

## Albino Farelerde İyonlaştırıcı Radyasyonun Hepatosit Morfolojisi ve Prolifere Hücre Çekirdek Antijeni (PCNA) Ekspresyonu Üzerindeki Etkileri

Siyami KARAHAN<sup>1</sup>, Kültiğın ÇAVUŞOĞLU<sup>2</sup>, Hasan Tarık ATMACA<sup>3</sup>, Emine YALÇIN<sup>4</sup>  
<sup>1</sup> Kırıkkale Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Bilim Dalı, Kırıkkale-TÜRKİYE  
<sup>2</sup> Kırıkkale Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Kırıkkale-TÜRKİYE  
<sup>3</sup> Kırıkkale Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Patoloji Ana Bilim Dalı, Kırıkkale-TÜRKİYE  
<sup>4</sup> Kırıkkale Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Kırıkkale-TÜRKİYE

**Özet:** Bu çalışmada, iyonlaştırıcı radyasyonun albino farelerde hepatosit proliferasyon oranına etkisinin araştırılması amaçlandı. Normal ve iyonlaştırıcı radyasyona maruz kalan albino fare hepatositlerindeki proliferere hücre çekirdek antijeni (PCNA) ekspresyonu immünoperoksidaz boyama tekniğiyle belirlendi. Radyasyon grubundaki fareler, çalışmanın bir ve yedinci günlerinde 30 dakika süre ile Kobalt 60-gama (1,333 MeV) ışını ile 10 Gy dozunda radyasyona maruz bırakıldı ve onbeşinci gün hayvanların nekropsileri yapıldı. Kontrol grubu fare hepatositlerinde PCNA immünopozitifliği sadece hücre çekirdeğinde gözlenirken, radyasyon grubu albino farelerde hem çekirdek hem de sitoplazmada tespit edildi. Kontrol grubunda, PCNA immünopozitif hepatositlerin oranı (%27,76±20,4), radyasyon grubuna oranla (%7,53±5,43) daha yüksekti (p<0,007). Kontrol grubunda çift çekirdekli (dikaryotik) hepatositlerin yüzdesi (%10,22±3,54) radyasyon grubuna oranla (%16,61±7,01) daha düşüktü (p<0,019). Radyasyona maruz kalan farelerin karaciğerinde iri çekirdekli hepatositlere ve piknotik hepatositlere sıklıkla rastlandı. Çift çekirdekli hepatositlerdeki PCNA immunoreaktivitesi çoğunlukla her iki çekirdekte, daha az sıklıkla da tek çekirdekte görüldü. Sonuç olarak, PCNA ekspresyonu normal albino fare hepatositlerinde çekirdekte eksprese olurken, radyasyona maruz kalmış fare hepatositlerinde genellikle hem çekirdek hem de sitoplazmada gözlemlendi. Ayrıca, 10 Gy iyonlaştırıcı gama radyasyon proliferere olan hepatosit sayısında azalmaya ve çift çekirdekli hepatosit sayısında artışa neden olmaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Fare, hepatosit, immunohistokimya, iyonlaştırıcı radyasyon, PCNA

### The Effects of Ionizing Radiation on the Hepatocyte Morphology and Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) Expression in Albino Mice

**Summary:** In this study, it was aimed to investigate the effect of ionizing radiation on hepatocyte proliferation in albino mice. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression was determined in hepatocytes of the normal mice and those exposed to ionizing radiation by means of immunoperoxidase staining technique. Mice in the radiation group were exposed to Cobalt 60-gamma (1.333 MeV) rays for 30 min at a dose of 10 Gy on the first and the seventh day of the study, and were necropsized on day 15. While PCNA immunoreactivity was observed in the hepatocyte nuclei of the control mice, the reaction was determined not only in nuclei but also in cytoplasm of hepatocytes of the irradiated mice. The percentage of PCNA immunoreactive hepatocytes was significantly higher in the control mice (%27.76±20.4) than that of the irradiated mice (%7.53±5.43) (p<0.007). The percentage of binucleated cells in the control mice (%10.22±3.54) was significantly lower than that of the irradiated mice (%16.61±7.01) (p<0.019). In the liver of the irradiated group, hepatocytes with either a larger nucleus or picnotic nucleus were frequently seen. PCNA immunoreactivity in binucleated cells was observed frequently in both nuclei, but rarely in one of the nuclei. As a result, hepatocytes of the normal albino mice displayed nuclear PCNA expression whereas the irradiated mice usually showed both nuclear and cytoplasmic expressions. In addition, 10 Gy ionized gamma radiation reduced the number of the proliferating hepatocytes, but increased the number of the binucleated hepatocytes.

