



RATLARDA OLUŞTURULAN KARACİĞER TÜMÖR MODELİNDE OCTREOTİDE KEMOTERAPÖTİK AJANININ, ISI OK PROTEİNLERİ , 8-HİDROKSİ DEOKSİGUANOZİN VE OKSİDATİF STRES PARAMETRELERİ DÜZEYLERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

¹Velid Unsal, ²Ergl Belge Kuruta, ³Ertan Blblolu, ²Glcan Haskaya, ⁴Harun
ıralık

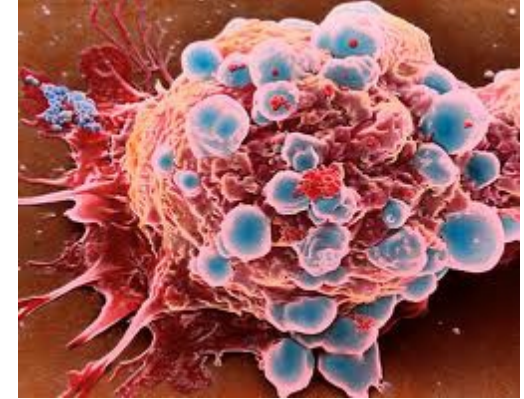
¹Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya AD, Ankara

²St İmam Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya AD, Kahramanmaraş

³St İmam Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi AD, Kahramanmaraş

⁴St İmam Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Patoloji AD, Kahramanmaraş

Karsinogenez



- Karsinogenez (neoplastik transformasyon) karsinogenlerin çoğunlukla sinyal iletim yollarıyla etkileşimi sonucu belirli bir süreçte gelişen ve birbirini izleyen çok basamaklı hücresel değişikliklerin yer aldığı kontrolsüz hücre çoğalmasdır.

- 
- Kimyasal veya metabolizma sırasında oluşan karsinogen eğer karaciğerde detoksifiye edilemezse DNA'yı değiştirebilir.
 - Hepatosellüler karsinoma, dünyada en yaygın kanserlerden biri olup, bunun oluşumunda Dietilnitrozamin(DEN), Asetilaminofloren(2-AAF), fenobarbital, alkol gibi kimyasallar, aflatoksin B1 metabolit ya da hepatit virüsleri (B ve C) gibi ajanların etkendir.

DEN 'in Tümör Oluşumundaki Rolü

- Çalışmamızda kullandığımız karsinojenden biri olan DEN'in metabolitleri, DNA'ya bir ya da iki oksidasyon sağlayan elektron ile kovalent bağlanarak tümör promotörlerinin bağlanmasına aracılık eder.

2-AAF'nin Karaciğerde Tümör Oluşumundaki Rolü

- 2-AAF, DEN'in birinci adımından sonra, ikinci adım olarak DNA'da guanin bazına bağlanıp toksik etki oluşturur.

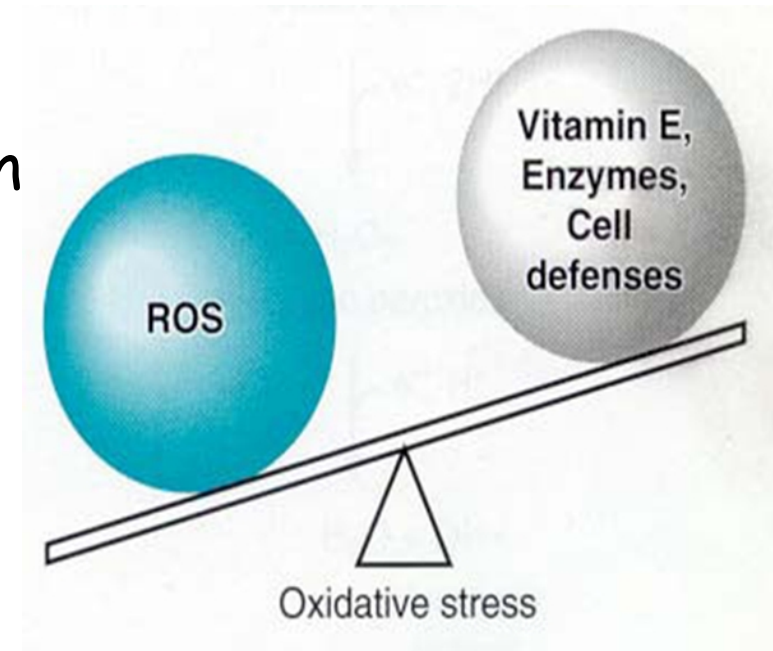
DEN ve 2-AAF'nin Karaciğerde Tümör Oluşumundaki Roller

- Dietilnitrozamin indükleyici, 2-AAF ise promotör olarak mesane ve karacigerde tümör oluşumunda rol alırlar .

Serbest radikaller

- Reaktif oksijen türleri DNA'da 20'den fazla oksidatif baz hasar ürününün oluşmasına yol açar.
- Bu hasara uğrayan bazlar arasında 8 hidroksi deoksiguanozin (8-OHdG) oldukça duyarlı ve en sık karşılaşılan oksidatif DNA hasarı belirticidir.

- Vücutta doğal metabolik yollarla oluşan serbest radikaller normalde radikal parçalayan antioksidan sistemlerle ortadan kaldırılmaktadır.
- Ancak, çeşitli nedenlerle reaktif oksijen türlerinin artması ve antioksidan mekanizmaların yetersiz kalması sonucu **Oksidatif Stres** adı verilen bir dizi patolojik olay meydana gelmektedir.



Hidroksi deoksiguanizin (8-OHdG)

- Cu^{2+} iyonları DNA'da G-C'den zengin bölgelerde yüksek oranda bulunduğundan oksidatif hasara en fazla maruz kalan baz guanindir.
- Bu nedenle en yaygın olarak ölçülen baz hasarı 8-OH dG'dir.

Isı şok proteinleri

- Birçok biyolojik sistem içerisinde strese karşı tepki oluşmaktadır.
- Bu tepkinin en belirgin olanı, ilk defa yüksek ateşe bağlı olarak hücrelerde keşfedilen ve ısı şok proteinleri (Hsp) olarak adlandırılan bir grup protein ailesidir.



