



T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

# SIÇANLARDA GİBBERELLİK ASİTİN TNF- $\alpha$ , IL-4 VE IL-10 DÜZEYLERİNE ETKİSİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. Hacer Berna ÖZTÜRK

*Antalya, 2007*



T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

# SIÇANLARDA GİBBERELLİK ASİTİN TNF- $\alpha$ , IL-4 VE IL-10 DÜZEYLERİNE ETKİSİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. Hacer Berna ÖZTÜRK

Tez Danışmanları:  
Prof.Dr. Mustafa Kemal BALCI  
Yrd.Doç. Dr. Nuray Erin

“Kaynak gösterilerek tezimden yararlanılabilir”

**Antalya, 2007**

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Yönetim Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2007.04.0103.007).

## TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım Anabilim Dalı Başkanımız değerli hocam Prof. Dr. Gülşen Yakupoğlu başta olmak üzere, tezimin planlanmasında, gerçekleşmesinde emeği geçen ve yardımını, tecrübesini esirgemedi bana destek olan tez danışmanım sayın Prof. Dr. Mustafa Kemal Balcı'ya, yine tez çalışmamda bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, yardım ve desteklerini her zaman gördüğüm tez danışman yardımcısı sayın hocam Yrd. Doç. Dr. Nuray Erin'e teşekkür ederim.

Çalışmada kullandığımız deney hayvanlarının teminini ve deney aşamasında her türlü yardımı esirgemeyen Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Fiziyojji A.D. Deney Hayvanları Ünitesi, Veteriner Hekim Şakir Atalay'a, ekibine ve diğer tüm bölüm çalışanlarına teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim boyunca birlikte fedakarca çalışmaktan onur duyduğum tüm uzman ve asistan arkadaşlarımla, hemşire ve diğer hastane personeline teşekkür ederim.

Beni yetiştiren, her zaman sabırları, sevgileri ve destekleri ile yanımda olan, benim için benden daha çok yorulan, varlıklarıyla gurur duyduğum babam Muhittin Afacan ve annem Melahat Afacan'a sonsuz teşekkür ederim.

Çalışma boyunca sürekli desteğini gördüğüm, daima yanımda olan, sabır ve sevgisini benden esirgemeyen eşim Av. Fatih Öztürk'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

# İÇİNDEKİLER

|                                                                                                       | Sayfa |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Simgeler ve Kısaltmalar Dizini.....                                                                   | iv    |
| Şekiller Dizini.....                                                                                  | v     |
| 1. GİRİŞ.....                                                                                         | 1     |
| 2. GENEL BİLGİLER.....                                                                                | 5     |
| 2.1. Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Tanımı.....                                                      | 5     |
| 2.2. Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Sınıflandırılması.....                                           | 6     |
| 2.3. Çalışmada Kullanılan Bitki Büyüme Düzenleyicilerinden Gibberellik Asit'in Genel Özellikleri..... | 6     |
| 2.4. Tümör Nekrozis Faktör- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ).....                                            | 11    |
| 2.5. İnterlökin-4 (IL-4).....                                                                         | 12    |
| 2.6. İnterlökin-10 (IL-10).....                                                                       | 13    |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM.....                                                                               | 15    |
| 3.1. Kullanılan Deney Hayvanları.....                                                                 | 15    |
| 3.2. Kullanılan Bitki Büyüme Düzenleyicileri.....                                                     | 15    |
| 3.3. Kan alma, Disseksiyon İşlemleri Ve Çalışılacak Materyallerin Eldesi.....                         | 16    |
| 3.4. Testis Ağırlıklarının Ölçümü.....                                                                | 17    |
| 3.5. Serum TNF- $\alpha$ , IL-4 ve IL-10 Düzeylerinin Tayini.....                                     | 17    |
| 4. BULGULAR.....                                                                                      | 19    |
| 4.1. Gibberellik Asitin Deney Hayvanlarının Gelişimi Üzerine Etkisi.....                              | 19    |
| 4.2. Gibberellik Asitin Serum TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-10 Düzeylerine Etkisi.....                     | 27    |
| 5. TARTIŞMA.....                                                                                      | 36    |
| 6. SONUÇLAR.....                                                                                      | 39    |
| 7. ÖZET.....                                                                                          | 40    |
| 8. ABSTRACT.....                                                                                      | 41    |
| 9. KAYNAKLAR.....                                                                                     | 43    |

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

|                      |                                             |
|----------------------|---------------------------------------------|
| ABA.....             | Absisitik Asit                              |
| ARDS .....           | Acute Respiratory Distress Syndrome         |
| ATP.....             | Adenozin Trifosfat                          |
| DMA.....             | Dimetilallil                                |
| DMA-PP.....          | Dimetilallil Pirofosfat                     |
| DNA.....             | Deoksiribonükleik Asit                      |
| ELİSA.....           | Enzyme-Linked Immunosorbent Assay           |
| GA3.....             | Gibberellik Asit                            |
| GH .....             | Growth Hormon                               |
| IGF .....            | İnsülin Like Growth Factor                  |
| IL-4.....            | İnterlökin-4                                |
| IL-10.....           | İnterlökin-10                               |
| IL-1.....            | İnterlökin -1                               |
| IL-6.....            | İnterlökin -6                               |
| IL-8.....            | İnterlökin -8                               |
| IL-12.....           | İnterlökin -12                              |
| IL-13.....           | İnterlökin -13                              |
| IPP.....             | İsopentil-Pirofosfat                        |
| JMML.....            | Juvenil Myelomonositik Lösemi               |
| MIP-1 $\alpha$ ..... | Makrofaj İnhibitör Protein-1 $\alpha$       |
| NADPH.....           | Nikotinamidadenin Dinükleotid Fosfat        |
| NHL.....             | Non Hodgkin Lenfoma                         |
| NK .....             | Natural Killer                              |
| TNF- $\alpha$ .....  | Tümör Nekrosis Faktor-Alfa                  |
| VEGF.....            | Vasküler Endotelyal Büyüme (Growth) Faktörü |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

| Şekil                                                                                                                                                                     | Sayfa |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 1. Kronik tedavi grubundaki sıçanların deney başlangıcındaki ağırlık grafiği. ....                                                                                        | 23    |
| 2. Kronik tedavi grubundaki sıçanların haftalık ağırlık değişim grafiği. ....                                                                                             | 24    |
| 3. Kronik tedavi grubunda kontrol, 2mg/kg GA <sub>3</sub> ve 20mg/kg GA <sub>3</sub> uygulanan gruplar arasındaki ağırlık değişimi grafiği. ....                          | 27    |
| 4.1. Kontrol hayvanlarında yaşla kilo artışı arasındaki oranla testis ağırlığı artışı arasındaki oran grafiği. ....                                                       | 28    |
| 4.2. Kronik tedavi grubunda 1 ay boyunca 3 haftada 3 kez 20mg/kg GA <sub>3</sub> uygulanan grupta bir testiste maligniteyi düşündüren makroskobik şekil değişikliği. .... | 29    |
| 5. Kronik tedavi grubunda TNF-alpha düzeyinde değişiklik grafiği.....                                                                                                     | 31    |
| 6. Akut tedavi grubunda TNF-alpha düzeyinde değişiklik grafiği.....                                                                                                       | 32    |
| 7. Kronik tedavi grubunda IL-4 düzeyinde değişiklik grafiği. ....                                                                                                         | 34    |
| 8. Akut tedavi grubunda kontrol ve 20mg/kg GA <sub>3</sub> uygulanan grupta IL-4 düzeyinin değişikliğinin grafiği. ....                                                   | 35    |
| 9. Kronik tedavi grubunda IL-10 düzeyinin değişiklik grafiği. ....                                                                                                        | 37    |

|                                                                                                                       |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 10. Akut tedavi grubunda kontrol ve 20mg/kg GA <sub>3</sub> uygulanan grupta IL-10 düzeyinin değişiklik grafiği. .... | 38 |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|



## 1.GİRİŞ

21. yüzyılın başında olduğumuz şu günlerde hızlı nüfus artışı, beraberinde bazı sorunları da getirmektedir. Dünyanın bugün için karşı karşıya olduğu beslenme sorunu, en iyimser tahminlerle bile her geçen yıl hızla artmaktadır. Bitkisel ürünlere dayalı beslenmenin dünyadaki dağılımı bütün bölgelerde aynı değildir. Çünkü tarımda bitkisel üretimi sınırlayan çeşitli faktörler bölgelere bağlı olarak değişim gösterir. Bunlar arasında verimli tarım topraklarının su ve rüzgar tarafından taşınması (erozyon) nedeniyle çoraklaşması, kuraklık, çevre kirliliği yer almaktadır. Öte yandan günümüzde ekonomisi tarıma dayanan, sınırlı tarım alanlarına ve artan nüfusa sahip olan herhangi bir ülkede bitkisel kaynaklardan mümkün olduğu kadar çok verim elde etmek zorunlu hale gelmiştir.

Dünyada artan nüfusun besin gereksinimlerini karşılamak ve uygun olmayan tarım alanlarından en verimli şekilde yararlanmak zorunluluğu araştırmacıları bu yönde çalışmalar yapmaya teşvik etmektedir. Bu çalışmalardan ümitli ve belki de çok önemli olanlarından biri bitki büyüme maddelerinin büyüme ve gelişmedeki özel ve önemli rollerinden yararlanmak, bir bakıma hormonal tarıma yönelmektir. Doğal olarak bitkilerde sentezlenen, büyüme ve buna bağlı diğer fizyolojik olayları kontrol eden, meydana geldiği yerden bitkinin diğer kısımlarına taşınarak oralarda da etkin olabilen çok az yoğunluklarda dahi etkisini gösterebilen organik maddelere “bitki büyüme faktörleri veya bitki hormonları” adı verilir (1,2). Bitki büyüme maddelerinin bitkiler üzerindeki fizyolojik etkilerinin çok çeşitli olması, onların tarım alanlarında yaygın biçimde kullanılmasına neden olmakta ve bu durum tarımsal çalışmalar için büyük bir ekonomik önem taşımaktadır.

Bitki büyüme düzenleyicilerinin nasıl, hangi bitkilerde ve hangi dozlarda uygulanması gerektiği üzerine dünyada çeşitli rehber kitaplar mevcuttur (3,4,5). Türkiye’de de Tarım Orman ve Köyişleri Bakanlığı, 04.01.1987 tarihli onayıyla hormonları ruhsata bağlamıştır (6). Ancak ülkemizde bitki büyüme düzenleyicileri yaygın bir şekilde ve ne yazık ki bilinçsiz olarak kullanılmaktadır. Üretici ne kadar yüksek doz kullanır ve ne kadar çok sayıda

uygulama yaparsa o kadar iyi sonuç alacağı inancındadır. Çünkü bu uygulamalarla bitkinin meyve tutumu olumsuz sera koşullarında bile sağlanabilmekte ve sınırlı alanlardan daha fazla verim elde edilebilmektedir. Oysa bu fazla doz ve uygulamaların meyve kalitesini bozduğu bunun yanı sıra insan sağlığına verebileceği zararlar da düşünülmektedir. Buna rağmen bugüne kadar üreticiyi bu düşüncesinden saptırmak mümkün olmamıştır (7).

Aslında bitki büyüme düzenleyicilerini doğru dozda ve zamanlarda kullanarak onlardan maksimum fayda elde edebiliriz. Bunun için bu maddeleri iyi tanımak son derece önemlidir.

Bu maddelerin kullanım dozları son derece önemli bir konudur. Bitki büyüme maddelerinin aşırı dozda kullanılmasıyla birlikte bitkilerde tümör oluşturmaları (8,9,10) gibi olumsuz değişimlere yol açması, bitkilerde protein, vitamin, aminoasit, glukoz miktarları ile DNA, RNA ve protein sentezinde değişimlere neden olması (11,12) gibi sebepler, araştırmacıları bu maddelerin ilk önce bitkilerde daha sonra da hayvan ve en önemlisi insan sistemlerindeki etkilerini araştırmaya sevk etmiştir.

Ekonomisi tarıma dayalı diğer ülkelerde olduğu gibi ülkemizde de son yıllarda ekonomik şartların gerekliliği olarak ve bilim dünyasının hızla ilerleyerek sunduğu değişikliklere ayak uydurabilmek için tarımda bitki büyüme maddeleri kullanılmaya başlamıştır. Bu maddeler günümüzde tarım alanlarında özellikle seracılıkta verimi arttırmak amacı ile yaygın olarak kullanılırken, bilimsel denetimden yoksun ve aşırı dozlarda kullanılması sonucunda hayvanlar ve özellikle insan sağlığı üzerinde olumsuz etkileri olabileceğini gösteren sınırlı sayıda literatür bilgisi bulunmaktadır.

Gibberellinler de 1926'dan beri bilinen bitki büyüme ve gelişmesinin düzenlenmesinde büyük önem taşıyan bitki büyüme faktörleridir (13). Gibberellinler tarımda verim ve kalitenin artırılması için kullanılmaktadır (14). Gibberellinlerin bitkilerde en çok bulunan çeşidi gibberellik asittir (GA<sub>3</sub>) (15).

Yaygın olarak kullanılan gibberelik asitin deney hayvanlarında yeterince araştırılınca karsinogenik etkileri gösterilmiştir. GA<sub>3</sub>'in sınırlı sayıda çalışmada karaciğerde hepatosellüler karsinom oluşturduğu, farelerde belirgin kilo artışı, aksiller bölgede sebaze adenom, meme ve akciğer adenokarsinomu oluşturduğu

gösterilmiştir (16,17). Swiss albino farelerde yapılan bir başka çalışmada da GA<sub>3</sub>'ün karaciğer, böbrek ve beyin dokularında biriktiği gösterilmiştir (18). Erişkin albino ratlarda yapılan bir çalışmada kanla direkt teması yoğun olan karaciğer, böbrek ve kalp gibi organlarda bitki hormonlarının toksik etkileri incelenmiştir. GA<sub>3</sub>'ün en önemli hasarı böbrekte oluşturduğu ve plazma ile lenfositik interstisyel hücre infiltrasyonuna neden olduğu gösterilmiştir (18). Bu çalışmalar GA<sub>3</sub>'ün hayati organları etkilediği, kanser ve benzeri patolojilere yol açabileceğini göstermektedir ama mekanizması ile ilgili bilgi vermemektedir. GA<sub>3</sub>'ün tümör gelişimine neden olmasının pek çok mekanizması olabilir. Kronik inflamasyon ile kanser gelişimi arasındaki bağlantı yakın dönemde ortaya konmuştur.

Bu sınırlı bilgiler GA<sub>3</sub>'ün kronik inflamasyonu artırarak tümör oluşabileceğini düşündürmektedir. Başka bir deyişle çalışmamızda GA<sub>3</sub>'in sitokin dengesini ve dolayısıyla inflamasyon cevabını değiştirerek tümör gelişimini indüklemesi yada kolaylaştırması olasıdır ve bu çalışmada bu olasılığı test etmek amaçlanmıştır.

Spesifik olarak kronik inflamasyonun kanser gelişimini (19) ve metastazı kolaylaştırdığı bilinmektedir (20,21). Tümör nekrozis faktör- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interlekin-4 (IL-4) ve interlekin-10 (IL-10) kanser gelişiminde yada önlenmesinde önemli sitokinlerdendir. Bu sitokinlerin düzeylerine bu çalışmada araştırılmıştır.

