

T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI



DENEYSEL KARACİĞER İNTOKSİKASYONUNDA
APOPTOSİS ORANLARININ TESPİTİ VE GALEKTİN-3'ÜN
EKSPRESYONUNUN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Zeliha GÖÇER

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Kamil SEYREK

BALIKESİR - 2016

T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DENEYSEL KARACİĞER İNTOKSİKASYONUNDA
APOPTOSİS ORANLARININ TESPİTİ VE GALEKTİN-3'ÜN
EKSPRESYONUNUN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Zeliha GÖÇER

TEZ SINAV JÜRİSİ

Prof. Dr. Çiğdem YENİSEY
Adnan Menderes Üniversitesi - Başkan

Prof. Dr. Kamil SEYREK
Balıkesir Üniversitesi - Üye

Prof. Dr. Özlem YAVUZ
Balıkesir Üniversitesi - Üye

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Kamil SEYREK

Bu araştırma; Balıkesir Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2012/76 nolu proje ile desteklenmiştir.

BALIKESİR - 2016



T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TEZ KABUL VE ONAY

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde yürütülmüş olan
“Deneysel Karaciğer İntoksikasyonunda Apoptosis Oranlarının Tespiti ve Galektin-3’ün
Ekspresyonunun Araştırılması”

başlıklı tez çalışması, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 02/06/2016

TEZ SINAV JÜRİSİ

Prof. Dr. Çiğdem YENİSEY
Adnan Menderes Üniversitesi
Başkan

Prof. Dr. Özlem YAVUZ
Balıkesir Üniversitesi
Üye

Prof. Dr. Kamil SEYREK
Balıkesir Üniversitesi
Üye

Yukarıdaki Yüksek Lisans Tezi, Enstitü Yönetim Kurulunun
09. / 08. / 2016 tarih ve 20.16. / 15. sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Özlem YAVUZ
Enstitü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda patent ve telif haklarını ihlal edici etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tezde kullanılmış olan tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi beyan ederim (07.03.2016).

Zeliha GÖÇER



TEŐEKKÜR

Tezimin y¼r¼t¼lmesinde bana rehberlik eden ve her t¼rl¼ desteğini esirgemeyen danıŐman hocam Sayın Prof. Dr.Kamil SEYREK'e, çalıŐmamın deneylerini yaptığım aŐamada b¼y¼k desteklerini g¼rd¼ę¼m hocalarım Sayın Doç.Dr. Hasan AKŞİT ve Yrd.Doç.Dr. Dilek AKŞİT'e, araŐtırmaya sağladığı desteklerden dolayı sonsuz teŐekk¼r ederim. Eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerini bana aktaran başta danıŐman hocama, Sayın Doç.Dr. Adnan Adil HIŐMİOęULLARI'na ve Sayın Prof.Dr. Özlem YAVUZ'a sonsuz saygı ve Ő¼kranlarımı sunarım.

Tezimin deney aŐamasında bana yardımcı olan Araştırma G¼revlisi Onur YILDIZ'a, b¼l¼m arkadaŐlarım Hayrettin KARA'ya ve Eren KIRDAR'a teŐekk¼r ederim.

Eğitimim boyunca her zaman bana destek veren eŐime ve annelerine hep pozitif enerji veren 3 g¼zel kıza ma desteklerinden Őt¼r¼ çok teŐekk¼r ederim.

İÇİNDEKİLER

| | |
|---|---|
| İÇİNDEKİLER | i |
| ÖZET | ii |
| ABSTRACT | iii |
| SİMGELER ve KISALTMALAR | iv |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER | 3 |
| 2.1. Galektin-3 (Gal-3)..... | 3 |
| 2.2. Apoptozis | 12 |
| 2.2.1. Bcl-2 Ailesi | 15 |
| 2.2.2. <i>Kaspaz</i> Protein Ailesi | 16 |
| 2.2.3. Apoptozun Uyarılması | 17 |
| 2.3. Rat Karaciğerinin Yapısı ve Fonksiyonları..... | 19 |
| 2.4. Karbon Tetraklorürün (CCl ₄) Yapısı ve Karaciğer Üzerine Etkisi | 22 |
| 3. GEREÇ ve YÖNTEM | 24 |
| 3.1. ELISA Yöntemi ile Apoptosis Oranlarının Belirlenmesi | 24 |
| 3.2. TUNEL Yöntemi ile Apoptosis Oranlarının Belirlenmesi..... | 25 |
| 3.3. Gal-3 Ekspresyon ve Lokalizasyonunun İmmunohistokimyasal Olarak Gösterilmesi | 26 |
| 3.4. İstatistiksel Değerlendirme..... | 26 |
| 4. BULGULAR | 27 |
| 4.1. ELISA Yöntemi ile Belirlenen DNA Kırılmasının Oranları..... | 27 |
| 4.2. TUNEL Yöntemi ile Belirlenen DNA Kırılmasının Oranları..... | 27 |
| 4.3. Gal-3 Ekspresyonunun İmmunohistokimyasal Olarak Gösterilmesi..... | 29 |
| 5. TARTIŞMA | 32 |
| 6. SONUÇ ve ÖNERİLER | 37 |
| KAYNAKLAR | 39 |
| EKLER | 48 |
| EK-1 ÖZGEÇMİŞ..... | Hata! Yer işareti tanımlanmamış. |
| EK-2 ETİK KURUL RAPORU | 49 |
| EK-3 İZİNLER..... | 50 |

ÖZET

Deneysel Karaciğer İntoksikasyonunda Apoptosis Oranlarının Tespiti ve Galektin-3'ün Ekspresyonunun Araştırılması

Bu çalışmanın amacı, karbon tetraklorür (CCl₄) ile karaciğerde oluşturulmuş toksite modelinde, TUNEL ve ELISA yöntemlerini kullanarak apoptosis oranlarının belirlenmesi ve immunohistokimyasal yöntemler ile de galektin-3'ün (gal-3) ekspresyon ve lokalizasyonunun araştırılmasıdır.

Karaciğer toksisitesi oluşturmak amacıyla ratlara CCl₄, periton içi (i.p.) yol ile 1ml / kg 1:1 oranında, zeytinyağındaki çözeltisi şeklinde, birer gün ara ile 3 defa enjekte edilmiştir. Son CCl₄ enjeksiyonundan 24 saat sonra eter anestezisi altında karaciğer dokuları alınmış ve ELISA yöntemi ile karaciğer dokularındaki apoptozis oranları belirlenmiştir. TUNEL yöntemi kullanılarak da apoptotik hücrelerin görüntülenmesi yapılmıştır. Daha sonra da immunohistokimyasal olarak Gal-3'ün apoptotik hücrelerdeki ekspresyon ve lokalizasyonlarının incelenmiştir.

Karbon tetraklorür verilen gruptaki ortalama DNA fregmantasyonu 1.32 ± 0.15 U/mg protein iken kontrol guruptaki DNA fragmantasyonu 0.85 ± 1.42 U/mg proteindir. Karbon tetraklorüre maruz kalan grupta apoptozis oranları istatistiksel olarak anlamlı düzeylerde artmıştır ($p < 0.001$). Deney grubundaki CCl₄'den kaynaklanan apoptozis oranlarındaki artış TUNEL boyama tekniği ile de teyit edilmiştir. Deney gurubundaki apoptotik hücreler çoğunlukla safra kanalı çevresinde gözlenmiştir. Kontrol gurubunda ise karaciğer parankimi içinde çok az sayıda apoptotik hücre gözlenmiştir. İmmünhistokimyasal olarak gal-3'ün varlığı CCl₄'e maruz kalan hayvanlarda karaciğer parankiminde tespit edilirken, sağlıklı karaciğer dokuların parankiminde gal-3'ün varlığı çok zayıf olarak gözlemlenebilmiştir.

Sonuç olarak, CCl₄ rat karaciğerinde apoptozun uyarmakta, gal-3 ise CCl₄ toksikasyonunun neden olduğu apoptozise karşı hücreleri korumaktadır.

Anahtar Kelimeler: Apoptozis, galektin-3, karaciğer, CCl₄, ELISA, TUNEL, immunohistokimya.

ABSTRACT

Detection of Apoptosis Rate in Experimental Liver Intoxication and The Investigation of Galectin-3 Expression

The aim of this study was to investigate the rate of apoptosis in rat liver tissues exposed to carbon tetrachloride (CCl₄) toxicity. Rate of apoptosis was determined using TUNEL and ELISA techniques. Furthermore, alterations in the expression and localisation of galectin-3 (gal-3) was determined by immunohistochemical methods.

To induce liver toxicity CCl₄ is given to the rats intra peritonally (i.p.) 3 times every other day at a dose 1 ml/kg solved in olive oil in 1:1 proportion. Twenty four hour later following the last injection liver tissues of rats were removed under ether anesthesia. Rates of apoptosis in liver tissues were detected using ELISA and TUNEL techniques. Differences in the expression and localisation of gal-3 in liver tissues between healthy and experimental animals were visualized using immunohistochemical method.

The mean DNA fragmentation in CCl₄ administrated group was 1.32 ± 0.15 U/mg protein, while the mean DNA fragmentation in control animals was 0.85 ± 1.42 U/mg protein. There was a statistically significant ($p < 0.001$) increase in the apoptosis rate in cells exposed to CCl₄. Data given above showed that CCl₄ induce DNA fragmentation in the rat liver. Similarly in the experimental animals a remarkable increase in the number of apoptotic cells was visualised with TUNEL staining technique. Apoptotic cells in experimental group were localised predominately around bile ducts, in control group however only very few apoptotic cells were detected in liver paranchyma. Immunohistochemically in CCl₄ exposed animals antibody raised against gal-3 reacted with cells mainly localised in liver parachyma, while very slight reaction was detected in healthy tissues.

In conclusion, CCl₄ induce apoptosis in rat liver and data given above indicate that gal-3 may protect cells from apoptosis induced by CCl₄.

Key Words: Apoptosis, galectin-3, liver, CCl₄, ELISA, TUNEL, immunohistochemistry.

SİMGELER ve KISALTMALAR

| | |
|---------------------------------|--|
| AIF | Apoptozis İndükleyici Faktör |
| Apaf-1 | Apoptotik peptidaz / Proteaz aktive edici faktör-1 |
| ALP | Alkalen Fosfataz |
| ALT | Alanin amino Transferaz |
| AST | Aspartat amino Transferaz |
| Bcl2 | Anti-apoptotik Protein |
| b-FGF | Beta-fibroblast büyüme faktörü |
| Bc-XL | Anti-apoptotik protein |
| Bc1-W | Anti-apoptotik protein |
| Bim | Pre-apoptotik protein |
| Bid | Pre-apoptotik protein |
| Bad | Pre-apoptotik protein |
| Bp | Baz çifti |
| CCl ₄ | Karbon Tetraklorür |
| CAD | Kaspazlarla Aktive Edilen <i>DNAz</i> |
| CCl ₃ | Trikloro metil |
| CCl ₃ O ₂ | Trikloro metil peroksil |
| DNA | Deoksiribo Nükleik Asit |
| DISC | Apoptozis Uyarıcı Sinyal Kompleksi |
| DAB | Diamino Benzidin |
| ELISA | Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay |
| EndoG | <i>Endonükleaz-G</i> |
| Fas | Hücre Ölüm Reseptörü |
| FasL | Hücre Ölüm Reseptörü Ligandı |

| | |
|---------------|--|
| FGF-1 | Fibroblast Büyüme Faktörü-1 |
| FDA | Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi |
| FADD | Ölüm Alanlı Fas İntili Protein |
| Gal-3 | Galektin-3 |
| GGT | Gama Glutamil Transferaz |
| GM-CT-01 | Galaktomannan - <i>Cyamopsis tetragonoloba</i> - 01 |
| HSP | Isı Şok Proteini |
| IP | İntra-peritoneal |
| IGF | İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü |
| IL-2 | İnterlökin-2 |
| ICAD | Kaspazlarca aktive edilen <i>DNAz</i> inhibitörü |
| kDa | Kilo Dalton |
| MMP-2 | <i>Matriks Metalloproteinaz</i> - 2 |
| MMP-9 | <i>Matriks Metalloproteinaz</i> - 9 |
| MCP | Modifiye Turunçgil Pektini |
| NWGR | Asp-Trp-Gly-Arg |
| NG-2 | Nöral/glial antijen-2 |
| NGF | Nöron büyüme faktörü |
| Omi/HtrA2 | HtrA serin <i>peptidaz</i> - 2 |
| PARP | Poli ADP - <i>riboz polimeraz</i> |
| PBS | Phosphate Buffered Saline |
| Smac/DIABLO | Sekonder mitokondri kaynaklı kaspaz aktivatörü / Kaspaz bağlayan proteinin direkt inhibitörü |
| TNF- α | Tümör Nekroz Faktör - α |
| TUNEL | TdT aracılı floresan-Dutp işaretleme |
| VEGF | Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| | Sayfa No |
|---|-----------------|
| Şekil 2.1. Gal-3'ün Yapısı ve Oluşturduğu Pentamerik Yapı..... | 4 |
| Şekil 2.2. Gal-3'ün Apoptozis Yolakları Üzerindeki Rolü | 7 |
| Şekil 2.3. Kanserli Hücrelerde Bulunan Gal-3'ün Fonksiyonu..... | 8 |
| Şekil 2.4. Apoptozun Oluşmasında Bcl-2 Protein Ailesi, Kilit Role Sahiptir..... | 16 |
| Şekil 2.5. Apoptozun Uyarılması, Ekstrinsik veya İntrensik Yollar ile Olabilmektedir..... | 19 |
| Şekil 2.6. Vücuda Alınan CCl ₄ 'ün Oksidatif Hasar Mekanizması..... | 23 |
| Şekil 4.1. Karbon Tetraklorür Toksikasyonuna Maruz Kalan Karaciğer Dokusunda Apoptotik Hücreler..... | 28 |
| Şekil 4.2. İkinci Grup (Kontrol), Normal Karaciğer Dokusu..... | 29 |
| Şekil 4.3. Kontrol Grubuna Ait Karaciğer Dokusunda Gal-3 Varlığı..... | 30 |
| Şekil 4.4. Deney Grubuna Ait Karaciğer Dokusunda Gal-3 Varlığı | 31 |

TABLolar DİZİNİ

Sayfa No

| | |
|--|----|
| Tablo 4.1 Apoptozun Göstergesi Olan DNA kırılması, Grup 1 ve Grup 2'nin Karşılaştırılması..... | 27 |
|--|----|



1. GİRİŞ

Apoptozis (programlanmış hücre ölümü) ‘hücre intiharı’ olarak da bilinir ve fizyolojik bir olaydır. İnsan vücudunun hayatiyetini devam ettirebilmesi için her gün 50-70 milyar hücre, apoptozis yolu ile kendini feda etmektedir. Organizmanın ihtiyaç duymadığı, biyolojik görevini tamamlamış veya hasarlı hücreleri apoptozis yolu ile gen düzeyinde kontrol edilen bir mekanizma üzerinden ortadan kaldırılır. Apoptotize giden hücrelerin nükleus membranlarının çevresinde kromatinler toplanır ve yoğunlaşır.

Galektin-3 (gal-3), ağırlığı türe bağlı olarak 29 - 35 kDa (kilo Dalton) arasında değişen, karbonhidrat bağlayan bir proteindir. N-terminal bölgesi 110-130 amino asitten, C-terminal bölgesi ise 130 amino asitten meydana gelmektedir. C-terminal bölgesindeki amino asit dizilimi yönünden, hücrelerde anti-apoptotik rolü bulunan Bcl-2 proteinine benzerlik göstermektedir. Bcl-2 ile göstermiş olduğu yapısal benzerlik sayesinde, gal-3’ün de anti-apoptotik özelliği bulunmaktadır. Ancak, gal-3’ün karbon tetraklorür (CCl₄) ile hasar oluşturulmuş karaciğer hücrelerinin apoptozunda rol oynayıp oynamadığına ilişkin bir bilgi bulunmamaktadır.

Karaciğer hem anatomik lokalizasyonu hem de fizyolojik ve biyokimyasal rolü nedeniyle toksik maddelere ve çeşitli ilaçlara çok sık maruz kalan bir organdır. Karaciğerde dejenerasyon dahil çeşitli patolojik tablolara yol açan 600’den fazla kimyasal maddeden biri de CCl₄’dür. Karbon tetraklorür, karaciğere lipid peroksidasyonu ile zarar vermektedir. Oluşan serbest radikaller, hücre membranlarındaki fosfolipidlerde bulunan yağ asitlerinin peroksidasyonuna yol açarak hücre harabiyetine neden olurlar.

Araştırmamızda; rat karaciğerinde serbest radikal oluşturmak için CCl₄ toksite modeli uygulanmış; TUNEL ve ELISA yöntemleri ile apoptosis oranları ve immunohistokimyasal olarak da gal-3’ün apoptotik hücrelerdeki ekspresyon ve

lokalizasyonları incelenmiştir. Apoptotik ve sağlıklı hücrelerdeki gal-3 lokalizasyonlarında farklılık bulunup bulunmadığının araştırılması ve elde edilen bilgiler ışığında, bu proteinin, toksikasyona maruz kalmış karaciğer hücrelerinin apoptozunnde, fibrozis ve remodeling'inde rollerinin olup olmadığı araştırılmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Galektin-3 (Gal-3)

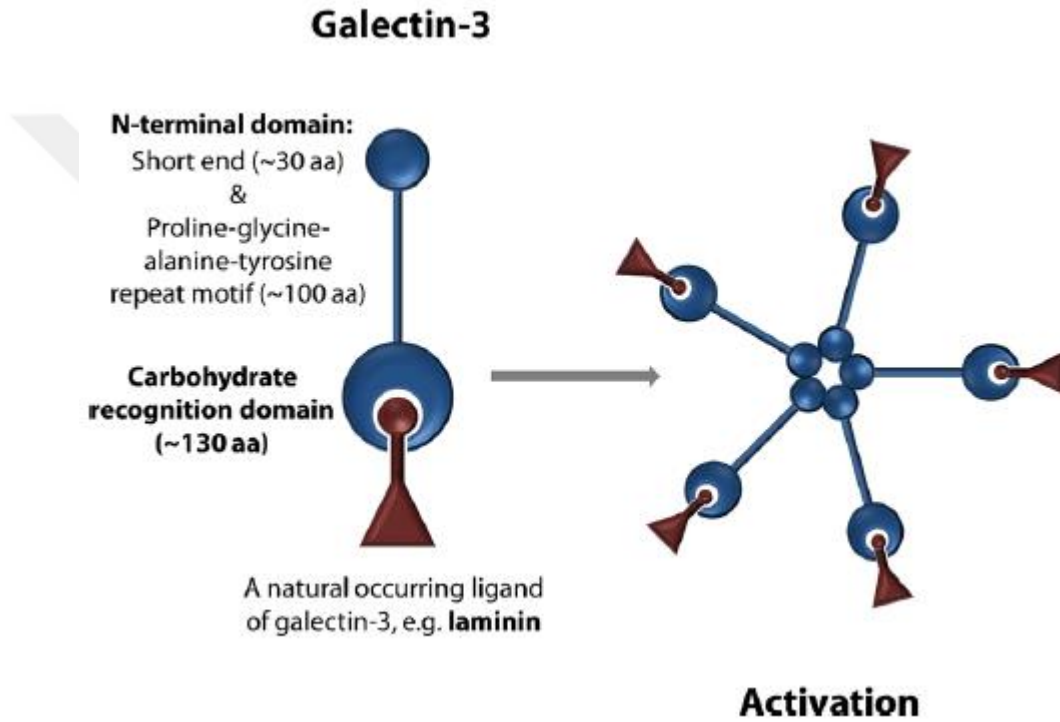
Galektinler; küçük molekül ağırlığa sahip ve hücre büyümesi, hücre göçü, hücre - hücre, hücre - ekstraselüler matriks etkileşimleri, sinyal iletimi gibi çok sayıda biyolojik rolleri bulunan karbonhidrat bağlayan proteinlerdir (Kus ve ark., 2005). Bu güne kadar galektin ailesine ait 15 farklı galektin türü keşfedilmiştir (Lumachi ve Basso, 2002). Bu ailenin bir üyesi olan gal-3, yaklaşık 29-35-kD molekül ağırlığında, galaktoza spesifik bir proteindir. Gal-3, tüm galektinler içindeki memelilerden izole edilen tek şimerik galektindir (Almkvist ve Karlsson, 2004; Birdsall, 2001; Liu ve ark., 1995; Miller ve ark., 2009a; Sharma ve ark., 2004). Gal-3, ilk olarak 1982 yılında, 'Mac2-proteini' adıyla keşfedilmiştir. Özellikle doksanlı yıllardan bu yana, üzerinde yoğun olarak çalışılmaktadır (Kus ve ark., 2005).

