

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**KARBON TETRA KLORÜR İLE KARACİĞER HASARI
OLUŞTURULAN SIÇANLARDA EPİGALLOKATEŞİN-3-
GALLAT'IN KASPAZ-3, BCL-2, NRF-2 VE NF-kB
PROTEİN EKSPRESYONUNA ETKİSİ**

Gamze GÜR KALMAZ

Yüksek Lisans Tezi
Biyoloji Anabilim Dalı
Danışman: Doç. Dr. Abdullah ASLAN

MAYIS-2018

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KARBON TETRAKLORÜR İLE KARACİĞER HASARI OLUŞTURULAN
SIÇANLARDA EPİGALLOKATEŞİN-3- GALLAT'IN KASPAZ-3, BCL-2, NRF-2 VE
NF-κB PROTEİN EKSPRESYONUNA ETKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Gamze GÜR KALMAZ

(151110103)

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 17 Nisan 2018

Tezin Savunulduğu Tarih: 8 Mayıs 2018

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Abdullah ASLAN (F.Ü.)



Diğer Jüri Üyeleri: Prof. Dr. Orhan ERMAN (F.Ü.)



Dr. Öğr. Üyesi Can Ali AĞCA (B.Ü.)



MAYIS-2018

ÖNSÖZ

Bu yüksek lisans tezinde, sıçanlara karbon tetraklorür (CCl₄) verilerek karaciğer hasarı oluşturuldu ve bu dokuda Epigallokateşin-3-gallat (EGCG)'ın, kaspaz-3, bcl-2, Nrf-2 ve NF-kB proteinlerinin ekspresyonlarına etkisi araştırılarak ve TUNEL metodu ile apoptozis düzeyi belirlenerek DNA'da meydana gelen hasar tespit edilmiştir.

Bu tez çalışmamın oluşum aşamasında ve tüm yüksek lisans eğitimimde gerek teorik gerek pratik alanda bana her zaman yol gösteren, yardımlarını, bilgi ve tecrübelerini her zaman yanımda hissettiğim tez danışmanım ve değerli hocam Sayın Doç. Dr. Abdullah ASLAN'a: çalışmamıza değerli katkılarından dolayı Sayın Dr. Öğr. Üyesi Tuncay KULOĞLU'na, bu çalışmaya maddi destek sağlayan Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Koordinasyon Birimi'ne (FÜBAP, F.F. 17.14) ve F.Ü. Rektörü Sayın Prof. Dr. Kutbettin DEMİRDAĞ'a, çalışmamızın deney hayvanları aşamasını yürüttüğümüz FÜDAM'ın değerli çalışanlarına; çalışmalar sırasında yardımlarından dolayı Özlem GÖK, Seda BEYAZ ve Emre ARSLAN'a Fırat Üniversitesi Biyoloji Bölümü'ndeki değerli hocalarıma teşekkür ediyorum. Ayrıca eğitim hayatım boyunca her zaman bana destek olan ve bu günlere gelmemde en büyük pay sahibi olan aileme ve eşime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Gamze GÜR KALMAZ

Elazığ-2018

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ	II
İÇİNDEKİLER.....	III
ÖZET	V
SUMMARY	VI
ŞEKİLLER LİSTESİ	VII
TABLOLAR LİSTESİ	VIII
SEMBOLLER VE KISALTMALAR	IX
1. GİRİŞ	1
1.1. Karaciğerin Anatomisi	2
1.2. Karbon Tetraklorür (CCl ₄)'ün Genel Özellikleri ve Toksisitesi.....	3
1.3. Apoptozis	4
1.3.1. Apoptotik Markerler (Kaspaz-3, Bcl-2, Nrf-2 ve NF-kB).....	6
1.4. EGCG ve Antioksidan Özellikleri	8
2. MATERYAL VE METOT.....	11
2.1. Materyal	11
2.1.1. Kimyasal Maddeler ve EGCG	11
2.2. Metot	11
2.2.1. Hayvan Materyali ve Araştırma Grupları	11
2.2.2. Karbon Tetraklorür Hazırlanması ve Uygulanması	12
2.2.3. Epigallocateşin-3- gallat Hazırlanması ve Uygulanması	12
2.2.4. Karaciğer Dokusu MDA Ölçümleri.....	12
2.2.5. Plazma MDA Ölçümleri	12
2.2.6. MDA Ölçümleri için Standart Eğri Çizimi.....	13
2.2.7. Western Blotlama Çalışması için Doku Homojenizasyonu.....	13
2.2.8. SDS-PAGE ve Western Blotlama Tekniği ile Kaspaz-3, Bcl-2, Nrf-2 ve NF-kB Proteinlerinin Analizi.....	13
2.2.8.1. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE).....	14
2.2.8.2. Western Blotlama ile Protein Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi.....	14
2.2.8.3. TUNEL Metoduyla Apoptozis Düzeylerinin Belirlenmesi	16
2.2.8.4. İstatistiksel Analizler	16

3.	BULGULAR.....	17
3.1.	Canlı Ağırlık Değişimi	17
3.2.	MDA Ölçüm Sonuçları.....	18
3.3.	Kaspaz-3, Bcl-2, Nrf-2 ve NF-kB Proteinlerinin Ekspresyon Düzeyleri (ApoptotikMarkerlar)	20
3.3.1.	Kaspaz-3 Protein Ekspresyon Düzeyleri	20
3.3.2.	Bcl-2 Protein Ekspresyon Düzeyleri	21
3.3.3.	Nrf-2 Protein Ekspresyon Düzeyleri	21
3.3.4.	NF-kB Protein Ekspresyon Düzeyleri	22
3.4.	TUNEL Metoduyla Belirlenen Histolojik Sonuçlar	23
4.	SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	26
	KAYNAKLAR	31
	ÖZGEÇMİŞ	38

ÖZET

Epigallokateşin-3-gallat (EGCG) doku hasarı, kanser oluşumunu önleme ve metabolizma hızını arttırmada etkili bir polifenoldür. Bu tez çalışmasında, 28 adet Wistar albino (n=28, 8 haftalık) sıçan kullanılmıştır. Sıçanlar 4 gruba ayrılmış ve her grupta 7 sıçan yer almıştır. Gruplar: (i) Kontrol Grubu: Standart diyet; (ii) EGCG Grubu (50 mg/kg CA, ip): Standart diyet + EGCG verilen grup; (iii) CCl₄ Grubu (1,5 ml/kg CA, ip): Standart diyet + CCl₄ verilen grup; (iv) CCl₄ + EGCG Grubu: Standart diyet + CCl₄ (1,5 ml/kg CA, ip) + EGCG (50 mg/kg CA, ip) verilen grup. Hayvanlar 4 hafta sonra dekapite edilerek karaciğer dokuları incelenmiştir. Karaciğer dokusunda kaspaz-3, bcl-2, Nrf-2 ve NF-kB ekspresyon düzeyleri Western blotlama tekniğiyle, lipid peroksidasyonu MDA (malondialdehit) analizleri spektrofotometre ile belirlenmiştir. EGCG uygulamasının, CCl₄ + EGCG grubunda, CCl₄ grubuna göre kaspaz-3, bcl-2, Nrf-2 ve NF-kB ekspresyonları bakımından anlamlı bir fark oluşturduğu bulunmuştur (p<0.05). EGCG uygulamasıyla, kaspaz-3 ve Nrf-2 ekspresyon düzeyleri artış, MDA düzeyi azalış buna karşın bcl-2 ve NF-kB ekspresyon düzeyleri azalış göstermiştir. TUNEL metodu incelemelerinde, CCl₄ + EGCG grubunda CCl₄ grubuna göre apoptotik indeks oranının daha düşük olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlar, EGCG'nin Wistar albino sıçanlarda karaciğer hasar oranını azalttığı ve EGCG uygulamasının insanlarda da karaciğer hasarını azaltıcı etkisinin olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Epigallokateşin-3-gallat, Apoptozis, Kaspaz-3, Bcl-2, Nrf-2, NF-kB

SUMMARY

The Effect of Epigallocatechin-3-Gallate on Caspase-3, Bcl-2, Nrf-2 and NF-kB Protein Expression in Rats with Carbon Tetrachloride-induced Liver Damage

Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) is a polyphenol that is effective in preventing tissue damage, cancer formation and increasing metabolism. In this thesis, 28 Wistar albino rats (n = 28, 8 weeks old) used. Animals were divided into four groups, and 7 rats involved in each group. The groups were: (i) Control Group: Standard diet; (ii) EGCG Group (50 mg/kg Live Weight (LW), ip): Standard diet + EGCG; (iii) CCl₄ Group (1,5 ml/kg LW, ip): Standard diet + CCl₄; (iv) CCl₄ + EGCG Group: Standard diet + CCl₄ (1,5 ml/kg LW, ip)+ EGCG (50 mg/kg LW, ip). The animals were decapitated after 4 weeks and liver tissues were examined. Expression levels of caspase-3, bcl-2, Nrf-2 and NF-kB in the liver were determined by western blot technique, lipid peroxidation MDA (malondialdehyde) analysis by spectrophotometer. EGCG application, in the CCl₄ + EGCG group, when compared to the CCl₄ group, caspase-3, bcl-2, Nrf-2 and NF-kB expressions and MDA level create a significant difference (p<0.05). Caspase-3 and Nrf-2 expression level increased, MDA level decreased but bcl-2 and NF-kB expression level was decreased, through the application of EGCG. The rate of apoptotic index was observed decrease in the CCl₄ + EGCG group than the CCl₄ group at TUNEL assay examinations. These results shows that EGCG reduce the rate of liver damage at Wistar albino rats and these findings will be guiding in research of inhibitory effect of liver damage of humans like rats.

Key Words: Epigallocatechin-3-gallate, Apoptosis, Caspase-3, Bcl-2, Nrf-2, NF-kB

ŞEKİLLER LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1.1. Karaciğerin kesiti	2
Şekil 1.2. CCl ₄ 'ün moleküler yapısı ve bazı özellikleri	4
Şekil 1.3. Apoptozise uğrayan bir hücrenin ölüm aşamaları.....	5
Şekil 1.4. Bir hücredeki apoptozis aşamaları	6
Şekil 1.5. EGCG'nin kimyasal formülü ve yapısı	8
Şekil 1.6. EGCG mekanizması.....	10
Şekil 3.1. Gruplarda görülen bitiş canlı ağırlık oranları.....	17
Şekil 3.2. Deney grupları.....	18
Şekil 3.3. MDA standart eğrisi.....	19
Şekil 3.4. Karaciğer dokusunda gruplar arasında MDA düzeylerinin karşılaştırılması.....	19
Şekil 3.5. Gruplar arasında plazma MDA düzeylerinin karşılaştırılması.....	20
Şekil 3.6. Gruplara göre kaspaz-3 protein ekspresyon düzeyleri	20
Şekil 3.7. Gruplara göre bcl-2 protein ekspresyon düzeyleri	21
Şekil 3.8. Gruplara göre Nrf-2 protein ekspresyon düzeyleri	21
Şekil 3.9. Gruplara göre NF-kB protein ekspresyon düzeyleri	22
Şekil 3.10. Kontrol grubu karaciğer dokusundaki TUNEL pozitif hücreler	23
Şekil 3.11. EGCG grubu karaciğer dokusundaki TUNEL pozitif hücreler.....	23
Şekil 3.12. CCl ₄ grubu karaciğer dokusundaki TUNEL pozitif hücreler.....	24
Şekil 3.13. CCl ₄ + EGCG grubu karaciğer dokusundaki TUNEL pozitif hücreler	24

TABLÖLAR LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1.1. Bir fincan yeşil çayda bulunan bileşenlerinin miktarı	9
Tablo 3.1. Grupların başlangıç ve bitiş canlı ağırlıkları	17
Tablo 3.2. Çalışma gruplarından elde edilen plazma ve karaciğer dokusu MDA seviyeleri.....	18
Tablo 3.3. TUNEL metoduyla belirlenen apoptotik indeks (%).....	24



SEMBOLLER VE KISALTMALAR

AI	: Apoptotik indeks
CA	: Canlı Ağırlık
CCl₄	: Karbon Tetraklorür
ConA	: KonkanavalinA
DAB	: Diaminobenzidine
DT	: Domates Tozu
EA	: Ellagaik Asit
EGCG	: Epigallokateşin-3-Gallat
EP	: Etil Pirüvat
FÜDAM	: Fırat Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezi
hARE	: İnsan Antioksidan Yanıt Elemanı
IRI	: İskemi-reperfüzyon
İP	: İntra Peritoneal
K	: Kontrol
LDL	: Düşük Dansiteli Lipoprotein
MDA	: Malondialdehit
PBS	: Fosfat tamponu
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
SAB	: Örnek Uygulama Tamponu
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
SOD	: Super Oksit Dismutaz
TUNEL	: Terminal Deoksinükleotidil Transferazd UTP Çentik Etiketleme
WSDF	: Propolis Türevi

