

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİMDALI

**TİROİT KANSERLERİNDE HEMOKSİJENAZ VE
PROLİDAZ ENZİM AKTİVİTELERİ İLE OKSİDATİF
STRESS PARAMETRELERİ ARASINDAKİ İLİŞKİNİN
İNCELENMESİ**

UZMANLIK TEZİ
Dr. Duygu TERZİOĞLU

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Ezel USLU

İSTANBUL – 2013

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 19582

TEŞEKKÜR

Uzmanlık tezi çalışmamda ve uzmanlık eğitimim boyunca desteğini esirgemeyen İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Hüseyin SÖNMEZ' e, eğitimimde emeği geçen İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı' ndaki tüm hocalarıma, uzmanlık eğitimim sürecinde bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen, benimle birlikte laboratuara giren, tanımaktan büyük mutluluk duyduğum değerli danışman hocam, Sayın Prof. Dr.Ezel USLU' ya,

Tez dönemimde desteklerini esirgemeyen, İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr.Murat ÖZCAN'a ve Uzm. Dr.Serkan TEKSÖZ'e,

Birlikte çok güzel zamanlar geçirdiğimiz sevgili asistan arkadaşlarıma,

Her zaman yanımda olduklarını bildiğim canım annem ve babama, hiçbir zaman beni yalnız bırakmayan biricik ablama,

Teşekkür ederim.

Dr. Duygu TERZİOĞLU

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
KISALTMALAR	v
TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ	viii
ÖZET	ix
ABSTRACT.....	x
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Tarihçe	3
2.2. Tiroit Anatomisi	3
2.3. Tiroit Fizyolojisi	5
2.4. Tiroit Kanseri	6
2.5. Papiller tiroit kanseri	8
2.6. Etyoloji ve Risk Faktörleri	9
2.7. Oksidatif stres	10
2.8. Serbest Radikaller	12
2.9. Reaktif oksijen türleri.....	13
2.10.Serbest Radikallerin Etkileri	16
2.11.Antioksidan Sistem	18
2.12.Prolidaz	28
2.13.Hem Oksijenaz Enzim Sistemi	36
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	44
3.1. Yöntemler.....	45
3.2. İstatistiksel Değerlendirme	52
4. BULGULAR	53
5. TARTIŞMA	57
6. KAYNAKLAR	60

KISALTMALAR

$\cdot\text{OH}$: Hidroksil radikali
$^1\text{O}_2$: Singlet oksijen radikali
AKŞ	: Açlık kan şekeri
ATP	: Adenozin trifosfat
CAT	: Katalaz
cGCS	: Gama glutamil sisteinil sentetaz
cGMP	: Siklik guanozin monofosfat
cGS	: Gama glutamil transpeptidaz
CO	: Karbon monoksit
Cp	: Seruloplazmin
CuZnSOD	: Bakır-çinko süperoksit dismutaz
DEAE	: Dietilaminetil
DIT	: Diiyodotirozin
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DRP	: Demir regülatör proteini
ECSOD	: Ekstrasellüler süperoksit dismutaz
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
ELISA	: Enzyme-linked immunosorbent assay
ERK	: Ekstraselüler sinyal regülatör kinaz
ET-1	: Endotelin-1
FAD	: Flavın adenin dinükleotit
G6PD	: Glukoz-6- fosfat dehidrogenaz
Gly-pro	: Glisil-prolin
GPxe	: Ekstrasellüler glutatyon peroksidaz

GS	: Glutatyon sentaz
GS	: Guanilat siklaz
GSH	: Redükte glutatyon
GSH-Px	: Glutatyon peroksidaz
GSH-Rd	: Glutatyon redüktaz
GSSG	: Okside glutatyon
GST	: Glutatyon S transferaz
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
HO	: Hem oksijenaz
HOO [·]	: Hidroperoksil radikali
HRP	: Horseradish peroxidase
HSP	: Isı şok proteini
Kca	: Kalsiyuma bağlı potasyum
L(R)O [·]	: Alkoksil radikali
L(R)OO [·]	: Peroksil radikali
L(R)OOH	: Hidroperoksit
MAPK	: Mitojen aktivatör protein kinaz
MDA	: Malondialdehit
MIT	: Monoiyodotirozin
MnSOD	: Manganez süperoksit dismutaz
mRNA	: Mesajcı ribonükleik asit
MRP	: Multidrug resistans protein
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NFκB	: Nükleer faktör kappa beta
NO	: Nitrik oksit
O ₂ [·]	: Süperoksit radikali

O ₃	: Ozon
$\cdot\text{OCl}$: Hipoklorit radikali
ONOO ⁻	: Peroksinitrit radikali
PC	: Protein karbonil
PTK	: Papiller tiroit kanseri
PUFA	: Çoklu doymamış yağ asidi
RNT	: Reaktif nitrojen türleri
ROT	: Reaktif oksijen türleri
SOD	: Süperoksit dismutaz
T3	: Triiyodotironin
T4	: Tiroksin
TBG	: Tiroksin bağlayan globulin
TBPA	: Tiroksin bağlayan prealbumin
TG	: Tiroglobulin
TNF- α	: Tümör nekroz faktörü
TR	: Tiroit hormon reseptörleri
TRH	: Tirotropin releasing hormon (Tirotrop serbestleştirici hormon)
Trx	: Tiyoredoksin
TrxR	: Tiyoredoksin redüktazı
TSH	: Tiroit stimulan hormon
VCAM-1	: Vasküler hücre adezyon molekülü-1

TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ

TABLolar

Tablo 2. 1. Differansiasyon düzeyine göre Tiroit Folliküler ve Parafolliküler Hücreli Karsinomlarının Sınıflandırılması	7
Tablo 2. 2. Radikal ve radikal olmayan reaktif oksijen türleri	10
Tablo 2. 3. Oksidatif stres ile ilişkili bazı hastalıklar	11
Tablo 2. 4. Oksijenin indirgenmesi.....	13
Tablo 2. 5. Hidrofilik ve lipofilik fazda bazı antioksidanlar	20
Tablo 4. 1. Oksidatif stres ürünlerinin ve antioksidan enzimlerin tiroit maligniteli hastalarda ameliyat öncesi ve sonrası değişimleri	53

ŞEKİLLER

Şekil 2. 1. Tiroit anatomisi.....	4
Şekil 2. 2. Vücuttaki önemli serbest radikaller ve serbest radikal hasarı sonuçları.....	13
Şekil 2. 3. Radikallerin yol açtığı hücre hasarı	19
Şekil 2. 4. İnsan dokularındaki major antioksidan enzimler ve bağlı yollar	21
Şekil 2. 5. Redükte Glutasyon (GSH)	22
Şekil 2. 6. Glutasyon redoks döngüsü	23
Şekil 2. 7. Glutamik asitten prolin sentezi	32
Şekil 2. 8. Prolin ve diğer amino asitlerin genel yapısal görünümü	32
Şekil 2. 9. Memeli kollajeninde bulunan prolin ve hidroksprolin izomerleri.....	33
Şekil 2. 10. Prolinin metabolik yollarla bağlantısı.....	34
Şekil 2. 11. Kollajen yıkımında prolidaz ve prolinazın yeri	35
Şekil 2. 12. Hem molekülünün yapısı	36
Şekil 2. 13. Hem parçalanma yolağı.	37
Şekil 2. 14. Hem molekülünün parçalanma ürünleri ve fonksiyonları	39
Şekil 3. 1. L-prolin standart eğrisi	46
Şekil 3. 2. PC gruplarının 2,4-DNPH ile karbonil türevi olan hidrazonları oluşturma reaksiyonu	49
Şekil 3. 3. HO-1 standart eğrisi.....	52
Şekil 4. 1. Prolidaz düzey histogramı	54
Şekil 4. 2. MDA düzey histogramı	54
Şekil 4. 3. PC düzey histogramı.....	55
Şekil 4. 4. H0-1 düzey histogramı	55
Şekil 4. 5. SOD düzey histogramı.....	56

ÖZET

Oksidan stresin kanser vakalarında arttığı bildirilmiştir. Kanser hücrelerinin çoğalmasında hücreyel sinyal yolaklarının aktivasyonunda veya inhibisyonunda oksidan stresin rolü olduğu açıklanmıştır. Çalışmamızın temel amacı, tiroit kanserlerinde HO-1 ve prolidaz enzimlerinin oksidatif stres ile ilişkisini ortaya koymak ve bu enzimlerin tanıda tümör markeri olarak ya da tedavi başarısının değerlendirilmesinde kullanılabilirliğini araştırmaktır.

Çalışmamıza 31 hasta ve 25 kontrol birey dahil edildi. Kontrol grubunda, PTK hastalarda tiroidektomi öncesi ve sonrası 30. günde; HO-1, prolidaz enzimlerine, oksidan stres göstergeleri olarak malondialdehit (MDA) ve protein karbonil (PC) düzeylerine ve antioksidan savunma sisteminin göstergesi olarak da süperoksit dismutaz (SOD) enzim düzeyine bakıldı.

Papiller tiroit kanseri grubunda tiroidektomi sonrası MDA ve SOD serum düzeylerinde anlamlı bir azalma vardı ($p < 0.001$). Ayrıca, ameliyat öncesi ve kontrol grupları arasında MDA, PC, HO-1 ve SOD düzeyleri karşılaştırılmasında anlamlı fark bulunması yanında (sırasıyla $p < 0.001$, $p = 0.003$, $p = 0.006$ ve $p = 0.025$), ameliyat sonrası ile kontrol grubu karşılaştırıldığında prolidaz, MDA, PC, SOD değerleri açısından anlamlı fark bulundu (sırasıyla $p = 0.024$, $p < 0.001$, $p = 0.002$, $p = 0.016$).

Bu sonuçlar eşliğinde; HO-1 enzim eksikliğinin veya supresyonun papiller tiroit kanseri patogenezinde rol aldığı, prolidaz enzim aktivitesinin PTK oluşumunda rol almadığı düşünülebilir. Fakat daha kesin bilgi elde etmek için apoptotik markerlerin da dahil edildiği, hasta sayısının artırıldığı ileri araştırmalara ihtiyaç vardır.

Kanser patogenezinde oksidatif stresin tartışılmaz rolü göz önüne alındığında ileride, hastaların serumlarında görülen parametrik değişimlerin oksidatif stresin yol açtığı tüm değişikliklerle ilişkilendirilmesi beklenmektedir.

Anahtar kelimeler: Papiller tiroit kanseri, oksidatif stres, HO-1, prolidaz

ABSTRACT

It has been reported that oxidative stress is increased in cancer cases and also involved in the proliferation, activation and inhibition of signaling pathways in cancer cells. The main purpose of our study to examine the relation between papillary thyroid cancer, oxidative stress, HO-1, prolidase enzymes and investigate whether these enzymes could be utilized as tumor markers for diagnosis or in the evaluation of treatment's success.

31 patients and 25 control subjects were included in this study. HO-1, prolidase, one of the oxidant stress indicators malondialdehyde (MDA), protein carbonyl (PCO) parameters and superoxide dismutase (SOD) as indicator of antioxidant defense system were measured pre-operatively and 30 days after thyroidectomy in PTC patients and healthy individuals.

In PTC group, significant decrease in the serum levels of MDA and SOD after thyroidectomy is observed (each $p < 0.001$). Also, significant difference is observed in the serum levels of prolidase, MDA, PC, and SOD after operations between PTC and control groups ($p = 0.024$, $p < 0.001$, $p = 0.002$, $p = 0.016$ respectively) in addition to significant differences of MDA, PCO, HO-1 and SOD pre-operative serum levels ($p < 0.001$, $p = 0.003$, $p = 0.006$, and $p = 0.025$ respectively).

In light of these findings, one can argue that the deficiency or suppression of HO-1 enzyme plays a role in the pathogenesis of papiller thyroid cancer, yet has no role in the pathogenesis of PTK prolidase enzyme activity. However, further research with a larger number of patients is needed; such researches should include apoptotic markers in order to obtain more precise information.

Given the unquestionable role of oxidative stress in the pathogenesis of cancer, in the future it is expected to associate parametric changes in the serum of patients with all the differences caused by oxidative stress.

Key words: Papillary thyroid cancer, oxidative stress, HO-1, prolidase

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Tiroit karsinomları en sık görülen endokrin karsinomdur (1). Tiroit kanserinin yıllık insidansı dünyanın farklı bölgelerinde 100.000'de 0,5 ile 10 olgu arasında değişmektedir. Tiroit kanseri malign endokrin neoplazmlarla ilişkili ölümlerin %66'sından sorumludur (2). En sık görülen tiroit kanseri papiller tiroit kanseridir (PTK) ve tiroit kanserlerinin yaklaşık %80'nini oluşturmaktadır (3). Kadınlarda erkeklere oranla iki kat daha yüksek görülmektedir (3).

Yakın zamanda birçok çalışma oksidatif stresle (OS) tiroit kanserini ilişkilendirmiştir (1,4,5). Bu çalışmalar çeşitli oksidatif ve antioksidan sistemlerin tiroit kanseri ile arasındaki ilişkiyi araştırmış ve bu kanserin oksidatif stresle olan ilişkisini göstermişlerdir.

Serbest radikallerle antioksidanlar arasındaki dengenin radikaller yönünde bozulmasıyla oluşan oksidatif stres, birçok hastalığın patogeneğinde komplikasyonların oluşum mekanizmasında rol oynamaktadır (6). Başlıca süperoksit anyonu, hidrojen peroksit ve hidroksil radikalinden oluşan reaktif oksijen türlerinin (ROT), karsinojenik potansiyel taşıdıkları ve invazyonu tetikledikleri düşünülmektedir (4,7).

ROT düzeyleri süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) gibi antioksidan enzimler tarafından kontrol edilir. Malondialdehit (MDA) bir lipid peroksidasyon belirteçidir ve düzeyleri hücre ve dokularda oksidatif hasarın indikatörü olarak sıklıkla kullanılmaktadır (4). Lipit peroksidatların oluşumu ve temizlenmesi arasındaki denge, hücrelerdeki peroksit düzeylerini belirlemektedir. Bu denge, hücre savunma mekanizmalarının azalması ya da peroksidasyon reaksiyonlarının artması sonucu bozulabilir (8).

Oksidatif stres, tiroit dokusunda tiroksin sentezinde H_2O_2 kullanımı sırasında, ROT üretimi nedeni ile inflamasyonda ve tümörlerin aktif proliferasyon fazında sıklıkla oluşmaktadır (9,10).

Hemoksijenaz-1 enzimi hem yıkılım yolunda etkin mikrozomal bir enzimdir. Bu yolda üretilen karbonmonoksitin (CO) hız kısıtlayıcı enzimidir. Organizmanın dengesinin bozulduğu durumlarda birçok faktör tarafından etkilenip aktivitesi artmaktadır ve bu enzimin birçok sistem üzerinde etkileri olduğu gösterilmiştir.

Hemoksijenaz-1 'in dolaylı olarak bir antioksidan gibi davranıp hücre ve organları koruduğu bildirilmiştir (11,12).

Prolidaz enzimi (İminodipeptidaz), C terminalinde prolin veya hidroksiprolin bulunan iminodipeptidleri yıkan enzimdir. Bu dipeptidler, organizmada kollajen yıkımında açığa çıkar (13).

Araştırmalarda prolidaz enziminin kanserlerde serumda arttığı gözlenmiş ve bunun total oksidan stres ile pozitif korelasyon gösterdiği bildirilmiştir (13,14).

Bizim bilgimize göre literatürde tiroit kanserli hastalarda HO-1 ve prolidaz enzimlerinin oksidatif stresle ilişkisini gösteren bir çalışma yoktur. Bizim çalışmamızda amacımız; tiroit kanserlerinde HO-1 ve prolidaz enzimlerinin oksidatif stres ile ilişkisini ortaya koymak ve bu enzimlerin tanıda ve tedavi başarısının değerlendirilmesinde kullanılabilirliğini araştırmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

Tiroit terimi Grekçe'deki kalkan şekilli anlamına gelen thyreoides kelimesinden köken alır. İlk olarak bu bezi Galen (Galenos M.S.129-198) tarif etmiştir. Tiroit ismi ise 1656 yılında Adenographia adlı eserinde Thomas Wharton tarafından kullanılmıştır. Tarihte ilk defa tiroit bezine cerrahi girişimi Egina'lı Paulus gerçekleştirmiştir (15).

19.Yüzyıla kadar tiroit hastalarının tanı ve tedavisinde büyük bir ilerleme görülmemiştir. Bern Üniversitesinden Theoder Kocher tarafından tiroit cerrahisi ile ilgili tıp literatüründe ilk büyük eser 1878 yılında yazılmıştır (15).

Patolojik anatominin gelişmediği çağlarda tüm tiroit kanserleri “sarkomatöz dejenerasyon” olarak isimlendirilmiştir. İlk olarak 1862 yılında Paris'te Gosselin tiroit kanser hücrelerini ortaya koymuştur. 1932 yılında soliter nodül ile tiroit kanseri arasındaki ilişki anlaşılmıştır. Tümör çapı, lenf ganglion metastazı ve uzak metastaz varlığını gösteren TNM sistemi tiroit kanseri sınıflamasında kullanılmaya başlanmıştır (15).

Burns Isii 1811'de ilk olarak primer tiroit kanserinin tam tarifini yapmış, 1887'de Langhans tarafından tiroit kanseri sınıflamasında düzenlemeler yapılmıştır (16).

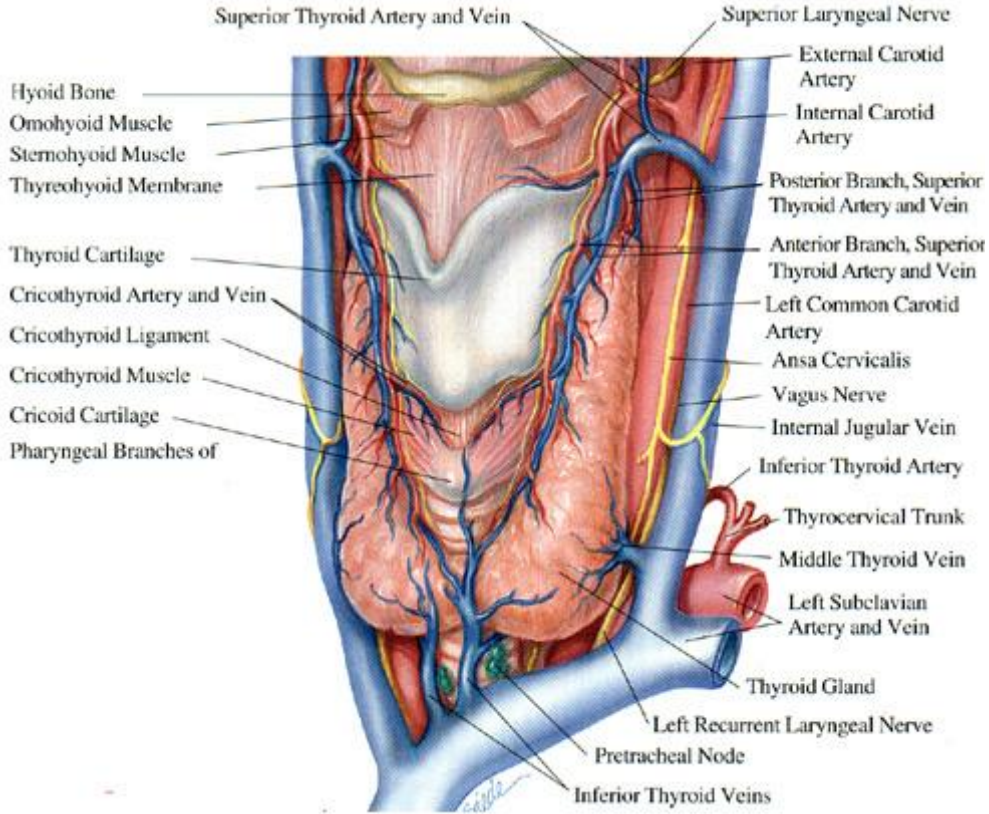
2.2. Tiroit Anatomisi

Erişkin tiroit bezi ortalama 15-20 gr ağırlığındadır. Sağ ve sol iki lob ve bunları birleştiren istmustan oluşmaktadır. Ayrıca %50-80 sıklıkla bu yapılara ilave olarak istmustan yukarıya doğru uzanan ve tiroglossal kanalın kalıntısı olan piramidal lob bulunur (17).

Her bir lobun boyu 4-5 cm, eni 2-3 cm, kalınlığı 2-4 cm olup tiroit kıkırdağın ortası ile 6. trakeal halka arasında uzanır. Lateralinde karotis kılıfı ve sternokleidomastoid kası yer alır. Tiroit bezi yüzeyle derine doğru; deri, süperfisyel fasya, derin boyun fasyasının yüzeyle tabakası ve bu tabakanın örttüğü sternokleidomastoid, omohyoid, sternohyoid ve sternotiroit kasları (strep kasları) tarafından örtülür. Arka medialde özefagus ve trakea tarafından sınırlanmıştır (17,18).

Lateral lobun posterosüperiorunda süperior, posteroinferiorunda inferior paratiroitler yerleşmiştir. Bezin kanlanması süperior ve inferior tiroit arterleri ile olur.

Tiroitin venleri bezin yüzeyinde bir pleksus oluşturarak üst, orta ve alt tiroital venlere dökülür. Üst ve orta venler internal juguler vene, alt venler ise pleksus oluşturarak brakiosefalik vene drene olur (19).



Şekil 2. 1. Tiroit anatomisi

Lenfatik drenaj subkapsüler bir pleksus aracılığı ile parakapsüler bölge, pretrakeal alan, internal juguler ve rekürren sinir komşuluğundaki lenf bezlerine olur. İstmusun üzerinde ve trakeanın önünde palpe edilen lenf bezine “Delphian Nodu” denir ve genellikle malignite veya tiroitle birlikte görülür (17).

Rekürren laringeal sinirler larinksin intrinsek kaslarını innerve ederler. Süperior laringeal sinir, iç (internal) ve dış (eksternal) olmak üzere iki dala ayrılır. İnternal dal epiglot ve larinks mukozasında dağılan sensitif dallar verir. Eksternal dal ise krikotiroit ve farinksin konstrüktör kaslarına motor dallar verir (20).

2.3. Tiroit Fizyolojisi

Tiroitin folliküler hücrelerinden tiroksin (T4) ve triiyodotironin (T3) hormonları salgılanır. Ayrıca parafoliküler hücrelerden de kalsiyumun metabolizmasında etkili olan kalsitonin salgılanmaktadır.

T3 ve T4 genel anlamda bazal metabolizmayı düzenleyen hormonlardır. Hücre içinde bulunan nükleus reseptörlerine bağlanarak protein yapımını regüle ederler. Ayrıca mitokondrielerde oksidasyon olaylarını hızlandırır, membran yapısında yer alan enzimlerin aktivitesini kontrol etmek gibi diğer fonksiyonları da vardır. Bu bağlamda tiroit hormonları yaşam için mutlak gereklidirler (21).

Tiroitten T3 ve T4 sekresyonu anterior hipofizden salgılanan tiroit stimulan hormonun (TSH) kontrolü altındadır. TSH uyarısı T3 ve T4 salınımını uyarırken, kandaki T3 ve T4 artışı hipofizden TSH salınımını süprese eder (negatif feed-back) ve salınımı ise hipotalamustan salgılanan TRH'nın (tirotropin releasing hormon, tirotrop serbestleştirici hormon) kontrolü altındadır. Tiroksin ve triiyodotironin sekresyonunun artmasıyla metabolizma hızı %60-100 oranında artabilir. Salgının ortadan kalkması ise metabolizma hızını normalin %40 altına düşürür (22,23).

Tiroit hormonlarının oluşumu eksojen iyot alımına bağlıdır. Follikül hücresinde tirozine bir iyot bağlanması ile monoiyodotirozin (MIT), iki iyot bağlanması ile diiyodotirozin (DIT) oluşur. İki DIT eşlendiğinde T4, bir MIT ile bir DIT eşlendiğinde T3 meydana gelir. Tiroit hormonları tiroglobuline (Tg) bağlı olarak follikül içindeki kolloidde depolanır. Bu depo vücudun 1-3 aylık ihtiyacını karşılamaya yeterlidir.

T3 ve T4 tiroglobulinden ayrılarak serbest hormon şeklinde kana salgılanırlar ve tamamına yakını plazma proteinlerine bağlanırlar. Bu hormonlara bağlanma eğilimi en yüksek olan taşıyıcı protein bir glikoprotein olan tiroksin bağlayan globülin (TBG)'dir ki 2/3'ünü bağlar ve T3'e bağlanma eğilimi daha düşüktür. 1/4'ü tiroksin bağlayan prealbümine (TBPA), 1/10 kadarı da albümine bağlanır. Plazmadaki tiroit hormonlarının %0,02'si serbest haldedir ve bunlar fizyolojik olarak aktif fraksiyonu oluşturur.

Tiroit bezinden salgılanan hormonun %90'ı T4, %10'u ise T3'tür. Bununla birlikte tiroksinin önemli bir bölümü (%75-85) kanda triiyodotironine çevrilir (T4'un T3'e deiyodinasyonu). Bu çevrilme çok önemlidir çünkü T3 plazmada 10-20 kat daha

az miktarda bulunsa da T4'ten dört kat daha aktiftir. T3'ün yarılanma ömrü bir gün iken T4'ün yedi gündür.

Tiroit hormonları hedef hücreye pasif diffüzyonla veya ATP bağımlı aktif transportla geçer. Daha sonra hücre çekirdeğindeki tiroit hormon reseptörlerine (TR) bağlanarak etkilerini başlatırlar (22,23).

