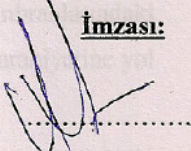

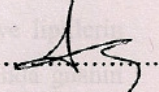
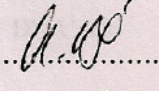
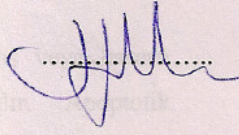
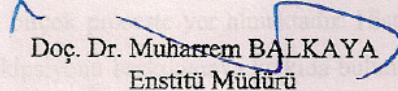


T.C.  
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE  
AYDIN

Biyokimya Anabilim Dalı Doktora Programı öğrencisi Hasan AKŞİT tarafından hazırlanan "Deneysel Karaciğer İntoksikasyonunda DNA Hasarının Belirlenmesi ve N Asetil Sisteinin Rolü" başlıklı tez, 11/03/2011 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

<u>Ünvanı, Adı ve Soyadı :</u>	<u>Üniversitesi :</u>	<u>İmzası:</u>
1- Prof. Dr. Ayşegül BİLDİK	ADÜ, Veteriner Fakültesi	
2- Prof. Dr. Kamil SEYREK	Balıkesir Üniversitesi, Tıp Fakültesi	
3- Doç. Dr. Funda KIRAL	ADÜ, Veteriner Fakültesi	
4- Doç. Dr. Pınar Alkım ULUTAŞ	ADÜ, Veteriner Fakültesi	
5- Yrd. Doç. Dr. Selim SEKKİN	ADÜ, Veteriner Fakültesi	

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu Doktora Tezi, Enstitü Yönetim Kurulunun ..2011/06-IX..... Sayılı kararıyla ..11.03.2011... tarihinde onaylanmıştır.

  
Doç. Dr. Muharrem BALKAYA  
Enstitü Müdürü

## ÖNSÖZ

Karaciğer, toksik maddelere ve çeşitli ilaçlara çok sık maruz kalan bir organdır. Karaciğerde hasar dahil çeşitli patolojik tablolara yol açan 600'den fazla kimyasal molekülden biri de karbontetraklorürdür. Karbontetraklorür karaciğere lipit peroksidasyonu ile zarar vermektedir. Oluşan serbest radikaller hücre membranlarındaki fosfolipidlerde bulunan yağ asitlerinin peroksidasyonuna yol açarak hücre harabiyetine yol açarlar.

Oksidanların aşırı üretimi veya antioksidanların azalışı sonucu oluşan dengesizlik, anormal oksidan üretimine yol açar, böylelikle “oksidatif stres” oluşur. Oksidatif strese, *in vivo* üretilen reaktif oksijen türleri (ROS), nükleik asitlerin proteinlerin ve lipitlerin oksidatif hasarına neden olur. DNA'da tüm pürin ve pirimidin bazları arasında guanin oksidasyona daha çok yatkındır. Bu nedenle 8-hidroksi-2-deoksiguanozin DNA'daki oksidatif hasarın önemli bir göstergesi olarak kabul edilmektedir.

Organizmanın ihtiyaç duymadığı, biyolojik görevini tamamlamış veya hasarlı hücreler apoptozis ile genetik olarak kontrol edilerek ortadan kaldırılır. Apoptotik hücrenin kromatini nükleus membranının çevresinde toplanır ve yoğunlaşır. Apoptozisin en önemli özgün yönü DNA'nın internükleozomal bölgelerden parçalanmasıdır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda histon asetilasyonun apoptozis ile ilgili olabileceğine dair bulgular elde edilmiştir.

Histon asetil transferaz kompleksleri, transkripsiyon aktivasyonu, gen sessizliği, DNA tamiri ve hücre siklusunun devamlılığı gibi birçok olayda yer almaktadır. Histon deasetilasyonu kapalı kromatin durumuna ve transkripsiyonu baskılamaya katkıda bulunur. Normal hücrelerde histon asetilaz (HAT) ve histon deasetilaz (HDAC) enzim aktiviteleri arasında korunan bir denge vardır.

Araştırmamızda HAT ve HDAC enzim aktiviteleri tayin edilerek, bu enzimlerin aktiviteleri üzerine (dolaylı olarak transkripsiyon üzerine) oksidatif stresin olası etkisi, gen

transkripsiyonu ile kontrol edilen apoptosis ve histon asetilasyonu arasındaki ilişki araştırılmıştır.

Karaciğerde serbest radikal oluşturmak için CCl<sub>4</sub> toksite modeli uygulanmıştır. Oluşan oksidatif stresin DNA'da oluşturabileceği hasarın ve DNA kırılmalarının, histon asetilasyonu ile ilgisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Önemli bir antioksidan olan N Asetil sisteinin DNA'daki hasar üzerine koruyucu rolü incelenmiştir.

Araştırma, "Deneysel Karaciğer İntoksikasyonunda DNA Hasarının Belirlenmesi ve N Asetil Sisteinin Rolü" isimli ve 1100500 kodlu proje olarak, TÜBİTAK tarafından desteklenerek gerçekleştirilmiştir.

# İÇİNDEKİLER

	<b>Sayfa</b>
KABUL VE ONAY SAYFASI .....	i
ÖNSÖZ .....	ii
İÇİNDEKİLER .....	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ .....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	x
1. GİRİŞ .....	1
1. 1. Karaciğer.....	3
1. 1. 1. Karaciğerin Özellikleri ve Fonksiyonları .....	3
1. 1. 2. Karaciğer Enzimleri .....	5
1. 2. Karbon tetraklorür (CCl <sub>4</sub> ) .....	6
1. 3. Serbest Radikal .....	7
1. 3. 1. Serbest Radikallerin Oluşumu .....	8
1. 3. 2. Serbest Oksijen Radikalleri ve Reaktif Oksijen Türleri .....	8
1. 3. 3. Serbest Radikallerin Lipidlere Etkileri .....	10
1. 3. 4. Serbest Radikallerin Proteinlere Etkileri .....	11
1. 3. 5. Serbest Radikallerin Nükleik Asitler ve DNA'ya Etkileri .....	11
1. 3. 6. Serbest Radikallerin Karbonhidratlara Etkileri .....	12
1. 4. Antioksidan Savunma .....	12
1. 5. Total Antioksidan ve Oksidan Kapasite .....	14
1. 6. Bir Antioksidan Olarak N Asetil Sistein (NAS) .....	16
1. 7. DNA'da Oksidatif Hasar Yapan Başlıca Etkenler .....	17
1. 8. Oksidatif DNA Hasarı Neticesi Oluşan Değişiklikler .....	19
1. 9. Oksidatif DNA Hasarının Belirlenmesi ve Analiz Teknikleri .....	21
1. 10. Histon Asetilasyonu ve Deasetilasyonu .....	23
1. 11. Apoptozis .....	29
1. 11. 1. Apoptozis Mekanizmaları .....	30
1. 11. 2. Apoptozisin Saptanmasında Kullanılan Yöntemler .....	36
2. GEREÇ VE YÖNTEM .....	39
2. 1. Deney Hayvanları .....	39

2. 2. Deney Grupları ve Uygulama Protokolü .....	39
2. 3. Kullanılan Cihazlar .....	41
2. 4. Kullanılan Kimyasal Maddeler .....	41
2. 5. Serumda Aspartat Aminotransferaz (AST) Analizi .....	42
2. 6. Serumda Alanin Aminotransferaz (ALT) Analizi .....	42
2. 7. Malondialdehit (MDA) Analizi .....	42
2. 8. Serumda Total Antioksidan Kapasitesi (TAK) Analizi .....	43
2. 9. Serumda Total Oksidan Kapasitesi (TOK) Analizi .....	43
2. 10. Karaciğer Dokusunda Nükleer Ekstrakt Hazırlanması .....	43
2. 11. Nükleer Ekstraktlarda 8-hidroksi-2-deoksiguanozin Analizi .....	44
2. 12. Nükleer Ekstraktlarda Histon Asetil Transferaz (HAT) Analizi .....	45
2. 13. Nükleer Ekstraktlarda Histon Deasetilaz (HDAC) Analizi .....	45
2. 14. Nükleer Ekstraktlarda Apoptotik DNA Fragmentasyonu Analizi .....	46
2. 15. Nükleer Ekstraktlarda Protein Analizi .....	46
2. 16. Karaciğer Dokularında Apoptotik Hücrelerin TUNEL Yöntemi İle Belirlenmesi.....	47
2. 17. İstatistiksel Analizler .....	47
3. BULGULAR .....	48
3. 1. Aspartat Aminotransferaz (AST) Sonuçları .....	48
3. 2. Alanin Aminotransferaz (ALT) Sonuçları .....	49
3. 3. Malondialdehit (MDA) Sonuçları .....	50
3. 4. Total Antioksidan Kapasitesi (TAK) Sonuçları .....	51
3. 5. Total Oksidan Kapasitesi (TOK) Sonuçları .....	52
3. 6. 8-hidroksi-2-deoksiguanozin (8-OHdG) Sonuçları .....	54
3. 7. Histon Asetil Transferaz (HAT) Sonuçları .....	55
3. 8. Histon Deasetilaz (HDAC) Sonuçları .....	56
3. 9. Apoptotik DNA Fragmentasyon Sonuçları .....	57
3. 10. Apoptotik Hücrelerin TUNEL Yöntemi Analizi Sonuçları .....	58
4. TARTIŞMA .....	63
5. SONUÇ .....	77
ÖZET .....	79
SUMMARY .....	81
KAYNAKLAR .....	83

ÖZGEÇMİŞ .....	106
TEŞEKKÜR .....	107

## SİMGELER ve KISALTMALAR

8-OHdG	8-hidroksi-2-deoksiguanozin
AIF	Apoptosis İndükleyici Faktör
ALT	Alanin aminotransferaz
Apaf – 1	Apoptotic Protease Activating Factor-1
AST	Aspartat aminotransferaz
ATP	Adenozin trifosfat
bp	Baz çifti
CAT	Katalaz
CCl <sub>3</sub>	Triklorometil
CCl <sub>4</sub>	Karbon tetraklorür
CHCl <sub>2</sub>	Dikloroetan
DNMT	DNA metiltransferazlar
EPA	Birleşik Devletler Çevre Koruma Dairesi
FADD	Fas associated death domain
Fas	Hücre Ölüm Reseptörü
FasL	Hücre Ölüm Reseptörü Ligandı
GSH	İndirgenmiş Glutatyon
GSH-Px	Glutatyon peroksidaz
GST	Glutatyon S-Transferaz
HAT	Histon asetilaz
HB	Hematoksilen boyama
HDAC	Histon deasetilaz
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HMT	Histon metil transferaz
IAP	Inhibitors of Apoptosis
IL – 1	İnterlökin – 1
İP	İntraperitoneal
MDA	Malondialdehit
NAS/NAC	N Asetil Sistein
NO	Nitrik oksit
O.	Oksi radikali
ONOO-	Peroksinitrit

PI	Propidium iyodür
PS	Fosfatidilserin
RIP	Receptör Interacting Protein
ROM	Reaktif oksijen metabolitleri
ROS	Reaktif oksijen türleri
SOD	Superoksid dismutaz
SOR	Serbest oksijen radikalleri
TAK	Total Antioksidan Kapasitesi
TBA	Tiyobarbitürik asit
TCA	Trikarboksilik asit
TNF	Tumor Necrosis Factor (Tümör Nekroz Faktörü)
TNFR - 1	Tümör Nekroz Faktör Reseptörü -1
TOK	Total Oksidan Kapasitesi
TUNEL	TdT-(terminal deoksinükleotidil transferaz) aracılı floresan-dUTP işaretleme



## ÇİZELGELER

		<b>Sayfa</b>
Çizelge 1. 11. 1	Apoptozis ve Genler	31
Çizelge 3. 1	Aspartat aminotransferaz (AST) sonuçları ve istatistik	48
Çizelge 3. 2	Alanin aminotransferaz (ALT) sonuçları ve istatistik	49
Çizelge 3. 3	Malondialdehit (MDA) sonuçları ve istatistik	50
Çizelge 3. 4	Total antioksidan kapasitesi (TAK) sonuçları ve istatistik	52
Çizelge 3. 5	Total oksidan kapasitesi (TOK) sonuçları ve istatistik	53
Çizelge 3. 6	8-hidroksi-2-deoksiguanozin (8-OHdG) sonuçları ve istatistik	54
Çizelge 3. 7	Histon asetil transferaz (HAT) sonuçları ve istatistik	55
Çizelge 3. 8	Histon deasetilaz (HDAC) sonuçları ve istatistik	56
Çizelge 3. 9	Apoptotik DNA fragmentasyon sonuçları ve istatistik	57

## ŞEKİLLER

		<b>Sayfa</b>
Şekil 1. 4	Enzim Savunma Mekanizması	13
Şekil 1. 7	DNA' da oksidatif hasar ve olası sonuçları	18
Şekil 1. 8. 1	DNA baz modifikasyonları	20
Şekil 1. 8. 2	Guanin'den modifiye baz olan 8-OHdG'nin oluşumu	21
Şekil 1. 10	DNA, oktamerik yapıdaki histon (H) kompleksinin etrafında dolanarak nükleozom yapısının oluşumu	26
Şekil 3. 1	Aspartat aminotransferaz (AST) sonuçları grafiği	49
Şekil 3. 2	Alanin aminotransferaz (ALT) sonuçları grafiği	50
Şekil 3. 3	Malondialdehit (MDA) sonuçları grafiği	51
Şekil 3. 4	Total antioksidan kapasitesi (TAK) sonuçları grafiği	52
Şekil 3. 5	Total oksidan kapasitesi (TOK) sonuçları grafiği	53
Şekil 3. 6	8-hidroksi-2-deoksiguanozin (8-OHdG) sonuçları grafiği	54
Şekil 3. 7	Histon asetil transferaz (HAT) sonuçları grafiği	55
Şekil 3. 8	Histon deasetilaz (HDAC) sonuçları grafiği	56
Şekil 3. 9	Apoptotik DNA fragmentasyon sonuçları grafiği	57
Şekil 3. 10. 1	CCL <sub>4</sub> uygulanan grupta 6. saatte apoptotik hücreler	59
Şekil 3. 10. 2	CCL <sub>4</sub> + NAS uygulanan grupta 6. saatte apoptotik hücreler	59
Şekil 3. 10. 3	Kontrol (Zeytinyağı) grubunda 6. saatte normal hücreler	60
Şekil 3. 10. 4	Kontrol (Zeytinyağı+NAS) grubunda 6. saatte normal hücreler	60
Şekil 3. 10. 5	CCL <sub>4</sub> uygulanan grupta 72. saatte apoptotik hücreler	61
Şekil 3. 10. 6	CCL <sub>4</sub> + NAS uygulanan grupta 72. saatte apoptotik hücre	61
Şekil 3. 10. 7	Kontrol (Zeytinyağı) grubunda 72. saatte normal hücreler	62
Şekil 3. 10. 8	Kontrol (Zeytinyağı+NAS) grubunda 72. saatte normal hücreler	62

# 1. GİRİŞ

Karaciğer, anatomik lokalizasyonu, fizyolojik ve biyokimyasal rolü nedeni ile toksik maddelere ve çeşitli ilaçlara çok sık maruz kalan bir organdır. Karaciğerde hasar dahil çeşitli patolojik tablolara yol açan 600'den fazla kimyasal molekülden biri de karbontetraklorürdür. Bu hasarın değişik şekillerinin, oksidatif stres ve bunu takiben ortaya çıkan serbest radikallerle oluştuğu bilinmektedir (Robbins ve ark 2000).

Toksik oksijen ve hidroksijen radikallerinin lipid peroksidasyonu ve başka yollarla hepatosit membranlarını hasarlayabilecekleri *in vivo/in vitro* çalışmalarda gösterilmiştir. Karbontetraklorür karaciğere lipid peroksidasyonu ile zarar vermektedir. Metabolizma esnasında öncelikle stabil olmayan başlangıç metaboliti triklorometil ( $CCl_3$ ) serbest radikali oluştuktan sonra lipidler ve proteinler ile kovalent bağlar oluşturarak hızla triklorometil peroksit ( $CCl_3 COO^-$ ) veya hidrojen atomlarını kaybetmiş olan kloroform formuna dönüşür. Daha sonra sekonder olarak oluşan konjuge dien, lipid hidroperoksit ve malondialdehit gibi yapılar ile kısa zincirli karbonhidratlar oluşur. Oluşan bu serbest radikaller hücre membranlarındaki fosfolipidlerde bulunan yağ asitlerinin peroksidasyonuna yol açarak hücre harabiyetine yol açarlar (Slater 1982, Recknagel 1989). Yapılmış olan birçok çalışmada karaciğer hastalıklarında oksidatif stres ve buna bağlı olarak ortaya çıkan karaciğer hasarı ile fibrozis arasında ilişki olduğu gösterilmiştir (Shimizu 2001, Shimizu 2003).

Serbest radikallerin fazlalığı, hücrelere hatta bunların DNA'sına bile zarar veren kimyasal zincir reaksiyonlarını başlatabilmekte ve kanser oluşturacak bir dizi olaya neden olabilmektedir. Normal şartlarda hücrelerde oksidantlar ve antioksidanlar arasında korunan bir denge vardır. Fakat oksidantların aşırı üretimi veya antioksidanların azalması sonucu oluşan dengesizlik, anormal oksidant üretimine yol açar, böylelikle "oksidatif stres" oluşur. Oksidatif streste, *in vivo* üretilen ROS'lar, nükleik asitlerin proteinlerin ve lipidlerin oksidatif hasarına neden olur. DNA'da tüm pürin ve pirimidin bazları arasında guanin oksidasyona daha çok yatkındır. Bu nedenle ROS'un başlıca hedefi DNA modifikasyonudur (Gümüş ve Yurtsever 2007, Tür ve Sözbilir 2008). Oksidasyonda bir

OH radikali, guanin molekülünün 8. pozisyonuna eklenir ve oksidasyonla değişikliğe uğratılmış DNA'nın serbest radikal lezyonlarından biri olan 8-OHdG (8-oxo-dG; 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin) oluşur (Altuntaş 2007).

Apoptozis (programlanmış hücre ölümü), hücre intiharı olarak da bilinen fizyolojik bir olaydır. Embriyolojik gelişim ve erişkin dokunun yaşamının sürdürülmesinde anahtar rol oynar. Organizmanın ihtiyaç duymadığı, biyolojik görevini tamamlamış veya hasarlı hücreler apoptozis ile genetik olarak kontrol edilerek ortadan kaldırılır. Apoptotik hücrenin kromatini nükleus membranının çevresinde toplanır ve yoğunlaşır. Apoptozisin en önemli özgün yönü DNA'nın internükleozomal bölgelerden parçalanmasıdır (Akşit ve Bildik 2008). Son yıllarda yapılan çalışmalarda histon asetilasyonun apoptozis ile ilgili olabileceğine dair bulgular elde edilmiştir (Kang ve ark 2004). Her ne kadar histon asetilasyonu önceki çalışmalar da yalnızca transkripsiyon aktivasyonuna bağlanmışsa da, son araştırmalar çok daha geniş ve birçok fonksiyona sahip olduğunu işaret etmektedir. Histon asetil transferaz kompleksleri, transkripsiyon aktivasyonu, gen sessizliği, DNA tamiri ve hücre siklusunun devamlılığı gibi birçok proseste yer almaktadır. Histon asetilasyonu, kromatinin açılmasıyla transkripsiyon için uygun ortamın şekillenmesine iştirak eder ve transkripsiyon faktörlerinin DNA'ya ulaşmasına izin verir, buna karşılık histon deasetilasyonu kapalı kromatin durumuna ve transkripsiyonu baskılamaya katkıda bulunur. Normal hücrelerde histon asetilaz (HAT) ve histon deasetilaz (HDAC) enzim aktiviteleri arasında korunan bir denge vardır (Rahman ve ark 2004) .

Araştırmamızda HAT ve HDAC enzim aktiviteleri tayin edilerek, bu enzimlerin aktiviteleri üzerine (dolaylı olarak transkripsiyon üzerine) oksidatif stresin olası etkisi, gen transkripsiyonu ile kontrol edilen apoptozis ile histon asetilasyonu arasında bir ilişkisinin olup olmadığı araştırılmıştır. Son dönemlerde histon asetilasyonu ile ilgili çeşitli hastalıklarda yapılmış birçok çalışma olmasına rağmen DNA'daki oksidatif hasar ve apoptozisin birlikte değerlendirildiği araştırmaya rastlanmamıştır.

Karaciğerde serbest radikal oluşturmak için CCl<sub>4</sub> toksite modeli uygulanmıştır. Oluşan oksidatif stresin DNA'da oluşturabileceği hasarın ve DNA kırılmalarının, histon asetilasyonu ile ilgisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Aynı zamanda, en önemli intrasellüler antioksidanlardan olan GSH'nin öncül maddesi olarak kullanılan N Asetil sisteinin DNA'daki hasar üzerine koruyucu rolü araştırılmıştır.

## 1. 1. Karaciğer

### 1. 1. 1. Karaciğerin Özellikleri ve Fonksiyonları

Karaciğer, sindirim kanalından emilen besinlerin işlendiği ve vücudun diğer bölümleri tarafından kullanılması için depolandığı bir organdır. Karaciğer, deri dışında, vücudun en büyük organı ve bezidir. Diyaframın altında karın boşluğunda yerleşmiştir. Karaciğere gelen kanın %70-80'nini portal ven, %10-20'sini hepatik arter karşılar. İnce barsaklardan emilen maddelerin çoğu portal ven yoluyla karaciğere ulaşır, sadece kompleks lipidler lenfatik yolla taşınır (Junqueira ve ark 1992).

Pek çok önemli fonksiyonu bulunmakla birlikte temel görevleri şöyle sıralanabilir; sekresyon, ekskresyon, depo, fagositoz, detoksikasyon, konjugasyon, esterleştirme, metabolizma ve hemopoezdir (Guyton 1991). Karaciğer tüm bu görevleri karaciğer parankimini oluşturan epitel hücreleri aracılığıyla gerçekleştirir. Karaciğer parankiminde çeşitli nedenlerle dejenerasyon oluşurken aynı zamanda rejenerasyon da oluşur. Ancak organa gelen hasar sürekli olur ve tekrarlanırsa hücre yenilenmesinden daha fazla oranda bağ dokusu artışı meydana gelir. Bağ dokusundaki bu artış karaciğer yapısındaki bozuklukla sonuçlanır ve siroz olarak isimlendirilir. Karaciğer parankiminin tahrip olması ve bunun yerine yağ dokunun gelişmesi, fonksiyonel karaciğer hücreleri yanında vasküler ve safra kanalları sistemlerini de bozar (Junqueira ve ark 1992). Karaciğerde siroza; toksik maddeler (karbon tetraklorür, alkol, fosfor, kloroform, manganez, arsenik, kömür katranı), enfeksiyonlar ve parazit larvaları, karaciğerde alyuvar yıkımı sonucunda aşırı düzeyde hemosiderin birikimi gibi faktörler neden olmaktadır (Ariosto ve ark 1989, Doi ve ark 1991, Fischer-Nielsen ve ark 1991).

Yukarıda da belirtildiği gibi karaciğerin çok değişik fonksiyonları bulunmaktadır. Bununla beraber çoğu kez karaciğerin bu fonksiyonları birbirleriyle ilişkilidir. Karaciğer epitel hücrelerinin dejenerasyonu sonucunda bu görevlerin büyük bir kısmında aksamalar meydana gelmekte bu da kendisini klinik semptomlarla göstermektedir. Karbontetraklorür ile deneysel olarak oluşturulan intoksikasyondan ve sirozdan pek çok organ (karaciğer, dalak, pankreas, timus, lenf düğümleri, akciğerler, kalp) (Guyton 1991) ile sistem doğrudan veya dolaylı bir şekilde etkilenmektedir. Bu sistemlerin başında ise kan - dolaşım sistemi, solunum sistemi, boşaltım sistemi, sinir sistemi gelmektedir (Çınar ve ark 1999).

Karaciğer hücresi vücudun çok yönlü bir hücresidir. Hem endokrin hem de ekzokrin fonksiyonu olan bu hücreler, bazı maddelerin sentezini yapar ve depolar, bazılarını detoksifiye eder ve bazılarını da taşır (Çetinkaya 2009).

Safra üretimi, kan bileşenlerinin alınıp, dönüştürülüp safra kanalikülleri içine salgılanması nedeni ile bir anlamda ekzokrin fonksiyondur. Safra; su ve elektrolitlere ek olarak birkaç esansiyel komponente de sahiptir. Bunlar, safra asitleri, fosfolipitler, kolesterol ve bilirubindir. Safra asitleri, lipazla sindirimi ve daha sonraki absorpsiyonu kolaylaştırmak için sindirim sistemindeki lipidleri emülsiyon haline getirmede önemli bir fonksiyona sahiptir. Safra fosfolipitleri ile birlikte safra asitleri, kolesterolü çözülebilir hale getirir ve vücuttan atılmasını kolaylaştırır (Arii ve ark 1990, Çetinkaya 2009).

Lipidler ve karbonhidratlar, trigliserid ve glikojen halinde depolanır. Metabolitleri depolama kapasitesi, vücudun öğünler arasındaki enerji gereksinimini karşıladığı için önemlidir. Karaciğer vitaminler için büyük bir depo görevi yapmaktadır. Hepatosit; lipidleri ve aminoasitleri glukoneogenesis adı verilen kompleks enzimatik bir olayla glikoz haline dönüştürür. Ürenin meydana gelmesiyle sonuçlanan aminoasit deaminasyonun da asıl yeridir. Bu bileşik kan yoluyla böbreklere taşınır ve bu organ yoluyla vücut dışına atılır (Çetinkaya 2009, Cabre ve ark 2000).

Çeşitli ilaçlar ve maddeler, oksidasyon, metilasyon ve konjugasyonla metabolize edilebilir. Bu işleme katılan enzimler başlıca granülsüz endoplazmik retikulumda bulunur. Glukuronik asidi bilirubine bağlayıcı bir enzim olan glukuronil transferaz, steroidler, barbitüratlar, antihistaminikler ve antikonvülzanlar gibi çok sayıda ilacın da konjugasyonunu sağlar. Bu nedenle ilaçlarla oluşan hasarların ana hedefidir. Karaciğer hasarına yol açan ve hemen hemen her tür karaciğer hastalığı tablosuyla sonuçlanabilen 600'den fazla farklı ilaç vardır (Demirdağ ve ark 2004, Çetinkaya 2009).

### **1. 1. 2. Karaciğer Enzimleri**

Karaciğer fonksiyon testi olarak bilinen birçok enzim ölçümü gerçekte karaciğerin fonksiyonunu göstermemekte, fakat karaciğerdeki hücre harabiyeti veya kolestaz hakkında bilgi vermektedir. Karaciğer fonksiyon testi yüksekliği dendiğinde etiyojiye yönelik olanlar ve karaciğer fonksiyonel rezervini gösteren testler dışındaki, karaciğer hücre

harabiyetini (AST, ALT) veya kolestazı (Alkalın fosfataz ve GGT) gösteren testler anlaşılmaktadır. Karaciğerdeki akut veya kronik hasarlar bu enzimlerin serum düzeylerinde yükselmeye yol açar (Roderick 2004).

Karaciğer enzimlerinden aminotransferazlar normalde hücre içi enzimlerdir. Plazmadaki yüksek aminotransferaz düzeyleri bu enzimlerden zengin hücre hasarını gösterir. Örneğin fiziksel bir travma veya bir hastalık durumu hücre yıkımına neden olur ve bu durum hücre içi enzimlerin kana karışmasına yol açar. Aminotransferazlardan ikisinin, önemli tanısal değeri vardır. Bunlar AST ve ALT'dir. Hemen hemen tüm karaciğer hastalıklarında, plazma AST ve ALT düzeylerinde yükseklik gözlenir. Önemli viral hepatit ve uzamış dolaşım kollapsı gibi ileri hücre nekrozuna neden olan durumlarda daha belirgin düzeylerde yükselme meydana gelir. Aminotransferazlar miyokard infarktüsü ve kas hasarı gibi karaciğer dışı hastalıklarda da yükselebilir (Soyak 2006).

Alanin aminotransferaz (ALT); karaciğer, kas ve beyinde yüksek konsantrasyonda bulunur. Glutamik asitten bir amino gurubunu, pirüvik asite transfer eder ve alanin amino asiti oluşurken yine alfa keto glutarik asit ortaya çıkar (Murray ve ark 1993).

Aspartat aminotransferaz (AST); bir amino asitin alfa amino gurubunun bir alfa keto asite transferi ile yeni bir alfa keto asidi ve yeni bir alfa amino asiti meydana getiren reaksiyonu katalizler. Reaksiyona katılan maddelerden her ikisi önce bir ara madde meydana getirirler. Bu ara madde bir hidrolitik olarak yeni bir amino asite ve yeni bir keto asite parçalanır. Pridoksal fosfat koenzim olarak görev yapmaktadır ve amino grupları için bir ara taşıyıcı olarak hizmet eder. Normal olarak en çok kalp kası, iskelet kası, beyin, karaciğer ve böbrekte bulunur. Fakat bunlardan kalp, kas ve karaciğer hücreindeki şiddetli travma ve nekrozlu durumlarda kısa bir zamanda serumdaki miktarı şiddetle artar. ALT karaciğerin akut hücre zedelenmesinde AST'ye göre daha spesifiktir (Ertekin 1996).

## **1. 2. Karbon tetraklorür (CCl<sub>4</sub>)**

Karbon tetraklorür (CCl<sub>4</sub>) renksiz, berrak, uçucu bir sıvıdır. Önceleri kuru temizleme, yangın söndürme, tahıl dezenfeksiyonu ve böceklerle mücadelede yararlanılan bu kimyasal bileşik; günümüzde petrol ürünleri, çeşitli yağlar, vernik, cila, reçine çözücüsü ve organik bileşiklerin imalatında kullanılmaktadır. Çevreden insan vücuduna günlük

ortalama 0,1 µg CCl<sub>4</sub> girişi olduğu tahmin edilmektedir. Birleşik Devletler evre Koruma Dairesi (EPA) hayvan deneylerinden elde edilen sonuçlara dayanarak, CCl<sub>4</sub>'u insan için olası kanserojen (grup B2) sınıfına dahil etmiştir (Thrall ve ark 2000).

Karbon tetraklorür deneysel karaciğer harabiyeti oluşturmak için yaygın kullanılan peroksidant aktivitesi bilinen bir maddedir (Güven ve ark 2003).

Karbon tetraklorür, temizlik maddelerinin ve solventlerinin yapımında, tahılların ilalanmasında ve kloroflorokarbonların sentezinde ara ürün olarak yaygın bir şekilde kullanılmasına rağmen toksisitesinin keşfedilmesi ve florokarbon kullanımının azalmasıyla üretimi 1974'ten bu yana azalmıştır. CCl<sub>4</sub>'ün havadaki miktarı genellikle çok az olmasına rağmen bazı şehirlerde nispeten yüksek konsantrasyonlarda bulunurlar. Yiyeceklerde sıklıkla tolere edilebilir seviyede, içme sularında ise düşük seviyede saptanmıştır. CCl<sub>4</sub>'den en fazla etkilenen organlar karaciğer ve böbreklerdir (Sert ve Altın Saat 2008).

Karbon tetraklorür Veteriner hekimlikte ise, helmintlere karşı paraziter mücadelede uygulanmaktadır (Adams 1995, Kaneko ve ark 2000). İlaç ağızdan verildikten sonra sindirim kanalından yavaş ve sınırlı ölçüde emilir. Dolaşıma geçtikten sonra, vücudu akciğer, böbrek ve özellikle safrayla terk eder (Kaya ve ark 2000). CCl<sub>4</sub>, yüksek dozlarda kullanıldığında karaciğerde birikerek harabiyete ve hatta siroza neden olabilir (Murakami ve ark 1998, ınar ve ark 1999, Shimizu ve ark 2001).

Normal şartlarda i ve dış kaynaklı birçok stres faktörü hücresel dengeyi sürekli değiştirmektedir. Bu stresörlere karşı korunmada, hücrenin kendi geliştirdiği serbest radikal zincir reaksiyonlarını inhibe eden ve antioksidanlar olarak tanımlanan bazı bileşikler rol oynamaktadır. Karbon tetraklorürün metabolizması sonucu ortaya çıkan serbest radikaller organizmalar üzerinde olumsuz etkiler oluşurmaktadır. Karaciğer hücrelerinin endoplazmik retikuluma yerleşmiş olan monooksijenazlar tarafından (CCl<sub>4</sub>)'den bir klor atomu ayrılarak dayanıksız bir radikal oluşur. Bu serbest radikal, doymamış yağ asitlerinde çok sayıda bulunan metil gruplarından bir hidrojen atomu koparır ve onunla birleşir. Bu reaksiyon sonucu bir taraftan kloroform oluşurken, diğer taraftan da yağ asidi esterlerinin bir serbest radikali ortaya çıkar. Serbest radikallerin oluşumu hücredeki antioksidan savunma sistemlerini aşarsa membrandaki yağ asitleri serbest radikallerle reaksiyona girerek peroksidasyon ürünlerini oluşturur (Üstündağ ve ark 2005).



Karbon tetraklorür ile oluşan hepatotoksisitenin seyri bir dereceye kadar dokulardaki parsiyel oksijen basıncıyla ilişkilidir. Düşük basınçta kovalent metabolit bağlanması ile triklorometil ( $CCl_3$ ) ve dikloroetan ( $CHCl_2$ ) radikalleri meydana gelir. Bunun sonucunda sıklıkla lipit metabolizması etkilenir (sentezde artış, hepatosit dışına transportta azalma) ve steatozis (yağlı karaciğer) gelişir. Oksijen basıncında ise  $CCl_3-OO$  radikali oluşur, bu da hücrede steatozdan apoptoza kadar olan değişikliklere neden olur (Boll ve ark 2001).

### **1. 3. Serbest Radikal**

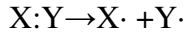
Serbest radikal bir ya da daha çok sayıda eşleşmemiş elektron içeren atom veya atom gruplarına denir. Bu maddeler bir tepkimeye oldukça yatkın hatta saldırgan olarak tarif edilirler. Çok etkin, yüksek enerjili, kısa ömürlü ve izole edilemeyen ara ürünlerdir. Diğer bir tanımlama ile serbest radikaller; yapılarında tek sayıda elektron içeren, açık elektron kabuğu konfigürasyonuna sahip atom veya moleküllerdir. Radikal ve serbest radikal terimleri sıklıkla birbirlerinin yerine kullanılmakla beraber, radikal terimi, serbest radikalın su molekülleri tarafından tutulmuş bağlı formunu ifade etmek için kullanılmaktadır. Tarihsel olarak ise “Radikal” terimi, reaksiyon sırasında değişmeden kalan atom gruplarını tanımlamaktadır (Staroverov ve Davidson 2000).

Biyolojik serbest radikaller oldukça dayanıksız ve aynı zamanda reaktif moleküller olup, elektronları hücredeki diğer moleküllerle etkileşime girerek oksidatif stres (hasar) meydana getirirler. Serbest radikaller normal hücresel metabolizma sırasında oluşabildiği gibi, çeşitli dış etkenler aracılığı ile de meydana gelebilir. Oksidatif stres, organizmadaki prooksidan ve antioksidan dengenin bozulması olarak tanımlanmaktadır. Radikaller; lipitler, proteinler ve nükleik asitler gibi temel hücresel bileşenlerde hasara yol açabilme özelliğine sahiptir. Oluşan bu hasarın kanser, ateroskleroz, amiloidoz, yaşa bağlı bağışıklık yetersizliği ve hipertansiyon gibi çeşitli hastalıklar ile ilişkili olduğu ve biyolojik yaşlanma sürecinde rol oynadığı bilinmektedir (Kopani ve ark 2006).

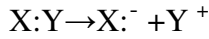
### 1. 3. 1. Serbest Radikallerin Oluşumu

Serbest radikaller 3 yolla meydana gelirler (Akkuş 1995).

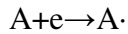
1. Kovalent bağlı bir molekülün her bir parçasında ortak elektronlardan birisinin kalarak homolitik bölünmesi sonucu meydana gelirler.



2. Normal bir molekülden tek bir elektronun kaybı veya bir molekülün heterolitik bölünmesi ile meydana gelebilirler. Heterolitik bölünmede kovalent bağı oluşturan her iki elektron atomların birinde kalır. Böylece serbest radikal değil iyonlar meydana gelir.



3. Normal bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi ile meydana gelirler.



Biyolojik sistemlerde serbest radikaller en fazla elektron transportu sonucu meydana gelirler. Serbest radikaller pozitif yüklü, negatif yüklü veya elektriksel olarak nötral olabilirler. Organik veya inorganik moleküller şeklinde olabilirler (Akkuş 1995).

### 1. 3. 2. Serbest Oksijen Radikalleri ve Reaktif Oksijen Türleri

Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir. Serbest oksijen radikali biyokimyasında anahtar rolü oynayan maddeler oksijenin kendisi, süperoksid, hidrojen peroksit, geçiş metallerinin iyonları ve hidroksil radikalidir. Bunlardan ilk dördünün çeşitli reaksiyonları ile sonucusu meydana gelir (Akkuş 1995).

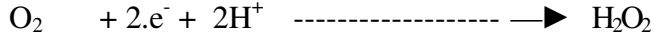
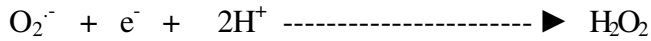
Oksijenin elektronları o şekilde dağılmışlardır ki bu elektronlardan iki tanesi eşleşmemiştir. Bu yüzden oksijen bazen bir “diradikal” olarak da değerlendirilir. Oksijenin bu özelliği onu diğer serbest radikallerle kolayca reaksiyona girmesini sağlar. Radikal olmayan maddelerle ise daha yavaş reaksiyona girer. Oksijen en son suya indirgenir. Bu

arada, kısmi redüksiyonla çok sayıda yüksek derecede reaktif ürünler de oluşabilirler (Akkuş 1995).

Süperoksit radikali; Hemen tüm aerobik hücrelerde oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu, serbest süperoksit radikal anyonu ( $O_2^{\cdot-}$ ) meydana gelir. Süperoksit, bir serbest radikal olmakla birlikte kendisi direk olarak fazla zarar vermez. Asıl önemi, hidrojen peroksit kaynağı olması ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır. Süperoksidin, fizyolojik bir serbest radikal olan nitrik oksit ile birleşmesi sonucu reaktif bir oksijen türevidir olan peroksinitrit meydana gelir (Gümrükçüoğlu 2009).

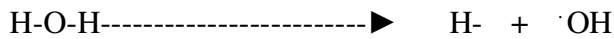


Hidrojen peroksit; Moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden 2 elektron alması veya süperoksidin bir elektron alması sonucu peroksit oluşur. Peroksit molekülü 2 hidrojen atomu ile birleşerek hidrojen peroksidi ( $H_2O_2$ ) meydana getirir.  $H_2O_2$  membranlardan kolayca geçebilen, uzun ömürlü bir oksidandır (Gümrükçüoğlu 2009).



Hidrojen peroksit, açığa süperoksit çıkmadan oksijenin direk divalan reaksiyonu ile de oluşabilir.

Hidroksil radikali; Hidroksil radikali ( $\cdot OH$ ), hidrojen peroksidin geçiş metallerinin varlığında indirgenmesiyle (Fenton reaksiyonu ile) meydana gelir. Suyun yüksek enerjili iyonize edici radyasyona maruz kalması sonucunda da hidroksil radikali oluşur (Akkuş 1995).



