL) riskinde bir artış olmadığı ortaya konmuştur. Bazı vaka kontrol çalışmalarında ise KLL riskinde artış olduğu rapor edilmiştir. Benzen ve lösemi arasındaki ilişkiyi ortaya koyan son çalışmalarda, kronik benzen maruziyetinde, 2,5–10 yıllık bir periyotta lösemi riskinin yükseldiğini rapor edilmiştir. Konu ile ilgili yapılan çoğu araştırma benzene maruziyet süresi ile lösemi görülme riskindeki artış arasında pozitif bir ilişki olduğu bildirilmektedir [15].

#### Benzenin genotoksik etkileri

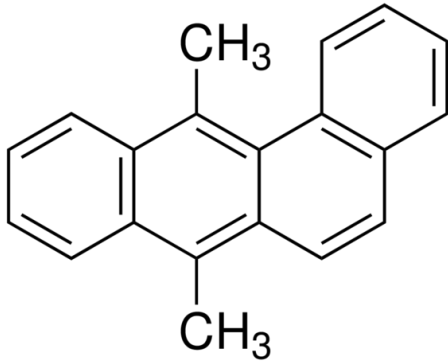
Benzen, kromozomlarda aberasyonlarına yol açabilen bir madde olup, kromozomal etkiler, benzen konsantrasyonunun 100 ppm’in üzerinde olduğu uzun süreli maruziyetin söz konusu olduğunda ortaya çıkabilir. Bazı çalışmalarda ise benzen konsantrasyonu 10 ppm üzerinde olduğu durumlarda da kromozomal etkilerin oluşabileceği rapor edilmiştir. Çalışmalarda CYP2E1, MPO, NQO1 ve GSTT1 gibi benzen metabolizmasında rol alan genlerdeki varyasyonların benzen hematotoksisitesi ile ilişkili olabileceğini rapor etmişlerdir. Bazı çalışmalarda ise düşük dozda benzene maruz kalan kişilerin lenfositlerinde DNA hasarı olduğu bildirilmiştir [15].

### Benzenin immünolojik etkileri

Yüksek dozda benzen maruziyetinde T lenfositlerde, İmmünglobülin G ve İmmünglobülin A seviyelerinde düşüş, İmmünglobülin M düzeyinde ise artış meydana geldiği bildirilmiştir. Benzen maruziyetinde CD4+, CD8+ve CD19+ yüzey molekülleri düzeylerinde düşme, CD16+,CD56+ yüzey molekülleri ile NK (Naturel Killer) hücre düzeylerinde artış olduğunu bildirmişlerdir [15].

### **2.3.2. DMBA**

Bir polibenzen türevi olan DMBA aynı zamanda polisiklik aromatik hidrokarbonlar ailesinin de üyesidir [98].



Şekil 2.10. DMBA' nın moleküler yapısı [70]

Molekül Formülü :  $C_{20}H_{16}$

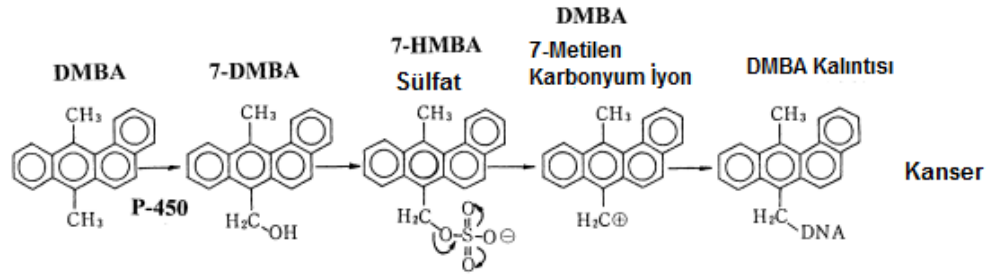
Molar kütlesi : 256.34 g/mol

Erime Sıcaklığı : 122-123°C

DMBA deneysel lösemi ve diğer kanser türlerini oluşturmak amacıyla kemirgen deney modellerinde sıklıkla kullanılmaktadır [13, 14, 87, 89, 90]

Dolaylı bir kanserojen olan DMBA'nın kanserojen hale gelebilmesi için metabolik aktivasyona ihtiyacı vardır. DMBA metabolizması sırasında oluşan

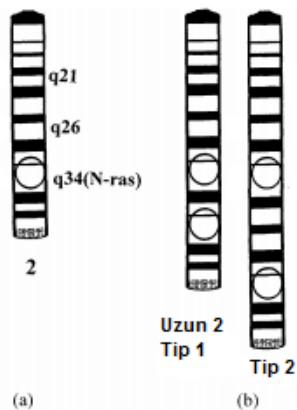
reaktif oksijen türleri hücre içerisinde üretildiği yerden diğer hücelere yayılabilir [13, 87, 98].



Şekil 2.11. DMBA'nın karaciğerde metabolize edilmesi [13]

Bu reaktif oksijen türevlerinin lipid peroksidasyonunu başlatmasıyla zararlı sonuçlar ortaya çıkar. Bu nedenle DMBA uygulanmış hayvanlardaki hepatik lipid peroksidasyonundaki artış, reaktif oksijen türlerinin üretimini arttırırken antioksidan mekanizmalarda bir azalmaya sebep olur [13, 98].

DMBA'nın kanserojen mekanizması ile ilgili çeşitli görüşler olmakla birlikte en çok kabul gören görüş N-ras mutasyonu yaparak sürekli hücre bölünmesini uyardığı yönündedir [13, 99].



Şekil 2.12. DMBA uygulaması sonucu oluşan N-ras mutasyonu [13]

DMBA ile indüklenen lösemide lösemi hücreleri çoğunlukla karaciğer ve dalakta birikir. Lösemi ilerledikçe karaciğer büyür ve vücut yüzeyinden palpe

edilebilir hale gelir. Ayak altlarında solgunluk ve kilo kaybı, ilk aşamada lösemiden şüphelenmek için yeterli bir ip ucudur. Lösemnin ilerleyen safhalarında günde 2-10 g kilo kaybı, karaciğer yetmezliği, lösemnin son safhalarında ise aşırı kilo kaybı ve peteşiyal tarzda kanamalar gözlenmektedir. Lösemi tespit etmenin en kolay ve güvenilir yolu kan yayma preparatı ve karaciğer biyopsisi alma yöntemleridir [13].

### DMBA uygulaması sonucu oluşan lösemi tipleri

DMBA uygulaması sonucu oluşan lösemiler anatomik, histolojik ve sitogenetik özelliklerine göre sınıflandırıldığında dört ana tip tanımlanmıştır.

#### *Hepatik tip*

DMBA ile indüklenen lösemilerin % 80'ini bu tip oluşturmaktadır. Karaciğer genellikle granüler yapıda, esnekliğini kaybetmiş ve vücut ağırlığının % 10-15'i ağırlığına ulaşmış durumdadır. Dalak ağırlığı genellikle 1 g'ın üstünde olup, bazı vakalarda timus ve lenf nodları büyümüş durumdadır. Periferal kanda hafif ya da orta dereceli lökosit yüksekliği hastalığın ilerleyen safhalarında ortaya çıkar ve genellikle  $50 \times 10^3$ 'ü aşmaz. Kan yaymasında çoğunlukla atipik eritroblastlar ve anormal blastlar görülür. Karaciğer histolojik incelemesinde karaciğer sinüslerini işgal etmiş anormal derecede büyük blastlar gözlenir. Lösemi hücreleri, dalakta genellikle dalak hücrelerine saldırır, lenf folikülleri ise lösemnin geç fazlarına kadar korunur. Lösemik infiltrasyon genellikle, lenf nodları ve kemik iliğini en fazla etkiler.

#### *Miyeloblastik tip*

Miyeloblastik tipin karakteristik özelliği yüksek lökosit sayısı ve lösemi hücrelerinde peroksidaz pozitif granül bulunmasıdır. Dalak genellikle büyümüş durumdadır. Karaciğer hafif veya normal derecede büyümüş durumda ve yeşilimsi bir renk almıştır. Karaciğer histolojik incelemesinde

lösemik hücrelerin genellikle periportal alanlarda yoğunlaştığı gözlenmektedir. Trizomi +2 bu tip lösemide genellikle görülmez.

#### *Lenfoid tip*

Lösemilerin % 8'i lenfoid tiptedir. Lökosit sayısı yüksekliği ve periferik kanda çok sayıda lökosit gözlenmesi tipik özelliğidir. Dalak büyümüşür ancak karaciğer normal durumdadır. Lenfoid ve eritroid lösemilerin birlikte görüldüğü durumlar hariç +2 trizomisi gözlenmez.

#### *Timik tip*

Lösemilerin yaklaşık % 3'ü bu tipte olup, büyük timus, hafif derecede büyümüş karaciğer, aşırı derecede büyümüş lenf nodları ve splenomegali ile karakterizedir. Bu tipte en belirgin özellik palpe edilebilen lenf nodlarıdır [13].

DMBA uygulaması sonucu oluşan lösemi tipleri ve karakteristik özellikleri Çizelge 2.1'de özetlenmiştir.

Çizelge 2.1. DMBA uygulaması sonucu oluşan lösemi tipleri [13]

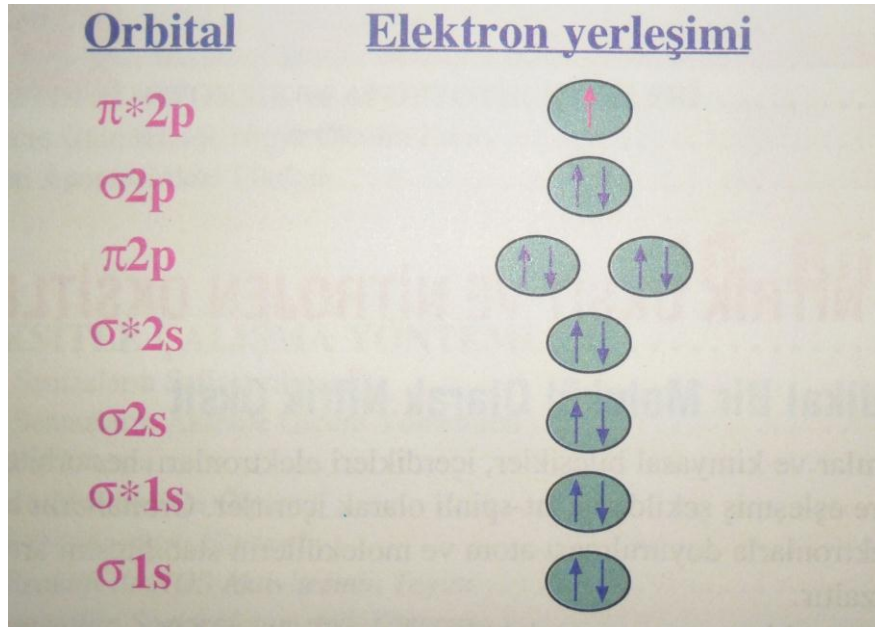
| Makroskobik     | Karaciğer Histolojisi | Hematoloji    | Karyotip | Çekirdek Şekli |
|-----------------|-----------------------|---------------|----------|----------------|
| Hepatik (%95,6) | Diffüz                | Eritroblastik | +2       | Yuvarlak       |
|                 |                       | Endotel       | Normal   | Şekilsiz       |
| Lenfoid (%0,1)  | Periportal            | Lenfoid       | Normal   | Şekilsiz       |
| Kloroma (%3,4)  | Periportal            | Miyeloid      | Normal   | Şekilsiz       |
| Timik (%0,9)    | Periportal            | Timik         | Normal   | Şekilsiz       |

## 2.4. Serbest Radikaller ve Nitrik Oksit

Yapılarında eşleşmemiş elektron içeren atom veya bileşikler serbest radikaller olarak tanımlanmaktadır. Serbest radikaller normal hücresel metabolizma sırasında oluşabildiği gibi, çeşitli dış etkenler aracılığı ile de meydana gelebilir. Biyolojik serbest radikaller oldukça dayanıksız ve aynı zamanda reaktif moleküller olup, elektronları hücredeki diğer moleküllerle etkileşime girerek oksidatif stres meydana getirirler. Oksidatif stres, organizmadaki pro-oksidan ve anti-oksidan dengenin oksidanlar lehine bozulması olarak tanımlanmaktadır [7].

### 2.4.1. Nitrik oksit

Nitrik oksit ( $\text{NO}\cdot$ ) renksiz bir gaz olup, serbest radikal özelliğine sahip basit bir moleküldür. Nitrojen merkezli bir radikal olarak bilinen nitrik oksit molekülü, gittikçe artan enerji seviyelerine göre  $1s^2 1s^2 2s^2 2p^4 2p^2 2p^1$  şeklinde bir elektronik konfigürasyona sahip olup 2p dış orbitalindeki paylaşılmamış tek elektron, bu moleküle radikalik özellik kazandırır [8].



Şekil 2. 13. Nitrik oksit molekülünün elektronik konfigürasyonu [8]

Nitrojen gazında ( $N_2$ ) iki nitrojen atomu birbirine üçlü bağ ile bağlı olup, bağ uzunluğu  $1,06 \text{ \AA}$ 'dur. Çift bağ ile birbirine bağlı olan oksijen molekülünde ise bağ uzunluğu  $1,18 \text{ \AA}$ 'dur. Nitrik oksit gazında ise nitrojen ile oksijen atomu arasındaki bağ uzunluğu  $1,14 \text{ \AA}$  olup, iki atomun birbirine 2,5 bağ olarak ifade edilebilecek bir bağ ile bağlandığını gösterir. Nitrik oksidin saf sudaki maksimum çözünürlüğü  $1 \text{ atm}$  basınç altında  $25^\circ\text{C}$ 'de  $1,9 \text{ mM}$ ,  $37^\circ\text{C}$ 'de ise  $1,4 \text{ mM}$ 'dir. Radikallerin en önemli özelliği, paylaşılmamış elektron içeriği nedeniyle çok reaktif olmalarıdır. Oysa paylaşılmamış elektron içermesine rağmen  $\text{NO}$ ' nun reaktivitesi son derece düşüktür. Bunun başlıca nedeni, paylaşılmamış elektronun azot veya oksijen atomları üzerinde lokalize olmaması, fakat iki atom üzerinde delokalize olarak bulunmasıdır. Benzer durum çeşitli halkasal yapıdaki organik moleküllerde de görülür. Bu tür moleküllerin bazı radikal formlarının reaktivitesi, paylaşılmamış elektronun tek atom üzerinde lokalize olduğu radikallerin reaktivitesinden çok daha azdır. Radikalik tepkimeler yönünden reaktivitesi az olmasına rağmen  $\text{NO}$  büyük bir afinite ile organik yapılardaki metal merkezlere bağlanır.  $\text{NO}$  organik radikallerle difüzyon limitine yakın bir hızla tepkimeye girerek nitrojen içeren organik moleküllerin oluşmasına neden olur. Nitrik oksidin biyolojik moleküllerle başlıca önemli tepkimeleri ise kendiliğinden oksidasyonu sırasında oluşan reaktif nitrik oksit türevleri aracılığıyla gerçekleştirilir [5, 8]. Bu türlerin bir kısmı radikal ve/veya oksitleyici olduklarından sağlık için risk oluştururlar. Radikal özellik gösteren nitrik oksit türleri reaktif ve kısa ömürlü iken, nitrit ve nitrat gibi türler ise  $\text{NO}$  oksidasyonunun stabil son ürünleridir. Çizelge 2.2'de verilen nitrik oksit türlerinin önemli bir kısmı biyolojik sistemlerde oluşurlar. Vücutta oluşan nitrik oksit türlerinin başlıca kaynakları yine vücutta oluşan nitrik oksittir. Nitrik oksidin tek elektron oksidasyonu ile nitrozonyum iyonu ( $\text{NO}^+$ ) oluşur. Molekülün tek elektron ile indirgenmesiyle oluşan tür ise nitroksil ( $\text{NO}^-$ ) iyonudur. Nitrojen oksit türevlerinden biri olan nitrik oksit ( $\text{NO}^\bullet$ ) radikali endojen olarak sentezlenebilen ve önemli fizyolojik etkileri olan bir biyomoleküldür [8].

Çizelge 2.2. Atmosferde ve biyolojik sistemlerde bulunabilen başlıca nitrojen oksit türleri [8]

| Formülü                                    | Adı                    | Diğer Adları           |
|--|------------------------|------------------------|
| NO   | Nitrojen monoksit      | Nitrik oksit           |
| NO <sup>+</sup>                            | Nitrozil               | Nitrozonyum iyonu      |
| NO <sup>-</sup>                            | Okzonitrat             | Nitroksil anyonu       |
| NO <sub>2</sub>                            | Nitrojen Dioksit       |                        |
| NO <sub>2</sub> <sup>+</sup>               | Nitril İyonu (Katyonu) |                        |
| NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>               | Nitrit                 | Dioksonitrat           |
| NO <sub>3</sub>                            | Nitrojen trioksit      |                        |
| NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>               | Trioksonitrat          | Nitrat                 |
| NO <sub>2</sub>                            | Dinitrojen monoksit    | Nitröz oksit           |
| N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> <sup>-</sup> | Dioksodinitrat         |                        |
| ONOO                                       | Nitrozoperoksil        | Peroksinitrit radikali |
| ONOO <sup>-</sup>                          | Peroksinitrit          |                        |
| ONOOH                                      | Peroksinitröz asit     |                        |
| N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>              | Dinitrojen trioksit    |                        |
| N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>              | Dinitrojen tetraoksit  |                        |
| N <sub>3</sub>                             | Trinitrojen            |                        |
| N <sub>3</sub> <sup>-</sup>                | Trinitrit              | Azid                   |

Nitrik oksit çok yönlü biyolojik haberci bir molekül olup, farklı biyolojik etkilere sahiptir. Nitrik oksit başlangıçta çeşitli biyolojik fonksiyonların regülasyonunda rol alan, hücre içi ve hücreler arası bir haberci molekül olarak tanımlanmıştır. Bu görevlere verilebilecek en temel örnekler sinir sistemindeki nörotransmitter fonksiyonu ve damar düz kaslarının gevşemesine olan etkileridir. Nitrik oksitle yapılan sonraki çalışmalar nitrik oksidin lökositlerin endotel hücrelerine yapışmalarında, inflamasyonlu dokuya lökosit göçünde, platelet agregasyonunun inhibisyonunda, damar geçirgenliğinin kontrolünde, penil ereksiyonda, immün sistem fonksiyonlarında, bağırsak ve böbrekler su ve tuz emilimi fonksiyonlarında da düzenleyici rol oynadığını göstermiştir Nitrik oksidin hücreleri sitotoksik etkilere karşı koruyucu etkileri de tanımlanmıştır. Radikal özelliğine sahip olan nitrik oksit, bu özelliğinin gereği olarak başta oksijen radikalleri olmak üzere diğer atom merkezli radikallerle tepkimeye girerek, kendisinin ve tepkimeye girdiği radikalın radikallik özelliğine son verir. Bu özelliğiyle nitrik oksit tokoferoller ve askorbik asit benzeri bir antioksidan özellik kazanır. Belirtilen düzenleyici ve koruyucu



etkilerinin yanı sıra sitotoksik etkilere de sahiptir. Normal fizyolojik homeostatik kontrolde görev alan nitrik oksit çeşitli inflamasyon ve çeşitli hastalıklarda sentezi artan ve sonuçta doku hasarına katkıda bulunan etkenlerden biridir. Artrit ateroskleroz, doku enfeksiyonları, dejeneratif nöronal hastalıklar, diyabet ve pek çok diğer hastalıkta NO sentezi artar ve üretilen NO doku hasarına doğrudan sebep olur. Nitrik oksidin sitotoksik etkilerinin moleküler düzeydeki nedeni, nitrik oksitten kaynaklanan serbest radikallerin enzim inhibisyonlarına, zar lipidlerinin oksidatif yıkımına ve hücresel antioksidanların tüketimine neden olmalarıdır. Nitrik oksidin bahsedilen çok yönlü etkileri aşağıda özetlenmiştir [5, 8].