TNF- $\alpha$ 'nın etkisi iki yönlü olarak düşünülmüştür. Çalışmaların büyük bir kısmı TNF- $\alpha$ 'nın, gen mutasyonuna, gen amplifikasyonuna ve kromozomal instabiliteye neden olarak DNA (Deoksiribonükleik Asit) hasarına yol açtığı ve kanser oluşumunu kolaylaştırdığı yada indüklediğini göstermektedir (22). Ayrıca TNF- $\alpha$ 'nın mutajenik etkilerinin yanında mitojenik etkilerinin olduğu, over epitelyal hücre gelişimini stimüle ettiği gösterilmiştir (23). TNF- $\alpha$ 'nın kanser tedavisinde kullanıldığını gösteren çalışmalar da yumuşak doku sarkomasında ve irrezektabl melanomada izole uzuva infüzyonla TNF- $\alpha$  tedavisinin olumlu sonuç verdiği gösterilmiştir (eggermont 2003). Sıçanlar üzerinde yapılan çalışmalar büyük solid organ tümörlerinde TNF- $\alpha$ 'nın kemoteropötik ilaçlarla beraber kullanılmasının sinerjistik antitümör etkinliği olduğunu göstermiştir

(manusama-stavas 1996, manusama-nooijen 1996). İkinci önemli mediatör interlökin-4 (IL-4)'ün dikkat çekici etkisi proinflamatuvar sitokinlerin salınımını ve ekspresyonunu inhibe etmektedir (24,25,26,27). IL-4 ile ilgili çalışmalar genel olarak IL-4'ün tümör gelişimini engellediğini göstermektedir ve IL-4'ün bu etkisi proinflamatuvar sitokinlerin salınımını inhibe etmesine, sitotoksik immün yanıt oluşturmaya bağlı görünmektedir (28,29). Hatta Evre IV küçük hücreli dışı akciğer kanserinde rekombinant insan IL-4 ile tedavi kullanılarak doza bağımlı olumlu sonuç alınmıştır (30).

Çalışmada değerlendirilen son sitokin İnterlökin-10 (IL-10), IL-4 gibi antiinflamatuvar sitokinlerdendir (31). IL-10, monosit/makrofaj ürünü olan proinflamatuvar sitokinleri ki bunlar TNF- $\alpha$ , IL-1 (İnterlökin-1), IL-6 (İnterlökin-6), IL-8 (İnterlökin-8), IL-12 (İnterlökin-12) ve granülosit koloni stimüle edici faktörü inhibe etmektedir (32,33,34,35,36,37). IL-10 eksikliğinin kolorektal kanser gelişimini arttırdığı görülmüştür (38). Benzer şekilde IL-10'un ekspresyonunda artışın kutanöz malign melanoma, meme kanserine ve over kanserine karşı koruyucu olduğu, tümör gelişimini engellediği gösterilmiştir (39,40,41,42).

Sonuç olarak GA<sub>3</sub>'ün tümör oluşumunu arttırıcı etkisini gösteren sitokin dengesindeki bozuklukların yeri olabilir. Bu çalışmada bu sitokinler incelenmiştir. Bizim hipotezimiz; GA<sub>3</sub>'in inflamasyon artışıyla mutasyona neden olduğu yada mutasyona uğramış hücrelerin yok edilmesini engellediği ve tümör oluşumunu hızlandırdığı şeklindedir. İnflamasyon-antiinflamasyon arası dengenin bozulmasının göstergesi olarak da TNF- $\alpha$ , IL-4 ve IL-10'un değişikler araştırılmıştır.

Bu bilgiler ışığında, sıçanlara 30 gün gibberellik asit verilerek TNF- $\alpha$ , IL-4 ve IL-10 düzeylerine serumda bakıldı. Ayrıca GA<sub>3</sub>'in sitokinler üzerine akut etkisi tek verielerek incelendi. Bu çalışmanın sonucunda GA<sub>3</sub>'in inflamasyonu arttırarak sitokin dengesi üzerine etkisini değerlendirebileceğimizi düşünmekteyiz.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Bitki büyüme Düzenleyicilerinin Tanımı

Büyüme düzenleyicileri, bitkiler tarafından oluşturulan ya da bitkiye dışarıdan verilen ve çok küçük miktarlarda; bitkide büyüme, gelişme ve diğer fizyolojik olayları tek başına veya birlikte, olumlu ya da olumsuz yönde etkileyebilen, oluştukları dokularda etkin olabildikleri gibi bitkinin diğer kısımlarına taşınabilen ve bu etkinliği diğer kısımlarda da gösterebilen organik maddelerdir. Bitkinin kendisinde oluşan, bitkinin büyümesini düzenleyen bu maddelere bitki hormonu da denir (1,2). Bir maddenin hormon olarak nitelendirilebilmesi için bitkide oluşması, oluştuğu yerden başka bir yere taşınabilir olması, taşındığı yerde değişik yaşam olaylarını yönetmesi veya düzenlemesi, çok düşük konsantrasyonlarda bu etkilerini gösterebilmesi gerekir.

Bitkide meydana gelen fizyolojik faaliyetlerin çoğu hormonların kontrolü altındadır. Hormonların etkileri daima bir denge içerisinde, birbirini tamamlayıcı veya bir diğerinin etkisini azaltıcı olarak ortaya çıkar (13).

Bitki hormonları ile insan hormonları arasındaki fark, birçok insan hormonunun etkileri spesifik olmasına karşılık, bir bitki hormonunun bitki doku veya organ tipine bağlı olarak pek çok farklı etkinliklere sahip olabilmesidir. Bu sebeple bitki hormonları için büyüme düzenleyicileri veya büyüme maddeleri deyimleri daha çok kullanılmaktadır. Ama çok küçük miktarlarda etkin olmak ve sentezlendikleri yerden uzakta etki edebilmeleri onların hormon niteliklerini destekleyici bilgilerdir.

Bitki büyüme düzenleyicileri doğal ve sentetik olmak üzere iki şekildedir. Doğal olanlar bitkinin kendisi tarafından sentezlenmekte, yapay olanlar ise bitkilerden izole edilen ve yapıları açıklanmış hormonlardan sağlanan bilgilere dayanılarak, kimya endüstrisi tarafından geliştirilen değişik yapı ve özellikteki maddelerdir. Yapay maddelerin zaman zaman doğal olanlarından daha etkili bulundukları ve bunların yerini alabildikleri görülmüştür.

## **2.2. Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Sınıflandırılması**

Bitkisel hormonlar, bitkiler üzerindeki uyarıcı ve geciktirici özellikleri dolayısıyla iki ana grupta incelenebilirler. Bitki büyüme ve gelişmesini başlatıp hızlandıranlara uyarıcı, büyüme ve gelişmeyi yavaşlatıp durduranlara da engelleyici denilir. Bitki büyümesini düzenleyen hormonlar günümüzde beş tiptir (14). Bunlardan bitkilerde uyarıcı etki yapan hormonlar, oksinler, gibberellinler ve sitokinlerdir. Bitkide büyümeyi engelleyen hormonlar ise absisitik asit (ABA) ve etilendir.

İlk kez 1880 yılında Charles Darwin ve oğlu Francis Darwin'in gözlemleriyle keşfedilen bitki büyüme düzenleyicileri, aktif olarak 1926 yılında Frits Went tarafından araştırılmaya başlanmıştır. 1926'da ilk kez oksin keşfedilmiş ve 1928'de oksin kantitatif olarak ilk kez Went tarafından belirlenmiştir. Batı dünyası botanikçileri sadece oksinin bir fitohormon olduğuna inanıyorlardı, fakat çok geçmeden gibberellinler, sitokinler, absisitik asit ve etilenin önemi keşfedildi (15). Günümüzde de yeni bitki düzenleyicileri arayışı büyük bir hızla devam etmektedir.

## **2.3. Çalışmada Kullanılan Bitki Büyüme Düzenleyicilerinden Gibberellik Asit'in Genel Özellikleri**

Gibberellinler (GA) adını Gibberella fujikuroi (Fusarium moliniforme) adlı bir fungustan almıştır (43,44,45) ve Japonya'da 1926'da bir Japon botanikçi olan Kurosawa tarafından keşfedilmiştir (1,13). Bu fungusla enfekte olan pirinç bitkileri aşırı uzama (bakanae) hastalığına yakalanmışlardır (43,44,45). Araştırmacı mantardan ve mantarın yetiştiği ortamdan hazırladığı özütü kullanarak farklı bitkilerde aynı semptomların meydana gelmesini sağlayabilmiştir (46).

1939 yılında Yabuta ve Hayashi adlı araştırmacılar bitkilerde aşırı boy uzamasına neden olan maddeyi kristal hale getirmeyi başarmışlardır (46,47).

Uluslararası konum Japon araştışıcıların keşfine gerekli önemin verilmesini engelledi. Boylanmaya ve erken çiçeklenmeye neden olan bu madde ancak 1950'li yıllardan itibaren tekrar incelenmeye başlanmıştır (48). 1955'de İngiliz araştırıcı Brian ve yardımcıları sadece tek bir gibberellin üreten bir *Fusarium* suşu elde etmeyi başardılar. Gibberellin miktarı, yapısı belirlenebilecek kadar yeterliydi. Bu madde Gibberellik Asit veya Gibberellin A<sub>3</sub> (GA<sub>3</sub>) adını aldı (49).

Gibberellik Asit ticarete sunularak deneysel ve uygulamalı çalışmalarda kullanıldı ve gibberellik gücü test edilmek istenen bileşiklerde referans olarak hizmete girdi. şimdi artık Gibberellik Asit veya Gibberellin denildiğinde sadece GA<sub>3</sub> anlaşılmaktadır (49).

Gibberellinler şu ana kadar 126 bileşiği içeren büyük bir gruptur (50). Gibberellinler diterpenoid asitlerdir ve kimyasal yapılarında “Gibban-karbon iskeleti” bulunmaktadır. Gibberellinler asit yapısındadırlar ve yüksek bitkilerde en çok bulunan çeşidi gibberellik asittir (GA<sub>3</sub>) (15). Gibberellik asit (GA<sub>3</sub>)'in kapalı formülü C<sub>19</sub>H<sub>22</sub>O<sub>6</sub> olup molekül ağırlığı 346,7'dir. Erime derecesi 233-235 °C arasında değişen GA<sub>3</sub>'ün çözücöleri su, eter, metanol, etanol, aseton, etil asetat, sodyum bikarbonat ve sodyum asetatır.

Gibberellinlerin biyosentezi uzun zamandan beri bilinmekte olup gibberellinlerin terpen grubuna ait olduğu doğrulanmıştır. Gibberellin 20 karbonlu bir diterpendir. Sentezi mevalonik asit aracılığı ile olur; bu asit genellikle koenzim-A'nın aktive ettiği üç asetilin birleşmesiyle oluşur, NADPH (Nikotinamidadenin Dinökleotid Fosfat) ile de indirgenme göröölür. Mevalonik asit karbonu, suyunu kaybedip ATP (Adenozin Trifosfat) ile aktive edilmiş halde pirofosfatı bağlayarak isopentil-pirofosfat (IPP) haline döner. Bu da zaten aktifleşmiş isoprendir. İPP dimetilallil pirofosfat (DMA PP) halinde izomerleşir. İki, sonra üç, sonrada dört DMA geranil-geranil pirofosfat oluşturmak üzere birleşir. Bunlar bir diterpen olan kauren şeklinde halkalanır. 20 karbonlu kauren tüm gibberellinlerin çıkış noktasıdır. Burada sekiz köşeli orta halka küçük değişikliklerle (oksidasyon, ikili bağ oluşumu vb....gibi) beş halkalı hale döner (6. karbon orta HCO<sub>2</sub>'yi oluşturur). Bu sentez genç filiz ve köklerin uç bölgelerinde, genç yapraklarda, embriyoda (aks ve kotiledonlar) özellikle

yoğundur. Gibberellin miktarı üretici dokularda vejetatif dokulara göre çok daha yüksektir (47,49).

### **2.3.1. Gibberellik Asit'in Kullanım Alanları Ve Fizyolojik Etkileri**

Bitki büyüme düzenleyicisi olarak tarımda yaygın şekilde kullanılan gibberellinler hücre büyüme ve bölünmelerini artırarak boy uzamasını sağlamaktadırlar. GA<sub>3</sub> özellikle meyve uzaması ve genç ağaçlarda yan dal uzaması için yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (15).

Gibberellinlerin bitkiler üzerindeki en belirgin etkileri hücrenin hacimce büyümesi ve sonuçta bölünmesi veya her iki olayda etkili olmalarıdır. Gibberellinler verim ve kalitenin artırılmasıyla ilgili değişik fizyolojik gelişmelerde önemli etkinliklere sahiptir (1,14).

Gibberellinler, tohumların dinlenme veya uyku halini yani dormansiye kırarak çimlenmeyi teşvik ederler (13). Bitkisel organlardaki dormansinin sona erişinin, gibberellin sentezindeki artış ile ilişkili olduğu bilinmektedir (1,49,51).

Gelişen tohumlarda yüksek konsantrasyonlarda oluşan gibberellin tohum çimlenmesinde ve dormansinin kontrolünde önemli fonksiyonları olduğu bilinmektedir (51). Tohum çimlenmesinde depo nişastasının hidrolize edilmesini sağlayan enzim (alfa-amilaz) oluşumunu sağlayarak nişastanın embriyo tarafından kolaylıkla kullanılabilen şekerlere dönüşümüne yardımcı olur ve çimlenmeyi kolaylaştırır. Bir başka ifadeyle döllenme ve tohum olgunluğu arasındaki embriyonik safha olaylarının düzenlenmesinde önemli bir rol oynar (52). Gibberellik asitin bu etkisinden bira endüstrisinde malt üretilmesinde yararlanılmaktadır (2). Gibberellinlerin Havai'de şeker kamışı büyümesini ve şeker verimini arttırmak için ticari olarak kullanıldığı rapor edilmektedir (53).

Gibberellik asitin uygulanması bitkilerde polinasyon (tozlaşma) sonucu meyve tutulumunun ve meyvelerde büyümeyi arttırabilmektedir (1). Gibberellinlerin diğer etkileri; yapraklarda ve turuncgil meyvelerinde yaşlanmayı geciktirme ve yaprak görünümünü etkileme olarak sıralanabilir. İkinci etki nedeniyle yaprakların görünüşü değişir ve heterofili ortaya çıkar (53).

Gibberellinin çok yoğun olarak tepe tomurcuklarında, kıvrılmış genç yapraklarda ve genç nodyum (gövde üzerinde yaprak ya da tomurcuğun geliştiği yer) aralarında bulunduğu gözlenmiştir. Yaşlı dokularda ise çok az miktarda bulunur. Apikal tomurcuklar ve genç yapraklar gibberellin üretim merkezleridir. Gibberellinler gövdeye oranla çok az olmakla birlikte kökte de tespit edilmiştir. Ayrıca çiçek taslakları ve özellikle oluşum halindeki tohumlarda da önemli miktarda gibberellin bulunduğu bilinmektedir (48).

### 2.3.2 Gibberellik Asit'in Patolojik Etkileri

Ekonomisi tarıma dayalı diğer ülkelerde olduğu gibi ülkemizde de son yıllarda ekonomik şartların gerekliliği olarak ve bilim dünyasının hızla ilerleyerek sunduğu değişikliklere ayak uydurabilmek için tarımda bitki büyüme maddeleri kullanılmaya başlamıştır. Bu maddeler günümüzde tarım alanlarında özellikle seracılıkta verimi arttırmak amacı ile yaygın olarak kullanılırken, bilimsel denetimden yoksun ve aşırı dozlarda kullanılması sonucunda hayvanlar ve özellikle insan sağlığı üzerinde olumsuz etkileri olabileceğini gösteren sınırlı sayıda literatür bilgisi bulunmaktadır.

Bir kurbağa türü olan Bufo regularis üzerinde GA<sub>3</sub>'in etkisi ile ilgili olarak yapılan bir çalışmada bu maddenin kurbağa karaciğerinde hepatosellüler karsinom oluşturduğu saptanmıştır (16). GA<sub>3</sub>'in karsinojenik etkilerinin araştırıldığı başka bir çalışmada gavaj yolu ile 22 ay beslenen Swiss albino farelerde belirgin kilo artışı, aksiller bölgede sebaze adenom, meme ve akciğer adenokarsinomu oluşturduğu görülmüş. GA<sub>3</sub>'in farelerde kanserojen olduğu vurgulanmıştır (17).

