

156853

T.C
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**KARACİĞER TÜMÖRÜNDE
ANTIOKSİDAN SİSTEM VE KOLŞİSİNİN ETKİSİ**

Bil. Uz. Necmiye CANACANKATAN

DOKTORA TEZİ

DANIŞMANI

Prof. Dr. Levent KAYRIN

Bu tez Çukurova Üniversitesi Araştırma Projeleri tarafından SBE.2000.D.9 No' lu proje olarak desteklenmiştir.

Tez No:.....


ADANA-2004


KABUL VE ONAY FORMU

Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü


Biyokimya Anabilim Dalı Doktora Programı Çerçevesinde yürütülmüş olan Karaciğer nöroendokrin antioksidan sistem ve kolşisinin etkisi adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi : 17 / 09 / 2004


Prof. Dr. Levent Kayrın
Çukurova Üniversitesi
Jüri Başkanı


İmza
Prof. Dr. Fazilet Aksu
Çukurova Üniversitesi
Jüri Üyesi


İmza
Prof. Dr. Figen Doran
Çukurova Üniversitesi
Jüri Üyesi


İmza
Doç. Dr. Lülüfer Tamer
Çukurova Üniversitesi
Jüri Üyesi


İmza
Doç. Dr. Gülen Attila
Çukurova Üniversitesi
Jüri Üyesi

Yukarıdaki tez, Yönetim kurulunun 6.10.2004...tarih ve 27.12.2004... sayılı kararı ile kabul edilmiştir.


Prof. Dr. Sait POLAT
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Biyokimya Anabilim Dalında görev yaptığım süre içerisinde biyokimya bilgi ve deneyimi ile eğitimimi pekiştiren tez danışmanım sayın Prof. Dr. Levent KAYRIN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimim süresince bilimsel ve sosyal katkılarını esirgemeyen sayın Prof. Dr. Güneş YÜREĞİR'e, Prof. Dr. Kıymet AKSOY'a, Prof. Dr. Nurten DİKMEN'e, Doç. Dr. Abdullah TULİ'ye, Doç. Dr. M. Akif ÇÜRÜK'e ve çalışma arkadaşlarıma ayrı ayrı teşekkür ederim.

Deneysel çalışmalarım süresince 6 ayda bir gerçekleştirilen tüm toplantılara katılarak beni yönlendiren, bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen tez izleme jürimde bulunan sayın Prof. Dr. Fazilet AKSU' ya, sayın Doç. Dr. Gülen ATTİLA'ya ve bu toplantılara katılarak, katkıda bulunan ve aynı zamanda histopatolojik incelemeleri değerlendiren sayın Prof. Dr. Figen DORAN'a teşekkür ederim.

İstatistiksel verilerin değerlendirilmesinde katkıda bulunan sayın Prof. Dr. Refik BURGUT ve Arş. Gör. Yaşar SERTDEMİR'e; Biyokimyasal parametrelerin çalışmasında katkısını esirgemeyen sayın Yrd. Doç. Dr. Tamer İNAL'a ve Merkez Laboratuvarı çalışanlarına ve sıçanların temin ve bakımını üstlenen Arş. Gör. Kenan DAĞLIOĞLU ve TIBDAM çalışanlarına teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimim süresince sabır ve desteğini esirgemeyen sevgili eşim Dr. Mehmet CANACANKATAN' a, annem ve babam sevgili Asuman ve Mahmut KALAV'a şükranlarımı sunarım.

Tez çalışmamı SBE.D.9 Nolu proje olarak destekleyen Çukurova Üniversitesi Rektörlüğü'ne ve Araştırma Projeleri Birimi'ne ayrıca teşekkür ederim.

Bil.Uz.Necmiye CANACANKATAN

Adana / 2004

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
ÖZET	xi
ABSTRACT	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. HEPATOSELLÜLER KARSİNOMA	3
2.2. KOLŞİSİN	5
2.2.1. KOLŞİSİNİN TARİHÇESİ	5
2.2.2. KOLŞİSİNİN KİMYASAL YAPISI VE ANALOGLARI	6
2.2.3. BİYOLOJİK ETKİLER	8
2.2.4. KOLŞİSİNİN EMİLİM VE DAĞILIMI	9
2.2.5. KOLŞİSİNİN ATILIMI	10
2.2.6. KOLŞİSİNİN ETKİ MEKANİZMASI	11
2.2.6.1. AKUT GUT ARTRİTTE	11
2.2.6.2. HÜCRE ZARI ETKİSİ	12
2.2.6.3. MİTOZ VE DNA SENTEZİNİN İNHİBİSYONU	12
2.2.6.4. AMİLOİDOZ'DA ETKİ MEKANİZMASI	12
2.2.6.5. KOLŞİSİN VE SIKLIK 3', 5'-ADENOZİN MONOFOSFAT	13
2.2.7. KOLŞİSİNİN YAN ETKİLERİ	13
2.3. SERBEST RADİKALLER	13
2.3.1. PATOLOJİK ÖNEMİ OLAN SERBEST RADİKAL TÜRLERİ	14
2.3.2. REAKTİF OKSİJEN BİLEŞİKLERİ	15
2.3.2.1. SÜPEROKSİT RADİKALI ($O_2^{\cdot-}$)	15
2.3.2.2. HİDROJEN PEROKSİT (H_2O_2)	15
2.3.2.3. HİDROKSİL RADİKALI ($\cdot OH$)	16
2.3.2.4. NİTRİK OKSİT (NO^{\cdot})	16
2.3.2.5. SİNGLET OKSİJEN (1O_2)	17
2.3.3. SERBEST RADİKALLERİN OLUŞUMU VE ETKİLERİ	17
2.3.3.1. SERBEST RADİKALLERİN OLUŞUMU	17
2.3.3.2. SERBEST RADİKALLERİN ETKİLERİ	18
2.3.3.2.1. LİPİT PEROKSİDASYONU	18

2.3.3.2.2. SERBEST RADİKALLERİN OLUŞTURDUĞU PROTEİN HASARI	19
2.3.3.2.3. SERBEST RADİKALLERİN OLUŞTURDUĞU DNA HASARI	20
2.3.4. SERBEST RADİKALLER VE KANSER	21
2.4. ANTİOKSİDAN SİSTEM	24
2.4.1. ANTİOKSİDAN ENZİMLER	25
2.4.1.1. SÜPEROKSİT DİSMUTAZ ENZİMİ (SOD)	25
2.4.1.2. GLUTATYON PEROKSİDAZ ENZİMİ (GSH-PX)	26
2.4.1.3. KATALAZ (CAT)	27
2.4.1.4. TİYOREDOKSİN SİSTEMİ	27
2.4.1.5. PEROKSİREDOKSİNLER	28
2.4.1.6. SÜPEROKSİT REDÜKTAZLAR	28
2.4.1.7. SERULOPLAZMİN	28
2.4.1.8. GLUTATYON REDÜKTAZ(GSH-RD)	28
2.4.1.9. GLUTATYON S-TRANSFERAZ(GST)	29
2.4.2. ZİNCİR KIRICI ANTİOKSİDANLAR	29
2.4.2.1. LİPİT FAZ ZİNCİR KIRICI ANTİOKSİDANLAR	29
2.4.2.1.1. TOKOFEROLLER	29
2.4.2.1.2. KAROTENLER	30
2.4.2.1.3. UBİKİNON	30
2.4.2.1.4. FLAVONOİDLER	31
2.4.2.2. SIVI FAZ ZİNCİR KIRICI ANTİOKSİDANLAR	31
2.4.2.2.1. ASKORBAT	31
2.4.2.2.2. REDÜKTE GLUTATYON	31
2.4.2.2.3. ÜRAT	32
2.4.3. METAL BAĞLAYICI PROTEİNLER	32
3- GEREÇ VE YÖNTEM	33
3.1. GEREÇLER	33
3.1.1. CİHAZLAR	33
3.1.2. KİMYASAL MADDELER	33
3.2. DENEY HAYVANLARININ SEÇİMİ VE TEMİNİ	34
3.3. ÖN ÇALIŞMA	34
3.4. ÇALIŞMA GRUPLARI	35
3.5. ÇALIŞMA ÖRNEKLERİNİN HAZIRLANIŞI	36
3.5.1. KAN ÖRNEKLERİ	36
3.5.2. DOKU ÖRNEKLERİ	36
3.5.2.1. DOKU HOMOJENATININ HAZIRLANIŞI	36
3.5.2.2. HİSTOPATOLOJİK İNCELEMELER İÇİN	36

3.5.1. KAN ÖRNEKLERİ	36
3.5.2. DOKU ÖRNEKLERİ	36
3.5.2.1. DOKU HOMOJENATININ HAZIRLANIŞI	36
3.5.2.2. HİSTOPATOLOJİK İNCELEMELER İÇİN DOKULARIN HAZIRLANMASI	36
3.6. ANALİZ YÖNTEMLERİ	37
3.6.1. BİYOKİMYASAL ANALİZLER	37
3.6.1.1. ANTİOKSİDAN SİSTEMİN İNCELENMESİ	37
3.6.1.1.1. ERİTROSİTLERDE GSH MİKTARININ VE GSH-PX ENZİM AKTİVİTESİNİN İNCELENMESİ	37
3.6.1.1.1.1. ERİTROSİT GSH ÖLÇÜMÜ	37
3.6.1.1.1.2. ERİTROSİT GSH-PX ÖLÇÜMÜ	40
3.6.1.1.1.3. HEMOGLOBİN TAYİNİ	42
3.6.1.1.2. KARACİĞER DOKUSUNDA GSH VE MDA MİKTARI İLE GSH-PX VE SOD ENZİM AKTİVİTESİNİN İNCELENMESİ	44
3.6.1.1.2.1. DOKU GSH ÖLÇÜMÜ	44
3.6.1.1.2.2. DOKU GSH-PX ÖLÇÜMÜ	45
3.6.1.1.2.3. DOKU MDA ÖLÇÜMÜ	46
3.6.1.1.2.4. DOKU SOD ÖLÇÜMÜ	47
3.6.1.1.2.5. LOWRY YÖNTEMİ İLE PROTEİN TAYİNİ	52
3.6.1.2. AST, ALT, ALP VE TOTAL PROTEİN DÜZEYLERİNİN İNCELENMESİ	54
3.6.2. KARACİĞER DOKULARININ HİSTOPATOLOJİK İNCELENMESİ	54
3.6.2.1. İMMUNOHİSTOKİMYASAL BOYAMA EVRELERİ	54
4. BULGULAR	56
4.1. ÖN ÇALIŞMA İLE İLGİLİ HİSTOPATOLOJİK BULGULAR	56
4.2. BİYOKİMYASAL ANALİZLERE AİT BULGULAR	63
4.2.1. ERİTROSİTLERDE VE KARACİĞER DOKULARINDA ANTİOKSİDAN SİSTEME AİT BULGULAR	62
4.3. KARACİĞER DOKULARININ HİSTOPATOLOJİK BULGULARI	76
5. TARTIŞMA	81
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	90
7. KAYNAKLAR	91
ÖZGEÇMİŞ	99

ŞEKİLLER DİZİNİ

il 2.1. : Kolşisinin kimyasal yapısı	6
il 2.2. : Kolşisin çekirdeğinin genel yapısı.	7
il 2.3. :Reaktif oksijen bileşiklerinin oluşumu	15
il 2.4. : Serbest radikallerin oluşumu ve etkileri	18
il 2.5. : Serbest oksijen türevleri ve kanser patogenezi	21
il 2.6. : Serbest Radikallere karşı antioksidan sistem	24
il 2.7. : Antioksidan Enzimler	25
il 4.1. : HE x 100 kontrol grubu sıçanlarda normal karaciğer dokusu	57
il 4.2. : HE x 100 4 hafta süresince günlük içme sularına son derişimi 100 ppm DEN ilave edilen sıçanlarda karaciğer dokusunda portal alanlarda dağınık mononükleer iltihabi hücre infiltrasyonu, fibrozis, parankimde rejenerasyon bulguları	58
il 4.3. : HE x 25 10 hafta süresince içme sularına son derişimi 100 ppm DEN ilave edilen sıçanlarda karaciğerde sirotik görünüm. Normal yapı tamamen bozulmuş ve karaciğer fibröz septalar ile mikronodüllere ayrılmış	59
il 4.4. : HE x 100 10 hafta süresince günlük içme sularına son derişimi 100 ppm DEN ilave edilen sıçanlarda siroz. Portal alan-Lobül sınırında düzensizlik, fibröz septalarda ve portal alanlarda mononükleer iltihap hücreleri, pakarankimde rejenerasyon bulguları.	60
il 4.5. : Retikülin x 100 10 hafta süresince günlük içme sularına son derişimi 100 ppm DEN ilave edilen sıçanlarda siroz. Retiküler çatıda kabalaşma ve nodüler görünüm.	61
il 4.6. : Retikülin x 100 19 hafta süresince günlük içme sularına son derişimi 100 ppm DEN ilave edilen sıçanlarda displastik karaciğer hücrelerine komşu tümör odağı. Tümör hücreleri hiperkromatik nükleuslu, geniş eozinofilik sitoplazmalı, trabeküler yapılar oluşturmuş.	62
il 4.7. Eritrositlerde Kontrol grubu (Grup I) ile çalışma grupları GSH değerlerinin karşılaştırılması	66

kil 4.8. : Eritrositlerde Kontrol grubu (Grup I) ile çalışma grupları GSH-Px değerlerinin karşılaştırılması	66
kil 4.9. : Kontrol grubu (Grup I) ile çalışma grupları AST değerlerinin karşılaştırılması	69
kil 4.10. : Kontrol grubu (Grup I) ile çalışma grupları ALT değerlerinin karşılaştırılması	70
kil 4.11. : Kontrol grubu (Grup I) ile çalışma grupları ALP değerlerinin karşılaştırılması	70
kil 4.12. : Kontrol grubu (Grup I) ile çalışma grupları Total protein değerlerinin karşılaştırılması	71
kil 4.13. : Sıçan karaciğer dokularında Kontrol grubu (Grup I) ile çalışma grupları GSH değerlerinin karşılaştırılması	74
kil 4.14. : Sıçan karaciğer dokularında Kontrol grubu (Grup I) ile çalışma grupları GSH-Px değerlerinin karşılaştırılması	75
kil 4.15. : Sıçan karaciğer dokularında Kontrol grubu (Grup I) ile çalışma grupları SOD değerlerinin karşılaştırılması	75
kil 4.16. : Sıçan karaciğer dokularında Kontrol grubu (Grup I) ile çalışma grupları MDA değerlerinin karşılaştırılması	76
kil 4.17. : HE x 100 kontrol grubu sıçanlarda normal karaciğer dokusu.	78
kil 4.18. : HE x 100 Grup III'te bulunan sıçanlarda displastik karaciğer hücrelerine komşu tümör odağı.	79
kil 4.19. : HE x 100 Grup V'te bulunan sıçanlarda displastik karaciğer hücrelerine komşu tümör odağı.	80

ÇİZELGELER DİZİNİ

zelge 2.1.: HCC'nın gelişimi ile ilgili veya gelişimine yatkınlığı olan durumlar	4
zelge 2.2. Kolşisinin metabolitleri ve analogları	7
zelge 2.3.: Patolojik olarak önemli oksijen radikalleri	14
zelge 2.4.: Radikal olmayan oksijen türevi bileşikler	14
zelge 2.5. : Serbest radikallerin oluşturduğu hastalıklar	23
zelge 4.1. : Eritrositlerde GSH miktarının ve GSH-Px enzim aktivitesi	64
zelge 4.2. : Eritrositlerde GSH miktarının ve GSH-Px enzim aktivitesinin istatistiksel verileri	65
zelge 4.3. : Çizelge 4.2.'de verilen değerlerin ikili grup karşılaştırmalarına ilişkin p değerleri	65
zelge 4.4. : Plazmada ALT, AST, ALP ve Total Protein değerleri	67
zelge 4.5. : Plazmada ALT, AST, ALP ve Total Protein değerlerine ait istatistiksel veriler	68
zelge 4.6. : Çizelge 4.5.'de verilen değerlerin ikili grup karşılaştırmalarına ilişkin p değerleri	69
zelge 4.7. : Sıçan karaciğer dokularında GH, GSH-Px, SOD ve MDA değerleri	72
zelge 4.8. : Sıçanların karaciğer dokularında GSH, GSH-Px, SOD ve MDA değerlerine ait istatistiksel veriler	73
zelge 4.9. : Çizelge 4.8.'de verilen değerlerin ikili grup karşılaştırmalarına ilişkin p değerleri	74

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ALT	Alanin aminotransferaz
ALP	Alkalen fosfataz
AST	Aspartat aminotransferaz
ARDS	Adult respiratory distress syndrome (Erişkin respiratuar distress sendromu)
cAMP	Adenozin monofosfat
CAT	Katalaz
C _{max}	Maksimal derişim
CYP	Sitokrom P ₄₅₀
DNA	Deoksiribonükleik asit
DTNB	5,5'-ditiyo-bis [2-nitrobenzoyik asit]
EC-SOD	Ekstraselüler SOD
EDTA	Etilen diamin tetraasetik asit
FMF	Familial mediterranean fever (Ailesel Akdeniz Ateşi)
GSH	Redükte glutatyon
GSH-Px	Glutatyon Peroksidaz
GSH-Rd	Glutatyon Redüktaz
GSSG	Okside glutatyon
Hb	Hemoglobin
HCC	Hepatosellüler karsinoma
INT	2-[4-iyodofenil] - 3- [4-nitrofenol] - 5 – feniltetrazoliyum klorid
MDA	Malondialdahit
NADPH	Redükte nikotin amioladenin dinokleotid
NOS	Nitrik oksit sentaz
NSAID	Non Steroid antiinflammatory drugs (Steroit olmayan antiinflamatuvar ilaçlar)
RNA	Ribonükleik asit
SOD	Süperoksit Dismutaz Enzimi
T _{1/2}	Yarı yaşam süresi
TBA	Tiyobarbitürik asit
T _{max}	Plazma maksimum düzeyine erişme süresi
Trx	Tiyoredoksin
TrxR	Tiyoredoksin redüktaz

ÖZET

Karaciğer Tümöründe Antioksidan Sistem ve Kolşisinin Etkisi

Hepatosellüler karsinoma (HCC) ölümlle ilişkili kanser sebeplerinin en büyük üçüncü sebebidir ve insidansı her gün biraz daha artmaktadır. Oksidatif stres varlığında serbest radikal oluşumunun arttığı ve serbest radikallere uzun süre maruz kalınması ile DNA üzerinde oksidatif hasar riskinin artacağı düşünülmektedir.

Kolşisin yüzyıllardır tıpta; Gut , Behçet Hastalığı, Ailesel Akdeniz Ateşi (FMF), karaciğer sirozu, dermatolojik hastalıklar ve skleroderma tedavisinde yaygın kullanımı olan eski bir ilaçtır. Kolşisinin tedavi amaçlı kullanıldığı bu hastalıkların çoğunda nötrofil fonksiyonlarında ve serbest oksijen türevlerin üretiminde artış gözlenmektedir.

Bu çalışmamızda HCC' da antioksidan sistem ve Malondialdehiti (MDA) ve bunu yanı sıra antimitotik ve mikrotübül inhibitörü olan kolşisinin HCC üzerine etkisini araştırdık. Bu amaçla kimyasal bir karsinojen olan N-Nitrosodietilamin ile sıçanlarda deneysel HCC modeli oluşturduk.

Antioksidan etkiyi gözlemek amacı ile eritrositlerde ve karaciğer dokularında antioksidan enzimlerden glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktiviteleri, bir serbest radikal temizleyici olan redükte glutatyon (GSH) miktarı ve lipit peroksidasyonunun göstergesi olarak ise MDA düzeyi saptandı. Ayrıca ALT, AST, ALP ve total protein serum düzeyleri ölçüldü. Eritrositlerde ve karaciğer dokularında GSH ve GSH-Px Beutler yöntemleri ile; karaciğer dokularında SOD enzimi ve MDA düzeyi sırası ile McCord et al. ve tiyobarbütirik asit yöntemi ile ölçüldü. Histopatolojik incelemeler ışık mikroskopisi ile yapıldı.

Elde ettiğimiz sonuçlar ışığında serbest radikallerin HCC' ın oluşumun nedenlerinden biri olabileceği düşünülmektedir. Kolşisin HCC oluşumunu önleyici bir etkiye sahiptir fakat bu etki antioksidan sistem ile ilişkili değildir.

Anahtar sözcükler: Hepatosellüler karsinoma, Kolşisin, Serbest radikaller, antioksidan, N-nitrosodietilamin.

ABSTRACT

Antioxidant system in liver tumor and the effect of colchicine on liver tumor

Hepatocellular carcinoma(HCC) is representing the third largest cause of cancer related death and its incidence is increasing day by day. It would be reasonable to expect that oxygen radicals would likely persist longer under conditions of oxidative stress presenting an increased risk of oxidative damage to DNA.

Colchicine is an ancient drug, widely use in the the treatment of gout, Behcet's disease(BD), Mediterranean fever (FMF), liver cirrhosis, dermatologic disorders and scleroderma. Increased neutrophil functions and excessive production of reactive oxygen species(ROS) were claimed some of these diseases that colchicine is used for treatment.

In this study we aimed to study antioxidant system and malondialdehyde (MDA) in HCC and also effect of colchicine on HCC, an antimitotic and microtubulin formation disturbing drug. For this purpose we developed an experimental HCC model by using N-nitrosodiethylamine (DEN), a chemical carcinogenic agent.

The activities of antioxidant enzymes including glutathione peroxidase (GSH-Px), superoxide dismutase (SOD) and a well-known oxyradical scavenger reduced glutathione (GSH) and MDA one of the end product of lipid peroxidation were determined in erythrocytes and liver. Also ALT, AST, ALP and total protein were determined in serum. GSH-Px enzyme activity and level of GSH were assayed according to Beutler methods. SOD enzyme activity and MDA content were assayed according to Mc Cord and thiobarbituric acid methods, respectively. Histopathologic investigations were performed light microscopy.

In the light of the results, it was concluded that free radicals in liver may be the one of the reason for the formation of HCC. Colchicine inhibit formation of HCC but this effect wasn't occured by antioxidant system.

Key Words: Hepatocellular carcinoma, Colchicine, Free radicals, Antioxidants, N-Nitrosodiethylamine.

1.GİRİŞ

Hepatosellüler karsinoma (HCC) dünyada en yaygın görülen kanser tipidir¹. HCC' nin insidansı her gün biraz daha artmaktadır. HCC için başlıca risk faktörleri alkol ve/veya Hepatit B(HBV) ve C virüsleri ile oluşan karaciğer sirozudur^{2,3}. Diğer risk faktörleri arasında demir yüklemesi, ilaçlar, birden fazla virüs enfeksiyonları, lipit ve karbohidrat metabolizmasındaki değişimler sayılabilir⁴.

Serbest radikaller bir veya daha fazla paylaşılmamış elektron içeren moleküller olup oksijenin rol aldığı normal hücre metabolizması sonucu veya patolojik olarak vücutta oluşabilirler⁵. Oluşan bu radikallerin karsinogenezin etiolojisindeki rolü tam olarak bilinmemesine rağmen oksijen radikallerinin sürekliliği DNA'nın oksidatif hasar riskini arttırmaktadır⁶.

Bitkilerden ve mikro organizmalardan sağlanan doğal ürünler çeşitli toplumlar tarafından yüzyıllardan bu yana ilaç olarak kullanılmaktadır. Bu maddeler farmasötik endüstride yeni ilaç araştırmasında incelenen öncü bileşiklerinde en önemli kaynaklarını oluşturmaktadır. Son yıllarda araştırmacılar geleneksel halk ilaçlarına tekrar dönüş yapmışlardır⁷.

Annual Reports of Medicinal Chemistry 1984-1995 yılları arasında yayınlanan raporlarında antikanser ve antiinfeksiyöz yeni ilaç ham maddelerinin % 60'ını doğal orijinli olduğu belirtmektedirler⁸.

Kolşisin; akut gut ataklarında ve profilaksisinde, Ailesel Akdeniz Ateşinde (FMF)⁹, karaciğer sirozunda¹⁰, Behçet hastalığında¹¹, Sedef hastalığında, Sweet's sendromunda, skleroderma ve sarkoidozda yaygın kullanımı olan oldukça eski bir ilaçtır¹². Kolşisin mitoz ve diğer mikrotübül bağımlı fonksiyonlar üzerinde mikrotübül oluşumunu inhibe etmek gibi etkileri vardır^{13,14}. Kolşisinin tedavi amaçlı kullanıldığı bu hastalıkların birçoğunda nötrofil fonksiyonlarında artış ve reaktif oksijen türevlerinin aşırı üretiminin olduğu belirtilmiştir^{15,16,17}.

Bu çalışmamızda HCC' da antioksidan sistem ve kolşisinin etkisini araştırmak üzere kimyasal bir karsinojen olan N-Nitrosodietilamin (DEN) ile sıçanlarda deneysel HCC modeli oluşturmayı planladık . DEN kullanımındaki mortalite ve morbiditenin düşük olması, bu karsinojen ajanı seçmemize neden olmuştur¹⁸.

HCC' da antioksidan sistem ve kolşisinin etkisini araştırmak üzere bir serbest radikal temizleyicisi olan redükte glutasyonu (GSH)¹⁹, peroksite metabolize eden Glutasyon peroksidaz (GSH-Px)²⁰ ve serbest radikalleri hidrojen peroksite dönüştüren süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitelerini ve ayrıca da lipit peroksidasyonun göstergesi olan malondialdehit (MDA) miktarını ölçmeyi amaçladık²¹. Karaciğer hücre hasarını teyit etmek amacıyla ALT, AST, ALP ve total protein²² serum düzeylerini ölçülmeyi ve tümör gelişimini izlemek amaçlı ise ışık mikroskopisi ile histopatolojik incelemeler gerçekleştirilmeyi planladık.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Hepatosellüler Karsinoma

Hepatosellüler karsinoma (HCC) hepatositlerin malign tümörüdür. Hepatositler epitelial hücrelerdir ve bundan dolayı HCC adenokarsinoma olarak tanımlanır²³. HCC yılda en az 1 milyon kişinin ölümüne neden olan, dünyada gözlenen en yaygın solid-organ tümörüdür^{4,24}. HCC insidansı 1993 ile 2000 yılları arasında 15.000 vakadan 20,200 vaka sayısına yükselerek %48 oranında artış göstermiştir²⁵. HCC kanser ilişkili ölümlerde 3. sırayı alır. En çok görülen kanser tipinde, kadınlarda 8. erkeklerde ise 5. sıradadır²⁶. HCC' nin etiyolojisi, hastalığın klinik ve patolojik özelliğini etkilerken, yaşam süresi üzerine bir etki göstermediği öne sürülmüştür²⁷.

HCC' nin oluşumunda enfeksiyonlar, siroz, çevresel faktörler ve metabolik hastalıklar rol oynar⁴. HCC oluşum risk faktörleri arasında ilk sırayı alkol ve/veya Hepatit B ve C virüsleri yer alır^{28,29}. Farklı nedenlerden dolayı oluşan siroz ise % 60-80 oranı ile önemli bir yer işgal etmektedir²⁵. Kimyasal karsinojenler ve nitritler, hidrokarbonlar, organoklorin pestisitler, primer metaller gibi kimyasallar da HCC gelişiminde rol oynarlar (Çizelge 2.1.)⁴.

Çizelge 2.1.: HCC'nın gelişimi ile ilgili veya gelişimine yatkınlığı olan durumlar

İnfeksiyonlar

Hepatit B virüsü

Hepatit C virüsü

Siroz

Alkol

Otoimmün hepatit

Primer biliyer siroz

Kriptojenik siroz

Çevresel faktörler

Androjenik steroidler

Aflatoksinler

Sigara

N-nitrozo bileşikler

Pirrolizidin alkaloitler

Metabolik hastalıklar

Hemokromatozis

α_1 -Antitripsin yetersizliği

Wilson hastalığı

Porfiriya akut intermitan

Tip 1 ve 3 glikojen depo hastalığı

Galaktozemi

Sitrülinemi

Hereditör tirozinemi

Ailesel kolestatik siroz

HCC'nin tedavisindeki zorluklar ve mortalitenin bu kadar yüksek olması bir takım faktörlere bağlıdır. Bunlardan birincisinde, HCC genellikle siroz ile ilişkilidir ki hastalığın tek sebebi değildir, fakat aynı zamanda kanser tedavisindeki seçenekleri kısıtlar. İkincisi ise, HCC'nin genellikle erken evrelerde asemptomatik olması ve

primer tümörün küçük olduğu zamanda dahi intravasküler veya intrabilyer sahada yayılımı için oldukça büyük eğiliminin olmasıdır^{4,24}.

