

40720

T.C.  
EGE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

# **DOKU HASARINDA ANTIOKSİDAN ENZİM DEĞİŞİKLİKLERİ**

**Biyokimya Programı**

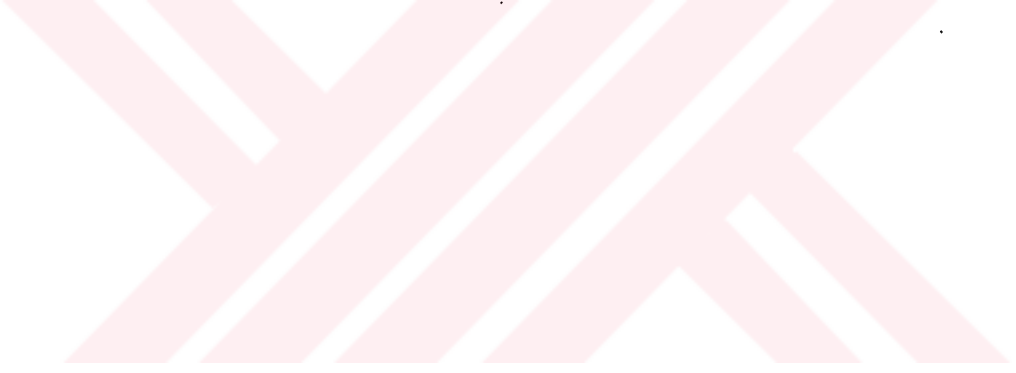
**DOKTORA TEZİ**

**Tıp Doktoru Eser Yıldırım Sözmen**

**Danışman Öğretim Üyesi: Prof.Dr.Sermet ERLAÇIN**

**İZMİR-1994**

E.Ü.T.F. Biyokimya anabilim dalında doktora yapabilmem için verdikleri destek ve yardımlar için sayın hocam Prof Dr Sermet Erlaçin ile çalışmamın ve eğitimimin her aşamasında her konuda yanımda olarak tezimin hazırlanmasında büyük emeği geçen değerli hocalarım Prof Dr Fatma Kutay ve Prof Dr Taner Onat'a, çalışma arkadaşım Uzm Dr Tijen Tanyalçın' a teşekkür ederim.



# İÇİNDEKİLER

<b>BÖLÜM I</b>	<b>Sayfa no</b>
-GİRİŞ ve AMAÇ .....	1
-GENEL BİLGİLER .....	3
-Radikal kavramı ve oksijen radikalleri.....	3
-Reaktif oksijen metabolitlerinin kaynakları....	5
- " " " "	
biyolojik aktiviteleri ve hücre hasarı.....	7
-Bazı iz elementlerin oksidan stresteki rolleri	13
-Mitoksantron hakkında genel bilgiler.....	17
-Antioksidan savunma.....	24
-İlaca bağlı karaciğer hasarı ve göstergeleri...:	29
<b>BÖLÜM II</b>	
-GEREÇ VE YÖNTEM.....	31
-1.Aletler.....	31
-2.Kimyasal materyeller.....	31
-3.Örnekler.....	34
-4.Yöntemler.....	35
-5.İstatistiksel analiz.....	41
<b>BÖLÜM III</b>	
-BULGULAR.....	42
<b>BÖLÜM IV</b>	
-TARTIŞMA VE SONUÇ.....	59
-ÖZET.....	67
-SUMMARY.....	69
-KAYNAKLAR.....	71
-ÖZGEÇMİŞ.....	84

## GİRİŞ VE AMAÇ

İlaçların karaciğerde oluşturduğu toksik etkilere karşı karaciğerin yanıtı oldukça stereotipiktir. İlaçlarla oluşan toksik karaciğer hasarının en önemli nedeninin membran lipidlerinin peroksidatif yıkılımı ile oluşan oksidan stres olduğu bilinmektedir. Bu oksidan stres sonucu karaciğerde yağlanma veya nekroz olayları gelişmektedir(35,41,76,84). Karaciğerde reaktif oksijen metabolitleri ile meydana gelen çok doymamış yağ asidlerinin peroksidatif yıkılımı sonucu oluşan lipid peroksidleri, mikrozomlarda sitokrom P450 bağımlı monoksjenaz ile glikoz-6- fosfataz enzimlerinin inaktivasyonuna, membran harabiyeti yaparak lizozomlardan hidrolitik enzimlerin açığa çıkması ile karaciğer hücre hasarına neden olmaktadır. Ancak, ilaçlar veya diğer etkenler ile oluşturulan her oksidan stres hücrede hasar yapamayabilir, çünkü hücrede bu olaylara karşı bir antioksidan savunma sistemi bulunmaktadır. Hücrenin savunma sistemleri enzimatik (Superoksid dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz) ve non enzimatik (E vitamini, C vitamini, glutatyon gibi) olabilmekte ve oksidan stresin önlenmesinde çeşitli şekillerde rol oynamaktadır (6,18,36,38,40,71,72).

Mitoksantron (Novantron,Lederle) ,deneysel tümör modelleri ve insan tümörlerinde yüksek antitümoral aktiviteye sahip olan antracenedion tipi yeni bir antineoplastik ajandır. Faz1 ve Faz2 klinik çalışmalar tek başına veya diğer ilaçlarla kombine olarak verildiğinde meme kanseri, akut lösemi,non Hodgkin lenfoma gibi pekçok kanser türünde olumlu yanıtlar alındığını göstermiştir(3,10,80,96). Mitoksantronun (MTO) sitotoksitesinin gerçek mekanizması tam olarak bilinmemekle beraber antitümör aktivitesini flavo-

proteinlerin etkisi ile oluşan semikinon ve oksijen serbest radikalleri yardımıyla gösterdiği ortaya konmuştur. Metabolizması sırasında oluşan kinonların intraselluler olarak bölgeye özgün serbest radikallere dönüştükten sonra DNA da çapraz bağlanma ve zincir kopması yaptığı ileri sürülmektedir(3,4,12,48,49,65,75,103). MTO'nun neden olduğu hepatotoksik ve kardiyotoksik yan etkilerinin de aynı mekanizmalarla oluştuğu sanılmaktadır. Ancak bu konuda yapılan araştırma sonuçları bazı farklılıklar göstermektedir (48,75,80,103).Bu nedenle araştırmacılar son yıllarda MTO'nun toksik etkilerin mekanizmalarını aydınlatmak üzere yoğun çalışmalar yapmaktadır.Yapılan literatür taramasında bu yeni araştırmalar içinde karaciğerde oluşan toksik etkilerin erken tanısına yönelik çalışmalara rastlanamamıştır.

Bu bilgilerden yola çıkarak, yeni ve üzerinde halen çalışmaların devam ettiği bir antineoplastik ajan olan MTO'nun hepatotoksik yan etkilerinin erken dönemde ortaya konmasında antioksidan enzimlerin rollerinin araştırılmasının amaçlandığı bu çalışmada sıçanlara tek doz Mitoksantron verilmesinin ardından eritrositer SOD, katalaz ve karaciğer dokusu SOD, katalaz düzeyleri yanısıra karaciğer hasarının marker enzimleri olarak kabul edilen AST, ALT ve OTK düzeyleri plazma ve karaciğer dokusunda saptanarak bulgular histopatolojik veriler ile birlikte değerlendirilmiş ve Mitoksantronun hepatotoksik etkisinin erken dönemde belirlenmesinde antioksidan enzimlerin değeri ortaya konulmaya çalışılmıştır.

## GENEL BİLGİLER

### *RADİKAL KAVRAMI VE OKSİJEN RADİKALLERİ*

Atom yapısı bir çekirdek ve çevresinde bulunan değişik sayıda elektronlardan oluşmaktadır. Elektronlar enerji düzeylerine göre belirli bir düzende yerleşir ve "orbit"adı verilen yörüngelerde hareket ederler. Her bir orbitte iki elektron bulunur. Aynı orbitaldeki iki elektron daima birbirine zıt yönde kendi eksenini etrafında dönmektedir. Buna uygun olarak önce herbir orbitale bir tane aynı yöne dönen elektron yerleşir, atom numarasına göre artan elektronlar tekrar aynı sıra ile ters yönde dönecek şekilde yerleşir.

Oksijen atomu için atom numarası yani elektron sayısı 8 dir. Bu elektronların orbital yapısı Şekil-1 de gösterilmiştir (71)

**2P**



**2s**

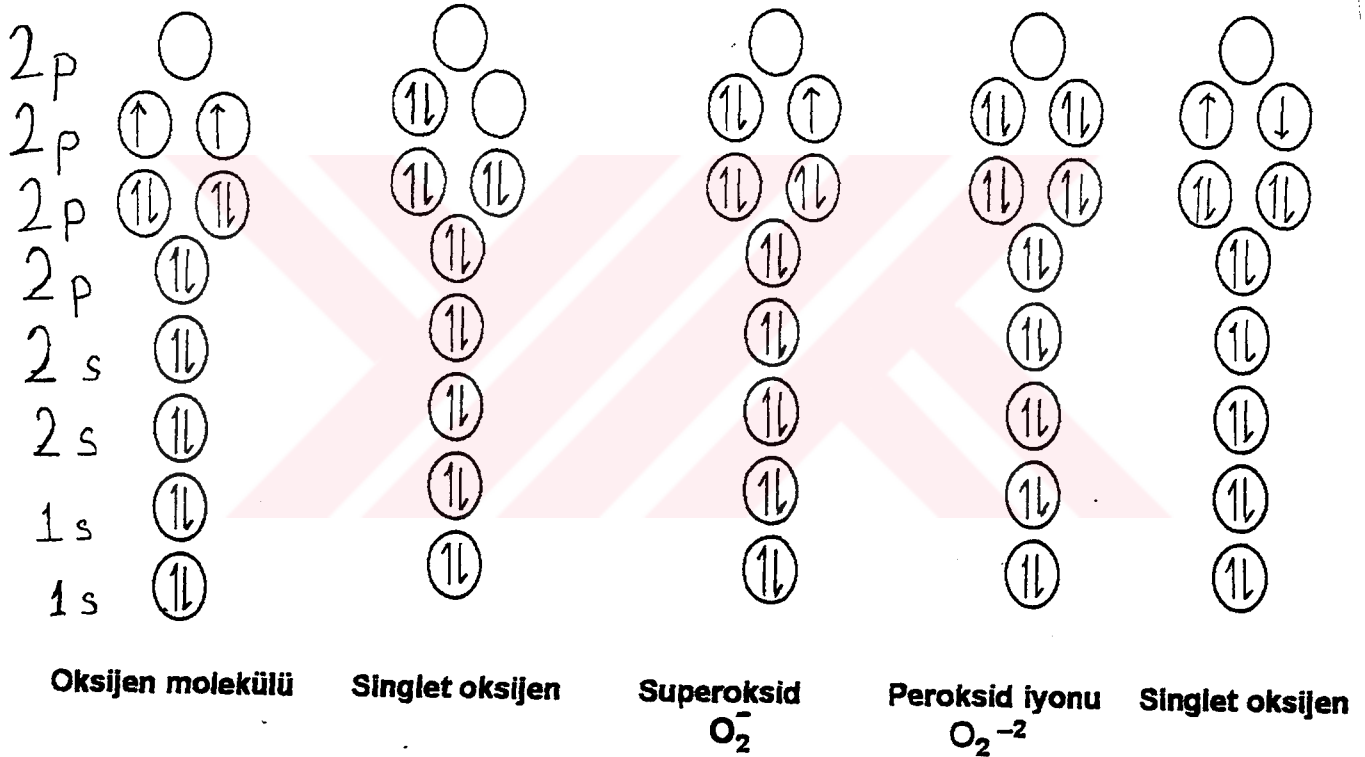


**1S**



Şekil-1-Oksijen atomunun orbital yapısı

Oksijen molekülündeki aynı yönde dönen iki elektrona sahip 2p son orbitali önemlidir. Bu orbitallerden herhangi birindeki elektron bir orbitali bırakıp diğerine geçtiğinde veya farklı orbitallerde farklı yönde döndüğünde "Singlet oksijen" oluşur. Orbitalden birine ters dönüşlü bir elektron veya ikisine ters dönüşlü iki elektron daha gelirse "Radikal" elde edilir. Doğal oksijenden türeyen oksidan moleküller şekil 2 de verilmiştir (38,71).



Şekil-2 Doğal oksijenden türeyen oksidan moleküller

Serbest radikal, oksidan molekül veya en doğru adlandırma ile reaktif oksijen partikülleri, atomik veya moleküler yapılarda eşlenmemiş tek elektron içeren ve dolayısıyla reaktif özellik taşıyan moleküllerdir. Bu radikaller tek elektronunu bir başka moleküle verebilir (redüksiyon), bir başka molekülden elektron alarak elektron çifti

oluşturabilir (oksidasyon). Sonuçta nonradikal yapıyı radikal şekle dönüştürebilir. Bu özellikleri ile reaktif oksijen partikülleri iki ana başlık altında incelenmektedir (38,71,72);

1-Radikaller;

- Superoksid radikal (O<sub>2</sub>.)
- Hidroksil radikal (.OH)
- Peroksil radikal (ROO.)
- Alkoksil radikal (RO.)
- Semikinon radikal (HQ.)
- Hemoproteine bağlı serbest radikaller

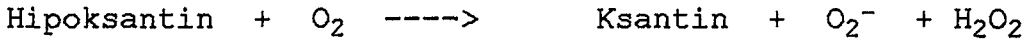
2-Non radikaller;

- Hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)
- Lipid hidroperoksit (LOOH)
- Hipohalöz asid (HOX)
- N-halojenli aminler (R-NH-X)
- Singlet oksijen
- Ozon (O<sub>3</sub>)
- Azot dioksit (NO<sub>2</sub>)

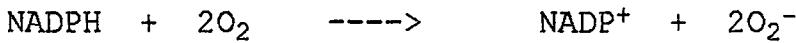
### **REAKTİF OKSİJEN METABOLİTLERİNİN KAYNAKLARI**

**1-Enzimatik tepkimeler** ; Vücutta endojen olarak oluşabilen oksijen metabolitlerinin enzimatik kaynakları aşağıda özetlenmiştir (38,73);

#### **Ksantin Oksidaz**



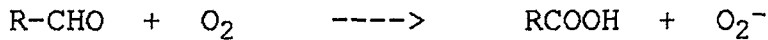
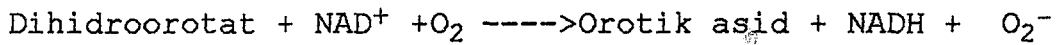
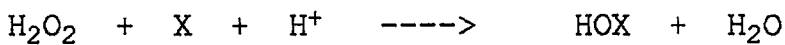
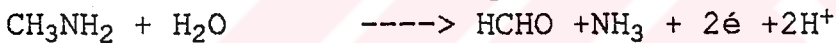
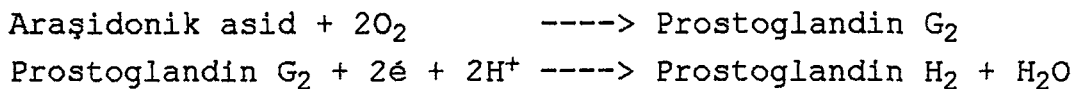
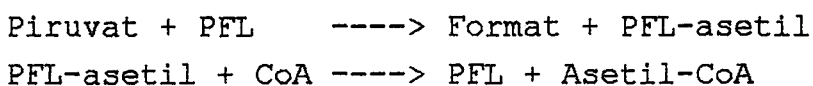
#### **NADPH Oksidaz**



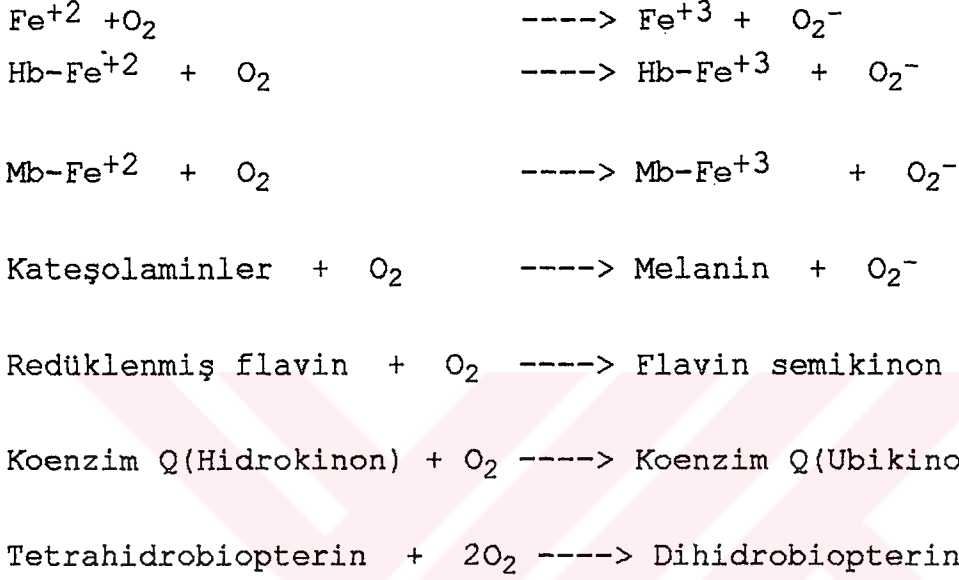
#### **Amin Oksidaz**





**Aldehid Oksidaz****Dihidroorotat dehidrogenaz****Peroksidazlar****NADH Oksidaz** tepkimesi**Metilamin dehidrogenaz****Galaktoz oksidaz****Ribonükleotid redüktaz****Prostaglandin H sentaz****Piruvat format liyaz**

**2-Nonenzimatik tepkimeler;** Otoksidasyon tepkimeleri sonucu oluşan reaktif oksijen metabolitlerinin nonenzimatik kaynakları aşağıda özetlenmiştir(38,72).



**3-Dış etkenler;**

- Radyasyon
- Hava kirliliği
- Toksik kimyasallar
- Sitostatikler
- Pestisitler
- Sigara

**REAKTİF OKSİJEN METABOLİTLERİNİN BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ  
VE HÜCRE HASARI**

Reaktif oksijen parçacıkları ile oluşan hücre hasarını açıklamak için başlıca iki mekanizma öne sürülmüştür (71);  
1-Serbest oksijen radikalleri çok sayıda hücrenel hedefle tepkimeye girerek hücre ölümüne kadar gidebilen olayları

başlatmaktadır.

2-Oluşumu artan hidrojen peroksitin glutatyon peroksidaz tarafından detoksifikasyonu sırasında çözünebilen ve proteine bağlı tiyollerin oksidasyonu, hücre içi serbest kalsiyum konsantrasyonunun artmasına neden olmaktadır.

Serbest radikallerin hücresel hedefleri Tablo 1 de özet olarak gösterilmiştir; (35,84)

Bu etkiler sonucu hücrenin aşağıda sözü edilen bölümlerinde şu değişiklikler gözlenir;

**1-Ekstraselluler boşluk,** Oksidatif indirgenme depolimerizasyon tepkimeleri olarak tanımlanan bir dizi tepkime ile reaktif oksijen metabolitleri hiyaluronik asidi parçalamaktadır. Hiyaluronik asid ve kollajenin yıkılımı yaşayan dokuların yapısal özellikleri ile membran geçirgenliklerini belirgin olarak değiştirmektedir. (25,76,84)

**2-Biyomembranlar,** Memeli hücre membranları peroksidatif hasara karşı çok duyarlı olan büyük miktarda çok doymamış yağ asidi (PUFA) içermektedir (25). Bu yağ asidlerinin peroksidasyonu en çok araştırılan radikal tepkimelerinden biridir (84).



alkanallar

alkenaller

4 hidroksi alkenaller

Radikal yağ asidi ile birleşerek yukarıdaki tepkimeler serisini başlatır (tepkime 1) Radikal yağ asidinin oksijenle birleşmesi sonucu lipid peroksid radikal (ROO') oluşur (tepkime 2). Lipid peroksit radikalleri başka yağ

## Hedef

## Sonuç

Doymamış ve tiol içeren aminoasitler ; Protein denaturasyonu ve çapraz bağların oluşumu,enzim inhibisyonu ve hücre membran geçirgenliğinde değişiklik

Nükleik asit bazları;  
Karbonhidratlar  
Doymamış lipidler;

Hücre döngüsünde değişiklik, mutasyon  
Hücre membranı reseptör duyarlılığında değişiklik  
Kolesterol ve yağ asidi oksidasyonu, lipid çapraz bağ oluşumu,  
organel ve hücre membran geçirgenliğinde değişiklik  
Nikotinamid ve flavin içeren kofaktörlerin miktarında ve aktivitesinde azalma

Kofaktörler;

Nörotransmitterler

Serotonin ve epinefrin gibi nörotransmitterlerin miktarında ve aktivitesinde azalma

Antioksidanlar

E vitamini ve B karoten ilekatalaz ve SOD enzimlerininhibisyonu, GSH Px aktivitesinde değişiklik olmaması

Proteinler

Peptid zincirinde kopma, denaturasyon,

DNA

Zincir kopması, baz değişikliği

Hyaluronik asid

Sinoviyal sıvı vizkozitesinde değişiklik

Tablo-1-Serbest radikallerin hücresel hedefleri

asidi yan zincirleriyle tepkimeye girerek lipid hidroperoksitleri oluştururlar (tepkime 3). Bu peroksid ürünleri metal iyonları varlığında bazı enzimatik tepkimeler ile etan, pentan, malondialdehid benzeri yıkım ürünlerinin yanısıra kemiluminesans ve fluoresans veren bileşikler oluştururlar (reaksiyon 4). Lipid peroksidasyonu ve kükürt içeren proteinlerin oksidasyonu sonucu membran geçirgenliği ve kırılabilirliği artar. Bunun sonucu membran enzimlerinin aktivitesi azalırken hücreye  $Ca^{+2}$  girişi artar. Hücre içi serbest  $Ca^{+2}$  artışı aşağıda belirtilen pek çok hasar yapıcı olayı başlatmaktadır (68,83). Bu olaylar, fosfolipaz aktivitesi ile fosfolipid kaybında artış, membran geçirgenliğinde değişiklik ve potansiyel kaybına bağlı toksik etkide artış, proteaz aktivasyonu ile proteolitik etkinin şiddetlenmesi, katabolik enzimlerin aktivitesinde artış ve endonükleaz aktivitesi ile DNA kırılmalarının oluşumudur.