Hsp 70

- Stres altında proteinleri korur ve kümeleşmelerini önler.
- Polipeptidleri birbirine bağlar.

Kanserde Isı şok Proteinlerinin Rolü

- Hsp 70, apoptozda görev alır ve bunu da birkaç anahtar proteinle etkileşime girerek gerçekleştirir.
- Bu moleküler şaperonlar, ısı şoku boyunca protein kümelenmesi ve katlanmaları durumunda görev alırlar.
- Hsp 'nin protein katlanmasındaki görevleri ve hücre koruyucu özellikleri, tümör hücrelerinin korunmasında büyük rol oynamaktadır .



Octreotide

- Octreotide tüm büyüme faktörlerini inhibe etmektedir.

AMAÇ

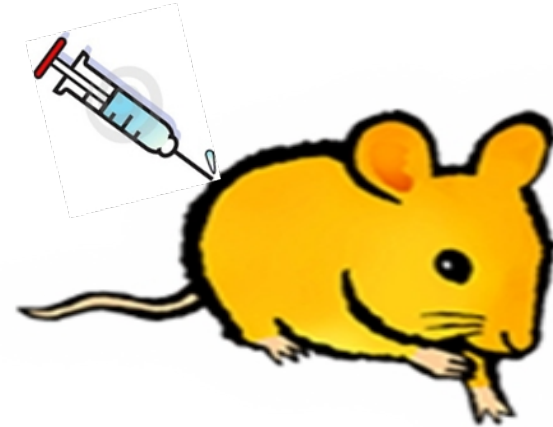


- Bu araştırmada; ratlara DEN ve 2-AAF verilmesiyle karaciğer tümör modeli oluşturarak karaciğer doku hücreleri tahribatının düzeylerini ve octreotide maddesinin biyokimyasal ve histopatolojik olarak karaciğer dokusu üzerine etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.



MATERYAL VE METOD

- Toplam 64 adet dişi Sprague-dawley cinsi rat eşit olarak 8 gruba ayrılmıştır.



Gruplar	Birinci doz ve rutin uygulamalar	İkinci uygulamalar
Grup1: Kontrol	Su + Yem	
Grup 2 : Zeytinyağı	Su + Yem	Deney sonuna kadar haftada 3 kez 0,1 ml/kg gavaj uygulandı.
Grup 3: DMSO	Su + Yem	Deney sonuna kadar haftada 3 kez 0,1 ml/kg gavaj uygulandı.
Grup 4 : OCT	0,1 ml DMSO'da çözünmüş 300 µg/kg OCT i.p olarak 1 kez uygulandı.	
Grup 5 : DEN	DEN, 175 mg/kg i.p 0,1 ml DMSO'da çözündürülerek 1 kez uygulandı. Su + Yem	
Grup 6 : 2-AAF	Su + Yem	Deneyin başlamasından sonra 7. 8. ve 9.günde 20 mg 2-AAF /kg oranında DMSO'da çözündürülerek 0.1 ml z.yağ içinde gavajla verildi.
Grup 7: DEN+AAF	DEN, 175 mg/kg i.p 0,1 ml DMSO'da çözündürülerek 1 kez uygulandı. Su + Yem	Deneyin başlamasından sonra 7. 8. ve 9.günde 20 mg 2-AAF /kg oranında DMSO'da çözündürülerek 0.1 ml z.yağ içinde gavajla verildi.
Grup8: DEN+AAF+ OCT	DEN, 175 mg/kg i.p 0,1 ml DMSO'da çözündürülerek 1 kez uygulandı. Su + Yem	Deneyin başlamasından sonra 7. 8. ve 9.günde 20 mg/kg 2-AAF oranında DMSO'da çözündürülerek 0.1 ml z.yağ içinde gavajla verildi. 0,1 ml DMSO'da çözünmüş 300 µg OCT, DMSO 'da çözündürülerek 16.,23.ve 30.günde i.p olarak verildi.

Karaciger Dokusunun Makroskobik Görüntüler



Kontrol grubu



5.Grup (DEN)



7.grup (DEN+ 2-AAF)

Ratlardan alınan karaciger dokularından elde edilen süpernatantlarda;

Malondialdehit(MDA)

Katalaz (CAT)

Süperoksit Dismutaz (SOD)

Nitrik oksit(NO)

Glutatyon peroksidaz(GSH-Px)

8-hidroksi deoksiguanozin(8-OHdG)

Hsp 70



ölçümleri yapıldı.



- SOD aktivitesi tayininde **Fridovich**
- CAT ve GSH-Px aktivitesi tayininde **Beutler**
- MDA düzeyi tayininde ise **Ohkawa**
- NO aktivitesi tayininde **Griess**
- 8-OHdG ve Hsp 70 tayininde **Eliza**

yöntemi kullanıldı.