Swiss albino farelerde yapılan bir başka çalışmada da GA<sub>3</sub>'in karaciğer, böbrek ve beyin dokularında biriktiği gösterilmiştir (18). Bu çalışmada GA<sub>3</sub>'in 100mg/l olarak kullanılan dozu 1ml metanolde çözünerek swiss albino farelerin doğumdan 10 hafta boyunca içme suyuna ilave edilmiştir. 10. hafta sonunda deney sonlandırılarak böbrek, beyin ve karaciğer dokuları alınmıştır. Bu dokularda GA<sub>3</sub>'in birikimi ölçüldüğünde en fazla böbrek dokusunda, daha sonra karaciğerde en az beyin dokusunda biriktiği görülmüştür. Bu çalışmalar GA<sub>3</sub>'in

karsinogen olabileceğini göstermektedir ama mekanizması ile ilgili bilgi vermemektedir. GA3'ün tümör gelişimine neden olmasının pek çok mekanizması olabilir. Önceki çalışmalar GA3'e bağlı tümör gelişiminde, immünolojik doku hasarının ve endojen büyüme faktörlerinin salınımının rol oynadığını düşündürmektedir. Örneğin, erişkin albino ratlarda yapılan bir çalışmada kanla direkt teması yoğun olan karaciğer, böbrek ve kalp gibi organlarda bitki hormonlarının toksik etkileri incelenmiştir. GA3'in en önemli hasarı böbrekte oluşturduğu ve plazma ile lenfositik interstisyel hücre infiltrasyonuna neden olduğu gösterilmiştir (18).

### **2.3.3. İnflamasyon ve Kanser İlişkisi**

Rudolf Virchow 1863'de malign neoplazmların kronik inflamasyondan meydana geldiği hipotezini ortaya atmıştır. Virchow irritan durumların doku hasarına, inflamasyona ve hücre proliferasyonuna neden olduğuna dikkati çekmiştir (54,55). Kronik inflamasyonun kanser gelişimini (19,56) ve metastazı kolaylaştırdığı bilinmektedir (20,21,57,58).

Yara iyileşmesinde inflamasyonun durmaması ve sürekli devam etmesi sonucunda malignite ile ilişkili hücreler ve dokularda anormallikler oluşur (54,55). Dvorak'a göre fizyolojik yara iyileşmesi ile stromada neoplastik hücre proliferasyonu ve invazyonunun oluşabilmesi için gereken patolojik mekanizma arasında benzerlik vardır (59,60). Tümör gelişiminde de yara iyileşmesine benzer şekilde öncelikli olarak makrofajlar toplanır; makrofajlar büyüme faktörlerinin ve sitokinlerin en önemli kaynağıdır (55). Kutanöz melanoma ve sokuamöz hücreli kanser prekürsörü olan lezyonlarda, displastik nevusta ve karsinoma in situ lezyonlarında makrofajların varlığı gösterilmiştir (58,61,62).

İnflamasyonun birçok kanser tipinde risk faktörü olduğu çalışmalarda tanımlanmıştır (63,64). Örneğin özefagusta gastroözefageal reflü sonucu kronik inflamatuvar hasar, özefajit ve sonrasında barrett kolumnar epitelyal metaplazi geliştiği gösterilmiştir (65). Aspest fiberlerine maruz kalan plevrada aspestosis maruziyetin devamında da mezotelyoma geliştiği gösterilmiştir (66). Ultraviyole ışınları ile önce güneş yanığı maruziyet devam ederse melanoma

gelişebilmektedir (67). İnflamatuvar barsak hastalıkları ile kolorektal kanser arasında da benzer şekilde korelasyon vardır; inflamatuvar barsak hastalığı olan birisinin yaşam boyu kolorektal kanser gelişme riski artmıştır. (68,69,70,71).

#### **2.4. Tümör Nekrozis Faktör-alfa (TNF- $\alpha$ )**

Kronik inflamasyonun kanser gelişimini (19) ve malign hücrelerdeki metastatik durumu kolaylaştırdığı bilinmektedir (20,21). Tümör nekrozis faktör- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) kanser immünolojisinde önemli sitokinlerdendir.

TNF, ilk olarak Bacillus-Calmette-Guerin ile infekte farelerde hemorajik tümör nekrozunda gösterilmiştir (72). TNF- $\alpha$  157 aminoasitli, 17 kDa molekül ağırlığına sahiptir ve hücre yüzeyine 2 adet homotrimerik reseptörü ile bağlanır (73). Tümördeki mikroyapılanma tümör hücresi ile stromal hücreler arasındaki sitokinler aracılığı ile olur. Bu sitokinlerden en önemlisi TNF- $\alpha$ 'dır (74). TNF'nin inflamasyonda, viral replikasyonda, tümör metastazında, transplant rejeksiyonunda major mediatör olduğu araştırmalarla açığa kavuşturulmuştur (75,76,77). TNF- $\alpha$ , DNA (Deoksiribonükleik Asit) üzerine direkt etkisi olduğu bilinen önemli bir inflamatuvar sitokindir. Bir çalışmada TNF- $\alpha$ 'nın DNA hasarına yol açtığı ve mutajenik etkisinin iyonize radyasyona benzer olduğu gösterilmiştir. Hatta TNF- $\alpha$  tedavisinin kültürdeki hücrelerde gen mutasyonunu, gen amplifikasyonunu ve kromozomal instabiliteyi arttırdığı gösterilmiştir (22). Monosit ve makrofaj ürünü olan TNF- $\alpha$ 'nın over tümör hücre büyümesini stimüle ettiği bilinmektedir. Bir çalışmada monosit ürünü olan sitokinlerin otokrin ve parakrin etkiyle normal ve malign over epitel hücrelerinde büyümeyi stimüle ettiği gösterilmiştir (23,78). Meme, over, kolorektal, prostat, mesane, özefagus, renal hücreli kanser, melanoma, lenfoma ve lösemilerde TNF- $\alpha$ 'nın tümör mikro yapılanmasını arttırdığı gösterilmiştir (79,80,81,82,83,84).

TNF makrofajlardan ve çok çeşitli tümör hücrelerinden sentezlenir (56); B hücreli lenfoma (85,86), kutanöz T hücreli lenfoma (87), megakaryoblastik lösemi (88), erişkin T hücreli lösemi (89), akut myeloid lösemi (90), kronik lenfositik lösemi (91), akut lenfositik lösemi (92), meme kanseri (93), kolon kanseri, akciğer kanseri, skuamöz hücreli karsinoma, pankreas kanseri (94), over

kanseri (95,96,97,98), glioblastoma (99), nöroblastoma (100) bu tümörlerdendir. TNF-  $\alpha$ , tümörler de büyüme faktörlerinin ekspresyonunu artırır (94,98). TNF-  $\alpha$ 'nın makrofaj aracılı angiogenezi sağladığı rapor edilmiştir (101).

Non-Hodgkin lenfoma, myeloid lösemi ve kronik lenfositik lösemi de dolaşımda yüksek düzeyde TNF ve TNF'nin çözünebilir reseptörlerinin olması kötü prognoz kriteri olarak kabul edilir (102).

Bu çalışmaların yanında kanser tedavisinde TNF-  $\alpha$ 'nın kullanıldığını gösteren çalışmalarda mevcuttur. Yumuşak doku sarkomasında ve irrezektabl melanomada izole uzuva infüzyonla TNF-  $\alpha$  tedavisinin olumlu sonuç verdiği gösterilmiştir (eggermont 2003). Sıçanlar üzerinde yapılan çalışmalar büyük solid organ tümörlerinde TNF- $\alpha$ 'nın kemoteropötik ilaçlarla beraber kullanılmasının sinerjistik antitümör etkinliği olduğunu göstermiştir (manusama-stavas 1996, manusama-nooijen 1996).

## **2.5. İnterlökin-4 (IL-4)**

İnterlökin-4 (IL-4), olgun T helper-2 hücreleri ile mast hücreleri ya da bazofiller tarafından sentezlenen 20 kDa'luk glikoproteindir (103,104). IL-4 kanser immünolojisinde önemli sitokinlerdendir. IL-4'ün dikkat çekici etkisi proinflamatuvar sitokinlerin salınımını ve ekspresyonunu inhibe etmek şeklindedir (24,25,26,27,31). IL-4'ün inhibe ettiği sitokinler interlökin-1 (IL-1), interlökin-6 (IL-6), interlökin-8 (IL-8), tümör nekrosiz faktör-alfa (TNF- $\alpha$ ) ve makrofaj inhibitör protein-1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ )'dır (24,25,26,27,31). IL-4'ün aktive ettiği tümör inhibisyonu makrofaj ve eozinofil infiltrasyonu ile olur (105,106,107,108).

IL-4'ün bronkopulmoner displaziye neden olan inflamatuvar sitokin ürünlerini önlediği çalışmalarda gösterilmiştir (109). Ek olarak IL-4 tümör dokusuna karşı sitotoksik cevabı güçlü bir şekilde artırır (28,29). IL-4'ün kolon kanserini ve meme kanserini inhibe ettiği kültürde ekilen kanser hücrelerinde gösterilmiştir (29). Evre IV küçük hücreli dışı akciğer kanseri olan 63 hastada yapılan bir çalışmada rekombinant insan IL-4 ile tedavi yapılarak doz bağımlı olumlu sonuç alınmıştır (30). IL-4'ün hastalığı stabilize edici ve tümör

hücrelerinin ölümüne kadar götürebilecek ciddi etkisi olduğu görülmüştür. Bu veriler IL-4'ün adjuvan tedavide kullanılabileceğini gösterir.

Juvenil myelomonositik lösemi (JMML) hücreleri ile in vitro yapılan bir çalışmada; IL-10, IL-4 ve IL-13 uygulanan hücrelerde IL-10 ile JMML hücrelerinin yaşayabilirliği inhibe olmuş ancak IL-4 ve IL-13 ile inhibisyon görülmemiştir (110).

Anti-inflamatuar sitokinler olarak bilinen IL-4 ve IL-10, tümör geliştirilen farelere uygulanmış ve IL-4 uygulanan farelerde tümör rejeksiyon cevabı alınırken IL-10 verilen farelerde hiç etki görülmemiştir. Ayrıca IL-4 uygulanan farelerde nötrofil ve NK (natural killer) hücrelerde artma ve splenomegali tespit edilmiştir (111)

## **2.6. İnterlökin-10 (IL-10)**

İnterlökin-10 (IL-10), insan immün cevabında en önemli anti-inflamatuar sitokindir (112). IL-10 esas olarak CD4(+) Th2 hücrelerinde, monositlerde ve B hücrelerinde sentezlenen dolaşımda sıkıca paketlenmiş homodimer yapıda bulunan 160 aminoasitli bir proteindir (113,114). IL-10 reseptörü, tetramer yapısındadır ve iki alfa zinciri iki de beta zinciri içerir. IL-10, alfa zincirli 110-kd'luk reseptörüne yüksek afinite ile bağlanır (115,116). Bu sırada 40-kd'luk beta subünitesine ihtiyaç duyar (117). IL-10, monosit/makrofaj ürünü olan proinflamatuar sitokinleri ki bunlar TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 ve granülosit koloni stimüle edici faktörü inhibe eder (32,33,34,35,36,37,112).

IL-10, hücre yüzeyindeki TNF reseptörlerini ve TNF reseptörlerinin sistemik dolaşıma geçişini azaltır (118,119). IL-10, çeşitli inflammatuar durumlarda ve sistemik hastalık durumunda hastaların dolaşımında kolaylıkla ölçülebilir (34,120). IL-10 düzeylerinin dolaşımda yeterli konsantrasyonda olması konağın sistemik inflammatuar cevabı açısından gereklidir (31). Akut akciğer hasarında IL-10'un akciğerde düşük konsantrasyonda olması bu hastaların çoğunda ARDS (Acute respiratory distress syndrome) gelişimi ile sonuçlanmaktadır (121).

IL-10 eksikliği olan farelerde yapılan bir çalışmada takipte önce displazi sonra kolorektal kanser geliştiği görülmüştür (38). Bir diğer çalışmada yüksek IL-10 ekspresyonunun kutanöz malign melanoma karşı koruyucu olduğu, bu antitümör etkinliği; VEGF (vascular endothelial growth factor)'ün sentezini azaltarak anjiogenezi inhibe etmesine bağlanmıştır (39,40). Meme kanseri modeli ile farelerde yapılan bir çalışmada IL-10'un antimetastatik ve antitümör etkinliği kanıtlanmıştır (41). IL-10'un antimetastatik etkinliği; NK (natural killer) hücreleri aracılığı ile sağladığı gösterilmiştir (41,122). Over kanserli farelerde yapılan bir çalışma da IL-10, VEGF (vascular endothelial growth factor)'ü over kanser hücrelerinde azaltarak tümör büyümesini, anjiogenezi ve peritoneal yayılımı engellediği gösterilmiştir (42). Bu çalışmalar gelecekte antimetastatik tedavi modalitelerinde IL-10'un etkili olarak yer alacağını göstermektedir.

Nonhodgkin lenfoma (NHL)'lı 153 hastada retrospektif olarak yapılan bir çalışmada orta dereceli ve yüksek dereceli NHL'da IL-10'un hasta serumlarında ELİSA (enzyme-linked immunosorbent assay) yöntemiyle artmış olarak ölçülmesi kötü prognoz kriteri olarak kullanılabileceğini göstermiştir (123). Küçük hücreli dışı akciğer kanserli 60 hastada kemoterapi öncesi ve sonrası IL-10 düzeyleri incelendiğinde IL-10 düzeyinin artışı kötü prognostik faktör olarak kullanılabileceğini göstermiştir (124). Ancak diffüz büyük hücreli lenfomalı hastalarda yapılan çalışmada IL-10'un prognostik faktör olarak kullanılamayacağını göstermiştir (125). Yapılan bir çalışmada hepatosellüler karsinomada tümör rezeksiyonu sonrası IL-10 düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı azalma tespit edilmiştir, bu nedenle IL-10'un progresyonu göstermede önemli rol oynadığı belirtilmiştir (126).

### **3. GEREÇ VE YÖNTEM**

#### **3.1. Kullanılan Deney Hayvanları**

Deneyler, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Deney Hayvanları Laboratuvarlarında saf Wistar sıçanlardan (Harlan, İsrail) üretilmiş;  $22 \pm 2$  derece sıcaklık, % 50-60 nem ve 12 saat aydınlık fotoperyot içeren laboratuvar koşullarında yetiştirilmiş, 6 haftalık (kronik tedavi grubu) ve 15 haftalık (akut tedavi grubu) erkek sıçanlarla Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Deney Hayvanları Laboratuvarlarında yapıldı.

Sıçanlar standart sıçan yemi ile beslenerek, günlük su ihtiyaçları da düzenli bir şekilde karşılandı.

#### **3.2. Kullanılan Bitki Büyüme Düzenleyicisi**

Bitki büyüme düzenleyicisi olarak seçilen gibberellik asit (Sigma G7645) metanolde çözünerek, her grup için farklı oranlarda distile su ile sulandırılarak kullanıldı.

##### **3.2.1.Sıçanlara Bitki Büyüme Düzenleyicisinin Uygulanması**

Bu çalışmada sıçanlara iki farklı uygulama yapıldı. İlk uygulama kronik tedavi grubu, ikinci uygulama akut tedavi grubu olarak belirlendi.

#### DENEY GRUPLARI:

A) Kronik tedavi grubu, n=33 sıçan

A1) Kontrol Grubu: Distile su ile hazırlanmış %20'lik metanol solüsyonundan 0,1 ml/100 mg başına verildi (n=11).

A2) 2 mg/kg GA<sub>3</sub> Grubu: 1 g gibberellik asit tozu 10 ml metanol ile çözüldükten sonra distile su seyreltilti. Hazırlanan 2 mg/ml'lik gibberellik asit solüsyonundan 0,1 ml/100 mg başına verildi (n=11).

A3) 20 mg/kg GA<sub>3</sub> Grubu: 1 g gibberellik asit tozu 10 ml metanol ile çözüldükten sonra distile su ile hazırlandı. Hazırlanan bu 20 mg/ml'lik gibberellik asit solüsyonundan 0,1 ml/100 mg başına verildi (n=11).

B) Akut tedavi grubu, n=19 sıçan

B1) Kontrol Grubu: Distile su ile hazırlanmış %20'lik metanol solüsyonundan 0,1 ml/100 mg başına verildi (n=9).

B2) 20 mg/kg GA<sub>3</sub> grubu: 1g gibberellik asit tozu 10 ml metanol ile çözüldükten sonra distile su ile seyreltilti. 20 mg/ml'lik gibberellik asit solüsyonundan 0,1 ml/100 mg başına verildi (n=10).

İntraperitoneal enjeksiyon miktarı mg/kg vücut ağırlığı esasına uygun 100 g sıçan ağırlığına 0,1 ml çözelti kuralına göre, değişen ağırlık oranınca oransal olarak hesaplanarak yapıldı. Uygun konsantrasyonlardaki deney çözeltilerinin hayvanlara enjeksiyonu bir mililitrelik steril plastik enjektörlerle yapıldı ve her bir enjektör bir kere kullanılarak atıldı.