HCC'nin izlenmesi oldukça karmaşıktır çünkü tümör değişik radyolojik görüntülere sahiptir ve sıklıkla sirotik regeneratif ve displastik nodüllerle bir arada bulunurlar. HCC'nin biyopsisi risklidir. Bundan dolayı tarama ve hasta takibi genellikle tercih edilir²³. HCC için cerrahi ve dokuyu çıkarma yaklaşımı dışında standart bir tedavi bulunmamaktadır ve prognozu oldukça zayıftır²⁹.

2.2. Kolşisin

Kolşisin gut tedavisinde ve FMF'te yaygın olarak kullanılan eski, alkaloit yapıda bir ilaçtır. *Colchicum* latince adıdır³⁰. Kolşisin *Liliaceae* familyasından *Colchicum autumnale*'den (sarı safran, çiğdem), diğer *colchicum* türlerinden, ayrıca yine *Liliaceae* familyasından *Gloriosa superba*' dan da elde edilir^{30,31}.

Bitki Orta ve Güney Avrupa' da yetişmektedir. Türkiye' de Trakya' da Edirne civarında ve Çanakkale' de Kaz dağında bulunur. Adından da anlaşılacağı üzere, sonbaharda çiçek açan bir bitkidir ve bu nedenle tohumlar ertesi yılın haziran-temmuz aylarında olgunlaşır. Meyve üç gözlü bir kapsüldür ve tohumlar bu kapsüllerde plasentaya bağlı olarak bulunur. Bu alkaloit, bitkinin olgunlaştıktan sonra toplanıp kurutulmuş tohumlarından ekstre edilir³².

Kolşisin soluk sarı, suda çözünebilir ve ışığa maruz bırakıldığında rengi kararan bir alkaloittir. UV ışınına maruz tutulduğunda farklı fotoizomerlere dönüşür¹².

2.2.1. Kolşisinin Tarihçesi

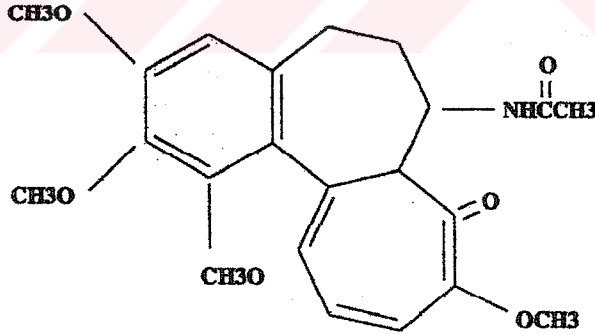
Kolşisin alkaloitini ihtiva eden sarı safranın (çiğdem) soğanlarının tıbbi kullanımından ilk olarak MS 1.yüzyılda Anazarbos'un Dioscorides' inde söz edilmiştir¹². Kolşisinin gut tedavisinde kullanımından ise ilk olarak MS 6. yüzyılda bahsedilmiştir^{30,31}.

Kolşisinin ödem ve diğer antiromatizmal hastalıkların tedavisinden çok podagra için kullanımı Baron Von Storch tarafından 1763'te yapılmıştır³⁰.

Daha sonra 1820'de ise kolşisin gut için çok daha etkin tıbbi kullanımı ile tekrar gündeme gelmiş ve 1972'den bu yana FMF'e karşı profilaksi için tek etkili ilaç olarak popülerite kazanmıştır. Bu yılda Goldfinger, kolşisin kullanan gut ve FMF'li bir hastada, her iki hastalığın da klinik belirtilerinde önemli ölçüde düzelme kaydedildiğini gözlemiştir³⁰.

2.2.2. Kolşisinin Kimyasal Yapısı ve Analogları

Dewar, kolşisin molekülünün yapısını 1945'te açıklamıştır³¹. Heterosiklik bir alkaloid olan kolşisinin kimyasal yapısı, N-(5,6,7,9, tetrahidro-1,2,3,10, tetrametoksi-9 oksobenzo [a] hep-tain-7-il) asetamid olarak isimlendirilir³⁰. Şekil 2.1.'de gösterildiği gibi kolşisinin azotu halka dışındadır ve bir asetamid teşkil etmiştir. Bu asetamid grubu 4 tane metoksil taşıyan benzosikloheptano tropolon halka sisteminde sikloheptana bağlı olarak bulunur. Burada tropolon, bir keton grubu taşıyan, yedi üyeli ve doymamış bir halkadır. 4 metoksil grubunun 3'ü benzen, biri tropolon halkasına bağlanmıştır³².



Şekil 2.1. Kolşisinin kimyasal yapısı

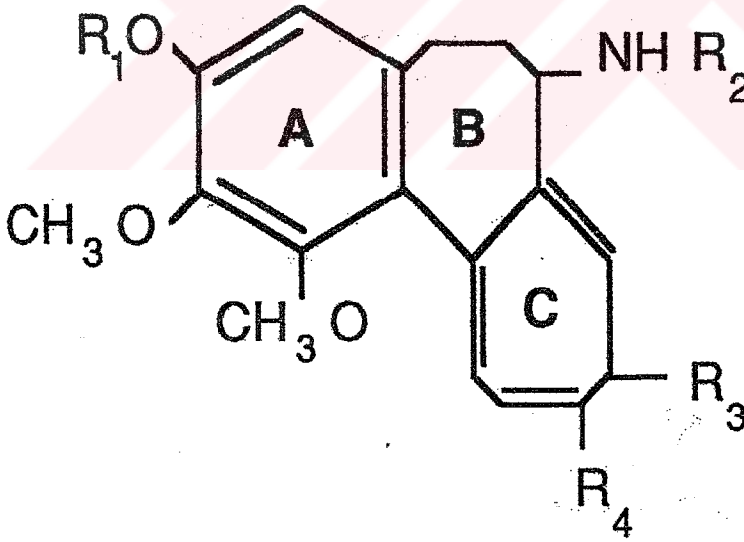
Kolşisinin farklı metabolitleri veya analogları vardır. Bunların genel yapısı Şekil 2.2'de ve bu metabolitlerin değişken grupları (R₁, R₂, R₃ ve R₄) Çizelge 2.2.'de açıklanmıştır. Dezasetilmetil kolşisinin üç boyutlu kristalografik çalışması Margulies, C halkasının yapısının tamamı ise King ve arkadaşları tarafından açıklanmıştır. Yedi

üyeli troponoloid halkası düzlemsel ve 54° açılık dihedral yapı oluşturur. Diğer yedi üyeli halka ise kayık konfigürasyonu şeklinde katlanır³¹.

Çizelge 2.2. Kolşisinin metabolitleri ve analogları

	R1 ^a	R2	R3	R4
Kolşisin	CH ₃	COCH ₃	O	OCH ₃
Dezasetilmetilkolşisin	CH ₃	CH ₃	O	OCH ₃
Dezasetiltiyokolşisin	CH ₃	H	O	SCH ₃
Kolşikozit	C ₆ H ₁₁ O ₅	COCH ₃	O	OCH ₃
Trimetilkolşisineikasit	CH ₃	H	O	OH
Kolşisein	CH ₃	COCH ₃	OH	O

^a Bakınız Şekil 2.2



Şekil 2.2.: Kolşisin çekirdeğinin genel yapısı. Bakınız Çizelge 2.2.

Kolşisin, UV ışınında izomerlerinin oluşturduğu bir karışıma dönüşür. Kolşisin gibi, türevleri de ışığa hassas olup, bunlar α , β ve γ lumikolşisinlerdir. Kolşisin ve analogları yapı farklılığından dolayı, değişik hastalıklarda birbirinden farklı etki gösterirler^{31,33,34}.

2.2.3. Biyolojik Etkiler

Mikrotübüller sinir hücreleri, titrektüylü hücreler, lökositler ve sperm kuyruklarında bulunurlar. Andreu ve arkadaşları kolşisinin hücresel düzeydeki etkilerinin daha çok mikrotübüller ile etkileşimine bağlı olduğunu iddia etmiştir³⁵. Kolşisin tübülüne iki bölgeden bağlanmaktadır. Bu bölgelerden biri oldukça çalışılan yüksek afinite bölgesidir. Kolşisin bu bölgeye ısıya bağımlı, geri dönüşümsüz ve yavaş bağlanır. Diğer bölge düşük afinite bölgesidir ve bağlanma geri dönüşümlüdür³⁶. Kolşisin ve sentetik analogu tiyokolşisin, hücre bölünmesini tübülüne bağlanarak ve tübülün polimerizasyonunu inhibe ederek engeller. Bu bileşiklerin, lösemili P388 ve L1210 farelerine karşı antitümör etkisi göstermelerine rağmen toksik etkileri nedeni ile medikal kullanımları sınırlanmıştır³⁷.

Kershenobich ve arkadaşları kolşisinin, primer biliyer sirozlu hastalarda fibroblastların proliferasyonunu inhibe ettiğini ve monositleri tarafından interlökin 1'in üretimini azalttıklarını³⁸, bir diğer çalışmada ise sıçanlarda karbontetraklorür ile indükleyerek oluşturdukları siroz vakalarında, oral kolşisin uygulaması ile kollajen sentezinin ve depolarının inhibe edildiğini göstermişlerdir³⁹. Warnes ve Kaplan da çalışmalarında kolşisinin primer siroz için yararlı olduğunu bildirmişlerdir^{40, 41}.

FMF; peritonit, plörit ve sinovit ile oluşan, ateş ve ağrı ile seyreden paroksimal ataklar ile çocukluk döneminde başlayan bir hastalıktır¹⁷. Akut ataklar süresince nötrofillerin degranülasyonuna ve lizozomal enzimlerin pirojenik maddelerinin salınımına bağlı olarak polimorfonükleer lökositlerin serozal zara şiddetli bir şekilde akışı vardır¹⁷. Antiinflamatuvar etkisinden dolayı kolşisin FMF akut ataklarının önlenmesinde kullanılır^{42,43}. Bu etkisinden dolayı kullanıldığı diğer bir hastalık ise Behçet Hastalığıdır. Behçet Hastalığı kronik, inflamatuvar bozukluğu olan etiolojisi

bilinmeyen, mukokütanoz, oküler, artiküler, vasküler ve santral sinir sistemi düzensizlikleri ile seyreden bir hastalıktır^{44,45}.

Gut, artrit ile karakterize edilen hastalıkların grubudur ve monosodyum ürat kristallerinin eklemlerde ve yumuşak dokuda depolanması ve ürat metabolizmasının hasarı ile sonuçlanır. Klinik belirtiler akut ve kronik artriti, interstisyel böbrek hastalığını ve ürik asit böbrek taşı oluşumunu kapsar. Akut krizler kolşisin, steroid olmayan antiinflamatuvar ilaçlar (NSAID) veya steroidler ile tedavi edilir⁴⁶.

Kolşisin aynı zamanda lökositoklastik vaskülit, psöriazis ve Sweet's sendromu, Bullous hastalığı gibi cilt hastalıklarında yararlı etki gösterir¹⁷.

Kolşisinin erken uygulanması sıçanlarda Peyronie hastalığına benzer durumlarda hastalığın oluşmasını baskılar⁴⁷.

Kolşisin lökositlerde yüksek derişimde bulunmasından dolayı yapışkanlık, ameborel hareketlilik ve lizozomların degranülasyonu gibi lökosit etkilerini inhıbe eder. Bununla beraber en önemli etkisi lökosit kemotaksisi üzerinedir. Kolşisinin bu etkilerinden kemotaksi 1×10^{-8} mol/L kadar düşük derişimlerde oluşurken diğer etkilerin görülmesi için daha yüksek doza ihtiyaç vardır³⁰.

Kolşisinin diğer etkileri ise insulini, tiroksini, tiroid stimule edici hormonu, amilaz ve katekolamin salınımını; mast hücrelerinden histamin salınımını; fagositler tarafından lizozomal hidrolazlar azaltmasını ve ekstrasellüler boşluğa kollojen taşınmasını inhıbe etmesidir³⁰.

2.2.4. Kolşisinin Emilim ve Dağılımı

Kolşisinin uygulanması oral yolla veya solüsyonlar ile intravenöz yolla olmaktadır. Yapılan ilk çalışmaların sonunda, oral yolla ilaç alımı sonucu, ilacın yaklaşık olarak tamamının absorblandığı ve biyoyararlanımının %100'e yakın olduğu düşünülüyordu. Ancak yapılan son çalışmalar ile kolşisinin biyoyararlanımının %25-%50 arasında olduğu gösterilmiştir. İlacın tam olarak hangi bölgeden absorblandığı bilinmemekle birlikte, aşırı dozda veya kronik kolşisin kullanımında barsağın ileum bölümünde disfonksiyonun oluşması ilacın bu bölgeye kadar vardığını düşündürmektedir³⁰.

Wallace ve Ertel kolşisinin farmakokinetiğini çalışmakta öncü olmuşlardır. 2 mg kolşisin intravenöz uygulamasından sonra ise ilk 10 dakikada plazma düzeylerinde hızlı ve bunu takiben logaritmik bir düşüş gözlenmiştir³⁰.

Kolşisinin oral uygulamasından sonra plazma maksimum düzeyine erişme süresi (Tmax) 1-3 saat arasındadır. Tmax tablet veya solüsyon kullanımında benzerdir. Son zamanlarda, kolşisinin ağızdan alındıktan sonra 6 saat içinde ikinci bir maksimum düzey oluşturduğu, bunun da ikinci bir emilim bölgesi ve enterohepatik döngü ile ilgili olabileceği ileri sürülmüştür. Bununla beraber maksimum derişime ulaşma sürelerinde ve maksimum derişimlerinde kişiler arasında büyük farklılıklar gözlenmektedir. Bu; gastrointestinal mukoza, emilim bölgesindeki pH veya kolşisinin barsakta bağlandığı bileşiklerden ayrılması ile izah edilebilir³⁰.

Kolşisinin plazmadan hızla temizlenişi ve daha sonraki günlerde sürekli olarak salınımı; ilacın vücut dokularına bağlanarak depolandığını düşündürmektedir. Kolşisinin dokulara bağlandığının başka bir ispatı ise intravenöz uygulamadan 10 gün sonra lökositlerde tayin edilebilmesidir³⁰. Ayrıca diğer bir çalışma ile kolşisinin %50'sinin plazma proteinlerine bağlandığı gösterilmiştir^{12,30}.

Kordon kanından alınan örneklerde çok küçük miktarda kolşisinin bulunması, kolşisinin plasenta aracılığı ile fetüse geçtiğini düşündürmektedir³⁰.

Kolşisinin anne sütünde de bulunması yağ asitlerine ve protein bileşiklerine bağlanıyor olmasını düşündürmektedir³⁰.

2.2.5. Kolşisinin Atılımı

İdrarla atılım intravenöz dozun %20'si için 2 saat ve %30'u için 24 saat sonra olarak tespit edilmiştir. Ancak çok küçük fakat ölçülebilir değerde kolşisin miktarı 7. ve 10. günlerde de idrarda tespit edilmiştir. Hayvan deneyleri sonucu kolşisinin, böbrek yolu ile atılmasının yanı sıra karaciğerde bir çok metabolizmaya da girdiği ileri sürülmüş olup başlıca, safra atılımını takiben sitokrom P₄₅₀ (CYP) sistemi ile demetilasyon oluşumudur. Yapılan çalışmalar sonucunda kolşisinin %10' nun insan karaciğer mikrozomlarında, 3 demetil kolşisin ve 2 demetilkolşisin'e metabolize olduğu açığa çıkarılmıştır. Bu metabolitlerin üretimi başlıca CYP 3A4 izoformları tarafından

gerçekleştirilmektedir^{30,48}. Kolşisin metabolitlerinin rolü ve biyolojik etkileri bilinmemektedir. Kolşisinin ve metabolitlerinin oldukça büyük miktarlarda safra ve barsak salgularında bulunması enterohepatik döngüye tekrar girdiğini ortaya koymaktadır³⁰.

Önceleri yapılan çalışmalarda, terminal atılım yarı yaşam süresinin ($T_{1/2}$) IV uygulama için 19 dakika, oral uygulama için ise 16 saat kadar olduğu gösterilmiştir. Son çalışmalarda ortalama $T_{1/2}$ 9,3 saat olarak bulunmuştur. Ben-chetrit ve arkadaşlarının böbrek ve karaciğer hastalığı olmayan FMF' li hastalarda yaptıkları çalışmada benzer bir sonuç ($T_{1/2}$ 9 ± 4 saat) bulmuştur³⁰.

Wallace ve arkadaşları, C-ışaretlenmiş kolşisin kullanarak yapılan çalışmada, $T_{1/2}$ ve ilacın klerensinde böbrek yetersizliği olan hastalar ile sağlıklı kişiler arasında önemli bir fark gözlememişlerdir. Ayrıca karaciğer hastalığı ve normal böbrek fonksiyonu olan hastalarda, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında maksimal derişim (C_{max})'in daha yüksek, dağılım hacminin daha düşük ve $T_{1/2}$ süresinin daha kısa olduğu gözlenmiştir. Sağlıklı kişilerle karşılaştırıldığında ciddi böbrek yetersizliği olan hastalarda kolşisinin $T_{1/2}$ 'sinin normaline göre 2-3 kat daha uzun olduğu; böbrek yetersizliği ve siroz olan hastalarda ise bunun 10 kat daha uzun olduğu tespit edilmiştir³⁰.

Leighton ve arkadaşları karaciğer sirozu olan hastalarda benzer sonuçlar elde etmişlerdir. Bu bulgular kolşisinin bilinen dozunu kullansalar dahi karaciğer veya böbrek hastalığı olan hastaların takip edilmelerini ileri sürmektedir³⁰.

2.2.6. Kolşisinin Etki Mekanizması

2.2.6.1. Akut Gut Artritte

Gut hastalarının sinovyal sıvılarında sodyum urat kristallerinin birikmesi, polimorfonükleer lökositlerin, bu urat kristallerini fagosite etmesi yönünde bir seri reaksiyonuna öncülük ederler. Bu işlem lizozomal enzimlerin, kininin ve komplementlerin salınımı ile yoğun bir biyokimyasal trafiği başlatır. Ürat çökelme

döngüsüne doğru inflamasyon yanıt çoğalır ve genişler. Gutta ve deneysel ürat kristalleri ile indüklenen artritte, kolşisinin tıropatik etkisinin, kemotaktik faktörün üretimini ve nötrofiller tarafından salınımının baskılanması ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Diğer bir etki mekanizması ise, üratların polimorfonükleer lökositlerin hareketlerini rastgele arttırdığı ve kolşisinin bu hareketliliği inhibe ettiği yönündedir. Kolşisin ayrıca, fagositoz ile ilgili lökositlerin damar duvarına yapışmasını, üratlar ile uyarılan hareketliliği, kemotaksisi ve diğer fonksiyonları etkileyebilir³¹.

2.2.6.2. Hücre Zarı Etkisi

Fagositoz genellikle sitoplazmik mikrovizkozitenin düşüşü ile ilişkilidir. Oysa kolşisin ilave edildiğinde hücre zarı mikrovizkozitesindeki bu karakteristik düşüş oluşmaz. Fagositoza zar lipitinin tekrar yapılanması eşlik eder. Bunun yanı sıra yapılan bazı çalışmalar ise kolşisinin, hücre zarı bileşenlerinin lateral hareketinide etkilediğini göstermiştir³¹.

2.2.6.3. Mitoz ve DNA Sentezinin İnhibisyonu

Önceki *in vitro* çalışmalar kolşisinin mitozisi metafazında bloke ettiğini değil, DNA sentezinide inhibe ettiğini göstermiştir. Aynı zamanda hücrenin DNA sentezine girişini de baskılar. Kolşisinin, hücre düzenleyici olayları erken G₁ veya M fazı gibi kritik zamanda değiştirebileceği ve bunun da daha sonra DNA sentezinin inhibisyonu ile sonuçlanabileceği bazı araştırmacılar tarafından belirtilmektedir³¹.

2.2.6.4. Amiloidoz'da Etki Mekanizması

Kolşisin, FMF'in amiloidozunda önleyici ve tedavi edici etkiye sahiptir. *In vitro* çalışmalarda serum Amiloid A proteinin salgılanmasını inhibe ettiği gözlenmiştir. Amiloidozun patogenezi tam olarak bilinmemekle beraber farelerde ve FMF'li

hastalarda bu protein hepatositlerde sentezlenir ve amiloid depolarının başlıca bileşenlerindedir^{30,31}.

2.2.6.5. Kolşisin ve Siklik 3', 5'-Adenozin Monofosfat

Kolşisin mikrotübüllerin bir araya gelmesini önler ve insan lökositlerinde siklik 3',5'-Adenozin monofosfat (cAMP) artışına neden olur. Bu etki mekanizması tam olarak bilinmemektedir³¹.

2.2.7. Kolşisinin Yan Etkileri

Kolşisin kullanan hastalarda ilk olarak diareyi takiben bulantı, kusma ve abdominal ağrı gibi gastrointestinal semptomlar gözlenir. Kolşisinin kullanımında oldukça sık gözlenen diğer yan etkiler ise miyopati ve nöropatidir. İkinci aşamada ise kemik depresyonu, hemolitik anemi, karaciğer harabiyeti, böbrek yetmezliği, respiratuar distres sendromu, aritmi, nöromüsküler distribüsyonlar (miyopati, paraliz) ve yayılmış intravasküler koagülasyon gözlenir. Hiponatremi ve metabolik asidoz oluşur^{30,42}.

2.3. Serbest Radikaller

Serbest radikaller bir veya daha fazla paylaşılmamış elektron içeren moleküllerdir. Serbest radikaller oldukça reaktif olup, geniş reaksiyon yelpazeleri vardır. Bu reaksiyonlardan belli başlı iki grubu, kovalen bağ oluşumu ile sonuçlanan elektron transferi ve toplama reaksiyonlarıdır. Serbest radikaller redükleyici (elektron verenler) ve oksitleyici (elektron alanlar) olmak üzere iki sınıfta toplanırlar^{49,50}.

2.3.1. Patolojik Önemi Olan Serbest Radikal Türleri

Organizmada bir çok serbest radikal bulunmaktadır. Fizyopatolojik olarak önemli oksijen radikalleri (Çizelge 2.3.) ve radikal olmayan oksijen türevleri (Çizelge 2.4.) aşağıda özetlenmiştir^{51,52,53}.

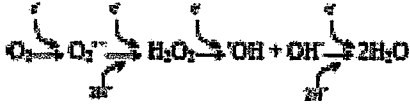
Çizelge 2.3.: Patolojik olarak önemli oksijen radikalleri

Adı	Moleküler formülü
Süperoksit radikali	$O_2^{\cdot-}$
Hidroksil radikali	$\cdot OH$
Nitrik oksit	$NO\cdot$
Ferril iyonu	$FeO^{\cdot+2}$
Perferril iyonu	$FeO_2^{\cdot+2}$
Alil	$R\cdot$
Alkoksil	$RO\cdot$
Peroksil	$ROO\cdot$

Çizelge 2.4.: Radikal olmayan oksijen türevi bileşikler

Adı	Moleküler formülü
Hidrojen peroksit	(H_2O_2)
Singlet oksijen	$(^1O_2)$
Ozon	(O_3)
Hipoklorit asit	$(HOCl)$
Lipit hidroperoksit	$(LOOH)$
Peroksinitrit	$(ONOO^-)$

Moleküler oksijen, paralel spin konfigürasyonu ile iki tane çiftlenmemiş elektrona sahip bir diradikaldır. Elektronların aynı orbitali paylaşmaları için ters spinleri olmalıdır. Moleküler oksijene ilave edilen elektron her seferinde redüksiyonu boyunca birinden diğerine transfer edilir ki bu da bir çok oldukça reaktif ara ürün oluşturur⁵¹. Reaktif oksijen türleri elektron transferi ile bir zincir reaksiyonu şeklinde oluşur⁵⁴.

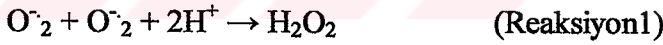


Şekil 2.3.:Reaktif oksijen bileşiklerinin oluşumu

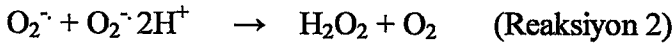
2.3.2. Reaktif Oksijen Bileşikleri

2.3.2.1. Süperoksit Radikali ($O_2^{\cdot -}$)

Oksijen molekülüne (O_2) bir elektron girişi ile oluşur^{55,56}. $O_2^{\cdot -}$ radikali özellikle mitokondri zarının iç kısmı gibi elektrondan zengin çevrelerde spontan olarak oluşur. Bununla beraber ksantin oksidaz gibi flavoenzimler, lipooksigenaz ve siklooksigenaz enzimleri, fagositik hücrelerin NADPH-bağımlı oksidaz enzimi gibi endojen kaynaklardan da oluşabilirler^{57,58}. İki molekül $O_2^{\cdot -}$ radikalinin hızlı bir şekilde hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dismutasyonu ya spontan olarak (Reaksiyon 1) ya da süperoksit dismutaz (SOD) enzimi (Reaksiyon 2) ile gerçekleşir⁵⁹.



SOD



2.3.2.2. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

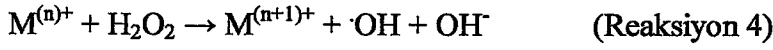
$O_2^{\cdot -}$ 'e ikinci bir elektron eklenmesiyle oluşan peroksit iyonu fizyolojik pH'da derhal proton olarak H_2O_2 'e dönüşür. H_2O_2 'nin oluşumu H_2O_2 'nin dismutasyonu, NADPH –oksidaz, glukoz oksidaz ve ksantin oksidaz enzimleri tarafından gerçekleşir⁵¹. H_2O_2 bir serbest radikal değildir, fakat bilinen en reaktif serbest radikal olan $\cdot OH$ 'nin kaynağı olmasından dolayı oldukça önemlidir⁶⁰.

2.3.2.3. Hidroksil Radikali ($\cdot\text{OH}$)

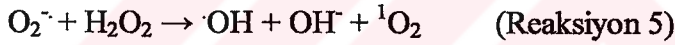
$\cdot\text{OH}$ fazla miktarda üretildiğinde veya hücresel antioksidan sistem defansının yetersiz kaldığında hücre hasarı oluşturur. $\cdot\text{OH}$, suyun iyonize radyasyon ile muamele edildiğinde bir elektronun hidrojene ve diğer elektronun oksijene geçişi ile oluşur (Reaksiyon 3)⁶¹.



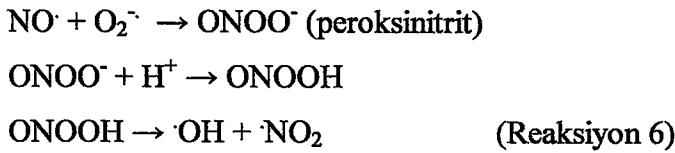
$\cdot\text{OH}$ oluşum yollarından bir diğeri ise H_2O_2 'nin geçiş metal iyonları ile reaksiyonudur. Bu reaksiyon Fenton reaksiyonu olarak adlandırılır (Reaksiyon 4)⁶².



$\cdot\text{OH}$ oluşum yollarından biri de Haber-Weiss reaksiyonudur. O_2^- , dismutasyon ürünü olan H_2O_2 ile tepkimeye girerek $\cdot\text{OH}$ ve $^1\text{O}_2$ oluşumuna neden olur (Reaksiyon 5)⁶².



O_2^- ve bir vazodilatör radikal olan $\text{NO}\cdot$ arasındaki etkileşim sonucunda da $\cdot\text{OH}$ radikali oluşur (Reaksiyon 6)⁶².



2.3.2.4. Nitrik Oksit ($\text{NO}\cdot$)

$\text{NO}\cdot$, nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi tarafından oluşturulur⁵⁷. $\text{NO}\cdot$, O_2^- ile reaksiyona girerek reaktif bir ara ürün olan peroksinitriti (ONOO^-) oluşturur (Reaksiyon 6)⁶².

2.3.2.5. Singlet Oksijen (1O_2)

Oksijen molekülüne enerji girişı ile oluşan oldukça reaktif bir oksijen formudur. Orbitalde paralel gezinen elektronlar enerji girişı ile anti paralel olurlar. (1O_2), $O_2^{\cdot-}$ 'nin kendiliğinden dismutasyonu, superoksit radikali ve hidroksil radikalinin etkileşmesi ile Haber-Weiss tepkimesi, $O_2^{\cdot-}$ 'nin diaçil peroksitlerle tepkimesi ve fagositoz sonucu oluşur⁶².

