

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

KARACİĞERDE TÜMÖR OLUŞMASINA NEDEN OLAN
DIETİLNİTROZAMİN VE 2-ASETİLAMİNOFLORAN UYGULANMIŞ
SIÇANLARA DEMETOKSİVİRİDİN VE 1- α -HİDROKSİ
DEMETOKSİVİRİDİN'İN ETKİLERİ

DOKTORA TEZİ
M. CENGİZ ÜSTÜNER

DANIŞMAN
PROF. DR. İRFAN DEĞİRMENCİ

HAZİRAN 2006

KABUL VE ONAY SAYFASI

M. Cengiz ÜSTÜNER'in DOKTORA TEZİ olarak hazırladığı "Karaciğerde Tümör Oluşmasına Neden Olan Dietilnitrozamin ve 2-Asetilaminofloran Uygulanmış Sıçanlara Demetoksiviridin ve 1- α -Hidroksi Demetoksiviridin'in Etkileri" başlıklı bu çalışma jürimizce Lisansüstü Öğretim Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Tarih : 20 Haziran 2006

ÜYE : Prof. Dr. Hasan Veysi GÜNEŞ

ÜYE : Prof. Dr. Ayşe BAŞARAN

ÜYE : Prof. Dr. İrfan DEĞİRMENCI

ÜYE : Prof. Dr. Ecir Ali ÇAKMAK

ÜYE : Doç. Dr. Hilmi ÖZDEN

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Yönetim Kurulu'nun
...22.06.2006... tarih ve ...668/2079... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Ferruh YÜCEI
Enstitü Müdürü

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER	i
ÖZET	iv
SUMMARY	vi
ŞEKİL DİZİNİ	viii
ÇİZELGE DİZİNİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Hücre Siklusu ve Kanserde Sinyal İletim Yolları	4
2.1.1. MAPK Sinyal İletim Yolu	5
2.1.2. Ras ve Raf'ın MAPK Sinyal İletim Yolu ile İlişkisi	7
2.1.3. MAPK ile Cx32 proteinin İlişkisi	8
2.1.4. MAPK Yolunda, PI-3 kinaz ve H-Ras İlişkisi	9
2.2. DEN ve 2-AAF'nin Karaciğerde Tümör Oluşumundaki Roller	11
2.2.1. DEN'in Karaciğerde Tümör Oluşumundaki Rolü	11
2.2.2. 2-AAF'nin Karaciğerde Tümör Oluşumundaki Rolü	12
2.3. DEN ve 2-AAF'nin Sitokrom p450 Enzim Sistemine Etkileri	13
2.3.1. Sitokrom p450 Enzim Sistemi ve GST Enzimlerine DEN ve 2-AAF'nin Etki Mekanizmaları	15
2.4. Karsinogenez ve Serbest Oksijen Radikalleri	18

2.4.1. DEN ve 2-AAF'nin Aktif Oksijen Türlerini Üreterek Tumor Gelişimine Etkisi	18
2.5. Demethoxyviridin (DMV) ve 1- α -hidroksi-demethoxyviridin (1 α -Hidroksi-DMV)	20
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	23
3.1. Gereçler	23
3.1.1. Deney Hayvanları.....	23
3.1.2. Kimyasal Maddeler.....	23
3.1.3. Aygıtlar	26
3.2. Yöntem	28
3.2.1. Doz ve Deney Grupları	28
3.2.2. Deney Hayvanlarından Çalışılacak Örneklerin Alınması	30
3.2.3. Karaciğer Dokusunda Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi Ölçümü	30
3.2.4. Karaciğer Dokusunda Glutasyon Peroksidaz (GPx) Aktivitesi Ölçümü	33
3.2.5. Karaciğer Dokusunda Malondialdehit (MDA) Düzeyi Ölçümü ...	35
3.2.6. Karaciğer Dokusunda Katalaz Düzeyi Ölçümü	38
3.2.7. Western Blot Yöntemi ile CYP1A2'nin Belirlenmesi	41
3.2.8. Karaciğer Örneklerinden Histolojik Preparatların Hazırlanması	47
3.2.9. İmmunohistokimya yöntemi ile Ha-Ras, Cx32 ve GST-p belirlenmesi	50

4. BULGULAR	53
4.1. Karaciğer Dokusunda Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi	53
4.2. Karaciğer Dokusunda Glutasyon Peroksidaz (GPx) Aktivitesi	54
4.3. Karaciğer Dokusunda Malondialdehit (MDA) Düzeyi	55
4.4. Karaciğer Dokusunda Katalaz Aktivitesi	56
4.5. CYP1A2 Enzimi Ekspresyonu	57
4.6. Karaciğer'de Histolojik Bulgular	59
4.6.1. H&E Bulgular	59
4.6.2. İmmunohistokimyasal Bulgular	64
5. TARTIŞMA	66
6. SONUÇ	73
7. KAYNAKLAR	75
ÖZGEÇMİŞ	

ÖZET

Bu çalışmada, dietilnitrozamin (DEN) ve 2-asetilaminofloran (2-AAF)'nın 2 aylık 86 adet Spraque dawley türü sıçan karaciğerinde tümör oluşturma etkileri ile demethoxviridin (DMV) ve ondan türetilmiş 1- α -hidroksi- demethoxviridin (1- α -hidroksi-DMV)'in bu tümör oluşumunu ne derece önleyebildikleri araştırıldı. Bu amaçla deney hayvanları 10 gruba ayrıldı. Gruplar, 1.grup (kontrol), 2.grup (0,1 ml yağ gavajla), 3.grup (0.1 ml DMSO i.p), 4.grup (0.1 ml DMSO'da çözündürülerek 1.5 mg/kg DMV oranında i.p), 5.grup (0.1 ml DMSO'da çözündürülerek 1.5 mg/kg 1- α -hidroksi-DMV oranında i.p), 6.grup (0.1 ml DMSO'da çözündürülerek 175 mg/kg DEN oranında i.p), 7.grup (0.1 ml DMSO'da çözündürülerek 20 mg/kg 2-AAF oranında 0.1 ml yağ ile birlikte gavajla), 8.grup (DEN uygulamasından bir hafta sonra 20 mg/kg 2-AAF oranında 0.1 ml yağ ile birlikte gavajla), 9.grup (DEN + 2-AAF ile birlikte 16., 23. ve 30. günde 1,5 mg/kg dozunda DMV, 0.1 ml DMSO'da çözündürülerek i.p) ve 10.grup (DEN + 2-AAF ile birlikte 16., 23. ve 30. günde 1,5 mg/kg dozunda 1- α -hidroksi-DMV oranında 0.1 ml DMSO'da çözündürülerek i.p) olarak düzenlendi. Deneyin 5. haftasında, eter anestezisi altında sıçanların karaciğeri alındı. Karaciğer homojenatları hazırlanarak, SOD, Gpx ve katalaz enzim aktiviteleri ve MDA düzeyleri spektrofotometrik olarak belirlendi. Ayrıca, karaciğer mikrosomları hazırlanarak, Western blot yöntemiyle CYP1A2 enzimlerinin ekspresyonu incelendi. Karaciğer doku preparatları H&E boyama yöntemi ile histopatolojik olarak ve immunohistokimyasal yöntem ile de Ha-Ras, GST-p ve Cx32 proteinleri yönünden değerlendirildi.

Elde edilen bulgular, kontrole göre SOD aktivite % inhibisyonunun 6., 7. ve 8. gruplarda çok önemli düzeyde, 10.grupta önemli düzeyde azaldığı ve 9.grupta ise kontrol düzeyine yaklaştırdığı ortaya koymuştur. Gpx bakımından, kontrole göre, 2., 3., 4., 5., 7. ve 9. gruplarda fark bulunmazken 6., ve 8. gruplarda çok önemli düzeyde, 10. grupta ise önemli düzeyde fark bulundu. MDA düzeyi 2., 3., 4. ve 5. gruplarda kontrole yakın değerlerde fakat 6., 7., 8., 9. ve 10. gruplarda çok önemli düzeyde yüksek bulundu. Katalaz aktivitesi, 2., 3., 4., 5. ve 9. gruplarda kontrole benzer

düzye de iken, 6., 7., 8., ve 10. gruplarda çok önemli düzeyde azalma gösterdi. CYP1A2 ekspresyonu, kontrol grubuna göre 2. ve 3. gruplarda farklı bulunmadı, 4. grupta en az, 5. ve 10. gruplarda önemli, 6., 7., 8. ve 9. gruplarla ise çok önemli düzeyde farklı bulundu.

Histolojik olarak; 1., 2., 3., 4. ve 5. gruplarda dejeneratif bulgular ve patolojik bozukluklara rastlanmazken, 6., 7. ve 8. gruplarda, 8. grupta daha fazla olmak üzere, hepatosit karyomegali, hepatosit sitomegali ve iltihabi hücre infiltrasyonu oluşumu gibi patolojik bozukluklar gözlemlendi. İmmunohistokimyasal olarak; Ha-Ras ve GST-p'nin 8. grupta arttığı, 9. ve 10. gruplarda düştüğü, Cx32'nin ise tüm gruplarda değişmeden kaldığı belirlendi.

Sonuç olarak, her iki mantar metabolitlerin de preneoplastik dönemde etkili olduğu ortaya kondu. Fakat bu sonucun daha da kesinleşebilmesi ve preneoplastik dönemi takip eden evrelerde ne gibi etkilerinin olabileceğini ortaya koyabilmek için, henüz çok yeni olan bu konuda, daha çok çalışmaya ihtiyaç vardır.

Anahtar Sözcükler : 2-AAF, Antioksidan enzimler, Cx32, CYP1A2, DEN, DMV, GST-p, Ha-Ras, 1- α -hidroksi-DMV

SUMMARY

In this study, we determined the effects of diethylnitrosamine (DEN) and 2-acetylaminofluorene (2-AAF) in the liver of 2 months old, totally 86 Sprague dawley rats, and we determined the effects on protection of tumorigenesis of demethoxyviridin (DMV) and its metabolite 1- α -hidroksi-demethoxyviridin (1- α -hidroksi-DMV).

We grouped the study animals in 10 groups. The first one was the control, the second group (olive oil), 3. group (DMSO), 4. group (DMV), 5. group (1- α -hidroksi-DMV), 6. group (DEN), 7. group (2-AAF), 8. group (DEN + 2-AAF), 9. group (DEN + 2-AAF + DMV) and 10. group (DEN + 2-AAF + 1- α -hidroksi DMV). DEN (175 mg/kg DEN dissolved in 0.1 ml DMSO) was injected intraperitoneally to its administrated groups on first day. 2-AAF (20 mg/kg 2-AAF dissolved in 0.1 ml DMSO and combined with 0.1 ml olive oil) was given to its administrated groups with gavage technique on 7., 8. and 9. days. DMV and 1- α -hidroksi DMV (1.5 mg/kg separately, DMV/1- α -hidroksi dissolved in 0,1ml DMSO) were injected intraperitoneally to theirs administrated groups on the 16., 23. and 30. days.

In the 5. week of the study, the rat liver tissues were removed under ether anaesthesia. Liver homogenates prepared and SOD, Gpx and Catalase enzyme activities and MDA levels determined spectrophotometrically. On the other hand liver microsomes prepared and the expression of CYP1A2 enzymes determined with Western blot technique. Liver tissue slides evaluated as histopathologically with H&E staining and immunohistochemically about Ha-Ras, GST-p and Cx32 proteins.

The results showed too significant differences of SOD % activity inhibition in 6, 7 and 8. groups. According to control group, in the 10. group the decreasing was significantly and in the 9. group it was near to the control group. No statistical differences were found in 2. 3. 4. 5. 7 and 9 groups about Gpx, but it is too significant difference in 6th and 8th groups, and it was significantly difference in 10. group. MDA levels were nearly to the control in 2, 3, 4 and 5. groups, but it was too significantly increase in the 6. 7. 8. 9 and 10. groups. Catalase activity was likely to the control in 2,

3, 4, 5 and 9. groups, but in 6. 7. 8 and 10. groups it showed too significantly decrease. CYP1A2 expression didn't show a difference to the control in 2. and 3. groups. It was the least in 4. group, it was significantly in 5 and 10. groups and too significant decreasing in 6. 7. 8. 9. groups.

Any pathology and degeneration found histologically in 1. 2. 3. 4 and 5. groups, but hepatocyte caryomegaly, hepatocyte cytomegaly and inflammatory cell infiltration found pathologically in 6. 7. and 8. groups and more in 9. group. Immunohistochemically, Ha-Ras and GST-P increased in 8. group, decreased in 9. and 10. groups and Cx32 didn't change in any groups.

Finally, it was found that both of the fungi metabolites were effectible in preneoplastic period. But there is need to new studies in order to make definite and find the affects on following stages after preneoplastic period.

Key Words : 2-AAF, Antioxidant enzymes, Cx32, CYP1A2, DEN, DMV, GST-p, Ha-Ras,1-hidroksi- DMV

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. MAPK yolu arasında , büyüme faktör reseptör-tirozin kinaz sinyal yolu gösterilmiştir	6
Şekil 2.2. Forbol esterlerin MAPK yolundaki rolü	8
Şekil.2.3. Sinyal iletimi aracılığıyla, büyüme ve yaşamadan sorumlu PI-3 kinaz ailesi ve protein kinaz B/Akt yolunun işlevleri.	10
Şekil 2.4. Ksenobiyotiklerin kullanımı sonucunda oluşan mutasyonlar karaciğerde sırasıyla preneoplastik, neoplastik, benign neoplazmi ve malign neoplazmi oluşturur	12
Şekil 2.5. Detoksifikasyon reaksiyonlarında sitokrom p450 ve sülfoniltransferaz (GST) enzimlerinin faz I ve faz II'deki etkileri .	17
Şekil 2.6. DMV'den 1- α -hidroksi DMV'nin sentezi	20
Şekil 2.7. PI-3 kinaz wortmannin ile inhibisyonu	21
Şekil 2.8. Fosfotidil-3-kinazın wortmannin ile MAPK sinyal yolunda inhibisyonunun gösterilmesi	21
Şekil 3.1. MDA standart eğrisi	38
Şekil 3.2. Jelde bulunan proteinlerin nitroaselülöz membrana aktarılış düzeneği	44
Şekil 3.3. Sandaviç oluşturma aparatı	44
Şekil 4.1. Kontrol ve deney gruplarının SOD % inhibisyon değerleri	54
Şekil 4.2. Kontrol ve deney gruplarının Gpx değerleri	55

Şekil 4.3. Kontrol ve deney gruplarının MDA değerleri	56
Şekil 4.4. Kontrol ve deney gruplarının katalaz değerleri	57
Şekil 4.5. Kontrol ve deney gruplarının CYP1A2 değerleri	58
Şekil 4.6. CYP1A2 proteinlerinin nitroselülöz membranda panceaus S boyası ile görüntülenmesi	58
Şekil 4.7. CYP1A2 proteinlerinin SDS page ile görüntülenmesi	59
Şekil 4.8. CYP1A2 proteinlerinin antikor ile işaretlenerek film'de görüntülenmesi	59
Şekil 4.9. Kontrol grubuna ait normal görünümde karaciğer dokusu H&E orj. Büy.x100	60
Şekil 4.10. 8.Gruba ait dejeneratif bulgular, hepatosit karyomegali, hepatosit sitomegali ve iltihabi hücre infiltrasyonu oluşumu	61
Şekil 4.11. 8.Gruba ait preneoplastik fokus	61
Şekil 4.12. 8.Gruba ait preneoplastik fokus	62
Şekil 4.13. 9.Gruba ait preneoplastik fokus	62
Şekil 4.14. 10.Gruba ait preneoplastik fokus	63
Şekil 4.15. 8.Gruba ait karaciğer dokusunda Ha-Ras protein	64
Şekil 4.16. 8.Gruba ait karaciğer dokusunda GST-p enzimi	65
Şekil 4.17. 8.Gruba ait karaciğer dokusunda Cx32 protein	65

ÇİZELGE DİZİNİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 3.1. Doz ve deney grupları	29
Çizelge 4.1. Kontrol ve deney gruplarının SOD % inhibisyon değerleri ve bunların istatistiksel değerlendirilmeleri	53
Çizelge 4.2 Kontrol ve deney gruplarının Gpx değerleri ve bunların istatistiksel değerlendirilmeleri	54
Çizelge 4.3.Kontrol ve deney gruplarının Gpx değerleri ve bunların istatistiksel değerlendirilmeleri	55
Çizelge 4.4. Kontrol ve deney gruplarının katalaz değerleri ve bunların istatistiksel değerlendirilmeleri	56
Çizelge 4.5. Kontrol ve deney gruplarının CYP1A2 değerleri ve bunların istatistiksel değerlendirilmeleri	57

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler ve Kısaltmalar	Açıklama
α	Alfa
μ l	Mikrolitre
1- α -hidroksi DMV	1- α -hidroksi demethoxyviridin
2-AAF	2-asetil amino flourin
ADP	Adenin difosfat
ATP	Adenin trifosfat
Büy.	Büyütme
Cx32	Konneksin 32
CYP	Sitokrom P450
DAG	Diaçil gliserol
DEN	Dietilnitrozamin
DMSO	Dimetilsülfoksit
DMV	Demethoxyviridin
DNA	Deoksiribonükleik asit
F=P	Fosfor
FB	Fenobarbital
g	Gram

GDP	Guanin difosfat
Gpx	Gutasyon Peroksidaz
GST-p	Glutasyon-S-transferaz
GTP	Guanin trifosfat
H&E	Hematoksilen ve Eozin
IP ₃	İnozitol 1,4,5-trifosfat
JAK	Nonreseptör protein kinaz
kDa	Kilo dalton
LPO	Lipid peroksidaz
MAPK = ERK	Mitojen aktive edici kinaz
MAPK K = MEK	Mitojen aktive edici kinaz kinaz
MAPKKK = Raf	Mitojen aktive edici kinaz kinaz kinaz
MDA	Malondialdehit
ml	Mililitre
mU	Mili Ünit
N	Numara
NADP	Nikotinamid adenin dinükleotid
Orj	Orijinal
PBK	Protein kinaz B

PDK	Protein bağımlı kinaz
PI-3K = PI-3 kinaz	Fosfoinositol-3-kinaz
PIP ₂	Fosfotidil inozitol 4,5-bifosfat
PLC	Fosfo lipaz C
PTEN	Tümör baskılayıcı protein
SOD	Süperoksit dismutaz
SOS = GEF	Son of sevenless = Guanine exchange factor
STAT	Sinyal iletilci transkriptaz aktivatörü

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Karaciğer kanseri, kanser çeşitleri arasında en yaygın gruba girer. Bu kanserin oluşumunda, fenobarbital (FB), alkol, aflatoksin B1 metaboliti, B ve C hepatit virüsleri gibi ajanlar yanında dietilnitrozamin (DEN), 2-asetilaminofloran (2-AAF)'de etkilidir (42,57,90,103). Karaciğer tümörü oluşturulmasında kullandığımız ksenobiyotiklerden DEN ve 2-AAF, fare, sıçan, hamster, tavşan, köpek, domuz ve maymun gibi hayvanlar için karsinogeniktir (2,11,66,92). Kemirgenlere birlikte uygulanan DEN ve 2-AAF hepatokarsinogenesisi başlatır ve hepatositlerde preneoplastik başlangıca neden olur (2,6,12,13,31,41,50,57,60,63,85,90,94,99,100,101,102,103). DEN'in indükleyici, 2-AAF'nin ise promotör olarak mesane ve karaciğerde tümör oluşturuca etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (6,13,57,60,90).

Karsinogenezin temelinde, büyümenin kontrolü ve farklılaşma gibi biyolojik olayları etkileyen mutasyonların aşamalı olarak bir araya gelmesi yer alır (28). Hücre sinyal iletim yolları ve sinyal proteinlerini hedef alan onkogenik mutasyonlara sık olarak rastlanmaktadır. Hücre, bölünme sinyalini aldığı anda, sinyal ileti sisteminden olan sinyal başlatma ve sinyal oluşturma yolu örneğın, Protein aktive edici kinaz (MAPK), Protein Kinaz C veya reseptör olmayan protein kinaz/sinyal iletilci transkriptaz aktivatörü (JAK/STAT) yolunu devreye sokarak bölünmesini tamamlar (15,39,42).

MAPK iletim yolu, Ras aktivasyonu ile başlar ve sırasıyla Raf (MAPKKK), MEK (MAPKK) ve ERK (MAPK) protein kinaz sistemi ile ilerleyerek transkripsiyonu başlatır (15,28,39,79). Ökaryotik hücrelerin tümünde mevcut olan bu proteinler, hücre zarı ve hücre çekirdeğı arasındaki bilgi aktarımında çok önem taşırlar. Sinyal ileti yolları, embriyogenezis, yaşama, çoğalma, farklılaşma ve apoptozis işlevlerinin düzenlenmesinde rol alırlar (10,28).

Deneysel olarak, DEN uygulanmış farelerin karaciğerinde, MAPK yolunda görev alan Ha-Ras proto-onkogenlerinin 61. kodonunda mutasyon belirlenmiştir (7,32). Tümörlü karaciğer hücrelerindeki Ha-Ras ile normal hücre incelendiğinde, tümörlü hücre p21^{Ras} proteinlerinin anti-apoptotik etkiye sahip oldukları, fosfotidil-3-kinaz gibi

onkogen protein kinaz ve büyüme faktörü reseptörlerince aktif hale getirildikleri belirlenmiştir (32,33). Ras onkoprotein aktivasyonu, hücre çoğalmasını artırabilir. Özellikle, aromatik bileşikler (DEN ve phenobarbital, 2-AAF gibi ajanlar)'in etkisi ile Ha-Ras ve Ki-Ras'ta ortaya çıkan mutasyonlar sonucu olan aktivasyonun fare karaciğerinde tümör oluşturduğu ortaya konmuştur (32).

Tümör oluşumu sırasında, MAPK yolunun aşırı aktif olduğu ve nedeni henüz tam açıklanmamış olsa da konneksin 32 (Cx32)'nin aktivite ile bağlantılı olarak azaldığı bilinmektedir (46,49,97).

DEN ve 2-AAF'nin karaciğer dokusunda sitokrom p450 sistemini etkilediği ve buna bağlı olarak preneoplastik lezyonların olduğu, ancak bu ilişkinin tam açıklanamadığı bildirilmektedir (61). Ksenobiyotiklerin biyotransformasyonunda, detoksifikasyon enzimleri faz I ve faz II olmak üzere ardışık iki reaksiyonla görev yaparlar (60,64,83). Faz I'de görev yapan sitokrom P450 enzimleri poliaromatik hidrokarbonları onun istenmeyen metabolitleri olan oksijenli epoksit ve dihidrodiol epoksitlerine dönüştürürler. Bu metabolitler de DNA ile bağ oluşturarak kansere yol açarlar. Bu olay en çok karaciğer ve akciğerde gerçekleşir (3). Çalışmamızda araştırdığımız, CYP1A2, sıçan ve insan hepatositlerinde detoksifikasyona katılan sitokrom p450 enzimlerinin bir tipidir. CYP1A2, detoksifikasyon işleminin birinci fazında bir monooksijenaz olarak görev yapar. Bu nedenle miktarında azalma olur (5,16,22,60,66,69,81,84,87,93). Faz II reaksiyonlarında görev yapan Glutasyon-S-transferaz p (GST-p) ise, karaciğerde preneoplastik lezyon oluştuğunda hücre sitozolünde bulunan bir enzimdir. Çalışmamızda da araştırdığımız, GST-p çok yönlü bir protein olup ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda önemli role sahiptir ve hepatositlerde, ksenobiyotiklerin toksik metabolitlerinin oluşumunda glutasyon konjugatların oluşumunu sağlar (16,17,19,50,52,56,60,64,66,74,83). GST-p, erken tümör tanısında tümör oluşumunda aşırı ekspresyon göstermesi ve miktarının artması nedeniyle belirleyici olarak kullanılmaktadır (14,17).

Tümör oluşumunu etkileyen faktörlerin çoğunun, hücrede radikal oluşumuna neden olduğu gösterilmiştir. Bu radikallerin, lipit peroksidasyonu ikinci ürünü olan

malondialdehiti (MDA)' artırdığı (1,21,25,30,98), ama buna karşılık savunma sistemi enzimleri olan süperoksitdismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (Gpx) (28,91,98,104) ve katalazın (30) miktarlarını azalttığı belirlenmiştir.

Yapılan bir çalışmada, DEN ve FB uygulanan sıçan karaciğer hücrelerinde, normal hücrelere göre Gpx (glutatyon peroksidaz) ve SOD (Süperoksit dismutaz)'da azalma, katalaz ve MDA (malondialdehit)'da ise artış olduğu belirlenmiştir. Bu durum, serbest radikallerin neden olduğu hasara karşı enzimlerin zar ve sitoplazma savunucusu olarak görev aldıklarını ortaya koymaktadır. Bu savunmada SOD ve katalaz, oksijen radikalini hidrojen peroksit ve suya dönüştürür. Oluşan hidrojen peroksit, glutatyon peroksidaz tarafından yakalanarak katalaz enzimi veya diğer enzimlerce yok edilir (9).

Biz çalışmamızda, bir mantar metaboliti olan wortmanninden türetilmiş demethoxyviridin (DMV) ve 1- α -hidroksi demethoxyviridin (1- α -hidroksi-DMV)'nin, fosfotidil-3-kinaz (PI 3-kinaz)'ı inhibe etmek suretiyle Ha-Ras'ı inaktive edip, MAPK'ın aktivitesini azaltarak karaciğerde tümör oluşumunu önleyip önleyemeyeceğini araştırmayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

Hepatosellüler karsinoma, dünyada, en yaygın kanserlerden biri olup, bunun oluşumunda dietilnitrozamin (DEN), 2-asetilaminofloran (2-AAF), fenobarbital, alkol gibi kimyasallar, aflatoksin B1 metabolit ya da hepatit virüsleri (B ve C) gibi ajanların etkendir (42,57,90,103). Karsinogenezin temelinde, hücrenin çoğalması, çoğalmanın kontrolü ve hücrelerin farklılaşması gibi biyolojik olayları tetikleyen mutasyonların aşamalı olarak bir araya gelmesi yer alır. Kanser gelişimi sürecinde, hücreler çeşitli değişimlere uğrar. Bu değişimler, tümör hücrelerinin hızlı ve sınırsız çoğalarak ve çevre dokuya yayılmalarına neden olur (28). Karsinogenezde, sinyal iletim yolları ve sinyal proteinlerini hedef alan onkojenik mutasyonlara da sık olarak rastlanır. Sinyal iletiminde meydana gelen değişimler hücre siklusu kontrol noktalarının inaktif hale geçmesine neden olur. Bu durum, tümör gelişimi ve invazyon/metastaz sürecinde etkin rol oynar (28).