Singlet oksijen; Singlet oksijen ( $^1O_2$ ), ortaklanmamış elektronu olmadığı için radikal olmayan reaktif oksijen molekülüdür. Serbest radikal reaksiyonları sonucu meydana geldiği gibi serbest radikal reaksiyonlarının başlamasına da sebep olur (Akkuş 1995).

### 1. 3. 3. Serbest Radikallerin Lipidlere Etkileri

Lipidler serbest radikallerin etkilerine karşı en hassas olan biyomoleküllerdir. Hücre membranlarındaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar (Delibaş ve Özçankaya 1995).

Poliansatüre yağ asitlerinin oksidatif yıkımı lipid peroksidasyonu olarak bilinir. Lipid peroksidasyonu kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler ve oldukça zararlıdır. Hücre membranlarında lipid serbest radikalleri ve lipid peroksit radikallerinin oluşması, reaktif oksijen türlerinin neden olduğu hücre hasarının önemli bir özelliği olarak kabul edilir. Serbest radikallerin sebep olduğu lipid peroksidasyonuna "nonenzimatik lipid peroksidasyonu" denir (Akpoyraz ve Durak 1995).

Lipid radikali dayanıksız bir bileşiktir ve bir dizi değişikliğe uğrar. Lipid radikallerinin moleküler oksijenle etkileşmesi sonucu lipid peroksit radikalleri oluşur. Lipid peroksit radikalleri, membran yapısındaki diğer poliansatüre yağ asitlerini etkileyerek yeni lipid radikallerinin oluşumuna yol açarken kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipid peroksitlerine dönüşürler ve böylece olay kendi kendini katalizleyerek devam eder (Akpoyraz ve Durak 1995).

Lipid peroksitleri yıkıldığında çoğu biyolojik olarak aktif olan aldehitler oluşur. Bu bileşikler ya hücre düzeyinde metabolize edilirler veya başlangıçtaki etki alanlarından diffüze olup hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayarlar (Düzgüner 2005).

Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonunda malondialdehit (MDA) meydana gelir. Malondialdehit kanda ve idrarda ortaya çıkar, yağ asidi oksidasyonunun spesifik ya da kantitatif bir indikatörü olmamakla beraber lipid peroksidasyonunun derecesiyle iyi korelasyon gösterir. Bu nedenle biyolojik materyalde malondialdehit ölçülmesi lipid peroksit seviyelerinin indikatörü olarak kullanılır (Düzgüner 2005).

Nonenzimatik lipid peroksidasyonu çok zararlı bir zincir reaksiyonudur. Direkt olarak membran yapısına ve ürettiği reaktif aldehitlerle indirekt olarak diğer hücre bileşenlerine zarar verir. Böylece doku hasarına ve birçok hastalığa neden olur (Akpoyraz ve Durak 1995).

### **1. 3. 4. Serbest Radikallerin Proteinlere Etkileri**

Proteinler serbest radikallere karşı poliansatüre yağ asitlerinden daha az hassastırlar. Proteinlerin serbest radikal harabiyetinden etkilenme derecesi amino asit kompozisyonlarına bağlıdır. Doymamış bağ ve kükürt içeren triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metiyonin, sistein gibi amino asitlere sahip proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenirler. Bu etki sonucunda özellikle sülfür radikalleri ve karbon merkezli organik radikaller oluşur (Gümrükçüoğlu 2009).

### **1. 3. 5. Serbest Radikallerin Nükleik Asitler ve DNA'ya Etkileri**

İyonize edici radyasyonla oluşan serbest radikaller DNA'yı etkileyerek hücrede mutasyona ve ölüme yol açarlar. Hidroksil radikali deoksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyona girer ve değişikliklere yol açar. Aktive olmuş nötrofillerden kaynaklanan hidrojen peroksit membranlardan kolayca geçerek ve hücre çekirdeğine ulaşarak DNA hasarına, hücre disfonksiyonuna ve hatta hücre ölümüne yol açabilir. Süperokside maruz kalan DNA molekülleri hayvanlara enjekte edildiklerinde daha fazla antijenik özellik gösterirler ki bu oldukça önemli bir etkidir, çünkü otoimmün bir hastalık olan sistemik lupus eritematozusta ve romatoit artritte dolaşımda anti-DNA antikorlar bulunur (Akkuş 1995).

### **1. 3. 6. Serbest Radikallerin Karbonhidratlara Etkileri**

Serbest radikallerin karbonhidratlara etkisiyle çeşitli ürünler meydana gelir ve bunlar, çeşitli patolojik süreçlerde önemli rol oynarlar (Akkuş 1995).

Diyabet ve diyabet komplikasyonlarının gelişimi, koroner kalp hastalığı, hipertansiyon, psöriyazis, romatoit artrit, Behçet hastalığı, çeşitli deri ve göz hastalıkları, kanser gibi birçok hastalıkta ve yaşlılıkta serbest radikal üretiminin arttığı, antioksidan savunma mekanizmalarının yetersiz olduğu gösterilmiştir. Ancak bu hallerde serbest radikal artışının sebep mi yoksa sonuç mu olduğu tam olarak bilinmemektedir (Akkuş 1995).

#### 1. 4. Antioksidan Savunma

Antioksidan savunma sistemi hücre içi ve hücre dışı olarak ikiye ayrılır. Hücre içi savunma sisteminin enzimatik antioksidanları; süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon s-transferazlar (GST), katalaz (CAT), mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi ve hidroperoksidazdır. Enzimatik olmayan antioksidanlar; melatonin, seruloplazmin, transferrin, miyoglobin, hemoglobin, ferritin, bilirubin, glutatyon, sistein, metiyonin, urat, laktoferrin ve albümindir. Hücre dışı savunma sistemi ise; vitaminler, ilaçlar ve gıda antioksidanları olmak üzere sınıflandırılabilirler (Tosun ve Karadeniz 2005, Yüce ve Aksakal 2007).

Vitamin eksojen antioksidanlar;  $\alpha$ -tokoferol (vitamin E),  $\beta$ -karoten, askorbik asit (vitamin C) ve folik asit (folat)dir (Tarin ve ark 1998).

İlaç olarak kullanılan eksojen antioksidanlar; ksantin oksidaz inhibitörleri (allopürinol, oksipürinol, pterin aldehit, tungsten), NADPH oksidaz inhibitörleri (adenozin, lokal anestezikler, kalsiyum kanal blokerleri, nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar, diphenyline iodonium), rekombinant süperoksit dismutaz, trolox-C (vitamin E analogu), endojen antioksidan aktiviteyi artıranlar (GSH-Px aktivitesini artıran ebselen ve asetilsistein), nonenzimatik serbest radikal toplayıcılar (mannitol, albümin), demir redoks döngüsü inhibitörleri (desferroksamin), nötrofil adezyon inhibitörleri, sitokinler (TNF ve IL-1), barbitüratlar ve demir şelatörleridir (Tarin ve ark 1998).

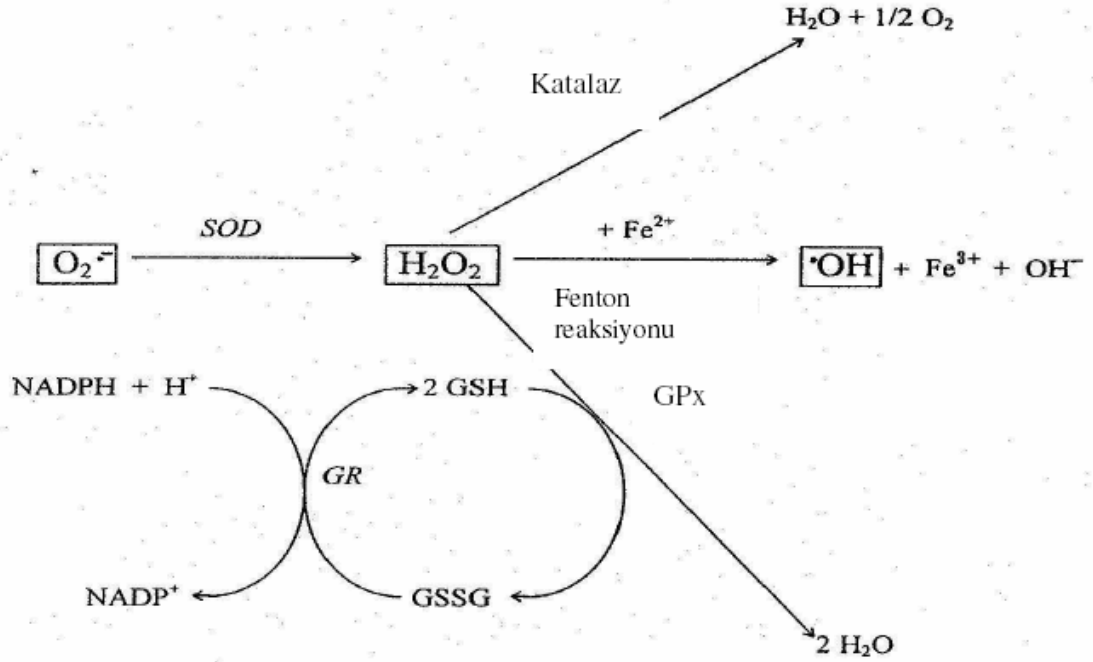
Antioksidanlar 4 ayrı şekilde etki ederler (Çavdar ve ark 1997).

a) Toplayıcı etki (scavenging etki): Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma veya çok daha zayıf yeni bir moleküle çevirme işlemine toplayıcı etki denir. Antioksidan enzimler, trakeobronşial mukus ve küçük moleküller bu tip bir etki gösterirler (Çavdar ve ark 1997).

b) Bastırıcı etki (quencher etki): Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltma veya inaktif şekle dönüştürme bastırıcı etkidir. Vitaminler, flavanoidler bu tarz bir etkiye sahiptirler (Akkuş 1995).

c) Zincir kırıcı etki (chain breaking etki): Serbest oksijen radikallerini bağlayarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyici etki zincir kırıcı etkidir. Hemoglobin, seruloplazmin ve mineraller zincir kırıcı etki gösterirler (Çavdar ve ark 1997).

d) Onarıcı etki (repair etki): Serbest radikallerin oluşturdukları hasarın onarılması onarıcı etkidir (Akkuş 1995).



Şekil 1. 4. Enzim Savunma Mekanizması (Armstrong 1998)

## 1. 5. Total Antioksidan ve Oksidan Kapasite

Canlı hücrelerde bulunan protein, lipid, karbohidrat ve DNA gibi okside olabilecek maddelerin oksidasyonunu önleyen veya geciktirebilen maddelere antioksidanlar ve bu olaya antioksidan savunma denir. Memeli hücrelerinde oksidan ürünlere karşı korunma bazı prensipler içinde gerçekleşmektedir. Oksidanların organizmadaki düzeylerini arttırıcı etkenlerin ve risk faktörlerinin iyi belirlenmesi ve bunlardan uzak durulması ilk yapılması gereken girişim olmalıdır. İkinci girişim ise ROS'larla tetiklenen biyokimyasal reaksiyonlar bir yada birkaç basamağında kırmaktır. Üçüncü mücadele yolu, oluşan mediyatörlerle aktive olan inflamatuvar hücrelerin lezyon yerine hücumunu ve orada aşırı birikimini önlemektir. Oksidan moleküllerle mücadelede üzerinde durulacak esas girişim

ise belirli düzeyi aşan oksidanlara direkt olarak etki edip onları inaktif hale getiren antioksidanlardır (Ertürk 2006).

Antioksidan savunma sistemi, serbest radikallerin oluşturduğu hasardan dokuları koruyan ve oksidatif stresi bastıran kompleks bir sistemdir. Vücudun total antioksidan kapasitesine (TAK) en büyük katkı plazmadaki antioksidan moleküllerden gelir. Plazma farklı kan bileşenlerini oksidatif hasara karşı koruyabildiği gibi, diyetle alınan antioksidanların vücudun diğer kısımlarına dağılmasını da sağlayabilir. Bununla birlikte plazma oksidatif stresle savaşmak için basit bir kimyasal sistem değildir, direk olarak radikalleri toplayabilen zincir kırıcı antioksidanlara da sahiptir. İn vivo her antioksidanın katkısı onun etkinliğine ve biyolojik sıvılardaki konsantrasyonuna bağlıdır. Albumin, ürik asit ve askorbik asit insan plazmasındaki total antioksidan kapasiteye ana katkıyı (>%85) sağlar. Bu üstünlük büyük ölçüde onların kandaki diğer antioksidanlara nisbeten yüksek konsantrasyonlarına bağlıdır. Bireysel antioksidanlar antioksidan savunma sisteminde özel bir rol oynamasına rağmen bu antioksidanlar in vivo oksidatif hasara karşı organları sinerjistik bir koruma sağlamak için birlikte etki edebilirler. Bu yüzden antioksidan savunma sistemini değerlendirmek için total antioksidan kapasiteyi ölçmek daha anlamlıdır (Vural ve ark 2007).

Serbest radikallerin meydana getirdiği hasarı engellemeye çalışan antioksidanların bir kısmı enzim, bir kısmı ise enzim olmayan moleküllerden oluşmuştur. Vücudun antioksidan/oksidan durumu antioksidan enzimlerin aktivitesi ve antioksidan/oksidan moleküllerin konsantrasyonu ayrı ayrı ölçülerek değerlendirilebilmekle beraber, genel antioksidan/oksidan durumu total antioksidan durum ve total oksidan durumun (TOK) ölçümü ile daha kolay değerlendirilebilmektedir (Kurban ve ark 2010).

Serbest radikallerin oluşumu, antioksidan kapasiteyi aşacak olursa metabolik ve fonksiyonel birçok bozukluk ortaya çıkar. Dokularda, tek elektronların devamlı oksijene akışı endojen oksidatif stresi meydana getirir. ROS olarak bilinen ve oksijenden türeyen superoksid, peroksid, hidroksil ve diğer serbest radikaller çok reaktiftir. Bu nedenle bunların fazla olması membran bütünlüğünü sağlayan fosfolipidlerin, proteinlerin, DNA ve RNA gibi moleküllerin bütünlüğünü tehdit eder. Çeşitli biyolojik olaylarda, örneğin antimikrobiyal savunma, iltihaplanma, kanser, radyasyon hasarı, fotobiyolojik etkiler ve yaşlanmada, ROS işe karışır. Sonuçta DNA baz hasarları, protein oksidasyon ürünleri, lipid peroksidasyon ürünleri açığa çıkar ve hücrenin dengesi bozularak harap olur.



TOK'nin azalmasını etkileyen eksternal ve internal birçok faktör vardır. Özellikle hücre içerisinde artan oksidatif radikaller antioksidan koruyucu mekanizmanın azalmasına ve oksidatif stresin artmasına neden olmaktadır. Oksidatif stresin artması da özellikle karaciğer hücresinde ölüme neden olmakta bunun göstergesi olan enzimlerde yükselme, fibrozda gelişme ve siroz ile sonuçlanmaktadır (Sırmatel ve ark 2009).

Yapılan çalışmalar kronik viral hepatit olgularında ROS'un arttığını, ortaya çıkan lipid peroksidasyonunun DNA ve RNA hasarına yol açarak hücrenin malignleşmeye gidebileceğini göstermiştir. Olgularda TOK değerinin yüksek bulunması ROS artışının bir göstergesidir. Halliwell (1991) yaptığı çalışmada viral infeksiyonlarda inflamatuvar yanıt ile ilişkili olarak lipid peroksidasyonunun artabileceğini, iyileşme sırasında oksidatif stresin azalmasının en erken göstergesinin antioksidan düzeyde artış olduğunu belirtmiştir. Akaike ve ark (1998) virüsle infekte hücrelerde superoksit anyon ve hidrojen peroksidlerin arttığını, bu serbest radikallerin DNA ve RNA'da mutasyonla malign transformasyona yol açtığını deneysel olarak göstermişlerdir. Oksidatif stresin artması kronik hepatit olgularında hepatoselüler harabiyete neden olmakta, artan serbest radikallerin yaptığı DNA harabiyeti süre ilerleyince hepatoselüler kanser gelişimi görülebilmektedir. Yamamoto ve ark (1998) yüksek oksidatif stresin kronik viral hepatit, siroz ve hepatoselüler kanser olgularında nekroinflamasyonla birlikte olduğunu ortaya koymuşlardır. Kronik viral hepatit olgularında artan TOK değeri ve azalan TAK düzeyi, hücrede oksidatif stresin yüksek olduğunu, nekroinflamasyonla birlikte hücre harabiyetinin olduğunu doğrulamaktadır (Sırmatel ve ark 2009). Moriya ve ark (2001) yaptıkları hayvan deneyinde TOK'de bir değişiklik saptamamışlardır. Bu hayvan deneyinde artan ROS'un inflamasyon olmadan karaciğer hücresinde oksidatif stresi artırarak hepatoselüler kansere ilerlediğini göstermişlerdir. Bu durumun karaciğer enzimleri normal kronik viral hepatit olgularında gelişen siroz ile açıklanabileceğini bildirmişlerdir.

## **1. 6. Bir Antioksidan Olarak N Asetil Sistein (NAS)**

N Asetil Sisteinin; moleküler yapısı nedeniyle hücrelere kolayca girebildiği ve önemli bir antioksidan olan glutatyon oluşumunda öncül rol oynayarak oksidan strese karşı dokuların savunmasını desteklediği, yapısında bulunan serbest tiyol grupları ile de direkt antioksidan etki gösterdiği bildirilmektedir. Son yıllarda N Asetil Sisteinin yapısında

bulunan serbest tiyol grupları ile direkt antioksidan etki gösterdiği; hidrojen peroksit, hidroksil radikali, hipokloröz asit gibi oksidan moleküllerle etkileşerek radikal toplayıcı etki gösterdiği ileri sürülmektedir (Zafarullah ve ark 2003, Sener ve ark 2003).

Glutasyon, vücutta her yerde bulunan esansiyel bir tripeptiddir. Hücreleri oksidanlara karşı korumasını sağlayan bir sülfidril grubu içerir. GSH, intrasellüler nonprotein tiollerin yaklaşık %90'ını oluşturur. Anahtar bir intrasellüler indirgeyici ajandır ve immun modülasyona ve inflamatuvar durumlarda görev yapmaktadır (Meister 1991). Sülfidril içeren bileşiklerin uygulanması O<sub>2</sub> tarafından indüklenen oksidatif stresi GSH seviyelerini yükselterek sınırlayabilir. NAS, bir sistein donörü bileşiktir. GSH'ın hücrel prekürsörü olarak hareket eder, oral alınmasını takiben bağırsaklarda sisteine deasetile olur. Ek olarak NAS uygulamasının, lipid peroksidasyonunda azalma ve GSH depolarının ikamesi ile sonuçlanması, bu ajanın oksidatif strese karşı etkin rolü olabileceğini düşündürmektedir. NAS'in koruyucu etkisi, en az üç farklı mekanizma ile açıklanabilir;

-İtrasellüler sülfidril havuzunun onarımı;

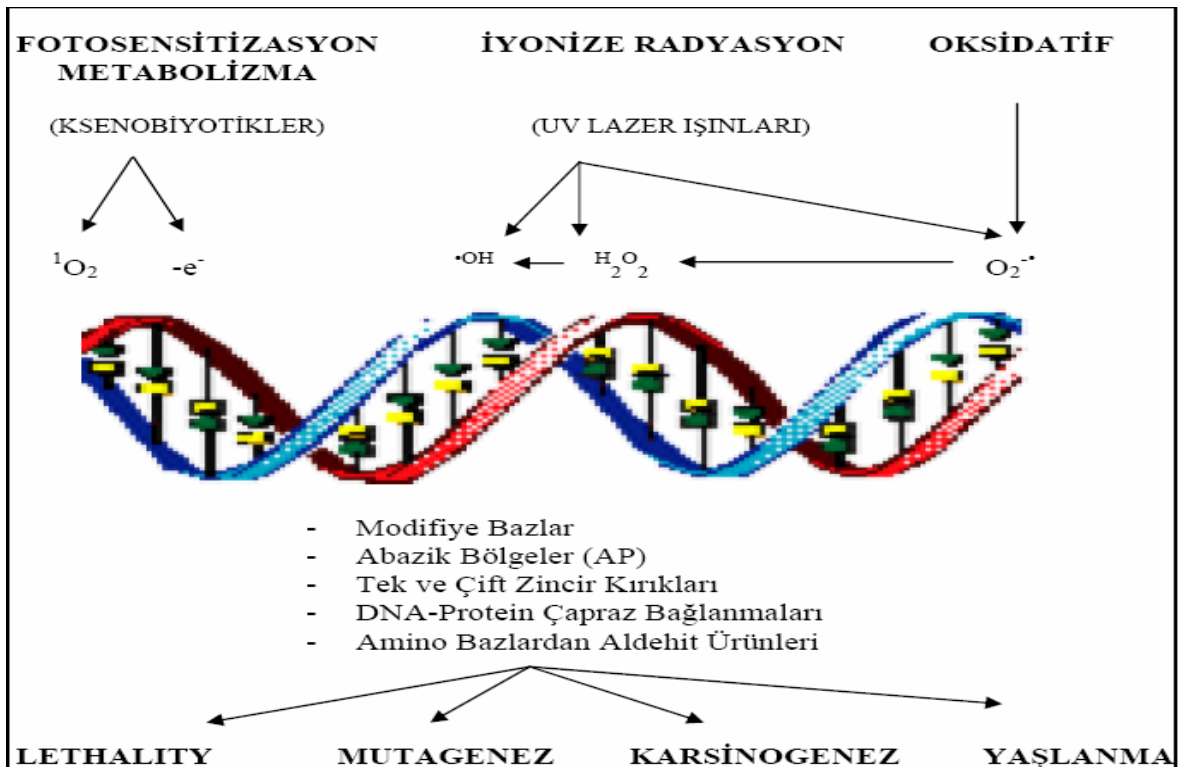
-Toksik metabolitlere karşı detoksifiye edici mekanizmanın olmazsa olmazı olan intrasellüler GSH konsantrasyonunun idamesi

-NAS'in kendi potansiyel antioksidan etkisi (Vendemiale ve ark 2001).

NAS'in karaciğer hastalıklarında antioksidan ve antitoksik özellikler göstererek faydalı olduğu ortaya konmuştur. Bu etkilerini, karaciğer kan akımını arttırarak, GSH seviyelerini yükselterek ve serbest oksijen radikallerini temizleyerek gerçekleştirmektedir (Jones 1998, Angulo ve Lindor 2002). Asetaminofen ve alkole bağlı toksik durumlarda, 10-18 saat içinde verildiğinde karaciğer hasarını ve mortaliteyi azaltmaktadır. İlaça bağlı akut karaciğer nekrozu olgularında tedavi için destekleyici önlemler yanında karaciğer hücrelerinde glutasyon ve sistein düzeyini yükselten sülfidril grubu donörü (glutasyon prekürsörü) ilaçlar (NAS, L-metionin ve sisteamin gibi) uygulanır. NAS apoptozu önleyebilmektedir ve çeşitli proteinlerin aktivitelerini düzenleyerek hücre ömrünü uzatmaktadır (Zafarullah ve ark 2003).

## 1. 7. DNA’da Oksidatif Hasar Yapan Başlıca Etkenler

Genel olarak; iyonize radyasyon, yüksek oksijen konsantrasyonu, otooksidasyona uğrayan kimyasallar (dihidroksifumarat, dopamin, L-DOPA, noradrenalin, adrenalin), ksantin oksidaz ve substratları, TNF- $\alpha$ , DNA’da oksidatif hasar yapan başlıca etkenlerdir. DNA hasarına neden olan etkenler eksojen ve endojen olarak gruplandırılabilir. Eksojen (çevresel) etkenler; aflatoksin, benzopren, kemoterapi ilaçları, alkilleyici ajanlar, vinil klorid, mustard gazları vb. gibi kimyasal ajanlar ve UV radyasyon, iyonize radyasyon vb. gibi fiziksel ajanlar olarak belirtilmektedir. Endojen (spontan) etkenler; yanlış eşleşmeler, insersiyon/delesyonlar, deaminasyon ve metilasyon gibi kimyasal değişiklikler, depürinasyon/depirimidinasyon (10.000/hücre/gün) gibi kimyasal değişiklikler, baz kayıpları ve oksidatif hasar (100.000/hücre/gün) olarak belirtilmektedir. Onarım yapılmazsa somatik mutasyon görülür (Altuntaş 2007).



Şekil 1. 7. DNA’ da oksidatif hasar ve olası sonuçları (Altuntaş 2007).

DNA'da oksidatif hasarın oluşumu iki hipotez ile açıklanmıştır. "Fenton Kimyası" hipotezinde OH radikalleri DNA'ya saldırarak hasar oluşturur.  $O_2^-$  gibi  $H_2O_2$ 'de doğrudan DNA'da hasar yapmaz. OH radikalının DNA üzerine etkili olabilmesi için DNA'da veya çok yakınında oluşması gerekmektedir. Reaktivitesi çok yüksek olan OH radikalının hücre içinde diffüze olarak nükleusa geçme olasılıkları azdır. Olası mekanizma membranı kolayca geçebilen  $H_2O_2$ 'in nükleusta Fe-Cu iyonları ile reaksiyona girerek (Haber-Weiss ve Fenton reaksiyonları) hidroksil radikallerini oluşturmasıdır (Sarı 2008).

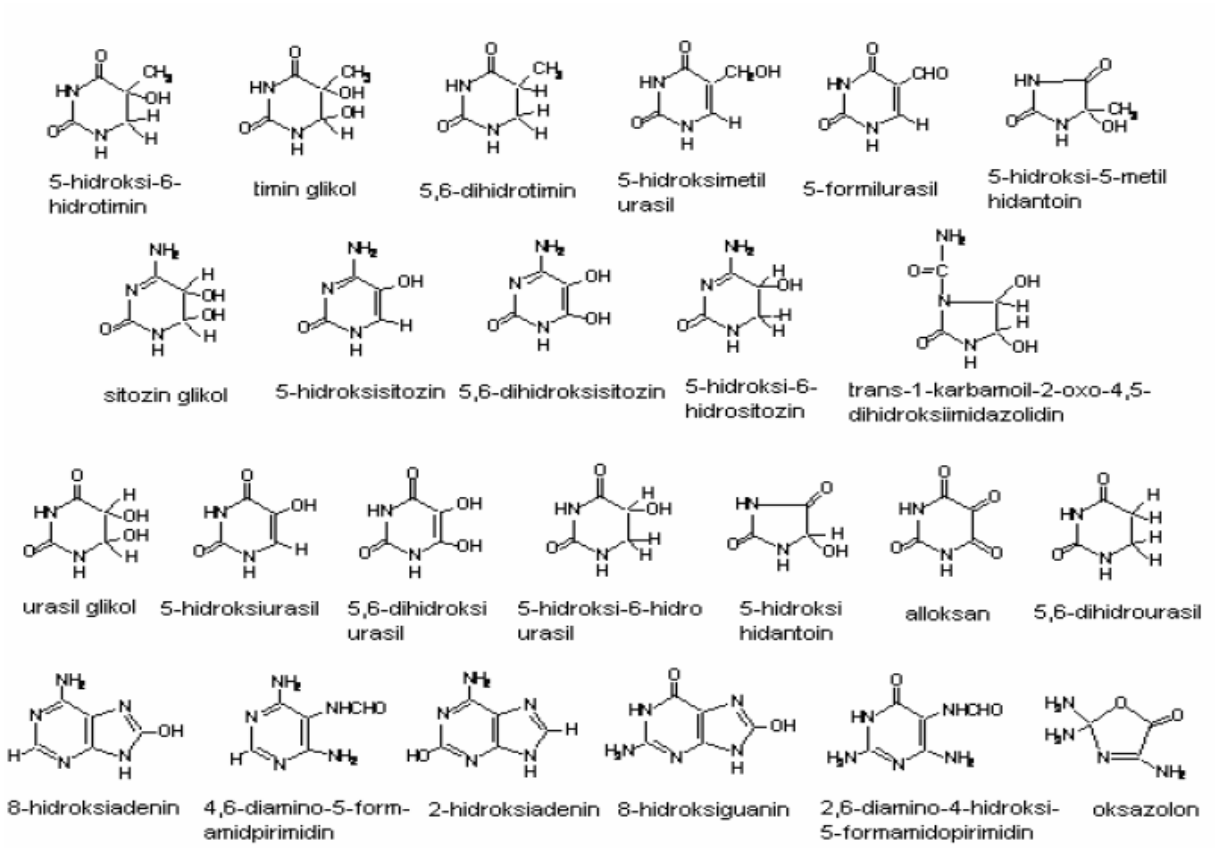
$Fe^{2+}$  veya diğer geçiş metallere varlığında Fenton reaksiyonu sonucu, süperoksit radikallerinin ( $O_2^-$ ) varlığında Haber-Weiss reaksiyonu sonucu en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan  $OH^-$  radikali oluşur. DNA çok sayıda negatif yüklü fosfat grupları içerdiğinden, çeşitli katyonları bağlama yeteneğine sahip büyük bir anyondur.  $Fe^{2+/3+}$  ve  $Cu^{1+/2+}$  iyonları negatif yüklü DNA'ya sürekli bağlı bulunabildikleri gibi oksidatif stres altında hücre içinde bulunan demirli ve bakırlı proteinlerden serbestleşerek de DNA'ya bağlanabilmektedirler. Redoks aktif transisyon metal iyonlarının bağlanmaları DNA molekülünü  $H_2O_2$ 'in hedefi haline getirmektedir. DNA'ya bağlı metal iyonları ile  $H_2O_2$ 'in DNA üzerinde reaksiyonlaşmasından oluşan OH radikalleri, OH radikal temizleyicileri tarafından uzaklaştırılmamaktadır. Ayrıca, OH radikal temizleyicilerinin oluşturduğu radikaller de DNA'ya hasar verebilmektedir. Nükleaz aktivasyonu hipotezine göre oksidatif stres, sitozolik  $Ca^{2+}$  iyon konsantrasyonunda büyük bir artışa neden olarak nükleusdaki  $Ca^{2+}$  bağımlı endonükleazları aktive etmekte ve DNA'nın fragmentasyonuna neden olmaktadır (Burçak ve Andican 2004).

## 1. 8. Oksidatif DNA Hasarı Neticesi Oluşan Değişiklikler

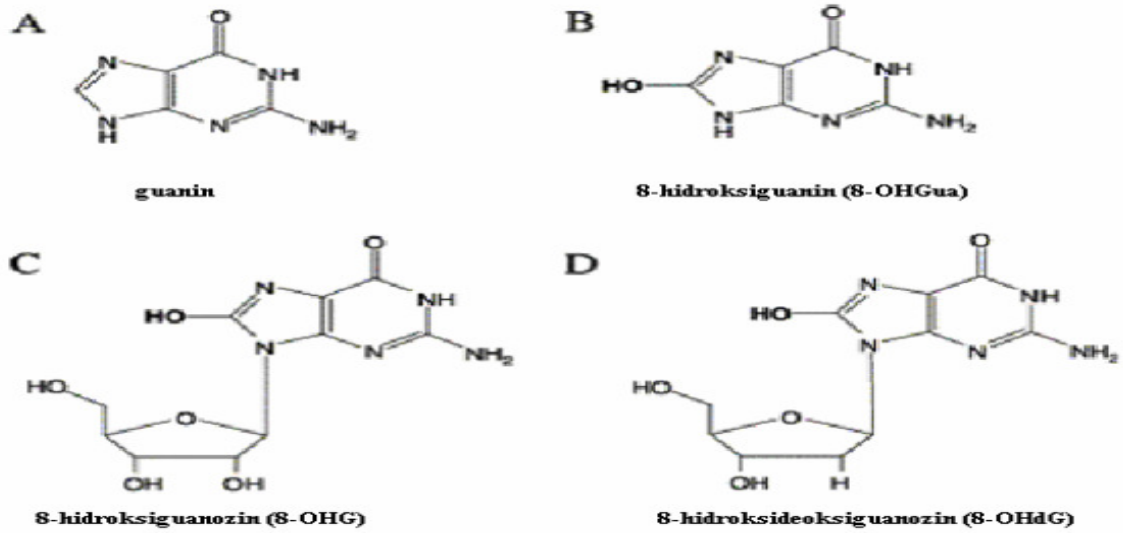
Serbest radikaller, farklı mekanizmalarla DNA' da baz ve şeker lezyonları, tek ve çift zincir kırıkları, abazik bölgeler, DNA-Protein çapraz bağlanmasına neden olurlar. Hasara uğramış nükleosidler, hem nükleer hem de mitokondrial DNA'da birikir (Ames 1989). Mitokondrial DNA histonlarla örtülmemiş olması sebebi ile ROS saldırısına karşı nükleer DNA'ya göre daha hassastır. Elektron transport zincirinin mitokondride olduğu düşünülürse, burada oluşan serbest radikallerin organelin kendisine zarar verdiği söylenebilir. Mutasyonların 'Mitokondrial DNA'da yoğunlaşmasının bir sebebi de budur.

Bu değişiklikler neticesi oluşan hücre yaralanmaları, hücre ölümlerine yada ağır dönüşümlere yol açabilir (Yokuş ve Mete 2003).

DNA'da oksidatif hasar ile ilk oluşan lezyon dal kırıklarıdır. Dal kırıkları DNA onarımı sırasında nukleaz aktivitesi ile de oluşabileceğinden her zaman oksidatif DNA hasarını göstermemektedir. Tek dal kırıklarında, diğer daldaki bilgi doğru okunarak 'hasarlı dal onarıcı enzimlerle' onarılabildiğinden çift dal kırıkları daha önemlidir. OH radikali pürin ve pirimidin bazlarında modifikasyonlar meydana getirmektedir (Choi ve ark 2002). Günümüzde 100 kadar oksidatif DNA baz hasarı tanımlanmıştır. Hasarlı bazlardan bazıları timin-glikol, sitozin-glikol, 8-hidroksi-2-deoksiguanozin (8OHdG), FAPyG ve FAPyAdenin'dir. Guanin DNA bileşenleri içerisinde en düşük iyonizasyon potansiyeline sahip bir bileşik olup serbest radikallerin etkilerine açıktır. DNA'nın oksidasyonu ile oluşan baz modifikasyonları şekil 1. 8. 1'de görölmektedir. Bu baz modifikasyonlarından en fazla bilinen ve üzerinde en çok çalışılanı 8-OHdG'dir. Modifiye bir baz olan 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin, guanin'in 8. karbon atomuna hidroksil radikali atakları sonucu oluşan, oksidatif DNA hasarının duyarlı bir göstergesidir. (Altuntaş 2007).



Şekil 1. 8. 1. DNA baz modifikasyonları (Dizdaroğlu ve ark 2001).



Şekil 1. 8. 2. Guanin'den modifiye baz olan 8-OHdG'nin oluşumu (Altuntaş 2007).

DNA'nın replikasyonu veya onarımı sırasında da bazlar oksidasyona uğramaktadırlar. Bazı oksidatif DNA modifikasyonları somatik mutasyona yol açarak hücrenin fonksiyonlarını bozmaktadır. ROM (Reaktif oksijen metabolitleri) ile indüklenen mutasyonların DNA'nın transisyon metallerini bağladığı bölgelerde ('hot spot') kümelenmiş olduğu tespit edilmiştir (Burçak ve Andican 2004).

### 1. 9. Oksidatif DNA Hasarının Belirlenmesi ve Analiz Teknikleri

DNA hasarının oluşumunu, hücresel tamir mekanizmasını ve hastalıklardaki biyolojik önemini anlamak için oluşan lezyonların doğru tespit ve ölçümü gereklidir. Bu sebeple kullanılan analiz tekniği, analizi yapılacak ilgili parametre ve çalışılacak numunenin seçimi DNA hasarının değerlendirilmesinde oldukça önemlidir (Yokuş ve Mete 2003).

Serbest radikallerin DNA'da oluşturduğu DNA baz ve şeker hasar ürünlerini, DNA-Protein çapraz bağlanmalarını ve zincir kırıklarını tanımlamak ve miktarlarını belirlemek için, immunokimyasal teknikler, postlabeling ölçüm teknikleri, NMR spektroskopisi, gaz kromatografi/mass spektroskopisi (GC/MS), yüksek basınçlı likit

kromatografi (HPLC) ile radyoaktivite, absorbans ve elektrokimyasal belirleme yöntemleri gibi değişik analitik teknikler geniş olarak kullanılmıştır. Genellikle bu tekniklerle aynı anda ya bir ürün ya da sınırlı sayıda ürün ölçümü yapılır (Dizdaroğlu ve Karakaya 1999).

Hücre ve dokularda, birçok purin ve pirimidin lezyonunun tespiti ve miktar analizi yapılmıştır. 8OHdG, ROS'un, DNA'da yaptığı yaklaşık 23 tane oksidatif baz hasar ürününden en başta geleni ve biyolojik önemi en iyi bilinenidir. Guanin DNA bileşenleri içerisinde en düşük iyonizasyon potansiyeline sahip bileşiktir. Bu sebeple de ROS'un başlıca hedefidir HPLC'de elektrokimyasal dedektör (HPLC-EC) kullanılarak 8OHdG tayini, oksidatif DNA hasarının tespitinde yüksek derecede duyarlı, seçici ve en sık kullanılan yöntemdir (Jaruga ve ark 2000).

Oksidatif DNA hasarının analizinde güvenilir ve tekrarlanabilir sonuçların eldesi için, ilk olarak DNA'nın uygun bir şekilde izolasyonu gerekmektedir. Yapılan araştırmalar; DNA ekstraksiyonu sırasında fenol kullanımının çok az yapay oksidasyona neden olduğu, ölçümde çok az miktardaki DNA hidrozilatı kullanılmasının hata yüzdesini arttırabileceği, DNA hidrozilatının enzimatik hidrolizinde inkübasyon süresinin ve enzim miktarının farklı sonuçlara neden olabileceği, redoks aktif metallerin varlığının artifaktlara neden olabileceği ve ortama düşük molaritedeki desferal gibi bir şelatörün eklenmesinin geçiş metallerinden kaynaklanabilecek oksidasyonları engelleyebileceği belirtilmiştir. Oksijensiz ortamda yürütölen reaksiyon sonuçları ile normal atmosfer altında yapılan analiz sonuçları karşılaştırıldığında, oksijensiz ortamda yapılan sonuçların tekrarlanabilirliğinin daha yüksek olduğu ve sonuçların daha düşük olduğu belirtilmiştir (Nakajima ve ark 1996).

Son yıllarda araştırmacılar modifiye olmuş baz ölçümlerinde spesifik onarım enzimlerinin kullanıldığı teknikler geliştirmişlerdir. Bu yöntemin avantajı GC/MS ile analizde türetme sırasında karşılaşılan yapay oksidasyonların önüne geçilebilmesidir. Dezavantajı ise tüm modifiye bazların piklerinin gözlenememesidir. DNA hasar ürünlerinin spesifik tiplerinin kantitatif analizi için immunoassay yöntemler geliştirilmiştir. İmmunohistokimyasal yöntemin sınırlı bilgi verdiği söylenmiştir. Bu yöntemde 8OHdG boyanması, monoklonal antikorlar kullanılarak yapılır ve 8OHdG düzeyi boyamanın yoğunluğuna bağlı olarak değerlendirilir. DNA hasarının boyutları 32P postlabeling yada O-6-methyl guanosin kullanılarak radioimmunosay yöntemi ile belirlenebilir. İmmunoaffinite yöntemi kullanılarak yapılan ölçümler yüksek düzeydeki hasarın etkilerinin belirlenmesinde faydalı olmasına rağmen ölçümü yapabilmek için gerekli olan



zaman ve örnekteki miktarın belirlenmesi konusunda yeterli hassasiyettir. 8OHdG için bir başka ölçüm yöntemi de yüksek performanslı kapiller elektroforezidir (Farinati ve ark 1998).