2.4. Tiroit Kanseri

Normal tiroit dokusu histolojik olarak 2 temel parankimal hücre tipinden oluşur. Folliküler hücreler kolloid folikülleri çevreler, iyodu konsantre eder, ve tiroit hormonu üretir. Bu hücreler hem iyi diferansiye kanserlere hem de anaplastik tiroit kanserine dönüşebilir. İkinci hücre tipi C veya parafolliküler hücrelerdir; kalsitonin üretirler ve medüller tiroit karsinomunun temel orjinini oluştururlar. İmmün ve stromal hücreler lenfoma ve sarkom oluşumundan sorumludur. Amerika Birleşik Devletlerinde her yıl 33.500 yeni tiroit vakası tanımlanmaktadır. Yaklaşık olarak bunların %90'ı iyi diferansiye kanserler, %5-9'u medüller, %1-2 anaplastik, %1-3'ü lenfoma, %1'den azı sarkom ve diğer nadir tümörlerden oluşmaktadır (24).

Tiroit karsinomları en sık görülen endokrin karsinomdur. 2007 yılında endokrin malignansilerin %94'ü ve endokrin sistem kanserlerinden ölümlerin %66'sından sorumludur (25). İyi diferansiye tiroit karsinomlar; papiller, folliküler ve her ikisinin değişik oranlarda karışımından oluşan papiller ve folliküler mikst tümörlerdir.

Papiller folliküler karsinom kombinasyonunda hastalığın prognostik özellikleri genellikle papiller karsinomla uyumlu görünmektedir. İyi diferansiye tiroit karsinomlarının 3. grubu Hürtle hücreli veya onkositik karsinomdur. İyi diferansiye tiroit karsinomlarının dağılımı %80-85 papiller, %10-15 folliküler, %3-5 Hürtle hücreli karsinomlardır (24).

Tiroit kanserleri, folliküler hücreler (papiller, folliküler, hürtle hücresi ve anaplastik karsinomlar) ve parafolliküler C hücrelerinden (medüller karsinom) meydana gelir. Klinisyenler ve patologlar tarafından kullanılan sınıflama iyi, orta, kötü şeklinde diferansiyasyon derecesine göre yapılan sınıflamadır. Diferansiyasyon derecesine göre tiroit karsinomlarının sınıflandırılması Tablo 2.1'de belirtilmiştir (24).

Tablo 2. 1. Differansiasyon düzeyine göre Tiroit Folliküler ve Parafolliküler Hücreli Karsinomlarının Sınıflandırılması

<p><u>İyi Diferansiye</u></p> <p>Klasik papiller tiroit karsinomu</p> <p>Mikrokarsinom <1cm</p> <p>Kistik</p> <p>Papiller tiroit karsinomun folliküler varyantı</p> <p>Klasik folliküler tiroit karsinomu</p> <p>Hürtle hücreli(oksifilik, onkositik) karsinomlar</p> <p><u>Orta Diferansiye</u></p> <p>Medüller tiroit karsinomu</p> <p>Papiller tiroit karsinomun sklerozan varyantı</p> <p>İnsüler Karsinom</p> <p>Papiller karsinomun uzun hücreli varyantı</p> <p><u>Kötü Diferansiye (Yüksek gradeli malignensi)</u></p> <p>Anaplastik (Andiferansiye) karsinoma</p>
--

Diyette iyodun bulunduğu gelişmiş ülkelerde; papiller tiroit karsinomu malign epitelyal tiroit kanserlerinin %80-85'ini oluşturmaktadır. Papiller karsinomun makroskopik görünümü subkapsüler beyaz skardan; 5-6cm'in üzerinde tiroit dışı dokulara da invaze olan geniş tümörlere kadar değişmektedir. Kistik değişiklikler, kalsifikasyon ve ossifikasyon tanımlanmıştır (24) .

Mikroskopik olarak; papiller karsinom papilla yapılarının olmasıyla karakterize olsa da bazı varyantlarında papiller alanlar yoktur tamamen folliküler yapıdan oluşur ve bunlara folliküler varyant denir. Miks papiller ve folliküler karsinom terimi uzun süredir kullanılmamaktadır. Çünkü papiller karsinomlar çoğunlukla folliküler alanlar içermektedir; yalnız bu alanları içerip içermemesinden bağımsız olarak prognoz değişmemektedir (25).

Papiller karsinom, lenfatik alanlara yayılma eğilimindedir gland içinde multimodal lezyonlar mevcuttur; bu nedenle rejyonel lenf nodu metastaz insidansı yüksektir. Lenfatik yayılım tümör boyutu çok küçük olsa da papiller tiroit karsinomunun başlangıç bulgusu olabilir. Bir cm altındaki kitlelere mikrokarsinom adı verilir (24).

Dünyada guatrın nonendemik olduğu alanlarda; folliküler karsinom yaklaşık %5 ila 10 arasındadır (26). Diyete iyodun girmesiyle daha sık folliküler karsinom tanısı konular hale gelmiştir. Folliküler patern içeren tümörlerin çoğu biyolojik davranışları, doğal öyküsü ve prognozu ile papiller karsinom gibi davranan papiller karsinom folliküler varyanttır (27). Folliküler tiroit karsinomu unifokal kalın kapsüllü, kapsül ve/veya damar invazyonu gösterir. Kapsüler invazyon olsa da vasküler invazyon yoksa prognoz mükemmeldir; 10 yıllık sağkalım %85-100 oranındadır (24).

2008 yılında 37.340 yeni tiroit kanseri vakası tanı almış olup bunların %70-75 kadarı papiller tiroit karsinomudur. Hastalığın insidansı 1935 yılında kadınlarda 1,3/100.000 ve erkeklerde 4,6/100.000 oranında iken bu oran 2001-2005 yılları arasında kadınlarda 13,4/100.000 ve erkeklerde 4,7/100.000 oranına yükselmiştir (28,29).

SEER veri tabanı incelendiğinde 1973 yılından 2002 yılına gelindiğinde tiroit kanseri insidansında 2,9 kat artış saptanmıştır (100.000'de 2,7'den 7,7'ye yükselmiştir). Bu dramatik artış artık çok küçük tümörlerin bile erken saptanmasına bağlanmıştır (30,31). Kadın erkek oranı 2,5/1 ve kadın sayısında artış 4 ve 5. dekatta saptanmıştır (30).

2.5. Papiller tiroit kanseri

Papiller tiroit karsinomlarının çeşitli patolojik alt tipleri mevcuttur.

1- Folliküler varyant: Papiller tiroit karsinomunun %10 oranında en sık görülen varyantıdır. Bu tümörler küçük-orta boyutta folliküler yapılar içerirler. Sitolojik olarak tipik papiller karsinom özellikleri sergilerler; hipodens kromatin içeren üst üste binmiş geniş nükleüsler, nükleer psödoinklüzyonlar, nükleer oluklar ve psammom cisimcikleri içerir. Folliküler varyant klasik papiller karsinomdan daha küçüktür, bölgesel lenf nodu metastazı riski daha düşüktür. Ancak genel sağkalım ve rekürrens oranları aynıdır (32,33).

2- Tall-cell Varyant: Klasik papiller tipten çok daha agresiftir. Papiller kanserlerin yaklaşık %1'i kadardır. Primer tümör boyutu daha büyüktür, daha invazivdir, tanı anında lokal ve uzak metastaz yapmıştır (24) .

3- Papiller Mikrokarsinom: 1 cm altındaki kitlelere mikrokarsinom adı verilir. Prognozu iyidir.

4- Diffüz Sklerozan Tip: Çocuk ve genç yaş grubunda daha sık görülür. Yaygın skuamoz metaplazi, skleroz alanları, çok sayıda psammom cisimcikleri ve yaygın lenfositik infiltrasyon görülür. Ekstratiroidal yayılım ve uzak metastaz çok olduğundan agresif bir alt tiptir.

5- Kolumnar tip: Bu alt tipte belirgin köşeli hücreler görülür. Erkeklerde daha sık olup %90 oranında uzak metastaz yapar.

6- Trabeküler tip

2.6. Etyoloji ve Risk Faktörleri

Çocukluk döneminde radyasyon maruziyeti diferansiye tiroit karsinomu gelişiminde en önemli risk faktörüdür. Radyasyona en önemli maruziyet şekli; medikal olarak çocukluk döneminde tedavi nedeniyle olabilir; atom bombası ve nükleer kazalar da maruziyetlere neden olmaktadır (34).

Çocukluk döneminde timik bölgeye radyasyon alan adolosan dönemde akne nedeniyle veya Hodgkin Lenfoma tanısıyla radyoterapi alan çocuklarda görülme sıklığı artmıştır (35,36). Radyasyona maruziyet sonucu gelişen papiller tiroit karsinomu daha agresif ve nüks etmeye eğilimli olmakla birlikte prognozu diğer papiller karsinomlardan farklı değildir (37).

Diyetsel faktörler, seks hormonları, çevresel maruziyet, genetik faktörler gibi radyasyon maruziyeti dışındaki faktörler üzerinde çalışılmış fakat karışık sonuçlar saptanmış net korelasyon gösterilememiştir. İyottan fakir diyetler veya iyot alımını bloke eden sebzelerden oluşan diyetler TSH'ı stimüle ederek guatrojenik rol oynar.

İzlanda, Norveç, Havai gibi kabuklu deniz hayvanları tüketimi ve dolayısıyla iyot alımı fazla olan ülkelerde papiller tiroit kanseri fazla görülmektedir. Ancak son zamanlarda yapılan çalışmalarda balık tüketimi ile tiroit kanseri arasında ilişki saptanmamıştır (38) .

Epidemiyolojik çalışmalar birinci derece akrabalarında tiroit kanseri olan hastalarda 4-10 kat artış saptanmıştır. Ailede tiroit kanseri genetik geçişli bazı ailevi hastalıklarla birlikte görülebilir (39). Bunlar;

1. Papiller renal neoplazi ile birlikte olan papiller tiroit karsinomu,
2. Familial nonmedüller tiroit karsinomu,
3. Hücre oksifilisi ile birlikte olan familial tiroit karsinomu,
4. Familial adenomatoz polipozis,
5. Cowden (Multipl Hamartom) Sendromu,
6. Carney Complex 1'dir.

2.7. Oksidatif stres

Vücuttaki fizyolojik aktivitenin doğal ürünü olan serbest radikalleri, organizma doğuştan kazandığı çok hassas bir donanımla oksidan-antioksidan denge olarak tanımlanabilecek bir çizgide tutmaya çalışır. Bu dengenin bozulması oksidatif strese yol açar (40). Reaktif oksijen türleri (ROT), reaktif nitrojen türleri (RNT) ve sülfür merkezli radikaller oksidan sınıfına girer. Ancak tüm reaktif türleri radikal değildirler. Radikal olan ve olmayan reaktif türleri Tablo 2.2'de özetlenmiştir (41,42).

Tablo 2. 2. Radikal ve radikal olmayan reaktif oksijen türleri

Reaktif Türleri	
Radikal	Non-Radikal
Hidroksil ($\cdot\text{OH}$)	Peroksinitrit ($\text{ONOO}\cdot$)
Alkoksil ($\text{L(R)O}\cdot$)	Hipoklorit ($\cdot\text{OCl}$)
Hidroperoksil ($\text{HOO}\cdot$)	Hidroperoksit (L(R)OOH)
Peroksil ($\text{L(R)OO}\cdot$)	Singlet oksijen ($^1\text{O}_2$)
Nitrik oksit ($\text{NO}\cdot$)	Hidrojen peroksit (H_2O_2)
Süperoksit ($\text{O}_2\cdot$)	Ozon (O_3)

Canlı organizma için önemli olan yapıları, fiziksel ve kimyasal özellikleri, hücresel kaynakları, rol oynadıkları tepkimeler ve etkileri ile çeşitli klinik durumların patogeneğinde rol oynayan serbest radikaller, atomik yörüngelerinde eşleşmemiş

elektron bulundurarak, bağımsız olarak var olabilen moleküllerdir. Eşleşmemiş elektronun kazandırdığı en önemli özellik birçok radikal ile bu elektronun paylaşılabilinmesidir (43-45).

Serbest radikallerin en önemli tepkimeleri, moleküler oksijen ve onun reaktif türlerinin olduğu tepkimelerdir (46).

Demir, bakır, mangan, molibden gibi geçiş metalleri de dış yörüngelerinde birer elektron taşımalarına rağmen radikal karakter göstermezler. Serbest radikal kabul edilen atom ve moleküller elektron dağılımlarının yanı sıra termodinamik yapıları ve lokal kinetik reaktiviteleri ile değerlendirilir (47,48). Antioksidan ise; okside olabilen substrata göre ortamda daha az derişimde bulunan ve bu substratın oksidasyonunu belirgin şekilde geciktiren veya engelleyen madde olarak tanımlanabilir. Bu tanıma göre antioksidanların fizyolojik rolü, serbest radikalleri içeren kimyasal tepkimelerin sonucunda hücresel bileşenlere gelebilecek zararı önlemektir (49).

Aerobik metabolizmada denge, serbest radikal oluşumu ve bunların benzer hızla antioksidan sistemler tarafından uzaklaştırılmasıyla karakterizedir. Geri dönüşümsüz oksidatif hasarın birikimi ile önce hücre daha sonra doku ve organ sistemlerinde yapısal ve işlevsel bozukluklar ortaya çıkabilir. Oksidatif stres ile ilişkili hastalıkların bazıları Tablo 2.3’de belirtilmiştir (50).

Tablo 2. 3. Oksidatif stres ile ilişkili bazı hastalıklar

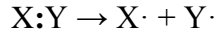
<ul style="list-style-type: none">• Astım• Ateroskleroz• Serebral vasküler hastalıklar• Kronik obstruktif pulmoner hastalık• Konjestif kalp yetmezliği• Diyabet• Hipertansiyon• Grip• Miyokard enfaktüsü• Pnömoni• Hepatit• Kanser• İnflamasyon hastalıklar

2.8. Serbest Radikaller

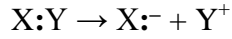
Serbest radikaller hücrede metabolik dengenin bir parçası olarak devamlı yapılırlar (51).

Serbest radikaller 3 yolla meydana gelirler (52,53) ;

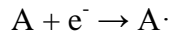
1. Kovalent bağlı normal bir molekülün, her bir parçasında ortak elektronlardan birisinin kalarak homolitik bölünmesi.



2. Normal bir molekülden tek bir elektronun kaybı veya bir molekülün heterolitik bölünmesi. Heterolitik bölünmede kovalent bağı oluşturan her iki elektron atomların birinde kalır. Böylece serbest radikaller değil, iyonlar meydana gelir.



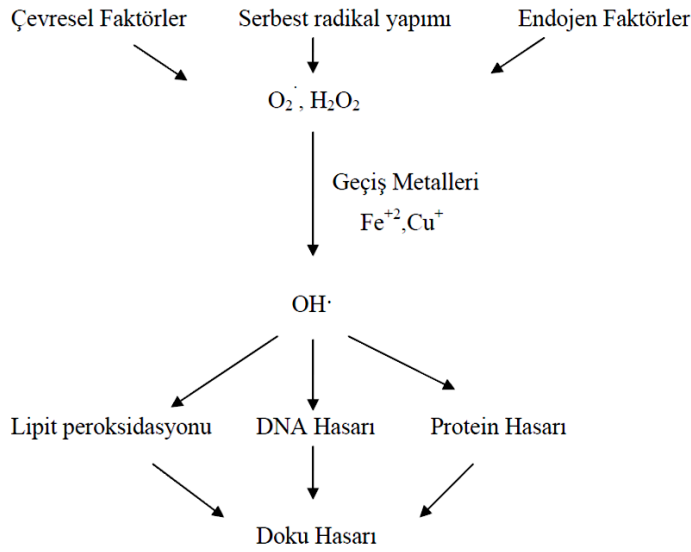
3. Normal bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi



Organizmada oksidatif strese neden olan radikal yapımı endojen ve çevresel faktörleri içeren çeşitli mekanizmalarla gerçekleşir (Şekil 2.2) (49).

Endojen faktörler mitokondriyal sızıntı, solunumsal patlama, enzim reaksiyonları, otooksidasyon tepkimeleridir. Çevresel faktörlerin başlıcaları ise sigara dumanı, hava kirliliği, ultraviyole ışınları, iyonize radyasyon ve ksenobiotiklerdir (49).

Örneğin bir nefes sigara dumanında yaklaşık 10^{14-16} serbest radikal bulunmaktadır, aşırı egzersiz ile mitokondri oksijeninin yaklaşık %2-5'i serbest radikal yapımında kullanılır (51,54).



Şekil 2. 2. Vücuttaki önemli serbest radikaller ve serbest radikal hasarı sonuçları

Serbest radikallerin aerobik hücrelerde en önemli tepkimeleri moleküler oksijen ve onun reaktif türleri (süperoksit anyonu ve hidroksil radikali), peroksitler ve geçiş metallerinin olduğu tepkimelerdir (46).

2.9. Reaktif oksijen türleri

Normal şartlarda oksijen kararlı, sudaki çözünürlüğü sınırlı bir gazdır. İnsan hayatı için hem gerekli hem de toksik olan bir moleküldür. ROT, oksijenin iki eşleşmemiş elektronlarının ayrı orbitallerde paralel spin yapması sonucu oluşan radikallerdir (55).

Moleküler oksijen elektron transferiyle suya kadar indirgenir. Bu yol 4 elektron gerektirir ve bu yolda reaktif ara moleküller oluşur ki bunlar süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksil radikalleridir. Bunlar önemli oksidatif stres ajanları olup reaktif oksijen türleri (ROT) olarak adlandırılır (Tablo 2.4) (56,57).

Tablo 2. 4. Oksijenin indirgenmesi

$O_2 + e + H^+ \rightarrow HO_2^{\cdot}$	Hidroperoksil radikali
$HO_2^{\cdot} \rightarrow H^+ + O_2^{\cdot}$	Süperoksit radikali
$O_2^{\cdot} + 2H^+ + e \rightarrow H_2O_2$	Hidrojen peroksit
$H_2O_2 + e \rightarrow OH^- + \cdot OH$	Hidroksil radikali
$\cdot OH + e + H^+ \rightarrow H_2O$	

2.9.1. Süperoksit Radikali (O₂[·])

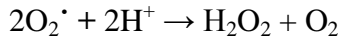
Oksijenli ortamda yaşam, oksidatif fosforilasyon ile ATP üretimi açısından önemli ölçüde yarar sağlarken bazı tehlikeleri de beraberinde getirir. Oksidatif fosforilasyonun ana bileşeni olan oksijene bir elektron eklenmesi ile süperoksit radikali oluşur (58).

Süperoksit radikali serbest radikal olmasına karşın reaktifliği yüksek değildir. Kendiliğinden, özellikle elektronca zengin bir ortam olan iç mitokondri zarında solunum zinciriyle birlikte oluşur. Süperoksit ayrıca iskemi-reperfüzyonda aktive olan ksantin oksidaz gibi flavoenzimlerce endojen olarak da oluşturulur. Lipooksijenaz ve siklooksijenaz ise diğer süperoksit oluşturan enzimlerdir (59-61).

Süperoksit ayrıca yüksek enerjili elektromanyetik dalgalar gibi fiziksel ve kimyasal ajanlar ile bazı bileşiklerin ootoksidasyonunda ve fagositozda oluşur (62).

Süperoksit kimyası çözelti ortamına bağlı olarak farklılıklar gösterir. Süperoksit sulu çözeltide askorbik asit, tiyol gibi molekülleri oksitleyebilen zayıf bir oksitleyici ajandır. Bunun yanında süperoksit güçlü bir indirgeyici ajan olup sitokrom c ve ferrik-EDTA gibi çeşitli demir komplekslerini indirgeyebilir (63).

Süperoksit, hidrojen peroksit ve moleküler oksijenin oluştuğu dismutasyon tepkimesinden dolayı sulu ortamda hızlıca kaybolur. Diğer taraftan süperoksit dismutaz (SOD) enzimiyle katalizlenen dismutasyon tepkimesi ise spontan dismutasyondan 109 kat daha hızlıdır (64).



2.9.2. Hidrojen Peroksit (H₂O₂)

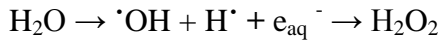
Hidrojen peroksit serbest radikal olmamasına karşın biyolojik zarlara nüfuz edebilmesi ve daha reaktif oksijen türlerinin yapım aşamasında aldığı rolden dolayı önemlidir. Diğer bir önemli işlevi ise hücre içi sinyal molekülü olarak görev yapmasıdır (57).

Hidrojen peroksit süperoksit radikalinin dismutasyon tepkimesi sonucu oluşur. Ürat oksidaz, glukoz oksidaz, d-aminoasit oksidaz gibi birçok enzim oksijene iki elektron transfer ederek direk hidrojen peroksit oluşturabilirler (52).

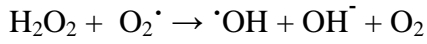
Hidrojen peroksitin redoks özelliği ve geçiş metalleri varlığında yüksek reaktif serbest radikalleri oluşturmasına karşı vücut, savunma sistemi geliştirmiştir. İstenmeyen hidrojen peroksit katalaz, glutatyon peroksidaz ve diğer oksidazlar ile hücreden uzaklaştırılır (63).

2.9.3. Hidroksil radikali ($\cdot\text{OH}$)

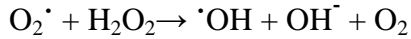
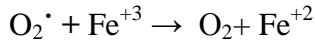
Hidroksil radikalının major oluşumu suyun yüksek enerji ile iyonizasyonudur.



Hidrojen peroksit ise süperoksit ile tepkimeye girerek en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikali oluşturmak üzere kolaylıkla yıkılabilir.



Bu tepkimeye Haber-Weiss tepkimesi denir ve tepkime katalizörsüz ortamda oldukça yavaşken, demirin katalizörlüğünde çok hızlıdır.



Katalizörlü tepkimede demir önce ferrik formdan (Fe^{+3}) süperoksit ile ferröz forma (Fe^{+2}) indirgenir. Ferröz form Fenton tepkimesi ile ferrik forma tekrar yükseltgenirken $\cdot\text{OH}$ ve OH^- üretilir (55,63).

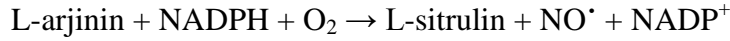
2.9.4. Singlet Oksijen ($^1\text{O}_2$)

Singlet oksijen eşleşmemiş elektron içermediği için serbest radikal değildir. Bununla birlikte elektronların antiparalel spin olmasından dolayı oksijenin yüksek reaktif formudur (63).

Moleküler oksijende paylaşılmamış iki dış elektron aynı yönde, aynı yörüngelerdedir. Singlet oksijende ise elektronlar antiparalel spin oluştururlar. Delta veya sigma formuna göre aynı veya ayrı yörüngelerde bulunurlar. Aynı yörüngede ise delta singlet oksijen, ayrı yörüngelerde iseler sigma singlet oksijen formu oluşur. Sigma formu delta formuna göre daha enerjetik olup kolayca delta formuna dönüşebilir (45,63).

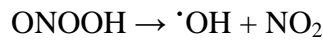
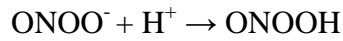
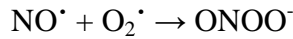
2.9.5. Nitrik Oksit (NO[•])

NO[•] enzimatik olarak nitrik oksit sentaz enzimi tarafından L-arjinin'den sentezlenir.



NO[•] eşleşmemiş elektron bulundurmasına rağmen birçok biyomolekül ile kolayca tepkimeye giremez, öte yandan peroksil, alkil gibi diğer serbest radikallerle kolayca tepkimeye girerek daha az reaktif moleküller oluşturur (57).

Yüksek miktarlarda O₂[•] yapımı NO[•] ile paraleldir ve birbirlerini etkileyerek [•]OH ve [•]NO₂ oluşumuna neden olurlar. Tepkime sırasında ise peroksinitrit (ONOO⁻) ve peroksinitröz asit (ONOOH) ara ürünleri oluşur (57).



2.10. Serbest Radikallerin Etkileri

2.10.1. DNA ve Nükleik Asitlere Etkileri

İyonize edici radyasyona maruz kalınması ile oluşan serbest radikaller DNA'yı etkileyerek hücrede mutasyona neden olurlar. Sitotoksik etki, büyük oranda nükleik asit baz modifikasyonlarından kaynaklanan kromozom değişikliklerine veya DNA'daki diğer değişikliklere bağlıdır. Hidroksil radikali deoksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyona girer. Hidrojen peroksit zarlardan kolayca geçip hücre çekirdeğine ulaşarak DNA hasarına, hücrede fonksiyon bozukluğuna ve hatta hücre ölümüne neden olabilir (65,66).

2.10.2. Proteinlere Etkileri

Proteinler, radikallerin etkilerine lipitlere oranla daha az hassastır ve amino asit dizilişlerine bağlı olarak etkilenirler. Özellikle doymamış bağ ve sülfür içeren moleküllerin serbest radikallerle etkileşimi yüksektir. Bu nedenle triptofan, tirozin, fenil alanin, histidin, metionin ve sistein gibi amino asitleri içeren proteinler serbest radikallerden daha kolay etkilenirler. İmmünoglobulin G ve albümin gibi disülfid bağı fazla olan proteinlerin ise üç boyutlu yapıları bozulur (55,63,64).

2.10.3. Karbohidratlara Etkileri

Monosokkaritlerin otooksidasyonu sonucu hidrojen peroksit, peroksit ve okzoaldehitler meydana gelir. Açığa çıkan okzoaldehitler proteinlere bağlanabilme özelliklerinden dolayı antimitotik etki göstererek etki eder ve böylece kanser ve yaşlanmaya neden olabilirler (65).

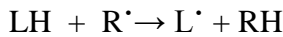
Serbest oksijen radikalleri bağ dokunun önemli bir bileşeni olan hiyalüronik asit gibi karbohidratların parçalanmalarına da yol açabilirler (58).