Kronik tedavi grubundaki sıçanlara hayvanların ağırlığına göre ayarlanan dozlarda çözeltiler intraperitoneal olarak haftada üç gün olmak üzere 30 gün enjeksiyon yapıldı, her hafta ağırlıkları ölçüldü ve deney sonlandırılarak serum ve dokular ayrıldı.

Akut tedavi grubundaki sıçanlara hayvanların ağırlığına göre ayarlanan dozlarda çözeltiler intraperitoneal olarak yapıldı ve 3 saat sonrasında deney sonlandırılarak serum ve dokular ayrıldı.

### **3.3. Kan alma, Disseksiyon İşlemleri ve Çalışılacak Materyallerin Eldesi**

Eter anestezisi altında karın kısmından açılarak abdominal aortadan kan alınarak öldürülen sıçanların safra kesesi patlatılmadan ayrıldıktan sonra karaciğer çıkartılıp sıvı nitrojende dondurularak saklandı. Kan örnekleri EDTA'lı deney tüplerine konulularak santrifüjde 3000 devirde 5 dakika santrifüj edildi. Serumların ayrıştırılması 15 dakika içinde yapıldı ve bu süre içinde kan örnekleri buz içinde saklandı. Santrifüj edilen kanın serumu otomatik pipet yardımı ile ependorf tüplerine ayrıldı ve hemen sıvı nitrojende dondurularak -80 derecede saklandı.

### **3.4. Testis Ağırlıklarının Ölçümü**

Kronik tedavi grubundaki sıçanların 30 gün boyunca enjeksiyonlar sırasında testislerinin belirgin büyüdüğü gözlemlendi. Eter anestezisi altında karın kısmından açılan sıçanların testisleri çıkarıldı ve formalinde fixe edildi. Daha sonra hafifçe kurutularak hassas terazide ağırlıkları ölçüldü. Akut tedavi grubundaki sıçanların testislerinin ağırlıkları da aynı şekilde ölçüldü.

### **3.5. Serum TNF- $\alpha$ , IL-4 ve IL-10 Düzeylerinin Tayini**

#### **3.5.1. Serum TNF- $\alpha$ Düzeyinin Tayini**

Ependorf tüplerine ayrılan ve -80 derecede saklanan serumlarda Biosource Immunassay TNF- $\alpha$  Rat Kit'i kullanılarak ELISA (Enzyme Linked-Immuno-Sorbent Assay) yöntemi ile TNF- $\alpha$  düzeyi Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Sağlık Bilimleri Araştırma Merkezi'nde ölçüldü.

#### **3.5.2. Serum IL-4 Düzeyinin Tayini**

Ependorf tüplerine ayrılan ve -80 derecede saklanan serumlarda Biosource Immunassay IL-4 Rat Kit'i kullanılarak ELISA (Enzyme Linked-Immuno-Sorbent Assay) yöntemi ile IL-4 düzeyi Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Sağlık Bilimleri Araştırma Merkezi'nde ölçüldü.

### **3.5.3. Serum IL-10 Düzeyinin Tayini**

Ependorf tüplerine ayrılan ve -80 derecede saklanan serumlarda Biosource Immunassay IL-10 Rat Kit'i kullanılarak ELISA (Enzyme Linked-Immuno-Sorbent Assay) yöntemi ile IL-10 düzeyi Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Sağlık Bilimleri Araştırma Merkezi'nde ölçüldü.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Gibberellik Asitin Deney Hayvanlarının Gelişimi Üzerine Etkisi

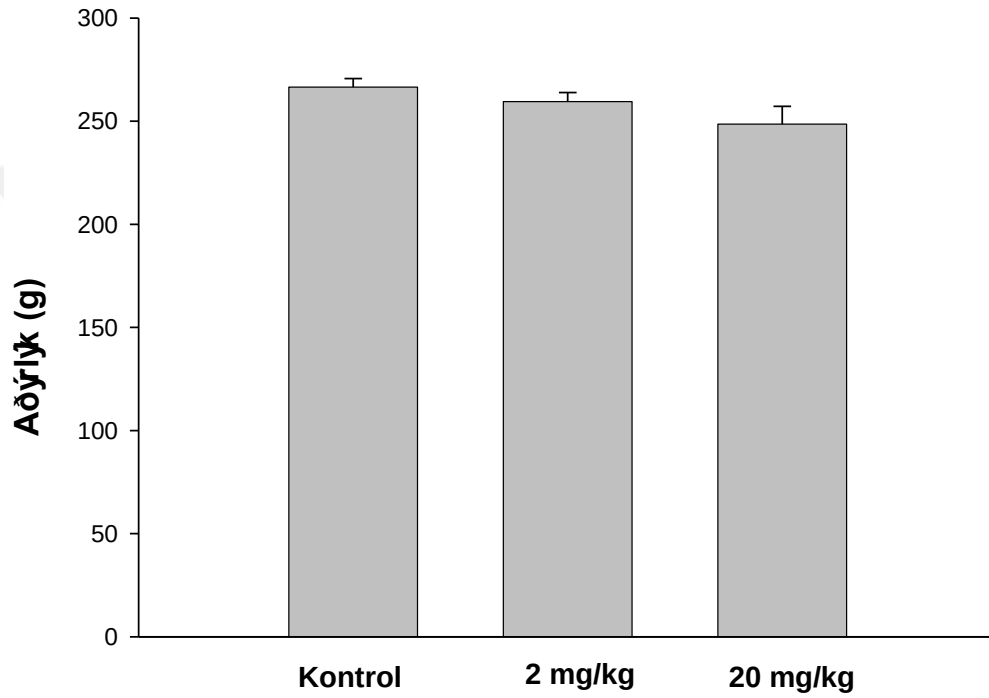
#### 4.1.1. Gibberellik Asitin Ratların Ağırlık Artışına Üzerine Etkisi

Kronik tedavi grubunda her hafta ratların ağırlığı ölçüldü. GA<sub>3</sub>'in ağırlık artışına etkisini araştırabilmek için aynı yaşta ve eşit ağırlıkta sıçan seçildi. Şekil 1'de kontrol ve tedavi gruplarının başlangıç ağırlıkları görülmektedir. Şekil 2'de GA<sub>3</sub>'in ağırlık artışına etkisi görülmektedir. Ağırlık artışındaki değişiklikler şöyle hesaplandı. Tedaviden önceki ağırlık baz olarak alınarak 1 hafta sonraki ağırlık ölçülerek arasındaki fark kaydedildi. 2. haftanın sonunda ağırlık tekrar ölçüldü ve 2. haftanın ağırlık artışı değişimi bazal değere göre hesaplandı. Örneğin deneyin başlangıcında deney hayvanının ağırlığı 255 g ölçüldü. Bir hafta sonra ağırlığı 260 g ölçüldü. 1. haftanın ağırlık artışı 5 g olarak kaydedildi. 2. hafta ağırlığı 295 g ölçüldü ve ağırlık artışı 40 g olarak kaydedildi.

Kontrol grubunda haftalık ağırlık artışı 1. hafta  $9 \pm 2$  g, 2.hafta  $34,5 \pm 4,4$  g, 3. hafta  $65 \pm 10,9$  g, 4. hafta  $104,5 \pm 18,4$  g olarak tespit edildi. 2 mg/kg GA<sub>3</sub> uygulanan grupta haftalık ağırlık artışı 1. hafta  $14,5 \pm 2,8$  g, 2. hafta  $49 \pm 6,4$  g, 3. hafta  $84,5 \pm 10,4$  g, 4. hafta  $131,3 \pm 15,4$  g olarak tespit edildi. Kontrol grubu ile 2 mg/kg GA<sub>3</sub> uygulanan grubun ağırlık artışı unpaired student's t-testi uygulandığında istatistiksel olarak anlamlı ağırlık artışı 2. haftada tespit edildi.

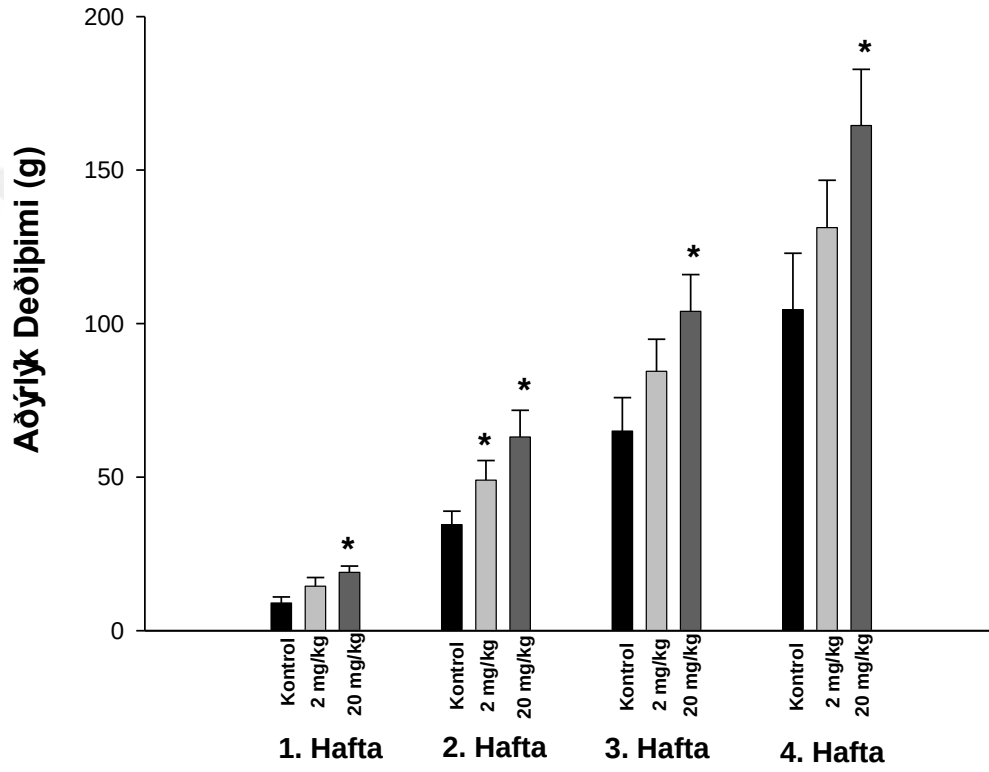
20 mg/kg GA<sub>3</sub> uygulanan grubun ağırlık artışı 1. hafta 19±2 g, 2. hafta 63,1±8,7 g, 3. hafta 104±12 g, 4. hafta 164,5±18,3 g olarak tespit edildi. Kontrol grubu ile 20 mg/kg GA<sub>3</sub> uygulanan grubun ağırlık artışı unpaired student's t-testi uygulandığında ağırlık artışı her haftada istatistiksel olarak anlamlı tespit edildi.

### Kronik Tedavi Grubunun Başlangıcında Ağırlık Grafiği



Şekil 1. Kronik tedavi grubundaki sıçanların deney başlangıcındaki ağırlık grafiği. 6 haftalık olan sıçanların deney başlangıcında kontrol, 2 mg/kg GA<sub>3</sub> ve 20 mg/kg GA<sub>3</sub> grubunda ağırlıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktu.

### Kronik Tedavi Grubunda Haftalık Ağırlık Değişimi Grafiği



Şekil 2. Kronik tedavi grubundaki sıçanların haftalık ağırlık değişim grafiği. Kronik tedavi grubundaki sıçanlar her hafta ağırlıkları ölçüldü. Her hafta kontrol grubuna göre 2 mg/kg GA<sub>3</sub> ve 20 mg/kg GA<sub>3</sub> grubunda istatistiksel olarak anlamlı ağırlık artışı saptandı. \* P < 0,05 Unpaired Student's T-Test

#### 4.1.2. Gibberellik Asit'in Testis Ağırlıklarına Etkisi

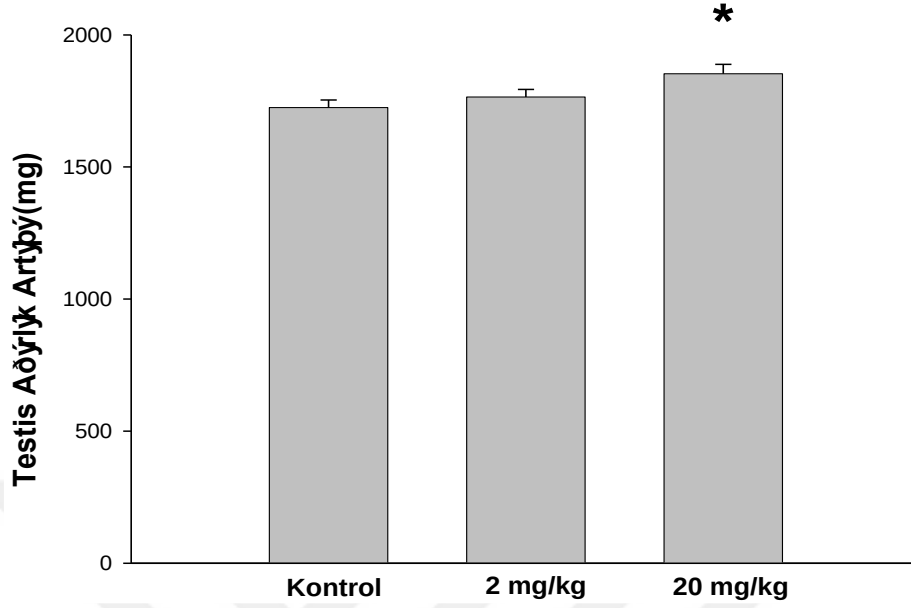
Kronik tedavi grubunda deneyin sonunda GA<sub>3</sub> tedavisiyle sıçanların testislerinde belirgin büyüme fark edildiğinden testis ağırlıkları ölçüldü. Kontrol grubunun testis ağırlıkları 1725±28,6 mg, 2 mg/kg GA<sub>3</sub> uygulanan grubun testis ağırlığı 1765±28,7 mg, 20 mg/kg GA<sub>3</sub> uygulanan grubun testis ağırlığı 1853±35,5 mg olarak bulundu. Kontrol grubundaki testis ağırlığı ile 20 mg/kg GA<sub>3</sub> uygulanan gruptaki testis ağırlık değerlerine unpaired student's t-test uygulandığında şekil 3'de görüldüğü gibi ağırlık artışı istatistiksel olarak anlamlı tespit edilirken 2 mg/kg GA<sub>3</sub> uygulanan gruptaki testis ağırlık değerlerine unpaired student's t-test uygulandığında ağırlık artışında istatistiksel olarak anlamlı değişiklik bulunamadı.

10 haftalık kontrol grubu ile 15 haftalık kontrol grubunun testis ağırlıkları karşılaştırıldı. Kronik tedavi grubunun kontrol grubundaki sıçanlar deney sonlandırıldığında 10 haftalıktı. Akut tedavi grubunun kontrol grubundaki sıçanlar deney yapıldığında 15 haftalıktı. Aradaki 5 haftalık süre testis ağırlıklarında belirgin farklılığı göstermiştir. Deney hayvanlarının testis büyüklüğünün artışı, aradaki 5 haftalık sürede artan vücut ağırlığından mı yoksa GA<sub>3</sub>'in etkisine mi bağlı olarak arttığını anlamak için kontrol gruplarının testis ağırlığının/vücut ağırlığına oranına bakıldı. 10 haftalık kontrol grubu deney hayvanlarının testis ağırlığı/vücut ağırlığı oranı (0,0055), akut tedavi grubunun 15 haftalık kontrol grubu deney hayvanlarının testis ağırlığı/vücut ağırlığı oranı (0,0055) olarak bulundu. Bu da deney hayvanlarının testislerindeki büyümenin vücut ağırlık artışıyla orantılı olduğunu göstermektedir. Biz bu deneyde her deney hayvanının kendi testis ağırlığı ile kendi vücut ağırlığını orantılayamadık. Bu yüzden istatistiksel olarak değerlendiremedik. Bu nedenle testislerdeki

büyümenin testisin GA<sub>3</sub>'den daha fazla etkilendiğini söyleyemeyiz. Bu sonuçlara farklı bir bakış açısı olarak kontrol hayvanlarında yaşla kilo artışı arasındaki oranla testis ağırlığı artışı arasındaki oranı değerlendirdik, şekil 4.1.'de görüldüğü gibi 15 haftalık kontrol grubunun vücut ağırlıkları/10 haftalık kontrol grubunun vücut ağırlıkları oranı (1,2) iken, 15 haftalık kontrol grubunun testis ağırlıkları/10 haftalık kontrol grubunun testis ağırlıkları oranı (1,18) bulundu. Bu sonuçlar testis ağırlığındaki artışın vücut ağırlığındaki artışla orantılı olduğunu göstermektedir.

