

T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**LİTYUM KARBONATIN *İN VİTRO* ORTAMDA İNSAN
LENFOSİTLERİNDEKİ SİTOTOKSİSİTE, GENOTOKSİSİTE VE
OKSİDATİF DURUM ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Bülent ADAR

DANIŞMAN

Prof. Dr. Nurten AKSOY

ŞANLIURFA

2015

T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**LİTYUM KARBONATIN *İN VİTRO* ORTAMDA İNSAN
LENFOSİTLERİNDEKİ SİTOTOKSİSİTE, GENOTOKSİSİTE VE
OKSİDATİF DURUM ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Bülent ADAR

DANIŞMAN

Prof. Dr. Nurten AKSOY

Bu tez, Harran Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 14117 proje numarası ile desteklenmiştir.

ŞANLIURFA

2015

TEŞEKKÜR

Eğitimim ve tez çalışmam sũresince beni her konuda bilgilendiren ve desteğini esirgemeyen değerli tez danışmanım Prof. Dr. Nurten AKSOY'a,

Asistanlığımın ilk yıllarında bilgi ve birikimlerini içtenlikle paylaşan, yetişmemde katkıları olan değerli Tıbbi Biyokimya A.D. Öğretim Üyeleri Doç. Dr. şahbettin SELEK ve Prof. Dr. Abdurrahim KOYIĞIT'e ve değerli hocalarım Yrd. Doç. Dr. Hatice SEZEN ile Yrd. Doç. Dr. Emin şAVIK'e,

Birlikte çalışmaktan büyük keyif aldığım, zorlu çalışma koşullarına rağmen büyük bir özveri ve sabırla çalışan değerli Asistan arkadaşlarım Dr. Ahmet KAYMAZ ile Dr. Ali Said KADAK'a ve tüm Tıbbi Biyokimya Laboratuvarı alışanlarına,

Tez çalışmamdaki değerli katkılarından dolayı Tıbbi Biyokimya A.D. Öğretim görevlisi Abdullah TAşKIN'a, Uzm. Dr. Selçuk AKIN ve Uzm. Dr. Murat ÜSTÜNEL'e, Arş. Gör. Seyhan TAşKIN, Mehmet DOĞAN ve Reşit ALTIN'a,

Asistanlığıma başladığım gũnden itibaren her türlü katkılarından dolayı başta Sayın M. Murat ALKAN ve Sayın Tevrat ZERAY olmak üzere tüm Dekanlık personeline,

Hayatım boyunca her zaman yanımda olan, bana her konuda destek olan AİLEME sonsuz teşekkür ederim.

Dr. Bũlent ADAR

İÇİNDEKİLER

SAYFA NO

TEŞEKKÜR	I
İÇİNDEKİLER	II
ŞEKİL LİSTESİ	V
TABLO LİSTESİ	VI
KISALTMALAR	VII
ÖZET	X
ABSTRACT	XII
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Lityum	3
2.1.1. Lityumun Fiziksel Özellikleri	3
2.1.2. Lityumun Kimyasal Özellikleri	4
2.1.3. Doğada Bulunuşu	4
2.1.4. Üretim Yöntemleri ve Değerleri	5
2.1.5. Kullanım Alanları	6
2.1.6. Su Ortamındaki Lityum	7
2.1.7. Kara Ortamındaki Lityum	8
2.1.8. Lityumun Tıpta Kullanımı	9
2.1.9. Lityumun Etki Mekanizmaları	13
2.1.9.1. Fosfoinozitol-3-Kinaz Aktivasyonu (PI3K)	13
2.1.9.2. Serin Treonin Protein Kinaz B (Akt-1) Aktivasyonu	13
2.1.9.3. Düşük K (Potasyum)-uyarılmış Fosfataz	13
2.1.9.4. Inozitol Monofosfataz (IMP)	13
2.1.9.5. Glikojen Sentaz Kinaz 3 β (GSK3 β)	14
2.1.9.6. Diğer Mekanizmalar	14
2.1.10. Lityumun Farmakokinetiği	15
2.1.11. Nötrofillere Etkisi	17
2.1.12. Lenfositlere Etkisi	19
2.1.13. Lityum Toksisitesi	19
2.2. Genotoksisite ve Lityum	23

2.2.1. DNA Hasarı Tipleri	25
2.2.1.1. Endojen Kaynaklı DNA Hasarları	25
2.2.1.1.1. DNA Replikasyonu Sırasında Ortaya Çıkan Yanlış Eşleşmeler	26
2.2.1.1.2. DNA'da Varolan Kararsızlıklar Sonucu Oluşan Hasarlar	26
2.2.1.2. Çevresel Nedenlerden Kaynaklanan Hasarlar	27
2.2.2. DNA Hasarına Hücre Yanıtı	29
2.2.3. DNA Tamir Mekanizmaları	30
2.2.3.1. Direkt Tamir ya da Hasarın Geri Döndürülmesi (Reversal of Damage)	30
2.2.3.2. Eksizyon (kesip-Çıkama) Tamiri	31
2.2.3.3. Replikasyon Sonrası (post-replikasyon) tamiri	33
2.2.3.4. SOS Tamiri	33
2.2.3.5. Çift Zincir Kırıklarının Tamiri	33
2.2.4. Lityumun Genotoksisite Üzerine Etkileri	34
2.2.5. Lityumun Teratojenitesi	34
2.3. Oksidatif Durum, Sitotoksisite ve Lityum	35
2.3.1. Serbest Radikaller	35
2.3.1.1. Süperoksit Radikali (O_2^-)	37
2.3.1.2. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)	37
2.3.1.3. Hidroksil Radikali (HO^-)	37
2.3.1.4. Serbest Oksijen Radikallerinin Hücreye Zararlı Etkileri	38
2.3.1.4.1. Membran Lipidlerine Etkisi (Lipid Peroksidasyonu)	38
2.3.1.4.2. Proteinlere Etkisi	39
2.3.1.4.3. Nükleik asitlere Etkileri	40
2.3.1.4.4. Karbonhidratlara Etkileri	40
2.3.2. Antioksidan Mekanizmalar	40
2.3.2.1. Enzim Olan Antioksidanlar	42
2.3.2.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)	42
2.3.2.1.2. Katalaz (CAT)	43
2.3.2.1.3. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px)	43
2.3.2.1.4. Glutasyon-S-Transferaz (GST)	44

2.3.2.1.5. Glutasyon Redüktaz (GSH-Rd)	44
2.3.2.1.6. Mitokondrial Sitokrom Oksidaz	45
2.3.2.2. Enzim Olmayan Antioksidanlar	45
2.3.2.2.1. Glutasyon (GSH)	45
2.3.2.2.2. Vitamin C (Askorbik Asit)	45
2.3.2.2.3. Vitamin E (Tokoferol)	47
2.3.2.2.4. Seruloplazmin	47
2.3.3. Lityum ve Sitotoksosite	47
2.3.4. Lityum ve Oksidatif Durum	48
2.4. Total Antioksidan Kapasite	49
2.5. Oksidatif Stres	49
2.6. Comet Assay ile DNA Hasarının Belirlenmesi	49
3. GEREÇ VE YÖNTEM	54
3.1. Demirbaş Malzemeler	54
3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	55
3.3. Hücre kültürünün hazırlanması	56
3.4. Çalışma gruplarının oluşturulması	56
3.5. Hücrelerin İnkübasyonu	56
3.6. Kullanılan Yöntemler ve Çalışma Prensipleri	57
3.6.1. Metil Tiyazol Tetrazolyum (MTT) Hücre Canlılık Testi	57
3.6.2. Comet Assay Yöntemi ile DNA Hasarının Ölçülmesi	57
3.6.3. Total Oksidan Seviye (TOS) Ölçümü	59
3.6.4. Total Antioksidan Seviye veya Kapasite (TAS) Ölçümü	60
3.6.5. Oksidatif Stres İndeksi (OSI) Hesaplanması	61
3.7. Yapılan İstatistiksel Analizler	61
4. BULGULAR	62
5. SONUÇ VE TARTIŞMA	66
KAYNAKLAR	76

ŞEKİL LİSTESİ

SAYFA NO

Şekil-1	: Lityum	4
Şekil 2	: Lityum etki mekanizması	15
Şekil-3	: DNA hasarı oluşumu ve sonuçları	25
Şekil-4	: UV ışığı etkisi sonucu oluşan başlıca DNA hasarları	28
Şekil-5	: Fotoreaktivasyon mekanizması	30
Şekil-6	: Baz eksizyon tamiri (BER) mekanizması	32
Şekil-7	: Serbest radikallerin hasar oluşturma mekanizmaları	39
Şekil-8	: Antioksidan gruplar ve görevleri	42
Şekil-9	: 0-4. evrelerdeki comet assay görüntüleri	59
Şekil-10	: MTT ile yapılan canlılık testinde artan Lityum konsantrasyonlarının lenfositler üzerindeki sitotoksik etkileri	62
Şekil-11	: Farklı konsantrasyonlardaki Lityum karbonat ile pozitif ve negatif kontrol grupları kullanılarak yapılan TAS ölçümü.	64
Şekil-12	: Farklı konsantrasyonlardaki Lityum karbonat ile Pozitif ve Negatif kontrol grupları kullanılarak yapılan TOS ölçümü.	65
Şekil-13	: Farklı konsantrasyonlardaki Lityum karbonat ile Pozitif ve Negatif kontrol grupları kullanılarak yapılan OSI ölçümü.	65

TABLO LİSTESİ**SAYFA NO**

Tablo-1	: Önemli lityum mineralleri	5
Tablo-2	: Lityumun psikiyatride kullanım alanları	12
Tablo-3	: Lityumun farmakokinetik özellikleri	17
Tablo-4	: Lityumun yan etkileri	22
Tablo-5	: Radikal ve radikal olmayan oksijen türevi bileşikler	36
Tablo-6	: Lityum karbonat verilen gruplar, Negatif kontrol grubu ve Pozitif kontrol (H ₂ O ₂) gruplarının TAS, TOS, OSI ve DNA Hasarı Düzeylerinin İstatistiksel Analizi	63

KISALTMALAR

Kj	: Kilo joule
Ppm	: Per part million
SQM	: Chemical and Mining Society of Chile
EPA	: Australian Capital Territory Environment Protection Regulation
FDA	: Food and Drug Administration
PI3K	: Fosfoinozitol-3-Kinaz
IMP	: Inozitol Monofosfataz
GSK3β	: Glikojen Sentaz Kinaz 3 β
cAMP	: Siklik adenzin monofosfat
Akt-PKB	: Serin treonin protein kinaz B
PI3K	: Fosfoinozitol-3-kinaz
NFAT	: Aktive T hücre nükleer faktör
G-CSF	: Granülosit koloni stimüle edici faktör
CFUs	: Kemik iliğinde koloni oluşturan birimler
PFC	: Plak oluşturuvcu hücre
NAG	: N-asetil- β -glukoaminidaz
EKG	: Elektrokardiyografi
UV	: Ultraviyole
IR	: İyonize Radyasyon
BER	: Baz eksizyon tamiri
NER	: Nükleotid eksizyon tamiri

MER	: Yanlış eşleşme eksizyon tamiri
NHEJ	: Serbest Uçların Non-homolog Bağlanması
HR	: Homolog Rekombinasyon
mG	: Metilguanin
CHO/HGPRT	: Chinese hamster ovary cell/hypoxanthine-guanine phosphoribosyl-transferase
MDA	: Malondialdehit
SOD	: Süperoksit dismutaz
GSH-Px	: Glutasyon peroksidaz
CAT	: Katalaz
GST	: Glutasyon-S- transferaz
GR	: Glutasyon Redüktaz
GSH	: Glutasyon
TNFα	: Tümör nekroz faktör α
TRAIL	: TNF-bağımlı apoptozis indükleyici ligand
NFκB	: Çekirdek faktör-kappa B
TBARS	: Tiobarbitürik asit reaktif maddeleri
FBS	: Fetal bovin serum
RPMI	: Roswell Park Memorial Institute medium
TAS	: Total Antioksidan Seviye
TOS	: Total Oksidan Seviye
OSI	: Oksidatif Stres İndeksi
MTT	: Metil Tiyazol Tetrazolyum
DMSO	: Dimetil sülfoksit

NMP	: Normal erime noktası
LMP	: Düşük erime noktası
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
EUE	: Embriyo epitelyal hücreleri
NMRI	: Naked Mole-Rat Initiative
AA8 hamster	: Chinese hamster ovary cell line
PBS	: Phosphate buffered saline
TAR	: Total antioksidan reaktivitesi

ÖZET

LİTYUM KARBONATIN *İN VİTRO* ORTAMDA İNSAN LENFOSİTLERİNDEKİ SİTOTOKSİSİTE, GENOTOKSİSİTE VE OKSİDATİF DURUM ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Dr. Bülent ADAR

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi

Giriş ve Amaç: Lityum en düşük yoğunluğa sahip metaldir ve çok çeşitli endüstrilerde kullanım alanına sahiptir. Seramik, cam, alüminyum, yağ, eczacılık ve pil sektörü bunlar içerisinde en önemlilerindedir. Lityum halen dünya genelinde mani, depresyon ve manik depresif hastalık tedavi ve profilaksisinde de kullanılan önemli bir ilaçtır. Lityum tedavisi sonucu oluşan yan etkileri dermatolojik, gastrointestinal, oftalmolojik ve endokrinal etkileriyle ilişkilidir. Uzun süreli tedavisinde ise nefrolojik ve kardiyovasküler yan etkiler oluşmaktadır. Lityumun dar bir terapötik tedavi aralığı bulunmakta ve yan etki potansiyeli çok fazladır.

Bu çalışmamızda lityumun farklı konsantrasyonlarında *in vitro* ortamda lenfosit hücrelerindeki, sitotoksosite, genotoksite ve oksidatif durum üzerine etkilerini araştırmayı amaçladık.

Gereç ve Yöntem: *In vitro* lenfosit hücre kültürü ortamında son LiCO_3 konsantrasyonları; 16 mM, 8 mM, 5 mM, 4 mM, 3 mM, 2 mM, 1 mM olan çözeltiler hazırlandı. LiCO_3 içermeyen hücre kültür çözeltilerinden (-) negatif kontrol grubu, son konsantrasyonu 100 uM (mikromolar) H_2O_2 içeren çözelti ile (+) pozitif kontrol grubu oluşturuldu. 24 saat inkübasyondan sonra MTT hücre canlılığı testi yapıldı. 36 saat sonra ise Comet Assay yöntemi ile lityum karbonatın genotoksitesini araştırıldı, kolorimetrik yöntemle de oksidatif-antioksidatif etkileri araştırıldı.

Bulgular ve Tartışma: MTT testine göre 1 mM lityumun hücreler üzerinde sitotoksik etkisi nerdeyse hiç yokken artan konsantrasyonlarıyla beraber bu etkinin artmış olduğu tespit

edildi. Gruplar TAS düzeyi açısından karşılaştırıldığında 1mM lityum karbonat bulunduran grup diğer gruplara göre yüksek ve negatif kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0.05$). DNA hasarı ve TOS açısından karşılaştırıldığında lityum verilen gruplar negatif kontrol grubuyla kıyaslandığında anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0.05$).

Sonuç: Lityum karbonat 1mM konsantrasyonda yüksek bir antioksidan kapasiteye sahiptir ve 1mM den daha yüksek konsantrasyonlarda lenfositler üzerinde belirgin sitotoksik etki göstermektedir. 16 mM konsantrasyona kadar *in vitro* ortamda oksidatif etkilerin artışına neden olmamaktadır ve lenfositlerde kromozom kırığına bağlı genotoksik etki göstermemektedir.

Anahtar kelimeler: Genotoksisite lityum, sitotoksisite, OSI, TAS, TOS

SUMMARY

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF LITHIUM CARBONATE'S UPON CYTOTOXICITY, GENOTOXICITY AND OXIDATIVE STATUS ON HUMAN BLOOD LYMPHOCYTES IN *IN VITRO* ENVIRONMENT

Bulent ADAR MD,

Specialty Thesis, Department of Medical Biochemistry

Purpose: Lithium is a metal with the lowest density and has many usage areas in various industries. Ceramics, glass, aluminum, oil, pharmaceutical and battery industries are the most important ones among them. Lithium is still an important drug which is used in the treatment and prophylaxis of mania, depression and manic-depressive illness in the worldwide. Lithium treatment side effects are associated with dermatological, gastrointestinal, ophthalmologic and endocrine effects. Long-term therapy consists nephrological and cardiovascular side effects. Lithium has the narrow therapeutic treatment range and it has too much potential side effects.

In this study we aimed to investigate cytotoxicity, genotoxicity and oxidative-antioxidative effects of lithium at different concentrations on lymphocytes in *in vitro* environment.

Material and Method: *In vitro* lymphocytes cell culture medium solution were prepared containing at last 16 mM, 8 mM, 5 mM, 4 mM, 3 mM, 2 mM, 1 mM concentrations of LiCO₃. Negative control group was prepared without LiCO₃, positive control group was prepared with a solution containing final concentration of 100 uM (micromolar) H₂O₂. After 24 hours of incubation MTT cell viability assay was performed. After 36 hours the genotoxicity of lithium carbonate investigated with the comet assay method, the oxidative-antioxidative effects were investigated with a colorimetric method.

Results and Discussion: 1 mM lithium almost had no cytotoxic effect on cells by the MTT assay but with increasing concentrations of lithium this cytotoxic effect found to be increased. When groups were compared in terms of TAS levels; 1 mM Lithium carbonate containing group was higher than the other groups and significantly higher than negative control group ($p < 0.05$). When groups were compared in terms of the DNA damage and TOS level, lithium-treated groups had no significant difference compared with the negative control group ($p > 0.05$).

Conclusion: Lithium carbonate has a high antioxidant capacity at 1 mM concentration and at concentrations higher than 1 mM show significant cytotoxic effect on lymphocytes. in *in vitro* environment. Up to 16 mM concentration of lithium carbonate does not cause increase on oxidative effects and does not show genotoxic effects depend on the chromosome breakage on lymphocytes.

Keywords: Cytotoxicity, genotoxicity, lithium, OSI, TAS, TOS

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Lityum en düşük yoğunluğa sahip metal olup, periyodik tabloda hidrojen ve helyumdan sonra gelmektedir. Atom numarası 3 olup, atom ağırlığı 6.941'dir. Lityum; adını Yunancada taş anlamına gelen "lithos" kelimesinden almaktadır. Yaklaşık 150'den fazla lityum mineralinin varlığı bilinmekte ve göllerden direk olarak elde edilen lityum karbonat çeşitli endüstri sektörlerinde hammadde olarak kullanılmaktadır. Lityumun endüstriyel alandaki başlıca kullanım alanları; seramik, cam, alüminyum, yağ, eczacılık ve pil sektörleridir (1-6).

Lityum, tıpta ilk kez 1800'lü yılların ortalarında A. Lipowitz ve Alexander Ure tarafından *in vitro* olarak lityum çözeltilerinin ürik asit kristallerini çözme yeteneğinin keşfinden sonra, mesanenin ürik asit taşlarının tedavisi ve gut hastalarında ürik asit çökelti tedavisi için kullanılmaya başlanmıştır (8-9).

19. yüzyılın ikinci yarısından itibaren, ürik asit dengesindeki bozulmanın birçok hastalığın nedeni olabileceği görüşünün yaygınlaşmasıyla lityumun kullanım alanı hızla genişlemiştir. Romatizmal hastalıklar, dispepsi, böbrek taşları, mesanenin yangısı, hipertansiyon, astım, angina, baş ağrısı gibi pek çok durumda da kullanılmaya başlanmıştır.

Lityumun psikiyatri alanında kullanımı ise İngiltere'de Alexander Haig ve Fransa'da Armand Trousseau depresif hastalarda lityumun etkin bir seçenek olabileceğini ileri sürmüşlerdir daha sonra Amerikalı William A. Hammond lityumun manik hastalarda da etkin olduğunu gözlemlemiştir. Böylece lityum depresyonun hem akut hem de koruyucu tedavisi ve akut manik atakların kontrolü için kullanılmaya başlanmıştır. Ancak, tedavi edici etkileri ile birlikte, titreme, bulantı, kusma, ishal ve halsizlik gibi yan etkiler görülmüş aynı zamanda lityuma bağlı toksik etkiler ve ölümler de kısa sürede dikkati çekmiştir (10). Lityum halen dünya genelinde mani, depresyon ve manik depresif hastalık tedavi ve profilaksisinde kullanılan önemli bir ilaçtır.

Lityum ve bileşiklerinin ilaç, kurutma ve klima üniteleri, seramik ve metalürjik işlemler gibi çok çeşitli kullanım alanlarına sahip olması insanların lityumla yakın temasta

bulunmasına neden olmaktadır. Tedavide kullanılan lityumun serum düzeyi takip edilmektedir ancak dokulardaki dağılımı serumdan çok farklı olabilmektedir.

Yaşlılarda ve böbrek fonksiyonu azalan kişilerde yarılanma ömrü oldukça uzar ve uygulanan dozun azaltılması gerekebilir. Lityum plazma proteinlerine bağlanmayıp önce ekstraselüler sıvıya daha sonra intraselüler sıvıya dağılır. Lityumun hücre içine girişi sodyum elementi gibi basit transport şeklidir. Hücre dışına çıkışı ise aktif transport şeklinde olduğundan ve lityumun taşıma sistemlerinden ayrılması çok yavaş olduğu için hücre dışına çıkışı oldukça zordur. Lityumun eliminasyonu %95 oranında böbreklerden ve glomerüler filtrasyon yoluyla olmaktadır. Terleme ve feçes yoluyla atılımı % 5'ten daha azdır. Hücre membranlarındaki dokuya spesifik yapılar, hücre içi lityum taşınması ve atılımındaki farklar nedeni ile vücut içindeki dağılımı farklıdır (36-37).

Nörotransmitter reseptör sinyaller, sinyal iletim kaskadı, hormonal ve sirkadiyan düzenleme, iyon transportu ve gen ifadesi üzerine birden çok biyokimyasal ve moleküler etkileri bulunmaktadır (20-35). Lityum tedavisi sonucu oluşan yan etkileri dermatolojik, gastrointestinal, oftalmolojik ve endokrinale etkileriyle ilişkilidir. Uzun süreli tedavisinde ise nefrolojik ve kardiyovasküler yan etkiler oluşmaktadır (55-63).

Bu çalışmamızda dar bir terapötik tedavi aralığı bulunan ve yan etki potansiyeli çok fazla olan lityumun farklı konsantrasyonlarında *in vitro* ortamda lenfosit hücrelerindeki, sitotoksite, genotoksite ve oksidatif durum üzerine etkilerini araştırmayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Lityum

Lityum en düşük yoğunluğa sahip metal olup, periyodik tabloda hidrojen ve helyumdan sonra gelmektedir. Atom numarası 3 olup, atom ağırlığı 6.941'dir. Lityum; adını Yunanca'da taş anlamına gelen "lithos" kelimesinden almaktadır. Bu ismin verilme nedeni lityumun bir mineral kaynağında keşfedilmesi, ancak diğer önemli IA grubu elementleri olan sodyum ve potasyumun bitkisel kaynaklarda keşfedilmiş olmasıdır. Lityumun ilk tanımlanması 19. yüzyılda Johan August Arfvedson'un daha sonra spodümen $[LiAl(Si_2O_6)]$ olarak adlandırılan mineral üzerinde yaptığı çalışmalar sonucu olmuştur (1).

Arfvedson, çalışması sırasında mineralin önemli bir kısmını tanımlayamadığını fark edip, daha sonra bu bileşiğin farklı bir kimyasal özelliğe sahip olduğunu görmüştür. Ancak 1855 yılına kadar lityumun metal olarak sentezi gerçekleştirilememiştir. Robert Bunsen ve Augustus Matthienson $LiCl$ 'nin elektrolizi sonucu lityum metali elde etmişlerdir. Lityumun yüksek miktarlarda üretimi ise 1900'lu yıllarda $[LiAl(Si_2O_6)]$ minerali olarak Güney Dakota'daki Etta ocağından çıkarılması ile başlamıştır. Lityum ve bileşiklerinin yüksek miktarlarda tüketimi ise 1950'li yıllarda başlayıp 1960'a kadar süren Atom Enerji Komisyonun (AEC) termonükleer programı için yarattığı talep sonucu olmuştur. Ancak, bu proje tamamlandıktan sonra Amerikan lityum üreticileri fazla kapasite sorunuyla karşı karşıya kalmıştır. 1960'lı yıllardan sonra ise lityumun seramik, cam, metalürji, eczacılık, yağ ve pil sektöründe yaygın kullanım alanı bulmasıyla bu açık dengelenmeye çalışılmıştır (2).

2.1.1. Lityumun Fiziksel Özellikleri:

Yoğunluğu	: 0.535 g/ml
Erime noktası	: 180. 54 °C (453.69K)
Kaynama noktası	: 1342 °C (1615K)
Molar hacmi	: 13.02 ml/mol
Isı iletkenliği (300K)	: 0.85 W cm ⁻¹ K ⁻¹
Özgül ısı	: 3.582 J g ⁻¹ K ⁻¹

Buharlaşma Entalpisi: 147 kJ mol⁻¹

Atomlaşma Entalpisi: 159 kJ mol⁻¹ (3).



şekil-1: Lityum

2.1.2. Lityumun Kimyasal Özellikleri:

Elektronik konfigürasyonu	: [He]. 2s ¹
Kabuk yapısı	: 2.1
Elektron ilgisi	: 59.6 kJ/mol ⁻¹
Elektronegatiflik	: 0.98 (Pauling birimi) 0.89 (Sanderson elektronegatifliğine göre)
Atomik Yarıçapı	: 145 pm (167 pm hesaplama ile),
İyonlaşma enerjileri:	
I. iyonlaşma Enerjisi	: 520. 2kJ/mol
II. iyonlaşma Enerjisi	: 7298. 1kJ/mol
III. iyonlaşma Enerjisi	: 11815 kJ/mol
Oksidasyon sayısı	: 1, indirgenme Potansiyeli: E ⁰ = -3.040 volt (3).

2.1.3. Doğada Bulunuşu

Lityumun yeryüzündeki ortalama konsantrasyonu yaklaşık % 0,006 oranında olup, deniz suyunda da yaklaşık 0,1 ppm lityum olduğu sanılmaktadır. Lityumun doğadaki ana kaynakları killer, mineraller ve salamuralar (tuzlu yer altı suları) olup, ticari ölçekte üretim mineraller ve salamuralardan yapılmaktadır.

Yaklaşık 150'den fazla lityum mineralinin varlığı bilinmesine rağmen, bunların çok azının ticari olarak önemi bulunmaktadır. Ticari olarak öneme sahip lityum mineralleri Tablo 1'de gösterildiği gibi spodümen, lepidolit, petalit ve amblygonit'tir (4).

Tablo-1: Önemli lityum mineralleri

Mineral	Formül	Teorik % Li ₂ O	Ticari % Li ₂ O
Spodümen	LiAl(Si ₂ O ₆)	8.0	1.5-7.0
Lepidolit	K ₂ (Li,Al) ₅₋₆ [Si ₆₋₇ Al ₂₋₁ O ₂₀ (OH,F) ₄]	Değişken	3.0-4.0
Petalit	LiAl(Si ₄ O ₁₀)	4.9	3.0-4.5
Amblygonit	LiAl(PO ₄)(F,OH)	10.1	8.0-9.0

2.1.4. Üretim Yöntemleri ve Değerleri

Lityum mineralleri ile bunların işlenmesi ve göllerden direk olarak elde edilen Li₂CO₃ (lityum karbonat) çeşitli endüstri sektörlerinde hammadde olarak kullanılmaktadır. Lityum mineralleri üretiminde Avustralya (Sons of Gwalia), Zimbabve (Bikita) ve Kanada (Tanco) sırasıyla 150.000 ton, 55.000 ton ve 21.000 ton üretim kapasiteleriyle dünyada en önemli üretici konumunda yer almaktadırlar (5).

Li₂CO₃ üretiminde ise Salar de Atacama'daki salamuralardan üretimi gerçekleştiren SQM Chemicals ilk sırada yer almaktadır.

Spodümen minerali ocaktan çıkarılıp kırıldıktan sonra flotasyon yöntemiyle zenginleştirilerek konsantre cevher elde edilmektedir. Konsantre cevher 1100°C'de kavrularak, mineralin kristal yapısı değiştirilmekte ve böylece sülfürik aside karşı daha reaktif hale gelmektedir. Dönüşmüş spodümen ile sülfürik asit 250°C'ye ısıtılarak, lityum sülfat elde edilmektedir.

Su ile liç işlemiyle çözeltiye alınan lityum soda külü (Na₂CO₃) ile reaksiyona sokularak Li₂CO₃ çöktürülmektedir (3).