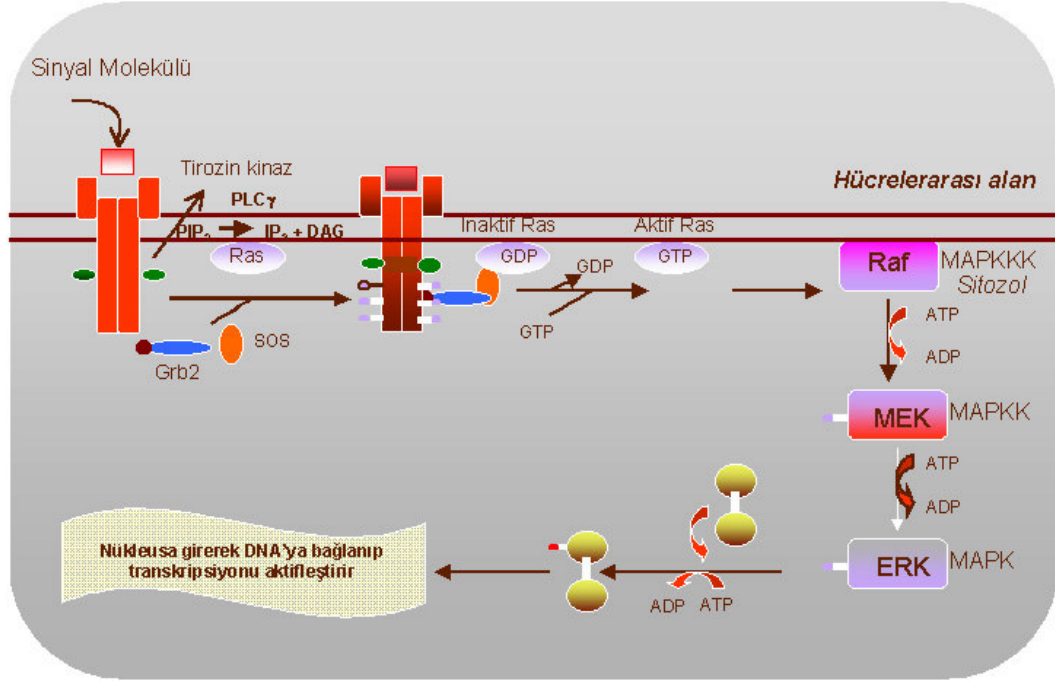
2.1. Hücre Siklusu ve Kanserde Sinyal İletim Yolları

Bir hücrenin canlılığının göstergesi olan en anahtar noktalardan biri onun birbirine tıpa tıpa benzeyen iki hücreye bölünmesidir. Genel olarak, hücreler bir bölünme sinyali almadıkları sürece hücre siklusunun aktif (G₁, G₂, S ve M) fazlarına girmezler ve G₀ fazında beklerler. Hücre bölünmesinde büyüme faktörleri, sitokinler veya mitojenler gibi çeşitli faktörler rol oynar. Hücre, bölünme sinyali aldığı anda, mitojen aktive edici protein kinaz (MAP kinaz=MAPK), protein kinaz C veya reseptör olmayan protein kinaz/sinyal iletili transkriptaz aktivatör (JAK/STAT) yolları gibi sinyal iletili sistemi devreye girer. Gerekli protein senteziyle ilişkili transkripsiyon başlar, böylece hücre mitoz girer (15,39,42).

2.1.1. MAPK Sinyal İletim Yolu

MAPK'lar, "mitojen aktiviteli protein kinazlar" süper ailesinde yer alır. Ökaryotik hücrelerin tümünde mevcut olan bu proteinler hücre membranından çekirdeğe bilgi aktarılmasında önem taşır. Bu sinyal ileti yolu, embriyogenezis, büyüme, çoğalma, farklılaşma ve apoptoz işlevlerinin düzenlenmesinde rol alır (10,28).

MAPK yolu, reseptör aracılı uyarının hücre içine iletiminden sorumlu bir ardışık kinaz sistemi olarak çalışır. Bu sistem hem sinyalin güçlendirilmesi hem de düzenleyici etkileşimler (sinyalin süresi, şiddeti ve kinetiği) açısından önem taşır. Sinyal iletimi G-protein aktivasyonu (Ras aktivasyonu) ile başlar ve MAP kinaz kinaz kinaz 'ın (MAPKKK=Raf) aktivasyonundan sonra sırasıyla MAP kinaz kinaz (MAPKK=MEK) ve MAP kinaz (MAPK=ERK) aktive olur. MAPK ise sitoplazmik substratları (hücre iskeleti elemanları, diğer protein kinazlar) ve/veya nükleus transkripsiyon faktörlerini fosforilasyon yoluyla aktive ederek hücrenin biyolojik cevabının oluşmasını sağlar. *Ras/Raf/MEK/ERK sinyal iletim yolu ve kanser hormonları, büyüme faktörleri, farklılaşma faktörleri ve tümör başlatıcı (promotör) maddeler bu sinyal yolunu kullanırlar. Bu iletim yolu Ras aktivasyonu ile başlar ve sırasıyla Raf, MEK ve ERK proteinleri olan kinaz sistemi ile ilerler. Ras ve Raf protoonkogendir. İstirahat halindeki hücrelerde Ras proteinleri inaktif (Ras-GDP) halde bulunurlar. Hücrenin uyarılması ile GDP'nin yerine GTP bağlanarak, aktif konformasyona dönüşüm (Ras-GTP) tetiklenir (Şekil 2.1). Ras aktivasyonu tersinir bir süreçtir. Bu aktivasyonda rol oynayan moleküller, SOS (son of sevenless) ve Grb2 (growth-factor-receptor-bound protein 2) adaptör proteinleridir. Bu sinyal yolunun efektör molekülleri, SOS üzerinde negatif düzenleyici etki ile Ras aktivasyonunu sonlandırmaktadır. Aktive olan Ras proteinleri, Raf kinazlara yüksek afinite ile bağlanarak onların hücre membranına yerleşimini ve aktivasyonunu sağlar (15,28,39,79).*

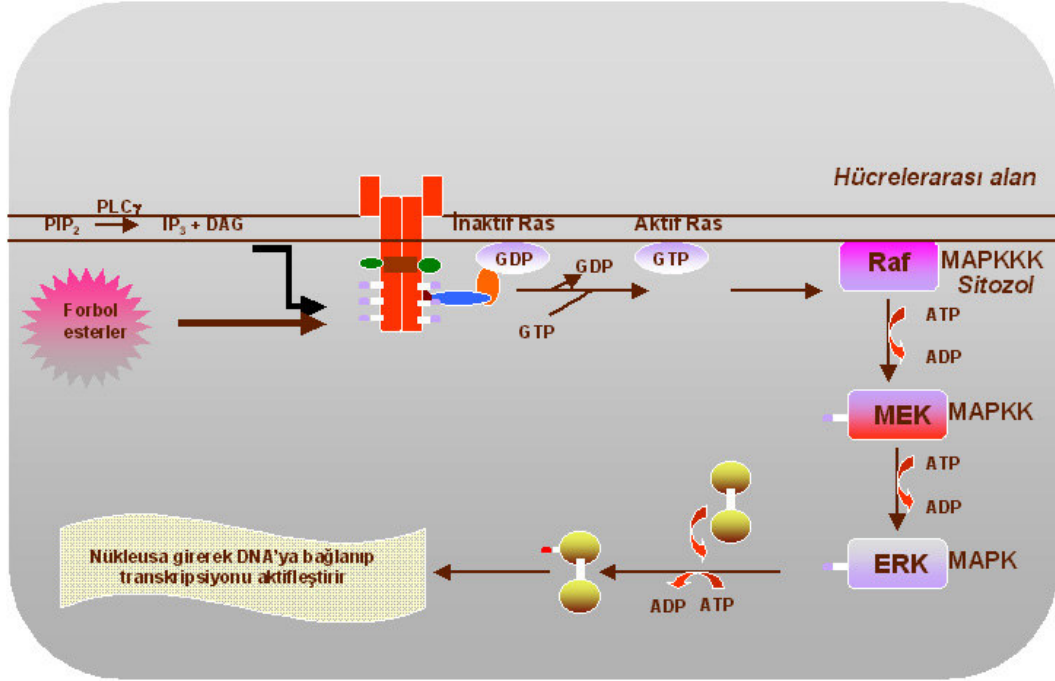


Şekil 2.1. MAPK yolu arasında , büyüme faktör reseptör-tirozin kinaz sinyal yolu gösterilmiştir (POLLAND T. D., EARNSHAW W. C.: *Cell Biology kitabından modifiye edilmiştir* (79)).

İnsan tümörlerinin %30'unda Ras/Raf/MEK/ ERK yolunun aşırı aktivasyonu söz konusudur. Bu oran tümörlerdeki Ras mutasyonu sıklığı ile uyumludur. Mutant Ras proteinleri, aktif RAS-GTP formunda kalarak hücrenin kontrolsüz uyarılmasından sorumlu tutulmaktadır. Diğer yandan, transferaz inhibitörleri Ras aktivasyonunu önler. Klinik çalışmalar, bu ajanların antitümöral etkilerinden tedavide yararlanılabileme olasılığını güçlendirmektedir. Ras iletim yolu ile tetiklenen transformasyon sürecinde sinerjik etkileşim de önem taşır. Normal koşullarda, EGF ve PDGF gibi büyüme faktörlerinin PI-3 kinaz (Fosfoinositol-3-kinaz=PI-3K) yolunu uyarımalarında Ras'ın etkinliği minimal düzeydedir. Buna karşılık onkojenik Ras, PI-3 kinaz yolunun güçlü bir aktivatörüdür. Onkojenik Ras bu yolu aktive ederek apoptozisi baskılar. İnsan kanserlerinin önemli bir bölümü epitel hücrelerinden köken alır. Dolayısıyla, bu hücrelerde apoptozisin baskılanması karsinogenez sürecinde kritik etkenlerden birini oluşturur (20,28).

2.1.2. Ras ve Raf'ın MAPK Sinyal İletim Yolu ile İlişkisi

Ras sinyali değişik, hücrel fonksiyonlara sahiptir. Bu hücrel fonksiyonlar çoğalma, farklılaşma ve apoptozdur. Ras izoenzimlerinin fonksiyonları tam olarak anlaşılammakla birlikte, Ha-Ras ve Ki-Ras fonksiyonlarının birbirlerine zıt olduğu bilinmektedir. Ha-Ras izoformu 12V-Ha-Ras'ın aşırı ekspresyonu sonucu PI-3 kinaz inhibitörü olan LY294002 PI3K/Akt sinyal potansiyeli inhibe edilerek iyonize radyasyona direnç oluşturur. Böylece, aşırı ekspresyon engellenmiş olur. Ki-Ras izoformu olan 12V-Ki-Ras'ın aşırı ekspresyonu iyonize radyasyon MAPK aktivitesinin artmasına neden olur. MAPK inhibitörü olan p38 de iyonize radyasyona bağlı hücre ölümünü azaltır. MAPK'ın aktivitesi için öncelikle, Ras'ın aktivasyonu gerekir (20,46,67). Bu aktivasyonda fosfolipid fosfatidilinositol 4,5-bifosfat (PIP2)'nin rolü büyüktür. PIP2, hücre zarında lokalize olmuştur. Farklı hormon ve büyüme faktörlerinin etkisiyle uyarılan fosfolipaz C, PIP2'yi hidrolize ederek diaçilgliserol (DAG) ve inositol 1,4,5 trifosfat (IP3) meydana gelir. DAG ve IP3 ikincil mesajcı olarak, görev yaparlar. DAG, protein kinaz C ailesine ait olan protein-serin / threonin kinaz'ı aktive eder. Protein kinaz C'ler DAG'ın analogu olan forbol esterleriyle de aktive edilir. Aktive olan protein kinaz C, Raf/MEK/MAPK yolunu harekete geçirerek hücre çoğalması ile ilgili genlerin ekspresyonunu veya proteinlerin fosforilasyonunu sağlar (**Şekil 2.2**) (15,33,39,42,46,47).



Şekil 2.2 Forbol esterlerin MAPK yolundaki rolü (POLLAND T. D., EARNSHAW W. C.: *Cell Biology* kitabından modifiye edilmiştir (15,47,79)).

2.1.3. MAPK ile Cx32 proteinin ilişkisi

Memeliler, 20 tip konneksin proteinini üretir. Biri diğerine benzer şekilde üretilmesine rağmen farklı zamanlarda farklı yerlerde gelişirler. Konneksin proteinlerin 6 tanesi bir araya gelerek buldukları hücre yüzeylerinde kanal oluşturur. Gap junction adı verilen bu yapı sadece küçük moleküllerin geçişine izin vermektedirler. Embriyonik gelişim, salgılama, hücre farklılaşması ve büyümenin kontrolünde önemli göreve sahiptir (8,46,62,70). Cx32, karaciğerde Gap junction kanalını oluşturan konneksin proteinidir. Fare ve sıçanlarla yapılan çalışmalarda, Cx32 eksikliğinin karaciğer fonksiyonunun bozulmasına neden olduğu belirlenmiştir. Karsinojenik kimyasal ajanların deney hayvanlarında benzer şekilde Cx32 eksikliğine neden olduğu belirlenmiştir (8,46,62,66,70).

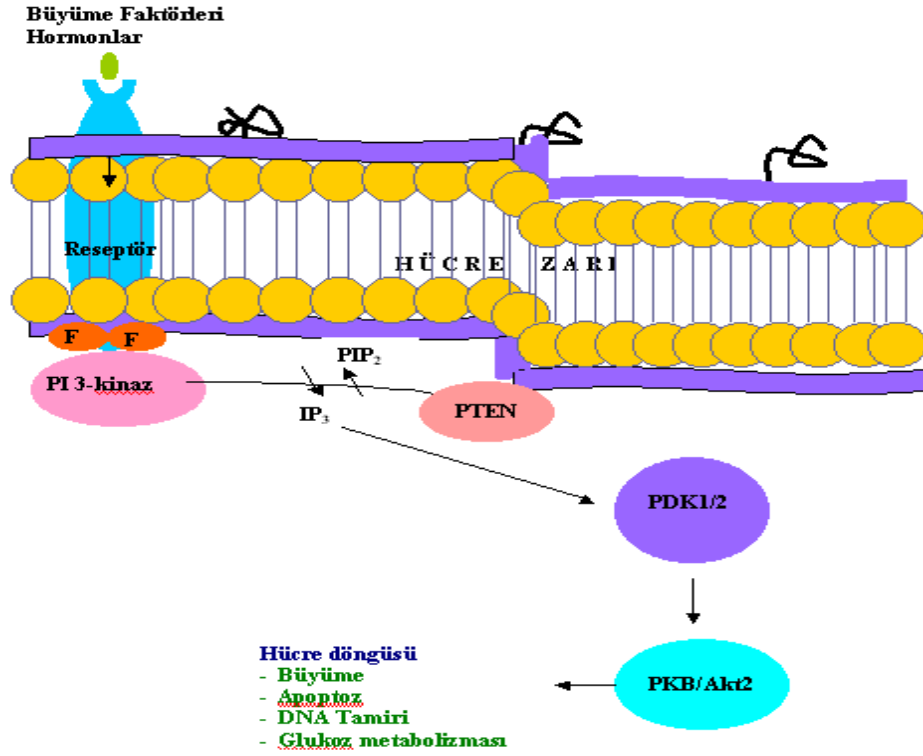
Bu kimyasal ajanların tümör oluşumunu indükledikleri de belirlenmiştir. Tümör oluşumu gözlemlendiğinde Cx32'nin yok edildiği ortaya konmuştur (46,68). Henüz

Cx32'nin tümör oluşumunda neden yok edildiği ortaya konmamıştır. Fakat, çalışmalar MAPK yolunu işaret etmektedir. Çünkü, tümör oluşumu sırasında MAPK yolunun aşırı aktif olduğu belirlenmiştir. MAPK'ın aktivasyonu sık sık tümör oluşumunun karakteristiğini göstermektedir. MAPK aşırı aktif olduğunda neden tümör oluşumu söz konusudur ve Cx32 ile arasındaki bağlantı nedir? Bu sorunun cevabı henüz bilinmemektedir (46,49,97).

2.1.4. MAPK Yolunda, PI-3 kinaz ve H-Ras İlişkisi

PI-3 kinaz ailesi, büyüme ve yaşama sinyallerinin iletiminden sorumlu proteinlerdir. Reseptörün uyarılmasından sonra PI-3 kinaz, inozitol fosfolipidlerin fosforilasyonunu katalizler. Fosfotidilinozitol trifosfat (PIP3) bu yolla oluşan bir lipid aracı moleküldür. PIP3, PIP3 bağımlı kinazlar (PKD) ve protein kinaz B (PKB)'nin aktivasyonundan sorumludur (**Şekil 2.3**). Protein kinaz B, *Akt1* ve *Akt2* genleri tarafından kodlanan bir proteindir. Bu genler, viral *v-akt* onkogeninin insanda bulunan homologlarıdır. Sitokinler ve büyüme faktörleri PI-3 kinaz ve PKB yolunu aktive ederek hücreler için yaşama sinyalleri oluştururlar. Tümör baskılayıcı proteinlerden PTEN ise, PIP3 oluşumunu inhibe ederek negatif düzenleyici olarak rol oynar. Karsinogenezde etkili olan PI-3 kinaz sinyal yolu değişimleri, PI-3 kinaz'ın sentezini artırabilir (28).

Diethylnitrosamine (DEN) uygulanmış farelerde, MAPK yolunda görev alan Ha-Ras proto-onkogenlerin 61. kodonunda mutasyon belirlenmiştir. Bu mutasyonda karaciğerde tümör oluşumunun indüklendiği tesbit edilmiştir (7,32). Tümörlü ve normal karaciğer hücresi Ha-Ras yönünden incelendiğinde, sadece hücrelerde p21^{Ras} proteinlerinin anti-apoptotik etkiye sahip oldukları belirlenmiştir. p21^{Ras} proteinleri, PI-3 kinaz gibi onkogen protein kinaz ve büyüme faktörü reseptörlerince p21^{Ras}-GTP kompleksi şeklinde aktif hale getirilerek, hücre ileti sisteminde, nükleus transmembran reseptörlerden gelen sinyalin iletimine aracılık ederler (32,33).



Şekil.2.3 Sinyal iletimi aracılığıyla, büyüme ve yaşamadan sorumlu PI-3 kinaz ailesi ve protein kinaz B/Akt yolunun işlevleri. (*Protein bağımlı kinazlar (PDK), protein kinaz B (PKB), Tümör baskılayıcı protein (PTEN), Fosfor (F)(28)*)

Eğer Ras geninde üç nokta mutasyonundan (12,13 ve 61.kodondaki mutasyonlar) biri olursa, Ras onkoproteininin ekspresyonu durur, böylece p21^{Ras}-GTP kompleksi inaktif hale gelir (7,32,33). Bu durum, Ras proteinin çok yönlü etkiye sahip olduğunu gösterir. p21^{Ras}-GTP kompleksi ile bazı proteinler (özellikle Raf kinaz ailesi), fosfotidil-3-kinaz ile doğrudan ilişkiye girerler. Bu proteinler, Ras'ın etkilerini geri dönüşümsüz olarak azaltırlar (17,32,33). Ras onkoproteinlerindeki aktivasyon hücre proliferasyonunu artırabilir. Özellikle, aromatik bileşiklerden DEN gibi başlatıcı ve FB, 2-AAF gibi geliştirici ajanlar'ın etkisi ile, Ha-Ras ve Ki-Ras'ta ortaya çıkan mutasyonlar, fare karaciğer tümör oluşumunda rol oynarlar (32).

2.2. DEN ve 2-AAF'nin Karaciğerde Tümör Oluşumundaki Roller

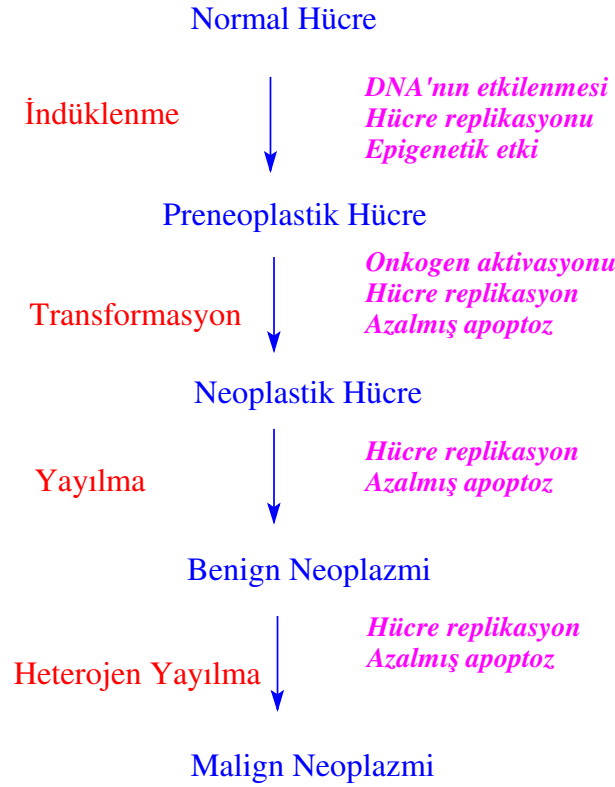
DEN ve 2-AAF, biyolojik sistemde tümör oluşumuna neden olan kimyasallardır. Tümör oluşturmak için kullanılan ksenobiyotiklerden DEN, 2-AAF ve fenobarbital, fare, sıçan, hamster, tavşan, köpek, domuz ve maymun gibi hayvanlar için karsinogeniktir (2,11,66,92). DEN ve 2-AAF birlikte uygulanması kemirgenlerde hepatokarsinogenesisi başlatır ve hepatositlerde preneoplastik başlangıca neden olur (2,6,12,13,31,41,50,57,60,63,85,90,94,99,100,101,102,103,104). DEN indükleyici, 2-AAF ise promotör olarak mesane ve karaciğerde tümör oluşumunda rol alırlar (6,13,57,60,90). DEN ve 2-AAF gibi promotör olarak görev yapan FB ile yapılan bir çalışmada bunların, H-Ras'ın 61. kodonunda mutasyona neden olduğu belirtilmiştir (7).

2.2.1. DEN'in Karaciğerde Tümör Oluşumundaki Rolü

Kanser araştırmalarında tümör indükleyici olarak genellikle DEN kullanılmaktadır (6,8,12,18,29,31,58,61,74,78,85,88,89,90,93,99,102). DEN'in yapısında amid, üreaz ve karbon içeren bileşikler bulunur (43). Amin içeren gıdaların alınmasında, mide suyunda nitrit ile birleşen amin son ürün olarak DEN'in oluşumunu sağlar. DEN sanayide, fiber endüstrisinde copolymerlerin yumuşatıcısı ve yağ üretiminde katkı maddesi olarak kullanılır. DEN, kanser oluşumunda direkt etkiye sahiptir. Bunun anlamı enzimlere bağılı olmaksızın DEN'in kendiliğinden hidrolize olmasıdır (43,66). İki hidroksilasyon reaksiyonu ile aktive olan DEN'in bu biyolojik aktivasyonu sitokrom p450 tarafından katalizlenir (43,60,90).

2.2.2. 2-AAF'nın Karaciğer Tümörü Oluşumundaki Rolü

2-AAF, sentetik arylamin yapısında olan 2-aminofloranın biyolojik olarak asetillenmesi sonucu 2-AAF oluşur. 2-AAF, detoksifikasyon reaksiyonlarının ikinci fazında görev yaparak DEN'in birinci adımından sonra, ikinci adım olarak DNA'da guanin bazına bağlanıp toksik etki oluşturur. Bu toksik etki, mutasyonlara neden olarak, karaciğerde, sırasıyla preneoplastik, neoplastik, benign neoplazmi ve malign neoplazmi oluşur (**Şekil 2.4**) (6,18,31,44,48,50,57,60,74,76,85,94).



Şekil 2.4 Ksenobiyotiklerin kullanımı sonucunda oluşan mutasyonlar, karaciğerde sırasıyla preneoplastik, neoplastik, benign neoplazmi ve malign neoplazmi oluşturur (44).

DEN ve 2-AAF benzeri kimyasal tümör promotör ajanların birikimi sonucu, düz E.R.'de detoksifikasyon reaksiyonları için detoksifikasyon enzimleri sentezlenir (6,18,27,60,65,77). Bu enzimler topluca sitokrom P450 olarak bilinir. Sitokrom P450,

karaciğer mikrozomlarında ve adrenal korteks mitokondrilerinde temel elektron transport zincirindeki en son enzimdir (96).

2.3. DEN ve 2-AAF'nin Sitokrom p450 Enzim Sistemine Etkileri

Sitokrom p450 enzimleri ışığı 450 nm de en yüksek düzeyde absorbe eder. Bu enzimler detoksifikasyonun (Toksik maddelerin uzaklaştırılması) ilk fazını oluştururlar. Substrat olarak, atmosferik oksijeni kullanıp, oksitlenir ve yan ürün olarak da su ortaya çıkar. Sitokrom p450 enzimlerinin karakteristik özelliği, tek bir kimyasal substratın çok değişik p450 enzimleri tarafından yıkılabilmesi, tek bir p450 proteinin ise yapısal olarak farklı bir çok kimyasal maddeyi okside edebilmesidir. p450 enzimlerinin kimyasal maddeleri metabolize ve detoksifiye etme kapasiteleri önemlidir (96).

DEN ve 2-AAF'nin etkisi ile karaciğer dokusunda preneoplastik lezyonların oluşumu ile sitokrom p450 arasındaki ilişki henüz tam olarak belirlenememiştir (60), DEN ve 2-AAF'nin biyotransformasyonunda esas olan enzimatik reaksiyonlar faz I ve faz II olmak üzere iki şekilde sınıflandırılabilmiştir. Faz I'de oksidasyon-redüksiyon, faz II'de ise konjugasyon reaksiyonları gerçekleşir (60,64,83).

Faz I ve faz II reaksiyonlarında monooksijenaz enzimleri görev yaparlar, bunlardan sitokrom p450 enzim sistemi ;

1. Teropatik ajanların inaktivasyonu ya da aktivasyonunu,
2. Kimyasal ajanları reaktif moleküllere dönüştürerek istenmeyen hücrel hasara, hücre ölümüne ya da mutasyonlara,
3. Steroid hormonların üretimine,
4. Yağ asitleri ve retinoidlerin metabolize olmasına,
5. İlaç-ilaç etkileşimlerinde enzimlerin indüklenmesi ya da inhibe edilmesine aracılık eder (3,45).