**3-Mitokondria,** Normal koşullarda mitokondria, sitokrom oksidaz sistemi ile oksijeni suya indirgeyerek detoksifiye etmektedir. Elektron transport zincirinde yer alan pek çok bileşik (NAD, FAD, Koenzim Q gibi) oksijen ile tepkimeye girerek  $O_2^-$  salınımına neden olur, buna tek değerli oksijen kaçağı denir. Bu kaçağa neden olan faktörler bilinmemektedir. Normal koşullarda bu kaçak hücrenin savunma sistemleri ile yok edilebilmektedir. Ancak oksidan stres durumunda savunma sistemleri yetersiz kalmakta ve mitokondriada hasar oluşmaktadır. Bu hasar sonucu hücrenin enerji sisteminin etkilenmesiyle ATP kullanımında artma ve ATP sentezindeki azalma ile bağlantılı olarak hücrede ATP düzeyi hızla düşer. Gliseraldehid 3 fosfat dehidrogenazın aktivitesinin azalması iki SH grubunu kaybetmesine bağlıdır. Böyle bir moleküle NAD bağlanamayacağı için ATP sentezi inhibe olmaktadır. Bunun yanısıra ATP sentetaz aktivitesi de

**4-Çekirdek,** Herhangi bir nedenle oluşmuş olan serbest radikaller ve özellikle malon dialdehid hücre çekirdeğinde başlıca DNA ile tepkimeye girmektedir. Nükleik asid yapısındaki baz değişimleri veya DNA zincir kopması sonucu kromozomal yapıda değişiklikler oluşturarak sitotoksisiteye neden olmaktadır. Sonuçta mutajenik ve karsinojenik etkiler gözlenmektedir.

**5-Sitozol,** Sitoplazmada bulunan proteinlerin çoğu ile oksihemoglobin, katalaz gibi hemoproteinler serbest radikallere karşı özellikle duyarlıdırlar. Antioksidan bir enzim olan superoksid dismutazın (SOD) da katalitik aktivitesi için gerekli olan histidin kalıntısı radikallerle bloke edilerek aktivitesi inhibe edilmektedir.

Oksidatif stres sonucu oluşan doku hasarı şekil 3 de gösterilmiştir; (40)

Serbest radikallerin neden olduğu doku hasarı ile ilgili klinik yönden önemli durumlar aşağıda özetlenmiştir. (14,25,92)

1-Toksik eksojen ajanlar:iyonizan radyasyon

kemoterapötik ilaçlar

nitrofurantoin

karbon tetra klorür

parakuat

kimyasalkarsinojenler

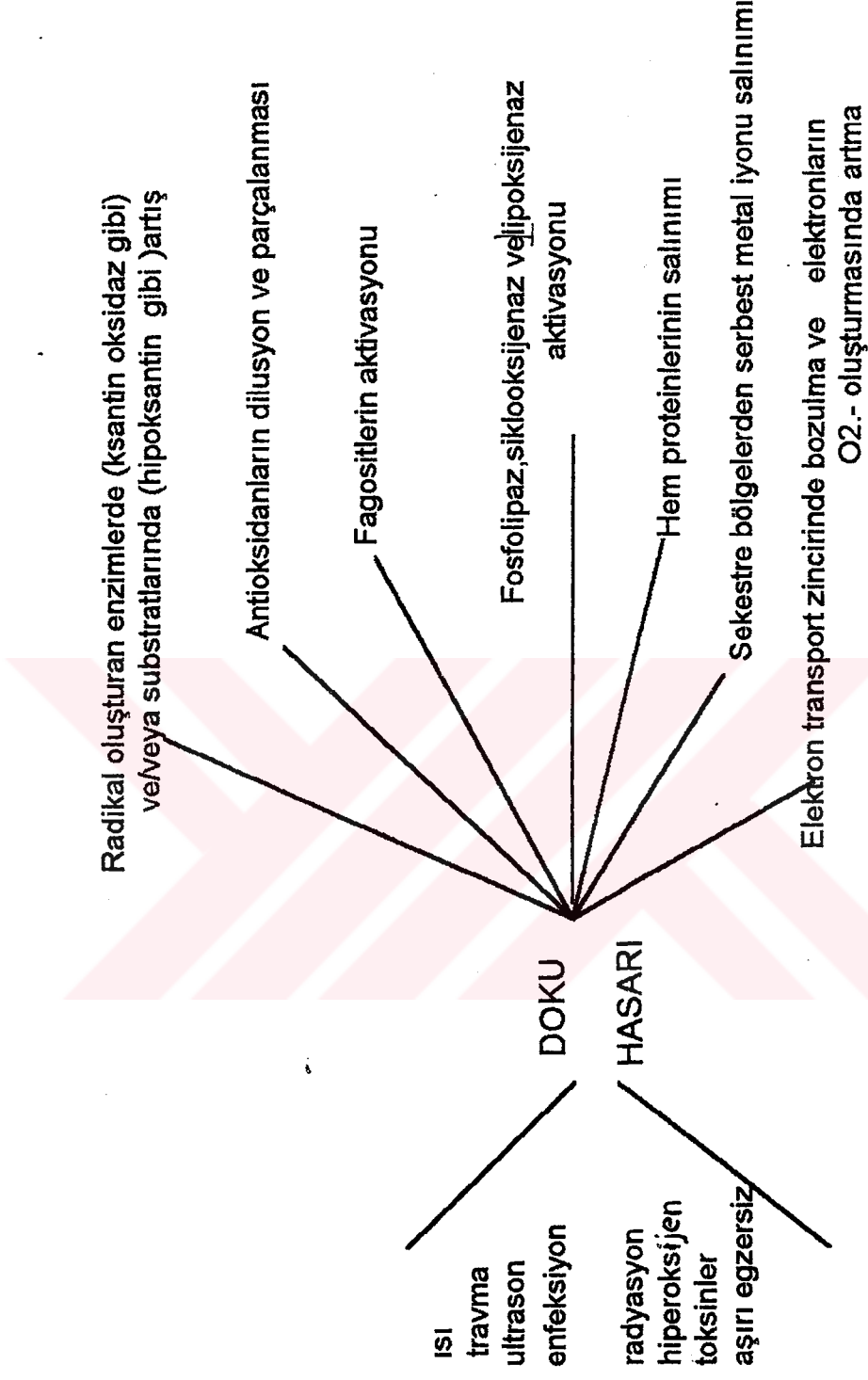
(benzpiren, sigara, ozon, NO<sub>2</sub>)

alloksan

2-Hiperoksijenasyon sendromları:

akciğerde oksijen toksisitesi

retrolental fibroplazi



Şekil-3 Oksidatif stres sonucu oluşan doku hasarı

## 3-İskemi/reperfüzyon sendromları:

myokard enfarktüsü  
 kardiopulmoner bypass  
 organ transplantasyonu  
 mide mukozasında hasar  
 (stres ülseri)  
 barsak iskemisi  
 nekrotizan enterokolit  
 şok sonrası karaciğer yetmezliği  
 beyin iskemisi  
 akut renal tubuler nekroz  
 serbest flep transferleri (deri)

## 4-İnflamatuvar hastalıklar:

nötrofil fagositosisi  
 artrit  
 inflamatuvar kemik hastalıkları  
 bağ doku hastalıkları  
 immun yetmezlikler

## 5-Toksik doku hasarı:

aspirasyon pnömonisi  
 pankreatit  
 özofajit

## 6-Genel durumlar:

yaşlanma  
 dolaşım şoku  
 periferik ödem

### ***BAZI İZ ELEMENTLERİN OKSİDAN STRESTEKİ ROLLERİ***

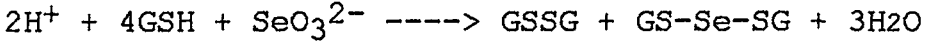
#### **SELENYUM**

Beslenmede esansiyel bir iz element olan selenyumun diyetteki normal miktarı ve toksisitesi arasındaki sınır halen tartışmalıdır. Günlük selenyum gereksinimi 60 ug olarak kabul edilir. İnsanda selenyumun normal değerleri; tam kanda 58-234 µg/lt, serumda 46-143 µg/lt ve idrarda 7-160 µg/lt dir (91). Selenyum insanlarda en fazla böbrek



korteksi karaciğer, pankreas ve hipofiz bezinde bulunmaktadır.

Selenyumun biyokimyasal fonksiyonları tam olarak bilinmemekle beraber organizmadaki önemi glutatyon peroksidaz (GSH-Px, EC:1.11.1.9) enziminin yapısına girmesidir (86). GSH-Px yapısında selenyum, sistein kalıntılarındaki kükürt atomunun yerine geçerek selenosistein şeklinde bulunmaktadır (6,77). Bilindiği gibi GSH-Px, hidrojen peroksidi metabolize eden temel enzimlerden biridir. Hücrelerin oksidatif hasardan korunması sırasında selenit indirgenirken GSH oksidasyonu ve selenodiglutasyon meydana gelmektedir(11)



Bu tepkimede oluşan selenodiglutasyon neoplastik hücrelerin gelişmesini inhibe eden en etkin selenyum bileşiği olarak tanımlanmaktadır.

### **BAKIR**

Önemli bir iz element olan bakırın günlük gereksinimi yaşa göre değişmektedir. Normal bir erişkinde vücuttaki toplam bakır miktarı 80-120 mg kadardır (15). En yoğun olarak karaciğer ve beyinde daha sonra böbrekte bulunur. Kas ve kemik kitlesi çok olduğu için total bakırın yarısı bu organlarda bulunmaktadır (78). Plazma bakırının %95 den fazlası seruloplazmine bağlıdır, eritrosit yapısındaki bakır ise büyük oranda SOD enziminin yapısında yer almaktadır. Normal değerler yaşa bağlı olarak değişmektedir. Erişkin kişilerde normal plazma bakır; 87-153 µg/lt arasındadır. Bakırın insan vücudundaki en önemli görevi sitokrom c oksidaz, superoksid dismutaz, urat oksidaz, mono amin oksidaz gibi pek çok enzimin yapısına girmesidir(16). Bu enzimlerin temel yapısını oluşturarak gösterdiği antioksidan görevinden başka kanser oluşumu üzerine de etkili olduğu ortaya konmuştur. Son yıllarda yürütülen çalışmalar kanserin

olası nedenleri arasında serbest radikaller ve superoksit radikal iyonunun rolü üzerinde durmaktadır (47). Laboratuvarlarda alınan güncel sonuçlar bakırın iz düzeylerinin serbest radikal tarafından oluşturulan biyolojik hasarı dramatik bir şekilde arttırdığını göstermektedir. Enzimatik aktivite kayıpları, DNA da tek ve çift halat kırılmaları , proteinlerin özelliklerinde değişiklikler , intrasellüler bakır düzeyinin arttırılması ile oluşturulmaktadır. Bakırın belli bir organda birikimi intrasellüler hasara yol açmakta ve kanseröz lezyonlar ile kendini belli etmektedir(61). Superoksit tarafından oluşturulan biyolojik hasarda da bakır iyonlarının rolü olduğu yönünde bulgular bulunmaktadır. Bu modele göre superoksit radikali veya askorbat gibi diğer indirgen maddeler bakır kompleksini kupröz duruma indirger. Sonra bu kompleksler hidrojen peroksit ile tepkimeye girerek proteinler, RNA ve DNA' yı hasara uğratan hidroksil radikalleri oluşturur. Bakır iyonlarının bulunduğu spesifik bir konumda hidroksil radikallerinin tekrarlayan oluşumu bu mekanizmada rol oynar. Bu radikaller hücresele DNA ' da hücre içi mekanizmalar tarafından tamir edilemeyecek şekilde çift halat yıkılmalarına yol açar ve malign bir olayı başlatır.

Superoksit hasarında olaya bakırın katılımı ile ilgili ilk basamak, hücresele protein gibi biyolojik bir makromoleküle metal iyonun bağlanması veya kompleks oluşturmasıdır. Dokularda bulunan bakırın çoğu spesifik bağlı olduğuna ve superoksit dismutaz gibi bazı enzimlerin integral bir bölümünü oluşturduğuna göre total bakır içeriğinde hafif bir artma nonspesifik kompleksleşmiş bakırda belirgin bir artmaya yol açar ve bu da tek başına biyolojik hasardan sorumludur (61).

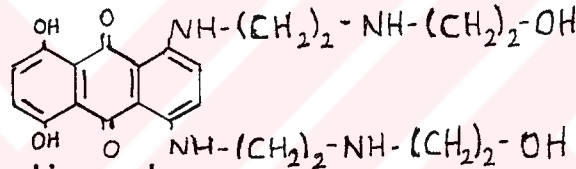
## ÇİNKO

Son yıllarda üzerinde en çok çalışılan iz elementlerden biri olan çinkonun günlük gereksinimi yaşa göre değişmektedir. Vücutta toplam yaklaşık 2 gram bulunur.Yapılan çalışmalar çinkonun başlıca karaciğer, böbrek, dalak, barsak mukozası, akciğer, pankreas, tiroid, hipofiz, testis ve adrenal tarafından alınıp tutulduğunu, beyin, kas, eritrosit ve kemiklerde dönüşümünün oldukça yavaş olduğunu göstermiştir (15,88). Çinko ile biyolojik redoks işlemleri olası değildir. Biyolojik sıvılarda serbest halde bulunmayan çinko organik ligandlar ile kompleksleşmiş durumdadır. En önemli görevi alkol dehidrogenaz, aldolaz, karbonik anhidraz DNA polimeraz, glutamat dehidrogenaz, lösin aminopeptidaz, alkalin fosfatazlar, superoksit dismutaz gibi pek çok metalloenzimin yapısında yer almasıdır(30). Bir antioksidan vitamin olan A vitamininin plazma konsantrasyonunun düzenlenmesi için gerekli olan çinko, karaciğerden A vitaminini mobilize eder(39,87). Antioksidan mekanizmaya bu dolaylı katkısından başka çinko non enzimatik serbest radikal tepkimesine karşı membran yapısını stabilize ederek E vitaminine analog bir rol oynamaktadır. Eritrositlerde yapılan çalışmalar çinkonun bir antioksidan gibi etki etmediğini ancak peroksidasyon sonrasında oluşacak hasara karşı eritrosit hücre membranını stabilize ettiğini göstermiştir. Karaciğer dokularında yürütülen çalışmalarda ise çinkonun karaciğer mikrozomlarında hem NADPH oksidaz ile interferans yapma etkisi ile hem de SOD'ın yapısında bulunması ile dokuda malondialdehid oluşumunu inhibe ettiği ve bu şekilde lipid peroksidasyon oluşumunu azalttığı gösterilmiştir (20,22)

**NOVANTRONE- MITOXANTRONE HCl-NSC 301739 HAKKINDA  
GENEL BİLGİLER**

Antracenedion olarak bilinen antineoplastik ajanların kimyasal bir tipi olan Novantron ilk kez 1979 da kimyasal araştırmalar ile gündeme gelmiştir.

**Kimyasal yapısı;** Kapalı formülü;  $C_{22}H_{28}N_4O_6 \cdot 2HCl$ , Molekül kütlesi 517.4 Da olan, yapısal olarak Doxorubisin ve Daunorubisine benzeyen Novantronun açık adı; 1,4 dihidroksi 5,8 bis 1 (2( 2 hidroksi etil)amino)etil amino L - 9,10 antrasenedion dihidroklorid'dir. Kimyasal yapısı Şekil-4 de gösterilmektedir.



**Şekil-4 Mitoksantronun kimyasal yapısı**

**Preparat bileşimi;** Preparatta 2 mg/ml serbest baz olarak bulunur ve 0.8% (w/v) NaCl, 0.005% (w/v) sodyum asetat ile 0.046% (w/v) asetik asid içerir. (55)

**Farmakokinetik özellikleri;** Intraperitoneal, intra muskuler, subkutan ve intravenöz etkili olan bileşik peroral etkisizdir. 15 mg/m<sup>2</sup> İV verilmesini takiben plazmada hızla dağılır ve santral sinir sistemi dışındaki tüm dokulara geçer (81).

**Dağılım;** MTO %78 i insan plazma proteinine bağlanır. Bağlanma konsantrasyondan bağımsızdır ve ilaçlardan etkilenmez. İV verildikten sonra başlıca 3 aşama geçirir; (56)

Başlangıç dağılım periyodu ; t<sub>1/2</sub> ortalama 12 dakikadır

Sekonder " " ; t<sub>1/2</sub> " 93 "

Eliminasyon fazı ; ortalama 36 saattir.

Terminal yarı ömrü aynı metodu kullanan pekçok araştırmacı tarafından farklı bulunmuş ve 8.9 ile 212 saat arasında değişen değerler bildirilmiştir. Bu uzun terminal yarı ömür ve geniş dağılım hacmi Mitoksantronun derin doku bölümlerinde bağlandığını ve yavaş yavaş salındığını göstermektedir(3). Stewart ve arkadaşları ölümden önceki son MTO tedavisi 13-272 gün olan olgularda bile postmortem dokularda mitoksantron saptamıştır. Lu ve arkadaşları mitoksantronun kandaki dağılımını incelemişler ve %51 plazma, %23 eritrosit, %12 monosit, %6 lökosit ve %5 trombositlerde dağıldığını saptamışlardır(3).

**Atılımı;** MTO verildikten sonra karaciğer, kemik iliği, kalb, tiroid , dalak , pankreas , adrenal bez , böbrek , beyin dokularında sırası ile azalır. Plazmadan eliminasyon başlıca renal ve bilier atılım ile olmaktadır. İdrarda yapılan çalışmalar başlıca 5 şekilde atılabildiğini göstermiştir. Yapısı değişmeden atılabildiği gibi, iki yan zincirindeki terminal hidroksil grubunun oksidasyonu sonucu oluşan monokarboksilik asid ve dikarboksilik asid metabolitleri ve yapısı tam olarak anlaşılammış olan iki farklı metabolit şeklinde de idrar ile atıldığı saptanmıştır (21). Wolff ve arkadaşları glukuronik asid ve glutatyon konjugatları şeklinde idrarda saptamayı başarmışlardır (69). Glukuronidasyon , glutatyon konjugasyonu ve mono ve dikarboksilik asidler MTO'nun önemli detoksifikasyon yollarıdır(79). İlaç verilmesinden sonraki 5 gün içinde ,renal atılım dozun %6-11'i iken feçesle atılım dozun %25'i kadardır(55). Ortalama renal klirens; 0.9-2.7 lt/h/m<sup>2</sup> olarak bulunmuştur(33).

**Analiz yöntemleri;** Biyolojik örneklerde MTO analizleri için şu yöntemler kullanılmaktadır;

Radyo immün assay (RIA)  
Enzim bağımlı immünosorbent assay (ELISA)  
Yüksek performanslı ince tabaka  
kromatografisi (HPTLC)  
Fluorometri  
Yüksek performanslı sıvı kromatografisi  
(HPLC)

Bu yöntemlerden HPLC nin en spesifik ve duyarlı olduğu saptanmıştır (33).

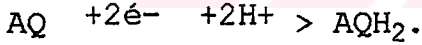
**Kullanım alanı;** Akut lenfoblastik lösemi, meme kanseri (10), Non Hodgkin lenfoma (56) primer hepatosellüler kanser vakalarında tek başına veya diğer sitostatiklerle birlikte kullanılmakta ve iyi sonuçlar verdiği bildirilmektedir. Yapılan çalışmalarda farelerde oluşturulan deneysel tümör modellerinde özellikle lösemi, lenfoma ve osteojenik sarkomada olumlu sonuçlar elde edilmiştir (96).

**Yan Etkileri;** Hematolojik yan etkiler doza bağlıdır. Bu etkiler içinde en erken görüleni lökositopenidir. Farklı araştırmacılar tarafından yürütülen çalışmalarda farklı oranlarda yan etkiler saptanmıştır. Lenk ve arkadaşları tedavi sırasında %40 olguda bulantı-kusma, %9 olguda orta derecede stomatit ve %4.4 olguda reversibl alopesi saptarken Henderson ve arkadaşları aynı yan etkileri sırayla %7, %1 ve %66 olguda gözlemiştir. Deri nekrozu şeklindeki lokal deri lezyonları ekstrasvazyon olduğunda görülebilmektedir (29).

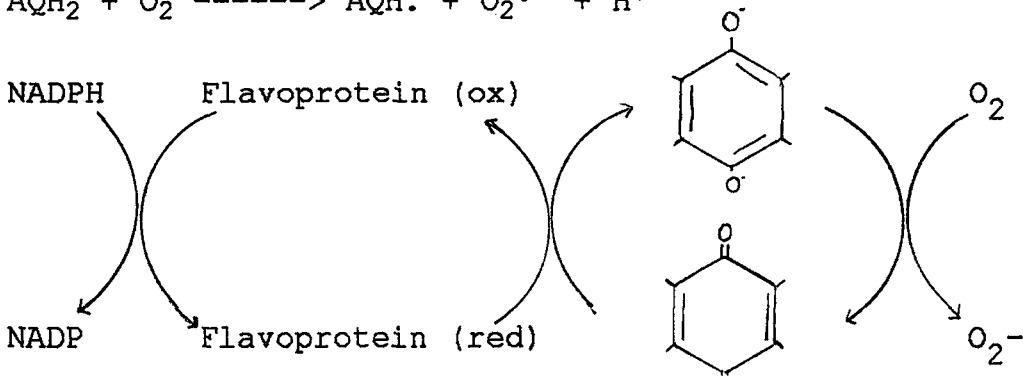
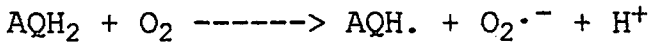
En iyi bilinen yan etki kardiyotoksisitedir. Kardiyotoksik etkinin lipid peroksidasyonunun stimülasyonu ile ilgili olduğu düşünülmektedir (4,27,28). Saleta ve arkadaşları yaptıkları çalışmada MTO uygulanan 441 olgunun 4 ünde konjestif kalp yetmezliği geliştiğini saptamışlardır (80).