2.1.5. Kullanım Alanları

Lityumun çok çeşitli endüstrilerde kullanım alanı bulunmakta olup; seramik, cam, alüminyum, yağ, eczacılık ve pil sektörü bunlar içerisinde en önemlilerindedir. Ayrıca çeşitli metallerle alaşımlar da oluşturmaktadır (Li-Al, Li-Mg alaşımları). Seramik sektöründe lityum karbonat ya da mineral olarak kullanılan lityum, erime sıcaklığının ve ısıl genleşme katsayısının düşmesini sağlarken, akışkanlığı da artırmaktadır. Ayrıca lityum kullanılması ile daha toksik bileşiklerin kullanılmasının önüne geçilmektedir. Amerika'da piroseramik sektörü lityum talebinin büyük çoğunluğunu oluşturmaktadır.

Düşük demir içerikli spodümen ile petalit camın fiziksel özelliklerini artırmaktadır. Cam üreticileri, beher ve şişe cam üretimlerinde lityumu kullanarak daha hafif ve daha ince kalınlığa sahip ürünler elde etmektedirler.

Lityum karbonat ya da lityum florit alüminyum potalara katılarak verimin artmasını sağlamaktadır. Ucuz olması dolayısıyla lityum karbonat daha çok tercih edilmektedir. Hücreye eklenen lityum karbonat, kriyolit ile reaksiyona girerek daha az yakıt tüketimini ve daha iyi akım verimini sağlamaktadır. Ayrıca flor emisyonlarının da %20-30 kadar azalmasını sağlamaktadır.

Gres yağı sektöründe kullanılan lityum bileşikleri, yüksek sıcaklık aralıklarında bile çalışma imkanı sağlamakta olup, suya karşı direncin artmasını da sağlamaktadır. Yüksek enerji yoğunluğu, düşük kütle ve diğer çevresel ve performans özellikleri lityumun, ikincil (şarj edilebilen) pil sektöründe taşınabilir elektronik cihazlardan araçlar için güç sağlayıcı olmasına kadar geniş bir aralıkta kullanımını sağlamaktadır. Lityum-metal anotların kullanımı kolayca yanıcı hale gelmesinden dolayı zamanla durdurulmasına rağmen polimerik Li iyon elektrolitleri kullanılarak bu problemin ortadan kaldırılması sağlanmıştır. Pil sektöründe lityumun kullanımının artacağı düşünülmektedir. Lityum-Alüminyum alaşımları düşük yoğunlukları ve elastik modüllerinin daha yüksek olmasından dolayı diğer alüminyum alaşımlarına göre uçak gövdesinde daha yaygın olarak kullanılmaktadır (6).

2.1.6. Su Ortamındaki Lityum

Lityum esas olarak su içinde iyonik formda bulunmaktadır. Lityum, lityum hidroksit ve hidrojen oluşturmak üzere su ile reaksiyona girmektedir. Lityumun deniz suyu ve doğal sulardaki konsantrasyonları ug/L düzeyindedir.

Literatüre göre yüzeydeki sularda bulunan lityum konsantrasyonları 1 ve 10 ug/L arasındadır. Deniz suyu yaklaşık olarak 0,17 mg/L içerir, yeraltındaki sularda lityum konsantrasyonları 0,5 mg/L dolaylarındadır. Kuzey Şili’de lityumdan zengin bölgelerde bulunan nehirlerde bu oran 3 ug/L’dir. Yüzeydeki sularda bulunan en yüksek lityum içeriği 5,2 mg/L’dir. Dünya genelinde maden suyunda lityum 0,05–1 mg/L düzeylerinde bulunurken en yüksek oranı 100 mg/L dolaylarında bazı maden sularında bulunmaktadır.

Pimephales promelas (Sazan yavrusu), *Ceriodaphnia dubia* ve bir tatlı su salyangozu (*Elimia clavaeformis*) üzerinde lityum toksisitesi ile ilgili yapılan bir çalışmada birçok doğal suda bulunan sodyum içeriğinin lityum toksisitesini önlediğini bulunmuştur.

Etkin konsantrasyon (EC50), test edilen hayvanların % 50’si üzerinde biyolojik etki oluşturan bir maddenin sudaki konsantrasyonudur. Letal konsantrasyon (LD50) ise eğer inahalsyonla veriliyorsa tanımlanan hayvan popülasyonunun % 50’sini öldüren havada bulunan madde miktarıdır.

Daphnia magna üzerinde akut etki konsantrasyonu (EC50) 33-197 mg/L olarak belirlenmiştir. Bu tatlı sularda bulunan konsantrasyondan 1000 kat daha fazladır.

Lityum klorid ve lityum sülfat suda yüksek çözünürlüğe sahiptir ve bileşikleri de sulu ortamda çözünmektedir. Olumsuz ortam etkileri gösteren lityum bileşikleri gösterilememiştir. Lityumun partiküllere afinitesi az olduğundan biyolojik birikimi beklenmemektedir.

2.1.7. Kara Ortamındaki Lityum

Karada lityum, lityum karbonat (Li_2CO_3), lityum klorid (LiCl) veya lityum oksit (Li_2O) şeklinde bulunur. Lityum daha çok kil fraksiyonunda ve tüm topraklarda eser miktarda bulunur ve daha az olmakla beraber toprakta organik halde değişen miktarlarda bulunmaktadır (7-200 ug/g).

Lityum kaynağı genellikle tortul kayaçlardır. Örneğin, 19 ppm miktarı ile lityumun ölü deniz aragonitinde gösterildiği gibi buharlaştırılan göl suyundan elde edilen çökelmiş karbonatlar yüksek lityum konsantrasyonu içerebilir.

Lityum bütün bitkiler tarafından alınmaktadır ancak büyüme gelişimleri için gerekli değil gibi görünmektedir. Yapılan bitki gözlemlerinde lityum alımı bitkilerde 0,2 ile 300 ppm arasında değişmektedir. *Cirsium arvense* ve *Solanum dulcamera* gibi bitkilerde lityum konsantrasyonu diğer bitkilere göre 3-6 kat daha fazladır.

Kenger *arvense* ve *Holoschoenus vulgaris* gibi tuz-toleranslı bitkilerin lityum içeriği 99,6-226,4 mg/g'a ulaşabilir.

Bitkilerde lityumun alımının artması bazı asidik topraklarda artmıştır. Toprak asiditesinin artması bazı ağır metallerin örneğin, demir, nikel, kobalt, manganez gibi metalik elementler, bakır ve bir dereceye kadar alüminyum, kurşun ve kadmiyumun çözünürlüğünü arttırmaktadır. Bitki lityum düzeyleri direk ve önemli bir şekilde bu elementlere bağlıdır. Lityum bitki ve hayvanlarda potasyum ve sodyum ile aynı zamanda magnezyuma ihtiyaç duyan enzimlerle etkileşime girmektedir. Lityumun kompleks oluşturma özellikleri Na^+ ve K^+ 'dan daha güçlüdür ancak Mg^{2+} 'den daha zayıftır.

Tedavi sırasında ulaşılan konsantrasyonları Li^+ ve Mg^{2+} benzer konsantrasyonlarda bulunurlar, lityumun bağlandığı taraflar Mg^{2+} tarafından işgal edilmemiştir. Mg^{2+} bölgeleri Na^+ ve K^+ yerine Li^+ tarafından doldurulmuştur. Bütün alkali metal iyonları Mg^{2+} den 1000 kat daha hızlı yer değiştirir, bu Li^+ 'nin tercihen neden Mg^{2+} içeren enzimlerin aktivitelerini etkilediğini açıklamaktadır.

Australian Capital Territory Environment Protection Regulation (**EPA, 2005**)'ya göre lityum bir kirleticidir ve sulama için kullanılan su kaynaklarında çevresel zarar oluşturmaktadır bu nedenle su yollarında verilen lityum konsantrasyonları 2.5 mg/L'ye eşit veya daha az olmalıdır (7).

2.1.8. Lityumun Tıpta Kullanımı

Lityum, tıpta ilk kez 1800'lü yılların ortalarında A. Lipowitz ve Alexander Ure tarafından *in vitro* olarak lityum çözeltilerinin ürik asit kristallerini çözme yeteneğinin keşfinde sonra, mesanenin ürik asit taşlarının tedavisi ve gut hastalarında ürik asit çökelti tedavisi için kullanılmaya başlanmıştır (8-9).

19. yüzyılın ikinci yarısından itibaren, ürik asit dengesindeki bozulmanın birçok hastalığın nedeni olabileceği görüşünün yaygınlaşmasıyla lityumun kullanım alanı hızla genişlemiştir. Romatizmal hastalıklar, dispepsi, böbrek taşları, mesanenin yangısı, hipertansiyon, astım, angina, baş ağrısı gibi pek çok durumda da kullanılmaya başlanmıştır.

Lityumun psikiyatri alanında kullanımı ise İngiltere'de Alexander Haig ve Fransa'da Armand Trousseau depresif hastalarda lityumun etkin bir seçenek olabileceğini ileri sürmüşlerdir daha sonra Amerikalı William A. Hammond lityumun manik hastalarda da etkin olduğunu gözlemlemiştir. Böylece lityum depresyonun hem akut hem de koruyucu tedavisi ile akut manik atakların kontrolü için kullanılmaya başlanmıştır.

Ancak, tedavi edici etkileri ile birlikte, titreme, bulantı, kusma, ishal ve halsizlik gibi yan etkiler görülmüş aynı zamanda lityuma bağlı toksik etkiler ve ölümler de kısa sürede dikkati çekmiştir.

1900'lü yıllara gelindiğinde ise lityum; gut, romatizma, kabızlık, obezite, gebelikte ortaya çıkan albüminüri, astım, idrar inkontinansı, sistit, ürogenital hastalıklar, baş ağrısı, nevralji, bel ağrısı, sıtma gibi pek çok hastalıkta kullanılmıştır.

Birçok hastalığa deva olduğu ileri sürülen lityum, soda ve bira içinde de pazarlanmaya başlanmıştır. 1940'larda lityum klorid tuzu hipertansif ve konjestif kalp yetmezliği olan hastaların düşük sodyum içeren diyetlerinin bir parçası olarak sofraya tuzu şeklinde kullanılmaya başlanmıştır. Fakat akut ve ölümcül zehirlenme olgularının görülmesi bu amaçla lityum kullanımını sınırlamıştır (10).

1949 yılında Avustralyalı psikiyatrist John F.J. Cade; 10 manik hastada lityum tedavisinin etkin olduğunu bildirmiş ardından lityumun hem akut antimanik etkinliği hem de manik depresif bozuklukta koruyucu amaçlı kullanımını kontrollü çalışmalar ile desteklenmiştir (11).

1960'lı yılların sonuna doğru bu amaçla kullanımı giderek yaygınlaşmıştır. 1970 yılında ise Amerika Birleşik Devletleri'nde Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration; FDA) tarafından mani tedavisinde kullanımı, dört yıl sonra ise mani öyküsü olan hastalarda idame tedavisi olarak kullanımı onaylanmıştır.

FDA tarafından Valproatin akut manide kullanımının onaylandığı 1995 yılına kadar bipolar bozukluğun tedavisinde FDA onaylı tek ilaç olan lityumun kullanımı yaygın bir şekilde devam etmiştir (9).

Lityum, bipolar bozukluğun manik atak tedavisinde etkinliği kanıtlanmış bir ilaçtır. Lityumun ilk kullanıldığı yıllarda yapılan çalışmalarda saptanan ilaca yanıt oranı % 78 dolayında iken, son yıllarda bu oranın daha az olduğuna dair çalışmaların arttığı görülmektedir (12-14). Özellikle karma (mikst) atak, hızlı döngülü ataklarda, eşlik eden madde kullanımı ya da organisitenin olduğu durumlarda yanıt azalmaktadır. Lityumun antimanik etkisini antipsikotiklerle karşılaştıran çalışmaların değerlendirilmesinde; bu tür olguların ortalama olarak %89'unun lityum ile tedaviye yanıt verdiği saptanmıştır (12, 13, 15).

Lityumun bipolar depresyondaki etkinliği major depresyona göre fazladır. Plasebo kontrollü çalışmalarda bipolar depresyonda yanıt oranı %79 iken, major depresif hastalıkta %36'dır. Ancak, bipolar depresyonda çoğu zaman ek bir antidepresana gerek duyulmaktadır.

Böyle durumlarda lityumun manik kayma ve hızlı döngü riskini azalttığı da düşünülmektedir (13).

Lityumun bipolar bozukluğun koruyucu tedavisindeki yeri de oldukça önemlidir. Atakların sıklığını, şiddetini ve sürelerini azalttığı kanıtlanmıştır. Yaygın kullanımla birlikte yapılan çift kör plasebo kontrollü çalışmalarda lityumun % 79 oranında tekrarlamayı önlediği gösterilmiştir. Sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda bu oranın %50-60'lara düştüğü görülmüştür (14). Bu durum lityuma yanıtı etkileyen faktörlere dikkati çekmiştir. Karma mani, hızlı siklus, ataklar arasında işlevselliğin bozuk oluşu, atak örüntüsünün depresyon-mani-ötimi şeklinde oluşu, eşlik eden madde kullanımı ve kişilik bozukluklarında lityuma yanıt verme oranını düşürdüğü belirtilmiştir (13, 14, 16).

Lityum psikiyatri alanında bipolar bozuklukların dışında Tablo 2'de gösterildiği gibi geniş bir kullanım alanına sahiptir. Yineleyici veya dirençli unipolar depresyonda antidepresanlarla birlikte güçlendirme tedavisi olarak, şizoaffektif bozukluk ve şizofrenide affektif komponent belirgin ise antipsikotiklerle birlikte özkıyım davranışının engellenmesi amacıyla, agresyonun önlenmesi amacıyla davranış bozukluğu ve dürtü kontrol bozukluğu olanlarda, obsesif kompulsif bozuklukta kullanımı, lityumun kullanım alanlarına örnek olarak verilebilir.

Psikiyatrik hastalıklar dışında da kullanılabilir. Lityumun, kemik iliğinde granülosit yapımını uyarması nedeniyle nötropenik hastalarda (aplastik anemi veya kanser, immunsupresifler ile indüklenen nötropeni), amiyotrofik lateral sklerozda bulgulardaki ilerlemenin geciktirilmesi amacıyla, uygunsuz antidiüretik hormon üretiminin varlığında, tiroid kanserlerine radyoaktif iyot tedavisine ekleme tedavisi olarak, kronik veya epizodik küme baş ağrıların tedavisinde ve genital herpes enfeksiyonlarında kullanımı bildirilmiştir (9).

Tablo-2: Lityumun psikiyatride kullanım alanları (17-18).

YAYGIN KABUL GÖREN KULLANIM ALANLARI	Bipolar I bozukluk (manik atak ve koruyucu tedavisinde) Bipolar I bozukluk (depresif atak) Bipolar II bozukluk Siklotimik bozukluk Yineleyici majör depresif bozukluk Akut depresyonda etkiyi güçlendirmek için Şizoaffektif bozukluk
YARARLI OLDUĞU DÜŞÜNÜLEN DURUMLAR	Duygulanım belirtileri bulunan şizofrenik bozukluk İmpulsif agresif davranışla giden durumlar Döngüsel özellik gösteren paranoid bozukluk
DENENEBİLECEK DURUMLAR	Duygulanım belirtileri bulunmayan şizofreni Alkol ve madde kullanım bozuklukları Obsesif-kompulsif bozukluk Posttravmatik stres bozukluğu Premenstrual disforik bozukluk Yeme bozuklukları Kişilik bozuklukları Dürtü kontrol bozuklukları Dikkat eksikliği hiperaktivite bozukluğu Periyodik katatoni Tardif diskinezi

2.1.9. Lityumun Etki Mekanizmaları

Lityumla ilgili birçok mekanizma tanımlanmıştır (19).

2.1.9.1. Fosfoinozitol-3-Kinaz Aktivasyonu (PI3K)

Kronik lityum ve sodyum valproat tedavilerinin rat beyinde miyoinozitol düzeyini azalttığı ve inozitolmonofosfatı arttırdığı görülmüştür (20). PI3K'nin glikojen sentazı GSK3 β fosforile ederek inhibe ettiği, (21-22) PI3K inhibisyonunun nöron azalmasını, aktivasyonunun ise çoğalmasını sağladığı aynı zamanda PI3K'nin hücreler arası bağlantıdaki gap junctionları düzenlediği belirtilmiştir (23).

2.1.9.2. Serin Treonin Protein Kinaz B (Akt-1) Aktivasyonu

Lityum Akt-1'i aktiveleştirir, Akt-1 de GSK3 β 'yi inhibe eder. Akt-1 apoptotik ve yaşamsal yollarda önemli bir protein kinazdır (24-25).

2.1.9.3. Düşük K (potasyum)-uyarılmış fosfataz

Lityum düşük K'ya bağlı fosfataz da dahil birçok sitozolik fosfatayı inhibe eder. Lityum rat beyincik granül hücrelerini düşük ekstraselüler K düzeylerinde apoptozise karşı koruduğu tespit edilmiştir (26).

2.1.9.4. Inozitol Monofosfataz (IMP)

Lityumun inozitol fosfatı serbest inozitole enzimatik olarak çevirerek IMP inhibisyonuna katkıda bulunduğu 150 yıl önce keşfedilmiştir (27). Kronik lityum tedavisinin IMP sentezini beyinde paradoksal olarak arttırdığı bulunmuştur (28).

Araştırmacılar yıllarca fosfoinozitol azalmasının lityumun etki mekanizmalarının nedeni olduğunu düşünmüşlerdir. Bunun yanı sıra en son yapılan çalışmalar bunun lityumun

mekanizmalarından olmadığı ileri sürülmüştür (29). IMP santral sinir sisteminde mitokondriyal biyogenezi uyaran otofajide önemli bir rol oynar (30).

2.1.9.5. Glikojen Sentaz Kinaz 3β (GSK3β)

Lityumun IMP inhibisyonu GSK3β etkinleşmesini önler ayrıca yüksek lityum konsantrasyonları GSK3β'yi direk inhibe eder. Ayrıca lityum GSK3β'yi bunun dışında bir çok yolla daha inhibe eder. GSK3β transkripsiyon faktörlerini fosforile ederek hücre büyümesi, inflamasyon, nörokoruma ve farklılaşma için genleri aktifleştirir (31-32).

2.1.9.6. Diğer Mekanizmalar

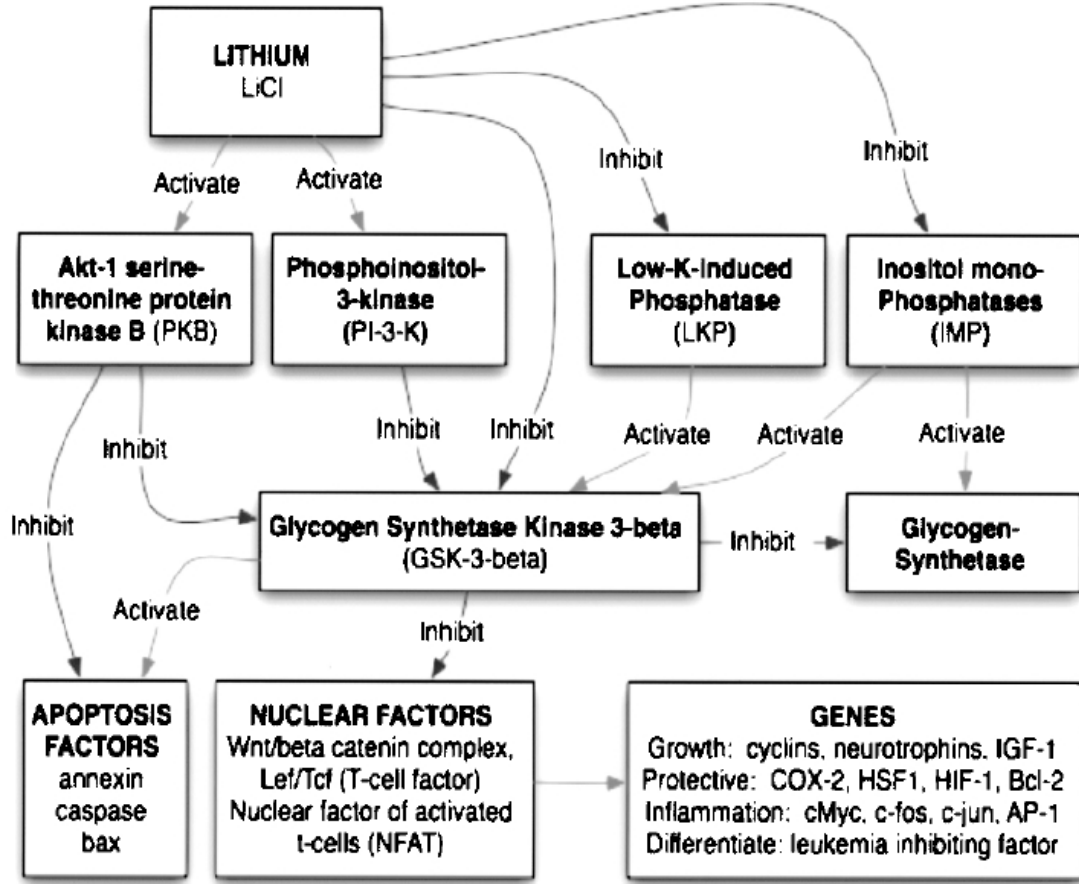
Lityum insan lenfositlerinde guanilat siklaz enziminin güçlü bir inhibitörüdür. İnsan lenfosit hücrelerinin 72 saat boyunca lityumla muamele edilmesi Na/K pompa sayısını belirgin bir şekilde arttırmıştır (33). Bu etki miyoinozitolün eklenmesiyle önlenir.

Lityum G proteini ilişkili adenilat siklaz enzimini inhibe eder böylece GSK3β düzeylerini etkiler (34). Lityum insan lenfositlerinde cGMP'nin birikmesini önler (35).

Jope, lityumun bipolar hastalığıdaki etki mekanizmasının üç etkili sistem olduğunu söylemiştir. Birincisi; lityum eksitatör ve inhibitör sistemleri yeniden düzenleyerek eksitatör glutamaterjik nörotransmitter düzeyini azaltır. İkincisi ise GSK3β, cAMP bağımlı kinaz ve protein kinaz C gibi haberci sistemlerini düzenler bunlarda nöral plastisiteye katkıda bulunur ve duygudurum düzenlenmesi ile dengelenmesini sağlar. Üçüncü olarak; sinyal düzenleyici ikincil mesajcıları, transkripsiyon faktörlerini ve gen ifadesini düzenler.

Lityumun birçok etkisinin GSK3β üzerinde birleştiği görülmektedir (Şekil 2). Lityum Akt serin treonin protein kinaz B (Akt-PKB) ve fosfoinozitol-3-kinaz (PI3K)'i aktifleştirir, düşük potasyum bağımlı fosfatazı ve inozitol monofosfatazı inhibe eder (31).

Şekil-2: Lityum etki mekanizması (31).



Bu aktivitelerin toplamı GSK3 β 'nin inhibisyonudur, Wnt β -katenin, T-cell faktör, NFAT ve diğer nükleer faktörleri fosforile eder. Böylece bu nükleer faktörler hücre içine giremez. Bunun yanı sıra inflamasyon, stres ve diğer sinyallerle defosforile edildiği zaman çekirdeğe girip inflamasyon, büyüme, farklılaşma ve korumayı aktifleştirir (31).

2.1.10. Lityumun Farmakokinetiği

Yaşlılarda ve böbrek fonksiyonu azalan kişilerde yarılanma ömrü oldukça uzar ve uygulanan dozun azaltılması gerekebilir. Lityum plazma proteinlerine bağlanmayıp önce ekstraselüler sıvıya daha sonra intraselüler sıvıya dağılır. Lityumun hücre içine girişi Na elementi gibi basit transport şeklindedir. Hücre dışına çıkışta ise aktif transport şeklinde olduğundan ve lityumun taşıma sistemlerinden ayrılması çok yavaş olduğu için hücre dışına

çıkışı oldukça zordur. Lityumun eliminasyonu %95 oranında böbreklerden ve glomerüler filtrasyon yoluyla olmaktadır. Terleme ve feçes yoluyla atılımı % 5'ten daha azdır (36).

Hücre membranlarındaki dokuya özgü yapılar, hücre içi lityum taşınması ve atılımındaki farklar nedeni ile vücut içindeki dağılımı farklıdır (36-37).

Lityum, gastrointestinal kanaldan hızla emilir ve alımından 2-4 saat sonra plazmadaki en yüksek miktarına ulaşır. Lityumun dağılımı vücuttaki toplam su miktarına bağlıdır fakat kan beyin bariyerine geçişi yavaş ve dengelidir.

Lityum plazma proteinlerine bağlanmayıp plazmada dağıldıktan sonra hücre içi sıvıya geçer. Lityumun hücre içine girişi sodyumunkine benzer olarak basit bir transport şeklindedir. Hücre dışına aktif transportla çıktığından ve çok yavaş taşıma sistemlerinden ayrıldığı için hücre dışına çıkışı oldukça zordur. Lityumun her dokuya özgü hücrel transportundan dolayı vücut içindeki dağılımı farklıdır.

Lityum konsantrasyonu bazı dokularda serum konsantrasyonundan daha yüksek bazı dokularda ise daha düşüktür. Lityumun beyindeki konsantrasyonu serum konsantrasyonu kadardır. Tiroid bezinde ise serum konsantrasyonunun 4-5 katına kadar ulaşabilir. Alyuvardaki lityum miktarı plazmadaki lityum miktarından daha azdır.

Lityumun eliminasyon yarı ömrü yaklaşık 24-48 saattir. Yaşlı ve böbrek fonksiyonu bozuk olan kişilerde bu sürenin sırasıyla 36 ve 40-50 saate kadar çıktığı rapor edilmiştir. Lityum atılımı genel olarak idrar yoluyla olur %1 kadarı ise feçesle olur. Lityumun %80'i muhtemelen sodyum reabsorbsiyonundan sorumlu olan aynı mekanizma ile proksimal tubullerden reabsorbe olur. Lityumun böbrek yoluyla vücuttan temizlenmesi plazma konsantrasyonu ile orantılıdır. Tek doz lityumun yaklaşık %50'si 24 saatte atılır. Düşük tuz alımı tübüllerdeki sodyum miktarının azalmasına neden olur. Bu da lityumun tübüllerden daha fazla geri alınmasına ve sonuç olarak intoksikasyona neden olabilir.

Renal lityum klirensi normal şartlar altında aynı bireyde oldukça sabittir ancak yaşla birlikte ve sodyum alımı düştüğü zaman atılımı azalır. Verilmesi gereken serum miktarı

lityumun böbreklerden atılım düzeyine bağlıdır. Bu nedenle böbreklerden lityum atılımı bireyler arasından farklılık gösterebildiği için verilmesi gereken lityum dozu kişiye göre ayarlanmalıdır. Klinik raporlarda, serum lityum serum lityum düzeyi 300 mg alındıktan sonra yaklaşık 0.2-0.4 mmol/L, 600 mg alındıktan sonra ise 0.3-0.6 mmol/L düzeyine ulaşmaktadır (38). Tablo 3'te Lityumun genel farmakokinetik özellikleri gösterilmiştir.

Tablo-3: Lityumun farmakokinetik özellikleri (39).

Emilim	Hızlı (oral) 2-4 saatte en yüksek konsantrasyona ulaşır. 6-8 saatte tamamı emilir.
Dağılım	Plazma proteinlerine bağlanmaz. Tüm vücut sıvılarına dağılır. İntraselüler kompartman sıvısına girişi yavaştır. Dolaşıma girişi hızlı beyine girişi yavaştır Tiroid dokusunda birikir.
Sanal dağılım hacmi	0.5-0.9 L/kg'dır
Plazma yarı ömrü	12 saattir. Kararlı durum 2 haftada oluşur.
Eliminasyon	Eliminasyonun yarı ömrü 24 saattir. %95 böbrekler (Na'un proksimal klirensine eşdeğerdir.) Bu nedenle atılımı serum Na düzeyinden etkilenir.

2.1.11. Nötrofillere Etkisi

Hematolojik olarak normal deneklerde kullanılan lityum artmış kemik iliği nötrofil üretimi ile (40-41) G-CSF (granülosit koloni stimüle edici faktör) stimülasyonunu takiben kanda artmış nötrofillerle ilişkilidir.

Doymamış vitamin B-12 bağlama kapasitesi toplam vücut nötrofil havuzu için indirek bir göstergedir ve lityum alan manik-depresif hastalarda arttığı görülmüştür (42). Bu sonuç daha sonraları izotop kaplı granülositlerin kinetik ölçümü ile doğrulanmıştır (43).

İnsanlarda lityum kullanımı G-CSF'nin üriner miktarını arttırmıştır (44). Bu, lityumun granülopoezi uyaran bir humoral stimülatör üretimini arttıran temel bir eylemi olduğunu düşündürmektedir.

