

T.C
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜŐÜ
TİBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

SUBKRONİK p-DİMETİLAMİNOAZOBENZEN (p-DAB)
UYGULANAN SIÇANLARDA İNOSİTOL 6-FOSFAT VE RETİNİL
ASETAT'IN KARACİĞER DOKUSU ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ

DOKTORA TEZİ

ÖZLEM AYDIN

DANIŐMAN

Yrd. Doç. Dr. FAHRETTİN AKYÜZ

AĞUSTOS -2010

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

SUBKRONİK p-DİMETİLAMİNOAZOBENZEN (p-DAB)
UYGULANAN SIÇANLARDA İNOSİTOL 6-FOSFAT VE RETİNİL
ASETAT'IN KARACİĞER DOKUSU ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ

DOKTORA TEZİ

ÖZLEM AYDIN

DANIŐMAN

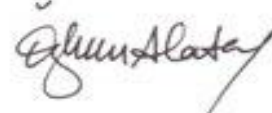
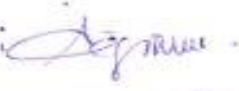



Yrd. Doç. Dr. FAHRETTİN AKYÜZ

PROJE NO: 2008-11016

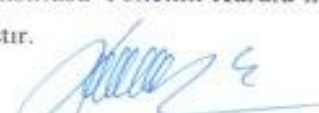
KABUL VE ONAY SAYFASI

Özlem Aydın'ın Doktora Tezi olarak hazırladığı "Subkronik p-dimetil aminoazobenzen (p-DAB) uygulanan sıçanlarda inositol 6-fosfat ve retinil asetat'ın karaciğer dokusu üzerindeki etkileri" başlıklı bu çalışma, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddesi uyarınca değerlendirilerek "KABUL" edilmiştir.

09.09.2010

- BAŞKAN : Prof. Dr. Ö. ALATAŞ 
- ÜYE : Prof. Dr. İrfan DEĞİRMENCİ 
- ÜYE : Prof. Dr. Gengör Karbek 
- ÜYE : Doç. Dr. Ahmet KAHRAMAN 
- ÜYE : Yard. Doç. Dr. Fahrettin AKIÖZ 

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 26/08/2010 tarih ve 840/5859 sayılı kararı ile onaylanmıştır.


Prof. Dr. Ferruh Yücel
Enstitü Müdürü

ÖZET

Subkronik p-dimetilaminoazobenzen (DAB) ve 2,3,7,8, tetraklorodibenzo-p-dioksin (TCDD) vererek deneysel kanser modeli oluşturmayı hedeflediğimiz çalışmamızda, antiproliferatif ve apoptotik özelliklere sahip inositol 6 fosfat (IP6) ile retinil asetat (RA)'ın karaciğer dokusundaki koruyucu rollerini değerlendirdik. Çalışmamızda *Sprague dawley* erkek sıçanlar her grupta 30 adet olacak şekilde 6 gruba ayrıldı. Kontrol hayvanları (grup 1 ve 2) standart laboratuvar diyeti ile beslendiler. Grup 2'ye diyetin yanı sıra gavajla mısır yağı (0,25 mL/100 g vücut ağırlığı, haftada 5 gün) da verildi. Grup 3'teki hayvanlara yemleriyle DAB (%0,06) ve gavajla TCDD (70 ng/100 g vücut ağırlığı, haftada 1 gün) verildi. DAB + TCDD verilen diğer üç grup sırayla IP6 (%0,5, içme suyunda), RA (1 mg/100 g vücut ağırlığı, haftada 5 gün) ve IP6 + RA aldı. Tüm maddeler başlandıktan sonra 15., 30., 60., 90. ve 120. günlerde her gruptan 6 sıçanın kan ve doku örnekleri alındı. Serumda ALT, AST, ALP, LDH; plazmada VEGF, MMP-2; karaciğerde MDA, Sitokrom c, DNA Fragmantasyonu ölçüldü. CYP1A1 western blot ile belirlendi. Karaciğer dokuları histopatolojik olarak değerlendirildi. Grup 3'ün 90. ve 120. gün örneklerinde VEGF ve MMP-2 değerleri artarken, Sitokrom c ve DNA fragmantasyonu değerleri ile CYP1A1 enzim ekspresyonu azalmıştı. Yine grup 3'ün 90. ve 120. gün örneklerinde preneoplastik fokus bulgusu mevcuttu. Grup 4, 5 ve 6'da istatistiksel olarak preneoplastik fokusa rastlanmadı. Karaciğer kanser modeli oluşturmak için DAB'ın başlatıcı (initiator) ve TCDD'nin promotör olarak kullanıldığı bu deneysel çalışmada DAB + TCDD kombinasyonunun karaciğerde preneoplastik fokus oluşumunu tetiklediği gösterildi. Bu süreçte IP6 ve RA'nın preneoplastik dönüşümü büyük oranda engelleyerek koruyucu rol oynadığı belirlendi.

Anahtar Sözcükler: p-DAB, TCDD, IP6, Retinil Asetat, Karaciğer, Preneoplastik Fokus

SUMMARY

We evaluated the protective roles of antiproliferative and apoptotic substances inositol hexaphosphate (IP6) and retinyl acetate (RA) on the liver tissue with an experimental cancer model formed by subchronic administration of p-dimethylaminoazobenzene (DAB) and 2,3,7,8, tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). *Sprague dawley* male rats were randomized into 6 group each consist of 30 rats. Control animals (group 1 and 2) were fed a standard laboratory diet. Group 2 was received corn oil (0,25 mL/100 g body weight, 5 days/week) by gavage along with diet. Group 3 animals was allowed DAB (0,06%) by food and TCDD (70 ng/100 g body weight, once a week) by gavage. Three other groups of DAB + TCDD treated animals received IP6 (0,5%) in drinking water, RA (1 mg/100 g body weight, 5 days/week) and IP6 + RA, respectively. After the beginning of the study, blood and tissue samples were taken from 6 rats /group by 15., 30., 60., 90., and 120. days. ALT, AST, ALP, LDH levels were measured in serum; VEGF, MMP-2 in plasma; MDA, Cytochrome c, DNA fragmentation in liver. CYP1A1 was determined by western blot. Liver tissues were evaluated histopathologically. Plasma VEGF and MMP-2 levels were increased and cytochrome c and DNA fragmentation levels and expression of CYP1A1 were decreased in group 3 at 90., and 120. day samples. Preneoplastic foci were found at 90., and 120. day samples of group 3. In contrast there were no preneoplastic foci in group 4, 5, and 6 statistically. DAB + TCDD combination was shown to trigger preneoplastic foci formation in this study which uses DAB as an initiator and TCDD as a promoter for formation liver cancer model. IP6 and RA have protective roles in this process by inhibiting preneoplastic transformation.

Keywords: p-DAB, TCDD, IP6, Retinyl Acetate, Liver, Preneoplastic Focus

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	v
SUMMARY	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİL DİZİNİ	x
TABLO DİZİNİ	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Biyotransformasyon ve Sitokrom P450 Reaksiyonları	5
2.2. Biyotransformasyonda Aril Hidrokarbon Reseptörünün Rolü	9
2.3. p-dimetilaminoazobenzen (p-DAB) ve 2,3,7,8-tetraklorodibenzo-p-dioxin (TCDD)'in Tümör Oluşumundaki Rolü	11
2.3.1. p-DAB ve tümör oluşumundaki rolü	11
2.3.1.1. p-DAB'a bağlı oksidatif hasarın tümör oluşumuna etkisi	15
2.3.2. TCDD ve tümör oluşumundaki rolü	16
2.3.2.1. TCDD'ye bağlı oksidatif hasarın tümör oluşumuna etkisi	18
2.4. p-DAB ve TCDD'nin CYP1A Enzim Sistemine Etkileri	19
2.5. p-DAB ve TCDD'nin VEGF'ye Etkileri	20
2.6. p-DAB ve TCDD'nin Matriks Metalloproteinazlara Etkileri	21
2.7. Apoptoz	22

İÇİNDEKİLER (devam ediyor)

2.7.1. Kaspazlar.....	24
2.7.2. Bcl-2 protein ailesi.....	26
2.8. İnozitol altı fosfat.....	28
2.9. Retinil Asetat.....	31
2.10. IP6 ve Retinil Asetat'ın Apoptoza Etkileri.....	34
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	39
3.1. Gereç.....	39
3.1.1. Deney Hayvanlarının Temini ve Bakımı.....	39
3.1.2. Kimyasal Maddeler.....	39
3.1.3. Cihazlar ve Sarf Malzemeler.....	42
3.2. Yöntem.....	44
3.2.1. Doz ve Deney Grupları.....	44
3.2.2. Deney Hayvanlarından Çalışılacak Örneklerin Alınması.....	46
3.2.3. Serum ALT, AST, ALP ve LDH Ölçümü.....	46
3.2.4. Plazma VEGF Ölçümü.....	49
3.2.5. Plazma MMP-2 Ölçümü.....	50
3.2.6. Karaciğer Dokusu MDA Ölçümü.....	52
3.2.7. Karaciğer Dokusu Protein Ölçümü.....	55
3.2.8. Karaciğer Dokusu Sitokrom c Ölçümü.....	57
3.2.9. Karaciğer Dokusu DNA Fragmantasyonu Ölçümü.....	59
3.2.10. Western Blot Yöntemi İle CYP1A1'in Belirlenmesi.....	62
3.2.11. Karaciğer Dokusu Histolojik Preparatların Hazırlanması.....	67

İÇİNDEKİLER (devam ediyor)

3.2.12. İstatistiksel Analiz.....	70
4.BULGULAR.....	71
4.1. Serum ALT Bulgusu.....	71
4.2. Serum AST Bulgusu	71
4.3. Serum ALP Bulgusu.....	76
4.4. Serum LDH Bulgusu.....	76
4.5. Plazma VEGF Bulgusu	81
4.6. Plazma MMP-2 Bulgusu	81
4.7. Karaciğer Dokusu MDA Bulgusu	86
4.8. Karaciğer Dokusu Sitokrom c Bulgusu	86
4.9. Karaciğer Dokusu DNA Fragmantasyonu Bulgusu	92
4.10. Karaciğer Dokusu CYP1A1 Enzim Ekspresyonu.....	92
4.11. Karaciğerde Histolojik Bulgular.....	99
5. TARTIŞMA.....	111
6. SONUÇ.....	133
7. KAYNAKLAR DİZİNİ.....	136
ÖZGEÇMİŞ	

ŞEKİL DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Sitokrom P450-Bağımlı Monooksijenaz Reaksiyonları.....	6
Şekil 2.2. Reaksiyon Mekanizması.....	9
Şekil 2.3. AhR Yolağı.....	10
Şekil 2.4. p-DAB'ın Kimyasal Yapısı.....	11
Şekil 2.5. p-DAB'ın metabolitlerinden bazıları.....	13
Şekil 2.6. p-DAB'ın metabolik aktivasyonu	14
Şekil 2.7. TCDD'nin moleküler yapısı.....	16
Şekil 2.8. İki temel apoptotik yolak	26
Şekil 2.9. Apoptozun aktivasyonu ve inhibisyonu	28
Şekil 2.10. Kalpain ve mitokondri bağımlı kaspaz kaskadı.....	36
Şekil 2.11. AtRA aracılı apoptoz.....	38
Şekil 3.1. Maddelerin gruplara başlanılma zamanı.....	45
Şekil 3.2. MDA standart grafiğı.....	54
Şekil 3.3. Protein standart grafiğı.....	56
Şekil 3.4. DNA standart grafiğı.....	62
Şekil 4.1. Kontrol ve deney gruplarının 15., 30., 60., 90. ve 120. güne ait ALT değerleri.....	73
Şekil 4.2. Kontrol ve deney gruplarının 15., 30., 60., 90. ve 120. güne ait AST değerleri.....	75

ŞEKİL DİZİNİ (devam ediyor)

Şekil 4.3. Kontrol ve deney gruplarının 15., 30., 60., 90. ve 120. güne ait ALP değerleri.....	78
Şekil 4.4. Kontrol ve deney gruplarının 15., 30., 60., 90. ve 120. güne ait LDH değerleri.....	80
Şekil 4.5. Kontrol ve deney gruplarının 15., 30., 60., 90. ve 120. güne ait VEGF değerleri.....	83
Şekil 4.6. Kontrol ve deney gruplarının 15., 30., 60., 90. ve 120. güne ait MMP-2 değerleri.....	85
Şekil 4.7. Kontrol ve deney gruplarının 15., 30., 60., 90. ve 120. güne ait MDA değerleri.....	89
Şekil 4.8. Kontrol ve deney gruplarının 15., 30., 60., 90. ve 120. güne ait Sitokrom c değerleri.....	91
Şekil 4.9. Kontrol ve deney gruplarının 15., 30., 60., 90. ve 120. güne ait DNA fragmentasyonu değerleri.....	95
Şekil 4.10. Kontrol grubunun 15., 30., 60., 90. ve 120. güne ait CYP1A1 proteinlerinin antikorla işaretlendiği film görüntüsü.....	96
Şekil 4.11. Grup 3'ün 15., 30., 60., 90. ve 120. güne ait CYP1A1 proteinlerinin antikorla işaretlendiği film görüntüsü.....	96
Şekil 4.12. Kontrol ve deney gruplarının 15., 30., 60., 90. ve 120. güne ait CYP1A1 değerleri.....	98
Şekil 4.13. Kontrol grubuna ait normal görünümlü karaciğer dokusu.....	105
Şekil 4.14. Grup 3'e ait hücresel dejenerasyon bulgusu.....	105
Şekil 4.15. Grup 3'e ait hücresel dejenerasyon bulgusu.....	106
Şekil 4.16. Grup 3'e ait yoğun hücresel dejenerasyon bulgusu.....	106

ŞEKİL DİZİNİ (devam ediyor)

Şekil 4.17. Grup 3'e ait iltihabi hücre infiltrasyonu bulgusu.....	107
Şekil 4.18. Grup 4'e ait iltihabi hücre infiltrasyonu bulgusu.....	107
Şekil 4.19. Grup 5'e ait iltihabi hücre infiltrasyonu bulgusu.....	108
Şekil 4.20. Grup 6'ya ait iltihabi hücre infiltrasyonu bulgusu.....	108
Şekil 4.21. Grup 3'e ait nekroz ve iltihabi hücre infiltrasyonu bulgusu.....	109
Şekil 4.22. Grup 3'e ait nodüler yapı şeklinde preneoplastik fokus bulgusu.....	109
Şekil 4.23. Grup 3'e ait nodüler yapı şeklinde preneoplastik fokus bulgusu.....	110
Şekil 4.24. Grup 3'e ait nodüler yapı şeklinde preneoplastik fokus bulgusu.....	110

TABLO DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
Tablo 4.1. Kontrol ve deney gruplarının 15., 30., 60., 90. ve 120. güne ait serum ALT değerleri ve istatistiksel değerlendirmesi.....	72
Tablo 4.2. Kontrol ve deney gruplarının 15., 30., 60., 90. ve 120. güne ait serum AST değerleri ve istatistiksel değerlendirmesi.....	74
Tablo 4.3. Kontrol ve deney gruplarının 15., 30., 60., 90. ve 120. güne ait serum ALP değerleri ve istatistiksel değerlendirmesi.....	77
Tablo 4.4. Kontrol ve deney gruplarının 15., 30., 60., 90. ve 120. güne ait serum LDH değerleri ve istatistiksel değerlendirmesi.....	79
Tablo 4.5. Kontrol ve deney gruplarının 15., 30., 60., 90. ve 120. güne ait plazma VEGF değerleri ve istatistiksel değerlendirmesi.....	82
Tablo 4.6. Kontrol ve deney gruplarının 15., 30., 60., 90. ve 120. güne ait plazma MMP-2 değerleri ve istatistiksel değerlendirmesi.....	84
Tablo 4.7. Kontrol ve deney gruplarının 15., 30., 60., 90. ve 120. güne ait karaciğer dokusu MDA değerleri ve istatistiksel değerlendirmesi	88
Tablo 4.8. Kontrol ve deney gruplarının 15., 30., 60., 90. ve 120. güne ait karaciğer dokusu Sitokorm c değerleri ve istatistiksel değerlendirmesi.....	90
Tablo 4.9. Kontrol ve deney gruplarının 15., 30., 60., 90. ve 120. güne ait karaciğer dokusu DNA fragmantasyonu değerleri ve istatistiksel değerlendirmesi.....	94
Tablo 4.10. Kontrol ve deney gruplarının 15., 30., 60., 90. ve 120. güne ait karaciğer dokusu CYP1A1 enzim ekspresyonu değerleri ve bunların istatistiksel değerlendirmesi.....	97
Tablo 4.11. Kontrol ve deney gruplarının 15., 30., 60., 90. ve 120. güne ait hücrel dejenerasyon skorlarının istatistiksel değerlendirmesi.....	101

TABLO DİZİNİ (devam ediyor)

Tablo 4.12. Kontrol ve deney gruplarının 15., 30., 60., 90. ve 120. güne ait iltihabi hücre infiltrasyonu skorlarının istatistiksel değerlendirmesi..	102
Tablo 4.13. Kontrol ve deney gruplarının 15., 30., 60., 90. ve 120. güne ait nekroz skorlarının istatistiksel değerlendirmesi.....	103
Tablo 4.14. Kontrol ve deney gruplarının 15., 30., 60., 90. ve 120. güne ait preneoplastik fokus skorlarının istatistiksel değerlendirmesi.....	104

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler ve Kısaltmalar

Açıklama

AhR	Aril hidrokarbon reseptörü
Akt	Protein kinaz B
APAF	Apoptoz proteaz aktive edici faktör
ARNT	Aril hidrokarbon reseptörü nükleer translokator
AtRA	All trans retinoik asit
BaP	Benzo[a]pren
Bax	Proapoptotik bcl-2 üyesi
Bcl-2	Apoptoz düzenleyici protein
bFGF	Temel fibroblast büyüme faktörü
bp	Baz çifti
CaCo-2	İnsan kolon karsinoma hücre serisi
CCl ₄	Karbon tetra klorür
CYP1A1	Sitokrom P450 1A1
DEN	Dietil nitrozamin
DMBA	7,12-dimetilbenzantrasen
EGFR	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
ERK1	Ekstraselüler sinyal ilişkili kinaz 1
HAA	Heterosiklik aromatik amin/amid
HCC	Hepatoselüler karsinoma
HCV	Hepatit C virüs
HeLa	Servikal kanserden derive hücre serisi
IARC	Uluslar arası kanser araştırma ajansı
IGF-1R	İnsülin benzeri büyüme faktör 1 reseptörü
IP	İnositol fosfat

IP4	İnositol 4 fosfat
IP5	İnositol 5 fosfat
IP6	İnositol 6 fosfat
kb	Kilobaz
LDH	Laktat dehidrojenaz
LRAT	Lesitin:retinol açıltransferaz
MAECs	Fare aortik endotelyal hücreler
MAPK	Mitojen aktiveli protein kinaz
MDA	Malondialdehid
MMP-2	Matriks metalloproteinaz 2
NFκB	Nükleer faktör kappa B
N-OH AAB	N-hidroksi aminoazobenzen
N-OH-MAB	N-hidroksi metilaminoazobenzen
PAH	Polisiklik aromatik hidrokarbon
PARP	Poli ADP-riboz polimeraz
p-DAB	p-dimetil aminoazobenzen
PDGF	Trombosit kaynaklı büyüme faktörü
PDGFR-b	Trombosit kaynaklı büyüme faktörü reseptörü-beta
PI3K	Fosfotidil 3 kinaz
RA	Retinil asetat
RAR	Retinoik asit reseptörü
RBP	Retinol bağlayıcı protein
ROS	Reaktif oksijen türleri
RSK	Ribozomal protein S6 kinaz
RXR	Retinoik X reseptörü
SH-SY5Y	Nöroblastoma hücre serisi
SP1	Spesifite protein 1
SSC4	Skuamöz hücreli karsinoma hücre serisi
TCDD	2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin
TG2	Transglutaminaz 2
TGFβ	Transforme edici büyüme faktörü beta

TICAM	Tıbbi-Cerrahi Deneysel Araştırma Merkezi
TNF	Tümör nekrozis faktör
TPA	12-O-tetradekanoil forbol-13-asetat
TRAIL	TNF-İlişkili Apoptoz İndükleyici Ligand
VEGF	Vasküler endotelyal büyüme faktörü
XRE	Ksenobiyotik yanıt eleman

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Teknolojinin hızlı bir şekilde gelişmesine paralel olarak çevre kirliliği de artış göstermektedir ve çevre çeşitli insan etkinlikleri sonucunda oluşan atıklar, duman, zehirli kimyasal maddeler ve öbür zararlı maddelerle sürekli kirlenmektedir. Günümüzde binlerce kimyasal madde çeşitli amaçlar için kullanılmakta ve bu sayı her geçen yıl artmaktadır. Modern yaşamın vazgeçilmez unsurları olan kimyasal maddelerin kullanımı insan sağlığı ve çevre için pek çok risk taşımaktadır. Günümüzde ulaşılan teknolojinin sağladığı imkânlar ile bu riskler kabul edilebilir düzeylere indirilmektedir. Geliştirilen uluslararası kurallar, kimyasal kullanımında insan sağlığı ve çevrenin zarar görmemesini hedeflemektedir. Özellikle 1960'lardan sonra toksikoloji bilimindeki hızlı gelişmenin yanı sıra kimyasal maddeler için risk yönetimi uygulamalarının geliştirilmesi, güvenli kimyasal kullanımı olanağını getirmiştir. Bugün ilaç, gıda katkı maddesi, kozmetik, tarım ilacı, endüstri kimyasalı olarak kullanılan her kimyasalın insan sağlığı ve çevreye olan etkisi ayrıntılı olarak incelenmekte, insan sağlığı ve çevre üzerinde kabul edilemez ölçüde risk taşıyanların kullanımına izin verilmemektedir.

Kanser günümüzde önemi giderek artan bir sağlık ve yaşam sorunu durumundadır. Ölüm nedeni olarak, kalp ve damar hastalıklarının hemen ardından gelmektedir.

Kanser, bazı etkilerle değişime uğramış hücrelerin, gerek yerel ve gerek uzak noktalarda kontrolsüz olarak çoğalıp büyümelerinin sonucu oluşan habis hastalıklar grubudur. Normalde hücreler belli bir kontrol altında, ihtiyaca göre bölünerek çoğalırlar. Hücreler bir taraftan programlı ölüm ya da apoptoz denen olay ile yok olurken, diğer taraftan da büyüme faktörlerinin etkisiyle çoğalır. Hücrelerin yaşaması ve ölmesi arasında sürdürülen bu denge bozulduğu zaman kanser oluşabilmektedir. Çeşitli kimyasallar ve toksinler, aşırı alkol ve sigara tüketimi, genetik faktörler, hareketsiz yaşam, obezite, radyasyon ve virüsler kanser oluşturan başlıca nedenler olarak sıralanabilir.

Tedavisi ve tanısı birçok uzmanlık dallarının işbirliğini gerektiren, tedavisi güç olan, erken tanının önemli olduğu bu hastalık grubunun tanı ve tedavisinde gelişen teknoloji ve modern bilimsel yöntemler yeni yaklaşımlar sunmakta, erken tanı ve tedavi olanakları ile insanlığa hizmet etmektedir. Kanserde belki tedaviden daha önemli olan husus kanserin önlenmesidir. Kanser önlenmesinde karsinojenik maddelerden uzak durmak, temiz ve sağlıklı yaşamak ve uygun bir diyet uygulamak gibi hususlara uyulması kanser sıklığını azaltabilmektedir.

Bazı kimyasallar hem deney hayvanlarında hem de insanların günlük yaşantılarında karşılaşmalarının bir sonucu olarak hepatoselüler karsinomayı da içeren kötücül (malignant) hepatik tümörlere neden olabilirler. Bu kimyasallara vinil klorid, aromatik aminler, nitrojen bileşikleri, polisiklik aromatik hidrokarbonlar ve alkilleyici ajanlar örnek verilebilir. Hepatoselüler kanserler dünya çapındaki yaygın tümörler içinde dördüncü sırayı oluşturmaktadır (98).

Azo bileşikleri kozmetik, yiyecek, deri, kâğıt ve tekstil endüstrilerini içeren birçok endüstri alanında yaygın olarak kullanılır (102). Azo boyası p-dimetil aminoazobenzen (p-DAB, methyl yellow) yiyeceklerde boya olarak kullanılan azo boyalarının en basit yapıda olanıdır ancak kemirgenlerdeki karsinojenik aktivitesinden dolayı p-DAB'ın kullanımı artık yasaklanmıştır (46, 112, 163). p-DAB, IARC (International Agency for Research on Cancer) tarafından Grup-2B kanserojen olarak değerlendirilmektedir (83) ve insanlar için risk taşıyan tehlikeli bir madde (2, 69,75,157) olarak listelenmiştir. Fare ve sıçanlar p-DAB'ı besinleriyle kronik olarak aldıkları zaman bu hayvanların karaciğerlerinde p-DAB'a bağlı karsinojenik etkilerin ortaya çıktığı bildirilmiştir (84, 121).

TCDD (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin) polihalojenli aromatik hidrokarbonların en etkili üyesidir (139). İnsanlar için en toksik maddelerden biridir ve aynı zamanda çevrede hayli yaygındır. Volkanik patlamalar, orman yangınları ve yakılan çöplerle, klorlama süreçlerinde ve belirli plastiklerin üretiminde doğal olarak oluşmaktadır (81). TCDD'ye maruz kalan insanlarda ve deney hayvanlarında geniş

yelpazede toksisite ve biyokimyasal değişiklikler görülür (12). TCDD her iki cins kemirgen için çok konumlu (multi-site) bir kanserojendir (79), bununla birlikte direkt olarak genotoksik değildir (95). İki basamaklı karsinogenez modellerinde TCDD, kemirgen deri ve karaciğerinde etkili bir tümör promotörüdür (137, 140).

İnositol altı fosfat (IP6), fitik asit olarak da bilinir, doğal gıdaların önemli bir bileşeni olup yüksek lif içeren gıdalarda bol miktarda bulunur. Tahılların çoğu, baklagiller, kabuklu yemişler, yağlı tohumlar ve soya %0,5 ile %6,4 veya daha fazla miktarda IP6 içerirler (153). İnositol altı fosfat hemen hemen tüm bitki ve memeli hücrelerinde 1mM ile 10 mM arasındaki konsantrasyonlarda bulunur ve hem in vivo hem de in vitro çalışmalarda anti kanser fonksiyona sahip olduğu gösterilmiştir (153, 179). Yaklaşık 30 yıldır yapılan araştırmalar IP6'nın farklı kanser modellerinde geniş bir spektrumda antineoplastik aktivite gösterdiğine işaret etmektedir (42, 152). IP6 kolon, prostat, karaciğer ve meme gibi çeşitli insan kanser hücre serilerinde hücre farklılaşmasını indükleyerek tümör gelişimini inhibe etmektedir (152). IP6 hem insan hem de kemirgenlerin gastrointestinal sisteminden iyi emilmektedir ve uygulama sonrası herhangi bir toksik etki rapor edilmemiştir (50, 153, 154, 179). İn vivo ve in vitro çalışmalar karaciğer, akciğer, prostat ve diğer sistemlerde koruyucu etkileri olduğunu göstermiştir (55).

Retinil asetat, vitamin A ailesinin ana bileşiği olan retinolün besinlerde bulunan esterlenmiş formlarından biridir (52,76). Vitamin A büyüme ve gelişme için gereklidir. Eksikliğinde vücut ağırlığındaki artış dururken besin alımı da azalır (63). Sıçanlarda TCDD maruziyetinin sonucunda hepatik vitamin A içeriği azalmaktadır (40). Retinoid'lerin önemli kemopreventif ajanlardan biri olduğu klinik denemelerde gösterilmiştir (66, 67, 104). Son yirmi yıldır yapılan çalışmalar vitamin A ve kanser gelişimi arasında güçlü bir ilişki olduğunu ortaya koymuştur. Deney hayvanlarında vitamin A eksikliği kimyasal kanserojenlere karşı artmış duyarlılıkla ve daha yüksek kanser oranı ile ilişkilidir (114). Ayrıca epidemiyolojik çalışmalar diyetlerinde daha düşük vitamin A alan bireylerde kanser gelişme riskinin daha yüksek olduğunu işaret etmektedir (66). Bu gözlemler fizyolojik retinoid seviyelerinin premalignant ve

malignant lezyonların gelişimine karşı organizmayı koruduğu hipotezini desteklemektedir. Karsinogenezin deneysel modelleri, karsinojenik ajanlara maruz kalan hayvanlarda deri, oral kavite, akciğer, meme, prostat, mesane, karaciğer ve pankreas kanserlerinin gelişiminin önlenmesinde retinoid'lerin farmakolojik seviyelerinin etkisini göstermiştir (114).

Bu çalışmada amacımız yaygın çevresel kirleticiler olan p-DAB (başlatıcı, initiator) ve TCDD (promoter)'yi subkronik olarak verip bir deneysel kanser modeli oluşturmak, deney hayvanlarından kan ve doku örneklerini çalışma süresince 5 kez, belirli zaman aralıklarıyla alarak p-DAB -TCDD kombinasyonunun karaciğer dokusunda zaman ve doza bağlı etkilerini ortaya koymak ve bu süreçte bazı biyokimyasal parametrelerde, MMP2, VEGF, sitokrom c, DNA fragmentasyonu ve CYP1A1 protein ekspresyonunda değişiklik olup olmadığını belirleyerek, anti-proliferatif ve apoptotik etkilere sahip retinil asetat (RA) ile inositol-6-fosfatın bu parametreler üzerindeki etkilerini araştırmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

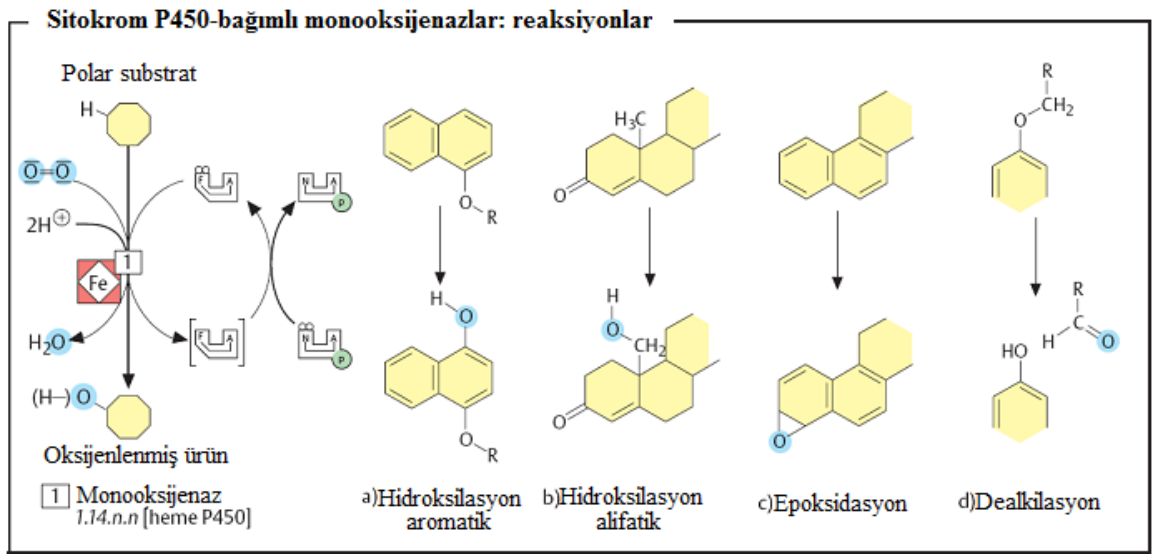
İnsanlar sıklıkla diyetsetel, çevresel, terepatik ya da mesleki nedenlerle yabancı maddelere maruz kalırlar. Sindirim ve solunum sistemi ya da deri yoluyla alınan bu maddelerin bir kısmı doğal kaynaklardan gelebildiği gibi bir kısmı da sentetik olarak insanlar tarafından üretilmiş olanlardır. Bazısı toksik olan bu yabancı maddelere karşı organizma, savunma mekanizmaları geliştirmiştir ve bu maddeleri biyotransformasyon yoluyla inaktif hale getirecek etkili mekanizmalara sahiptir (96).

2.1. Biyotransformasyon ve Sitokrom P450 Reaksiyonları:

Biyotransformasyon esas olarak karaciğerde gerçekleşir. Karaciğerde bol miktarda bulunan sitokrom P450 (CYP450) ailesine üye enzimler, ilaçlar, kanserojenler ve çevresel toksikantların yanı sıra endojen kaynaklı steroid hormonların biyotransformasyonunda önemli role sahiptirler (29, 30, 54).

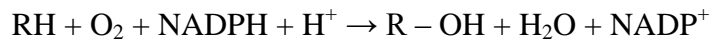
Vücut için yabancı olan ve ksenobiyotik olarak adlandırılan bu maddelerin metabolizmalarının iki fazda gerçekleştiği kabul edilmektedir. Faz I reaksiyonlarında hidroksilasyon ana reaksiyondur ve Sitokrom P450'ler ya da monooksijenazlar denilen enzim ailesinin üyeleri tarafından katalizlenir. Hidroksilasyona ek olarak bu enzimler deaminasyon, dehalojenasyon, desülfürasyon, epoksidasyon, peroksijenasyon ve redüksiyonu içeren geniş bir dizi reaksiyonu da katalizlerler (**Şekil 2.1**). Faz I'de hidroksillenen ya da üretilen diğer bileşikler faz II' de özgül enzimler tarafından glukronik asit, sülfat, asetat, glutatyon ya da belli aminoasitlerle konjugasyon veya metilasyonla çeşitli polar metabolitlere dönüştürülür. Ksenobiyotik metabolizmasının bu iki fazının da amacı suda çözünebilirliği arttırmak ve böylece vücuttan atılımı kolaylaştırmaktır. Hidrofobik özelliği çok olan ksenobiyotikler daha fazla polar forma dönüştürülemezse yağ dokuda kalıcı olarak birikebilirler. Bazen ksenobiyotikler faz I reaksiyonları sırasında inaktif formdan biyolojik olarak aktif formlara dönüşebilir. Bu

durumda söz konusu olan orijinal ksenobiyotik “prodrug” ya da “prokarsinojen” olarak tanımlanır. Diğer durumda ksenobiyotik faz I reaksiyonları ile konjugasyon öncesi inaktif veya daha az aktif formlara dönüştürülür. Konjugasyonla daha az aktif ya da inaktif hale dönüştürülen faz I reaksiyonlarının ürünü idrar ya da safra yoluyla vücuttan uzaklaştırılır. Bazı durumlarda ise konjugasyon ksenobiyotiğin biyolojik aktivitesini artırabilir (116).



Şekil 2.1. Sitokrom P450-bağımlı monooksijenaz reaksiyonları [Koolman, J., Roehm, K.H., 2005, Color Atlas of Biochemistry, Second edition, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, pp 318-320’den modifiye edilmiştir (96)].

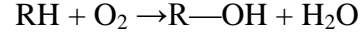
Bir monooksijenaz (Sitokrom P450) tarafından katalizlenen reaksiyonun genel formülü şöyledir:



Formülde RH, ilaç, kanserojen, petrol ürünü, çevresel kirlenici, pestisid gibi bir ksenobiyotiği veya endojen kaynaklı bazı steroid, eikozanoid, yağ asitleri ve retinoidleri temsil etmektedir. Substratlar genellikle lipofildir ve hidroksilasyonla daha hidrofilik hale çevrilir (116).

Karma fonksiyonlu oksidazlar olarak da isimlendirilen Sitokrom P450 sistemi bu isme uygun olarak bir oksijen molekülünden bir oksijen atomunu substrata aktarırken diğer oksijen atomu da su molekülü şeklinde serbest kalır (116).

Redükte Sitokrom P450 → Okside Sitokrom P450



Endoplazmik retikulumdaki başlıca monooksijenaz için kullanılan bu Sitokrom P450 ismi hazırlanan mikrozomal solüsyon kimyasal redüksiyon sonrası karbonmonoksit gazına maruz bırakıldığı zaman 450 nm'de belirgin bir pik gösterdiği için verilmiştir (116).

Sitokrom P450'ler hemoproteinlerdir ve karaciğer ile bağırsaklarda en çok olmak üzere olasılıkla tüm dokularda bulunurlar. Düz endoplazmik retikulumun membranlarında (mikrozomal fraksiyon) yerleşmişlerdir. Ek olarak böbrek üstünde mitokondrielerde bulunur ve kolesterol ve steroid biyosentezlerinde önemli rol alırlar. Mitokondriyal Sitokrom P450 sistemi mikrozomal sistemden farklıdır ve NADPH bağlı bir flavoprotein, adrenodoksin redüktaz ve non-hem demir-sülfür proteini, adrenodoksin kullanır. Sitokrom P450'nin yaklaşık 150 civarında izoformu bulunmuştur ve insan karaciğerinde endoplazmik retikulumda en az 6 izoformu bulunmaktadır. Sitokrom P450 izoformlarının çoğu indüklenebilme özelliğine sahiptir. Bu özellik klinik uygulamalar için oldukça önemlidir (116).

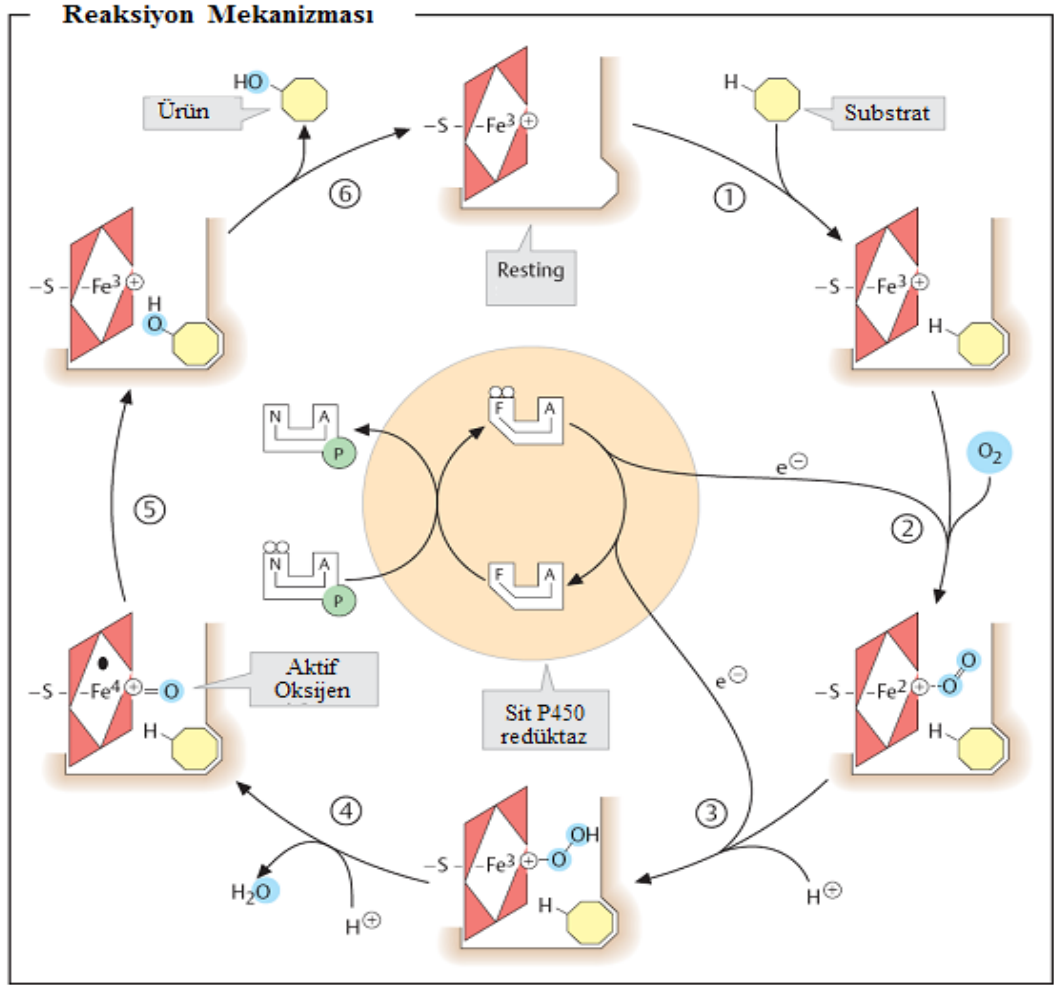
Bazı Sitokrom P450'ler katalitik aktivitesi düşük polimorfik form (genetik izoform)'lar gösterirler. Bu durum bireyler arasında görülen ilaç cevabındaki varyasyonları açıklamak için önemlidir (116).

Sitokrom P450 bağlı monooksijenaz reaksiyonları:

Sitokrom P450'nin katalizlediği reaksiyonda moleküler oksijenden bir oksijen atomu substrata aktarılırken, diğer oksijen atomu bir su molekölü olarak salınır.

Reaksiyonlar:

1. Dinlenme durumunda hem grubunun demiri +3 değerliklidir ve ilk olarak substrat hem grubunun yanına bağlanır
2. FADH₂'den bir elektronun transferi demiri +2 değerliğe indirger ve oksijen molekölünün bağlanabileceği form oluşur.
3. İkinci bir elektronun transferi ve demirin valansındaki (değerlik) bir değişim peroksit olarak bağlı oksijeni indirger.
4. Bir hidroksil iyonu bu ara formdan ayrılır ve bir proton alarak bir su molekölü ve oksijenin reaktif formu oluşur. Buradaki ferril radikalinde demir biçimsel olarak dört değerliklidir.
5. Aktive oksijen, substrattaki C-H bağı içine girerek bir OH grubu oluşur.
6. Ürünün ayrılması ile enzim başlangıç durumuna döner (**Şekil 2.2**) (96).



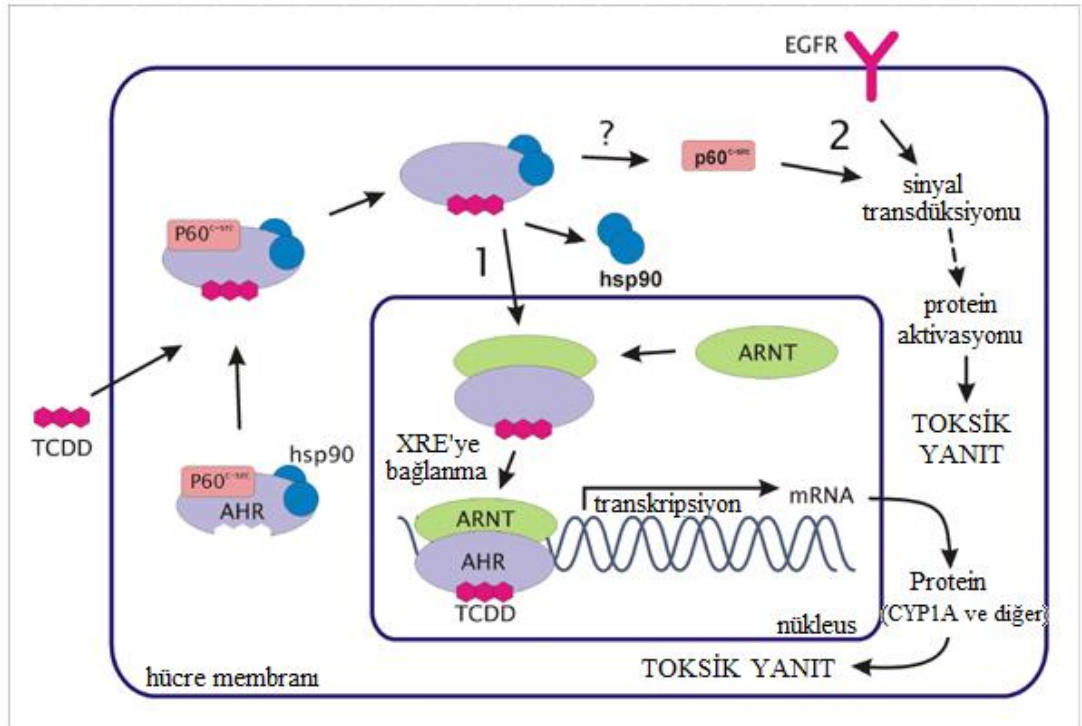
Şekil 2.2. Monooksijenaz Reaksiyon Mekanizması [Koolman, J., Roehm, K.H., 2005, Color Atlas of Biochemistry, Second edition, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, pp 318-320'den modifiye edilmiştir (96)].

2.2. Biotransformasyonda Aril Hidrokarbon Reseptörünün Rolü

Halojenli aromatik hidrokarbon (HAH)' lara ve polisiklik aromatik hidrokarbon (PAH)' lara maruziyet hem insanlar hem de hayvanlarda yaygın toksik ve karsinojenik yanıtla sonuçlanır. Bu maruziyetin etkilerinin büyük kısmının Aril Hidrokarbon Reseptörü (AhR) aracılığıyla olduğu kabul edilmektedir (58).

AhR, Dioksin reseptörü olarak da bilinir ve pek çok bileşiğin toksisitesine aracılık eden bir transkripsiyon faktörüdür (48,138). Aril hidrokarbon reseptörü DNA-bağlama proteinlerinin “basic helix-loop-helix” süper ailesinin bir üyesidir (147).

AhR sitozolik bir ligandla bağlandığında nükleusa girer ve Aril Hidrokarbon Reseptörü Nükleer Translokator (ARNT) ile kompleks oluşturur. AhR/ARNT heterodimeri faz I ve faz II ilaç metabolize eden bir kısım enzimi kodlayan genlerin düzenleyici kısımlarında bulunan özgül DNA bölgelerine bağlanır ve bu genlerin transkripsiyonunu aktive eder (Şekil 2.3) (58).



Şekil 2.3. AHR yolu [www.helsinki.fi/science/dentenv/dioxin'den modifiye edilmiştir (185)].

Aktive olan bu genlere özellikle ksenobiyotik metabolizmasında etkili rol oynayan CYP1A1, CYP1A2 örnek verilebilir (99, 169).

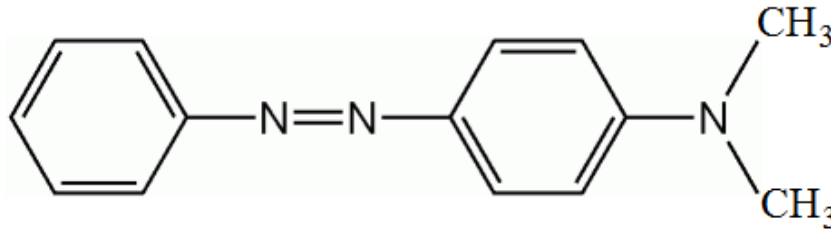
AhR'nin TCDD ve Benzo[a]pren (BaP) gibi eksojen ligandlara maruziyeti çoklu sinyal yolağının aktivasyonuna neden olabilir. Her ne kadar özgül bir sinyal yolağı üzerine etkileri bu toksik ajanlarla ilgili olsa da bununla ilgili mekanizmalar karakterize edilmemiştir. Eldeki bilgiler ligand-aktif AhR ile sinyal transdüksiyon olaylarının etkileşiminin ligandın toksisitesini artırdığını gösterse de ajan, sinyal mekanizması ve toksik sonuç arasındaki bağlantı zayıf kalmaktadır (18, 22).

2.3. p-dimetilaminoazobenzen (p-DAB) ve 2,3,7,8-tetraklorodibenzo-p-dioxin (TCDD)'in Tümör Oluşumundaki Rolü

2.3.1. p-DAB ve tümör oluşumundaki rolü

Azo bileşikleri kozmetik, yiyecek, deri, kağıt ve tekstil endüstrilerini içeren birçok endüstri alanında yaygın olarak kullanılır (88). Bu azo boyalarının en basit yapılı olan 4-dimethylaminoazobenzene (p-DAB), bazı endüstriyel kimyasalların renklendirilmesinde kullanılmasının (72) yanı sıra yiyeceklerde boya maddesi olarak da kullanılmaktadır (88).

p-DAB azot köprüsüyle bağlanmış iki benzen halkası içerir (Şekil 2.4). Sarı renkli katı kristal yapıdadır ve suda çözünmez. Piridin, benzen, kuvvetli mineral asitler ve yağlarda çözünebilir özelliktedir (72).



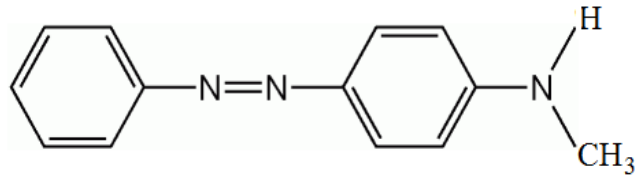
Şekil 2.4. p-DAB'ın kimyasal yapısı (103)

Aminoazo boyaları biyokimyasal *N*-oksidasyona uğrayan ve reaktif elektrofillere dönüşümü kolaylaştıran ekzosilik amino gruplarına sahiptirler (127).