Bundan başka oksidatif DNA hasarının boyutları indirekt olarak da tespit edilebilir. *İn vivo* DNA hasarının belirlenmesinde, zincir kırıkları ve onarım kinetikleri, immunofluorasans (flow cytometry) ve tek hücre jel elektroforezi (COMET) gibi yöntemler geliştirilmiştir. Oksidanlara maruz kalmanın neticesi oluşan DNA tek zincir kırıkları COMET ile ölçülebilir. Bu metodun temeli, elektroforetik alanda DNA'nın göç mesafesi ile tek zincir kırıklarının arasında bir korelasyon bulunmasıdır. Oksidatif DNA hasarının onarılmasından sorumlu glikozilazların ölçülmesiyle de (Fpg ve endonuklez III) DNA hasarının boyutlarının belirlenebileceği söylenmiştir (Astley ve ark 1999).

Çalışmaların çoğu lenfositlerden yada total kandan elde edilen akyuvarlardan izole edilen DNA'larda yapılmıştır (Nakajima ve ark 1996). Bundan başka idrarda da birçok modifiye DNA bazları ekstrakte edilebilir. HPLC-UV ile Timin glycol, Timidin glycol'un ve 5-hydroxymetilurasil'in üriner düzeyi belirlenmiştir. İdrarda okside olmuş DNA bazları analizinde poliklonal ve monoklonal antikoları içeren bir yöntemde, gama-irradiasyon ile indüklenmiş oksidatif hasar ürünleri, 8-Hydroxyadenin ve Thymidine glycol'un ölçümünü oldukça yüksek hassasiyette gerçekleştirilmiştir (Farinati ve ark 1998).

## **1. 10. Histon Asetilasyonu ve Deasetilasyonu**

DNA paketlenmesi, gen ekspresyonunun kontrolü için önemli bir basamak olup, paketlenmenin ilk aşamasında histon proteinleri rol oynamaktadır (Strachan ve Read 2004). Ökaryotik hücrelerde DNA, 5 tip histon proteini (H2A, H2B, H3, H4 ve bağlayıcı H1) ile paketlenerek nükleozom yapısını oluşturmaktadır. Nükleozom 146 baz çiftlik DNA'nın 1.65 dönüş yaparak histon oktameri üzerine sarılmasıyla oluşan bir yapı olup DNA'da tekrarlayan birimler halinde bulunmaktadır. Nükleozomu oluşturan histon proteinlerinin amino kuyruk bölgelerinin nükleozomun dışarısında kalması nedeniyle asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon, ubikütinizasyon, sumolizasyon gibi çeşitli posttranslasyonel modifikasyonlar yapılabilmektedir. Modifikasyonlar tek başlarına ya da farklı kombinasyonlarda bulunarak kromatin yapısını değiştirmekte, bu sayede DNA'ya bağlanan proteinler için etkileşim yüzeyi oluşmakta ve gen ekspresyonu kontrolü başta

olmak üzere replikasyon, tamir gibi birçok biyolojik olay kontrol edilmektedir (Munshi ve ark 2009).

Gen ekspresyonunun kontrolünü sağlayan en önemli histon modifikasyonu asetilasyondur. Histon asetilasyonu gen ekspresyonunu birden fazla yolla etkilemektedir. Negatif yüklü asetil grubunun histon proteininin amino kuyruk bölgesindeki pozitif yüklü lizin aminoasidine takılmasıyla, pozitif yük nötralize olmakta ve kromatinde gevşeme meydana gelmektedir. Değişen kromatin yapısı, transkripsiyon faktörlerinin hedef genlerin promotor bölgelerine ulaşabilmesini sağlamaktadır. Ayrıca, asetilli histonlar bazı transkripsiyonel aktivatör proteinler için bağlanma bölgesi oluşturmaktadır. Asetilasyon geri dönüşümlü bir modifikasyondur. Asetil grubunun histon proteinlerinden çıkartılması deasetilasyon olarak tanımlanmakta, kromatinin tekrar sıkı paketlenmesine ve transkripsiyonun baskılanmasına neden olmaktadır (Lizuka ve Smith 2003, Peterson ve Laniel 2004).

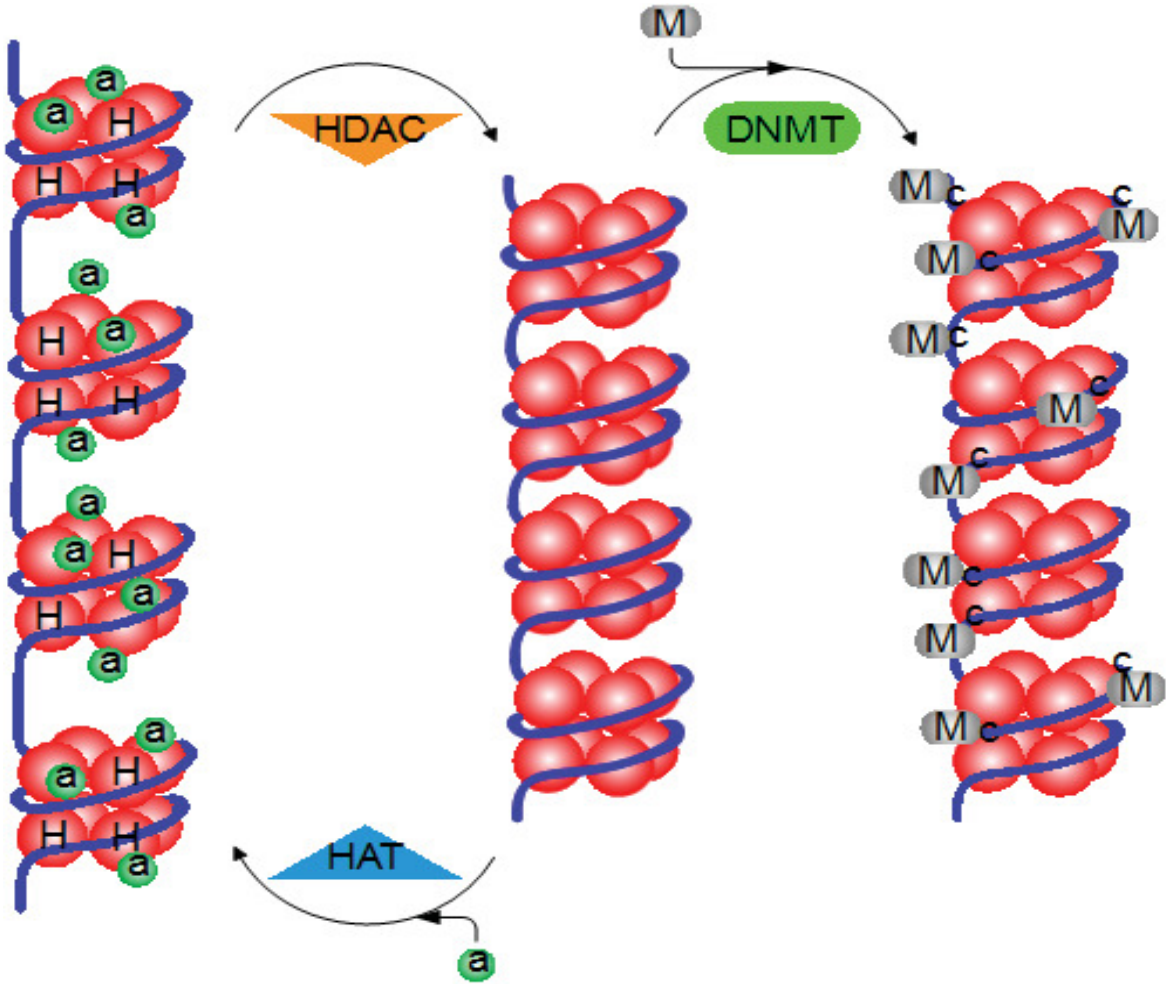
Histon asetilasyonu dinamik bir süreç olup birbirine zıt fonksiyon gören iki büyük enzim ailesi tarafından katalizlenmektedir. Asetilasyon histon asetiltransferaz (HAT), deasetilasyon ise HDAC enzimleri tarafından katalizlenmektedir (Ogryzko 2001, Thiagalingam ve ark 2003).

Histon deasetilazlar evrimsel olarak korunmuş metallo-enzimler olup insanlarda dört sınıfa ayrılır. Sınıf I; HDAC 1, 2, 3, 8, sınıf II; HDAC 4, 5, 6, 7, 9, 10, sınıf III; SIRT enzimlerini, sınıf IV ise HDAC 11 enzimlerini içermektedir. Histon olmayan proteinlerin de deasetilasyonunu katalizlemeleri nedeniyle son yıllarda bu enzimlerle ilgili çok sayıda araştırma yapılmıştır (Gray ve Ekström 2001, Glozak ve ark 2005). HDAC inhibisyonunun hücre çoğalmasını durdurduğunun ve hücreleri farklılaşmaya ve/veya apoptoza yönelttiğinin anlaşılmasından sonra HDAC inhibisyon aktivitesine sahip olan bileşikler araştırılmış ve bazılarında tedavi amacıyla klinik faz çalışmalarına geçilebilmiştir (Haberland ve ark 2009, Sleiman ve ark 2009).

Nükleer DNA oktamerik histon kompleksi etrafında sarılı olarak bulunmaktadır. H2a, H2b, H3 ve H4 alt birimlerinden oluşan oktamerik yapının etrafında DNA, nükleus içinde kromatini oluşturur. Uzun yıllar sadece yapısal proteinler olduğu düşünülen histonların transkripsiyonun regülasyonunu da sağladığı anlaşılmıştır. İlk olarak 1960'larda histon asetiltransferazların aktivitesi sonucu oluşan histon asetilasyonu ile artmış

transkripsiyon arasındaki ilişki ortaya konmuştur. Histonların asetillenmesiyle DNA ve histon arasındaki allosterik bazlar zayıflayarak, promotor bölgelerindeki DNA gevşeyip transkripsiyon faktörlerinin DNA'ya ulaşması ve transkripsiyonun başlatılması gerçekleşmektedir. Bu etki histon deasetilazlarca ortadan kaldırılıp, transkripsiyon gereğinde susturulabilmektedir (Taunton ve ark 1996) (Şekil 1. 10).

DNA dışında histonların H3K9 aminoasitlerinin histon-metiltransferazlarca metilasyonu da söz konusudur. Histonların asetilasyonu, fosforilasyonu, sitrulinizasyonu, ubiquitinasyonu, ribozilasyonu gibi diğer mekanizmalarla da histon DNA ilişkisi yeniden düzenlenip kromatinin yapısı değişmektedir.



Şekil 1. 10. DNA, oktamerik yapıdaki histon (H) kompleksinin etrafında dolanarak nükleozom yapısını oluşturmaktadır. Histon asetiltransferaz enzimi (HAT) histonlara asetil grupları (a) ekleyerek DNA ile histonlar arasındaki allosterik bağları gevşetmektedir. Bu sayede transkripsiyon faktörleri DNA'ya bağlanıp transkripsiyonu başlatabilmektedir. Histonlardaki asetil grupları histon deasetilaz enzimi (HDAC) ile ortadan kaldırılmaktadır. Histonların deasetile edilmesi, DNA metiltransferazların (DNMT) sitozinleri (c) metillemesini (M) kolaylaştırarak, transkripsiyonun yapılamadığı heterokromatin yapısını oluşturmaktadır (Kürtüncü ve Eraksoy 2008).

İnsan genomunda bulunan yaklaşık 23.000 gen, belirli hücrelerde ve belirli zamanlarda ifade edilmelidir. Hücreler gen ifadesindeki bu kontrolü sağlayabilmek için DNA'larını globüler histon protein oktomerleri etrafına sararak oluşturdukları nükleozom yapılarını kullanırlar. DNA ve histon proteinlerinden oluşan bu nükleozomlar kromatin olarak organize edilirler. Kromatin yapısındaki değişiklikler gen ifadesini kontrol eder; kromatin yapı sıkılaşıp yoğunlaştığında (sessiz) genler inaktive olur, kromatin yapısı

gevşeyerek açıldığında (aktif) ise genler aktive olarak ifade edilir. Kromatin yapısındaki bu dinamik durum ise, geri dönüştürülebilir olan ve DNA metilasyonu ya da histon modifikasyonları ile sağlanan epigenetik paternler ile gerçekleştirilir. Bu işlemlerde görevli olan enzimler arasında, DNA metiltransferazlar (DNMT), histon deasetilazlar, histon asetilazlar, histon metiltransferazlar ve methyl-binding protein (MECP2) sayılabilir. Normal epigenetik paternlerden bir sapma olduğunda ortaya çıkan gen ifadesindeki anormallikler çeşitli klinik sonuçlara yol açabilir. DNA metillenmesi, genel kural olarak, DNMT'ler tarafından CpG adacıklarında ve sitozinin 5 numaralı karbonunda meydana getirilir. Omurgalı DNA'sındaki C-G baz çiftlerinin %70'ten fazlası metillenmiş durumdadır. Bu metillenmenin canlıdan canlıya ve dokudan dokuya göre değiştiği bilinmektedir. Metillenme profillerinin fonksiyonel bir takım sonuçları olabileceği önceden beri düşünülmektedir. Bu konuda ilk yapılan araştırmalarda metillenme ile gen ifadesi arasında bir ilişki olduğu saptanmıştır. Genlerin promotor bölgelerindeki metilasyon seviyesinin düşük olması aktif gen ifadesi ile korelasyon göstermektedir (Murell ve ark 2005).

DNA'nın de novo metilasyonu ve bu metilasyonun devamlılığının sağlanmasında DNMT'ler görevlidir. Günümüzde bilinen 5 insan DNMT'si vardır. CpG adacıklarında görülen DNA metillenmesi, gen ifadesinin kontrolünde önemli rol oynamaktadır. Gen ifadesinin düzenlenmesinde, özellikle genlerin promotor bölgelerindeki metillenme, transkripsiyon faktörlerinin tanıma bölgelerinde değişiklikler meydana getirerek bu faktörlerin bağlanmasını engellemekte ve bu şekilde gen ifadesinin baskılanmasında rol oynamaktadır. Hücre farklılaşmasıyla beraber farklı dokularda farklı genlerin ifade olmasının temelinde bu düzenleme yatmaktadır. DNA metillenmesi, DNA'nın yapısında bazı değişikliklere yol açarak bir grup metil-CpG bağlanma proteininin (MeCPs) tanıma bölgesini oluşturur. Bu bölgelere metil-CpG bağlanma domaini (MBD) ile bağlanan birçok transkripsiyon repressörü vardır. Bu proteinlerden biri olan MeCP2, Sin3a/HDAC (histon deasetilaz) olarak tanımlanan bir histon modifiye edici kompleksin bileşenleri arasındadır. MeCP2, tek bir metillenmiş CpG çiftine bağlanabilen bir MBD'ye ve transkripsiyon baskılayan bir TRD domainine sahiptir. DNA metillenmesinin, dolaysız olarak gen ifadesini etkilediği modelde, metillenme sonucu oluşan tanıma bölgelerindeki histonların deasetilasyonunun, gen ifadesini baskılayan bir kromatin yapısına yol açtığı ileri sürülür (Bird 2002).

DNA'nın paketlenmesinde görevli olan histon proteinlerinin bazik amino-terminal uçları nükleozomdan çıkıntılar yapar ve bir takım posttranslasyonel modifikasyonlara uğrayabilir. Bu modifikasyonlar arasında; HAT' lar tarafından asetillenme ve HMT (histon metil transferaz)'lar tarafından metillenme yer almaktadır. Histonlar üzerinde yapılan bu değişiklikler, kromatinin yapısının gevşek ya da sıkı olma durumunu etkileyerek gen ifadesinde regülâtör rol oynar (Örneğin, asetil grupları histonlardaki (+) yükü nötralize ederek histonlar ve DNA arasındaki elektrostatik etkileşimleri zayıflatır) (Jenuwein ve Allis 2001).

Belirli bazı histon modifikasyonları öökromatinin ve heterokromatinin aktif ya da inaktif markırları olarak kullanılabilirler. H3 ve H4 histonlarının lizin rezidularından asetillenmesinin aktif kromatinle korelasyon gösterdiği, deasetilasyonun ise kromatinin daha sıkı bir şekilde paketlenerek genlerin inaktif duruma geçmesiyle sonuçlandığı bilinmektedir. Histon lizin metilasyonu ise, asetilasyonun tersine, hangi rezidude olduğuna göre aktivasyon ya da inaktivasyonla sonuçlanabilir. Bu yolla, histonlardaki spesifik modifikasyonlar, transkripsiyonel olarak aktif ve inaktif kromatinin belirlenmesinde bir çeşit “*marker*” olarak kullanılabilir. Histonlardaki modifikasyonların ve DNA metilasyonunun birlikte çalışarak gen ifadesinin durumunu belirlediği ve bu şekilde hücrenin yazgısının belirlenmesinde önemli rol oynadığı kabul edilmektedir (Jenuwein ve Allis 2001).

Histon deasetilaz inhibitörleri, histon asetilasyonunu sağlayarak bazı genlerin ifadesini değiştirebilmekte, ayrıca transkripsiyon faktörleri ve tümör baskılayıcı proteinler gibi histon olmayan bazı proteinlerin asetilasyonunu arttırarak biyolojik aktiviteleri etkilemektedir. HDAC inhibitörleri uygulanarak histonların deasetilasyonu engellenmekte, histonlar asetilli halde kalmakta ve transkripsiyonun sürekliliği sağlanmaktadır (Marks ve ark 2003, Rosato ve Grant 2005).

Histon deasetilaz inhibitörleri ile yapılan in vivo çalışmalar, tümör büyümesini ve metastazı önemli ölçüde azalttıklarını göstermiştir. Örneğin; kısa zincirli yağ asitlerinden butirik asitler ve türevleri kolon, prostat, endometriyal ve servikal karsinomlarda çalışılmış, kanserli hastalarda hücre siklusunu etkileyerek bölünmeyi durdurduğu, farklılaşma ve apoptozu uyardığı gösterilmiştir (Lindemann ve Johnstone 2004, Bora ve Yurter 2007).

## 1. 11. Apoptozis

Apoptozis; organizmanın ihtiyaç duymadığı, biyolojik görevini tamamlamış veya hasarlı hücrelerin, zararsız bir biçimde ortadan kaldırılmasını sağlayan ve genetik olarak kontrol edilen programlı hücre ölümüdür (Hıkm ve ark 1995, Öktem ve ark 2001).

Yüksek organizmalarda hücre ölümü iki farklı mekanizma ile gerçekleşir, klasik hücre ölümü nekroz olarak adlandırılır. Hücre ölümün diğer şekli olan apoptozis ise genellikle tek tek hücreleri etkiler, birçok fizyolojik ve patolojik koşullarda ortaya çıkar ve genellikle enflamasyon söz konusu değildir (Öztürk 2002).

Ökaryotik organizmalardaki hücreler doğarlar, belirli bir süre yaşarlar ve sonra ölürlür. Yaşam süresi hücre tipine göre değişmektedir. Örneğin; bağırsak hücreleri 3–5 günlük bir yaşam süresini takiben ölürlük derinin epidermal hücreleri 20–25 günlük bir süre sonunda ölmektedir. Fakat kalp kası hücreleri veya nöronlar ömür boyu yaşarlar. Zamanı gelince, bu hücreler daha önceden programlanmış bir şekilde ölürlük. Tüm bu ölümler fizyolojik şartlarda meydana geldiği için bu ölüm şekli fizyolojik hücre ölümü olarak da adlandırılır (Ulukaya 2003). Apoptozla hücre ölümü; enerji kullanılarak hücrenel yaralanma ve enflamasyon olmaksızın, çok daha ustaca gerçekleştirilir (Guimaraes ve Linden 2004). Programlı hücre ölümünün, bütün çok hücreli organizmalarda, gelişmede ve homeostazın sürdürülmesinde vazgeçilmez bir rolü vardır (Tomatır 2003).

Apoptozis birçok gen ile ilişkili aktif bir sistem olup, Yunancada apo (= ayrı) ve ptozis (= düşen) kelimelerinin birleştirilmesi ile oluşmuş sonbaharda yaprak dökümünü tanımlayan bir kelimedir (Özvaran 2004). Tümörlerde sık görülen bir olay olup hücre ölümüne yol açan aktif olarak düzenlenmiş bir hücrenel süreçtir. Apoptozise direnç göstermek, hücre kaybını azaltarak tümöre bir avantaj sağlar (Rashed ve Ragab 2004).

Apoptozis, hücrelerde normal gelişim sırasında meydana gelen ölüm olarak 1842 yılında Vogt tarafından tanımlanmıştır. Programlanmış hücre ölümü terim olarak ilk kez 1965 yılında kullanılmıştır. Apoptozis terimi ilk kez 1972 yılında Kerr ve arkadaşları tarafından kullanılmıştır. Kerr, fizyolojik olarak ölen hücrelerin çekirdeklerinde yoğunlaşmış kromatin parçalarını gözlemlemiş ve organellerin iyi korunduğunu fark ederek bu olayı büzüşme nekrozu olarak adlandırmıştır (Yılmaz 2005).

### 1. 11. 1. Apoptozis Mekanizmaları

Hücrenin kendi otomatik saati olan genlerin aktivasyonu veya çevreden gelen sinyallerle apoptozis başlamaktadır (Erdoğan 2003).

Apoptozisde ana morfolojik olay, nükleusun yoğunlaşması ve daha sonra parçalara ayrılmasıdır. DNA endonükleaz ile oldukça özgül şekilde internükleozomal bölgelerden 180–200 bp (baz çifti) büyüklüğünde parçalara ayrılır (Galle 1997). Apoptozisin erken evresinde hücreler birleşme bölgelerinden ayrılır, özelleşmiş yüzey organellerini kaybeder ve belirgin şekilde büzülür, daha sonra plazma membranında tomurcuklanmalar oluşur ve hücre, sitoplazma ile çevrilmiş kromatin parçalarından oluşan apoptotik cisimciklere parçalanır. Apoptotik hücreler komşu hücreler ve makrofajlar tarafından tanınır ve fagosite edilir (Öktem ve ark 2001).

Apoptozis önceden hazır olan hücrelerde primer başlatılabilir ya da bir uyarın sonucu sekonder olarak gelişir. Hücre dışı uyarınlar tümör nekroz faktörü, koloni uyarıcı faktörler, nöron büyüme faktörü, insülin benzeri büyüme faktörü, IL–2 gibi maddelerin ortamda azalması, glukokortikoidler, radyasyon, ilaçlar, çeşitli antijenler gibi pozitif uyarınlar olabilir. Otoimmün hastalık gelişiminde rolü olduğu belirtilen Fas/FasL, sFas proteinleri, virüsler (HIV gp120 proteini, influenza virüsü. TNF reseptörü üzerinden; adenovirüs hücre genetik yapısını bozarak) hücreyi apoptozise götürmektedir (Erdoğan 2003).

Uyarınlar hücre içinde  $Ca^{+2}$  artışına neden olmakta ve/veya cAMP gibi hücre içi ikincil habercileri aktive etmektedir. Örneğin sitoplazmik  $Ca^{+2}$  miktarında hafif artış c-fas, c-myc ve sıcak şoku proteini gibi yeni mRNA basamaklarını harekete geçirir. Ayrıca, apoptoziste etkili endonükleaz, transglutaminaz gibi enzimleri de aktive eder. Bunlar da kromatinde parçalanmaya, hücre iskeletinde ve sitoplazmik proteinlerde değişikliklere neden olur. Sitoplazmik kalsiyum, kalmodulin ile bağlanırsa apoptozis inhibe edilebilir (Öktem ve ark 2001).

Organizmada apoptozisi uyarın ve engelleyen çok sayıda gen bulunmaktadır (Öktem ve ark 2001).



Çizelge 1. 11. 1. Apoptozis ve Genler (Öktem ve ark 2001)

Apoptozisi baskılayan genler	Apoptozisi indükleyen genler
<ul style="list-style-type: none"><li>• Bcl-2 grubundan; BHRL-1, bcl-xl, bcl-w, bfl-1, brag-1, mcl-1, A1</li><li>• c-abl geni</li><li>• ras onkogeni</li><li>• çözünebilir fas</li><li>• p35</li><li>• A20</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Bcl-2 grubundan; Bad, Bax, Bak, Bcl-xS, bad, bik, Hrk1</li><li>• c-myc</li><li>• p53, p21</li><li>• fas (CD95/APO1) FADD/MORT, RIP, FAST</li><li>• interlökin dönüştürücü enzim benzeri proteinler (İCE)</li><li>• LOH (MTS1/CDK41)</li></ul>

Apoptozisi etkileyen hücre içi uyarılar genel olarak; büyüme faktörleri, onkojenler, tümör süpresör genler olmak üzere üç ana grupta toplanabilir (Tomatır 2003).

Apoptozis süreci; DNA hasarına genlerin yanıtı, hücre membranı tarafından ölüm sinyallerinin alınması (Fas ligandı), hücreye doğrudan proteolitik enzim girişi (granzim) olmak üzere üç farklı şekilde işleyebilir (Roshal ve ark 2001). Bu süreçte belli başlı üç anahtar bileşen vardır. Bunlar; Bcl-2 ailesi proteinleri, kaspazlar ve Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor-1) proteindir. Bu bileşenlerin biyokimyasal aktivasyonu, apoptozda gözlenen mitokondriyal hasar, çekirdek zarı kırılması, DNA fragmentasyonu, kromatin yoğunlaşması ve apoptotik cisimlerin şekillenmesi gibi morfolojik değişikliklerden sorumludur (Staley ve ark 1997, Tomatır 2003).

DNA tek veya çift iplik parçaları ve nükleotit azlığı, DNA-bağlı transkripsiyon faktör p53 ile başlayan bir dizi olayı aktive eder ve hücre apoptotik yola gider (Choi ve ark 2004).

İnsanda apoptozun düzenlenmesi, p53 ile başlayan ve kaspazlara kadar devam eden bir süreçtir. Bir tümör süpresör gen olarak çalışan p53 mutasyona uğradığı ya da bulunmadığı zaman hücre yaşamı uzar. Genotoksik olaylarla oluşan hücre hasarı, bir transkripsiyon regülatör geni olan p53'ü aktive eder. p53 protein ürünü DNA'ya doğrudan bağlanarak hasarı tanıdıktan sonra ya G1'de hücre siklusunun durmasını indükleyerek tamir için gerekli zamanı kazanır ya da hasar fazlaysa apoptoza yönlendirir. Ayrıca p53'ün

Bax/Bax, Bax/Bcl-2, Bcl-2/Bcl-2 gruplarının oranlarını düzenlediği düşünülmektedir (Choi ve ark 2004).

Apoptozun regülasyonu Bcl-2/Bax gen ailesi ile sağlanır. Bu ailenin 20 üyesi tanımlanmıştır; bunlardan bazıları apoptoz inhibitörüdür (antiapoptotik), bazıları ise apoptozu uyarır ve proapoptotik genler olarak tanımlanır. Bcl-2/Bax gen ailesinin ürünleri, mitokondri ve çekirdek zarlarının yanı sıra endoplazmik retikulum zarının üzerinde de yer alırlar ve homodimer ya da heterodimerler şeklinde kompleks oluşturarak çalışırlar (Nagata 1997).

Bcl-2 üyeleri;

Antiapoptotik	Proapoptotik
Bcl-2	Bax Blk
Bcl-xl	Bod Bak
Boo	Bcl-xs
Bcl-w	Bid
A1	Bim
Mcl-1	

Bcl-2 ailesinin bir diğer ilginç özelliği de reaktif oksijen düzeylerinin apoptoz üzerindeki etkilerini pro-oksidan gibi davranarak kontrol etmesidir. Bax proteinleri sitoplazmada da bulunur. Apoptotik sinyalin alınmasından sonra Bax proteinleri, mitokondri zarının 'permeabilite geçiş poru'na doğru yönelirler ve buraya bağlanırlar. Bu bağlanma seçici iyon geçirgenliğini (permeabilitesini) azaltabilir (Kaneda ve ark 1999). Zardaki bu değişiklikler nedeniyle sitokrom c ve AIF (Apoptosis Inducing Factor) gibi mitokondri zarı içinde yer alan faktörler sitoplazmaya geçerler. AIF doğrudan kromatin yoğunlaşmasının ve nükleer fragmentasyonun meydana geldiği çekirdeğe doğru yönelirken, sitoplazmadaki sitokrom c apoptozun en son basamağında görev alır. Sitokrom c bir sitoplazma proteini olan Apaf-1'e bağlanması prokaspaz-9' u aktive eder ve oluşan bu kompleks 'apoptosom' olarak isimlendirilir. Prokaspaz-9' un aktivasyonu, bir seri kaspaz aktivasyonunu başlatır (Tomatır 2003).

Apaf-1 aynı zamanda ATP'ye de bağlanır. Bu olay apoptozun neden enerji gereksinimi duyduğunu açıklamaktadır. Apoptozun mekanizmasında üç temel grup rol alır. Bunlar ölüm reseptörleri, adaptör proteinler ve proteolitik enzimlerdir (kaspazlar) (Nagata 1997).

Ölüm reseptörleri; TNF reseptör gen ailesine aittir. Bu reseptör polipeptidlerin sitoplazmik bölümleri ölüm alanı adı verilen bir aminoasit dizisini içerir ve adaptör proteinlere bağlanırlar (Nagata 1997).

Adaptör proteinler, reseptörle gelen sinyal sonucunda kaspazlara bağlanıp onları aktive ederler. Bu reseptörlerin en çok bilinenleri TNF reseptörü-1 (TNFR1) ve Fas (CD95) karaciğerde bol miktarda bulunur. Fas'ın etkisiyle kaspaz dizisi (kaskadı) aktive olur ve kaspazlar aktive olan DNAaz aracılığı ile DNA yıkımına neden olur. Memeli hücrelerinde sistein proteaz ailesinden olan kaspazların aktif merkezinde sistein yer alır ve sitoplazmada inaktif prokürsörler olarak bulunur. Diğer adı ile ICE proteazlardır ve bir proteaz aktivasyon dizisi (şelalesi) başlatarak sitoplazmik proteinlerin yıkımında rol almaktadır, bu sırada nükleazlar da aktive olarak DNA fragmentasyonu ve RNA degradasyonu gerçekleşmektedir. Sitokrom c'nin sitoplazma içine salınması ile apoptozun son basamaklarından sorumlu enzim sistemi olan kaspazlar aktive olur (Topal ve ark 2004).

Kaspazlar bir seri olaylar dizisinde diğer prokaspazları aktive ederler. Kaspazlar; sitokin üretimine katkıda bulunurlar (kaspaz 1, 4, 5, 13), proteolizisin başlatıcıları (kaspaz 3, 6, 7) olarak sınıflandırılırlar. Ölüm sinyali veren başlatıcı kaspazlar, adaptöre bağlanırlar ve ölüme yönlendirirler ama infazı gerçekleştiremezler bunu yapacak olanları aktifleştirirler. İnfazı gerçekleştiren uygulayıcı kaspazlar başlatıcı kaspazların akışını aktive ederler (Tomatır 2003).

Kaspazlar bir grup sistein proteaz enzimidir. Apoptozis için gereklidir. Basulovirus protein P<sup>35</sup>, tüm kaspazların kuvvetli inhibitörüdür. Kaspazlar, apoptozisin son devresindeki hücrel substratların yıkımından sorumlu olduğu gibi apoptozisin başlatılmasında da kritik önemi vardır. Memelilerde en az 14 kaspaz vardır. (Bilgici 2004).

Apoptotik programın merkezi bileşeni kaspazlardır. Kaspaz aktivasyonu hücreye özgüdür ve kaspaz inhibitörlerinin (IAP) efektör kaspazları inhibe ederek apoptozu engellediği gösterilmiştir (Donoghue ve ark 1999). Kaspazlar, proteinleri yalnızca aspartik

asit bulunan bölgelerden keser, bu nedenle c-asp-ases adını almışlardır. Böylece kaspazların kısıtlı proteolizisi nedeniyle, hücrede lizis şekillenmez ve apoptotik cisimcikler oluşur (Nicholson ve ark 2004).

Kaspazlar;

Apoptozisi Başlatanlar	Apoptozisi Yürütenler	Sitokin Aktivasyonu Yapanlar
C-2	C-3	C-1 C-13
C-8	C-6	C-4 C-14
C-9	C-7	C-5
C-10		C-11
		C-12

Önceden de değinildiği gibi apoptozis genotoksik ajanların etkisiyle yaratılan ağır DNA hasarına yanıt olarak p53'ün indüksiyonuyla da başlatılabilir. İndüklenen p53, bir pro-apoptotik bcl-2 ailesi üyesi olan bax'ın indüksiyonuna yol açarak apoptozisi başlatır. p53 bax'ın indüksiyonu haricinde ayrıca Fas ve DR5 gibi hücre yüzey ölüm reseptörlerinin indüksiyonuna neden olarak da apoptozisi başlatabilir (Bender ve ark 2005).

Apoptozis ayrıca reaktif oksijen radikallerinin (ROS) hem mitokondri hem plazma membranı hem de genom üzerinde oluşturabileceği hasarlara bağlı olarak da başlatılabilir (Bender ve ark 2005).

Oksijen kullanımının doğal sonucu olarak reaktif oksijen metabolitleri meydana gelmektedir. Başta mitokondriyal elektron transportu olmak üzere, fagositik aktivasyon, çeşitli sentez ve yıkım reaksiyonlarında ROS oluşmakta ve prooksidan/antioksidan dengenin prooksidanlar lehine kayması sonucunda gelişen oksidatif stres, çeşitli mekanizmalar ile biyomoleküllere hasar vermektedir. ROS oluşumundaki artma, antioksidan enzim düzeylerindeki azalma sonucu hücrenin oksidatif strese karşı savunma hattı kırılmakta ve ölüme sürüklenmektedir. Biyolojik hasarla karakterize radikal reaksiyonlar arasında en belirgin olanı lipid peroksidasyonudur. Hücre membranlarının oksijen radikallerine maruz kalması lipid peroksidasyon reaksiyonlarını uyarır. Lipid peroksidasyonu, lipid hidroperoksitlerinin aldehit MDA ve diğer karbonil bileşiklerine

dönüşmesiyle sona ermektedir. Hücre içi glutasyon miktarlarındaki düşüşler hücreyi oksidatif stres yolu ile apoptoza sürükler. Hücre içi düşük glutasyon seviyelerine sahip çeşitli hayvan modelleri ile yapılan çalışmalarda glukortikoidlerle indüklenmiş trombosit apoptozisini başlattığı ve anti-Fas/APO- 1 ile indüklenen lenfosit apoptozisini arttırdığı gözlemlenmiştir (Polat 2008).

Apoptozisin özet olarak belli başlı aşamaları;

- Apoptozisin indüksiyonu
- Hücre yüzey ölüm reseptörlerinin uyarılması
- Sitokrom c'nin salıverilmesi
- Apoptozom oluşumu (sitokrom c + Apaf-1 + kaspaz-9)
- Mitokondriyal transmembran potansiyelin değişmesi
- Kaspazların aktivasyonu
- Fosfatidilserinin hücre membranının iç yüzünden dış yüze transloke olması
- DNA'azın aktivasyonu sonucu DNA'nın fragmentasyonu (internükleozomal DNA fragmentasyonu)
- Yapısal proteinlerin yıkılmasına bağlı olarak apoptoze özgü morfolojik değişikliklerin meydana gelmesidir (Antar 2005).

### **1. 11. 2. Apoptozisin Saptanmasında Kullanılan Yöntemler**

Apoptozisi saptamak için çok çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. 1972 yılında apoptozis terimi ilk kez kullanıldığında hücrenin morfolojik görünümüne göre karar verilmişti. Oysa günümüzde morfolojik değerlendirmenin yanı sıra apoptoze özgü olduğu bilinen bazı aktivasyonların (örneğin, aktif kaspaz-3 tayini) moleküler düzeyde belirlenmesiyle de saptanabilmektedir. İlk kez morfolojik kriterlere göre belirlenen apoptozis, 1980'li yılların sonuna doğru DNA kırıklarının oluştuğunun ortaya çıkarılmasıyla birlikte bu kırıkların saptanmasına yönelik yöntemlerle belirlenmeye başlanmıştır. 1990'lı yılların ortalarında ise apoptotik hücrelerde kaspazların aktifleştiği bulunmuştur. Böylece kaspaz aktivasyonlarının belirlenmesine yönelik metotlarla saptanabilen apoptozis 1990'ların sonuna doğru fosfatidilserin translokasyonunu belirleyen yöntemlerle de saptanmaya başlanmıştır. 2000'li yılların başlarında apoptotik epitelyal hücrelerde olmak üzere kaspaz aktivitesiyle kırılan bir protein olan keratin 18'in kırıldıktan

sonraki özgün formunu saptayan antikorların kullanılarak daha spesifik olarak saptanması takip etmiştir (Stassi 2006).

Apoptozisin belirlenmesinde kullanılan yöntemler;

- Işık mikroskobu kullanımı; morfolojik görüntüleme yöntemleri içinde en ucuz ve kolay olanı hematoksilen ile boyamadır. Hematoksilen ile boyanan preparatlar ışık mikroskobu ile incelenir. Hematoksilen boyama (HB) hem hücre kültürü çalışmalarında hem de doku boyamalarında kolaylıkla kullanılabilir. Apoptotik hücrelerin saptanmasında genellikle ilk metod olarak başlanması uygundur (Mehmet 2006).

- Floresan mikroskobu / lazerli konfokal mikroskop kullanımı; floresan maddelerin (örn: propidium iyodür) kullanılmasıyla yapılan bir boyama şeklidir. Floresan boyalar DNA'ya bağlanabildiklerinden hücrenin kromatini dolayısıyla nükleusu görünür hale gelebilir (Vairetti ve ark 2005).

- Elektron mikroskobu; morfolojik değişikliklerin en doğru olarak gözleendiği bir yöntemdir. Üstelik subsellüler detaylarda (örn: mitokondrinin durumu, hücre zarı ya da nükleus membranının bütünlüğünün bozulup bozulmadığı gibi) incelenebilir (Ulukaya 2003).

- Faz kontrast mikroskobu; bu tür mikroskop sadece hücrelerin kültür ortamında veya pleytlerde büyütüldüğü çalışmalarda hücreyi veya hücre topluluğunu incelemek amacıyla kullanılır. Ölen hücreler yapıştıkları substratundan ayrılacakları için besiyer içinde yüzmeye başlarlar. Bu hücreler faz kontrast mikroskobu ile gözlenebilirler (Yılmaz 2005).

- Anneksin V yöntemi; normal hücrelerde hücre zarının sitoplazmik yüzünde fosfatidilserin (PS) bulunmaktadır. Eğer hücre apoptoze giderse normalde iç yüzde yerleşmiş olan PS molekülleri hücre zarının dış yüzüne transloke olurlar. Dış yüze transloke olan PS'ler, floresan bir madde ile işaretlenmiş Anneksin V kullanılarak görünür hale getirirler. Böylece apoptotik hücreler saptanmış olur (Vairetti ve ark 2005).

