



**KODEİN ve KODEİN TUZLARINA
UZUN SÜRELİ MARUZİYETİN METALLOTİYONİN
SENTEZİ ve LİPİT PEROKSİDASYONU
ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ**

DERYA TEMİR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI
Dr. Öğr. Üyesi Emel CANPOLAT**

Ağustos – 2019

Her hakkı saklıdır

T.C.
TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KODEİN ve KODEİN TUZLARINA UZUN SÜRELİ MARUZİYETİN
METALLOTİYONİN SENTEZİ ve LİPİT PEROKSİDASYONU
ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

DERYA TEMİR

TOKAT
Ağustos - 2019

Her hakkı saklıdır



Bu tez çalışması;

Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından 2018/53 nolu proje ile desteklenmiştir.

Derya TEMİR tarafından hazırlanan “**Kodein Ve Kodein Tuzlarına Uzun Süreli Maruziyetin Metalloiyonin Sentezi Ve Lipit Peroksidasyonu Üzerindeki Etkilerinin Belirlenmesi**” adlı tez çalışmasının savunma tarihi 27 AĞUSTOS 2019 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen Jüri tarafından Oy Birliği / Oy Çokluğu ile Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman
Dr. Öğr. Üyesi Emel CANPOLAT

Üye
Dr. Öğr. Üyesi Fatma GEDİKLİ
Gaziosmanpaşa Üniversitesi

Üye
Dr. Öğr. Üyesi Dursun KISA
Cumhuriyet Üniversitesi

Emel Canpolat
Fatma Gedikli
Dursun Kisa

ONAY

Prof. Dr. Cetin ÇEKİÇ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

26-10/2019-9



TEZ BEYANI

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.



DERYA TEMİR

27 Ağustos 2019

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KODEİN ve KODEİN TUZLARINA UZUN SÜRELİ MARUZİYETİN METALLOTİYONİN SENTEZİ ve LİPİT PEROKSİDASYONU ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

DERYA TEMİR

TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

(TEZ DANIŞMANI:DR. ÖĞR. ÜYESİ EMEL CANPOLAT)

Kodein *Papaver somniferum L.* (haşhaş) bitkisinin kapsüllerinde bulunan bir alkaloid çeşidi olup %3'lük bir oran ile haşhaşta morfinden sonra en fazla oranda bulunmaktadır. Tıpta tedavi amaçlı analjezik (ağrı kesici), antitussif (öksürük dindirici) ve antidiyareik (ishal önleyici) olarak kullanılmaktadır. Kodein saf olarak kodein pür şeklinde bulunabildiği gibi fosfat ve sülfat tuzlarının eklenmesi ile birlikte kodein tuzları olarak bilinen formları da elde edilmektedir. Kodein fosfat ya da sülfat suda kolayca çözünebilir olması ve vücut tarafından daha kolay absorbe edilmeleri nedeniyle tıpta tedavi amaçlı olarak (oral tablet ya da parenteral enjeksiyon şeklinde) daha fazla tercih edilmektedir. Bu çalışmada pür kodein ve kodein tuzlarına (kodein fosfat ve kodein sülfat) uzun süreli maruziyetin bir stres proteini olarak metallothionein sentezi ve lipit peroksidasyonu üzerindeki etkilerinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla kodein ve kodein tuzları canlı ağırlığına göre ilk 15 gün boyunca 10 mg/kg, sonraki 15 gün boyunca ise 20 mg/kg olacak şekilde intraperitoneal (karın boşluğu içerisine) olarak farelere enjekte edilmiştir. Kodein ve kodein tuzlarının verilmesinden 15 gün sonra deney hayvanlarının yarısının, deney bitiminde ise tüm farelerin doku örnekleri alınarak dokularda MT protein varlığı kompetitif ELISA yöntemi ile lipit peroksidasyonu ise MDA tayini ile belirlenmiştir. Kodein ve kodein tuzlarına kronik maruziyetin 15. ve 30. günlerde hem karaciğer hem de böbrekte MT-1 ve MT-2 seviyelerinde anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı tespit edilmiştir. Özellikle karaciğerde kodein sülfat MDA seviyelerini hem 15. gün hem de 30. günde belirgin şekilde arttırmıştır. Böbrekte ise özellikle 15. günde kontrol dışındaki bütün gruplarda MDA seviyelerinde belirgin bir artış olduğu, 30. günde ise MDA seviyelerinin düştüğü gözlemlenmiştir.

2019, 49 SAYFA

ANAHTAR KELİMELER: Kodein, Kodein Sülfat, Kodein Fosfat, Kompetitif ELISA Metallothionein, Malondialdehit, Oksidatif Stres, Lipit Peroksidasyonu.

ABSTRACT

MASTER THESIS

DETERMINATION OF THE EFFECTS OF LONG-TERM EXPOSURE TO CODEINE AND CODEINE SALTS ON METALLOTHIONEIN SYNTHESIS AND LIPID PEROXIDATION

DERYA TEMİR

TOKAT GAZIOSMANPASA UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

DEPARTMENT OF BIOLOGY

SUPERVISOR : ASST. PROF. DR. EMEL CANPOLAT

Codeine is a type of alkaloid found in the capsules of *Papaver Somniferum L.* (poppy) with a rate of 3% after morphine. It is used as analgesic, antitussive and antidiarrheal in medicine. Codeine can be present as codeine pure, and as well as in the forms of codeine salts, which are obtained with the addition of phosphate and sulfate salts. Codeine phosphate or sulfate is more preferred for therapeutic purposes (in the form of oral tablets or parenteral injections), since it is readily soluble in water and is more readily absorbed by the body. The aim of this study was to determine the effects of long-term exposure to pure codeine and codeine salts (codeine phosphate and codeine sulfate) on metallothionein synthesis as a type stress protein and lipid peroxidation. For this purpose, the codeine and codeine salts were injected intraperitoneally (intraperitoneally) into mice at a dose of 10 mg/kg for the first 15 days and 20 mg/kg for the next 15 days. Tissue samples were taken from the mice at day 15 and day 30. The presence of MT protein and lipid peroxidation were determined by competitive ELISA and MDA assay, respectively. It has been found that chronic exposure to codeine and codeine salts did not cause significant changes in MT-1 and MT-2 levels in both liver and kidney. Codeine sulfate significantly increased MDA levels in the liver on both 15th and 30th days. It has also been observed that MDA levels were significantly increased at day 15 in all experimental groups except control group, but decreased on day 30.

2019, 49 PAGES

KEYWORDS: Codeine, Codeine Sulphate, Codeine Phosphate, Competitive ELISA Metallothionein, Malondialdehyde, Oxidative Stress, Lipid Peroxidation

ÖNSÖZ

Bu çalışmanın başlangıcından sonlandırıldığı ana kadar her türlü sorunun aşılmasında bana yardımcı olan, insani ve ahlaki değerleri ile de örnek aldığım, yanında çalışmaktan onur duyduğum ve ayrıca tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırla desteğini esirgemeyen değerli hocam ve tez danışmanım sayın Dr. Öğr. Üyesi Emel CANPOLAT'a,

Çalışmam boyunca laboratuvarlarının tüm imkanlarını kullanmama izin vererek mesleki anlamda tecrübe ve birikim kazanmama yardımcı olan Biyoloji Bölüm Başkanlığına ve Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölüm Başkanlığına, proje süresince vermiş oldukları destek nedeniyle Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu ve çalışanlarına, deney hayvanlarının bakımını üstlenen Gaziosmanpaşa Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Birimi (DETAB) çalışanlarına,

Tezimin uygulama kısmında yardımlarını esirgemeyen çalışma arkadaşım Şeyda KAYA'ya,

Deneysel çalışmalarına ayıracağı vakit konusunda gösterdikleri sabır ve anlayış için başta Hüseyin ER olmak üzere değerli okul idarecilerime ve bu süreçte manevi desteklerini esirgemeyen değerli öğretmen arkadaşlarıma,

Tüm hayatım boyunca en büyük desteği ve sevgiyi vererek bu zorlu süreçte de beni yalnız bırakmayan başta annem Emine TAŞTAN olmak üzere tüm aileme ve değerli eşim Akif TEMİR'e sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

DERYA TEMİR

27 Ağustos 2019

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
ÖNSÖZ	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR	vii
ŞEKİL LİSTESİ	i
ÇİZELGE LİSTESİ	ii
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kodein ve Kodein Tuzları	3
2.1.1. Kodein.....	3
2.1.2.Kodein tuzları.....	6
2.2. Metalloiyonin.....	7
2.2.1. Metalloiyonin protein yapısı	7
2.2.2. Metalloiyoninlerin sınıflandırılması.....	9
2.2.3. MT İzoformlarının genel işlevi	9
2.2.4. Metalloiyonin gen yapısı	9
2.2.5. MT gen ekspresyonu ve regülasyonu	10
2.2.6. Metalloiyoninlerin fonksiyonları.....	12
2.2.7. Metalloiyoninlerin dokulardaki dağılımı	16
2.3. Lipit Peroksidasyonu.....	19
3. MATERYAL ve YÖNTEM	20
3.1. Materyal.....	21
3.1.1. Deney hayvanları.....	21

3.1.2. Haşhaş alkaloitleri	21
3.1.3. Antikorlar	21
3.1.4. Kullanılan kimyasal maddeler	21
3.1.5. Kullanılan deney malzemeleri.....	23
3.1.6. Kullanılan cihazlar	23
3.2. Yöntem	24
3.2.1. Kullanılan solüsyonların hazırlanması	24
3.2.2. Serum örneklerinin elde edilmesi	25
3.2.3. Kodein, kodein sülfat ve kodein fosfatın hazırlanması	25
3.2.4. Enjeksiyonlar.....	26
3.2.5. Dokuların izolasyonu	26
3.2.6. Doku lizatlarının hazırlanması	27
3.2.7. Doku lizatlarında protein miktarının BCA yöntemi ile belirlenmesi	27
3.2.8. MT-UC1MT ELISA	28
3.2.9. Kompetitif ELISA.....	28
3.2.10. Dokularda MDA (Malondialdehit) Tayini	29
3.2.11. İstatistiksel yöntem	30
4. BULGULAR	31
4.1. Kodein Uygulamasının Farelerin Genel Vücut Ağırlıkları Üzerine Etkileri	31
4.2. UC1MT Reaktivitesinin Test Edilmesi	31
4.3. Dokulardaki Toplam Protein Miktarının Tespit Edilmesi.....	32
4.4. Kodein ve Kodein Tuzlarının MT-1 ve MT-2 Seviyeleri Üzerine Etkisi	33
4.4.1. Kodein ve kodein tuzlarının karaciğer MT-1 seviyeleri üzerindeki etkisi	33
4.4.2. Kodein ve kodein tuzlarının karaciğer MT-2 seviyeleri üzerindeki etkisi	33
4.4.3. Kodein ve kodein tuzlarının böbrek MT-1 seviyeleri üzerindeki etkisi	34
4.4.4. Kodein ve kodein tuzlarının böbrek MT-2 seviyeleri üzerindeki etkisi	35
4.5. Kodein ve Kodein Tuzlarının MDA (Malondialdehit) Seviyeleri Üzerine Etkisi	35
4.5.1. Kodein ve kodein tuzlarının karaciğerde MDA seviyeleri üzerine etkisi.....	36
4.5.2. Kodein ve kodein tuzlarının böbrekte MDA seviyeleri üzerine etkisi	37
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	38
6. KAYNAKLAR.....	42

7. ÖZGEÇMİŞ.....49



SİMGELER ve KISALTMALAR

Simge	Açıklama
Ag	Gümüş
Cd	Kadmiyum
Cu	Bakır
Hg	Cıva
Zn	Çinko
g	Gram
kg	Kilogram
L	Litre
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
ng	Nanogram
nm	Nanometre
α	Alfa
β	Beta
μ g	Mikrogram
μ L	Mikrolitre
$^{\circ}$ C	Celcius

Kısaltma	Açıklama
ARE	Antioksidan Tepki Elementi
BSA	Bovine Serum Albümini
BCA	Bicinchoninic Acid Assay
CYP2D6	Sitokrom P450 2D6 Enzimi
CYP3A4	Sitokrom P450 3A4 Enzimi
Cys	Sistein
C ₂ H ₂	Asetilen

DEA	Diethanolamin
GRE	Glukokortikoid Tepki Elementi
GIF	Büyüme Önleyici Faktör
HADYEK	Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
KCl	Potasyum Klorür
KH ₂ PO ₄	Potasyum Dihidrojen Fosfat
MDA	Malondialdehit
MgCl ₂	Magnezyum Klorür
MRE	Metal Tepki Elementi
MT	Metallotiyonin
MTF-1	Metal Transkripsiyon Faktörü-1
NaCl	Sodyum Klorür
Na ₂ CO ₃	Sodyum Karbonat
NaH ₂ PO ₄	Sodyum Dihidrojen Fosfat
NaN ₃	Sodyum Azit
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
PCO	Protein Karbonil
PNPP	Para Nitrofenil Fosfat
Pro	Prolin
RNS	Reaktif Nitrojen Türleri
RPM	Revolutions Per Minute
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
STAT	Transkripsiyon Aktivatörü
TBA	Tiyobarbitürik Asit
TBARS	ThioBarbituricAcidReactiveSubstances
TCA	Trikloroasetik Asit
Tris-HCl	Tris Hidroklorür
UC1MT	Anti-MT Monoklonal Antikoru
UGT2B7	UDP-glukuronosiltransferaz-2B7
UV	Ultraviyole
8-OHG	8-Hidroksiguanin

ŞEKİL LİSTESİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Haşhaş kapsülleri.....	3
Şekil 2.2. Kodeinin kimyasal yapısı.....	4
Şekil 2.3. Kodein metabolizması	5
Şekil 2.4. Kodein sülfatın kimyasal yapısı	6
Şekil 2.5. Kodein fosfatın kimyasal yapısı	6
Şekil 2.6. Metalloitiyonin domain yapısı ve metal bağlama bölgeleri	8
Şekil 2.7. Tüm metalloitiyonin izoformlarının amino asit sekanslarının α ve β domainleri üzerindeki görünümü	8
Şekil 2.8. Metalloitiyonein gen izoformlarının 16. kromozomdaki lokalizasyonları	10
Şekil 2.9. MT-1 ve MT-2 izoformlarının ekspresyonu	11
Şekil 2.10. Oksidatif hasar.....	14
Şekil 2.11. Reaktif oksijen ve nitrojen türleri	15
Şekil 2.12. Kadmiyumun MT ile bağlanması ve plazma, karaciğer, kan hücreleri ve böbrek arasındaki akışın şematik diyagramı	18
Şekil 2.13. Lipit peroksidasyon ürünleri	20
Şekil 2.14. MDA'nın TBA ile reaksiyonu.....	20
Şekil 4.1. UC1MT antikorunun MT-1 ve MT-2 izoformları ile olan reaktivitesi	32
Şekil 4.2. Karaciğer dokularında MT-1 absorbands grafiği	33
Şekil 4.3. Karaciğer dokularında MT-2 absorbands grafiği	34
Şekil 4.4. Böbrek dokularında MT-1 absorbands grafiği.....	34
Şekil 4.5. Böbrek dokularında MT-2 absorbands grafiği.....	35
Şekil 4.6. MDA ve TBA'nın reaksiyonu sonucu oluşan pembe renkli kompleks	36
Şekil 4.7. Karaciğer dokusunda MDA seviyeleri	36
Şekil 4.8. Böbrek dokusunda MDA seviyeleri	37

ÇİZELGE LİSTESİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1. Haşhaştan elde edilen önemli alkaloidler	4
Çizelge 3.1. Deney grupları	26
Çizelge 4.1. Karaciğer ve böbrek dokularının protein konsantrasyonları	32



1. GİRİŞ

Papaver somniferum L. (haşhaş) kapsüllerinde bulunan alkaloidler için yetiştirilen bir kültür bitkisi olup ıslah edilmiş haşhaş bitkisinin kapsüllerinde %1 civarında alkaloid bulunmaktadır (Koç ve ark., 2006). Afyondan (opium) bu güne kadar 44 alkaloid izole edilmiştir (Hosztafi, 1998). Ancak tıp ve eczacılık alanlarında kullanılması nedeniyle araştırmalar morfin, kodein, tebain, noskabin ve papaverin alkaloidleri üzerine yoğunlaşmıştır (Arslan ve ark., 2008).

Morfin etkili bir analjezik olmasına rağmen, bağımlılık yapma özelliği çok fazladır. Kodein diğer adıyla 3-metil morfin, morfinden daha zayıf bir analjezik olup ilk olarak 1832'te Robiquet tarafından opiumdan izole edilmiş ve 1881'de ise Grimaux tarafından morfinin metilasyonu ile hazırlanmıştır (Schiff, 2002). Morfin ile karşılaştırıldığında daha az fiziksel ve psikolojik bağımlılık oluşturma özelliğine sahiptir (Süzer, 2010). Kodein, morfin ile aynı farmakolojik etkilere sahip olmasına rağmen daha az etkilidir. Hafif-orta derecede ağrıların dindirilmesinde bir analjezik (ağrı kesici) olarak ve solunum sisteminin kimyasal veya mekanik tahrişiyle ortaya çıkan öksürüğün giderilmesinde ise bir antitussif (öksürük dindirici) olarak kullanılmaktadır. Kodein, analjezik olarak özellikle aspirin veya parasetamol ile kombinasyon halinde ağızdan uygulanmaktadır (Schiff, 2002). Kodeinin alışkanlık yapma derecesi daha az olmakla beraber, morfin ve eroin alanlar bunları bulamadıklarında kodeine başvurabilmektedir (Aşçıoğlu ve ark., 2013). Kodeinin tıp alanında tedavi amaçlı olarak kullanımı özellikle fosfat ve sülfat tuzları şeklindedir (Arslan ve ark., 2008). Kodein sülfat ve kodein fosfat tuzları pür kodeine sülfat ve fosfat gruplarının eklenmesi ile elde edilmektedir (Pubchem, 2016a; Pubchem, 2016b). Pür kodein suda çözünmediğinden parenteral veya oral olarak tıpta tedavi amaçlı daha çok fosfat veya sülfat tuzları şeklinde kullanılmaktadır (Aşçıoğlu ve ark., 2013).

Opioidlerle ilgili olarak yapılan çalışmaların çoğunda özellikle morfinin etkileri araştırılmıştır. Morfine uzun süre maruz kalan sıçanlarda karaciğer ve böbrekte toksik etkilerin ortaya çıktığı, serum ve karaciğer enzim seviyelerinde belirgin değişiklikler olduğu belirtilmiştir (Jalili ve ark., 2017; Atıcı ve ark., 2005; Salahshoor ve ark., 2018).