2.10.4. Lipitlere Etkileri

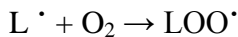
Serbest radikallerin biyolojik dokulardaki doymamış yağ asitlerine etkileri lipit peroksidasyonu olarak bilinir. Biyolojik zarların yapısı lipit ve proteinden oluşmaktadır. Lipit peroksidasyonu lipitlere olduğu kadar zar proteinlerine de zarar verir (47).

Lipit peroksidasyonu, çoklu doymamış yağ asitlerinin (PUFA) reaktif oksijen türleri tarafından peroksitler, alkoller, malondialdehit, etan ve pentan gibi ürünlere yıkılma tepkimelerine denilmektedir. Yağ asitlerinin peroksidasyonu sonrasında açığa çıkan ürünler zar geçirgenliğini ve akışkanlığını ciddi şekilde etkileyip hücre ve organel içeriklerinin ayrılmasına neden olan kopma ve kırılmalara yol açar. Lipit peroksidasyonu ile meydana gelen zar hasarı geri dönüşümsüzdür (58,63).

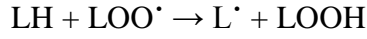
Zincir reaksiyonu şeklinde olan lipit peroksidasyonu, organizmada oluşan radikal etkisiyle çoklu doymamış yağ asitleri üzerindeki metilen grubundan bir hidrojen atomu uzaklaştırılması ile başlar. Bu reaksiyon başlangıç reaksiyonu olarak isimlendirilir. Hidrojen atomu uzaklaşması ile karbon atomu üzerinde eşleşmemiş elektron kalır ve bunun sonucu yağ asidi zinciri bir lipit radikali ($L\cdot$) niteliği kazanır.



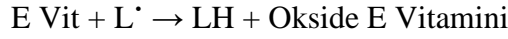
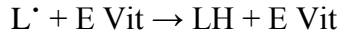
Oluşan lipit radikalının molekül içi çift bağlarının pozisyonunun değişmesiyle konjuge dienler oluşur. Bir alkenin iki çift bağı arasında bir tane tekli bağ varsa bu yapı konjuge dien olarak isimlendirilir. Bu şekilde moleküler düzenleme sağlanmış olur. Lipit radikalının moleküler oksijen ile etkileşmesi sonucu lipit peroksil radikali ($LOO\cdot$) oluşur.



Peroksil radikali diğer komşu yağ asitlerini etkileyerek yeni lipit radikallerinin oluşmasına neden olurken kendisi de açığa çıkan hidrojen atomunu alarak lipit hidroperoksitlerine (LOOH) dönüşür. Böylece peroksidasyon başladıktan sonra kendi kendine yayılabilmekte ve çok sayıda yağ asidi zinciri lipit hidroperoksitlerine dönüşebilmektedir. Bu tepkime ilerleme reaksiyonu olarak isimlendirilir (58,63,66-68).



Oldukça kararlı olan lipit hidroperoksitleri lipit peroksidasyonunun ilk ürünüdür. Lipit peroksidasyonunun sürekli olarak devam ettiği durumlarda E vitamini gibi zincirleme tepkimeyi sonlandırıcı bir antioksidan ile lipit peroksidasyonu sonlanabilir.



Geçiş metalleri varlığında lipit hidroperoksitleri bu metallerin redoks döngüsüyle birlikte lipit peroksidasyonunu başlatabilecek radikallerin oluşumuna neden olabilirler.

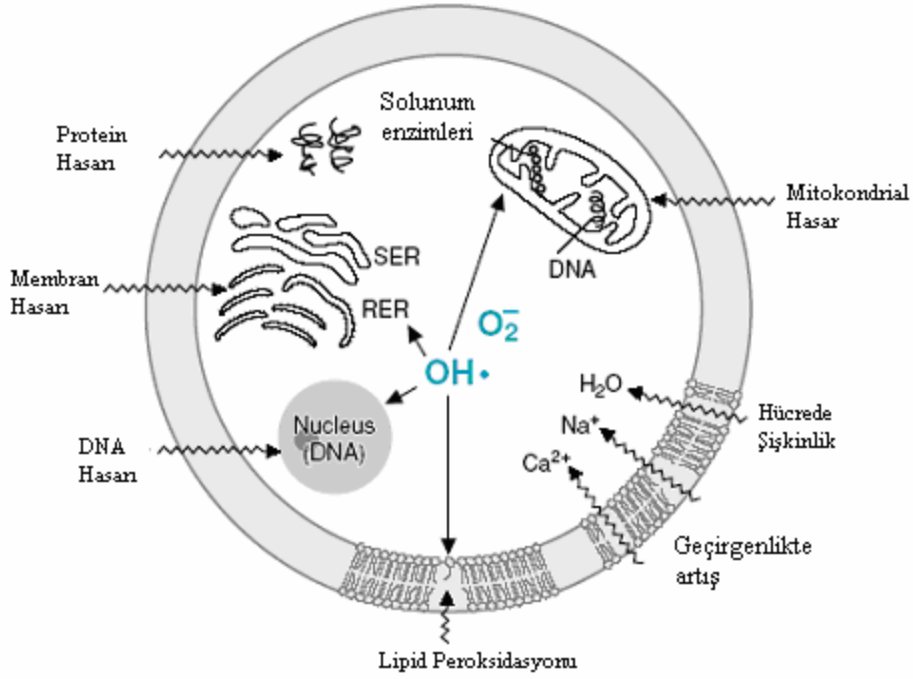
Lipitlerden araşidonik asit metabolizması sonucu serbest radikal üretimine “enzimatik lipit peroksidasyonu” diğer radikallerin sebep olduğu lipit peroksidasyonuna ise “non-enzimatik lipit peroksidasyonu” denir (55).

Lipit proksidasyonunun son bileşeni olan malondialdehit (MDA) peroksidasyona uğramış çoklu doymamış yağ asitlerinin bölünmesiyle oluşan üç karbonlu bir dialdehidtir ve oksidatif durumun göstergesi olarak yaygın kullanılır. Bu dialdehid biyolojik ortamda makromoleküllerin NH₂ ve/veya SH gruplarına bağlı veya serbest olarak bulunur. Oluşan MDA; deformasyon, iyon transportu, enzim aktivitesi ve hücre yüzey bileşenlerinin agregasyonu gibi zar özelliklerinin değişmesine yol açar (55,68).

2.11. Antioksidan Sistem

Organizma içindeki radikaller, geri dönüşümsüz hücre hasarına yol açan birçok tepkimeye neden olurlar (Şekil 2.3). Süperoksit ve hidroksil radikalleri hücre, mitokondrial, nükleer ve endoplazmik zarlarda lipit peroksidasyonunu başlatırlar.

Geçirgenlikteki artış mitokondrial hasara neden olan Ca⁺²,un hücreye akın etmesine neden olur (42).



Şekil 2. 3. Radikallerin yol açtığı hücre hasarı

Hücre ve organ sistemlerini reaktif oksijen türlerine karşı koruyabilmek için organizma karmaşık bir sistem geliştirmiştir. Bu sistem endojen ve eksojen orjinli, etkileşimli ve birlikte çalışan çeşitli bileşenler içerir (69).

Antioksidan sistem hasar öncesi radikal oluşumunu önler, oksidatif hasarı onarır, hasara uğramış molekülleri temizler ve mutasyonları önler. Nötralize olması gereken çeşitli reaktif ara ürünleri ve indirgenmesi gereken okside biyomolekülleri etkileyen hem lipofilik hem hidrofilik fazda pek çok antioksidan Tablo 2.5 'de özetlenmiştir (70).

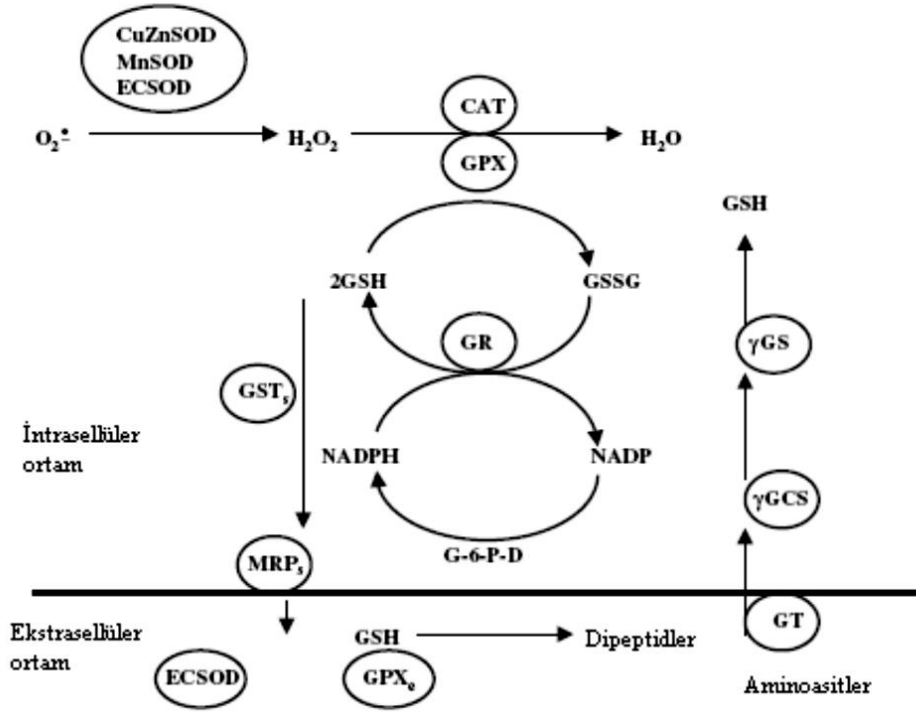
Tablo 2. 5. Hidrofilik ve lipofilik fazda bazı antioksidanlar

Antioksidan	Faz	Etki
Süperoksit Dismutaz(SOD)	Hidrofilik	$O_2^{\cdot -}$ 'nin H_2O_2 ve O_2 'e dismutasyonu
Katalaz(CAT)	Hidrofilik	H_2O_2 'nin H_2O ve O_2 'e dismutasyonu
Glutatyon peroksidaz(GSH-Px)	Hidrofilik veya Lipofilik	R-OOH'nin R-OH indirgenmesi
Glutatyon redüktaz (GSH-Rd)	Hidrofilik	Okside glutatyonun indirgenmesi
Glutatyon S Transferaz (GST)	Hidrofilik	R-OOH'nin GSH ile konjugasyonu
Metallotieninler	Hidrofilik	Geçiş metalleriyle nötralizasyon
Tiyoredoksinler	Hidrofilik	R-S-S-R'nin R-SH'a indirgenmesi
Glutatyon	Hidrofilik	R-S-S-R'nin R-SH'a indirgenmesi Serbest radikal temizleyicisi GSH-Px ve GST'nin kofaktörü
Ubikinon	Lipofilik	Serbest radikal temizleyicisi Lipid peroksidasyonunda korun
Askorbik asit	Hidrofilik	Serbest radikal temizleyicisi Tokoferol kazanımı Enzimlerin redükte formda korunması
Karotenler	Lipofilik	Serbest radikal temizleyicisi $O_2^{\cdot -}$ baskalayıcı
Tokoferol	Lipofilik	Selenyum absorpsiyonunu artırır Serbest radikal temizleyicisi Lipid peroksidasyonunda korun
Selenyum	Amfilik	Tiyoredoksin, GSH-Px yapıtaşı

Antioksidanları hücre içi, hücre dışı ve zar antioksidanları olarak sınıflandırabiliriz. Bunlara örnek vermek gerekirse; Hücre içi antioksidanlar için süperokit dismutazları, katalazı, glutatyon peroksidazı, glutatyon S transferazı, glutatyon redüktazı, hücre zarı antioksidanları için E vitaminini, β karoteni, koenzim Q'yu örnek verebiliriz.

Hücre dışı antioksidanlar da ise transferini, laktoferrini, haptoglobini, hemopeksini, albümini, seruloplazmini, ekstrasellüler süperoksit dismutazı, ekstrasellüler glutatyon peroksidazı, bilirubini, askorbik asiti sayabiliriz (52).

Reaktif oksijen türlerine karşı primer savunma enzimatik ve enzimatik olmayan intrasellüler antioksidanlarca yapılır (Şekil 2.4) (71).

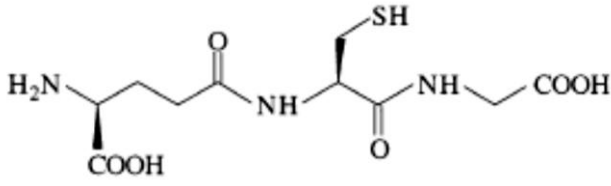


Şekil 2. 4. İnsan dokularındaki major antioksidan enzimler ve bağlı yollar

CuZnSOD (bakır-çinko SOD), MnSOD (manganez SOD), ECSOD (ekstrasellüler SOD), CAT (katalaz), GSH-Px (glutasyon peroksidaz), GSH-Rd (glutasyon redüktaz), GSH (redükte glutasyon), GSSG (okside glutasyon), GST (glutasyon S transferaz), MRP (Multidrug resistans protein), G6PD (glukoz-6- fosfat dehidrogenaz), cGS (gama glutamil transpeptidaz), cGCS (gama glutamil sisteinil sentetaz),(glutamat sistein ligaz), GS (glutasyon sentaz), GPXe (ekstrasellüler glutasyon peroksidaz) (72).

2.11.1. Redükte Glutasyon (GSH)

Tripeptid yapıdaki GSH (L- γ - glutamil-L-sisteinil-glisin) oksidatif ve elektrofilik stres ve radyasyona karşı hücrelerin korunmasında önemli rol oynar (Şekil 1.5). Sitolik GSH redoks döngüsünde substrat olarak rol alırken, ROT'a karşı direkt olarak da savunma yapabilir (73).



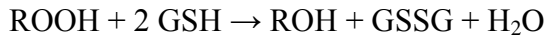
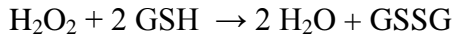
Şekil 2. 5. Redükte Glutatyon (GSH)

Hücrede milimolar derişimde bulunan GSH primer olarak redükte formda(GSH) bulunur ancak okside formda disülfüd dimeri (GSSG) olarakta bulunabilir (74).

GSH'ın hücresel seviyesi γ -glutamil transpeptidaz, aminoasit transporterları, glutatyon sentetaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktazı içeren çoklu bir enzim sistemi tarafından korunur (75).

2.11.2. Glutatyon Peroksidaz Enzimi (GSH-Px)

Glutatyon Peroksidaz organik hidroperoksitlerin (lipit hidroperoksitler, DNA hidroperoksitler) veya hidrojen peroksitin GSH tarafından indirgenmesi tepkimesini katalizler. 1957'de Mills tarafından keşfedilmiştir (73).

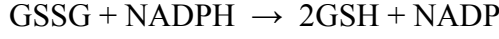


Glutatyon Peroksidaz enzimi, selenyum bağımlı ve selenyum bağımsız olarak iki gruba ayrılabilir. Selenyum bağımlı grupta hidrojen peroksit ve diğer organik peroksitleri indirgeyen beş üye vardır, selenyum bağımsız Glutatyon Peroksidaz ise hidrojenperoksit ile ihmal edilebilir bir aktifliğe sahip olup sadece organik hidroperoksitleri redükler (75).

Selenyum bağımlı üyelerden, GSH-Px 1 veya hücresel GSH-Px bütün hücrelerde eksprese edilen, tetramerik yapıda, sitozolik bir enzimdir. Eritrosit, böbrek ve karaciğerde yüksek miktarda bulunur. GSH-Px 2 veya gastrointestinal GSH-Px insanlarda karaciğer ve gastrointestinal kanalda eksprese edilir; böbrek, kalp, akciğer, plasenta ve uterusunda bulunmaz. GSH-Px 3 veya plazma GSH-Px plazmanın lipit kısmından izole edilmiş bir glikoproteindir, akciğer, plazma ve diğer ekstrasellüler sıvılarda bulunur. GSH-Px 4 veya fosfolipit GSH-Px sitozolde, mitokondri ve hücre zarında bulunur. GSH-Px 5 veya epididimal GSH-Px selenyum bağımlı değildir ve yalnız epididimiste eksprese edilir. GSH-Px 6 hücresel GSH-Px ile homoloji gösterir, burun epiteli ve embriyolarda eksprese edilir (73).

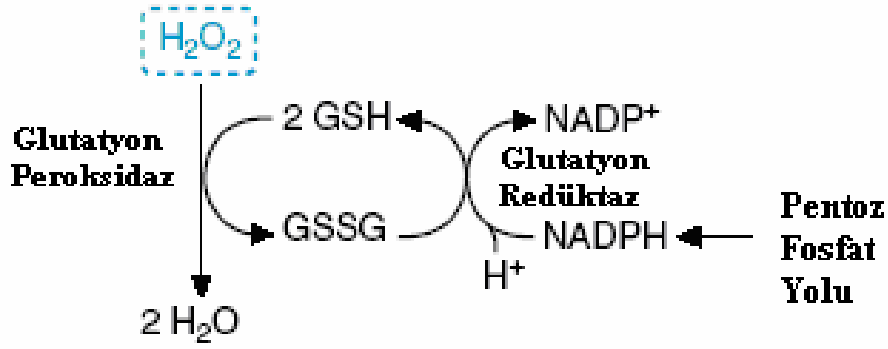
2.11.3. Glutatyon Redüktaz Enzimi (GSH-Rd)

Okside glutatyon (GSSG) NADPH bağıflı flavo enzim olan Glutatyon Redüktaz tarafından redükte formuna (GSH) indirgenir (49,57,73).



Glutatyon redüktazın kalıtımı otozomal dominanttır, 8. kromozom üzerindedir. Glutatyon peroksidaz ile benzer doku dağılımı gösterir.

Glutatyon redüktaz flavin adenin dinükleotid (FAD) içerir, NADPH'tan bir elektronun GSSG'nin disülfüd bağlarına aktarılmasını katalizler. Bu nedenle NADPH serbest radikal hasarına karşı gereklidir ve major kaynağı pentoz fosfat yoludur (Şekil 2.6) (66).



Şekil 2. 6. Glutatyon redoks döngüsü

2.11.4. Glutatyon-S-Transferaz Enzimi (GST)

GST memeli türlerinde elektrofilik bileşenlerin GSH ile konjugasyonunu katalizleyen izoenzimlerin oluşturduğu çoklu bir gen ailesinden oluşur; alfa, mu, teta, pi, zeta, sigma, kappa ve omega olarak gösterilen 8 esas gen sınıfı ile düzenlenmiştir. Alfa kromozom 6'da mu kromozom 1'de teta kromozom 22'de pi kromozom 11'de, zeta kromozom 14'de sigma kromozom 4'de kappa ve omega kromozom 10'da kodlanır (66,76).

GST karsinojenleri, çevresel etmenleri, ilaç ve geniş spektrumlu ksenobiotikleri metabolize eder. Mikrozomal GST belirlendiyse de GST aktivitesi esasen sitozoliktir (73).

GST iki subüniteden oluşmuş dimerik bir proteindir. Bu subünitelerden her biri glutasyon bağlanma bölgesi (G bölgesi) ve buna komşu elektrofilik substrata bağlanan nispeten hidrofobik olan bölge içerir. Bunun yanında çeşitli izoenzimlerde transport veya düzenleyici fonksiyonu olduğu düşünülen substrat bağlanmayan bölge de belirlenmiştir.

GST, hidroksialkenler, lipit peroksidasyonunun ürünlerinden propenaller ve DNA hidroperoksitleri gibi endojen zararlı bileşiklerin detoksifikasyonunu sağlayabildiği için oksidatif strese karşı savunmaya katılır, bunun yanında epoksidler ve kinonlar gibi maddelerin biotransformasyonunda elektrofilik ksenobiotikler ve/veya reaktif ara ürünler oluşabilir (66,75).

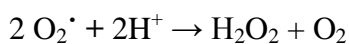
GST enziminin teta ve alfa sınıfları selenyum bağlı olmayan Glutasyon peroksidaz aktivitesi gösterirler, GST pi formu lipit hidroperoksitleri ve hidroksialkenler, malondialdehitler ve propenalleri inaktive eder. GST pi ayrıca hassas SH- grubuyla ROT ile direkt reaksiyona girerek disülfit yapımının inaktif olmasına neden olur (75).

2.11.5. Süperoksit Dismutaz Enzimi (SOD)

Reaktif oksijen türlerine karşı primer antioksidan enzim Süperoksit Dismutaz'dır. Formları arasında aminoasit dizilimi, aktif metal bölgesi ve hücrel dağılım farkı vardır. Prokaryotlarda Fe ve Mn-SOD bulunurken, ökaryotlarda Mn, CuZn ve ekstrasellüler SOD (EC-SOD) bulunur (77).

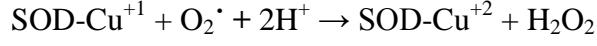
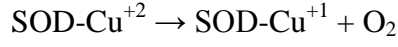
Mn-SOD homotetramer yapıdadır, her subünitesinde bir Mn iyonu bulunur, ve 88 kDa ağırlığındadır. Hücrel Mn-SOD içeriği kalp, beyin, karaciğer, böbrek gibi yüksek metabolik aktivitesi olan dokularda daha fazladır. CuZn-SOD 32 kDa ağırlığında olup memelilerde en çok karaciğer, böbrek, eritrosit ve santral sinir sisteminde bulunur. İki protein subünitesi içerir her subünitede Cu ve Zn atomları bulunur. EC-SOD ise en çok vaskülatür, akciğer, uterus ve tiroit bezlerinde bulunur (72,78).

SOD, süperoksit molekülünün hidrojen peroksite ve moleküler oksijene tepkimesini katalizler (49,55,57).



Tepkimede süperoksit anyonu Cu^{+2} ve bir arjinin rezidüsünün guanido grubuna bağlanır. Bu şekilde süperoksitten bir elektron Cu^{+2} 'a transfer olurken Cu^{+1} ve

moleküler oksijen oluşur. İkinci süperoksit anyonu Cu^{+1} 'dan bir elektron, bağlanma ortağından ise iki elektron alarak hidrojen peroksiti oluşturur (55,72).

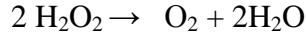


2.11.6. Katalaz Enzimi (CAT)

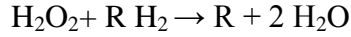
Katalaz çoğu organizmada bulunan ve hem içeren homotetramerik bir enzimdir. Peroksizomlarda yüksek derişimlerde bulunur (79,80).

Katalaz enzimi yapı ve işlevlerine göre bifonksiyoneldir. Tüm prokaryot ve ökaryotlarda bulunur. Her subünite bir hem grubu ve NADPH molekülü içerir. Birçok katalazda NADPH molekülü yüzeye yakın ve sıkıca bağlıdır. Bu kofaktör peroksitin oksijene dönüşümünde katalazın inaktivasyonunu koruduğu ve etkisini arttırdığı gözlenmiştir (80).

Katalaz hidrojen peroksitin su ve moleküler oksijene dismutasyonunu katalizler.



Katalaz ayrıca fenol, alkol gibi farklı substratların, hidrojen peroksitin çift redüksiyonu ile detoksifikasyonunu sağlar.



Glukoz-6-fosfat eksikliklerinde NADPH'ın olgun eritrostlerdeki düşüklüğünün katalazda inhibisyona neden olduğu ve hemolizin GSH-Rd/GSH-Px'den çok katalazdan kaynaklandığı düşünülmektedir (57).

2.11.7. Tiyoredoksin sistem

Tiyoredoksin sistem oksidoredüktaz enzim aktivitesi gösteren tiyoredoksin (Trx) ile tiyoredoksin redüktazı (TrxR) içeren iki antioksidan enzim sistemi içerir. Memeli ve prokaryotik hücrelerde bulunur. Tiyoredoksin redüktaz NADPH kullanarak tiyoredoksinin disülfid aktif bölgesini ve pek çok substratı redükler. Yapılan çalışmalarda, tiyoredoksinin insanda immun sistem düzenlenmesiyle ilişkili olduğu ve farklı genlerce kodlanan üç farklı varyantı gösterilmiştir. Tiyoredoksin redüktaz izoenzimleri, her subünitesinde bir FAD bulunduran NADPH bağlı

oksidoredüktazlardır. Tiyoredoksin redüktazın ilk saflaştırılması 1977'de yapılmıştır (57).

2.11.8. Ubikinon (Koenzim Q)

Ubikinon esas olarak mitokondride elektron transport zincirinin bir parçası olarak kullanılmaktadır, bunun yanında ubikinon düşük derişimlerde plazmada ve hücre zarlarında lipit peroksidasyonuna karşı koruyucu antioksidan olarak bulunur.

Ubikinonun yenilenmesi lipoamid dehidrogenaz ve kısmen tiyoredoksin redüktazı da içeren enzim ailesinin diğer üyeleriyle gerçekleştirilir (81).

2.11.9. Askorbik Asit (C Vitamini)

Askorbik asit insan plazmasında ve hücre zarında bulunan, zarı geçebilen major antioksidanlardan biridir. Suda çözünebilir düşük moleküler ağırlıklı bu antioksidan kollojen sentezi, demir absorpsiyonu ve hücrelerin redoks durumunun korunmasında gereklidir. Tokoferoller, peroksidler ve süperoksit gibi reaktif oksijen türlerini redükler. Askorbik asitin antioksidan olarak esas görevi lipit hidroperoksidlerin oluşumunu engellemektir. Bu da aterosklerotik plak oluşumunu engellemede önemli rol üstlendiğini gösterir (82).

2.11.10. Karotenler (A Vitamini)

Alkoller (retinoller), aldehytler (retinaller) ve retinoik asitler başta olmak üzere A vitamininin çeşitli türleri bulunur. A vitamininin en etkili ve en yaygın türü β -karoten'dir. Suda çözünmeyen bu bileşik havada okside olarak inaktif ürünler oluşturur (83).