#### Nitrik oksidin Düzenleyici etkileri

- Düz kasların gevşemesi
- Hücre adhezyonunun kontrolü
- Platelet agregasyonunu inhibisyonu
- Renal ve intestinal görevleri
- Damar geçirgenliğine etkileri
- İmmün sistemdeki fonksiyonları

#### Nitrik Oksidin Koruyucu Etkileri

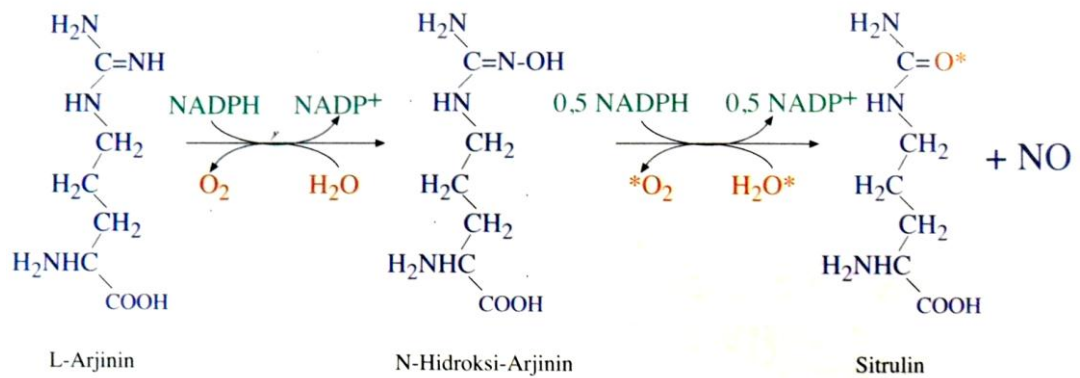
- Antioksidan olarak işlev görür.
- Antiinflamatuvar etkileri vardır.
- TNF toksisitesine karşı etkileri bulunmaktadır.

#### Nitrik Oksidin Zararlı Etkileri

- Antioksidanları tüketmesi
- Enzim inhibisyonları
- DNA hasarları

- Lipit peroksidasyonu
- Diğer toksik etkenlere duyarlılığı arttırması [8]

Nitrik oksidin sentezi için kullanılan öncül biyolojik molekül arjinin amino asidi olup, nitrik oksidin arjininden biyosentezi iki basamakta gerçekleşir. Tepkimenin ilk basamağında arjinin guadino nitrojeni ( $N^W$ ) hidroksillenerek NW-Hidroksiarjinin (N-OH-Arjinin) oluşur. Bu ara ürün oldukça stabildir ve istenirse tepkime ortamından izole edilebilir. Enzime sıkı bağlı olan ara ürün, ikinci aşamada sitrulin ve nitrik okside çevrilir. Enzimatik NO sentezinin her iki aşaması da enzimin birer monooksijenaz aktivitesi sayesinde gerçekleşir. Nitrik oksit sentaz enzimi tarafından bir mol arjininden bir mol NO sentezi için 2 mol oksijen ile 1,5 mol NADPH kullanılır. Kullanılan oksijenlerin iki atomu suya indirgenirken, diğer iki oksijen atomu NO ve sitrulin oluşumuna katılır. Nitrik oksidin yapısındaki oksijen atomunun kaynağı, ilk monooksijenaz aktivitesi ile arjinine katılan atomdur. Sitrulindeki oksijen atomunun kaynağı ise ikinci monooksijenaz tepkimesi sırasında kullanılan oksijendir. Nitrik oksidin arjinin amino asidinin guadino nitrojeninden sentezi sırasında nitrojen atomu 5 elektronluk bir oksidasyona uğrar. Arjinin N-hidroksi-arjinine çevrilmesi sırasında substratta iki elektronluk oksidasyon; N-hidroksi-arjininden NO ve sitrulin sentezi sırasında ise aynı nitrojen atomunda üç elektronluk oksidasyon daha gerçekleşir. Bu tepkimeler sırasında elektron alıcı koenzimlere gerek yoktur ve oksidasyon ile kaybedilen elektronlar iki oksijen molekülünün suya indirgenmesinde kullanılır. Tepkime için gerekli olan üç elektron da NAPH'dan temin edilir [5, 8].



Şekil 2.14. Nitrik oksit sentaz tarafından katalizlenen arjinin amino asidinden nitrik oksit sentezi [8]

Belirtilen arjininden NO sentezi sadece insanlara özgü bir olay olmayıp, memelilerde dahil olmak üzere çok çeşitli canlı türleri NO sentezlemekte ve sentezlenen NO çeşitli biyolojik faaliyetlerde kullanılmaktadır. Arjininden kaynak alan NO sentezi kuşlar, balıklar, omurgasızlar hatta bitki ve bakterilerde de gösterilmiştir [8].

Nitrik oksit sentezini katalizleyen NOS enzimlerinin konstitüf (cNOS) indüklenebilir NOS (iNOS) olmak üzere iki temel izoformu bulunmaktadır. Konstitüf enzimin ayrıca iki formu bulunmaktadır. Bunlardan biri endotelial NOS (eNOS), diğeri ise nöronal NOS (nNOS)'dur [5].

#### Konstitüf Nitrik Oksit Sentetazlar (cNOS)

Endotel hücreleri uyarıldıkları zaman, anında NO üretmeye başlarlar. Uyarıya ani cevap oluşması, NO sentezini katalizleyen enzimin konstitüf bir enzim olduğunu ve uyarıya yanıt için yeni bir protein sentezinin gerektirmediğini gösterir. Endotelial NOS kofaktör olarak NADPH ve Ca<sup>+2</sup>/kalmodule ihtiyacı duyar ve NG-Metil-L-Arjinin (L-NMA) ve NG-Nitro-L-Arjinin (L-NNA) gibi arjinin analogları tarafından kompetitif olarak inhibe edilir. Uyarıcılarla hücrede geçici olarak yükselen sitoplazmik Ca<sup>+2</sup>, Ca<sup>+2</sup>/kalmodule

kompleksi şeklinde eNOS'u aktive eder. Endotel hücreleri tarafından sentezlenen NO, difüzyonla düz kas hücrelerine geçerek, guanilat siklazı aktive edip, cGMP seviyesini artırır ve düz kaslarda gevşemeyi sağlar. Kalsiyum pompalarının sitoplazmik kalsiyum derişimini düşürmesi ile eNOS aktivasyonu sona ereceğinden; eNOS tarafından kısa süre ile düşük derişimde NO sentezi sağlanır. Konstitüf NOS enzimlerinin ikinci formu ise nöronal NOS (nNOS)'dur. Bazı nöronların NMDA veya glutamat ile uyarılmasıyla enzim aktivitesi üç katına çıkar ve zamanda cGMP seviyesi artar. Bu hücrelerdeki NO ve cGMP sentezi L-NMA ve L-NNA tarafından inhibe edilir. Nöronal enzimin aktivitesi kalsiyum kalmodulin bağımlıdır. Konstitüf enzimler aktiviteleri için  $Ca^{+2}$  ve kalmoduline bağımlı olduklarından, saflaştırma çalışmaları sırasında aktiviteleri ölçülürken bu koenzimlerin deney ortamına ilave edilmeleri gerekir. nNOS, cerebral cortex, hipokampus ve corpus striatumda ve serebellumdaki bütün basket hücreleri granüllerinde bulunur [8].

#### Konstitüf nitrik oksit sentaz enzimlerinin bazı özellikleri

- Sitoplazmada nNOS veya zarda lokalize olan eNOS enzimleri bu sınıfa girer.
- NADPH bağımlı ve P-450 tipinde hemoproteinlerdir.
- L-arjinin analogları tarafından inhibe edilirler.
- $Ca^{+2}$ /Kalmodulin bağımlı enzimlerdir.
- Kısa süreli NO sentezini katalizlerler.
- Aktiviteleri çok düşük olup, dakikada miligram enzim başına pikomol seviyesinde enzim sentezlerler.
- Enzimlerin sentezi ve aktivitesi glukokortikoidlerden etkilenmez.
- Endotelial tipi olan eNOS mast hücreleri, plateletler, pankreasın  $\beta$  adacıklarında ve vasküler düz kas hücrelerinde bulunur.
- Nöronal tipi olan nNOS ise sinir sistemi, adrenal bezin medulla ve korteks kısmında ve astrositlerde bulunur [8].

### İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz (iNOS)

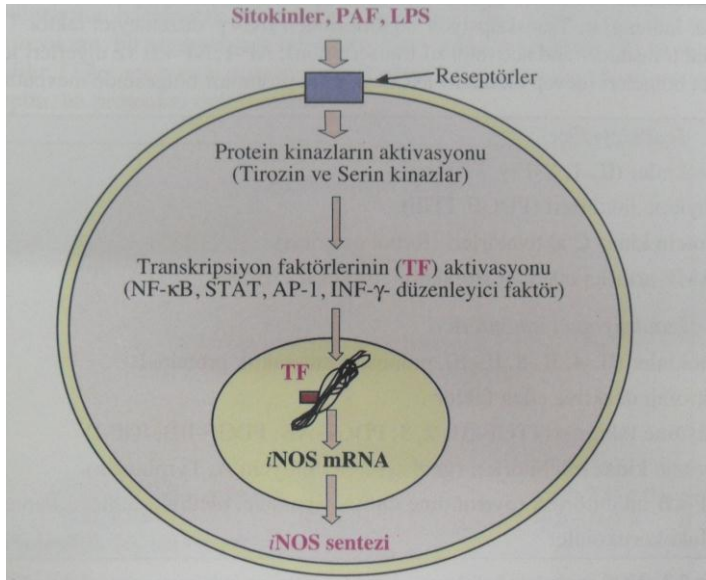
NOS enzimlerinin indüklenebilir izoformu olan iNOS alt birim olarak kalmoduline ihtiyaç duyar. Aktivitesi için hücre içi kalsiyumun artması gerekli değildir. Normal hücre kalsiyum derişiminde aktif formda bulunan bu enzim aktivitesi, artan sitoplazmik kalsiyum derişiminden etkilenmez. iNOS enziminin sentezini polisakkaritler gibi çeşitli bakteriyel ürünler ile inflamatuvar sitokinler (interferon- gama, IL-1,IL-2,TNF- $\alpha$  vb.) indükler. iNOS sadece fagositik lökositlere özgü bir enzim olmayıp uygun indüksiyon sağlandığında bütün çekirdekli hücreler bu enzimi sentezleme yeteneğine sahiptir. iNOS fetal ve erişkin akciğer dokularında indüksiyonu olmadan da bulunmaktadır. Bu bulgu, iNOS izoformunun bazı dokularda konstitif olabileceğini düşündürmektedir. Konstitif enzimlerinin aksine, fagositik lökositler ve diğer hücre türlerinde bulunan indüklenebilir nitrik oksit sentaz enzimlerinin aktivitesi ölçülmeyecek kadar azdır ya da hiç yoktur. Bu enzim aktivitesinin ölçülebilmesi için mesajcı moleküllerle protein sentezinin indüklenmesi gerekir. iNOS'un indüksiyonu çeşitli bakteriyel ürünlere (LPS gibi) ve proinflamatuvar sitokinlere bağımlıdır. Aktivitesi kalsiyum bağımlı olmayan iNOS alt birim olarak kalmoduline ihtiyaç duyar. Kalmodulin alt birimi iNOS enzimini aktif bir konformasyonda tutar [5, 8].

#### İndüklenebilir nitrik oksit sentaz enziminin bazı özellikleri

- Sitoplazmik bir enzimdir.
- NADPH bağımlı ve P450 tip bir hemoproteindir.
- L-arjinin analogları tarafından inhibe edilir.
- Kalmodulin iNOS'un bir alt birimidir ve enzim aktivitesi kalsiyum bağımlı değildir. Enzimin aktivitesi, transkripsiyon aşamasındaki kontrol ile düzenlenir.
- Uzun süreli NO sentezini katalizleyen enzimdir.
- Enzimin aktivitesi yüksektir. Enzimin miligramı başına dakikada nanomol seviyede enzim sentezlenir.

- Enzimin indüksiyonu glukokortikoidler tarafından inhibe edilebilir.
- Konstitüf enzimin aksine, uygun indükleyicilerle uyarıldığında birçok hücre türü inos enzimini sentezler. Makrofajlar, PMN-lökositler, T-lenfositler, kondrositler, hepatositler, Kupffer hücreleri, böbrek, retina ve bağırsak epitel hücreleri, fibroblastlar, keratinositler, vasküler düz kas ve çizgili kas hücreleri, mezengial hücreler, mezotelyal hücreler, beyin endotal hücreleri, mikroglia hücreleri, astrositler, pankreasın Langerhans adacıkları, HL-60 lösemi hücreleri, nöroblastoma hücreleri, adenokarsinoma hücreleri vb. [8].

Uyarılmasından sonra iNOS enziminin sentezlenmesi birkaç saat içinde gerçekleşir. Sitokinlerle indüksiyondan 24 saat sonra NO sentezi en yüksek seviyeye çıkar ve sonra hızla düşer. iNOS'un mRNA düzeyi en yüksek seviyesine 16. saatte çıkar ve maksimum NO sentezi süresince düşer. iNOS aktivitesi koenzim olarak tetrahidrobiopterin bağımlıdır; FAD ise enzim aktivitesini artırır [8, 46, 91].



Şekil 2.15. İndükleyici ajanlarla iNOS sentezinin aktivasyon mekanizması

Çizelge 2.3. Başlıca NOS formlarının dağılımı ve aktivatörleri [8]

| İzoform | Kromozomu             | Enzimi içeren Hücreler   | Enzimin Aktivasyonu   |
|---------|-----------------------|--|---|
| nNOS    | 7;26 Ekzon<br>21 kb   | - Beyin<br>- Bağırsaklar<br>- İdrar Yolları<br>- Üreme Organları<br>- Nonadrenerjik Nöronlar         | Asetil kolin<br>Bradikinin<br>Ca <sup>+2</sup> iyonoforları<br>Histamin<br>Lökotrienler |
| eNOS    | 12;28Ekzon<br>>100 kb | - Endotel Hücreleri<br>- Mast Hücreleri<br>- Düz Kas Hücreleri<br>- Nötrofiller, Plateletler         | Serotonin<br>Trombin  |
| iNOS    | 17;26 Ekzon<br>37 kb  | - Makrofajlar, Nötrofiller<br>- Solunum Yolu Epitel Hücreleri<br>- Fibroblastlar<br>- Mast HÜcreleri | LPS<br>TNF- $\alpha$<br>TNF- $\beta$<br>IL-1 ve 2                                       |

## 2.5. Hücre Döngüsü ve Apoptoz

Sağlıklı bir hücrenin bir bölünmenin sonundan diğer bölünmenin başına kadar geçirdiği sürece hücre döngüsü denir ve kendi içinde G<sub>0</sub>,G<sub>1</sub>,G<sub>2</sub>ve M olmak üzere dört ana bölüme ayrılır [1].

Hücre döngüsünün mitoz evresinden sonraki G<sub>1</sub> evresinde büyüyen ve farklılaşan hücreler G<sub>0</sub> dinlenme evresine geçmektedir. G<sub>0</sub> evresinde hücredeki tüm biyokimyasal aktiviteler devam etmektedir ancak G<sub>0</sub>'daki hücreler bölünme faaliyetini gerçekleştiremez. Hücrenin G<sub>0</sub>'dan çıkıp tekrar hücre döngüsüne katılması için büyüme faktörleri sitokinler ve tümör virusları gibi mitojenik etkenlerle uyarılması gerekmektedir. Bu etkenlerle uyarılan hücre tekrar G<sub>1</sub> evresine girecektir ve hücre bölünmesi ile sonuçlanacak aşamalardan sırasıyla geçecektir. Hücre döngüsünün hayati önem taşıyan aşamaları ve hücre bölünmesi olağanüstü mekanizmalarla korunmaktadır. Bu

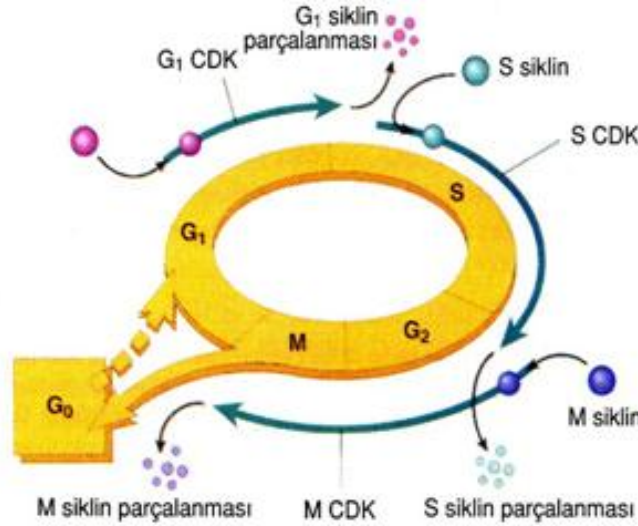
kontrol mekanizmalarındaki herhangi bir bozukluk kontrolsüz hücre bölünmesine yani kanser oluşumuna yol açacaktır [4].