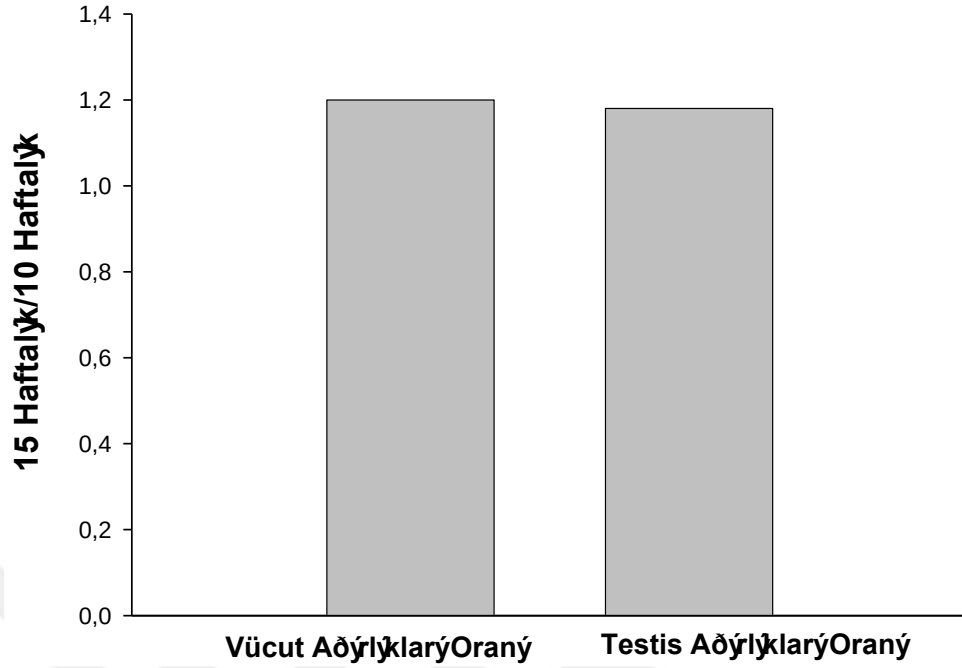
Ayrıca 1 ay boyunca haftada 3 gün 20 mg/kg GA<sub>3</sub> uygulanan grupta bir testiste maligniteyi düşündüren şekil 4.2.'de görüldüğü gibi makroskopik şekil değişikliği gözlemlendi.

### Kronik Tedavi Grubunda Testis Ağırlık Artışı Grafiği



Şekil 3. Kronik tedavi grubunda kontrol, 2 mg/kg GA<sub>3</sub> ve 20 mg/kg GA<sub>3</sub> uygulanan gruplar arasındaki ağırlık değişimi grafiği. Kronik tedavi grubunda gruplar eşit yaşta ve ağırlıkta alınmasına rağmen deney sonunda kontrol grubu dışındaki sıçanların testislerinin belirgin büyüdüğü gözlemlendi. Deney sonunda çıkarılan ve ağırlıkları hassas tartı ile ölçülen testisler 20 mg/kg GA<sub>3</sub> uygulanan grupta kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış tespit edildi. 2 mg/kg GA<sub>3</sub> uygulanan grupta kontrol grubuna göre artış tespit edildi ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. \* p<0,05 Unpaired Student's T-Test

### Vücut ve Testis Ağırlık Oranının Yaşla Değişimi



Şekil 4.1. Kontrol hayvanlarında yaşla kilo artışı arasındaki oranla testis ağırlığı artışı arasındaki oran grafiği. 15 haftalık kontrol grubunun vücut ağırlıkları/10 haftalık kontrol grubunun vücut ağırlıkları oranı (1,2) iken, 15 haftalık kontrol grubunun testis ağırlıkları/10 haftalık kontrol grubunun testis ağırlıkları oranı (1,18) bulundu. Bu sonuçlar testis ağırlığındaki artışın vücut ağırlığındaki artışla orantılı olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.2. Kronik tedavi grubunda 1 ay boyunca haftada 3 kez 20 mg/kg GA<sub>3</sub> uygulanan grupta bir testiste maligniteyi düşündüren makroskopik şekil değişikliği. Resimde solda görülen testis morfolojik değişimi olan, sağda görülen ise morfolojik olarak normal bir testis.

## **4.2. Gibberellik Asitin Serum TNF- $\alpha$ , IL-4 ve IL-10 Düzeylerine Etkisi**

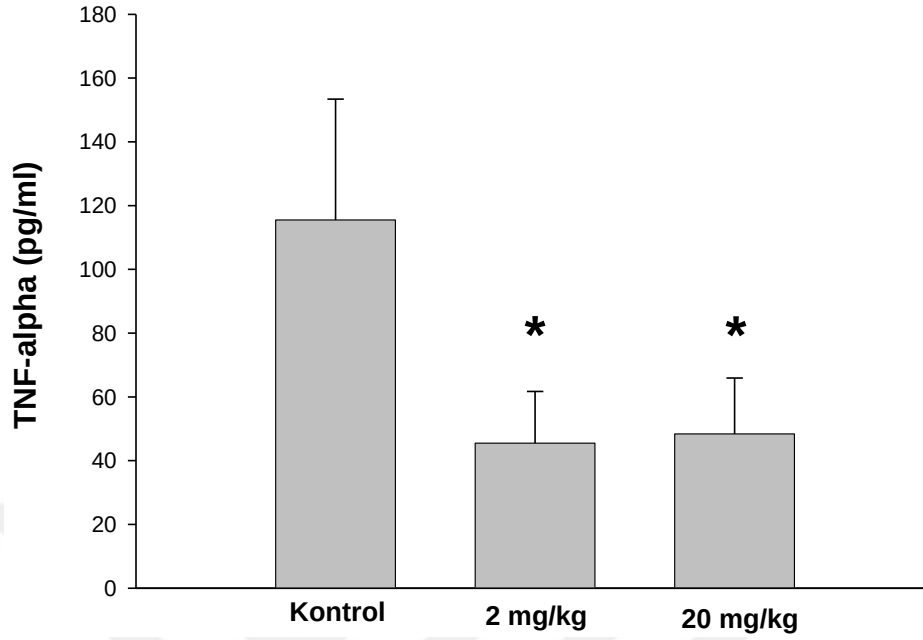
### **4.2.1. Gibberellik Asitin Serum TNF- $\alpha$ Düzeyine Etkisi**

Monosit ve makrofajlardan sentezlenen TNF- $\alpha$ , en önemli inflamatuvar sitokindir. Kronik tedavi grubunda TNF- $\alpha$  düzeyi ölçüldüğünde hem 2 mg/kg hem de 20 mg/kg grubunda istatistiksel anlamlı TNF- $\alpha$  değişiklik tespit edildi.

Kronik tedavi grubundaki TNF- $\alpha$  düzeyleri ölçüldüğünde sırası ile çözücü verilen grupta  $115,5 \pm 100,4$  pg/ml, 2 mg/kg dozunda GA<sub>3</sub> kullanılan grupta  $45,5 \pm 16$  pg/ml ve 20 mg/kg dozunda GA<sub>3</sub> kullanılan grupta  $48,4 \pm 17$  pg/ml olarak bulundu. Bu bulgulara Mann-Whitney Test uygulandığında şekil 8’de görüldüğü gibi kontrol grubuna göre 2 mg/kg GA<sub>3</sub> uygulanan grupta ve yine kontrol grubuna göre 20 mg/kg GA<sub>3</sub> uygulanan grupta istatistiksel olarak anlamlı TNF- $\alpha$  azalması tespit edildi.

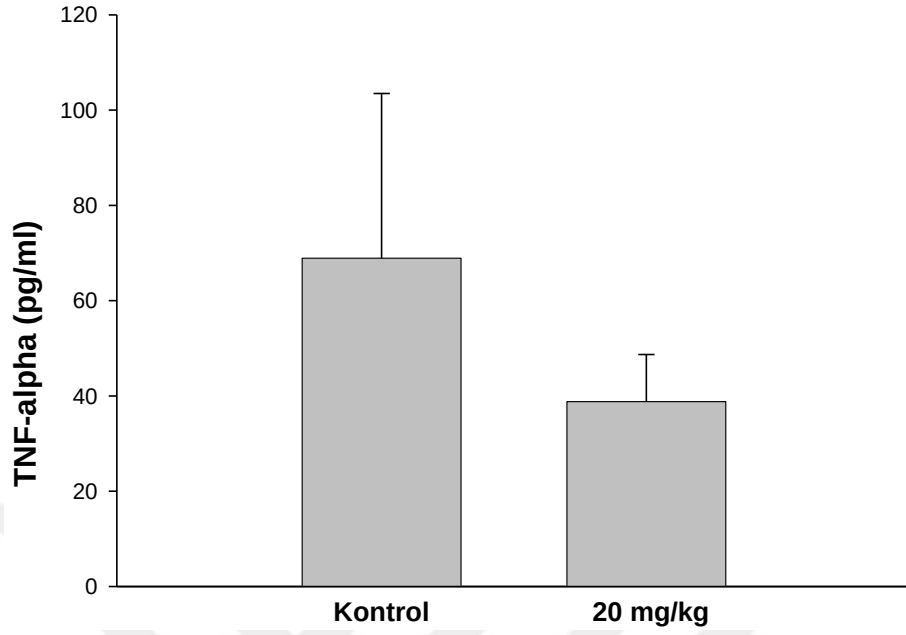
Tek doz GA<sub>3</sub> uygulanan grupta TNF- $\alpha$  düzeyi ölçüldüğünde istatistiksel olarak anlamlı değişiklik tespit edilmedi. Akut tedavi grubunda TNF- $\alpha$  düzeyleri ölçüldüğünde çözücü verilen grupta  $68,9 \pm 34,6$  pg/ml, 20 mg/kg GA<sub>3</sub> uygulanan grupta  $38,8 \pm 9,9$  pg/ml olarak bulundu. Bu bulgulara Mann-Whitney Test uygulandığında şekil 6’da görüldüğü gibi kontrol grubuna göre 20 mg/kg GA<sub>3</sub> uygulanan grupta istatistiksel olarak anlamlı TNF- $\alpha$  düzeyinde değişiklik tespit edilmedi.

### Kronik Tedavi Grubunda TNF-alpha Düzeyinde Değişiklik Grafiği



Şekil 5. Kronik tedavi grubunda TNF-alpha düzeyinde değişiklik grafiği. 30 gün boyunca GA<sub>3</sub> uygulanan başlangıçta 6 haftalık olan wistar sıçanların serum TNF-alpha düzeyi ELİSA yöntemi ile çalışıldı. 2 mg/kg GA<sub>3</sub> ve 20 mg/kg GA<sub>3</sub> uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı azalma tespit edildi. TNF-alpha (Tumor necrosis factor-alpha), GA<sub>3</sub> (Gibberellik Asit), \* P<0,05 Mann-Whitney Test

### Akut Tedavi Grubunda TNF-alpha Düzeyinde Değişiklik Grafiği



Şekil 6. Akut tedavi grubunda TNF-alpha düzeyinde değişiklik grafiği. Tek doz GA<sub>3</sub> uygulanan 15 haftalık wistar sıçanların serum TNF-alpha düzeyleri ELİSA yöntemi ile çalışıldı. Kontrol grubu ile 20 mg/kg GA<sub>3</sub> uygulanan grupta ölçülen TNF-alpha düzeyinde istatistiksel anlamlı değişiklik tespit edilmedi. TNF-alpha (Tumor necrosis factor-alpha), GA<sub>3</sub> (Gibberellik Asit), Mann-Whitney Test.

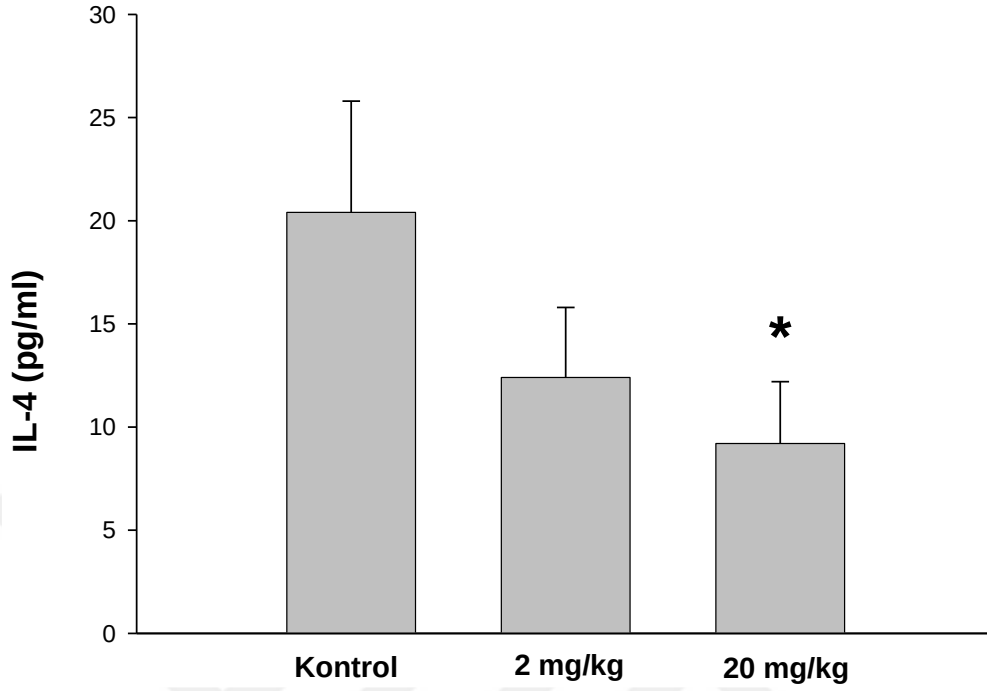
#### 4.2.2. Gibberellik Asitin Serum IL-4 Düzeyine Etkisi

IL-4, en önemli antiinflamatuvar sitokinlerden birisidir ve düzeyindeki azalma hem kronik inflamasyon hemde kanser gelişimiyle ilişkilendirilmektedir. 30 gün GA<sub>3</sub> uygulanan kronik tedavi grubunda 20 mg/kg GA<sub>3</sub> uygulanan grupta kontrol grubuna göre IL-4 düzeyinde istatistiksel anlamlı değişiklik tespit edildi.

Kronik tedavi grubundaki IL-4 düzeyleri ölçüldüğünde ortalama değeri sırası çözücü verilen kontrol grubunda  $20,4 \pm 5,4$  pg/ml, 2 mg/kg dozunda GA<sub>3</sub> kullanılan grupta  $12,4 \pm 3,4$  pg/ml ve 20 mg/kg dozunda GA<sub>3</sub> kullanılan grupta  $9,2 \pm 3$  pg/ml olarak bulundu. Bu bulgulara Mann-Whitney Test uygulandığında şekil 7’de görüldüğü gibi kronik tedavi grubunda kontrol grubuna göre 20 mg/kg GA<sub>3</sub> uygulanan grupta istatistiksel olarak anlamlı IL-4 azalması tespit edildi. Kontrol grubuna göre 2 mg/kg GA<sub>3</sub> uygulanan grupta ise IL-4 azalması görülmesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı IL-4 değişimi tespit edilmedi.