**Key Words:** Hepatocyte, immunohistochemistry, ionizing radiation, mouse, PCNA

### Giriş

Prolifere hücre çekirdek antijeni (PCNA-Proliferating cell nuclear antigen), genomik DNA replikasyonu, rekombinasyonu ve tamirinde önemli rolü olan 36 KD ağırlığında temel bir proteindir (16, 25). PCNA, hücre siklusunun G<sub>1</sub> fazında sentezlenmeye başlar, S fazında en yüksek seviyesine

ulaşır ve DNA polimeraz δ'ya yardımcı olarak görev yapar (4, 18). İnterfazdaki hücrelerde PCNA çözünür formdadır ancak UV ışık gibi tetikleyiciler, çözünmeyen kromatin-PCNA kompleksi oluşumuna neden olur ki, hücre siklusunun S fazındaki PCNA bu formdadır. Prolifere hücre çekirdek antijeninin çözünmez forma geçmesi de PCNA-temelli DNA polimeraz δ aktivitesi için bir göstergedir (2). Tanno ve Taguchi (1999) PCNA'nın düşük veya yüksek konsantrasyonlu Potasyum klorür ile ekstraksiyonuna göre, nükleoplazmada L ve H, sitoplazmada ise L ve P formlarının bulunduğu söz etmektedirler (24). Yeni sentezlenen P ve

Geliş Tarihi/Submission Date : 20.05.2008

Kabul Tarihi/Accepted Date : 21.04.2009

\* Çalışma, 20-23 Mayıs 2008 tarihlerinde Çukurova Üniversitesi'nde gerçekleştirilmiş olan 9. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi'nde sunulmuştur.

L formundaki PCNA'nın bir kısmı sitoplazmada kalırken, L formundaki PCNA'nın bir kısmı da nükleoplazmaya transfer olur ve DNA'ya bağlanarak H formuna çevrilir (24).

Son yıllarda parafinde bloklanan doku örneklerinden hazırlanan kesitlerde, PCNA ekspresyonunun belirlenmesinde monoklonal PCNA antikorları yaygın olarak kullanılmakta ve bu teknikler otoradyografik teknikler H3 timidin ve 5-bromo-2'-deoksiüridin - BrdU tekniklerine ciddi alternatif oluşturmaktadır (6). Fare ve sıçan PCNA'sı da bu türlerin hepatosit proliferasyonu için uygun bir işaretleştiricidir (7). İmmünohistokimyasal boyamalarda önemli ölçüde çekirdek lokalizasyonu gösteren PCNA'nın, lenfoma (15) ve osteosarkoma hücrelerinde (13, 26), fetal dönemdeki yüksek derecede farklılaşma kapasitesine sahip hücrelerde (5), plasentanın sitotrofoblastlarında (3) hem çekirdek hem de sitoplazmada lokalize olduğu bildirilmektedir. Çekirdekteki PCNA'nın hücre çoğalmasındaki rolü kısmen anlaşılmalı olmasına rağmen sitoplazmadaki PCNA fonksiyonu yeterince anlaşılamaştır (3).

Gerek çevresel, gerekse tedavi amaçlı uygulanan iyonlaştırıcı radyasyonun, normal hepatositler üzerindeki etkilerinin belirlenmesi ve azaltılmasına yönelik çalışmalara ilgi gün geçtikçe artmaktadır (15, 17, 19, 21). İyonlaştırıcı radyasyon, hücrelerde DNA hasarına yol açan reaktif oksijen radikalleri aracılığı ile ünit membranlarda lipid peroksidasyonuna neden olmaktadır (19,21). Maruz kalınan doz ve süreye bağlı olmakla birlikte iyonlaştırıcı radyasyon verilen kemirici karaciğerinde, piknotik ve çift çekirdekli (dikaryotik) hepatosit sayısında artış görülmektedir (14, 19, 21). Oksidatif hücre hasarlarında kromatin-PCNA komplekslerinin oluşumunda aksaklıklar olabileceğine dair bazı bulgular vardır (2). Kompleks şekillenmesindeki aksamanın PCNA ekspresyonunda herhangi bir değişikliğe yol açıp açmadığına dair bulgular ise yetersizdir.

