

**T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**DİETİLNİTROZAMİN ve FENOBARBİTAL UYGULANAN
RATLARDA Dipyrido[3, 2-a:2', 3'- c]phenazine (dppz) Au(III)
KOMPLEKSİNİN APOPTOTİK PROTEİNLER ve UBİKUITİN
SİSTEM ÜZERİNE ETKİLERİ**

DOKTORA TEZİ

NESLİHAN TEKİN

DANIŞMAN

YRD. DOÇ. DR. FAHRETTİN AKYÜZ

OCAK 2013

**T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZI ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TİBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**DIETİLNİTROZAMİN ve FENOBARBİTAL UYGULANAN
RATLARDA Dipyrido[3, 2-a:2', 3'- c]phenazine (dppz) Au(III)
KOMPLEKSİNİN APOPTOTİK PROTEİNLER ve UBİKUITİN
SİSTEM ÜZERİNE ETKİLERİ**

DOKTORA TEZİ

NESLİHAN TEKİN

DANIŞMAN

YRD. DOÇ. DR. FAHRETTİN AKYÜZ

Proje No: 201011044 (ESOGÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Fonu)

KABUL VE ONAY SAYFASI

Neslihan TEKİN'in Doktora Tezi olarak hazırladığı "Dietilnitrozamin ve fenobarbital uygulanan ratlarda dipyrido[3, 2-a:2', 3'-c]phenazine (dppz) Au(III) kompleksinin apoptotik proteinler ve ubiquitin sistem üzerine etkileri" başlıklı çalışma jürimiz tarafından Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Tarih: 28/01/2013

ÜYE: Prof. Dr. Özkan 

ÜYE: Prof. Dr. Güngör KANBAK

ÜYE: Prof. Dr. Hasan Veysi GÜNEŞ

ÜYE: Prof. Dr. Ahmet KAHRAMAN

ÜYE: Yrd. Doç. Dr. Fahrettin AKYÜZ (Tez Danışmanı)

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 28/01/2013 tarih ve 943/4378 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Kazım ÖZDAMAR

Enstitü Müdürü



ÖZET

Dietilnitrozamin (DEN) ve fenobarbital (FB) vererek deneysel kanser modeli oluşturmayı hedeflediğimiz çalışmamızda, apoptotik özelliği olan dipyrido[3, 2-a:2', 3'-c]phenazine (dppz) Au(III) kompleksinin ([Au(dppz)Cl₂]Cl) karaciğer dokusunda p53, kaspaz 3, Bcl-2, Bax, DNA fragmantasyonu ve ubikuitin üzerine etkileri araştırıldı.

Bu çalışmada, 48 erkek Sprague-Dawley türü sıçanlar her grupta 8 adet olacak şekilde, grup I (kontrol grubu), grup II (Dimetil sülfoksit (DMSO)), grup III ([Au(dppz)Cl₂]Cl), grup IV (DEN+ FB), grup V (DEN+FB+[Au(dppz)Cl₂]Cl (2. hafta)) ve grup VI (DEN+FB+[Au(dppz)Cl₂]Cl (7. hafta)) olmak üzere 6 gruba ayrılmıştır. Dietilnitrozamin sıçanlara bir defa olmak üzere 175 mg/kg intraperitoneal (i.p.) olarak verildi. Dietilnitrozamin uygulamasından 2 hafta sonra FB 500 ppm olacak şekilde günlük olarak uygulandı. [Au(dppz)Cl₂]Cl uygulaması grup V'te DEN uygulamasından 2 hafta sonra başladı ve haftada bir kez 2 mg/kg olmak üzere i.p. olarak verildi. Grup VI'da ise ([Au(dppz)Cl₂]Cl kompleksi DEN uygulamasından 7 hafta sonra başladı ve sıçanlara haftada bir kez 2 mg/kg (i.p.) olmak üzere uygulandı. Deney toplam 13 hafta sürdü. 13. haftanın sonunda sıçanlardan kan ve doku örnekleri alındı. Serumda AST, ALT, LDH düzeyleri, karaciğer dokusunda kaspaz 3, p53, Bax, Bcl-2, ubikuitin ve DNA fragmantasyonu ölçüldü. Karaciğer dokuları histopatolojik olarak değerlendirildi. Grup IV, grup I ile karşılaştırıldığında AST, ALT, LDH, Bcl-2 ve ubikuitin düzeylerinde artış belirlenirken kaspaz 3 ve p53 düzeylerinde azalma belirlendi. Grup IV'te preneoplastik fokus bulgusu mevcuttu. Grup V, grup IV ile karşılaştırıldığında kaspaz 3, p53, Bax ve DNA fragmantasyonu değerlerinde artış gözlemlendi. Grup VI'da ise grup IV'e göre kaspaz 3 ve p53 düzeylerinde artış belirlendi.

Sonuçlarımız, DEN ve FB uygulaması ile oluşturulan hepatosellüler karsinoma modelinde, [Au(dppz)Cl₂]Cl kompleksinin kaspaz 3, p53 seviyelerinde artışa ve DNA fragmantasyonuna neden olarak apoptozu indüklediğini göstermektedir. Bu durum kanserli dokularda görülen proliferasyona karşı [Au(dppz)Cl₂]Cl kompleksinin etkili olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar kelimeler: Kaspaz-3, p53, Bax, Bcl-2, ubikuitin, [Au(dppz)Cl₂]Cl

SUMMARY

In our study, we aimed to create a cancer model by administering diethylnitrosamine (DEN) and fenobarbital (FB). We investigated the effects of an apoptotic complex, dipyrido[3, 2-a:2', 3'- c]phenazine (dppz) Au(III) ([Au(dppz)Cl₂]Cl), on liver p53, caspase 3, Bcl-2, Bax, DNA fragmentation, and ubiquitin levels.

In this study, 48 male Spraque-Dawley rats divided into 6 groups (8 animals in each group); group I (control), group II (Dimethyl sulfoxide (DMSO)), group III ([Au(dppz)Cl₂]Cl), group IV (DEN + FB), Group V (DEN+FB+[Au(dppz)Cl₂]Cl (2nd week)) and grup VI (DEN+FB+[Au(dppz)Cl₂]Cl (7th week)). Rats were administrated with diethylnitrosamine in a single dose of intraperitoneal (i.p.) 175 mg/kg. After 2 weeks of diethylnitrosamine administration, rats were given daily FB in the dose of 500 ppm. In group V, after two week of DEN administration, [Au(dppz)Cl₂]Cl 2 mg/kg i.p. was given once a week. In the group IV animals given weekly 2 mg/kg [Au(dppz)Cl₂]Cl complex, 7 weeks after DEN administration. Experiment lasted for 13 weeks. 13 weeks after, blood and tissue samples collected from the rats. Serum AST, ALT, LDH levels and liver caspase 3, p53, Bax, Bcl-2, ubiquitin and DNA fragmentation levels were measured. Liver samples were evaluated histopathologically. AST, ALT, LDH, Bcl-2 and ubiquitin levels were higher in group IV, compared to group I, but caspase 3 and p53 levels were lower. There was preneoplastic focus in group IV. In group V, caspase 3, p53, Bax and DNA fragmentation levels higher than those of group IV. Caspase 3 and p53 levels were increased in group VI compared with group IV.

Our results indicate that, in a hepatocellular carcinoma model created with DEN and FB administration, [Au(dppz)Cl₂]Cl complex induces apoptosis by elevating caspase 3, p53 levels and DNA fragmentation. This suggests, [Au(dppz)Cl₂]Cl complex may be effective on proliferation seen in cancers.

Key Words: Caspase 3, p53, bax, bcl-2, ubiquitin, [Au(dppz)Cl₂]Cl

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	v
SUMMARY.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
TABLO DİZİNİ.....	x
ŞEKİL DİZİNİ.....	xi
GRAFİK DİZİNİ.....	xiv
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xv
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Ksenobiyotiklerin Metabolizması.....	4
2.1.1. Faz I Reaksiyonları.....	5
2.1.2. Faz II Reaksiyonları.....	8
2.1.3. Nitrozaminler.....	8
2.1.3.1. Dietilnitrozamin.....	10
2.1.4. Fenobarbital.....	12
2.2. Apoptoz.....	15
2.2.1. Apoptoz Morfolojisi.....	16
2.2.2. Apoptoz ve Nekroz Arasındaki Farklar.....	18
2.2.3. Apoptozun Mekanizması.....	20

2.2.3.1. Ekstrinsik Yolak.....	20
2.2.3.2. İntrensik Yolak.....	20
2.2.3.3. İntrensik Endoplazmik Retikulum Yolağı.....	22
2.2.4. Apoptozun Genetik Kontrolü.....	22
2.2.4.1. Bcl-2 Gen Ailesi Proteinleri.....	23
2.2.4.2. p53.....	26
2.2.4.3. Kaspazlar.....	28
2.3. Hücre İçi Protein Yıkımı.....	31
2.3.1. Ubikuitin Sistem.....	32
2.3.2. Proteozom.....	32
2.3.3. Ubikuitinasyon Mekanizması.....	33
2.3.4. Hepatosellüler Karsinoma Patogenezinde Ubikuitin Sistem Bozukluğunun Rolü.....	35
2.4. Dipyrido[3, 2-a:2', 3'- c]phenazine (dppz) Au(III) kompleksi.....	38
3.GEREÇ ve YÖNTEMLER.....	43
3.1. GEREÇ.....	43
3.1.1. Deney Hayvanlarının Temini ve Bakımı.....	43
3.2. YÖNTEM.....	43
3.2.1. Doz ve Deney Gruplarının Belirlenmesi.....	43
3.2.1.1. Dipyrido[3, 2-a:2', 3'- c]phenazine (dppz) Au(III) kompleksi Sentez ve Doz Çalışmaları.....	43

3.2.1.2. Deney Gruplar.....	46
3.2.2. Deney Hayvanlarından Çalışılacak Örneklerin Alınması.....	48
3.2.3. Serum AST, ALT ve LDH Ölçüm Yöntemleri.....	48
3.2.4. Karaciğer Dokusunda Kaspaz 3 Ölçümü.....	49
3.2.5. Karaciğer Dokusunda p53 Ölçümü.....	52
3.2.6. Karaciğer Dokusunda DNA Fragmantasyonu Ölçümü.....	54
3.2.7. Karaciğer Dokusu İmmünohistokimyasal Ölçümler (Bax, Bcl-2, Ubikuitin).....	57
3.2.8. TUNEL Boyama.....	59
3.2.9 Karaciğer Dokusu Histolojik Preparatların Hazırlanması.....	60
3.2.10. İstatistiksel Analiz.....	61
4. BULGULAR.....	62
5. TARTIŞMA.....	92
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	108
7. KAYNAKLAR DİZİNİ.....	110
8. ÖZGEÇMİŞ.....	128

TABLO DİZİNİ

Tablo 3.1. Deney grupları ve deney hayvanlarının özellikleri.....	47
Tablo 4.1. Ölüm (%), doz (mg) ve doz (mg), yaşama olasılığı.....	63
Tablo 4.2. ALT değerleri ve istatistiksel değerlendirmesi.....	64
Tablo 4.3. AST değerleri ve istatistiksel değerlendirmesi.....	66
Tablo 4.4. LDH değerleri ve istatistiksel değerlendirmesi.....	67
Tablo 4.5. Kaspaz 3 değerleri ve istatistiksel değerlendirmesi.....	69
Tablo 4.6. p53 değerleri ve istatistiksel değerlendirmesi.....	70
Tablo 4.7. DNA Fragmantasyonu değerleri ve istatistiksel değerlendirmesi	72
Tablo 4.8. Bax immünohistokimyasal boyaması sonucu elde edilen skorlama sonuçlarının istatistiksel analizi	73
Tablo 4.9. Bcl-2 immünohistokimyasal boyaması sonucu elde edilen skorlama sonuçlarının istatistiksel analizi	76
Tablo 4.10. Ubikuitin immünohistokimyasal boyaması sonucu elde edilen skorlama sonuçlarının istatistiksel analizi.....	79
Tablo 4.11. Hücresel nekroz, hücresel dejenerasyon, nodüler yapı ve inflamasyon skorlarının istatistiksel değerlendirilmesi	86

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 2.1. Sitokrom p450 Enzim Sisteminin Şematik Gösterimi.....	6
Şekil 2.2. Monooksijenaz Reaksiyon Mekanizması.....	7
Şekil 2.3. Nitrozamin Metabolizması.....	10
Şekil 2.4. Dietilnitrozaminin Moleküler formülü.....	12
Şekil 2.5. Fenobarbitalin Moleküler Formülü.....	13
Şekil 2.6. Fenobarbital İndüksiyon Mekanizması.....	15
Şekil 2.7. Apoptoza Uğrayacak Temel Hücrede Görülen Morfolojik Değişiklikler.....	17
Şekil 2.8. Apoptoz ve Nekroz Arasındaki Farklar.....	19
Şekil 2.9. Apoptozda Ekstrinsik ve İntrensik Yolaklar.....	21
Şekil 2.10. Bcl-2 Ailesi Üyeleri.....	24
Şekil 2.11. Kanser ve Apoptoz.....	26
Şekil 2.12. p53 Geni Etki mekanizması.....	27
Şekil 2.13. Prokaspaz ve Aktif Kaspazın Yapısı.....	29
Şekil 2.14. Proteozom Yapısı.....	33
Şekil 2.15. Ubikuitinasyon Mekanizması.....	34
Şekil 2.16. Gankyrin Aracılı Mdm2-p53 Etkileşimi ve p53 Yıkımında pRb regülasyonu Modeli.....	36
Şekil 2.17. NF-κB Aktivasyonu.....	37
Şekil 2.18. Sisplatin Etki Mekanizması.....	39
Şekil 2.19. [Au(dppz)Cl ₂]Cl Kompleksinin Moleküler Formülü.....	40

Şekil 3.1. [Au(dppz)Cl ₂]Cl sentezi reaksiyon şeması.....	44
Şekil 4.1. Grup I (a), grup II (b), grup III (c) ve grup IV (d) Bax boyamaları.....	74
Şekil 4.2. Grup V (a) ve grup VI (b) Bax boyaması.....	75
Şekil 4.3. Grup I (a), grup II (b), grup III (c) Bcl-2 boyamaları	77
Şekil4.4. Grup IV (d,e) , grup V (f) ve grup VI (g) Bcl-2 boyamaları	78
Şekil 4.5. Grup I (a,b), grup II (c), grup III (d), grup V (e), grup VI (f) ubikuitin boyamaları	80
Şekil 4.6. Grup IV (a,b) ubikuitin boyamaları	81
Şekil 4.7. Grup I (a), grup II (b) ve grup III'e (c) ait TUNEL yöntemi uygulanmış karaciğer örnekleri	82
Şekil 4.8. Grup IV'te TUNEL yöntemi uygulanmış karaciğer örnekleri.....	83
Şekil 4.9. Grup VI'da TUNEL yöntemi uygulanmış karaciğer örnekleri.....	83
Şekil 4.10. Grup V'te TUNEL yöntemi uygulanmış karaciğer örnekleri	84
Şekil 4.11. Grup I'e ait Karaciğer Dokusu Örneklerinin Işık Mikroskobu İnceleme Görüntüleri.....	86
Şekil 4.12. Grup II'ye ait Karaciğer Dokusu Örneklerinin Işık Mikroskobu İnceleme Görüntüleri.....	87
Şekil 4.13. Grup III'e ait Karaciğer Dokusu Örneklerinin Işık Mikroskobu İnceleme Görüntüleri.....	87
Şekil 4.14. Grup IV'e ait Karaciğer Dokusu Örneklerinin Işık Mikroskobu İnceleme Görüntüleri.....	88
Şekil 4.15. Grup IV'e ait Karaciğer Dokusu Örneklerinin Işık Mikroskobu İnceleme Görüntüleri.....	89
Şekil 4.16. Grup IV'te Karaciğer parankiminde proneoplastik fokus.....	90

Şekil 4.17. Grup V'e Ait Karaciğer Dokusu Örneklerinin Dokusu Örneklerinin Işık Mikroskobu İnceleme Görüntüleri.....	90
Şekil 4.18. Grup IV'e Ait Karaciğer Dokusu Örneklerinin Dokusu Örneklerinin Işık Mikroskobu İnceleme Görüntüleri.....	91
Şekil 4.19. Ön denemelerde 7. haftada elde edilen preneoplastik fokus görüntüsü.....	91

GRAFİK DİZİNİ

Grafik 3.1. Kaspaz 3 standart grafiği DNA standart grafiği.....	52
Grafik 3.2. p53 standart grafiği.....	54
Grafik 3.3. DNA standart grafiği	57
Grafik 4.1. ALT değerleri ve istatistiksel değerlendirmesi	65
Grafik 4.2. AST değerleri ve istatistiksel değerlendirmesi	66
Grafik 4.3. LDH değerleri ve istatistiksel değerlendirmesi	68
Grafik 4.4. Kaspaz 3 değerleri ve istatistiksel değerlendirmesi	69
Grafik 4.5. p53 değerleri ve istatistiksel değerlendirmesi	71

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler ve Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
AFP	α -feto protein
ALP	Alkalen fosfataz
ALT	Alanin aminotransferaz
AST	Aspartat aminotransferaz
APAF-1	Apoptotik proteaz aktive edici faktör-1
ANOVA	Tek yönlü varyans analizi
AİF	Apoptoz indükleyici faktör
AMP	Adenozin monofosfat
ATP	Adenozin trifosfat
Au	Altın
AÜBİBAM	Anadolu Üniversitesi Bitki İlaç ve Bilimsel Araştırma Merkazi
CAD	Kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz
CAR	Yapısal androstan reseptörü
CARD	Kaspaz aktive edici toplayıcı bölge
CASPASE	Sistein Aspartat Spesifik Proteaz
Cdk	Siklin bağımlı kinaz

COOH	Karboksil
Cu ²⁺	Bakır
CO ₂	Karbondioksit
cyp450	Sitokrom p450
DNA	Deoksiribonükleik asit
DEN	Dietilnitrozamin
DED	Ölümü etkileyen bölge
DISC	Ölüm-başlatıcı sinyal kompleksi
DMSO	Dimetil sülfoksit
DMSO-d6	Döteryumlu DMSO
dppz	Dipyrido[3, 2-a:2', 3'- c]phenazine
E1	Ubikuitin aktive edici enzim
E2	Ubikuitin konjuge edici enzim
E2F	Transkripsiyon uzama faktörü 2
E3	Ubikuitin-protein ligaz enzimi
ERK1/2	Ekstrasellüler sinyal düzenleyici kinaz 1/2
ESOGÜ	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
FADD	Fas bağlantılı ölüm domeini
FADH ₂	Redükte flavin adenin nükleotid
FB	Fenobarbital
Fe	Demir

FT-IR	Fourier Transform Infrared
G1	Gap1
GADD45	DNA hasar proteini 45
HCl	Hidroklorik asit
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
IB	İnhibitör κ B- α
ICAD	Kaspazla aktifkeşen deoksiriboz inhibitörü
ICE	İnterlökin-1 beta dönüştürücü enzim
IR	İnfrared
i.p.	İntraperitoneal
İTK	İnce tabaka kromatografisi
LD	Lethal doz
LDH	Laktat dehidrogenaz
MDH	Malat dehidrogenaz
Mdm-2	Mouse double minutes 2
N	Azot
NF κ B	Nükleer faktör kappa B
NADPH	Redükte nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NH ₂	Amin
O	Oksijen atomu
O ₂	Moleküler Oksijen

OH ⁻	Hidroksil
O ₂ ⁻	Süperoksit
OH [·]	Hidroksil radikali
PARP	Poli ADP Riboz polimeraz
PBREM	Fenobarbitale yanıtı düzenleme modülü
PBS	Fosfat tampon çözeltisi
POD	Anti-human p53 pan peroksidaz
ROS	Reaktif oksijen türleri
RNA	Ribonükleik asit
RXR	Retinoid X reseptörü
S	Sentez
SH	Tiyol
SMAC	Mitokondri kaynaklı kaspaz aktivatörü
SPSS	Statistical Package for Social Sciences
TBM	Tetrametilbenzidin
TNF-1	Tümör Nekroz Faktör-1
TRADD	TNF reseptör bağlantılı ölüm domaini
TRAF-2	Tümör Nekroz Faktör Reseptör İlişkili Faktör-2
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick and labeling
UDP	Üridin difosfat

^1H NMR	^1H Nükleer Manyetik Rezonans
$[\text{Au}(\text{dppz})\text{Cl}_2]\text{Cl}$	Dipyrido[3, 2-a:2', 3' - c]phenazine (dppz)
	Au(III)
μL	Mikrolitre
mL	Mililitre
L	Litre
ppm	Parts per million
8-OHdG	8-hidroksi-2'-deoksiguanozin

1. GİRİŞ ve AMAÇ

İnsanlar sıklıkla diyetsetel, çevresel, terapötik ya da mesleki nedenlerle karsinojenik etki gösteren doğal kaynaklı birçok kimyasal maddeye maruz kalmaktadır. Bazı kimyasallar insanlarda günlük hayatta karşılaşmalarına bağılı olarak hepatoselüler karsinomayı da içeren kötü huylu tümörlere neden olabilirler (113).

Karsinojenler arasında nitrozaminler ve nitrozo bileşikleri yaygın olarak tümör oluşumuna neden olmakta ve insan sağlığını olumsuz etkilemektedir (94). Bu etkilerini protein ve nükleik asitlere bağlanarak gösterdikleri bilinmektedir. Nitrozaminlerin metabolik aktivasyonu ile spontan olarak oluşan N-nitrozoüre hedef dokunun Deoksiribonükleik asidi (DNA) ile etkileşerek bazların değişimine neden olmakta ve karsinogenezini başlatmaktadır (217).

Sigara dumanı, su ve havanın yanı sıra peynir, balık ve et ürünlerinde bulunan, ayrıca tekstil ürünlerinin hazırlanmasında, yağ ve kauçuk endüstrisinde kullanılan dietilnitrozaminin (DEN) ratlarda karsinojenik ve mutajenik etkilerinin yüksek olduğu saptanmıştır (217). Antiepileptik bir ilaç olan fenobarbital (FB) bir tümör promotörüdür. Dietilnitrozamin gibi bir inisiyatör ile kanserin başlatılması ile FB hepatokarsinogenezini ilerletmektedir (19). Yine DEN ve FB uygulanan sıçanların karaciğerlerinde histolojik olarak, preneoplastik fokus, nodüller ve hiperplastik kuppfer hücreleri belirlenmiştir (21). İnisiyatör olarak DEN ve promotör olarak FB ile oluşturulan deneysel hepatokarsinogenez modeli, premalignant hücre tipinin gelişimine ve hücre büyümesi, farklılaşması ve hücre ölümü mekanizması, hücre ve hücreler arası değişimleri araştırmayı amaçlayan çalışmalar için iyi bir araçtır (37).

Kanser hücreleri normal hücrelerden daha hızlı bir şekilde çoğalır ve büyür. Bu kontrolsüz çoğalmanın nedeni hücrenin DNA'sında meydana gelen mutasyonlardır. Normal şartlar altında hasar görmüş hücreler apoptoza gider, fakat bu durum tümör hücrelerinde farklıdır. Kanser gelişiminde, artmış hücre proliferasyonunun yanı sıra, azalmış apoptoz hızının da katkısı olduğu bilinmektedir (31). Kanser dokularındaki gelişmeyi önlemek amacı ile farklı mekanizmalar ile apoptoz uyarıcı yönde yeni tedavi olanakları geliştirilmektedir. Hepatoselüler karsinoma oluşumunda hücre

proliferasyonu ve apoptoz arasındaki denge çok önemlidir. Bu nedenle hepatosellüler karsinoma patogenezinde yer alan genetik ve moleküler değişikliklerin ve apoptoz ile ilgili mekanizmanın bilinmesi hepatosellüler karsinomanın nasıl oluştuğu ve nasıl tedavi edilebileceği açısından oldukça önem arz etmektedir (121, 164).

Apoptozda en önemli rol mitokondriye aittir (171). Herhangi bir nedenle meydana gelen DNA hasarlanmasında p53 tümör süpressör proteini aktive olarak bir dizi mekanizmayı başlatır. Bu mekanizmalar ile hasarlı hücre gap1 (G1) fazında durur ve sentez (S) fazına giremez. Bu nedenle DNA hasarı olan hücrede ya onarım sağlanır ya da hücre apoptozu gider. Böylece hasarlı DNA'nın siklus boyunca replike olması önlenir (158). Apoptotik sinyaller p53 birikimini sağlar ve mitokondriden sitokrom c ve diğer düzenleyicilerin serbest kalmasını sağlayarak proteolitik enzimler olan kaspazların aktivasyonunu sağlar (5,79). Apoptoz, Bcl-2 ailesi üyeleri aracılığı ile gerçekleşir. Bcl-2 ailesi üyeleri proapoptotik ve antiapoptotik olmak üzere ikiye ayrılır (3). Bir antiapoptotik protein olan Bcl-2, proapoptotik proteinler olan Bax, Bak ve Bid'in mitokondri membranından geçişine engel olduğu düşünülmektedir (55). Bcl-2, antiapoptotik protein ailesinin en iyi çalışılmış üyesidir. Bax'a bağlanmakta ve Bax tarafından başlatılan geçirgenliği bloke ederek apoptozu baskılamaktadır (3, 135).

DNA'nın hasarlanması ya da çeşitli şiddetli stres durumlarına cevap oluşturmak üzere p53 tümör süpressör proteini intrinsik yolu tetikler. Kanser tedavisinde uygulanan kemoterapi ve radyoterapi p53 aracılığıyla bu yolu aktive eder. p53, Bax gibi proapoptotik proteinleri yeniden düzenleyerek intrinsik yolu aktive eder (16). Bax, p53'e yanıt olarak kopyalanarak aktive olur. Aktive olduğunda mitokondriyal zarı dimerize olur (3, 135). Bax, mitokondriden sitokrom c'nin serbest kalmasını sağlayarak bir adaptör protein olan APAF-1 (apoptotik proteaz aktive edici faktör-1) ile beraber başlatıcı kaspaz 9'u aktive eder. O da kaspaz 3, 6 ve 7'yi aktifleştirerek hücredeki kritik komponentleri yok edip, apoptozun gerçekleştirilmesini sağlar (16).

Apoptozda hücre küçülür, yüzeyinde sitoplazmik çıkıntılar meydana gelir. Sitoplazmada yoğunlaşma, hücre dansitesinde artma ve çekirdek membranına yakın bölgelerden başlayarak kromatinde yoğunlaşma görülür. Daha sonra tüm çekirdek kondanse olur ve DNA'nın fragmantasyonu meydana gelir (190). Fragmantasyon

apoptotik hücrelerde kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz (CAD) enzimi tarafından DNA'nın nükleozom birimlerine ayrılmasıyla sağlanır. Kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz, normal hücrelerde kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz inhibitörüne (ICAD) bağlı inaktif formda bulunur ancak apoptoz sinyali alan hücrelerde kaspaz 3 tarafından aktive edilir ve çekirdek DNA'sının hızlı biçimde 180-200 baz çiftlik nükleozomal fragmanlara ayrılmasını sağlar (80). Hücre birçok apoptotik partiküle ayrılır. Apoptotik partiküller komşu hücreler ya da fagositik hücreler tarafından fagosite edilerek dokudan uzaklaştırılır (190).

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, ubikuitin proteazom yolağının hücre döngüsü proteinleri, tümör baskılayıcı moleküller, onkogenler, transkripsiyon faktörleri ve pro ve anti-apoptotik proteinlerin regülasyonundan sorumlu olduğu gösterilmiştir (90). Ubikuitin, hedef proteinlerin bir çoğuna Adenozin trifosfat (ATP) eşliğinde kovalent olarak bağlanarak çeşitli regülatör prosesleri yönlendiren yüksekçe korunmuş bir proteindir (108). Kısa ömürlü ve hatalı proteinler sitozolde ATP bağımlı ubikuitin aracılı sistem ile yıkılır (82).

Kanser tedavisiyle ilgili yapılan araştırmalardaki bulgular, apoptoz ve sitotoksitenin kemoterapiyle yakından ilişkili olması metal komplekslerinin kanser tedavisi için oldukça uygun ilaç hammaddeleri olabileceğini göstermektedir. Proteinlerin ve enzimlerin pek çoğunun biyolojik aktivitesinin metal merkezlerine bağlı olduğu düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda, Au(III) gibi metallerle oluşturulan komplekslerin DNA'ya bağlanarak kanser hücreleri üzerinde apoptotik etkiye ve hücre çoğalması üzerinde toksik etkiye sahip olduğu, dolayısıyla potansiyel antikanserojen ajan etkisi gösterdikleri bildirilmiştir (40,116,22).

Hepatosellüler karsinomanın evrensel sorunu, genellikle etkisiz kalan güncel tedavi seçenekleri ile birlikte, sıklıkla kötü prognoz göstermesi ve ortalama yaşam süresinin kısa olmasıdır. Bu yüzden daha etkili tedaviler ve ilaç rejimleri geliştirmek için yeni yollara ihtiyaç duyulmaktadır (53). Bu verilerin ışığı altında çalışmamızda DEN ve FB uygulanarak karaciğer hasarı oluşturulan sıçanlarda, ([Au(dppz)Cl₂]Cl kompleksinin karaciğer dokusunda p53, kaspaz 3, Bcl-2, Bax, DNA fragmantasyonu ve ubikuitin üzerine etkileri araştırıldı.

2. GENEL BİLGİLER

İnsanlar bilerek veya bilmeyerek birçok yabancı kimyasal maddeye, ilaca ve ksenobiyotiğe maruz kalmaktadır (9). Bunlar; ilaçlar, endüstriyel kimyasallar, pestisitler, pişmiş gıdaların piroliz ürünleri, alkaloidler, sekonder bitki metabolitleri, küfler, bitkiler ve hayvanlar tarafından üretilen toksinler gibi doğal ve insan yapımı kimyasallardır. Tıbbi açıdan önemli başlıca ksenobiyotikler; kimyasal karsinojenler, poliklorlu bifeniller ve bazı insektisitler gibi çeşitli yollarla çevreye sızan bileşiklerdir (168). Mesleki olarak, çevresel ya da besin maddeleri yoluyla bu bileşiklere maruz kalılabilmektedir. Vücudumuzdaki metabolik olaylar ve dolayısıyla insan sağlığı bu maruziyetlerden değişen düzeylerde etkilenir. Ksenobiyotikler ve oluşan etkiler arasındaki ilişkinin belirlenebilmesi için maruz kalma durumu ve hastalık sürecinde yer alan mekanizmaların belirlenmesi gerekir (9).

2.1. KSENOBİYOTİKLERİN METABOLİZMASI

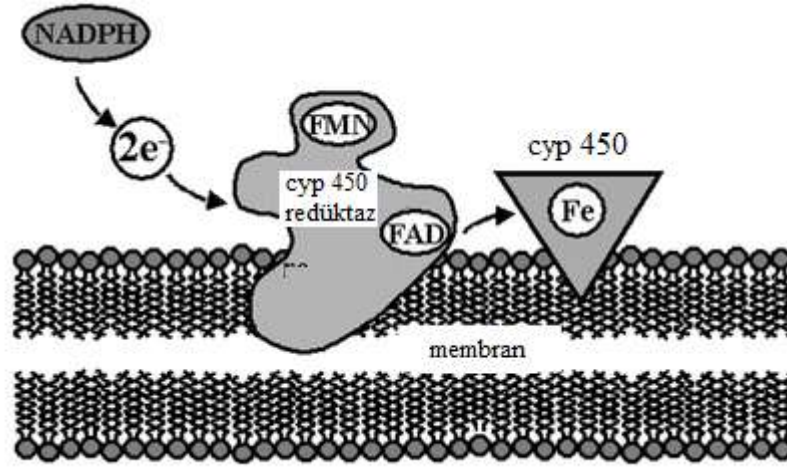
Tüm yüksek organizasyonlu canlılar için besinle alınan doğal bileşikler dışında kalan, vücuda dışarıdan istemsiz giren vücut için yabancı olan bir madde, ksenobiyotik olarak adlandırılır (4). Artan sanayileşme ve kentleşmenin bir sonucu olarak canlılar pek çok ksenobiyotikle karşı karşıya kalmaktadır (66,143). Bu maddelerin biyolojik membranları aşip kan dolaşımına girmesi emilim olarak tanımlanır. Ksenobiyotiklerin vücuda girdikleri en önemli yollar gastrointestinal kanal, solunum sistemi ve deridir (69,168). Ksenobiyotikler genelde lipofilik yapıda olup lipid membranlardan geçerek lipoproteinlerle vücut sıvılarına taşınırlar. Lipofilik yapıda olan ksenobiyotikler çok çabuk emilir ancak fizyolojik pH'da iyonize olamamaları nedeniyle çok az itrah edilirler. Organizma bu toksik etkiyi ortadan kaldırmak için lipofilik yapıdaki ksenobiyotikleri hidrofilik bileşiklere dönüştürür. Çeşitli enzimlerin etkisi ile gerçekleşen bu reaksiyonlara “biyotransformasyon” denilmektedir (66,143). Biyotransformasyonun yer aldığı başlıca organ karaciğerdir. Ksenobiyotiklerin metabolizması faz I ve faz II olarak ikiye ayrılır. Faz I reaksiyonlarında ana tepkime

sitokrom p450 (cyp450) enzim ailesi tarafından katalizlenen hidrosillenmedir. Faz II reaksiyonlarında ise enzimatik reaksiyonlar ile ekzojen moleküller endojen kofaktörler ile konjuge edilirler (52). Ksenobiyotik metabolizmasında faz I evresi reaksiyonlarında genel amaç hidrosil (-OH), karboksil (-COOH), tiyol (-SH) ve amino (-NH₂) grupları gibi polar grupları oksidasyon, redüksiyon ve hidroliz reaksiyonları ile ksenobiyotiğin yapısına eklemektir (143). Faz II reaksiyonlarında ise amaç, oluşan polar metabolitleri glukuronidler, sülfatlar, asetatlar ve amino asitler gibi endojen substratlar ile konjuge edilmesidir. Bu şekilde vücuttan üre ile kolayca uzaklaştırılabilen hidrofilik ürünler meydana gelir (66). Hidrofobik özelliği çok olan ksenobiyotikler daha fazla polar forma dönüştürülemezse yağ dokusunda kalıcı olarak birikebilirler. Bazen ksenobiyotikler faz I reaksiyonları sırasında inaktif formdan biyolojik olarak aktif formlara dönüşebilir. Bu durumda söz konusu olan orijinal ksenobiyotik "prokarsinojen" olarak tanımlanır. Diğer durumda ksenobiyotik faz I reaksiyonları ile konjugasyon öncesi inaktif veya aktif formlara dönüştürülür. Konjugasyonla inaktif forma dönüştürülen faz I reaksiyonlarının ürünü idrar ya da safra yoluyla vücuttan uzaklaştırılır. Bazı durumlarda ise konjugasyon ksenobiyotiğin biyolojik aktivitesini arttırabilir (137).

2.1.1. Faz I Reaksiyonları

Faz I reaksiyonlarında ksenobiyotiklerin yapısına -OH, -NH₂ ve -SH grupları eklenerek daha polar hale getirilir. Reaksiyonlar N- ve O- dealkilasyon, alifatik ve aromatik hidrosilasyon, N- ve S- oksidasyon ve deaminasyonu içerir (95). Ksenobiyotiklerin faz I metabolizmasından sorumlu başlıca enzim cyp450 enzim ailesidir. Membrana bağlı bir protein olan cyp450 çeşitli ksenobiyotiklerin ve endojen moleküllerin monooksijenizasyonunu katalizler (163). İnsanlarda cyp450 birçok organda yaygın olarak bulunur. En çok karaciğerde yer alır. Hücrenin endoplazmik retikulum, mitokondri ve nükleus membranlarına yerleşmiştir (4). Bunlar "hem" içeren proteinlerdir. "450" rakamı; "hem" içeren karaciğer pigmentlerinin, karbonmonoksit bağlandıktan sonra absorbe ettiği ışığa ait dalga boyunun nanometre olarak en yüksek değerini ifade eder (75, 115).

Sitokrom p450 enzim sistemi iki bileşenden oluşmaktadır. Bunlar; aktif merkezinde demir (Fe^{+3}) içeren ve cyp450 denilen hemoprotein kısım ve bir flavoprotein olan NADPH- cyp450 redüktaz adı verilen kısımdır (Şekil 2.1). Sitokrom p450, enzim sisteminin substratı ve oksijen bağlayan yeridir. Flavoprotein kısım ise elektron taşıyıcı sistem olarak görev yapar (201).



Şekil 2.1. Sitokrom p450 enzim sisteminin şematik gösterimi (61)

Monooksijenazlar ya da karma fonksiyonlu oksijenazlar olarak isimlendirilen cyp450 sistemi bir oksijen molekülünden bir oksijen atomunu substrata aktarır. Diğer oksijen atomuda su molekülü şeklinde serbest kalır (137).

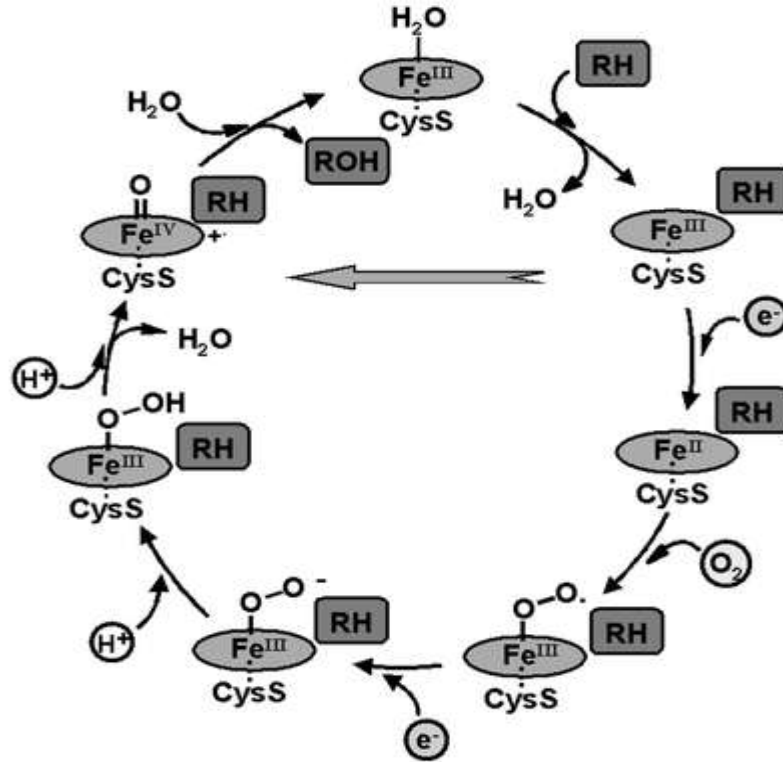
Bir monooksijenaz tarafından katalizlenen tepkime şu şekildedir;



Bu formüldeki RH, ilaçlar, karsinojenler, pestisidler, petrol ürünleri, kirlilikler gibi pek çok ksenobiyotiği simgeler. Buna ek olarak bazı steroidler, eikonazoidler, yağ

asitleri ve retinoidler gibi iç kaynaklı bileşikler de substrat olarak kullanılır. Substratlar genellikle lipofildir ve hidroksilasyon ile daha hidrofil hale gelirler (137).

Sitokrom p450 enzim sisteminin önemli komponentlerinden biri olan hem grubunun görevi, moleküler formdaki oksijeni reaktif atomik forma dönüştürmektir. Reaksiyon olmadığı durumda hem grubunda bulunan demir, +3 değerlikli olarak bulunmaktadır. Reaksiyonun başlangıcında substrat hem grubunun yanına bağlanır. FADH₂'den bir elektron transferi sonucunda +3 değerlik indirgenerek +2 değerlikli hale gelir ve O₂'nin bağlanmasına olanak sağlar. Bu elektron dışında bir elektron daha gruba eklenerek Fe⁺²'yi Fe⁺³'e çevirir ve böylelikle bağlı oksijen peroksite indirgenmiş olur. Bu ara formdan bir OH iyonu açığa çıkar. Bu reaksiyon sonucunda reaktif oksijen formu oluşurken, su açığa çıkar. Oluşan reaktif oksijen formundaki demir, +4 değerliklidir ve aktifleştirilmiş oksijen atomuna sahiptir. Bu oksijen kendisini substratın bir R-H bağına sokarak OH grubunu oluşturur. Daha sonra son ürünün salıverilmesinin ardından enzim tekrar açığa çıkar (Şekil 2.2) (111).



Şekil 2.2. Monooksijenaz reaksiyon mekanizması (61)

2.1.2. Faz II Reaksiyonları

Faz II reaksiyonlarında görev alan enzimler ksenobiyotiklerin ve endojen bileşiklerin biyotransformasyonunda önemli rol oynar. Faz II'de amaç konjugasyon reaksiyonlarını gerçekleştirmektir. Faz I reaksiyonları sonucu oluşan metabolitler konjugasyon reaksiyonları sonucu daha polar özellik kazanırlar. Böylece atılımları daha da kolaylaşır ve toksisiteleri azalır. Konjugasyon reaksiyonları; glukuronik asit ile konjugasyon, sülfatasyon, metilasyon, asetilasyon, glutatyon ve amino asitler ile konjugasyonu içerir. Faz II reaksiyonlarında yer alan enzimler genellikle transferazlardır. Bunlar; üridin difosfo (UDP) glukuronil transferaz, sülfotransferaz, N-asetil transferaz, glutatyon S-transferaz ve metil transferazdır (95).

2.1.3. Nitrozaminler

Nitrozaminler su, toprak ve havada mevcuttur. Gıdalar, beslenme malzemeleri, ilaçlar, kozmetik ürünleri ve pestisitlere kontamine olarak bulunurlar. Cilt, solunum yolu ya da sindirim yolu nitrozaminlerin absorbe edildiği yerlerdir. Nitroso bileşikleri primer olarak nitrit veya nitrat'tan üretilir. Sekonder olarak ise bu bileşiklere maruz kalan insanların organlarında tersiyer aminlerden üretilir (167).

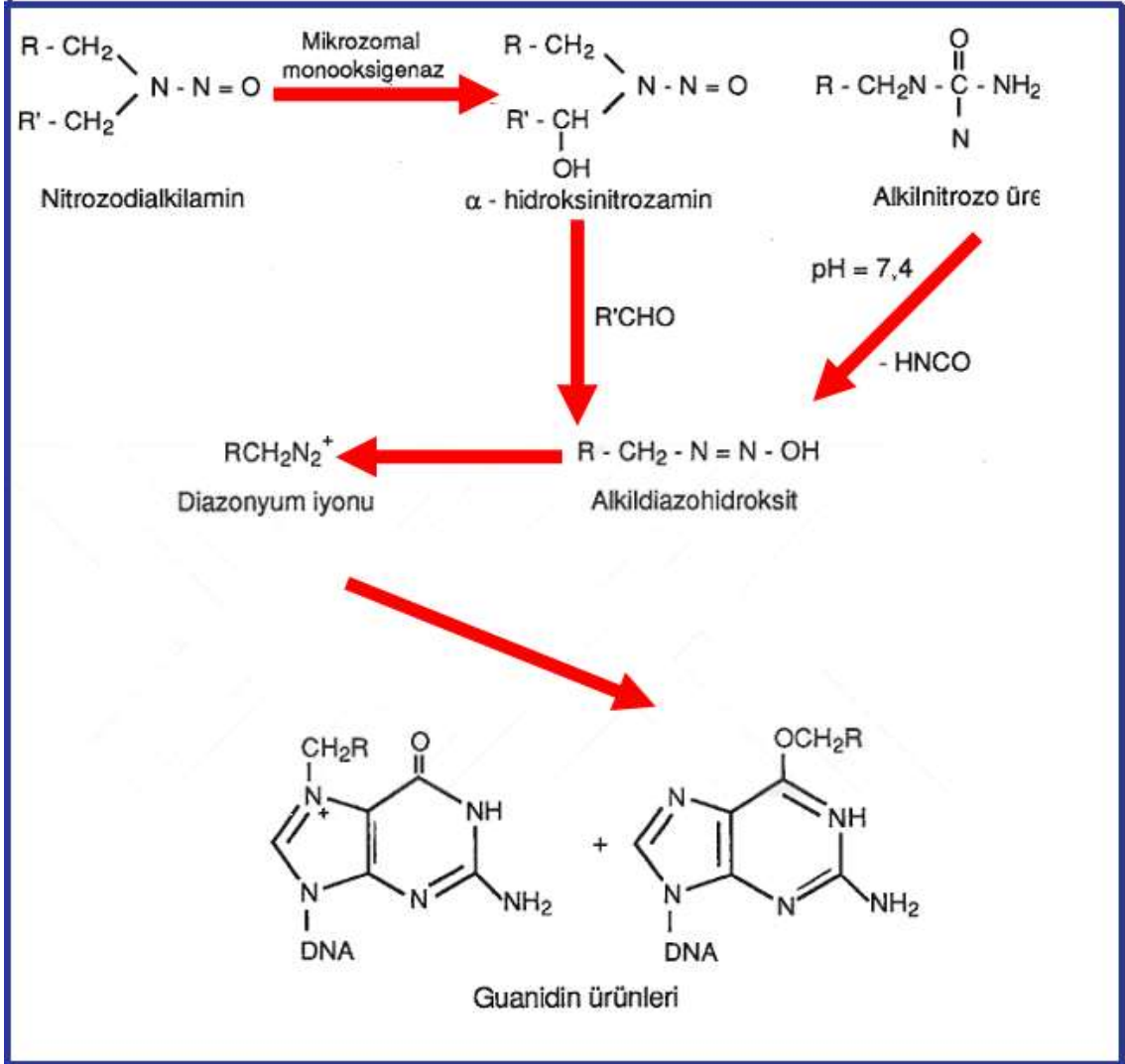
Nitrozaminler toksik, teratojenik, mutajenik ve karsinojeniktirler (17). Günümüze kadar 300 civarında N-nitroso bileşiği test edilmiş ve bunların %90'ının deney hayvanlarında kanser oluşumuna yol açabileceğine yönelik önemli bulgular elde edilmiştir (117, 161). Canlılarda hangi organın hangi N-nitroso bileşiğinden etkileneceği canlının türüne ve kanserojenin kimyasal yapısına göre değişkenlik göstermektedir. Doz, alım sıklığı ve şekli, etkilenen organın farklı olmasına neden olabilmekte (akciğer, böbrek ya da karaciğer gibi) ve tümörün oluştuğu hedef hücrenin değişmesine yol açabilmektedir (118).

Nitrozaminlerin metabolizması öncelikle karaciğerde gerçekleşir. Ancak başta DEN olmak üzere nitrozaminler toksik etkilerini öncelikle kanda, ama özellikle

karaciğerde oluştururlar. Ayrıca kan akımının fazla olduğu böbrekler gibi diğer organlar da bu durumdan karaciğere göre daha düşük düzeyde etkilenirler. Çeşitli araştırmalarda deney hayvanlarına farklı nitrozaminler verildiğinde başta karaciğer olmak üzere diğer organ ve doku tümörlerine neden olduğu gösterilmiştir (193,199).

İnsan ve hayvanlarda ağızdan alınan nitrozaminler, sindirim kanalından emilerek yarım saatte kana geçmektedirler. Bir defada alınan dozun %70'i ilk sekiz saatte, geri kalanı da 24 saat içinde vücuttan atılır. Metabolize olan ürünlerin %40-65'i CO₂'e dönüşerek solunum yoluyla, %7'si de idrarla değişimsiz atılır. Geri kalanı ise dokulara dağılır (50).

Nitrozaminlerin kanserojenik ve sitotoksik etki gösterebilmeleri için metabolik aktivasyonları gereklidir (36). Bu aktivasyonlar cyp450 bağlı monooksijenazlar tarafından NADPH ve O₂ varlığında yürütülür (13). Aktivasyon işlemi için genellikle cyp450 bağımlı tepkimelerde α -karbon atomunun oksitlenmesi ile gerçekleşir (215). Nitrozaminler aktivasyon sonucu reaktif metabolitlerine dönüşürler. Alifatik nitrozaminler kolaylıkla alkildiazohidrokside metabolize olurken bunlarda bozularak alkildiazoyum iyonunu oluşturur. Aktivasyon sonucu oluşan elektrofilik metabolitler genellikle DNA, Ribonükleik asit (RNA) ve proteinlerde nükleofilik gruplarla tepkimeye girmektedir (Şekil 2.3) (132).



Şekil 2.3. Nitrozamin metabolizması (33)

2.1.3.1 Dietilnitrozamin

Karsinojen bir madde olan DEN (Şekil 2.4) insektisitlerden, tarımda kullanılan kimyasallardan ve nitrattan şekillendiği, sigara dumanında bulunduğu ve aynı zamanda besinlerde bulunan nitratın midede sekonder ve tersiyer aminlerle reaksiyonu sonucu da meydana geldiği bildirilmektedir (11).