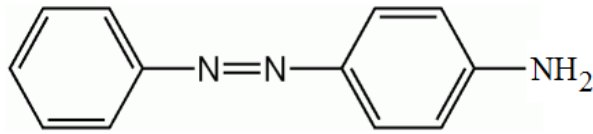
Azo bileşiklerinin bazıları DNA ile kovalent olarak etkileşebilen oldukça reaktif metabolik araçları vasıtasıyla karsinojenite gösterirler ve mutasyonlara sebep olurlar (88).

Kimyasal karsinogenezin başlangıcı sıklıkla hedef dokulardaki metabolik aktivasyonu gerektirir (143). Azo boyalarının çoğu için ana metabolik yolak redüktif bölünmedir ve olay ya toksik aktivasyona ya da detoksikasyon ve ekskresyona ilerler (103). p-DAB (N,N-dimethyl-4-aminoazobenzen) metabolizmasının ilk fazı özgül CYP450 tarafından gerçekleştirilir ve N-demetilasyon, ring-hidroksilasyon, N-hidroksilasyon ve azoredüksiyonu içerir. 4'-pozisyonundaki ring-hidroksilasyon, DAB metabolizmasının ana yolağıdır ve oluşan ürün 4'-hidroksi-DAB, glukronid ya da sülfatla konjuge edilerek safraya atılır (143).

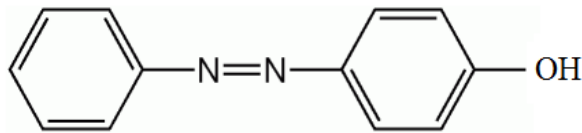
Aşağıda mikrozomal CYP450 tarafından metabolize edilen p-DAB'ın metabolitlerine örnekler verilmiştir (**Şekil 2.5**) (103).



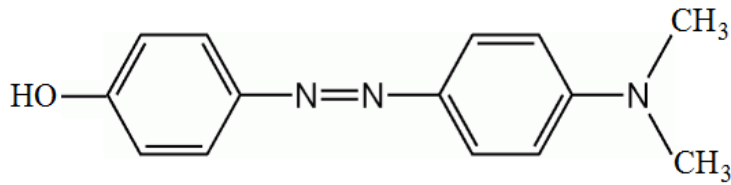
Metilaminoazobenzen (MAB)



Aminoazobenzen (AAB)



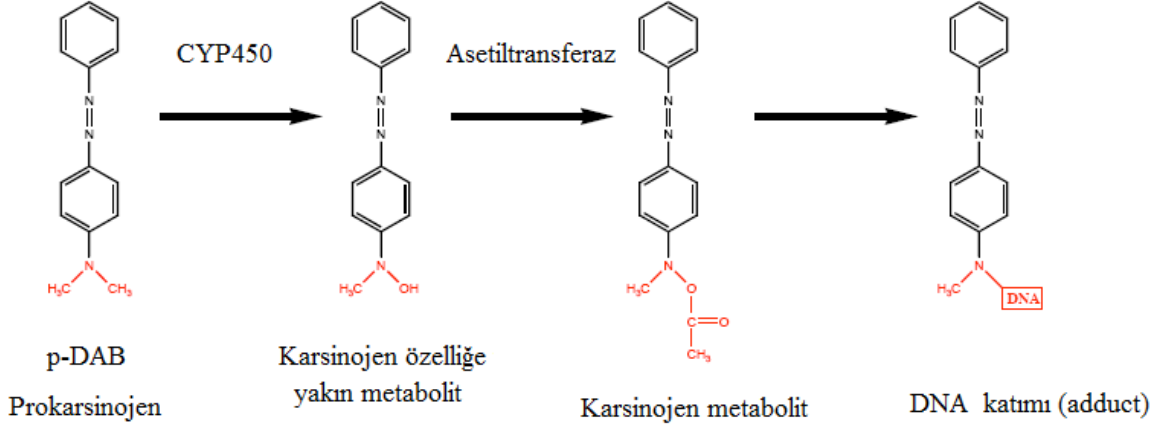
4- Hidroksiazobenzen



4'- Hidroksi - DAB

Şekil 2.5. p-DAB'ın metabolitlerinden bazıları (103).

Aşağıda p-DAB'ın N-hidroksilasyona uğradıktan sonra asetillenmesi şematize edilmiştir (Şekil 2.6). Asetillenen metabolit DNA katımı oluşturarak karsinojenite göstermektedir (71).



Şekil 2.6. p-DAB'ın metabolik aktivasyonu

[<http://pharmacology.medicine.dal.ca/undergraduate/courses.cfm>.'den modifiye edilmiştir (71)].

Karaciğer mikrozom sitokrom P450 tarafından *N*-demetilasyona uğrayan p-DAB, *N*-hidroksilasyon ve esterifikasyon basamaklarından geçtiğinde sülfotransferaz tarafından katalize edilen tepkimeyle oluşan esterifiye metabolit, son parçalanma ürünü olarak kabul edilir ve DNA, RNA ve proteine kovalent olarak bağlanır (91).

p-DAB, *N*-demetilasyonla metilaminobenzen (MAB)'e metabolize edilebilir daha sonra MAB, demetilasyonla aminoazobenzen (AAB)'e ya da *N*-hidroksi-*N*-metil-4-aminoazobenzen (NOH-AAB)'e metabolize edilebilir (10). AAB oluşması durumunda metabolik aktivasyon mikrozomal P450 sistemiyle doğrudan *N*-hidroksilasyona ilerleyebilir. AAB'ın *N*-hidroksilasyonu çoğu durumda CYP1A ailesi tarafından katalizlenmektedir (92, 190).

Genellikle DNA ile p-DAB'ın metabolitleri arasındaki kovalent bağlanmanın başlıca karsinojenik faktör olduğu kabul edilir (127).

Diyet içinde oral olarak verildiği zaman p-DAB'ın sıçanlarda karaciğer tümörlerini indüklediği bildirilmiştir (82). Fare ve sıçanlar p-DAB'ı besinleriyle kronik olarak aldıkları zaman bu hayvanların karaciğerlerinde p-DAB'a bağlı karsinojenik etkilerin ortaya çıktığı bildirilmiştir. Ratlarda p-DAB'ın yüksek dozları (50–250 mg/kg vücut ağırlığı) 24 saat içerisinde hepatik dejenerasyona neden olmaktadır ve bunu portal alan etrafındaki parankimal hücrelerin fokal dejenerasyonu izlemektedir. Ancak hepatik tümörler indüklenmek istendiğinde pek çok araştırmacı p-DAB'ı besinle %0,05-0,06 oranında ve kronik olarak vermiştir (16). p-DAB, IARC (International Agency for Research on Cancer) tarafından insanlar için Grup 2B kanserojen olarak sınıflandırılmaktadır (83). Kemirgenlerdeki karsinojenik aktivitesinden dolayı p-DAB'ın yiyeceklerde katkı maddesi olarak kullanımı yasaklanmıştır (88).

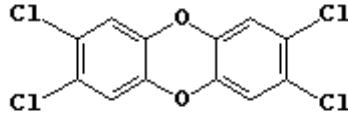
2.3.1.1. p-DAB'a bağlı oksidatif hasarın tümör oluşumuna etkisi

Mikrozomal hepatik fraksiyon aracılığıyla p-DAB'ın metabolizasyonu reaktif elektrofiller (127) ve serbest radikaller oluşturur (21). Bu serbest radikaller daha sonra reaktif oksijen türleri (ROS) oluşturur. ROS, hücrelerin neoplastik gelişiminin başlaması ve ilerlemesinde muhtemelen önemli rol oynayan hücresel komponentler ile etkileşir ve hepatotoksisite oluşumuna neden olur. ROS lipidler, DNA ve proteinler ile etkileşerek kanserojenik katım (adduct)'ların oluşumuna yol açar (117).

Serbest radikallerin unsatüre lipidlere atağı lipid peroksidasyon sürecini başlatır. Lipid peroksidasyonu ise lipid, alkol, aldehit ve malondialdehit gibi ürünler haline lipidlerin yıkımıyla sonuçlanır (89). Oksidatif hasar selektif hücre ölümü ve hücre proliferasyonunda kompensatuvar artışa neden olur. Bu uyarı yeni mutasyon oluşumuyla sonuçlanan tamir edilmemiş DNA hasarını ilerletir (93).

2.3.2. TCDD ve tümör oluşumundaki rolü

TCDD, 2, 3, 7 ve 8. pozisyonlarda klor içeren dioksinlerden (184) ve çevresel kirleticilerin en toksik olanlarından biridir (**Şekil 2.7**). Dioksinler, lipofilik özelliği, stabilitesi ve biyodegradasyona direnci nedeniyle besin zincirinde birikirler hatta anne sütünde bile mevcuttur. Çeşitli çalışmalar bu bileşiklerin katıldığı genel etki mekanizmalarını meydana çıkarmıştır. TCDD, CYP1A'nın indüksiyonundan, üreme ile ilgili ve gelişimsel defektler, immünotoksosite, timus atrofisi, epitelyal bozukluklar, karaciğer hasarı, wasting sendromu ve kansere kadar geniş yelpazede çeşitli biyolojik cevapları uyarır (172).



Şekil 2.7. TCDD'nin moleküler yapısı (184).

İnsanların TCDD'ye maruziyetinin büyük kısmı diyet vasıtasıyla olmaktadır. Deneysel olarak ise yağda çözülmüş olarak gavaj ya da diyetle kullanımları yaygındır. Kontamine ortamlarda havadaki toz, toprak ve kül partikülleri ile solunum yoluyla da alınmaktadır. Oral alımdan sonra %80 civarında gastrointestinal sistemden emilmektedir. Dominant olarak şilomikronlar aracılığıyla lenfatik yoldan dolaşıma aktarılır. Hücre zarları ve dokulara büyük ihtimalle pasif difüzyonla dağılır. Kandan uzaklaştırılması hızlıdır ve alımdan 1 saat kadar sonra karaciğer, kas, deri, adipoz doku ve diğer dokularda dağılmış durumdadırlar. Bunu karaciğer ve adipoz dokuda yeniden dağılımları (redistribution) izler ki bu dokularda maruziyetten günler sonra bile doku konsantrasyonları artış göstermektedir (184).

TCDD'nin yarılanma ömrü sıçan ve hamsterlarda 12-24 gün kadardır. Gönüllü insanlarla yapılan çalışmalarda ise bu süre 5.8 - 9.7 yıl arasında değişmektedir (38).

Dioksinlerin metabolize edilmeleri genellikle zordur ve karaciğer mikrozomlarında ilaç-metabolize eden enzimler tarafından polar maddelere metabolize edilmeleri de yavaştır. Hidroksilli metabolitleri ve sülfür içeren metabolitleri belirlenmiştir ve metabolitlerin çoğu konjuge edilmiş ve idrar ya da safraya salgılanmıştır. Triklorodihidroksidibenzo-p-dioksin ve tetraklorodihidroksidifenil eter'in TCDD'nin sıçan safrasındaki majör metabolitleri olduğu belirlenmiştir (184).

TCDD ya da metabolitleri ile protein ve nükleik asitler arasında neredeyse hiç kovalent bağlanma bulunamamıştır (38).

IARC tarafından grup 2B karsinojen olarak sınıflanmaktadır. TCDD'nin kanserojenitesi ile ilgili kanıtların deneysel hayvanlarda yeterli olduğu ancak insanlar için bu kanıtların sınırlı olduğu düşünülmektedir. TCDD'nin sıçan, fare ve hamsterlarla yapılan çalışmalarda her iki cinsiyet için de çok konumlu (multisite) bir kanserojen olduğu bulunmuştur. Bazı bildirimler aksini gösterse de TCDD'nin DNA ile etkileşmediği ve direkt genotoksik olmadığı düşünülmektedir. İki basamaklı başlatma-arttırma (initiation-promotion) modellerinde TCDD'nin başlatma özelliği yok gibi görünmektedir, bununla beraber TCDD sıçan ve farelerin akciğer ve karaciğerlerinde potent bir tümör promotör'üdür. TCDD'nin indüklediği karsinogenezin mekanizması tam olarak anlaşılammıştır. Direkt genotoksitenin yokluğunda çeşitli muhtemel mekanizmalar ileri sürülmektedir. TCDD'nin özgül olarak AhR' ye bağlanması ve eş zamanlı olarak gen ekspresyonunun indüksiyonu TCDD'nin çeşitli toksik etkilerinin ortaya çıkmasında önemli role sahiptir. AhR'nin aktivasyonu TCDD'nin kanserojenitesiyle ilgili olabilir fakat karsinogenezin farklı evrelerindeki rolünün detayları açık değildir (172).

Kemirgen hücre serilerininin TCDD'ye çoklu maruziyeti hücrel membranlardaki protein kinaz C seviyeleri ve aktivitesinde hızlı bir artışla sonuçlanır (17, 18, 22).

TCDD, özellikle EGFR ile ilgili tirozin kinazları aktive eder (108). TCDD, EGFR ligandı olmadığı halde (150) AhR ve EGFR sinyali arasındaki çapraz bağlantı TCDD indüklü gelişimsel toksisite (131) ve hepatokanserojenite (149) için önemli gibi gözükmektedir. Ayrıca MAPK (mitojen aktıveli protein kinaz) yolağında TCDD muhtemelen EGFR adaptör kompleksinden reseptör ve non reseptör fosfotirozin kinaz sinyallerinin iletisinin sonucu olarak küçük GTPaz p21^{RAS} için gen kodlayan HRAS'ın ekspresyonunu aktive eder (37).

Mikroarray deneylerinde kullanılan insan hepatoma hücreleriyle yapılan gen ekspresyon analizleri TCDD tarafından RAS MAP kinaz yolağının aktivasyonunu doğrulamaktadır (142).

2.3.2.1. TCDD'ye bağı oksidatif hasarın tümör oluşumuna etkisi

TCDD'ye akut, yüksek doz maruziyetin laboratuvar hayvanlarında reaktif oksijen türlerinin üretimini, lipid peroksidasyonunu, DNA hasarını indüklediğı ve membran akışkanlığını azalttığını gösteren çalışmaların yanı sıra TCDD'nin düşük dozlarda subkronik uygulanımının da fare beyinde oksidatif stresi indüklediğı, lipid peroksidasyonunu ve DNA hasarını arttırdığını gösteren çalışmalar mevcuttur (61).

Oksidatif stres, kimyasal kanserojenezin başlatma (initiation), arttırma (promotion) ve ilerleme (progression) safhalarında farklı mekanizmalar yoluyla etkili olur. Promotion mekanizması sinyal transdüksiyon yollarındaki karışıklık sayesinde primer olarak gen ekspresyonu üzerine bir etki olarak tanımlanır. Bu yüzden TCDD'nin promotional etkisi oksidatif strese bağı olabilir, çünkü oksidatif stres pek çok sinyal yolunu etkileyebilmektedir. Etkilenmiş sinyal yollarına 8-oxoG oluşumundan ileri gelen hipometilasyon, lipid ve proteinlerin oksidatif hasarının sonucu olarak membran yapı ve fonksiyonunun değışmesiyle hücre içi kalsiyum birikimi, protein oksidasyonu ve kalsiyum tarafından başlatılan protein kinaz C aktivasyonu, membran oksidasyonu ve protein kinaz C tarafından hücrelerarası iletişim geçit kavşaklarının (gap junctionlar)

inhibisyonu örnek verilebilir. Arttırma (promotion)'nın bir diğerk mekanizması, başlatma (initiation)'ya uğrayan hücrelerde ya DNA sentezindeki artış ya da apoptozda azalma yoluyla spesifik gen ekspresyonunun artışıdır. Oksidatif stres, c-mic, c-fos, c-jun veya p53 gibi DNA sentezini ya da apoptozu düzenleyen genleri aktive edebilir (195).

Sitokrom P450 tarafından substratın oksidasyonu ve O_2 'nin $O_2^{\bullet-}$ 'ye redüksiyonunun ROS üreten bir mekanizma olduğu bildirilmiştir. $O_2^{\bullet-}$, kendiliğinden dismutasyona uğrayabilir ve hidrojen peroksit oluşabilir ve ortamda geçiş metalleri bulunuyorsa hidroksil radikalleri de oluşabilecektir. Bu yüzden ksenobiyotiklerin biyotransformasyonu esnasında hidroksil radikallerinin oluşabileceği önerilmektedir (195).

TCDD aynı zamanda ksantin oksidaz gibi bazı enzimleri aktive edebilmektedir. Ksantin oksidaz, hipoksantin ve ksantine oksidasyonunu, ksantininde ürik asite oksidasyonunu katalizler ve bir oksidan olarak davranır. Ek olarak TCDD, ROS' un uzaklaştırılmasında gerekli olan glutatyon peroksidaz ve süper oksit dismutaz gibi bazı enzimleri etkileyebilir ve bu enzimlerin aktivitelerini azaltabilir (195).

2.4. p-DAB ve TCDD'nin CYP1A Enzim Sistemine Etkileri

Sitokrom P450 1A1 ve 1A2, polisiklik aromatik hidrokarbonların (PAH) ve heterosiklik aromatik amin/amidlerin (HAA) oksijenasyonunu, amino azo boyaların ise demetilasyonunu katalizler. Karsinojenik PAH'ların ve HAA (prokarsinojen)'ların oksijenasyonu arene oksit, diolepoksit ve diğerektrofilik reaktif türlerin oluşumuna yol açar. Bu reaktif türler de tümör oluşumu ve toksisiteye öncülük edecek DNA ve protein katım (adduct)'larını oluşturur (107).

CYP1A1 insanlarda karaciğerdışı dokularda düşük seviyelerde eksprese edilse de hem karaciğerdışı dokularda oldukça indüklenebilir özelliktedir.

CYP1A2 esas olarak karaciğerde eksprese edilir ve indüklenebilirdir. CYP1A1 ve 1A2'nin pek çok kimyasal tarafından hem mRNA hem de enzim seviyelerinin oldukça indüklenebilir olması bu enzimlerin göze çarpan davranışsal bir özelliğidir (107). CYP1A1 aktivitesinin indüksiyonu, ligandla aktive edilen bir transkripsiyon faktörü olan AhR aracılığıyla gerçekleşir. AhR'ye TCDD gibi halojenli hidrokarbonlar ve benzopren gibi aril hidrokarbonları içeren kanserojenler bağlanır. Ligandla bağlanan reseptör, nükleusa transloke olur ve aril hidrokarbon nükleer translokatorü ile heterodimer oluşturur. Bu heterodimer birtakım genlerde bulunan ksenobiyotik yanıt elemanı (xenobiotic-responsive elements, XRE) ile etkileşir. AhR'nin ligandlara moleküler cevabı ise CYP1A1 geninin indüksiyonu şeklindedir (105). TCDD ile temsil edilen AhR'nin daha stabil ligandları CYP1A indüksiyonuna ek olarak AhR bağımlı bir yolla hayvanlarda geniş ölçüde yan etkilere sebep olabilirler. TCDD'nin toksik etkilerinin mekanizması henüz pek anlaşılammıştır. TCDD, CYP1A'nın zayıf bir substratıdır ve reaktif araçlar oluşturmaz. CYP1A indüksiyonu ve TCDD toksisitesi arasındaki ilişki tartışmalı bir konu olarak kalmaktadır (107).

CYP1A'nın kimyasal karsinogenez ve toksisitedeki önemli rolü, CYP1A'nın indüksiyonunun keşfinden beri kanser araştırmalarında, ilaç geliştirme, toksikoloji, gıda güvenliği, çevre ve iş sağlığı konularında merkezi bir konumda ilgi çekmektedir (107).

p-DAB, CYP1A ailesinin indüksiyonunu sağlayarak AhR aracılı gen ekspresyonunu değiştirebilir ancak AhR ligandı olarak ılımlı bir özelliğe sahiptir (88).

2.5. p-DAB ve TCDD'nin VEGF'ye Etkileri

Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF), orijinal olarak tümörden salgılanan protein olarak keşfedilmişti. Vasküler permeabilite faktörü olarak ve/veya endotelial büyüme faktörü olarak işlev görmesi nedeniyle tümör biyolojisinde en azından iki yolla önemli rolü olduğu düşünülmektedir. Potent permeabilite faktörü

olarak VEGF, anjiyogenez sırasında hücre göçü için substratum olarak hareket eden fibrin ağının oluşumunu yönlendirecek plazma fibrinojeninin ekstravazasyonunu düzenler. Endotelial büyüme faktörü olarak VEGF, endotel hücre proliferasyonunu uyarır ve muhtemelen de yeni kan damarı oluşumunu indükler. **Park ve arkadaşları**, farklı aşamadaki hepatoselüler displastik nodülleri ve hepatoselüler karsinoma'lı patolojik örnekleri kullanarak VEGF ekspresyonu ve anjiyogenezi değerlendirdikleri çalışmalarında displastik nodüllerin preneoplastik lezyonlarında VEGF ekspresyonu ve anjiyogenezin arttığını belirlemişler ve VEGF ekspresyonu ile anjiyogenezin derecesinin çok basamaklı hepatokarsinogenezin ilerlemesi (progression) ile kademeli şekilde arttığını bildirmişlerdir. Bu bulgular, çok basamaklı hepatokarsinogenezin erken safhalarında karsinojen dokunun anjiyogenezinde VEGF'nin önemli rolü olduğunu göstermektedir. VEGF'nin hem hepatositler hem de hepatoselüler karsinoma hücrelerinde eksprese edildiği ve salgılandığı, endotel hücreler üzerine müteakip olarak etki ettiği gösterilmiştir. VEGF'nin ekspresyonunun infiltre olan inflamatuvar hücrelerden salınan inflamatuvar sitokinler tarafından düzenlendiği önerilmektedir. Aynı zamanda hipoksi de VEGF ekspresyonunu arttırıcı bir faktördür (129).

Zeytun ve arkadaşları, TCDD'nin karaciğerde VEGF ekspresyonunu belirgin şekilde artırdığını bildirmişlerdir (198).

2.6. p-DAB ve TCDD'nin Matriks Metalloproteinazlara Etkileri

Matriks metalloproteinazlar (MMP), ekstraselüler matriks komponentlerini degrade edebilen çinko bağımlı endopeptidazlar ailesine aittirler ve malignansi ile açık bir şekilde bağlantılıdır. Bu enzimler, tümör hücre invazyonu, kan damarı penetrasyonu ve metastazla ilişkilidir (89).

DAB'la indüklenen hepatokarsinogenezde invazyon markerları olan MMP-2 ve MMP-9'in ekspresyonlarında artış olduğu belirlenmiştir (118). Karsinojen olarak p-

DAB ve fenobarbitalin kronik olarak verildiği sıçanlarda karaciğer dokusunda metalloproteinazların ekspresyonunun arttığı belirlenmiştir (89).

Elde edilen kanıtlar AhR sinyalinin matriks metabolizmasında özellikle MMP'lerin kapsadığı genlerin ekspresyonunu değiştirdiğini göstermektedir. MMP'ler sadece yapısal proteinleri degrade etmez aynı zamanda kriptik bölgelerin açığa çıkışı, büyüme faktörlerinin salınımı ve reseptörlerin yarılmaları (cleavage) aracılığıyla hücre membranı ya da yakınındaki hücre sinyalizasyonunda önemli araçlardır. TCDD, insan melanoma hücre serilerinde ve normal insan keratinositlerinde MMP'lerin ekspresyonunu ve aktivitesini indükler ve bu MMP ekspresyonu AhR sinyal yolağı aracılığıyla olmaktadır. AhR'nin aracılık ettiği doku spesifik toksik cevapların çoğu MMP aktivitesinden etkilenir. Örneğin karsinogenezin üç safhası (initiation, promotion ve progression) kısmen MMP'lerin etkileriyle düzenlenir. MMP'ler hem TCDD maruziyetine AhR cevabında hem de yapısal olarak ilişkili bileşikler ve AhR yolağının endojen fonksiyonunda önemlidirler (64).

MMP aktivitesi anjiyogenezi hem artırabilir hem de baskılayabilir. Kısaca MMP'ler hem ekstraselüler matriksi degrade ederek hem de VEGF ve TGF- β gibi anjiyogenik faktörlerin ekstraselüler matriksten salınmalarını kolaylaştırarak anjiyogenezi artırırlar. MMP'ler, aynı zamanda endostatin gibi ekstraselüler matriks bileşenlerinden kaynaklanan inhibitörler vasıtasıyla anjiyogenezi inhibe edebilirler (64).

2.7. Apoptoz

Apoptoz bir hücrenin programlı ölüme yönlendirilmesiyle doğal olarak oluşan bir süreçtir. Bu süreç esnasında hücre morfolojisinde birtakım karakteristik değişiklikler izlenir. Kromatin kümeleşmesi, DNA degradasyonu, hücrede büzülme, hücre çekirdeğinin fragmantasyonu ve membranla çevrili apoptotik kesecikler haline parçalanma apoptotik hücre ölümünün karakteristikleridir ve bir diğer hücre ölüm şekli

olan nekrozdan belirgin şekilde farklıdır. Apoptoz bir organizmanın gelişimi ve fonksiyonunun bir parçası olarak genetik program temeline dayanır. İstenmeyen veya gereksiz hücrelerin yok edilmesine hizmet eder ve pek çok dokuda aktive edilebilir bir süreçtir. Apoptoz, doku homeostazında merkezi bir önem taşır. Çünkü bir organ ya da dokuda hücre sayısı sınırlı limitler içinde sabit tutulmalıdır. Hücre bölünmesi nedeniyle meydana gelen hücre sayısındaki artış yaşlı ya da daha fazla fonksiyonel olmayan hücrelerin eliminasyonu ile kompanse edilir. Eğer apoptotik programda bir defekt olursa hücrelerde patolojik artma ya da azalma görülebilir. Hücre sağ kalım oranında artış görülen hastalıklara kanserler ve otoimmün hastalıklar örnek verilebilir. Artmış apoptozla ilgili hastalıklara ise AIDS ve nörodejeneratif hastalıklar örnek oluşturur. Apoptoz gelişim ve farklılaşma sürecinde özellikle embriyoda kaçınılmaz bir role sahiptir. İmmün sistemde bazı durumlarda apoptotik programlar aktive edilir. Örneğin sitotoksik T hücreler tarafından virüs enfekte hücrelerin eliminasyonu, timusta otoreaktif B ya da T hücrelerin eliminasyonu bunlara örnek verilebilir. Apoptozun bir diğer fonksiyonu da hasarlanmış hücrelerin ortadan kaldırılmasıdır. Hücre hasarı ya da stres varlığında apoptotik program aktive edilebilmektedir (97).

Apoptoz, bir başlama evresi, bir işaret tümleştirme evresi ve bir eylem evresi olmak üzere üç genel evreye ayrılabilir. Apoptoz, Tümör Nekrozis Faktör (TNF) gibi ölüm almaçları üzerinden ya da gelişme hormonlarından yoksun kalma gibi dış işaretçiler tarafından başlatılabileceği gibi mitokondri bütünlüğünü bozan olayların yanı sıra onarılamayacak kadar hasarlanmış DNA tarafından da başlatılabilir. İşaret tümleştirme evresinde ise bu pro-apoptotik işaretler, Bcl-2 ailesi üyelerinin dahil olduğu, çeşitli yollar üzerinden gelen ve anti-apoptotik hücre yaşam işaretlerine karşı dengelenir. Eylem evresi ise kaspazlar olarak tanımlanan proteazlar tarafından yürütülür (161).

2.7.1. Kaspazlar

Pek çok proteaz gibi kaspazlar da inaktif proenzimler halinde sentezlenen 30-50 kDa molekül ağırlığına sahip efektör moleküllerdir ve proteolitik süreçle aktive edilirler. İnaktif prokaspaz pro-domen, büyük alt birim ve küçük alt birim olmak üzere üç ana bölgeden oluşur. Aktif enzimin iki aktif bölgesi tetramer yapıda olduğu gösterilmiştir. Otokatalitik ayrılmayla ya da diğer kaspazlar tarafından aktive edilirler ve aspartik asit kalıntısından sonra proteinleri ayırırlar. N-terminal pro-domen atılır, kalan iki parça iki aktif bölgesi tetrameri oluşturacak olan aktif kaspaz yapısı içine birleştirilir (97).

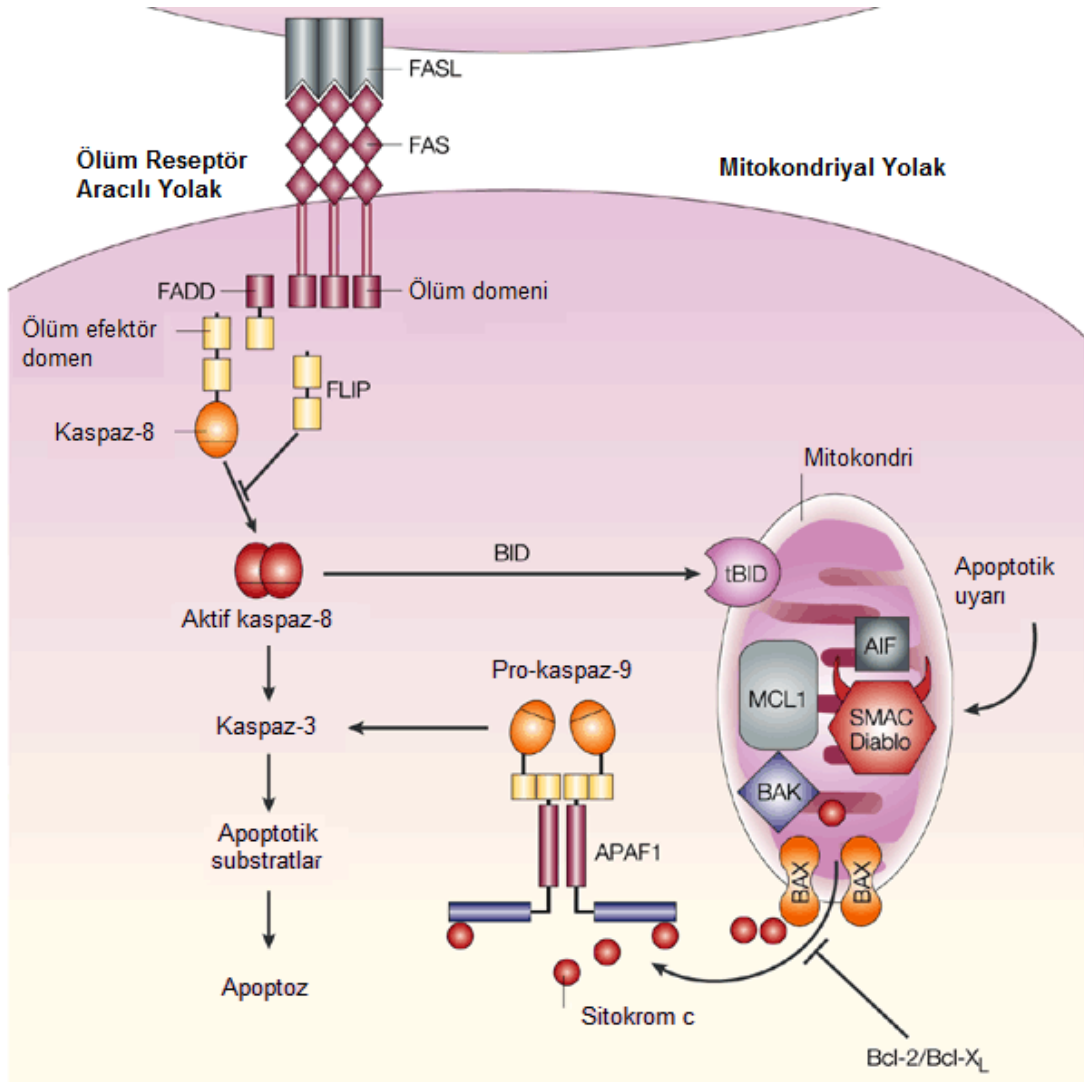
Yüksek bölünme spesifiteleri kaspazların karakteristik özellikleridir. Kaspazların çoğunun bölünme spesifiteleri farklıdır ve substrat olarak farklı proteinlere etki ederler. Kaspazların aktivasyonu çok sıkı kontrol edilmektedir. Hücrenin normal halinde kaspazlar inaktif halde bulunurlar ancak küçük bir sinyalle çok hızlı ve yaygın olarak aktive edilebilirler (97).

Apoptozdaki fonksiyonları temel alındığında kaspazlar iki sınıfa bölünürler: Başlatıcı kaspazlar (kaspaz 2, 8, 9, 10) ve efektör (eylemci) kaspazlar (kaspaz 3, 6, 7) (74).

Başlatıcı kaspazlar proapoptotik sinyali alır ve kaspaz kaskadının aktivasyonunu başlatırlar. Aktivasyonları ya transmembran bir reseptörle etkileşim (ölüm almaç yolu) ya da sitotoksik etkilerle (mitokondrial tümleştirme) olur ve apoptozom adı verilen bir kompleks oluşur (97, 161). Başlatıcı kaspazlar, eylemci kaspazları aktive eder, bunlarda hücre yapışmasına katılan protein kinazları, çekirdek iç zarının yüzünü kaplayan laminleri, hücre çatısı için gereken aktin ve diğer proteinleri DNA onarım enzimlerini parçalar. Bunlar endonükleaz kaspaz-aktif DNaz'ın inhibitör bir proteinini de yıkar. Çekirdek zarfının yıkılması ile diğer endonükleazlar da aktif hale geçer (161).

Ölüm almaçları aracılı apoptozda bu almaçlar hücre dışı domenlerde ligandlara, hücre içi domenlerinde adaptör proteinlere bağlanır, bir trimer oluşturur ve prokaspaz 8'in bağlanacağı bir iskelet yaparlar ve otokatalitik ayrılma ile kaspaz kaskadı aktive edilir (**Şekil 2.8**) (161).

Apoptoz, gelişme faktörünün ortadan kalkması, hücre örsentisi, bazı steroidlerin salınması ve hücre kalsiyumunu düşük düzeyde sürdürememe gibi hücre içi işaretler tarafından indükte edildiğinde ise mitokondriden sitokrom c salınımı olmaktadır. Sitozole salınan sitokrom c Apaf (pro-apoptotik proteaz aktive edici faktör)'a bağlanır. Apaf/sitokrom c karması, apoptozom adlı aktif bir karmayı yapmak üzere başlatıcı bir kaspaz olan kaspaz 9'a bağlanır. Apoptozom ise zimojen kırılması yoluyla eylemci kaspazları aktive eder (**Şekil 2.8**) (161).



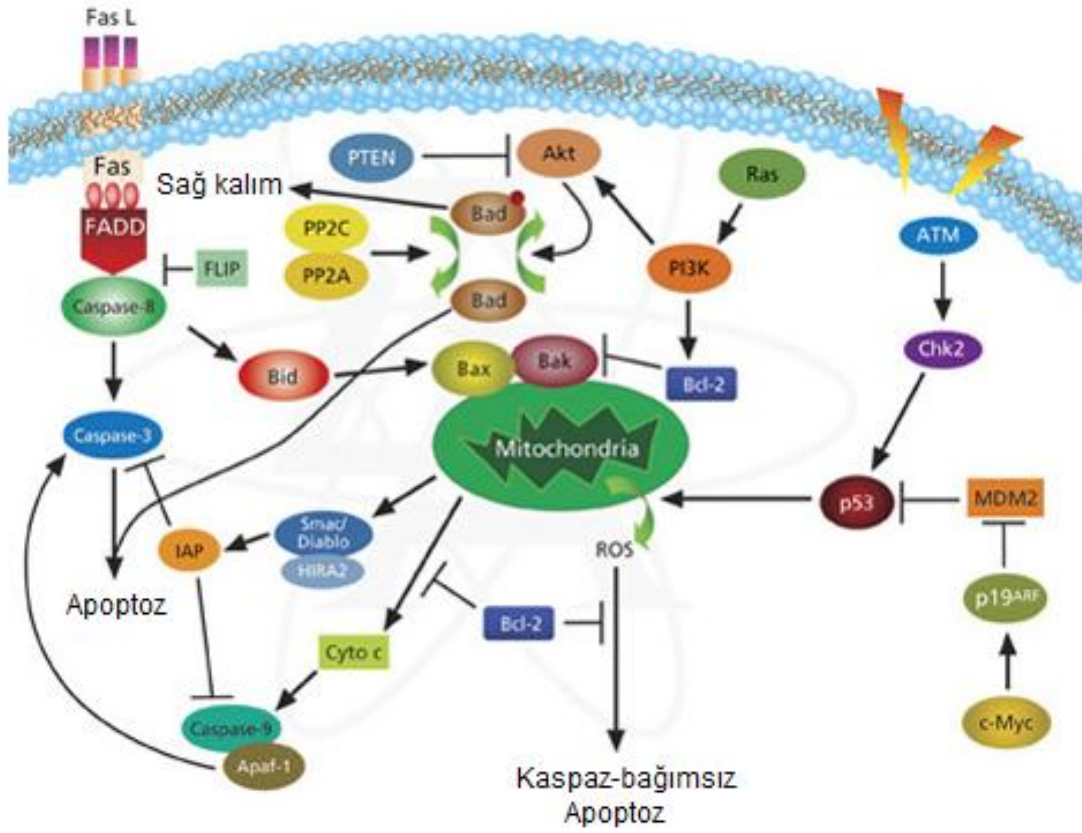
Şekil 2.8. İki temel apoptotik yolak [www.nature.com/nri/journal/v2/n7/fig_tab/nri_846_F3.gif'den modifiye edilmiştir (186)].

2.7.2. Bcl-2 protein ailesi

Bcl-2 ailesi üyeleri, bir hücrenin apoptoza gitmesi gerekip gerekmediğine karar vermek üzere apoptotik ve anti-apoptotik işaretleri tümleştiren karar vericilerdir. Anti-apoptotik Bcl-2 protein ailesine ait üyelere, Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-wL örnek verilebilir ve bunlar en az iki yoldan ölüm işaretlerini antagonize eder. Bunlar, kanal oluşturucu

apoptoz yandaşı faktörleri antagonize etmek için dış mitokondri zarına sokulurlar ve bu yolla sitokrom c salınmasını azaltırlar. Aynı zamanda sitoplazmik Apaf'a bağlanarak da apoptozom oluşmasını engellemektedirler. Apoptotik Bcl-2 proteinlerden iyon kanalı oluşturuculara Bax, Bak ve Bok örnek teşkil eder. BH3 sadece üyelere ise Bad, Bid ve Bod/Bim örnektir. İyon kanalı oluşturan üyeler anti-apoptotik üyelere benzerler ancak Apaf için bağlanma bölgeleri bulunmaz. Mitokondri dış zarında BH3 sadece üyeleri ile dimerize oldukları zaman sitokrom c'nin salınmasını teşvik eden bir iyon kanalı yaparlar. BH3 sadece üyeleri, zara bağlanmalarını ya da iyon kanalı oluşturmalarını sağlayan domenler içermez, ancak diğer Bcl-2 üyelerine bağlanma domenleri taşırlar. Hücre apoptotik bir uyarı aldığı zaman BH3 proteinine benzer bir protein olan Bid aktive olur ve daha sonra Bax'ı aktive eder. Aynı zamanda Bcl-2/Apaf karmasını parçalar ve inaktif durumda tutulmakta olan Apaf böylece serbest kalarak apoptozom oluşturmak üzere salınan sitokrom c'ye bağlanır. Apoptozun tetiklenmesi için gelişme faktörlerinden yoksunluk, DNA hasarının onarım enzimleri tarafından izlenmesi, p53 geninin ekspresyonunda artış, TNF ya da diğer bağışıklık faktörlerinin salınması gibi bir grup uyarı gereklidir. Ek olarak onkogenlerde meydana gelen mutasyonlar apoptoza dirençli hücreler yaratabilir (161).

Neoplastik dönüşümün özelliklerinden birisi de hayatta kalma için gelişme faktörüne bağımlı olmanın ortadan kalkmasıdır. Bu duruma PDGF/Akt/Bad yolu örnek olarak verilebilir. Bu yol, apoptozu inhibe eden gelişme faktörüne bağımlı işaret yollarından birini aktive etmektedir. Defosforile haldeki Bad apoptotik davranışta Bid'e benzer. PDGF'nin reseptörüne bağlanması PI-3 kinazı aktive eder, buda serin/treonin kinaz Akt'ı (protein kinaz B) fosforile ve aktive eder. Akt'nin aktivasyonu Bad'ın fosforillenerek inaktivasyonu ile sonuçlanır. MAP kinaz yolu da apoptozun düzenlenmesine katılır ve hücrenin hayatta kalması için işaretler yollar. MAPKK, RSK olarak bilinen bir protein kinazı fosforile ve aktive eder. Akt gibi RSK'da Bad'ı fosforile ederek bunun aktivitesini inhibe eder. Böylece Bad hücre yaşaması için işaret verme de PI-3 kinaz/Akt ve MAP kinaz yolları için bir kavuşum noktası olarak etki yapar (**Şekil 2.9**). Bu yolları denetleyen RAS gibi genlerde mutasyonlar olması apoptoza dirençli hücreler yaratır (161).



Şekil 2.9. Apoptozun aktivasyonu ve inhibisyonu.
 (www.sigmaldrich.com/img/assets/6460/Activation_and_Inhib_of_Apo.jpg'den modifiye edilmiştir
 (187)].

2.8. İnozitol altı fosfat

Fitik asit (IP6) her bir karbonuna bir fosfat grubunun bağlı olduğu 6 fosfat içeren basit yapıya sahip bir karbonhidrat halkasıdır. Besinlerde fosforlu inositol major form olarak bulunur ve tahıllar, kabuklu yemişler, baklagiller, yağlı tohumlar ve tanelerin ağırlıklarının %1-5'i kadarını oluşturur (124).

Hemen hemen tüm memeli hücreleri IP6'yı ve daha az oranda da yaşamsal hücre fonksiyonlarının düzenlenmesinde önemli rolü olan farklı sayıda fosfat grupları (IP1-5) taşıyan IP6 formlarını içerirler. İnozitol, hücre membranlarında lipidlerle konjuge halde fosfatidil inositol olarak yaygın şekilde bulunur. Plazma membranındaki

inositol fosfolipidler sinyal transdüksiyon sistemlerindeki biyolojik önemlerinden dolayı daha dikkatli ele alınırlar. Fosfatidil inositol 4,5 bisfosfat (PIP₂), sinyal transdüksiyonunda çeşitli informasyonel moleküller için bir öncü niteliğindedir (11). İnositol fosfatlar çeşitli hücrel aktiviteyi kontrol ederek önemli rolleri olan çok yönlü moleküllerdir (146). İnositol polifosfatlar için farklı bağlanma proteinleri izole edilmiştir ki bunlar iyon kanallarına etki, protein trafiği (100), endositoz (199), eksositoz (35) ve mRNA'nın nükleustan sitozole taşınması (194) gibi hücrel fonksiyonlarda rol alan proteinlerdir (80).

Shamsuddin ve arkadaşlarının hipotezine göre IP₆ hücreler tarafından özümsebilir ve IP₁₋₅'lere defosforile edilebilir, bundan sonra hücre içi fosfat havuzuna girebilir ve tümör gelişimini inhibe edebilir (151). IP₆ verildikten sonra hücre içi inositol fosfatlar ölçüldüğünde daha düşük sayıda fosfat içeren inositol fosfat seviyelerinde (IP₁₋₃) artış olduğu belirlenmiştir (51, 173). Dahası İnositol fosfatlar memeli hücre sistemlerinin çoğunda sinyal transdüksiyonunda rolleri olan yaygın moleküller oldukları için farklı hücre ve doku sistemlerinde antikanser etkilerinin gözlenebileceği varsayılmaktadır (151). Yapılan bir çalışmada IP₆ 'nın deneysel hepatoma inhibisyonunda etkili olduğu gösterilmiştir. Nude farelere subkutan olarak inokule edildiğinde tümör oluşturabilen hücrelerin tümör formlarına dönüşme yetenekleri, bu hücreler (HepG2 hücreleri) inokulasyon öncesi in vitro ortamda tek doz IP₆ ile muamele edildiğinde kaybolmuştur. Ek olarak IP₆ ile direkt muamele edildiğinde karaciğer kanserlerinde gerileme görülmüştür (175).

Farelerin kullanıldığı iki aşamalı deri kanseri modelinde inisiasyon fazı süresince içme sularında IP₆ alan hayvanlarda tümör gelişiminde inhibisyon izlenirken arttırma (promotion) fazı süresince IP₆ alan hayvanlarda tümör gelişiminin inhibe olmadığı gözlenmiştir (55).

IP₆, diyetle verileden daha düşük konsantrasyonlarda içme suyuyla verildiğinde (% 0,4 – 2 arasındaki konsantrasyonlarda) tümör inhibisyonunu kıyaslanabilir ölçüde arttırmaktadır. Örneğin, %20 yüksek lifli diyet içinde %0,4 IP₆ vermektense bu miktar içme suyuyla verildiğinde daha güçlü tümör inhibisyonu elde edilmiştir (174).

Fosfatidil inositol türevleri ekstraselüler uyarıya cevap olarak hücrel sinyalleri iletir ve fosforilasyondan sorumlu enzimler ve bu sinyal lipidlerinin hidrolizi geniş bir yelpazede önemli rol oynar. Primer olarak D-myo-inositol halkasının 3. pozisyonundaki lipid fosfatidilinositolü fosforile eden fosfatidil inositol-3 kinaz merkezi bir moleküldür, aynı zamanda substrat olarak fosfatidil inositollerin fosforillenmiş formlarını da kullanabilir. IP₆, fosfatidilinositol-3 kinazı inhibe etmektedir (78).

IP6 tarafından Aktive edici protein-1(Activating protein-1) ve Fosfatidilinositol-3 kinaz'ın bloke edilmesine ek olarak (78) protein kinaz C (176) ve MAPK'lar (199) IP6'nın aracılık ettiği antikanser aktivite ile ilişkilidirler.

IP6, Fe³⁺'ü şelatladığı ve •OH oluşumunu baskıladığı için bir antioksidan olarak kabul edilmektedir (49). Bu nedenle IP6 antioksidatif fonksiyonu üzerinden hücre hasarını ve aktif oksijen türlerinin aracılık ettiği karsinogenezi azaltabilir. Bu aktivite onun özgün yapısıyla ilgilidir. IP6'nın 1, 2, 3. pozisyonlardaki fosfat grupları demirle spesifik olarak etkileşir ve onun hidroksil radikali oluşturma yeteneğini inhibe eder (155). Aynı zamanda tümör hücre proliferasyonunda önemli olan magnezyum ve çinko gibi diğer divalent katyonları şelatlayarak da tümör progresyonunu sınırlandırabilir (168).

Hücrel düzeyde hücre içi fosfat havuzundaki artış doğal öldürücü (Natural Killer) hücre toksisitesinde artışa neden olur (168). Doğal öldürücü hücre aktivitesindeki bu yükselme vücudun karsinojenik tehditlere karşı immün cevabını arttırmaktadır (144). IP6 in vitro olarak doğal öldürücü hücre aktivitesini artırır ve in vivo olarak da karsinojen indüklü doğal öldürücü hücre aktivitesinin baskılanmasını normale döndürür (9).

Tümörler büyümeleri ve yayılmaları için yeni kan damarlarının oluşumuna ihtiyaç duyarlar. Pek çok tümör normal kan damarı oluşumunu uyaran bir sitokin olan VEGF'yi büyük miktarda üretir. IP6 endotel hücrelerin büyüme ve farklılaşmasını inhibe ederken

malignant hücrelerden VEGF'nin sekresyonunu da inhibe etmektedir (178). IP6, FGF'yi antagonize ederek anjiyogenezi ve tümör gelişimini inhibe edebilir (115).

2.9. Retinil Asetat

Siklohekzenil halkası taşıyan poliizopren bileşikler olan ve retinol, retinal ve retinoik asit gibi biyolojik olarak aktif bir grup moleküle A vitamini adı verilmektedir. Karaciğer, böbrek, yumurta, tereyağı gibi hayvansal gıdaların yanı sıra sebze ve meyvelerde de karoten olarak bulunmaktadır (128).

Vitamin A esansiyel bir mikronutrienttir ve çeşitli fizyolojik süreçlerde, merkezi rol oynar. Bu süreçlere üreme, hücre büyüme ve farklılaşması, embriyogenez ve görme örnek verilebilir (192).