Memelilerde, bu enzimlerin yoğun buldukları organ karaciğer olup akciğerdeki miktarları karaciğere göre 0.1 – 0.001 arasında değişir. Bu ailedeki enzimler yapısal olarak farklı bileşiklerin oksidasyonunu kolaylaştırır. Örneğin, kolesterol, vitamin D ve steroid hormon gibi vücuda yabancı olmayan (endojen) maddelerin hem yapım hem de yıkımlarında bazı tepkimeleri bu enzimler katalize eder. Tıbbi ve tarımsal ilaçlarda ayrıca sigara dumanında da bulunan benzen ve piridin gibi poliaromatik hidrokarbonlar, aseton, etil alkol gibi organik çözücüler, kozmetikleri, yiyecek katkı maddelerini ve organizmaya yabancı olan çok sayıdaki organik kimyasal maddeleri oksitleyerek suda çözünen maddelere dönüştürürler. Genel anlamıyla bir şekilde vücudumuza giren bu tip maddelerin, vücuttan atılmaları bu yolla olur. 1960'lı yıllarda p450 enzim sisteminin tek işlevinin vücuda alınan kimyasal maddeleri zararsız hale getirmek olduğu sanılıyordu (3). Fakat bunların, zehirli maddeleri zararsız hale getirmenin yanı sıra, bazı toksik olmayan maddeleri de toksik metabolitlere dönüştürerek tümör oluşumuna neden oldukları resbit edilmiştir (3,5,16,19,22,60,69,84,87,93). Sitokrom P450 enzimleri sigara dumanında bulunan poliaromatik hidrokarbonlardan benzoapireni, oksijenli metabolitlerine yani epoksit ve dihidrodiol epoksitlerine dönüştürmekte, bunlar da DNA'yla bağ oluşturmakta ve bir süreç içerisinde kansere yol açmaktadır. Bu en çok karaciğer ve akciğerde gerçekleşir (3).

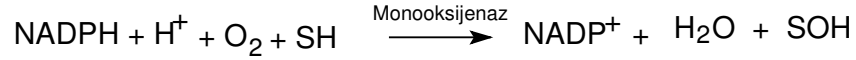
Sitokrom P450 enzim sistemlerinin, bireyden bireye değişen ve oldukça farklı olan formları ortaya çıkabilir. P450 ailesi çeşitli sistemlerdeki en değişken aileyi oluşturur. CYP genlerinin inanılmaz çeşitliğinde en az 30 gen dublikasyonu rol oynar. Bu proteinlerin kodlanması için bilinen 481 gen 74 aileye bölünerek en azından % 40 oranında gen varyasyonlarıyla birbirinden ayrılır (96). Aile ismi sayıyla örneğin, CYP1, CYP2 gibi gösterilmektedir. Memelilerde 77 ailenin sadece 14' ü bulunmaktadır. Yaklaşık 20 alt aile vardır ve bunlar rakamın önüne harf konularak örneğin, CYP1A gibi ifade edilir. Kişisel enzimler, alt aileyi gösteren harfi takiben konan yine bir numara örneğin, CYP1A2 gibi ile gösterilir (3,27,96). CYP1A2, sıçan ve insan hepatositlerinde detoksifikasyona katılan sitokrom p450 enziminin bir tipidir (5,22,60,69,16,66,81,84, 87,93) ve DEN ile 2-AAF uygulanmış sıçanlarda bu enzimi ekspresyonunda azalma

belirlenmiştir (60). Özellikle CYP2 ailesinin, hayvan organizmaları tarafından detoksifiye edilmesi gereken bitki toksinlerine yanıt olarak geliştiği sanılmaktadır.

2.3.1. Sitokrom p450 Enzim Sistemi ve GST Enzimlerine DEN ve 2-AAF'nın Etki Mekanizmaları

Benzo(a)pyrene, DEN, PB, 2-AAF ve acetaminophen gibi ksenobiyotiklerde sitokrom p450 sistemi toksik metabolitler üretmektedir. Bu oluşan toksik bileşikler hücre hasarına ya da tümör oluşumuna neden olmaktadır (48,51,56).

Kimyasal ajanların oksidasyonu, sitokrom p450 tarafından, GST aracılığıyla yapılır (97). Sitokrom p450, herhangi bir ajanı (S, substrat) kendine bağlayarak katalizleme reaksiyonunda, oksitleyici ajan olarak oksijeni ve redükleyici ajan olarak da NADPH'ı kullanır. Alınan ajan için bir bağlanma bölgesine sahiptir, bu bağlanma bölgesinde tek bir demir ihtiva eden protoporphyrin IX (hem) yer alır. Memeli hücrelerinde sitokrom p450 bir elektron transport sistemine sahiptir (39,60,80).



Yapılan birçok çalışma, sitokrom P450'ye bağımlı monooksijenaz enzimlerinin saflaştırılması ve mekanizmalarının aydınlatılması üzerinedir. Araştırmalar, karaciğer ve akciğer monooksijenazları ve bu enzimlerin önemli bir parçası olan sitokrom P450 üzerine yoğunlaşmaktadır. Sitokrom P450'nin izole edilme yollarının araştırılması, p450'nin akciğer ve karaciğer hücrelerinde endoplazmik retikulum membranında gömülü olduğunu ortaya koymuştur (39,60,80).

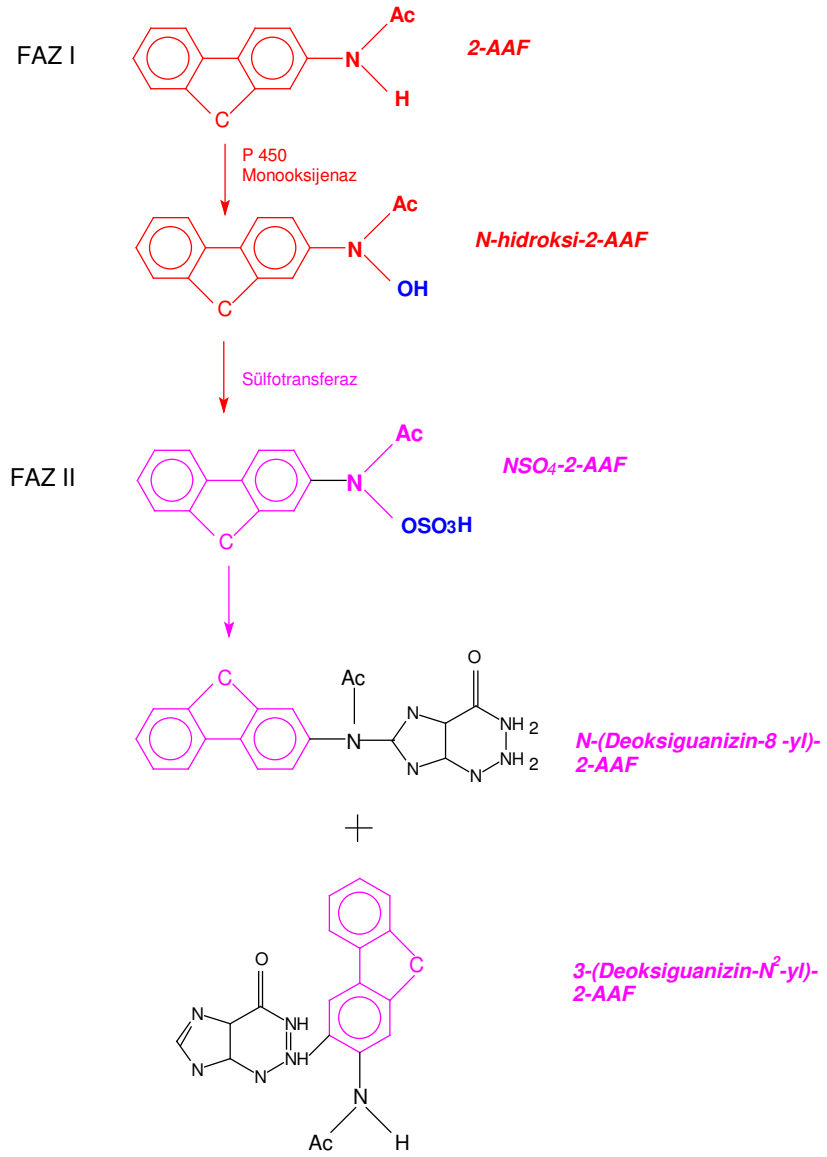
Faz I hidroksilasyon reaksiyonundan sonra oluşan madde, faz II'de glutatyon konjugat ile bağlanır ve bu konjugat uygun transferazlar tarafından katalizlenir (39,44,66,97).

Faz II'de görev yapan, GST immunohistokimyasal olarak araştırıldığında, bunun GST-p karaciğer preneoplastik lezyonlarındaki hücre sitozolünde yer aldığı anlaşılmıştır. GST-p, çok yönlü bir protein olup, ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda

çok önemlidir GST-p, tümör oluşumunda aşırı ekspresyon göstermesi nedeniyle erken tümör tanısında tümör belirleyicisi olarak kullanılır. GST-p, hepatositlerdeki, ksenobiyotiklere ait toksik metabolitlerin oluşumunu sağlar (14,16,17,19,50,52,56, 60,64,66,74,83).. Ksenobiyotikler, glutatyon konjugat miktarında artışa neden olarak toksik hale getirir.

Glutatyon konjugat toksisitesi oluşumu iki farklı mekanizma ile gerçekleşir.

- 1. Mekanizma;** konjugat direkt olarak alkilendiği zaman toksik etkilere sahip olan sülfür half-mustard molekülünün etkisindedir. Örneğin, 2-AAF önce faz I'de sitokrom p450 enzimleri aracılığıyla n-hidroksi-2-AAF, daha sonra da faz II'de sülfoniltransferazlar (Örneğin, GST) aracılığıyla DNA'da guanine bağlanarak N-deoksiganizin-8-yl-2-AAF'ye dönüşür (**Şekil 2.5**) (31,38,48,51,64). Diğer bir örnekte de, GST, 1,2-dibromoetan ve glutatyon arasında konjugasyonun katalizlenmesidir. Bu olayda half-mustard'dan episülfonium iyonu oluşur, bu iyon da DNA'ya bağlanır. DNA ile glutatyon konjugatın kovalent olarak bağlanması, 1,2-dibromoetan karsinojenik etki gösterir (17,40,52,53,61,97).
- 2. Mekanizma;** glutatyon konjugat kendi toksisitesini yaratır. Bu olayda, glutatyon onun uygun sistein konjugatına dönüşür, sistein konjugattan da β -liyaz aracılığı ile sülfür kısmını oluşturan bölüm yok edilir. Sonuçta toksik ve reaktif sistein konjugat oluşur (17,35,38,40,48,51,53,97).



Şekil 2.5. Detoksifikasyon reaksiyonlarında sitokrom p450 ve sülfoniltransferaz (GST) enzimlerinin faz I ve faz II'deki etkileri (38).

2.4. Karsinogenez ve Serbest Oksijen Radikalleri

Karsinogenez; hücrelerde kimyasal, fiziksel, biyolojik ve genetik bir veya birden çok değişikliğin birleşmesi ile ortaya çıkan bir zedelenme sürecidir. Tümör oluşumunu etkileyen faktörlerin çoğu, hücrede radikal üretimine neden olur. Bu faktörler, karsinogenezin başlama, gelişme ve ilerleme aşamalarında da etkilerini göstererek tümör oluşumu ve gelişimini indüklerler. Bu konuda çeşitli hayvan model çalışmaları yapılmıştır, bunlar;

- Serbest oksijen radikali üreten bileşiklerin tümör promotörü olduğunu,
- Bu bileşiklerden bazılarının tümör promotorunun biyokimyasal fonksiyonunu taklit edebildiğini,
- Bazı promotorların serbest oksijen radikali üretebildiğini,
- Antioksidan mekanizmanın tümör promotorları tarafından düzenlendiğini,
- Serbest oksijen radikali süpürücülerinin, antioksidantlar ve detoksifikasyondan sorumlu enzim ve moleküllerin tümörün ilerlemesini engellediğini göstermiştir (73).

2.4.1. DEN ve 2-AAF'nin Aktif Oksijen Türlerini Üretmek Tümör Gelişimine Etkisi

DEN'in metabolitleri, DNA'ya bir ya da iki oksidasyon sağlayan elektron ile kovalent bağlanarak tümör promotörlerinin bağlanmasına aracılık eder (62). Tümör promotörü bir süperoksit anyonu indükleyicisi olarak görev yaparak reaktif oksijen molekülleri ve hidrojen peroksit oluşumunu sağlar. Bunun sonucunda süperoksit ve hidrojen peroksit birikimi gerçekleşir. Bu birikim, koruyucu antioksidant mekanizmanın azalmasını ve yüksek oranda reaktif hidroksil radikali oluşumunu sağlar. Bunun sonucunda DNA'nın yapısında kopma ve deoksiriboz parçalanması ortaya çıkar. Reaktif hidroksil radikalleri ayrıca, lipid membran yağ asitlerinin hidrojen atomlarını ayırır. Hidroperoksi radikalleri, hidrojen atomları ile doymamış çok karbonlu yağ

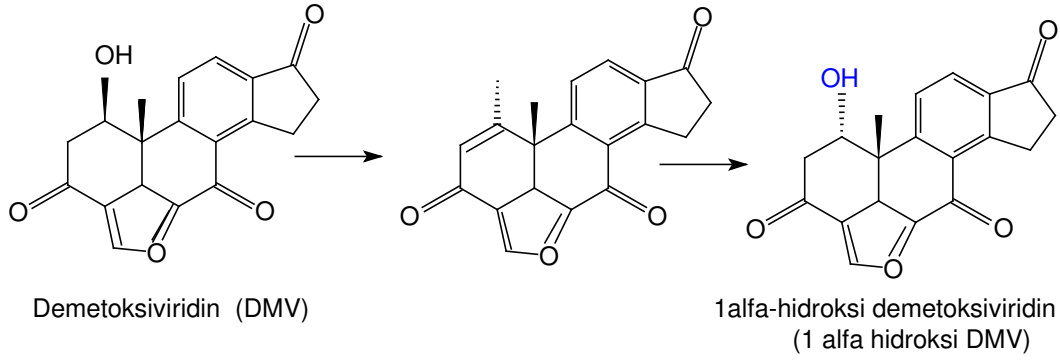
asitlerin karbonil gruplarıyla birleşme sağlayarak oluşur. Buna ek olarak, hidroperoksi radikalleri, lipid-hidroperoksit düzenlenmesindeki zincir reaksiyonundan hidrojeni ayırırlar. Bunun için, süperoksit ve hidroperoksit radikalleri lipit peroksidasyon (LPO)'nun artmasına neden olur ve hücre membranında hasar artışı ortaya çıkar (60,91).

Promotör olarak fenobarbital (FB) ya da 2-AAF kullanılan hepatosit hücrelerinin peroksizomlarında büyüme ve sayıca artış gözlenirken, peroksizomal yağ asit oksidasyonu ve mikozomal hidroksilasyon aktivitesinde artışa neden olur. Bunun sonucunda da; DNA hasarı ve tümör oluşumu ortaya çıkar. Oluşan hasarın giderilmesinde, serbest radikallere karşı, savunma sistemindeki spesifik enzimler rol alır (9,36). Bu spesifik enzimlerin kullanılmasıyla; glutatyon peroksidaz (Gpx) ve süperoksit dimutaz (SOD)'da azalma, katalaz ve malondialdehit (MDA)'da ise artış olduğu belirlenmiştir (1,9,21,25,30,91,98,104). Yapılan bir çalışmada da DEN ve FB kullanılarak tümör oluşturulduğunda katalaz ekspresyonunun azaldığı bildirilmiştir (30).

Yine DEN ve FB uygulanan sıçanların karaciğerinde, histolojik olarak, preneoplastik fokus, nodüller ve hiperplastik kupffer hücrelerini belirlemişlerdir. Aynı çalışmada, Gpx ve SOD'da azalma ve katalaz'da artış belirlenirken, MDA'da artış olduğu belirlenmiştir. Bu enzimler antioksidan olarak, serbest radikallerin neden olduğu hasara karşı zar ve sitozolde savunma görevi yaparlar. Bu savunmada, SOD, Gpx ve katalaz çok önemlidir. SOD ve katalaz, oksijen radikalini hidrojen peroksit ve su haline dönüştürür. Oluşan hidrojen peroksit, glutatyon peroksidaz tarafından yakalanır, katalaz veya diğer enzim sistemleri tarafından yok edilir. Bu enzim sistemleri NADPH'ı kullanarak, hidrojen peroksiti suya dönüştürür. Kanserli hücrelerde, normal hücreye göre SOD miktar daha yüksek olmasının nedeni, tümör hücrelerinde serbest oksijen radikallerinin aşırı derecede üretilmesidir (9).

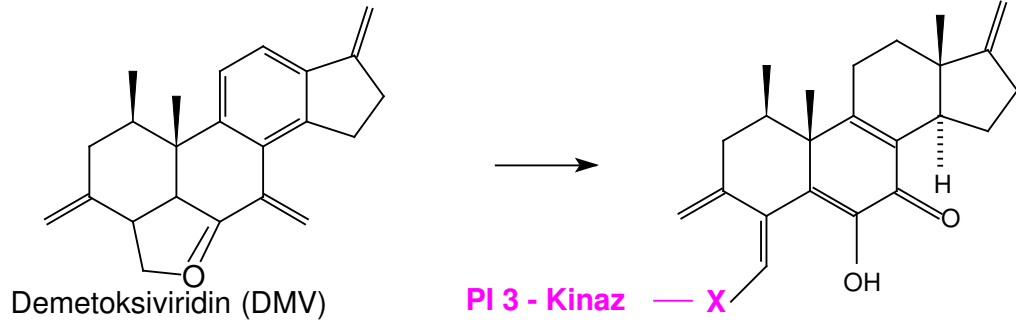
2.5. Demetoksiviridin (DMV) ve 1- α -hidroksi-demetoksiviridin (1- α -Hidroksi-DMV)

DMV ve 1- α -hidroksi-DMV, wortmannin mantarından türetilmiş mantar metabolitleridir. DMV, Nodulisporium hinnuleum mantarından glukozlu ortamda, 1- α -hidroksi-DMV ise seyreltilmiş hidroklorik asit ortamda DMV'nin aseton ile muamele edilmesiyle türetilmiştir (**Şekil 2.6**) (54,75).



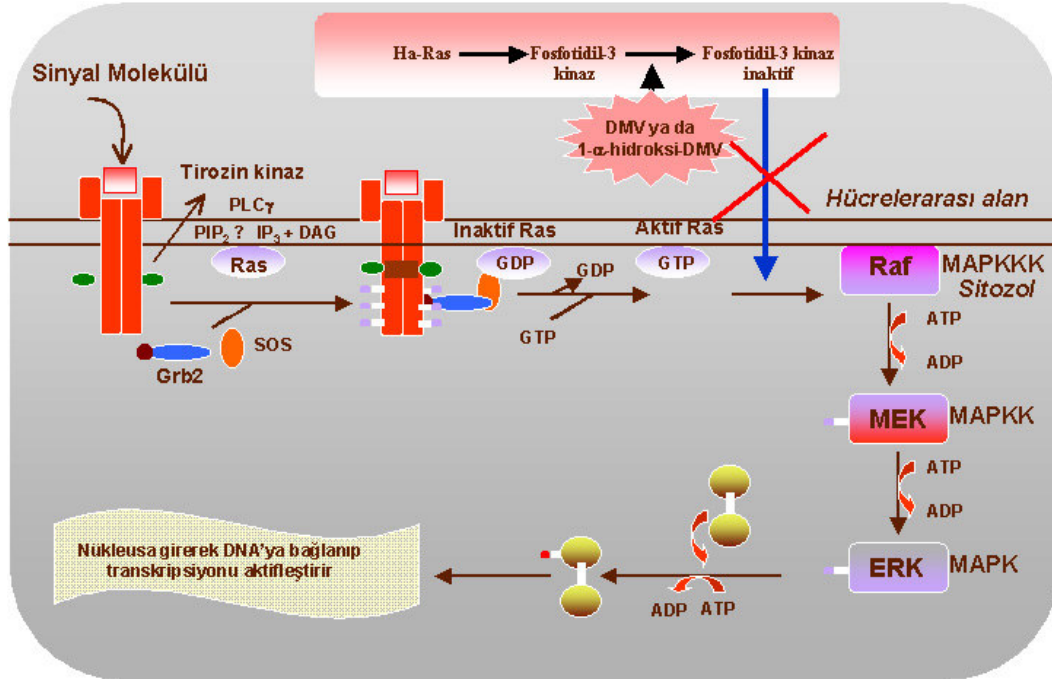
Şekil 2.6 DMV'den 1- α -hidroksi DMV'nin sentezi (*KIRAN İ. ve arkadaşlarından modifiye edilerek alınmıştır (54,72)*).

DMV ve 1- α -hidroksi-DMV metabolitleri, önemli bir hücre fonksiyon mediatörü olan PI-3 kinaz gibi bazı enzimlerin aktivitelerini inhibe ederek, antitümör etki gösterirler (**Şekil 2.7**) (23,24,26,34,55,59,71,72,75,86).



Şekil 2.7 PI-3 kinaz'ın wortmannin ile inhibisyonu (*BRYAN H. ve arkadaşlarından modifiye edilerek alınmıştır (72).*)

Wortmannin ya da türevlerinin PI-3 kinaz'ın aktivitesi üzerine etkisi araştırıldığında, büyüme faktör reseptörlerince ve p21^{Ras} onkogen protein kinazlarca aktif hale getirildiği gösterilmiştir (**Şekil 2.8**) (59,72,75).



Şekil 2.8 Fosfotidil-3-kinazın wortmannin ile MAPK sinyal yolunda inhibisyonunun gösterilmesi (*POLLAND T. D., EARNSHAW W. C.: Cell Biology kitabından modifiye edilmiştir (59,72,79).*)

PI-3 kinaz heterodimer bir yapıda olup, 85 kDa (p85) düzenleyici ve 100 kDa katalitik subunit (p110)'a sahiptir. PI-3 kinaz, hücre membranının fosfolipid'e ait myo-inositolü D-3-OH pozisyonunda fosforlar. Aynı zamanda fosfotidil 4,5 fosfatın fosforlanmasını sağlayarak fosfotidil 3,4,5 fosfatı oluşturur. Fosfotidil 3,4,5 fosfat da PLC'yi aktive ederek PIP2'nin hidrolizini stimule ederek, diaçilgliserol (DAG) ve inositol 1,4,5 trifosfat (IP3) dönüşümünü sağlar (34,72,75).

Pankreatik β -hücrelerinde, wortmanninin PI 3-kinazı inhibe ederek PLC'nin aktivitesini inhibe ettiği, böylece PIP2'nin hidrolizini engelleyerek, diaçilgliserol (DAG) ve inositol 1,4,5 trifosfat (IP3) oluşumunun engellendiği ortaya konmuştur (34).

Wortmanninin in vivo olarak, insan MCF-7 meme kanser hücreleri ve murine C3H kanser hücrelerinin büyümesini inhibe ettiği tesbit edilmiştir (59).

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Denev Hayvanları

Çalışmamızda, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında yetiştirilen, 8 haftalık Spraque dawley türü sıçanlar kullanılmıştır. Spraque dawley sıçanlar, havalandırma ve diğer temizlik kurallarına dikkat edilerek muhafaza edilmiş yeterince normal çeşme suyu ve pelet yem ile beslenmiştir.