Hücre çekirdeğinde yer alan hücre bölünmesinde görevli biyokimyasal mekanizmalar ekstrasellüler düzenleyici moleküller olan mitojenlerle aktive edilmektedir. Bunlar büyüme faktörleri ve sitokinlerdir. Büyümeyi düzenleyici proteinler protoonkogenler tarafından sentez edilmektedir. Hücre büyümesinin kontrolünden protoonkogenler sorumlu iken büyümenin gerekli zamanlarda sınırlandırılmasından ise tümör baskılayıcı genler pRB, p53, p21 proteinlerini sentezleyen genler sorumludur. Protoonkogenlerin çeşitli etkenlerle onkogen haline dönüşümü, hücre bölünmesinin kontrol mekanizmasını bozup kanser oluşumuna yol açmaktadır. Yaşamsal işlevini tamamlayan veya görevini yerini getiremeyecek kadar hasara uğramış hücreler ise programlanmış hücre ölümü apoptoz mekanizması ile yok edilmektedir. Çok düzenli ve titiz bir şekilde kontrol edilen hücre döngüsü, hücre büyümesi ve hücre bölünmesi için organizmanın yürüttüğü bir programdır. Hücre türüne göre hücre döngüsünün süresi bir dakika ile bir sene arasında değişmektedir. Hücre döngüsü G1, S, G2 ve M olmak üzere dört evrede gerçekleşmekte bu aşamalardan sonra hücreler G0 dinlenme evresine geçmektedir [4, 85].

Hücre tipine göre değişmekle birlikte genellikle S evresi 6-8 saat sürer ve S evresinde DNA replikasyonu, kromozomların eşlenmesi, RNA ve protein sentezi olmaktadır. Bölünme ve sentez arası süreyi belirleyen G2 evresi süresince DNA sentezi olmamakta ancak RNA ve protein sentezi devam etmektedir. Gerçekleşen sentez olayları ile hücre büyüklüğü iki katına ulaşmaktadır. Mitoz bölünme çekirdek bölünmesi ve sitoplazma bölünmesi yani sitokinez M evresinde gerçekleşmektedir. Çekirdek bölünmesi profaz, metafaz, anafaz ve telofaz olmak üzere dört evrede gerçekleşmektedir. Bu evreler esnasında çekirdek zarı erimekte, kromatin kısalıp kalınlaşarak kromozomları oluşturmakta, eş kromozomların her bir seti hücrenin zıt kutuplarına çekilmektedir. Son farklılaşma aşamasını tamamlayan hücreler



hücre döngüsü dışında bir dinlenme evresi olan G<sub>0</sub> evresine geçmektedir. G<sub>0</sub> evresi hücrenin türüne göre bir saat, bir yıl veya hücrenin tüm yaşamı boyunca sürebilir. G<sub>0</sub> evresindeki hücre tekrar mitojenlerce uyarıldığında tekrar G<sub>1</sub> evresinin başından hücre döngüsüne katılmaktadır [4].



Şekil 2.16. Hücre döngüsü evreleri ve kontrol noktaları [52]

### 2.5.1. Hücre döngüsünün gelişimi ve düzenlenmesi

Hücre büyümesi ve bölünmesi birçok biyolojik molekül ile kontrol edilmektedir. Büyüme, hücre döngüsü ve bölünme evreleri büyüme faktörleri, sitokinler, onkogenler, siklinler ve siklin bağımlı proteazlar (CDK) gibi proteinler aracılığıyla koordinasyon içinde düzenlenmekte, evrelerin herhangi birinde DNA hasarı gibi bir aksaklık söz konusu olduğunda tümör baskılayıcı genler olan p53, p21, Rb ve CDK inhibitörleri döngüyü tamamen durdurmaktadır. Ekstrasellüler uyarı ile başlayan hücre büyümesi hücre kaynaklı düzenleyici mekanizmalar ile koordinasyon içinde yürütülmektedir. Hücre döngüsünün başlatılması ve sürdürülmesi için mitojenlerin yanı sıra hücrenin diğer hücrelerle teması ve ekstrasellüler matrikse bağlanması da önem taşımaktadır. Büyüme faktörleri ve sitokinler gibi mitojenlerle tetiklenen hücre döngüsünün sonlandırılmasında etkili olan faktörlerden biri hücrenin kaderinler aracılığıyla diğer hücrelere temas etmesidir. Hücrenin ekstrasellüler

matrikse integrinler ile bağlanması sonucu hücre döngüsü düzenlenmektedir. Hücre döngüsünün düzenlenmesinde mitojenler ve integrinler birlikte görev yapmaktadır. G0 evresindeki bir hücre büyüme faktörleri, sitokinler ve onkogenler ile uyarıldığında S evresine geçiş hazırlıkları başlamaktadır. S evresinde DNA sentezinde görevli enzimler ve deoksiribonükleotidlerin sentezi için gerekli genlerin ekspresyonu şarttır. Genlerin uyarılması için transkripsiyon faktörleri olan Jun, Fos, NF-AT, NF- $\kappa$ B ve Myc fosforillenerek ve çekirdeğe transloke olarak ilişkili genlerin uyarılmasını sağlamaktadır. Siklinler, CDK ve E2F sentezi gerçekleşmektedir. Transkripsiyonel düzenlemeyi sağlayan E2F, G2 evresinden S evresine geçişi sağlamaktadır. Mitojenlerin reseptörlerine bağlanmasıyla aktiflenen protein kinazlar (MAPK) Ras ve Jak ikinci habercilerle transkripsiyon faktörlerini fosforilleyerek kinazları protein kinaz C ve ERK uymaktadır. G1 evresinden S evresine geçişte gerekli olan E2F bu aşamada aktif hale getirilmektedir. G1 evresinden S evresine geçişteki restriksiyon noktasının aşılması için gerekli olan E2F transkripsiyon faktörünün aktiflenmesi sonucu DNA replikasyonu için gerekli olan proteinler ile deoksiribonükleotidler ve düzenleyici proteinlerden (siklinler ve protein kinazlar-CDK) bazıları sentez edilmektedir. Tümör baskılayıcı gen ürünü olup aynı zamanda hücre döngüsünü düzenleyen retinoblastoma (Rb) proteini tarafından E2F inhibe edilmektedir. E2F'in Rb tarafından inhibisyonu ile G1 evresinden S evresine geçiş için gerekli proteinleri sentezleyen genlerin ekspresyonu durdurulmuş olur ve hücre döngüsünün devam etmesi engellenmektedir. Hücre döngüsünün evreleri protein kinaz ailesi (CDK) tarafından kontrol edilmektedir. Hücrenin metabolik aktiviteleri için gerekli olan proteinleri aktiveleyen bu kinazlar hücre bölünmesini düzenlemektedir. Protein kinazların aktiflenmesi için gerekli olan siklin protein ailesi üyeleri siklin A, siklin B, siklin C, siklin D; CDK sınıfı proteinler arasında ise CDK1, CDK2, CDK3, CDK4, CDK5 ve CDK6 bulunmaktadır. Hücre döngüsünün değişik dönemlerinde siklin-CDK kompleksleri farklı kombinasyonlardadır. G1 evresi aşamalarının orta ve son dönemlerinde siklin D-CDK4 ile siklin D-CDK6 kompleksleri aktif iken; G1 evresinin geç dönemlerinde siklin E-CDK2, S evresinde siklin A-CDK2, G2

ve M evrelerinin anafaz süresince ise siklin B-CDK1 işlev görmektedir. Hücre döngüsü esnasında genomun iki hücreye eşit olarak aktarılıp aktarılmadığının saptanması için hücre döngüsünün belirli aşamalarında kontrol noktaları bulunmaktadır. Bu kontrol noktaları G1, G2 ve M evrelerinin son aşamalarında olup iki kontrol noktası arası yapılan işlemlerin doğruluğunu kontrol etmektedirler. Örneğin, sentezlenen DNA hasarlı veya tam olarak replike edilememiş ise döngü M evresine girmeden G2'de durdurulmaktadır. DNA replikasyonundaki hasarlar tespit edildiğinde G1 evresinin sonunda döngü inhibe edilmekte hasarın onarılması sentezin tekrarlanması sağlanmaktadır. Hücre bölünmesi esnasında yavru kromozomlar iğ iplikleri üzerine düzgün bir şekilde yerleşememişse döngü mitoz esnasında durdurulmaktadır. Anafazın başlaması ise anafaz teşvik edici kompleks (anaphase promoting complex) APC tarafından kontrol edilmektedir. DNA hasarı giderilinceye kadar hücrenin S veya M evrelerine geçişi kontrol noktalarınca engellenmektedir. G1 evresinde tespit edilen orta dereceli DNA hasarları tümör baskılayıcı gen p53'ün sentezlediği 53 kDa büyüklüğünde bir protein sayesinde onarılmaktadır. p53'ün sentezlediği protein p21 proteininin sentezini sağlamaktadır. p21 proteini ise siklin-CDK kompleksini inhibe ederek döngüyü hasarın büyüklüğüne göre durdurmakta veya askıya almaktadır. Hasar onarılabilecek boyutlarda ise kontrol noktalarında durdurulup DNA sentezinin tekrarlanması veya hasarlı bölgelerin onarılması sağlanmaktadır. Hasar onarılamayacak kadar büyük ise p53 hücreyi apoptoza yönlendirmekle görevlidir [4, 41].

### **2.5.2. Apoptoz**

Yunanca kelime anlamı ayrılıp düşmek olan apoptoz, biyolojik bir terim olarak bir dizi biyokimyasal değişiklik ile gözlenen, programlanmış hücre ölümü olarak tanımlanır. 1972'de Kerr ve arkadaşları tarafından tanımlanan apoptoz nekrozu bilinen tek hücre ölüm mekanizması olmaktan çıkardı. Zamanla apoptozun embriyonik dönemden ölüme kadar homeostazın sürdürülmesinde birçok rolü olduğu anlaşıldı [4, 45].

Doku homeostazisi proliferasyon ve apoptozisin dengesinin sağlıklı bir şekilde sürmesine bağlıdır. Bu dengenin bozulması ise başta kanser olmak üzere birçok hastalığa yol açmaktadır. Apoptoz bilinen iki yol vasıtasıyla gerçekleştirilir. Bunlar hücre içinde başlayan sinyallere dayanan mitokondriyal içsel yolak ve hücre dışı uyanlarla aktive olan ekstrinsik (dışsal) yolaktır. Oksidatif stres, mitokondriden sitokrom c salınımı, kaspaz proteazların aktivasyonu, endonükleazların aktivasyonu gibi moleküler olaylar ve eksternal uyanlar apoptozu başlatabilir [41].

Apoptoz, tek bir hücrede, büzüşme ve çevre hücrelerle olan temasın kaybolması ile karakterizedir. Hücresel büzüşmenin nedeni, Na, K, Cl taşıyıcı sisteminin durması nedeniyle hücre içi ve dışı arasındaki sıvı hareketinin olmamasıdır. Apoptotik uyarım alan hücre, hacminin yarısına düşer, çevre ile olan bağlantılarını keser ve mikrovillusları kaybolur. Elektron mikroskopunda gözlenen değişikliklerde, öncelikle plazma membranının şekli bozulur ve kabarcıklanmalar oluşur; bu yapı zeiosis olarak tanımlanır. Zardaki tomurcuklanma ve parçalara ayrılma olayında transglutaminaz enzimi etkili olmaktadır. Hücre zarında iç yüzeyden dışarıya fosfatidilserin translokasyonu olur. Plazma ve çekirdek kondansasyonunu takiben kromatinin kümelenmesi şekillenir. Kromatindeki değişikliklerin başlamasının hemen öncesinde sitozolik  $Ca^{++}$  düzeyinde önemli bir artış olmaktadır. Kromatin kondansasyonu, nükleozomlar arasındaki bağlantı bölgelerinin ayrılması ile karakterizedir. 180-200 baz çiftinden oluşan parçalar, elektroforezde ip merdiven görüntüsü oluşturur. İnternükleozomal DNA parçalanmasının kalsiyum artışına duyarlı endonükleazlar ile olduğu ileri sürülmektedir. Endonükleazlar timositler gibi bazı hücrelerde yapısal olarak bulunur, bazı hücrelerde ise apoptozun başlamasından önce transkripsiyon ile oluşturulur. Hücrenin parçalanmasıyla nükleer materyal içeren zarla çevrili apoptotik cisimcikler oluşur. İki katlı lipit tabakada fosfolipit asimetrisi, hücre zarının bir özelliğidir. Fosfolipidler, yani iç tabakada bulunan fosfatidilserin ve fosfatidiletanolamin ve dış tabakada bulunan fosfatidilkolin asimetrik olarak dağılmışlardır. Normal hücrelerde bu asimetri ATP'ye bağlı translokaz ile aktif

olarak korunmaktadır. Apoptoz sırasında ya ATP translokaz yetmezliği ya da diğer enzim sisteminin aktivasyonu fosfotidil serinin dış yüzey tabakaya yerleşmesi ile sonuçlanır. Bu durum, apoptotik cisimciğin fagositozu için bir uyarıdır. Apoptotik cisimcikler, sitokin salgılanmasını ve inflamasyon oluşumunu uyarmaksızın, makrofajlar ya da komşu hücreler tarafından fagosite edilirler. Apoptoz 30-60 dakika gibi bir sürede tamamlanır Hücre iskeleti apoptozda önemli bir role sahiptir ve stabilizasyonu apoptozu engellemektedir. Apoptotik hücrelerin dokudan uzaklaştırılması ve yerine yenilerinin konması ise günlük  $1 \times 10^{11}$  hücre olarak tahmin edilmektedir ve bu yetişkin bir bireyin total vücut ağırlığının her 18-24 ayda bir değişmesi demektir [45].

Nekroz ise apoptozdan farklı olarak pasif hücre lmdr. Nekrozda apoptoz için gerekli olan RNA, protein sentezi, yeni enzim aktiviteleri gereksinimi yoktur [4].

Nekrozda apoptozdan farklı olarak hücresel büzüşme yerine şişme olur, bu nekrozun erken belirtisidir. Patolojik hücre ölümü yani nekrozun klasik nedenleri içinde ise hipertermi, oksidatif fosforilasyon-Krebs siklusu ya da glikolizisin inhibisyonu, otolizis, hipoksi ve çeşitli toksinler yer alır. Hücre tarafından genlerle programlanmayan ve çeşitli dış etkenlerle gerçekleşen nekrotik hücre ölümünde; enerji depolarında ani azalma ile birlikte hücre zarının geçirgenliği bozulur ve sodyum ile suyun hücre içerisine girmesine neden olur, böylece hücre şişer. Ayrıca hücreyle birlikte mitokondirilerde de şişme gözlenir, diğer organeller ise plazma içinde dağılır. şişme sonucunda hücre zarı patlar ve bütünlüğünü kaybeder, proteolitik enzimler içeren plazma, hücreler arası boşluğa sızar, doku çevresinde inflamasyon ile birlikte zedelenme oluşturur [45].

Çizelge 2.4. Apoptoz ile nekroz arasındaki farklar [4, 86]

| Özellik  | Apoptoz   | Nekroz   |
|--|---|--|
| <b>Dağılım</b>                                   | Dokuda tek tek dağılmış hücrelerde meydana gelen ölümlerdir.  | Komşu hücre gruplarını da etkiler.   |
| <b>Nedenler</b>                                  | Fizyolojik ve/veya patolojiktir.  | Daima patolojiktir.  |
| <b>Işık Mikroskobu Görüntüsü</b>                 | Apoptoza uğrayan hücre çekirdek kalıntıları içeren oval veya yuvarlak eosinofilik partiküllere dönüşmektedir. | Hücre sınırları düzensiz olup bazofili kaybı vardır. Çekirdekte piknoz, karyoreksis, karyolizis görülebilir. |
| <b>Eksudatif yangı ve Nötrofil İnfiltrasyonu</b> | Görülmemektedir.  | Genellikle görülmektedir.  |

Apoptozun organizmadaki etkileri başlıca üç başlık altında toplanabilir. Bunlar apoptozla ilgili fizyolojik olaylar, apoptozun inhibisyonu sonucu oluşan patolojik olaylar, apoptozun aktivasyonu ile ilişkili patolojik olaylardır.

Apoptozla ilgili fizyolojik olaylar

- Fetüsün implantasyonu
- Menstruasyon
- Embriyogenez
- Fetal gelişim sürecindeki organogenez
- Menapozda follikül atrezisi
- Laktasyon sonrasında meme bezleri regresyonu

Apoptozun inhibisyonu ile ilgili patolojik olaylar

- Kanserler
- Otoimmün hastalıklar
- Latent virüs enfeksiyonları

### Apoptozun aktivasyonu ile ilişkili patolojik olaylar

- Nörodejeneratif bozukluklar
  - Amiyotrofik lateral skleroz
  - Parkinson Hastalığı
  - Huntington Hastalığı
  - Spinocerebellar Ataksi
- AIDS
- Aplastik Anemi
- Toksik Karaciğer Hasarı
- Miyokard infarktüsü [4].

### Apoptotik Reseptörler

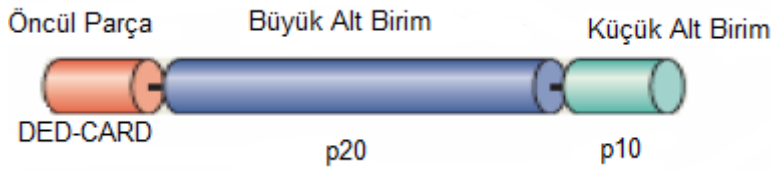
Sitokinler hedef hücrelerde spesifik reseptörlere bağlanarak hücre proliferasyonu ve diferansiyasyonunu kontrol etmektedir. Sitokinler yapısal özelliklerine 3'e ayrılır. Bunlar TNF(Tümör Nekroz Faktör), sitokin bağımlı büyüme faktörü ve helikal yapıli sitokinlerdir. Apoptotik reseptörler TNF reseptör gen ailesine aittir. Bilinen apoptotik reseptörler Fas (APO-1/CD95), TNF-R1 (TNF reseptörü-1), TNF-R2 (TNF reseptörü-2), DR3 ve DR6 dır. Fas Ligand (FasL) ve TNF Ligandın apoptozu başlatmak üzere hedef hücredeki reseptörüne bağlanmasıyla apoptoz kaskadını başlatır [40].

### Hücrede apoptozun düzenlenmesi

Hücrede apoptozun düzenlenmesinde sistin protezalar (kaspazlar) ve Bcl-2 gen ailesinin ürünü olan iki proteinin aktif rol oynadığı belirlenmiştir.