İstatistiksel Analiz

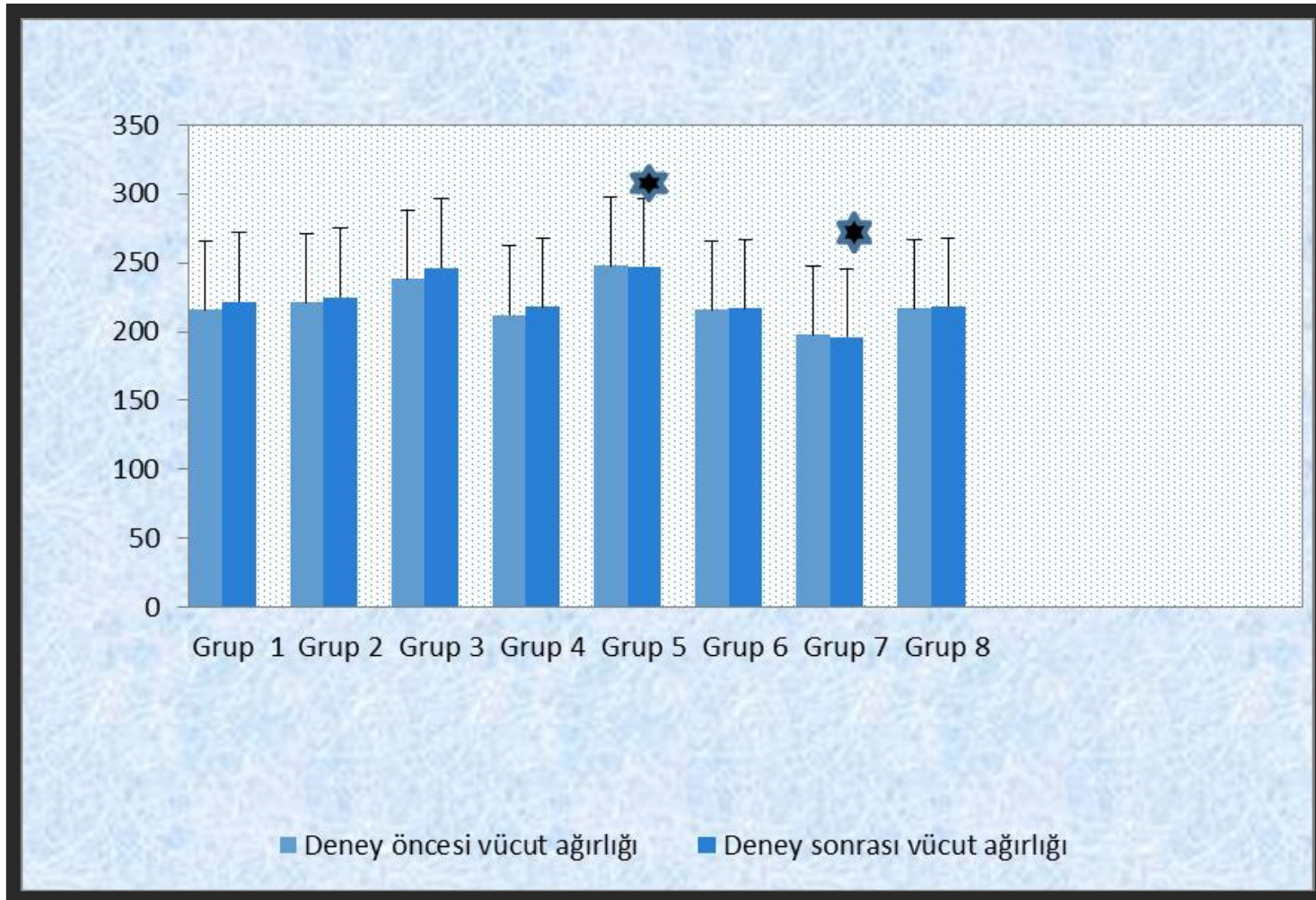


- ❖ Sonuçlar ortalama $\pm$ SD olarak verildi.
- ❖ İstatistik değerlendirmeler için gruplar arasındaki karşılaştırmalarda Kruskal-Wallis testi, ikili karşılaştırmaların değerlendirilmesinde ise Mann-Whitney U testi kullanıldı.
- ❖ $p < 0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