Retinol vitamin A ailesinin ana bileşimidir. Ancak besinlerde serbest Retinol bulunmaz, genellikle retinil palmitat (52) gibi yağ asidi esterleri formunda oluşmuştur. Besin takviyelerinde bulunan başlıca formlar ise retinil palmitat ve retinil asetattır. Vitamin A öncülleri barsaktan %60-90 oranında emilirler. Emilim için safra tuzları, pankreatik enzimler ve diyetel yağ gereklidir. Retinil esterleri enterositlere girmeden önce pankreatik hidrolazlar tarafından hidrolize edilir. Enterositlerde yeniden retinil esterlerine re-esterifiye edilen retinol şilomikronlarla lenfatik sisteme geçer ve retinil esterlerin çoğu şilomikron kalıtlarından karaciğerde parankim hücreler tarafından alınır. Burada yeniden retinol ve yağ asitlerine hidroliz edilir (76). Karaciğerde depolanacak olan retinol, stellate hücreler ve hepatositlerde lecithin: retinol acyltransferase (LRAT) gibi bazı enzimler tarafından retinil olarak depolanmak üzere tekrar esterifiye edilir (192). Retinolün bir kısmı retinol bağlayıcı protein (retinol binding protein, RBP) ile bağlanarak farklı dokulara taşınmak üzere dolaşıma aktarılabilir (76) ya da ardışık olarak biyolojik aktif formlar olan retinal ve retinoik asite oksidize edilir (192).

Vücutta bulunan vitamin A'nın yaklaşık %50-85'i karaciğerde depolanmış halde bulunur. RBP, serum retinolünün %90'dan fazlasını bağlayan primer taşıyıcısıdır ve serum retinolünün %95'i esterleşmemiş formdadır. Hücrelerin içinde retinil ve metabolitleri hem sitozolde hem de nükleusta retinol bağlayıcı proteinlere bağlı olarak bulunurlar. Sitozolik bağlayıcı proteinler; hücrel retinol bağlayıcı protein (cellular retinol-binding protein, CRBP)'lerdir. Nükleer bağlayıcı proteinler ise; retinoik asit reseptör (retinoic acid receptor, RAR)'ler ve retinoid X reseptör (retinoid X receptor, RXR)'lerdir.(76).

Yapılan çalışmalarda retinoidlerin çeşitli karsinogenez modellerinde tümör gelişimini baskılamada etkin oldukları bulunmuştur. Tümör başlatma (initiation) ve arttırma (promotion) veya her ikisini etkileyip etkilemedilerini belirlemek için bir karsinojen ya da tümör arttırıcı (promoting) ajan ile eş zamanlı ya da sonrasında verilmesini kapsayan, uygulamanın lokal ya da sistemik, diyet içinde veya intragastrik olduğu çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmaların çoğu göstermiştir ki belli retinoidler "antipromotion" aktiviteye sahiptirler.

Başlangıç çalışmalarında doğal olarak oluşan retinoidler kullanılmıştır. Bununla birlikte sentetik retinoidlerin bulunmasıyla beraber doğal bileşiklerden daha düşük toksisiteye sahip ve daha aktif bileşikler tanımlanmıştır (106).

Bulguların çoğu retinoidlerin tümör başlatma (initiation)'dan ziyade tümör arttırma (promotion) safhasında etkili olduklarını göstermektedir. Promotion safhası, bir preneoplastik lezyon oluşturmak ve preneoplastik lezyonu bir malignant lezyona dönüştürmek için inisiasyona uğramış hücre popülasyonunun genişlemesini kapsar. Bu süreçler hücre proliferasyonunun düzenlenmesindeki bozukluk, anormal farklılaşma, apoptoza gitme eğiliminde azalma ya da kayıp ile ilgilidir. Retinoidler hücre proliferasyonunu inhibe edebilirler, hücre farklılaşmasını değiştirebilirler ve apoptozu arttırabilirler (106).

Retinoidlerin etkilerinin çoğu gen ekspresyonunu değiştirmelerinden kaynaklanır. Nükleer retinoid reseptörler, ligand-aktiviteli transkripsiyon arttırıcı faktörlerdir ve

steroid reseptör süper ailesinin üyeleridir. Bu reseptörler retinoidlerin gen ekspresyonu ve bunun sonucu olarak da hem normal hem tümör hücrelerinin büyüme ve farklılaşmaları üzerine etkilerine aracılık etmede önemli rol oynarlar. İki tip nükleer reseptör tanımlanmıştır; retinoik asit reseptörler (RAR)ve retinoid X reseptörler (RXR). Bu reseptörlerin ligand bağlama özellikleri farklılık gösterir. RAR'lar all-trans retinoik asit (AtRA) ve 9-cis retinoik asit (9CRA) bağlarken RXR'ler 9CRA bağlarlar. RAR ve RXR'ler heterodimer oluştururlar ve DNA'da retinoik asit yanıt elemanları olarak bilinen özel bölgelere bağlanarak retinoid yanıt genlerinin transkripsiyonunu arttırlar (106).

Retinoik asit nükleer reseptörlere bağlanarak hücre farklılaşmasını uyarabilir, proliferasyonu baskılayabilir ve/veya apoptozu uyarabilir (76).

Retinoidler tarafından hem baskılama hem artırma, karaciğer kanserinin farklı modellerinde rapor edilmiştir. Hepatokarsinogenezin inhibisyonu, 3'-methyl-4-dimethyl-4-aminoazobenzene'e maruz kalan ve retinil asetat, 13 cis retinoik asit, retinoik asit analogu trimetil metoksifenil (46) veya asiklik retinoid (E-5166; 3, 7, 11, 15-tetramethyl-2, 4, 6, 10, 14-hexadecapentaenoic acid) ile beslenen sıçanlarda gösterilmiştir (119).

BaP ve TCDD gibi toksinler normal vitamin A metabolizmasını bozabilir ve farklı dokularda vitamin A'yı metabolize eden enzimlerle (örn; LRAT) etkileşebilirler (57, 122). Akciğerler, barsak, böbrekler ve karaciğerde BaP ve TCDD'nin vitamin A depolarını etkileyebileceği ve vitamin A düzeylerinde azalmaya neden olacağı saptanmıştır (15, 122).

Retinoidler BaP veTCDD gibi AhR ligandlarının karsinojenik etkilerini inhibe edebilir (59). AhR ligandlarının doku retinoid içeriğini azalttığı ve skuamöz metaplazya (squamous metaplasia) gibi preneoplastik lezyonları indüklediği gösterilmiştir. Bu lezyon aynı zamanda retinoid eksikliğinde indüklenebildiği gibi retinoidler tarafından

tersine çevrilebilmektedir. Bu tersine çevrilme (reverse) kültürde ve in vivo olarak gösterilmiştir (33). Nitekim skuamöz metaplazya (squamous metaplasia) hem AhR ligandı hem de retinoid eksikliğinden ileri gelir. AhR ligandlarının doku retinoid içeriğini azaltabildiği bilinmektedir ve AhR eksojen ligandlar olmasa dahi gen ekspresyonunu etkileyebilir, buda muhtemelen AhR'nin kaybının retinoid metabolizmasını etkileyebilmesinden kaynaklanır. Yapılan bir çalışmada AhR-null fare karaciğerinde yabancı tip (wild-type) fare karaciğerine göre retinol esterleri, retinol ve retinoid asitte üç kat artış olduğu gösterilmiştir (5). Artmış karaciğer retinoidleri retinoid asit reseptörü aracılığındaki TG2 (Transglutaminaz 2)'nin indüksiyonuyla AhR-null farede karaciğer fibrozisine sebep olabilir. TG2, latent durumdaki TGF β 'yi aktif hale döndürmektedir (5, 197). TGF β proliferasyonda azalmaya ve apoptozda artışa neden olur ve bu küçük karaciğer boyutu ve fibrozisin nedenidir (197). AhR-null fareler vitamin A içermeyen diyetle beslendiklerinde karaciğer fibrozisi kısmi olarak geriye dönebilir.

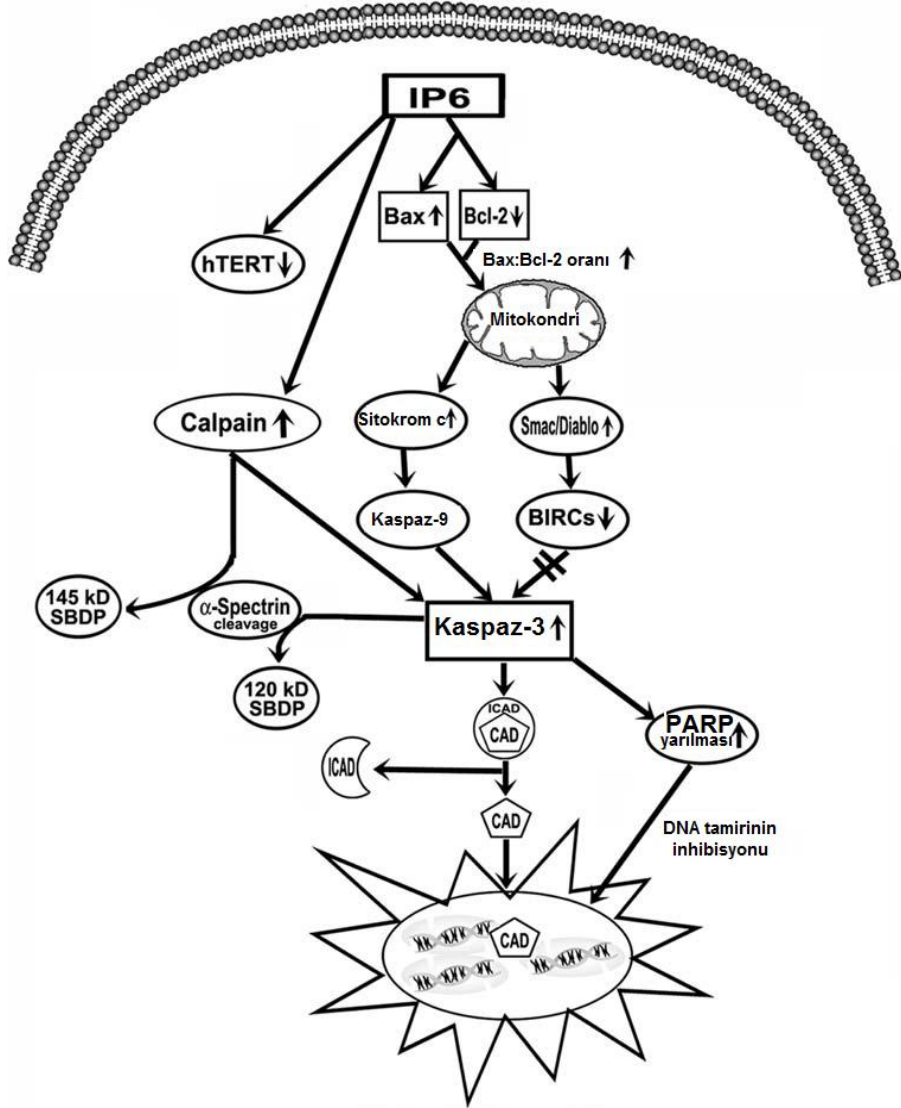
2.10. IP6 ve Retinil Asetat'ın Apoptoza Etkileri

Normal hücrelerin sınırlı oranda ve bir kontrol dahilinde bölünmelerine karşılık malignan hücreler sıklıkla hücre çoğalmasını düzenleyen kontrol mekanizmalarından kaçarlar ve bu hücrelerde genellikle defektif hücrelerin replikasyonunu önleyen kontrol noktalarının kaybı söz konusudur. IP6 kontrolsüz hücre bölünmesini bloke ederek hücre döngüsünü düzenleyebilir ve malignan hücreleri ya farklılaşmaya ya da apoptoza gitmeye zorlayabilir. IP6, insan meme, kolon (36, 177) ve prostat (158) kanser hücre serilerinin S fazında önemli bir azalmayı ve G1 fazının bloke edilmesini indükleyebilir. IP6, hem in vivo olarak hem de prostat ve servikal kanser hücre serilerinde in vitro olarak apoptozu indükler. Bu etkisini zamana ve doza bağlı olarak kaspaz 3, kaspaz 9 ve poli ADP-riboz polimeraz aracılığıyla gerçekleştirir (39, 86, 158).

IP6'lar, hücrelerin içine muhtemelen pinositotik olarak taşınmaktadırlar ve hemen sonrasında IP4 ve IP5'e defosforile edilirler. IP4 ve IP5, Akt-NfκB hücre sağ kalım yolunu inhibe edebilirler. Bunu da Akt'ın aktivitesini gösterdiği yer olan plazma membranına translokasyonunu inhibe ederek yaparlar (39).

IP6, mitokondrial membran potansiyelinde azalmaya neden olarak direkt mitokondri hasarı oluşturur ve membran permeabilitesi artar. Sonuçta sitokrom c sitoplazmaya salınır. Salınan sitokrom c kaspaz 9 ve kaspaz 3'ü aktive eder. Bunu DNA tamir enzimi Poli (ADP-riboz) Polimeraz (PARP)'ın yarılması izler ki bu hücreyi apoptoza yönlendirir (39).

Prostat kanser LNCap hücrelerinde IP6'nın pro-apoptotik Bax'ın ekspresyonunu ve Bax: Bcl-2 oranında artış sebebiyle anti-apoptotik Bcl-2 seviyelerini düzenlediği ve aynı zamanda sağ kalım sinyal molekülü Akt'ı inhibe ettiği oysa DU145 hücrelerinde, kaspaz aktivasyonu ve PARP'ın yarılması (cleavage) yoluyla apoptozu indüklediği bildirilmiştir. **Karmakar ve arkadaşları**, T98G hücre serisine (Human glioblastoma cell line) IP6 uygulandığında kalpain ve kaspaz-9'un upregülasyonu ile apoptozun uyarıldığını bildirmişlerdir. IP6'nın aynı zamanda kaspaz-3'ün aktivitesini de uyardığını rapor etmişlerdir (**Şekil 2.10**) (87).



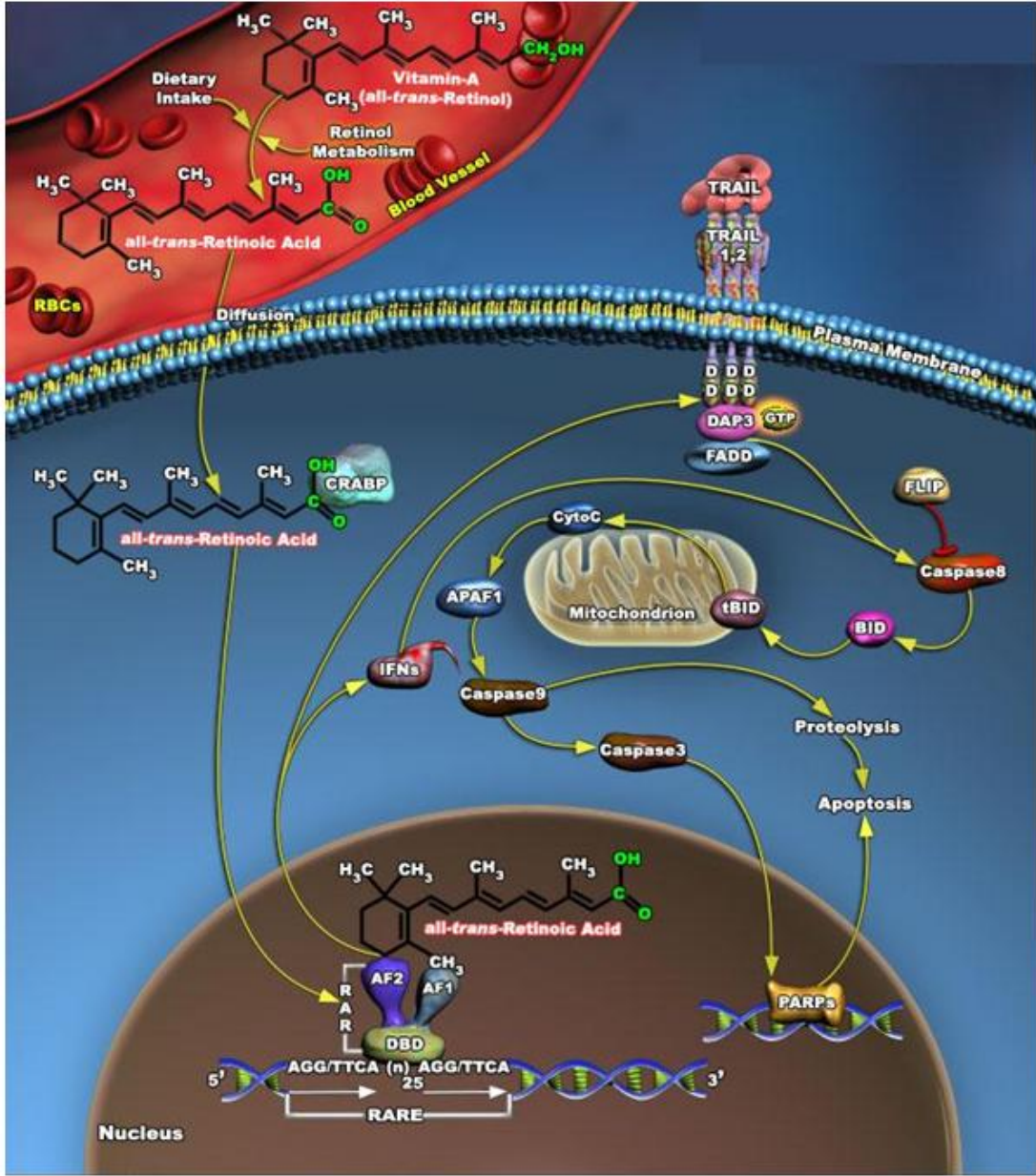
Şekil 2.10. Kalpain ve mitokondri bağımlı kaspaz kaskadı [Karmakar, S., Banik, N.L., Ray, S.K., 2007, Molecular Mechanism of Inositol Hexaphosphate-mediated Apoptosis in Human Malignant Glioblastoma T98G Cells, Neurochem Res 32, 2094-2102'den modifiye edilmiştir (87)].

Retinoidler, hücre döngüsünün baskılanması, apoptozun ve/veya farklılaşmanın uyarılması yoluyla antikarsinojenik etki gösterirler (101). Çeşitli çalışmalar retinoidlerin belli kanser hücrelerinde anti-proliferasyon ya da apoptotik etkileri olduğunu göstermiştir (28). Retinoidler, RAR'ları özellikle RAR- γ 'yı aktive ederek pankreatik adenokarsinoma hücrelerinde apoptozu uyarmaktadırlar. Bunu kaspaz aktivasyonunun yanı sıra Bcl-2 ailesine ait üyelerin ekspresyonlarını değiştirerek (Bcl-2/ Bax oranında azalma) yapmaktadırlar (136).

Retinoik asit izomerleri olan all-trans retinoik asit, 13-cis retinoik asit ve 9-cis retinoik asitin MCF-7 insan meme kanser hücrelerinin apoptozu üzerine etkileri ile ilgili yapılan bir çalışmada bu izomerlerin sitoplazmada kaspaz aktivitesini ve mitokondriden sitokrom c salınımını artırarak apoptozu uyardıkları gösterilmiştir (65).

Retinoik asitin, insan Hepatoma Hep 3B hücrelerinde apoptozu uyardığı, DNA fragmentasyonunu arttırdığı bildirilmiştir. Retinoik asitin bu etkisini hücre döngüsündeki G1 fazından önce Hep 3B hücrelerinin birikimine neden olarak gösterdiği önerilmektedir, çünkü G0/G1 geçişi aktif apoptoz sürecinde ana kontrol noktasıdır (90).

AtRA'nın indüklediği apoptoz mekanizması, TRAIL (TNF-İlişkili Apoptoz İndükleyici Ligand) ve onun ölüm reseptörlerinin yol açtığı mitokondriyal disfonksiyon aracılığıyla gerçekleşir. AtRA, interferonları aktive ederek onların TRAIL reseptörleri ile sinerjistik olarak kaspaz-8'i aktive etmelerini sağlar (**Şekil 2.11**) (188).



Şekil 2.11. AtRA aracılı apoptoz [www5.appliedbiosystems.com/tools/pathway'den modifiye edilmiştir (188)].

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. GEREÇ

3.1.1. DENEY HAYVANLARININ TEMİNİ VE BAKIMI

Çalışmamızda deney hayvanı olarak Eskişehir Osmangazi Üniversitesi'ne bağlı TICAM'dan alınan 16 haftalık *Sprague dawley* erkek sıçanlar kullanılmıştır. Deney hayvanları uygun sıcaklık ve havalandırma koşullarında tutulmuş ve temizlik kurallarına dikkat edilmiştir. Çalışma öncesi ESOGÜ Deney Hayvanları Etik Kurulu'ndan onay alınmıştır.

3.1.2. KİMYASAL MADDELER

- % 96 etil alkol (Riedel de Haen, Germany)
- %40 Akrilamid/bis solüsyon,37.5:1 (Applichem, Germany)
- 10X Tris/Glisin/SDS (Sigma, Germany)
- Absolü etanol (Riedel de Haen, Germany)
- AEC kromojen (Lab Vision, Canada)
- Amonyum persülfat (Applichem, Germany)
- Antikor Dilue Solüsyonu (Lab Vision, Canada)
- Aprotinin (Boehringer mannheim, Germany)
- Asetaldehit (Fluka, Switzerland)
- Asetik asit (Riedel de Haen, Germany)
- BCA protein ölçüm kiti (Sigma, Germany)
- BSA standardı (Sigma, Germany)
- CaCl₂ (Riedel de Haen, Germany)
- DNA standardı, Calf thymus (Sigma, Germany)
- Sitrat buffer,konsantre, pH 6 (Fluka, Germany)

- Commassie blue (Applichem, Germany)
- Mısır yağı (Sigma, Germany)
- CYP1A primer antikor (Santa Cruz, USA)
- CYP1A sekonder antikor (Santa Cruz, USA)
- Difenilamin (Merck, Germany)
- Distile su
- DTT (dithiothreitol) (Sigma, Germany)
- EDTA (Ferah Berlin, Germany)
- EDTA buffer, pH:8 (Fluka, Germany)
- EGTA (Sigma, Germany)
- Elektroforez örnek tampon (Sigma, Germany)
- Eosin Y, instant, alkolik (Thermo Shandon, USA)
- Etanol, %95 (Riedel de Haen, Germany)
- E-Z monte solüsyonu (Thermo Shandon, USA)
- Fenilmetilsülfonil Florid (PMSF) (Sigma, Germany)
- Formaldehide %37-40 (Riedel de Haen, Germany)
- Glisin (Merck) (Riedel de Haen, Germany)
- H₃PO₄(Riedel de Haen, Germany)
- HCl (Merck, Germany)
- Hematoksilen, Haris instant (A + B) (Thermo Shandon, USA)
- HEPES (Merck, Germany)
- Hidrojen peroksid, %3 (Lab Vision, Canada)
- IP6 (Sigma, Germany)
- İmmünohistokimyasal boyama kit (Avidin-biotin system) (Lab Vision, Canada)
- KCl (Riedel de Haen, Germany)
- KOH (Merck, Germany)
- Metanol (CH₄O) (Riedel de Haen, Germany)
- Mg Cl₂ (Merck, Germany)
- MMP-2 Elisa kiti (R&D Systems, United Kingdom)
- Molecular Weight Marker (Sigma, Germany)
- Mounting medium, aqueous (Lab Vision, Canada)

- NaOH (Merck, Germany)
- n-butanol (Merck, Germany)
- Nonidet P-40 (Sigma, Germany)
- Panceaus S (Applichem, Germany)
- p-DAB (Sigma, Germany)
- Pepstatin (Sigma, Germany)
- Perklorik asit (Merck, Germany)
- PBS (Sigma, Germany)
- PBS, pH:7.4, tween 20 (Lab Vision, Canada)
- Poly-L-Lysine solüsyonu (Sigma, Germany)
- Potasyum Fosfat (Riedel de Haen, Germany)
- Piridin (Merck, Germany)
- Retinil asetat (Sigma, Germany)
- Ripa lysis buffer (Santa Cruz, USA)
- SDS (Merck, Germany)
- Sitokrom c Elisa kiti (R&D Systems, United Kingdom)
- Sodyum fosfat, dibasic (Na_2HPO_4), kristal (Riedel de Haen, Germany)
- Sodyum fosfat, monobasic (NaH_2PO_4), kristal (Riedel de Haen, Germany)
- Sükröz (Sigma, Germany)
- Sülfürük asit (Riedel de Haen, Germany)
- TCA (Riedel de Haen, Germany)
- TCDD (AccuStandard, USA)
- TEMED (N,N,N,N-Tetra-metil-etil endiamin) (Fluka, Switzerland)
- Thimerosal (Applichem, Germany)
- Tiyobarbitürük asit (TBA) (Fluka, Switzerland)
- Tris aminomethane (Merck, Germany)
- Tris asetat (Applichem, Germany)
- Tris buffer saline, pH:7.6, tween 20 (Lab Vision, Canada)
- Triton X-100 (Sigma, Germany)
- Tripsin enzim (Lab Vision, Canada)
- Tween 20 (Lab Vision, Canada)

- VEGF 96 test (R&D Systems, United Kingdom)
- Western blot Blocker Solution (Sigma, Germany)
- Western Blot Luminal Reagent (Santa Cruz, USA)
- Ksilen (Thermo Shandon, USA)

3.1.3. CİHAZLAR VE SARF MALZEMELER

- Balon Joje (50,100, 500 ve 1000 mL)
- Beher (50, 100, 500 ve 1000 mL)
- Bistüri ucu
- Blok kaseti çelik kapağı (Isolab, Germany)
- Buz makinası (Hoshizaki)
- Buzdolabı (Arçelik)
- Cam kalemi
- Çeker ocak
- Çelik kaset kapağı toplama kabı, çelik
- Derin Dondurucu, -80⁰C (Thermo, ULT 1386-5-V40)
- Disposable mikrotom bıçağı Low profil (Thermo Shandon, USA)
- Distile su cihazı
- Doku blok kaseti (Isolab, Germany)
- Doku sınırlayıcı kalem (Lab Vision, Canada)
- Eldiven: (Steril Ameliyat Eldiveni, 7.5 Numara)
- Elisa (Perkin Elmer 2030 Multilabel reader, Victor X3)
- Etüv (Binder)
- E-Zmount damlatma kabı
- Fiber Sünger (10.5-7.5, Bio Rad)
- Filtre kağıdı (10.5-7.5, Bio Rad)
- Güç kaynağı (Bio Rad, Power Pac 300)
- Hassas terazi (Sartorius)
- İmmünohistokimyasal boyama kabı
- Kemiluminesans Analiz Software

- Kurutma kağıdı, 40x40 cm (Isolab, Germany)
- Lam saklama kutusu, siyah, plastik, kapaklı (Isolab, Germany)
- Lam taşıma sepeti, kollu, çelik (30 lam)
- Lamel (24x60) (Isolab, Germany)
- Mezür (50, 100, 500 ve 1000 mL)
- Mikropipet Ucu: (Silikonlu 100 µL) (Greiner, Germany)
- Mikropipet Ucu: (Silikonlu 10 µL) (Greiner, Germany)
- Mikropipet Ucu: (Silikonlu 1mL) (Greiner, Germany)
- Mikroskop(Olympus)
- Mikrotom(Reichert)
- Mini elektroforez cihazı (Bio Rad,170-3930)
- Mounting medium damlatma kabı
- Nitroselüloz membran / Sandviç filtre kağıdı (Pierce, USA)
- Otomatik pipet (eppendorf,100 ve 1000 µL)
- Otomatik pipet uçları (100 ve 1000 µL)
- Parafin, boncuk (Thermo Shandon, USA)
- Pastör Pipeti (CAM) (Isolab, Germany)
- Pastör Pipeti(Plastik) (Isolab, Germany)
- Permanent marker (Isolab, Germany)
- pH metre (İnolab, Detsan)
- Poly-L-Lysinli Lam (Menzel, Germany)
- Polypropilen Kapaklı Tüp (1.5 mL)(Greiner, Germany)
- Polypropylen Kapaklı Tüp (50 mL) (Greiner, Germany)
- Preparat mapesi (Roth, Germany)
- Puset, plastik, şeffaf (500 ml'lik), deve boyunlu (Isolab, Germany)
- Renkli Frost Lam (Isolab, Germany)
- Santrifüj (Nüve NF800)
- Santrifüj, soğutmalı (Jouan MR22)
- Shaker (Heidolph Polymax 1040, Heidolph Titramax 100)
- Spektrofotometre (Shimadzu, UV-1601)
- Spektrofotometre küveti (cam, plastik)
- Su banyosu (Nüve BM402)

- Synegene Kemiluminesans Görüntüleme Cihazı
- Ultrasantrifüj (Hamil 4.0 Ultra)
- Vorteks (Restch)
- Whatman no.1 filtre (Aldrich, Germany)
- Whatmann 3 kağıdı (Aldrich, Germany)

3.2. YÖNTEM

3.2.1.DOZ VE DENEY GRUPLARI

Çalışmamızda kullandığımız 16 haftalık 275-350 gram ağırlığındaki *Sprague dawley* sıçanlar 6 gruba ayrıldı ve her grupta 30 adet olacak şekilde rastgele dağıtıldı. Çalışmamızda tüm maddeler başlandıktan sonraki 15., 30., 60., 90. ve 120. günler örnek alım zamanları olarak belirlendi ve her örnek alım zamanında gruplardan 6'şar adet hayvan sakrifiye edildi. Sıçanların 15-20 saniye eter anestezisi altında kardiyak yolla kanları alınıp servikal dislokasyon sonrası karaciğerleri çıkartıldı. Maddelerin gruplara başlanılma zamanı aşağıda gösterilmiştir (**Şekil 3.1**).

Deney grupları şöyledir:

Grup 1: Kontrol (n=30)

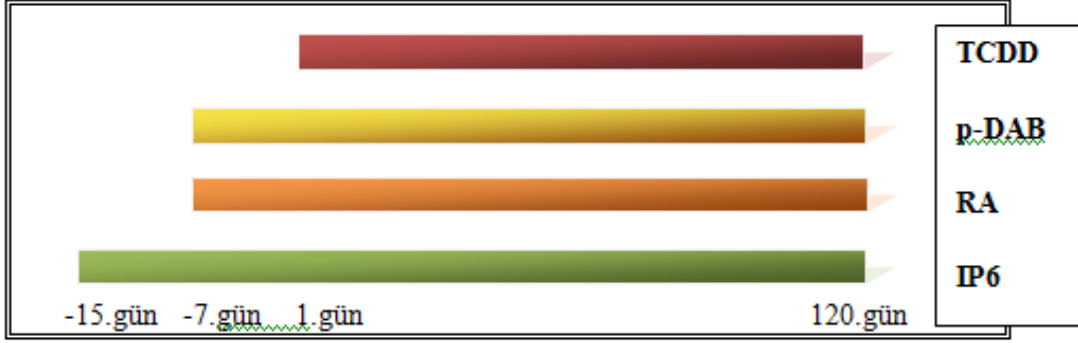
Grup 2: Mısır yağı kontrol (n=30)

Grup 3: DAB + TCDD (n=30)

Grup 4: DAB + TCDD + IP6 (n=30)

Grup 5: DAB + TCDD + RA (n=30)

Grup 6: DAB + TCDD + IP6 + RA (n=30)



Şekil 3.1. Maddelerin gruplara başlanılma zamanı

- TCDD, 70 ng/100 g.vücut ağırlığı olacak şekilde mısır yağında çözdürülerek haftada bir gavajla verildi.
- DAB (p-DAB), %0.06 oranında ve diyetle verildi.
- RA, 1 mg/ 100 g.vücut ağırlığı (0.25 ml/100 g.vücut ağırlığı, mısır yağında çözdürülerek) olacak şekilde gavajla ve haftada 5 gün verildi.
- IP6, %0,5 oranında içme suyuna katılarak verildi.

Kontrol: Standart sıçan yemi + içme suyu.

Mısır yağı kontrol: Standart sıçan yemi + içme suyu + 0.25 ml/100 g. vücut ağırlığı mısır yağı, gavajla haftada 5 gün.

DAB+TCDD: Diyetle %0,06 DAB + haftada bir gavajla 70 ng/100 g. vücut ağırlığı TCDD + içme suyu.

DAB+TCDD+IP6: Diyetle %0,06 DAB + haftada bir gavajla 70 ng/100 g. vücut ağırlığı TCDD + içme suyuyla %0,5 IP6.

DAB+TCDD+RA: Diyetle %0,06 DAB + haftada bir gavajla 70 ng/100 g. vücut ağırlığı TCDD + haftada 5 gün gavajla 1mg/100 g.vücut ağırlığı RA.

DAB+TCDD+IP6+RA: Diyetle %0,06 DAB + haftada bir gavajla 70 ng/100 g. vücut ağırlığı TCDD + içme suyuyla %0,5 IP6 + haftada 5 gün gavajla 1mg/100 g.vücut ağırlığı RA.

3.2.2. DENEY HAYVANLARINDAN ÇALIŞILACAK ÖRNEKLERİN ALINMASI

Her örnek alım zamanında sıçanlara 15-20 saniye eter ile inhalasyon anestezisi uygulandıktan sonra serum ve plazma örnekleri için kardiyak yolla kanları alınarak servikal dislokasyon uygulandı ve karaciğerleri çıkartıldı. Serum örnekleri, separasyon tüplerinde 20 dakika bekletildikten sonra 3500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve üstte kalan süpernatant ALT, AST, ALP, LDH ölçümü için kullanıldı. Plazma örnekleri, lityum heparinli tüplere kan alındıktan sonra 30 dakika içinde 1000 x g'de 20 dakika santrifüj edildi ve üstte kalan kısım VEGF ve MMP-2 ölçümü için kullanılmak üzere -80°C saklandı. Çıkarılan karaciğer, soğuk (4°C) % 0.9'luk sodyum klorürle üç kez yıkama serisinden geçirildi ve kısımlara ayrıldı. Bir kısım histopatolojik ve immünohistokimyasal görüntüleme için nötral formalin içine alındı. Bir kısım, MDA, Sitokrom c, DNA Fragmantasyonu, Total Protein ölçümleri için -80°C saklandı. Bir kısım da Western Blot analizi için (CYP1A1) küçük plastik tüplere konulup sıvı nitrojen içinde 10 saniye tutulup -80°C 'de saklandı.

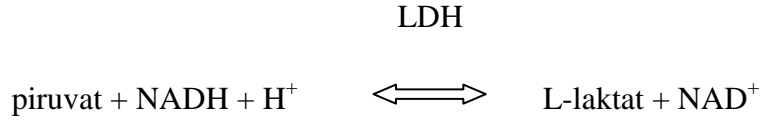
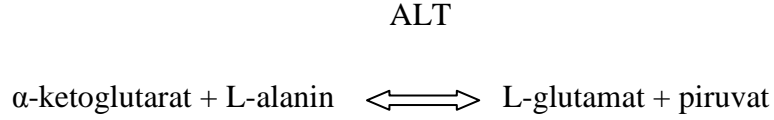
CYP1A1'in ölçümü ve değerlendirilmesinde, Tıbbi Biyoloji ABD'dan, histopatoloji preparatlarının hazırlanması ve değerlendirilmesinde Histoloji ve Embriyoloji ABD'dan, verilerin istatistiksel değerlendirilmesinde Biyoistatistik ABD'dan destek alındı.

3.2.3. SERUM ALT, AST, ALP VE LDH ÖLÇÜMÜ

ALT, AST, ALP ve LDH'nin ölçümünde Roche Modular otoanalizörle uyumlu kantitatif test kitleri kullanıldı.

ALT ölçüm prensibi:

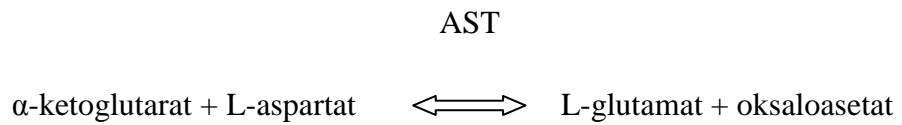
ALT tarafından katalizlenen aşağıdaki reaksiyon ile artan piruvat, Laktat Dehidrojenaz'ın (LDH) katalizlediği reaksiyon ile laktata dönüşürken NADH da oksitlenerek NAD⁺'ye dönüşür.

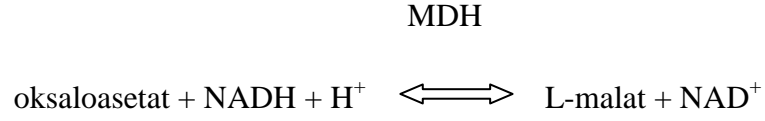


Piruvatın oluşum hızı ve dolayısıyla ALT aktivitesindeki artışla direkt orantılı olarak NADH miktarındaki azalma fotometrik olarak ölçülür.

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.

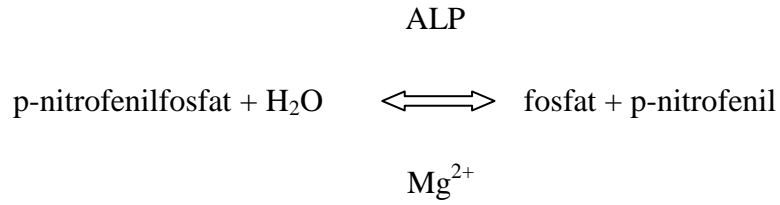




Oksaloasetatın oluşum hızı ve dolayısıyla AST aktivitesindeki artışla direkt orantılı olarak NADH miktarındaki azalma fotometrik olarak ölçülür.

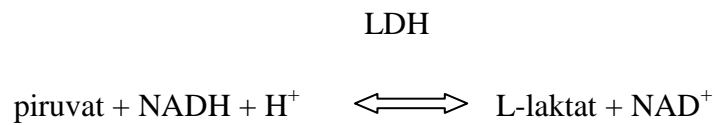
ALP ölçüm prensibi:

p-nitrofenil fosfat, magnezyum ve çinko iyonları varlığında ALP tarafından hidrolize edilir ve ürünler fosfat ile p-nitrofenildir. ALP aktivitesi ile orantılı olarak salınan p-nitrofenil, kolorimetrik olarak ölçülür.



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.



3.2.4. PLAZMA VEGF ÖLÇÜMÜ

VEGF ölçümü için R&D Quantikine Elisa kiti kullanıldı.

Ölçüm Prensipleri:

Ölçüm, kantitatif sandviç enzim immün assay tekniğine dayanmaktadır. Örneklerde bulunan VEGF'nin özgül monoklonal antikora bağlanmasıyla bağlanan miktarı ölçülür.

Örnek hazırlanması:

a. Plazma örneklerinin hazırlanması

Plazma örnekleri, lityum heparinli tüplere alınan kandan hazırlandı. 30 dakika içinde 1000 x g'de 20 dakika santrifüj edilerek süpernatant alındı ve -80°C saklandı.

1. Süpernatant çalışma günü oda ısısında çözünmeye bırakıldı.
2. Kit içerisindeki reaktifler hazırlandı.
3. Tüm örnekler kullanım öncesi oda ısısına getirildi.

b. Ölçüm Yöntemi

1. Açılan mikropate'de kuyucuklara 50 µL assay diluent pipetlendi.
2. Önceden numaralandırılarak belirlenen kuyucuklara 50 µL standart, kontrol ve plazma örnekleri eklendi.
3. Koruyucu strip kapatılan plate 2 saat boyunca shaker'da inkübasyona bırakıldı.

4. İnkübasyon sonunda otomatik plate yıkayıcıda bir kuyucuğa bir seferde 400 μ L yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkandı, plate ters çevrilip kurutma kağıtı ile kurutuldu.
5. Her kuyucuğa 100 μ L VEGF konjugate'ı eklendi.
6. Striple kapatılıp 1 saat daha shaker'da inkübe edildi.
7. Yıkama ve kurutma basamağı 5 kez tekrar edildi.
8. Her kuyucuğa 100 μ L substrat solüsyonu eklenerek karanlıkta 30 dakika inkübe edildi.
9. Her kuyucuğa 100 μ L stop solüsyonu eklenerek reaksiyon durduruldu.
10. 30 dakika içinde mikroplate okuyucuda 450 nm dalga boyunda absorbanlar okundu.

c. Sonucun hesaplanması

Mikroplate okuyucuya bağlı bilgisayar yazılımı ile 4 parametre standart eğrisine göre otomatik olarak hesaplandı.

3.2.5. PLAZMA MMP-2 ÖLÇÜMÜ

MMP-2 ölçümü için R&D Quantikine Elisa kiti kullanıldı.

Ölçüm Prensipleri:

Ölçüm, kantitatif sandviç enzim immün assay tekniğine dayanmaktadır. Örneklerde bulunan MMP-2'nin özgül poliklonal antikora bağlanmasıyla bağlanan miktarı ölçülür.

Örnek hazırlanması:

a.Plazma örneklerinin hazırlanması

Plazma örnekleri, lityum heparinli tüplere alınan kandan hazırlandı. 30 dakika içinde 1000 x g'de 20 dakika santrifüj edilerek süpernatant alındı ve -80°C saklandı.

1. Süpernatant çalışma günü benç üzerinde çözünmeye bırakıldı.
2. Örnek sayısı kadar tüp numaralandırılarak hazırlandı.
3. Plazma örnekleri calibrator diluent ile 1'e 9 hacimde dilüsyon yapılarak kullanıldı.
4. Kit içerisindeki reaktifler hazırlandı.
5. Tüm örnekler kullanım öncesi oda ısısına getirildi.

b.Ölçüm Yöntemi

1. Açılan mikropate'de kuyucuklara 100 µL assay diluent pipetlendi.
2. Önceden numaralandırılarak belirlenen kuyucuklara 50 µL standart, kontrol ve dilüsyonlu plazma örnekleri eklendi.
3. Koruyucu strip kapatılan plate 2 saat boyunca shaker'da inkübasyona bırakıldı.
4. İnkübasyon sonunda otomatik plate yıkayıcıda bir kuyucuğa bir seferde 400 µL yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkandı, plate ters çevrilip kurutma kağıtı ile kurutuldu.
5. Her kuyucuğa 200 µL MMP-2 conjugate'ı eklendi.
6. Strip kapatılıp 2 saat daha shaker'da inkübe edildi.
7. Yıkama ve kurutma basamağı 5 kez tekrar edildi.
8. Her kuyucuğa 200 µL substrat solüsyonu eklenerek karanlıkta 30 dakika inkübe edildi.
9. Her kuyucuğa 50 µL stop solüsyonu eklenerek reaksiyon durduruldu.

10. 30 dakika içinde mikropate okuyucuda 450 nm dalga boyunda absorbanlar okundu.

c. Sonucun hesaplanması

Mikropate okuyucuya bağılı bilgisayar yazılımı ile 5 parametre standart eğrisine göre otomatik olarak hesaplandı.

3.2.6. KARACİĞER DOKUSU MDA ÖLÇÜMÜ

Ölçüm Prensibi:

Yöntem, lipid peroksidasyonu son ürünlerinden olan MDA'nın tiyobarbitürik asit ile verdiği renk reaksiyonuna dayanmaktadır (126).

Örnek hazırlanması:

a.Doku homojenatının hazırlanması

1. Dokular -80°C 'lik derin dondurucudan çıkarıldı ve her biri 1 gram tartıldı
2. Örnek sayısı kadar alınan ve numaralandırılan tüplere konuldu.
3. Tüplere 1 gram doku için 9 mL hacimde olacak şekilde 0,15 N KCl solüsyonundan eklenerek örnekler homojenize edildi.
4. Homojenatlar, $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 5000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.
5. Süpernatantlar alındı ve ölçüm için kullanıldı.

b.Çözeltiler

1. %8,1'lik sodyum dodesil sülfat (SDS): 8,1 gram SDS tartılıp, bir miktar distile suda eritildi ve son hacim 100 mL'ye tamamlandı.
2. %20'lik Asetat Tamponu (pH:3,5): 20 mL asetik asit alındı ve 100 mL'ye tamamlandı. pH, 3,5'e ayarlandı.
3. %0,8'lik Tiyobarbütirik asit (TBA): 0,8 gram TBA tartılıp, bir miktar distile suda eritildi ve son hacim 100 mL'ye tamamlandı.
4. N-butanol/pyridine karışımı: 15/1 hacimleri karıştırılarak kullanılmadan hemen önce hazırlandı.

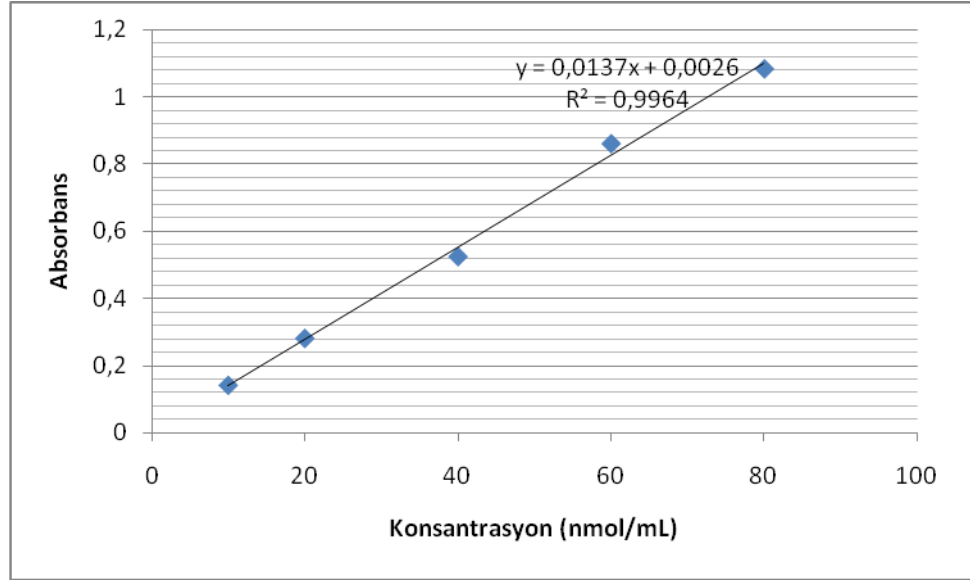
c.Spektrofotometrik ölçüm

1. Kapaklı tüpler alınarak kör tüpü ve örnek tüpleri hazırlandı.
2. Kör tüpüne, 0,2 mL SDS, 1,5 mL asetat tamponu, 1,5 mL TBA ve 0,8 mL distile su; örnek tüplerine 0,4 mL homojenat, 0,2 mL SDS, 1,5 mL asetat tamponu, 1,5 mL TBA ve 0,4 mL distile su eklendi.
3. Tüpler 95⁰C'de 60 dakika inkübasyona bırakıldı ve süre sonunda musluk suyu altında soğutuldu.
4. Soğutulmuş tüplere 1mL distile su ve n-butanol/pyridine karışımından 5'er mL eklenerek vortekslendi.
5. 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Üstteki süpernatant alınarak ölçüm için kullanıldı.
6. Örneklerin absorbansları 532 nm'de köre karşı okundu.

d.Sonucun hesaplanması

1. Örneklerin konsantrasyonlarını hesaplayabilmek için lipid peroksit standardı (1.1.3.3.tetraetoksipropan) 10, 20, 40, 60, 80 nmol/mL konsantrasyonlarda hazırlandı.

- Standart tüplerine 0,2 mL SDS, 1,5 mL asetat tamponu, 1,5 mL TBA ve 0,4 mL distile su konuldu ve farklı konsantrasyonlardaki standarttan 0,4 mL numaralandırılmış tüplere eklendi.
- Kör ve örnek tüplerinde olduğu gibi işlemlerden geçirildi ve 532 nm’de absorbansları okundu.
- Elde edilen absorbanslarla, konsantrasyon değerleri Microsoft Office Excel 2007 programı kullanılarak grafiğe geçirildi ve aşağıdaki standart grafiği elde edildi (Şekil 3.2).
- Örneklerin konsantrasyonları, standart grafiği kullanılarak hesaplandı.
- Aynı homojenatların total proteinleri ölçüldü ve örneklerin konsantrasyonları total proteinlerine oranlandı.
- Sonuçlar, nmol/mg protein olarak verildi.



Şekil 3.2. MDA standart grafiği

3.2.7. KARACİĞER DOKUSU PROTEİN ÖLÇÜMÜ

Ölçüm Prensihi:

Ölçüm, Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının farklı konsantrasyonlardaki protein çözeltilerinde değişik şiddette mavi renk ortaya koymasına dayanan Bradford yöntemine göre yapıldı (19).

Örnek hazırlanması:

a. Doku homojenatının hazırlanması

1. MDA ve Sitokrom c ölçümlerinde kullanılan homojenatlar kullanıldı ve ölçümlerin yapıldığı fraksiyonlarda protein değerleri belirlendi.

b. Çözeltiler

1. Belirteç: 25 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 tartıldı. 12.5 mL %95'lik etanolde çözdürülüp üzerine 25 mL %85'lik H₃PO₄ eklendi. Son hacim distile su ile 250 mL'ye tamamlandı. Bu derişik çözeltilerdir. Kullanılacağı zaman 5 kat sulandırıldı. Whatman no 1 filtreden geçirildikten sonra kullanıldı.