Gri Collie cinsi bir köpeğin nötropenik döneminde lityum verilmiş ve nötrofil, trombosit ve retikülosit sayıları döngüsündeki kusur olduğu düşünülen pluripotent kök hücrelerdeki durum ve anormal denetim mekanizmaları netleştirilmiştir (45). Ayrıca, Levitt ve Quesenberry fare kemik iliği kültür ortamına ekledikleri lityumun pluripotent kök hücrelerini ve granülosit ilişkili progenitör hücreleri arttırdığını gözlemlemişlerdir. Lityumun böylece hematopoezi iki şekilde etkilediği görülmüştür. G-CSF üretimini arttırmakta ve pluripotent kök hücreleri direk olarak çoğaltmaktadır (46).

İnsanlarda lityum tedavisi süresince nötrofil elastaz düzeyi artmıştır (47).

Lityum 0,5-5 mM düzeyde intraperitoneal olarak farelere verildiğinde pluripotent kök hücre popülasyonunu arttırmıştır. Kemik iliğinde; koloni oluşturan birimlerde (CFUs), kemik iliği selülaritesinde ve periferal (WBC) beyaz kürelerde anlamlı bir artış görülmüştür. Kemik iliği CFUs düzeyi lityum verilmesinden 4 gün sonra 1mM verilen grupta en yüksek düzeye ulaşmıştır ($p < 0.001$). 5 mM lityum düzeyinde (insanlarda ulaşılabilen doz düzeyi değildir) CFUs düzeyi normal düzeylere inmiştir (48). *In vitro* ortamda uygulanan 1mM lityum (psikiyatrik hastaların kanında bulunan en yüksek doz düzeyi) kemik iliğindeki ve hücre kültüründeki CFU düzeyleri artmıştır. Kemik iliği eritroid CFUs düzeyi ≥ 0.5 mM'de azaldığı tespit edilmiştir. *In vivo* (0.5–5.0 mM i.p.) ve *in vitro* lityum verildikten sonra CFU düzeylerindeki artışta benzer sonuçlar alınmıştır. Lityumla tedavi edilen farelerdeki serumda G-CSF düzeyi artmıştır (49).

2.1.12. Lenfositlere Etkisi

Lityumun *in vitro* ortamda çeşitli lenfosit işlevlerini etkilediği bilinmektedir. Bunlar; E rozet formasyonu oluşturma, mitojen indüklenmiş timidin inkorporasyonu ve cAMP bağımlı plak oluşturuvcu hücre (PFC) baskılanmasıdır (50-51).

Wetman ve ark. 1982'de lityum varlığında lenfosit kültüründeki IgG düzeyini 10^2 - 10^3 mM konsantrasyonlarına anlamlı derecede yükseltmiştir. 1-10 mM dozlarda lityum verilmiş kültürlerde IgG ve IgM sentezi artışı olmuştur. Bununla uyumlu olarak kontrol grubuna göre lityum alan hastaların kanındaki IgM PFC düzeyinin anlamlı derecede artmış olduğu görülmüştür (52). Bipolar hastalarda enfeksiyoda artış ve aşılama sonrası düşük antikor titresi sistematik olarak görülmemiştir.

2.1.13. Lityum Toksisitesi

Lityum karbonat yan etkileri fazla ve güvenilirlik indeksi düşük olan bir ilaçtır (53). Lityum 0,6-1,5 mEq/L arasında dar bir terapötik aralığa sahip olduğundan toksisite oluşturma ihtimali yüksektir (54).

Yapılan bir çalışmada lityumun serumdaki dozu 1,5 mM'den yüksek olduğunda toksik etkiler oluşturabileceği, serum lityum seviyesinin 1,5-2,0 mM olduğunda böbrekte, karaciğerde, kalpte ve birçok dokuda geri dönüşümlü toksik etki oluşturabileceği, serum lityum düzeyi 2 mM'den yüksek olduğunda ise, nörolojik semptomlara neden olabileceği ve uzamış lityum toksisitesinin bu konsantrasyonda gerçekleşip kalıcı beyin hasarına sebep olabileceği belirtilmiştir (55).

Lityum birçok metabolik değişikliğe de neden olabilir. Lityum sırasıyla sodyum, potasyum, magnezyum ve kalsiyumla yarışır. Böylece intraselüler alanda ve kemiklerde minerallerle yer değiştirir. Eser elementler ve toksik metallerle etkileşimi sonucu böbreklerde biyolojik ve toksik yönleri gösterilmiştir.

Yapılan bir çalışmada serum ve idrar lityum konsantrasyonunun doza bağımlı olduğu tespit edilmiş ve nefrotoksisiteyle ilgili bazı biyokimyasal göstergelerin erken aşamada saptanabileceği tahmin edilmiştir.

Ratlara oral lityum karbonat günde beş kere 10 mg Li/kg (group I), 20 mg Li/kg (group II) dozlarında verilmiş. Aynı dönem boyunca kontrol ratlara % 0.9 NaCl (group III) verilmiştir (56). Deney sırasında ratlara verilen lityum dozu kontrol ratlarıyla kıyaslandığında serum ve idrardaki konsantrasyonların günlük verilen dozlara bağlı olduğu gözlemlenmiştir. Bir hafta sonunda 10 mg Li/kg intragastrik doz alan grupta idrarda kayda değer bir bakır atılımı olduğu görülmüş aynı zamanda kontrol grubuyla kıyaslandığında N-asetil- β -glukoaminidaz (NAG) aktivitesinde artış görülmüştür. Artan üriner protein konsantrasyonu da bir hafta sonunda günlük 20 mg Li/kg olarak tespit edilmiştir. Bu çalışmada lityum karbonatın nefrotoksisitesinin oral alım sonrası doğrudan serum ve üriner konsantrasyonuna bağlı olduğu bulunmuştur. Lityumun yaklaşık %80'si proksimal tubulden geri emilir ve % 20'si ise böbreklerden atılır. Beyindeki lityum konsantrasyonları serumdakine benzerdir. Lityum intoksikasyonu sonucu böbrek fonksiyonlarında bozulmalar ile proteinüri ve diürez saptanmıştır.

Lityumun renal eliminasyonu su ve sodyum dengesi ile beraber birkaç faktörden etkilenir. Lityumun renal tubuller düzeyinde sodyum ve potasyum ile yarıştığı bilinmektedir. Bunun yanı sıra sodyum ve su dengesi lityumun serum düzeyi ile birlikte toksisitesini de etkilemektedir. Lityum toksisitesi için en önemli şey dehidratasyon sodyum ve su dengesizliğine neden olacaktır (56).

Lityum intoksikasyonu hem insanlarda hem de deney hayvanlarında yavaş seyreder. Kronik alımı takiben gastrointestinal tahriş, titreme, susuzluk ve poliüri gibi semptomlar başlar. Yüksek dozlarda birikimi atılımından daha fazladır ve fazla miktarda sodyum ve potasyum atılır bu da kardiyak aritmi ve böbrek fonksiyonlarının çökmesine neden olur. Fazla miktarda sodyum alımı böbrek tübüllerinde lityum reabsorbsiyonuyla yarışacağından intoksisiteyi azaltabilir (57).

Lityum vazopressin, aldosteron ve paratiroid hormonu gibi hormonlara verdiği yanıtı değiştirerek böbrek fonksiyonları üzerinde etki gösterebilir. Histolojik olarak böbrek üzerinde tübüler lezyonlar, tübüler atrofi, glomerüloskleroz, interstisyel fibrozis ve kreatininin klirensinde azalma yapabilir (58-59).

Lityum kullanımının tiroid bezine de etkisi yüksektir. Lityuma bağlı en sık gelişen durumlar; guatr, subklinik ve klinik hipotiroidizm, nadiren hipertiroididir. Lityum, tiroid hormon sentezi ve salınımını bir kaç mekanizma ile önler. Lityum tiroid işlevlerine hormonal ve hormonal olmayan iyot salınımını azaltarak baskılayıcı etki gösterir ve tiroid bezinde tiroglobulin iyodizasyonunu ve tiroid bezinin iyot tutabilmesini azaltır (60). Terapötik dozlarda lityum kullanımının da guatr oluşturabileceği belirtilmiş ve tedavi kesildiğinde guatr gerilemiştir. Bu etki de lityumun direk etkisinden çok iyotun renal klirensini azaltıp sekonder etki olarak meydana getirdiği düşünülmektedir.

Kardiyak belirtiler genellikle elektrokardiyografi (EKG)'de saptanabilir. Kardiyovasküler sistem üzerine olan yan etkisi EKG'de T dalgasında düzleşme ters T dalgası, iletimde yavaşlama, QT aralığında uzama ve atrioventriküler blok gibi değişikliklere sebep olabilmektedir. Bu durum lityumun hücre içi K iyonu ile yerini değiştirmesi ile açıklanabilir (61-62). 3-4 mM serum Lityum düzeyinde kardiyak aritmi, hipotansiyon ve periferik vasküler kollaps gibi yaşamı tehdit edici etkiler ortaya çıkabilmektedir (63). Lityum hematopoetik sistemde de lökositleri etkileyebilmektedir. Nötrofil düzeyini belirgin bir şekilde arttırabilmektedir (64-65)

Lityum hücre membran fizyolojisini etkileyen Ca, Na, K, Mg metabolizmasını da etkiler, hiperkalsemi ile hiperparatiroidizme yol açar. Lityuma bağlı gelişen hiperkalsemi nadir de olsa böbrek taşları, osteopeni ve osteoporoz, dispeptik yakınmalar ile peptik ülser, kardiyak aritmiler, hipertansiyon, dehidratasyon, kas güçsüzlüğü ve böbrek işlevlerinde bozulmaya yol açabilir (66).

Lityumun ayrıca yapılan araştırmalarda belirlenen yan etkilerinden birisi de cinsel işlev ve erkek fertilitesine olan toksik etkisidir (67). Depresyon tanısı almış hastalarda 3 haftalık lityum uygulanmasıyla spermilerin yaşam sürelerinde anlamlı bir azalma olduğu

saptanmıştır (68). Tablo 4'te lityum tedavisi nedeniyle oluşabilecek başlıca yan etkileri belirtilmiştir.

Tablo-4: Lityumun yan etkileri (53)

BAŞLICA YAN ETKİLER	
Nörolojik ve Psikiyatrik	Ekstremitelerde titremeler Hafıza bozuklukları Kas zayıflaması Komaya varan bilinç bozuklukları Epilepsi nöbetleri Baş dönmesi, libido bozuklukları
Kardiyovasküler	EKG değişiklikleri T dalgasında yassılaşma, ters dönme Frekans bozuklukları Aritmiler
Gastro-intestinal	Bulantı, kusma, diyare Karın ağrısı
Sıvı ve elektrolit	Kilo artışı Ödem poliüri
Hematolojik	Lökositoz, lenfopeni
Endokrinolojik	Guatr, hipotiroidi
Deri	Akne Psöriyazis

2.2. Genotoksisite ve Lityum

Genetik bilginin nesilden nesile sağlıklı olarak aktarılabilmesi için DNA yapısının korunması son derece önemlidir. Genetik materyalin moleküler bütünlüğünde ekzojen veya endojen faktörlerin etkisiyle meydana gelen tüm değişiklikler 'DNA hasarı' olarak adlandırılır.

Genom, DNA hasarı oluşturabilecek birçok faktöre maruz kalır. DNA hasarı ilk başta tamir edilmeye çalışılır ancak bu gerçekleştirilemiyorsa programlı hücre ölümü veya hücresel düzeydeki çeşitli mekanizmalar devreye girer (69). Dinamik bir yapıya sahip olan DNA molekülü, onarılabilen tek biyomolekül olması bakımından önemlidir (70).

DNA hasarları fizyolojik olaylar sonucu meydana gelebilmektedir. Bunlar, DNA replikasyonu esnasında oluşabilen yanlış nükleotid eşleşmeleri ve topoizomerez I ile topoizomerez II enzimlerindeki işlev bozukluğu nedeniyle DNA zincir kırıkları gibi işlemler sonucu oluşur.

Bununla birlikte hidrolitik reaksiyonlar ve non enzimatik metilasyonlar sonucu bir hücrede bir gün içerisinde binlerce DNA baz hasarı oluşmaktadır. Oksidatif solunumun, ağır metaller aracılığı ile gerçekleşen Fenton reaksiyonlarının veya çevresel toksik ajanların yer aldığı redoks reaksiyonlarının yan ürünü olan reaktif oksijen bileşikleri de DNA hasarına neden olmaktadır (71).

Enfeksiyon veya inflamasyona yanıt olarak makrofaj ve nötrofillerin artmış sayısı ve aktivitesi sonucu oksijen radikalleri ve azot bileşikleri üretilir (72).

Bu bileşikler; yanlış baz eşleşmelerine neden olabilir, DNA replikasyonu ve transkripsiyonunu engelleyen delesyonlara veya DNA zincir kırıklarına neden olabilirler.

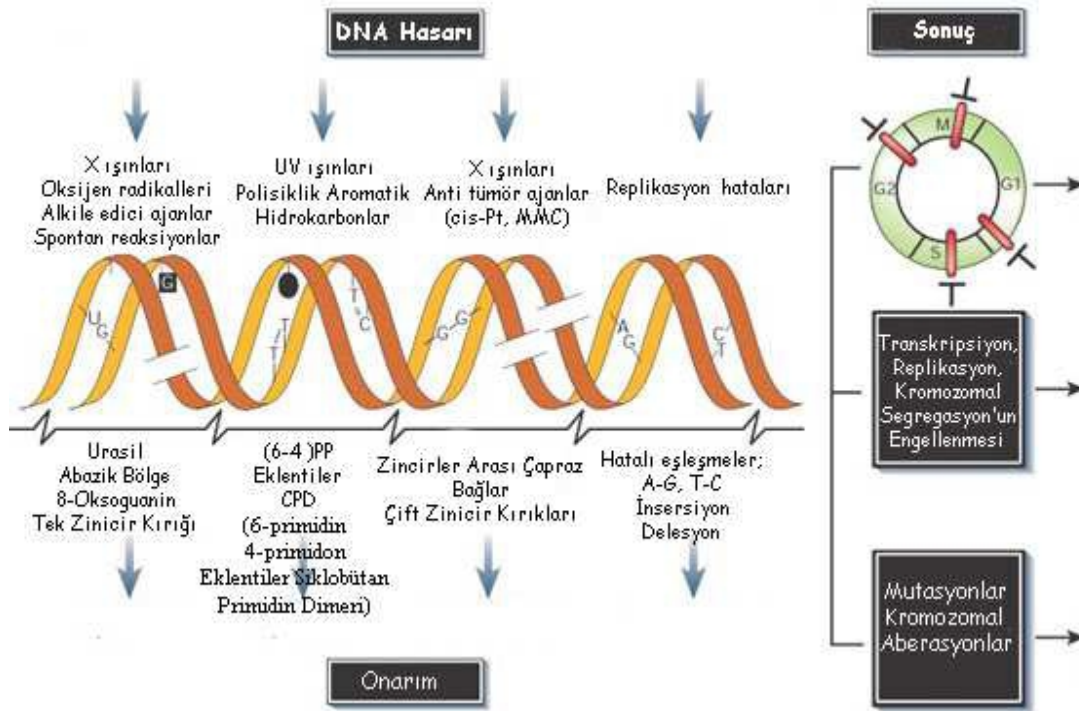
Nadir görülmekle beraber birbirine yakın bölgelerde bulunan iki adet tek zincir kırığı oluştuğu zaman DNA çift zincir kırıkları oluşur. DNA çift zincir kırıkları diğer DNA hasarları kadar sık görülmesine de onarılmaları zordur (73).

DNA'da meydana gelen hasarlar malignite ve hücrel yaşlanmada da büyük rol oynar (74).

Endojen veya çevresel etkenler sonucu oluşabilecek DNA hasarları genomun replikasyonunu ve transkripsiyonu engelleyebileceği gibi onarılmadıklarında ya da doğru onarılmadıklarında mutasyonlara veya genomda hücrenin ya da organizmanın canlılığını tehdit eden delesyonlar, translokasyonlar ve anöploidi gibi daha büyük anomalilere neden olmaktadır (Şekil 3, 75).

Endojen etkenlerin neden olduğu DNA hasarı miktarı çevresel etkenlerin neden olduğu DNA hasarından daha fazladır. Bununla birlikte normal hücrel aktiviteler sonucu oluşan DNA hasarları ile bazı çevresel etkenlere maruziyeti sonucu oluşan DNA hasarları aynıdır ya da birbirlerine çok benzemektedir (76).

Ekzojen faktörlerden kaynaklanan DNA hasarlarının neden olduğu mutasyonlar ve gen ekspresyonundaki değişiklikler ile ekzojen faktörlerle beraber etkinliği artan endojen DNA hasarları çoğu kanser vakasında birlikte rol almaktadır. Bu nedenle oluşan endojen DNA hasarlarının ekzojen DNA hasarları ile etkileşimini bilmek kanser ve diğer hastalıkların gelişimini anlamak için önemlidir (74).



Şekil-3: DNA hasarı oluşumu ve sonuçları (77).

2.2.1. DNA Hasarı Tipleri

2.2.1.1. Endojen Kaynaklı DNA Hasarları

Endojen kaynaklı DNA hasarları genellikle enzimler ve enzim ürünleri tarafından oluşturulur. Oksidasyon-redüksiyon döngüleri sonucu oluşan protonlar, mitokondrilerden salınan serbest oksijen radikalleri, lipidlerin oksidasyonu sonucu üretilen etoksi grubu içeren bileşikler endojen biyokimyasal reaksiyonların ürünlerinden bazılarıdır. Bu ürünler depurinasyon, depirimidinyasyon, baz hasarları, eklentiler veya zincir kırıkları oluşturarak DNA'ya hasar verebilirler. Bununla birlikte metabolik aktivitenin fazla olduğu hücre bölünmesi sırasında DNA'nın yapısını ve aktivitesini devam ettirmekle görevli enzimlerdeki bozukluklar da DNA'ya hasar verebilmektedir (78).

2.2.1.1.1. DNA Replikasyonu Sırasında Ortaya Çıkan Yanlış Eşleşmeler

DNA sentezi sırasında DNA polimerazlar doğru nükleotidleri seçerek polimerizasyonu sağlarlar. Ancak DNA replikasyonu sırasında hatalar oluşabilmektedir. Replikasyon sonrasında oluşan hataları düzeltmekle görevli DNA polimerazın hata okuma (proofreading) 3'-5' ekzonükleaz aktivitesindeki bozukluklar mutasyonlarla birlikte kalıtsal ve sporadik kanserlere neden olabilmektedir (79).

2.2.1.1.2. DNA'da Varolan Kararsızlıklar Sonucu Oluşan Hasarlar

Deaminasyon: Sitozin ve adeninin spontan olarak deaminasyona uğraması sonucu sırasıyla urasil ve hipoksantin oluşmaktadır. DNA yapısındaki hipoksantin potansiyel olarak mutajeniktir. Replikasyon sırasında hipoksantin sitozin ile eşleşir ve A:T G:C mutasyonuna neden olur.

Daha nadir olarak guaninin deaminasyonu ile de ksantin oluşmaktadır. Ksantin sitozin ve timin ile eşleşemediği için DNA sentezi durur.

Adenin deaminasyonu ile oluşan hipoksantin, guaninin deaminasyonu ile oluşan ksantin ve sitozinin deaminasyonu ile oluşan urasil DNA onarım sistemleri tarafından onarılırken, DNA metilasyonu ile oluşan 5-metil sitozinin deaminasyona uğraması sonucu oluşan timin normal bir DNA bazı olduğu için onarım sistemleri tarafından gözden kaçırılır. Sonuçta G:C T:A mutasyonu meydana gelir.

Baz Kaybı: DNA yapısında bulunan pürin ve pirimidin bazlarının termal dayanıklılığına bağlı olarak hidrolitik baz kaybı olur ve sonuçta pürin veya pirimidinleri uzaklaştırılmış bölgeler oluşur. Baz kaybı replikasyonu etkileyeceği gibi pürin veya pirimidinleri uzaklaştırılmış bölgede 3' fosfodiester bağının kolayca hidroliz olmasıyla zincir kırıkları da oluşur (80).

Metilasyon: Bir metil grubunun sitozin halkasının 5 numaralı karbonundan yapıya eklenmesi ile meydana gelir. Bu reaksiyon CpG dinükleotit olarak da adlandırılan 5'-CG-3'

dizisinin içerisinde DNA metiltransferaz katalizinde gerçekleşir. DNA'nın metilasyonu ökaryotik hücrelerde en çok görülen epigenetik (DNA nükleotit dizisinde bir değişiklik olmaksızın gen anlatımında meydana gelen değişiklik) olaylardan biridir (81).

Oksidatif Hasar: Oksidatif hasarlar en sık görülen DNA hasarlarıdır. Hücrede metabolik ve diğer biyokimyasal reaksiyonlar sonucu ve çevresel faktörler nedeni ile sürekli olarak reaktif oksijen türleri (ROT) oluşur. Süperoksit anyon radikali (O_2^-), hidroksil radikali ($OH\bullet$), hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi reaktif oksijen türleri DNA hasarlarına yol açar (74). Hidroksil radikali ($OH\bullet$) biyolojik moleküller için en reaktif oksijen ürünüdür. DNA'da baz hasarları ve DNA-protein çapraz bağları gibi bir çok değişikliğe neden olur (82).

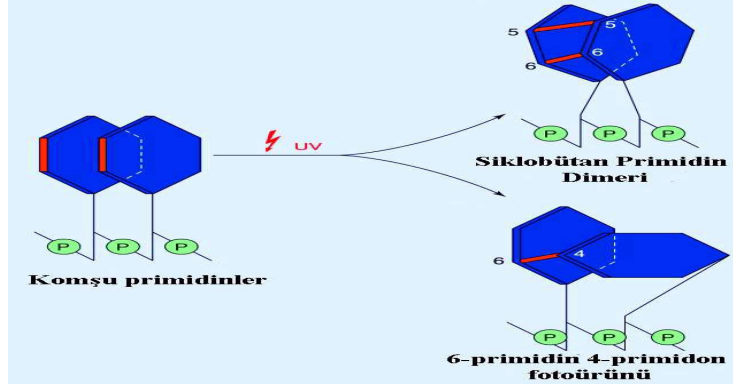
2.2.1.2. Çevresel Nedenlerden Kaynaklanan Hasarlar

İyonize radyasyon, UV ışınları ve doğal ya da insan yapımı kimyasallar DNA'ya hasar vermektedir.

Ultraviyole Işınlar: 240-400 nm dalga boyunda olan UV ışınları DNA üzerinde iki tip hasar oluşturabilir.

1- Pirimidin dimerlerinin oluşumu: UV ışınlarına maruz kalan DNA'da komşu pirimidinler arasında kovalent bağlar oluşur ve en çok siklobütan pirimidin dimerleri oluşmaktadır (Şekil 4, 83).

2- DNA çapraz bağları ve zincir kırıkları: UV radyasyon DNA-protein ve daha az olmak üzere DNA-DNA çapraz bağlarının oluşumuna neden olur. Ayrıca UV'ye maruz kalan DNA'da zincir kırıkları olduğu bilinmektedir (80).



Şekil-4: UV ışığı etkisi sonucu oluşan başlıca DNA hasarları (84).

İyonize Radyasyon (IR): IR'nin hücre üzerine etkisi 2 şekilde olabilir. IR'nin doğrudan etkisi, radyasyon enerjisinin doğrudan DNA ile etkileşimi sonucu oluşurken, dolaylı etki radyasyonla açığa çıkan enerji ile uyarılan moleküllerin DNA ile etkileşimi sonucu ortaya çıkar (85).

IR etkisiyle, DNA'yı çevreleyen suyun O-H bağlarının hidrolitik ayrılmasıyla oluşan hidroksil radikali (OH•) DNA ile etkileşir. Sonuçta baz hasarı ve zincir kırıkları meydana gelir.

Oksijen varlığında IR sonucu doymuş halkalı baz türevleri oluşur. Bunların en önemlileri timin glikol, metil tetranil üre, 5-OH hidantoin, 5-OH-metil urasil, 8-OH guanin, 4,6 diamino 5-formamido pirimidin'dir. Bu hasarlı bazların bir kısmı replikasyon sırasında eşlenmez ve transkripsiyon sırasında da çerçeve kayma mutasyonuna neden olurken, bir kısmı ise yanlış eşleşerek nokta mutasyonuna yol açar (86). Diğer taraftan IR doğrudan zincir kırıkları oluşturmak yoluyla da replikasyonu durdurabilir (87).

Alkilleyici Maddeler: Alkilasyon, nükleotidlerdeki amino ve keto gruplarına metil (CH₃ -) ya da etil (CH₃ - CH₂) gibi bir alkil grubu eklenmesi işlemidir. Nitrozaminler, etilmetilsülfonat ve Nmetil- N1-nitrosoguanidin en önemli alkilleyici ajanlardır. En önemli alkilasyon bölgesi, guaninin 6. karbon atomundaki oksijendir (88).

Çevresel mutajen ve karsinogenlerin en geniş grubu olup, pek çoğu anti-kanser ilaç olarak kullanılmaktadır (80). Çeşitli gıda maddelerinde, bazı ilaçlarda ve tütünde bulunan alkilleyici maddelerin bir kısmı insanda sitokrom P450 sistemi tarafından metabolik aktivasyona uğrayarak, bir kısmı da enzimatik olmayan yolla elektrofilik bir yapı kazanırlar. Çok kısa yaşam süresi olan bu aktif ara ürünler DNA yapısındaki nükleofilik merkezlere atak yaparak DNA alkilasyonuna neden olurlar.

Alkilleyici maddeler organizmada endojen olarak ta sentezlenebilirler. Endojen alkilleyiciler, organizmada bulunan pirimer aminlerin nitrik oksitten türeyen nitroz anhidrit, nitrat gibi nitrozlayıcı bileşikler tarafından oluşurlar (89).

2.2.2. DNA Hasarına Hücre Yanıtı

Hücrede DNA hasarı meydana geldiğinde dört önemli yanıt oluşur (90).

1. DNA hasarı kontrol noktalarının aktivasyonu ile hücre döngüsünün ilerlemesinin engellenmesi, bu şekilde hasarlı genetik materyalin onarımına imkan sağlanması ve hasarlı kromozomların genetik geçişinin önlenmesi,

2. Hasarlı DNA'nın çıkarılarak DNA çift zincirinin doğru bir şekilde yeniden yapılandırılması (DNA onarımı),

3. Hücredeki bazı genlerin transkripsiyon düzeylerinin hücrenin yararına olacak şekilde değişmesi (transkripsiyonel cevap),

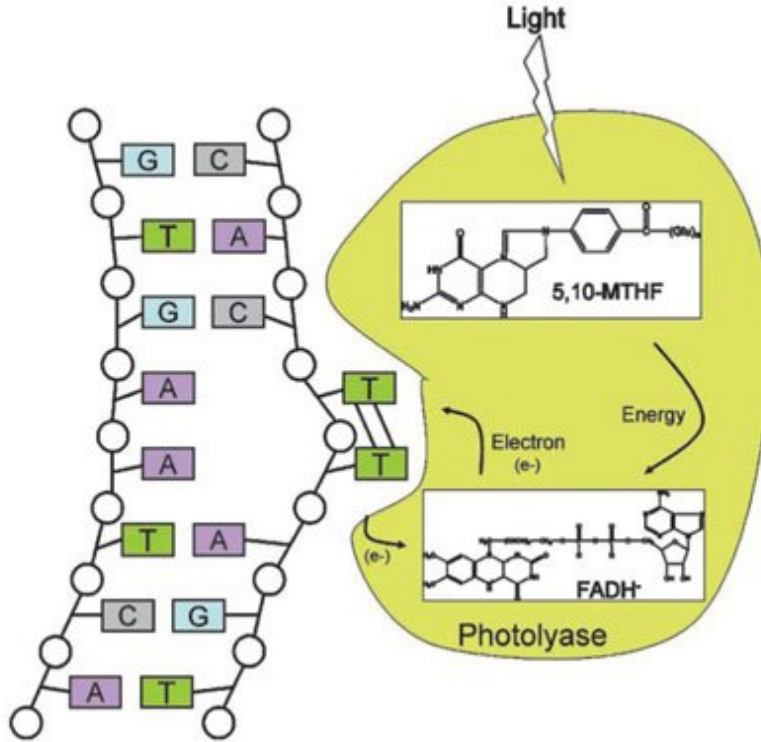
4. Ciddi olarak hasar görmüş hücrelerin elenmesi (programlı hücre ölümü, apoptoz).

Bu yanıtlardan herhangi birinin işlev görmemesi hücre düzeyinde genomik kararsızlıkla, organizma düzeyinde ise genetik hastalıklar, kanser veya yaşlanma ile sonuçlanır (91).