3.1.2. Kimyasal Maddeler

- DEN (Sigma, USA)
- 2-AAF (Sigma, JAPAN)
- DMV (ESOGÜ Fen Edebiyat Fak. Biyokimya Bilim Dalı, TURKEY)
- 1- α -hidroksi DMV (ESOGÜ Fen Edebiyat Fak. Biyokimya Bilim Dalı, TURKEY)
- %30 Akrilamid/ Bis akrilamid 37,5:1 solüsyonu (Qbiogene, USA)
- Amonyum persülfat (Qbiogene, USA)
- Hematoksilen (Bio optica, ITALY)
- Hücresel Glutasyon Peroksidaz Ölçüm Kiti (Calbiochem, USA)
- KCl (Merck, GERMANY)
- %30 H₂O₂ (Sigma, GERMANY)
- 1.1.3.3 Tetraetoksipropene (Sigma, GERMANY)
- 2- Merkaptioethanol (Sigma, GERMANY)
- Absölü Alkol (Detsan, TURKEY)
- Absölü kloroform (Detsan, TURKEY)
- Amonyum molibdat (Sigma, GERMANY)

- Entellan (GBL, NETHERLAND)
- Eozin (Bio optica, ITALY)
- Fosforik asit (H_2PO_4) (Merck, GERMANY)
- HCl (Merck, GERMANY)
- Aseton (C_3H_6O) (Merck, GERMANY)
- Bicinchonic asit assay kit (Sigma, USA)
- Borik asit (H_3PO_4) (Carlo Erba, ITALY)
- Bromfenol mavisi (Merck, GERMANY)
- Commassie brilliant mavisi (Merck, GERMANY)
- Cx32 antikor (Santa Cruz, USA)
- CYP1A2 antikor (Santa Cruz, USA)
- Dodesilsülfat Natriyumsalz (SDS) (Merck, GERMANY)
- Formaldehit (HCHO) (J.T. Baker, NETHARLAND)
- Glasiyal asetik asit %99 (UNY, JAPAN)
- Gliserol %87 (Pancreac, SPAIN)
- Glisin (J.T.Baker, NETHARLAND)
- GST-p antikor (Novo Chostra, USA)
- Ha-ras antikor (Santa Cruz, USA)
- Ksilol (Merck, GERMANY)
- Loading buffer (Santa Cruz, USA)
- Metanol (CH_4O) (Merck, GERMANY)
- Molecular Weight Marker (Santa Cruz, USA)
- Molecular Weight Marker (Serva, USA)
- Na_2HPO_4 (Merck, GERMANY)

- n-Bütanol (Sigma, GERMANY)
- Nitrosellüloz membran (Serva, USA)
- Potasyum dihidrojen fosfat(KH_2PO_4) (Merck, GERMANY)
- Panceaus S (Sigma, GERMANY)
- RIPA buffer (Santa Cruz, USA)
- Sekonder antikor (Santa Cruz, USA)
- Serum fizyolojik
- SOD ELISA Ölçüm Kiti (Fluka, JAPAN)
- Sodyum bikarbonat (NaHCO_3) (Merck, GERMANY)
- Sodyum dihidrojen fosfat 2 hidrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Merck, GERMANY)
- Sodyum hidroksit (Reidel deHaen, GERMANY)
- Sodyum karbonat (Na_2CO_3) (Merck, GERMANY)
- Sodyum klorür (NaCl) (Merck, GERMANY)
- TBA (tiyobarbitürik asit) (Merck, GERMANY)
- TEMED (N,N,N,N-Tetra-metil-etilendiamin) (Appllichem, USA)
- Total Protein Kiti (Bio-Clinica, ITALY)
- Tris (ICN Biomedicals, USA)
- Trizma base (Sigma, GERMANY)
- Tween 20 (Merck, GERMANY)
- Western blot Blocker (Sigma, USA)
- Western blot luminal Reagent (Santa cruz, USA)
- Zeytin yağ (Komili, TURKEY)

3.1.3. Ayratlar

- Balon joje (100ml, 500ml)
- Mini elektroforez cihazı (Bio Rad, 170-3930)
- Bistüri ucu
- Cam fanus
- Cam kalemi
- Çeker ocak
- Enjektör (10 ml)
- Etüv (Nüve NT 715)
- Fotoğraf filmi (Kodak)
- Hassas terazi (Precisa-125A)
- Hayvan kafesi
- Homojenizatör (IKA-Ultra –Turrax T25)
- Homojenizatör ucu (IKA-T25, S25N 10G)
- Kronometre
- Lam
- Lamel
- Manyetik karıştırıcı (Nüve)
- Mezür (50 ml, 100 ml, 500 ml, 1000 ml)
- Mikroskop (Olympus PM10-ADS marka fotomikroskop)
- Mikrotom (Reichert Jung 820)
- Operasyon takımı
- Otomatik pipetler
- Pastör pipeti (Cam ve Plastik)

- Pipet uçları (1000 ve 100 µl)
- Plastik doku takip kaseti
- Soğutmalı santrifüj (Heraeus Biofuge Stratos)
- Spektrofotometre (Shimadzu UV-1601)
- Spektrofotometre tüpleri (1 ml, 2 ml)
- Su banyosu (Nüve)
- Syngene Kemilüsans Görüntüleme Cihaz
- Vial (Eppendorf)
- Vorteks mikser (Restch)
- Mikroskop (Olympus)
- Buz makinası (Hoshizaki)
- Buzdolabı (Arçelik)
- Çalkalayıcı (Janke & Kunkel, HS 500)
- Derin dondurucu (-20°C) (Arçelik)
- Derin dondurucu (-86°C) (New Brunswick Scientific)
- Distile su cihazı
- Elektroforez (Biorad)
- Fiber sünger (10,5x7,5cm) (Bio-Rad, 1703934)
- Filtre kağıdı (10,5x7,5cm) (Bio Rad, 1703932)
- Güç kaynağı (Bio Rad, Power Pac 300, 165-5050)
- Hassas terazi (Precisa-125A)
- Kemilüminesans Analiz Software (Yazılım programı)
- Mikropipet ucu (silikonlu 1, 200, 1000 ml) (Neptune)
- Mikroplate okuyucu (ELISA) (LabSystems)

- Mini elektroforez transfer cihazı (Bio Rad, 170-3930)
- pH metre (NEL)
- Shaker (Heidolph Polymax 1040, Heidolph Titramax 100)

3.2. Yöntem

3.2.1. Doz ve Deney Grupları

Çalışmada 86 adet 150-200 gr ağırlığında 8 haftalık Spraque-dawley türü sıçan kullanıldı. Doz ve deney grupları **Çizelge 3.1**'de verildi.

Çizelge 3.1. Doz ve deney grupları

Gruplar	n	Birinci doz ve diğer rutin uygulamalar	İkinci uygulamalar
1.Grup Kontrol	8	Su + Yem	-
2.Grup Yağ	8	0,1 ml/kg gavaj Su + Yem	-
3. Grup DMSO	8	Su + Yem	1. Haftada 0.1 ml DMSO i.p. olarak verildi
4.Grup DMV	8	Su + Yem	DMV (1,5 mg/kg) DMSO'da çözüldürülerek 16., 23., ve 30. günde bir kez i.p. olarak verildi.
5.Grup 1- α -Hidroksi DMV	8	Su + Yem	1- α -Hidroksi DMV (1,5 mg/kg) DMSO'da çözüldürülerek 16., 23., ve 30. günde bir kez i.p. olarak verildi.
6.Grup DEN	8	DEN, 175 mg/kg i.p 0.1 ml DMSO'da çözüldürülerek uygulandı Su + Yem	-
7.Grup 2-AAF	8	Su + Yem	Deneyin başlamasından sonra 7., 8., ve 9. günde 20 mg 2-AAF /kg oranında DMSO'da çözüldürülerek 0.1 ml yağ içinde gavajla verildi
8.Grup DEN + 2-AAF	14	DEN 175 mg/kg i.p. 0.1 ml DMSO'da çözüldürülerek uygulandı Su + Yem	DEN uygulamasından 1 hafta sonra 7., 8. ve 9. günlerde 2-AAF 20 mg/kg oranında 0.1 ml DMSO'da çözüldürülerek 0.1 ml yağ içinde gavajla verildi
9.Grup DEN + 2-AAF + DMV	8	DEN 175 mg/kg i.p. 0.1 ml DMSO'da çözüldürülerek uygulandı Su + Yem	DEN uygulamasından 1 hafta sonra 7., 8. ve 9. günlerde 2-AAF 20 mg/kg oranında DMSO'da çözüldürülerek 0.1 ml yağ içinde gavajla verildi ve DMV (1,5 mg/kg) 0.1 ml DMSO'da çözüldürülerek 16., 23., ve 30. günde bir kez i.p. olarak verildi
10.Grup DEN + 2-AAF + 1- α -Hidroksi DMV	8	DEN 175 mg/kg i.p. 0.1 ml DMSO'da çözüldürülerek uygulandı Su + Yem	DEN uygulamasından 1 hafta sonra 7., 8. ve 9. günlerde 2-AAF 20 mg/kg oranında 0.1 ml DMSO'da çözüldürülerek 0.1 ml yağ içinde gavajla verildi ve 1- α -Hidroksi DMV (1,5 mg/kg) DMSO'da çözüldürülerek 16., 23., ve 30. günde bir kez i.p. olarak verildi.

DEN, sıçanlara, 175 mg/kg olacak şekilde 0.1 ml dimethylsülfoksitte (DMSO)'da çözündürülerek intraperitoneal (i.p) olarak uygulandı (7,42,57,90,103,). 2-AAF 20 mg/kg oranında 0.1 ml saf zeytin yağı içerisinde gavajla uygulandı (6,18,31,57,60,74). Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bilim Dalında üretilen, DMV ve 1- α -Hidroksi-DMV metabolitleride 1.5mg/kg sıçan olacak şekilde 0.1 ml DMSO'da çözündürülerek intraperitoneal (i.p) olarak uygulandı (54,75).

3.2.2. Deney Hayvanlarından Çalışılacak Örneklerin Alınması

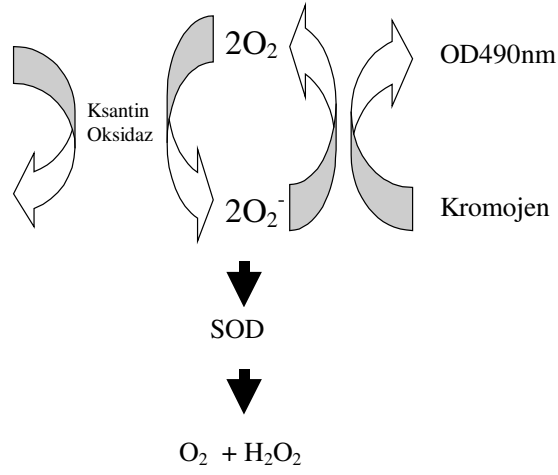
Beş haftalık deney uygulaması sonunda, sıçanlardan eter anestezisi altında karaciğer alındı. Sıçanlardan alınan karaciğer örnekleri ikiye bölünerek bir kısmı -86 °C'de SOD, MDA, katalaz ve Gpx'in spektrofotometrik ölçümü için ve ayrıca Western blot yöntemi ile CYP1A2 analizi için saklandı. Diğer bir kısmı da immunohistokimyasal (Ha-Ras, Cx32, GST-p için) ve ışık mikroskobide histopatolojik inceleme için nötral formaline alındı.

3.2.3. Karaciğer Dokusunda Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi Ölçümü

SOD aktivite ölçümü için (FLUKA[®], USA) kiti kullanıldı.

Ölçüm Prensipleri:

Superoksit anyonları (O₂⁻), Ksantin/Ksantin oksidaz sistemi tarafından oluşturulup kromojen solüsyon kullanılarak ölçümü yapıldı.



a. Örnek Hazırlanması

Homojenat Hazırlanması:

- 1) Örnek sayısı kadar tüp alındı ve numaralandı.
- 2) Her hayvandan ortalama 1 g kadar karaciğer dokusu alındı.
- 3) Alınan doku parçası 0.16 mg/ml heparin içeren %0.9 NaCl solüsyonunda yıkandı.
- 4) Alınan doku miktarı kadar serum fizyolojik ilave edildi.
- 5) Tüpler buz dolu bir kap içinde homojenizatör cihazında 8000 devirde 10 vuruşta homojenize edildi.
- 6) Homojenizasyon sonrası 3000xg'de 10 dakika santrifüj edildi.
- 7) Santrifüj sonrası süpernatant ayrıldı.
- 8) Ayrı bir test tüpüne süpernatant'ın 250 µl'si ve buzda soğutulmuş ekstraksiyon reagent'ının 400 µl'si ilave edildi.
- 9) 30 saniye vortekslendi.
- 10) +4°C'de 3000xg'de 10 dakika santrifüj edildi.

11) Üstte toplanan süpernatant bir vialle alındı. Aynı gün içinde ölçüm yapılacaksa +4 °C’de, daha sonra ölçüm yapılacaksa –86 °C derin dondurucuda saklandı.

b. Ölçüm Yöntemi

- 1) Kit’te verilen çalışma solüsyonu hazırlandı.
- 2) Kit’te verilen enzim çalışma solüsyonu hazırlandı
- 3) Aşağıdaki gösterildiği gibi 96’lık mikropate kuyularına örnek ve diğerleri kondu.

	Kör 1	Kör 2	Kör 3	Örnek
Örnek		20 µl		20 µl
De iyonize su	20 µl		20 µl	
Çalışma Solüsyonu	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl
Enzim Çalışma Solüsyonu	20 µl			20 µl

- 4) Plate 37 °C’de 20 dakika inkübe edildi.
- 5) Elisa ile 490nm’de ölçüm yapıldı.

c. Sonucun Hesaplanması

Aşağıdaki formüle göre % inhibisyon olarak hesaplandı.

$$\text{SOD Aktivitesi (\% inhibisyon)} = \frac{(\text{Kör1}-\text{Kör3})-(\text{örnek}-\text{Kör2})}{(\text{Kör1}-\text{Kör3})} \times 100$$

3.2.4. Karaciğer Dokusunda Glutasyon Peroksidaz (GPx) Aktivitesi

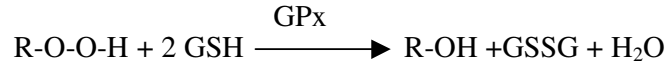
Ölçümü

Hücrel glutasyon peroksidaz aktivite ölçümü için (CALBIOCHEM®, USA) kiti kullanıldı.

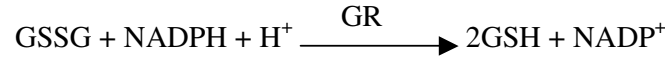
Ölçüm Prensi:

Kit indirek olarak GPx aktivitesini ölçer. GPx ortamdaki organik peroksit varlığında redükte glutasyon GSH'ı okside glutatyona (GSSG) dönüştürür. Daha sonra dışarıdan ortama eklenen NADPH ve glutasyon redüktaz (GR) ile okside glutasyon tekrar redükte glutatyona dönüşür, böylece GSH derişimi sabit tutulur.

Oluşan kimyasal tepkimede NADPH'ın NADP'ye dönüşmesi esnasında spektrofotometrede 340 nm dalga boyunda absorbanstaki azalma izlenerek okside glutasyon oluşum hızı ölçülmüş ve GPx enzim aktivitesi hesaplanmıştır.



(1)



a. Örnek Hazırlanması

Homojenat Hazırlanması:

- 1) Örnek sayısı kadar tüp alındı ve numaralandı.
- 2) Her hayvandan ortalama 1 g kadar karaciğer dokusu alındı.
- 3) Alınan doku parçası 0.16 mg/ml heparin içeren % 0.9 NaCl solüsyonunda yıkanarak kırmızı kan hücreleri ve pıhtıdan uzaklaştırıldı.
- 4) 4 ml'lik soğuk buffer ilave edilen tüp içindeki doku, buz dolu bir kap içinde homojenizatör cihazında 8000 devirde 10 vuru da homojenize edildi.

- 5) Homojenizasyon sonrası 3000xg'de 10 dakika santrifüj edildi.
- 6) Üstteki kısım alındı.
- 7) +4 °C'de 10000xg'de 20 dakika santrifüj edildi.
- 8) Toplanan süpernatant kısmı ölçümde kullanıldı.
- 9) Aynı gün içinde ölçüm yapılacaksa +4 °C'de, daha sonra ölçüm yapılacaksa -86°C derin dondurucuda saklandı.

b. Ölçüm Yöntemi

- 1) Günlük kullanılacak buffer miktarı belirlendi.
- 2) Her biri 20 testlik NADPH reagent şişesi 7,5 ml buffer ile sulandırıldı.
- 3) Tert-butil hidroperoksit substratı deiyonize su ile dilue edildi. (% 0.007)
Bu üç solüsyon 23-25°C arasındaki sıcaklığa getirildi. Artan solüsyon kesinlikle tekrar kullanılmadı.
- 4) Örnekler ölçümden hemen önce buffer ile 1:10 şeklinde sulandırıldı.
- 5) Bir blank tüpü ve herbir örnek için ayrı test tüpleri hazırlanarak numaralandı.
- 6) Blank tüpüne konan 350 µl buffer üzerine 70 µl distile su ve 350 µl NADPH reagent ilave edildi.
- 7) Herbir örnek tüpüne 350 µl buffer, 350 µl NADPH reagent ve 70 µl dilue edilmiş örnek ilave edildi.
- 8) Ölçüm küvetine alınan örnek spektrofotometreye yerleştirildi.
- 9) 350 µl dilue edilmiş tert-butil hidroperoksit substratı otomatik pipetle çekilip bırakılarak eklendi. Hava kabarcığı oluşmamasına dikkat edildi.
- 10) 340 nm'de her 30 sn'de bir absorbans ölçümü otomatik olarak spektrofotometrenin kayıt sistemi kullanılarak 3 dakikanın üzerinde kaydedildi.

A340 nm'de t=0 zamanda absorbans < 0.8 olup olmadığına bakıldı. Böyle bir durum görüldüğünde NADPH reagent vialinin yeniden hazırlanmasına dikkat edildi.

c. Sonucun Hesaplanması

Her 30 saniyede bir A340 da örnek ve blankın azalan oranı hesaplandı. A340'da eğim hesaplanıp örnek oranından blank oranının farkı alınıp net oran (A340/dk) hesaplandı.

$$\begin{aligned} 1\text{mU/ml} &= 1\text{nmol NADPH/dk/ml} = (\text{A340/dk}) / 0.00622 \\ &= \text{Bulunan değer} \times 16 \\ &= \text{U/gr yaş doku} \end{aligned}$$

Homojenat için bu değer mU/ml olarak verildi.

3.2.5. Karaciğer Dokusunda Malondialdehit (MDA) Düzeyi Ölçümü

Yöntemin amacı; lipit peroksidasyonu son ürünlerinden bir tanesi olan MDA'nın tiyobarbitürik asit (TBA) ile verdiği renk reaksiyonuna dayanmaktadır (UCHIAMA ve MIHARA 1978)(95).

a. Örnek Hazırlanması

Homojenat Hazırlanması:

- 1) Örnek sayısı kadar tüp alınarak numaralandı.
- 2) Ölçüm işlemine kadar -86°C 'lik derin dondurucuda saklanan karaciğer doku örneklerinden, yaklaşık 0.4 g alındı.
- 3) Alınan örnekler SF ile yıkandı.
- 4) Buz dolu bir kap içinde tüpe geçirildi.

- 5) Tüp içindeki örnekler daha sonra %1 KCl çözeltisi kullanılarak homojenize edildi.
- 6) Buz dolu bir kap içindeki tüpte bulunan örnek, ultrasonik homojenizatör cihazında 8000 devirde 10 vuru da homojenize edildi.
- 7) Daha sonra soğutmalı santrifüjde +4°C'de 4000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi.
- 8) Üstte toplanan süpernatant kısmı ayrı bir vial e alınarak ölçümde kullanıldı. Aynı gün içinde ölçüm yapılacaksa +4 °C'de, daha sonra ölçüm yapılacak ise -86 °C'de derin dondurucuda saklandı.

b. Çözeltiler

% 1 Fosforik asit çözeltisi: 1 ml fosforik asit, distile su ile 100 ml ye tamamlandı.

% 0.6 TBA (Tiyobarbitürik asit) çözeltisi: 6 g TBA 1000 ml suda çözüldürüldü.

c. Spektrofotometrede Ölçüm

- 1) Her ölçümde bir blank ve örnek tüpleri hazırlandı.
- 2) Blank tüpüne; 0.5 ml distile su, 3 ml fosforik asit çözeltisi, 1 ml TBA çözeltisi, örnek tüpüne; 0.5 ml homojenat, 3 ml fosforik asit çözeltisi, 1 ml TBA çözeltisi ilave edildi.
- 3) Blank ve örnek tüpleri bir beherde su içinde 45 dk. kaynatıldı.
- 4) Tüpler soğuduktan sonra içlerine 4 ml butanol ilave edildi.
- 5) 3500 rpm'de 10 dk. santrifüj edildi.
- 6) Ölçüm için süpernatant alındı.

7) Spektrofotometre 532 nm'ye getirildikten sonra, distile su ile sıfırlanarak, blank ve örnek tüplerinin absorbansları okundu.

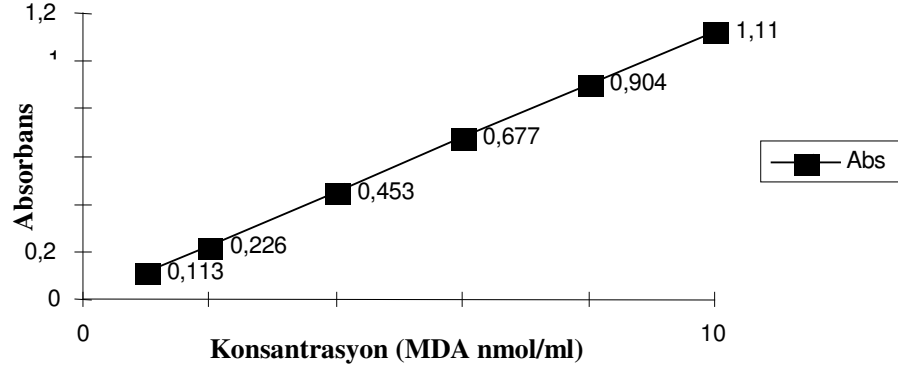
d. Sonucun Hesaplanması

1) Konsantrasyonların belirlenebilmesi için; lipit peroksit standardından (1.1.3.3. tetraetoksipropan) 1, 2, 4, 6, 8 ve 10 nmol/ml konsantrasyonlarında standartlar hazırlandı (Şekil 3.1).

2) Standart eğrisinin hazırlanması:

- Blank tüpüne; 0.5 ml distile su, 3 ml fosforik asit çözeltisi, 1 ml TBA çözeltisi konuldu.

- Standart tüplerine; 0.5 ml farklı konsantrasyonlarda standart, 3 ml fosforik asit çözeltisi, 1 ml TBA çözeltisi ilave edildi ve 532 nm'de absorbanslar okundu. Okunan absorbanslarla, konsantrasyon değerleri milimetrik kağıt üzerinde yerleştirilerek standart eğrisi çizildi. Standart eğrisinde, spektrofotometreden okunan absorbans değerine karşılık gelen konsantrasyon değerleri okundu (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. MDA standart eğrisi

Grafikten belirlenen değerler homojenatta nmol/g yaş doku olarak hesaplandı.

3.2.6. Karaciğer Dokusunda Katalaz Düzeyi Ölçümü

Katalaz aktivitesi, amonyum molibdatla stabil bir kompleks oluşturan hidrojen peroksitin spektrofotometrik olarak değerlendirilmesi temeline dayanan ölçümler sonucu belirlendi (GOTH L., 1991)(37).

a. Örnek Hazırlanması

Homojenat Hazırlanması:

- 1) Örnek sayısı kadar tüp alınarak numaralandı.
- 2) Yaklaşık 0.4 g ağırlığında karaciğer doku örnekleri alındı.
- 3) Alınan örnekler SF ile yıkandı.
- 4) Buz dolu bir kap içinde tüpe geçirildi.
- 5) Daha sonra tüp içindeki örnekler, sodyum-potasyum-fosfat tamponu ile homojenize edildi.

Sodyum-Potasyum-Fosfat Tamponu:

- a) KH_2PO_4 'den 9.08 g alındı ve 1 litre distile su içinde çözüldü (A).
 - b) Na_2HPO_4 'den 11.88 g alındı ve 1 litre distile su içinde çözüldü (B).
 - c) Daha sonra 3.3 ml A çözeltisinden alınarak B çözeltisi ile 100 ml'ye tamamlandı ve pH = 8 olacak şekilde pH metrede ayarlandı.
- 6) Buz dolu bir kap içindeki tüpte bulunan örnek, homojenizatör cihazında 8000 devirde 10 vuru da homojenize edildi.
 - 7) Daha sonra soğutmalı santrifüjde $+4^\circ\text{C}$ 'de 4000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi.
 - 8) Üstte toplanan süpernatant ayrı bir vialle alınarak ölçümde kullanıldı. Aynı gün içinde ölçüm yapılacaksa $+4^\circ\text{C}$ 'de, daha sonra ölçüm yapılacaksa -86°C derin dondurucuda saklandı.

b. Çözeltiler

- 1) **Substrat çözeltisi:** %30 H_2O_2 den 8.11 ml alınıp, fosfat tamponu ile 1000 ml ye tamamlanıp pH 7.4 ayarlandı.
- 2) **32.4 mmol/l amonyum molibdat ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) çözeltisi:** Bunun için, 8 g amonyum molibdat 200 ml distile suda çözülerek hazırlandı. Her zaman taze olarak kullanıldı ve kısa süreli bekleme lerde çökelti oluşmuş sa ölçüm yapılmadan önce çözelti vortekslendi.
- 3) **Tampon çözeltisi:**
 - A) 4.08 g KH_2PO_4 alınarak 500 ml distile suda çözüldü.
 - B) 8.04 g Na_2HPO_4 alınarak 500 ml distile suda çözüldü.

Daha sonra (A) çözeltisinden 3.3 ml alınarak (B) çözeltisi ile 100 ml ye tamamlandı ve pH=7.4'e ayarlandı.

c. Spektrofotometrede Ölçüm

- 1) Her bir örnek tüpü için bir blank tüpü (blank 1, B1) hazırlandı ve tüpler numaralandı.
- 2) Blank (B1) tüplerine ; 37 °C de su banyosu içinde 1 ml substrat ve 0.2 ml homojenat ilave edilerek başlatılan reaksiyon, anında 1 ml amonyum molibdat çözeltisi ilavesiyle reaksiyon durduruldu.
- 3) Örnek tüplerine ise ; 1 ml substrat ve 0.2 ml homojenat konarak, 37 °C de 60 saniyelik inkübasyon süresince devam eden reaksiyon yine 1 ml amonyum molibdat çözeltisi ilavesiyle durduruldu.
- 4) Örnek tüplerinin inkübasyonu için 60 saniyelik bekleme süresi içinde blank 2 (B₂) ve blank 3 (B₃) tüpleri hazırlandı.
- 5) Blank 2 tüpüne ; 1 ml substrat, 1 ml molibdat ve 0.2 ml tampon ilave edildi.
- 6) Blank 3 tüpüne ; 1 ml tampon, 1 ml molibdat ve 0.2 ml tampon, ilave edildi.
- 7) Spektrofotometre 405 nm de distile suyla sıfırlandıktan sonra B₂ ve B₃ tüplerindeki çözeltilerin absorbans değerleri okundu, sonra blank (B₁) tüpleri ve arkasından örnek tüplerinin absorbansları okundu.

d. Sonucun Hesaplanması

Spektrofotometrede okunan değerler, aşağıdaki formüle uygulandı ve sonuçlar; homojenatta KU/g protein olarak bulundu.

$$\text{Katalaz aktivitesi} = \frac{\text{Örnek} - \text{Blank}(B_1)}{\text{Blank 2}(B_2) - \text{Blank 3}(B_3)} \times 271$$

3.2.7. Western Blot Yöntemi ile CYP1A2'nin Belirlenmesi

a. Ölçüm Prensipleri

Western blot yöntemi, farklı örneklerde protein, miktarının ölçülmesine ve moleküler ağırlıklarının belirlenmesine izin verir. Proteinler, genellikle SDS-PAGE olmak üzere jel elektroforez yöntemi kullanılarak ayrılır. Proteinler, nitroselüloz adı verilen özel blotlama kağıdının tabakalarına transfer edilir. Blot, nitroselüloz üzerindeki herhangi bir yapışkan bölgeye bağlanması için genel bir proteinle (örneğin süt proteini) inkübe edilir. Antikor bir enzime (örneğin alkalin fosfatase veya horseradish peroksidaz) veya boyaya sahiptir. Antikor'un yeri, eklenmiş enzimi renkli bir ürüne dönüştürüp gözlemlenebilmesini ve fotoğraflanabilmesini sağlayan bir renklendirici substrat ile inkübe edilmesinden sonra belirlenir. Proteinler genellikle içerdikleri yüklü aminoasit karışımının bir yansıması olarak net pozitif veya negatif yüke sahiptirler. Eğer bir protein molekülünü içeren solüsyona elektrik alan uygulanırsa, büyüklüğüne, şekline ve net yüküne bağlı olarak göç eder. Elektroforez olarak bilinen bu teknik, protein karışımlarını ayırmak için kullanılır. 1960'ların ortasında bu teknik SDS poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) olarak modifiye edilmiş ve proteinlerin rutin analizinde kullanılmaya başlanmıştır. Sodyum dodekil sülfat (SDS) negatif olarak şarj edilmiş güçlü bir deterjandır. Bu deterjan protein moleküllerinin hidrofobik bölgelerine bağlanır, uzatılmış polipeptid halkalarının içinde açılmaları sebep olur. Özel protein molekülleri, diğer proteinler veya lipid molekülleriyle ilişkilerinden dolayı serbest kalır

ve deterjan solüsyonunda bağımsız olarak çözünürler. Buna ek olarak indirgeyici bir ajan olarak bilinen merkaptoetanol S-S bağlarını kırar, böylece çok alt yapılı moleküllerdeki (multisubunit) kurucu polipeptidlerin tümünün birbirinden ayrılıp analiz edilmesini sağlarlar (4).

b. Yöntem

Hepatik Mikrosom Hazırlama

- 1) RIPA tampon (sc-24948) buz içine alındı.
- 2) 1 gram doku, 3 ml RIPA içine kondu.
- 3) Karışım +4 °C'de homojenize edildi.
- 4) 30 dakika buzda inkübe edildi.
- 5) +4 °C'de 10 dakika 10 000 g de santrifüj işlemi yapıldı.
- 6) Supernatant atıldı.
- 7) Geriye kalan tekrar santrifüj edildi.
- 8) Supernatant yani hücre lizatı toplandı.
- 9) Berraklaşma sağlanana kadar santrifüj işlemine devam edildi.
- 10) Lizat elektroforeze kadar –86 °C'de saklandı.