A vitamininin antioksidan etkisi yanında gerekli olduğu sistemik etkiler hücre ve intrasellüler zar dayanıklılığının sağlanması, epitel dokunun bütünlüğünün sürdürülmesi ve glikoprotein sentezidir (83).

2.11.11. Tokoferoller (E Vitamini)

α , β , γ , δ olmak üzere dört farklı tokoferol formu bulunur. Biyolojik olarak en yaygın ve en aktif E vitamini şekli olan d- α -tokoferoldür. Yağda çözünen fakat suda çözünmeyen bu bileşikler oksijen bulunmayan ortamlarda asit ve sıcaklığa dayanıklıdır (84).

Eşleşmemiş elektronlarla reaksiyona giren ve indirgeyebilen hidroksil grubu içerir. Radikal reaksiyonları sırasında zincir kırıcı etkiye sahiptir. Glutatyon ve askorbik asit ile antioksidan etkisi artar (46,84,85).

2.11.12. Flavonoidler

Flavonoidler çeşitli sebze, meyve ve otlarda bulunan polifenol grubu doğal kimyasallardır. Doğada altı binin üzerinde flavonoid vardır. Antioksidan, antiarteriyosklerotik, antiinflamatuvar, antitümör, antitrombojenik, antiviral, antialerjik etkileri vardır. Flavonlar, flavonoller, flavanonlar; kateşinler, isoflavonlar, antosiyanidinler olarak altı sınıfa ayrılırlar.

Flavonoidler, önemli metal şelatörleri ve serbest radikal temizleyicisi gibi rol oynarlar. Flavonoidler tarafından temizlenebilen ve formasyonları inhibe edilebilen reaktif oksijen ürünleri; süperoksit anyonları, hidroksil radikali, alkol radikali, peroksil radikali ve perhidroksi radikaldır. Flavonoidler, radikallerin reaktif kısımlarıyla etkileşerek, reaktif oksijen ürünlerini stabilize ederler (86).

2.11.13. Selenyum (Se)

Selenyum yiyeceklerde selenosistein öncü maddesi olan selenitler, selenatlar ve selenometiyonin olarak bulunur. İn vitro hayvan deneylerinde Se bileşiklerinin apoptozisi ve transforme hücrelerde hücre siklusunu indirgediği gösterilmiş ve bundan dolayı da kanser hücre gelişimini durduğu ileri sürülmüştür (85,87).

2.11.14. Transferin ve Laktoferrin

Transferin kanda demir taşıyan bir β -globindir. Laktoferrin ise dolaşımdaki serbest demiri düşük pH'larda bağlar (55,85).

2.11.15. Ürik Asit

İnsanlarda pürin nükleozidleri olan adenzin ve guanozin katabolizmasının temel ürünü ürik asittir. Metal bağlayıcı ve serbest radikal temizleyicisi olarak görev alır (88).

2.11.16. Bilirubin

Bilirubin büyük bir kısmı ömrünü dolduran eritrositlerin parçalanmasından kaynaklanır ve dolaşımdan karaciğer tarafından alınır ve biyotransformasyona uğrar, safra ve idrarla atılır. Antioksidan olarak peroksil radikalleri toplar (85).

2.11.17. Haptoglobin (Hp)

Haptoglobin hemoglobini geri dönüşümsüz olarak bağlayan bir α_2 -glikoproteindir. Ekstrasellüler hemoliz sırasında hemoglobin eritrositlerden salınır ve serbest hemoglobin dimerleri tümüyle haptoglobine bağlanır (85).

2.11.18. Seruloplazmin (Cp)

Seruloplazmin total serum bakırının yaklaşık %95'ini içeren α_2 globulindir. Cp'nin primer fizyolojik rolü plazma redoks reaksiyonlarıyla ilişkilidir. Serbest ferik iyonları ve ferritin bağlayan bölgelerin varlığı gibi faktörlere bağlı olarak oksidan veya antioksidan olarak işlev görür. Cp'nin demirin iyonik durumunu düzenlemede ve toksik demir ürünleri oluşmaksızın demirin transferine girmesinde yaşamsal önemi vardır (85).

2.12. Prolidaz

Prolidaz enzimi, iminopeptidaz, prolin dipeptidaz, peptidaz D olarak da bilinen hidrolazlar sınıfında bulunan bir enzimdir. Uluslararası sınıflandırmaya göre; EC 3.4.13.9 sınıfında yer alır. Hidrolazlar; C-O, C-N, C-C ve fosforik anhidrit bağına da içeren bazı bazların hidrolizini kataliz ederler. Prolidaz enzimi karboksil terminal pozisyondaki prolin veya hidroksiprolin içeren dipeptitlerin hidrolizini katalizler (89,90).

1937 yılında Bergmann ve Fruton glisin-prolin'in önceden bilinen peptidazlardan farklı, intestinal mukozal bir enzim tarafından hidroliz edildiğini saptamışlardır (91). O tarihten itibaren prolidaz adı verilen bu enzimin pek çok memeli dokusunda varlığı gösterilmiştir (92,93).

2.12.1. Prolidazın Yapısı

Prolidaz enzimi birçok memeli dokusunda ve mikroorganizmalarda dağılım gösterir. Sitoplazmik, homodimerik bir metaloenzimdir. Mn^{+2} prolidaz enzimi aktivitesini 5-10 kat arttırmaktadır. Enzimin maksimum aktivitesi için Mn^{+2} 'a ek olarak aktif merkezinde arjinin ve anyonik amino asit artıklarının olması gerekir (94). Proteazlar monomer yapıda olmasına rağmen tüm prolidazlar dimer yapı gösterirler ve ancak bu şekilde katalitik aktivite gösterirler (95). Prolidaz glikoprotein yapısındadır ve ağırlık olarak %5 karbonhidrat içerir.

Prolidaz enziminin aktif merkezinde tiyol grubu yer alır ve bu grup bloke edilirse aktivite düşer. Bu da sistemin enzimin aktivitesi için gerekli olduğunu gösterir. Doğal enzim için optimum pH: 7,6-7,8'dir ve izoelektirik nokta pH: 4,4-4,5 olarak saptanmış olup bu değer yapıdaki asidik amino asitlerin varlığını belirtmektedir (87). Enzimin karakteristiği araştırıldığında DEAE (Dietilaminitil selüloz dizi kromatografisi) kromatografisinde prolidazın iki pik verdiği görülür (95).

2.12.2. Prolidazın İzoenzimleri

Prolidaz geni, insanda 19 numaralı kromozomun kısa kolunda lokalize olup (19p 13.2bölgesi) sembolü PEPD' dir (96). Dietiaminoetil selüloz dizi kromatografisi (DEAE) ile kültürlü deri fibroblastları ve normal insan eritrositlerinden ayrıştırılan prolidazın 2 formunun olduğu görülmüştür (97). Bunlar prolidaz I ve prolidaz II olarak isimlendirilmiştir. Bu iki izoenzim substrat spesifitesi ile bazı kimyasal özellikler bakımından farklılıklar gösterirler (98). Bu iki izoenzimi ilk izole eden Butterworth ve Priestman olmuştur (1985). Myara ve arkadaşları 1987 ve 1989 yılında, Ohhashi ve arkadaşları ise 1990 yılında izoenzimleri izole etmeyi başarmışlardır (99,100).

Prolidaz I'in molekül ağırlığının 112 kDa olduğu ve birbirini tamamlayan eşit molekül ağırlığında 2 subüniteden oluştuğu (56kDa) bulunmuştur (98,100). Prolidaz II 'nin ise molekül ağırlığının 185 kDa olduğu ve birbirine eş iki subüniteden (95 kDa) oluştuğu gözlenmiştir (100,101).

Prolidaz I tüm insan dokularında bulunur. Yapılan çalışmalarda prolidaz I 'in tüm iminodipeptitlerle reaksiyona girmesine rağmen gly-pro dipeptitini tercih ettiği bulunmuştur. Cosson ve arkadaşları 1992 'de prolidaz II nin Gly-Pro dipeptidine karşı düşük bir aktivite gösterdiğini ve bu izoenzimin plazmada bulunmadığını kaydederek preinkübasyonun uzaması ile aktivitenin önemli ölçüde düştüğünü göstermişlerdir (102). Prolidaz II'nin en yüksek aktiviteyi Gly-Pro yerine Met-Pro'e karşı gösterdiği saptanmıştır (98).

Prolidaz I'i in vitro tespit etmek için optimum şartlar; 1mM MnCl konsantrasyonunda 24 saat 37°C'de preinkübasyon olduğu bildirilmiştir. Ayrıca Mn⁺² konsantrasyonunun yükseltilecek zamanın azaltılabileceğini ya da yüksek preinkübasyon ısısı, düşük MnCl₂ konsantrasyonu ve düşük preinkübasyon zamanı kullanılabileceği kaydedilmiştir (103). Cosson ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarda

prolidaz I ve prolidaz II'yi kromatografik olarak ayırdıktan sonra izoenzimlerin farklı doku dağılımları gösterdiklerini bulmuşlardır (Tablo 2.6) (104).

Tablo 2.6. İnsan prolidaz I ve prolidaz II izoenzimlerinin doku dağılımları

	Prolidaz I	Prolidaz II
Karaciğer	53	47
Böbrek	62	38
İleum	53	47
Jejenum	53	47
Duadenum	42	58
Pankreas	22	78
Mide	42	58
Dalak	52	48
Beyin	36	64
Beyincik	44	56
Kalp	37	63
İskelet kası	34	66
Eritrositler	51	49

Araştırmacılar karaciğer kaynaklı prolidaz II'nin karaciğerde inhibe edildiğini saptamışlar (100). Bu inhibisyona da plazma proteinlerinin sebep olduğunu göstermişlerdir. Haptoglobilin, α_2 makroglobulin ve α_1 antitripsinin prolidaz II'nin aktivitesinde etkili olmadığı fakat saf albüminin altı saatlik inkübasyondan sonra aktiviteyi ortadan kaldırdığı görülmüştür. Albüminin bu inhibitör etkisine dayanarak insan plazmasında prolidaz II'nin aktivitesinin olmadığı açıklanmıştır (104).

Saf insan böbrek prolidaz I'in agaroz jel elektroforezindeki görüldüğü bölge α_1 globülin bölgesidir. İzoelektrik noktasının 4,65 olduğu titrasyon eğrisinden bulunmuştur. Bu nokta insan ve hayvan dokularındaki diğer prolidazlar için de geçerli olmaktadır.

Çeşitli insan dokularından alınan prolidaz I izoenzimi tavşan immünglobülinleri ile çapraz reaksiyon verir fakat aynı immünglobülinler prolidaz II ile reaksiyon vermez. Bu durum hepatik fibrozis ve prolidaz eksikliği olan hastaların dokuları ve plazmalarından prolidaz I araştırmalarında bir spesifik immünoassay yöntem geliştirilebileceğini akla getirmiştir (104).

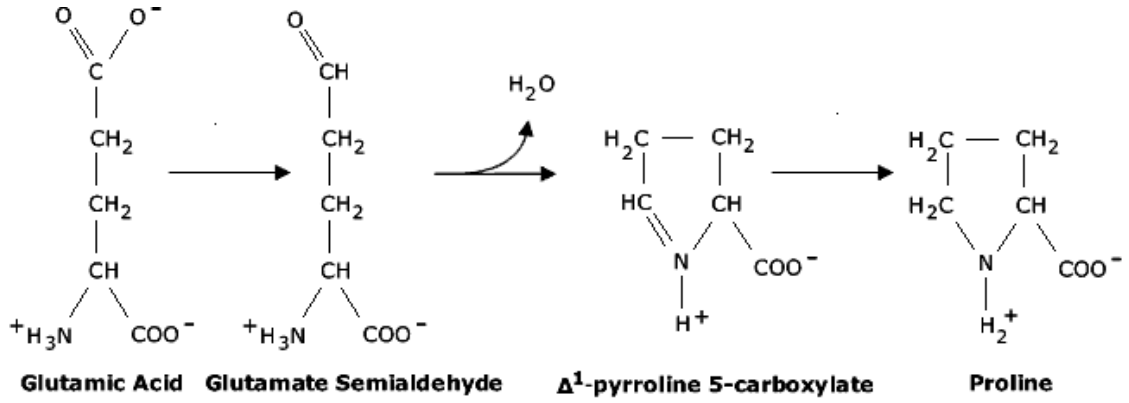
2.12.3. Prolidaz İnhibitörleri ve Aktivatörleri

Yapılan çalışmalarda enzimin aktivasyonu için gerekli olan Mn^{+2} iyonu yerine başka metal iyonlarının ilavesi ile inhibisyon olduğu gözlenmiştir. Boright ve ark.'larının domuz böbrek prolidazı üzerinde yaptığı çalışmalarda Fe^{+2} , Co^{+2} , Ni^{+2} , Cu^{+2} , Zn^{+2} , Cd^{+2} , Ag^{+1} , Hg^{+2} , Pb^{+2} ve Pt^{+4} iyonlarının prolidazı inhibe ettiği bulunmuştur. Ortalama 1-4 mM aralığındaki konsantrasyonlarda glutatyon kullanıldığında optimal stabilizasyon ve aktivite sağlandığı ancak glutatyonun yüksek konsantrasyonunun inhibisyona sebep olduğu bulunmuştur. Aynı araştırmacılar iyodoasetamin ve p-kloromerküri benzoatın da enzimi inhibe ettiğine değinmişlerdir (93).

Oono ve ark. yaptığı çalışmada Co 'ın Leu-Pro dışındaki substratlara karşı prolidazı inhibe ettiği gözlenmiştir (105).

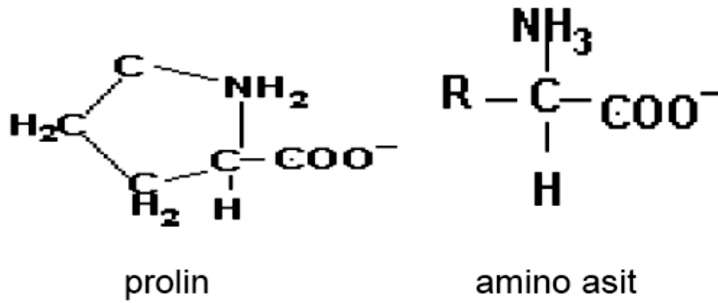
2.12.4. Prolin

Prolin esansiyel olmayan bir imino asittir. Glutamatın halka yapısındaki bir türevidir. Prolin sentezinde glutamatın γ -karboksi grubunun ATP ile tepkimeye katılması sonucu γ -glutamilfosfat oluşmaktadır. Bunun NADPH ile indirgenmesi sonucu oluşan glutamat γ -semialdehit sonra kendiliğinden Δ^7 -prolin-5-karboksilat oluşturmak üzere halkalaşmakta ve bu yapı indirgenerek prolini oluşturmaktadır (Şekil 2.7). Prolin katabolizmasında prolin oksidaz ile prolinden oluşan Δ^7 -prolin 5-karboksilat, glutamat γ -semialdehit ile ornitine transamine olabilmekte veya glutamata oksitlenmektedir (100).



Şekil 2. 7. Glutamik asitten prolin sentezi

Prolinin diğer amino asitlerden farkı R grubunun hem amino grubu hemde α karbon grubuna bağlı olarak siklik bir yapıya yol açmasıdır (Şekil 2.8).



Şekil 2. 8. Prolin ve diğer amino asitlerin genel yapısal görünümü

Benzersiz yapısal özellikten dolayı prolin bir peptit sekansına girdiği zaman önemli konformasyonel özellikler gösterir. Bu aminoasidin siklik yapısı polipeptit omurganın yapısal yönlerine temel sınırlamalar getirmektedir. Prolin siklik yapısının sonucu olarak hiçbir fonksiyonel grup içermez ki; bu durumda hidrojen bağına veya peptit bir bağı rezonans stabilizasyonuna katılmayı engeller bu nedenle prolin α helix veya β tabakalı sekonder yapılarına uyumlu olmayan tek amino asittir. Kemik, tendon ve destekleyici membran dokularını ana bileşeni olan kollejen prolinin yapısal özelliklerine belirgin bir şekilde bağlıdır (106).

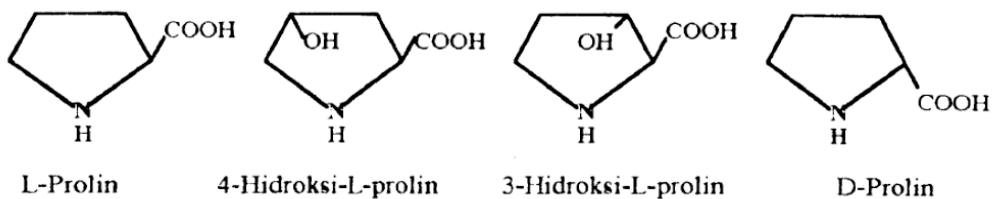
Prolin potansiyel bir yapı kırıcı olan ve peptit zincirlerinin yönünü değiştirme eğilimine sahip peptit zincir içine sabit bir eğim sağlar. Proteinlerin yüzeyindeki ters bir

dönüş veya saç tokası eğimi şeklinde önemli yapısal olayın proteinler içindeki en önemli sonucu prolin tarafından oluşturulmasıdır (102,107).

Prolin ve hidroksiprolin, kollajen yapısında yer alan en önemli amino asittir. Prolin türevleri olan 3-hidroksiprolin ve 4-hidroksiprolin karışık fonksiyonlu oksijenazlar kullanılarak polipeptit zincirinde bulunan prolin kalıntılarından elde edilmektedir. Hidroksiprolinin hidroksiprolin oksidaz ile parçalanması sonucunda glioksalat ve pirüvat oluşmaktadır. Hidroksiprolin hidrojen yapım ve yıkımında açığa çıkar (100).

Prolin biyolojik olarak aktif peptitlerin enzimatik degradasyona karşı koruma sağlamaktadır. Bu durum peptit veya protein prekürsörlerinin post transyasyonel modifikasyonlarının regülasyonunda açıkça bellidir. Polipeptit zincirinin içinde yerleşik olan prolin amino asitleri, zincirlerin enzimatik süreci öncesinde modifikasyon bölümünde bulunur ve polipeptit zincirinin protelize hassasiyetini sınırlayan yapısal unsurlar olarak hareket eder. Bu durum peptitlerin post-translasyonel modifikasyonunda görev alan ekzopeptidazların özelliği ile ilişkili araştırmalarda gösterilmiştir. Biyolojik olarak aktif peptitlerin amino ucuna yakın yerlerde ortaya çıkan prolin gözlemiyle desteklenmektedir (108).

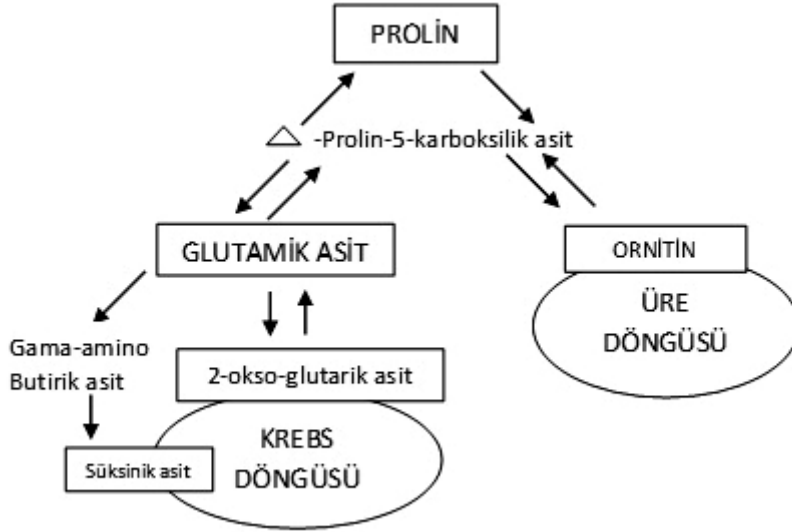
Prolin ve hidroksiprolin prolidino halkasındaki azot atomuna bir hidrojen atomunun girmesi ile oluşmaktadır. Bunlar genelde imino asit ismiyle adlandırılır. L-prolin amino asitlerin hücre dışı havuzunun temel bileşenidir (Şekil 2.9). Bunu sadece glutamin ve alanin amino asitleri takip eder. Hidroksiprolin öncelikle vücut sıvılarında oligopeptitlerde bulunmaktadır. İnsanlarda hidroksiprolinin yapısı 4-hidroksi -L-prolin şeklindedir ve vücut sıvılarında daha az bulunur. Protein yapısında bulunan hidroksiprolin peptide bağlı prolinin hidroksillenmesi ile oluşmaktadır (94).



Şekil 2. 9. Memeli kollajeninde bulunan prolin ve hidroksiprolin izomerleri

Prolin ayrıca Krebs ve üre döngüsüyle metabolik olarak bağlantılıdır. Δ -prolin-5-karboksilik asit prolin metabolizmasında iki döngüyü birbirine bağlayan bir pozisyonundadır (Şekil 2.10) (109).

Prolinin karbon zincirinden Krebs döngüsüne geçişi, tüm dokularda bilinen klasik yoldan 2-okso-glutarik asit metabolizması ile olur (109).



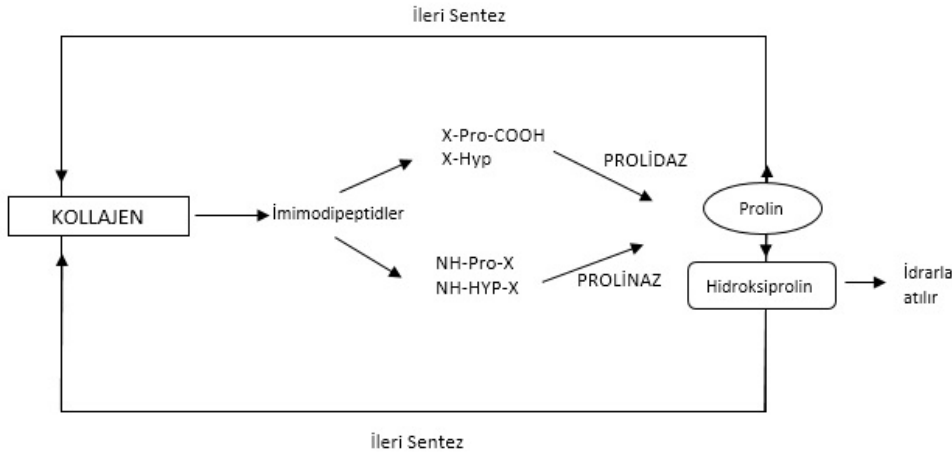
Şekil 2. 10. Prolinin metabolik yollarla bağlantısı

2.12.5. Prolidazın Kollajen Yapım ve Yıkımında Önemi

Kollajen yıkımı interstisyel kollajenaz enziminin kollajen molekülünün amino ucuna yakın bir yüzeyine bağlanmasıyla başlar. Üçlü sarmal yapıdaki kollajen molekülüne etkili enzim orijinal kollajen molekülünün %25 ve %75 kadarını taşıyan iki adet sarmal yapıda molekül açığa çıkarmaktadır. Sarmal yapıları dayanıklı olmayan bu küçük moleküllerin vücutta parçalanması ile elde edilen polipeptitler, proteazlar tarafından daha küçük peptitler veya serbest amino asitlere yıkılmaktadır (110,111). Prolidazın bütün biyolojik fonksiyonunun prolin döngüsüyle beraber kollajen dejenerasyon ürünleri ve diğer Xaa – Pro dipeptidlerin metabolizması olduğuna inanılmaktadır. Prolidaz C-terminalinde amino asidi prolin veya hidroksiprolin olan dipeptidleri hücre içinde hidroliz eder. Prolin yeniden döngüye girer ve yeni protein sentezinde kullanılırken hidroksiprolin idrarla atılmaktadır (110,111). Kollajen dokudaki amino asitlerin yaklaşık %25'ini prolin ve hidroksiprolin oluşturduğundan, prolidaz kollajen yıkımında önemli rol oynamaktadır. Prolidaz hücre içi protein

yıkımının son basamağında, özellikle yüksek miktarda prolin içeren prekollajenin yıkımı aşamasında rol oynamaktadır. Enzim için substrat kaynağı kollajen olup iminopeptidler kollajenin yıkımının son basamağında ortaya çıkmaktadır.

Kollajen yıkımında prolidaz ve prolinaz enzimlerinin yeri aşağıdaki şekilde gösterilmektedir (Şekil 2.11).



Şekil 2. 11. Kollajen yıkımında prolidaz ve prolinazın yeri

Prolidaz beslenme ile alınan proteinlerden ve vücuttaki depo kollajeninden imino asitlerin geri kazanılmasında önemli rol oynar (112). Prolidaz eksikliği prolinin normal döngüsündeki bozulmayla sonuçlanır. Prolidaz eksikliğinde büyük miktarda prolin ve hidroksiprolin üre ile dışarı atılır. Prolidaz enzim aktivitesi eritrosit, lökosit ve fibroblastlarda çok düşüktür. Etkilenen hasta bireylerde prolidaz enzim aktivitesi saptanamaz. İminopeptidüri, aynı zamanda raşitizm, hiperparatiroidizm ve paget hastalığı gibi durumlarda tanımlanır. Fakat İminopeptidüri prolidaz eksikliğinde çok daha yüksektir.