Çevresel bir karsinojen ve hepatotoksin olan DEN deneysel hayvan modellerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (68). Bir hepatokarsinojen olan DEN insanların maruz kaldığı sigara dumanı, et ve viski gibi birçok çeşit üründe

bulunmaktadır (129). Karaciğerde dejeneratif, proliferatif ve neoplastik lezyonlara sebep olmaktadır (68).

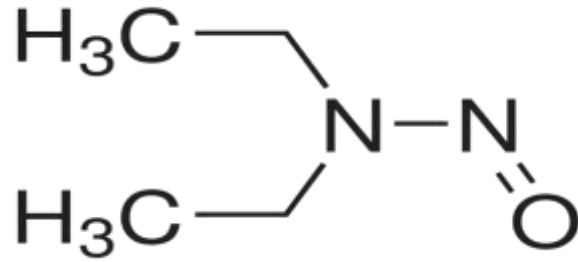
Dietilnitrozamin karaciğerde cyp450 izoenzimleri tarafından hidroksile edilmekte ve alkilasyon mekanizması ile biyoaktif hale gelmektedir. Biyoaktif hale gelen DEN, DNA ile reaksiyona girer ve bazların etilasyonuna neden olur. Etil DNA adduct'ları baz çiftlerini kesebilir, mutasyonlara, ras gibi proto-onkogenlerin aktivasyonuna ve p53 gibi tümör süpresör genlerin inhibisyonuna sebep olabilir. Bu durum sıklıkla hepatosellüler karsinoma ile sonuçlanır (129).

Dietilnitrozaminler elektrofilik maddeler olmaları nedeniyle nükleik asit ve proteinlerdeki nükleofilik atomlara bağlanırlar. Karsinojenik elektrofiller tarafından proteinlerde değişikliğe uğratılan nükleofilik atomlar, methionin ve sisteindeki kükürt, histidindeki halka azotu ve tirozindeki 3. karbon atomu olarak belirlenmiştir (17, 72).

Dietilnitrozamin reaktif oksijen türlerinin (ROS) artmasına sebep olarak oksidatif stres ve hücre hasarına neden olur. Reaktif oksijen türlerinin üretimi DEN'in karsinojenik etkilerinden sorumlu olabilir (160). Reaktif oksijen türlerinin hücre içi yüksek seviyeleri mitokondrial hasar, DNA modifikasyonu ve lipid peroksidasyonuna yol açıyor olması nedeniyle, insanlarda kanseride içeren birçok hastalık durumuyla sonuçlanır. Dietilnitrozamine maruziyette nonparenkimal hücrelerde bir inflamatuvar yanıt ortaya çıkar. Birçok sitokin ve büyüme faktörü salgılanır. Bunlar DEN-indüklü mutasyonları taşıyan sessiz hepatosit hücrelerini proliferasyona teşvik eder. Bu proses yavru hücrelere genetik değişimlerin transmisyonunu sağlar. Bunu karaciğer neoplastik progresyonu, artmış proliferasyonu, displazi, hepatosellüler adenom ve hepatosellüler karsinomaya dönüşüm takip eder (103).

Dietilnitrozaminin metabolitleri, DNA'ya bir ya da iki oksidasyon sağlayan elektron ile kovalent bağlanarak tümör promotörlerinin bağlanmasına aracılık eder (125). Tümör promotörü bir süperoksit anyonu indükleyicisi olarak görev yaparak reaktif oksijen molekülleri ve hidrojen peroksit oluşumunu sağlar. Bunun sonucunda süperoksit ve hidrojen peroksit birikimi gerçekleşir. Bu birikim, koruyucu antioksidan mekanizmanın azalması ve yüksek oranda reaktif hidroksil radikali oluşumunu sağlar.

Bunun sonucunda DNA'nın yapısında kopma ve deoksiriboz parçalanması ortaya çıkar. Reaktif hidroksil radikalleri ayrıca, lipid membran yağ asitlerinin hidrojen atomlarını ayırır. Hidroperoksit radikalleri, hidrojen atomları ile doymamış çok karbonlu yağ asitlerinin karbonil gruplarıyla birleşme sağlayarak, lipid hidrojenperoksit düzenlenmesindeki zincir reaksiyonundan hidrojeni ayırır. Dolayısıyla süperoksit ve hidroperoksit radikalleri lipid peroksidasyonunun artmasına neden olur ve hücre membranında hasar artışı ortaya çıkar (189,192).



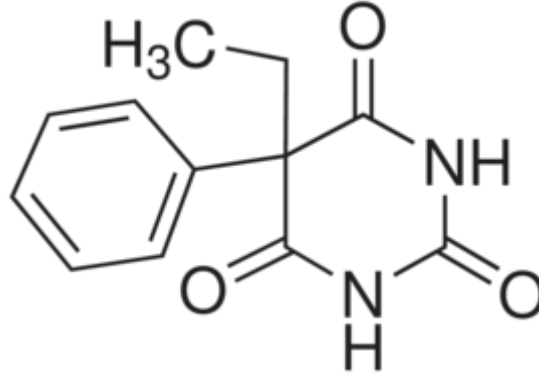
Şekil 2.4. Diethilnitrozaminin moleküler formülü ($C_4H_{10}N_2O$) (209)

2.1.4. Fenobarbital

Deneysel hepatokarsinogenezde birçok bileşik promotör olarak belirlenmiştir. Bunlar; barbitüratlar, dikloro difenil trikloroethan, α ve γ -heksaklorosikloheksan, poliklorobifeniller, bütil hidroksitoluen, hipolipidemik ilaç nafenopin, mestranol, steroidler ve deksametazon'u içermektedir. Tümör promosyonuna neden olan ajanlar mutajenik değildirler fakat genlerin ekspresyonunun değişimine neden olarak hiperproliferasiyona, dokunun yeniden yapılanmasına ve inflamasyona neden olurlar (76).

Sedatif etkilere sahip antiepileptik bir ilaç olan FB (Şekil 2.5) non-genetotoksik bir hepatik tümör promotörüdür (177,189). Fenobarbital tipik bir cyp450 indükleyicisidir. cyp2A, cyp2B, cyp2C ve cyp3A gibi birçok cyp450 enzim ailesini etkilemektedir. Fenobarbitalin etkileri faz I enzimlerinin yanı sıra, faz II enzimlerini (UDP-glukuronil transferaz, glutatyon S- transferaz, epoksit hidrolaz ve aldehit dehidrogenaz), hem sentezi ve lipid metabolizmasında yer alan enzimleri de kapsar.

Karaciğerde 50 civarında gen FB tarafından aktive edilebilmektedir (49). Fenobarbitale maruziyet karaciğer hücrelerinin metabolizma ve hemeostazisini etkiler. Hepatik hücre proliferasyonu, apoptoz inhibisyonu, preneoplastik lezyonların büyümesi, endoplazmik retikulum proliferasyonu ve hücre kontrol noktalarında değişim bu etkilerdendir (87).



Şekil 2.5. Fenobarbitalin (C₁₂H₁₂N₂O₃) moleküler formülü (210)

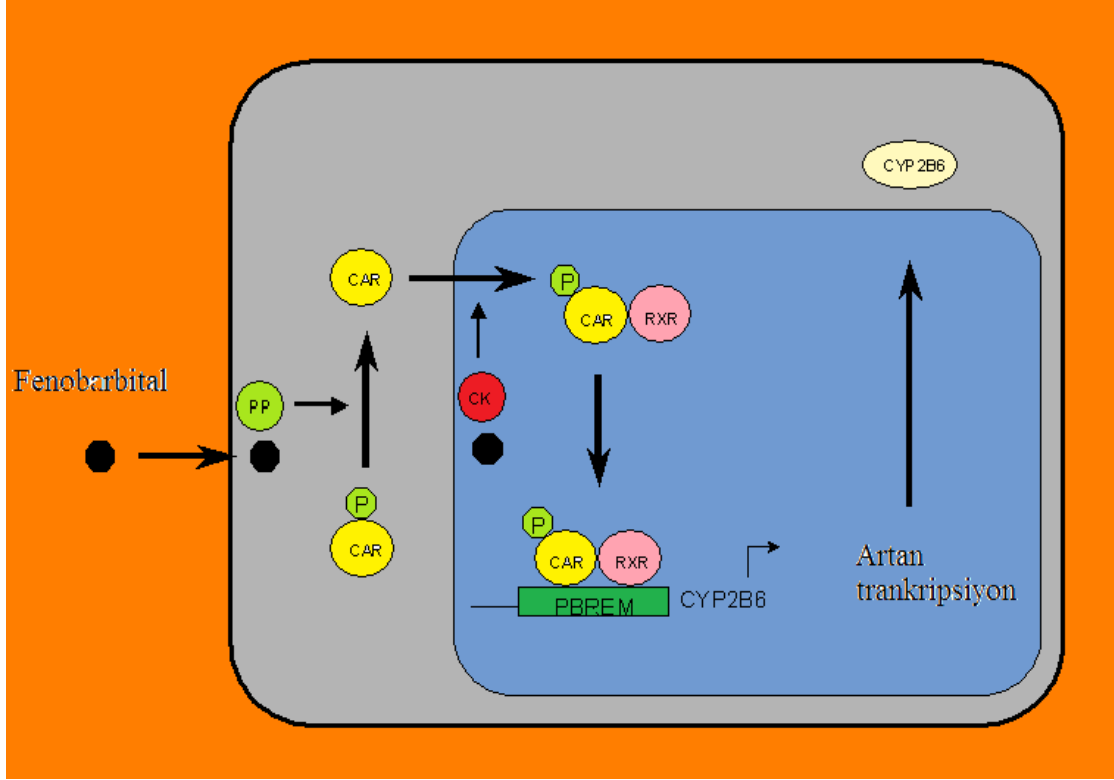
Fenobarbital gibi ilaçların tekrarlayarak uygulanması düz endoplazmik retikulum hipertrofisine neden olmaktadır ve yeni enzim sentezinin hızlanması sonucu birkaç gün içerisinde cyp450 miktarında önemli derecede artışa neden olur. İndüksiyon mekanizması incelenmiş ve cyp450 mRNA'sının transkripsiyonunda artış sonucu gerçekleştiği anlaşılmıştır (14).

Oksijenin cyp450 sistemi tarafından indirgenmesi genellikle membran fosfolipidleri ve aktif bölgenin yapısı gibi çeşitli etkenler tarafından düzenlenir. Fenobarbitale maruz kalma durumunda cyp450 indirgememesinin regülasyonu kolaylıkla bozulabilir. Bu durumda p450 bir substrat olmaksızın da aktif reaktif oksijen türleri üretir. Fenobarbital, hidroksil radikali üretimiyle lipid peroksidasyonunu indükler. Hidroksil radikali DNA yapısını bozarak tümör oluşumuna neden olabilmektedir (89). Hidroksil radikalleri gibi serbest radikallerin, DNA'da oluşturduğu oksidatif hasar; baz ve şeker hasarına, zincir kırıklarına ve DNA protein çapraz bağlanması gibi çoklu bozuklukları içeren değişikliklere neden olur (96). 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-

OHdG), hem hidroksil radikali hem de singlet oksijen tarafından aktive edilen oksidatif olarak değiştirilmiş başlıca DNA ürünlerindedir. Süper oksit ve hidroksil radikali birçok geni indükler. Hidroksil radikali kısmen c-myc gibi proto-onkogenlerin ekspresyonunu indükleyerek hücre proliferasyonu ve farklılaşmasına yol açar. Deney hayvanlarına FB bir karsinojen ile verildiğinde kanseri güçlü bir şekilde indüklemekte ve bu nedenle sıklıkla kanser çalışmalarında kullanılmaktadır (89).

Fenobarbital birçok cyp 450 geninin ekspresyonunu etkilemektedir. Fenobarbitalin cyp 450 sistemi üzerine olan indüklenme mekanizmasını açıklamak bu aileden birçok cyp450 ailesini (cyp2A, cyp2B, cyp2C, cyp3A) etkiliyor olması nedeniyle zordur (49).

Fenobarbitalin cyp2A ailesini oluşturan genler üzerine indüksiyon mekanizmasının yapısal androstan reseptörü (CAR) tarafından düzenlenmektedir. Fenobarbital CAR'nün direkt ligandı değildir. Bir şaperon proteinle interaksiyon ile olabileceği gibi fosforilasyon ve/veya defosforilasyon CAR nükleer translokasyonunda belirtilen mekanizmalardır. Bu transkripsiyon faktörünün fonksiyonu sitozolik ve nükleer kompartmanlar arasındaki dağılım ile düzenlenir. Fenobarbitale maruz kaldığında CAR sitoplazmadan nükleusa transloke olmaktadır (177). Nükleusta retinoid X reseptörü (RXR) ile bir heterodimer oluşturur ve FB'e yanıtı düzenleme modülüne (PBREM) bağlanır. Fenobarbitale yanıtı düzenleme modülü, FB'e yanıt verebilen çok yönlü bir yanıt elemanıdır. Fenobarbitale yanıtı düzenleme modülü oluşan heterodimer için iki bağlanma bölgesi içerir (NR1 ve NR2). Heterodimer yapının N1 ve N2 bölgesine bağlanması ile PBREM aktive olur ve böylelikle cyp2B geninin transkripsiyonu aktive edilmiş olur (şekil 2.6) (49, 87).



Şekil 2.6. Fenobarbital indüksiyon mekanizması (85)

2.2. APOPTOZ

Hücre ölümü, nekroz ve apoptoz yoluyla birbirinden farklı iki şekilde gerçekleşmektedir (155). Yunancada “sonbaharda ağaçların yaprak dökmesi” anlamına gelen “apoptoz” terimi ilk olarak 1972 yılında Kerr ve arkadaşları tarafından hücre ölümünün farklı bir morfolojisi olarak tanımlanmıştır (107). Apoptoz, çeşitli travmatik hücre dışı lezyonlar ya da genetik faktörlerle aktive edilen ve hücrenin kendisi tarafından programlanmış bir mekanizma vasıtasıyla hücre ölümünü kontrol eden aktif bir işlem olup, hücrenin intiharı olarak tanımlanabilir. Böylece hormonal olarak aktif çeşitli maddeler, iyonize radyasyon ve kemoterapiyi içeren travmatik ajanlar vasıtasıyla gerçekleşen hücre dışı lezyonların ya da genetik faktörlerle aktive edilen hücre dışı intihar programının apoptoza neden olduğu söylenebilir (173). Fizyolojik bir işlem olarak apoptoz, normal gelişim sırasında ve olgun organizmadaki çeşitli hücre tiplerinin tahribi

esnasında spesifik hücrelerin kaybindan sorumludur (191). Nekroz ise, hasara maruz kalmış hücrede enzimlerin ilerleyici litik etkilerinin yol açtığı morfolojik değişikliklerin tümü olarak tanımlanır (155).

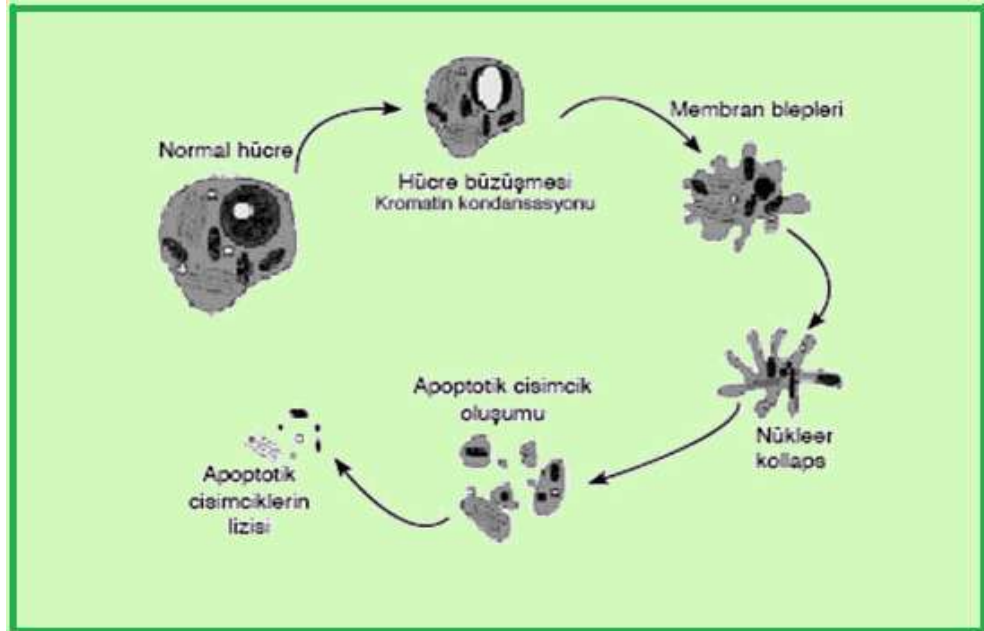
Doğadaki birçok canlının normal gelişim sürecinde başlayan ve yetişkin hayat boyunca da devam eden sayısız biyolojik olayın ve hastalığın ortaya çıkmasında apoptoz mekanizması büyük önem taşır (172). Çoğalmakta olan bir hücre topluluğunun büyüklüğü bölünme hızına bağlı olduğu kadar, ölüm hızına da bağlıdır (151). Doku homeostazisinin bir düzen içinde oluşu, apoptoz/proliferasyon dengesinin sağlıklı bir şekilde sürdürülmesine bağlıdır. Bu dengenin bozulması organ işlevlerinde bozulma ve neoplaziye neden olmaktadır (172, 198). Karsinogenezde artmış proliferasyon ve azalmış apoptozun görülmesi buna örnek olarak gösterilebilir (198).

2.2.1. Apoptoz Morfolojisi

Apoptoz, kademeli olarak morfolojik değişikliklere sebep olan sitolojik ve biyokimyasal özellikler ile karakterizedir. Apoptotik morfoloji; hücre büzülmesi, kromatin yoğunlaşması, çekirdeğin parçalara ayrılması ve “apoptotik cisimcik” olarak adlandırılan aktin bağımlı sitoplazmik çıkıntılar oluşturarak hücreden ayrılması ve bu apoptotik cisimciklerin makrofajlar tarafından fagosite edilmesi basamaklarını içerir (1).

Apoptozun üç farklı fazı vardır. Birinci faz sırasında apoptoza giden hücre komşu hücrelerden bağımsız bir hale gelir ve hücrede yüzeyinde bulunan mikrovillus, bağlantı noktaları ve desmozomlar kaybolur. DNA spesifik endonükleazlar tarafından sindirilerek fragmente olur ve veziküller içerisinde paketlenir. DNA’da gerçekleşen değişiklikler zincir kırıklarını (karyoheksis) ve nükleer kromatin kondensasyonunu (piknozis) kapsamaktadır. Piknotik kromatin ışık mikroskopunda gözlenen hilal görüntüsü ile karakterizedir. Endoplazmik retikulum şişer ve ekzositozla içeriği salınır. Hücre yoğunlaşmaya ve sitoplazma küçülmeye başlar (101). Endoplazmik retikulum dışında diğer hücre organelleri yapılarını korur (46). Sitoplazma yoğunluğu arttığı için organeller kalabalık görünür. Hücre zarı sağlam olduğundan

nekrozda olduğu gibi bir inflamatuvar reaksiyon gözlenmez (20,47,211). Apoptoz, tek bir hücrede, büzüşme ve çevre hücrelerle olan temasın kaybolması ile karakterizedir. Hücresel büzüşmenin nedeni sodyum, potasyum, klor taşıyıcı sistemin durması nedeniyle hücre içi ve dışı arasındaki sıvı hareketinin olmamasıdır (196). İkinci fazda hücre organel veya nükleer fragmentleri içeren tomurcuklar oluşturur. Bu tomurcuklar birçok membran bağımlı veziküle dönüşür ve hücre yuvarlak düz şekilli membran bağımlı “apoptotik cisimcikler” halini alır (101). Bu parçacıkların en büyük özelliği, fragmente olmuş nükleusların ve parçalanmış hücreye ait tüm yapıların plazma membranı ile kaplanarak immün sistemi inflamasyon yönünde uyarmamasıdır (119,213). Üçüncü fazda ise membran geçirgen bir hal alır (101). Apoptoz için morfolojik değişimler hücre büzülmesi, kromatin yoğunlaşması, hücre membran tomurcuklanması olurken fosfolipidlerin açığa çıkar. Sağlıklı hücrelerde plazma membranının içinde bulunan fosfolipidlerin apoptotik hücrelerde plazma membranının dış yüzünde bulunur ve fagositik hücreler için sinyal görevi görür (123). Apoptotik cisimcikler ve membrana bağlı tomurcuklar epitel hücreler, vasküler endotel hücreleri veya tümör hücreleri tarafından fagosite edilir (Şekil 2.7) (101).



Şekil 2.7. Apoptoza uğrayacak hedef hücrede görülen morfolojik değişiklikler (78)

2.2.2. Apoptoz ve Nekroz Arasındaki Farklar

Apoptoz ve nekroz arasında biyokimyasal, morfolojik ve ışık ve elektron mikroskop bulguları da dahil olmak üzere pek çok fark bulunmaktadır (155).

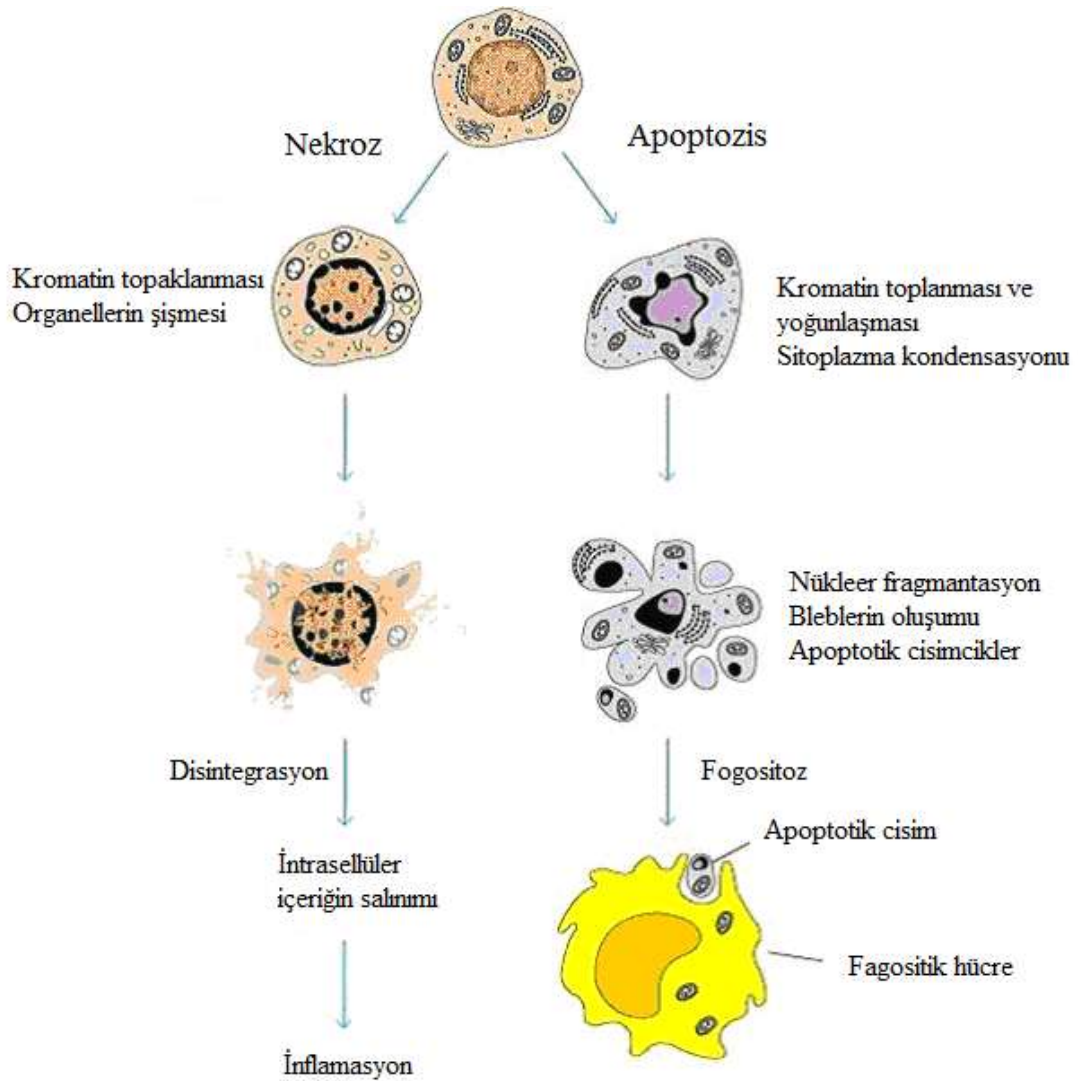
Apoptozda hücreler biyokimyasal reaksiyonların bir kaskat aktivasyonu yoluyla ölüme gider. Oysaki nekroz hücrenin çevresinde gelişen olumsuz etkenler nedeniyle gerçekleşir. Apoptozda giden hücrelerde nükleusta dahil olmak üzere tüm hücre çeşitli parçalara ayrılır (apoptotik cisimcikler). Hücre parçalanma esnasında protein ve ATP üretimine devam eder. Yani apoptotik cisimcikler bozulmamış ve fonksiyonlarına devam eden hücre komponentleri içermektedirler. Bunun aksine nekrotik hücre ölümünde membran bütünlüğü bozulmakta ve metabolik fonksiyonlar durmaktadır. Bu nedenle nekroza uğrayan hücrelerde ATP ve protein üretimi durmaktadır. Yapısal olarak nekrozun başlangıç aşamasında hücre organeller şişer ve nonfonksiyonel hale gelir. Buna ilaveten kabarcık benzeri oluşumlar gözlenmesine rağmen organel içermezler ve boyutları artar. Hatta hücre membranı patlar ve hücre içeriği çevre dokulara yayılır. Bu proses "sitolizis" olarak adlandırılır. Açığa çıkan bu içerikler etkilenen dokulardaki inflamatuvar cevabı indükler. Bu cevaba immün sistem hücreleri, sitokinler ve reaktif oksijen türleri aracılık eder (139).

Apoptozun gerçekleşebilmesi için hücre içi ATP seviyesinin yüksek olması gerekmektedir. Nekroz için ise fazladan enerjiye gereksinim yoktur. Hücrenin apoptoz veya nekroz ile öleceğine hücre içi ATP seviyesi ile karar verilir. Apoptozda, hücre içinde ATP azalmasına neden olmayan fizyolojik veya patolojik bir uyarı olur. Nekrozda ise başlatıcı nedenler ağır hipoksi, toksinler ya da ATP eksikliğine neden olan faktörlerdir (172).

Nekroz bileşik hücre gruplarını etkiler, oysa apoptozda tek tek hücreler etkilenir (48, 180). Nekrozda organellerin devamlılığının bozulması mevcut iken, apoptozda; apoptozu başlatan Bcl-2 gen ailesinin ürettiği por oluşturan proteinlerin etkisi ile organeller bütünlüğünü korur, ancak delikli bir yapıya kavuşur (46, 47).

Nekrozda iyon dengesi kaybolur, apoptozda ise sıkı bir şekilde kontrol edilen enzimatik olaylar mevcuttur (211). Nekroz +4°C'de bile gerçekleşebilir. Apoptoz ise

aktif bir olgudur ve +4° C'de gerçekleşemez (47). Agaroz jel elektroforezi yapıldığında, nekroz sırasında DNA'nın rastgele sindirimi mevcuttur. Oysa apoptozda rastgele olmayan, monooligonukleozomal parçalanma mevcuttur. Bu da agaroz jel elektroforezde apoptoz için karakteristik "ladder pattern" denen merdiven şeklinde kırılmalar meydana getirir (59,211). Nekroz sırasında hücre ölümünün geç bulgusu; postlitik DNA parçalanması vardır (DNA, hücre bütünlüğü bozulmadan önce parçalanır). Ayrıca apoptozda mitokondri tarafından sitoplazmaya birçok faktör salınımı mevcuttur (28,59). Nekroz sırasında nonspesifik zar parçalanması olurken apoptozda zar asimetrisinde değişiklikler olur (Şekil 2.8) (47).



Şekil 2.8. Apoptoz ve nekroz arasındaki farklar (206)

2.2.3. Apoptoz Mekanizması

Apoptoz mekanizmasında sistein proteazların kaspaz ailesi başlatıcı ve sonlandırıcı olarak merkezi rol oynamaktadır. Kaspazlar üç yolak ile aktive olmaktadır (204).

1. Ekstrinsik yolak (ölüm reseptörleri)
2. İntrinsik yolak (mitokondri aracılı)
3. İntrinsik endoplazmik retikulum yolağı (204).

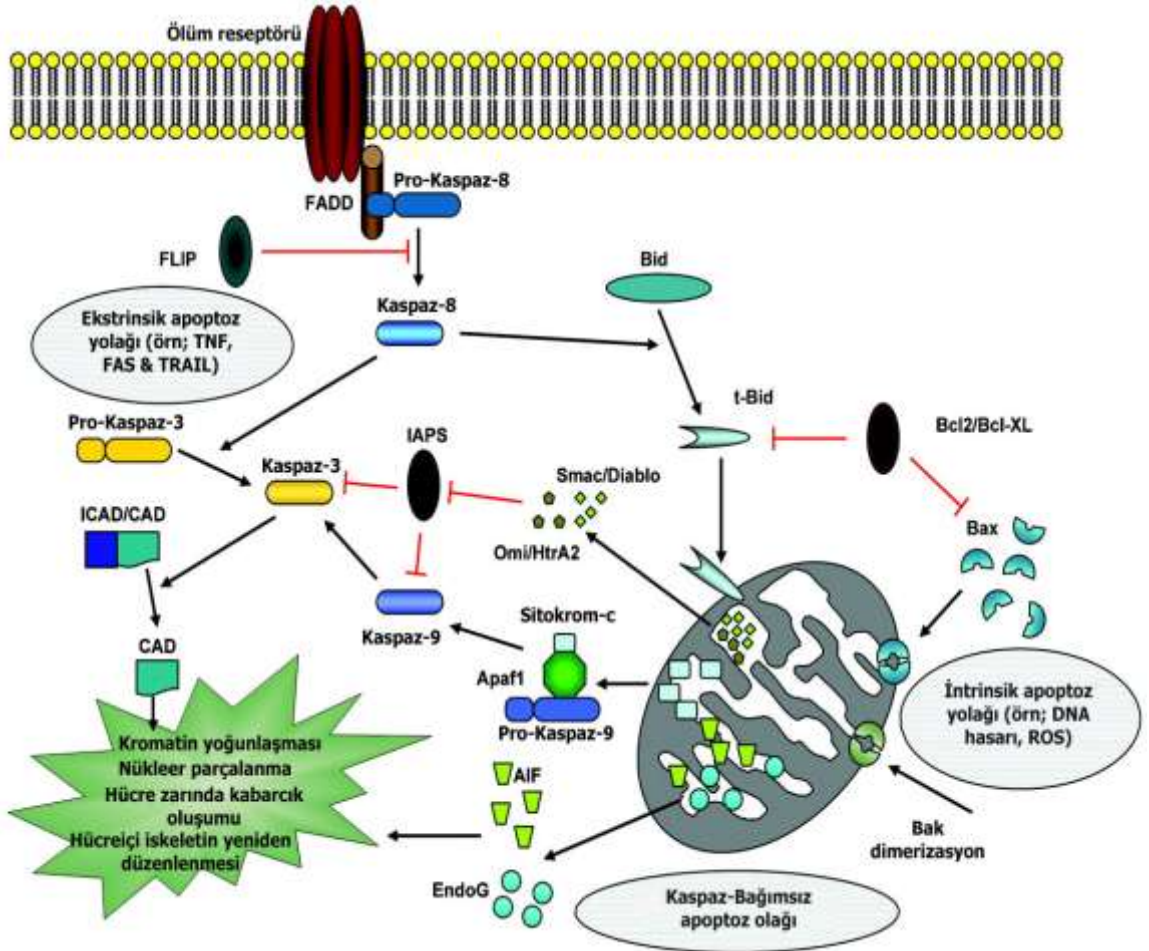
2.2.3.1. Ekstrinsik Yolak (ölüm reseptörleri, dış yolak)

Ekstrinsik yolak isminde de vurgulandığı gibi ölüm ligandlarının ölüm reseptörlerine bağlanması ile başlamaktadır. Birçok ölüm reseptörü tanımlanmakla birlikte bunlarda en iyi bilinen ölüm reseptörleri Tümör Nekroz Faktör-1 (TNF-1) ve Fas reseptörleridir ve bunların liganları ise TNF ligandı ve Fas liganıdır. Bu ölüm reseptörleri, TNF reseptör bağlantılı ölüm domaini (TRADD) ve Fas bağlantılı ölüm domaininde (FADD) olduğu gibi bir adaptör protein içerirler. Ölüm ligandının ölüm reseptörüne bağlanması adaptör protein bağlanma bölgesinin formasyonuna yol açar ve ölüm-başlatıcı sinyal kompleksi (DISC) olarak bilinen ligand-reseptör-adaptör protein kompleksi oluşur. Ölüm-başlatıcı sinyal kompleksi pro-kaspaz 8'i aktive eder. Kaspaz 8'in aktif şekli bir başlatıcı kaspazdır ve diğer kaspazları da uyararak apoptozu başlatır (Şekil 2.9) (204).

2.2.3.2. İntrinsik Yolak (mitokondri aracılı, iç yolak)

İntrinsik yolak hücre içinde başlatılmaktadır. Hipoksi, onarılamayan DNA hasarı, sitozolik Ca^{++} seviyelerinin çok yüksek olması ve şiddetli oksidatif stres gibi bazı iç sinyaller intrinsik mitokondriyal yolağı tetiklemektedir. Sebep ne olursa olsun bu yolak mitokondrial permeabilitenin artması ve sitokrom c gibi proapoptotik proteinlerin sitoplazmaya salınması ile sonuçlanır. Bu yolak Bcl-2 ailesinden bir grup protein

tarafından düzenlenir. Bcl-2 proteinlerinin iki ana grubu proapoptotik proteinler ve antiapoptotik proteinlerdir. Proapoptotik proteinler apoptozu mitokondriden sitokrom c'nin salınmasını sağlayarak regüle ederken antiapoptotik proteinler bu salınımı engellemektedirler. Antiapoptotik ve proapoptotik preteinler arasındaki denge hücrenin apoptoza gidip gitmeyeceğini belirlemektedir. Diğer apoptotik faktörler mitokondrinin membranlar arası kısmından salınan apoptozu indükleyici faktör (AİF) ve mitokondri kaynaklı kaspaz aktivatörüdür (SMAC). Sitokrom c, sitoplazmaya salınca APAF-1 ile birleşir ve apoptozom'u oluşturur. Bu kompleks prokaspaz 9'a bağlanır (204). Aktif kaspaz 9'da kaspaz 3'ü aktive ederek diğer kaspaz kaskadının tetiklenmesini sağlar (Şekil 2.9) (106).



Şekil 2.9. Apoptozda ekstrinsik ve intrinsik yollar (70)

2.2.3.3. İntresik Endoplazmik Retikulum Yolağı

Apoptozda tam olarak bilinmeyen üçüncü yolak intrinsik endoplazmik retikulum yolağıdır. Bu yolağın kaspaz 12 bağımlı ve mitokondriden bağımsız fonksiyon gösterdiği bildirilmektedir. Hipoksi, glukoz yetersizliği, kalsiyum dengesindeki bozukluklar ve serbest radikallere maruz kalma gibi hücrel stresler endoplazmik retikulumun hasar görmesine sebep olarak protein sentezinin azalmasına ve protein katlanmalarının açılmasına neden olur ve bir adaptör protein olan Tümör Nekroz Faktör Reseptör İlişkili Faktör-2 (TRAF-2), prokaspaz 12'ye bağlanır ve onu inaktive eder (204). Endoplazmik retikulumun strese maruz kalmasıyla TRAF-2 ayrılır ve bu ayrılma kaspaz 12'nin aktive olmasına neden olur (91,218). Aktive olan kaspaz 12, prokaspaz 9'a bağlanır. Daha sonra aktif hale geçen kaspaz 9 apoptotik yolaktaki en önemli efektör kaspaz olan kaspaz 3'ü aktive etmek için prokaspaz 3'e bağlanır. Kaspaz 12'nin sitokrom c salınımına neden olarak intrinsik yolağı uyardığını gösteren kanıtlar olmasına rağmen bu mekanizma mitokondriden bağımsızdır (136).

2.2.4. Apoptozun Genetik Kontrolü

Protoonkogenler hücre farklılaşması ve çoğalmasında görev yapan proteinleri kodlayarak hücrenin normal büyüme ve gelişimini düzenleyen genlerdir. Normal hücrel genler olan protoonkogenlerin mutasyona uğramış halleri onkogen olarak isimlendirilir (105). Onkogenler, hücrenin aşırı büyüme ve bölünmesi doğrultusunda uyarımı gerçekleştirir. Hücrenin büyüme ve bölünmesini aktive edici genleri baskılayan ve dengeleyen genler ise adından da anlaşılacağı üzere tümör baskılayıcı genlerdir (10, 134, 145). Son yapılan çalışmalar, bazı onkogenlerin ve tümör baskılayıcı genlerin programlı hücre ölümünü kontrol ettiğini göstermektedir (34). Omurgalılarda apoptozu düzenleyen genler c-myc, p53 ve Bcl-2 ailesi (Bcl-2, Bax ve Bcl-x) olarak bilinmektedir ve üretimini sağladıkları proteinler de aynı adlarla anılmaktadır (138, 212).

2.2.4.1. Bcl-2 Gen Ailesi Proteinleri

18. Kromozom üzerinde yer alan Bcl-2 geni ilk kez B hücreli foliküler lenfomalarda tanımlanmıştır (105). Bcl-2 ailesi apoptozu düzenlemede en önemli role sahip olan onkoprotein grubudur (197). Şimdiye kadar Bcl-2 ailesinin 25 üyesi tanımlanmış olup bu proteinler mitokondri, düz endoplazmik retikulum, perinükleer membran ve hematopoietik hücrelere lokalize olarak bulunmaktadır (104). Bcl-2 proteinlerinin iki ana grubu proapoptotik proteinler (Bax, Bak, Bad, Bcl-Xs, Bim, Hrk vs) ve antiapoptotik proteinlerdir (Bcl-2, Bcl-2XL, Bcl-W, Bfl-1 vs) (204). Hücrelerin apoptotik uyarıya duyarlılığı pro ve antiapoptotik Bcl-2 proteinleri arasındaki dengeye bağlıdır. Hücrede proapoptotik proteinler fazla olduğunda hücre apoptoza daha duyarlı olurken, antiapoptotik proteinlerin fazla olduğu durumlarda ise hücre apoptoza daha az duyarlı hale gelmektedir (170).

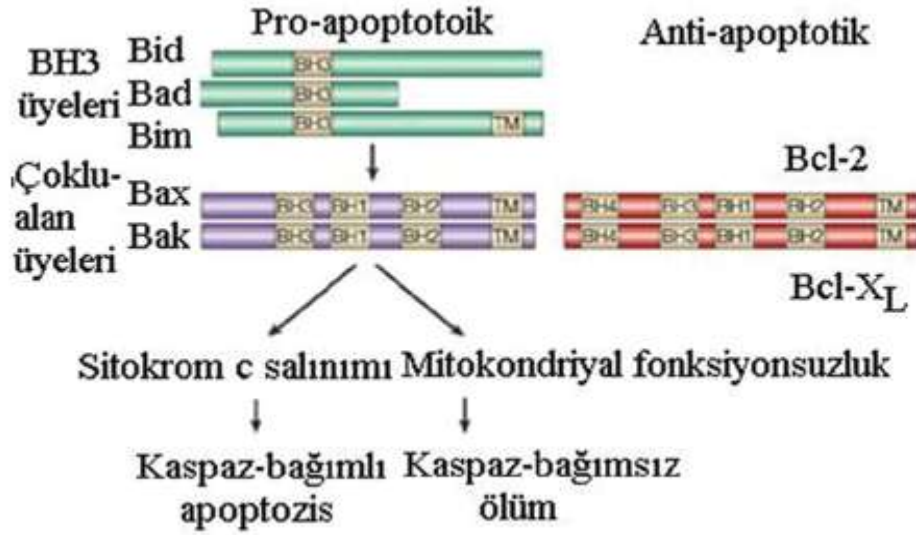
Bütün Bcl-2 gen ailesi üyeleri mitokondrinin dış zarında homo veya heterodimerler halinde bulunurlar ve por oluşumu ve iyon kanallarının şekillenmesini sağlarlar. Apoptozun intrinsik yolağı Bcl-2 ailesinin üyeleri ile düzenlenmektedir. Bcl-2 ailesinin bütün üyeleri yapılarında bulunan Bcl-2 homoloji bölgelerinden (BH1-BH4) en az birini taşır (146). Proapoptotik ve antiapoptotik etkili Bcl-2 ailesinin işleyişi yapılarında bulunan hidrofobik cep ve amfipatik α -heliks bölgelerine bağlıdır. BH1, BH2 ve BH3 bölgeleri hidrofobik cebi oluşturur, amfipatik α -heliks ise BH3 bölgesinde yer alır. Proapoptotik ya da antiapoptotik üyeler birbirlerine hidrofobik cep üzerinde bulunan BH3 bölgesinden bağlanırlar. Bu bağlanma apoptozun başlaması için BH3 bölgesinin gerekli olduğunu göstermektedir (77). Bcl-2 ailesi proteinlerinin dikkat çekici özelliklerinden birisi de homodimer ve heterodimer oluşturabilme kabiliyetidir. Bu ailenin antiapoptotik ve proapoptotik üyeleri arasındaki heterodimerizasyon, birbirlerinin biyolojik aktivitelerini inhibe ettiğini düşündürmektedir. Apoptotik aktivite için BH1, BH2 ve BH3'e ilave olarak BH4'ün olması gerekliyen proapoptotik aktivite için BH3 olması gerekir (Şekil 2.10) (197).

Proapoptotik Bcl-2 proteinleri sıklıkla sitozol içinde bulunurlar ve hücrel stres takiben antiapoptotik proteinlerin yer aldığı mitokondri yüzeyine yerleşirler (24). Bax ya da Bak gibi proapoptotik proteinler heterodimerizasyon yoluyla kaspaz

serbestleşmesini uyarır ve mitokondri zarının permeabilitesini değiştirerek sitokrom c'nin serbestleşmesine neden olur. Dolayısıyla kaspaz aktivitesine neden olur (197).

Bcl-2 ailesinin iyon kanalları oluşturduğu düşünülmektedir. Bcl-xl, bakteriyel toksinlerin por meydana getirme etkisine benzer bir özelliğe sahiptir. Bcl-2, Bcl-xl ve Bax sentetik lipid membranlarda iyon kanalları oluştururlar (78).

Bcl-2 diğer bir mekanizmasında APAF-1 ve Bcl-xl'in birleşik etkisi ile olur. Bcl-xl, APAF-1'i ayırarak prokaspaz 9'un aktif kaspaz 9'a dönüşmesini önler (78).



Şekil 2.10. Bcl-2 ailesi üyeleri (99)

Bcl-2, Bcl-xl

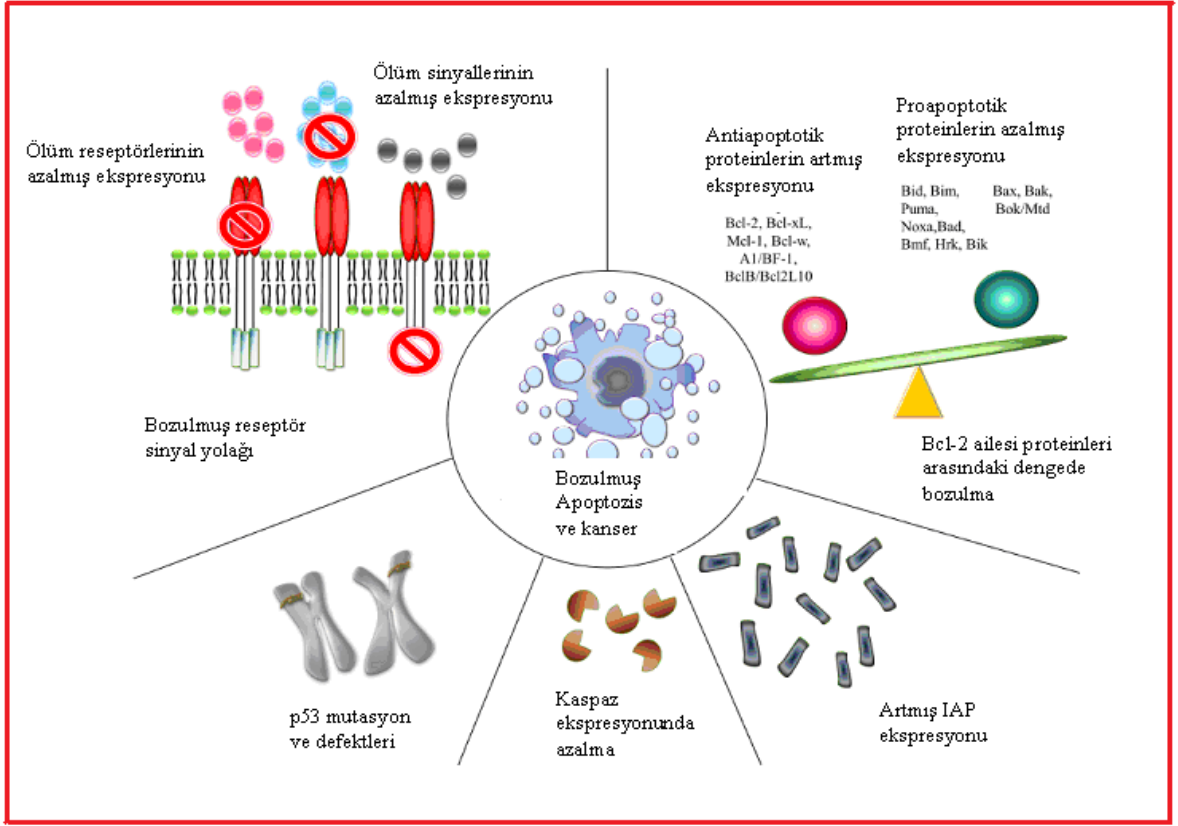
Apoptozu inhibe eden proteinlerdir. Bu proteinler yapılarında transmembran domain ile birlikte, BH1, BH2, BH3 ve BH4 domainlerini içerirler (77). Bcl-2 güçlü bir ölüm inhibitörüdür ve mitokondriden sitokrom-c salınımını engellemede rol oynar. Bcl-2 mitokondri membran dışında, endoplazmik retikulum ve nükleer membranlarda yer almaktadır (141). Mitokondriyal membran porları non-spesifik transportlardır ve 1,5 kDa'dan küçük moleküller porlardan geçebilir. Bcl-2 mitokondriyal membran porlarının

açılışını inhibe eder (78). Bcl-xl ise mitokondri membran dışında lokalizedir. Bcl-xl ve Bcl-2 beraberce mitokondri membran geçirgenliğini korurlar. Proapoptotik proteinleri (Bax ve Bad) inhibe ederek apoptozu engeller (106). Bcl-xl kaspaz aktivasyonunu, APAF-1 üzerinden önler (141).

Bax, Bad ve Bid

Apoptozu uyarıcı özellik gösteren proteinlerdir. Bu grupta BH4 bölgesi dışında diğer üç bölgeyi de içeren Bax, Bak ve Bok ile sadece BH3 bölgesi içeren proteinler olan Bad ve Bid de yer alır (77). Bax ve bad proteinleri etkilerini diğer bir protein ailesi; kaspazlar üzerinden gerçekleştirir. Bunların sayısı da bir düzineden fazladır. Sağlıklı hücrede bax sitozolde bulunur. Apoptotik uyarı ile sitozolik Bax mitokondriye yönelir ve çeşitli değişimler sonucunda Bax'ın hidrofobik C terminal ucu açığa çıkar ve sitokrom-c salınımına neden olur. Kalpain tarafından Bax salınımı uyarılarak sitokrom-c açığa çıkar (203). Bcl-2'nin tersine hücre içinde yüksek miktarlarda Bax proteini birikimi apoptoza neden olur. Bax proteini mitokondri zarında delikler oluşturarak sitokrom-c'nin mitokondriden salınmasına neden olur ve proapoptotik kaspazları aktive ederek apoptozu başlatır. Bad, sağlıklı hücrelerde mitokondri membranının dış zarında bulunur. Apoptoz sırasında Bax değişime uğrar ve N terminal uç açığa çıkarken Bcl-xl bad'dan ayrılır (187, 203). Bid, Bcl-2'yi inaktive etmek veya Bax'ı aktiflemek üzere mitokondriye yönelir (141). Endojen Bid'in yarısı sitozolde erir. Diğer yarısı ise hücre içi membranlarda özellikle de endoplazmik retikulumda bulunur (187).