2.2.3. DNA Tamir Mekanizmaları

2.2.3.1 Direkt Tamir Mekanizmaları

A- Fotoreaktivasyon: Bakteri ve diğer bazı organizmalar UV hasarını onarmak için fotoreaktivasyon denen bir mekanizmaya sahiptir. Bu yöntemle çoğunlukla ışık onarımı denmektedir çünkü gerçekleşebilmesi için ışık gereklidir. Fotoreaktivasyon sırasında fotolizaz enzimi pirimidin dimer hasarlı bölgeye bağlanır daha sonra ikinci bir molekül olan kromofor ışık enerjisini kimyasal enerjiye dönüştürerek DNA onarımı için gerekli enerjiyi sağlar. Bu tamir mekanizması bitki, mantar, meyve sinekleri ve bazı kurbağalarda görülmüştür ancak insanlarda yoktur (92). Şekil 5'te fotoreaktivasyon yöntemiyle DNA onarım mekanizması görülmektedir.



Şekil-5: Fotoreaktivasyon mekanizması

B- O6-Metilguanin Tamiri: O6-Metilguanin (mG) alkilleyici ajanlar varlığında oluşur ve yüksek oranda mutajeniktir. O6 Metilguanin-DNA metil transferaz enzimi, DNA'daki yanlış metillenen bazların CH₃ gruplarını kendi sistein rezidülerine transfer ederek

normal Guanin oluşumunu sağlar. Bunu yaparken enzim de geri dönüşümsüz olarak baskılanmış olur ve işlev dışı kalır. Böylece bu onarımda enzimin özgünlüğü kadar sayısı da önem kazanmaktadır.

C- Basit Tek Zincir Kırıklarının Ligasyonu: X ışını ya da peroksitler gibi bazı ajanlar DNA zincirinde basit kırıklara neden olabilmektedir. Bir zincirde olan basit kırıklar DNA ligaz enzimi ile hemen tamir edilmektedir. DNA ligaz; enerji gerektiren bir reaksiyon ile 5' fosfat grubu ile 3'OH grubu arasındaki fosfodiester bağı oluşturur.

2.2.3.2.Eksizyon (Kesip-Çıkarma) Tamiri

DNA'daki hasarlı bazın oligonükleotid parçaları olarak çıkartılıp bu bölgenin doğru bazlarla doldurulması ve oluşan çentiğin ligasyonla kapatılması ana prensiptir.

Tamir sistemi 3 temel basamak içerir:

- 1- Hasar veya hata tanınır ve enzimatik olarak bir nükleaz tarafından kesip çıkarılır.
- 2- DNA polimeraz oluşan boşlukları doldurur.
- 3- DNA ligaz son bağı kurar ve boşluk tamamen kapanır (93).

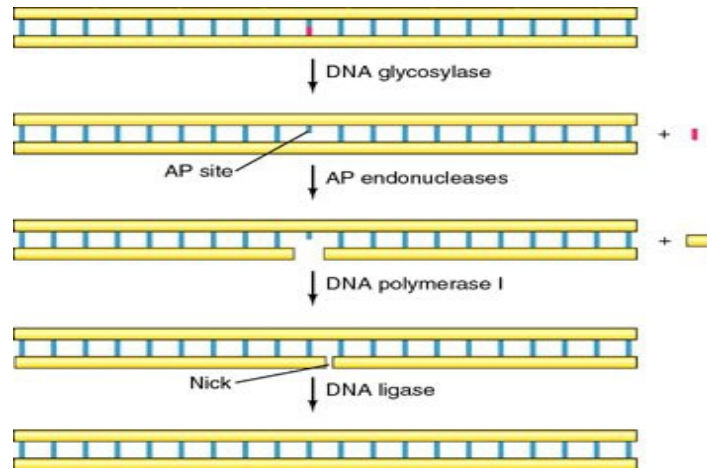
A. Baz Eksizyon Tamiri (BER): DNA bazlarının spontan hidrolizi veya kimyasal ajanlar nedeni ile oluşan uygun olmayan bazların tamiri ile ilgilidir.

Bu sistem DNA glikozilazlar tarafından yürütülür (Şekil 6). Enzim şeker baz arasındaki bağı keser ve apuridik ya da apirimidinik bölge oluşturur. AP endonükleaz denilen başka bir enzim, bazını kaybeden bölgede şeker-P arasındaki bağı keser.

Deoksiribofosfodiesteraz denilen başka bir enzim bazın kaybedildiği yerin çevresini temizleyerek DNA polimeraz enziminin rahat çalışmasına olanak verir. Bu enzim de boşluğu kalıp zinciri kullanarak doldurur.

Zarara uğramış DNA ipliğinin kusurlu bölgenin iki tarafında kesen bir *endonukleaz* tarafından iplikte bir kırık meydana gelir. 5'-3' *eksonukleazın* iplikteki kusurlu bölgeyi yok edilir.

Boşluğun bir tarafında oluşan 3'-OH grubunu primer olarak, tamamlayıcı dizileri taşıyan zinciri de kalıp gibi kullanan *DNA polimeraz* tarafından yeni bir iplik sentez edilir ve *DNA ligazın* yeni sentez edilen parçanın 3'ucunu eski ipliğe kovalent biçimde bağlanır (94).



Şekil-6: Baz eksizyon tamiri (BER) mekanizması

B. Nükleotid Çıkarma Onarımı (Nucleotide Excision Repair / NER): DNA bazları üzerinde büyük eklentiler oluşturan birçok farklı hasarı tanıyabilen bir onarım mekanizmasıdır (95).

Birçok DNA hasarının özellikle heliks distorsiyonuna neden olanların onarımında etkindir. İnsanlarda güneşten gelen UV' nin karsinojenik etkilerine (dimerler) ve sisplatin, 4-nitrokuinolin oksid gibi etkenlerle reaksiyon sonucu oluşan büyük eklentili hasarlara karşı önemli bir savunma mekanizmasıdır (90, 96).

C. Yanlış Eşleşme Onarımı: Bu onarım mekanizması, DNA replikasyonu sırasında meydana gelen yanlış eşleşme hatalarını düzeltir (97). Replikasyondan sonra görev alan bu onarım sistemi DNA replikasyonu doğruluğunun en son kontrol noktasıdır (98, 91).

2.2.3.3. Rekombinasyonel Onarım

DNA'nın zarar görmüş parçasının değiştirilmesinde kalıp olarak kullanılacak tamamlayıcı zincirin bulunmadığı durumda kullanılan ve replikasyondan sonra aktif olan bir onarım mekanizmasıdır.

Timin dimeri gibi bir lezyonu içeren DNA replike olurken DNA polimeraz önce lezyonda duraklar ve yeni sentezlenen zincir boyunca bir boşluk bırakarak lezyonun üzerinden atlar. Bu boşluğa bir yanıt olarak RecA proteini rekombinasyonel bir değiş-tokuş işlemi ile başlangıçta hasarsız tamamlayıcı dizide bulunan bir segmenti bu boşluğa sokup onu tamamlar. Bu işlem "verici" zincirde bir boşluk bırakır. Bu boşluk daha sonra doldurulur.

2.2.3.4. SOS Onarımı

DNA hasarının yüksek oranda olduğu ve diğer onarım mekanizmalarının başarılı olamadığı durumlarda devreye giren acil cevap sistemidir.

Hücrelerde çok ciddi DNA hasarlarına karşı acil yanıt DNA onarım enzimlerinin miktarının artmasıdır. DNA sentezi sırasında, bir lezyonun üzerinden atlamak yerine, sistem, DNA polimerazın lezyon karşısında replikasyonu devam ettirmesini sağlar. Fakat replikasyonun doğruluğundan fedakarlık edilir. Bu nedenle hataya eğilimli onarım sistem de denir (99-100).

2.2.3.5. Çift Zincir Kırıklarının Tamiri

Çift zincir kırıkları spontan oluşur ve genellikle hücrenin reaktif oksijene yanıtı olarak ortaya çıkar ve iki ayrı mekanizma bu potansiyel ölüm lezyonlarını düzeltir.

Çift zincir kırıkları düzeltilmediğinde kromozom aberasyonlarına ve kanser öncesi evreye geçişe neden olabilir. DNA çift zincir kırıkları iki şekilde tamir edilir. Bunlar serbest uçların homolog olmayan şekilde bağlanması (non-homolog end joining) (NHEJ) ve homolog rekombinasyon olmak üzere iki farklı mekanizma ile gerçekleşebilir (101).

2.2.4. Lityumun Genotoksisite Üzerine Etkileri

Lityumun insan ve insan olmayan sistemlerde genetik toksisitesiyle ilgili yapılan çalışmalarda uzun dönem lityum tedavisi alan hastaların lenfositlerinde yapılan kardeş kromatid değişimini arttırmadığı gözlemlenmiştir.

Weiner ve ark. 5 Salmonella suşu, CHO, HGPRT hücreleri ve primer hepatosit hücrelerinde programsız DNA çoğalmasını ve erkek ratlarda da kemik iliği üzerine olan sitogenetik etkilerini araştırmışlardır. Lityumun hiçbir sistemde genetik toksisite etkisi göstermediğini saptamışlardır (102-103).

Daha önce lityumun genotoksik etkisi olduğu belirtilen çalışmalarla ilgili olarak Nordic Uzman Grubunun yüksek lityum konsantrasyonlarında belirgin genotoksitesinin olası bir açıklamasının ikincil bir etkisi olarak GSK3'ü inhibe etmesine bağlı hücre sağkalım süresini arttırması olabileceğini belirtmişlerdir. Ancak aynı araştırmacılar lityum bileşiklerinin kimyasal özellikleri göz alındığında onların mutajen olmasının pek olası olmadığını da belirtmişlerdir (104).

Son zamanlarda yayınlanan Avrupa İstihdam ve Toplumsal İlişkiler Komisyonu tarafından yapılan araştırmada da; lityum ile ilgili insan, hayvan ve genotoksisite çalışmaları ile ilgili tüm verilere bakıldığında ağırlıklı olarak lityum iyonunun DNA'ya zarar vermediğini ve mutajenik olmadığını ayrıca literatürde kanser ile ilgili herhangi bir bilginin de mevcut olmadığını belirtmişlerdir (105).

2.2.5. Lityumun Teratojenitesi

Lityumla ilgili olabilecek esas teratojenik etkiler kardiyak malformasyonlar ve artmış doğum ağırlığıdır. Özellikle Ebstein anomalisi ile ilişkisi olabilmektedir.

İnsanlarda terapötik amaçla kullanılan lityum dozlarının hayvanlara verilmesiyle yapılan deneylerde herhangi bir anomali saptanmamıştır. Bununla birlikte yüksek dozlarda

anensefali, kraniyofasial ve iskelet anomalileri ile kan damarı gelişim anomalileri meydana gelmiştir.

Diğer omurgalılar üzerinde yapılan deneylerde lityumun dorsoventral özellikleri etkilediği ve damar oluşumunu engellediği görülmüştür. Her iki etkinin de miyoinozitol ön tedavisi ile önlenabilir olması lityumun fosfatidilinositol döngüsünü engellediğini göstermektedir.

Son yapılan çalışmalar lityumun omurgasızlar üzerindeki etkisinin Wnt-GSK-3 yolağındaki GSK-3 β 'yi engellemesine bağlı olduğu düşünülmektedir (106).

2.3. Oksidatif Durum, Sitotoksisite ve Lityum

2.3.1. Serbest Radikaller

Serbest radikaller, en dış yörüngelerinde bir ya da daha fazla çiftleşmemiş elektron içeren reaktif moleküllerdir. Oksijen türevi radikaller, biyolojik sistemin en iyi bilinen serbest radikalleridir ve canlı hücrelerde, normal süreçte fizyolojik miktarlarda üretilirler. Çok miktarda üretildiklerinde hücre ve doku hasarına neden olabilirler. Yapılarındaki ortaklanmamış elektrolitlerden dolayı oldukça reaktiftirler ve tüm hücre bileşenleri ile kolayca etkileşebilme özelliği gösterirler (107-108).

Serbest radikaller üç yolla meydana gelirler:

- 1- Kovalent bağlı radikal olmayan bir molekülün bağlarının koparılması ile iki ayrı radikal oluşumu ile,
- 2- Normal bir molekülden tek bir elektronun kaybı veya bir molekülün bölünmesi ile,
- 3- Normal bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi ile.

Organik veya inorganik moleküller, elektriksel olarak pozitif yüklü, negatif yüklü, nötral şekilde olabilirler.

Oksijen, atom numarası 8 olan, doğada dioksijen olarak bulunan kararsız bir elementtir. Bu kararsız konumu, enerji düzeylerinde bulunan elektronlarının yapısıyla ilişkilidir. Oksijen molekülündeki aynı yöne dönen iki elektrona sahip 2P son orbitali önemlidir. Bu orbitallerden herhangi birindeki elektron, bir orbitali bırakıp diğerine geçtiğinde veya farklı yönde döndüğünde “singlet oksijen” oluşur. Orbitallerden birine ters dönüşlü iki elektron veya ikisine ters dönüşlü iki elektron daha gelirse “oksijen radikali” elde edilir (107).

Oluşan radikal eşleşmemiş tek elektronu nedeniyle çok dengesizdir ve hızla ortamdaki kaybolur. Bu yüzden bu radikaller tek elektronlarını bir başka moleküle verebilir (redüksiyon) ya da bir başka molekülden elektron alarak elektron çifti oluşturabilirler (oksidasyon). Sonuçta non radikal yapıyı radikal bir şekle dönüştürebilirler. Oksijenden türeyen çeşitli radikal ve non radikal bileşikler Tablo 5’te gösterilmiştir.

Tablo-5: Radikal ve radikal olmayan oksijen türevi bileşikler

OKSİJEN TÜREVİ BİLEŞİKLER	
RADİKALLER	RADİKAL OLMAYANLAR
Hidroksil (HO [•])	Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂)
Alkoksil (RO [•])	Singlet Oksijen (O ₂ ^{↑↓})
Peroksil (ROO [•])	Ozon (O ₃)
Süperoksit (O ₂ ^{•-})	Hipoklorid (HOCl)
Nitrik Oksit (NO [•])	Lipidhidroperoksit (LOOH)
Azot Dioksit (NO ₂ [•])	Peroksinitrit (ONOO [•])

2.3.1.1. Süperoksit Radikali (O_2^-)

Canlılarda oluştuğu ilk gösterilen radikal olan süperoksit radikali hasarlandırıcı özelliği fazla olmayan bir serbest radikal türevi olup H_2O_2 kaynağıdır. Oksitleyici ve metal iyonları redükleyici etkisi vardır.

Mitokondrideki enerji metabolizması sırasında oksijen kullanılırken, tüketilen oksijenin % 1-5 kadarı süperoksit yapımı ile sonlanmaktadır. Aktive edilen fagositik lökositlerden bol miktarda süperoksit üretilir. Antibakteriyel etki için gerekli olan bu radikal yapımı, daha reaktif türlerin oluşumunu da başlatmaktadır (108, 109). Daha sonra bu radikaller, hidrojen peroksit (H_2O_2) dönüşür. H_2O_2 'in kendisi serbest radikal olmasa da en reaktif serbest radikal türlerinden hidroksil radikaline otooksidasyon yolu ile dönüşebilir.

2.3.1.2. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

Hidrojen peroksit, oksijenin enzimatik olarak iki elektronla indirgenmesi ya da süperoksitlerin enzimatik ve enzimatik olmayan dismutasyon tepkimeleri sonucunda oluşmaktadır.

Dismutasyon spontan olarak veya süperoksit dismutaz enzimi aracılığıyla olabilir. H_2O_2 membranlardan kolaylıkla geçip hücreler üzerinde bazı fizyolojik rollere sahip olabilir. H_2O_2 özellikle proteinlerdeki hem grubunda bulunan demir ile tepkimeye girerek, yüksek oksidasyon düzeyindeki reaktif demir formlarını oluşturabilmektedir. Bu formdaki demir çok güçlü oksitleyici özelliklere sahip olup, hücre zarlarında lipid peroksidasyonu gibi radikal tepkimeleri başlatabilmektedir (108, 110).

2.3.1.3. Hidroksil Radikali (HO^-)



Hidroksil radikali, biyolojik sistemlerde bulunan en güçlü serbest radikaldir. Dokular radyasyona maruz kaldıklarında, enerjinin çoğu hücre içindeki su tarafından emilir ve radyasyon oksijen ve hidrojen arasında kovalent bağa neden olur. Sonuçta iki radikal meydana gelir. Bu radikallerden biri hidrojen (H^{\cdot}) ve diğeri ise hidroksil radikalidir (OH^{\cdot}).

Yine OH^{\cdot} radikalleri aromatik halkaya katılma özelliği gösterdiklerinden DNA ve RNA'da bulunan pürin ve pirimidin bazlarına katılarak radikal oluşumuna neden olurlar. Bir dizi reaksiyona katılabilen OH^{\cdot} radikalleri DNA'nın baz ve şekerlerinde ciddi hasarlar oluşturarak DNA iplik kırılmalarına neden olurlar. Hasar çok kapsamlı olursa hücrel koruyucu sistemler tarafından tamir edilemeyebilir ve bunun sonucunda çeşitli mutasyonlar ve hücre ölümleri meydana gelir (111).

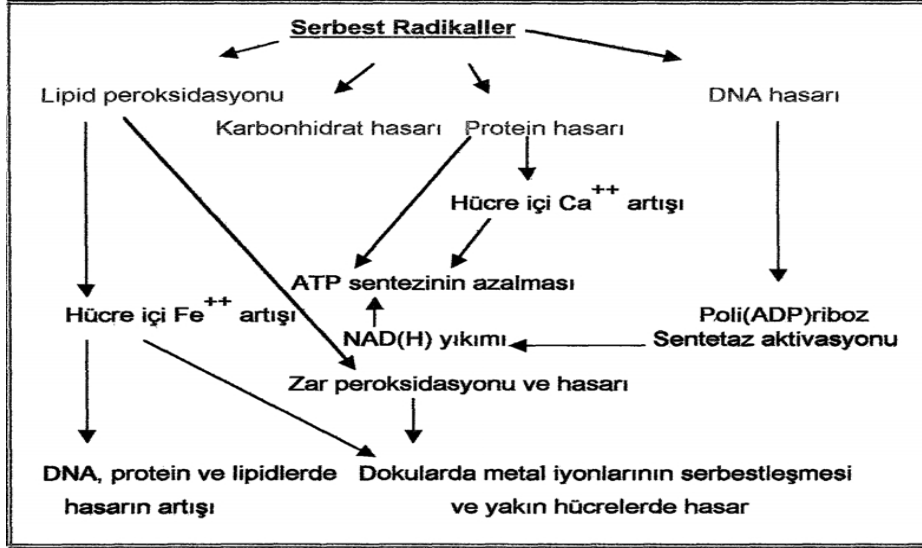
2.3.1.4. Serbest Oksijen Radikallerinin Hücreye Zararlı Etkileri

Serbest radikaller hücrelerin lipid, protein, DNA, karbonhidrat ve enzim gibi tüm önemli bileşenlerine etki ederler (Şekil 7).

Mitokondrideki aerobik solunumu ve kapiller geçirgenliği bozarak, bir yandan hücrenin potasyum kaybına neden olurken öte yandan trombosit agregasyonunu arttırlar (112).

2.3.1.4.1. Membran Lipidlerine Etkisi (Lipid Peroksidasyonu)

Lipidler, serbest oksijen radikallerine karşı en hassas olan vücut bileşenleridir. Membrandaki kolesterol ve doymamış yağ asitleri, serbest radikaller tarafından kolayca perokside edilirler ki bu hasar geri dönüşümsüzdür. Hasar ile membran geçirgenliğinin değişmesi, anormal kalsiyum iyonu girişine yol açarak hücrel fonksiyonların bozulmasına ve oksidasyon ile fosforilasyonun ayrılmasına neden olur. Ayrıca ortamdaki demir ve bakır gibi metal iyonları, lipid peroksitlerinin sitotoksik ürünlere dönüşümünü hızlandırır.



Şekil-7: Serbest radikallerin hasar oluşturma mekanizmaları

Lipid hiperoksidleri yıkımı ile biyolojik olarak aktif olan aldehitler oluşur ki bu maddeler, hücre içine yayılarak, hasarın hücrenin diğer bölümlerine de yansımaya neden olurlar. Lipid peroksidasyonun sonunda MDA oluşur. Oluşan MDA, iyon transportu, enzim aktivitesi ve hücre yüzey bileşenlerinin agregasyonu gibi membran özelliklerini değiştirerek mutajenik, genotoksik ve karsinojenik etkilere yol açabilir (113).

2.3.1.4.2. Proteinlere Etkisi

Serbest radikallerin proteinlere etkisi proteinlerin aminoasit içeriğine göre değişir. Protein molekülleri üzerindeki sülfhidril veya amino gruplarıyla serbest radikallerin etkileşmesi sonucu proteinlerde oluşan yapısal değişiklikler üçe ayrılır:

- 1- Aminoasitlerin modifikasyonu,
- 2- Proteinlerin fragmantasyonu,
- 3- Proteinlerin agregasyonu veya çapraz bağlanmalarıdır (114).

Proteinin temel yapısındaki değişme, antijenitesindeki değişmeye ve proteolize hassasiyete yol açabilir. Radikaller, membran proteinleri ile reaksiyona girebilirler ve enzim, nörotransmitter ve reseptör proteinlerinin fonksiyonlarının bozulmasına neden olabilirler.

Serbest radikallerin etkisiyle IgG ve albümin gibi fazla sayıda disülfid bağı bulunduran proteinlerin üç boyutlu yapıları bozular. Böylece normal fonksiyonlarını yerine getiremezler. Hem proteinleri de serbest radikallerden önemli oranda zarar görürler. Özellikle okside olmuş hemoglobinin O₂ veya H₂O₂ ile reaksiyonu methemoglobin oluşumuna sebep olmaktadır (113).

2.3.1.4.3. Nükleik asitlere Etkileri

Nükleik asitler, serbest radikallere bağlı değişikliklere duyarlıdır. Hidroksil radikallerin DNA ile tepkimesi sonucunda baz modifikasyonları, baz delesyonları, zincir kırılmaları gerçekleşebilmektedir. Oksijen radikalleri, oksidatif yarılma ile DNA hasarına yol açabilmektedir. Özellikle pirimidinlerden olan timin en hassas yapıdır. DNA halatlarının kopması, DNA çift sarmalı ayrılması sonucu hücrede mutasyonlar ve ölüm gelişebilmektedir. 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OhdG), oksidatif DNA hasarının bir göstergesidir. Yenidoğanlarda ve hipokside kalan bebeklerde bu oranın yüksek olduğu bildirilmektedir (115).

2.3.1.4.4. Karbonhidratlara Etkileri

Monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu hidrojen peroksid, peroksitler ve okzoaldehitler meydana gelmektedir. Monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu katarakt, diyabet ve sigara içimi ile ilişkili kronik hastalıkların, inflamatuvar eklem hastalıklarının oluşumuna katkıda bulunabilirler (116).

2.3.2. Antioksidan Mekanizmalar

Yükseltgenebilir bir substratla (protein, lipid, karbonhidrat ve nükleik asitler) karşılaştırıldığında daha düşük konsantrasyonlarda bulunduğu zaman o substratın oksidasyonunu belirgin biçimde geciktiren/önleyen maddeye antioksidan denir (117). İkinci bir tanıma göre diyetsel antioksidan normal fizyolojik fonksiyonların varlığında reaktif oksijen ve nitrojen türleri gibi reaktif türlerin yan etkilerini belirgin biçimde azaltan ve yiyeceklerde var olan maddeler olarak tanımlanır (118). Ancak bu tanım yeniden gözden

geçirilmiş ve genişletilerek membran stabilitesini devam ettirme özelliğinin de antioksidanların fonksiyonlarından biri olduğu belirtilmiştir (119).

Antioksidan savunma mekanizmaları etkilerini aşağıdaki yollarla gösterebilirler (Şekil 8).

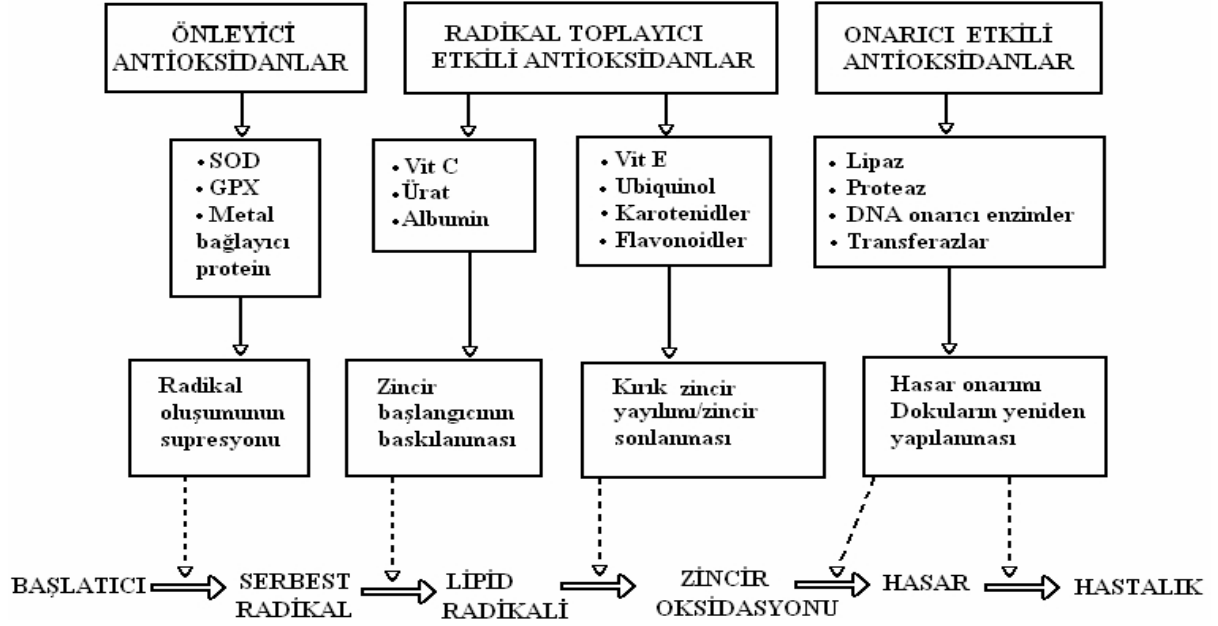
- 1- Hasarlı hedef moleküllerin yerini alarak,
- 2- Reaktif oksijen türleri oluşumunu minimumda tutarak,
- 3- Hasarlı hedef molekülleri onararak,
- 4- Yüksek derecede reaktif türlerin oluşumunda görev alan metal iyonlarını bağlayarak,
- 5- Reaktif türleri enzim kullanarak yahut bizzat kendisinin yer aldığı reaksiyonlarla temizleyerek (120).

Aerobik hücrelerde pek çok antioksidan sistem bulunmaktadır. Bu antioksidanlar endojen ve eksojen kaynaklı olarak ikiye ayrılmaktadır.

Endojen antioksidanlar, enzim olarak görev yapanlar ve enzim olmayan antioksidanlar olarak iki grupta incelenmektedir.

Enzim olan antioksidanlar; süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), katalaz, glutatyon-S- transferaz (GST), glutatyon redüktaz ve mitokondrial oksidaz sistemidir.

Enzim olmayanlar ise; bilirubin, albümin, ürik asit, α -tokoferol, askorbik asit, seruloplazmin, transferrin, ferritin ve glutatyon gibi maddelerdir. Bunlar oksijen radikallerine karşı ilk savunma sistemini oluşturmaktadırlar (121-122). Eksojen antioksidan olarak da allopurinol, folik asit, C vitamini, E vitamini, asetilsistein, mannitol, adenzin, kalsiyum kanal blokerleri, non steroid antiinflamatuvar ilaçlar ve demir şelatörleri sayılabilir (123).



Şekil-8: Antioksidan gruplar ve görevleri (124).

2.3.2.1. Enzim Olan Antioksidanlar

2.3.2.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)

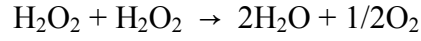
SOD enziminin bakır-çinko, mangan ve demir içeren üç tip izoenzimi bulunur. Bakır ve çinko içeren Cu-Zn-SOD sitoplazmada, mangan içeren Mn-SOD mitokondride aktivite gösterir. Cu-Zn-SOD ve Mn-SOD aynı mekanizma üzerinden etki gösterirler ancak Mn-SOD pH 7'nin üzerinde aktivitesini kaybederken Cu-Zn-SOD'un aktivitesi pH 5.5-10 aralığında değişmez.

SOD, substrat olarak serbest oksijen radikallerini kullanan ve süperoksiti hidrojen peroksite çeviren bir metalloenzimdir. Bu reaksiyon "oksidatif strese karşı ilk savunma" olarak da adlandırılmaktadır. Çünkü süperoksit zincirleme radikal reaksiyonlarının güçlü bir başlatıcısıdır. Bu sistem sayesinde hücrel kompartmanlardaki süperoksit düzeyleri kontrol altında tutulmaktadır.