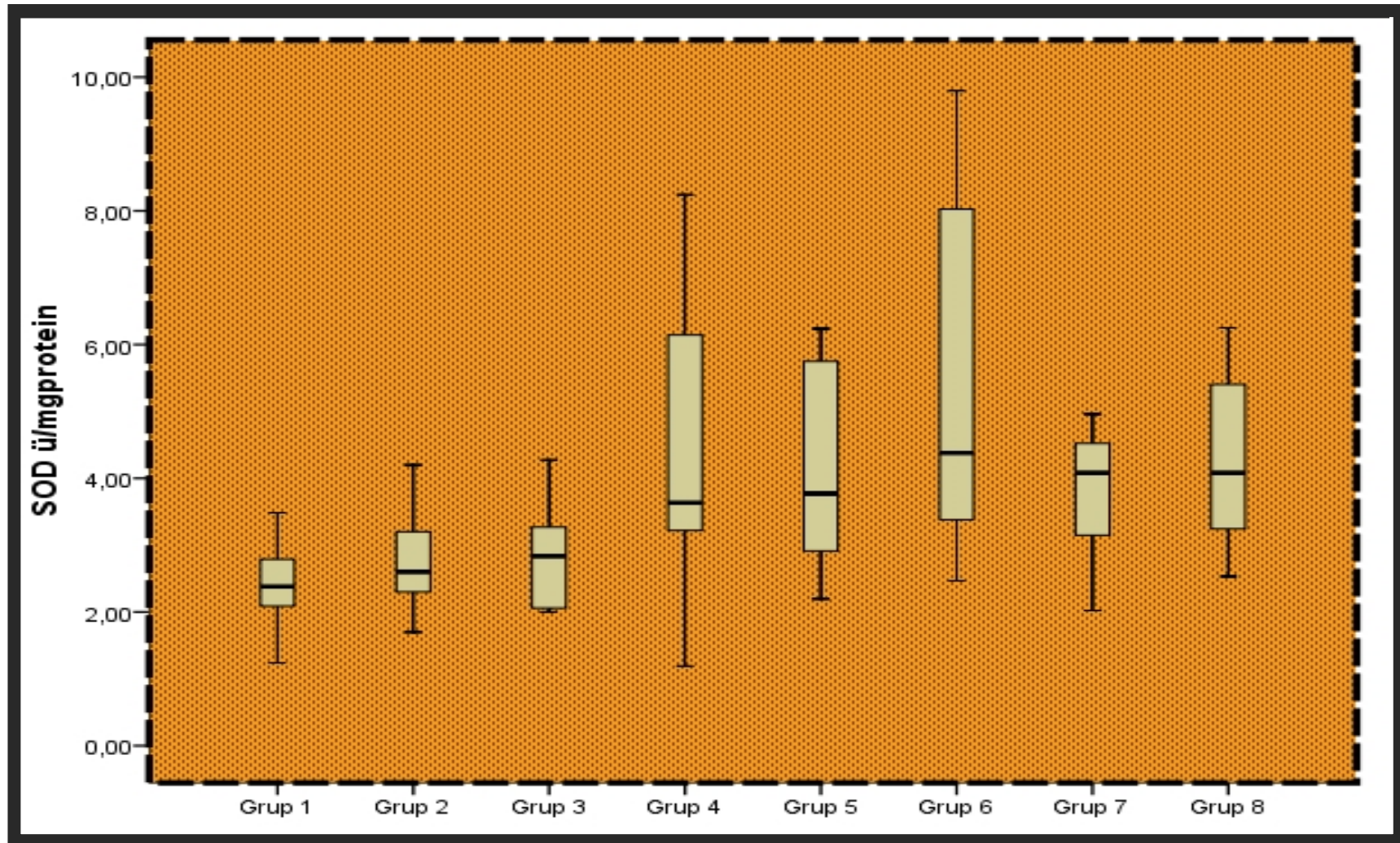
BULGULAR



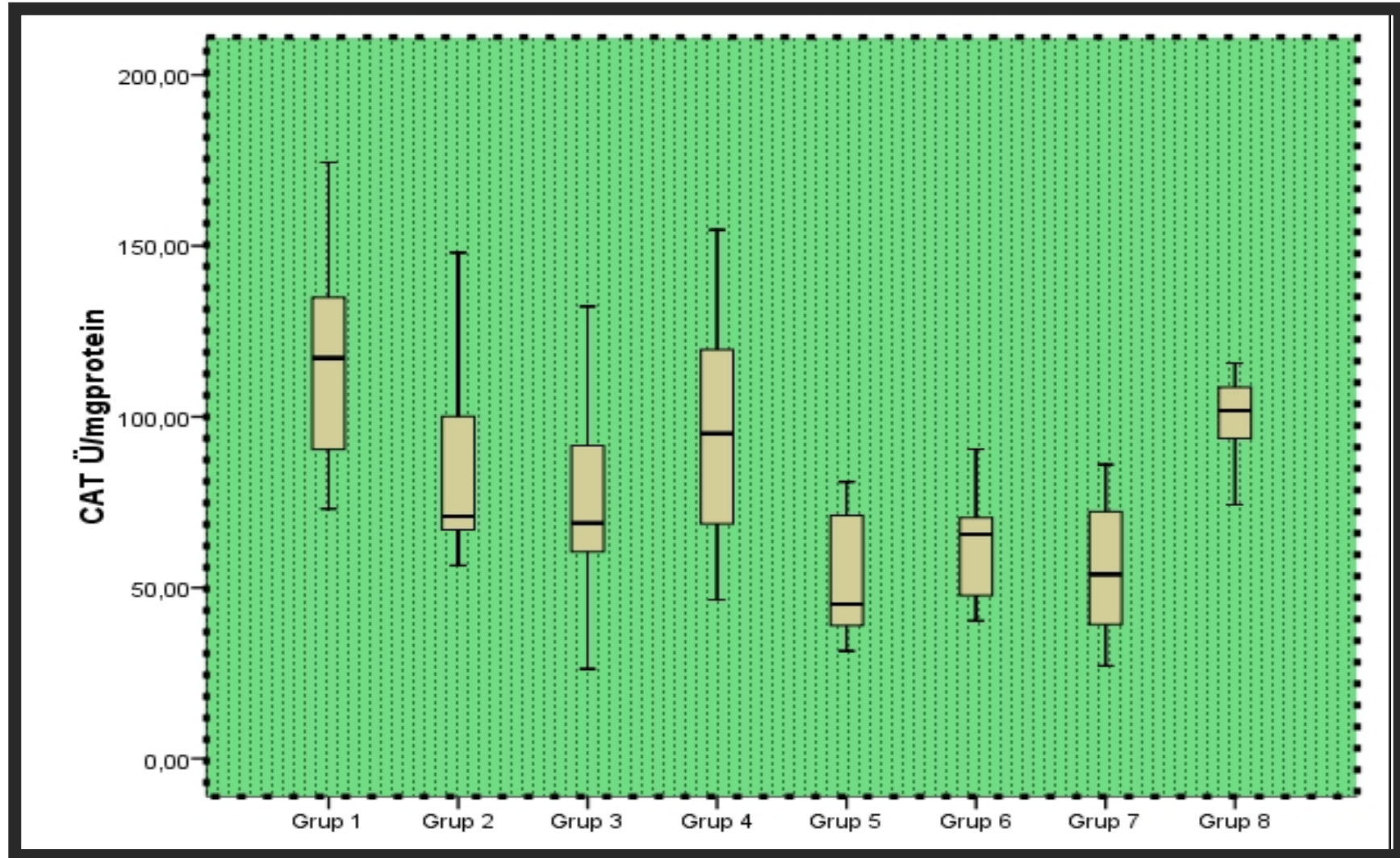
Ratların deney öncesi ve sonrası vücut ağırlıkları değişim grafiği