Bax, Bcl-2 ile heterodimer, kendisi ile homodimerler oluşturur. Bax, hücrelerde aşırı eksprese edildiği zaman, ölüm sinyaline yanıt ve apoptotik ölüm hızlanır. Bcl-2 aşırı eksprese edildiği zaman, Bax ile heterodimer yapar ve ölüm baskılanır (148). Bu nedenle, Bax/Bcl-2 oranı, apoptoza yatkınlığın belirlenmesinde önemlidir. Bax proteini, Bcl-2'ye benzer şekilde bir karboksil uç içerir ve Bcl-2 gibi mitokondri de dahil intraselüler membranlara lokalize olur. Bax, normal maturasyon sürecinde ölen hücrelerdeki bölgelerde ve dokularda büyük oranda eksprese olur. Ayrıca, Bax/Bcl-2 oranı, gelişim sürecinde değişiklik gösterir (174).

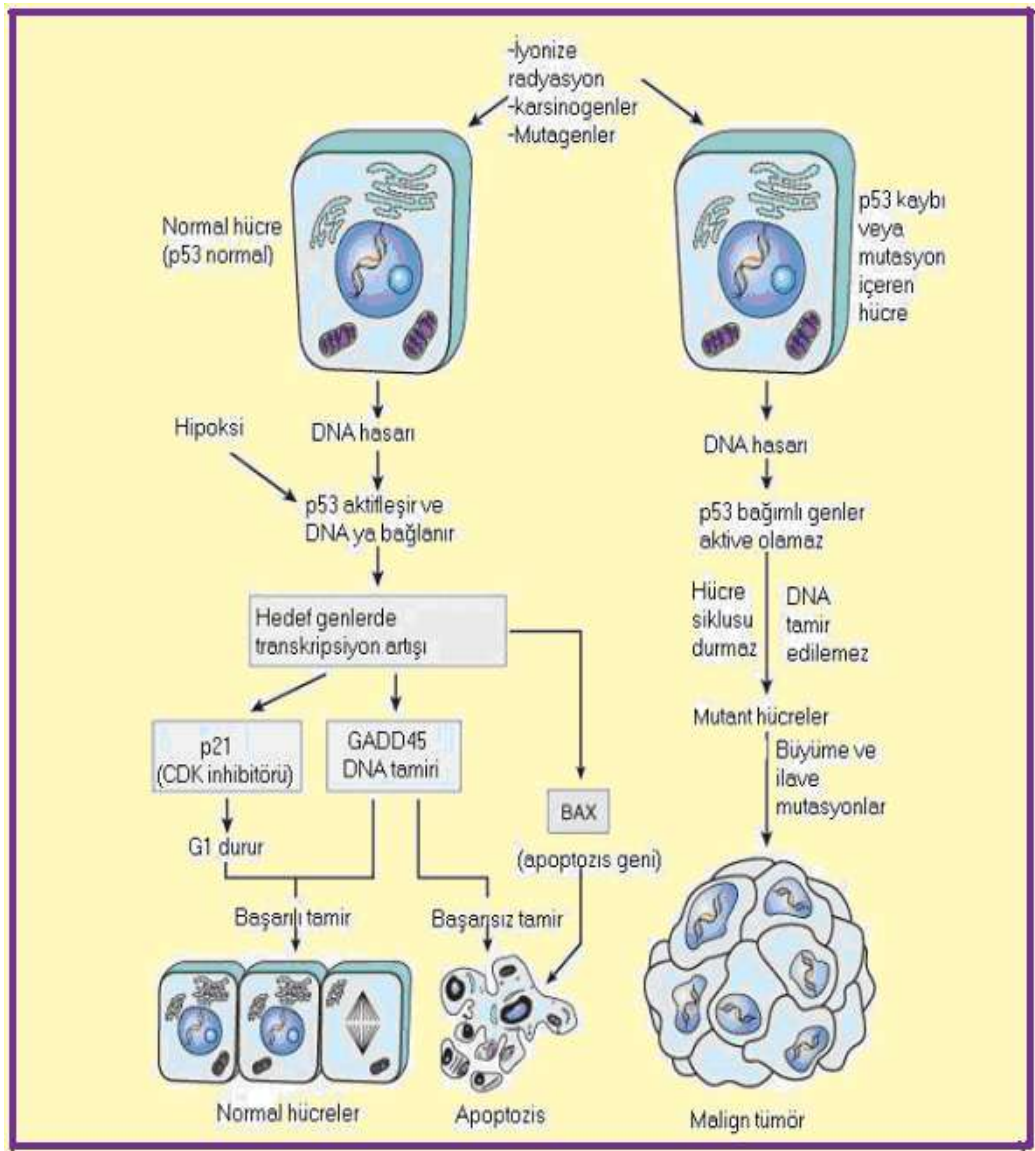


Şekil 2.11. Kanser ve apoptoz (204)

2.2.4.2. p53

Tümör protein 53 olarak isimlendirilen p53 proteini en iyi bilinen tümör baskılayıcı proteindir. 17. kromozomun kısa kolu üzerinde bulunan TP53 tümör baskılayıcı geni tarafından kodlanmaktadır ve moleküler ağırlığı 53 kDa'dur. Apoptozun yanısıra hücre döngüsünün regülasyonu, çoğalma, farklılaşma, gen amplifikasyonu, DNA rekombinasyonu, kromozomal ayrımı ve hücre yaşlamada önemli rol üstlenmektedir. Bu nedenle "genom gardiyanı" olarak isimlendirilir (204). p53 proteini normal hücrelerde düşük konsantrasyonlarda bulunmaktadır. Hücre DNA'sı fiziksel ya da kimyasal mutajenik bir ajana maruz kaldığında ise p53 geninin ekspresyonu sonucu p53 proteininin konsantrasyonu artar (15, 23). Bu artış p53 proteinlerinin hedef genleri olan Mouse double minutes 2 (Mdm-2), p21, büyüme durması ve DNA hasar proteini 45 (GADD45) ve Bax gibi genlerin transkripsiyonunun artmasına yol açar. p21^{WAF1/CIP1} geni tarafından kodlanan protein, siklin bağımlı

kinazları (cdk) inhibe ederek hücre döngüsünü G1/S evresinde durdurur (86). GADD45 geninin kodladığı protein ise DNA tamirinde rol alır. p53 hücre apoptozuna Bax/Bcl-2 yolunu izleyerek neden olmaktadır. p53 tarafından aktive edilen Bax geni, Bcl-2 genini inaktive ederek apoptozu başlatır (220). p53 proteini DNA'sı hasar görmüş hücrelerin çoğalmasını durdurmakta ve DNA'nın onarımına olanak sağlamaktadır. DNA hasarı onarılamayan hücrelerin ise apoptoz ile yok edilmesine neden olmaktadır (Şekil 2.12) (73).



Şekil 2.12. p53 geni etki mekanizması (181)

İnsan kanserlerinin %50'den daha fazlasında p53 tümör baskılayıcı geninde defektler belirlenmiştir (204). Bu durum Mdm-2 gibi p53 inhibitörlerinin ekspresyon artışını ya da p53'ün önemli ko-aktivatörlerinin susturulduğunu göstermektedir (83).

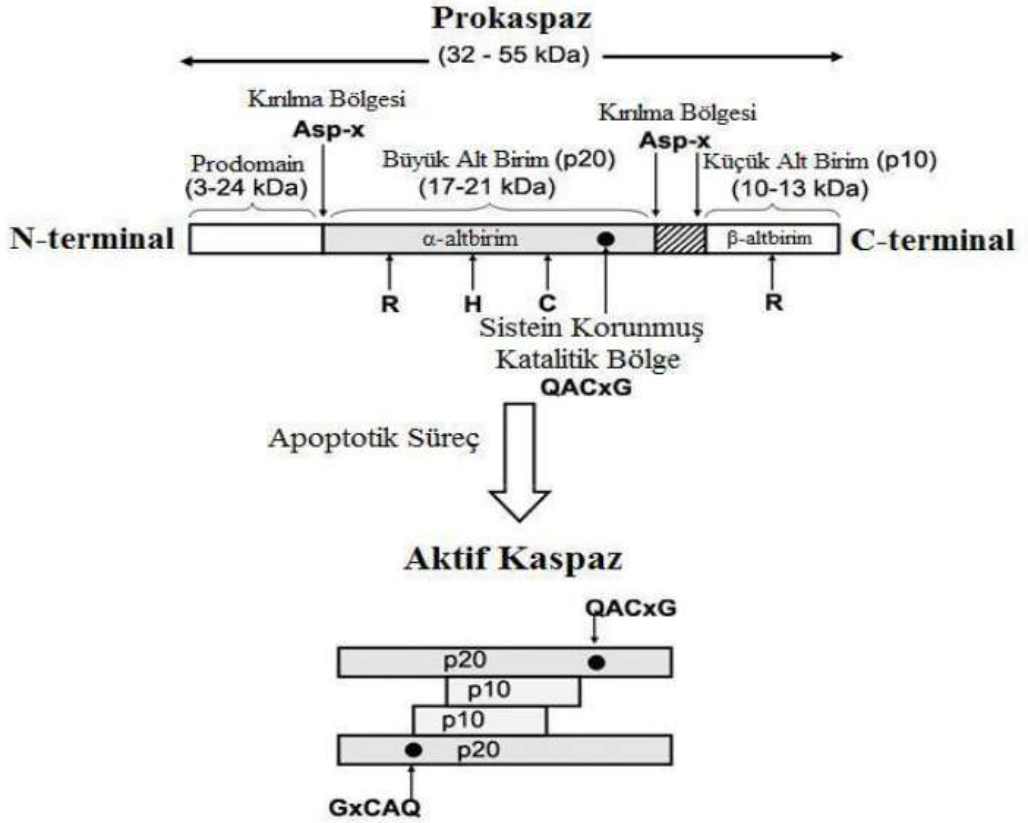
Hasarlı hücrelerde fonksiyonel p53 yoksa hücre siklusu kontrol edilmeden ilerler. p53'ün düzenleyici aktivitesi ise negatif düzenleyici Mdm-2 proteini ile sağlanır (114,120). Mdm-2, p53 degradasyonunda rol oynayan başlıca enzim ubiquitin-protein ligaz enzimidir (E3) (156). Mdm-2 proteini, p53'ü kontrol altında tutar ve p53'ün G1/S geçişinde siklusu durdurur ve apoptozu engeller. Radyasyon vb. etkilerle DNA'da bir hasar meydana geldiğinde Mdm-2 proteininin p53'e bağlanma bölgesinde yapısal değişiklikler meydana gelir. Bu nedenle Mdm-2 p53'ü bağlayamaz ve serbest p53'ün transkripsiyonel aktivitesi hücre siklusunu G1 noktasında durdurur ve Bax genini aktive ederek hücreyi apoptozu götürür. Mdm-2, p53'ün transkripsiyonunu azaltır veya p53'e bağlanarak aktivitesini inhibe eder (114,120).

2.2.4.3. Kaspazlar

Kaspazlar apoptotik hücre ölümü sırasında önemli rol oynayan sistein-proteaz grubu enzimlerdir. Kelime olarak "Sistein Aspartat Spesifik Proteaz" (CASPASE) olarak türetilmiştir (142). Hem intrinsik hemde ekstrinsik apoptozda görev alan kaspazların bugüne kadar 14 izoformu keşfedilmiştir. İlk keşfedilen kaspaz memelilerde interlökin-1 beta dönüştürücü enzim (ICE) ile denk olan *C.elegans*'ın ced-3'üdür. Daha sonra kaspaz 1 olarak isimlendirilmiştir (78).

Kaspazlar proteini aspartat amino asidinden sonra kesen ve aktif merkezinde sistein bulunduran proteaz ailesidir. Bu kesme işlemi proteinin aktivasyon veya inaktivasyonuna neden olmaktadır. Kaspazlar zimojen olarak salınırlar. Tüm kaspazların yapısında büyük (p10) ve küçük (p20) katalitik alt üniteleri ve N- ucunda bağlanma bölgeleri vardır. N-terminal bölgesi kaspazdan kaspaza değişiklik göstermektedir (216). Aktive olmaları için proteolizle C-ucundaki aspartik asit kalıntılarının ayrılması gerekir. Genellikle bağlanma bölgesinin uzaklaşması ile katalitik

iki alt üniteye ayrılır. Ayrılan büyük ve küçük alt üniteler katalitik ünite oluşturmak üzere bir araya gelirler. Aktif kaspaz iki p10 ve iki p20 alt ünitesi içeren ve iki aktif bölgesi olan bir heterotetramerdir. Aktif bölge sistein ve histidin uçları büyük alt ünite, substrattaki aspartatlara bağlanarak parçalanmayı oluşturan arginin uçları ise küçük alt ünite de bulunmaktadır. Kaspazlar aspartat bölgelerinden substratlarını parçaladığı ve kendileri de aspartat bölgelerinin parçalanmasıyla aktive oldukları için proteolitik bir kaskad başlatma potansiyelleri vardır (Şekil 2.13) (153).



Şekil 2.13. Prokaspaz ve aktif kaspazın yapısı (43)

Kaspaz 1, 2, 4, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 13 başlatıcı kaspazlar olup, uzun N terminal bölgesi içerirler. Bu uzun N terminal bölgelerinde kaspaz aktive edici toplayıcı bölge (CARD) veya ölüme etkileyen bölgeler (DED) bulunmaktadır. Kaspaz 3, 6, 7, 14 sonlandırıcı kaspazlar olup kısa N-terminal bölgesi içerirler. Başlatıcı kaspazlardan 1,

2, 4, 5, 9, 11, 12, 13 CARD domain, kaspaz 8, 10 ise DED domaini içermektedir. Kaspaz 3, 6, 7, 14 ise kısa N-terminal bölgeye sahip olup, CARD veya DED domaini içermektedir (216).

Kaspaz 3

Kaspaz 3'ün, insan kromozomunun 4q33-q35.1 bölgesinde bulunan 32 kDa ağırlığında bir sistein proteaz olduğu gösterilmiştir (195). Diğer kaspazlar gibi kaspaz 3'te inaktif proenzim olarak bulunmaktadır. Apoptotik uyarı geldiği zaman kaspaz 3 aspartik asit bölgesinden proteolitik yıkıma uğrayarak iki alt üniteye ayrılır. Bu iki alt ünitenin kendi arasında tetramerik bir yapı oluşturmasıyla kaspaz 3 aktif hale geçer (51). Kaspazlar içerisinde kaspaz 3 apoptozdaki rolleri ve özellikleri açısından en iyi anlaşılmiş olanıdır. Kaspaz 3 birçok etkiye sahiptir. Bu etkilerin bazıları ölüm indükleyicilerine maruz kalan belirli hücre tiplerinde hücre ölümü için kritik özelliktedir. Bazı etkileri ise hücre ölümü kesinleştikten sonra bu sürecin düzgün bir şekilde gerçekleşmesini sağlamak yönündedir (159).

Apoptozun efektör kaspazlarından biri olan kaspaz 3, apoptoz sürecinde birçok farklı sistem tarafından kırılan nükleer enzim, poli ADP Riboz polimeraz (PARP) gibi birçok anahtar proteinin kısmen veya tamamen proteolitik kırılmasından sorumludur (195). Kaspaz 3 fodrin, aktin, lamin gibi hücrenin yapısal proteinlerini, DNA tamir mekanizmasında görev alan PARP enzimini, DNA fragmentasyon faktörlerini, siklin bağımlı protein kinazları ve bazı sinyal yolağı proteinleri gibi birçok molekülün parçalanmasını sağlayarak hücrenin yapısal bütünlüğünün bozulmasına sebep olur (38).

Kaspaz 3 gen hedefleriyle apoptozda derin hasarlar oluşturulmuş fareler ile yapılan ilk çalışmada, mendel yasalarıyla beklenenden daha az sayıda fare doğmuştur. Doğan fareler, aynı anneden doğan diğer farelerden daha küçük olup 1-3 haftalıkken ölmüşlerdir. Fenotipleri önemli ölçüde sınırlanmıştır. Embriyonik kalp, akciğer, karaciğer ve böbreklerde gözle görünür bir anormallik gözlenmezken en fazla sinir sisteminde etki göstermiştir (112, 205).

Kaspaz 3'ün apoptoz indüksiyonundaki temel rolü Zheng ve arkadaşları tarafından knockout farelerinin hepatosit ve timositlerinde yapılan çalışma ile gösterilmiştir. Buna göre kontrol hücreleri ile kaspaz 3 -/- hepatosit ve timositler aynı hızda ölmelerine rağmen, FasL'den eksprese olan 3T3 hücreleri ile yeniden kültüre edildiğinde 6 saat içinde yabancı tip hücrelerin çekirdeklerinin parçalara ayrıldığı ve sitoplazmik tomurcuk oluşumu gibi tipik apoptotik özellikler gösterdiği fakat kaspaz 3 -/- hücrelerde bu özelliklerin gözlemlenmediği bildirilmiştir (223).

2.3. HÜCRE İÇİ PROTEİN YIKIMI

Tüm hücre içi proteinler sürekli sentez ve yıkıma uğrarlar. Bu sürekli protein döngüsü ile hasara uğramış ya da değişime uğramış proteinler ortadan kaldırılmaktadır. İlk bakışta fonksiyonlarını kaybetmeden önce hücresel bileşenlerin bu tip sürekli yenilenmesi hücre kaynaklarının boşuna tüketimi gibi görünebilir. Ancak hasarlı hücre içi bileşiklerinin birikmesinin hücre fonksiyonu ve canlılığı üzerine olumsuz etkileri vardır. Protein yıkımı ile yıkılan proteinin amino asit bileşenleri yeni proteinlerin sentezi için yeniden kullanılır. Farklı proteinlerin hücre içinde sentezlenip yıkıldığı oranlar da farklıdır ve değişik uyaranlara cevap olarak ya da farklı şartlar altında değişebilirler. Protein sentezi ve yıkımı arasındaki bu denge, hücrelerin hücre dışındaki çevrenin değişimlerine adaptasyonu için hücre içi protein seviyelerini hızla değiştirmelerine olanak sağlar (127).

Hücre içi protein döngüsünden iki ana proteolitik sistem sorumludur: lizozomal sistem ve ubikuitin proteozom sistemi. Lizozomlar keşfedilen ilk proteolitik sistemler olup 80'lerin başında ubikuitin proteozom sisteminin önemi anlaşılmıştır. Protein yıkımının rolü sadece toparlanma olmakla kalmayıp hücre döngüsü ve hücre bölünmesi gibi başlıca hücre içi işlemlerin düzenlenmesine kadar genişlemiştir (127).

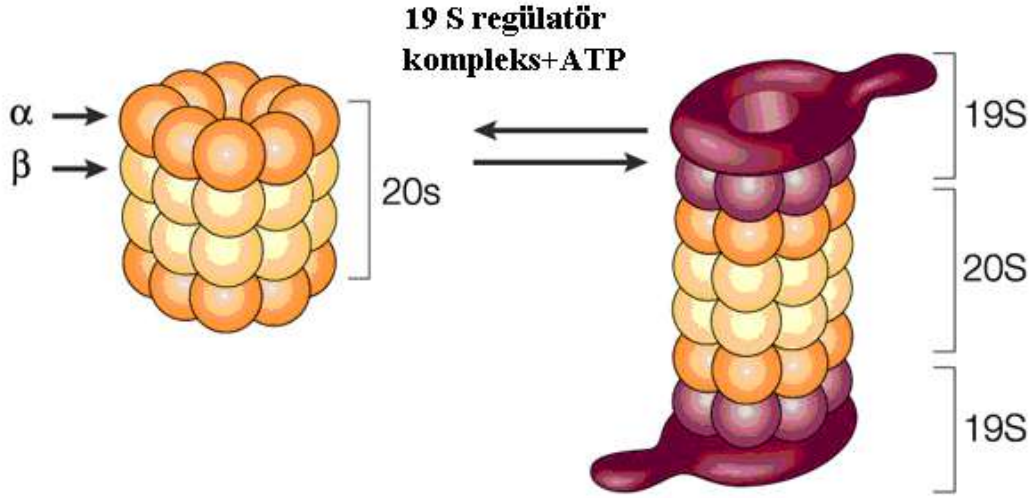
2.3.1. Ubikuitin Sistem

Ubikuitin proteozom sistemi ökaryot hücrelerde önemli bir proteolitik yoldur. Yıkım için substratların izlenmesi ve bunların o anki proteolitik kırılması iki ana aşamadır. Ubikuitin proteozom sistemi hücrel homeostazın devamlılığına ve protein kalitesi kontrolüne yardımcı olur. Fakat bu sistemi hücre canlılığı için vazgeçilmez yapan temel hücre içi işlemlerdeki düzenleyici rolüdür. Bu temel işlemler arasında hücre döngüsünün ilerlemesi, hücre bölünmesi, transkripsiyon ve sinyal mekanizmaları sayılabilir (127).

Ubikuitin proteozom sistemi hücrel homeostaz için gerekli olan hücre döngüsü düzenlenmesi, apoptoz, reseptör sinyalleşmesi, endositoz ve diğerleri gibi çok sayıda önemli süreçte rol oynar. Hücre büyümesi ve proliferasyonu tümör baskılayıcılarının, protoonkogenlerinin ve sinyal ileti komponentlerinin ubikuitin aracılı yıkımı ile kontrol edilir. Bunların doğal sonucu olarak ubikuitin proteozom sistem bileşenlerinden biri ya da daha fazlasındaki bozukluk insan hastalıklarındaki önemli sebeplerinden biri olarak düşünülmektedir (53).

2.3.2. Proteozom

Ubikuitin proteozom sisteminin proteolitik bileşeni proteozomdur. Proteozom prokaryot ve ökaryotlarda bulunan multikatalitik enzimatik bir komplekstir. Bir katalitik öz (20S proteozom) ve birkaç tip düzenleyici alt birimin (19S ve 11S) farklı kombinasyonları çeşitli tiplerde hücre içi proteozomları oluşturur. Bu katalitik öz 4 adet üst üste halkadan oluşan varil şekilli bir bölmedir; 4 adet halkanın her biri de 7 farklı α 1-7 (dış iki halka) veya β 1-7 (iki iç halka) alt birimi içerir. İki iç alt birimin 3'ü (β 1,2,5) proteolitik aktif kısımları taşır, dış α alt birimler ise holoenzimi stabil hale getirir (Şekil 2.14) (127).



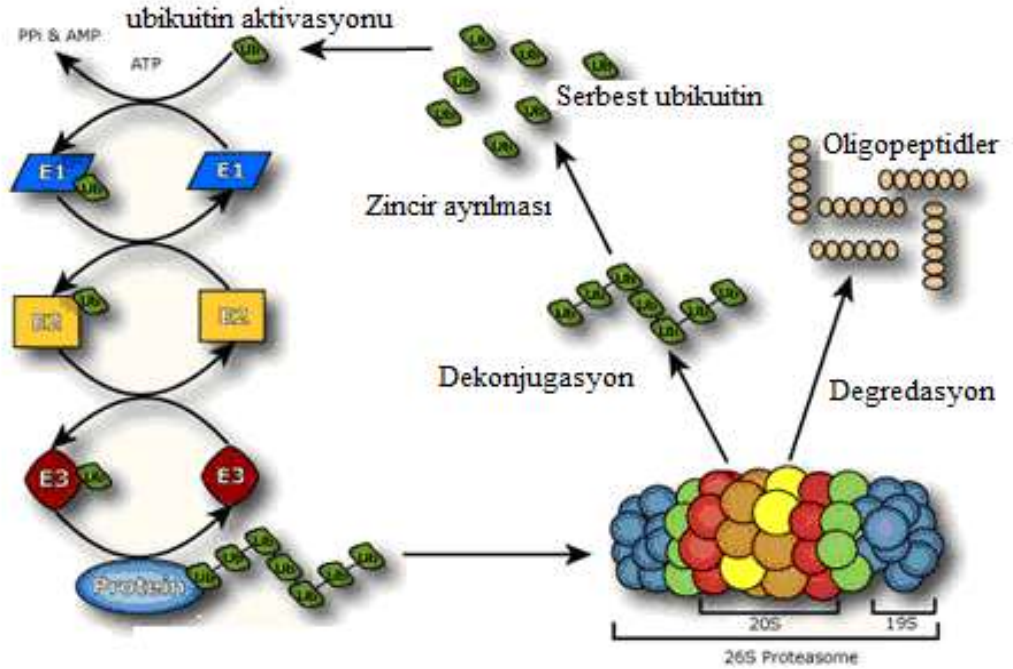
Şekil 2.14. Proteozom yapısı (2)

En iyi bilinen proteozom tipi 26S proteozomdur. 26S proteozom katalitik öz ile iki yan 19S düzenleyici alt birimin bileşiminden oluşur. Pek çok ubikuitin işaretli protein 26S proteozomu tarafından tanınır ve yıkılır. 19S düzenleyici alt birimin farklı bileşenleri substrat tanınmasında rol alır. Ayrıca bunlar α halkasının 'açık' durumuna karşı uygun değişimleri tetiklerler ve genelde substratı katalitik öze yönlendiren gücü sağlar. 19S alt birimleri diğer alt birimlerle birlikte stabil hale gelen bir kapak ve bir tabanı örgütlerler (127).

2.3.3. Ubikuitinasyon Mekanizması

Ubikuitin tüm ökaryotik hücrelerde bulunan ısıya dayanıklı, küçük (8.5 kDa) bir proteindir (45). 76 aminoasit içeren ubikuitinin primer yapısı yüksek oranda korunmuştur (166). Regülatör proteinlerin ubikuitin aracılı yıkımı birçok metabolik olayda önemli rol oynar (109). Diğer proteinler için bir post-translasyonel modifikasyon işareti olarak etki eder. Hedef proteinlere ubikuitin eklenmesi ATP bağımlı arka arkaya çalışan üç esansiyel enzim gerektirmektedir. Bunlar; ubikuitin aktive edici enzim (E1), ubikuitin konjuge edici enzim (E2) ve E3'dir (53).

Ubikuitinin karboksil (C) terminalindeki glisin kalıntısı E1 tarafından uyarılır. ATP gereklidir. Ubikuitin adenilatın ara formu oluşur ve P_{Pi} salınır. Bunu takiben ubikuitin E1'deki sistein kalıntısına tioester bağı ile bağlanır ve AMP (adenozin monofosfat) açığa çıkar. Aktif ubikuitin, E2 enziminin sistein kalıntısına transfer edilir (179). E3 enzimi sistemin en önemli substrat belirleyici faktörü olarak çalışır. Ubikuitin, hedef proteinlerin lizin rezidülerine esas olarak ε-amino gruplarından, kendi C-terminal karboksil grubu ile izo-peptid bağı oluşturarak konjuge olur. Ubikuitinin kendisinde 7 tane lizin rezidüsü bulunur. Önceki ubikuitinde bulunan bu lizin rezidülerine yeni ubikuitinler eklenerek devam eden ubikuitin eklenme döngüsü oluşur. Bu yolla, bir hedef proteinde poli-ubikuitin zincirleri oluşturulabilir. Eğer hedef protein üzerindeki poli-ubikuitin zinciri bağlanmayı başarsa ve ubikuitin parçaları dört veya daha fazla ise bu 26S proteazom için tanıma sinyali olarak etki eder. Proteozom hedef proteini ATP bağımlı yolla parçalar (Şekil 2.15) (53).



Şekil 2.15. Ubikuitinasyon mekanizması (207)

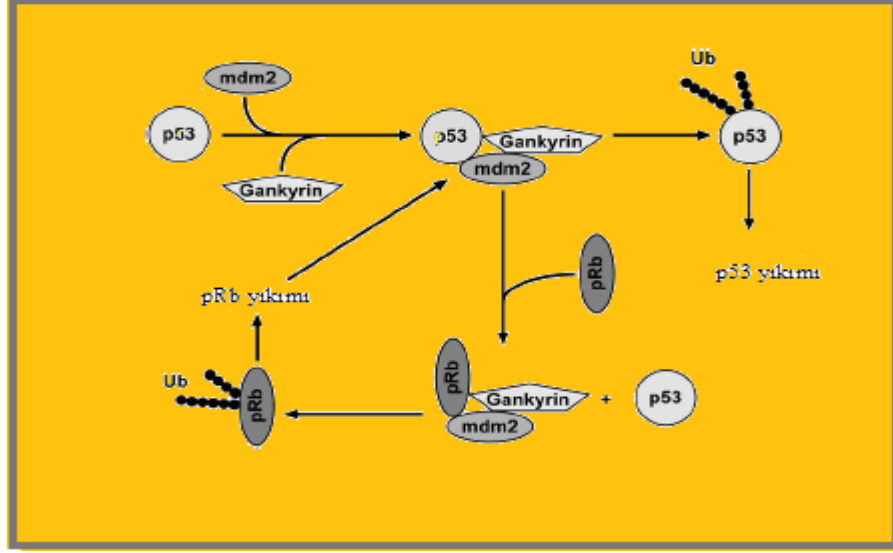
2.3.4. Hepatosellüler Karsinoma Patogenezinde Ubikuitin Sistem Bozukluğunun

Rolü

İnsan karaciğer kanserinin moleküler incelemesinde, hem onkogenler hemde tümör süpresör genlerdeki değişimleri içeren çok sayıda genetik ve epigenetik değişimler saptanmıştır. Bu genetik değişimlerin bir kısmı direkt olarak ubikuitin proteozom sistemi ve onun işlevlerini etkilemektedir.

Hepatosellüler karsinoma ile bağlantılı küçük bir protein olan gankyrin 26S proteozomun regülatör altbirimi olarak ubikutinlenmiş proteinlerin ATP bağımlı yıkımında görev alır. İnsanlarda hepatosellüler karsinomada rutin olarak hem mRNA hemde protein seviyeleri yükselir. Bir karaciğer kanseri modelinde hepatositlerdeki artmış gankyrin ekspresyonu gözlenebilen en erken olaylardan birisidir. Hepatosellüler karsinomada gankyrinin aşırı ekspresyonu tümör hücrelerinin anti apoptotik aktivite göstermelerine neden olur. Gankyrin üzerinde cdk ve retinoblastoma proteini (pRb) için bağlanma bölgeleri bulunmaktadır. Gankyrin cdk4'ü bağladığı ve p16 ile yarışarak cdk4 kinaz aktivitesi üzerindeki inhibitör etkileri kaldırdığı gösterilmiştir. Gankyrin'in cdk4 aktivitesi üzerindeki bu etkisi, gankyrin aşırı üretiminin pRb hiperfosforilasyonuna neden olduğu ve aktif transkripsiyon uzama faktörü-2 (E2F) salınımı ile muhtemelen artmış hücre bölünmesine neden olmaktadır. E2F, tümör baskılayıcı gen ürünü olan ve aynı zamanda hücre döngüsünü düzenleyen pRb tarafından inhibe edilmektedir. Gankyrin hiperfosforile pRb'yi 26S proteozoma taşır. Burada gankyrin'in ATPaz'a bağlanması pRb salınımı ve ardından yıkılmasını sağlar. Gankyrin aynı zamanda p53 tümör baskılayıcı proteinini de etkilemektedir. p53 normal şartlar altında oldukça kararsız bir proteindir ve Mdm-2 protein etkisi sırasında p53 inaktive edilir. Mdm-2 bir E3 enzimidir. p53 ubikuitinasyonu ve ardından 26S proteozom ile yıkımı sırasında p53 stabilizasyonunun negatif düzenleyicisi olarak etki gösterir. Ek olarak, gankyrin Mdm-2 ile hem in vitro hemde in vivo etkileşmektedir. Bu etkileşim p53 için Mdm-2'nin hem birlikteliğini hemde aktivitesini artırır. Bu gankyrin aracılı artmış Mdm-2 ve p53 etkileşimi artmış ubikuitinasyona ve ardından p53'ün proteozomal yıkımına neden olur. pRb proteini, gankyrin aracılı Mdm-2 ve p53 etkileşmesini engelleyebilir ve bu sayede p53 ubikuitinasyonunu ve hemen ardından

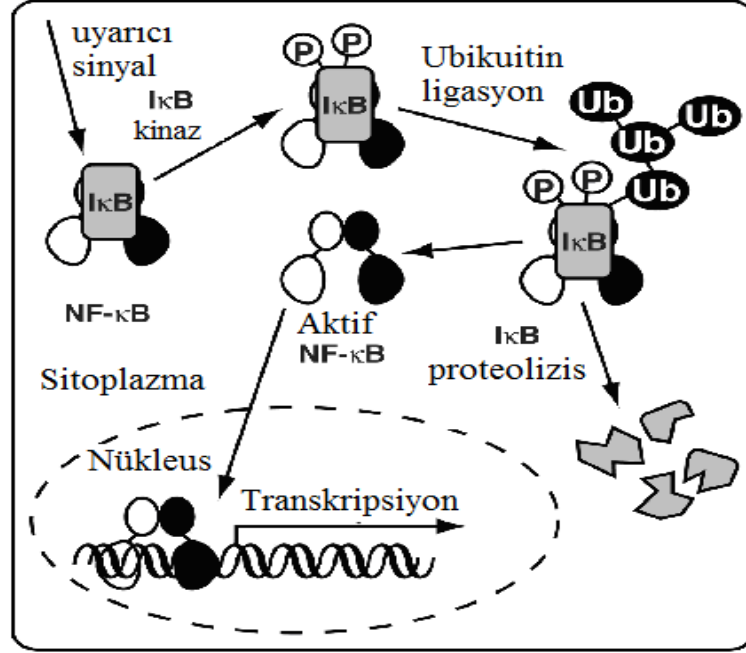
yıkımını engeller. Bu veriler; pRb'nin gankyrin aracılı Mdm2-p53 etkileşimini bozarak p53 stabilizasyonunu etkilediği görüşü ile uyumludur. Ancak artmış Mdm-2 veya gankyrin ekspresyonu (çoğu zaman kanserde olduğu gibi) durumunda pRb yıkılır, bu yüzden p53'ünde yıkımını artırır (Şekil 2.16) (53).



Şekil 2.16. Gankyrin aracılı Mdm-2 - p53 etkileşimi ve p53 yıkımında pRb regülasyonu modeli (53)

Son yıllardaki çalışmalar, ubikuitin proteozom sisteminin Nükleer faktör kapa B (NF- κ B) aktivasyonu ile sonuçlanan sinyal kaskatlarında çok çeşitli roller oynadığını göstermektedir. Çeşitli immünolojik uyarılara yanıt olarak transkripsiyonel hücre düzenlemeleri, transkripsiyon düzenleyici faktör, NF- κ B ile ayarlanır. Çalışmalarda, ubikuitin proteozom sistem bileşenlerinin genetik bozuklukları ile NF- κ B sinyal sistemi bozukluklarının hepatosellüler karsinoma patogenezi ile birlikte olduğu belirtilmiştir. Ubikuitin proteozom sistem bileşenlerinin selektif inhibisyonu ile NF- κ B blokajı gerçekleştirilebilir. Bunun, ilaç üretimi için yeni ve verimli bir hedef olduğu konusunda bilgi verilmiştir. İnaktif NF- κ B sitoplazmada nukleusa translokasyonu inhibe eden inhibitör κ B- α (IB)'ye bağlı olarak bulunur. Patojenler (virüs-bakteri), radyasyon, bazı kemoterapötik ajanlar, sitokinler (TNF- α , IL-1) hücre içi sinyal ileti yoluyla NF- κ B'yi aktive eder. Bu aktivasyon da apoptoz inhibisyonuna neden olur. Ubikuitin, IB'ye kovalent bağlanır, fosforile olur, fosfo IB hızla 26S proteozom tarafından yıkılır, NF- κ B'nin nükleer translokasyonu gerçekleşir (Şekil 2.17). Böylece aktive NF- κ B

antiapoptotik etki gösterir. Ubikuitin proteozom yolu inhibe edilerek NF- κ B transkripsiyonel faktörün blokajı tümör hücre ölümünü fazla miktarda artırır (53).



Şekil 2.17. NF- κ B aktivasyonu (208)

2.4. Dipyrido[3, 2-a:2', 3'- c]phenazine (dppz) Au(III) kompleksi ([Au(dppz)Cl₂]Cl)

Çeşitli hastalıkların tedavisi için Çinli ve Arap hekimlerin altın kullanımı çok eskilere dayanmaktadır. Daha yakın zamanlarda, Koch'un Au(CN)₂⁻ nin bakteriositatik etkisini göstermesi ile altın bileşiklerinin farmakolojik aktivitesi için bilimsel bir temel sağlanmış oldu. Romatoid artritli hastalarda altın bazlı bileşikler tedavide kullanılmaktadır. Sonradan altın bileşiklerinin anti-tümör aktiviteleri araştırılmaya başlanmıştır ve daha yakın zamanlarda ise anti-HIV etkileri araştırılmaktadır (194).

Altın bileşiklerinin tıpta kullanımına krizoterapi denilmektedir (194). Son yıllarda tıbbi inorganik kimyada altın yaygın olarak kullanılmaktadır (140). Anti-

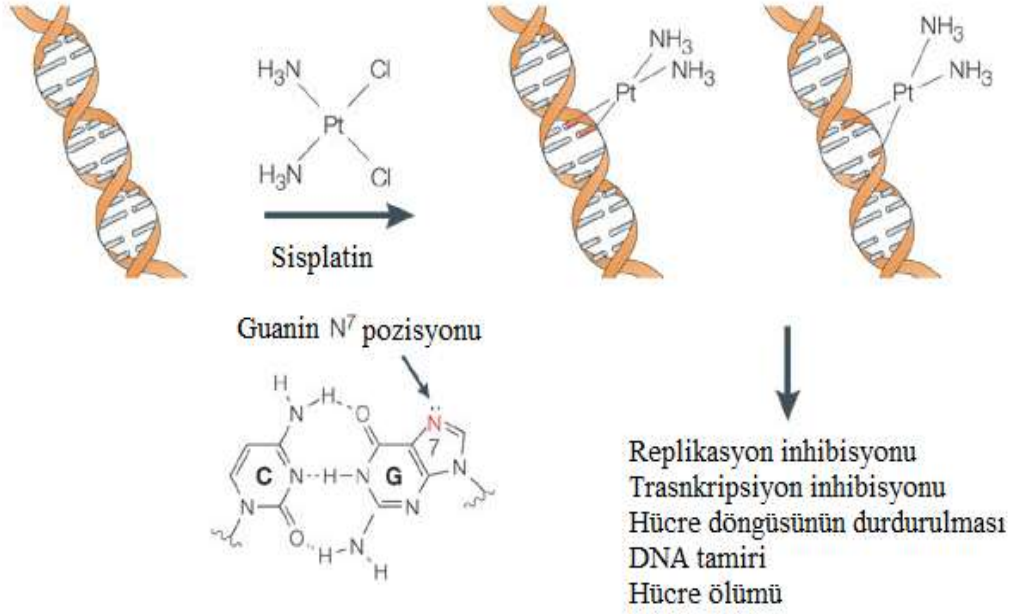
inflamatuvar ve immünsupresiv etkileri nedeniyle romatoid artritli hastalarda kullanılmakta olan bazı Au(I) bileşikleri olası antikanser etkileri düşünülerek araştırılmıştır. Gerçekten de, Au(I) thiomalate, Au(I) thioglukoz ve auranofin gibi bazı klinik olarak kullanılan antiartritlik Au(I) bileşikleri hem in-vitro hem de in-vivo'da önemli antitümör aktivite göstermişlerdir (13).

Yaklaşık son 20 yıldır, potansiyel antikanser ajanı olarak Au(III) bileşikleri yeni bir merak oluşmuştur. Böylece çok sayıda Au(III) hedefleri araştırılmıştır. Au(III) komplekslerinin çoğu grubu önemli antikanser aktiviteye sahip olabilir. Bunlar, Au(III) koordine kompleksler, Au(III) biyoligand içeren kompleksler ve organometalik Au(III) türleri olarak sınıflandırılabilir (154).

Güçlü bir antitümör aktiviteye sahip olan inorganik kompleks sisplatin birçok insan solid karsinomasında tedavide yaygın olarak kullanılmaktadır. Sisplatin, metastatik nasofarenjal karsinomada etkili olmasına ve küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde sağ kalımı uzatmasına rağmen hepatosellüler karsinomalı hastalarda sisplatine genel yanıt oranı düşüktür ve hasta yaşam süresini uzatmada başarılı değildir. Bu nedenle hepatosellüler karsinoma tedavisinde yeni ve toksik olmayan bir ajana ihtiyaç duyulmaktadır (124).

Aynı zamanda Au(III) kompleksleri, antitümör platin kompleksleri gibi invitro'da önemli sitotoksik etkiler göstermektedir (140). Altın, Au(III) oksidasyon durumunda sisplatin ile izoelektronik ve izoyapısaldır ve benzer squar planar yapı göstermektedir. Pt(II) kompleksine benzer DNA adduct'ları oluşturabileceği mantığı üzerine araştırmalar yapılmıştır (Şekil 2.18) (116). Şimdiye kadar Au(I) türevlerinin potansiyel antikanser aktiviteleri yaygın olarak araştırılmıştır. Au(III) komplekslerinin fizyolojik koşullardaki zayıf stabilitesi alternatif bir antitümör ajan olmalarını engellemiştir (13). Au(III)'ün fizyolojik şartlarda Au(I)'e indirgenmektedir (116). Au(III) metal merkezinin stabilitesi multidentate ligandların koordinasyon tarafından geliştirilmiştir (13). Bu nedenle araştırmalarda Au(III) oksidasyon durumu bazı ligandlar ile stabil hale getirilmektedir (116). Bioaktif moleküllerin-metal merkezlere koordinasyonu, orijinal molekülden daha fazla terapötik etkili yeni bileşiklerle sonuçlanır. Metal bileşiklerin artan aktivitelerinin sebebi normal metabolik yollardan

korunmaları ve yavaş salınım mekanizmaları olabilir (194). Fakat fazla stabilizasyon biyolojik aktivite kaybına neden olabilir (13).



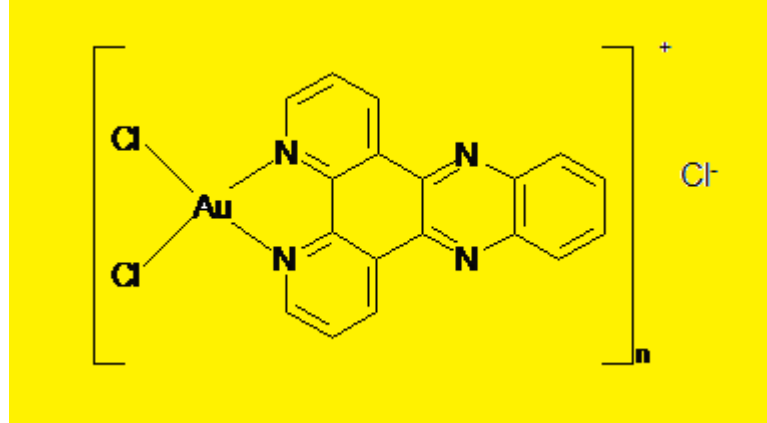
Şekil.2.18. Sisplatin etki mekanizması (58)

Maruyama ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada dipirido [3,2-a:2',3'-c] (dppz) fenazin ligand içeren komplekslerin DNA'ya yüksek bağlanma affinitesine sahip olduğu rapor edilmiştir. Bu kompleksler diğer komplekslerden daha fazla bağlanma affinitesi göstermektedir. Çünkü dppz ligand, bir DNA sarmalının baz çifti arasına eklenebilir (128).

Antikanser ajanların mekanizmasını anlamak için, hücrenin ölümünü tetikleyen olayların kademelerine karışan moleküler bileşenleri tanımlamak büyük önem taşımaktadır. Pt ve Au bileşiklerinin kimyasal benzerliği nedeniyle her ikisinde hedefinin DNA olabileceğine inanılmaktadır. Bununla birlikte in-vitro'da Au(I) ve Au(III) komplekslerinin DNA ile direkt interaksyonu belirlenmekle birlikte diğer hücresel komponentlerle de interaksyon verdikleri belirtilmiştir. Diğer yandan Au

komplekslerinin sitotoksitelerini gösterebilmeleri için mitokondrinin uygun bir hedef olabileceği belirtilmiştir. Özellikle mitokondriyal tiyoredoksin redüktaz auronafin, aurothiomalate ve diğer Au(I) triethylposphine türevleri gibi altın bileşikleri için oldukça özel hedef olabileceği belirtilmiştir (13).

Birçok çalışmada altın komplekslerinin DNA ile etkileşime interkalasyon yolu ile girdiği belirtilmiştir. M. Navara ve ark. çalışmalarında altın kompleksi ve DNA arasında interkalasyon gözlemiştir. Spektroskopik titrasyon ile DNA ve metal kompleksi arasında interkalasyonun belirlenmesine rağmen interkalasyonun türü hakkında bilgi vermemektedir. İnterkalativ interaksiyonlar ile DNA heliks yapısındaki değişimleri değerlendirmek için bazı çalışmalar yapılmaktadır. Çalışmalarda klasik bir interkalatör olan etidyum bromid ve birçok dppz-metal kompleksi rapor edilmiştir. DNA viskozitesinin ölçümünde $[Au(dppz)Cl_2]Cl$ kompleksinin (Şekil 2.19) farklı konsantrasyonları önem taşımaktadır. Altın kompleksinin konsantrasyonlarındaki artış DNA viskozitesini arttırmaktadır. Bu durum $[Au(dppz)Cl_2]Cl$ kompleksinin bir DNA interkalatörü olduğunu göstermektedir (140).



Şekil 2.19. $[Au(dppz)Cl_2]Cl$ kompleksinin moleküler formülü

DNA anti-kanser ilaçlar için başlıca hedeftir ve Au(III) bileşiklerinin DNA'ya bağlanması yaygın olarak çalışılmıştır (215). Calamai ve arkadaşları, bir square planar Au(III) kompleksinin DNA'ya karşı iyi bağlanma özelliğini göstermişlerdir. DNA'ya bağlanma yeteneği, sitotoksik etki mekanizmasını gösterebilir. Etki mekanizmasında

antitümör metal komplekslerinin toksik etkilerinde metal-protein etkileşimleri anahtar rol oynamaktadır. Bu durum, DNA antitümör metal ilaçları için ilkin hedef olduğu örnekleme hızla reddetmekte ve artık geçersiz hale getirmekte olduğu için daha önemli olduğu belirtilmektedir (32).

Ancak Au(III) komplekslerinin DNA ile interkalasyonunun zayıf olduğunun gösterilmesi, DNA'nın primer hedef olmadığını göstermektedir (116). Kanser kontrolsüz hücre çoğalmasıyla karakterize olması nedeniyle, kemoterapötik indüklü apoptoza büyük ilgi vardır (215). Mitokondri, yeni kanser ilaçlarının geliştirilmesinde apoptozun regülasyonunda kilit bir rol oynaması nedeniyle önemli bir hedef olmaktadır. Birçok altın içerikli bileşiğin, anti-tümör etkilerini mitokondriyal hücre ölümünü kapsayan mekanizmalar ile gösterdiklerine dair deliller vardır. Au(III) komplekslerini içeren birçok çalışmada bu bileşiklerin mitokondriyal fonksiyonlar ve mitokondriyal tiyoredoksin redüktaz üzerine etkileri araştırılmıştır. Bu bileşiklerin mitokondriyal zar geçirgenliğini artırdıkları belirlenmiştir. Buna ilaveten, Au(III) kompleksleri tiyoredoksin redüktazı inhibe ettikleri gösterilmiştir. Fakat bu durumda Au(III) oksidasyon durumunun stabil olup olmadığı belirlenememiştir. Over kanserinde Au(III) komplekslerinin sitotoksisite mekanizması araştırılmıştır. Bu bileşiklerin hücre döngüsü üzerine sadece ılımlı bir modifikasyon yaparken, apoptozu sisplatinden daha fazla indükledikleri belirlenmiştir (116).

Au(III) porfirinla ile yapılan çalışmalarda mitokondrinin temel hedef olduğu gösterilmiştir. Au(III) porfirinla, hem kaspaz bağımlı hemde kaspaz bağımsız mitokondriyal yollar ile apoptozu indüklemektedir. Bu kompleksin reaktif oksijen türlerini arttırdığı ve membran geçirgenliğini değiştirerek mitokondri membran potansiyelinin ($\Delta\Psi_m$) indüklenmesine neden olduğu önerilmiştir (185).

Au(III) ditiyokarbamat anti-tümör kompleksinin, insan tümör hücre kültürü çalışmalarında sisplatinden daha fazla sitotoksik etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Bu kompleks DNA ile etkileşmekte fakat primer hedefi DNA değildir. Birçok raporda mekanizmasının proteozom inhibisyonu ile ilgili olduğu belirtilmiştir. Proteozom inhibisyonunun mekanizması bilinmemekte fakat bu bileşiğin reaktif oksijen türlerinin üretimini arttırarak proteozomları okside ve inaktive ettiği önerilmiştir (116).