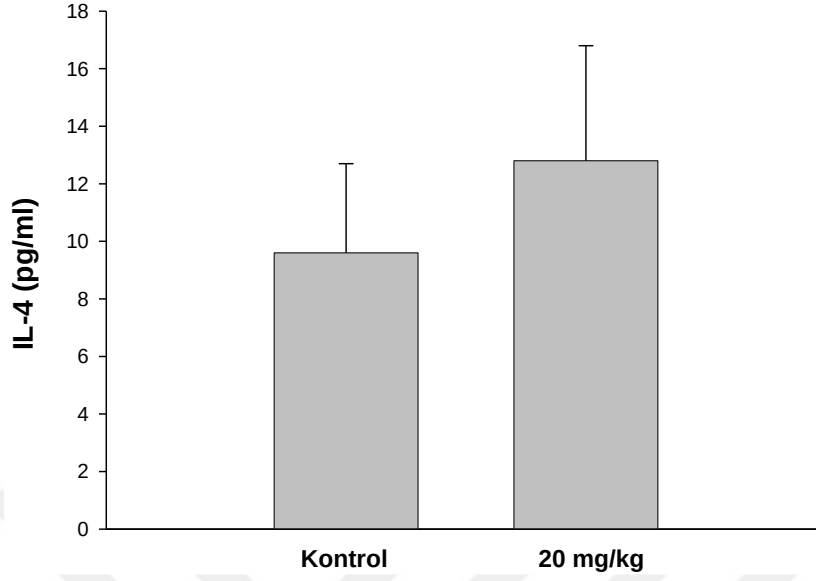
Akut tedavi grubunda IL-4 düzeyleri ölçüldüğünde ortalama değeri sırası ile çözücü verilen kontrol grubunda  $9,6 \pm 3,1$  pg/ml, 20 mg/kg dozunda GA<sub>3</sub> kullanılan grupta  $12,8 \pm 4$  pg/ml olarak bulundu. Bu bulgulara Mann-Whitney Test uygulandığında şekil 8’de görüldüğü gibi kontrol grubuna göre 20 mg/kg GA<sub>3</sub> uygulanan grupta istatistiksel olarak anlamlı IL-4 değişimi tespit edilmedi.

### Kronik Tedavi Grubunda IL-4 Düzeyinde Değişim Grafiği



Şekil 7. Kronik tedavi grubunda IL-4 düzeyinde değişiklik grafiği. 30 gün boyunca GA<sub>3</sub> uygulanan başlangıçta 6 haftalık olan wistar sıçanların serum IL-4 düzeyi ELİSA yöntemi ile çalışıldı. 20 mg/kg GA<sub>3</sub> uygulanan grupta kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı azalma tespit edildi. IL-4 (İnterlökin-4), GA<sub>3</sub> (Gibberellik Asit), \* P<0,05 Mann-Whitney Test

**Akut Tedavi Grubunda IL-4 Düzeyinin  
Kontrol ve 20 mg/kg Gibberellik Asit Uygulanan Grupla Karşılaştırılması**



Şekil 8. Akut tedavi grubunda kontrol ve 20 mg/kg GA<sub>3</sub> uygulanan grupta IL-4 düzeyinin değişikliğinin grafiği. Tek doz GA<sub>3</sub> uygulanan 15 haftalık wistar sıçanların serum IL-4 düzeyleri ELİSA yöntemi ile çalışıldı. Kontrol grubu ile 20 mg/kg GA<sub>3</sub> uygulanan grupta ölçülen IL-4 düzeyinde istatistiksel anlamlı değişiklik tespit edilmedi. IL-4 (İnterlökin-4), GA<sub>3</sub> (Gibberellik Asit), Mann-Whitney Test

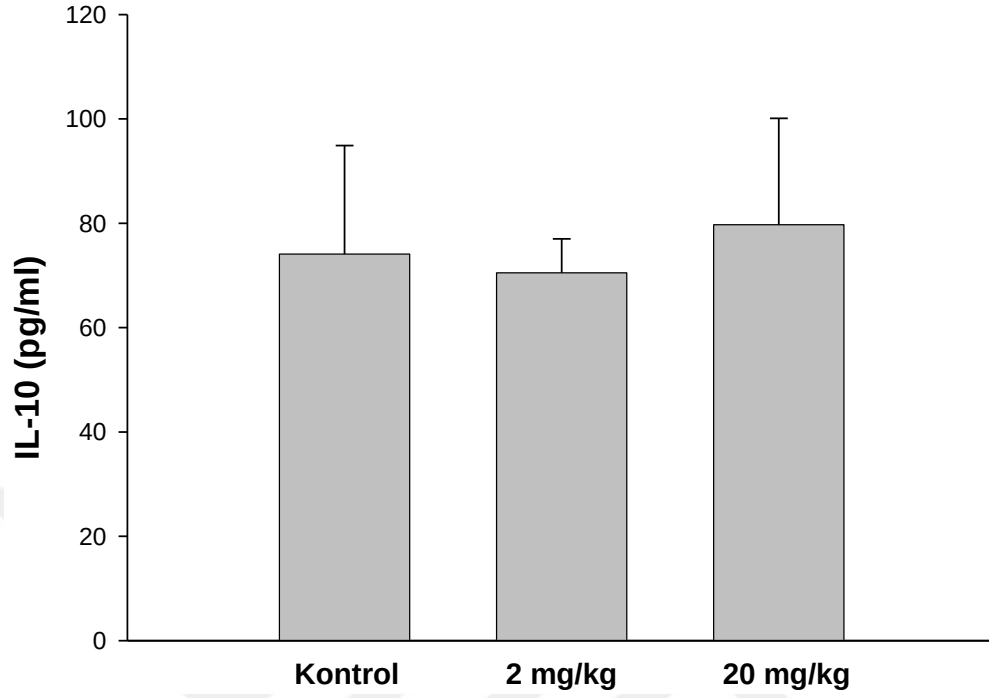
#### 4.2.3. Gibberellik Asitin Serum IL-10 Düzeyine Etkisi

IL-10, önemli antiinflamatuvar sitokinlerdendir ve eksikliği tümör gelişimi hızlandırdığı bulunmuştur. 30 gün GA<sub>3</sub> uygulanan kronik tedavi grubunda IL-4 ve TNF- $\alpha$  düzeyinde değişiklik görülmesine rağmen IL-10 düzeyinde istatistiksel anlamlı değişim tespit edilmedi.

Kronik tedavi grubundaki IL-10 düzeyleri ölçüldüğünde ortalama değeri sırası ile çözücü verilen kontrol grubunda  $74,1 \pm 20,8$  pg/ml, 2 mg/kg dozunda GA<sub>3</sub> kullanılan grupta  $70,5 \pm 6,5$  pg/ml ve 20 mg/kg dozunda GA<sub>3</sub> kullanılan grupta  $79,7 \pm 20,4$  pg/ml olarak bulundu. Bu bulgulara Mann-Whitney Test uygulandığında şekil 9'da görüldüğü gibi kronik tedavi grubu ile 2 mg/kg dozunda GA<sub>3</sub> uygulanan ve kontrol grubuna göre 20 mg/kg GA<sub>3</sub> uygulanan grupta istatistiksel olarak anlamlı IL-10 değişimi tespit edilmedi.

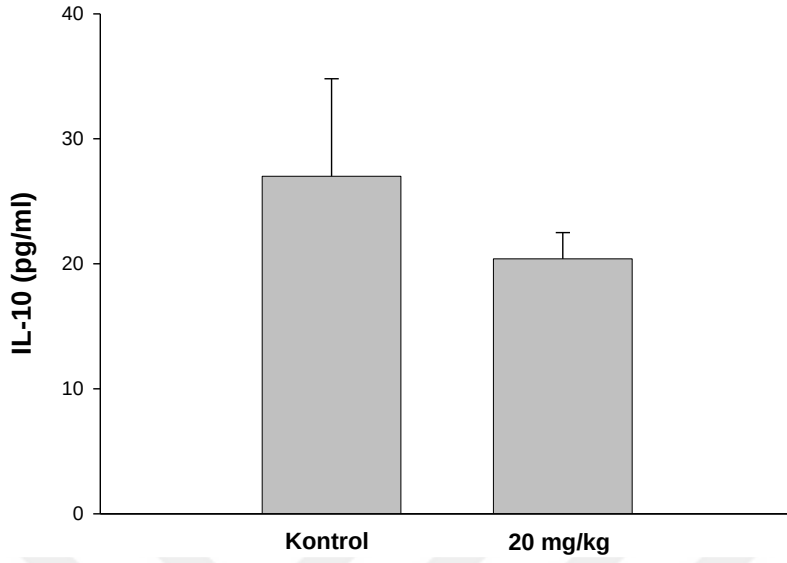
Akut tedavi grubunda IL-10 düzeyleri ölçüldüğünde ortalama değeri sırası ile çözücü verilen kontrol grubunda  $27 \pm 7,8$  pg/ml, 20 mg/kg dozunda GA<sub>3</sub> kullanılan grupta  $20,4 \pm 2,1$  pg/ml olarak bulundu. Bu bulgulara Mann-Whitney Test uygulandığında şekil 10'da görüldüğü gibi kontrol grubuna göre 20 mg/kg GA<sub>3</sub> uygulanan grupta istatistiksel olarak anlamlı IL-10 değişimi tespit edilmedi.

### Kronik Tedavi Grubunda IL-10 Değipim Grafiği



Şekil 9. Kronik tedavi grubunda IL-10 düzeyinin değışilik grafiği. 30 gün boyunca GA<sub>3</sub> uygulanan başlangıçta 6 haftalık olan wistar sıçanların serum IL-10 düzeyi ELİSA yöntemi ile çalışıldı. 20 mg/kg GA<sub>3</sub> uygulanan grupta kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı değışim tespit edilmedi. IL-10 (İnterlökin-10), GA<sub>3</sub> (Gibberellik Asit), Mann-Whitney Test

**Akut Tedavi Grubunda IL-10 Düzeyinin  
Kontrol ve 20 mg/kg Gibberellik Asit Uygulanan Grupla Karşılaştırılması**



Şekil 10. Akut tedavi grubunda kontrol ve 20 mg/kg GA<sub>3</sub> uygulanan grupta IL-10 düzeyinin değişiklik grafiği. Tek doz GA<sub>3</sub> uygulanan 15 haftalık wistar sıçanların serum IL-10 düzeyleri ELİSA yöntemi ile çalışıldı. Kontrol grubu ile 20 mg/kg GA<sub>3</sub> uygulanan grupta ölçülen IL-10 düzeyinde istatistiksel anlamlı değişiklik tespit edilmedi. IL-10 (İnterlökin-10), GA<sub>3</sub> (Gibberellik Asit), Mann-Whitney Test

## 5. TARTIŞMA

Bu çalışmada bitki büyüme faktörü olan GA<sub>3</sub>'in sıçanlar üzerindeki etkileri araştırıldı. GA<sub>3</sub>'in metabolik etkileri açısından kilo artışı üzerine duruldu. 1 ay boyunca haftada 3 gün GA<sub>3</sub> verilen grupta kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı ağırlık artışı bulundu. Doza bağlı görülen bu ağırlık artışı GA<sub>3</sub>'in büyüme üzerine pozitif etkisini göstermektedir. Günümüzde insanlarda kilo artışı önemli bir sorundur. Bunun kaynağı genellikle beslenme şeklidir; fazla yağlı ve kalorisi yüksek besin maddelerinin alımı yanında alınan besin maddelerinin içeriğinde olabilecek bitki büyüme faktörleri insanlarda büyüme üzerine etkisini kilo artışı ile gösterebilir. Bizim çalışmamız sıçanlarda GA<sub>3</sub>'in besin değişikliği yapmadan, tek başına özellikle yüksek dozda alımı kilo alımını anlamlı derecede arttırdığı yönündedir. GA<sub>3</sub>'in kilo arttırıcı etkisinin mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Ayrıca çalışmamızda testislerin birinde anomali görüldüğü için değerlendirilen testis ağırlıkları da kilo artışı ile orantılı olarak GA<sub>3</sub>'in yüksek dozunda testislerde anlamlı ağırlık artışı görülmüştür. GA<sub>3</sub>'in ağırlık üzerine etkisi sadece 2 çalışma da gösterilmiştir. Bu çalışmaların birinde beslenme sıvılarına 3 hafta boyunca GA<sub>3</sub> eklenen deney hayvanlarında istatistiksel anlamlı vücut ağırlık değişimi yapmadığı (127), diğer çalışma da 22 ay haftada 2 kez gavaj ile GA<sub>3</sub> verildiğinde sıçanlarda kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı ağırlık artışı gözlenmiştir (17). Ancak Abdelhamid ve arkadaşlarının çalışmasında ağırlık değişimi olmazken; karaciğer, kalp, adrenal ve tiroid bezinde istatistiksel anlamlı ağırlık azalmasına yol açtığı gösterilmiştir (127). Bizim çalışmamızda testis ağırlıklarına bakıldığında yaşa bağlı olmaksızın 1 ay boyunca haftada 3 kez 20 mg/kg GA<sub>3</sub> verilen grupta kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı testis ağırlık artışı tespit edildi. Ayrıca yine aynı grupta bir testiste maligniteyi düşündüren makroskobik şekil değişikliği gözlendi. Benzer bulgular 45 gün intradermal ve ağızdan GA<sub>3</sub> verilen sıçanlarla yapılan bir çalışmada gösterilmiştir. Bu çalışmada testislerde germ hücrelerinde azalma ve bozulma, seminifer tubullerinin boyutunda azalma ve leyding hücrelerinde distrofi gözlenmiştir (128). Neonatal sıçanlarda yapılan bir çalışmada GA<sub>3</sub> uygulanan grubun tiroid, over ve adrenal bezlerinde ağırlık artışı bulunurken

testislerde ağırlık azalması bulunmuştur (129). Sonuç olarak literatürdeki bu bulgularda GA3'in etkisinin birbirinden farklı görülmelerine rağmen hepsinin ortak yanı GA3'in organ değişimine yol açtığı şeklindedir.

Bizim çalışmamızın ana hedefi, GA3'in tümör oluşturunca etkisinin sitokin dengesindeki değişikliklerin yer alıp almadığının araştırılmasıydı. Çalışmamızda GA3'e 4 hafta maruz kalmak hem TNF- $\alpha$  hemde IL-4 düzeyini azalttığı bulundu. Girişte de ayrıntılı açıklandığı gibi GA3'in inflamatuvar hücre infiltrasyonunu arttırdığı ve kronik inflamasyona neden olabileceği düşünülmektedir. İnflamasyon kanser bağlantısından yola çıkılarak sitokinler üzerine olan etkisi araştırıldı. GA3'in sitokinler üzerine etkisi ile ilgili literatürde çalışma bulunmamaktadır. TNF- $\alpha$ 'daki azalma tümör gelişimi için çok önemli olabilir. Çalışmaların çoğu TNF- $\alpha$ 'daki artışın tümörün ilerlemesinde önemli olduğunu gösterse de TNF- $\alpha$ 'daki azalmanın tümör gelişimi üzerine etkisi olabilir.

Çalışmada IL-4'de azalma görüldü. IL-4'de azalma tümör gelişiminde artış arasında bağlantı pek çok çalışmada gösterilmiştir. IL-4'ün kolon kanserini ve meme kanserini kültürde ekilen kanser hücrelerinde inhibe ettiği gösterilmiştir (29). Evre IV küçük hücreli dışı akciğer kanserinde rekombinant insan IL-4 ile tedavi yapılarak doz bağımlı olumlu sonuç alınmıştır (30). IL-4'ün hastalığı stabilize edici ve tümör hücrelerinin ölümüne kadar götürebilecek ciddi etkisi olduğu görülmüştür. Bu veriler IL-4'ün adjuvan tedavide kullanılabileceğini gösterir. Dolayısıyla GA3'in IL-4'ü azaltıcı etkisi kanser hastalığının ilerlemesini arttırıyor olabilir.

Bir başka çalışmamızda kanser-inflamasyon arasındaki bağlantıdan yola çıkarak GA3'ün, inflamasyonda önemli rol oynayan mast hücre degranülasyonu ile duysal sinir sonlanmalarında bulunan Substance P düzeyi üzerindeki olası etkilerini araştırılmıştır (yayına hazırlanmaktadır). GA3'in hem akut hem de kronik etkilerini incelenmiştir. Mast hücreden ve duysal sinir sonlanmalarından zengin olan deri ve mesane dokusunda Substans P düzeyi ve mast hücre sayısındaki değişiklikler belirlenmiştir. Kronik tedavi deri ve mesanede mast hücre degranülasyonunu arttırmıştır. Akut uygulamada mesane mast hücre sayısında ve degranülasyonunda değişiklik gözlenmezken bu uygulamanın deride hem degranüle hem toplam mast hücre sayısını arttırdığı bulunmuştur.