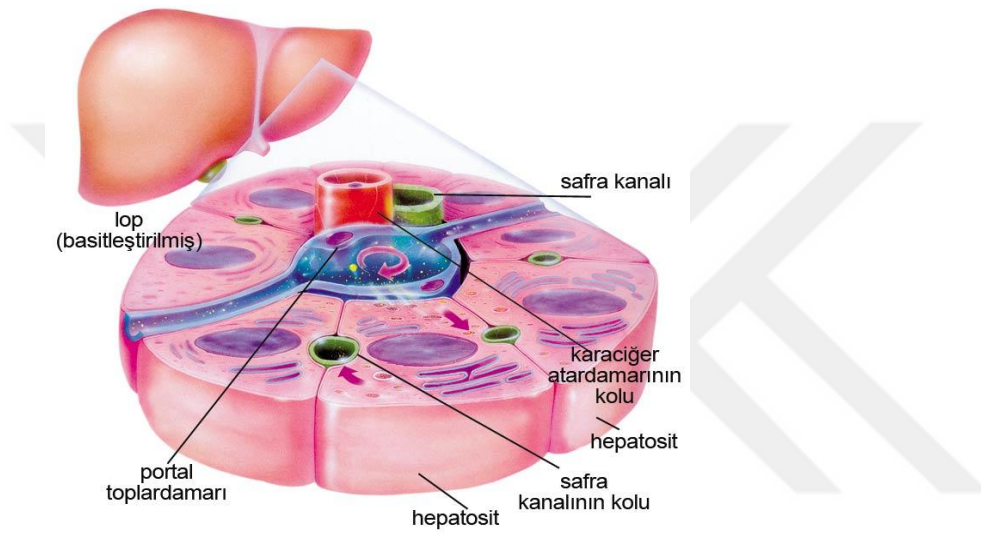
1. GİRİŞ

Yapılan çalışmalarda, yeşil çay içerisinde bulunan EGCG'nin, antioksidatif, antienflamatuar, antimutajenik, antikarsinojenik, antianjiyojenik, apoptotik, antiobezite, antidiyabetik, antibakteriyal ve yaşlanmayı geciktirici gibi farmakolojik özelliklere sahip olduğu belirtilmiştir (Çelik, 2006). Ayrıca yapılan *in vivo* ve *in vitro* deneysel çalışmalara göre, EGCG'nin başta karaciğer, kolon, mide, özofagus ve akciğer kanserleri başta olmak üzere prostat, meme ve cilt kanseri gibi birçok kanser türüne ve doku hasarına karşı koruyucu görevi üstlendiği tespit edilmiştir (Sharangi, 2009; Kayaalp, 2009). Yeşil çay içenlerde kardiyovasküler hastalıklar daha az görülmekte, kolesterol ve okside LDL düzeylerini düşürmektedir. Kan şekerini düşürerek tip II diyabetten korunmayı sağlamaktadır ve obeziteyi önleyebilmektedir (Yazıcı ve Güner-Akdoğan, 2010). Karaciğer, canlı sistemlerde meydana gelen metabolik aktivitelere bağlı olarak toksik madde ve ilaçlara yoğun olarak maruz kalan bir organdır (Erdoğan vd., 2004). Ayrıca sindirim sistemi ve dolaşım sistemi arasındaki konumu ve sahip olduğu önemli görevlerinden dolayı çoğu zaman hasara uğrayabilmektedir. Bu süreç, etkili bir onarımla cevaplanmazsa normal karaciğer yapısı bozulabilir. Normal şartlarda iç ve dış kökenli çoğu stres faktörü hücrel homeostaziyi daima değiştirmektedir. Antioksidanlar bu faktörlere karşı hücreyi sürekli korumaktadır (Akşit vd., 2015). Tıbbi bitkilerde bu antioksidanların bulunmasıyla sağlık alanında kullanımları artmış ve birçok hastalığın tedavisinde olumlu sonuçlar verebilmiştir. Örneğin, çay tüketimi ile değişik kanser türleri arasındaki bağlantılar, birçok kişi tarafından araştırılmıştır ve çayın sağlığı etkileyen olumlu etkileri, yapılan bu çalışmalar ile ortaya konulmuştur. Çaydaki flavinlerin ve özellikle yeşil çayda fazlaca bulunan kateşinler gibi (EGCG) polifenollerin antioksidan etkilerden sorumlu olduğu belirtilmektedir (Çelik, 2006).

Bu bilgiler doğrultusunda bu yüksek lisans tezinde, CCl₄ ile karaciğer hasarı oluşturulan sıçanlarda EGCG'nin moleküler marker olarak kullanılan kaspaz-3, bcl-2, Nrf-2 ve NF-kB protein ekspresyonlarına ve DNA hasarına karşı koruyucu etkisi araştırılmıştır.

1.1. Karaciğerin Anatomisi

Karaciğer, vücudun en kompleks ve en önemli organlarından biridir (Şekil 1.1). Ksenobiyotiklerin sentezi, salgılanması ve metabolizması da dahil olmak üzere vücudun çeşitli fizyokimyasal işlevlerinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Karaciğer vücudumuzdaki toksik kimyasalların ve ilaçların detoksifikasyonundan sorumlu hayati organlardan biridir. Böylece tüm zehirli kimyasalların hedef organıdır (Vuda vd., 2012).



Şekil 1.1. Karaciğerin kesiti (URL-1, 2018)

Karaciğer, karnın sağ üst bölümüne yerleşmiş olup aşağıda duodenuma (oniki parmak bağırsağı), sağ böbreğe, ortada ise özofagus ve mideye komşudur. Deriden sonra hacimce en büyük iç organdır. Karaciğerin ağırlığı, yaklaşık 1200-1600 gr arasındadır. Erişkinlerde yaklaşık 1,5 kg ağırlığa sahiptir ve erişkin vücut ağırlığının yaklaşık %2,5'ine denk gelmektedir. Karaciğer yüzeyinin tamamı ince bağ dokusundan oluşan düzgünce sıralanmış kollogen lifler, fibroblastlar ve ince kan damarlarından oluşan Glisson kapsülü ile örtülüdür (Aycan, 2015). Sindirim kanalından geçen besinlerin işlenip vücuttaki diğer bölgelerin faydalanması için bir kısmının depolandığı diğer bir kısmının ise hemen dolaşıma verildiği bir organdır. Ayrıca protein sentezi, safra salgılanması, kanın depo edilmesi, detoksifikasyon ve inaktivasyon karaciğerin fonksiyonlarından birkaçıdır. Karaciğer hasarı da denilen hepatoksisite (hepatik toksisite) organizmanın doğal toksinler,

pestisitler, ilaçlar gibi birçok kimyasallarla karşı karşıya kalmaları nedeniyle oluşmaktadır. Saydığımız bu kimyasallara da hepatotoksin denilmektedir (Çolak, 2011).

Karaciğerin inanılmaz bir kendini yenileme yeteneği vardır. Karaciğer dokusunun ameliyatla çıkarılması ya da zararlı maddelerin etkisiyle yok edilmesi dokunun kütlesi oluşuncaya kadar devam eden hücrelerinin bölünmesini başlatır. Yenilenmesi şalon (Chalon) adındaki mitoz inhibitör maddeleri ile sağlanmaktadır. Doku hasara uğradığında ya da kısmen çıkarıldığında, Chalon'ların sayısı azalır ve bununla birlikte dokudaki hücre bölünmesinde artış gözlemlenir, fakat yenilenme devam ederse Chalon'ların sayısı artar ve hücre bölünmesi azalır (Aras, 2016).

1.2. Karbon Tetraklorür (CCl₄)'ün Genel Özellikleri ve Toksisitesi

Karbon tetraklorür (CCl₄) peroksidan aktivitesi gösterdiği bilinen bir madde olup hızlıca buharlaşabilen, renksiz, koyu, yanıcı olmayan bir sıvıdır. Ortamda kendiliğinden var olabildiği gibi çoğu kimyasal reaksiyon neticesinde ürün olarak ortaya çıkabilmektedir. CCl₄, lipit peroksidasyonun belirlenmesinde ayraç olarak kullanılan malondialdehit (MDA) seviyelerinde artışa ve uzun vadeli uygulanması kronik karaciğer hasarına yol açmaktadır. Bu özelliklerinden dolayı da karaciğer tedavisi üzerinde etkili olabilecek moleküler biyolojik yolların değerlendirilmesi için bilimsel araştırmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Aslan ve Can, 2014; Tang vd., 2017; Güven ve Gülmez, 2003; Thrall vd., 2000).

CCl₄, endoplazmik retikulumdaki sitokrom P-450'nin indirgenmesi ile triklorometile (CCl₃), daha sonra oksijen varlığında proxy triklorometil radikali (CCl₃O₂)'ne dönüştürülmektedir. CCl₄'ün metabolize edilmesi sonucunda meydana gelen bu serbest radikaller, çoklu doymamış yağ asitleri ile tepkimeye girebilmektedir. Öte yandan, antioksidan enzim aktivitesini azaltarak, hücre zarında lipit peroksidasyonunu indükleyen reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumuna neden olabilmektedir. Böylece, CCl₄, kalsiyum iyonlarının plazma zarından geçirgenliğini arttırarak kalsiyum dengesinde önemli ölçüde bozulmalara ve sonuçta nekrozise sebep olabilmektedir (Gök, 2017). CCl₄ ilk olarak yağ dokusuna yerleşmektedir. Daha sonra buradan ayrılıp akciğerlere geçiş yapmaktadır. Akciğerlerde değişime uğrayan CCl₄'ün çok az bir miktarı nefesle dışarı verilir, geri kalanı ise hücre içi moleküllerle tepkimeye girer (Al-Dbass vd., 2012; Tanrıverdi, 2005; Aslan ve Can, 2014; Can, 2014).

Karbon tetraklorür yoğun buharı nedeniyle kendine özgü bir kokuya sahiptir. 23°C’de katı halde olup ve 77°C’de kaynayan CCl₄’ün yoğunluğu, 1,585 g/cm³tür. Atomik yapısı merkezinde karbon atomu olup çevresinde dört adet Cl atomu bulunmaktadır (Şekil 1.2). Apolar yapıdadır ve suda çözünmez. Karbon tetraklorür zehirli bir sıvı olup uzun süre buharının solunması veya deri ile temas edilmesi mide bulantısına yol açabilir. Bu durum devam ederse karaciğer ile birlikte birçok organ zarar görür ve ölüm ile sonuçlanabilir (URL-2, 2017).

Formül: CCl₄

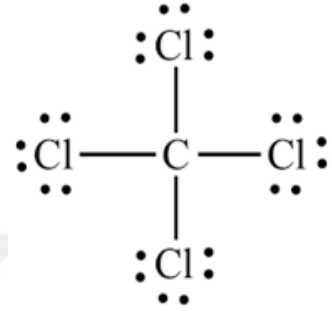
Yoğunluk: 1,5867g/cm³

Erime noktası:-22,92

Kaynama noktası: 76,72°C

Molar kütlesi: 153,82 g/mol

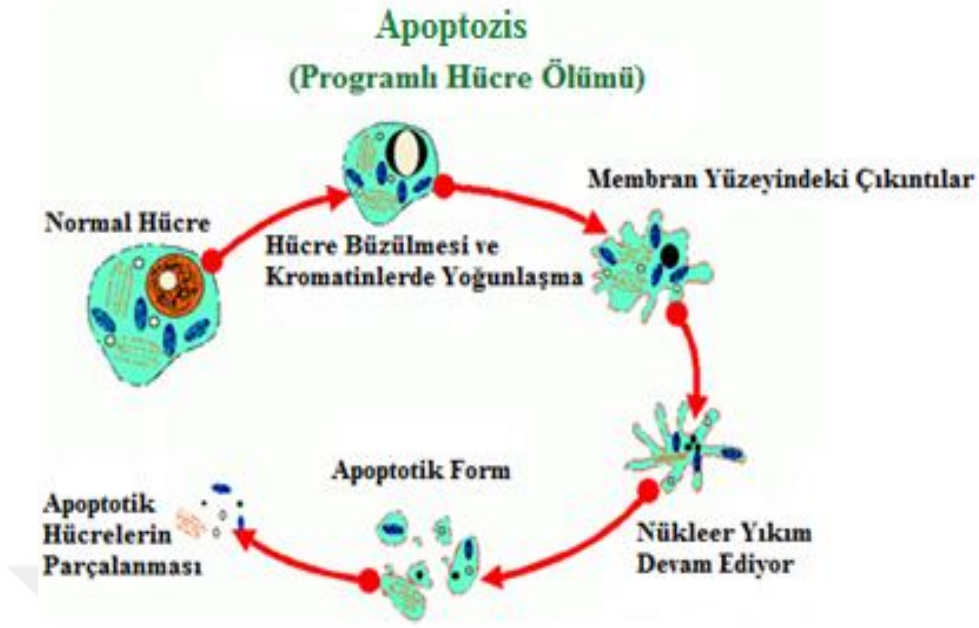
İçinde çözünebildiği maddeler: Karbondisülfür (CS₂), Eter, Formik asit, Benzen, Alkol, Kloroform



Şekil 1.2. CCl₄’ün moleküler yapısı ve bazı özellikleri (URL-3, 2018)

1.3. Apoptozis

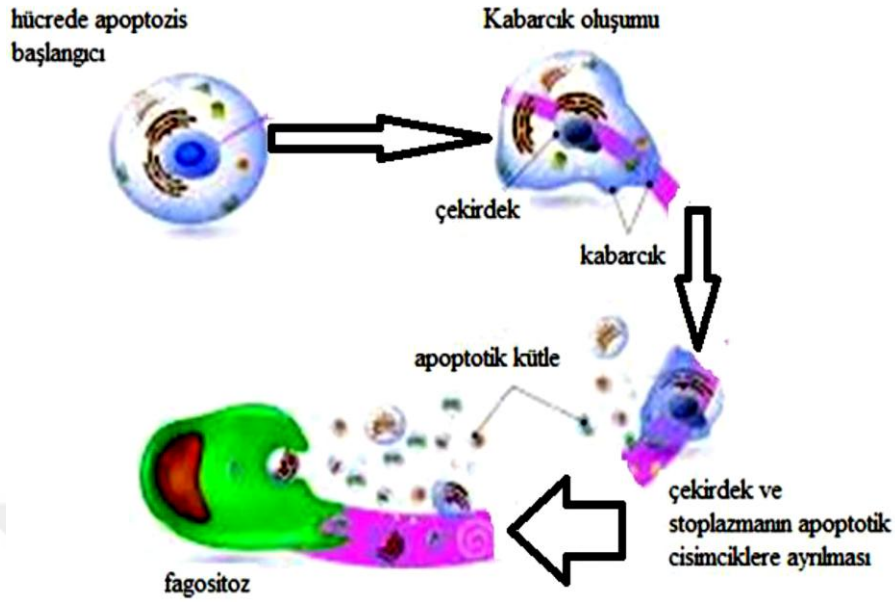
Çok hücrelilerde bir hücre diğer hücreleri kötü olarak etkiliyorsa veya çevresindeki hücrelerden gerekli olan sinyali alamıyorsa bu hücrenin yok edilmesi gerekmektedir. Metamorfoz esnasında kuyruğu olan yavru kurbağanın büyürken bu hücrelerini tahrip ederek kuyruğun yok olması örnek verilebilir. İşte bu durumlarda patolojik ya da çevreden gelen fizyolojik uyarılara karşı bir cevap olarak apoptozis olayı ortaya çıkmaktadır. Apoptozis tip I programlı (kontrollü) hücre ölümüdür. Bu deyim yunanca Apo (ayrı) ve Pzotis (düşmek) kelimelerinden oluşmaktadır (Dilsiz, 2004).