### Sistein Proteazlar (Kaspazlar)

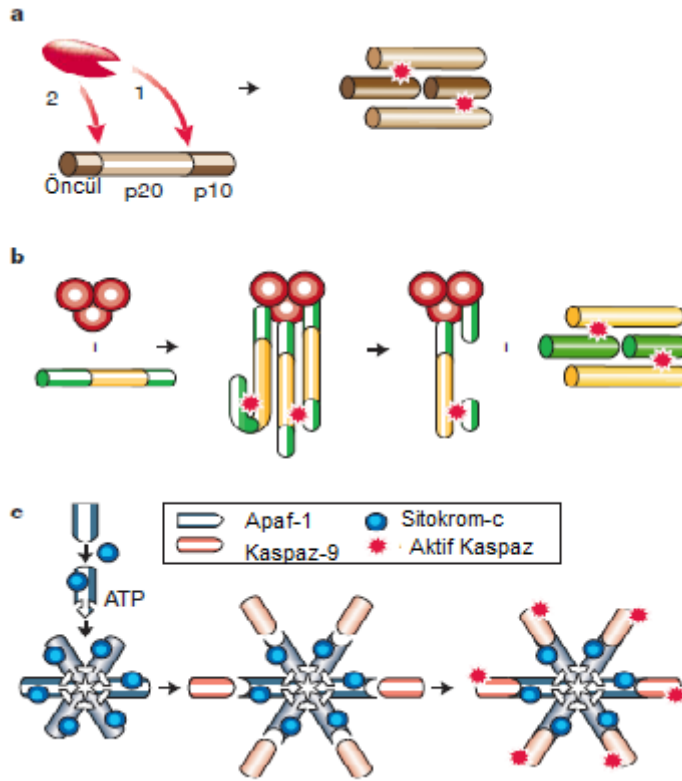
Kaspazlar hücrede inaktif proenzimler halinde bulunup, proteolitik hidroliz ile aktive edilmektedirler. Memeli hücrelerinde sistein proteaz ailesinden olan kaspazların aktif merkezinde sistein yer alır ve sitoplazmada inaktif prokürsörler olarak bulunur.



Şekil 2.17. Kaspazların yapısı [53]

Diğer adı ile ICE proteazlardır ve bir proteaz aktivasyon dizisi başlatarak sitoplazmik proteinlerin yıkımında rol almaktadır, bu sırada nukleazlar da aktive olarak DNA fragmentasyonu ve RNA degradasyonu gerçekleşmektedir. Salınması ile apoptozun son basamaklarından sorumlu enzim sistemi olan kaspazlar aktive olur. Şimdiye kadar sitozolde bulunan 14 kaspaz tanımlanmıştır, inflamasyonu uyaran ve ilk kez bir proteaz olarak tanımlanan ICE, prokaspaz-1 olarak isimlendirilmiştir. Kaspazlar bir seri olaylar dizisinde diğer prokaspazları aktive ederler. Kaspazlar; sitokin üretimine katkıda bulunanlar (kaspaz 1,4,5,13), proteolizisin başlatıcıları (kaspaz 2,8,10) ya da uygulayıcıları (kaspaz 3,6,7) olarak sınıflandırılırlar. Ölüm sinyali veren başlatıcı kaspazlar, adaptöre bağlanırlar ve ölüme yönlendirirler ama infazı gerçekleştirmezler bunu yapacak olanları aktifleştirirler. İnfazı gerçekleştiren uygulayıcı (effektör) kaspazlardır. Uygulayıcı kaspazlar, başlatıcı kaspazların akışını aktive ederler [40, 41].





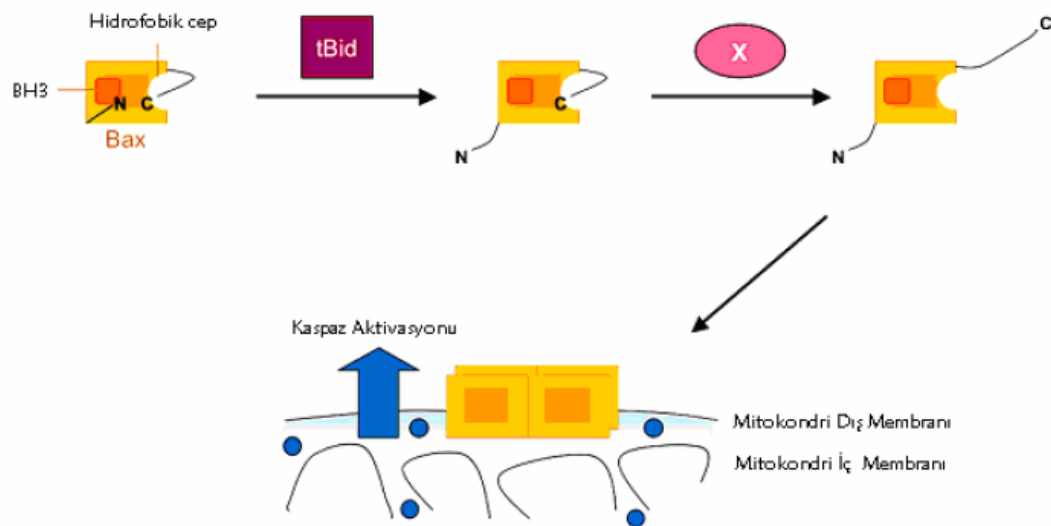
Şekil 2.18. Kaspazların aktivasyon basamakları [44]

Apoptotik programın merkezinde kaspazlar bulunmaktadır. Kaspaz aktivasyonu hücreye özgü olup, kaspaz inhibitörlerinin (IAP) effektor kaspazları inhibe ederek apoptozu engellediği gösterilmiştir. Ayrıca IAP (Inhibitors of Apoptosis) ailesinin kaspazlardan ayrı olarak, transkripsiyon faktörlerin modülasyonu ve hücre siklusunun kontrolünde de yer alarak apoptozu inhibe ettiği bilinmektedir. Bu inhibitörler malign hücrelerde aşırı artmış olarak gözlenirler ve kanserleşmede önemli rol oynarlar [36, 45].

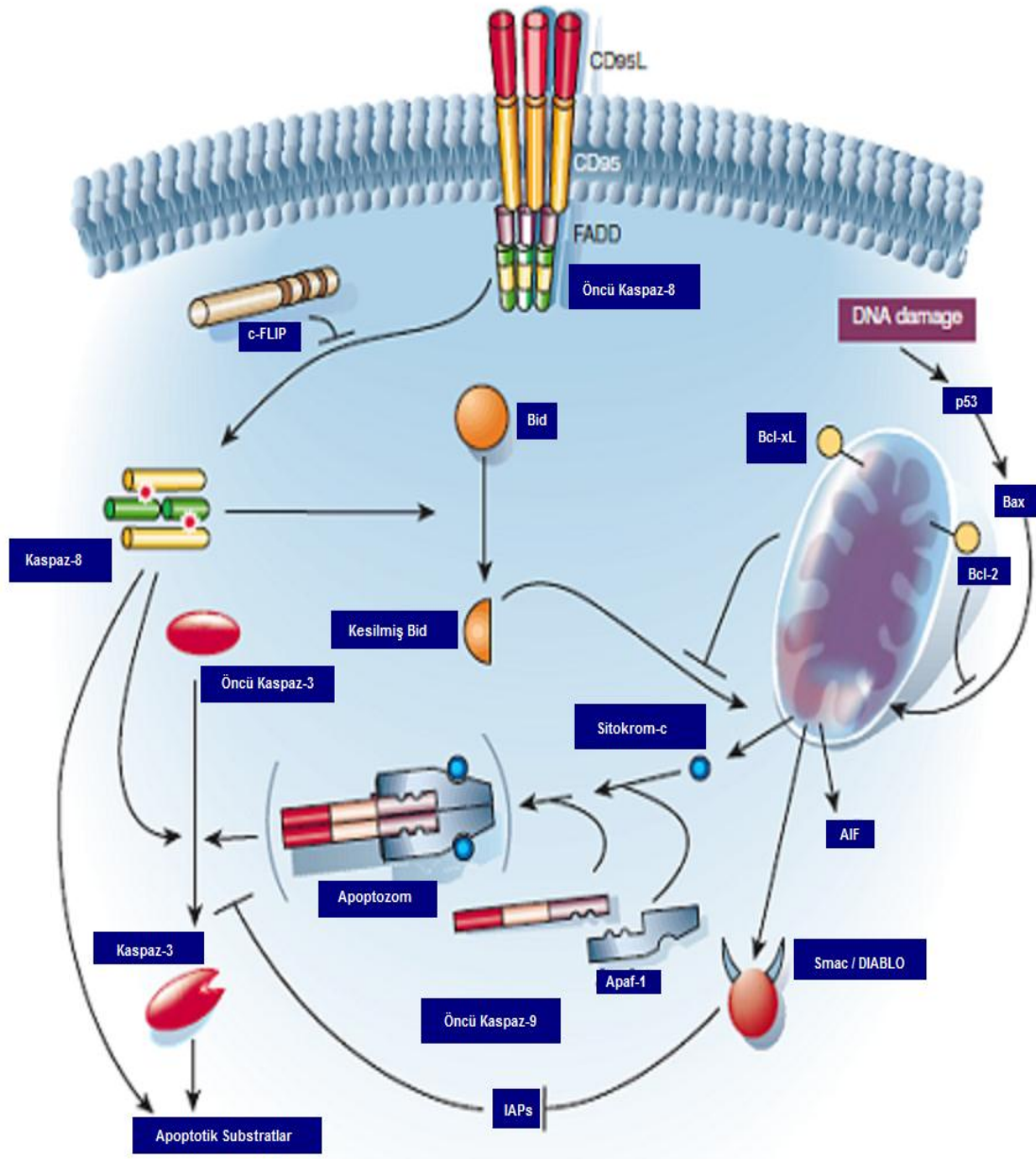
### *Bcl-2 Gen Ailesi*

Bu gen ailesinin ürünü olan proteinler kaspaz aktivasyonunu düzenleyerek apoptozu uyarmakta veya inhibe etmektedir. Bcl-2 mitokondri dış membranında lokalize olup, mitokondriden sitokrom-c salınımını buna bağlı olarak da effektor kaspazların aktivasyonunu önleyerek etki göstermektedir. Sitolzde bulunan ve uygun bir uyarı sonucu yapısal değişikliğe uğrayarak

mitokondri membranına giden bax, sitozolde mitokondriyal sitokrom-c salınmasına neden olmaktadır. Benzer şekilde işlev görerek bcl2 ve bax proteinleri de apoptozu uyardır [4, 40].



Şekil 2.19. Bax gen ailesinin aktivasyonu [54]



Şekil 2.20. Memeli hücrelerindeki iki ana apoptotik yolak ve işleyişi [44]

### 2.5.3. Nitrik oksidin apoptozdaki etkileri

Nitrik oksidin apoptozdaki etkileri hücre tipine bağlı olarak proapoptotik ya da antiapoptotiktir. Örneğin, entotel hücrelerinde ve hepatositlerde antiapoptotik olan NO; düz kas ve tümör hücrelerinde proapoptotik etkiye sahiptir [57].

Nitrik oksidin apoptotik etkileri genel olarak cGMP/PK G sisteminden bağımsızdır. Bunun nedeni stabil cGMP analoglarının apoptotik etkileri olmamasıdır. Bu nedenle NO'nun apoptotik etkilerini S-nitrozasyonu/ADP-ribozilasyonu yoluyla yaptığı kabul edilir. S-nitrozasyonu ve ADP ribozilasyonunun hücrede enerji metabolizmasını bozduğu bilirse de, apoptozun inhibisyonu için başka mekanizmaların olması da gerektiği yaygın bir görüştür [8].

Nitrik oksitin diğer bir etkisi de p53 tümör baskılayıcı protein sentezini arttırmasıdır. NO vericilerinin makrofajlarda apoptozu indüklemeleri sırasında p53 birikimi de olur. Düz kas hücrelerinde iNOS indüksiyonu ile sentezlenen nitrik oksit p53 sentezini arttırarak bu hücrelerde apoptoza neden olur. Düz kas hücrelerinde p53 ile indüklenen apoptozun, hücrenin tiyol redoks durumuna bağlı olduğunu ve glutatyon derişiminin azalması ile p53 birikiminin arttığı görülmüştür. Zarı geçebilen GSH türevleri (glutatyon monoetil ester) NO bağımlı p53 birikimini önlemekte ve hücreyi apoptozdan kurtarmaktadır [4, 37, 38].

Nitrik oksit transkripsiyon sırasında ve sonrasında bazı etkileri apoptozu baskılayabilir. Örneğin NO karaciğerde apoptotik bazı proteinlerin sentezini indükler. Nitrik oksit tarafından sentezi indüklenen HSP-70, karaciğerde TNF- $\alpha$  ve aktinomis-D'nin neden olduğu apoptozu inhibe eder.  $\beta$ -hücrelerinde apoptotik etkiye sahip olan Bcl-2 protein sentezi NO tarafından arttırılır. Hücreleri oksidatif hasara karşı koruyucu proteinler olan hem oksijenaz-1 ve ferritin sentezi de NO tarafından arttırılmaktadır [8, 88].

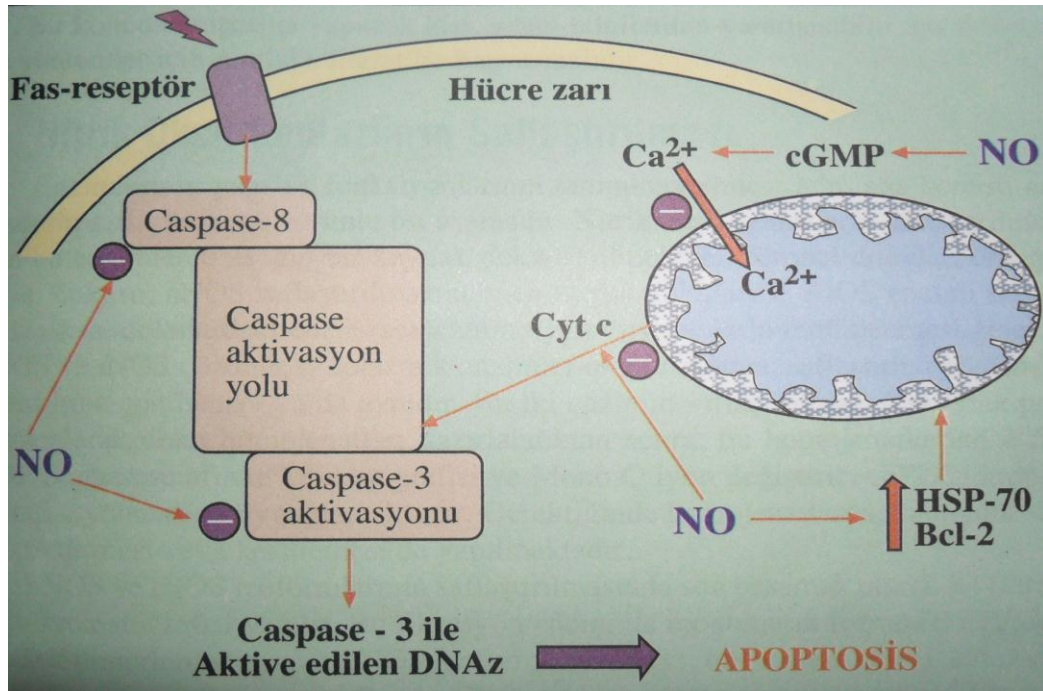
Apoptotik sinyal iletiminin anahtar proteini kaspaz enzimleridir. Apoptotik uyarı sırasında (örneğin TNF- $\alpha$  ile uyarı, Fas reseptör aktivasyonu, büyüme faktörlerinin yokluğu durumlarında) sistin proteazlar olan kaspaz enzimleri aktive olurlar. Kaspaz enzimlerinin yukarıdaki sinyal iletim yolları aracılığıyla aktivasyonu nitrik oksit tarafından inhibe edilir. Sistein bağımlı proteazlar olan kaspaz enzimlerinin (kaspaz 1 ve 8) NO-bağımlı inaktivasyonlarının nedeni

tiyol gruplarının nitrozasyonudur. NO vericileri ayrıca Fas reseptörleri ile kaspaz aktivasyonu arasındaki sinyal iletim yolunu da etkileyerek kaspaz aktivasyonunu önlerler [8, 38, 39].

Çizelge 2.5. Nitrik oksitin proapoptotik ve antiapoptotik etkilerinin mekanizmaları [8]

| NO   |   |
|--|---|
| PROAPOPTOTİK ETKİLERİ  | ANTIPOPTOTİK ETKİLERİ   |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ COX-2 sentezinin inhibisyonu</li> <li>▪ Bcl-2 sentezinin baskılanması</li> <li>▪ DNA ile tepkimeleri</li> <li>▪ p53 sentezinin indüksiyonu</li> <li>▪ Mitokondri zar geçirgenliğinin artması</li> <li>▪ Tiyollerin oksidasyonu</li> <li>▪ Kaspaz aktivasyonu</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ HSP-70 ve Bcl-2 sentezinin indüksiyonu</li> <li>▪ Hemoksijenaz ve ferritin sentezinin indüksiyonu</li> <li>▪ Kaspaz enzimlerinin S-nitrozasyon ile inaktivasyonu</li> <li>▪ Mitokondride cGMP'nin artmasına bağlı <math>Ca^{+2}</math> azalması</li> <li>▪ Antioksidan etkileri</li> </ul> |

Nitrik oksit mitokondrileri de stabilize ederek apoptosisi baskılar. Proapoptotik uyarı mitokondri iç zar yapısında bozulmalara ve buradan sitokrom c'nin salınımına neden olur. Nitrik oksit vericilerinin TNF- $\alpha$  ile indüklenen sitokrom c salınımını inhibe ettiği bulunmuştur. Bu inhibisyonun nedeni, NO'nin mitokondriyi koruyucu bir protein olan Bcl-2 sentezini ve stabilizasyonunu artırması olabilir. Sitokrom c kaspaz-9 ile kompleks oluşturarak kaspaz-3 enziminin aktivasyonuna neden olur. Kaspaz-3 enzimi apoptoz için DNaz enzimini aktive ettiğinden; sitokrom c'nin mitokondri zarından salınımının NO tarafından inhibe edilmesi önemli bir antiapoptotik etki oluşturur [8].