- TUNEL yöntemi; DNA kırıklarının in situ olarak tanınmasını sağlar. İn situ DNA fragmantasyonu, TdT-(terminal deoksinükleotidil transferaz) aracılı floresan-dUTP işaretleme (TUNEL) yöntemiyle belirlenir. Apoptotik hücrelerin görüntülenmesi için peroksidaz substrat 3.3-diaminobenzidin kullanılır. Nükleer boyama için methyl green (%0.5) kullanılır. TUNEL-pozitif hücreler ışık mikroskobu altında görüntülenir. Parafin

bloklar, donmuş kesitler, kültürü yapılmış solüsyon halindeki veya pleytlere ekilmiş, ya da lameller üzerinde büyütülmüş hücrelerde apoptozisin varlığı bu metodla saptanabilir (Watanabe ve ark 1999).

- M30 yöntemi; M30 yönteminde apoptotik hücreler sitokeratin 18'in kaspazların etkisiyle kırılması sonucu ortaya çıkan yeni antijenik bölgenin immunohistokimyasal yöntemle boyanması prensibine göre belirlenir. Sadece sitokeratin 18'i eksprese eden dokularda kullanılması mümkündür. Bu dokular epitelyal kaynaklı dokulardır (Yılmaz 2005).

- Kaspaz-3 yöntemi; kaspaz-3 yöntemi ile sadece apoptotik hücrelerde oluşan aktif kaspaz-3 İHC metoduyla belirlenebilir. Bunun için, dokunun kaspaz-3 eksprese ettiğinin bilinmesi ya da çalışılan dokuda apoptozise yol açan ajanın kaspaz-3'ü kırıp kırmadığının bilinmesi gerekir. Ancak, bu bilirse apoptotik hücreler bu metotla tespit edilebilirler (Antar 2005).

- Agaroz jel elektroforezi; DNA kırıklarının gösterilebildiği bir başka yöntemdir. Apoptoziste DNA, 180 baz çifti ve bunun katlarına karşılık gelen noktalardan (internükleozomal bölgelerden) kırıldığı için merdiven görüntüsü (ladder pattern) oluşur. Bu bulgu apoptozisin karakteristik özelliğidir (Hekim 2003).

- Western blotting; bu metod yardımıyla apoptozise özgü bazı proteinlerin eksprese olup olmadıklarının (örneğin, bcl-2) ya da kırılıp kırılmadıklarının (örneğin, kaspaz-3) saptanması mümkündür. Sitokrom c'nin mitokondriye çıkıp çıkmadığının belirlenmesi de bu metodla yapılabilir (Liu ve ark 2006).

- Flow sitometri; flow sitometri yardımıyla floresan bir madde ile işaretlenmiş antikor kullanılarak apoptoziste eksprese olduğu bilinen herhangi bir hücre yüzey proteininin saptanması mümkündür. Böylece apoptotik hücreler belirlenebilir (Laurenzi 2006).

- ELISA yöntemi; ELISA ile apoptotik süreç sonunda parçalanmış ve sitoplazmaya sızmış mono yada oligonükleozomları (DNA fragmentlerini) saptamak amaçlanır. Bu yöntemle hücre lisatlarında, hücre kültürlerinde, hücre kültür süpernatantlarında ve serum ya da plazmada çalışmak mümkündür (Brugere ve ark 1999). Hücre kültür ortamında genellikle normal sağlıklı hücreler, apoptotik hücreler ve nekrotik hücreler birlikte bulunurlar (Hekim 2003). Çalışma yöntemi santrifügasyonla başlar. Elde edilen süpernatant muhtemelen nekrotik süreç sonucunda ortama salınan nükleer materyali içerebilir. Bu yüzden de

süpernatant santrifügasyondan sonra atılır. Geri kalan materyal yıkanır ve süpernatant tekrar atılır. Böylece nekrotik hücreler uzaklaştırılır. Geriye kalan normal hücreler ve apoptotik hücrelerin sitoplazmik nükleozomları çıkarılmak için hücre plazma membranı permeabilize edilir ve elde edilen sitoplazmik materyalde nükleozomlar ELISA yöntemi ile tespit edilir. Aynı şekilde M30 düzeylerinin ölçümü de mümkündür (Frankfurt ve Krishan 2001).

- Fluorometrik yöntem; kültürü yapılmış hücrelerde kaspaz aktivitesinin tayin edilmesinde kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemde ilgili kaspazın antikorunun bulunduğu pleytlere hücre lizatlarının konulması ile kaspaz molekülleri tutulur ve sonra ortama kaspazların parçaladığı ve kendisine floresan bir maddenin tutulduğu bir substrat ilave edilir. Ortamdaki kaspaz aktivitesiyle orantılı olarak ortaya çıkan floresanın şiddeti fluorimetre ile ölçülerek kaspaz aktivitesi saptanır (Yılmaz 2005).



## 2. GEREÇ VE YÖNTEM

### 2. 1. Deney Hayvanları

Bu çalışmada, 5,5-6 aylık ortalama 350–400 gram ağırlıklarında 60 adet erkek Sprague Dawley türü rat kullanıldı. Deneme süresince hayvanlar Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Deney Hayvanları laboratuvarında ışık (12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık) ve ısı ( $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) kontrollü odalarda % 20 protein içeren kuru pelet yem ve su *ad libitum* verilmek üzere izlendi.

### 2. 2. Deney Grupları ve Uygulama Protokolü

Hayvanlar çalışma başlamadan üç hafta önce deney hayvanları ünitesinde standart kafeslere konularak ortama alışması beklendi. Çalışmada her biri 10 hayvandan oluşan 6 grup oluşturuldu. Gruplara şu işlemler uygulandı.

1. Grup ( $\text{CCl}_4$ , 6. saat): Karaciğer toksisitesi oluşturmak amacıyla  $\text{CCl}_4$ , periton içi (i.p.) 2 ml/kg 1/1 oranında zeytinyağındaki çözeltisi şeklinde tek doz enjekte edildi. Hayvanlar  $\text{CCl}_4$  enjeksiyonundan 6 saat sonra eter anestezisine alınıp kalplerinden kan alındı, nukleer ekstrakt ve tunel yöntemi için karaciğer dokusu alındı.
2. Grup ( $\text{CCl}_4$ +NAS, 6. saat): Karaciğer toksisitesi oluşturulup N Asetil Sisteinin koruyucu etkisinin belirlenmesi amacıyla  $\text{CCl}_4$  periton içi (i.p.) 2 ml/kg 1/1 oranında zeytinyağındaki çözeltisi şeklinde tek doz enjekte edildi ve N Asetil Sistein uygulamasına (periton içi 50 mg/kg/gün)  $\text{CCl}_4$  enjeksiyonundan 3 gün önce başlandı ve deney süresince devam edildi. Hayvanlar  $\text{CCl}_4$  enjeksiyonundan 6 saat sonra eter anestezisine alınarak kan ve karaciğer dokusu alındı.
3. Grup ( $\text{CCl}_4$ , 72. saat): Karaciğer toksisitesi oluşturmak amacıyla  $\text{CCl}_4$ , periton içi (i.p.) 2 ml/kg 1/1 oranında zeytinyağındaki çözeltisi şeklinde tek doz enjekte edildi ve 72 saat sonra hayvanlar eter anestezisine alınarak kan ve karaciğer örnekleri alındı.

4. Grup (CCl<sub>4</sub>+NAS, 72. saat): Karaciğer toksisitesi oluşturulup N Asetil Sisteinin koruyucu etkisinin belirlenmesi amacıyla CCl<sub>4</sub> periton içi (i.p.) 2 ml/kg 1/1 oranında zeytinyağındaki çözeltisi şeklinde tek doz enjekte edildi ve N Asetil Sistein uygulamasına (periton içi 50 mg/kg/gün) CCl<sub>4</sub> enjeksiyonundan 3 gün önce başlandı ve deney süresince devam edildi. Hayvanlar CCl<sub>4</sub> enjeksiyonundan 72 saat sonra eter anestezisine alınarak kalplerinden kan ve karaciğer dokusu alındı.
5. Grup (Zeytinyağı): 2 ml/kg zeytinyağı periton içi (i.p.) tek doz enjekte edildi. 5 adet rattan 6 saat sonra, 5 adet rattan 72 saat sonra eter anestezisi altında kan ve karaciğer dokusu örnekleri, kontrol değerleri için alındı.
6. Grup (Zeytinyağı+NAS): 2 ml/kg zeytinyağı i.p. tek doz, N Asetil Sistein uygulamasına ise (periton içi 50 mg/kg/gün) deney gurubuna enjekte edilen CCl<sub>4</sub>'den 3 gün önce başlandı ve deney süresince devam edildi. 5 adet rattan 6 saat sonra, 5 adet rattan 72 saat sonra eter anestezisi altında kan ve karaciğer örnekleri kontrol değerleri için alındı.

Deney süresinin sonunda eter anestezisi altında alınan kan örnekleri 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek serumları ayrıldı ve daha sonra çalışılmak üzere -80°C'de saklandı.

Deney süresinin sonunda hayvanlardan alınan taze karaciğer dokusu örneklerinin yarısı apoptotik TUNEL yöntemi için analizler yapılmaya kadar -80°C'de saklandı. Diğer yarısında nükleer ekstrakt hazırlandı ve analizler yapılmaya kadar -80°C'de saklandı.

Elde edilen nükleer ekstraktlarda 8-hidroksi-2-deoksiguanozin, Histon Asetil Transferaz, Histon Deasetilaz, ile serumda Total Antioksidan Kapasitesi, Total Oksidan Kapasitesi, AST ve ALT düzeyleri hazır ticari kitler kullanılarak analiz edildi. Serum MDA seviyesi ise Yoshioko ve arkadaşlarının (1979) bildirdiği yöntemle yapıldı. Apoptozis karaciğer dokusunda TUNEL yöntemi ile, DNA fragmentasyonu ise nükleer ekstraktlarda ELİSA yöntemi ile belirlendi.

### **2. 3. Kullanılan Cihazlar**

Analizler sırasında Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı laboratuvarında bulunan; -80°C'lik derin dondurucu (Glacier ultralow temperature freezer, Japonya), -20°C'lik derin dondurucu (Bosch, Türkiye), ELISA okuyucusu (Optic İvymen System 2100-C, İspanya) ve çalkalayıcısı (Insel Hamble SO3 8DH, İngiltere), Santrifüj (Nüve NF800R, Türkiye), homojenizatör (Yellow Line Ost Basic, Almanya), spektrofotometre (Shimadzu UV-1601, Avustralya), Vorteks (Velp, İtalya), Manyetik karıştırıcı (Velp, İtalya), Etüv (Memmert, Almanya), Hassas terazi (Sartorius, Almanya) ve otomatik pipetler (İsolab 2-20µl, İsoTerm 20-200 µl, Brand 5-50 µl, İsoTerm 100-1000 µl), pH metre (pH 211, Hanna, Amerika) Histoloji Anabilim Dalı laboratuvarında bulunan mikrotom (Leica, Almanya) kullanılmıştır.

### **2. 4. Kullanılan Kimyasal Maddeler**

Analizler sırasında CCl<sub>4</sub>, N asetil sistein (Merck, K40328922), Asetik asit (Merck, K40866656), Paraformaldehit (Sigma, P6148), Butanol (Merck K37211388), Triklorasetik asit (Merck, K36929507), Tiyobarbitürik asit (Merck, L55063680), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O (Disodyum hidrojen fosfat dihidrat) (Merck, 6580), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Potasyum dihidrojen fosfat) (Merck, 4871), NaCl (Sodyum klorür) (Merck, 6400), Etil alkol (Smyras, 2050500), Ksilol (Carlo Erba, 492306), Eter (Carlo Erba, 447522), Hematoksilen (Sigma, S1275), Hidrojen peroksit (Merck, K40027400), Faramount (Dako, 2972), Nükleer ekstrakt kiti (Cayman, 10009277, USA), Cell Death Detection ELISA Plus kiti (Roche, 11774425001, Mannheim, Germany), HAT kiti (HAT Activity Assay, Kamiya, KT-146, Seattle, USA), HDAC kiti (HDAC Activity Assay Kit, Cayman, 10011563, USA), 8-hidroksi-2-deoksiguanozin kiti (8-hidroksi-2-deoksiguanozin EIA Kit, Cayman, 589320, USA), Total protein kiti (Archem, A2301, TURKEY), TAK kiti (Total Antioxidant Status Assay kit, Rel Assay Diagnostics, RL0017, TURKEY), TOK kiti (Total Oxidant Status Assay kit, Rel Assay Diagnostics, RL0024, TURKEY), AST kiti (AST, Archem, A2212, TURKEY), ALT kiti (Archem, A2222, TURKEY) ve TUNEL kiti (ApopRag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit, Chemicon, S7101, USA) kullanılmıştır.

## **2. 5. Serumda Aspartat Aminotransferaz (AST) Analizi**

Serumda aspartat aminotransferaz (AST) analizi aspartat aminotransferazın 25°C’de bir dakikada 1 mmol L-aspartat ve alfa ketoglutaratı; oksaloasetat ve glutamata transaminasyonu sonucu meydana gelen absorbans artışının 340 nm’de 1-3 dakika boyunca ölçülmesi prensibi ile çalışan hazır ticari kit (AST, Archem, A2212, TURKEY) kullanılarak yapıldı. Bir tüpe 4:1 oranında birinci ve ikinci ayıraç karışımından 1 ml konuldu. Üzerine 100 µl serum ilave edilip karıştırıldıktan sonra 90 saniye 37°C’de inkübe edildikten sonra 60 saniyede bir 340 nm’de 3 okuma yapıldı ve delta absorbans değeri hesaplanıp standart faktör ile çarpılarak U/L cinsinden sonuç bulundu.

## **2. 6. Serumda Alanin Aminotransferaz (ALT) Analizi**

Serumda alanin aminotransferaz (ALT) analizi alanin aminotransferazın 25°C’de bir dakikada 1 mmol L-alanin ve alfa ketoglutaratı; piruvat ve glutamata transaminasyonu sonucu meydana gelen absorbans artışının 340 nm’de 1-3 dakika boyunca ölçülmesi prensibi ile çalışan hazır ticari kit (ALT, Archem, A2222, TURKEY) kullanılarak yapıldı. Bir tüpe 4:1 oranında birinci ve ikinci ayıraç karışımından 1 ml konuldu. Üzerine 100 µl serum ilave edilip karıştırıldıktan sonra 90 saniye 37°C’de inkübe edildikten sonra 60 saniyede bir 340 nm’de 3 okuma yapıldı ve delta absorbans değeri hesaplanıp standart faktör ile çarpılarak U/L cinsinden sonuç bulundu.

## **2. 7. Malondialdehit (MDA) Analizi**

MDA analizi lipid peroksidasyon ölçüm metodu olan Yoshiko ve ark (1979) bildirdikleri metod uygulanarak spektrofotometrede (Shimadzu UV-1601, Australia) yapıldı. Bu yöntemin prensibi TBA (tiyobarbitürik asit) ile MDA’nın asidik pH ve sıcak ortamda tepkimesi sonucu oluşan pembe renkli pigmentin spektrofotometrik ölçümüne dayanmaktadır. Analiz için numunelerden 250 µl vidalı kapaklı cam tüplere konuldu üzerine 1,25 ml Triklorasetik asitin (TCA) % 10’luk çözeltisinden ilave edilip karıştırıldı ve 0,5 ml % 0,67’lik Tiyobarbitürik asit ilave edildi. Kör tüpüne ise TCA’dan 1,5 ml ve TBA’dan 0,5 ml konuldu. Tüplerin ağızları sıkıca kapatılıp 30 dakika kaynar su banyosunda tutulduktan sonra çeşme altında soğutuldu ve 2 ml n-butanol ilave edilip

karıştırılarak 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Üstteki faz 535 nm'de okundu. Absorbans sonuçları 155,5 kat sayısı ile çarpılarak  $\mu\text{mol/L}$  cinsinden sonuçlar bulundu.

## **2. 8. Serumda Total Antioksidan Kapasitesi (TAK) Analizi**

Serumda total antioksidan kapasitesi ölçümü, serum numunesindeki antioksidanların ABTS'den kaynaklanan koyu mavi yeşil rengi azaltması sonucu şekillenen absorbans değişiminin ölçülmesi esasına dayanan hazır ticari kit (Total Antioxidant Status Assay kit, Rel Assay Diagnostics, RL0017, TURKEY) kullanılarak yapıldı. Bu amaçla 500  $\mu\text{l}$  1. ayıraç bir tüpe konulup üzerine 30  $\mu\text{l}$  standart ve numuneler konuldu ve 660 nm'de birinci okuma yapıldı. 75  $\mu\text{l}$  2. ayıraç ilave edilip 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 660 nm'de ikinci okuma yapıldı, delta değerleri bulunup standarda göre hesaplaması yapıldı.

## **2. 9. Serumda Total Oksidan Kapasitesi (TOK) Analizi**

Serumda total oksidan kapasitesi ölçümü, demir iyonunun asidik ortamda kromojen ile renkli bir kompleks oluşturduğu, rengin şiddetinin numunedeki oksidanların miktarına bağlı olarak değiştirdiği ve rengin yoğunluğunun spektrofotometrik olarak belirlenebildiği hazır ticari kit (Total Oxidant Status Assay kit, Rel Assay Diagnostics, RL0024, TURKEY) kullanılarak yapıldı. Bu amaçla 500  $\mu\text{l}$  1. ayıraç bir tüpe konulup üzerine 75  $\mu\text{l}$  standart ve numuneler konuldu ve 530 nm'de birinci okuma yapıldı. 25  $\mu\text{l}$  2. ayıraç ilave edilip 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 530 nm'de ikinci okuma yapıldı, delta değerleri bulunup standarda göre hesaplaması yapıldı.

## **2. 10. Karaciğer Dokusunda Nükleer Ekstrakt Hazırlanması**

Karaciğer dokusunda nükleer ekstraksiyon işlemi hazır ticari kit (Cayman, 10009277, USA) kullanılarak yapıldı. Ratlardan alınan taze karaciğer dokularından 0,2 gr tartılıp küçük parçalara bölündükten sonra 0,6 ml soğuk Hipotonik tampon (0,6  $\mu\text{l}$  DTT ve 0,6  $\mu\text{l}$  % 10' luk Nonidet P-40 ilaveli) ilave edildi. Homojenizatörde 1500 rpm'de 3 dakika

homojenize edildi ve buzlu ortamda 15 dakika inkübe edildi. 300 g'de 10 dakika +4°C'de santrifüj edildi ve süpernatant başka bir tüpe ayrıldı (1. Tüp). Pelet 100 µl Hipotonik tampon (0,6 µl DTT ve 0,6 µl % 10' luk Nonidet P-40 ilaveli) ile çözdürülüp buzlu ortamda 15 dakika tekrar inkübe edildi. 10 µl % 10' luk Nonidet P-40 ilave edilip karıştırıldıktan sonra 14000 g'de 30 saniye +4°C'de santrifüj edildi. Süpernatant başka bir tüpe aktarılıp 1. tüp ile karıştırıldı. Pelet 50 µl soğuk Ekstraksiyon tampon (Proteaz ve fosfataz inhibitör ilaveli) ile çözdürülüp 15 saniye vortekslenildikten sonra buzlu çalkalayıcıda 15 dakika inkübe edildi. 14000 g' de 10 dakika +4°C'de santrifüj edildi. Süpernatant başka bir tüpe alınarak analiz yapılana kadar -80°C'de saklandı.

## **2. 11. Nükleer Ekstraktlarda 8-hidroksi-2-deoksiguanozin Analizi**

Nükleer ekstraktlarda 8-hidroksi-2-deoksiguanozin analizi, 8-OHdG monoklonal antijeninin (Anti-8-OHdG) örnek, standart veya önceden plakanın kuyucuklarına bağlanmamış 8-OHdG'lere yarışmalı olarak bağlanma özelliğinden yararlanarak hazır ticari kit (8-hidroksi-2-deoksiguanozin EIA Kit, Cayman, 589320, USA) kullanılıp yapıldı. Nükleer ekstraktlar -80°C'den çıkarılıp oda sıcaklığına gelmesi beklendi. Bu esnada kitin çözeltileri ve standartları hazırlandı. ELISA kitinin mikroyuvarları kör, total aktivite, spesifik olmayan bağlanma, maksimum bağlanma, standart ve numune kuyucukları olarak işaretlendi. Spesifik olmayan bağlanma kuyucuğuna 100 µl, maksimum bağlanma kuyucuğuna ise 50 µl EIA tampon konuldu. Standart kuyucuklarına 50 µl standart ve numune kuyucuklarına ise 50 µl numuneler ilave edildi. Daha sonra kör ve total aktivite kuyucuğu hariç diğer kuyucuklara Tracer çözeltisi eklendi. Maksimum bağlanma, standart ve numune kuyucuklarına 50 µl Antikor ilave edildi ve mikroyuvarların üzeri parafilm ile kapatılarak 18 saat +4°C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrası tüm kuyucuklar boşaltılıp 5 kez yıkama solusyonu ile yıkandı. Tüm kuyucuklara 200 µl Ellman's ayırıcı ilave edildi. Total aktivite kuyucuğuna 5 µl Tracer çözeltisi eklendi. Mikroyuvarların üzeri parafilm ile kapatılıp 90-120 dakika karanlıkta hafif çalkalayan çalkalayıcıda inkübe edilip 405 nm'de okundu.

## **2. 12. Nükleer Ekstraktlarda Histon Asetil Transferaz (HAT) Analizi**

Nükleer ekstraktlarda Histon asetil transferaz analizi, asetil CoA'nın kofaktör olarak kullanıldığı ve CoA'dan serbest kalan aktif HAT ile peptit substratlarının asetile olduğu, NADH'nın şekillenip fotometrik olarak ölçülebildiği hazır ticari kit (HAT Activity Assay, Kamiya, KT-146, Seattle, USA) kullanılarak yapıldı. Nükleer ekstrakt numuneleri 40 µl mikropleytin kuyucuklarına ilave edildi. Arka plan okumayı bertaraf etmek için 40 µl numune yerine distile su kullanıldı. Pozitif kontrol için de 10 µl Hücre nükleer ekstraktı ile 30 µl distile su bir kuyucuğa konuldu. Daha sonra kuyucukların tamamına 50 µl HAT analiz tampon, 5 µl HAT Substrat I, 5 µl HAT Substrat II ve 8 µl NADH oluşturuvcu enzim ilave edilip karıştırıldı. 37 °C'de 1-4 saat renk oluşuncaya kadar inkübe edildi. İnkübasyon periyodu süresince 450 nanometrede 1 saatte bir kontrol okuması yapıldı. Yeterli sarı renk oluşunca inkübasyona son verildi. Pozitif kontrol sonucuna göre nükleer ekstraktların sonuçları hesaplandı.

## **2. 13. Nükleer Ekstraktlarda Histon Deasetilaz (HDAC) Analizi**

Nükleer ekstraktlarda Histon deasetilaz analizi hazır ticari kit (HDAC Activity Assay Kit, Cayman, 10011563, USA) kullanılarak yapıldı. Nükleer ekstraktlar -80°C'den çıkarılıp oda sıcaklığına gelmesi için beklenirken kitin çözelti ve standartları hazırlandı. Kitin mikropleyti standart, pozitif kontrol, pozitif kontrol+Trichostatin A çözeltisi, numune ve numune+Trichostatin A çözeltisi kuyucukları şeklinde işaretlendi. Standart kuyucuklarına 150 µl analiz tampon ve 10 µl standart konuldu. Pozitif kontrol ve pozitif kontrol+Trichostatin A çözeltisi kuyucuklarına 140 µl analiz tampon ve 10 µl pozitif kontrol ilave edildi. Numune ve numune+Trichostatin A çözeltisi kuyucuklarına 140 µl Analiz tampon ile 10 µl numune konuldu. 10 µl Trichostatin A pozitif kontrol+Trichostatin A çözeltisi kuyucuklarına ve numune+Trichostatin A çözeltisi kuyucuklarına ilave edildi. Pozitif kontrol ve numune kuyucuklarına ise 10 µl analiz tampon ilave edildi. 10 µl HDAC Substrat tüm kuyucuklara ilave edildi. Mikropleyt pleyt kaplayıcı ile kapatılıp çalkalayıcıda 37°C'de 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası tüm kuyucuklara 40 µl developer çözeltisi ilave edilip 15 dakika oda sıcaklığında tekrar inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası 340'de 450 nm referans dalga boyunda ölçüm yapıldı.

## **2. 14. Nükleer Ekstraktlarda Apoptotik DNA Fragmentasyonu Analizi**

Apoptotik hücrelerin çekirdeklerindeki DNA kırılmalarının ölçümü, kantitatif sandwich enzim immunoassay prensibine dayanan ve apoptotik DNA fragmentasyonu esnasında oluşan sitoplazmik DNA-histon kompleksinin belirlenmesini sağlayan hazır ticari kit (Cell Death Detection ELISA Plus kit, Roche, 11774425001, Mannheim, Germany) kullanılarak yapıldı. Apoptotik hücrelerin çekirdeklerindeki DNA kırılmalarının ölçümü amacıyla -80°C 'de muhafaza edilen nükleer ekstraktlar dışarıya alındı. 20 µl nükleer ekstrakt üzerine ELISA kitinin içinde kullanıma hazır halde bulunan lizis tamponundan 200 µl ilave edilip 30 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından 20000 g'de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatant Roche firmasının Cell Death Detection ELISA plus hazır ölçüm kitinde kullanıldı. Bunun için 20 µl süpernatant streptavidin kaplı mikropleyt kuyucuklarına ilave edildi ve daha sonra her bir kuyucuğa 80 µl reaktif (Monoklonal antikor, antihiston-biotin ve anti-DNA-POD karışımı) eklendi. Reaksiyonun oluşması için 2 saat 15-25°C'de 200 rpm'de hafif çalkalayan çalkalayıcıda inkübe edildi. Sürenin sonunda her bir kuyucuk inkübasyon tamponu ile yıkandı. Daha sonra her bir kuyucuğa 100 µl ABTS [substrate 2,2'-azino-di-(3-ethylbenzthiazoline sulfonate) diammonium salt crystals] solusyonu eklenip 10 dakika oda sıcaklığında hafif çalkalayarak inkübe edildi. Sürenin sonunda ABTS stop solusyonu ilave edilip 405 nm' de ABTS ve ABTS stop solusyonuna karşı okundu.

## **2. 15. Nükleer Ekstraktlarda Protein Analizi**

Nükleer ekstraktlarda protein analizi biüret prensibine dayanan hazır ticari kit (Total protein, Archem, A2301, TURKEY) kullanılarak yapıldı. Kör, standart ve numune tüpleri hazırlandı. Total protein ayırıcından 1 ml konuldu. Üzerine numune tüpüne 10 µl örnek, standart tüpüne ise 10 µl standart ve kör tüpüne 10 µl distile su ilave edildi. Karıştırılıp 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 546 nm'de okuma yapıldı ve standarda göre hesaplaması yapıldı. Nükleer ekstrakta yapılan analizler protein sonucuna uyarlandı.



## 2. 16. Karaciğer Dokularında Apoptotik Hücrelerin TUNEL Yöntemi İle Belirlenmesi

-80°C'de muhafaza edilen karaciğer örnekleri çıkartılıp -20°C'de poly-L-lysine kaplı lamlara 5 mikron kalınlığında kreostat kesitler alındı ve -20°C'de muhafaza edildi. Analiz, DNA kırıklarının in situ olarak tanınmasını sağlayan in situ DNA fragmentasyonu, TdT-(terminal deoksinükleotidil transferaz) aracılı floresan-dUTP işaretleme (TUNEL) yöntemine dayanan TUNEL hazır ticari kit (ApopRag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit, Chemicon, S7101, USA) kullanılarak yapıldı. Analiz yapılacağı gün çıkarılan lamlar % 1'lik paraformaldehit (PBS'de, pH 7,4) içerisinde 10 dakika oda sıcaklığında fikse edildi. 2 defa 5'er dakikalık PBS'de yıkandıktan sonra 2:1 Etanol:Asetik asit karışımında -20°C'de 5 dakika postfiksasyon yapıldı. 2 kez 5'er dakika PBS ile yıkandı. PBS'de hazırlanmış % 3'lük hidrojen peroksitte 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. 3 defa 5'er dakikalık PBS'de yıkama yapıldı ve lamlar kurulandıktan sonra 75 µl dengeleme tamponundan lamların üzerine damlatıldı ve 10 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Sonra 55 µl TdT enzim çalışma solusyonundan lamların üzerine damlatılıp nemlendirilmiş 37°C'lik ortamda 1 saat inkübe edildi. Lamlar reaksiyonu durdurma solusyonunda 10 dakika oda sıcaklığında bırakıldı. 3 kez 1'er dakikalık PBS'de yıkandı ve üzerine 65 µl anti-digoksinin peroksidaz konjugat damlatıldı ve 30 dakika inkübe edildi. 4 defa 2'şer dakikalık PBS'de yıkandıktan sonra lamlar kurulanıp 75 µl peroksidaz substrat damlatılarak 3-6 dakika arasında bekletildi. 3 kez 1'er dakika yıkandı ve 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Hematoksin ile zıt boyama yapıldı. 3 kez deiyonize suda yıkandı. 3 değişim % 100 n-butanolde 30'ar saniye bekletildi. 3 değişim ksilolde 2'şer dakika bekletildi. Lamel yapıştırıcısı sürülerek lamlar kapatıldı. Görüntüleme sistemi bulunan mikroskopta değerlendirmesi yapıldı ve fotoğrafları çekildi.

## 2. 17. İstatistiksel Analizler

Elde edilen verilerin istatistiksel analizi amacıyla SPSS (for Windows Release 11.5 Standart Versiyon Copyright © Spss Inc. 1989-2001) hazır paket programı kullanıldı. Çalışma gruplarına ait veriler ortalama  $\pm$  standart hata ( $\text{Ortalama} \pm S_{\bar{x}}$ ) şeklinde gösterildi ve istatistiksel yöntem olarak gruplar arası karşılaştırmada One-Way ANOVA testi uygulandı. Duncan testi ile önemler tespit edildi. İstatistiksel açıdan farklarının anlamlı olup olmadığı ve önemlilik düzeyleri saptandı.

### 3. BULGULAR

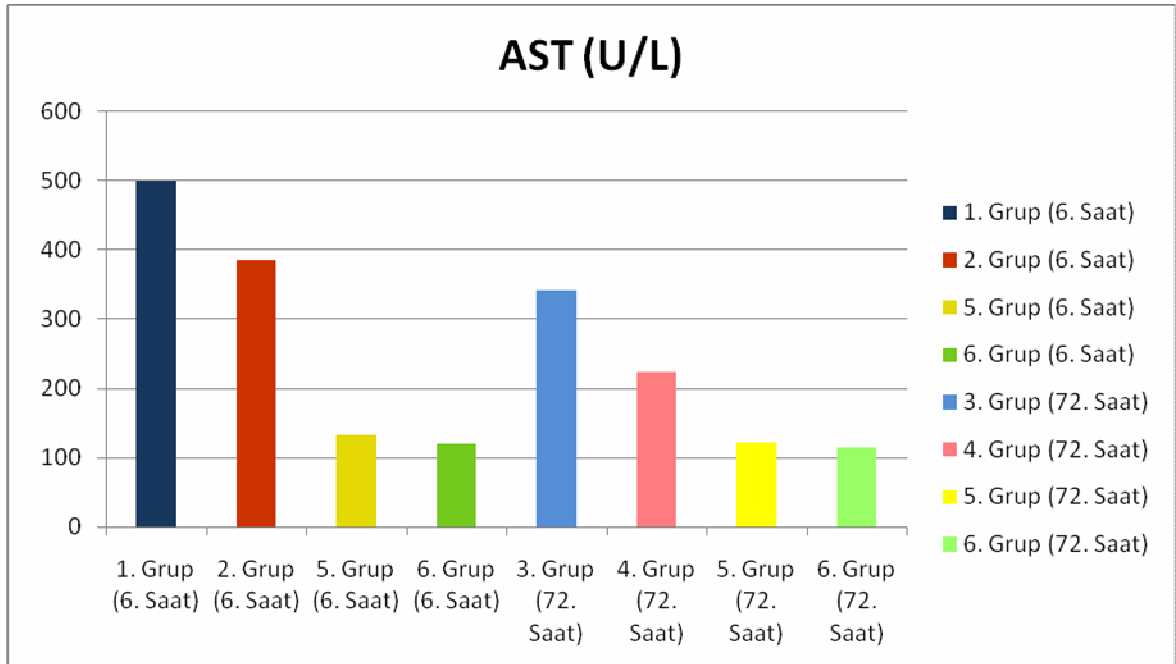
#### 3. 1. Aspartat Aminotransferaz (AST) Sonuçları

AST düzeyinin CCl<sub>4</sub> verilen grupta 6. saatte kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığı ve NAS eklenmesi ile AST düzeyinin düştüğü izlendi (P<0.05). Bununla birlikte 72. saatte 6. saate göre anlamlı bir düşüş olduğu gözlemlendi. 72. saatte gruplar arası farkın istatistiksel açıdan önemli olduğu belirlendi (Çizelge 3. 1 ve Şekil 3. 1).

Çizelge 3. 1. Aspartat aminotransferaz (AST) sonuçları ve istatistik

AST (U/L) (Ortalama± S <sub>x</sub> )								
CCl <sub>4</sub> (6. Saat) (n=10)	CCl <sub>4</sub> +NAS (6. Saat) (n=10)	Zeytinyağı (6. Saat) (n=5)	Zeytinyağı+ NAS (6. Saat) (n=5)	CCl <sub>4</sub> (72. Saat) (n=10)	CCl <sub>4</sub> +NAS (72. Saat) (n=10)	Zeytinyağı (72. Saat) (n=5)	Zeytinyağı+ NAS (72. Saat) (n=5)	P
500,451±2,76 <sup>a</sup>	384,722±2,87 <sup>b</sup>	133,18±2,84 <sup>e</sup>	120,86±2,50 <sup>c</sup>	341,95±10,96 <sup>c</sup>	224,06±2,70 <sup>d</sup>	121,74±3,15 <sup>e</sup>	114,48±1,43 <sup>e</sup>	***

\*\*\* P<0,001: İstatistiksel olarak anlamlı  
a, b, c, d, e: Aynı satırda farklı harf taşıyan grup ortalamaları arası fark önemlidir (P<0,05)



Şekil 3. 1. Aspartat aminotransferaz (AST) sonuçları grafiği

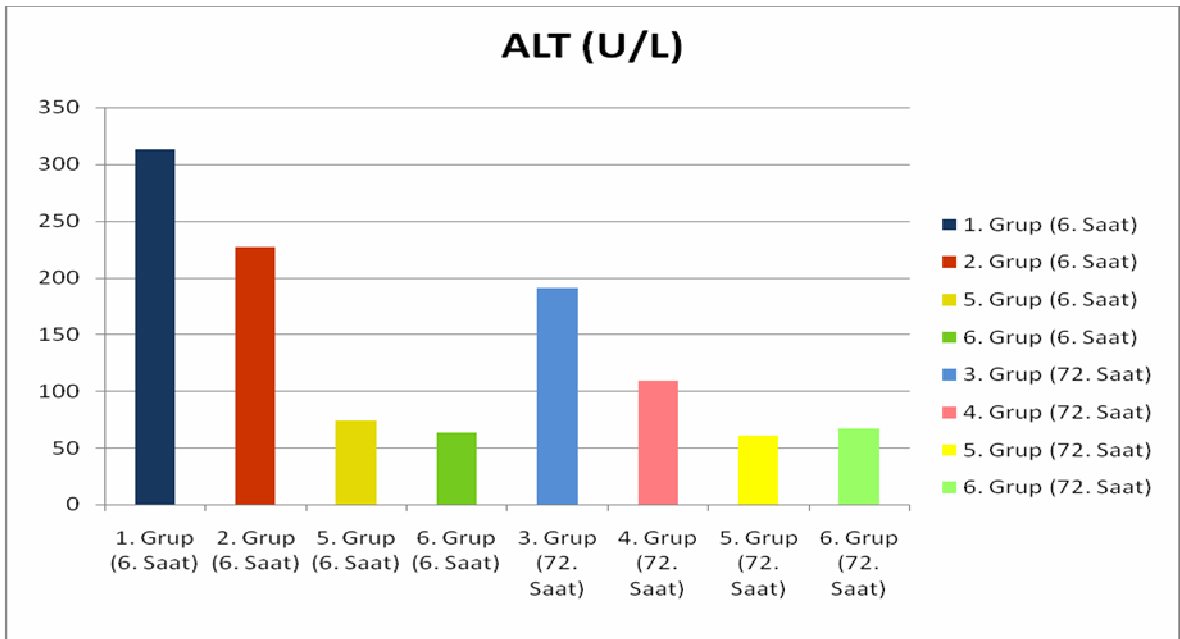
### 3. 2. Alanin Aminotransferaz (ALT) Sonuçları

ALT düzeyinin CCl<sub>4</sub> verilen grupta 6. saatte kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığı ve NAS eklenmesi ile ALT düzeyinin düştüğü izlendi (P<0.05). Bununla birlikte 72. saatte 6. saate göre anlamlı bir düşüş olduğu gözlemlendi. 72. saatte gruplar arasındaki farkın istatistiksel açıdan önemli olduğu belirlendi (Çizelge 3. 2 ve Şekil 3. 2).

Çizelge 3. 2. Alanin aminotransferaz (ALT) sonuçları ve istatistik

ALT (U/L) (Ortalama± S <sub>x</sub> )								
CCl <sub>4</sub> (6. Saat) (n=10)	CCl <sub>4</sub> +NAS (6. Saat) (n=10)	Zeytinyağı (6. Saat) (n=5)	Zeytinyağı+ NAS (6. Saat) (n=5)	CCl <sub>4</sub> (72. Saat) (n=10)	CCl <sub>4</sub> +NAS (72. Saat) (n=10)	Zeytinyağı (72. Saat) (n=5)	Zeytinyağı+ NAS (72. Saat) (n=5)	P
313,215±2,39 <sup>a</sup>	227,21±3,46 <sup>b</sup>	74,454±2,42 <sup>c</sup>	63,706±2,33 <sup>f</sup>	191,104±1,48 <sup>c</sup>	109,318±2,08 <sup>d</sup>	60,714±4,53 <sup>f</sup>	66,774±3,85 <sup>c,f</sup>	***

\*\*\* P<0,001: İstatistiksel olarak anlamlı  
a, b, c, d, e, f: Aynı satırda farklı harf taşıyan grup ortalamaları arası fark önemlidir (P<0,05)



Şekil 3. 2. Alanin aminotransferaz (ALT) sonuçları grafiği

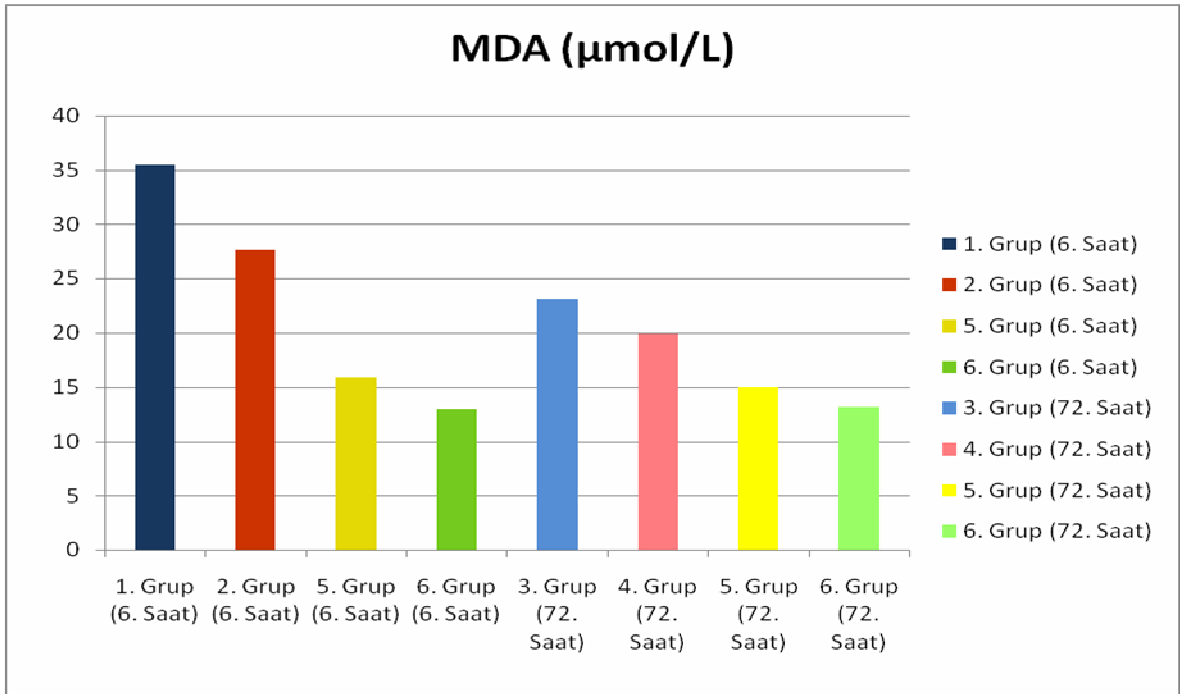
### 3. 3. Malondialdehit (MDA) Sonuçları

Malondialdehit düzeyinin CCl<sub>4</sub> verilen grupta 6. saatte kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığı ve NAS eklenmesi ile düzeyinin düştüğü izlendi (P<0.05). Bununla birlikte 72. saatte 6. saate göre anlamlı bir düşüş olduğu gözlemlendi. 72. saatte gruplar arasında istatistiki açıdan önem olduğu belirlendi (Çizelge 3. 3 ve Şekil 3. 3).