Bu çalışmada, sağlıklı ve iyonlaştırıcı gama ışınlarına maruz bırakılan albino farelerde hepatosit morfolojisinin ve PCNA ekspresyonunun belirlenmesi amaçlanmıştır.

### Gereç ve Yöntem

Çalışmada kullanılan 10 erkek albino fare (*Mus musculus var. albinos*), her birinde 5'er fare bulunan kontrol ve radyasyon gruplarına ayrıldı. Çalışma boyunca tüm hayvanlar pelet halindeki standart fare yemiyle beslendi ve suya serbestçe ulaşabildiler. Tüm deneysel uygulamalar, Kırıkkale

Üniversitesi Etik Kurul Yönergesi esaslarına uygun olarak gerçekleştirildi. Radyasyon grubundaki hayvanlar, Ankara Üniversitesi Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı'nda, çalışmanın bir ve yedinci günlerinde iki kez, Kobalt 60-gama (1.333 MeV) ışınları ile (ATC Cobalt 60 SSD) 10 Gy dozundaki radyasyona 30 dakika süreyle maruz bırakıldı.

Onbeş günlük deney süresi sonunda fareler letal dozda pentobarbital verilerek ötenazi edildi. Alınan karaciğer örnekleri % 2.5' lik glutaraldehitte tespit edildi ve 0.1 M kakodilat tamponunda (pH: 7.4) ile yıkanarak, 2 saat % 1'lik ozmik asitte postfiksasyon gerçekleştirildi. Alkol ve ksilol serilerinden geçirilerek parafine bloklanan dokulardan alınan seri kesitlerin bir kısmı hematoksilen-eozinle boyanırken, kalan kesitleri de immunohistokimyasal yöntemle PCNA demonstre edildi (27).

### İmmünohistokimyasal işlemler

Kesitler bir gece 37 °C de kurutulduktan sonra ksilolde iki kez 10'ar dakika tutularak parafin uzaklaştırıldı. Sonrasında absölü alkolden başlayarak distile suya kadar sırasıyla 10' ar dakika % 95 ve %70 alkollerde tutularak rehidrasyon gerçekleştirildi. Bütün aşamalar oda sıcaklığında (20°C) ve nemli ortamda gerçekleştirildi. Endojen peroksidaz, kesitler distile suda hazırlanan %3' lük hidrojen peroksitte 5 dakika tutularak bloke edildi. Antijen geri kazanım işlemi kesitlerin retrieval solüsyonunda (Dako ürün kodu: 2031, ABD) 40 dakika süreyle kaynatılmasıyla gerçekleştirildi. Non-spesifik blokaj işlemi için kesitler protein bloke edici solüsyonda (Labvision; İngiltere, ultravision detection system, TP-125-HL) 5 dakika süreyle tutuldu. PCNA antikoruyla (Dako; ürün kodu: N1529) 50 dakika süreyle ile inkübe edilen kesitler biyotinli polivalent anti-mouse sekonder antikorla (Labvision; ultravision detection system, TP-125-HL) 10 dakika inkübasyonu takiben streptavidin peroksidaz enzimi (Labvision; ultravision detection system, TP-125-HL) ile 10 dakika inkübe edildi. Renk reaksiyonu için Amino etil karbazol (AEC) kromojeni kullanıldı ve Mayer's hematoksilen ile 1-2 dakika karşıt boyama yapıldı. Distile suyla yıkanan preparatlar su bazlı yapıştırıcıyla kapatıldı. Kontrol preparatları, birer kesitte primer antikor, diğerinde ise sekonder antikor eklenmeden yapılan boyamayla hazırlandı.