Gal-3, N-asetil laktozamin ve laktoz gibi β -galaktozid olarak bilinen karbonhidrat rezidülerini selektif olarak bağlanmaktadır. Özellikle, N-asetil laktozamine bağlanma affinitesi daha yüksektir. Gal-3, insanlarda 14. kromozomda bulunan, 6 ekzon ve 5 introndan meydana gelen tek bir gen (LGALS3) tarafından kodlanır (Kus ve ark., 2005).

Gal-3, yaklaşık 32 kDa ağırlığındadır ve C-terminal ucunda karbonhidrat tanıyan bölgesi bulunur. N-terminal ucu ise sayıları farklılık sergileyebilen 110 - 130 amino asitten oluşmaktadır. N-terminal ucunda kolajen benzeri ve 9 amino asidin (Pro-Gly-Ala-Triozin-Pro-Gly-X-X) 7 - 14 kez tekrarlayan ünitelerinden oluşan ve α -kolajen ile homoloji sergileyen bir bölgesi bulunur. Gal-3, vücut sıvılarında monomer olarak bulunurken, hücrelerde genellikle pentamer şeklinde bulunur. Bu pentamerik yapı, proteinin biyolojik fonksiyonlarını yerine getirebilmesi için hayati öneme sahiptir. Pentamerik yapı, N-terminal uçlarının bir araya gelmesi ile şekillendiğinden, gal-3'ün biyolojik aktivasyonu için N-terminal ucun varlığı esansiyeldir. Gal-3'ün N-terminal ucu, *matriks metalloproteinaz-2* (MMP-2) ve

matriks metalloproteinaz-9 (MMP-9) tarafından proteoliz edilmeye duyarlıdır (Birdsall, 2001; Liu ve ark., 1995; Miller ve ark., 2009a; Sharma ve ark., 2004).

Gal-3, galektin ailesinin tek şimerik üyesidir ve bu proteinin C-terminal ucu iyi korunmuş bir NWGR (Asp-Trp-Gly-Arg) motifi içerir ki bu motif, galaktosidlere bağlanmak için esansiyeldir. Gal-3'de yer alan bu NWGR motifi, Bcl-2 ailesinde de bulunur. Her iki proteinin anti-apoptotik aktiviteleri için bu motifin varlığı gereklidir (Luckey ve Peterson, 2001; Kus ve ark., 2005).



Şekil 2.1. Gal-3'ün yapısı ve oluşturduğu pentamerik yapı. Şeklin kullanılma izni için ilgili yayın evinden (Springer) alınmıştır. Lisans numarası: 3557511027633.

Gal-3; hücre nükleusunda, stoplazmada, hücre yüzeyinde ve biyolojik sıvılarda bulunur. Prolifere olan hücrelerde, gal-3 ekspresyonunun arttığı ve özellikle de proliferatif hücrelerin nükleusuna lokalize olduğu görülmüştür. Gal-3, siklin D sentezini uyararak hücre proliferasyonuna neden olmaktadır. Sentezi, diğer proteinlerde de olduğu gibi ribozomlarda gerçekleşir. Gal-3, herhangi bir sinyal peptidi içermez ve hücre dışına ekzositoz yolu ile gönderilir. Gal-3, hücre dışına çıktığında, hücre yüzeyinde veya ekstraselüler matrikste yer alan glukokonjugatlara bağlanır (Cooper ve Barondes, 1990; Cooper ve ark., 1991; Cooper, 2002;

Hernandez ve Baum, 2002). Pentamerik yapısından dolayı hücre-hücre ve hücre ekstraselüler matris etkileşimlerinde etkin bir rol üstlenir. İntraselüler gal-3, splisozomların yapısına katılır ve pre-mRNA 'splicing'inde (uç-birleştirme) rol alır. Gal-3, embriyogenezde, hücrelerarası ve hücre stroma ilişkilerinde etkili olarak organogenezde de rol alır (Hsu ve Liu, 2004; Rabinovich, 2002). Gal-3, hücre yüzeyindeki multivalent karbonhidratlara (glikanlara) çapraz bağlanma özelliği ile bağlanır. Membran sinyalinin oluşturarak çeşitli hücrelerarası olayları başlatır (Hsu ve Liu, 2004; Rabinovich, 2002).

Tümör hücreleri, makrofajlar, epitelial hücreler, fibroblastlar ve aktive edilmiş T-hücreleri gibi çok farklı hücre çeşidinde, gal-3'ün varlığına rastlanmıştır (Jeng ve ark., 1994; Jin ve ark., 2007; Joza ve ark., 2001; Yan ve Katz, 2010). Son yıllarda yapılan çalışmalarda, galektinlerin immün hücrelerin homeostazında ve inflammasyonda anahtar rol oynadığı gösterilmiştir (Rabinovich, 2002). Gal-3'ün pro-inflammatuar bir protein olduğu ve T-hücre aracılı inflammasyonda rol aldığı ortaya konulmuştur. Akut koroner sendromların (miyokard enfarktüsü vs.), temelde akut inflammasyon zemininde oluşan trombüs formasyonu ile ortaya çıktığı bilinmektedir. Akut koroner sendromlarda, gal-3'ün artmış olduğu tespit edilmiştir. Dolayısıyla tüm bu bilgiler ışığında, pro-inflammatuar bir protein olan gal-3'ün miyokard enfarktüsü gibi akut koroner sendromların ortaya çıkmasında rol oynadığı görülmektedir. Akut koroner sendromlarda artan inflammasyon, prognozu kötü etkilediğinden dolayı artmış gal-3 miktarının prognoz ve hastalığın tanınmasında belirleyici olabileceği gösterilmiştir (Ozaki, 2004).

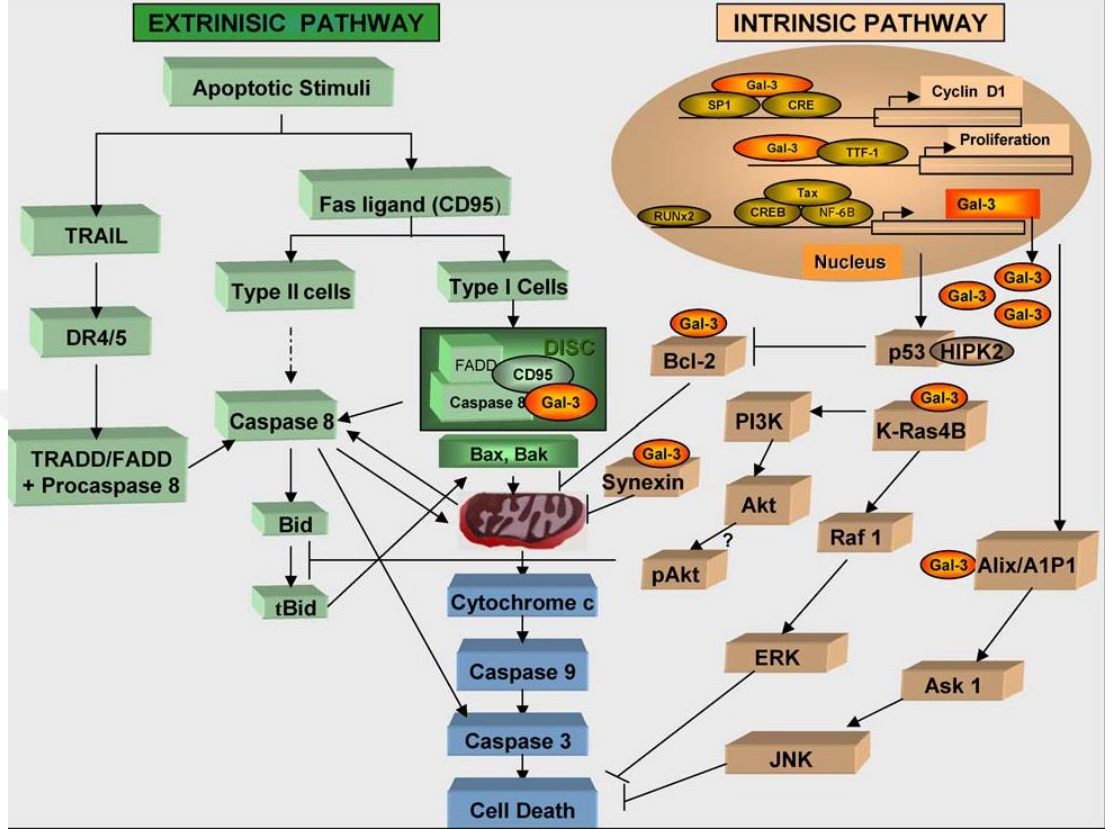
Gal-3'ün ayrıca bazı patojenik mikroorganizmaların yüzeyindeki glikanları bağlayarak immüneye neden olduğu ortaya konulmuştur (Ohshima ve ark., 2003). Örneğin; *Klebsiella*'daki lipopolisakkaridlere, C-terminal domain üzerinden bağlandığı gözlenmiştir. Gal-3'ün nötrofil aktivasyonu, adhezyonu, makrofaj ve monosit kemo-atraksiyonunda inflammatuar bir molekül olarak rol oynadığı bildirilmiştir. İmmün sistem hastalıkları olan kronik hepatit, glomerulonefrit, ülseratif kolit, romatoid artirit, psoriasis'te gal-3 ekspresyonunun sağlıklı dokular ile kıyaslandığında, istatistiksel olarak anlamlı olacak ölçüde arttığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Baum, 2003; Rabinovich, 1999; Santucci, 2000). Fizyolojik hücre ölümü olarak bilinen apoptozun (hücre intiharı, hücre

ayıklanması, programlanmış hücre ölümü) çeşitli enzimatik yolların aktivasyonu ile oluştuğu bilinmektedir. Gal-3, anti-apoptotik bir protein olan Bcl-2 proteini ile yapısal benzerlik göstermektedir (Gandhi, 2007; Juszczynski, 2007; Paclik, 2007; Santucci, 2003). Gal-3'ün de Bcl-2 ile sergilemiş olduğu bu yapısal benzerlik sayesinde, apoptotik yollar üzerinde etkili olduğu gösterilmiştir (Lacina ve ark., 2006; Offner, 1990). TNF-TNFR-Nfkb, Fass-Fadd-Prokaspaz, Granzyme-B-Prokaspaz gibi bir çok sinyal patikasının apoptozise gidişte rol oynadığı bilinmektedir (Hahn ve ark., 2004). Gal-3'ün bu sinyal patikalarını etkilediği ve böylece apoptozun seyri üzerinde rol aldığı bildirilmiştir (Garin, 2007; Hahn ve ark., 2004; Matarrese, 2005; Stowell, 2007; Yang ve ark., 1996).

Gal-3'ün intra ya da ekstrasellüler lokalizasyonuna göre, apoptozis üzerindeki etkisi de farklılıklar sergiler. İntrasellüler gal-3'ün anti-fas antikor, staurosporine, TNF radyasyon ve nitrik oksit gibi ajanlar tarafından stimüle edilen apoptozun, karbonhidrat bağımsız mekanizma ile inhibe ettiği bildirilmiştir (Matarrese, 2005). Stoplazmik veya nükleer yerleşim gösteren gal-3 moleküllerinin, hücreye bir apoptotik uyarının gelmesinin ardından, hücreleri apoptozisten korumak için mitokondrilere doğru bir yönelme gösterdikleri saptanmıştır. İntrasellüler gal-3'ün, Bcl-2'de de olduğu gibi Bax-proteini ile oligomerize olarak Bax proteinlerinin bir araya gelmesini engellediği tespit edilmiştir. Gal-3 tarafından bağlandığından dolayı bir araya toplanamayan Bax-proteinleri, mitokondrial membran geçirgenliğini değiştiremediklerinden, apoptotik yolun bu noktada kapatıldığı görülmüştür. Gal-3'ün, Bax-proteinleri ile etkileşime geçebilmeleri için NWGR motifinin esansiyel olduğu bildirilmiştir (Garin, 2007; Matarrese, 2005; Stowell, 2007; Yang ve ark., 1996).

Ekstrasellüler gal-3 ise intrasellüler gal-3'ün aksine, apoptozun uyarmaktadır. Ekstrasellüler gal-3'ün pro-apoptotik etkisini gösterebilmesi için laktoz amin içeren hücre yüzeyindeki glikokonjugatlara, C-terminal ucu üzerinden bağlanması gerekmektedir (Garin, 2007; Matarrese, 2005; Stowell, 2007; Yang ve ark., 1996). Özellikle, hücre membranının ekstrasellüler matrikse bakan kısmında lokalize olan CD-95 ile ekstrasellüler gal-3'ün etkileşim içine girdikleri ve apoptozun uyarılmasında bu etkileşimin rol oynadığı bildirilmiştir. Gal-3'ün ister ekstrasellüler, isterse intrasellüler olsun, apoptozun şekillenmesinde etkili olduğu bilinen bir

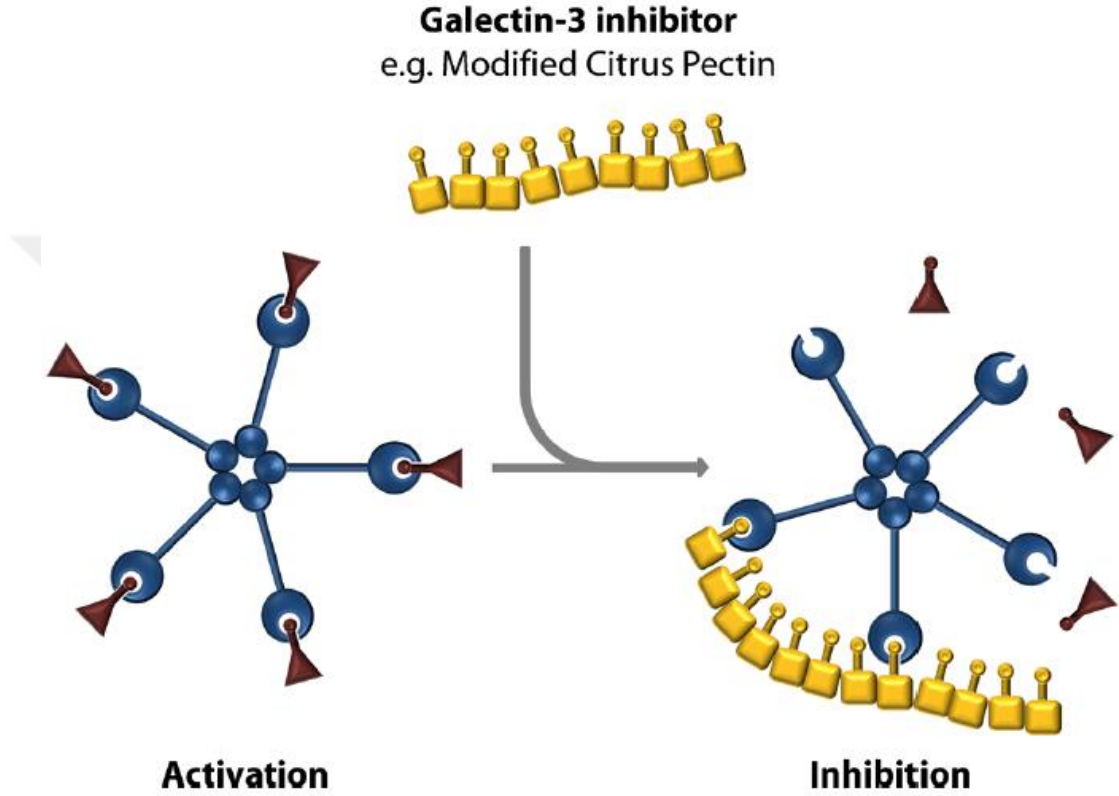
gerçek olmakla birlikte, bu proteinin apoptoz üzerindeki etki mekanizmaları hala tam olarak açığa çıkartılabilmemiş değildir. Bu konuda, günümüzde de çok sayıda bilim insanı çalışmalarına devam etmektedir (Barrionuevo, 2007; Sturm, 2004).



Şekil 2.2. Gal-3'ün apoptozis yolları üzerindeki rolü. Apoptozis sinyali geldiğinde, ister stoplazmik olsun, isterse nükleusta lokalize olan gal-3 olsun, intrasellüler gal-3'ün mitokondrilere yöndikleri görülmektedir. Şeklin kullanılma izni için ilgili yayınevinden (Springer) alınmıştır. Lisans numarası: 3581230368246.

Kanser hücrelerinin yüzeyindeki gal-3 ekspresyonunun arttığı tespit edilmiştir (Jackson ve ark., 2007; Johnson ve ark., 2007; Jung, 2007). Gal-3, kendisi için spesifik olan karbonhidrat ünitelerine (N-asetil laktozamin ve laktoz) bağlanabildiğinden dolayı kanserli hücrelerin çevre dokulara tutunmasını sağlayan protein gibi davranır. Dolaşım sisteminde bulunan metastatik hücreler, yüzeylerinde ekspresyonu uyarılmış olan gal-3 aracılığıyla, hedef dokulardaki spesifik karbonhidrat ünitelerine bağlanarak ilgili dokuya tutunabilirler (Jackson ve ark., 2007; Johnson ve ark., 2007; Jung, 2007). Yapılan çalışmalar, Gal-3'ün prometastatik bir molekül olduğunu ortaya koymuştur. gal-3'ün karbonhidratlara bağlanan

kısımlarını önceden kapatarak metastazın önüne geçmek için çalışmalar yapılmıştır. Modifiye turunçgil pektini (MCP), narenciye kabuğundan elde edilen pektinin, enzimatik olarak modifiye edilmiş şeklidir. Normal pektin, gastrointestinal sistemden absorbe olmaz fakat MCP absorbe olur. MCP'nin çeşitli çalışmalarda, kanser hastalarında gal-3'ün karbonhidrat domainine bağlanarak fazla gal-3'ü bloke ettiği gösterilmiştir (Johnson ve ark., 2007; Jung, 2007). (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Kanserli hücrelerde bulunan gal-3'ün karbonhidrat bağlayan kısımları modifiye sitrus pektini ile doyurulduğunda dokulardaki spesifik karbonhidratlara bağlanamadığı ve metastaz yapamadığı görülmüştür. Şeklin kullanıma izni için ilgili yayınevinden (Springer) alınmıştır. Lisans numarası: 3557511027633.

