

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

**EHRİCH ASİT TÜMÖRÜ İMPLANTE EDİLEN DENEKLERDE OKSİDAN
STRESİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İLKNUR KARAYEL

Tez Danışmanı
Prof. Dr. AYDAN BABÜL

ANKARA
AĞUSTOS 2009

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

**EHRİCH ASİT TÜMÖRÜ İMPLANTE EDİLEN DENEKLERDE OKSİDAN
STRESİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İLKNUR KARAYEL

Tez Danışmanı
Prof. Dr. AYDAN BABÜL

Bu tez çalışması kısmen Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri SBE-01/2008-20 kod numaralı proje ile desteklenmiştir.

ANKARA
AĞUSTOS 2009

KABUL ve ONAY

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Fizyoloji Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Programı
çerçevesinde yürütölmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 20.09.2009

İmza
Ünvanı Adı ve Soyadı
Gazi Üniversitesi
Jüri Başkanı
Prof. Dr. Deniz Erbaşı

İmza
Ünvanı Adı ve Soyadı
Gazi... Üniversitesi
Prof. Dr. Aydan Babıl

İmza
Ünvanı Adı ve Soyadı
Gazi Üniversitesi
Prof. Dr. Neziyet Kılıç

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	I
İçindekiler	II
Şekiller	V
Grafikler ve Tablolar	V
Semboller, Kısaltmalar	VI
Önsöz	VIII

1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kanser Nedir ?	3
2.1.1. Kanser Türleri	4
2.1.2. Kanserin Nedenleri	5
2.3. Ehrlich Asit Tümörü (EAT)	6
2.4. Serbest Oksijen Radikalleri ve Oksidatif Stres	8
2.4.1. Serbest Oksijen Radikalleri	10
2.4.1.1. Süperoksit Radikali (O_2^-)	11
2.4.1.2. Hidroksil Radikali ($\cdot OH$)	12
2.4.1.3. Singlet Oksijen (1O_2)	13
2.4.1.4. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)	13
2.5. Lipid Peroksidasyonu Hakkında Genel Bilgi	14
2.5.1. Lipid Peroksidasyonu ve Etki Mekanizması	14
2.5.2. . Lipid Peroksidasyonunun Patolojik Etkileri	15
2.5.2.1. Proteinler Üzerine Etkileri	16
2.5.2.2. Karbonhidratlar Üzerine Etkileri	17
2.5.2.3. Nükleik Asitler ve DNA Üzerine Etkileri	17
2.6. Vücudun Antioksidan Savunma Mekanizmaları	18

2.6.1. Enzimatik Antioksidanlar	20
2.6.1.1. Süperoksit Dismutaz	20
2.6.1.2. Katalaz	21
2.6.1.3. Glutasyon Peroksidaz	21
2.6.1.4. Glutasyon S-Transferaz	22
2.6.1.5. Glutasyon Redüktaz	23
2.6.1.6. Mitokondriyal Sitokrom Oksidaz	23
2.6.2. Nonenzimatik Antioksidanlar	24
2.6.2.1. Glutasyon	24
2.7. Malondialdehid	26
2.8. Serbest Oksijen Radikalleri ve Kanser	27
2.9. Askorbik Asit	29
2.9.1. Askorbik Asit' in Fonksiyonları	30
2.9.2. Askorbik Asit ile Kanser ve Serbest Radikallerin İlişkisi	32
2.10. Vitamin E	35
2.10.1. Vitamin E' nin Fonksiyonları	36
2.10.2. Vitamin E ile Kanser ve Serbest Radikallerin İlişkisi	37
3. GEREÇ VE YÖNTEM	38
3. 1. Kullanılan Gereçler, Maddeler ve Denekler	38
3. 1.1. Deney Hayvanları	38
3. 1. 2. Laboratuvar Koşulları	38
3. 1. 3. Kullanılan Laboratuvar Cihazları ve Kimyasal Maddeler	38
3.2. Deney Hayvanlarının Hazırlanması	40
3. 3. Tayin Yöntemleri	41
3. 3. 1 Dokuda MDA Tayin Yöntemi	41
3. 3. 2. Dokuda Glutasyon Tayin Yöntemi	42
3. 3. 3. Dokuda Süperoksit Dismutaz Aktivitesinin Tayin Yöntemi	43
3.3.4. Protein Tayini:	44
3. 4. İstatistiksel Değerlendirme	45
4. BULGULAR	46
4.1. Karaciğer Dokusu Malondialdehit (MDA) Düzeyleri	46

4.2. Karaciğer Dokusu Glutasyon (GSH) Düzeyleri	48
4.3. Karaciğer Dokusu Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi	50
5. TARTIŞMA	51
6. SONUÇ	56
7. ÖZET	57
8. SUMMARY	59
9. KAYNAKLAR	61
10. EKLER	
EK-1: Teşekkür	
EK-2: Etik Kurul Kararı	
EK-2: Sertifika	
11. ÖZGEÇMİŞ	