Au(III)tetra porfirin ile yapılan çalışmada bu kompleksin Hepatosellüler karsinoma ve nazofarengal karsinomada in-vitro ve in-vivo çalışmalar ile anti-kanser etkileri belirlenmiştir. Apoptoz ile bağlantılı birçok genin transkripsiyon ve translokasyonunun ve proteinlerin ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (215).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. GEREÇ

3.1.1. DENEY HAYVANLARININ TEMİNİ VE BAKIMI

Çalışmamız için gerekli olan Etik Kurul raporu Eskişehir Osmangazi Üniversitesi (ESOGÜ) Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurulu tarafından değerlendirilmiş ve 124 numaralı karar numarası ile kabul edilerek onaylanmıştır. Araştırmamızda ölçümü yapılacak olan parametreler için gerekli malzemelerin sağlanabilmesi amacıyla çalışma proje haline getirilmiştir. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri komisyonunca desteklenen 201011044 nolu proje 31 Aralık 2010 tarihinde proje komisyonundan onay almıştır.

Çalışmamızda kullanılan sıçanlar Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıbbi Cerrahi Araştırma Merkezi'nden temin edilmiştir. Deney Hayvanları 12 saat karanlık 12 saat aydınlık ortamda, %45-65 nem oranı 22 ± 1 °C sabit oda ısısı sağlanan ESOĞÜ Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarında barındırılmıştır. Sıçanlara yem ve su kısıtlaması yapılmamıştır ve temizlik kurallarına dikkat edilmiştir.

3.2. YÖNTEM

3.2.1. DOZ VE DENEY GRUPLARININ BELİRLENMESİ

3.2.1.1. Dipyrido[3, 2-a:2', 3'- c]phenazine (dppz) Au(III) Kompleksinin Sentez ve Doz Çalışmaları

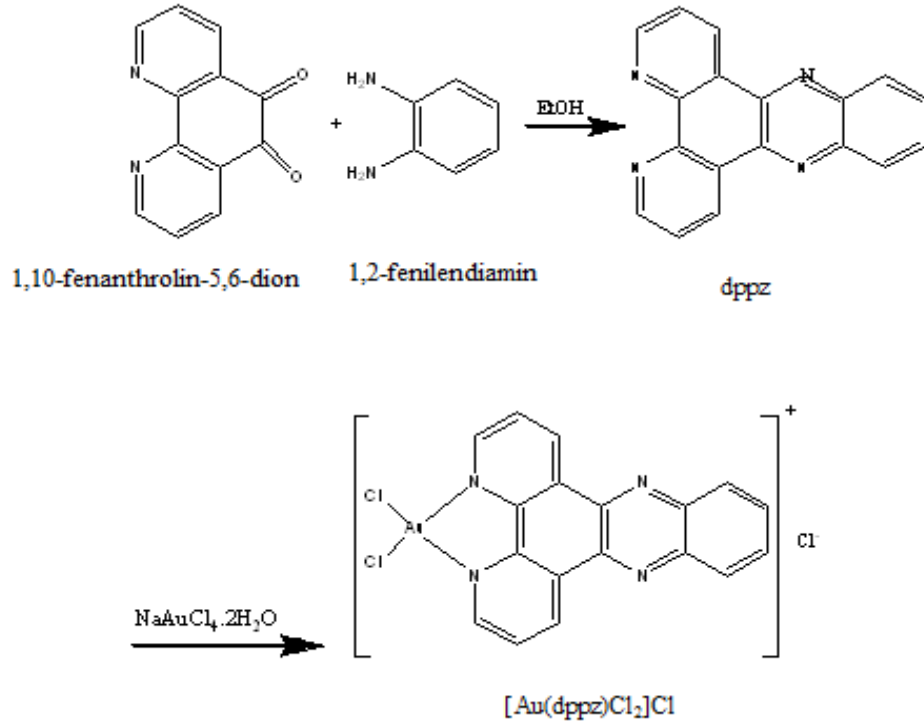
Dipyrido[3, 2-a:2', 3'- c]phenazine (dppz) Au(III) kompleksi Anadolu Üniversitesi Bitki İlaç ve Bilimsel Araştırma Merkezinde (AÜBİBAM) sentezlendi. Dipyrido[3, 2-a:2', 3'- c]phenazine (dppz) Au(III) kompleksi ile daha önce deney hayvanları üzerinde çalışma yapılmamıştır. Bu nedenle kullanılabilcek olan en uygun

dozu belirlemek amacıyla Dipyrido[3, 2-a:2', 3'- c]phenazine (dppz) Au(III) kompleksinin akut toksisite çalışması yapıldı.

a. Dipyrido[3, 2-a:2', 3'- c]phenazine (dppz) Au(III) Kompleksinin Sentez Çalışması

Bu tez çalışması kapsamında, ligand olarak dipyrido[3,2-a:2',3'-c]fenazin (dppz) kullanılarak, $[\text{Au}(\text{dppz})\text{Cl}_2]\text{Cl}$ kompleksi sentezlenmiştir.

Sodyum tetrakloroaurat dihidrat ($\text{NaAuCl}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 1,10-fenanthrolin-5,6-dion ve reaksiyonlarda kullanılan reajan ve çözücüler satın alınarak temin edildi. Ürünlerin elde edilmesi için yürütülen kimyasal reaksiyonlarda izlenen yol reaksiyon şemasında ayrıntılı olarak gösterilmektedir (Şekil 3.1.)



Şekil 3.1. $[\text{Au}(\text{dppz})\text{Cl}_2]\text{Cl}$ sentezi reaksiyon şeması

Reaksiyonlar İnce Tabaka Kromatografi (İTK) yöntemi ile izlenmiş, bileşiklerin yapıları, elementel analiz, İnfrared (IR) spektroskopisi, ¹H Nükleer Manyetik Rezonans (¹H NMR) spektroskopisi ve kütle analizleri ile aydınlatıldı. Elementel analizler için Perkin-Elmer elementel analiz cihazı kullanıldı ve İnfrared analizleri Perkin-Elmer Fourier Transform İnfrared (FT-IR) spektrofotometre cihazında 4000-200 cm⁻¹ aralığında, KBr pellet ile gerçekleştirildi. ¹H-NMR spektrumları çözücü olarak döteryumlu DMSO (DMSO-d₆) kullanılarak, Bruker DX400 cihazında alındı. Tüm analizler AÜBİBAM'da yapıldı.

Dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazin (dppz)

1,10-fenanthrolin-5,6-dion ve 1,2-fenilendiamin etanol içerisinde 2 saat 30-40°C'de geri soğutucu altında karıştırıldı. Çöken ürün etanol-su kullanılarak kristallendirildi (214, 57). (C₁₈H₁₀N₄ ; % C: 76.58; H: 3.57; N: 19.85). IR (KBr) V_{max} (cm⁻¹): 3148, 3110, 3075 (Ar C-H), 1645, 1630, 1450, 1391 (C=N, C=C). ¹H-NMR(300 MHz) (DMSO-d₆) δ(ppm) : 7.5-7.8 (6H, m), 8.3-8.8 (4H, m). MS(EI) (m/z): 282.3 (M⁺).

Dipyrido[3, 2-a:2', 3'- c]phenazine (dppz) Au(III) kompleksi

[Au(dppz)Cl₂]Cl literatür yöntemi kullanılarak elde edildi (126). Ligand ve NaAuCl₄.2H₂O, etanol-su içeren karışımında, 1 saat, 30°C'de karıştırıldı. Çökelek süzülerek alındı, birkaç defa su ve dietileter ile yıkanmış, süzölmüş ve vakum altında desikatörde kurutuldu. Kuruyan ürün aseton ve dietil eter kullanılarak kristallendirildi. (C₁₈H₁₀AuCl₃N₄ ; % C: 36.92; H: 1.72; N: 9.57). IR (KBr) V_{max} (cm⁻¹): 3175, 3110, 3081 (Ar C-H), 1650, 1624, 1450, 1382 (C=N, C=C), 327 (Au-Cl), 290 (Au-N). ¹H-NMR(300 MHz) (DMSO-d₆) δ (ppm) : 7.7-7.9 (6H, m), 8.5-8.9 (4H, m). MS(EI) (m/z): 585.6 (M⁺).

Sonuç

Ürünlerin elemental analiz, ¹H NMR (154) ve IR (130) analiz sonuçları beklendiği şekilde elde edildi. Komplekslerin ¹H NMR spektrumlarında, polipiridil yapıdaki ligandın taşıdığı azot atomlarının aktivasyonundan dolayı koordinasyona bağlı çoklu pikler literatüre uygun olarak tespit edildi. Infrared spektrumlarında, N-H, C=N ve C=C gerilim bandları 3175-3075 ve 1650-1396 cm⁻¹, M-Cl bandları 390–320 cm⁻¹'de yine literatür verileri ile uyumlu olarak görüldü.

b. Dipyrido[3, 2-a:2', 3'- c]phenazine (dppz) Au(III) Kompleksinin Akut Toksikite çalışması

Çalışmada her biri 2 aylık Spraque-Dawley türü 5 rat içeren 9 grup oluşturulmuştur. Birinci gruba sadece 1 ml DMSO uygulandı. Diğer gruplara ise sırasıyla 2mg/kg, 4 mg/kg, 8 mg/kg, 16 mg/kg, 32 mg/kg, 64 mg/kg, 128 mg/kg ve 256 mg/kg [Au(dppz)Cl₂]Cl kompleksi 1 ml DMSO içerisinde çözdürülerek verildi. Hayvanlar tartıldı ve dozlar ağırlıklarına göre verildi. Tüm uygulamalar i.p. olarak yapıldı. 72 saat sonra çalışma gruplarındaki ölü hayvanlar sayıldı. Probit analizi metodu uygulanarak lethal doz (LD) düzeyleri (LD1, LD10, LD50, LD90, LD99) hesaplanmıştır. LD50 çalışmasının sonuçlarına göre toksik değerlere ulaşmayacak şekilde ayarlanmış doz olarak 2 mg/kg'lık dozun deney gruplarına uygulanmasına karar verildi.

3.2.1.2. Deney Grupları

Çalışmamızda, 48 adet 2 aylık erkek Spraque-Dawley türü sıçanlar kullanıldı. Deney hayvanlarından her grupta 8 tane olmak üzere 6 grup oluşturuldu (Tablo 3.1).

Tablo 3.1. Deney grupları ve deney gruplarının özellikleri

Gruplar	Gruplardaki sıçanların özellikleri
Grup I (8)	Bu gruptaki sıçanlar 13 hafta boyunca standart sıçan yemi ve içme suyu ile beslendiler.
Grup II (8)	Bu gruptaki sıçanlara deneyin birinci gününde 0,1 ml DMSO i.p. olarak uygulandı. İki hafta süresince hiçbir uygulama yapılmadı. İki hafta sonra tekrar haftada bir kez olmak üzere 0,1 ml DMSO i.p. olarak deney bitimine kadar (11 hafta) uygulandı. Bu gruptaki hayvanlar deney süresince (13 hafta) standart sıçan yemi ve içme suyu ile beslendiler.
Grup III (8)	Deney başlangıcından iki hafta sonra başlayarak haftada bir kez olmak üzere 2mg/kg [Au(dppz)Cl ₂]Cl kompleksi 0,1 ml DMSO içerisinde çözdürülerek i.p. olarak deney bitimine kadar (11 hafta) uygulandı. Bu gruptaki hayvanlar deney süresince (13 hafta) standart sıçan yemi ve içme suyu ile beslendiler.
Grup IV (8)	Deneyin birinci gününde 175 mg/kg DEN 0,1 ml DMSO içerisinde çözdürülerek sıçanlara i.p. olarak uygulandı. Dietilnitrozamin uygulamasından sonra 2 hafta süreyle hiçbir uygulama yapılmadı. İkinci haftadan sonra FB, 500 ppm (62) olacak şekilde günlük olarak içme suyu ile birlikte deney bitimine kadar (11 hafta) sıçanlara verildi.
Grup V (8)	Deneyin birinci gününde 175 mg/kg DEN 0,1 ml DMSO içerisinde çözdürülerek sıçanlara i.p. olarak uygulandı. Dietilnitrozamin uygulamasından sonra 2 hafta süreyle hiçbir uygulama yapılmadı. İkinci haftadan sonra FB, 500 ppm (62) olacak şekilde günlük olarak içme suyu ile birlikte deney bitimine kadar (11 hafta) sıçanlara verildi. Fenobarbital uygulaması ile başlayarak haftada bir kez olmak üzere 2mg/kg [Au(dppz)Cl ₂]Cl kompleksi 0,1 ml DMSO içerisinde çözdürülerek i.p. olarak deney bitimine kadar sıçanlara uygulandı.
Grup VI (8)	Deneyin birinci gününde 175 mg/kg DEN 0,1 ml DMSO içerisinde çözdürülerek sıçanlara i.p. olarak uygulandı. Dietilnitrozamin uygulamasından sonra 2 hafta süreyle hiçbir uygulama yapılmadı. İkinci haftadan sonra FB, 500 ppm (62) olacak şekilde günlük olarak içme suyu ile birlikte deney bitimine kadar (11 hafta) sıçanlara verildi. Bu grupta [Au(dppz)Cl ₂]Cl kompleksi uygulamasına deneyin yedinci haftasında haftada 1 kez 2mg/kg DMSO içerisinde çözdürülerek i.p. olarak deney bitimine kadar uygulandı.*

*Yapılan ön çalışmada preneoplastik fokus oluşumuna ve hücrel inflamasyona 7. haftada rastlanılması nedeni ile Grup VI'da [Au(dppz)Cl₂]Cl kompleksi uygulamasına bu haftadan itibaren başlandı.

3.2.2. DENEY HAYVANLARINDAN ÇALIŞILACAK ÖRNEKLERİN ALINMASI

Deney bitiminde hayvanlardan ketamine-ksilazine (3.4 mg/kg, 172.4 mg/kg) (100) ile anestezi uygulandıktan sonra serum örnekleri için kardiyak yolla kanları alındı ve karaciğerleri çıkartıldı. Biyokimya tüplerine alınan kan örnekleri 20 dakika bekletildikten sonra 3500 g'de 15 dakika santrifüj edildi ve üstte kalan serum Aspartat aminotransferaz (AST), Alanin amino transferaz (ALT) ve Laktat dehidrogenaz (LDH) ölçümü için kullanıldı. Sıçanlardan alınan karaciğer örnekleri soğuk (4°C) %0,9'luk sodyum klorürle üç kez yıkama yapıldıktan sonra parçalara ayrıldı. Bir kısmı p53, kaspaz 3 ve DNA fragmantasyonu ölçümü için derin dondurucuda -80°C'de saklandı. Diğer bir kısmı da immunohistokimyasal inceleme (Bcl-2, Bax ve ubikuitin), TUNEL ve ışık mikroskopide histopatolojik inceleme için nötral formaline alındı.

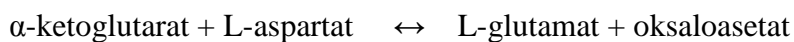
3.2.3. SERUM AST, ALT VE LDH ÖLÇÜMÜ

AST, ALT ve LDH'nın ölçümünde Roche Modular otoanalizörle uyumlu kantitatif test kitleri (Roche Diagnostics) kullanıldı.

AST ölçüm prensibi:

AST tarafından katalizlenen aşağıdaki reaksiyon ile artan oksaloasetat, Malat dehidrojenaz'ın (MDH) katalizlediği reaksiyon ile malata dönüşürken NADH'da oksitlenerek NAD⁺ye dönüşür.

AST



MDH



Oksaloasetatın oluşum hızı ve dolayısıyla AST aktivitesindeki artışla direkt orantılı olarak NADH miktarındaki azalma fotometrik olarak ölçülür.

ALT ölçüm prensibi:

ALT tarafından katalizlenen aşağıdaki reaksiyon ile artan piruvat, LDH'nin katalizlediği reaksiyon ile laktata dönüşürken NADH'da oksitlenerek NAD⁺ye dönüşür.

ALT



LDH



NADH'da meydana gelen azalma piruvat oluşumu ile ve ALT aktivitesi ile doğru orantılıdır ve fotometrik olarak belirlenir.

LDH ölçüm prensibi:

LDH, piruvatın laktata dönüşümünü katalizler ve bu esnada NADH oksitlenir ve NAD⁺ oluşur. NADH'deki azalma oranı direkt olarak LDH aktivitesi ile orantılıdır ve fotometrik olarak belirlenir.

LDH



3.2.4. KARACİĞER DOKUSUNDA KASPAZ 3 ÖLÇÜMÜ

Kaspaz 3 ölçümü için USCN Elisa kiti (katolog numarası: E90626Ra) kullanıldı. Ölçümler Victor X3 multiplate okuyucu ile yapıldı.

Ölçüm Prensipleri

Ölçüm kantitatif sandviç enzim immün assay tekniğine dayanmaktadır. Kit içerisinde kaspaz 3 spesifik monoklonal antikorlar ile kaplı mikrotiter plate bulunmaktadır. Standart ve örnekler kaspaz 3 için spesifik biotinle konjuge poliklonal antikorlar ile kaplı mikrotiter plate eklenir. Sonra, avidin ile konjuge Horseradish Peroksidaz platedeki her bir kuyucuğa eklenir ve inkübe edilir. Her bir kuyucuğa tetra metil benzidin (TMB) substrat solüsyonu eklenir. Yalnızca kaspaz 3 içeren kuyucuklar biotinle konjuge antikor ve enzim konjuge Avidin ile renk oluşturur. Enzim substrat reaksiyonu stop solüsyonunun eklenmesi ile sona erer ve spektrofotometrik olarak 450 nm dalga boyunda renk değişimi ölçülür. Sonuçlar 4 parametre standart eğrisine göre otomatik olarak hesaplandı ve yaş doku ağırlığına oranlanarak ng/g yaş doku olarak ifade edildi.

Karaciğer Doku Örneklerinin Hazırlanması

Kaspaz 3 ölçümü için karaciğer dokuları eşit ağırlıkta parçalara bölündü ve fosfat tampon çözeltisinde (PBS) homojenizatör ile homojenize edildi. Homojenatlar 5000xg'de 5 dakika santrifüj edildi.

1. Kit içerisindeki reaktifler hazırlandı.
2. Tüm örnekler ve kit içerisindeki reaktifler kullanım öncesi oda ısısına getirildi.

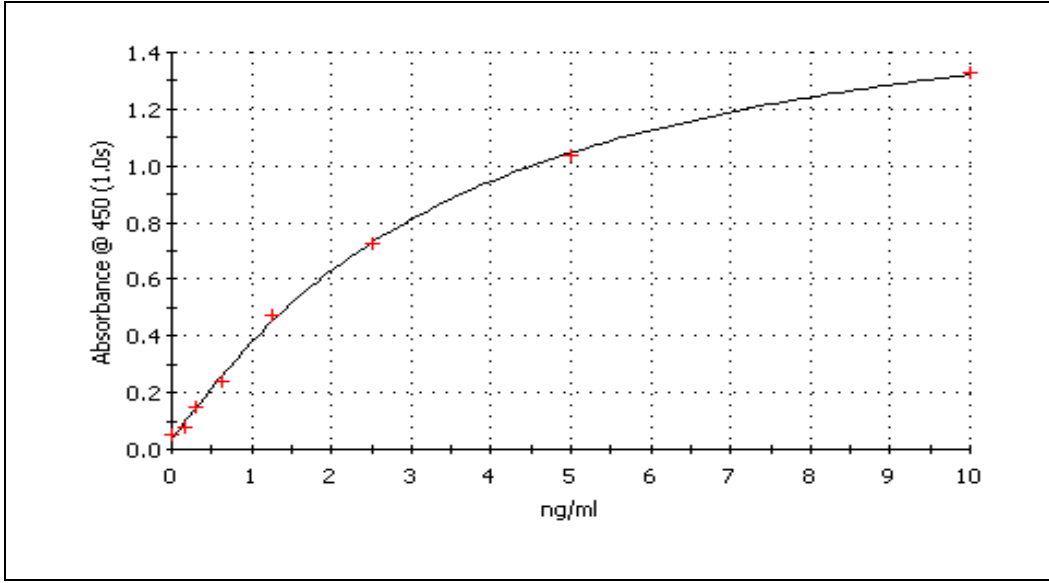
Ölçüm Yöntemi

1. Standart, blank ve örnekler için kuyucuklar belirlendi. 100 µl standart, blank ve örnekler belirlenen kuyucuklara pipetlendi. Plate koruyucu strip ile kaplandı ve 2 saat 37 °C'de inkübe edildi.
2. Yıkama yapılmadan kuyucuktaki sıvılar uzaklaştırıldı.

3. 100 µl Reaktif A çalışma solüsyonu her bir kuyucuğa eklendi. Plate koruyucu strip ile kaplandı ve 1 saat 37 °C’de inkübe edildi.
4. Platedeki solüsyonlar aspire edildi. Her bir kuyucuğa 350 µl yıkama solüsyonu eklenildi ve 1-2 dakika beklenildikten sonra bütün kuyucuklardaki solüsyonlar uzaklaştırıldı. Bu işlem 3 defa tekrarlandı. Plate kurutma kağıdı üzerinde ters çevirilerek kurutuldu.
5. 100 µl Reaktif B çalışma solüsyonu her bir kuyucuğa eklendi ve plate koruyucu strip ile kaplanarak 30 dakika 37 °C’de inkübe edildi.
6. Tekrar aspirasyon işlemi yapıldı ve 4. basamaktaki işlemler 5 kez tekrarlandı.
7. Her kuyucuğa 90 µl TMB substrat solüsyonu eklendi. Plate, koruyucu strip ile kaplandı ve 15 dakika ışıktan korunarak inkübasyona bırakıldı.
8. Her kuyucuğa 50 µl stop solüsyonu eklendi sonra mikropate okuyucuda 450 nm dalga boyunda absorbanslar okundu.

Sonucun Hesaplanması

Mikropate okuyucuya bağlı bilgisayar yazılımı ile 4 parametre standart eğrisine göre otomatik olarak hesaplandı (Grafik 3.1). Hesaplama sonucu ng/g yaş doku ağırlığı olarak bulunan sonuçlar, yaş doku ağırlığına oranlanarak ng/g yaş doku olarak ifade edildi.



Grafik 3.1. Kaspaz 3 standart grafiği (Grafik VICTOR™ X3, PerkinElmer Inc., USA, Plate okuyucuda, WorkOut 2.5, DAZAQ LTD, programında çizilmiştir)

3.2.5. KARACİĞER DOKUSUNDA p53 ÖLÇÜMÜ

p53 ölçümü için ROCHE p53 pan Elisa kiti (katolog numarası: 11828789001) kullanıldı.

Ölçüm prensibi

Ölçüm kantitatif sandviç enzim immün assay tekniğine dayanmaktadır. Streptavidin kaplı mikrotiter platette, biotinle işaretli antikorlar bağlı olarak bulunmaktadır. Tek inkübasyon basamağı sırasında p53 içeren örnekler, bağlı antikorlar ve peroksidaz etiketli antikorlar ile stabil bir immün-kompleks oluşturmak üzere reaksiyona girer. Yıkama basamağını takiben kompleksteki peroksidaz, substratı olan TMB ile reaksiyona girer. Enzim substrat reaksiyonu stop solüsyonunun eklenmesi ile sona erer ve spektrofotometrik olarak 450 nm dalga boyunda renk değişimi ölçülür. Fotometrik olarak belirlenen renk p53'ün konsantrasyonu ile orantılıdır. Sonuçlar 4 parametre standart eğrisine göre otomatik olarak hesaplandı ve yaş doku ağırlığına oranlanarak, pg/g yaş doku olarak ifade edildi.

Karaciğer Doku Örneklerinin Hazırlanması

Sıçanlardan alınan karaciğer dokusunda p53 ölçümü için dokular eşit ağırlıkta parçalara ayrıldı ve RIPA buffer ile homojenizatörde homojenize edildi. Hazırlanan homojenizatlar 10000xg'de 10 dakika santrifüj edildi.

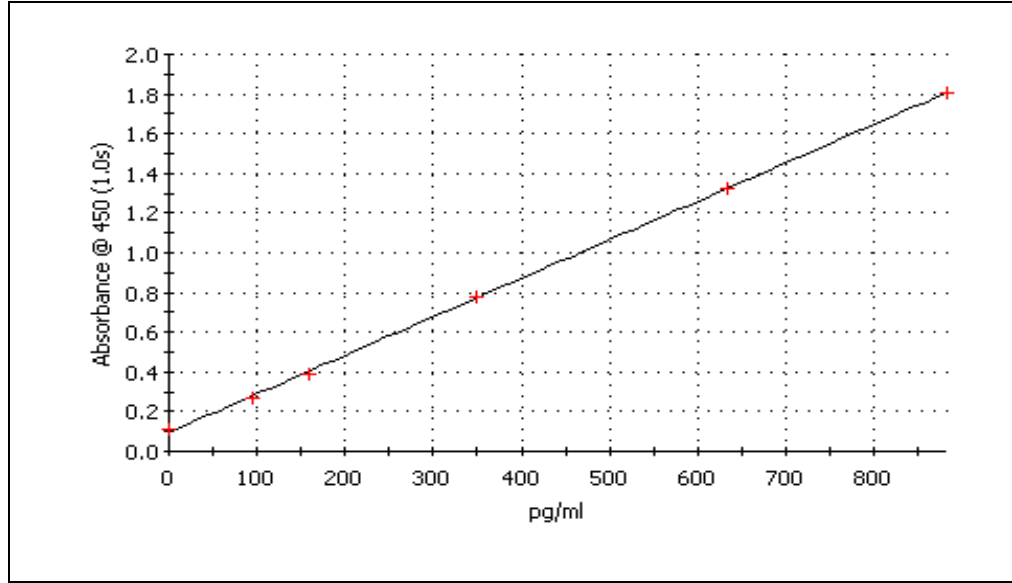
- 1.Süpernatant 1:5 oranında örnek dilüenti ile dilüe edildi.
- 2.Kit içerisindeki reaktifler hazırlandı.
- 3.Tüm örnekler ve kit içerisindeki reaktifler kullanım öncesi oda ısısına getirildi.

Ölçüm Yöntemi

1. Açılan mikropalte önceden numaralandırılmış olan kuyucuklara 100 µl standart ve örnekler pipetlendi.
2. Her bir kuyucuğa 100 µl anti-human p53 pan peroksidaz (POD) eklendi.
3. Mikrotiter plate, koruyucu striple kaplandı ve 2 saat boyunca 15-25 °C'de shaker'da inkübe edildi.
4. İnkübasyon sonunda otomatik plate yıkayıcıda bir kuyucuğa bir seferinde 300 µl pipetlenecek şekilde yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkandı. Plate ters çevirilerek kurutma kağıdı ile kurutuldu.
5. Her bir kuyucuğa 200 µl TMB substrat solüsyonu eklendi. Mikrotiter plate koruyucu striple kaplandı ve oda sıcaklığında shaker'da 10-20 dakika inkübe edildi.
6. Her bir kuyucuğa 50 µl stop solüsyonu eklenerek reaksiyon durduruldu.
7. Stop solüsyonu eklendikten 5 dakika sonra mikropalte okuyucuda 450 nm dalga boyunda absorbanslar okundu.

Sonucun Hesaplanması

Mikroplate okuyucuya bağı bilgisayar yazılımı ile 4 parametre standart eğrisine göre otomatik olarak hesaplandı (Grafik 3.2). Hesaplama sonucu pg/ml olarak bulunan sonuçlar, yaş doku ağırlığına oranlanarak pg/g yaş doku olarak ifade edildi.



Grafik 3.2. p53 standart grafiği (Grafik VICTOR™ X3, PerkinElmer Inc., USA, Plate okuyucuda, WorkOut 2.5, DAZAQ LTD, programında çizilmiştir).

3.2.6. KARACİĞER DOKUSUNDA DNA FRAGMENTASYONU ÖLÇÜMÜ

DNA fragmentasyonu ölçümünde spektrofotometrik bir ölçüm metodu olan difenilamin reaksiyonu kullanılmıştır (29).

Ölçüm prensibi

Bu ölçüm temel olarak DNA'nın hidrolizi esasına dayanır. Açığa çıkan 2-deoksiriboz'lar dehidrasyonla aldehite dönüşür ve ortama eklenen difenilamin ile mavi renkli bileşikler oluşur (29). DNA konsantrasyonu arttıkça mavi renk koyulaşır.

Karaciğer Doku Homojenatının Hazırlanması

1. Dokular -80 °C derin dondurucudan çıkarıldı ve her biri 0,3 gram tartıldı.
2. Üzerlerine 2,7 ml lizis buffer (5mM tris-HCl, 20 mM EDTA, %0,5 Triton X-100, pH 8) eklenerek homojenize edildi.
3. Homojenat +4 °C'de, 26000 x g'de 25 dakika santrifüj edildi.
4. Süpernatant fragmente DNA içeren kısımdı, dikkatlice alındı ve başka bir tüpe aktarıldı.
5. Pellet ise intact (sağlam) DNA içeren kısımdı.
6. Süpernatantın ve pelletin DNA içerikleri difenilamin reksiyonu kullanılarak ölçüldü.

Çözeltiler

1. 0,5 N Perklorik asit: 43 ml % 70'lik perklorik asit alındı ve distile su ile son hacim 1000 ml'ye tamamlandı.
2. Solüsyon A: 1,5 gram difenilamin, 100 ml saf glasiyel asetik asitte çözüldü. Üzerine 1,5 ml %98'lik sülfürik asit eklendi. Bu solüsyon karanlıkta saklanır.
3. Solüsyon B: 50 ml deiyonize su 1 ml asetaldehit karıştırılarak hazırlandı. Bu solüsyon taze kullanılır.

Spektrofotometrik ölçüm

1. Süpernatantların DNA içeriğinin ölçümü
 - Numaralandırılan örnek tüplerine 1914 µl süpernatant alındı, üzerlerine 86 µl konsantre perklorik asit eklendi.
 - Kör olarak 0,5 N perklorik asit kullanıldı.
 - Kör ve örnek tüpleri 90 °C'de 15 dk inkübasyona bırakıldı.
 - İnkübasyon sonrası 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.

- Süpernatanttan 0,75 ml alındı, 0,75 ml solüsyon A ve 3,75 µl solüsyon B eklendi.
- Oda ısısında 18 saat inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda örneklerin absorbansları 600 nm’de köre karşı okundu (6,18,65,144).

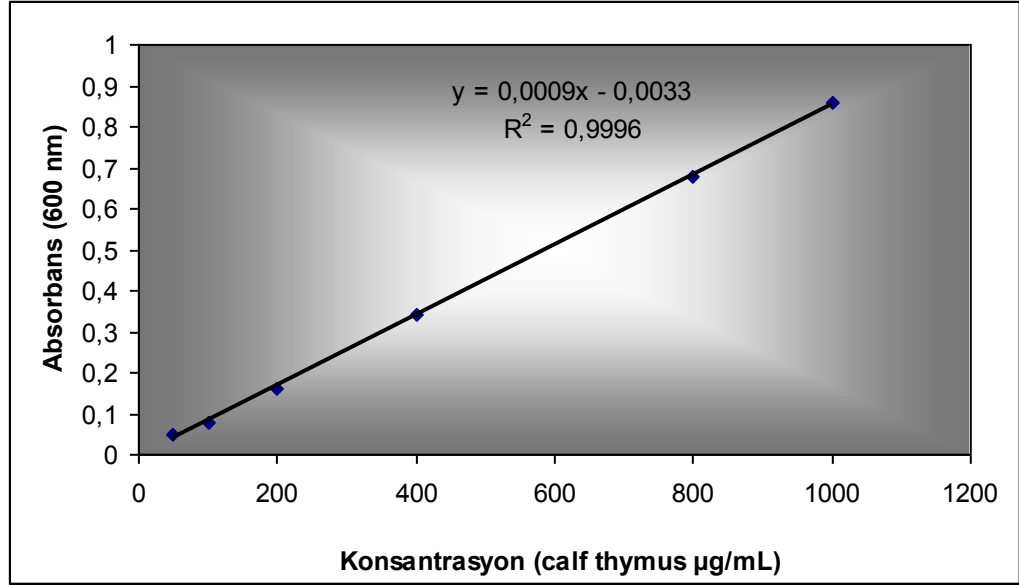
2. Pelletlerin DNA içeriğinin ölçümü

- Numaralandırılan pelletlerin üzerine 6 ml 0,5 N perklorik asit eklendi.
- Kör olarak 0,5 N perklorik asit kullanıldı.
- Kör ve pellet tüpleri 90 °C’de 15 dk inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon sonrası 1500 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi.
- Süpernatanttan 0,75 ml alındı (1/8 dilüsyon), 0,75 ml solüsyon A ve 3,75 µl solüsyon B eklendi.
- Oda ısısında 18 saat inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda örneklerin absorbansları 600 nm’de köre karşı okundu (6,18,65, 144).

Sonucun Hesaplanması

Örneklerin konsantrasyonlarını hesaplayabilmek için DNA standardı (calf thymus) 50, 100, 200, 400, 800 ve 1000 µg/ml konsantrasyonlarda hazırlandı. Standartların 600 nm’de spektrofotometrik ölçümü sonucu elde edilen absorbanslarla konsantrasyon değerleri Microsoft Office Excel 2007 programında grafiğe geçirildi (Grafik 3.3). Örneklerin konsantrasyonları grafikten elde edilen doğrunun denklemi kullanılarak hesaplandı. DNA fragmentasyon sonuçları % olarak, aşağıda verilen formüle göre hesaplandı (182, 189).

$$\text{DNA Fragmentasyonu (\%)} = \frac{\text{Süpernatant}}{\text{Süpernatant + Pellet}} \times 100$$



Grafik 3.3. DNA standart grafiği

3.2.7. KARACİĞER DOKUSUNDA İMMÜNİSTOKİMYASAL ÖLÇÜMLER

Bcl-2, Bax ve ubikuitin'in immünhistokimyasal incelenmesi için sırasıyla Ub antikor (10C2-2):sc-58448 (Santha cruz biotechnology), Anti-Bcl-2 antikor (ab7973)(Abcam) ve Anti-Bax antikor (ab7977) (Abcam) antikorları kullanıldı.

Ölçüm Prensibi

İşaretlenmiş antikor yöntemi ile antijeni tanıma ve gösterme temel ilkesine dayanmaktadır. Streptavidin-Biyotin kompleksi teknolojisi kullanılır. Streptavidinin biyotine afinitesi çok fazladır. Streptavidin peroksidaz etkili olarak nötral, hafif alkali pH'da yalnızca biyotinlenmiş sekonder antikora bağlanır. Oluşan kompleks kromojenik substrat eklenerek görünür hale getirilir. Antijenin bulunduğu bölgede renkli bir çökelti oluşur.

Ölçüm Yöntemi

İmmünohistokimyasal inceleme için alınan karaciğer doku örnekleri %10'luk formaldehit fiksasyonu sonrası 3 saat akan suda yıkandı. Alkol serilerinden geçirilen dokular parafin ile bloklandı. İmmünohistokimyasal inceleme için uygun olan bloklara aşağıda belirtilen işlemler sıra ile uygulandı.

- Poly-l-lysine ile kaplanmış lam üzerinde 4 mikron kalınlığında kesitler alındı.
- Fiziksel deparafinizasyon için kesitler 60°C'de etüvde 60 dakika parafinin erimesi için bekletildi.
- Kimyasal deparafinizasyon için lamalar ksilol serilerinden geçirildi (3x5 dakika).
- Etil alkol serilerinden geçirildi ve boyama için hazır hale getirildi (3x1 dakika %96'lık alkol).
- Dokular yüksek basınç ve nemli ortamda 1/10'luk sitrat tamponu içinde 10 dakika tutuldu.
- Boyama kapalı kutu içinde nemli ortamda yapıldı. Solüsyonlar lam yüzeyindeki doku üzerini örtecek şekilde damlatıldı.
- Doku sınırlama kalemi ile dokuların etrafı çizildi.
- % 3'lük hidrojen peroksidadza 10 dakika bekletildi. Önce distile su ile 1 dakika sonra fosfat tamponu ile 2 defa yıkandı.
- Ultra V blokta 5 dakika bekletildi.
- Primer antikor (Bcl-2 (Anti-Bcl-2 antikor (ab7973)(Abcam)), Bax (Anti-Bax antikor (ab7977) (Abcam)), ubiquitin (Ubikuitin antikor (10C2-2):sc-58448 (Santha cruz biotechnology)) ile 60 dakika inkübasyona bırakıldı.
- Fosfat tamponu ile 3 kez yıkandı.
- ENHANCER (sinyal arttırıcı): 20 dakika
- Fosfat tamponu ile 3 kez yıkandı.
- HRP, POLYMER (biotinylated goat anti-polyvalent + streptavidin): 30 dakika
- Fosfat tamponu ile 3 kez yıkandı.
- AEC Kromojen uygulandı ve 5 dakika inkübasyona bırakıldı.
- Çeşme suyunda 30 saniye yıkandı ve Hemotoksilen ile zemin boyanması yapıldı.
- Çeşme suyu ile 1 dakika yıkama yapıldı.

- Distile su ile 30 saniye yıkama yapıldı.
- Lamlar havada kurutuldu.
- Aques Mounting Medium damlatılıp lamel ile kapatıldı.

İmmünohistokimyasal boyama değerlendirilmesi ESOGÜ Histoloji Anabilim Dalında tek bir araştırmacı tarafından, 40X büyütmede 3 ayrı alan taranarak semikantitatif yöntemle boyanan hücrelerin sayısına göre 0 (yok), + (hafif), ++ (orta), +++ (şiddetli) olarak yapıldı.

3.2.8. TUNEL BOYAMASI

Ölçüm Prensipleri

Apoptoz rutin histolojik teknikler ile gösterilebilir. Ancak apoptozu tespit etmek için daha hassas yöntemler bulunmaktadır. Apoptotik hücrelerin en erken evrelerde görülebilmesi için bu yöntemlerin başında TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick and labeling) yöntemi gelmektedir. Apoptotik sinyaller DNA üzerinde kırıklar oluşturmaktadır. Açığa çıkan DNA parçalarının serbest 3'-OH uçlarına terminal deoksinükleotidil transferaz aracılığıyla digoxigenin işaretlenmiş ve işaretlenmemiş deoksinükleotidler eklenir. Daha sonra digoxigenin işaretlenmiş yeni nükleotidler anti-digoxigenin konjugatı ile tespit edilir. Diaminobenzidine işaretlenmiş örnek ile tepkimeye girerek DNA kırığı bölgesinde çözünemeyen bir substrat oluşturur. Metil yeşili ile zıt boyama yapılarak işlem sonlandırılır. Araştırmamızda TUNEL aktivitesi Chemichon marka ApopTag® Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit kullanılarak deney ve kontrol gruplarına ait 4µm kalınlığındaki parafin kesitlerde çalışıldı.

3.2.9. KARACİĞER DOKUSU HİSTOLOJİK PREPARATLARININ HAZIRLANMASI

Deney gruplarını oluşturan tüm sıçanlardan, karaciğer örnekleri alındı. Sıçanların karaciğer örnekleri, ışık mikroskopik düzeyde histolojik incelemelerinin yapılabilmesi için %10'luk formalin fiksatifi içine alınarak 48 saat süre ile fiksasyonları sağlandı. Fiksasyonları sağlanan örnekler fiksatifin çökmesini engellemek amacıyla 3-4 saat çeşme suyunda yıkandı. Çeşme suyuyla yıkanan doku parçaları daha sonra sırasıyla kademeli olarak %70'lik, %80'lik, %90'lık ve %96'lık alkol serilerinde 45'er dakika bekletilerek dehidratasyonları sağlandı. Dehidratasyonlarının ardından örnekler şeffaflandırılmak üzere 2 kez 20'er dakika ksilolde bekletildi. Karaciğer örnekleri şeffaflanmalarının ardından etüv içinde 65°C'de eritilmiş parafinlere alınarak 60 dakika süreyle üç ayrı parafinde bekletildi. Parafinize edilen dokular ayrı ayrı parafin içeren kasetlere gömülerek bloklandı ve kesit alınmaya hazır duruma getirildi. Parafin bloklardan kesitlerin alınmasında kullanılacak mikrotom bıçağı buzdolabında soğutulularak, mikrotom aracılığı ile her bir örnekten 5'er mikrometre kalınlığında doku kesitleri alındı. Kesitlerin 45°C'de su banyosunda açılmaları sağlanarak temiz lamalar üzerine alınmasından sonra etüv içinde 1 saat süre ile bekletilmeleri sağlandı. Preparatlar 1'er saat süre ile iki ayrı ksilolde tutulup deparafinizasyonları sağlandıktan sonra boyama aşamasına geçildi. Kesitlerin boyanmasında Hematoksilen-Eosin ikili boyası kullanıldı. Deparafinizasyonu yapılmış olan doku kesitleri 5'er dakika süreyle %96, %90, %80, %70'lik alkollerde ve distile suda bekletildi. Kesitler Hematoksilen ile 2 dakika ve Eosin ile 10 dakika boyandı. Çeşme suyu ile fazla boyası alınan kesitler hızla alkol serilerinden geçirilip dehidratasyonları sağlandı ve dokular iki ayrı ksilolde 30'ar dakika tutularak şeffaflandırıldı. Şeffaflanan dokular daha sonra entellan ile kapatılarak ışık mikroskopik düzeyde Olympus BH-2 mikroskop ile değerlendirmeleri yapıldı ve karaciğer örneklerini içeren tüm preparatların Olympus DP-70 digital kamera ile fotoğrafları çekildi.

Bulguların değerlendirilmesinde nekroz, hücrel dejenerasyon, nodüler yapı ve hücrel inflamasyona göre skorlama yapılmıştır. Histolojik boyama değerlendirilmesi ESOĞÜ Histoloji Anabilim Dalında tek bir araştırmacı tarafından, 40X büyütmede 3

ayrı alan taranarak semi-kantitatif yöntemle boyanan hücrelerin sayısına göre 0 (yok), + (hafif), ++ (orta), +++ (şiddetli) olarak yapıldı.

3.2.10. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Verilerin istatistiksel değerlendirilmesi ESOGÜ Biyoistatistik Anabilim Dalında SPSS (Statistical Package for Social Sciences) for Windows 20.0 paket programı kullanılarak yapıldı. Gruplar arasında klinik ve metabolik değişken ölçümleri açısından fark olup olmadığını analiz etmek için öncelikle dağılımların normal dağılıma uygunlukları analiz edildi. Verilerin normal dağılıp dağılmadığı Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro-Wilk testleri kullanılarak değerlendirildi. Normal dağılım gösteren verilerin karşılaştırılmaları Tek Yönlü Varyans Analiz (Oneway ANOVA) ile yapıldı. Parametrik veriler, ortalama±standart sapma (SD, standard deviation) olarak verildi. Nonparametrik veriler Kruskal Wallis ile test edildi ve sonuçlar median ile %25-%75 persentil olarak verildi. Normal dağılım göstermeyen histolojik değerlendirmeler ve immünohistokimyasal boyama sonucu elde edilen veriler Dunn's testi ile değerlendirildi. $p<0,05$, istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışmamızda elde ettiğimiz bulguların istatistiki anlamlılıkları belirtilmiş ve gruplara ait veriler hem tablo hem de grafik olarak verilmiştir.

4.1. Dipyrido[3, 2-a:2', 3'- c]phenazine (dppz) Au(III) Kompleksi Lethal

Doz Bulgusu

Dipyrido[3, 2-a:2', 3'- c]phenazine (dppz) Au(III) kompleksine ait probit analiz metodu ile belirlenen letal doz bulguları tablo 1'de verilmiştir. Buna göre LD₁ dozu 46.0935 mg, LD₁₀ dozu 111.259 mg, LD₅₀ dozu 225.502 mg, LD₉₀ dozu 353.734 ve LD₉₉ dozu ise 458.740 mg olarak belirlenmiştir. Ölüm aralığı % olarak LD₁'de %1, LD₁₀'da %10, LD₅₀'de %50, LD₉₀'da %90 ve LD₉₉'da ise %99'dur. % olarak yaşama olasılığı 1 mg doz uygulaması ve 2 mg doz uygulaması için %100 olarak bulunmuştur (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Probit analiz metodu ile belirlenen letal dozlara göre, ölüm (%), doz (mg) ve doz (mg), yaşama olasılığı (%)

	Ölüm (%)	Doz (mg)		Doz (mg)	Yaşama olasılığı (%)
LD1	1	46.0935		1	1.0000 (%100)
	2	59.8899		2	1.0000 (%100)
	3	69.8588		3	0.99999
	4	77.9675		4	0.99999
	5	84.9380		5	0.99997
	6	91.1275		6	0.99996
	7	96.7423		7	0.99993
	8	101.914		8	0.99991
	9	106.731		9	0.99987
LD10	10	111.259		10	0.999829
	20	147.420		20	0.998916
	30	175.768		30	0.996808
	40	201.114		40	0.993138
LD50	50	225.502		50	0.987593
	60	250.383		60	0.979903
	70	277.380		70	0.969841
	80	309.277		80	0.957220
LD90	90	353.734		90	0.941901
	91	359.720		100	0.923789
	92	366.220			
	93	373.364			
	94	381.338			
	95	390.424			
	96	401.086			
	97	414.170			
	98	431.518			
LD99	99	458.740			

4.2. Serum ALT Bulgusu

Serum ALT değerleri bakımından grup I'e göre grup IV'te ileri derecede önemli artış ($p<0,001$) belirlenirken, grup I ile diğer gruplar arasında istatistiksel olarak fark yoktu ($p>0,05$). Grup II ve grup III'e göre grup IV'te ileri derecede önemli artış ($p<0,001$) belirlenirken grup II ve grup III'e göre grup V ve grup VI'da istatistiksel olarak fark bulunamadı ($p>0,05$). Grup IV'e göre grup V ve grup VI'da ileri derecede önemli azalma belirlendi ($p<0,001$). Grup V'e göre grup VI'da istatistiksel olarak fark yoktu ($p>0,05$) (Tablo 4.2. ve Grafik 4.1).

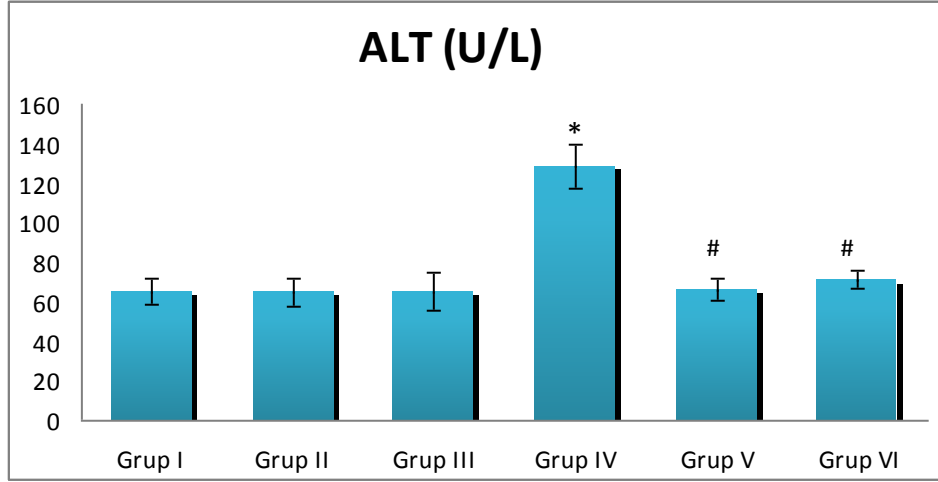
Tablo 4.2. ALT değerleri ve istatistiksel değerlendirmesi

GRUPLAR	N	ALT(U/L)
Grup I	8	65,13±6,40
Grup II	8	64,88±7,26
Grup III	8	65,00±9,67
Grup IV	8	128,50±11,17*
Grup V	8	66,25±5,80 #
Grup VI	8	71,00±4,54 #

Her bir grubun değeri ortalama±standart sapma (SD) olarak verildi.

Grup I, grup II ve grup III'e göre fark: *, $p<0,001$

Grup IV'e göre fark: #; $p<0,001$



Grafik 4.1. ALT değerleri ve istatistiksel değerlendirmesi

Grup I, grup II ve grup III'e göre fark: *, $p < 0,001$

Grup IV'e göre fark: #; $p < 0,001$

4.3. Serum AST Bulgusu

Serum AST değerleri bakımından grup I'e göre grup IV'te ileri derecede önemli artış ($p < 0,001$), grup V'te önemli düzeyde artış ($p < 0,05$) ve grup VI'da ileri derecede önemli artış ($p < 0,001$) belirlendi. Grup I'e göre grup II ve grup III'te istatistiksel olarak fark yoktu ($p > 0,05$). Grup II'ye göre grup IV'te ileri derecede önemli artış ($p < 0,001$), grup V'te önemli düzeyde artış ($p < 0,05$) ve grup VI'da ileri derecede önemli artış ($p < 0,001$) belirlendi. Grup III'e göre grup IV'te ileri derecede önemli artış ($p < 0,001$), grup V'te önemli düzeyde artış ($p < 0,05$) ve grup VI'da ileri derecede önemli artış ($p < 0,001$) belirlendi. Grup II ve grup III arasında istatistiksel olarak fark yoktu ($p > 0,05$). Grup IV'e göre grup V ve grup VI'da istatistiksel olarak fark yoktu ($p > 0,05$). Grup V'e göre grup VI'da istatistiksel olarak fark yoktu ($p > 0,05$) (Tablo 4.3. ve Grafik 4.2).