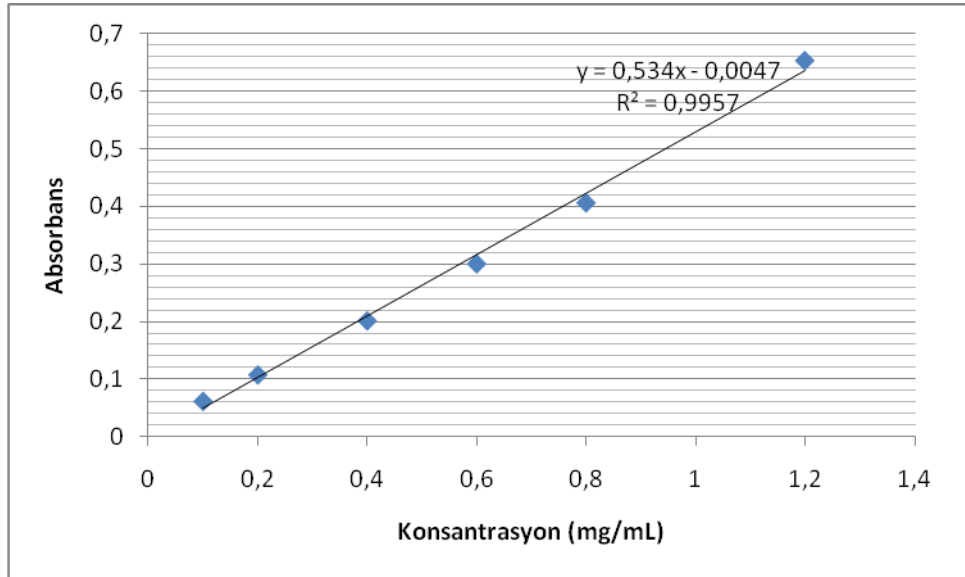
c. Spektrofotometrik ölçüm

1. Kör, örnek ve standart tüpleri hazırlandı.
2. Kör tüpüne 0,1 mL distile su ve 5 mL belirteç eklendi. Örnek tüplerine 0,1 mL homojenat ve 5 mL belirteç eklendi.

3. Tüpler vortekslendikten sonra 5 dakika beklendi ve 595 nm’de absorbanları köre karşı okundu.

d. Sonucun hesaplanması

1. Örnek konsantrasyonlarının hesaplanabilmesi için protein standardı olarak bovine serum albumin (BSA) 0,1, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 ve 1,2 mg/mL konsantrasyonlarda hazırlandı.
2. Belirteçten 5 mL ve farklı konsantrasyonlardaki standarttan 0,1 mL numaralandırılmış standart tüplerine eklendi.
3. Vortekslenen tüpler 5 dakika beledikten sonra 595 nm’de absorbanları okundu.
8. Elde edilen absorbanlarla, konsantrasyon değerleri Microsoft Office Excel 2007 programı kullanılarak grafiğe geçirildi ve aşağıdaki standart grafiği elde edildi (**Şekil 3.3**).
4. Örneklerin konsantrasyonları, standart grafiği kullanılarak hesaplandı.



Şekil 3.3. Protein (BSA) standart grafiği

3.2.8. KARACİĞER DOKUSU SİTOKROM C ÖLÇÜMÜ

Sitokrom c ölçümü için R&D Quantikine Elisa kiti kullanılmıştır.

Ölçüm Prensipleri:

Ölçüm, kantitatif sandviç enzim immün assay tekniğine dayanmaktadır. Örneklerde bulunan sitokrom c'nin özgül monoklonal antikora bağlanmasıyla bağlanan miktarı ölçülür.

Örnek hazırlanması:

Apoptoz esnasında sitokrom c mitokondri membranından sitozole salınır. Çalışmamızda sitozole salınan ve mitokondride kalan sitokrom c miktarlarını tespit edebilmek için öncelikle karaciğer dokusunda mitokondriyal ve sitozolik fraksiyonlar elde edildi (162). Ölçümler her iki fraksiyonun süpernatantları kullanılarak yapıldı.

a. Karaciğer dokusundan mitokondriyal ve sitozolik fraksiyonların hazırlanması

Solüsyonlar:

Buffer A: 20mmol/L HEPES-KOH (pH 7.5), 250mmol/L sükröz, 10mmol/L KCl, 1.5mmol/L MgCl₂, 1mmol/L EDTA, 1mmol/L EGTA, 1mmol/L dithiothreitol, 0,1 mmol/L PMSF, 2µg/mL aprotinin ve 5µg/mL pepstatin içermektedir.

Buffer B: 10mmol/L Tris (pH 8.0), %0,5 Nonidet P-40 ve 5mmol/L CaCl₂ içermektedir.

Mitokondriyal ve sitozolik fraksiyonların hazırlanması:

1. Dokular -80°C derin dondurucudan çıkarıldı ve her biri 0,3 gram tartıldı.
2. 1 gram doku için 9 mL hacim olacak şekilde hesaplanan 2.7 mL Buffer A ile homojenize edildi.
3. Homojenat, $+4^{\circ}\text{C}$ 'de, 800 x g'de 10 dakika santrifüj edildi.
4. Süpernatantlar alınıp yeni tüplere aktarıldı ve $+4^{\circ}\text{C}$ 'de, 8000 x g'de 10 dakika santrifüj edildi.
5. Süpernatant ve pellet ayrıldı.
6. Süpernatantlar ultrasantrifüjde $+4^{\circ}\text{C}$ 'de, 100000 x g'de 1 saat santrifüj edildi.
7. Son süpernatant sitozolik fraksiyon olarak kullanıldı.
8. Bir önceki adımda ayrılan pellet, 1mL Buffer B'de çözündürüldü.
9. 5000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatant mitokondriyal fraksiyon olarak kullanıldı.

b.Ölçüm Yöntemi

1. Kit içerisindeki reaktifler hazırlandı.
2. Süpernatantlar 1/150 oranında distile su ile dilue edildi.
3. Tüm örnekler kullanım öncesi oda ısısına getirildi.
4. Açılan mikropate'de her kuyucuğa 75 μL sitokrom c conjugate pipetlendi.
5. Önceden numaralandırılarak belirlenen kuyucuklara 50 μL standart, kontrol ve dilüsyonlu örnekler eklendi.
6. Koruyucu strip ile kapatılarak oda ısısında 2 saat inkübasyona bırakıldı.
7. İnkübasyon sonunda otomatik plate yıkayıcıda bir kuyucuğa bir seferde 400 μL yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkandı, plate ters çevrilip kurutma kağıdı ile kurutuldu.
8. Her kuyucuğa 100 μL substrat solüsyonu eklendi. Karanlıkta oda ısısında 30 dakika inkübe edildi.

9. Her kuyucuğa 100 µL stop solüsyonu eklenerek reaksiyon durduruldu.
10. 30 dakika içinde mikropate okuyucuda 450 nm dalga boyunda absorbanlar okundu.

c. Sonucun hesaplanması

1. Mikropate okuyucuya bağlı bilgisayar yazılımı ile 4 parametre standart eğrisine göre otomatik olarak hesaplandı.
2. Hesaplanan bu sonuçlar dilüsyon faktörü olan 150 ile çarpıldı.
3. Hem sitozolik hem de mitokondriyal fraksiyonların total proteinleri Bradford yöntemiyle 1/50 dilüsyon yapılarak ölçüldü (131). Son hesaplamada dilüsyon faktörü olan 50 ile çarpılarak protein miktarları belirlendi.
4. Sitolik ve mitokondriyal fraksiyonların 150 ile çarpılan sonuçları, protein miktarlarına oranlanarak bu fraksiyonların sitokrom c oranları ng/mg protein olarak hesaplandı.
5. Sonuçlar, sitozolik fraksiyonun mitokondriyal fraksiyona oranı olarak verildi.

3.2.9. KARACİĞER DOKUSU DNA FRAGMENTASYONU ÖLÇÜMÜ

DNA fragmentasyonu ölçümünde spektrofotometrik bir ölçüm metoduna dayanan difenilamin reaksiyonu (20) kullanılmıştır.

Ölçüm Prensipleri:

Temel olarak DNA'nın hidrolizi esasına dayanır. Açığa çıkan 2-deoksi-riboz'lar dehidrasyonla aldehite dönüştüğünde ortama eklenen difenilamin ile mavi renkli bileşikler oluşur (20). DNA konsantrasyonu arttıkça mavi renk koyulaşır.

Örnek hazırlanması:

a.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, 20mM EDTA, %0,5 Triton X-100, pH 8) eklenerek homojenize edildi.
3. Homojenat, $+4^{\circ}\text{C}$ 'de, 26000 x g'de 25 dakika santrifüj edildi.
4. Süpernatant fragmante DNA içeren kısımdı, dikkatlice alındı ve başka bir tüpe aktarıldı.
5. Pellet ise intact DNA içeren kısımdı.
6. Süpernatantın ve pelletin DNA içerikleri difenilamin reaksiyonu kullanılarak ölçüldü.

b.Çözeltiler

1. 0.5 N Perklorik asit: 43 μL perklorik asit alındı ve distile su ile son hacim 1000 mL'ye tamamlandı.
2. Solüsyon A: 1.5 gram difenilamin, 100mL glasiyel asetik asitte çözüldü. Üzerine 1,5 mL sülfürik asit eklendi. Bu solüsyon karanlıkta saklanır.
3. Solüsyon B: 50mL deiyonize su ile 1mL asetaldehit karıştırılarak hazırlandı. Bu solüsyon taze kullanılır.

c.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.

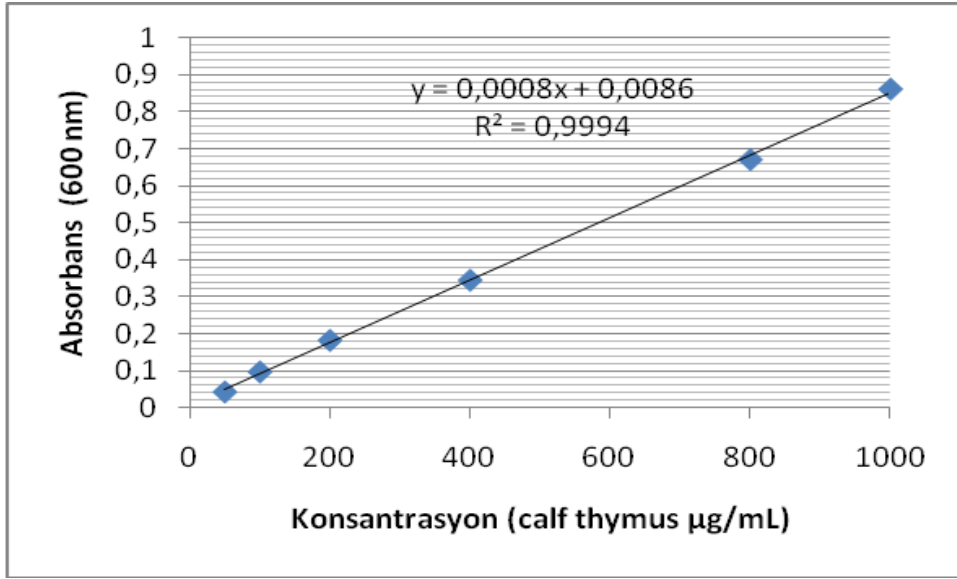
- K r ve örnek tüpleri 90⁰C'de 15 dakika inkübasyona bırakıldı.
 - Inkübasyon sonrası 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.
 - Süpernatanttan 0.75 mL alındı, 0.75 mL Solüsyon A ve 3.75  L Solüsyon B eklendi.
 - Oda ısısında 18 saat inkübasyona bırakıldı. Bu s renin sonunda örneklerin absorbanları 600 nm'de okundu (1, 6, 43, 123).
2. Pelletlerin DNA içeriğinin  l m 
- Numaralandırılan Pelletlerin  zerine 6 mL 0.5 N perklorik asit eklendi.
 - K r olarak 0,5 N perklorik asit kullanıldı
 - K r ve pellet tüpleri 90⁰C'de 15 dakika inkübasyona bırakıldı.
 - Inkübasyon sonrası 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.
 - Süpernatanttan 0.75 mL alındı (1/8 dilüsyon), 0.75 mL Solüsyon A ve 3.75  L Solüsyon B eklendi.

Oda ısısında 18 saat inkübasyona bırakıldı. Bu s renin sonunda örneklerin absorbanları 600 nm'de köre karşı okundu (1, 6, 43, 123).

d.Sonucun hesaplanması

1. Örneklerin konsantrasyonları hesaplayabilmek için DNA standardı (calf thymus) 50, 100, 200, 400, 800 ve 1000  g/mL konsantrasyonlarda hazırlandı .
2. Seri dilüsyon 0,5 N perklorik asit ile yapıldı.
3. 0,5 N perklorik asit eklenen ve farklı konsantrasyonlarda DNA standardı içeren numaralandırılmış standart tüpleri ve 0,5 N perklorik asit içeren k r tüpü, 90⁰C'de 15 dakika inkübasyona bırakıldı.
4. 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.
5. S pernatantlardan 0.75 mL alındı, 0.75 mL Solüsyon A ve 3.75  L Solüsyon B eklendi.
6. Oda ısısında 18 saat inkübasyona bırakıldı. Bu s renin sonunda örneklerin absorbanları k re karşı 600 nm'de okundu.

7. Elde edilen absorbanslarla konsantrasyon değerleri Microsoft Office Excel 2007 programında grafiğe geçirildi (Şekil 3.4).
8. Örneklerin konsantrasyonları grafikten elde edilen doğrunun denklemi kullanılarak hesaplandı.
9. Sonuçlar, süpernatantların pelletlere oranının 100'le çarpımı olarak verildi.



Şekil 3.4. DNA standart grafiği

3.2.10. WESTERN BLOT YÖNTEMİ İLE CYP1A1'İN BELİRLENMESİ

a.Ölçüm Prensibi

Yüklü moleküllerin elektriksel alanda ayrılmaları temeline dayanan elektroforez tekniği proteinlerin ayrılması ve analizinde geniş çapta kullanılır. Elektroforetik ayrımaya (genelde SDS-PAGE) uğrayan proteinler ya doğrudan jel üzerinde ya da sabit bir yüzeye (nitroselüloz ya da naylon membran) aktarıldıktan (emdirildikten) sonra saptanır ve analiz edilirler.

Membrana emdirilen proteinlerin uygun antikorlarla işleme sokularak immünolojik yoldan belirlenmesine Western emdirimi (blotting) denir. Aktarım yapıldıktan sonra saptama işlemine hazır hale getirilmiş membran, önce hedeflenen proteine özgü birincil antikor ile reaksiyona sokulur. Sonra bu antikor da, renkli bir ürün ortaya koyabilen enzim (alkalen fosfataz ya da horseradish peroksidaz gibi) bağlı veya radyoaktif işaretli ikincil antikor ile işleme sokulur. Son aşamada bu immünolojik etkileşim, enzim bağlı ikincil antikor kullanılmışsa enzimatik dönüşüm aracılığıyla, radyoaktif işaretli ikincil antikor kullanılmışsa otoradyografik yöntemle belirlenir (165).

b. Yöntem

- Solüsyonlar

1. Ayırıcı jel solüsyonu (%10'luk)

- TEMED, 9 μ L
- Akrilamid/Bis akrilamid %30, 4mL
- %10 Amonyum persülfat, 0.1mL
- %10 SDS, 0.1mL
- 1.5 M Tris (pH 8.8), 2.5mL
- Distile su

2. Yükleme jeli solüsyonu (%5'lik)

- TEMED, 9 μ L
- Akrilamid/Bis akrilamid %30, 0.67mL
- %10 Amonyum persülfat, 0.04mL
- %10 SDS, 0.04mL
- 1.5 M Tris (pH 6.8), 0.5mL
- Distile su

3. Tank Tamponu

- 5X Tank tamponu için 0.025 M Tris, 0.192 M glisin ve % 0.1 SDS ile hazırlanır ve pH 8.3'e ayarlanır.

4. Aktarıcı solüsyon

- Tris 3.03 g
- Glisin 14.4 g
- Metanol 200 mL
- Distile su

• Hepatik Mikrozm Hazırlama

1. 1 gram doku için 3 mL RIPA lizis buffer kullanılarak dokular +4°C'de homojenize edildi.
2. Homojenatlar, 30 dakika buz içinde inkübe edildi.
3. İnkübasyon sonrası +4°C'de 10 000 x g'de 10 dakika santrifüj edildi.
4. Süpernatant alındı.
5. Tekrar +4°C'de 10 000 x g'de 10 dakika santrifüj edildi.
6. Süpernatant alındı ve berraklaşana kadar santrifüj işlemi devam ettirildi.
7. Son süpernatant ölçüm için kullanıldı.

• Elektroforez yöntemi

1. Dikey elektroforez düzeneği aparatları hazırlandı.
2. Jelin döküleceği kaset, jel dökme bölmesine yerleştirildi. Sızdırmazlığı kontrol edildi.
3. Hazırlanan ayırıcı jel solüsyonu dikey elektroforez düzeneğinin yarısına kadar dolduruldu.
4. Jel solüsyonunun hava ile temasını kesmek için üzerine bidistile su döküldü.

5. Polimerizasyon için 30 dakika beklendi.
6. Polimerizasyondan sonra jelin üzerindeki su kurutma kağıdına emdirilerek uzaklaştırıldı.
7. Hazırlanan toplayıcı jel solüsyonu ayırıcı jelin üzerine döküldü ve uygun genişlikteki tarak bu jele yerleştirildi.
8. Yükleme jelinin polimerizasyonu için 20 dakika beklendi.
9. Polimerizasyondan sonra tarak dikkatlice çıkarıldı.
10. 5 kez sulandırılan 5X Tank tamponu elektrodların temas edebileceği yüksekliğe kadar dolduruldu.
11. Polimerize jellerin bulunduğu kaset, elektroforez aygıtına yerleştirildi.
12. 50 µg lizat alındı ve 2X elektroforez tamponu ile karıştırıldı.
13. Karışım 4 dakika kaynatıldı.
14. Her bir kuyucuğa 25 µL kaynatılan karışım dikkatlice yüklendi.
15. Sistem güç kaynağına bağlandı.
16. Elektroforez, protein yükleme jelindeyken 80 Voltta, ayırıcı jeldeyken 120 Voltta devam ettirildi.

- Transfer yöntemi

Jelde bulunan proteinler nitroselüloz membrana sandviç düzeneği yöntemine göre aktarılarak sandviç oluşturma aparatına yerleştirildi.

1. Nitroselüloz membran, whatman 3 kağıdı ve sünger 30 dakika aktarıcı solüsyon içinde bekletildi.
2. Aktarıcı solüsyon bidistile su ile 1000 mL'ye tamamlandı.
3. Elektroforez sonrası jel, aktarıcı solüsyona alındı.
4. Transfer kasetine sırasıyla sünger, whatman 3, jel, nitroselüloz membran tekrar whatman 3 ve sünger konularak kaset kapatıldı.
5. Kaset mini trans-blot'a yerleştirildi, 30 Volt, 90 Amper'de 18 saat transfer için bekletildi.
6. Süre sonunda nitroselüloz membrana geçiş panceau S boyası ile kontrol edildi. Jel commasie blue ile boyanarak proteinlerin yürümleri gözlemlendi.

7. Boyama işleminden sonra nitroselüloz membran steril bidistile su ile yıkandı ve primer antikor bağlantısı için hazır hale getirildi.
- Antikor ile işaretleme yöntemi
 1. Kuru nitroselüloz membran 5-10 dakika steril bidistile su içerisinde bekletildi.
 2. Transfer yapılan nitroselüloz membran western blot bloker tampon solüsyonunda 1 saat bekletildi.
 3. Bloklama solüsyonu uzaklaştırıldı.
 4. Nitroselüloz membran yıkama solüsyonunda 1 kez 15 dakika ve 2 kez de 5'er dakika süresince yıkandı.
 5. 7,5 µL CYP1A1 primer antikor ile 1.5 mL western blot bloker tamponu karıştırıldı.
 6. Transfer yapılan nitroselüloz membran, primer antikor ve western blot bloker tamponu ile 1 saat boyunca inkübe edildi.
 7. İnkübasyon sonrası membran, yıkama solüsyonunda 1 kez 15 dakika ve 2 kez de 5'er dakika süresince yıkandı.
 8. 3,5 µL sekonder antikor ile 1.5 mL western blot bloker tamponu karıştırıldı ve membran, sekonder antikor ve western blot bloker tamponu ile 1 saat boyunca inkübe edildi.
 9. İnkübasyon sonrası membran, yıkama solüsyonunda 1 kez 15 dakika ve 2 kez de 5'er dakika süresince yıkandı.
 10. Western blotting luminal solüsyonu hazırlandı.
 11. Karanlık film odasında membran üzerine western blotting luminal solüsyonu eklendi ve 1 saat beklendi.
 12. Western blotting luminal solüsyonundan alınan membran, karanlık odada film kasetlerine yerleştirildi ve üzerine film konarak proteinlerin görüntüsü alındı.
 13. Otomatik banyo film sisteminde filmlerin banyosu yapıldı.

14. Filmler, Synegene kemiluminesans görüntüleme cihazına alınarak proteinlerin görüntüleri bilgisayara aktarıldı ve synegene software programı aracılığıyla protein miktarları belirlendi.

3.2.11. KARACİĞER DOKUSU HİSTOLOJİK PREPERATLARIN HAZIRLANMASI

a. Doku Tespiti

Karaciğer dokuları çıkarıldıktan sonra rasgele örnekleme yöntemine göre karaciğerin tüm loblarından kesitler alınarak %10'luk nötral formalin içine bırakıldı ve 24-48 saat formalin içinde bekletildi.

b. Doku Takibi

1. Yıkama:

Dokular, formalin kalıntılarından arındırmak için 1 saat akan çeşme suyunda yıkandı.

2. Dehidratasyon:

Dokular artan derecelerdeki alkol serilerinden geçirildi.

70⁰ alkol, 60 dk.

80⁰ alkol, 60 dk.

90⁰ alkol(I), 60 dk.

90⁰ alkol(II), 60 dk.

96⁰ alkol(I), 60 dk.

96⁰ alkol(II), 75 dk.

Absolü alkol(I), 60 dk.

Absolü alkol(II), 75 dk.

3. Şeffaflaştırma:

Ksilol(I), 30 dk.

Ksilol(II), 30 dk.

Ksilol(III), 30 dk.

4. Parafin infiltrasyonu:

Parafin (I), 30 dk.

Parafin (II), 60 dk.

Parafin (III), 75 dk.

5. Gömme:

Dokular parafin içine gömülerek blok haline getirildi.

c. Kesitlerin Alınması

1. Bloklanmış dokulardan mikrotom ile 4µm kalınlığında kesitler alındı.
2. Kesitler sıcak su banyosuna alınarak (37⁰C) açılmaları sağlandı.
3. Su banyosundan alınan kesitler poly-L-lysinli lamlara alındı.
4. Kesitler, parafinin erimesi için lam taşıma sepeti içinde 60⁰C'lik etüvde 2 saat bekletildi.
5. Kesitler ksilol serilerinden geçirilerek deparafinize edildi.
Ksilol(I), 30 dk.
Ksilol(II), 30 dk.
Ksilol(III), 30 dk.

d. Boyama işleme

Deparafiize işleminden geçirilen kesitler, hisolojik yapının gözlenebilmesi için hematoksilen ve eozin boyama yöntemi uygulandı.

Hematoksilen-Eozin Boyama Yöntemi:

1. Kesitler, hidrasyon için azalan dereceli alkol serisinden geçirildi.
Absolü alkol, 1 dk.
Absolü alkol, 1 dk.
96⁰ alkol(I), 1 dk.
96⁰ alkol(II), 1 dk.
90⁰ alkol, 1 dk.
80⁰ alkol, 1 dk.
60⁰ alkol, 1 dk.
2. Kesitler, 2 dakika akan çeşme suyunda yıkandı.
3. Kesitler, boyama için hematoksilen solüsyonunda 3 dakika bekletildikten sonra tekrar akan çeşme suyunda 2 dakika yıkandı.
4. Kesitler, 1: 99 oranındaki asit (%1 HCl) – alkol (%70) karışımına batırılıp çıkarıldı.
5. Daha sonra 1: 99 oranındaki amonyak (%1 NH₃) – distile su karışımına batırılıp çıkarıldı.
6. Akan çeşme suyunda 2 dk yıkanan kesitler, eozin solüsyonunda 2 dk boyandı.
7. Daha sonra kesitler, artan dereceli alkol serisinden geçirildi.
60⁰ alkol, 1 dk.
80⁰ alkol, 1 dk.
90⁰ alkol, 1 dk.
96⁰ alkol (I), 1 dk.
96⁰ alkol (II), 1 dk.

- Absolü alkol (I), 1 dk.
Absolü alkol (II), 1 dk.
8. Kesitler, ksilolde şeffaflaştırıldı.
Ksilol (I), 1 dk.
Ksilol (II), 1 dk.
Ksilol (III), 1 dk.
9. Kesitler, entellan ile kapatılarak dokunun lam ve lamel arasında hava almadan uzun süre saklanabileceği preparatlar elde edildi.

e. Doku İnceleme ve Görüntüleme

Tüm kesitler Olympus BH-2 marka fotomikroskop ile incelenerek görüntülendi.

3.2.12. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Verilerin istatistiksel değerlendirilmesinde PASW 18.0 istatistik paket programı kullanıldı. Grupların varyans analizi One-Way Anova ile yapıldı. Çoklu karşılaştırmalarda LSD testi kullanıldı. Parametrik verilerin normal dağılıp dağılmadığı Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro-Wilk testleri kullanılarak değerlendirildi. Parametrik veriler, ortalama±standart sapma (SD, standard deviation) olarak verildi. Non-parametrik veriler Kruskal Wallis ile test edildi ve sonuçlar median ile %25-%75 persentil olarak verildi. $p < 0,05$, istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

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

4.1. SERUM ALT BULGUSU

Serum ALT değerleri bakımından 30.gün örneklerinde grup 3 ve 4'ün ALT değerleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak çok önemli düzeyde azalmıştı ($p<0,01$). 60. gün örneklerinde kontrol grubuna göre grup 3'de önemli düzeyde azalma ($p<0,05$), grup 4, 5 ve 6'da çok önemli düzeyde azalma ($p<0,01$) belirlendi. 90. gün örneklerinde kontrol grubuna göre grup 3'de önemli düzeyde azalma ($p<0,05$) ve grup 6'da çok önemli düzeyde azalma ($p<0,01$) gözlemlendi (**Tablo 4.1 ve Şekil 4.1**).

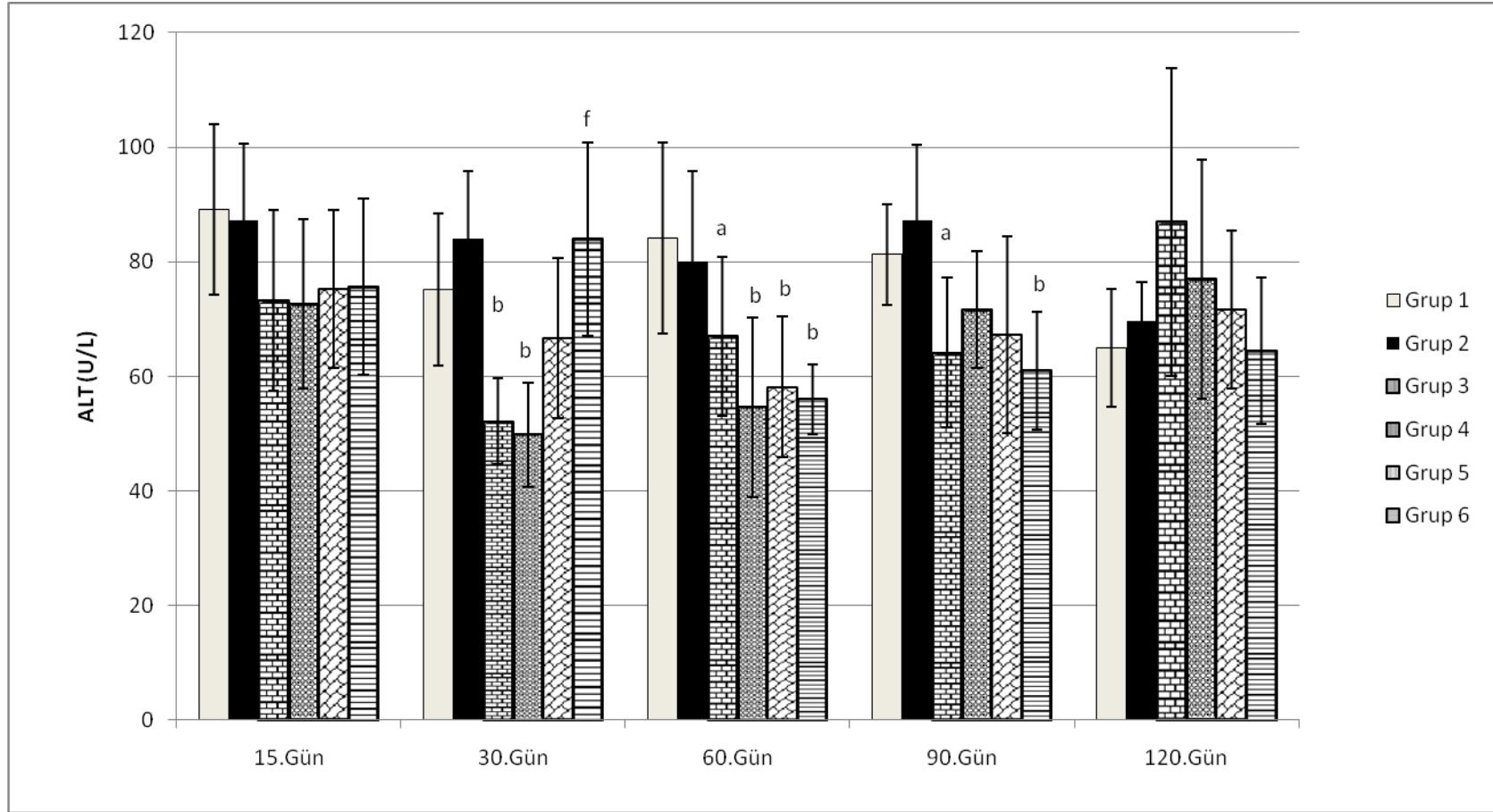
4.2. SERUM AST BULGUSU

Serum AST değerleri bakımından 90. gün örneklerinde kontrol grubuna göre grup 3'de ileri derecede önemli artış ($p<0,001$) ve grup 4'te çok önemli artış ($p<0,01$) gözlenirken grup 3'e göre grup 4'de çok önemli azalma ($p<0,01$), 5 ve 6'da ileri derecede önemli azalma ($p<0,001$) gözlemlendi. 120. gün örneklerinde ise kontrol grubuna göre grup 3'de ileri derecede önemli artış ($p<0,001$), 4, 5 ve 6'da önemli düzeyde artış ($p<0,05$) gözlenirken grup 3'e göre grup 4, 5, ve 6'da ileri derecede önemli azalma ($p<0,001$) gözlemlendi (**Tablo 4.2 ve Şekil 4.2**).

Tablo 4.1: Kontrol ve deney gruplarının 15., 30., 60., 90. ve 120. güne ait serum ALT değerleri ve istatistiksel değerlendirmesi

GRUPLAR	n	ALT (U/L)				
		15.GÜN (n=6)	30.GÜN (n=6)	60.GÜN (n=6)	90.GÜN (n=6)	120.GÜN (n=6)
1.Kontrol	30	89,16±14,81	75,16±13,31	84,16±16,66	81,83±8,79	65,00±10,21
2.M. Yağı Kontrol	30	87,16±13,48	84,00±11,86 ^{###}	80,00±15,81	87,33±13,00 ^{##}	69,66±6,71
3.DAB+TCDD	30	73,33±15,79	52,16±7,49 ^{**}	67,00±13,89 [*]	64,16±13,04 [*]	87,00±26,87
4.DAB+TCDD+IP6	30	72,66±14,77	49,83±9,13 ^{**}	54,66±15,68 ^{**}	71,66±10,13	77,00±20,92
5.DAB+TCDD+RA	30	75,33±13,77	66,66±13,93	58,16±12,31 ^{**}	67,33±17,21	71,66±13,82
6.DAB+TCDD+IP6 +RA	30	75,66±15,37	84,00±16,85 ^{###}	56,00±6,00 ^{**}	61,00±10,29 ^{**}	64,50±12,80

Her bir grubun değeri ortalama ± standart sapma (SD) olarak verildi. *; kontrole göre fark #; Grup 3'e göre fark
*; p<0,05, **; p<0,01, ***; p<0,001 #; p<0,05, ##; p<0,01, ###; p<0,001

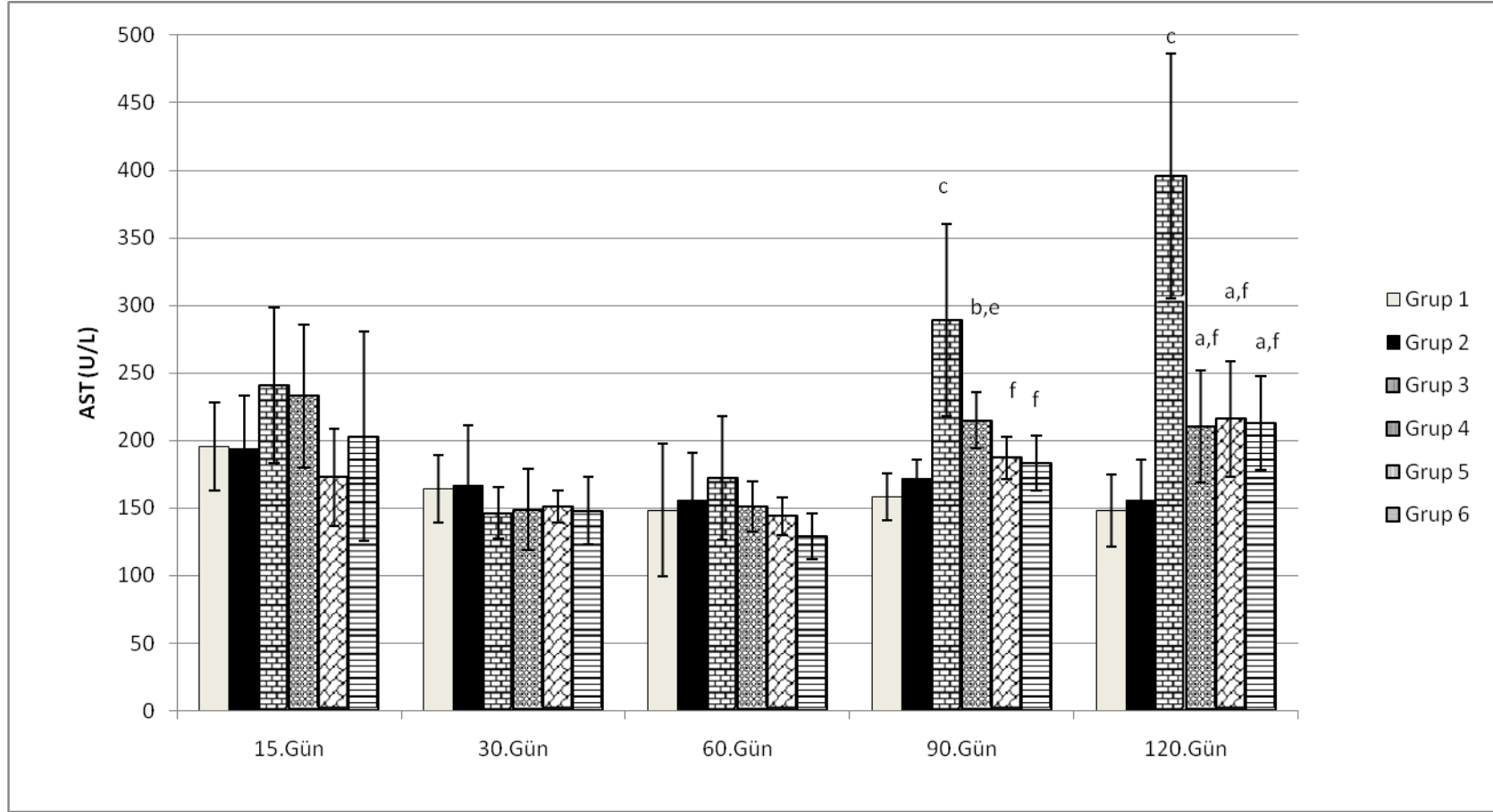


Şekil 4.1. Kontrol ve deney gruplarının 15., 30., 60., 90. ve 120. güne ait ALT değerleri. Kontrole göre fark: a; $p < 0,05$, b; $p < 0,01$, c; $p < 0,001$. Grup 3'e göre fark: d; $p < 0,05$, e; $p < 0,01$, f; $p < 0,001$

Tablo 4.2. Kontrol ve deney gruplarının 15., 30., 60., 90. ve 120. güne ait serum AST değerleri ve istatistiksel değerlendirmesi

GRUPLAR	n	AST (U/L)				
		15.GÜN (n=6)	30.GÜN (n=6)	60.GÜN (n=6)	90.GÜN (n=6)	120.GÜN (n=6)
1.Kontrol	30	195,33±32,70	164,16±24,82	148,16±49,12	158,16±17,61	148,16±26,36
2.M. Yağı Kontrol	30	194,16±38,90	167,16±44,03	155,33±35,71	171,83±14,37 ^{###}	155,50±30,44 ^{###}
3.DAB+TCDD	30	241,83±57,52	146,16±19,19	172,50±45,73	289,00±70,83 ^{***}	395,83±90,98 ^{***}
4.DAB+TCDD+IP6	30	232,83±52,84	148,83±29,96	151,16±18,28	215,00±20,96 ^{**.#}	210,33±41,39 ^{*,###}
5.DAB+TCDD+RA	30	172,66±35,80	151,16±11,60	144,16±14,06	187,16±15,56 ^{###}	216,16±42,73 ^{*,###}
6.DAB+TCDD+IP6 +RA	30	202,83±77,51	148,00±25,23	129,00±17,00	183,33±20,16 ^{###}	212,66±34,66 ^{*,###}

Her bir grubun değeri ortalama ± standart sapma (SD) olarak verildi. *: kontrole göre fark [#]; Grup 3'e göre fark
*: p<0,05, **: p<0,01, ***: p<0,001 [#]; p<0,05, ^{##}; p<0,01, ^{###}; p<0,001



Şekil 4.2. Kontrol ve deney gruplarının 15., 30., 60., 90. ve 120. güne ait AST değerleri. Kontrolle göre fark: a; $p<0,05$, b; $p<0,01$, c; $p<0,001$. Grup 3'e göre fark: d; $p<0,05$, e; $p<0,01$, f; $p<0,001$

4.3.SERUM ALP BULGUSU

Serum ALP değerleri bakımından 15. gün örneklerinde kontrol grubuna göre grup 4'te önemli düzeyde azalma ($p<0,05$) ve grup 6'da ileri derecede önemli artış ($p<0,001$) gözlenirken grup 3'e göre grup 5'de çok önemli düzeyde artış ($p<0,01$), grup 6'da ileri derecede önemli artış ($p<0,001$) gözlendi. 30. gün örneklerinde kontrol grubuna göre grup 3'de önemli artış ($p<0,05$), 5 ve 6'da çok önemli artış ($p<0,01$) belirlendi. 60. gün örneklerinde kontrol grubuna göre grup 5 ve 6'da çok önemli düzeyde artış ($p<0,01$), grup 3'e göre grup 5'de önemli düzeyde artış ($p<0,05$) ve grup 6'da çok önemli düzeyde artış ($p<0,01$) belirlendi. 90. gün örneklerinde kontrol grubuna göre grup 4'de önemli düzeyde artış ($p<0,05$) ve grup 5'te çok önemli düzeyde artış ($p<0,01$) gözlenirken grup 3'e göre de grup 4 ve 5'de çok önemli düzeyde artış ($p<0,01$) gözlendi. 120.gün örneklerinde ise grup 5 ve 6'da önemli düzeyde artış ($p<0,05$) belirlendi (**Tablo 4.3 ve şekil 4.3**).

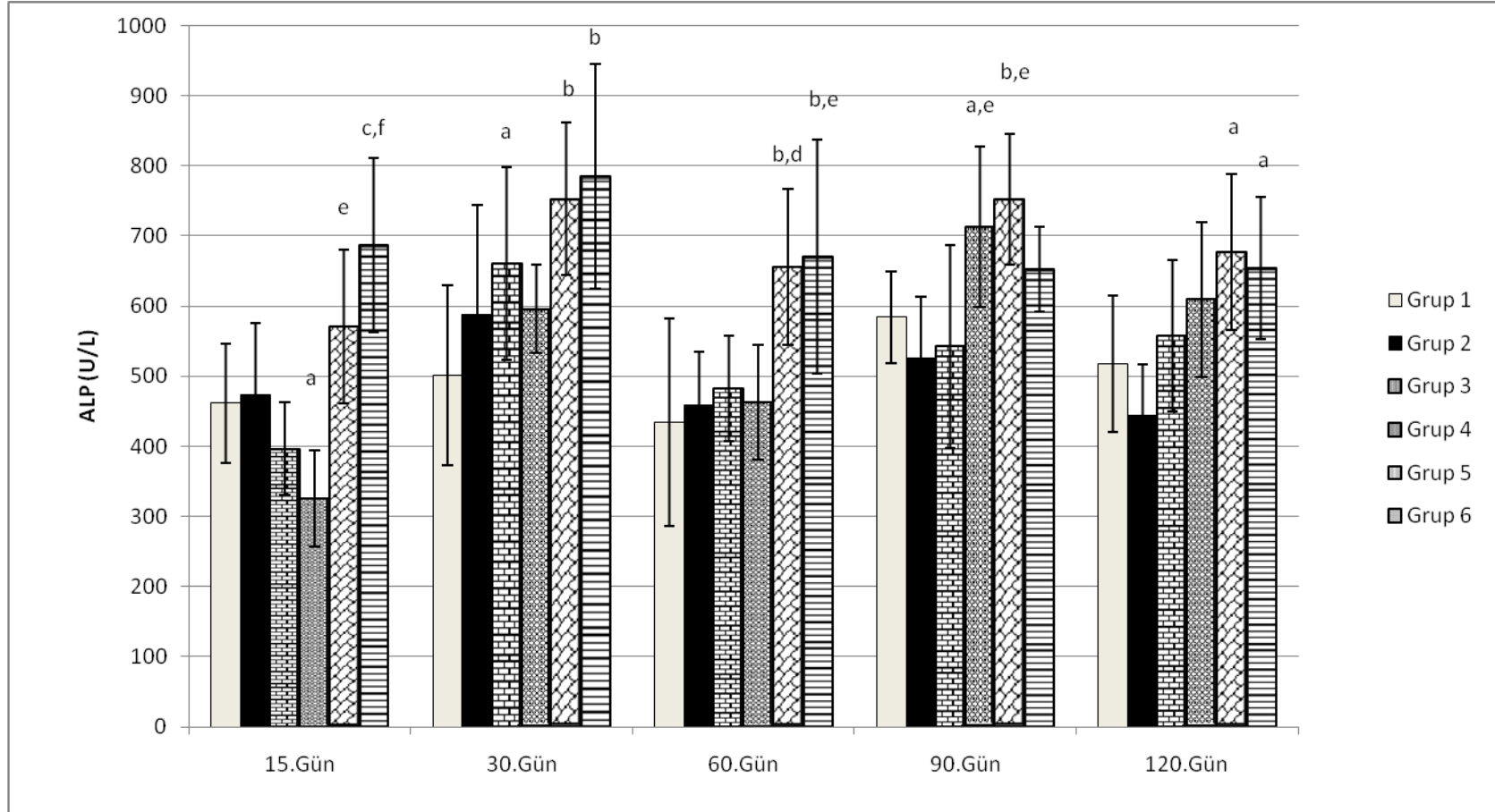
4.4.SERUM LDH BULGUSU

Serum LDH değerleri bakımından kontrol grubuna göre 15.gün örneklerinde grup 4'te önemli düzeyde artış ($p<0,05$) belirlenirken, 30.gün örneklerinde grup 3 ve 6'da ileri derecede önemli azalma ($p<0,001$), grup 4 ve 5'de çok önemli düzeyde azalma ($p<0,01$) belirlendi. 90. gün örneklerinde kontrol grubuna göre grup 3, 4 ve 6'da ileri derecede önemli azalma ($p<0,001$) ve grup 5'te çok önemli düzeyde azalma ($p<0,01$) gözlendi. 120. gün örneklerinde ise kontrol grubuna göre grup 3, 4 ve 6'da ileri derecede önemli azalma ($p<0,001$) ve grup 5'te önemli düzeyde azalma ($p<0,05$) belirlendi (**Tablo 4.4 ve şekil 4.4**).