**Metabolizma ve Etki Mekanizması;** MTO'nun etki mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Diğer antrasiklinlerde olduğu gibi nükleik asitler ilacın hücredeki başlıca hedefidir. MTO yapısında bir kinon grubu taşır, bu grubun metabolik indirgenme ile aktivasyona uğradığı düşünülmektedir (48,65). Sürdürülen çalışmalar MTO'nun etki mekanizmasının karaciğerdeki metabolizması ile sıkı bir ilişki gösterdiğini ortaya koymuştur. MTO karaciğerde sitokrom P450'e bağımlı "mixed function oxidase=karışık fonksiyonlu oksidaz" ile metabolize edilmektedir. Bu metabolizma yolu pek çok ilacın vücuttaki biotransformasyonunda rol oynamaktadır (Şekil 5) (100). MTO nun yapısındaki kinon grubu iki yolla metabolize edilmektedir;

1-Antrakınonların (AQ) iki elektron ile indirgenmesi sonucunda daha dengeli hidrokınonlar oluşur. (12) (şekil6) Bu yol detoksikasyon olayında rol oynar ve NADPH (kinon akseptor) oksidoreduktaz (DT-Diaforaz olarak da bilinir) ile katalizlenir: (32,34)

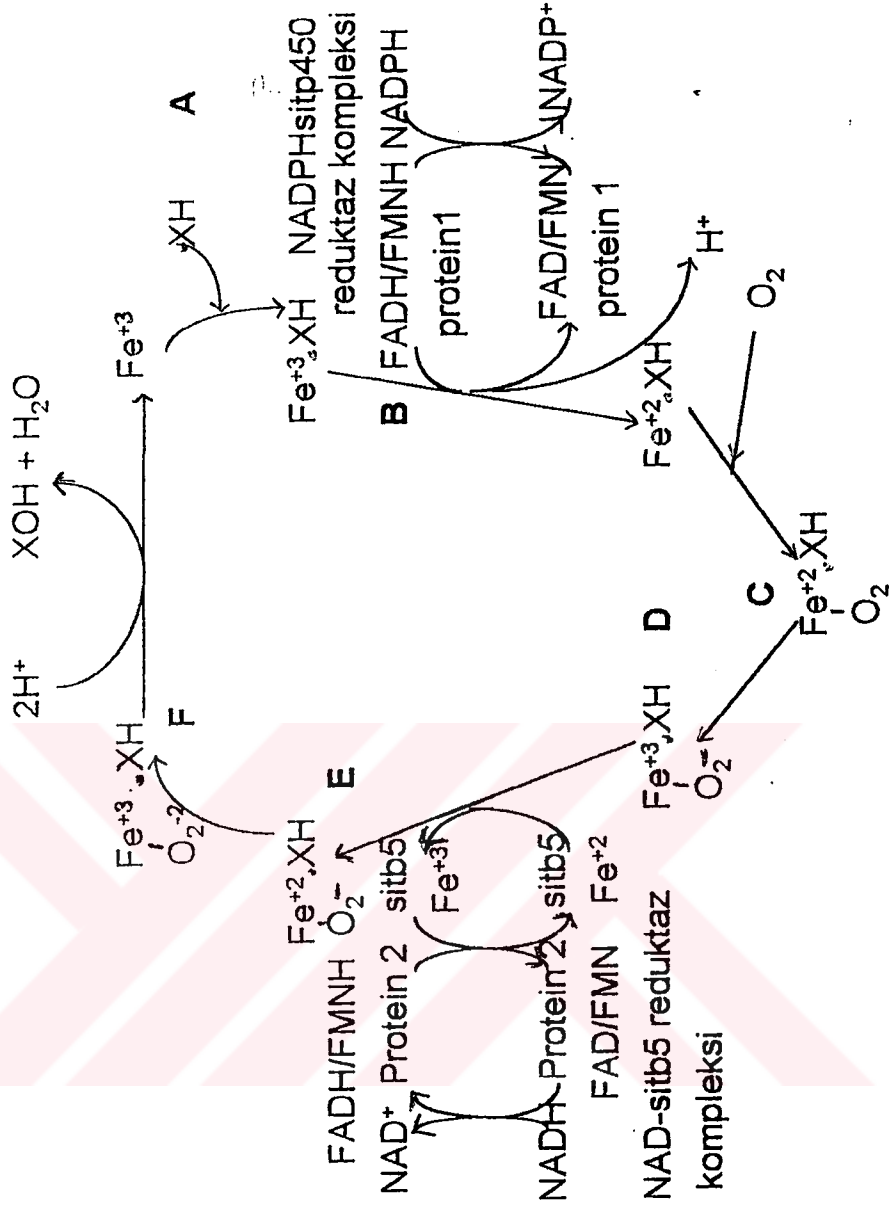


Bu işlem molekuler oksijenin varlığında dihidrokinonun otoksidasyonu üzerinden iki tek elektronlu oksidasyon olayı ile gerçekleştirilir. Önce dihidrokinonun tek elektronlu oksidasyonu sonucu semikinon serbest radikal ve superoksit anyon oluşur.



**Şekil-6- MTO 'nun olası mikrozomal aktivasyon metabolizması**



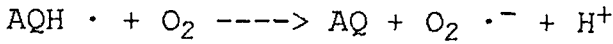


- A-1. Basamak: Fe ile sitokrom ksenobiyotifi bağlar  
 B-Fe+3, Fe+2'e redüklenirken NADPH sit P450 reduktaz kompleksi é transfer eder.  
 C- Molekuler oksijen bağlanır.  
 D- Fe'den bir é oksijene gider ve oksijen radikali oluşur.  
 E- İki é NAD-sit b5 reduktaz kompleksi veya NADP sit P450 reduktaz kompleksi aracılığıyla transfer edilebilir.  
 F- Hidroksillenmiş örneğe peroksil anyon denir ( $\text{O}_2^{-2}$ ) ve hidroksillenmiş ksenobiyotik salınır.

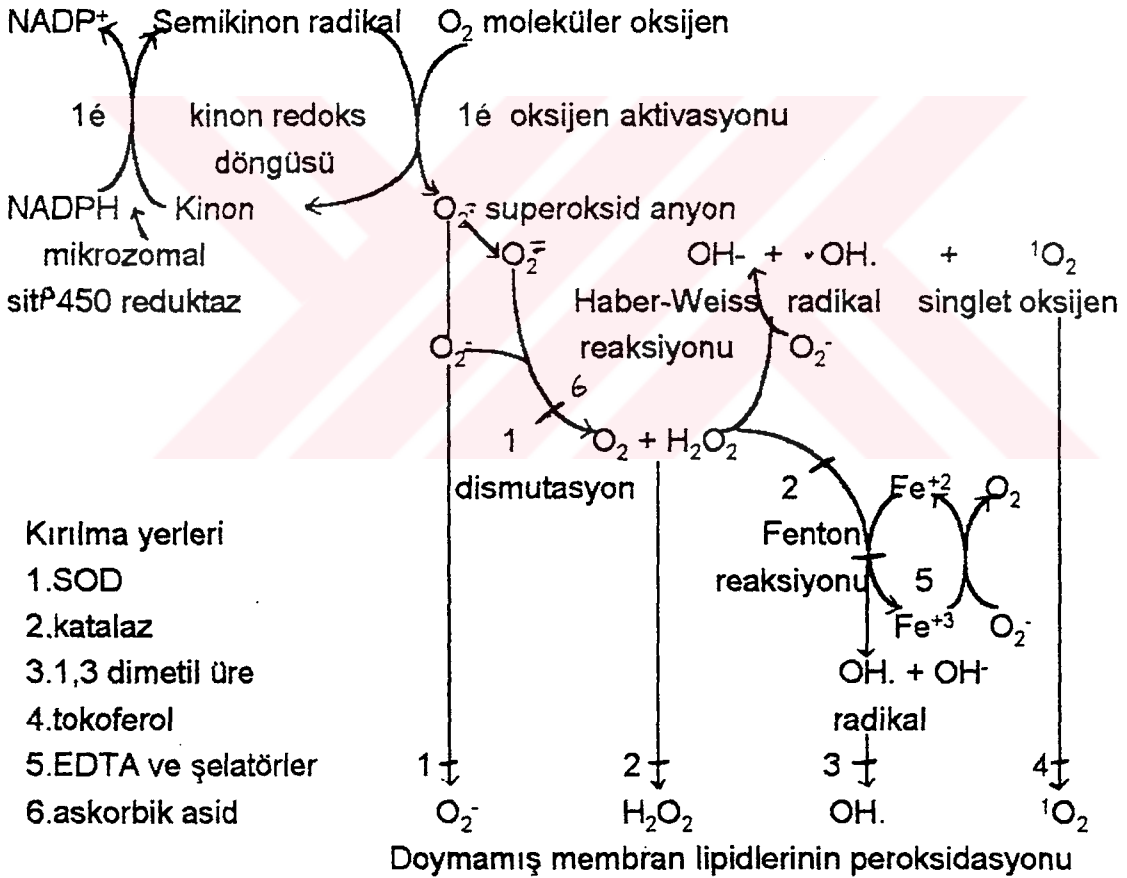
Şekil-5. Ksenobiyotifiğin biotransformasyon mekanizması



İkinci olarak semikinonun oksidasyonu ile superoksit anyon elde edilir ve başlangıçtaki kinon rejenere edilir. Yeniden oluşan kinon diğer enzimatik indirgenme tepkimeleri için kullanılabilir durumdadır. Bu işlem bir tür redoks döngüsü olarak tanımlanabilir.



Bu metabolizmanın olası işleyişi Şekil-7 de gösterilmiştir(64).



Şekil-7 Antrasiklin grubu ilaçların enzimatik aktivasyon mekanizmaları ve semikinon serbest radikal ve sekonder reaktif oksijen ürünlerinin oluşması

2-Tek elektron indirgenmesi ile semikinon radikal oluşur: Bu olay başlıca NADPH-sitokrom c reduktaz ve NADH-sitokrom

b5 reduktaz enzimlerinin aktivitesi ile gerçekleşir. Tek elektron indirgenmesi ile oluşan semikinonlar moleküler oksijen ile redoks döngüsüne katılır ve çeşitli reaktif oksijen örnekleri (superoksid anyon, hidrojen peroksit, hidroksil radikal, singlet oksijen gibi) oluşmasına neden olur; Bu redoks döngüsü oksidatif stres ve hücre toksisitesine yol açabilmektedir.

Bu metabolik olaylardan sonra MTO etkisini iki mekanizma ile göstermektedir (56) MTO , DNA yapısına katılarak veya DNA ya elektrostatik olarak bağlanarak DNA ve RNA sentezini inhibe etmektedir.

Hücre kültüründe MTO nun morfolojik değişiklikler (mikronukleus oluşumu) yanısıra çekirdekte yapısal değişiklikler ve kromozom kırılmalarına yolaçtığı gösterilmiştir(56). MTO nun hücre döngüsündeki etkileri faza spesifik değildir. MTO ile meme kanser hücresinde yapılan invitro çalışmalar,hücrelerin hücre döngüsünün G2 fazında durdurulduğunu ve bu bloke hücrelerin substans bağımlı hücre ölümlerine karşı daha duyarlı olduğunu fakat hücre döngüsüne özgün olmadığını göstermiştir.

Tümör hücresinde MTO ya direnç gelişmesi hücre membran değişikliğine bağlıdır.Bunun sonucu hücrede MTO nun alınıp tutulması ve buna bağlı olarak DNA ya bağlanma azalmaktadır(56).

Antineoplastik etkisinin yanısıra MTO nun antiviral, antibakteriyel, antiprotozoal, immun sistemi düzenleyici etkileri vardır ve bazı hayvan türlerinde mutajenik aktivite göstermektedir(56).

## **ANTIOKSIDAN SAVUNMA**

Hücreler oksidatif hasarı önleyen, yokeden veya kısmen azaltan bazı mekanizmalara sahiptir. Oksidanlarla mücadelede birinci aşama risk faktörlerinin belirlenmesi ve bunlardan uzak durulmasıdır. İkinci yol ise doku hasarına yol açan olayın etkisi ile tetiklenen biyokimyasal tepkimeleri bir veya birkaç basamakta engellemektir. Bu amaçla yapılabilecek girişimler şunlar olabilir;  $\text{Na}^+$  aktif girişi inhibe edilmesi,  $\text{K}^+$  girişi aktive edilmesi, hücre içi laktik asidozun inhibisyonu, sitotoksik ve vazojenik antiödem girişimler, yeniden fosfolipid sentezi hızlandırıcıları, kalsiyum kanal blokerleri, lipid peroksidasyonu ve siklooksijenaz inhibitörleri, lökotrienlerin inhibisyonu, opiat antagonistleri, PAF inhibitörleri,  $\text{H}_2$  reseptör antagonistleri, atrial natriüretik peptid, hipotermi gibi işlemler yapılabilmektedir (68,72). Üçüncü aşama, aktive olmuş nötrofillerin lezyon bölgesine hücumunu ve birikimini inhibe etmek için antienflamtuvarların kullanılmasıdır. Dördüncü ve en etkin yol artmış oksidanlara doğrudan etki ederek onları yoketmektir; Direkt etki ile oksidanları inaktif hale getiren maddelere "Antioksidanlar" denir. Tüm antioksidanlar başlıca dört yol ile etkilerini gerçekleştirmektedir (72). Bu etkiler:

1-Scavenging etki , oksidanları tutma ve zayıf bir moleküle dönüştürme etkisidir. Enzimler bu şekilde etki yapar.

2-Quencher etki , oksidanlara bir hidrojen aktararak etkisiz hale getirme etkisidir. Vitaminler, flavanoidler bu şekilde etki eder.

3-Onarma etkisi,

4-Zincir koparma etkisi, oksidanları bağlayarak fonksiyonlarının önlenmesi etkisidir. Ağır mineraller, hemoglobin, seruloplazmin bu yolla etki eder.

Antioksidan moleküller doğal antioksidanlar ve ilaçlar olmak üzere başlıca iki başlık altında incelenmektedir; (38,71,72)

### **A-Doğal antioksidanlar**

#### 1-Enzimler

Superoksid dismutaz,  $O_2^{\cdot-}$ 'nin hidrojen perokside dismutasyonunu katalizler.

Katalaz, hidrojen peroksidin dismutasyonunu katalizler.

Glutatyon peroksidaz, hidrojen peroksid ve lipid peroksidlerinin redüksiyonunu katalizler.

Glutatyon redüktaz, GSSG nin GSH ye dönüşümünü sağlayarak indirekt yolla antioksidan etki gösterir.

Hidroperoksidaz

Sitokrom c oksidaz

#### 2- Ekstraselluler sıvının nonenzimatik antioksidanları

Seruloplazmin , demiri okside eder

Transferrin , demiri bağlar

Hemoglobin, oksidanları bağlar.

E vitamini ve analogları , lipid peroksidasyon zincirini kırar

C vitamini,  $O_2^{\cdot-}$  ve  $OH^{\cdot}$  yi direkt olarak tutar, E vitaminini rejenere eder

Tiyol içerenler; (glutatyon, N asetil sistein, metyonin, kaptopril), serbest radikal ve HOCl tutucusudur.

A vitamini , direkt olarak peroksillere etki eder.

Ürik asid ,  $O_2^{\cdot-}$ ,  $OH^{\cdot}$  ve peroksil tutucusudur.

Ubikinon , serbest radikal tutucusudur.

Glikoz , hidroksil radikal "

Bilirubin , serbest radikal "

Albumin , bakırı bağlar

Piruvat , hidrojen peroksid tutucusudur.

Haptoglobulin , hemoglobini bağlar.

Hemopeksin , serbest hemi bağlar.

**B-ilaçlar**

Rekombinan h-SOD

Ebselen

21 aminosteroidler

Demir şelatörleri Deferroksamin, dimetil tioüre

Sitokinler TNF ve interlökin-1

Ksantin oksidaz inhibitörleri allopurinol, oksipurinol

Mannitol

Barbitüratlar

Flavanoidler

Trimetazidin

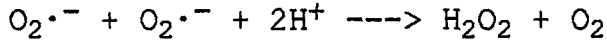
Indapamid

Ca<sup>2+</sup> kanal blokerleri, H<sub>2</sub> reseptör blokerleri**ENZİMATİK ANTIOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ**

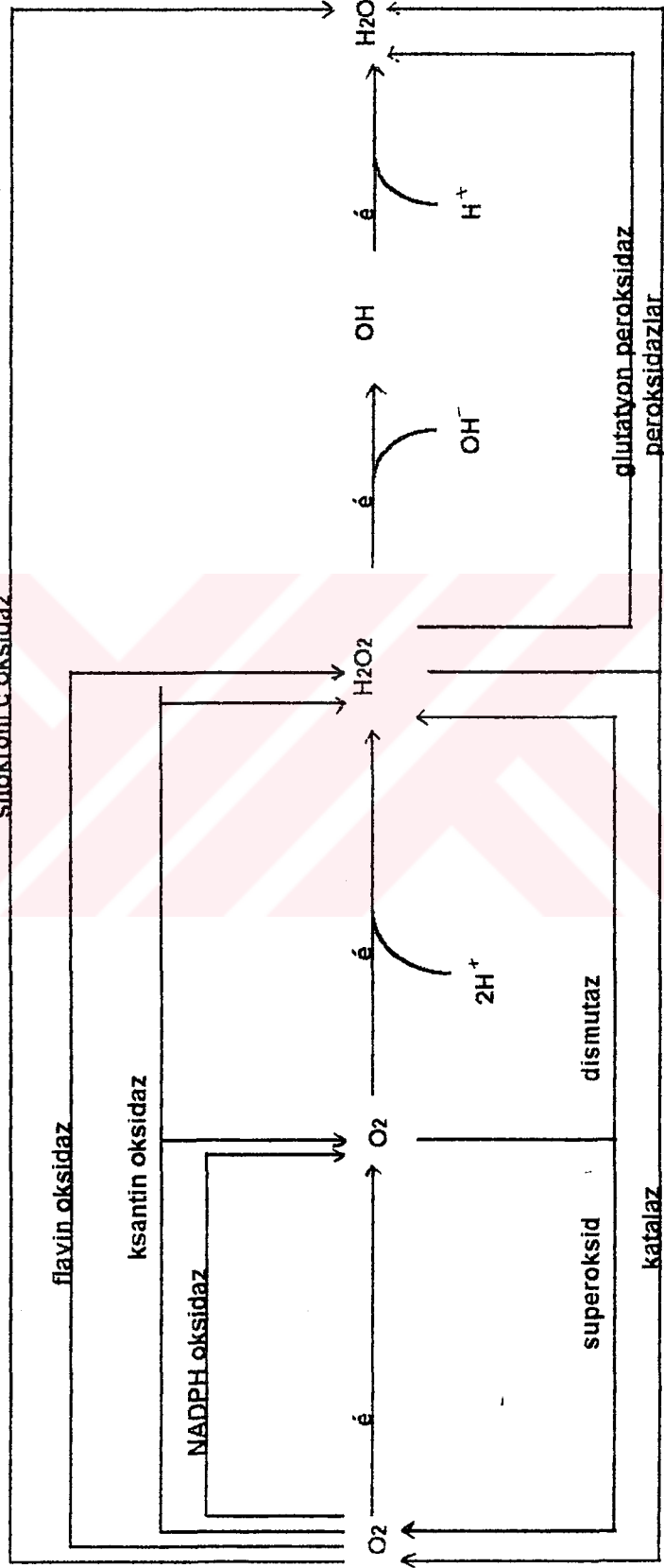
Vücutta enzimatik antioksidan mekanizmanın işleyişi şekil 8 de gösterilmiştir (99).

**Superoksid dismutaz (SOD) Superoksid oksidoredüktaz,****EC 1.15.1.1.**

Oksijeni metabolize eden bütün hücrelerde bulunan ve superoksidin hidrojen perokside dismutasyonunu katalizleyen bir metaloenzimdir (70,97).



Bugüne kadar dört farklı şekli bulunmuştur. Bunlardan biri ökaryotik hücrelerin sitozolünde ve mitokondrianın intermembran aralığında bulunur. Molekül kütlesi 31.200Da olan bu enzim her bir dimerik protein için birer molekül bakır ve çinko içerir (97). Çinkonun stabiliteyi sağladığı ve bakırın ise aktiviteden sorumlu olduğu düşünülmektedir. Çinkonun ayrılması irreversibl iken bakır reversibl ayrılır ve tekrar bağlanabilir, ancak bağlanma yeri aynı reseptör



Şekil-8, Enzimatik antioksidan mekanizmanın işleyişi

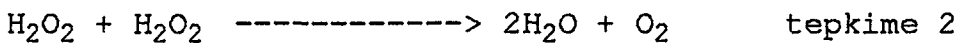
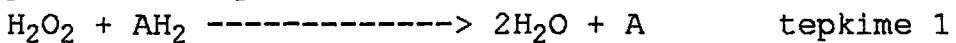
olmayabilmektedir. Bu enzimin önemli bir örneği sığır ve insan eritrositlerinde bulunan eritrokupreindir (17,82). Liou ve arkadaşlarının son çalışmasında (58) CuZn-SOD'un sıçan karaciğerinde primer olarak sitoplazmik yerleşimli olduğu mitokondri ve peroksizomlarda ise eser miktarlarda bulunduğu ortaya konmuştur. CuZn-SOD'un lizozomlarda saptanmasının ise sitoplazmadan geçmesine bağlı olduğu öne sürülmüştür.