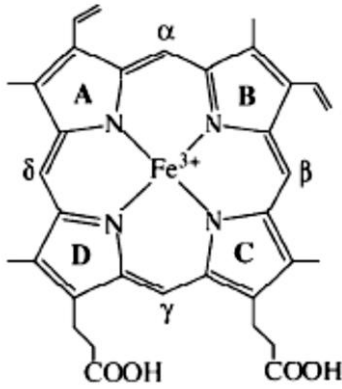
Prolidaz enzim aktivitesinin eksikliği durumu, oldukça nadir karşılaşılan otozomal resesif geçişli kalıtsal bir hastalığa yol açmaktadır. Hastalığın semptomları çok değişken olup kronik tekrarlayan enfeksiyonlar, mental retardasyon, splenomegali ve cilt lezyonları görülmektedir (113). Prolidaz enzimi ile açığa çıkan prolin ve hidroksi prolin amino asitleri, kollajen dokusunun yaklaşık % 25'ini oluşturmakta ve bağ dokusunun devamlılığının sağlanması için gereklidir (114). Prolidaz enzimi; intestinal mukoza, böbrek, karaciğer, beyin, kalp, uterus, timus, eritrositler, lökositler, fibroblastlar ve plazma gibi pekçok dokuda bulunmaktadır (115-118). Geniş doku dağılımı olması

prolidaz enzim aktivitesindeki değişimlerin pekçok hastalığın gelişiminde ve sonucunda önem kazanabileceğini düşündürmektedir.

2.13. Hem Oksijenaz Enzim Sistemi

2.13.1. Hem molekülü

Hem (fe-protoporfirin IX) tetrapirrol yapısında, merkezinde demir içeren önemli biyolojik aktivitelere sahip bir moleküldür ve oksijen transportu/depolanması, enerji üretimi ve detoksifikasyonunda görev alan proteinlerin yapısında bulunur. Yapısında hem molekülü içeren proteinlere hemoprotein denir ve hem molekülü proteinlere kovalent veya kovalent olmayan bağ ile bağlanarak hemoproteinlerin aktif merkezini oluşturur. Hem molekülündeki pirol halkaları methen (mezo) karbon köprüleri ile birleşmiştir (Şekil 2.12). Bu tetrapirrol makrosiklik yapı hem molekülünün rengini, uzaysal konformasyonunu ve floresan özelliklerini belirler. Porfirin molekülü tek başına oksijene bağlanamaz ve enzime bağlı oksidatif reaksiyonların katalizinde, elektron transferinde görev alamaz. Bu özelliğini bir geçiş elementi ile şelat oluşturunca kazanır (119).



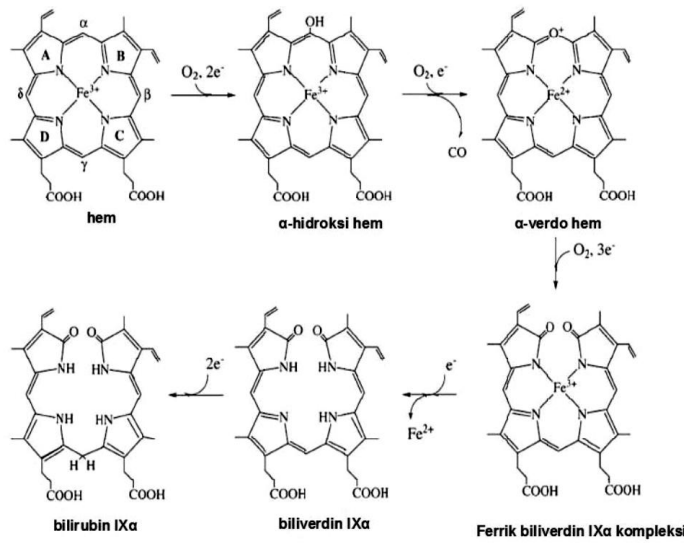
Şekil 2. 12. Hem molekülünün yapısı

2.13.2. Hem molekülünün HO ile oksidatif parçalanması

Safra pigmentlerinden biliverdin ve bilirubin uzun yıllar önce tanımlanmasına rağmen bu reaksiyonun HO tarafından katalize edildiği 1968 yılında Tenhunen ve arkadaşları tarafından bulunmuştur (120). Hem oksijenaz basit protein yapısında olup aktivasyonu için prostetik gruba ihtiyaç duymadan substrat hem ile kompleks oluşturduğunda aktive olan mikrozomal bir enzimdir. Ferrik hem-HO kompleksinin oluşması ile başlayan reaksiyon NADPH-sitokrom *p*-450 redüktaz tarafından aktarılan

bir elektron ile yapıda bulunan demir indirgenir (121). Daha sonra moleküler oksijen enzim kompleksine bağlanarak oksijen formu oluşturur. Demire bağlı oksijen, redüktazdan bir elektron ve H₂O'dan proton alarak Fe⁺³-OOH yapısı meydana gelir. Fe⁺³-OOH'ın terminal oksijeni porfirin halkasının α-mezo karbonuna saldırarak α-mezo-hidroksihem yapısı oluşur (122). Oluşan bu yapı bir molekül oksijen ile tekrar reaksiyona girerek Fe⁺³-verdo hem yapısını oluştururken CO reaksiyondan salıverilir. Reaksiyonun bu basamağında bir elektron kullanılır.

Bir sonraki basamak olan verdo hem'in ferrik biliverdin-IXα kompleksine dönüşümü ise bir molekül oksijen ve 3 elektron gerektirmektedir. Reaksiyonda daha sonra demir ve biliverdin serbestleşir (120). Sonuç olarak reaksiyon sonunda bir molekül hemin CO, Fe⁺² ve biliverdine dönüşümü için 3 molekül O₂ ve 7 adet elektron kullanılmış olur. Oluşan biliverdin ise biliverdin redüktaz enzimi ile 2 elektron varlığında bilirubin IXα yapısına redüklenir (Şekil 2.13) (123).



Şekil 2.13. Hem parçalanma yolu

Hem oksijenaz izoformları ve moleküler özellikleri

Günümüze kadar hem oksijenazın genetik olarak farklı iki izoformu tanımlanmıştır: indüklenebilir formu HO-1 ve yapısal formu HO-2 (124-126). HO-1 ve HO-2 aynı reaksiyonları katalize ederler. Katalize ettikleri reaksiyonda kullandıkları substrat, kofaktör ve koenzim aynıdır. Ancak farklı enzim kinetikleri, K_m değerleri, termostabiliteleri ve immünoreaktiviteleri vardır (124,125). Bu enzimler farklı gen

ürünleri olmalarına rağmen aminoasit veya nükleotid dizileri, amino asit kompozisyonları ve transkrip numaraları benzerlik gösterir. HO-1 aynı zamanda stress proteini HSP32 olarak da bilinir (127). HO-1'in moleküler ağırlığı yaklaşık 32 kDa, HO-2'nin ise yaklaşık 36 kDa'dır (128).

İnsan HO-1 ve HO-2 enzimleri %42 oranında amino asit homolojisi gösterir. Ayrıca her iki enzim de hücre membranlarına tutunmalarını sağlayan ve karboksil (-COOH) uçlarında bulunan benzer hidrofobik bölgelere sahiptir (129). HO-2, HO-1den farklı olarak fonksiyonel bir bölge içerir. Bu bölge hem regülatör bölgesi olarak tanımlanmıştır ve moleküle ilave hem bağlanma bölgeleri sağlar. Bu özellik HO-2'nin hem yıkımından farklı heme bağlı bazı fonksiyonlarının olduğunu gösterir (130).

2.13.3. Doku dağılımları ve subselüler lokalizasyonları

2.13.3.1. Doku dağılımları

HO-1 büyük oranda eritrositlerin parçalandığı organ olan dalakta bulunur. Ayrıca karaciğer retikuloendotelyal hücrelerinde ve kemik iliğinde de eksprese olmaktadır (131). HO-1'in kemik iliğinin hematopoietik kök hücrelerinde bulunduğunu gösteren birçok çalışma vardır (132,133). Bu hücrelerde hem farklılaşma faktörü olduğu için, HO-1 intrasellüler hem konsantrasyonunu azaltarak bu hücrelerin farklılaşmasına engel olur (132,133). Hemoliz gibi kan hemoglobin düzeyinin aşırı derecede arttığı durumlarda HO-1 enzimi böbrek, makrofaj ve karaciğer parankim hücrelerinde ciddi bir artış gösterir. Bunun dışında eritrosit veya hemoglobin metabolizması ile direkt ilgisi olmayan dokularda HO-1 bazal düzeyde bulunur. Ancak kimyasal veya fiziksel bir uyarıya karşı hızlı transkripsiyonel aktivasyon gösterir (134). Yapısal izoform HO-2, en fazla testis ve beyinde bulunur. Ayrıca damarlar, merkezi sinir sistemi, gastrointestinal sistem, karaciğer ve böbrekler de yüksek miktarda HO-2 içermektedir. HO-2, çevresel stres ile aktive olamaz ancak beyinde adrenal glukokortikoidlere cevap verebilir (124-126,135).

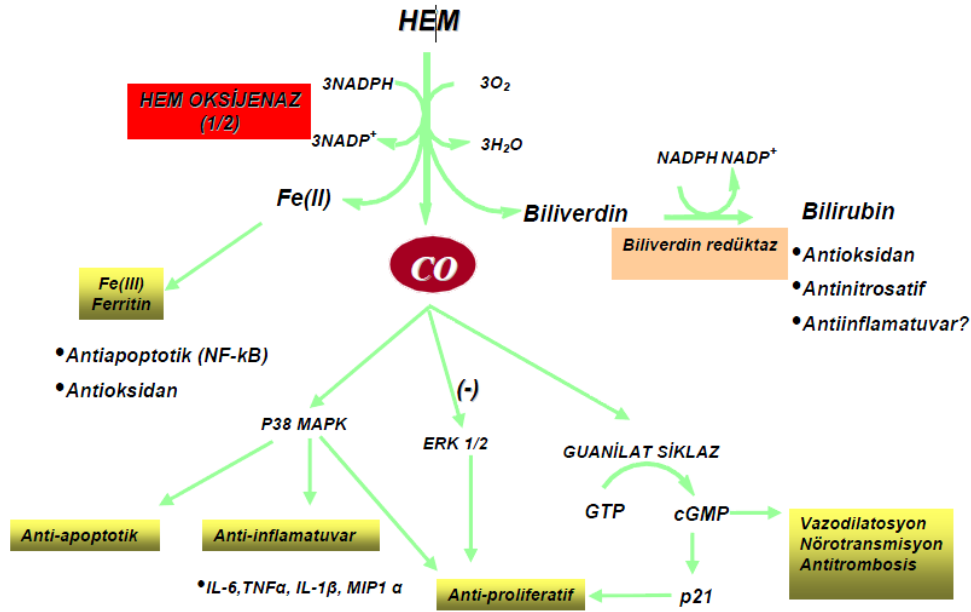
2.13.3.2. Subselüler lokalizasyonları

Hem oksijenaz endoplazmik retikulum ile ilişkili protein olarak kabul edilir. Çünkü mikrozomal hücre fraksiyonları yüksek oranda HO aktivitesine sahiptir. Ancak son yıllarda yapılan çalışmalar HO enziminin diğer hücre kompartmanlarında da bulunduğunu göstermektedir (136). Örneğin endotel hücre plazma membranında

kaveolde HO-1'in bulunduğunu ve kaveolin-1 ile HO-1 arasında fiziksel bir etkileşim olduğunu destekleyen bir çalışma mevcuttur (136). HO-1 indüktörleri ile muamele edilen hücrelerden elde edilen sitokrom-c fraksiyonlarındaki dramatik HO-1 varlığı hem oksijenazın mitokondride lokalize olduğunu destekleyen bulgulardandır (137). Ayrıca HO-2'nin nükleusta lokalize olduğu belirtilmiştir (138).

2.13.4. Hem oksijenazın reaksiyon ürünleri ve fonksiyonları

Hem oksijenaz hem molekülünün parçalanması üzerinden gelişen hücre farklılaşması, eritrosit döngüsü ve demir konsantrasyonunu dengede tutmak gibi bilinen etkilerinin yanısıra reaksiyon ürünleri üzerinden gelişen önemli sitoprotektif etkilere de sahiptir. Şekil 2.14'de CO, bilirubin ve Fe/Ferritin üzerinden gelişen etkiler kısaca özetlenmiştir.



Şekil 2. 14. Hem molekülünün parçalanma ürünleri ve fonksiyonları

Demir biyolojik sistemlerde hem ve metaloporfirin havuzundan bağımsız olarak düşük molekül ağırlıklı organik bileşiklerle kompleks halde bulunur ve çok sıkı bağlı olmayan bu formu metal şelatörler ile reaksiyona hazır durumdadır (139). Hem molekülünün parçalanması ile salıverilen demir labil ve şelat oluşturabilen demir havuzunu oluşturur (140). Reaksiyon sonunda serbestleşen demir, demir regülatör proteinlerine (DRP) bağlanarak demir döngüsü ile ilgili kritik proteinlerin mRNA stabiliteelerini değiştirerek intrasellüler demir homeostazını sağlar (141). Demir-DRP

kompleksi mRNA stabiliteleleri üzerinde pozitif veya negatif etki gösterebilir. Örneğin düşük demir konsantrasyonunda DRP aktif halde kalarak ferritin mRNA translasyonunu inhibe eder. Yüksek demir konsantrasyonu ferritin sentezini belirgin şekilde artırır (142). Serbest demir intrasellüler reaktif oksijen türlerinin oluşumuna neden olur. Bunun dışında lipid peroksidasyonu, nitrik oksite (NO) bağlı tiyol gruplarının nitrozilasyonu ve hidrojen peroksitten reaktif oksidan hidroksil radikalinin oluştuğu Haber-Weiss reaksiyonunda önemli görevleri vardır (143).

2.13.4.1. Demir ve ferritinin antiapoptotik etkisi

Ferritin sitoprotektif etkili bir moleküldür ve HO aktivitesine bağlı olarak artan sentezi HO aracılı sitoprotektif etkiyi potansiyalize ederek hücrelerin daha dirençli hale gelmesini sağlar (144,145).

Hem oksijenaz enziminin antiapoptotik etkisi büyük oranda CO ile ilişkilidir. Ancak yapılan bazı çalışmalar bu etkinin belirli oranda demire bağlı olduğunu göstermektedir. Örneğin HO-1 upregülasyonunun jurkat-T hücrelerini fas-antikoru ile oluşturulan apoptozise karşı dirençli kıldığını gösteren bir çalışma mevcuttur (145). Bu etki demire bağlı NFkB aktivasyonu ile ilişkilidir ve aktive olan NFkB, c-flip gibi antiapoptotik yolları aktive eder. Gözlenen bu etki demir şelatörleri varlığında bloke edilmiştir (145).

2.13.4.2. Biliverdin ve Bilirubin

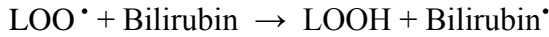
Hem molekülünün parçalanması ile ortaya çıkan ilk ürün biliverdin çözünür yeşil renkli bir pigmenttir. Biliverdinin biliverdin redüktaz ile enzimatik reaksiyonla indirgenmesi sarı renkli hidrofobik özellik gösteren bilirubini oluşturur (146). Bilirubin memeli hücrelerinde en fazla bulunan endojen antioksidandır ve insan serumundaki antioksidan aktivite büyük oranda bilirubin kaynaklıdır (147). Serumda albümine bağlı bilirubin karaciğere transfer olur. Daha sonra karaciğer hücrelerinde albüminden ayrılarak fosfolipid membranlardan hepatositlere difüze olur. Hepatositlerde mikrozomal bilirubin üridin difosfat glukronoziltransferaz enzimi ile suda çözünür bilirubin monoglukronid ve diglukronide dönüşerek safraya salıverilir. Glukronidasyon bilirubini çözünür hale getirir ve gastrointestinal sistemden absorplanmasına engel olur (148). Metabolik atık olarak kabul edilen bilirubin normal koşullarda hızlı bir şekilde vücuttan elimine edilir. Konjuge olmamış bilirubin yenidoğanlarda plazmada birikerek neonatal sarılığa neden olur ve nörotoksik etkiler gelişir. HO'nun metaloporfirinlerle

(kalay mezoporfirin) farmakolojik inhibisyonu klinikte sarılık tedavisinde kullanıma girmiştir (149).

2.13.4.3. Bilirubin antioksidan etkisi

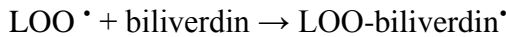
HO-1'in oksidatif strese karşı antioksidan rolü için ileri sürülen mekanizmalardan ilki prooksidan olan hem'in yıkılımını katalizleyerek hücresel dengeyi antioksidan yöne kaydırmasıdır (150). Diğer mekanizma; HO-1 aktivitesi sonucu oluşan bilirubin memelilerdeki en önemli endojen antioksidan özelliğe sahip olmasıdır (151). Yeni doğanlarda yüksek serum bilirubin düzeyi kernikterus tablosuna neden olsa da steril olmayan ortamda doğan bebekler için fizyolojik sarılık seviyesindeki bilirubin düzeyinin koruyucu rolü olduğu bildirilmektedir (152). Sonuç olarak oksidan-antioksidan dengeyi bilirubin konsantrasyonu, lokalizasyonu, transportu ve atılımı gibi faktörler etkiler.

Bilirubin konjuge çift bağ ve bir çift reaktif hidrojen atomu içerir. H atomunu radikale aktararak antioksidan aktivitesini gösterdiği düşünülmektedir. Örneğin lipid peroksil radikali (LOO^{*}) ile etkileşerek lipid hidroperoksit (LOOH) ve bilirubin radikalini (Bilirubin^{*}) oluşturur.



Endojen antioksidan sistemleri zayıf olan myokard ve sinir sisteminde bilirubin önemli bir koruyucu rolü olduğu bildirilmektedir. Stocker ve ark. bilirubin beyinde vitamin E gibi davranarak peroksil radikalini tuttuğunu ortaya koymuşlardır (150). İskemik kalp hasarı oluşturulan farelere verilen bilirubin koruyucu etkisi bir başka çalışmada gösterilmiştir (153). Ayrıca bilirubin düzeyleri normalin üst sınırına yakın kişilerde aterojenik risklerin daha düşük olduğu bildirilmiştir (154).

Buna karşın biliverdin sadece konjuge çift bağ taşır ve antioksidan aktivitesi rezonans stabilize edici etkisiyle ilgilidir.



Konjuge/konjuge olmayan bilirubin ve biliverdin direkt olarak peroksil radikalini yakalama özelliğinin yanısıra S-nitrozotiyol, nitroksil iyonu, peroksinitrit gibi reaktif nitrojen türlerini de etkili bir şekilde yakalar (155,156).

Aynı zamanda NADPH oksidaz enzimini bloke ederek süperoksit oluşumunu bloke ettiği bildirilmiştir (157).

2.13.4.4. Bilirubin antiinflamatuar etkisi

Bilirubin son yıllarda tanımlanan antiinflamatuar etkisi büyük olasılıkla reaktif oksijen türlerini yakalamasına bağlı olarak gelişir. Bir çalışmada *in vitro* ortamda bilirubin lökosit migrasyonunu bloke edip vasküler hücre adezyon molekülü-1 (VCAM-1) ile ilişkili havayolu inflamasyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir (158).

2.13.5. Karbon monoksit

Karbon monoksit hemoglobine bağlanarak oksijenin dokulara dağılımını bloke etme özelliği gösteren biyolojik sistemlerde genelde stabil, ortaklanmamış elektronu olmayan bir gazdır. CO, hemoglobinin yapısında bulunan demire reversibl olarak oksijenden 240 kat daha fazla afinite ile bağlanır. Bu nedenle yüksek konsantrasyon CO gazına maruz kalarak meydana gelen CO zehirlenmelerinde antidot olarak hiperbarik oksijen terapisi uygulanabilir (159). CO önemli bir sinyal molekülüdür ve hücre fonksiyonlarını regüle edici etkiler gösterir. CO üzerinden gelişen bu etkiler aşağıda detaylı olarak açıklanmıştır.

2.13.5.1. CO'nun vazodilatör etkisi

CO ile gelişen vazodilatör etkiyi bir kaç mekanizma ile açıklamak mümkündür. Molekülün dilatör etkisi büyük oranda guanilat siklaz (GS) aktivasyonuna bağlı olarak artan cGMP düzeyine bağlıdır. CO'ya bağlı olarak gelişen dilatasyonun spesifik GS inhibitörleri varlığında bloke edilmesi bu etkinin belirli oranda bu mekanizma ile geliştiğini doğrulamaktadır (160). Bunlara ilave olarak düz kas hücrelerinde oluşan CO indirekt olarak endotel hücrelerindeki parakrin etkileri ile vazoregülatör etki gösterebilir. Endotel hücrelerinde cGMP'ye bağlı mitojen endotelin-1 (ET-1) downregülasyonu ile oluşan antiproliferatif etki CO molekülünün indirekt vazoregülatör etkisine bir örnektir (161).

CO direkt olarak kalsiyuma bağlı potasyum (Kca) kanallarını aktive eder (162,163). Kca kanal inhibitörleri varlığında vazodilatör etkinin belirli oranda azalması bu vazodilatör etkinin cGMP ve geniş kondüktanslı Kca kanal ile birlikte oluşturulduğunu göstermektedir. Ayrıca düşük konsantrasyonlarda CO uygulaması internal depolardan NO salınımına neden olarak vazodilatör etki gösterebilir (164).

2.13.5.2. CO'nun apoptozis ve proliferasyonu inhibe edici etkisi

CO'nun antiapoptotik etkisi ilk kez *in vitro* ortamda tanımlanmıştır. Hücre kültürü ortamında fare endotel hücre ve fibroblastlarında tümör nekroz faktörü- α (TNF- α) ile indüklenen apoptozis ekzojen CO uygulaması ile inhibe olmuştur (165,166). Bu etkinin p38 MAPK inhibitörleri varlığında ortadan kalkması, p38 MAPK'nin bu etkideki önemini vurgulamaktadır (167).

CO molekülünün sitoprotektif etkilerinden büyük oranda cGMP sorumludur ve antiproliferatif etkisinde de aynı yolağın sorumlu olduğunu ileri süren birçok çalışma mevcuttur (165,167-170). Vasküler düz kas hücre proliferasyonunun CO ile inhibisyonunda, cGMP'ye bağımlı endotel kaynaklı mitojenlerin down regülasyonunun da katkısı vardır (171). Düz kas hücre proliferasyonu hücre büyüme siklusunda görev alan kinazlar ve siklin kompleksleri ile regüle edilir. Hücre büyümesinde görev alan bu faktörler p21waf1/cip1 hücre siklus inhibitörünün kontrolü altındadır (172). CO, p21 üzerinden antiproliferatif etki gösterir ve bu etkiye p38MAPK'nın aracılık ettiği düşünülmektedir. Ayrıca, CO'in ERK1/2 üzerinde baskılayıcı etki göstermesi antiproliferatif etkisine katkıda bulunabilir (173).

2.13.5.3. CO'nun antiinflamatuvar etkisi

Hücre kültürü ve hayvan modelleri çalışmaları HO-1 kaynaklı veya ekzojen CO'nun antiinflamatuvar etkili olduğunu göstermiştir (174). CO antiinflamatuvar sitokinlerin sentezini artırarak veya inflamatuvar etkili sitokinler üzerinde inhibitör etki göstererek inflamasyonu regüle eder. Bu etkilere p38 MAPK'nın aracılık ettiğini destekleyen bulgular mevcuttur (175,176).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Hasta grubu İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı Topuzlu Servisi'ne başvuran papiller tiroit kanseri ön tanısıyla opere edilen patoloji sonuçlarıyla tanısı koyulan 31 hastadan oluşturulmuştur.

Hasta ve kontrol grubu seçiminde diyabet, hipertansiyon ve diğer kronik hastalığı mevcut olanlar, oral kontraseptif, tiroksin, östrojen replasman terapi gibi hormonal tedavi alanlar çalışmaya dahil edilmedi.

Olgular tiroit kanserli bireyler sağlıklı bireyler ve olmak üzere gruplandırıldı. Hasta grubu (n=31) yaş aralığı 31-79 arası olup, yaş ortalaması 50.74 ± 11.18 (ortalama \pm SD; median 38 yıl) olarak bulunmuştur. Kontrol grubu ise (n=25) yaş ve cinsiyet bakımından eşleştirilmiş 31-62 yaş aralığındaki sağlıklı bireyler arasından seçilmiştir. Kontrol grubunun yaş ortalaması 49.28 ± 9.52 (ortalama \pm SD; median 44 yıl) olarak bulunmuştur.

Kontrol grubundan ve hasta grubundan (ameliyat günü sabahı ve ameliyat sonrası 30. günde) 12 saatlik gece açlıktan sonra sabah saat 8.00-10.00 arasında venöz kan örneği alınımı gerçekleştirildi. Kuru tüplere alınan kan örnekleri $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 5000 rpm'de 10 dk santrifuj edildi. Elde edilen serum örnekleri -80°C 'de çalışma gününe kadar saklandı.

Alınan örneklerde hastaların açlık kan şekeri, kolesterol, serum tiroit hormonları gibi parametreler aynı gün içinde Fikret Biyal Merkez Laboratuvarında otomasyon sistemi ile tayin edildi. Serumda Hemoksijenaz-1 ölçümü ELISA yöntemi ile, prolidaz modifiye fotometrik metot ile, protein karbonil Levine metodu ile, SOD Sun yöntemi ile, MDA Tiyobarbitürik asit yöntemi ile İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda bakıldı.

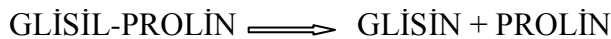
Gereçler

ELISA Okuyucu	(C10M CA-200)
ELISA Yıkayıcı	(C10M CA-2000)
Spektrofotometre	Hitachi U- 1900
Su Banyosu	Memmert WNB 14 L 4
Santrifuj	(Universal 320R Hettich Zentrifugen)
Vortex	(Elektromag)
Hassas Terazi	(Shimadzu Libror)
Derin Dondurucu	Rua Instruments
pH metre	(Shott CG 840)
Otomatik pipet	Socorex

3.1. Yöntemler

3.1.1. Serum Prolidaz Enzim aktivitesinin Ölçülmesi

Prolidaz enzim aktivitesi Özcan ve ark. tarafından optimize edilen Myara ve ark. yöntemi ile tayin edildi (177,104). Bu metoda göre; substrat olarak glisil-prolin kullanılarak enzim etkisi ile açığa çıkan prolinin asidik ortamda ısı etkisiyle ninhidrin ile renkli bir bileşik (pembe) oluşturma ilkesine dayanarak serum prolidaz aktivitesi ölçülür. Rengin şiddeti prolin konsantrasyonuna bağlıdır ve spektrofotometrik olarak ölçülür.