Çizelge 3. 3. Malondialdehit (MDA) sonuçları ve istatistik

MDA (µmol/L) (Ortalama± S <sub>x</sub> )								
CCl <sub>4</sub> (6. Saat) (n=10)	CCl <sub>4</sub> +NAS (6. Saat) (n=10)	Zeytinyağı (6. Saat) (n=5)	Zeytinyağı+ NAS (6. Saat) (n=5)	CCl <sub>4</sub> (72. Saat) (n=10)	CCl <sub>4</sub> +NAS (72. Saat) (n=10)	Zeytinyağı (72. Saat) (n=5)	Zeytinyağı+ NAS (72. Saat) (n=5)	P
35,443±1,13 <sup>a</sup>	27,631±0,50 <sup>b</sup>	15,938±0,38 <sup>e</sup>	12,977±0,36 <sup>f</sup>	23,174±0,61 <sup>c</sup>	19,903±0,33 <sup>d</sup>	14,959±0,92 <sup>e,f</sup>	13,222±1,15 <sup>f</sup>	***

\*\*\* P<0,001: İstatistiksel olarak anlamlı  
a, b, c, d, e, f: Aynı satırda farklı harf taşıyan grup ortalamaları arası fark önemlidir (P<0,05)



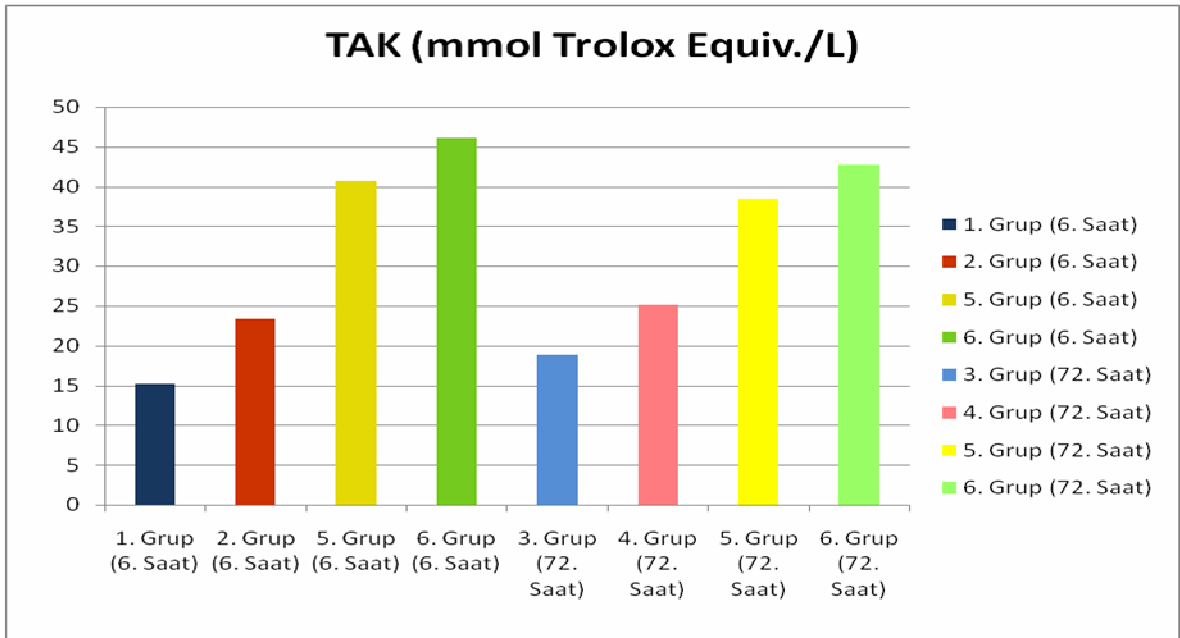
Şekil 3. 3. Malondialdehit (MDA) sonuçları grafiği

### 3. 4. Total Antioksidan Kapasitesi (TAK) Sonuçları

TAK düzeyinin CCl<sub>4</sub> verilen grupta 6. saatte kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldığı ve NAS eklenmesi ile TAK düzeyinin arttığı izlendi (P<0.05). Bununla birlikte 72. saatte 6. saate göre bir artış olduğu fakat istatistiki açıdan anlamlı olmadığı belirlendi. 72. saatte TAK düzeyinin gruplar arasındaki farkın istatistiki açıdan önemli olduğu gözlemlendi (Çizelge 3. 4 ve Şekil 3. 4).

Çizelge 3. 4. Total antioksidan kapasitesi (TAK) sonuçları ve istatistik

TAK (mmol Trolox Equiv./L) (Ortalama± S <sub>x</sub> )								
CCl <sub>4</sub> (6. Saat) (n=10)	CCl <sub>4</sub> +NAS (6. Saat) (n=10)	Zeytinyağı (6. Saat) (n=5)	Zeytinyağı+ NAS (6. Saat) (n=5)	CCl <sub>4</sub> (72. Saat) (n=10)	CCl <sub>4</sub> +NAS (72. Saat) (n=10)	Zeytinyağı (72. Saat) (n=5)	Zeytinyağı+ NAS (72. Saat) (n=5)	P
15,224±0,43 <sup>f</sup>	23,335±0,91 <sup>d</sup>	40,766±1,20 <sup>b,c</sup>	46,160±0,78 <sup>a</sup>	18,814±0,52 <sup>c</sup>	25,130±0,69 <sup>d</sup>	38,472±2,09 <sup>c</sup>	42,750±2,16 <sup>b</sup>	***
*** P<0,001: İstatistiksel olarak anlamlı								
a, b, c, d, e, f: Aynı satırda farklı harf taşıyan grup ortalamaları arası fark önemlidir (P<0,05)								



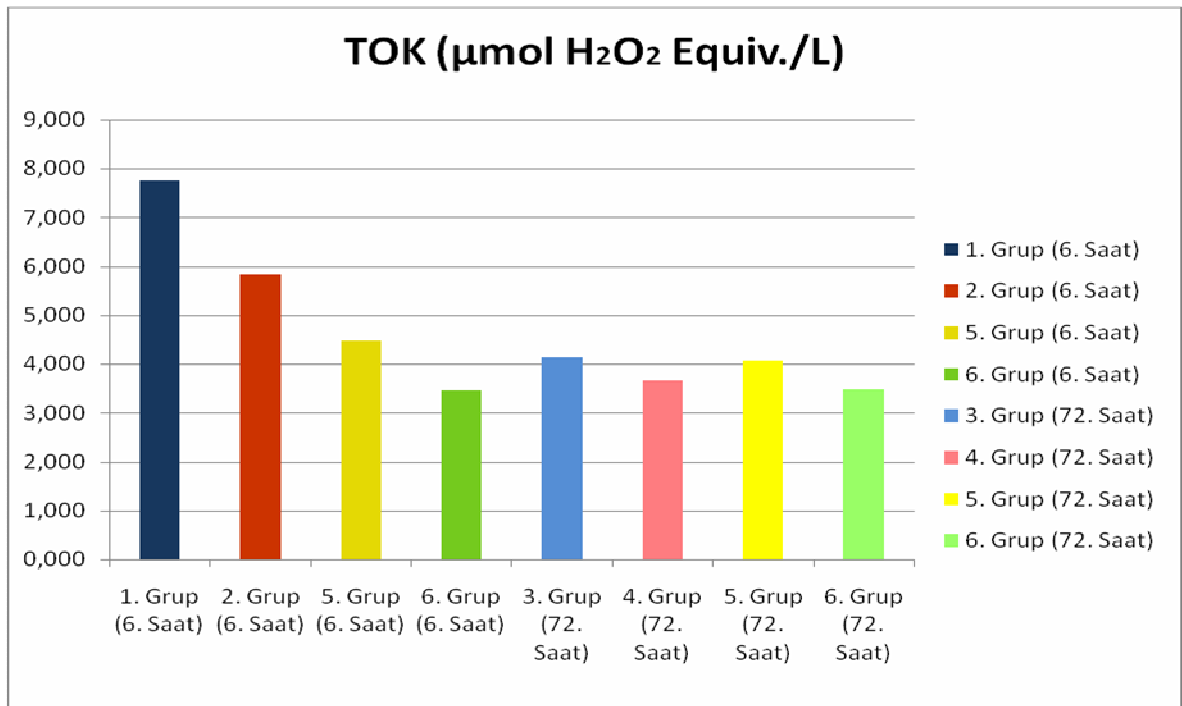
Şekil 3. 4. Total antioksidan kapasitesi (TAK) sonuçları grafiği

### 3. 5. Total Oksidan Kapasitesi (TOK) Sonuçları

TOK düzeyinin CCl<sub>4</sub> verilen grupta 6. saatte kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığı ve NAS eklenmesi ile TOK düzeyinin düştüğü izlendi (P<0.05). Bununla birlikte 72. saatte 6. saate göre istatistiki açıdan anlamlı bir düşüş olduğu fakat 72. saatte gruplar arasındaki farkın istatistiki açıdan önemli olmadığı gözlemlendi (Çizelge 3. 5 ve Şekil 3. 5).

Çizelge 3. 5. Total oksidan kapasitesi (TOK) sonuçları ve istatistik

TOK ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv./L) (Ortalama $\pm$ S $\bar{x}$ )								
CCl <sub>4</sub> (6. Saat) (n=10)	CCl <sub>4</sub> +NAS (6. Saat) (n=10)	Zeytinyağı (6. Saat) (n=5)	Zeytinyağı+ NAS (6. Saat) (n=5)	CCl <sub>4</sub> (72. Saat) (n=10)	CCl <sub>4</sub> +NAS (72. Saat) (n=10)	Zeytinyağı (72. Saat) (n=5)	Zeytinyağı+ NAS (72. Saat) (n=5)	P
7,766 $\pm$ 0,34 <sup>a</sup>	5,844 $\pm$ 0,16 <sup>b</sup>	4,486 $\pm$ 0,21 <sup>c</sup>	3,455 $\pm$ 0,19 <sup>d</sup>	4,137 $\pm$ 0,17 <sup>c,d</sup>	3,669 $\pm$ 0,09 <sup>d</sup>	4,070 $\pm$ 0,29 <sup>c,d</sup>	3,496 $\pm$ 0,15 <sup>d</sup>	***
*** P<0,001: İstatistiksel olarak anlamlı a, b, c, d: Aynı satırda farklı harf taşıyan grup ortalamaları arası fark önemlidir (P<0,05)								



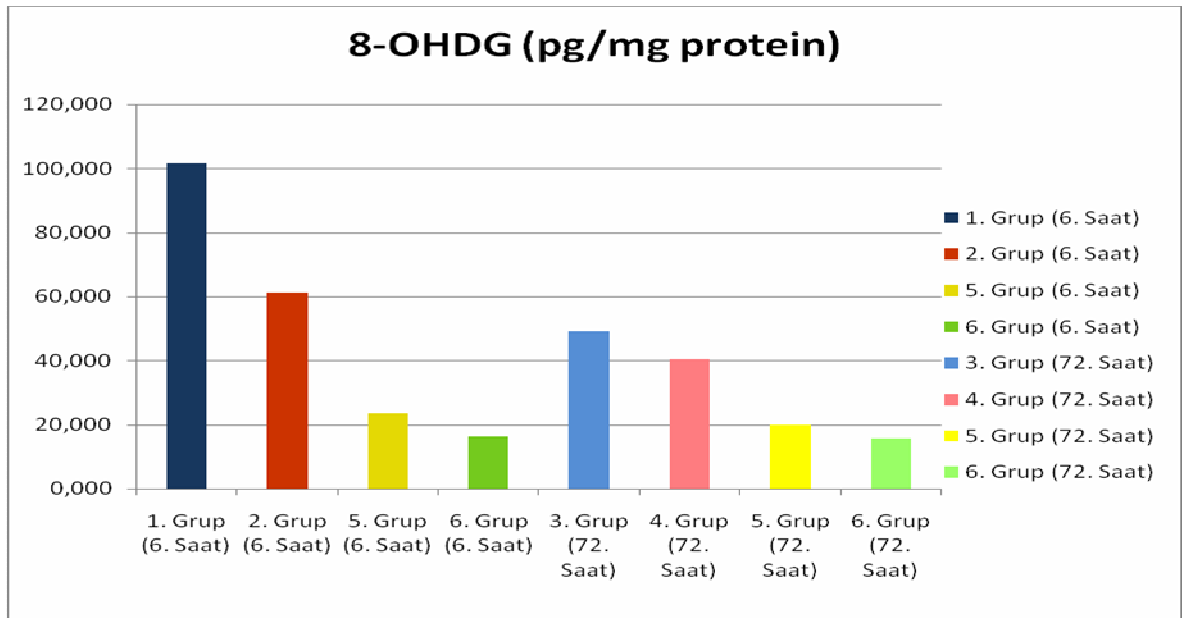
Şekil 3. 5. Total oksidan kapasitesi (TOK) sonuçları grafiği

### 3. 6. 8-hidroksi-2-deoksiguanozin (8-OHdG) Sonuçları

8-OHdG düzeyinin CCl<sub>4</sub> verilen grupta 6. saatte kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığı ve NAS eklenmesi ile düzeyinin azaldığı izlendi (P<0.05). Bununla birlikte 72. saatte 6. saate göre istatistiki açıdan anlamlı bir azalma olduğu belirlendi. 72. saatte 8-OHdG düzeyi CCl<sub>4</sub> ve CCl<sub>4</sub>+NAS grubunda kontrol grubuna göre yüksek ve anlamlı olduğu fakat birbiriyle karşılaştırıldığında istatistiki açıdan önemli olmadığı gözlemlendi (Çizelge 3. 6 ve Şekil 3. 6).

Çizelge 3. 6. 8-hidroksi-2-deoksiguanozin (8-OHdG) sonuçları ve istatistik

8-OHdG (pg/mg protein) (Ortalama± S <sub>x</sub> <sup>-</sup> )								
CCl <sub>4</sub> (6. Saat) (n=10)	CCl <sub>4</sub> +NAS (6. Saat) (n=10)	Zeytinyağı (6. Saat) (n=5)	Zeytinyağı+ NAS (6. Saat) (n=5)	CCl <sub>4</sub> (72. Saat) (n=10)	CCl <sub>4</sub> +NAS (72. Saat) (n=10)	Zeytinyağı (72. Saat) (n=5)	Zeytinyağı+ NAS (72. Saat) (n=5)	P
101,709±7,44 <sup>a</sup>	61,167±2,23 <sup>b</sup>	23,597±2,40 <sup>d</sup>	16,313±2,00 <sup>d</sup>	49,154±1,71 <sup>c</sup>	40,321±1,47 <sup>c</sup>	19,941±1,15 <sup>d</sup>	15,890±0,88 <sup>d</sup>	***
*** P<0,001: İstatistiksel olarak anlamlı a, b, c, d: Aynı satırda farklı harf taşıyan grup ortalamaları arası fark önemlidir (P<0,05)								



Şekil 3. 6. 8-hidroksi-2-deoksiguanozin (8-OHdG) sonuçları grafiği

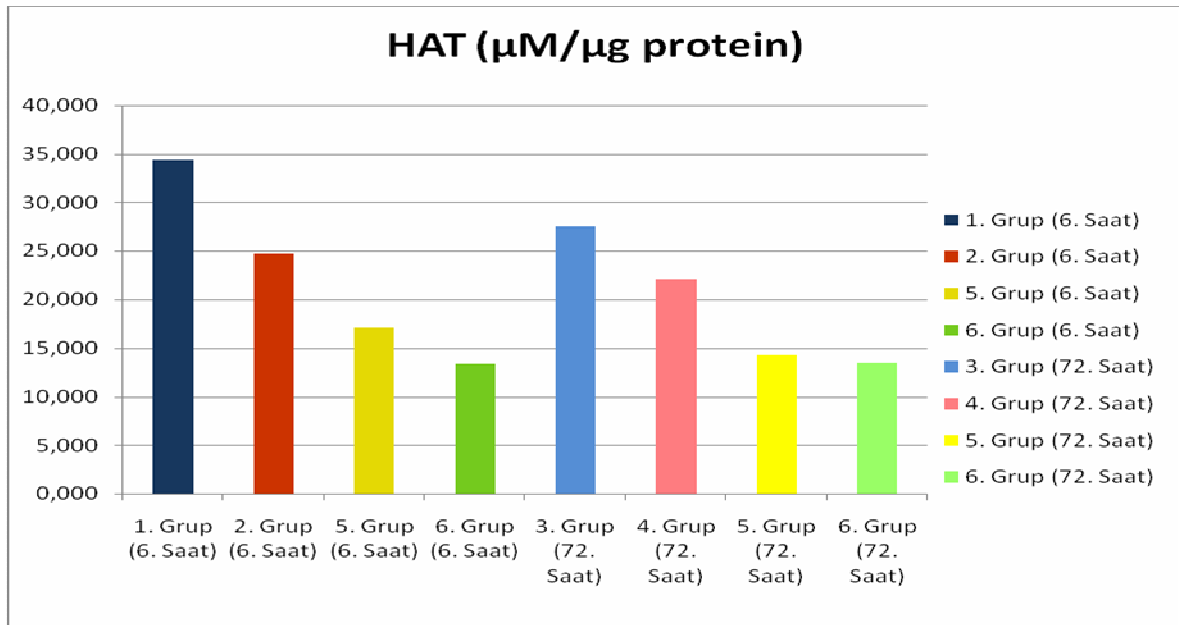
### 3. 7. Histon Asetil Transferaz (HAT) Sonuçları

HAT düzeyinin CCl<sub>4</sub> verilen grupta 6. saatte kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığı ve NAS eklenmesi ile düzeyinin azaldığı izlendi (P<0.05). Bununla birlikte 72. saatte 6. saate göre istatistiki açıdan CCl<sub>4</sub> verilen grupta anlamlı bir azalma olduğu belirlendi. 72. saatte HAT düzeyi CCl<sub>4</sub>+NAS grubunda 6. saate göre düşük olduğu fakat istatistiki açıdan önemli olmadığı, 72. saatte HAT düzeyinin gruplar arasındaki farkın istatistiki açıdan önemli olduğu gözlemlendi (Çizelge 3. 7 ve Şekil 3. 7).

Çizelge 3. 7. Histon asetil transferaz (HAT) sonuçları ve istatistik

HAT ( $\mu\text{M}/\mu\text{g}$ protein) (Ortalama $\pm$ S $\bar{x}$ )								
CCl <sub>4</sub> (6. Saat) (n=10)	CCl <sub>4</sub> +NAS (6. Saat) (n=10)	Zeytinyağı (6. Saat) (n=5)	Zeytinyağı+ NAS (6. Saat) (n=5)	CCl <sub>4</sub> (72. Saat) (n=10)	CCl <sub>4</sub> +NAS (72. Saat) (n=10)	Zeytinyağı (72. Saat) (n=5)	Zeytinyağı+ NAS (72. Saat) (n=5)	P
34,329 $\pm$ 0,99 <sup>a</sup>	24,692 $\pm$ 1,09 <sup>b,c</sup>	17,064 $\pm$ 1,77 <sup>d</sup>	13,347 $\pm$ 1,54 <sup>e</sup>	27,507 $\pm$ 0,57 <sup>b</sup>	22,122 $\pm$ 0,91 <sup>c</sup>	14,298 $\pm$ 0,87 <sup>d,e</sup>	13,480 $\pm$ 1,57 <sup>e</sup>	***

\*\*\* P<0,001: İstatistiksel olarak anlamlı  
a, b, c, d, e: Aynı satırda farklı harf taşıyan grup ortalamaları arası fark önemlidir (P<0,05)



Şekil 3. 7. Histon asetil transferaz (HAT) sonuçları grafiği



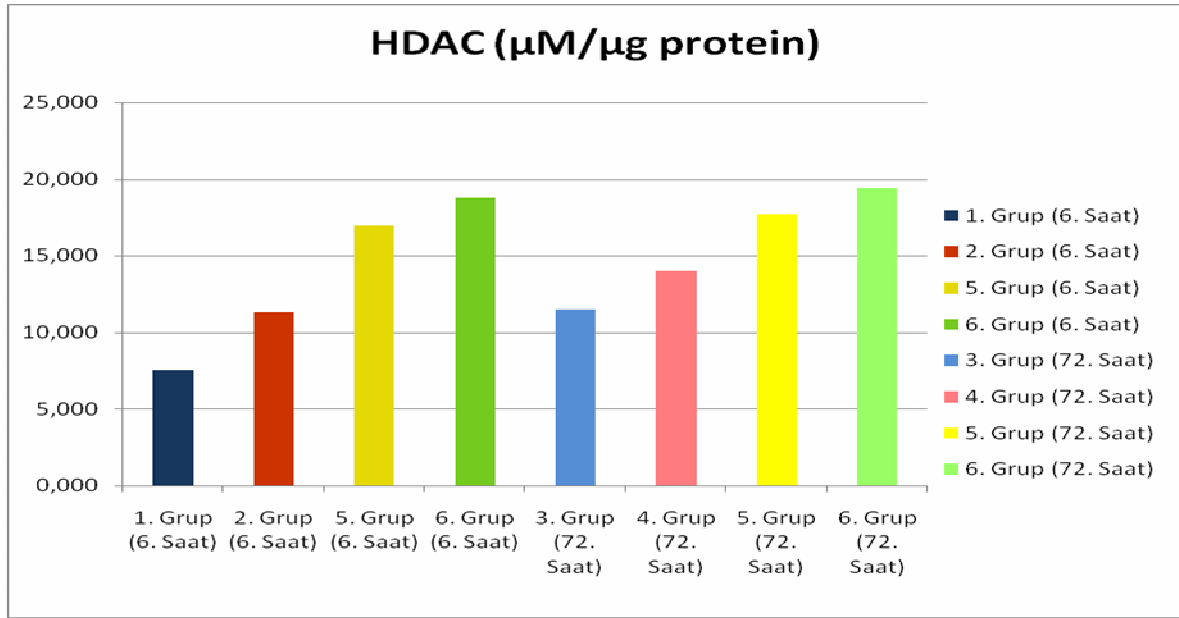
### 3. 8. Histon Deasetilaz (HDAC) Sonuçları

HDAC düzeyinin CCl<sub>4</sub> verilen grupta 6. saatte kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldığı ve NAS eklenmesi ile düzeyinin arttığı izlendi (P<0.05). Bununla birlikte 72. saatte 6. saate göre bir artış olduğu ve istatistiki açıdan anlamlı olduğu belirlendi. 72. saatte HDAC düzeyinin gruplar arasındaki farkın istatistiki açıdan önemli olduğu gözlemlendi (Çizelge 3. 8 ve Şekil 3. 8).

Çizelge 3. 8. Histon deasetilaz (HDAC) sonuçları ve istatistik

HDAC ( $\mu\text{M}/\mu\text{g}$ protein) (Ortalama $\pm$ S $\bar{x}$ )								
CCl <sub>4</sub> (6. Saat) (n=10)	CCl <sub>4</sub> +NAS (6. Saat) (n=10)	Zeytinyağı (6. Saat) (n=5)	Zeytinyağı+ NAS (6. Saat) (n=5)	CCl <sub>4</sub> (72. Saat) (n=10)	CCl <sub>4</sub> +NAS (72. Saat) (n=10)	Zeytinyağı (72. Saat) (n=5)	Zeytinyağı+ NAS (72. Saat) (n=5)	P
7,538 $\pm$ 0,43 <sup>c</sup>	11,332 $\pm$ 0,65 <sup>d</sup>	16,993 $\pm$ 0,87 <sup>b</sup>	18,813 $\pm$ 0,87 <sup>ab</sup>	11,508 $\pm$ 0,45 <sup>d</sup>	13,985 $\pm$ 0,34 <sup>c</sup>	17,725 $\pm$ 0,87 <sup>ab</sup>	19,385 $\pm$ 0,96 <sup>a</sup>	***

\*\*\* P<0,001: İstatistiksel olarak anlamlı  
a, b, c, d, e: Aynı satırda farklı harf taşıyan grup ortalamaları arası fark önemlidir (P<0,05)



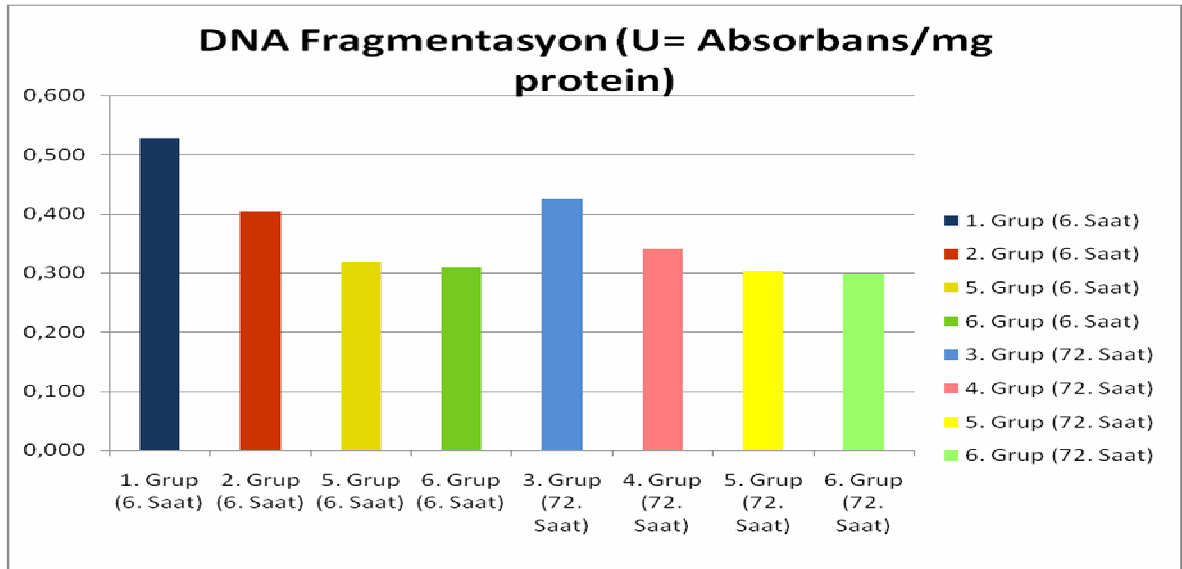
Şekil 3. 8. Histon deasetilaz (HDAC) sonuçları grafiği

### 3. 9. Apoptotik DNA Fragmentasyon Sonuçları

Apoptotik DNA fragmentasyon düzeyinin CCl<sub>4</sub> verilen grupta 6. saatte kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığı ve NAS eklenmesi ile düzeyinin azaldığı izlendi (P<0.05). Bununla birlikte 72. saatte 6. saate göre istatistiki açıdan anlamlı bir azalma olduğu belirlendi. 72. saatte CCl<sub>4</sub> verilen grupta Apoptotik DNA fragmentasyon düzeyi kontrol ve CCl<sub>4</sub>+NAS grubuna göre yüksek olduğu ve istatistiki açıdan önemli olduğu, CCl<sub>4</sub>+NAS grubundaki düşüşün CCl<sub>4</sub> grubuna göre anlamlı fakat kontrol grubuna göre istatistiki açıdan önemli olmadığı gözlemlendi (Çizelge 3. 9 ve Şekil 3. 9).

Çizelge 3. 9. Apoptotik DNA fragmentasyon sonuçları ve istatistik

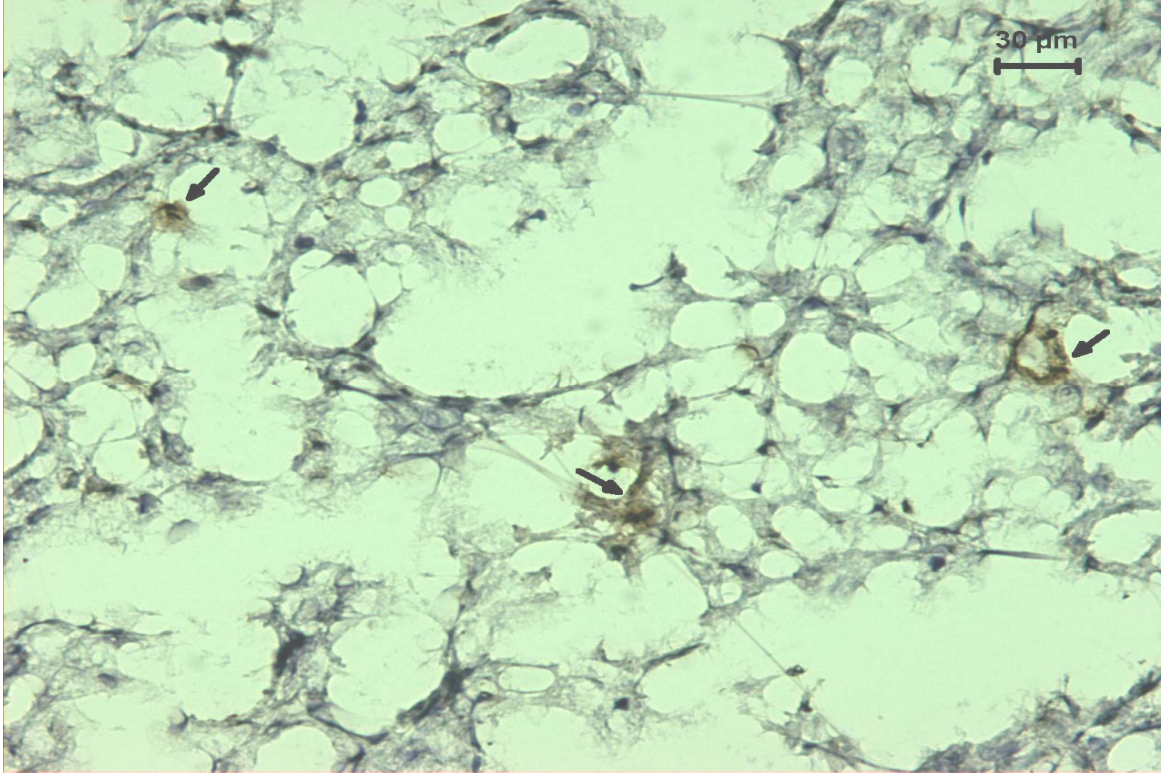
DNA Fragmentasyon (U= Absorbans/mg protein) (Ortalama± S <sub>x</sub> )								
CCl <sub>4</sub> (6. Saat) (n=10)	CCl <sub>4</sub> +NAS (6. Saat) (n=10)	Zeytinyağı (6. Saat) (n=5)	Zeytinyağı+ NAS (6. Saat) (n=5)	CCl <sub>4</sub> (72. Saat) (n=10)	CCl <sub>4</sub> +NAS (72. Saat) (n=10)	Zeytinyağı (72. Saat) (n=5)	Zeytinyağı+ NAS (72. Saat) (n=5)	P
0,527±0,009 <sup>a</sup>	0,405±0,01 <sup>b</sup>	0,319±0,005 <sup>c,d</sup>	0,310±0,01 <sup>d</sup>	0,426±0,01 <sup>b</sup>	0,341±0,005 <sup>c</sup>	0,303±0,002 <sup>d</sup>	0,299±0,001 <sup>d</sup>	***
*** P<0,001: İstatistiksel olarak anlamlı a, b, c, d: Aynı satırda farklı harf taşıyan grup ortalamaları arası fark önemlidir (P<0,05)								



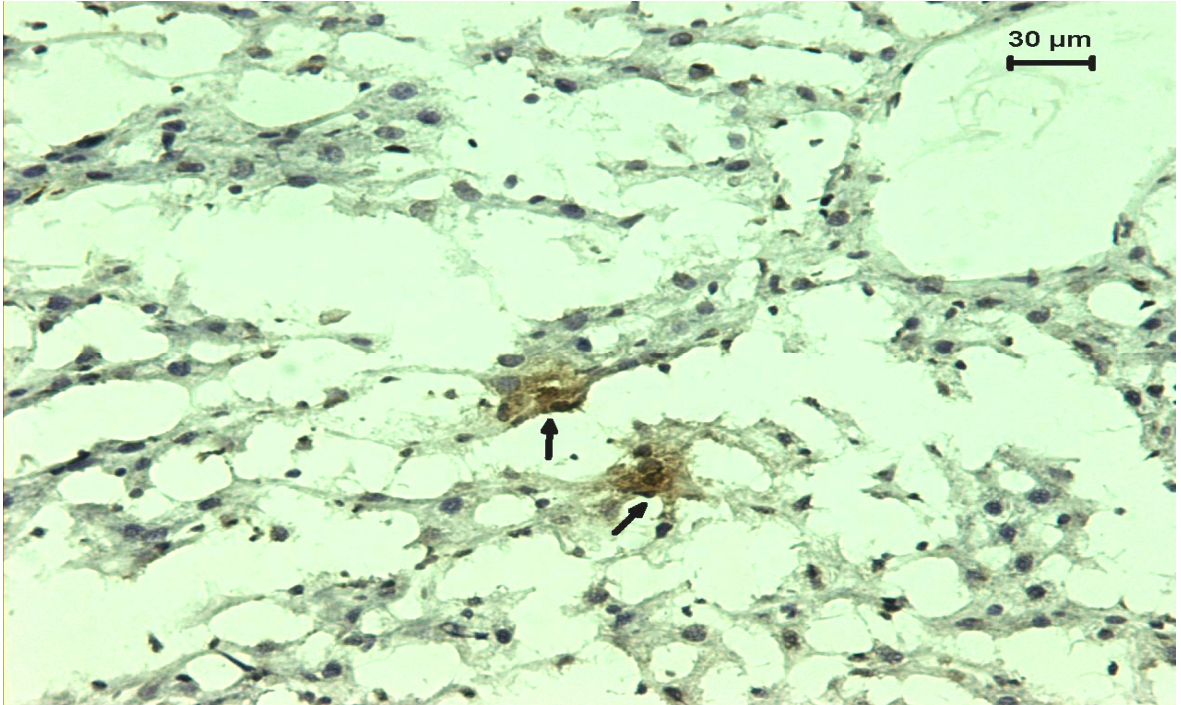
Şekil 3. 9. Apoptotik DNA fragmentasyon sonuçları grafiği

### **3. 10. Apoptotik Hücreslerin TUNEL Yöntemi Analizi Sonuçları**

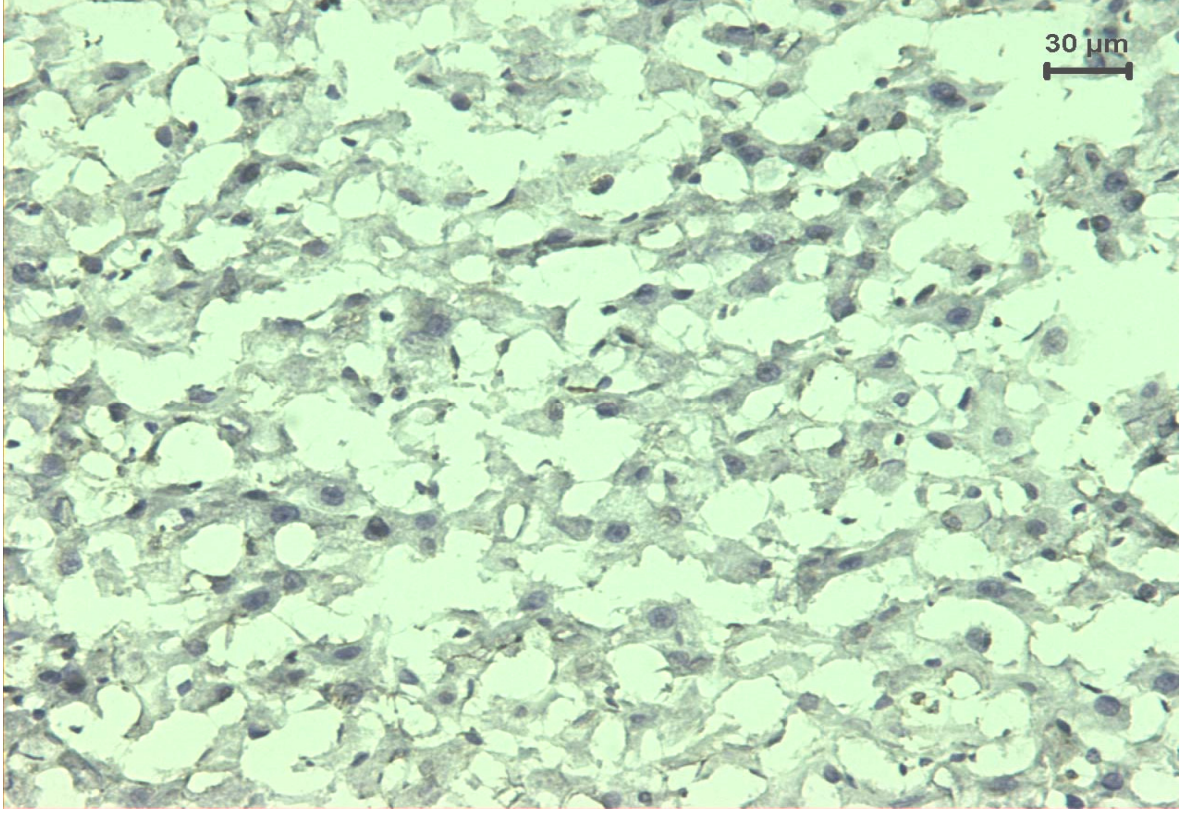
CCl<sub>4</sub> verilen grupta 6. saatte TUNEL pozitif hücrelerin görüldüğü fakat düşük düzeyde olduğu NAS uygulamasının ise TUNEL pozitif hücreleri azalttığı, 72. saatte ise pozitif hücrelerin sayısının iyice azaldığı, kontrol grubunda ise normal hepatositlerin görüldüğü tespit edilmiştir.