Şekil 2.21. Nitrik oksitin antiapoptotik etkilerinin mekanizması [8]

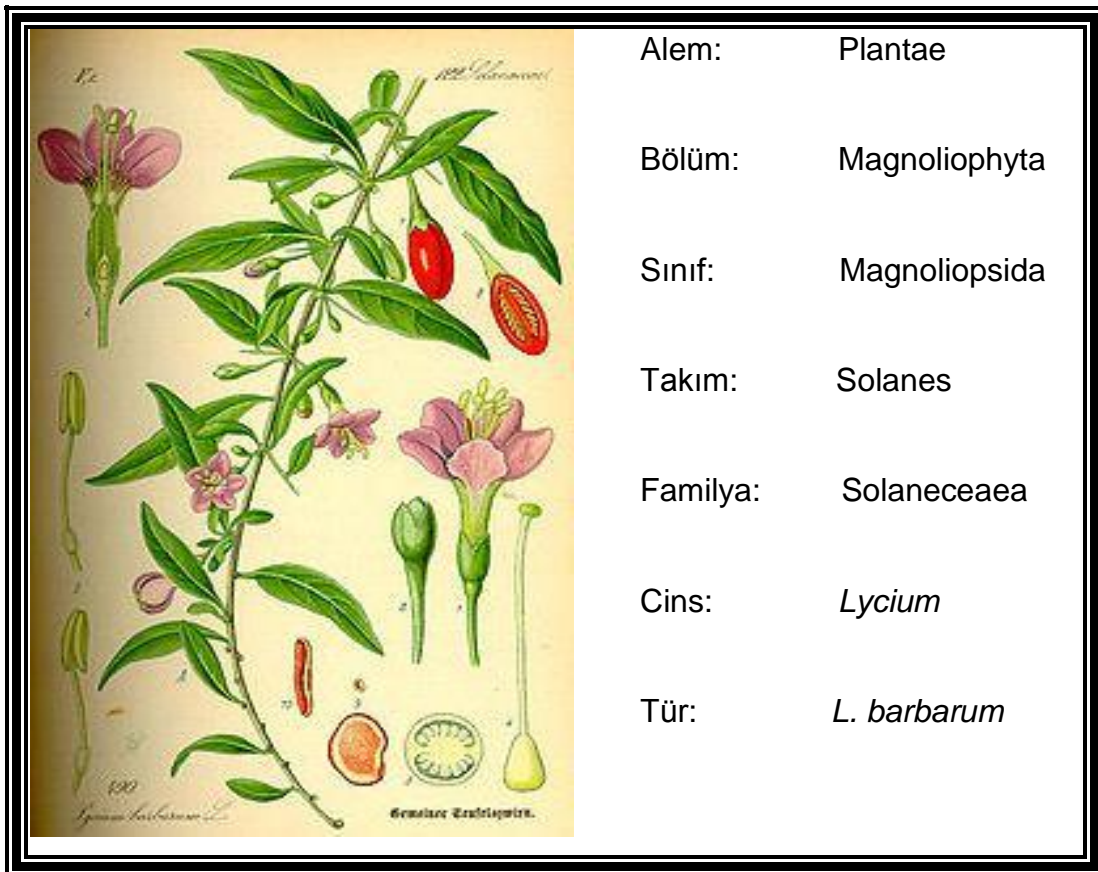
Nitrik oksitin sitotoksik, proapoptotik ya da antiapoptotik etkilerinden hangisini göstereceği yine ortamdaki NO derişimine bağlıdır. Endotelial NOS tarafından sentezlenen NO sitotoksik etkilere karşı koruyucu ve antiapoptotik etkilere sahiptir. Yüksek derişimde NO sentezi iNOS ve nNOS tarafından sentezlenen NO sitotoksik ve proapoptotik etkilere sahiptir. Nitrik oksitin hücre ölümü üzerinde gözlenen etkileri NO derişimine, kullanılan ya da in vivo oluşan nitrik oksitin redoks formuna ve hücrenin redoks durumuna son derece bağlıdır [4, 37-39].

## 2.6. *Lycium barbarum*

*Lycium barbarum* Solonaceae familyasının bir üyesi olup goji berry adıyla da bilinir. Solonaceae familyasının üyeleri genellikle tropik ve subtropik bölgelerde, bazıları ılıman iklim kuşaklarında yayılış gösteren yaprakları basit veya parçalı, almaçlı dizilişli, stipulasız otsu, çalı veya ağaç şeklinde, gövdelerinde bikoateral iletim demetleri bulunan bitkilerdir [47].

Çiçekleri erdişi, genel olarak aktinomorf, bazıları zigomorftur. Kaliks 5 birleşik sepalden korolla ise 5 birleşik petalden oluşmaktadır. Androkeum iç dairesi körelmiş, dış dairesinde 5 stamen bulunur. Ovaryum üst durumlu ve iki karpellidir. Meyve bakka veya kapsula şeklinde olup, üzerinde kalıcı kaliks bulunur. Çiçekleri 1-3 aksiyal radyal çiçeklerdir. Kaliks bialbial olup üst dudak çift dişli, alt dudak ise üç dişlidir. Korolla huni şeklinde olup beş lobludur rengi genellikle mor veya açık mordur. Stamen tüylü ve dört lobludur. Ovaryum tek boyuncuklu ve odalıdır. Meyveler kırmızı, uzun iğ şeklinde ve tatlıdır. *Lycium barbarum*, çalı formunda 3 m'ye kadar büyüeyebilen ağaçlardır [47, 48].

Bitki habitatı genellikle Çin ve Moğolistan olup ülkemizde de kültür bitkisi olarak yetiştirilmektedir. Meyveler genellikle sonbahar ve yaz aylarında toplanır. Meyveler genellikle güneş altında kurutularak kullanılır. Bitki kurt özümü, çay bitkisi, çay ağacı ve sahte yasemin adıyla da anılır [48].



Şekil 2.22. *Lycium barbarum*'un filogenetik sınıflandırılması [49]





Şekil 2. 23. *Lycium barbarum* meyveleri [58]

*Lycium barbarum* Güney Avrupa ve Asya' da yaygın olarak yetişen bir bitki olup, ülkemizde de kültür bitkisi olarak yetiştirilmektedir. Bitki özellikle Çin'de iyi bilinen ve yaygın olarak çay şeklinde tüketilen bir bitkidir. *Lycium barbarum*, meyvelerinin antioksidan içeriği oldukça zengindir. Meyvelerin antidiyabetik ve immün stimule edici ve antikanserojen etkisi bilinmektedir [67, 71, 73, 77, 78, 80, 82, 83, 84].

Bitkinin tıbbi değer taşıyan kısmı meyveleridir ancak, yapraklarında da biyolojik aktivite gösteren flavonoidlerin bulunduğu bildirilmiştir [22, 50, 93].

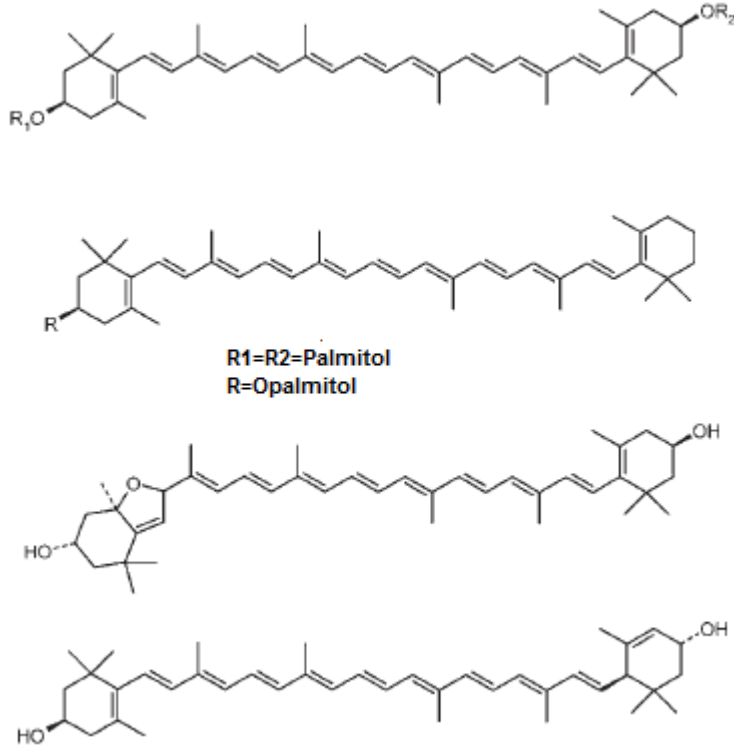
Yapılan ekstraksiyon çalışmaları sonucu *Lycium barbarum* yapraklarında rutin, gentisik asit ve kuvarsetin tespit edilmiştir [20].

Ayrıca bitkinin meyvelerinde kaemferol, kuvarsetin, mirisetin, klorojenik asit, kaemferol, kafeik asit ve vanilik asit türevleri, zeaksanin dipalmitat,  $\beta$ -karoten, heksan,  $\beta$ -kriptoksantin ve neoksantin saptanmıştır [25, 43, 63, 66, 72, 78]



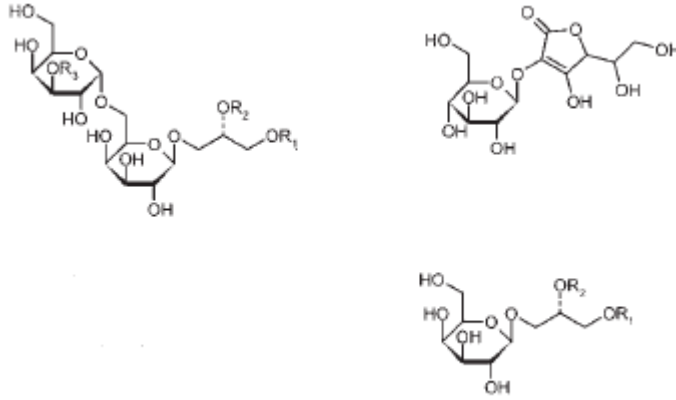
### Farmakolojik olarak aktif bileşenleri

Bitkinin farmakolojik özellik gösteren bileşenleri suda çözünebilen polisakkaritler, glikoproteinler ve karotenoidler olup özellikle fisalin (zeaksantin dipalmitat) kanser tedavisinde önemli bir bileşiktir [50].

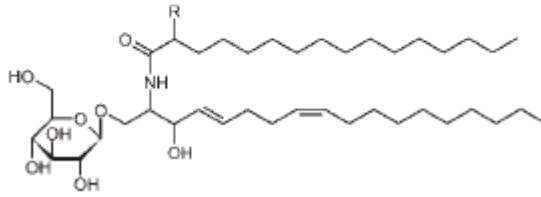


Şekil 2.24. *Lycium barbarum* meyve ve yapraklarındaki karotenoidler [69]

Bitkinin tanımlanan muhtemel etkileri immun stimule edici ve hipoglisemik etkileridir. Ayrıca bağırsak boşaltıcı ve diüretik olarak kullanılır. Bitki Çin Tıbbı'nda genellikle bel ve diz bölgesi zayıflıklarını tedavi etmede, karaciğer ve böbrek bozukluklarında, diyabette, kulak çınlamasının giderilmesinde, görme bozukluklarında ve anemi tedavisinde kullanılır. Hint Tıbbı'nda ise anemi, menstruasyon bozukluklarında, diş ağrısı ve kanamalı hemoroid tedavisinde kullanılır [50].



R1=Palmitol  
R2=R3=Linolenil



Şekil 2.25. *Lycium barbarum* meyvesindeki C vitamini prekursorleri ve glukolipitler [69]

Bitkinin sağlığa bilinen bir zararı olmamasına ve toksik etkisi bildirilmemesine rağmen, bitkinin meyve ve yapraklarının hipoglisemik etkisi sebebiyle gebelik süresince kullanılmaması önerilir. Uygulama şekli tüm olarak, kesilmiş veya toz haline getirilmiş ilaç şeklinde olup, günlük doz insan için 6-15 g arasındır [50, 69].

### **3. MATERYAL ve METOD**

Deneyin hayvan bakımı ve uygulamaları kısmı G. Ü. Deneysel Araştırmalar Merkezinde (GÜDAM), laboratuvar çalışmaları ise Gazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyokimya-Fizyoloji Araştırma Laboratuvarı ve Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Laboratuvarı'nda yapıldı.

#### **3.1. Deney Hayvanları**

Deneylerde G. Ü. Deneysel Araştırmalar Merkezinde (GÜDAM)'dan sağlanan 200–250 g ağırlıkta 18 adet dişi Wistar-Albino rat kullanıldı. Hayvanlar deney öncesi ve deney süresince ad-libitum beslendi ve gün ışığı döngüsü paralelinde aydınlanan ortamda bakıldılar.

#### **3.2. Deney Gruplarının Oluşturulması**

Deneylerde her grupta 6 tane olmak üzere toplam 18 adet rat kullanıldı.

##### Kontrol Grubu

Kontrol grubundaki hayvanlara iki haftada bir diğer gruplarda çözücü olarak kullanılan susam yağı gavaj yolu ile verildi.

##### Lösemi grubu

Lösemi oluşturmak amacıyla Sugiyama ve Welsch'nin DMBA ile lösemi oluşturma metodları modifiye edilerek kullanıldı [13, 14]. Uygulamalar iki haftada bir yapılarak, bu gruptaki hayvanlara lösemi oluşturmak amacıyla ilk doz 200mg/kg takip eden yedi enjeksiyon 10 mg/rat olmak üzere DMBA susam yağında çözülüp gavaj yolu ile verildi. Sekiz enjeksiyon sonunda hayvanların lösemi olduğunu tespit etmek için kuyruk arterinden bir damla kan alınarak yayma preparat yapıldı. Yapılan preparatlar Giemsa ile

boyanarak ışık mikrokobu altında incelendi. DMBA uygulamalarından 48 saat sonra gavaj yolu ile ekstrede çözücü olarak kullanılan su verildi.

### Tedavi Grubu

Gruptaki hayvanlara lösemi oluşturmak amacıyla ilk doz 200 mg/kg, takip eden yedi doz ise 10 mg/rat olarak DMBA susam yağında çözülüp gavaj yolu ile verildi ve uygulamalar arasında iki hafta zaman bırakıldı. Sekiz enjeksiyon sonunda hayvanların lösemi olduğunu tespit etmek için kuyruk arterinden bir damla kan alınarak yayma preparat yapıldı. Yapılan preparatlar Giemsa ile boyanıp ışık mikrokobu altında incelendi. Lösemi olduğu tespit edilen hayvanların vücutlarından benzen metabolitlerinin atılması için 48 saat beklendikten sonra tedavi amacıyla *Lycium barbarum* sulu ekstresi 10 gün boyunca 200 mg/kg olarak gavaj yolu ile verildi.

Gavaj uygulamaları bittikten bir gün sonra tüm hayvanlar intramuskuler ketamin (60 mg/kg) ve ksilazin (10 mg/kg) anestezisi altında feda edildi. Tüm gruplardan uygun şekilde elde edilen dalak ve karaciğer dokuları, NOx ve kaspaz-3 tayininde kullanılmak üzere – 80 °C’de saklandı.

## **3.3. Yöntemler**

### **3.3.1. DMBA preparatlarının hazırlanışı**

Lösemi oluşturmak amacıyla Sugiyama ve Welsch’inin DMBA dozları baz alındı. Deneklere ilk doz için 200 mg DMBA tartılıp susam yağında çözülerek stok solüsyon oluşturuldu. Bu solüsyon deneklere vücut ağırlıkları oranında gavaj ile verildi. Sonraki yedi enjeksiyon ise yine aynı yöntemle 10 mg/rat olarak uygulandı [13, 14].

### 3.3.2. *Lycium barbarum* sulu ektresinin hazırlanması

Kültüre edilmiş ve kurulmuş *Lycium barbarum* meyveleri havanda dövülerek toz haline getirildi. Toz haline getirilmiş materyalden 100 g alınarak 60°C'deki 1L suda 6 saat manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak bekletildi. İşlem sonunda karışım süzülüp 50°C'de liyofilize edildi. Herhangi bir kontaminasyon ihtimaline karşı elde edilen ekstre 0,20 µm por açıklığındaki filtreden süzülüp -20°C'de saklandı [6, 42].

### 3.3.3. %5'lik Giemsa Stain hazırlanışı

% 5'lik Giemsa boyası Sorenson buffer kullanılarak hazırlandı. Bu amaçla tampon A ve B olmak üzere iki ayrı tampon hazırlandı.

Tampon A:11.34 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  250 ml saf su içinde çözüldü (pH=4,8).

Tampon B:14.83 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  250 ml saf su içinde çözüldü (pH=9,3).

5 ml tampon A, 5 ml tampon B ve 5 ml Giemsa karıştırılarak üzerleri 100 ml oluncaya kadar saf su ile tamamlandı (pH=6,8). Elde edilen boya filtre kâğıtları ile süzülerek kullanıldı. Kan yayma preparatları direkt olarak boya içerisine konulup, 10 dk boya içersinde bekletildi Bu sürenin sonunda preparatlar boyadan çıkarılıp, üç ayrı kaptaki saf su içinden geçirilerek preparatlar üzerindeki fazla boyanın akması sağlandı. Bundan sonra preparatlar dik vaziyette konularak kurumaya bırakıldı [55]. Preparatlar ışık mikroskobu altında 40'luk objektifle incelendi.

### 3.3.4. Dokuda NOx tayini

Dokulardaki NOx konsantrasyonu Griess yöntemi ile çalışıldı [56].

Çalışma için aşağıdaki reaktifler hazırlandı.

- 0,1 M Sodyum Fosfat Tamponu (pH:7)

- Griess I: % 0,2'lik Naftiletilediamin Dihidroklörür (NEDD)

- Griess II: % 10'luk Fosforik asit ( $H_3PO_4$ ) içinde % 2'lik Sülfanilamid
- 1 M Hidroklorik asit (HCl) içinde 400 mg Vanadyum (III) Klorür ( $VCl_3$ )

#### Dokuların Hazırlanması

Dokular, sodyum fosfat tamponu ile (1:9) homojenize edildikten sonra, 3500 RPM'de 15 dk santrifüj edildi. 200  $\mu$ L süpernatana, ortamdaki nitratı nitrite indirgemek amacıyla eşit miktarda  $VCl_3$  eklendikten sonra 37 °C'de 30 dk inkübasyona bırakıldı. Daha sonra sodyum fosfat tamponu ile eşit miktarlarda karıştırılmış olan Griess I+II reaktifleri eklendi. 37 °C'de 10 dk inkübasyondan sonra numunelerin optik dansitesi spektrofotometrede, köre karşı, 540 nm'de okundu.