Özellikle morfinin beyin, karaciğer ve böbreklerde metalloiyonin seviyelerini belirgin şekilde arttırdığı gözlemlenmiştir (Hidalgo ve ark., 1991; Florianczyk ve Stryjecka-Zimmer, 2001).

Metalloiyonin (MT), ağır metaller başta olmak üzere serbest radikaller (Iszard et al., 1995), glukokortikoidler (Kelly ve ark., 1997), enflamatuar ajanlar ve sitokinler (Leibbrandt ve Koropatnick, 1994), radyasyon (Shirashi ve ark., 1989; Shibuya ve ark., 1995), açlık, aşırı soğuk veya sıcak ve egzersiz gibi stres faktörlerinin (Niioka and Kojima, 1991; Hernandez ve ark., 2000; Kondoh ve ark., 2002) etkisiyle sentezlenen, önemli fizyolojik, immünolojik rolleri olan ve aynı zamanda kuvvetli antioksidan özelliğe sahip bir stres proteindir (Borghesi ve Lynes, 1996). Strese karşı üretilen ve önemli fizyolojik rolleri üstlenen bir stres proteini olmasına rağmen metalloiyoninin özellikle organizmaların hastalıklara karşı savunmasında önemli rolü olan humoral bağışıklık üzerinde baskılayıcı etkilere (immünosüpresif) sahip olduğu belirlenmiştir (Lynes ve ark., 1993, Canpolat ve Lynes, 2001).

Şu ana kadar yapılan bilimsel çalışmalar genellikle morfine kronik olarak maruz kalan organizmalar üzerinde yoğunlaşmıştır. Özellikle tıpta analjezik (ağrı kesici), antitussif (öksürük dindirici) ve antidiyareik (ishal önleyici) özellikleri nedeniyle tedavi amaçlı olarak daha yaygın bir kullanımı olan kodeine uzun süreli maruziyetle ilgili olarak kayda değer bir çalışma yapılmamıştır. Bu çalışmada, pür kodein ve kodeinin tıpta daha yaygın olarak kullanılan formları olan kodein sülfat ve kodein fosfata uzun süreli yani kronik olarak maruz kalınması durumunda organizmalarda strese karşı üretilen ve önemli bir stres proteini olan metalloiyonin sentezi ve oksidatif stres üzerinde meydana gelebilecek değişikliklerin araştırılması amaçlanmıştır. Tedavi amaçlı olarak kullanılan kodein ya da kodein tuzlarına uzun süre maruz kalınması durumunda çok amaçlı fonksiyonlara sahip bir protein olarak MT sentezinin ne ölçüde etkileneceğinin bilinmesi hem kodein hem de MT ile ilgili araştırmalar açısından önem arz etmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kodein ve Kodein Tuzları

2.1.1. Kodein

Afyon tam olgunlaşmamış haşhaş bitkisinin kapsüllerinin çizilmesi ile elde edilmektedir (Süzer, 2010). Afyonun karşılığı opiumdur. Afyon ve benzeri maddelerin tümüne opioid adı verilmektedir (Ögel, 2019). Opioidler merkezi sinir sisteminde bulunan opioid reseptörlerine bağlanarak agonist etki oluşturan maddelerdir (Akyol, 2010). Papaveraceae (Gelincikgiller) familyasından *Papaver somniferum* L. (haşhaş) adı verilen bir bitki türünün kapsüllerinden elde edilmektedir. (Şekil 2.1). Opioidler güçlü anajezik etkilerinden dolayı “narkotik analjezikler” olarak da adlandırılmaktadır. (Kılıç, 2017).



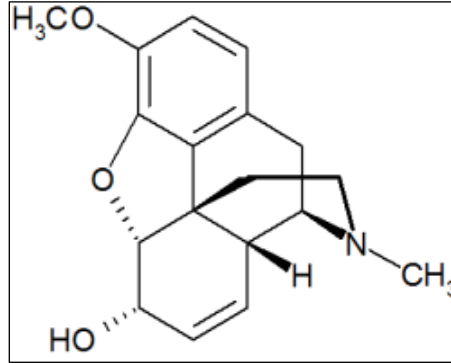
Şekil 2.1. Haşhaş kapsülleri (Anonim, 2015)

Morfin, kodein, tebain, papaverin ve noskapin gibi haşhaş kapsüllerinin içerdiği afyondan elde edilen önemli alkaloid çeşitleridir (Çizelge 2.1). Bu alkaloidlerden morfin, kodein ve tebainin uyuşturucu özellikleri olmakla birlikte noskapin ve papaverinin uyuşturucu özelliği bulunmamaktadır. Bu alkaloidlerden özellikle morfin ve kodeinden tıp alanında analjezik (ağrı kesici), anestezi (uyuşturucu) ve antitüssif (öksürük kesici) olarak faydalanılmaktadır (Anonim, 2018).

Çizelge 2.1. Haşhaştan elde edilen önemli alkaloidler (Önmez, 2007)

Adı	Formülü	Bulan	Tarih
Morfin	C ₁₇ H ₁₉ O ₃ N	Serturmer	1816
Narkotin (noskabin)	C ₂₂ H ₂₃ O ₇ N	Robiquet	1817
Kodein	C ₁₈ H ₂₁ O ₃ N	Robiquet	1832
Narsein	C ₂₃ H ₂₇ O ₈ N	Pelletier	1832
Tebain	C ₁₉ H ₂₁ O ₃ N	Merck	1835
Pseudomorfin	C ₁₇ H ₁₈ O ₃ N	Smiles	1835

Kodein %3'lük bir oran ile haşhaştan morfinden (%8-15) sonra en fazla bulunan alkaloiddir. Kodein (3-metil morfin) haşhaş bitkisinden doğal olarak elde edilebildiği gibi morfinin fenolik hidroksil grubundan metillenmesi ile de hazırlanabilmektedir (Aşçıoğlu ve ark., 2013). Kimyasal olarak 7,8-didehidro-4,5-epoksi-3-metoksi-17-metil morfinan-6-ol monohidrat olarak bilinir, ancak 1:10'luk bir etki oranıyla morfinden daha az etkilidir (Piech ve ark., 2015). Şekil 2.2'de kimyasal yapısı verilen kodeinin kimyasal formülü C₁₈H₂₁NO₃, molekül ağırlığı 299,364 g/mol'dür (Aşçıoğlu ve ark., 2013).

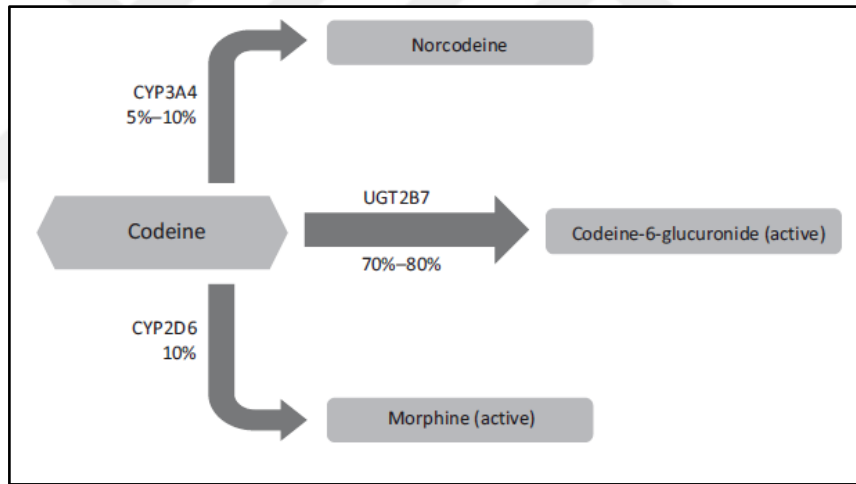


Şekil 2.2. Kodeinin kimyasal yapısı (Aşçıoğlu ve ark., 2013)

Kodein, morfin ve kodein-6-glukuronidin aktif bileşiklerine metabolize olan bir ön ilaç olarak kabul edilir. Hafif ve orta şiddette ağrının tedavisi için geleneksel olarak kullanılır ancak sıklıkla pediatrik kullanım için önerilmektedir. Ayrıca kodein öksürük şurubunda yaygın olarak kullanılmaktadır, ancak kötüye kullanılması durumunda uyuşturucu bağımlılığına neden olmaktadır (Piech ve ark., 2015). Kodein ve türevleri

hafif ve orta şiddette ağrıyı gidermek için kullanılırlar. Kodein beyindeki ve omurilikteki opioid reseptörlerine bağlanarak etki etmektedir (Koleva ve ark., 2007). Kodein esas olarak karaciğerde endoplazmik retikulum enzimleri tarafından metabolize edilir (ANI Pharmaceuticals, 2017). Şekil 2.3'te gösterildiği gibi kodein üç ana yoldan metabolize edilmektedir:

- Kodeinin çoğunluğu (yaklaşık % 70'i) UDP-glukuronosiltransferaz-2B7 (UGT2B7) enzimi tarafından aktif kodein-6-glukuronide metabolize edilir.
- % 5 -10'u sitokrom P450 3A4 (CYP3A4) enzimi tarafından inaktif norcodeine metabolize edilir.
- Kodeinin yaklaşık % 10'u ise sitokrom P450 2D6 (CYP2D6) enzimi tarafından başka bir aktif metabolit olan morfine metabolize edilir (Fortenberry ve ark., 2018).



Şekil 2.3. Kodein metabolizması (Roxane Laboratories, 2013)

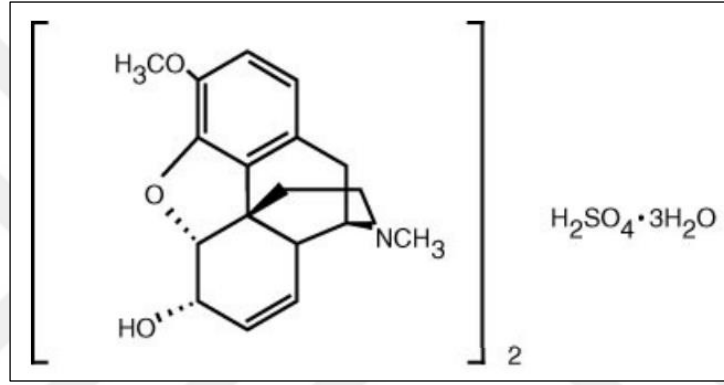
Kodein tıbbi olarak genellikle nonnarkotik analjeziklerle birlikte, ilaç olarak parasetamol (Aferin kapsül, Geralgine K tablet), asetilsalisilik asit (Dolviran tablet) ve nonsteroid antiinflamatuvarlarla (Nurofen Plus) birlikte kombine olarak kullanılabilir. Kodein ayrıca kafein (Dolviran tablet, Pacofen tablet) ve antihistaminikleri de (Aferin kapsül, Apex kapsül, Bronkar-A kapsül) içeren antigripal ilaç kombinasyonlarında da bulunmaktadır (Aşçıoğlu ve ark., 2013).

2.1.2.Kodein tuzları

Pür kodein şeklinde elde edilen kodeine sülfat ve fosfat gruplarının eklenmesi ile kodeinin kodein sülfat ve kodein fosfat şeklindeki formları elde edilmektedir.

Kodein sülfat, analjezik, antidiyareik ve antitussif aktiviteye sahip olan bir fenantren alkaloid ve opioid agonisti olan ve doğal olarak oluşan kodeinin sülfat tuzu şeklindedir.

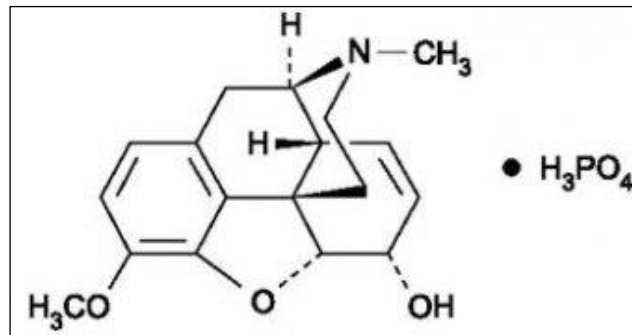
Şekil 2.4'te kimyasal yapısı verilen kodein sülfatın molekül formülü $C_{18}H_{23}NO_7S$ olup molekül ağırlığı 397.4 g/mol'dür (Pubchem, 2016b).



Şekil 2.4. Kodein sülfatın kimyasal yapısı (TAGI Pharma, 2016)

Kodein fosfat, analjezik, antidiyareik ve antitussif aktivitelere sahip olan bir fenantren alkaloid ve opioid agonisti olan ve doğal olarak oluşan kodeinin fosfat tuzu şeklindedir.

Şekil 2.5'te kimyasal yapısı verilen kodein fosfatın molekül formülü $C_{18}H_{24}NO_7P$ olup molekül ağırlığı 397.4 g/mol'dür (Pubchem, 2016a)



Şekil 2.5. Kodein fosfatın kimyasal yapısı (Anonim, 1998)

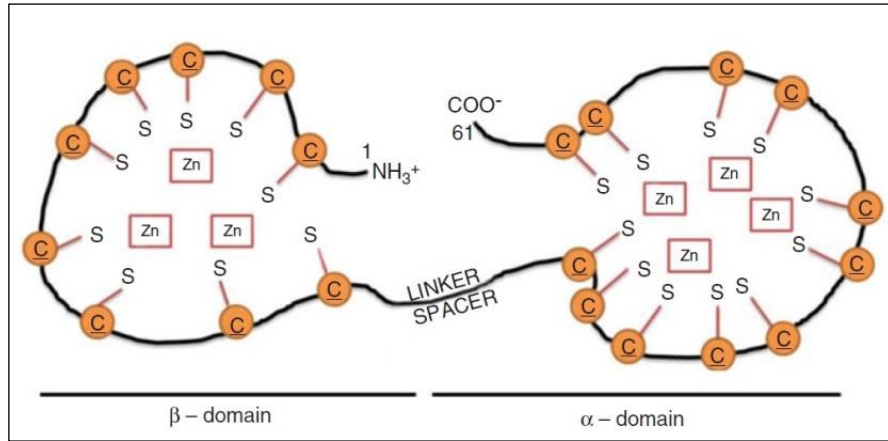
2.2. Metalloiyonin

2.2.1. Metalloiyonin protein yapısı

Metalloiyonin (MT) ilk defa Margoshes ve Vallee tarafından 1957'de at böbreğinde kadmiyum bağlayıcı bir protein olarak keşfedilmiştir (Margoshes ve Valle, 1957). Üç boyutlu protein yapısı, 1990'larda hem X-ışını kristalografisi hem de NMR (Nükleer Manyetik Rezonans) spektroskopisi ile belirlenmiştir (Robbins ve Stout, 1991, Otvos ve Armitage, 1991). Bu proteinler hücre içinde sistince zengin bir protein grubu olup bakteriler, bitkiler, omurgalı ve omurgasızlarda bulunan metal bağlayıcı proteinlerdir (Ruttkey-Nedecky ve ark., 2013). Metalloiyoninler düşük molekül ağırlığına (6-7 kDa) sahiptir ve toplam aminoasit içeriğinin yaklaşık %30'una karşılık gelen 20 sistein molekülünden oluşmaktadır (Bremner ve Beattie, 1990).

Memeli MT'leri 61 ila 68 amino asitten oluşan tek zincirli polipeptitlerdir (Sakulsak, 2012). MT-1, MT-2 ve MT-4 izoformları 61-62 aminoasit içerirken MT-III izoformu 68 aminoasit içerir. Ayrıca memelilerin MT moleküllerinde hiçbir aromatik amino asit bulunmamaktadır. MT molekülünün sistein (Cys) rezidülerinin Cys-X-Cys, Cys-X-X-Cys ve Cys-Cys (X Cys dışındaki aminoasitleri temsil etmektedir) şeklinde düzenlenen tek bir polipeptit zincire sahip olduğu ortaya konulmuştur (Huang ve ark., 1977).

Memeli MT'leri α ve β olmak üzere iki domainden oluşmaktadır. Bu domainlerden β domaini (1-30 arası aminositler) 9 sistein içerirken α domaini (31-61 arası aminoasitler) 11 sistein içermektedir (Borghesi ve Lynes, 1996). Yani memeli MT'leri toplamda 20 sistein içermektedir. Peptitlerin N-terminal kısmı β domaini olarak tanımlanır ve üç divalent metal iyonunu bağlama yeteneğine sahiptir. C-terminal kısım α domaini olarak tanımlanır ve dört divalent metal iyonunu bağlama yeteneğine sahiptir (Şekil 2.6) (Ruttkey-Nedecky ve ark., 2013). Metalloiyoninler 12 tane univalent metal atomu ile reaksiyona girebilirler (Coyle ve ark., 2002).



Şekil 2.6. Metalloitiyonin domain yapısı ve metal bağlama bölgeleri (Dziegiel ve ark., 2016)

Şekil 2.7’de gösterildiği gibi MT-1 ve MT-2 (61-62 aa) izoformları yapısal olarak benzer olup ancak Cys dışındaki bazı amino asitlerdeki farklılıklar nedeniyle toplam yüklerinde farklılıklar gösterirler. MT-3 (68 aa) diğer izoformlarda bulunmayan korunmuş bir motif olan Cys(6)-Pro-Cys-Pro(9) içermektedir (Ghoshal ve Jacob, 2001; Hidalgo ve ark., 2001).