Elektroforez Yöntemi

- 1) Jelin hazırlanması için arasına dökülmek üzere iki cam levha kullanıldı.
- 2) Cam levhalardan sızıntı olup olmadığını kontrol etmek için camların arasında oluşan aralığa alkol doldurdu ve sızıntı olmadığı gözlemlendikten sonra alkol kurutma kağıdına emdirilerek uzaklaştırıldı.
- 3) Ayırıcı jel solüsyonu çeker ocakta 50 ml'lik santrifüj tüpü içinde aşağıdaki şekilde hazırlandı.

Ayırıcı jel solüsyonu (%10'luk):

Distile su	3,3 ml
Akrilamid/ Bis akrilamid %30	4 ml
1.5M tris(PH:8.8)	2.5 ml
%10 SDS	0.1 ml
%10 Amonyum persülfat	0,1ml
TEMED	9 µl

- 4) Hazırlanan jel, hazırlanan dikey elektroforez düzeneğine yarısına kadar dolduruldu.
- 5) Jel solüsyonunun hava ile temasının kesilmesi için üzerine bidistile su döküldü.
- 6) Polimerizasyon için 30 dakika beklendi.
- 7) Polimerizasyon işleminden sonra jelin üzerindeki su kurutma kağıdına emdirilerek alındı.
- 8) Hazırlanan toplayıcı jel solüsyonu ayırıcı jelin üzerine döküldü.

Toplayıcı jel solüsyonu (%5'lik)

Distile su	2.7 ml
Akrilamid/ Bis akrilamid %30	0.67 ml
1M tris(PH:6.8)	0.5 ml
%10 SDS	0.04 ml
%10 Amonyum persülfat	0,04 ml
TEMED	9 µl

- 9) Hemen bu jele kullanım amacına uygun olarak tarak yerleştirildi.
- 10) Toplayıcı jelin polimerizasyonu için 20 dakika beklendi.
- 11) Polimerizasyon tamamlandıktan sonra tarak çıkarıldı.
- 12) 40-60 µg olacak şekilde lizat alındı ve 2 katı elektroforez tamponu (sc-24945) ile karıştırıldı.
- 13) Karışım 4 dakika kaynatıldı.

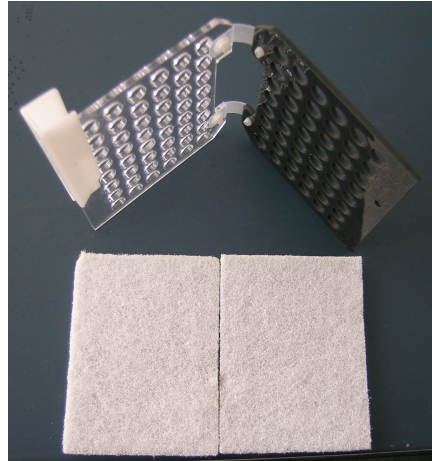
- 14) 10 mm'lik kuyucuklara loading buffer ile karıştırılan 25 µl'lik karışımı kondu.
- 15) Elektroforezde, toplayıcı jelde 80 V'ta ayırıcı jelin sonuna kadar da 120 V'ta yürütüldü.

Transfer Yöntemi

Jelde bulunan proteinler nitrosellüloz membrana sandaviç düzeneği yöntemine göre aktarıldı ve sandaviç oluşturma aparatına yerleştirildi (Şekil 3.2, Şekil 3.3).



Şekil 3.2. Jelde bulunan proteinlerin nitrosellüloz membrana aktarılış düzeneği.



Şekil 3.3. Sandaviç oluşturma aparatı

- 1) Nitroselüloz membran, whatman 3 kağıdı ve sünger 30 dakika aktarıcı solüsyon içinde bekletildi.

Aktarıcı Solüsyon

Tris	3,03 g
Glisin	14,4 g
Metanol	200 ml

Steril bi distile su ile 1 lt'ye tamamlandı. Aktarıcı solüsyon kullanılana kadar +4°C'de bekletildi.

- 2) Proteinlerin ayrışması işleminden sonra jel aktarıcı solüsyona alındı
- 3) Transfer kasetine sırasıyla sünger, Whatman 3MM, jel, nitroselüloz membran onu üzerine tekrar Whatman 3MM ve sünger konularak kaset kapatıldı.
- 4) Kaset mini trans-blot'a yerleştirildi, 30 V 90 A'de 18 saat transfer için bekletildi.
- 5) Bekleme sonunda nitroselüloz membrana geçişin olup olmadığı ponceaus boyası ile kontrol edildi. Jel ise comasie boya ile boyanarak proteinlerin yürümleri gözlemlendi.
- 6) Boyamadan sonra nitroselüloz membran steril bi distile su ile yıkandı ve primer antikor bağlantısı için hazır hale getirildi.

Antikor ile İşaretleme Yöntemi

- 1) Kuru nitroselüloz membran 5-10 dakika steril bi distile su içerisinde bekletildi.
- 2) Transfer yapılan nitroselüloz membran Western blot bloker (Sigma W138) tampon solüsyonunda 1 saat bekletildi.
- 3) Bloklama solüsyonu uzaklaştırıldı.
- 4) Transfer yapılan nitroselüloz membran yıkama solüsyonunda 1 kez 15 dakika ve iki kezde 5'er dakika yıkandı.
- 5) 7.5µl CYP1A2 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) İnkübasyonu yapılan membran yıkama solüsyonunda 1 kez 15 dakika ve iki kezde 5 dakika yıkandı.
- 8) 3.5 µl Sekonder antikor ile 1.5 ml Western blot bloker tamponu karıştırıldı.
- 9) Membran, sekonder antikor (3.75 µl) ve Western blot bloker tamponu (1.5 ml) karışımı içerisinde 1 saat inkübe edildi.
- 10) İnkübasyonu yapılan membran yıkama solüsyonunda 1 kez 15 dakika ve iki kezde 5 dakika yıkandı.
- 11) Protein belirlenmesini sağlayan A ve B solüsyonundan 3.5 ml alınarak western blotting luminal solüsyonu hazırlandı.
- 12) Karanlık film odasında membran üzerine Western blotting luminal solüsyonu eklendi ve 1 dakika beklendi.
- 13) Western blotting luminal solüsyonundan alınan membran yine karanlık odada film kasetlerine yerleştirildi ve üzerine film konarak proteinlerin görüntüsü alındı.
- 14) Bu filmlerin otomatik banyo film sisteminde banyosu yapıldı.
- 15) Bu filmler Synegene Kemilüminesans görüntüleme cihazına alınarak proteinlerin görüntüleri bilgisayara aktarıldı ve synegene software programı aracılığıyla protein miktarları belirlendi.

3.2.8. Karaciğer Örneklerinden Histolojik Preparatların Hazırlanması

a. Doku Tespiti

Hayvanlardan alınan karaciğer örneklerinden her biri (karaciğerin tüm loblarından rasgele örnekleme yöntemiyle alınarak) tespit için % 10 tamponlanmış nötral formalin solüsyonunda 24-48 saat bırakıldı.

b. Doku Takibi

1) Yıkama: Dokular 1 saat akan çeşme suyunda yıkanarak formalin kalıntularından arındırıldı.

2) Dehidratasyon (dokuların suyunun alınması): Dokular yıkama işleminden sonra artan derecelerdeki alkol serilerinden geçirilerek sertleşmeleri sağlandı.

70 ° alkol – 60 dk.

80 ° alkol – 60 dk.

90 ° alkol (I) – 60 dk.

90 ° alkol (II) – 60 dk.

96 ° alkol (I) – 60 dk.

96 ° alkol (II) – 75 dk.

Absolü alkol (I) – 60 dk.

Absolü alkol (II) – 75 dk.

3) Seffaflaştırma:

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. bekletildi.

4) Gömme: Dokular parafin içine gömülerek, blok haline getirildi.

c. Kesitlerin Alınması

1) Mikrotom yardımı ile bloklanmış dokulardan 4 µm kalınlığında kesitler alındı.

2) Kesitler sıcak su banyosuna alınarak (37 °C) açılmaları sağlandı .

3) Daha sonra kesitler poly-L-lysinli lamlara alındı.

4) Kesitler lam taşıma sepetleri içinde 60°C'lik etüvde 2 saat bekletilerek parafinin erimesi sağlandı.

5) Daha sonra kesitler ksilol serilerinden geçirilerek deparafinize edildi.

Ksilol (I) - 30 dk.

Ksilol (II) - 30 dk.

Ksilol (III) - 30 dk.

d. Boyama İşlemi

Deparafinize işlemi tamamlanmış kesitlere, genel histolojik yapının gözlenebilmesi için hematoksilen ve eozin boyama yöntemi uygulandı.

Hematoksilen-Eozin Boyama Yöntemi:

1) Kesitler azalan dereceli alkol serisinden geçirilerek hidratasyon işlemi yapıldı.

Absolü alkol -1 dk.

Absolü alkol -1 dk.

96° alkol (I) -1 dk.

96° alkol (II) -1 dk.

90° alkol -1 dk.

80° alkol -1 dk.

60° alkol -1 dk.

2) Kesitler akan çeşme suyunda 2 dk yıkandı.

3) Kesitler hematoksilen solüsyonunda 3 dk. boyandı.

4) Kesitler akan çeşme suyunda 2 dk yıkandı.

5) Kesitler Asit-Alkol 1:99 oranında (%1 HCl + %70 Alkol)'e bir kez batırılıp çıkarıldı.

6) Kesitler Amonyak-Su 1:99 oranında (%1 NH₃ +Distile su)'ya bir kez batırılıp çıkarıldı.

7) Kesitler akan çeşme suyunda 2 dk yıkandı.

8) Kesitler Eozin solüsyonunda 2 dk. boyandı.

9) Kesitler artan dereceli alkol serisinden geçirildi (dehidratasyon işlemi)

60 ° alkol - 1 dk.

80 ° alkol - 1 dk.

90 ° alkol - 1 dk.

96 ° alkol (I) - 1 dk.

96 ° alkol (II) - 1 dk.

Absolü alkol (I) - 1 dk.

Absolü alkol (II) - 1 dk.

10) Şeffaflaştırma işlemi: Kesitler ksilolde şeffaflaştırıldı

Ksilol (I) – 1 dk.

Ksilol (II) – 1 dk.

Ksilol (III) – 1 dk.

11) Kesitler entellan ile kapatıldı. Böylece hazırlanan preparatlarda, dokunun lam ve lamel arasında hava almadan uzun bir süre saklanabilmesi sağlandı.

e. Doku İnceleme ve Görüntüleme

Kesitlerin tümü Olympus PM10-ADS marka fotomikroskop ile incelenerek görüntülendi.

3.2.9. İmmunohistokimya yöntemi ile Ha-Ras, Cx32 ve GST-p belirlenmesi

Parafin blok haline getirilen dokulara ayrı ayrı Ha-Ras, Cx32 ve GST-p için immunohistokimyasal boyama metodunun aşamaları adım adım uygulandı. Kesitler Ha-Ras, Cx32 ve GST-p için uygun primer antikor ile aşağıdaki şekilde inkübe edildi. En son preparat kapatıldı ve ışık mikroskop altında incelenerek değerlendirildi.

Yöntem

1. Parafin bloktan alınan kesitte immunohistokimyasal boyama için dokunun yoğun olduğu bölümü kaplayacak kadar (1 damla) primer antikor damlatılarak, bir gece oda ısısında inkübe edildi.
2. Alanlara bir pipet yardımı ile PBS solüsyonu damlatıldı ve preparatın üzerindeki PBS solüsyonu lamı silkeleyerek uzaklaştırıldı.
3. Alanın üzerini kaplayacak kadar biotin işaretli sekonder antikor damlatılarak 10 dk inkübe edildi.

4. Alanlara bir pipet yardımı ile PBS solüsyonu damlatıldı ve preparatın üzerindeki PBS solüsyonu lamı silkeleyerek uzaklaştırıldı.
5. Alanın üzerini kaplayacak kadar streptavidin-peroksidaz konjugatı damlatılarak 10 dk inkübe edildi.
6. Alanlara bir pipet yardımı ile PBS solüsyonu damlatıldı ve preparatın üzerindeki PBS solüsyonu lamı silkeleyerek uzaklaştırıldı.
7. Alanın üzerini kaplayacak kadar substrat-kromojen solüsyonu (AEC) damlatılarak 1-10 dk inkübe edildi.
8. Mikroskopta gözlemleyerek, işaret alındıktan sonra distile suda çalkalandı.
9. Alanın üzerini kaplayacak kadar hematoksilen damlatılarak 2dk. çeşme suyunda 3 dk. PBS'de yaklaşık 30 saniye bekletildi.
10. Distile suda çalkalandı.
11. Preparat havada kurutulduktan sonra, PBS:gliserin (1:1) hazır kapama ortamı ile kapatıldı.
12. Preparatlar ışık mikroskop altında incelenerek, mikroskoba bağlı fotoğraf makinası ile laboratuvarımızda görüntülendi.

Boyama işlemi sırasında kullanılan solüsyonların hazırlanışı ve inkübasyon işleminin tekniği aşağıda bildirilmiştir.

Fiksasyon solüsyonu: 1:1 oranında Aseton:Metanol karışımı hazırlandı, kullanılıncaya kadar +4°C'de saklandı.

Fosfat Buffer (PBS) Solüsyonu: 8.79 g NaCl, 0.274 g KH₂PO₄, 1.135 g Na₂HPO₄ tartıldıktan sonra, 1000 ml distile suda eritildi. pH 7.2-7.4 olmasına dikkat edildi.

Primer antikor: H-Ras, Cx32 ve Gst-p primer antikorunu kullanıldı.

Substrat-kromojen solüsyonu: Kitin içinde bulunan AEC kromojenine ait A, B ve C solüsyonları kullanıldı. Bir vial içerisine birer damla A, B ve C solüsyonundan damlatılıp, üzerine 1 ml distile su konarak hazırlandı ve hemen kullanıldı.

İnkübasyon: Kapaklı bir kap içerisinde yapıldı. Kaba biraz ılık su kondu. Cam çubuklar kabın tabanına uzatıldı. Cam çubukların üzerine de preparatlar sıralandı.

İstatistiksel Analiz

Çalışmamız sonucunda elde edilen bulgular ANOVA ve Tukey testi (SPSS 12.0) ile değerlendirildi ve önemlilik için $p < 0,05$ düzeyi kullanıldı.

4. BULGULAR

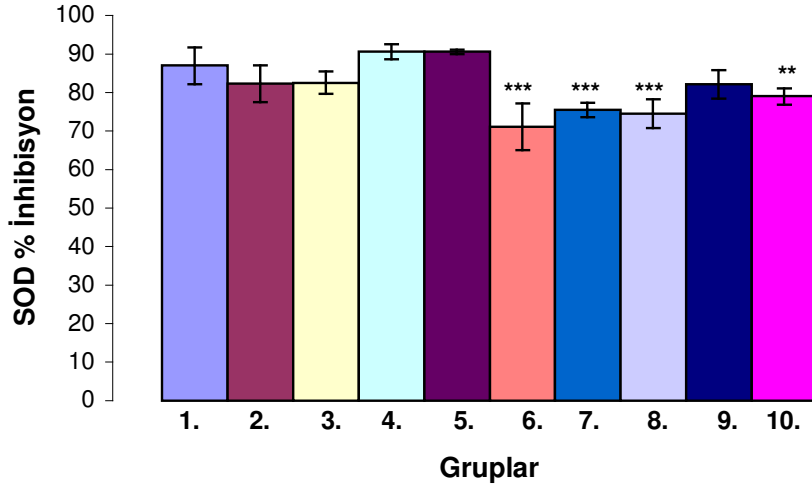
4.1. Karaciğer Dokusunda Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi

SOD % inhibisyonu bakımından, kontrol grubuna göre ($87,00 \pm 4,76$), 2. ($82,28 \pm 4,82$), 3. ($82,57 \pm 2,93$), 4. ($90,57 \pm 1,90$), 5. ($90,67 \pm 0,53$) ve 9. ($82,14 \pm 3,71$) gruplarda fark bulunmadı ($P > 0,05$). Buna karşılık 6. ($71,14 \pm 6,09$), 7. ($75,42 \pm 1,90$) ve 8. ($74,57 \pm 3,73$) gruplarda çok önemli düzeyde ($p < 0,001$), 10. grupta ($79,00 \pm 2,08$) ise önemli düzeyde ($P < 0,01$) azalma bulundu (**Çizelge 4.1, Şekil 4.1**).

Çizelge 4.1. Kontrol ve deney gruplarının SOD % inhibisyon değerleri ve bunların istatistiksel değerlendirilmeleri

Gruplar	N	SOD % inhibisyon
1. Kontrol	7	$87,00 \pm 4,76$
2. Zeytin Yağ	7	$82,28 \pm 4,82$
3. DMSO	7	$82,57 \pm 2,93$
4. DMV	7	$90,57 \pm 1,90$
5. 1-Hidroksi DMV	7	$90,67 \pm 0,53$
6. DEN	7	$71,14 \pm 6,09^{***}$
7. 2-AAF	7	$75,42 \pm 1,90^{***}$
8. DEN + 2-AAF	7	$74,57 \pm 3,73^{***}$
9. DEN + 2-AAF + DMV	7	$82,14 \pm 3,71$
10. DEN + 2-AAF + 1- α -Hidroksi DMV	7	$79,00 \pm 2,08^{**}$

$P > 0,05$ ** $P < 0,01$ *** $P < 0,001$



Şekil 4.1. Kontrol ve deney gruplarının SOD % inhibisyon değerleri

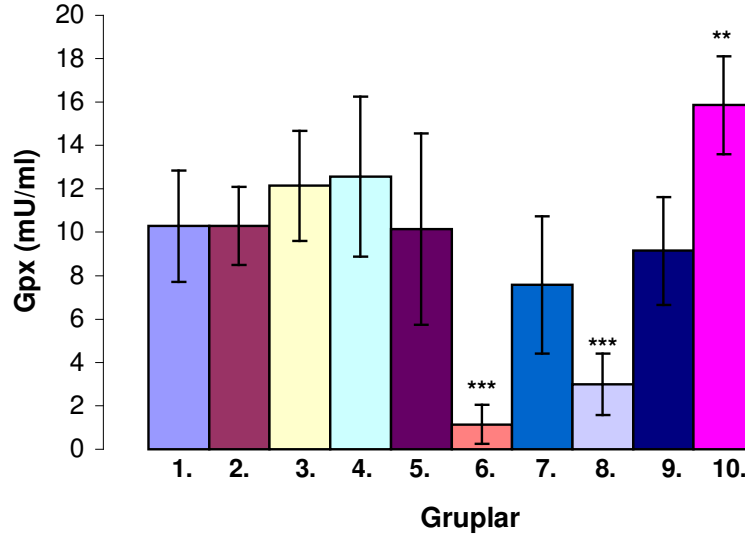
4.2. Karaciğer Dokusunda Glutatyon Peroksidaz (GPx) Aktivitesi

Gpx, bakımından, kontrol grubuna göre ($10,28 \pm 2,56$), 2. ($10,14 \pm 1,79$), 3. ($12,14 \pm 2,54$), 4. ($12,57 \pm 3,69$), 5. ($10,14 \pm 4,41$), 7. ($7,57 \pm 1,41$) ve 9. ($9,14 \pm 2,47$) gruplarda fark bulunmadı ($P > 0,05$). Buna karşılık, 6. ($1,14 \pm 0,89$) ve 8. ($3,00 \pm 1,41$) gruplarda çok önemli düzeyde azalma ($p < 0,001$) ve 10. grupta ($15,85 \pm 2,26$) ise önemli düzeyde artış ($P < 0,01$) bulundu (Çizelge 4.2, Şekil 4.2).

Çizelge 4.2 Kontrol ve deney gruplarının Gpx değerleri ve bunların istatistiksel değerlendirilmeleri

Gruplar	N	Gpx (mU/ml)
1. Kontrol	7	$10,28 \pm 2,56$
2. Zeytin Yağ	7	$10,14 \pm 1,79$
3. DMSO	7	$12,14 \pm 2,54$
4. DMV	7	$12,57 \pm 3,69$
5. 1-Hidroksi DMV	7	$10,14 \pm 4,41$
6. DEN	7	$1,14 \pm 0,89^{***}$
7. 2-AAF	7	$7,57 \pm 1,14$
8. DEN + 2-AAF	7	$3,00 \pm 1,41^{***}$
9. DEN + 2-AAF + DMV	7	$9,14 \pm 2,47$
10. DEN + 2-AAF + 1-α-Hidroksi DMV	7	$15,85 \pm 2,26^{**}$

$P > 0,05$ ** $P < 0,01$ *** $P < 0,001$



Şekil 4.2. Kontrol ve deney gruplarının Gpx değerleri

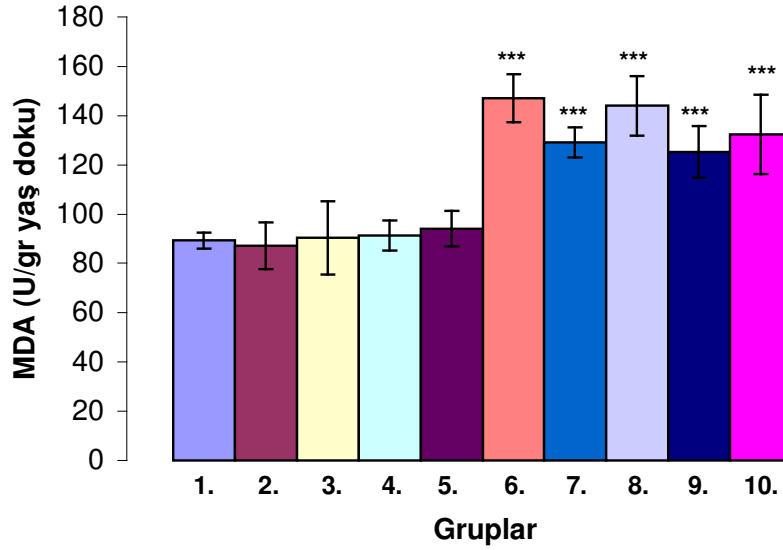
4.3. Karaciğer Dokusunda Malondialdehit (MDA) Düzeyi

MDA bakımından, kontrol grubuna göre (89,28 ± 3,25), 2. (87,14 ± 9,49), 3. (90,28±14,87), 4. (91,28±6,10) ve 5.(94,14±7,10), gruplarda fark bulunmazken (P>0.05), 6. (147,00±9,81), 7. (129,14±6,14), 8. (144,00±12,17), 9. (125,28 ±10,48) ve 10. (132,42±16,09) gruplar arasında çok önemli düzeyde artış (p< 0.001) bulundu (Çizelge 4.3, Şekil 4.3).

Çizelge 4.3. Kontrol ve deney gruplarının MDA değerleri ve bunların istatistiksel değerlendirilmeleri

Gruplar	N	MDA (U/ gr yaş doku)
1. Kontrol	7	89,28 ± 3,25
2.Zeytin Yağ	7	87,14 ± 9,49
3. DMSO	7	90,28 ± 14,87
4. DMV	7	91,28 ± 6,10
5. 1-Hidroksi DMV	7	94,14 ± 7,10
6. DEN	7	147,00 ± 9,81***
7. 2-AAF	7	129,14 ± 6,14***
8.DEN + 2-AAF	7	144,00 ± 12,17***
9. DEN + 2-AAF + DMV	7	125,28 ± 10,48***
10. DEN + 2-AAF + 1-α-Hidroksi DMV	7	132,42 ± 16,09***

P>0.05 *** P<0.001



Şekil 4.3. Kontrol ve deney gruplarının MDA değerleri

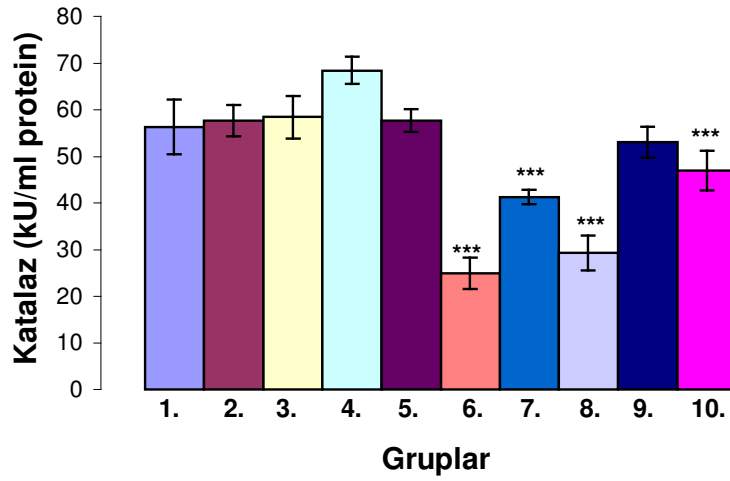
4.4. Karaciğer Dokusunda Katalaz Aktivitesi

Katalaz, bakımından, kontrol grubuna göre (56,28±5,85), 2. (57,71±3,35), 3. (58,42±4,57), 4. (58,42 ± 2,87), 5. (57,71±2,42) ve 9. (53,00±3,36) gruplarda fark bulunmazken (P>0.05), 6. (24,85±3,33), 7. (41,28±1,60), 8. (29,28±3,68), ve 10. (47,00±4,24) gruplarda çok önemli düzeyde azalma (p<0.001) bulundu (Çizelge 4.4, Şekil 4.4).