Lösemi, iskemi, hepatit, müsküler distrofi, respiratuar distres sendromu, böbrek yetmezliği, Fankoni anemisi, akciğer enfeksiyonları ve motor nöron hastalıkları gibi serbest

radikal açığa çıkaran olaylarda ve hastalıklarda koruyucu rol oynadığı düşünülmektedir. Aynı zamanda SOD, lipid peroksidasyonunu da inhibe etmektedir. SOD aktivitesi yüksek oksijen kullanan dokularda fazladır. SOD'un ekstrasellüler aktivitesi çok düşüktür (125).

2.3.2.1.2. Katalaz (CAT)



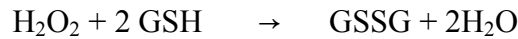
Katalaz enzimi hidrojen peroksitin su ve moleküler oksijene çevrildiği reaksiyonu katalizler. Enzim hücre içinde peroksizomlarda yerleşmiştir ve bir hemoproteindir. Dört tane hem grubu içerir. Katalaz'ın etkisi de SOD'a benzerdir.

Bu reaksiyon H_2O_2 konsantrasyonları yükseldiğinde önem kazanırken düşük H_2O_2 konsantrasyonlarında diğer peroksidazlar H_2O_2 'lerin daha az reaktif olan alkollere ve suya parçalanmasını katalizler. Kanda, böbrek ve karaciğerde ayrıca mukoz membranlarda bulunur. Granulomatoz hücreleri solunumsal patlamaya karşı korur (120).

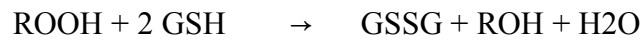
2.3.2.1.3. Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px)

GSH-Px, pek çok hücrenin sitozollerinde bulunan bir enzimdir ve hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumludur. Sitozol ve mitokondrilerde SOD tarafından oluşturulan H_2O_2 ve yağ asidi hidroperoksitlerini ortadan kaldırmaktadır. Düşük H_2O_2 konsantrasyonunda çalışmaktadır. Kofaktör olarak selenyum elementinin kullanır.

GSH-Px



GSH-Px



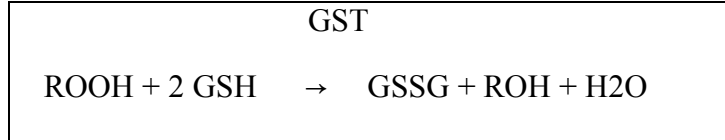
Hidrojen peroksit ve organik peroksitlerin indirgenmesiyle oksitlenen glutatyon, glutatyon redüktaz enzimi ve başlıca pentoz fosfat yolundan sağlanan NADPH yardımıyla indirgenerek reaksiyonların devamını sağlar (125).

GSH-Px, fagositik hücrelerde önemli fonksiyonlara sahiptir. Diğer antioksidanlarla birlikte GSH-Px, solunum patlaması sırasında serbest radikal peroksidasyonu sonucu, fagositik hücrelerin zarar görmesini engeller. Eritrositlerde de GSH-Px oksidan strese karşı en etkili antioksidandır. GSH-Px aktivitesindeki azalma, H₂O₂'in artmasına ve şiddetli hücre hasarına yol açar.

Yapılan çalışmalarda kord kanı GSH-Px ve total antioksidan düşüklüğü olan bebeklerde DNA hasarının yüksek olduğu gösterilmiş ve doğumda oksijen radikallerinin oluşumunun arttığı ifade edilmiştir (126).

2.3.2.1.4. Glutatyon-S-Transferaz (GST)

Lipid peroksitlerine karşı selenyumdan bağımsız glutatyon peroksidaz aktivitesi göstermektedir.



Antioksidan aktivitesine ek olarak başka biyokimyasal fonksiyonlara da sahip olup bilirubin, hem ve bazı kortikosteroidler gibi endojen maddelere geri dönüşsüz olarak bağlanarak bunların hücre içi transportunda da görev almaktadır (125).

2.3.2.1.5. Glutatyon Redüktaz (GSH-Rd)

H₂O₂ indirgenmesi esnasında GSH oksitlenir. GSH-Px'in fonksiyonunun devamlılığı için okside glutatyon tekrar indirgenmelidir. Reaksiyon GSH redüktaz tarafından katalizlenir. Enzim NADPH bağımlı bir flavoproteindir (125).



2.3.2.1.6. Mitokondrial Sitokrom Oksidaz

Süperoksit anyonunun suya dönüştüğü reaksiyonu katalizler, bakır içerir. Mitokondrideki elektron taşıma zincirinin son basamağında yer alır.

2.3.2.2. Enzim Olmayan Antioksidanlar

2.3.2.2.1. Glutatyon (GSH)

Glutamat, sistein ve glisin aminoasitlerinden sentezlenen ve hücrede en fazla tiyol içeren bileşiktir. GSH sentezinde kullanılan sisteinin kaynağı N-asetilsisteindir. Glutaminin glutaminaz ile hidrolizi ve α -ketoglutarat ile dallı zincirli aminoasitlerin transaminasyonu GSH sentezinde kullanılan glutamatın temel kaynaklarıdır.

GSH'dan kaynaklanan glutatyon radikali (GS⁻) bir prooksidandır. Ancak iki GS- birleşerek okside glutatyonu (GSSG) oluştururlar bu da GSH-Rd tarafından GSH'ya indirgenir. Doğrudan veya dolaylı yollarla reaktif oksijen türlerini temizler. Hücrel oksidasyon-redüksiyon dengesinin düzenlenmesinde önemli rol oynayan tiyol proteinleriyle etkileşime girer (127).

2.3.2.2.2. Vitamin C (Askorbik Asit)

C vitamini pek çok biyolojik fonksiyon için gerekli suda çözünebilen bir mikronutrienttir. Birçok enzimin kofaktörü olarak görev yapar. Bunlar; kollajenin posttranslasyonel hidroksilasyonu, karnitin biyosentezi, dopaminin norepinefrine dönmesi, peptid amidasyonu ve tirozin metabolizmasında görev alan enzimlerdir.

Anti-skorbutik fonksiyonu yanında C vitamini potent bir indirgeyici ajan ve biyolojik sistemlerde serbest radikal toplayıcısıdır (128). Biyolojik sıvılarda en çok bulunan ve suda çözünen bir antioksidandır. Süperoksit, hidroperoksit radikalleri ve singlet oksijen ile peroksinitrit, nitrojen dioksit ve nitroksit radikallerini toplayabilme özelliğine sahiptir. Paradoksik olarak C vitamini *in vitro* koşullarda bir prooksidan gibi davranabilir. C vitamininin demir ve bakır ile birlikteliği lipidlerin, proteinlerin ve DNA'nın oksidatif modifikasyonunu indüklemek için kullanılmaktadır (118). C vitamini oksidatif strese ferrik demiri ferroz demire indirgeyerek ve sonrasında H₂O₂'in hidroksil radikaline dönüşümünü sağlayarak neden olabilir. Ancak genel olarak bu C vitamini aracılı Fenton reaksiyonları insanda ferritin ve transferin gibi metal bağlayıcı proteinlerin etkin demir sekestrasyonu sayesinde kontrol edilir. Prooksidan etkinin *in vivo* koşullarda gerçekleşip gerçekleşmediği net değildir (118, 129). İnsan plazmasının *in vitro* inkübasyonu yöntemiyle yapılan çalışmalar C vitamininin aktive redoks geçiş metalleri ve H₂O₂ eklenmesi durumunda bile lipid peroksidasyonunu engellediğini göstermiştir (130).

Plazma askorbik asit havuzunda sigara kullanımıyla ilişkili düşüş ilk olarak 1930'larda tanımlanmıştır (131). Sonraki çalışmalarda da sigara içenlerde içmeyenlere göre plazma/serum/lökosit C vitamini konsantrasyonlarının yaklaşık olarak % 40 daha düşük olma eğiliminde olduğu gözlenmiştir.

Aksoy N. ve ark. yaptıkları bir çalışmada streptozosin verilerek diyabet oluşturulan ratlarda vitamin C ve E'nin oksidatif stres üzerine etkilerini araştırmışlardır. 10 tane rat 3 gruba ayrılmış, 1. Grup; kontrol grubu (diyabet oluşturulmayan grup), 2. Grup; tedavi verilemeyen diyabet oluşturulan grup, 3. Grup ise; vitamin C ve E ile tedavi edilen diyabet oluşturulan gruplar olarak belirlenmiştir. 6 hafta sonra Grup 1'e göre, Grup 2 ve 3'teki glukoz düzeyinin anlamlı olarak yüksek, vücut ağırlığının ise anlamlı olarak düşük olduğu belirlenmiştir (p<0,001). Grup 1 ve 3'e göre, Grup 2'deki malondialdehid düzeyi anlamlı olarak düşük, SOD, GSH-Px ve GSH-Rd düzeyleri anlamlı olarak yüksek ölçülmüştür (p <0.01, p<0.01, p<0.001, ve p<0.01). Vitamin C ve E ile tedavinin kontrol grubuna göre malondialdehiti düşürdüğü ve antioksidan düzeyi arttırdığı belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre de kombine vitamin C ve E tedavisinin oksidatif stres düzeyinin arttığı diyabette yararlı etkilerinin olduğu söylenmiştir. (132).

2.3.2.2.3. Vitamin E (Tokoferol)

Alfa tokoferol yağda çözünen lipit zincirini kıran bir antioksidandır. Mitokondri ve endoplazmik retikulum gibi membrandan zengin hücre kısımlarında vitamin E konsantrasyonu artmıştır. Çok güçlü bir antioksidan olan alfa tokoferol hücre membran fosfolipitlerinde bulunan çoklu doymamış yağ asitlerini serbest radikal ataklarına karşı korur, oluşan radikalleri temizler, lipid peroksidasyonunu inhibe eder. (133).

Selenyum ve E vitamininin ve GSH-Px ve SOD gibi antioksidan enzimlerin düzeylerini arttırdığı bunun da oksidatif düzeyin arttığı kolon kanseri gibi bazı hastalıkları önleyebileceği belirtilmiştir (134).

2.3.2.2.4. Seruloplazmin

Plazma antioksidan aktivitesinin önemli bir kısmı, bakır içeren ve taşıyan akut faz proteini seruloplazminden kaynaklanır. Demir ve bakır bağımlı lipid peroksidasyonu inhibe eder. Daha az önemli olmakla birlikte süperoksit radikali ile reaksiyona da girer.

2.3.3. Lityum ve Sitotoksisite

Birçok çalışmada lityumun hücreler üzerinde koruyucu etkisi olduğu belirtilmiştir. Lityumun bu koruyucu etkisinin mekanizması tam olarak bilinmemesine karşın bazı çalışmalarda bu etki GSK-3 inhibisyonuna bağlanmıştır. Bunun nedeni de birçok koşulda GSK-3'ün apoptozisi indüklemesi lityumun da bunu inhibe etmesine bağlanmıştır. Önceki çalışmalara göre de TNF α veya TRAIL gibi mediatörleri aktifleştirerek apoptozisi güçlendirdiği belirtilmiştir. Lityumun intrinsik apoptozisi önleyerek hücre ölümü üzerine koruyucu etkisine karşı hücre ölümü reseptörleri aracılığıyla ekstrinsik apoptotik uyarıyı kolaylaştırdığı da belirtilmiştir. Bu temel farklılık GSK3'ün uyarı yollarında özellikle ekstrinsik apoptotik etkiyi önleyici rolü olan NF κ B'yi inhibe etmesine ve intrinsik yolda apoptozisi önlemesine bağlanmıştır (135).

Song ve ark. yaptıkları çalışmada ise 20 mM lityumun anlamlı bir şekilde Jurkat hücreleri (T lenfoblastik hücreleri) ve hipokampal hücrelerde Fas'ı aktive ederek apoptotik sinyali önemli ölçüde arttırdığını belirtmişlerdir. Diğer GSK3 inhibitörleri olan 20 µM indirubin-3'-monoxime, 5 µM kenpaullone ve 5 µM rottlerin'in de Fas-bağımlı apoptotik uyarıyı indüklediği gösterilmiş ve bu da apoptozisin uyarılmasının GSK3 inhibisyonuna bağlı olduğu belirtilmiştir. Bu sonuçlara göre lityumun sadece nörokoruyucu olmadığı aynı zamanda buna zıt olarak ölüm-aracılı reseptörleri de uyararak apoptozisi kolaylaştırdığını belirtmişlerdir (136).

2.3.4. Lityum ve Oksidatif Durum

Yapılan çalışmalarda terapötik konsantrasyonlardaki lityumun neden olduğu oksidatif stresin antioksidan sistemler tarafından dengelendiği için antioksidan defansın yüksekliği ile sonuçlandığı belirtilmiştir (137-139).

Oksidatif düzeyin majör belirteçleri tiobarbitürik asit reaktif maddeleri (TBARS), SOD, katalaz ve GSH Px gibi enzimlerdir. Lityumun DNA hasarı, serbest radikal oluşumu ve lipid peroksidasyonunu önleyici-geri döndürücü etkisinin olduğunu gösteren çeşitli çalışmalar daha önce yapılmıştır.

Rushaniya ve ark. yaptıkları çalışmada sağlıklı kişilere 2-4 hafta boyunca terapötik dozlarda (0,6-1 mM) lityum vermişlerdir. Sağlıklı gönüllülerde lityum tedavisi sonucu tüm deneklerin SOD seviyeleri değişmiştir. Lityum tedavisinden sonra SOD/CAT oranında belirgin bir azalma olmuş, oksidan seviyenin azalmasının hidrojjen peroksit düzeyindeki düşmeye bağlı olduğunu söylemişlerdir. Genel olarak mevcut bulgularla lityumun sağlıklı bireylerde antioksidan etkilerinin olması onun bipolar hastalardaki nöroprotektif etkiyi desteklediğini belirtmişlerdir (140).

2.4. Total Antioksidan Kapasite

Antioksidan savunma sistemleri, özgül etkiler dışında bir ortak etkiler ve ilişkiler ağı oluşturur. Örneğin; vitamin C ve glutatyon, vitamin E'nin rejenerasyonunu sağlayarak; ürik asit, vitamin C'nin otooksidasyonunu engelleyerek sinerjistik etki gösterirler. Böylece antioksidan durumu göstermede tek tek antioksidan ölçümü yanında değişik antioksidanları ortak etkilerinin ölçümüne yani "total antioksidan kapasite"nin bilinmesine ihtiyaç doğar. Sonuçta plazmanın total antioksidan kapasitesinin her antioksidanın tek başına etkilerine ek olarak değişik antioksidanlar arasındaki ilişkilere bağlı olduğu söylenebilir (141).

2.5. Oksidatif Stres

Organizmada normal şartlarda da oluşan serbest radikal üretimi, değişik savunma mekanizmaları ile ortadan kaldırılır. Bu nedenle patolojik bir durum oluşmaz. Serbest radikal oluşum hızı ve serbest radikal miktarı savunma mekanizmalarının gücünü aştığı zaman oksidan stres ortaya çıkar. Sonuç olarak serbest radikallerinin hücre fonksiyonlarına net etkisi, radikal ürünleri ile koruyucu sistemler arasındaki dengeye bağlıdır (142).

2.6. Commet Assay ile DNA Hasarının Belirlenmesi

Spesifik hücrelerde DNA zincir kırıkları ilk kez 1978 yılında Rydberg ve Johanson (143) tarafından belirlenmiştir.

Mikroskop lamı üzerinde agaroz jel içine gömülmüş hücreler hafif alkali ortamda bekletilerek membranların parçalanıp DNA sarmallarının kısmi açılması sağlanır. Daha sonra nötralize edilen hücreler akridin turuncusu ile işaretlenir ve DNA hasarının düzeyi yeşil floresansın kırmızı floresansa oranının fotometrik ölçümü ile belirlenir.(yeşil floresans çift sarmal DNA'yı, kırmızı floresans ise tek sarmal DNA'yı belirtir). Günümüzde bu teknik çok sayıda kritik basamak içerdiğinden tamamen terk edilmiştir. Daha sonraki yıllarda izole edilmiş hücrelerde DNA hasar tespitinin hassasiyetini arttırmak için Ostling ve Johanson (144) mikro jel elektroforez tekniğini geliştirmişlerdir.

Mikro jel elektroforez tekniğinde mikroskop lamalarının üzerine agaroz jel içinde hücreler gömülür, yoğun tuz ve deterjan içeren lizis çözeltisinde bekletilerek membranlar parçalanır. Nötr pH ortamında kısa bir süre elektroforez uygulanır. Yüksek oranda zincir kırığı içeren DNA, sağlam DNA'ya göre daha hızlı bir şekilde anoda doğru geçer. DNA göçünün miktarı preperatların etidyum bromür ile boyanmasıyla oluşan floresansın yoğunluğunun floresans mikroskobu ile ölçülmesi sonucu belirlenir.

Ancak burada elektroforezin nötral koşullarda uygulanması yöntemin kullanımını sınırlamaktadır. Nötral koşullarda çift sarmal kırıkları tespit edilirken tek sarmal kırıkları tespit edilemez. 1988 yılında Singh ve ark. (145) elektroforezi kuvvetli alkali ortamda (pH >13) uygulayarak bu sorunu çözmüşlerdir.

Günümüzde uygulanan “Comet Assay” Singh ve ark. tarafından geliştirilmiş olan, tek ve çift zincir kırıkların tamamının tanımlanmasına olanak sağlayan metodolojidir. Bu teknik göreceli olarak kolay, ucuz, hızlı ve non-invaziv bir teknoloji olduğu ve 10-20 mikrolitre kan örneğinde uygulanabildiğinden beslenme, yaşlanma, egzersiz gibi biyolojik süreçlerin izlenmesinde, çevresel değişikliklerin canlı sistemlerdeki etkisinin belirlenmesinde, hipoksi, ozon ve kemoterapi etkilerinin izlenmesinde, sperm kalitesinin değerlendirilmesinde ve genotoksisite çalışmalarında sıklıkla tercih edilmektedir (146-147).

“COMET ASSAY” BASAMAKLARI

1. Mikroskop lamalarının hazırlanması
2. Hücresel materyalin hazırlanması
3. Lizis
4. Alkali ortamda DNA çift sarmal yapısının açılması (Alkali unwinding)
5. Elektroforez
6. Nötralizasyon
7. DNA'nın boyanması ve “comet”lerin görüntülenmesi
8. Comet sayımı ve DNA hasarının belirlenmesi

1. Mikroskop lamalarının hazırlanması: Lam hazırlamada en önemli hedef tüm işlemler tamamlanincaya kadar jelin bozulmadan kalabilmesi ve mikroskopik inceleme sırasında temiz, net bir görüntü verebilmesidir.

Deneyden bir gün önce normal erime noktalı agaroz jel mikroskop lamalarına baştan sona yayılır. Bu işleme ön kaplama denir. Ön kaplama yapılan lamalar kuruması için en az bir gece bekletilir. Ertesi gün düşük erime noktalı ikinci bir agaroz jel içinde süspansiye edilmiş hücreler ön kaplama yapılmış olan lamaların üzerine yayılır. Böylece iki jel tabakası arasında gömülü hücreleri içeren sandviç benzeri bir sistem oluşturulur.

Sağlıklı sonuçlar elde edilmesinde agaroz jelin konsantrasyonu ve jel içindeki hücrelerin konsantrasyonları çok önemlidir. Optimal hücre sayısı her gözlem alanında birkaç taneden fazla olmamalıdır. Yüksek hücre yoğunlukları özellikle DNA göçünün hızlı olduğu preparatlarda comet'lerin üst üste gelmesine neden olur. Yüksek agaroz konsantrasyonu ise DNA göç hızını ve diğer işlem basamaklarını etkiler.

Bazı araştırma protokollerinde hücreler üzerinde *in vitro* hasar oluşturularak inceleme yapılmaktadır. DNA üzerinde hasar oluşturmak amacıyla UV, iyonizan radyasyon veya ksantin/ksantin oksidaz, H₂O₂ gibi radikal oluşturan ajanlar kullanılmaktadır. Bu tip çalışmalarda hücreler belirli konsantrasyon ve dozajdaki hasar yapıcı madde ile kısa süre soğuk ortamda muamele edildikten sonra lizis işlemine geçilir.

2. Hücresel materyalin hazırlanması: “Comet Assay”in sonuçlarının doğruluğu test materyalinin hassas bir şekilde hazırlanmasına bağlıdır. Kültüre edilmiş hücreler, tam kan örnekleri (polimorf lökositler, mononükleer hücre fraksiyonları), pirimer insan fibroblastları doku örnekleri materyal olarak kullanılabilir ve bunların her birinin hazırlanması spesifiktir.

Tam kan örneklerinde DNA hasar çalışmasında heparinize kan kültür ortamına alınır, düşük erime noktalı agaroz ile karıştırılarak kullanılır. Lenfosit ve mononükleer hücrelerde DNA hasar çalışmalarında, bu hücre fraksiyonları histopak ile izole edildikten sonra kullanılır.

Fibroblast ve çeşitli doku örneklerinde ise tripsin-EDTA ile muamele edilerek önce proteinler uzaklaştırılır. Bu tip ön işlemlerle serbestleşen hücreler daha önce agaroz jel ile ön kaplama yapılmış ve numaralandırılmış lamalar üzerine uygulanırlar.

3. Lizis: Agaroz jel donduktan sonra yüksek konsantrasyonda tuz ve deterjan içeren lizis çözeltisinde bir saat bekletilir. Lizis sırasında kan ve doku örneklerinde mevcut olan eritrositlerin parçalanmasıyla açığa çıkan demire bağlı serbest radikal aracılı DNA hasarını önlemek için lizis çözeltisine % 10 oranında dimetil sülfoksit eklenir. Lizis işlemi sırasında membranlar parçalanır ve hücre içeriği çekirdekten uzaklaştırılır. DNA küçük bir miktar nonhiston proteinlerle birlikte yüksek çift sarmal yapısında kalır. Lamlar birkaç defa uygun bir tampon ile yıkanarak hücresel artıklar, kalan deterjan ve tuzlar uzaklaştırılır. Artık preparatlar bir sonraki aşamaya hazırdır (148).

4. Alkali ortamda DNA çift sarmal yapısının açılması: Hazırlanmış olan preparatlar çift sarmal DNA yapısının açılması için elektroforez öncesinde yüksek alkali özellikteki (pH>13) elektroforez tamponunda inkübe edilir. Alkali tampon içersinde çekirdekteki çift sarmal DNA, zincir kırıklarının bulunduğu noktalardan açılmaya başlar (149).

5. Elektroforez: Alkali ortamda DNA sarmalının açılmasından sonra jel içinde oluşan tek zincir DNA alkali koşullarda elektroforeze tabi tutularak comet oluşumu sağlanır. Elektrik akımı uygulandığı zaman, anoda doğru hareket eden DNA parçaları bir kuyruklu yıldız görüntüsü verir. Yöntemin ismi olan 'comet' bu kuyruklu yıldız görüntüsünden kaynaklanmıştır. Hasarsız DNA ise çekirdekten çıkamaz. Elektroforez 25 V, 300 mA akım ve 25 dk. süre içinde gerçekleştirilir (149).

6. Nötralizasyon: Alkali ortamda elektroforezden sonra, jel pH'sının nötralizasyonu için lamlar uygun bir tamponla (pH 7.5) üç defa yıkanır. Nötralizasyondan sonra lamlar boyanarak cometler sayılabilir veya jeller kurutularak lamlar daha sonra incelenmek üzere saklanabilir (148).

7. DNA'nın boyanması ve "Comet"lerin görüntülenmesi: "Comet" in görüntülenmesi için kullanılan DNA spesifik boyalar ve mikroskopta seçilen uygun büyütme,

uygulayıcının spesifik ihtiyaçlarına bağlıdır ve yöntemin güvenilirliğine ile hassasiyetine fazla bir etkisi yoktur. İşaretleme için yaygın olarak kullanılan floresan boya etidyum bromürdür. Boyama sonrasında floresan mikroskopunda anoda doğru göç eden DNA fragmanları kuyruklu yıldız görüntüsü verir, hasarsız DNA ise spot şeklinde görülür (148, 150).

8. “Comet” sayımı ve DNA hasarının belirlenmesi: Güvenilir sonuçlar elde edebilmek için mikroskopik değerlendirme aynı kişi tarafından yapılmalı ve bu işi yapan kişi değerlendirme sırasında lamaların numarasını veya hangi çalışma grubuna ait olduğunu bilmemelidir. “Comet”lerin sayılmasında iki farklı yol izlenebilir:

a) Görsel analiz: Farklı derecelerdeki hasarı gösteren “comet”leri insan gözü kolaylıkla ayırt eder. Görsel değerlendirmeye göre “comet”ler DNA göç uzunluğuna göre 5 kategoride tanımlanır (0-4).

Sınıflandırma “comet”lerin görünümüne göre aşağıdaki gibi gerçekleştirilir: Parlak başlı objeler ve görünmeyen kuyruklar 0 kategorisine girer (kuyruksuz spot şeklindeki görüntüler), çok küçük başlı cometler ve uzun dağınık kuyruklar 4. Kategoriyeye girer, 0-4 kategorileri arasında yer alan “comet”ler kolaylıkla ayırt edilebilir.

Sayma işlemi için her lamdan rastgele 100 “comet” seçilir ve her birine içinde buldukları kategoriye göre bir değer verilir (0, 1, 2, 3 veya 4). Her bir kategorideki “comet” sayısı belirlenerek DNA hasarı matematiksel olarak hesaplanır (148,150).

b) Bilgisayarlı görüntü analizi: Mikroskop üzerine monte edilen kapalı sistem dijital kamera bağlantısı ile otomatik olarak karakteristik “comet”lerin görüntüleri imaj analiz sistemi ile analiz edilir. Bu analizlerin yapılabilmesi için birçok şirket tarafından geliştirilmiş olan yazılımlar kullanılır.

Programlar comet başını kuyruktan ayırt edebilecek ve kuyruk uzunluğu, baş ve kuyruktaki floresans yüzdesi, kuyruk momenti gibi çeşitli parametreleri belirleyebilecek şekilde tasarlanmıştır. Kuyruktaki % DNA floresansı, DNA zincir kırığı sıklığı ile doğru orantılıdır. Kuyruk momenti kuyruk uzunluğu ve göreceli kuyruk yoğunluğunu içeren formüllerle hesaplanan bir parametredir (149). Lamalar analiz edildiğinde görsel hesaplamalarla bilgisayar görüntü analizleri paralellik gösterir ve bu sonuçlar arasındaki eşleşme mükemmeldir (151).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Demirbaş Malzemeler

1. Laminar flow güvenlik kabini (Heraeus[®])
2. CO2 inkübatörü (%5 CO2, %95 nem ve 37 °C) (LaboTect[®])
3. Soğutmalı santrifüj (Hettich Universal[®] 30 RF)
4. Biyokimya otoanalizörü (Abbott[®] C4000)
5. Floresan invert mikroskop (Olympus[®])
6. Işık mikroskobu (Olympus[®] CK X41)
7. Dijital fotoğraf makinesi (Olympus[®] C 5050 Z)
8. (± 4 °C) Buzdolabı (Profilo[®])
9. -20°C derin dondurucu (New Brunswick Scientific[®], C54285 model)
10. -80°C derin dondurucu (Revco[®])
11. Manyetik karıştırıcı (Hangping[®], Variomag[®])
12. Vorteks (Nüve[®], NM 110 model, Türkiye)
13. Pipetler (0,5-2 µl, 0,5-100 µl, 50-200 µl, 200-1000 µl, 1-5 ml) (Gilson[®])
14. Hassas terazi (Sartorius[®] marka 0,0001 g'a duyarlı)
15. Deiyonize su cihazı (Easypure[®] RF)
16. Distile su cihazı (Nüve[®])
17. Elektroforez cihazı (Biolab[®] Midi Cell)
18. Hot plate (Thermolyne[®])
19. pH metre (Hanna[®], pH 211 model Japon)
20. Lam (Isolab[®])
21. Pipet ucu (Beyaz, 0.1-10 µL), (Sarı, 1-200 µL), (Mavi, 100-1000 µL)

22. Kurutma kağıdı
23. Cam malzemeler (Mezür, Beher, Erlen, Şale)
24. Eppendorf tüpü

3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

1. Normal erime noktasına sahip (NMP, 65 °C) agaroz jel (Sigma®)
2. Düşük erime noktasına sahip (NMP, 37 °C) agaroz jel (Sigma®)
3. Sodyum-EDTA (Carlo Erba®)
4. Sodyum klorür (Merck®)
5. Potasyum klorür (KCl) (Merck®)
6. Tris baz (Sigma®)
7. Triton X-100 (Sigma®)
8. Sodyum hidroksid (Merck®)
9. Disodyum hidrojen fosfat (Merck®)
10. Sodyum dihidrojen fosfat (Merck®)
11. Etidyum bromit (Sigma®)
12. Hidrojen peroksit (Merck®)
13. Tris HCl (Sigma®)
14. Histopaque-1077 (Sigma®)
15. Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Carlo Erba®)
16. RPMI 1640 Medium
17. Lityum karbonat (Merck®)
18. MTT (Metil Tiyazol Tetrazolyum)(Sigma®)

3.3. Hücre kültürünün hazırlanması

Bu çalışmada sağlıklı, gönüllü ve sigara içmeyen bir kişiden çalışmaların yapıldığı günlerde 10 ml'lik heparinize edilmiş tüplere kan örneği alındı. Boş steril bir tüp içine 1 ml Histopaque-1077 solüsyonu eklendi. Bunun üzerine 1 ml taze heparinize kan yavaşça konuldu ve bu işlem 10 ayrı tüpe uygulandı. Tüpler 25°C ve 2100 rpm'de 30 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üç ayrı tabaka meydana geldi. En alt tabakada lökositler eritrositler, trombositler ve diğer şekilli elemanlar, orta tabakada lenfositlerin içinde yüzdüğü histopaque solüsyonu ve en üst tabakada ise plazma bulunur. Santrifügasyon sonrası orta tabakada biriken lenfositler pipetle çekilerek boş bir tüpe alındı. Histopaque solüsyonunu uzaklaştırmak için lökosit-histopaque çözeltisi 1 ml, 1 M (pH=7.4) PBS (fosfat tampon solüsyonu) ile karıştırıldıktan sonra 25°C, 1600 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Üstteki süpernatant atıldı ve lökosit pelleti elde edildi. Elde edilen lökosit pelleti hücre kültür flaskına aktararak 10 ml (%80 RPMI 1640 medium ve %20 fetal bovine serum (FBS) ve 5 µg/mL gentamisin) hücre kültür süspansiyonu oluşturuldu.