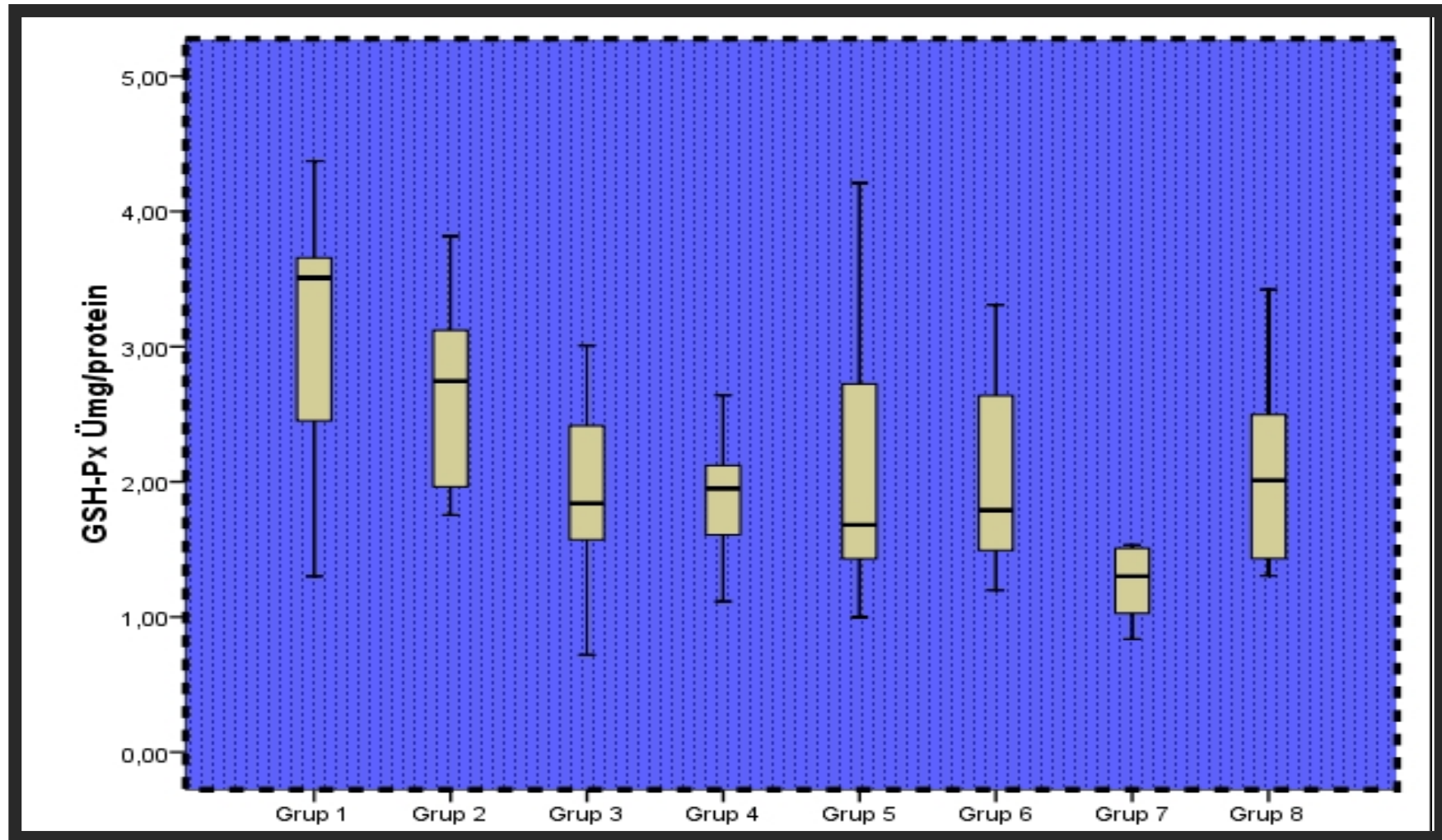
Grupların SOD değerlerinin grafiksel gösterimi



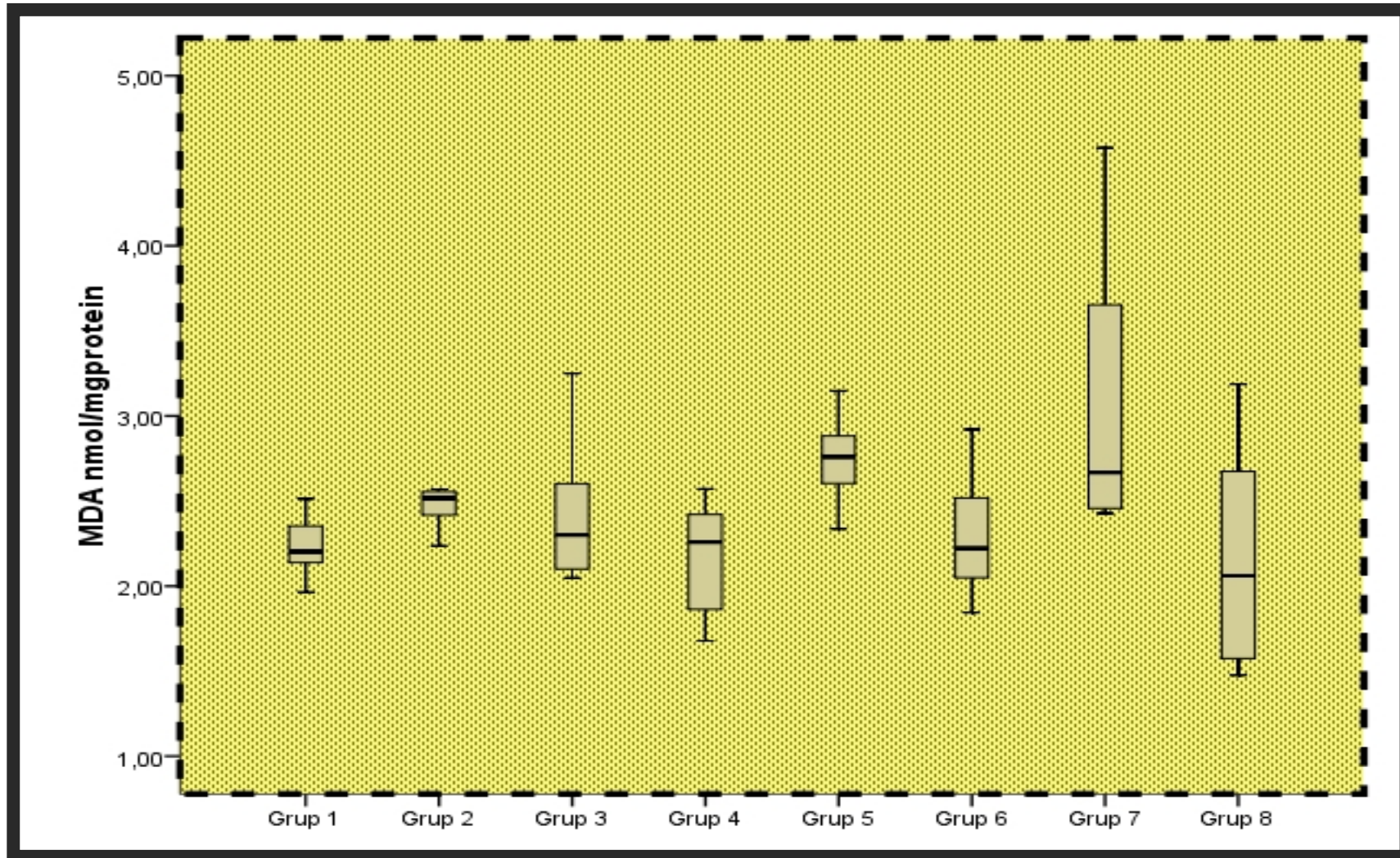
Grupların CAT değerlerinin grafiksel gösterimi