Şekil 1.3. Apoptozise uğrayan bir hücrenin ölüm aşamaları (URL-4, 2018)

Apoptozis, sinyal yolları, tetikleyiciler, genler, proteinler ve moleküllerin büyük bir bölümünü içeren bir sistemdir. Başlatma safhası ve uygulama safhası olarak iki farklı evreden oluşmaktadır. Başlatma evresinde birbirinden farklı proteinler bulunur ve oldukça komplekstir. Hücre dışından veya içinden gelen çeşitli sinyaller ile başlatılır. Apoptozisi tetikleyen hücre dışı sinyallere büyüme faktörlerinin kaybı, hipoksi ve radyasyon, intrasellüler sinyallere ise DNA hasarı, kemoterapi ilaçlarının neden olduğu hasar, telomer arızası ve virüs enfeksiyonu örnek olarak verilebilir. Apoptoziste yürütme safhasını başlatma safhası tetiklemektedir. Uygulama safhasında ise direk hücre ölümüyle son bulan özel enzimlerin (kaspaz ailesi, NF-kB, bcl-2, bax, Nrf-2 vs.) aktivasyonunu içermektedir (Şekil 1.3) (Morrill ve He, 2017).

APOPTOZİS



Şekil 1.4. Bir hücredeki apoptozis aşamaları (URL-5, 2018)

Apoptozis canlının deri ve ince barsak gibi organlarının hücrelerinde sürekli olarak devam etmekte ve bu döngü organizmanın hayatı boyunca sürmektedir. Her bir saniyede yaklaşık 1 milyon hücremiz apoptozis ile yok edilmektedir. Bu hücrelerin yerine ise mitozla yerine yenileri meydana getirilmektedir. Bu şekilde bir denge var olmaktadır. Apoptoziste görevli olan genlerin sentezlediği proteinler; hücreleri yok eden, DNA'larını parçalayan ve bunları sindiren olmak üzere üçe ayrılmaktadır. Örneğin kaspazlar DNA onarımında görevli olan polimerazların parçalanmasına ve apoptozisin oluşumuna olanak sağlamaktadır. Apoptozis hata gösterdiğinde tümörögenesis ve neticede kanser vb. hastalıklar meydana gelmektedir (Dilsiz, 2004).

Apoptoziste özetle, hacmi küçülen hücre parçalanır ve apoptotik cisimler ortaya çıkmaktadır. Bu cisimler sonrasında makrofajlar tarafından, komşu epitel hücrelerce ya da fagositozla yutulmaktadır (Şekil 1.4) (Dilsiz, 2004).

1.3.1. Apoptotik Markerler (Kaspaz-3, Bcl-2, Nrf-2 ve NF-kB)

Apoptozis, canlının gelişme aşamasında bazı hücre türlerinin yıkımı olurken özel hücrelerin de yok olmasından sorumludur. Yıkım az olursa hücre sayıca artar, fazla olursa azalır ve engellenemeyen bir doku hasarı meydana gelir. Apoptozis miktarı birçok yöntemle hesaplanabilmektedir (Thompson, 1994; Hugle ve Fulda, 2015). Canlının

DNA'sında bir dejenerasyon olduğu zaman apoptozis yoluyla hasarlı olan hücre yok edilir. Bu şekilde DNA'sında sakıncalı mutasyon bulunan hücrelerin kanser oluşturması engellenmiş olur (Aslan ve Can, 2014).

Kaspaz ailesi, apoptozisin başlatılması ve uygulanmasında kritik roller oynamaktadır (Mishra ve Vinayak, 2015). Kaspazlar hücrede sitoplazmada bulunup apoptoz ile alakalı iki farklı enzim grubundan oluşmaktadır; başlatıcı kaspazlar ve uygulayıcı kaspazlar. İnsan kan ve endotel hücrelerinde bulunan veziküller, kaspaz-3 içermektedir. Kaspaz-3 içeren bu veziküllerin salınımı ve inhibisyonu apoptozun indüksiyonunu önleyebilmektedir. Ayrıca DNA polimeraz aktivitesini baskılayarak hücreyi apoptozise yönlendirmektedir (Aslan, 2011; Can, 2014; Böing vd., 2013).

Antiapoptotik bir protein olan bcl-2, kanser tedavisi için ideal bir hedef haline gelmiş olmakla birlikte normal hücrelere kıyasla birçok kanserde yüksek oranda etkili bir proteindir. Bcl-2 ağırlıklı olarak sitoplazmada mitokondri zarı üzerinde konumlanmış olup porlarının geçirgenliğini denetleyen ve apoptozisin düzenlenmesinde merkezi role sahip bir onkoprotein grubudur (Aslan, 2011; Can, 2014). Bcl-2 proteininin etkisiyle sitokrom c'nin salınması sonucu bcl-2 heterodimerleri biçimlenmekte ve böylece apoptozis önlenmiştir (Can, 2014; Altunkaynak ve Özbek, 2008; Radha ve Raghavan, 2017).

Tüm hücrelerde inaktif halde bulunan ve Nrf-2 aktivatörü tarafından serbest bırakılınca aktifleşen Nrf-2, apoptoziste rol alarak tümör önlenmesinde görevli olan önemli bir proteindir. Hücreyi koruma özelliğinden dolayı, kanserleşme olasılığını azaltarak mutasyona uğratmakla görevlidir. Eritroid 2'ye bağlı nükleer faktör (Nrf-2), transkripsiyon faktörlerinden cap'n'collar (Cnc) ailesinin bir üyesi olmakla birlikte ve sitoprotektif (doku koruyucu) genlerin indüklenebilen hücresel sisteminin ana regülatörüdür. Ayrıca Nrf-2 transkripsiyon faktörü, antiinflamatuvar ve nöroprotektif (nöron koruyucu) genlerin beraberinde faz II detoksifikasyon ve antioksidan genlerin önemli bir regülatörüdür. Nrf-2, faz I ve II detoksifikasyon enzimleri, antioksidan proteinler, antiinflamatuvar ve nöroprotektif faktörler, büyüme faktörleri, reseptörler ve diğer transkripsiyon faktörleri gibi geniş bir protein yelpazesini kodlamaktadır (Chu vd., 2017). Aktivatör ile serbest bırakılan Nrf-2 proteini hücre çekirdeğine geçerek insanlarda bulunan tüm antioksidan sistemin ana regülatörü olan hARE (insan antioksidan yanıt elemanı)'yi DNA'ya bağlar. Çekirdekte Nrf-2 aktifleşerek katalaz, glutatyon ve süperoksitdismutaz (SOD) gibi antioksidan enzimlerin üretimini teşvik etmektedir. Üretilen bu antioksidanlar sayesinde de yaşlanma ve hastalıklara karşı mücadele kolay hale gelebilmektedir (Cho ve Kleeberger,

2010; URL-6, 2017). NF-kB, tüm hücrelerde sitoplazmada inaktif halde bulunup çeşitli hücre içi ve dışı uyarıcılar (bakteriler, virüsler, büyüme faktörleri, kemoterapötik ajanlar, çeşitli fizyolojik, fiziksel ve oksidatif uyarılar) ile aktif hale geldiğinde çekirdeğe geçmektedir. Büyüme ve inflamasyon, tahriş, yaralanma veya enfeksiyona karşı vücudun tepkisi anlamına gelen bir proteindir. NF-kB 1986 yılında Baltimore ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmalar neticesinde bulunmuştur. İlk önce B lenfositlerin çekirdeklerinde 10 baz çifti uzunluğunda bir DNA bölgesine bağlanmış transkripsiyon faktörü olarak nitelendirilen NF-kB, zamanla bir çok organizmada ve çoğu hücre tipinde bulunup, birçok genin ekspresyonunun düzenlenmesinde önemli bir regülatör protein olduğu tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalarda tümörlerde NF-kB'nin tamamen veya sürekli baskılanmasının hücre çoğalmasını önlediği, hücre döngüsünü engellediği ve apoptozise neden olduğu gözlenmiştir (Bharti ve Aggarwal, 2002; Shishodia ve Aggarwal, 2004; Ekinci ve Memis, 2008;Sriram vd., 2009; Özkan, 2012).

1.4. EGCG ve Antioksidan Özellikleri

(-)-Epigallocatechin gallate

CAS No:

989-51-5 Product Structure

Synonyms:

(-)-cis-2-(3,4,5-Trihydroxyphenyl)-3,4-dihydro-1(2H)-benzopyran-3,5,7-triol 3-gallate

(-)-cis-3,3',4,5,5',7-Hexahydroxy-flavane-3-gallate

EGCG

Product Code:

FE09970

MDL No:

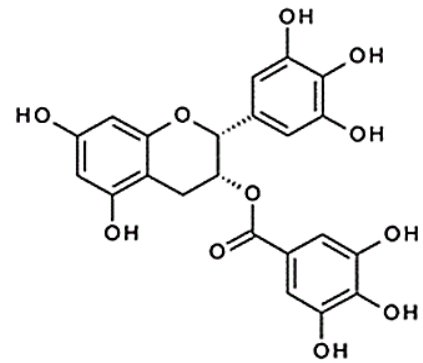
MFCD00075940

Chemical Formula:

C₂₂H₁₈O₁₁

Molecular Weight:

458.37



Şekil 1.5. EGCG'nin kimyasal formülü ve yapısı (URL-7, 2018)

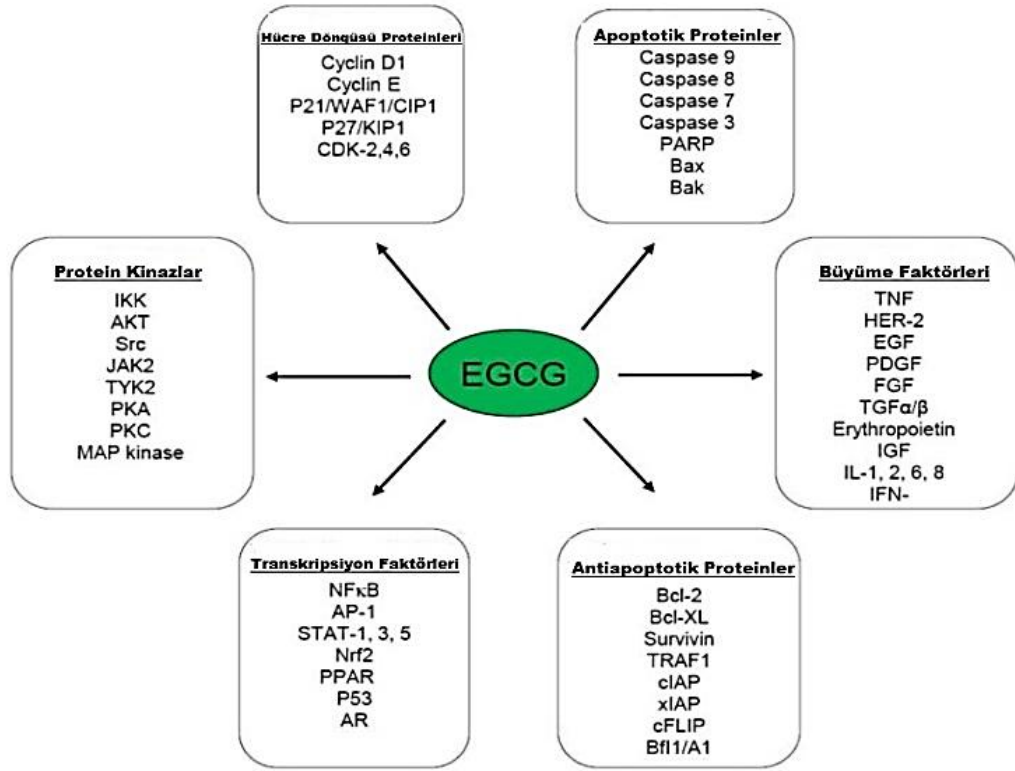
Yeşil çayın ham ekstraktlarında bulunan fenolik madde bileşimi, kateşin ve flavonol glikozitlerden meydana gelmektedir. Bu polifenoliklerde başlıca dört kateşin tespit edilmiştir. Bu kateşinlerin içinde en fazla bulunanı epigallokateşin-3-gallat (EGCG) olarak adlandırılmaktadır (Üstün ve Demirci, 2013; Chen et al. 2001). İçeriğindeki hidroksil gruplarından dolayı suda çözünebilir (Şekil 1.5). Yapılan çoğu çalışmalarda özellikle yeşil

Çayda bulunan EGCG'nin hücre büyümesini durdurmadan kanserli hücrelerin çoğalmasını engellediği, doku hasarlarına karşı koruyucu olduğu belirtilmektedir (Sun vd., 2006).