### Hücre sayımı ve istatistiksel analizler

Dijital görüntüleme sistemi ve Olympus DS2 görüntü analiz sistemi yardımıyla her bir olguda seri

olarak alınan 3 kesitte farklı 10 mikroskop sahasında tek ve çift çekirdekli hepatositlerle PCNA immünopozitif hepatositler sayıldı. Çift çekirdekli hepatositler ve PCNA immünopozitif hepatositlerin tek çekirdekli ve PCNA-immünonegatif hepatositlere oranı hesaplandı. Sonuçlar ortalama  $\pm$  standart sapma olarak ifade edildi. Çift çekirdekli hepatosit oranı, PCNA pozitif hücre oranı ve PCNA pozitif çift çekirdekli hepatosit oranı açısından gruplar arası farklılıkların önem derecesi student *t* testi ile değerlendirildi. İstatistiksel önem derecesi olarak  $p < 0.05$  dikkate alındı.

### Bulgular

Radyasyon grubunda çift çekirdekli hepatosit oranı (%16,61 $\pm$ 7,01) kontrol grubuna göre (%10,22 $\pm$ 3,54) önemli derecede fazlaydı ( $p < 0.019$ ). Ayrıca radyasyon grubundaki farelerde iri çekirdekli (poliploidi) hepatositlere sıklıkla rastlandı (Şekil 1A ve 1B). Bunun yanında yine radyasyon grubu farelerin hepatositlerde hidropik dejenerasyon ve piknotik çekirdeklerin sıklığı dikkati çekti. Bazı iri çekirdekli hepatositlerde ise hiperkromazi gözlemlendi (Şekil 1B).

(%16,54 $\pm$ 9,33) kontrol grubuna (%23,89 $\pm$ 11,05) göre düşük olmakla birlikte aradaki fark istatistiksel öneme sahip değildi ( $p > 0.05$ ). Çift çekirdekli hepatositlerde PCNA immünopozitifliği çoğunlukla her iki çekirdekte daha az sıklıkla da tek çekirdekte tespit edildi (Şekil 1C).

### Tartışma ve Sonuç

İmmünoperoksidaz tekniğiyle gerçekleştirilen PCNA immünopozitifliği genellikle çekirdekte lokalize olmaktadır. Ancak lenfoma (13, 15) ve osteosarkoma (26) hücrelerinde, plasentanin sitotrofoblastlarında (3) ve embriyodan farklılaşmakta olan epitel hücrelerinde (5) hem çekirdek hem de sitoplazmada lokalize olduğu bildirilmiştir. Sitoplazmik PCNA lokalizasyonunun nedeni tam olarak aydınlatılamamış olmakla birlikte yüksek konsantrasyonlarda sitoplazmik PCNA sentezi veya hücre dejenerasyonu ile ilgili olabileceği ileri sürülmektedir (3). Sunulan çalışmada, PCNA immünopozitifliği kontrol grubunda sadece çekirdekte gözlemlendiği halde, radyasyona maruz bırakılan farelerde hem çekirdek hem de sitoplazmada gözlemlendi. Bununla birlikte, yalnızca çekirdek lokalize

**Tablo 1.** Kontrol ve İyonlaştırıcı Radyasyona Maruz Bırakılan Farelerde Çift Çekirdekli ve PCNA İmmünopozitif Hepatosit Oranları.

Grup	Çift çekirdekli hepatosit (%)	PCNA immünopozitif hepatosit (%)	PCNA immünopozitif çift çekirdekli hepatosit (%)
Kontrol	10,22 $\pm$ 3,5	27,76 $\pm$ 20,4	23,89 $\pm$ 11,05
Radyasyon	16,61 $\pm$ 7,01*	7,76 $\pm$ 5,43 *	16,54 $\pm$ 9,33
	P<0,019	P<0,007	P>0,05