3.4. Çalışma gruplarının oluşturulması

LiCO₃ konsantrasyonları hazırlamak için MERCK firmasından satın alınan LiCO₃ kimyasalı kullanıldı. 1 M (pH=7.4) PBS içinde çözdürüldü. Hazırlanan hücre kültürü ortamında son LiCO₃ konsantrasyonları; 16 mM, 8 mM, 5mM, 4mM, 3mM, 2mM, 1mM, olan çözeltiler hazırlandı. LiCO₃ içermeyen hücre kültür çözeltisinden (-) negatif kontrol grubu, son konsantrasyonu 100 uM (mikromolar) olan H₂O₂ çözeltisi ile (+) pozitif kontrol grubu oluşturuldu.

3.5. Hücrelerin İnkübasyonu

İnkübasyon için 3 ml'lik 24 kuyucuklu hücre kültür flaskları kullanıldı. Her kuyucuğa 3 ml kültür Çözeltisi (%80 RPMI 1640 Medium, %20 Fetal Bovine Serum (FBS), 5 µg/mL Gentamisin) ve 3x10⁵/ml olacak şekilde lenfosit ilave edildi.

Daha önce belirtilen konsantrasyonlardaki LiCO₃ ve kontrol grupları hücre kültür flasklarına ikiye tekrar haline eklendi. Hazırlanan hücre kültür flaskları 37 °C'de %5 CO₂ ortamında 36

saat süreyle inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra hücreler 1600 rpm de 10 dk. santrifüj edilerek süpernatantı TAS, TOS ve OSİ ölçümü için ayrıldı.

3.6. Kullanılan Yöntemler ve Çalışma Prensipleri

3.6.1. Metil Tiyazol Tetrazolyum (MTT) Hücre Canlılık Testi

MTT hücre canlılık testi, Mosman T. tarafından geliştirilen modifiye bir yöntem ile çalışıldı. MTT (3-(4,5-dimetildiazol-2-il)-2,5 difenil tetrazolyum bromür) metodunda canlı hücrelerdeki mitokondriyal redüktaz enziminin, sarı renkli bir çözelti olan MTT çözeltisini, suda çözünmeyen mor renkli formazan kristallerine dönüştürmesi ve oluşan renkli kristallerin DMSO ile çözülerek, çözeltinin 570 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmesi prensibine dayanmaktadır (152).

LiCO₃ ve negatif kontrolden oluşan hücre kültür çözeltileri ikişer tekrar halinde hücre kültür flasklarına eklendi, 37 °C'de ve %5 CO₂ ortamında 24 saat inkübasyona bırakıldı. PBS tamponu içerisinde 5 mg/ml olacak şekilde MTT stok çözeltisi hazırlandı. Stok çözeltisi bir filtreden geçirilip sterilize edildi ve çözünmeyen MTT partiküllerinden arındırıldı. Hazırlanan MTT çözeltisinden, son konsantrasyonu 100 µl/ml olacak şekilde lenfosit süspansiyonuna eklenerek 4 saat 37 °C'de inkübasyona bırakıldı. Daha sonra üstte kalan süpernatant atıldı. Her bir kuyucuğa 1 ml DMSO eklenip 10 dakika karıştırılarak mor renkli kristallerin çözünmesi sağlandı. Sonuçlar 570 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü ve negatif kontrol grubuyla karşılaştırılarak % olarak hesaplandı.

3.6.2. Comet Assay Yöntemi ile DNA Hasarının Ölçülmesi

Yöntemin Prensipleri: Mononükleer lökosit DNA hasarı Singh ve ark. tarafından geliştirilen Alkali Tek Hücre Elektropherez (Comet Assay) yöntemi modifiye edilerek çalışıldı (153). Yöntemin prensibi, alkali pH'da farklı molekül ağırlıklarına ve farklı elektrik yüküne sahip DNA moleküllerinin elektriksel alanda farklı uzaklıklara göç etmeleri esasına dayanmaktadır. Tek hücreler agaroz jele yerleştirilir ve lizisten sonra zarar görmemiş DNA'lar taşınma sırasında comet (kuyruk) oluşturmayacak şekilde yürürler. Oysa DNA zincirinde

herhangi bir nedenle kırılmalar oluşmuşsa farklı moleküler ağırlıklara ve farklı elektrik yüklerine sahip olacaklarından, elektriksel alanda farklı hızlarda hareket ederek kuyruk şeklinde bir görüntü oluştururlar. Elektroforezden sonra DNA molekülleri, DNA spesifik floresan boyalar ile boyanıp floresan mikroskopla incelendiğinde boyanmış DNA'lar gözle veya kinetik okuma programları ile değerlendirilebilir.

Slaytların Hazırlanması: %1'lik normal melting point (NMP) agaroz jel hazırlanıp eritildikten sonra 80 µl alınarak kenarları buzlanmış lamalar üzerine damlatıldı. Lamların üzeri lamel ile kapatılarak buzdolabında (2-4 °C) 5 dakika bekletildikten sonra lameller kaldırıldı. Hazırlanan lamalar nemli kutularda bekletildi. PBS tamponu ile mm³' te 10⁴ hücre olacak şekilde dilüe edilmiş mononükleer hücrelerden 10 µl alınarak 80 µl %0,6'lık low melting point (LMP) agaroz jel (37 °C) ile karıştırılarak birinci tabaka üzerine tabakalandırıldı. Daha sonra lamel ile kapatılarak buzdolabında donması için 5 dakika bekletildi. Ardından lameller kaldırılarak slaytların hazırlanma işlemi tamamlandı.

Lizis aşaması: Hücre zarlarının parçalanması için önce 2,5 M Sodyum klorür, 100 mM EDTA ve 10 mM trizma base distile suda çözülerek stok lizing solüsyonu hazırlandı (pH=10). Çalışmadan hemen önce stok lizing solüsyonuna %1 oranında triton X-100 ve %10 oranında DMSO eklendikten sonra slaytlar 50 dakika soğuk lizing solüsyonunda bekletildi.

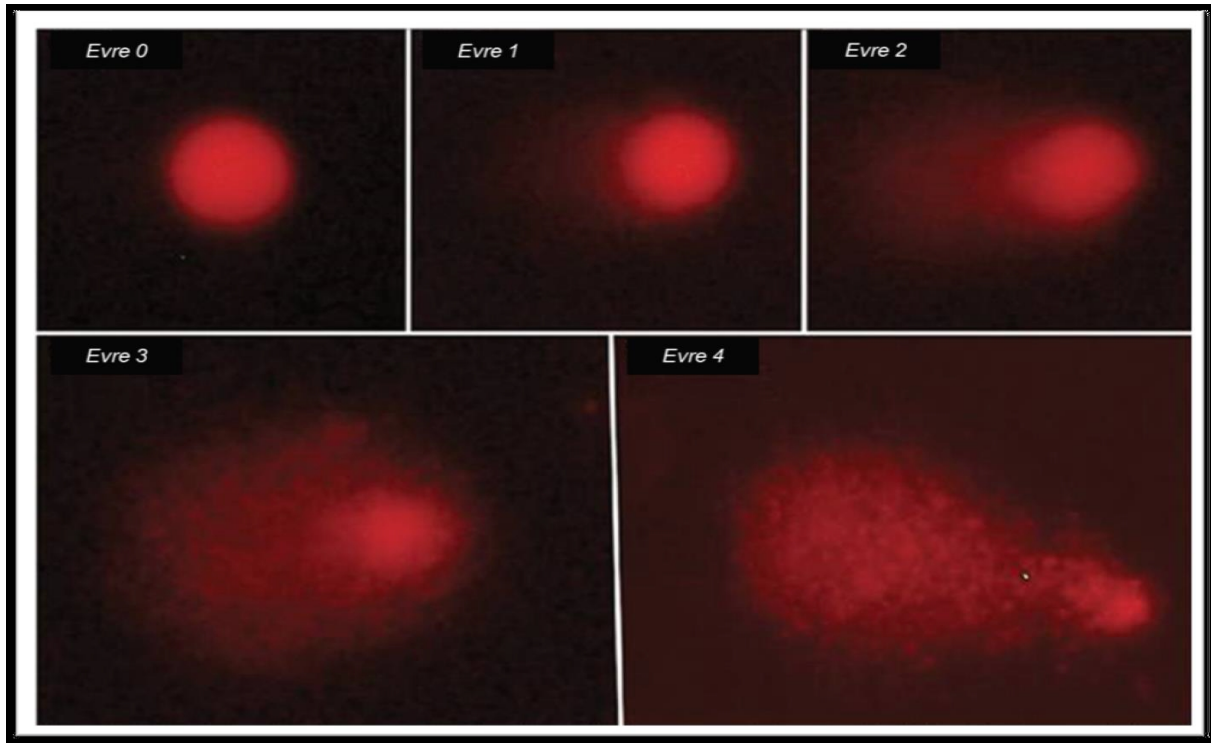
Elektroforez tamponu: Elektroforezde yürütülmeden önce DNA zincirlerinin ayrılması için slaytlar alkali elektroforez tamponunda 30 dakika bekletildi. Alkali elektroforez tamponu 1mM Na₂EDTA ve 300 mM NaOH'tan oluşmaktadır (pH >13).

Elektroforezde yürütme: Alkali elektroforez tamponunda inkübasyon tamamlandıktan sonra DNA'lar bu tampon çözeltisi içerisinde 300 mA elektriksel akımda ve 5-25 °C'de 25 dakika yürütüldü.

Nötralizasyon: Elektroforezde yürütme işlemi tamamlandıktan sonra alkali elektroforez tampon çözeltisini ortamdaki uzaklaştırmak için slaytlar 3 dakika süre ile 3 kez nötralizasyon tamponu (0.4 M Tris-HCl, pH 7.4) ile yıkandı.

Boyama: Nötralizasyon işleminden sonra boyama yapılarak cometler sayılır veya jel oda sıcaklığında kurutularak slaytlar nemli ortamda en fazla bir hafta depolanabilir. Boyama işlemi için floresan bir boya olan etidyum bromür boyası (5 µg/ml) kullanıldı.

Her bir slaytın üzerine 80 µL boya damlatıldıktan sonra lamel ile üzeri kapatılarak 20 büyütme floresan mikroskop ile (Eksitasyon DB: 546 nm, Emisyon DB: 580 nm) 100 adet DNA görüntüsü değerlendirildi. Değerlendirme işlemi için DNA'lar hasar düzeyine göre 5 evreye (0, 1, 2, 3 ve 4) ayrıldı (Şekil 9).



Şekil-9: 0-4. evrelerdeki comet assay görüntüleri

3.6.3. Total Oksidan Seviye (TOS) Ölçümü

Erel tarafından geliştirilen tam otomatik kolorimetrik bir yöntemdir.

Total Oksidan Seviye Ölçümünde Kullanılan Ayıraçlar

Reaktif 1: 140 mM NaCl çözeltisi içerisinde 25 mM H₂SO₄ çözülerek ana solüsyon hazırlanır. Ana solüsyonda önce % 10 oranında glycerol çözülüp daha sonra 250 uM ksilenol

orange çözümlere hazırlanır.

Reaktif 2: Ana solüsyon içerisinde önce 10 mM o-dianisidine dihydrochloride çözdürülüp sonra 5 mM Amonyum ferröz sülfat çözümlere hazırlanır. 560 nm'de spektrofotometrik olarak End-Point ölçüm yapılır.

Prensip: Örnekte bulunan oksidanlar ferröz iyon-o-dianisidine kompleksini ferrik iyonla oksitlerler. Ortamda bulunan gliserol bu reaksiyonu hızlandırarak yaklaşık üç katına çıkarmaktadır. Ferrik iyonlar asidik ortamda ksilenol orange ile renkli bir kompleks oluştururlar. Örnekte bulunan oksidanların miktarıyla ilişkili olan rengin şiddeti spektrofotometrik olarak ölçülmektedir. Standart olarak H₂O₂ kullanılır. Sonuçlar µmol H₂O₂ equivalent/L olarak ifade edilir (154).

3.6.4. Total Antioksidan Seviye veya Kapasite (TAS) Ölçümü

Erel tarafından geliştirilen tam otomatik bir yöntem olup, güçlü serbest radikallere karşı vücudun total antioksidan kapasitesini ölçen bir metottur

Total Antioksidan Seviye Ölçümünde Kullanılan Ayraçlar

Reaktif 1: 75 mM Clark tamponu (pH:1,8) içerisinde 10 mM o-dianisidine dihydrochloride ve 45 µM Amonyum ferröz sülfat çözümlere hazırlanır.

Reaktif 2: Clark tamponu (pH:1,8) içerisinde 7,5 mM Hidrojen peroksit (H₂O₂) çözdürülerek hazırlanır. 240 nm'de spektrofotometrik olarak End-Point ölçüm yapılır.

Prensip: Fe²⁺-o-dianisidine kompleksi hidrojen peroksit ile Fenton tipi reaksiyon oluşturarak OH radikalini oluşturur. Bu güçlü reaktif oksijen türü indirgen düşük pH'da renksiz odianisidine molekülü ile reaksiyona girerek sarı-kahverengi dianisidyl radikallerini oluştururlar. Dianisidyl radikalleri ileri oksidasyon reaksiyonlarına katılarak renk oluşumu artırmaktadır. Ancak örneklerdeki antioksidanlar bu oksidasyon reaksiyonlarını bastırarak renk oluşumunu durdurmaktadırlar. Bu reaksiyon otomatik analizörde 240 nm'de

spektrofotometrik olarak ölçülerek sonuç verilmektedir. Kalibratör olarak E vitamininin suda çözünür bir analogu olan Trolox kullanılır. Sonuçlar mmol Trolox Equivalent/L olarak ifade edilir (155).

3.6.5. Oksidatif Stres İndeksi (OSİ) Hesaplanması

Örneklerin oksidatif stres indekslerinin (OSİ) hesaplanması için öncelikle TOS ve TAS'ın birimleri μmol şeklinde hesaplandı. Daha sonra, $OSİ(AU)=[(TOS \mu\text{mol/L})/(TAS \mu\text{mol/L})] \times 100$ formülüne göre OSİ hesaplandı.

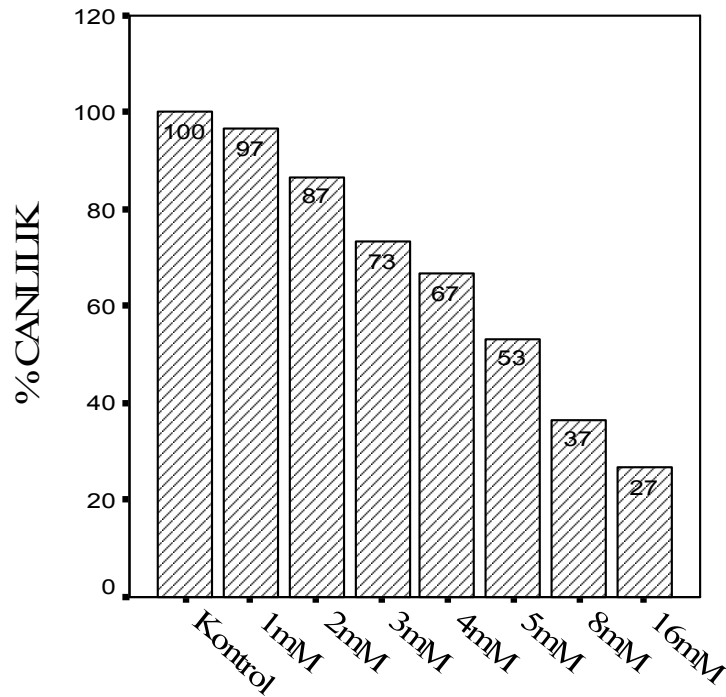
3.7. Yapılan İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler SPSS Versiyon 11.5 (SPSS Inc. Chicago USA) bilgisayar programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çoklu karşılaştırmalar için parametrik varsayımların gerçekleştiği verilerde tek yönlü varyans analizi (ANOVA) uygulandı. Sonuçlar ortalama \pm standart sapma (SD) olarak elde edildi. Gruplar birbirleriyle non parametrik T testi kullanılarak karşılaştırıldı.

4. BULGULAR

Lityum karbonat içeren gruplar, negatif kontrol grubu ve pozitif kontrol grubundan (100 uM H₂O₂) oluşan çalışmamızda MTT, TAS, TOS, OSI ve DNA hasarı ölçümleri daha önce belirtilen şekillerde ve en az üç tekrar yapılarak çalışıldı.

Lityumun lenfositler üzerindeki sitotoksik etkilerini belirlemek amacıyla MTT testi yapıldı. MTT testine göre 1 mM lityumun hücreler üzerinde sitotoksik etkisi neredeyse hiç yokken artan konsantrasyonlarıyla beraber bu etkinin arttığı görülmektedir (Şekil 10). 5 mM konsantrasyondan sonra ise kontrol grubuna göre hücrelerin yaklaşık % 50'si canlı kalmaktadır. Bu nedenle lityum için LD 50 (lethal doz 50) 5 mM olarak belirlendi.



Şekil-10: MTT ile yapılan canlılık testinde artan Lityum karbonat konsantrasyonlarının lenfositler üzerindeki sitotoksik etkileri

Belirlenen konsantrasyonlarda hazırlanan lityum karbonatın, Negatif ve Pozitif kontrol (H_2O_2) gruplarının *in vitro* lenfosit hücre kültürü ortamında TAS, TOS, OSI ve DNA hasarı üzerine olan etkilerinin istatistiksel analizi Tablo 6' da gösterilmektedir.

GRUPLAR	TAS	TOS	OSI	DNA HASARI
Kontrol	0,32 ± 0,003	8,08 ± 0,007	2,46 ± 0,026	7,0 ± 2,78
1 mM	0,34 ± 0,002	8,03 ± 0,014	2,33 ± 0,012	6,2 ± 2,57
2 mM	0,32 ± 0,014	8,04 ± 0,049	2,49 ± 0,13	7,4 ± 2,11
3 mM	0,32 ± 0,006	8,02 ± 0,056	2,44 ± 0,062	7,8 ± 2,74
4 mM	0,31 ± 0,019	8,06 ± 0,028	2,54 ± 0,006	7,6 ± 3,23
5 mM	0,30 ± 0,046	8,00 ± 0,007	2,53 ± 0,035	8,4 ± 2,06
8 mM	0,31 ± 0,007	8,04 ± 0,049	2,49 ± 0,014	8,0 ± 2,3
16 mM	0,31 ± 0,068	8,04 ± 0,035	2,55 ± 0,044	8,0 ± 1,63
H_2O_2	0,29 ± 0,098	8,90 ± 0,120	3,00 ± 0,059	118,6 ± 24,58
<i>p</i>	0,006	< 0,001	< 0,001	< 0,001

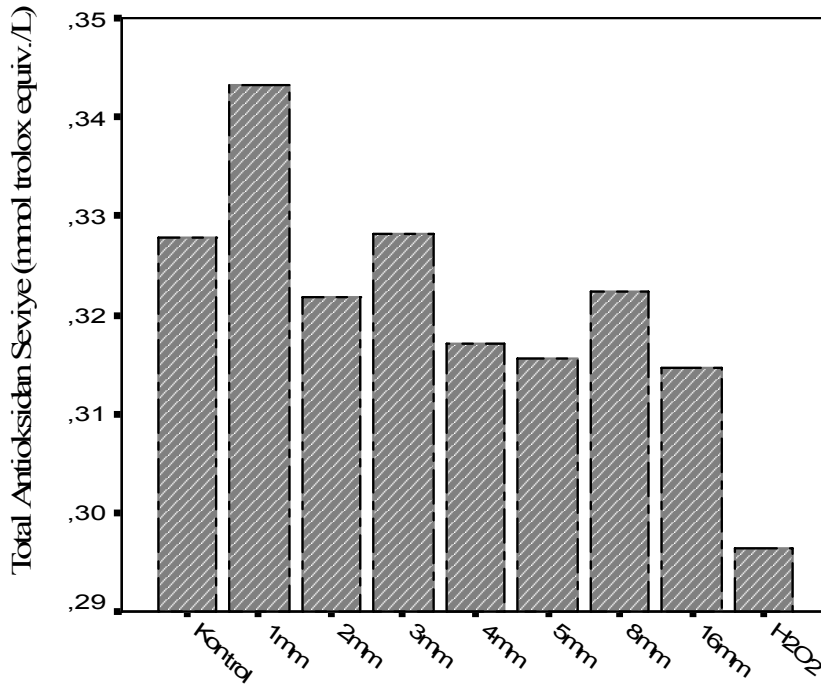
Tablo-6: Lityum karbonat verilen gruplar, Negatif kontrol grubu ve Pozitif kontrol (H_2O_2) gruplarının TAS, TOS, OSI ve DNA Hasarı Düzeylerinin İstatistiksel Analizi

Gruplar TAS düzeyi açısından karşılaştırıldığında 1mM lityum karbonat verilen grup diğer gruplara göre yüksek fakat istatistiksel olarak anlamlı değildi, negatif kontrol grubuna göre ise istatistiksel olarak yüksek ve anlamlı bulundu ($p<0.05$). Pozitif kontrol olarak kullanılan 100 uM H₂O₂ ise diğer gruplara ve negatif kontrol grubuna göre istatistiksel olarak düşük ve anlamlı bulundu ($p<0.05$) (Şekil 11).

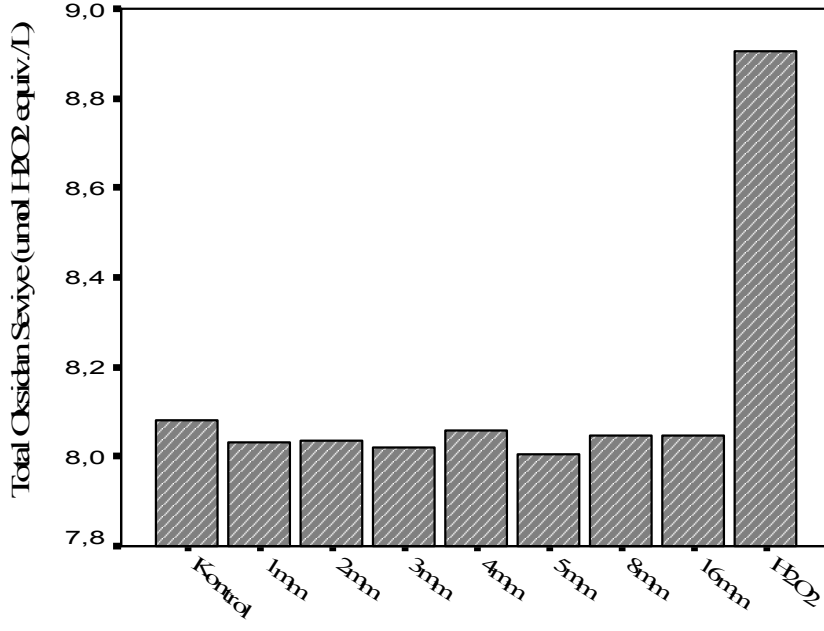
TOS açısından karşılaştırıldığında pozitif kontrol diğer gruplara göre istatistiksel olarak yüksek ve anlamlı bulundu ($p<0.001$). Lityum verilen gruplar negatif kontrol grubuyla kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0.05$) (Şekil 12).

OSI açısından karşılaştırıldığında 1mM lityum kullanılan grup, negatif kontrol grubuna göre istatistiksel olarak düşük ve anlamlı bulundu ($p<0.05$). Pozitif kontrol diğer gruplara ve negatif kontrol grubuna göre istatistiksel olarak yüksek ve anlamlı bulundu ($p<0.001$) (Şekil 13).

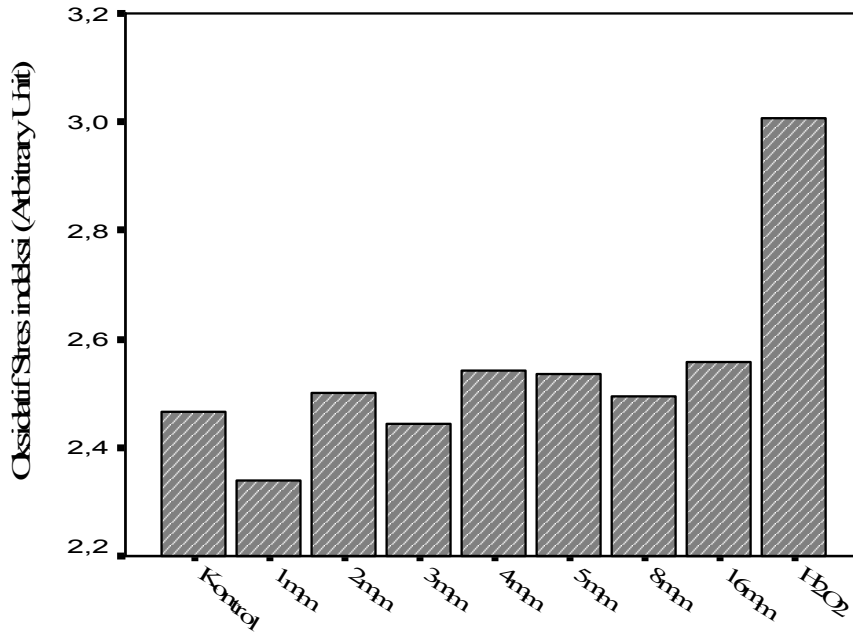
DNA hasarı açısından karşılaştırıldığında pozitif kontrol grubu diğer gruplara göre istatistiksel olarak yüksek ve anlamlı bulundu ($p< 0,001$). Ancak lityum karbonat verilen gruplar birbirleriyle ve negatif kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu ($p>0.05$).



Şekil-11: Farklı konsantrasyonlardaki Lityum karbonat ile pozitif ve negatif kontrol grupları kullanılarak yapılan TAS ölçümü.



Şekil-12: Farklı konsantrasyonlardaki Lityum karbonat ile Pozitif ve Negatif kontrol grupları kullanılarak yapılan TOS ölçümü.



Şekil-13: Farklı konsantrasyonlardaki Lityum karbonat ile Pozitif ve Negatif kontrol grupları kullanılarak yapılan OSI ölçümü.

5. SONUÇ VE TARTIŞMA

Lityum yaklaşık 100 yıldır manik-depresif hastalık tedavisinde kullanılmaktadır ve 1970'li yılların başında U.S. FDA tarafından onaylanmış ilk ilaçlardandır. Lityumun beyin ve kanda birçok etkisi bulunmasına rağmen yıllar boyunca bu etkilerin nasıl gerçekleştiği bilinmemektedir. Son dönemlerde yapılan çalışmalarla lityumun özellikle psikiyatrik hastalarda hangi mekanizmalarla tedavi edici etkisini gerçekleştirdiği ve artan konsantrasyonlardaki sitotoksik etki mekanizmaları açıklanmaya çalışılmıştır, ancak halen tam olarak çözülememiştir.