Tablo 1.1. Bir fincan yeşil çayda bulunan bileşenlerinin miktarı (stn ve Demirci, 2013)

Bileřen	Yeşil ay
EGCG	60-125mg
Theaflavinler	-
Kafein	20-50mg
L-Theanine	20-40mg

Kanserli hücrelerde kinazların aşırı ekspresyonu (şekil 1.6), bazı transkripsiyon faktörlerinde azalışa, hücre döngüsü proteinlerinin ekspresyonlarında ise bazı değişikliklere neden olmaktadır. EGCG hücrelerin hızlı bir şekilde çoğalmasına sebep olan bu protein kinazları ve gen düzenlenmesinde görevli transkripsiyon faktörlerini baskılayarak kanser oluşumunu engellemektedir. Onkoproteinler; onkagenler aracılığıyla oluşmaktadır ve DNA transkripsiyonunu devamlı hale getirebilmektedir. EGCG bu onkoprotein oluşumunu hücre döngüsünde görev alan CDK gibi proteinlerin salgılanmasını duraklatarak engelleyebilmektedir. Ayrıca EGCG bcl-2, survivin gibi antiapoptotik proteinlerin ekspresyonlarında azaltıcı, kaspaz-3, Nrf-2, bax gibi apoptotik proteinlerin ekspresyonlarında ise arttırıcı etki göstermektedir. Apoptotik proteinlerin artışı da sitokrom c'nin salgılanmasını sağlayarak büyüme faktörlerini inhibe eder ve böylece hücreyi apoptozise yönlendirmektedir (Singh vd., 2011).



Şekil 1.6. EGCG mekanizması (Singh vd., 2011)

2. MATERYAL VE METOT

2.1. Materyal

2.1.1. Kimyasal Maddeler ve EGCG

Western blotlama BIO-RAD Mini-PROTEAN®3 Cell jel elektroforez sistemi ile yapılmıştır, kullanılan primer antikorlar (anti-kaspaz-3 sc-70497, anti-bcl-2 sc-509, anti-Nrf-2 ab137550, anti-NF-kB sc-8008) ve sekonder antikor (sc-516102) Santa Cruz Biotechnology ve Abcam'den sağlanmıştır.

Bu tez çalışmasında kullanılan bütün kimyasallar, Sigma-Aldrich, Bio-Rad, BioShopve Merck'ten, EGCG (FE09970) ise CARBOSYNTH'den temin edilmiştir.

2.2. Metot

2.2.1. Hayvan Materyali ve Araştırma Grupları

Çalışmamızın hayvan deneyleri bölümü, F.Ü. Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'nun 17.03.2017 toplantı tarihi, 2017-31 protokol numaralı ve 73 karar nolu izni ile F.Ü. Deney Hayvanları Araştırma Merkezi'nde (FÜDAM) gerçekleştirilmiştir.

Çalışmada 28 adet Wistar albino (n=28, 8 haftalık) sıçan kullanılmıştır. Sıçanlara gün içinde 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık olacak biçimde bir aydınlatma periyodu uygulanmıştır. Sıçanlar canlı ağırlıkları (CA) birbirine yakın olacak şekilde 4 gruba ayrılmıştır. Gruplar: (i) Kontrol Grubu: Standart diyet ile beslenen, CCl₄ ve EGCG verilmeyen grup; (ii) EGCG: Standart diyet ile beslenen, CCl₄ verilmeyen fakat EGCG (50 mg/kg CA, ip) verilen grup; (iii) CCl₄ Grubu: Standart diyet ile beslenen ve CCl₄ verilen grup (1,5 ml/kg CA, ip); (iv) CCl₄ + EGCG Grubu: CCl₄ (1,5 ml/kg CA, ip) ve EGCG (50 mg/kg CA, ip) verilen grup. Sıçanların CA eşit olacak şekilde ayarlanıp gruplar oluşturulmuştur. CA çalışma süresince haftalık olarak kayıt altına alınmıştır. Yem ve su, çalışma süresince *ad libitum* olarak verilmiştir. Araştırma sonucunda sıçanların karaciğer dokuları alınarak gerekli analizler yapılmıştır. Ayrıca kan, akciğer, böbrek, kas ve beyin dokuları da alınmış ve başka çalışmalar için kullanılacaktır.

2.2.2. Karbon Tetraklorür Hazırlanması ve Uygulanması

Karbon tetraklorür, sıçanların CA'ları birbirine yakın olacak şekilde 4 gruba ayrıldıkları ilk günden başlanarak, dört hafta süresince haftada iki kez 1,5 ml/kg CA intraperitoneal (karın zarı içine) olarak, 1:3 oranında zeytinyağı ile karıştırılarak enjekte edilmiştir (Aslan ve Can, 2014).

2.2.3. Epigallokateşin-3- gallat Hazırlanması ve Uygulanması

0,2 gr Epigallokateşin-3-gallat tartıldı ve 15 ml serum fizyolojik içerisinde çözüldükten sonra hayvanlara ikinci haftadan itibaren haftada üç kez intraperitoneal, 50 mg/kg CA dozlarında yapılmıştır. Çalışma 4 hafta devam etmiştir (Tipoe vd., 2010).

2.2.4. Karaciğer Dokusu MDA Ölçümleri

Karaciğer dokusu küçük parçalara bölünerek 0,5 gram dokuya karşılık 4,5 ml % 1,15'lik potasyum klorür ile cam homojenizatörde parçalanmıştır. Hazırlanan bu homojenattan MDA tayini Ohkawa vd., (1979) yöntemine göre bazı değişiklikler yapılarak ölçülmüştür. Bu metot'da, 0,1 ml doku homojenatına % 8,1 sodyum dodesil sülfat (SDS), 750 µl % 20'lik (pH: 3,5) asetik asit solüsyonundan eklenmiştir. Ardından 750 µl % 0,8'lik (pH: 3,5) tiyobarbütirik asit (TBA) solüsyonundan eklenmiştir. Son hacmi 4 ml olacak şekilde saf su eklenerek 95°C'de kaynar su banyosunda 45 dk bekletilmiştir. Daha sonra soğutulularak 1 ml distile su ve 15:1 (v/v) oranında 5 ml n-butanol-piridin çözeltisinden eklenip vortekslenmiştir. 5000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek en üstteki organik tabaka alınıp 532 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Sonuçlar nmol/g olarak hesaplanmıştır (Ohkawa vd., 1979; Aslan ve Can, 2014).

2.2.5. Plazma MDA Ölçümleri

Örneklerden 200 µl alınıp üzerlerine % 8,1 SDS'ten 200 µl ilave edilmiştir. % 20'lik asetik asit'ten (pH: 3,5) 1,5 ml ve % 0,8'lik (pH: 3,5) TBA'dan 1,5 ml eklenerek son hacmi 4 ml'ye distile su ile tamamlanmıştır. Hazırlanan bu karışım 95°C'de kaynar su banyosunda 1 saat bekletilip soğutulduktan sonra 1 ml distile su 15:1 (v/v) oranında 5 ml

n-butanol-piridin karışımından eklenerek vortekslenmiştir. 4000 rpm’de 15 dakika santrifüj edilip daha sonra üst kısımdaki organik tabaka alınıp 532 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Sonuçlar nmol/ml olarak hesaplanmıştır (Ohkawa vd., 1979; Aslan ve Can, 2014).

2.2.6. MDA Ölçümleri için Standart Eğri Çizimi

MDA stoklarından (1,1,3,3 tetramethoksiopropan) 10 µl alınıp 100 ml saf suya tamamlanmıştır. Eğri çizimi için günlük standarttan saf suyla 40, 20, 10, 8, 5, 4 oranında seyreltme yapılarak 15, 30, 60, 75, 121, 151 n/mol değişiminde çalışma standartları hazırlanmıştır (Antmen, 2005). Daha sonra, yukarıda anlatılmış olan MDA prosedürüne göre basamaklar uygulanarak sonuçlar doku için nmol/g; plazma için nmol/ml olarak kaydedilmiş ve standart eğri grafiği çizilmiştir.

2.2.7. Western Blotlama Çalışması için Doku Homojenizasyonu

Karaciğer doku örnekleri, küçük parçalar şeklinde kesilerek cam homojenizatör de lizis tamponu (0,5 M Tris [pH: 8], EDTA, β-Merkaptoetanol, Fenil metil sülfonilflorid [PMSF]) içerisinde parçalanmıştır. Parçalanmış dokulara ait örnekler 15000 rpm’de 45 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrasında süpernatant alınıp kullanılıncaya kadar -80°C’de saklanmıştır (Aslan ve Can 2014).

2.2.8. SDS-PAGE ve Western Blotlama Tekniği ile Kaspaz-3, Bcl-2, Nrf-2 ve NF-kB Proteinlerinin Analizi

Moleküler belirteç olarak kullanılan bu proteinlerin dokulardaki sentez miktarları dokusal hasarların takibi açısından oldukça önemlidir. Bu çalışmada kaspaz-3, bcl-2, Nrf-2 ve NF-kB proteinlerinin hasarlı ve normal dokulardaki ekspresyon seviyeleri spesifik antikolar kullanılarak SDS-PAGE ve Western blotlama tekniği ile belirlenmiştir. Özetle, SDS-PAGE tekniği kullanılarak dokulardan alınan protein örnekleri % 12’lik jelde yürütülmüş, sonrasında bu proteinler (Kaspaz-3, Bcl-2, Nrf-2 ve NF-kB) western blotlama tekniği ile nitroselüloz membrana aktarılmıştır (Laemmli, 1970) ve ardından nitroselüloz

membrandaki protein ekspresyon düzeyleri yoğunluk belirleyici analiz sistemi ile ölçülmüştür (Image J; NationalInstitute of Health, Bethesda, USA).

2.2.8.1. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)

SDS-PAGE, BIO-RAD Mini-PROTEAN® 3 Cell jel elektroforez sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Proteinleri ayırmak için kullanılan jel şu şekilde hazırlanmıştır (Laemmli, 1970).

Ayrırma Jeli (Separating)'nin Hazırlanışı (% 12)

dH ₂ O	3,35 ml
1,5 M TrisHCl (pH: 8.8)	2,5 ml
% 10 SDS	100 µl
% 30 Akrilamid/Bis	4 ml
% 10 Amonyum Persülfat	75 µl
TEMED	15 µl

Yükleme Jeli (Stacking)'nin Hazırlanışı (% 4)

dH ₂ O	6,1 ml
0,5 M TrisHCl (pH: 6.8)	2,5 ml
% 10 SDS	100 µl
% 30 Akrilamid/Bis	1,3 ml
% 10 Amonyum Persülfat	60µl
TEMED	12 µl

Hazırlanan protein örnekleri kuyulara yüklenerek proteinlerin jelde ayrılması sağlanmıştır (Laemmli, 1970).

2.2.8.2. Western Blotlama ile Protein Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi

Western Blot Transfer Tamponu 5X

Glisin	4,3 g/300 ml
Trizma Base	5,81 g/300 ml
Metanol	75 ml/300 ml

dH₂O ile 300 ml'ye tamamlandı.

PBS (Phosphate Buffered Saline) 9X

1,45 M NaCl	84,74 g/l
0,075 M Na ₂ HPO ₄ .12 H ₂ O	26,8 g/l
0,025 M NaH ₂ PO ₄ .12 H ₂ O	3,9 g/l

PBS Tween-20

PBS	1000 ml
Tween-20	2 ml

Western Blotlama Sonrasında Nitroselüloz Membranda Protein Görüntüleme Solüsyonu

1 M Tris (pH: 6,8)	1,33 ml/40 ml
3,3''-Diaminobenzidin (DAB) tablet	4 tablet
% 30 H ₂ O ₂	40 µl/40ml
dH ₂ O ile 40 m'ye tamamlandı.	

Protein transferi işleminde blotlama öncesinde, SDS-PAGE ile proteinlerin jelde birbirinden ayrılması sağlanmıştır. Daha sonra blotlama yapılarak jelden nitrosülüloz membrana proteinler transfer edilmiştir. Blotlamanın ardından membran, PBS Tween-20'de (PBS yıkama solüsyonu) 15 dakika yıkanmıştır. Bir gece süt tozu içerisinde bekletilmiştir. Bloklamanın ardından 90 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Daha sonra 1:500 oranında seyreltilmiş primer antikor (anti-kaspaz-3 sc-70497, anti-bcl-2 sc-509, anti-Nrf-2 ab137550, anti-NFkB sc-8008) eklenerek 90 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. 15 dakika PBS solüsyonu yıkanmıştır. 1:1000 oranında seyreltilmiş sekonder antikor (sc-516102) eklenerek 90 dakika oda ısısında bekletilmiştir. Yine aynı şekilde PBS solüsyonu ile 15 dakika yıkanmıştır. Daha sonra Diaminobenzidin (DAB, Amresco), solüsyonu içerisinde bantlar belirgin hale gelinceye kadar bekletilmiştir. En sonunda da saf su içerisine alınarak reaksiyon durdurulmuştur. Bu metotta Aslan (2011)' in metodu dikkate alınarak uygulamalar yapılmıştır.

2.2.8.3. TUNEL Metoduyla Apoptozis Düzeylerinin Belirlenmesi

Parafin bloklardan 5-6 µm kalınlığında kesitler alınıp polilizinli lamlara konuldu. Üretici firmanın talimatları doğrultusunda Apop Tag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit (Chemicon, catno: S7101, USA) ile apoptoza uğrayan hücreler belirlendi. TUNEL boyamanın değerlendirilmesinde Harris hematoxilen ile maviye boyanmış çekirdekler normal iken kahverengi nükleer boyanma gösteren hücreler hasarlı olarak analiz edildi. Kesitlerde 10'luk büyütmede rastgele seçilen alanlarda, normal ve apoptotik en az 500 hücre sayıldı. Apoptotik hücrelerin, toplam (normal + apoptotik) hücrelere oranı ile Apoptotik indeks (AI)'i hesaplandı ve istatistiksel analizleri yapıldı. Pozitif kontrol dokusu olarak sıçan meme dokusu kullanıldı. Negatif kontrol için çalışma solüsyonu yerine Reaction Buffer uygulandı.

2.2.8.4. İstatistiksel Analizler

İstatistiksel veriler SPSS 20 paket programında varyans analizi ile değerlendirilmiştir. Gruplar içi farklılıkları belirlemek için One-Way ANOVA *Post Hoc Duncan*, Tukey ve Tamhane's T2 testleri uygulanmıştır. Yapılan istatistiksel ölçümlerin güvenilirliği açısından, ölçümler en az 3 tekrarlı yapılmıştır.