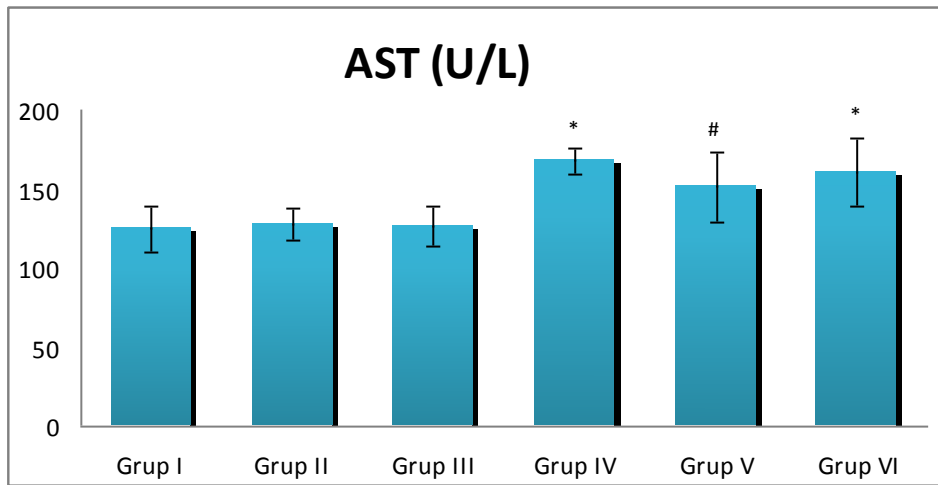
Tablo 4.3. AST değerleri ve istatistiksel değerlendirmesi

Gruplar	N	AST(U/L)
Grup I	8	125,25±14,50
Grup II	8	127,63±10,25
Grup III	8	126,75±12,76
Grup IV	8	168,13±8,01 *
Grup V	8	151,38±22,13 #
Grup VI	8	160,25±21,57 *

Her bir grubun değeri ortalama±standart sapma (SD) olarak verildi.

Grup I, grup II ve grup III'e göre fark: *, p<0,001

Grup I, grup II ve grup III'e göre fark: #; p<0,05



Grafik 4.2. AST değerleri ve istatistiksel değerlendirmesi

Grup I, grup II ve grup III'e göre fark: *, p<0,001

Grup I, grup II ve grup III'e göre fark: #; p<0,05

4.4. Serum LDH Bulgusu

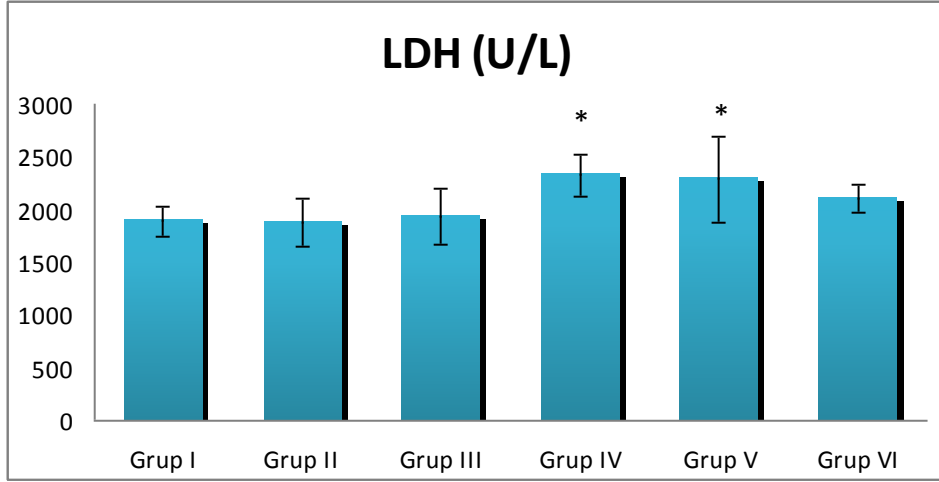
Serum LDH değerleri bakımından grup I'e göre grup IV ve grup V'te önemli düzeyde artış (p<0,05) belirlendi. Grup I'e göre grup II, grup III ve grup VI arasında istatistiksel olarak fark yoktu (p>0,05). Grup II'ye göre grup III ve grup VI arasında istatistiksel olarak fark (p>0,05) bulunamazken grup IV ve grup V'te önemli düzeyde artış belirlendi (p<0,05). Grup III'e göre grup VI'da istatistiksel olarak fark bulunamazken (p>0,05) grup IV ve grup V'te önemli düzeyde artış belirlendi (p<0,05). Grup IV'e göre grup V ve grup VI arasında istatistiksel olarak fark bulunamadı (p>0,05). Grup VI ile diğer gruplar arasında istatistiksel olarak fark yoktu (p>0,05) (Tablo 4.4. ve Grafik 4.3).

Tablo 4.4. LDH değerleri ve istatistiksel değerlendirmesi

GRUPLAR	N	LDH (U/L)
Grup I	8	1890,38±138,35
Grup II	8	1874,13±226,21
Grup III	8	1928,00±265,70
Grup IV	8	2326,38±206,61*
Grup V	8	2291,63±409,31*
Grup VI	8	2107,88±125,92

Her bir grubun değeri ortalama±standart sapma (SD) olarak verildi.

GrupI, grup II ve grup III'e göre fark: *; p<0,05



Grafik 4.3. LDH değerleri ve istatistiksel değerlendirilmesi

Grup I, grup II ve grup III'e göre fark: *; $p < 0,05$

4.5. Karaciğer Dokusu Kaspaz 3 Bulgusu

Karaciğer dokusu kaspaz 3 değerleri bakımından grup I'e göre grup II ve grup III arasında istatistiksel olarak fark yoktu ($p > 0,05$). Grup I'e göre grup IV'te ileri derecede önemli azalma ($p < 0,001$) belirlenirken, grup V ve grup VI'da ileri derecede önemli artış ($p < 0,001$) belirlendi. Grup II'e göre Grup IV'te ileri derecede önemli azalma ($p < 0,001$) belirlenirken grup V ve grup VI'da ileri derecede önemli artış ($p < 0,001$) belirlendi. Grup II ve grup III arasında istatistiksel olarak fark yoktu ($p > 0,05$). Grup III'e göre Grup IV'te ileri derecede önemli azalma ($p < 0,001$) belirlenirken grup V'te ileri derecede önemli artış ($p < 0,001$) belirlendi. Grup IV'e göre grup V ve grup VI'da ileri derecede önemli artış belirlendi ($p < 0,001$). Grup VI'ya göre grup V'te ileri derecede önemli artış belirlendi ($p < 0,001$) (Tablo 4.5. ve Grafik 4.4).

Tablo 4.5: Kaspaz 3 değerleri ve istatistiksel değerlendirmesi

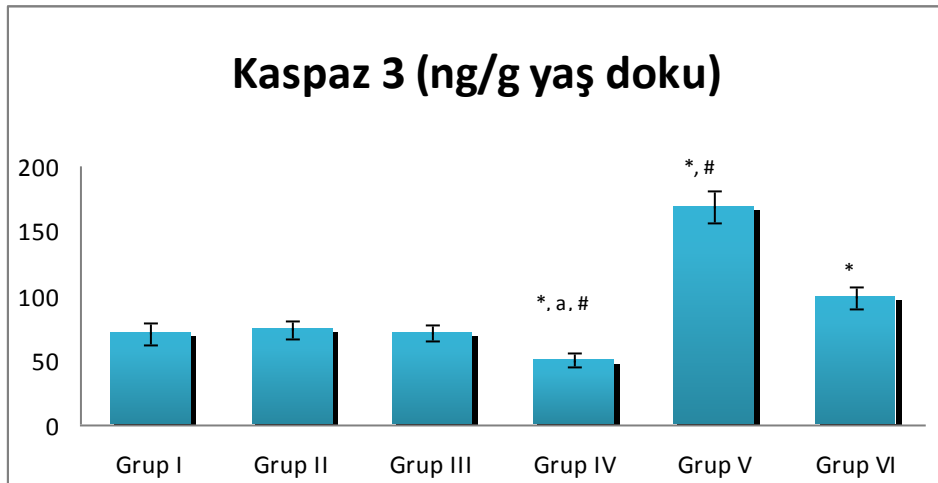
GRUPLAR	N	Kaspaz 3 (ng/g yaş doku)
Grup I	8	70,5822±7,88
Grup II	8	74,2980±7,10
Grup III	8	71,8324±6,38
Grup IV	8	50,3211±5,33 ^{*, a, #}
Grup V	8	169,1589±11,98 ^{*,#}
Grup VI	8	98,4880±7,86 [*]

Her bir grubun değeri ortalama±standart sapma (SD) olarak verildi.

Grup I ve grup II ve grup III'e göre fark: ^{*}; p<0,001

Grup V'e göre fark: ^a; p<0,001

Grup VI'ya göre fark: [#]; p<0,001



Grafik 4.4. Kaspaz 3 değerleri ve istatistiksel değerlendirmesi

Grup I ve grup II ve grup III'e göre fark: ^{*}; p<0,001

Grup V'e göre fark: ^a; p<0,001

Grup VI'ya göre fark: [#]; p<0,001

4.6. Karaciğer Dokusu p53 Bulgusu

Karaciğer dokusu p53 değerleri bakımından grup I ve grup II arasında istatistiksel olarak fark bulunamadı ($p>0,05$). Grup I'e göre grup IV'te ileri derecede önemli azalma ($p<0,001$) belirlendi. Grup I'e göre grup III, grup V ve grup VI'da ileri derecede önemli artış ($p<0,001$) belirlendi. Grup II'ye göre grup III, grup V ve grup VI'da ileri derecede önemli artış ($p<0,001$) belirlenirken grup IV'te ileri derecede önemli azalma ($p<0,001$) bulundu. Grup IV'e göre grup III, grup V ve grup VI'da ileri derecede önemli artış ($p<0,001$) belirlendi. Grup III'e göre grup V ve grup VI'da ileri derecede önemli artış ($p<0,001$) belirlendi. Grup V'e göre grup VI'da istatistiksel olarak fark yoktu ($p>0,05$) (Tablo 4.6. ve Grafik 4.5).

Tablo 4.6. p53 değerleri ve istatistiksel değerlendirmesi

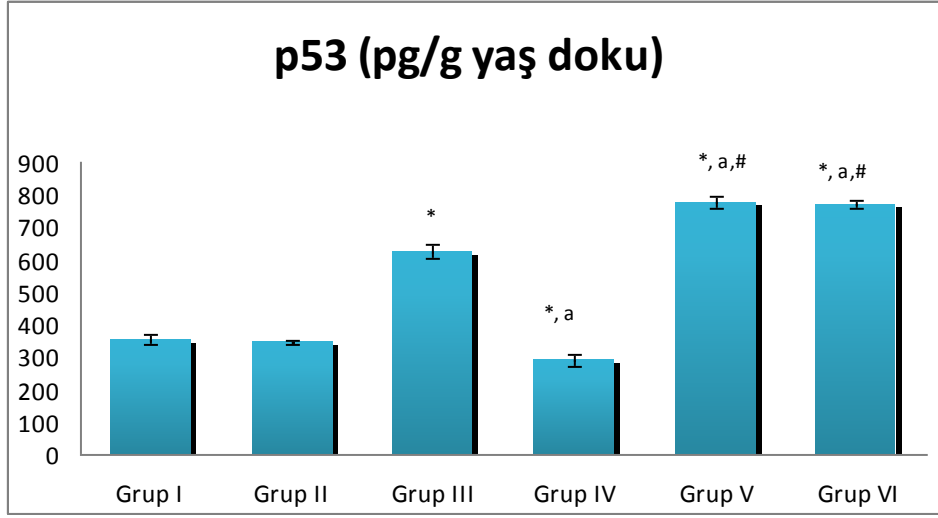
GRUPLAR	N	P53 (pg/g yaş doku)
Grup I	8	353,5627±16,32
Grup II	8	345,1433±8,76
Grup III	8	624,1358±21,17 *
Grup IV	8	290,0066±16,95 *, ^a
Grup V	8	776,8802±16,01 *, ^{a,#}
Grup VI	8	770,5776±11,98 *, ^{a,#}

Her bir grubun değeri ortalama±standart sapma (SD) olarak verildi.

Grup I ve grup II'e göre fark: *, $p<0,001$

Grup III'e göre fark: ^a; $p<0,001$

Grup IV'e göre fark: #; $p<0,001$



Grafik 4.5. p53 değerleri ve istatistiksel değerlendirmesi

Grup I ve grup II'e göre fark: *, $p < 0,001$

Grup III'e göre fark: ^a; $p < 0,001$

Grup IV'e göre fark: [#]; $p < 0,001$

4.7. Karaciğer dokusu DNA Fragmantasyonu Bulgusu

Karaciğer dokusu DNA fragmantasyonu değerleri bakımından grup I'e göre grup II, grup III, grup IV ve grup VI arasında istatistiksel olarak fark yoktu ($p > 0,05$). Grup V'te ise grup I, grup II, grup III ve grup IV'e göre önemli düzeyde artış belirlendi ($p < 0,001$). Grup V ve grup VI arasında istatistiksel olarak fark yoktu ($p > 0,05$) (Tablo 4.7).

Tablo 4.7. % DNA fragmentasyonu değerleri ve istatistiksel değerlendirmesi. İstatistiksel sonuçlar medyan (%25-%75) olarak verildi

GRUPLAR	N	% DNA Fragmentasyonu, Medyan (%25 - %75)
Grup I	8	0,140 (0,130-0,149)
Grup II	8	0,135 (0,114-0,150)
Grup III	8	0,145 (0,136-0,184)
Grup IV	8	0,161 (0,143-0,177)
Grup V	8	0,365 (0,313-0,373)*
Grup VI	8	0,231 (0,174-00,302)

Grup I, grup II, grup III ve grup IV'e göre fark: *; p<0,001

4.8. Karaciğer Dokusu İmmünohistokimya Bulguları (Bcl-2, Bax, ubikuitin)

Çalışmamızdaki karaciğer doku örnekleri immünohistokimyasal boyama yöntemiyle incelendi. Değişiklikler, 0/1/2/3/4 pozitif [0(yok),+ (hafif),++ (orta),+++ (belirgin)] olarak değerlendirildi. Tüm gruplar Bax, Bcl-2 ve ubikuitin bakımından değerlendirilmiş olup sonuçlar tablo halinde verilmiştir.

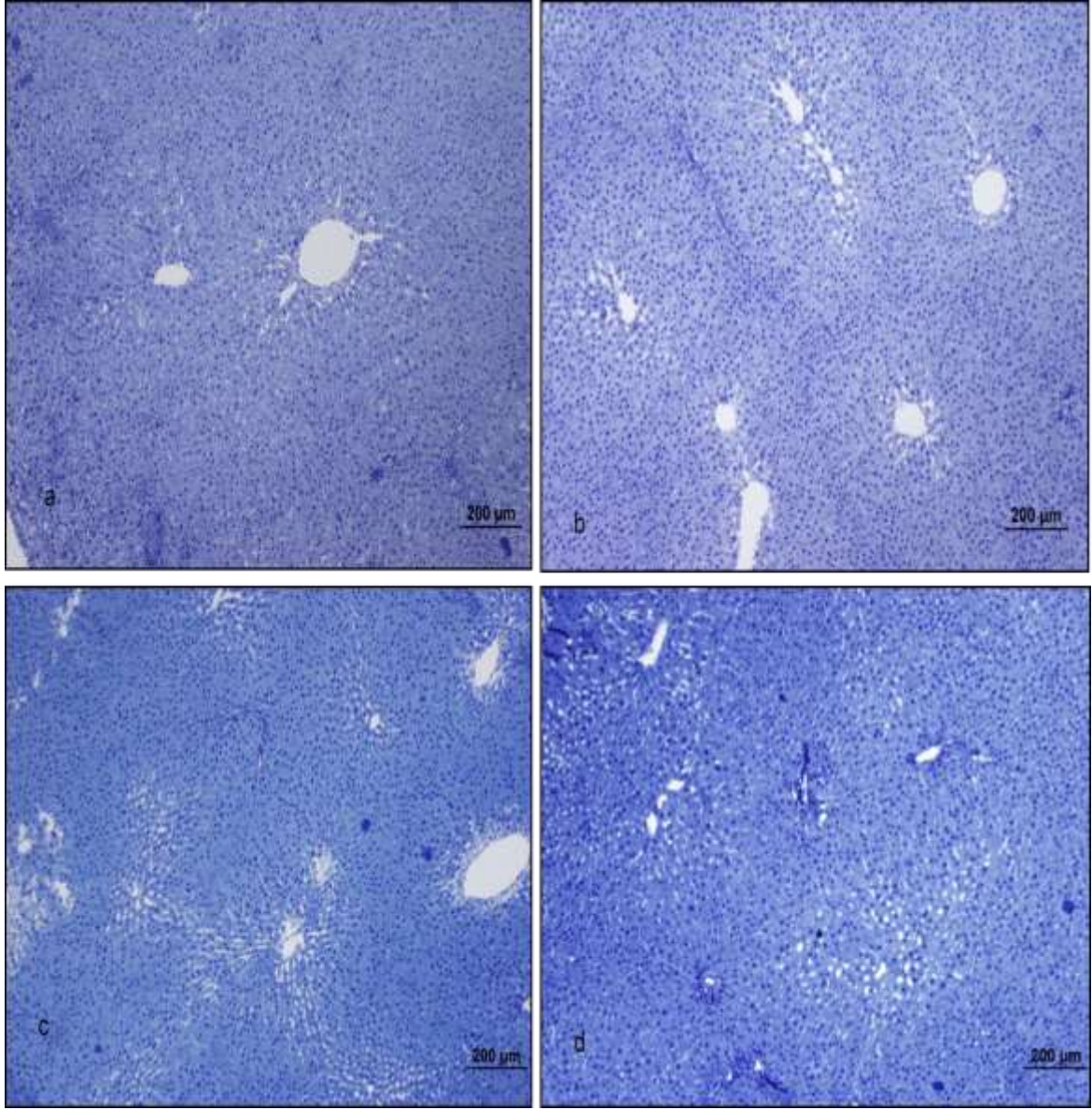
4.8.1. Bax bulguları:

Bax immünohistokimyasal boyamasında grup V'te grup I, grup II, grup III ve grup IV'e göre çok önemli düzeyde artış belirlendi (p<0,01). Grup I ile diğer gruplar arasında istatistiksel olarak fark yoktu (p>0,05). Benzer şekilde diğer gruplar birbiri ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak fark bulunamadı (p>0,05) (Tablo 4.8).

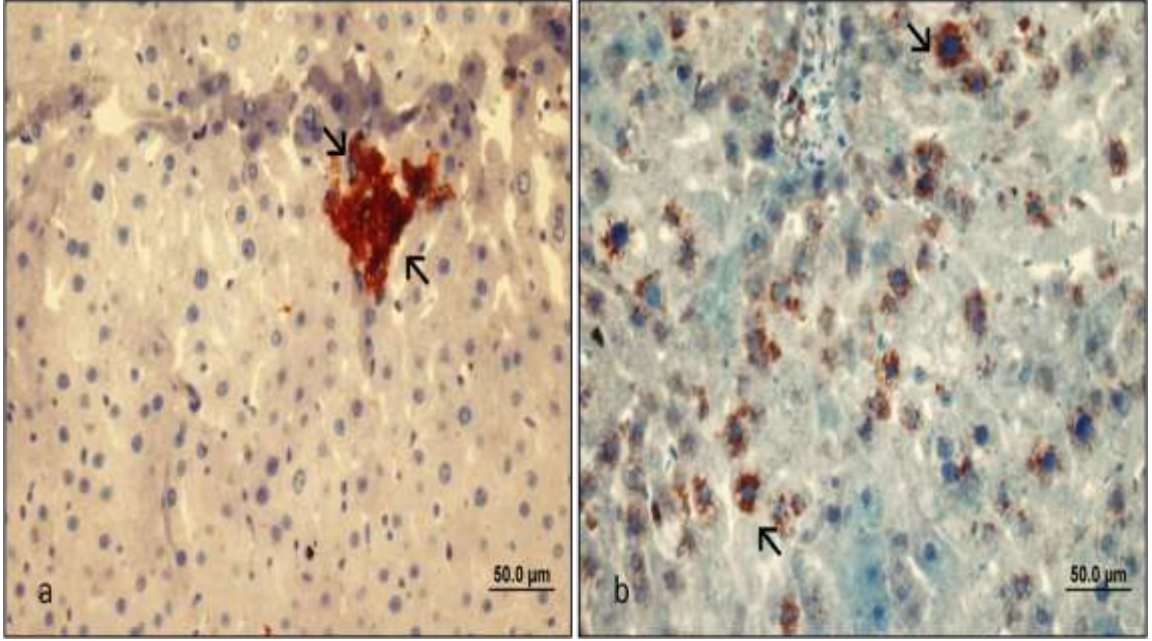
Tablo 4.8. Bax immünohistokimyasal boyanması sonucu elde edilen skorlama sonuçlarının istatistiksel analizi

GRUPLAR	N	Bax
Grup I	8	0 (0-0)
Grup II	8	0 (0-0)
Grup III	8	0 (0-0)
Grup IV	8	0 (0-0)
Grup V	8	1 (0,25-1) *
Grup VI	8	1 (0-1)

Grup I, grup II, grup III ve grup IV'e göre fark: *; p<0,01



Şekil 4.1. Grup I (a), grup II (b), grup III (c) ve Grup IV (d) karaciğer dokusunda Bax immünhistokimyasal boyanmaları (bar: 200 µm). Grup I, grup II, grup III ve grup IV'te Bax açısından boyanma gözlenmemektedir.



Şekil 4.2. Grup V (a) ve grup VI (b) karaciğer dokusunda Bax immünohistokimyasal boyamaları (bar: 50.0 µm). Grup V ve grup VI'da Bax değerlendirmelerinde boyanma izlenmektedir (→).

4.8.2. Bcl-2 Bulguları

Bcl-2 immünohistokimyasal boyamasında grup I'e göre grup IV'te ileri derecede önemli artış ($p < 0,001$) belirlenirken grup I ile diğer gruplar arasında istatistiksel olarak fark bulunamadı ($p > 0,05$). Grup II'e göre grup IV'te önemli düzeyde artış ($p < 0,05$) belirlenirken grup II ve diğer gruplar arasında istatistiksel olarak fark yoktu ($p > 0,05$). Grup III'e göre grup IV'te çok önemli düzeyde artış ($p < 0,01$) belirlenirken grup III ile diğer gruplar arasında istatistiksel olarak fark bulunamadı ($p > 0,05$). Grup IV'e göre grup V'te ve grup VI'da istatistiksel olarak fark bulunamadı ($p > 0,05$). Grup V ve grup VI arasında istatistiksel olarak fark bulunamadı ($p > 0,05$) (Tablo 4.9).

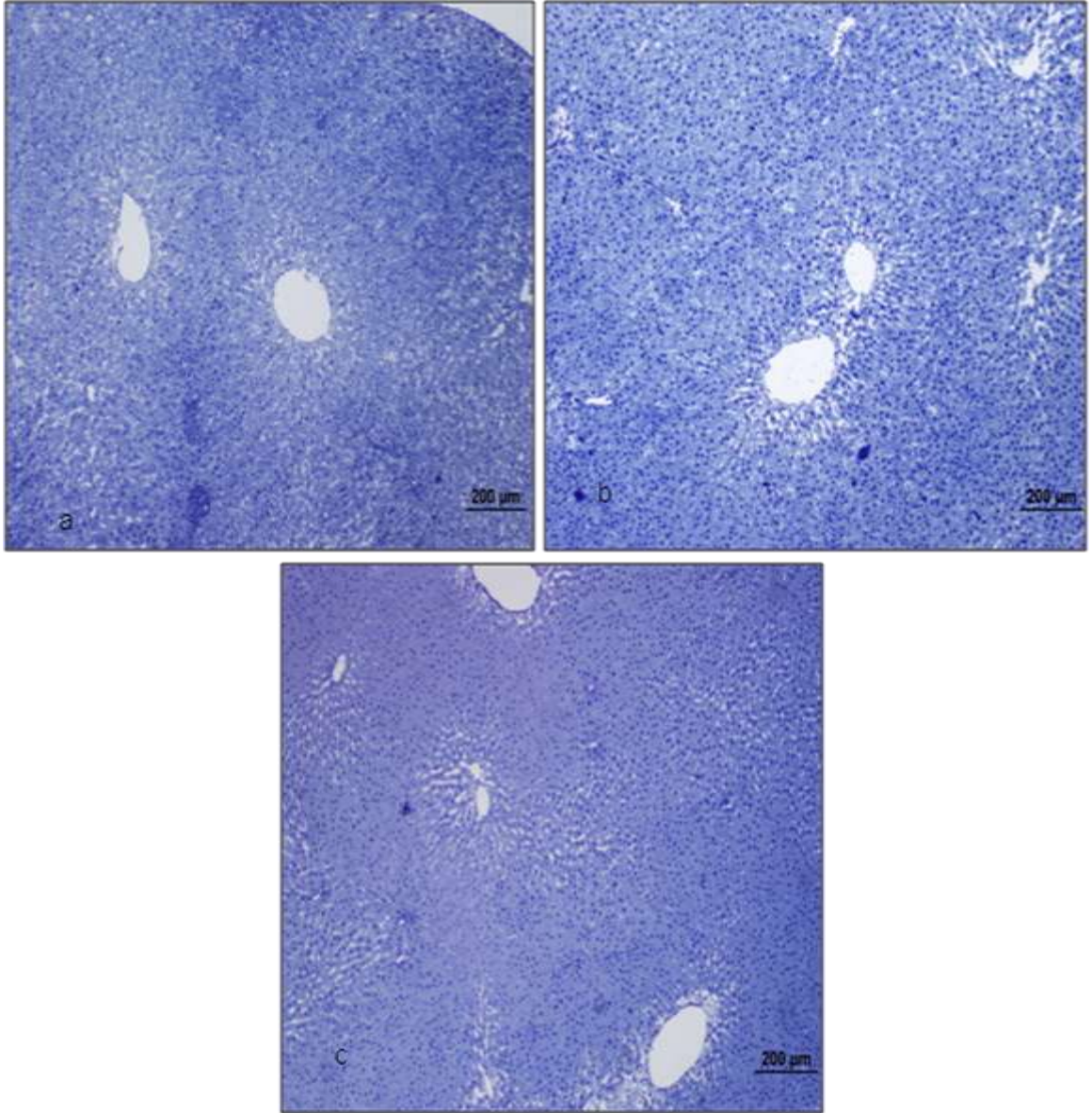
Tablo 4.9. Bcl-2'nin immünohistokimyasal boyanması sonucu elde edilen skorlama sonuçlarının istatistiksel analizi

GRUPLAR	N	Bcl-2
Grup I	8	0 (0-0)
Grup II	8	0 (0-0,75)
Grup III	8	0 (0-0)
Grup IV	8	1 (1-1) ^{*,a, b}
Grup V	8	0,50 (0-1)
Grup VI	8	0,50 (0-1)

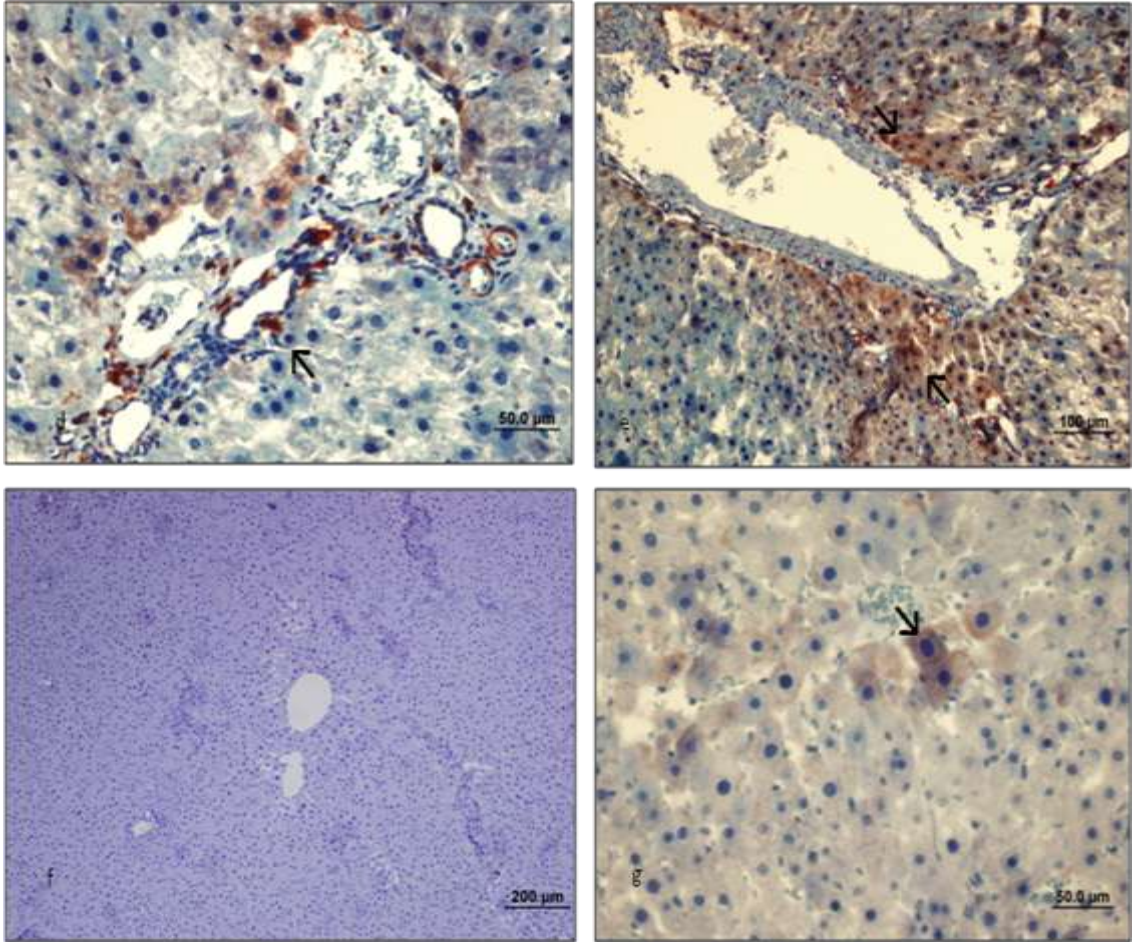
Grup I'e göre fark: ^{*}; p<0,001

Grup II'ye göre fark: ^a; p<0,05

Grup III'ye göre fark: ^b; p<0,01



Şekil 4.3. Grup I (a), grup II (b), grup III (c) Bcl-2 immünohistokimyasal boyamaları (bar: 200 µm). Grup I, grup II ve grup III 'te Bcl-2 açısından boyanma gözlenmemektedir.



Şekil 4.4. Grup IV (d,e) , Grup V (f) ve grup VI (g) Bcl-2 boyamaları (bar: 50 µm, 100 µm, bar: 200 µm, bar: 50.0 µm). Grup IV ve grup VI'da Bcl-2 değerlendirmelerinde boyanma izlenmektedir (→).

4.8.3. Ubikuitin Bulguları

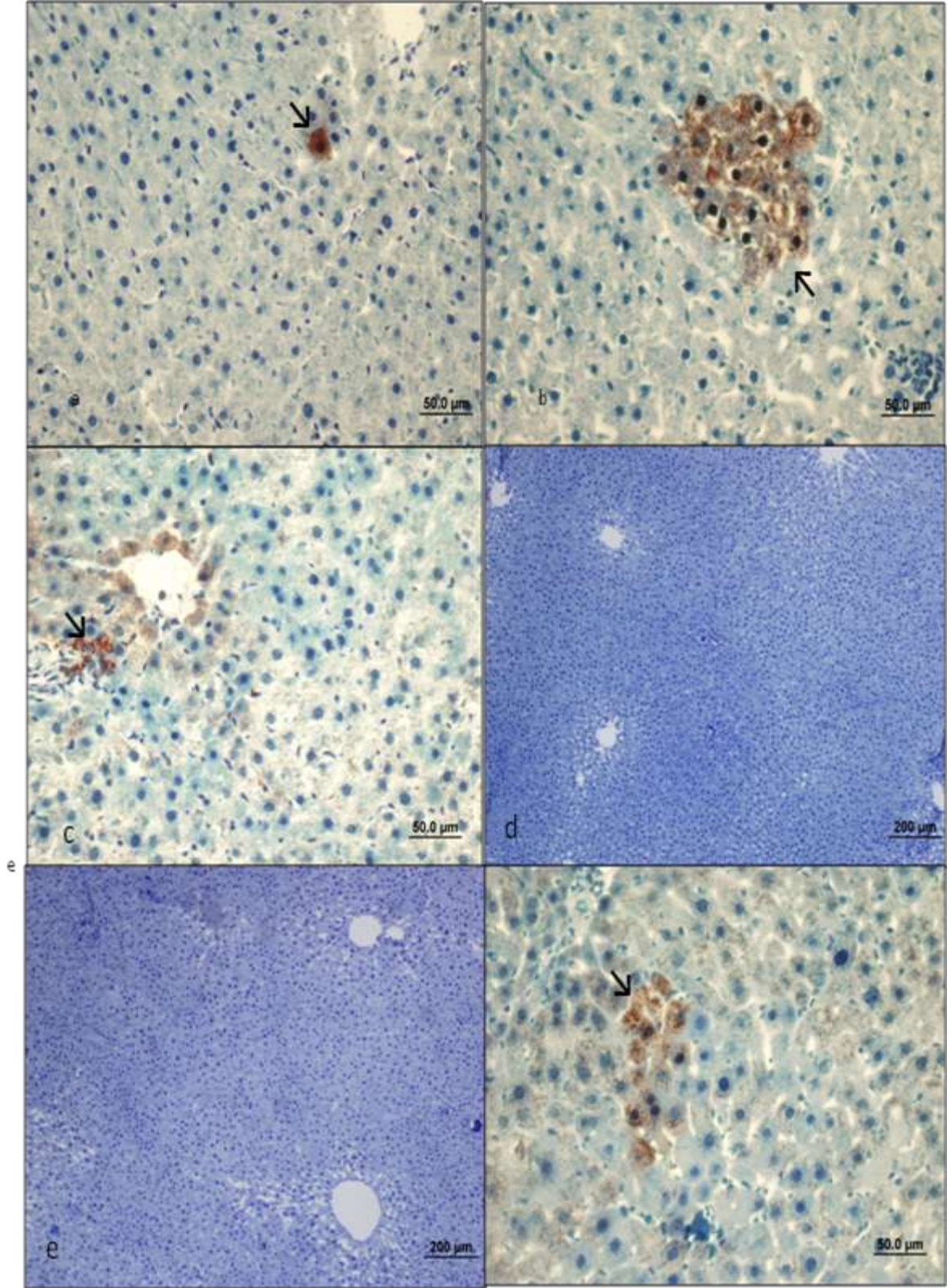
Ubikuitin'in immünohistokimyasal boyamasında grup I'e göre grup IV'te ileri derecede önemli artış belirlendi ($p < 0,05$). Grup I ve diğer gruplar arasında istatistiksel olarak fark bulunamadı ($p > 0,05$). Grup III'e göre grup IV'te ileri derecede önemli artış ($p < 0,001$), grup VI'da önemli düzeyde artış belirlendi ($p < 0,05$). Grup III ve diğer gruplar arasında istatistiksel olarak fark bulunamadı ($p > 0,05$). Grup II ve Grup V diğer gruplar ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak fark bulunamadı ($p > 0,05$) (Tablo 4.10).

Tablo 4.10. Ubikuitin immünohistokimyasal boyaması sonucu elde edilen skorlama sonuçlarının istatistiksel analizi

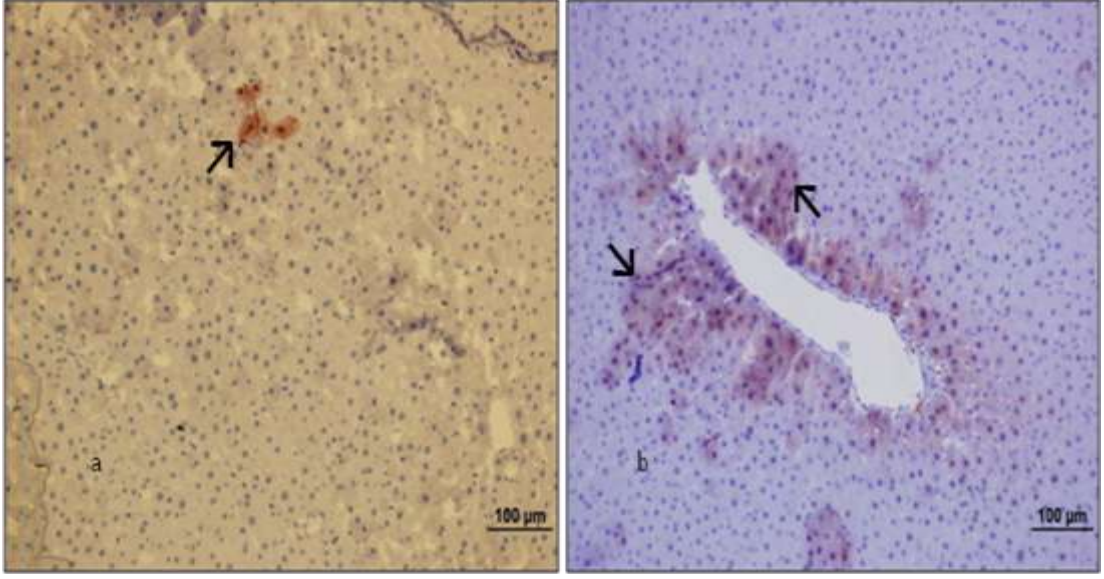
GRUPLAR	N	Ubikuitin
Grup I	8	0(0-0,75)
Grup II	8	0(0-1)
Grup III	8	0(0-0)
Grup IV	8	1(1-1,75) * ^a , ^{bb}
Grup V	8	1(0,25-1)
Grup VI	8	1(1-1) ^b

Grup I'e göre fark: *, p<0,05

Grup III'ye göre fark: ^b; p<0,05, ^{bb}; p<0,001

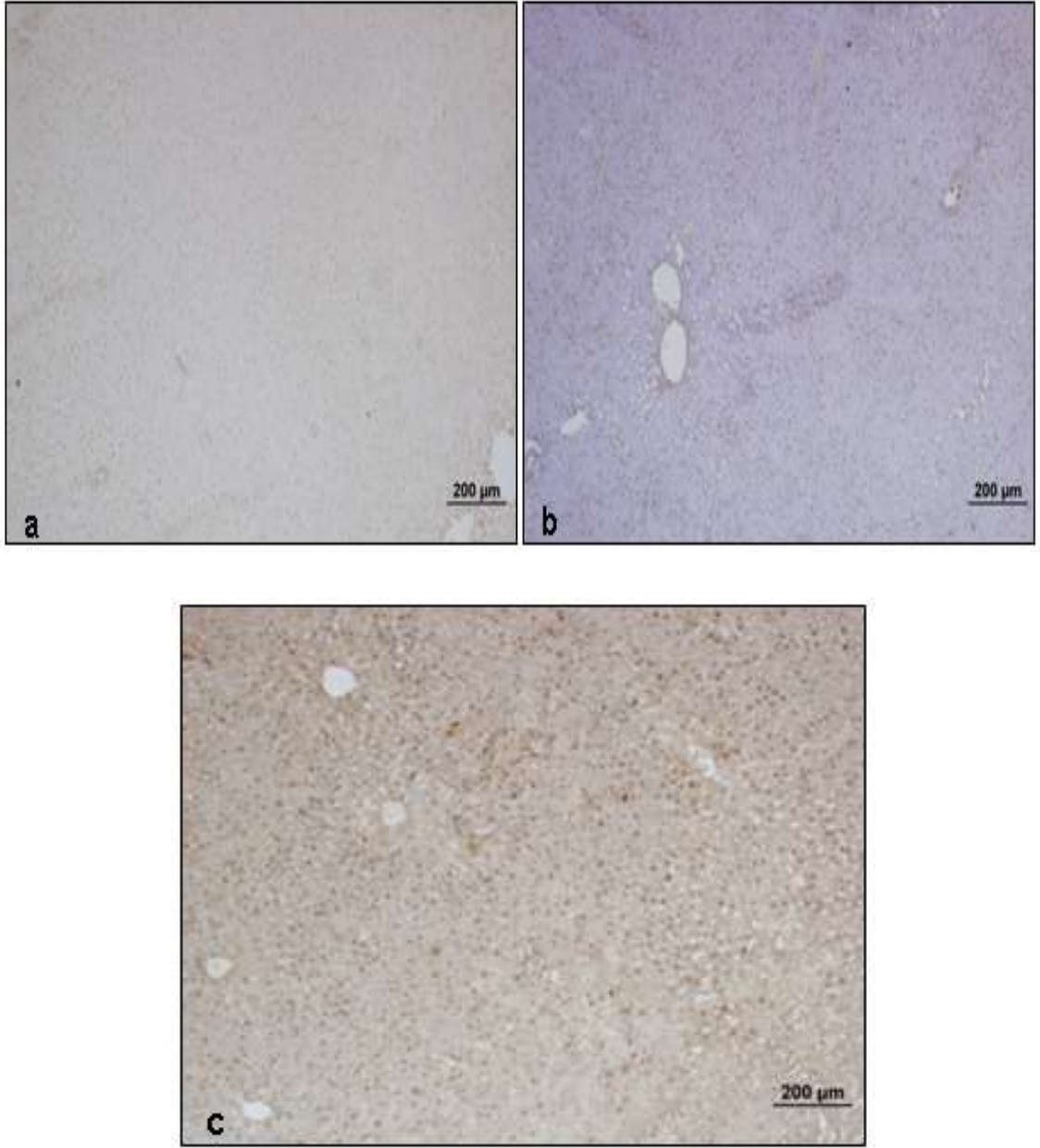


Şekil 4.5. Grup I (a,b), grup II (c), grup III (d), grup V (e), grup VI (f) ubikuitin boyamaları (bar: 50.0 µm, 50.0 µm, bar: 50.0 µm, bar: 200 µm, bar: 200 µm, bar: 50.0 µm). Ubikuitin değerlendirmelerinde boyanma izlenen hücreler (→).

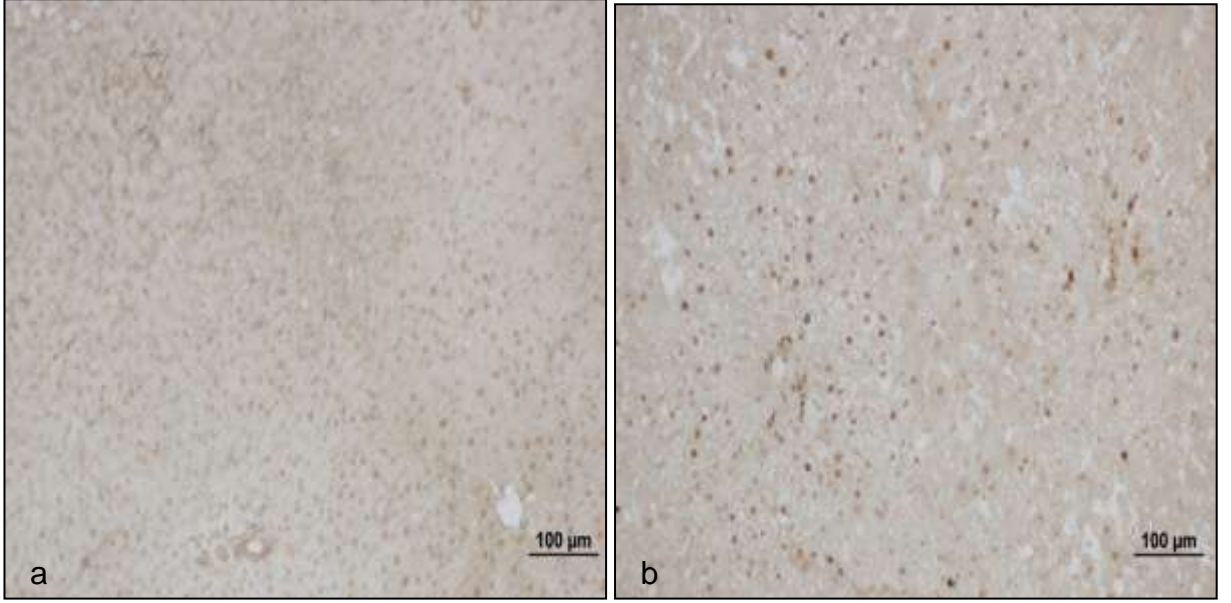


Şekil 4.6. Grup IV (a,b) ubikuitin boyamaları (bar: 100 µm). Grup IV'te ubikuitin değerlendirmelerinde boyanma izlenmektedir (→).

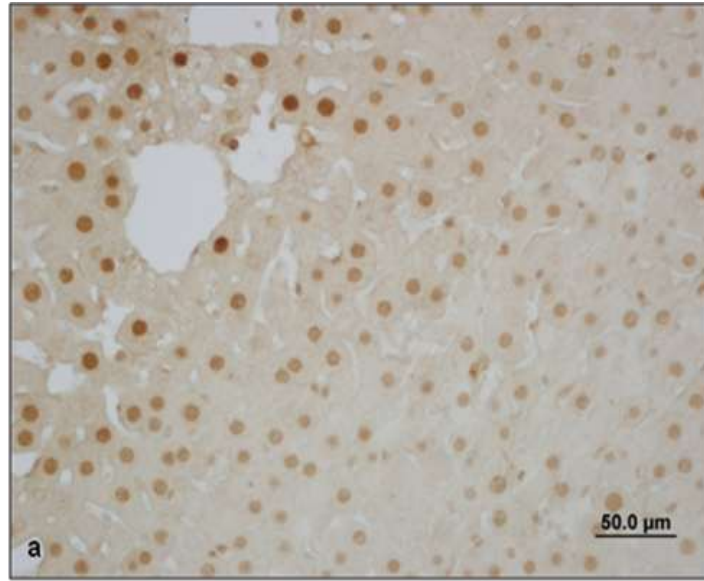
4.9. Karaciğer Dokusu TUNEL Bulguları



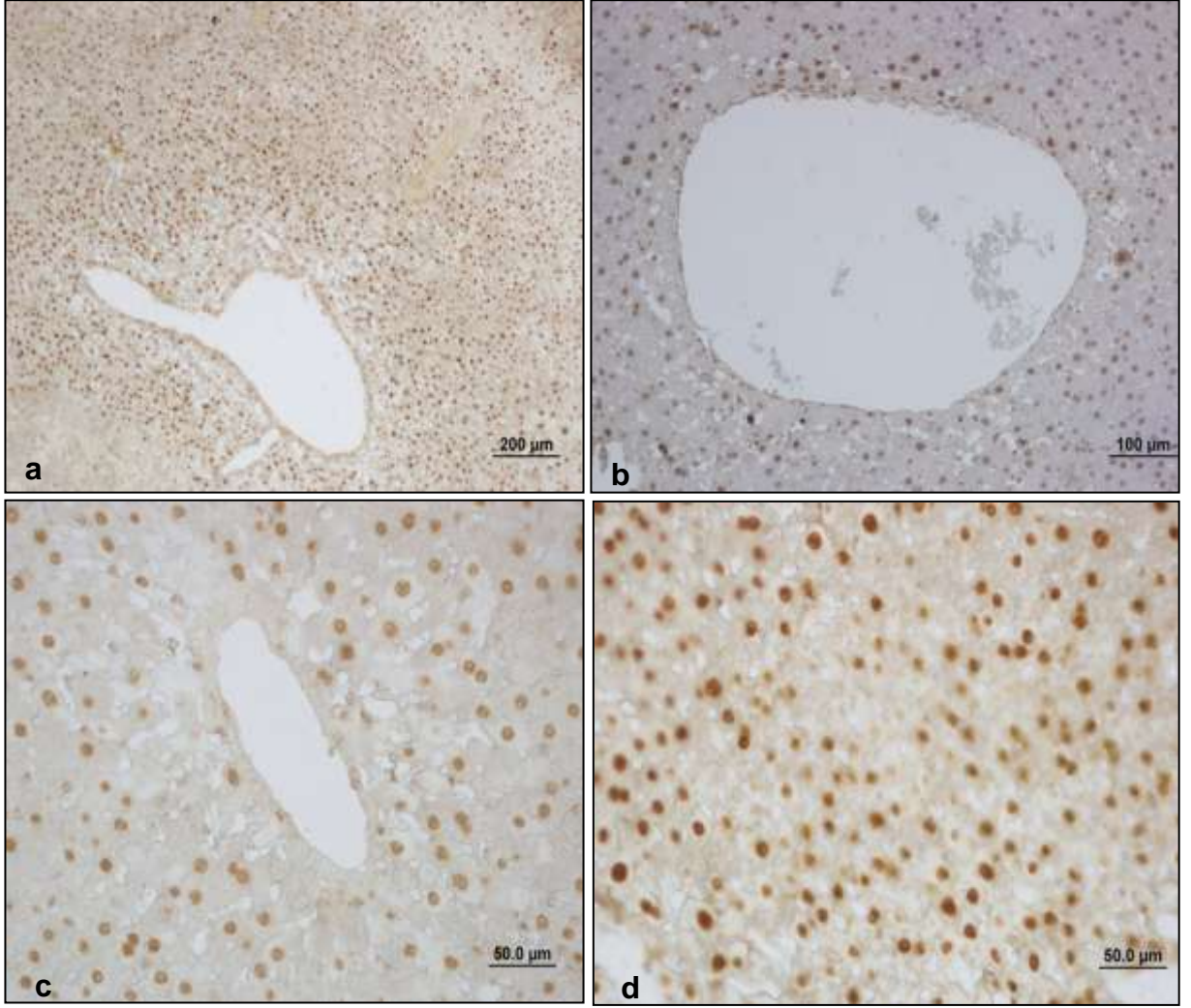
Şekil 4.7. Grup I (a), grup II (b) ve grup III'e (c) ait TUNEL yöntemi uygulanmış karaciğer örnekleri. Grup I (a), grup II (b) karaciğerlerinde TUNEL negatif hücreler görülmekte. Grup III (c) karaciğer örneklerinde az da olsa TUNEL pozitif boyanmış hücreler izlenmekte (TUNEL),(bar:200µm, bar:100µm).