Protein	Aa	1	10	20	30	40	50	60	68
MT-1A	61	MDPNCSCATG	GSCTCTGSK	CKECKCTSCK	KSCCSCPMS	CAKCAQGCIC	KGASEKCSCC	A	
MT-1B	61	MDPNCSCCTG	GSCACAGSCK	CKECKCTSCK	KCCCSCPVG	CAKCAQGCVC	KGSEKCRCC	A	
MT-1E	61	MDPNCSCATG	GSCTCAGSCK	CKECKCTSCK	KSCCSCPVG	CAKCAQGCVC	KGASEKCSCC	A	
MT-1F	61	MDPNCSCAAG	VSCTCAGSCK	CKECKCTSCK	KSCCSCPVG	CSKCAQGCVC	KGASEKCSCC	D	
MT-1G	62	MDPNCSCAAA	GVSCTCASSC	KCKECKTSC	KKSCCSCPV	GCAKCAQGC	CKGASEKCSC	CA	
MT-1H	61	MDPNCSCAAG	GSCACAGSCK	CKKCKCTSCK	KSCCSCPVG	CAKCAQGCIC	KGASEKCSCC	A	
MT-1X	61	MDPNCSCSPV	GSCACAGSCK	CKECKCTSCK	KSCCSCPVG	CAKCAQGCIC	KGTSKDCSCC	A	
MT-2A	61	MDPNCSCAAG	DSCTCAGSCK	CKECKCTSCK	KSCCSCPVG	CAKCAQGCIC	KGASDKSCC	A	
MT-3	68	MDPETCPQPS	GGSCTCADSC	KCEGCKTSC	KKSCCSCP	ECEKCAKDCV	CKGGEEAAEAE	AEKSCCQ	
MT-4	62	MDPRECVCMS	GGICMCGDNC	KCTTCNCKTY	WKSCCPCPP	GCAKARGCI	CKGGSDKCSC	CP	
		β-domain				α-domain			

Şekil 2.7. Tüm metalloitiyonin izoformlarının amino asit sekanslarının α ve β domainleri üzerindeki görünümü (Dziegiel ve ark., 2016)

Proteinin metal iyonları bağlı olmayan kısmına apo metalloitiyonin (apo-MT) veya tiyonin adı verilmektedir. Organizmada doğal olarak oluşan çinko iyonları, apo-MT'nin ana bağlayıcı ortağı olarak kabul edilmektedir. Ayrıca organizmada patolojik olarak meydana gelen diğer esansiyel olmayan metal iyonları (kurşun, bakır, kadmiyum, cıva, platin, kromat, bizmut ve gümüş gibi) apo-MT bağlama bölgelerine daha fazla yakınlık göstermektedir (Dziegiel ve ark., 2016). Şimdiye kadar, sadece demir iyonlarının apo-

MT alanlarının metal bağlama bölgelerine daha düşük afiniteye sahip olduğu tespit edilmiştir (Foster ve Robinson, 2011). Sıçan dokularında, apo-MT'nin toplam MT miktarının % 54'ünü oluşturduğu, buna karşın sıçan kanser hücrelerinde ise daha yüksek apo-MT seviyeleri tespit edilmiştir (Yang ve ark., 2001).

2.2.2. Metalloiyonların sınıflandırılması

Metalloiyonların izoformları molekül ağırlıkları, metal bağlama özellikleri, ve buldukları doku tipleri göz önünde bulundurularak sınıflandırılmaktadır (Cherian ve ark., 2003). Metalloiyonunun 4 farklı izoformu tanımlanmıştır: MT-1, MT-2, MT-3 ve MT-4. MT-1 ve MT-2 tüm doku tiplerinde bulunan başlıca iki izoformdur. MT-3 ve MT-4 ise belirli dokular ile sınırlı küçük izoformları olarak tanımlanmaktadır. MT-3 proteini ilk olarak beyin nöronlarından büyümeyi önleyici bir faktör (GIF) olarak izole edilmiştir bunun dışında MT-3 kalp, böbrekler ve üreme organlarında da ifade edilmektedir. MT-4 proteini ise çok tabakalı epitelde bulunmakla birlikte oral epitel, özofagus, abdomen, ayak tabanı ve yenidoğan derisinde de tespit edilmiştir (Uchida ve ark., 1991, Quaipe ve ark., 1994, Moffatt ve Seguin, 1998)

2.2.3. MT izoformlarının genel işlevi

Vücuttaki tüm hücrelerde bulunan MT-1 ve MT-2 bakır ve çinko düzenler, hücre transkripsiyonuna katılır, ağır metalleri detoksifiye eder ve bağışıklık fonksiyonlarında rol oynar. Beyinde büyüme önleyici faktör (GIF) olarak işlev gören MT-3, aynı zamanda beyin hücrelerinin gelişimi, organizasyonu ve programlanmış hücre ölümünde büyük rol oynamaktadır. MT-IV ciltte ve üst gastroisntestinal sistemde bulunmaktadır. Mide asidinin pH' ını düzenlemeye yardımcı olmaktadır (Thirumoorthy ve ark., 2011).

2.2.4. Metalloiyon gen yapısı

İnsanlarda 16q13 kromozomu üzerinde bulunan MT proteinleri en az 10 tanımlanmış fonksiyonel gen içerebilen bir gen ailesi tarafından kodlanır (Şekil 2.8.) (Cherian ve ark., 2003).



Şekil 2.8. Metallothionein gen izoformlarının 16. kromozomdaki lokalizasyonları (Mergen, 2008)

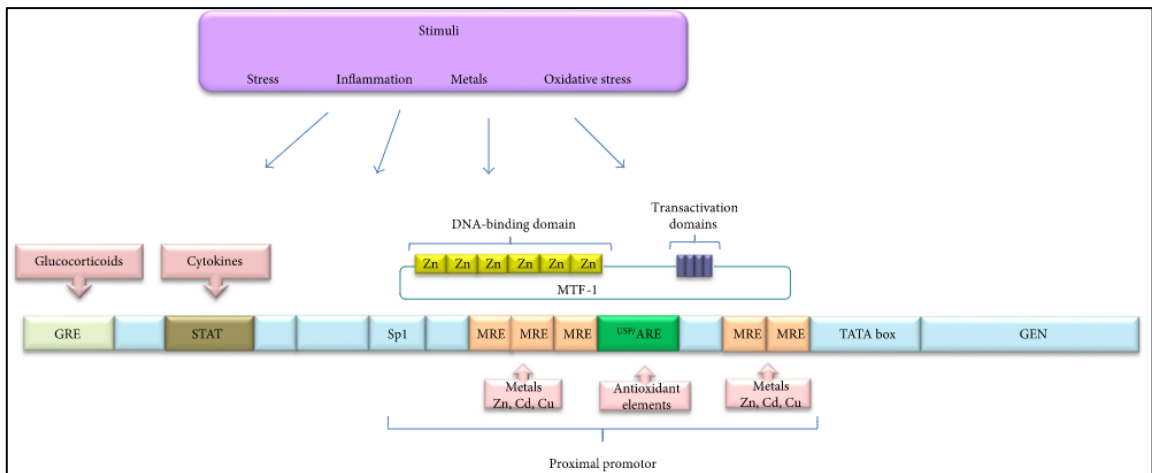
MT-II, MT-III ve MT-IV proteinleri tek bir gen tarafından kodlanmış olup MT-I proteini bir dizi MT-I geni tarafından kodlanan birçok alt tip içermektedir. Bilinen fonksiyonel MT-I ve MT-II izoformları MT-IA, -IB, -IE, -IF, -IG, -IH, -IX ve -IIA'dır (Takahashi, 2012). İnsanlarda MT-II izoform geni (MT-IIA) toplam MT gen ifadesinin neredeyse %50'sini oluşturan gendir. Ayrıca bu dört izoformun tamamı plasentada da ifade edilmektedir (Klassen ve ark., 1999). MT-1C, MT-1D, MT-1I, MT-1J, MT-1K, MT-1L ve MT-2B ise insanlarda pseudogen olarak kabul edilir, çünkü şimdiye kadar karşılık gelen proteinler tanımlanmamıştır (Dziegel ve ark., 2016).

Farelerde 8. kromozom üzerinde her izoform için spesifik 4 fonksiyonel MT geni (MT-I, MT-II, MT-III ve MT-IV) içermektedir (Palmiter ve ark., 1992; West ve ark., 2008).

2.2.5. MT gen ekspresyonu ve regülasyonu

MT geni ekspresyonu, ağır metaller, hormonlar, sitokinler, büyüme faktörleri, organik bileşikler ve serbest radikalleri içeren çeşitli faktörler tarafından indüklenmektedir. (Gomulkiewicz ve ark., 2010). Bu faktörler MT-I ve MT-II gen ekspresyonunu koordineli olarak indüklerken, diğer iki MT geni (MT-III ve MT-IV) bu indükleyicilere karşı tepkisizdir (Vasak, 2005). MT gen ekspresyonu transkripsiyon düzeyinde kontrol edilmektedir. MT-I ve MT-II transkripsiyonu, metale duyarlı bir metal transkripsiyon faktörü-1 (MTF-1) ile düzenlenmektedir. MT-I ve MT-II genlerinin 5' ucu, bir TATA kutusu (çekirdek destekleyici element) ve sayısız cis-etkili tepki elemanı (destekleyici proksimal elemanlar) içermektedir. Bu cis etkili tepki elementleri metal tepki elementleri (MRE'ler), glukokortikoid tepki elementleri (GRE) ve antioksidan tepki elementlerinden (ARE) oluşmaktadır. Metallothioneinlerin metal ile indüklenmiş sentezine, tüm memeli MT genlerinin promotör bölgesinde bulunan korunmuş bir

konsensüs dizisine (TGCRNC) sahip cis-etkin DNA dizileri olan Metal Tepki Elemanları (MRE) aracılık eder. MRE'ler, MT genlerinin bazal ekspresyonunda yer alan çeşitli transkripsiyon faktörleri için bağlayıcı bölgelerdir. Bu faktörler arasında, altı çinko parmağından oluşan çinkoya duyarlı bir transkripsiyon faktörü olan Metal transkripsiyon Faktörü-1 (MTF-1), MT-1 ve MT-2 genlerinin kurucu ve uyarılmış ifadesi için esastır (Ghoshal ve Jacob, 2001). MT-1 ve MT-2 genlerinin ekspresyonu genin düzenleyici bölgesinde bulunan iki önemli element aracılığıyla gerçekleşmektedir (Klassen ve ark., 1999; Andrews ve ark., 2001; West ve ark., 2008) Her iki elemente metal transkripsiyon faktörü (MTF-1), glukokortikoid duyarlı elementler (GRE), sinyal transdüseri ve transkripsiyon aktivatörü (STAT) aracılık etmektedir. MT geninin ekspresyonu zinc finger (çinko parmak) vasıtasıyla proksimal MRE promotorlarına bağlanan metalloregülasyon protein olan zinc finger transkripsiyon faktörü MTF-1 tarafından önemli ölçüde düzenlenir (Şekil 2.9) (Andrews ve ark., 2001; Kimura ve Kambe, 2016). Daha önce yapılan çalışmalarda, altı farklı parmak arasındaki bağlayıcıların, sitoplazmadan çekirdeğe MTF-1 translokasyonunun modüle edilmesine aktif olarak katıldığı ve bunun MT-I geninin promotörüne bağlandığı ve Zn'nin MTF-1'i aktive eden tek bilinen metal olduğu tespit edilmiş ayrıca bu faktörün oksidatif stres ile aktive edilebileceği de görülmüştür (Dalton ve ark., 1996; Andrews ve ark., 2001; Stankovic ve ark., 2007).



Şekil 2.9. MT-1 ve MT-2 izoformlarının ekspresyonu (Anonim, 2017).

Metal iyonları özellikle de organizmada doğal olarak bulunan çinko iyonları MT-I ve MT-II gen ekspresyonunun en güçlü indükleyicileridir. MT-I ve MT-II genlerinin promotor bölgesinde bulunan altı çinko parmak C₂H₂ domaini vasıtası ile DNA ile etkileşime giren metal MTF-1'e bağlanır. Bu bağlanma daha sonra gen transkripsiyonunun başlamasına neden olur (Langmade ve ark., 2000; Otsukave ark., 2000; Saydam ve ark., 2002). Toksikolojik çalışmalarda çinko dışında kadmiyum, cıva gibi metal iyonlarına maruz kalınmasının karaciğer, böbrek ve bağırsaklarda MT-I ve MT-II ekspresyonunun artışına neden olduğu gösterilmiştir (Vasak ve Meloni, 2011). Esansiyel olmayan metal iyonları MTF-1' i aktive edemez fakat MT-1 ve MT-2 proteinlerine daha yüksek afiniteleri nedeniyle çinko iyonlarını MT-1 ve MT-2 proteinlerinden uzaklaştırarak hücre içi (intraselüler) serbest çinko seviyelerini artırabilirler. Daha sonra serbest çinko iyonlarının MTF-1'e bağlanması ile MT-I ve MT-II gen transkripsiyonunun aktivasyonu gerçekleşmektedir (Koizumi ve ark., 1999; Murata ve ark., 1999)

Çeşitli faktörler ve koşullar tarafından indüklenen oksidatif stresin MRE'yi içeren mekanizmadan bağımsız olarak MT ekspresyonunu artırdığı gösterilmiştir (Vasak ve Meloni, 2011; Babula ve ark. 2012). Hidrojen peroksit gibi serbest radikallerin çeşitli faktörler ile üretilmesi MT molekülünün oksidasyonu ve ardından bağlı çinko iyonlarının serbest bırakılması MTF-1'in aktivasyonuna yol açmaktadır (Andrews, 2000; Nguyen ve ark., 2003).

MT ekspresyonu ayrıca serbest radikallere ve iyonlaştırıcı radyasyona cevap olarak da düzenlenir, bununla birlikte indüksiyon sekonder olaylara aracılık eder. Örneğin, X-ışınlarının karaciğerde MT'yi artırdığı gösterilmiştir (Shiraishi ve ark, 1986).

2.2.6. Metallotiyoninlerin fonksiyonları

Yapılan çalışmalar 61 aminoasite sahip bu olağandışı proteinlerin hem temel metallere (çinko ve bakır) hem de toksik metallere (kadmiyum ve cıva) bağlanabileceğini ortaya koymuştur. Zengin tiyol içeriğinden dolayı, MT'ler çinko, kadmiyum, cıva, platin ve gümüş gibi bir miktar iz metalini bağlayarak hücreleri ve dokuları ağır metal

toksitesine karşı korumaktadır (Takahashi, 2012). Bu protein, vücutta cıva ve kadmiyum gibi ağır metallerin detoksifikasyonu, bakır ve çinko gibi esansiyel metallerin homeostazı, reaktif oksijen türlerine karşı antioksidasyon, DNA hasarına karşı koruma gibi rollere sahiptir.

Genel olarak MT'nin üç temel işlevi modüle ettiği bilinmektedir:

- 1) Hidroksil radikali veya nitrik oksit gibi gaz halinde mediatörlerin salınımı,
 - 2) Apoptozis,
 - 3) Çinko, kadmiyum veya bakır gibi ağır metallerin bağlanması ve değişimi
- (Thirumoorthy, 2011).

MT ve Metaller

Metallotiyoninler Cd, Cu, Hg ve Ag gibi çeşitli ağır metalleri bağlama kabiliyeti nedeniyle hücrel detoksifikasyon aracı olarak kabul edilirler (Ghoshal ve Jacob, 2001). *İn vivo* ve *in vitro* çalışmalar, ağır metallerle maruziyetin (diyet veya çevre) özellikle karaciğerde MT-1 ve MT-2 seviyelerinin yükselmesine neden olduğunu göstermiştir. MT-1 ve MT-2 nakavt farelerde metallerle benzer şekilde maruz kalma metal toksitesine yol açarken, MT-1 ve MT-2'nin overekspresyonu olan fareler ise toksiteye karşı nispeten korunmuştur (Coyle ve ark., 2002).

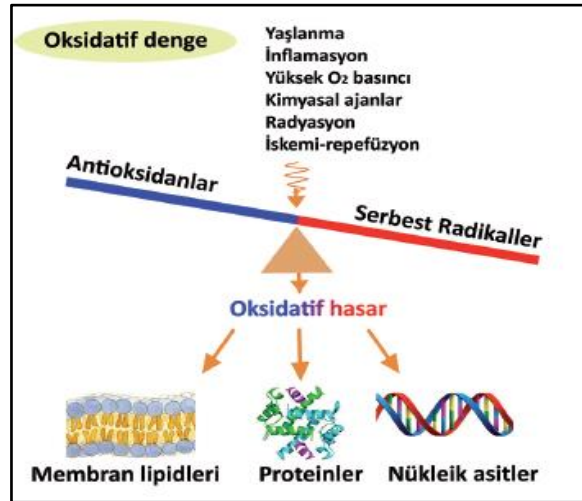
Metallotiyoninler biyolojik olarak Zn^{2+} ve Cu^{+} gibi metallerle bağlanmaları nedeniyle metal homeostazında önemli bir rol oynarlar. Ayrıca, bu biyometaller için bir rezervuar görevi görerek bu iyonların biyolojik etkinlikleri için çinko gerektiren hücrel makromoleküllere geri dönüşümlü transferini de kolaylaştırırlar. Metallotiyoninler, transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunu veya inhibisyonunu modifiye eden bir çinko donörü (MT) veya bir çinko alıcısı (apothionein) olarak hareket edebilir. Transkripsiyon faktörlerinin MT ile geri dönüşümlü aktivasyonu, çinko parmak proteinleri için spesifiktir (Ghoshal ve Jacob, 2001).

Çeşitli organ ve dokularda ve birçok hücre tipinde eksprese edilen MT-1 ve MT-2 izoformları, çinko metabolizması ile ilgili olarak da kapsamlı olarak araştırılmıştır. MT-1 ve MT-2 hücre çinko homeostazını korumak amacıyla ve çinkoyu bağlayarak

hücre içi çinko konsantrasyonunu azaltarak ağır metal kaynaklı sitotoksisteyi hafifletmektedir (Kimura ve Kambe, 2016)

MT ve Oksidatif Stres

Serbest radikaller dış atomik orbitalinde bir ya da birden fazla eşlenmemiş elektron içeren, yüksek enerjili moleküllerdir (Karabulut ve Gülay, 2016). Metaller tarafından katalizlenen reaksiyonların yan ürünleri olan serbest radikaller UV ışınımı, X-ışını veya gama ışınması ve iltihaplanma sırasında nötrofiller ve makrofajlar tarafından üretilebildikleri gibi, mitokondriyal solunum zincirinin de yan ürünleri olarak ortaya çıkmaktadır (Cadenas, 1989). Serbest radikaller inflamatuvar ve immune reaksiyonlarda faydalı olmasına karşın fazla miktarda üretildiklerinde oksidatif strese yol açarak hücresel yapılara zarar vermektedir (Poli ve ark., 2004; Valko ve ark., 2006). Oksidatif stres, biyolojik sistemlerde hücresel metabolizma sonucunda oluşan serbest radikallerin artışı ile bunlara karşı üretilen antioksidanlar arasındaki dengenin bozulması sonucunda ortaya çıkmaktadır (Şekil 2.10).