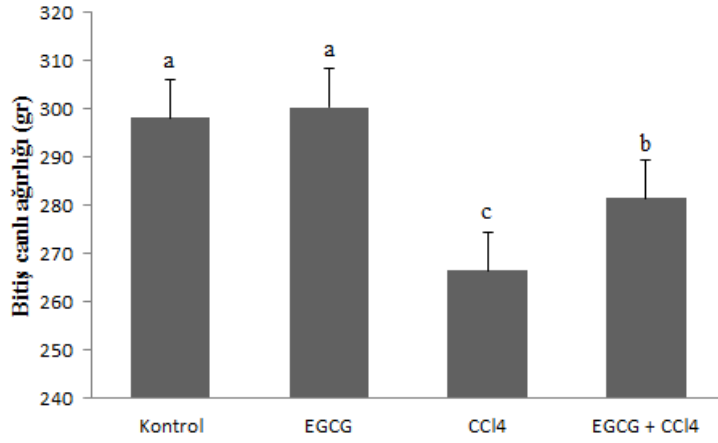
3. BULGULAR

3.1. Canlı Ağırlık Değişimi

Tablo 3.1. Grupların başlangıç ve bitiş canlı ağırlıkları

Gruplar	Başlangıç canlı ağırlığı (g)	Bitiş canlı ağırlığı (g)
Kontrol	230,28	298,21±3,03 ^a
EGCG	232,01	300,35±3,03 ^a
CCL ₄	228,57	266,49±3,02 ^c
EGCG+ CCL ₄	231,57	281,56±3,03 ^b

a-c: Aynı sütunda farklı harfi taşıyan gruplar arasındaki fark önemlidir (p<0.05).



Şekil 3.1. Gruplarda görülen bitiş canlı ağırlık oranları

a-c: Aynı sütunda farklı harfi taşıyan gruplar arası fark anlamlıdır (p<0.05).



Şekil 3.2. Deney grupları

Bitiş canlı ağırlıklarına bakıldığı zaman gruplar arasında istatistiksel anlamda bir fark olduğu ($p<0.05$) ve en düşük ağırlık ölçümünün CCl_4 grubunda olduğu; EGCG+ CCl_4 grubunda ise CCl_4 gruba göre belirgin bir şekilde ağırlığın arttığı görülmektedir (Tablo 3.1 ve Şekil 3.1).

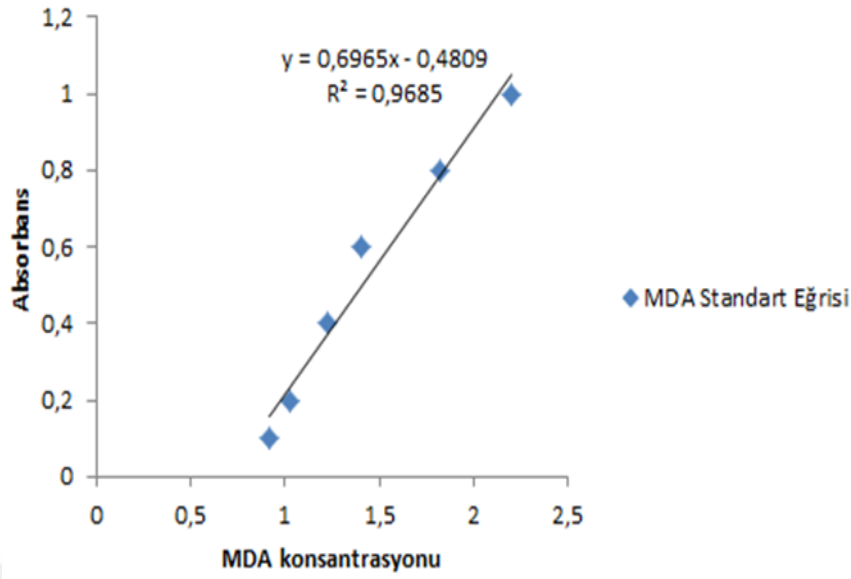
3.2. MDA Ölçüm Sonuçları

Tablo 3.2. Çalışma gruplarından elde edilen plazma ve karaciğer dokusu MDA seviyeleri

Gruplar	Kontrol	EGCG	CCl_4	EGCG+ CCl_4
Plazma MDA (nmol/ml)	$0,61 \pm 0,01^c$	$0,62 \pm 0,02^c$	$0,93 \pm 0,03^a$	$0,75 \pm 0,00^b$
Karaciğer Doku MDA (nmol/g)	$0,93 \pm 0,03^c$	$0,91 \pm 0,03^c$	$1,38 \pm 0,2^a$	$1,11 \pm 0,05^b$

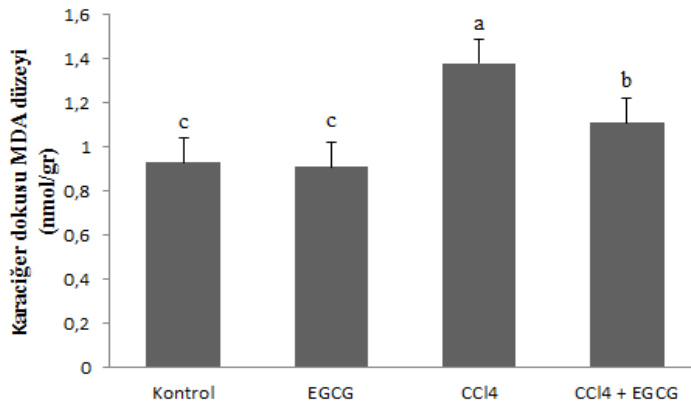
a-c: Aynı satırda farklı harfi taşıyan gruplar arası fark önemlidir ($p<0.05$).

Plazma ve karaciğer dokusunda MDA hesaplama işlemi $x = (y + 0,4809)/0,6965$ şeklinde yapılmış olup 'y' değeri spektrofotometrede ölçülmüş MDA değeridir ($y=0,6965x - 0,4809$). Bu değerlere göre MDA standart eğrisi çizilmiştir (Şekil 3.3).



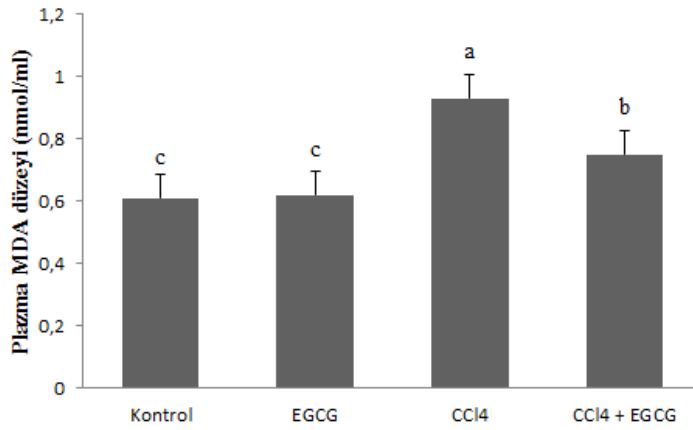
Şekil 3.3. MDA standart eğrisi

Tablo 3.2'deki sonuçlar, plazma ve karaciğer MDA miktarının, EGCG verilen gruplarda CCl₄ grubuna göre, önemli ölçüde azaldığını göstermektedir ($p < 0.05$) (Tablo 3.2, Şekil 3.4 ve 3.5).



Şekil 3.4. Karaciğer dokusunda gruplar arasında MDA düzeylerinin karşılaştırılması

a-c: Aynı satırda farklı harfi taşıyan gruplar arası fark önemlidir ($p < 0.05$).

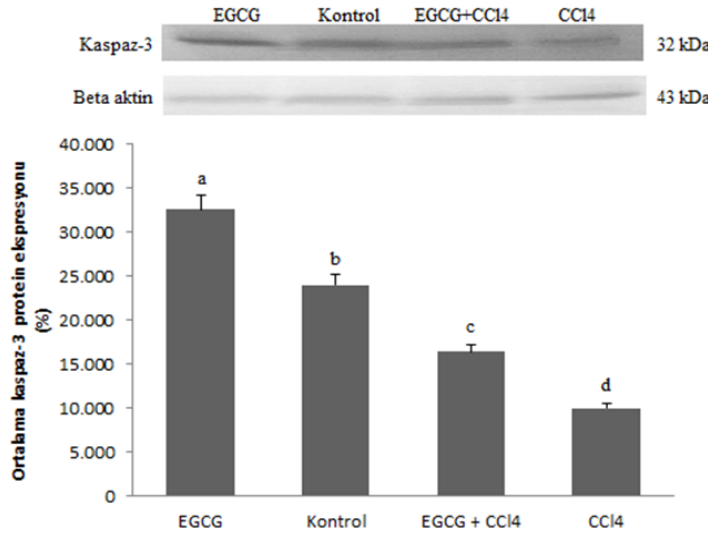


Şekil 3.5. Gruplar arasında plazma MDA düzeylerinin karşılaştırılması

a-c: Aynı satırda farklı harfi taşıyan gruplar arası fark önemlidir ($p < 0.05$).

3.3. Kaspaz-3, Bcl-2, Nrf-2 ve NF- κ B Proteinlerinin Ekspresyon Düzeyleri (Apoptotik Markerlar)

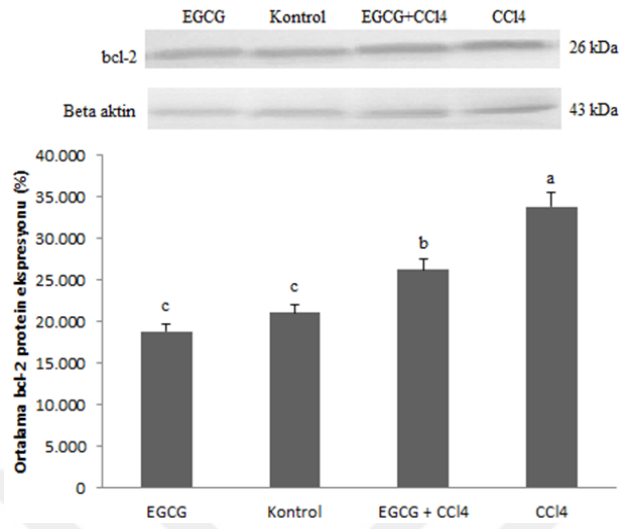
3.3.1. Kaspaz-3 Protein Ekspresyon Düzeyleri



Şekil 3.6. Gruplara göre kaspaz-3 protein ekspresyon düzeyleri

a-c: Aynı sütunda farklı harfi taşıyan gruplar arası fark anlamlıdır ($p < 0.05$).

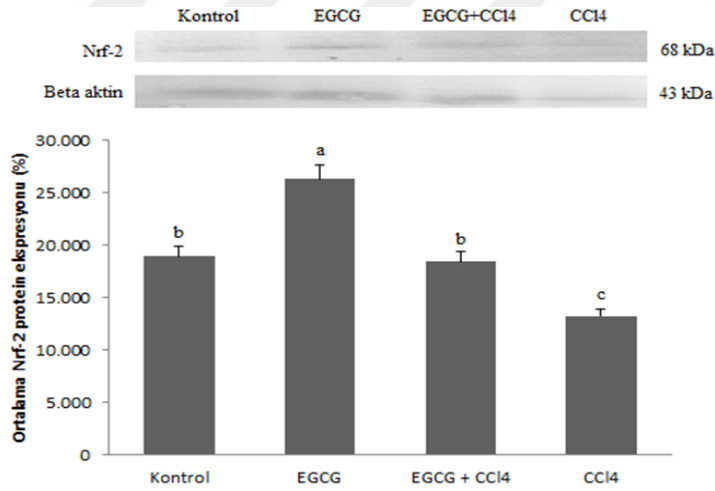
3.3.2. Bcl-2 Protein Ekspresyon Düzeyleri



Şekil 3.7. Gruplara göre bcl-2 protein ekspresyon düzeyleri

a-c: Aynı sütunda farklı harfi taşıyan gruplar arası fark anlamlıdır ($p < 0.05$).

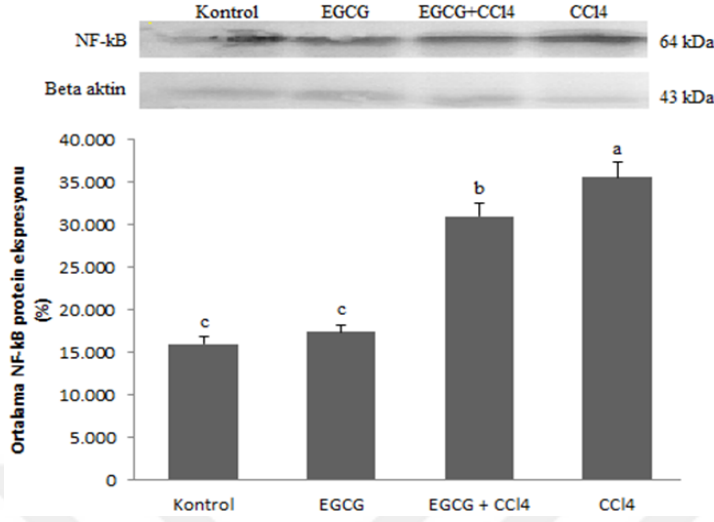
3.3.3. Nrf-2 Protein Ekspresyon Düzeyleri



Şekil 3.8. Gruplara göre Nrf-2 protein ekspresyon düzeyleri

a-c: Aynı sütunda farklı harfi taşıyan gruplar arası fark anlamlıdır ($p < 0.05$).