SOD un iki tipi her bir molekülüne başına iki adet manganez içermektedir. Bu enzimlerden biri mitokondria matriksinde bulunurken (molekül kütlesi=75.000Da), diğeri E. Coli gibi bakterilerin sitozolünde (molekül kütlesi=40.000Da) bulunur (70). CuZn-SOD siyanür ile inhibe olurken Mn-SOD siyanür ile inhibe edilemez (97,98).

Dördüncü tip SOD demir içerir ve E. Colinin periplazmik aralığında bulunur. Molekül kütlesi 40.000Da olan bu enzim yapısal olarak Mn-SOD'a büyük benzerlikler göstermektedir (71).

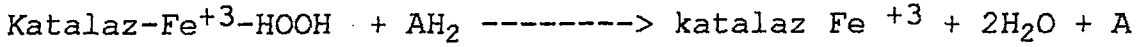
#### **Katalaz EC:1.11.1.16**

Katalaz yapısal olarak bir hemoproteindir. Sığır karaciğerinde yürütülen çalışmalarda katalazın molekül ağırlığının 248.000 Da olduğu ve nonkovalent bağlı protoporfirin IX Fe (hem) grubu içerdiği ortaya konmuştur (67,86). Kan, kemik iliği, muköz membran, karaciğer ve böbrekte yüksek miktarlarda bulunmaktadır (67). Düşük hızlarda hidrojen peroksidin olduğu durumlarda veya yüksek elektron alıcısı konsantrasyonlarında peroksidatif tepkimeyle (tepkime 1), hidrojen peroksid oluşum hızının yüksek olduğu durumlarda ise katalitik tepkimeyle (tepkime 2) hidrojen peroksidi suya dönüştürerek ortamdan uzaklaştırır.



En yüksek katalitik turnover hızına sahip olduğu bilinen katalazın, aktivitesi için demir gerekir. Aktif kısmı olan  $Fe^{+3}$ -protoporfirinini iki fonksiyonel döngüsü bulunmaktadır. Katalaz  $Fe^{+3} + H_2O_2 \rightarrow$  Katalaz- $Fe^{+3}$ -HOOH aktif değil  
 Katalaz- $Fe^{+3}$ -HOOH +  $H_2O_2 \rightarrow$  Katalaz  $Fe^{+3} + 2H_2O + O_2$   
 detoksifikasyon mekanizması

Ortamda çok düşük hidrojen peroksit düzeyi olduğunda ve aktif olmayan enzim bileşiği ile elektron alıcısı tepkimeye girer:



### ***İLACA BAĞLI KARACİĞER HASARI VE GÖSTERGELERİ***

İlaçların karaciğerde oluşturdukları hasar için üç neden öne sürülmektedir (91).

- 1- Direkt etki ile oluşan hasar
- 2-İmmun hipersensitiviteye bağlı oluşan hasar
- 3-Predictable hepatotoksinlerle oluşan hasar

İlaçların karaciğer dokusunda oluşturduğu hasar ilacın tipi, metabolizması, etki mekanizmasına göre çok farklı klinik özellikler ve laboratuvar bulguları gösterebilmektedir(45,91).

Kemoterapötik ilaçlar doku hasarı yaparak enzim salınımına neden oldukları için serum transaminazları ve LDH düzeylerinde artışa neden olmaktadır(45). Özellikle akut ve toksik hasarda AST ve ALT de belirgin artışlar olmaktadır. Bu artışlar karaciğer nekrozunun derecesine bağlı değildir. İlaça bağlı hasarda AST düzeylerinde daha belirgin artışlar saptanmaktadır bunun uyum sağlamaya bağlı olduğu düşünülmektedir(42).



-Aspartat Amino Transferaz-AST (EC:2.6.1.1.); Aspartatın oksaloasetata dönüşümünü katalizleyen bu enzimin mitokondrial ve sitozolik izoenzimleri vardır. Kalb, iskelet kası ve karaciğerde yüksek oranda bulunmaktadır.

-Alanin Amino Transferaz-ALT (EC:2.6.1.2.); Alaninin piruvata dönüşümünü katalizleyen bu enzimin mitokondrial formu çok düşük konsantrasyonlarda bulunur ve stabil değildir. Bu nedenle daha çok sitozolik fraksiyonundan sözedilmektedir. En yüksek oranda karaciğerde lokalizedir.

-Ornitin Karbamoil Transferaz-OTK (EC:2.1.3.3.) Ornitin ve karbamoil fosfattan sitrulin sentezini katalizleyen bu enzim mitokondri membranına bağlı olarak bulunmaktadır. En yüksek aktivitesini karaciğerde göstermektedir. Özellikle primer karaciğer hastalıklarında belirgin olarak yükseldiği yolunda yayınlar vardır (50).

## GEREÇ VE YÖNTEMLER

### I-ALETLER;

- 1.Spektrofotometre - LKB Ultraspec 11
- 2.Spektrofotofluometre - Aminco Bowman
- 3.Atomik absorpsiyon spektrofotometresi - Pye Unicam
- 4.Ultrasantrifüj - Beckman model L2-50 ultrasantrifüj
- 5.Soğuk santrifüj - Hettich
- 6.Homojenizatör - Braun Melsungen
- 7.pHmetre - Copenhagen PHM 63 digital pHmeter
- 8.Su banyosu - Kotterman
- 9.Hassas terazi - Mettler H 20
- 10.Aluminyum blok ısıtıcı
- 11.Otoanalizör - Hitachi 705
- 12.Santrifüj tüpleri, cam kapaklı deney tüpleri
- 13.Otomatik ve cam pipetler

### II-KİMYASAL MATERYALLER;

#### 1-Kimyasal Maddeler:

- Mitoxantrone (Novantrone), Er kim
- Hidrojen peroksid, Merck
- Epinefrin , Sigma
- SGOT kiti , Wako
- SGPT kiti, Wako
- Urease powder, Sigma
- Karbamoil fosfat Lityum tuzu, Sigma
- Ornithin HCl , Sigma
- Antipirin , sigma
- Demir-3-klorür , Sigma

- H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>
- Diasetil monoksim (DAM) , Sigma
- 2 2' azino bis /3-ethoxybenz thiazoline-6 sulfonic acid (ABTS )Sigma
- Sodyum karbonat , Merck
- Sodyum hidroksit, Merck
- Bakır sülfat. 5 H<sub>2</sub>O, Merck
- Sodyum-Potasyum tartarat,4 H<sub>2</sub>O, Merck
- Folin ciocalteu
- Diamino naftalen (DAN),Sigma
- Sikloheksan, Merck

### 2-Tamponlar ve solusyonlar(37);

- a) Fosfat tampon, 50mM, pH=7.0
 

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6.81 g/lt
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	8.9 g/lt
- b) Karbonat tampon, 50 mM, pH=10.2
 

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> anhidr	5.3 g/lt
NaHCO <sub>3</sub>	4.2 g/lt
- c) Tris-HCl tampon , 20 mM, pH=7.4
 

Tris	2.42 g/lt	50 ml
HCl	1.72 ml/lt	41.4 ml

+ KCl 8.175 g/lt
- d) Serum fizyolojik: %0.9 NaCl
- e) Siyanür içeren karbonat tampon, 50 mM, pH=9.7  
KCN 195.36 mg/lt (3mM) 50 mM karbonat tamponda hazırlanır)

## f) Drabkin çözeltisi

Potasyum siyanür	50 mg/lt
Sodyum bikarbonat	1000 mg/lt
Potasyum ferri siyanür	200 mg/lt
Primer potasyum fosfat	140 mg/lt

## g) Trietanolamin tampon, 0.4 M, pH=7.7

Trietanolamin	59.676 g/lt
HCl 1 M	53.3 ml/lt

## h) Selenyum için tampon çözelti

Amonyum hidroksit	114 ml/lt (7mM)
Bromcresol purple	10 mg/lt
EDTA	7.44 g/lt (20 mM)

## i) OTK için reaktif

Antipirin 65 mM	12.233 g/lt
Demir 3 klorür 12.5 mM	2.028 g/lt
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	625 ml
Bidistile su	375 ml

3-Standartlar

a) Superoksit dismutaz standartı ,bovin eritrosit SOD 3000Ü, Sigma

b) Selenyum Standartı ,atomic absorpsiyon standartı, Sigma, 50-400 ug/lt 0.1 M HCl ile hazırlanır.

c) Bakır Standartı ,Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.3H<sub>2</sub>O dan hazırlanan stok çözelti (3.7980 g/lt) 1/100 dilue edilerek elde edilen standart çözeltiden 0.2-2.0 ppm lik bakır standartları hazırlandı.

d)Çinko Standartı; Saf çinko metal 0.1 g tartıldı ve 10 ml 5N HCl ile çözüldükten sonra bidistile su ile 1 litreye tamamlandı. Bu stok çözelti 1/100 dilüe edildikten sonra 0.2-2.0 ppm lik standartlar hazırlandı.

e)Sitrülin Standartı; Sitrulin 17.5 mg/10 ml bidistile su hazırlanarak 1 mmol standart solusyon elde edildi.

f)Protein Standartı; 200 mg/100 ml konsantrasyonda Bovin serum albumin çözeltisinden bidistile su ile 25-200 mg/dl lik standartlar için gerekli seyreltmeler yapıldı.

g)Hemoglobin Standartı; 15 g/100ml lik hazır standart 10ul/10ml seyreltilerek 100mg/lt standart çözelti elde edildi.

### III-ÖRNEKLER;

Çalışmanın bu bölümü iki aşamalı olarak gerçekleştirilmiştir

Birinci aşama; sıçanlar için hepatotoksik dozu ve toksik etkinin görüldüğü zamanı saptayabilmek amacıyla yaklaşık 150±20 g ağırlığındaki standart hayvan besi yemi ile beslenen ,ortalama 2 aylık Swiss albino türü sıçanlara aynı gün 12 mg/kg olacak şekilde intraperitoneal Mitoksantron enjekte edilmiştir. Kontrol grubu için üç ve enjeksiyondan sonraki 4.,5.ve 6. günlerde üçer sıçan kalblerinden kan almak suretiyle öldürülmüş ve dokuları ayrılarak hepsi aynı gün çalışılmak üzere -20 C de saklanmıştır. Bu sıçanların eritrositlerinde bekletmeden SOD, katalaz ve karaciğer dokularında ise SOD, katalaz, SGOT, SGPT analizleri yanısıra karaciğerde histopatolojik değerlendirme yapılmıştır. Bu değerlendirmelerin sonucunda

karaciğerde toksik etkilerin 5. ve 6. gün olduğu saptanmıştır. Amacımız toksik etkiler mikroskobik düzeyde görülmeden toksisiteyi araştırmak olduğu için 2. aşamada çalışmalar sadece ilacı takiben 4. ve 5. günlerde yürütülmüştür.

İkinci aşama; Yaklaşık 150±20 g ağırlığında ve ortalama 2 aylık 24 adet Swiss albino türü sıçan çalışmaya alınmıştır. Oniki sıçan kontrol grubu olarak ayrılmış ve diğer grup ile birlikte aynı gün yaklaşık 0.6 ml distile su IP enjekte edilmiştir. Diğer oniki adet sıçana ise 12 mg/kg olacak şekilde yaklaşık 0.6 ml Mitoksantron enjeksiyonu yapılmıştır. Enjeksiyondan sonraki 4. gün 6 adet kontrol grubundan ve 6 adet deney grubundan ve 5. günde aynı şekilde 6 adet kontrol ve 6 adet deney grubundan olmak üzere onikişer sıçan eter anestezisi altında kalblerinden kan alınmak suretiyle öldürülmüştür. Derhal karaciğer dokuları çıkarılarak serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra dokular 3 parçaya ayrılmıştır. Sol alt lobdan alınan doku parçaları %10. formaline konarak histopatolojik inceleme için ayrılmıştır. Diğer örnekler derhal -20 ° C de derin dondurucuya konarak çalışılacağı güne dek saklanmıştır.

Çalışma gruplarını özetlemek gerekirse;

- 1-Kontrol grubu (n=15), ortalama 0.6 ml su IP verildi.
- 2-MTO 4 grubu, (n=9), tek doz ,12 mg/kg, ortalama 0.6 ml MTO IP verildi, uygulamadan sonraki 4.gün çalışmaya alındı.
- 3-MTO 5 grubu, (n=9), tek doz, 12 mg/kg, ortalama 0.6 ml MTO IP verildi, uygulamadan sonraki 5.gün çalışmaya alındı.

#### IV-YÖNTEMLER

1-Plazmada yapılan analizler: Sıçanların kalbinden alınan heparinize kan örnekleri +4 ° C de 1000gx10 dk santrifüjden sonra plazmaları ayrılmıştır. Bu plazma örneklerinde OTK, AST, ALT tayinleri yapılmıştır.

OTK tayini;(5,18,19,23,43) Ornitin Trans Karbamoilazın ornitini sitruline çevirmesi esasına dayalı spektrofotometrik yöntem kullanılmıştır.

Çalışma şekli:

	Örnek	Kör	Analiz körü
TEB tampon	-	0.1ml	0.4ml
Ornitin HCl 5mM	0.4ml	0.4ml	-
Plazma	0.1ml	-	0.1ml

37°C de 5 dakika inkübe edilir.

Karbamoil P Li tuzu	0.4ml	0.4ml	-
Urease 2g/L	-	-	0.4ml

37°C de 20 dakika inkübe edilir.

TCA %10	1.1ml	1.1ml	1.1ml
---------	-------	-------	-------

600g x 10 dakika santrifüj edilir.

Supernatant	1ml	1ml	1ml
Reagent	4ml	4ml	4ml
DAM 100 mM	1ml	1ml	1ml

Bütün tüpler 100°C de 20 dakika kaynatılır ve karanlıkta 10 dakika soğutulur.460 nm dalga boyunda spektrofotometrede suya karşı okunur. Hesaplama da örnek absorbanans değeri ile kör ve analiz körünün toplam değeri arasındaki fark alınır.Sitrülin çözeltisi kullanılarak önceden hazırlanmış olan standart grafikten yararlanarak, çalışmada bulunan optik dansite farkları U/lt cinsinden hesaplanır.

OTK aktivitesi (U/lt) biyolojik sıvının litresinde dakikada oluşan sitrülinin mikromolüne eşdeğerdir.

SGOT (AST) tayini;Plazma örnekleri direkt olarak Hitachi 705 otoanalizörde aşağıdaki prensibe dayalı Wako kiti kullanılarak çalışıldı.

alfa oksoglutarat+L aspartat ---> L glutamat+oksaloasetat  
oksaloasetat+NADH+H<sup>+</sup> ---> L malat+NAD<sup>+</sup>

Oluşan NAD spektrofotometrik olarak ölçüldü.

*SGPT (ALT) tayini;* Plazma örnekleri direkt olarak Hitachi 705 otoanalizörde aşağıdaki prensibe dayalı Wako kiti kullanılarak çalışıldı.

alfa oksoglutarat+L alanin ---> L glutamat+piruvat

piruvat+NADH+H<sup>+</sup> ---> Laktat+NAD<sup>+</sup>

Oluşan NAD miktarı spektrofotometrik olarak ölçüldü.

2-Eritrositlerde yapılan analizler: Plazmaları ayrılmış olan heparinize kan örnekleri 3 kez %0.9 NaCl çözeltisi ile yıkandıktan sonra soğuk bidistile su ile (1/5) hemolize edilmiş ve bu hemolizatlarda bekletilmeden SOD, katalaz ve hemoglobin tayinleri yapılmıştır.

*SOD tayini;* (24, 41, 64, 66, 82, 101) Hemolizatlar karbonat tampon ile 1/1000 dilüe edilerek pH=10.2 de epinefrinin adrenokroma otoksidasyonu esasına dayalı kolorimetrik yöntem ile SOD düzeyleri tayin edilmiştir. 2 ml tampon üzerine 7sn içinde 0.2ml örnek ve 0.025ml epinefrinin %0.55'lik (1mM HCl içinde hazırlanmış) çözeltisinden eklenerek absorbands artışı 15 sn aralarla 3 dk boyunca 480nm de okunmuştur. Enzimin epinefrinin adrenokroma otoksidasyonunu inhibe etme yüzdesinin hesaplanmasından sonra standart grafikten elde edilen veriler Ü/g Hb olarak değerlendirilmiştir. Kör için 2,2 ml tampon solusyon ve epinefrin kullanılmıştır.

*Katalaz tayini;* (1, 2, 17, 61, 89) Hemolizatlar fosfat tampon ile 1/1000 dilüe edilerek hidrojen peroksidin katalaz tarafından parçalanması temeline dayalı UV spektrofotometrik yöntem ile katalaz düzeyleri tayin edilmiştir. Taze hazırlanan 30mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.34ml %30'luk H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+99.7ml tampon) içeren fosfat tampon çözeltisinden 3ml üzerine 0.2ml örnek eklenerek 240nm de absorbandsın azalması 15 sn aralıklarla, 3 dk boyunca okunmuş ve lineer regresyonlara göre her bir analiz için en uygun absorbandslar bulunarak, k değeri şu



şekilde hesaplanmıştır;

$$k=2.3/ t \times \log A1/A2$$

Üniteye çevirmek için;

$$1\dot{U}=2.3 \times \log A1/A2 /t \times 6.93 \times 10^{-3}$$

$$= \dot{U}/0.1\text{ml} \times 10 = \dot{U}/\text{ml} \times 1000 (\text{dilasyon}) = \dot{U}/\text{ml}$$

Sonuçları standardize edebilmek için veriler g/Hb olarak değerlendirilmiştir.

*Hemoglobin tayini;* 5ml Drabkin çözeltisine 0.02ml hemolizat eklenerek 5dk sonra 546nm de suya karşı okunmuştur. Standartlarda aynı şekilde çalışılarak aşağıdaki gibi hesaplanmıştır:

$$\text{Deney/Standart} \times \%g \text{ Standart} \times \text{son hacim/kan hacmi} \times 1/100 = \%g \text{ Hb}$$

### 3-Karaciğer dokularında enzim analizleri:

*Doku homojenizasyonu;* Karaciğer doku örnekleri hassas terazide tartıldıktan sonra fosfat tampon ile (1/10,w/v) homojenizatörde 1000 devirde ortalama 10 vuru yapılarak homojenize edilmiştir. Homojenatlar 600g x 10 dakika santrifüj edildikten sonra üst faz homojenatlarda total ve MnSOD, katalaz, AST, ALT, OTK ve protein tayinleri yapılmıştır. Tüm bu işlemler +4° C de gerçekleştirilmiş ve enzim tayinleri için örnekler bekletilmemiştir.

*Total SOD tayini;*(90) Homojenatlar karbonat tampon ile 1/100 dilüe edildikten sonra eritrositlerdeki gibi çalışılmış, sonuçlar doku proteinine göre değerlendirilmiştir.

*Mn-SOD tayini;*(31,62) 1/100 dilüe homojenatlar siyanür içeren karbonat tampon ile total SOD yönemi gibi çalışılmış ve sonuçlar doku protenine göre hesaplanmıştır.

*Katalaz tayini;* Homojenatlar fosfat tampon ile 1/100 dilüe edildikten sonra eritrositteki gibi çalışılmış ve sonuçlar doku proteinine bölünerek hesaplanmıştır.

*SGOT (AST) tayini;* Homojenatlar 1/200 dilusyondan sonra otoanalizörde belirlenerek doku proteinine göre değerlendirilmiştir.

*SGPT (ALT) tayini;* Homojenatlar 1/200 dilusyondan sonra otoanalizörde çalışılarak doku proteinine göre hesaplanmıştır.

*OTK tayini;* (51) Homojenatlar 1/100 dilüe edildikten sonra plazmadaki yöntem ile çalışılmış, sonuçlar U/mg protein olarak hesaplanmıştır.

*Protein tayini;* (59) Proteinlerin alkali ortamda bakır iyonları ile biüret tepkimesi vermesi esasına dayanan Lowry yöntemi ile yapılmıştır. Peptid bağları alkali ortamda bakır tuzları ile mor renkli bir kompleks oluşturur ve aynı zamanda protein yapısındaki tirozin ve triptofan aminoasidleri fosfomolibdat-fosfotungstat çözeltisi (Folin-Ciocalteu) ile indirgenir. 1/20 dilüe edilen homojenattan 0.1ml üzerine 0.9ml bidistile su eklendikten sonra 5ml taze alkali bakır sülfat solusyonu konarak 10 dakika oda ısısında bekletildi. Karışımlara 1:1 oranında 1N HCl ile dilüe edilmiş folin çözeltisinden 1ml konarak oda sıcaklığında 30 dakika bekletildikten sonra 750nm de köre karşı okundu. Sonuçlar siğir serum albumininden hazırlanan standart çözelti ile çizilen grafikten hesaplanmıştır.

*Subselluler SOD tayini;* Karaciğer doku örnekleri tartılarak Tris-HCl tampon ile (1:10,w:v) homojenizatörde yaklaşık

1000 devirx10 vuru ile homojenize edilmiştir(7). 600gx10 dk santrifüjden sonra supernatant alınarak 10000gx15 dk, +4 °C de santrifüj edilerek pellet mitokondriyal SOD ve protein tayini için ayrılmış ve supernatant tekrar 100.000gx60 dk +4 °C de santrifüj edilerek sitozol fraksiyonu elde edilmiş ve bu fraksiyonda SOD ve protein tayinleri yapılmıştır.