Çözeltiler

- Ön inkübasyon çözeltisi; 1 mmol/L GSH, 50 mmol/L MnCl₂, 50 mmol/L pH=7 Tris HCl çözeltisinde çözülür.

- Gly-Pro içeren ön inkübasyon çözeltisi; 144 mmol/L Gly-Pro, 50 mmol/L Tris HCl çözeltisinde pH=7,8'de çözülür.

- Glasiyal asetik asit

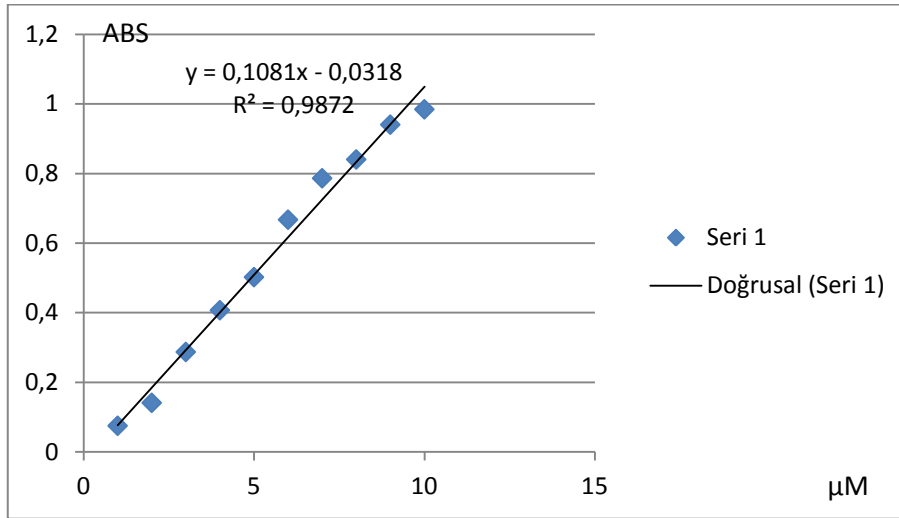
- Tris HCL tamponu (pH=7,8)

- Ninhidrin çözeltisi; 0,5 mol/L'lik ortofosforik asit içerisinde 3 g/dL olacak şekilde ninhidrin çözülür.

- Prolin standart grafiği için bir seri (50µM, 100 µM, 200 µM 1mM) prolin çözeltileri hazırlanır.

Yöntem

100 µL serum ile 100 µL serum fizyolojik karıştırılıp bu karışımdan 25 µL alındı ve 75 µL ön inkübasyon çözeltisi ilave edilerek 37⁰C'de 30 dakika inkübe edildi. Karışım üzerine Gly-Pro içeren ön inkübasyon çözeltisinden 100 µL eklenip 37⁰C'de 5 dakika inkübe edildi. Tepkimeyi durdurmak için 1 mL glasiyal asetik asit eklendi. Karışım üzerine 300 µL Tris HCl tamponu ve 1 mL ninhidrin solüsyonu eklendi ve karışım 90⁰C'de 20 dakika bekletildi. Buz ile soğutulup beklemeksizin 515 nm'de spektrofotometrede substratın katılmadığı örnek körüne karşı absorbanslar ölçüldü. Örnekler için elde edilen absorbans değerleri L-prolin standart eğrisi grafiğinden okunarak 1 dakikada oluşturulan µmol/L prolin olarak hesaplanmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3. 1. L-prolin standart eğrisi

3.1.2. Serumda Malondialdehit (MDA) Ölçülmesi

Lipid peroksidasyonunun son ürünlerinden biri olan MDA'nın tiyobarbitürik asit ile yüksek ısı ve asit ortamda oluşturduğu kromojen madde pembe renkli ürün oluşturur (178). Spektrofotometrede 535 nm dalga boyunda absorbanslar ölçüldü. MDA düzeyi $1.56 \times 10^5 M^{-1} cm^{-1}$ ekstinksiyon katsayısı kullanılarak nmol/ml olarak hesaplandı.

Çözeltiler

-%0,8 Tiyobarbitürik asit

-%30 TCA

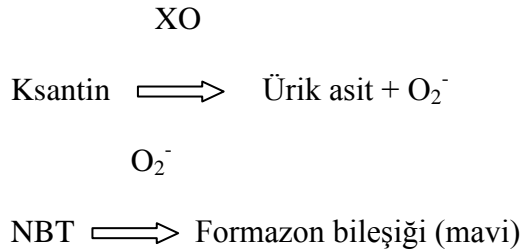
-5 M HCl

Yöntem

Deney tüplerine 0.2 ml serum, kör tübüne 0.2 ml distile su konuldu. Üzerlerine 0.750 ml %0.8 TBA, 0.5 ml %30 TCA ve 50 µL 5 M HCl çözeltileri ilave edildi. Tüplerin ağzı sıkıca kapatıldı ve kaynar su içinde 15 dakika bekletildi. Tüpler soğuduktan sonra 5000 rpm'de 10 dakika santrifuj edildi ve süpernatantın absorbansı köre karşı 535 nm'de ölçüldü.

3.1.3. Serumda Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesinin Ölçülmesi

SOD aktivite ölçümü nitroblue tetrazolium (NBT) ile ortaya çıkan süperoksitin indirgenmesi esasına dayanan Sun ve arkadaşlarının belirttiği metoda (179) ve Durak ve arkadaşlarının tarif ettiği (180) modifikasyona göre yapıldı. Bu yöntemde ksantin-ksantin oksidaz reaksiyonu ile ortaya çıkan süperoksit anyon radikalleri, NBT'ü indirgeyerek mavi renkte bir formazon bileşiği oluşturur.



Örnekteki SOD enzimi oluşan bu radikalleri alkali pH'da yakalayarak NBT indirgenmesini inhibe eder ve mavi renk oluşumu engellenir. Oluşan rengin şiddeti, SOD aktivitesi ile ters orantılıdır. 1 Ünite SOD aktivitesi, NBT'nin indirgenme hızını % 50 inhibe eden enzim miktarıdır.

Çözeltiler

1-Ölçüm reaktifi

- 0,3 mM Ksantin
- 0,6 Mm EDTA (Etilendiamin Tetraasetik asit-2 Na Tuzu)
- 150 µM NBT (Nitroblue tetrazolium)
- 400 mM Na₂CO₃
- 1 g/L BSA (Bovine serum albumin)

hazırlanarak koyu renkli şişede +4⁰C'de saklandı.

2 M Amonyum sülfat çözeltisi

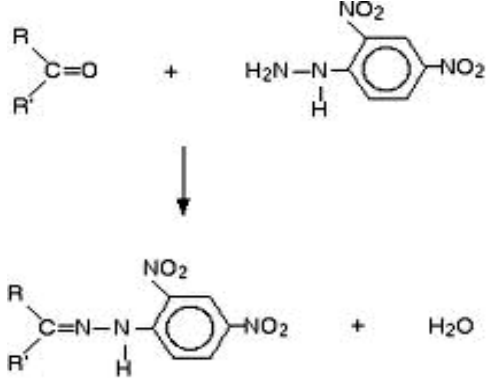
- 167 U/L Ksantin oksidaz (XO 25 Ü/3,4 ml Sigma)
- Kloroform Etanol (CE): 3/5, v/v
- 8 mmol/L CuCl₂

SOD ölçümü için reaktif karışımı; çalışmadan hemen önce taze olarak EDTA, NBT, Na₂CO₃ ve BSA çözeltileri sırası ile 10: 5: 5: 3: 1,5 oranlarında karıştırılarak hazırlandı ve pH 10.2'ye ayarlandı. 500 µl Serum lipitleri 500 µl kloroform/etanol (3/5,v/v) ilavesi ile ekstrakte edildi, 15000 rpm'de 60 dakika santrifuj edildikten sonra test tüpüne süpernatanttan 500 µl, kör tüpüne de 500 µl distile su konuldu. Tüm tüplere reaktif karışımından 2,45 ml, ksantin oksidaz çözeltisinden 50 µl ilave edildi. 25⁰C'de 20 dakika bekletildi. Reaksiyonu durdurmak için 50µl CuCl₂ çözeltisi ilave edildi, 25⁰C'de 20 dakika tekrar bekletildikten sonra 560 nm'de distile suya karşı absorbanlar okundu.

$$\text{Hesaplama: } \% \text{ İnhibisyon} = \frac{(A_{\text{kör}} - A_{\text{örnek}})}{A_{\text{kör}}} \times 100$$

3.1.4. Serumda Protein Karbonil Gruplarının Ölçülmesi

2,4- dinitrofenilhidrazin (2,4-DNPH) ile PC gruplarının oluşturduğu kromoforik hidrazonların 360 nm'de vermiş olduğu absorbansının spektrofotometrik olarak ölçülmesi prensibine dayanır (181).



Şekil 3. 2. PC gruplarının 2,4-DNPH ile karbonil türevi olan hidrazonları oluşturma reaksiyonu

Çözeltiler

- 2 M HCl
- 10 mM DNPH (2,4-dinitrofenilhidrazin)
- % 20 TCA (Trikloroasetik asit)
- Etanol/etil asetat (1:1,v/v)
- 6 M Guanidin

Yöntem

0,1 ml serum örneklerine 2 M HCl'de çözülmüş 10 mM DNPH ilave edildi. Deney tüpleri oda ısısında 15 dakika bir vortexlenerek 1 saat karanlıkta inkübe edildi. %20'lik TCA çözeltisinden 0,5 ml eklenerek 15 dakika +4⁰C'de bekletildi. Elde edilen çözelti 5 dakika 5000 rpm'de santrifuj edildi. Santrifuj işlemi sonrası süpernatantlar uzaklaştırıldı. Kalan çökelti 3 defa 4 ml etanol-etil asetat karışımı ile yıkandı. Yıkamış çökeltinin üzerine 1 ml 6M Guanidin ilave edilerek 37⁰C'deki su banyosunda 30 dakika bekletildi. Örneklerin absorbansları 360 nm'de reaktif körüne karşı spektrofotometrede okundu. Kromoforik hidrazonların molar ekstinksiyon katsayısı $\epsilon = 22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ kullanılarak PC konsantrasyonları hesaplandı.

3.1.5. Serum HO-1 Ölçülmesi

Prensip

İnsan (HO-1) aktivitesini belirlemek için biyotin çift antikorlu sandviç teknolojisine dayanan ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) yöntemi kullanıldı. HO-1'e karşı oluşturulmuş monoklonal antikorla kaplı kuyucuklara standartlar ve örnekler pipetlenir ve inkübasyona bırakılır. Daha sonra streptavidin-HRP ile immünkompleks oluşturması için biyotinle işaretli anti HO-1 antikor eklenir. İnkübasyon ve yıkama sonrası bağlanmayan enzimler uzaklaştırılır. Substrat A ve B eklenir. Bunun sonucunda çözelti mavi bir renk alacaktır ve bu renk asit etkisiyle sarıya dönüşecektir. Çözeltinin renk tonu hem oksijenaz 1 (HO-1)'in konsantrasyonu ile pozitif korelasyon gösterir.

Çözeltiler

HO-1'e spesifik antikorlar ile kaplı 96 kuyudan oluşan plaka

Standart çözeltisi (4,8 ng/ml, 2,4 ng/ml,0,3 ng/ml)

Standart dilüsyon çözeltisi

Streptavidin-HRP

Anti HO-1 antikor biyotin ile işaretli

Yıkama çözeltisi (1/30 distile su ile seyreltilir.)

Substrat A (hidrojen peroksit)

Substrat B (3,3',5,5'-Tetra Metil Benzidin)

Stop solüsyonu (Sülfirik asit)

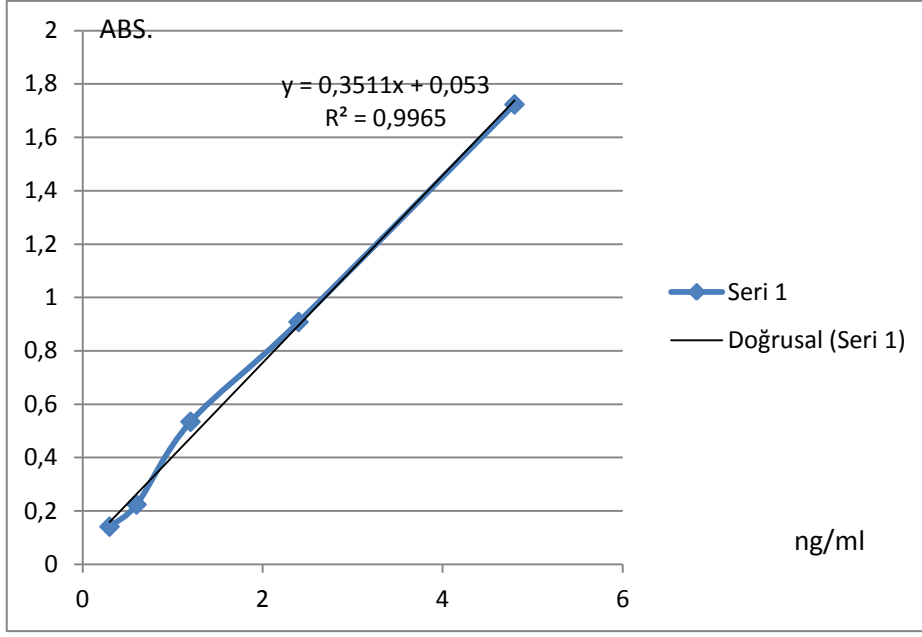
Uygulama

- Kullanmadan önce kitin içindeki tüm malzemeler oda sıcaklığına getirildi.
- 9,6 ng/ml standart stok çözeltisi ½ dilue edilerek standartlar hazırlandı.
- Kör kuyucuğa örnek koyulmadı. Biotin işaretli anti HO-1 antikor ve streptavidin-HRP ilave edildi. Substrat A, substrat B ve stop solüsyonu örneklerle aynı basamakta ilave edildi.

- Standart solüsyonları 50µl pipetlendi. 50µl streptavidin-HRP ilave edildi. (biotin antikorları standartlarla birleştiği için ilave edilmedi)
- Örnek kuyucuklarına 40µl serum, 10 µl HO-1 antikoru, 50µl streptavidin-HRP pipetlendi.
- Plak yavaşça çalkalanarak 37 °C’de 60 dakika inkübasyona bırakıldı.
- Her kuyudaki sıvı aspire edildi. Her kuyuya 350µl yıkama solüsyonu ilave edildi 30 sn sonra kuyu içeriği aspire edildi. Bu işlem 5 defa tekrarlandı.
- Her kuyucuğa önce 50µl substrat A solüsyonu sonra 50µl substrat B solüsyonu pipetlendi. Plak yavaşça çalkalandı. 10 dakika 37°C’de karanlıkta inkübasyona bırakıldı.
- Reaksiyonu durdurmak için 50 µl stop solüsyonu her kuyucuğa pipetlendi (bu dakikada mavi renk sarı renge dönüşür).
- Stop solüsyonu pipetlendikten 10 dakika sonra, 450 nm dalga boyunda köre karşı sıfırlama yapılarak absorbanslar ölçüldü.
- Standartların konsantrasyonlarına ve bunlara karşılık gelen optik dansite değerlerine göre standart eğrisinin lineer regresyon denklemi hesaplandı. Daha sonra örneklerin optik dansite değerlerine göre de konsantrasyonları hesaplandı.

Hesaplama

Kör’ün absorbansı standart ve örneklerin absorbanslarından çıkarıldı. Her bir standart konsantrasyonu grafikteki x-ksenine, standartlara ait absorbanslar ise y-ksenine yerleştirilerek standart eğrisi çizildi. Örneklerdeki HO-1 konsantrasyonu eğriden yararlanılarak hesaplandı (Şekil 3.3).



Şekil 3. 3. HO-1 standart eğrisi

3.2. İstatistiksel Değerlendirme

PTK hastaların ameliyat öncesi ve sonrası kıyaslamasında Wilcoxon Signed Ranks testi; sağlıklı kontrol, ameliyat öncesi ve sonrası gruplar arası sonuçların kıyaslamasında Tek Yönlü ANOVA testi kullanıldı. İstatistiksel analizler “Statistical Package for the Social Sciences” (SPSS) programı ile bilgisayar ortamında gerçekleştirildi. Anlamlılık düzeyi için $p < 0,05$ değeri kabul edildi.

4. BULGULAR

Kontrol grubundaki bireyler için yaş ortalaması 49.28 ± 9.52 , hasta grubundaki yaş ortalaması 50.74 ± 11.18 ($p=0.606$) saptandı. Cinsiyet dağılımı kontrol grubu için E:K 8:17, hasta grubu için 8:23 ($p=0.610$) olarak saptandı. Hasta grubundaki bireylerde AKŞ ameliyat öncesi 104.65 ± 43.62 , ameliyat sonrası 101.68 ± 37.20 , sırasıyla kolesterol 211.45 ± 58.16 ve 220.58 ± 60.10 , FT3 3.05 ± 0.55 ve 2.28 ± 1.209 , FT4 1.13 ± 0.35 ve 1.07 ± 0.79 , TSH 2.42 ± 4.33 ve 25.19 ± 35.80 saptandı. Bu parametrelerden AKŞ, kolesterol ve FT4'ün ameliyat öncesi ve sonrası değerlerinde anlamlı olarak farklılık izlenmiş (sırasıyla $p < 0.005$, $p < 0.005$, $p = 0.05$) olmakla birlikte FT3 ve TSH değerlerinde farklılık saptanmamıştır (sırasıyla $p = 0.65$, $p = 0.83$).

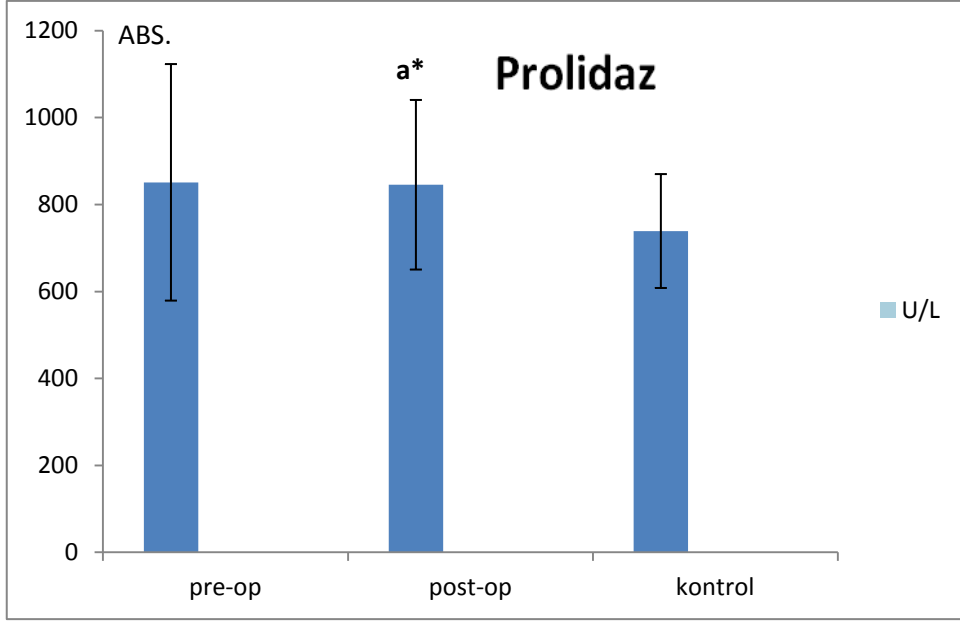
Hasta grubunun ameliyat öncesi ve sonrası bakılan parametrelerinin (Prolidaz, Malondialdehit, Protein karbonil, Hemoksijenaz-1, Süperoksit dismutaz) değerleri Tablo 4.1'de gösterilmiştir.

Hastaların hiçbirinde PTK'ine ait metastaz saptanmamıştır.

Tablo 4. 1. Oksidatif stres ürünlerinin ve antioksidan enzimlerin tiroit maligniteli hastalarda ameliyat öncesi ve sonrası değişimleri

	Prolidaz	MDA	PC	HO-1	SOD
Ameliyat Öncesi	850.81 ± 272.41	6.35 ± 1.55	186.83 ± 51.22	1.61 ± 0.48	1.67 ± 0.55
Ameliyat sonrası	845.26 ± 195.76	4.58 ± 1.15	176.034 ± 25.46	1.73 ± 0.76	0.87 ± 0.75
p-değeri	0.936	<0.001	0.293	0.247	<0.001
Ameliyat Öncesi	850.81 ± 272.41	6.35 ± 1.55	186.83 ± 51.22	1.61 ± 0.48	1.67 ± 0.55
Kontrol	738.85 ± 131.57	3.503 ± 0.72	150.33 ± 33.49	2.07 ± 0.731	1.26 ± 0.89
p-değeri	0.06	<0.001	0.003	0.006	0.025
Ameliyat sonrası	845.26 ± 195.76	4.58 ± 1.15	176.034 ± 25.46	1.73 ± 0.76	0.87 ± 0.75
Kontrol	738.85 ± 131.57	3.503 ± 0.72	150.33 ± 33.49	2.07 ± 0.731	1.26 ± 0.89
p-değeri	0.024	<0.001	0.002	0.10	0.016

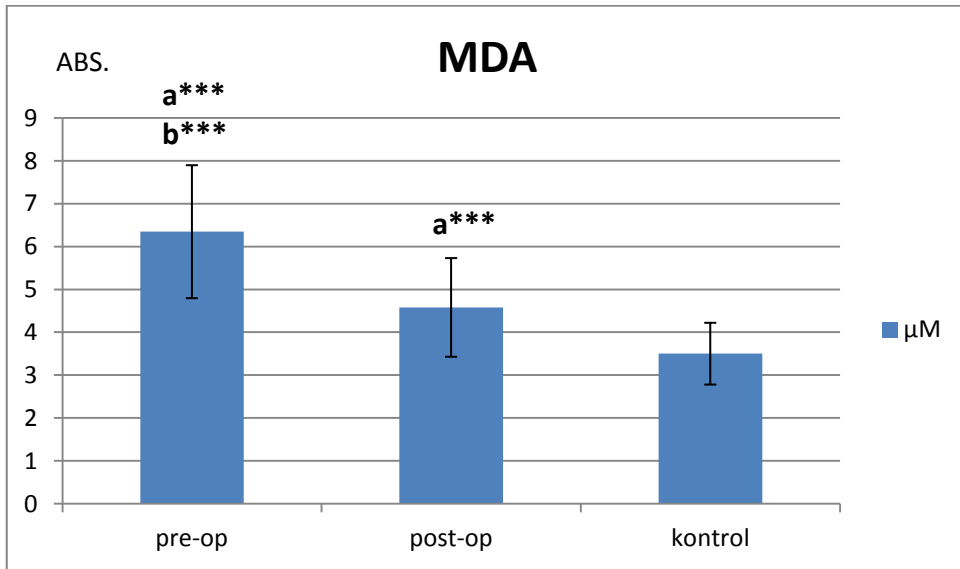
*Tüm değerler ortalama \pm standart sapma, kalın yazılmış p değerleri istatistiksel olarak anlamlı olarak belirtildi