3.3.4. NF-kB Protein Ekspresyon Düzeyleri



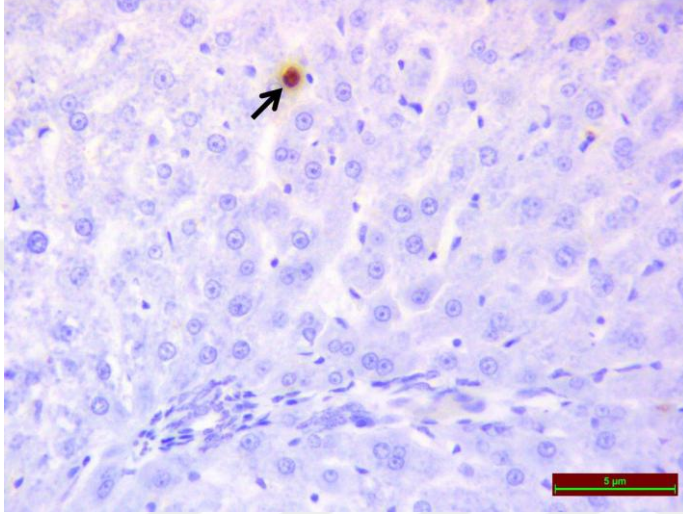
Şekil 3.9. Gruplara göre NF-kB protein ekspresyon düzeyleri

a-c: Aynı sütunda farklı harfi taşıyan gruplar arası fark anlamlıdır ($p < 0.05$).

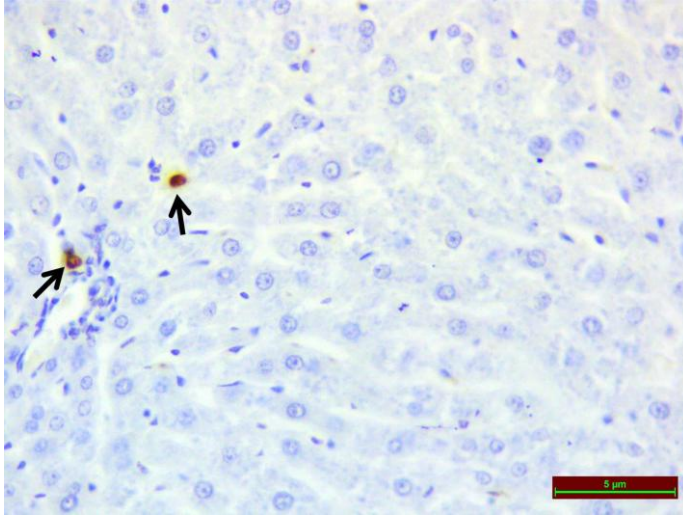
Elde edilen sonuçlara bakıldığında, kaspaz-3 ekspresyon düzeyinin EGCG grubunda en yüksek, CCl₄ grubunda en düşük değere ulaştığı, CCl₄ + EGCG grubunda CCl₄ grubuna göre önemli ölçüde arttığı görülmektedir (Şekil 3.6). Bcl-2 ekspresyon düzeyinin, CCl₄ grubunda en yüksek, CCl₄ + EGCG grubunda azaldığı ve CCl₄ grubu ile karşılaştırıldığında aradaki farkın istatistiksel açıdan önemli olduğu bulunmuştur ($p < 0.05$) (Şekil 3.7). NF-kB düzeyinin kontrol ve EGCG gruplarında en düşük ve birbirine çok yakın değerlerde olduğu, aradaki farkın önemli olmadığı, farklı olarak da CCl₄ grubunda en yüksek düzeye ulaştığı, CCl₄ + EGCG grubunda CCl₄ grubuna göre düştüğü görülmektedir (Şekil 3.8). Nrf-2 düzeyinin CCl₄ grubunda en düşük değerde olduğu, buna karşın CCl₄ grubu ile kıyaslandığında CCl₄ + EGCG grubunda Nrf-2 ekspresyon düzeyinin artış göstererek kontrol grubuna yakın değere ulaştığı görülmektedir (Şekil 3.9). Bu sonuçlara bağlı olarak, EGCG'nin kaspaz-3 ve Nrf-2 sentezini artırıcı yönde, NF-kB ve bcl-2 sentezini ise azaltıcı yönde etkilediğini söyleyebiliriz.

3.4. TUNEL Metoduyla Belirlenen Histolojik Sonuçlar

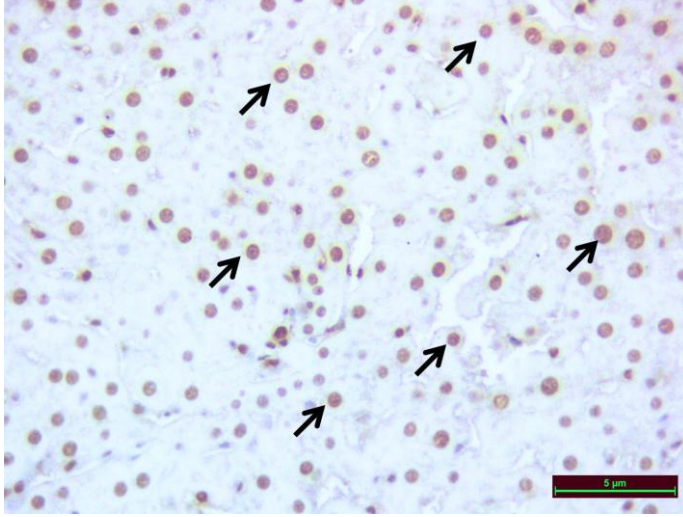
Çalışmamızda, apoptotik hücrelerin belirlenmesi için yapılan TUNEL boyamanın ışık mikroskopi altında incelenmesi sonucu; sıçanların karaciğer dokusundaki hepatositlerde (siyah ok) TUNEL pozitifliği gözlenmiştir.



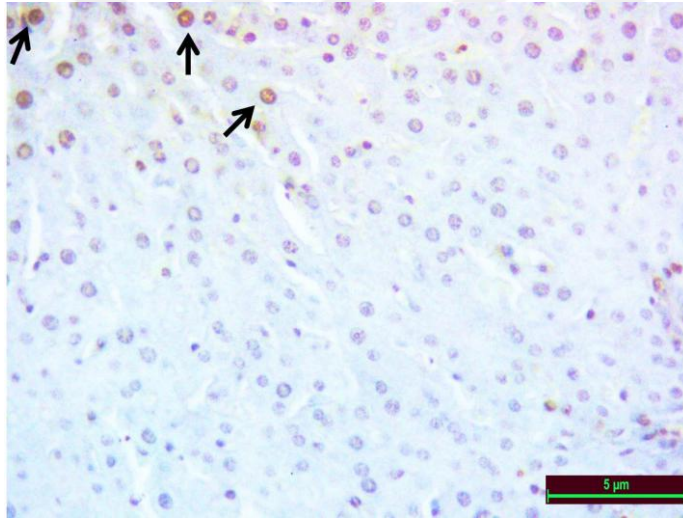
Şekil 3.10. Kontrol grubu karaciğer dokusundaki TUNEL pozitif hücreler (→). Skala bar: 50µm.



Şekil 3.11. EGCG grubu karaciğer dokusundaki TUNEL pozitif hücreler (→). Skala bar: 50µm.



Şekil 3.12. CCl₄ grubu karaciğer dokusundaki TUNEL pozitif hücreler (→). Skala bar: 50μm.



Şekil 3.13. CCl₄ + EGCG grubu karaciğer dokusundaki TUNEL pozitif hücreler (→). Skala bar: 50μm.

Tablo 3.3. TUNEL metoduyla belirlenen apoptotik indeks (%)

Gruplar	Apoptotik indeks %
Kontrol	2,33±0,81
EGCG	2,83±1,47
CCl ₄	19,33±4,27 ^a
CCl ₄ +EGCG	6,50±1,87 ^b

Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

^aKontrol grubuna göre karşılaştırıldığında,

^bCCl₄ grubu ile karşılaştırıldığında, (p<0.05).

TUNEL boyama sonucunda; TUNEL pozitifliği karaciğer dokusunda kontrol (Şekil 3.10) grubu ile karşılaştırıldığında; sadece EGCG verilen pozitif kontrol grubunda (Şekil 3.11) anlamlı bir değışiklik gözlemlenmedi, CCl₄ (Şekil 3.12) grubunda anlamlı bir yükselme olduğu gözlemlendi ($p<0.05$). CCl₄+EGCG (Şekil 3.13) grubunda ise CCl₄ grubu ile kıyaslandığında apoptotik indeksin azalma göstererek normale yaklaştığı görölmektedir.



4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Yeşil çay, polifenoller, kafein, teanin, vitamin ve mineraller dahil olmak üzere çeşitli biyoaktif bileşenler içermektedir. Çay bileşenlerinin en büyük grubu çay polifenolüdür ve EGCG yeşil çayda en fazla bulunan antioksidan bileşiktir. Yeşil çaydaki biyoaktif polifenol olan EGCG'nin antiobezite, kardiyovasküler koruma, antikanser antiinflamatuvar, antioksidan, antitümör, anti-bakteriyel ve antiviral aktiviteler etkileri dahil olmak üzere çeşitli biyolojik ve farmakolojik aktivitelere sahip olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir (Liu vd., 2014; Luo vd., 2017).

Lambert vd.(2010), EGCG'nin fareler üzerinde karbon tetraklorür, asetaminofen gibi hepatotoksikanların neden olduğu karaciğer toksisitesini önlediğini; Wang vd. (2015), EGCG'nin, süperoksit anyonları, hidroksil radikalleri gibi reaktif oksijen türlerinin (ROS) yanı sıra nitrik oksit, nitrojendioksit ve peroksinitrit de dahil olmak üzere reaktif azot türlerini nötralize ettiğini belirtmişlerdir.

Vegias vd. (2008), sıçanlara CCl₄ verilerek oluşturulan hasara karşı EGCG'nin mükemmel bir antioksidan ve sitoprotektif aktivite gösterdiğini; Tipoe vd. (2010), CCl₄ ile karaciğer hasarı oluşturulan farelerde EGCG'nin inflamatuvar süreci ve oksidatif stresi azalttığı böylelikle karaciğer hasarını önlediğini belirtmişlerdir.

Lipit peroksidasyonu, yüksek derecede sitotoksik etki gösteren ürünlerin oluşumu ile son bulmaktadır. Bu ürünlerin başında da malondialdehit (MDA) gelmektedir (Ertürk, 2006). Liu vd. (2014), konkanavalin A (ConA) ile indüklenen karaciğer hasarına karşı farelerde EGCG'nin koruyucu etkilerini araştırdıkları çalışmalarında, ConA ile verilen farelerde MDA seviyelerinin arttığını, EGCG ön tedavisinin, MDA seviyelerindeki artışı önemli ölçüde azalttığını tespit etmişlerdir. Bu sonuçların, EGCG'nin ConA tarafından indüklenen hepatik oksidatif stresi azalttığını belirtmişlerdir.

Gök, (2017); CCl₄ ile karaciğer hasarı oluşturulan sıçanlarda Ellagik asit'in (EA) koruyucu rolünü araştırmıştır. Plazma ve karaciğer dokusunda, EA verilen gruplarda MDA seviyesinin azaldığını ve en yüksek düzeyde MDA miktarlarının CCl₄ gruplarında olduğunu tespit etmiştir.

Sisplatin nefrotoksitesine (CDDP) EGCG'nin etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, uygulanan sisplatinin etkisiyle MDA seviyesinin en düşük pozitif kontrol grubunda en yüksek ise hasarlı grupta olduğu görülmüştür (Timurkaan, 2010).

Hipertiroidili hastalara antitiroid ilaçlar verilerek tedavi öncesi ve sonrası serum MDA seviyeleri tespit edilmiş, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında tedavi sonrası dönemde serum MDA düzeylerinde anlamlı bir azalma olurken ($p<0.05$), hipertiroid hastaların serum MDA düzeylerinde artma olduğu belirlenmiştir (Gür vd., 2005).

Farelerde zorla yüzme egzersiziyle oral olarak verilen EGCG'nin anti-yorgunluk etkisinin değerlendirildiği çalışmada; fareler kontrol ve EGCG (50, 100 ve 200 mg/kg) olarak dört gruba ($n=12$) ayrılmış, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 50, 100 ve 200 mg/kg gruplarının karaciğerindeki MDA düzeyleri ile 100 ve 200 mg/kg gruplarının kaslarındaki MDA seviyelerinin anlamlı olarak düşük olduğu ($p<0.05$), 50 mg/kg grubu ile karşılaştırıldığında, 200 mg/kg grubunun karaciğerdeki MDA düzeyleri ile 100 ve 200 mg/kg gruplarının kaslarının MDA düzeylerinin anlamlı olarak daha düşük olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$) (Teng ve Wu, 2017).

Orsolic vd. (2013), farelerde alloksanın neden olduğu antidiyabetik etkinin suda çözünen propolis türevi (WSDP) ve EGCG'nin pozitif etkinliğini gerçekleştirmek için yaptıkları çalışmada; karaciğer ve böbreklerde lipid reroksidasyonu alloksanla indüklenen farelerde (diyabetik farelerde), WSDP veya EGCG ile tedavi edilen farelere kıyasla arttığını, diyabetik farelerin sırasıyla WSDP veya EGCG ile tedavisinde, karaciğer ve böbreklerinde MDA seviyelerinde önemli bir azalma ile sonuçlandığını tespit etmişlerdir.

Bulgularımıza göre, MDA düzeylerini karşılaştıracak olursak (tablo); gruplar arasında istatistiksel olarak belirgin bir fark tespit edilmiştir ($p<0.05$). En yüksek MDA seviyesinin CCl_4 grubunda olduğu, CCl_4 + EGCG grubunun MDA düzeyinin ise CCl_4 grubuna göre daha düşük çıktığı ve istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık olduğu görülmüştür. Bunun sonucunda; EGCG'in karaciğer dokusunda ve plazmada, MDA düzeyini azaltarak doku hasarını iyileştirici yönde bir etkiye sahip olduğunu söyleyebiliriz.