Çizelge 4.4. Kontrol ve deney gruplarının katalaz değerleri ve bunların istatistiksel değerlendirilmeleri

Gruplar	N	Katalaz (kU/ml protein)
1. Kontrol	7	56,28 ± 5,85
2.Zeytin Yağ	7	57,71 ± 3,35
3. DMSO	7	58,42 ± 4,57
4. DMV	7	58,42 ± 2,87
5. 1-Hidroksi DMV	7	57,71 ± 2,42
6. DEN	7	24,85 ± 3,33***
7. 2-AAF	7	41,28 ± 1,60***
8.DEN + 2-AAF	7	29,28 ± 3,68***
9. DEN + 2-AAF + DMV	7	53,00 ± 3,36
10. DEN + 2-AAF + 1-α-Hidroksi DMV	7	47,00 ± 4,24***

*** P<0.001



Şekil 4.4. Kontrol ve deney gruplarının katalaz değerleri

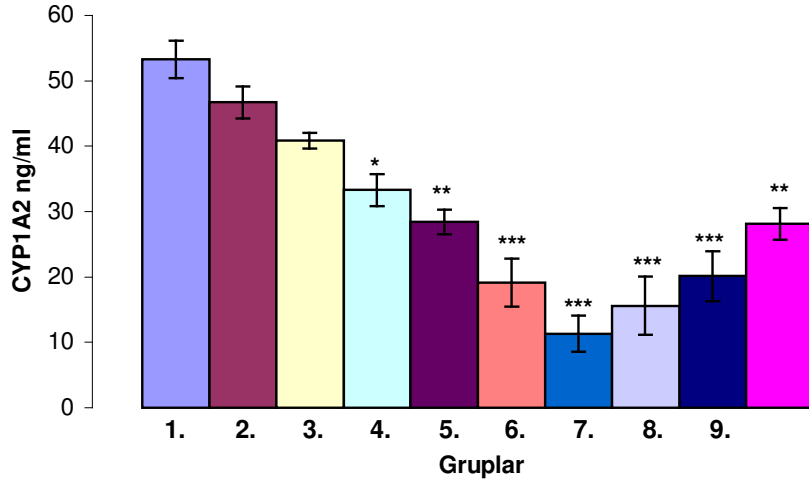
4.5. CYP1A2 Enzim Ekspresyonu

CYP1A2 bakımından, kontrol grubuna göre (53,28±2,85), 2. (46,71±2,43) ve 3. (40,85±1,22) gruplarda fark bulunmadı (P>0.05), 4. (33,28±2,43) grupla p<0.05 düzeyinde, 5. (28,42 ± 1,89) ve 10. (28,14±2,44) gruplarla önemli düzeyde (p<0.01), 6. (19,14±3,67), 7. (11,28±2,77), 8. (15,57±4,48) ve 9. (20,14±3,82) gruplarla çok önemli düzeyde azalma (p<0.001) bulundu (Çizelge 4.5, Şekil 4.5, 4.6, 4.7, 4.8).

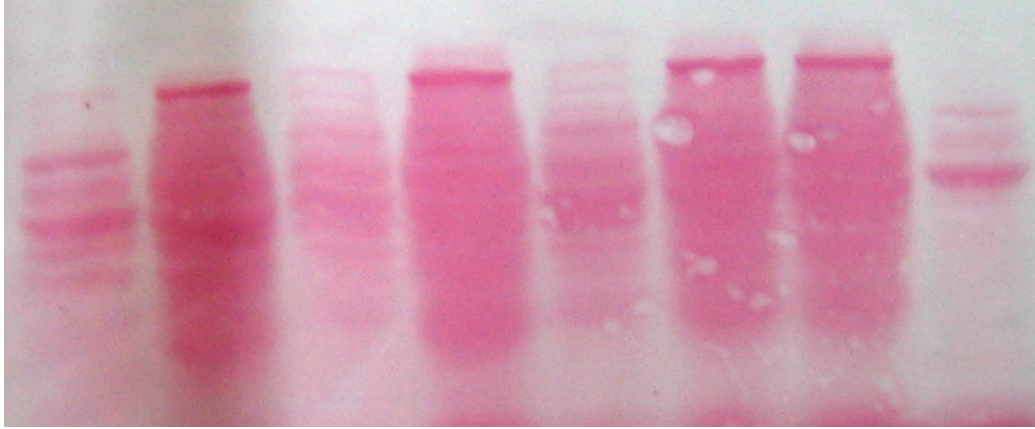
Çizelge 4.5. Kontrol ve deney gruplarının CYP1A2 değerleri ve bunların istatistiksel değerlendirilmeleri

Gruplar	N	CYP1A2 (ng/ml)
1. Kontrol	7	53,28 ± 2,85
2.Zeytin Yağ	7	46,71 ± 2,43
3. DMSO	7	40,85 ± 1,22
4. DMV	7	33,28 ± 2,43*
5. 1-Hidroksi DMV	7	28,42 ± 1,89**
6. DEN	7	19,14 ± 3,67***
7. 2-AAF	7	11,28 ± 2,77***
8.DEN + 2-AAF	7	15,57 ± 4,48***
9. DEN + 2-AAF + DMV	7	20,14 ± 3,82***
10. DEN + 2-AAF + 1-α-Hidroksi DMV	7	28,14 ± 2,44**

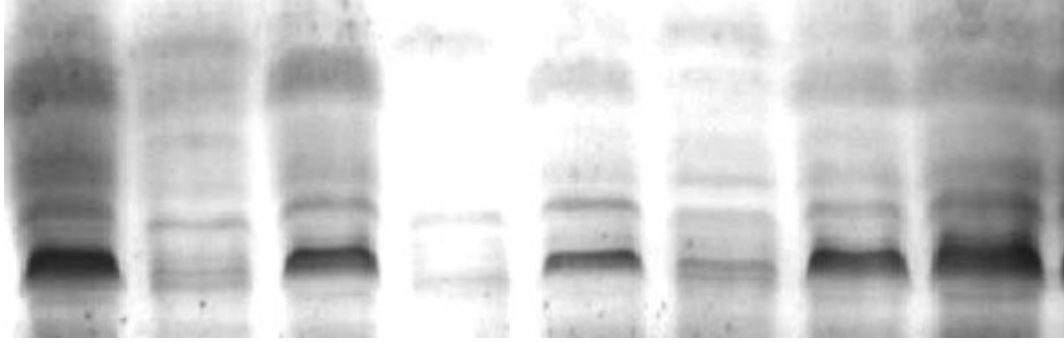
P>0.05 * P< 0.05 ** P<0.01 ***P<0.001



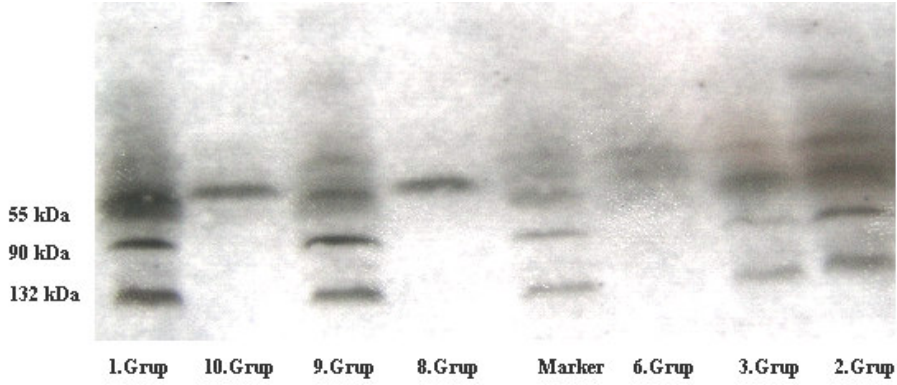
Şekil 4.5. Kontrol ve deney gruplarının CYP1A2 değerleri



Şekil 4.6. CYP1A2 proteinlerinin nitroselülöz membranda panceaus S boyası ile görüntülenmesi.



Şekil 4.7. CYP1A2 proteinlerinin SDS page ile görüntülenmesi.



Şekil 4.8. CYP1A2 proteinlerinin (kDa) antikor ile işaretlenerek film’de görüntülenmesi.

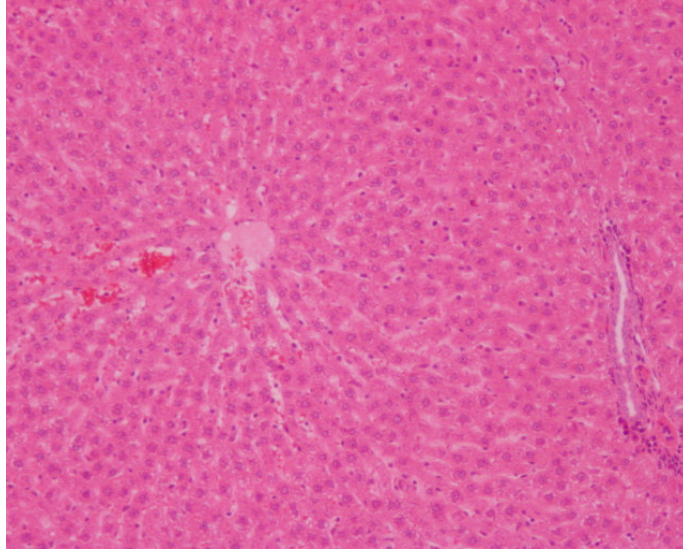
4.6. Karaciğer’de Histolojik Bulgular

Çalışmamızdaki karaciğer doku örnekleri H&E ve immunohistokimyasal boyama yöntemleriyle incelendi ve patoloji değişiklikler 1 / 2 / 3 / 4 pozitif (+ / ++ / +++ / ++++) olarak değerlendirildi.

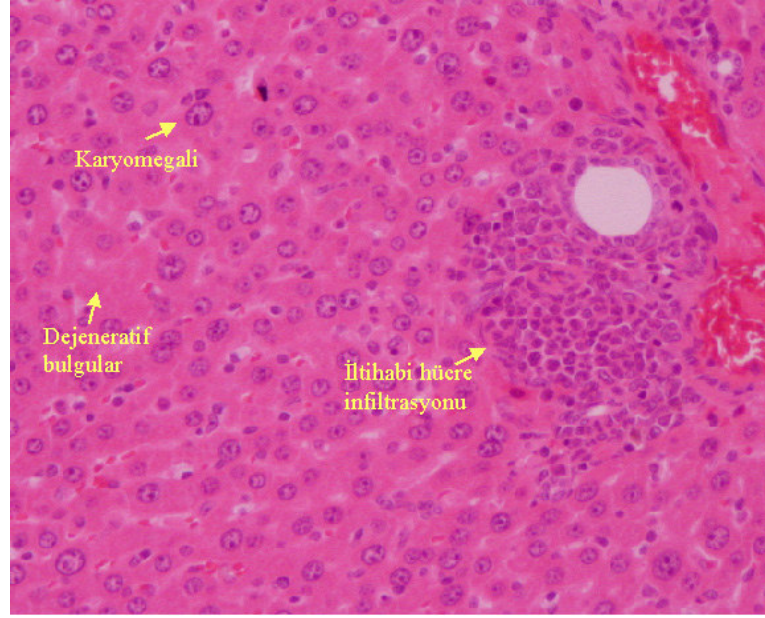
4.6.1. H&E Bulgular

Çalışmamızda tüm gruplar, dejeneratif bulgular, hepatosit karyomegali, hepatosit sitomegali ve iltihabi hücre infiltrasyonu oluşumu bakımından değerlendirilmiş olup 1., 2., 3., 4., 5. gruplarda dejeneratif bozukluklara rastlanmadı (**Şekil 4.9**). 6. grupta dejeneratif bulgularda +++, hepatosit karyomegali +++, hepatosit

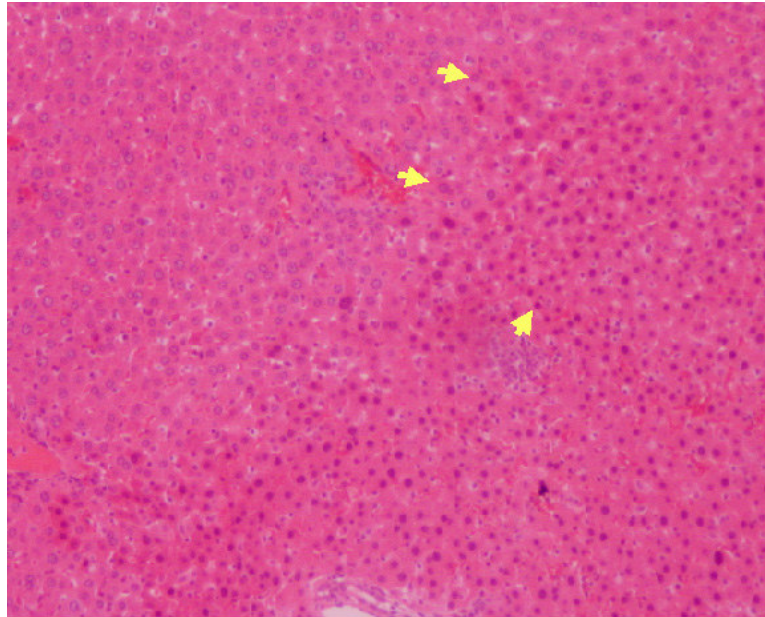
sitomegalide de ++ görüldü. 7.grupta, dejeneratif bulgular ++, hepatosit karyomegali ++, hepatosit sitomegali ++ olarak belirlendi. 8.grupta dejeneratif bulgular +++++, hepatosit karyomegali +++++, hepatosit sitomegali + ve iltihabi hücre infiltrasyonu oluşumu +++++, nekroz + (Şekil 4.10) ve preneoplastik fokus +++++ olarak belirlendi (Şekil 4.11 ve 12) . 9.grupta dejeneratif bulgular +++, hepatosit karyomegali +++ ve iltihabi hücre infiltrasyonu oluşumu +++ olarak görüldü (Şekil 4.10). 10.grupta da dejeneratif bulgular +++, hepatosit karyomegali +++ ve iltihabi hücre infiltrasyonu +++ olarak dejeneratif bozukluklar belirlendi (Şekil 4.13).



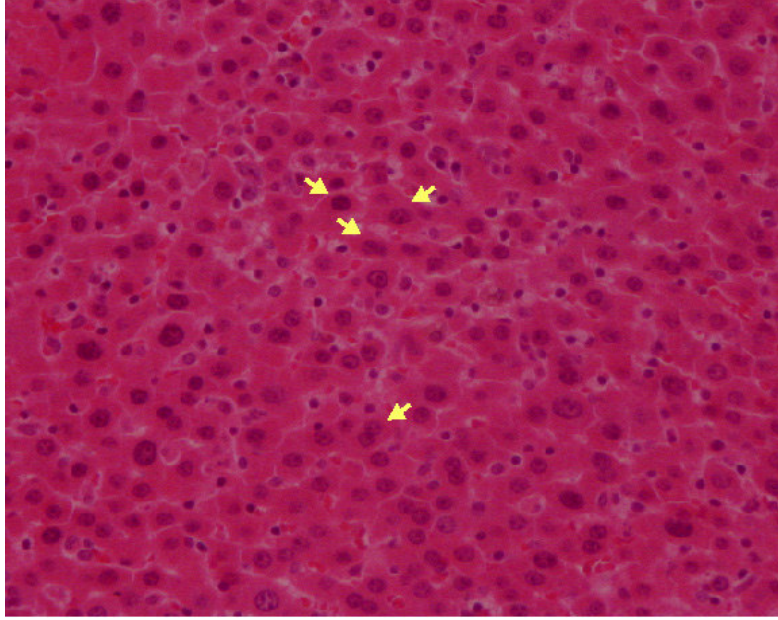
Şekil 4.9. Kontrol grubuna ait normal görünümde karaciğer dokusu. H&E, Orj. Büy.x100



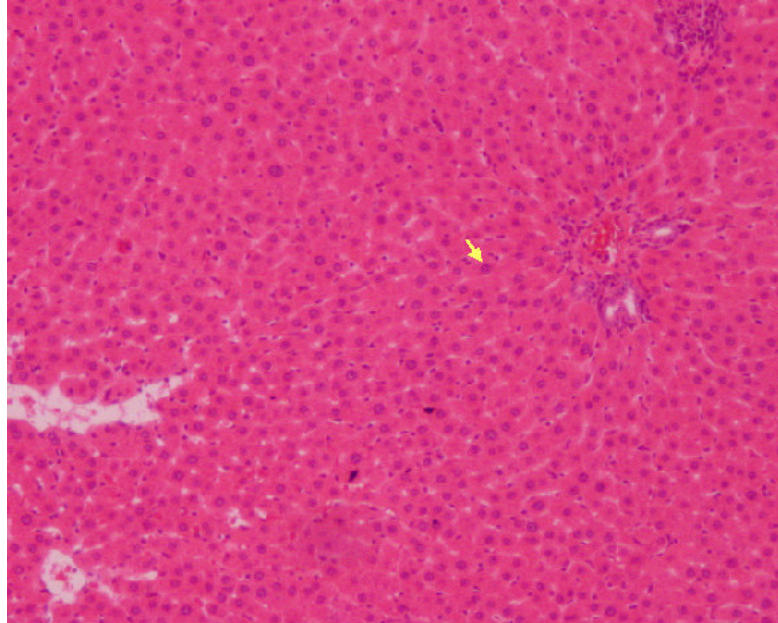
Şekil 4.10. 8.Gruba ait dejeneratif bulgular, hepatosit karyomegali, hepatosit sitomegali ve iltihabi hücre infiltrasyonu oluşumu. H&E, Orj. Büy.x100.



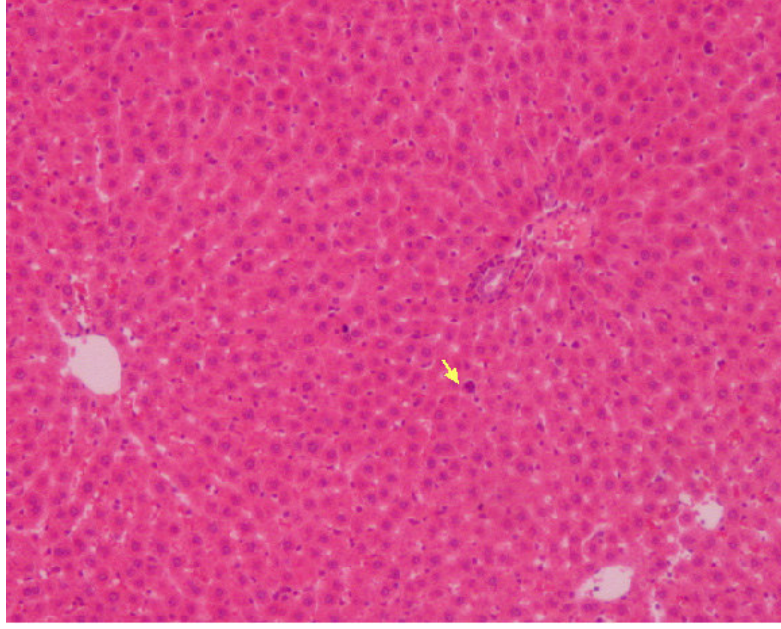
Şekil 4.11. 8.Gruba ait preneoplastik fokus. H&E, Orj. Büy.x100.



Şekil 4.12. 8.Gruba ait preneoplastik fokus. H&E, Orj. Büy.x200.



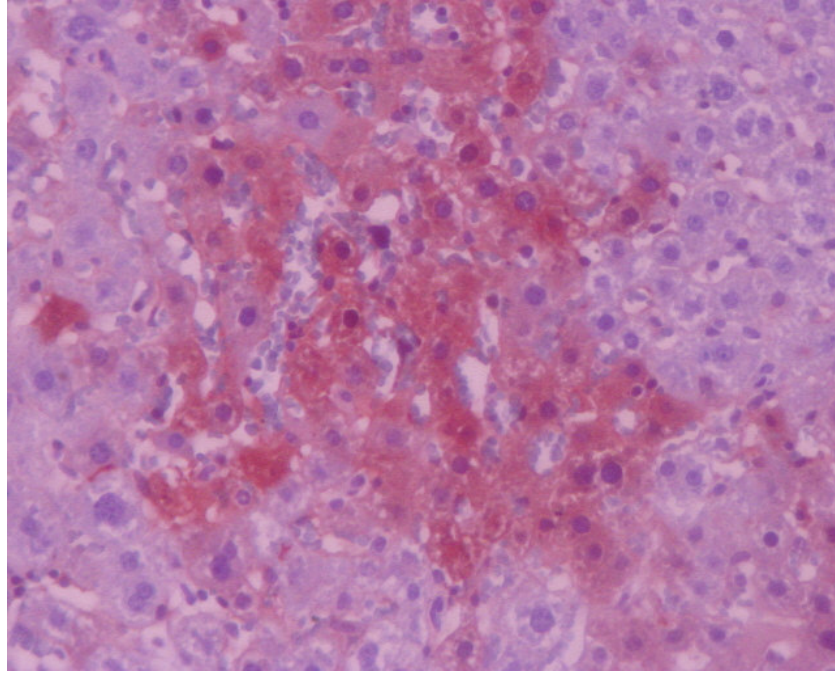
Şekil 4.13. 9.Gruba ait preneoplastik fokus. H&E, Orj. Büy.x200.



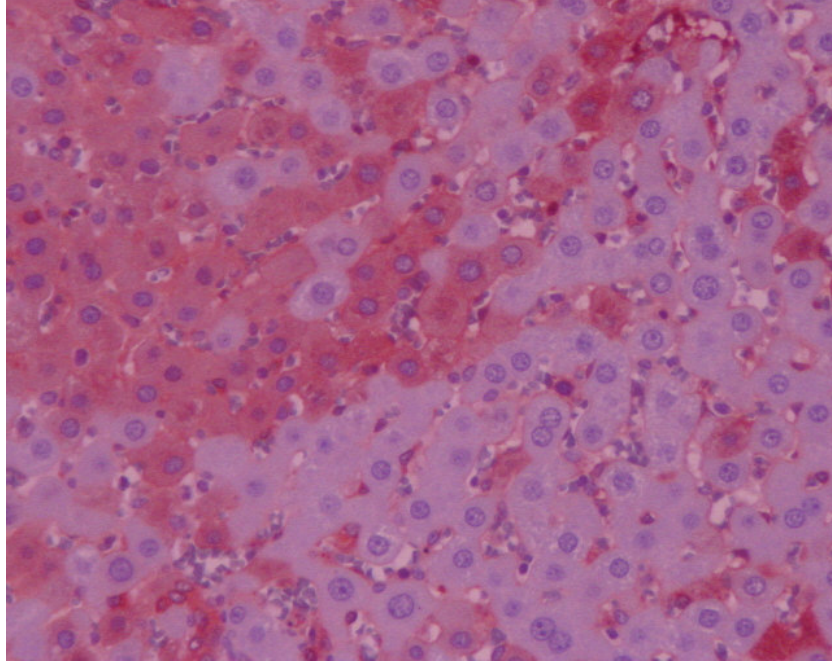
Şekil 4.14. 10.Gruba ait preneoplastik fokus görünümü H&E, Orj.
Büy.x200.

4.6.2. İmmunohistokimyasal Bulgular

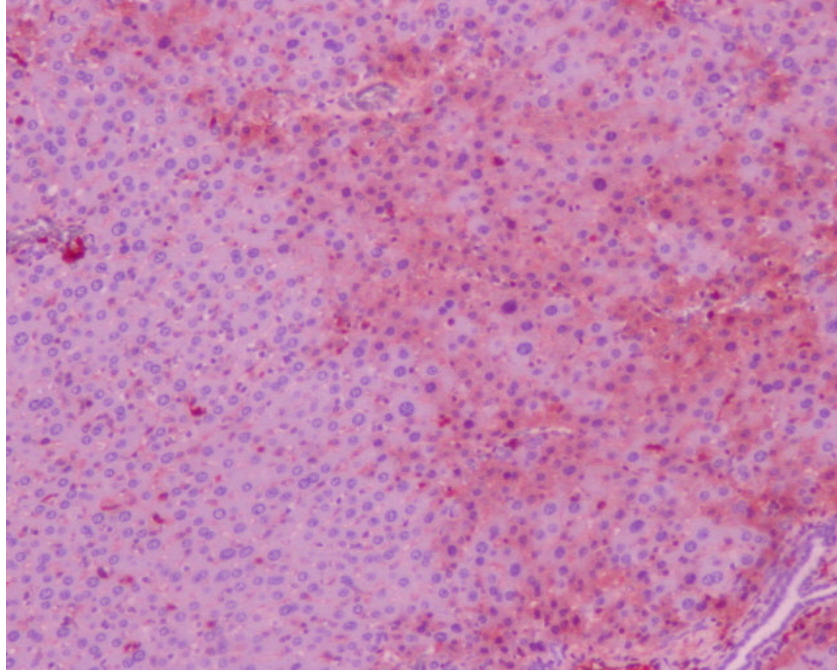
Çalışmamızda 1., 2., 3., 4., 5., 6., 7. ve 10.gruplar arasında Ha-Ras, Cx32 ve GST-p proteinlerinde işaretlenme gözükmezken, 8. grupta Ha-Ras (**Şekil 4.15**), GST-p (**Şekil 4.16**) ve Cx32'de (**Şekil 4.17**) +++ işaretlenme görüldü. 9.grupta ise Ha-Ras, Cx32 ve GST-p'de + işaretlenme görüldü.



Şekil 4.15. 8.Gruba ait karaciğer dokusunda Ha-Ras protein. Orj. Büy.x200.



Şekil 4.16. 8.Gruba ait karaciğer dokusunda GST-p enzimi.Orj.
Büy.x200.



Şekil 4.17. 8.Gruba ait karaciğer dokusunda Cx32 proteini. Orj.
Büy.x100.