Tablo 4.3. Kontrol ve deney gruplarının 15., 30., 60., 90. ve 120. güne ait serum ALP değerleri ve istatistiksel değerlendirmesi

GRUPLAR	n	ALP (U/L)				
		15.GÜN (n=6)	30.GÜN (n=6)	60.GÜN (n=6)	90.GÜN (n=6)	120.GÜN (n=6)
1.Kontrol	30	461,16±84,39	500,83±128,67	434,33±147,60	583,33±64,64	517,16±97,16
2.M. Yağı Kontrol	30	474,50±102,99	587,16±157,08	458,00±76,36	526,16±86,42	443,33±73,36
3.DAB+TCDD	30	396,50±65,58	661,00±137,05*	482,33±75,06	542,16±144,11	557,83±108,44
4.DAB+TCDD+IP6	30	325,66±68,32*	596,00±62,50	462,33±82,09	712,66±114,24* ^{##}	609,33±109,86
5.DAB+TCDD+RA	30	570,66±109,21 ^{##}	752,66±108,39**	655,16±110,95** [#]	751,66±93,32** ^{##}	677,00±111,66*
6.DAB+TCDD+IP6+RA	30	686,33±124,30*** ^{###}	784,33±160,01**	670,83±166,42** ^{##}	652,16±60,54	654,50±101,11*

Her bir grubun değeri ortalama ± standart sapma (SD) olarak verildi. *; kontrole göre fark [#]; Grup 3'e göre fark
*, p<0,05, **, p<0,01, ***; p<0,001 [#]; p<0,05, ^{##}; p<0,01, ^{###}; p<0,001

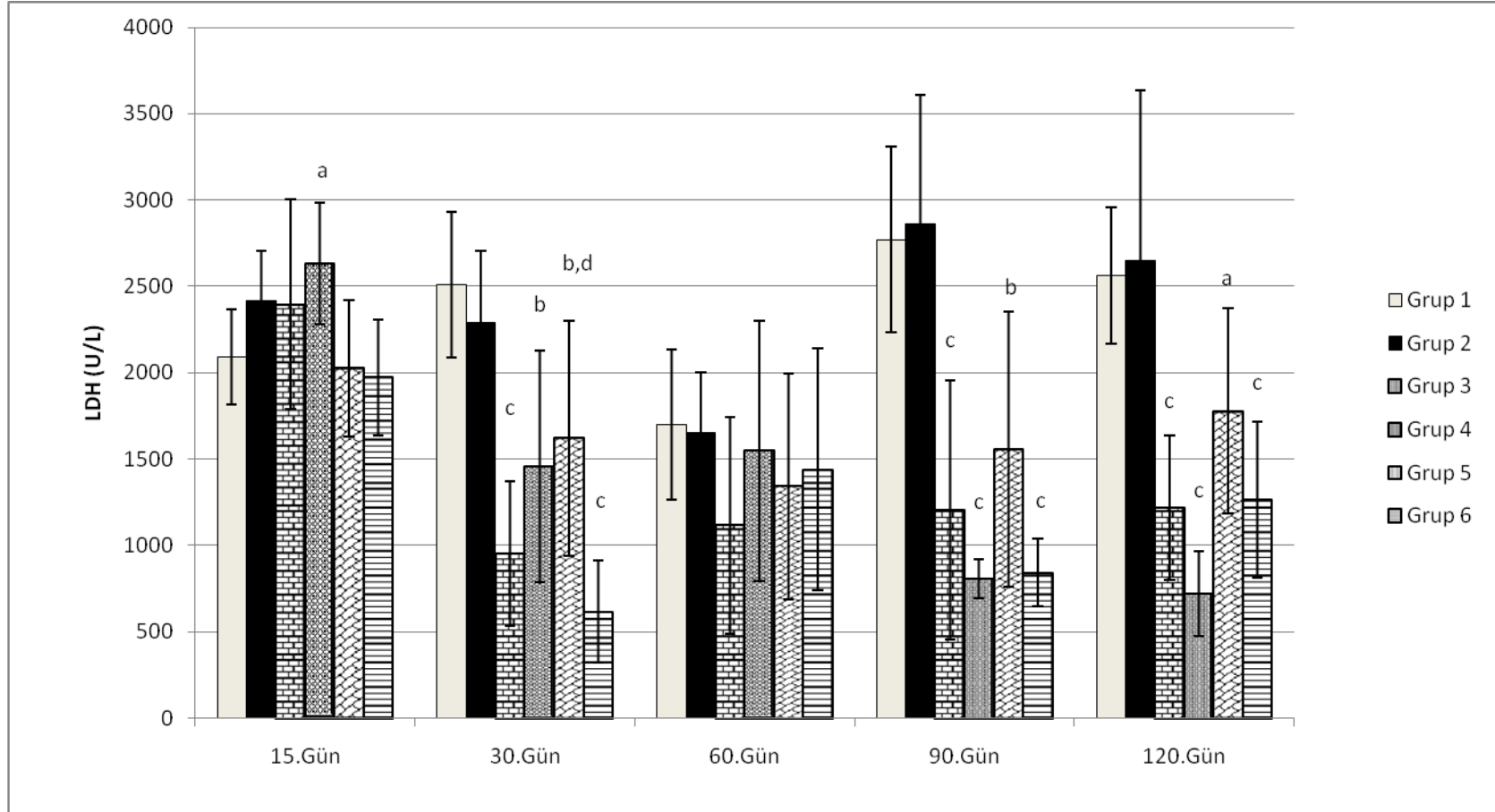


Şekil 4.3. Kontrol ve deney gruplarının 15.,30.,60.,90. ve 120. güne ait ALP değerleri. Kontrole göre fark: a; $p<0,05$, b; $p<0,01$, c; $p<0,001$. Grup 3'e göre fark: d; $p<0,05$, e; $p<0,01$, f; $p<0,001$

Tablo 4.4. Kontrol ve deney gruplarının 15., 30., 60., 90. ve 120. güne ait serum LDH değerleri ve istatistiksel değerlendirmesi

GRUPLAR	n	LDH (U/L)				
		15.GÜN (n=6)	30.GÜN (n=6)	60.GÜN (n=6)	90.GÜN (n=6)	120.GÜN (n=6)
1.Kontrol	30	2089,83±275,37	2507,83±421,59	1700,16±432,34	2771,33±535,88	2561,33±396,52
2.M. Yağı Kontrol	30	2419,50±284,64	2288,16±416,90 ^{##}	1653,00±350,99	2858,50±751,42 ^{###}	2648,50±987,38 ^{###}
3.DAB+TCDD	30	2395,66±608,88	951,83±417,67 ^{***}	1116,83±629,39	1205,50±752,17 ^{***}	1220,66±418,43 ^{***}
4.DAB+TCDD+IP6	30	2631,00±352,30*	1455,83±670,44 ^{**}	1547,33±751,47	808,50±114,53 ^{***}	721,50±243,68 ^{***}
5.DAB+TCDD+RA	30	2025,83±393,75	1621,66±681,85 ^{**,#}	1341,50±655,71	1557,33±796,31 ^{**}	1779,16±592,28*
6.DAB+TCDD+IP6+RA	30	1972,66±332,48	616,83±296,75 ^{***}	1439,00±701,16	842,33±195,03 ^{***}	1265,83±451,45 ^{***}

Her bir grubun değeri ortalama ± standart sapma (SD) olarak verildi. *: kontrole göre fark #; Grup 3'e göre fark
*: p<0,05, **: p<0,01, ***; p<0,001 #; p<0,05, ##; p<0,01, ###; p<0,001



Şekil 4.4. Kontrol ve deney gruplarının 15.,30.,60.,90. ve 120. güne ait LDH değerleri. Kontrole göre fark: a; $p<0,05$, b; $p<0,01$, c; $p<0,001$. Grup 3'e göre fark: d; $p<0,05$, e; $p<0,01$, f; $p<0,001$

4.5. PLAZMA VEGF BULGUSU

Plazma VEGF değerleri bakımından 15. gün örneklerinde kontrol grubuna göre grup 3'de önemli düzeyde artış (p<0,05) ve grup 6'da çok önemli düzeyde artış (p<0,01) belirlendi. 30. gün örneklerinde kontrol grubuna göre grup 6'da çok önemli düzeyde artış (p<0,01) gözlendi. 60. gün örneklerinde kontrol grubuna göre grup 6'da önemli düzeyde artış (p<0,05) ve grup 3'te ileri derecede önemli artış (p<0,001) gözlenirken, grup 3'e göre grup 4'de ileri derecede önemli azalma (p<0,001), grup 5'de çok önemli azalma (p<0,01) ve grup 6'da önemli düzeyde azalma (p<0,05) gözlendi. 90. gün örneklerinde kontrol grubuna göre grup 3'te çok önemli düzeyde artış (p<0,01) belirlenirken, grup 3'e göre grup 4'de çok önemli düzeyde azalma (p<0,01) ve grup 5'de önemli düzeyde azalma (p<0,05) belirlendi. 120. gün örneklerinde kontrol grubuna göre grup 3'de ileri derecede önemli artış (p<0,001), grup 5 ve 6'da çok önemli düzeyde artış (p<0,01), gözlenirken grup 3'e göre grup 4'de ileri derecede önemli azalma (p<0,001), grup 5 ve 6'da çok önemli düzeyde azalma (p<0,01) gözlendi (**Tablo 4.5 ve Şekil 4.5**).

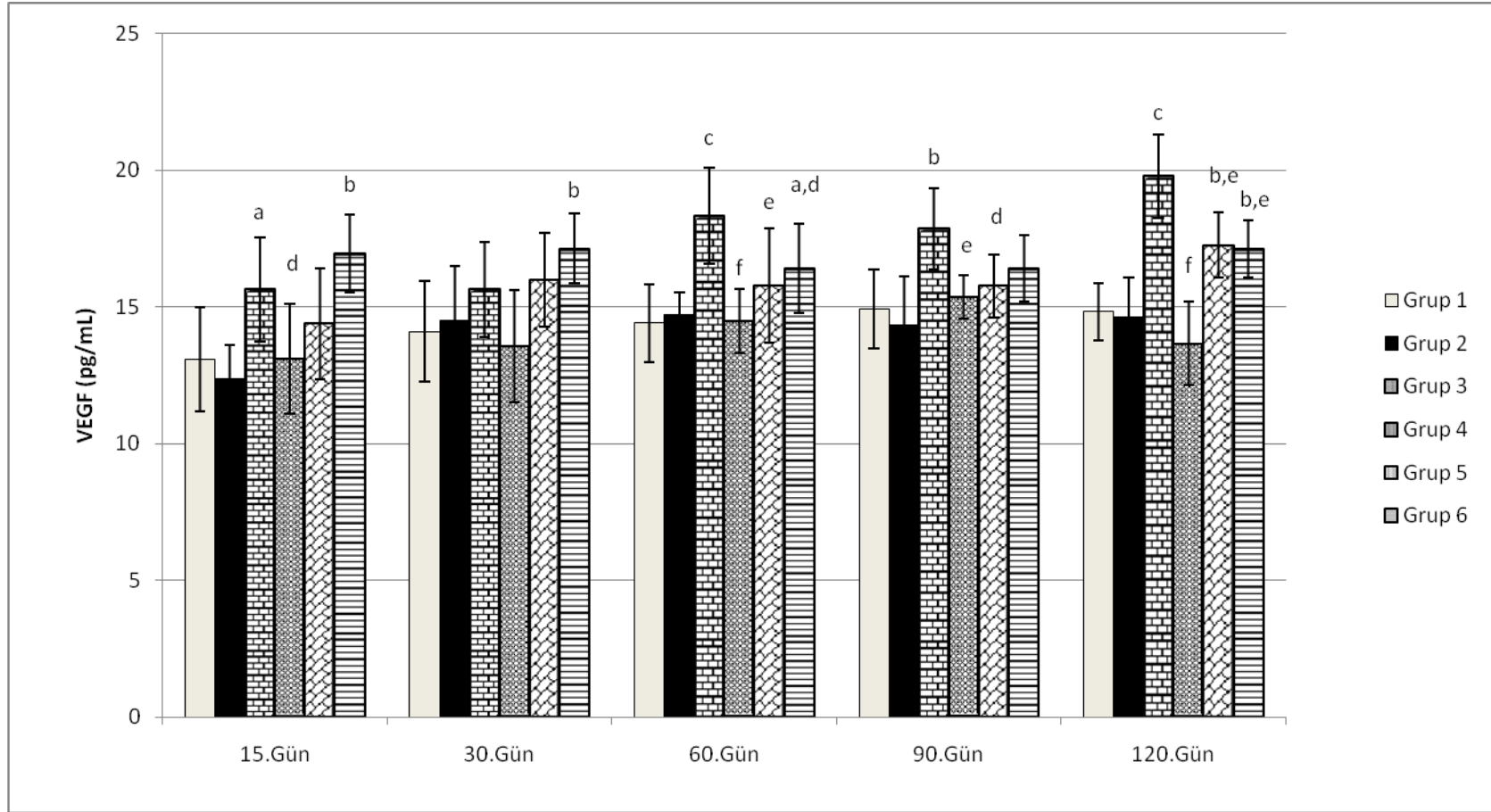
4.6. PLAZMA MMP2 BULGUSU

Plazma MMP2 değerleri bakımından 15. ve 30. gün örneklerinde gruplar arasında fark yoktu. 60. gün örneklerinde kontrol grubuna göre grup 6'da önemli düzeyde azalma (p<0,05), grup 3'e göre grup 5'de önemli düzeyde artış (p<0,05) belirlendi. 90. gün örneklerinde kontrol grubuna göre grup 3'de ileri derecede önemli artış (p<0,001), grup 4 ve 5'te önemli düzeyde artış (p<0,05) belirlenirken, grup 3'e göre grup 6'da ise çok önemli düzeyde azalma (p<0,01) belirlendi. 120. gün örneklerinde kontrol grubuna göre grup 3, 4, 5 ve 6'da ileri derecede önemli artış (p<0,001) gözlenirken, grup 3'e göre grup 4, 5 ve 6'da ileri derecede önemli azalma (p<0,001) gözlendi (**Tablo 4.6 ve Şekil 4.6**).

Tablo 4.5. Kontrol ve deney gruplarının 15., 30., 60., 90. ve 120. güne ait plazma VEGF değerleri ve istatistiksel değerlendirmesi

GRUPLAR	n	VEGF (pg/mL)				
		15.GÜN (n=6)	30.GÜN (n=6)	60.GÜN (n=6)	90.GÜN (n=6)	120.GÜN (n=6)
1.Kontrol	30	13,06±1,90	14,10±1,83	14,40±1,44	14,93±1,45	14,84±1,05
2.M. Yağı Kontrol	30	12,36±1,24 ^{##}	14,49±1,97	14,70±0,82 ^{###}	14,35±1,76 ^{###}	14,62±1,45 ^{###}
3.DAB+TCDD	30	15,64±1,91*	15,64±1,73	18,34±1,75***	17,86±1,47**	19,79±1,53***
4.DAB+TCDD+IP6	30	13,10±2,02 [#]	13,55±2,05	14,48±1,15 ^{###}	15,36±0,80 ^{##}	13,66±1,53 ^{###}
5.DAB+TCDD+RA	30	14,38±2,03	16,00±1,72	15,79±2,09 ^{##}	15,77±1,17 [#]	17,26±1,19 ^{**.} #
6.DAB+TCDD+IP6 +RA	30	16,95±1,41**	17,14±1,29**	16,40±1,64 ^{*.#}	16,41±1,22	17,12±1,03 ^{**.} #

Her bir grubun değeri ortalama ± standart sapma (SD) olarak verildi. *; kontrole göre fark [#]; Grup 3'e göre fark
*; p<0,05, **; p<0,01, ***; p<0,001 [#]; p<0,05, ^{##}; p<0,01, ^{###}; p<0,001

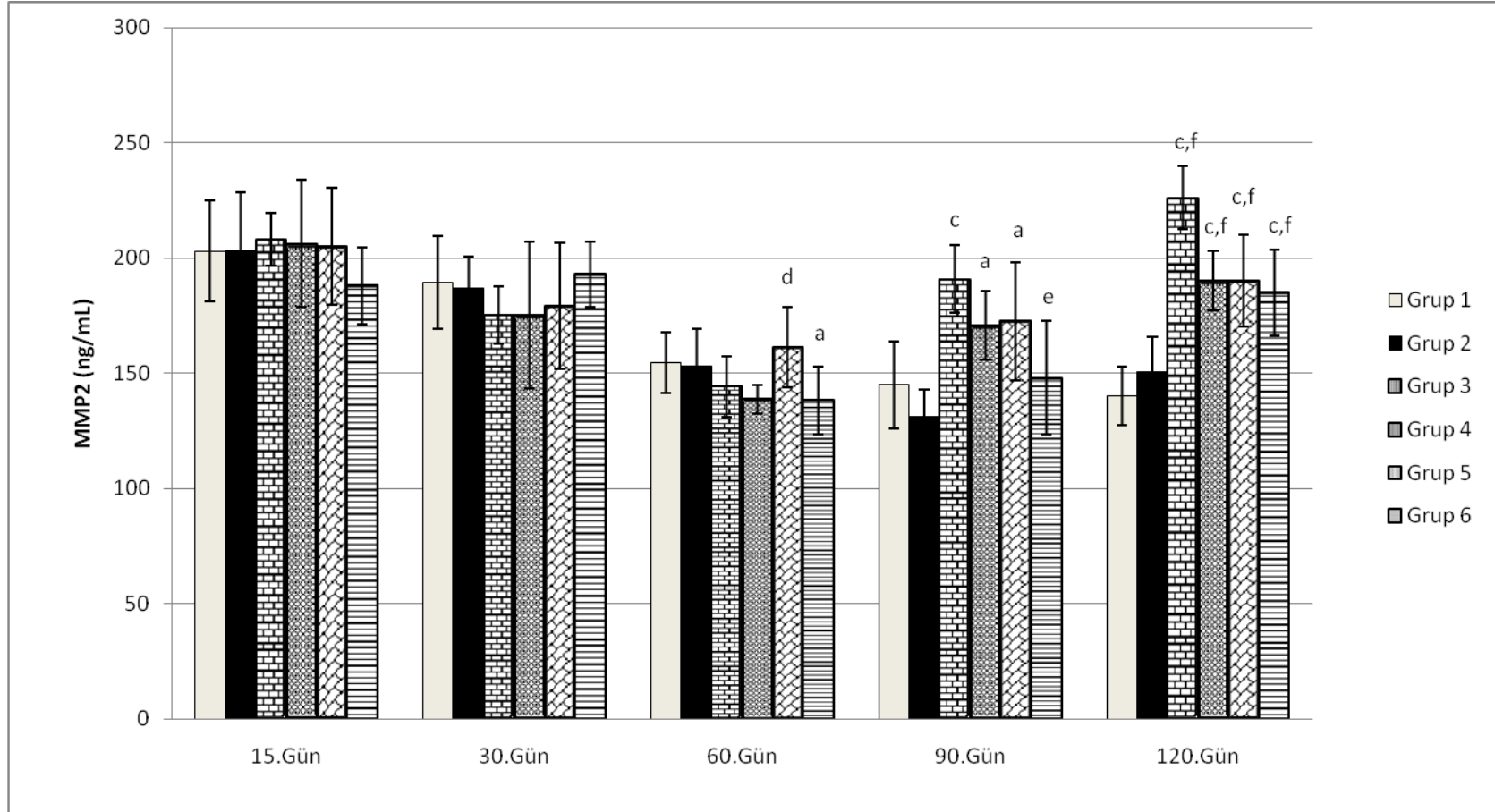


Şekil 4.5. Kontrol ve deney gruplarının 15.,30.,60.,90. ve 120. güne ait VEGF değerleri. Kontrole göre fark: a; $p<0,05$, b; $p<0,01$, c; $p<0,001$. Grup 3'e göre fark: d; $p<0,05$, e; $p<0,01$, f; $p<0,001$

Tablo 4.6. Kontrol ve deney gruplarının 15., 30., 60., 90. ve 120. güne ait plazma MMP-2 değerleri ve istatistiksel değerlendirmesi

GRUPLAR	n	MMP-2 (ng/mL)				
		15.GÜN (n=6)	30.GÜN (n=6)	60.GÜN (n=6)	90.GÜN (n=6)	120.GÜN (n=6)
1.Kontrol	30	203,06±21,89	189,33±20,18	154,60±13,17	144,91±18,84	140,16±12,60
2.M. Yağı Kontrol	30	203,25±25,09	186,83±13,90	153,16±15,98	131,03±11,93 ^{###}	150,50±15,33 ^{###}
3.DAB+TCDD	30	208,16±11,54	175,28±12,46	144,16±13,07	190,90±14,80 ^{***}	226,16±13,70 ^{***}
4.DAB+TCDD+IP6	30	206,25±27,50	175,13±31,81	138,78±6,18	170,66±14,94 [*]	190,16±13,04 ^{***,###}
5.DAB+TCDD+RA	30	205,18±25,54	179,13±27,43	161,31±17,28 [#]	172,50±25,41 [*]	190,26±20,04 ^{***,###}
6.DAB+TCDD+IP6+RA	30	187,95±16,76	193,00±14,14	138,16±14,63 [*]	148,10±24,79 ^{##}	185,00±18,62 ^{***,###}

Her bir grubun değeri ortalama ± standart sapma (SD) olarak verildi. *; kontrole göre fark #; Grup 3'e göre fark
*; p<0,05, **; p<0,01, ***; p<0,001 #; p<0,05, ##; p<0,01, ###; p<0,001



Şekil 4.6. Kontrol ve deney gruplarının 15.,30.,60.,90. ve 120. güne ait MMP-2 değerleri. Kontrole göre fark: a; p<0,05, b; p<0,01, c; p<0,001. Grup 3'e göre fark: d; p<0,05, e; p<0,01, f; p<0,001

4.7. KARACIĞER DOKUSU MDA BULGUSU

Karaciğer dokusu MDA değerleri bakımından 15. gün örneklerinde gruplar arasında fark yoktu. 30. gün örneklerinde kontrol grubuna göre grup 5'te önemli düzeyde azalma ($p<0,05$) gözlenirken, grup 3'e göre de grup 5'de çok önemli düzeyde azalma ($p<0,01$) gözlemlendi. 60. gün örneklerinde kontrol grubuna göre grup 3'te önemli düzeyde artış ($p<0,05$), grup 4'de önemli düzeyde azalma ($p<0,05$), grup 5 ve 6'da ileri derecede önemli azalma ($p<0,001$) belirlendi. 60. gün örneklerinde grup 3'e göre grup 4, 5 ve 6'da yine ileri derecede önemli azalma ($p<0,001$) mevcuttu. 90. gün örneklerinde kontrol grubuna göre grup 3'te önemli düzeyde artış ($p<0,05$), grup 4 ve 6'da çok önemli düzeyde azalma ($p<0,01$) gözlenirken, grup 3'e göre grup 4 ve 6'da ileri derecede önemli azalma ($p<0,001$) ve grup 5'de önemli düzeyde azalma ($p<0,05$) gözlemlendi. 120. gün örneklerinde kontrol grubuna göre grup 3'te çok önemli düzeyde artış ($p<0,01$) mevcuttu. Kontrol grubuna göre grup 4'de çok önemli düzeyde azalma ($p<0,01$), grup 5 ve 6'da ileri derecede önemli azalma ($p<0,001$) gözlenirken, grup 3'e göre de grup 4, 5, ve 6'da ileri derecede önemli azalma ($p<0,001$) gözlemlendi (**Tablo 4.7** ve **Şekil 4.7**).

4.8. KARACIĞER DOKUSU SİTOKROM C BULGUSU

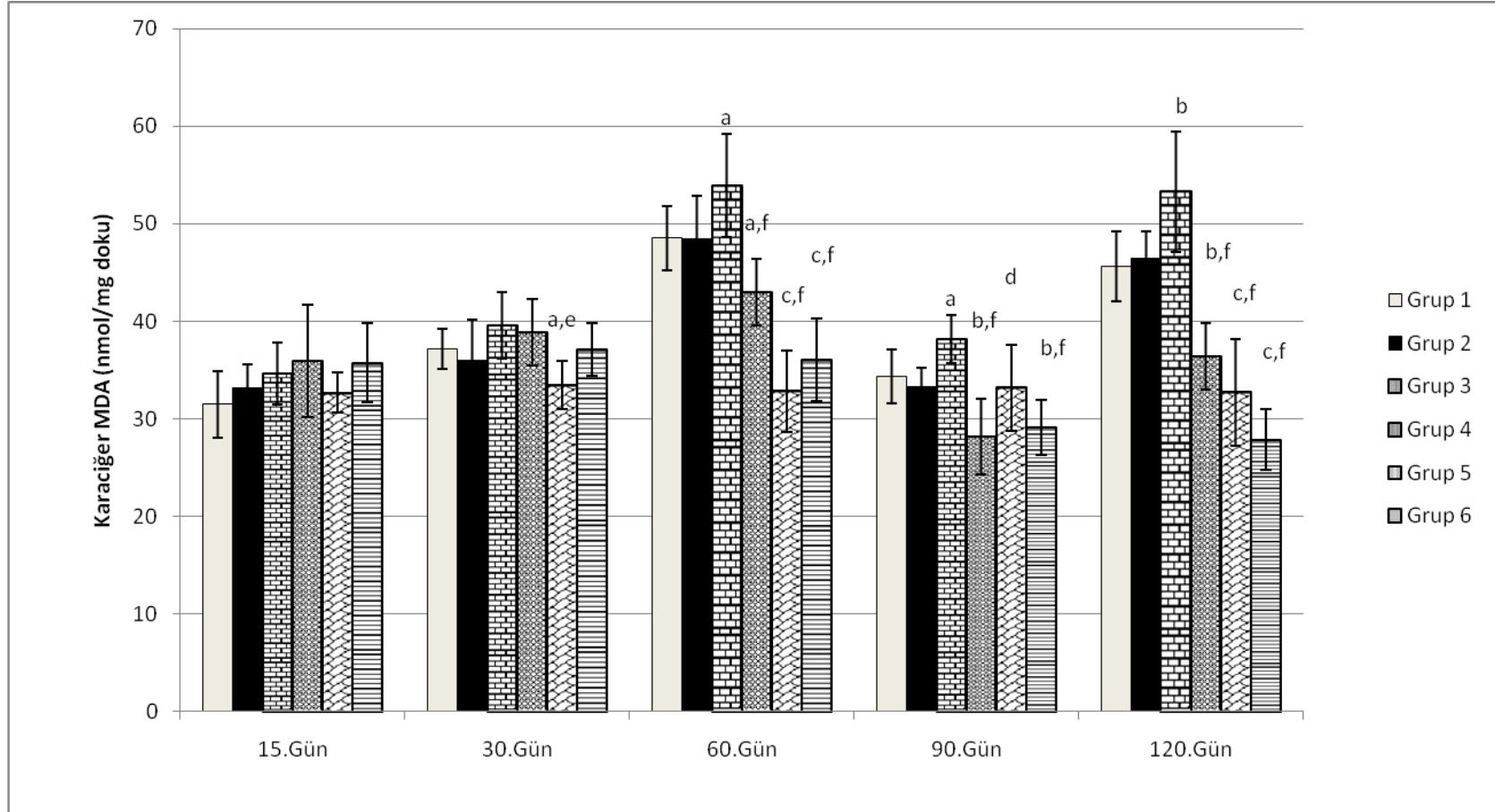
Karaciğer dokusu sitokrom c değerleri bakımından 15. gün örneklerinde gruplar arasında fark yoktu. 30. gün örneklerinde kontrol grubuna göre grup 3, 4, 5 ve 6'da ileri derecede önemli artış ($p<0,001$) belirlendi. Grup 3'e göre değerlendirildiğinde ise grup 4'de çok önemli düzeyde artış ($p<0,01$), grup 5 ve 6'da ileri derecede önemli artış ($p<0,001$) belirlendi. 60. gün örneklerinde kontrol grubuna göre grup 3'te önemli düzeyde azalma ($p<0,05$), grup 4, 5 ve 6'da ileri derecede önemli artış ($p<0,001$) gözlenirken, grup 3'e göre grup 4, 5, ve 6'da ileri derecede önemli artış ($p<0,001$) gözlemlendi. 90. gün örneklerinde kontrol grubuna göre grup 3'te çok önemli düzeyde azalma ($p<0,01$), grup 4, 5 ve 6'da ileri derecede önemli artış ($p<0,001$) mevcutken

grup 3'e göre grup 4, 5, ve 6'da ileri derecede önemli artış ($p<0,001$) vardı. 120. gün örneklerinde grup 3'te çok önemli düzeyde azalma ($p<0,01$), grup 4, 5 ve 6'da ileri derecede önemli artış ($p<0,001$) ve yine grup 3'e göre grup 4, 5, ve 6'da ileri derecede önemli artış ($p<0,001$) belirlendi (**Tablo 4.8 ve Şekil 4.8**).

Tablo 4.7. Kontrol ve deney gruplarının 15., 30., 60., 90. ve 120. güne ait karaciğer dokusu MDA değerleri ve istatistiksel değerlendirmesi

GRUPLAR	n	Karaciğer MDA (ng/mg protein)				
		15.GÜN (n=6)	30.GÜN (n=6)	60.GÜN (n=6)	90.GÜN (n=6)	120.GÜN (n=6)
1.Kontrol	30	31,49±3,43	37,21±2,05	48,54±3,30	34,35±2,80	45,64±3,59
2.M. Yağı Kontrol	30	33,19±2,34	35,99±4,23 [#]	48,48±4,41 [#]	33,25±2,03 [#]	46,50±2,66 [#]
3.DAB+TCDD	30	34,66±3,16	39,56±3,39	53,90±5,33*	38,16±2,47*	53,29±6,20**
4.DAB+TCDD+IP6	30	35,90±5,76	38,89±3,39	42,99±3,36*. ^{###}	28,19±3,83**. ^{###}	36,40±3,40**. ^{###}
5.DAB+TCDD+RA	30	32,67±2,05	33,47±2,41*. ^{##}	32,83±4,12***. ^{###}	33,19±4,39 [#]	32,73±5,43***. ^{###}
6.DAB+TCDD+IP6 +RA	30	35,74±4,08	37,14±2,71	36,09±4,23***. ^{###}	29,14±2,86**. ^{###}	27,86±3,13***. ^{###}

Her bir grubun değeri ortalama ± standart sapma (SD) olarak verildi. *; kontrole göre fark [#]; Grup 3'e göre fark
*; p<0,05, **; p<0,01, ***; p<0,001 [#]; p<0,05, ^{##}; p<0,01, ^{###}; p<0,001

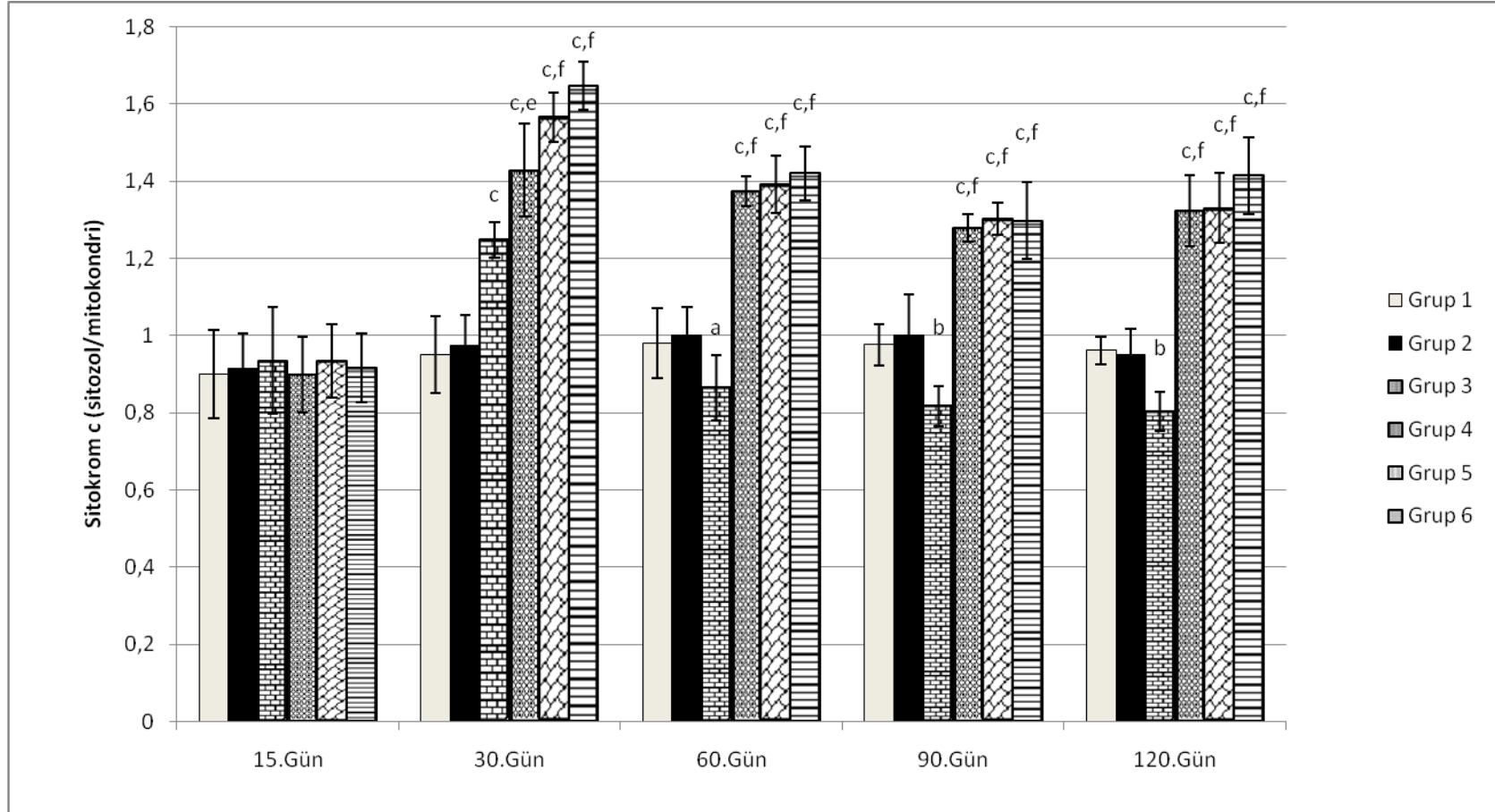


Şekil 4.7. Kontrol ve deney gruplarının 15.,30.,60.,90. ve 120. güne ait MDA değerleri. Kontrole göre fark: a; p<0,05, b; p<0,01, c; p<0,001. Grup 3'e göre fark: d; p<0,05, e; p<0,01, f; p<0,001

Tablo 4.8. Kontrol ve deney gruplarının 15., 30., 60., 90. ve 120. güne ait karaciğer dokusu Sitokrom c değerleri ve bunların istatistiksel değerlendirmesi

GRUPLAR	n	Sitokrom c (sitozol/mitokondri)				
		15.GÜN (n=6)	30.GÜN (n=6)	60.GÜN (n=6)	90.GÜN (n=6)	120.GÜN (n=6)
1.Kontrol	30	0,89±0,11	0,95±0,09	0,98±0,09	0,98±0,05	0,96±0,04
2.M. Yağı Kontrol	30	0,91±0,09	0,97±0,08 ^{###}	1,00±0,07 ^{##}	1,00±0,11 ^{###}	0,95±0,07 ^{##}
3.DAB+TCDD	30	0,93±0,14	1,25±0,05 ^{***}	0,86±0,08 [*]	0,82±0,05 ^{**}	0,80±0,05 ^{**}
4.DAB+TCDD+IP6	30	0,9±0,10	1,43±0,12 ^{***,##}	1,37±0,04 ^{***,###}	1,28±0,04 ^{***,###}	1,32±0,09 ^{***,###}
5.DAB+TCDD+RA	30	0,93±0,10	1,57±0,06 ^{***,###}	1,39±0,07 ^{***,###}	1,30±0,04 ^{***,###}	1,33±0,09 ^{***,###}
6.DAB+TCDD+IP6+RA	30	0,92±0,09	1,65±0,06 ^{***,###}	1,42±0,07 ^{***,###}	1,30±0,10 ^{***,###}	1,41±0,10 ^{***,###}

Her bir grubun değeri ortalama ± standart sapma (SD) olarak verildi. *; kontrole göre fark [#]; Grup 3'e göre fark
*; p<0,05, **; p<0,01, ***; p<0,001 [#]; p<0,05, ^{##}; p<0,01, ^{###}; p<0,001



Şekil 4.8. Kontrol ve deney gruplarının 15.,30.,60.,90. ve 120. güne ait Sitokrom c değerleri. Kontrole göre fark: a; $p<0,05$, b; $p<0,01$, c; $p<0,001$. Grup 3'e göre fark: d; $p<0,05$, e; $p<0,01$, f; $p<0,001$

4.9. KARACIĞER DOKUSU DNA FRAGMENTASYONU BULGUSU

Karaciğer dokusu DNA fragmentasyonu değerleri bakımından 15. gün örneklerinde grupta kontrol grubuna göre fark gözlenmezken grup 3'e göre grup 6'da çok önemli düzeyde azalma ($p<0,01$) belirlendi. 30. gün örneklerinde kontrol grubuna göre grup 3'te ileri derecede önemli artış ($p<0,001$), grup 3'e göre grup 4 ve 6'da ileri derecede önemli azalma ($p<0,001$) ve grup 5'de çok önemli düzeyde azalma ($p<0,01$) gözlemlendi. 60. gün örneklerinde kontrole göre grup 3'de ileri derecede önemli azalma ($p<0,001$), grup 4 ve 5'te çok önemli düzeyde azalma ($p<0,01$), grup 6'da ise ileri derecede önemli artış ($p<0,001$) vardı. 60. gün örneklerinde grup 3'e göre grup 4 ve 5'de çok önemli düzeyde artış ($p<0,01$), grup 6'da ise ileri derecede önemli artış ($p<0,001$) mevcuttu. 90.gün örneklerinde kontrole göre grup 3'de ileri derecede önemli azalma ($p<0,001$), grup 4 ve 5'te çok önemli düzeyde azalma ($p<0,01$), grup 6'da ise ileri derecede önemli artış ($p<0,001$) vardı. 90. gün örneklerinde grup 3'e göre grup 4, 5 ve 6'da ileri derecede önemli artış ($p<0,001$) belirlendi. 120. gün örneklerinde kontrol grubuna göre grup 3'de ileri derecede önemli azalma ($p<0,001$), grup 4, 5 ve 6'da ise hem kontrol grubuna hem de grup 3'e göre ileri derecede önemli artış ($p<0,001$) belirlendi (**Tablo 4.9 ve Şekil 4.9**).

4.10. KARACIĞER DOKUSU CYP1A1 ENZİM EKSPRESYONU

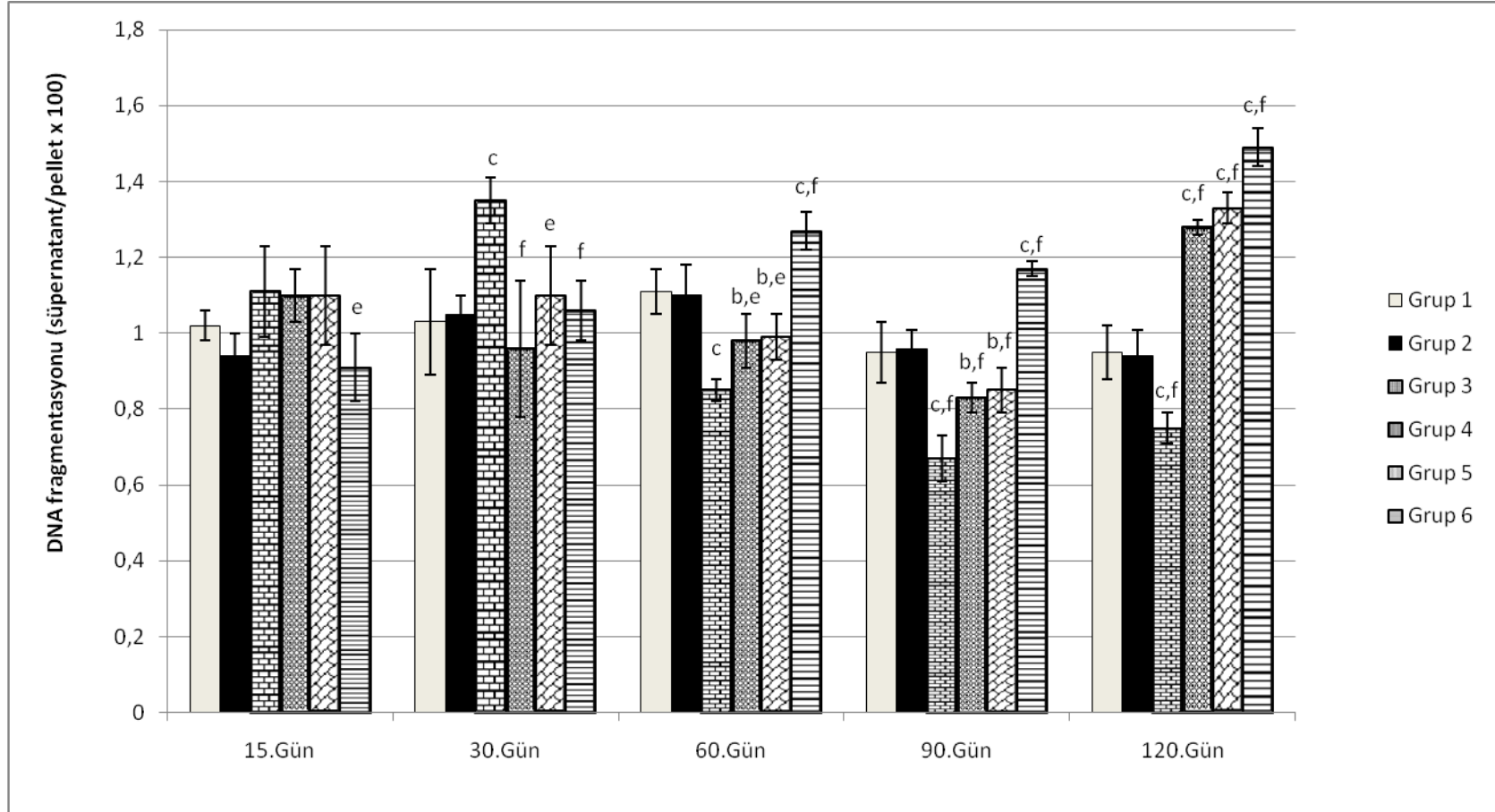
Karaciğer dokusu CYP1A1 protein değerleri bakımından 15. gün örneklerinde kontrol grubuna göre grup 3'te ileri derecede önemli artış ($p<0,001$), grup 3'e göre grup 4 ve 6'da çok önemli düzeyde azalma ($p<0,01$), grup 5'de ileri derecede önemli azalma ($p<0,001$) gözlemlendi. 30. gün örneklerinde kontrol grubuna göre grup 3'de çok önemli düzeyde artış ($p<0,01$), grup 3'e göre grup 4, 5 ve 6'da önemli düzeyde azalma ($p<0,05$) mevcuttu. 60. gün örneklerinde kontrol grubuna göre grup 3, 4, 5 ve 6'da ileri derecede önemli azalma ($p<0,001$) gözlemlendi. 90. gün örneklerinde kontrol grubuna göre grup 3'de ileri derecede önemli azalma ($p<0,001$), grup 4, 5 ve 6'da çok önemli düzeyde azalma

($p < 0,01$) gözlenirken, grup 3'e göre grup 4 ve 5'de çok önemli düzeyde artış ($p < 0,01$), grup 6'da ileri derecede önemli artış ($p < 0,001$) mevcuttu. 120. gün örneklerinde kontrol grubuna göre grup 3, 4, 5 ve 6'da ileri derecede önemli azalma ($p < 0,001$), grup 3'e göre ise grup 4, 5 ve 6'da ileri derecede önemli artış ($p < 0,001$) belirlendi (**Tablo 4.10 ve Şekil 4.10, Şekil 4.11, Şekil 4.12**).

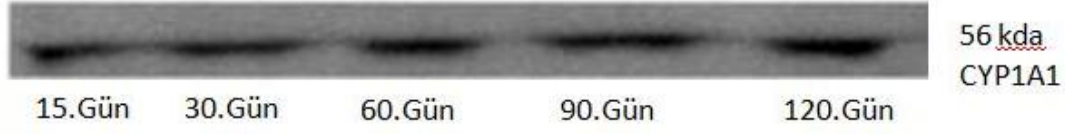
Tablo 4.9. Kontrol ve deney gruplarının 15., 30., 60., 90. ve 120. güne ait karaciğer dokusu DNA fragmantasyonu değerleri ve istatistiksel değerlendirmesi

GRUPLAR	n	DNA fragmantasyonu (süpernatant/pelletX100)				
		15.GÜN (n=6)	30.GÜN (n=6)	60.GÜN (n=6)	90.GÜN (n=6)	120.GÜN (n=6)
1.Kontrol	30	1,02±0,04	1,03±0,14	1,11±0,06	0,95±0,08	0,95±0,07
2.M. Yağı Kontrol	30	0,94±0,06 ^{##}	1,05±0,05 ^{###}	1,10±0,08 ^{###}	0,96±0,05 ^{###}	0,94±0,07 ^{###}
3.DAB+TCDD	30	1,11±0,12	1,35±0,06 ^{***}	0,85±0,03 ^{***}	0,67±0,06 ^{***}	0,75±0,04 ^{***}
4.DAB+TCDD+IP6	30	1,10±0,07	0,96±0,18 ^{###}	0,98±0,07 ^{**.#}	0,83±0,04 ^{**.#}	1,28±0,02 ^{***.#}
5.DAB+TCDD+RA	30	1,10±0,13	1,10±0,13 ^{##}	0,99±0,06 ^{**.#}	0,85±0,06 ^{**.#}	1,33±0,04 ^{***.#}
6.DAB+TCDD+IP6+RA	30	0,91±0,09 ^{##}	1,06±0,08 ^{###}	1,27±0,05 ^{***.#}	1,17±0,02 ^{***.#}	1,49±0,05 ^{***.#}

Her bir grubun değeri ortalama ± standart sapma (SD) olarak verildi. *; kontrole göre fark [#]; Grup 3'e göre fark
 *; p<0,05, **; p<0,01, ***; p<0,001 [#]; p<0,05, ^{##}; p<0,01, ^{###}; p<0,001



Şekil 4.9. Kontrol ve deney gruplarının 15., 30., 60., 90. ve 120. günlere ait DNA fragmantasyonu değerleri. Kontrolle göre fark: a; $p<0,05$, b; $p<0,01$, c; $p<0,001$. Grup 3'e göre fark: d; $p<0,05$, e; $p<0,01$, f; $p<0,001$



Şekil 4.10. Kontrol gruplarının 15., 30., 60., 90. ve 120. günlere ait CYP1A1 proteinlerinin antikorla işaretlendiği film görüntüsü

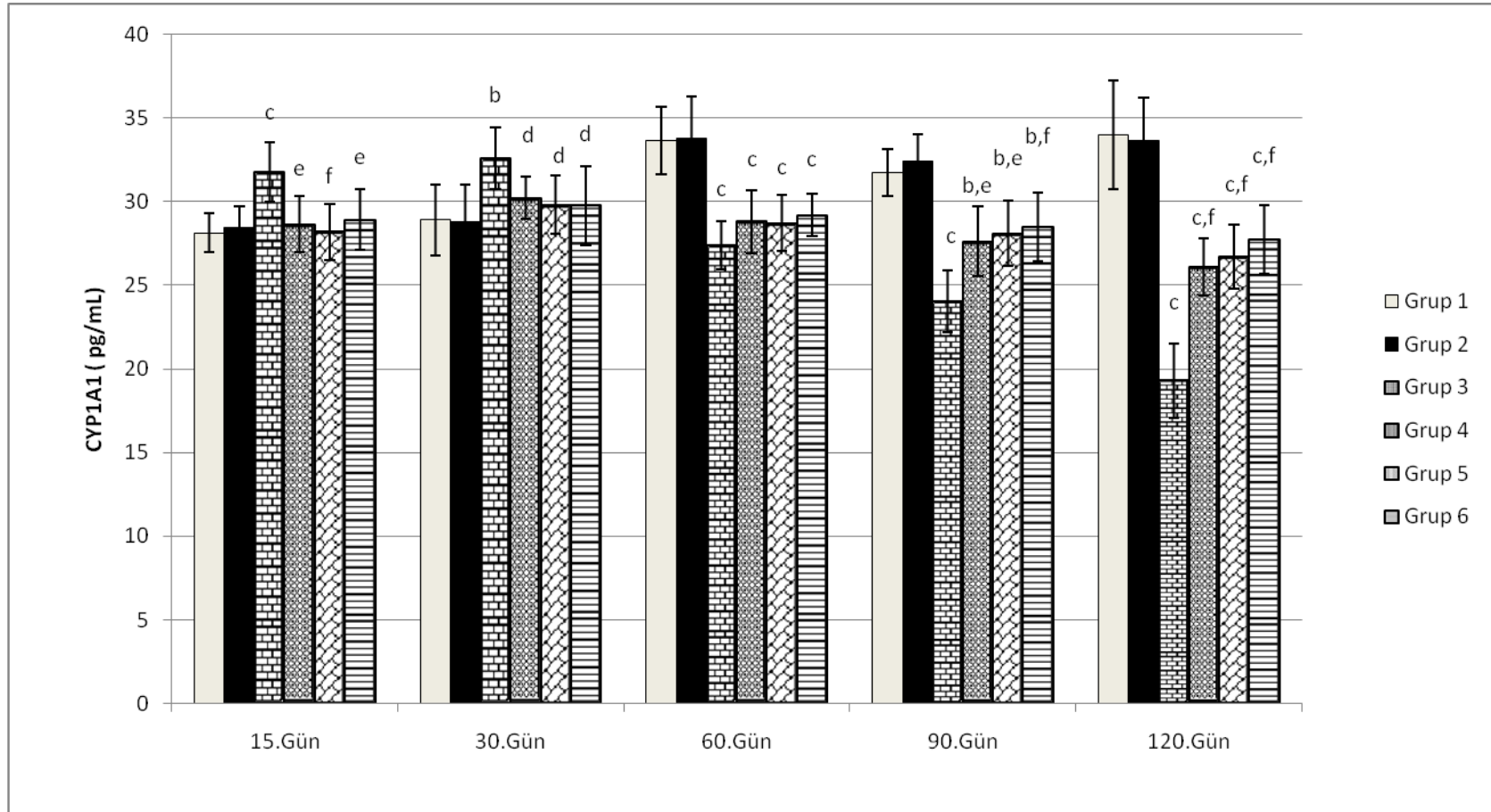


Şekil 4.11. Grup 3'ün 15., 30., 60., 90. ve 120. günlere ait CYP1A1 proteinlerinin antikorla işaretlendiği film görüntüsü

Tablo 4.10. Kontrol ve deney gruplarının 15., 30., 60., 90. ve 120. güne ait karaciğer dokusu CYP1A1 enzim ekspresyonu değerleri ve istatistiksel değerlendirmesi

GRUPLAR	n	CYP1A1 (pg/mL)				
		15.GÜN (n=6)	30.GÜN (n=6)	60.GÜN (n=6)	90.GÜN (n=6)	120.GÜN (n=6)
1.Kontrol	30	28,14±1,18	28,90±2,14	33,64±2,00	31,75±1,39	33,99±3,23
2.M. Yağı Kontrol	30	28,42±1,29 ^{##}	28,78±2,23 ^{##}	33,75±2,50 ^{###}	32,42±1,62 ^{###}	33,65±2,54 ^{###}
3.DAB+TCDD	30	31,76±1,79 ^{***}	32,60±1,83 ^{**}	27,39±1,46 ^{***}	24,03±1,85 ^{***}	19,30±2,24 ^{***}
4.DAB+TCDD+IP6	30	28,65±1,65 ^{##}	30,21±1,27 [#]	28,80±1,90 ^{***}	27,61±2,10 ^{**.#}	26,10±1,69 ^{***.###}
5.DAB+TCDD+RA	30	28,18±1,67 ^{###}	29,80±1,73 [#]	28,71±1,68 ^{***}	28,10±1,96 ^{**.#}	26,72±1,91 ^{***.###}
6.DAB+TCDD+IP6 +RA	30	28,92±1,80 ^{##}	29,75±2,36 [#]	29,19±1,27 ^{***}	28,46±2,05 ^{**.#}	27,70±2,05 ^{***.###}

Her bir grubun değeri ortalama ± standart sapma (SD) olarak verildi. *; kontrole göre fark #; Grup 3'e göre fark
*; p<0,05, **; p<0,01, ***; p<0,001 #; p<0,05, ##; p<0,01, ###; p<0,001



Şekil 4.12. Kontrol ve deney gruplarının 15.,30.,60.,90. ve 120. güne ait CYP1A1 değerleri. Kontrolle göre fark: a; $p<0,05$, b; $p<0,01$, c; $p<0,001$. Grup 3'e göre fark: d; $p<0,05$, e; $p<0,01$, f; $p<0,001$

4.11. KARACİĞERDE HİSTOLOJİK BULGULAR

Çalışmamızdaki karaciğer doku örnekleri H&E boyama yöntemiyle incelendi. Patolojik değişiklikler, 0/1/2/3/4 pozitif [0(yok),+ (hafif),++ (orta),+++ (belirgin),++++ (şiddetli)] olarak değerlendirildi. Tüm gruplar, hücresel dejenerasyon, iltihabi hücre infiltrasyonu, nekroz ve preneoplastik fokus bakımından değerlendirilmiş olup sonuçlar tablo halinde verilmiştir (**Tablo 4.11, Tablo 4.12, Tablo 4.13, Tablo 4.14**).