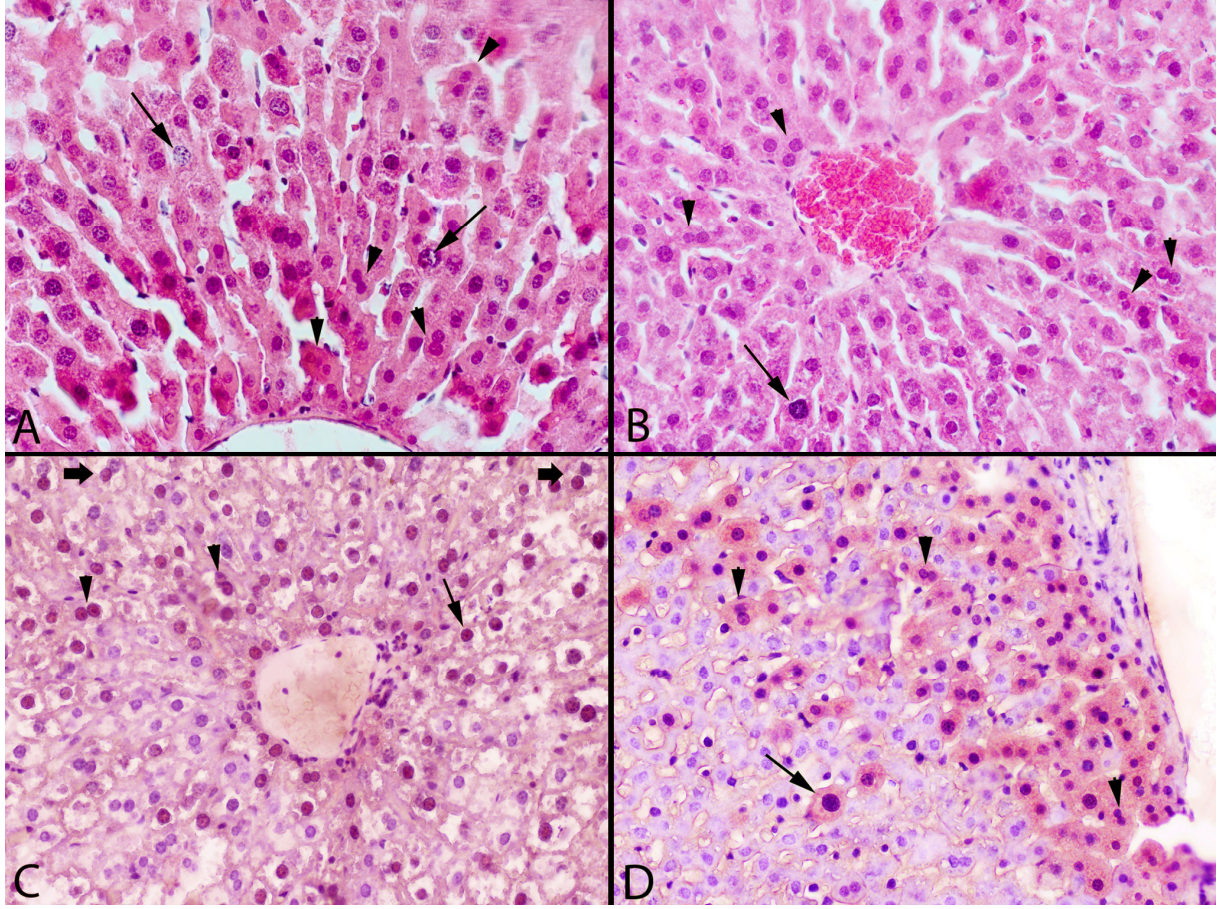
\* İşaretili gruplar arasında istatistiki farka işaret etmektedir.

Kontrol grubu fare hepatositlerinde PCNA immünopozitifliği, sadece çekirdekte gözlenirken, radyasyon grubundaki albino farelerin hepatositlerinde hem çekirdek hem de sitoplazmada tespit edildi (Şekil 1C ve 1D). Radyasyon grubundaki PCNA immünopozitif hepatositlerin oranı (%7,53 $\pm$ 5,43) kontrol grubuna göre (%27,76 $\pm$ 20,4), önemli derecede düşüktü ( $p < 0.007$ ). PCNA pozitif hepatositlere çoğunlukla portal alanlara komşu bölgelerde rastlandı, bu durum özellikle radyasyona maruz bırakılan fare karaciğerlerinde daha belirgindi.