Aslan vd., (2016), akciğerlerdeki TUNEL pozitifliğini kontrol grubuyla karşılaştırdıklarında CCl_4 grubunda apoptotik indeksin en yüksek olduğu, CCl_4 + çörek otu grubunda ise apoptotik indeksin azaldığını tespit etmişlerdir ($p < 0.05$)

Yalçın vd. (2017), CCl_4 ile karaciğer hasarı oluşturulan sıçanlar üzerinde *Salvia cryptantha* bitki özütünün hepatoprotektif özelliğini araştırmışlardır. Hasar oranını belirlemek için TUNEL methodunu uygulamışlardır. Kontrol ve zeytinyağı verilen gruplar arasında karaciğer dokularında apoptozis miktarında benzerlik gözlemlenmiştir. Kontrol grubuna kıyasla CCl_4 grubundaki karaciğer dokularında apoptotik indeksin daha fazla

olduğu, CCl₄ + *S. cryptantha* ile *S. cryptantha* verilen grupta karaciğer dokularının TUNEL ekspresyonunda düşüş olduğunu tespit etmişlerdir.

Tak vd. (2016), farelerde hepatik iskemi-reperfüzyon hasarına karşı EGCG'nin koruyucu etkilerini araştırmışlardır. EGCG tedavisinin, oksidatif strese bağlı hasar ve hücrel apoptoz ile hepatik iskemi-reperfüzyon hasarının boyutunu azalttığını tespit etmişlerdir.

Karaman vd. (2017), Omega-3'ün CCl₄ zehirlenmesine karşı iyileştirici etkisini araştırdıkları çalışmalarında TUNEL yöntemini kullanmışlardır. Deneyin sonucunda CCl₄ grubu da dahil olmak üzere herhangi bir grubunda TUNEL yöntemi ile apoptotik hücre ölümü tespit edememişlerdir.

Zhu vd. (2017), *in vitro* olarak insan akciğerinde belirledikleri birkaç hücre ile ilgili yaptıkları çalışmalarında, EGCG'nin, tümör oluşumunu inhibe edip apoptozu indükleyerek etkili bir şekilde akciğer kanser kök hücre (CSC) aktivitesini azalttığını ifade etmişlerdir.

Bulgularımızdaki TUNEL sonuçlarına bakıldığında zaman (Tablo 3.3) kontrol ve EGCG grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşmadığı görülmektedir. Fakat CCl₄ grubunda kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artış görülürken ($p < 0.05$), CCl₄ + EGCG grubunda ise CCl₄ grubuna kıyasla anlamlı bir şekilde azalış görülmüştür ($p < 0.05$). Bu veriler, karaciğer hasarına karşı EGCG'nin apoptotik indeksi azaltarak karaciğeri CCl₄'ün toksik etkisine karşı önemli ölçüde koruduğunu ortaya koymaktadır.

Tipoe vd. (2010), CCl₄ ile karaciğer hasarı oluşturulan farelerde EGCG'nin koruyucu etkisini araştırdıkları çalışmalarında, hem EGCG hem de tedavi grubunda, NF-kB aktivitesi'nin önemli ölçüde azaldığını ($p < 0.01$), ancak kontrol ile karşılaştırıldığında NF-kB aktivitesinin arttığını belirtmişlerdir.

Aslan(2011), azoksimetan verilerek oluşturulan kolorektal kanserli dokularda, domates tozu (DT) verilen grupta kaspaz-3 ekspresyonunun azoksimetan grubuna göre belirgin şekilde arttığını belirtmiştir.

Zhang vd. (2017), CCl₄ ile indüklenen karaciğer fibrozu oluşturulan sıçanlarda etil piruvatın (EP) koruyucu etkilerini araştırdıkları çalışmalarında; CCl₄ ile indüklenen karaciğer fibrozunda TLR4 ve NF-kB'nin mRNA düzeylerinin arttığını, CCl₄+EP grubunun CCl₄ grubuyla karşılaştırıldığında NF-kB-pozitif hücrelerin yoğunluğunun az olduğunu belirtmişlerdir.

Sıçan karaciğerinde meydana gelen iskemi-reperfüzyon (IRI) hasarında kaspaz-3 ekspresyonunun araştırıldığı çalışmada; kaspaz-3 ifadesinin, hepatik IRI olan ve hızlı nitrik oksit salınan grupta baskılandığı, IRI olan ve yavaş salınan grupta baskılanmadığı tespit edilmiştir (Ko vd., 2017).

Han vd. (2017), arsenik ile oksidatif stres ve karaciğer hasarı oluşturulan sıçanlarda EGCG'nin koruyucu etkilerini araştırdıkları çalışmalarında; EGCG'nin arsenik aktivitesini azalttığını, karaciğer dokularında arsenik tutulumunu hafiflettiğini ve Nrf-2 sinyalleme ile ilgili genlerin (Nrf-2, Nqo1 ve Ho-1) ifadelerini geliştirdiğini tespit etmişlerdir. Bu bulguların EGCG'nin, Nrf-2 sinyalleme yolunun aktivasyonu ile oksidatif stresle ilişkili hepatotoksisiteyi azaltmak için yararlı olabileceğini hepatotoksisiteyi önlemede EGCG'nin arsenik tedavisi için potansiyel bir tedavi olabileceğini belirtmişlerdir.

Rishi vd. (2017), alkolün karaciğer hasarı oluşturduğu sıçanlarda bir probiyotik olarak EGCG'yi kullandıkları çalışmalarında; alkol uygulanan gruplardaki karaciğerde vakuolar dejenerasyon gözlediklerini, EGCG uygulanan gruplarda karaciğerde herhangi bir yağ değişim olmaksızın karaciğerin normal olduğunu tespit etmişlerdir. Bu çalışmada NF-kB/p-50'nin, hem serbest hem de kapsüllenmiş probiyotik-EGCG tedavisi ile etkisiz hale getirildiğini belirtmişlerdir.

Gök, (2017), CCl₄ ile karaciğer hasarı oluşturulan sıçanlarda Ellagik asit'in (EA) koruyucu rolünü araştırdığı çalışmasında; kaspaz-3 ekspresyon düzeyinin kontrol grubunda en yüksek iken CCl₄ grubunda en düşük değere ulaştığını tespit etmiştir. Ayrıca, bcl-2 ekspresyon düzeyinin ise CCl₄ grubunda en yüksek, CCl₄ + EA grubunda CCl₄ grubuna göre düştüğünü tespit etmiştir.

Aslan ve Can, (2014), CCl₄ ile karaciğer hasarı oluşturdukları çalışmada; deve dikenini verilen grupta (CCl₄ + deve dikenini) CCl₄ grubuna, göre bcl-2 ekspresyon seviyesinin azaldığı ve kaspaz-3 ekspresyon seviyesinin ise artış gösterdiği tespit edilmiştir.

Bulgularımıza göre, kaspaz-3 miktarı CCl₄ + EGCG grubunda oldukça fazla, CCl₄ grubunda ise daha az olduğu görülmüştür (Şekil 3.6). Bcl-2 ekspresyon düzeyinin kontrol ile EGCG grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermediği (p>0.05), CCl₄ + EGCG grubunda ise CCl₄ grubuna göre daha düşük olduğu bulunmuştur (p<0.05) (Şekil 3.7). Ayrıca , Nrf-2 ekspresyon düzeyi, kontrol ve EGCG gruplarıyla karşılaştırıldığı zaman, hem CCl₄ + EGCG grubunda hem de CCl₄ grubunda aradaki farkın istatistiksel açıdan önemli olduğu (p<0.05), CCl₄ +EGCG grubunda Nrf-2 ekspresyonunun CCl₄ grubuna göre önemli ölçüde artış gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 3.8). NF-kB ekspresyon

düzeyi kontrol ve EGCG gruplarında en düşük olduğu ve aradaki farkın önemli olmadığı ($p>0.05$), CCl_4 grubunda en yüksek düzeye ulaştığı, $CCl_4 + EGCG$ grubunda CCl_4 grubuna göre düştüğü gözlenmiştir ($p<0.05$) (Şekil 3.9).

Sonuç olarak; EGCG karaciğer hasarına karşı doku ve DNA hasarını önleyebilmektedir. Bununla birlikte apoptotik proteinlerin sentezlenmesini arttırarak karaciğerde meydana gelen hasarlı hücreleri apoptozise uğratmaktadır (Singh vd., 2011). Nrf-2, NF- κ B, bcl-2 ve kaspaz-3 proteinlerinin ekspresyon seviyelerini belirlemek için uyguladığımız TUNEL metodu sonuçlarını incelediğimizde CCl_4 , EGCG ve apoptozis arasında bir bağlantı olabileceğini düşünebiliriz. Sonuç olarak bu bilgiler doğrultusunda EGCG'nin etkili bir antioksidan özelliğinin olması dışında karaciğeri koruyucu etkisinin olduğu ve oluşacak hasara karşı koyabileceğini söyleyebiliriz. Elde ettiğimiz sonuçlara ve literatürde EGCG ile ilgili yapılmış olan çalışmalara bakıldığında EGCG'nin akciğer, böbrek, beyin, gibi çoğu organda önemli ölçüde koruyucu etkilerinin olduğu gözlenmiştir. Ayrıca normal hücrelere kıyasla tümör hücrelerine yönlendirilmiş apoptotik etkisi olan EGCG'nin kanser tedavisinde olumlu sonuçlar verebileceği yönünde umut vaat ettiğini söyleyebiliriz.

KAYNAKLAR

- Akşit, H., Akşit, D., Bildik, A., Kara, H., Yavuz, Ö. ve Seyrek, K., 2015. Deneysel Karaciğer İntoksikasyonunda N-Asetil Sistein'in Glutasyon Metabolizması ve Lipid Peroksidasyonuna Etkileri, *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **62**, 1-5.
- Al-Dbass, A.M., Al-Daihan, S.K. and Bhat, R.S., 2012. *Agaricus blazei*, Murill as an Efficient Hepatoprotective and Antioxidant Agent Against CCl₄-Induced Liver Injury in Rats, *Saudi Journal of Biological Sciences*, **19**, 303-309.
- Altunkaynak, B.Z. ve Özbek, E., 2008. Programlanmış Hücre Ölümü: Apoptoz Nedir?, *Tıp Araştırmaları Dergisi*, **6**, 93-104.
- Antmen, Ş.E., 2005. Beta Talasemide Oksidatif Stres, *Yüksek Lisans Tezi*, Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Aras İ., 2016. Karbon Tetraklorür İle Oluşturulan Karaciğer Hasarında Safran İle Safranal ve Crocin gibi Safran Bileşenlerinin Karaciğer Üzerine Sitoprotektif Etkileri, *Uzmanlık tezi*, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı, Van.
- Aslan, A., 2011. Ratlarda Azoksimetan Uygulanarak Oluşturulan Kolorektal Kanserde Likopenin Siklooksijenaz-2 (Cox-2), Kaspaz-3, Kaspaz-9, Bax, Bcl-2, P53 Proteinlerinin Ekspresyonu ve DNA Hasarı Üzerine Etkisi, *Doktora Tezi*, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Elazığ.
- Aslan, A., Boydak, D., Can, M.I., Kuloğlu, T. and Başpınar, S., 2016. *Black cumin* may be a Potential Drug for Development of Carbontetrachloride-Induced Lung Damage in Rats, *Progress in Nutrition*, **18(1)**, 56-62.
- Aslan, A., Can, M.İ., 2014. Milk thistle Impedes the Development of Carbontetrachloride-Induced Liver Damage in Rats Through Suppression of Bcl-2 and Regulating Caspase Pathway, *Life Sciences*, **117**, 13-18.
- Aycan S., 2015. Ratlarda Tiyoasetamidle Oluşturulan Karaciğer Toksisitesi Üzerine Üzüm Çekirdeği Ekstraktının Etkileri, *Uzmanlık Tezi*, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Elazığ.
- Bharti A.C. and Aggarwal B.B., 2002. Nuclearfactor-kappa B and cancer: its role in prevention and therapy, *Biochem Pharmacol*, **64**, 883-888.
- Böing, A. N., Stap, J., Hau, C.M., Afink, G.B., Ris-Stalpers, C., Reits, E.A., Sturk, A., van Noorden, C.J.F. and Nieuwland, R., 2013. Active caspase-3 is removed from

cells by release of caspase-3-enriched vesicles, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1833**, 1844-1852.

Can, M.İ., 2014. Karbon Tetraklorür (CCl₄) ile Karaciğer Hasarı Oluşturulmuş Ratlarda Deve Dikeni (*Silybummarianum L.*)'nin Kaspaz-3, Kaspaz-9, Bax, Bcl-2 Proteinlerinin Ekspresyonu ve DNA Hasarı Üzerine Etkisi, *Yüksek Lisans Tezi*, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Elazığ.

Chen, Z., Wang, S., Lee, K.M.S., Huang, Y. and Ho, W.K.K., 2001. Preparation of flavanol-rich green tea extract by precipitation with AlCl₃, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **81**, 1034-1038.

Cho, H.Y. and Kleeberger, S.R., 2010. Nrf2 protect against airway disorders, *Toxicology and Applied Pharmacology*, **244**, 43-56.

Chu, X., Liu, Y. and Zhang, H., 2017. Activating or Inhibiting Nrf-2?, *Trends in Pharmacological Sciences*, **38 (11)**, 953-955.

Çelik, F., 2006. Çay (*Camellia sinensis*); İçeriği, Sağlık Üzerindeki Koruyucu Etkisi ve Önerilen Tüketimi. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Science*, **26**, 642-648.

Çolak E., 2011; Karbon Tetraklorürün (CCl₄) İndüklediği Karaciğer Hasarı ve Oksidatif Stres Üzerine *Cynara scolymus L.* Yaprağı Ekstraktının Etkileri, *Yüksek Lisans Tezi*, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Eskişehir.

Dilsiz N., 2004. Moleküler Biyoloji, Palme Yayıncılık, Ankara.