*Mitokondriyal SOD tayini;* Mitokondri fraksiyonu 1/100 karbonat tampon ile dilüe edildikten sonra dokudaki total SOD yöntemi gibi çalışılmıştır.

*Sitozolik SOD tayini;* Sitozolik fraksiyon 1/10 karbonat tampon ile dilüe edildikten sonra dokudaki yöntem ile çalışılmıştır.

*Protein tayini;* Mitokondri fraksiyonu 1/100 ve sitozolik fraksiyon 1/10 dilüe edildikten sonra protein tayinleri yapılmıştır.

4.Karaciğer dokusunda element analizleri:Selenyum, bakır ve çinko analizleri için tartılan doku örnekleri  $\text{HNO}_3/\text{HClO}_4$  (1/1) solusyonu ile (1/10,w/v) 72 saat enkübe edilerek homojenize edilmiş ve santrifüj işleminden sonra element tayinleri yapılmıştır(61,93).

*Selenyum tayini;* (9,52,85)Selenyumun selenite indirgenmesi ve diaminonaftalen ile fluoresans vermesi esasına dayanan bu yöntemde  $\text{HNO}_3/\text{HClO}_4$  ile homojenize edilmiş örnekten 0.4 ml alınarak üzerine 1ml  $\text{HNO}_3/\text{HClO}_4$  eklenmiş ve alüminyum blokta 150 °C de 30 dakika,190 °C de 2 saat ve 210 °C de 1 saat ısıtılmıştır. Tüpler soğuduktan sonra 6M HCL çözeltisinden 0.2 ml ilave edilerek 150 °C de 5 dakika yeniden ısıtarak dijesyon işlemi tamamlanmıştır. Selenatın selenite indirgenmesi aşamasında tüplere 2 ml tampon çözelti

eklenerek sarı renk oluşması gözlenmiş, tüpler soğuduktan sonra 5ml 0.1N HCl eklenerek hacim bidistile su ile 10 ml e tamamlanmış ve örnekler bir gece oda ısısında ve karanlıkta bekletilmiştir. Ertesi gün plazselenol kompleksi oluşması için taze hazırlanmış DAN (0.1 M HCl içinde 4g/L hazırlanır) çözeltisinden 0.5 ml ilave edilerek 40 °C lik su banyosunda 30 dakika inkübe edilmiştir. Sikloheksan ile ekstraksiyondan sonra 360 nm eksitasyon ve 520 nm emisyon dalga boyunda fluoresans okunarak çizilen standart grafikten sonuçlar değerlendirilmiştir.

*Bakır tayini;* (61)HNO<sub>3</sub>/HClO<sub>4</sub> çözeltisi ile hazırlanmış homojenatlar ve standartlar aynı gün arka arkaya 324.8 nm dalga boyu, 5 mAmpere akım şiddeti ve 0.5 slit genişliğinde atomik absorpsiyon spektrofotometresinde okunarak sonuçlar çizilen grafikten ug/g yaş doku olarak hesaplanmıştır.

*Çinko tayini;* (46,61) Önceden hazırlanmış standart çözeltiler ve asid ile özütlenmiş doku örnekleri aynı gün arka arkaya 213.9 nm dalga boyunda, 10 mAmpere akım şiddeti ve 0.5 slit genişliğinde okunmuş ve standartlara göre grafik çizilerek ug/g yaş doku olarak değerler elde edilmiştir.

## 5-İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Bu çalışmada bulguların istatistiksel değerlendirilmesinde ANOVA istatistik programından yararlanılmıştır. Çoklu karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi ve ikili karşılaştırmalar için Student t testi kullanılmıştır. Ayrıca tüm değerler arasında korelasyonlar çifleştirilmiş düzenli korelasyon testi ile araştırılmıştır.

## BULGULAR

Bu çalışmada MTO'nun hepatotoksik etkisini araştırmak amacıyla plazma, eritrosit ve karaciğer dokularında çeşitli biyokimyasal parametreler araştırılmış ve dokular histolojik olarak ışık mikroskobunda incelenerek değerlendirme yapılmıştır.

Çalışmanın birinci aşamasında elde edilen veriler Tablo-2' de sunulmuştur. Bu aşamada eritrositer enzimlerde 4. gün değişiklikler gözlenirken karaciğer enzimlerinde belirgin değişiklikler ,histopatolojik inceleme ile uygun olarak 5.gün saptanmıştır. 6. gün yürütölen çalışmadaki bulgular 5. gündeki sonuçların bir devamı gibi gözlenmiştir. Amacımız akut dönemde toksisiteyi tanımlamak olduğu için çalışmanın ikinci aşamasında sadece 4. ve 5.gün gruplar çalışmaya alınmıştır.

Plazmada karaciğer hasarını araştırmak için AST, ALT ve OTK analizleri yapılmış, AST düzeyleri Tablo-3,ALT düzeyleri Tablo-4 ve OTK düzeyleri Tablo-5 de sunulmuştur. Bu üç enzimin birlikte değerlendirilmesi ise Grafik-1 de gösterilmiştir.Yapılan varyans analizi ve student-t testlerinde AST ve ALT düzeylerinde kontrol ile MTO grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanamamıştır (AST;f=0.105,ALT;f=0.65). OTK değerleri ise 4.gün belirgin olarak azalırken ( $p<0.05$ ),5. gün kontrole göre anlamlı olarak artmıştır( $p<0.05$ ) (f=9.5, $p<0.01$ ).

Bu çalışmada toksik radikallerle oluşan karaciğer hasarının daha hassas bir göstergesi olduğu düşünölen eritrositer SOD, katalaz düzeyleri ve hemoglobin tayinleri yapılmıştır. Varyans analizinde eritrositer SOD düzeyleri için

$f=11,84, p<0.01$  , katalaz için  $f=5.3, p<0.01$  ve hemoglobin değerleri için  $f=0.5, p>0.05$  olarak hesaplanmıştır. Yapılan student-t testi ile SOD'un 4. ve 5. gün kontrole göre anlamlı olarak arttığı ( $p<0.01$ ) ve 4. ile 5. gün arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermediği saptanmıştır (Tablo-6). Eritrositer katalaz düzeyleri ise 4. gün kontrole göre belirgin olarak azalırken ( $p<0.01$ ), 5.gün normal değerlere yaklaşmıştır( $p>0.05$ ), (Tablo-7). 4. ve 5. gün değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır. Hemoglobin değerlerinin de kontrol, 4.gün ve 5.gün arasında anlamlı bir değişiklik göstermediği saptanmıştır (Tablo-8).Eritrositlerde elde edilen sonuçların birlikte değerlendirilmesi Grafik-2 de görülebilir.

Karaciğer dokularında yapılan marker enzim analizlerinin istatistiksel değerlendirilmesinde; varyans analizi ile AST ( $f=13.37, p<0.01$ ) (Tablo-9) ve ALT ( $f=11.11, p<0.05$ ) (Tablo-10) düzeylerinde anlamlı değişiklikler saptanırken OTK değerlerinde anlamlı bir değişme olmadığı gözlenmiştir ( $f=0.99, p>0.05$ ). Student-t testi ile AST ve ALT nin 4.gün anlamlı olarak değişmediği, 5. gün her iki enzimin de belirgin olarak azaldığı saptanmıştır( $p<0.01$ ). Karaciğer homojenatlarında marker enzim değerleri Grafik-3 de verilmiştir.

Karaciğer dokusunda yürütülen antioksidan enzim analizlerinin değerlendirilmesinde, varyans analizi ile katalaz ve total SOD aktivitelerinde belirgin değişiklikler olduğu Mn-SOD aktivitesinin ise değişmediği saptanmıştır (sırayla;  $f=11.0, p<0.01$ ,  $f=4.5, p<0.05$ ,  $f=2.33, p>0.05$ ). Tablo-12 de görülebileceği gibi katalaz düzeyleri 4. ve 5. gün kontrole göre anlamlı olarak azalmıştır( $p<0.01$ ). Total SOD aktiviteleri de (Tablo-13) 4.gün daha az ( $p<0.05$ ) ve 5. gün

daha belirgin olarak azalmıştır ( $p<0.01$ ). İstatistiksel değerlendirmede 4. ile 5. gün arasında anlamlı bir fark olmadığı saptanmıştır. Mn-SOD aktiviteleri Tablo-14 de verilmiştir.

Karaciğerin mitokondri ve sitozolik fraksiyonlarında yürütülen çalışmalarda elde edilen veriler sırasıyla Tablo-15 ve Tablo-16 da sunulmuştur. İstatistiksel değerlendirmede varyans analizi ile her iki fraksiyonda SOD aktivitelerinde saptanan değişiklikler anlamlı bulunmuştur ( $f=10.06, p<0.01$  ve  $f=7.2, p<0.01$ ). Student-t testi ile mitokondrial SOD'un 4. gün daha az ( $p<0.05$ ) olmak üzere giderek azaldığı gözlenmiştir (5.gün;  $p<0.01$ ). Sitozolik SOD ise 4. gün anlamlı olarak değişmezken 5. gün belirgin olarak azalmıştır ( $p<0.01$ ). Karaciğer dokusunda yürütülen antioksidan enzim analizlerinin değerlendirilmesi Grafik-4 de sunulmuştur.

Karaciğer dokularında yapılan element tayinlerinin istatistiksel değerlendirilmesi sonucu; selenyum ve çinkonun varyans analizi ile anlamlı değişiklikler gösterdikleri (sırayla:  $f=7.1, p<0.01$  ve  $f=7.4, p<0.01$ ) bakır değerlerinde ise değişiklik olmadığı saptanmıştır ( $f=1.99, p>0.05$ ). Student-t testi ile selenyumun 4. ve 5. gün kontrole göre anlamlı olarak arttığı ( $p<0.01$ ) ortaya konmuştur (Tablo-17). Bakır düzeyleri 4.gün hafif artmış ancak bu artış anlamlı bulunmamıştır ( $p>0.05$ ) (Tablo-18). Çinko değerleri ise 4. gün belirgin bir şekilde artarken ( $p<0.01$ ), 5.gün normal değerlerine yaklaşmıştır (Tablo-19). Element analizlerinin birlikte değerlendirilmesi Grafik-5 de verilmiştir.

Karaciğer dokularının histopatolojik değerlendirilmesinde (E.Ü.T.F. Patoloji anabilim dalı, prot no=19742-750, 19922-930) 4. gün normale yakın bir karaciğer dokusu gözlenirken

5. gün yer yer sitoplazmik vakualizasyon ile hücre hasarının başladığı saptanmıştır. Normal karaciğer dokusu Resim-1 4.gün karaciğer dokusunun görünümü Resim-2 ve 5.güne ait fotoğraf Resim-3 de sunulmuştur.

Tablo-2, Çalışmanın birinci aşamasında elde edilen veriler

	Kontrol	MTO 4	MTO 5	MTO 6	
<b>E SOD</b>	<b>1</b>	<b>8613</b>	<b>13094</b>	<b>11864</b>	<b>9800</b>
<b>U/g Hb</b>	<b>2</b>	<b>7487</b>	<b>10810</b>	<b>8120</b>	<b>9240</b>
	<b>3</b>	<b>5866</b>	<b>10242</b>	<b>11070</b>	<b>8860</b>
<b>E KAT</b>	<b>1</b>	<b>6972</b>	<b>5070</b>	<b>6562</b>	<b>6840</b>
<b>U/g Hb</b>	<b>2</b>	<b>7172</b>	<b>4486</b>	<b>7170</b>	<b>6440</b>
	<b>3</b>	<b>6129</b>	<b>5590</b>	<b>5824</b>	<b>7120</b>
<b>Kc KAT</b>	<b>1</b>	<b>15.6</b>	<b>16.0</b>	<b>3.8</b>	<b>5.2</b>
<b>U/mg pr</b>	<b>2</b>	<b>19.3</b>	<b>7.7</b>	<b>10.2</b>	<b>7.4</b>
	<b>3</b>	<b>17.9</b>	<b>11.7</b>	<b>7.4</b>	<b>8.8</b>
<b>Kc SOD</b>	<b>1</b>	<b>6.2</b>	<b>4.9</b>	<b>4.3</b>	<b>4.0</b>
<b>U/mg pr</b>	<b>2</b>	<b>7.2</b>	<b>5.8</b>	<b>4.1</b>	<b>3.8</b>
	<b>3</b>	<b>8.0</b>	<b>5.3</b>	<b>2.9</b>	<b>4.2</b>
<b>Mn-SOD</b>	<b>1</b>	<b>0.55</b>	<b>0.62</b>	<b>0.47</b>	<b>0.50</b>
<b>U/mg pr</b>	<b>2</b>	<b>0.60</b>	<b>0.50</b>	<b>0.24</b>	<b>0.42</b>
	<b>3</b>	<b>0.76</b>	<b>0.63</b>	<b>0.54</b>	<b>0.46</b>
<b>MitSOD</b>	<b>1</b>	<b>4.4</b>	<b>5.3</b>	<b>3.4</b>	<b>4.2</b>
<b>U/mg pr</b>	<b>2</b>	<b>5.6</b>	<b>4.2</b>	<b>4.2</b>	<b>4.6</b>
	<b>3</b>	<b>3.6</b>	<b>3.2</b>	<b>2.5</b>	<b>3.6</b>
<b>SitSOD</b>	<b>1</b>	<b>5.4</b>	<b>9.1</b>	<b>5.1</b>	<b>5.6</b>
<b>U/mg pr</b>	<b>2</b>	<b>7.2</b>	<b>5.9</b>	<b>5.5</b>	<b>4.8</b>
	<b>3</b>	<b>8.1</b>	<b>8.2</b>	<b>4.6</b>	<b>4.2</b>
<b>Histopatoloji</b>	<b>(-)</b>	<b>(-)</b>	<b>(+)</b>	<b>(+)</b>	<b>(+)</b>



Tablo-3, Kontrol ve MTO uygulamasını (12mg/kg MTO,IP) takiben sıçan plazması SGOT(AST) aktiviteleri (U/lt)

	Kontrol n=12	MTO 4 n=6	MTO 5 n=6
	132	80	198
	136	221	119
	113	89	142
	70	101	104
	155	107	132
	163	107	93
	145		
	146		
	122		
	88		
	94		
	116		
Ort±SEM	123.3±8.2	123.0±21.3 p>0.05	131.3±15.2 p>0.05

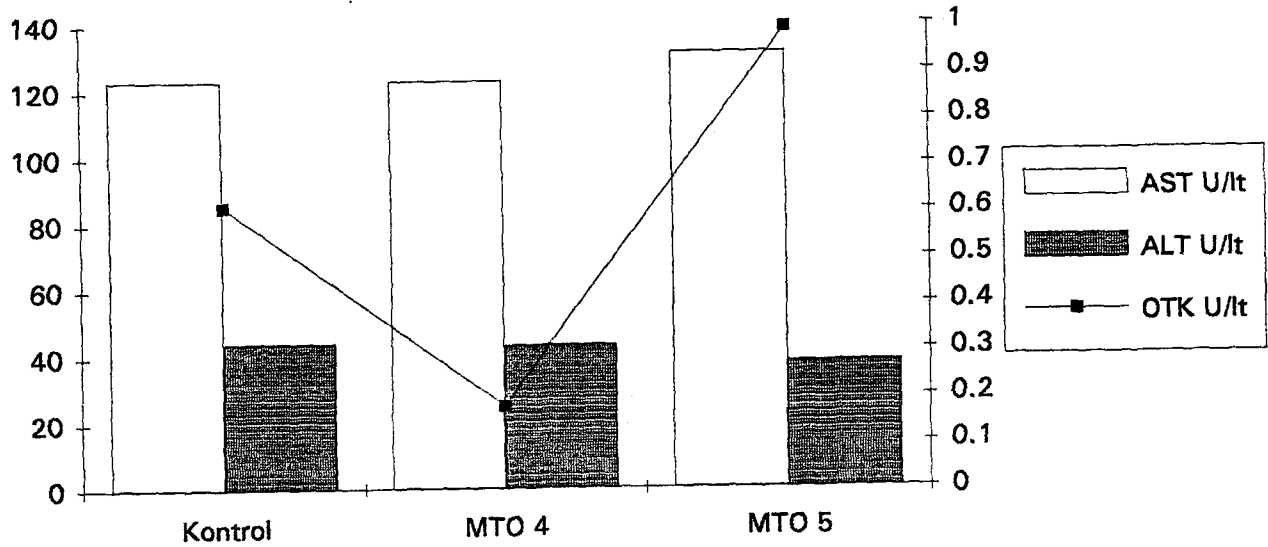
Tablo-4, Kontrol ve MTO uygulamasını (12mg/kg MTO,IP) takiben sıçan plazması SGPT(ALT) aktiviteleri (U/lt)

	Kontrol n=12	MTO 4 n=6	MTO 5 n=6
	67	51	50
	58	50	28
	56	45	29
	37	23	40
	26	43	42
	38	48	44
	40		
	37		
	41		
	50		
	37		
	42		
Ort ±SEM	44.1±3.3	43.3±4.3 p>0.05	38.2±3.5 p>0.05

Tablo-5, Kontrol ve MTO uygulamasını (12mg/kg MTO,IP) takiben sıçan plazması OTK aktiviteleri (U/lt)

	Kontrol n=10	MTO 4 n=6	MTO 5 n=6
	0.60	0.21	0.23
	0.18	0.19	1.33
	0.12	0.17	1.00
	1.07	0.15	1.30
	1.00	0.18	1.50
	0.75	0.18	0.65
	0.45		
	0.70		
	0.65		
	0.60		
Ort $\pm$ SEM	0.61 $\pm$ 0.10	0.18 $\pm$ 0.01 p<0.05	1.00 $\pm$ 0.19 p<0.05

Grafik-1, Sıçanların plazmalarında karaciğer marker enzimleri



Tablo-6, Kontrol ve MTO uygulamasını (12mg/kg MTO,IP) takiben sıçan eritrositlerinde SOD enzim aktiviteleri (U/gr Hb)

Kontrol n=15	MTO 4 n=9	MTO 5 n=8
8613	13094	11864
7487	10810	8120
3907	7978	13875
8035	16796	11070
5866	18046	11658
7969	6750	8490
6881	8996	5830
8146	10242	10600
5897	13420	
7444		
7542		
5849		
5412		
5465		
7292		
Ort±SEM 6787±340	11792±1289 p<0.01	10188±903 p<0.01

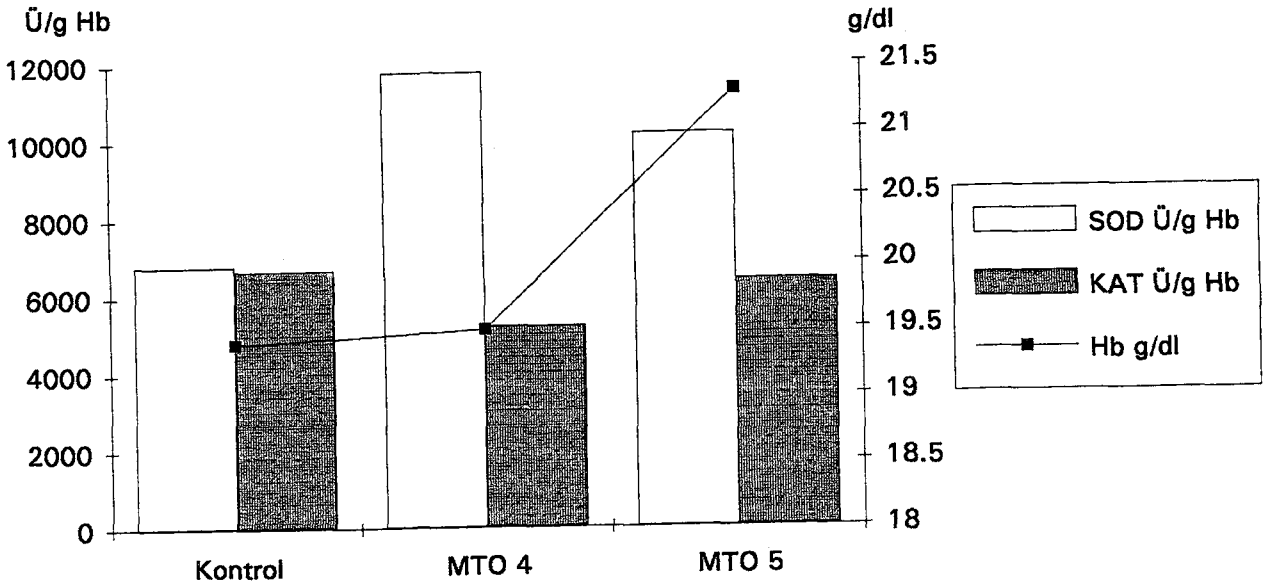
Tablo-6, Kontrol ve MTO uygulamasını (12mg/kg MTO,IP) takiben sıçan eritrositlerinde Katalaz enzim aktiviteleri (U/gr Hb)

Kontrol n=15	MTO 4 n=9	MTO 5 n=8
6972	5070	6562
7172	4486	7170
5001	5590	5824
5433	4862	8747
7262	6040	5340
6129	4632	4023
6395	5877	5762
8377	4980	7775
6382	5462	
5841		
7262		
7723		
8107		
6952		
5008		
Ort ±SEM 6667±271	5222±182 p<0.01	6400±526 p>0.05

Tablo-8, Kontrol ve MTO uygulamasını (12mg/kg MTO,IP) takiben sıçan eritrositlerinde hemoglobin düzeyleri (gr/dl)

	Kontrol n=15	MTO 4 n=9	MTO 5 n=9
	23.8	24.0	20.2
	27.4	14.8	27.3
	31.0	18.8	26.6
	16.8	25.6	19.0
	17.9	17.4	18.2
	21.7	20.0	22.4
	20.8	15.8	21.7
	19.1	17.9	18.0
	19.5	21.1	18.4
	13.8		
	9.0		
	13.2		
	14.3		
	21.8		
	21.1		
Ort±SEM	19.4±1.4	19.5±1.2 p>0.05	21.3±1.2 p>0.05