Hücresel dejenerasyon bakımından kontrol gruplarında herhangi bir dejeneratif bulguya rastlanmadı (**Şekil 4.13**). 15. gün örneklerinde kontrol grubuna göre grup 3 ve 5’de önemli düzeyde artış ($p<0,05$) mevcuttu (**Şekil 4.14**). 30.gün örneklerinde kontrol grubuna göre grup 3 ve 6’da çok önemli düzeyde artış ($p<0,01$), grup 4 ve 5’de önemli düzeyde artış ($p<0,05$) gözlemlendi. 60. gün örneklerinde kontrol grubuna göre grup 3’de çok önemli düzeyde artış ($p<0,01$), grup 4, 5 ve 6’da önemli düzeyde artış ($p<0,05$) belirlendi (**Şekil 4.15**). 90. gün örneklerinde kontrol grubuna göre grup 3’de ileri derecede önemli artış ($p<0,001$), grup 4 ve 5’de çok önemli düzeyde artış ($p<0,01$), grup 6’da önemli düzeyde artış ($p<0,05$) gözlenirken grup 3’e göre grup 6’da önemli düzeyde azalma ($p<0,05$) gözlemlendi. 120. gün örneklerinde kontrol grubuna göre grup 3’de çok önemli düzeyde artış ($p<0,01$), grup 4 ve 5’de önemli düzeyde artış ($p<0,05$) , grup 3’e göre ise grup 6’da önemli düzeyde azalma ($p<0,05$) belirlendi (**Şekil 4.16**), (**Tablo 4.11**).

İltihabi hücre infiltrasyonu kontrol gruplarında gözlenmedi. Grup 3’de 60. gün, örneklerinde kontrol grubuna göre çok önemli düzeyde artış ($p<0,01$) mevcuttu. 60. gün örneklerinde grup 3’e göre grup 5’de önemli düzeyde azalma ($p<0,05$) ve grup 6’da çok önemli düzeyde azalma ($p<0,01$) gözlemlendi. 90. gün örneklerinde kontrol grubuna göre grup 3 ve 4’de çok önemli düzeyde artış ($p<0,01$) ve grup 6’da önemli düzeyde artış ($p<0,05$) belirlendi. 120. gün örneklerinde kontrol grubuna göre grup 3’de çok önemli düzeyde artış ($p<0,01$), 4 ve 5’de önemli düzeyde artış ($p<0,05$), grup 3’e göre grup

6'da ise önemli düzeyde azalma ($p<0,05$) belirlendi (**Şekil 4.17**, **Şekil 4.18**, **Şekil 4.19**, **Şekil 4.20**), (**Tablo 4.12**).

Nekrotik bulgu kontrol gruplarında gözlenmedi. 30. gün örneklerinde kontrol grubuna göre grup 3'de çok önemli düzeyde artış ($p<0,01$), grup 3'e göre grup 4'de çok önemli düzeyde azalma ($p<0,01$), grup 5 ve 6'da önemli düzeyde azalma ($p<0,05$) gözlemlendi. 60. gün örneklerinde kontrol grubuna göre grup 3 ve 4'de önemli düzeyde artış ($p<0,05$) mevcuttu. 90. gün örneklerinde kontrol grubuna göre grup 3'de çok önemli düzeyde artış ($p<0,01$), grup 4 ve 6'da önemli düzeyde artış ($p<0,05$) belirlendi. Grup 3'e göre ise grup 5'de önemli düzeyde azalma ($p<0,05$) gözlemlendi. 120. gün örneklerinde kontrol grubuna göre grup 3'de ileri derecede önemli artış ($p<0,001$) (**Şekil 4.21**) ve grup 4'de önemli düzeyde artış ($p<0,05$), grup 3'e göre ise grup 5'de önemli düzeyde azalma ($p<0,05$) mevcuttu (**Tablo 4.13**).

Preneoplastik fokus bakımından kontrol gruplarında herhangi bir bulguya rastlanmadı. 90. gün örneklerinde kontrol grubuna göre grup 3'de ileri derecede önemli artış ($p<0,001$), grup 3'e göre ise grup 4 ve 5'de çok önemli düzeyde azalma ($p<0,01$), grup 6'da önemli düzeyde azalma ($p<0,05$) gözlemlendi. 120. gün örneklerinde kontrol grubuna göre grup 3'de ileri derecede önemli artış ($p<0,001$) (**Şekil 4.22**, **Şekil 4.23**, **Şekil 4.24**), grup 3'e göre grup 4, 5 ve 6'da çok önemli düzeyde azalma ($p<0,01$) belirlendi (**Tablo 4.14**).

Tablo 4.11. Kontrol ve deney gruplarının 15., 30., 60., 90. ve 120. güne ait hücrel dejenerasyon skorlarının istatistiksel değeri

GRUPLAR	HÜCRESEL DEJENERASYON				
	15.GÜN (n=6)	30.GÜN (n=6)	60.GÜN (n=6)	90.GÜN (n=6)	120.GÜN (n=6)
1.Kontrol	0 (0-0)	0(0-0,5)	0,5(0-1)	0(0-0)	0(0-1)
2.M. Yağı Kontrol	0 (0-0) #	0(0-0,25)###	0(0-1)###	0(0-0) ###	0(0-0,25) ###
3.DAB+TCDD	1(0-1) *	1,5(1-2,25)**	2 (1,75-2,25)**	3(2-4)***	3,5(2-4)***
4.DAB+TCDD+IP6	0 (0-1)	1(1-1,25)*	1(1-2)*	1(1-2)**	1,5(1-2,25)*
5.DAB+TCDD+RA	1(0-1)*	1(1-1,25)*	1(1-2)*	1(1-2)**	2(1-2)*
6.DAB+TCDD+IP6 +RA	0,5(0-1)	1,5(1-2)**	1,5(1-2)*	1(1-1,25)*, #	1,5(0,75-2) #

Her bir grubun değeri median ile (25.-75.) persentil olarak tanımlandı. *; kontrole göre fark #; Grup 3'e göre fark
*, p<0,05, **, p<0,01, ***, p<0,001 #; p<0,05, ##; p<0,01, ###; p<0,001

Tablo 4.12. Kontrol ve deney gruplarının 15., 30., 60., 90. ve 120. güne ait iltihabi hücre infiltrasyonu skorlarının istatistiksel değerlendirmesi

GRUPLAR	İLTİHABİ HÜCRE İNFİLTRASYONU				
	15.GÜN (n=6)	30.GÜN (n=6)	60.GÜN (n=6)	90.GÜN (n=6)	120.GÜN (n=6)
1.Kontrol	0(0-0)	0(0-0)	0(0-0,25)	0(0-0)	0(0-1)
2.M. Yağı Kontrol	0(0-0,25)	0(0-0)	0(0-0,25) ##	0(0-1)	0(0-0,25) ###
3.DAB+TCDD	0,5(0-1)	0,5(0-1)	1,5(0,75-2,25)**	2(0-4)**	2,5(1,75-4)**
4.DAB+TCDD+IP6	0(0-0,25)	0(0-0,25)	0,5(0-1,5)	1(1-1,25)**	1,5(1-2,25)*
5.DAB+TCDD+RA	0,5(0-1)	0(0-2)	0(0-1) #	0(0-1,25)	1,5(0,75-3)*
6.DAB+TCDD+IP6 +RA	0(0-1)	0,5(0-1,25)	0(0-0,25) ##	1,5(0-3)*	0,5(0-2) #

Her bir grubun değeri median ile (25.-75.) persentil olarak tanımlandı. *; kontrole göre fark #; Grup 3'e göre fark
*, p<0,05, **, p<0,01, ***, p<0,001 #; p<0,05, ##; p<0,01, ###; p<0,001

Tablo 4.13. Kontrol ve deney gruplarının 15., 30., 60., 90. ve 120. güne ait nekroz skorlarının istatistiksel değerlendirmesi

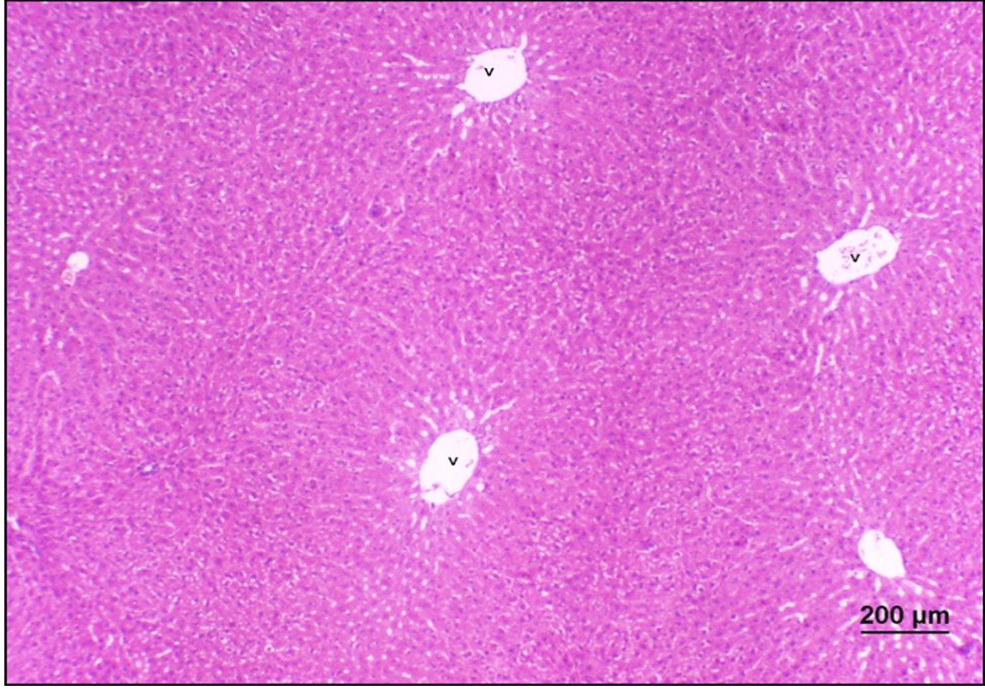
GRUPLAR	NEKROZ				
	15.GÜN (n=6)	30.GÜN (n=6)	60.GÜN (n=6)	90.GÜN (n=6)	120.GÜN (n=6)
1.Kontrol	0(0-0)	0(0-0)	0(0-0)	0(0-0)	0(0-0)
2.M. Yağı Kontrol	0(0-0)	0(0-0) ##	0(0-0) #	0(0-0) ##	0(0-0) ###
3.DAB+TCDD	0(0-0)	1(1-1)**	1(0-1)*	2(1-2)**	2(1-2)***
4.DAB+TCDD+IP6	0(0-0)	0(0-0) ##	1(0-1)*	1(0-1)*	1(0-1)*
5.DAB+TCDD+RA	0(0-0)	0(0-0) ##	0(0-1)	0,5(0-1) #	0,5(0-1) #
6.DAB+TCDD+IP6 +RA	0(0-0)	0(0-1) #	0,5(0-1)	1(0-1)*	1(0-1)

Her bir grubun değeri median ile (25.-75.) persentil olarak tanımlandı. *: kontrole göre fark #; Grup 3'e göre fark
*, p<0,05, **, p<0,01, ***, p<0,001 #; p<0,05, ##; p<0,01, ###; p<0,001

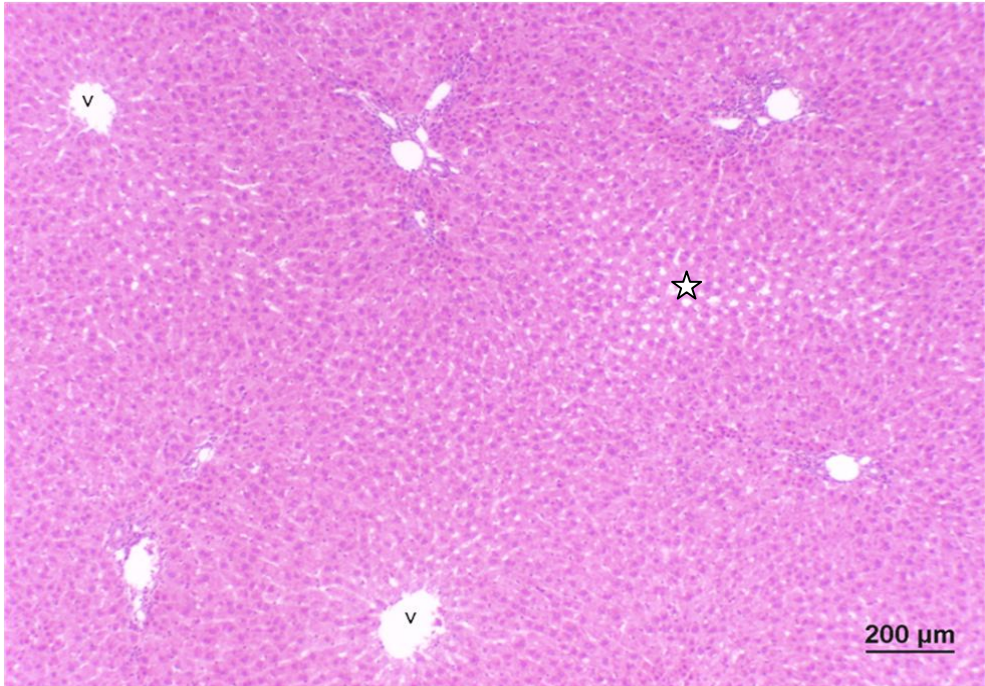
Tablo 4.14. Kontrol ve deney gruplarının 15., 30., 60., 90. ve 120. güne ait preneoplastik fokus skorlarının istatistiksel değerlendirmesi

GRUPLAR	PRENEOPLASTİK FOKUS				
	15.GÜN (n=6)	30.GÜN (n=6)	60.GÜN (n=6)	90.GÜN (n=6)	120.GÜN (n=6)
1.Kontrol	0(0-0)	0(0-0)	0(0-0)	0(0-0)	0(0-0)
2.M. Yağı Kontrol	0(0-0)	0(0-0)	0(0-0)	0(0-0)###	0(0-0)###
3.DAB+TCDD	0(0-0)	0(0-0)	0(0-1,25)	2(1,5-2,25)***	2,5(1-3,25)***
4.DAB+TCDD+IP6	0(0-0)	0(0-0)	0(0-0)	0(0-0,5)##	0(0-1,75)##
5.DAB+TCDD+RA	0(0-0)	0(0-0)	0(0-0)	0(0-0,25)##	0(0-1,25)##
6.DAB+TCDD+IP6 +RA	0(0-0)	0(0-0)	0(0-0)	0(0-1)#	0(0-1)##

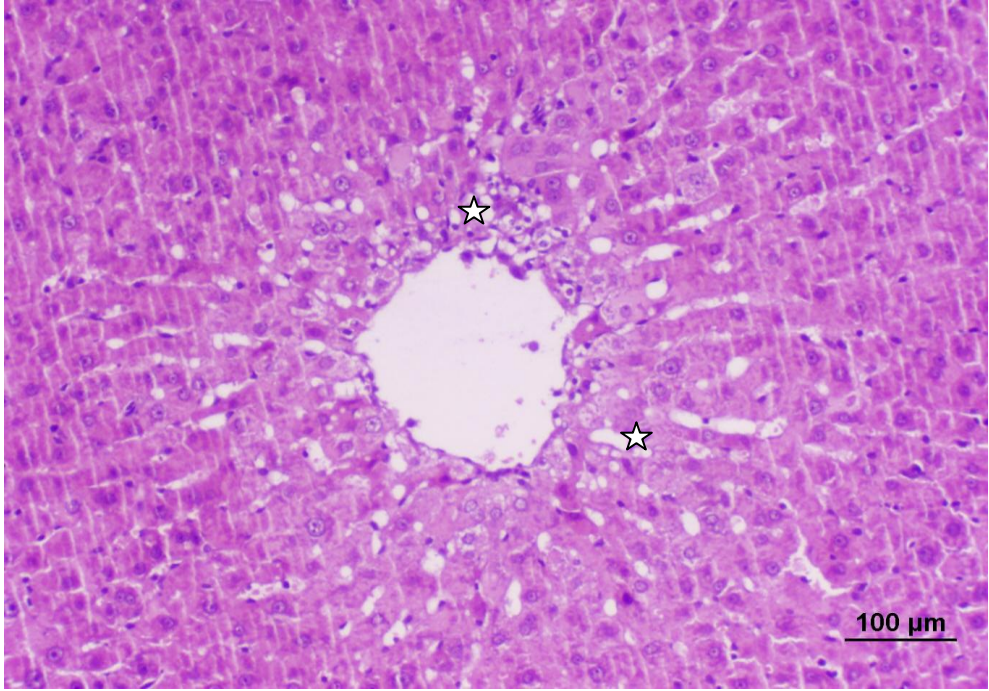
Her bir grubun değeri median ile (25.-75.) persentil olarak tanımlandı. *; kontrole göre fark #; Grup 3'e göre fark
*; p<0,05, **; p<0,01, ***; p<0,001 #; p<0,05, ##; p<0,01, ###; p<0,001



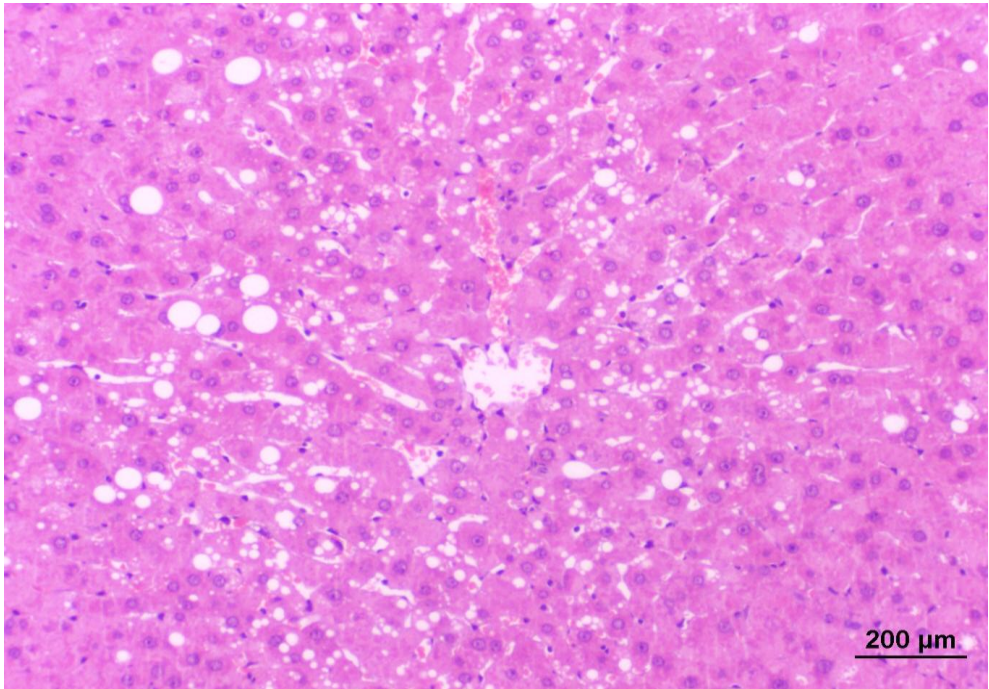
Şekil 4.13. Kontrol grubuna ait normal görünümlü karaciğer dokusu (120.gün örneklerinden, H&E, x4 Orjinal büyültme). v; vena sentralis



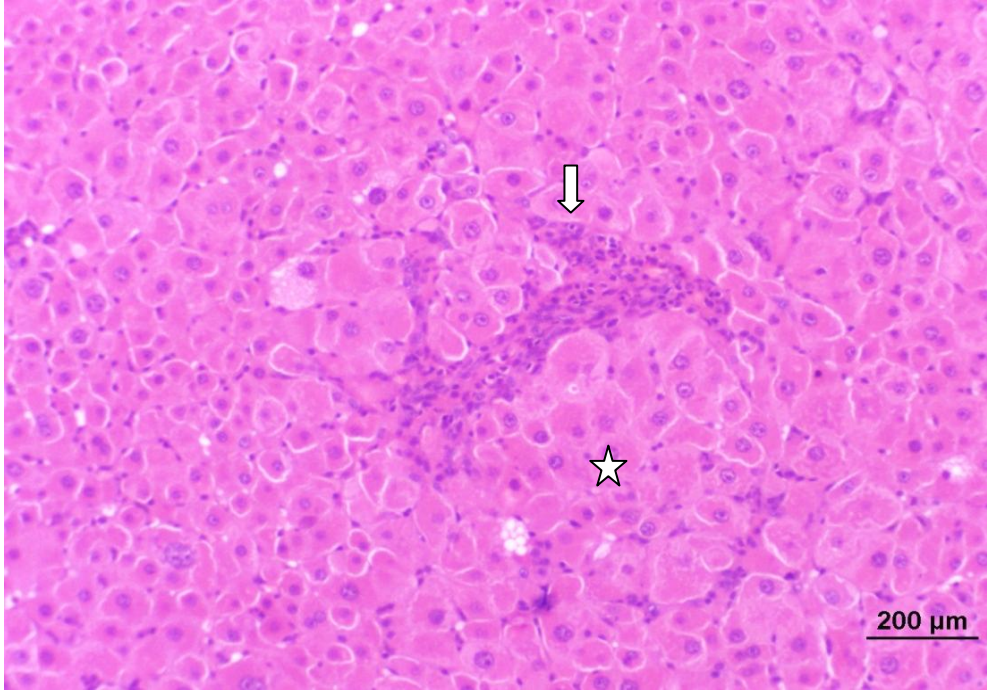
Şekil 4.14. Grup 3'e ait hücresel dejenerasyon bulgusu (15.gün örneklerinden, H&E, x4 Orjinal büyültme) v; vena sentralis, yıldız; hücresel dej. alanı



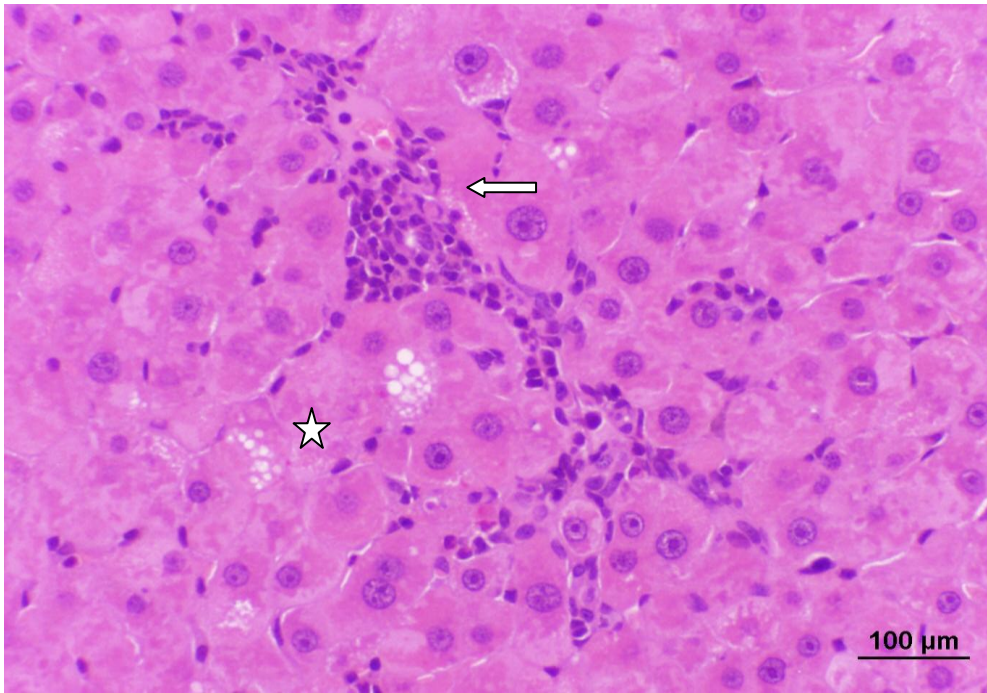
Şekil 4.15. Grup 3'e ait ait hücresel dejenerasyon bulgusu (60.gün örneklerinden, H&E, x10 Orjinal büyültme) yıldız; hücresel dej. alanı



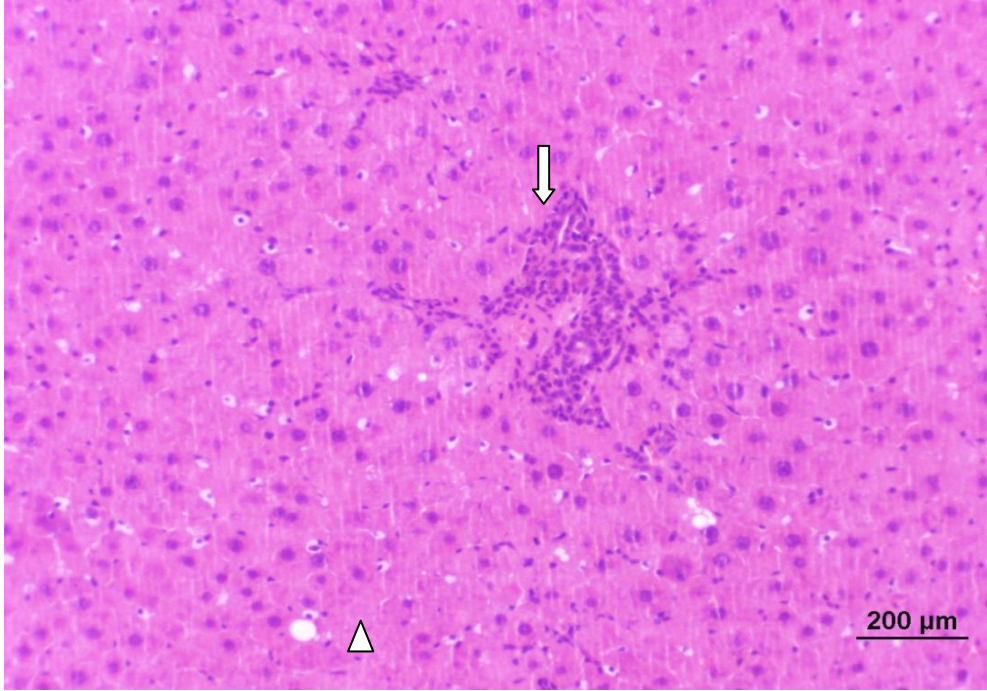
Şekil 4.16. Grup 3'e ait ait yoğun hücresel dejenerasyon bulgusu (120.gün örneklerinden, H&E, x10 Orjinal büyültme)



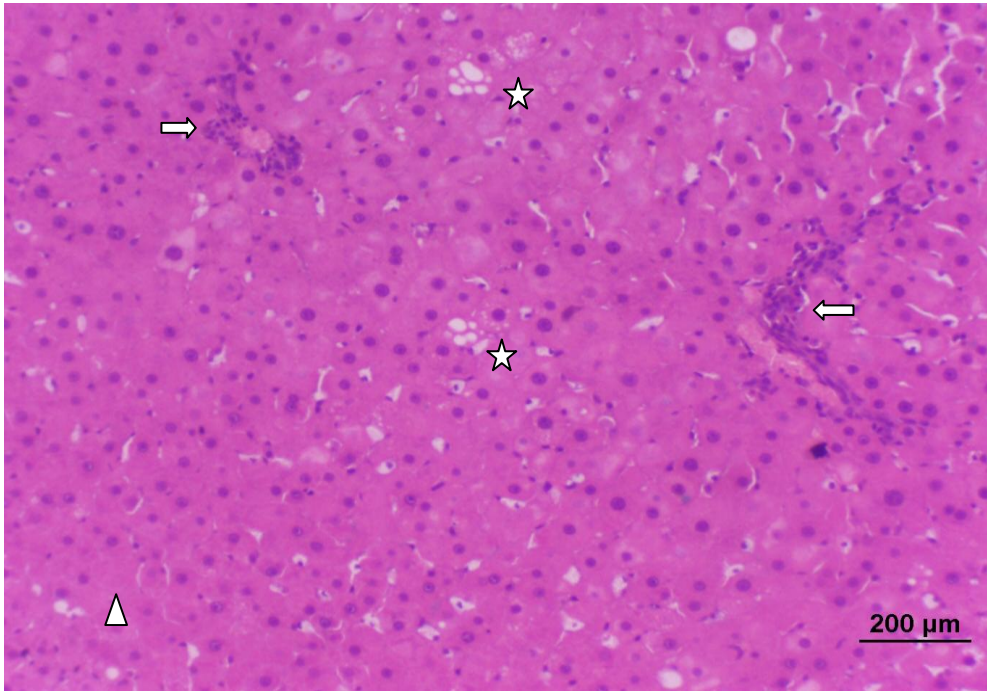
Şekil 4.17. Grup 3'e ait iltihabi hücre infiltrasyonu bulgusu (120.gün örneklerinden, H&E, x20 Orjinal büyültme) ok; iltihabi hücre infiltrasyonu, yıldız; hücresel dejenerasyon alanı



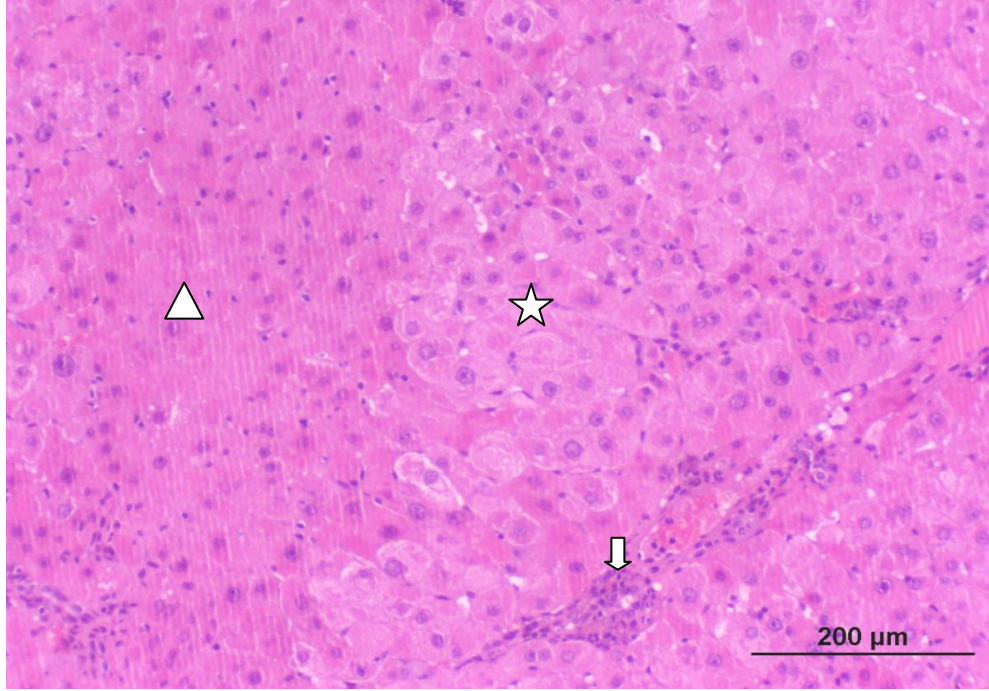
Şekil 4.18. Grup 4'e ait iltihabi hücre infiltrasyonu bulgusu (120. gün örneklerinden H&E, x20 Orjinal büyültme). Ok; iltihabi hücre infiltrasyonu, yıldız; hücresel dejenerasyon alanı.



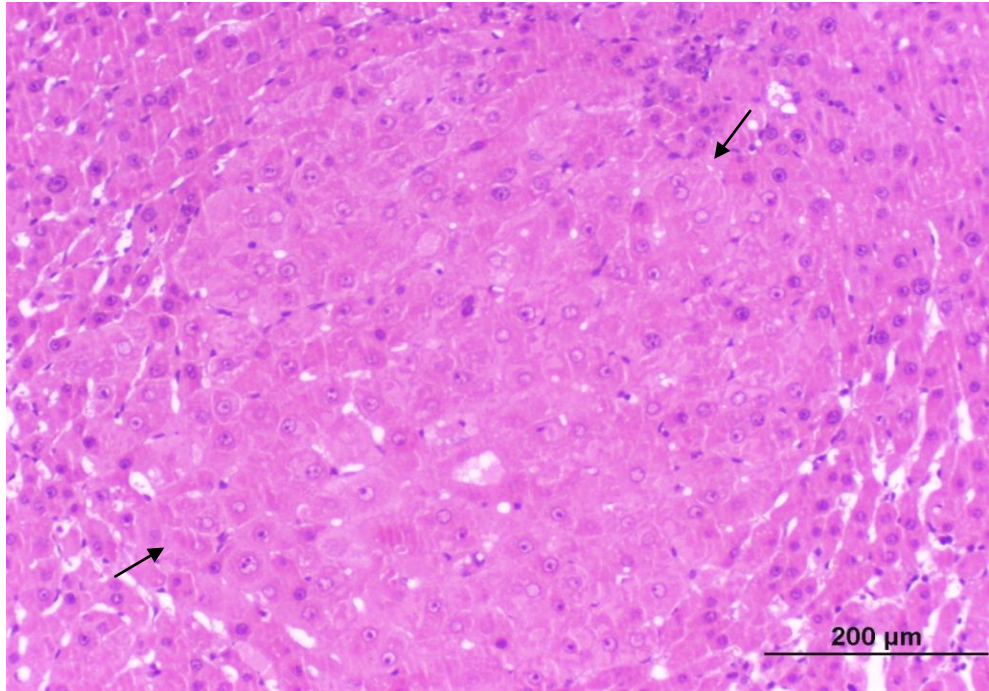
Şekil 4.19. Grup 5'e ait iltihabi hücre infiltrasyonu bulgusu (120. gün örneklerinden H&E, x10 Orjinal büyültme). Ok; iltihabi hücre infiltrasyonu, üçgen; nekroz alanı.



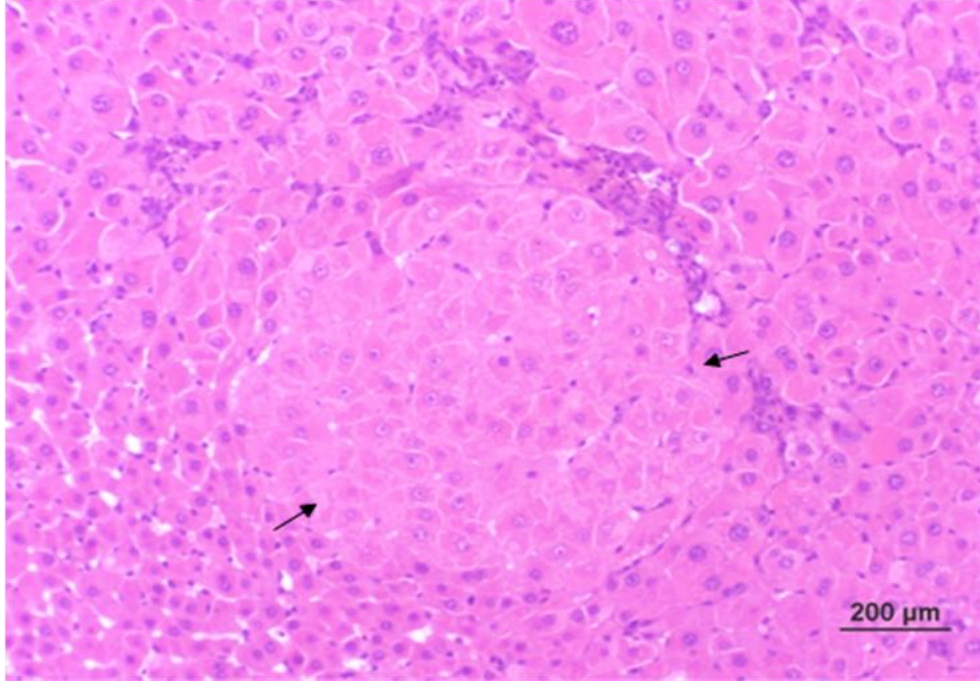
Şekil 4.20. Grup 6'ya ait iltihabi hücre infiltrasyonu bulgusu (120. gün örneklerinden H&E, x10 Orjinal büyültme). Ok; iltihabi hücre infiltrasyonu, yıldız; hücresel dejenerasyon, üçgen; nekroz alanı.



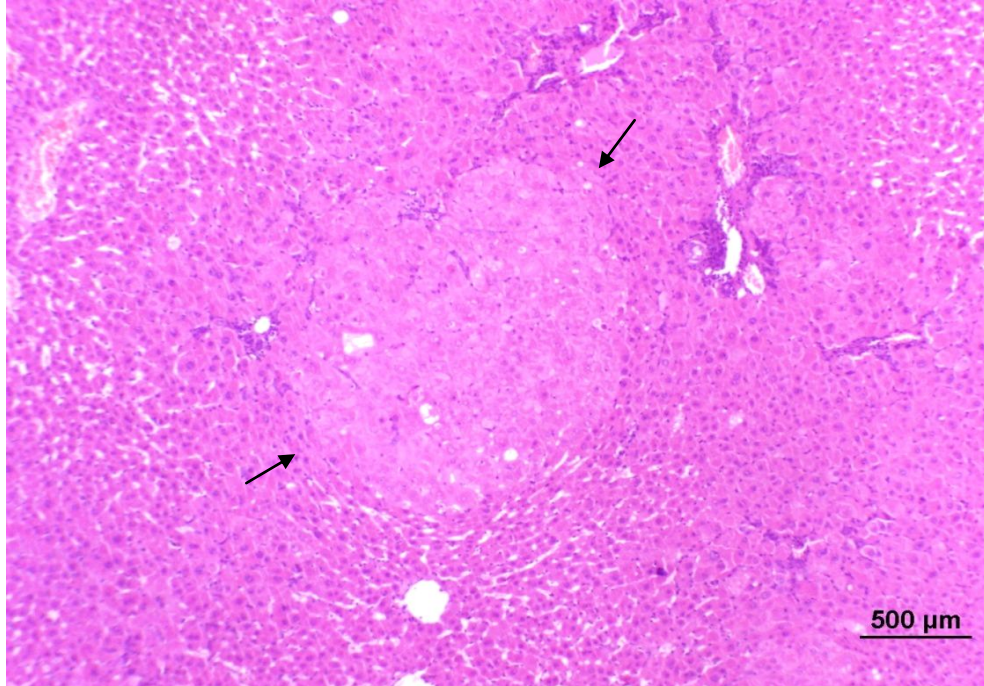
Şekil 4.21. Grup 3'e ait nekroz ve iltihabi hücre infiltrasyonu bulgusu (90. gün örneklerinden H&E, x10 Orjinal büyültme) yıldız; hücresel dejenerasyon alanı, üçgen; nekroz alanı, ok; iltihabi hücre infiltrasyonu.



Şekil 4.22. Grup 3'e ait nodüler yapı şeklinde preneoplastik fokus bulgusu (90. gün örneklerinden H&E, x10 Orjinal büyültme) iki ok arası; preneoplastik fokus alanı.



Şekil 4.23. Grup 3'e ait nodüler yapı şeklinde preneoplastik fokus bulgusu (120. gün örneklerinden H&E, x10 Orjinal büyültme) iki ok arası; preneoplastik fokus alanı



Şekil 4.24. Grup 3'e ait nodüler yapı şeklinde preneoplastik fokus bulgusu (120. gün örneklerinden H&E, x4 Orjinal büyültme) iki ok arası; preneoplastik fokus alanı

5. TARTIŞMA

Bu bölümde, p-DAB ve TCDD'yi subkronik olarak uyguladığımız çalışmamızdaki 5 belirli örnek alım zamanı için retinil asetat ve inositol-6-fosfatın ALT, AST, ALP, LDH, VEGF, MMP-2, MDA, Sitokrom c, DNA Fragmantasyonu, CYP1A1 enzim ekspresyonu ile histolojik olarak dejeneratif bulgular, iltihabi hücre infiltrasyonu, nekroz ve preneoplastik fokus bakımından karaciğer dokusuna etkileri sırasıyla karşılaştırılıp tartışılacaktır.

ALT

Bir transaminaz olan ALT'nin yükselen seviyeleri hepatoselüler hasarın en duyarlı göstergesi olarak bilinir. Ancak yüksek ALT seviyesine bakarak hasarın sebebini belirlemek mümkün değildir. Üstelik ALT yüksekliğine bakarak karaciğer hastalığının safhası ya da kronikliği belirlenemez. Karaciğer hasarının varlığına rağmen sıklıkla hatalı-normal (false-normal) değerler ölçülebilmektedir. Bu hatalı-normal sonuçları oluşturan çeşitli sebepler mevcuttur. Bu sebeplerden biri karaciğer parankimasının aşırı kaybı olabileceği gibi, toksinlerin neden olduğu hepatoselüler enzim sentezinin engellenmesi ve/veya tüketilmesi de bir diğer sebep olabilmektedir (98). TCDD ile yapılan önceki çalışmalardan bazılarında normal ALT değerlerinin yanı sıra (189), azalmış ALT değerleri hem akut hem de subkronik dozlarda gözlenmiştir (40,166). Farelere 120 gün süresince DAB vererek örnek alım zamanları açısından bizim çalışmamıza benzer bir çalışma yapmış olan **Biswas ve Khuda-Bukhsh'a** göre 60. ve 120. gün örneklerinde 7, 15, 30 ve 90. gün örneklerine kıyasla karaciğerde ALT ve AST azalmış ancak her örnek alım zamanında kendi kontrollerine göre artmıştır (16). DAB'ın tümör başlatıcı olarak subkronik dozda uygulandığı bir başka çalışmada ise karaciğerde ALT değerlerinin arttığı gösterilmiştir (132).

Çalışmamızda 15. ve 120. gün örneklerinde serum ALT seviyeleri açısından gruplar arasında fark yoktu. DAB+TCDD grubunda 30., 60. ve 90. gün örneklerinin ALT değerleri kontrol grubuna göre azalmıştı.

DAB+TCDD grubunda histopatolojik olarak karaciğer hasarı mevcuttu ancak aşırı parankima kaybı yoktu. Bu grupta gözlediğimiz kontrol grubuna yakın ya da azalmış ALT seviyeleri muhtemelen TCDD'nin hepatik enzim sentezini bozmasından kaynaklanmaktadır.

Literatürde IP6'nın serum ALT seviyesini etkileyip etkilemediğini gösteren fazla çalışma mevcut değildir. Meme kanseri hastalarında yapılan bir çalışmada, İnositol ile birlikte IP6 verilen grupta ALT seviyelerinin referans değerlerden sapma göstermediği belirtilmiştir (7). Çalışmamızda DAB+TCDD+IP6 grubunun ALT değerleri 30. ve 60. gün örneklerinde azalmıştı. Bu gruptaki azalma DAB+TCDD grubunda olduğu gibi TCDD'nin enzim sentezini bozucu etkisinden kaynaklanmış olabilir.

Vitamin A'nın ALT seviyelerini doza ve uygulama süresine bağlı olarak arttırabildiği bildirilmiştir (193). Öte yandan TCDD karaciğerde vitamin A metabolizmasını değiştirerek hücre yararlanabilirliğini etkileyebilmekte ve vitamin A depolanmasını azaltmaktadır (192). Çalışmamızda DAB+TCDD+RA verilen grupta 60. gün örneklerinde gözlenen ALT düşüklüğü, TCDD'nin hepatik enzim sentezini bozucu etkisine ilave olarak hepatik vitamin A metabolizmasını etkilemesiyle de ilişkili olabilir.

RA ve IP6'yı birlikte verdiğimiz grupta bulgular, ayrı ayrı verildiklerindeki sonuçlara benzemektedir. Bulgularımız, RA ve IP6'yı birlikte vermenin DAB+TCDD kombinasyonunun ALT seviyelerine olan etkilerini değiştirmedini göstermektedir.

AST

Bir transaminaz olan AST'nin yükselmiş seviyeleri hepatoselüler hasarın güvenilir bir göstergesi kabul edilmektedir (98). Ancak karaciğerin yanısıra, kalp, iskelet kası, böbrek, beyin, pankreas, akciğerler ile beyaz ve kırmızı kan hücrelerinde de bulunmaktadır (73). Hücrede hem sitozolik (% 20) hem de mitokondriyal (%80) fraksiyonda bulunur (98). **Biswas ve Khuda-Bukhsh**'a göre 120 gün süresince DAB verilen farelerde karaciğer AST değerleri dalgalı değişim gösterse de artmış bulunmuştur (16). Farelere yüksek dozda TCDD verildikten 14 gün sonra AST değerlerinin arttığını gösteren **Patterson ve arkadaşlarının** çalışmasının yanı sıra (134), dioksinlerin kombinasyonu içinde TCDD'nin düşük dozda verilmesinden 16 gün sonra serum AST değerlerinin değişmediği bildirilmiştir (41). DAB+TCDD grubunda 90. ve 120. gün örneklerindeki serum AST artışı TCDD'nin biriken dozunun hücre hasarını arttırıcı etkisinden olabileceği gibi, DAB+TCDD kombinasyonunun karaciğer dışındaki diğer dokularda yapmış olabileceği doku hasarından da (16, 195) kaynaklanıyor olabilir.

Çalışmamızda DAB+TCDD+IP6 verdiğimiz grupta 90. ve 120. gün örneklerindeki kontrole göre artmış, DAB+TCDD grubuna göre azalmış AST değerleri bakımından IP6'nın, hücre hasarını azaltıcı etkisinin olduğu söylenebilir. **Bacic ve arkadaşlarının** meme kanserinde inositolle beraber IP6 verildiğinde AST değerlerinin referans değerlerden sapmadığı yönündeki çalışmalarından (7) başka literatürde IP6'nın AST değerlerini etkilediğini gösteren çalışmaya rastlanmadığı için bu konuda karşılaştırma yapılamadı.

Retinoik asidin doza (25), vitamin A'nın ise doza ve uygulama süresine bağlı olarak AST seviyelerini arttırdığını gösteren çalışmalar (193) göz önüne alındığında çalışmamızda DAB+TCDD+RA verdiğimiz grubun 120. gün örneklerinde kontrole göre artmış, DAB+TCDD grubuna göre azalmış serum AST değerleri bakımından uyguladığımız RA dozunun hücre hasarına katkıda bulunmadığı bunun yerine hücre

hasarını azaltıcı etkisinin olduğu söylenebilir ancak bu duruma TCDD'nin A vitamini metabolizmasını değiştirebilme yeteneğinin de (192) katkısı olmuş olabilir.

IP6 ve RA'yı birlikte verdiğimiz grupta kontrole göre 120. gün örneklerinde artan, DAB+TCDD grubuna göre azalan değerler, ayrı ayrı verildiklerindeki benzer oranlardaydı. Hücre hasarına etkileri bakımından IP6 ve RA'nın birlikte verilmeleri belirgin bir değişikliğe neden olmamıştır.

ALP

ALP, karaciğerin yanı sıra kemik doku, böbrek, barsak, akciğerler ve plasentada bulunur. Karaciğerde ALP, özellikle safra kanalı bölgesindeki hücrelerin sitozol ve membranında lokalize olmuştur. ALP'nin aktivitesindeki artış safra asitleri tarafından uyarılır. Hepatobiliyer hastalıklar, kolestaz ve yer kaplayan karaciğer lezyonları için duyarlı bir belirteçtir. Bunların dışında böbrek hastalıkları, osteoblastik aktivite, hipertroidizm, hiperlipidemi, çeşitli ilaç ve kimyasalların etkisi gibi nedenlerle serum değerleri yükselebilmektedir (98).