Lityum 0.6-1.5 mEq/L arasında dar bir terapötik aralığa sahip olduğundan toksisite oluşturma ihtimali yüksektir (54, 156). Yapılan bir çalışmada lityumun serumdaki dozu 1.5 mM'den yüksek olduğunda toksik etkiler oluşturabileceği, serum lityum seviyesinin 1.5-2.0 mM olduğunda böbrekte, karaciğerde, kalpte ve bir çok dokuda geri dönüşümlü toksik etki oluşturabileceği, serum lityum düzeyi 2 mM'den yüksek olduğunda ise, nörolojik semptomlara neden olabileceği ve uzamış lityum toksisitesinin bu konsantrasyonda gerçekleşip kalıcı beyin hasarına sebep olabileceği belirtilmiştir (55).

Bu nedenle lityum toksisitesinin altında yatan mekanizmaların açığa kavuşturulması için çeşitli çalışmalar yapılmıştır.

Biz de bu çalışmamızda lityum karbonatın oluşturabileceği muhtemel genotoksik, sitotoksik ve oksidatif etkileri lenfosit hücre kültüründe analiz ederek kullanılan tedavi dozlarının ne kadar sağlıklı olduğunu ortaya çıkarmaya çalıştık.

Lityum tuzlarının *in vivo* ve *in vitro* olarak mutasyonlar üzerindeki etkisini göstermek amacıyla DNA hasarı, kromozom anomalileri ve kardeş kromatid değişimini inceleyen çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Lityumun genotoksik etkilerini inceleyen aşağıda belirtilen bazı çalışmalar lityum bileşiklerinin yüksek dozlarda genotoksisiteye neden olduğunu rapor ederken diğer birçok çalışma ise bu etkiyi göstermede başarısız olmuştur (105).

Yaptığımız literatür taramasında lityumun genotoksik etkisinin olduğunu belirten sınırlı sayıdaki çalışmalar şunlardır;

Slamenova ve ark. yaptıkları çalışmada; LiCO₃'ün yüksek konsantrasyonlarda (3 mg/mL) V79 Çin hamster hücrelerinde ve insan EUE fibroblastlarında DNA sentezini az miktarda inhibe ettiğini ve bu etkinin S9 fraksiyonu (tedavi sırasında memeli metabolizmasını uyarması için post-mitokondriyal supernatant fraksiyon bazı kimyasallarla hücre kültürüne eklendi) eklenmesiyle azaltıldığını belirtmişlerdir. Aynı yazarlar V79 Çin hamster hücrelerinde S9 fraksiyonu yokluğunda DNA tek zincir kırığı ve gen mutasyonunda da hafif bir artış olduğunu belirtmişlerdir. Anlamlı klastojenik bulgu görülmediğini ve lityumun şüpheli mutajenik etki gösterdiğini söylemişlerdir (157).

King ve ark. yaptıkları çalışmada; intraperitoneal enjeksiyon ile 2 X 1,1 g/kg lityum verilen NMRI farelerinde mikronükleusu olan polikromatik eritrositlerde artış olduğu görülmüştür. Bu çalışmada lityumun kromozom dağılımıyla etkileşebileceği belirtilmiştir (158).

Sram ve ark.; 6 aylık ratların içme suyuna 3, 6 ve 12 ay boyunca lityum karbonat 0,05% (500 ppm-0,7 mg/L) eklenmesi ile N-methyl-N0-nitro-Nnitrosoguanidine'i alkillemesi sonucu lenfositlerdeki DNA sentezini hafifçe azalttığını belirtilmişlerdir (159).

Yapılan bir başka çalışmada üç farklı lityum tuzu üç doz düzeyinde su veya zeytinyağı içinde farelere verilerek kardeş kromatid değişimi ve kromozom anomalileri incelenmiştir. 0,2-21 mg/kg lityum klorür, 1,2-120 mg/kg lityum karbonat zeytinyağı içinde ve 0,05-5 mg/kg lityum asetat ise su içinde verilmiş kromozom anomalilerinin verilen üç doz düzeyinde de kontrol grubuna göre artmış olduğu belirtilmiştir. Kardeş kromatid değişiminin az bir oranda arttığı gözlemlenmiştir (anlamlı bir artış yoktu) (160).

Lityumun genotoksik olmadığını gösteren çalışmalardan bazıları şunlardır;

Kanematsu ve ark. LiCl'nin Bacillus aluminium suşları üzerinde herhangi bir genotoksik etkisinin olmadığını belirtmişlerdir. Lityum karbonatın 72 saatlik kültür periyodunda 0,1, 1 ve 10 gram konsantrasyonlarında 70 kg'lık bir kişinin vücudunda periferik lenfositlerde yapısal kromozom bozukluklarına neden olmadığı belirtilmiştir (161).

Bu sonuçları doğrulayan bir başka çalışmada ise hayvanlara verilen toksik dozlardaki lityum tuzlarının lenfositlerde sitogenetik değişikliklere neden olmadığı söylenmiştir (162).

Lityum ile tedavi edilen 19 manik-depresif hasta 23 kontrolle kıyaslandığında herhangi bir kromozom anomalisi saptanmamış ancak mitotik aktivite anlamlı derece azalmıştır (163).

Benzer şekilde Banduhn ve ark. lityumun lenfositler üzerindeki gonotoksik etkisini araştırdıkları çalışmada kromozom anomalisi saptamamışlardır (164).

50'si lityum sülfat, 17'si lityum karbonat ve 10'u lityum asetat ile tedavi edilen toplam 77 hastada ve aynı zamanda 2 haftadan 2 yıla kadar lityum karbonat verilen 16 manik depresif hastanın da üzerinde yapılan çalışmada lenfositlerde anomali görülmemiştir (165).

Yapılan bir başka çalışmada da lityum, 8,4, 12,6 ve 16,8 mg/L konsantrasyonlarında lenfositler ile kültüre edilmiş ve yapısal anomaliyi arttırmadığı gözlemlenmiştir (166).

Psikiyatrik hastalıkları için uzun dönem ve devamlı lityum terapisi alan 23 hastada kardeş kromatid değişim analizi de içeren kromozom çalışmaları yapılmıştır. Yaşları uyumlu olan 90 sağlıklı kişi kontrol grubu olarak seçilmiş, lityum alan grup kontrol grubuyla kıyaslandığında herhangi bir kromozom hasarına rastlanmadığı belirtilmiştir (167).

Pastor ve ark., lityum tuzları tarafından oluşturulabilecek DNA tek veya çift zincir kırıklarını alkali comet assay yöntemiyle ölçmüşlerdir. Çin AA8 hamster fibroblast hücreleri LiCO_3 veya LiCl ile 3 veya 24 saat süre inkübe edilmiş ve uygulanan en yüksek konsantrasyon olan 10 mM lityum karbonatın DNA hasarı indüklenmesinde etkisiz olduğu görülmüştür, lityum uygulanmayan kontrollerle kıyaslandığında kuyruk momenti arasında bir fark olmadığı gözlemlenmiştir (168).

Andreazza Ana Cristina ve ark., duygudurum düzenleyicileri olarak kullanılan lityum, valproat ve amfetaminin ratlara verilip DNA hasarına etkilerini incelediği bir çalışma yapmışlardır. Bu çalışmada lityum 47,5 mg/kg dozlarında erkek ratlara günde iki kez verilmiş ve hem hipokampus hücreleri hem de periferik kan hücreleri üzerinde oluşturduğu DNA hasarına comet assay yöntemiyle bakılmıştır. Lityum ile tedavi sonrası periferik kan

hücrelerinde DNA hasarını sırasıyla önleyici ve geri döndürücü ($p=0,233$, $p= 0,025$), hipokampus hücrelerinde ise hasarı geri döndürücü ($p=0.345$) olduğu görülmüştür (169).

Yaptığımız çalışmada lityum karbonatı PBS içinde çözündürüp lenfositlerle 36 saat boyunca inkübe ettik. Lityum karbonatın son konsantrasyonu 1 mM, 2 mM, 3 mM, 4mM, 5 mM, 8 mM ve 16 mM olacak şekilde hücre kültür ortamına ekledik. Negatif kontrol grubunda ise lenfositlere lityum karbonat uygulamadık. Comet assay yöntemiyle DNA hasarı ölçüldüğünde negatif kontrol grubu ile farklı konsantrasyonlarda lityum karbonat uygulanan gruplar arasında anlamlı bir fark bulmadık ($p>0,05$).

Daha önce lityumun genotoksik etkisinin olduğunu belirten çalışmalarla ilgili olarak Nordic Uzman Grubunun yüksek lityum konsantrasyonlarında belirgin genotoksisitesinin olası bir açıklamasının ikincil bir etkisi olarak GSK'ü inhibe etmesine bağlı hücre sağkalım süresini arttırması olabileceğini belirtmişlerdir. Ancak aynı araştırmacılar lityum bileşiklerinin kimyasal özellikleri göz alındığında onların mutajen olmasının pek olası olmadığını da belirtmişlerdir (104).

Son zamanlarda yayınlanan Avrupa İstihdam ve Toplumsal İlişkiler Komisyonu tarafından yapılan araştırmada da yaptığımız çalışmanın sonucunu destekler biçimde; lityum ile ilgili insan, hayvan ve genotoksisite çalışmaları ile ilgili tüm verilere bakıldığında ağırlıklı olarak lityum iyonunun DNA'ya zarar vermediğini ve mutajenik olmadığını ayrıca literatürde kanser ile ilgili herhangi bir bilginin de mevcut olmadığını belirtmişlerdir (105).

Yapılan çalışmalarda terapötik konsantrasyonlardaki lityumun neden olduğu oksidatif stresin antioksidan sistemler tarafından dengelendiği için antioksidan defansın yüksekliği ile sonuçlandığı belirtilmiştir (137-139).

Oksidatif düzeyin majör belirteçleri TBARS, SOD, CAT ve GSH-Px gibi enzimlerdir. Lityumun DNA hasarı, serbest radikal oluşumu ve lipid peroksidasyonunu önleyici-geri döndürücü etkisinin olduğunu gösteren çalışmalardan bazıları şunlardır; Rushaniya ve ark. yaptıkları çalışmada sağlıklı kişilere 2-4 hafta boyunca terapötik dozlarda (0,6 - 1mM) lityum vermişlerdir. Sağlıklı gönüllülerde lityum tedavisi sonucu tüm deneklerin SOD seviyeleri değişmiştir. Lityum tedavisinden sonra SOD/CAT oranında belirgin bir azalma olmuş,

oksidan seviyenin azalmasının hidrojen peroksit düzeyindeki düşmeye bağlı olduğunu söylemişlerdir. Genel olarak mevcut bulgularla lityumun sağlıklı bireylerde antioksidan etkilerinin olması onun bipolar hastalardaki nöroprotektif etkiyi desteklediğini belirtmişlerdir (140).

Ana Paula ve ark. yaptıkları çalışmada Wistar tipi erkek ratlar kontrol grubu ve kronik değişken strese tabi tutulan grup olmak üzere iki gruba ayrılmış, bu gruplar LiCl verilen ve verilmeyen gruplar olarak alt gruplara ayrılmıştır. 40 gün sonra LiCl verilen gruptaki son lityum konsantrasyonu 0,6 ve 1,2 mM olarak ölçülmüştür. Öldürülen ratların hipokampus, hipotalamus ve frontal kortekslerindeki lipoperoksidasyon üretimi, serbest radikal miktarı, total antioksidan reaktivitesi (TAR), SOD ve GSH-Px enzim düzeyleri ölçülmüştür. Lityumun hipokampüste; serbest radikal miktarını azalttığı, SOD, GSH-Px ve TAR'ı arttırdığı hipotalamusta TAR, ve SOD'u arttırdığı belirtilmiştir. Bu sonuçlara dayanarak lityumun antioksidan özellikleri olduğunu fakat strese tabi tutulan gruptaki oksidan düzeyi önlemede etkisiz olduğunu belirtmişlerdir (170).

Yaptığımız çalışmada da belirtilen çalışmalara benzer şekilde terapötik konsantrasyonda (1mM) kullandığımız LiCO_3 'ün diğer kullandığımız lityum konsantrasyonlarına göre yüksek ve lityum verilmeyen negatif kontrol grubuna göre TAS düzeyinin istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek olduğunu ($p < 0,05$) ve lityum karbonat verilen gruplardaki TOS sonuçlarının negatif kontrol grubuna göre düşük ancak istatistiksel olarak anlamlı olmadığını bulduk ($p > 0,05$). Bu sonuçlara göre çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılan lityumun terapötik dozlarda antioksidan kapasiteyi arttırdığını, oksidatif durumu ise baskıladığını söyleyebiliriz. Dolayısıyla gerek yalnız başına gerekse diğer tedavilere kombine olarak kullanılmakta olan lityumun tedavi dozlarında kullanımının vücudumuz açısından bir mahsuru olmadığı gibi oksidatif hasara karşı doku ve hücrelerimizi korumak, oksidan-antioksidan dengemizin idamesine katkıda bulunmak gibi avantajları da bulunmaktadır.

Günümüzde MTT testi (aynı zamanda hücre sel canlılık testi olarak da bilinmektedir) hem medikal hem paramedikal pek çok ilaç ve kimyasal maddenin letal dozlarının belirlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (152). Biz de bu çalışmamızda lityumun tedavi dozları bilinmesine rağmen hücre sel canlılık testi MTT ile letal dozlarını tekrar değerlendirerek farklı konsantrasyonlarında, doz artımlarında karşılaşılabilecek sitotoksik

etkilerini araştırdık. Yaptığımız MTT testine göre lenfosit hücre konsantrasyonu artan lityum konsantrasyonlarıyla orantılı olarak azalmaktaydı. Artan lityum konsantrasyonlarında ölçülen TOS, negatif kontrol grubuna göre düşüktü fakat istatistiksel olarak bulunan fark anlamlı değildi. Buna göre artan lityum konsantrasyonlarında MTT testi ile tespit edilen canlı hücre sayısındaki azalmanın yalnızca oksidatif hasara bağlı gerçekleşmemiş olabileceğini tetikleyici başka nedenlerinde bulunma ihtimalini düşünmemiz gerekmektedir.

Çalışmamızda Comet Assay yöntemiyle DNA hasarını araştırarak terapötik ve artan lityum konsantrasyonlarında ortaya çıkabilecek genotoksik etkileri de araştırmayı amaçladık. Bulduğumuz sonuçlarımıza göre lityum verilen grupla negatif kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktu. Negatif kontrol grubuna göre lityum grubunda TOS değerlerinde de anlamlı bir yükseklik olmaması lityumun oksidatif strese bağlı DNA hasarı oluşturma ihtimalinin düşük olduğunu düşündürmektedir. Comet Assay ile artan lityum konsantrasyonlarında lenfositlerde ölçülen DNA hasarı açısından anlamlı bir fark olmaması veya anlamlı bir oksidatif hasarın tespit edilmemesi de azalan hücresel yoğunluğun yalnızca oksidatif strese bağlı gerçekleşmediği fikrini desteklemektedir.

Yapılan bazı çalışmalarda ise lityumun toksik etkisinin oksidatif hasara bağlı olduğu belirtilmiştir. Örneğin; Toplan ve ark. lityum karbonatın farklı dozlarda eritrosit oksidan-antioksidan durumu, ozmotik fragilite ve tiroid fonksiyonları üzerine olası etkilerini incelemek amacıyla bir çalışma yapmışlardır. Bu çalışmada, 24 tane Wistar tipi erkek ratlar eşit üç gruba ayrılmış, 30 gün boyunca birinci gruba % 0,1, ikinci gruba % 0,2 lityum karbonat içtikleri suya katılmış üçüncü grup kontrol grubu olarak belirlenmiş ve içtikleri suya lityum konmamıştır. Deney süresi sonunda eritrosit ozmotik fragilitesi, triiyodotironin (T3), tiroksin (T4), tiroid stimülan hormon (TSH), malondialdehit (MDA), SOD ve GSH düzeyleri kanda ölçülmüştür. 2. gruptaki SOD ve MDA düzeyleri kontrole göre anlamlı bir şekilde yüksekken GSH düzeyi anlamlı olarak düşük bulunmuştur (171). Aynı araştırmacılar bir önceki çalışmalarında ratlarda deneysel olarak oluşturdukları hipotiroidiye bağlı oksidatif stres ve oksidatif defansta bir değişiklik gözlelemediklerini belirtmişlerdir (172). Oksidatif düzeyin artmasının ve antioksidan kapasitenin azalmasının hipertiroidizm sonucu geliştiği daha önce belirtilmiştir (173). Bu nedenle yüksek konsantrasyon lityum (5-7 mM) verilen ikinci grupta yüksek MDA ve düşük GSH nedeniyle oksidatif stresin arttığını belirtmişlerdir ancak artmış oksidatif düzeyin tiroiddeki bozukluğa mı ya da eritrositlerde artmış ozmotik fragiliteye mi

bağlı bunun daha açıklığa kavuşturulamadığını belirtmişlerdir. Bu çalışmanın (172) sonuçlarına göre lityum karbonatın eritrosit membranı üzerindeki etkisinden veya tiroid fonksiyon bozukluğuna bağlı oksidatif stresin artmış olabileceğini belirtmişlerdir.

Yapılan başka bir çalışmada 2 mM lityum 5 ml tam kana verilmiş ve Ellman metoduyla 180 dakika boyunca hem plazma hem de eritrositlerin sitozolik fraksiyonlarındaki GSH düzeyi ölçülmüştür. Plazmadaki ve sitozolik fraksiyondaki GSH miktarının kontrole göre zamanla giderek azaldığı tespit edilmiş ve GSH'nın muhtemelen oksidatif strese bağlı okside glutatyona dönüştüğü için azaldığını belirtmişlerdir. Çalışmanın sonuçlarına göre de lityumun eritrosit membranından geçerek burada birikmesine bağlı olarak oksidan düzeyi arttırdığını ve buna bağlı olarak GSH'nın düştüğünü bu nedenle lityuma bağlı sitotoksik etkilerin buna bağlı olabileceğini söylemişlerdir. Ancak eritrositlerde artmış oksidatif stresin hangi mekanizmalara bağlı olarak gerçekleştiği açıklanamamıştır (174).

Çalışmamızda kullandığımız bütün lityum konsantrasyonlarında TOS düzeyinin negatif kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir yüksekliğinin olmaması lityumun lenfosit hücre kültürü ortamında oksidatif düzeyi arttırmadığını göstermektedir. Lityumun oksidan düzeyi arttırdığını belirten yukarıda çalışmalara bakıldığında bu durum GSH düzeyindeki azalmaya bağlanmıştır. Bu nedenle toksik konsantrasyonlardaki lityumun eritrositlerdeki antioksidan moleküllerde azalmaya neden olarak oksidan moleküllere daha savunmasız hale getirdiğini ancak lenfositlerde böyle bir etkisinin olmadığını düşünmekteyiz.

Bizim mevcut çalışmamızda lityum verilen çalışma gruplarında negatif kontrole göre, TOS değerlerinin anlamlı olmasa da düşük olması, TAS değerlerinin yüksek olması ve anlamlı DNA hasarının tespit edilmemesi lityumun lenfositler üzerinde oksidatif düzeyde bir hasar yapmadığı fikrini vermektedir. Lityumun hücresel düzeydeki etki mekanizmaları yapılan çalışmalarla anlaşılmaya çalışılmış ancak halen tam olarak netleştirilememiştir.

Birçok çalışmada lityumun hücreler üzerinde koruyucu etkisi olduğu belirtilmiştir. Lityumun bu koruyucu etkisinin mekanizması tam olarak bilinmemesine karşın bazı çalışmalarda bu etki GSK-3 inhibisyonuna bağlanmıştır. Bunun nedeni de birçok koşulda GSK-3 ün apoptozisi indüklemesi lityumun da bunu inhibe etmesine bağlanmıştır. Önceki çalışmalara göre de TNF- α veya TRAIL gibi mediatörleri aktifleştirerek apoptozisi

güçlendirdiği belirtilmiştir (175-176). Lityumun intrinsik apoptozisi önleyerek hücre ölümü üzerine koruyucu etkisine karşı hücre ölümü reseptörleri aracılığıyla ekstrinsik apoptotik uyarıyı kolaylaştırdığı da belirtilmiştir. Bu temel farklılık GSK-3'ün uyarı yollarında özellikle ekstrinsik apoptotik etkiyi önleyici rolü olan NFκB'yi inhibe etmesine ve intrinsik yolakta apoptozisi önlemesine bağlanmıştır (135).

Song ve ark. yaptıkları çalışmada ise 20 mM lityumun anlamlı bir şekilde Jurkat hücreleri (T lenfoblastik hücreleri) ve hipokampal hücrelerde Fas'ı aktive ederek apoptotik sinyali önemli ölçüde arttırdığını belirtmişlerdir. Diğer GSK-3 inhibitörleri olan 20 µM indirubin-3'-monoxime, 5 µM kenpaullone ve 5 µM rottlerin'in de Fas-bağımlı apoptotik uyarıyı indüklediği gösterilmiş ve apoptozisin uyarılmasının GSK-3 inhibisyonuna bağlı olduğu belirtilmiştir. Bu sonuçlara göre lityumun sadece nörokoruyucu olmadığı aynı zamanda buna zıt olarak ölüm-aracılı reseptörleri de uyararak apoptozisi kolaylaştırdığını belirtmişlerdir (136).

Yaptığımız çalışmada da lityumun artan konsantrasyonlarına bağlı olarak canlı lenfosit hücre yoğunluğu azalmaktaydı. Daha önce yapılan bazı çalışmalarda oksidatif düzeyin artışına bağlı hücresel hasarın olduğu belirtilmiştir. TOS düzeyinin lityum karbonat verilen gruplarda negatif kontrole göre istatistiksel olarak anlamsız fakat düşük olması oksidatif hasara bağlı sitotoksisitenin oluşmadığını göstermektedir. Bu nedenle lityumun yüksek dozlarda oksidatif strese bağlı olmaksızın apoptozisi indüklemesine bağlı veya daha önceki çalışmalarda belirtilen yolak veya reseptörler ya da bilinmeyen daha başka mekanizmalarla hücreler üzerine toksik etki oluşturduğunu düşünebiliriz.

Sonuç olarak, lenfosit hücre kültüründe 16 mM lityum konsantrasyonuna kadar negatif kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir DNA kromozom kırığı tespit edilmedi. Bu açıdan lityum karbonatın genotoksik bir etki göstermediğini söyleyebiliriz. Fakat yapılan sınırlı sayıdaki çalışmada lityumun mutajen olabileceği belirtilmiştir (157-160). Bunun yanı sıra birçok çalışmada da mutajen olmadığı belirtilmektedir (161-169). Yaptığımız çalışma da genel kanı olan lityumun mutajen olmadığı fikrini daha çok desteklemektedir.

Kullandığımız bütün lityum konsantrasyonlarında oksidan düzey negatif kontrol grubuna göre yüksek değildi. Lityumun sitotoksik etki mekanizması halen tam olarak

çözülemedi. Yapılan birçok çalışmada bu etki oksidatif hasara bağlanmıştır, ancak bizim sonuçlarımıza göre lityum oksidatif hasar oluşturacak kadar oksidatif stres oluşturmamaktadır. Ayrıca daha önce de belirttiğimiz gibi farklı mekanizmalarla sitotoksik etki oluşturduğunu gösteren çalışmalar da yapılmıştır. Yaptığımız çalışmada TOS düzeyi açısından lityum karbonat verilen gruplar ile negatif kontrol grubu arasında anlamlı bir fark olmadığı için lityumun artan konsantrasyonlarıyla orantılı olarak lenfositlerde oluşturduğu toksik etkinin oksidatif hasara bağlı olmadığını farklı bir mekanizmaya bağlı olarak gerçekleştiğini düşünmekteyiz. Özellikle 1mM lityum verilen grupta antioksidan düzeyin kontrol grubuna göre anlamlı oranda yüksek, oksidan düzeyin ise düşük olması ve bu dozun genellikle tercih edilen terapötik doz olması lityumun bu dozlarda güvenilir bir şekilde kullanılabileceğini göstermektedir. Fakat MTT çalışmamızda 1 mM'dan sonra sitotoksik etki dozun artırılmasıyla birlikte artış göstermektedir. Bu nedenle lityumun tedavi dozunun artırılması gerektiği durumlarda hususen bu sitotoksik etkiye dikkat edilmesi gerekmektedir.

Günümüzde lityum karbonat en fazla psikiyatrik hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır ve ortalama 0,6-1,2 mM konsantrasyon düzeylerinde hastalara verilmektedir. Artan konsantrasyonlarıyla beraber çeşitli doku ve sistemlerde sitotoksik etkiler oluşturduğu bilinmektedir. Ancak hem tedavi edici etkisini nasıl gerçekleştirdiği hem de sitotoksik etkisini hangi mekanizmalara bağlı oluşturduğu halen tam olarak çözülemedi ve günümüze kadar bu mekanizmaların açığa kavuşturulması için birçok çalışma yapılmıştır.

Çalışmamızda 1mM konsantrasyonda lityum en yüksek antioksidan kapasiteye, en düşük oksidatif durum ve oksidatif stres indeksi ve ayrıca en düşük sitotoksik etkiye sahipti. Antioksidan aktivitenin doku ve hücreler üzerinde koruyucu, tedavi edici etkiler oluşturduğu göz önüne alınırsa lityumun terapötik dozlarda oksidatif hasara ve sitotoksisiteye karşı koruyucu etkiye sahip olduğu söylenebilir. Çalışmamızda lityumun artan konsantrasyonlarıyla beraber bu koruyucu etkisinin azalmakta, sitotoksik etkisinin ise artmakta olduğunu tespit ettik. Kullandığımız lityum karbonatın bütün konsantrasyonlarında negatif kontrol grubuna göre anlamlı genotoksik etkisi bulunmamaktaydı.

Bulgularımız ışığında lityum karbonatın ortalama terapötik konsantrasyonu olan 1 mM düzeyde güvenilir bir ilaç olarak kullanılabileceğini, bu dozlarda sahip olduğu antioksidan özelliğinden dolayı da oksidatif hasar ve sitotoksik etkiye karşı koruyucu etkisinin

olabileceğini ve tedavi edici etkisinin de bu antioksidan özelliğiyle ilgili olabileceğini söyleyebiliriz. Bu tedavi dozlarının üzerine çıkıldığı zaman ise antioksidan aktivitenin azaldığı, sitotoksik etkisinin ise doz artışına paralel olarak artış gösterdiğini ve dolayısıyla doz ayarlaması gereken durumlarda bu durumun göz önüne alınması gerektiğini vurgulamak gerekir. Bununla birlikte, bu bulgularımızın daha detaylı moleküler ve klinik *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarla teyit edilmesi lityumun sitotoksik etki mekanizmaları konusunda bilinmeyen hususların aydınlatılması bakımından önem taşımaktadır.

KAYNAKLAR

1. Kamienski C. W., McDonald D. P., Stark, M. W., Papcun, J. R. Lithium and lithium compounds. Kirk-Othmer encyclopedia of chemical technology. 2000; 1302-66
2. Fishwick J.H., Applications of Lithium in Ceramics, 1974; 190-4
3. Ober J. A., In Minerals Yearbook, vol. I, metals and minerals Lithium 2001; 471-6
4. Sailer M., Lithium takes charge, Industrial Minerals, 2000; 37
5. Tamlin M., Sheth A., McCracken D. J. Lithium: world supply and demand. Mining Engineering (Colorado USA), 2002; 54(6): 37-8.
6. Ooi K., Miyai Y., Katoh S., Recovery of lithium from seawater by manganese oxide adsorbent. Separation Science and Technology, 1986; 21(8): 755-66.
7. Aral H., Angelica Vecchio-Sadus A. Toxicity of lithium to humans and the environment a literature review. Ecotoxicology and Environmental Safety 2008; 70 (3): 349-56.
8. El-Mallakh RS, Jefferson JW. Prethymoleptic use of lithium. Am J Psychiatry. 156:129, 1999.
9. Jefferson JW, Greist JH. Lithium. Kaplan and Sadock's comprehensive textbook of psychiatry, 8. Ed. Sadock BJ, Sadock VA. Philadelphia, PA, ABD, 2007; 2839-50.
10. Corcoran AC, Taylor RD, Page IH. Lithium poisoning from the use of salt substitutes. J Am Med Assoc, 1949; 139: 685-8.
11. Schou M. The early European lithium studies. Aust NZJ Psychiatry; 1999; 33 Suppl: 39-47.
12. Bernstein J G. Drug Therapy in Psychiatry. 3rd Ed., Massachusetts: Aimes Mirror Company, 1995; 195-6.
13. Sadock BJ, Sadock VA. Comprehensive Textbook of Psychiatry. Volume 2, 7th Edition., Philadelphia: Lippincott Williams Wilkins, 2000; 1338-77
14. Uluşahin A. Koruyucu sağaltımda öngörücü değişikliklere sahip miyiz? Psikiyatri Psikoloji Psikofarmakoloji Dergisi, 2000; 8(2): 23-4.
15. Vahip I. İki uçlu duygudurum bozukluğunda lityum sağaltımına uyum. Türk Psikiyatri Dergisi, 1997; 8(3): 190-1.
16. Öztürk O. Ruh sağlığı ve Bozuklukları. Hekimler Yayın Birliği, Ankara, 1997; 7: 471-2.