Şekil 4.8. Grup IV'te TUNEL yöntemi uygulanmış karaciğer örnekleri. Bu örneklerde az da olsa TUNEL pozitif boyanmış apoptotik hücreler görülmekte. (TUNEL),(bar:100µm).



Şekil 4.9. Grup VI'te TUNEL yöntemi uygulanmış karaciğer örnekleri. Bu örneklerde TUNEL pozitif kahverengi boyanmış apoptotik hücreler görülmekte (TUNEL),(bar:50.0µm)



Şekil 4.10. Grup V’te karaciğer örneklerinde TUNEL pozitif kahverengi boyanmış çok sayıda apoptotik hücre izlenmekte (a-d) (TUNEL) (bar:200µm, bar:50.0µm, bar:100µm).

4.10. Karaciğer Dokusunda Histolojik Bulgular

Çalışmamızdaki karaciğer doku örnekleri Hematoksilen-Eozin boyama yöntemiyle incelendi. Işık mikroskobu incelemesinde tüm gruplar, hücresel dejenerasyon, iltihabi hücre infiltrasyonu, nekroz ve preneoplastik fokus bakımından değerlendirilmiş olup sonuçlar tablo halinde verilmiştir (Tablo 4.11).

Nekrotik bulgu grup I grup II ve grup III’te gözlenmedi. Grup I’e göre, grup IV’te ileri derecede önemli artış ($p<0,001$) belirlenirken, diğer gruplar arasında istatistiksel olarak fark yoktu ($p>0,05$). Grup II’ye göre grup IV’te ileri derecede önemli artış ($p<0,001$) belirlenirken, grup II ile diğer gruplar arasında istatistiksel olarak fark yoktu ($p>0,05$). Grup III’e göre grup IV’te ileri derecede önemli artış ($p<0,001$) belirlenirken, grup III ile diğer gruplar arasında istatistiksel olarak fark yoktu ($p>0,05$).

Grup IV'e göre grup V'te çok önemli düzeyde azalma belirlendi ($p<0,01$). Grup V ve grup VI arasında istatistiksel olarak fark yoktu ($p>0,05$).

Hücrel dejenerasyon bakımından grup I, grup II ve grup III'te herhangi bir dejeneratif bulguya rastlanmadı. Grup I'e göre grup IV'te ileri derecede önemli artış ($p<0,001$) ve grup VI'da önemli düzeyde artış ($p<0,05$) belirlendi. Grup I ile grup II, grup III ve grup V arasında istatistiksel olarak fark yoktu ($p>0,05$). Grup II'ye göre grup IV'te ileri derecede önemli artış ($p<0,001$) ve grup VI'da önemli düzeyde artış ($p<0,05$) belirlendi. Grup III'e göre IV'te ileri derecede önemli artış ($p<0,001$) ve grup VI'da önemli düzeyde artış ($p<0,05$) belirlendi. Grup IV'e göre grup V'te önemli düzeyde azalma belirlenirken ($p<0,05$) grup IV ve grup VI arasında istatistiksel olarak fark yoktu ($p>0,05$). Grup V ve grup VI arasında istatistiksel olarak fark yoktu ($p>0,05$) (Tablo 4.11).

Nodüler yapı bakımından grup I, grup II ve grup III'te herhangi bir bulguya rastlanmadı. Grup I'e göre grup IV'te ileri derecede önemli artış ($p<0,001$) belirlenirken, grup I ile diğer gruplar arasında istatistiksel olarak fark yoktu ($p>0,05$). Grup II'ye göre grup IV'te ileri derecede önemli artış vardı ($p<0,001$). Grup II ile diğer gruplar arasında istatistiksel olarak fark yoktu ($p>0,05$). Grup III'e göre grup IV'te ileri derecede önemli artış ($p<0,001$) belirlenirken grup III ile diğer gruplar arasında istatistiksel olarak fark yoktu ($p>0,05$). Grup IV'e göre grup V ve grup VI arasında istatistiksel olarak fark yoktu ($p>0,05$). Grup V ve grup VI arasında istatistiksel olarak fark yoktu ($p>0,05$) (Tablo 4.11).

İnflamasyon bakımından grup I'e göre grup IV'te ileri derecede önemli artış ($p<0,001$) belirlenirken, grup I ile diğer gruplar arasında istatistiksel olarak fark yoktu ($p>0,05$). Grup II'ye göre grup IV'te çok önemli düzeyde artış ($p<0,01$) belirlenirken, grup II ile diğer gruplar arasında istatistiksel olarak fark yoktu ($p>0,05$). Grup III'e göre grup IV'te çok önemli düzeyde artış ($p<0,01$) belirlenirken, grup III ile diğer gruplar arasında istatistiksel olarak fark yoktu ($p>0,05$). Grup IV'e göre grup V'te çok önemli düzeyde azalma belirlendi ($p<0,01$). Grup IV ve grup VI arasında istatistiksel olarak fark yoktu ($p>0,05$). Grup V ve grup VI arasında istatistiksel olarak fark bulunamadı ($p>0,05$) (Tablo 4.11).

Tablo 4.11. Kontrol ve deney gruplarına ait hücresel nekroz, hücresel dejenerasyon, nodüler yapı ve inflamasyon skorlarının istatistiksel değerlendirilmesi

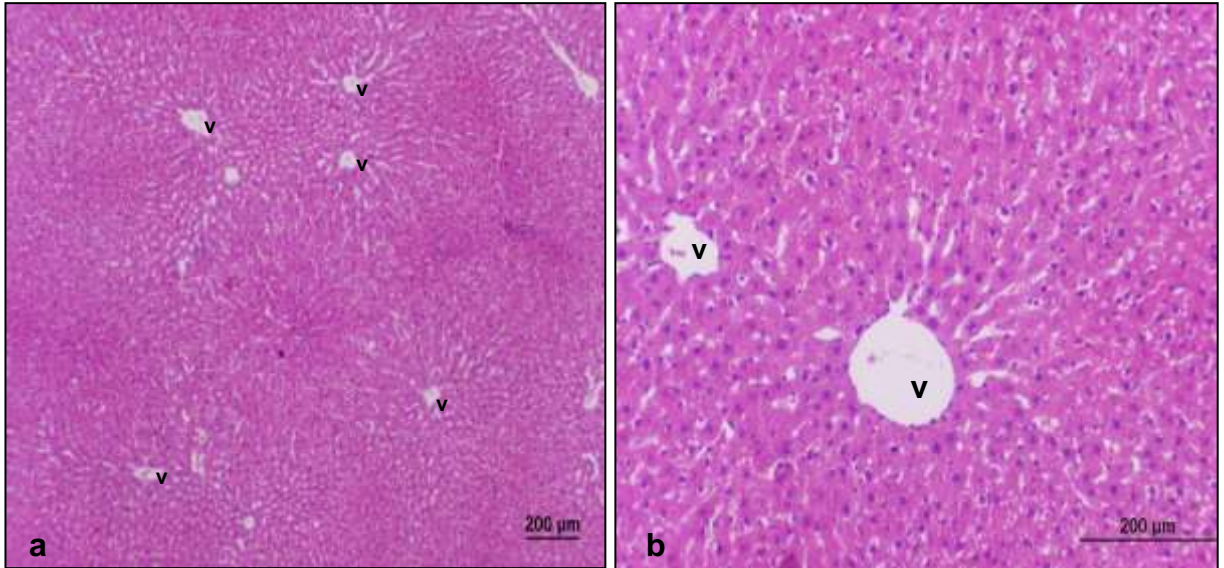
	Grup I	Grup II	Grup III	Grup IV	Grup V	Grup VI
Hücresel nekroz	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	2 (2-3) **, aaa, bbb	0 (0-0,75) ##	1(0,25-1,75)
Hücresel dejenerasyon	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	3(2,25-3) **, aaa, bbb	1(0-1) #	1(1-1,75) *, a, b
Nodüler yapı	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	2(2-2) **, aaa, bbb	1(0-1)	1(0,25-1,75)
İnflamasyon	0 (0-0)	0(0-0,75)	0(0-1)	3(2-3) **, aa, bb	0(0-1) ##	1(0,25-2)

Grup I'e göre fark: *, p<0,01, **, p<0,001

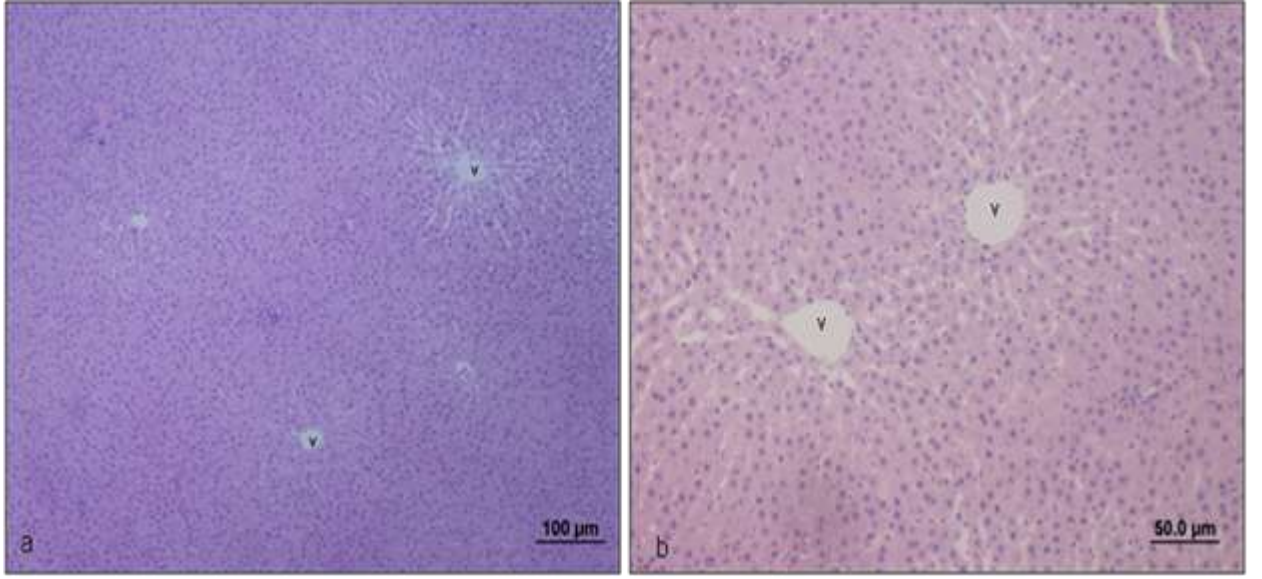
Grup II'ye göre fark: ^a; p<0,05, ^{aa}; p<0,01, ^{aaa}; p<0,001

Grup III'ye göre fark: ^b; p<0,05, ^{bb}; p<0,01, ^{bbb}; p<0,001

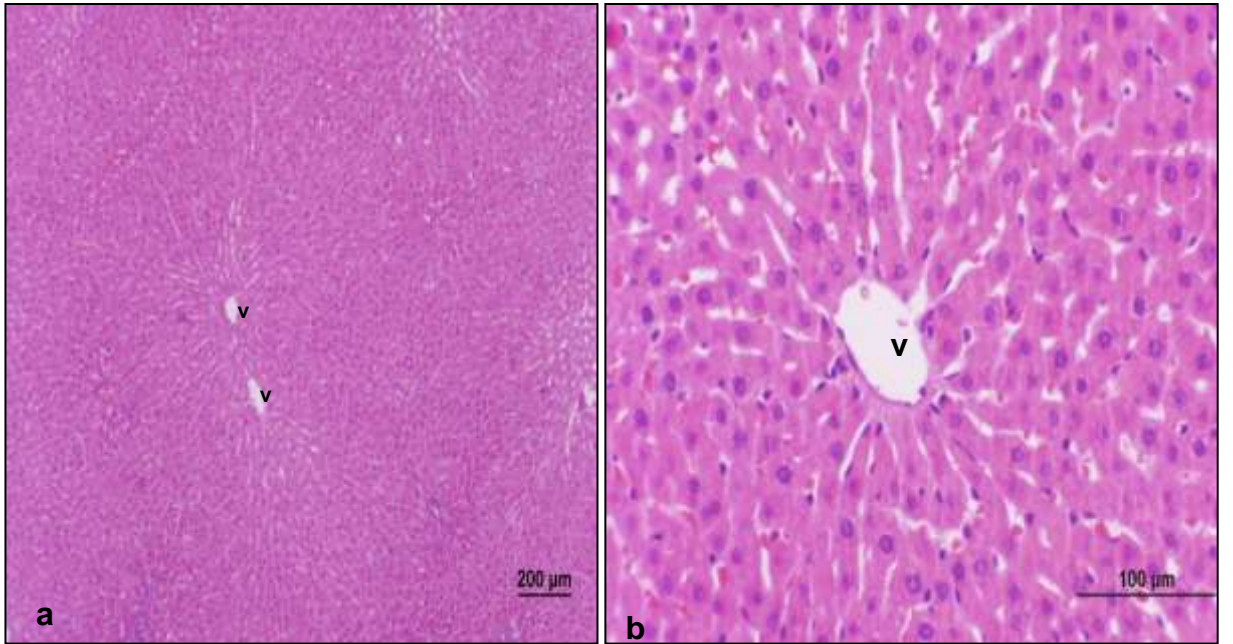
Grup IV'e göre fark: [#]; p<0,05, ^{##}; p<0,01



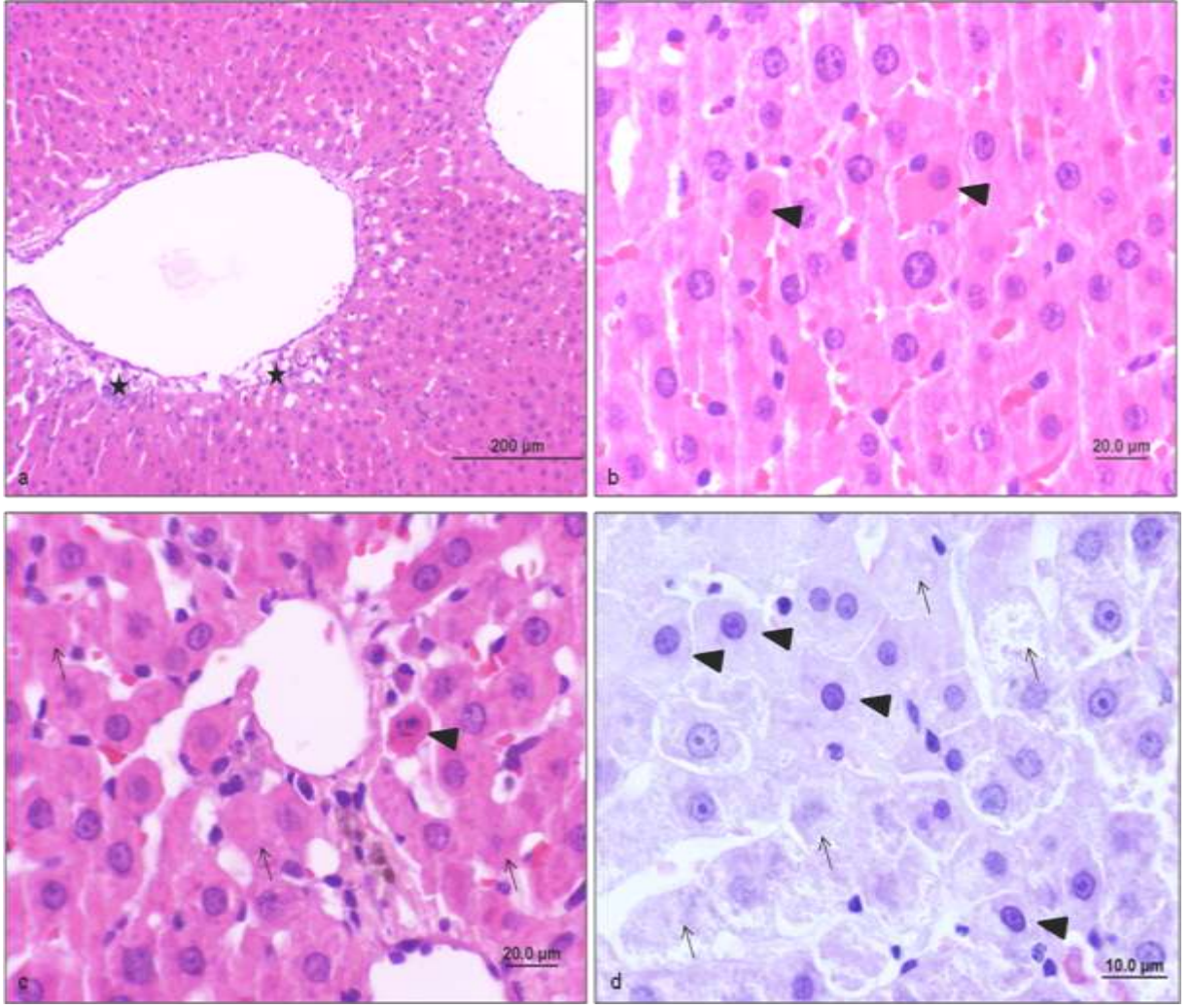
Şekil 4.11. Grup I'e ait Karaciğer Dokusu Örneklerinin Işık Mikroskobu İnceleme Görüntüleri. Grup I'de hepatosit hücreleri, sinüzoidal yapılar ve vena sentralis (v) yapılarıyla beraber normal görünümlü karaciğer yapısı görülmekte (a, b), (HE, bar:200µm).



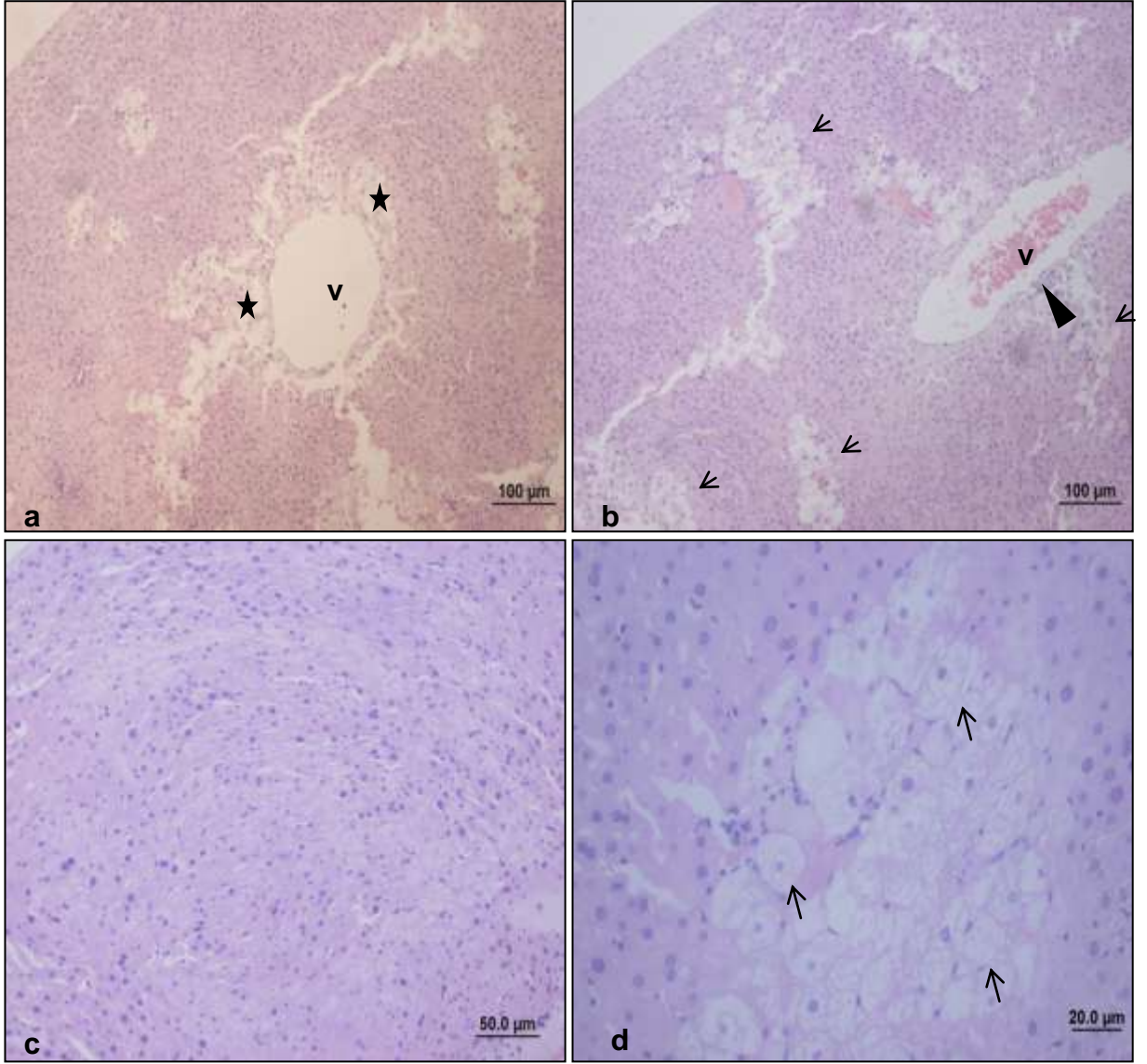
Şekil 4.12. Grup II'ye ait karaciğer dokusu örneklerinin ışık mikroskobu inceleme görüntüleri. Grup II'de Hepatosit hücreleri, sinüzoidal yapılar ve vena sentralis (v) yapılarıyla beraber normale yakın görümlü karaciğer yapısı görülmekte (a,b), (HE, bar:100µm, bar:50.0µm).



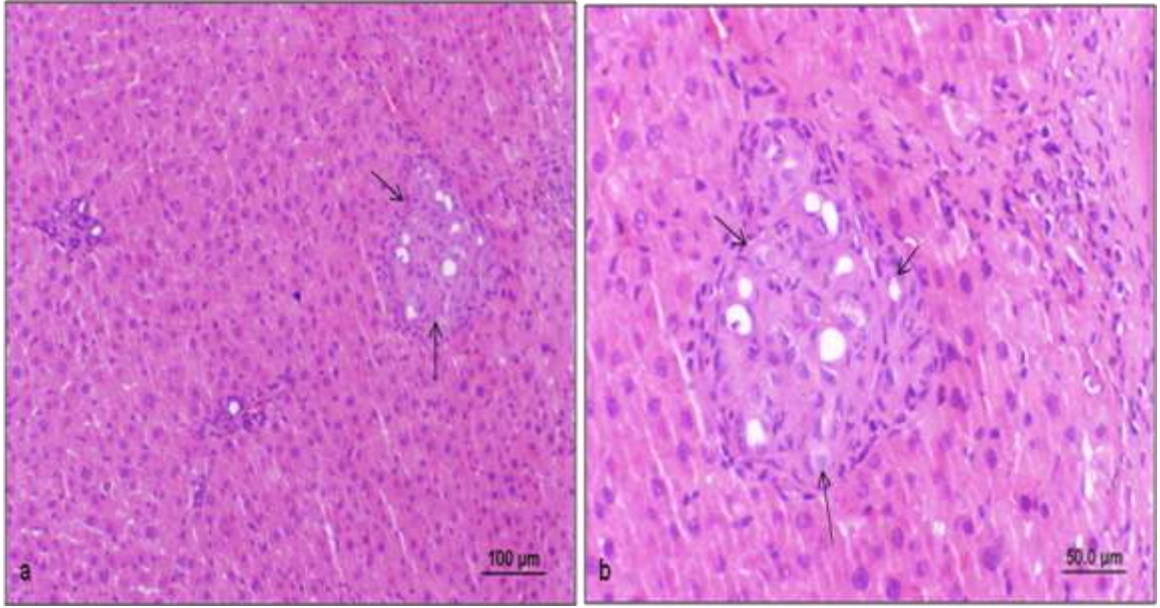
Şekil 4.13. Grup III'e ait karaciğer dokusu örneklerinin ışık mikroskobu inceleme görüntüleri. Grup III'te hepatosit hücreleri, sinüzoidal yapılar ve vena sentralis (v) yapılarıyla beraber normal görümlü karaciğer yapısı görülmekte (a, b), (HE, bar:200µm, bar:100µm).



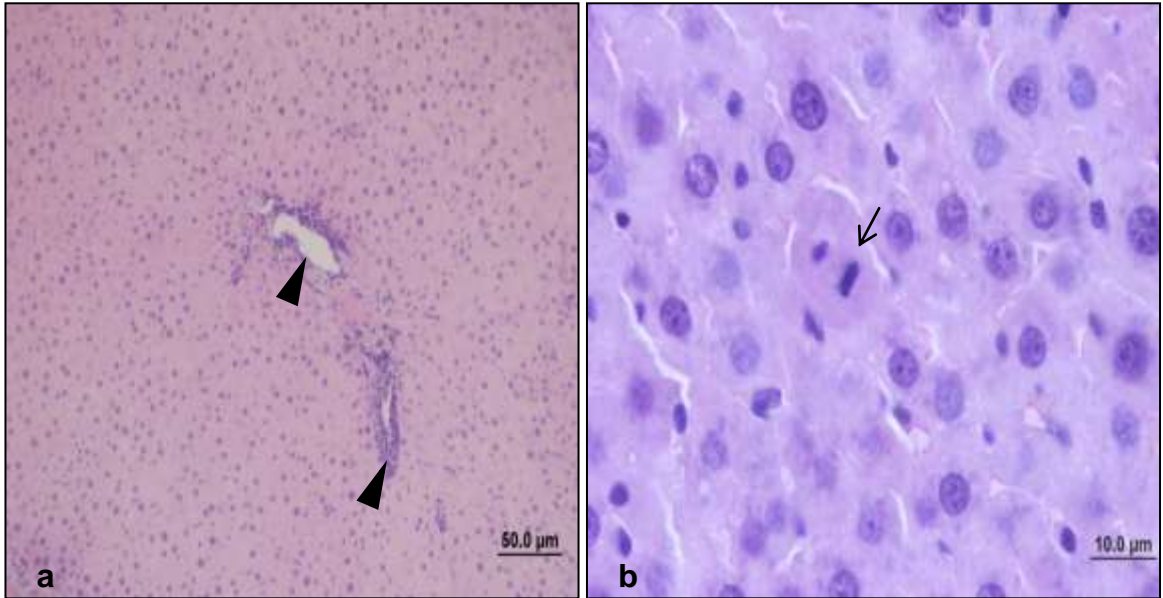
Şekil 4.14. Grup IV'e ait karaciğer dokusu örneklerinin ışık mikroskobu inceleme görüntüleri. Grup IV'te karaciğerde yoğun hasar görülmekte özellikle vena sentralis (v) etrafındaki hücrelerde hasar (*) (a), piknotik nükleuslu eozinofilik sitoplazmalı nekrotik hepatosit hücreleri (►) (b,c,d), karyolizis gözlenen hepatosit hücreleri (→) (c,d) izlenmekte (HE, bar:200µm, bar:20.0µm, bar:10.0µm).



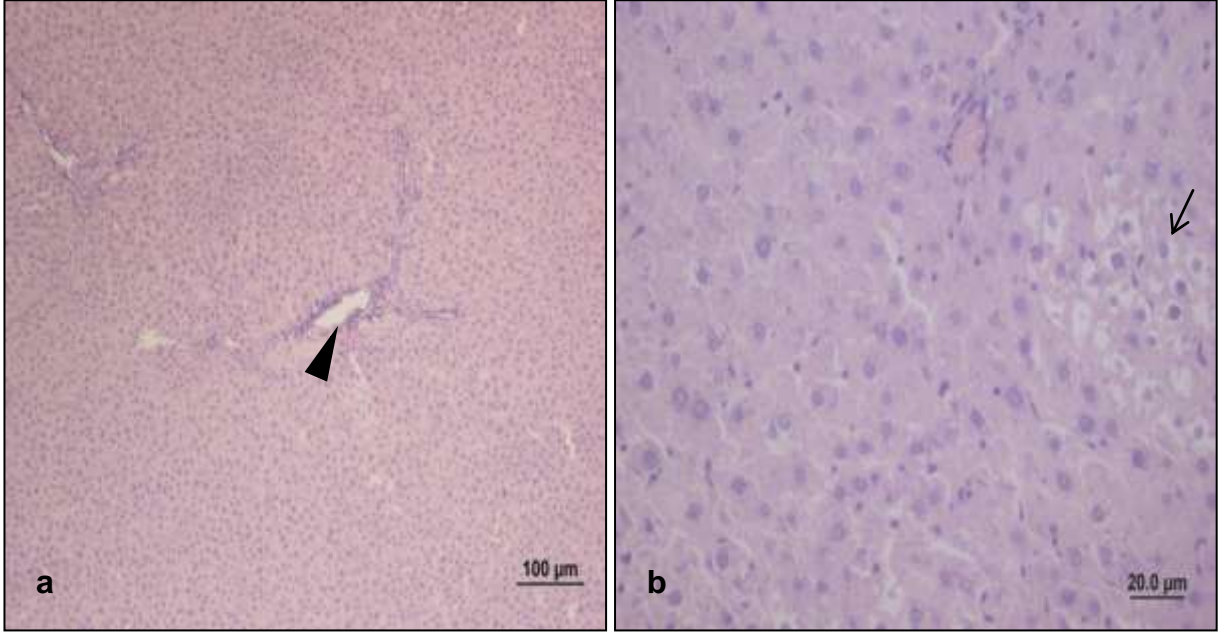
Şekil 4.15. Grup IV'e ait karaciğer dokusu örneklerinin ışık mikroskobu inceleme görüntüleri. Grup IV'te karaciğerde yoğun hasar görülmekte özellikle vena sentralis (v) etrafındaki hücrelerde yoğun hasar (*) (a,b), birçok hücrede hidropik değişiklikler (→) (b,d), nodüler tarzda düzenlenmiş hepatosit hücre kordonları (c) izlenmekte (HE, bar:100µm, bar:50.0µm bar:20.0µm).



Şekil 4.16. Grup IV'te Karaciğer parankiminde proneoplastik fokus (→) dikkat çekmekte (a,b), (HE, bar:100µm, bar:50.0µm).

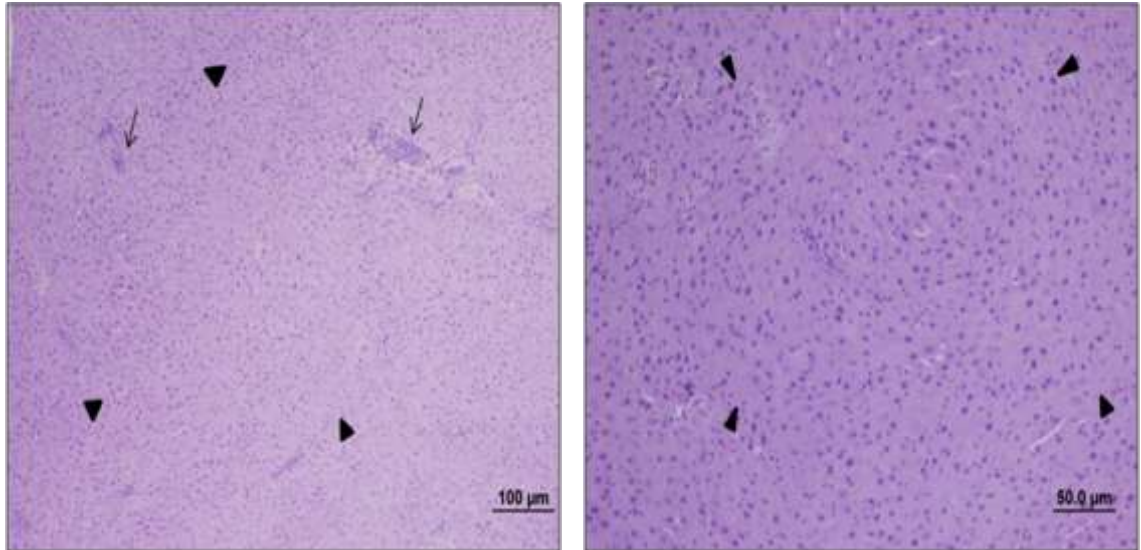


Şekil 4.17. Grup V'e ait karaciğer dokusu örneklerinin ışık mikroskobu inceleme görüntüleri. Grup V'te karaciğerde azalmış hasar ile birlikte normale yakın karaciğer yapısı görülmekte. Portal alanda kısmi hüresel infiltrasyon (►) (a) ile bazı hepatositlerde hücre bölünmesi dikkat çekmekte (→) (b) gözlenmekte (HE, bar:50.0µm bar:10.0µm).



Şekil 4.18. Grup VI'ya ait karaciğer dokusu örneklerinin ışık mikroskobu inceleme görüntüleri. Grup VI'da karaciğerde grup IV'e göre azalmış hasar görülmekle birlikte, grup V'e göre daha yoğun hasar dikkat çekmekte. Portal alanda kısmi hüresel infiltrasyon (►) (a) ile bazı hücrelerde hidropik değişiklikler gözlenmekte (→) (b) (HE, bar:100µm bar:20.0µm)

Çalışmamızda yapılan ön denemeler sonucunda 7. haftada preneoplastik fokus oluşumuna rastlanılması sonucunda Grup VI'da bu haftada $[Au(dppz)Cl_2]Cl$ uygulamasına başlanılmıştır.



Şekil 4.19. Ön dnmelerde 7. haftada elde edilen preneoplastik fokus görüntüsü. Karaciğerde preneoplastic fokus alanları görülmekte (►) ayrıca hüresel inflamasyon dikkat çekmekte (→) (HE, bar:100µm).

5. TARTIŞMA

Bütün organizmalar kaçınılmaz bir şekilde ve sürekli olarak yabancı kimyasallara ve ksenobiyotiklere maruz kalırlar. Bunlar; ilaçlar, endüstriyel kimyasallar, pestisidler, pişmiş gıdaların piroliz ürünleri, alkaloidler, sekonder bitki metabolitleri, küfler, bitkiler ve hayvanlar tarafından üretilen toksinler gibi doğal ve insan yapımı kimyasallardır (168).

Bir kimyasal bileşiğin kendisi toksik olabileceği gibi organizmada biyotransformasyon sonucu toksik bileşiklere dönüşebilmektedir. Karsinojenik ve mutajenik bileşikler kuvvetli elektrofilik özellik taşırlar. Elektrofilik ara ürünlere dönüşerek metabolize olan bileşikler genellikle alkilleyici ajanlar olarak bilinir. Reaktivitesi yüksek olan bu bileşikler organizmada nükleofilik özellikli -SH, -NH₂ ya da -OH gruplarını içeren proteinlerle, RNA ve DNA gibi makromoleküllerle kovalent bağ yapabilirler. Bu bağlanmanın kimyasal karsinogenez olgusunda neoplastik gelişimi başlattığı düşünülmektedir (81).

Diyetin de içerisinde yer aldığı çevresel ve coğrafi etkenler belirli kanser türlerinin insidansı ile ilişkilidirler. Dietilnitrozaminin birçok hayvan türünde çeşitli organlarda tümör oluşumunu indüklediği belirlenmiştir. Dietilnitrozaminin metabolik aktivasyonu cyp 450 kataliziyle hidroksilasyonunu gerektirir. Oluşan stabil olmayan metabolitler DNA'da alkilasyona neden olur, böylece tümör formasyonu gerçekleşir. Çeşitli cyp 450 formlarında yer aldığı faz I ve faz II enzimleri ekspresyonlarının FB uygulaması ile arttığı gösterilmiştir (7). Bu tip kimyasallara maruziyetin artması durumunda mutajenik ve karsinojenik sonuçlar ortaya çıkmaktadır. İnsan vücudu bu tip kimyasal bileşiklere karşı çok çeşitli savunma mekanizmaları geliştirmesine rağmen bu kimyasal bileşiklere karşı giderek artan maruziyet nedeniyle, mutajenik ve/veya karsinojenik özelliklerini baskılayabilecek nitelikte diğer bileşiklerin kullanılmasına gerek vardır (81).

Antikanser ilaçlar, sitotoksinler olarak ifade edilen antiproliferatif ajanlardır (67). Metal türevleri içinde kanser tedavisinde genelde platin bileşikleri kullanılmaktadır. Son yıllarda altın (III) bileşikleri, sisplatin tedavisine karşı bir

alternatif olarak kullanılmaktadır. Çünkü bunlar yapısal olarak birbirleriyle benzer özellikler gösterir. Altın ilaçlarının onlarca yıldır kullanıldığı düşünülmektedir. Ancak bunların etki mekanizması hala araştırılmaktadır (133).

Enzimlerin değişen aktiviteleri (AST, ALT, LDH), hücre proliferasyonunun etkilerini yansıtmaktadır ve tümör hücrelerinde metabolik turnoverları normal hücrelerden oldukça farklıdır. Aktivitelerindeki artış kanser durumunda transformasyona uğrayan hücrelerin sayısı ile korelasyon göstermektedir (93).

Alaninaminotransferaz ve AST vücutta birçok organ ve dokuda yaygın olarak bulunan enzimlerdir (71). Transaminazların seviyesi karaciğer fonsiyonunu göstermektedir ve bu enzimlerin serumda artmış seviyeleri karaciğer hasarının bir göstergesidir. Kanser kemoprevensiyonu ve terapisi bu enzimlerin araştırılmasına bağlıdır (183). Biyolojik sistemlerde transaminasyonun rolü iyi bilinmektedir. α -ketoglutarik asit, oksaloasetik asit, pürivik asit diğer yandan aspartik asit ve glutamik asit transaminaz substratlarıdır. Transaminasyon oldukça önemli metabolitlerin dönüşümüyle ilgilidir (93).

Alaninaminotransferaz öncelikle karaciğer ve böbreklerde bulunup, kalp ve iskelet kasında daha az miktarda mevcut iken (122), AST karaciğer dışında kalp kası, iskelet kası, böbrek, pankreas, akciğer, beyin ile lökosit ve eritrosit gibi kan hücrelerinde de bulunmaktadır. Dolayısıyla serum aminotransferaz aktivitesinde yükseklik karaciğer dışı nedenlerden de kaynaklanabilir (54). Alaninaminotransferaz hücre sitoplazmasında bulunurken AST hem sitoplazmada hem de mitokondride bulunur (122). Alaninaminotransferaz karaciğer hastalıkları için AST den daha spesifik olmakla birlikte bazı karaciğer hastalıklarında AST'nin daha fazla artış göstermesi mümkündür (71). Aspartataminotransferaz ve ALT hücre hasarı ve plazma membranının bozulması sonucunda sitoplazmadan kana salınmaktadır. Serum AST ve ALT hepatik hasarın teşhisinde biomarkırdırlar çünkü hepatik hasar sonrasında kana salınırlar (175).

Aminotransferazlar karaciğerde hasar meydana geldiğinde teşhiste kullanılan ilk enzimlerdir (97). Karaciğer dokusunda karsinojenler nedeniyle inflamasyon ve

nekrozun oluşması bu enzimlerin karaciğer hücrelerinden plazmaya sızmalarına sebep olur (8). Kanserli hayvanlarda artmış aminotransferaz aktivitesi gözlenmiştir. Hepatosellüler karsinomada artmış transaminaz aktivitesi belirlenmiştir ve tedavi sırasında tümör kütlesi ile AST ve ALT arasında bir korelasyon olduğu gösterilmiştir. Kemoterapi sonrası hepatik malignansili, ilaca yanıt vermeyen hastalarda bu enzimlerin seviyesinde artış belirlenmiştir (93).

Shaarawy ve arkadaşları çalışmalarında DEN uygulamasının ratlarda ALT ve AST seviyelerini arttırdığını göstermişlerdir (175). Dietilnitrozamin ve FB uygulaması, hücre membranının bozulmasına ve tahrip olmasına neden olarak transaminazların karaciğer dokusundan sızmasına yol açar (183). Dietilnitrozamin bir hepatotoksin ve karsinojendir. Dietilnitrozamin verilen hayvanlarda AST ve ALT seviyelerindeki artış, hepatotoksisite ve karsinogenezde preneoplastik değişimlerin gelişimi, artmış çeşitlilik ve karaciğer karsinomasının ilerleyen evreleri ile ilişkilidir (93).

Sun ve arkadaşlarının farelerde DEN ve FB ile oluşturulan tümör modelinde ALT seviyelerinde kontrole göre artış olduğunu ancak AST seviyesinde ise önemli bir değişim olmadığını belirtmiştir (183). Jahan ve arkadaşları, sıçanlarda DEN ve FB ile indüklenen hepatokarsinogenez modelinde serum AST ve ALT seviyelerinin arttığını göstermişlerdir (93). El Mesallamy ve arkadaşları kimyasal olarak DEN ile ratlarda oluşturulan hepatokarsinogenezis modelinde AST ve ALT düzeylerindeki artışı, DEN uygulaması ile serbest radikal üretiminin artmasına bağlı olarak hepatosellüler membranın zarar görmesi ve sitoplazmik enzimlerin sistemik sirkülasyona salınmasına bağlamışlardır (60). Taha ve arkadaşları, DEN/Asetilaminofloran sıçan hepatokarsinogenezis modelinde benzer şekilde AST ve ALT seviyelerinin kontrol grubuna göre arttığını ve bu durumun karaciğer hasarının bir göstergesi olduğunu belirtmişlerdir (186).

Çalışmamızda grup I, grup II ve grup III'e göre DEN ve FB uygulaması yapılan grupta (grup IV) serum ALT ve AST değerleri artmıştır. Grup IV'te ALT ve AST seviyelerinde belirlenen artışın nedeni DEN ve FB uygulamasının karaciğer dokusunda nekroz ve inflamasyonu arttırmasına bağlı olarak bu enzimin karaciğer hücrelerinden seruma sızması olarak açıklanabilir. Hem ALT hem de AST açısından grup I'e göre

grup II ve grup III arasında istatistiksel olarak fark yoktu. Bu durum çözücü olarak kullandığımız DMSO ve $[Au(dppz)Cl_2]Cl$ kompleksinin membran bütünlüğüne zarar vermediğini göstermektedir.

Serum ALT seviyesi bakımından grup IV'e göre grup V ve grup VI'da ileri derecede önemli azalma belirlendi. Çalışmamızda $[Au(dppz)Cl_2]Cl$ kompleksinin karaciğer parankim hücrelerinde rejenerasyona neden olduğu ve membran bütünlüğünü koruyarak bu enzimlerin sızmasını önlediği söylenebilir. AST değerleri açısından ise $[Au(dppz)Cl_2]Cl$ uygulaması ile grup V ve grup VI'da AST değerlerinde azalma gözlenmesine rağmen bu sonuç istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur. Lum ve arkadaşlarının Au (III) meso-tetraarylpophyrin ile hepatosellüler hücre dizisinde yaptıkları çalışmada Au (III) meso-tetraarylpophyrin kompleksinin sham grubuna göre AST seviyelerini düşürdüğünü ve Au (III) meso-tetraarylpophyrin'in normal karaciğer hücrelerine zarar vermediğini belirtmişlerdir (124). Çalışmamızda $[Au(dppz)Cl_2]Cl$ uygulaması ile ALT değerlerinde gözlemlenen azalma AST değerlerine yansımamıştır.

Laktat dehidrogenaz enzimi glikolizin anahtar enzimidir ve laktat üretimini katalizler. Bu enzim tüm dokularda yaygın olup beş izoenzimi vardır. Karaciğer dokusu LDH5 yönünden daha zengindir. Kardiyolojik problemler dışında LDH ve izoenzimleri ile ilgili çalışmalar, genellikle karaciğer maligniteleri başta olmak üzere çeşitli malignitelere ve bazı karaciğer hastalıklarına yöneliktir (30). Karaciğer parankimasının hasarlanmasından sonra bu izoenzimler yükselebilmektedir (113). Yükselmiş serum LDH'ı genellikle karaciğer hasarı ile ilişkilidir ve hasarlanan hücrelerden kana salınır (44). Jahan ve arkadaşları, sıçanlarda DEN ve FB ile indüklenen hepatokarsinogenez modelinde serum LDH seviyelerinin arttığını göstermişlerdir (93). Benzer şekilde Jagadeesh ve arkadaşları, DEN/FB ile oluşturdukları sıçan hepatokarsinogenez modelinde LDH seviyelerinin sağlıklı sıçanlara kıyasla artış gösterdiğini gözlemlemişlerdir. Toksik karaciğer hasarında LDH seviyelerinde kritik değişimler olabileceğini ve membran bütünlüğünün ve geçirgenliğinin toksik ajanlara yanıt olarak nonspesifik değişimler gösterebileceğini belirtmişlerdir (92).

Bizim çalışmamızda literatürlerle (92, 93) uyumlu olarak serum LDH değerleri bakımından, grup I'e göre karsinojenlerin uygulandığı grup IV'te önemli düzeyde artış

belirlendi. Grup V'te grup I'e göre önemli düzeyde artış belirlendi. Dietilnitrozamin ve FB uygulaması ile LDH seviyelerinin artış göstermesi muhtemelen bu toksik ajanlarının membran bütünlüğüne ve geçirgenliğine zarar vermesi nedeni ile gerçekleşmektedir. Grup I, grup II ve grup III arasında istatistiksel olarak fark yoktu. Bu durum DMSO ve [Au(dppz)Cl₂]Cl kompleksinin sağlıklı hücrelerde membran bütünlüğüne zarar vermediğini ve dolayısıyla LDH sistemik dolaşıma salınmadığını göstermektedir. Grup IV'e göre [Au(dppz)Cl₂]Cl kompleksinin uygulandığı grup V ve grup VI arasında LDH seviyesi bakımından azalma gözlenmesine rağmen bu değer istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Çalışmalarda apoptoz disregülasyonunun hepatosellüler karsinoma oluşumunda önemli bir neden olduğu gösterilmiştir. Apoptozun indüklenmesi kanserden korunma için önemli bir mekanizmadır (221). Kaspaz 3 apoptozun en önemli bir mediyatörüdür. Apoptotik kaskatta başlıca enzim kaspaz 3'tür ve sıklıkla apoptotik aktiviteyi belirlemede kullanılır (84).