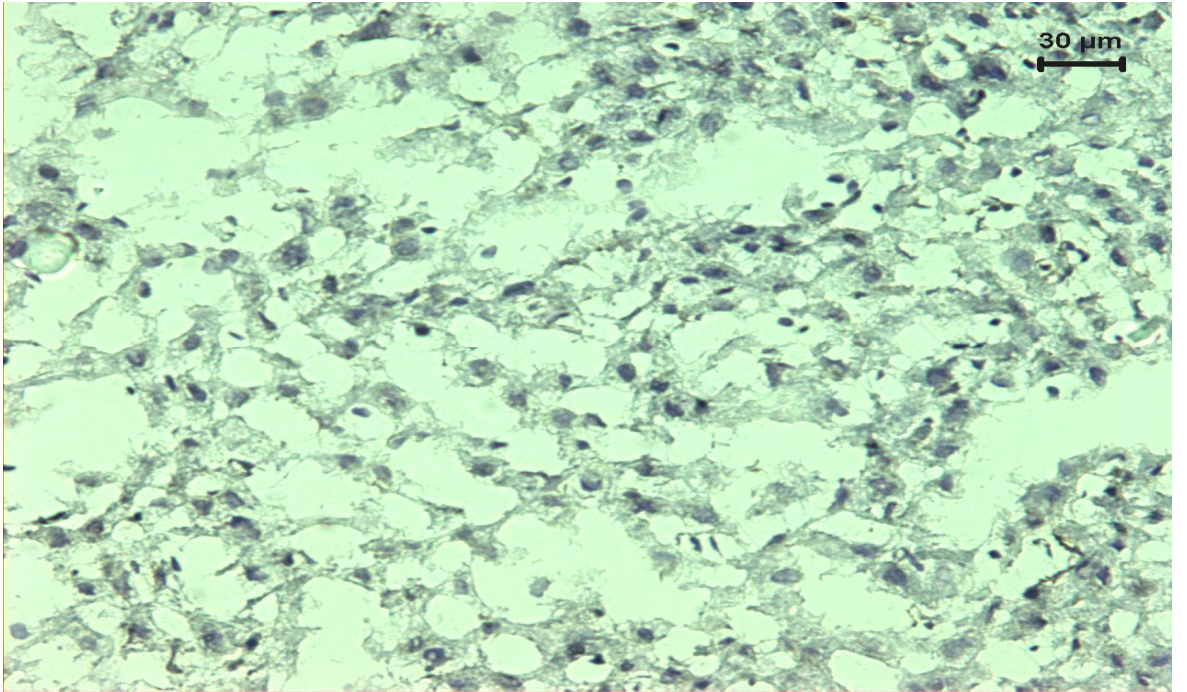
Şekil 3. 10. 1. CCl<sub>4</sub> uygulanan grupta 6. saatte apoptotik hücreler, TUNEL (+) (ok işaretleri)



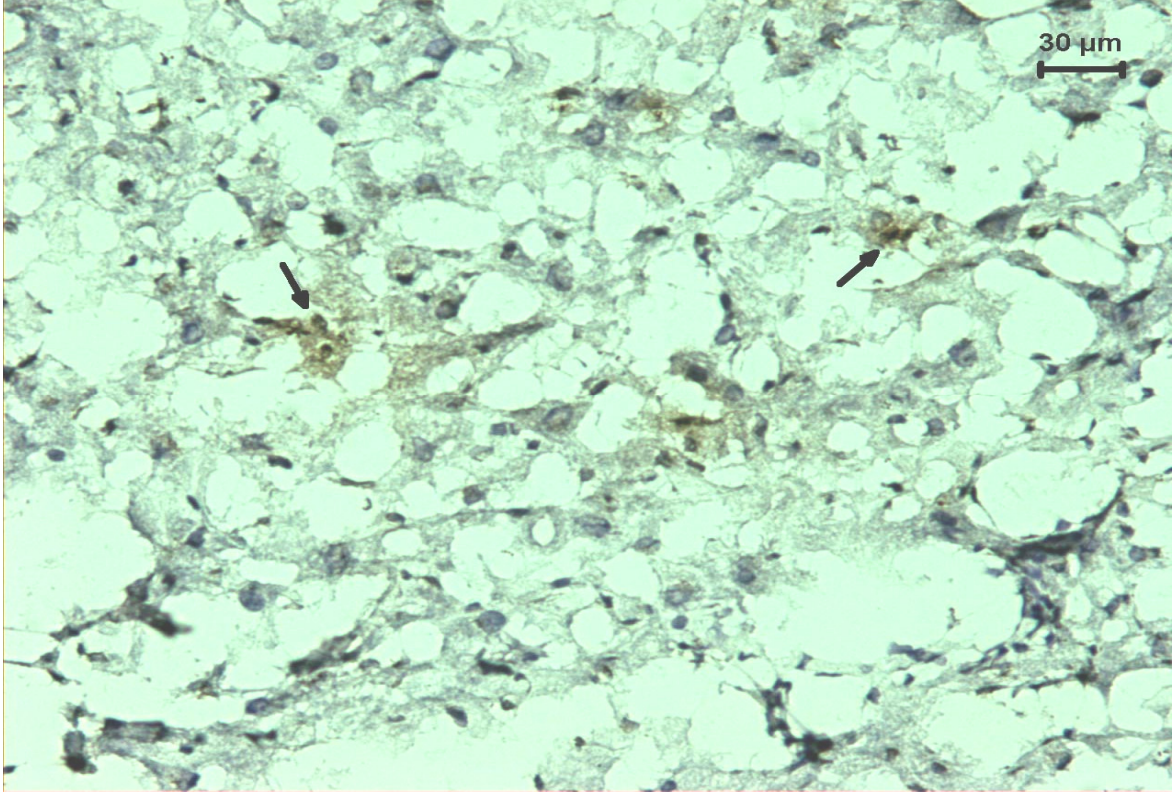
Şekil 3. 10. 2. CCl<sub>4</sub> + NAS uygulanan grupta 6. saatte apoptotik hücreler, TUNEL (+) (ok işaretleri)



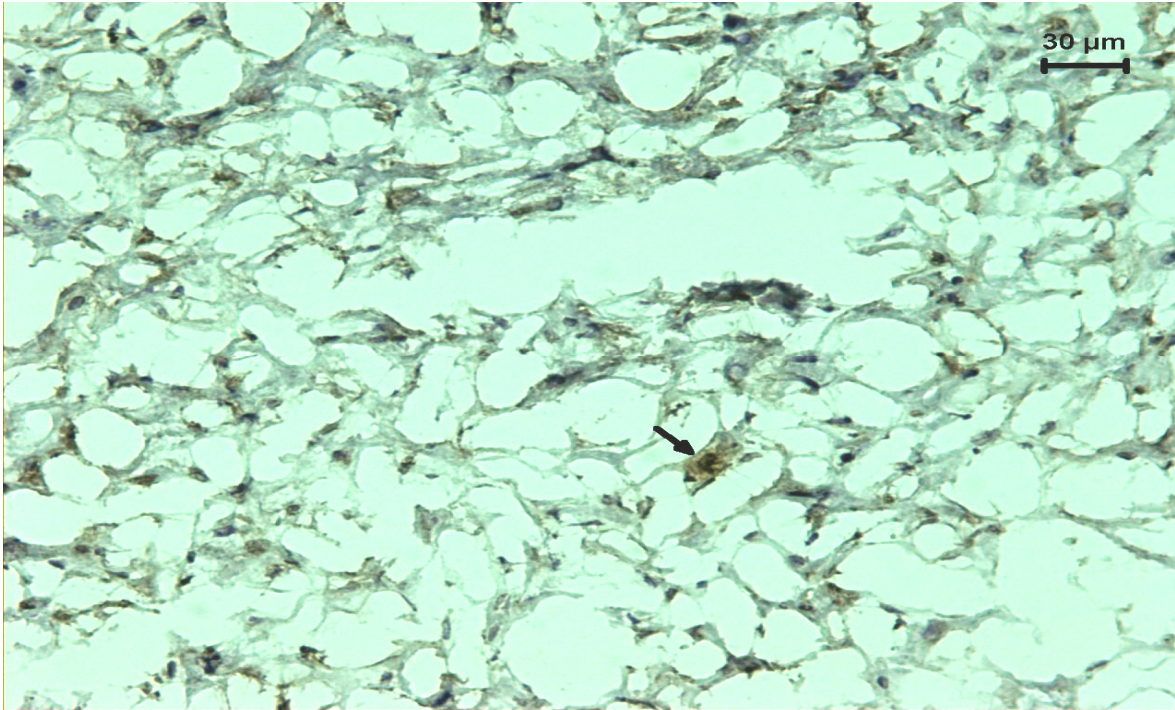
Şekil 3. 10. 3. Kontrol (Zeytinyağı) grubunda 6. saatte normal hücreler, TUNEL (-)



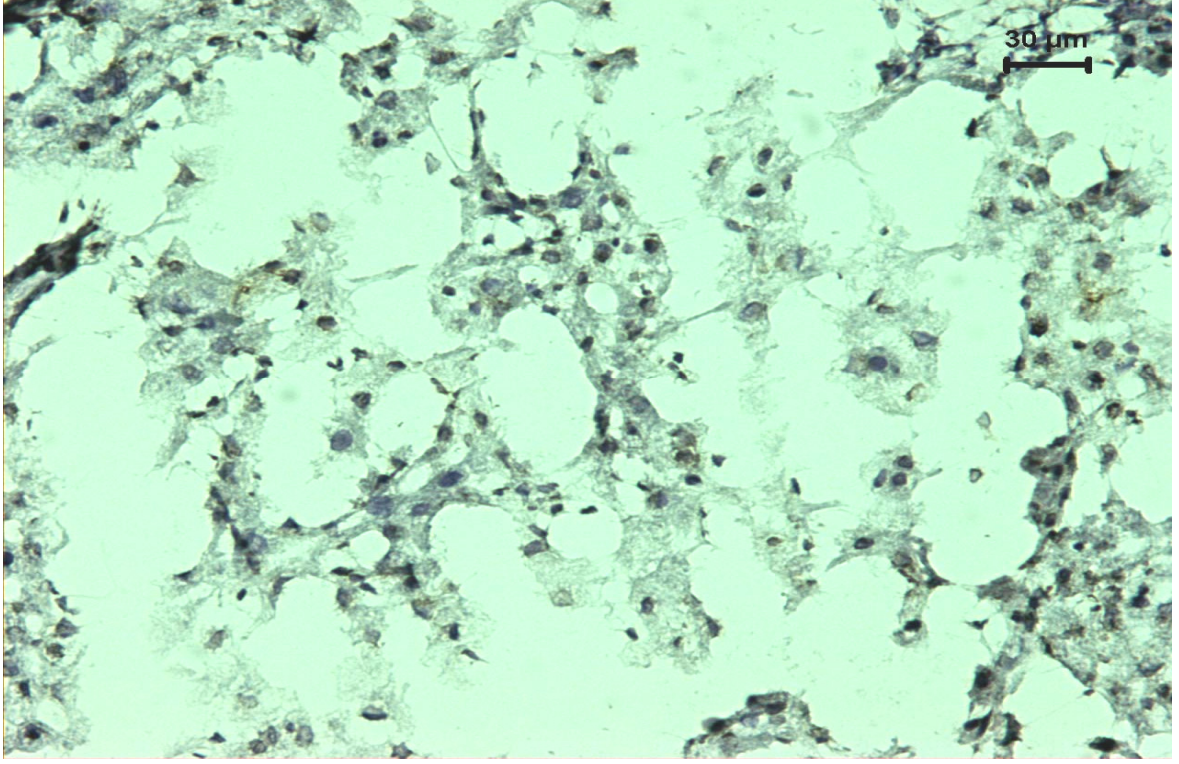
Şekil 3. 10. 4. Kontrol (Zeytinyağı+NAS) grubunda 6. saatte normal hücreler, TUNEL (-)



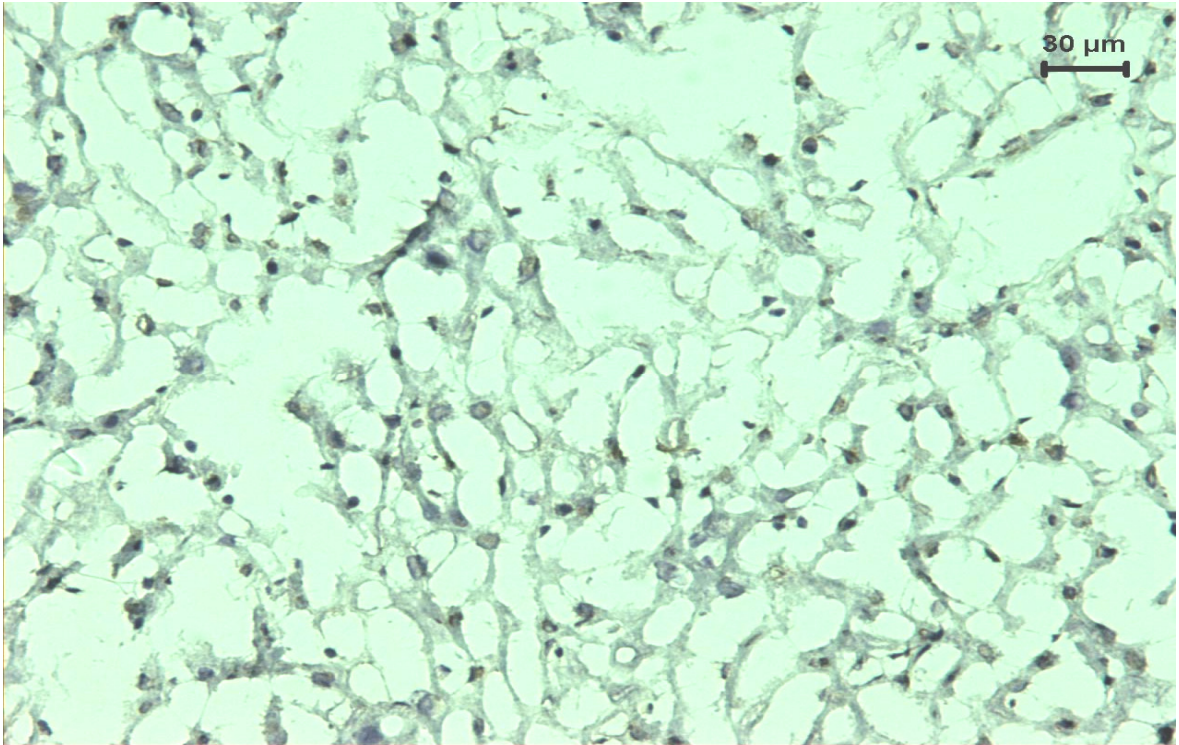
Şekil 3. 10. 5. CCl<sub>4</sub> uygulanan grupta 72. saatte apoptotik hücreler, TUNEL (+) (ok işaretleri)



Şekil 3. 10. 6. CCl<sub>4</sub> + NAS uygulanan grupta 72. saatte apoptotik hücre, TUNEL (+) (ok işareti)



Şekil 3. 10. 7. Kontrol (Zeytinyağı) grubunda 72. saatte normal hücreler, TUNEL (-)



Şekil 3. 10. 8. Kontrol (Zeytinyağı+NAS) grubunda 72. saatte normal hücreler, TUNEL (-)

#### 4. TARTIŞMA

Karaciğer, değişik toksinler, ilaçlar ve kimyasal ajanlarla sürekli karşılaşan ve onları detoksifiye eden veya oluşan hasara rejenerasyon yeteneği ile karşılık veren bir organdır. Karaciğer hasarının en önemli mekanizmalardan birisini de serbest radikaller oluşturmaktadır. Serbest radikallerle gelişen hücre zedelenmesinde özellikle üç reaksiyon önemlidir. Membranların lipid peroksidasyonu, DNA'ya bağlanarak DNA hasarı, proteinlere ve karbohidratlara bağlanarak bunların yapılarındaki bozulmalar olarak sayılabilir (Dünder ve Aslan 2000, Onat 2002).

Karaciğer; sindirim sistemi ve dolaşım sistemi arasındaki yerleşimi ve ortaya koyduğu fonksiyonlar nedeniyle pek çok etkenle hasarlanabilmektedir. Kronik karaciğer hasarları ve siroz batı ülkelerinde başta gelen ölüm nedenlerindedir (Çetinkaya 2009).

Karaciğerde; viral hepatitler, alkol kullanımı, ilaçlar, metabolik hastalıklar ve kimyasal ajanlar gibi pek çok etken, akut ve kronik hasarlara yol açar. Hasarlanma süreci etkin bir rejenerasyon ve onarımla cevaplanmazsa normal karaciğer yapısı bozulur. Bundan dolayı siroza kadar gidebilecek karaciğer hasarlarının daha başlangıç döneminde engellenmesi önem kazanmaktadır. Deneysel çalışmalarda pek çok etkenle karaciğer hasarı oluşturulabilmesine rağmen insandaki siroz gelişim sürecine benzerlik gösterdiği için, en çok tercih edilen ve kullanılan  $CCl_4$ 'dür (MacDonald-Wicks ve Garg 2003, Poyrazoğlu 2009).

Karbon tetraklorür, yaygın olarak kullanılan bir serbest solvent, temizleyici ajan ve herbisittir. Sindirim yolu ile alındığında özellikle hepatik dokuları tahrip eder.  $CCl_4$  toksisitesinden kaynaklanan hasar, genellikle serbest radikal orijinli olarak kabul edilir. Karaciğer homojenatları veya mikrozomları,  $CCl_4$  ile inkübe edildiğinde, artmış lipid peroksidasyonun göstergesi olan MDA düzeyinde önemli artışlar ölçülmüştür (Kömüroğlu ve ark 2007).

Karbon tetraklorür, lipid peroksidasyonu oluşturarak oksidatif hasarlara yol açmaktadır. Oksidatif hasarlarda, fibroblast ve hepatik stellat hücrelerinin kollajen gen



transkripsiyonunu uyararak, karaciğer stellat hücreleri ile ve fibroblastların ekstrasellüler matriks ve kollajen sentezini gerçekleştirmelerini sağlar, fibrozisi şiddetlendirir (Robbins ve ark 2000).

Karbon tetraklorür; deneysel amaçlı olarak karaciğer fibrozisi geliştirmesi bakımından araştırmalarda çok sık kullanılmaktadır (Jeong ve ark 1996, Bahçecioğlu ve ark 1999, Muriel ve Escobar 2003, Wang ve ark 2005, Devay 2008). CCl<sub>4</sub>'ün karaciğerde mitokondriyal monooksijenaz (P450 2E1) sistemi tarafından metabolize edilmesi esnasında triklorometil (CCl<sub>3</sub>-) serbest radikali oluştuktan sonra lipidler ve proteinler ile kovalent bağlar oluşturarak hızla triklorometil peroksite (CCl<sub>3</sub>O<sub>2</sub>-) veya hidrojen atomlarını kaybetmiş olan kloroform formuna dönüşür (Arii ve ark 1990, Dashti ve ark 1992). CCl<sub>4</sub>'ün metabolizması sonucu ortaya çıkan (CCl<sub>3</sub>-) ve (CCl<sub>3</sub>O<sub>2</sub>-) serbest radikal toksisitesinden sorumlu tutulmaktadır (Akkuş 1995).

Yılmaz ve Bahçecioğlu (2000) yaptıkları bir çalışmada; CCl<sub>4</sub> ile siroz oluşturulmuş ratlarda GSH-Px ve G6PDH enzim düzeylerindeki düşmeye bağlı olarak süperoksit radikallerinin aşırı düzeyde biriktiğini ve serbest radikallerin siroz gibi karaciğer hastalıklarının patogenezinde rol oynayabileceğini göstermişlerdir.

Doi ve ark (1991), Fischer-Nielsen ve ark (1991) ratlara oral olarak CCl<sub>4</sub> verdikten sonra, 4. haftadan itibaren karaciğer hücrelerinde dejenerasyonların başladığını ve 12. haftada tamamen sirozun oluştuğunu gözlemlemişlerdir.

Ariosta ve ark (1989) deneysel siroz oluşturabilmek için CCl<sub>4</sub>'ün laboratuvar hayvanlarına subkutan, inhalasyon veya intragastrik olarak verilebileceğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar enjeksiyondan yaklaşık 8-10 hafta sonra sirozun oluştuğunu gözlemlemişler ve bu oluşumu desteklemek için yapmış olduğu biyokimyasal analizlerde ALT'nin kontrol grubunda 33 mU/ml iken deney grubunda 118 mU/ml olduğunu yani yaklaşık 6 kat arttığını, Dashti ve ark (1989) yaptıkları çalışmada ise, AST'nin kontrol grubunda 1,3 µkat/L bulunmasına karşın, deney grubunda bu değer 4,3 µkat/L'ye çıktığını görmüşlerdir. ALT değerinin ise kontrol grubunda 0,8 µkat/L, deney grubunda 2,2 µkat/L olarak belirlemişlerdir.

Comporti (1985), Duran ve ark (2004) toksik karaciğer hastalıkları ile ilgili yaptıkları çalışmalarda, CCl<sub>4</sub> ile deneysel toksik karaciğer hastalığı oluşturulan deney hayvanlarının karaciğerlerinde nekroz oluştuktan sonra, serum ALT düzeyinde maksimum

bir artış olduğunu, nekrotik durumun kaybolmasıyla serum ALT düzeyinin de buna paralel olarak yavaş bir şekilde düşmeye başladığını, Tanrıverdi (2005) kronik CCl<sub>4</sub> uygulaması ile karaciğer hasarının oluştuğunu, antioksidan olarak nikotinamid kullanılması ile CCl<sub>4</sub> grubunda AST ve ALT'nin kontrol grubuna göre yaklaşık olarak 9 kat arttığını belirlemişlerdir. Yaptığımız çalışmada CCl<sub>4</sub> enjeksiyonundan 6 saat sonra AST ve ALT düzeyleri, diğer araştırmacıların bulgularına benzer olarak kontrol grubuna göre yaklaşık 5 kat artmıştır. Enjeksiyondan 72 saat sonra geçen sürede ise, enzim düzeylerinin kontrol grubuna göre önemli oranda yüksek olmasına rağmen 6. saate göre düştüğü görülmüştür. Karaciğer hasarının göstergesi olarak kabul edilen bu enzimlerdeki değişim, NAS uygulamasının ve toksikasyondan sonra geçen zamanın karaciğerdeki rejenerasyona katkı sağladığını göstermektedir.

Son zamanlarda serbest oksijen metabolitlerinin, çeşitli maddelerin ve ilaçların karaciğer üzerine olan toksisitesinde temel bir rol oynadığı çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur (Kumar ve ark 2003, Tafazoli ve ark 2005, Pramod ve ark 2008, Ye ve ark 2009).

Deneysel olarak CCl<sub>4</sub> toksikasyonunun oluşturulduğu bir araştırmada, MDA düzeylerinde önemli artış saptanmıştır. Aynı zamanda karaciğerde yağlı dejenerasyonla birlikte sentrilobuler nekroz gözlenmiştir. Araştırmacılar CCl<sub>4</sub>'ün yol açtığı karaciğer hasarının genellikle karaciğer mikrozomlarındaki lipid peroksidasyonuna bağlı olduğunu, MDA düzeylerinin ve antioksidan enzimlerdeki değişikliklerin hasarın derecesi ile ilgili olduğunu ileri sürmüşlerdir (Özenirler ve ark 1996).

Yapılan çalışmalarda CCl<sub>4</sub> kullanımına ve alkolik karaciğer hastalığına bağlı olarak karaciğer hasarı oluşumu sırasında ROS üretiminde meydana gelen aşırı artış ve buna bağlı olarak antioksidan enzimler olan SOD ve GSH-Px düzeylerinde anlamlı azalmalar görülmüştür. Dolayısı ile antioksidan enzimler ile karaciğer hasarı, fibrozis ve lipid peroksidasyon düzeyleri arasında ters bir korelasyon olduğu tespit edilmiştir (Castilla Cortazar ve ark 1997, Polavarapu 1998).

Yapılan bir çalışmada diyabet tedavisinde kullanılan roziglitazon isimli ilacın antioksidan sistemi desteklediği ve daha az lipid peroksidasyon ürünü ortaya çıktığı tespit edilmiştir. ALT ve MDA düzeyleri CCl<sub>4</sub> grubunda diğer gruplardan yüksek bulunmuştur. CCl<sub>4</sub>+ roziglitazon grubunda ALT ve MDA düzeyleri CCl<sub>4</sub> grupundan düşük ancak kontrol

grubundan yüksek bulunmuştur (Kaya 2007). Erten (2009) CCl<sub>4</sub>'ün yaptığı hasarın dihidromircenol ile anlamlı bir şekilde düzeldiğini ALT ve AST seviyeleri ile apoptotik hücre sayısında belirgin bir azalmanın olduğunu, Galicia-Moreno ve ark (2009) yaptığı çalışmada ise NAS'ın CCl<sub>4</sub> ile oluşturulan deneysel karaciğer sirozunda oksidatif stres ve profibrinogenik etki üzerinden yararlı etkileri olduğunu ortaya koymuşlardır. Yaptıkları analizlerde NAS verilen grupta, CCl<sub>4</sub> grubuna göre MDA düzeyinin azaldığını, GSH düzeyinin ise arttığını tespit etmişlerdir. Çalışmamızda antioksidan etkili NAS kullanımı ile AST, ALT ve MDA düzeylerinin düşmesi ve apoptotik hücre sayısının azalması araştırmacıların sonuçları ile uyumludur.

Ratlara 0,5 ml/kg dozunda günde bir kez 7 gün boyunca CCl<sub>4</sub> uygulanan bir çalışmada AST ve ALT düzeyinin kontrol grubuna göre yaklaşık olarak 8 kat arttığı, MDA düzeyinin ise kontrol grubuna göre yaklaşık olarak 2 kat arttığı tespit edilmiştir (Shenoy ve ark 2001). Üstündağ ve ark (2005) ratlara 5 hafta süresince haftada 3 gün olmak üzere i.p CCl<sub>4</sub> uygulamış, deney sonrası yapılan analizlerde plazma ve karaciğer dokusu MDA düzeylerinin CCl<sub>4</sub> grubunda arttığını, AST ve ALT artışının ise CCl<sub>4</sub> grubunda kontrol grubuna göre yaklaşık olarak 5 kat düzeyde olduğunu belirlemişlerdir. Yaptığımız çalışmada CCl<sub>4</sub> 2 ml/kg i.p tek doz uygulanmış AST ve ALT düzeyindeki artışın CCl<sub>4</sub> grubunda kontrol grubuna göre yaklaşık 5 kat düzeyde arttığı, MDA düzeyindeki artışın ise yaklaşık 2 kat olduğu tespit edilmiş olup araştırmacıların bulgularına benzerdir.

Yapılan bir çalışmada Malatya kayısının CCl<sub>4</sub> ile oluşturulmuş yağlı karaciğer hastalığı üzerine olası koruyucu etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Sakrifiye edilen ratların karaciğerlerinden alınan doku örneklerinde katalaz, süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz aktiviteleri, total glutatyon ve lipit peroksidasyonunun en önemli göstergesi olan malondialdehit düzeyi belirlenmiştir. Çalışmada elde edilen veriler kayısının, CCl<sub>4</sub>'ün neden olduğu karaciğer yağlanması sonucu oluşan oksidatif hasarları antioksidan enzimlerin aktivitelerini artırarak ve lipit peroksidasyonunu düşürerek azaltabileceğini göstermiştir (Erdoğan ve ark 2007).

Halk arasında spazm çözücü ve yaralar üzerinde antiseptik olarak kullanılan *Ballota glandulosissima* (Köpek Otu) liyofilize ekstresinin, ratlarda karbon tetraklorürle oluşturulmuş akut karaciğer toksisitesi üzerine koruyucu etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, ratlara i.p CCl<sub>4</sub> uygulanmış koruyucu amaçlı olarak da *Ballota glandulosissima* liyofilize ekstresi verilmiştir. CCl<sub>4</sub> uygulanan grupta AST ve ALT değerlerinin kontrol

grubuna göre yaklaşık olarak 20 kat düzeyinde arttığı, *Ballota glandulosissima* liyofilize ekstresi ilave edilen grupta ise kontrol grubuna göre 10 kat arttığı, CCl<sub>4</sub> grubuna göre azaldığı; CCl<sub>4</sub> grubundaki ratların karaciğerinde yaygın balon dejenerasyonu, seyrek apoptozis, sentriobüller nekroz ve köprüleşme nekrozunun olduğu, *Ballota glandulosissima*+CCl<sub>4</sub> uygulanan ratların karaciğerlerinde, az miktarda balon dejenerasyonu, azalmış apoptozis, sentriobüller nekroz ve köprüleşme nekrozu olduğu belirlenmiştir (Özbek ve ark 2004).

Lipid peroksidasyonun serbest oksijen radikaller yoluyla hücre membranına olan hasarda temel bir rol oynadığı bilinmektedir. MDA lipid peroksid düzeylerinin ölçülmesinde sıklıkla kullanılmaktadır ve lipid peroksidasyonunun derecesi ile çok iyi korelasyon göstermektedir. CCl<sub>4</sub>'ün karaciğer üzerine olan toksisitesinde MDA düzeylerinin arttığı ve kullanılan NAS gibi antioksidan maddelerle bu artışın azaltıldığı ortaya konmuştur (Demirdağ ve ark 2004, Galicia-Moreno ve ark 2009). Karaciğer enzimlerinin değerlendirilmesi sonucunda; ALT ve AST düzeyleri, CCl<sub>4</sub> grubunda belirgin olarak yükseldiği ve NAS tedavisi ile belirgin azaldığı ortaya konmuştur (Çetinkaya 2009).

Fizyolojik şartlarda hücrede oluşan oksidanların düzeyi ile TAK arasında bir denge bulunmaktadır. Buna hücrenin oksidan/antioksidan dengesi adı verilmektedir (Halliwell 1991, Cheeseman ve Slater 1993). NAS'nin akrilamidle beraber uygulanmasının ratlarda oksidatif stresi baskıladığı ve lenfositlerde oluşan akrilamid kaynaklı genotoksik hasarlanmaları ciddi derecede önlediği gösterilmiştir (Cao ve ark 2008, Zhang ve ark 2008).

Kadiiska ve ark (2005) ratlara 120 mg/kg, 1200 mg/kg dozunda i.p CCl<sub>4</sub> ve kontrol grubuna da sadece yağ vermişler ve enjeksiyondan 2, 7 ve 16 saat sonra kan alarak analiz yapmışlardır. MDA, her iki CCl<sub>4</sub> grubunda 2 saat sonra kontrol grubuna göre yüksek, 7 saat sonra sadece yüksek doz CCl<sub>4</sub> grubunda yüksek, diğer CCl<sub>4</sub> grubunda azalmaya başladığı 16 saat sonra ise düzeylerin her iki grupta da kontrol grubuna göre yüksek fakat 2. saate göre düşük olduğu belirlenmiştir. Aynı çalışmada yapılan 8-OHdG analizinde, yüksek doz CCl<sub>4</sub> grubunda 7. saatte kontrol grubuna göre yaklaşık 6 kat, düşük doz CCl<sub>4</sub> grubunda ise yaklaşık 2 kat artma, 16. saatte ise 8-OHdG düzeyi CCl<sub>4</sub> grubunda kontrol grubuna göre yüksek fakat 7. saate göre düşük olduğu tespit edilmiştir. Bizim çalışmamızda CCl<sub>4</sub> grubunda 8-OHdG düzeyinin kontrol grubuna göre 6. saatte yüksek

olması 72. saatte yine kontrol grubuna göre yüksek fakat 6. saate göre düşük olması araştırıcıların bulguları ile uyumludur.

Akut tek doz alkol (0.5 g/kg) uygulamasından 24 saat sonra rat karaciğerindeki GSH düzeylerinin belirgin bir şekilde azaldığı gözlenmiştir (Dinçer ve ark 1999). Bir başka çalışmada ise, kronik karaciğer hastalarının plazmalarında GSH'daki azalmanın yanısıra Fe, Zn, Se gibi eser elementlerin düzeylerinin de belirgin şekilde azaldığı saptanmıştır (Loguercio ve ark 1992). CCl<sub>4</sub> ile karaciğer hasarı oluşturulan farelerde yapılan çalışmada ise birinci deney grubuna CCl<sub>4</sub>, ikinci deney grubuna CCl<sub>4</sub>+kefir oral olarak kontrol grubuna ise sadece distile su verilmiştir. Kefirin antioksidan etkisinin değerlendirilmesi amacıyla 7 hafta uygulamaya devam edilmiştir. Antioksidan parametrelerden GSH, GSH-px, GST ve katalaz enzim düzeyinin ise CCl<sub>4</sub> uygulanan grupta kontrol grubuna göre azaldığı belirlenmiştir (Güven ve ark 2003). Vendemiaie ve ark (2001) dimetilnitrozamin (DMN) ile geliştirilen fibroz modelinde oksidatif stresin etkinliğini ve modelde NAS uygulamalarının oksidatif stres ile karaciğer fibroz parametrelerindeki etkinliğini çalışmışlardır. Bu çalışmada DMN ile karaciğer fibrozu ve oksidatif stres tetiklenmiştir. NAS uygulaması ile fibroz markeri fibronektin düzeyi belirgin şekilde azaltılmış, hepatik glutatyon artırılmış ve MDA düzeyinin düştüğü görülmüştür. Parakuat (PQ) ile indüklenen oksidatif strese karşı güçlü bir serbest radikal tutucusu olan NAS'in iyileştirici etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, plazmada, karaciğerde, akciğerde, böbreklerde ve beyinde, PQ'ın neden olduğu MDA düzeyindeki artışın NAS ön uygulamasıyla düştüğü gözlenmiştir. PQ+NAS uygulanan grupta karaciğer, akciğer, beyin ve böbrek GSH düzeylerinde önemli derecede iyileşmeler olduğu tespit edilmiştir (Çeçen ve ark 2002).

Ratlara tek doz 2 ml/kg dozunda i.p olarak CCl<sub>4</sub> verilip, siyah ve yeşil çayın antioksidan aktivitesinin değerlendirildiği bir başka çalışmada, CCl<sub>4</sub> verilen grupta ALT ve MDA düzeyinin arttığı, TAK düzeyinin ise azaldığı, yeşil ve siyah çay verilen grupta ise CCl<sub>4</sub> grubuna göre ALT, MDA düzeylerinin azalıp TAK düzeyinin ise arttığı tespit edilmiştir (Almurshed 2006).

Çalışma sonuçları ayrıntılı olarak verilen araştırıcıların elde ettikleri bulgularda olduğu gibi, yaptığımız çalışmada da CCl<sub>4</sub> toksikasyonu lipid peroksidasyonuna neden olmuştur. Kontrol grubunda MDA düzeyleri 15,9 µmol/L bulunurken toksikasyon oluşturulan ratların serumlarında enjeksiyondan 6 saat sonra 35,4 µmol/L bulunmuştur. 72

saat sonra MDA miktarı 23,1  $\mu\text{mol/L}$ 'ye düştüğü görülmüştür. Antioksidan olarak NAS enjekte edilen gruplarda ise MDA düzeylerinin anlamlı olarak azalması lipid peroksidasyonuna karşı NAS'ın koruyucu olarak rol oynadığını göstermektedir. TOK ölçümlerinde elde edilen sonuçlar da MDA sonuçlarına benzer şekilde değişim göstermiştir. TAK düzeyleri ise antioksidan verilen gruplarda yüksek, toksikasyon grubunda düşük bulunmuştur. Araştırmada elde ettiğimiz bulgular göstermiştir ki sonuçlar, diğer araştırmacıların sonuçlarını desteklemektedir. Oksidatif stres; protein, yağ ve DNA gibi biyolojik moleküller üzerinde hasar meydana getirir (Wiseman ve Halliwell 1996, Chapple 1997, Moseley ve ark 1998). Lim ve ark (2000) oksidatif stresin artmasına neden olabilecek durumların DNA molekülleri üzerinde erken oksidatif hasar meydana getirdiğini rapor etmişlerdir.

Oksidatif strese bağlı olarak 8-OHdG seviyesinin, kronik obstrüktif akciğer hastalığında (Igishi ve ark 2003), kronik böbrek rahatsızlıklarında (Akagi ve ark 2003), bazı karaciğer bozukluklarında (Seki ve ark 2003), kronik kolesistitde (Seki ve ark 2002), romatoid artritde (Rall ve ark 2000), insüline bağlı olmayan diabetes mellitusta (Suzuki ve ark 1999), bazı kanser türlerinde (Shi ve ark 2004, Chiou ve ark 2003) ve kronik iltihabi hastalıklarda (Romano ve ark 2000, Chang ve ark 2004) vücut sıvılarında ve dokularında arttığı saptanmıştır.

8-OHdG'nin, DNA'ya yapılan serbest radikal saldırısının yaygın bir ürünü olduğu; oksidatif stresin ve kanser gelişimine yönelik memeli hücrelerindeki mutajenitenin iyi bir biyomarkeri olduğu bildirilmiştir. Birçok kanser hücresinin yüksek 8-OHdG seviyesine sahip olduğu bulunmuş ve bu çalışmalar oksidatif DNA hasarı için önemli bir belirteç olabileceğini bildirmektedirler (Borek 1991).

Neal ve ark (2003) farelerde yüksek doz irradyasyon ile bağırsak, akciğer ve karaciğerlerde protein ve lipitlerin oksidatif hasarı ve DNA hasarına karşı NAS'ın koruyucu etkisini araştırmışlardır. Farelere radyasyon uygulanmış ve NAS verilerek koruyucu özelliği tespit edilmiştir. NAS'ın radyasyona karşı koruyucu olduğu lipit peroksidasyonunun göstergesi MDA düzeyini ve oksidatif hasarın göstergesi 8-OHdG düzeylerini düşürmesi ile tespit edilmiştir.

X-Ray ile farelerde karaciğer hasarı oluşturulup reaktif oksijen türlerine (ROS) karşı NAS'ın koruyucu etkisinin değerlendirildiği bir çalışmada, karaciğer hasarı

oluşturulup NAS verilen grupta, lipid peroksidasyonunun göstergesi MDA düzeyinde azalma, DNA hasarında iyileşme (COMET yöntemi ile yapılan analizlerde) ve hücre apoptozisinde azalma, GSH ve SOD düzeylerinde ise artma tespit edilmiştir (Liu ve ark 2006).

Mistletoe alkali (MA) maddesinin CCl<sub>4</sub> ile oluşturulan karaciğer sirozundaki antioksidan aktivitesini değerlendirmek amacıyla ratlarda yapılan bir çalışmada, CCl<sub>4</sub> grubunda kontrol grubuna göre MDA düzeyinin arttığı, GSH, GSH-px, SOD ve GST düzeylerinin karaciğer ve böbrekte azaldığı, MA verilen grupta ise kontrol grubu değerlerine yaklaştığı yani CCl<sub>4</sub> grubuna göre yükseldiği, idrardaki 8-OHdG düzeyinin CCl<sub>4</sub> grubunda kontrol grubuna göre yükseldiği MA verilen grupta ise azaldığı tespit edilmiştir (Shi ve ark 2006).

Qiusheng ve ark (2004) yaptıkları çalışmada, CCl<sub>4</sub> ile ratlarda karaciğer hasarı oluşturmuşlar ve luteolin-7-glucoside'in etkisini değerlendirmişlerdir. CCl<sub>4</sub> verilen grupta AST, ALT, MDA ve 8-OHdG düzeylerinin arttığını, GSH düzeyinin ise azaldığını, luteolin-7-glucoside verilen grupta ise AST, ALT, MDA ve 8-OHdG düzeylerinin yalnızca CCl<sub>4</sub> verilen gruba göre düştüğü, luteolin-7-glucoside'in ROS'a karşı antioksidan aktivite gösterdiği GSH düzeyinin arttığı tespit edilmiştir.