a: Kontrol'e göre b: Ameliyat sonrasına göre

* p < 0,05 ** p < 0,01 *** p < 0,001

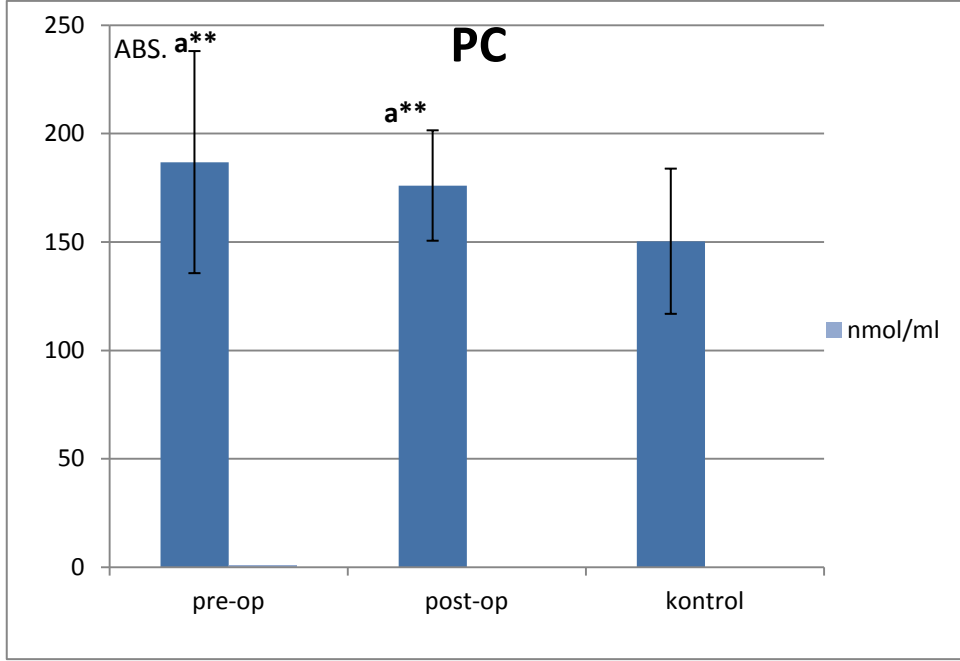
Şekil 4. 1. Prolidaz düzey histogramı



a: Kontrol'e göre b: Ameliyat sonrasına göre

* p < 0,05 ** p < 0,01 *** p < 0,001

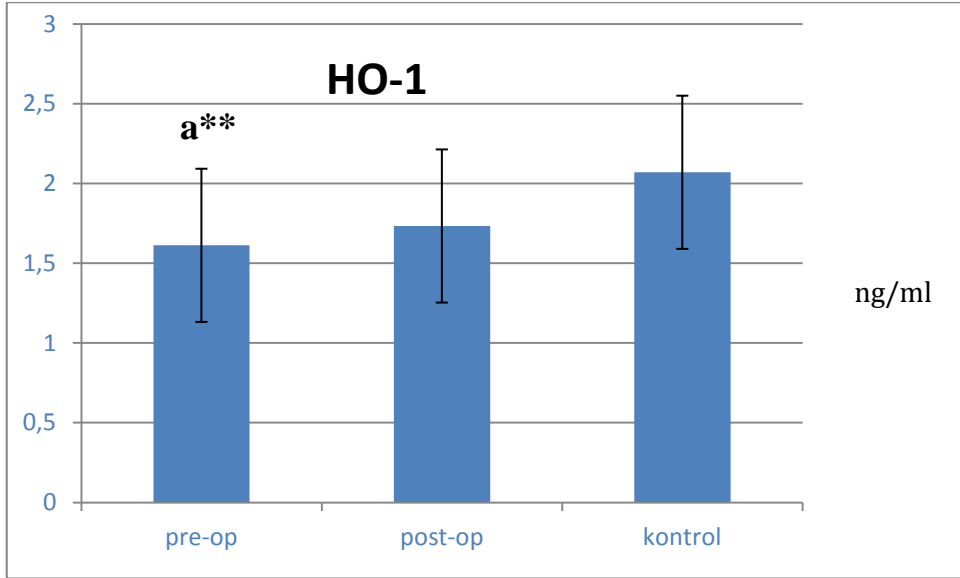
Şekil 4. 2. MDA düzey histogramı



a: Kontrol'e göre b: Ameliyat sonrasına göre

* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$

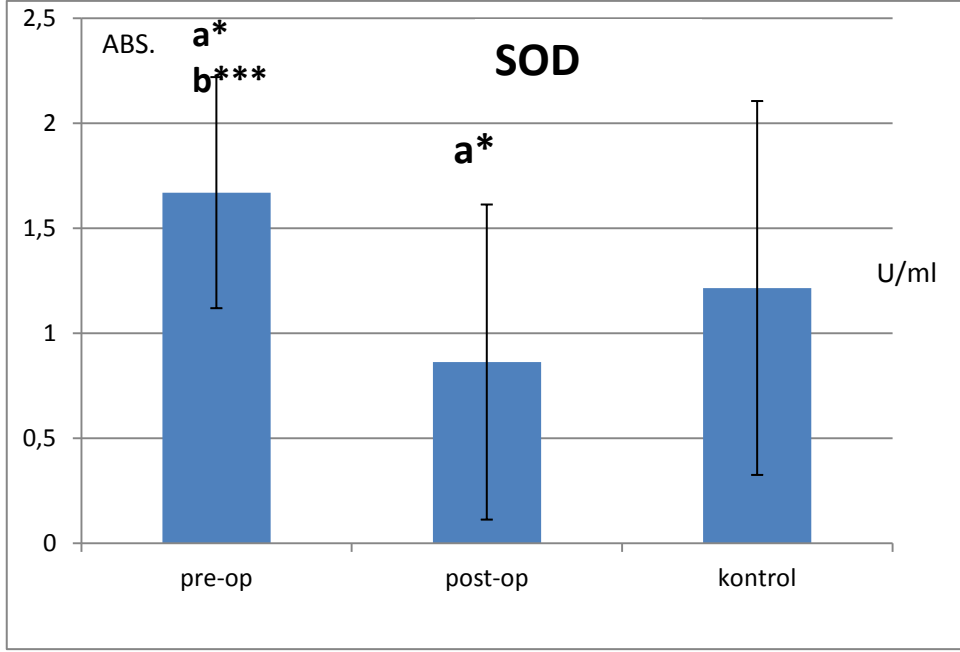
Şekil 4. 3. PC düzey histogramı



a: Kontrol'e göre b: Ameliyat sonrasına göre

* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$

Şekil 4. 4. HO-1 düzey histogramı



a: Kontrol'e göre b: Ameliyat sonrasına göre

* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$

Şekil 4. 5. SOD düzey histogramı

5. TARTIŞMA

Tiroit patolojileri, tiroit bezinin atrofisi ile gelişen hipotiroitizmden neoplastik proliferasyona kadar geniş bir aralıkta yer alır. Enfeksiyonlar, iyottan fakir beslenme ve stres gibi çevresel faktörlerle, genetik faktörlerin kompleks ve sıkı etkileşimleri patogeneizde rol alır (5). Deneysel hayvan modellerinde ve insan patolojilerinde oksidatif stresin tiroit disfonksiyonlarıyla bağlantısı gösterilmiştir (9,182,183).

Aslında, tiroit bezinin kendisi reaktif oksijen moleküllerinin TSH stimülasyonu ile ürettiği yerdir. Tiroglobulin iyonidasyonunda ve tiroit hormon sentezinde tiroperoksidaz enziminin substratı olarak reaktif oksijen molekülleri kullanılır (7).

Tiroit bezi dışında oksidatif stres oluşturan durumların tiroit kanseri hastalarında etkili olup olmadığının araştırılması gerekmektedir (7).

Wang ve ark. çalışmasında oksidatif stresin oluşumu hangi sistemde olursa olsun tiroit kanseriyle olan güçlü ilişkisi gösterilmiştir (184). Son yıllarda diğer araştırmacılar da yüksek oksidatif stresin tiroit kanserinin moleküler mekanizmasında olası risk faktörü olduğunu göstermişlerdir.

Bizim çalışmamızda serum SOD seviyeleri ameliyat öncesi grupta ameliyat sonrası ve kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu. Akıncı ve ark. yaptıkları çalışmada hasta ve kontrol gruplarında SOD aktivitelerinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulmamışlardır (4). Sugawara ve ark. Durak ve ark. yaptıkları çalışmalarda hasta gruplarında kontrollere göre anlamlı düşüş saptamışlardır (185,186). Senthil ve ark. yaptığı çalışmada papiller tiroit karsinomunda artmış MDA seviyesine karşın SOD aktivitesinde azalma tespit edilmiştir (1). Tersine, bizim çalışmamızda, Lassoued ve ark. ve Sadani ve ark. çalışmalarına benzer şekilde SOD aktivitesinde ameliyat öncesi anlamlı artış gözlenmiştir (5,187). Bu artış bize SOD aktivitesinin oksidatif strese karşı kompanse edilebilir cevap olarak arttığını düşündürebilir.

Ameliyat sonrası, kontrol grubuna göre SOD aktivitesinde anlamlı azalma bulunması nedeniyle; ameliyat öncesi SOD aktivitesinin yüksek bulunması papiller tiroit kanseri açısından şüphe uyandırabilir. Bu yüzden bizim çalışmamızda papiller tiroit kanseri gelişiminde SOD aktivitesinin önemli bir rolü bulunuyor gibi gözükse de hasta sayımızın az olması nedeniyle kesin bir karara varmak mümkün değildir. Daha kesin bilgi edinmek için büyük hasta serileriyle araştırmalar yapılmalıdır.

Akıncı ve ark., Sadani ve ark. Mano ve ark. yaptıkları çalışmalarda PTK 'da MDA konsantrasyonunu normal tiroit dokularına göre anlamlı derecede yüksek bulmuşlardır (4,187,188). Bizim çalışmamızda da, bu araştırmalara benzer şekilde ameliyat öncesi serum MDA seviyeleri ameliyat sonrası gruba göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur. Ancak, ameliyat sonrası grup kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek tespit edilmesi nedeniyle MDA seviyesindeki artışın tiroit dokusu dışından da kaynaklandığını düşünebiliriz.

Tiroit kanserlerinde serbest radikallerin artması, artan lipit peroksidasyonu ve antioksidan sistemdeki hasar ile açıklanmıştır (189). Meme ve kolon karsinomlarında doku MDA seviyeleri yüksek bulunurken endometriyum karsinomu dokusunda MDA seviyesinin yüksek bulunmaması artmış antioksidan sistem ile açıklanmıştır (187). Bizim çalışmamızda MDA artışı SOD aktivitesi artışı ile birlikte gözlenmiştir. Bu da bize PTK'unda antioksidan enzim aktivitesi artışının lipit peroksidasyonunu kompanse edecek seviyede olmadığını düşündürülebilir. Çalışmamızda hasta gruplarımızın ötiroid olması göz önüne alınarak oksidan yönde kayma olduğu düşünülebilir. Sonuç olarak, PTK'unda MDA seviyelerinin tiroitektomi sonrası değerlendirilmesi tedavi başarısı açısından önemli olabilir. Fakat daha fazla araştırmalara hiç şüphesiz ihtiyaç vardır.

HO hem katabolizmasında hız sınırlayıcı enzimdir. HO-1'in hücre proliferasyonu ve büyümesi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Ayrıca HO-1 birçok kanser çeşidinin patogenezinde yer alır (190,191). HO-1 çeşitli hücre türlerinde apoptozise karşı direnç sağlar. Chen ve ark. yaptığı çalışmada, artan HO-1 aktivitesinin PTK hücrelerinin apoptotik uyarılara duyarlılığını azalttığı bildirilmiştir (190). Bunun aksine, çalışmamızda HO-1 aktivitesi ameliyat öncesi ve sonrası gruplarda, kontrol grubuna göre hafifçe düşük bulunmuştur. Ayrıca, HO-1 aktivitesi ameliyat sonrası grupta ameliyat öncesine göre yüksek bulundu ama istatistiksel olarak anlamlı değildir. Diğer taraftan ameliyat öncesi grup kontrol grubuna göre belirgin düşük saptandı ve istatistiksel olarak anlamlı idi ($p < 0.05$). Bu sonuçlar eşliğinde; HO-1 enzim eksikliğinin veya supresyonun papiller tiroit kanseri patogenezinde rol aldığı düşünülebilir. Fakat bu farklılığı açıklamak için apoptotik markerlerin de dahil edildiği ileri araştırmalara ihtiyaç vardır.

Prolidaz enzimi matriks metalloproteinaz ailesinin bir üyesidir. Kollajen yıkımında, matriksin yapılandırılmasında ve hücre büyümesinde önemli rol oynar.

Prolidaz enzim aktivitesi; pankreas, akciğer, mide adenokarsinomu ve meme, over, endometriyum karsinomu gibi birçok kanser çeşidinde araştırılmıştır (14,192-196). Bizim çalışmamızda ameliyat öncesi ve sonrası gruplarda kontrol grubuna göre hafif yükselme tespit edilmiş olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bildiğimiz kadarıyla, PTK'da serum prolidaz aktivitesinin çalışıldığı bir çalışma mevcut değildir. Bizim çalışmamızın önemi, bu konudaki ilk araştırma olmasıdır. Anlamlı fark bulunmamamızın sebebi prolidaz enzim aktivitesinin PTK oluşumunda rol almadığı olabilir, ya da hasta sayımız yetersiz kalmış olabilir.

Enzimlerin ve yapısal proteinlerin oksidatif modifikasyonları çok sayıda hastalığın etyolojisi ve/veya ilerlemesinde önemli rol oynar. Oksidatif modifikasyona uğramış amino asitler ile bu amino asitlerin türevleri protein oksidasyonunu değerlendirmede kullanılmakta ve yenileri de güncel olarak listeye eklenmektedir. Protein karbonil içeriği, protein oksidasyonunun en genel ve kullanışlı biyomarker'idir (197). Bizim çalışmamızda protein karbonil değerleri ameliyat öncesi ve sonrası gruplarda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Fakat ameliyat öncesi ve sonrası gruplar arasında anlamlı fark bulunmamıştır. Çalışmamızdaki hasta gruplarında metastaz olmaması dikkate alındığında protein karbonil gruplarının tiroit bezi dışından kaynaklandığını düşünebiliriz. Daha önce, PTK'da serum protein karbonil tayini yapılan bir araştırma mevcut olmadığı için çalışmamız anlam kazanmıştır. Fakat, daha fazla araştırmaya hiç şüphesiz ihtiyaç vardır.

Kanser patogenezinde oksidatif stresin tartışılmaz rolü göz önüne alındığında ileride, hastaların serumlarında görülen parametrik değişimlerin oksidatif stresin yol açtığı tüm değişikliklerle ilişkilendirilmesi beklenmektedir. Bu da reaktif oksijen türlerinin kanser oluşum mekanizmasına olan etkisinin daha iyi anlaşılmasını sağlayacak ve kansere karşı mücadelede antioksidan ek tedavinin önemini ortaya koyacaktır.

6. KAYNAKLAR

1. Senthil N, Manoharan S. Lipid peroxidation and antioxidants status in patients with papillary thyroid carcinoma in India. *Asia Pac J Clin Nutr.* 2004;13(4):391-5.
2. American Cancer Society. *Cancer Facts and Figures 2007.* Atlanta: American Cancer Society 2007
3. Wells SA. Cancer of the Endocrine System. In Devita VT, Hellman S, Rosenberg SA, eds.: *Cancer: Principles and Practice of Oncology.* 8th Ed., Philadelphia Lippincott Williams&Wilkins, 2008. ch 44 pp 1655-82
4. Akinci M, Kosova F, Cetin B, Sepici A, Altan N, Aslan S, Cetin A. Oxidant/antioxidant balance in patients with thyroid cancer. *Acta Cir Bras.* 2008 Nov-Dec;23(6):551-4.
5. Lassoued S, Mseddi M, Mnif F, Abid M, Guermazi F, Masmoudi H, El Feki A, Attia H. A comparative study of the oxidative profile in Graves' disease, Hashimoto's thyroiditis, and papillary thyroid cancer. *Biol Trace Elem Res.* 2010 Dec; 138(1-3): 107-15. doi: 10. 1007/s12011-010-8625-1. Epub 2010 Mar 5.
6. Bankson DD, Kestin M, Rifai N. Role of free radicals in cancer and atherosclerosis. *Clin Lab Med.* 1993 Jun;13(2):463-80
7. Xing M. Oxidative stress: a new risk factor for thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2012 Jan 9;19(1):C7-11. doi: 10.1530/ERC-11-0360. Print 2012 Feb.
8. Karbownik M, Lewinski A. The role of oxidative stress in physiological and pathological processes in the thyroid gland; possible involvement in pineal-thyroid interactions. *Neuro Endocrinol Lett.* 2003 Oct;24(5):293-303. Review.
9. Komosinska-Vassev K, Olczyk K, Kucharz EJ, Marcisz C, Winsz-Szczotka K, Kotulska A. Free radical activity and antioxidant defense mechanisms in patients with hyperthyroidism due to Graves' disease during therapy. *Clin Chim Acta.* 2000 Oct;300(1-2):107-17.

10. Guerra LN, Ríos de Molina Mdel C, Miler EA, Moiguer S, Karner M, Burdman JA. Antioxidants and methimazole in the treatment of Graves' disease: effect on urinary malondialdehyde levels. *Clin Chim Acta*. 2005 Feb;352(1-2):115-20.
11. Suzuki M, Iso-o N, Takeshita S, Tsukamoto K, Mori I, Sato T, Ohno M, Nagai R, Ishizaka N. Facilitated angiogenesis induced by heme oxygenase-1 gene transfer in a rat model of hindlimbischemia. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;302:138–143. [PubMed: 12593860]
12. Terry CM, Cliekeman JA, Hoidal JR, Callahan KS. Effect of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 alpha on heme oxygenase-1 expression in human endothelial cells. *Am J Physiol* 1998;274:H883–H891. [PubMed: 9530200]
13. Gecit I, Aslan M, Gunes M, Pirincci N, Esen R, Demir H, Ceylan K. Serum prolidase activity, oxidative stress, and nitric oxide levels in patients with bladder cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2012 May;138(5):739-43. doi: 10.1007/s00432-011-1136-4. Epub 2012 Jan 19.
14. Camuzcuoglu H., Arioz D.T., Toy H. , Kurt S., Celik H. , Aksoy N.. Assessment of preoperative serum prolidase activity in epithelial ovarian cancer. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 147 (2009) 97–100
15. Ureles AL. *Thyroidology-Reflections on Twentieth Century history*. Falk S (ed) *Thyroid Disease*. Raven Press. New York. 1990; 1: 1-14.
16. Ünal A. *Klinik Cerrahi Onkoloji. Tiroit Kanserleri* 1997; 27: 351-360.
17. Skandalakis JE, Skandalakis PN, Skandalakis LJ. Anatomy of the thyroid gland. In *Surgical Anatomy and Technique*. Springer-Verlag. New York. 1995; 31-44.
18. Dere F. *Glandula Thyroidea ve Parathyroidea*. *Anatomi* 1990; 497-502.
19. Henry JF. *Surgical anatomy and embryology of the thyroid and parathyroid glands and rekürrent and external laryngeal nerves*. Clark OH, Duh QY(ed). *Textbook of Endocrine Surgery*. WB Saunders. Philadelphia. 1997; 2: 8-14.

20. Kuran O. Sistematik anatomi. 3. baskı. Filiz kitabevi. İstanbul.1993; bölüm 7: 631-632.
21. Tezelman ST. Siperstein AE. Signal transduction in thyroid neoplasms. Clark OH, Duh QY. (ed): Textbook of Endocrine Surgery. WB Saunders. Philadelphia. 1997; 28: 214-227.
22. Kaynaroğlu ZV. Tiroit fizyolojisi ve fonksiyon testleri. Sayek İ. (ed). Temel Cerrahi. 2. baskı. Güneş Kitabevi. Ankara. 1996; Bölüm: 15: 1523-1524.
23. Guyton AC: Tiroit bezi ve Metabolik Hormonlar. Tıbbi Fizyoloji. 3. baskı. Nobel/W.B. Saunders. İstanbul. 1989; 2: 1293-1309.
24. Wells SA. Cancer of the Endocrine System. In Devita VT, Hellman S, Rosenberg SA, eds: *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. 8th Ed, Philadelphia Lippincott Williams&Wilkins, 2008. ch 44 pp 1655-82.
25. American Cancer Society. Cancer Facts and Figures 2007. Atlanta: American. Cancer Society 2007.
26. Sandelin K, Thompson NW, Bondeson L. Metastatic parathyroid carcinoma: dilemmas in management. *Surgery*. 1991 Dec; 110(6): 978-86; discussion 986-8.
27. Dotzenrath C, Goretzki PE, Sarbia M, Cupisti K, Feldkamp J, Röher HD. Parathyroid carcinoma: problems in diagnosis and the need for radical surgery even in recurrent disease. *Eur J Surg Oncol*. 2001 Jun;27(4):383-9.
28. Polednak AP. Trends in cancer incidence in Connecticut, 1935-1991. *Cancer* 1994; 74: 2863.
29. Ries, LAG, Melbert, D, Krapcho, M, et al (Eds). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2005, National Cancer Institute, Bethesda, MD 2008.
30. Davies L, Welch HG. Increasing incidence of thyroid cancer in the United States, 1973-2002. *JAMA* 2006; 295:2164.
31. Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program (www.seer.cancer.gov). SEER Stat Database: Incidence - SEER 9 Regs Public-Use, Nov 2005 Sub (1973-2003), National Cancer Institute, DCCPS,

Surveillance Research Program, Cancer Statistics Branch, released April 2006.

32. Tielens ET, Sherman SI, Hruban RH, Ladenson PW. Follicular variant of papillary thyroid carcinoma. A clinicopathologic study. *Cancer* 1994; 73: 424.
33. Zidan J, Karen D, Stein M, et al. Pure versus follicular variant of papillary thyroid carcinoma: clinical features, prognostic factors, treatment, and survival. *Cancer* 2003; 97: 1181.
34. D'Avanzo A, Treseler P, Ituarte PH, et al. Follicular thyroid carcinoma: histology and prognosis. *Cancer* 2004; 100: 1123.
35. Cibas ES, Ali SZ. The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology. *Thyroid* 2009; 19: 1159.
36. Enewold L, Zhu K, Ron E, et al. Rising thyroid cancer incidence in the United States by demographic and tumor characteristics, 1980-2005. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009; 18: 784.
37. Tucker MA, Jones PH, Boice JD Jr, et al. Therapeutic radiation at a young age is linked to secondary thyroid cancer. The Late Effects Study Group *Cancer Res.* 1991 Jun 1;51(11):2885-8.
38. Ron E, Lubin JH, Shore RE, et al. Thyroid cancer after exposure to external radiation: a pooled analysis of seven studies. *Radiat Res.* 1995 Mar; 141(3): 259-77.
39. Nikiforov YE, Nikiforova M, Fagin JA. Prevalence of minisatellite and microsatellite instability in radiation-induced post-Chernobyl pediatric thyroid carcinomas. *Oncogene.* 1998 Oct 15; 17(15): 1983-8.
40. Bosetti C, Kolonel L, Negri E, et al. A pooled analysis of case-control studies of thyroid cancer. VI. Fish and shellfish consumption. *Cancer Causes Control.* 2001 May; 12(4): 375-82.
41. Galanti MR, Ekblom A, Grimelius L, Yuen J. Parental cancer and risk of papillary and follicular thyroid carcinoma. *Br J Cancer.* 1997; 75(3): 451-6.

42. Dündar Y, Aslan R. Oksidan-Antioksidan Denge ve Korunmasında Vitaminlerin Rolü, *Hayvancılık Araştırma Dergisi*. 1999; 9(1-2): 32-39.
43. Abuja P.M, Albertini R. Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. *Clinica Chimica Acta*. 2001; 306:1-17.
44. Word RJ, Peters TJ. Free radicals. Kaplan LA, Pesce AJ editors. *Clinical chemistry*. 3th Ed. Mosby Year Book, Inc. 1996; 765-777.
45. Dormandy T L. An approach to free radicals. *Lancet*, 1983; 322: 1010-1013.
46. Kaynak K. Akciğer kanserinde oksidatif hasarın rolü. *Solunum*, 2002; 4(4); 468-473.
47. Halliwell B, Gutteridge JM. *Free radicals in biology and medicine*. 2th Ed. Oxford: Clarendon Pres, 1989. 125.
48. Zwart De LL, Meerman JHN, Commandeur JNM, Vermeulen NPE. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free Radical Biology and Medicin*. 1999; 26: 202-226.
49. Aslan R, Şekeroğlu MR, Bayiroğlu F. Serbest Radikal Türlerin Membran Lipid Peroksidasyonuna Etkileri ve Antioksidan Savunma, *Y.Y.Ü Sağlık Bil. Derg.* 1995; 2(1); 137-142.
50. Byung PY. Cellular Defenses Against Damage from Reactive Species. *Physiological Review*. 1994; 74(1): 139-172.
51. Young I.S, Woodside J.V. Antioxidants in health and disease, *J Clin Pathol*, 2001; 54: 176-186.
52. Clarkson P.M, Thompson H.S. Antioxidants: What role do they play in physical activity and health? *Am J Clin Nutr*, 2000; 72: 637-46.
53. Urso ML, Clarkson MP. Oxidative stres, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology*, 2003; 189: 41-54.
54. Halliwell B, Gutteridge JMC. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J*, 1984; 219; 1-14.

55. Halliwell B, Gutteridge JMC. Role of Free Radicals and Catalytic Metal Ions in Human Disease: An overview. *Methods Enzymol*, 1990; 49(3): 577-587.
56. Church DF, Pryor WA. Free Radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. *Environ. Health Perspect*, 1985; 64: 111-126.
57. Akkuş İ. *Serbest Oksijen Radikalleri ve Fizyopatolojik Etkileri*. Mimoza Basım Yayın ve Dağıtım, Konya: 1995; 1-15.
58. Fridovich I. Oxidative Stres. *Encyclopedia of Life Sciences*. Nature Publishing Group, 2001.
59. Nordberg J, Arner ESJ. Reactive Oxygen Species, Antioxidants and The Mammalian Thioredoxin System. *Free Radical Biology and Medicine*, 2001; 31(11): 1287-1317.
60. Kurutaş Belge E, İnanç Güler F, Kılınc M. Serbest Radikaller. *Arşiv*, 2004; 13: 120-13.
61. Zimmerman, B. J. ; Granger, D. N. Mechanisms of reperfusion injury. *Am. J. Med. Sc*, 1994; 307: 284–292.
62. Kontos, H. A. ; Wei, E. P. ; Ellis, E. F. ; Jenkins, L. W. ; Povlishock, J. T. ; Rowe, G. T. ; Hess, M. L. Appearance of superoxidation radical in cerebral extracellular space during increased prostaglandin synthesis in cats. *Circ. Res*. 1985; 57: 142–151.
63. McIntyre, M. ; Bohr, D. F. ; Dominiczak, A. F. Endothelial function in hypertension *Hypertension*. 1999; 34: 539–545.
64. Oruç Özcan E. 2,4-Diamin ve Azinfosmetilin *Tilapia Nilotica*'da Karaciğerde Antioksidan Enzim Aktivitelerine ve Lipid Peroksidasyonuna Etkileri. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana, 1998.
65. Gutteridge J M C. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chemistry* 1995; 41: 1819-1828.
66. Hinder R. A, Stein H.J. Oxygen-derived free radicals. *Arch Surg*. 1991; 126: 104-105.