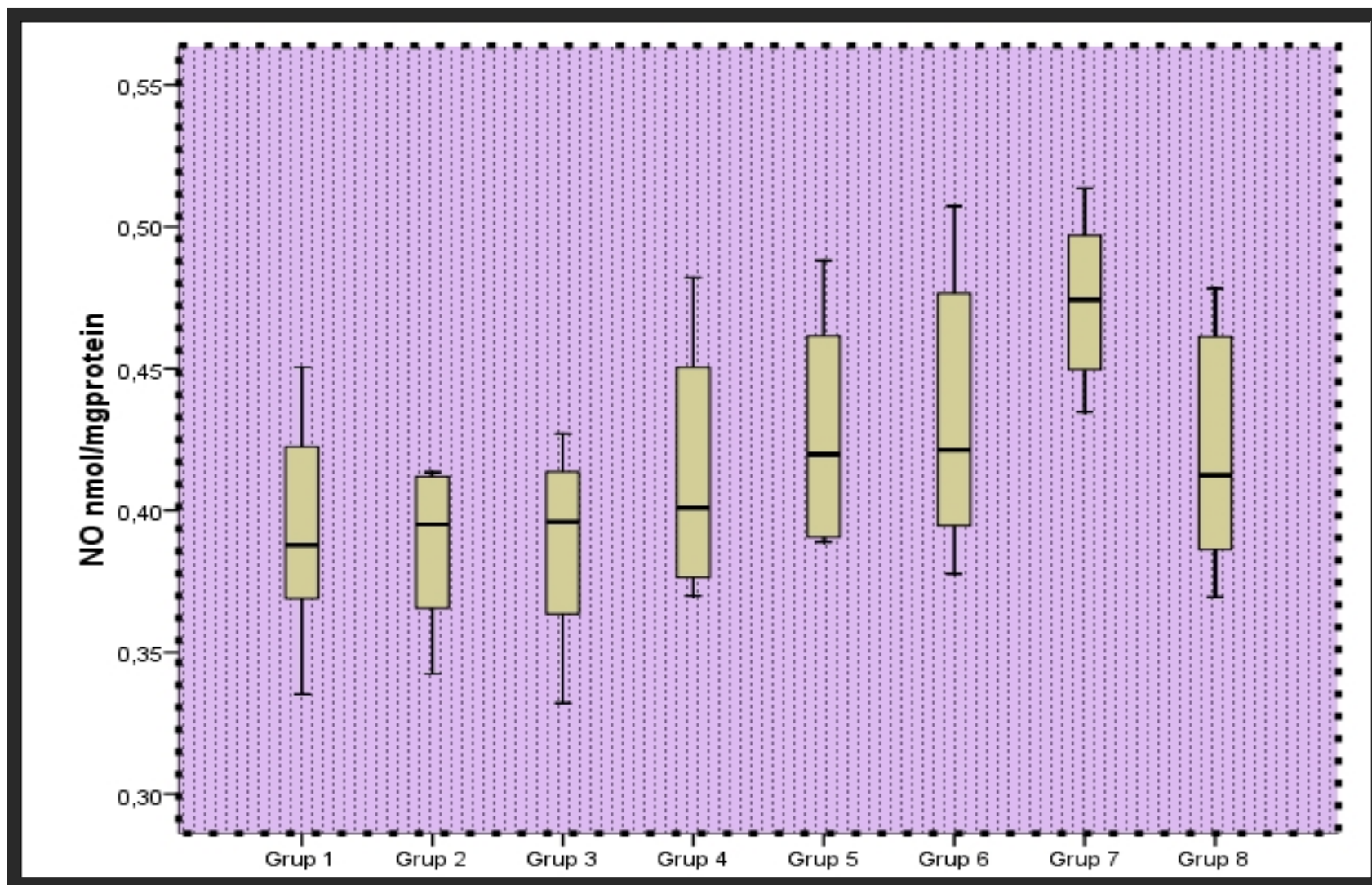
Grupların GSH-Px değerlerinin grafiksel gösterimi