Araştırmacılar bazı tip kanserlerde 8-OHdG ve TAK ölçümleri yapmışlar (Ray ve ark 2000, Gönenç ve ark 2006) ve hatta hastalık durumu ile DNA'daki oksidatif hasar arasında korelasyon kurmuşlardır (Schwarz ve ark 2001, Nordberg ve Amer 2001). Yapılan bir çalışmada, beyin tümöründe DNA hasarının artar iken TAK değerlerinin azaldığı ve DNA hasarı ile TAK değerleri arasında negatif bir korelasyon olduğu bildirilmiştir (Hanımoğlu 2007).

Oksidatif stresin lipid peroksidasyonu dışında DNA molekülleri üzerinde de hasar oluşturduğu bilinmektedir. 8-OHdG düzeyindeki artış DNA'daki hasarın belirteci olarak kabul edilmektedir. Shi ve ark (2006) ile Qiusheng ve ark (2004) idrardaki 8-OHdG düzeylerini ölçerek DNA'daki oksidatif hasarı saptamışlardır. Araştırmamızda DNA hasarı nükleer ekstraktlarda 8-OHdG miktarları tespit edilerek belirlenmiştir. Elde edilen bulgulardan MDA düzeyindeki artışa paralel olarak CCl<sub>4</sub> enjekte edilen grupta yüksek, zamana bağlı olarak 72. saatte daha düşük, antioksidan uygulanan gruplarda ise kontrol grubuna göre yüksek olmasına rağmen deneme gruplarından anlamlı bir şekilde düşük

olduğu görülmektedir. Bulgularımızın aksine Zwart ve ark (1998) ratlara CCl<sub>4</sub>'ü 0.25, 0.5 ve 1 ml/kg olarak 3 farklı dozda i.p olarak enjekte etmişlerdir. Deney sonunda MDA, 8-OHdG ve histopatolojik hasar düzeylerini belirlemişlerdir. Doza bağlı olarak MDA düzeylerinde artış olduğu ve CCl<sub>4</sub> enjeksiyonundan 12 saat sonra şekillenmeye başladığı, idrardaki 8-OHdG düzeyindeki artışın ise istatistiki açıdan önemli olmadığını bulmuşlardır. 1 mg/kg CCl<sub>4</sub> DNA'da oksidatif hasar oluşturmazken 2 mg/kg dozun DNA'da hasara neden olduğu düşüncesindeyiz. Nükleer ekstraktlardaki 8-OHdG düzeyleri ile idrardaki düzeylerin ölçümünün DNA hasarının saptanması açısından aynı öneme sahip olduğu kanısındayız.

Apoptozis hem patolojik hem de fizyolojik şartlarda oluşabilen bir süreçtir. Temel olarak "intrinsik" ve "ekstrinsik" olmak üzere iki ayrı yoldan başlatılır. Serbest radikaller ve radyasyon, hücreyi apoptozise götüren muhtemel nedenler arasında yer almakta ve bu iki faktörün apoptozisi intrinsik yolak üzerinden tetiklediği düşünülmektedir (Elmore 2007, Akşit ve Bildik 2008).

"Programlanmış hücre ölümü" olarak tarif edilen apoptozun başlamasında serbest oksijen radikallerinin DNA hasarına yol açması önemli rol oynamaktadır (Akşit ve Bildik 2008). Venkatakrishnan ve ark (2006) yaptığı çalışmada kanser hastalarında doksorubisin uygulanmasının reaktif oksijen metabolitleri üretimine bağlı olarak apoptoz oranını artırdığını, Ueno ve ark (2006) ise doksorubisinin apoptozu kardiyomiyositlerde mitokondriyal yolak aracılı kaspaz aktivasyonu ile artırdığını ve bu artışın doksorubisinin neden olduğu kardiyomiyopatide önemli rol oynadığını ileri sürmüşlerdir. Oksidan stresin apoptoz oluşumundaki önemli rolü göz önüne alındığında, antioksidan ajanların antiapoptotik etki göstermelerinin beklenen bir sonuç olduğunu belirtmişlerdir. Nitekim Ungvari ve ark (2007) resveratrolün oksidatif stresin neden olduğu apoptoz oranını azalttığını göstermişlerdir.

Yapılan bir çalışmada cep telefonunun belirli derecelerde oksidatif stres oluşturduğu belirlenmiştir. Antioksidanların ise apoptozisi ve oksidatif stresi azaltmadığı bildirilmiştir. Araştırmada apoptotik süreçlerle ilgisi nedeniyle oksidatif süreçler de incelenmiş, ayrıca antioksidanların hem oksidasyona, hem de apoptozise etkileri ortaya konmuştur. Buna göre antioksidanların, cep telefonunun arama sırasında ürettiği dalgaların neden olduğu apoptozisi istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaltmadığı tespit edilmiştir (Koç 2008).



Kolestazis modellerinde, biriken safra asid konsantrasyonu ile karaciğer zedelenmesi arasında doğrusal bir ilişki mevcuttur. Safra asitleri hepatik apoptozisi uyarmaktadır (Yerushalmi ve ark 2001, Kılıçoğlu ve ark 2008). Fibrozisin en yüksek değerlere ulaştığı evrede parenkimal olmayan hücrelerde apoptozisin de pik yaptığı gözlenmiştir. Apoptozisin arttırılması yolu ile fibrozisin azaltılabileceği öne sürülmüştür (Iredale ve ark 1998). Tıkanma sarılığı oluşturulan bir çalışmada ligasyona bağlı apoptozisin arttığı, bal tedavisi ile hepatositlerdeki apoptozisin azaldığı belirlenmiştir (Kılıçoğlu ve ark 2008). Ligasyon oluşturulan gruptaki hepatositlerde TUNEL (+) boyanma kontrole göre artmış gözlenirken, portal alanlardaki proliferatif safra epitel hücrelerinde az sayıda TUNEL (+) boyanma izlenmiştir.

N asetil sisteinin apoptozisi önlediği, çeşitli proteinlerin aktivitelerini düzenleyerek hücre ömrünü uzattığı, endotel disfonksiyonunu azalttığı ileri sürülmektedir (Foresti ve ark 1999). NAS'ın yapısında bulunan sülfidril grubu nedeniyle mukoproteinlerdeki disülfür bağlarını azaltarak mukolitik etki gösterdiği ve moleküler yapıdaki bu değişikliğin mukusun akışkanlığını artırdığı kabul edilir (Zafarullah ve ark 2003).

L-sisteinin N-asetillenmiş türevi olan NAS'ın, moleküler yapısı nedeniyle hücrelere kolayca girebildiği ve önemli bir antioksidan olan GSH oluşumunda öncül rol oynayarak oksidan strese karşı dokuların savunmasını desteklediği bildirilmiştir (Bayır ve ark 2006). Son yıllarda NAS'ın yapısında bulunan serbest tiyol grupları ile direkt antioksidan etki gösterdiği; hidrojen peroksit, hidroksil radikali, hipokloroz asit gibi oksidan moleküllerle etkileşerek radikal toplayıcı etki gösterdiği ileri sürülmektedir.

Yapılan bir araştırmada; ratlara 25 mg/kg dozda akrilamid, 21 gün süreyle ağızdan verilmiştir. 21 günlük akrilamid uygulamasının sonunda; ratlardan alınan kan numunelerinden izole edilen lenfositlerin comet analizinde, akrilamid grubu ratlarda kontrol grubuna göre ciddi derecede DNA hasarının meydana geldiği, hatta bazı lenfositlerin apoptozise uğradığı açıkça görülmüştür. Ancak akrilamidle beraber 250 mg/kg dozunda NAS uygulanmasının, akrilamid grubuna göre DNA hasarını ciddi derecede önlediği, apoptotik hücre sayısını önemli oranda azalttığı ortaya konulmuştur (Altınöz 2009). Çalışmamızda CCl<sub>4</sub>+NAS grubunda CCl<sub>4</sub> grubuna göre DNA hasarının ve apoptozisin azalması araştırmacıların bulguları ile benzerlik göstermektedir.

Ratlara 0,3 ml/kg periton içi tek doz CCl<sub>4</sub> uygulanıp 3, 6, 12, 24, 48, 72 ve 96 saat sonra eter anestezisi altında kan ve karaciğer dokusu örnekleri alınan bir çalışmada, apoptozis DNA fragmentlerinin gel elektroforezi ve TUNEL yöntemi ile tespit edilmiştir. Deney grubunda kontrol grubuna göre apoptotik hepatositlerin miktarı CCl<sub>4</sub> enjeksiyonundan 3 saat sonra artmaya başlamış ve 6. saatte pik yapmış ve daha sonra azalmaya başlamıştır (Shi ve ark 1998).

Fareler üzerinde yapılan bir çalışmada, 12 fareye madeni yağda çözdürülmüş CCl<sub>4</sub> enjekte edilmiş diğer 12 fareye de sadece madeni yağ enjekte edilmiştir. 48 saat sonra kontrol ve deney grubu sakrifiye edilerek karaciğerleri çıkarılmıştır. Karaciğerde apoptotik hücrelerin düzeyi TUNEL yöntemi ile değerlendirilmiş ve CCl<sub>4</sub> grubunda hepatositlerde % 80 oranında apoptozis şekillendiği, kontrol grubunda ise negatife yakın düzeyde minimal olduğu belirlenmiştir (Carter ve ark 2006).

Ratlarda oral olarak 4 ml/kg dozunda karbontetraklorür ile karaciğer toksisitesi oluşturulan bir çalışmada, tek doz CCl<sub>4</sub> uygulanmasından 12, 18 ve 24 saat sonra deney sonlandırılmıştır. CCl<sub>4</sub> uygulanan grupta kaspaz-3'ün aktivasyonu ile karaciğerde apoptozis şekillendiği, CCl<sub>4</sub>'ün oksidatif strese neden olduğu, AST düzeyinin CCl<sub>4</sub> uygulanan grupta 12. saatte artmaya başladığı ve 24. saatten sonra azaldığı ve artışın başlangıçta 20 kat düzeyinde olduğu ve sonra 10 katlara doğru indiği, antioksidan Vitamin C ve E'nin 12. saatte karaciğerde düzeyinin kontrol grubuna göre arttığı 24. saatte ise azalmaya başladığı tespit edilmiştir (Lida ve ark 2009).

Yapılan bir çalışmada, ratlarda 2 ml/kg dozunda i.p olarak CCl<sub>4</sub> ile akut karaciğer hasarı indüklenmiş ve 0, 16, 32, 48, 64 ve 80. saatler ile 4. ve 7. günlerde kan ve karaciğer dokusu alınarak analizler yapılmıştır. ALT düzeyinin 32. saate kadar artarak maksimum seviyeye ulaştığı ve bu saatten sonra düşmeye başladığı, apoptotik TUNEL pozitif hücrelerin sayısının 64. saate kadar arttığı ve bu saatte maksimum seviyeye ulaşarak sonra düşmeye başladığı tespit edilmiştir (Lee ve ark 2003).

Ratlara 16 hafta boyunca haftada bir kez intragastrik olarak CCl<sub>4</sub> verilip, 6, 12, 24 ve 72. saatlerde sonlandırılarak antiapoptotik ve proapoptotik genlerin PCR ile analiz edildiği bir çalışmada, akut evrede antiapoptotik genlerin yükseldiğini fakat daha sonra proapoptotiklerin yükselmeye başladığını, proapoptotik genlerin CCl<sub>4</sub> ile indüklenmiş sirozlu

karaciğerde düzeyinin iyice arttığını ve karaciğerin rejenerasyonunda önemli rol oynadığını gözlemlemiştir (Masson ve ark 2000).

Apoptosisin bir nedeni olarak oksidatif hasar gösterilmektedir. Ancak apoptosisin mekanizması henüz tam anlaşılmadığı için farklı bakış açılarından yapılacak araştırmalara ihtiyaç vardır. Karbon tetraklorürün apoptosis üzerine etkisinin araştırıldığı çalışmalarda, CCl<sub>4</sub>'ün lipit peroksidasyonuna neden olduğu özellikle endoplazmik retikulum ve mitokondrinin yapısını bozduğu, kaspaz-3'ü aktive ederek karaciğer hücrelerini apoptosise götürdüğü uygulanmadan 12 saat sonra nekroz olduğu bildirilmektedir (Armbrust ve ark 1997, Aydoğan ve ark 2006). Iredale ve ark (1998) yaptıkları araştırmada, ratlara haftada 3 kez 4 hafta boyunca i.p CCl<sub>4</sub> enjekte etmişler, 6 ve 72. saat ile 7 ve 28 gün sonra karaciğer dokusu olarak analizler yapmışlardır. 6. saatte TUNEL pozitif hücrelerin görülmeye başladığını, 72. saatte ise pik seviyeye ulaştığını, daha sonra azalmaya başladığını tespit etmişlerdir. CCl<sub>4</sub> ile deneysel karaciğer hasarı oluşturduğumuz çalışmamızda deney grubunda 6. saatte TUNEL pozitif hücrelerin sayısının kontrol grubuna göre fazla olduğu belirlenmiş olup 6. saatte apoptosisin başladığını göstermektedir. Ancak Iredale ve ark.(1998)'nın bulgularının aksine DNA fragmentasyonunda elde ettiğimiz veriler apoptosisin azaldığını göstermiştir. TUNEL yöntemiyle tespit edilen pozitif hücre sayılarındaki azalmalar da DNA fragmentasyon sonuçlarını güçlendirmektedir. Önemli bir hücre içi antioksidan olan glutatyonun öncül maddesi olarak NAS verdiğimiz grupta karaciğer dokusundaki apoptotik hücre sayılarının toksikasyon grubuna göre daha az olması, DNA kırıklarının daha düşük ölçülmesi yukarıda ayrıntılı olarak çalışmalarını sunulan araştırmacıların bulguları ile uyumludur. Bulgularımız apoptosisin oluşum mekanizmasında serbest radikallerin rolü olduğu, antioksidanların da azaltıcı etki gösterdiği hipotezi destekler niteliktedir.

HDAC inhibitörü olduğu anlaşılan Valproik asit'in kullanıldığı bir çalışmada, apoptotik hücre ölümüne yol açtığı; hücre morfolojisinde izlenen değişiklikler ve kaspaz-3 ekspresyonundaki artış ile tespit edilmiştir (Tolun 2009).

Histonların asetilasyonu ve deasetilasyonu arasındaki dengeyi HAT ve HDAC aileleri sağlamaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar HDAC'ları inhibe edebilen bileşiklerin hücre bölünmesinin durdurulması, apoptoz ve farklılaşmanın indüklenmesi gibi biyolojik olaylarda etkili olduğunu göstermiştir (Dokmanovic ve Marks 2005).

Kronik lökemi hücrelerinde yapılan bir çalışmada, suberoylanilid hidroksamik asid ile hücreler 48 saat inkübe edildiğinde HDAC inhibisyonunun şekillendiği, kaspaz 3, 6 ve 8'in aktivasyonu yoluyla apoptozisin başlatıldığı gösterilmiştir (Stamatopoulos ve ark 2010).

Potansiyel antikanser ajanı olarak bilinen Trichostatin A'nın kullanıldığı bir çalışmada, mitokondrial membran potansiyelinin değiştiği, reaktif oksijen türlerinin azaldığı, HDAC inhibisyonunun şekillenip, hücre diferansiyasyonu ve apoptotik hücre ölümünün şekillendiği tespit edilmiştir (Moreira ve ark 2003). Yine antikanser ajanı olarak bilinen sodyum bütirat ile yapılan bir çalışmada, insan lökemik limfoblast hücrelerinde HDAC inhibisyonu, hücre diferansiyasyonu ve apoptozisin şekillendiği belirlenmiştir (Bernhard ve ark 1999).

İnsan akut promiyelositik lökemi hücrelerinde yapılan bir çalışmada, antikanser ajanı olarak kullanılan apisidinin HAT düzeyini artırdığı, HDAC düzeyini azalttığı, DNA fragmentasyonunda artışın şekillendiği, Bax'ın arttığı, sitokrom c ve prokaspaz-3'ün aktive olduğu, nükleer morfolojik değişiklikler ve apoptotik cisimciklerin oluştuğu belirlenmiştir (Kwon ve ark 2002). Benzofenon ve Garsinol gibi doğal HAT inhibitörlerinin kullanıldığı bir çalışmada, gen ekspresyonu ve hücre siklusunda önemli olduğu, HAT artışı ve HDAC azalmasına bağlı olarak apoptozisin indüklendiği belirlenmiştir (Balasubramanyam ve ark 2004). HAT ve HDAC enzimlerinin, histon asetilasyonu ile transkripsiyon faktörlerinin DNA'ya ulaşmasını sağladığı ileri sürülmektedir. CCl<sub>4</sub> toksikasyonu ile histon asetilasyonu ve apoptozisin birlikte değerlendirildiği çalışmalar sınırlı olduğundan sonuçları karşılaştıracak yeterli literatür bulunamamıştır. Çalışmamızda elde ettiğimiz veriler doğrultusunda apoptozisin arttığı CCl<sub>4</sub> grubunda karaciğer hücrelerinin nükleer ekstraktlarında HAT enzim aktivitelerinin yüksek, HDAC aktivitelerinin düşük bulunması; apoptozisin az görüldüğü NAS verilen grup ile kontrol grubunda tersi bir sonuç bulunması apoptozisin mekanizmasında histon asetilasyonunun rolü olabileceğini düşündürmektedir. Apoptozisin görüldüğü kanser araştırmalarında bulunan sonuçlarda apoptozis ile histon asetilasyonu arasındaki ilişki, araştırma bulgularımız ile aykırılık içermektedir. Ancak apoptozisin genetik mekanizması ile histon asetilasyonunun araştırılacağı, gen ekspresyonu düzeyinde çalışmalara ihtiyaç olduğu kanısındayız.

## 5. SONUÇ

Çalışmada karaciğerde oksidatif stres oluşturmak amacıyla CCl<sub>4</sub> modeli kullanılmıştır. Deneme gruplarında karaciğer enzimlerindeki yükseliş karaciğerde hasar şekillendiğinin göstergesi olarak kabul edilmiştir. CCl<sub>4</sub> uygulanan gruplarda TOK yüksek, TAK düşük; CCl<sub>4</sub> ile birlikte antioksidan olarak N asetil sistein uygulanan grupta ise tersi sonuçlar elde edilmiştir. Bulgular CCl<sub>4</sub>'ün oksidatif strese neden olduğunu, N asetil sisteinin antioksidan olarak oksidatif strese karşı koruyucu rol oynadığını göstermektedir.

Çalışmanın diğer bir amacı DNA'daki oksidatif stresin, apoptosis ve histon asetilasyonu ile arasındaki ilişkiyi araştırmaktır. Histon asetilasyonunun apoptozise neden mi olduğu veya apoptozisin histon asetilasyonuna mı neden olduğu halen tartışmalıdır. Apoptosis son dönemlerde en çok araştırılan konulardan biri olmasına rağmen mekanizma tam aydınlatılamamıştır. Apoptozisin düzenlenmesi, p53 gen ekspresyonu ile başlayan ve kaspazlara kadar devam eden bir süreçtir. Genotoksik olaylarla oluşan hücre hasarı, bir transkripsiyon regülatör geni olan p53'ü aktive etmektedir. p53 protein ürünü DNA'ya doğrudan bağlanarak hasarı tanıdıktan sonra ya G1'de hücre siklusunun durmasını indükleyerek tamir için gerekli zamanı kazanır ya da hasar fazlaysa apoptoza yönlendirir. Ayrıca p53'ün Bax/Bax, Bax/Bcl-2, Bcl-2/Bcl-2 gruplarının oranlarını düzenlediği düşünülmektedir. Araştırmada karaciğer hücrelerinin çekirdek ekstraktlarında 8-OHdG seviyelerinin yüksekliğine paralel olarak aynı gruplarda DNA fragmentasyon sonuçlarının yüksek olması ve apoptotik hücrelerin bulunması oksidatif stresin apoptosise neden olabileceğini doğrulamaktadır. Apoptotik hücrelerin görüldüğü deneme gruplarında histon asetilasyonunda rol oynayan enzim aktiviteleri DNA'daki histon proteinlerinin asetillenmesi ile transkripsiyona uygun hale geldiğini düşündürmektedir. Bu bağlamda apoptozisin gen düzeyinde regülasyonunu sağlayan p53 geni ile 8-OHdG düzeyi arasında bir ilginin olabileceği sonucu çıkarılabilir. N asetil sistein uygulamalarının histon asetilasyonunu gerçekleştiren enzimlerin aktivitelerini değiştirmesi apoptotik hücre sayısının deneme grubuna göre daha az sayıda olması da bu görüşümüzü desteklemektedir. Ancak histon asetilasyonu ile apoptosisin genetik olarak düzenlenmesinin araştırılacağı geniş kapsamlı, moleküler çalışmalar mekanizmanın aydınlatılmasına ışık tutacaktır. Aynı

zamanda araştırma sonuçları göstermektedir ki, CCl<sub>4</sub> intoksikasyonu zamana bağlı olarak organizma tarafından tolere edilmektedir ve sağlıklı kontrol grubuna verilen N asetil sistein antioksidan olarak bir önem taşımamaktadır.

## ÖZET

Çalışmamızda HAT ve HDAC enzim aktiviteleri tayin edilerek, bu enzimlerin aktiviteleri üzerine (dolaylı olarak transkripsiyon üzerine) oksidatif stresin olası etkisini, gen transkripsiyonu ile kontrol edilen apoptosis ile histon asetilasyonu arasında bir ilişkinin olup olmadığını, N Asetil Sisteinin deneysel karaciğer intoksikasyonunda DNA hasarı üzerine koruyucu rolünün olup olmadığını araştırmayı amaçladık.

Çalışmaya 6 grupta toplam 60 adet rat alındı. Karaciğer toksisitesi oluşturmak amacıyla CCl<sub>4</sub>, periton içi 2 ml/kg 1/1 oranında zeytinyağındaki çözeltisi şeklinde tek doz enjekte edildi. NAS uygulamasına (periton içi 50 mg/kg/gün) CCl<sub>4</sub> enjeksiyonundan 3 gün önce başlandı ve deney süresince devam edildi. Kontrol gruplarına zeytinyağı ve N Asetil Sistein uygulaması yapıldı. CCl<sub>4</sub> enjeksiyonundan 6 ve 72 saat sonra eter anestezisi altında kan ve karaciğer dokusu alındı. Karaciğer dokusundan nükleer ekstrakt hazırlandı.

Serum AST, ALT, MDA düzeylerinin, CCl<sub>4</sub> verilen grupta 6. saatte kontrol gruplarına göre arttığı, 72. saatte artışın olduğu fakat altıncı saate göre azaldığı belirlenmiştir. CCl<sub>4</sub>+NAS verilen grupta ise 6. ve 72. saatte kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında artışın olduğu fakat CCl<sub>4</sub> gruplarına göre düzeyinin azaldığı belirlenmiştir. CCl<sub>4</sub> uygulamasının deneysel karaciğer intoksikasyonu ve lipid peroksidasyonuna neden olduğu, NAS uygulamasına ve zamana bağlı olarak düzeyinin azaldığı tespit edilmiştir.

Serum TAK analizinde, CCl<sub>4</sub> verilen grupta 6. saatte kontrol gruplarına göre düzeyinin azaldığı, 72. saatte de azalmanın olduğu fakat altıncı saate göre arttığı görülmüştür. CCl<sub>4</sub>+NAS verilen grupta ise 6. ve 72. saatte kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında azalmanın olduğu fakat CCl<sub>4</sub> gruplarına göre düzeyinin arttığı belirlenmiştir. TOK analizinde, CCl<sub>4</sub> verilen grupta 6. saatte kontrol gruplarına göre düzeyinin arttığı, 72. saatte ise gruplar arasında fark olmadığı; CCl<sub>4</sub>+NAS verilen grupta 6. saatte kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında artışın olduğu fakat CCl<sub>4</sub> gruplarına göre düzeyinin azaldığı, 72. saatte ise fark olmadığı belirlenmiştir.

Nükleer ekstraktlarda yapılan 8-hidroksi 2-deoksiguanozin ve Histon Asetil Transferaz analizinde, CCl<sub>4</sub> verilen grupta 6. saatte kontrol gruplarına göre düzeyinin arttığı, 72. saatte de artışın olduğu fakat altıncı saate göre düzeyinin azaldığı belirlenmiştir. CCl<sub>4</sub>+NAS verilen grupta ise 6. ve 72. saatte kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında artışın olduğu fakat CCl<sub>4</sub> gruplarına göre düzeyinin azaldığı saptanmıştır. Histon deasetilaz düzeyinin, CCl<sub>4</sub> verilen grupta 6. saatte kontrol gruplarına göre azaldığı, 72. saatte de azalmanın olduğu fakat altıncı saate göre arttığı görülmüştür. CCl<sub>4</sub>+NAS verilen grupta ise 6. ve 72. saatte kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında azalmanın olduğu fakat CCl<sub>4</sub> gruplarına göre düzeyinin arttığı belirlenmiştir.

Apoptotik DNA fragmentasyonu analizinde ise, 6. saatte CCl<sub>4</sub> grubunda kontrol grubuna göre düzeyinin arttığı, 72 saatte de artışın olduğu fakat altıncı saate göre düzeyinin azaldığı tespit edildi. CCl<sub>4</sub>+NAS verilen grupta ise 6. ve 72. saatte kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında artışın olduğu fakat CCl<sub>4</sub> gruplarına göre düzeyinin azaldığı tespit edilmiştir. Apoptozis ayrıca karaciğer dokusunda TUNEL yöntemi ile değerlendirilmiş ve 6. saatte, CCl<sub>4</sub> verilen grupta kontrol gruplarına göre apoptotik hücrelerin arttığı, NAS ilave edilen grupta CCl<sub>4</sub> grubuna göre azaldığı, 72 saatte kontrol grubuna göre bir artışın olduğu fakat 6. saate göre düzeyinin azaldığı görülmüştür.

Karaciğerde serbest radikal oluşturmak için CCl<sub>4</sub> toksisite modeli uygulanmıştır. Oksidatif stres olduğu ve buna bağlı olarak DNA'da hasar ve DNA kırılmalarının şekillenip, histon asetilasyonunun arttığı, deasetilasyonunun ise azaldığı ve hücrelerin apoptozise yöneldiği belirlenmiştir. Aynı zamanda, N Asetil Sisteinin DNA'daki hasar üzerine koruyucu rolünün olduğu, oksidatif stres ve apoptozisi azalttığı tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler; Karbon tetraklorür, N asetil sistein, oksidatif DNA hasarı, histon asetilasyonu, serbest radikaller, apoptozis



## SUMMARY

### **Akşit H. Determination of DNA damage in experimental liver intoxication and role of N acetyl cysteine**

We were assigned to HAT and HDAC enzymes, We aimed to investigate whether on the activities of these enzymes (on transkripsiyon indirectly) the possible effect of oxidative stress, apoptosis and gene transcription is controlled by whether or not a relationship between histone acetylation, N acetyl cysteine on the protective role of DNA damage in experimental liver intoxication.

In this study, totaly 60 rats were used in 6 groups. Liver toxicity of CCl<sub>4</sub> in order to create, intraperitoneally 2 ml / kg, 1 / 1 ratio as a single dose of olive oil solution was injected. N Acetyl Cysteine application (intraperitoneal 50 mg / kg / day) was started 3 days before CCl<sub>4</sub> injection and was continued during the experimental period. Control groups were performed in olive oil and N Acetyl Cysteine. 6. and 72. hours after CCl<sub>4</sub> injection, blood and liver tissue were taken under ether anesthesia. Nuclear extracts were prepared from liver.

Serum AST and ALT levels increased in the group CCl<sub>4</sub> 6. hour than the control groups, 72. hour there was an increased but were decreased compared to 6. hour. In the group with CCl<sub>4</sub>+NAC 6. and 72. hours there were an increased level compared with control groups but levels were reduced compared to the CCl<sub>4</sub> group. MDA analysis, CCl<sub>4</sub> in the group 6. hour increase than the control groups, 72. hour there was an increased but were decreased compared to 6. hour. In the group with CCl<sub>4</sub>+NAC 6. and 72. hour there was an increased level compared with control groups, but levels were decreased compared to the CCl<sub>4</sub> groups. CCl<sub>4</sub> intoxication and lipid peroxidation in the liver caused by experimental application, the level, depending on the NAS application and time were reduced.

Serum analysis of TAS, the levels decreased in the group CCl<sub>4</sub> 6. hour compared to the control groups, 72. hour there was an decreased but were increased compared to 6. hour. In the group with CCl<sub>4</sub>+NAC 6. and 72. hours there were an decreased level

compared with control groups but levels were increased compared to the CCl<sub>4</sub> group. Analysis of the TOS, the levels increased CCl<sub>4</sub> in the group 6. hour compared to control groups, 72. hour difference between the groups was not identified. CCl<sub>4</sub>+NAC treated group compared with the control group 6 hours, there was an increased, but the level decreased compared to CCl<sub>4</sub> group, the difference was not identified in 72. hour.

The 8-hydroxy-2-deoxyguanosine and Histone Acetyl Transferase analysis in nuclear extract, the CCl<sub>4</sub> treated group, the level was increased compared to control groups in 6 hours, 72. hour, but also there was an increased level compared to 6. hour were reduced. CCl<sub>4</sub>+NAC treated group, the level was increased compared with control groups in the 6. and 72. hours, but decreased levels were determined according to CCl<sub>4</sub> group. The level of histone deacetylase, CCl<sub>4</sub> treated group 6. hour level was decreased than the control groups, 72. hour there was an decreased but were increased compared to 6. hour. CCl<sub>4</sub>+NAC treated group was decreased compared with control groups in the 6. and 72. hours, but increased levels were determined according to CCl<sub>4</sub> group.

In the analysis of apoptotic DNA fragmentation, the levels increased in the group CCl<sub>4</sub> 6. hour than the control groups, 72. hour there was an increased but were decreased compared to 6. hour. In the group with CCl<sub>4</sub>+NAC 6. and 72. hour there was an increased level compared with control groups, but levels were decreased compared to the CCl<sub>4</sub> groups. Apoptosis also was evaluated by TUNEL assay in liver tissue, and 6. hour, apoptotic cells increased in CCl<sub>4</sub> treated group than the control groups, the NAS was added to the group decreased compared to the CCl<sub>4</sub> group, 72. hour is an increase compared with the control groups but decreased levels were determined compared with 6. hour.

Toxicity model of CCl<sub>4</sub> in the liver was performed to generate free radicals. Oxidative stress, DNA damage and DNA breakage occurred and formed and consequently, increased histone acetylation, decreased histone deacetylation and increased apoptosis were determined. At the same time, that the protective role of N acetyl cysteine on DNA damage and reduced oxidative stress and apoptosis were determined.

Key Words; Carbon tetrachloride, N acetyl cysteine, oxidative DNA damage, histone acetylation, free radicals, apoptosis

## KAYNAKLAR

Adams HR. Veterinary Pharmacology and Therapeutics. 7<sup>nd</sup> Ed. Ames: Iowa State University Press; 1995.

Akagi S, Nagake Y, Kasahara J, Sarai A, Kihara T, Morimoto H, Yano A, Nakao K, Nanba K, Ichikawa H, Makino H. Significance of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine levels in patients with chronic renal failure. Nephrology (Carlton) 2003; 8(4): 192-195.

Akaike T, Suga M, Maeda H. Free radicals in viral pathogenesis: molecular mechanisms involving superoxide and NO. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine 1998; 217(1): 64-73.

Akkuş İ. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Konya: Mimoza Yayınları; 1995.

Akpoyraz M, Durak İ. Serbest radikallerin biyolojik etkileri. The Journal of the Faculty of Medicine 1995; 48: 253-262.

Akşit H, Bildik A. Apoptozis. Yüzüncüyıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 2008; 19(1): 55-63.

Almurshed KS. Protective effect of black and green tea against carbon tetrachloride induced oxidative stress in rats. Saudi Medical Journal 2006; 27(12): 1804-1809.

Altınöz E. Ratlarda, akrilamid kaynaklı oksidatif stres ve genotoksisite üzerine N-asetilsisteinin etkilerinin araştırılması. Uzmanlık Tezi. İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Malatya, Türkiye. 2009.

Altuntaş İ. Otoimmün tiroid hastalığının tanı ve takibinde oksidatif DNA hasar belirleyicisi 8-ohdg'nin önemi. Yüksek Lisans Tezi. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Türkiye. 2007.

Ames BN. Endogenous oxidative DNA damage, aging and cancer. Free Radical Research of Communications 1989; 7: 121-128.

Angulo P, Lindor KD. Treatment of non-alcoholic steatohepatitis. *Best Practice & Research In Clinical Gastroenterology* 2002; 5: 797-810.

Antar V. Bir genel kaspaz inhibitörü olan qvd-oph'nin nöroprotektif etkilerinin deneysel spinal kord travması modelinde incelenmesi. Uzmanlık Tezi. Sağlık Bakanlığı Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi Beyin ve Sinir Cerrahisi Kliniği, İstanbul, Türkiye. 2005.

Arii S, Monden K, Hai S, Sasaoki T, Adachi Y, Funaki N, Higashitsuji H, Tobr T. Depressed function of kupffer cells in rats with CCl<sub>4</sub>-induced liver cirrhosis. *Research in Experimental Medicine* 1990; 190:173-182.

Ariosto F, Riggio O, Cantafora A, Colucci S, Gaudoi E, Mechelli C, Merli S, Seri S, Capocacia L. Carbon tetrachloride - induced experimental cirrhosis in the rat: A reappraisal of the model. *European Surgical Research* 1989; 21: 280-286.

Armbrust T, Batusic D, Ringe B, Ramadari G. Mast cells distribution in human liver disease and experimental rat liver fibrosis, Indications for Mast Cell Participation in Development of Liver Fibrosis. *Journal of Hepatology* 1997; 26: 1042-1054.

Armstrong DA. *Methods in Molecular Biology*. New Jersey: Toronto Humana Pres; 1998.

Astley S, Smith AL, Southon S, Sampson M. Vitamin E supplementation and oxidative damage to DNA and plasma ldl in type 1 diabetes. *Diabetes Care* 1999; 22: 1626-1631.

Aydoğan S, Yerer Betül M, Goktas A. Melatonin and nitric oxide. *Journal of Endocrinological Investigation* 2006; 29(3): 281-287.

Bahçecioğlu IH, Üstündağ B, Özercan İ, Ergül E, Baydaş G, Akdere T, Demir A. Protective effect of Ginkgo Biloba extract on CCl<sub>4</sub>-induced liver damage. *Hepatology Research* 1999; 15: 215-224.

Balasubramanyam K, Altaf M, Varier RA, Swaminathan V, Ravindran A, Sadhale PP, Kundu TK. Polyisoprenylated Benzophenone, Garcinol, a natural histone

acetyltransferase inhibitor, represses chromatin transcription and alters global gene expression. *The Journal of Biological Chemistry* 2004; 279(32): 33716–33726.

Bayır S, Eskiocak S, Altaner G. Kolesterolde zengin diyetle beslenen ratlarda NAC'in anti-oksidan/pro-oksidan etkileri. *Türk Klinik Biyokimya Dergisi* 2006; 1: 15-23.

Bender LM, Morgan MJ, Thomas LR, Liu ZG, Thorburn A. The adaptor protein TRADD activates distinct mechanisms of apoptosis from the nucleus and the cytoplasm. *Cell Death and Differentiation* 2005; 12: 473-481.

Bernhard D, Ausserlechner MJ, Tonko M, Loffler M, Hartmann BL, Csordas A, Kofler R. Apoptosis induced by the histone deacetylase inhibitor sodium butyrate in human leukemic lymphoblasts. *FASEB Journal* 1999; 13: 1991–2001.

Bilgici B. Apoptozis, 2004, Erişim: <http://biyokimya.8m.net/apopitozis.html>. Erişim Tarihi: 08.05.2007.

Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes & Development* 2002; 16: 6–21.

Boll M, Weber LW, Becker E, Stampfl A. Mechanism of carbon tetrachlorideinduced hepatotoxicity. Hepatocellular damage by reactive carbon tetrachloride metabolites. *Zeitschrift Fur Naturforschung Section C-A Journal of Biosciences* 2001; 56: 649-659.

Bora G, Yurter HE. Epigenetik hastalıklar ve tedavi yaklaşımları. *Hacettepe Tıp Dergisi* 2007; 38: 48-54.

Borek C. Free-radical processes in multistage carcinogenesis. *Free Radical Research Communications* 1991; 12-13: 745–750.

Brugere CM, Nowacki W, Gueux E, Kuryszko J, Rock E, Rayssiguier Y, Mazur A. Accelerated thymus involution in magnesium-deficient rats is related to enhanced apoptosis and sensitivity to oxidative stress. *British Journal of Nutrition* 1999; 81: 405–411.

Burçak G, Andican G. Oksidatif DNA hasarı ve yaşlanma. *Cerrahpaşa Journal of Medicine* 2004; 35: 159-169.

Cabre M, Camps J, Paternain JL, Ferre N, Joven J. Time-course of changes in hepatic lipid peroxidation and glutathione metabolism in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 2000; 27: 694-699.

Cao G, Alessio HM, Cutler RG. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine* 1993; 14: 303-313.

Cao J, Liu Y, Jia L, Jiang LIP, Geng CY, Yao XF, Kong Y, Jiang BN, Zhong LF. Curcumin attenuates acrylamide-induced cytotoxicity and genotoxicity in HepG2 cells by ROS scavenging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2008; 56: 12059-12063.

Carter E, Jung W, Cyr E, McIntosh L, Tompkins R, Fischman A. Evaluation of CCl<sub>4</sub> induced apoptosis in murine liver with <sup>99m</sup>Annexin-V and <sup>99m</sup>Tc albumin. *Journal of Nuclear Medicine* 2006; 47: 332.

Castilla Cortazar I, Garcia M, Muguerza B, Quiroga J, Perez R, Santidrian S, Prieto J. Hepatoprotective effects of insuline like growth factor I in rats with carbon tetrachloride induced cirrhosis. *Gastroenterology* 1997; 113(5): 1682-1691.

Chang CS, Chen WN, Lin HH, Wu CC, Wang CJ. Increased oxidative DNA damage, inducible nitric oxide synthase, nuclear factor kappa-B expression and enhanced antiapoptosis-related proteins in Helicobacter pylori-infected non-cardiac gastric adenocarcinoma. *World Journal of Gastroenterology* 2004; 10(15): 2232-2240.

Chapple IL. Reactive oxygen species and antioxidants in inflammatory diseases. *Journal of Clinical Periodontology* 1997; 24(5): 287-296.

Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *British Medical Bulletin* 1993; 49(3): 479-480.

Chiou CC, Chang PY, Chan EC, Wu TL, Tsao KC, Wu JT. Urinary 8-hydroxydeoxyguanosine and its analogs as DNA marker of oxidative stress: Development of an ELISA and measurement in both bladder and prostate cancers. *Clinica Chimica Acta* 2003; 334(1-2): 87-94.

Choi D, Hwang S, Lee E, Yoon S, Yoon BK, Bae D. Expression of mitochondria-dependent apoptosis genes (p53, bax, and bcl-2) in rat granulosa cells during follicular development. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation* 2004; 11(5): 311-317.