Radyasyona maruz bırakılan farelerin karaciğerindeki PCNA pozitif çift çekirdekli hepatosit oranı

zasyonu gösteren hepatosit sayısı oldukça sınırlıydı. Bu bulgulara dayanılarak, 10 Gy gama radyasyonuna maruz bırakılan albino farelerin hepatositlerinde aşırı PCNA sentezlendiği ve/veya yıkımlandığı ileri sürülebilirse de bu durumun ilave moleküler çalışmalarla desteklenmesi gereklidir. Elde edilen sonuçlar, ayrıca 10Gy gama radyasyona maruz bırakılan farelerde hepatosit proliferasyonunun baskılandığını göstermektedir

Kemirici karaciğerinde hepatositlerin yaklaşık % 30'u çift çekirdeklidir. Çift çekirdekli hücreler, mitoz bölünmenin sitokinezis evresinin tamamlanmaması yani asitokinez sonucu meydana gelir. Doğumda oldukça sınırlı sayıda olan çift çekirdekli



**Şekil 1.** Albino fare karaciğeri. **A)** İyonlaştırıcı radyasyona maruz bırakılan fare hepatositleri arasında iri çekirdekli hepatositler (oklar) ve çift çekirdekli hepatositler (ok başları) görülmektedir. H&E X320; **B)** Yoğun boyanmış iri çekirdekli hepatosit (ok) ve çift çekirdekli hepatositler görülmektedir (ok başları) H&E X320; **C)** PCNA immünopozitifliği, kontrol grubundaki albino fare hepatositlerinin sadece çekirdeğinde (ince ok) gözlenmektedir. Çift çekirdekli hepatositlerde çoğunlukla her iki çekirdek de PCNA immünopozitif (ok başları) iken tek çekirdeği PCNA immünopozitif olan hepatositler azınlıktadır (kalın ok). İmmünperoksidaz & hematoksilen X320; **D)** İyonlaştırıcı radyasyona maruz bırakılan farelerin hepatositlerinde PCNA hem çekirdekte hem de sitoplazmada ekspresyone olmaktadır. Tek çekirdekli (ok) ve çift çekirdekli (ok başı) PCNA immünopozitif hepatositler görülmektedir. İmmünperoksidaz & hematoksilen X 320

hepatosit sayısı yaşla birlikte artar ve doğumdan 4-7 hafta sonra tekrar azalma eğilimi gösterir (8, 11, 23). Çift çekirdekli hepatositlerin bölünerek tek çekirdekli tetraploid (4n) özelliği gösteren hücreleri meydana getirdikleri de rapor edilmiştir (11). Gerek çift çekirdeklik, gerekse poliploidi rodent karaciğeri normal morfolojik ve fizyolojik bir özelliğidir (9, 11). Poliploidi bir hücrenin terminal farklılaşma ve yaşlanmasıyla ortaya çıkar (22). DNA reaksiyonuna giren karsinojenler hepatositlerin sitokinezini sağlayarak çift çekirdekli hepatositlerin oranında azalmaya neden olur (23). Diğer taraftan, kurşun sitrat ve X ışınları çift çekirdekli hepatosit sayısında artışa yol açar (1,20). Bir çalışmada (12), 0.78 cGy dozundaki radyasyona maruziyet sonucu çift

çekirdekli hepatosit oranı arttığı, diğer bir çalışmada ise (21) 6 ve 8Gy dozundaki maruziyeti takip eden 7 nci güne kadar artışın devam ettiği, daha sonra bu oranın kısmen azalma eğilimi göstermekle birlikte 14. günde normal düzeyden hala yüksek olduğu belirtilmektedir.

Maharwal ve ark. (2005), 6Gy, 8Gy ve 10 Gy ile Swiss albino farelerinde iyonlaştırıcı radyasyonun çift çekirdekli hücre sayısında uygulamanın 1'nci gününde artışa ve daha sonraki günlerde hafif bir düşüşle birlikte 7'nci günde tekrar artışa neden olduğunu bildirmektedirler (19). Çift çekirdekli hücre sayısının 6Gy uygulanmış farelerde 30'ncü gün kontrol grubunun seviyesine indiğini de ifade et-

mektedirler (19). Sunulan çalışmada da 10 Gy iyonlaştırıcı radyasyona maruz bırakılan farelerde çift çekirdekli hepatosit sayısı arttığı ve bu hücrelerde PCNA ekspresyonunun genellikle her iki çekirdekte, daha az sıklıkla da tek çekirdekte olduğu tespit edilmiştir. Bir hücre proliferasyonu göstergesi olarak kabul edilen PCNA ekspresyonu gösteren hepatosit sayısı azalırken çift çekirdekli hücre sayısındaki artış, hepatositlerin sitoplazmik füzyonuna bağlanabilir (8).