#### Standardın Hazırlanması

6,4 mM'lık stok sodyum nitrit ( $NaNO_2$ ) standartı günlük olarak dilüe edilerek, 128,64, 32, 16, 8, 4, 2 ve 1  $\mu$ M konsantrasyonlarda standartlar elde edildi. Dokulardaki  $NO_x$  miktarı, hazırlanan standart eğriye göre hesaplandı ve  $\mu$ mol/gr doku olarak verildi.

### **3.3.5. Dokuda Kaspaz-3 tayini**

Karaciğer ve dalak dokularında kaspaz-3 tayini ticari kit ile ELİSA'da çalışıldı.

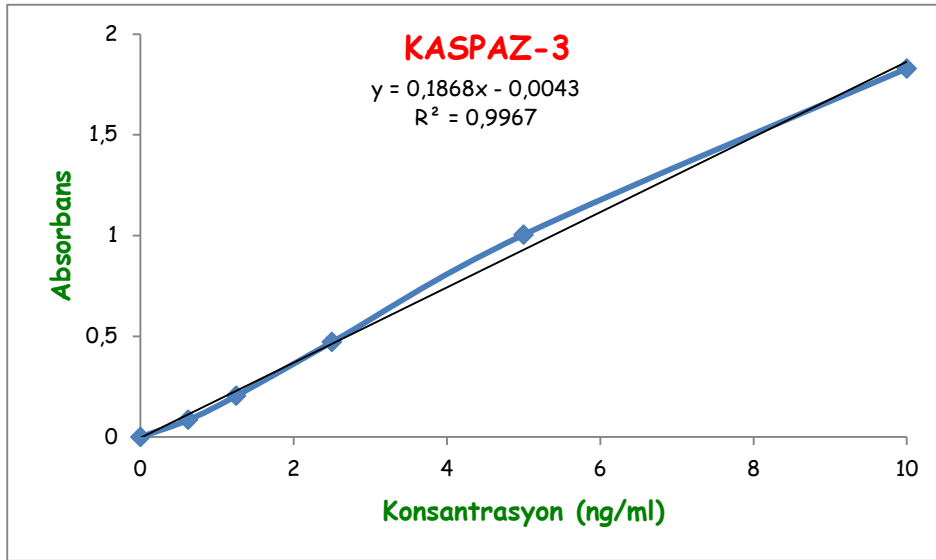
#### Dokuların Hazırlanması

100 mg doku 1 ml PBS ile homojenize edilip -20°C'de bir gece inkübasyona bırakıldı. Hücre membranlarını kırmak amacıyla yapılan iki dondurma çözme döngüsünden sonra homojenat 2-8 °C'de 5000xg' de 5 dakika santrifüj edildi. Çalışma için aşağıdaki reaktifler kitteki prosedüre göre hazırlandı.

Kitte toz halinde bulunan 10  $\mu$ l Biotin Antibody 990 $\mu$ l biotin antibody dilüsyon solüsyonu ile karıştırıldı. HPR-Avidin kendi dilüsyon solüsyonu ile 10 kat dilüe

edildi. Yıkama solüsyonu 25 kat distile su ile dilüe edilip kullanıldı. Standart 7 kez  $\frac{1}{2}$  oranında sample dilüent ile dilüe edilip birbirinin yarısı konsantrasyonda yedi farklı standart elde edildi.

Tüm reaktif ve standartlar kitteki prosedüre göre hazırlandıktan sonra ELİSA plate kuyucuklarına 100 µl standart ve örnekler pipetlendi ve 37°C'de 2 saat inkübasyona bırakıldı. Kuyucuklar iki saat sonunda yıkama yapılmaksızın aspire edildi. 100 µl biotin antibody eklenen eliza plate 37°C'de 1 saat inkübe edildi. Bir saat sonunda kuyucuklar aspire edilip üç kez yıkandı. Her kuyucuğa 100 µl HPR- Avidin eklenip 37°C'de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi bitiminde plate aspire edilip beş kez yıkandı. İşlem tamamlandıktan sonra her kuyucuğa 100 µl TMB Substrat pipetlenip ışısız ortamda 37°C'de 15-30 dk inkübe edildi. 50µl stop solüsyonu eklenip 450 nm'de okundu. Okunan absorbans değerleri kullanılarak kaspaz-3 standart eğrisi hazırlandı.



Şekil 3.1. Kaspaz-3 standart eğrisi

### **3.4. İstatistiksel Değerlendirme**

Bulguların değerlendirilmesinde Mann-Whitney U testi kullanıldı. Tüm değerler aritmetik ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verildi ve  $p < 0,05$  değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



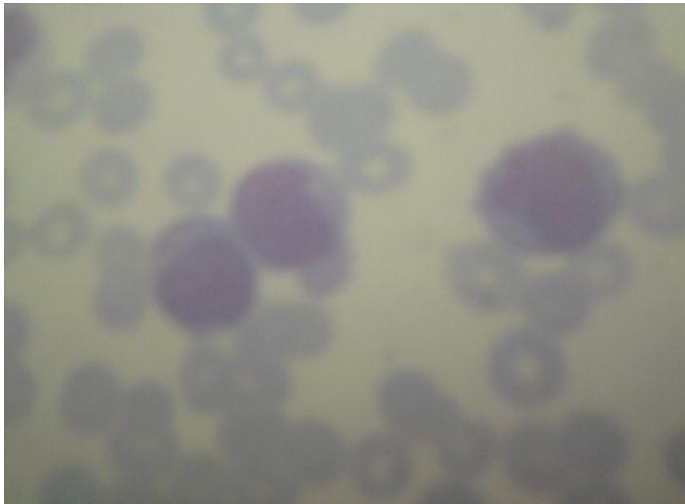
#### 4. BULGULAR

Deney sonucunda yapılan yayma preparatların mikroskopik incelemesine göre ratların kan sayımı sonucu Çizelge 4.1' de verilmiştir.

Çizelge 4.1. DMBA ile lösemi yapılan ratların kan sayımı sonuçları

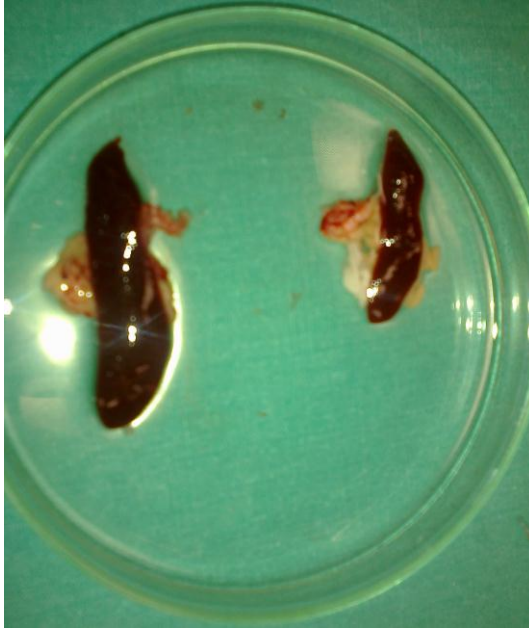
| Kan Hücresi Türü | Kontrol Grubundaki Ratların Ortalama Değerleri | Lösemik Ratların Ortalama Değerleri |
|------------------|--|-------------------------------------|
| Eritrosit        | $7-10 \times 10^6$                             | $6,6 \times 10^6$                   |
| Lökosit          | $6-17 \times 10^3$                             | $23 \times 10^3$ *                  |
| Nötrofil         | %9-34  | %7                                  |
| Lenfosit         | %65-85   | %85                                 |
| Eozinofil        | %0-6   | %3                                  |
| Monosit          | %0-5   | %2                                  |
| Bazofil          | %0-2   | %3                                  |

\*Kan sayımı sonucunda lökositlerin alt fraksiyonlarının sayısı normal sınırlarda olmakla birlikte, periferik kanda çok sayıda blast bulunmaktadır. Total lökosit sayısı blastlarla birlikte verilmiştir.



Resim 4.1. DMBA ile lösemi oluşturulan ratların periferik kan yayması

Giemsa boyası, Işık Mikroskobu x 40



Resim 4. 2. DMBA ile lösemi oluşturulan ratlarda splenomegali

Solda DMBA uygulaması sonucu lösemi olan ratın dalağı, sağda kontrol grubundaki sağlıklı ratın dalağı

Dalak ve karaciğer dokusunda NOx ve kaspaz-3 düzeylerine ait sonuçlar Çizelge 4.2. ve Çizelge 4.3.'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Karaciğer dokusunda NOx ve Kaspaz-3 düzeyleri

| Gruplar<br>(n=6) | NOx<br>µmol/g doku      | Kaspaz-3<br>ng/g doku       |
|------------------|-------------------------|-----------------------------|
| Kontrol          | 0,81± 0,16              | 67,56± 54,76                |
| Lösemi           | 0,63± 0,09 <sup>a</sup> | 51,90± 39,31 <sup>a</sup>   |
| Tedavi           | 0,60± 0,08 <sup>a</sup> | 34,96± 34,45 <sup>a,b</sup> |

<sup>a</sup>p< 0,05 kontrol grubunun aynı değeriyle karşılaştırıldığında

<sup>b</sup>p< 0,05 lösemi grubunun aynı değeriyle karşılaştırıldığında

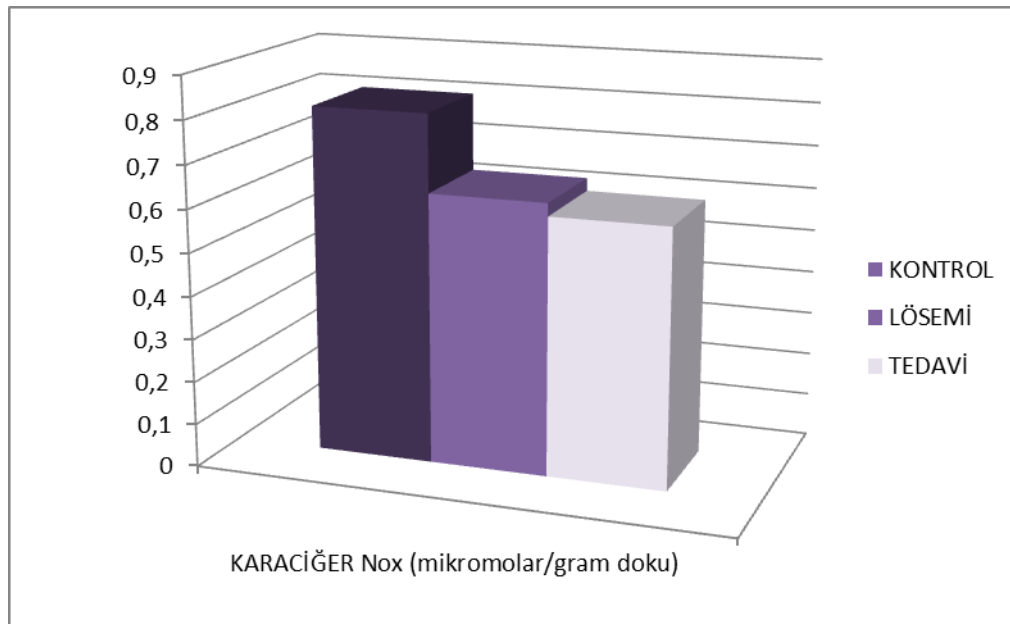
Çizelge 4.3. Dalak dokusunda NOx ve Kaspaz-3 düzeyleri

| Gruplar<br>(n=6) | NOx<br>µmol/g doku      | Kaspaz-3<br>ng/g doku |
|------------------|-------------------------|-----------------------|
| Kontrol          | 0,37± 0,06              | 60,4± 5,52            |
| Lösemi           | 0,25± 0,07 <sup>a</sup> | 67,6± 3,65            |
| Tedavi           | 0,19± 0,05 <sup>a</sup> | 76,03± 6,36           |

<sup>a</sup>p< 0,05 kontrol grubunun aynı değeriyle karşılaştırıldığında

#### 4.1. Karaciğer Dokusu NOx Düzeyleri

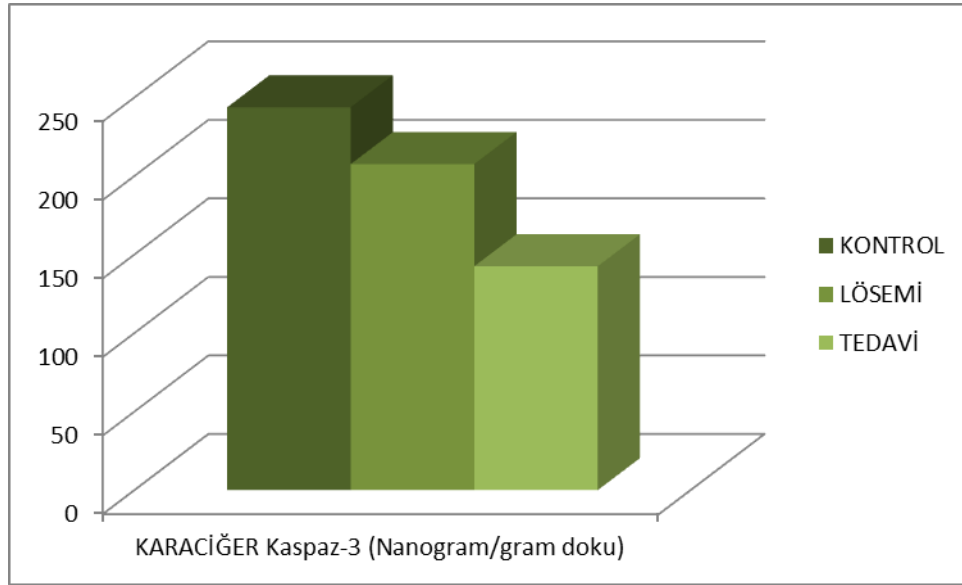
Çalışmada elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde karaciğer dokusu NOx seviyeleri lösemi ve tedavi grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında her iki grupta da kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş olduğu saptanmıştır. Ancak tedavi grubu ile lösemi grubu karşılaştırıldığında ise tedavi grubu NOx seviyelerindeki düşüş istatistiksel olarak anlamlı değildir. (Çizelge 4.2.)



Şekil 4.1. Karaciğer dokusu NOx düzeyleri

#### 4.2. Karaciğer Dokusu Kaspaz-3 Düzeyleri

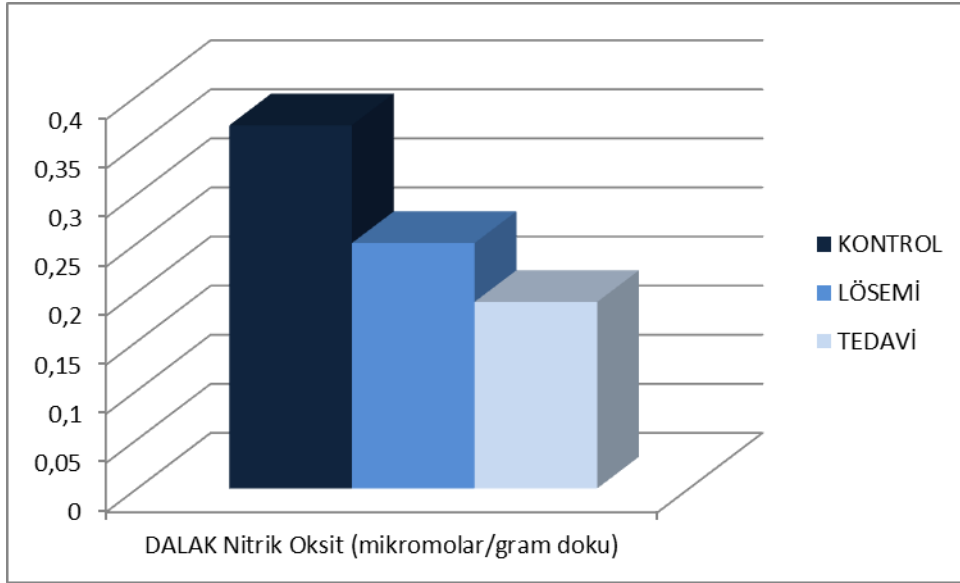
Lösemi ve tedavi gruplarının karaciğer dokularındaki kaspaz-3 konsantrasyonları, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük bulunmuştur (Çizelge 4.2.).



Şekil 4.2. Karaciğer dokusu kaspaz-3 düzeyleri

#### 4.3. Dalak Dokusu NOx Düzeyleri

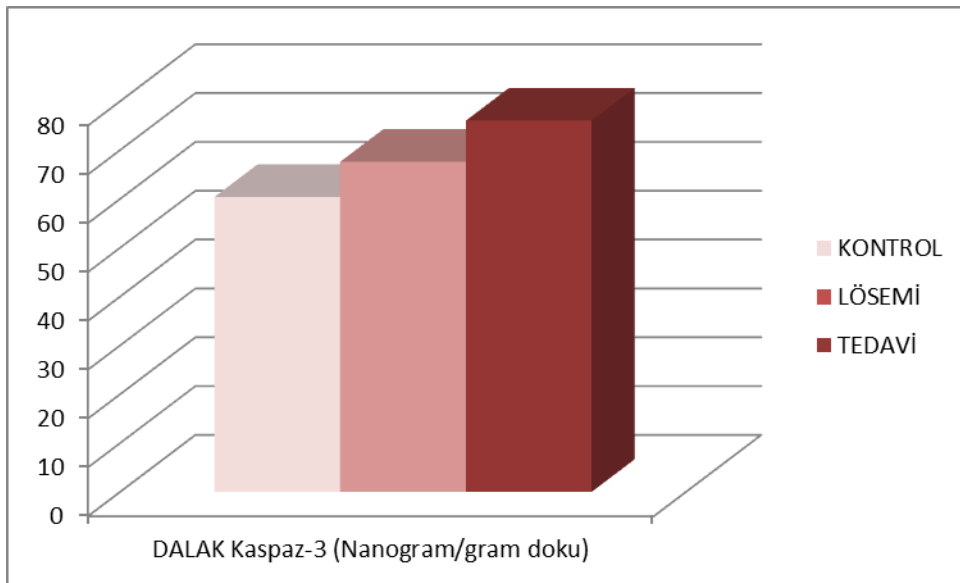
Çalışmada elde edilen verilere göre en yüksek ortalama NOx konsantrasyonu kontrol grubunda tespit edilmiştir ( $0,37 \pm 0,06$ ). Lösemi ve tedavi grupları, kontrol grubuyla kıyaslandığında, dalak dokusu NOx konsantrasyonunda sürekli bir azalma olduğu görülmüştür. Bu azalış değerlendirildiğinde lösemi ve tedavi gruplarında tespit edilen düşüş kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Ancak tedavi grubundaki NOx seviyesindeki azalma lösemi grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı değildir (Çizelge 4.3.).