Substans P düzeyindeki değişiklikler her iki dokuda da benzer bulunmuştur. GA<sub>3</sub>'ün 20 mg/kg dozda akut etkisi kronik etkisinden farklı olarak deride Substans P düzeyini azaltmış, mesane de ise değiştirmemiştir. Mast hücre degranülasyonundaki artış GA<sub>3</sub>'e özellikle kronik olarak maruz kalmanın inflamatuvar hastalıkları tetikleyebileceğini göstermektedir. Substans P her ne kadar inflamatuvar bir mediatör olarak değerlendirilse de son dönemde yapılan çalışmalar Substans P'deki azalmanın inflamatuvar hasarı arttırdığını göstermektedir. Dolayısıyla GA<sub>3</sub> uygulanan sıçanlarda sitokin dengesini bozup mast hücre degranülasyonu arttırarak inflamatuvar olayları tetikleyebilir yada inflamatuvar olayları arttırabilir.

Bütün bu çalışmalar burada anlatılanlar ve yapılan çalışmalar GA<sub>3</sub>'e kronik maruz kalmanın inflamasyonu tetiklediği ve kronik inflamasyonun görüldüğü birçok hastalığa yol açabileceğini göstermektedir.

## 6. SONUÇLAR

Çalışmamızda 1 ay boyunca haftada 3 gün GA<sub>3</sub> verilen grupta kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı ağırlık artışı bulundu. Bir deney hayvanının testisinde şekil bozukluğu görülmesi üzerine testis dokularıda ayrıldı. Testis ağırlıklarına bakıldığında yaşa bağlı olmaksızın 1 ay boyunca haftada 3 kez 20 mg/kg GA<sub>3</sub> verilen grupta kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı testis ağırlık artışı tespit edildi. GA<sub>3</sub>'e 4 hafta maruz kalmak hem TNF- $\alpha$  hemde IL-4 düzeyini azalttığı ancak IL-10 düzeyinde değişiklik yapmadığı bulundu. Sonuç olarak, GA<sub>3</sub> hem sitokin dengesini etkilemekte hem de metabolik değişikliklere neden olmaktadır. Bu değişiklikler inflamatuvar hastalıkların ve malignitelerin gelişmesine ya da ilerlemesine katkıda bulunabilir.

## 7. ÖZET

Tarımda ürün miktarını arttırmak için kullanılan bitki büyüme faktörlerinin bilinçsiz kullanımının insan sağlığı üzerindeki etkileri bilinmemektedir. Gibberellinler ailesinden olan ve tarımda çok kullanılan Gibberellik asit (GA<sub>3</sub>), endojen olarak gelişmekte olan öeyve çekirdeklerinde bulunmakta ve meyve gelişiminde önemli rol oynamaktadır. GA<sub>3</sub>'in tümör oluşumuna etkisini gösteren çalışmalar mevcuttur. Fakat ilişkinin fizyopatolojisi tam olarak bilinmemektedir. GA<sub>3</sub>'in sitokin dengesini ve dolayısıyla inflamasyon cevabını değiştirerek tümör gelişimini indüklemesi yada kolaylaştırması olasıdır ve bu çalışmada bu olasılığı test etmek amaçlanmıştır. Spesifik olarak kronik inflamasyonun kanser gelişimini ve metastazı kolaylaştırdığı bilinmemektedir. TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-10 kanser gelişiminde yada önlenmesinde önemli sitokinlerdir. Bizim çalışmamızın ana hedefi, GA<sub>3</sub>'in tümör oluşturunca etkisinin sitokin dengesindeki değişikliklerin yer alıp almadığının araştırılmasıydı.

GA<sub>3</sub>'in hem akut hem de kronik etkilerini incelemek için 50 adet erkek Wistar sıçan beş gruba bölünmüştür. Kronik tedavi deneylerinde ilk gruba 2 mg/kg, ikinci gruba 20 mg/kg dozunda GA<sub>3</sub> ve üçüncü gruba çözücü intraperitoneal olarak haftada üç gün 30 gün süresince enjekte edilmiştir. Akut tedavi grubunda sadece yüksek doz GA<sub>3</sub> tedavisi (20 mg/kg) yada çözücü intraperitoneal olarak bir kere verilmiş ve enjeksiyondan üç saat sonra dokular çıkartılmıştır. Ayrılan serumlarda TNF- $\alpha$ , IL-4 ve IL-10 düzeylerine serumda bakıldı.

Bizim çalışmamız da sıçanlarda GA<sub>3</sub>'in besin değişikliği yapmadan, tek başına özellikle yüksek dozda alımı kilo alımını anlamlı derecede arttırdığını göstermiştir. Bu çalışmamızda GA<sub>3</sub>'e 4 hafta maruz kalmak hem TNF- $\alpha$  hem de IL-4 düzeyini azalttığı, IL-10 düzeyinde değişiklik yapmadığı bulundu.

Sonuç olarak, GA<sub>3</sub> hem sitokin dengesini etkilemekte hem de metabolik değişikliklere neden olmaktadır. Bu değişiklikler inflamatuvar hastalıkların ve malignitelerin gelişimine yada ilerlemesine katkıda bulunabilir.

Anahtar Sözcükler: Gibberellik asit, IL-4, IL-10, sıçan

## **8. ABSTRACT**

### **The Effect of Gibberellic Acid on Level of TNF- $\alpha$ , IL-4 and IL-10 for Rats**

The effects of plant growth factors used indiscretely for increasing the amount of agricultural products, on human health are unknown. Gibberillic acid (GA<sub>3</sub>), a member of gibberillin family, which is used very commonly at agriculture exists at growing fruit seeds and plays an important role at fruit growth. There are studies demonstrating the effects of GA<sub>3</sub> at tumor growth. But the physiopathology of the relationship isn't completely recognized. It's possible that GA<sub>3</sub> induces or eases tumor growth by changing cytokine balance and consequently the inflammation response and this study aims to test this possibility. It's known that chronic inflammation spesifically eases cancer growth and metastasis. TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-10 are important cytokines at cancer growth and prevention. The main aim of our study was to inspect whether changes at cytokine balance takes place at tumor-growing effect of GA<sub>3</sub>.

Fifty Wistar rats were divided into five groups to inspect both acute and chronic effects of GA<sub>3</sub>. At chronic treatment experiments, first group was given 2 mg/kg of GA<sub>3</sub> , second group was given 20 mg/kg of GA<sub>3</sub> and solvent was given to third group three days a week for 30 days with intraperitoneal injections. At acute treatment group, high dose GA<sub>3</sub> treatment (20 mg/kg) or solvent was given once as IP and tissues were taken out three hours after injection. Levels of TNF- $\alpha$ , IL-4 and IL-10 were examined at isolated sera.

At our study, it was shown that without feeding change GA<sub>3</sub> increased weight gain significantly when it's administrated alone, especially at high dose. It was also found that 4-week exposure to GA<sub>3</sub> increased both TNF- $\alpha$  and IL-4 levels and it didn't cause a change at the level of IL-10.

As a result, GA<sub>3</sub> both changes cytokine balance and causes metabolical changes. These changes may attribute to growth or progression of inflammatory diseases and malignancies.

Key Words: Gibberellic acid, TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-10, rat



## 9. KAYNAKLAR

1. Kaçar B, Katkat AV, Öztürk Ş. Bitki fizyolojisi Uludağ Üniv. Güçlendirme Vakfı Yayın no:198, Bursa, 2002: 457-92.
2. Taiz L, Zeiger E. Plant Physiology. Sinauer Associates Inc., P.O. Box 407, Sunderland. 1998 p.1-792
3. Anonymous. Study Guide. Plant Growth Regulators For Agricultural Pest Control Advisers. Univ of California, Division of Agricultural Sciences, Priced Publication 1978. p.4047.
4. Anonyme. Ligne Directrice de l'OCDE. Essais De Produits Chimiques, Vol. 4, Belgique: 1981. p.279
5. Copin A, Houins G, Pussemier L, Salambier JF. Environmental Behavior of Pesticides and Regulatory Aspects (OECD Guidelines for Testing of Chemicals). Fifth International Workshop, Brussels:1994. p.50
6. Önder F, Çınarlı İ. Stimulan Etkili Bitki Büyüme Hormonlarının Böcekler Üzerinde Yan Etkileri. Ege Üniv. Ziraat Fak. Yıllığı, İzmir. 1989; 5(5):47-62
7. Sevgican A. Örtüaltı Sebzeciliği. Ege Üniv. Ziraat Fak. Yayınları, No:528, Cilt:1, İzmir:1999. s.302 .
8. Ames IH. Gibberellic acid: Effect on Genetic Tumor Induction. Canadian Journal of Botany, 1971 (49):1699-1701.
9. Ames IH, Hill CA, Walton DC, Dashek WV. Hormonal Regulation of Genetic Tumor Induction: Cytokinin and Absciscic Acid. Plant and Cell Physiology 1979 20(6): 1055-61

10. Weiler EW, Spainer K. Phytohormones in the Formation of Crown Gall Tumors. *Planta* 1981 (153): 326-37
11. Mohr H, Schopfer P. *Lehrbuch de Pflanzenphysiologie* Springer-Verlag, Berlin 1978, p.608
12. Theologis A. Rapid Gene Regulation by Auxin. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 1986 (37): 407-38.
13. Kaynak L, Ersoy N. Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Genel Özellikleri ve Kullanım Alanları. *Akd. Üniv. Zir. Fak. Derg. Antalya:1997 (10):223-36*
14. Kaynak L, İmamgiller B. Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Fizyolojik Olaylardaki Roller. *Akd. Üniv. Zir. Fak. Derg. Antalya:1997 (10):289-99*
15. Ünsal NP. Bitki Büyüme Maddeleri, İstanbul Üniv. Basımevi, Yayın No: 3677, Enstitü Yayın No:4, İstanbul 1993 s.357.
16. El-Morfty MM, Khudoley VV, Sakr SA, Ganem NF. Induction of neoplasms in Egyptian toads *Bufo regularis* by oil of chenopodium, *Oncology.* 1992; 49(3):253-5.
17. El-Morfty MM, Sakr SA, Rizk AM, Moussa E.A. Carcinogenic effect of gibberellin A3 in swiss albino mice. *Nutr Cancer* 1994 ; 21:183-90.
18. Yavaş A, Ozmen M, Topcuoglu S. F . Analysis of gibberellic acid, abscisic acid, indole-3-acetic acid and zeatin from the selected tissues of albino mice. *Toxicological and Environmental Chemistry*, Vol. 59, 1995: p.251-60.
19. Philip M, Donald A. Rowley and Hans Schreiber. Inflammation as a tumor promoter in cancer induction. *Semin Cancer Biol.* 2004; 14(6):433-9.

20. Tlsty TD. Stromal cells can contribute oncogenic signals. *Semin Cancer Biol* 2001; 11:97-104.
21. van Kempen LC, Ruiter DJ, van Muijen GN, Coussens LM. The tumor microenvironment: a critical determinant of neoplastic evolution. *Eur J Cell Biol* 2003; 82:539-48.
22. Yan B, Wang H, Rabbani ZN, Zhao Y, Li W, Yuan Y, et.al. Tumor necrosis factor-alpha is a potent endogenous mutagen that promotes cellular transformation. *Cancer Res* 2006; 66(24):11565-70.
23. Wu S, Boyer CM, Whitaker RS, Berchuck A, Wiener JR, Weinberg JB, et.al. Tumor necrosis factor alpha as an autocrine and paracrine growth factor for ovarian cancer: monokine induction of tumor cell proliferation and tumor necrosis factor alpha expression *Cancer Res* 1993; 53(8):1939-44.
24. Brown MA, Hural J. Functions of IL-4 and control of its expression. *Crit Rev Immunol* 1997; 17:1-32.
25. Wang P, Wu P, Siegel ML, et al. Interleukin (IL)-10 inhibits nuclear factor kB (NF-kB) activation in human monocytes: IL-10 and IL-4 suppress cytokine synthesis by different mechanisms. *J Biol Chem* 1995; 270:9558-63.
26. te Velde AA, Huijbens RJF, de Vries JE, et al. Interleukin-4 (IL-4) inhibits secretion of IL-1b, tumor necrosis factor-alpha and human IL-6 by human monocytes. *Blood* 1990; 76:1392-7.
27. Paul WE. Interleukin-4: a prototypic immunoregulatory lymphokine. *Blood* 1991; 77:1859-70.

28. Tepper RI, Coffman RL, Leder P. An eosinophil-dependent mechanism of the antitumor effect of IL-4. *Science* 1992; 257:548-51.
29. Toi M, Bicknell R, Harris AL. Inhibition of colon and breast carcinoma cell growth by interleukin-4. *Cancer Res* 1992; 52:275-9.
30. Vokes EE, Figlin R, Hochster H, et al. A phase II study of recombinant human interleukin-4 for advanced or recurrent non-small cell lung cancer. *Cancer J Sci Am* 1998; 4:46-51.
31. Opal SM, Depalo VA. Anti-inflammatory cytokines. *Chest* 2000; 117:1162-72.
32. Clarke CJP, Hales A, Hunt A, et al. IL-10-mediated suppression of TNF-alpha production is independent of its ability to inhibit NF kappa B activity. *Eur J Immunol* 1998; 28:1719-26.
33. Gerard D, Bryns C, Marchant A, et al. Interleukin-10 reduces the release of tumor necrosis factor and prevents lethality in experimental endotoxemia. *J Exp Med* 1993; 177:547-50.
34. Marchant A, Bruyns C, Vandenabeele P, et.al. Interleukin-10 controls interferon-gama and tumor necrosis factor production during experimental endotoxemia. *Eur J Immunol* 1994; 24:1167-71.
35. Fiorentino DF, Zlotnik A, Mossman TR, Howard M, O'Garra A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol* 1991; 147:3815-22.
36. de Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, De Vries JE. Interleukin-10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an

autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* 1991; 179:1209-20.

37. Seitz M, Loetscher P, Dewald B, Towbin H, Gallati H, Baggiolini M. Interleukin-10 differentially regulates cytokine inhibitor and chemokine release from blood mononuclear cells and fibroblasts. *Eur J Immunol* 1995; 25:1129-32.

38. Sturlan S, Oberhuber G, Beinhauer BG, Tichy B, Kappel S, Wang J, et.al. Interleukin-10-deficient mice and inflammatory bowel disease associated cancer development. *Carcinogenesis* 2001; 22:665-71.

39. Howell WM, Turner SJ, Bateman AC, Theaker JM. IL-10 promoter polymorphisms influence tumour development in cutaneous malignant melanoma. *Genes Immun* 2001; 2:25-31.

40. Huang S, Xie K, Bucana CD, Ullrich SE, Bar-Eli M. Interleukin-10 suppresses tumor growth and metastasis of human melanoma cells: potential inhibition of angiogenesis. *Clin Cancer Res* 1996; 2:1969-79.

41. Kundu N, Beaty TL, Jackson MJ, Fulton AM. Antimetastatic and antitumor activities of interleukin-10 in a murine model of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88:536-41.

42. Kohno T, Mizukami H, Suzuki M, Saga Y, Takei Y, Shimpo M, et.al. Interleukin-10-mediated inhibition of angiogenesis and tumor growth in mice bearing VEGF-producing ovarian cancer. *Cancer Res* 2003; 63:5091-4.

43. Davies PJ. Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action. In: Sun TP. Cornell Univ. Ithaca, NY. 2004: 304-20.