Poliploidi, hücrenin haploid veya diploid kromozom seti yerine üç, dört veya daha fazla kromozom setine sahip olması durumudur. Hepatositlerde geç fötal ve postnatal dönemlerde ortaya çıkan poliploidi, normal rodent karaciğer dokusunda oldukça yaygındır (9, 11). Gorla ve ark. (2001) gama radyasyonun neden olduğu oksidatif DNA hasarının siçanlarda poliploid hepatosit sayısını artırdığını bu hücrelerin iri çekirdekli ve hiperkromatik olduğunu bildirmişlerdir (10). Bu çalışmada da, radyasyona maruz bırakılan farelerde iri çekirdekli hepatositlere sıklıkla rastlandı ve bunların bazılarının çekirdekleri oldukça yoğun boyandı. Bununla birlikte, söz konusu çekirdeklerin poliploidi gösterip göstermedikleri ise kesin olarak bilinmemektedir.

Sonuç olarak, PCNA ekspresyonu normal albino fare hepatositlerinde çekirdekte, radyasyona maruz bırakılan fare hepatositlerinde ise genellikle hem çekirdekte hem de sitoplazmada gözlemlendi. 10 Gy iyonlaştırıcı gama radyasyon proliferasyon olan hepatosit sayısında azalmaya ve çift çekirdekli hücre sayısında artışa neden olmaktadır.

### Teşekkür

Farelere iyonlaştırıcı radyasyon uygulanmasındaki yardımlarından dolayı Ankara Üniversitesi Radyasyon Onkolojisi Ana Bilim Dalı öğretim üyesi Prof.Dr. Cengiz KURTMAN'a teşekkür ederiz.

### Kaynaklar

1. Albert MD, Bucher NL, 1960. Latent injury and repair in rat liver induced to regenerate at intervals after X-radiation. *Cancer Res*, 20: 1514-1522.
2. Balajee AS, Dianova I, Bohr VA, 1999. Oxidative damage-induced PCNA complex formation is efficient in xeroderma pigmentosum group A but reduced in Cockayne syndrome group B cells. *Nucleic Acids Res*, 27 (22): 4476-4482.
3. Blankenship TN, King BF, 1994. Developmental expression of Ki-67 antigen

and proliferating cell nuclear antigen in macaque placentas. *Dev Dyn*, 201(4) : 324-33.

4. Bravo R, Frank R, Blundell Pa, Macdonald-Bravo H, 1987. Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase-delta. *Nature*, 326 (6112): 515-517.
5. Casasco A, Giordano M, Danova M, Casasco M, Icaro Cornaglia A, Calligaro A, 1993. PC10 monoclonal antibody to proliferating cell nuclear antigen as probe for cycling cell detection in developing tissues. A combined immunocytochemical and flow cytometric study. *Histochemistry*, 99 (3): 191-199.
6. Connolly KM, Bogdanffy MS, 1993. Evaluation of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) as an endogenous marker of cell proliferation in rat liver: a dual-stain comparison with 5-bromo-2'-deoxyuridine. *J Histochem Cytochem*, 41(1):1-6.
7. Eldrige SR, Butterworth BE, Goldsworthy TL, 1993. Proliferating cell nuclear antigen: a marker for hepatocellular proliferation in rodents. *Environ Health Perspect*, 101 Suppl 5: 211-218.
8. Fujii E, Karasawa Y, Kumano E, Sakurai T, Misawa Y, Mori T, Ito T, Suzuki M, Sugimoto T, 2004. Nuclearity and BrdU Labeling of Rat Hepatocytes in Cyto centrifuge Preparations of Freshly Isolated Hepatocytes with Cumulative Labeling of Bromodeoxyuridine. *J Toxicol Pathol*, 17: 43-49.
9. Gandillet A, Alexandre E, Holl V, Royer C, Bischoff P, Cinqualbre J, Wolf P, Jaeck D, Richert L, 2003. Hepatocyte ploidy in normal young rat. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 134(3): 665-673.
10. Gorla Gr, Malhi H, Gupta S, 2001. Polyploidy associated with oxidative injury attenuates proliferative potential of cells. *J Cell Sci*, 114: 2943-2951.
11. Guidotti JE, Brégerie O, Robert A, Debey P, Brechot C, Desdouets C, 2003. Liver cell polyploidization: a pivotal role for binuclear hepatocytes. *J Biol Chem*, 278(21): 19095-19101.
12. Guryev DV, 2005. Histologic assesment of regenerating rat liver under low-dose radiation exposure. *International Congress Series*, 1276: 181-181.