Şekil 4.3. Dalak dokusu NOx düzeyleri

#### 4.4. Dalak Dokusu Kaspaz- 3 Düzeyleri

Lösemi ve tedavi grupları kaspaz-3 düzeylerindeki yükseliş kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür (Çizelge 4.3.).



Şekil 4.4. Dalak dokusu kaspaz-3 düzeyleri

## 5. SONUÇ ve TARTIŞMA

Lösemi hematopoetik kök hücreleri ve kan hücrelerini etkisi altına alan malign bir hastalıktır [35]. Lösemi etkenleri arasında önemli yer tutan benzen ve türevleri (DMBA) aynı zamanda deneysel lösemi oluşturmak amacıyla da kullanılmaktadır [13, 14]. DMBA doğrudan bir kanserojen olmayıp, metabolizması esnasında kanserojen özellik kazanır. Metabolize edilmesi esnasında ortaya çıkan ara metabolitler ve serbest radikaller başta kemik iliği, kan, dalak ve karaciğer olmak üzere tüm vücudu etkiler [13, 15, 98]. Kanserleşen dokularda serbest radikal miktarı artmış, kaspazlar gibi apoptotik enzim aktiviteleri ise azalmış olarak gözlenmektedir [2, 35]. Bu serbest radikaller arasında NO yaptığı çok yönlü etkiler ile apoptoz enzimlerinin aktivitesini de düzenler [57].

*Lycium barbarum*'un içerdiği aktif bileşikler sebebiyle kanser tedavisinde veya kanser tedavisine yardımcı olarak da kullanılabileceği yaygın bir düşüncedir [22, 23, 25, 27, 62, 63, 66]. Literatürde bitkinin ekstresinin veya bitkiden izole edilen polisakkaritlerin kanser tedavisinde kullanımı ile ilgili çeşitli çalışmalar bulunmaktadır [11, 12, 30, 75].

Bu bilgilere dayanarak bu çalışmada DMBA ile lösemi oluşturulan ratlarda *Lycium barbarum* sulu ekstresinin karaciğer ve dalak dokularındaki NOx ve kaspaz-3 parametreleri üzerine etkisini araştırmak amaçlanmıştır.

Çalışmada sistemik DMBA uygulaması ile lösemi oluşturulan *Wistar albino* ratlarda, lösemi oluşumundan sonra, 10 gün boyunca *Lycium barbarum* sulu ekstresi verilmiş deneklerin karaciğer ve dalak dokuları kaspaz-3 ve NOx parametreleri açısından incelenmiştir.

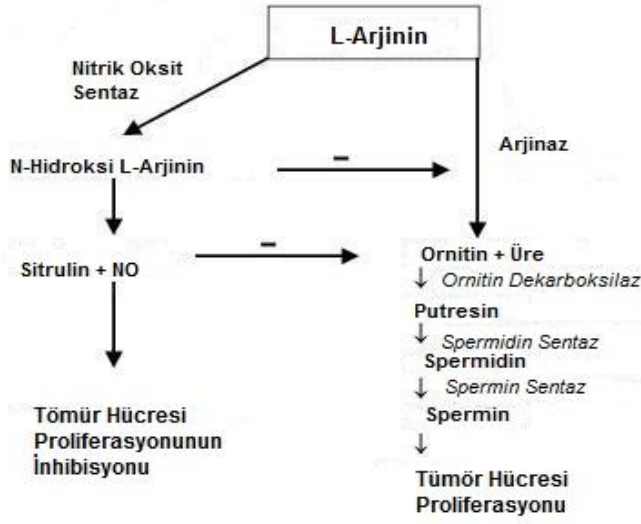
Çalışma sonucunda elde edilen bulgulara göre karaciğer ve dalak dokularındaki NOx konsantrasyonları, tedavi ve lösemi gruplarında kontrole göre anlamlı şekilde düşük bulunmuştur.

Çalışmada elde edilen bulgular ışığında karaciğer ve dalakta NOx seviyelerinde gözlenen düşüş üç muhtemel mekanizma ile açıklanabilir.

Lösemi oluşturmak amacıyla deneklere verilen DMBA'nın biyolojik sistemlerde yüksek miktarda serbest radikal oluşturduğuna ilişkin literatür bilgisi mevcuttur Bu radikal türlerden en reaktif olanları oksijen kaynaklı serbest radikallerdir. [89, 90]. NO reaktif oksijen türleri ile reaksiyona girerek peroksinitrit (ONOO-) gibi sitotoksik türlerin oluşumuna yol açabilir [8]. Bu bilgiler değerlendirildiğinde çalışmamızda karaciğer ve dalak dokularında NOx parametresinde gözlenen düşüş, NO'nun DMBA'nın oluşturduğu oksijen kaynaklı serbest radikallerle reaksiyona girerek, kendi derişimlerinde azalmaya neden olduğunu düşündürmektedir.

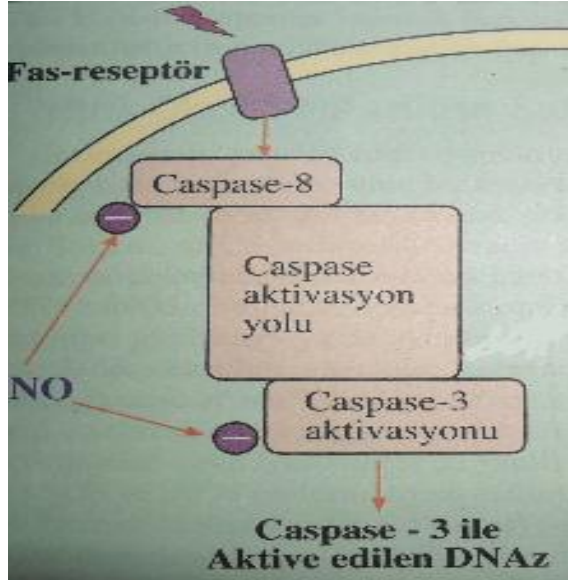
Çalışmanın verilerine dayanarak akla gelen ikinci mekanizma DMBA ile indüklenen kanserlerde artan arjinaz aktivitesinin NOS aktivitesini baskıladığı yönündedir. Arjinaz enziminin kanserli hücrelerde normal hücrelere göre daha fazla miktarda bulunduğu, kolorektal kanserler, epidermal papillomalar, sinir dokusu tümörleri ve prostat kanserinde gösterilmiştir [94-97].

Arjinaz ve NOS aynı amino asidi (L-arjinin) substrat olarak kullandığı için artan arjinaz aktivitesi ortamdaki L-arjinin miktarını azaltmış ve dolayısıyla NOS aktivitesinin azalması ile NOx seviyeleri de azalmış olabilir. Arjinaz ve NOS arasındaki ilişki Sekil 5.1'de gösterilmiştir. Ancak lösemilerde arjinaz aktivitesini direkt olarak gösteren bir literatür çalışması mevcut değildir. Bu açıdan lösemideki arjinaz ve NOS aktitelerinin karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesi için ilerleyen çalışmaların planlanması uygun olacaktır.



Şekil 5.1. Nitrik Oksit Sentaz ve Arjinaz ilişkisi [100]

Mevcut tabloda düşünülen üçüncü ihtimal ise NO'nun enzim inhibisyonu yaparak kaspaz-3'ün aktivasyonunu engellediği yönündedir. NO yaptığı çok yönlü ve düzenleyici etkilerle kaspazların aktivasyonunu da etkiler [57].



Şekil 5.2. Nitrik oksidin kaspaz enzimlerini inhibisyon yolları [8]

Şekil 5.2'de de görüldüğü gibi NO kaspaz-3 ve 8'e bağlanarak enzimin aktivasyonunu inhibe edebilir [8].



Bu inhibisyon mekanizması ile hem dokudaki NOx konsantrasyonlarındaki hem de kaspaz-3 seviyelerindeki düşüş açıklanabilir.

Karaciğer ve dalak dokularında *Lycium barbarum* uygulanan tedavi grubunda lösemi grubuna göre gözlenen azalma istatistiksel olarak anlamlı değildir. Bitki ekstresinin 200 mg/kg dozunda karaciğer ve dalak NOx seviyeleri üzerinde önemli bir etkisinin olmadığı saptanmıştır.

Ancak Lin ve arkadaşlarının (2008) yaptığı çalışma ise tıbbi değer taşıyan bir mantar türü olan *Coriolus versicolor* ile *Lycium barbarum* ekstresinin kombine edilerek fare makrofaj hattı üzerine uygulanması sonucu bu kombinasyonun immün düzenleyici etki gösterdiğini ve NO üretimini arttırdığı öne sürülmüşlerdir [76].

Bu bilgi doğrultusunda *Lycium barbarum*' un tek başına NOx üretimine kayda değer bir etkisinin bulunmadığı ancak daha yüksek dozlarda ve destekleyici maddelerle birlikte uygulanması halinde etkili olduğu düşünülmektedir.

Karaciğer dokusunda kaspaz-3 parametresinde lösemi ve tedavi gruplarında kontrole göre gözlenen azalmanın sebebi kanserleşen dokularda kaspaz seviyelerinin azalarak hücrenin apoptozdan kaçması ile açıklanabilir. Ayrıca NO'nun kaspaz-3 enzimi üzerinde yaptığı inhibitör etki de kaspaz-3 derişiminde azalmaya yol açmıştır.

Karaciğer dokusu kaspaz-3 parametresinde tedavi grubunda lösemi grubuna göre tespit edilen düşüş *Lycium barbarum* meyveleri sulu ekstresinin NO'dan bağımsız bir mekanizma ile kaspaz-3'ü inhibe ettiğini düşündürmektedir. Bu inhibisyonun mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte *Lycium barbarum*' un karaciğer koruyucu etki göstererek karaciğer hücrelerinin apoptozunu durdurduğu varsayılmaktadır.

Bu bilgi *Lycium barbarum* ve diğer *Lycium* türlerinin karaciğer ve nöron hücrelerini apoptoza karşı koruduğu bilgisi ile örtüşmektedir. İlgili çalışmaların bulguları aşağıda özetlenmiştir.

Man ve arkadaşları (2006) yaptıkları çalışmada *Lycium barbarum* sulu ekstresinin  $\beta$ -amiloid peptidini indükleyerek nöron hücrelerini apoptoza karşı koruduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca DTT gibi indirgeyici bir ajanın neden olduğu LDH salınımı ve kaspaz-3 aktivitesini azaltarak nöron hücrelerini apoptoza karşı koruyucu etki gösterdiğini bildirmişlerdir [21].

Ho ve arkadaşları 2010 yılında yayınladıkları çalışmalarında sistemik homosistein uygulamasının kortikal nöronlarda oluşturduğu toksisiteyle beraber artan kaspaz-3 ve LDH aktivitesinin *Lycium barbarum* uygulanan grupta azaldığını bildirmişlerdir [74].

Lin ve arkadaşları (1997), *Lycium barbarum*' a çok yakın bir tür olan *L. chinense*' nin  $CCl_4$ 'ün sebep olduğu karaciğer hasarına karşı antioksidan ve karaciğer koruyucu etki gösterdiğini öne sürmüşlerdir [29].

Ancak *Lycium barbarum*' un hangi mekanizma ile NO'dan bağımsız olarak kaspaz seviyelerini düşürdüğüünün anlaşılması için ileri çalışmalara gerek vardır.

Dalak dokusu kaspaz-3 düzeyleri lösemi ve tedavi gruplarında kontrole göre yüksek bulunmuştur. Ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir, bu veriler göz önüne alındığında 10 günlük 200 mg/kg *Lycium barbarum* uygulamasının dalak hücrelerinin apoptozunda etkili olmadığı saptanmıştır. Literatürde lösemide *Lycium barbarum* uygulamasının dalak kaspaz-3 seviyeleri üzerine etkisi ile ilgili bir çalışma bulunmamaktadır. *Lycium barbarum*' un farklı dozlarının karşılaştırmalı değerlendirildiği daha ileri çalışmaların yapılması uygun olacaktır.

Sonuç olarak, *Lycium barbarum* sulu ekstresinin, deneysel lösemi oluşturulan ratların karaciğer dokularındaki kaspaz-3 seviyelerini azaltarak karaciğer koruyucu etki gösterdiği ve dalak hücrelerinin apoptozunda etkili olmadığı tespit edilmiştir.

Ayrıca karaciğer ve dalak NOx seviyeleri üzerinde *Lycium barbarum'* un önemli bir etkisi bulunmamaktadır.

## KAYNAKLAR

1. Hoffman, R., Benz, E.J., Shattil, S.J., Furie, B., Cohen, H.J., Silberstein, L.E., McGlave, P., "Hematology Basic Principles and Practice 4th Edition", **Elsevier Churchill Livingstone**, Philadelphia, 1057-1120 (2005)
2. Aydoğdu, İ., "Kan Hastalıkları 1. baskı", **Sistem Ofset Yayıncılık**, Ankara, 75-77, 80-82, 86-88, 123-127, 137-138 (2005)
3. Beutler, E., Litchman, M.A., Coller, B.S., Kipps, T.J., Seligsohn, U., "Williams Hematology 6<sup>th</sup> Edition", **McGraw-Hill**, New York, 1019, 1163-1164, 1141-1143, 1047-1048, (2001)
4. Onat, T., Emerk, K., Sözmen, E.Y., "İnsan Biyokimyası, 2. Baskı", **Palme Yayıncılık**, Ankara, 691-711 (2006)
5. Çekmen, M.B., Turgut, M., Türköz, Y., Aygün, A., Gözükara, E.M., "Nitrik oksit ve nitrik oksit sentazın fizyolojik ve patolojik özellikleri", **T. Klin. J. Pediatr.**, 10: 226-236 (2001).
6. Md, S., Sunil, S.J., "Antidiabetic activity of aqueous fruit extract of Cucumis trigonus Roxb. in streptozotocin- induced- diabetic rats", **J. Ethnopharmacol.**,127: 565-567 (2009)
7. Çakatay, U., Kayalı, R., "Serbest Radikal Biyokimyasının Tarihsel Süreçteki Gelişimi", **Cerrahpaşa Tıp Dergisi**, 32:162-167 (2006)
8. Kılınç, K., Kılınç, A., "Nitrik Oksit Biyolojik Fonksiyonları ve Toksik Etkileri", **Palme Yayıncılık**, Ankara, 1-11, 125-127 (2003)
9. Aydoğdu, İ., Kuku, İ., Kaya, E., Gödekmerdan, A., "Kan Hastalıkları Atlası", **Sistem Ofset Yayıncılık**, Ankara, 69-82, 97-108 (2002)
10. Colin, A.S., Williams, D.A., "Hematopoiesis" Handin, R. I., Lux, S. E., Stossel, T. P., Blood Principles and Practice of Hematology, **J. B. Lippincott Company**, Philadelphia, 171-224 (1995)
11. Huang, Y., Tan, A., Lu, J., "Scavenging effect of total flavonoids of *Lycium barbarum* L. on active oxygen radicals and inhibitory effects on heat output from L1210 cells", **Wei Sheng Yan Jui**, 27 (2): 109-115 (1998)
12. Gan, L., Wang, J., Zhang, S., "Inhibition the growth of human leukemia cells by *Lycium barbarum* polysaccharide", **Wei Sheng Yan Jui**, 30 (6): 333 (2001)

13. Sugiyama, T., Mitsuhiko, O., Kenichi, K., Sakan, M., Norifumi, U., "7,12-DMBA induced rat leukemia: a review with insights into future research", **Leuk. Res.**, 26 (12): 1053-1658 (2002)
14. Welsch, C.W., Horowitz, S., Huggins, C.B., "Influence of prolactin on carcinogen-induced leukemogenesis in Long Evans rats", **Cancer Res.**, 35: 3746-3749 (1975)
15. Tözün, M., Ünsal, A., "Benzen ve sağlık etkileri", **TAF Prev. Med. Bull.**, 7 (6):541-546 (2008)
16. Lu Shao, P., Zhao, T., "Chemical characterization of *Lycium barbarum* polysaccharides and their reducing myocardial in ischemia/reperfusion of rat heart", **Int. J. Biol. Macromol.**, 47: 681-684 (2010)
17. Ming, M., Guanhua, L., Guang, C., Xuan, Z., "Effect of *Lycium barbarum* polysaccharides administration on blood lipid metabolism and oxidative stress of mice fed high-fat diet in vivo", **Food Chem.**, 113 (2009): 872-877 (2008)
18. Lin, C.L., Wang, C.C., Chang, S.C., Inbaraj, B.S., Chen, B.H., "Antioxidative activity of polysaccharide fractoins isolated from *Lycium barbarum* Linnaeus", **Int. J. Biol. Macromol.**, 45 (2): 146-151 (2009)
19. Niu, A., Wu, J., Wang, R., "Protective effect of *Lycium barbarum* polysaccharides on oxidative damage in skeletal muscle of exhaustive exercise rats", **Int. J. Biol. Macromol.**, 42 (5): 447-449 (2008)
20. Haotian, D., Yi, C., Gang, C., "Far infrared-assisted extraction followed by capillar electrophoresis for the determination of bioactive constituents in the leaves of *Lycium barbarum* Linn.", **J. Chromatogr. A**, 1217 (27): 4511-4516 (2010)
21. Man, Y., Ho, Y., So, K., Yuen, W., Chang, R.C., "Cytoprotective effects of *Lycium barbarum* against reducing stress on endoplasmic reticulum", **Int.J.Mol.Med.**, 17: 1157-1161 (2006)
22. Dong, J. Z., Lu, D.Y., Wang, Y., "Analysis of flavonoids from leaves of cultivated *Lycium barbarum* L.", **Plant Foods Hum. Nutr.**, 64: 199-204 (2009)
23. Koşar, M., Altıntaş, A., Kırimer, N., Başer, H.C., "Determination of the free radical scavenging activity of *Lycium* extracts", **Chem. Of Nat. Comp.**, 39 (6): 531-535 (2003)