5. TARTIŞMA

Bu bölümde, çalışmamızda tümör oluşumuna etkisi olan DEN ve 2-AAF'nin birlikte sıçanlara verilerek, bir mantar metaboliti olan DMV ve ondan türetilmiş 1- α -hidroksi-DMV'nin SOD, Gpx, katalaz enzim aktiviteleri, MDA düzeyi ve CYP1A2 enzimlerinin ekspresyonuna ve yine hem histolojik olarak, hem de immunohistokimyasal olarak Ha-Ras, GST-p, Cx32 proteini ile preneoplastik fokus, dejeneratif bulgular, hepatosit karyomegali, iltihabi hücre filtrasyonu ve nekroza olan etkileri yönünden sırasıyla karşılaştırılıp, tartışılacaktır.

SOD

SOD % inhibisyonu bakımından, 1. (Kontrol) gruba göre, 2. (Yağ), 3. (DMSO), 4. (DMV) ve 5. (1- α -hidroksi-DMV) gruplarda fark bulunmadı. Ancak, 6. (DEN), 7. (2-AAF), 8. (DEN + 2-AAF) gruplarda çok önemli düzeyde, 10. (DEN + 2-AAF + 1- α -hidroksi-DMV) grupta ise önemli düzeyde azalma bulunurken, 9. (DEN + 2-AAF + DMV) grubun ise kontrol düzeyine yaklaştığı ortaya kondu.. Kontrole göre, 6., 7. ve 8. grupların SOD % inhibisyonundaki azalmanın SOD enziminin aktivitesinin engellendiği ya da aşırı miktarda O₂⁻ radikalının üretilmesi gösterilebilir. Yine, kontrole oranla 10. grupta önemli düzeyde azalma, 9. grupta ise kontrol grubuna yaklaştıracak kadar SOD inhibisyonundaki azalma bize aktivitenin arttığını göstermektedir. BANAKAR M. C. ve arkadaşları (2004) DEN ve FB uygulanan sıçanların karaciğerinde SOD aktivitesinde azalma belirmişlerdir. SOD'un savunma sistemi için çok önemli olduğunu ortaya koymuşlardır. SOD, antioksidan olarak görev yaparak, zar ve sitozolde serbest radikallerin neden olduğu hasara karşı savunma yaptığını belirtmişlerdir. SOD ve katalaz, oksijen radikalini hidrojen peroksit ve su haline dönüştürdüğünü ve oluşan hidrojen peroksitin glutatyon peroksidaz tarafından yakalanarak, katalaz veya diğer enzim sistemleri tarafından yok edildiğini bildirmişlerdir. Kanserli hücrelerde, normal hücreye göre SOD miktarının daha yüksek olmasının nedeni olarak, tümör hücrelerinde serbest oksijen radikallerinin aşırı derecede üretilmesi olduğunu belirtmişlerdir (9). CHAKRABORTY T. ve arkadaşlarının (2003) yaptıkları farklı bir çalışmada, DEN ve 2-AAF'nin sıçan karaciğeri hücrelerinde SOD aktivitesini artırdığını belirlemişlerdir (18). GOEPTAR A. R. ve arkadaşları (1994)

sıçanlara FB uygulayarak karaciğer hücrelerinde SOD aktivitesinde artış olduğunu ortaya koymuşlardır (36). FERNANDEZ D. C. ve arkadaşlarının (1998) hepatosit kültürüne FB uyguladıkları bir çalışmada, SOD'un inhibisyonunda %50 azalma olduğunu belirlemişlerdir (30). Bunun sonucunda, bu çalışmada olduğu gibi bizim çalışmamızda da azalma olduğu ortaya konmuştur. Ama ilk kez denemeleri nedeniyle, DMV ve 1- α -hidroksi-DMV'nin etkilerini araştırılması açısından herhangi karşılaştırma yapılamamıştır.

Gpx

Gpx düzeyinde, kontrol grubuna göre, 2., 3., 4., 5., 7. ve 9. gruplarda fark bulunmazken 6., ve 8. gruplarda çok önemli düzeyde azalma ve 10. grupta ise önemli düzeyde artış bulundu. Bu bulgular sonucunda Gpx'in, DEN ve 2-AAF uygulanan gruplarda Gpx'in çok önemli düzeyde azaldığı, DMV'nin de 1- α -hidroksi-DMV kadar olmasa da Gpx düzeyini artırıcı etkisinin olduğu belirlenmiştir. Yapılan çalışmada, BANAKAR M. C. ve arkadaşları (2004) sıçanlara DEN ve FB uygulamışlar, Gpx'in azaldığını, bunun yanında savunma sisteminde rol aldığını ve savunma sistemi için çok önemli olduğunu ortaya koymuşlardır. SOD ve katalazın, oksijen radikalini hidrojen peroksit ve su haline dönüştürdüğü ve bu oluşan hidrojen peroksitin de, glutatyon peroksidaz tarafından yakalanarak, katalaz ya da diğer enzim sistemleri tarafından yok edildiğini ortaya koymuşlardır (9). Bu çalışmada olduğu gibi bizim çalışmamızda da, DEN ve 2-AAF'nin Gpx aktivitesini azalttığı belirlenmiştir.

MDA

MDA düzeyinde, kontrol grubuna göre, 2., 3., 4. ve 5. gruplarda fark bulunmazken, 6., 7., 8., 9. ve 10. gruplar arasında çok önemli düzeyde artış bulundu. Bu bulgulara göre DEN ve 2-AAF'nin LPO'nun ikinci ürünü olan MDA'yı artırdığı, ancak buna DMV ve 1- α -hidroksi-DMV'nin istatistiksel olarak etkisinin olmadığı tesbit edildi. Bu sonuca göre superoksit ve hidroperoksit radikalleri LPO'nun artmasını sağlayarak, hücre zarı hasarının artışına neden olmuşlardır. Koruyucu olarak ise, bu metabolitlerin herhangi bir etkisine rastlanmamıştır. THIRYNAVUKKARASU C. ve

arkadaşları (2003) DEN ve FB ile oluşturdukları hepatik tümör oluşumu ile antioksidantlar arasındaki ilişkiyi şu şekilde açıklamışlardır; DEN'in metabolitleri DNA'ya bir ya da iki oksidasyon sağlayan elektron ile kovalent bağlanarak tümör promotörlerinin bağlanmasına aracılık ederler. Tümör promotörü, bir superoksit anyonu indükleyicisi olarak görev yaparak reaktif oksijen molekülleri ve hidrojen peroksit oluşumunu sağlar. Bunun sonucunda superoksit ve hidrojen peroksit birikimi gerçekleşir. Bu birikim, koruyucu antioksidant mekanizmanın azalmasını ve yüksek oranda reaktif hidroksil radikali oluşmasını sağlar. Oluşan hidroksil radikalleri deoksiribozda parçalanmalara dolayısıyla DNA kırıklarına neden olur. Reaktif hidroksil radikalleri, lipid membranda yer alan yağ asitlerindeki hidrojen atomlarını ayırır. Bu hidrojen atomları da doymamış çok karbonlu yağ asitlerinin karbonil gruplarıyla birleşerek hidroperoksi radikallerini oluşturur. Hidroperoksi radikalleri, lipid-hidroperoksit oluşumu sırasında hidrojeni ayırırlar. Bu durum, superoksit ve hidroperoksit radikallerinin LPO artışına, dolayısıyla hücre zarında hasara neden olduklarını ortaya koymaktadır (91). CONKLİN K. A. (2002) hazırlamış olduğu derlemede MDA'nın lipid peroksidasyonunun ikinci ürünü olduğunu ve onun belirleyicisi niteliğini taşıdığını belirtmiştir (21). BANAKAR M. C. ve arkadaşları (2004) da sıçanlara DEN ve FB uyguladıkları sıçanların karaciğer doku hücrelerinde, radikal oluşumu sonucunda oluşan lipid peroksidasyonunun ikinci ürünü olan MDA (malondialdehit)'da artış olduğunu belirtmişlerdir (9). Bu sonuçlar, bizim çalışmamızda tesbit ettiğimiz MDA düzeyinin artışı ile paralellik göstermektedir. DMV ve 1- α -hidroksi-DMV metabolitlerinin, MDA düzeyine olan etkilerinin araştırıldığı herhangi bir çalışmaya rastlayamadığımızdan bunlarla ilgili karşılaştırma yapılamamıştır.

KATALAZ

Katalaz aktivitesinde, bulguları, kontrol grubuna göre, 2., 3., 4., 5. ve 9. gruplarda fark bulunmazken, 6., 7., 8., ve 10. gruplar arasında çok önemli düzeyde azalma bulundu. Bu da bize DEN ve 2-AAF'nin katalaz aktivitesini azalttığını ya da aşırı kullanım nedeni ile azaldığı, DMV'nin ise bu aktivasyonu artırarak kontrol düzeyine getirdiğini göstermektedir. BANAKAR M. C. ve arkadaşlarına (2004) göre katalazın savunma sistemi için çok önemli olduğu ve toksik etki sonucunda oluşan serbest oksijen radikallerini SOD ile beraber hidrojen peroksit ve suya dönüştürdüğü ve bunun sonucunda da Gpx'de de belirtildiği üzere, Gpx'in bu oluşan hidrojen peroksiti yakaladığı ve bunun sonucunda da katalaz ve diğer enzim sistemlerinin bunları suya dönüştürdüğünü ortaya koymuşlardır (9). Yapılan farklı bir çalışmada da, GOEPTAR A. R. ve arkadaşları (1994) sıçanlara FB uygulayarak hepatosit sitozolünde katalazda azalma olduğunu ortaya koymuşlardır (36). Bizim çalışmamızın sonuçlarında bu çalışma ile paralellik göstermektedir. Ancak, ABDELLATİF A. ve arkadaşları (2003) DEN ve 2-AAF uyguladıkları sıçanlarda (1), FERNANDEZ D. C. ve arkadaşları (1998) da hepatosit kültürüne FB uyguladıkları çalışmalarda katalazda artış olduğunu belirtmişlerdir (30). Bu sonuçlar, bizim sonucumuz ile uyumlu değildir.

CYP1A2

CYP1A2 düzeyinde, kontrol grubuna göre 2. ve 3. gruplarda fark bulunmazken, 4. grupta ekspresyon yönünden azalma, 5. ve 10. gruplarla önemli düzeyde, 6., 7., 8. ve 9. gruplarla karşılaştırıldığında ise çok önemli düzeyde azalma bulunmuştur. Bu sonuçlara göre, detoksifikasyon reaksiyonlarının I. fazında, diğer bir deyişle sıçan hepatokarsinogenezin erken safhasında bir monooksijenaz olarak görev yapan CYP1A2'nin ekspresyonu DEN, 2-AAF, DEN + 2-AAF ve DMV verilen grupta istatistiksel olarak ekspresyonda azalmanın değişmemesi, ancak DEN + 2-AAF + 1- α -hidroksi DMV verilen grupta ekspresyonun istatistiksel olarak az da olsa artması, 1- α -hidroksi DMV'nin detoksifikasyon reaksiyonlarından faz I reaksiyonda CYP1A2'nin ekspresyonunu artırdığı bu çalışma ile ortaya konmuştur. Yapılan çalışmalarda CYP1A2'nin ekspresyonunun, DEN ve 2-AAF ya da benzeri olarak görev yapan FB ve

2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin'de azaldığı ortaya konmuştur (5,60,66,82,93). Bu çalışmaları kısaca belirtirsek; LIU L. ve arkadaşları (2005) sıçan hepatokarsinogenenin erken safhasında sitokrom p450 ekspresyonunu belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada, sıçanlara DEN ve 2-AAF uygulayarak, sıçan karaciğerinde Western blot mikrosomal ayırma yaparak CYP1A2 seviyesindeki değişikliği SDS PAGE ile ortaya koymuşlardır. Sonuçta DEN+2-AAF ve sadece 2-AAF uygulanan sıçanların hepatositlerinde CYP1A2 seviyesinin azaldığını tesbit etmişlerdir (60), TRITSVHER A. M. ve arkadaşlarının (1992) DEN uygulanmış sıçan hepatositlerinde CYP1A2 düzeyinin azaldığını bunu da ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu sonucunda enzimlerin indüklenmesi sonucunda reaktif DNA metabolitlerinin oluşumuna neden olduğunu ortaya koymuşlardır (93), ANDERSON M. ve arkadaşları (1997) DEN + 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin ile geometrik hepatik bölge model oluşturarak, CYP1A1 ve CYP1A2'nin indüklenmesini araştırmak istedikleri bir çalışma sonucunda CYP1A2'nin indüklendiğini ortaya koymuşlardır (5), SANTOSTEFANO M. J. ve arkadaşları (1998) sıçanlara 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin vererek, karaciğer hücresinde, detoksifikasyon reaksiyonlarının birinci fazında CYP1A2'nin ekspresyonunun azaldığını belirtmişlerdir (82), MITSUMORI K. ve arkadaşları (1997) DEN ve 500 ppm oksfendazol (FB türevi) uyguladıkları sıçanlarda CYP1A2'nin ekspresyonunun indüklendiğini ve kullanımını nedeniyle de azaldığını ortaya koymuşlardır (66),

HİSTOLOJİK VE İMMUNOHİSTOKİMYASAL BULGULARIN TARTIŞMASI

Histolojik olarak çalışmamızda 1., 2., 3., 4., 5. gruplarda herhangi bir patolojik bozukluğa rastlanmadı. 6. ve 7. grupta bu bulguların benzerlik göstermesi ancak 8. grupta 6. ve 7. gruba oranla daha fazla patolojik bulguların bulunması ve özellikle preneoplastik odakların görülmesi yaptığımız çalışmanın seyrinin doğru olduğunu göstermektedir. Bu patolojik bulgular bize tümör oluşumunun başladığını ve bu tümör oluşumuna etkisini incelememiz nedeniyle daha ileri aşamasının beklenilmemesi gerektiğini ve doğru zamanda DMV ve 1- α -hidroksi-DMV uyguladığımızı göstermiştir. Özellikle, DMV ve 1- α -hidroksi-DMV uyguladığımız

gruplarda patolojik olarak bir düzelme (+ kadar) olmuştur. NORMAN B. H. ve arkadaşları (1996) Swiss T-hücrelerine uyguladıkları wortmanninin, PI 3-kinazı inhibe ederek, tümör oluşumunu etkilediğini ortaya koymuşlardır (72). GAO Z. Y. ve arkadaşları (1996) pankreatik β -hücrelerinde wortmanninin, insülin sekresyonunu inhibe etmesini araştırmışlar, sonuçta wortmanninin PI 3-kinazı inhibe ederek PLC'nin aktivitesini inhibe ettiğini, böylece PIP₂'nin hidrolizinin engellendiğini ve dolayısıyla diaçilgliserol (DAG) ve inositol 1,4,5 trifosfat (IP₃) oluşumunun engellendiğini ortaya koymuşlardır (34). CROSS M. ve arkadaşları (1995) wortmannin ve onun yapısal analogu olan DMV'i Swiss 3T3 hücrelerine uygulamışlar, bu maddelerin PI 3-kinazı inhibe ederek PLC'yi inaktive ettiğini ve PIP₂'nin hidrolizini engelleyerek DAG ve IP₃ aktivitesini durdurduğunu belirtmişlerdir (23).

Immunohistokimyasal olarak Ha-Ras ve GST-p ekspresyonunda DEN + 2-AAF uygulanan sıçanlarda çok artış belirlendi. DEN + 2-AAF + DMV ve DEN + 2-AAF + 1- α -hidroksi DMV verilen gruplarda ise belirli oranda azalma belirlendi. Cx32'nin de karsinomun tam olarak oluşmaması nedeniyle hücreler arasındaki yerini aldığını belirledik. KURODA H. ve arkadaşları (2002) DEN verdikleri sıçan hepatositlerindeki tirozin kinaz reseptörünün gen ekspresyonunu belirlemek istemişler, yaptıkları çalışma sonucunda, preneoplastik görünüm ve immunohistokimyasal olarak GST-p enziminde artış belirlemişlerdir (57), MEJIA G. E. ve arkadaşları (2004) DEN + 2-AAF uyguladıkları sıçanların hepatositlerinde hepatik fokus, parankima, nodül ve neoplastik oluşumun yanı sıra GST-p'nin arttığını belirlemişlerdir (64), CHAKRABORTY T. ve arkadaşları (2003) DEN + 2-AAF vererek sıçan hepatositlerinde vanadiumun etkilerini araştırdıkları çalışmada, hepatositlerde bazofilik fokus, eozinofilik fokus ve sinozidlerin oluştuğunu belirlemişlerdir (18), ARORA A. ve SHUKLA Y. (2004) DEN + 2-AAF verilen sıçan hepatositlerinde GST-p aktivitesinin artışı gözlemişlerdir (6), AYDINLIK H. ve arkadaşları (2001) DEN + FB uyguladıkları sıçan karaciğerinde Ha-Ras'ın 61. kodonunda mutasyonun yanı sıra Cx32'nin ekspresyonunda %80 azalma olduğunu belirtmişlerdir. Aynı çalışmada sadece DEN uyguladıklarında, Ha-Ras ve Cx32 'de önemli düzeyde değişiklik gözlenmediğini belirtmişlerdir (7), LUEBECK G. E. (2000) ve WALKER N. J. (2000)

ile arkadaşları, sıçanlara DEN + 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin uygulayarak, karaciğerde tümör oluşumunun erken safhasında, hepatik fokus ve GST-p ekspresyonunda artış belirlemişlerdir (61,100), LIU L. ve arkadaşları (2005) DEN + 2-AAF uyguladıkları sıçanlarda hepatokarsinogenizin erken safhasında hepatositlerinde GST-p'nin arttığını ortaya koymuşlardır (60), FREY S. ve arkadaşları (2000) DEN + 5-bromodeoxyuridine uygulayarak hepatosellüler kanser oluşturdukları farelerde ras geninin 61. kodonunda mutasyon olduğunu, bunun sonucunda da tümör oluşumunun arttığını ortaya koymuşlardır (32), NEVEU M. J. ve arkadaşları (1994) FB uyguladıkları sıçanların sentrolobüler hepatositlerde immunohistokimyasal olarak Cx32 azaldığını belirlemişlerdir (70), MITSUMORI K. ve arkadaşları (1997) DEN + 500 ppm oksfendazol (FB türevi) uyguladıkları sıçanlarda sentrolobüler hepatositlerde Cx32'de önemli düzeyde azalma, histolojik olarak yağ asitlerinde dejenerasyon ve hipertrofi gibi değişiklikler belirlemişlerdir (66).

Sonuç olarak, her iki mantar metabolitin preneoplastik dönemde etkili olduğu ortaya kondu. Fakat bu sonucun daha da kesinleşebilmesi ve preneoplastik dönemi takip eden evrelerde ki etkilerinin de ortaya koyabilmek için, henüz çok yeni olan bu konunun daha çok çalışılması gerekmektedir.

6. SONUÇ

Çalışmamızda karaciğerde tümör oluşumuna neden olan DEN + 2-AAF'nin etkisini ortadan kaldırmak amacıyla, sıçanlara uygulanan DMV ve 1- α -hidroksi-DMV mantar metabolitlerinin etkilerine ait sonuçlar aşağıda belirtilmiştir.

- 1.SOD % inhibisyonu;** kontrol grubuna göre, DEN, 2-AAF ya da birlikte uygulanan gruplarda, SOD % inhibisyonunda azalma belirlendi. DEN + 2-AAF + DMV verilen grupta SOD % inhibisyonun kontrol grubu ile istatistiksel olarak yaklaşık aynı düzeyde olduğu, DEN + 2-AAF + 1- α -hidroksi-DMV uygulanan grupta da % inhibisyonun önemli düzeyde kontrole yaklaştığı belirlendi.
- 2.Gpx aktivitesi;** kontrol grubuna göre, DEN ve DEN + 2-AAF uygulanan grupta çok önemli düzeyde azalma ve DEN + 2-AAF + 1- α -hidroksi-DMV verilen grupta ise önemli düzeyde artma gözlemlendi. DMV'nin ise 1- α -hidroksi-DMV kadar olmasa da düzeltici etkisinin olduğu belirlendi.
- 3.MDA düzeyi;** kontrol grubuna göre, DEN, 2-AAF, DEN + 2-AAF, DEN + 2-AAF + DMV ve 2-AAF + DEN + 1- α -hidroksi-DMV uygulanan gruplarda çok önemli düzeyde artış belirlendi. DMV ve 1- α -hidroksi-DMV'nin MDA düzeyi açısından istatistiksel olarak etkilerine rastlanılmadı.
- 4. Katalaz aktivitesi;** kontrol grubuna göre, DEN, 2-AAF ve DEN + 2-AAF uygulanan gruplarda azalma belirlendi. DEN + 2-AAF + DMV verilen grupta bu aktivitenin kontrole yaklaştığı, DEN + 2-AAF + 1- α -hidroksi-DMV uygulanan grupta ise istatistiksel olarak önemli olmasa da artış belirli bir artış belirlendi.
- 5.CYP1A2 ekspresyonu;** kontrol gruba göre, DEN, 2-AAF, DEN + 2-AAF, DEN + 2-AAF + DMV uygulanan gruplarda daha fazla olmak üzere DMV ve DEN + 2-AAF + 1- α -hidroksi-DMV uygulanan gruplarda azalma

belirlendi. DEN, 2-AAF, DEN + 2-AAF ve DMV verilen gruplarda istatistiksel olarak ekspresyonda azalma olmazken, DEN + 2-AAF + 1- α -hidroksi DMV verilen grupta ekspresyonun istatistiksel olarak az da olsa artması, 1- α -hidroksi DMV'nin detoksifikasyonun birinci fazında CYP1A2 ekspresyonunu arttırdığını ortaya koymuştur.

6. Histolojik olarak; çalışmamızda kontrol grubuna göre, DEN ve 2-AAF uygulanan gruplarda dejeneratif bulgular, hepatosit karyomegali, hepatosit sitomegali ve iltihabi hücre infiltrasyonu oluşumu bakımından patolojik bozukluklara rastlanırken DEN ve 2-AAF uygulanan grupta daha fazla oranda patolojik bulguların bulunması ve özellikle preneoplastik fokusların görülmesi yaptığımız çalışmanın seyrinin doğru olduğunu göstermiştir. DEN ve 2-AAF'nin yanı sıra uyguladığımız DMV ve 1- α -hidroksi-DMV uygulanan gruplarda patolojik olarak bir düzelme olduğu belirlendi.

7. İmmunohistokimyasal olarak; kontrol grubuna göre, DEN + 2-AAF uygulanan grupta Ha-Ras ve GST-p proteinleri artış gösterdi. DEN + 2-AAF + DMV ve DEN + 2-AAF + 1- α -hidroksi-DMV uygulanan gruplarda ise bu proteinlerin miktarında belirli oranda azalma olduğu görüldü. Karsinomun tam olarak oluşmaması nedeniyle, Cx32'nin de hücreler arasındaki yerini aldığı belirlendi.

Sonuç olarak, her iki mantar metabolitinin preneoplastik dönemde etkili olduğu ortaya kondu. Fakat bu sonucun daha da kesinleşebilmesi ve preneoplastik dönemi takip eden evrelerde, ne gibi etkilerinin olabileceğini ortaya koyabilmek için, henüz çok yeni olan bu konuda, yapılacak yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

1. ABDELLATIF A., ALTONSKY A.H., AWAD M.E., ROBERFROID M., KHAN M. N.U.: Peroxisomal Enzymes and 8-Hydroxydeoxyguanosine in Rat Liver Treated with Perfluorooctanoic Acid. *Disease Markers*, 19: 19-25, 2003.
2. AHN B., HAN B. S. ,KIM D. J.,OHSHIMA H.: Immunohistochemical Localization of Inducible Nitric Oxide Synthase And 3-Nitrotyrosine in Rat Liver Tumors Induced by N-Nitrosodiethylamine. *Carcinogenesis*, 20(7): 1337-1344, 1999.
3. AKBABA G.: Erken Kanser Tanısında Dünya Çapında Bilim İnsanımız. *Bilim ve Teknik*, 66-69, 2001.
4. ALBERTS B., BRAY D., LEWIS J., RAFF M., ROBERTS K., WATSON J. D.: *Molecular Biology of The Cell*. Second Edition 169-173, 1989.
5. ANDERSEN M.E., BIRNBAUM L.S., BARTON H.A., EKLUND C.R.:Regional Hepatic CYP1A1 and CYP1A2 Induction with 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin Evaluated with a Multicompartment Geometric Model of Hepatic Zonation.*Toxicology and Applied Pharmacology*,144:145-155,1997.
6. ARORA A., SHUKLA Y.: Induction of Preneoplastic Altered Hepatic Foci Following Dietary Sulphur Supplementation. *Human&Experimental Toxicology*, 23: 229-234, 2004.
7. AYDINLIK H., NGUYEN T. D., MOENNIKES O., BUCHMANN A., SCHWARZ M.: Selective Pressure During Tumor Promotion by Phenobarbital Leads to Clonal Outgrowth of B-Catenin-Mutated Mouse Liver Tumors. *Oncogene*, 20: 7812-7816, 2001.

8. BAGER Y., KATO Y., KENNE K., WARNGARD L.: The Ability to Alter The Gap Junction Protein Expression Outside GST-P Positive Foci in Liver of Rats was Associated to The Tumour Promotion Potency of Different Polychlorinated Biphenyls. *Chemo-Biological Interactions*, 103: 199-212,1997.
9. BANAKAR M.C., PARAMASIVAN S.K.,CHATTOPADHYAY M.B.,DATTA S.,CHAKRABORTY P., CHATTERJEE M.,KANNAN K.,THYGARAJAN E.:1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ Prevents DNA Damage and Restores Antioxidant Enzymes in Rat Hepatocarcinogenesis Induced by Diethylnitrosamine and Promoted by Phenobarbital. *World J. Gastroenterol*, 10(9):1268-1275, 2004.
10. BANASIEWICZ T., PASZKOWSKI J., WIERZBICKI T., PYDA P., PAWELEK T., GRONEK P., DREWS M.: Proliferative Activity of Metastatic Liver Tumors Based on The Evaluation of MAPK Sub-Unit p42s Activity. *Med Sci Monit*, 5(6): 1070-1073, 1999.
11. BARBASON H., MORMONT C., MASSART S., BOUZAHZAH B.: Anti-Carcinogenic Action of Phenobarbital Given Simultaneously with Diethylnitrosamine in The Rat. *Eur T Cancer Clin Oncol.*, 22(9): 1073-1078, 1986.
12. BARBISAN L. F., SCOLASTICI C., MIYAMOTO M., SALVODARI D. M. F., RIBEIRO L. R., EIRA A. F., CAMARGO J. L.V.: Effects of Crude Extracts of *Agaricus Blazei* on DNA Damage and on Rat Liver Carcinogenesis Induced by Diethylnitrosamine. *Genetics and Molecular Research*. 2(3): 295-308, 2003.
13. BARBISAN SPINARDI A. L. T., KANENO R., RODRIGUES M. M.A., SALVADORI D. M. F., MOREIRA E. I. T., BARBISAN L. F., CAMARGO J. L. V.: Lymphoproliferative Response And T Lymphocyte Subsets in a Medium-Term Multi-Organ Bioassay for Carcinogenesis in Wistar rats. *Cancer Letters*, 154: 121-129, 2000.