67. Meram İ, Aktaran Ş. Serbest Radikallerin Biomoleküller Üzerine Etkileri. *Arşiv*. 2002; 11: 299.
68. Özkan A, Fışkın K. Serbest Oksijen Radikalleri, Karsinogenez ve Antioksidant Enzimler. *Türk Hematoloji Onkoloji Dergisi*. 2004; 14: 52-60.
69. Sodergen E. Lipid Peroxidation In vivo Evolution and Application of Methods for Measurements, Sweden, Tryck&Medier, 2000.
70. Abuja P.M, Albertini R. Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. *Clinica Chimica Acta*. 2001; 306: 1-17.
71. Percival M. Antioxidants. *Clinical Nutrition Insights*. 1998; 98(10): 1-4.
72. Sorg O. Oxidative stres: a theoretical model or biological reality? *C. R. Biologies*, 2004; 327: 649-662.
73. Bowler R. P, Crapo J. D. Oxidative Stres in Allergic Respiratory Diseases. *J. Allergy Clin Immunol*. 2002; 110(3): 349-356.
74. Kinnula V.L, Paakko P, Soini Y. Antioxidant enzymes and redox regulating thiol proteins in malignancies of human lung. *FEEBS*, 2004; 1-6.
75. Lucente G, Luisi G, Pinnen F. Design and Synthesis of Glutathione Analogues. *Il Framaco*. 1998; 53: 721-735.
76. Hall L, Williams K, Perry A.C.F, Frayne J, Jury J.A. The majority of human glutathione peroxidase type 5 (GPX5) transcripts are incorrectly spliced: implications for the role of GPX5 in the male reproductive tract. *Biochem J*. 1998; 333: 5-9.
77. Haan j.b, Bladier C, Griffith P, Keiner M, O'shea R.D, Kola İ. Mice with a homozygous null mutation for the most abundant glutathione peroxidase, Gpx1, show increased susceptibility to the oxidative stres-inducing agents paraquat and hydrogen peroxide. *Issue of August*. 1998; 273(35): 22528-22536.
78. Strange R.C, Spiteri M.A, Ramchandran S, Fryer A.A. Glutathione-S-transferase family of enzymes. *Mutation Research*. 2001; 482: 21-26.

79. Oberley L.W. Representative of Polypeptid Structure of Bovine CuZnSOD. *Superoxide Dismutase*, 1982; 1:28.
80. Ernster, L.; Dallner, G. Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function. *Biochim. Biophys. Acta*, 1995; 1271: 195–204.
81. Xia, L.; Bjȯrnstedt, M.; Nordman, T. ; Eriksson, L. C.; Olsson, J. M. Reduction of ubiquinone by lipoamide dehydrogenase. An antioxidant regenerating pathway. *Eur. J. Biochem.* 2001; 268: 1486– 1490.
82. Frei B, Stocker R, England L, Ames BN. Ascorbate: the most effective antioxidant in human blood plasma. *Av Exp Med Biol.* 1990; 264: 155-163.
83. Sies H, Stahl W, Sundquist AR. Antioxidant function of vitamins. Vitamin E and C, betacarotene and other carotenoids. *Ann N Y Acad Sci*, 1992; 669: 7-20.
84. Tadmouri G.O, Bařak A.N. β -thalassemia in Turkey; A review of the clinical epidemiological molecular and evoluinory aspects. *Hemoglobin.* 2001; 25(2): 227-239.
85. Burtis C.A, Ashwood E.R. Vitaminler. Aslan D. Eds. *Klinik Kimyada Temel İlkeler.* Ankara: Palme Yayınları, 2005: 548-550, 332-333, 578-601.
86. Nijveldt R.J, Noad E, Hoarn D.E.C, Boelens P.G, Norren K, Leeuwen P.A.M. Flavonoids: a review of probable mechanism of action and potential applications. *Am J Clin Nutr.* 2001; 74: 418-425.
87. Onat T, Eerk K, Sözmen Y.E. *İnsan Biyokimyası.* Ankara: Palme Yayıncılık. 2002: 135, 535-536.
88. Becker M.A, Roessler B.J. Hyperuricemia and Gout. In Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, New York: 7th Ed. McGraw Hill, 1995: 1655-1677.
89. Endo FA, Matsuda I. (1991) Molecular basis of prolidase (peptidase D) deficiency. *Mol Biol and Med.* 8: 117–127.
90. Myara I, Cosson C, Moatti N, Lemonnier A. (1994) Human kidney prolidase-purification, preincubation properties and immunological reactivity. *Int J Biochem.* 26: 207–214.

91. Bergmann M, Fruton J S, J Biol Chem. 1937; 118: 405-415.
92. Davis NC, Smith EL: Purification and Some Properties of Prolidase of Swine Kidney, J.Biol Chem, 244: 261-275,1957.
93. Boright A, Scriver CR: Prolidase Deficiency: Biochemical Classification of Alleles Am J Hum Genet. 1989; 44: 731-740.
94. Phang JM. Yeh GC. Scriver. : Disorders of Proline and Hydroxyproline Metabolism In The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease, (7th Ed) ScriverRC. Blandet al. Sly WS, (Eds) Mc Graw Hill, Montreal. 1995; 1125-1141.
95. Mock WL, Zhuang H. Chemical Modification Locates Guanidinyl and Carboxylate Groups Within The Active site of prolidase Biochem biophys Res Com. 1991; 180 (1): 401-406.
96. Endo F. Tanoue A. structural organization of the gene for human prolidase (Peptidase D) and Demonstration of a partial gene deletion in a patient with prolidase deficiency. J. Biol chem, 265(19): 11306- 11311, 1989.
97. Sugahara K, Ohno T. The Use of liquid chromatography Mass spectrometry for the identification and Quantification of Urinary immunodipeptidase in prolidase deficiency. Eur J clin-Chem Clin Biochem 1993; 31: 317-322.
98. Surazynski, A. and J. Palka, FAK-independent regulation of prolidase activity and collagen biosynthesis in MCF- 7 cells. Folia Histochem Cytobiol, 2001;39 Suppl 2212- 3.
99. Myara I, Charpentier C, Lemonnier A. Optimal conditions for prolidase assay by localization of human prolidase. J Biol Chem, 1989, 264 (8): 4476-4481.
100. Ohhashi, T. T. Ohno, J. Arata, et al. Characterization of prolidase I and II from erythrocytes of a control, a patient with prolidase deficiency and her mother. Clin Chim Acta, 1990; 187: 1, 1- 9.
101. Cheng TC, DeFrank JJ, Rastogi VK, Alteromonas prolidase for organophosphorus Agent decontamination. Chem Biol Interact. 1999; 455 (62): 119-120.

102. Cosson C, Myara I: Only prolylase I Activity is present in human plasma. *Int. J Biochem.* 1992; 24 (3): 427-432.
103. Bielawska A, Bielawski K, Chrzanowski K, et al. Prolylase-activated prodrug for cancer chemotherapy cytotoxic activity of proline analogue of chlorambucil in breast cancer MCF-7 cells. *Farmaco.* 2000; 55 (11-12): 736-41.
104. Myara I, Cosson C., Moatti, N., Lemonnier, A.: Human kidney prolylase-purification, preincubation properties and immunological reactivity. *Int. J Biochem.* 1994; 26 (2): 207-214.
105. Yaron A, Naider F. Proline-Dependent structural and biological properties of peptides and proteins. *Crit. Rev. Biochem Mol. Biol.* 28: 31-81.
106. Oono T, Arata J. Characteristics of prolylase and prolylase in prolylase-deficient patients with some preliminary studies of their role in Skin. *J dermatol.* 1988; 15: 212-219.
107. Crawford JL, Lipscomb WN, Schellman CG. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 1973; 70: 538-543.
108. Persson B, Flinta C, Von Heijne G, Jorvall E. *EUR. Biochem.* 1985; 152: 523-527.
109. Radzicka A, Wolfenden R. : Analogues of intermediates in Action of pig kidney prolylase *Biochemistry.* 1991; 30: 4160-4164.
110. Chamson A, Voigtlander V. Collagen Biosynthesis Anomalies in Prolylase Deficiency. Effect of Glycyl-L-Proline on the Degradation of Newly Synthesized Collagen *Clin. Physiol Biochem.* 1989;7: 128- 136.
111. Elçi K. Hipertansiyonun Kollajen Doku Üzerindeki Etkilerini Prolylase Enzim Aktivitesini Ölçerek Belirlemeye Çalışmak Uzmanlık Tezi. Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Kardiyoloji Dalı Şanlıurfa. 2007
112. Göçebe M. Prolylase Enziminin Serum Aktivite Değerlerini Kardiyak Hipertrofi Hastalarda Tespit Ederek Hastalığın Erken Tanısı Açısından Prolylase Enzim Aktivitesinin Bir Rolü Olup Olamayacağını İncelemek.

Uzmanlık Tezi. Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Kardiyoloji Dalı Şanlıurfa. 2007.

113. Alparslan S, Gültepe M: Serum Prolidase Activity: Its Value as an Indicator of Collagen Accumulation in Chronic Liver Diseases. *Biyokimya Dergisi*, 18(1): 1-9,1993.
114. Whang SH, Zhi QW, Sun MJ. (2006) Dual activities of human prolidase. *Toxicol In Vitro*. 20: 71-77.
115. Noren O, Dabelsteen E, Sjöström H and Josefsson L. (1977) Histological localization of two dipeptidases in the pig small intestine and liver, using immunofluorescence. *Gastroenterology*. 72: 87–92.
116. Hui KS and Lajtha A. (1978) Prolidase activity in brain: Comparison with other organs. *J Neurochem*. 30: 321–327.
117. Smith EL. (1948) The peptidases of skeletal, heart, and uterine muscle. *J Biol Chem*. 173: 553–569.
118. Sheffield LJ, Schlesinger P, Faull K, Halpern BJ, Schier GM, Cotton RG, Hammond J, Danks DM. (1977) Imino-peptiduria, skin ulcerations, and edema in a boy with prolidase deficiency. *J Pediatr*. 91: 578–583.
119. Maines, M.D. (1997). The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*. 37: 517-54, 517-554.
120. Tenhunen, R., Marver, H.S., Schmid, R., (1968). The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 61, 748-755.
121. Yoshida, T. , Kikuchi, G. (1978). Reaction of the microsomal heme oxygenase with cobaltic protoporphyrin IX, and extremely poor substrate. *J. Biol. Chem.* 253, 8479-8482.
122. Yoshida, T., Kikuchi, G., (1979). Purification and properties of heme oxygenase from rat liver microsomes. *J. Biol. Chem.* 254, 4487-4491.
123. Yoshida, T, Noguchi, M. Kikuchi, G. (1980). Oxygenated form of heme. heme oxygenase complex and requirement for second electron to initiate

heme degradation from the oxygenated complex. *J. Biol. Chem.* 255, 4418-4420.

124. Kikuchi, G., Yoshida, T., Noguchi, M., (2005). Heme oxygenase and heme degradation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338, 558-567.
125. Maines, M.D., Trakshel, G.M., (1992). Differential regulation of heme oxygenase isozymes by Sn- and Zn-protoporphyrins: possible relevance to suppression of hyperbilirubinemia. *Biochim. Biophys. Acta.* 1131, 166-174.
126. Maines, M.D., Trakshel, G.M., Kutty, R.K., (1986). Characterization of two constitutive forms of rat liver microsomal heme oxygenase. Only one molecular species of the enzyme is inducible. *J. Biol. Chem.* 261, 411-419.
127. Trakshel, G.M., Kutty, R.K., Maines, M.D., (1986). Purification and characterization of the major constitutive form of testicular heme oxygenase. The noninducible isoform. *J. Biol. Chem.* 261, 11131-11137.
128. Shibahara, S. Muller, R., Taguchi, H. et al., (1985). Cloning and expression of cDNA for rat heme oxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 7865-7869.
129. Rotenberg, M.O., Maines, M.D., (1990). Isolation, characterization, and expression in *Escherichia coli* of a cDNA encoding rat heme oxygenase-2. *J. Biol. Chem.* 265, 7501-7506.
130. Maines, M.D., Panahian, N., (2001). The heme oxygenase system and cellular defense mechanisms. HO-1 and HO-2 have different functions *Adv. Exp. Med. Biol.* 502: 249-72, 249-272.
131. Tenhunen, R., Marver, H.S., Schmid, R., (1969). Microsomal heme oxygenase. Characterization of the enzyme. *J. Biol. Chem.* 244, 6388-6394.
132. Abraham, N.G., (1991). Molecular regulation--biological role of heme in hematopoiesis. *Blood Rev.* 5, 19-28.
133. Abraham, N.G., Nelson, J.C., Ahmed, T. et al., (1989). Erythropoietin controls heme metabolic enzymes in normal human bone marrow culture. *Exp. Hematol.* 17, 908-913.

134. Brown, A.C., Lutton, J.D., Pearson, H.A. et al., (1988). Heme metabolism and in vitro erythropoiesis in anemia associated with hypochromic microcytosis. *Am. J. Hematol.* 27, 1-6.
135. Raju, V.S., McCoubrey, W.K., Jr., Maines, M.D., (1997). Regulation of heme oxygenase-2 by glucocorticoids in neonatal rat brain: characterization of a functional glucocorticoid response element. *Biochim. Biophys. Acta.* 20; 1351, 89-104.
136. Kim, H.P. , Wang, X. , Galbiati, F. et al., (2004). Caveolae compartmentalization of heme oxygenase-1 in endothelial cells. *FASEBJ.* 18, 1080-1089.
137. Pimstone, N.R., Engel, P., Tenhunen, R. et al., (1971). Further studies of microsomal hem oxygenase: mechanism for stimulation of enzyme activity and cellular localization. *S. Afr. Med. J.* :169-74, 169-174.
138. Li, V.G., Ientile, R., Abraham, N.G. et al., (2004). Immunocytochemical localization and expression of heme oxygenase-1 in primary astroglial cell cultures during differentiation: effect of glutamate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 315, 517-524.
139. Richardson, D.R., Ponka, P., (1997). The molecular mechanisms of the metabolism and transport of iron in normal and neoplastic cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1331, 1-40.
140. Freeman, B.A., Crapo, J.D., (1981). Hyperoxia increases oxygen radical production in rat lungs and lung mitochondria. *J. Biol. Chem.* 256, 10986-10992.
141. Eisenstein, R.S., (2000). Iron regulatory proteins and the molecular control of mammalian iron metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* 20: 627-62, 627-662.
142. Ryter, S.W., Tyrrell, R.M., (2000). The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. Heme oxygenase has both pro- and antioxidant properties. *Free Radic. Biol. Med.* 28, 289-309.

143. Balla, J., Jacob, H.S., Balla, G. et al., (1993). Endothelial-cell heme uptake from heme proteins: induction of sensitization and desensitization to oxidant damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 9285-9289.
144. Vile, G.F., Basu-Modak, S., Waltner, C. et al., (1994). Heme oxygenase mediates an adaptive response to oxidative stress in human skin fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 2607-2610.
145. Choi, B.M., Pae, H.O., Jeong, Y.R. et al., (2004). Overexpression of heme oxygenase (HO)-1 renders Jurkat T cells resistant to fas-mediated apoptosis: involvement of iron released by HO-1. *Free Radic. Biol. Med.* 36, 858-871.
146. Heirwegh, K.P., Fevery, J., Blanckaert, N., (1989). Chromatographic analysis and structure determination of biliverdins and bilirubins. *J. Chromatogr.* 496, 1-26.
147. Gopinathan, V., Miller, N.J., Milner, A.D. et al., (1994). Bilirubin and ascorbate antioxidant activity in neonatal plasma. *FEBS Lett.* 349, 197-200.
148. Leto, T.L., Adams, A.G., de, M., I, (1994). Assembly of the phagocyte NADPH oxidase: binding of Src homology 3 domains to proline-rich targets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 10650-10654.
149. Kappas, A., (2004). A method for interdicting the development of severe jaundice in newborns by inhibiting the production of bilirubin. *Pediatrics.*
150. Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh AF, Glazer AN, Ames BN. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science.* 1987 Feb 27; 235(4792): 1043-6.
151. Dore S, Takahashi M, Ferris CD, Zakhary R, Hester LD, Guastella D, Snyder SH. Bilirubin, formed by activation of heme oxygenase-2, protects neurons against oxidative stress injury. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Mar 2; 96(5): 2445-50.
152. Vachharajani TJ, Work J, Issekutz AC, Granger DN. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000 May; 278(5): H1613-7.
153. Clark JE, Foresti R, Sarathchandra P, Kaur H, Green CJ, Motterlini R. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000 Feb; 278(2): H643-51.

154. Mayer M. Association of serum bilirubin concentration with risk of coronary artery disease. *Clin Chem.* 2000 Nov; 46(11): 1723-7.
155. Kaur, H. Hughes, M.N., Green, C.J. et al., (2003). Interaction of bilirubin and biliverdin with reactive nitrogen species. *FEBS Lett.* 543, 113-119.
156. Mancuso, C. Bonsignore, A., Di, S.E. et al., (2003). Bilirubin and S-nitrosothiols interaction: evidence for a possible role of bilirubin as a scavenger of nitric oxide. *Biochem. Pharmacol.* 66, 2355-2363.
157. Kwak, J.Y. Takeshige, K., Cheung, B.S. et al., (1991). Bilirubin inhibits the activation of superoxide-producing NADPH oxidase in a neutrophil cell-free system. *Biochim. Biophys. Acta.* 1076, 369-373.
158. Keshavan, P. Deem, T.L., Schwemberger, S.J. et al., (2005). Unconjugated bilirubin inhibits VCAM-1-mediated transendothelial leukocyte migration. *J. Immunol.* 174, 3709-3718.
159. Gorman, D. Drewry, A., Huang, Y.L. et al., (2003). The clinical toxicology of carbon monoxide. *Toxicology.* 187, 25-38.
160. Hussain, A.S. Marks, G.S., Brien, J.F. et al., (1997). The soluble guanylyl cyclase inhibitor 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3- α]quinoxalin-1-one (ODQ) inhibits relaxation of rabbit aortic rings induced by carbon monoxide, nitric oxide, and glyceryl trinitrate. *Can. J. Physiol Pharmacol.* 75, 1034-1037.
161. Morita, T. Kourembanas, S., (1995). Endothelial cell expression of vasoconstrictors and growth factors is regulated by smooth muscle cell-derived carbon monoxide. *J. Clin. Invest.* 96, 2676-2682.
162. Jaggar, J.H. Leffler, C.W., Cheranov, S.Y. et al., (2002). Carbon monoxide dilates cerebral arterioles by enhancing the coupling of Ca^{2+} sparks to Ca^{2+} -activated K^+ channels. *Circ. Res.* 91, 610-617.
163. Kaide, J.I. Zhang, F., Wei, Y. et al., (2001). Carbon monoxide of vascular origin attenuates the sensitivity of renal arterial vessels to vasoconstrictors. *J. Clin. Invest.* 107, 1163-1171.

164. Wang, R., Wang, Z., Wu, L., (1997). Carbon monoxide-induced vasorelaxation and the underlying mechanisms. *Br. J. Pharmacol.* 121, 927-934.
165. Brouard, S. Otterbein, L.E., Anrather, J. et al., (2000). Carbon monoxide generated by heme oxygenase 1 suppresses endothelial cell apoptosis. *J. Exp. Med.* 192, 1015-1026.
166. Petrache, I. Otterbein, L.E., Alam, J. et al., (2000). Heme oxygenase-1 inhibits TNF-alpha-induced apoptosis in cultured fibroblasts. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol.* 278, L312-L319.
167. Brune, B. Ullrich, V., (1987). Inhibition of platelet aggregation by carbon monoxide is mediated by activation of guanylate cyclase. *Mol. Pharmacol.* 32, 497-504.
168. Durante, W. Schafer, A.I., (1998). Carbon monoxide and vascular cell function (Review). *Int. J. Mol. Med.* 2, 255-262.
169. Morita, T. Perrella, M.A., Lee, M.E. et al., (1995). Smooth muscle cell derived carbon monoxide is a regulator of vascular cGMP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 1475-1479.
170. Otterbein, L.E. Zuckerbraun, B.S., Haga, M. et al., (2003). Carbon monoxide suppresses arteriosclerotic lesions associated with chronic graft rejection and with balloon injury. *Nat. Med.* 9, 183-190.
171. Morita, T. Kourembanas, S., (1995). Endothelial cell expression of vasoconstrictors and growth factors is regulated by smooth muscle cell derived carbon monoxide. *J. Clin. Invest.* 96, 2676-2682.
172. Taille, C. El-Benna, J. Lanone, S. et al., (2005). Mitochondrial respiratory chain and NAD(P)H oxidase are targets for the antiproliferative effect of carbon monoxide in human airway smooth muscle. *J. Biol. Chem.* 280, 25350-25360.
173. Derijard, B. Raingeaud, J. Barrett, T. et al., (1995). Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms. *Science.* 267, 682-685.

- 174.Otterbein, L.E. Bach, F.H. Alam, J. et al. (2000). Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nat. Med.* 6, 422-428.
- 175.Derijard, B. Raingeaud, J. Barrett, T. et al. (1995). Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms. *Science.* 267, 682-685.
- 176.Raingeaud, J. Whitmarsh, A.J. Barrett, T. et al. (1996). MKK3- and MKK6-regulated gene expression is mediated by the p38 mitogenactivated protein kinase signal transduction pathway. *Mol. Cell Biol.* 16,1247-1255.
- 177.Özcan Ö. , Gültepe M. , İpçioğlu O.M. , Bolat B. , Kayadibi H. Prolidazın Mutlak Aktivitesini Değerlendirmede Fotometrik Enzim Aktivitesi Ölçüm Metodunun Optimizasyonu. *Türk Biyokimya Dergisi* 01/2007; Source: DOAJ.
- 178.Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid Peroksidation. *Methods Enzymol.* 1978; 12: 302-10.
- 179.Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem.* 1988 Mar; 34(3): 497-500.
- 180.Durak I, Yurtarslanl Z, Canbolat O, Akyol O. A methodological approach to superoxide dismutase (SOD) activity assay based on inhibition of nitroblue tetrazolium (NBT) reduction. *Clin Chim Acta.* 1993 Jan 31; 214(1): 103-4.
- 181.Reznick AZ, Packer L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol.* 1994; 233: 357-63.
- 182.Ademoğlu E, Ozbey N, Erbil Y, Tanrikulu S, Barbaros U, Yanik BT, Bozbora A, Ozarmağan S. Determination of oxidative stress in thyroid tissue and plasma of patients with Graves' disease. *Eur J Intern Med.* 2006 Dec;17(8): 545-50.
- 183.Baskol G, Atmaca H, Tanriverdi F, Baskol M, Kocer D, Bayram F. Oxidative stress and enzymatic antioxidant status in patients with hypothyroidism before and after treatment. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2007 Sep; 115(8): 522-6.

184. Wang D, Feng JF, Zeng P, Yang YH, Luo J, Yang YW. Total oxidant/antioxidant status in sera of patients with thyroid cancers. *Endocr Relat Cancer*. 2011 Dec 1; 18(6): 773-82. doi: 10.1530/ERC-11-0230. Print 2011 Dec.
185. Sugawara M, Kita T, Lee ED, Takamatsu J, Hagen GA, Kuma K, Medeiros-Neto GA. Deficiency of superoxide dismutase in endemic goiter tissue. *J Clin Endocrinol Metab*. 1988 Dec;67(6):1156-61.
186. Durak I, Bayram F, Kavutcu M, Canbolat O, Oztürk HS. Impaired enzymatic antioxidant defense mechanism in cancerous human thyroid tissues. *J Endocrinol Invest*. 1996 May;19(5):312-5.
187. Sadani GR, Nadkarni GD. Role of tissue antioxidant defence in thyroid cancers. *Cancer Lett*. 1996 Dec 3; 109(1-2): 231-5.
188. Mano T, Shinohara R, Iwase K, Kotake M, Hamada M, Uchimuro K, Hayakawa N, Hayashi R, Nakai A, Ishizuki Y, Nagasaka A. Changes in free radical scavengers and lipid peroxide in thyroid glands of various thyroid disorders. *Horm Metab Res*. 1997 Jul; 29(7): 351-4.
189. Yanagawa T, Ishikawa T, Ishii T, Tabuchi K, Iwasa S, Bannai S, Omura K, Suzuki H, Yoshida H. Peroxiredoxin I expression in human thyroid tumors. *Cancer Lett*. 1999 Oct 18; 145(1-2): 127-32.
190. Chen GG, Liu ZM, Vlantis AC, Tse GM, Leung BC, van Hasselt CA. Heme oxygenase-1 protects against apoptosis by tumor necrosis factor-alpha and cycloheximide in papillary thyroid carcinoma cells. *J Cell Biochem* 2004; 92: 1246–1256. [PubMed: 15258907].
191. Murphy BJ, Laderoute KR, Vreman HJ, Grant TD, Gill NS, Stevenson DK, Sutherland RM. Enhancement of heme oxygenase expression and activity in A431 squamous carcinoma multicellular tumor spheroids. *Cancer Res*. 1993 Jun 15; 53(12): 2700-3.
192. Palka J, Surazynski A, Karna E, Orłowski K, Puchalski Z, Pruszyński K, Laszkiewicz J, Dzienis H. Prolidase activity dysregulation in chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *Hepatogastroenterology*. 2002 Nov-Dec; 49(48): 1699-703.

193. Karna E, Surazynski A, Palka J. Collagen metabolism disturbances are accompanied by an increase in prolidase activity in lung carcinoma planoepitheliale. *Int J Exp Pathol*. 2000 Oct; 81(5): 341-7.
194. Cechowska-Pasko M, Pałka J, Wojtukiewicz MZ. Enhanced prolidase activity and decreased collagen content in breast cancer tissue. *Int J Exp Pathol*. 2006 Aug; 87(4): 289-96.
195. Arioz DT, Camuzcuoglu H, Toy H, Kurt S, Celik H, Aksoy N. Serum prolidase activity and oxidative status in patients with stage I endometrial cancer. *Int J Gynecol Cancer*. 2009 Oct; 19(7): 1244-7.
196. Guszczyn T, Sobolewski K. Deregulation of collagen metabolism in human stomach cancer. *Pathobiology*. 2004; 71(6): 308-13.
197. Çakatay U, Kayalı R. The clinical importance of protein oxidation. *Cerrahpaşa J Med* 2004; 35: 140-149.