2.3.3. Serbest Radikallerin Oluşumu ve Etkileri

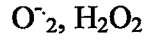
2.3.3.1. Serbest Radikallerin Oluşumu

Başta $O_2^{\cdot-}$ ve H_2O_2 olmak üzere bir çok hastalığın oluşumunda rol alan serbest radikallerin çoğunluğunu, oksijen türevleri oluşturmaktadır (Şekil 2.4.)^{55,63}.

Endojen Kaynaklar

- Mitokondrial sızıntı
- Solunumsal patlama
- Enzim reaksiyonları
- Otooksidasyon reaksiyonlar

Serbest Radikal Üretimi



Lipit peroksidasyonu

Protein hasarı

Modifiye DNA bazları

Doku Hasarı

Eksojen Kaynaklar

- Sigara dumanı
- Kirleticiler
- UV ışını
- İyonize radyasyon
- Ksenobiyotikler

Şekil 2.4.: Serbest Radikallerin Oluşumu ve etkileri

2.3.3.2. Serbest Radikallerin Etkileri

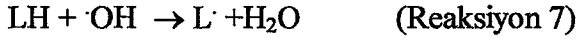
Oluşan serbest radikaller doku hasarı ile sonuçlanan lipit peroksidasyonuna^{64,65}, DNA bazlarının modifikasyonuna⁵⁶ ve protein hasarına⁵⁹ neden olurlar(Şekil2.4.).

2.3.3.2.1. Lipit Peroksidasyonu

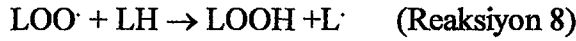
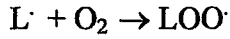
Serbest radikallerin hedeflerinden birisi biyomembranlardır⁶⁴. Biyolojik sistemlerde oluşan çoklu doymamış yağ asitlerinin serbest radikaller ile oksidasyonu lipit peroksidasyonu olarak tanımlanır ve dört aşamada oluşur^{64,65}.

1.Başlama Aşaması: Lipit peroksidasyonu çoklu doymamış yağ asitlerinin metilenkarbonundan veya yan zincirinden bir hidrojen atomu (H^{\cdot}) koparılması ile başlar

(Reaksiyon 7)⁶⁴. Bu işlem sonucunda, yağ asiti zincirinde bir çiftlenmemiş elektron bulunur, dolayısı ile lipit radikali oluşur⁶⁴.

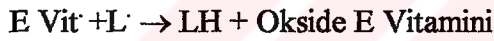
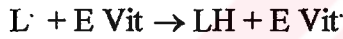


2. İlerleme Aşaması: Karbon merkezli radikal, konjuge dien oluşturmak üzere tekrar moleküler düzenlemeye girerler. Burada oksijen ile reaksiyona girerek peroksi radikalini (LOO \cdot) oluşturur. Oluşan LOO \cdot diğer yağ asitlerinden H⁺ alarak kendisi lipit peroksit haline dönüşürken yeni bir karbon merkezli radikal oluşturur (Reaksiyon 8). Bu şekilde zincirleme reaksiyon başlar^{64, 65}.



3. Yıkım Aşaması: Oluşan lipit hidroperoksitler parçalanarak farklı yıkım ürünleri oluştururlar ki bu ürünler sitotoksik, mutajenik ve genotoksik özelliklere sahiptir^{66,67}. Bu ürünlerin başlıcaları dien konjugatları, 4-hidroksinonenal, MDA, 8-epiprostaglandin F_{2 α} , pentan ve etandır^{64,65,68,69}.

4. Sonlanma Aşaması: Lipit peroksidasyonu E Vitamini gibi zincirleme reaksiyonu sonlandırıcı bir antioksidan ile sonlanır (Reaksiyon 9)⁶⁵.



2.3.3.2.2. Serbest Radikallerin Oluşturduğu Protein Hasarı

Serbest radikallerin proteinler üzerinde oluşturdukları hasar ile proteinlerin ve amino asitlerin yapılarında modifikasyonlar oluşur. Bu da proteinlerin spesifik görevlerinin engellenmesi ile sonuçlanır⁵⁹.

Lipitlerde olduğu gibi proteinlerde de oksidasyon gerçekleşir^{64,70}. Protein oksidasyon ürünleri ve protein karbonil türevleri; amino asit yan zincirlerinin oksidatif modifikasyonları, proteinlerin lipit ve karbohidrat oksidasyon ürünleri ile reaksiyona girmesi sonucu oluşur. Son zamanlarda proteinlerde karbonil grubunun varlığı, proteinin oksidatif hasara uğradığının bir göstergesi olarak kabul edilmektedir. Dokularda ki protein karbonil içeriğinin artışı romatoid artrit, Alzheimer Hastalığı, respiratuar distres sendromu (ARDS), Parkinson hastalığı ve ateroskleroz gibi hastalıklarla ilişkilidir⁷⁰.

Fenil alanin oksidasyonu sonucu oluşan *orto*-tirozin, L tirozinde tek elektron oksidasyonu sonucu oluşan tirozil radikallerinin birbiri ile etkileşimi sonucu oluşan ditirozin, okside amino asitler⁷⁰, 2-okzo histidin, 3-kloro tirozin gibi biyomarkerlar ölçülerek oksidatif stres hasrının proteinler üzerine etkisi tespit edilmektedir⁶⁴.

2.3.3.2.3. Serbest Radikallerin Oluşturduğu DNA Hasarı

Reaktif oksijen türevleri ile ilk olarak oluşan DNA baz hasarından mutasyonlara kadar öncülük eden birçok farklı yolak vardır. Bunlarda en basit olanı kimyasal modifikasyonlardır⁷⁰.

Serbest radikaller özellikle ·OH DNA-protein çapraz bağlarında, deoksiriboz-fosfat omurgasında, ayrıca pürin ve pirimidin bazlarının özgün kimyasal yapılarında modifikasyon gerçekleştirerek DNA hasarı oluşturur^{56, 71}.

Oksidatif baz modifikasyonları mutasyonu ile DNA iplik kırılmaları indüklenebilir⁷⁰. Deoksiriboz yapılarının üzerindeki kimyasal değişimler purin ve pirimidinlerin salınımlarına ve mutajenik olan bazik olmayan kısımların oluşmasına neden olur. ·OH radikali adenin ve guaninin 5-formamido-4,6-diamino- pirimidin gibi kırık halka yapılara veya 8-hidroksi-guanin gibi hidroksi purinlere; timini ve sitozini ise sırası ile timin glikole ve 5-hidroksisitozine dönüştürerek DNA bazlarında modifikasyona neden olur⁵⁶.

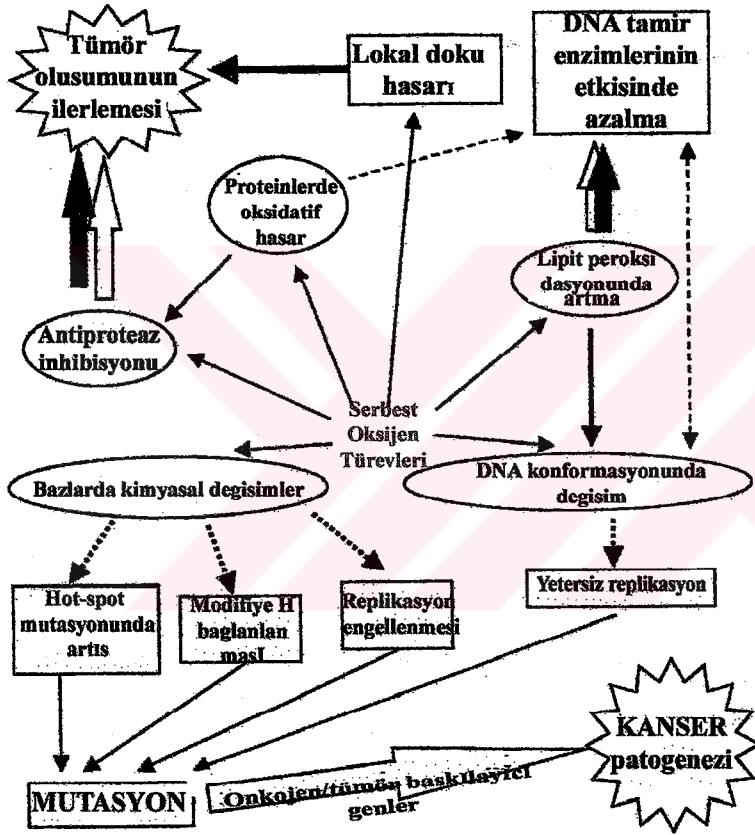
¹O₂ genellikle guanin üzerinde 8-hidroksilasyon modifikasyonu oluşturur⁷⁰. 8-okzoguanin ve timin glikol spontan olarak uyarılan DNA hasarıdır⁷¹. Her bir hücrede oksidatif metabolizma tarafından uyarılan 8-okzoguanin lezyon düzeyi yaklaşık olarak 10⁶ bazda 0,2'dir⁷⁰.

Oksidatif metabolizma ile uyarılan DNA lezyonları çoğunlukla tek lezyon olmasına rağmen, rastgele çoklu lezyonlarında uyarılma olasılığı vardır. Bitişik nükleotidler üzerinde oluşan iki lezyon olarak bilinen rastgele DNA lezyonları bir ·OH ile DNA kısmının etkileşimi sonucu başlatılır⁷¹.

Deoksitükleotidler mono-nükleozidlere metabolize edildikten sonra idrar ile atılır. *In vivo*'da idrarda okside nükleotidlerin normal şartlarda da varlığı bu olayın patolojik olmayan koşullarda da oluştuğunu göstermektedir⁷⁰.

2.3.4. Serbest Radikaller ve Kanser

Normal şartlarda, oksijen türevleri hücrede detoksifiye edilir. Ancak reaktif oksijen türevlerinin artışı ile onkojenik mutasyonların öncülüğünde makromoleküllerde ve hücre çevresinde bir takım değişiklikler oluşur ve bu da kanser patogenezi ve tümör gelişimine katkıda bulunur (Şekil 2.5.)⁶⁶.



Şekil 2.5. : Serbest oksijen türevleri ve Kanser patogenezi

Fazla miktarda serbest reaktif oksijen üretimi ile antiproteazların inhibisyonu ve lokal doku hasarı meydana gelir ki buda tümör farklılaşımı, invazyon ve metastazın ilerlemesine neden olur⁶⁶.

Serbest radikaller RNA dizilerinde, nokta mutasyonlar, delesyonlar, gen amplifikasyonu ve tekrar yapılanma gibi pek çok farklılıkları uyarırlar. DNA' nın kimyasal modifikasyonları; hidrojen bağlanma özgünlüğünde değişikliğe, açık halka

pürin ve pirimidin ürünlerinin oluşumuna neden olarak, DNA replikasyonunu engeler. DNA' daki konformasyonel değişiklikler DNA polimرازlar tarafından replikasyonun doğru olarak yapılmasını azaltır. Diğer yandan proteazlar ve doku üzerinde oluşan oksidatif hasar tümör gelişimine ve metastaza yol açar. Oksidatif hasarın polimeraza özgün bağlanma bölgelerindeki (hot-spot) etkisi ile mutasyon oluşur⁶⁶.

Bununla beraber lipit peroksidasyonundaki artış genomun bütünlüğünü korumakla görevli iplik kırma tamir enzimleri ve baz eksizyon tamir enzimleri gibi defans mekanizmalarının etkisini azaltır. Bunun sonucunda bir çok proto-onkojen ve/veya bazı tümör baskılayıcı genler aktive olur (Şekil 2.5.)⁶⁶.

Baz modifikasyonlarının DNA konformasyonu üzerine etkisi üzerine yapılan çalışmalar henüz başlamış olmalarına rağmen okside bazların nonpolar olduğu ve bunların lokal DNA yapısına zarar verebileceği bilinmektedir. Farklı kanser tiplerinde, yapılan son araştırmalarda antioksidan enzim düzeyinin düştüğü ve hidroksile DNA baz düzeyinde ise oksidatif hasara bağlı olarak artış olduğu gözlenmiştir⁶⁶.

Serbest Radikaller başlıca karaciğer, beyin, kardiyovasküler sistem, böbrek ve genel vücut sistemlerini hedef alırlar. Bu nedenle bir çok hastalığın oluşumunda etkin olarak rol alırlar (Çizelge 2.5.)^{55,72,73}.

Çizelge 2.5.: Serbest Radikallerin Oluşturduğu Hastalıklar

İnflamasyon hastalıkları

Vaskülit

Artrit

Glomerulonefrit

Lupus eritematosus

Kardiyovasküler sistem hastalıkları

Ateroskleroz

İskemi-reperfizyon hasarı

Yaşlanma

Otoimmün hastalıklar

Nörodejeneratif hastalıklar

Parkinson hastalığı

Alzheimer hastalığı

Musküler distrofi

Amiotrofik lateral skleroz

ARDS

Kanser

Akciğer

Deri

Barsak

Kolorektal

Lösemi

Karaciğer

Oftalmik hastalıklar

Katarakt

Glokom

Enfeksiyöz hastalıklar

Hepatit

AIDS

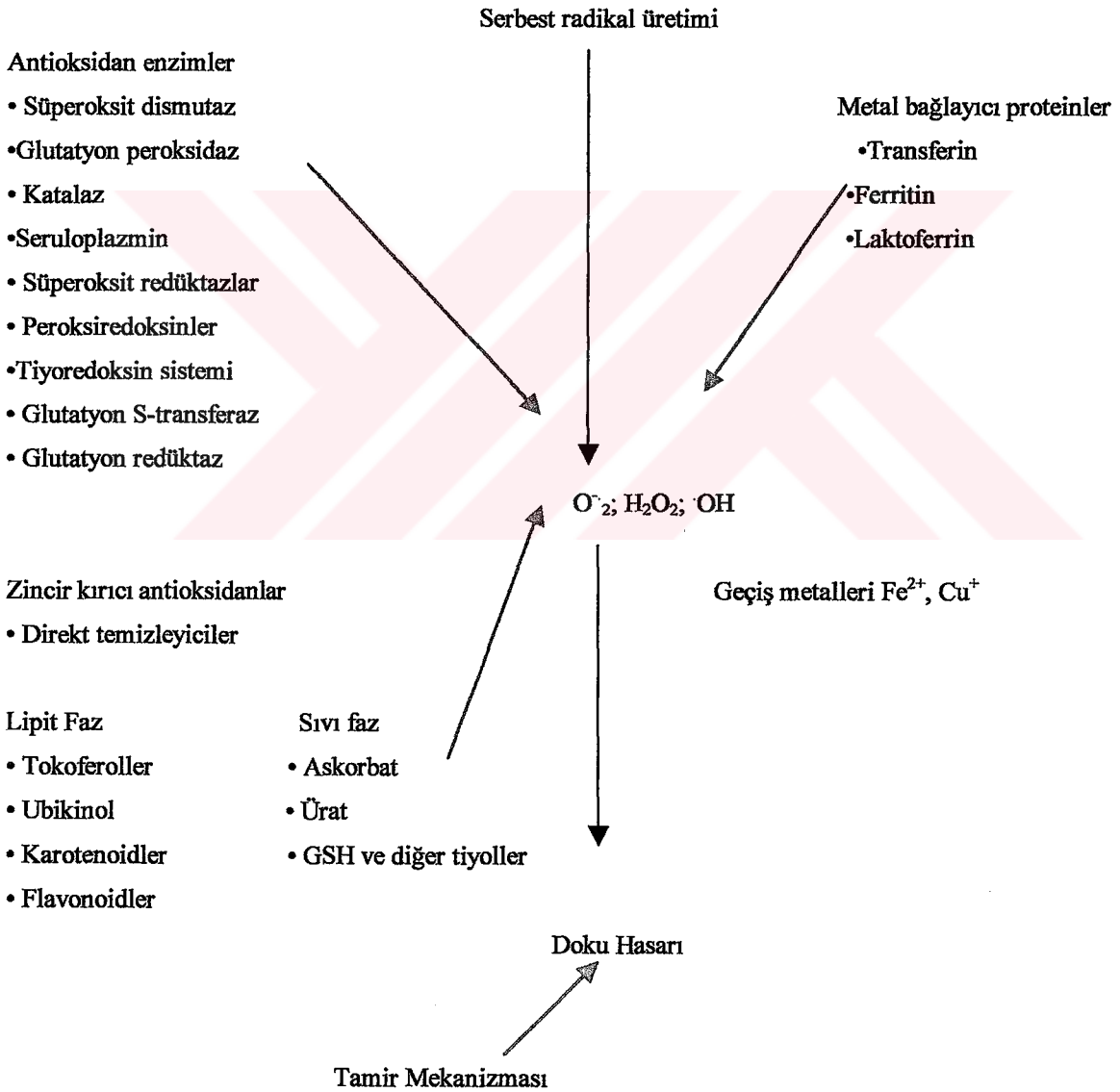
Pnömoni

Alerjik hastalıklar

Bronşial astma

2.4. Antioksidan Sistem

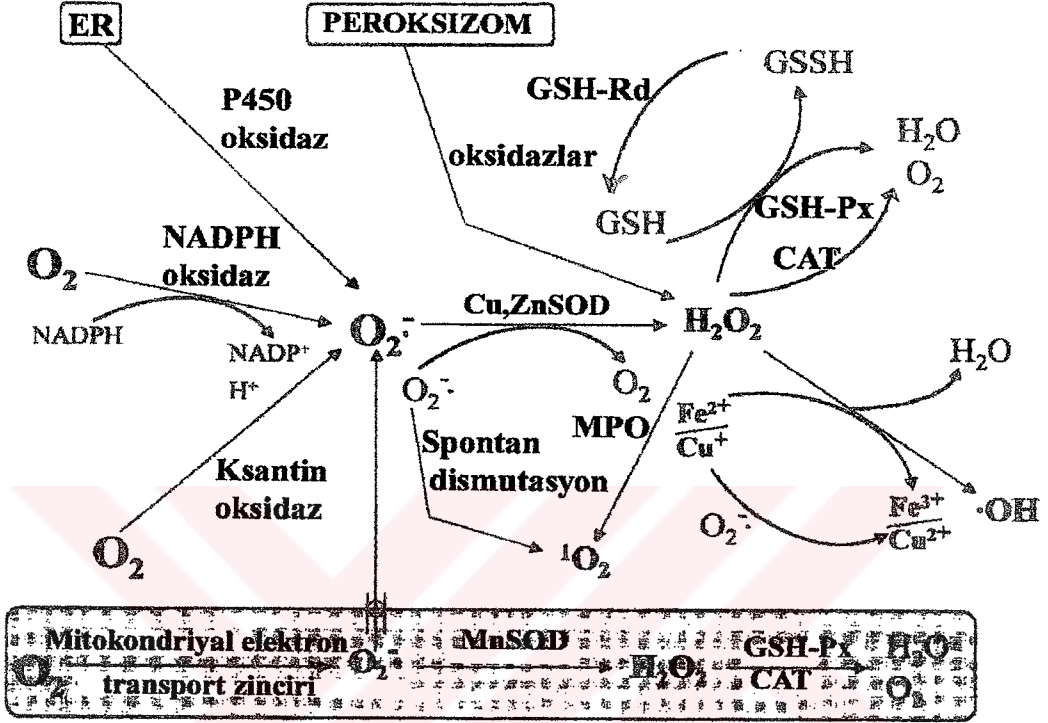
Serbest radikallerin hemen hemen tüm hücre bileşenlerine hasar oluşturmalarından dolayı buna karşı endojen ve eksojen kaynaklı antioksidanlar, hücre bileşenlerini bu zarardan koruma amaçlı bir defans sistemi oluştururlar. Bunlar antioksidan enzimler, zincir kırıcı antioksidanlar ve geçiş metallerini bağlayan proteinler olmak üzere üç ana grupta toplanırlar (Şekil 2.6.)⁵⁵.



Şekil 2.6.: Serbest Radikallere karşı antioksidan sistem

2.4.1. Antioksidan Enzimler

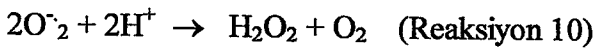
Antioksidan sistemde bulunan enzimler birbirinden farklı reaksiyonları kataliz etmelerine rağmen tüm reaksiyonlar birbirine bağlıdır (Şekil 2.7.)⁶⁶.



Şekil 2.7. Antioksidan Enzimler

2.4.1.1. Süperoksit Dismutaz Enzimi (SOD)

Süperoksit dismutazlar, iki $O_2^{\cdot-}$ 'ni H_2O_2 'te ve moleküler oksijene dismutasyonunu kataliz eden enzimlerdir (Reaksiyon 10)^{74,75}.



Ökaryotik hücrelerde, hücre içinde metal içeren iki SOD izoenzimi bulunur. Bunlar mitokondriyal, 90kDa'luk tetramerik MnSOD ve sitozolik, 32kDa'luk dimerik Cu,ZnSOD enzimleridir⁷⁶.

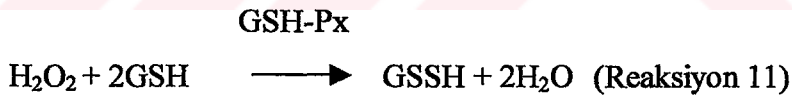
$O_2^{\cdot-}$ 'nin mitokondride oldukça fazla bulunmasından dolayı mitokondriyal MnSOD esansiyeldir. MnSOD'nin mutasyonunda neonatal ölüm gözlenir. Cu, Zn-SOD'in tersine MnSOD'in ekspresyonu oksidatif stres ve ilginç olarak tiyoredoksin (Trx) ile uyarılır⁵¹.

Sitozolik Cu,Zn-SOD, MnSOD'den daha az önemlidir. Bu enzimin eksik olduğu transjenik hayvanlarda adaptasyon oluşabilmekte ve fenotipler normal olarak görülmektedir. Sitozolik SOD gen mutasyonu ile letal nörodejeneratif bir hastalık olan Amiyotrofik lateral skleroz oluşur⁵¹.

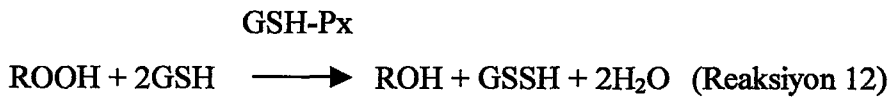
SOD' nin üçüncü izoenzimi ise ekstraselüler SOD' dir (EC-SOD). EC-SOD lenf, sinovyal sıvı ve plazma gibi ekstraselüler matrikslerde bulunur. Marklund ve arkadaşları tarafından 1982' de bulunmuştur. EC-SOD türden türe farklılık göstermekle birlikte 135kD moleküler ağırlıktadır. EC-SOD birçok organizmada tetramer, bazılarında ise dimerdir. EC-SOD herbir subünitte bir Cu ve Zn atomu içerir. EC-SOD geni Cu,ZnSOD ile yaklaşık %60, MnSOD ile ise minimal homoloji gösterir. EC-SOD nitrik oksit ile uyarılan sinyal reaksiyonlarında önemlidir⁷⁶.

2.4.1.2. Glutasyon Peroksidaz Enzimi (GSH -Px)

Memelilerde hepsi selenosistein içeren en az dört farklı GSH-Px vardır. Tüm GSH-Px'ler GSH'ı substrat olarak kullanarak H₂O₂'in redüksiyonunu kataliz ederler (Reaksiyon 11)^{77,78}.



GSH-Px' lar hücre zarındaki lipit peroksitler gibi diğer peroksitleride alkole dönüştürerek indirgeyebilirler (Reaksiyon 12)⁵¹.



GSH-Px1 (klasik enzim) ve GSH-Px2 (gastrointestinal GSH-Px) her ikisinde sitozolik enzimler olup tüm dokularda fazlaca bulunur. GSH-Px1 oksidatif strese karşı acil etki gösterir. GSH-Px2 gastrointestinal alanda ifade edilir ve lipit peroksidasyonunun toksik etkisine karşı önemlidir⁷⁸.

GSH-Px3 (plazma GSH-Px) böbrekte, akciğer, kalp ve plasentada ifade edilir ve ekstra selüler alanda ise başlıca plazmada bulunur. GSH-Px3, GSH-Px4' ten daha az etkin olmasına rağmen, çok daha karmaşık lipidlerin hidroperoksitlerini indirger^{77,78}.

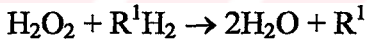
GSH-Px4 (fosfolipit hidroperoksit GSH-Px) yaklaşık tüm dokularda bulunur. Diğer izoenzimler tetramer yapıdayken GSH-Px4 farklı olarak monomerdur. Küçük yapısı ve hidrofobik özelliğinden dolayı zarlarda bulunan perokside fosfolipitleri ve kolesterolü indirgeme özelliği vardır. Mitokondriyal GSH-Px4' ün hücrenin oksidatif stresten korunmasında primer olarak rol aldığı düşünülmektedir^{77,79}. GSH-Px4'in sperm başında yapı proteini olarak bulunduğu⁷⁹ ve sperm olgunlaşmasında en az üç farklı görevi olduğu belirtilmektedir⁵¹.

2.4.1.3. Katalaz (CAT)

Birçok organizmada bulunan ve hem içeren enzimlerdir. Memelilerde peroksizomlarda bulunur ve H₂O₂'in suya ve moleküler oksijene dismutasyonunu kataliz eder (Reaksiyon 13).



CAT' tin fenoller gibi farklı substratları da detoksifiye etme özellikleri vardır.



Katalaz H₂O₂'den O₂ oluşum riskini azaltır. CAT NADPH'a bağlanarak, inaktivasyondan korunur ve etkisi artar. NADPH' ın olgunlaşmamış eritrositlerde azaldığı, Glukoz-6-fosfat-dehidrogenaz enzim eksikliği hastalığında hemolizin, daha önceden inanıldığı gibi GSH-Rd/GSH-Px aktivitesinin azalmasından çok artık CAT'ın inhibisyonundan dolayı oluşabileceği düşünülmektedir^{51,80}.

2.4.1.4. Tiyoredoksin Sistemi

Tiyoredoksin iki antioksidan sistem olan, tiyoredoksin (Trx) ve tiyoredoksin redüktazı (TrxR) içerir. Tiyoredoksinler oksidoredüktaz aktivitesi gösteren proteinlerdir. Memelilerde ve prokaryotik hücrelerde bulunurlar. TrxR enzimi NADPH' ı kullanarak

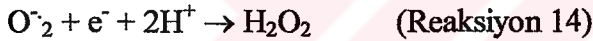
Trx' in disülfit aktif bölgesini ve bir çok substratı redüklerler. Redükte Trx, peroksiredoksinler ve okside glutatyon dahil bir çok protein ve peptitlerde bulunan disüflitleri indirgemede oldukça etkindirler⁵¹.

2.4.1.5. Peroksiredoksinler

Peroksiredoksinler; H₂O₂, alkil hidroperoksitler gibi peroksitleri direk olarak redükleyebilen enzimlerdir. Bu enzimler üzerindeki yapılan çalışmalar yeni olmakla beraber en az 13 memeli peroksiredoksinin varlığı bilinmektedir⁵¹.

2.4.1.6. Süperoksit Redüktazlar

O₂⁻'ni direkt azaltarak etki gösteren, yeni bulunan süperoksit temizleyici enzimlerdir. Bu enzimler demir içermektedirler ve şüana kadar anaerobik sülfat redükleyici bakterilerde gözlenmişlerdir (Reaksiyon 14)⁵¹.



2.4.1.7. Seruloplazmin

Ferrosidaz aktivitesine sahiptir. Fe²⁺'i Fe³⁺'e okside eder ve böylece H₂O₂'dan ·OH oluşumunu ve demire bağımlı lipoperoksidasyonu inhibe eder⁶⁶.

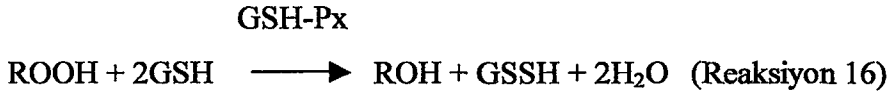
2.4.1.8. Glutatyon Redüktaz (GSH-Rd)

GSH-Px, H₂O₂ ve diğer lipid peroksitleri indirgerken, aynı zamanda GSH yükseltgenerek GSSH formuna dönüştür (Reaksiyon 12). GSH-Rd, GSSH' ın organizmada önemli bir serbest radikal temizleyicisi olan redükte formuna dönmesinde rol alır (Reaksiyon 15)⁸¹.