Gal-3 ekspresyonundaki artışın, tümör dokularının hepsi için geçerli olmadığı görülmüştür. Örneğin; tiroid, karaciğer, mide, dil kanserlerinde gal-3'ü determine eden genin transkripsiyonunun uyarıldığı ancak ovaryum, uterus ve meme kanserlerinde ise bu proteini kodlayan genin transkripsiyonunun azaldığı görülmüştür. Kolon kanserlerinde ise bazı vakalarda artmış, bazı çalışmalarda düşmüştür. İntrahepatik kolanjiyokarsinomda, hastalığın erken evresinde

ekspresyonu artmış, geç evresinde ise azalmıştır. Diğer yandan, bazı çalışmalarda da gal-3'ün anjiyogenezi uyardığı dolayısıyla kanserin beslenmesine, büyümesine ve yayılmasına aracılık ettiği ortaya konulmuştur. Bütün bu çalışmalar, gal-3'ün fizyolojik ve biyokimyasal fonksiyonları ile tümör hücrelerindeki patolojik rolünün ne kadar karmaşık olduğunu ortaya koymaktadır (Jackson ve ark., 2007; Johnson ve ark., 2007; Jung, 2007). Makrofajların stimülasyonu sonucu, bu hücrelerde gal-3 sentezi uyarılır ve sentezlenen gal-3, makrofajlardan dışarıya salgılanmaya başlar. Makrofojlarca salgılanan gal-3'ün de miyofibroblast aktivasyonunu arttırdığı görülmüştür (Henderson ve ark., 2006; Kang ve ark., 2009). Gal-3 tarafından uyarılan miyofibroblast aktivasyonunun da fibrozise neden olabildiği belirlenmiştir. Özellikle kalp, akciğer, karaciğer, böbrek ve deride makrofaj kaynaklı gal-3'ün miyofibroblast aktivasyonuna, dolayısıyla da fibrozise neden olabildiği ortaya konulmuştur. Gal-3'ün fibrozis ve risk biyomarkeri olarak kullanılabileceği bildirilmiştir. Özellikle kalp yetmezliklerinde, miyokard içinde fibrozis oluşmaktadır. Fibrozis, ne kadar fazla ise kalp yetmezliğinin de o oranda ileri olduğu ve bunun da prognoz açısından kötü olduğu bilinmektedir (Sharma ve ark., 2004). Gal-3, kalp yetmezliğinde miyokard içinde oluşan fibrozisin göstergesidir. Artmış gal-3 düzeyi, kötü prognoz ile pozitif korelasyon göstermektedir (>17 ng/ml = artmış mortalite, hospitalizasyon göstergesi) (Huang ve ark., 2009; Shimizu ve ark., 2009).

Hem insan, hem de hayvanlarda fibrotik karaciğer varlığında, gal-3 ekspresyonunun da istatistiksel olarak artmış olduğu görülmüştür. Yapılan çalışmalar, farelerde karaciğer fibrozisinin gelişimi için gal-3 ekspresyonunun varlığının gerekli olduğunu ortaya koymuştur. Gal-3'ü kodlayan genin noksanlığında, karaciğer toksinlerine maruz kalan farelerde, karaciğerde bariz bir yağlanmanın varlığına karşın, fibrozis şekillenmediği gözlemlenmiştir. İnsanlarda da karaciğer gal-3 inhibitörleri ile gal-3 bloke edildiğinde, fibrozisin engellendiği bildirilmiştir (Huang ve ark., 2009; Sharma ve ark., 2004; Shimizu ve ark., 2009).

Gal-3'ün kornea epitelyum hücrelerinin migrasyonunu uyardığı bildirilmiştir. Kornea epitel hücrelerinin migrasyonunun uyarılmasında, gal-3'ün, integrinin yapısında bulunan N-glikanlara bağlandığı görülmüştür. Bu bağlanmanın, hücre migrasyonunun uyarılmasında kilit rol oynadığı düşünülmektedir. Ayrıca gal-3'ün kornea epitel membranındaki müsin ile etkileşime girerek koruyucu bir bariyer olan

'lattik'i oluşturduğu görülmüştür. Yapılan çalışmalar, non-oküler dokularda da monosit, makrofaj, mast hücresi ve dendritik hücrelerde, gal-3 eksprese edilerek benzer etkiler oluşturulduğunu göstermiştir (Cooper ve Barondes, 1990). Ayrıca gal-3, çeşitli patofizyolojik süreçlerde farklı davranmaktadır. Bazı kanser tiplerinde artarken, bazılarında da azalmaktadır (Jackson ve ark., 2007; Johnson ve ark., 2007; Jung, 2007). Gal-3, birçok patofizyolojik yolun kesişim yerinde rol alan bir monekül olduğundan, patofizyolojik süreci uyaran etkenler, patofizyolojik sürecin gerçekleştiği organ, canlı türü, patofizyolojik süreç sonunda oluşan hasarlanma tipi ve hastalık tipi gal-3'ün davranışını belirlemektedir. Bu durumlar, bazen bu patofizyolojik süreci artırırken, bazen de azaltabilmektedir. Gal-3, kornea yaralanmalarında epitelizasyonu artırarak yara iyileşmesi sağlarken, Gal-3 inhibitörlerinin kullanımı, fare karaciğerinde fibrozisi ve siroz gelişimini azaltır (Inohara ve Raz, 1994; Nangia-Makker ve ark., 2002; Pienta ve ark., 1995; Yan ve Katz, 2010).

Tümör hücrelerinin metabolizması, sağlıklı hücrelere göre çok daha hızlı olduğundan, enerji ihtiyaçları da daha yüksektir. Bundan dolayı besin maddelerinin ve oksijenin bu hücrelere ulaştırılabilmesi için yeni kan damarlarına ihtiyaç duyulmaktadır. Tümörlü dokularda vaskülarizasyonun uyarılabilmesi amacıyla anjiyogenik faktörlere gereksinim vardır. Anjiyogenik faktörler ise ya bizzat tümör hücreleri tarafından ya da inflammatuvar hücreler tarafından salgılanır. Anjiyogenik faktörlerden fibroblast büyüme faktörü-1 (FGF-1), endotel hücreleri için hem kemotaktik, hem de mitojeniktir (He ve Baum, 2006; Offner, 1990; Puche ve Key, 1995). Proteolitik enzimlerin aktivitesi, anjiyogenez için esansiyeldir ve FGF-1'in de bu enzimlerin sentezini uyardığı bildirilmiştir. Yine anjiyogenez için endotel hücrelerinin perisitler ile etkileşime geçmeleri gerekmektedir. Endotel hücreleri ile perisitlerin etkileşiminde, vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ile birlikte beta-fibroblast büyüme faktörünün de (b-FGF) de rol oynadığı bilinmektedir. Gal-3, her iki büyüme faktörü üzerine etki ederek anjiyogenezi stimüle eder. Nöral/glial antijen-2 (NG-2), proteoglikan yapılı bir transmembran proteini olup çok sayıda hücre tipinde eksprese edilir. Hücre adhezyonu, hücre göçü ve hücre-hücre etkileşimlerinde rolü olduğu düşünülmektedir. Perisitlerde bulunan NG-2, endotel motilitesini sağlar ve bu biyolojik fonksiyonunu yerine getirebilmesi için de gal-3'e bağlanması gerekmektedir (Chan, 2006; Georgiadis, 2007; Inagaki, 2000).

Adiponektin, Gal-3'ü kodlayan genden, mRNA transkripsiyonunu engellediği için dokularda gal-3 ekspresyonunu da azaltmaktadır. Adiponektin sentezi ile gal-3 düzeyi arasında, negatif korelasyonun varlığına rastlanmıştır. Hatta adiponektin sentezinin az olduğu dokularda, gal-3 miktarının arttığı görülmüştür. Gal-3 düzeyi ile arteriyosklerozis arasında pozitif bir korelasyonun varlığı belirlenmiştir. Yapılan çalışmalar, adiponektin azlığından kaynaklanan gal-3 fazlalığı ile arteriyoskleroz arasında bir ilişkinin varlığını ortaya koymuştur. Özellikle de arteriyosklerotik plaklarda bulunan monositlerin diğer monositlere göre daha fazla miktarda gal-3 eksprese ettikleri belirlenmiştir (Ozaki, 2004; Shimizu ve ark., 2009). Son zamanlarda, Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA), özellikle konjestif kalp yetmezliğinde, kan serum gal-3 seviyesini ölçmek için serum gal-3 testini kabul etmiştir. Kan serum gal-3 seviyeleri, bu hastalıklarda marker ve prognoz belirleyici olarak kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalar sonucunda, arterioskleroz tanı ve prognozunun belirlenmesinde gal-3'ün de diyagnostik marker olarak kullanılabilceği düşünülmektedir (Miller ve ark., 2009a; Miller ve ark., 2009b).

Hastalıkların tedavisinde kullanım amacı ile çeşitli moleküller geliştirilmiş ve geliştirilmeye de devam edilmektedir. Özellikle çağımızda, en önemli ölüm nedenlerinden biri olan kanser hastalığının tedavisine yönelik geliştirilen ilaçlar, ayrı bir önem arz etmektedir. Bilindiği gibi sitokinler, özellikle immun sistem hücreleri tarafından salgılanan ve çok sayıda biyokimyasal ve fizyolojik rolü bulunan moleküllerdir. Sitokinlerin salgılandığı hücrelerden biri de T-lenfositlerdir. T-lenfositlere yüzeyindeki galaktozidler aracılığıyla gal-3 bağlandığında, bu hücrelerin sitokin salgılanması engellenmektedir. Bir baklagil olan *Cyamopsis tetragonoloba* veya guar adıyla bilinen bir çeşit fasülyeden elde edilen sakız, yapısında bol miktarda 1,4-β-D-galaktomannan ünitesi içermektedir ve Galaktomannan-*Cyamopsis tetragonoloba* (GM-CT-01) adıyla anılmaktadır. GM-CT-01'nin yapısındaki karbonhidrat üniteleri, gal-3'ü bağlamaktadır. Davanat® adıyla piyasaya sürülen bu ürün kullanılarak yapılan çalışmalarda, farklı kemoterapötikler ile kombine edilmiş ve çalışmaların sonucunda başarının %50 oranında gal-3 miktarının arttığı görülmüştür. Davanat®'in yapısındaki karbonhidrat üniteleri, gal-3'ün T-lenfositlerine bağlanmasını engelleyerek etkili olduğu bildirilmiştir (Miller ve ark., 2009c; Nangia-Makker ve ark., 2002; Sathisha ve ark., 2007).

Gal-3'ün dışarıdan verilmesi; iyileşmeyen epitel defektleri, kuru göz ve retinopatide kullanılabileceğini göstermiştir. Deneysel çalışmalarda, gal-3 inhibitörlerinin karaciğer fibrozisini engellediği, klinik ve histopatolojik olarak da gösterilmiştir (Inohara ve Raz, 1994; Pienta ve ark., 1995; Yan ve Katz, 2010). Multifonksiyonel bir protein olan gal-3'ün üzerine yapılacak olan yeni çalışmaların bu proteinin biyolojik rollerinin aydınlatılmasına katkıda bulunacağı bir gerçektir. Çok sayıda fizyolojik ve patolojik olayda etkin bir rol üstlenen bu protein, üzerine yeni çalışmaların yapılmasını fazlasıyla hak etmektedir ve göz ardı edilmemesi gereken bir moleküldür.

2.2. Apoptozis

Apoptoz terimi, ilk olarak 1972 yılında, Kerr ve arkadaşları tarafından, nekrozda görülen hücre ölümünden farklı olarak gerçekleşen ayrı bir hücre ölümü şekli için tanımlanmış bir ifade olup, fizyolojik hücre ölümünü tanımlamaktadır (Kerr ve ark., 1972; Searle ve ark., 1982). Apoptoz eski bir Yunan terimi olup, kelime anlamı tam olarak 'petallerin çiçekten, yaprakların ağaçtan doğal bir yol ile düşmesi' anlamına gelmektedir. Bugün de bu terim, aynı şekilde kullanılmakta ve fizyolojik nedenlerden kaynaklanan hücre ölümünü tanımlamaktadır. Diğer bir ifade ile apoptozis, hücrelerin dış ortamdan kaynaklanan çeşitli travmatik lezyonlar ya da hücre içi mekanizmalar ile harekete genetik faktörlerle aktive edilen ve hücrenin bizzat kendisi tarafından programı yapılmış bir mekanizma üzerinden hücre ölümünü kontrol eden aktif bir işlem olup 'hücrenin intiharı' olarak tanımlanabilir. Hormonal olarak aktif çeşitli maddeler, iyonize radyasyon ve kemoterapiyi içeren travmatik ajanlar vasıtasıyla gerçekleşen hücre ölümünün ya da genetik faktörler ile aktive edilen hücre ölümünün, apoptozis, hücrelerin sağlıklı yaşamları sırasında bazı hücre tiplerinin ortadan kaldırılmasından sorumludur (Thompson, 1994).

Dokularda apoptoz oranının azalması ile hücre sayısı artarken eğer apoptoz oranı artarsa, hücre sayısı azalır ve istenmeyen doku tahribatı meydana gelebilmektedir. Yapılan çalışmalar, apoptozun memelilerin yaşamında bir denge unsuru olduğunu ortaya koymuştur. Erişkin bir bireyde, her saniye, 1 milyon üzerinde hücre, apoptozis yolu ile uzaklaştırılırken bu sayı, günlük olarak yaklaşık

6×10^{10} hücreye karşılık gelmektedir. Apoptoza uğrayan bu hücrelerin yerine, yine aynı sayıda hücre, mitoz yolu ile yerine konulmaktadır. Yapılan hesaplar, 18-24 ayda bir, bir insan vücudunun kendi ağırlığınca hücrenin, apoptozis yolu ile vücuttan uzaklaştırıldığını ve yerine yenilerinin konulduğunu ortaya koymuştur. Birçok fizyolojik ve biyokimyasal olayda, apoptozun varlığı esansiyel öneme sahiptir. Embriyonal hayatın sağlıklı bir şekilde devam ettirilebilmesinden, erişkin bireylerin sağlıklı bir yaşam sürebilmelerine kadar, her alanda apoptozun gerekliliği ortaya konulmuştur (Schwartzman ve Cidlowski, 1993). Embriyonal hayatta, parmaklar arasında bulunan perdelerin apoptozis yolu ile uzaklaştırıldığı görülmüştür. Mitoz ile apoptozun dengesinin bozulması sonucu, çok sayıda hastalık karşımıza çıkmaktadır (Ballian ve ark., 2007). Çok hücreli canlıların yanı sıra tek hücreli ökaryotik organizmalarda da apoptozun varlığı ortaya konulmuştur (Lumachi ve Basso, 2002).

İnsan vücudunda, her gün binlerce mutasyonun ortaya çıktığı bilinmektedir. Hücrelerin DNA'larında ortaya çıkan bu mutasyonlar, hücrelerde bulunan tamir mekanizmaları ile onarılmaktadır. Çeşitli nedenlerle mutasyonların tamirinin yapılamadığı durumlarda, mutasyona uğrayan patolojik hücrelerin çoğalıp yayılmasını engellemek amacıyla apoptozis mekanizmaları devreye girer ve hücreler, fizyolojik yollardan intihara süreklenir. Bilindiği gibi, kanser hücrelerinde de hücre siklusu bozulmuş ve bu hücreler, çok hızlı bir şekilde çoğaldıklarından diğer hücreler için tehdit oluşturmaktadırlar. Mutasyona uğrayan tümör hücrelerinin kansere dönüşüp bütün vücut açısından tehlike oluşturmaması için bu hücreler, apoptozis yolu ile diğer hücrelerin yararına olacak şekilde kendilerini feda etmektedirler (Evan ve Littlewood, 1998). Hücreler, apoptoza sürüklenmeden önce hücrelerde replikasyon durdurulur. Bunun nedeni, hücrelerin DNA'larında oluşan hasarı düzeltmeleri ve yavru hücrelere aktarmalarının önüne geçmektir. DNA tamiri yapılamazsa da apoptozis mekanizmaları devreye girer.

Apoptoz, bir yandan erişkin bireylerin vücudunun bütünündeki hücre sayısının sabit tutulmasını sağlarken, diğer yandan immun sistem hücrelerinin faaliyetleri üzerinde de etkilidir (Evan ve Littlewood, 1998). İmmun sistemin uyarılması sonucu artmış olan lenfosit sayısı, savunma mekanizmalarına olan ihtiyacın azalması durumunda apoptozis yolu ile azaltılmaktadır (Toubi ve Shoenfeld, 2007). Apoptozun görülme sıklığı, dokulara ve dokulardaki hücrelerin

tiplerine göre farklılık göstermektedir. Mitoz bölünmenin çok görüldüğü bağırsak ve deri epitelinde apoptoza çok rastlanırken, karaciğer hücrelerinde ise mitoz ile orantılı bir şekilde apoptozis de az görülmektedir (Toubi ve Shoenfeld, 2007).

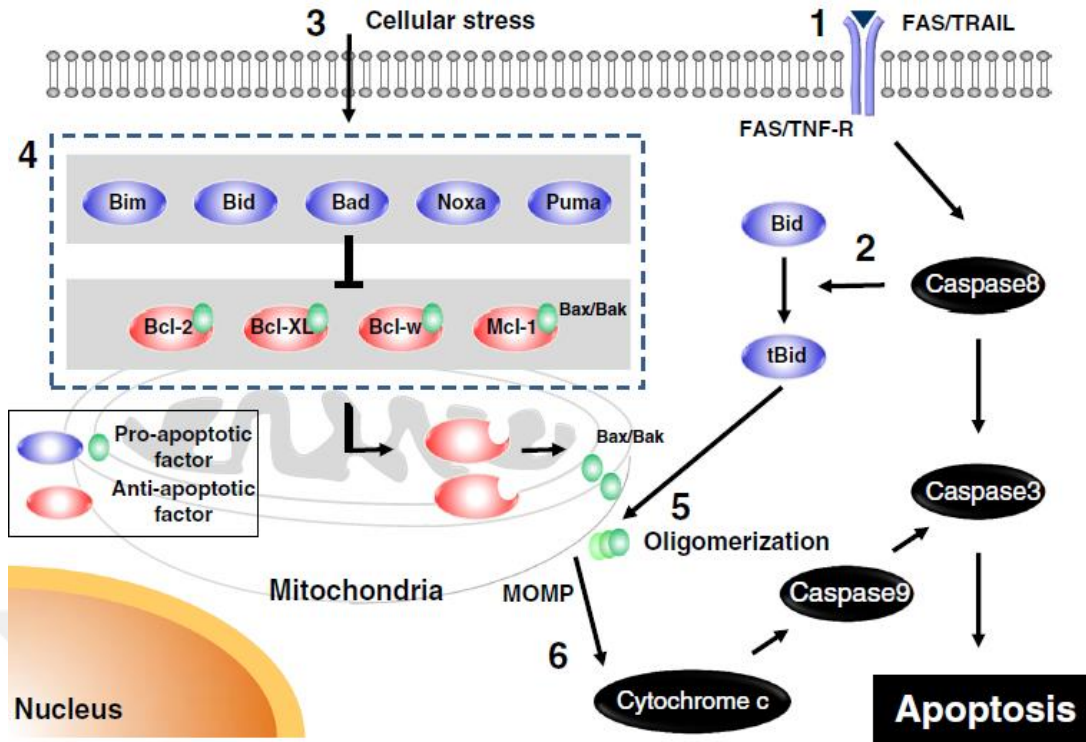
Mitoz - apoptoz dengesinin apoptoz yönünde kaydığı durumlarda, Alzheimer ve Parkinson gibi dejeneratif hastalıklar ile ülseratif kolit, AIDS ve bazı spesifik immunolojik hastalıkların da ortaya çıkabileceği bildirilmiştir (Mountz ve ark., 1996; Saikumar ve ark., 1999). Yapılan çalışmalar, apoptozun hızlı bir olay olduğunu göstermiştir. Mitoz ile karşılaştırıldığında, apoptozun yaklaşık 20 kat daha hızlı olduğu görülmüştür. Apoptozun varlığının hücrelerde çok geç fark edilmesinin nedenlerinden birinin, immun reaksiyon oluşturmaksızın apoptotik hücrelerin fagosite ediliyor olması iken, diğerinin ise apoptotik sürecin çok hızlı olmasından kaynaklandığı ifade edilmektedir (Marshall ve ark., 2007; Mountz ve ark., 1996).