44. Hock B, Elstner EF. Plant Toxicology Forth Edition. Boca Raton, Florida. 2005; 1:65-85.
45. Rost TL, Barbour MG, Stocking CR, Murphy TM. Plant Biology Second Edition. Univ. Of California. California 2006; 241-56.
46. Demirsoy A, Türkan İ. Genel Biyoloji. Cilt 2. Palme Yayıncılık, Ankara. 2000 s.587-1187.
47. Srivastava LM. Plant growth and development: hormones and environment. Simon Fraser Univ. Burnaby, British Columbia Canada, 2002: 171-88.
48. Akman Y. Bitki Fizyolojisine Giriş “Botanik” Palme Yayınları, Ankara. 1996 s.1-494.
49. Akman Y, Darıcı C. Bitki Fizyolojisi (Beslenme ve Gelişme Fizyolojisi) İhsan Kitabevi, Ankara 1998: 432-42.
50. Hedden P, Phillips AL: Gibberellin metabolism: new insights revealed by the genes. Trends Plant Sci. 2000; 5:523-30.
51. Hartman H.T, Kester D.E, Davies F.T, Geneve Jr.R.L. Plant Propagation: Principle and Practices. Sixth Edition. Simon&Schuster/A Viacom Company Upper Saddle River, New Jersey 1997 p. 1-770.
52. Larcher W. Physiological Plant Ecology. Third Edition Springer. 1995 p.1-506
53. Salisbury F.B, Ross C.W, Plant Physiology. Wadsworth Publishing Company. 1992 p. 1-682

54. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 2001;357:539-45.
55. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002; 420:860-7.
56. Aggarwal BB, Shishodia S, Sandur SK, Pandey MK, Sethi G. Inflammation and cancer: How hot is the link? *Biochemical Pharmacol* 2006; 72:1605-21.
57. Mantovani A. Cancer: inflammation by remote control. *Nature* 2005; 435(7043):752-3.
58. Coussens LM, Tinkle CL, Hanahan D, Werb Z. MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis. *Cell* 2000; 103:481-90.
59. Dvorak HF. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Eng J Med* 1986; 315:1650-9.
60. Dvorak HF. Rous-Whipple Award Lecture. How tumors make bad blood vessels and stroma. *Am J Pathol* 2003; 162:1747-57.
61. Bocker EB, Zwadlo G, Suter L, Brune M, Sorg C. Infiltration of primary and metastatic melanomas with macrophages of the 25F9-positive phenotype. *Cancer Immunol. Immunother.* 1987; 25:81-6.
62. Flynn EA, Schwartz JL, Shklar G. Sequential mast cell infiltration and degranulation during experimental carcinogenesis. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 1991; 117:115-22.

63. Schottanfeld D, Bebe-Dimmer J. Chronic inflammation: a common and important factor in the pathogenesis of neoplasia. *CA Cancer J Clin.* 2006; 56(2):69-83.
64. Ben-Baruch A. Inflammation-associated immune suppression in cancer: the roles played by cytokines, chemokines and additional mediators. *Semin Cancer Biol.* 2006;16(1):38-52.
65. Murphy SJ, Anderson LA, Johnston BT, Fitzpatrick DA, Watson PR, Monaghan P, et.al. Have patients with esophagitis got an increased risk of adenocarcinoma? Results from a population-based study. *World J Gastroenterol* 2005; 11(46):7290-5.
66. Mossman BT, Kamp DW, Weitzman SA. Mechanisms of carcinogenesis and clinical features of asbestos-associated cancers. *Cancer Invest* 1996; 14(5):466-80.
67. Berwick M, Armstrong BK, Ben-PoratL, Fine J, Kricker A, Eberle C, et.al. Sun exposure and mortality from melanoma. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97(3):195-9.
68. Jain SK, Peppercorn MA. Inflammatory bowel disease and colon cancer. *Digestive Disease and Sciences.* 1997; 15(4-5):243-52.
69. Ekblom A, Helmick C, Zack M, Adami HO. Increased risk of large-bowel cancer in Crohn's disease with colonic involvement. *Lancet* 1990; 336(8711):357-9.
70. Ransohoff DF. Colon cancer in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1988; 94(4):1089-91.

71. Desaint B, Legendre C, Florent C. Dysplasia and cancer in ulcerative colitis. *Hepatogastroenterology* 1989; 36(4):219-26.
72. Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci* 1975; 72:3666-70.
73. MacEwan DJ. TNF receptor subtype signalling: differences and cellular consequences. *Cell Signal* 2002; 14:477-92.
74. Aggarwal BB, Samanta A, Feldmann M. In: Oppenheim J, Feldmann M, editors. *TNF- $\alpha$  cytokine reference*. London: Academic Press; vol. 1 2000 p. 413-33.
75. Aggarwal BB, Shishodia S, Ashikawa K, Bharti AC. The role of TNF and its family members in inflammation and cancer: lessons from gene deletion. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2002; 1(4):327-41.
76. Pass HI, Mew D, Pass HA, Temeck BK. The macrophage, TNF and other cytokines: *Chest Surg Clin N Am* 1995; 5(1):73-90.
77. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 2001; 104:487-501.
78. Szlosarek PW, Grimshaw MJ, Kulbe H, Wilson JL, Wilbanks GD, Burke F. et al. Expression and regulation of tumor necrosis factor- $\alpha$  in normal and malignant ovarian epithelium. *Mol Cancer Ther* 2006; 5(2):382-90.
79. Naylor MS, Stamp GW, Foulkes WD, et al. Tumor necrosis factor and its receptors in human ovarian cancer: potential role in disease progression. *J Clin Invest* 1993; 91:2194-206

80. Mizokami A, Gotoh A, Yamada H, et. al. Tumor necrosis factor-alpha represses androgen sensitivity in the LNCaP prostate cancer cell line. *J Urol* 2000; 164:800-05
81. Vinante F, Rigo A, Tecchio C, et. al. Serum level of p55 and p75 soluble TNF receptors in adult acute leukaemia at diagnosis: correlation with clinical and biological features and outcome. *Br J Haematol* 1998; 102:1025-34
82. Warzocha K, Salles G, Bienvenu J, et. al. Tumor necrosis factor ligand-receptor system can predict treatment outcome in lymphoma patients. *J Clin Oncol* 1997; 15:499-508
83. Foa R, Massaia M, Cardone S, et. al. Production of tumor necrosis factor-alpha by B-cell chronic lymphocytic leukemia cells: a possible regulatory role of TNF in the progression of the disease. *Blood* 1990; 76:393-400
84. Herrmann F, Helfrich SG, Lindermann A, et. al. Elevated circulating levels of tumor necrosis factor predict unresponsiveness to treatment with interferon alfa-2b in chronic myelogenous leukaemia. *J Clin Oncol* 1992; 10:631-34
85. Digel W, Stefanic M, Schoniger W, Buck C, Raghavachar A, Frickhofen N, et. al. Tumor necrosis factor induces proliferation of neoplastic B cells from chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1989; 73(5):1242-6.
86. Digel W, Schoniger W, Stefanic M, Janssen H, Buck C, Schmid M, et. al. Receptors for tumor necrosis factor on neoplastic B cells from chronic lymphocytic leukemia are expressed in vitro but not in vivo. *Blood* 1990; 76(8):1607-13.
87. Giri DK, Aggarwal BB. Constitutive activation of NF-kappaB causes resistance to apoptosis in human cutaneous T cell lymphoma HuT-78 cells.

Autocrine role of tumor necrosis factor and reactive oxygen intermediates. *J Biol Chem* 1998; 273(22):14008-14.

88. Liu RY, Fan C, Mitchell S, Chen Q, Wu J, Zuckerman KS. The role of type I and type II tumor necrosis factor (TNF) receptors in the ability of TNF- $\alpha$  to transduce a proliferative signal in the human megakaryoblastic leukemic cell line Mo7e. *Cancer Res* 1998; 58(10):2217-23.

89. Tsukasaki K, Miller CW, Kubota T, Takeuchi S, Fujimoto T, Ikeda S, et al. Tumor necrosis factor  $\alpha$  polymorphism associated with increased susceptibility to development of adult T-cell leukemia/lymphoma in human T-lymphotropic virus type 1 carriers. *Cancer Res* 2001; 61(9):3770-4.

90. Stifter G, Heiss S, Gastl G, Tzankov A, Stauder R. Over-expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  in bone marrow biopsy from patients with myelodysplastic syndromes: relationship to anemia and prognosis. *Eur J Haematol* 2005; 75(6):485-91.

91. Duncombe AS, Heslop HE, Turner M, Meager A, Priest R, Exley T, et al. Tumor necrosis factor mediates autocrine growth inhibition in a chronic leukemia. *J Immunol* 1989; 143(11):3828-34.

92. Elbaz O, Mahmoud LA. Tumor necrosis factor and human acute leukemia. *Leuk Lymphoma* 1994; 12(3-4):191-5.

93. Montesano R, Soulie P, Eble JA, Carrozzino F. Tumour necrosis factor  $\alpha$  confers an invasive, transformed phenotype on mammary epithelial cells. *J Cell Sci* 2005; 118(Pt 15):3487-500.

94. Kalthoff H, Roeder C, Giesekeing J, Humburg I, Schmiegel W. Inverse regulation of human ERBB2 and epidermal growth factor receptors by tumor necrosis factor  $\alpha$ . *Proc Natl Acad Sci* 1993; 90(19):8972-6.

95. Wu S, Boyer CM, Whitaker RS, Berchuck A, Wiener JR, Weinberg JB, et. al. Tumor necrosis factor alpha as an autocrine and paracrine growth factor for ovarian cancer: monokine induction of tumor cell proliferation and tumor necrosis factor alpha expression. *Cancer Res* 1993; 53(8):1939-44.
96. Takeyama H, Wakamiya N, O'Hara C, Arthur K, Niloff J, Kufe D, et. al. Tumor necrosis factor expression by human ovarian carcinoma in vivo. *Cancer Res* 1991; 51(16):4476-80.
97. Naylor MS, Stamp GW, Foulkes WD, Eccles D, Balkwill Fr. Tumor necrosis factor and its receptors in human ovarian cancer. Potential role in disease progression. *J Clin Invest* 1993; 91(5):2194-206.
98. Woodworth CD, McMullin E, Iglesias M, Plowman GD. Interleukin 1 alpha and tumor necrosis factor alpha stimulate autocrine amphiregulin expression and proliferation of human papillomavirus-immortalized and carcinoma-derived cervical epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci* 1995; 92(7):2840-4.
99. Aggarwal BB, Schwarz L, Hogan ME, Rando RF. Triple helix-forming oligonucleotides targeted to the human tumor necrosis factor (TNF) gene inhibit TNF production and block the TNF-dependent growth of human glioblastoma tumor cells. *Cancer Res* 1996; 56(22):5156-64.
100. Goillot E, Combaret V, Ladenstein R, Baubet D, Blay JY, Philip T, et. al. Tumor necrosis factor as an autocrine growth factor for neuroblastoma. *Cancer Res* 1992; 52(11):3194-200.
101. Leibovich SJ, Polverini PJ, Shepard HM, Wiseman DM, Shively V, Nuseir N. Macrophage-induced angiogenesis is mediated by tumour necrosis factor-alpha. *Nature* 1987; 329(6140):630-2.

102. Warzocha K, Salles G, Bienvenu J, et al. Tumor necrosis factor ligand-receptor system can predict treatment outcome in lymphoma patients. *J Clin Oncol* 1997; 15:499-508.
103. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, et al. Two types of murine helper T-cell clone: I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986; 136:2348-57.
104. Kelso A. Th1 and Th2 subsets: paradigms lost? *Immunol Today* 1995; 16:374-9.
105. Golumbek PT et al. Treatment of established renal cancer by tumor cells engineered to secrete interleukin-4. *Science* 1991; 254:713-6
106. Bosco M et al. Low doses of IL-4 injected perilymphatically in tumor-bearing mice inhibit the growth of poorly and apparently nonimmunogenic tumors and induce a tumor-specific immune memory. *J Immunol* 1990; 145:3136-43.
107. Tepper RI, Pattengale PK, Leder P. Murine interleukin-4 displays potent anti-tumor activity in vivo. *Cell* 1989; 57: 503-12.
108. Tepper RI, Coffman RL, Leder P. An eosinophil-dependent mechanism for the antitumor effect of interleukin-4. *Science* 1992; 257:548-51.
109. Mulligan MS, Warner RL, Foreback JL, Shanley TP, Ward PA: Protective effects of IL-4, IL-10, IL-12 and IL-13 in IgG immune complex-induced lung injury: role of endogenous IL-12. *J Immunol* 1997; 159:3483-9.

110. Iversen PO, Hart PH, Bonder CS, Lopez AF. Interleukin (IL)-10, but not IL-4 or IL-13, inhibits cytokine production and growth in juvenile myelomonocytic leukemia cells. *Cancer Res.* 1997; 57(3):476-80.
111. Terres G, Coffman RL. The role of IL-4 and IL-10 cytokines in controlling an anti-tumor response in vivo. *Int Immunol* 1998; 10(6):823-32.
112. Chung F. Anti-inflammatory cytokines in asthma and allergy: interleukin-10, interleukin-12, interferon-gama. *Mediators of Inflammation.* 2001; 10:51-9.
113. Howard M, O'Garra A. Biological properties of interleukin-10. *Immunol Today* 1992; 13:198-200.
114. Opal SM, Wherry JC, Grint P. Interleukin-10: potential benefits and possible risks in clinical infectious diseases. *Clin Infect Dis* 1998; 27:1497-1507.
115. Liu Y, Wei SH, Ho AS, de Waal Malefyt R, Moore KW. Expression cloning and characterization of a human IL-10 receptor. *J Immunol* 1994; 152:1821-9.
116. Ho AS, Liu Y, Khan TA, Hsu DH, Bazan JF, Moore KW. A receptor for interleukin-10 is related to interferon receptors. *Proc Natl Acad Sci* 1993; 90:11267-71.
117. Spencer SD, Di MF, Hooley J. et.al. The orphan receptor CRP2-4 is an essential subunit of the interleukin-10 receptor. *J Exp Med* 1998; 187:571-8.
118. Dickensheets HL, Freeman SL, Smith FM, et.al. Interleukin-10 upregulates tumor necrosis factor type II (p75) gene expression in endotoxin-stimulated human monocytes. *Blood* 1997; 90:4162-71.

119. Joyce DA, Gibbons DP, GeenP, et.al. Two inhibitors of pro-inflammatory cytokine release, interleukin-10 and interleukin-4, have contrasting effects on release of soluble p75 tumor necrosis factor receptor by cultured monocytes. *Eur J Immunol* 1994; 24:2699-705.
120. van der Poll T, de Waal Malefyt R, Coyle SM, et.al. Anti-inflammatory cytokine responses during clinical sepsis and experimental endotoxemia: sequential measurements of plasma soluble interleukin-1 (IL-1) reseptor type II, IL-10, and IL-13. *J Infect Dis* 1997; 175:118-22.
121. Donnelly SC, Strieter RM, Reid PT, et. al. The association between mortality rates and decreased concentrations of interleukin-10 and interleukin-1 receptor antagonist in the lung fields of patients with the adult respiratory distress syndrome. *Ann Intern Med* 1996; 125:191-6.
122. Zheng LM, Ojcius DM, Garaud F et.al. Interleukin-10 inhibits tumor metastasis through an NK cell-dependent mechanism. *J Exp Med* 1996; 184:579-84.
123. Blay JY, Burdin N, Rousset F, Lenoir G, Biron P, Philip T, et.al. Serum interleukin-10 in non-hodgkin lenfoma: a prognostic factor. *Blood* 1993; 82(7):2160-74.
124. de Vita F, Orditura M, Galizia G, Romano C, Roscigno A, Lieto E, et.al. Serum interleukin-10 levels as a prognostic factor in advanced non-small cell lung cancer patients. *Chest* 2000; 117:365-73.
125. Cortes JE, Talpaz M, Cabanillas F, Seymour JF, Kurzrock R. Serum levels of interleukin-10 in patients with diffuse large cell lymphoma: lack of correlation with prognosis. *Blood* 1995; 85(9):2516-20.

126. Chau YG, Wu CW, Lui WY, Chang TJ, Kao HL, Wu LH, et.al. Serum interleukin-10 but not interleukin-6 is related to clinical outcome in patients with resectable hepatocellular carcinoma. *Ann Surg* 2000; 231(4):552-8.

127. Abdelhamid AM, Dorra TM, Ali MA, Abou-Egla EH. Effect of gibberellic acid on broiler chickens performance and some metabolic parameters. *Arch Tierernahr.* 1994; 46(3):269-76

128. Ravikumar S, Srikumar K. Metabolic dysregulation and inhibition of spermatogenesis by gibberellic acid in rat testicular cells. *J Environ Biol.* 2005;26(3):567-9.

129. Csaba G, Darvas S, László V. Effects of treatment with the plant hormone gibberellin on neonatal rats. *Acta Biol Med Ger.* 1977; 36(10):1487-8.