17. Saygılı R, Bayraktar E. Lityum Ansiklopedisi. 1.Baskı, İzmir: Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınlar, 1988; 1-555
18. Lee S, Chow CC, Wing YK ve ark. Thyroid function and psychiatric morbidity in patients with manic disorder receiving lithium therapy. *J Clin Psychopharmacol*, 2000; 20: 204-5.
19. Jope, R. S. Anti-bipolar therapy: Mechanism of action of lithium. *Mol. Psychiatry* 1999; 4(2): 117–28.
20. O'Donnell T., Rotzinger S., Nakashima T., Hanstock C., Ulrich M., Silverstone P., Chronic lithium and sodium valproate both decrease the concentration of myoinositol and increase the concentration of inositol monophosphates in rat brain. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 2003; 13(3): 199–207.
21. Lochhead P. A., Coghlan M., Rice S. Q., Sutherland C. Inhibition of GSK-3 selectively reduces glucose-6-phosphatase and phosphatase and phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression. *Diabetes* 2001; 50(5): 937–46.
22. Tong, H., Imahashi K., Steenbergen C., Murphy E. Phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 β during preconditioning through a phosphatidylinositol-3-kinase-dependent pathway is cardioprotective. *Circ. Res.* 2002; 90(4):377–9.
23. Gao Q., Katakowski M., Chen X., Li Y., Chopp M. Human marrow stromal cells enhance connexin43 gap junction intercellular communication in cultured astrocytes. *Cell Transplant.* 2005; 14(2–3): 109–17.
24. Chalecka-Franaszek E., Chuang D. M. Lithium activates the serine/threonine kinase Akt-1 and suppresses glutamate induced inhibition of Akt-1 activity in neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999; 96(15): 8745–50.
25. Beurel, Eleonore, Steven F. Grieco, and Richard S. Jope. "Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): Regulation, actions, and diseases. *Pharmacology & therapeutics* 2014; 2-3
26. Mora A., Sabio G., Gonzalez-Polo R. A.; Cuenda A., Alessi D. R., Alonso J. C., Fuentes J. M., Soler G., Centeno F. Lithium inhibits caspase 3 activation and dephosphorylation of PKB and GSK3 induced by K⁺ deprivation in cerebellar granule cells. *J. Neurochem.* 2001; 78(1): 199–206.
27. Agranoff B. W., Fisher S. K. Inositol, lithium, and the turns brain. *Psychopharmacol. Bull.* 2001; 35(3): 5–18.
28. Parthasarathy L. K., Seelan R. S., Wilson M. A., Vadnal R. E., Parthasarathy R. N. Regional changes in rat brain inositol monophosphatase 1 (IMPase 1) activity with

- chronic lithium treatment. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 2003; 27(1): 55–60.
29. Berry G. T., Buccafusca R., Greer J. J., Eccleston E. Phosphoinositide deficiency due to inositol depletion is not a mechanism of lithium action in brain. *Mol. Genet. Metab.* 2004; 82(1): 87–92.
30. Sarkar S., Krishna G., Imarisio S., Saiki S., O’Kane C. J., Rubinsztein D. C. A rational mechanism for combination treatment of Huntington’s disease using lithium and rapamycin. *Hum. Mol. Genet.* 2008; 17(2): 170–8.
31. Young W. "Review of lithium effects on brain and blood." *Cell transplantation* 2009; 18(9): 951-75.
32. Kim J, Park S, Lyoo H, Koo E, Kim M, Jeong Y Extended stability of cyclin D1 contributes to limited cell cycle arrest at G1-phase in BHK-21 cells with Japanese encephalitis virus persistent infection. *Journal of Microbiology*; 2015; 53(1): 77-83.
33. Jenkins R. J., Aronson J. K., Brearley C. J. Increases in Na/K pump numbers in isolated human lymphocytes exposed to lithium in vitro. Reversal by myo-inositol and by inhibitors of protein kinase C and the Na/H antiport. *Biochim. Biophys. Acta* 1991; 1092(2): 138–44.
34. Risby E. D., Hsiao J. K., Manji H. K., Bitran J., Moses F., Zhou D. F.; Potter W. Z. The mechanisms of action of lithium. II. Effects on adenylate cyclase activity and beta-adrenergic receptor binding in normal subjects. *Arch. Gen. Psychiatry* 1991; 48(6): 513–24.
35. Schubert T., Stoll L., Muller W. E. Therapeutic contractions of lithium and carbamazepine inhibit cGMP accumulation in human lymphocytes. A clinical model for a possible common mechanism of action? *Psychopharmacology (Berl.)* 1991; 104(1): 45–50.
36. Keleş E., Yüceyar A.N., Bayam E., Bademkiran F., Şirin H., Kocaman A.S., Lityum Nörotoksisitesi, Olgunun Klinik ve Elektrofizyolojik Değerlendirilmesi *Journal of Neurological Sciences*, 2013; 30(2)-(36): 392-400.
37. Keck PH., Mc Elroy S., Clinical pharmacodynamics and pharmacokinetics of antimanic and mood-stabilizing medications, 2002; 4-11.
38. Focosi D. Lithium and hematology: established and proposed uses. *Journal of leukocyte biology* 2009; 85(1): 20-8.
39. Dökmeci İ., Farmakolojik ilaçlar ve etkileri, Alfa Yayınları, 2007; 690-1.

40. Radomski J., Fuyat H., Nelson A., Smith P., The toxic effects, excretion and distribution of lithium chloride., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1950; 100: 429–44.
41. Petrini M., Vaglini M., Carulli G., Azzara A., Ambrogi F., Bertelli A. Effects of lithium and rubidium on the differentiation of mononuclear cells. *Int. J. Tissue React.* 1986; 8: 391–2.
42. Tisman G., Herbert V., Rosenblatt S. Evidence that lithium induces human granulocyte proliferation: elevated serum vitamin B 12 binding capacity in vivo and granulocyte colony proliferation in vitro. *Br. J. Haematol.* 1973; 24: 767–71.
43. Rothstein G., Clarkson D., Larsen W., Grosser B., Athens J. Effect of lithium on neutrophil mass and production. *N. Engl. J. Med.* 1978; 298: 178–80.
44. Harker W. G., Rothstein G., Clarkson D., Athens J. W., Macfarlane J. L. Enhancement of colony-stimulating activity production by lithium. *Blood* 1977; 49: 263–7.
45. Hammond, W., Dale, D. Lithium therapy of canine cyclic hematopoiesis. *Blood* 1980; 55: 26–8.
46. Levitt, L., Quesenberry P. The effect of lithium on murine hematopoiesis in a liquid culture system. *N. Engl. J. Med.* 1980; 302: 713– 9.
47. Capodicasa E., Russano A. M., Ciurnella E., De Bellis F., Rossi R., Seuteri A., Biondi R. Neutrophil peripheral count and human leukocyte elastase during chronic lithium carbonate therapy. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 2000; 22: 671–83.
48. Gallicchio, V., Chen M. Modulation of murine pluripotential stem cell proliferation in vivo by lithium carbonate. *Blood* 1980; 56: 1150–2.
49. Gallicchio V., Chen M. Influence of lithium on proliferation of hematopoietic stem cells. *Exp. Hematol.* 1981; 9: 804–10.
50. Gelfand E. W., Dosch H. M., Hastings B., Shore A. Lithium: a modulator of cyclic AMP-dependent events in lymphocytes? *Science* 1979; 203: 365–7.
51. Hart D. A. Modulation of concanavalin A stimulation of hamster lymphoid cells by lithium chloride. *Cell. Immunol.* 1979; 43: 113–22.
52. Weetman A., McGregor A., Lazarus J., Rees Smith B., Hall R. The enhancement of immunoglobulin synthesis by human lymphocytes with lithium. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 1982; 22: 400–7.
53. Kayaalp O., Akılcı yönleriyle tıbbi farmakoloji, Palme Yayıncılık, Ankara 2002; 91-2.
54. Kalelioğlu T., Taşdemir A., Genç,A., Genç S.E., Özver İ.,Yeşilbaş D., Altınbaş K., Kurt E., Lityum tekli tedavisi alan hastaların hematolojik ve biyokimyasal değerlerinin incelenmesi, *Journal of Mood Disorders* 2012; 2(3): 109-14.

55. Vermier T., Sıçanlarda amfetamin ile oluşan davranış değişiklikleri üzerine Lityum Klorür'ün etkileri, Doktora tezi, Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü. 1976
56. Chmielnicka J., Nasiadek M., The trace elements in response to lithium intoxication in renal failure. *Ecotoxicol. Environ. Safety* 2003; 55: 178–83.
57. Venugopal B, Luckey TD. Metal toxicity in mammals, vol II. New York: Plenum Press; 1978; 341-352
58. Görker I. Subakut ve kronik kullanımda Lityum Klorürün sıçanlarda spermatogenezis etkisi üzerine araştırılması, Uzmanlık Tezi, İstanbul Üniversitesi; 1992
59. Oliveira J.L., Júnior B.G., Abreu K., Rocha N.A., Franco L.F., Araújo S.M. Lithium nephrotoxicity, *Rev Assoc Med Bras* 2010; 56(5): 600-6.
60. Schou M, Amdisen A, Jensen SE, Olsen T. Occurrence of goitre during lithium treatment. *Br Med J*, 1968; 3: 710-3.
61. Oğuztürk H., Turtay G., Koca, E., Çelik E., Toğal T., Lithium intoxication related cardiac arrhythmia: Case report, *Sakarya Medical Journal* 2011; 110-2.
62. Pühr, J., Hack, J.B., Early C.A., Price W.L., Meggs W.J, Lithium overdose with electrocardiogram changes suggesting ischemia, *Journal of medical toxicology*, 2008; 170-2.
63. Weiner ML. Overview of lithium toxicology. *Lithium in biology and medicine: new applications and developments*. New York: VCH; 1991. 83-99
64. Carmen, J., Okafor K., The effects of lithium therapy on leukocytes:A, *Journal of the national medical association*, 1993; 85(4): 301-3.
65. Palominao A., Kukoyi O., Xiong GL. Leukocytosis after lithium and clozapine combination therapy, *Ann Clin Psychiatry*; 2010; 22(3): 205-6.
66. Eker D.Ö., Eker M.Ç., Lityumun metabolik yan etkileri, *Psikiyatride güncel yaklaşımlar*, 2010; 26-51.
67. Allagui M.S ., Hfaiedh N., Croute F., Guermazi F., Vincent C., Soleilhavoup JP., El Feki A., Side effects of low serum lithium concentrations on renal, thyroid, and sexual functions in male and female rats, *C. R. Biologies*, 2005; 900–11.
68. Raoof NT., Pearson RM., Turner P., Lithium inhibits human sperm motility in vitro, *British journal of clinical*, 1989; 28: 715-7.
69. Kulaksız G, Sancar A. Nükleotid Eksizyon Onarımı ve Kanser. *Türk Biyokimya Dergisi*; 2007; 32: 104-11.
70. Friedberg EC. DNA damage and repair, Review. *Nature* 2003; 23: 436-40.

71. Vlko M., Rhodes CJ., Moncol J., Izakovic M., Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* 2006; 160: 1–40.
72. Kawanishi S., Hiraku Y., Pinlaor S., Ma N. Oxidative and nitrative DNA damage in animals and patients with inflammatory diseases in relation to inflammation related carcinogenesis. *Biol. Chem.* 2006; 387: 365–72.
73. Khanna KK., Jackson SP. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nature Genet.* 2001; 27: 247–54.
74. De Bont R., Van Larebeke N. Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. *Mutagenesis.* 2004; 19(3): 169–85.
75. Jackson SP., Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature.* 2009; 461: 1071–8.
76. Jackson AL., Loeb LA. The contribution of endogenous sources of DNA damage to the multiple mutations in cancer. *Mutat. Res.* 2001; 477: 7-21.
77. Hoeijmakers J. H. J. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 2001; 411: 366–74.
78. Wang JC. DNA topoisomerases. *Annu. Rev. Biochem.* 1985; 54: 665-97.
79. Modrich P. Mismatch repair, genetic stability, and cancer. *Science.* 1994; 266: 1959-60.
80. Dinçer Y, Akçay T. DNA Hasarı Review. *Türk Biyokimya Dergisi.* 2000; 25: 73-9.
81. Weissbach A. A chronicle of DNA methylation (1948-1975). *Exs.* 1993; 64: 1-2.
82. Dizdaroğlu M. Oxidative damage to DNA in mammalian chromatin. *Mutat Res.* 1992; 275: 331–42.
83. Lehninger. *Biyokimyanın İlkeleri. İşlekel H.çeviren. Biyosinyal iletimi. İçinde Kılıç N, çeviri editörü. Ankara: Palme. 2005; 437-83.*
84. Harry VS. Xeroderma pigmentosum and the role of UV-induced DNA damage in skin cancer. *Molecular Medicine Today.* 1999; 5: 89-94.
85. Vávrová J, Rezáčová M. The importance of senescence in ionizing radiation-induced tumour suppression. *Folia Biol.* 2011; 57: 41-6.
86. Sharma KK, Swarts SG, Bernhard WA. Mechanisms of Direct Radiation Damage to DNA: The Effect of Base Sequence on Base End Products. *J Phys Chem;* 2011; 115: 4843-55.
87. Mladenov E, Iliakis G. Induction and repair of DNA double strand breaks: The increasing spectrum of non-homologous end joining pathways. *Mutat Res;* 2011; 711: 61-2.

88. Beranek DT., Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents, *Mutat Res.* 1990; 231(1): 11-30.
89. Saygılı Eİ, Aksoy ŞN, Akçay T, Dinçer Y. Alkilleyici maddelerin induklediği tümör oluşumu ve savunma mekanizması. *Anadolu Tıp Dergisi*; 2009; 10: 40-7.
90. Onur E, Tuğrul B, Bozyiğit F. DNA hasarı ve onarım mekanizmaları. *Türk Biyokimya Dergisi*; 2009; 7: 61-70.
91. Zhang Y, Rohde LH, Wu H. Involvement of Nucleotide Excision and Mismatch Repair Mechanisms. *Current Genomics*; 2009; 10: 250-8.
92. Sinha R. P., Häder D. P. UV-induced DNA damage and repair: A review. *Photochemical and Photobiological Sciences* 2002; 1: 225–36.
93. http://tr.wikipedia.org/wiki/DNA_onarımı
94. Krokan H., Rune S., Geir S. "DNA glycosylases in the base excision repair of DNA." *Biochem. J.* 1997; 325: 1-16.
95. Hanawalt PC. Subpathways of nucleotide excision repair and their regulation. *Oncogene*, 2002; 21: 8949-56.
96. Riedl T, Hanaoka F, Egly JM. The comings and goings of nucleotide excision repair factors on damaged DNA. *Embo J*, 2003; 22: 5293-303.
97. Debeleş Bütüner B, Kantarcı G. Mutasyon, DNA hasarı, onarım mekanizmaları ve kanserle ilişkisi. *J Fac Pharm* 2006; 35: 149-70.
98. Li GM. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Res* 2008;18: 85-98.
99. Liu S. K., Tessman, groE genes affect SOS repair in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 172(10), 1990: 6135-38
100. William S. K., Michael R. C., *Genetik Kavramlar, Çeviri Editörü; Öner C., Palme Yay., Ankara, 2002*
101. <http://cmgm.stanford.edu/biochem201/Handouts/dnarepair.pdf>, 25.05.2011.
102. Latimer NZ, Chin E, Garson OM. Sister-chromatid exchanges in the lymphocytes of humans on long-term lithium therapy. *Mutat Res.* 1980; 74: 421-2.
103. Weiner ML, Batt KJ, Putman DL, Curren RD, Yang LL. Genotoxicity evaluation of lithium hypochlorite. *Toxicology.* 1990; 1965: 1-22.
104. Json Lagerkvist B, Lindell B. The Nordic Expert Group for Criteria Documentation of Health Risks from Chemicals. 131. Lithium and lithium compounds. *Arbete och Hälsa* 2002; 16: 1-48.

105. Recommendation from the Scientific Committee on Occupational Exposure Limits for lithium hydride. European Commission Employment, Social Affairs and Inclusion. 2010; 5
106. Léonard, Albert P. Hantson H., Gerber G. B. "Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of lithium compounds." *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology* 1995; 339(3): 131-7.
107. Kuppusamy UR, Dharmani M, Kanthimathi MS, Indran M. Antioxidant enzyme activities of human peripheral blood mononuclear cells exposed to trace elements. *Biol Trace Elem Res.* 2005; 106: 29–40.
108. Gutteridge JMC. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem.* 1995; 41: 1819–28.
109. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br. Med. Bull.* 1993; 49: 479–80.
110. Meister A. Glutathione, ascorbate, and cellular protection. *Cancer Res.* 1994; 54(7): 1969-75.
111. Southorn P, Powis G. Free radical in medicine I. Chemical nature and biological reactions. *J. Mayo Clin. Proc.* 1988; 63(3): 381 –8.
112. Kılınç K, Kılınç A. Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri. *Hacettepe Tıp dergisi.* 2002; 33(2): 110-8.
113. McCord JM: Human disease, free radicals and the oxidant/antioxidant balance. *Clin Biochem* 1993; 26: 351–7.
114. Ripine JE, Bast A, Lankharst. Lipids and The Oxidative Strees Study Group: Oxidative stres in chronic obstructive pulmonary disease. *J Respir Crit Care Med.;* 1997; 156: 341–7.
115. Asad SF, Singh S, Ahmad A. Prooxidant and antioxidant activities of bilirubin and its metabolic precursor biliverdin: a structure-activity study. *Chem Biol Interact;* 2001; 137: 59-74.
116. Steenken S. Purine bases, nucleosides, and nucleotides: aqueous solution redox chemistry and transformation reactions of their radical cations and e- and OH adducts. *J. Chem. Rev.;* 89(24):503–520; 1989
117. Halliwell B. Vitamin C: antioxidant or pro-oxidant in vivo? *Free Radic Res.* 25: 439-454; 1996
118. Food and Nutrition Board, Institute of Medicine Dietary reference intakes for vitamin C, vitamin E, selenium and carotenoids. A report of the panel on dietary

- antioxidants and related compounds, subcommittees on upper reference levels of nutrients and interpretation and uses of dietary reference intakes. Washington DC. National Academy Press. 2000; 1-506.
- 119.** Chaudiere J, Ferrari Iliou R. Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. *Food Chem Toxicol.* 1999; 37: 949-62
 - 120.** Gutteridge JMC, Halliwell B. *Antioxidants in nutrition, health and disease.* 1st ed. New York. Oxford University Press. 1994
 - 121.** Buonocore G, Perrone S, Bracci R. Free radicals and brain damage in the newborn. *Biol Neonate.* 2001; 79: 180-6.
 - 122.** Buhimschi IA, Buhimshi CS, Pupkin M. Beneficial impact of term labor: nonenzymatic antioxidant reserve in the human fetus. *Am J Obstet Gynecol.* 2003; 189: 181- 8.
 - 123.** Scandalios JG. The rise of ROS. *TRENDS in Biochemical Sciences.* 2002; 27: 483-6.
 - 124.** Uysal M. Serbest radikaller, lipid peroksidleri organizmada prooksidan-antioksidan dengeyi etkileyen koşullar. *Klinik gelişim.*; 1998; 11: 336–41.
 - 125.** Akkuş I. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Konya; Mimoza yayımları, 1995; 42-4.
 - 126.** Zhao J, Liu XJ, Ma JW. DNA damage in healthy term neonate. *Early Hum Dev.* 2004; 77: 89-98.
 - 127.** Fang Y-Z, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants and nutrition. *Nutrition.* 2002; 18: 872-9.
 - 128.** Rose RC, Bode AM. Biology of free-radical-scavengers- an evaluation of ascorbat. *Faseb J.*;7:1135-1142; 1993
 - 129.** Carr A, Frei B. Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? *Faseb J.* 1999; 13: 1007-24.
 - 130.** Suh J, Zhu BZ, Frei B. Ascorbate does not act as apro-oxidant toward lipids and proteins in human plasma exposed to redox-active transition metal ions and hydrogen peroxide. *Free Radic Biol Med.* 2003; 34: 1306-14.
 - 131.** Notrhrop-Clewes CA, Thurnham DI. Monitoring micronutrients in cigarette smokers. *Clinica Chimica Acta.* 2007; 377: 14-38.
 - 132.** Aksoy N. "Beneficial effects of vitamins C and E against oxidative stress in diabetic rats." *Nutrition Research* 2005; 25(6): 625-30.
 - 133.** Makarov VG, Makarova M, Selezneva AI. Studying the mechanism of antioxidant

- effect of vitamins and flavonoids. *Vopr Pitan.* 2005; 74: 10-13.
134. Vural, H., Aksoy, N., Arslan S. O., Bozer M. Effects of vitamin E and selenium on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in colon of methylazoxymethanol treated rats. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 2000; 38(10): 1051-3.
 135. Hoeflich KP, Luo J, Rubie EA, Tsao M-S, Jin O, Woodgett JR: Requirement for glycogen synthase kinase-3 β in cell survival and NF- κ B activation. *Nature* 2000; 406: 86-90.
 136. Song Ling, Tong Zhou and Richard S. Jope. "Lithium facilitates apoptotic signaling induced by activation of the Fas death domain-containing receptor." *BMC neuroscience* 2004; 5(1): 20-1.
 137. Oishi K, Yokoi M, Maekawa S. Oxidative stress and haematological changes in immobilized rats. *Acta Physiol Scand* 1999; 165: 65–9.
 138. King TD, Jope RS. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 protects cells from intrinsic but not extrinsic oxidative stress. *Neuroreport* 2005; 16: 597–601.
 139. Brigelius-Flohe R Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic Biol Med* 1999; 27: 951– 65.
 140. Khairova R. "Effects of lithium on oxidative stress parameters in healthy subjects." *Molecular medicine reports* 2012; 5(3): 680-1.
 141. Polidori MC, Stahl W, Eichler O, Niestroj I, Sies H. Profiles of antioxidants in human plasma. *Free Radic Biol Med.*; 2001; 30(5): 456–62;
 142. Erel O. A new automated colorimetric method total antioxidant status. *Clin Bio.* 2005; 6171: 9–13.
 143. Rydberg B, Johanson KJ. İçinde Hanawalt PC, Friedberg EC. *DNA Repair Mechanism*. New York: Academic Press; 1978; 465-8.
 144. Ostling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun*: 1984; 123: 291-8.
 145. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A Simple technic for quantiation of low levels of DNA damage in individual cells *Exp Cell Res*; 1988; 175: 184-91.
 146. Møller P, Loft S, Lundby C, Olsen NV. Acute hypoxia and hypoxic exercise induce DNA strand breaks and oxidative DNA damage in humans. *Faseb J* 2001; 15: 1181-6.

147. Shamsi MB, Venkatesh S, Tanwar M, Talwar P, Sharma RK, Dhawan A. DNA integrity and semen quality in men with low seminal antioxidant levels. *Mutat Res*; 2009; 665: 29-36.
148. Green MH., Lowe JE., Delaney CA., Green IC. Comet assay to detect nitric oxidedependent DNA Damage in mammalian cells. *Methods Enzymol*; 1996; 269: 243-66.
149. Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations *Mol Biotechnol*; 2004; 26: 249-61.
150. McKelvey-Martin VJ, Green MH, Schmezer P, Pool- Zobel BL, De Méo MP, Collins A. The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a European review. *Mutat Res*; 1993; 288: 47-63.
151. Collins AR, Ma AG, Duthie SJ. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. *Mutat Res*; 1995; 336: 69-77.
152. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.*; 1983; 65(1-2): 55–63.
153. Şekeroğlu V, Atlı Şekeroğlu Z. Genotoksik hasarın belirlenmesinde mikronükleus testi. *Türk Hij Den Biyol Derg.* 2011; 684(4): 241–52.
154. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *J. Clinical Biochemistry*; 2005: 47(5): 119–29.
155. Erel O. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *J. Clinical Biochemistry* 2004; 37: 112– 9.
156. Unalı A., Çöpoğlu Ü.A., Bülbül F., Vırtı O. Lityumun kırk yıldır sorunsuz kullanımı: Olgu Sunumu, *Journal of Mood Disorders* 2013; 3(2):70-3.
157. Slamenova D., Budayova E., Gabelova A., Moravkova A., Panikova L. Results of genotoxicity testing of mazindol (degonan), lithium carbonicum (contemnl) and dropropizine (ditustat) in Chinese hamster V79 and human EUE cells. *Mutat. Res.* 1986; 169: 171–7.
158. King M.C., Beikirch H., Eckhardt K., Gocke E., Wild D. Mutagenicity studies with X-ray contrast media, analgesics, antipyretics, antirheumatics and some other pharmaceutical drugs in bacterial *Drosophila* and mammalian test systems. *Mutat. Res.* 1979; 66: 33–43.

159. Sram R.J., Binkova B., Topinka J., Fojtikova I. Inhibition of DNA repair synthesis in the rat by in vivo exposure to psychotropic drugs and reversal of the effect by co-administration with a tocopherol. *Mutat. Res.* 1990; 244: 331–5.
160. Sobti RC, Sharma M, Gill RK. Frequency of sister chromatid exchanges (SCEs) and chromosome aberrations (CAs) caused by three salts of lithium (in vivo). *Cytologia* 1989; 54: 245-8.
161. Timson J., Price D.J. Lithium and mitosis. *Lancet* 1971; 1: 93-4.
162. Bille P.E., Jensen M.K., Jensen J.P.K., Poulsen J.C, Studies on the haematologic, cytogenetic effects of lithium. *Acta Med. Scand.* 1975; 198: 281–6.
163. Genest P., Villeneuve A. Lithium, chromosomes and mitotic index. *Lancet* 1971; 1: 1132-3.
164. Banduhn N., Obe G., Miller-Oerlinghausen B. Is lithium mutagenic in man? *Pharmakopsychiatrie/Neuropsychopharmakologie* 1980; 13: 218–27.
165. Jarvik L.F., Bishun N.P., Bleiweiss H., Kato T., Moralishvili E., Chromosome examinations in patients on lithium carbonate. *Arch. Gen. Psychiat.* 1971; 24: 166–8.
166. Friedrich U., Nielsen J., Lithium and chromosomal abnormalities. *Lancet* 1969; 2: 435-6.
167. Garson O. M., Latimer N. Z., Chiu E., Dixon K. Chromosome studies of patients on long-term lithium therapy for psychiatric disorders. *The Medical journal of Australia*, 1981; 2(1): 37-9.
168. Pastor N., Kaplan C., Domínguez I., Mateos S., Cortés, F. Cytotoxicity and mitotic alterations induced by non-genotoxic lithium salts in CHO cells in vitro. *Toxicology in vitro*, 2009; 23(3): 432-8.
169. Andreatza A. C., Kauer-Sant'Anna M., Frey B. N., Stertz L., Zanotto C., Ribeiro L., Kapczinski F. Effects of mood stabilizers on DNA damage in an animal model of mania. *Journal of psychiatry & neuroscience: JPN*, 2008; 33(6): 516-7.
170. de Vasconcellos A. P. S., Nieto F. B., Crema L. M., Diehl, L. A., de Almeida L. M., Prediger M. E., Dalmaz C. Chronic lithium treatment has antioxidant properties but does not prevent oxidative damage induced by chronic variate stress. *Neurochemical research*, 2006; 31(9): 1141-51.
171. Toplan S., Dariyerli N., Ozdemir S., Ozcelik D., Zengin E. U., Akyolcu M. C. Lithium-induced hypothyroidism: oxidative stress and osmotic fragility status in rats. *Biological trace element research*, 2013; 152(3): 373-8.

- 172.** Dariyerli N, Toplan S, Akyolcu MC, Hatemi H, Yigit G Erythrocyte osmotic fragility and oxidative stress in experimental hypothyroidism. *Endocrine* 2004; 25: 1–5.
- 173.** Aslan M., Cosar N., Celik H., Aksoy N., Dulger A. C., Bejenik H., Selek S. Evaluation of oxidative status in patients with hyperthyroidism. *Endocrine*, 2011; 40(2): 285-9.
- 174.** Khan H. Effect of lithium metal on the chemical status of glutathione (GSH) present in whole blood (especially in plasma and cytosolic fraction in human blood). *Pak. J. Pharm. Sci* 2010; 23(2): 188-93.
- 175.** Liao X, Zhang L, Thrasher JB, Du J, Li B: Glycogen synthase kinase-3 β suppression eliminates tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand resistance in prostate cancer. *Mol Cancer Ther*, 2003; 2: 1215-22.
- 176.** Schwabe RF, Brenner DA: Role of glycogen synthase kinase-3 in TNF- α -induced NF- κ B activation and apoptosis in hepatocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2002; 283: 204-11.