Kociba ve arkadaşlarının sıçanlara 2 yıl süreyle kronik dozda TCDD verdikleri çalışmada serum ALP değerleri artmıştı (94). Dietilnitrozamin'in başlatıcı, TCDD'nin promotör olarak kullanıldığı çalışmada sıçanlara 20 hafta boyunca TCDD verilmesi serum ALP seviyelerini arttırırken, 30 haftalık uygulama sonunda elde edilen ALP değerleri değişmemişti (189). **Biswas ve Khuda-Bukhsh'a** göre 120 gün süresince DAB verilen farelerde karaciğer ALP değerleri 30. günde yükselmiş, 60. günde belirgin şekilde düşmüş, 90. ve 120. günlerde ise hemen hemen değişmeden kalmıştır (16). Bizim çalışmamızda da DAB+TCDD grubunun serum ALP değerleri 30. gün örneklerinde artmıştı. Ancak diğer örnek alım zamanlarında değişmemişti. Literatüre benzer şekilde bulduğumuz sonuçlara göre DAB+TCDD kombinasyonunun serum ALP

aktivitesini arttırıcı etkisinin fazla olmadığı ya da hepatobiliyer bölgeyi çok fazla etkilemediği söylenebilir.

Sıçanlarda CCl₄ uygulanmasına bağlı yükselen serum ALP değerlerinin IP₆ eklenmesinden 2 hafta sonra kontrole göre düştüğü bildirilmiştir (60). **Bacic ve arkadaşlarının** meme kanserli hastalarda yaptığı çalışmada ise inositolle beraber IP₆ verildiğinde serum ALP değerlerinin referans limitlerde kaldığı ve değişmediği belirtilmiştir (7). Bizim çalışmamızda DAB+TCDD+IP₆ alan grubun 15. gün örneklerindeki serum ALP değerlerinin kontrole göre düştüğü, 90. gün örneklerindeki ALP değerlerinin ise arttığı gözlemlendi. Diğer örnek alım günlerinde kontrol grubuna göre farklılık yoktu.

DAB+TCDD+RA alan grubun 30., 60., 90. ve 120. gün örneklerinde serum ALP değerleri artmıştı. Hipervitaminoz A'lı hastaların bazılarında serum ALP değerlerinin arttığını bazılarında ise değişmediğini rapor eden **Ballev ve arkadaşlarının** (8) çalışmasının yanı sıra düşük dozda vitamin A'nın uzun süreli alınmasının insanlarda ALP yükselmesine neden olduğu bildirilmiştir (62). Ek olarak retinoik asit ALP gen ekspresyonunu uyarmaktadır (47). Sonuçlarımız literatüre benzer şekilde olup bu gruptaki ALP artışı RA'nın A vitamini metabolizması aracılığıyla ALP'nin sentezini arttırmasından kaynaklanıyor olabilir.

IP₆ ve RA'yı birlikte alan grubun sonuçları DAB+TCDD+RA alan grubun sonuçlarına benzerlik göstermektedir. Bu gruptaki tüm örnek alım zamanlarında gözlenen ALP artışları muhtemelen yine RA'nın etkisiyle gözlenmiştir.

LDH

LDH, hemen hemen tüm dokularda bulunan ve 5 izoenzime sahip sitoplazmik bir enzimdir. LDH₄ ve LDH₅ izoenzimleri karaciğer de baskın olarak bulunurlar. Karaciğer

parankimasının hasarlanmasından sonra bu izoenzimler yükselmektedir (98). Yükselmiş serum LDH'ı genellikle karaciğer hasarı ile ilişkilidir ve hasarlanan hücrelerden kana salınır. Bu enzimin azalmış seviyelerinin klinik olarak spesifik doku hasarları ile ilişkili olmadığı belirtilmiştir. Kalıcı organoklorinli kirleticiler (persistent organochlorine pollutants)'le kontamine balıkların sıçanlara verildiği bir çalışmada LDH seviyelerinin azaldığı gösterilmiştir. Yapılan in vitro bir çalışmada ise organoklorinin LDH aktivitesini inhibe ettiği rapor edilmiş ve bu inhibisyon enzimin eş zamanlı presipitasyonu ile açıklanmıştır. **Chu ve arkadaşlarının** sıçanlarla yaptığı çalışmada, kalıcı organoklorinli kirleticilerin karışımı farklı dozlarda oral olarak verilmiş ve yüksek doz alan gruplarda LDH aktivitesinin azaldığı rapor edilmiştir (26). TCDD'yi de içeren kontaminant karışımının sıçanlara farklı dilüsyonlarda subkronik olarak verildiği bir başka çalışmada ise karışımın konsantrasyonu arttıkça LDH aktivitesinin azaldığı rapor edilmiştir (180). TCDD ile yapılan hücre kültürü çalışmalarında LDH salınımının arttığı, bunun da hücre hasarının bir göstergesi olduğu bildirilmiştir (3). Ancak bu çalışmada ölçülen LDH hücreden salınan enzim miktarıdır ve aktivitesinin azaldığı ya da arttığı bir durumdan bahsedilmemiştir. Kontaminant karışımlarla yapılan çalışmalarda LDH bir ya da daha fazla kontaminant etkisiyle azalmış olabileceğinden TCDD'nin etkisinin ne kadar olduğunu tahmin etmek mümkün değildir ancak TCDD benzeri bileşiklerin LDH aktivitesini azaltması, TCDD'nin de benzer bir etkiye neden olabileceği ihtimalini düşündürmektedir.

Çalışmamızda DAB+TCDD grubunda 15. ve 60. gün örneklerinde kontrole göre fark yokken diğer örnek alım zamanlarında serum LDH seviyeleri belirgin düzeyde azalmıştı.

DAB'ın LDH'yı azalttığıyla ilgili herhangi bir literatür olmadığından DAB+TCDD grubundaki düşük LDH değerleri, TCDD'nin enzimin aktivasyonunu azaltmasından ve/veya protein sentezini etkilemesinden kaynaklanmış olabilir.

CCl₄ verilerek hepatik sirozun indüklendiği bir çalışmada CCl₄ uygulandıktan 24 saat sonra iki hafta süreyle IP6 verilmiş ve LDH düzeyinin CCl₄ grubuna göre azaldığı

gösterilmiştir. Bu çalışmada hepatosit hasarına karşı IP6'nın koruyucu etkisi olduğu ileri sürülmektedir (60). **Bacic ve arkadaşlarının** meme kanseri hastalarında yaptıkları çalışmada inositol ve IP6 verilen gupta LDH değerlerinin referans değerlerden sapma göstermediği belirtilmiştir (7).

İnsan kolon karsinoma hücrelerinin (CaCo-2) kullanıldığı hücre kültürü çalışmasında hücre hasarını göstermek için sitoplazmaya salınan LDH seviyeleri ve hücre ölümünü göstermek için de DNA fragmantasyonu belirlenmiş ve IP6 konsantrasyonuna bağlı olarak her ikisinin de arttığı ve bunun IP6'nın apoptozu uyararak anti karsinojenik özelliğinden kaynaklanmış olabileceği bildirilmiştir (170).

Çalışmamızda 15. gün örneklerinde DAB+TCDD+IP6 grubunda artan LDH düzeyi hücre hasarının artışından kaynaklanmış olabilir. Ancak 30., 90. ve 120. gün örneklerinde kontrole göre azalan değerler, TCDD'nin LDH düzeyleri üzerine azaltıcı etkisinin baskın olduğunu göstermektedir.

Literatürde Vitamin A'nın LDH azalmasına neden olduğunu gösteren bir çalışmaya rastlayamadığımız için DAB+TCDD+RA grubunda 30., 90. ve 120. gün örneklerinde gözlenen kontrole göre düşük LDH seviyeleri DAB+TCDD grubunda olduğu gibi TCDD'nin etkisiyle gözlenmiş olabilir.

DAB+TCDD+IP6+RA grubunda gözlenen DAB+TCDD grubuna benzer sonuçlar yine olasılıkla TCDD'nin etkisiyle gerçekleşmiştir.

VEGF

Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF), vasküler permeabilite faktör olarak da tanımlanır. İlk olarak tümörden salınan protein olarak keşfedilmiştir. Tümör gelişimindeki rolünü ortaya koymak için çeşitli araştırmalar yapılmıştır ve tümör

biyolojisinde iki yolla önemli role sahip olduğu düşünülmektedir. Vasküler permeabilite faktör olarak ve /veya endotelyal büyüme faktörü olarak. Potent permeabilite faktörü olarak anjiyogenez esnasında hücre göçünün düzenlenmesinde rol alır. Endotel büyüme faktörü olarak ise endotel hücre proliferasyonunu uyarır. Bu uyarı muhtemelen yeni damar oluşumunu indüklemek içindir (129).

Hepatoselüler karsinoma (HCC) adım adım ilerleyen bir süreçtir ve preneoplastik lezyonlardan ilerlemiş hepatoselüler karsinomaya kadar devam eder (120). Farklı dereceli displatik nodül ve hepatoselüler karsinoma lezyonları bulunan hastalarla yapılan çalışmada **Park ve arkadaşları** VEGF ekspresyonu ve anjiyogenezin displastik nodüllerin preneoplastik lezyonlarında oluştuğunu ve çok adımlı hepatokarsinogenezin ilerlemesiyle gittikçe arttığını bildirmişlerdir. Hepatokarsinogenezde tümör damarlarının oluşumunun düzenlenmesinde VEGF anahtar bir rol oynasa da hepatoselüler karsinomalarda VEGF ekspresyonunun derecesi değişkendir ve HCC'lerin %30'unda VEGF ekspresyonu tümör hücrelerinin %5'inden daha azında gözlenmiştir. Bu durum tümör anjiyogenezinde diğer anjiyogenik faktörlerin de katkıda bulunabileceğini önermektedir (129). **Yoshiji ve arkadaşlarının** çalışmasında endotel hücrelerinin çoğunda VEGF ekspresyonu non-tümöral hepatik parankimadan ziyade tümör dokusunda gözlenmiştir (196). Bir başka çalışma da ise tümör dokusundaki VEGF ekspresyonunun, HCC'li hastalarda serum VEGF seviyeleri ile önemli derecede uyumlu olduğu gösterilmiştir (141). Karaciğer hasarından sonra hem hepatositlerde hem de nonparankimal hücrelerde VEGF-A üretimi artmaktadır. Karaciğer hasarına yanıt olarak hepatosit büyüme faktörü gibi büyüme faktörleri up-regüle edilmektedir. Lokal olarak up-regüle edilen bu büyüme faktörleri hasar sonrası yeniden büyüme için önemli olduğu kadar toksinle indüklenen hasara karşı da koruyucu olabilir. Bu süreç, hepatositlerin proliferasyonu ve sağ kalımı (survival) için önemlidir (32). TCDD tarafından AhR'nin aktivasyonu, artmış VEGF üretiminin aracı olduğu bir mekanizmayla fare retinasında vaskülarizasyonu ilerletmiştir (164). **Roman ve arkadaşlarının** *AhR*^{-/-} MAECs (Mouse Aortic Endothelial Cells) ile yaptıkları çalışmada VEGF-A ve VEGF-B mRNA ekspresyonunun azaldığını ve VEGF'nin AhR bağımlı anjiyogenezde rolü olduğunu bildirmişlerdir. Ek olarak anjiyogenezde endotel hücreler tarafından VEGF'nin salgılanmasının da AhR bağımlı olduğunu rapor etmişlerdir (145).

Bizim çalışmamızda DAB+TCDD grubunda 15., 60., 90. ve 120. gün örneklerinde plazma VEGF değerleri kontrol grubuna göre yüksekti. 15. ve 60. gün örneklerinde gözlenen VEGF değerleri, TCDD'nin AhR reseptörünü aktive edebilme özelliği nedeniyle AhR aracılı olarak yükselmiş olabileceği gibi hücrel hasara yanıt olarak da yükselmiş olabilir. 90. ve 120. gün örneklerindeki daha yüksek VEGF değerleri ise muhtemelen **Park ve arkadaşlarının** çalışmasıyla (129) benzer şekilde preneoplastik lezyonlardan salınımı nedeniyle gözlenmiştir.

Tümör hücrelerinden anjiyogenik faktörlerin sentezi ve salgılanmasında mitojenik, hücre sağ kalım ve inflamatuvar sinyaller esansiyel rol oynar. Bu süreç reseptör tirozin kinazların aktivasyonu aracılığıyla oluşur. EGFR, IGF-1R ve PDGFR-b gibi reseptör kinazlar, ERK1/2 ve PI3K'ı içeren önemli sinyal moleküllerinin fosforilasyonunu ilerleterek tümör hücrelerinde VEGF ve MMP'lerin ekspresyonuna neden olurlar (13). IP6'nın PI3K'ı etkilemediğini gösteren çalışmaların yanı sıra (24) önemli ölçüde bloke ettiğini gösteren çalışmalar da mevcuttur (78, 199). IP6, in vitro olarak bFGF'nin indüklediği anjiyogenezi inhibe eder ve VEGF ekspresyonunu azaltır (159). Çalışmamızda DAB+TCDD+IP6 grubunda VEGF seviyeleri DAB+TCDD grubuna göre azalmıştı. Bu azalma, histopatolojik olarak hücrel hasar ve preneoplastik fokus oluşumundaki azalmayla uyumlu olarak muhtemelen IP6'nın mitojenik sinyal yolağını bloke etmesiyle de ilgilidir.

Retinoidler çok yönlü etkiye sahip bileşiklerdir. Bazı retinoidlerin kanser hücrelerinde büyümeyi inhibe ettiği, farklılaşmayı ve/veya apoptozu uyardığı rapor edilmiştir. Bazı retinoidler ise hücrel proliferasyonu uyarma kapasitesine sahiptirler. Retinoidler, biyolojik etkilerini nükleer reseptörleri aktive ederek gösterirler. RAR ve RXR'ler özgül retinoid nükleer reseptörleridir. Retinoidler aynı zamanda nükleer reseptörlerin farklı setlerini aktive edebilme yeteneğine sahiptirler. Özel hücrel şartlarda retinoidlerin hangi nükleer reseptör setine yönleneceğini ve hangi yolağın tercih edileceğini belirleyen bazı moleküler faktörlerin olduğu tahmin edilmektedir (70).

Retinoik asit, bronkoalveolar karsinoma hücrelerinde VEGF gen ekspresyonunu arttırmaktadır (191). Yine retinoik asidin çeşitli hücre tiplerinde VEGF'yi düzenlediği rapor edilmiştir. **Sidell ve arkadaşları**, insan endometriyal stromal hücreleriyle yaptıkları çalışmada retinoik asit ile VEGF'nin transkripsiyonel bir aktivatörü olan TPA (12-O-tetradekanoil forbol-13-asetat)'yı kombine verdiklerinde VEGF'nin salınımının arttığını bildirmişlerdir (156).

Çalışmamızda DAB+TCDD+RA grubunda 120. gün örneklerinde VEGF değerleri kontrol grubuna göre artmış, DAB+TCDD grubuna göre ise 60., 90. ve 120. gün örneklerinde azalmıştı. Kontrol grubuna göre yükselmiş değerler histopatolojik olarak hücresel hasar ve preneoplastik fokus oluşumuyla uyumlu olmadığından bu gruptaki ılımlı artışın retinoid metabolizmasıyla ilgili olduğunu düşünmekteyiz.

DAB+TCDD+IP6+RA grubunda kontrol grubuna göre artmış değerler muhtemelen yine RA'nın baskın etkisiyle gözlenmiş olabilir.

MMP-2

MMP-2, Zn⁺² bağımlı bir endopeptidaz ailesinin üyesidir. Primer fonksiyonu ekstraselüler matrikste proteinlerin degradasyonudur. Fizyolojik olarak diğer MMP'lerle koordinasyon halinde embriyonik gelişim, anjiyogenez, ovulasyon, meme bezi involüsyonu, yara iyileşmesi gibi normal fizyolojik süreçlerde rol oynar. MMP-2, transkripsiyonel ve post transkripsiyonel düzeyde sıkı bir şekilde düzenlenir (68). MMP'ler doku matriksini degrade ederek anjiyogenezde kritik bir adım olan damar oluşumu için yeni oluşmuş endotel hücrelerin hareketini kolaylaştırır. Endotel ve tümör hücrelerinde MMP'lerin ekspresyonunda tümör derecesiyle uyumlu olarak artış gözlenir (13). MMP'ler hücre sinyalinin değiştirilerek, büyüme faktörlerinin salınımı ve protein fonksiyonunda artışla tümör gelişiminin daha erken evrelerine katkıda bulunurlar (64). Deneysel karaciğer karsinogenezinde MMP'lerin potansiyel rolünün araştırıldığı az

sayıda çalışma vardır (44). **Wood ve Archer**, hem Fischer 344 (duyarlı) hem de Copenhagen-Cop (dirençli) sıçanlarda preneoplastik lezyon gelişiminin erken safhalarında gelatinazların rolünü araştırdıkları çalışmalarında Cop sıçanlara oranla Fischer 344 sıçanlarda hepatik MMP-2 ve MMP-9 aktivitesinin arttığını bildirmişlerdir (182). **Gao ve arkadaşları** ise sıçanlarda DEN ile başlatılmış HCC'nin gelişimi sırasında MMP-2 mRNA'sında ve pro ve aktif MMP-2 ile pro MMP-9 aktivitesinde artış olduğunu rapor etmişlerdir (45). **Villano ve arkadaşlarının** A2058 melanoma hücre serilerinde yaptığı çalışmada TCDD'nin AhR yolağının aktivasyonu aracılığıyla MMP'lerin (MMP-1, 2 ve 9) ekspresyonunu ve aktivitesini arttırdığı ve bununda A2058 serilerinin in vitro invazyonuna katkıda bulunduğu bildirilmiştir. Üstelik TCDD verildiğinde AhR yolağı tümör başlatmadan (initiation) ziyade tümör ilerletme (progression) safhasına katkıda bulunmaktadır (171).

Bizim çalışmamızda DAB+TCDD grubunda 90. ve 120. gün örneklerinde kontrole göre artmış olan MMP-2 aktivitesinde TCDD'nin AhR yolağı aktivasyonunun katkısı olmuşsa da biz özellikle bu zamanlarda gözlenen preneoplastik lezyonların etkili olduğunu düşünmekteyiz.

Anjiyogenik faktörlerin tümör hücrelerinden sentezi ve salınmasında mitojenik, hücre sağ kalım ve inflamatuvar sinyaller önemli rol oynar. EGFR, IGF-1R ve PDGFR-b gibi reseptörler, tümör hücrelerinde VEGF ve MMP'lerin ekspresyonuna neden olan ERK1/2 ve PI3K gibi önemli sinyal moleküllerinin fosforilasyonunu ilerletir. Fitokimyasalların tümör hücrelerinde bu sinyal mekanizmasını bozduğu gösterilmiştir (13). Literatürde IP6'nın MMP'nin aktivitesi ya da protein sentezi üzerine etkilerini içeren bir çalışmaya rastlayamadık. Çalışmamızda DAB+TCDD+IP6 alan grubumuzda 90. ve 120. gün örneklerinde DAB+TCDD grubuna göre azalmış ve kontrole yaklaşan değerler, IP6'nın mitojenik uyarıyı azaltıcı etkisi nedeniyle MMP-2 ekspresyonunun azalmasından kaynaklanıyor olabilir.

Park ve arkadaşları, in vitro çalışmalarında retinolün MMP-2 ve MMP-9'un protein seviyesi ve aktivitesini azaltarak kolon kanser hücre serilerinin invazyonunda

azalmaya neden olduğunu bildirmişlerdir (130). Çalışmamızda DAB+TCDD+RA grubunda 90. ve 120. gün örneklerinde belirlenen DAB+TCDD grubuna göre azalmış ve kontrole yaklaşan MMP-2 değerleri, retinil asetatın MMP-2 aktivitesini ve/veya protein sentezini azalttığını göstermektedir.

IP6 ve RA'yı birlikte verdiğimiz grupta DAB+TCDD grubuna göre azalmış ve kontrole yaklaşan değerler IP6 ve RA'nın sinerjistik etki ile tek başlarına verildikleri gruplara oranla MMP-2 aktivitesini ve/veya protein sentezini daha da düşürdüklerini göstermektedir.

MDA

Lipid peroksidasyonu serbest radikallerin hücre membranındaki çoklu doymamış yağ asitlerini okside etmesi sonucu gelişir. Oluşan lipid hidroperoksitler aldehit ve karbonil bileşiklerine dönüşür. Sonuçta yağ asitlerinin peroksidasyonunda tiyobarbitirik asitle ölçülebilen malondialdehit (MDA) meydana gelir ve MDA, lipid peroksidasyonunun son ürünü olarak ölçülür (167).

DAB ve fenobarbitalle indüklenen hepatokarsinogenezde farelerin karaciğerinde MDA seviyelerinin arttığı bildirilmiştir (14). **Oh ve Lee** sıçanlara %0,06 oranında DAB verdikleri çalışmalarında MDA seviyelerinin arttığını bildirmişlerdir (125). DAB'ın metabolizması sırasında reaktif oksijen türlerinin oluştuğu rapor edilmiştir (21).

Laboratuvar hayvanlarına akut yüksek doz TCDD uygulandığında oksidatif stresin oluştuğu ve bunun da reaktif oksijen türlerinin üretimi, lipid peroksidasyonu ve DNA hasarını arttırdığı gösterilmiştir (160). Farelere subkronik olarak TCDD uygulandığında süperoksit üretimini arttırdığı ve lipid peroksidasyonunun uyarıldığı bildirilmiştir (61). Çalışmamızda DAB+TCDD grubunda 60., 90. ve 120. gün

örneklerinde MDA seviyelerinin kontrole göre anlamlı derecede yüksek olması DAB+TCDD kombinasyonunun doz birikimine bağlı olarak hücre membranlarında hasar oluşturduğunu ve lipid peroksidasyonunu uyardığını göstermektedir.

Midorikawa ve arkadaşları, hücre kültüründe (Human leukemia, HL-60) yaptıkları çalışmalarında IP6'nın oksidatif DNA hasarını etkili biçimde inhibe ettiğini ve Cu(II), Fe(II) ve Fe(III) gibi metalleri şelatlayarak H₂O₂'den reaktif oksijen türlerinin oluşumunu önleyen bir antioksidan olarak davrandığını bildirmişlerdir (111). **Miyamoto ve arkadaşları**, IP6 ve onun hidroliz ürünlerinin biyolojik sistemlerde demir iyonunun indüklediği lipid peroksidasyonuna karşı koruyucu olabileceğini bildirmişlerdir (113). Bizim çalışmamızda da literatürle benzer yönde sonuçlar elde edildi ve DAB+TCDD+IP6 grubunda MDA seviyeleri 60., 90. ve 120. gün örneklerinde hem kontrol grubuna hem de DAB+TCDD grubuna göre anlamlı düzeyde azalmıştı.

Retinoidlerin lipid peroksidasyonuna karşı antioksidan özelliğe sahip oldukları hem in vivo hem de in vitro çalışmalarda gösterilmiştir (53). β -Karoten ve diğer karotenoidlerin membran sistemlerinde serbest radikal reaksiyonlarını baskılayabilme yetenekleri olduğu için antioksidan olarak işlev gördükleri düşünülmektedir. β -Karotenin, lipid peroksidasyonu ile ilişkili peroksil radikalleri ile direkt olarak etkileşme yeteneğine sahip olduğu bildirilmiştir (109). Tersine **Chamilova ve arkadaşları**, N-metil-N-nitrozüre (MNU) ile sıçanlarda meme kanseri oluşturdukları çalışmalarında subkronik olarak günde 8.2 mg retinil asetat verilen grupta MDA seviyelerinin arttığını ve retinil asetatın kimyasalla indüklenen meme kanserinde etkili olsa bile, retinil ester birikiminden kaynaklanan toksik karaciğer hasarı nedeniyle klinik kullanımının sınırlandığını bildirmişlerdir (23). Bizim çalışmamızda DAB+TCDD+RA grubunda 30., 60. ve 120.gün örneklerinde kontrole göre MDA seviyeleri azalmıştı. 15. gün örnekleri dışındaki zamanlarda DAB+TCDD grubuna göre de MDA seviyeleri azalmıştı. TCDD'nin retinoid metabolizmasına etkileri düşünüldüğünde uyguladığımız RA dozunun lipid peroksidasyonunu azaltacak yeterlilikte olduğu söylenebilir.

DAB+TCDD+IP6+RA alan grupta yine IP6 ve RA alan gruplara benzer şekilde 60., 90. ve 120. gün örneklerinde MDA değerleri hem kontrol hem de DAB+TCDD grubuna göre azalmıştı. IP6 ve RA'nın kombine verilmeleri de lipid peroksidasyonunu azaltacak etkinlikte olduklarını göstermektedir.

Sit c

Apoptoz, programlı hücre ölümü, fizyolojik şartlarda gerçekleşen bir hücre ölüm şekli olduğu kadar patolojik şartlarda da oluşan bir savunma mekanizmasıdır. Apoptozla tümör hücreleri, virüsle kontamine olmuş hücreler, kendi başına buyruk hale gelen ve kendine zarar veren immün hücreler gibi istenmeyen ve tehlikeli hücreler ortadan kaldırılır ve bunlara karşı savunma oluşturulur (56).

Farklı derecelerde özgüllük, duyarlılık ve doğruluğa sahip çeşitli apoptoz ölçüm metodları bildirilmiştir (134). Biz çalışmamızda apoptozu sitokrom c'nin sitozole salınma oranını ve DNA fragmentasyonunu ölçerek değerlendirdik.

Sitokrom c, mitokondrilerde membranlar arası alanda iç membranın dış yüzeyine bağlı olarak bulunur. Elektron transport zincirinde kompleks III ve kompleks IV arasındaki elektron alışverişinde rol oynayarak ATP sentezine katkıda bulunur (135). Sitokrom c'nin mitokondrilerden salınımı olayı, halen tartışmalıdır. Sitokrom c, PT (permeability transition) poru yoluyla, Bax ile mitokondrilerde sitokrom c'nin geçmesi için kanallar oluşması yoluyla ve su dolan mitokondrilerin dış membranlarının patlaması yoluyla sitoplazmaya girebilir (56). Sitozole salınan sitokrom c, Apaf-1(apoptotic protease-activating factor-1)'e bağlanır ve ATP varlığında apoptozom oluşturmak üzere kaspaz 9'u aktive eder. Aktive olan kaspaz 9, diğer kaspazları aktive ederek apoptoz kaskadını ilerletir ve hücrenin ölüm sürecini başlatır (135).

Proliferasyona ek olarak apoptoz da bir hücre klonunun büyümesi için ana faktör olarak pay sahibidir. Klonal büyüme, kemirgen karaciğerinde fenotipik olarak değişmiş, preneoplastik hepatositlerin karakteristik bir özelliğidir. Bu hücrelerin genotoksik karaciğer karsinojenleri gibi çeşitli nedenlerle oluşmuş, bir ya da daha çok kritik fakat henüz belirlenmemiş lezyonlarda bulunduğu düşünülmektedir. Karaciğer tümör promotör'lerinin etkisiyle preneoplastik fokusların klonal büyümesi kolaylaştırılır ve bu etki malignansi yönünde ilerlemeleriyle ilişkilidir (183).

DNA hasarının indüklediği apoptoz, karsinogenezde önemli bir rol oynar ve tümör promotör'lerinin hareketinin bir işleyişi olarak önerilir. Genotoksik lezyonlarda bulunan hepatositlerin sağ kalımına izin veren apoptozun inhibisyonu karaciğerde TCDD ve fenobarbitalin tümör promotör'leri olarak hareket etmeleri açısından çok önemli olabilir. TCDD ile muamele edilen sıçanların preneoplastik karaciğer fokuslarında apoptozun belirgin şekilde baskılandığı gösterilmiştir (183). TCDD'nin apoptozu değiştirme kapasitesi ile ilgili fare ve sıçanlarda yapılan çalışmaların bir kısmında hepatositlerde ve karaciğer dokusunda TCDD'nin apoptozu baskıladığı bir kısmında ise apoptotik hücre ölümüne herhangi bir etkisinin olmadığı bildirilmiştir. Balık embriyosu, kültüre T hücreleri ve timositlerle yapılan çalışmalarda ise TCDD'nin apoptozu indüklediği rapor edilmiştir. Yine *Xenopus* embriyolarının hepatositlerinde TCDD'nin hem apoptoz hem de nekrozu indüklediği bildirilmiştir. TCDD'nin apoptozu indükleme kabiliyetinin hücre tipi/doku spesifik olabileceği önerilmektedir (134). Ek olarak nongenotoksik karsinojenlerin proliferasyonu arttırdığı ve apoptozu inhibe ettiği bilinmektedir (148). Kültüre edilmiş hepatositlerde fenobarbital DNA sentezini indüklerken, apoptozu baskılar (133).

Çalışmamızda DAB+TCDD grubunda sitokrom c (sitozol/mitokondri) değerleri açısından 30. gün örneklerinde kontrole göre anlamlı düzeydeki yükselme artan hücre hasarına yanıt olarak apoptoza giden hücre sayısının artışından kaynaklanıyor olabilir. 60., 90. ve 120. gün örneklerinde gözlenen kontrole göre azalmış sitokrom c salınımı ise TCDD'nin biriken dozuyla beraber apoptozu inhibe etme yeteneğiyle ilgili olabilir.

IP6'nın apoptozu iki yolla indüklediği düşünülmektedir. İlkinde güçlü bir hücre sağ kalım yolağı olan Akt-NFκB yolağını inhibe eder. İkincisinde ise mitokondriyal permeabilizasyona neden olarak sitokrom c salınımını artırır. **Ferry ve arkadaşları**, HeLa hücrelerinde yaptıkları çalışmalarında IP6'nın Akt yolağını inhibe ederek mitokondriyal membran potansiyelini etkilediğini ve membran potansiyelindeki azalmanın direkt olarak mitokondriyal defekte neden olduğunu bildirmişlerdir. Bu defekt sonucunda sitozole salınan sitokrom c miktarında artış olduğunu rapor etmişlerdir (39). Hayvan modellerinde tümör hücresinin apoptotik aktivitesini indükleyerek antitümörojenik etki gösteren IP6 ile CaCo-2 (human colon carcinoma cells) hücreleri muamele edildiğinde histon ilişkili DNA fragmentasyonu ve apoptozun karakteristiklerinden biri olan membran kabarcıkları (blebbing) gözlenmiştir (170).

Çalışmamızda DAB+TCDD+IP6 grubunda 30., 60., 90. ve 120. gün örneklerinde gözlenen hem kontrol grubuna hem de DAB+TCDD grubuna göre yüksek değerler IP6'nın mitokondriden sitokrom c salınımını arttırdığını ve bu etkisinin TCDD'nin apoptozu baskılama özelliğine karşın gerçekleştiğini göstermektedir.

Retinoidler, hücre proliferasyonunu inhibe edebilirler, hücre farklılaşmasını düzenleyebilirler ve apoptozu arttırabilirler (106). Vitamin A sıçan kolonik tümör hücre serilerinde apoptozu indükleyerek proliferasyon ve farklılaşmayı değiştirebilme kapasitesi sergiler (110). Retinoik asit mitokondri üzerine direkt etkiye sahip olup membran potansiyelinde düşme, organelde şişlik, yumrulaşma (svelling) ve sitokrom c'nin salınımına neden olmaktadır. **Pettersson ve arkadaşları**, pankreatik adenokarsinoma hücrelerinde retinoidlerin, RAR'ları özellikle de RARγ'yı aktive ederek kaspaz aktivasyonunun yanı sıra Bcl-2 ailesi üyelerinin ekspresyonlarındaki değişiminin de işe karıştığı yolak aracılığıyla apoptozu indüklediğini bildirmişlerdir (136).

Bizim çalışmamızda DAB+TCDD+RA grubunda 30., 60., 90. ve 120. gün örneklerinde gözlenen hem kontrol grubuna hem de DAB+TCDD grubuna göre yüksek sitokrom c değerleri, RA'nın mitokondriden sitokrom c salınımını arttırdığını ve bunu

IP6'nın etkisine benzer şekilde mitokondri membran potansiyelinde oluşturduğu değişiklik aracılığıyla gerçekleştirmiş olabileceğini düşündürmektedir. Yine RA'nın sitokrom c salınımına etkisini IP6 alan gruba benzer şekilde TCDD'nin apoptozu baskılama özelliğine karşın gerçekleştirdiğini tahmin etmekteyiz.

DAB+TCDD+IP6+RA grupta 30., 60., 90. ve 120. gün örneklerinde de sitokrom c değerleri IP6 ve RA'yı ayrı ayrı verdiğimiz gruplarla benzer şekildeydi. IP6+RA kombinasyonunun sinerjistik etkisi yine sitokrom c salınımını arttırması yönündedir.

DNA FRAGMENTASYONU

Kromozomal DNA'nın oligonükleozomal büyüklükte fragmanlara bölünmesi apoptozun biyokimyasal karakteristiklerinden biridir (77). Her ne kadar oligonükleozomal (~200 bp) büyüklükteki fragmanlar apoptozun karakteristiği olsa da apoptozun erken safhalarında DNA fragmanlarının büyüklüğü kilobaz (20-300 kb) boyutlarındadır (85).

Worner ve Schrenk'e göre TCDD ve fenobarbital UV ışınlarının neden olduğu internüklezomal DNA fragmentasyonunu baskılar (183).

Çalışmamızda 30. gün örneklerinde DAB+TCDD grubunda DNA fragmentasyonu artmıştı. Bu artışın hasarlanan hücrelerin ortadan kaldırılması için apoptotik aktivitenin artmasından kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz. 60., 90. ve 120. gün örneklerinde ise DNA fragmentasyonu azalmıştı. Bu zamanlarda gözlenen azalma muhtemelen TCDD'nin biriken dozuyla beraber apoptozu baskılayabilme özelliğinden kaynaklanmaktadır.

IP6'nın, in vitro olarak kolon karsinoma hücrelerinde DNA fragmentasyonunu arttırdığı bilinmektedir (170).

Bizim çalışmamızda DAB+TCDD+IP6 grubunda 60. ve 90. gün örneklerinde kontrole göre azalmış ancak DAB+TCDD grubuna göre artmış DNA fragmentasyonu değerleri IP6'nın apoptozu uyarma ve DNA fragmentasyonunu arttırabilme özelliğine karşılık TCDD'nin DNA fragmentasyonunu baskılayabilme özelliğinin öne çıkmasından kaynaklanabilir ya da örneklerin alındığı zamanda sitozole çıkamamış daha büyük DNA fragmanlarının varlığı nedeniyle de kontrole göre düşük değerler elde edilmiş olabilir. 120. gün örneklerinde gözlenen hem kontrol grubu hem de DAB+TCDD grubuna göre artış muhtemelen IP6'nın DNA fragmentasyonunu arttırabilme yeteneğinden kaynaklanmaktadır.

DAB+TCDD+RA grubundaki sonuçlarımız IP6 alan grupla aynıydı. 60. ve 90. gün örneklerinde TCDD'nin baskın etkisi ile düşük değerler elde edilmiş olabilir. Yine sitozole çıkamamış daha büyük DNA fragmanları nedeniyle de düşük değerler gözlenmiş olabilir. 120. gün örneklerinde ise RA'nın baskın etkisi sonucu DNA fragmentasyonu artmış olabilir.

DAB+TCDD+IP6+RA alan grupta 60., 90. ve 120. gün örneklerinde DNA fragmentasyonu hem kontrol hem de DAB+TCDD grubuna göre yüksekti. IP6 ve RA'nın DNA fragmentasyonu üzerine olan sinerjistik etkisinin TCDD'nin DNA fragmentasyonunu baskılayabilme yeteneğine baskın olduğunu ve bu nedenle yüksek değerler elde ettiğimizi düşündürmektedir.

CYP1A1

TCDD ve PAH'lar gibi çevresel kontaminantlara maruziyet CYP1A gen ailesinin indüksiyonuna neden olur. CYP1A1'in transkripsiyonel aktivitesi AhR tarafından düzenlenmektedir (27). Ancak TCDD, CYP1A'nın zayıf bir substratıdır ve reaktif araçlar oluşturmaz. CYP1A indüksiyonu ve TCDD toksisitesi arasındaki ilişki tartışmalı bir konu olarak kalmaya devam etmektedir (107).

Walker ve arkadaşları, sıçanlara 30 hafta boyunca farklı dozlarda TCDD uyguladıkları çalışmalarında karaciğerde CYP1A enzimlerinin doza bağlı olarak indüklendiğini bildirmişlerdir (181). **Czepiel ve arkadaşları**, TCDD'nin karaciğerde CYP1A1 üzerine etkilerini araştırdıkları çalışmalarında sıçanlara bir hafta arayla 3 kez 0,75µg ve 8µg dozlarda TCDD vermişler ve CYP1A1 için düşük dozda düşük immünohistokimyasal boyanma, yüksek dozda yüksek immünohistokimyasal boyanma gözlemişler ancak CYP1A1 aktivitesini ölçtüklerinde düşük dozdaki aktivitenin yüksek doza oranla daha fazla olduğunu belirlemişlerdir. Bu sonuçların TCDD'nin doza bağlı toksik etkisi nedeniyle CYP1A1 proteinlerini yıkmasından kaynaklanabileceğini önermektedirler (31). **Anderson ve arkadaşları**, Huh.8 (human hepatoma cell line expressing the HCV subgenomic replicon) hücre serisinde TCDD tarafından CYP1A1 indüksiyonunu değerlendirdikleri çalışmalarında TCDD verilen grupta CYP1A1 geninin ekspresyonunun baskılandığını belirlemişlerdir. Bu baskılanmanın kısmi olarak ROS'dan veya AhR sinyal yolağında bir bozukluktan kaynaklanabileceğini, XRE bağlayan reseptörün tam fonksiyonel olmayabileceği ya da sitozolik AhR'nin ligand bağlama residülerindeki değişme nedeniyle fonksiyonel olmayabileceğini rapor etmişlerdir (4).

Murugan ve arkadaşları, subkronik olarak p-DAB uyguladıkları sıçanlarda CYP1A aktivitesinin arttığını bildirmişlerdir. Prokarsinojen olan p-DAB'ın karaciğerde CYP tarafından N-oksidasyon ve N- hidroksilasyonla N-OH-MAB ve N-OH AAB gibi elektrofilik metabolitlerine dönüştürüldüğünü ve bu metabolizma esnasında $O_2^{\bullet-}$ ve H_2O_2 oluştuğunu rapor etmişlerdir (117). PAH'ların CYP1A indüksiyonuyla amino azo boyalarına bağlı karsinogenezi inhibe ettiğini, bunu azo boyalarının nonkarsinojenik metabolitlere dönüşümünü artırarak gerçekleştirdiğini gösteren çalışmalar mevcuttur (107).

Biz çalışmamızda DAB+TCDD grubunda 15. ve 30. gün örneklerinde kontrol grubuna göre CYP1A1 ekspresyonunun arttığını belirledik. Bu artışın DAB ve TCDD'nin kombine etkisiyle CYP1A1 ekspresyonunu indüklemesinden kaynaklandığını düşünmekteyiz. 60., 90. ve 120. gün örneklerinde gözlenen CYP1A1

ekspresyonundaki azalma ise TCDD'nin zamanla biriken dozunun toksik etkileri sonucu meydana gelmiş olabileceği gibi CYP1A1 protein sentezi ile ilgili AhR yolağında meydana gelmiş olabilecek bir ya da daha fazla bozukluktan da kaynaklanabilir.

DAB+TCDD+IP6 grubunda 60., 90. ve 120. gün örneklerinde kontrole göre CYP1A1 değerlerindeki azalma TCDD'nin toksisitesinden kaynaklanabilir. 90. ve 120. gün örneklerinde DAB+TCDD grubuna göre artış olması IP6'nın TCDD'nin toksisitesini azaltmasıyla ilgili olabilir.

Diyetsel karotenoidler AhR'nin zayıf ligandlarıdır. Retinoik asidin RAR'lar üzerinden CYP1A1 genini indüklediği insanlarda gösterilmiş ancak kültüre edilmiş kemirgen hücrelerinde bu indüksiyon görülmemiştir (34).

DAB+TCDD+RA grubunda 60., 90. ve 120. gün örneklerinde kontrole göre azalan CYP1A1 değerlerinin TCDD'nin toksisitesi ile ilgili olduğunu düşünmekteyiz. 90. ve 120. gün örneklerinde DAB+TCDD grubuna göre artış olması IP6 grubuna benzer şekilde RA'nın TCDD'nin toksisitesini azaltmasıyla ilgili olabilir.

IP6 ve RA'yı birlikte verdiğimiz DAB+TCDD+IP6+RA grubundaki sonuçlar da IP6 ve RA'yı ayrı ayrı verdiğimiz gruplardaki gibiydi. IP6 ve RA'yı kombine vermek TCDD'nin CYP1A1 ekspresyonuna etkisini ayrı ayrı verildikleri duruma göre değiştirmemişti.

HİSTOPATOLOJİK BULGULARIN TARTIŞMASI

Çalışmamızda her iki kontrol grubunda da histopatolojik olarak değerlendirdiğimiz bulgular hücresel dejenerasyon, iltihabi hücre infiltrasyonu, nekroz ve preneoplastik fokus açısından herhangi bir patolojiye rastlanmadı.

DAB+TCDD grubunda kontrol grubuna göre hücrel dejenerasyon tüm zamanlardaki örneklerde oluşmuştu. 15. gün örneklerinden 120. gün örneklerine doğru hücrel dejenerasyonun arttığını gözlemledik. 60., 90. ve 120. gün örneklerinde orta şiddette iltihabi hücre infiltrasyonu oluşmuştu. Düzensiz ve hafif nekroz odakları 30. ve 60. gün örneklerinde izlenirken orta şiddette nekroz odakları 90. ve 120. gün örneklerinde gözlendi. 90. gün örneklerinde orta, 120. gün örneklerinde belirgin şiddette preneoplastik fokus bulgusu mevcuttu. Bu durum DAB ve TCDD'nin uygulama süresine bağlı olarak toksik etkilerinin arttığını göstermektedir.

DAB+TCDD+IP6 grubunda kontrol grubuna göre hücrel dejenerasyon 30., 60., 90. ve 120. gün örneklerinde hafif şiddette oluşmuştu. 90. ve 120. gün örneklerinde hafif şiddette iltihabi hücre infiltrasyonu, 60., 90. ve 120. gün örneklerinde yine hafif şiddette nekroz alanları gözlenirken preneoplastik fokus bakımından istatistiğe yansıyan bir bulgu yoktu.

DAB+TCDD+RA grubunda kontrol grubuna göre hücrel dejenerasyon 15., 30., 60., 90. gün örneklerinde hafif şiddette, 120. gün örneklerinde orta şiddette gözlendi. 120. gün örneklerinde gözlenen orta şiddetteki iltihabi hücre infiltrasyonu dışında bu grupta nekroz ve preneoplastik fokus oluşumları istatistiki açıdan gözlenmedi.

DAB+TCDD+IP6+RA grubunda kontrol grubuna göre hücrel dejenerasyon 30., 60 ve 90. gün örneklerinde hafif şiddette mevcuttu. 90. gün örneklerinde hafif şiddette iltihabi hücre infiltrasyonu ve nekroz alanı dışında bir patolojiye ve preneoplastik fokus oluşumuna rastlanmadı.

Bulgularımız, bu iki çevresel kontaminant DAB ve TCDD'nin subkronik olarak uygulandıklarında karaciğerde hücrel hasarın yanısıra preneoplastik fokus oluşumuna neden olduklarını göstermektedir.

IP6 alan grubun hücresel dejenerasyon, iltihabi hücre infiltrasyonu ve nekroz bulguları her bir örnek alım zamanı kendi içinde değerlendirildiğinde DAB+TCDD grubuna göre farklı değilken bu bulguların oluşma zamanları DAB+TCDD grubunkilerden daha geç zamanda ortaya çıkmıştı. 90. ve 120. günlerdeki preneoplastik fokus oluşumunu ise anlamlı derecede azaltmıştı. O halde IP6'nın düşük dozda bile hücre hasarını azalttığı ve preneoplastik fokus oluşumunu önlediği söylenebilir.

RA alan grupta her bir örnek alım zamanı için hücresel dejenerasyon DAB+TCDD grubundan farklı değildi. 120. gün örneklerinde DAB+TCDD grubuna göre iltihabi hücre infiltrasyonunda fark görülmezken, nekroz ve preneoplastik fokus oluşumlarının DAB+TCDD grubuna göre anlamlı derecede azalması TCDD'nin A vitamini depleksyonu kabiliyetine karşın RA'nın karaciğerde nekroz ve preneoplastik fokus oluşumlarını engelleyebildiğini göstermektedir.

IP6+RA kombinasyonu, 90. ve 120. gün örneklerinde hücresel dejenerasyonu, 60. ve 120. gün örneklerinde iltihabi hücre infiltrasyonunu DAB+TCDD grubuna göre azaltmıştı. DAB+TCDD grubuna göre 90. ve 120. gün örneklerinde nekroz açısından bir iyileşme gözlenmezken preneoplastik fokus oluşumu anlamlı derecede azalmıştı. IP6+RA kombinasyonunun karaciğerde preneoplastik fokus oluşumunu sinerjik etki ile engelleyebildiği ancak bu oluşum bakımından ayrı ayrı verilmeleri ile kombine verilmelerinin pek fazla fark yaratmadığı söylenebilir.

Deneysel karaciğer kanser modeli oluşturmak için başlatıcı (initiator) olarak p-DAB ve promotör olarak TCDD'yi kullandığımız çalışmamızda subkronik olarak verdiğimiz bu kimyasallar *Sprague dawley* erkek sıçanların karaciğerlerinde preneoplastik fokus oluşumuna neden olmuştur. Her iki kimyasalda günlük hayatta karşılaşılabileceğimiz, yaygın çevresel kirleticilerdir ve ayrı ayrı kanserojenik etkilerini ortaya koyan pek çok çalışma mevcuttur. Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular, bu çevresel kirleticilerle temasın kaçınılmaz olduğu durumlarda diyetle IP6 ve RA alınmasının karaciğer için koruyucu rol oynayabileceğini göstermektedir.

6. SONUÇ

Deneysel kanser modeli oluşturmak için kullandığımız DAB ve TCDD'nin karaciğerdeki etkilerine karşı IP6 ve RA'nın koruyucu rolüne ait sonuçlar aşağıda belirtilmiştir.

DAB+TCDD alan grup 3'de hepatik hasara rağmen serum ALT seviyelerinde gözlenen düşük değerler, DAB+TCDD kombinasyonunda özellikle TCDD'nin etkisiyle karaciğerde ALT sentezinin baskılandığını düşündürmektedir.

DAB+TCDD kombinasyonu grup 3'de, zamanla ve biriken TCDD dozuyla birlikte muhtemelen hücre hasarını arttırarak serum AST değerlerinde artışa neden olmuştur. IP6 ve RA alan gruplarda serum AST değerlerinin azalarak kontrole yaklaşması IP6 ve RA'nın hem ayrı hem de birlikte uygulandıklarında hücre hasarını azaltmalarıyla ilişkili gibi görünmektedir.

DAB+TCDD kombinasyonu grup 3 ve 4'de serum ALP değerlerine belirgin bir katkıda bulunmamıştır. Oysa RA alan grupta gözlenen artmış serum değerleri RA'nın vitamin A metabolizması aracılığıyla büyük olasılıkla ALP sentezini arttırmasından kaynaklanmaktadır.

Grup 3'de gözlenen düşük serum LDH değerleri TCDD'nin LDH aktivitesini baskılamasından kaynaklanıyor olabilirse de LDH enzim sentezini baskılamasından da kaynaklanıyor olabilir. IP6 ve RA alan gruplarda da TCDD'nin inhibisyon etkisi grup 3'e benzer şekilde gözlenmiştir.

DAB+TCDD kombinasyonu grup 3'de hem hepatosit hasarı hem de preneoplastik lezyonların oluşumuna neden olmuştur ve VEGF değerleri hepatosit hasarına yanıt olarak, preneoplastik lezyonlardan salınarak ve muhtemelen TCDD'nin AhR yolağı

aracılığıyla katkısı nedeniyle yüksek bulunmuştur. IP6, preneoplastik lezyon oluşumunu ve hücre sel hasarı azaltarak ve belki mitojenik sinyal yolağı blokajı aracılığıyla DAB+TCDD grubuna göre VEGF seviyelerini azaltmıştır. RA ise muhtemelen vitamin A metabolizması aracılığıyla VEGF sentezini arttırarak VEGF değerlerinde kontrole göre ılımlı bir artışa neden olmuştur.

TCDD, AhR yolağı aracılığıyla MMP-2 ekspresyonunu uyarabilse de DAB+TCDD grubundaki MMP-2 artışının gözlendiği zamanlar preneoplastik lezyonların gözlendiği zamanlarla uyumludur ve muhtemelen MMP-2 artışı bu lezyonlardan salınma nedeniyle gözlenmiştir. IP6, antimitojenik etki ile MMP-2 ekspresyonunu azaltarak, RA ise MMP-2 ekspresyonu ve/veya aktivitesini azaltarak MMP-2 değerlerini grup 3'e göre düşürmüştür. IP6+RA kombinasyonunda bu düşüş biraz daha fazla olmuştur.