Fujikawa ve arkadaşları, insanlarda hepatosellüler karsinomada kaspaz 3 ekspresyonunun sağlıklı gruba göre azalmış olduğunu immünohistokimyasal olarak belirlemişlerdir (64). Bunun aksine Persad ve arkadaşlarının hücre kültüründe ve insanlar üzerinde yaptığı çalışmada ise kaspaz 3'ün ekspresyonunda kontrol grubuna göre artış gözlemlenmiştir. Burada belirlenen kaspaz 3 artışının α -feto protein (AFP) onkoproteinine bağlı olabileceği belirtilmiştir. AFP düşük konsantrasyonda hepatosellüler karsinoma hücre dizileri için büyüme faktörüyken yüksek konsantrasyonlarda kaspaz 3 aktivasyonunu indükleyerek apoptozu arttırabileceği bildirilmiştir. Fakat aynı çalışmada kaspaz 3'ün ekspresyonunun artmasına rağmen aktivitesinde ve apoptozda herhangi bir artış meydana gelmediği gösterilmiştir. Kaspaz 3 ekspresyonunun azalması çeşitli tümör ve hücre kültürü çalışmalarında apoptoz ve tedaviye direnç olduğunu göstermektedir. Meme kanseri ve lenfomalarda kemoterapötik ajanların da yer aldığı apoptotik stimülülere direncin, kaspaz 3'ün yetersiz ekspresyonu nedeniyle olduğuna dair bilgi mevcuttur. Sisplatin-tamoksifen ve iyonize radyasyonla indüklenen apoptoz direnç, meme, lenfosit ve HeLa hücre dizisinde kaspaz 3'e bağlıdır (157). Kanser hücrelerinde APAF-1 eksikliğinin belirlendiği ve buna bağlı olarak

kaspaz aktivitesinin azaldığı belirtilmiştir (162). Zhang ve arkadaşları çalışmalarında DEN ile oluşturdukları hepatokarsinogenez modelinde, DEN uygulaması yapılan grupta kaspaz 3 protein seviyelerinin azaldığını göstermişlerdir (221). Sun ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada hepatosellüler karsinomada hücre apoptozu ile kaspaz 3 ekspresyonu arasında bir korelasyon olmamasına rağmen, kaspaz 3 ekspresyonunun azalmasının hepatosellüler karsinoma oluşumuna katkıda bulunabileceğini bildirmişlerdir (184). Che ve arkadaşları tarafından in-vitro ve in-vivo olarak gerçekleştirilen hepatosellüler karsinoma modellerinde uyguladıkları bir seri Au (III) porfirin kompleksinin potent antikanser etki gösterdiğini gözlemlemişlerdir. Au (III) porfirin 1a'nın hem kaspaz bağımlı hem de kaspaz bağımsız yolak ile apoptozu indüklediği belirtilmiştir. Bu kompleksin ROS'ni arttırdığı ve membran geçirgenliğini değiştirdiğini belirtmişlerdir (124).

Çalışmamızda karaciğer dokusu kaspaz 3 değerleri bakımından grup I'e göre grup II ve grup III arasında istatistiksel olarak fark yoktu. Grup I'e göre grup IV'te ileri derecede önemli azalma belirlendi. Grup IV'e göre grup V ve grup VI'da ileri derecede önemli artış belirlendi. Grup VI'ya göre grup V'te ileri derecede önemli artış belirlendi. Çalışmamızda uygulamış olduğumuz DEN ve FB grup IV'te kaspaz 3 ekspresyonunda azalmaya neden olmuş olabilir. Çalışmamızda kullandığımız $[Au(dppz)Cl_2]Cl$ kompleksinin Che ve ark. yaptıkları çalışmada olduğu gibi membran permeabilitesini değiştirerek sitokrom c'nin sitozole salınmasına neden olduğunu ve kaspaz 3 miktarını artırarak etkisini gösterdiğini düşünmekteyiz.

Hücrel strese cevapta p53 tümör baskılayıcı proteini ana bileşendir. DNA hasarı, hipoksi, ısı stresi gibi durumlarda hücrel stresin kaynağına ve miktarına bağlı olarak hücre DNA'sının tamiri, hücre döngüsünün durdurulması ve apoptozu düzenlemektedir. p53 DNA ile sekans spesifik etkileşim yoluyla, CDKN1A (p21) ve Mdm-2'de dahil olmak üzere bazı genlerin transkripsiyonunu baskılar veya aktive eder. Mutasyona uğramış insan tümörlerinin çoğunda örneklendiği gibi p53 genom stabilitesinin kritik bir göstergesi olarak fonksiyon görür (98). p53 normal şartlar altında oldukça kararsız bir proteindir ve Mdm-2 proteininin etkisi ile p53 inaktive edilir. Mdm-2, p53 ubikuitinasyonunu ve ardından 26S proteazom ile yıkımı sırasında p53

stabilizasyonunun negatif düzenleyicisi olarak etki gösterir. Hücresel stres sırasında p53 stabilizasyonu yolundaki primer yol p53-Mdm-2 etkileşiminin engellenmesidir (53). Mdm-2'nin aşırı ekspresyonu veya amplifikasyonu çeşitli tipteki insan kanserlerinde sıklıkla gözlenir (147).

Tümör oluşumunda p53 tümör baskılayıcısının inaktivasyonu sıklıkla gerçekleşen bir olaydır. p53 geni mutasyona uğramakta ve mutant p53 proteinleri onkojenik fonksiyonlar kazanmaktadır (165). Finnberg ve arkadaşları DEN ve FB uygulaması yapılan ratların karaciğerinden elde ettikleri hepatositlerde p53 seviyesinde azalma belirlemiştir (63).

p53 tümör baskılayıcı proteini birçok proapoptotik gen ürününün ekspresyonunu indükler ve intrinsik ve ekstrinsik yolu başlatır (104). p53 tümör baskılayıcı protein malignan gelişimi önlemede önemli rol oynamaktadır. Birçok insan tümöründe p53'ün baskılandığı ya da kaybolduğu belirlenmiştir. p53 geninde kayıp ya da mutasyonun karaciğerde adenom oluşumuyla bağlantılı olduğu belirtilmiştir (56).

Çalışmamız karaciğer dokusu p53 değerleri bakımından değerlendirildiğinde grup I ve grup II arasında istatistiksel olarak fark bulunamamıştır. Grup I'e göre grup IV'te ileri derecede önemli azalma belirlenirken grup I'e göre grup III, grup V ve grup VI'da ileri derecede önemli artış belirlenmiştir. Grup II'ye göre grup III, grup V ve grup VI'da ileri derecede önemli artış belirlenirken grup IV'te ileri derecede önemli azalma bulundu. Grup IV'e göre grup III, grup V ve grup VI'da ileri derecede önemli artış belirlendi. Grup III'e göre grup V ve grup VI'da ileri derecede önemli artış belirlendi. Grup V ve grup VI arasında istatistiksel olarak fark bulunamadı. Deneysel karaciğer kanser modeli oluşturmak için inisiyator olarak DEN ve promotör olarak FB kullandığımız çalışmamızda uygulamış olduğumuz bu kimyasallar karaciğerde p53 seviyesini azaltmıştır. Bu durumda DNA hasar tamirinde rol alan, hücre döngüsünü durdurulabilen ya da hücreyi ölüme götüren p53'ün fonksiyonunu yapamaması dolayısıyla değişmiş hücrelerin proliferasyona gidebileceğinin bir göstergesi olarak yorumlanabilir. Literatürde çeşitli tipteki kanserlerde Mdm-2'nin aşırı ekspresyonunun sıklıkla gözlemlendiği belirtilmiştir (147). Çalışmamızda grup IV'te gözlemlenen p53 seviyesindeki azalma, Mdm-2'deki artış nedeniyle p53'ün transkripsiyonel aktivitesinin

inhibe olmasından kaynaklanıyor olabilir. Grup III'te p53 artışı belirlenmiş ancak bu grupta p53'ün etkileyebileceği ölçülen diğer parametreler açısından herhangi bir değişim olmaması bu artışın sadece miktarla sınırlı kaldığını ve sağlıklı hücrelerde fonksiyonunu etkilemediğini düşündürmektedir. Grup IV'e göre $[Au(dppz)Cl_2]Cl$ kompleksi uygulanan gruplarda (grup V ve grup VI) p53 düzeylerinde belirlenen artış nedeniyle maddemizin hasarlı hücrenin apoptozuna yol açıyor olabilir. Bu durum DEN ve FB uygulaması yapılan sıçanlarda hücre membranlarının hasar görmüş olması nedeniyle $[Au(dppz)Cl_2]Cl$ kompleksinin, hücre içine geçişinin sağlıklı hayvanlara kıyasla daha kolay olabileceğini düşündürmektedir. Şimdiye kadar altın bileşikleriyle yapılan çalışmalarda bu komplekslerin antitümör etkili olduğu ve hepatosellüler karsinomada apoptozu indüklediği vurgulanmış (39,124) ancak bunu apoptoz yolağında yer alan parametreler üzerine etkilerine dair net bir bilgi bulunmamaktadır. Bu durum $[Au(dppz)Cl_2]Cl$ kompleksinin p53 proteininin artışına neden olarak apoptozu indükleyebileceğinin göstergesi olabilir.

Antiapoptotik Bcl-2 proteini, proapoptotik proteinleri nötralize eder ve kanser hücrelerinin apoptozla geçme yeteneğini belirlemede çok önemlidir. Bax normalde sitoplazmada bulunurken apoptozu ilerletmek için mitokondriye transloke olur. Fakat Bax aktivitesi Bcl-2 gibi antiapoptotik proteinler tarafından giderilmektedir. Birçok kanser hücreleri Bcl-2 gibi antiapoptotik proteinlerin artmış ekspresyonu nedeniyle apoptozdan kaçınmaktadır (221). Hepatosellüler karsinomada gözlemlenen çeşitli genetik değişiklikler Bcl-2 ailesinin proapoptotik ve antiapoptotik üyeleri arasında dengesizliği tetiklemektedir. Bu proteinler aynı zamanda kanser tedavisi içinde önemli bir hedefdir. Bcl-2 apoptozu baskılayarak neoplastik hücrelerin yaşam süresini uzatmaktadır. Bishayee ve arkadaşları, DEN ve FB ile ratlarda oluşturdukları hepatokarsinogenez modelinde karaciğer dokusunda immünohistokimyasal boyama sonucu Bax pozitif hücrelerin oldukça düşük seviyelerde olduğunu belirlerken Bcl-2 pozitif hücrelerin ise oldukça sık olduğunu göstermişlerdir. Sağlıklı rat dokusunda ise herhangi bir boyama belirleyememişlerdir (25). Zhang ve arkadaşları çalışmalarında DEN ile oluşturdukları hepatokarsinogenez modelinde, DEN uygulaması yapılan grubu kontrol grubu ile kıyasladıklarında Bax protein seviyelerinde azalma belirlenirken Bcl-2 protein seviyelerinin arttırdığını göstermişlerdir (221). İnsan miyeloid hücre dizisinde

Au(III)-methylsarcosine dithiocarbamate türevleri ile yapılan çalışmada bu Au komplekslerinin antiproliferatif ve apoptotik etkileri belirlenmiş, antiapoptotik Bcl-2 molekülünün baskılandığı ve proapoptotik Bax proteininin ise upregülasyonunu indüklediği belirtilmiştir (12).

Çalışmamızda Bcl-2 immünohistokimyasal boyamasında grup I, grup II ve grup III'e göre grup IV'te artış belirlendi. Bu durum çalışmamızda inisiyator olarak DEN ve promotör olarak FB kullanılarak oluşturulan rat modelinin karaciğer dokusunda Bcl-2 seviyelerinde artışa neden olduğu dolayısı ile bu antiapoptotik proteinin artması ile apoptozun engellendiği söylenilebilir. [Au(dppz)Cl₂]Cl kompleksinin kullanıldığı gruplarda (grup V ve grup VI) grup IV'e göre Bcl-2 düzeyleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı.

Bax immünohistokimyasal boyamasında grup I, grup II ve grup III'e göre grup V'te artış belirlendi. Grup IV'e göre grup V'te Bax değerleri açısından artış belirlenmiştir. İlginç olarak apoptoz indüksiyon mekanizmasında Bcl-2/Bax oranından daha çok tek başına Bcl-2 miktarına daha çok bağımlı olduğu belirtilmiştir (219). Bizim çalışmamızda da kontrol gruplarına kıyasla karsinojenlerin verildiği grupta Bax açısından bir fark bulunamamıştır. Bu durum grup IV'te Bax seviyeleri belirgin bir değişim olmadığı halde Bcl-2 seviyesinde gözlemlenen artışın apoptozun inhibisyonuna yol açabileceğini göstermektedir. Bununla birlikte [Au(dppz)Cl₂]Cl uygulaması yapılan grup V'te grup IV'e kıyasla Bax artışının belirlenmesi artan hücre proliferasyonuna karşın apoptoz mekanizmasının devreye girebilmesi açısından önemli olabilir.

Rodentlerde deneysel hepatokarsinogenez başlangıç, ilerleme ve progresyon aşamalarını kapsar. Apoptoz bütün aşamalarda önemli rol oynamakla birlikte özellikle ilerleme aşamasında etkilenmiş hepatositlerin klonal çoğalmasında önemlidir. Bu çoğalma preneoplastik hepatositlerin hücre proliferasyonunun selektif olarak artmasına ve apoptozun selektif olarak azalmasına sebep olmaktadır. Birçok çalışmada içlerinde FB'inde yer aldığı birçok ilerletici ajan sıçan hepatokarsinogenezinde preneoplastik hepatositlerin apoptozunu selektif olarak inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu durum kimyasallarla oluşturulan karaciğer kanser deneylerinde apoptozun çok önemli olduğunu göstermektedir (152). Apoptozun inhibisyonu ve preneoplastik klonların

çoğalması tümör promosyon aşamasında önemli rol oynar. Bir promotör olan FB ile preneoplastik fokuslarda apoptozun inhibisyonu gösterilmiştir (27). Bishayee ve arkadaşları ile Chodon ve arkadaşları, DEN ve FB ile sıçanlarda oluşturdukları hepatokarsinogenez modelinde sıçan karaciğer dokusunda sağlıklı ratlarda ve karsinojen uygulanan ratlarda apoptozun oldukça seyrek olduğunu belirlemişlerdir (25, 42). Taha ve arkadaşları çalışmalarında DEN ile indüklenen karaciğer hasarında karsinojen kontrol gruplarında apoptotik hücre ölümünün oldukça düşük olduğunu belirtmişlerdir (186).

Kemopreventif ajanlarda olduğu gibi çeşitli kemoterapötiklerde de apoptoz, temel etki mekanizması olarak öne sürülmektedir (25). Kromozomal DNA'nın oligonükleozomal büyüklükte fragmanlara bölünmesi apoptozun biyokimyasal karakteristiklerinden birisidir (222). DNA fragmantasyonunun belirlenmesi apoptozun güvenilir bir göstergesidir (25). DNA antikanser ilaçlar için başlıca hedeftir ve Au (III) komplekslerinin DNA'ya bağlanması yaygın olarak çalışılmıştır (215). Altın kompleksleri ile yapılan birçok çalışmada bu bileşiklerin sitotoksik ve antitümör etkiye sahip olduğu ve kanser hücrelerinde apoptoza neden olduğu belirtilmiştir. Mitokondri altın bileşikleri için bir hedeftir (13). Che ve arkadaşları servikal kanserli HeLa hücrelerinde [Au(III)(tetraporphyrin)]Cl₄ ile yapmış oldukları çalışmada bu bileşiğin apoptotik cisimciklerin oluşumuna ve DNA fragmantasyonuna neden olduğunu göstermişlerdir (39). Mitokondri apoptozda önemli rol oynamaktadır. Apoptozda öncelikli olarak mitokondri transmembranı çökmektedir (74). Elektron transferi sırasında protonlar, mitokondriyal membran potansiyeli oluşturur ve matriksten zarlar arası boşluğa salınırlar (88). Mitokondriyal membran potansiyelinin bozulması sonucunda membran potansiyelinin kaybolmasının, mitokondri bağlantılı apoptozu başlattığı kabul edilmektedir. Membran potansiyelinin kaybolması ATP sentezinin azalması ve dolayısıyla apoptotik faktörlerin salınmasına neden olur. Sitokrom c, AIF, SMAC/DIABLO mitokondriden sitoplazmaya geçerek hücre ölümüne neden olur (35). Yine bu bileşikler için mitokondriyal tiyoredoksin redüktaz oldukça özel bir hedeftir. Au kompleksleri ile yapılan çalışmalarda tiyoredoksin redüktazın azaldığı belirtilmiştir. Hücresel sistemlerde ve izole edilen mitokondride Au bileşiklerinin H₂O₂ üretimine neden olduğu auranofin uygulaması ile gözlemlenmiştir. Aynı zamanda Au(III)

dithiocarbamato türevleri ile yapılan çalışmada reaktif oksijen türlerinin üretimine yol açtığı belirtilmiştir. Bu durum Au(III) komplekslerinin mitokondriyal elektron transport zincirini stimülasyonundan daha çok tiyoredoksin redüktaz aktivitesi üzerine olan inhibitör etkisi ile ilgilidir. Bunun yanı sıra Au(III) dithiocarbamato komplekslerinin HeLa hücrelerinde ERK1/2 (ekstrasellüler sinyal düzenleyici kinaz 1/2) fosforilasyon seviyelerini arttırdığı belirtilmiştir. Reaktif oksijen türleri tarafından ERK1/2 yolağının aktivasyonu birçok çalışmada gösterilmiştir. ERK1/2 hücre proliferasyonu ve yaşamının yanı sıra apoptozun ilerlemesinde de önemli rol oynamaktadır. ERK indüklü apoptoz tam olarak anlaşılammış olmasına rağmen hem intrinsik hem de ekstrinsik yolağı etkilediği düşünülmektedir. ERK fosforilasyonunun inhibisyonu Bax ekspresyonunu azaltmaktadır (13). Çalışmamız DNA fragmantasyonu açısından hem TUNEL metodu ile hem de spektrofotometrik olarak değerlendirilmiştir.

Çalışmamızda DNA kırıklarının olduğu hücreler TUNEL pozitif olarak belirlendi. Grup I, grup II karaciğerlerinde TUNEL negatif hücreler gözlenirken grup III karaciğer örneklerinde az da olsa TUNEL pozitif boyanmış hücreler belirlenmiştir. Grup IV'te TUNEL yöntemi uygulanmış karaciğer örneklerinde az sayıda TUNEL pozitif boyanmış apoptotik hücreler gözlenmektedir. Grup V ve VI'da ise karaciğer örneklerinde TUNEL pozitif kahverengi boyanmış çok sayıda apoptotik hücre belirlenmiştir. Bu sonuçların göstermiş olduğu üzere çalışmamızda $[Au(dppz)Cl_2]Cl$ kompleksinin uygulanması ile tiyoredoksin redüktaz aktivitesini azaltmış olabilir. Bu durum ERK fosforilasyonunun artmasına, dolayısıyla apoptoza neden olmuş olabilir. Bunun yanı sıra çalışmamızda $Au(dppz)Cl_2]Cl$ kompleksinin uygulanması ile mitokondriyal membran geçirgenliğini arttırarak (116) mitokondriden sitokrom c salınımına neden olarak apoptoz yol açmış olabilir.

Spektrofotometrik olarak belirlediğimiz sonuçlara göre çalışmamızda karaciğer dokusu DNA fragmantasyonu değerleri bakımından grup IV'e göre $Au(dppz)Cl_2]Cl$ kompleksinin uygulandığı grup V'te artış belirlendi. DNA fragmantasyonundaki artış apoptotik aktivitenin arttığını göstermektedir. Hepatosellüler karsinomada in-vitro ve in-vivo yapılan çalışmalarda çeşitli altın komplekslerinin uygulanması ile apoptozun indüklendiği gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda bu literatürlerle bağdaşmaktadır.

Ubikuitin toksik hasar, yüksek sıcaklık, viral enfeksiyon ve besin yoksunluğu gibi stresli koşullar altında anormal ve kısa ömürlü proteinlerin yıkımında görev alır (150). Ubikuitin molekülü anormal bir hücrenin malign hücreye dönüşümüyle ilgili hücre içi sinyaller, hücre proliferasyonu, bağışıklık yanıtı ve transkripsiyonun düzenlenmesi gibi birçok moleküler homeostatik mekanizmaya katılır (179).

Ubikuitin proteozom yolu inhibe edilerek NF- κ B transkripsiyonel faktörün blokajı tümör hücre ölümünü fazla miktarda artırır. NF- κ B bağışıklık, stres, inflamatuvar, gelişme ve akut faz yanıtları ile ilgili gen ekspresyonlarının aktivasyonunu sağlar. İnaktif NF- κ B heterodimeri sitoplazmada nukleusa translokasyonu inhibe eden inhibitör κ B- α (IB)'ye bağlı olarak bulunur. Patojenler (virus-bakteri), radyasyon, bazı kemoterapötik ajanlar, sitokinler (TNF α , IL-1) hücre içi sinyal ileti yoluyla NF- κ B'yi aktive eder (202, 131). NF- κ B birçok yaşam faktörünü düzenlemesinin yanı sıra antiapoptotik aktiviteyle de bağlantılıdır. Antiapoptotik protein Bcl-2 ekspresyonunu upregüle etmektedir (200). Bu aktivasyon da apoptoz inhibisyonuna neden olur. Ub IB'ye kovalen bağlanır, fosforile olur, fosfo IB hızla 26S proteozom tarafından yıkılır, NF- κ B'nin nukleer translokasyonu gerçekleşir (202, 131). Bu özellik çok sayıda transgenik hayvan modellerinde gayet iyi bir şekilde gösterilmiştir. İndüklenebilir I κ B "super-reseptör"ün eksprese edildiği bir çalışma, NF κ B aktivitesinin fonksiyonel inhibisyonu karaciğer kanseri gelişimini engellemiştir (199). Tersine, parsiyel NF- κ B inhibisyonu durumunda kimyasal olarak indüklenen karaciğer hasarı artmış karaciğer kanser insidansına neden olmuştur (53).

Hepatosellüler karsinomanda içinde yer aldığı çeşitli kanser türlerinde ubikuitin veya ubikuitinle konjuge proteinlerin birikimi immünohistokimyasal olarak gösterilmiştir. Bu birikim için olası açıklamalardan birisi, bu birikmiş proteinlerin ubikuitin-bağımlı proteolizisden bağımsız olarak neoplastik hücrelerin spesifik proteinleri olabileceği yönündedir. Shirahashi H ve arkadaşları çalışmalarında hepatosellüler karsinomalı hastaların karaciğer dokusunda hem sitoplazmada hem de nukleusta ubikuitin boyanmasının sağlıklı gruba kıyasla daha fazla olduğunu belirlemişlerdir (176). Osada ve arkadaşları çalışmalarında normal hücrelerde hiç ya da çok az immün boyama gözlendiğini ancak hepatosellüler karsinomalı hastalardan elde

edilen karaciğer dokusunda ise güçlü bir immün boyanma gözlemlendiğini belirtmişlerdir. Bu tür bir birikim tümör-spesifik ubikuitine proteinlerin depolanması veya neoplastik hücrelerin yüksek metabolik/katabolik oranı sonucu olabilir (150). Benzer değişimler renal hücre karsinomasında da rapor edilmiştir (102).

Çalışmamızda ubikuitinin immünohistokimyasal boyamasında grup I'e göre grup IV'te çok önemli düzeyde artış belirlenmiştir. Karsinogenlerin uygulandığı grup IV ile $[Au(dppz)Cl_2]Cl$ kompleksinin uygulandığı gruplar (grup V ve grup VI) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. Grup II ve grup III'ye göre grup IV'te çok önemli düzeyde artış belirlenmiştir. Çalışmamızda grup IV'te ubikuitin artışı DEN ve FB uygulaması sonucu proliferasyona uğramış hücrelerin artan metabolik aktiviteleri sonucu oluşan proteinlerin yıkımını gerçekleştirebilmek için arttığını düşündürmektedir. Bunun yanı sıra artmış ubikuitin düzeyleri, NF- κ B aktivitesinin artmasına neden olarak antiapoptotik protein Bcl-2'nin artmasına ve apoptozun azalmasına neden olmuş olabilir. Çalışmamızda grup IV'te belirlenen bulgular bu doğrultudadır.

Çalışmamızda grup I, grup II ve grup III histopatolojik olarak değerlendirildiğinde nekroz, hücresel dejenerasyon, nodüler yapı ve inflamasyon açısından herhangi bir patolojiye rastlanılmamıştır.

Dietilnitrozamin, mutasyona uğramış karaciğer hücrelerinin sayısının artmasına katkıda bulunan postnekrotik hepatosellüler çoğalmayı uyarır ve bu nedenle karaciğer çalışmalarında model olarak kabul edilir (103). Dietilnitrozamin, cyp 450 bağlı monooksijenaz sisteminin enzimleri tarafından uzaklaştırılmakta, bu sırada meydana gelen reaktif ara ürünler, bağlayıcı enzimlerin katalitik bölgelerine ilgileri az olduğu için idrarla atılmayıp önemli hücre bileşenleriyle kovalent bağlar oluşturarak nekroz, mutasyon ve kansere neden olmaktadır (41). Tessitore ve arkadaşları karaciğere 200mg/kg DEN uygulamasının fibroz ve nekroza sebep olduğunu bildirmişlerdir (188). Che ve arkadaşları servikal kanserli HeLa hücrelerinde bir altın bileşiği olan $[Au(III)(tetraporphyrin)]Cl_4$ ile yaptıkları çalışmada bu bileşiğin apoptoza neden olurken, nekroza neden olmadığını ya da çok az derecede nekroz gözlemlendiğini belirtmişlerdir (39). Çalışmamızda nekrotik bulgu açısından grup I, grup II ve grup III'e

göre grup IV'te ileri derecede önemli artış belirlenirken, grup I, grup II ve grup III ile diğer gruplar arasında istatistiksel olarak fark yoktu. Grup IV'e göre grup V'te çok önemli düzeyde azalma belirlendi. Bu durum çalışmamızda inisiyatör olarak DEN ve promotör olarak FB kullanılarak oluşturulan sıçan modelinde bu maddelerin karaciğer dokusunda nekroza neden olduğunu göstermektedir. $[\text{Au}(\text{dppz})\text{Cl}_2]\text{Cl}$ kompleksinin grup V'te (promotör ile aynı anda başlatılan uygulamada) nekroz oluşumunu azaltması bu bileşiğin kimyasal karsinojene maruziyetten sonra kullanılmasının daha etkin olabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamız hücrel dejenerasyon açısından değerlendirildiğinde grup I, grup II ve grup III'e göre grup IV'te ileri derecede önemli artış belirlendi. Yine Grup I, grup II ve grup III'e göre grup VI'da önemli düzeyde artış belirlendi. Grup I ile grup II, grup III ve grup V arasında istatistiksel olarak fark yoktu. Grup IV'e göre grup V'te önemli düzeyde azalma belirlendi. Bu durum çalışmamızda uyguladığımız kimyasal karsinojenlerin hücrel dejenerasyonu arttırdığını ve bu maddelere maruziyet ile başlayan $[\text{Au}(\text{dppz})\text{Cl}_2]\text{Cl}$ kompleksi uygulamasının hücrel dejenerasyonu azalttığını ve ileri aşamalarda kullanıma kıyasla daha etkili olduğunu göstermektedir.

Reaktif oksijen türleri ve reaktif nitrojen türlerinin üretimi aracılığıyla oluşan oksidatif stres hepatokarsinogenez için predispozan faktör olarak hareket eder ve hepatosellüler karsinoma ve kronik karaciğer hastalıklarına sevk eden önemli bir güçtür. İnflamasyonun oksidatif stres tarafından oluşturulan ilk biyolojik cevap olduğu iyi bilinmektedir. Oksidatif hasar ve inflamasyonun düzenlenmesi hepatokarsinogeneze karşı korunma ve kanserin önlenmesi açısından önemlidir. Reaktif oksijen türleri, lipid peroksidasyonuna ve DNA oksidasyonuna neden olarak karaciğer kanserinin inisiasyon, promosyon ve progresyonunda rol alır. Son zamanlarda inflamasyonunda hepatosellüler karsinomanın inisiasyon, promosyon ve progresyon aşamalarındaki rolüne dair deliller mevcuttur (26). Altın bazlı anti-artritik ilaç olan auranofin ve sodium thiomalate'ın immünsüpresiv ajanlar olduğu ve monosit ve diğer kan hücrelerinin aktivasyonunu sınırladığı belirlenmiştir. Bu bileşikler proinflamatuvar mediyatörlerin sekresyonunu sınırlamaktadır (149). İnflamasyon bakımından grup I, grup II ve grup III'e göre grup IV'te ileri derecede önemli artış belirlendi. Yine Grup I, grup II ve grup III'e göre grup

VI'da önemli düzeyde artış belirlendi. Grup IV' e göre grup V'te çok önemli düzeyde azalma belirlendi. Grup IV'te inflamasyon bakımından gözlenen artış uygulamış olduğumuz karsinojenlerin oksidatif strese neden olarak kanser oluşumuna sevk ettiğinin bir göstergesi olabilir. Bunun yanı sıra grup V'te belirlemiş olduğumuz azalma ise promotör ajan ile birlikte uygulamaya başlanılan $[Au(dppz)Cl_2]Cl$ kompleksinin inflamasyonu baskılayıcı yönde etkiye sahip olabileceğini göstermektedir. Bu durum $[Au(dppz)Cl_2]Cl$ kompleksinin antikanser aktiviteye sahip olabileceğini düşündürmektedir.

Dietilnitrozaminin hepatik mikrozomlarda metabolik aktivasyonu sonucu oluşan etilkarbonyum iyonu DNA'ya bağlanmakta, DNA adduct'ları oluşmakta ve fosfolipid membran yağ asitlerinin lipid peroksidasyonu yoluyla süperoksit radikallerinin üretimine neden olarak hepatokarsinogeneze yol açmaktadır. DEN ile tümör promotör ajan FB birlikte rat karaciğerinde oksidatif hasara neden olmaktadır. Ratlarda FB'in devam eden uygulamasının DEN indüklü neoplastik hepatik nodüllerde ROS oluşumunun arttığı görülmüştür (26). Genotoksik bir ajan ile muamele edilen ratlarda karaciğerde FB uygulamasının tümör ilerlemesini sağladığı gösterilmiştir. Tümör promotörlerinin devam eden uygulamaları hücrelerin genomlarının zarar görmesini ve bunların klonal genişlemesine neden olmaktadır. Genetik olarak değişmiş hücrelerin malignant transformasyonu malign tümörlerin gelişimine sebep olur (27). Rodentlerde DEN indüklü preneoplastik fokus ve preneoplastik ve neoplastik nodül oluşumu insanlardaki Hepatosellüler karsinoma gelişimine benzer (25). Kolaja ve arkadaşları, FB'in DNA sentezini arttırarak preneoplastik hepatositlerin büyümesini indüklediğini ve hücre proliferasyonuna neden olduğunu belirtmişlerdir (110).

Çalışmamızda nodüler yapı bakımından grup I, grup II ve grup III'e göre grup IV'te ileri derecede önemli artış belirlenirken, grup I, grup II ve grup III ile diğer gruplar arasında istatistiksel olarak fark yoktu. Deneysel karaciğer kanser modeli oluşturmak için inisiyatör olarak DEN ve promotör olarak FB'i kullandığımız çalışmamızda subkronik olarak verdiğimiz bu kimyasallar sıçanların karaciğerlerinde preneoplastik fokus oluşumuna neden olmuştur. Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular, bu maddelere maruziyet durumundan hemen sonra $[Au(dppz)Cl_2]Cl$ uygulamasının ya

da daha geç süreyle başlayan uygulamanın her ikisinde de preneoplastik fokus açısından karaciğer için koruyucu rol oynayabileceğini göstermektedir.

Deneysel olarak hepatosellüler karsinoma modeli oluşturduğumuz çalışmamızda inisiyatör olarak uyguladığımız DEN ve promotör olarak kullanılan FB, sıçan karaciğerinde preneoplastik fokus oluşumuna neden olmuştur. Günlük hayatta maruz kalabileceğimiz DEN ve antiepileptik bir ilaç olarak kullanılan FB'in kanserojenik etkilerini ortaya koyan birçok çalışma bulunmaktadır. Kanser tedavisi için yapılan çalışmalar göz önüne alındığında altın ile hazırlanan kompleksler ile yapılan uygulamaların başarılı sonuçlara ulaştığı gözlemlenmiştir. Çalışmamızda elde etmiş olduğumuz bulgulara dayanarak bu karsinojenlere maruziyet durumunda hücre ölümünün düzenlenebilmesi açısından apoptozu indükleyen bir ajan olarak $[Au(dppz)Cl_2]Cl$ kompleksinin etkin bir madde olabileceğini düşünmekteyiz.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Deneysel hepatosellüler karsinoma modeli oluşturmak için kullandığımız DEN ve FB'in karaciğerdeki etkilerine karşı $[Au(dppz)Cl_2]Cl$ kompleksinin rolüne dair sonuçlar aşağıda belirtilmiştir.

Grup IV'te grup I'e göre ALT, AST ve LDH seviyelerinde artış belirlenmiştir. Bu durum uygulamış olduğumuz DEN ve FB'in hepatik hasara neden olarak serum ALT, AST ve LDH değerlerinde artışa neden olduğunu göstermektedir. Grup V ve grup VI'da ALT değerlerinin azalarak kontrole (grup I) yaklaşması $[Au(dppz)Cl_2]Cl$ kompleksinin hücre hasarını azaltmasıyla ilişkili gibi görünmektedir. $[Au(dppz)Cl_2]Cl$ kompleksi uygulaması yapılan Grup V ve grup VI, grup IV ile karşılaştırıldığında bu kompleksin AST ve LDH değerlerine belirgin bir katkıda bulunmadığı gözlemlenmiştir.

Kaspaz 3 değerleri bakımından grup I'e göre grup IV'te önemli düzeyde azalma belirlenmiştir. Grup IV'te kaspaz 3 düzeylerinde belirlenen azalma çalışmamızda uygulamış olduğumuz karsinojen maddelerin kaspaz 3 ekspresyonunu azaltmıştır. Bu durum DEN ve FB uygulamasının apoptozu inhibe etmesiyle ilişkili görünmektedir. Grup IV'e göre grup V ve VI'da kaspaz 3 düzeyleri açısından belirlenen artış $[Au(dppz)Cl_2]Cl$ kompleksinin membran potansiyelini değiştirerek sitokrom c salınımına neden olduğu ve dolayısıyla kaspaz 3 miktarını arttırdığını düşündürmektedir.

p53 değerleri açısından, DEN ve FB uygulamasının birlikte yapıldığı grup IV'te grup I'e göre azalma belirlenmiştir. Dietilnitrozamin ve FB uygulaması sıçanlarda p53 düzeyinde azalmaya neden olmuştur. p53'te karsinojenler nedeniyle oluşan azalma DNA hasarının onarılmasına ya da hasar gören hücrelerin apoptoza gitmesine engel olmaktadır. Dolayısıyla mutasyona uğramış hücreler proliferasyona gidebilecektir. $[Au(dppz)Cl_2]Cl$ kompleksinin uygulanmış olduğu gruplarda grup IV'e göre p53 seviyelerinde artış belirlendi. Bu durum $[Au(dppz)Cl_2]Cl$ kompleksinin p53'ü arttırarak apoptozu indükleyen anti-tümör etkili bir bileşik olabileceğini göstermektedir.

Dietilnitrozamin ve FB uygulaması ile grup IV'te, grup I'e göre Bcl-2 değerlerinde artış belirlendi. Antiapoptotik etkili Bcl-2 proteininde immünohistokimyasal

boyanma sonucu belirlenen artış, artan hücre proliferasyonuna Bax proteininin apoptozu engellenmesi nedeniyle olabileceğini göstermektedir. $[Au(dppz)Cl_2]Cl$ kompleksinin uygulandığı gruplarda Bcl-2 değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlılık bulunamamıştır.

Bax immünohistokimyasal boyamasında grup I, grup II ve grup IV'e göre grup V'te önemli düzeyde artış belirlendi. Grup V'te $[Au(dppz)Cl_2]Cl$ kompleksinin uygulanmasıyla artan Bax proteini, mitokondiyal membranda porlar oluşmasına neden olarak sitokrom c salınmasına neden olabilir. Bax'ta belirlenen artış $[Au(dppz)Cl_2]Cl$ kompleksinin apoptotik etkilerini gösterebilmesi açısından önemlidir.

Spektrofotometrik olarak belirlenen DNA fragmentasyonu bakımından grup V'te grup I, grup II, grup III ve grup IV'e göre artış belirlendi. TUNEL metodu ile belirlenen görüntülerde yine grup V'te fragmente DNA'ların fazla olduğu belirlendi. Çalışmamızda uygulamış olduğumuz $[Au(dppz)Cl_2]Cl$ kompleksi apoptozu indüklemektedir. $[Au(dppz)Cl_2]Cl$ kompleksinin uygulaması ile grup V'te belirlenen p53, kaspaz 3 düzeylerindeki artış ve proapoptotik bax proteininde belirlenen artış bu bulguyu desteklemektedir.

Çalışmamızda, grup I, grup II ve grup III histopatolojik olarak değerlendirildiğinde hücresel dejenerasyon, inflamasyon nekroz ve preneoplastik fokus oluşumu açısından herhangi bir patolojiye rastlanmadı. İnisiyator olarak DEN ve promotör olarak FB uygulaması karaciğerde hücresel dejenerasyon, inflamasyon ve nekroz oluşumunu arttırmıştır. Ayrıca preneoplastik fokus oluşumuna neden olmuştur. $[Au(dppz)Cl_2]Cl$ kompleksinin uygulandığı grup V'te grup IV'e göre, nekroz, hücresel dejenerasyon ve inflamasyon histopatolojik bulguları açısından azalma belirlenmiştir.

$[Au(dppz)Cl_2]Cl$ kompleksinin apoptozu indüklemeye mekanizması üzerine etkilerini araştıran in-vivo hayvan modelleri ve in-vitro hücre modelleri ile yapılacak ileri moleküler çalışmaların yararlı olacağı görüşündeyiz.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ

1. Abbro, L., Dini, L., 2003, Common morphological features of apoptotic cell blebs, *Ital J Zool*, 70, 4, 297-99 p.
2. Adams, J., 2004, The proteasome: a suitable antineoplastic target, *Nat Rev Cancer*, 4, 5, 349, 60 p.
3. Adams, J.M., Cory, S., 1998, The Bcl-2 protein family: Arbiters of cell survival. *Science* 281, 5381, 1322-6 p.
4. Ademoğlu, E., Gürdöl, F., 2010, *Biyokimya, Nobel tıp kitabevi*, 639s.
5. Agostinis, P., 2003, Bcl-2 Phosphorylation: A tie between cell survival, growth, and ROS, *Blood*. 102, 9, p.
6. Ahmed, A.A., 2009, Protective effect of montelukast on paraquat-induced lung toxicity in rats, *Bio Science Trends*, 3, 2, 63-72 p.
7. Aiub, C.A.F., Gadermaier, G., Oliveira, I., Felzenszwalb, I., Ferreira, F., Pinto, L.F.R., Eckl, P., 2011, N-Nitrosodiethylamine genotoxicity in primary rat hepatocytes: Effects of cytochrome P450 induction by phenobarbital, *Toxicol Lett*, 206, 2, 139– 43 p.
8. Ajith, T.A., Janardhanan, K.K., 2006, Chemopreventive activity of a macrofungus *Phellinus rimosus* against N-nitrosodiethylamine induced hepatocellular carcinoma in rat, *J Exp Ther Oncol*, 5, 4, 309-21 p.
9. Akay, C., 2004, Biyomarkerlerin toksikolojide kullanımı, *Gülhane Tıp Derg*, 46, 1, 73-83 s.
10. Akins, P.T., Liu, P.K, Hsu, C.Y., 1996, Immediate early gene expression in response to cerebral ischemia: Friend or Foe ?, *Stroke*, 27, 9, 1682- 7 p.
11. Akyüz, F., İnal, M., Bayçu, C., Kanbak, G., 2001, Changes in antioxidant status and lipid peroxidation at liver and kidney tissues of the rats that were given diethylnitrosamine, *Ann Med Sci*, 10, 2, 50-54 p.
12. Aldinucci, D., Lorenzon, D., Stefani, L., Giovagnini, L., Colombatti, A., Fregona, D., 2007, Antiproliferative and apoptotic effects of two new gold (III) methylsarcosinedithiocarbamate derivatives on human acute myeloid leukemia cells in vitro, *Anticancer Drugs*, 18, 3, 323-32 p.
13. Apel, K.E., Christian, E.R., Hildebrat, G.A., 1985, Oxidative dealkylation and reductive denitrosation of Nitrosomethylalaniline in vitro, *Chem Biol Interect*, 53, 69-76 p.
14. Arinc, E., Schenkman, J.B., Hodgson, E., 1995, Molecular aspects of oxidative drug metabolizing enzymes. *Nato ASI Series Springer-Verlag, Berlin Heidelberg*, 90, 65-67 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

15. Arscott, P.L., Stokes, T., Myc, A., Giordano, T.J., Thompson, N.W., Baker, J.R., 1999, Fas (CD95) expression is up-regulated on papillary thyroid carcinoma, *J Clin Endocrinol Metab*, 84, 11, 4246-52 p.
16. Ashkenazi, A., 2002, Targeting Death and decoy receptors of the tumor-necrosis factor superfamily. *Nat Rev Cancer*, 2, 6, 420–30 p.
17. Atalay, A., 1989, Nitrozaminlerin proteinlerle etkileşimi, *Biyokimya Dergisi*, 14, 3, 30-33 p.
18. Atroshi, F., Rizzo, A., Biese, I., Veijalainen, P., Saloniemi, H., Sankari, S., and Andersson, K. , 1999, Fumonisin B-induced DNA damage in rat liver and spleen: 1 effects of pretreatment with coenzyme Q , l-carnitine, 10 α -tocopherol and selenium. *Pharmacol Res*, 40, 6, 459-67 p.
19. Aydınlık, H., Nguyen, T.D., Moennikes, O., Buchmann,A., Schwarz, M., 2001, Selective pressure during promot ion by phenobarbital leas to clonal outgrowth of B-catenin-mutated mouse liver tumors, *Oncogene*, 20, 53, 7812-6 p.
20. Balakumran, A., Champbell, G.A., Maslen, M.T., 1996, Calcium channel blockers induce thymic apoptosis in vivo in rats, *Toxicol Appl Pharmacol*, 139, 122-7 p.
21. Banakar, M.C., Paramasivan, S.K., Chattopadhyay, M.B., Data, S., Chakraborty, P., Chatterjee, M., Kanan, K., Thygarajan, E., 2004, 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ Prevents Dna Damage And Restores Antioxidant Enzymes In Rat Hepatocarcinogenesis Induced By Diethylnitrosamine And Promoted By Phenobarbital. *World J. Gastroenterol*, 10, 9, 1268-75 p.
22. Barnard, P.J, Berners-Price, S.J., 2007, Targeting the mitochondrial cell death pathway with gold compounds, 251, 13-14, 1889-1902 p.
23. Bennett, M.W., O’Connel, J., O’Sullivan, G.C., Brady, C., Roche, D., Collins, J.K, Shanahan, F., 1998, The Fas counterattack in vivo: apoptotic depletion of tumor infiltrating lymphocytes associated with Fas ligand expression by human esophageal carcinoma, *J Immunol*, 160, 11, 5669-75 p.
24. Bernecker, O.Y., Huq, F., Podesser, B.K., Hajjar, R.J., 2003, Apoptosis in heart failure and the senescent heart, *Cardiovasc toxicol*, 3, 3, 183-90 p.
25. Bishayee A., Barnes KF., Bhatia D., Darvesh A.S., Carrol R.T., 2010, Resveratrol supresses oxidative stres and inflammatory response in diethylnitrosamine-initiated rat hepatocarcinogenesis, *american association for cancer research*, 3, 6, 753-763 p.
26. Bishayee, A., Mbimba, T., Thoppila, R.J., Háznagy-Radnai, E., Sipos, P., Darvesh, A.S., Folkesson, H.G., Hohmann, J., 2011, Anthocyanin-rich black currant (*Ribes nigrum* L.) extract affords chemoprevention against diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinogenesis in rats, *J Nutr Biochem*, 22, 11,1035–46 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

27. Bohnenberger, S., Wagner, B, Schmitz, H.J., Schrenk, D., 2001, inhibition of apoptosis in rat hepatocytes treated with “non dioxin like” polychlorinated biphenyls, *Carcinogenesis*, 22, 10, 1601-6 p.
28. Bortner C D, Odernburg N B E, Crdlowski J A. 1995, The role of fragmentation in apoptosis, *Trends Cell Biol*, 5, 1, 21-8 p.
29. Burton, K., 1956, A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid, *Biochem J*, 62, 2, 315-23 p.
30. Büyükbaş, S., İnal, A., 2006, Ilımlı alkol alan erkeklerde laktat dehidrogenaz izoenzim değişiklikleri, *Van Tıp Derg*: 13, 3, 85-9 s.
31. Cabadak, H., 2008, Hücre siklusu ve kanser, *ADÜ Tıp Fakültesi Derg*; 9, 3, 51-61 p.
32. Calamai, P., Guerri, A., Messori, L., Orioli, P., Speroni, G.P., 1999, Structure and DNA binding properties of the gold (III) complex [AuCl₂(esal)], *Inorganica Chimica Acta*, 285, 4, 309-312 p.
33. Candan, F., 1995, Dietilnitrozamin’in sıçan (*rattus norvegicus*) karaciğer mikrozomal NADH-sitokrom b₅ redüktaz’a in-vitro etkisi, *Doktora tezi, C.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü*, 4s.
34. Caotes, P.J., Hales, S.A., Hall, P.A., 1996, The association between cell proliferation and apoptosis; studies using cell cycle-associated proteins Ki67 and DNA polymerase alpha, *J Pathol*, 178, 1, 71-7 p.
35. Caruso, F., Villa, R., Rossi, M., Pettinari, C., Francesco P., Marzia P., Daidone, M.G., Zaffaroni, N. 2006, Mitochondria are primary targets in apoptosis induced by the mixed phosphine gold species chlorotriphenylphosphine-1,3-bis (diphenylphosphino) propanegold (I) in melanoma cell lines, *Biochem Pharmacol*, 73, 6, 773-81 p.
36. Casado, J., Castro, A., Lorenzo, M.F., Meijide, F., 1986, Kinetic studies on the formation of N-nitroso compounds, *Monatoshefte für Chemie*, 117, 335-344 p.
37. Chakraborty, T., Chatterjee, A., Dhachinamoorthi D, Srivastawa, S., Panayappan, L., Chatterjee, M., 2006, Vanadium limits the expression of proliferating cell nuclear antigen and inhibits early DNA damage during diethylnitrosamine-induced hepatocellular preneoplasia in rats. *Environ Mol Mutagen*, 47, 8, 603-15 p.
38. Chang, Y.H., Yang, X., 2000, Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases, *Microbiol Mol Biol Rev*, 64, 4, 821-46 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

39. Che, C.M., Sun, R.W., Yu, W.Y., Ko, C.B., Zhu, N., Sun, H., 2003, Gold (III) porphyrins as a new class of anticancer drugs: cytotoxicity, DNA binding and induction of apoptosis in human cervix epitheloid cancer cells, *Chem Commun (Camb)*, 21, 14, 1718-9 p.
40. Che, C.M., Yang, M., Wong, K., Chan, H.L., Lam, W., 1999, Platinum (II) complexes of dipyrrophenazine as metallointercalators for DNA and potent cytotoxic agents against carcinoma cell lines, *Chem Eur J*, 5, 11, 3350-55 p.
41. Chiarello, P.G., Iglesias, A.C., Zucoloto, S., Moreno, F., Jordao, A.A., Vannucchi, H., 1998, Effect of a necrogenic dose of diethylnitrosamine on vitamin E-deficient and vitamin E-supplemented rats, *Food Chem Toxicol*, 36, 11, 929-35 p.
42. Chodon, D., Banu, S.M., Padmavathi, R., Sakthisekaran, D., 2007, Inhibition of cell proliferation and induction of apoptosis by genistein in experimental hepatocellular carcinoma, *Mol Cell Biochem*, 297, 1-2, 73-80 p.
43. Chowdhury, I., Tharakan, B., Bhat, G.K., 2008, Caspases - an update, *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 151, 1, 10-27 p.
44. Chu, I., Bowers, W.J., Caldwell, D., Nakai, J., Pulido, O., Yagminas, A., Wade, M.G., Moir, D., Gill, S., Mueller, R., 2005, Toxicological effects of gestational and lactational exposure to a mixture of persistent organochlorines in rats: systemic effects, *Toxicol Sci*, 88, 2, 645-55 p.
45. Ciechanover, A., Hod, Y., and Hershko, A., 1978, A heat-stable polypeptide component of an ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 81, 4, 1100-5 p.
46. Cohen, J.J., 1993, Apoptosis: The physiological pathway of cell death. *Hosp Pract*, 15, 35-43.
47. Cohen, J.J., 1993, Apoptosis, *Immunol Today*, 14, 126-30 p.
48. Cummings, M.C., Winterford, C.M., Walker, N.I., 1997, Apoptosis, *Am J Surg Pathol*, 21, 1, 88-101 p.
49. Czekaj, P., 2000, Phenobarbital-induced expression of cytochrome P450 genes, *Acta Biochim Pol*, 47, 4, 1093-105 p.
50. Dağoğlu, G., Keleş, O., Yıldırım, M., Yılmaz, O., Aksoy, A., 1995, Van ve İstanbul Piyasasında Tüketime Sunulan Bazı Et Ürünlerinde Şekillenen Nitrozamin Türevlerinin Araştırılması, *İ. Ü. Vet. Fak. Derg.*, 81, 2, 318-326 s.
51. D'Amelio, M., Sheng, M., Cecconi, F., 2012, Caspase-3 in the central nervous system: beyond apoptosis, *Trends Neurosci*, 35, 11, 700-9 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