Grafik-2, Sıçanların eritrositlerinden elde edilen değerler



Tablo-9, Kontrol ve MTO uygulamasını (12mg/kg MTO,IP) takiben sıçan karaciğer homojenatlarında SGOT(AST) aktiviteleri (Ü/mg prot)

	Kontrol n=14	MTO 4 n=9	MTO 5 n=9
	0.68	0.90	0.33
	2.04	1.30	0.57
	0.98	2.00	0.50
	1.64	1.00	0.57
	1.09	2.13	0.76
	1.50	2.00	0.94
	1.15	2.70	1.05
	1.58	1.54	0.54
	0.72	1.98	0.78
	1.82		
	1.10		
	0.98		
	0.82		
	1.10		
<b>Ort±SEM</b>	<b>1.23±0.11</b>	<b>1.73±0.19</b> p>0.05	<b>0.67±0.08</b> p<0.01

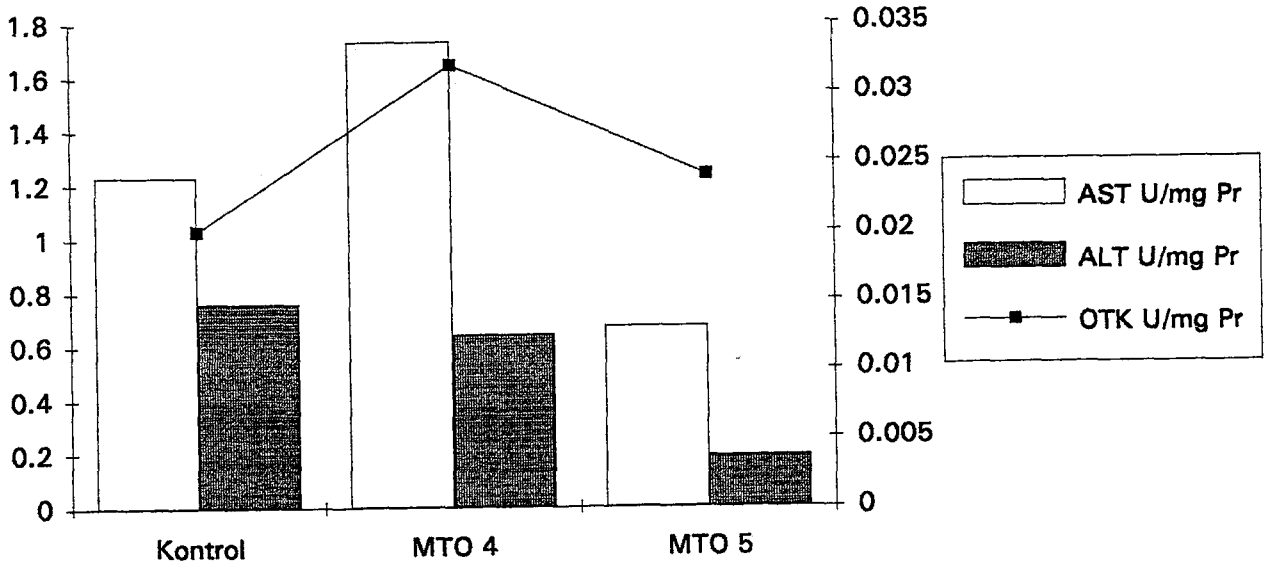
Tablo-10 ,Kontrol ve MTO uygulamasını (12mg/kg MTO,IP) takiben sıçan karaciğer homojenatlarında SGPT(ALT) aktiviteleri(Ü/mg prot)

	Kontrol n=14	MTO 4 n=9	MTO 5 n=9
	0.25	0.95	0.07
	1.05	0.77	0.15
	1.10	0.77	0.11
	0.47	0.19	0.10
	0.39	0.58	0.17
	1.00	0.49	0.35
	0.25	0.79	0.36
	1.15	0.60	0.18
	1.40	0.69	0.22
	0.95		
	0.35		
	0.58		
	1.00		
<b>Ort±SEM</b>	<b>0.76±0.11</b>	<b>0.64±0.07</b> p>0.05	<b>0.19±0.03</b> p<0.01

Tablo-11, Kontrol ve MTO uygulamasını (12mg/kg MTO,IP) takiben sıçan karaciğer homojenatlarında OTK aktivitei (Ü/mg prot)

	Kontrol n=10	MTO 4 n=9	MTO 5 n=9
	0.022	0.046	0.020
	0.034	0.021	0.037
	0.020	0.110	0.015
	0.021	0.012	0.020
	0.013	0.012	0.021
	0.019	0.010	0.028
	0.020	0.015	0.025
	0.015	0.027	0.030
	0.016	0.036	0.020
	0.022		
Ort ±SEM	0.020±0.00	0.032±0.01 p>0.05	0.024±0.00 p>0.05

Grafik-3, Karaciğer homojenatlarında marker enzimler



Tablo-12, Kontrol ve MTO uygulamasını (12mg/kg MTO,IP) takiben sıçan karaciğer homojenatlarında katalaz aktiviteleri(Ü/mg prot)

	Kontrol n=15	MTO 4 n=9	MTO 5 n=9
	15.6	15.0	3.8
	19.3	7.7	10.2
	17.9	11.7	11.0
	18.9	4.0	9.4
	15.6	14.1	4.5
	10.5	8.1	7.4
	23.7	10.0	8.5
	11.9	8.3	8.7
	10.3	11.5	6.9
	11.4		
	10.0		
	12.1		
	10.2		
	20.0		
	14.1		
<b>Ort ±SEM</b>	<b>14.8±1.1</b>	<b>10.0±1.1</b> <b>p&lt;0.01</b>	<b>7.8±0.8</b> <b>p&lt;0.01</b>

Tablo-13, Kontrol ve MTO uygulamasını (12mg/kg MTO,IP) takiben sıçan karaciğer homojenatlarında total SOD aktiviteleri (Ü/mg prot)

	Kontrol n=14	MTO 4 n=8	MTO 5 n=7
	6.2	4.9	4.3
	5.3	5.8	6.3
	6.5	5.8	2.1
	8.6	5.3	2.9
	7.2	6.1	6.6
	6.6	5.6	7.4
	8.0	7.3	4.1
	5.4	4.5	
	5.6		
	7.7		
	5.4		
	7.7		
	5.9		
	6.3		
<b>Ort ±SEM</b>	<b>6.6±0.3</b>	<b>5.7±0.3</b> <b>p&lt;0.05</b>	<b>4.8±0.7</b> <b>p&lt;0.01</b>

Tablo-14, Kontrol ve MTO uygulamasını (12mg/kg MTO,IP) takiben sıçan karaciğer homojenatlarında MnSOD aktiviteleri(Ü/mg prot)

	Kontrol n=11	MTO 4 n=9	MTO 5 n=9
	0.55	0.62	0.73
	0.60	0.63	0.47
	0.40	0.50	0.24
	0.76	0.32	0.50
	0.56	0.40	0.54
	0.67	0.33	0.10
	0.70	0.60	0.55
	0.54	0.51	0.54
	0.48	0.44	0.37
	0.62		
	0.48		
<b>Ort±SEM</b>	<b>0.58±0.03</b>	<b>0.48±0.04</b> <b>p&lt;0.05</b>	<b>0.45±0.06</b> <b>p&lt;0.05</b>

Tablo-15, Kontrol ve MTO uygulamasını (12mg/kg MTO,IP) takiben sıçan karaciğer mitokondrial SOD aktiviteleri (Ü/mg mitokondri protein")

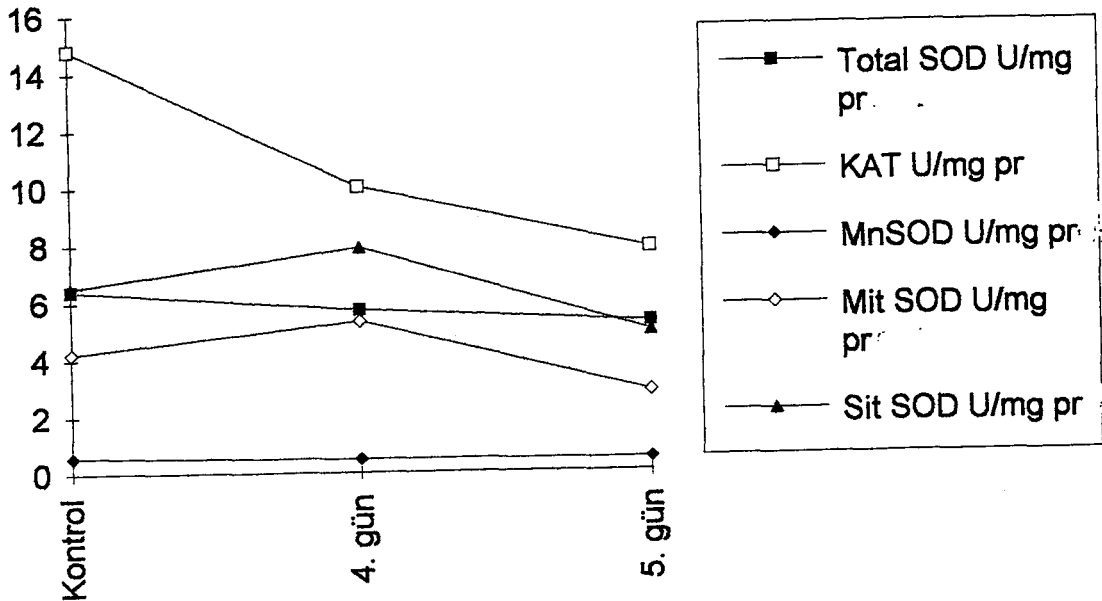
	Kontrol n=11	MTO 4 n=9	MTO 5 n=9
	4.4	5.3	3.4
	5.6	4.2	4.2
	1.8	3.2	2.5
	3.6	4.7	1.6
	5.1	8.1	2.1
	3.4	6.6	3.6
	4.4	4.8	2.6
	3.2	4.6	3.0
	4.2	5.9	2.4
	5.8		
	4.6		
<b>Ort±SEM</b>	<b>4.2±0.3</b>	<b>5.3±0.5</b> <b>p&lt;0.05</b>	<b>2.8±0.3</b> <b>p&lt;0.01</b>



Tablo-16, Kontrol ve MTO uygulamasını (12mg/kg MTO,IP) takiben sıçan karaciğer sitozolik SOD aktiviteleri (Ü/mg sitozol proteini)

	Kontrol n=12	MTO 4 n=8	MTO 5 n=9
	5.4	9.1	5.1
	4.8	10.7	6.6
	5.2	7.1	2.9
	5.0	5.9	3.3
	5.9	7.2	5.5
	4.7	6.3	5.9
	7.2	8.2	5.4
	10.6	8.5	5.2
	6.0		4.6
	6.5		
	8.8		
	8.1		
<b>Ort ±SEM</b>	<b>6.5±0.6</b>	<b>7.9±0.5</b> <b>p&gt;0.05</b>	<b>4.9±0.4</b> <b>p&lt;0.01</b>

Grafik-4, Sıçanların karaciğerlerinde antioksidan enzimler



Tablo-17, Kontrol ve MTO uygulamasını (12mg/kg MTO,IP) takiben sıçan karaciğer homojenatlarında Selenyum düzeyleri ( $\mu\text{g}/\text{gr}$  yaş doku)

	Kontrol n=15	MTO 4 n=9	MTO 5 n=9
	0.44	0.91	0.58
	0.30	0.40	0.66
	0.49	0.77	0.83
	0.53	0.49	0.30
	0.65	0.63	1.68
	0.71	1.44	0.60
	0.62	0.84	0.93
	0.61	0.71	0.62
	0.56		
	0.62		
	0.65		
	0.68		
	0.50		
	0.62		
	0.71		
<b>Ort<math>\pm</math>SEM</b>	<b>0.58<math>\pm</math>0.03</b>	<b>0.77<math>\pm</math>0.11</b> <b>p&lt;0.05</b>	<b>0.77<math>\pm</math>0.14</b> <b>p&lt;0.05</b>

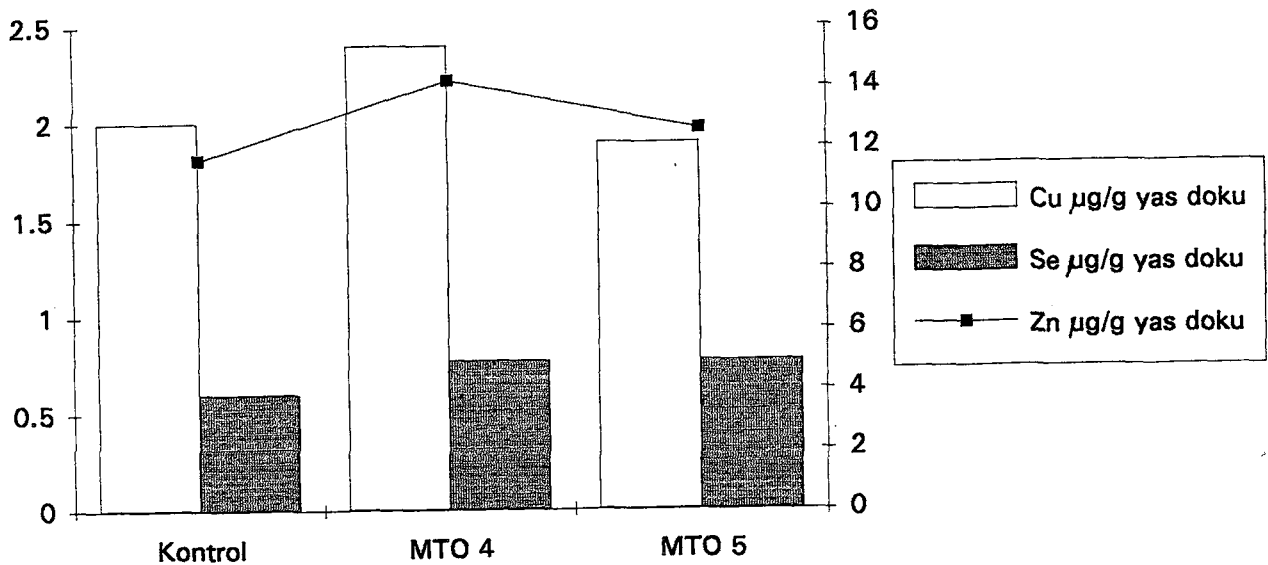
Tablo-18, Kontrol ve MTO uygulamasını (12mg/kg MTO,IP) takiben sıçan karaciğer homojenatlarında Bakır düzeyleri ( $\mu\text{g}/\text{gr}$  yaş doku)

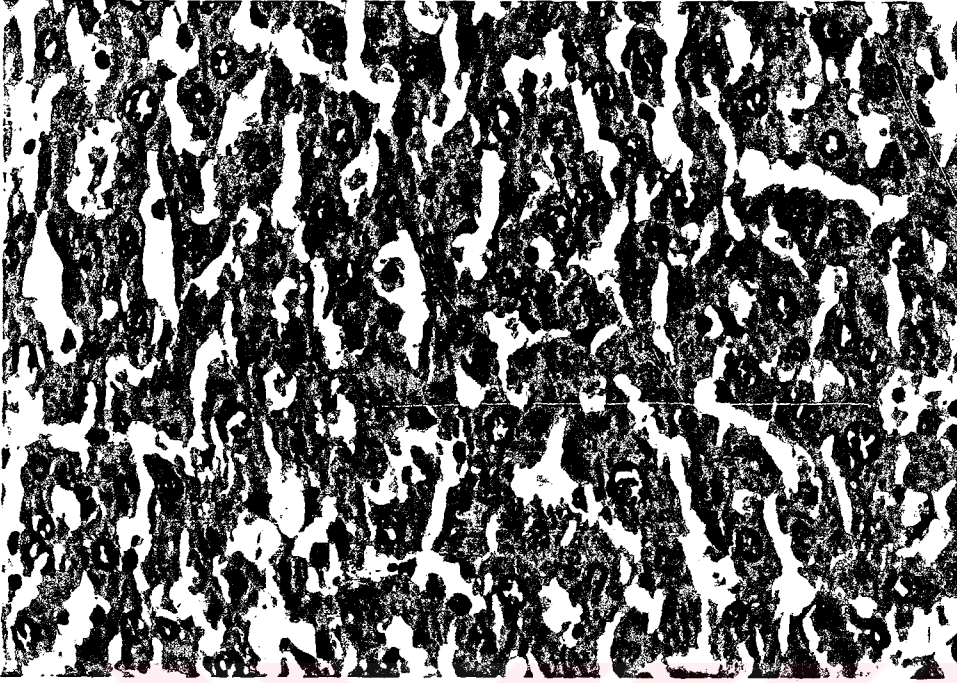
	Kontrol n=15	MTO 4 n=9	MTO 5 n=9
	1.8	2.4	2.4
	2.0	2.2	2.0
	1.6	2.6	2.0
	2.0	2.8	1.8
	2.4	2.2	1.6
	2.2	2.0	2.0
	1.6	2.4	1.8
	2.6	2.2	
	2.0	2.6	
	2.2		
	1.8		
	1.6		
	2.0		
	2.2		
<b>Ort<math>\pm</math>SEM</b>	<b>2.0<math>\pm</math>0.1</b>	<b>2.4<math>\pm</math>0.1</b> <b>p&gt;0.05</b>	<b>1.9<math>\pm</math>0.1</b> <b>p&gt;0.05</b>

Tablo-19, Kontrol ve MTO uygulamasını (12mg/kg MTO,IP) takiben sıçan karaciğer homojenatlarında Çinko düzeyleri ( $\mu\text{g}/\text{gr}$  yaş doku)

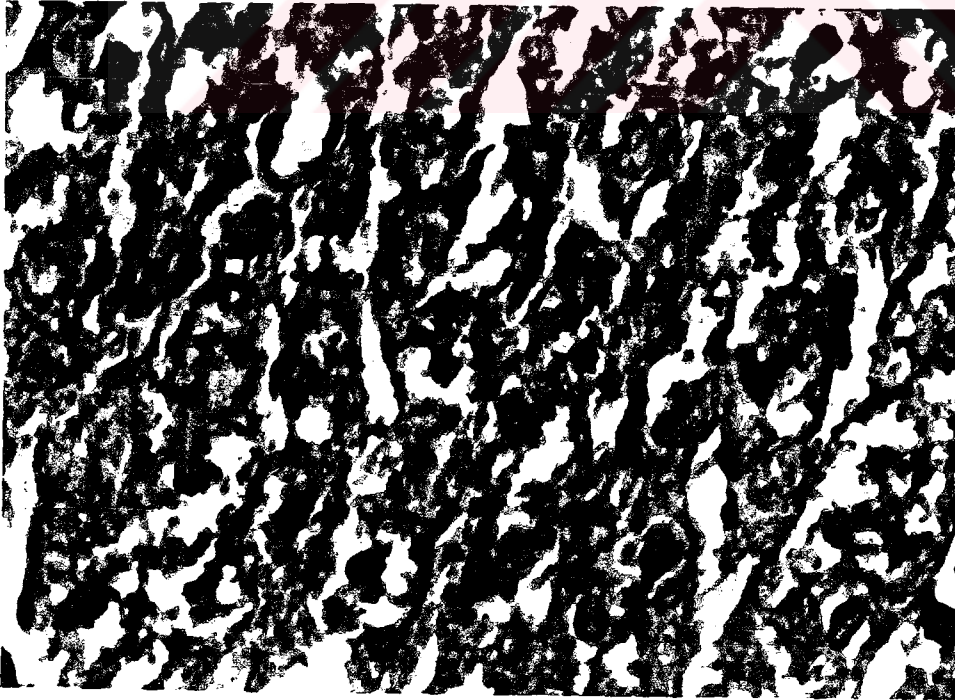
	Kontrol n=15	MTO 4 n=9	MTO 5 n=9
	12	13	15
	11.4	15	13.2
	11.2	12.4	12.8
	13.4	18.8	14.4
	9.4	12.0	9.4
	11.2	13.4	13.4
	12.0	15.0	11.2
	10.6	15.0	11.8
	13.2	13.2	13.4
	12.0		
	11.4		
	10.8		
	12.4		
	12.8		
	10.4		
<b>Ort<math>\pm</math>SEM</b>	<b>11.6<math>\pm</math>0.3</b>	<b>14.2<math>\pm</math>0.7</b> <b>p&lt;0.01</b>	<b>12.6<math>\pm</math>0.6</b> <b>p&gt;0.05</b>

Grafik-5, Karaciğer homojenatlarında element değerleri

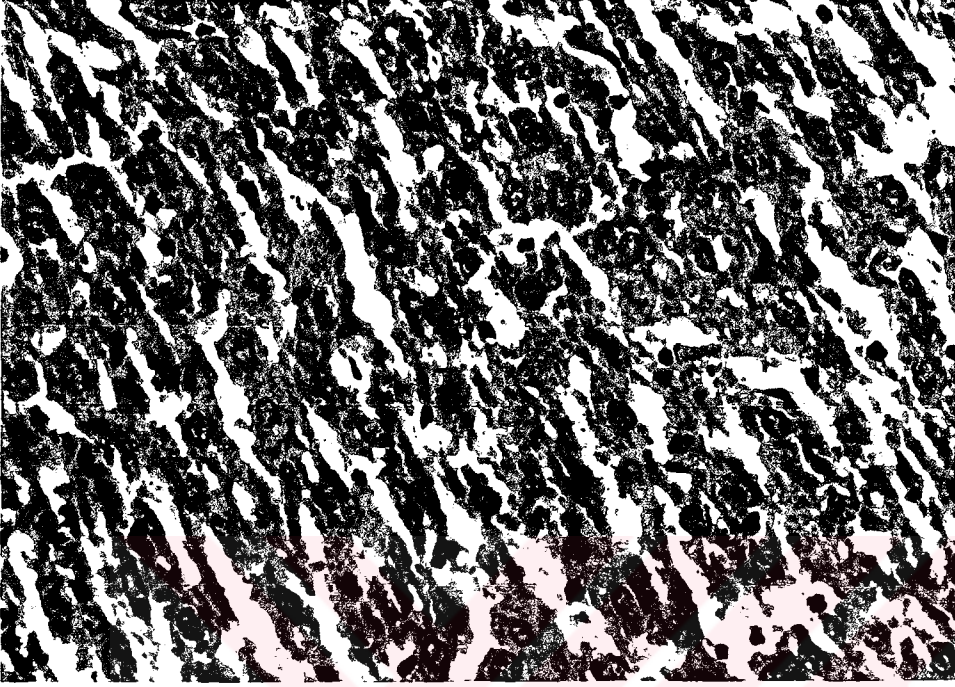




Resim-1, Kontrol grubuna ait karaciğer dokusu(x40)



Resim-2, MTO 4 grubuna ait karaciğer dokusu (x40)



Resim-3, MTO 5 grubuna ait karaciğer dokusu (x40)

## TARTIŞMA VE SONUÇ

Son yıllarda meme kanseri, lösemi, lenfoma gibi pekçok kanser türünün tedavisinde yararı ve etkinliği klinik çalışmalarla kanıtlanmış olan MTO'nun etki mekanizması ve buna bağlı olarak karaciğerde oluşturduğu toksik etkilerle ilgili çalışmalar giderek yoğunluk kazanmıştır (3,4,12,27,28,32,34,48,57,81). MTO ile karaciğer ve kalbte oluşan toksik etkilerin nedeninin metabolizması sırasında oluşan radikaller (superoksid anyon ve diğer oksijen metabolitleri) olduğu yolunda kanıtlar mevcut olmasına karşın bu konudaki yayınların verileri çok çelişkilidir (2,48,49,57,64,65,69,75). MTO ile oluşan toksik karaciğer hasarının erken tanısı konusundaki yayınlar ise oldukça yetersizdir. MTO ile oluşturulan karaciğer hasarının nedeninin ve erken tanı olanaklarının araştırılmasının amaçlandığı bu çalışmada, plazmada , eritrositlerde ve karaciğer dokularında karaciğer hasarının göstergeleri olarak bilinen enzimatik markerlar yanısıra MTO'nun etki mekanizmasının bir bölümü ile oluşturduğu düşünülen antioksidan enzimlerdeki değişiklikler araştırılarak erken tanı değerleri tartışılmıştır.