Şekil 2.10. Oksidatif hasar (Özcan ve ark, 2015)

Oksidatif hasar varlığı Malondialdehit (MDA), 8-hidroksiguanin (8-OHG), protein karbonil (PCO) gibi ürünlerin dokularda ve vücut sıvılarında biyokimyasal yöntemlerle ölçülmesi ile tespit edilmektedir (Özcan ve ark., 2015). Bu çalışma kapsamında kodein ve kodein tuzlarına uzun süreli maruziyetin MDA seviyeleri üzerindeki etkilerine de

bakılmıştır. MDA ve lipid peroksidasyonu ile ilgili olarak ilerleyen kısımda detaylı bilgi verilmiştir.

MT-1 ve MT-2'nin ROS (Reaktif oksijen türleri) ve RNS (Reaktif nitrojen türleri) gibi serbest radikallerin etkisinden dolayı ortaya çıkan oksidatif stresin etkilerinin azaltılmasında önemli rollerinin olduğu belirtilmiştir (Valko ve ark., 2006). Aerobik organizmalarda ROS ve RNS en önemli serbest radikallerdir (Şekil 2.11.) (Valko ve ark., 2004; Pacher ve ark., 2007).

Reaktif Oksijen Türleri (ROS)	
Radicals:	Non-Radicals:
$O_2^{\cdot-}$ Superoxide	H_2O_2 Hydrogen peroxide
OH^{\cdot} Hydroxyl	$HOCl^{\cdot}$ Hypochlorous acid
RO_2^{\cdot} Peroxyl	O_3 Ozone
RO^{\cdot} Alkoxyl	1O_2 Singlet oxygen
HO_2^{\cdot} Hydroperoxyl	$ONOO^{\cdot}$ Peroxynitrite

Reaktif Nitrojen Türleri (RNS)	
Radicals:	Non-Radicals:
NO^{\cdot} Nitric Oxide	$ONOO^{\cdot}$ Peroxynitrite
NO_2^{\cdot} Nitrogen dioxide	$ROONO$ Alkyl peroxyntrites
	N_2O_3 Dinitrogen trioxide
	N_2O_4 Dinitrogen tetroxide
	HNO_2 Nitrous acid
	NO_2^+ Nitronium anion
	$NO^{\cdot-}$ Nitroxyl anion
	NO^+ Nitrosyl cation
	NO_2Cl Nitryl chloride

Şekil 2.11. Reaktif oksijen ve nitrojen türleri (Collins, 1999)

ROS üreten oksidatif stres indükleyici ajanlar, MT'ler ile kimyasal olarak reaksiyona girmekte ve transkripsiyon seviyesinde hızlı bir şekilde MT genlerini indüklemektedir (Ghoshal ve Jacob, 2001). MT-1 ve MT-2 ekspresyonunun serbest radikaller ile gözlenen indüksiyonu, bu proteinlerin hücreleri oksidatif strese karşı koruyabileceği düşüncesine yol açmıştır (Andrews, 2000; Nguyen ve ark., 2003). MT moleküllerinde nükleofilik özelliklere sahip çok sayıda tiyolik grubun bulunması, onların yalnızca metalik katyonları değil aynı zamanda reaktif oksijen türlerini ve organik radikalleri de bağlamasına neden olmaktadır. MT sentezinin indüksiyonu, alkilize edici ajanların veya

serbest radikallerin metalik ortamında bir artış ile ilişkilidir. Bu, metalotiyoninlerin hücreyi öldürücü bileşiklerden korumasının yoludur (Campagne ve ark, 2000).

MT ve Apoptozis

Apoptozis veya programlanmış hücre ölümü, ömrünü tamamlamış veya hasar görmüş hücreleri ortadan kaldıran bir mekanizmadır (Chaabane ve ark., 2013). Apoptozis patolojik süreçlerin yanı sıra çok sayıda fizyolojik süreçlerde de önemli bir rol oynamaktadır. Normal koşullar altında, gereksiz hücreler normal işleyişe izin verecek şekilde dokulardan elimine edilir. Bu sürecin anormallikleri ve inhibisyonu, özellikle otoimmün veya neoplastik bozukluklar olmak üzere birçok hastalığın gelişmesine yol açabilir (Khan ve ark., 2014). Apoptozisin ROS ve çinko iyonları aracılığıyla modüle edildiği gösterilmiştir (Formigari ve ark., 2007). Bu esansiyel metal iyonu ayrıca ökaryotik hücrelerde, çeşitli enzimlerin ve transkripsiyon faktörlerinin aktivitesini düzenleyerek, farklılaşma, hücre büyümesi ve apoptozis gibi önemli süreçlerde etkili olmaktadır. (MacDonald, 2000). MT-1 ve MT-2'nin serbest radikal temizleme ve metal bağlama özellikleri nedeniyle apoptozise güçlü bir şekilde etki ettiği gösterilmiştir (Coyle ve ark., 2002; McGee ve ark., 2010). Hücre tipine bağlı olarak, MT-1 ve MT-2 DNA'yı UV kaynaklı hasarlardan koruyabilmektedir. Bunun yanı sıra kanser hücrelerinde yüksek MT-1 ve MT-2 ekspresyonunun kemoterapi ve radyoterapiden koruduğu gösterilmiştir. Apoptozisin ana düzenleyicilerinden biri p53 proteindir. Birçok çalışmada p53 ifadesinin çinko iyon konsantrasyonuna ve ROS seviyelerine bağlı olduğu da belirtilmiştir (Meplan ve ark., 2000; Fan ve Cherian 2002; Ostrakhovitch ve Cherian 2004).

2.2.7. Metalotiyoninlerin dokulardaki dağılımı

Metalotiyonin proteini vücutta karaciğer, böbrek, pankreas ve bağırsak gibi dokularda bulunmaktadır (Minami ve ark., 1999). MT sentezinin baskın bölgesi karaciğerdir, ancak lenfositler ve lenfoid dokular dahil olmak üzere hepatik olmayan hücrelerin çoğu MT sentezleme kabiliyetine sahiptir (Borghesi ve Lynes, 1996). MT-1 ve MT-2 vücutta daha çok karaciğer, böbrek, pankreas ve bağırsak gibi dokularda yaygın olarak

bulunurken MT-3 esas olarak beyinde MT-4 ise daha çok çok katlı epitel dokuda bol miktarda bulunmaktadır (Minami ve ark., 1999; Vasak, 2005). Karaciğer, böbrek, bağırsak ve pankreas dahil birçok dokuda MT'lerin ağır metallerle uyarıldığı gösterilmiştir.

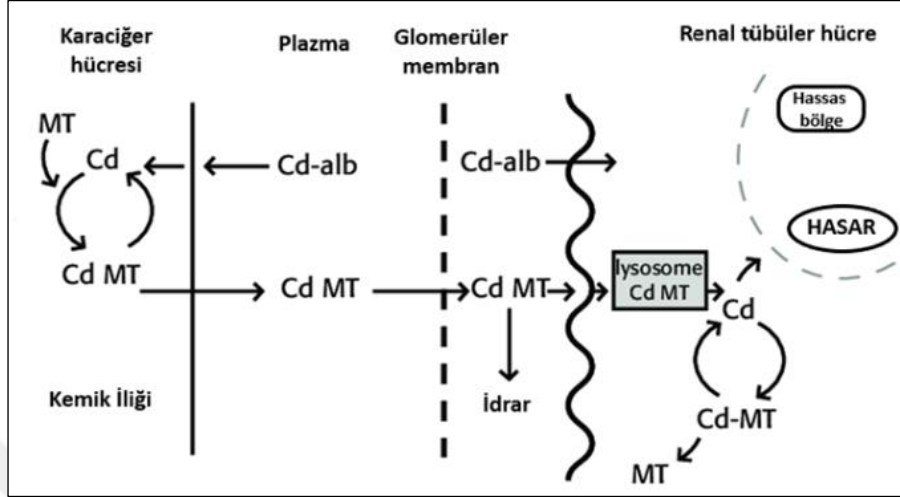
Karaciğerde MT

MT'lerin ekspresyonu, fiziksel stres, kimyasal stres ve endojen faktörler gibi birçok faktör tarafından indüklenmektedir (Babula ve ark., 2012). Metalloprotein sentezini indükleyen metaller farklı organları farklı etkileyebilmektedir. Zn pankreasta, Cd ise akut olarak karaciğerde kronik olarak ise böbrekte metalloprotein sentezini uyarır. Antioksidanlar, α -tokoferoller ve glutatyonun karaciğer savunmasında önemli rolleri bulunmaktadır. Potansiyel bir antioksidan olan metalloprotein ise karaciğer epitel hücrelerinin korunmasını sağlamaktadır (Zhou ve ark., 2002). Karaciğerde metalloprotein sentezi metaller, sitokinler, hormonlar ve stres gibi etmenlere bağlı olarak artmaktadır (Coyle ve ark., 2002). Memelilerde MT-1 ve MT-2 izoformları karaciğerde, metaller, ilaçlar ve enflamatuar mediatörler tarafından hızla uyarılmaktadır (Vasak, 2005). Metalloproteinler ayrıca oksidantların zararlı etkilerini yok ederek lipid peroksidasyonu ve oksidatif stres nedeniyle ortaya çıkan fonksiyonel bozuklukları da önlemektedir (Zhou ve ark., 2002).

Böbrekte MT

Ağır metal kadmiyumun (Cd) yaygın bir çevresel kirletici olduğu ve insan sağlığını olumsuz yönde etkileyebilecek potansiyel bir toksin olduğu bilinmektedir. Maruz kalma büyük ölçüde solunum veya gastrointestinal yollar ile gerçekleşmektedir. Böbrek, kronik Cd maruziyeti ve toksisitesinden etkilenen ana organdır. Cd, böbrek içinde, renal proksimal tübüldeki serbestçe filtrelenmiş ve metalloproteinine bağlı Cd'un (Cd-MT) reseptör aracılı endositozuyla tercihli alınımının bir sonucu olarak böbreklerde birikmektedir. İçselleştirilmiş Cd-MT endozomlarda ve lizozomlarda parçalanarak serbest Cd'yi sitozolde serbest bırakılmaktadır (Şekil 2.12). Böylelikle reaktif oksijen

türleri üretebilmekte ve hücre ölüm yollarını aktive edebilmektedir (Johri ve ark., 2010).



Şekil 2.12. Kadmiyumun MT ile bağlanması ve plazma, karaciğer, kan hücreleri ve böbrek arasındaki akışın şematik diyagramı (Duffus, 2006)

Bağırsaklarda MT

Bağırsaklarda metallothiyonin proteini Zn'nin emilimi ve salınımını düzenlemektedir. Bağırsaklardan çinko salınımının büyük miktarda azalmasına, karaciğerde çinkonun tutulmasına, vücuttan çinko kaybının önlenmesine ve alımının artmasına neden olmaktadır (Philcox ve ark., 2000). Zn'nin yüksek konsantrasyonları ve açlık durumu bağırsak epitel hücrelerinde MT ekspresyonunu uyarmakta ve Zn'nin emilimini azaltmaktadır.(Coyle ve ark., 2002).

Pankreasta MT

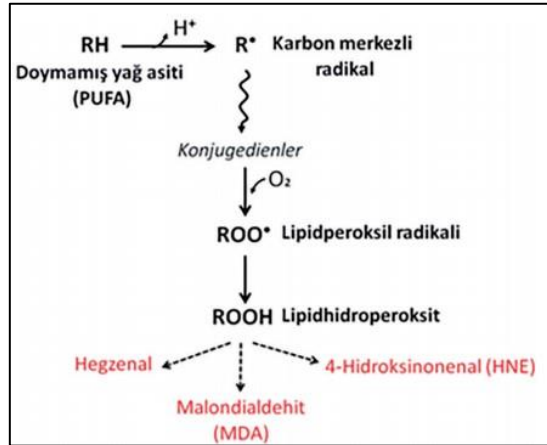
Pankreasta sentezlenen MT'ler çinko tuzlarına bağlı olarak bulunmaktadır (Ohly ve ark., 2000). Pankreasta MT seviyelerinin yükselmesi, bu proteinin Zn salgılanmasının düzenlenmesinde rol oynadığını göstermektedir. Pankreas ve karaciğerin, Zn kaynaklı MT sentezine en duyarlı organlar da olduğu gösterilmiştir. Ayrıca sitokinler ve endotoksin pankreasta etkili MT indükleyicileridir (Coyle ve ark., 2002). Zn langerhans adacıklarındaki hücrelerin gerçekleştirdiği yaşamsal faaliyetler için gerekli olup

pankreasista bulunan beta hücreleri çok miktarda çinko içermektedir. Zn pankreasın langerhans adacıklarında bulunan beta hücrelerinden salgılanan insülinin salgılanması, depolanması ve biyosentezinde önemli rol oynamaktadır. Aşırı Zn alınımı bu adacıklarda MT sentezini artırarak beta hücrelerinde fonksiyonel bozukluklar oluşmasını engellemektedir (Kim ve ark., 2000)

2.3. Lipit Peroksidasyonu

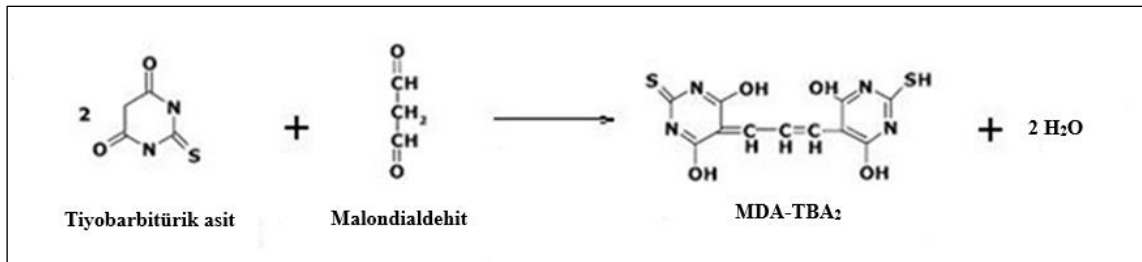
Memeli hücre membranlarında bulunan poliansatüre yağ asitlerinin (çoklu doymamış yağ asitleri) serbest oksijen radikaller ile reaksiyona girmesi sonucu peroksitler, alkoller, aldehitler, hidroksi yağ asitleri, etan, pentan, malondialdehit (MDA) gibi çeşitli ürünlere yıkılması olayına lipit peroksidasyonu denir (Büyüksulu ve Yiğitbaşı, 2015). Lipid peroksitlerinin miktarlarının artması sonucunda hücre zarının akışkanlığının azalmasına bağlı olarak hücre fonksiyonlarında bozukluklar meydana gelmektedir.

Lipit peroksidasyonu, kuvvetli yükseltgen bir radikalın, zar yapısında bulunan poliansatüre yağ asidi zincirindeki alfa metilen gruplarından bir hidrojen atomu uzaklaştırılması ve bunun sonucunda yağ asit zincirinin radikal nitelik kazanması ile başlamaktadır. Daha sonra dayanıksız bir bileşik olan lipit radikalinden, önce lipit konjugedien molekülü, daha sonra da moleküler oksijenin bağlanmasıyla lipit peroksid radikali oluşmaktadır. Lipit peroksid radikali ise, ya başka bir lipit molekülü ile etkileşime girerek lipit hidroperoksid molekülü oluşturmakta, ya da lipit endoperokside dönüşmektedir. Oluşan lipit peroksid radikalleri, zar yapısındaki diğer çoklu doymamış yağ asitlerini etkileyerek yeni lipit radikallerinin oluşumunu sağlamaktadır (Yina ve ark., 2009). Lipit peroksidasyon reaksiyonları sonucunda oluşan lipit peroksitleri (lipit peroksit, siklik peroksit ve siklik endoperoksit) sonuçta sekonder veya son ürünler olan Malondialdehit (MDA), 4-Hidroksinonenal (HNE) ve hegzanal isimli aldehitlere dönüşmektedir (Şekil 2.13) (Kanner ve ark., 1987; Esterbauer ve ark., 1991).



Şekil 2.13. Lipit peroksidasyon ürünleri (Özcan ve ark., 2015)

Lipit peroksidasyonu ürünlerinin en önemlisi olan MDA hücre içindeki çeşitli bileşikler ile tepkimeye girerek hücrede hasar oluşturmaktadır (Büyüksulu ve Yiğitbaşı, 2015). Ayrıca MDA, membran komponentlerinin çapraz bağlanma ve polimerizasyonuna neden olarak, membranlarda reseptörleri ve membrana bağlı enzimleri etkisiz hale getirmek suretiyle membran proteinlerinde de ciddi hasarlar meydana getirebilmektedir (Goulart ve ark., 2005). Lipit peroksidasyonunu belirlemek amacıyla dokularda lipit peroksidasyonunun yan ürünlerinden biri olan MDA seviyelerinin tayini yapılmaktadır. MDA tayini MDA'nın TBA(tiyobarbitürik asit) ile reaksiyona girmesi (Şekil 2.14) sonucu oluşan pembe renkli kompleksin 532 nm'de absorbasının ölçülmesi ile yapılmaktadır (Eken, 2019).



Şekil 2.14. MDA'nın TBA ile reaksiyonu (Jetawattana, 2005)

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Deney hayvanları

Bu çalışmada toplam 48 adet 25-30 g ağırlığında 8-12 haftalık inbred BALB/c cinsi erkek fareler kullanıldı. Fareler Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda üretilmiş ve oda sıcaklığının 21°C olduğu ve 12 saat aydınlık/karanlık siklusunun sağlandığı odalarda barındırıldı. Deneyde kullanılacak hayvanlar her grupta aynı yaşta ve aynı ağırlıkta 6 tane fare olacak şekilde 4 farklı gruba ayrılmış ve kafesteki fareleri birbirinden ayırt etmek için fare numaralandırma sistemine göre farelerin kulakları delindi. Deney hayvanları üzerinde gerçekleştirilecek olan bütün işlemler için Gaziosmanpaşa Üniversitesi Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurulu'ndan (HADYEK) gerekli izinler alındı.

3.1.2. Haşhaş alkaloitleri

Çalışmamızda kullanılan pür kodein, kodein sülfat ve kodein fosfat Sağlık Bakanlığı İlaç ve Eczacılık Genel Müdürlüğü'nün özel izni ve Toprak Mahsülleri Ofisi'nin aracılığı ile Afyon Bolvadin'deki Haşhaş Alkaloitleri Fabrikası'ndan satın alındı.

3.1.3. Antikorlar

Kompetitif ELISA deneylerinde primer antikor olarak UC1MT antikorunu (Enzo Life Sciences) (anti-MT monoklonal antikorunu) ve sekonder antikor olarak da alkalen fosfataz ile konjuge edilmiş goat anti- Mouse Ig antikorunu (Southern Biotechnology) kullanıldı.