Apoptotik uyarıyı alan hücrelerde, birtakım morfolojik ve biyokimyasal değişimler gözlemlenir. Öncelikle hücreler, çevrelerindeki hücreler ile olan etkileşimlerini azaltırken, bağdoku ile olan irtibatlarını zayıflatırlar. Apoptotik hücrelerin kendilerini çevrelerinden izole etmelerinin sonucu olarak da bu hücreler daha yuvarlak bir hal alır. Nükleus membranına yakın bölgelerde kromatin kondenzasyonu görülür, hücre membranında çıkıntılar meydana gelir ve apoptotik cisimcikler oluşur. Bütün bu olaylar sırasında, hücre stoplazması çevreye akmaz ve membran içinde kalır (Walker ve ark., 1988; Wyllie, 1980a). Apoptozun gerçekleşmesi sırasında oluşan DNA çözülmesi, apoptozun mekanizma ve seviyeleriyle ilgili çalışmalarda önemlidir (Ruaslathi ve Reed, 1994; Steller, 1995). Apoptoz mekanizmasının aktive edilmesini takip eden yaklaşık 1 saatlik bir süre sonunda, DNA kırılmaları görülmeye başlar (Tilly, 1992; Wyllie, 1980b). DNA kırılmaları başladıktan sonra da apoptozisten geri dönüş söz konusu değildir (Schwartzman ve Cidlowski, 1993).

2.2.1. Bcl-2 Ailesi

Bcl-2 (B-cell lenfoma-2) ailesi, apoptozun regülasyonunda anahtar rolü olan bir protein grubudur. Anti-apoptotik (Bcl-2, Bc-XL, Bcl-w ve Mcl-1) ve pro-apoptotik (Bim, Bid, Bad, Noxa ve Puma) üyeleri bulunan geniş bir protein ailesidir. Anti-apoptotik proteinler, apoptozun önleyici etkilerini, pro-apoptotik proteinleri inhibe ederek gösterirler. Bcl-2 ve Bcl-XL gibi anti-apoptotik proteinler, stokrom-c'nin serbest kalarak mitokondriden stoplazmaya geçişini engellerken (Tsujimoto, 1998), Bax ya da Bak gibi pro-apototik üyeler ise oligomerizasyon yoluyla mitokondri membranında porlar oluşturur ve stokrom-c'nin bu porlar aracılığıyla mitokondrilerden stoplazmaya geçişine aracılık ederler (Taneja ve ark., 2001; Tsujimoto, 1998). Mitokondrilerden stoplazmaya stokrom-c geçişi, apoptozun geri dönüşümü olmayan bir yola girdiğini göstermektedir. Stokrom-c'nin sitoplazmaya geçişi, apoptozis indükleyici faktör (AIF) eşliğinde olur. Hücrelerdeki pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinlerin arasındaki denge, o hücrelerin yaşam ve ölüm arasındaki seçeneğini belirler (Fisher, 1994; Joza ve ark., 2001).

Bcl-2 geninin varlığı, ilk olarak B hücreli foliküler lenfomada tanımlanmıştır. Yapılan çalışmalar, Bcl-2'nin ekspresyonunun arttığı hücrelerin yaşam sürelerinin uzadığını ve bu durumun da maligniteye zemin hazırladığını ortaya koymuştur. Bcl-2 proteini, mitokondri dış membranında lokalize olmakta ve sitoplazmadan mitokondri içine veya mitokondrilerden sitoplazmaya iyon geçişine aracılık etmektedir. Serbest oksijen reaktiflerinin, mitokondri membranlarında neden olduğu hasarı azalttığı ortaya konulmuş ve bu özelliğinden dolayı da anti-oksidan bir protein olarak da tanımlanmıştır (Tsujimoto, 1998).



Şekil 2.4. Apoptozun meydana gelmesinde Bcl-2 protein ailesi, kilit bir role sahiptir. Bcl-2 ailesinin pro-apoptotik üyeleri (Bim, Bid, Bad, Noxa ve Puma), yine Bcl-2 ailesinin anti-apoptotik üyelerine bağlandığında, anti-apoptotik üyelerin Bax ve Bak üzerindeki inhibe edici etkisi ortadan kalkınca, hücrelerin ölüme sürüklenmesinin önü açılmış olur. Şeklin kullanıma izni, ilgi yayınevinden (Springer) alınmıştır. Lisans numarası: 3558150736751.

2.2.2. Kaspaz Protein Ailesi

Kaspazlar, aktif merkezlerinde sistein yer aldığı için ‘*sistein proteazlar*’ olarak da bilinen (cysteinyll aspartate - *specific proteinases*), hücrelerin stoplazmalarında inaktif formda (zimojen) bulunan bir enzim grubudur. Bugüne kadar, 14 *kaspaz* varlığı saptanmış ve hemen hemen hepsinin de apoptoziste rolünün bulunduğu ortaya konulmuştur. *Kaspazların* en önemli özelliklerinden biri, birbirlerini aktive edebilmeleridir. *Kaspazların* bir kısmı (*kaspaz 2, 8, 9, 10*) ‘*başlatıcı kaspazlar*’ olarak bilinirken, bir kısmı ise (*kaspaz 3, 6, 7*) ‘*efektör kaspazlar*’ olarak tanımlanırlar. Ölüm sinyallerinin neden olduğu apoptotik uyarı kaspazlara ulaştığında, bu enzimler, aldıkları sinyali efektör kaspazlara naklederler. Efektör kaspazlar ise hücre iskeleti proteinleri, nükleer membran proteini laminin A,

poli ADP - riboz polimeraz (PARP) gibi proteinleri proteolize ederek apoptotik hücre morfolojisinin oluşmasına neden olurlar (Leach, 1998; Saikumar ve ark., 1999).

2.2.3. Apoptozun Uyarılması

Apoptotik sürecin başlaması, çok farklı nedenlerden kaynaklanabilmektedir. Apoptozis, apoptotik hücrelerin genlerinde önceden planlanmış bazı gen dizilerinin ekspresyonunun başlaması ile uyarılabileceği gibi, hücre dışından gelen bazı sinyaller ile de başlatılabilmektedir. Hücre dışı uyaranlar arasında; Tümör Nekroz Faktör- α (TNF- α), glukokortikoidler, radyasyon, ilaçlar, çeşitli antijenler, virüsler (influenza virüsü gibi) olabileceği gibi, İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü (ILGF), İnterlökin-2 (IL-2) gibi faktörler ve Nöron Büyüme Faktörü (NGF) gibi bazı moleküllerin yetersizlikleri de olabilmektedir. Apoptozun uyaran mekanizmalar, hücre dışından gelen bir uyarı ile harekete geçiriliyorsa, bu yol apoptozun 'ekstrinsik yolu' eğer apoptotik mekanizmalar hücrenin kendi içindeki diğer bazı mekanizmalar ile tetikleniyorsa, buna da apoptozisin 'intrinsik yolu' adı verilmektedir (Leach, 1998; Shi, 2001).

2.2.3.1. Ekstrinsik Yol ile Apoptozun Uyarılması

Ekstrinsik yollar ile apoptozun uyarılması için öncelikle ligandların (FasL/CD95L, TNF- α , APO3L, APO2L/TRAIL) reseptörlerine (Fas/APO-1/CD95, TNFR1, DR-3/APO-3/SWL-1/TRAMP, DR-4/TRAIL-R1, DR-5/TRAIL-R2/KILLER) bağlanması gerekmektedir. FAS reseptörü (APO-1/CD95), trimerik bir moleküldür. FAS ligandı (FasL) reseptörüne bağlanınca, reseptörün 3 alt ünitesi bir araya toplanır ve reseptörün stoplazmik kısmına FADD (Ölüm Alanlı Fas İlintili Protein, Fas-Associated Death Domain) proteini bağlanır. FADD, bir ucuyla FAS reseptörüne bağlanırken, diğer ucuna prokaspaz-8 toplanır. Fas reseptörü, FasL, FADD proteini ve prokaspaz-8'in meydana getirdikleri bu yeni komplekse 'ölüm uyarıcı sinyal kompleksi (DISC, Death Inducing Signal Complex)' adı verilir. FADD proteinine bağlanan prokaspaz-8, aktive olarak kaspaz-8'e dönüşür. Aktive olan kaspaz-8, ya kaspaz-3'ü aktive ederek veya Bid (BH3 İnteracting-Domain Death Agonist, BH3 Etkileşim Bölgesi Ölüm Agonisti) proteinini keserek 2 farklı yol ile hücreleri apoptozise sürükleyebilmektedir. Birinci yolda; aktif kaspaz-8, kaspaz-3'ü

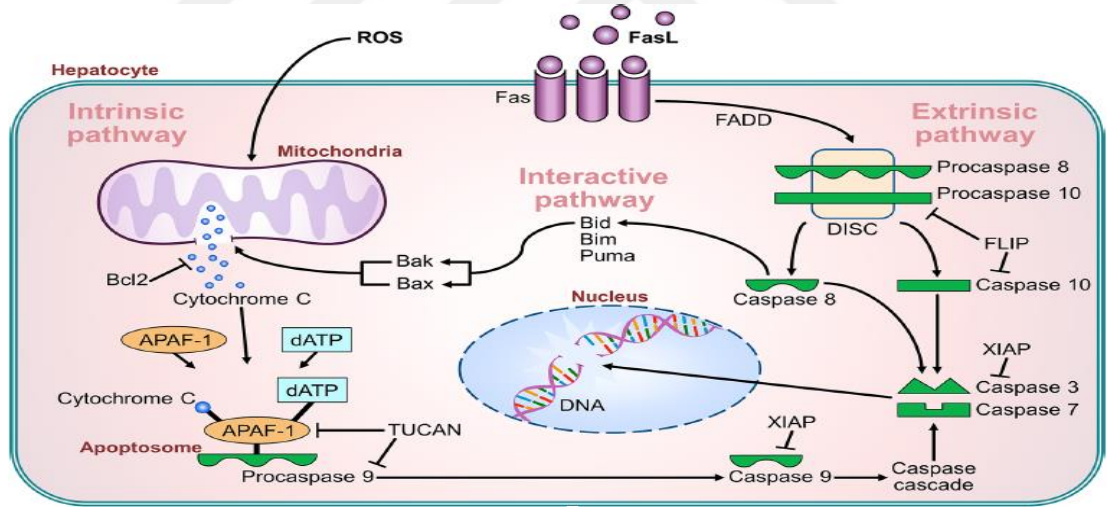
aktive eder. Kaspaz-3 ise çok sayıda hücre iskeleti proteini ile ICAD'ı (Kaspazlarca aktive edilen DNAz inhibitörü, (Inhibitor of Caspase Activated *DNAse*) parçalar. ICAD, kaspaz-3 tarafından parçalanınca, bu enzimin CAD (Kaspazlarca Aktive Edilen DNAz, Caspase Activated DNA) üzerindeki inhibe edici etkisi ortadan kalkar. CAD ise DNA'yı 180 - 200 bp inter-nükleozomal parçalara ayırır ve hücre apoptozise sürüklenir. Aktive olan kaspaz-8, enzimatik aktivitesi ile BH3-only/Bcl-2 ailesinin bir üyesi ve pro-apoptotik bir protein olan Bid proteinini ikiye böler. İkiye bölünen Bid, tBid (kesilmiş, kısaltılmış Bid, truncated Bid) olarak isimlendirilir. tBid ise mitokondri membranında Bcl-2'yi inhibe ederek, Bcl-2'nin Bax üzerindeki inhibe edici etkisini ortadan kaldırır. Bcl-2 tarafından inhibe edildiğinden dolayı bir araya toplanamayan Bax proteinleri, Bcl-2'nin tBid tarafından inhibe edilmesi sonucu, artık Bcl-2 tarafından inhibisyona maruz kalmaz ve oligomerize Bax proteinlerinin oligomerizasyonu, mitokondri membranında stokrom-c'nin geçişine olanak sağlayan porları meydana getirir. Stokrom-c, oluşan bu porlar aracılığıyla mitokondrilerden stoplazmaya geçer. Stoplazmaya geçen stokrom-c molekülleri, önce Apaf-1 (Apoptotik peptidaz / Proteaz Aktive Edici Faktör-1) ile birleşir. Apaf-1 ve stokrom-c'nin bir araya geldiği yapıya prokaspaz-9 bağlanır ve bu bağlanmanın sonucunda oluşan komplekse 'apoptozom' (Stokrom c, Apaf-1 ve prokaspaz-9) Kompleksi adı verilir. Apoptozomun yapısında, prokaspaz-9 aktive olur ve aktif kaspaz-9 adını alır. Aktif kaspaz-9 ise kaspaz-3'ü aktive eder ve apoptotik yol, yine kaspaz-3 üzerinden ilerler (Cotran ve ark., 2002; Leach, 1998; Shi, 2001).

2.2.3.2. İntrensik Yol ile Apoptozun Uyarılması

Apoptozun uyarılması için uyarının mutlaka hücre dışından olması gerekmemektedir. Tamir edilemeyen hücre hasarının varlığı, hipoksi, deterjanlar, sitotoksik ilaçlar, yüksek stoplazmik Ca^{2+} düzeyi ve oksidatif stresin artmış olması, intrinsik yollar ile de apoptozis mekanizmalarını uyarabilmektedir. İntrensik yollar ile apoptozun indüklenmesinde uyarının DNA hasarı mı, hipoksi mi, Ca^{2+} düzeylerindeki artış mı, yoksa hücre içi stresin artmış olmasından mı kaynaklandığına bakılmaksızın hepsinde ortak nokta; mitokondri membran geçirgenliğinin artması sonucu, mitokondrilerden stoplazmaya stokrom-c, Smac/DIABLO (Sekonder Mitokondri Kaynaklı Kaspaz Aktivatörü / Kaspaz Bağlayan Proteinin Direkt Inhibitörü), Omi/HtrA2 (HtrA serin peptidaz-2) veya

EndoG (*Endonükleaz G*) gibi birtakım mitokondriyal moleküllerin geçişi olur. Sitoplazmaya stokrom-c geçişi sonucu, ekstrinsik yolda olduğu gibi intrinsik yolda da yine apaf-1, stokrom-c ve prokaspaz-9'un bir araya gelmesi sonucu 'apoptozom' şekillenir. Ekstrinsik yolda, hücreler hem kaspaz-8, hem de kaspaz-9 ile apoptozise sürüklenirken, intrinsik yolda ise sadece kaspaz-9 üzerinden apoptozis meydana gelmektedir. Ancak apoptozis, ister ekstrinsik yolla, isterse intrinsik yol ile uyarılmış olsun, her iki yolda da mitokondrielerin kilit rollerinin olduğu görülmektedir.

Mitokondri membran geçirgenliğinin artması sonucu, sitoplazmaya geçen moleküllerden biri de Smac/DIABLO'dur. Bu molekül, hücre stoplazmasındaki kaspaz inhibitörlerini bloke ederek kaspazların aktivasyonuna neden olur. Aktive olan kaspazlar ise hücreyi apoptozise sürüklerler. Omi/HtrA2 de kaspaz inhibitörlerini bloke ederek apoptozise uyarabildiği gibi kaspaz bağımsız bir yol ile de hücreleri apoptozise sürükleyebilmektedir. Ancak Omi/HtrA2'nin kaspaz bağımsız yol ile neden oldukları apoptozis, nekroz benzeri bir apoptozis olarak tanımlanmaktadır (Cotran ve ark., 2002; Leach, 1998; Shi, 2001).



Şekil 2.5. Apoptozun uyarılması ekstrinsik veya intrinsik yollar ile olabilmektedir. Şeklin kullanılma izni için ilgili yayınevinden (Springer) alınmıştır. Lisans numarası: 3558780506215.

2.3. Rat Karaciğerinin Yapısı ve Fonksiyonları

Rat karaciğerinin 4 lobu vardır (sol, orta, sağ, kaudat lob). Sol ve orta lob, tek parça halindedir fakat orta lobta round ligamanın yapıldığı çentik vardır. Sağ lob, iki

parçadır. Kaudat lob, paracaval ve spiegel olarak ikiye ayrılır. İnsan ve rat karaciğerinin temel yapısı benzerdir. Karaciğer, tek katlı yassı bir epitel türü olan mezotelyum ve altındaki ince bir bağ dokudan oluşan visseral periton ile çevrilidir. Visseral peritonun hemen altında da sıkı bağ dokudan yapılmış, bol kolajen lif ve az oranda da elastik lif içeren Glisson kapsülü mevcuttur. Organın üstten görünüşü dışbükeydir, iç kısım ise hilum benzeri bir oyuntu içerir ve bu bölge 'karaciğer kapısı (Porta hepatis)' adını alır. Glisson kapsülü, bu karaciğer kapısından içeri girerek karaciğer lobüllerini çevreler ve portal alanlar oluşturur. Karaciğer, çok zengin bir kan donanım ağına sahiptir ve 2 önemli kaynaktan kanlanır: Portal ven, karaciğere gelen kanın %75'ini oluşturur. Bu kan; bağırsaklar, dalak ve pankreastan gelen besin maddelerinden zengin ve oksijen bakımından düşük, az basınçlı bir ven kanıdır. Hepatik arter ise total kanın sadece %25'ini oluşturur ve oksijenden zengin, yüksek basınçlı arter kanı taşır. Portal ven ve hepatic arter ile karaciğere gelen kan, doku içerisinde sinüzoidlere akarak hepatositler ile yakın ilişki kurar ve sonrasında da hepatic venler ile toplanarak inferior vena cava ile organı terk eder. Sinüzoidler, endotel ve makrofaj tipi hücreler ile tek sıra döşeli bir yapıdadır. Sinüzoid duvarı, kesintisiz bir duvar yapısı değildir (Aytekin ve Solakoglu, 2006).