52. Danielle, K., Seviyor, Pelkonen, O., Ahokas, J.T., 2012, Hepatocytes: The powerhouse of biotransformation, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 44, 2, 257–61 p.
53. Dawson, S.P., 2008, Hepatocellular carcinoma and the ubiquitin-proteasome system, *Biochim Biophys Acta*, 1782, 12, 775-84 p.
54. Demirçeken, F.G., Derelli, E., Kuloğlu, Z., Kansu, A., Deda, G., Girgin, N., 2003, Serum aminotransferaz aktivite yüksekliğinin asemptomatik müküler distrofi tanısındaki önemi, *Tur Ped Arş*, 38, 3, 160-6 s.
55. Deng, X., Gao, F., Flagg, T., May, W.S., Jr. 2004, Mono- And Multisite Phosphorylation Enhances Bcl-2's Antiapoptotic Function And Inhibition Of Cell Cycle Entry Functions *Pnas*, 101, 1, 153–158 p.
56. Deng, W.G., Fu, Y., Li, Y.L., Sugiyama, T., 2004, Potential role of p53 mutation in chemical hepatocarcinogenesis of rats, *World J Gastroenterol*, 10, 1, 46-52 p.
57. Dickeson, J.E., Summers, L.A., 1970, Derivatives of 1,10-Phenanthroline-5,6-quinone, *Aust J Chem*, 23, 5, 1023-7 p.
58. Dong Wang & Stephen J. Lippard, 2005, Cellular processing of platinum anticancer drugs, *Nature Reviews Drug Discovery* 4, 307-20 p.
59. Eastman, A., 1995, Survival factors, intranuclear signal transduction and the activation of endonucleases in apoptosis, *Cancer Biol*, 6, 1, 45- 52 p.
60. El Mesallamy, H.O., Metwally, N.S., Soliman, M.S., Ahmed, A.K., Abdel Moaty, M.M., 2011, The chemopreventive effect of Ginkgo biloba and Silybum marianum extracts on hepatocarcinogenesis in rats, *Cancer Cell Int*, 11, 1, 38 p.
61. Feiters, M.C., Rowan, A.E., Nolte, R.J.M., 2000, From simple to supramolecular cytochrome P450 mimics, *Chem Soc Rev*, 2000, 29, 375-84 p.
62. Finnberg N., Silinis, I., Stenius, U., Höberg, J., 2004, Characterizing the role of MDM2 in diethylnitrosamine induced autolysosomal damage and development of pre-neoplastic lesions, *Carcinogenesis*, 25, 1, 113-22 p.
63. Finnberg, N., Stenius, U., Höberg, J., 2000, Xenobiotics modulate the p53 response to DNA damage in preneoplastic enzyme-altered foci in rat liver: effects of diethylnitrosamine and phenobarbital, *Toxicol Sci*, 54, 1, 95-103 p.
64. Fujikawa, K., Shiraki, K., Sugimoto, K., Ito, T., Yamanaka, T., Takase, K., Nakano, T., 2000, Reduced expression of ICE/caspase 1 and CPP32/caspase 3 in human hepatocellular carcinoma, *Anticancer Res*, 20, 3B, 1927–32 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

65. Fujise, T., Iwakiri, R., Wu, B., Amemori, S., Kakimoto, T., Yokoyama, F., Sakata, Y., Tsunada, S., Fujimoto, K., 2006, Apoptotic pathway in the rat small intestinal mucosa is different between fasting and ischemia-reperfusion, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 291, 1, 110-116 p.
66. Gao, J., Kashfi, K., Liu, X., Rigas, B., 2006, NO-donating aspirin induces phase II enzymes in vitro and in vivo. *Carcinogenesis*, 27, 4, 803-10 p.
67. Garza-Ortiz, A., 2008, Design, synthesis, characterization and biological studies of ruthenium and gold compounds with anticancer properties, Doctoral Thesis, Leiden Institute of Chemistry, Faculty of Science, Leiden University, in Dutch, 11-25 p.
68. Gayathri, R., Priya, D.K.D., Gunassekaran, G.R., Sakthisekaran, D., 2009, Ursolic acid attenuates oxidative stress-mediated hepatocellular carcinoma Induction by diethylnitrosamine in male wistar rats, *Asian Pacific J Cancer Prev*, 10, 933-938 p.
69. Gelal, A., 2003, Ksenobiyotiklerin emilim, dağılım ve eliminasyonu, *Türkiye Klinikleri Farmakoloji*, 1, 1, 6-9 s.
70. Ghavami, S., Hashemi, M., Ande, S.R., Yeganeh, B., Xiao, W., Eshraghi, M., Bus, C.J., Kadkhoda, K., Wiechec, E., Halayko, A.J., Los, M., 2009, Apoptosis and cancer: mutations within caspase Genes, *J Med Genet*, 46, 8, 497–510 p.
71. Giannini, E., Risso, D., Botta, F., Chiarbonello, B., Fasoli, A., Malfatti, F., Romagnoli, P., Testa, E., Ceppa, P., Testa, R., 2003, Validity and clinical utility of the aspartate aminotransferase-alanine aminotransferase ratio in assessing disease severity and prognosis in patients with hepatitis C virus-related chronic liver disease, *Arch Intern Med*, 163, 2, 218-24 p.
72. Golkar, S.O., Bergmark, E., 1988, Alkylation of haemoglobin, plasma, proteins and DNA in the Mouse by the diethylnitrosamine, *Carcinogenesis*, 9, 11, 1915-17 p.
73. Greenblatt, M.S., Bennet, W.P., Hollstein, M., Haris, C.C., 1994, Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res*, 54, 18, 4855-78 p.
74. Griffioen, K.J.S., Ghribi, O., Fox, N., Savory, J., De Witt, D.A., 2004, Aluminum Maltolate –Induced Toxicity in NT2 Cells Occurs Through Apoptosis and Includes Cytochrome c Release, *Neuro Toxicology*, 25, 5, 859-867 p.
75. Guéguen, Y., Mouzat, K., Ferrari, L., Tissandie, E., Lobaccaro, J.M., Batt, A.M., Paquet, F., Voisin, P., Aigueperse, J., Gourmelon, P., Souidi, M., 2006, Cytochromes P450: xenobiotic metabolism, regulation and clinical importance. *Ann Biol. Clin*, 64, 6, 535-548 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

76. Gupta, S., Sundarrajan, M., Rao, KVK., 2003, Tumor promotion by metanil yellow and malachite green during rat hepatocarcinogenesis is associated with dysregulated expression of cell cycle regulatory proteins, *Teratog Carcinog Mutagen*, 1, 301-12 p.
77. Gustafsson, A.B., Gottlieb, R.A., 2007, Bcl-2 family members and apoptosis, taken to heart, *Am J Physiol Cell Physiol*, 292, 1, C45-51 p.
78. Gültekin, N., Karaoğlu, K., Küçükateş, E., 2008, New discoveries in the mechanisms of apoptosis and cell survival and novel potential therapeutic strategies, *Arch Turk Soc Cardiol*, 36, 2, 120-30 s.
79. Güneş, H.V., 2006, *Moleküler Hücre Biyolojisi*, Kaan Kitabevi, Baskı: 388 s.
80. Güneş, Ö., Eren, Ü., 2008, Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler, *Y.Y.Ü. Vet Fak Derg*, 2, 73-8 s.
81. Gürbüz, N., 2006, Antimutajenler ve antikarsinojenler (kanser gelişiminin kimyasal bileşiklerle önlenmesi), *Türkiye Klinikleri J Med Sci*, 26, 3, 312-8 p.
82. Güney, Y., Bilgihan, A., 2002, Ubiquitin system, *T Klin Tıp Bilimleri*, 22, 6, 616-9 p.
83. Haupt, S., Berger, M., Goldberg, Z., Haupt, Y., 2003, Apoptosis - the p53 network, *J Cell Sci*, 116, 20, 4077-85 p.
84. Huang, H., Zhang, X.F., Zhou, H.J., Xue, Y.H., Dong, Q.Z., Ye, Q.H., Qin, L.X., 2010, Expression and prognostic significance of osteopontin and caspase-3 in hepatocellular carcinoma patients after curative resection, *Cancer Sci*, 101, 5, 1314-9 p.
85. Hukkanen, J., 2000, Xenobiotic-metabolizing cytochrome p450 enzymes in human lung, *Acta Univ Oul D*, 621, 17, 1-69 p.
86. Hunter, T., Pines J., 1994, Cyclins and cancer II: cyclin D and CDK inhibitors come of age, *Cell*, 79, 4, 573-82 p.
87. Igor, Z., Masahiko, N., 2000, Phenobarbital-elicited activation of nuclear receptor CAR in induction of cytochrome P450 genes, *Biochem Biophys Res Commun*, 277, 1, 1-6 p.
88. Iijima, T., Mishima, T., Akagawa K., Iwao, Y. 2006, Neuroprotective effect of propofol on necrosis and apoptosis following oxygen-glucose deprivation-relationship between mitochondrial membrane potential and mode of death, *Brain Res*, 1099, 1, 25-32.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

89. Imaoka, S., Osada, M., Minamiyam, Y, Yukimura, T., Toyokuni S., Takemura, S., Hiroi, T., Funae Y., 2004, Role of phenobarbital-inducible cytochrome P450s as a source of active oxygen species in DNA-oxidation, *Cancer Lett*, 203, 2, 117-25 p.
90. Inoue, T., Shiraki, K, Fuke, H., Yamanaka, Y., Miyashita, K., Yamaguchi, Y., Yamamoto, N., Ito, K., Sugimoto, K., Nakano, T., 2006, Proteasome inhibition sensitizes hepatocellular carcinoma cells to trail by suppressing caspase inhibitors and AKT pathway, *Anticancer Drugs*, 17, 3, 261-68 p.
91. Ito, Y., Pandey, P., Mishra, N., Targeting of the c-Abl Tyrosine kinase to mitochondria in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *Mol Cell Biol*, 2001, 21, 18, 6233–6242 p.
92. Jagadeesh, M.C., Sreepriya, M., Bali, G., Manjulakumari, D., 2011, Protective effects of embelin and curcumin against diethylnitrosamine / phenobarbital induced experimental hepatocarcinogenesis in rats, 5,1,
93. Jahan, M.S., Vani, G., Shyamaladevi A.S., 2011, Anti-carcinogenic Effect of *Solanum trilobatum* in Diethylnitrosamine Induced and Phenobarbital Promoted Heptocarcinogenesis in Rats, *Asian J Biochem*, 6, 1, 74-81 p.
94. Jahan, M.S., Vani, G., Shyamaladevi, C.S., 2007, Effect of *Solanum trilobatum* on hepatic drug metabolising enzymes during diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis promoted by Phenobarbital in rat, *Hepatol Res* 37, 1, 35-49 p.
95. Jancova, P., Anzenbacher, P., Anzenbaherova, E., 2010, Phase II drug metabolizing enzymes, *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 154, 2, 103-16 p.
96. Jaruga, P., Rodriguez, H., Dizdaroğlu, M., 2001, Measurement of 8-hydroxy-2'-deoxyadenosine in DNA by liquid chromatography/mass spectrometry. *Free Radical Biol Med*, 31, 336-44 p.
97. Jayakumar, S., Madankumar, A., Asokkumar, S., Raghunandhakumar, S., Gokuladhas, K., Kamaraj, S., Divya, M.G., Devaki, T., 2012, Potential preventive effect of carvacrol against diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma in rats, *Mol Cell Biochem*, 360, 1-2, 51–60 p.
98. Jenkins, L.M.M., Durell, A.R., Mazur S.J., Appella E., 2012, p53 N-terminal phosphorylation: a defining layer of complex regulation, *Carcinogenesis*, 33, 8, 1441-9 p.
99. Jesenberger, V., Jentsch, S., 2002, Deadly encounter: ubiquitin meets apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3, 2, 112-21 p.
100. Kalkanis, J.G., Whitworth, C., Rybak. L.P., 2004, Vitamin E reduces cisplatin ototoxicity, *Laryngoscope*, 114, 3, 538-42 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

101. Kam, P.C.A., Ferch, N.I., 2000, Apoptosis: mechanisms and clinical implications, *Anaesthesia*, 55, 1081-93 p.
102. Kanayama, H., Tanaka, K., Aki, M., Kagawa, S., Miyaji, H., Satoh, M., Okada, E., Sato, S., Shimbara, N., Ichihara, A., 1991, Changes in expressions of proteasome and ubiquitin genes in human renal cancer cells. *Cancer Res*, 51, 24, 6677-85 p.
103. Kang, J.S., Wanibuchi, H., Morimura, K., 2007, Role of CYP2E1 in Diethylnitrosamine-Induced hepatocarcinogenesis in vivo, *Cancer Res*, 67, 23, 11141-6 p.
104. Kang, M., Reynolds, C.P., 2009, Bcl-2 inhibitors: targeting mitochondrial apoptotic pathways in cancer therapy, *Clin Cancer Res*, 15, 4, 1126-32 p.
105. Karaman, A., 2003, Onkogenlerin fonksiyonel sınıflandırılması ve onkogenlerle ilişkili habaset örnekleri, *Sendrom*, 15, 8, 56-62 s.
106. Keane, R.W., Kraydieh, S., Lotocki, G., Bethea, J.R., Krajewski, S., Reed, J.C., Dietrich, W.D., 2001, Apoptotic and anti-apoptotic mechanisms following spinal cord injury, *J Neuropathol Exp Neurol*, 60, 5, 422-29 p.
107. Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., Currie, A.R., 1972, Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics, *Br J Cancer*, 26, 4, 239-57 p.
108. Kızıltunç, A., Şahin, Y.N., 1997, Structure and function of ubiquitin system, *MJAU*, 29, 358-63 p.
109. King, R.W., Deshaies, R.J., Peters, J.M., Kirschner, M.W., 1996, How proteolysis drives the cell cycle, *Science*, 274, 5293, 1652-9 p.
110. Kolaja, K.L., Stevenson, D.E., Walborg, E.F., Klauning, J.E., 1996, Dose dependence of phenobarbital promotion of preneoplastic hepatic lesions in F344 rats and B6C3F1 mice: effects on DNA synthesis and apoptosis, *Carcinogenesis*, 17, 5, 947-54 p.
111. Koolman, J., Roehm, K.H., 2005, *Color Atlas of Biochemistry*, Second edition, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 318-320 p.
112. Kuida, K., Zheng, T.S., Na, S., Kuan, C., Yang, D., Karasuyama, H., Rakic, P., Flavell, R.A., 1996, Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice, *Nature*, 384, 6607, 368-72 p.
113. Kuntz, E., Kuntz, H.D., 2006, *Hepatology Principles and practice*, 2nd edition, Springer Medizin Verlag Heidelberg, 906 p.
114. Lakin, N.D., Jackson, S.P., 1999, Regulation of p53 in response to DNA damage, *Oncogene*, 18, 53, 7644-55 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

115. Lewis, D.F., 2003, P450 structures and oxidative metabolism of xenobiotics, *Pharmacogenomics*, 4, 4, 387-395 p.
116. Li, C.K., Sun, R., Kui, S., Zhu, N., Che, C.M., 2006, Anticancer cyclometalated $[\text{Au}^{\text{III}}_m(\text{C}^{\wedge}\text{N}^{\wedge}\text{C})_m\text{L}]^{n+}$ compounds: synthesis and cytotoxic properties, *Chem Eur J*, 12, 20, 5253-66 p.
117. Lijinsky, W., 1992, *Chemistry and Biology of N-nitroso Compounds*, Cambridge, UK Cambridge Univ Pres, 464 p.
118. Lijinsky, W., Kovatch, R.M., 1989, Carcinogenesis by nitrosamines and azoxyalkanes by different routes of administration to rats, *Biomed Env Sci*, 2, 154-159 p.
119. Lipponen, P., Aaltomaa, S., Koşma, V.M. Syrjanen, K., 1994, Apoptosis in breast cancer as related to histopathological characteristics and prognosis, *Eur J Cancer*, 14, 2068-73 p.
120. Lowe, S.W., Lin, A.W., 2000, Apoptosis in cancer, *Carcinogenesis*, 21, 3, 485–495.
121. Lopez-Saez, J.F., de la Torre, C., Pincheire, J., Gimenez-Martin, G., 1998, Cell proliferation and cancer, *Histopathol*, 13, 4, 1197-214 p.
122. Lott, J.A., Wolf, P.L., 1986, Alanine and aspartate aminotransferase (ALT and AST), *Clinical enzymology: a case-oriented approach*, Chicago, Year Book Medical Publishers, 111-38 p.
123. Lu, J., Ashwell, K., Ken, W.S., Waite, P., 2000, Advances in spinal cord injury: role of apoptosis. *Spine*, 25, 14, 1859-66 p.
124. Lum, C.T., Yang, Z.F., Li, H.Y., Wai-Yin Sun, R., Fan, S.T., Poon, R.T., Lin, M.C., Che, C.M., Kung, H.F., 2006, Gold(III) compound is a novel chemocytotoxic agent for hepatocellular carcinoma, *Int J Cancer*, 118, 6, 1527-38 p.
125. Ma, X.D., Ma, X., Sui, Y., Wang, W.L., Wang, C., 2003, Signal transduction of gap junctional genes, connexin 32, connexin 43 in human hepatocarcinogenesis, *World J Gastroenterol*, 9, 5, 946-50 p.
126. Marcon G, Carotti S, Coronello M, Messori L, Mini E, Orioli P, Mazzei T, Cinellu MA, Minghetti G., J. 2002, Gold(III) Complexes with Bipyridyl Ligands: Solution Chemistry, Cytotoxicity, and DNA Binding Properties, *J Med Chem*, 45, 8, 1672-7 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

127. Martinez-Vicente, M., Sovak, G., Cuervo, A.M., 2005, Protein degradation and aging, *Exp Gerontol*, 40, 8-9, 622-33 p.
128. Maruyama, K., Mishima, Y., Minagawa, K., Motonaka, J., 2001, Electrochemical and DNA-binding properties of dipyridophenazine complexes of osmium(II), *J Electroanal Chem*, 510, 1-2, 96-102 p.
129. Matsuda, M., Nakamoto, Y., Suzuki, S., Kurata, T., Kaneko, S., 2005, Interferon-c-mediated hepatocarcinogenesis in mice treated with diethylnitrosamine, *Laboratory Investigation*, 85, 655–663 p.
130. McConnell, A.A., Brown, D. H., Smith, W. E., 1981, The vibrational properties of some gold(III)-halide complexes, *Spectrochim. Acta, Part A*, 37, 8, 583-5 p.
131. Mcdade, T.P., Perugini, R.A., Vittimberga, F.J. Callery. M.P., 1999, Ubiquitin proteasome ,inhibition enhances apoptosis of human pancreatic cancer cells, *Surgery*, 126, 2, 371-7 p.
132. Micheal, C.A., 1989, Mechanism of action of N-nitrosocompounds:cancer surveys, 8, 241-249 p.
133. Milacic, V., Ping Dou, Q., 2009, The tumor proteasome as a novel target for gold(III) complexes: Implications for breast cancer therapy, *Coord Chem Rev*, 253, 1649–1660.
134. Miller, D.M., Blume, S., Borst, M., 1990, Oncogenes: malignant transformation and modern medicine, *Am J Med Sci*, 300, 1, 59-65 p.
135. Miyashita, T., Harigai, M., Hanada, M., Reed, J.C., 1994, Identification of a p53-dependent negative response element in the bcl-2 gene, *Cancer Res*, 54, 12, 3131-5 p.
136. Morishima N., Nakanishi, K., Takenouchi, H., Shibata, T., 2002, An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis, *J Biol Chem*, 277, 37, 34287-94 p.
137. Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes P.A., Harper's Illustrated Biochemistry, twentysixth edition, McGraw-Hill Companies, USA, 626-633 p.
138. Nakano, R., 1997, Apoptosis: gene directed cell death, *Horm Res*, 48, 3, 2-4 p.
139. Nanji, A.A., Hiller-Sturmhöfel, S.S., 1997, Apoptosis and necrosis two types of cell death in alcoholic liver disease, *Alcohol Health Res World*, 21, 4, 325-30 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

140. Navarro, M., Hernández, C., Colmenares, I., Hernández, P., Fernández, M., Sierraalta, A., Marchán, E., 2007, Synthesis and characterization of [Au(dppz)₂]Cl₃. DNA interaction studies and biological activity against *Leishmania (L) mexicana*, *J Inorg Biochem*, 101, 1, 111-6 p.
141. Newton, K., Strasser, A., 1998, The Bcl-2 family and cell death regulation, *Curr Opin Genet Dev*, 8, 1, 68-75 p.
142. Nicholson, D.W., 1999, Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death, *Cell Death Differ*, 6, 11, 1028-42 p.
143. Nishimura, M., Naito, S., 2006, Tissue-specific mRNA expression profiles of human phase I metabolizing enzymes except for cytochrome P450 and phase II metabolizing enzymes, *Drug Metab Pharmacokinet*, 21, 5, 357-74 p.
144. Noda, T., Iwakiri, R., Fujimoto, K., Matsuo, S., Aw, T.Y., 1998, Programmed cell death induced by ischemia-reperfusion in rat intestinal mucosa, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 274, 2,1, 270-6 p.
145. Nowell, P.C., 1990, Cytogenetics of tumor progression, *Cancer*, 65, 10, 2172-5 p.
146. O'Brien. M.A., Kirby, R., 2008, Apoptosis: a review of pro-apoptotic and anti-apoptotic pathways and dysregulation in disease, *J Vet Emerg Crit Car*, 18, 6, 572–85 p.
147. Oliner J.D., Kinzler K.W, Meltzer P.S., George D.L., Vogelstein B., 1992, Amplification of a gene encoding a TP53-associated protein in human sarcomas, *Nature*, 358, 80–83.
148. Oltvai, Z.N., Milliman, C.L., Korsmeyer, S.J., 1993, Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death, *Cell*, 74, 4, 609-19 p.
149. Omata, Y., Lewis, J.B., Lockwood, P.E., Tseng, W.Y., Messer, R.L., Bouillaguet, S., Wtaha, R.L., 2006, Gold-induced reactive oxygen species (ROS) do not mediate suppression of monocytic mitochondrial or secretory function, *Toxicol in Vitro*, 20, 5, 625-33 p.
150. Osada, T., Sakamoto, M., Nishibori, H., Iwaya, K., Matsuno, Y., Muto, T., Hirohashi, S., 1997, Increased ubiquitin immunoreactivity in hepatocellular carcinomas and precancerous lesions of the liver, *J Hepatol*, 26, 6, 1266-73 p.
151. Ovalı, E., 1999, Apoptozis, *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*, Güneş Kitabevi, 197-203.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

152. Oyama, K., Shiota, G., Ito, H., Murawaki, Y., Kawasaki, H., 2002, Reduction of hepatocarcinogenesis by ursodeoxycholic acid in rats, *Carcinogenesis*, 23, 5, 885-92 p.
153. Öniz, H., 2004, Apoptosis: the death decision, *SSK Tepecik Hast Derg*, 14, 1, 1-20 s.
154. Palanichamy, K., Ontko, A.C., 2006, Synthesis, characterization, and aqueous chemistry of cytotoxic Au(III) polypyridyl complexes, *Inorg Chim Acta*, 359, 1, 44-52.
155. Parlakpınar, H., Koç, M., Acet, A., 2003, Hücre ölümünün gözden geçirilmesi; nekroz ve apoptozisin karşılaştırılması, *Sendrom*, 105-8 p.
156. Pei, D., Zhang, Y., Zheng, J., 2012, Regulation of p53: A collaboration between Mdm2 and MdmX, *Oncotarget*, 3, 3, 228–35 p.
157. Persad, R., Liu, C., Wu, T.T., Houlihan, P.S., Hamilton, S.R., Diehl, A.M., Rashid, A., 2004, Overexpression of caspase-3 in hepatocellular carcinomas, *Mod Pathol*, 7, 7, 861-7 p.
158. Popov, Z., Hoznek, A., Colombel, M., Bastuji-Garin, S., Lefrere-Belda, M.A., Bellot, J., Abboh, C.C., Mazerolles, C., Chopin, D.K., 1997, The prognostic value of p53 nuclear overexpression and MIB-1 as a proliferative marker in transitional cell carcinoma of the bladder, *Cancer*, 80, 8, 1472-81 p.
159. Porter, A.G., Jalnicke, R.U., 1996, Emerging roles of caspase-3 in apoptosis, *Cell Death Differ*, 6, 2, 99-104 p.
160. Pradeep, K., Mohan, C.V.R., Gobianand, K., Karthikeyan, S., 2007, Silymarin modulates the oxidant–antioxidant imbalance during diethylnitrosamine induced oxidative stress in rats, *European Journal of Pharmacology*, 560, 110–6 p.
161. Preussmann, R., Stewart, B.W., 1984, N-Nitroso carcinogens. Eds: Searle CE. In: *Chemical Carcinogens*, *J Am Chem Soc*, 182, 643-828 p.
162. Ramakrishnan, G., Lo Muzio, L., Elinos-Báez, C.M., Jagan, S., Augustine, T.A., Kamaraj, S., Anandakumar, P., Devaki, T., 2009, Silymarin inhibited proliferation and induced apoptosis in hepatic cancer cells, *Cell Prolif*, 42, 2, 229-40 p.
163. Reed, J.R., Backes, W.L., 2012, Formation of p450-p450 complexes and their effect on p450 function, *Pharmacol Ther*, 133, 3, 299-10 p.
164. Rew, D.A., Wilson, G.D., 2000, Cell production rates in human tissues and tumours and their significance. Part II: Clinical Data *Eur. J. Surg. Oncol*, 26, 4, 405–417.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

165. Rivlin, N., Brosh, R., Oren, M., Rotter, V., 2011, Mutations in the p53 tumor suppressor gene important milestones at the various steps of tumorigenesis, *Genes Cancer*, 2, 4, 466-74 p.
166. Rodwell, V.R., 2000, Catabolism of proteins and of amino acid nitrogen, In Murray RK. Et al. Eds. *Harpers Biochemistry*, 25th ed. Appleton and lange, 313-322 pp.
167. Rostkowska, K., Zwierz, K., Rózański, A., Moniuszko-Jakoniuk, J., Roszczenko, A., 1998, Formation and Metabolism of N-Nitrosamines, *Polish Journal of Environmental Studies*, 7,6, 321-5 p.
168. Rozman, K.K., Klaassen, C.D., 2001, Absorption, distribution, and excretion of toxicants in casarett and Doull's toxicology: The Basic Science of Poisons Klaasen CD (Ed), *TheMcGraw-Hill Companies*, New York.
169. Saggiaro, D., Rigobello, M.P., Paloschi, L., Folda, A., Moggach, S.A., Parsons, S., Ronconi, L., Fregona, D., Bindoli, A., 2007, Gold(III)-dithiocarbamate complexes induce cancer cell death triggered by thioredoxin redox system inhibition and activation of ERK pathway, *Chem Biol*, 14, 10, 1128-39 p.
170. Sainz, R.M., Mayo, J.C., Reiter, R.J., Tan, D.X., Rodriguez, C., 2003, Apoptosis in primary lymphoid organs with aging, *Microsc Res Tech*, 62, 6, 524-39 p.
171. Salganik, R., 2001, The benefits and hazards of antioxidants: controlling apoptosis and other protective mechanisms in cancer patients and the human population, *J Am Coll Nutr*, 20, 5, 464-72 p.
172. Sarioğlu, S., Ataman, Ş., 2003, Apoptoz, *T Klin FTR*, 3, 37-44 s.
173. Searle, J., Kerr, J.F., Bishop, C.J., 1982, Necrosis and apoptosis distinct modes death with fundamentally different significance, *Pothol Annu*, 17, 2, 229-59 p.
174. Sedlak, T.W., Oltvai, Z.N., Yang, E., Wang, K., Boise, L.H., Thompson, C.B., Korsmeyer, S.J., 1995, Multiple Bcl-2 family members demonstrate selective dimerizations with Bax, *Proc Natl Acad Sci*, 92, 17, 7834-8 p.
175. Shaarawy, S.M. Tohamy, A.A., Elgendy, S.M., Elmageed, Z.Y.A., Bahnasy, A., Mohamed, M.S., Kandil, E., Matrougui, K., 2009, Protective effects of garlic and silymarin on NDEA-induced rats hepatotoxicity, *Int J Biol Sci*, 5, 6, 549-57 p.
176. Shirahashi, H., Sakaida, I., Terai, S., Hironaka, K., Kusano, N., Okita K., 2002, Ubiquitin is a possible new predictive marker for the recurrence of human hepatocellular carcinoma, *Liver*, 22, 5, 413-8 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

177. Shizu, R., Shindo, S., Yoshida, T., Numazawa, S., 2012, MicroRNA-122 down-regulation is involved in phenobarbital-mediated activation of the constitutive androstane receptor, *Plos One*, 7, 7, 41291.
178. Soliman, M.G., 2010, Immunological and DNA fragmentation studies on the protective effect of thyme against navelbine induced oxidative stress in mice, *Nature and Science*, 8,8, 136 -145 p.
179. Spataro, V., Norbury, C., Haris, A., 1998, The ubiquitin-proteasome pathway in cancer. *B J Cancer*, 77, 3, 448-455.
180. Spencer, S., Cataldo, N.A., Jaffe, R.B., 1996, Apoptosis in the human female reproductive tract, *Obstet Gynecol Surv*, 51, 5, 314- 23 p.
181. Srigley, J.R., Hutter, R.V., Gelb, A.B., Henson, D.E., Kenney, G., King, B.F., Raziuddin, S., Pisansky, T.M., 1997, Current prognostic factors-renal cell carcinoma: Workgroup No. 4. Union Internationale Contre le Cancer (UICC) and the American Joint Committee on Cancer (AJCC), *Cancer*, 80, 5, 994-6 p.
182. Su, J.F., Guo, C.J., Wei, J.Y., Yang, J.J., Jiang, Y.G., Li, Y.F., 2003, Protection against hepatic ischemia-reperfusion injury in rats by oral pretreatment with quercetin, *Biomed Environ Sci*, 16, 1-8 p.
183. Sun, H., Yu, L., HuailingWei, Liu, G., 2012, A novel antihepatitis drug, bicyclol, prevents liver carcinogenesis in diethylnitrosamine-initiated and phenobarbital-promoted mice tumor model, doi:10.1155/2012/584728
184. Sun, B.H., Zhang, J., Wang, B.J., Zhao, X.P., Wang, Y.K., Yu, Z.Q., Yang, D.L., Hao, L.J., 2000, Analysis of in vivo patterns of caspase 3 gene expression in primary hepatocellular carcinoma and its relationship to p21(WAF1) expression and hepatic apoptosis, *World J Gastroenterol*, 6, 3, 356-60 p.
185. Sun R.W., Che, C.M., 2009, The anti-cancer properties of gold(III) compounds with dianionic porphyrin and tetradentate ligands, *Coord Chem Rev*, 253, 11-12, 1682-91 p.
186. Taha, M.M., Abdul, A.B., Abdullah, R., Ibrahim, T.A., Abdelwahab, S.I., Mohan, S., 2010, Potential chemoprevention of diethylnitrosamine-initiated and 2-acetylaminofluorene-promoted hepatocarcinogenesis by zerumbone from the rhizomes of the subtropical ginger (*Zingiber zerumbet*), *Chem Biol Interact*, 186, 3, 295-305 p.
187. Takahashi, K., Schwarz, E., Ljubetic, C., Murray, M., Tessler, A., Saavedra, R.A., 1999, DNA plasmid that codes for human Bcl-2 gene preserves axotomized Clarke's nucleus neurons and reduces atrophy after spinal cord hemisection in adults rats, *J Comp Neurol*, 404, 2, 159-71 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

188. Tessitore, L., Bollito, E., 2006, Early induction of TGF- β 1 through a fasting–re-feeding regimen promotes liver carcinogenesis by a sub-initiating dose of diethylnitrosamine, *Cell Prolif*, 39, 2, 105–16 p.
189. Tharappel, J.C., Spear, B.T., glauert, H.P., 2008, Effect of phenobarbital fenobarbital on hepatic cell proliferation and apoptosis in mice deficient in the p50 subunit of NF- κ B, *Toxicol Appl Pharmacol*, 226, 3, 338-44 p.
190. Thompson, C.B., 1999, Apoptosis in fundamental immunology”, Lippincott Raven Publishers, 22-26 p.
191. Thompson, E.B., 1994, Apoptosis and steroid hormones, *Mol Endocrinol*, 8, 6, 665-73 p.
192. Thirynavukkarasu, C., Sakthisekaran, D., 2003, Stabilization of membrane bound enzyme profiles by sodium selenite in N-nitrosodiethylamine induced and phenobarbital promoted hepatocarcinogenesis in rats, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 57, 117-23 p.
193. Thirunavukkarasu, C., Sakthisekaran, D., 2001, Effect of selenium on N-nitrosodiethyl-amine-induced multistage hepatocarcinogenesis with reference to lipid peroxidation and enzymic antioxidants, *Cell Biochem*, 19, 1, 27-35 p.
194. Tiekink, R.T., 2002, Gold derivatives for the treatment of cancer, *Crit Rev Oncol Hematol*, 42, 3, 225-48.
195. Tiso, N., Pallavicini, A., Muraro, T., Zimbello, R., Apolloni, E., Vale, G., Lanfranchi, G., Danieli, G.A., 1996, Chromosomal localization of the human genes, CPP32, Mch2, Mch3, and Ich-1, involved in cellular apoptosis, *Biochem Biophys Res Commun*, 225, 3, 983-9 p.
196. Tomatır A.G., 2003, Apoptoz; programlı hücre ölümü, *T. Klin. J. Med. Sci.*, 23, 499-08 s.
197. Tsujimoto, Y., 1998, Role of Bcl-2 family of proteins in apoptosis, apoptosomes or mitochondria, *Genes cell*, 3, 11, 697-707 p.
198. Ulukaya, E., Bölüm III: Hücre Siklusu ve Apoptozis, Akciğer Kanserleri Tanı ve Tedavide Temel İlkeler ve Uygulamalar, 1-15. <http://biyokimya.uludag.edu.tr/CellCycleApoptosis.pdf>
199. Vendemiaie, G., Grattagliano, I., Caruso, M.L., Serviddio, G., Valentini, A.M., Pirrelli M., Altomare, E., 2001, Increased oxidative stress in dimethylnitrosamine induced liver fibrosis in the rat: effect of n-acetylcysteine and interferonalpha, *Toxicol Appl Pharmacol*, 175, 2, 130-139 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

200. Vermeulen, K., Berneman, Z.N., Bockstaele, D.R.V., 2003, Cell cycle and apoptosis, *Cell Prolif*, 36, 3, 165-75 p.
201. Vural, N., 2005, Toksikoloji, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, Ankara Üniversitesi Basım Evi, Ankara, No: 73.
202. Wang, C.Y., Mayo, M.W., Baldwin, A.S.J., 1996, TNF and cancer therap yinduced apoptosis: potetiation by inhibition of NF- κ B, *Science*, 274, 5288, 784 7 p.
203. Wingrave, J.M., Schaecher, K.E., Sribnick, E.A., 2003, Early induction of secondary injury factors causing activation of calpain and mitochondria mediated neuronal apoptosis following spinal cord injury in rats, *Journal of Neuroscience Res*, 73, 95- 104 p.
204. Wong, R.S., 2011, Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment, *J Exp Clin Cancer Res*, doi: 10.1186/1756-9966-30-87
205. Woo, M., Hakem, R., Soengas, M.S., Duncan, G.S., Shahinian, A., Kagi, D., Hakem, A., McCurrach, M., Khoo, W., Kaufman, S.A., Senaldi, G., Howard, T., Lowe, S.W., Mak, T.W., 1998, Essential contribution of caspase 3/CPP32 to apoptosis and its associated nuclear changes, *Genes Dev*, 12, 6, 806-19 p.
206. www.aibnsus.org/AcdamicEmblem.html
207. www.biomol.de/infos_bostonbiochem.html?id=735&hersteller=BostonBiochem
208. www-rohan.sdsu.edu/~thuxford/Research.html
209. www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/n0756?lang=en®ion=TR
210. www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/p1636?lang=en®ion=TR
211. Wyllie, A.H., 1980, Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation, *Nature*, 284, 555-6 p.
212. Wyllie, A.H., 1995, The genetic regulation of apoptosis, *Curr Opin Genet Dev*, 5, 1, 97-104 p.
213. Wyllie, A.H., Kerr, J.F., Currie, A.R., 1980, Cell death: the significance of apoptosis, *Int Rev Cytol*, 68, 251-304 p.
214. Yamada, M., Nakamura, Y., Hasegawa, T., Itoh, A., Kuroda, S., Shimao, I., 1992, Oxidative chlorination of 1,10-Phenanthroline and its derivatives by phosphorus pentachloride in phosphoryl chloride, *Bull Chem Soc Jpn*, 65, 2007-9 p.
215. Yang, S.C., Koop, D.R., Wang, T., Coon, M.J., 1985, Immunochemical studies on the metabolism of nitrosamines by ethanol-inducible cytochrome p-450, *Biochem Biophys Res Commun*, 128, 1007-1013 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

216. Yazıcı, P., 2009, Apoptoz: Düzenleyici moleküller, hastalıklarla ilişkisi ve apoptoz saptama yöntemleri, Türkiye Klinikleri J Med Sci, 29, 6, 1677-86 s.
217. Yılmaz, S., Karahan,İ., Kandemir, F.M., 2008, Bazı Nitrozaminlerin Ratlarda Doku Pirüvat Kinaz Aktivitesi Üzerine Etkileri, Fırat Üniversitesi Sağ Bil Derg, 22, 3, 163-8 p.
218. Yoneda, T., Imaizumi, K., Oono, K., Yui D., 2001, Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor associated factor 2-dependent mechanism in response to er stres, J Biol Chem, 276, 17, 13935–40 p.
219. Yu, J., Zhou, X., He, X., Dai, M., Zhang, Q., 2011, Curcumin Induces Apoptosis Involving bax/bcl-2 in Human Hepatoma SMMC-7721 Cells, Asian Pac J Cancer Prev, 12, 8, 1925-9 p.
220. Zhan, Q., Fan, S., Bae, I., Guillouf, C., Liebermann, D.A., O'Connor, P.M., Fornace, A.J., 1994, Induction of bax by genotoxic stres in human cells correlates with normal p53 status and apoptosis, Oncogene, 9, 12, 3743-51 p.
221. Zhang, C.L., Zeng, T., Zhao, X.L., Yu, L.H., Zhu, Z.P., Xie, K.Q., 2012, Protective effects of garlic oil on hepatocarcinoma induced by n nitrosodiethylamine in rats, Int J Biol Sci, 8, 3, 363-74 p.
222. Zhang, J.H., Xu, M., 2000, DNA fragmentation in apoptosis, Cell Res, 10, 3, 205-11.
223. Zheng, T.S., Schlosser, S.F., Dao, T., Hingorani, R., Crispe, I.N., Boyer, J.L., Flavell, R.A., 1998, Caspase-3 controls both cytoplasmic and nuclear events associated with Fas-mediated apoptosis in vivo, Proc Natl Acad Sci, 95, 23, 13618-23 p.

8. ÖZGEÇMİŞ

Bireysel bilgiler

Adı Soyadı : Neslihan TEKİN
Doğum Tarihi, Yeri : 29.09.1980, AKSARAY
Uyruğu : T.C.
Medeni Durumu : Bekar
Telefon : 0 532 409 8997
Email : neslihan_tekin@hotmail.com

Eğitim Durumu

İlköğretim : 1986-1991, Atatürk İlköğretim Okulu, Aksaray
Ortaöğretim : 1991–1994, Kılıçaslan İlköğretim Okulu, Aksaray
Lise : 1994–1998, Osmangazi Lisesi(Yabancı dil ağırlıklı lise)
Üniversite : 1999–2004, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü
Yüksek Lisans : 2004-2007, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı
Doktora : 2007-----Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı

Mesleki Deneyim:

2007-2008 Aksaray Üniversitesi, Kimya Bölümü, Biyokimya.
2008-..... Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya AD.

Üye Olunan Bilimsel Kuruluşlar:

Türk Biyokimya Derneği

Yayımlar:

Makaleler

- 1.Ozden, H., Tekin, N., Akyuz , F., Gurer, F., Ustuner, M.C., Kucuk, F., Guven, G., Yaylak, F., 2009, The protective effect of NG-nitro-L-arginine methyl ester and insulin on nitric oxide inhibition and pathology in experimental diabetic rat liver, Saudi Med J, 30, 1, 30-4 p.
- 2.Akyuz, F., Aydın, O, Tekin, N., Temel, H.E., 2010, Effects of combination of p dimethylaminoazobenzene and dioxin on serum lipid profile, Turkiye Klinikleri J Cardiovasc Sci, 22, 3, 305-10 p.

3.Ozkurt, S., Sahin, G., Degirmenci, N.A., Temiz, G., Musmul, A., Tek, M., Birdane, A., Tekin, N., Akyuz, F., Yalcin, A.U., 2011, Late effects of renal transplantation on endothelial functions and cardiac morphology, *Transplant Proc*, 43, 2606-11p.

4.Tekin, N., Akyuz, F., Temel, H.E., 2011, NO levels in diabetes mellitus: effects of L-NAME and insulin on LCAT, Na⁺/K⁺ ATPase activity and lipid profile, *Diab Metab Syndr Clin Res*, 5, 191-5 p.

5.Akyüz, F., Aydın, Ö., Aydın, T., Tekin, N., Temel, H.E., Burukoğlu, D., Aral, E., 2012, Sıçanlarda lipopolisakkarit ile indüklenen akciğer hasarında asetilsalisilat aşırı dozlarının etkileri: VEGF'nin rolü, *Turk Biochem J*, 37, 3, 231–8 p.

6.Akyuz, F., Tekin, N., Aydın, O., Temel H.E., Isıklı, B., 2012, The effect of metformin and exercise on serum lipids, nitric oxide synthase and liver nitric oxide levels in streptozotocin-nicotinamide induced diabetic rats, *Afr J Pharm Pharmacol*, 6, 5, 336-42 p.

7.Tunçel, N., Korkmaz, T., Tekin, N., Şener, E., Akyüz, F., İnal, M., 2012, Antioxidant and Anti-Apoptotic Activity of Vasoactive Intestinal Peptide (VIP) Against 6-Hydroxy Dopamine Toxicity in the Rat Corpus Striatum, *J Mol Neurosci*, 46,51–7 p.

Poster Bidiriler

1 . F., Akyuz, Tekin, N., The effect of L-NAME application on NO levels and Na⁺/K⁺ ATPase activities of diabetic rats treated with insülin, XIV Balkan journal of clinical laboratory, 130, Antalya, 2007.

2. Özden, H., Tekin, N., Akyüz, F., Gurer, F., Küçük, F., Yaylak, F., Güven, G., Üstüner M.C., The role of L-NAME on the liver histopathological changes in insulin treated streptozotocin induced diabetic rats, 5th Asian-Pacific International Congress of Anatomists & 8th Iranian Congress of Anatomical Sciences, 92-93, Tahran, Iran, 2008.

3. Tekin, N., Aydın, O., Kılıç, N., Şenat, A., Eryuruk, B., Akyuz, F., Inal, M., The Effect of L-NAME Application on NO Levels and antioxidant enzymes in type 1 diabetic rats treated with insulin, 20 National Biochemistry Congress, Kapadokya, 2008.

4. Aydın, O., Temel, H., Tekin, N., Akyuz, F., Inal, M., Activity of Butyrylcholinesterase In Model of Inflammation Induced by LPS, National Biochemistry Congress, Kapadokya, 2008.

5. Akyuz, F., Kabay, S., Tekin, N., Kucuk, F., Ozden, H., Gurer, F., Ustuner, M.C., The effect of NG-nitro-Arginine Methyl ester (L-NAME) and insulin on kidney histology in experimental diabetic rats, *Surcical&Radiologic Anatomy*, İstanbul, 2009.

6. Akyuz, F., Tekin, N., Temel, H.E., Metformin treatment and exercise in animal model of type 2 diabetes: lipid and NO metabolism, National biochemistry Congress, İstanbul, 2007.

7. Aydin, O., Temel, H.E., Tekin, N., Akyuz, F., Subchronic Dioxin treatment, serum lipids and Butyrylcholineesterase Activity, National biochemistry Congress, Istanbul, 2009.
8. Aydin, O., Akyuz, F., Tekin, N., IP6 Increases Cytochrome C Releasing In Rat Liver Initiation- Promotion Model. 9th International ISSX Meeting. Abstract book, LB8, 4-8 September, Istanbul, 2010.
9. Aydin, O., Tekin N., Aydin, T., Temel, H.E., Burukoglu, D., Aral, E., Akyuz, F. Effects of Aspirin Overdose on Balf VEGF of Endotoxemic Rats. 9th International ISSX Meeting. Abstract book, P214, 4-8 September, Istanbul, 2010.
10. Korkmaz, O.T., Tekin, N., Şener, E., Tuncel, N., Akyuz, F., Inal, M., Anti-oxidant and Anti-apoptotic Actions of vasoactive Intestinal Peptide (VIP) on the Parkinsonian Rats, Turkish Journal of Neurology, 13-17 April, Istanbul, 2010.
11. Korkmaz, O.T., Tekin, N., Şener, E., Tuncel, N., Akyuz, F., Inal, M., 2012, Antioxidant and anti-apoptotic activity of Vasoactive Intestinal Peptide (VIP) against 6-hydroxy dopamine toxicity in the rat corpus striatum, Summer Neuropeptide Conference and The European Neuropeptide Club (ENC) Meeting, J Mol Neurosci, 48, 1, 173–201, 2012.
12. Tekin, N., Aydın, O., Bayraktar, O., Akyuz, F., The effects of S-allyl cysteine on lung tissue in rat model of Lipopolysaccharide (LPS)-induced Sepsis, Cell Membranes and Free Radical Research, 4th International Congress on Cell Membranes and Oxidative Stress: Focus on Calcium Signaling and TRP Channels, Isparta, 2012.
13. Ustuner, M.C., Çolak, E., Tekin, N., Ustuner, D., Çolak, E., Yangı, B., Burukoğlu, D., Akyüz, F., Güneş, H.V., Değirmenci, İ., The curative effects of *Olea europaea*L. leaf extract on carbon tetrachlorideinduced liver injury and the oxidative stress, 4th International Congress on Cell Membranes and Oxidative Stress: Focus on Calcium Signaling and TRP Channels, Isparta, 2012.
14. Ozbayer, C., Tekin, N., Yangı, B., E., Entok, Akyuz, F., Kurt, H., Değirmenci, İ., Güneş, H.V., Üstüner, M.C., Effects of *Nigella sativa* L. on NO production and DNA fragmentation in acute inflammation, 4th International Congress on Cell Membranes and Oxidative Stress: Focus on Calcium Signaling and TRP Channels, Isparta, 2012.
15. Tekin, N., Akyuz, F., Ustuner, M.C., Ozbayer, C., Aydın, O., Değirmenci, İ., Benkli, K., Burukoğlu, D., Ozden, H., Guven, G., Dipyrido[3, 2-a:2', 3'- c]phenazine (dppz) Au(III) complex is a novel anti-tumor agent for hepatocellular carcinoma, FEBS Special Meeting, Protein Quality and Ubiquitin Systems in Health and Disease, Kuşadası, 2012.

Projeler (araştırmacı)

1. Metformin ile tedavi edilen diyabetik modellerde, egzersiz uygulamasının ve L-NAME verilmesinin lipid parametreleri ve NOS üzerine etkilerinin araştırılması, 200611019, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, 2006-2007.

2. Subkronik p-dimetil Aminoazobenzen (p-DAB) uygulanan sıçanlarda inositol 6-fosfat ve retinil asetat'ın karaciğer dokusu ile karaciğer transglutaminaz II (TGII) enziminin aktiviteleri üzerine etkileri, 200811016, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, 2008-2010.

3. DEN ve fenobarbital ile oluşturulan karaciğer hasarında dipyrido[3, 2-a:2', 3'-c]phenazine (dppz) Au(III) kompleksinin etkilerinin araştırılması, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, 201011044, 2010-devam ediyor.

Kongre, Kurs

1. XV. Balkan klinik laboratuvar federasyonu kongresi, Antalya, Eylül, 2007.

2. Ulusal biyokimya kongresi, Nevşehir, 29 Ekim-1 Kasım, 2008.

3. Ulusal biyokimya kongresi, İstanbul, Ekim, 2009.

4. Ulusal HPLC ve mass spektrometri çalıştay ve sempozyumu, Gülhane Askeri Tıp akademisi, Ankara, Mayıs, 2008.

5. Tıpta araştırma ve veri analizi yöntemleri biyoistatistik kursu, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Şubat, 2009.

6. Nanomedicine and nanobiotechnology winter school, Bilkent Üniversitesi, Ankara, Ocak, 2010.

7. 4th international congress on cell membranes and oxidative stress: focus on calcium signaling and TRP channels, Isparta, Haziran, 2012.

8. FEBS Special Meeting, Protein quality and ubiquitin systems in health and disease, Kuşadası, Turkey, Kasım, 2012.