Bilindiği gibi akut ve toksik karaciğer hasarında en belirgin değişiklikler AST düzeylerinde olmakta, ALT de daha az değişiklik gözlenmektedir (42). Akut hasar gama GT düzeylerine etkisizdir. Son yıllarda karaciğer mitokondri membranına bağlı bir enzim olan OTK'nin de bazı klinik durumlarda AST ve ALT den daha değerli olduğu yolunda çalışmalar vardır (50). Ancak Kratf ve ark. köpeklerde ilaç entoksikasyonunda OTK'nin önemli olmadığını ortaya koymuşlardır (50). Bizim çalışmamızda plazma AST



düzeylelerinde 5.gün istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir artış (Tablo-3) ve ALT düzeylelerinde ise 5. gün yine istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir azalma Tablo-4) saptanmıştır. Plazma OTK aktiviteleri ise 4.gün düşmüş ancak 5.gün bir artış göstermiştir ( $p<0.05$ ) (Tablo-5). MTO ile ilgili bu konuda yayınlanmış herhangi bir çalışma olmamasına karşın diğer hepatotoksik ajanlarla yürütülen çalışmalarda AST ve ALT düzeylelerinin plazmadaki artışlarının karaciğer hasarının ışık mikroskobu düzeyinde görülmeye başlaması ile birlikte olduğu vurgulanmaktadır (13,26). Elde ettiğimiz verileri, bu bilgilerin ışığı altında değerlendirdiğimizde, AST ve OTK düzeylelerinde 5. gün saptanan artışın karaciğer hasarına bağlı olabileceği düşünülebilir. Histopatolojik veriler de 5. gün ışık mikroskobu düzeyinde gözlenen değişiklikler bu bulgularla uyumludur. Plazma enzim düzeyi değişiklikleri ancak hasar oluştuktan sonra hasarlı hücrelerden açığa çıkan enzimlere bağlı olduğu düşünülürse sıçanlara MTO verilmesinden daha uzun bir süre sonra plazma enzim değişikliklerini beklemek gerekmektedir.

Bilindiği gibi eritrositler, hemoglobinin otoksidasyonu ile oluşan süregelen bir oksijen radikal etkisine maruz kaldığı için sürekli bir oksidatif stres altındadır(17,94). Buna bağlı olarak SOD ve katalaz gibi antioksidan enzimler eritrositlerde yüksek oranda bulunmakta ve eritrositler vücudun antioksidan sisteminin periferik göstergeleri olarak kabul edilmektedir (17). Yıldırım ve arkadaşlarının sıçanlarda akut etanol entoksikasyonunda yaptıkları çalışmada ortaya koydukları gibi eritrositler akut toksisiteye karşı cevapta en erken etkilenen organellerdir ve eritrosit enzim aktivitelerinde gözlenen bu değişiklikler hasarın erken bir habercisi olabilir(95). Bu çalışmada eritrosit hemoglobin değerlerinde bir değişiklik olmaksızın SOD düzeylelerinin MTO verilmesinden sonraki 4.gün 2 katına

varan bir artış gösterdiğini, bunun 5.gün biraz azaldığı ancak normal değerlere düşmediği gözlenmiştir (Tablo-6, grafik-2). Katalaz düzeylerinde ise 4. gün belirgin bir düşme saptanmış, 5.gün normal değerlere yaklaşmıştır (Tablo-7). Bu çalışmada bulunan yüksek eritrosit SOD aktivitesinin ilacın metabolizması sırasında oluşan superoksid anyonlarının etkisiyle oluştuğu düşünülebilir. Eritrositer katalaz aktivitesindeki MTO 4 grubunda izlenen hafif düşme bu enzimin MTO'ya yanıt olarak inhibe edilebileceğini düşündürmektedir. Ancak bu konuda diğer toksik ajanlarda olduğu gibi konuya açıklık getirebilecek eritrosit katalazı ile ilgili bir kaynak çalışmaya rastlanmamıştır. Buna karşın karaciğer dokusunda katalaz değerlerinde düşmenin saptandığı çalışmalar vardır(34). Karaciğerde ışık mikroskobu düzeyinde görülebilen bir hasar oluşmadan eritrositer enzimlerde saptanan bu değişiklikler antioksidan enzim tayinlerinin erken dönem göstergeler olarak kullanılabilmesi kanısını desteklemektedir.

Karaciğer dokularında yürütülen çalışmalarda, karaciğer hasarının göstergeleri olan AST, ALT düzeylerinde 4. gün anlamlı değişiklikler olmadığı saptanmıştır (Tablo-9 ve 10, grafik-3). 5.gün ise AST ve ALT düzeylerinde gözlenen belirgin düşmeler karaciğer hasarı nedeniyle enzimlerin hücre dışına çıkmasına bağlanmıştır. Karaciğer OTK düzeyleri ise 4.gün ve 5. gün kontrole göre anlamlı bir fark göstermemiştir (Tablo-11).

Antioksidan enzimler olan SOD ve katalazın sıçan karaciğerindeki normal aktiviteleri konusunda yayınlarda çok farklı sonuçlardan söz edilmektedir (6,31,44,62,74,77). SOD tipleri için iki farklı çalışma şekli olduğu gözlenmiştir. Birinci tip uygulamada, SOD'un mitokondriada ve sitozolde yoğun bulunan tiplerini saptamak için doku fraksiyonu



uygulanarak aynı yöntemle bu doku bölümlerinde çalışılmıştır. Bu tür bir çalışma yapan Peskin ve arkadaşları, sitozolde SOD düzeylerini  $180 \pm 17$  Ü/mg protein ve mitokondride  $34 \pm 8$  Ü/mg protein (74), Jill ve arkadaşları ise erkek Wistar tipi sıçanlarda aynı analizleri sırasıyla  $503 \pm 59$  Ü/mg protein,  $50 \pm 4.7$  Ü/mg protein olarak saptamışlardır (44). Dryer ve arkadaşları yine aynı tür bir çalışmada total SOD aktivitesini  $26 \pm 2.1$  Ü/mg protein ve mitokondrial SOD 'u  $8.1 \pm 0.3$  Ü/mg protein olarak bulmuşlardır (31). Yürütülen bu çalışmada da sitozolik SOD  $6.5 \pm 0.8$  Ü/mg protein ve mitokondrial SOD  $4.2 \pm 0.3$  Ü/mg protein olarak saptanmıştır (Tablo-15 ve 16). Diğer bir grup araştırmacı ise SOD un bu iki farklı tipinin siyanür ile inhibe olup olmamasına göre ayırtetmek amacıyla total doku homojenetlerinde ortama siyanür ekleyerek ve eklemeksizin SOD tayinleri yapmışlardır. Siyanür eklenen ortamda CuZn-SOD inhibe olacağı için bu ortamda ölçülen SOD aktivitesi Mn-SOD yani mitokondrial SOD olarak değerlendirilmiştir. Mariucci ve arkadaşları bu tip bir çalışmada sıçan karaciğerinde CuZn-SOD ve Mn-SOD aktivitelerini sırasıyla  $380$  Ü/mg protein ve  $35-40$  Ü/mg protein (62), Dryer ve arkadaşları ise Sprague Dawley sıçanlarda yaptıkları çalışmada total ve Mn SOD düzeylerini  $26 \pm 2.1$  ve  $7.1 \pm 1.2$  Ü/mg protein olarak saptamışlardır (31). Bu çalışmada karaciğer homojenatlarında total SOD ve Mn SOD aktiviteleri için  $6.4$  ve  $0.58$  Ü/mg protein değerleri elde edilmiştir (Tablo-13 ve 14). Peskin ve arkadaşları ise mitokondri fraksiyonunda hem total SOD hem siyanür ile inhibe olan SOD düzeylerini araştırmışlar ve  $34 \pm 8$ ,  $3 \pm 1.3$  Ü/mg protein değerlerini bulmuşlardır (74). Aynı şekilde Dryer ve ark  $8.1 \pm 0.3$  ve  $7.3 \pm 0.2$  Ü/mg protein değerlerini elde etmişlerdir (31). Rao ve arkadaşları gibi bazı araştırmacılar ise karaciğer homojenatlarında sadece total SOD tayini ile yetinmişler ve  $24.6 \pm 0.9$  Ü/mg protein, Barja de Quiroga ve arkadaşları ise  $77 \pm 12$  Ü/mg protein

değerlerini saptamışlardır(6). Görüldüğü gibi literatürde normal karaciğer dokularında bile SOD aktiviteleri için çok farklı sonuçlar verimektedir. Yöntemlerin çoğu aynı olmasına karşın gözlenen bu geniş dağılım kullanılan sıçan cinslerindeki farklılıklar, doku fraksiyonu veya inhibisyon sırasında doğabilecek hatalardan kaynaklanabilir düşüncesindeyiz. Bu nedenle bir ilacın enzim düzeyine etkisinin araştırıldığı bu tür bir çalışmada asıl önemli olan çalışma gruplarının deneylerinin aynı koşullarda yürütülmesi ve karşılaştırılmasıdır. Çalışmamızda MTO verilmesini takiben karaciğer dokularında katalaz düzeyleri 4. ve 5. gün anlamlı bir düşme göstermiştir(Tablo-12). Bu düşme Arnaiz ve arkadaşlarının çalışmasında ilaç tarafından enzimin inhibisyonu ile açıklanmaktadır(4). Bu çalışmada karaciğer homojenatlarında total SOD düzeylerinde de anlamlı bir azalma saptanmıştır (Tablo-13). MTO metabolizması sırasında lipid peroksidasyonu oluşum mekanizması hakkında çok çelişkili yayınlar bulunmaktadır(4,49,57,64,69,103). Mimnaugh ve arkadaşları MTO'nun mikrozomal lipid peroksidasyonunu inhibe ettiğini, karaciğer mikrozomları tarafından NADPH oksidasyon hızına etkisiz olduğunu öne sürmüşlerdir(64). Kharasch ve arkadaşları bununla uyumlu olarak NADPH sitokrom P450 reduktazın bölümlerinde FAD ve FMN arasındaki elektron akışının drudurulduğunu ve böylece reaktif oksijen oluşumunun sınırlandığını ortaya koymuşlardır(49). Vile ve arkadaşları da bu bulguları destekleyecek şekilde MTO'nun peroksidasyonu inhibe ettiğini bulmuşlardır. Yaptıkları elektrokimyasal çalışmalarda, MTO'nun potansiyel olarak redüklenebilen bir kinon grubuna sahip olduğunu ancak redoks potansiyelinin  $-0.45\text{mV}$  olduğunu, bu potansiyelinde mikrozomal reduktaz tarafından reduksiyonunu artırmak için yetersiz olduğunu ileri sürmüşlerdir(103).

Ancak son yıllarda, Nguyen ve arkadaşlarının elektron spin rezonans tekniği kullanarak yaptıkları çalışmada, MTO'nun anaerobik koşullarda, insan ve sıçan karaciğer mikrozoamlarında, NADPH ile inkubasyonu sonucu ilactan bir serbest radikal elde etmişlerdir(69). MTO dan oluşan bu serbest radikal oksijene duyarlıdır ve kinona geri dönüşümü okside eder. NADPH varlığında sit P450 tek elektron oksidasyonunu katalizleyebilir. Benzer şekilde Basna ve arkadaşları da mikrozoonda sit P450 konsantrasyonu 0.19-0.24 olduğunda MTO serbest radikali oluştuğunu saptamışlardır(.Bu araştırmacılar MTO nun redoks aktivitesi ile ilgili çalışmalarında şu sonuçlara varmışlardır; 1-MTO reduktazlar için fakir bir substrattır. Eğer serbest radikal oluşmazsa redoks döngüsü gerçekleşmemektedir.2-MTO iki şekilde oksidize edilebilir: Serbest radikal katyon ve MTO nun C halkasındaki 7 ve 8 karbonların siklik yapısal bağlanması ile oluşan bir bileşik şeklinde. Bu serbest radikalın oksidatif koşullar altında irreversibl bir tepkimede oluştuğunu gösterir. 3-Hem enzimatik reduksiyon hem de enzimatik oksidasyonda redoks döngüsü eşlenmemiştir. 4-Elektrokimyasal olarak oluşan bu MTO serbest radikalın ürünleri ve davranışının enzimatik oksidasyondaki serbest radikal katyonlarına benzemesi koşul değildir. Son yayınlarda ortaya konan bu bulgular bizim SOD ve katalaz aktivitelerinde saptadığımız düşmeleri destekler. Llesuy ve arkadaşları da çalışmalarında SOD ve katalaz aktivitelerinde bir düşme yanısıra mitokondrial SOD aktivitesinde değişiklik olmadığını ortaya koymuşlardır(57). Bizim çalışmamızda da Mn-SOD düzeylerinde bir azalma saptanmış ancak istatistiksel olarak anlamlı olmayan bu azalma aynı şekilde siyanür inhibisyonu ile SOD tayini yapan Llesuy ve arkadaşlarının sonuçları ile uyumlu bulunmuştur. Llesuy ve arkadaşları bunu mitokondrinin ilac için bir hedef organ olmadığı şeklinde açıklamışlardır.Onlar çalışmalarında MnSOD gibi mitokondride

hidroperokside bağlı kemiluminesansında artmadığını göstermişlerdir. Ancak bizim çalışmamızda mitokondrial SOD aktivitesinde 5. gün anlamlı bir azalma saptanmıştır, bu azalma mitokondri fraksiyonunda Mn-SOD yanısıra diğer SOD enzimlerinin de bir miktar bulunması ve interferans yapması ile açıklanabilir. Bu verilerden yola çıkarak MTO metabolizması sırasında oluşan  $H_2O_2$  nin SOD u inaktive etmesinin ve lipid peroksidasyonunun stimule edilmesinin karaciğer hasarının bir nedeni olabileceğini söyleyebiliriz.

Çalışmamızda oksidan stres ile ilgili olduğu yolunda çalışmalar olan iz element düzeyleri de karaciğer dokusunda tayin edilmiştir. Kontrol grubunda selenyum düzeyleri  $0.58 \pm 0.03$   $\mu\text{g}/\text{gram}$  yaş doku olarak belirlenmiştir. Bu veriler Behne ve arkadaşlarının normal sıçan karaciğer dokusunda saptadığı  $0.64 \pm 0.03$   $\text{mg}/\text{kg}$  yaş doku sonucu ile uyum içindedir(8). Selenyum düzeylerinde 4. ve 5. gün istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptanmıştır (Tablo-17) ( $p < 0.05$ ). Bilindiği gibi selenyum önemli bir antioksidan enzim olan GSH Px'in yapısında aktif bölgede selenosistein olarak yer almaktadır (8,9). Lawrence ve arkadaşları Se yetmezliği olan sıçanlarda yaptıkları bir çalışmada Se bağımlı GSH Px aktivitesinin düştüğünü ortaya koymuşlardır(53,54). Llesuy ve arkadaşları ise MTO uygulanan farelerde yaptıkları bir çalışmada MTO'nun GSH Px aktivitesini inhibe ettiğini gözlemişler, ancak bu farelerin karaciğer dokularında Se tayini yapmamışlardır(57). GSH Px inhibe olmasına rağmen Se düzeylerinde saptanan bu çelişkili gibi görünen artma aslında dokunun bu inhibisyona bir cevabı olabilir ve GSH Px düzeylerini artırabilmek için bir savunma mekanizması olabilir kanısındayız. Bu çalışmada karaciğer dokusunda 4. gün bakır düzeyleri (Tablo-18) istatistiksel anlamlı olmayan ve çinko düzeyleri (Tablo-19) anlamlı bir artma göstermiş ve 5.gün normal değerlere düşmüştür. 4. gün

çinko düzeylerinde saptanan bu artış bu elementin SOD yapısında bulunması ve dokunun SOD'un inhibisyonuna cevabı şeklinde açıklanabileceği gibi çinkonun NADPH oksidaz sistemindeki rolü ile de açıklanabilir. Chvapil ve arkadaşları yaptıkları çalışmada karaciğer mikrozomlarında çinkonun malondialdehid oluşumunu inhibe ettiğini ve bu inhibisyonun NADPH oksidasyonunun yavaşlaması ile paralel olduğunu ortaya koymuşlardır(20,22).Normalde NADPH ile inkübe edilen mikrozomlarda hızla lipid peroksidasyonu oluşurken ortama çinko eklendiğinde malondialdehid oluşumu va lipid peroksidasyonu önemli ölçüde azalmıştır. Çinkonun bu mekanizmada rol oynayan demir ile interferans yaparak peroksidasyondan koruyucu bir rol oynadığı sanılmaktadır. Bu çalışmada saptanan çinko düzeylerindeki artış peroksidasyondan korunma mekanizmasının bir bölümü olarak açıklanabilir.

Sonuç olarak, MTO'nun karaciğerdeki toksik etkilerini araştırdığımız bu çalışmada elde ettiğimiz veriler, MTO'nun karaciğerde bir radikal reaksiyonuna neden olduğu hipotezini desteklemektedir. Bu hipotezden yola çıkarak toksik etkilerin erken dönemde saptanmasında, karaciğer marker enzimleri yanısıra ilacın etki mekanizmasında rol oynayan serbest radikallere karşı vücudun geliştirdiği antioksidan savunma sistemine ait enzim tayinlerinin özellikle periferik göstergeler olarak kabul edilen eritrositlerde gerçekleştirilmesinin yararlı olabileceği sonucuna varılmıştır. Günümüzde kanser patolojisinde serbest radikallerin kanıtlanmış önemli rollerine ek olarak bu radikallerin kemoterapötik ilaçların metabolizmaları sırasında da oluşabilmesi, bu olguların tedavisi sırasında antioksidan sistemlerin dışarıdan desteklenmesinin ne denli önemli olduğunu bir kez daha vurgulamaktadır.

## ÖZET

Bu çalışmanın amacı karaciğer marker enzimleri yanısıra eritrosit ve karaciğer dokularında antioksidan enzimler (SOD ve katalaz) ile bazı iz element tayinlerini yaparak MTO nun hepatotoksik etkisinin mekanizmasını ve erken tanıda bu enzimlerin değerini araştırmaktır.

Çalışmamızda kullanılan yaklaşık  $0\pm 20$  g ağırlığındaki Swiss albino türü erkek sıçanlar 3 gruba ayrıldı. Kontrol grubu (n=15) yaklaşık olarak 0.6ml distile su IP olarak verilirken MTO grubuna 12mg/kg BW (yaklaşık 0.6ml) MTO tek doz IP enjekte edildi. MTO verildikten sonraki 4. ve 5. günlerde 9'ar sıçan kalblerinden kan alınarak öldürüldü. Plazma ve karaciğer dokularında AST ve ALT düzeyleri Hitachi 705 otoanalizörde OTK düzeyleri ise sitrulin ölçümü esasına dayalı spektrofotometrik yöntem ile tayin edildi. Eritrosit ve karaciğer dokusu katalaz aktiviteleri Aebi metodu iile ve SOD aktiviteleri ise Misra&Fridovich'e göre ölçüldü. Mn-SOD aktivitesi siyanür ile CuZn-SOD'un inaktivasyonu esasına dayalı method ile ölçüldü.