2.4.1.9. Glutatyon S-Transferaz (GST)

Glutatyon S-Transferazlar (GST) oldukça farklı görevleri olan enzimlerdir. Ksenobiyotiklerin GSH konjugatlarının oluşumunda, farklı hormon ve organik iyonlara bağlanmada ve lipit peroksitlerin indirgenmesinde rol alırlar (Reaksiyon 16). GST'lar üç sitozolik ve bir mikrozomal olmak üzere dört ana gruba ayrılırlar. Sitozolik GST'lar α , μ , π ve θ olmak üzere 4 gruba ayrılırlar. GST- π prekanseröz lezyonlarda ve farklı tümör dokularında ifade edilmelerinden dolayı tümör markeri olarak önem kazanmışlardır^{82, 83 84}.



2.4.2. Zincir Kırıcı Antioksidanlar

Serbest radikaller bir molekül ile reaksiyona girerek yeni bir serbest radikal oluştururlar. Bu oluşum bazen zincirleme olarak devam eder. Bu işleme verilecek en klasik örnek lipit peroksidasyonudur. Bu reaksiyon iki radikalın birleşerek stabil bir ürün oluşturmasına veya zincir kırıcı bir antioksidan ile birleşmesine kadar devam eder. Zincir kırıcı antioksidanlar lipit ve sulu faz olmak üzere iki grupta toplanmıştır⁵¹.

2.4.2.1. Lipit Faz Zincir Kırıcı Antioksidanlar

2.4.2.1.1. Tokoferoller

Tokoferollerin α , β , γ , δ olmak üzere dört farklı formu vardır. α Tokoferol doğal dağılımı en geniş ve biyolojik aktivitesi en fazla olan formudur. E Vitamini antioksidan etkinliği en fazla olan α tokoferoldür. α Tokoferol membranda, lipoproteinlerde ve adrenal bezlerinde yoğun bir şekilde bulunur⁶⁶.

Çoklu doymamış yağ asitlerinden daha hızlı hareket ederek peroksil radikalleri ile reaksiyona girer⁵¹. α Tokoferol hidrofobik yapısına bağlı hidroksil grubundaki

hidrojen atomunu kolaylıkla uzaklaştırabilir. Böylece lipit peroksidasyonunda oluşan peroksi ve alkoksi radikalleri ortamda bulunan yağ asitleri yerine α tokoferol ile reaksiyona girer⁸⁵.

α Tokoferollün rejenerasyonu askorbik asit, GSH ve ürat ile; iki α Tokoferol radikalinin birleşmesi ile veya tokoferol kuinona oksidasyonu ile gerçekleşir⁶⁶.

Lipit peroksidasyonunu inhibe etmesi ile LDL' nin aterojenik modifikasyonunu inhibe eder⁸⁵. 1O_2 ile reaksiyona girer ve $\cdot OH$ ortamda uzaklaştırarak membran koruma özelliğine sahiptir⁶⁶.

2.4.2.1.2. Karotenler

Membran (zar) ve lipoproteinlerde en az 20 çeşit karoten olmasına rağmen en önemlisi β karotendir. Karotenler en çok 1O_2 üzerine etkilidir. Aynı zamanda düşük oksijen basıncında en az α tokoferoller kadar etkin antioksidanlardır. A Vitaminin öncül maddesi olmalarından dolayı çok önemlidirler. A vitamini de antioksidan özellik göstermektedir^{86,87}.

2.4.2.1.3. Ubikinon

Ubikinonlar lipitlerde çözünen ve izoprenoid takı içeren kinon türevleridir. Ubikinon mitokondride elektron transport zincirinin bir parçasıdır. İnsanlarda bulunan temel ubikinon, Ubikinon 10' dur (Koenzim Q) . Oksijen kaynaklı radikalleri ve singlet oksijen ile etkileşerek lipit peroksidasyonunun başlamasını ve böylece biyomoleküllerin hasarını önler⁸⁸.

2.4.2.1.4. Flavonoidler

Flavonoidler bitki pigmentlerini oluşturan polifenollerdir. Peroksidasyonu başlatan radikalleri tutma, metal iyonlarını bağlama ve radikal oluşturucu enzimleri inhibe ederek antioksidan etki gösterirler^{83,89}.

2.4.2.2. Sıvı Faz Zincir Kırıcı Antioksidanlar

2.4.2.2.1. Askorbat

Askorbat suda çözünen, oldukça güçlü indirgeyici özelliğe sahip bir antioksidandır. α tokoferol radikali, peroksitler, $O_2^{\cdot-}$ ve $\cdot OH$ radikali ile kolayca reaksiyona girerek bu radikalleri ortamdan uzaklaştırır. Askorbat özellikle hücre zarındaki lipitleri korur. Bu özelliğinden dolayı aterosklerotik plakların oluşumunu engeller^{90,91,92,93,94}.

2.4.2.2.2 Redükte Glutasyon(GSH)

Glutamik asit, sistein ve glisin amino asitlerinden meydana gelen bir tripeptittir. $\cdot OH$ ve singlet oksijen gibi serbest radikallerin temizleyicisi olup oldukça önemli bir intrasellüler antioksidandır¹⁹. GSH intrasellüler alanda tiyol gruplarının başlıca kaynağıdır. Aynı zamanda GSH-Px enzimi için esansiyel bir faktördür^{19,95}.

2.4.2.2.3 Ürat

Pürin metabolizmasının son son ürünü olan ürat (ürük asit) plazma normal konsantrasyonlarında lipit peroksidasyonunda ve radikal temizleticisi olarak rol alırlar⁸³.

2.4.3. Metal Bağlayıcı Proteinler

Metal bağlayıcı proteinlerden transferrin ve laktoferrin dolaşımdaki serbest demiri bağlayarak antioksidan etki gösterir. Ferritin ise dokulardaki demiri bağlar. Demir ve bakır iyonları serbest radikal reaksiyonlarına katılarak ortamda bulunan radikallerin daha reaktif hale dönmesini hızlandırmalarından dolayı metal bağlayıcı proteinlerin antioksidan savunmada önemli rolü vardır. Metal bağlayıcı proteinler özellikle ·OH ve lipit peroksidasyonunun oluşumunu önlemektedirler^{73,83}.

3. GEREÇLER VE YÖNTEMLER

3.1. Gereçler

3.1.1. Cihazlar

1. UV spektrofotometre	Shimadzu-UV 260
2. UV spektrofotometre	Shimadzu-UV 120-02
3. UV spektrofotometre	Shimadzu-UV 1601
4. Spektrofotometre	Bausch and Lomb Spectronic 20
5. Santrifüj	Sorvall RC2 B-20.000 rpm
6. Manyetik karıştırıcı	Heidolph MR 2002
7. Homojenizatör	Heidolph S0110R2R0
8. Buz makinası	Scotsman AF-10
9. Elektrikli Terazı	Mettler P 1210
10. Digital pH metre	WTW pH S25
11. Otomatik pipet	Gilson P-20, P-100, P-200, P-1000 µL
12. Biyokimya otoanalizörü	Olympus AU 5200

3.1.2. Kimyasal Maddeler

1. Folin ciocalteu (Sigma)
2. n-Butanol (Merck)
3. Asetik asit (Sigma)
4. Tiyoarbitürikasit (Sigma)
5. Sodyum dodesil sülfat (SDS) (Sigma)
6. 1,1,3,3-tetrametoksipropan (Sigma)
7. 5,5'-ditiyo-bis [2-nitrobenzoyik asit](DTNB) (Sigma)
8. Redükte glutatyon (GSH) (Sigma)
9. Redükte nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) (Sigma)
10. Glutatyon redüktaz (Sigma)
11. t-butil hidroperoksit (Sigma)

12. Ksantin (Merck)
13. Ksantin oksidaz (Sigma)
14. 2-[4-iyodofenil] -3- [4-nitrofenol]-5-feniltetrazolium klorid (INT) (Sigma)
15. 3-(sikloheksilamino)-1-propan sülfonik asit (CAPS) (Sigma)
16. N-nitrozodietilamin (DEN) (Sigma)
17. Kolşisin (Sigma)

Diğer kimyasallar analar kalitede olup Merck ve Sigma firmalarından temin edilmiştir. Çözeltiler saf su kullanılarak hazırlanmıştır.

3.2. Deney Hayvanlarının Seçimi ve Temini

Çalışmamızda deney hayvanı olarak Ç.Ü. Tıbbi Deneysel Araştırma Merkezi'nden (TIBDAM) temin edilen ortalama ağırlıkları 170-220 g olan, ergin, erkek Wistar albino sıçanları kullanıldı.

Sıçanlar, deneyler süresince (19 hafta) sıcaklığı ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) ve nemi ($\% 55 \pm 8$) sabit tutulan odalarda muhafaza edildi. Havalandırma, pencere tipi aspiratörle sağlanırken odanın aydınlık-karanlık döngüsü otomatik denetleyici bir aygıt ile 12 saat aydınlık-12 saat karanlık olacak şekilde ayarlandı.

Sıçanlar, temizliği düzenli olarak sağlanan plastik kafeslerde tutuldu ve beslenmeleri için hazır standart yem, su gereksinimleri için ise özel uygulamalar hariç çeşme suyu kullanıldı.

3.3. Ön Çalışma

Sıçanlarda tümör oluşum süresini tespit etmek amacı ile bir ön çalışma oluşturuldu. Sağlıklı genç erişkin Wistar albino sıçanlardan oluşturulan grubun, günlük içme sularına son derişimi 100 ppm olacak şekilde DEN ilave edildi. Başlangıçta (Kontrol), 4. ,10. ve 19. haftaların sonlarında gruptan rast gele 3 adet sıçan alınarak kurifiye edildi. Sıçanların karaciğer dokuları histopatolojik olarak incelendi. Hepatosellüler karsinoma

oluşumu 19. haftanın sonunda gözlemlendi. Elde edilen bu sonuçtan dolayı tüm çalışma gruplarındaki uygulamalar 19 hafta boyunca sürdürüldü.

3.4. Çalışma Grupları

Çalışma her grupta 8 sıçan olmak üzere 5 grupta yapıldı. Tüm uygulamalar 19 hafta süresince devam etti.

Grup I: (Kontrol grubu) Bu gruptaki sıçanlar özel bir uygulamaya tabi tutulmadan Bölüm 3.2.'de belirtilen şartlarda saklandı.

Grup II: (40 µg kolşisin/kg uygulanan sıçanlar) Bu gruptaki sıçanlara haftada 3 kez 1 mL saf suda çözünmüş 40 µg kolşisin/kg, gavaj ile uygulandı.

Grup III: (DEN uygulanan sıçanlar) Bu gruptaki sıçanların günlük içme suyuna son derişimi 100 ppm olacak şekilde DEN ilave edildi.

Grup IV: (DEN + 40 µg kolşisin/kg uygulanan sıçanlar) Bu gruptaki sıçanların günlük içme suyuna son derişimi 100 ppm olacak şekilde DEN ilave edildi. Aynı zamanda bu süre boyunca haftada 3 kez 1 mL saf suda çözünmüş 40 µg kolşisin/kg gavaj ile uygulandı.

Grup V: (DEN sonrası 40 µg kolşisin/kg uygulanan sıçanlar) Bu gruptaki sıçanlara ilk olarak günlük içme suyu olarak son derişimi 100 ppm olacak şekilde DEN ilave edilmiş çözelti verildi. 19. haftadan sonra ise sadece haftada 3 kez 1 mL saf suda çözünmüş 40 µg kolşisin gavaj ile uygulandı. Kolşisin uygulaması ile artan mortaliteden dolayı bu uygulama 2 hafta sürdürüldü.

3.5. Çalışma Örneklerinin Hazırlanışı

3.5.1. Kan Örnekleri

Yukarıda belirtilen gruplardaki sıçanlar uygulama sonrası anestezi madde verilmeden servikal dislokasyon ile sakrifiye edildi. İntrakardiyak olarak alınan kan örnekleri 2'ye ayrıldıktan sonra EDTA'lı tüplere konuldu. Birinci kısım kanların 3000x g'de 10 dakika yapılan santrifuj sonrası ayrılan plazmalarında ALT, AST, ALP ve total protein çalışıldı. İkinci kısım kanlarda ise GSH miktarı ve GSH-Px enzim aktivitesi ölçüldü.

3.5.2. Doku Örnekleri

Sıçanlardan intrakardiyak kan alınımından sonra karaciğerleri diseke edildi ve iki parçaya ayrıldı. Birinci parça doku homojenatı hazırlanmaya kadar -70°C 'da saklanırken, diğer parça ise histopatolojik incelemeler yapılmak üzere %10'luk formaldehid içerisinde patoloji laboratuvarına gönderildi.

3.5.2.1. Doku Homojenatının Hazırlanışı

Homojenizasyon, 10 mM Fosfat tamponunda (pH 7,0) 2 dakika süreyle ve 2200 devirde cam-teflon tip homojenizatör kullanılarak yapıldı. Elde edilen homojenat, $+4^{\circ}\text{C}$ 'da 14000x g'de 30 dakika süreyle santrifuj edilerek supernatan ayrıldı ve ayrılan supernatanda GSH-Px ve SOD enzim aktiviteleri ile GSH ve MDA düzeyleri ölçüldü.

3.5.2.2. Histopatolojik İncelemeler İçin Dokuların Hazırlanması

Karaciğer doku örnekleri % 10'luk formaldehitte fikse edildi. Dehidratasyon, parafinizasyon ve şeffaflaştırma işlemlerinden sonra 5 μm kalınlığında doku kesitleri

alındı. HARRİS Hematoksilen eosin, Masson's trikrom, retikülin, PAS, Prusya mavisi histokimyasal yöntemleri uygulandı. Olimpos mikroskopta değerlendirildi ve fotoğrafları çekildi.

Tümörlü olgulardaki tümör dokusunda, immunohistokimyasal yöntem ile α -fetoprotein araştırıldı. İmmunohistokimyasal çalışmada Strept Avidin Biotin Boyama Yöntemi kullanıldı.

3.6. Analiz Yöntemleri

3.6.1. Biyokimyasal Analizler

3.6.1.1. Antioksidan Sistemin İncelenmesi

3.6.1.1.1. Eritrositlerde GSH Miktarının ve GSH-Px Enzim Aktivitesinin İncelenmesi

3.6.1.1.1.1. Eritrosit GSH Ölçümü

Prensip:

Eritrositlerdeki GSH halinde bulunan tüm nonprotein sülfidril gruplarının, bir disülfid bileşiği olan 5,5'-ditiyo-bis [2-nitrobenzoyik asit] (DTNB)'yi redükleyerek, 412

nm dalga boyunda absorbans veren sarı renkli bir kompleks oluşturması esasına dayanır. Ölçülen absorbans değeri GSH miktarını yansıtır⁹⁶.

Ayrıraçlar:

1. Çöktürücü Çözelti

Glasiyel metafosforik asit	1,67 g
Disodyum EDTA	2,0 g
NaCl	300 g

Saf su ile 1000 mL'ye tamamlanır.

2. 0,3 M Na₂HPO₄

Na ₂ HPO ₄	42,59 g
----------------------------------	---------

Saf su ile 1000 mL'ye tamamlanır.

3. % 0,40 DTNB Çözeltisi

DTNB	40 mg
------	-------

% 1'lik Sodyum Sitrat ile 100 mL'ye tamamlanır.

Hemolizat Hazırlanması

200 µL tam kan üzerine 2 mL saf su ilave edilerek hazırlanan hemolizatın 200 µL' si hemoglobin ölçümünde, geriye kalan 2 mL ise GSH ölçümünde kullanılır

Yöntem

Deney tüpleri aşağıda verilen şekilde hazırlanır.

	Kör (mL)	Örnek (mL)
Hemolizat	-	2
Saf su	2	-
Çöktürücü	3	3
5 dakika bekletilir, örnek filtre kağıdından süzülür.		
Süzüntü	2	2
0,3 M Na ₂ HPO ₄	8	8
412 nm'de absorbands değeri köre karşı okunur (OD1). Tüplere:		
%0,04 DTNB	1	1

İlave edilir ve 412 nm'de absorbands değeri tekrar köre karşı okunur (OD2).

Hesaplama

$$\frac{C}{1000} = \frac{(OD2 - OD1) \times \frac{11}{2} \times \frac{5}{2} \times \frac{100}{Hb \text{ (g/dL)}}}{13600}$$

$$C \text{ (}\mu\text{mol/gHb)} = \frac{(OD2 - OD1) \times 101}{Hb \text{ (g/dL)}}$$

OD1 = DTNB ilave edilmeden önceki absorbands

OD2 = DTNB ilave edildikten sonraki absorbands

13600 = GSH ile DTNB etkileşimi sırasında oluşan sarı rengin molar ekstinksiyon katsayısı

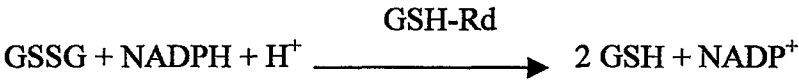
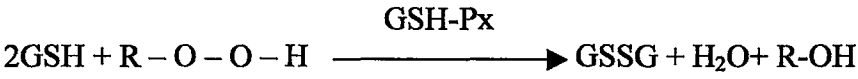
1000 = μ mole dönüşüm katsayısı

Hb = Hemoglobin (g/dL)

11/2; 5/2 = Seyreltme katsayısı

3.6.1.1.1.2. Eritrosit GSH-Px Ölçümü

Prensip: GSH'ın okside glutatyona (GSSG) oksidasyonu, t-bütil hidroperoksit varlığında GSH-Px ile gerçekleşir. Glutasyon peroksidaz enzim aktivitesi ölçümündeki prensip ise bu oksidasyon sonucunda oluşan GSSG'nin glutasyon redüktaz (GSH-Rd) enzimi ile tekrar GSH'a dönüşüm reaksiyonunun da kullanılan NADPH'nin NADP'ye oksitlenmesi sırasında, 340 nm dalga boyundaki absorbans değeri farkının zamana karşı okunması esasına dayanır⁹⁶.



Ayıracılar

1. Tris Tampon (pH 8.0)

Tris HCl	8,8 g
Tris Baz	5,4 g
EDTA	0,14 g

Saf su ile 100 mL'ye tamamlanır.

2. 0,1 M GSH

GSH	31 mg
-----	-------

Saf su ile 1 mL'ye tamamlanır.

Kullanılacak miktar günlük olarak hazırlanır.

3. 10 U / mL Glutasyon Redüktaz

Kullanılan glutasyon redüktazın U/mL'si üzerinden hesaplanır.

4. 2 mM NADPH

NADPH	17 mg
-------	-------

Saf su ile 10 mL'e tamamlanır.

Kullanılacak miktar günlük olarak hazırlanır.

5. 7 mM t-bütil hidroperoksit

% 70'lik sıvı t-bütil hidroperoksit 1:1000 oranında saf su ile sulandırılır.

Hemolizat Hazırlanması

+4 °C'de soğutulmuş serum fizyolojik ile 4 defa yıkanmış eritrosit pelletinden 50 µL alınıp üzerine 2 mL saf su ilave edilerek hazırlandı. Tüp buz kabında muhafaza edilir.

Yöntem

Çözeltiler kör ve örneğe ait deney tüplerine aşağıdaki şekilde konulur.

Çözeltiler	Kör	Örnek
1 M Tris Tamponu (µL)	100	100
0,1 M GSH (µ L)	20	20
10 Ü / mL Glutasyon Redüktaz (µL)	100	100
2 mM NADPH (µL)	100	100
Hemolizat (µL)	-	10
Saf su (µL)	670	660

Karışımlar 37 °C'de 10 dakika inkübe edilir.

t-butil-hidroperoksit (µL)	-	10
----------------------------	---	----

Daha sonra 340 nm dalga boyundaki absorbans değişikliği farklı zaman aralıklarında izlenir.

Hesaplama

Doğrusal artış gösteren zaman aralığındaki OD değerinden yararlanılarak GSH-Px enzim aktivitesi hesaplanır.

$$\text{GSH-Px Aktivitesi (U / mL)} = \frac{\Delta\text{OD} / \text{dak}}{6,22} \times \frac{\text{VT}}{\text{VS}}$$

ΔOD = Optik dansitedeki değişim

VT = Toplam hacim

VS = Hemolizat hacmi

6,22 = 1 mmol NADPH'nin 1 cm'lik ışık yolunda verdiği OD değeri

$$\text{GSH-Px Spesifik aktivitesi (U/gHb)} = \frac{\text{U/mL}}{\text{Hb (g/dL)}}$$

Hb = Hemoglobin

3.6.1.1.1.3. Hemoglobin Tayini

Prensip: Drabkin çözeltisinde bulunan ferrisiyanür hemoglobindeki +2 değerlikli demiri +3 değere yükseltgeyerek, hemoglobini methemoglobine dönüştürür. Bu ise potasyum siyanür ile birleşerek kararlı bir bileşik olan siyanomethemoglobini oluşturur. Siyanomethemoglobinin 540 nm dalga boyunda verdiği optik dansite ölçülerek hemoglobin (Hb) miktarı saptanır⁹⁷.

Ayırıcılar:

1. Drabkin çözeltisi

$K_3Fe(CN)_6$	189 mg
KCN	52 mg
$NaHCO_3$	1 mg

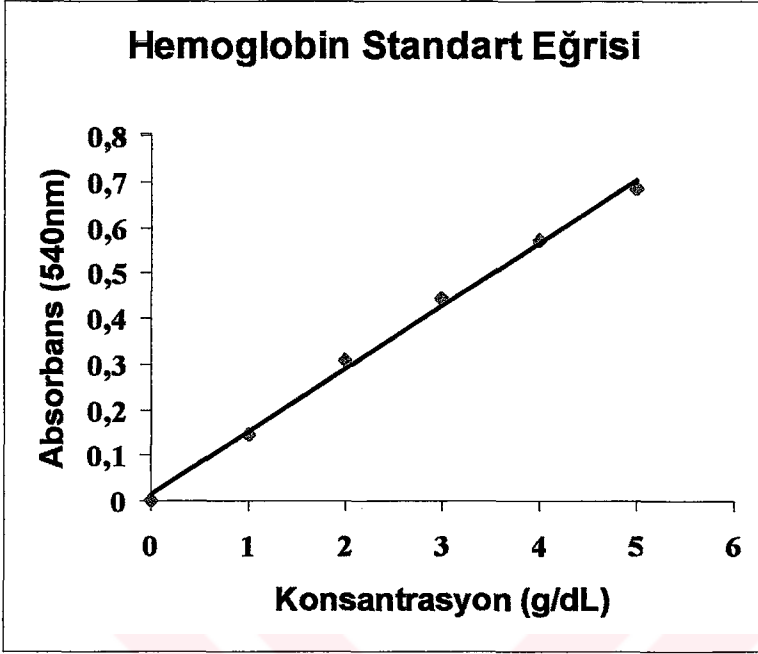
Saf su ile 1000 mL'ye tamamlanır.

Hemoglobin Standart Eğri Çizimi

Çözeltiler tüplere aşağıdaki şekilde konur.

Tüp No	Kör	1	2	3	4	5
Derişim (g/dL)	0	1	2	3	4	5
Standart (μ L)	-	100	100	100	100	100
Drabkin (mL)	5	5	5	5	5	5

15 dakika oda ısısında bekletilir. Spektrofotometrede 540 nm dalga boyunda optik dansite okunarak standart eğri çizilir.



Yöntem

Çözeltiler tüplere aşağıdaki şekilde konur.

	Kör	Örnek
Hemolizat (μ L)	-	100
Drabkin Çözeltisi (mL)	5	5

15 dakika oda ısısında bekletilir. Spektrofotometrede 540 nm dalga boyunda optik dansite okunarak standart eğriden değerlendirilir.

3.6.1.1.2. Karaciğer Dokusunda GSH ve MDA miktarı ile GSH-Px ve SOD Enzim Aktivitesinin İncelenmesi

3.6.1.1.2.1. Doku GSH Ölçümü

Prensip: Dokuda GSH Ölçüm Yöntemi 3.6.1.1.1.1.'de açıklanan prensip esasına dayanmaktadır.

Yöntem

Kör ve örneğe ait deney tüpleri aşağıda verilen şekilde hazırlanır.

	Kör (mL)	Örnek (mL)
Doku homojenatı	-	2
Saf su	2	-
Çöktürücü	3	3
Karışım 5 dakika bekletilir, örnek filtre kağıdından süzülür.		
Süzüntü	2	2
0,3 M Na ₂ HPO ₄	8	8
Örneğin absorbans değeri 412 nm'de köre karşı okunur (OD1). Daha sonra tüplere:		
%0,04 DTNB	1	1

ilave edilir ve örnek tüpte oluşan renk 412 nm'de köre karşı okunur (OD2).

Hesaplama

Glutasyon derişimi $\mu\text{mol/mg}$ protein olarak hesaplanır:

$$\frac{C (\mu\text{mol/mL})}{1000} = \frac{(OD2-OD1)}{13,600} \times \frac{5}{2}$$

$$C (\mu\text{mol/mL}) = (OD2-OD1) \times 0,185$$

$$\mu\text{mol/mg protein} = \frac{C (\mu\text{mol/mL})}{\text{Protein (mg / mL)}}$$

13,600: GSH ile DTNB etkileşimi sırasında oluşan sarı rengin molar ekstinksiyon katsayısı

C: $\mu\text{mol}/\text{mL}$ Glutasyon

OD1: DTNB ilave edilmeden önce 412 dalga boyunda ölçülen optik dansite

OD2: DTNB ilave edildikten sonra 412 dalga boyunda ölçülen optik dansite

1000 : μmol 'e dönüşüm katsayısı

5/2 : seyreltme katsayısı

3.6.1.1.2.2. Doku GSH-Px Ölçümü

Prensip: Dokuda GSH-Px Ölçüm Yöntemi 3.6.1.1.2.'de açıklanan prensip esasına dayanmaktadır.

Yöntem

Dokuda GSH-Px enzim aktivitesinin ölçümü 3.6.1.1.2 açıklandığı şekilde yapılmıştır.

Hesaplama

$$\text{GSH-Px aktivitesi (U/mL)} = \frac{\Delta\text{OD}}{6,22} \times \frac{\text{VT}}{\text{VH}}$$

ΔOD = Optik dansite farkı

6,22 = 1 mmol NADPH'nin 1 cm'lik ışık yolunda verdiği OD değeri

VT = Total hacmi

VH = Doku Homojenatının hacmi

$$\text{GSH-Px Spesifik Aktivitesi (U/mg protein)} = \frac{\text{GSH-Px aktivitesi (U/mL)}}{\text{Protein (mg protein/mL)}}$$

3.6.1.1.2.3. Doku MDA Ölçümü

Prensip: Lipit peroksidasyonu sonucunda, sekonder bir ürün olarak oluşan MDA'nın aerobik şartlarda, pH 3,4'te tiyobarbitürik asit (TBA) ile 95 °C'de inkübasyonu sonucu oluşan pembe renkli kompleksin, 532 nm'deki absorbans değerinin ölçümü esasına dayanır⁹⁸.

Ayırıklar

1. % 8,1'lik SDS

Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) 8,1 g

Saf su ile 100 mL'ye tamamlanır.

2. % 20'lik Asetik Asit

Asetik asit 20 mL

Saf su ile 100 mL'ye tamamlanır.

Doymuş NaOH ile pH 3,5'e ayarlanır.

3. % 0,8'lik TBA

Tiyobarbitürik asit 0,8 g

Saf su ile 100 mL'ye tamamlanır.

Doymuş NaOH ile pH 3,5'e ayarlanır.

4. n-Butanol / Piridin (nBu/Pri) Çözeltisi (15/1)

n-Butanol 15 mL

Piridin 1 mL

5. Stok Standart

1,1,3,3 tetrametoksipropan (yoğunluk = 0,99 g/mL)

Yöntem Çalışması

Örnek çalışması için ayıraçlar aşağıda tabloda belirtildiği şekilde tüplere konur.

Çözeltiler	Kör	Standart	Örnek
Doku homojenatı (mL)	-	-	0,1
Standart (mL)	-	0,1	-
SDS (mL)	0,2	0,2	0,2
Asetik Asit (mL)	1,5	1,5	1,5
TBA (mL)	1,5	1,5	1,5
Saf Su (mL)	0,8	0,7	0,7
95 °C'de 30 dakika inkübe edilir, soğutulur.			
Saf Su (mL)	1,0	1,0	1,0
nBu / pri	5,0	5,0	5,0

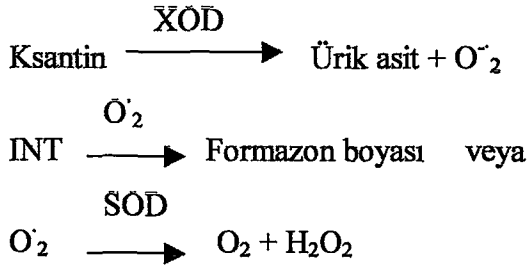
Çözeltiler vortekslendikten sonra 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir, üstteki organik kısım alınarak 532 nm'de absorbans değeri okunur. Sonuç günlük standart kullanılarak değerlendirilir.

$$\text{MDA (nmol/mg protein)} = \frac{\text{nmol / mL}}{\text{Protein (mg/mL)}}$$

Sonuç günlük standart kullanılarak değerlendirilir.