Karaciğer, ağırlıklı olarak parankima hücreleri olan hepatositlerden meydana gelir. Hepatositler; 20 - 30 µm çapında, heksagonal şekilli hücrelerdir ve uzunluğu 2 mm, çapı da 700 µm olan, 5 lobül şeklinde düzenlenmişlerdir. Karaciğerin lobular yapısında, 3 farklı lobül tipi tanımlanmıştır. Bu tanıma göre; kan, periferden merkezi vene doğru akar. Safra, karaciğer hücreleri tarafından üretilerek safra kanallıklarına girer. Safra, lobülün periferine, portal alandaki lobüllerarası safra kanallarına doğru akar. İkinci lobül tanımı, karaciğerin safra salgısı dikkate alınarak yapılmıştır. Bir lobülün periferine doğru akan ekzokrin sekresyon görüşü, salgısını merkezi bir lumene veren, çok sayıda bezin tanımına uygun değildir. Portal lobül, merkezinde portal alan ve köşelerinde merkezi venlerin bulunduğu bir üçgen olarak ifade edilebilir. Üçüncü lobül tanımı ise dağıtıcı arteriyollerden kanın akımına ve toksik yaralanmalardan sonra hepatic dejenerasyona uygun şekilde yapılmıştır. Hepatic asinüs olarak tarif edilen bu lobülde parankima bölgeleri; zon 1, zon 2 ve zon 3 olarak ifade edilmiştir. Birinci bölgede yer alan hücreler, besin maddeleri açısından zengin içeriğe sahip damarlara oldukça yakın olarak yer alan hücrelerdir. Besin maddelerine kolay ulaşabilmeleri bu hücreleri toksik maddelerin neden olduğu

dejeneratif etkilere karşı daha kolay koruyabilmekte ve buna bağlı olarak da ömürleri daha uzun olmaktadır. Ayrıca, bu hücrelerin rejenerasyon yetenekleri oldukça yüksek olduğundan kendilerini çok sık yenileyebilmektedirler. Besinler açısından zengin damarlardan nispeten daha uzakta bulunan ikinci bölgedeki hücreler ise toksik maddelerin dejeneratif etkilerinden daha fazla zarar gördüklerinden ömürleri göreceli olarak daha kısadır. Üçüncü alanda yer alan hücrelerde rejenerasyon yetenekleri çok daha düşük olup farklı toksik maddelere karşı daha duyarlıdır. Bu bölgede yer alan hücrelerde nekroz diğer alanlara göre daha sık görülmektedir (Aytekin ve Solakoglu, 2006; Çetin ve ark., 2008).

Karaciğer tarafından başta albümin olmak üzere pek çok plazma proteini sentezlenir ve salgılanır. Karaciğer parankimasının %80'ini oluşturan hepatositler, bir ya da iki nükleusa sahiptir. Binükleer hepatositler, nükleus hacmi ve DNA içeriğinin artmasıyla 'endomitozis' sonucu meydana gelir ve hepatositlerin %25'i binükleerdir. Erişkin karaciğerde, mitoz nadirdir ancak hasar sonrası tamir döneminde yüksek mitotik aktivite gözlenir. Hepatositlerin stoplazmaları, fazla sayıda mitokondri ve pürüzsüz endoplazmik retikulum bulunmasından dolayı granüllü ve eozinofilik bir karakter sergilerler. Çeşitli ilaçların detoksifiye edilmesinde düz endoplazmik retikulumun önemli görevleri bulunmaktadır; Granüler bir yapıya sahip olan endoplazmik retikulum ise yapısında bol miktarda ribozom barındırır bazofilik karakter sergilemektedir. Burada kan fibrinojenleri, protrombin ve kan albüminleri sentezlenir. Her hücrede, yaklaşık 50 kadar Golgi kompleksi bulunmaktadır. Diğer bir sitoplazmik bileşen, karaciğerde biriken glikojendir. Ayrıca karaciğerde kolesterol, yağ asitleri, trigliseridler, basit yağlar gibi çeşitli lipidler de depolanmaktadır (Aytekin ve Solakoglu, 2006).

Disse aralığı, karaciğerin fizyolojik fonksiyonlarının gerçekleştirildiği paransim hücreleri ile sinüzoidler arasında yoğun bir şekilde madde alışverişine aracılık eden bir boşluktur. Kan damarlarında bulunan zengin besin maddelerinin hepatositlere alınması ile hepatositlerde ortaya çıkan toksik maddelerin uzaklaştırılarak kan damarlarına gönderilmesi sırasında Disse boşluğu doğrudan doğruya etkili olmaktadır. Disse boluğunda maddelerin geçişine uygun hücrelerarası matriks, kolajen yapısı ve retikulum lifleri yer almaktadır. Disse aralığında lipid deposu gibi iş gören hücreler (Ito hücreleri) yer almakta ve bu hücreler yağda

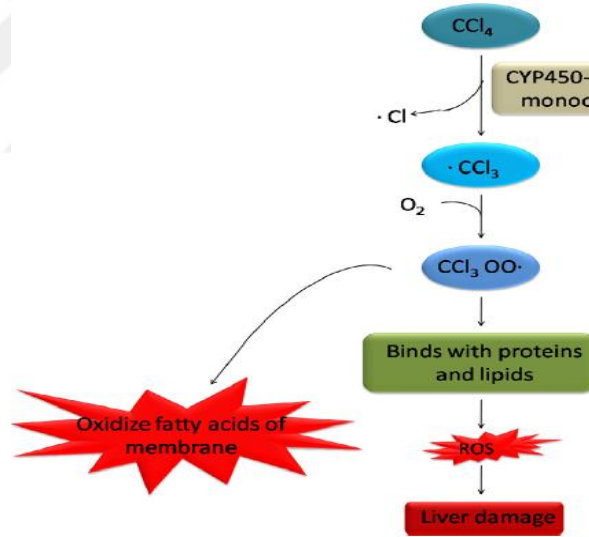
eridiğinden dolayı vitamin A yönünden oldukça zengindirler ve ihtitaç halinde organizma için vitamin A kaynağı olarak da devreye girmektedirler. Bu hücrelerde, yağda eriyen A vitamini depolanır (Aytekin ve Solakoglu, 2006; Çetin ve ark., 2008; Demir, 2006). Diğer yandan Kupffer hücreleri hepatositlerin sinüzoidlere bakan yüzünde yer alıp hepatositler oldukça yakın bir lokalizasyon sergilemektedirler. Kupffer hücre membranları bol miktarda uzantılar sergilemekte ve sitoptazmanın membranın değişik yerlerinden yapmış olduğu bu uzantılardan dolayı yıldız görünümü ortaya çıkmaktadır. Kupffer hücrelerindeki yalancı ayak şeklindeki bu uzantılar bir yandan sinüzoidin karşı tarafında yer alan hepatositlere doğru olabileceği gibi diğer Kupffer hücrelerine de uzantılar şeklinde olabilmektedir. Kupffer hücrelerinin nukleusları oldukça büyük olup, merkezi bir lokalizasyon sergilemektedir. Diğer somatik hücrelerde olduğu gibi Kupffer hücre de sitozollerinde çok sayıda lizozom ile nukleusa yakın olarak bulunan Golgi cisimciklerini barındırmaktadırlar (Aytekin ve Solakoglu, 2006; Çetin ve ark., 2008; Demir, 2006).

2.4. Karbon Tetraklorürün (CCl₄) Yapısı ve Karaciğer Üzerine Etkisi

Karbon tetraklorür (CCl₄); saydam, yanıcı olmayan ve kolayca buharlaşabilen renksiz bir sıvıdır (Kus ve ark., 2005). Deneysel olarak yapılan çalışmalarda; CCl₄'ün karaciğerde mitotik aktiviteyi arttırdığı, hepatositlerde dejenerasyon, hepatik yağ dejenerasyonu, mononükleer hücre infiltrasyonu, fibrozis, siroz ve kansere neden olduğu gösterilmiştir (Kus ve ark., 2005; Manibusan ve ark., 2007). Oluşturduğu karaciğer dejenerasyonu, insandaki siroz gelişim sürecine benzerlik gösterdiği için CCl₄, kemirgenlerde karaciğer hasarı ile ilgili deneysel çalışmalarda en çok kullanılan kimyasal ajandır. CCl₄'e bağlı karaciğer toksisitesinin oluşmasında, oksidatif stres önemli rol oynamaktadır (Jadhav ve ark., 2010).

Oksidatif stres sonucu açığa çıkan serbest oksijen radikallerine bağlı olarak oluşan lipid peroksidasyonunun kanser, aterosklerotik kalp hastalıkları, karaciğer hastalıkları ve toksik hücre hasarlarında oluşan patogeneze sorumlu olduğu bilinmektedir (Luckey ve Peterson, 2001; Muriel ve Escobar, 2003). Şekil 5.'te de gösterildiği gibi; CCl₄'ün dokularda hasar oluşturma mekanizması, CCl₄'ün stokrom P₄₅₀ enzimi aracılığıyla oldukça toksik triklorometil (CCl₃) ve triklorometil peroksil

(CCl_3O_2) serbest radikallerine dönüşümü sonrası başlayan lipid peroksidasyonu ile ortaya çıkan oksidatif hasar olarak açıklanmıştır (Aranda ve ark., 2010). Yapılan çalışmalarda; CCl_4 uygulanmış sıçanlarda, oksidatif stres ve karaciğer Kupffer hücrelerinin inaktivasyonunun, karaciğer fibrozisinde önemli bir rol oynadığı görülmüştür (Kus ve ark., 2005; Muriel ve Escobar, 2003). Deneysel çalışmalarda; CCl_4 'ün karaciğer ve böbrek başta olmak üzere, birçok organda doku hasarına yol açtığı ve özellikle karaciğer dokusunda koagülatif nekroz, ağır fibroz, mononükleer hücre infiltrasyonu, hemoraji, yağ dejenerasyonu ve dejeneratif nodüller şekillenmesi gibi klasik siroz histolojik bulgularına neden olduğu, ayrıca serum AST (Aspartat amino transferaz) ve ALT (Alanin amino transferaz) değerlerini de artırdığı gözlenmiştir (Aranda ve ark., 2010; Kus ve ark., 2005; Jadhav ve ark., 2010). Lee ve arkadaşları (2004) yaptıkları çalışmada; CCl_4 ile oluşturulan karaciğer hasarında, ısı-stres proteinlerinde aşırı bir uyarılma olduğunu tespit etmişlerdir (Aranda ve ark., 2010; Lee ve ark., 2004).



Şekil 2.6. Vücuda alınan CCl_4 , stokrom P_{450} enzimi aktivitesi sonucu oldukça toksik olan triklorometile (CCl_3), ardından da triklorometil peroksil (CCl_3O_2) radikallerine dönüşür. Ortaya çıkan bu radikaller ise lipid peroksidasyonuna neden olarak oksidatif hasara yol açar. Şeklin kullanılma izni için ilgili yayınevinden (Springer) alınmıştır. Lisans numarası: 3564730687368.

3.GEREÇ ve YÖNTEM

Araştırmada, deney hayvanı olarak 14 adet, 15-17 haftalık, 170 - 210 gram ağırlığında, erkek Sprague-Dawley türü rat kullanıldı. Çalışma sırasında kullanılan bütün doku örnekleri Balıkesir Üniversitesi Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurulu'nun 28.11.2011 tarihinde vermiş olduğu etik kurul izni üzerine yapılan deneysel çalışma sırasında edinilmiştir. Deney hayvanları $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de, 12 saat karanlık-12 saat aydınlık ortamda, standart kafeslerde, serbest pelet yem ve su alımı sağlanarak barındırıldı. Hayvanlar, çalışma başlamadan 3 hafta önce standart kafeslere konularak ortama alışması beklendi. Çalışmada, 2 grupta 7'şer hayvandan oluşan toplam 14 hayvan kullanıldı.

Grup 1: Karaciğer toksisitesi oluşturmak amacıyla CCl_4 , periton içi (i.p.) yol ile, 1 ml/kg, 1:1 oranında zeytinyağındaki çözeltisi şeklinde, birer gün ara ile 3 defa enjekte edildi. Hayvanlar, son enjeksiyondan 24 saat sonra eter anestezisine alınarak kan ve karaciğer dokuları alındı.

Grup 2 (Kontrol): 1 ml/kg serum fizyolojik 1:1 oranında zeytinyağındaki çözeltisi şeklinde (i.p.), birer gün ara ile 3 defa enjekte edildi. Hayvanlar, son enjeksiyondan 24 saat sonra eter anestezisine alınarak kan ve karaciğer dokuları alındı.

Her iki grup için de TUNEL ve ELISA yöntemleri ile apoptosis oranları ve immunohistokimyasal olarak da gal-3'ün ekspresyonu araştırıldı.

3.1. ELISA Yöntemi ile Apoptosis Oranlarının Belirlenmesi

Apoptotik hücrelerin çekirdeklerindeki DNA kırılmalarının ölçümü, sandviç enzim immunoassay prensibine dayanan ve apoptotik DNA fragmentasyonu esnasında oluşan stoplazmik DNA - histon kompleksinin belirlenmesini sağlayan Roche firmasının 'Cell Death Detection ELISA Plus' (Mannheim, Germany) ticari ölçüm kiti kullanılarak yapıldı. Kitin prospektüsünde önerildiği şekilde; önce

ratlardan elde edilen dokular tartıldı ve ELISA kitinin içindeki kullanıma hazır halde bulunan 'lysis buffer'dan ilave edildi. Dokular, homojenizatörde (Yellow Line Ost Basic, Almanya) 2 dakika süre ile homojenize edildi. Homojenizasyon işleminin ardından, örnekler 20.000 g'de 10 dakika süreyle santrifüj edildi. Yirmi µl süpernatant, streptavidin kaplı mikropleyt kuyucuklarına ilave edildi ve daha sonra her bir kuyucuğa 80 µl immunoreagent (monoklonal antikor, antihiston - biotin ve anti-DNA - POD karışımı) eklendi. Reaksiyonun oluşması için 2 saat süreyle, 15 - 25°C'de, çalkalayıcıda hafifçe çalkalanarak inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda, her bir kuyucuk 'inkübasyon buffer' ile yıkandı. Daha sonra her bir kuyucuğa, 100 µl ABTS [substrate 2,2-azino-di-(3-ethylbenzthiazoline sulfonate) diammonium salt crystals] solüsyonu eklenip 10 dakika oda sıcaklığında hafifçe çalkalanarak inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda, ABTS stop solüsyonu ilave edilip 405 nm'de, ABTS ve ABTS stop solüsyonuna karşı okundu.

3.2. TUNEL Yöntemi ile Apoptosis Oranlarının Belirlenmesi

Apoptotik hücrelere özgün 180 - 200 bazlık DNA parçalarının gösterilmesi amacıyla 'ApopTag® Peroksidaz *in situ* Apoptozis Detection Kit'i (S7100, Chemicon International, CA, USA) kullanıldı.

Dokulardan parafin blok ve kesitler hazırlanıp iki gün süre ile oda ısısında kurumaya bırakıldı. Kesitler, ksilol ve alkol serisinden (%70, %80, %95 etanol ve izopropanol) geçirildikten sonra doku kesitleri, 2 kez 5'er dakika olmak üzere, PBS (Phosphate Buffered Saline, pH 7,4) içinde yıkandı. Preparatlar, oda sıcaklığında, %3'lük H₂O₂'in metanolik çözeltisi içinde 5 dakika bekletildi ve ardından da 2 kez, 5 dakika boyunca PBS içinde yıkandı. PBS ile yıkanan preparatlar, kit içinde bulunan eküilibrasyon solüsyonuyla oda ısısında 10 dakika, inkübasyona bırakıldı. Daha sonra preparatlar, TdT enzimi ile 37°C'de 60 dakika inkübe edilip, ardından stop solüsyonuna konulup, 15 saniye çalkalandıktan sonra 10 dakika boyunca da stop solüsyonunda bekletildi. Ardından preparatlar, 2 kez birer dakika süre ile PBS içinde yıkandı ve anti-digoksinin konjugatı ile oda ısısında 30 dakika süreyle inkübe edildi. Daha sonra preparatlar, 4 kez 2'şer dakika PBS içinde yıkanıp 3,3-diaminobenzidin (DAB) kromojeni ile reaksiyona bırakılarak kahverengi bir reaksiyonun gözlenmesinden sonra dehidre edilip paramount yapıştırıcı ile kapatıldı.

Preperatların değerlendirilmesi ışık mikroskopunda (Leica DC-200) gerçekleştirildi.

3.3. Gal-3 Ekspresyon ve Lokalizasyonunun İmmunohistokimyasal Olarak Gösterilmesi

Gal-3 ekspresyon ve lokalizasyonlarının tespiti, immunohistokimyasal olarak ‘Avidin-Biotin Peroksidaz’ yöntemi ile yapıldı. Parafin bloklarda bulunan dokulardan alınan kesitler, TUNEL yönteminde anlatıldığı gibi hazırlanıp, ksilol ve alkol serisinden geçirildi. Dokular, 2 kez 5’er dakika olmak üzere, PBS içinde yıkandıktan sonra %3 oranında H₂O₂ içeren metanol içerisinde, 15 dakika süreyle reaksiyona bırakıldı. H₂O₂ ile endojen *peroksidaz* aktiviteleri bloke edilen örnekler, daha sonra 2 dakika süreyle 3’er kez PBS içerisinde yıkandı ve ardından da %1’lik domuz serumunda (DAKO, Glostrup, Danimarka) 30 dakika süreyle inkübasyona bırakıldı. Normal domuz serumu ile spesifik olmayan bağlantı yerleri kapatılan numuneler, ardından primer antikorda (Ant-gal-3 antibody, Santacruz Biotech, UK) 60 dakika süreyle inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda örnekler, dokularda bağlantı noktaları bulamayan antikorumun uzaklaştırılması için 3 kez PBS’de 5’er dakika yıkandı ve ardından da üzerlerine sekonder antikor (Domuz anti tavşan IgG, DAKO, Glostrup, Danimarka) antikorunu ile damlatılarak 60 dakika süreyle inkübe edildi. Preparatlar, PBS ile 3 kez 5’er dakika yıkanıp, Avidin-Biotin Peroksidaz enzim solüsyonunda (Cameron, Burlingame, USA) 30 dakika süreyle inkübe edildi. Sonra preparatlar 3 kez PBS’de 5’er dakika yıkanıp DAB’da (3,3-Diaminobenzidin, 50 mg DAB, 100 ml PBS) 5 dakika tutulup, şalelere 100 µl/100 ml olacak şekilde H₂O₂ damlatıldı. Yaklaşık 10 dakikalık inkübasyondan sonra preparatlar, Hemalaun ile 2-3 saniye boyunca karşı (counter staining) boya işlemine bırakıldı, eşme suyu ile yıkanıp ardından distile suya alındı ve sonrasında da alkol serisinde dehidre edildi. Dehidrasyondan sonra lamalar, paramount damlatılarak lamel ile kapatıldı ve ışık mikroskopunda değerlendirildi.

3.4. İstatistiksel Değerlendirme

Verilerin analizi, SPSS 18’de t-testi kullanılarak yapıldı. Değerler, ortalama ± standart hata olarak verildi.

4. BULGULAR

4.1. ELISA Yötemi ile Belirlenen DNA Kırılmasının Oranları

Apoptozun göstergesi olan DNA kırılmasında, karaciğer intoksikasyonu oluşturulan Grup 1 (CCl₄) ve kontrol grubu olan Grup 2 arasında istatistiksel olarak ileri düzeyde önemli farklılık bulunmuştur (p<0.001). Karbon tetraklorür ile karaciğer intoksikasyonu oluşturulan ratlarda, kontrol grubuna göre; karaciğer doku örneklerinde DNA kırılması miktarlarının daha fazla olduğu gözlenmiştir. Tablo 1.'de de görüldüğü gibi; toksikasyona maruz kalan Grup 1'de, DNA kırılması 1.32 ± 0.15 U/mg protein iken, kontrol grubu olan Grup 2'de DNA kırılması 0.85 ± 0.42 U/mg protein olarak bulunmuştur. Sonuçlar, SPSS 18'de t-testi kullanılarak analiz edilmiş ve Grup 1'de, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı DNA kırılmasının artmış olduğu saptanmıştır (p<0.001).