13. Hall PA, Levison DA, Woods AL, Yu CC, Kellock DB, Watkins JA, Barnes DM, Gillett CE, Camplejohn R, Dover R, Waseem NH, Lane DP, 1990. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: an index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. *J Pathol*, 162: 285-294.
14. Jeong WI, Do SH, Kim TH, Jeong DH, Hong IH, Ki MR, Kwak DM, Lee SS, Jee YH, Kim SB, Jeong KS, 2007. Acute effects of fast neutron irradiation on mouse liver. *J Radiat Res*, 48 (3): 233-240.
15. Kamel OW, Warnke RA, Banks PM, 1992. Localization of proliferating cell nuclear antigen (PCNA/Cyclin) in workshop cases of Hodgkin's disease and non-Hodgkin's lymphoma. *Semin Diagn Pathol*, 9(4): 311-314.
16. Kelman Z, Hurwitz J, 1998. Protein-PCNA interactions: a DNA-scanning mechanism? *Trends Biochem Sci*, 23 (7): 236-238.
17. Komatsu K, Wharton W, Hang H, Wu C, Singh S, Lieberman HB, Pledger WJ, Wang HG, 2000. PCNA interacts with hHus1/hRad9 in response to DNA damage and replication inhibition. *Oncogene*, 19 (46): 5291-5297.
18. Kurki P, Vanderlaan M, Dolbeare F, Gray J, Tan EM, 1986. Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin during the cell cycle. *Exp Cell Res*, 166 (1): 209-219.
19. Maharwal J, Samarth RM, Saini MR, 2005. Antioxidative effect of Rajgira leaf extract in liver of Swiss albino mice after exposure to different doses of gamma radiation. *Phytother Res*, 19 (8): 717-720.
20. Melchiorri C, Chieco P, Zedda AI, Coni P, Ledda-Columbano GM, Columbano A, 1993. Ploidy and nuclearity of rat hepatocytes after compensatory regeneration or mitogen-induced liver growth. *Carcinogenesis*, 14 (4):1825-1830.
21. Sharma R, Sharma J, 2005. Modification of gamma ray induced changes in the mouse hepatocytes by *Centella asiatica* extract: in vivo studies. *Phytother Res*, 19 (7): 605-611.
22. Sigal SH, Rajvanshi P, Gorla GR, Sokhi RP, Saxena R, Gebhard Dr JR, Reid LM, Gupta S, 1999. Partial hepatectomy-induced polyploidy attenuates hepatocyte replication and activates cell aging events. *Am J Physiol*, 276 (5 Pt 1): G1260-G1272.
23. Styles JA, 1993. Measurement of ploidy and cell proliferation in the rodent liver. *Environ Health Perspect*, 101 (Suppl 5): 67-71.
24. Tanno M, Taguchi T, 1999. Proliferating cell nuclear antigen in normal and regenerating rat livers. *Exp Mol Pathol*, 67(3): 192-200.
25. Tsurimoto T, 1999. PCNA binding proteins. *Front Biosci*, 4: D849-D858.
26. Wang W, Luo H, Wang A, 2006. Expression of survivin and correlation with PCNA in osteosarcoma. *J Surg Oncol*, 93 (7): 578-584.
27. Zahger D, Fishbein MC, Garfinkel LI, Shah PK, Forrester JS, Regnstrom J, Yano J, Cercek B, 1995. VCL, an Antagonist of the Platelet GP1b Receptor, Markedly Inhibits Platelet Adhesion and Intimal Thickening After Balloon Injury in the Rat. *Circulation*, 92:1269-1273.

#### Yazışma Adresi

Doç. Dr. Siyami KARAHAN  
 Histoloji ve Embriyoloji Bilim Dalı  
 Veteriner Fakültesi  
 Kırıkkale Üniversitesi  
 71451 Yahşihan, Kırıkkale  
 E-mail : siyamikarahan@yahoo.com  
 Tel : 318 357 33 01  
 Faks : 318 357 33 04