Plazma AST ve ALT düzeylerinde herhangi bir değişiklik saptanamazken OTK düzeylerinin MTO5 de anlamlı olarak arttığı bulundu. Karaciğer dokusunda 5.gün belirlenen AST ve ALT düzeylerindeki azalma histopatolojik bulgularla uyumludur. 4.gün eritrositer katalaz düzeyleri azalırken SOD de iki katına varan bir artma saptandı. Ayrıca karaciğer dokusu SOD ve katalaz düzeylerinin de MTO 5 grubunda belirgin olarak azaldığı gözlemlendi. Karaciğer dokusunda bakır düzeyleri değişmezken çinko ve selenyumun 4.gün belirgin olarak arttığı bulundu.

Bu çalışmada elde edilen bulgular MTO metabolizması sırasında lipid peroksidasyonu artışı olduğunu ve karaciğerdeki antioksidan enzimlerin MTO ile inhibe olduğunu desteklemektedir. Bu çalışmadaki bir diğer önemli sonuç; eritrositer antioksidan enzim düzeylerinin karaciğerde hücre hasarı grlmeden önce oluşmasıdır. Sonuç olarak, eritrositer antioksidan enzim düzeylerini tayin etmenin karaciğer toksisitesinin erken tanısında yararlı olabileceğini syleyebiliriz.





## SUMMARY

The aim of this study was to investigate the mechanism of MTO induced hepatotoxicity and the value of some antioxidant enzymes for early diagnosis of the hepatotoxicity, by determining the antioxidant enzyme levels in erythrocytes and liver tissue with liver marker enzymes.

In this study, male Swiss-Albino rats weighing 150±20 g were used and the rats were divided into three groups. While the control group (n=15) were injected only water (approx. 0.6ml), MTO group were injected MTO in a dose of 12mg/kg BW (approx. 0.6ml). Following MTO injection, 9 rats were killed by punctured from left ventricle on 4th day (MTO 4) and others were killed on 5th day (MTO 5).

AST and ALT levels of plasma and liver tissue were measured by Hitachi 705 autoanalyzer and OCT levels were determined spectrophotometrically based on the method of citrullin produce. Erythrocytes and liver tissue catalase activity were measured according to Aebi, SOD activity was determined according to Misra & Fridovich. Mn-SOD levels were measured by the inhibition of CuZn-SOD using cyanid in a concentration of 5mM. Cu and Zn levels were analysed by Atomic Absorbtion Spectrophotometry and Se levels were measured by fluorometric determination.

We could not found any significant change in plasma AST and ALT levels while there was an increase in OCT levels. On the 5th day of MTO injection, the decrease of AST and ALT activities in liver tissue were in concordance with



histopathological findings. While there was a decrease in the erythrocyte catalase activity on the 4th day of MTO treatment. We observed an increase in the activity SOD, two times higher than the value of control group.

There was also a significantly decrease in both of total SOD and catalase levels of liver tissue on the 5th day following MTO treatment. Although liver tissue copper levels were remained unchanged, zinc and selenium were increased in the 4th day.

Our findings support that lipid peroxidation have increased during of MTO metabolism and antioxidant enzymes in liver tissue were inhibited by MTO. Our data showed that; alteration in the activity of erythrocyte antioxidant nzyme levels preceed the onset of hepatic injury. In conclusion, we can say that determining antioxidant enzyme activities in erythrocytes can be useful for early diagnosis of hepatotoxicity.

## KAYNAKLAR

1. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 1984; 105:121-126
2. Agar NS, Sadrzadeh MH, Hallaway PE, Eaton JW, Erythrocyte catalase, *J Clin Invest*, 1985; 77:319-321
3. Alberts DS, Peng YM, Leigh S, Davis TP, Woodward DL, Disposition of Mitoxantrone in cancer patients. *Can Res* 1985; 45:1879-1884
4. Arnaiz SL, Llesuy S, Oxidative stress in mouse heart by antitumoral drugs: a comparative study of doxorubicin and mitoxantrone. *Toxicology*, 1993; 77:31-38
5. Bagrel A, Museur G, Siest G, Colorimetric measurement of OCT activity in plasma and results for a supposedly healthy population. *Clin Chem*, 1975; 21(12):1716-1720
6. Barja de Quiroga G, Perez-campo R, Lopez Torres M, Antioxidant defences and peroxidation in liver and brain of aged rats. *Biochem J* 1990; 272(1):247-50
7. Baudhuin P, Rahman-li Y, Sellinger OZ, Wattiaux R, Jacques P, deDuve C, Tissue fractionation studies. *Biochem J*, 1963; 92: 179-84
8. Behne D, Wolters W, Distribution of selenium and glutathione peroxidase in rat. *J Nutr*, 1983; 1-13:456-61

9. Behne D, Höfer-bosse T, Effects of a low selenium status on the distribution and retention of selenium in the rat. *J Nutr*, 1984; 114: 1289-96
10. Bezwoda WR, Hesdorfer C, The use of mitoxantrone plus cyclöphosphamide as first-line treatment of metastatic breast cancer. *Cancer*, 1986; 58: 1621-4
11. Björnstedt M, Kumar S, Holmgren A, Selenodiglutathione is a highly efficient oxidant of reduced thioredoxin and a substrate for mammalian thioredoxin reductase. *The J Biol Chem*, 1992; 267(12): 8030-4
12. Bachur NR, Gordon SL, Gee MV, A general mechanism for microsomal activation of quinone anticancer agents to free radicals. *Can Res*, 1978; 38: 1745-50
13. Borrow L, Kantarjian A, Tanner MS, Copper protects against galactosamine-induced hepatitis. *J Hepatol*, 1987; 5(1): 19-26
14. Bulkley GB, The role of oxygen free radicals in human disease processes. *Surgery*, 1983; 94(3): 407-11
15. Burch ER, Hahn KJH, Newer aspects of role of zinc, manganese and copper in human nutrition. *Clin Chem*, 1975; 21(4): 501-20
16. Burch R, Sullivan J, The Medical Clinics of North America. Symposium on trace elements. 1976, 60(4): 661-713
17. Ceballos-picot I, Trivier J, Nicole A, Sinet P, Thevenin M, Age correlated modifications of copper-zinc superoxide dismutase and glutathione related enzyme activities in human erythrocytes. *Clin Chem*, 1992; 38(1): 66-70

18. Ceriotti G, Gazzaniga A, Accelerated micro and ultramicro procedure for OCT determination. *Clin Chim Acta*, 1967; 16: 436-9
19. Ceriotti G, Optimal conditions for OCT determination. A simple micromethod without deproteinization. *Clin Chim Acta*, 1973; 47: 97-105
20. Chvapil M, New aspects in the biological role of zinc: a stabilizer of macromolecules and biological membranes. *Life Sci*, 1973; 13:1041-9
21. Chiccarelli FS, Morrison JA, Cosulich DB, Perkinson NA, Ridge DN, Sum FW, Murdock KC, Woodward DL, Arnold ET, Identification of human urinary mitoxantrone metabolites. *Can Res*, 1986; 46: 4858-61
22. Chvapil M, Peng YM, Aronson AL, Zukoski C, Effect of zinc on lipid peroxidation and metal content in some tissues of rats. *J Nutr*, 1973; 104: 434-43
23. Clayson KJ, Fine JS, Strandjord PE, A more sensitive automated method for determination of OCT activity in human serum. *Clin Chem*, 1975; 21(6): 754-7
24. Concetti A, Massel P, Rotilio G, Brunori M, Rachmilewitz EA, Superoxide dismutase in red blood cells; method of assay and enzyme content in normal subjects and in patients with B-thalassemia (major and intermedia). *J Lab Clin Med*, 1976; June: 1057-64
25. Del maestro RF, An approach to free radicals in medicine and biology. *Acta Physiol Scand*, 1980; suppl 492: 153-68

26. Dashti H, Jeppson B, Hagerstrand I, Hultberg B, Srinivas U, Abdulla M, Bengmark S, Thioacetamide and carbon tetrachloride-induced liver cirrhosis. *Eur Surg Res*, 1989; 21: 83-91
27. Doroshow JH, Davies KJA, Comparative cardiac oxygen radical metabolism by anthracycline antibiotics, mitoxantrone, bisantrene, 4'(9-acridinylamino)-methane sulfon-m-anisidide and neocarzinostatin. *Biochem Pharmacol*, 1983; 32(19): 2935-9
28. Doroshow JH, Effect of anthracycline antibiotics on oxygen radical formation in rat heart. *Can Res*, 1983; 43: 460-72
29. Dorr RT, Alberts DS, Soble M, Lack of experimental vesicant activity for the anticancer agents cisplatin, melphalan and mitoxantrone. *Can Chemother Pharm*, 1986; 16: 91-94
30. Dreno B, Le zinc et la peau. *Ann Dermatol Vener*, 1988; 115: 714-16
31. Dryer SE, Dryer RL, Autro AP, Enhancement of mitochondrial, cyanide-resistant superoxide dismutase in the livers of rats treated with 2,4-dinitrophenol. *J Biol Chem*, 1980; 255(3): 1054-7
32. Duthie SJ, Grant MH, The role of reductive and oxidative metabolism in the toxicity of mitoxantrone, adriamycin and menadione in human liver derived Hep G2 hepatome cells. *Br J Cancer*, 1989; 60: 566-71

33. Ehniger H, Schuler U, Proksch B, Zeller KP, Blanz J, Pharmacokinetics and metabolism of mitoxantrone. a review. Clin Pharmacokinet, 1990; 18(5) 365-80
34. Fisher GR, Gutierrez PL, Oldcorne MA, Patterson LH, NADPH oxidoreductase mediated two electron reduction of anthraquinone-based antitumor agents and generation of hydroxyl radicals. Biochem Pharmacol, 1992; 43(3): 575-85
35. Freeman BA, Crapo JD, Biology of disease. Free radicals and tissue injury. Lab Invest, 1982; 47(5): 412-26
36. Fridovich I, Biological effects of the superoxide radical. Arch Biochem Biophys, 1986; 247(1): 1-11
37. Gomori G, Preparation of buffers for use in enzyme studies. Methods in Enzymol
38. Grisham MB, Reactive metabolites of oxygen and nitrogen in biology and medicine. 1992, RG Landes Comp, Austin/Georgetown: 5-28
39. Haines AP, Cancer, retanol binding protein, zinc and copper. The Lancet, 1982; Jan: 2
40. Halliwell B, Gutteridge JMC, Cross CE, Free radicals, antioxidants and human disease: where are we now?. J Lab Clin Med, 1992; 119(6): 598-620
41. Halliwell B, Gutteridge JMC, Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage and antioxidant therapy. The Lancet; 1984: 23:1396-7

42. Henry JB, Clinical diagnosis & management by laboratory methods. 18th edition, 1991, WB Saundera Comp. USA: 243-4
43. Hunninghake D, Grisolia S, A sensitive and convenient micromethod for estimation of urea, citrulline and carbamyl derivatives. Anal Biochem, 1966; 16: 200-5
44. Ji LL, Dillon D, Wu E, Alteration of antioxidant enzymes with aging in rat skeletal muscle and liver. Am J Physiol, 1990; 258: R918-23
45. Kaplan AL, Pesce AJ, Clinical Chemistry, 2nd edition, 1989, CV Mosby Comp. USA: 367-70
46. Kelson JR, Shamberger RJ, Methods compared for determining zinc in serum by flame atomic absorption spectroscopy. Clin Chem, 1976; 24(2): 240-4
47. Kılınç K, Kanserde oksijen radikalleri ve superoksid dismutaz. Biokimya dergisi, 1986; 11(3): 59-76
48. Kharasch ED, Novak RF, Bis(alkylamino)anthracenedione antineoplastic agent metabolic activation by NADPH-cytochrome p-450 reductase and NADH dehydrogenase: diminished activity relative to anthracyclines. Arch Biochem Biophys, 1983; 224: 682-94
49. Kharasch ED, Novak RF, Inhibitory effects of anthracenedione antineoplastic agents on hepatic and cardiac lipid peroxidation. J Pharmacol and Exp Therapeutics, 1983; 226(2): 500-6
50. Kraft W, Lohss E, Ornithine carbamoyltransferase as diagnostic agent in liver disease of the dog. Adv Clin Enzymol, 1988; 6: 259-65

51.Kulhanek V, Maderova V, Sindelarova K, Vojtiskova V, Modified determination of OCT activity in biological material. Clin Chim Acta, 1963; 8: 579-85

52.Lalonde L, Jean Y, Roberts KD, Chapdelaine A, Bleau G, Fluorometry of selenium in serum or urine. Clin Chem, 1982; 28(1): 172-74

53.Lawrence RA, Burk RF, Species, tissue and subcellular distribution of non Se-dependent glutathione peroxidase activity. J Nutr, 1978; 108: 211-5

54.Lawrence RA, Parkhill LK, Burk RF, Hepatic cytosolic non Se-dependent glutathione peroxidase activity: its nature and the effect of selenium deficiency. J Nutr, 108: 981-7

55.Lederle Comp,Novantrone,product monograph. 1989,BETA medical arts,Greece

56.Lenk H, Müller U, Tanneberger S, Mitoxantrone: Mechanism of action, antitumor activity, pharmacokinetics, efficacy in the treatment of solid tumors and lymphomas and toxicity. Anticancer research, 1987; 7: 1257-64

57.Llesuy SF, Arnaiz SL, Hepatotoxicity of mitoxantrone and doxorubicin. Toxicology, 1990; 63: 187-98

58.Liou W, Chang LY,Geuze HJ, Strous GJ, Crapo JD, Slot JW, Distribution of CuZn superoxide dismutase in rat liver. Free Radic Biol Med, 1993; 14(2): 201-7

59.Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ, Protein measurement with folin phenol reagent. J Biol Chem, 1951; 193: 265-75



60. Lück H, Catalase. "Methods of enzymatic analysis" ed. ed: H.U. Bergmeyer, 2. baskı, Verlag Chemie GmbH, USA, 1965: 885-94
61. Margalioth JE, Copper and zinc levels in normal and malignant tissues. *Cancer*, 1983; 52(5): 868-72
62. Mariucci G, Ambrosini MV, Colarieti L, Bruschelli G, Differential changes in Cu, Zn and Mn superoxide dismutase activity in developing rat brain and liver. *Experientia*, 1990; 15, 46(7): 753-5
63. McCord JM, Fridovich I, Superoxide dismutase. *J Biol Chem*, 1969, 244(22): 6049-55
64. Mimnaugh EG, Gram TE, Trush MA, Stimulation of mouse heart and liver microsomal lipid peroxidation by anthracycline anticancer drugs: characterization and effects of reactive oxygen scavengers. *J Pharmacol and Exp Therapeutics*, 1983; 226(3): 806-16
65. Mimnaugh EG, Trush MA, Ginsburg E, Gram TE, Differential effects of anthracycline drugs on rat heart and liver microsomal reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-dependent lipid peroxidation. *Can Res*, 1982; 42: 3574-82
66. Misra HP, Fridovich I, The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem*, 1972; 247(10): 3170-5
67. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW, Harper's *Biochemistry*, 22nd edition, 1991, Typopress, Lübnan:

- 68.NATO/ASI kurs notları : "Modulation of cellular responses in toxicity"1994,İtalya
- 69.Nguyen B,Gutierrez PL, Mechanisms for the metabolism of mitoxantrone electron spin resonance and electrchemical studies. Chem Biol Interact, 1990; 74: 139-62
- 70.Oberley LW, Buettner GR, Role of superoxide dismutase in cancer: a review. Can Res, 1979; 39: 1141-9
- 71.Oksidan stres ve hücre hasarı kurs notları,1993,Ankara
- 72.Özdemir G, Reaktif oksijen partikülleri (ROP). Roche Bilimsel eserler serisi,1993,Eskişehir
- 73.Pedersen JZ, Finazzi-Agro A, Protein-radical enzymes. FEBS Letters, 1993, 325(1,2): 53-58
- 74.Peskin AV, Koen YM, Zbarsky IB, Superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities in tumors. FEBS Letters,1977; 78(1): 41-45
- 75.Peters JH, Gordon GR, Kashiwase D, Lown JW, Yen SF, Plambeck JA, Redox activities of antitumor anthracyclines determined by microsomal oxygen consumption and assays for superoxide anion and hydroxyl radical generation. Biochem Pharmacol, 1986, 35(8): 1309-23
- 76.Poli G, Albano E, Dianzani MU, The role of lipid peroxidation in liver damage. Chem Phys Lipids, 1987; 45: 117-42

77.Rao G, Xia E, Nadakavukaren J, Richardson A, Effect of dietary restriction on the age-dependent changes in the expression of antioxidant enzymes in rat liver. *J Nutr* 1990; 120(6): 602-9

78.Reinhard GJ, Trace elements, a selective survey. *Clin Chem*, 1975; 21(14): 476-500

79.Richard B, Fabre G, Fabre I, Cano JP, Excretion and metabolism of mitoxantrone in rabbits. *Can Res*, 1989; 49: 833-37

80.Saletan S, Mitoxantrone: an active, new antitumor agent with an improved therapeutic index. *Cancer Treatment Reviews*, 1987; 14: 297-303

81.Schwendener RA, Fiebig HH, Berger MR, Berger DP, Evaluation of incorporation characteristics of mitoxantrone into unilamellar liposomes and analysis of their pharmacokinetic properties, acute toxicity and tumor efficacy. *Cancer Chemother Pharmacol*, 1991; 27(6):429-39

82.Scott MD, Eaton JW, Kuypers FA, Chiu DTY, Lubin BH, Enhancement of erythrocyte superoxide dismutase activity: effects on cellular oxidant defense. *Blood*, 1989; 74(7): 2542-9

83.Sevanian A, Hochstein P, Mechanisms and consequences of lipid peroxidation in biological systems. *Ann Rev Nutr*, 1985; 5: 365-90

84.Slater TF, Free radical mechanisms in tissue injury. *Biochem J*, 1984; 222: 1-15

85. Sheehan TMT, Gao M, Simplified fluorometric assay of total selenium in plasma and urine. Clin Chem, 1990; 36(12): 2124-6

86. Smith EL, Hill RL, Lehman IR, Lefkowitz RJ, Handler P, White A, Principles of Biochemistry, 7th edition, 1983, McGraw Hill, Inc, USA: 382-3

87. Smith JC, Zinc: A trace element essential in vitamin A metabolism. Science, 1973; 181: 954-5

88. Sodeman , Pathologic physiology. Mechanism of disease. 7th edition, 1985, WB Saunders Comp, Philadelphia:

89. Stansell MJ, Deutsch HF, The levels of catalase and of erythrocyte peroxidase in human erythrocytes. Clin Chim Acta, 1966, 14: 598-607

90. Sykes AJ, McCormack FX, O'Brien TJ, A preliminary study of the superoxide dismutase content of some human tumors. Can Res, 1978; 38: 2759-62

91. Tietz NW, Textbook of Clinical Chemistry. 1986, WB Saunders Comp, USA: 1413-34

92. Yagi K, Lipid peroxides and human diseases. Chem Phys Lipids, 1987; 45: 337-51

93. Yıldırım E, : "Selim ve malign meme dokusunda serum ile kıyaslamalı önemli element değişiklikleri", uzmanlık tezi 1990, İzmir

94. Yıldırım ES, Tanyalçın T, Onat T, Erlaçın S, Eritrositer antioksidan enzimlerde yaşa bağlı değişiklikler, Biokimya Dergisi, 1993; 8(3):

- 95.Yıldırım ES, Tanyalçın T, Onat T, Kutay F, Erlaçın S, Ethanol induced oxidative stress and membrane injury in rat erythrocytes. European J Clin Chem Clin Biochem, baskıda
- 96.Wallace RE, Murdock KC, Angier RB, Durr FE, Activity of a novel anthracenedione, 1,4-dihydroxy-5,8-bis{{2-[(2-hydroxyethyl)amino]ethyl}amino}}-9,10-anthracenedione dihydrochloride, against experimental tumors in mice. Can Res, 1979; 39: 1570-4
- 97.Weisiger RA, Fridovich I, Superoxide dismutase, organelle specificity. J Biol Chem, 1973; 248(10); 3582-92
- 98.Weisiger RA, Fridovich I, Mitochondrial superoxide dismutase, site of synthesis and intramitochondrial localization. J Biol Chem, 1973; 248(13): 4793-6
- 99.Wendel A, Enzymes acting against reactive oxygen. Adv Clin Enzymol, 1988; 6: 161-7
- 100.Wilss; Biochemical basis of medicine, 2. baskı, Bulterworth and co ltd, London, 1989: 455-65
- 101.Winterbourn CC, Hawkins RE, Brian M, Carrell RW, The estimation of red cell superoxide dismutase activity. J Lab Clin Med, 1975; 85(2): 337-9
- 102.Wolf CR, Macpherson JS, Smyth JF, Evidence for the metabolism of mitoxantrone by microsomal glutathione transferases and 3-methylcholantrene-inducible glucuronosyl transferases. Biochem Pharmacol, 1986, 35: 1577-80

103.Vile GF, Winterbourn CC, Microsomal lipid peroxidation induced by adriamycin, epirubicin, daunorubicin and mitoxantrone: a comparative study. *Cancer Chemother Pharmacol*, 1989; 24: 105-8

## ÖZGEÇMİŞ

8.5.1963'de Niğde'de doğdum. İlk öğrenimimi Ankara, orta öğrenimimi Gaziantep ve Aydın'da tamamlayarak 1979 yılında girdiğim Ege Üniversitesi Tıp Fakültesinden 1985'de mezun oldum. Rize'de 2 yıl mecburi hizmetimi yaptıktan sonra 1987'de E.Ü.T.F. Biyokimya anabilim dalında ihtisasa başladım. 1991 yılında biyokimya uzmanı olarak aynı kürsüde çalışmalarımı sürdürdüm. Evliyim ve bir çocuğum var.