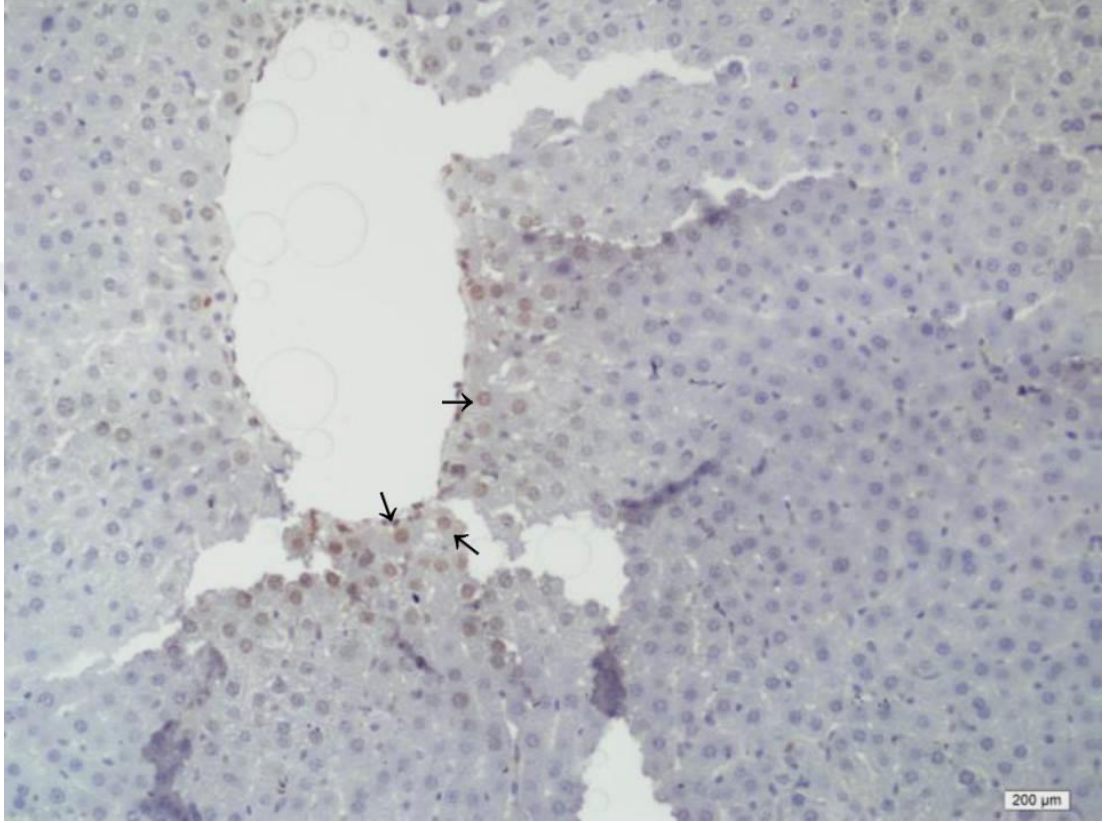
Tablo 4.1. Apoptozun göstergesi olan DNA kırılmasının, Grup 1 ve Grup 2 karşılaştırılması. Kontrol gruna göre, karbon tetraklorür ile toksisite oluşturulan ratların karaciğerlerinde, apoptozis oranlarının istatistiksel olarak anlamlı düzeylerde arttığı tespit edilmiştir.

| | Grup 1 (CCl ₄) n=7 | Grup 2 (Kontrol) n=7 | P |
|-------------------------------------|--|--|----------|
| DNA kırılması U / mg protein | 1.32 ± 0.15 | 0.85 ± 0.42 | 0.001*** |

4.2. TUNEL Yöntemi ile Belirlenen DNA Kırılmasının Oranları

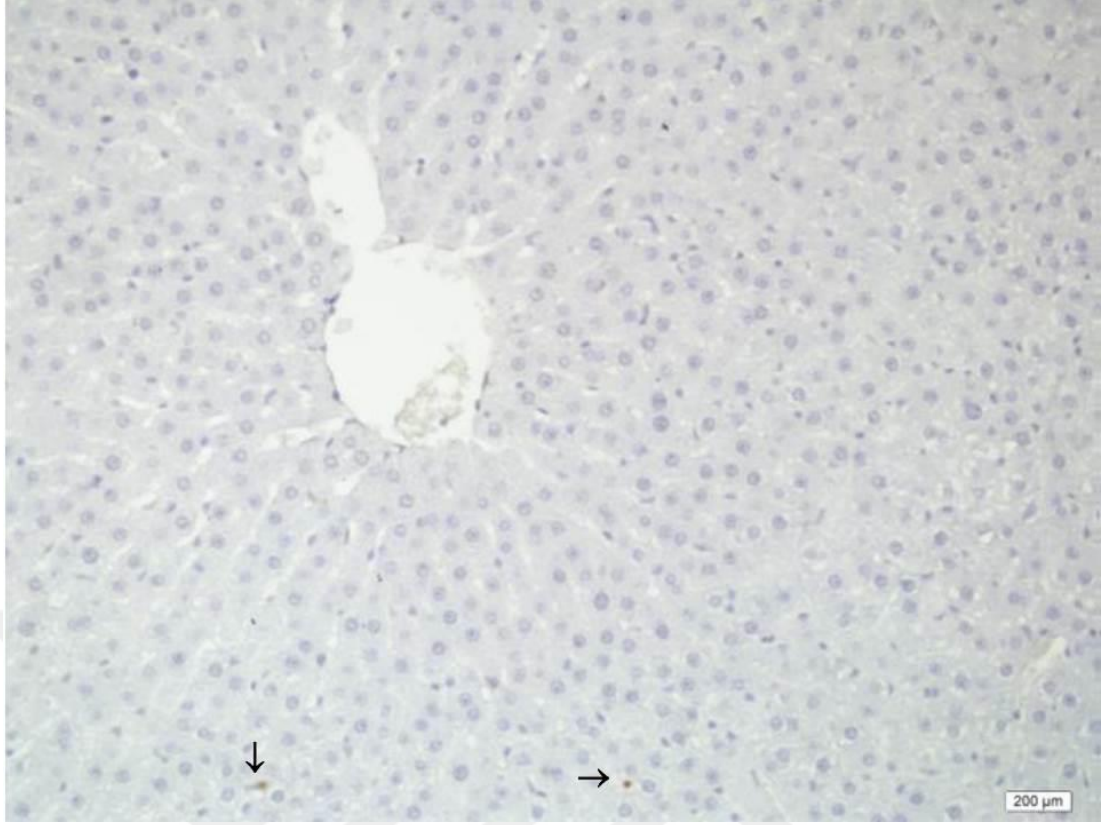
TUNEL yöntemi kullanılarak apoptotik hücrelerin tespiti sonucunda elde edilen bulgular, ELISA yöntemi ile elde edilen sonuçları net olarak destekler niteliktedir. Karbon tetraklorür toksikasyonuna maruz kalan ratların karaciğer hücrelerindeki apoptotik hücre sayısının, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında,

belirgin olarak arttığı tespit edilmiştir. Apoptotik hücrelerin, porankimden ziyade safra kanalları çevresinde artmış olduğu tespit edilmiştir. Büyük büyütmede (40X, 100X) yapılan ışık mikroskop incelemelerinde; apoptotik hücrelerde görülen reaksiyonların, daha çok sitoplazmada değil de çekirdekte hatta çekirdeğin de membrana yakın olan kısımlarında meydana geldiği görülmüştür (Şekil 4.1.).



Şekil 4.1. Karbon tetraklorür toksikasyonuna maruz kalan karaciğer dokusunda apoptotik hücreler (↑). Apoptotik hücrelerin, safra kanalları etrafında yoğunlaştıkları görülmektedir.

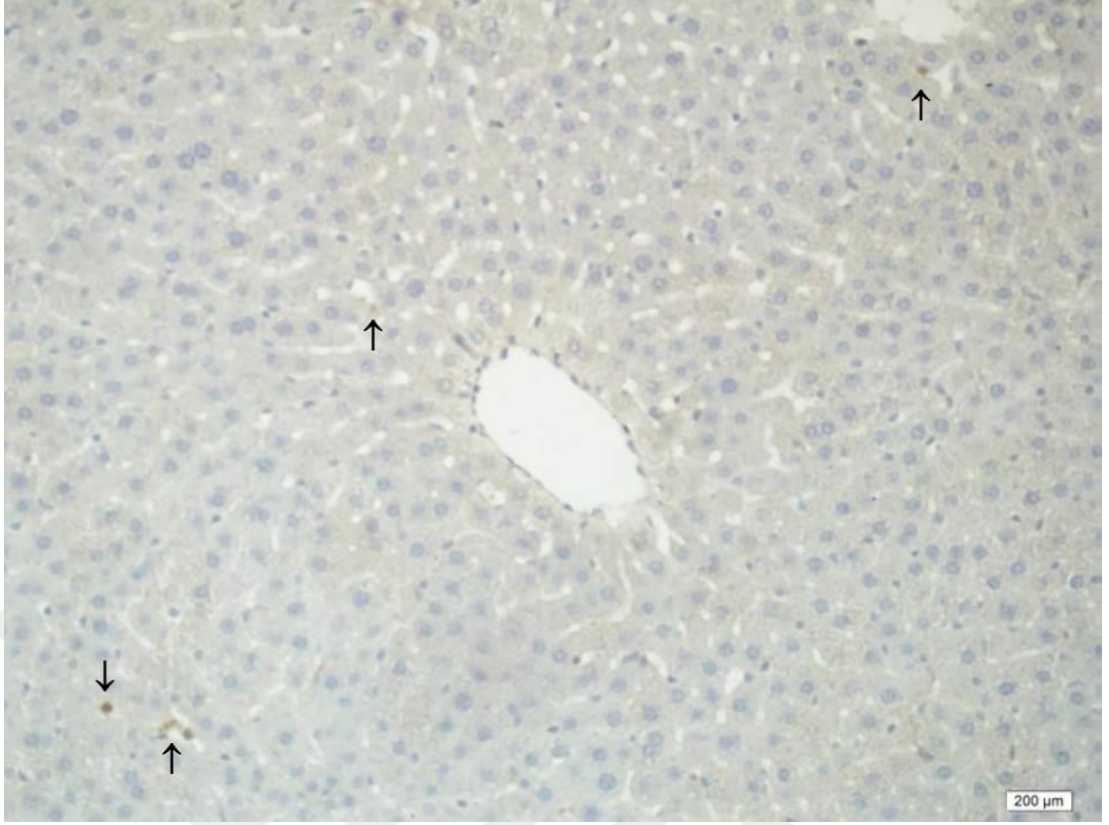
Kontrol grubundaki hayvanların karaciğerlerinde yapılan TUNEL boyamalarında, az sayıda apoptotik hücre görüntülenmiştir. Deney grubundaki dokulardan farklı olarak, apoptotik hücrelerin safra kanalları etrafında yoğunlaştıkları görülmemiştir (Şekil 4.2.).



Şekil 4.2. Grup 2 (kontrol), normal karaciğer dokusu. Apoptotik hücrelerin (↑) çok az sayıda bulunduğu ve safra kanalları etrafında değil de parانشimde yer aldıkları görülmektedir.

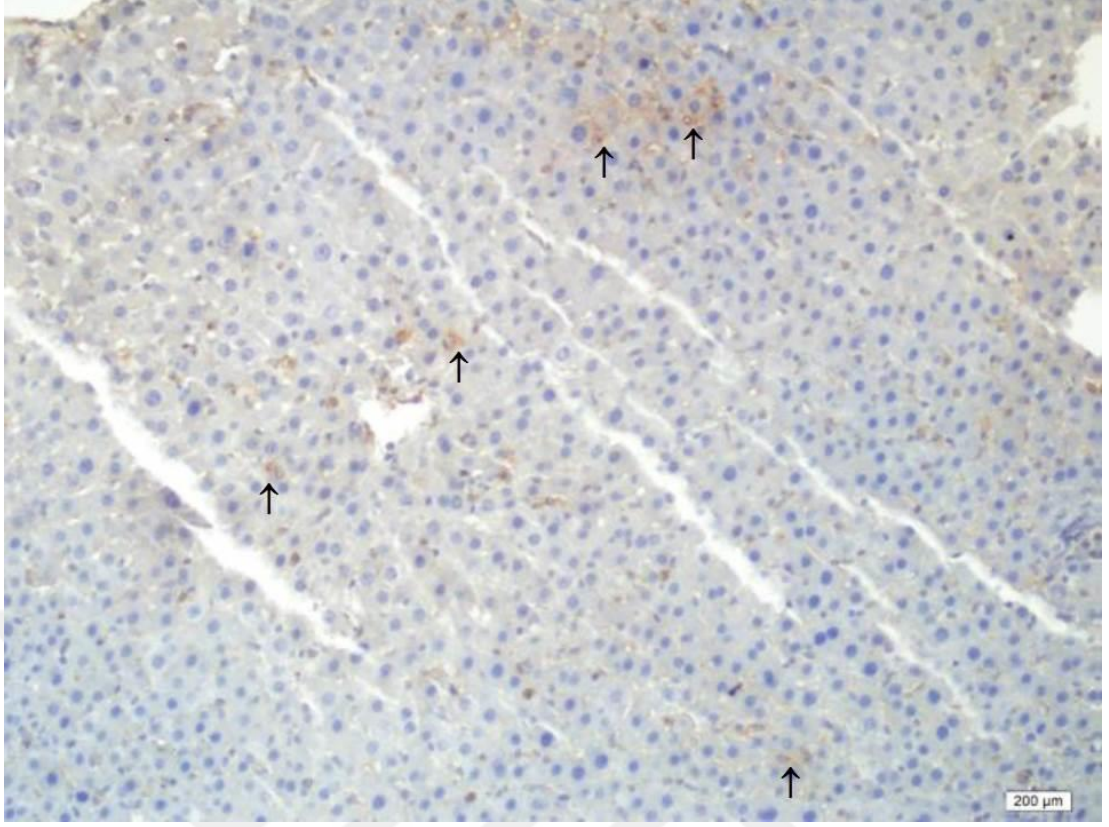
4.3. Gal-3 Ekspresyonunun İmmunohistokimyasal Olarak Gösterilmesi

Gal-3 ekspresyon ve lokalizasyonlarının tespiti, immunohistokimyasal olarak 'Avidin-Biotin Peroksidaz' yöntemi ile yapıldı. Şekil 4.3'te de görüldüğü gibi; kontrol grubuna ait karaciğer dokusunda gal-3'ün eksprese edildiği az sayıdaki hücrenin (↑) varlığına rastlanmıştır. Işık mikroskop düzeyinde yapılan incelemelerde; gal-3'ün eksprese edildikleri hücrelerde, nükleer bir lokalizasyon gösterdikleri tespit edilmiştir. Ekstraselüler matriks veya sitoplazmada, belirgin bir gal-3 ekspresyonu tespit edilememiştir.



Şekil 4.3. Kontrol grubuna ait karaciğer dokusunda gal-3 varlığı (↑). Çok az sayıdaki hücrenin, gal-3'ü eksprese ettikleri görülmüştür.

Karbon tetraklorür toksikasyonuna maruz kalan ratların karaciğer dokusunda, gal-3 ekspresyonunun (↑), kontrol grubundaki hayvanlara göre artmış olduğu tespit edilmiştir. Kontrol grubuna ait karaciğer dokularında, gal-3 antikoruna karşı tek tük hücrede nükleer bir reaksiyonun varlığı saptanırken, deney grubuna ait karaciğer dokularında, gal-3 antikoruna karşı çok sayıda hücrenin reaksiyon verdiği ve reaksiyonun niteliğinin sadece nükleus ile sınırlı kalmayıp, sitoplazmada da yoğun bir reaksiyonun bulunduğu görülmüştür (Şekil 4.4.).



Şekil 4.4. Deney grubuna ait karaciğer dokusunda gal-3 varlığı (↑). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, daha çok sayıdaki hücrenin gal-3'ü eksprese ettikleri görülmüştür.

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada, CCl₄ kullanılarak rat karaciğer dokusunda toksisite oluşturulmuş ve bu toksisite modelinde, karaciğer hücrelerindeki apoptozis oranları belirlenmiş ve immunohistokimyasal olarak da gal-3'ün ekspresyonu ve lokalizasyonu araştırılmıştır. Apoptozis oranlarının belirlenmesinde, TUNEL ve ELISA yöntemleri kullanılmıştır.

CCl₄ saydam, yanıcı olmayan ve kolayca buharlaşabilen renksiz bir sıvıdır (Kus ve ark., 2005). Deneysel olarak yapılan çalışmalarda; CCl₄'ün karaciğerde, mitotik aktiviteyi artırdığı, hepatositlerde hepatik yağ dejenerasyonu, mononükleer hücre infiltrasyonu, fibrozis, siroz ve kansere neden olduğu gösterilmiştir (Kus ve ark., 2005; Manibusan ve ark., 2007). Oluşturduğu karaciğer dejenerasyonu, insandaki siroz gelişim sürecine benzerlik gösterdiği için CCl₄, kemirgenlerde de deneysel karaciğer toksikasyonu çalışmalarda en çok kullanılan kimyasal ajandır. CCl₄'ün neden olduğu karaciğer toksisitesinin açığa çıkmasında, oksidatif stresin önemli rol oynadığı bildirilmiştir.

Oksidatif stres sonucu açığa çıkan serbest oksijen radikallerine bağlı olarak oluşan lipid peroksidasyonunun kanser, aterosklerotik kalp hastalıkları, karaciğer hastalıkları ve toksik hücre hasarlarında oluşan patogeneze sorumlu olduğu bilinmektedir (Luckey ve Peterson, 2001; Muriel ve Escobar, 2003). CCl₄'ün dokularda hasar oluşturma mekanizması, CCl₄'ün sitokrom P₄₅₀ enzimi aracılığıyla oldukça toksik triklorometil (CCl₃) ve triklorometil peroksil (CCl₃O₂) serbest radikallerine dönüşümü sonrası başlayan lipid peroksidasyonu ile ortaya çıkan oksidatif hasar olarak açıklanmıştır (Aranda ve ark., 2010). Yapılan çalışmalarda; CCl₄ uygulanmış sıçanlarda, oksidatif stres ve karaciğer Kupffer hücrelerinin inaktivasyonunun, karaciğer fibrozisinde önemli bir rol oynadığı görülmüştür (Kus ve ark., 2005; Muriel ve Escobar, 2003). CCl₄'ün karaciğer ve böbrek başta olmak üzere, birçok organda doku hasarına yol açtığı ve özellikle karaciğer dokusunda koagülatif nekroz, ağır fibroz, mononükleer hücre infiltrasyonu, hemoraji, yağ dejenerasyonu ve dejeneratif nodül şekillenmesi gibi klasik siroz histolojik

bulgularına neden olduğu, ayrıca serum AST ve ALT değerlerini de artırdığı gözlenmişti (Kus ve ark., 2005; Aranda ve ark., 2010). Araştırmalarda CCl₄ ile oluşturulan karaciğer hasarında, ısı-şok proteinlerinde (HSP) aşırı bir uyarılma olduğunu tespit edilmiştir (Lee ve ark., 2004). Özellikle de HSP-70'in CCl₄ toksikasyonuna duyarlı olduğu ve bu proteinin ekspresyonunun CCl₄ tarafından uyarıldığı ortaya konulmuştur. Diğer yandan, çok sayıda araştırmacı yaptıkları *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda; CCl₄'e maruz kalan karaciğer hücrelerinde, apoptozun uyarıldığını ortaya koymuşlardır (Lee ve ark., 2004). Bizim çalışmamızda da, karaciğerde CCl₄ ile oluşturulan toksite modelinde; TUNEL ve ELISA yöntemleri ile apoptosis oranları araştırılmış ve CCl₄ enjekte edilen ratların karaciğer doku örneklerindeki DNA kırılması miktarlarının, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek olduğu tespit edilmiştir (p<0.05). Deney grubundaki hayvanların karaciğer dokularında görülen bu artış, hem ELISA, hem de TUNEL yöntemi ile doğrulanmış ve her iki yöntemle elde edilen sonuçların paralellik sergiledikleri görülmüştür. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar ile önceki çalışmalarda elde edilen sonuçlar da uyum göstermektedir.