3.1.4. Kullanılan kimyasal maddeler

Kullanılan Kimyasal Madde	Firma
NaCl (sodyum klorür)	Merck
KCl (potasyum klorür)	Merck
NaH ₂ PO ₄ (sodyum dihidrojen fosfat)	Merck
KH ₂ PO ₄ (potasyum dihidrojen fosfat)	Merck
Na ₂ CO ₃ (sodyum karbonat)	Merck
NaN ₃ (sodyum azit)	Sigma
MgCl ₂ (magnezyum klorür)	Merck
Diethanolamin (DEA)	Merck
Tween 20	Sigma
Triton- X	Sigma
Tris- HCl	Sigma
MT-1	Enzo Life Sciences
MT-2	Enzo Life Sciences
Proteaz inhibitör tabletleri	Roche
BSA (bovine serum albümini)	Sigma
PNPP (para nitrofenil fosfat)	Sigma
BCA (bicinchoninic acid assay)	Thermo-Scientific
Reagent A	Thermo-Scientific
Reagent B	Thermo-Scientific
TBA (thiobabitürik asit)	Sigma
TCA (trikloroasetik asit)	Sigma
Kodein	TMO
Kodein Sülfat	TMO
Kodein Fosfat	TMO

3.1.5. Kullanılan deney malzemeleri

Malzemenin Adı	Firma
Fare kulak delme aparatı	İnterlab
Steril enjektör (1 mL)	Beybi
Diseksiyon aletleri	Isolab
Vida kapaklı santrifüj tüpleri (15 mL)	Isolab
Vida kapaklı santrifüj tüpleri (50 mL)	Isolab
Ependorf tüpleri (1.5 mL)	Isolab
Heparinsiz hematokrit kapiler tüpler	Isolab
Serolojik pipetler (5 mL)	Costar
Serolojik pipetler (10 mL)	Costar
Cam şişeler (100 mL, 500 mL, 1000 mL)	Isolab
Pipet ucu (2-20 µL)	Isolab
Pipet ucu (20-200 µL)	Isolab
Pipet ucu (1000 µL)	Isolab
96 kuyucuklu düz tabanlı mikrolakalar	Costar
Otomatik pipetler (2-20 µL, 20- 200 µL, 1000 µL)	Rainin
8 kanallı otomatik pipet	Rainin
Parafilm	İnterlab

3.1.6. Kullanılan cihazlar

Kullanılan cihaz	Firma
Sıvı azot tankı	Air Liqoude GT11
Vorteks	Biosan
Kaba terazi	Acculab

Hassas terazi	Radwag
Santrifüj	Hettich Universal 320 R
Buzdolabı	Vestel
-20 °C derin dondurucu	Vestel
-80 °C derin dondurucu	VWR Haier Symphony
Ultra saf su cihazı	Mp MINIpure
Buz makinesi	Scotsman AF80
Otoklav	Hirayama HMC
pH metre	Hanna Instruments
İnkübatör	Nuaire AutoFlow NU-4750
Mikroplaka okuyucu	Thermo Scientific

3.2. Yöntem

3.2.1. Kullanılan solüsyonların hazırlanması

Steril Salin (NaCl) Solüsyonu (% 0.85'lik): 0.85 g NaCl 100 mL distile su ile cam şişede çözdürülerek solüsyon hazırlandı. Hazırlanan solüsyon ağzı kapatılarak otoklavda steril edildikten sonra soğumaya bırakıldı.

Lizis Çözeltisi: 300 mM NaCl ve 10 mM Tris-HCl 1 litre distile suda çözdürüldü. pH 7.4'e ayarlandı. Hazırlanan çözeltiye daha sonra 0,5 mM MgCl₂ ve % 0,5 Triton X-100 eklendi.

PBS (Phosphate Buffered Saline) solüsyonu (1 L): 8 g NaCl, 0.2 g KCl, 0.2 g KH₂PO₄ ve 1.15 g Na₂HPO₄ 1 litre distile su içerisinde çözdürüldü. pH 7.2'ye ayarlandı.

Yıkama çözeltisi (PBS-Tween 20-NaN₃): Daha önce hazırlanan PBS çözeltisine % 0.05 Tween 20 ve % 0.02 NaN₃ ilave edilerek hazırlandı.

Kaplama çözeltisi (Coating): 1.57 g NaCO₃, 2.93 g NaHCO₃ ve 0.2 g NaN₃ 1 litre distile suda çözdürüldü. pH 9.6-9.8'e ayarlandı.

Bloklama çözeltisi (%2'lik): %2'lik BSA kaplama çözeltisi içerisinde çözdürülerek hazırlandı.

Substrat çözeltisi: 0.02 g NaN₃ ve 0.01 g MgCl₂.6H₂O bir miktar distile suda çözdürüldükten sonra 9.7 mL diethanolamin (DEA) eklendi. Distile su miktarı 100 mL'ye tamamlanarak pH 9.8' e ayarlandı.

Bağlama çözeltisi (Binding): 2.5 g BSA 1 litre PBS-Tween 20-NaN₃ çözeltisi içerisinde çözdürüldü.

TBA (tribarbitürik asit) çözeltisi (% 0.6'lık): 0.6 g TBA 100 mL distile su içerisinde çözdürülerek hazırlandı.

TCA (triklorasetik asit) çözeltisi (% 0.5'lik): 0.5 g TCA 100 mL distile su içerisinde çözdürülerek hazırlandı.

3.2.2. Serum örneklerinin elde edilmesi

Enjeksiyon öncesi ve enjeksiyon sonrası serum örneklerini elde etmek için, deneyin 15. ve 30. günlerinde farelerin hepsinin göz çukuru (orbital sinüs) veninden mikrohematokrit kapiler tüpler aracılığı ile kan alınarak serum örnekleri hazırlandı. Alınan kanlar 1 saat oda sıcaklığında, ardından da 1 saat 4°C'de bekletildikten sonra, 4°C'de, 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Elde edilen serum örnekleri 1.5 mL'lik ependorf tüplere aktarıldıktan sonra test edilinceye kadar -80°C'de muhafaza edildi.

3.2.3. Kodein, kodein sülfat ve kodein fosfatın hazırlanması

Farelere enjekte edilecek olan pür kodein, kodein sülfat ve kodein fosfatın dozunu belirlemek amacıyla öncelikle farelerin ağırlıkları hem enjeksiyon öncesinde hem de deney boyunca haftada bir defa belirlendi. Canlı ağırlıklarına göre ilk 15 gün boyunca 10 mg/kg, sonraki 15 gün boyunca ise doz iki katına çıkarılarak 20 mg/kg kodein,

kodein sülfat ve kodein fosfat %0.85'lik steril salin solüsyonu içerisinde çözdürülerek hazırlandı.

3.2.4. Enjeksiyonlar

Canlı ağırlıklarına göre ilk 15 gün boyunca 10 mg/kg, sonraki 15 gün boyunca (deneyin sonuna kadar) ise 20 mg/kg %0.85'lik steril salin solüsyonu içerisinde çözdürülen kodein, kodein fosfat ve kodein sülfat her bir fareye 200 µL (0.2 mL) olacak şekilde intraperitoneal (karın boşluğu içerisine) olarak Çizelge 3.1'de belirtilen şekilde farelere enjekte edildi. Kontrol grubundaki farelere herhangi bir madde enjekte edilmedi.

Çizelge 3.1. Deney grupları

Grup adı	Verilecek madde	Doz	Veriliş yolu	Hacim	Veriliş sıklığı
Kontrol grubu	Deney süresince herhangi bir madde enjekte edilmedi.				
Kodein grubu	Kodein	10 mg/kg 20 mg/kg	İntraperitoneal İntraperitoneal	200 µL 200 µL	Günlük (1-15.gün) Günlük (16-30.gün)
Kodein sülfat grubu	Kodein fosfat	10 mg/kg 20 mg/kg	İntraperitoneal İntraperitoneal	200 µL 200 µL	Günlük (1-15.gün) Günlük (16-30.gün)
Kodein fosfat grubu	Kodein sülfat	10 mg/kg 20 mg/kg	İntraperitoneal İntraperitoneal	200 µL 200 µL	Günlük (1-15.gün) Günlük (16-30.gün)

Kodein ve kodein tuzlarının verilmesinden 15 gün sonra kontrol grubu da dahil olmak üzere bütün gruplarda deney hayvanlarının yarısı, deneyin bitiminde ise tüm fareler öldürülerek kan örnekleri alındı ve bu örneklerden serum hazırlanarak test edilinceye kadar -80°C'de muhafaza edildi.

3.2.5. Dokuların izolasyonu

15. günde deneye dahil edilen hayvanların yarısına ve deneyin bitiminde ise tüm farelere ötenazi uygulandı ve diseksiyon yöntemiyle farelerden dokular (böbrek ve karaciğer) alınarak -80°C'de donduruldu.

3.2.6. Doku lizatlarının hazırlanması

Dokular test edilecekleri zaman -80°C 'den çıkarılarak parçalara ayrıldı ve yaklaşık 0.5 g doku alınarak NaCl, Tris-HCl, MgCl_2 , proteaz inhibitör tabletleri ve Triton X-100'den oluşan lizis buffer içerisinde homojen hale gelene kadar ezildikten sonra 1 saat boyunca her 10 dakikada bir vortekslenerek buz içerisinde inkübe edildi. İnkübasyon sonrası tüpler 4°C 'de 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatantlar elde edildi. Elde edilen süpernatantlar ependorf tüplerine aktararak -80°C 'de saklandı.

3.2.7. Doku lizatlarında protein miktarının BCA yöntemi ile belirlenmesi

Kodein ve kodein tuzları ile enjekte edilen farelerden elde edilen karaciğer ve böbrek dokularında bulunan MT miktarının belirlenebilmesi için, öncelikle tüm dokulardaki toplam protein miktarları tespit edildi. Toplam protein miktarlarını tespit edebilmek amacıyla BCA (bicinchoninic acid assay) kiti kullanıldı. İlk olarak hazırlanan doku lizatları -80°C 'den çıkartılarak buza konuldu. Buzda çözdürülen doku lizatlarının PBS çözeltisi içerisinde 1/40 dilüsyonları hazırlandı ve vorteksle karıştırıldı. Standart eğriyi oluşturmak üzere 2 mg/mL konsantrasyona sahip BSA çözeltisinden sırasıyla 1-0.5-0.25-0.125-0.062 mg/mL olacak şekilde seri dilüsyon yöntemiyle standart numuneler hazırlandı. Standart numuneler ve doku lizatları mikropłaka üzerindeki kuyucuklara (her standart ve örnek için üç kuyucuk kullanıldı) 25 μL olacak şekilde pipetlendikten sonra 50:1 oranında Reagent A; Reagent B çözeltisi hazırlanarak tüm kuyucuklara 200 μL eklendi. Hazırlanan mikropłakanın üzeri parafilm ile kaplanarak 37°C 'de 30 dakika inkübe edildi. İnkübatörden çıkarılan mikropłaka, mikropłaka okuyucusunda 562 nm dalga boyunda okutuldu. Deney sonucunda standartlar için elde edilen absorbans değerleri kullanılarak standart eğri grafiği oluşturuldu ve karaciğer ve böbrek doku lizatlarında bulunan toplam protein konsantrasyonları belirlendi ve ELISA deneylerinden önce lizatların konsantrasyonları lizis çözeltisi kullanılarak eşitlendi.

3.2.8. MT-UC1MT ELISA

Karaciğer ve böbrek doku lizatlarında MT protein miktarının belirlenmesi için öncelikli olarak deneyde kullanılacak UC1MT antikorusunun uygun dilüsyonunun belirlenmesi gereklidir. Bu amaçla UC1MT'nin farklı dilüsyonları (1/500, 1/1000, 1/2000, 1/4000, 1/8000 ve 1/16000) kullanılarak bu antikorun MT-1 ve MT-2 ile olan reaktivitesi test edilerek ve UC1MT'nin optimal dilüsyonu belirlendi. UC1MT'nin uygun dilüsyonunu tespit etmek amacıyla MT-1 ve MT-2 izoformları 5 µg/mL olacak şekilde hazırlandı ve mikropalakadaki her kuyucuğa 100 µL olacak şekilde pipetlendi. Daha sonra üzeri parafilm ile kaplanarak 37°C'de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası mikropalaka PBS (Tween 20-NaN₃) çözeltisi kullanılarak üç defa yıkandıktan sonra bloklama aşamasına geçildi. Bloklama için her bir kuyucuğa 200 µL bloklama çözeltisinden eklendikten sonra mikropalakanın üzeri kapatılarak 37°C'de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası tekrar yıkama işlemi yapıldıktan sonra yukarıda belirtilen şekilde hazırlanan UC1MT dilüsyonlarından her kuyucuğa 100 µL pipetlendi. 37°C'de bir saat inkübasyona bırakıldı. Tekrar bir yıkama işlemi yapıldıktan sonra goat anti-mouse Ig-AP antikoruna bağlama çözeltisi içerisinde hazırlanarak her kuyucuğa 100 µL olacak şekilde pipetlendi ve üzeri kapatılarak 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Yıkama işlemi tekrarlandıktan sonra 5 mL substrat çözeltisi içerisinde 1 tane PNPP tableti çözülürerek her bir kuyucuğa 100 µL olacak şekilde pipetlendi. Mikropalaka yaklaşık 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 405 nm dalga boyunda okutuldu.

3.2.9. Kompetitif ELISA

Bu çalışmada farelerden izole edilen karaciğer ve böbrek dokularında bulunan metalloproteinin miktarını belirlemek amacıyla ELISA'nın bir tipi olan kompetitif ELISA yöntemi kullanılmıştır. Kompetitif ELISA yönteminde, standart serileri MT'nin bilinen konsantrasyonlarından hazırlanmaktadır. Bu yöntemde hem standartlar hem de MT bulunduğu düşünülen doku lizatları UC1MT antikoruna ile karıştırılarak bir saat 37°C'de inkübe edilmekte ve sonrasında MT ile kaplanmış olan kuyucuklara bu standartlar ve numuneler eklenerek ve bunların mikropalakadaki MT ile bağlanma

dereceleri tespit edilmektedir. Numunedeki MT miktarı ne kadar fazla ise antikorun mikrolakadaki MT ile bağlanması o kadar az olacak ve daha zayıf bir sinyal alınacaktır. Bu prensip doğrultusunda mikrolakalar kaplama çözeltisi içerisinde hazırlanan 100 ng/mL MT ile kaplanarak 37°C’de bir saat inkübe edildi. Mikrolaka 3 kez PBS (Tween 20-NaN₃) çözeltisi ile yıkandıktan sonra bloklama aşamasında her bir kuyucuğa kaplama çözeltisi ile hazırlanan %2’lik BSA çözeltisinden 150 µL eklendi. Mikrolakanın üzeri kapatılarak 37°C’de 1 saat inkübe edildi. MT standartları 10 µg/mL, 1 µg/mL, 0.1 µg/mL, 0.001 µg/mL, 0.001 µg/mL ve 0.0001 µg/mL konsantrasyonlarda olacak şekilde hazırlandı ve doku lizatlarının konsantrasyonları da 3 mg/mL olacak şekilde ayarlandı. UC1MT antikorunun bağlama çözeltisi içerisinde 1/2000’lik dilüsyonu hazırlandı ve hem standartlara hem de lizatlara 1: 1 oranında eklenerek 37°C’de bir saat inkübe edildi. Bloklama aşaması tamamlandıktan sonra mikrolaka 3 kez PBS (Tween 20-NaN₃) çözeltisi ile yıkandı. Bloklama aşaması öncesinde hazırlanarak 1 saat 37°C’de inkübe edilen standart ve doku lizatları 4 °C’de 3000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi. Elde edilen supernatantlar 50 µL olacak şekilde uygun kuyucuklara pipetlenerek 37°C’de 1 saat inkübasyona bırakıldı. Bir sonraki aşamada yıkama işleminden sonra goat anti-mouse Ig-AP antikorunun 1/2000 dilüsyonu bağlama çözeltisi içerisinde hazırlanarak bütün kuyucuklara 50 µL olacak şekilde pipetlendi. İnkübasyon sonrası son yıkama işlemi yapılarak 5 mL substrat çözeltisinde 1 adet PNPP tableti çözdürüldü ve her bir kuyucuğa 50 µL olacak şekilde pipetlendi. Renk değişiminin gözlenebilmesi için mikrolaka oda sıcaklığında bir süre bekletildikten sonra mikrolaka okuyucusunda 405 nm dalga boyunda okutuldu.

3.2.10. Dokularda MDA (Malondialdehit) tayini

MDA tayini, MDA’nın TBA (tiyobarbütirik asit) ile reaksiyon vermesi sonucu renkli bir bileşik oluşması ve bunun 532 nm absorbansta ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Bu renkli kompleksin molar absorptivitesi 532 nm’de $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ’dir. Bu değer biliniyor, standart çözelti kullanılmadan spektrofotometrik miktar belirtimini sağlamaktadır. Karaciğer ve böbrek dokularında MDA miktarını test etmek amacıyla aynı miktarda karaciğer ve böbrek dokuları alınarak %0.5’lik TCA (triklorasetik asit) çözeltisinde homojenize edildi. Elde edilen homojenat ependorf tüplerine alınarak 4°C,

10.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek supernatant elde edildi. Her örnek için 1 mL supernatant ile 1 mL %0.6'lık TBA ile karıştırılarak 100°C' de 10 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası numuneler soğuk suda bekletilerek soğutuldu. 1 mL TBA ile 1 mL distile suyun karışımıyla kör hazırlandı. Küvete alınan kör ile ilk olarak 532 nm'de sıfırlama işlemi gerçekleştirildi. Daha sonra sonra tüm numunelerin 532 nm'de ölçümleri yapıldı.

Hesaplamalar aşağıdaki formülde gösterildiği şekilde yapıldı.

$$\begin{array}{l} 1.56 \times 10^5 \text{ absorbans} \\ \text{Numune absorbans} \end{array} \times \begin{array}{l} 1 \text{ molar çözeltinin ise} \\ \text{x molar çözeltinindir.} \end{array}$$

$x = NA / 1.56 \times 10^5$ işlemi doğrudan tüp içindeki sıvının molar konsantrasyonunu vermektedir.

Molar absorbtivite katsayısı, mikromolar absorptiviteye çevrilir. Bunun için 10^{-6} ile çarpılarak 0.156 rakamı elde edilir. Bu sonuç, absorbansı okunan tüp içindeki sıvının mikromolar konsantrasyonudur. Tüp içerisindeki karaciğer, ayıraçlarla sulandırılmış olduğundan, bulunan değer sulandırma katsayısı (dilüsyon faktörü) ile çarpılır.