3.6.1.1.2.4. Doku SOD Ölçümü

Prensip: Oksidatif yolla enerji üretimi sırasında oluşan endojen veya eksojen kaynaklı toksik süperoksit radikallerinin ($O_2^{\cdot -}$) suya (H_2O) ve moleküler oksijene (O_2) dismutasyonunu hızlandıran SOD enzim aktivitesinin ölçüm prensibi, ksantin varlığında ksantin oksidaz'ın (XOD) açığa çıkardığı süperoksit radikallerinin 2-[4-iyodofenil] - 3-[4-nitrofenol] - 5 - feniltetrazolium klorid (INT) ile 505 nm'de absorblanan kırmızı renkli formazon boyası oluşturmasının, ortamda bulunan SOD enzimi ile inhibisyonuna dayanır⁹⁹



Ayırdaçlar

1. CAPS (3-(sikloheksilamino)-1-propan sülfonik asit) Tamponu

CAPS 1,10 g

EDTA 0,35 g

Saf su ile 100 mL'ye tamamlanır.

CAPS tamponu ile 2-8 °C'da saklanmalıdır. pH NaOH ile 10,2'ye ayarlanır.

2. Stok Substrat Karışımı

Ksantin 0,0015 g

INT 0,0025 g

CAPS tamponu ile 10 mL'ye tamamlanır.

3. Günlük Substrat Karışımı:

CAPS tamponu ile 1:20 dilüsyonda hazırlanır. Bu çözelti 2-8 °C'da 10 gün süreyle dayanıklıdır.

4. Ksantin Oksidaz (80 Ü/L)

5. 0,01 M Fosfat Tamponu (pH:7,0)

Na_2PO_4 54,91 mg

NaH_2PO_4 73,58 mg

Saf su ile 100 mL'ye tamamlanır.

6. Standart (S6): 5,6 Ü/mL SOD içeren Ransod kitinin standartıdır.

SOD Standart Eğri Çizimi

Liyofilize olarak hazırlanmış SOD standardı (S6) 10 mL bidistile su ile sulandırılır. Standart eğri çiziminde kullanılacak olan diğer SOD derişimleri ise fosfat tamponuyla aşağıdaki tabloda verildiği şekilde hazırlanır. 2-8 °C'de saklandığında 2 hafta süreyle dayanıklıdır.

Çalışma Standartlarının Hazırlanışı

SOD Derişimi	Kullanılacak Standart	0,01 M Fosfat Tamponu
S5 (2,8 U/mL)	5 mL S6	5 mL
S4 (1,4 U/mL)	5 mL S5	5 mL
S3 (0,7 U/mL)	5 mL S4	5 mL
S2 (0,23 U/mL)	3 mL S3	6 mL

Standart eğri çizimi için tüplere ayraçlar aşağıdaki şekilde ilave edilir.

Çözeltiler	Çalışma Körü	Standart
Standart (mL)	-	0,05
Fosfat tamponu (mL)	0,05	-
Günlük Substrat Karışımı (mL)	1,7	1,7
İyice karıştırılır.		
Ksantin Oksidaz (mL)	0,25	0,25

Tekrar karıştırıldıktan 30 saniye (A1) ve 3,5 dakika sonra (A2) 37°C'da, 505 nm dalga boyunda havaya karşı absorbands değerleri okunur.

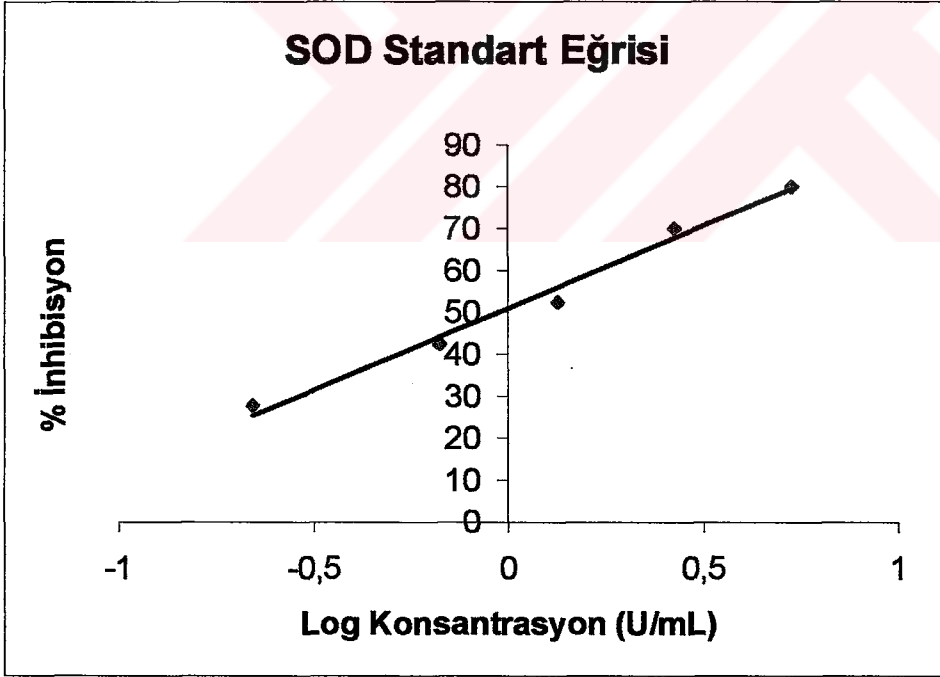
Hesaplama

Çalışma körü SOD içermediği için inhibisyona uğramamış reaksiyon olarak kabul edilir ve değeri % 100 olarak alınır. Tüm standartlar için % inhibisyon değeri bunlara ait değerlerin çalışma körüyle oranlanarak 100'den çıkarılması sonucu hesaplanır.

$$\Delta A / \text{dak}_{\text{standart}} = \frac{A2 - A1}{3 \text{ dakika}} \quad \Delta A / \text{dak}_{\text{çalışma körü}} = \frac{A2 - A1}{3 \text{ dakika}}$$

$$\% \text{ İnhibisyon} = 100 - \frac{\Delta A / \text{dak}_{\text{standart}}}{\Delta A / \text{dak}_{\text{çalışma körü}}} \times 100$$

Her bir standart için hesaplama yapıldıktan sonra X (yatay) eksenine SOD derişimlerinin (U/mL) logaritmik dönüşüm değerleri, Y (dikey) eksenine standartlara ait % inhibisyon değeri yazılarak doğrusal bir standart eğri elde edilir.



Örnek Çalışması:

Ayraçlar, tüplere aşağıda gösterildiği gibi konulur.

Çözeltiler	Çalışma Körü	Örnek
Doku homojenati (mL)	-	0,05
Fosfat tamponu (mL)	0,05	-
Günlük Substrat Karışımı (mL)	1,7	1,7
İyice karıştırılır.		
Ksantin Oksidaz (mL)	0,25	0,25

Tekrar karıştırıldıktan sonra oluşan rengin absorbans değerleri 30. saniye(A1) ve 3,5 dakika (A2) 37°C, 505 nm dalga boyunda havaya karşı okunur.

Hesaplama

Çalışma körü ve örnek $\Delta A/\text{dak}$ cinsinden aşağıdaki şekilde hesaplanır.

$$\Delta A/\text{dak}_{\text{örnek}} = \frac{A2 - A1}{3 \text{ dakika}} \quad \Delta A/\text{dak}_{\text{çalışma körü}} = \frac{A2 - A1}{3 \text{ dakika}}$$

Hesaplanan $\Delta A/\text{dak}_{\text{örnek}}$ ve $\Delta A/\text{dak}_{\text{çalışma körü}}$ aşağıdaki formül uygulanarak değerlendirilir.

$$\% \text{ İnhibisyon}_{\text{örnek}} = 100 - \frac{\Delta A / \text{dak}_{\text{örnek}}}{\Delta A / \text{dak}_{\text{çalışma körü}}} \times 100$$

Örneğe ait hesaplanan yüzde inhibisyon değerine karşılık gelen SOD değeri ise standart eğri kullanılarak bulunur ve aşağıdaki hesaplama yapılarak U/mg protein cinsinden ifade edilir.

$$\text{SOD aktivitesi (U/mg protein)} = \frac{\text{SOD aktivitesi (U/mL)}}{\text{Protein (mg protein)}}$$

3.6.1.1.2.5. Lowry Yöntemi ile Protein Tayini

Prensip: Alkali ortamda proteinlerin bakır sülfat ve fosfotungstik asit ile reaksiyona girerek oluşturduğu mavi renkli kompleksin 550 nm dalga boyunda absorbanans değerinin ölçülmesi prensibine dayanır¹⁰⁰.

Ayıraçlar

1. % 2 (w/v) Na₂CO₃

Na₂CO₃ 2 g

Toplam 100 mL 0,1 NaOH ile çözünür.

2. % 1 (w/v) CuSO₄5H₂O

CuSO₄5H₂O 1 g

Saf su ile 100 mL'ye tamamlanır.

3. % 2 (w/v) Na-K tartarat

Na-K tartarat 2 g

Saf su ile 100 mL'ye tamamlanır.

4. Ayıraç C: 50 mL %2 (w/v) Na₂CO₃, 0,5 mL %1 (w/v) CuSO₄5H₂O ve 0,5mL %2 (w/v) Na-K tartarat ilave edilerek hazırlanır.

5. Folin-Ciocalteu Ayıracı

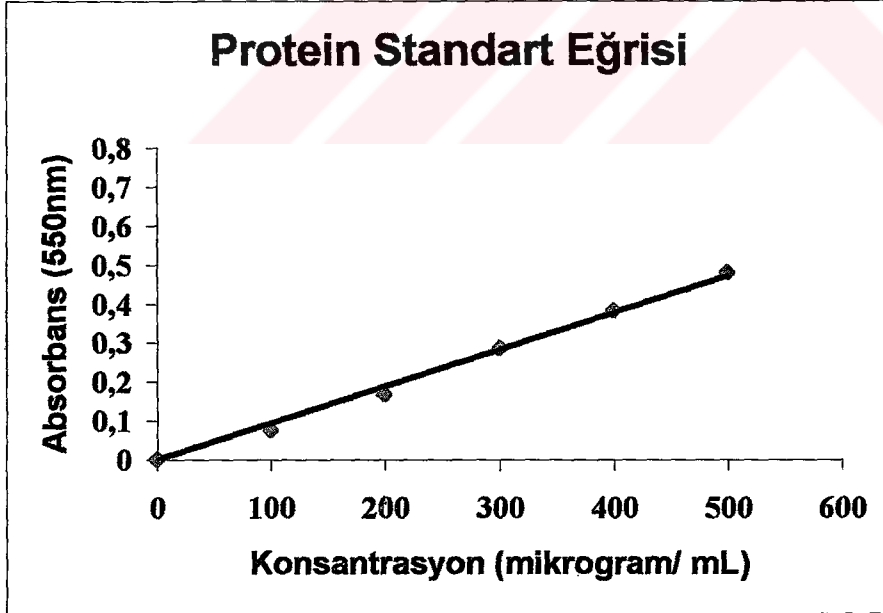
1:1,5 saf su ile dilue edilir.

Protein standart eğri çizimi:

Aşağıda verilen derişimlerde hazırlanan bovin serum albumin (BSA) standartları kullanılarak standart eğri çizimi yapıldı.

Tüp No	Kör	1	2	3	4	5	6	7
Kullanılan BSA Standart								
Derişim ($\mu\text{g/mL}$)	0	60	120	180	300	400	450	500
İgili BSA Standart								
çözeltisi (mL)	-	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Serum fizyolojik (mL)	0,3	-	-	-	-	-	-	-
Ayıraç C (mL)	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
Oda ısısında 10 dk bekletilir.								
Folin-ciocalteu ayıracı (mL)	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3

Oda ısısında 30 dakika bekletilir ve 550 nm'de köre karşı okunur ve standart konsantrasyonlarına karşı absorbans değerleri çizilir.



Yöntem

Çözeltiler tüplere aşağıdaki şekilde konur.

	Kör	Örnek
Serum fizyolojik (mL)	0,3	-
Doku homojenatı (mL)	-	0,3
Günlük çözelti (mL)	3,0	3,0

Oda ısısında 10 dakika bekletilir.

Folin-ciocalteu ayracı (mL)	0,3	0,3
-----------------------------	-----	-----

Oda ısısında 30 dakika bekletilir, absorbands değeri 550 nm'de okunur. Protein konsantrasyonu standart eğriden değerlendirilir.

3.6.1.2. AST, ALT, ALP ve Total Protein Düzeylerinin İncelenmesi

AST, ALT, ALP ve total protein düzeyleri merkez laboratuvarında biyokimya otoanalizörü Olympus AU 5200 ile ölçüldü.

3.6.2. Karaciğer Dokularının Histopatolojik İncelenmesi

3.6.2.1. İmmunohistokimyasal Boyama Evreleri

1. Her kesitin üzerini tamamen kaplayacak şekilde 3-4 damla “peroksidaz blocking reagent” (% 3 Hidrojen peroksidaz solüsyonu) damlatılarak 15 dakika oda sıcaklığında, nemli ortamda bekletildi. Burada amaç mevcut endojen peroksitleri yok ederek nonspesifik zemin boyanmasını azaltmaktır.

2. Kesitler üzerindeki fazla solüsyon dökülerek önceden hazırlanmış fosfat buffered tampon solüsyonunda (PBS 0,001 M pH 7,2) beşer dakika süre ile yıkandı.

3. Kesitlerin etrafi kurutulduktan sonra üzerlerine Reagent 1A (serum blocking solüsyon-% 10 non immün serum) damlatılarak 10 dakika bekletildi.

4. Kesitler PBS solüsyonunda beş dakika süre ile yıkandı. Doku çevresindeki PBS solüsyon fazlalığı silinerek uzaklaştırıldı.

5. Kesitlerden birine primer antikor diğer dokuya “negatif kontrol reagent” damlatılarak kesitler 60 dakika nemli ortamda, oda sıcaklığında bekletildi.

6. Kesitler PBS solüsyonunda beş dakika süre ile yıkandı. Doku çevresindeki PBS solüsyon fazlalığı uzaklaştırıldı.

7. Kesitler üzerine reagent 1B (biotinylated second antibody) damlatılarak 10 dakika bekletildi.

8. Kesitler PBS solüsyonunda beş dakika süre ile yıkandı. Doku çevresindeki PBS solüsyon fazlalığı silinerek uzaklaştırıldı.

9. Kesitler üzerine Reagent 2 (enzyme conjugate-streptavidin-peroksidase conjugate) damlatılarak 15 dakika bekletildi.

10. Kesitler PBS solüsyonunda beş dakika süre ile yıkandı. Doku çevresindeki PBS solüsyon fazlalığı silinerek uzaklaştırıldı.

11. Kesitlere tarife göre hazırlanan dimethyl formamide içinde 3-amino-9ethyl carbazole (AEC working color reagent) bol miktarda damlatıldı ve 15 dakika süre sıcaklığında nemli ortamda bekletildi.

12. Kesitler musluk suyunda yıkandı.

13. Mayer's hematoksilen ile 30-60 saniye zemin boyanması yapıldı. Yıkanarak % 0,3'lük amonyaklı su ile mavileştirildi ve tekrar yıkandı.

14. Kesitler gliserin jel ile kapatılarak mikroskopik incelemeye hazır hale getirildi. Örnekler ışık mikroskopunda değerlendirildi. Leitz marka mikroskopta kodak 21 DM / 100 ASA film kullanarak resimler çekildi.

4. BULGULAR

Çalışma süresince Ç.Ü. TIBDAM' da üretimi ve bakımı yapılan toplam 60 adet Wistar albino sıçan kullanıldı. Bunlardan 20 adet sıçan ön çalışmada kullanıldı.

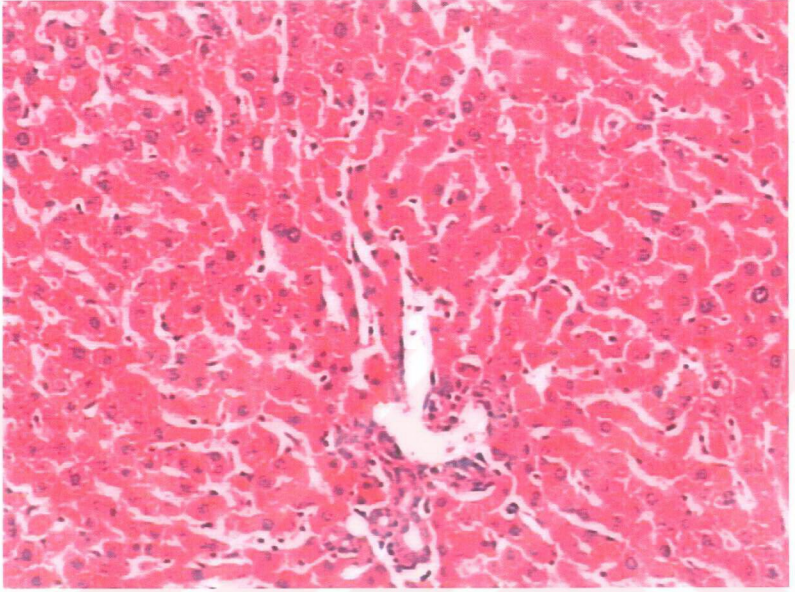
4.1. Ön Çalışma İle İlgili Histopatolojik Bulgular

Sağlıklı genç erişkin Wistar albino sıçanların günlük içme sularına son derişimi 100 ppm olacak şekilde DEN ilave edildi. Sıçanlarda tümör oluşum süresini tespit etmek amacı ile DEN uygulamadan önce (Kontrol) (Şekil 4.1.) ve uyguladıktan sonra 4. , 10. ve 19. haftanın sonunda grupta bulunan sıçanlardan rast gele 3 sıçan alınarak sakrifiye edildi.

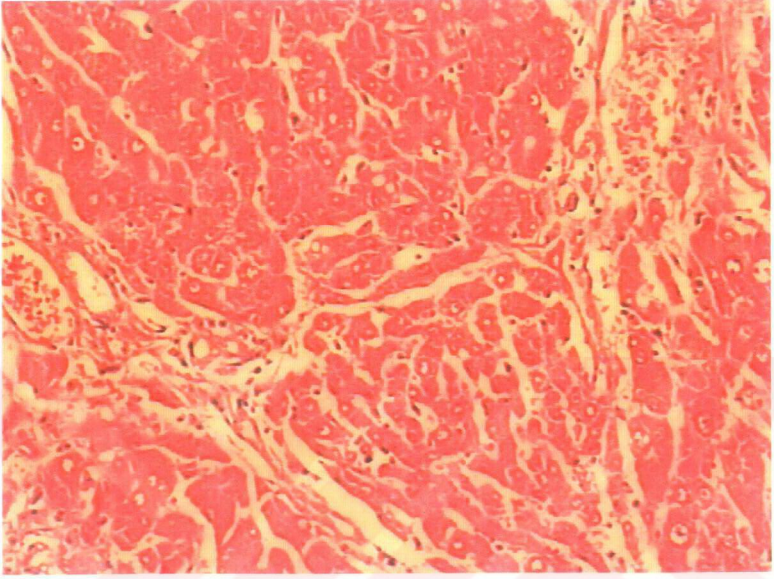
Histopatolojik incemeler sonucunda DEN uygulamadan (Kontrol) önce sakrifiye edilen sıçanlarda normal karaciğer dokusu gözlemlendi. 4. haftanın sonunda sakrifiye edilen sıçanların karaciğer dokusunda ise portal alanlarda dağınık mononükleer iltihabi hücre infiltrasyonu, fibrozis, parankimde rejenerasyon gözlemlendi (Şekil 4.2.).

10. haftanın sonunda portal fibrozisin arttığı, portal-portal ya da portal-santral köprüleşmeler oluşturan fibröz doku proliferasyonun geliştiği, ayrıca portal alanlarda mononükleer iltihabi hücre infiltrasyonu ile parankimde tek hücre nekrozları, belirgin rejenerasyon bulguları izlendi. Karaciğer dokusunun normal yapısını kaybettiği ve fibröz bantlarla mikronodüllere ayrıldığı gözlemlendi (Şekil 4.3., Şekil 4.4., Şekil 4.5.).

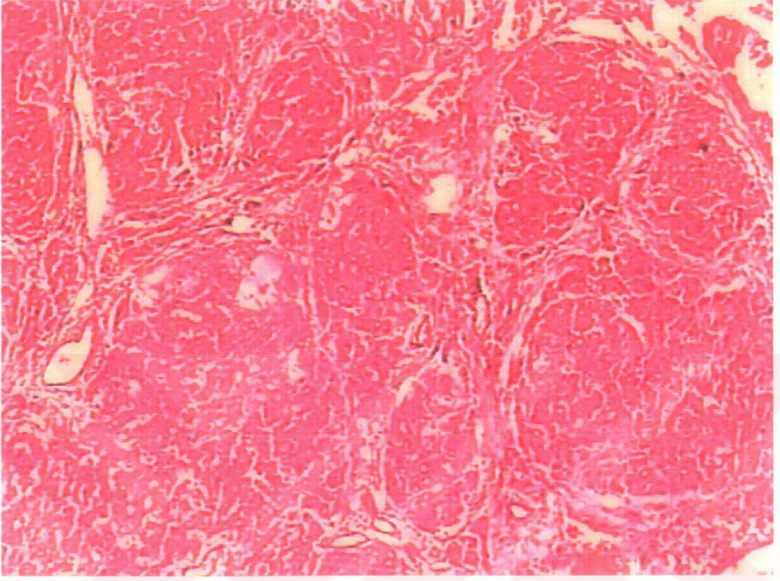
19. haftanın sonunda ise karaciğer dokusunda large-cell displazi alanlarına komşu geniş tümör odakları dikkati çekti. Tümörün oval- hiper kromik nükleuslu, genişçe eozinofilik sitoplazmalı atipik hepatositlerden meydana geldiği görüldü (Şekil 4.6.).



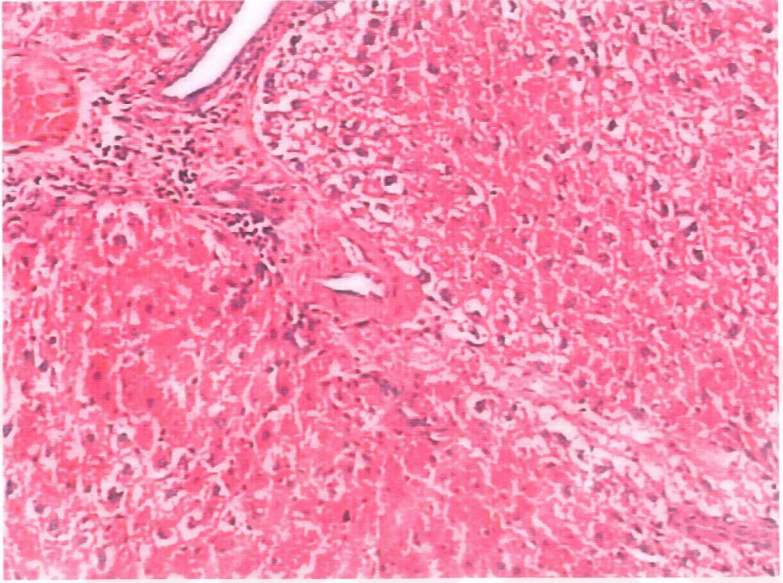
Şekil 4.1. : HE x 100 kontrol grubu sıçanlarda normal karaciğer dokusu.



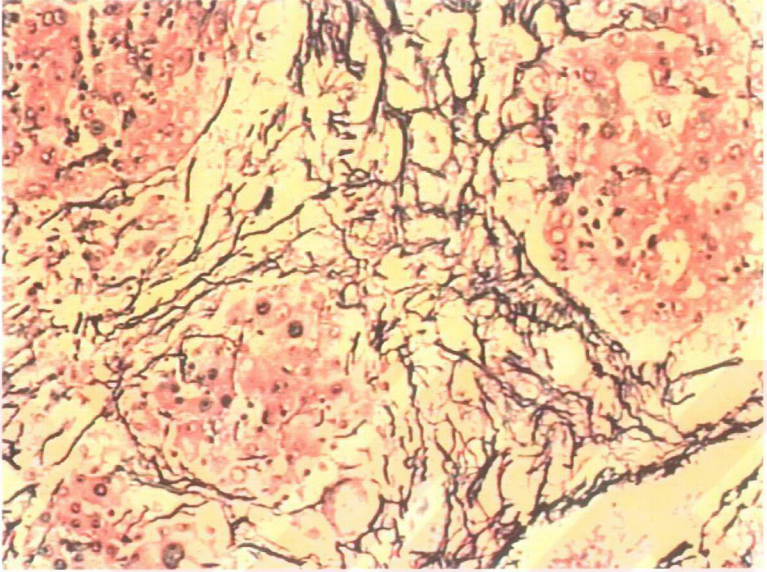
Şekil 4.2. : HE x 100 4 hafta süresince günlük içme sularına son derişimi 100 ppm DEN ilave edilen sıçanlarda karaciğer dokusunda portal alanlarda dağınık mononükleer iltihabi hücre infiltrasyonu, fibrozis, parankimde rejenerasyon bulguları.



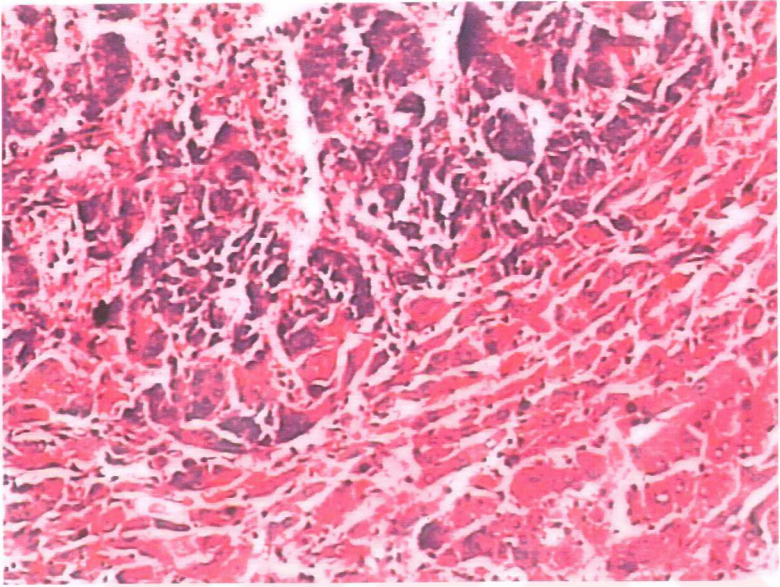
Şekil 4.3. : HE x 25 10 hafta süresince içme sularına son derişimi 100 ppm DEN ilave edilen sıçanlarda karaciğerde sirotik görünüm. Normal yapı tamamen bozulmuş ve karaciğer fibröz septalar ile mikronodüllere ayrılmış.



Şekil 4.4. : HE x 100 10 hafta süresince günlük içme sularına son derişimi 100 ppm DEN ilave edilen sıçanlarda siroz. Portal alan-Lobül sınırında düzensizlik, fibröz septalarda ve portal alanlarda mononükleer iltihap hücreleri, pakaran kimde rejenerasyon bulguları.



Şekil 4.5. : Retikülün x 100 10 hafta süresince günlük içme sularına son derişimi 100 ppm DEN ilave edilen sıçanlarda siroz. Retiküler çatıda kabalaşma ve nodüler görünüm.



Şekil 4.6. : Retikülün x 100 19 hafta süresince günlük içme sularına son derişimi 100 ppm DEN ilave edilen sıçanlarda displastik karaciğer hücrelerine komşu tümör odağı. Tümör hücreleri hiperkromatik nükleuslu, geniş eozinofilik sitoplazmalı, trabeküler yapılar oluşturmuş.

4.2. Biyokimyasal Analizlere Ait Bulgular

4.2.1. Eritrositlerde ve Karaciğer Dokularında Antioksidan Sisteme Ait Bulgular

Ön çalışma tamamlandıktan sonra geriye kalan 40 adet sıçan ile her bir grupta 8 adet olmak üzere aşağıda belirtilen çalışma grupları oluşturuldu. Tümör oluşumunun 19 hafta sürmesi nedeniyle çalışma gruplarındaki tüm uygulamalar 19 hafta süresince devam etti.

Çalışma Grupları

Grup I: (Kontrol grubu) Bu gruptaki sıçanlar özel bir uygulamaya tabi tutulmadan Bölüm 3.2.'de belirtilen şartlarda saklandı.