Yaptığımız çalışmalarda, TUNEL boyama yöntemi kullanılarak tespit edilen apoptotik hücrelerin, karaciğer parankiminden ziyade, daha çok safra kanallarına yakın alanlarda yoğunlaştıkları tespit edilmiştir. Karbon tetraklorürün karaciğer parankim hücrelerinde metabolize olması nedeniyle apoptotik hücrelerin daha çok parankimde yoğunlaşması beklenirken, apoptotik hücrelerin hangi nedenden dolayı safra kanalları ve kan damarlarına yakın alanlarda daha çok görüntülendikleri, açıklanmaya muhtaç bir konudur.

Daha önce yapılan çok sayıda çalışmada, CCl₄ kullanılarak yapılan toksite modellerinde, karaciğer ezimlerinden AST (Aspartat amino transferaz), ve ALT (Alanin amino transferaz), ALP (Alkalin fosfataz) ve GGT'nin (Gama glutamil transferaz) istatistiksel olarak anlamlı düzeylerde arttığı görülmüştür (Kus ve ark., 2005; Lee ve ark., 2004). Özellikle ALP ve GGT'nin artmış olması, safra kanallarının lumene bakan yüzünü döşeyen epitel hücrelerinde bir dejenerasyonun varlığına işaret etmektedir. Bizim çalışmamızda da bu alanda çok sayıda hücrenin ölmüş olması, bu yöndeki ifadeleri doğrular niteliktedir. ALT ve AST'nin artmış olmasına karşın, hepatositlerde belirgin bir apoptotik hücre artışının saptanamayışı,

bu hücrelerdeki kaybın apoptozis yolu ile değil de daha çok nekroz şeklinde olabileceğini düşündürmektedir. Çünkü serumdaki bu enzim aktivitesindeki artışın varlığı, karaciğer hücrelerinin parçalandığını ve hücre bütünlüğünün bozulduğunu göstermektedir. Ancak bilindiği gibi, apoptotik hücrelerde membran bütünlüğü korunmakta dolayısıyla hücre içeriğinin dışarı çıkışı sözkonusu olmamaktadır. Bütün bu bilgiler, CCl₄ toksikasyonundan dolayı karaciğer parankiminde beklenen apoptotik hücre artışının tespit edilmeyişini, bu hücrelerin apoptozis yolu ile değil, nekroz gibi hücre bütünlüğünün bozulduğu, başka hücre ölümlerinin varlığına işaret etmektedir.

Galektinler, küçük moleküler ağırlığı olan, hücre büyümesi ve aktivasyonu gibi çok sayıda fizyolojik ve biyokimyasal olaylarda rol oynayan, en az 15 farklı proteinden oluşan bir ailedir. Bu ailenin bir üyesi olan gal-3, yaklaşık 29 - 35 kDa molekül ağırlığında, galaktoz içeren oligosakkaritlere spesifik bir proteindir. Gal-3, tüm galektinler içindeki memelilerden izole edilen, tek şimerik galektindir. Bcl-2 ile göstermiş olduğu yapısal benzerlik sayesinde, gal-3'ün de anti-apoptotik özelliği bulunmaktadır. İntraselüler gal-3; Anti-fas antikoru, staurosporine, TNF, radyasyon ve nitrik oksit tarafından stimüle edilen apoptozun karbonhidrat bağımsız mekanizma ile inhibe ederken, gal-1 ise tam tersine apoptozun stimüle eder (Cooper, 2002; Garin, 2007; Hahn ve ark., 2004; Krzeslak ve Lipinska, 2004; Matarrese, 2005; Mehul ve Hughes, 1997). Ayrıca gal-3 aktive olmuş makrofajlardan salgılanan ve miyelofibroblast aktivasyonunu sağlayan moleküldür. Gal-3, organ fibrozisi ve remodeling'e neden olur. Gal-3; myelofibroblast aktivasyonu ve fibrozis oluşumunu kalp, akciğer, karaciğer, böbrek ve deride regüle eder. Fibrozis ve risk biyomarkeri olarak kullanılabilir (Huang ve ark., 2009; Henderson ve ark., 2006; Kang ve ark., 2009; Shimizu ve ark., 2009). Özellikle kalp yetersizliğinde, myokard içinde fibrozis oluşur. Fibroz gal-3 ekspresyonu ne kadar fazla ise yetmezlik de o kadar ileridir ve prognoz da o kadar kötüdür (Miller ve ark., 2009b; Miller ve ark., 2009c). Ancak gal-3'ün, CCl₄ ile hasar oluşturulmuş karaciğer hücrelerinin apoptozundeki rolüne dair bir bilgi bulunmamaktadır. Yukarıdaki açıklamalarda değinildiği gibi intraselüler gal-3; apoptozis inhibisyonu, fibroz ve remodeling'te görev alır. Bu çalışmada, deneysel karaciğer hasarı oluşturulmuş, hasar oluşan dokudaki apoptozis oranı ve gal-3 dağılımı, kontrol grubuna göre araştırılmıştır. Bilindiği gibi karaciğer paranziminde hücre bölünmesi oldukça az görülen bir olaydır. Hücrelerin çoğu G₀ fazına girmekte ve bu fazda fizyolojik fonksiyonlarını yerine getirmeye devam

etmektedirler. Bu çalışmada sağlıklı hücrelerin paraneoplazmi dokusunda gal-3 antikoruna karşı şekillenen reaksiyonun çok düşük olmasına karşın deney grubunun paraneoplazmi hücrelerinde gal-3 ekspresyonunun uyarıldığı görülmektedir. TUNEL boyama yönteminde paraneoplazmi dokusunda apoptotik hücrelerin sayılarının oldukça düşük olması ile anti-apoptotik bir protein olan gal-3 ekspresyonunun artmış olması paraneoplazmi hücrelerinin gal-3 tarafından apoptozisten korunmuş olabileceğini düşündürmektedir.

CCl₄ ile oluşturulan karaciğer intoksikasyonunda, DNA kırılmasının gözlemlendiği apoptotik hücrelerde, immunohistokimyasal olarak 'Avidin-Biotin Peroksidaz' yöntemi ile gal-3'ün varlığı ve lokalizasyonları incelenmiştir. Oksidatif strese duyarlı hepatik asinüslerdeki hepatositlerde, safra kanal ve dendritik hücrelerde ve rejeneratif dokuda gal-3 boyanması, kontrol grubuna göre yoğun olarak gözlenmiştir. Bu da çeşitli çalışmalarda gösterildiği gibi, oksidatif strese en az duyarlı olan hepatik asinüsde yani birinci bölgede bulunan hücreler, besleyici damarlara en yakın olanlardır. Bu hücreler, toksik maddelerin zararlarına karşın uzun ömürlüdürler ve rejenerasyon yetenekleri yüksektir. İkinci bölgede bulunan hücreler ise daha az ömürlüdürler. Üçüncü bölgede bulunan hücrelerde ise rejenerasyon çok daha yavaştır ve toksik etkiler ile oksidatif strese, en çok bu bölge duyarlıdır. Nekroz da ilk olarak bu bölgede görülür (Aytekin ve Solakoglu, 2006). Bu da bizim çalışmamız ile uyumludur. Çalışmamızda, kontrol grubundaki ratlarda, gal-3'e ait belirgin bir boyanma gözlenmemiştir. Fakat besleyici damarlardan uzak olan bölümlerde DNA kırılması, apoptotik hücre miktarı ve gal-3 dağılımı, kontrol grubuna göre fazla olarak saptanmıştır. Ayrıca ratlarda karaciğer fibrozisinin gelişimi için gal-3, temel moleküldür. Ratlarda, gal-3 geni eksikliğinde, toksine maruz kalma ve yağlı karaciğer ile fibrozis gözlenmez. İnsanda karaciğer fibrozunda anahtar rol oynayan stellat hücreler, galektin inhibitörleri tarafından bloke edilerek fibrinojenik markerların üretimini durdurur. Galektin inhibitörleri, ratlarda deneysel fibrozisi, fibrotik ve yağlı karaciğeri de azaltır (Huang ve ark., 2009; Henderson ve ark., 2006; Shimizu ve ark., 2009).

Fizyolojik hücre ölümü yani apoptozis, çeşitli enzimatik yolların aktivasyonu ile olur ve gal-3 bu yollar üzerinde etki göstermektedir. Bcl-2 ve NWGR motifi, apoptozis'i baskılar. Gal-3, Bcl-2 proteini ile yapısal benzerlik gösterir. Birçok sinyal

patikası, apoptozise gidişte rol oynar. Gal-3, bu sinyal patikalarını etkiler. Bu patikalar kesişerek birbirlerinin etkisini artırabilirler (Hahn ve ark., 2004; Matarrese, 2005; Stowell, 2007). İntraselüler gal-3'ün toksinler tarafından stimüle edilen apoptozun, karbonhidrat bağımsız mekanizma ile inhibe ettiği gösterilmiştir (Barrionuevo, 2007; Garin, 2007; Sturm, 2004). Bu çalışmada, toksikasyona maruz kalan hücrelerin çekirdeklerinde, çekirdeklerin de çekirdek membranına yakın bölgelerinde gal-3 ekspresyon ve lokalizasyonun artmış olması, gal-3 sentezinin apoptozun önlemek için artmış olabileceğine işaret etmektedir. Ancak gal-3'ün mitokondri membran geçirgenliğini düzenlemek için Bax proteinleri ile bağlanması amacıyla sitoplazmaya geçmesi beklenirken, neden daha çok nükleusta ve nükleusun da daha çok membranına yakın bölgelerinde lokalize oldukları konusunun aydınlatılabilmesi için yeni çalışmaların yapılmasının gerekliliği de ortaya çıkmış bulunmaktadır.

Bu çalışmada, CCl₄ ile oluşturulan karaciğer apoptozunda; nekroz, rejenerasyon ve fibroz süreçlerinde, gal-3'ün rol aldığı gösterilmiştir. Gal-3, yaşamsal olan bu süreçlerde aktif rol alan bir moleküldür. İnsanlar üzerinde yapılan çalışmalarda; özellikle kalp, akciğer, deri ve böbrek hastalıklarının apoptozis, fibrozis ve rejenerasyon gibi fizyolojik ve patolojik süreçlerin de rol aldığı gösterilmiş hatta bazı hastalıkların tanı ve tedavisinde kullanılmıştır (Miller ve ark., 2009b; Miller ve ark., 2009c; Ozaki, 2004).

İntraselüler gal-3, apoptozun inhibe eder. Apoptozun artmış olduğu bölgelerde, gal-3'ün ekspresyonuna rastlanmaması, ancak deney grubunun paranşim dokusunda gal-3'ün yoğun olarak bulunduğu alanlarda apoptotik hücreye çok az rastlanmış olması gal-3'ün hücreleri apoptozise karşı koruyabileceğini göstermektedir. Ancak daha önceki çalışmalarda CCl₄'ün karaciğer parankiminde fibrozis ve nekrozu uyardığının gösterilmiş olması ve bizim çalışmamızda da deney grubundaki hayvanların karaciğerlerinin paranşim dokusunda gal-3 ekspresyonunun artmış olması bu proteinin karaciğer nekrozu ve fibrozisinde rol almış olabileceğini de göstermektedir. Bu yöndeki bir ifade daha önceki çalışmalarda (Huang ve ark., 2009; Henderson ve ark., 2006; Shimizu ve ark., 2009) rapor edilen, gal-3'ün karaciğer fibrozisinde rol oynadığı ve gal-3 reseptörlerinin bloke edilmesi ile fibrozisin engellenebildiği yönündeki bilgileri destekler niteliktedir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Araştırmamızda, rat karaciğerinde serbest radikal oluşturmak için CCl₄ toksite modeli uygulanmış; TUNEL ve ELISA yöntemleri ile apoptozis oranları ve immunohistokimyasal olarak da gal-3'ün apoptotik hücrelerdeki ekspresyon ve lokalizasyonları incelenmiştir.

TUNEL ve ELISA yöntemleri ile apoptozis oranları araştırılmış ve CCl₄ enjekte edilen ratların karaciğer doku örneklerindeki DNA kırılması miktarlarının, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek olduğu tespit edilmiştir (p<0.05). Gal-3'ün ekspresyonu çalışmamızda gösterildiği gibi, rat karaciğerinde oksidatif strese en duyarlı paransim dokusunda CCl₄ toksikasyonu sonucu artmıştır Gal-3'ün ekspresyonunun uyarıldığı alanlarda apoptotik hücrelerin az sayıda bulunması gal-3'ün hücreleri apoptozisden korumuş olabileceğini göstermektedir.

Bu mekanizmalar; kalp yetmezliği, karaciğer fibrozisi, siroz ve çeşitli malignitelerin gelişimi ve yayılımında, apoptozis ile birlikte yer alan ve hastalıkların klinik gidişini belirleyen süreçlerdir. Gal-3'ün buradaki fizyolojik ve patolojik rolü anlaşıldıkça, bu molekül ve bunun etkilerini artırıp, azaltan diğer moleküller (galektin inhibitörleri gibi) üzerinden, hastalıkların teşhis ve tedavisinde kullanım olanakları olacaktır. Gal-3, hastalıklar daha klinik bulgu bile vermeden, hücrese düzeyde patolojik süreçlerde rol almaya başladığından, erken teşhis ve tedavide kullanım olanağı olacaktır ve uygulanan tedavilerin etkinliğinin değerlendirilmesinde birçok diğer belirteçlerin yanında, yaygın olarak kullanılacaktır. Örneğin; FDA, kan gal-3 seviyesinin, kalp yetmezliği tanısında kullanılmasını kabul etmiştir ama kalp yetmezliğinin prognozu ve tedavisinin değerlendirilmesi konusunda yeterli bir çalışma yoktur.

Her patofizyolojik süreç kendi içinde incelenerek (fibrozis, remodeling, apoptozis, nekroz vb.), gal-3'ün bu süreçlerdeki rolü aydınlatılabilir. Kanımızca, gal-3'ün tüm bu süreçlerdeki rolüne dair patofizyolojik mekanizmaların tam olarak

ortaya çıkarılması, hastalıkların tanı ve tedavisinde, prognozun belirlenmesinde kullanım alanının genişletilmesi için ileri hayvan ve insan çalışmalarının yürütülmesine ihtiyaç vardır.



KAYNAKLAR

Almkvist J, Karlsson A. Galectins as inflammatory mediators. *Glycoconj J*, 2004, 19:575-581.

Aranda M, Albendea CD, Lostale F, Lopez-Pingarron L, Fuentes-Broto L, Martinez-Ballarín E, Reiter RJ, Perez-Castejon MC, Garcia JJ. *In vivo* hepatic oxidative stress because of carbon tetrachloride toxicity: Protection by melatonin and pinoline. *J Pineal Res*, 2010, 49(1):78-85.

Aytekin Y, Solakoglu S. *Temel Histoloji*. Nobel Tıp Kitabevleri, 2006:332-344, İstanbul.

Ballian N, Hu M, Liu SH, Brunnicardi FC. Proliferation, hyperplasia, neogenesis and neoplasia in the islets of Langerhans. *Pancreas*, 2007, 35(3):199-206.

Barrionuevo P. A novel function for galectin-1 at the cross road of innate and adaptive immunity: Galectin-1 regulates monocyte/macrophage physiology through a non-apoptotic ERK-dependent pathway. *J Immunol*, 2007, 178:436-445.

Baum LG. Amelioration of graft versus host disease by galectin-1. *Clin Immunol*, 2003, 109:295-307.

Birdsall B. NMR solution studies of hamster galectin-3 and electron microscopic visualization of surface-adsorbed complexes: Evidence for interactions between the N- and C-terminal domains. *Biochemistry*, 2001, 40:4859-4866.

Chan J. Galectin-3 induces skeletal muscle differentiation in human fetal mesenchymal stem cells and increases muscle regeneration. *Stem Cells*, 2006, 24:1879-1891.

Cooper DN, Barondes SH. Evidence for export of a muscle lectin from cytosol to extracellular matrix and for a novel secretory mechanism. *J Cell Biol*, 1990, 110, 1681-1691.

Cooper DN, Massa SM, Barondes SH. Endogenous muscle lectin inhibits myoblast adhesion to laminin. *J Cell Biol*, 1991, 115:1437-1448.

Cooper DN. Galectinomics: Finding themes in complexity. *Biochim Biophys Acta*, 2002, 1572:209-231.

Cotran RS, Robbins SL, Kumar V. *Robbins Basic Pathology*. 7th ed., Philadelphia, W.B Saunders Company, 2002:4-31.

Çetin A, Öztürk F, Gül M, Esrefoglu M, Otlu, A. Sıçanların sindirim ve solunum sistemlerindeki makrofajların histolojik yapıları. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 2008, 15(4):225-231.

Demir R. *Histoloji ve Hücre Biyolojisi*. Palme Yayınları, 2006:457-459, Ankara,

Evan G, Littlewood T. A matter of life and cell death. *Science*, 1998, 281:1317-1322.

Fisher DE. Apoptosis in cancer therapy: Crossing the threshold. *Cell*, 1994, 78(4): 539- 542.

Gandhi MK. Galectin-1 mediated suppression of Epstein-Barr virus specific T-cell immunity in classic Hodgkin lymphoma. *Blood*, 2007, 110:1326-1329.

Garin MI. Galectin-1: A key effector of regulation mediated by CD4 CD25 T-cells. *Blood*, 2007, 109:2058-2065.

Georgiadis V. Lack of Galectin-1 results in defects in myoblast fusion and muscle regeneration. *Dev Dyn*, 2007, 236:1014-1024.

Hahn HP, Pang M, He J, Hernandez JP, Yang RY, Li LY, Wang X, Liu FT, Baum LG. Galectin-1 induces nuclear translocation of endonuclease G in *caspase*- and cytochrome c-independent T-cell death. *Cell Death Differ*, 2004, 11:1277-1286.

He J, Baum LG. Endothelial cell expression of galectin-3 induced by prostate cancer cells inhibits T-cell trans endothelial migration. *Lab Invest*, 2006, 86:578-590.

Henderson NC, Mackinnon AC, Farnworth SL, Poirier F, Russo FP. Galectin-3 regulates myofibroblast activation and hepatic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103:5060–5065.

Hernandez JD, Baum LG. Ah, sweet mystery of death! Galectins and control of cell fate. *Glycobiology*, 2002, 12:127R-136R.

Hsu DK, Liu FT. Regulation of cellular homeostasis by galectins. *Glycoconj J*, 2004, 19:507-515.