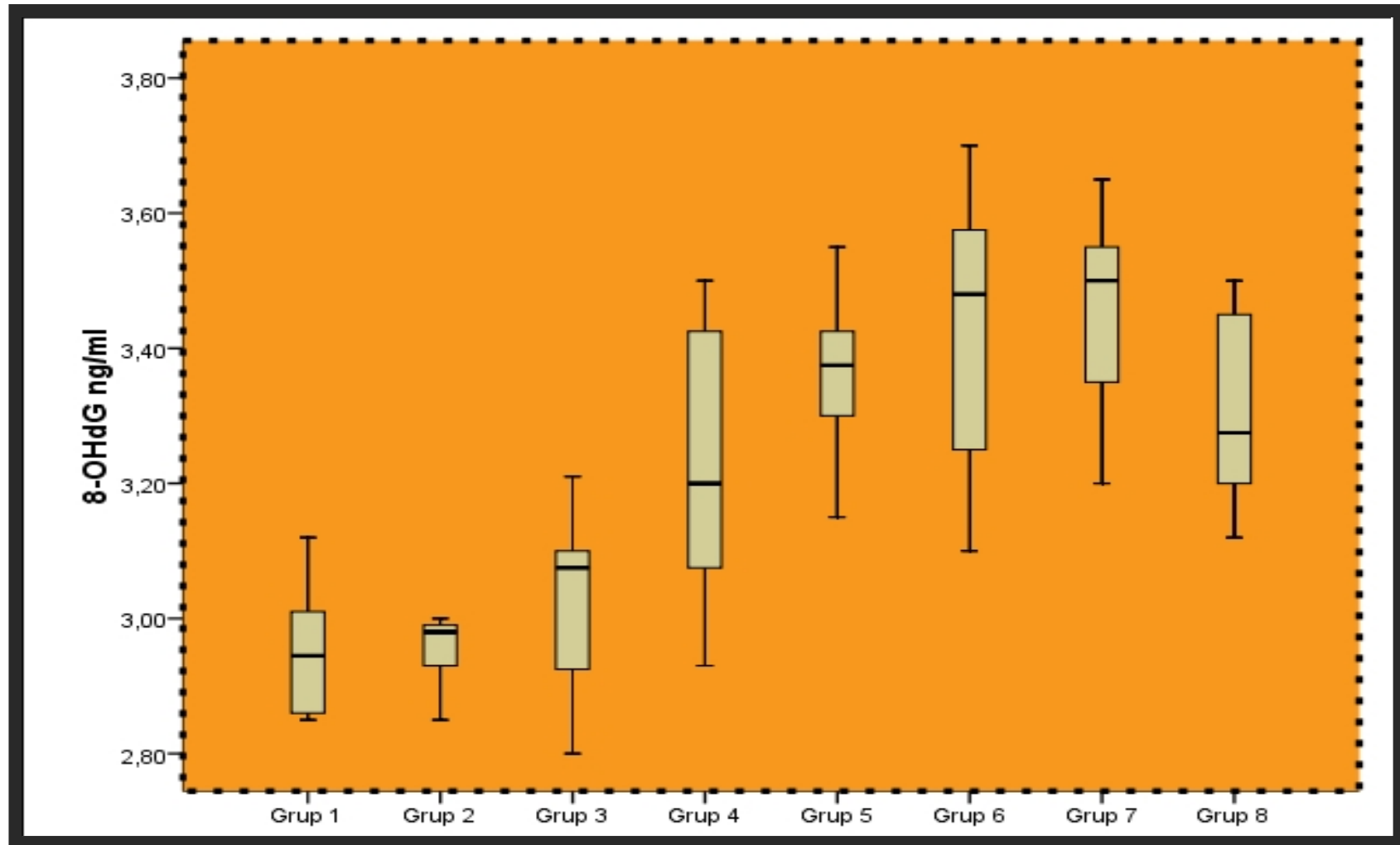
Grupların MDA değerlerinin grafiksel gösterimi



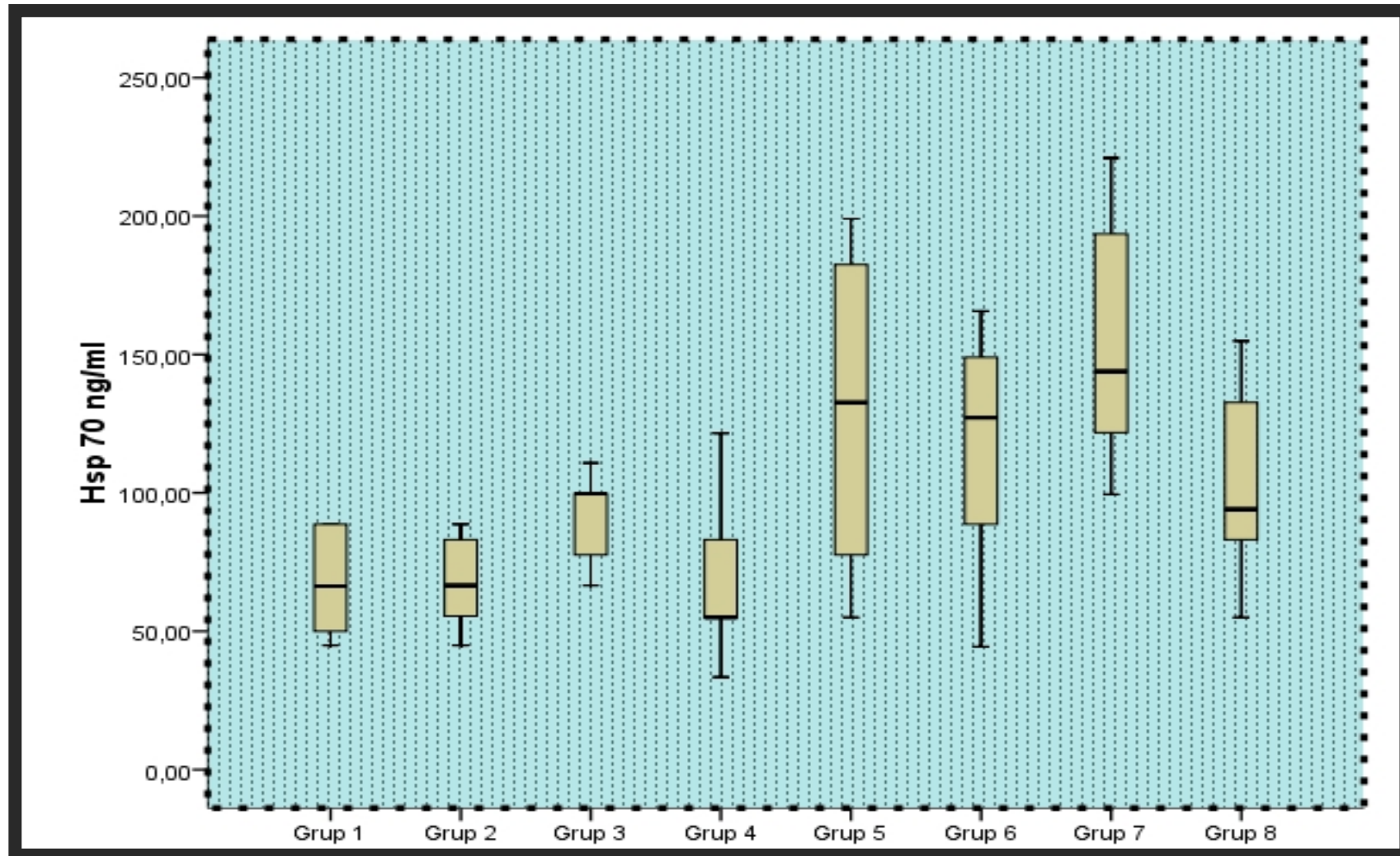
Grupların NO değerlerinin grafiksel gösterimi



Grupların 8-OH dG değerlerinin grafiksel gösterimi



Grupların Hsp 70 değerlerinin grafiksel gösterimi



TARTIŞMA VE SONUÇ

- Karaciger DNA'sında DEN'in 8 hidroksi deoksiguanozin (8-OH dG) düzeylerinin artışının DNA'nın oksidatif hasarını belirttiği rapor edilmiştir.