14. BASAK R., CHATTERJEE M.: Combined Supplementation of Vanadium and 1- α 25-Dihydroxyvitamin D₃ Inhibit Placental Glutathione S-Transferase Positive Foci in Rat Liver Carcinogenesis. *Life Sciences*, 68: 217-231, 2000.
15. BAŞARAN A: Tıbbi Biyoloji Ders Kitabı., Güneş&Nobel Kitabevleri, Genişletilmiş 7. Baskı, 2005.
16. BOT M.A. L., SIMON H.S., KERNALEGUEN D., RICHE C.: P-Glycoprotein Expression and Function in Rat Hepatocytes in Culture. *Pergamon*, 47: 2302-2306, 1994.
17. CAMPBELL J.A.H.,CORRIGALL A.V.,KIRSCH R.E.: Immunohistologic Localization of Alpha,Mu, and Pi Class Glutathione S-Transferases in Human Tissues.*Cancer*,67:1608-1613,1991.
18. CHAKRABORTY T., GHOSH S., DATTA S., CHAKRABORTY P., CHATTERJEE M.: Vanadium Suppresses Sister-Chromatid Exchange and DNA-Protein Crosslink Formation and Restores Antioxidant Status and Hepatocellular Architecture during 2-Acetylaminofluorene Induced Experimental Rat Hepatocarcinogenesis. *Journal of Experimental Therapeutics and Oncology*. 3:346-362, 2003.
19. CHEN Z.Y., FARIN F., OMIECINSKI J. C., EATON D. L.: Association Between Growth Stimulation By Phenobarbital And Expression of Cytochromes P450 1A1,1A2, 2B1/2 and 3A1 in Hepatic Hyperplastic Nodules in Male F344 Rats. *Carcinogenesis*,13: 675-682, 1992.
20. CHOI J.A., PARK M.T., KANG C. M., UM H.D., BAE S., LEE K.H., KIM T.H., CHO C. K., LEE Y.S., CHUNG H.Y., LEE S.J.: Opposite Effects of Ha-Ras and Ki-Ras on Radiation-Induced Apoptosis Via Differential Activation of PI3K/Akt and Rac/P38 Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Pathways. *Oncogene*, 23: 9-20, 2004.

21. CONKLIN K.A.:Dietary Polyunsaturated Fatty Acids: Impact on Cancer Chemotherapy and Radiation. *Altern Med Rev.*,7(1): 4-21, 2002.
22. CONOLLY R. B., ANDERSEN M. E.: Hepatic Foci in Rats after Diethylnitrosamine Initiation and 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin Promotion: Evaluation of a Quantitative Two-Cell Model and of CYP 1A1/1A2 as a Dosimeter. *Toxicology and Applied Pharmacology*,146:281-293,1997.
23. CROSS M. J., STEWART A., HODGKIN M. N., KERR D. J., WAKELAM M. J. O.: Wortmannin and Its Structural Analogue Demethoxyviridin Inhibit Stimulated Phospholipase A₂ Activity in Swiss 3T3 Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 270: 25352-25355, 1995.
24. CUTLER N. S., HEITMAN J., CARDENAS M. E.: STT4 Is Essential Phosphatidylinositol 4-Kinase That is a Target of Wortmannin in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, 272 (44): 27671-27677, 1997.
25. DAS S.: Garlic- A Natural Source of Cancer Preventive Compounds. *Asian Pacific J. Cancer Prev.*, 3: 305-311, 2002.
26. DAVOL P.A., BIZUNEH A., FRANCKELTON A.R.: Wortmannin a phosphoinositide 3-kinase Inhibitor, Selectively Enhancers Cytotoxicity of Receptor-Directed-Toxin Chimeras in vitro and in vivo. *Anticancer Research*,19: 1705-1714, 1999.
27. DEMET M. M, DENİZ F., ŞİMŞEK E., TAŞKIN E.O., DEVECİ A.: Psikotrop İlaç Yazılma Sıklığı ve İlaç Etkileşimleri: Sitokrom P450 Sistemi.Klinik Psikofarmakoloji Bülteni, 13: 43-49, 2003.
28. DOĞAN A.L., GÜÇ D.:Sinyal İletimi Mekanizmaları ve Kanser. *Hacettepe Tıp Dergisi*, 35:34-42, 2004.

29. DRAGAN Y. P., XU Y. H., PITOT H.C.: The Effect of The Dose of Diethylnitrosamine on The Initiation of Altered Hepatic Foci in Neonatal Female Rats. *Carcinogenesis*, 14: 385-391, 1993.
30. FERNANDEZ C.D., SANZ N., ALVAREZ A.M., WOLF A., CASCALES M.: The Effect of Non-Genotoxic Carcinogens, Phenobarbital and Clofibrate, on The Relationship between Reactive Oxygen Species, Antioxidant Enzyme Expression and Apoptosis. *Carcinogenesis*, 19: 1715-1722, 1998.
31. FINNBERG N., SILINS I., STENIUS U., HOGBERG. J.: Characterising The Role of MDM2 in Diethylnitrosamine Induced Acute Liver Damage and Development of Pre-Neoplastic Lesions. *Carcinogenesis*, 25: 113-122, 2004.
32. FREY S., BUCHMANN A., BURSCH W., HERMANN R. R., SCHWARZ M.: Suppression of Apoptosis in C3H Mouse Liver Tumors by Activated Ha-Ras Oncogene. *Carcinogenesis*, 21: 161-166, 2000.
33. GAILLARD E. N., BUSSAT M. C., FILLOUX C., CUBER J. C., OBBERGHEN E. V., CHAYVIALLE J. A., ABELLO J.: Bombesin Stimulates Cholecystokinin Secretion through Mitogen-Activated Protein-Kinase-Dependent and-Independent Mechanisms in The Enteroendocrine STC-1 Cell Line. *Biochem J.*, 331: 129-135, 1998.
34. GAO Z. Y., KONRAD R. J., COLLINS H., MATSCHINSKY F. M., ROTHENBERG P. L., WOLF B. A.: Wortmannin Inhibits Insulin Secretion in Pancreatic Islets and β -TC3 Cells Independent of Its Inhibition of Phosphatidylinositol 3-Kinase. *Diabetes*, 45:854-862, 1996.
35. GARDNER I., WAKAZONO H., BERGIN P., WAZIERS I., BEAUNE P., KENNA J. G., CALDWELL J.: Cytochrome P450 Mediated Bioactivation of Methyleugenol to 1'-Hydroxymethyleugenol in Fischer 344 Rat and Human Liver Microsomes. *Carcinogenesis*, 18: 1775-1783, 1997.

36. GOEPTAR A. R., GROOT E. J., SCHEERENS H., COMMANDEUR J. N. M., VERMEULEN N .P .E.: Cytotoxicity of Mitomycin C and Adriamycin in Freshly Isolated Rat Hepatocytes:The Role of Cytochrome P450.Cancer Research, 54:2411-2418, 1994.
37. GOTH, L.: A Simple Method for Determination of Serum Catalase Activity and Revision of Reference Range. Clinica Chimica Acta , 196: 143-152, 1991.
38. GRIFFIN M. J., WAISTON K. K.: P-Nitrophenol UDP Glucuronyltransferase and Epoxide Hydrase in Microsomes from Liver of Rats Fed 2-Acetylaminofluorene and Barbital. Proc. Okla. Acad. Sci, 59: 12-15, 1979.
39. GÜNEŞ H. V.: Moleküler Hücre Biyolojisi, Kaan Kitabevi, 1.Baskı, 2003.
40. HABIG W. H., PABST M. J., JAKOBY W. B.: Glutathione S-Transferases the First Enzymatic Step in Mercapturic Acid Formation.the Journal of Biological Chemistry, 249(22): 7130-7139, 1974.
41. HE R. K., BARRE G. M.: Influence of The Vitamin D Status on The Early Hepatic Response to Carcinogen Exposure in Rats. the Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 281: 464-469, 1997.
42. <http://biyokimya.uludag.edu.tr/CellCycleApoptosis.pdf> KAYIHAN E., ÖZYARDIMCI N. : Akciğer Kanserleri Tanı ve Tedavide Temel İlkeler ve Uygulamalar, Bölüm III.
43. <http://class.fst.ohio-state.edu/FST201/lectures/IFTCa.html>: A Scientific Status Summary by the Institute of Food Technologists Expert panel on Food Safety&Nutrition.
44. <http://feql.wsu.edu/esrp532/ESRP532Lecture7PPT.pdf>: FEISOT A. Overview of Contemporary Toxicological Hazards.

45. <http://www.bioanalytical.com/info/poster/pdf/Zhu-08.pdf>: TIANYI Z., YONGXIN Z., CHANDRANI G.: Rapid Quantitative Determination of Multiple Cytochrome P450 Probe Substrates by Gradient Liquid Chromatography/Electrospray Ionization Ion Trap Mars
46. http://www.fhrc.org/pubs/center_nems/2004/mar18/sart2.html: Cancer, Connexin and Cellular Communication.
47. http://www.insp.mx/salud/43/eng/i434_a_1.pdf: Transforming Growth Factor β -1: Its Structure, Function, and Cancer Regulation Mechanisms. Oscar Peralta-Zaragoza, MSc,(1) A Lagunas-Martínez, QBP,(1) Vicente Madrid-Marina, M en C, PhD.(1).
48. <http://www.oehha.ca.gov/prop65/pdf/hid2amin.pdf>:
49. <http://www.Oxfordbiomed.Com/News@Reviews/Invrev2.Htm>: Preclinical And Clinical Investigations of the Expression of Glutathione-S-Transferase-Isoenzymes.
50. ITO N.: Marriage of Surogate Markers with Medium Term Tests for Carcinogenicity and Modification Potential. Asian. Pacific Journal of Cancer Prevention,1: 349-355, 2000.
51. JENKINS G. T. S., PARRY J. M.: Restriction Site Mutation (RSM) Analysis of 2-Acetylaminofluorene (2-AAF)-Induced Mouse Liver Mutations and Comparison with the Measurement of in vivo Micronucleus Induction in the Bone Marrows of (2-AAF)-treated Mice. Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis 20: 107-117, 2000.
52. KAYSER M. F., VUILLEUMIER S.: Dehalogenation of Dichloromethare by Dichloromethare Dehalogenase/Glutathione S-Transferase Leads to Formation of DNA Adducts. Journal of Bacteriology, 183 : 5209-5212, 2001.

53. KETTERER B.: Detoxication Reactions of Glutathione and Glutathione transferases. *Xenobiotica*,16: 957-973, 1986.
54. KIRAN İ., İLHAN S., AKAR T., TUR L., EROL E.:Synthesis and Evaluation of Demethoxyviridin Derivates as Potential Antimicrobials.*Z.naturforsch*, 60: 686-692, 2005.
55. KISS Z., TOMONO M.: Wortmannin Inhibits Carcinogen-Stiulated Phosphorylation of Ethanolamine and Choline. *FEBS Letters*. 358: 243-246, 1995.
56. KITANO M., WANIBUCHI H., KIKUZAKI H., NAKATANI N., IMAOKA S., FUNAE Y., HAYASHI S., FUKUSHIMA S.: Chemopreventive Effects of Coumaperine from Pepper on the Initiation Stage of Chemical Hepatocarcinogenesis in the Rat. *Jpn. J. Cancer Res*. 91: 674-680, 2000.
57. KURODA H., OHTSURU A., FUTAKUCHI M., KAWASHITA Y., NAGAYAMA Y., FUKUDA E., NAMBA H., SHIRAI T., KANEMATSU T., YAMASHITA S.: Distinctive Gene Expression of Receptor-type Tyrosine kinase Families during Rat Hepatocarcinogenesis. *International Journal of Molecular Medicine*. 9: 473-480, 2002.
58. LEE G. H.: Correlation between Bcl-2 Expression and Histopathology in Diethylnitrosamine-Induced Mouse Hepatocellular Tumors.*American Journal of Pathology*,151: 957-961,1997.
59. LEMKE L.E., MURRIETA G. D. P., TAYLOR C. W., POWIS G.: Wortmannin Inhibits The Growth of Mammary Tumors Despite the Existence of A Novel Wortmannin-Insensitive Phosphatidylinositol-3-Kinase. *Cancer Chemother Pharmacol*. 44: 491-497, 1999.

60. LIU L.L., GONG L. K., QI X. M., CAI Y., WANG H., WU X.F., XIAO Y., REN J.: Altered Expression of Cytochrome P450 and Possible Correlation with Preneoplastic Changes in Early Stage of Rat Hepatocarcinogenesis. *Acta Pharmacologica Sinica*, 26(6): 737-744, 2005.
61. LUEBECK E. G., BUCHMAN A., STINCHCOMBE S., MOLLGAVKAR S. H., SCHWARZ M.: Effects of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin on Initiation and Promotion of GST-P-Positive Foci in Rat Liver: A Quantitative Analysis of Experimental Data Using a Stochastic Model. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 167: 63-73, 2000.
62. MA X. D., MA X., SUI Y. F., WANG W. L., WANG C. M.: Signal Transduction of Gap Junctional Genes, Connexin 32, Connexin 43 In Human Hepatocarcinogenesis. *World J. Gastroenterol*, 9(5): 946-950, 2003.
63. MARUYAMA S., NAGASUE N., DHAR D.K., YAMANOI A., EIASSAL O. N., SATOH K., OKITA K.: Preventive Effect of FK 143, α -Reductase Inhibitor, on Chemical Hepatocarcinogenesis in Rats. *Carcinogenesis*, 7: 2096-2104, 2001.
64. MEJIA E. G., MARES RAMIREZ M. V., POPOCA A. E., WALLIG M., TREVINO V. S.: Inhibition of Liver Carcinogenesis in Wistar Rats by Consumption of an Aqueous Extract from Leaves of *Ardisia Compressa*. *Food and Chemical Toxicology*, 42: 509-516, 2004.
65. MINO K., WATANABE J., KANAMURA S.: Effect of 3-Methylcholanthrene Administration on Expression of Cytochrome P-450 Isoforms Induced by Phenobarbital in Rat Hepatocytes. *The Journal of Histochemistry a Cytochemistry*, 46(10): 1151-1160, 1998.

66. MITSUMORI K., ONODERA H., SHODA T., UNEYAMA C., IMAZAWA T., TAKEGAWA K., YASUHARA K., WATANABE T., TAKAHASHI M.: Liver Tumour-promoting Effects of Oxfendazole in Rats. *Food and Chemical Toxicology*, 35: 799-806, 1997.
67. MIURA S. I., FUTINO M., MATSUO Y., KAWAMURA A., TANIGAWA H., NISHIKAWA H., SAKU K.: High Density Lipoprotein-Induced Angiogenesis Requires the Activation of RAs/MAP Kinase in Human Coronary Artery Endothelial Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 23: 802-808, 2003.
68. MOENNIKES O., BUCHMANN A., ROMUALDI A., OTT T., WERRINGLOER J., WILLECKE K., SCHWARZ M.: Lack of Phenobarbital-mediated Promotion of Hepatocarcinogenesis in Connexin32-Null Mice. *Carcinogenesis*, 60(18): 5087-5091, 2000.
69. MORI Y., KOIDE A., KOBAYASHI Y., FURUKAWA F., HIROSE M., NISHIKAWA A.: Effects of Cigarette Smoke and a Heterocyclic Amine, Meiqx on Cytochrome P-450, Mutagenic Activation of Various Carcinogens and Glucuronidation in Rat Liver. *Mutagenesis*, 18, 87-93, 2003.
70. NEVEU M. J., BABCOCK K. L., HERTZBERG E. L., PAUL D. L., NICHOLSON B. J., PITOT H. C.: Colocalized Alterations in Connexin 32 and Cytochrome P450I B1/2 by Phenobarbital and Related Liver Tumor Promoters. *Cancer Research*, 54: 3145-3152, 1994.
71. NORMAN B. H., PASCHAL J., VLAHOS C. J.: Synthetic Studies on the Furan Ring of Wortmanin. *Bioorganic A Medicinal Chemistry Letters*, 5(11): 1183-1186, 1995.
72. NORMAN B. H., SHIH C., TOTH J. E., RAY J. E., DODGE J. A., JOHNSON D. W., RUTHERFORD P. G., SCHUITZ R. M., WORZALLA J. F., VLAHOS C. J.: Studies on the Mechanism of Phosphatidylinositol 3-Kinase Inhibition by Wortmannin and Related Analogs. *J. Med. Chem.*, 39: 1106-1111, 1996.

73. ÖZKAN A., KAYAHAN F.: Serbest Oksijen Radikalleri, Karsinogenez ve Antioksidant Enzimler. *Thod*, 1, 56: 2004.
74. PARK D. Y., LEE C. H., SOL M. Y., SUH K. S., YOON S. Y., KIM J. W.: Expression and Localization of the Transforming Growth Factor- β Type I Receptor and Smads in Preneoplastic Lesions during Chemical Hepatocarcinogenesis in Rats. *J. Korean Med. Sci.*, 18: 510-519, 2003.
75. PENDL G. G., PRIESCHL E. E., THUMB W., HARRER N. E., AUER M., BAUMRUKER T.: Effects of Phosphatidylinositol-3-Kinase Inhibitors on Degranulation and Gene Induction in Allergically Triggered Mouse Mast Cells. *Int Arch Allergy Immunol*, 112: 392-399, 1997.
76. PIETROWSKA M., CANUSZEWSKA J., WALTER Z., RZESZOWSKA WOLNY J., WIDLAK P.: The Dedection and Characterization of Rat Protein Recognizing DNA Damaged by N-Acetoxy-Acetylaminofluorene. *Cellular&Molecular Biology Letters*, 5: 423-431, 2000.
77. PINTO L. F. R., MORAES E., ALBANO M. R., SILVA C. M., GODOY W., GLISOVIC T., LANG A. M.: Rat Oessophageal Cytochrome P450(CYP) Monooxygenase System: Comparison to the Liver and Relevance in N-Nitrosodiethylamine Carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 22: 1877-18883, 2001.
78. PITOT B.: Models of Liver Cancer, Non Genotoxic Carcinogens. *Toxicologic Pathology*, 24: 18-20, 1996.
79. POLLAND T. D., EARNSHAW W. C.: *Cell Biology*, 451-462, 2002.
80. ROBERTS B. J.: Evidence of Proteasome-Mediated Cytochrome P-450 Degradation. *the Journal of Biological Chemistry*, 272(15): 9771-9778, 1997.

81. RYU S. D., CHUNG W. G.: Induction of the Procarcinogen-Activating CYP1A2 by A Herbal Dietary Supplement in Rats and Humans. *Food and Chemical Toxicology*, 41: 861-866, 2003.
82. SANTOSTEFANO M. J., WANG X., RICHARDSON V. M., ROSS D. G., DEVITO M. J., BIRNBAUM L. S.: A Pharmacodynamic Analysis of TCDD-Induced Cytochrome P450 Gene Expression in Multiple Tissues:Dose-and Time-dependent Effects. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 151: 294-310, 1998.
83. SHIMIZU I., YASUDA M., MIZOBUCHI Y., MA Y. R., LIU F., SHIBA M., HORIE T., ITO S.: Suppressive Effect of Oestradiol on Chemical Hepatocarcinogenesis in Rats. *Gut*, 42: 112-119, 1998.
84. SHINKYO R., SAKAKI T., OHTA M., INOUE K.: Metabolic Pathways of Dioxin by CYP1A1: Species Difference between Rat and Human CYP1A Subfamily in the Metabolism of Dioxins. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 409: 180-187, 2003.
85. SPINARDI A. L. T., KANENO R., RODRIGUES M.A., SALVADORI D. M. F., ROCHA N. S., BARBISAN L. F., RIBEIRO L. R., CAMARGO L. V. D.: Natural Killer Activity in a Medium-term Multi-organ Bioassay for Carcinogenesis. *Jpn. J. Cancer Res.*, 90 : 101-107, 1999.
86. STANDAERT M. L., AVIGNON A., YAMADA K., BANDYOPADHYAY G., FARESE R. V. : The Phosphatidylinositol 3-Kinase Inhibitor, Wortmannin, Inhibits Insulin-Induced Activation of Phosphatidylcholine Hydrolysis and Associated Protein Kinase C Translocation in Rat Adipocytes. *Biochem T*, 313: 1039-1046, 1996.

87. SUZUKI S., TAKAHASHI S., ASAMOTO M., INAGUMA S., OGISO T., HIROSE M., SHIRAI T.: Lack of Modification of 2-Amino-3,8-Dimethylimidazo [4,5] Quinoxaline (Meiox)-Induced Hepatocarcinogenesis in Rats by Fenbendazole-A CYP1A2 Inducer. *Cancer letters*, 185:39-45, 2002.
88. TEE G. J.G., DRAGON Y. P., SINGH J., VAUGHAN J., Xu Y. H., GOLDSWORTHY T., PITOT H. C.: Quantitative Analysis of Dose-and Time-Dependent Promotion of Four Phenotypes of Altered Hepatic Foci by 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin in Female Spraque-Dawley Rats. *Toxicological Sciences*, 51: 211-223, 1999.
89. THIRISNAVUKKARASU C., SAKTHISEKARAN D.: Influence of Sodium Selenite on Glyroprotein Contents in Normal And N-Nitrosodiethylamine Initiated And Phenobarbital Promoted Rat Liver Tumors. *Pharmacological Research*, 48: 167-173, 2003.
90. THIRUNAVUKKARASU C., SAKTHISEKARAN D.: Effect of Dietary Selenite on N-Nitrosodiethylamine-Induced And Phenobarbital Promoted Multistage Hepatocarcinogenesis in Rat: Reflection in Some Minerals. *Biomedicine&pharmacotherapy*, 57: 416-421, 2003.
91. THIRYNAVUKKARASU C., SAKTHISEKARAN D.: Stabilization of Membrane Bound Enzyme Profiles by Sodium Selenite in N-nitrosodiethylamine Induced and Phenobarbital Promoted Hepatocarcinogenesis in Rats. *Biomedicine a Pharmacotherapy*, 57: 117-123, 2003.
92. THULLBERG M., KRAUPP G. B., HÖGBERG J., GARBERG. P.: Changes in Liver Fatty Acid-Binding Protein in Rat Enzyme-Altered Foci. *Cancer letters*, 128:1-10, 1998.

93. TRITSCHER A. M., GOLDSTEIN J. A., PORTIER C. J., McCOY Z., CLARK G. C.: Dose-Response Relationships For Chronic Exposure to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzop-Dioxin in a Rat Tumor Promotion Model: Quantification and Immunolocalization of CYP1A1 and CYP1A2 in the Liver. *Cancer Research*, 52: 3436-3442, 1992.
94. TRYPHONAS H., LACROIX F., LOK E., JEE P., CLAYSON D. B., HAYWARD S., MILLER D., MEHTA R.: The Effect of Butylated Hydroxytoluene on Selected Immune Surveillance Parameters in Rats Bearing Enzyme-altered Hepatic Preneoplastic Lesions. *Food and Chemical Toxicology*, 37: 671-681, 1999.
95. UCHIYMA M., MIHARA M.: Determination of Malonaldehyde Precursors in Tissues by Thiobarbituric Acid Test. *Analytical Biochem*, 86, 279-286, 1978.
96. ÜSTÜNER D.: Fluoksetinin Kromozomlar ve Mitotik İndeks Üzerine In Vitro ve In Vivo Etkilerinin İncelenmesi, Doktora Tez, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Bilim Dalı, Eskişehir, 2004.
97. VANDENBERGH Y., : Influence of Medium Composition and Culture Conditions on Glutathione-S-Transferase Activity in Adult Rat Hepatocytes during Culture., *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, 24 (4): 281-287, 1988.
98. VENKATRAMAN J. T., ANGKEOW P., SATSANGI N., FERNANDES G.: Effects of Dietary n-6 and n-3 Lipids on Antioxidant Defense System in Livers of Exercised Rats. *Journal of the American College of Nutrition*, 17: 586-594, 1998.
99. WADDELL W. J.: Threshold for Carcinogenicity of N-Nitrosodiethylamine for Esophageal Tumors in Rats. *Food and Chemical Toxicology*, 41: 739-741, 2003.

100. WALKER N. J., TRITSHER A. M., SILLS R. C., LUCIER G. W., PORTIER C.J.: Heatocarcinogenesis in Female Sprague-Dawley Rats following Discontinuous Treatment with 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p dioxin. *Toxicological Sciences*, 54: 330-337, 2000.
101. WESTHUIZEN L. V. D., GELDERBLOM W. C. A., SHEPHARD G. S., SWANEVELDER S.: Disruption of Sphingolipid Biosynthesis in Hepatocyte Nodules: Selective Proliferative Stimulus Induced by Fumonisin B₁. *Toxicology*, 200: 69-75, 2004.
102. WOOD G. A., ARCHER M. C.: Matrix Metalloproteinases-2 And 9 do not Play a Role in the Growth of Preneoplastic Liver Lesions in F344 Rats. *Exp. Biol. Med.*, 226 (8): 799-803, 2001.
103. WOOD G. A., SARMA D. S. R., ARCHER M. C.: Inheritance of Resistance to Promotion of Preneoplastic Liver Lesions in Copenhagen Rats. *Exp. Biol. Med.*, 226(9): 831-835, 2001.
104. XU Y. H., MARONPOT R., PITOT H.C.: Quantitative Stereologic Study of the Effects of Varying the Time Between Initiation and Promotin on Four Histochemical Markers in Rat Liver During Hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis*, 11: 267-272, 1990.

ÖZGEÇMİŞ

07.02.1965, Gaziantep doğumlu M.Cengiz ÜSTÜNER ilkokulu, ortaokul ve lise eğitimini Gaziantep'te tamamladıktan sonra birincilikle girdiği Orta Doğu Teknik Üniversitesi Gaziantep Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümünü 1991'de bitirdi. 1995'e kadar çeşitli özel sektörlerde görev yaptı. 1995 yılından itibaren Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında Araştırma Görevlisi olarak görev yapmaktadır. 1996 yılında Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda Lisansüstü eğitimine başladı ve 1999 yılında eğitimini tamamladıktan sonra aynı bölümde Doktora programına katıldı ve halen bu programa devam etmektedir. Evli ve iki çocuk babasıdır.