DAB+TCDD kombinasyonu subkronik, düşük doz uygulandığında reaktif oksijen türlerinin oluşumu aracılığıyla lipid peroksidasyonunu arttırmaktadır. IP6 ve RA ise hem ayrı hem de birlikte verildiklerinde lipid peroksidasyonunu azaltmaktadırlar.

Grup 3'de gözlenen sitoplazmaya salınan sitokrom c miktarındaki azalma DAB+TCDD kombinasyonunda özellikle promotör olan TCDD'nin apoptozu inhibe etmesiyle ilişkili görünmektedir. IP6 ve RA ise olasılıkla mitokondri membran potansiyelini etkileyerek sitokrom c salınımını ve dolayısıyla apoptozu arttırmaktadır.

DAB+TCDD kombinasyonu muhtemelen biriken dozla beraber DNA fragmantasyonunu azaltarak apoptozu baskılamıştır. IP6 ve RA ayrı ayrı DNA fragmantasyonunu arttırabilme yeteneğindedirler ve birlikte verildiklerinde de sinerjistik etkiyle DNA fragmantasyonunu arttırmışlardır.

DAB+TCDD kombinasyonunda muhtemelen TCDD'nin biriken dozuna bağlı olarak artan toksisitesi CYP1A1 protein ekspresyonunda azalmaya neden olmuştur. IP6 ve RA ise TCDD'nin CYP1A1 ekspresyonu üzerindeki inhibisyon etkisini kısmen düzeltmiştir.

DAB+TCDD kombinasyonu subkronik olarak uygulandığında uygulama süresi arttıkça karaciğerde hücresel dejenerasyon, itihabi hücre infiltrasyonu ve nekroz oluşumunu arttırmaktadır. Ayrıca preneoplastik fokus oluşumuna neden olmaktadır. IP6 ve RA ise karaciğerde hücresel hasarı azaltarak preneoplastik fokus oluşumuna karşı koruyucu rol oynamaktadırlar. IP6 ve RA birlikte verildiğinde ise hücresel dejenerasyon ve iltihabi hücre infiltrasyonunu ayrı verilmelerine oranla daha fazla azaltmıştır.

Sonuç olarak karaciğer kanser modeli oluşturmak için p-DAB'ın başlatıcı (initiator) ve TCDD'nin promotör olarak bir arada verildiği bu deneysel çalışmada DAB+TCDD kombinasyonunun karaciğerde preneoplastik fokus oluşumunu tetiklediği gösterildi. Bu süreçte IP6 ve RA'nın preneoplastik dönüşümü büyük oranda engelleyerek koruyucu rol oynadığı belirlendi. IP6 ve RA'nın koruyucu fonksiyonlarının antiproliferatif özelliklerine, apoptotik mekanizmaları uyarmalarına ve özellikle TCDD'nin neden olduğu protein sentezi ve enzim aktivitesi ile ilgili bozuklukları düzeltmelerine bağlı olduğunu düşünmekteyiz.

Bu iki kimyasal ajanın doz ve temas süresinin karaciğer üzerindeki etkilerinin araştırılacağı ilave çalışmaların yararlı olacağı görüşünderiz

KAYNAKLAR DİZİNİ

1. Ahmed, A.A., 2009, Protective effect of montelukast on paraquat-induced lung toxicity in rats, *Bio Science Trends*, 3, 2, 63-72.
2. Akamatsu, Y., Ikegami, R., 1968, Induction of hepatoma and systemic amyloidosis in mice by 4-(dimethylamino) azobenzene feeding, *Gann* 59, 201-206.
3. Aly, H.A.A., Domènech, O., 2009, Cytotoxicity and mitochondrial dysfunction of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in isolated rat hepatocytes, *Toxicol Lett* 191,79-87.
4. Anderson, G.R., Hasan, A., Yin, H., Qadri, I., Quattrochi, L.C., 2006, Regulation of the CYP1A1 gene by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin but not by beta-naphthoflavone or 3-methylcholanthrene is altered in hepatitis C virus replicon-expressing cells, *Mol Pharmacol* 70, 3, 1062-70.
5. Andreola, F., Fernandez-Salguero, P.M., Chiantore, M.V., Petkovich, M.P., Gonzalez, F.J., and De Luca, L.M., 1997, Aryl hydrocarbon receptor knockout mice (AHR^{-/-}) exhibit liver retinoid accumulation and reduced retinoic acid metabolism, *Cancer Res* 57, 2835-8.
6. 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.
7. Bacic, I., Druzijanic, N., Karlo,R., Skific, I., Jagic, S., 2010, Efficacy of IP6 + inositol in the treatment of breast cancer patients receiving chemotherapy: prospective, randomized, pilot clinical study, *Journal of Experimental & Clinical Cancer Res*, 29,12.
8. Ballew, C., Bowman, B.A., Russell, R.M., Sowell, A.L., and Gillespie,C., 2001, Serum retinyl esters are not associated with biochemical markers of liver dysfunction in adult participants in the third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III), 1988–1994, *Am J Clin Nutr* 73, 934-40.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

9. Baten, A., Ullah, A., Tomazic, V.J., Shamsuddin, A.M., 1989, Inositol-phosphate-induced enhancement of natural killer cell activity correlates with tumor suppression, *Carcinogenesis* 10,9, 1595-1598.
10. Bergmeyer, H.U., Brent, E., 1974, Methods of enzymatic analysis, in: H.U. Bergmeyer (Ed.), Verlag Chemie Weinheim, vol. 2, Academic Press, New York, pp 735-760.
11. Berridge, M.J., and Irvine, R.F., 1989, Inositol phosphates and cell signalling *Nature* 341, 197-205.
12. Bertazzi, P. A., Bernucci, I., Brambilla, G., Consonni, D., and Pesatori, A. C., 1998, The Seveso studies on early and long-term effects of dioxin exposure: A review, *Environ Health Perspect* 106, 625-633.
13. Bhat, T.A., Singh, R.P., 2008, Tumor angiogenesis – A potential target in cancer chemoprevention. *Food Chem Toxicol* 46, 1334-1345.
14. Bhattacharjee, N., Banerjee, P., Anisur, R.K., 2009, Homeopathic drugs Natrum sulphuricum and Carcinisin prevent azo dye-induced hepatocarcinogenesis in mice, *Indian J Biochem Biophys* 46, 4, 307-18.
15. Biesalski, H. K., and Stofft, E., 1992, Biochemical, morphological, and functional aspects of systemic and local vitamin A deficiency in the respiratory tract, *Ann NY Acad Sci* 669, 325-331.
16. Biswas, S.J., Khuda-Bukhsh, A. R., 2005, Cytotoxic and genotoxic effects of the azo-dye p-dimethylaminoazobenzene in mice: A time-course study, *Mutat Res* 587, 1-8.
17. Bombick ,D.W., Madhukar, B.V., Brewster, D.W., and Matsumura, F., 1985, TCDD (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin) causes increases in protein kinases

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

particularly protein kinase C in the hepatic plasma membrane of the rat and the guinea pig, *Biochem Biophys Res Comm* 127, 296-302.

18. Bombick, D.W., Jankun, J., Tullis, K., and Matsumura, F., 1988, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-pdioxin causes increases in expression of c-erb-A and levels of protein-tyrosine kinases in selected tissues of responsive mouse strains, *Proc Natl Acad Sci USA* 85, 4128-4132.
19. Bradford, M.M. ,1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem* 72, 248.
20. Burton, K., 1956, A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid, *Biochem J* 62, 315,323.
21. Caballero, F., Gerez, E., Batlle, A., and Vazquez, E., 2002, Interaction of cimetidine with P450 in a mouse model of hepatocarcinogenesis initiation, *Br J Cancer* 86, 630-635.
22. Carrier, F., Owens, R.A., Nebert, D.W., and Puga, A., 1992, Dioxin-dependent activation of murine Cyp1a-1 gene transcription requires protein kinase C-dependent phosphorylation, *Mol Cell Biol* 12, 1856-1863.
23. Chamilová, M., Bojková, B., Kalická, K., Kubatka, P., Adámeková, E., Ahlersová, E., Ahlers, I., Pástorová, B., 2001, Retinyl Acetate and Melatonin In Chemoprevention Of Mammary Carcinogenesis In Female Rats: Metabolic Changes, *Acta Vet Brno* 70, 57-63.
24. Chen, N., Ma,W.Y. and Dong, Z., 2001, Inositol hexaphosphate inhibits ultraviolet B-induced signal transduction, *Mol Carcinog* 31, 139-144.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

25. Choi, Y., Lee, C., Park, K., Kim, S.Y., Kim, S.H., Han, S., Kim, S.H., and Byun, Y., 2003, Subacute Toxicity of All-Trans-Retinoic Acid Loaded Biodegradable Microspheres in Rats. *Drug Dev Res* 59, 326-332.
26. Chu, I., Bowers, W.J., Caldwell, D., Nakai, J., Pulido, O., Yagminas, A., Wade, M.G., Moir, D., Gill, S., and Mueller, R., 2005, Toxicological Effects of Gestational and Lactational Exposure to a Mixture of Persistent Organochlorines in Rats: Systemic Effects, *Toxicol Sci* 88, 2, 645-655.
27. Ciolino, H.P., Daschner, P.J., Yeh, G.C., 1999, Dietary flavonols quercetin and kaempferol are ligands of the aryl hydrocarbon receptor that affect CYP1A1 transcription differentially, *Biochem J* 340, 715-22.
28. Clarke, N., Germain, P., Altucci, L., and Gronemeyer, H., 2004, Retinoids: potential in cancer prevention and therapy, *Expert Rev Mol Med* 6, 25, 1-23.
29. Conney, A.H., 2003, Induction of drug-metabolizing enzymes: a path to the discovery of multiple cytochromes P450, *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 43, 1-30.
30. Coon, M.J., 2005, Cytochrome P450: nature's most versatile biological catalyst. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 45, 1-25.
31. Czepiel, J., Biesiada, G., Gajda, M., Szczepański, W., Szypuła, K., Dabrowski, Z., Mach, T., 2010, The effect of TCDD dioxin on the rat liver in biochemical and histological assessment, *Folia Biol (Krakow)* 58, 85-90.
32. Davidson, A.J., Zon, L.I., 2003, Biomedicine, Love, honor, and protect (your liver), *Science* 299, 5608, 835-7.
33. De Luca, L. M., Darwiche, N., Jones, C. S., and Scita, G., 1995, Retinoids in differentiation and neoplasia, *Sci Am Sci Med* 2, 28-37.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

34. Denison, M.S., and Nagy, S.R., 2003, Activation Of The Aryl Hydrocarbon Receptor By Structurally Diverse Exogenous And Endogenous Chemicals *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 43, 309-34.
35. Efanov, A. M., Zaitsev, S. V., and Berggren, P.-O., 1997, Inositol hexakisphosphate stimulates non-Ca²⁺-mediated and primes Ca²⁺-mediated exocytosis of insulin by activation of protein kinase C, *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 94, 4435-4439.
36. El-Sherbiny, Y., Cox, M.C., Ismail, Z.A., Shamsuddin, A.M., and Vucenik, I., 2001, G₀/G₁ arrest and S phase inhibition of human cancer cell lines by inositol hexaphosphate (IP₆), *Anticancer Res* 21, 2393-2404.
37. Enan, E., and Matsumura, F., 1994, Significance of TCDD-induced changes in protein phosphorylation in the adipocyte of male guinea pigs, *J Biochem Toxicol* 9, 159-170.
38. Environmental Health Committee of the Central Environment Council; Living Environment Council, and Food Sanitation Investigation Council, 1999, Report on Tolerable Daily Intake (TDI) of Dioxin and Related Compounds, Japan, 53 p.
39. Ferry, S., Matsuda, M., Yoshida, H., Hirata, M., 2002, Inositol hexakisphosphate blocks tumor cell growth by activating apoptotic machinery as well as by inhibiting the Akt/NFκB-mediated cell survival pathway, *Carcinogenesis* 23,12, 2031-41.
40. Fletcher, N., Giese, N., Schmidt, C., Stern, N., Lind, P.M., Viluksela, M., Tuomisto, J.T., Tuomisto, J., Nau, H., Håkansson, H., 2005, Altered Retinoid Metabolism in Female Long-Evans and Han/Wistar Rats following Long-Term 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin (TCDD)-Treatment. *Toxicol Sci*, 86, 2, 264-72.
41. Fouzy, A.S.M., Desouky, H.M., Ghazi, Y.A., and Hammam, A.M., 2007, Some Clinico and Histopathological Changes in Female Goats Experimentally Exposed to Dioxin, *Pak J Biol Sci*, 10,8, 1213-1220.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

42. Fox, C.H., and Eberl, M., 2002, Phytic acid (IP6), novel broad-spectrum anti – neoplastic agent, *Complement Ther Med* 10, 229 - 234.
43. 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, 110-116.
44. Furtado, K.S., Pires, P.W., Justulin, L.A. Jr, Rodrigues, M.A., Felisbino, S.L., Barbisan, L.F., 2009, Metalloproteinases 2 and 9 activity during promotion and progression stages of rat liver carcinogenesis, *J Mol Histol* 40, 1, 1-11.
45. Gao ,Y., Zhang, Z., Jiang, Z-S., Fang, S.G., Sun, E.W., Wang, Y. Chen, B.H., 2002, Dynamic changes of matrix metalloproteinases in rat liver during the development of diethylnitrosamine-induced hepatocarcinoma, *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao* 22, 865-868.
46. Garner R. C., Martin C. N., Clayson D. B., 1984, *Chemical Carcinogens*, 2nd edition ACS Monograph American Chemical Soc, Washington DC, pp175-302.
47. Gianni, M., Terao, M., Sozzani, S., and Garattini, E., 1993, Retinoic acid and cyclic AMP synergistically induce the expression of liver/bone/kidney-type alkaline phosphatase gene in L929 fibroblastic cells, *Biochem J* 296, 67-77.
48. Gonzalez, F. J., Fernandez-Salguero, P., 1998, The aryl hydrocarbon receptor: studies using the AHR-null mice, *Drug Metab Dispos* 12, 1194-1198.
49. Graf, E., and Eaton, J. W., 1990, Antioxidant functions of phytic acid, *Free Radi Biol Med* 8, 61-69.
50. Grases, F., Simonet, B.T., Vucenik, I., Prieto, R.M., Costa-Bauza, A., March, J.G., Shamsuddin, A.M., 2001, Absorption and excretion of orally administered inositol hexaphosphate (IP6 or phytate) in humans, *Biofactors* 15, 53-61.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

51. Grases, F., Simonet, B. M., Vucenik, I., Perello, J., Prieto, R. M., and Shamsuddin, A. M., 2002, Effects of exogenous inositol hexaphosphate (InsP6) on the levels of InsP6 and of inositol trisphosphate (InsP3) in malignant cells, tissues and biological fluids, *Life Sci* 71,1535-1546.
52. Groff, J.L., Gropper, S.S., and Hunt, S.M. 1995, *The Fat Soluble Vitamins. In Advanced Nutrition and Human Metabolism.* Minneapolis: West Publishing Company, pp 284-324.
53. Guajardo, M., Terrasa, A., Catalá, A., 1999, The effect of alpha tocopherol, all-trans retinol and retinyl palmitate on the non enzymatic lipid peroxidation of rod outer segments, *Mol Cell Biochem*197,173-8.
54. Guengerich, F.P., 2004, Cytochrome P450: what have we learned and what are the future issues? *Drug Metab Rev* 36, 159-197.
55. Gupta, K.P., Singh, J., Bharathi, R., 2003, Suppression of DMBA-induced mouse skin tumor development by inositol hexaphosphate and its mode of action, *Nutr Cancer*, 46, 1, 66-72.
56. Gültekin, N., Karaoğlu, K., Küçükateş, E., 2008, Hücrede apoptoz ve sağkalım mekanizmalarının keşfedilmesi ve yeni potansiyel tedavi stratejileri, *Türk Kardiyol Dern Arş* 36, 120-130.
57. Hanberg, A., Nilsson, C. B., Trossvik, C., and Hakansson, H., 1998, Effect of 2,3,7,8 tetrachlorodibenzo- p-dioxin on the lymphatic absorption of a single oral dose of [3H]retinol and on the intestinal retinol esterification in the rat, *J Toxicol Environ Health A* 55, 331-344.
58. Hankinson, O., 1995, The aryl hydrocarbon receptor complex, *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 35, 307-340.
59. Hansen, L.A., Sigman, C.C., Andreola, F., Ross, S.A., Kelloff, G.J., and De Luca, L.M., 2000, Retinoids in chemoprevention and differentiation therapy, *Carcinogenesis* 21, 1271-9.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

60. Hassan, S.A., Rizk, M.Z., El-Sharkawi, F., Badary, O., and Kadry, M.O., 2007, The Possible Synergistic Role of Phytic Acid and Catechin in Ameliorating the Deteriorative Biochemical Effects Induced by Carbon Tetrachloride in Rats, *J Appl Sci Res* 3, 11, 1449-1459.
61. Hassoun, E.A., Wilt, S.C., Devito, M.J., Van Birgelen, A., Alsharif, N.Z., Birnbaum, L.S., Stohs, S.J., 1998, Induction of oxidative stress in brain tissues of mice after subchronic exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, *Toxicol Sci* 42, 1, 23-7.
62. Hathcock, J.N., Hattan, D.G., Jenkins, M.Y., McDonald, J.T., Sundaresan, P.R., and Wilkening, V.L., 1990, Evaluation of vitamin A toxicity, *Am J Clin Nutr* 52, 183-202.
63. Hayes, K.C., 1971, On the pathophysiology of vitamin A deficiency, *Nutr Rev* 29, 3-6.
64. Hillegass, J.M., Murphy, K.A., Villano, C.M., White, L.A., 2006, The impact of aryl hydrocarbon receptor signaling on matrix metabolism: implications for development and disease, *Biol Chem* 387, 1159-1173.
65. Hong, T.K., Lee-Kim, Y.C., 2009, Effects of retinoic acid isomers on apoptosis and enzymatic antioxidant system in human breast cancer cells, *Nutr Res Pract* 3, 2, 77-83.
66. Hong, W. K., and un. L. M., 1994, *Retinoids and human cancer*, Raven Press, New York, pp 597-658.
67. Hong, W. K., Lippman, S. M., Hittelman, W. N., and Lotan, R., 1995, Retinoid chemoprevention of aerodigestive cancer: from basic research to the clinic, *Clin Cancer Res* 1, 677-686.
68. <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/MMP2>.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

69. <http://ehp.niehs.nih.gov/roc/loc10.html>. NTP, Report on Carcinogens.
70. <http://kuscholarworks.ku.edu/dspace/bitstream/1808/5385/1>.
71. <http://pharmacology.medicine.dal.ca/undergraduate/courses.cfm>.
72. <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>.
73. <http://www.aafp.org/afp/2005/0315/p1105.html>.
74. <http://www.caspases.com>.
75. <http://www.cde.gov/niosh/npotocca.html>.
76. <http://www.pdrhealth.com/health/clinical-trials-index.aspx>.
77. Hua, Z.J., Xu, M., 2000, DNA fragmentation in apoptosis, *Cell Res* 10,205-211.
78. Huang, C., Ma, W.Y., Hecht, S.S., Dong, Z., 1997, Inositol hexaphosphate inhibits cell transformation and activator protein 1 activation by targeting phosphatidylinositol-3 kinase, *Cancer Res* 57, 14, 2873-2878.
79. Huff, J., Lucier, G., and Tritscher, A., 1994, Carcinogenicity of TCDD: Experimental, mechanistic, and epidemiologic evidence, *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 34, 343-372.
80. Huisaman, B., and Lochner, A.,1996, Inositol polyphosphates and their binding proteins-a short review, *Mol Cell Biochem* 157, 229-232.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

81. Hutz, R.J., Carvan III, M.J., Baldrige, M.G., Conley, L.K., and Ting Heiden, T., 2006, Environmental toxicants and effects on female reproductive function *Tren Reprod Bio* 2, 1-11.
82. International Agency for Research on Cancer (IARC), 1975, Some Aromatic Azo Compounds. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, vol. 8. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer pp 357.
83. International Agency for Research on Cancer (IARC), 1987, On the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to man, Group 2B, vol. 8 Supplement 7.
84. International Agency for Research on Cancer (IARC), 2003, IARC monographs programme on the evaluation of carcinogenic risks to human, Lyons, Available at: <http://193.51.164.11/default/html>. 2003.
85. Ioannou, Y.A., Chen, F.W., 1996, Quantitation of DNA fragmentation in apoptosis, *Nucleic Acids Res*, 24, 992-993.
86. Jenab, M., andThompson, L.U., 2000, Phytic acid in wheat bran affects cell morphology, differentiation and apoptosis, *Carcinogenesis* 21,1547-1552.
87. Karmakar, S., Banik, N.L., Ray, S.K., 2007, Molecular Mechanism of Inositol Hexaphosphate-mediated Apoptosis in Human Malignant Glioblastoma T98G Cells, *Neurochem Res* 32, 2094-2102.
88. Kato, T.A., Matsuda, T., Matsui, S., Mizutani, T., Saeki, K., 2002, Activation of the Aryl Hydrocarbon Receptor by Methyl Yellow and Related Congeners: Structure–Activity Relationships in Halogenated Derivatives, *Biol Pharm Bull* 25, 4, 466-471.
89. Khuda-Bukhsh, A.R., Banerjee, A., Biswas, R., Pathak, S., Boujedaini, N., and Belon, P., 2008, Crude Extract of Turmeric Reduces Hepato-Toxicity and

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Oxidative Stress in Rats Chronically Fed Carcinogens, *J Complement Integr Med* 5, 1, 34.
90. Kim, D.G., Jo, B.H., You, K.R., Ahn, D.S., 1996, Apoptosis induced by retinoic acid in Hep 3B cells in vitro, *Cancer Lett* 107, 149-159.
 91. Kimura, T., Kodama, M., and Nagata, C., 1982, A correlation of N-hydroxylation of aminoazodyes with their carcinogenic activity in the rat, *Carcinogenesis* 3, 1393-1396.
 92. Kimura, T., Kodama, M., Nagata, C., Kamataki, T., Kato, R., 1985, Comparative study on the metabolism of N-methyl-4-aminoazobenzene by two forms of cytochrome P-488, *Biochem Pharmacol* 34, 3375-3377.
 93. Klaunig, J. E., Xu, Y., Isenberg, J. S., Bachowski, S., Kolaja, K. L., Jiang, J., Stevenson, D.E., Walborg, E.F.Jr., 1998, The role of oxidative stress in chemical carcinogenesis, *Environ Health Perspect* 106, 289-295.
 94. Kociba RJ, Keyes DG, Beyer JE, Carreon RM, Wade CE, Dittenber DA, Kalnins RP, Frauson LE, Park CN, Barnard SD, Hummel RA, Humiston CG., 1978, Results of a two-year chronic toxicity and oncogenicity study of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in rats, *Toxicol Appl Pharmacol* 46, 2, 279-303.
 95. Kociba, R., 1984, Evaluation of the carcinogenic and mutant potential of 2,3,7,8-TCDD and other chlorinated dioxins, *Bio Mech Dioxin Action* 18, 73-84.
 96. Koolman, J., Roehm, K.H., 2005, *Color Atlas of Biochemistry*, Second edition, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, pp 318-320.
 97. Krauss, G., 2001, *Biochemistry of Signal Transduction and Regulation*, Second Edition, Wiley-VCH Verlag GmbH, pp 455-472.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

98. Kuntz, E., Kuntz, H.D., 2006, Hepatology Principles And Practice, 2nd Edition, Springer Medizin Verlag Heidelberg, 906 p.
99. Lamb, J. G., Straub, P., Tukey, R. H., 1994, Cloning and characterization of cDNAs encoding mouse Ugt1.6 and rabbit UGT1.6: differential induction by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, *Biochemistry* 33, 10513-10520.
100. Larsson, O., Barker, C. J., Sjöholm, A., Carlqvist, H., Mitchell, R. H., Bertorello, A., Nilsson, T., Honkanen, R. E., Mayr, G. W., Zwiller, J., and Berggren, P.-O., 1997, Inhibition of phosphatases and increased Ca²⁺ channel activity by inositol hexakisphosphate, *Science* 278, 471-474.
101. Ledda-Columbano GM, Pibiri M, Molotzu F, Cossu C, Sanna L, Simbula G, Perra A, Columbano A., 2004, Induction of hepatocyte proliferation by retinoic acid, *Carcinogenesis* 25, 11, 2061-6.
102. Levine, W.G., 1991, Metabolism of azo dyes: implication for detoxication and activation *Drug Metab Rev* 23, 253-309.
103. Levine, W. G., Stoddart, A. and Zbaida, S., 1992, Multiple mechanisms in hepatic microsomal azoreduction, *Xenobiotica* 22, 9, 1111 -1120.
104. Lippman, S. M., Benner, S. E., and Hong, W. K., 1995, The chemoprevention of cancer, Marcel Dekker, New York, pp 329-352.
105. Loaiza-Perez, A.I., Kenney, S., Boswell, J., Hollingshead, M., Alley, M.C., Hose, C., Ciolino, H.P., Yeh, G.C., Trepel, J.B., Vistica, D.T., Sausville, E.A., 2004, Aryl hydrocarbon receptor activation of an antitumor aminoflavone: Basis of selective toxicity for MCF-7 breast tumor cells, *Molecular Cancer Therapeutics*, Mol Cancer Ther 3, 6, 715-25.
106. Lotan, R., 1996, Retinoids in cancer chemoprevention, *Faseb J* 10, 1031-1039.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

107. Ma, Q., Lu, A.Y., 2007, CYP1A Induction and Human Risk Assessment: An Evolving Tale of in Vitro and in Vivo Studies, *Drug Metab Dispos* 35, 7, 1009-16.
108. Madhukar, B.V., Ebner, K., Matsumura, F., Bombick, D.W., Brewster, D.W., and Kawamoto, T., 1988, 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin causes an increase in protein kinases associated with epidermal growth factor receptor in the hepatic plasma membrane, *J Biochem Toxicol* 3, 261-277.
109. Mascio, P. D., Murphy, M. E. and Sies, H., 1991, Antioxidant defense systems: The role of carotenoids, tocopherols, and thiols, *Am J Clin Nutr* 53, 194-200.
110. Maziere, S., Cassand, P., Narbonne, J.F., Meflah, K., 1997, Vitamin A and apoptosis in colonic tumor cells *Int J Vitam Nutr Res* 67, 4, 237-41.
111. Midorikawa , K., Murata, M., Oikawa, S., Hiraku, Y., Kawanishi, S., 2001, Protective effect of phytic acid on oxidative DNA damage with reference to cancer chemoprevention, *Biochem Biophys Res Commun* 288, 3, 552-7.
112. Miller J. A., Miller E. C., 1953, The carcinogenic aminoazo dyes, *Adv Cancer Res* 1, 339-396.
113. Miyamoto, S., Kuwata, G., Imai, M., Nagao, A., Terao, J., 2000, Protective effect of phytic acid hydrolysis products on iron-induced lipid peroxidation of liposomal membranes, *Lipids* 35, 12, 1411-3.
114. Moon, R. C., Mehta, R. C., and Rao, K. J. V. N., 1994, Retinoids and cancer in experimental animals, Raven Press, New York, pp 573-595.
115. Morisson, R. S., Shi, E., Kan, M., Yamaguchi, F., McKeehan, W., Rudnicka-Nawrot, M., and Palczewski, K., 1994, Inositol hexaphosphate (InsP6): An antagonist of fibroblast growth factor receptor binding and activity, *In vitro cell Dev Biol* 30A, 783-789.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

116. Murray, R.K, Granner, D.K., Mayes,P.A., Rodwell, V.W. 2003, Harper's Illustrated Biochemistry, Twenty-Sixth Edition, McGraw-Hill Companies, USA, pp 626-633.
117. Murugan, R. S., Uchida, K., Hara, Y., Nagini, S.D., 2008, Black tea polyphenols modulate xenobiotic-metabolizing enzymes, oxidative stress and adduct formation in a rat hepatocarcinogenesis model, *Free Radic Res* 42,10, 873-884.
118. Murugan, R.S., Vinothini, G., Hara, Y., Nagini, S., 2009, Black tea polyphenols target matrix metalloproteinases, RECK, proangiogenic molecules and histone deacetylase in a rat hepatocarcinogenesis model, *Anticancer Res* 29, 6, 2301-5.
119. Muto, Y., Ninmiya, M., and Fujiki, H., 1990, Present status of research on cancer chemoprevent ion in Japan, *Jpn 1 Clin Oncol* 20, 219-220.
120. Nam, S.W., Park, J.Y., Ramasamy, A., Shevade, S., Islam, A., Long, P.M., Park, C.K., Park, S.E., Kim,S.Y., Lee, S.H., Park, W.S., Yoo, N.J., Liu, E.T., Miller, L.D., and Lee, J.Y., 2005, Molecular Changes From Dysplastic Nodule to Hepatocellular Carcinoma Through Gene Expression Profiling, *Hepatology* 42, 809-818.
121. Nesn, S., Argus, M., Bergman, H., Chu, K., Frith,C., Helmes, T., Mcgaughy, R., Ray, V., Slaga, T.j., Tennant, R., Weisburger, E., 1987, Chemical carcinogenesis: a review and analysis of the literature of selected chemicals and the establishment of the gene-tox carcinogen data base: a report of the US. Environmental ProtectionAgency gen-tox program, *Mutat Res* 185, 1- 195.
122. Nilsson, C. B., Hoegberg, P., Trossvik, C., Azais-Braesco, V., Blaner, W. S., Fex, G., Harrison, E. H., Nau, H., Schmidt, C. K., van Bennekum, A. M., and Hakansson, H., 2000, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin increases serum and kidney retinoic acid levels and kidney retinol esterification in the rat, *Toxicol Appl Pharmacol* 169, 121-131.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

123. 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, 270-276.
124. Norazalina, S., Norhaizan, M.E., Hairuszah, I., Norashareena, M.S., 2010, Anticarcinogenic efficacy of phytic acid extracted from rice bran on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats, *Exp Toxicol Pathol* 62, 3, 259-68.
125. Oh, S.H., Lee, M.H., 1981, Effect of p-dimethylaminoazobenzene and 2(3)-tert-butyl-4-hydroxyanisole on lipid peroxidation, glutathione-S-transferase, peroxidase and reductase in rat liver, *Yonsei Med J* 22, 2, 95-100.
126. Ohkawa , H., Ohishi, W., Yzaxgi, K. , 1979, Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, *Anal Biochem* 95, 351-358.
127. Ohnishi, S., Murata, M., Degawa, M., Kawanishi, S., 2001, Oxidative DNA damage induced by an N-hydroxy metabolite of carcinogenic 4-dimethylaminoazobenzene, *Jpn J Cancer Res* 92, 1, 23–29.
128. Onat, T., Emerk, K., Sözmen, E.Y., 2002, *İnsan Biyokimyası*, Palme Yayıncılık, Ankara, 518-519 s.
129. Park, Y.N., Kim, Y.B., Yang, K.M., Park, C., 2000, Increased Expression of Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis in the Early Stage of Multistep Hepatocarcinogenesis, *Arch Pathol Lab Med* 124,7,1061-5.
130. Park, E.Y., Wilder, E.T., and Lane, M.A., 2007, Retinol Inhibits the Invasion of Retinoic Acid-Resistant Colon Cancer Cells In Vitro and Decreases Matrix Metalloproteinase mRNA, Protein, and Activity Levels, *Nutr Cancer* 57, 1, 66-77.
131. Partanen, A.M., Alaluusua, S., Miettinen, P.J., Thesleff, I., Tuomisto, J. Pohjanvirta, R., Lukinmaa, P.L., 1998, Epidermal growth factor receptor as a

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- mediator of developmental toxicity of dioxin in mouse embryonic teeth, *Lab Invest* 78, 1473-1481.
132. Pathak, S., Das, J.K., Biswas, S.J., and Khuda-Bukhsh. A.R., 2006, Protective potentials of a potentized homeopathic drug, *Lycopodium-30*, in ameliorating azo dye induced hepatocarcinogenesis in mice, *Mol Cell Biochem* 285, 121-31.
 133. Pathak, S., Khuda-Bukhsh, A.R., 2007, Assessment of hepatocellular damage and hematological alterations in mice chronically fed *p*-dimethyl aminoazobenzene and phenobarbital, *Exp Mol Pathol* 83, 104-111.
 134. Patterson, R.M., Stachlewitz, R., and Germolec, D., 2003, Induction of apoptosis by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin following endotoxin exposure, *Toxicol Appl Pharmacol* 190, 120-134.
 135. Peter Quinn, Valerian Kagan., 2002, *Phospholipid Metabolism in Apoptosis. Subcellular Biochemistry*, Kluwer Academic Publishers, New York, Vol 36, Chap 1, 5 p.
 136. Pettersson, F., Dalgleish, A.G., Bissonette, R.P., Colston, K.W., 2002, Retinoids cause apoptosis in pancreatic cancer cells via activation of RAR- γ and altered expression of Bcl-2/Bax, *Br J Cancer* 87, 5, 555-61.
 137. Pitot, H., Goldsworthy, T., Campbell, H., and Poland, A., 1980, Quantitative evaluation of the promotion by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin of hepatocarcinogenesis from diethylnitrosamine, *Cancer Res* 40, 3616-3620.
 138. Pohjanvirta, R., Tuomisto, J., 1994, Short-term toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in laboratory animals: effects, mechanisms, and animal models, *Pharmacol Rev* 46, 483-549.
 139. Poland, A., and Knutson, J. C., 1982, 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: Examination of the mechanism toxicity, *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 22, 517-554.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

140. Poland, A., Palen, D., and Glover, E. 1982, Tumor promotion by TCDD in skin of HRS/J hairless mice, *Nature* 300, 271-273.
141. Poon RT-P, Lau CP-Y, Cheung S-T, Yu W-C, Fan S-T., 2003, Quantitative correlation of serum levels and tumor expression of vascular endothelial growth factor in patients with hepatocellular carcinoma, *Cancer Res* 63, 3121-3126.
142. Puga, A., Maier, A., and Medvedovic, M., 2000, The transcriptional signature of dioxin in human hepatoma HepG2 cells, *Biochem Pharmacol* 60, 1129-1142.
143. Raza, H., Levine, W. G., Chowdhury, N. R., and Chowdhury, J. R., 1987, Microsomal azoreduction and glucuronidation in the metabolism of dimethylaminoazobenzene by the rat liver, *Xenobiotica* 17, 6, 669 - 677.
144. Reddy, B.S., 1999, Prevention of colon carcinogenesis by components of dietary fiber, *Anticancer Res* 19, 5A, 3681-3683.
145. Roman, A.C., Carvajal-Gonzalez, J.M., Rico-Leo, E.M., Fernandez-Salguero, P.M., 2009, Dioxin receptor deficiency impairs angiogenesis by a mechanism involving VEGF-A depletion in the endothelium and transforming growth factor-beta overexpression in the stroma. *J Biol Chem* 284, 37, 25135-48.
146. Sasakawa, N., Sharif, M., and Hanley, M. R., 1995, Metabolism and biological activities of inositol pentakisphosphates and inositol hexakisphosphate, *Biochem Pharmacol* 50, 137-146.
147. Schmidt, J. V., Bradfield, C. A., 1996, Ah receptor signaling pathways, *Ann Rev Cell Biol* 12, 55-89.
148. Seufi, A.M., Ibrahim, S.S., Elmaghraby, T.K., Hafez, E.E., 2009, Preventive effect of the flavonoid, quercetin, on hepatic cancer in rats via oxidant/antioxidant activity: molecular and histological evidences, *J Exp Clin Cancer Res* 11, 28, 80.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

149. Sewall, C.H., Lucier, G.W., Tritscher, A.M., and Clark, G.C., 1993, TCDD-mediated changes in hepatic epidermal growth factor receptor may be a critical event in the hepatocarcinogenic action of TCDD, *Carcinogenesis* 14, 1885-1893.
150. Sewall, C.H., Clark, G.C., and Lucier, G.W., 1995, TCDD reduces rat hepatic epidermal growth factor receptor: comparison of binding, immunodetection, and autophosphorylation *Toxicol Appl Pharmacol* 132, 263-272.
151. Shamsuddin, A. M., and Ullah, A., , 1989, Inositol hexaphosphate inhibits large intestinal cancer in F344 rats 5 months after induction azoxymethane, *Carcinogenesis* 10, 625-626.
152. Shamsuddin, A.M., Yang, G-Y., Vucenik, I., 1996, Novel anti-cancer functions of IP6: growth inhibition and differentiation of human mammary cancer cell lines in vitro, *Anticancer Res* 16, 3287-3292.
153. Shamsuddin, A.M., Vucenik, I., and Cole, K.E., 1997, IP6: a novel anticancer agent. *Life Sci* 61, 343 - 354.
154. Shamsuddin, A.M., 1999, Metabolism and cellular functions of IP6, *Anticancer Res* 18, 3733-3736.
155. Shamsuddin, A. M., 2002, Anti-cancer function of phytic acid, *Int J Food Sci Technol* 37, 769-782.
156. Sidell,N., Feng, Y., Hao, L., Wu, J., Yu, J., Kane, M.A., Napoli, J.L., Taylor, R.N., 2010, Retinoic acid is a cofactor for translational regulation of vascular endothelial growth factor in human endometrial stromal cells, *Mol Endocrinol* 24, 1, 148-60.
157. Siemiatycki, J., Richardson, L., Straif, K., Latreille, B., Lakhani, R., Campbell, S., Rousseau, M.C., Boffetta, P., 2004, Listing occupational carcinogens, *Environ Health Perspect*, 112,1447-1459.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

158. Singh, R. P., Agarwal, C., and Agarwal, R. , 2003, Inositol hexaphosphate inhibits growth, and induces G1 arrest and apoptotic death of prostate carcinoma DU145: modulation of CDKI-CDK-cyclin and pRb-related protein-E2F complexes, *Carcinogenesis* 24, 555-563.
159. Singh, R.P., and Agarwal, R., 2006, Mechanisms of action of novel agents for prostate cancer chemoprevention. *Endocr Relat Cancer* 13: 751-778.
160. Slezak, B.P., Diliberto, J.J., Birnbaum, L.S., 1999, 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin-mediated oxidative stress in CYP1A2 knockout (CYP1A2^{-/-}) mice, *Biochem Biophys Res Commun* 264, 2, 376-9.
161. Smith, Colleen., Marks, Allan D., Lieberman, Michael., 2007, Marks' temel tıbbi biyokimyası klinik yaklaşım, Çeviri: Atik, U., Öncü Basımevi, Ankara 976 s.
162. Soeda, J., Miyagawa, S., Sano, K., Masumoto, J., Taniguchi, S., Kawasaki, S., 2001, Cytochrome c release into cytosol with subsequent caspase activation during warm ischemia in rat liver, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 281,1115-1123.
163. Stiborová M., Frei E., Schmeiser H. H., Wiessler M., Hradec J., 1992, Formation and ³²P-postlabeling of DNA and tRNA adducts derived from peroxidative activation of carcinogenic azo dye N,N-dimethyl-4-aminoazobenzene, *Carcinogenesis*, 13, 1657-1662.
164. Takeuchi, A., Takeuchi, M., Oikawa, K., Sonoda, K.H., Usui, Y., Okunuki, Y., Takeda, A., Oshima, Y., Yoshida, K., Usui, M., Goto, H., Kuroda, M., 2009, Effects of dioxin on vascular endothelial growth factor (VEGF) production in the retina associated with choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50, 7, 3410-6.
165. Temizkan, Güler., Arda, Nazlı., 2004, Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler, Nobel Tıp Kitabevleri, Genişletilmiş 2.baskı, Bölüm 7: Proteinlerin İzolasyonu, Analizi ve Saflaştırılması 161-273.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

166. Toxicological profile for chlorinated dibenzo-p-dioxins, 1998, U.S. Department of health and human services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 149-150.
167. Tuğ, T., Terzi, S.M., Özdemir, N., Özçelik, M., 2003, Akut Atak ve Atak Sonrası Stabil Dönemdeki Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı Olan Hastalarda Oksidatif Mekanizmaların Değerlendirilmesi, *Toraks Dergisi* 4,1, 12-15.
168. Urbano, G., López-Jurado, M., Aranda, P., Vidal-Valverde, C., Tenorio, E., Porres, J., 2000, The role of phytic acid in legumes: antinutrient or beneficial function? *J Physiol Biochem* 56, 3, 283-94.
169. Vasiliou, V., Kozak, C. A., Lindahl, R., Nebert, D. W., 1996, Mouse microsomal Class 3 aldehyde dehydrogenase: AHD3 cDNA sequence, inducibility by dioxin and clofibrate, and genetic mapping, *DNA Cell Biol* 25, 235-245.
170. Verghese, M., Rao, D.R., Chawan, C.B., Walker, L.T., Shackelford, L., 2006, Anticarcinogenic effect of phytic acid (IP6): Apoptosis as a possible mechanism of action, *LWT* 39, 1093-1098.
171. Villano, C.M., Murphy, K.A., Akintobi, A., White, L.A., 2006, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) induces matrix metalloproteinase (MMP) expression and invasion in A2058 melanoma cells, *Toxicol Appl Pharmacol* 210, 3, 212-24.
172. Viluksela, M., Bager, Y., Tuomisto, J.T., Scheu, G., Unkila, M., Pohjanvirta, R., Flodström, S., Kosma, V.M., Mäki-Paakkanen, J., Vartiainen, T., Klimm, C., Schramm, K.W., Wärngård, L., Tuomisto, J., 2000, Liver Tumor-promoting Activity of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in TCDD-sensitive and TCDD-resistant Rat Strains, *Cancer Res* 60, 6911-6920.
173. Vucenik, I., Shamsuddin, A. M., , 1994, [3H]-Inositol hexaphosphate (phytic acid) is rapidly absorbed and metabolized by murine and human malignant cells in vitro, *J Nutr* 124, 861-868.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

174. Vucenik, I., Yang, G.-Y., and Shamsuddin, A. M., 1995, Inositol hexaphosphate and inositol inhibit DMBA-induced rat mammary cancer, *Carcinogenesis* 16,1055-1058.
175. Vucenik, I., Zhang, Z. S., and Shamsuddin, A. M., 1998, IP6 in treatment of liver cancer. II. Intra-tumoral injection of IP6 regresses pre-existing human liver cancer xenotransplanted in nude mice, *Anticancer Res* 18, 4091-4096.
176. Vucenik, I., Ramakrishna, G., Tantivejkul, K., Anderson, L., and Ramljak, D., 1999, Inositol hexaphosphate (IP6) differentially modulates the expression of PKC δ in MCF-7 and MDA-MB 231 cells, *Proc Am Assoc Cancer Res* 40, 653.
177. Vucenik, I., Tantivejkul, K., Ramakrishna, G., Anderson, L. M. & Ramljak, D., 2000, Antiproliferative effect inositol hexaphosphate (IP6) in breast cancer cells is mediated by increase in p27 and decrease in Rb protein phosphorylation, *Proc Am Assoc Cancer Res* 41, 339.
178. Vucenik, I., Passaniti, A., Tantivejkul, K., Eggleton, P., Vitolo, M., and Shamsuddin, A. M., 2002, Anti-angiogenic potential of inositol hexaphosphate (IP6), *Rev Oncologia* 4, Suppl 1, 79.
179. Vucenik, I., Shamsuddin, A.M., 2003, Cancer inhibition by inositol Hex phosphate and inositol: form laboratory to clinic, *J Nutr* 133, 3778-3784.
180. Wade, M.G., Foster, W.G., Younglai, E.V., McMahon, A., Leingartner, K., Yagminas, A., Blakey, D., Fournier, M., Desaulniers, D., and Hughes, C.L., 2002, Effects of Subchronic Exposure to a Complex Mixture of Persistent Contaminants in Male Rats: Systemic, Immune, and Reproductive Effects, *Toxicol Sci* 67,131-143.
181. Walker, N.J., Portier, C.J., Lax, S.F., Crofts, F.G., Li, Y., Lucier, G.W., Sutter, T.R., 1999, Characterization of the dose-response of CYP1B1, CYP1A1, and CYP1A2 in the liver of female Sprague-Dawley rats following chronic exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, *Toxicol Appl Pharmacol* 154, 3, 279-86.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

182. Wood, G.A., Archer, M.C., 2001, Matrix metalloproteinases-2 and 9 do not play a role in the growth of preneoplastic liver lesions in F344 rats, *Exp Biol Med* (Maywood) 226,799-803.
183. Worner, W., and Schrenk, D., 1996, Influence of Liver Tumor Promoters on Apoptosis in Rat Hepatocytes Induced by 2-Acetylaminofluorene, Ultraviolet Light, or Transforming Growth Factor β 1, *Cancer Res* 56, 1272-1278.
184. www.epa.gov/ncea/pdfs/dioxin.
185. www.helsinki.fi/science/dentenv/dioxin.
186. www.nature.com/nri/journal/v2/n7/fig_tab/nri_846_F3.gif.
187. www.sigmaaldrich.com/img/assets/6460/Activation_and_Inhib_of_Apo.jpg.
188. www5.appliedbiosystems.com/tools/pathway.
189. Wyde, M.E., Seely, J., Lucier, G.W., and Walker, N.J., 2000, Toxicity of Chronic Exposure to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin in Diethylnitrosamine-Initiated Ovariectomized Rats Implanted with Subcutaneous 17 β -Estradiol Pellets, *Toxicol Sci* 54, 493-499.
190. Yamazaki, H., Degawa, M., Funae, Y., Imaoka, S., Inui, Y., Guengerich, F.P., Shimada, T., 1991, Roles of different cytochrome P450 enzymes in bioactivation of the potent hepatocarcinogen 3-methoxy-4-aminoazobenzene by rat and human liver microsomes, *Carcinogenesis* 12, 133-139.
191. Yan, X., Bellotto, D.J., Foster, D.J., Johnson, R.L. Jr., Hagler, H.K., Estrera, A.S., Hsia, C.C., 2004, Retinoic acid induces nonuniform alveolar septal growth after right pneumonectomy, *J Appl Physiol* 96, 3, 1080-9.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

192. Yang, Y.M., Huang, D.Y., Liu, G.F., Zhong, J.C., Du, K., Li, Y. F., and Song,X.H., 2005, Effects of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin on Vitamin A Metabolism in Mice. *J Biochem Mol Toxicol* 19,327–335.
193. Yeh,Y.H., Lee,Y.T., Hsieh, H.S., Hwang, D.F., 2008, Effect of taurine on toxicity of vitamin A in rats. *Food Chem* 106, 260-268.
194. York, J. D., Odom, A. R., Murphy, R., Ives, E. B., and Wentz, S. R., 1999, A phospholipase C-dependent inositol polyphosphate kinase pathway required for efficient messenger RNA export, *Science* 285, 96-100.
195. Yoshida, R., and Ogawa, Y., 2000, Oxidative Stress Induced by 2, 3, 7, 8 Tetrachlorodibenzo-p-dioxin: An Application of Oxidative Stress Markers to Cancer Risk Assessment of Dioxins, *Ind Health* 38, 5-14.
196. Yoshiji, H., Kuriyama, S., Hicklin, D.J., Huber, J., Yoshii, J., Miyamoto, Y., Kawata, M., Ikenaka, Y., Nakatani, T., Tsujinoue, H., Fukui, H., 1999, KDR/Flk-1 is a major regulator of vascular endothelial growth factor-induced tumor development and angiogenesis in murine hepatocellular carcinoma cells, *Hepatology* 30-1179-1186.
197. Zaher, H., Fernandez-Salguero, P.M., Letterio, J., Sheikh, M. S., Fornace,A. J., Jr., Roberts, A.B., and Gonzalez, F.J.,1998, The involvement of aryl hydrocarbon receptor in the activation of transforming growth factor-beta and apoptosis *Mol Pharmacol* 54, 313-21.
198. Zeytun, A., McKallip, R.J., Fisher, M., Camacho, I., Nagarkatti, M., Nagarkatti, P.S., 2002, Analysis of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced gene expression profile in vivo using pathway-specific cDNA arrays, *Toxicology* 178, 241-260.
199. Zi, X., Singh, R.P., and Agarwal, R., 2000, Impairment of erbB1 receptor and fluid-phase endocytosis and associated mitogenic signaling by inositol hexaphosphate in human prostate carcinoma DU145 cells, *Carcinogenesis* 21, 2225-2235.

ÖZGEÇMİŞ

09.09.1973'de Eskişehir'de doğan Özlem Aydın ilk, orta ve lise eğitimlerinin ardından Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden 2004 yılında birincilikle mezun oldu. Aynı yıl Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya A.B.D.'da doktora eğitimine başladı. Doktora eğitimine hala burada devam etmektedir. Eskişehir Yunus Emre Devlet Hastane'sinde biyolog olarak çalışmaktadır. Evli ve bir çocuk annesidir.

Doktora çalışması sırasında TÜBİTAK tarafından verilen Yurt İçi Doktora Burs Programı ile desteklenmiştir.