Huang WY, Li ZG, Rus H, Wang X, Jose PA, Chen SY. RGC-32 mediates transforming growth factor-beta-induced epithelial-mesenchymal transition in human renal proximal tubule cells. *J Biol Chem*, 2009, 284:9426-9432.

Inagaki Y. Oxidized galectin promotes axonal regeneration in peripheral nerves but does not possess lectin properties. *Eur J Biochem*, 2000, 267:2955-2964.

Inohara H, Raz A. Effects of natural complex carbohydrate (citrus pectin) on murine melanoma cell properties related to galectin-3 functions. *Glycoconjugate J*, 1994, 11:527-532.

Jackson CL, Dreaden TM, Theobald LK, Tran NM, Beal TL, Eid M, Gao MY, Shirley RB, Stoffel MT, Kumar MV, Mohnen D. Pectin induces apoptosis in human prostate cancer cells: Correlation of apoptotic function with pectin structure. *Glycobiology*, 2007, 17:805-819.

Jadhav VB, Thakare VN, Suralkar AA, Deshpande AD, Naik SR. Hepatoprotective activity of *Luffa acutangula* against CCl₄ and rifampicin induced liver toxicity in rats: A biochemical and histopathological evaluation. *Indian J Exp Biol*, 2010, 48:822-829.

Jeng KC, Frigeri LG, Liu FT. An endogenous lectin, galectin-3 (epsilonBP/Mac-2), potentiates IL-1 production by human monocytes. *Immunol Lett*, 1994, 42:113-6.

Jin WP, Quan XQ, Meng FP, Cui XD, Piao HJ. Relationship among hepatocyte apoptosis, P450 2E1 and oxidative stress in alcoholic liver disease of rats. *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue*, 2007, 19(7):419-421.

Johnson KD, Glinskii OV, Mossine VV, Turk JR, Mawhinney TP. Galectin-3 as a potential therapeutic target in tumors arising from malignant endothelia. *Neoplasia*, 2007, 9:662–670.

Joza N, Susin SA, Dongez E. Essential role of the mitochondrial apoptosis inducing factor in programmed cell death. *Nature*, 2001, 41:549-594.

Jung EJ. Galectin-1 expression in cancer-associated stromal cells correlates tumor invasiveness and tumor progression in breast cancer. *Int J Cancer*, 2007, 120:2331-2338.

Juszczynski P. The AP1-dependent secretion of galectin-1 by Reed Sternberg cells fosters immune privilege in classical Hodgkin lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104:13134-13139.

Kang EH, Moon KC, Lee EY, Lee YJ, Lee EB. Renal expression of galectin-3 in systemic lupus erythematosus patients with nephritis. *Lupus*, 2009, 18:22–28.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 1972, 26(4): 239-257.

Krzesełak A, Lipińska A. Galectin-3 as a multi functional protein. *Cell Mol Biol Lett*, 2004, 9(2): 305-328.

Kus I, Ogeturk M, Oner H. Protective effects of melatonin against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats: A light microscopic and biochemical study. *Cell Biochem Funct*, 2005, 23:169-174.

Lacina L, Plzakova Z, Smetena K Jr, Stork J, Kaltner H, Andre S. Glycophenotype of psoriatic skin. *Folia Biol*, 2006:52 – 53.

Leach AP. Apoptosis molecular mechanism for physiological cell death in health and disease. *Clin Lab Sci*, 1998, 11:346-349.

Lee KJ, Terada K, Oyadomari S. Induction of molecular chaperones in carbon tetrachloride-treated rat liver: Implications in protection against liver damage. *Cell Stress & Chaperones*, 2004, 9:58-68.

Liu FT, Hsu DK, Zuberi RI, Kuwabara I, Chi EY. Expression and function of galectin-3, a beta-galactoside-binding lectin, in human monocytes and macrophages. *Am J Pathol*, 1995, 147:1016-1028.

Luckey SW, Peterson DR. Activation of Kupffer cells during the course of carbon tetrachloride induced liver injury and fibrosis in rats. *Exp Mol Pathol*, 2001, 71:226-240.

Lumachi F, Basso S. Apoptosis: Life through planned cellular death regulating mechanisms, control systems, and relations with thyroid diseases. *Thyroid*, 2002, 12(1):27-34.

Manibusan MK, Odin M, Eastmond DA. Postulated carbon tetrachloride mode of action: A review. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev*, 2007, 25:185-209.

Marshall JC, Malam Z, Jia S. Modulating neutrophil apoptosis. *Novartis Found Symp*, 2007, 280:53-72.

Matarrese P. Galectin-1 sensitizes resting human T-lymphocytes to Fas (CD95)-mediated cell death via mitochondrial hyperpolarization, budding and fission. *J Biol Chem*, 2005, 280:6969-6985.

Mehul B, Hughes RC. Plasma membrane targeting, vesicular budding and release of galectin 3 from the cytoplasm of mammalian cells during secretion. *J Cell Sci*, 1997, 110:1169-1178.

Miller M, Klyosov A, Platt D, Mayo KH. Using Pulse Field Gradient NMR diffusion measurements to define molecular weight distributions in glycan preparations. *Carbohydrate Research*, 2009a, 344, 1205-1212.

Miller MC, Klyosov A, Mayo KH. The α -galactomannan Davanat binds galectin-1 at a site different from the conventional galectin carbohydrate binding domain. *Glycobiology*, 2009b, 19(9):1034-1045.

Miller MC, Nesmelova IV, Platt D, Klyosov A, Mayo KH. The carbohydrate-binding domain on galectin-1 is more extensive for a complex glycan than for simple saccharides: Implications for galectin-glycan interactions at the cell surface. *Biochem J*, 2009c, 421:211-221.

Mountz JD, Zheu T, Su X, Wu J, Cheng J. The role of programmed cell death as an emerging new concept for pathogenesis of auto-immune disease. *Clin Immunol Immunopathol*, 1996, 8:2-14.

Muriel P, Escobar Y. Kupffer cells are responsible for liver cirrhosis induced by carbon tetrachloride. *J Appl Toxicol*, 2003, 23:103-108.

Nangia-Makker P, Hogan V, Honjo Y, Baccarini S, Tait L, Bresalier R, Raz A. Inhibition of human cancer cell growth and metastasis in nude mice by oral intake of modified citrus pectin. *J Natl Cancer Inst*, 2002, 94:1854–1862.

Offner H. Recombinant human beta-galactoside binding lectin suppresses clinical and histological signs of experimental auto-immune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*, 1990, 28:177-184.

Ohshima S, Kuchen S, Seemayer CA, Kyburz D, Hirt A, Kliinzing S. Galectin 3 and its binding protein in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 2003, 48:2788-2795.

Ozaki K. Functional variation in LGALS2 confers risk of myocardial infarction and regulates lymphotoxin-alpha secretion *in vitro*. *Nature*, 2004, 429:72-75.

Paclik D. Galectin-2 induces apoptosis of lamina propria T-lymphocytes and ameliorates acute and chronic experimental colitis in mice. *J Mol Med Dec*, 2007:7-8.

Pienta KJ, Naik H, Akhtar A, Yamazaki K, Replogle TS, Lehr J, Donat TL, Tait L, Hogan V, Raz A. Inhibition of spontaneous metastasis in a rat prostate cancer model by oral administration of modified citrus pectin. *J Natl Cancer Inst*, 1995, 87:348–353.

Puche AC, Key B. Identification of cells expressing galectin-1, a galactose-binding receptor, in the rat olfactory system. *J Comp Neurol*, 1995, 357:513-523.

Rabinovich GA. Recombinant galectin-1 and its genetic delivery suppress collagen-induced arthritis via T-cell apoptosis. *J Exp Med*, 1999, 190: 385-398.

Rabinovich GA. Galectins and their ligands: Amplifiers, silencers or tuners of the inflammatory response? *Trends Immunol*, 2002, 23:313-320.

Ruaslathi E, Reed JC. Anchorage dependence integrins and apoptosis. *Cell*, 1994, 77:477-8.

Saikumar P, Dong Z, Mikhailov V, Denton M, Weinberg JM, Venkatachalam MA. Apoptosis definition, mechanism and relevance to disease. *Am J Med*, 1999, 107:489-506.

Santucci L. Galectin-1 exerts immunomodulatory and protective effects on concanavalin A-induced hepatitis in mice. *Hepatology*, 2000, 31:399-406.

Santucci L. Galectin-3 suppresses experimental colitis in mice. *Gastroenterology*, 2003, 124:1381-1394.

Sathisha UV, Jayaram S, Harish Nayaka MA, Dharmesh SM. Inhibition of galectin-3 mediated cellular interactions by pectic polysaccharides from dietary sources. *Glycoconj J*, 2007, 24:497-507.

Schwartzman RA, Cidlowski JA. Apoptosis: The biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocrine Review*, 1993, 14:133-150.

Searle J, Kerr JF, Bishop CJ. Necrosis and apoptosis distinct modes death with fundamentally different significance. *Pathol Annu*, 1982, 17:229-259.

Sharma UC, Pokharel S, van Brakel TJ, van Berlo JH, Cleutjens JP. Galectin-3 marks activated macrophages in failure-prone hypertrophied hearts and contributes to cardiac dysfunction. *Circulation*, 2004, 110:3121-3128.

Shi YA. Structural view of mitochondria mediated apoptosis. *Nos Struct Biol*, 2001, 8:394-401.

Shimizu M, Khoshnoodi J, Akimoto Y, Kawakami H, Hirano H. Expression of galectin-1, a new component of silt diaphragm, is altered in minimal change nephrotic syndrome. *Lab Invest*, 2009, 89:178–195.

Steller H. Mechanism and genes of cellular suicide. *Science*, 1995, 267:1445-1449.

Stowell SR. Human galectin-1, -2, and-4 induce surface exposure of phosphatidyl serine in activated human neutrophils but not inactivated T-cells. *Blood*, 2007, 109:219-227.

Sturm A. Human galectin-2: Novel inducer of T cell apoptosis with distinct profile of caspase activation. *J Immunol*, 2004, 173:3825-3837.

Taneja N, Tjalkens R, Philbert MA, Rehemtulla A. Irradiation of mitochondria initiates apoptosis in a cell free system. *Oncogene*, 2001, 20(2):167-177.

Thompson EB. Apoptosis and steroid hormones. *Mol Endocrinol*, 1994, 8:665-73.

Tilly JL. Ovarian follicular atresia as an apoptotic process, a paradigm for programmed cell death in endocrine tissues. *Mol Cell Endocrinol*, 1992, 84:19-23.

Toscano MA. Galectin-1 suppresses auto-immune retinal disease by promoting concomitant Th2- and T regulatory-mediated anti-inflammatory responses. *J Immunol*, 2006, 176:6323-6332.

Toubi E, Shoenfeld Y. Protective auto-immunity in cancer. *Oncol Rep*, 2007, 17(1): 245-521.

Tsujimoto Y. Role of Bcl-2 family of proteins in apoptosis, apoptosomes or mitochondria. *Genes Cell*, 1998, 3:697-707.

Walker NI, Harnon BW, Gobe GC, Kerr JF. Patterns of cell death. *Methods Achiev Exp Pathol*, 1988, 13:18-54.

Wyllie AH. Cell death: The significance of apoptosis. *Int Rev Cytol*, 1980a, 68:251-306.

Wyllie AH. Glucocorticoid-induced tymphocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*, 1980b, 284:555-556.

Yan J, Katz A. PectaSol-C modified citrus pectin induces apoptosis and inhibition of proliferation in human and mouse androgen-dependent and independent prostate cancer cells. *Integr Cancer Ther*, 2010, 9:197-203.

Yang RY, Hsu DK, Liu FT. Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, 2:6737-6742.



EKLER

EK-1: ÖZGEÇMİŞ

| KİŞİSEL BİLGİLER | |
|--|---|
| Adı Soyadı | : Zeliha GÖÇER |
| Doğum tarihi | : 06/03/1975 |
| Doğum yeri | : Sarıgöl / Manisa |
| Medeni hali | : Evli |
| Uyruğu | : T.C. |
| Adres | : Balıkesir Üniversitesi, Tıp Fakültesi Hastanesi, Hemşirelik Hizmetleri Müdürlüğü |
| Tel | : 05327248446 |
| Faks | : |
| E-mail | : zeliha.gocer@hotmail.com |
| EĞİTİM | |
| Lise | : Aydın Cumhuriyet Lisesi |
| Lisans | : Ege Üniversitesi, Hemşirelik Yüksek Okulu |
| YABANCI DİL BİLGİSİ | |
| | : İngilizce |
| ÜYE OLUNAN MESLEKİ KURULUŞ- LAR | |
| | : Yoğun Bakım Hemşireleri Derneği |

EK-2 ETİK KURUL RAPORU

T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU TOPLANTISI

TOPLANTI TARİHİ
28 /11 /2011

TOPLANTI SAYISI
2011/12

KARAR 2011/ 12 :

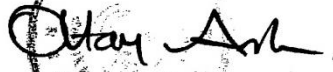
1- Üniversitemiz Veteriner Fakültesi Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. Hasan AKŞİT'in yürütücüsü olduğu "Deneysel Karaciğer İntoksikasyonunda N Asetil Sisteinin Glutatyon Metabolizması ve Lipid Peroksidasyonuna Etkileri" konulu projesinin görüşülmesine geçildi.

Görüşme sonunda; Projenin uygun olduğuna,

Oy birliğiyle karar verildi.

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU ÜYELERİ
(İMZA)

ASLI GİBİDİR



Prof. Dr. Oktay ARSLAN
Kurul Başkanı

EK-3 İZİNLER

SPRINGER LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Jan 28, 2015

This is a License Agreement between Kamil Seyrek ("You") and Springer ("Springer") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Springer, and the payment terms and conditions.

All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.

| | |
|-------------------------------------|---|
| License Number | 3557511027633 |
| License date | Jan 28, 2015 |
| Licensed content publisher | Springer |
| Licensed content publication | Cardiovascular Drugs and Therapy |
| Licensed content title | Galectin-3: A Modifiable Risk Factor in Heart Failure |
| Licensed content author | Rudolf A. de Boer |
| Licensed content date | Jan 1, 2014 |
| Volume number | 28 |
| Issue number | 3 |
| Type of Use | Thesis/Dissertation |
| Portion | Figures |
| Author of this Springer article | No |
| Order reference number | None |
| Original figure numbers | Figure 1 in a review entitled "Galectin-3: A Modifiable Risk Factor in Heart Failure" |
| Title of your thesis / dissertation | Detection of apoptosis rates and galectin-3 expression in liver toxication |
| Expected completion date | Sep 2015 |
| Estimated size(pages) | 70 |
| Total | 0.00 USD |

**SPRINGER LICENSE
TERMS AND CONDITIONS**

Mar 03, 2015

This is a License Agreement between Kamil Seyrek ("You") and Springer ("Springer") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Springer, and the payment terms and conditions.

All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.

| | |
|-------------------------------------|--|
| License Number | 3581230368246 |
| License date | Mar 03, 2015 |
| Licensed content publisher | Springer |
| Licensed content publication | Journal of Bioenergetics and Biomembranes |
| Licensed content title | Galectin-3 in apoptosis, a novel therapeutic target |
| Licensed content author | Pratima Nangia-Makker |
| Licensed content date | Jan 1, 2007 |
| Volume number | 39 |
| Issue number | 1 |
| Type of Use | Thesis/Dissertation |
| Portion | Figures |
| Author of this Springer article | No |
| Order reference number | None |
| Original figure numbers | Figure 1 |
| Title of your thesis / dissertation | Detection of apoptosis rates and galectin-3 expression in liver toxication |
| Expected completion date | Sep 2015 |
| Estimated size(pages) | 70 |
| Total | 0.00 USD |

**SPRINGER LICENSE
TERMS AND CONDITIONS**

Jan 29, 2015

This is a License Agreement between Kamil Seyrek ("You") and Springer ("Springer") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Springer, and the payment terms and conditions.

All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.

| | |
|-------------------------------------|--|
| License Number | 3558150736751 |
| License date | Jan 29, 2015 |
| Licensed content publisher | Springer |
| Licensed content publication | Cancer and Metastasis Reviews |
| Licensed content title | Why anti-Bcl-2 clinical trials fail: a solution |
| Licensed content author | Y. Harazono |
| Licensed content date | Jan 1, 2013 |
| Volume number | 33 |
| Issue number | 1 |
| Type of Use | Thesis/Dissertation |
| Portion | Figures |
| Author of this Springer article | No |
| Order reference number | None |
| Original figure numbers | Figures 1 and 3 |
| Title of your thesis / dissertation | Detection of apoptosis rates and galectin-3 expression in liver toxication |
| Expected completion date | Sep 2015 |
| Estimated size(pages) | 70 |
| Total | 0.00 USD |

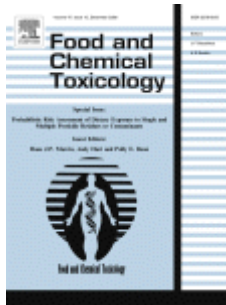
**SPRINGER LICENSE
TERMS AND CONDITIONS**

Jan 30, 2015

This is a License Agreement between Kamil Seyrek ("You") and Springer ("Springer") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Springer, and the payment terms and conditions.

All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.

| | |
|-------------------------------------|--|
| License Number | 3558780506215 |
| License date | Jan 30, 2015 |
| Licensed content publisher | Springer |
| Licensed content publication | Digestive Diseases and Sciences |
| Licensed content title | Targeting Apoptosis in Autoimmune Hepatitis |
| Licensed content author | Albert J. Czaja |
| Licensed content date | Jan 1, 2014 |
| Volume number | 59 |
| Issue number | 12 |
| Type of Use | Thesis/Dissertation |
| Portion | Figures |
| Author of this Springer article | No |
| Order reference number | None |
| Original figure numbers | Figure 1 |
| Title of your thesis / dissertation | Detection of apoptosis rates and galectin-3 expression in liver toxication |
| Expected completion date | Sep 2015 |
| Estimated size(pages) | 70 |
| Total | 0.00 USD |



Title: An update on oxidative stress-mediated organ pathophysiology

Publication: Food and Chemical Toxicology

Publisher: Elsevier

Date: December 2013

Copyright © 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Logged in as:

Kamil Seyrek

3000883335

[LOGOUT](#)

Order Completed

Thank you very much for your order.

This is a License Agreement between Kamil Seyrek ("You") and Elsevier ("Elsevier"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Elsevier, and the [payment terms and conditions](#).

[Get the printable license](#).

| | |
|--|--|
| License Number | 3564730687368 |
| License date | Feb 09, 2015 |
| Licensed content publisher | Elsevier |
| Licensed content publication | Food and Chemical Toxicology |
| Licensed content title | An update on oxidative stress-mediated organ pathophysiology |
| Licensed content author | None |
| Licensed content date | December 2013 |
| Licensed content volume number | 62 |
| Licensed content issue number | n/a |
| Number of pages | 17 |
| Type of Use | reuse in a thesis/dissertation |
| Portion | figures/tables/illustrations |
| Number of figures/tables/illustrations | 4 |
| Format | both print and electronic |
| Are you the author of this Elsevier article? | No |
| Will you be translating? | No |
| Order reference number | Figure 4 |
| Title of your thesis/dissertation | Detection of apoptosis rates and galectin-3 expression in liver toxication |
| Expected completion date | Sep 2015 |
| Estimated size (number of pages) | 70 |
| Elsevier VAT number | GB 494 6272 12 |
| Permissions price | 0.00 USD |
| VAT/Local Sales Tax | 0.00 USD / 0.00 GBP |
| Total | 0.00 USD |