Grup II: (40 µg kolşisin/kg uygulanan sıçanlar) Bu gruptaki sıçanlara haftada 3 kez 1 mL saf suda çözünmüş 40 µg kolşisin/kg gavaj ile uygulandı.

Grup III: (N-nitrozodietilamin (DEN) uygulanan sıçanlar) Bu gruptaki sıçanların günlük içme suyuna son derişimi 100 ppm olacak şekilde DEN ilave edildi.

Grup IV: (DEN + 40 µg kolşisin/kg uygulanan sıçanlar) Bu gruptaki sıçanların günlük içme suyuna son derişimi 100 ppm olacak şekilde DEN ilave edildi. Aynı zamanda bu süre boyunca haftada 3 kez 1 mL saf suda çözünmüş 40 µg kolşisin/kg gavaj uygulaması yapıldı.

Grup V: (DEN sonrası 40 µg kolşisin/kg uygulanan sıçanlar) Bu gruptaki sıçanlara ilk olarak 19 hafta süresince günlük içme suyu olarak son derişimi 100 ppm olacak şekilde DEN ilave edilmiş çözelti verildi. 19. haftadan sonra haftada 3 kez 1 mL saf suda çözünmüş 40 µg kolşisin/kg gavaj uygulaması yapıldı. Bu uygulama sıçanlarda mortalite artışından dolayı ancak 2 hafta kadar sürdürüldü.

Uygulamaların sonlandırıldığı çalışma gruplarında sıçan kanında GSH düzeyi ve GSH-Px enzim aktivitesi (Çizelge 4.1.), plazmada ise ALT, AST, ALP ve total protein değerleri saptandı (Çizelge 4.4.). Sıçanlardan intra kardiyak kan alımı sırasında bazı sıçanlardan az miktarda kan alınması ve bazılarında ise alınan kanların tamamen hemoliz olması nedeni ile eksik olan sonuçlar Çizelge 4.1. ve Çizelge 4.4 kayıt edilmedi.

Çizelge 4.1. : Eritrositlerde GSH miktarının ve GSH-Px enzim aktivitesi

ÖRNEK	GSH($\mu\text{mol/g Hb}$)	GSH-Px(U/ g Hb)
Grup I 1	10,68	313
2	11,72	159
3	10,5	193
4	9,39	220
5	8,26	314
6	10,71	237
Grup II 1	9,48	446
2	8,9	537
3	8,36	457
4	8,56	215
5	7,1	329
6	7,42	407
Grup III 1	6,28	532
2	5,99	1030
3	7	420
4	5,74	758
5	6,35	691
6	5,43	749
7	4,23	546
8	6,39	498
Grup IV 1	5,21	424
2	6,81	462
3	7,65	358
4	4,46	442
5	6,23	644
6	-	702
Grup V 1	1,06	782
2	2,43	722
3	2,01	810
4	2,84	924
5	1,93	758
6	-	991

Çizelge 4.2. : Eritrositlerde GSH miktarının ve GSH-Px enzim aktivitesinin istatistiksel verileri

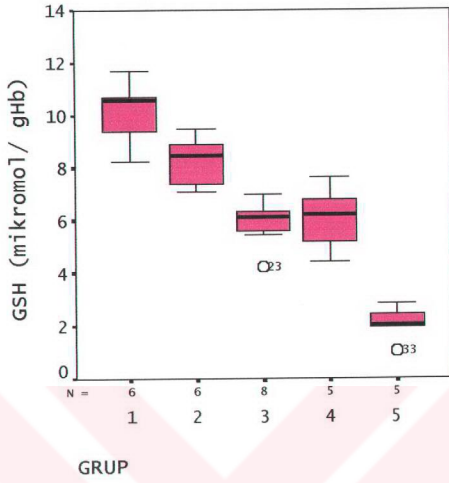
	Grup I $\bar{x} \pm SD$	Grup II $\bar{x} \pm SD$	Grup III $\bar{x} \pm SD$	Grup IV $\bar{x} \pm SD$	Grup V $\bar{x} \pm SD$
GSH ($\mu\text{mol/gHb}$)	10,21 \pm 1,21 n=6	8,30 \pm 0,90 n=6	5,92 \pm 0,83 n=8	6,07 \pm 1,26 n=5	2,05 \pm 0,66 n=5
GSH-Px (U/ gHb)	239,3 \pm 63,2 n=6	398,5 \pm 112,6 n=6	653,0 \pm 195,8 n=8	505,3 \pm 135,7 n=6	831,2 \pm 104,2 n=6

Eritrositlerde GSH miktarının ve GSH-Px enzim aktivitesi düzeyinin $\bar{x} \pm SD$ ' sı elde edildikten sonra çalışma grupları arasındaki istatistiksel farklılıklar karşılaştırıldı. İkili grup karşılaştırmalarına ait p değerleri Çizelge 4.3.'de gösterilmiştir. Eritrositlerde GSH düzeyinde Grup III ve Grup IV (p=0,999) arasındaki ilişki hariç tüm grup karşılaştırmalarında anlamlı farklılıklar gözlenmektedir. Eritrositlerde GSH-Px enzim aktivitesinde ise Grup I ve Grup II (p=0,410) , Grup II ve Grup IV (p=0,761) , Grup III ve Grup IV (p=0,418), Grup III ve Grup V (p=0,237) arasındaki ilişki hariç tüm grup karşılaştırmalarında anlamlı farklılıklar gözlenmektedir.

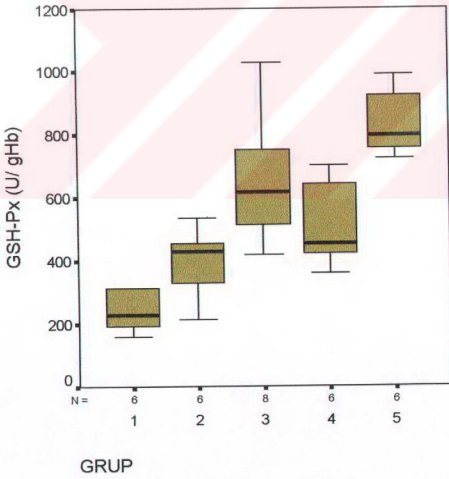
Çizelge 4.3. : Çizelge 4.2.' de verilen değerlerin ikili grup karşılaştırmalarına ilişkin p değerleri

Gruplar	GSH	GSH-Px
I-II	0,048	0,410
I-III	0,001	0,001
I-IV	0,001	0,042
I-V	0,001	0,001
II-III	0,004	0,036
II-IV	0,022	0,761
II-V	0,001	0,001
III-IV	0,999	0,418
III-V	0,001	0,237
IV-V	0,001	0,008

p<0,050 istatistiksel anlamlı farklılık gösterir.



Şekil 4.7. Eritositlerde Kontrol grubu (Grup I) ile çalışma grupları GSH değerlerinin karşılaştırılması



Şekil 4.8. : Eritositlerde Kontrol grubu (Grup I) ile çalışma grupları GSH-Px değerlerinin karşılaştırılması

Çizelge 4.4. : Plazmada ALT, AST, ALP ve Total Protein değerleri

ÖRNEK	ALT (U/L)	AST (U/L)	ALP (U/L)	Total protein (g/dL)
Grup I				
1	73	112	2	7,3
2	62	208	3	6,1
3	45	137	2	5,5
4	39	117	6	5,7
5	53	134	3	6,2
6	74	123	3	7,4
Grup II				
1	56	120	5	7,3
2	65	117	2	6,6
3	55	148	3	5,4
4	71	135	6	5,3
5	49	111	2	5,7
6	51	-	3	6,6
7	42	-	-	-
8	60	-	-	-
Grup III				
1	109	207	12	6,3
2	86	195	12	6,4
3	180	421	11	5,4
4	319	319	13	6,6
5	250	392	12	7
Grup IV				
1	271	333	12	5,5
2	199	186	11	5,9
3	260	248	14	6,2
4	319	271	12	4,4
5	247	369	11	4,7
6	-	-	12	-
Grup V				
1	448	237	9	4,8
2	340	184	11	4,3
3	361	261	12	5,9
4	390	233	13	6,8
5	327	391	13	4,1
6	279	253	-	-

Çizelge 4.5 : Plazmada ALT, AST, ALP ve Total Protein değerlerine ait istatistiksel veriler

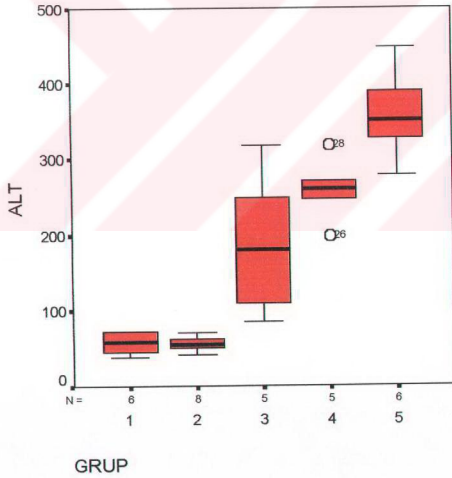
	Grup I ($\bar{x} \pm SD$)	Grup II ($\bar{x} \pm SD$)	Grup III ($\bar{x} \pm SD$)	Grup IV ($\bar{x} \pm SD$)	Grup V ($\bar{x} \pm SD$)
ALT(U/L)	57,7 ± 14,5 n=6	56,1 ± 9,2 n=8	188,8 ± 97,1 n=5	259,2 ± 43,3 n=5	357,5 ± 57,7 n=6
AST(U/L)	138,5 ± 35,4 n=6	126,2 ± 15,1 n=5	306,8 ± 103,6 n=5	281,4 ± 71,9 n=5	259,8 ± 69,6 n=6
ALP(U/L)	3,2 ± 1,5 n=6	3,5 ± 1,6 n=6	12,0 ± 0,7 n=5	12,0 ± 1,1 n=6	11,6 ± 1,7 n=5
Total Protein (g/dL)	6,4 ± 0,8 n=6	6,2 ± 0,8 n=6	6,3 ± 0,6 n=5	5,3 ± 0,8 n=5	5,2 ± 1,1 n=5

Plazmada ALT, AST, ALP ve total protein değerlerinin $\bar{x} \pm SD$ ' sı elde edildikten sonra çalışma grupları arasındaki istatistiksel farklılıklar karşılaştırıldı. Çizelge 4.6.'da ikili grup karşılaştırmalarına ait p değerleri gösterilmiştir. ALT değerlerinde Grup I ve Grup IV (p=0,002), Grup I ve Grup V(0,001), Grup II ve Grup IV (p=0,004), Grup II ve Grup V (p=0,001) arasında anlamlı farklılıklar gözlenmektedir. AST değerlerinde ise sadece Grup II ve Grup V (p=0,045) arasında anlamlı farklılık gözlenmektedir. ALP değerlerinde Grup I ve Grup II (p=0,996), Grup III ve Grup IV (p=1,000), Grup III ve Grup V (p=0,994), Grup IV ve Grup V (p=0,993) hariç diğer gruplar arasında anlamlı farklılıklar gözlenmektedir. Total protein ölçümünde ise tüm gruplar arasında anlamlı bir farklılık yoktur.

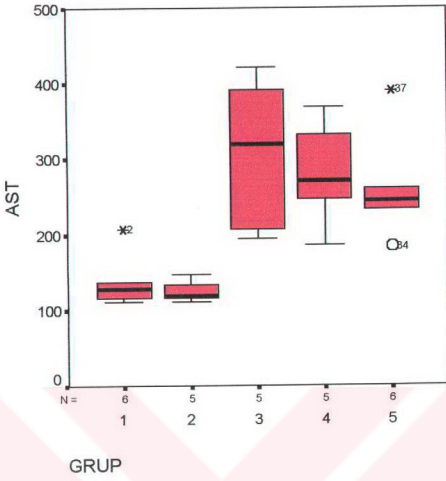
Çizelge 4.6. : Çizelge 4.5.' de verilen değerlerin ikili grup karşılaştırmalarına ilişkin p değerleri

Gruplar	ALT	AST	ALP	Total Protein
I-II	1,000	0,998	0,996	0,995
I-III	0,324	0,176	0,001	1,000
I-IV	0,002	0,075	0,001	0,417
I-V	0,001	0,058	0,001	0,277
II-III	0,318	0,156	0,001	0,997
II-IV	0,004	0,072	0,001	0,641
II-V	0,001	0,045	0,001	0,473
III-IV	0,883	1,000	1,000	0,486
III-V	0,125	0,995	0,994	0,339
IV-V	0,100	1,000	0,993	0,999

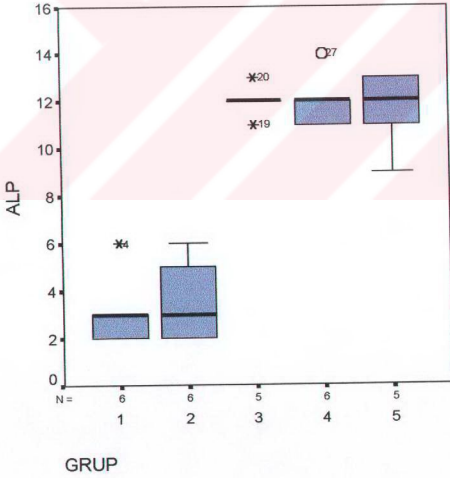
$p < 0,050$ istatistiksel anlamlı farklılık gösterir.



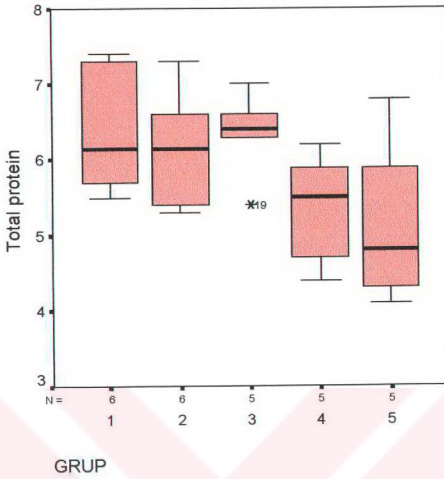
Şekil 4.9. : Kontrol grubu (Grup I) ile çalışma grupları AST değerlerinin karşılaştırılması



Şekil 4.10. : Kontrol grubu (Grup I) ile çalışma grupları ALT değerlerinin karşılaştırılması



Şekil 4. 11. : Kontrol grubu (Grup I) ile çalışma grupları ALP değerlerinin karşılaştırılması



Şekil 4.12. : Kontrol grubu (Grup I) ile çalışma grupları Total protein değerlerinin karşılaştırılması

Eritrositlerde ki ölçümlerin yanı sıra sıçan karaciğer dokularında da GSH-Px ve SOD enzim aktiviteleri ile GSH ve MDA düzeyleri ölçüldü (Çizelge 4.7.).

Çizelge 4.7. : Siçan karaciğer dokularında GSH, GSH-Px, SOD ve MDA değerleri

ÖRNEK	GSH ($\mu\text{mol/mg protein}$)	GSH-Px (U/ mg protein)	SOD (U/mg protein)	MDA (nmol/mg protein)
Grup I	1	0,0146	0,74	0,25
	2	0,0141	0,63	0,278
	3	0,0118	0,66	0,203
	4	0,0052	0,51	0,307
	5	0,0117	0,45	0,145
	6	0,011	0,78	0,304
	7	0,0107	0,86	0,231
	8	0,0112	0,6	0,245
Grup II	1	0,0116	0,683	0,365
	2	0,0074	0,79	0,338
	3	0,0178	0,582	0,336
	4	0,0129	0,71	0,248
	5	0,0099	0,82	0,201
	6	0,0071	0,743	0,189
	7	0,0065	0,865	0,179
	8	0,0083	0,766	0,229
Grup III	1	0,0038	0,84	0,364
	2	0,0059	0,914	0,392
	3	0,0051	0,654	0,564
	4	0,0072	0,46	0,566
	5	0,0068	0,5	0,572
	6	0,0055	0,727	0,604
	7	0,0061	0,693	0,471
	8	0,0048	0,86	0,25
Grup IV	1	0,0048	1,74	0,648
	2	0,0042	1,218	0,852
	3	0,0032	1,046	0,887
	4	0,0048	1,192	0,73
	5	0,0054	1,134	0,92
	6	0,0067	0,894	0,873
	7	0,0059	0,948	1,275
	8	0,0022	1,05	1,116
Grup V	1	0,0059	1,297	2,032
	2	0,0032	1,888	2,678
	3	0,0058	1,168	2,5
	4	0,0062	1,29	2,222
	5	0,0042	1,26	1,95
	6	0,0032	0,981	1,46
	7	0,0051	1,622	1,871
	8	0,0038	1,3	2,421

Çizelge 4.8. : Siçanların karaciğer dokularında GSH, GSH-Px, SOD ve MDA değerlerine ait istatistiksel veriler

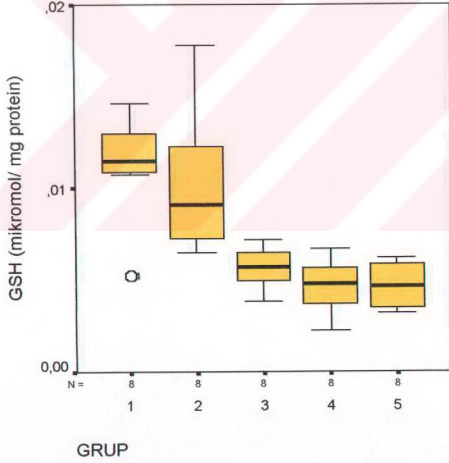
	Grup I $\bar{x} \pm SD$	Grup II $\bar{x} \pm SD$	Grup III $\bar{x} \pm SD$	Grup IV $\bar{x} \pm SD$	Grup V $\bar{x} \pm SD$
GSH ($\mu\text{mol/mg protein}$)	0,0113 \pm 0,003 n=8	0,0102 \pm 0,004 n=8	0,0057 \pm 0,001 n=8	0,0047 \pm 0,001 n=8	0,0047 \pm 0,001 n=8
GSH-Px (U/mg protein)	0,65 \pm 0,14 n=8	0,74 \pm 0,09 n=8	0,71 \pm 0,17 n=8	1,15 \pm 0,26 n=8	1,35 \pm 0,28 n=8
SOD (U/mg protein)	0,253 \pm 0,05 n=8	0,260 \pm 0,7 n=8	0,47 \pm 0,13 n=8	0,91 \pm 0,20 n=8	2,14 \pm 0,39 n=8
MDA (nmol/mg protein)	0,31 \pm 0,1 n=8	0,40 \pm 0,1 n=8	0,56 \pm 0,1 n=8	1,90 \pm 0,5 n=8	2,86 \pm 0,6 n=8

Siçan karaciğer dokularında GSH ve MDA düzeyleri ile GSH-Px ve SOD enzim aktivitelerinin $\bar{x} \pm SD$ ' sı elde edildikten sonra çalışma grupları arasındaki farklılıklar karşılaştırıldı. İkili grup karşılaştırmalarına ait p değerleri Çizelge 4.9.'da gösterilmiştir. GSH değerlerinde Grup I ve Grup II ($p=0,999$), Grup II ve Grup III ($p=0,111$), Grup III ve Grup IV ($p=0,788$) Grup III ve Grup V ($p=0,713$), Grup IV ve Grup V ($p=1,00$) arasında anlamlı farklılıklar bulunmamaktadır. GSH-Px enzim aktivitesinde ise Grup I ve Grup II ($p=0,533$), Grup I ve Grup III ($p=0,991$), Grup II ve Grup III ($p=0,997$) Grup IV ve Grup V ($p=0,434$) arasında anlamlı bir farklılık gözlenmemektedir. SOD enzim aktivitesinde sadece Grup I ve Grup II ($p=1,000$) arasında anlamlı bir farklılık olmadığı gözlenmektedir. MDA düzeylerinde Grup I ve Grup II ($p=0,618$), Grup II ve Grup III ($p=0,367$) arasında anlamlı bir farklılık olmadığı gözlenmektedir.

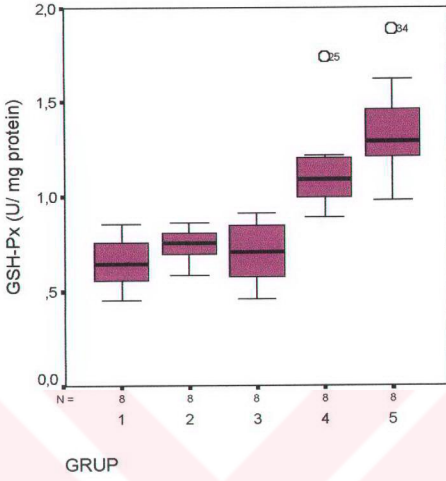
Çizelge 4.9. Çizelge4.8.'de verilen değerlerin ikili grup karşılaştırmalarına ilişkin p değerleri

Gruplar	GSH	GSH-Px	SOD	MDA
I-II	0,999	0,533	1,000	0,618
I-III	0,005	0,991	0,010	0,003
I-IV	0,001	0,001	0,001	0,001
I-V	0,002	0,001	0,001	0,001
II-III	0,111	0,997	0,017	0,367
II-IV	0,039	0,008	0,001	0,001
II-V	0,041	0,001	0,001	0,001
III-IV	0,788	0,003	0,002	0,001
III-V	0,713	0,001	0,001	0,001
IV-V	1,000	0,434	0,001	0,001

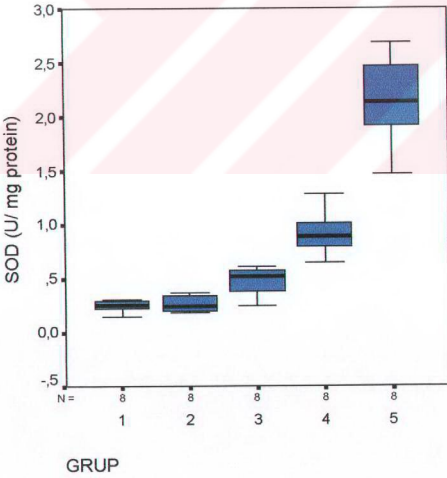
$p < 0,050$ istatistiksel anlamlı farklılık gösterir.



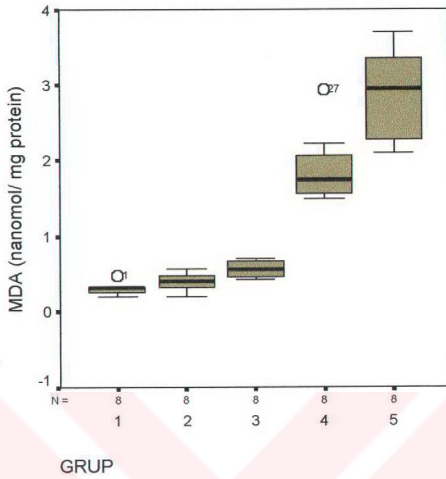
Şekil 4.13. Sıçan karaciğer dokularında Kontrol grubu (Grup I) ile çalışma grupları GSH değerlerinin karşılaştırılması



Şekil 4.14. Sıçan karaciğer dokularında Kontrol grubu (Grup I) ile çalışma grupları GSH-Px değerlerinin karşılaştırılması



Şekil 4.15. Sıçan karaciğer dokularında Kontrol grubu (Grup I) ile çalışma grupları SOD değerlerinin karşılaştırılması



Şekil 4.16. Sıçan karaciğer dokularında Kontrol grubu (Grup I) ile çalışma grupları MDA değerlerinin karşılaştırılması

4.3. Karaciğer Dokularının Histopatolojik Bulguları

Grup I: Kontrol grup sıçanlardan elde edilen karaciğer doku örneklerinde normal yapının korunduğu, portal alanlarda seyrek lenfosit infiltrasyonu, hepatositlerde yer yer bulanık şişme ve kupfer hücrelerinde hiperplazi dışında patolojik bulgu saptanmadı (Şekil 4.17.).

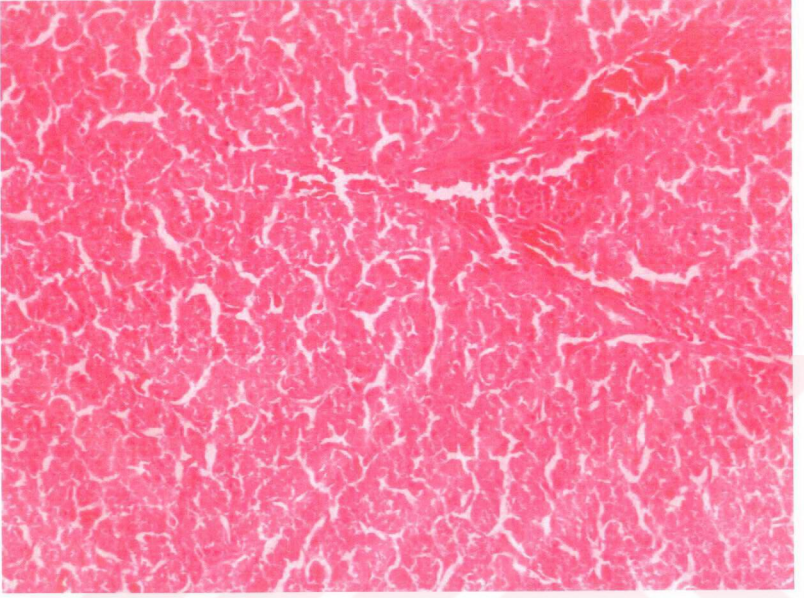
Grup II: 40 µg koşisin uygulanan sıçanlardan elde edilen karaciğer dok u örneklerinde portal alanlarda az sayıda mononükleer iltihap hücreleri görülmüş, portal alan-lobül sınırının korunduğu, parankimde hepatositlerde hidropik dejenerasyon, nükleer vakuolizasyon, tüm dokuda yaygın konjesyon dışında patolojik bulgunun olmadığı görülmüştür

Grup III: Karaciğer dokusunda genel yapının tümüyle bozulduğu, portal alanlarda belirgin mononükleer iltihabik hücre infiltrasyonu, az sayıda polimorf nüveli lökositler, safra kanalikül proliferasyonu ve lobül içerisine taşarak portal-portal ya da portal-santral köprüleşmeler oluşturarak karaciğeri nodüllere ayıran belirgin fibröz doku proliferasyonu görülmüştür. Bu sirotik zemin üzerinde karaciğer hücrelerinin yer yer displastik hal aldığı ve bu alanlara komşu bir odakta ya da birkaç odakta atipik

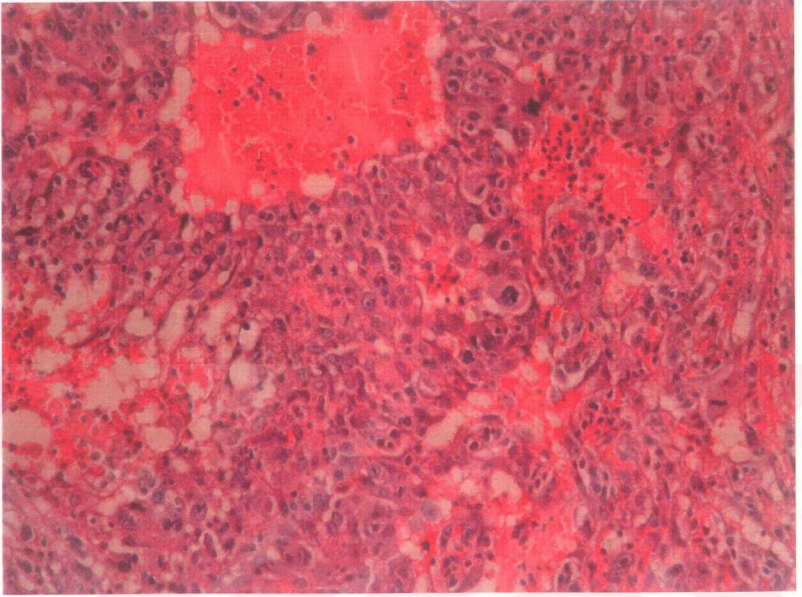
hücrelerin oluştuğu tümöral yapı izlenmiştir. Tümör hücreleri iri hiperkromatik nükleolu, geniş poligonal sitoplazmalı atipik hücreler olup, trabeküler ya da glandüler yapılar teşkil etmişler ve immünohistokimyasal yöntemle uygulanan Alfa fetoprotein ile pozitif boyanma göstermişlerdir (Şekil 4.18.).