Choi J, Yoon Sh, Kim J, Rhee K, Youn H, Chung M. Gene-specific oxidative DNA damage in helicobacter pylori-infected human gastric mucosa. *International Journal of Cancer* 2002; 99: 485-490.

Comporti M. Biology of diseases: Lipid peroxidation and celluler damage intoxic liver injurys. *Laboratory Investigation* 1985; 53(6): 599-622.

Çavdar C, Sifil A, Çamsarı T. Reaktif oksijen partikülleri ve antioksidan savunma. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi* 1997; 3(4): 92-95.

Çeçen ŞŞ, Cengiz G, Söylemezoğlu T. Parakuat toksisitesinde N-asetilsisteinin koruyucu etkisi. *Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi* 2002; 31(4): 259-271.

Çetinkaya A. Ratlarda N-asetil sistein ve L-karnitin'in karbon tetraklorür ile oluşturulan akut karaciğer hasarı üzerine etkileri. *Yan Dal Uzmanlık Tezi. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji Bilim Dalı, Kahramanmaraş, Türkiye. 2009.*

Çınar A, Yörük M, Meral İ, Kılıçalp D, Koç A, Ertekin A. Karbon Tetraklorür (CCl<sub>4</sub>) ile tavşanlarda deneysel olarak oluşturulan akut ve kronik intoksikasyonun karacigerin histolojik yapısına, bazı hematolojik değerlere ve elektrokardiyogram üzerine etkileri. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sicences* 1999; 23: 235-242.

Dashti HM, Sayer HA, Behbehani A, Madda J, Christenson JT. Liver cirrhosis induced by carbon tetrachloride and the effect of superoxide dismutase and xantine oxidase inhibitör treatment. *Surgeon-Journal of The Royal Colleges of Surgeons of Edinburgh and Ireland* 1992; 37: 23-28.

Dashti H, Jeppson B, Hagerstrand I, Hultberg B, Srinivas U, Abdulla M. Thioacetamide and carbontatrachloride-induced liver cirrhosis. *European Surgical Research* 1989; 21: 833-891.

Delibaş N, Özçankaya R. Serbest radikaller. SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi 1995; 2(3): 11-17.

Demirdağ K, Bahcecioglu IH, Ozercan IH, Ozden M, Yilmaz S, Kalkan A. Role of L-carnitine in the prevention of acute liver damage induced by carbon tetrachloride in rats. Journal of Gastroenterology and Hepatology 2004; 19: 333-338.

Devay SD. Karbon tetraklorür ile deneysel siroz oluşturulan ratlarda serbest radikal metabolizması; Stobadin'in antioksidan etkisi. Uzmanlık Tezi. Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye. 2008.

Dinçer S, Öz E, Özenirler S. Effect of single dose alcohol administration on malondialdehyde, glutathione, total protein and hydroxyproline levels of rat liver. The Turkish Journal of Gastroenterology 1999; 10(1): 1-3.

Dizdaroğlu M, Jaruga P, Rodriguez H. Identification and quantification of 8,59-cyclo-29-deoxyadenosine in DNA by liquid chromatography/mass spectrometry. Free Radical Biology & Medicine 2001; 30(7): 774-784.

Dizdaroğlu M, Karakaya AE. Advances in DNA damage and repair. Newyork: Kluwer Academic/Plenium Publishers; 1999. p. 67-87.

Doi K, Kurabe S, Shimazu N, Inagak M. Systemic histopathology of rats with CCl<sub>4</sub> induced hepatic cirrhosis. Laboratory Animals 1991; 25: 21-25.

Dokmanovic M, Marks AP. Prospects: Histone deacetylase inhibitors. Journal of Cellular Biochemistry 2005; 96: 293-304.

Donoghue S, Baden HS, Lauder I, Sobolewski S, Pringle JH. Immunohistochemical localization of caspase-3 correlates with clinical outcome in B-cell diffuse large-cell lymphoma. Cancer Research 1999; 59: 5386-5391.

Duran A, Kafalı ME, Şahin M, Köylü Ö, Gökalp A, Arslan U, Toy H. Tavşanlarda oluşturulan deneysel sepsis modelinde düşük doz NAC tedavisinin etkinliği. Selçuk Tıp Dergisi 2004; 20: 140-149.

Dündar Y, Aslan YR. Hekimlikte oksidatif stres ve antioksidanlar. 1. Baskı. Afyon: Afyon Kocatepe Üniversitesi Yayınları; 2000.



Düzgüner V. Deneysel olarak diyabet oluşturulan tavşanlarda çinkonun lipid peroksidasyonu ve antioksidan sistem üzerine etkisi. Yüksek Lisans Tezi. Mustafa Kemal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Hatay, Türkiye. 2005.

Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicology and Pathology* 2007; 35(4): 495-516.

Erdoğan A, Öztürk F, Ateş B, Yılmaz İ, Otlu A. Sıçanlarda karbon tetraklorür ile oluşturulmuş karaciğer yağlanması üzerine kayısının koruyucu etkilerinin biyokimyasal açıdan incelenmesi. 21. Ulusal Kimya Kongresi. İnönü Üniversitesi, Malatya; 2007.

Erdoğan BB. Apoptozis mekanizmaları: Tümör gelişiminde fas-fasl bağımlı apoptozis. *Akciğer Arşivi* 2003; 4: 165-174.

Ertekin A. Karbontetraklorür ile deneysel siroz oluşturulan tavşanlarda sialik asit, lipid-bağlı sialik asit, total protein ve bazı spesifik karaciğer enzimlerinin aktivitelerinin araştırılması. Doktora Tezi. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Van, Türkiye. 1996.

Erten R. Karbon tetraklorür ile oluşturulan deneysel akut karaciğer hasarında Dihydromyrcenol ve Geranyl Formate'in karaciğeri koruyucu etkisi. Uzmanlık Tezi. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı, Van, Türkiye. 2009.

Ertürk B. Akciğer kanserli hastalarda malondialdehit (MDA) ve total antioksidan kapasite (TAOK) düzeyi ölçümü ile oksidan-antioksidan dengenin araştırılması. Uzmanlık Tezi. Süreyyapaşa Göğüs ve Kalp-Damar Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İstanbul, Türkiye. 2006.

Farinati F, Cardin R, Degan P, Rugge M, Mario FD, Bonvicini P, Naccarato R. Oxidative DNA damage accumulation in gastric carcinogenesis. *Gut* 1998; 42: 351-356.

Fischer-Nielsen A, Poulsen HE, Hansen BA, Hage E, Keiding S. CCl<sub>4</sub> cirrhosis in rats: Irreversible histological changes and differentiated functional impairment. *Journal of Hepatology* 1991; 12: 110-117.

Foresti R, Sarathchandra P, Clark JE, Green CJ, Motterlini R. Peroxynitrite induces haem oxygenase-1 in vascular endothelial cells: a link to apoptosis. *Biochemical Journal* 1999; 339: 729-736.

Frankfurt OS, Krishan A. Enzyme-linked immunosorbent assay ELISA for the specific detection of apoptotic cells and its application to rapid drug screening. *Journal of Immunological Methods* 2001; 253: 133-144.

Galicía-Moreno M, Rodríguez-Rivera A, Reyes-Gordillo K, Segovia J, Shibayama M, Tsutsumi V, Vergara P, Moreno MG, Muriel P. N-acetylcysteine prevents carbon tetrachloride-induced liver cirrhosis: role of liver transforming growth factor-beta and oxidative stress. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology* 2009; 21(8): 908-914.

Galle PR. Apoptosis in liver disease. *Journal of Hepatology* 1997; 27: 405-412.

Ghiselli A, Serafini M, Natella F, Scaccini C. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: Critical review and experimental data. *Free Radical Biology and Medicine* 2000; 29: 1106-1114.

Glozak AM, Sengupta N, Zhang X, Seto E. Acetylation and deacetylation of non-histone proteins. *Gene* 2005; 363: 15-23.

Gönenç A, Erten D, Aslan S, Akıncı M, Simsek B, Torun M. Lipid peroxidation and antioxidant status in blood and tissue of malignant breast tumor and benign breast disease. *Cell Biology International* 2006; 30: 376-380.

Gray GS, Ekström JT. The human histone deacetylase family. *Experimental Cell Research* 2001; 262: 75-83.

Guimaraes CA, Linden R. Programmed cell death; apoptosis and alternative deathstyles. *European Journal of Biochemistry* 2004; 271: 1638-1650.

Guyton AC. *Textbook of Medical Physiology*. 8<sup>nd</sup> Ed. Philadelphia: WB Saunders Company; 1991.

Gümrükçüoğlu A. Serbest radikaller, [http://www.genetikbilimi.com/gen/serbest\\_radikaller.htm](http://www.genetikbilimi.com/gen/serbest_radikaller.htm). Erişim tarihi: 06.06.2009.

Gümüş A, Yurtsever E. Isırgan otu (*Urtica dioica* L.) tohumu ekstresinin, akut karbontetraklorür uygulanan albino sıçanlarda plazma ve karaciğer lipid peroksidasyonu ile glutasyon düzeylerine etkisi. Yüksek Lisans Tezi. Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye. 2007.

Güven A, Güven A, Gülmez M. The effect of kefir on the activities of GSH-Px, GST, CAT, GSH and LPO levels in carbon tetrachloride-induced mice tissues. *Journal of Veterinary Medicine B* 2003; 50: 412–416.

Haberland M, Montgomery RL, Olson EN. The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. *Nature Reviews Genetics* 2009; 10: 32-42.

Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human. *American Journal of Medicine* 1991; 91: 314-22.

Hanımoglu H. Glioblastoma multiforme’de doku 8-hydroxydeoxyguanosine ve total antioksidan kapasite değerleri. Uzmanlık Tezi. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Nöroşirürji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye. 2007.

Hekim N. Apoptosis. Kalıtsal Hastalıklara Moleküler Tıp Açısından Bakış Sempozyumu. İstanbul; 2003. p. 115-140.

Hıkım APS, Wang C, Leung AR, Swerdloff S. Involvement of apoptosis in the induction of germ cell degeneration in adult rats after gonadotropin-releasing hormone antagonist treatment. *Endocrinology* 1995; 136(6): 2770-2775.

Igishi T, Hitsuda Y, Kato K, Sako T, Burioka N, Yasuda K, Sano H, Shigeoka Y, Nakanishi H, Shimizu E. Elevated urinary 8-hydroxydeoxyguanosine, a biomarker of oxidative stress, and lack of association with antioxidant vitamins in chronic obstructive pulmonary disease. *Respirology* 2003; 8(4): 455-460.

Iredale JP, Benyon RC, Pickering J, McCullen M, Northrop M, Pawley S, Hovell C, Arthur MJP. Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis. Hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors. *Journal of Clinical Investigation* 1998; 102: 538-549.

Jaruga P, Speina E, Daniel G, Tudek B, Olinski R. Endogenous oxidative DNA base modifications analysed with repair enzymes and BC/MS technique. *Nucleic Acids Research* 2000; 28(6): 1-4.

Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. *Science* 2001; 293: 1074–1080.

Jeong TC, Kim HJ, Park J, Ha CS. Protective effects of red ginseng saponins against carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in sprague dawley rats. *Planta Medica* 1996; 63: 136-140.

Jones AL. Mechanism of action and value of N-acetylcysteine in the treatment of early and late acetaminophen poisoning: a critical review. *Journal of Toxicology Clinical Toxicology* 1998; 36: 277-285.

Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO. *Basic Histology*. 7<sup>nd</sup> Ed. New Jersey: Prentice Hill International Inc; 1992.

Kadiiska MB, Gladen BC, Baird DD, Germolec D, Graham LB, Parker CE, Nyska A, Wachsman JT, Ames BN, Basu S, Brot N, FitzGerald GA, Floyd RA, George M, Heinecke JW, Hatch GE, Hensley K, Lawson JA, Marnett LJ, Morrow JD, Murray DM, Plastaras J, Roberts II LJ, Rokach J, Shigenaga MK, Sohal RS, Sun J, Tice RR, Van Thiel DH, Wellner D, Walter PB, Tomer KB, Mason RP, Barrett JC. Biomarkers of oxidative stress study II. Are oxidation products of lipids, proteins, and DNA markers of CCl<sub>4</sub> poisoning? *Free Radical Biology & Medicine* 2005; 38: 698–710.

Kaneda K, Kashii S, Kurosawa T, Kaneko S, Akaike A, Honda Y, Minami M, Satoh M. Apoptotic DNA fragmentation and upregulation of Bax induced by transient ischemia of the rat retina. *Brain Research* 1999; 815: 11-20.

Kaneko T, Wang Pei Y, Sato A. Relationship between blood/air partition coefficients of lipophilic organic solvent and blood triglyceride levels. *Toxicology* 2000; 143: 203-208.

Kang J, Zhang D, Chen J, Lin C, Liu Q. Involvement of histone hypoacetylation in Ni<sup>2+</sup>-induced bcl -2 down-regulation and human hepatoma cell apoptosis. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 2004; 9: 713–723.

Kaya A. Deneysel karaciğer fibrozisi oluşturulan ratlarda roziglitazonun antifibrotik ve antioksidan etkileri. Uzmanlık Tezi. Fatih Üniversitesi Gastroenteroloji İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye. 2007.

Kaya S, Pirinççi İ, Bilgili A. Veteriner Uygulamalı Farmakoloji. 2. Baskı, 2. Cilt. Ankara: Medisan Yayınevi; 2000. p. 435-436.

Kılıçoğlu B, Gencay C, Kısmet K, Serin Kilicoglu S, Erguder I, Erel S, Sunay A, Erdemli E, Durak I, Akkus M. The ultrastructural research of liver in experimental obstructive jaundice and effect of honey. American Journal of Surgery 2008; 195: 249-256.

Koç A. Antioksidanların cep telefonu ile oluşturulmuş testiküler apoptozis ve oksidatif stres üzerine etkileri. Uzmanlık Tezi. Fatih Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye. 2008.

Kopani M, Celec P, Danisovic L, Michalka P, Biro C. Oxidative stress and electron spin resonance. Clinica Chimica Acta 2006; 364: 61-66.

Kömüroğlu U, Noyan T, Sekeroglu MR. Comparison of the effects of melatonin and pentoxifylline on the serum lipids of mice with carbon tetrachloride-induced liver toxicity. Turkiye Klinikleri Journal of Cardiovascular Science 2007; 19: 21-26.

Kumar O, Sugendran K, Vijayaraghavan R. Oxidative stress associated hepatic and renal toxicity induced by ricin in mice. Toxicon 2003; 1: 333-338.

Kurban S, Akpınar Z, Mehmetoğlu İ. Multiple skleroz hastalarında serum paraoksonaz ve arilesteraz aktiviteleri ile oksidatif stresin araştırılması. Genel Tıp Dergisi 2010; 20(1): 13-17.

Kürtüncü M, Eraksoy M. Multipl skleroz: Epigenetik bir hastalık olabilir mi?. Nöropsikiyatri Arşivi 2008; 45: 15-20.

Kwon SH, Ahn SH, Kim YK, Bae GU, Yoon JW, Hong S, Lee HY, Lee YW, Lee HW, Han JW. Apicidin, a histone deacetylase inhibitor, induces apoptosis and Fas/Fas ligand expression in human acute promyelocytic leukemia cells. The Journal of Biological Chemistry 2002; 277(3): 2073-2080.

Laurenzi VD. Flow cytometric methods for the study of cell death. Apoptozis, Hastalıklarla İlişkisi ve Güncel Belirleme Yöntemleri Kursu, Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir, Türkiye. 2006.

Lee JII, Lee KS, Paik YH, Park YN, Han KH, Chon CY, Moon YM. Apoptosis of hepatic stellate cells in carbon tetrachloride induced acute liver injury of the rat: analysis of isolated hepatic stellate cells. *Journal of Hepatology* 2003; 39: 960–966.

Lida C, Fujii K, Koga E, Washino Y, Kitamura Y, Ichi I, Abe K, Matsura T, Kojo S. Effect of alpha-tocopherol on carbon tetrachloride intoxication in the rat liver. *Archives of Toxicology* 2009; 83(5): 477-483.

Lim PS, Cheng YM, Wei YH. Large-scale mitochondrial DNA deletions in skeletal muscle of patients with end-stage renal disease. *Free Radical Biology and Medicine* 2000; 29(5): 454-463.

Lindemann KR, Johnstone WR. Histone deacetylase inhibitors: promising candidates for chemotherapeutic drugs. *Gene Therapy and Molecular Biology* 2004; 8: 61-74.

Liu X, Shi Y, Birnbaum MJ, Ye K, Jong RD, Oltersdorf T, Giranda VL, Luo Y. Quantitative analysis of anti-apoptotic function of akt in akt1 and akt2 double knock-out mouse embryonic fibroblast cells under normal and stressed conditions. *The Journal of Biological Chemistry* 2006; 281(42): 31380-31388.

Lizuka M, Smith MM. Functional consequences of histone modifications. *Current Opinion In Genetics & Development* 2003; 13: 154-160.

Loguercio C, Blanco CDV, Coltorti M, Nardi G. Alteration of erythrocyte glutathione, cysteine and glutathione synthetase in alcoholic and non-alcoholic cirrhosis. *Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation* 1992; 52: 207-213.

MacDonald-Wicks, LK, Garg, ML. Vitamin E supplementation in the mitigation of carbon tetrachloride induced oxidative stress in rats. *Journal of Nutritional Biochemistry* 2003; 14: 211-218.

Marks AP, Miller T, Richon V. Histone deacetylases. *Current Opinion in Pharmacology* 2003; 3: 344-351.

Masson S, Scotte M, Garnier S, Francois A, Hiron M, Teniere P, Fallu J, Salier JP, Daveau M. Differential expression of apoptosis-associated genes post-hepatectomy in cirrhotic vs. normal rats. *Apoptosis* 2000; 5: 173–179.

Mehmet H. Detection of mitochondrial events in apoptosis. *Apoptozis, Hastalıklarla İlişkisi ve Güncel Belirleme Yöntemleri Kursu, Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir, Türkiye.* 2006.

Meister A. Glutathione deficiency produced by inhibition of its synthesis, and its reversal; applications in research and therapy. *Pharmacology & Therapeutics* 1991; 51: 155-194.

Moreira JMA, Scheipers P, Sorensen P. The histone deacetylase inhibitor Trichostatin A modulates CD4+ T cell responses. *BMC Cancer* 2003; 3(30): 1-18.

Moriya K, Nakagawa K, Santa T, Shintani Y, Fujie H, Miyoshi H, Tsutsumi T, Miyazawa T, Ishibashi K, Horie T, Imai K, Todoroki T, Kimura S, Koike K. Oxidative stress in the absence of inflammation in a mouse model for hepatitis C virus-associated hepatocarcinogenesis. *Cancer Research* 2001; 61(11): 4365-4370.

Moseley R, Waddington RJ, Embery G, Rees SG. The modification of alveolar bone proteoglycans by reactive oxygen species in vitro. *Connective Tissue Research* 1998; 37(1-2): 13-28.

Munshi A, Shafi G, Aliya N, Jyothy A. Histone modifications dictate specific biological readouts. *Journal of Genetics and Genomics* 2009; 36: 75-88.

Murakami T, Nagamura Y, Hirano K. The effect of ethanolamine on acute carbon tetrachloride intoxication. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 1998; 21: 84-86.

Murell A, Rakyan VK, Beck S, From genome to epigenome. *Human Molecular Genetics* 2005; 14(1): 3-10.

Muriel P, Escobar Y. Kupffer cells are responsible for liver cirrhosis induced by carbon tetrachloride. *Journal of Applied Toxicology* 2003; 23(2):103-108.

Murray KR, Mayes PA, Granner DK, Rodwell VW. Harperin Biyokimyası. İstanbul: Barış kitapevi; 1993.

Nagata S. Apoptosis by death factor. Cell 1997; 88: 355-365.

Nakajima M, Takeuchi T, Morimoto K. Determination of 8-hydroxydeoxyguanosine in human cells under oxygen-free conditions. Carcinogenesis 1996; 17(4): 787-791.

Neal R, Matthews RH, Lutz P, Ercal N. Antioxidant role of N-acetyl cysteine isomers following high dose irradiation. Free Radical Biology & Medicine 2003; 34(6): 689-695.

Nicholson DW, Nicotera P, Melino G. Caspases and cell death. Encyclopedia of Biological Chemistry 2004; 1: 319-327.

Nordberg J, Amer ESJ. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. Free Radical Research Communications 2001; 31: 1287-1312.

Ogryzko VV. Mammalian histone acetyltransferases and their complexes. Cellular and Molecular Life Sciences 2001; 58: 683-692.

Onat T, Emerk K, Sözmen EY. İnsan Biyokimyası. 1. Baskı. Ankara: Palme Yayınları; 2002.

Öktem S, Özhan MH, Özol D. Apoptozisin önemi. Toraks Dergisi 2001; 2(1): 91-95.

Özbek H, Çitoğlu GS, Dülger H, Uğraş S, Sever B. Sıçanlarda karbon tetraklorürle oluşturulmuş akut karaciğer toksisitesi üzerine Ballota glandulosissima hub.-mor & patzak ekstresinin hepatoprotektif etkisinin araştırılması. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Bildiriler, 29-31 Mayıs, Eskişehir; 2004.

Özenirler S, Dinçer S, Akyol G, Öz I, Kandilci U, Babül A. CCl<sub>4</sub>'ün oluşturduğu karaciğer hasarına Ginkgo Biloba'nın etkisi. 13. UGK, Antalya, Sözlü Bildiriler, 1996. p. 138.

Öztürk F. Apoptoz. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 2002; 9(2): 143-148.



Özvaran MK. Malign mezotelyomada gen tedavisi. *Toraks Dergisi* 2004; 5(2): 110-115.

Peterson LC, Laniel M. Histones and histone modifications. *Current Biology* 2004; 14: 546-551.

Polat DK. Retinitis pigmentosa'lı hastalarda bazı enflamasyon ve oksidatif stres belirteçlerinin değişimi. Uzmanlık Tezi. Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Biyokimya Bölümü, İstanbul, Türkiye. 2008.

Polavarapu R, Spitz DR, Sim JE, Follansbee MH, Oberley LW, Rahemtulla A, Nanji AA. Increased lipid peroxidation and impaired antioxidant enzyme function is associated with pathological liver injury in experimental alcoholic liver disease in rats fed diets high in corn oil and fish oil. *Hepatology* 1998; 27(5): 1317-1323.

Poyrazoğlu OK. Ghrelin ve iki formunun karbon tetraklorürle oluşturulan akut karaciğer hasarına olan etkisi. Yan Dal Uzmanlık Tezi. Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Ana Bilim Dalı Gastroenteroloji Bilim Dalı, Elazığ, Türkiye. 2009.

Pramod K, Deval RG, Lakshmayya, Ramachandra SS. Antioxidant and hepatoprotective activity of tubers of *Momordica tuberosa* Cogn. against CCl<sub>4</sub> induced liver injury in rats. *Indian Journal of Experimental Biology* 2008; 46: 510-513.

Qiusheng Z, Xubo SX, Gang L, Meng S, Changhai W. Protective effects of luteolin-7-glucoside against liver injury caused by carbon tetrachloride in rats. *Pharmazie* 2004; 59(4): 286-288.

Rahman I, Marwick J, Kirkham P. Redox modulation of chromatin remodeling: impact on histone acetylation and deacetylation, NF-kB and pro-inflammatory gene expression. *Biochemical Pharmacology* 2004; 68: 1255–1267.

Rall LC, Roubenoff R, Meydani SN, Han SN, Meydani M. Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) as a marker of oxidative stress in rheumatoid arthritis and aging: effect of progressive resistance training. *Journal of Nutritional Biochemistry* 2000; 11(11-12): 581-584.

Rashed MM, Ragab NM. The pattern of expression of the apoptotic inducer fas and the apoptotic inhibitor bcl-2 oncogenes immunohistochemically in bone-marrow invaded by the non-hodgkin lymphomas. *Turkish Journal of Haematology* 2004; 21(3): 141-147.

Ray G, Batra S, Shukla NK. Lipid peroxidation, free radical production and antioxidant status in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment* 2000; 59: 163-170.

Recknagel R, Glende EA, Dolak JA, Waller RL. Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity. *Pharmacology & Therapeutics* 1989; 43: 139-154.

Robbins SL, Cotran RS, Kumar V. *Basic Pathology*. 6<sup>nd</sup> Ed. Philadelphia: WB Saunders Company; 2000. p. 516-519.

Roderick P. Liver function tests: defining what's normal. *British Medical Journal* 2004; 328: 987.

Romano G, Sgambato A, Mancini R, Capelli G, Giovagnoli MR, Flamini G, Boninsegna A, Vecchione A, Cittadini A. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in cervical cells: Correlation with grade of dysplasia and human papillomavirus infection. *Carcinogenesis* 2000; 21(6): 1143-1147.

Rosato RR, Grant S. Histone deacetylase inhibitors: insights into mechanisms of lethality. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 2005; 9: 809-824.

Roshal M, Zhu Y, Planelles V. Apoptosis in AIDS. *Apoptosis* 2001; 6: 103-116.

Sarı S. Farelerde Ehrlich asit solid tümör modelinde thymus sipyleus ve taurinin, böbrek mda, glutatyon, aopp düzeylerine ve sod aktivitesine etkileri. Yüksek Lisans Tezi. Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Türkiye. 2008.

Schwarz KB, Kew M, Klein A. Increased hepatic oxidative DNA damage in patients with hepatocellular carcinoma. *Digestive Diseases and Sciences* 2001; 46: 2173-2178.

Seki S, Kitada T, Sakaguchi H, Nakatani K, Wakasa K. Pathological significance of oxidative cellular damage in human alcoholic liver disease. *Histopathology* 2003; 42(4): 365-71.

Seki S, Kitada T, Yamada T, Sakaguchi H, Nakatani K, Onoda N, Satake K. Immunohistochemical detection of 8-hydroxydeoxyguanosine, a marker of oxidative DNA damage, in human chronic cholecystitis. *Histopathology* 2002; 40: 531–535.

Sener G, Tosun O, Sehirli AO, Kacmaz A, Arbak S, Ersoy Y. Melatonin and N-acetylcysteine have beneficial effects during hepatic ischemia and reperfusion. *Life Sciences* 2003; 72: 2707-2718.

Sert NN, Altınsaat Ç. Gebe ve gebe olmayan sıçanlarda karbontetraklorürün (CCl<sub>4</sub>) bazı biyokimyasal değerler üzerine etkileri. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2008; 14(2): 237-242.

Shenoy KA, Somayaji SN, Bairy KL. Hepatoprotective effects of ginkgo biloba against carbon tetrachloride induced hepatic injury in rats. *Indian Journal of Pharmacology* 2001; 33: 260-266.

Shi H, Hudson LG, Liu KJ. Oxidative stress and apoptosis in metal ion-induced carcinogenesis. *Free Radical Biology and Medicine* 2004; 37(5): 582-593.

Shi J, Aisaki K, Ikawa Y, Wake K. Evidence of hepatocyte apoptosis in rat liver after the administration of carbon tetrachloride. *American Journal of Pathology* 1998; 153(2): 515-525.

Shi ZM, Feng P, Jiang DQ, Wang XJ. Mistletoe alkali inhibits peroxidation in rat liver and kidney. *World Journal of Gastroenterology* 2006; 12(25): 4052-4055.

Shimizu I. Antifibrogenic therapies in chronic HCV infection. *Current Drug Targets Infectious Disorder* 2001; 1(2): 227-240.

Shimizu I. Impact of estrogens on the progression of liver disease. *Liver International* 2003; 23(1): 63-69.

Sırmatel F, Duygu F, Çelik H, Selek Ş, Sırmatel O, Gürsoy B, Eriş FN. Kronik viral hepatit olgularında total oksidatif seviye ve total antioksidan kapasitenin değerlendirilmesi. *Klinik Dergisi* 2009; 22(3): 92-96.

Slater TF. Free radicals as reactive intermediates in injury. In: R Snyder, DV Parke, JJ Kocsis, DJ Jollow, GG Gebson, CM Witmer (Eds). *Biological Reactive Intermediates II: Chemical Mechanisms and Biological Effects*. New York: Plenum Press; 1982. p. 575-589.

Sleiman SF, Basso M, Mahishi L, Kozikowski AP, Donohoe ME, Langley B, Ratan RR. Putting the 'HAT' back on survival signalling: the promises and challenges of HDAC inhibition in the treatment of neurological conditions. *Expert Opinion on Investigational Drugs* 2009; 18: 573-584.

Soyak G. Lenfoid löykozlu etçi anaç tavuklarda karaciğer enzim (alanin amino transferaz, aspartat amino transferaz, alkali fosfataz) düzeyleri. Yüksek Lisans Tezi. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Türkiye. 2006.

Staley K, Blaschke AJ, Chun J. Apoptotic DNA fragmentation is detected by a semiquantitative ligation-mediated PCR of blunt DNA ends. *Cell Death and Differentiation* 1997; 4: 66-75.

Stamatopoulos B, Meuleman N, Bruyn CD, Delforge A, Bron D, Lagneaux L. The histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid induces apoptosis, down-regulates the CXCR4 chemokine receptor and impairs migration of chronic lymphocytic leukemia cells. *Haematologica* 2010; 95: 1136-1143.

Staroverov VN, Davidson ER. Distribution of effectively unpaired electrons. *Chemical Physics Letters* 2000; 330: 161-168.

Stassi G. Detection of apoptosis in tissues. Apoptozis, Hastalıklarla İlişkisi ve Güncel Belirleme Yöntemleri Kursu. Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir, Türkiye. 2006.

Strachan T, Read PA. *Human molecular genetics*. 3<sup>rd</sup> Ed. London-New York: Garland Science; 2004. p. 34-38.

Suzuki S, Hinokio Y, Komatu K, Ohtomo M, Onoda M, Hirai S, Hirai M, Hirai A, Chiba M, Kasuga S, Akai H, Toyota T. Oxidative damage to mitochondrial DNA and its relationship to diabetic complications. *Diabetes Research and Clinical Practice* 1999; 45(2-3): 161-168.

Tafazoli S, Spehar DD, O'Brien PJ. Oxidative stress mediated idiosyncratic drug toxicity. *Drug Metabolism Reviews* 2005; 37: 311-25.

Tanrıverdi G. Karbon tetraklorür (CCl<sub>4</sub>) ile oluşturulmuş karaciğer hasarında değişik dozlardaki nikotinamidin protektif etkisinin ışık ve elektron mikroskopik olarak incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye. 2005.

Tarin JJ, Brincs J, Cano A. Serbest radikaller, antioksidanlar ve infertilite ile klinik ilişkiler. *Human Reproduction* 1998; 13(9): 2371-2376.

Taunton J, Hassig CA, Schreiber SL. A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p. *Science* 1996; 272: 408-411.

Thiagalingam S, Cheng HK, Lee JH, Mineva N, Thiagalingam A, Ponte FJ. Histone deacetylases: unique players in shaping the epigenetic histone code. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2003; 983: 84-100.

Thrall KD, Vucelick ME, Gies RA, Zangar RC, Weitz KK, Poet TS, Springer DL, Grant DM, Benson JM. Comparative metabolism of carbon tetrachloride in rats, mice, and hamsters using gas uptake and PBPK modeling. *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part A* 2000; 60: 531-548.

Tolun N. Histon deasetilaz inhibitörü valproik asidin endometriyum hücrelerinde proliferasyon üzerine etkileri. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul Bilim Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye. 2009.

Tomatır AG. Apoptoz; programlı hücre ölümü. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Science* 2003; 23: 499-508.

Topal D, Göral V, Topal AE. Helicobacter pylori infeksiyonunun apoptozisdeki rolü. *Güncel Gastroenteroloji* 2004; 8(4): 248-251.

Tosun İ, Karadeniz B. Çay ve çay fenoliklerinin antioksidan aktivitesi. *Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi* 2005; 20(1): 78-83.

Tür L, Sözbilir N. Karbon tetraklorür ile karaciğer hasarı oluşturulan ratlarda *Matricaria chamomilla* l.'nin karaciğer üzerine koruyucu etkilerinin araştırılması. Doktora

Tezi. Afyonkarahisar Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Afyon, Türkiye. 2008.

Ueno M, Kakinuma Y, Yuhki K, Murakoshi N, Iemitsu M, Miyauchi T, Yamaguchi I. Doxorubicin induces apoptosis by activation of caspase-3 in cultured cardiomyocytes in vitro and rat cardiac ventricles in vivo. *Journal of Pharmacological Sciences* 2006; 101(2): 151-158.

Ulukaya E. Apoptozis ders notları, 2003, Erişim: [http://biyokimya.uludag.edu.tr/apoptozis\\_ders\\_notu.pdf](http://biyokimya.uludag.edu.tr/apoptozis_ders_notu.pdf). Erişim Tarihi: 04.05.2007.

Ungvari Z, Orosz Z, Rivera A, Labinskyy N, Xiangmin Z, Olson S, Podlutzky A, Csiszar A. Resveratrol increases vascular oxidative stress resistance. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 2007; 292(5): 2417-2424.

Üstündağ B, Bahçecioğlu İH, Şahin K, Gülcü F, Düzgün S, Özercan İH, Gürsu MF. Soy izoflavonların karbon tetraklorüre (CCl<sub>4</sub>) bağlı karaciğer hasarı ve plazma paraoksonaz ile arilesteraz aktivite düzeylerine olan etkileri. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi* 2005; 19(4): 263-271.

Vairetti M, Ferrigno A, Bertone R, Richelmi P, Berte F, Freitas I. Apoptosis vs. necrosis: glutathione-mediated cell death during rewarming of rat hepatocytes. *Biochimica et Biophysica Acta* 2005; 1740: 367-374.

Vendemiale G, Grattagliano I, Caruso ML, Serviddio G, Valentini AM, Pirrelli M, Altomare E. Increased oxidative stress in dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis in the rat: effect of N-acetylcysteine and interferon-alpha. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2001; 2: 130-139.

Venkatakrishnan CD, Tewari AK, Moldovan L, Cardounel AJ, Zweier JL, Kuppasamy P, Ilangovan G. Heat shock protects cardiac cells from doxorubicin-induced toxicity by activating p38 MAPK and phosphorylation of small heat shock protein 27. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 2006; 291(6): 2680-2691.

Vural H, Demir CV, Yılmaz N, Eren İ. Alzheimer hastalığında total antioksidan kapasitenin araştırılması. *Tıp Araştırmaları dergisi* 2007; 5 (2): 63-66.

Wang H, Wei W, Wang NP. Melatonin ameliorates carbontetrachloride-induced hepatic fibrogenesis in rats via inhibition of oxidative stres. *Life Sciences* 2005; 77: 1902-1915.

Watanabe I, Toyoda M, Okuda J, Tenjo T, Tanaka K, Yamamoto T, Kawasaki H, Sugiyama T, Kawarada Y, Tanigawa N. Detection of apoptotic cells in human colorectal cancer by two different in situ methods; antibody against single-stranded DNA and terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end-labeling (TUNEL) methods. *Japanese Journal of Cancer Research* 1999; 90: 188-193.

Wiseman H, Halliwell B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: Role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochemical Journal* 1996; 313: 17-29.

Yamamoto Y, Yamashita S, Fujisawa A, Kokura S, Yoshikawa T. Oxidative stress in patients with hepatitis, cirrhosis, and hepatoma evaluated by plasma antioxidants. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1998; 247(1): 166-170.

Ye X, Feng Y, Tong Y, Ng KM, Tsao S, Lau GK, Sze C, Zhang Y, Tang J, Shen J, Kobayashi S. Hepatoprotective effects of Coptidis rhizoma aqueous extract on carbon tetrachloride-induced acute liver hepatotoxicity in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 2009; 124: 130-136.

Yerushalmi B, Dahl R, Devereaux MW, Gumprich E, Sokol RJ. Bile acid-induced rat hepatocyte apoptosis is inhibited by antioxidants and blockers of the mitochondrial permeability transition. *Hepatology* 2001; 33: 616-626.

Yılmaz İ. Erişkin ratlarda deneysel varikosel oluşturulması sonrası testislerde germ hücrelerinde apoptozis düzeylerinin yükselmesi ve yükselmiş olan apoptozisin varikosektomi sonrası gerileme düzeyi ve süresinin TUNEL yöntemi ile değerlendirilmesi. Uzmanlık tezi. Sağlık Bakanlığı Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi Üroloji Kliniği, İstanbul, Türkiye. 2005.

Yılmaz S, Bahçecioğlu IH. Karbon tetraklorür ile siroz oluşturulmuş ratlarda lipid peroksidasyonu, antioksidan enzim ve piruvat kinaz aktiviteleri. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences* 2000; 24: 25-28.

Yokuş B, Mete N. Oksidatif DNA hasarı. Klinik Laboratuvar Araştırma Dergisi 2003; 7(2): 51-64.

Yoshoiko T, Kawada K, Shimada T. Lipid peroxidation in maternal and cord blood and protective mechanism against active oxygen toxicity in the blood. American Journal of Obstetrics and Gynecology 1979; 135: 372–376.

Yüce A, Aksakal M. Ratların karaciğer ve testis dokusundaki antioksidan aktivite üzerine nar suyunun etkisi. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi 2007; 21(6): 253–256.

Zafarullah M, Li WQ, Sylvester J, Ahmad M. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. Cellular and Molecular Life Sciences 2003; 60: 6-20.

Zhang X, Jiang L, Geng C, Yoshimura H, Zhong L. Inhibition of acrylamide genotoxicity in human liver-derived HepG2 cells by the antioxidant hydroxytyrosol. Chemico-Biological Interactions 2008; 176: 173–178.

Zwart LL, Hermans RCA, Meerman JHN, Commandeur JNM, Salemink PJM, Vermeulen NPE. Evaluation of urinary biomarkers for radical-induced liver damage in rats treated with carbon tetrachloride. Toxicology and Applied Pharmacology 1998; 148: 71–82.



## ÖZGEÇMİŞ

Denizli ilinin Çal ilçesinin Bahadınlar köyü'nde 1981 yılında doğdu. İlkokulu; Bahadınlar ilkokulunda, Ortaokulu; Ortaköy ortaokulunda, Liseyi; Çal lisesinde tamamladı. Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nden 2004 yılında mezun olup aynı yıl Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitimine başladı. 2005 yılında Araştırma Görevlisi olarak göreve başladı. 2006 yılında evlendi. 2009 yılında 1 kızı oldu. Halen Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktadır.

## TEŞEKKÜR

Doktora tez çalışmamda ilgi, yardım ve hoşgörüsünü eksik etmeyen danışmanım ADÜ Veteriner Fakóltesi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Ayřegöl BİLDİK'e ve çalışmamın her aşamasında yardımlarını esirgemeyen Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Doç. Dr. Funda KIRAL ve Doç. Dr. Pınar Alkım ULUTAŞ'a ve Balıkesir Üniversitesi Tıp Fakóltesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Kamil SEYREK'e, Doktora tez aşamasındaki yardımlarından dolayı Doktora ve Yüksek Lisans Öğrencileri Turgut ŐEKERLER, Mürüvvet URAL, Hakan TEKELİ ve Erengöl BODU'a, tez aşamasında desteğini aldığım Histoloji - Embriyoloji Anabilim Dalı Doktora Öğrencisi Özay GÜLEŐ'e sonsuz destek ve anlayışlarından dolayı teşekkür ederim.

Eşim Dilek AKŞİT'e sabır, özveri ve yardımlarından dolayı, kızım Aleyna AKŞİT'e de tezin yazım aşaması sırasında uslu durduğundan dolayı teşekkür ederim.