3.2.11. İstatistiksel yöntem

Sonuçlar ELISA mikrolaka okuyucusu ve spektrofotometrik ölçümlerden elde edilen verilere (absorbans değerlerine) bakılarak değerlendirilmiştir. İstatistiksel analizler için GraphPad Prism 7 Software kullanılmıştır. Çalışmada gruplar arasındaki farklılık varians analizi (ANOVA) ile belirlenmiştir. Gerekli yazılım ve grafikler için Word ve Excel Programları kullanılmıştır.

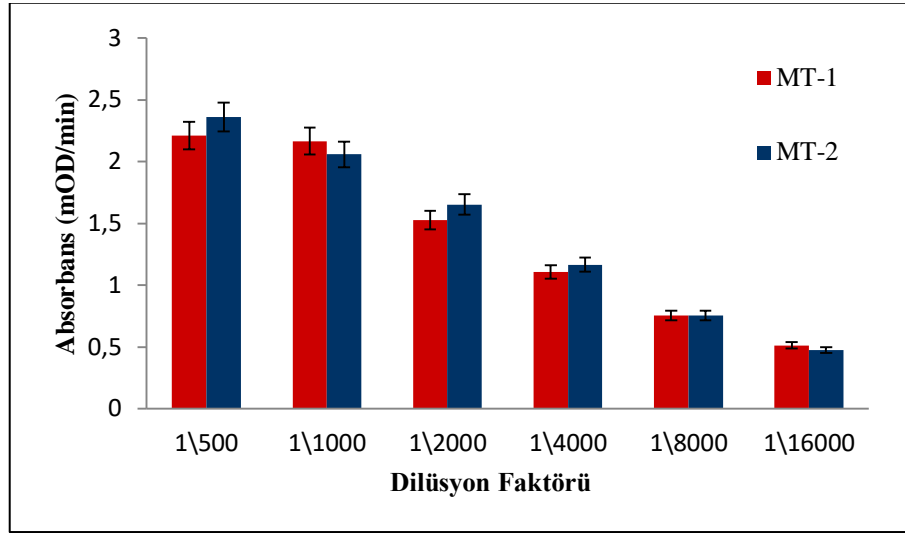
4. BULGULAR

4.1. Kodein Uygulamasının Farelerin Genel Vücut Ağırlıkları Üzerine Etkileri

Bu çalışmada kodein ve kodein tuzlarına uzun süreli maruziyetin etkisini belirlemek için farelere ilk 15 gün 10 mg/kg ve sonraki 15 gün ise 20 mg/kg olacak şekilde madde verilmiştir. Kodein ve kodein tuzlarına maruz kalan farelerin vücut ağırlıkları deneye başlamadan önce ve deneye başladıktan sonra ise haftada bir kez ölçülmüştür. Farelerin deney boyunca ağırlık durumlarında belirgin bir değişiklik görülmemiştir. Sadece ilk 15 gün içerisinde bazı farelerin ağırlıkları 2 ila 4 g arasında düşüş göstermiş ve deney sonrasında ise orijinal ağırlıklarına ulaşmışlardır. Farelerin genel sağlık parametrelerinde herhangi olumsuz bir değişiklik görülmemiştir. Ancak bazı farelerde halsizlik, ishal ve enjeksiyon bölgesinde kızarıklık gibi belirtiler tespit edilmiştir.

4.2. UC1MT Reaktivitesinin Test Edilmesi

Bu çalışmada dokularda MT miktarının belirlenmesi için anti-MT antikoruna olan UC1MT kullanılmıştır. Daha önce UC1MT'nin kullanıldığı çalışmalarda MT'nin iki izoformunu içeren ve tavşan karaciğerinden elde edilen MT-1 ve MT-2 kullanılmıştır (Lynes ve ark., 1993). Ancak bu MT-1 ve MT-2 izoformlarını içeren ürünün üretimden kalkması nedeniyle bu çalışmada ELISA testlerimiz MT-1 ve MT-2 ayrı ayrı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kompetitif ELISA testlerine başlamadan önce UC1MT antikorunun MT-1 ve MT-2 izoformları ile olan reaktivitesini ve uygun dilüsyonunu belirlemek için MT-UC1MT ELISA testi yapılmıştır. Farklı UC1MT dilüsyonları (1/500, 1/1000, 1/2000, 1/4000, 1/8000, 1/16000) kullanılarak gerçekleştirilen deneyde UC1MT antikorunun hem MT-1 hem de MT-2 izoformlarına karşı güçlü bir reaktivite gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.1). Elde edilen sonuçlar doğrultusunda ELISA testlerinde UC1MT antikorunun 1/2000 dilüsyonu kullanılmıştır.



Şekil 4.1. UC1MT antikorunun MT-1 ve MT-2 izoformları ile olan reaktivitesi

4.3. Dokulardaki Toplam Protein Miktarının Tespit Edilmesi

Deneyde kullanılan farelerin karaciğer ve böbrek dokularından hazırlanan lizatlarda bulunan toplam protein miktarları BSA'dan hazırlanan standart eğri doğrultusunda belirlenmiştir. Karaciğer dokularında bulunan toplam protein miktarı 16-36 mg/mL arasında, böbrek dokularında ise 10-19 mg/mL arasında olduğu tespit edilmiştir. Aşağıdaki çizelgede deneysel grupların ortalama protein değerleri verilmiştir (Çizelge 4.1). Dokulardaki protein miktarları en düşük konsantrasyona eşitlendikten sonra kompetitif ELISA testlerinde kullanılmıştır.

Çizelge 4.1. Karaciğer ve böbrek dokularının protein konsantrasyonları

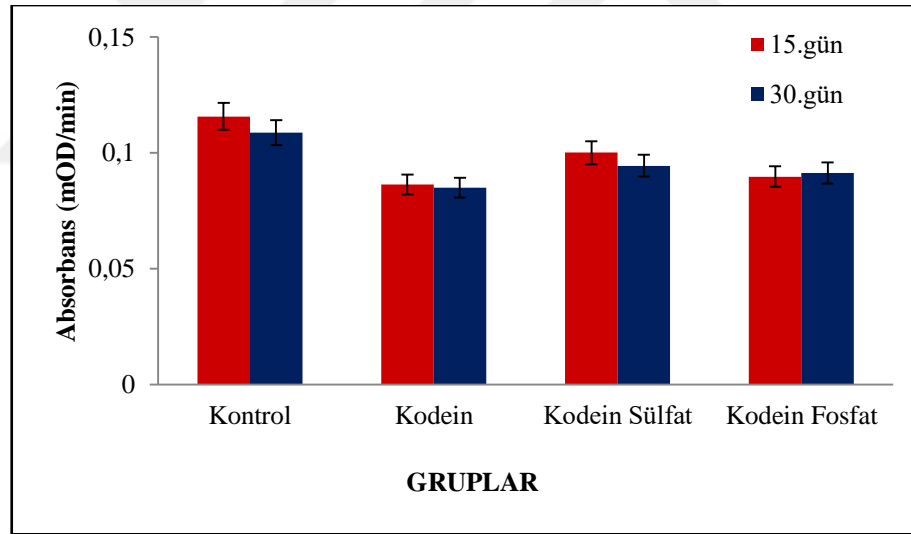
GRUPLAR	KARACİĞER		BÖBREK	
	15. gün	30. gün	15. gün	30. gün
Kontrol grubu	28 mg	24 mg	15 mg	13 mg
Kodein grubu	25 mg	21 mg	13 mg	18 mg
Kodein sülfat grubu	30 mg	22 mg	15 mg	13 mg
Kodein fosfat grubu	24 mg	22 mg	14 mg	14 mg

4.4. Kodein ve Kodein Tuzlarının MT-1 ve MT-2 Seviyeleri Üzerine Etkisi

Bu çalışmada kontrol grubu, kodein, kodein fosfat ve kodein sülfat ile enjekte edilen farelerin dokularından hazırlanan doku lizatlarında MT-1 ve MT-2 miktarları test edildi.

4.4.1. Kodein ve kodein tuzlarının karaciğer MT-1 seviyeleri üzerindeki etkisi

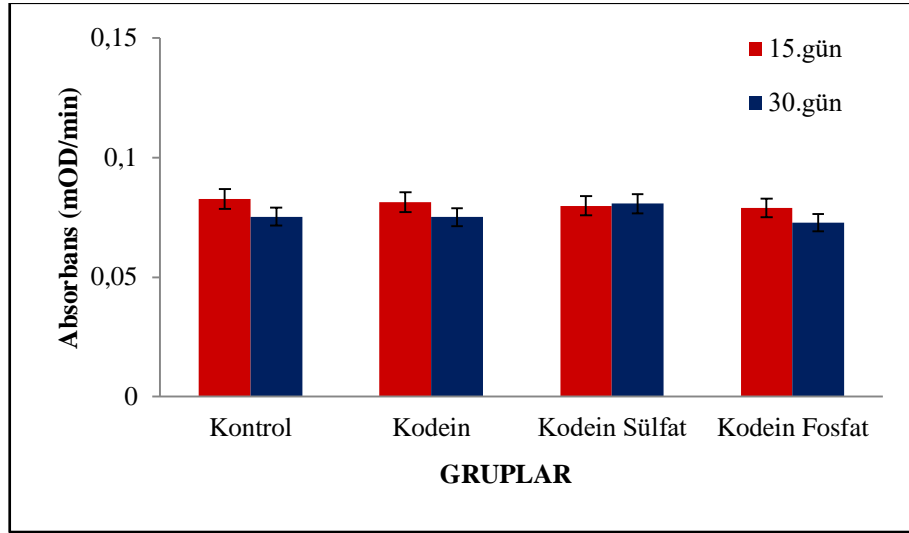
Kompetitif ELISA sonuçlarına göre hem 15. hem de 30. günlerde kodein ve kodein tuzları ile enjekte edilen farelerde sentezlenen MT-1 miktarı absorbans cinsinden Şekil 4.2’de verilmiştir. Kompetitif ELISA’da fazla miktarda MT içeren numunenin absorbansı daha düşük olacaktır. Şekilde de görüldüğü gibi kontrol ve diğer gruplar ile karşılaştırıldığında kodein ile enjekte edilen farelerde MT-1 miktarının belirgin olmayan bir şekilde arttığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.2. Karaciğer dokularında MT-1 absorbans grafiği

4.4.2. Kodein ve kodein tuzlarının karaciğer MT-2 seviyeleri üzerindeki etkisi

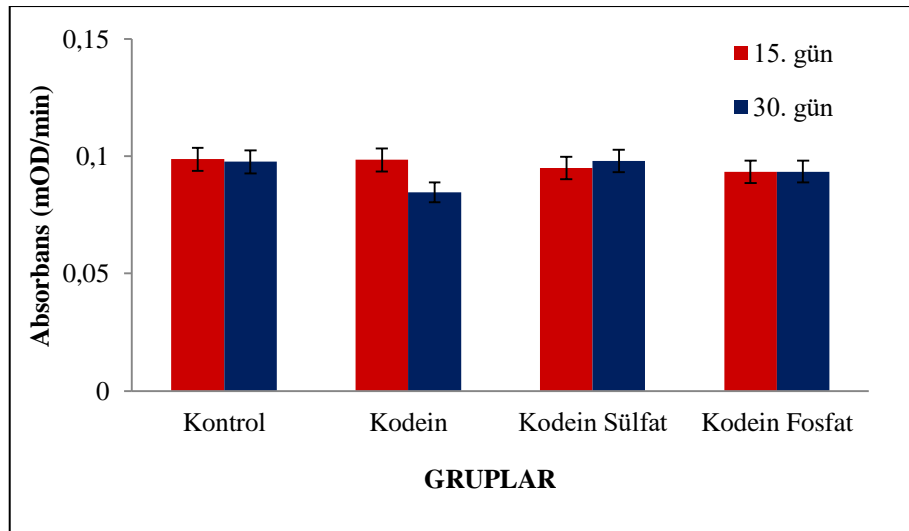
Karaciğerde MT’nin diğer bir izoformu olan MT-2 seviyelerine bakıldığında zaman kodein ve kodein tuzlarının verildiği gruplar kontrol ile karşılaştırıldığında MT-2 seviyelerinde herhangi bir değişikliğin olmadığı görülmüştür (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Karaciğer dokularında MT-2 absorbans grafiği

4.4.3. Kodein ve kodein tuzlarının böbrek MT-1 seviyeleri üzerindeki etkisi

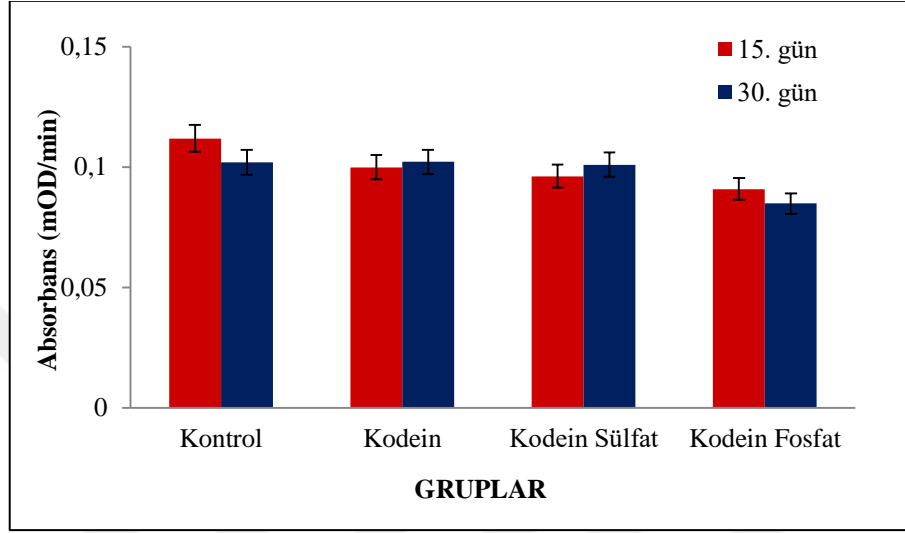
Kodein ve kodein tuzlarının böbrek MT seviyeleri üzerindeki etkilerine bakıldığı zaman hem 15. ve hem de 30. günlerde herhangi bir farklılık olmadığı tespit edilmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Böbrek dokularında MT-1 absorbans grafiği

4.4.4. Kodein ve Kodein Tuzlarının Böbrek MT-2 Seviyeleri Üzerindeki Etkisi

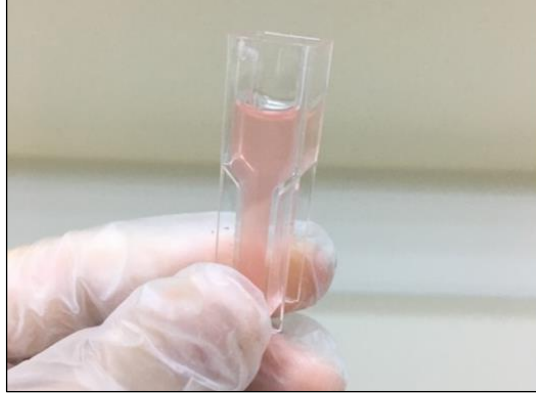
MT-1 sonuçları ile benzer şekilde kodein ve kodein tuzlarının böbrekte MT-2 seviyeleri üzerinde herhangi etkisinin olmadığı görülmüştür (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Böbrek dokularında MT-2 absorbans grafiği

4.5. Kodein ve Kodein Tuzlarının MDA (Malondialdehit) Seviyeleri Üzerine Etkisi

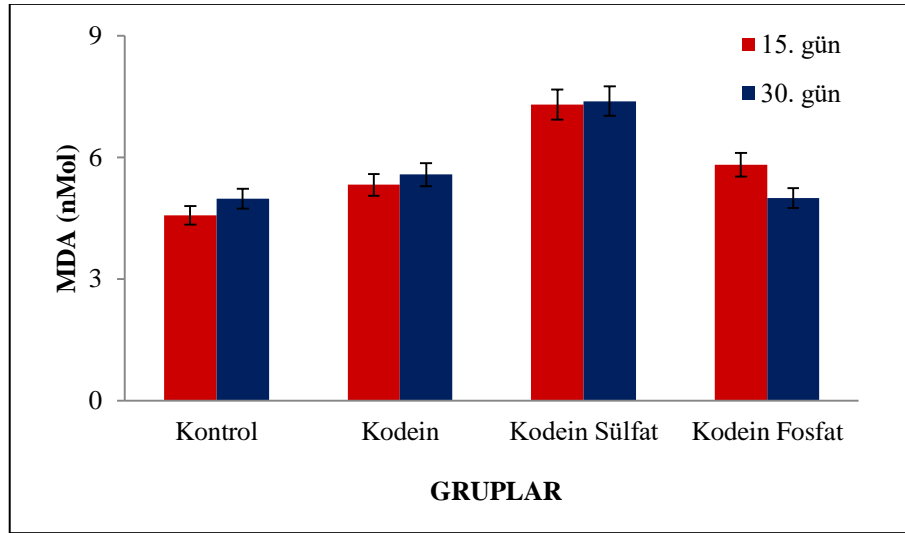
Lipit peroksidasyon ürünleri, TBARS (ThioBarbituric Acid Reactive Substances) olarak adlandırılır ve MDA eşdeğerleri olarak florometrik ve spektrofotometrik yöntemler ile vücut sıvılarında veya dokularda ölçülebilirler (Özcan ve ark., 2015). Bu çalışmada herhangi bir madde ile enjekte edilmeyen (kontrol grubu) ve kodein, kodein fosfat ve kodein sülfat ile enjekte edilen farelerden izole edilen karaciğer ve böbrek dokularında lipit peroksidasyon ürünü olan MDA'nın TBA ile reaksiyona girmesi sonucu oluşan pembe renkli kompleksin (Şekil 4.6) 532 nm'de ölçülmesi sonucunda ortaya çıkan absorbans değerleri kullanılarak MDA'nın kantitatif tayini yapılmıştır.