Grup IV: Kolşisin + DEN grubu sıçanlardan hazırlanan karaciğer örneklerinde, histolojik kesitle bazılarında (K₄, K₅, K₈) genel arşitektürün tümüyle bozulduğu, karaciğerin fibröz septalar ile nodüllere ayrıldığı, portal alanlarda mononükleer iltihap hücrelerinin varlığı, bazı portal alanlarda daha belirgin olmak üzere safra kanalikül proliferasyonu izlendi. Parankim hücrelerinde yaygın rejenerasyon bulguları, K₄ ve K₈ kayıtlı örneklerde largecell displazi bulguları ile K₅ ve K₈ nolu örneklerde malign neoplastik gelişim dikkati çekti. Tümör hücre sitoplazmalarında safra pigmenti saptandı. İmmünohistokimyasal yöntemle uygulanan alfa-feto protein ile tümörde pozitif boyanma görüldü. Bu grup içinde yer alan diğer sıçanlardan elde edilen karaciğer dokularında ise portal alanlarda fibrozis, mononükleer iltihabi hücre infiltrasyonu, parankimde belirgin kolestozis, yer yer safra gölcükleri nekrozları, asidofil cisimcikler, konjesyon, balonlaşma dejenerasyonu izlendi.

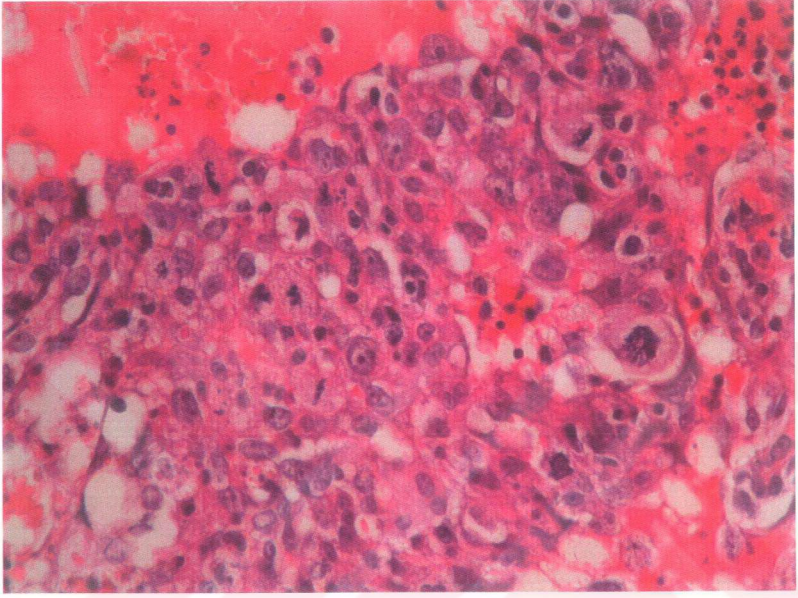
Grup V: Bu grup sıçanlardan elde edilen tüm karaciğer doku örneklerinde malign neoplastik gelişim dikkati çekti. Tümörün sinüzoid vasküler yüzeylerce trabeküllere ayrıldığı, dallar veya papiller yapılar halinde gelişim gösterdiği, dar bir stromaya sahip olduğu, yer yer asiner ya da psödoglandüler paternler oluşturduğu, bu gland benzeri yapıların lümenlerinin genellikle boş olduğu ya da safra içerdiği izlendi. Bazen ise tümörün sıkışık trabeküller ve komprese sinüzoidler nedeniyle solid bir patern sergilediği dikkati çekti. Tümör hücreleri eosinofilik granüler sitoplazmalı, iri yuvarlak nükleuslu idi ve hepatositleri taklid eden görünümdeydi. Nükleolus belirgindi, nükleositoplazmik oran artmıştı, bazı hücrelerde belirgin peomofizm, bizormitotik figürler ve tümör dev hücreleri görüldü. Tümörün genellikle tek odakta başladığı bazen ise birden fazla odaktan köken aldığı dikkati çekti. Çevre karaciğer dokusu sirotik görünümü yada portal fibrozisin belirgin olduğu bir yapıdaydı (Şekil 4.19.).



Şekil 4.17. : HE x 100 kontrol grubu sıçanlarda normal karaciğer dokusu.



Şekil 4.18. : HE x 100 Grup III'te bulunan sıçanlarda displastik karaciğer hücrelerine komşu tümör odağı.



Şekil 4.19. : HE x 100 Grup V'te bulunan sıçanlarda displastik karaciğer hücrelerine komşu tümör odağı.

5. TARTIŞMA

Serbest radikaller bir veya daha fazla paylaşılmamış elektron içeren reaktif maddelerdir¹⁰¹. Serbest radikallerin başlıca kaynakları hepatosit mitokondri ve CYP enzimleri, endotoksin tarafından aktive edilen makrofajlar (Kupffer hücreleri) ve nötrofillerdir¹⁰².

Karaciğer hasarının gözleendiği tüm hastalıklarda birbiri ile tutarlı bir şekilde reaktif oksijen türevlerinin üretiminde artış ve/veya antioksidan savunmasında önemli bir düşüş gözlenmektedir¹⁰².

Reaktif oksijen türevleri hepatositlerde; Ca²⁺ birikiminde, dolaşımında ve taşıma görevlerinde, nitrik oksit sentezi ve metabolizmasında, sitokin gen ifadesinde, kaspaz aktivasyonunda, büyüme faktörlerinin sentez ve aktivitesinde, DNA parçalanmasında, Na akımında ve daha birçok olayda etkilerini gösterirler. Bu olayların sıklığı ve bir veya daha fazlasının aynı anda gözlenmesi ile farklı tipte karaciğer hastalıkları oluşmaktadır¹⁰².

Son yıllarda çok iyi bilinmektedir ki oksidatif hasar fibrozis için bir substrattır. Diabet, obesite, toksik ajanlara maruz kalma, ilaçlar, etanol, ve HCV enfeksiyonları gibi bilinen klinik durumlarda kronik karaciğer hasarının ilk basamağı olan yağlı karaciğer oluşur. Serbest oksijen türevlerinin üretiminin artışı sırasında CYP2E1 ve CYP enzimlerinin uyarılması, zar lipid peroksidasyonu ve ATP harcanması, yağlı karaciğerden steatohepatite ve daha sonra fibrozis, siroz ve HCC'ya kadar ilerlemeyi başlatır¹⁰².

HCC dünyada en yaygın bulunan kanser türlerinden birisidir. HCC oluşumunda başlıca HCV ve HBV gibi enfeksiyonlar, siroz, çevresel faktörler ve metabolik hastalıklar rol alır⁴.

HCC için cerrahi müdahale standart tedavidir ve uzun süreli yaşam veya kür için ümit vadeden tek tercihtir. Birçok hasta cerrahi müdahale yapılmasının artık imkansızlaştığı zayıf karaciğer fonksiyonunun olduğu, bilobar hastalıkta veya ekstrahepatik metastazın olduğu evrede tespit edilebildiğinden dolayı çaresiz bir prognoz ile karşı karşıya gelir. Cerrahi müdahale edilebilecek hasta sayısı sadece %10-

20 arasındadır ve bu hastalardan %83'nde ise hastalığın 5 yıl içinde tekrarlaması gözlenmektedir^{103, 104}.

Bu çalışmamızda sıçanların günlük içme sularına son derişimi 100ppm olacak şekilde DEN ilave ederek deneysel HCC oluşturmak üzere bir ön çalışma gerçekleştirdik. Bu ön çalışmada 4. haftanın sonunda sakrifiye edilen sıçanlar karaciğer dokusunda portal alanlarda dağınık mononükleer iltihabi hücre infiltrasyonu, fibrozis ve parankimde rejenerasyon gözlendi (Şekil 4.2.). 10. haftanın sonunda ise portal-santral köprüleşmeler oluşturan fibröz doku proliferasyonun geliştiği, ayrıca portal alanlarda mononükleer iltihabi hücre infiltrasyonu ile parankimde tek hücre nekrozları, belirgin rejenerasyon bulguları kaydedildi. Karaciğer dokusunun normal yapısını kaybettiği ve fibröz bantlarla mikronodüllere ayrıldığı gözlendi (Şekil 4.3.; Şekil4.4.; Şekil 4.5.). 19. haftanın sonunda ise karaciğer dokusunda large-cell displazi alanlarına komşu geniş tümör odakları dikkati çekti. Tümörün oval-hiper kromik nükleuslu genişçe eozinefilik sitoplazmalı atipik hepatositlerden meydana geldiği görüldü (Şekil 4.6.).

Elde ettiğimiz bu sonuç sonrasında antimitotik ve mikrotübül oluşumunu inhibe edici bir ajan olan kolşisin ile HCC arasındaki ilişkiyi serbest radikal temizleyici bir madde olan GSH düzeyini, antioksidan sistemde yer alan GSH-Px, ve SOD enzim aktivitelerini¹⁰⁵ ve lipit peroksidasyonunun bir göstergesi olarak tanımlanan MDA miktarını¹⁰⁶ saptadık. Ayrıca karaciğer fonksiyonlarını takip etmek üzere ALT, AST, ALP enzimlerini ve total protein miktarını belirledik²².

Bu çalışmamızda eritrosit GSH miktarı, kontrol grubu ile çalışma grupları karşılaştırıldığında tüm gruplarda anlamlı istatistiksel farklılık gözlenmiştir. HCC oluşan (Grup III) ve DEN + kolşisin uygulanan denekler (Grup IV) arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Bu da kolşisinin HCC'da oluşan oksidatif hasar sonrası GSH'm tüketimini engellemediğini düşündürmektedir.

GSH miktarında kolşisin uygulanan deneklerde (Grup II) sınırda olmakla birlikte ($p=0,048$) diğer üç grupta bariz bir şekilde düşüş kaydedilmiştir. Hücrede başlıca redükte formunda bulunan endojen kaynaklı bir antioksidan olan GSH, özellikle hidroksil radikalının üretimini engeller ve ksenobiyotik detoksifikasyonunda görev alır. GSH düzeyinin düşmesi ortamda serbest radikallerin üretiminin artmasının ve oksidatif hasara karşı mücadele edilmesinin önemli bir göstergesidir⁹⁵. Eritrosit GSH düzeyindeki en farklı azalma Grup V' te ($2,05\pm0,66$) gözlenmiştir. HCC'de oksidatif

hasarın gözleendiği birçok çalışma da belirtilmiştir¹⁰⁷. Oluşan HCC üzerine kolşisin uygulanması GSH tüketimini arttırdığı düşünülmektedir. Wohabieb ve arkadaşları yaptıkları çalışma da benzer bir şekilde DEN ile beslenen sıçanlarda eritrosit GSH tüketimini ve H₂O₂ ile uyarılan MDA üretimi ile ilişkili GSH-Rd enzim aktivitesinin azalmasını saptamışlardır¹⁰⁸.

Hepatositler vücut havuzunun total GSH %10'nunu oluşturmaktadır¹⁰⁹. Karaciğer dokularında ki GSH ölçümleri, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ise kolşisin uygulanan grup hariç (p= 0,999) DEN uygulanan grupların hepsinde [Grup III (p=0,005); Grup IV (p=0,001); Grup V (p=0,002)] GSH düzeyi istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenmiştir. Scholz ve arkadaşları DEN uygulaması ile sıçan karaciğerlerinden preneoplastik nodüllerinde aktif oksijen türevlerinin oluşumunu kemiluminesans ile tespit etmiştir¹¹⁰. Muzio ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise GSH içeriğinin ve GST enzim aktivitesinin DEN ile beslenen sıçanlarda düştüğü saptanmıştır¹¹¹.

Bizim çalışmamıza benzer şekilde Das ve arkadaşları da 7 gün süresince gavaj ile 100 mg kolşisin / gün uygulamalarından sonra kontrol ile karşılaştırdıklarında GSH miktarında bir farklılık gözlememişlerdir¹¹². Buna karşı Kumar ve arkadaşları ise 21 gün intraserebroventriküler kolşisin uygulaması ile beyin dokularında GSH düzeyini anlamlı olarak azaldığını saptamışlardır¹¹³.

GSH-Px GSH'ı substrat olarak kullanarak vücutta oluşan peroksitleri özellikle de H₂O₂'in redüksiyonunu kataliz eder. Eritrositlerde ölçtüğümüz GSH-Px enzim aktivitesinde Grup I ve Grup II arasında (p=0,410) anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. HCC oluşan diğer üç grupta ise (Grup III, IV, V) kontrol ile karşılaştırıldığında anlamlı artış görülmektedir. En yüksek artış HCC oluşuktan sonra kolşisin uygulana grupta (Grup V) 831,2 ± 104,2'dir.

Karaciğer dokularında ölçülen GSH-Px ise kontrol grubu ile diğer gruplar karşılaştırıldığında kolşisin uygulanan denekler (Grup II) (p=0,533) ve DEN uygulanan denekler (Grup III) (p=0,991) arasında anlamlı bir farklılık gözlenmezken DEN uygulanan fibrozis ve HCC oluştuğu diğer iki grupta (Grup IV ve Grup V) anlamlı farklılık gözlenmiştir. HCC' da oksidatif hasarın arttığı bilinmektedir^{114,115}. Oksidatif hasarla karşılaştırıldığında⁵¹ vücudun ilk savunma mekanizmasından biri olan GSH-Px

enziminin, HCC oluşan deneklerde (Grup III) artmaması uyumlu bir sonuç değildir. Bu sonucun denek sayısının fazla olmamasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Bansal ve arkadaşları sıçan karaciğer mitokondrisinde artan miktarda DEN ilave ettikleri çalışmada 1µm DEN'e maruz bıraktıkları ortama kadar total GSH-Px enzim aktivitesinde bir artış gözlememişlerdir. 1µm DEN'dan daha yüksek konsantrasyonda ise DEN miktarı arttıkça GSH-Px enzim aktivitesi de artmıştır. Aynı çalışmada H₂O₂'in substrat olarak kullanıldığı Se-GSH-Px enzim aktivitesi ölçümünde ise total Se-GSH-Px' in tersine her konsantrasyonda Se-GSH-Px enzim aktivitesi azalmıştır ve bu azalma doza bağlı olarak gözlenmiştir. Se-GSH-Px enzim aktivitesi ölçümünde H₂O₂'in substrat olarak kullanılması Se-GSH-Px enzim aktivitesini baskıladığı düşünülmektedir¹¹⁶.

SOD enzim aktivitesi sadece kolşisin uygulanan denekler (Grup II) ile kontrol grubu arasında anlamlı bir farklılık göstermezken diğer tüm gruplarla (Grup III, IV, V) arasında anlamlı bir farklılık gözlenmektedir ve SOD enzim aktivitesinde artış olduğunu saptamışlardır. SOD enzimi OH üretimini engellemekte ve ayrıca antiproliferatif ajan olarak antikarsinogen ve karsinogenezin başlama, ilerleme ve transformasyon basamağında görev almaktadır¹¹⁷. SOD'nin fibrozis ve HCC oluşan gruplarda artmış olması bu özelliği ile ilişkili olabilir. Bansal ve arkadaşları sıçan karaciğer mitokondrisinde artan DEN konsantrasyonu ile birlikte SOD enzim aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlememişlerdir¹¹⁶.

Lipit hidroperoksitler ve hidroperoksitlerin yıkım ürünlerinden oluşan ürünler oksidatif hasarın ölçümünde çok önemlidir¹⁰⁶. Bu çalışmamızda lipit peroksidasyonunun son ürünlerinden biri olan MDA ölçümü yapılmıştır. Kontrol grubu (Grup I) ile karşılaştırıldığında kolşisin uygulananlar (Grup II) hariç diğer tüm gruplarda (Grup III, IV, V) lipit peroksidasyonunun bir göstergesi olarak MDA düzeyinde artış saptanmıştır. MDA karsinogenezden sorumlu olduğuna inanılan DNA "adduct" oluşumunda artmaktadır¹¹⁷. Bansal ve arkadaşları da sıçan karaciğer mitokondrisinde artan DEN konsantrasyonuna ve süreye bağımlı olarak lipit peroksidasyonunun arttığını gözlemişlerdir¹¹⁶. Hietanen'de DEN uygulaması ile lipit peroksidasyon ürünlerinde artış olacağını saptamıştır¹¹⁸.

Cedillo ve arkadaşları sıçanlarda CCl₄ ile oluşturdukları siroz modelinde, kolşisinin ve trimetilkolşisinik asitin lipit peroksidasyonu üzerine etkisini

araştırmışlardır. Her ikisi de CCl₄'ün etkisi ile artış gösteren MDA düzeyine önleyici bir etki göstermemiştir¹¹⁹. Das ve arkadaşlarının 7 gün süresince gavaj ile 100 mg kolşisin/gün uygulamalarından sonra kontrol ile karşılaştırdıklarında MDA düzeylerinde bir farklılık gözlenmemektedir¹¹². Kumar ve arkadaşları ise 21 gün intraserebroventriküler kolşisin uygulaması ile beyin dokularında MDA düzeyinde artış saptamışlardır¹¹³.

Buna çalışmalara karşı Rhoden ve arkadaşları CCl₄ ile oluşturdukları hepatik sirozda ise kolşisin uygulanan sıçanların sirotik karaciğer dokularında lipid peroksidasyonun azaldığı gözlenmiştir¹²⁰.

Karaciğer dokularının histopatolojik bulguları incelendiğinde Kontrol grup sıçanlardan (Grup I) elde edilen karaciğer doku örneklerinde normal yapının korunduğu, kolşisin uygulanan sıçanlardan (Grup II) elde edilen karaciğer doku örneklerinde portal alanlarda az sayıda mononükleer iltihap hücreleri görülmüş olup portal alan-lobül sınırının korunduğu, parankimde hepatositlerde hidropik dejenerasyon, nükleer vakuolizasyon, tüm dokuda yaygın konjesyon dışında patolojik bulgunun olmadığı görülmüştür. Grup III ve V' de ise sirotik zemin üzerinde karaciğer hücrelerinin yer yer displastik hal aldığı ve bu alanlara komşu bir odakta ya da birkaç odakta atipik hücrelerin olduğu tümöral yapı izlenmiştir. Kolşisin + DEN uygulanan sıçanlarda (Grup IV) Parankim hücrelerinde yaygın rejenerasyon bulguları, K₄ ve K₈ kayıtlı örneklerde largecell displazi bulguları ile K₅ ve K₈ nolu örneklerde malign neoplastik gelişim dikkati çekti. Tümör hücre sitoplazmalarında safra pigmenti saptandı. İmmünohistokimyasal yöntemle uygulanan alfa-feto protein ile tümörde pozitif boyanma görüldü. Bu grup içinde yer alan diğer 5 sıçandan (K1, K2, K3, K6 ve K7) sıçanlardan elde edilen karaciğer dokularında ise portal alanlarda fibrozis, mononükleer iltihabi hücre infiltrasyonu, parankimde belirgin kolestozis, yer yer safra gölcükleri nekrozları, asidofil cisimcikler, konjesyon, balonlaşma dejenerasyonu izlendi. Kolşisinin tümör oluşumunu önlediği düşünülmektedir.

Tümör invazyonu; tutunma, göç etme ve metastaz olmak üzere üç basamakta gerçekleşti¹²¹. Aslında tümör invazyonu tümör hücreleri ve ekstrasellüler matriks arasında kompleks ve incelikle gelişen, fizyolojik ve biyokimyasal etkileşimleri içeren dinamik yapışma işlemidir¹²².

Kolşisinin mikrotübül oluşumunu inhibe etme mekanizması, direkt tubüline bağlanması ve toplanma/toplanmama dengesinde işlemi toplanmama yönünde etki göstermesidir¹²³. Shao ve arkadaşları hepatosit ve HCC hücrelerinden oluşan ortamlara mikrotübül polimerizasyon inhibitörü olan kolşisin ilave etmişler ve daha sonra sonuçları kontrol grubuyla karşılaştırdıklarında HCC hücrelerinin yapışkanlık kuvvetlerinin azaldığı ve buna karşı hepatositlerin yapışkanlık kuvvetlerin de ise bir artış olduğunu gözlemişlerdir. Aynı zamanda morfolojik incelemeler göstermiştir ki kolşisin uygulamasından sonra her iki hücrede de yuvarlak büyük şekiller oluşmuştur¹²². İnsan karaciğerinde mikrotübül oluşumunun engellenmesi ile poligonal formdan iç veya yuvarlak olmak üzere hücre morfolojisinde değişim gözlenmektedir¹²³. Bu sonuç kolşisinin HCC oluşumunu engelleyici yönde olduğunu fakat normal karaciğer hücrelerin de ise yapışmaya neden olduğunu göstermektedir.

Bu çalışmamızda Grup IV'te (Kolşisin +DEN) K4, K5, K8 No'lu örnekler hariç diğer örneklerde tümör oluşumunu fibrozis, siroz aşamasında kalmıştır.

Siroz HCC'nin en önemli sebeplerinden biridir ve Avrupa ve Asya'da yıllık gelişim hızı %1-6 arasındadır³. Kolşisin siroz için yararlı olduğu pek çok çalışmada belirtilmiştir^{124,125,126,127}. Poo ve arkadaşları kolşisinin kronik olarak sıçanlarda safra kanal bağlanması uygulandığında hepatik fibrozisi ve portal hipertansiyonu önlediğini saptamışlardır¹²⁸.

Primer biliyer siroz; fibrozis, siroz, karaciğer yetmezliği ve ölümü takip eden kronik kolestatik hastalıktır. Aboutwerat histolojik olarak primer biliyer sirozun kanıtlandığı hastalarda yaptıkları çalışmada lipit peroksidasyon markerlarından plazma ve idrarda 8-izoprostan, plazma MDA düzeylerinin kontrol ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak yükseldiğini gözlemişlerdir. Bu çalışmada en çarpıcı sonuç ise primer biliyer sirozlu hastalarda saptanan plazma total GSH miktarındaki azalmadır. Ayrıca serum antioksidan düzeyinde, serum Se ve A vitamini düzeyindeki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bu sonuçlar çerçevesinde oksidatif stresin ölçümünün primer biliyer sirozun erken evrelerinde önemli olabileceği savunulmaktadır¹²⁹.

Kolşisinin uygulanan sıçanlar (GrupII) kontrol Grubu ile karşılaştırıldığında sadece eritrosit GSH miktarında ($p=0,048$) ki bu sonuçta sınırda olmak üzere anlamlı istatistiksel farklılık gözlenmiştir. Eritrosit ve karaciğer GSH-Px enzim aktivitesinde sırası ile ($p=0,410$), ($p=0,533$); karaciğer GSH miktarında ($p=0,999$); SOD enzim

aktivitesinde (p=1.000); MDA düzeyinde (p=0.618) ve karaciğer fonksiyon testlerinde ALT (p=1,000); AST (p=0,998); ALP (p=0,996) ve total protein (p=0,995) değerlerinde anlamlı istatistiksel farklılık gözlenmemiştir. Bu sonuç kolşisinin karaciğerde lipid peroksidasyonuna sebep olmadığını ve karaciğer hasarı oluşturmadığını fakat bu arada da ne yazık ki antioksidan mekanizmayı olumlu yönde uyarıcı bir özelliğinin olmadığını düşündürmektedir.

Kolşisinin tedavi amaçlı kullanıldığı hastalıkların birçoğunda nötrofil fonksiyonlarında artış ve reaktif oksijen türevlerinin aşırı üretiminin olduğu belirtilmiştir. Bu hastalıklarda kolşisinin antioksidan özeliği araştırılmıştır^{15,16,17}.

Matsumoto ve arkadaşları kronik piyelonefritin son aşaması olarak kabul edilen renal skarların tedavisinde kolşisin ve SOD uygulaması ile skar oluşumunu engellemişlerdir. Renal skar oluşumunun mekanizması tam olarak bilinmemekle beraber bakteriyel ve/veya inflamatuvar işlemlerin önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Bille ve Glauser böbrek infeksiyonunu takiben oluşan renal hasarın bakterilerin gelişiminden çok O_2^- , 1O_2 ve $\cdot OH$ gibi birçok aktif madde salgılayan polimorfolökosilerden dolayı olduğunu savunmaktadırlar. Kolşisinin lökosit göçünü inhibe ederek bu etkiyi sağladığı düşünülmektedir^{130,131}.

Behçet Hastalığında kemotaksi, fagositoz ve O_2^- üretiminde artış gibi polimorfonükleer hücrelerin farklı fonksiyonlarında artış gözlenmektedir. Behçet Hastalığının etiyolojik mekanizması hala tam olarak bilinmemesine rağmen, Behçet Hastalığında gözlenen bu etkilerin oksidatif doku hasarı ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Behçet Hastalığının aktif dönemi in aktif döneme karşılaştırıldığında MDA düzeyinin önemli derecede arttığı gözlenmiştir^{45,132,133}.

Proni ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarda, polimorfonükleer hücrelerin süper oksit radikal yakalama aktivitesinin Behçet Hastalığı olan kişilerde düşük olduğunu bulmuşlardır. Bu kişilere kolşisin uygulanması ile polimorfonükleer hücrelerin süper oksit radikal yakalama aktivitelerinin normal düzeye çıkması sağlanmıştır¹³⁴.

Köse ve arkadaşları ise Behçet Hastalığı olan kişiler ile kontrol grubunu karşılaştırdıklarında, plazma ve eritrositlerde C-reaktif proteinde, eritrosit sedimantasyonunda, MDA düzeyinde ve eritrosit SOD enzimin aktivitesinde artma ancak GSH-Px enzim aktivitesinde azalma gözlemişlerdir⁴⁵.

Kolşisinin kullanıldığı O_2^- üretiminin arttığı hastalıklardan bir diğeri ise FMF'tir. FMF'li hastaların kan kültüründe klastojenik faktörler ve kromozal hatalar gözlenmektedir¹⁷.

Kolşisinin yanı sıra kolşisinin metabolitlerinin de antioksidan özelliği araştırılmıştır. İnsanda oluşmamasına rağmen kolşisein olarak adlandırılan 10-demetilkolşisin rodentlerde CYP homologları ile metabolize olmakta ve kronik ve akut CCl_4 ile karaciğer hasarı oluşturulan sıçanlarda bu hasarı önlediği saptanmıştır. Muriel ve Suarez'in E Vitamini ile karşılaştırmalı olarak yaptıkları çalışmada kolşiseinin lipid peroksidasyonunu önlediği saptanmıştır¹³⁵. Kolşiseinin yüksek konsantrasyonlarda atmosferik oksijene karşı GSH'ın koruduğu ve esansiyel sülfidril grubu bulunan enzimlerin oksijen ile indüklenen inaktivasyonlarını önlediği gözlenmiştir¹³⁶. Kolşisein kolşisinden daha iyi antifibrotik etkiye sahiptir¹³⁷.

İnsanda kolşisin CYP3A4 ile 2-demetilkolşisine ve 3-demetilkolşisine metabolize olur. Modriansky ve arkadaşlarının 2-demetilkolşisinin, 3-demetilkolşisinin ve kolşiseinin zincir kırıcı antioksidan özelliğini araştırmışlardır. Araştırmalarının sonucunda daha önce yapılan çalışmaların tersine zincir kırıcı antioksidan özelliğinin olmadığını ve aynı zamanda kolşisin metabolitlerinin de GSH oksidasyonuna karşı koruyucu etkisinin olmadığını gözlemişlerdir¹³⁶.

Aminotransferazlar; ALT ve AST normal şartlarda hücre içi enzimlerdir. Plazmada yüksek aminotransferaz düzeyleri, bu enzimlerin fazlaca buldukları hücrelerin hasara uğradığının bir göstergesidir. Plazma AST ve ALT düzeyleri yaklaşık tüm karaciğer hastalıklarında yükselir. ALT karaciğer hastalıklarında AST'ye göre daha özgündür¹³⁸.

Bu çalışmamızda ALT enzim düzeyleri kontrol grubu (Grup I) ile karşılaştırıldığında Grup II ($p = 1,000$) ve Grup III ($p = 0,324$) arasında anlamlı istatistiksel fark gözlenmezken Grup IV ($p = 0,002$) ve Grup V ($p = 0,001$) arasında anlamlı istatistiksel fark bulunmuştur. ALT enziminin karaciğer hasarında arttığını ve bu gruptaki sıçanlar da ise HCC oluştuğunu göz önüne alırsak bu uyumlu bir sonuç değildir. Grup III'e ait ALT enzim düzeylerinin ortalaması ($188,8 \pm 97,1$) kontrol grubunun ($57,7 \pm 14,5$) yaklaşık 4 katı olmasına karşı istatistiksel anlamlı fark gözlenmemesinin nedeni SD'nin oldukça yüksek olmasından kaynaklanmaktadır. SD değerinin bu kadar yüksek olması ise örnek sayısının yetersiz olması ile ilişkilidir.

AST enzim ve total protein düzeylerinde de benzer bir şekilde istatistiksel anlamlı sonuç kaydedilmemiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldıklarında her üç grupta SD değerleri oldukça yüksektir.