Ekinci, Ö. ve Memis, L., 2008. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Karsinomlarında Nükleer Faktör Kappa B İmmünohistokimyasal Ekspresyonunun Prognozla İlişkisi, *Gazi Tıp Dergisi*, **19 (1)**, 1-5.

Erdoğan, E., Kaya, A., Rağbetli, M.Ç., Özbek, H. ve Cengiz, N., 2004. Anason (*Pimpinella anisum*) Ekstresinin Deneysel Akut Karaciğer Hasarında Karaciğer Koruyucu Etkisi Var mı?, *Van Tıp Dergisi*, **11 (3)**, 69-74.

Ertürk, B., 2006. Akciğer Kanseri Hastalarında Malondialdehit (MDA) ve Total Antioksidan Kapasite (TAOK) Düzeyi Ölçümü ile Oksidan-Antioksidan Dengenin Araştırılması, *Uzmanlık Tezi*, Sağlık Bakanlığı Süreyya paşa Göğüs ve Kalp-Damar Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İstanbul.

Gök, Ö., 2017. Karbon Tetraklorür ile Karaciğer Hasarı Oluşturulmuş Sıçanlarda Ellagik Asit'in Bazı Apoptotik Proteinlerin İfadesine Etkisi, *Yüksek Lisans Tezi*, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Elazığ.

- Gür, B., Halifeoğlu, İ., Telo, S. ve Tolun, İ. F.,** 2005. Hipertiroid Hastalarda Tedavi Öncesi ve Sonrası Malondialdehit ve Antioksidan Enzim Düzeyleri, *F.Ü. Sağlık Bil. Dergisi*, **19(3)**, 221-226.
- Güven, A.ve Gülmez, M.,** 2003. The effect of kefir on the activities of GSH-Px, GST, CAT, GSH and LPO levels in carbon tetrachloride-induced mice tissues. *J. Vet. Med B*,**50**, 412–416.
- Han, X.D., Zhang, Y.Y., Wang, K.L., Huang, Y.P., Yang, Z.B. and Liu, Z.,** 2017. The involvement of Nrf2 in the protective effects of (-)-Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) on NaAsO₂-induced hepatotoxicity, *Oncotarget*,**8(39)**, 65302-65312.
- Hugle, M. and Fulda, S.,**2015. Dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor NVP-BEZ235 synergizes with chloroquine to induce apoptosis in embryonal rhabdomyosarcoma, *Cancer Letters*, **360**, 1-9.
- Karaman, M., Özen, H., Dağ, S., Atakişi, O., Çiğsar, G. and Kaya, O.,** 2017. Ameliorative Effect of Omega-3 in Carbon Tetrachloride Toxicity, *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*,**23(1)**, 77-85.
- Kayaalp, O.,**2009. Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji, Hacettepe-Taş Kitapçılık Ltd. Şti., 315, Ankara.
- Ko, H. M., Joo, S. H., Jo, J. H., Park, W. S., Jung, W. Y., Shin, J. H. and Ahn, H. J.,** 2017. Liver-Wrapping, Nitric Oxide-Releasing Nanofiber Downregulates Cleaved Caspase-3 and Bax Expression on Rat Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury, *Transplantation Proceedings*,**49**, 1170-1174.
- Laemmli, U.K.,** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680-685.
- Lambert, J.D., Kennett, M.J., Sang, S., Reuhl, K.R., Ju, J. and Yang, C.S.,** 2010. Hepatotoxicity of high oral dose (-)-epigallocatechin-3-gallate in mice, *Food and Chemical Toxicology*, **48**, 409–416.
- Liu, D., Zhang, X., Jiana, L., Guo, Y. and Zheng, C.,** 2014. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) attenuates concanavalin A-induced hepatic injury in mice, *Acta Histochemica*, **116**, 654–662.
- Luo, K.W., Chen, W., Lung, W.Y., Wei, X.Y., Cheng, B.H., Cai, Z.M. and Huang, W.R.,** 2017. EGCG inhibited bladder cancer SW780 cell proliferation and migration both in vitro and in vivo via down-regulation of NF-κB and MMP-9, *Journal of Nutritional Biochemistry*,**41**, 56–64.

- Mishra, S. and Vinayak, M.,**2015. Role of Ellagic Acid in Regulation of Apoptosis By Modulating Novel and Atypical PKC in Lymphoma Bearing Mice, *BMC Complementary and Alternative Medicine*, **15 (281)**, 2-8.
- Morrill, S. and He, D.Z.Z.,** 2017. Apoptosis in Inner Ear Sensory Hair Cells, *Journal of Otology*, **12**, 151-164.
- Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi, K.,** 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, *Analyses of Biochemistry*, **95**, 351-358.
- Orsolich, N., Sirovina, D., Gajski, G., Garaj-Vrhovac, V., Jembrek, M.J. and Kosalec, I.,** 2013. Assessment of DNA damage and lipid peroxidation in diabetic mice: Effects of propolis and epigallocatechin gallate (EGCG), *Mutation Research*, **757**, 36– 44.
- Özkan, G.,** 2012. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri Nf-kappa B1 ve NfKb1a (1kb alfa) Gen Polimorfizmlerinin Rolünün Araştırılması, *Yüksek Lisans Tezi*, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı, İstanbul.
- Radha, G. and Raghavan, S. C.,** 2017. BCL2: A Promising Cancer Therapeutic Target, *BBA - Reviews on Cancer*, **1868**, 309-314.
- Rishi, P., Arora, S., Kaur, U.J., Chopra, K. and Kaur, I.P.,** 2017. Better Management of Alcohol Liver Disease Using a ‘Microstructured Synbox’ System Comprising *L. plantarum* and EGCG, *PLoS ONE*, **12 (1)**, 1-18.
- Sharangi, A.B.,**2009. Medicinal and therapeutic potentialities of tea (*Camellia sinensis* L.) – A review, *Food Research International*, **42**, 529-535.
- Shishodia S. and Aggarwal, B.B.,** 2004. Nuclear Factor-kB: a friend or a foe in cancer? *Biochem Pharmacol*, **68**, 1071-1080.
- Singh, B.N., Shankar, S. and Srivastava, R.K.,** 2011. Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG): Mechanisms, perspectives and clinical applications, *Biochemical Pharmacology*, **82**, 1807-1821.
- Sriram, N., Kalayarasan, S. and Sudhandiran, G.,** 2009. Epigallocatechin-3-gallate augments antioxidant activities and inhibits inflammation during bleomycin-induced experimental pulmonary fibrosis through Nrf-2–Keap1 signaling, *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, **22**, 221–236.
- Sun, C.L., Yuan, J.M., Koh, W.P. and Yu C.M.,** 2006. Green tea, black tea and colorectal cancer risk: a meta-analysis of epidemiologic studies, *Carcinogenesis*, **27(7)**, 1301-1309.

- Tak, E., Park, G.C., Kim, S.H., Jun, D.Y., Lee, J., Hwang, S., Song, G.W. and Lee, S.G.,** 2016. Epigallocatechin-3-gallate protects against hepatic ischaemia–reperfusion injury by reducing oxidative stress and apoptotic cell death, *Journal of International Medical Research*, **44** (6), 1248–1262.
- Tang, D., Wang, F., Tang, J., Mao, A., Liao, S. and Wang, Q.,** 2017. Dicranostigaleptopodu (Maxim.) Fedde extracts attenuated CCl₄- induced acute liver damage in mice through increasing anti-oxidative enzyme activity to improve mitochondrial function, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **85**, 763–771.
- Tanrıverdi, G.,** 2005. Karbon Tetraklorür (CCl₄) ile Oluşturulmuş Karaciğer Hasarında Değişik Dozlardaki Nikotinamidin Protektif Etkisinin Işık ve Elektron Mikroskopik Olarak İncelenmesi, *Yüksek Lisans Tezi*, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Teng, Y.S. and Wu, D.,** 2017. Anti-Fatigue Effect of Green Tea Polyphenols (-)-Epigallocatechin-3-Gallate (EGCG), *Pharmacogn Mag*, **13**(50), 326–331.
- Thompson, E.B.,** 1994. Apoptosis and Steroid Hormones, *Molecular Endocrinology*, **8**, 665-673.
- Thrall, K.D., Vucelick, M.E., Gies, R.A., Zangar, R.C., Weitz, K.K., Poet, T.S., Springer, D.L., Grant, D.M. and Benson, J.M.,** 2000. Comparative metabolism of carbon tetrachloride in rats, mice, and hamsters using gas uptake and PBPK modeling, *J. Toxicol. Env. Heal. A*, **60**, 531-548.
- Timurkaan, M.,** 2010. Sisplatin nefrotoksitesi oluşturulan ratlarda epigallokateşin galatın etkilerinin araştırılması, *Tıpta Uzmanlık Tezi*, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Elazığ.
- Tipoe, G.L., Leung, T.M., Liong, E.C., Lau, T.Y.H., Fung, M.L. and Nanji, A.A.,** 2010. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) reduces liver inflammation, oxidative stress and fibrosis in carbon tetrachloride (CCl₄)-induced liver injury in mice, *Toxicology*, **273**, 45–52.
- Üstün, Ç. ve Demirci, N.,** 2013. Çay Bitkisinin (*Camellia sinensis* L.) Tarihsel Gelişimi ve Tıbbi Açından Değerlendirilmesi, *Lokman Hekim Journal*, **3**(3), 5-12.
- Veigas, J. M., Shrivastava, R. and Neelwarne, B.,** 2008. Efficient amelioration of carbon tetrachloride induced toxicity in isolated rat hepatocytes by *Syzygium cumini* Skeels extract, *Toxicology in Vitro* **22**, 1440–1446.

- Vuda M., D'Souza R., Upadhyab S., Kumarb V., Raob N., Kumara V., Boillat C. and Munglib P.,** 2012. Hepatoprotective and antioxidant activity of aqueous extract of *Hybanthus enneaspermus* against CCl₄-induced liver injury in rats, *Experimental and Toxicologic Pathology*, **64**, 855-859.
- Wang, D., Wang, Y., Wan, X., Yang , C.S. and Zhang, J.,** 2015. Green tea polyphenol (–)-epigallocatechin-3-gallate triggered hepatotoxicity in mice: Responses of major antioxidant enzymes and the Nrf2 rescue pathway, *Toxicology and Applied Pharmacology*, **283**, 65–74.
- Yalcin A., Yumrutas Ö., Kuloglu T., Elibol E., Parlar A., Yilmaz İ., Pehlivan M., Dogukan M., Uckardeş F., Aydin H., Turk A., Uludag Ö., Sahin İ., Ugur K. and Aydin S.,** 2017. Hepatoprotective properties for *Salvia cryptantha* extract on carbon tetrachloride induced liver injury, *Cellular and Molecular Biology*, **63(12)**, 56-62.
- Yazıcı, P ve Güner-Akdoğan, G.,** 2010. Epigallocateşin Galatın Antioksidan ve Prooksidan, Polifenon 60'ın Prooksidan, Koenzim Q10'un Antioksidan Etkisi, Bildiri (XXII. Ulusal Biyokimya Kongresi, 27-30, Ekim, 2011, Eskişehir/*Türk Biyokimya Dergisi*, **35(özel sayı)**, 88.
- Zhang, M., Hu, X., Li, S., Lu, C., Li, J., Zong, Y., Qi, W. and Yang, H.,** 2017. Hepatoprotective effects of ethyl pyruvate against CCl₄-induced hepatic fibrosis via inhibition of TLR4/NF- κ B signaling and up-regulation of MMPs/TIMPs ratio, *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*, **42 (1)**, 72-81.
- Zhu, J., Jiang, Y., Yang, X., Wang, S., Xie, C., Li, X., Li, Y., Chen, Y., Wang, X., Meng, Y., Zhu, M., Wu, R., Huang, C., Ma, X., Geng, S., Wu, J. and Zhong, C.,** 2017. Wnt/b-catenin pathway mediates Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) inhibition of lung cancer stem cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **482**, 15-21.
- URL-1,** <http://metafizikl.blogspot.com.tr/2013/05/insan-mucizesi.html> Karaciğer, 15 Nisan 2018.
- URL-2,** https://www.turkcebilgi.com/karbon_tetraklor%C3%BCr#bilgi Karbon Tetraklorür, 13 Aralık 2017.
- URL-3,** https://ipfs.io/ipns/tr.wikipedia-on-ipfs.org/wiki/Karbon_tetraklor%C3%BCr.html Karbon Tetraklorür , 10 Nisan 2018.
- URL-4,** <http://naturalmedicinemylife.com/continued-curcumin-cancer-studies/Apoptosis>, 12 Mart 2018.

URL-5,<https://www.dreamstime.com/stock-illustration-apoptosis-process-programmed-cell-death-vector-diagram-image45763884> Apoptozis,5 Şubat 2018.

URL-6,[http://: www.nrf2.com](http://www.nrf2.com), Nrf-2 2 Kasım 2017.

URL-7,[https://www.carbosynth.com/carbosynth/website.nsf/\(w-productdisplay\)/cfaa89fb454dd4d3802574b00061be75](https://www.carbosynth.com/carbosynth/website.nsf/(w-productdisplay)/cfaa89fb454dd4d3802574b00061be75) EGCG, 11 nisan 2018.



ÖZGEÇMİŞ

Gamze GÜR KALMAZ

Doğum Yeri : Mersin

Doğum Tarihi: 16.09.1989

E-posta : gamze.grklmz@hotmail.com

Yüksek Lisans Tez Danışmanı: Doç. Dr. Abdullah ASLAN

2015-halen : Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Eğitimi

2008-2012 : Mustafa Kemal Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Lisans Eğitimi

2003-2006 : Lise Eğitimi, Tevfik Sırrı Gür Lisesi-Mersin

2001-2003 : Ortaöğretim, İleri İlköğretim Okulu-Mersin

1996-2001 : İlköğretim, Kayatepe İlköğretim Okulu-Mersin