Şekil 4.6. MDA ve TBA'nın reaksiyonu sonucu oluşan pembe renkli kompleks

4.5.1. Kodein ve kodein tuzlarının karaciğerde MDA seviyeleri üzerine etkisi

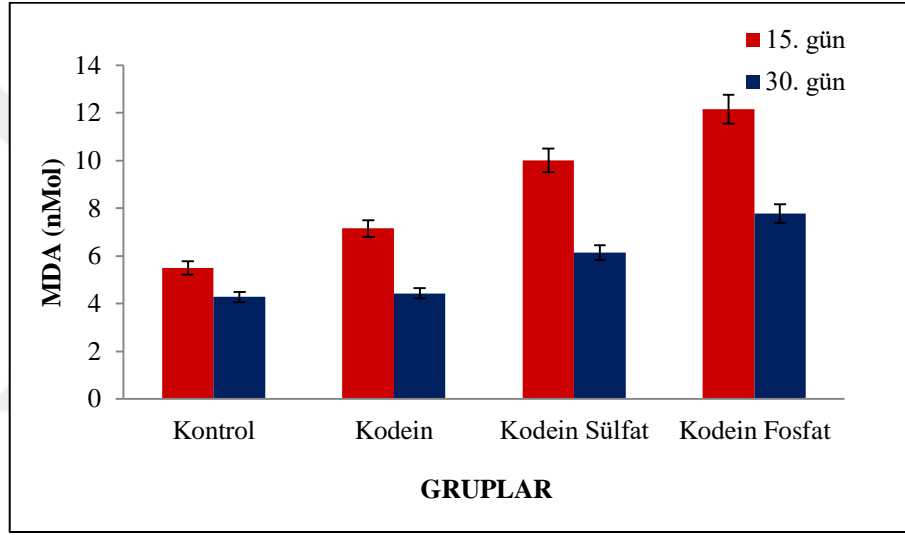
Yapılan MDA analizi sonucunda özellikle kodein sülfata maruz kalan farelerde MDA seviyelerinin kontrol ve diğer gruplar ile karşılaştırıldığında hem 15. gün hem de 30. günde belirgin şekilde arttığı görülmüştür ($p < 0.05$). Kodein ve kodein fosfata maruz kalan farelerde ise belirgin bir etkinin olmadığı görülmektedir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Karaciğer dokusunda MDA seviyeleri

4.5.2. Kodein ve kodein tuzlarının böbrekte MDA seviyeleri üzerine etkisi

Karaciğerden farklı olarak böbrek MDA seviyelerine bakıldığında daha farklı bir tablo ortaya çıkmıştır. Kodein ve kodein tuzlarının özellikle 15. günde belirgin bir şekilde ($p < 0.05$, $p < 0.01$) MDA seviyelerinin artışına neden olduğu görülmüştür. 30. günde ise 15. gün ile karşılaştırıldığında MDA seviyelerinin düştüğü ancak kodein fosfat grubunda kontrol grubuna nazaran MDA seviyelerinde artış olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. Böbrek dokusunda MDA seviyeleri

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Haşhaş bitkisinin tam olgunlaşmamış kapsüllerinin çizilmesi ile elde edilen afyonun içeriğinde morfin, kodein, tebain, noskapin ve papaverin gibi önemli alkaloidler bulunmaktadır. Genellikle bağımlılık yapma özellikleri ile bilinen alkaloidler bitkiler tarafından doğal olarak üretilen kimyasal bileşiklerdir. Opioid grubuna ait alkaloidlerin bağımlılık yapma özellikleri nedeniyle kötüye kullanımı ya da güçlü analjezik etkilerinden dolayı yanlış kullanımları sonucunda istenmeyen durumlar ortaya çıkabilmektedir. Haşhaş bitkisinde morfinden sonra en çok bulunan alkaloid olan kodein analjezik (ağrı kesici), antitussif (öksürük dindirici) ve antidiyareik (ishal önleyici) özellikleri nedeniyle tıp alanında yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada farklı şekillerde hazırlanarak tıpta daha çok tedavi amaçlı olarak kullanılan pür kodein ve kodein tuzlarına (kodein fosfat ve kodein sülfat) uzun süreli maruziyetin metalloiyonun sentezi ve lipid peroksidasyonu üzerindeki etkilerinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

Çalışmamızda model organizma olarak inbred BALB/c cinsi fareler kullanılmıştır. Fareler vücut ağırlıkları esas alınarak ilk 15 gün 10 mg/kg ve sonraki 15 gün ise 20 mg/kg kodein ve kodein tuzları ile 30 gün boyunca enjekte edilmiştir. Farelere her gün madde uygulanması nedeniyle günlük olarak takipleri yapılmıştır. Deney süresince farelerin genel sağlık durumlarının iyi olduğu ve her iki dozu da gayet iyi tolere ettikleri görülmüştür. Sadece birkaç farede halsizlik, ishal ve enjeksiyon bölgesinde kızarıklık gibi belirtiler görülmüştür. Bu belirtilerin farelerin genelinde görülmeyip sadece birkaç fare ile sınırlı kalması, farelerin uygulanan maddelere verdikleri aşırı reaksiyonlar ya da duyarlılıkları ile açıklanabilir.

Bu çalışmada kodein ve kodein tuzlarının iki farklı dozuna 30 gün boyunca maruz kalan farelerden, sadece kodein ile enjekte edilen farelerin karaciğerinde MT-1 miktarının belirgin olmayan bir şekilde arttığı, ama genel olarak bakıldığında herhangi bir değişiklik olmadığı gözlenmiştir. Aynı şekilde karaciğerde MT'nin diğer izoformu olan MT-2 seviyelerine bakıldığında da gruplar arasında yine belirgin bir değişiklik gözlenmemiştir.

Bir önceki çalışmamızda, bu çalışmamızdan farklı olarak kodein ve kodein tuzlarının farelerde metallothionein sentezi üzerindeki akut etkilerine bakılmıştır. Saf kodein ve kodein tuzlarının iki farklı dozu (10 mg/kg ve 20 mg/kg) ile üç saat arayla üç kez enjekte edilen farelerin karaciğer dokusunda MT-1 sentezinin belirgin şekilde arttığı ancak böbrek dokusunda herhangi bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir. Karaciğer MT sentezinin gerçekleştiği en önemli organlardan birisidir ve üç saat arayla üç kez tekrarlanan enjeksiyonların yani akut maruziyetin MT sentezi için yeterli bir zaman aralığı olduğu daha önce morfin kullanılarak yapılan çalışmalarda belirtilmiştir (Hidalgo ve ark., 1991).

Bu çalışmamızda ise kodein ve kodein tuzlarına kronik maruziyetin MT seviyeleri (MT-1 ve MT-2) üzerindeki etkileri test edilmiş, ancak 15. ve 30. günlerde farelerden alınan dokular test edildiğinde, hem karaciğer hem de böbrek dokusunda MT seviyelerinde bir farklılık tespit edilememiştir. Bu deneyden elde edilen sonuçlar doğrultusunda, akut maruziyetin MT sentezini uyardığı ancak 30 günlük bir kronik maruziyetin MT sentezine neden olmadığı şeklinde bir sonuç çıkarmamız mümkün değildir. Kodein ve kodein tuzları karaciğerde metabolize edildikten hemen sonra atılmak üzere böbreğe geçmektedir. Dolayısıyla deney başlangıcında verilen maddelere bir yanıt olarak MT sentezi gerçekleşmiş olsa bile, dokular 15. ve 30. günlerde izole edilerek test edildikleri için karaciğerde bu evrede farklılıkların gözlenmesi mümkün olmayabilir. Böbrekte de MT'nin yıkımından dolayı tespit edilememesi yine aynı şekilde açıklanabilir.

Deneyin 15. ve 30. günlerinde farelerden alınan dokularda metallothionein sentezinin tespit edilememesinin diğer bir nedeni de şu şekilde açıklanabilir: deneyin ilk günlerinde, uygulanan maddelere karşı farelerde etkin ve belirgin bir MT sentezi gerçekleşmiş olsa bile, bir süre sonra organizmanın uyarıya alışması sonucunda verilen cevap azalabilir ve bunu sonraki günlerde (deneyimizde 15. ve 30. günler) tespit etmemiz mümkün olmayabilir. Narkotik maddelerin karaciğer, beyin ve böbrekte metallothionein seviyeleri üzerindeki etkilerinin test edildiği bir çalışmada, altı aylık Wistar cinsi sıçanlara morfin intraperitoneal olarak 5 gün boyunca verilmiş ve 5. günün sonunda karaciğer, böbrek ve beyinde MT seviyeleri ölçülmüştür. Metallothionein

seviyelerinin özellikle karaciğerde 3 kat, böbreklerde ise 2 kat, beyinde ise 15 kat arttığı tespit edilmiştir (Florianczyk ve Stryjecka- Zimmer, 2001). Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar özellikle maruziyetin erken dönemlerinde daha etkin bir MT sentezinin olduğunu göstermektedir. Ancak bu çalışma artan doza bağlı olarak kronik maruziyetin etkilerini belirlemek amacıyla tasarlandığı için belirtilen günlerde testler gerçekleştirilmiştir.

Stresin bedendeki olumsuz etkilerini ortaya çıkarmak için hayvanlar üzerinde yapılan deneylerde, farelerin tekrarlanan bir uyarıcıya, stres tepkilerini her seferinde azaltarak karşı koydukları, ancak yeni tehlikelere karşı normal stres tepkisi vermeye devam ettikleri belirtilmiştir. Morimoto ve Evans (2004) tarafından yapılan bir çalışmada da, uzun süreli stresin zararlı olduğu, fakat ara sıra ve kısa süreli düşük seviyedeki akut stresin ise koruyucu olduğu belirtilmiştir.

Bu çalışmada MT seviyeleri dışında kodein ve kodein tuzlarına kronik maruziyetin lipit peroksidasyonu üzerindeki etkilerine de bakılmıştır. Lipid peroksidasyon ürünleri oksidatif stresin bir belirteci olarak kabul edilmektedir. Kodein ve kodein tuzlarına maruz kalan farelerde lipit peroksidasyonu, lipit peroksidasyon ürünlerinden biri olan MDA seviyelerine bakılarak belirlenmiştir. Özellikle kodein sülfata maruz kalan farelerin karaciğerinde MDA seviyelerinin diğer deneysel gruplarla karşılaştırıldığında belirgin şekilde arttığı görülmüştür. Böbrekte ise hem kodein hem de kodein tuzlarının özellikle 15. günde belirgin bir şekilde MDA seviyelerinin artışına neden olduğu tespit edilmiştir. 30. günde yapılan MDA analizlerinde ise 15. gün ile karşılaştırıldığında MDA seviyelerinin düştüğü, doza bağlı olarak MDA seviyelerinde belirgin bir artış olmadığı gözlenmiştir.

Daha önce yapılan çalışmalarda morfinin serbest radikallerin üretimini artırarak lipit peroksidasyonunu aktive ettiği tespit edilmiştir. Artan lipit peroksidasyonu antioksidan enzimleri bloke ederek serbest radikallerin ve reaktif oksijen türlerinin oluşuma neden olmaktadır. Bu radikallerin hücre zarında tahribata ve vücut dokularında yapısal ve fonksiyonel hasara neden olduğu belirtilmiştir (Jalili ve ark., 2016).

Bu çalışmamızdan elde edilen sonuçlar daha önce Atıcı ve ark. (2005) tarafından yapılan opioidlerin kronik kullanımının karaciğer ve böbrek toksitesi üzerine olan çalışması ile de uyumludur. Belirtilen çalışmada, sıçanlar morfin ve tramadola her on günde bir artan dozlar (ilk on gün 4, ikinci on gün 8, üçüncü on gün 10 mg/kg) ile kronik olarak maruz bırakılmış ve deney sonucunda MDA düzeylerine bakılmıştır. Çalışma sonucunda morfinin MDA seviyelerini belirgin şekilde arttırdığı hem karaciğerde hem de böbrekte toksisiteye neden olduğu belirtilmiştir.

Metallotiyonin önemli fizyolojik rolleri dışında aynı zamanda önemli bir antioksidandır. Bu çalışmada hem karaciğer hem de böbrekte MT-1 ve MT-2 seviyelerinin düşük olması karaciğer ve böbrekteki yüksek MDA seviyeleri ile de ilişkilendirilebilir. Eğer yeteri miktarda MT-1 ve MT-2 sentezi gerçekleşmiş olsaydı özellikle karaciğer ve böbrekte lipid peroksidasyonuna karşı etkin bir koruma sağlayabilirdi.

Sonuç olarak, kodein ve kodein tuzlarına kronik maruziyet MT-1 ve MT-2 seviyelerinde belirgin bir değişikliğe yol açmamakta, ancak oksidatif strese neden olarak lipid peroksidasyonunu arttırmaktadır. Bir antioksidan olarak metallotiyonin sentezinin yetersiz olması lipid peroksidasyonunu tetiklemekte ve buna bağlı olarak da MDA seviyeleri artmaktadır. Özellikle kodein ve kodein tuzlarına uzun süreli maruz kalınması durumunda karaciğerde ve böbrekte ortaya çıkan oksidatif stres nedeniyle kodein içeren ilaçların daha dikkatli ve bilinçli kullanılması adına bu çalışma önemli veriler sağlamaktadır.

6. KAYNAKLAR

- Akyol, A., 2010. Opioid Sistem ve Narkotik Analjezikler. *Turkiye Klinikleri J Neuro-Special Topics*, 3(1), 81-85.
- Andrews, G.K., 2000. Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions. *Biochem. Pharmacol*, 59, 95-104.
- Andrews, H.G., Lee, K.D., Ravindra, R., Lichtlen, P., Sirito, M., Sawadogo, M. ve Schaffner, W., 2001, The transcription factors MTF-1 and USF1 cooperate to regulate mouse metallothionein-I expression in response to the essential metal zinc in visceral endoderm cells during early development. *The EMBO Journal*, 20(5), 1114-1122.
- ANI Pharmaceuticals, 2017. Promethazine HCl and Codeine Phosphate Oral Solution. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2017/008306s032lbl.pdf ; (26.05.2019).
- Anonim, 1998. Kodein Fosfat. Önerme Altında Kabul Edilen veya Listelenen Kimyasallar, <https://oehha.ca.gov/proposition-65/chemicals/codeine-phosphate>, (26.05.2019).
- Anonim, 2015. Haşhaşın faydaları ve zararları. <https://www.sabah.com.tr/galeri/yasam/hashasin-faydolari-ve-zararlari/9> (19.05.2019).
- Anonim, 2017. Schematic representation of MT-I and MT-II gen. <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2017/5828056/fig2/> (08.04.2019)
- Anonim, 2018. 2017 Yılı Haşhaş Sektör Raporu <http://www.tmo.gov.tr/Upload/Document/hashasektorraporu2017.pdf> (20.05.2019)
- Aşçıoğlu, F., Özcan, M., Saygılı, S., Iraz, M., Okudan, M. ve İlhan, L., 2013. Kodein ve kodein içeren tıbbi müstahzarlar hakkında uzman görüşü. *J For Med.*, 27(3), 189-198.
- Atıcı, P.C. Cinel, İ., Cinel, L., Doruk, N., Eskandari, G. ve Oral, U. (2005). Liver and kidney toxicity in chronic use of opioids: An experimental long term treatment model. *J. Biosci* 30(2), 245-252.
- Arslan, Y., Katar, D., Kayaçetin, F. ve Subaşı, İ., 2008. Afyon (Opium) Alkaloidleri ve Önemi. *Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 17 (1-2), 63-73.
- Babula, P., Masarik, M., Adam, V., Eckschlager, T., Stiborova, M., Trnkova, L., Skutkova, H., Provaznik, I., Hubalek, J. ve Kizek, R., 2012. Mammalian metallothioneins: properties and functions. *Metallomics*, 4(8), 739-750.
- Borghesi, L.A, ve Lynes, M.A., 1996. Stress proteins as agents of immunological change:some lessons from metallothionein. *Cell Stress & Chaperones*, 1(2), 99-108.
- Bremner, J. ve Beattie, J.H., 1990. Metallothionein and the trace metals. *Ann Rev Nutr* ,10, 63-83.
- Büyüköslü, N. ve Yiğitbaşı, T., 2015. Reaktif Oksijen Türleri ve Obezitede Oksidatif Stres. *Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 5(3), 197-203.
- Cadenas, E., 1989. Biochemistry of oxygen toxicity. *Annual Review of Biochemistry*, 58(1), 79- 110.
- Campagne, M.V., Thibodeaux, H., Van Bruggen, N., Cairns, B. ve Lowe, D., 2000. Increased binding activity at an antioxidant-responsive element in the metallothionein-1 promoter and rapid induction of metallothionein-1 and -2 in response to cerebral ischemia and reperfusion. *J Neurosci*, 15, 5200-5207.

- Canpolat, E ve Lynes, M., 2001. In vivo manipulation of endogenous metallothionein with a monoclonal antibody enhances a T-dependent humoral immune response. *Tox. Sci.*, 62(1), 61-70.
- Chaabane, W., User, S.D., El-Gazzah, M., Jaksik, R., Sajjadi, E., Rzeszowska-Wolny, J. Ve Los, M.J., 2013. Autophagy, apoptosis, mitoptosis and necrosis: Interdependence between those pathways and effects on cancer. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 61(1), 43–58.
- Cherian, M. G., Jayasurya, A. ve Bay, B-H., 2003. Metallothioneins in human tumors and potential roles in carcinogenesis. *Mutation Research*, 533(1-2), 201- 209.
- Collins, 1999. Reactive oxygen species. <https://slideplayer.com/slide/5372691/>, 13.06.2019.
- Coyle, P., Philcoxa, J.C., Careya, L.C. ve Rofea, A.M., 2002. Metallothionein: The Multipurpose Protein. *Cell. Mol. Life Sci*, 59(4), 627–647.
- Dalton, T.P., Qingwen, L., Bittel, D., Liang, L. ve Andrews, G.K., 1996. Oxidative stress activates metal-responsive transcription factor-1 binding activity. Occupancy in vivo of metal response elements in the metallothionein-I gene promoter. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(42), 26233-26241.
- Duffus, J., 2006. Elemental speciation in human health risk assessment. https://www.researchgate.net/figure/Schematic-diagram-of-cadmium-binding-and-flow-between-plasma-liver-blood-cells-and_fig4_281705694; (05.07.2019)
- Dziegiel, P., Pula, B., Kobierzyci, C., Stasiolek, M. ve Podhorska-Okolow, M., 2016. Metallothioneins in Normal and Cancer Cells, Springer, 132 s, İsviçre.
- Eken, A., 2019. Rat Kan ve Doku Örneklerinde Oksidatif Stres Parametreleri <http://www.jcam.com.tr/files/KATD-986.pdf> (21.05.2019)
- Esterbauer, H., Schaur, R.J. ve Zollner, H., 1991. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med*, 11(1), 81-128.
- Fan, L.Z. ve Cherian, M.G., 2002. Potential role of p53 on metallothionein induction in human epithelial breast cancer cells. *British Journal of Cancer*, 87(9), 1019-1026.
- Florianczyk, B., Stryjecka-Zimmer, M., 2001. Induction of metallothioneins by ethanol and morphine. *Ann Univ Mariae Curie Sklodowska Med* 56: 183-187.
- Foster A.W., Robinson, N.J., 2011. Promiscuity and preferences of metallothioneins: the cell rules. *BMC Biol*, 9(1), 25-28.
- Formigari, A., Irato, P. ve Santon, A., 2007. Zinc, antioxidant systems and metallothionein in metal mediated-apoptosis: biochemical and cytochemical aspects. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 146(4), 443-459.
- Fortenberry, M., Crowder, J. ve So, T.Y., 2019. The Use of Codeine and Tramadol in the Pediatric Population-What is the Verdict Now?. *J Pediatr Health Care.*, 33(1), 117-123.
- Ghoshal K. ve Jacob S.T., 2001. Regulation of Metallothionein Gene Expression. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 66(1), 357-384.
- Gomulkiewicz, A., Podhorska-Okolow, M., Szulc, R., Smorag, Z., Wojnar, A., Zaber, M. ve Dziegiel, P., 2010. Correlation between metallothionein (MT) expression and selected prognostic factors in ductal breast cancers. *Folia Histochem Cytobiol*, 48(2), 242-248.