ALP membrana bağlı glikoprotein yapısında bir enzimdir ve obstrüktif hastalıklarda yükselir¹³⁸. Bu çalışmamızda ALP enzim düzeyleri ile kontrol grubu (Grup I) karşılaştırıldığında Grup II (p =1,000) hariç diğer üç grup ile Grup III (p =0,001); Grup III (p =0,001); Grup III (p =0,001) arasında istatistiksel anlamlı fark tespit edilmiştir.

Rhoden ve arkadaşları sıçanlarda CCl₄ ile oluşturdukları siroz modelinde; kolşisin uygulanan sıçanlarda kolşisin etkisi ile ALT, AST, ALP enzim düzeylerinin ve total protein değerinin yükseldiğini saptamışlardır¹²⁰.

Kaplan ve arkadaşları ise primer biliyer siroz olduğu histopatolojik olarak tespit edilmiş hastalara 2 yıl süresince kolşisin uygulaması başlatmışlar. 2 yıl süresince takip edilen hastalarda AST, ALT ve ALP enzim düzeylerinde ve bilirubin değerlerin de artış saptamışlardır¹³⁹.

DAS ve arkadaşları sıçanlarda CCl₄ ile oluşturdukları siroz modelinde ise tek doz CCl₄ uygulaması ile ALT, AST, ALP değerlerinin arttığını ve kolşisin ise bu artışa engel olmadığını gözlemişlerdir¹¹².

6. SONUÇLAR

1. Kolşisinin Antioksidan özeliğe sahip değildir.
2. HCC oluşan deneklerde oksidatif stress göstergesi olan parametrelerde artış gözlenirken, buna karşı antioksidan sistem savunmasında yer alan enzim ve maddelerde bir azalma saptanmıştır.
3. Kolşisin HCC oluşumunu engellemektedir fakat bu mekanizma antioksidan sistem üzerinden değildir.

ÖNERİLER

1. DEN ile oluşturulan deneysel HCC modeli ile daha farklı çalışmalar gerçekleştirilebilir.
2. Aynı çalışma kolşisinin farklı analogları kullanılarak tekrarlanabilir.

7. KAYNAKLAR

1. **Venook AP.** Key research issues in the management of hepatocellular carcinoma. *American Society of Clinical Oncology 2002 Educational Book Thirty-Eighth Annual Meeting*, 2002; 321-325.
2. **Seeff LB:** Natural history of hepatitis C. *Am J Med* 1999;107: 10S-15S
3. **Chalasan N, Said A, Ness R, Hoen H, Lumeng L.** Screening for hepatocellular carcinoma in patients with advanced cirrhosis in United States: Results of a National Survey. *Am J Gastroenterol*, 1999; 94: 2224-2229.
4. **Devita VT, Hellman S, Rosenberg SA.** Carcer, Principles and parctige of Oncology. 6th ed., Lippincott Williams and Wilking A Wolters Kluwer Company 2001; 52 Treatment of metastik cancer section 3: 1162-1187.
5. **Kirsch M, Groot DH.** NAD(P)H, a directly operating antioxidant?. *Faseb J*, 2001; 15:1569-1574.
6. **Slater J.** Free -radical mechanisms in tissue injury . *Biochem J* , 1984;222 :1-15
7. **Haslam E.** Natural Polphenols (Vegetable Tannins) as Drugs: Possible Modes of Action. *J.Nat. Prod.* 1996; 59: 205-215.
8. **Cragg GM, Newman DJ, Snader KM.** Natural Products in Drug Discovery and Development. *J.Nat. Prod.* 1997; 60: 52-60.
9. **Lidar M, Scherrmann JM, Shinar Y, Chetrit A, Niel E, Gershoni-Baruch R, Langevitz P, Livneh A.** Colchicine Nonresponsiveness in Familial Mediterranean Fever: Clinical, Genetic, Pharmacokinetic, and Socioeconomic Characterization. *Semin Arthritis Rheum*, 2004; 33: 273-282.
10. **Rambaldi A, Gluud C.** Colchicine for alcoholic and non-alcoholic liver fibrosis and cirrhosis. *Cochrane Database Of Systematic Reviews (Online: update Software)*, 2001; 3: CD002148.
11. **Kaklamani VG, Kaklamanis PG.** Treatment of Behçet's Disease-An Update. *Semin Arthritis Rheum*, 2001; 30: 299-312.
12. **TP Sullivan, MD, Lloyd E, JR, MD, King, PhD, Boyd AS, MD.** Colchicine in dermatology. *J Am Acad Dermatol*, 10998;39: 993-999.
13. **Mons S, Veretout F, Carlier MF, Erk I, Lepault J, Trudel E, Salesse C, Ducray P, Mioskowski C, Lebeau L.** The interaction between lipid derivatives of colchicine and tubulin: Consequences of the interaction of the alkaloid with lipid membranes. *Biocht Biophys Acta*, 2000; 1468:381-395.
14. **Suvroma G, Bhabatarak B.** Antimicrotubular drugs binding to vinca domain of tubulin. *Mol Cell Biochem*, 2003; 253: 41-47.
15. **Örem A, Çimsit G, Değer O, Vanizor B, Karahan SC.** Autoantibodies against Oxidatively Modified Low-Density Lipoprotein in Patients with Behçet's Disease. *Dermatology*, 1999; 198: 243-246.
16. **Kiraz S, Ertenli I, Çalgüneri M, Öztürk MA, Haznedaroğlu IC, Altun B, Erman M, Çelik I.** Interactions of nitric oxide and superoxide dismutase in Behçet's disease. *Clin Exp Rheumatol*, 2001; 19: 25-29.
17. **Sarkisian T, Emerit I, Arutyunyan R, Levy A, Cernjavsla L, Filipe P.** Familial mediterranean fever: clastogenic plasma factors correlated with increased O₂-production by neutrophils. *Hum Genet*, 1997; 101: 238-242.

18. **Ni Y, Marchal F, Damme B, Hecke P, Michiels J, Zhang X, Yu J, Baert AL.** Magnetic Resonance Imaging, Microangiography, and Histology in a Rat Model of Primary Liver Cancer. *Invest Radiol*, 1992; 27: 689-697.
19. **Sies H.** Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic Biol Med*, 1999;27: 916-921.
20. **Burk RF.** Protection against free radical injury by selenoenzymes. *Pharmacol Ther*, 1990; 45:383-385.
21. **Rotstein O.** Oxidants and antioxidant therapy. *Cirt Care Med*, 2001; 17: 239-247.
22. **Wallach J.** Interpretation of Diagnostic Tests . 4thed. Litle Brown Compony Boston. 1996; 57, 63, 249, 656,
23. **Coakley FV, Schwartz LH.** Imaging of Hepatocellular Carcinoma: A Practical Approach. *Semin Onco*, 2001: 28: 460-473.
24. **Little SA, Fong Y.** Hepatocellular Carcinoma: Current Surgical Management. *Semin Oncol*, 2001: 28:474-786.
25. **Aguayo A, Patt YZ.** Nonsurgical Treatment of Hepatocellular Carcinoma. *Semin Oncol*,, 2001: 28:503-513.
26. **Monto A, Wright TL.** The Epidemiology and Prevention of Hepatocellular Carcinoma. *Semin Oncol*, 2001: 28:441-449.
27. **Gelatti U, Donato F, Tagger A, Fantoni C, Portolani N, Ribero ML, Martelli C, Trevisi P, Covolo L, Simonati C, Nardi G.** Etiology of Hepatocellular Carcinoma Influences Clinical and Pathologic Features but Not Patient Survival. *Am J Gastroentreology*, 2003; 98: 907-914.
28. **Bruix J, Llovet JM.** Is there an optimal locoregional therapy for hepatocellular carcinoma? . *American Society of Clinical Oncology 2002 Educational Book Thirty-Eighth Annual Meeting*, 2002; 316-320.
29. **Bergsland EK.** Molecular Mechanisms Underlying the Development of Hepatocellular Carcinoma. *Semin Oncol*, 2001: 28:521-531.
30. **Ben-Chetrit E, Levy M.** Colchicine: 1998 Update. *Semin Arthritis Rheum*, 1998;28:48-59.
31. **Levy M, M.D., M. Sc., Spino M, Pharm.D, Stanley E, Read, M.D., Ph.D.** Colchicine: A State-of-the-Art Review. *Pharmacotherapy*, 1991; 196-211.
32. **Tanker N.** Farmakoknozi. Ankara Üniversitesi Yayınları, 1985; 28-31.
33. **Guan J, Zhu XK, Tachibana Y, Bastow KF, Brossi A, Hamel E, Lee KH.** Antitumor Agents. Part 186: *Synthesis and Biological Evaluation of Demethylcolchiceinamide Analogues as Cytotoxic DNA Topoisomerase II Inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*, 1998; 6: 2127-2131.
34. **Ulrichova J, Walterova D, Lukic V, Cernochova D, Chromcova I, Simanek V.** Biochemical Evaluation of Colchicine and Related Analogs. *Planta med* 1992;59: 144-147.
35. **Andreu JM, Timasheff SN.** Interaction of tubulin with single ring analog of colchicine . *Biochemistry*, 1982, 21: 534-543
36. **Ludueno RF, Roach MC.** Tubulin sulfhydryl groups as probes and targets for antimitotic and antimicrotubule agents. *Pharmacol Ther*, 1991; 133-152.
37. **Kuo-Hsiung Lee.** Novel Antitumor Agents from Higer Plants. *Natural Products Laboratory, Division of Medicinal Chemistry and Natural Products, School of Pharmacy, University of North Carolina, Chapel Hill, North Carolina*, 1999; 569-596.

38. **Kershenobich D, Rojkind M, Quriroga A, Alcocer-Vareza J.** Effect of colchicine on lymphocytes and monocytes function and its relation to fibroblast proliferation in primary cirrhosis. *Hepatology*, 1990; 11: 205-209
39. **Kaplan MM, Alling DW, Zieeerman HJ, Sepersky R, Hirsch GS, Elta GH.** A prospective trial of colchicine for primary biliary cirrhosis. *N Engl J Med*, 1986; 315: 14448-144454.
40. **Warnes TW, Smith A, Lee FI, Haboubi NY, Johnson PJ, Hunt L.** A controlled trial of colchicine in primary biliary cirrhosis. Trial design and preliminary report. *J Hepatol*, 1987; 5: 1-7.
41. **Kaplan MM, Delellis RA, Wolfe HJ.** Sustained biochemical and histologic remission of primary biliary cirrhosis in response to medical treatment. *Ann Intern Med*, 1997; 126: 682-688.
42. **Güven AG, Bahat E, Akman S, Artan R, Erol M.** Late diagnosis of severe colchicine intoxication. *Pediatrics*, 2002; 4: 347-356.
43. **Molad Y.** Update on colchicine and its mechanism of action. *Curr Rheum Rep*, 2002; 4: 252-256.
44. **Söğüt S, Aydın E, Elyas H, Aksoy N, Özyurt H, Totan Y, Akyol Ö.** The activities of serum adenosine deaminase and xanthine oxidase enzymes in Behçet's disease. *Clin Chim Acta*, 2002; 325:133-138.
45. **Köse K, Yazıcı C, Çambay N, Aşçıoğlu Ö, Doğan P.** Lipid Peroxidation and Erythrocyte Antioxidant Enzymes in Patients with Behçet's Disease. *Thoku J. Exp. Med.* 2002; 197: 9-16.
46. **Monu JUV, Pope TL.** Gout: a clinical and radiologic review. *Radiol Clin North Am*, 2004; 42: 169-184.
47. **El-sakka AI, Bakircioğlu ME, Bhatnagar RS, Yen TSB, Dahiya R, Lue TF.** The effects of colchicine on a peyronie's-like condition in an animal model. *J Urol*, 1999; 161.
48. **Tateishi T, Soucek P, Caraco Y, Guengerich FP, Wood AJJ.** Colchicine biotransformation by human liver microsomes. *Biochem Pharmacol*, 1997; 53:111-116.
49. **Buettner GR, Schafer FQ.** Free radicals, Oxidants, and Antioxidants. *Teratoloji*, 2000; 62:234
50. **Halliwell B, Gutteridge JMC.** Oxygen toxicity, oxygenradicals, transition metals and disease. *Biochem J*, 1984; 219: 1-14
51. **Nordberg J, Arner ESJ.** Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Bio Med*, 2001; 31: 1287-1312.
52. **Uysal M.** Serbest radikaller, lipid peroksidleri ve organizmada prooksidan, antioksidan dengelyi etkileyen koşullar. *Klinik gelişim*, 1998; 11: 336-341.
53. **Word RJ, Peters TJ.** Free Radicals. Kaplan LA, Pesce AJ editors. *Clinical Chemistry*. 3rdEd. Mosby Year Book, Inc. 1996; 765-777.
54. **Clarkson PM, Thompson HS.** Antioxidants: What role do they play in physical activity and health?. *Am J Clin Nutr*, 2000; 72: 637S-46S.
55. **Young IS, Woodside JV.** Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathology*, 2001; 176-186.
56. **Dreher D, Junod AF.** Role of Oxygen Free Radicals in Cancer Development. *Eur J Cancer*, 1996; A 32: 30-38.
57. **Cepinskas G, Rui T, Kvietytys PR.** Interection between reactive oxygen metabolites and nitric oxide in oxidant tolerance. *Free Radic Biol Med*, 2002; 33: 433-440.

58. Lindsay DG, Astley SB. European research on the functional effects of dietary antioxidants-EUROFEDA. *Mol Aspects Med*, 2002; 1-38.
59. Chandra J, Samali A, Orrentus S. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radic Biol. Med*, 2000; 29: 323-333
60. Betteridge DJ. What is oxidative stress?. *Metabolism*, 2000; 49: 3-8.
61. Cuzzocrea S, Riley DP, Caputi AP, Salvemini D. Antioxidant Therapy: A New Pharmacological Approach in Shock, Inflammation, and Ischemia/Reperfusion Injury. *Pharmacol Rev.*, 2001; 135-159.
62. Cheng FC, Jen JF, Tsai TH. Hydroxyl radical in living systems and its separation methods. *J Chromatogr B*, 2002; 21: 135-154.
63. Lachance PA, Nakat Z, Jeong WS. Antioxidants: An integrative approach. *Nutrion*, 2001; 17: 835-839.
64. McCall MR, Frei B. Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans? *Free Radic. Biol. Med.*, 1999; 26: 1034-1053.
65. Thomas MJ. The role of free radicals and antioxidants: how do we know that they are working?. *Critical Reviews in Food Sci. Nutrition*, 1995; 21-39.
66. Mates JM, Sanchez-Jimenez FM. Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy. *International J Biochem Cell Biol*, 2000; 32:157-170.
67. Ashok BT, Rashid A. The aging paradox: free radical theory of aging. *Exp Gerontol*, 1999; 293-303.
68. Zarkovic N. 4-Hydroxynonenal as a bioactive marker of pathophysiological processes. *Mol Aspects Med*, 2003; 24: 281-291.
69. Grune T, Davies KJA. The proteasomal system and HNE-modified proteins. *Mol Aspects Med*, 2003; 24: 195-204.
70. Zwart LL, Meerman JHN, Commandeur JNM, Vermeulen NPE. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free Radic Bio Med*, 1999; 26: 202-226
71. Chatgililoglu C, O'Neill P. Free radicals associated with DNA damage. *Exp Gerontol*, 2001; 1459-1471
72. Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human diseases: curiosity, cause, or consequence? *Lancet* 1994; 344: 721-724.
73. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free Radicals and Antioxidant Protection: Mechanism and Significance in Toxicology and Disease. *Human Toxicol*, 1988;7:7-13.
74. Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutates. *Annu Rev Biochem*, 1995; 64: 97-112.
75. Yim MB, Chok PB. Copper,zinc superoxide dismutases hydroxyl radical production from hydrogen peroxide. *Proc Natl Acad Sci*, 1990;87: 5006-5010.
76. Fattman CL, Schabber LM, Oury TD. Extracellular superoxide dismutase in biology and Medicine. *Free Radic BiolMed*, 2003; 35: 236-256
77. Brigelius-Flohe R. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic. Biol. Med.*, 1999; 27: 951-965.
78. Arthur JR. The glutathione peroxidases. *Cell. Mol. Life Sci*, 2000; 57: 1825-1835.

79. **Forsberg L, Faire U, Morgenstern R.** Oxidative stress, genetic variation and disease. *Arch Biochem Biophys*, 2001; 389: 84-93
80. **Agar NS, Sadradeh SMH, Eaton JW.** Erythrocyte catalase: A somatic oxidant defence? *J Clin Invest*, 1986; 77:319-321.
81. **Schafer FQ, Buettner RG.** Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the redox state of the glutathione disulfide / glutathione couple. *Free Radic Biol Med*, 2001; 1191-1212.
82. **Kura T, Takahashi Y, Takayama T, Ban N, Saito T, Kuga T, Niitsu Y.** Glutathione S-transferase- π is secreted as a monomer into human plasma by platelets and tumor cells. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1292: 317-323.
83. **Yalçın AS.** Antioksidanlar. *Klinik Gelişim*. 1998;11:342-346
84. **Ripple M, Mulcahy TR, Wilding G.** Characteristics of the glutathione / glutathione-s-transferase detoxification system in melphalan resistant human prostate cancer cells. *J Urol*, 1993; 209-214.
85. **Acharya J, Punchard NA, Taylor JA.** Red cell lipid peroxidation and antioxidant enzymes in iron deficiency. *Eur J Haematol*, 1991;47:287-291.
86. **Jacob RA, Burri BJ.** Oxidative damage and defense. *Am J Clin Nutr*, 1996;63:985-990
87. **Machlin LJ, Bendich A.** Free radical tissue damage: protective roles of oxidant nutrients. *Faseb J* 1987; 1: 441-445.
88. **Xia L, Björntedt M, Nordman T, Eriksson LC, Olsson, JM.** Reduction of ubiquinone by lipoamide dehydrogenase. An antioxidant regenerating pathway. *Eur J Biochem*, 2001;268:1486-1490
89. **Hertog MGL, Hollman PCH, Putte B.** Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wines and fruits juices. *J Agric Food Chem*, 1993;41: 1242-1246.
90. **May JM.** Is ascorbic acid an antioxidant for the plasma membrane?. *FASEB J*, 1999; 9:995-1006
91. **Frei B, Stocker R, England L, Ames BN.** Ascorbate: the most effective antioxidant in human blood plasma. *Av Exp Med Biol* 1990 264: 155-163.
92. **Buettner GR.** The pecking order of free radicals and ascorbate. *Ach Biochem Biophys*, 1993; 300: 535-543.
93. **Sies H, Stahl W, Sundquist AR.** Antioxidant function of vitamins. Vitamin E and C, beta-carotene and other carotenoids. *Ann N Y Acad Sci* , 1992;669: 7-20.
94. **Chopra M Thurnham DI.** Antioxidants and lipoprotein metabolism. *Proc Nutr Soc* 1992; 58: 663-671.
95. **Sastre J Pallarido FV, Vina J.** Glutathione oxidative stress and aging. 1996; *Age*, 19: 129-139.
96. **Beutler E:** Red Cell Metabolism. 2nd Ed. Grune & Stratton. New York. 1975: 74-76, 131-132
97. **White WL, Erickson MM, Stevens SC.** Chemistry for the clinical laboratory. CV Mosby Comp. St Louis. 1976:125-126.

98. **Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K.** Assay for Lipid Peroxides in Animal Tissues by Thiobarbituric Acid Reaction. *Anal Biochem*, 1979; 351-358.
99. **Mc Cord JM, Fridovich I:** Superoxide dismutase An enzymatic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem*, 1969;244:6049-6055.
100. **Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall JR.** Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 1961; 193: 265-275.
101. **Halliwell B.** Oxidants and human disease :some new concepts. *FASEB J*, 1987; 1: 358.
102. **Logurrcio C, Federico A.** Oxidative Stress in Viral and Alcoholic Hepatitis. *Free Radic Bio. Med* 2003; 34: 1-10.
103. **Johnson PJ.** Is there a role for systemic therapy in hepatocellular carcinoma, and if so, Can we assess response?. *American Society of Clinical Oncology 2002 Educational Book Thirty-Eighth Annual Meeting*, 2002; 310-315.
104. **Leung TWT, Johnson PJ.** Systemic Therapy for Hepatocellular Carcinoma. *Seminars in Oncology*, 2001: 28:514-520.
105. **Miller DR, Baehner RL:** Blood disease of infancy and childhood. Sixth ed. The C.V. Mosby Company .St.Louis. 1990:184,192, 295-304, 306-310;326-335.
106. **Halliwell B, Chirico S.** Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am.J. Clin. Nutr.*, 1993; 57: 715-725.
107. **Jakus V, Lopuchova M.** Role of free radicals, oxidative stress and antioxidant systems in liver diseases. *Buratisl. Lek. Listy*, 1999; 100: 548-559.
108. **Wohabieb SA, Godin DV.** Starvation-related alteration in free radical tissue defense mechanism in rat. *Diabetes*, 36:169-173
109. **Logurrcio C, Di Kpiero M.** The role of glutathione in the gastrointestinal tract: a review. *Ital. J. Gastroenterol. Hepatol.* 1999; 31: 401-407.
110. **Scholz W, Schütze K, Kunz W, Schwarz M.** Phenobarbital enhances the formation of reactive oxygen in neoplastic rat liver nodules. *Cancer Res.* 1990;50: 7015-7022.
111. **Muzio G, Marengo B, Salvo R, Semeraro A, Canuto RA, Tessitore L.** Liver cancer is induced by a subnecrogenic dose of dexamethasone when associated with fasting/refeeding: role of glutathione-transferase and lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med.*, 1999; 26: 1314-1320
112. **Das D, Pemberton PW, Burrows PC, Gordon C, Smith A, McMahon RFT, Warnes TW.** Antioxidant properties of colchicine in acute carbon tetrachloride induced rat liver injury and its role in the resolution of established cirrhosis. *Biochim Biophys Acta*, 2000;1502: 351-362.
113. **Kumar VMH, Gupta YK.** Intracerebroventricular administration of colchicine produces cognitive impairment associated with oxidative stress in rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 2002; 73: 565-571.
114. **Yamamoto Y, Yamashita S, Fujisawa A.** Oxidative Stress in Patients with Hepatitis, Cirrhosis, and Hepatoma Evaluated by Plasma Antioxidants. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 247:166-170.

115. **Dahlhaus M, Appel KE.** N-Nitrosodimethylamine, N-nitrosodiethylamine, and N-nitrosomorpholine fail to generate 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in liver DNA of male F344rats. *Mutat Res.*, 1993; 285: 295-302.
116. **Bansal AK, Bhatnagar D, Soni GL.** Effect of N-Nitrosodiethylamine on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in rat liver mitochondria: Protective role of antioxidants. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 1997; 59:254-260.
117. **Gibanananda R, Husain SA.** Oxidants, antioxidants and carcinogenesis. *Indian Journal Of Experimental Biology* 2002; 40: 1213-1232.
118. **Hietanen E, Ahotupa M, Bartsch H, Bereziat JC, Bussacchini V, Camus AM, Wild H.** Lipid peroxidation and chemically-induced cancer in rats fed lipid rich diet. In: K. Lapis and S. Eckhardt (eds). *Carcinogenesis and Tumour Progression. Budapest: Akadeial Kiad*, 1987; 4: 9-16.
119. **Cedillo A, Mourelle M, Muriel P.** Effect of Colchicine and Trimethylcolchicinic Acid on CCl₄-Induced Cirrhosis in the Rat. *Pharmacol Toxicol* 1996; 79: 241-246.
120. **Rhoden EL, Mauri M, Petteffi L, Bello-Klein A, Zettler CG, Rhoden CR.** Protective effect of colchicine on tissue damage caused by free radicals in hepatic cirrhosis: an experimental study in rats. *Gastroenterologia*, 1997; 34: 91-96.
121. **Liotta LA, Rao CN, Barsky SII.** Tumor invasion and extracellular matrix. *Lab. Invest*, 1983; 49: 636.
122. **Shao KF, Wu ZZ, Wang BC, Long M, Cai SX.** Effects of colchicine and cytochalasin D on the adhesion properties of the HCC onto the collagen IV/laminin coated surface. *Colloids Surf B: Biointerfacs*, 2000; 19: 55-59.
123. **Liu YH, Su B, Pei RJ, Yeh CC, Yeh KT, Lee KY, Hsu YH, Ho CC, Lai LS.** The stability of cytokeratin 18 in human liver cells during colchicine-induced microtubule disruption. *Food Chem Toxicol*, 2001; 39: 85-89.
124. **Kaplan MM.** Medical treatment of primary biliary cirrhosis. *Semin Liver Dis*, 1989; 9: 229-237.
125. **Kaplan MM.** Serum alkaline phosphatase-another piece is added to the puzzle. *Hepatology*, 1986; 6: 226-228.
126. **Kershenobich D, Uribe M, Suarez GI, Mata JM, Pereztamayo R, Rojkind M.** Treatment of cirrhosis with colchicine: a double-blind randomized trial. *Gastroenterology*, 1979; 77: 532-536.
127. **Kershenobich DF, Vargas F, Garcia-Tsao G, Perez-Tamayo R, Gent M, Rojkind M.** Colchicine in treatment of cirrhosis of the liver. *N Engl J Med*, 1988; 318: 1709-1713.
128. **Poo JL, Moreau A, Gaudin C, Lebrec D.** Early colchicine administration reduces hepatic fibrosis and portal hypertension in rats with bile duct ligation. *J Hepatology*, 1993; 90-94.
129. **Aboutwerat A, Pemberto PW, Smith A, Burrows PC, McMahon RFT, Jain SK, Warnes TW, Matsumoto T, Mizunoe Y, Ogata N, Tanaka M, Kumazawa J.** Oxidant stress is significant feature of primary cirrhosis. *Biochim Biophys Acta*, 2003; 142-150.
130. **Matsumoto, Y Mizunoe, N Sakamoto, J Kumazowa.** Suitability of Colchicine and Superoxide Dismutase for the Suppression of Renal Scarring following an Infection with Bacteria Showing Mannose-Sensitive Pili. *Nephron*, 1990; 130-135.
131. **Matsumoto T, Mizunoe Y, Ogata N, Tanaka M, Kumazawa J.** Role of superoxide in renal scarring following infection by mannose-sensitive pilated bacteria. *Urol Res*, 1991; 229-233.

132. Doğan P, Tanrikulu G, Soyuer Ü, Köse K. Oxidative Enzymes of Polymorphonuclear Leucocytes and Plasma Fibrinogen, Ceruloplasmin, and Copper Levels in Behçet's Disease. *Clin Biochem* 1994; 27: 413-418.
133. Köse K, Yazıcı C, Aşcıoğlu Ö. The evaluation of lipid peroxidation and adenosine deaminase activity in patients with Behçet's disease. *Clin Biochem*, 2001; 125-129.
134. Pronai L, Ichikawa Y, Nakazawa H, Arimori S. Enhanced superoxide generation and the decreased superoxide scavenging activity of peripheral blood leukocytes in Behçet's disease-effects of colchicine. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 1991; 227-233.
135. Muriel P, Quintanar ME, Perez-Alvarez V. Effect of colchicine on acetaminophen-induced liver damage. *Liver*, 1993; 13: 217-221.
136. Modriansky M, Tyurina Y, Tyurin VA, Matsura T, Shvedova AA, Yalowich JC. Anti-/pro-oxidant effects of phenolic compounds in cells: are colchicine metabolites chain-breaking antioxidants?. *Toxicology*, 2002; 177:105-117.
137. Dvorak Z, Ulrichova J, Pichard-Garci L, Modriansky M, Maurel P. Comparative effect of colchicine and colchicine on cytotoxicity and CYP gene expression in primary human hepatocytes. *Toxicol In Vitro*, 2002; 16: 219-227.
138. Burtis CA, Ashwood ER. Tietz Text book of Clinical Chemistry. 2nd ed. Saunders 1994; 790-791, 1489, 1491, 830-843, 831-832.
139. Kaplan MM, Schmid C, Provenzale D, Sharma A, Dicstern G, McKusick A. A prospective trial of colchicine and Methotrexate in the treatment of primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology*, 199; 117: 1173-1180.

ÖZGEÇMİŞ

01.01.1969 yılında Tarsus'ta doğdum. İlk öğretimimi Tarsus' ta tamamladıktan sonra ta öğretimimi TED Ankara Koleji'nde, lise eğitimi ise Tarsus Amerikan Koleji'nde namladım. 1987- 1992 yılları arasında Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'nde lisans itimime devam ettim. 1994-1997 yılları arasında Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri ıstitüsünden yüksek lisans derecesi alarak aynı yıl Doktora programına başladım. Evliyim iki kızım var.