24. Li, X. M., "Protective effect of *Lycium barbarum* polysaccharides on streptozotocin-induced oxidative stress in rats", ***Int. J. Biol. Macromol.***, 40 (2007): 461-465 (2006)
25. Ke, M., Zhang, X.J., Han, Z.H., Yu, H.Y., Lin, Y., Zhang, W.G., Sun, F.H., Wang, T.J., "Extraction, purification of *Lycium barbarum* polysaccharides and bioactivity of purified fraction", ***Carbohydr. Polym.***, 86 (2011): 136-141 (2011)
26. Li, X.L., Zhou, A.G., Li, X.M., "Inhibitin of *Lycium barbarum* polysaccharides and *Ganoderma lucidum* polysaccharides against oxidative injury induced by  $\gamma$ -irradiation in rat liver mitochondria", ***Carbohydr. Polym.***, 69 (2007): 172-178 (2006)
27. Le, K., Chiu, F., Ng, K., "Identification and qualification of antioxidants in Fructus lycii", ***Food Chem.***, 105 (2007): 353-363 (2006)
28. Liang, B., Jin, M., Liu, H., "Water-soluble polysaccharide from dried *Lycium barbarum* fruits: Isolation structural features and antioxidant activity", ***Carbohydr. Polym.***, 83 (2011): 1947-1951 (2010)
29. Lin, C.C., Chuang, S.C., Lin, J.M., Yang, J.J., "Evaluation of the antiinflammatory hepatoprotective and antioxidant activities of *Lycium chinense* of Taiwan", ***Phytomedicine***, 4 (3): 213-220 (1997)
30. He, N., Yang, X., Jiao, Y., Tian, L., Zhao, Y., "Characterisation of antioxidant and antiproliferative acidic polysaccharides from Chinese wolfberry fruits", ***Food Chem.***, 133 (2012): 978-989 (2012)
31. İnternet : Kök Hücre "Hematopoez"  
[http://www.kokhucre.info/icerik.php?id=117&alt\\_id=139&tab=0](http://www.kokhucre.info/icerik.php?id=117&alt_id=139&tab=0) (2013)
32. İnternet : Kök Hücre "Hematopoez"  
[http://www.kokhucre.info/icerik.php?id=117&alt\\_id=139&tab=0](http://www.kokhucre.info/icerik.php?id=117&alt_id=139&tab=0) (2013)
33. İnternet : Sağlık Danışma "Kan"  
<http://saglikdanisma.net/web/kan/> (2013)
34. İnternet : Wikipedia "Philadelphia Kromozomu"  
[http://en.wikipedia.org/wiki/Philadelphia\\_chromosome](http://en.wikipedia.org/wiki/Philadelphia_chromosome) (2013)
35. Chabner, B.A., Lynch, T.J., Longo, D. L., "Harrison Onkoloji El Kitabı", /Dönmez, B., ***Nobel Tıp Kitabevleri***, İstanbul 205-212, 247-252, 263-271.(2009)
36. Nicholson, D.W., Thornberry, N., "Caspases: Killer proteases", ***Tibs***, 22: 299-306 (1997)

37. Udipi, V., Yu, M., Malaviya, S., Saavedra, J.E., Shami, P.J., "JS-K, anitric oxide prodrug, induces cytochorome c release ande caspase activation in HL-60 myeloid leukemia cells", **Leuk. Res.**, 30: 1279-1283 (2006)
38. Al-alamy, O., Sammons, J., Martin, J.H., Hassan, H. T., "Divergent effect of taxol on proliferation, apoptosis and nitric oxide production in MHH225 CD34 positive and U937 CD34 negative homan leukemia cells", **Leuk. Res.**, 22: 939-945 (1998)
39. Kim, P. K.M., Zamora, R., Petrosko, P., Biliar, T.R., "The regulatory role of nitric oxide in apoptosis", **Int Immunopharmacol.**, 1: 1421-1441 (2001)
40. Nagata, S., "Apoptosis by death factor", **Cell**, 88: 355-365 (1997)
41. Porta, C., Larghi, P., Rimoldi, M., Totaro, M.G., Allavenac, P., Mantovani, A., Sica, A., "Cellular and molecular pathways linking inflammation and cancer", **Immunobiology**, 214: 761-777 (2009)
42. Gülçin, İ., Küfrevioğlu, Ö.İ., Oktay, M., Büyükokuroğlu, M.E., "Antioxidant, antimicrobial, antiulcer and analgesic activities of nettle (*Urtica dioica L.*)", **J. Ethnopharmacol.**, 90: 205-215 (2004)
43. Li, G., You, J., Sou, Y., Song, C., Sun, Z., Xia, L., Zhao, X., Shi, J., "A developed pre-column derivizatin method for the determination of free fatty acids in edible oils by reversed –phase HPLC with fluorescence detection and its application to *Lycium barbarum* seed oil", **Food Chem.**, 125: 1365-1372 (2011)
44. Hengartner, M.O., "The biochemistry of apoptosis", **Nature**, 407: 770-776 (2000)
45. Tomatır, A.G., "Apoptoz: Programlı Hücre Ölümü", **T Klin J Med Sci**, 23: 499-508 (2003)
46. Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A., Rodwell, V.W., "Harper'ın Biyokimyası", Murray, R.K. / Dikmen N., Özgünen T., **Nobel Tıp Kitabevleri**, İstanbul, 766-777 (2004)
47. Zeybek,N., "Farmasötik Botanik", **Ege Üniversitesi Basımevi**, İzmir, 292-293 (1985)
48. Ebadi, M., "Pharmacodynamic Basis of Herbal Medicine", **CRC Press**, New York, 237-239 (2002)
49. İnternet : Wikipedia "Lycium barbarum"

[http://tr.wikipedia.org/wiki/Lycium\\_barbarum](http://tr.wikipedia.org/wiki/Lycium_barbarum) (2013)

50. Lagow, B., "PDR for Herbal Medicines 3rd ed.", **Thomson PDR**, Montvale, 530-531 (2004)
51. Li, S., Yang, D., Yueng, C., Yu, W., Chang, R.C., So, K., Wong, D., Lo, A.C.Y., "*Lycium barbarum* polysaccharides reduce neuronal damage blood-retinal barrier disruption and oxidative stress in retinal ischemia/reperfusion injury", **Plos one**, 6 (1): 1-13 (2011)
52. İnternet : Lise Biyoloji "Hücre döngüsü"  
<http://www.lisebiyoloji.com/mitoz.html> (2013)
53. Thornberry, N.A., Rano, T.A., Peterson, E.P., Rasper, D.M., Timkey, T., Garcia-Calvo, M., Houtzager, V.M., Nordstrom, P.A., Roy, S., Vaillancourt, J. P., Chapman, K. T., Nicholson, D. W., "A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis", **J. Biol. Chem**, 272 (179): 07-11.(1997)
54. Ardjomande, S.A., Martinou, J.C., "Regulation of Bcl-2 proteins and of the permeability of the outer mitochondrial membrane", **C. R. Biol.**, 328 (7): 616-631.(2005)
55. İnternet : Goodrich Medical "Sorenson buffer"  
[http://goodrich.med.harvard.edu/resources/protocols/sorenson\\_buffer](http://goodrich.med.harvard.edu/resources/protocols/sorenson_buffer) (2013)
56. Green, L.C., Wagner, D.A., Glogowski, J., Skipper, P.L., Wishnok, J.S., Tannenbaum, S.R., "Analyses of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids", **Anal. Biochem.**, 126: 131–138 (1982).
57. Li, C., Wogan, G. N., "Nitric oxide as a modulator of apoptosis", **Cancer Lett.**, 226: 1-15 (2005)
58. Amagase, H., Farnsworth, N.R., "A review of botanical characteristics, phytochemistry, clinical relevance in efficacy and safety of *Lycium barbarum* fruit (Goji)", **Food Research Int.**, 44: 1702-1717 (2011)
59. Bilir, N., Yıldız, A.N., "İş Sağlığı ve Güvenliği 2. baskı" **Hacettepe Üniversitesi Yayınları**, Ankara, 199-201 (2004)
60. Redgwell, R.J., Curti, D., Wang, J., Dobruckowska, J.M., Gerwig, G.J., Kamerling, J. P., Bucheli, P., "Cell wall polysaccharides of Chinese wolfberry (*Lycium barbarum*): Part 1. Characterisation of soluble and insoluble polymer fractions", **Carbohydr. Polym.**, 84: 1344-1349 (2011)



61. Wu, H., He, X., Hong, Y., Ma, T., Xu, Y., Li, H., "Chemical characterization of *Lycium barbarum* polysaccharides and inhibition against liver oxidative injury of high fat mice", *Int J Biol Macromol.*, 46: 540-543 (2010)
62. Inbaraj, B.S., Lu, H., Kao, T.H., Chen, B.H., "Simultaneous determination of phenolic acids and flavonoids in *Lycium barbarum* Linnaeus by HPLC-DAD-ESI-MS", *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 51: 549-556 (2010)
63. Inbaraj, B.S., Lu, H., Hung, C.F., Wu, W.B., Lin, C.L., Chen, B.H., "Determination carotenoids and their esters in fruits of *Lycium barbarum* Linnaeus by HPLC-DAD-APCI-MS", *J Pharm Biomed Anal.*, 47: 812-818 (2008)
64. Chang, L., Cheng, J., Hsu, S., Liao, B., Wu, T., "Application of continuous supercritical anti-solvents for rapid recrystallization and purification of zeaxanthin dipalmitates from de-glycosides of *Lycium barbarum* fruits", *J. Of Supercrit. Fluids*, 57: 155-161 (2011)
65. Gan, L., Zhang, S.H., Yang, X.L., Xu, H.B., "Immunomodulation and antitumor activity by a polysaccharide-protein complex from *Lycium barbarum*", *Int Immunopharmacol.*, 4: 563-569 (2004)
66. Wang, C.C., Chang, S.C., Inbaraj, B.S., Chen, B.H., "Isolation of carotenoids, flavonoids and polysaccharides from *Lycium barbarum* L. and evaluation of antioxidant activity", *Food Chem.*, 120: 184-192 (2010)
67. Zou, S., Zhang, X., Yao, W., Niu, Y., Gao, X., "Structure characterization and hypoglycemic activity of a polysaccharide isolated from the fruit of *Lycium barbarum* L.", *Carbohydr. Polym.*, 80: 1161-1167 (2010)
68. Chung, R., Chen, C., Ng, L., "Nitrogen fertilization affects the growth performance, betaine and polysaccharides of *Lycium barbarum*" *Ind. Crop and Products*, 32: 650-655 (2010)
69. Potterat, O., "Goji (*Lycium barbarum* and *L. chinense*): Phytochemistry, Pharmacology and safety in the perspective of traditional uses and recent popularity" *Planta Med.*, 76: 7-19 (2009)
70. Internet : Sigma "DMBA"  
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/> (2013)

71. Chen, Z., Tan, B.K.H., Chan, S.H., "Activation of T lymphocytes by polysaccharide-protein complex from *Lycium barbarum* L.", **Int. Immunopharmacol.**, 8: 1663-1671 (2008)
72. Amagase, H., Sun, B., Borek, C., "*Lycium barbarum* (goji) juice improves in vivo antioxidant biomarkers in serum healthy adults", **Nutr. Res.**, 29: 19-25 (2009)
73. Gan, L., Zhang, S., Liu, Q., Xu, H., "A polysaccharide-protein complex from *Lycium barbarum* upregulates cytokine expression in human peripheral blood mononuclear cells", **Eur. J. Pharmacol.**, 471: 217-222 (2003)
74. Ho, Y., Yu, M., Yang, X., So, K., Yuen, W., Chang, R.C., "Neuroprotective effects of polysaccharides from Wolfberry, the fruits of *Lycium barbarum*, against homocysteine-induced toxicity in rat cortical neurons", **J. Alzheimers Dis.**, 19: 813-827 (2010)
75. Zhang, M., Chen, H., Huang, J., Li, Z., Zhu, C., Zhang, S., "Effect of *Lycium barbarum* polysaccharide on human hepatoma QGY7703 cells: Inhibition of proliferation and induction of apoptosis", **Life Sci.**, 76: 2115-2124 (2005)
76. Lin, F., Lai, Y., Yu, H., Chen, N., Chang, C., Lo, H., Hsu, T., "Effects of *Lycium barbarum* extract on production and immunomodulatory activity of the extracellular polysaccharopeptides from submerged fermentation culture of *Coriolus versicolor*", **Food Chem.**, 110: 446-453 (2008)
77. Luo, Q., Li, Z., Huang, X., Yan, J., Zhang, S., Cai, Y., "*Lycium barbarum* polysaccharides: Protective effects against heat induced damage of rat testes and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced DNA damage in mouse testicular cells and beneficial effect on sexual behavior and reproductive function of hemicastrated rats", **Life Sci.**, 79: 613-621 (2006)
78. Cui, B., Liu, S., Lin, X., Wang, J., Li, S., Wang, Q., Li, S., "Effects of *Lycium barbarum* aqueous and ethanol extracts on high-fat-diet induced oxidative stress in rat liver tissue", **Molecules**, 16: 9116-9128 (2011)
79. Chang, R.C., So, K., "Use of anti-aging herbal medicine, *Lycium barbarum* against aging associated diseases. What do we know so far?", **Cell Mol. Neurobiol.**, 28: 643-652 (2008)
80. Xin, Y., Wan, L., Peng, J., Guo, C., "Alleviation of the acute doxorubicin-induced cardiotoxicity by *Lycium barbarum*

- polysaccharides through the suppression of oxidative stress”, **Food Chem. Toxicol.**, 49: 259-264 (2011)
81. Li, X.M., Ma, Y.L., Liu, X.J., “Effect of the *Lycium barbarum* polysaccharides on age related oxidative stress in aged mice”, **J. Ethnopharmacol.**, 111: 504-511 (2011)
  82. Zhang, X.R., Zhou, W.X., Zhang, Y.X., Qi, C.H., Yan, H., Wang, Z. H., Wang, B., “Macrophages rather than T and B cells are principal immunostimulatory target cells of *Lycium barbarum* L. polysaccharide LBPF-OL”, **J. Ethnopharmacol.**, 136: 465-472 (2011)
  83. Chan, H., Chang, R.C., Ip, A.K., Chiu, K., Yuen, W., Zee, S., So, K., “Neuroprotective effects of *Lycium barbarum* Lynn on protecting retinal ganglion cells in an ocular hypertension model of glaucoma”, **Exp. Neurol.**, 203: 269-273 (2007)
  84. Yuan, L., Deng, H., Chen, L., Li, D., He, Q., “Reversal of apoptotic resistance by *Lycium barbarum* glycopeptide 3 in aged T cells”, **Biomed. Environ. Sci.**, 21: 212-217 (2008)
  85. Doğan, A.L., Güç, D., “Sinyal iletim mekanizmaları ve kanser”, **Hacettepe Med J.**, 35: 34-42 (2004)
  86. Whillie, A.H., Kerr, J.F.R., Currie, A.R., “Cell Death: The significance of apoptosis”, **Int Rev Cytol**, 68: 251-306 (1980)
  87. Motoyama, J., Yamashita, Morino, T., Takana, M., Kobayashi, T., Honda, H., “Hyperthermic treatment of DMBA-induced rat mammary cancer using magnetic nanoparticles”, **Biomagn Res Technol.**, 6: 1-6 (2008)
  88. Winter, E., Chiaradia, L.D., Cordiva, C.A.S., Nunes, R.J., Yunes, R.A., Creczynski-Pasa, T.B., “Naphthylchalcones induce apoptosis and caspase activation in leukemia cell line: The relationship between mitochondrial damage, oxidative stress, and cell death”, **Bioorg Med Chem.**, 18: 8026-8034 (2010)
  89. Çiftçi, H., Özkaya, A., Dayangaç, A., Ölçücü, A., Çelik, S., Şahin, Z., Ateş, S., “DMBA ile indüklenmiş kobayların beyin dokusundaki bazı elementler üzerine alfa lipoik asitin etkisi”, **Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.**, 15 (4): 569-573 (2009)
  90. Baum, A., Mevissen, M., Kamino, K., Mohr, U., Löscher, W., “A histopathological study on alterations in DMBA induced mammary carcinogenesis in rats with 50 Hz, 100 µT magnetic field exposure”, **Carcinogenesis**, 16 (1): 119-125 (1995)

91. Aktan, F., "iNOS mediated nitric oxide production and its regulation", **Life Sci.**, 75: 639-653 (2004)
92. Beşışık-Kalayoğlu, S., "Tirozin kinaz inhibitörleri ve tedavide kullanımları", **Ankem Derg.**, 19 (2): 117-122 (2005)
93. Shahidi, F., Naczk, M., "Phenolics in Food and Nutraceuticals", **CRC Press**, New York, 131 (2003)
94. Trapeznikova, S.S., Navasardiants, D.C., Levchenko, L.I., "Comparative study of the activity of arginase isoenzymes in brain tumors of humans and experimental animals", **Vopr Med Khim.**, 32(6): 29-34 (1986)
95. Leu, S.Y., Wang, S.R. "Clinical significance of arginase in colorectal cancer", **Cancer**, 70(5): 733-736 (1992)
96. Koza, R.A., Megosh, L.C., Palmieri, M., O'Brien, T.C., "Constitutively elevated levels of ornithine and polyamines in mouse epidermal papillomas", **Carcinogenesis**, 12(9): 1619- 1625 (1991)
97. Harris, B.E., Pretlow, T.P., Bradley, E.L., "Arginase activity in prostatic fluid of patients with benign prostatic hyperplasia and prostatic carcinoma", **Cancer Res.**, 43(6): 3008-3012 (1983)
98. Cavalieri, E.L., Rogan, E.G., "The approach to understanding aromatic hydrocarbon carcinogenesis the central role of radical cations in metabolic activation", **Pharmacol. Ther.**, 55: 99-183 (1992)
99. Sugiyama, T., Uenaka, H., Ueda, N., Fukuhara, A.S., Maeda, S., "Reproducible chromosomal changes of polycyclic hydrocarbon-induced rat leukemia: incidence and chromosome banding pattern", **J. Natl. Cancer Inst.**;60: 153-60 (1978)
100. İnternet: Translational Medicine "Arjinaz"  
<http://www.translational-medicine.com/content/figures/1479-5876-1-5-1.jpg>

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : BAŞARAN, Aylin  
Uyruğu : T.C.  
Doğum tarihi ve yeri : 09.03.1987 BULGARİSTAN  
Medeni hali : Bekar  
Telefon : 0 (312) 363 68 63  
e-mail : aylin\_basaran87@hotmail.com

### Eğitim

| Derece | Eğitim Birimi                           | Mezuniyet Tarihi |
|--------|---|------------------|
| Lisans | Kırıkkale Üniversitesi/ Biyoloji Bölümü | 2009             |
| Lise   | Ankara Anıttepe Lisesi                  | 2004             |

### Yabancı Dil

İngilizce

### Hobiler

Kitap okumak, müzik dinlemek, film seyrek