- Goulart, M., Batoreu, M.C., Rodrigues, A.S., Laires, A. ve Rueff, J., 2005. Lipoperoxidation products and thiol antioxidants in chromium exposed workers. *Mutagenesis*, 20(5), 311-315.
- Hernandez, J., Carrasco, J., Belloso, E., Giralt, M., Bluethmann, D., Lee, K., Andrews, G.K., ve Hidalgo, J., 2000. Metallothionein induction by restraint stress: role of glucocorticoids and IL-6. *Cytokine*, 12(6), 791-796.
- Hidalgo, J., Aschner, M., Zatta, P. ve Vasak, M., (2001) Roles of the metallothionein family of proteins in the central nervous system. *Brain Res Bull*, 55(2), 133-145.
- Hidalgo, J., Giralt, M., Garvey, J.S. ve Armario, A., 1991. Effect of morphine administration on rat liver metallothionein and zinc metabolism. *J. Pharmacol. and Exp. Therapeutics*, 259(1), 274-278.
- Hosztafi, S., 1998. Chemical Structures of Alkaloids. *Chemistry-Biochemistry of Poppy*, 3(1), 93-158.
- Huang, I.Y., Yoshida, A., Tsunoo, H. ve Nakajima, H., 1977. Mouse liver metallothioneins. Complete amino acid sequence of metallothionein-I. *J. Biol. Chem*, 252(22), 8217-8221.
- Jalili, C.; Ahmadi, S.; Roshankhah, S. ve Salahshoor, M., 2016. Effect of Genistein on reproductive parameter and serum nitric oxide levels in morphinetreated mice. *Int. J. Reprod. Biomed.*, 14(2), 95-102.
- Jalili, C. Salahshoor, M.R. Hoseini, M. Roshankhak, S. Sohrabi, M. ve Shabanizadeh, A., 2017. Protective effect of thymoquinone against morphine injuries to kidneys of mice. *Iranian Journal of Kidney Diseases.*, 11 (2), 142-150.
- Jetawattana, S., 2005. Malondialdehyde (MDA), a lipid oxidation product. [https://www.healthcare.uiowa.edu/CoreFacilities/esr/education/2005/1/JetawattanaS-Paper%201-MDA\(revised\).pdf](https://www.healthcare.uiowa.edu/CoreFacilities/esr/education/2005/1/JetawattanaS-Paper%201-MDA(revised).pdf); (18.06.2019).
- Johri, N., Jacquillet, G. ve Unwin, R., 2010. Heavy metal poisoning: the effects of cadmium on the kidney. *Biometals*, 23(5), 783-92.
- Iszard, M.B., Liu, J. ve Klaassen, C.D., 1995. Effect of several metallothionein inducers on oxidative stress defense mechanisms in rats. *Toxicology*, 104(1-3), 25-33.
- Kanner, J., German, J.B. ve Kinsella, J.E., 1987. Initiation of lipid peroxidation in biological systems. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 25(4), 317-364.
- Karabulut, H. ve Gülay, M.Ş., 2016. Antioksidanlar. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 1(1), 65-76.
- Kelly, E.J., Sandgren, E.P., Brinster, R.I., ve Palmiter, R.D., 1997. A pair of adjacent glucocorticoid response elements regulate expression of two mouse metallothionein genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, 94(19), 10045-10050.
- Khan, K.H., Blanco- Codesido, M. ve Molife, L.R., 2014. The role of zinc in growth and cell proliferation. *Crit Rev Oncol Hematol*, 90(3), 200-219.
- Klassen, C.D., Liu, J. ve Choudhuri, S., 1999. Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 39(1), 267- 294.
- Kılıç Sultan F., 2017. Opioidler, Ağrı, Opioidlerin Suistimali ve Yanlış Kullanımı, *Osmangazi Tıp Dergisi*, 39(3), 125-129.

- Kim, B.J., Kim, Y.H., Kim, S., Kim, J.W., Koh, J.Y., Oh, S.H., Lee, M.K., Kim, K.W. ve Lee, M.S., 2000. Zinc as a paracrine Effector in Pancreatic Islet Cell Death. *Diabetes*, 49(3), 367–372.
- Kimura, T. ve Kambe, T., 2016. The Functions of Metallothionein and ZIP and ZnT Transporters: An Overview and Perspective. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(3), 336-357.
- Koç, H., Camcı, H., Kadiroğlu, A. ve Gür, K. 2006. Seçilmiş bazı haşhaş hatlarının morfin oranları yönünden değerlendirilmesi üzerine bir araştırma. *Bitkisel Araştırma Dergisi*, 1(1), 31-35.
- Koizumi, S., Suzuki, K., Ogra, Y., Yamada, H. ve Otsuka, F., 1999. Transcriptional activity and regulatory protein binding of metal-responsive elements of the human metallothionein-IIA gene. *Eur J Biochem*, 259(3), 635-642.
- Kondoh, M., Tsukahara, R., Kuronaga, M., Higashimoto, M., Takiguchi, M. ve Sato, M., 2002. Enhancement of MT synthesis by leptin in fasted mice. *Life Sci*. 71(20), 2425-2433.
- Koleva, B., Kolev, T. ve Bakalska, R., 2007. Linear-dichroic infrared spectral (IR-LD) analysis of codeine and its derivatives. *Spectrochimica Acta Part A*, 67(1), 196-201.
- Langmade, S.J., Ravindra, R., Daniels, P.J. ve Andrews, G.K., 2000. The transcription factor MTF-1 mediates metal regulation of the mouse ZnT1 gene. *J Biol Chem*, 275(44), 34803-34809.
- Leibbrandt, M. ve Koropatnick, J., 1994. Activation of human monocytes with lipopolysaccharide induces metallothionein expression and is diminished by zinc. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 124(1), 72-81.
- Lynes, M.A., Borghesi, L.A., Youn, J. ve Olson, E.A., 1993. Immunomodulatory activities of extracellular metallothionein I. Metallothionein effects on antibody production. *Toxicology* 85(2-3), 161-177.
- MacDonald, R.S., 2000. The role of zinc in growth and cell proliferation. *J Nutr*, 130(5), 1500-1508.
- Margoshes, M. ve Vallee, B. L., 1957. A cadmium protein from equine kidney cortex. *J. Am. Chem. Soc.*, 79(17), 4813–4814.
- McGee, H.M., Woods, G.M., Bennett, B. ve Chung, R.S., 2010. The two faces of metallothionein in carcinogenesis: photoprotection against UVR-induced cancer and promotion of tumour survival. *Photochemical&Photobiological Sciences*, 9(4), 586-596.
- Meplan, C., Richard, M.J. ve Hainaut, P., 2000. Redox signalling and transition metals in the control of the p53 pathway. *Biochemical Pharmacology*, 59(1), 25-33.
- Mergen, G., 2008. Otopsi kemik dokusu örneklerinde toksik metal ve iz element düzeylerinin belirlenmesi ve metalloproteinin gen polimorfizmi ile ilişkisinin araştırılması. (Doktora Tezi), Atatürk Üniversitesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Minami, T., Shimizu, M., Tanaka, H., Okazaki, Y. ve Cherian, M.G., 1999. Metallothionein does not protect mouse endocrine cells from damage induced by alloxan injection. *Toxicology*, 132(1), 33-41.
- Moffatt, P. ve Seguin, C., 1998. Expression of the gene encoding metallothionein-3 in organs of the reproductive system. *DNA Cell. Biol.*, 17(6), 501–510.

- Morimoto, R.I. ve Evans, J., 2003. A Little Stress May Be Good For You. <https://www.sciencedaily.com/releases/2003/12/031211074021.htm>; (10.07.2019)
- Murata, M., Gong, P., Suzuki, K. ve Koizumi, S., 1999. Differential metal response and regulation of human heavy metal-inducible genes. *J Cell Physiol.*, 180(1), 105-113.
- Nguyen, T., Sherratt, P.J. ve Pickett, C.B., 2003. Regulatory mechanisms controlling gene expression mediated by the antioxidant response element. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 43(1), 233-260.
- Niioka, T. ve Kojima, Y., 1991. Studies on induction of zinc metallothionein by sensory and psychological stresses in rat liver In: *Metallothionein in Biology and Medicine*. C.D. Klaassen, and K.T. Suzuki (Ed.) CRC Press., pp. 265-270.
- Ohly, P., Dohle, C., Abel, J., Seissler, J. ve Gleichmann, H., 2000. Zinc Sulphate Induces Metallothionein in Pancreatic Islets of mice and Protects Against Diabetes Induced by Multiple Low Doses of Streptozotocin. *Diabetologia*, 43(8), 1020-1030.
- Otvos, J.D. ve Armitage, I.M., 1991. Structure of the metal clusters in rabbit liver metallothionein. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 77(12), 7094-7098.
- Ostrakhovitch, E.A. ve Cherian, M.G., 2004. Differential regulation of signal transduction pathways in wild type and mutated p53 breast cancer epithelial cells by copper and zinc. *Arch Biochem Biophys*, 423(2), 351-361.
- Otsuka, F., Okugaito, I., Ohsawa, M., Iwamatsu, A., Suzuki, K. ve Koizumi, S., 2000. Novel responses of ZRF, a variant of human MTF-1, to in vivo treatment with heavy metals. *Biochim Biophys Acta*, 1492(2-3), 330-340.
- Ögel, K., 2019. Bağımlılık Yapan Maddeler. <http://www.ogelk.net/Dosyadepo/maddeler.pdf> ; (26.05.2019)
- Önmez, H., 2007. *Papaver somniferum* Bitkisinden Elde Edilen Alkaloidlerin Ekstraksiyonunda Kullanılan Çözücü ve Metodların Karşılaştırılması. Basılmamış Yüksek Lisans Tezi. Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Konya.
- Özcan, O., Erdal, H., Çakırca, G. ve Yönden, Z., 2015. Oksidatif stres ve hücre içi lipid, protein ve DNA yapıları üzerine etkileri. *Journal of Clinical and Experimental Investigations*, 6 (3), 331-336.
- Pacher, P., Beckman, J.S. ve Liaudet, L., 2007. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol. Rev.*, 87(1), 315–424.
- Palmiter, R.D., Findley, S.D., Whitmore, T.E. ve Durnam, D.M., 1992. MT-III, a brain-specific member of the metallothionein gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 89(14), 6333-6333
- Philcox, J.C., Sturkenboom, M., Coyle P. ve Rofe, A.M., 2000. Metallothionein in Mice Reduces Intestinal Zinc Loss during Acute Endotoxin Inflammation, but not during Starvation or Dietary Zinc Restriction. *J. Nutr.*, 130(8), 1901–1909.
- Piech, R., Rumin, M. ve Paczosa-Bator, B., 2015. Voltammetric Determination of Codeine on Glassy Carbon Electrode Modified with Nafion/MWCNTs. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2015(626458), 7.
- Pubchem, 2016a. Codeine phosphate. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Codeine-phosphate>; (19.05.2019)

- Pubchem, 2016b. Codeine sülfate. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Codeine-sulfate> ; (19.05.2019)
- Quaife, C.J., Findley, S.D., Erickson, J.C., Froelick, G.J., Kelly, E.J., Zambrowicz, B.P. ve Palmiter, R.D., 1994. Induction of a new metallothionein isoform (Mt-Iv) occurs during differentiation of stratified squamous epithelia. *Biochemistry*,33(23), 7250-7259.
- Salahshoor, M.R., Vahabi, A., Roshankhak, S., Shabanizadeh, A. ve Jalili, C., 2018. The effects of thymoquinone against morphine-induced damage on male mice liver. *International Journal of Preventive Medicine*, 9(1), 8-15.
- Sakulsak N.,2012. Metallothionein: An Overview on its Metal Homeostatic Regulation in Mammals. *Int. J. Morphol*, 30(3), 1007-1012.
- Saydam, N., Adams, T.K., Steiner, F., Schaffner, W. ve Freedman, J.H., 2002. Regulation of metallothionein transcription by the metal-responsive transcription factor MTF-1: identification of signal transduction cascades that control metal inducible transcription. *J Biol Chem*, 277(23), 20438-20445.
- Schiff, P.L., 2002. Opium and Its Alkaloids. *Am. J. Pharm. Educ*, 66, 186-194.
- Shibuya, K., Satoh, M., Muraoka, M., Watanabe, Y., Oida, M. ve Shimizu, H., 1995. Induction of metallothionein synthesis in transplanted murine tumors by X irradiation. *Radiat. Res.*, 143(1), 54-57.
- Shiraishi, N., Yamamoto, H., Takeda, Y., Kondoh, S., Hayashi, H., Hashimoto, K. ve Aono, K., 1986. Increased metallothionein content in rat liver and kidney following X-irradiation. *Toxicol. Appl. Pharmacol*, 85(2), 128-134.
- Shiraishi, N., Yamamoto, H. ve Hiraki, Y., 1989. Elevation in metallothionein messenger RNA in rat tissues after exposure to X-irradiation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 98(3), 501-506.
- Stankovic, R.K., Chung, R.S. ve Penkowa, M., 2007. Metallothioneins I and II: neuroprotective significance during CNS pathology. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(3), 484-489.
- Süzer, 2010. Opioidler. http://www.onersuzer.net/eski/pdf/tr/309_Opioidler.pdf, 18.06.2019.
- Robbins, A.H. ve Stout, C.D., 1991. X-ray structure of metallothionein. *Methods Enzymol*, 205, 485-502.
- Roxane Laboratories, 2013. Codeine sulfate tablets. Highlights of prescribing information.https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2013/022402s006lbl.pdf, 19.05.2019.
- Ruttkey-Nedecky, B., Nejdil, L., Gumulec, J., Zitka, O., Masarik, M., Eckschlager, T., Stiborova, M., Adam, V. ve Kizek, R., 2013. The role of metallothionein in oxidative stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(3), 6044- 6066.
- TAGI Pharma, 2016. Codeine Sulfate oral solution, CII. <https://www.drugs.com/pro/codeine-sulfate-oral-solution.html> ; (25.05.2019)
- Takahashi, S., 2012. Molecular functions of metallothionein and its role in hematological malignancies. *Journal of Hematology & Oncology*, 5(1), 41-49.
- Thirumoorthy, N., Shyam Sunder, A., Manisenthil Kumar, M., Ganesh, G. ve Chatterjeje, M., 2011. A Review of Metallothionein Isoforms and their Role in Pathophysiology. *World J Surg Oncol.*, 9(1), 54-61.

- Uchida, Y., Takio, K., Titani, K., Ihara, Y. ve Tomonaga, M., 1991. The growth inhibitory factor that is deficient in the Alzheimers-disease brain is a 68-amino acid metallothionein-like protein. *Neuron*, 7(2), 337–347.
- Vasak, M., 2005. Advances in metallothionein structure and functions. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 19(1), 13–17.
- Vasak, M. ve Meloni, G., 2011. Chemistry and biology of mammalian metallothioneins. *J Biol Inorg Chem*, 16(7), 1067-1078.
- Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C.J. ve Telser, J., 2004. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol. Cell. Biochem.*, 266(1-2), 37–56.
- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M. ve Mazur, M., 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biokl Interact*, 160(1), 1-40.
- West, A.K., Hidalgo, J., Eddins, D., Levin, E.D. ve Aschner, M., 2008. Metallothionein in the central nervous system: Roles in protection, regeneration and cognition. *Neuro-toxicology*, 29(3), 489-503.
- Yang, Y., Maret, W. ve Valle, B.L., 2001. Differential. fluorescence labeling of cysteinyl clusters uncovers high. tissue levels of thionein. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 98(10), 5556-9.
- Yina, H., Coxa, B.E., Liub, W., Porter, N.A., Morrow, J.D. ve Milne, G.L., 2009. Identification of intact oxidation products of glycerophospholipids in vitro and in vivo using negative ion electrospray iontrap massspectrometry. *J Mass Spectrom*, 44(5), 672-680.
- Zhou, Z., Sun, X. ve Kang, Y.J., 2002. Metallothionein Protection against Alcoholic Liver Injury through Inhibition of Oxidative Stres. *Exp. Biol. Med.*, 227(3), 214–222.

7. ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı:	Derya TEMİR
Doğum Yeri ve Yılı:	Erbaa/ TOKAT - 1988
Telefon :	05547671732
E-posta :	biodrya@gmail.com

Eğitim Bilgileri

Öğrenim Durumu	Üniversite	Fakülte	Anabilim Dalı/Bölüm
Lisans	Gaziosmanpaşa Üniversitesi	Fen-Edebiyat Fak.	Biyoloji

Katıldığı Kurslar

Kursun Adı	Kursun Yapıldığı Yer	Yılı
Pedagojik Formasyon	Gaziosmanpaşa Üniversitesi Eğitim Fakültesi	2011-2012

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görevi
2018-	Çamlıbel Çok Programlı Anadolu Lisesi	Biyoloji Öğrt.
2014-2018	Sulusaray Çok Programlı Anadolu Lisesi	Biyoloji Öğrt.
2014-2014	Mahperi Hatun Mesleki ve Teknik Anadolu Lisesi	Biyoloji Öğrt.