- 
- Tessitore L.(2000) ve Atakişi (2005)'nin çalışmalarında, DEN verilmesinin ardından ratların vücut ağırlığının azaldığını tespit etmişlerdir..
 - Bizim çalışmamızla paralellik göstermektedir ve çalışmamızda ratların vücut ağırlıkları 5 ve 7. Grubun vücut ağırlık ortalamasının düştüğünü görebiliriz.
 - DEN+2-AAF 'nin verildiği bir çalışma bulunmadığından karşılaştırma yapılamamıştır.

- Üstüner ve ark. (2006) DEN ve 2-AAF uyguladıkları ratların karaciğer doku hücrelerinde kontrol grubu ile karşılaştırdıklarında MDA düzeylerinde artış belirlemişlerdir.
- Grup 8 (DEN+2-AAF+ OCT) 'de karaciğer doku hücrelerinin MDA düzeylerinde azalış tespit edildi.
- Bu bulgulara göre OCT'nin MDA düzeylerini azalttığı belirlenmiştir.

- Chakraborty ve ark.(2003) yaptıkları farklı bir çalışmada, DEN ve 2-AAF'nin rat karaciğeri hücrelerinde SOD aktivitesini artırdığını belirlemişlerdir.
- Çalışmamızda Grup 6 ve 8'deki SOD aktive artışlarının, karsinogenlerin aşırı şekilde ürettiği serbest radikallere cevap olarak savunma sisteminde görev yaptığı düşünülebilir.

- DEN uygulanan ratlarda yapılan çalışmalarda GSH-Px aktivitelerinde kontrol grubuna göre DEN grubunda azalma belirlemişlerdir.
- Bizim çalışmamızda bu tür çalışmalarla paralellik göstermektedir.
- Grup 8 (DEN+2-AAF+OCT)'in GSH-Px aktivitelerinin Grup 7 (DEN+2-AAF)'e göre değerlendirilmesinde ilk kez denenmesi nedeniyle herhangi bir çalışmayla karşılaştırma yapılamamıştır.
- Ancak GSH-Px'in grup 7'e göre Grup 8'deki artış nedeninin OCT 'nin antioksidan veya karsinoid tümör inhibe etme özelliğinden kaynaklandığı düşünülebilir.

- DEN uygulanan ratlarda yapılan çalışmalarda kontrol grubuna göre DEN grubunun NO düzeylerinde azalış belirlemişlerdir.
- DEN ve 2-AAF yada sadece 2-AAF uygulanmış ratların karaciğer doku hücrelerindeki NO düzeylerini gösteren bir çalışma olmamasına rağmen daha önce yapılan farklı çalışmalarda serbest radikallerin NO düzeyini arttırdığına dair çalışmalar mevcuttur.
- Grup 8 'deki NO düzeylerinde 7.Gruba göre anlamlı azalışı, OCT'nin antioksidan veya karsinoid tümör inhibe etme özelliğinden kaynaklandığı düşünülebilir.

- 
- DEN ve 2-AAF uyguladıkları ratlarda karaciğer doku hücrelerinde DEN, 2-AAF ve DEN+2-AAF gruplarının CAT aktivitelerinde azalış olduğunu tespit etmişlerdir.
 - Bu tür çalışmalar yaptığımız çalışma ile paralellik göstermektedir.

- Philips ve ark.(2007) fareler üzerinde oluşturduğu kanser hücrelerinin Hsp 70 düzeylerinde normal hücre grubuna göre artış gösterdiğini tespit etmişlerdir.
- Ancak Grup 8' deki Hsp 70 düzeyinde ki artışı karşılaştıracak bir çalışma bulunmadığından daha önce bahsettiğimiz gibi OCT'nin karsinoid tümör inhibe edici özelliğinin yanında antioksidan özelliğinden kaynaklandığı düşünülebilir.

- 
- Çalışmamızda ratların karaciğer doku hücrelerinde 8-OHdG düzeyinin artışında kimyasal karsinojenler DEN ve 2-AAF'in neden olduğu düşünülebilir.
 - Sonuç olarak, çalışmamızda OCT'in antioksidan etkisi olduğu düşünülmüştür.

KAYNAKÇA

- Wood G. A, Sarma D. S. R. Archer M. C. Inheritance of Resistance to Promotion of Preneoplastic Liver Lesions in Copenhagen Rats. *Exp. Biol. Med.*, 26(9): 831-835(2001)
- Max . D. ,Max., Sui Y. F., Wang W. L., Wang C. M.: Signal Transduction of Gap Junctional Genes, Connexin 32, Connexin 43 In Human Hepatocarcinogenesis. *World J. Gastroenterol*, 9(5): 946-950 (2003)
- Arora A., Shukla Y.: Induction of Preneoplastic Altered Hepatic Foci Following Dietary Sulphur Supplementation. *Human&Experimental Toxicology*, 23: 227-232, 2005.
- Barbisan Spinardi A. L. T., Kaneno R., Rodrigues M. et al. V.: Lymphoproliferative Response And T Lymphocyte Subsets in a Medium- Term Multi-Organ Bioassay for Carcinogenesis in Wistar rats. *Cancer Letters* , 154: 121-129 (2000)
- Kuroda H., Ohtsuru A., Futakuchi M., Kawashita Y. ,et al : Distinctive Gene Expression of Receptor-type Tyrosine kinase Families during Rat Hepatocarcinogenesis. *International Journal of Molecular Medicine* 9: 473-480 (2002)
- Liu L.L., Gong L. K., Qi X. M., et al.: Altered Expression of Cytochrome P450 and Possible Correlation with Preneoplastic Changes in Early Stage of Rat Hepatocarcinogenesis. *Acta Pharmacologica Sinica* , 26(6): 737-744 (2005)

TEŞEKKÜR

EDERİM...