ŞEKİLLER

Şekil 1: Serbest oksijen radikallerinin oluşumu	11
Şekil 2: Lipid peroksidasyonunun zincir reaksiyonları	14
Şekil 3: Glutatyonun yapısı	25

TABLO VE GRAFİKLER

Tablolar

Tablo 1: Reaktif oksijen türlerinin simgeleri ve elektron yapıları	10
Tablo 2: Serbest radikallerin hücredeki başlıca zararlı etkileri	16
Tablo 3: Biyolojik sistemlerde antioksidan savunma sistemi	19
Tablo 4: Kanseri oluşumunda oksidatif stres	28
Tablo 5: Denek Grupları	40

Grafikler

Grafik 1: Doku MDA düzeyleri	47
Grafik 2: Doku GSH düzeyleri	49
Grafik 3: Doku SOD aktivitesi	50

SEMBOLLER VE KISALTMALAR

gr :	Gram
mg :	Miligram
L :	Litre
ml:	Mililitre
nmol :	Nanomol
mmol :	Milimol
μmol :	Mikromol
İM :	Kas içine
SC :	Subkutan ,deri altına
İP :	Intraperitoneal
EAT :	Ehrlich asit tümörü
AA :	Askorbik asit , vitamin C
α-Tokoferol :	Vitamin E
ROS :	Reaktif oksijen türleri
NO[•] :	Nitrik oksit
NO₂[•] :	Nitrojen dioksit
H₂O₂ :	Hidrojen peroksit
ONOO⁻ :	Peroksinitrit
¹O₂ :	Singlet oksijen
O₂^{•-} :	Süperoksit radikali
•OH :	Hidroksil radikali
ROO[•] :	Peroksi radikali
ROOH :	Hidroperoksit
RO[•] :	Alkoksi radikali
ROOR :	Endoperoksit
HO₂[•] :	Hidroperoksi radikali
NO₂⁺ :	Nitril katyonu
NO⁻ :	Nitroksil
NO⁺ :	Nitrozil

ONOO[·] :	Peroksinitrit radikali
N₂O₃ :	Dinitrojen trioksit
N₂O₄ :	Dinitrojen tetraoksit
HO₂[·] :	Perhidroksil radikali
SOD :	Süperoksit dismutaz
KAT :	Katalaz
GPx :	Glutatyon peroksidaz
GST :	Glutatyon-S-transferaz
GSH :	Glutatyon
GSSG :	Okside glutatyon
LPO :	Lipid peroksidasyonu
PLGSH-Px :	Fosfolipid hidroperoksit glutatyon peroksidaz
PA2 :	Fosfolipaz A2
PKC :	Fosfokinaz C
DNPH :	Dinitrofenil hidrazin
BSA :	Sığır serum albumini
DTNB :	5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoik asit)
EDTA :	Etilen diamin tetra asetik asit
TCA :	Trikloraasetik asit
TBA :	Tribarbütik asit
NBT :	Nitro blue tetrazolium

ÖNSÖZ

Kanser; hücrenin normal davranışlarını düzenleyen mekanizmaların bozulması sonucunda hücrenin aşırı, kontrolsüz ve agresif bir biçimde çoğalmasıyla seyreden, ölümcül bir hastalıktır. Bu özellikleriyle kanser, çağımızın en önemli sağlık problemlerinden birisidir. Ölüm nedeni olarak, kalp ve damar hastalıklarının hemen ardından gelmektedir.

Kanser üzerine yapılan araştırmalar, 14. yy'dan bu yana devam etmektedir. Söz konusu zaman zarfında araştırmalar için çeşitli kimyasal bileşiklerden yararlanarak model oluşturmanın yanında onkolojik bakımdan anlamlı ilerleme kaydedebilmek için kemoterapötik açıdan somut sonuçlara ulaşmak gerekmiştir.

Kanser çalışmalarında kullanılan spontan veya indüklenen tümör modelleri için çok sayıda hayvan ve fazla miktarda maddi olanak ile uzun zaman gerektiğinden, bir çok araştırmacı tarafından daha az tercih edilmişlerdir. Bunun yanında transplante edilebilen tümörler, söz konusu dezavantajları avantaja çevirdiği için daha çok kullanılır olmuşlardır.

Bu çalışmada kullandığımız Ehrlich Asit Tümörü (EAT) modeli, transplante edilebilir ve farelere özgü olmasından dolayı çalışılması, tümör değerlendirmesi ve izlenmesi açısından kolaylık sağlar .

Çalışmamızda; Swiss Albino faresinde, solid EAT modeli geliştirilerek, 10 gün süreyle vitamin C ve E uygulamasının, karaciğer dokusunda meydana getirdiği antioksidan durumu değerlendirmek amacıyla MDA, SOD ve GSH düzeylerini inceledik.

1. GİRİŞ ve AMAÇ

KontROLSÜZ hücre çoğalması olarak tanımlanan tümör oluşumu, hücre çoğalmasıyla hücre ölümü arasındaki dengenin bozulmasıdır. Tümörün gelişimi aşamasında komşu hücrelerin istilası ve uzak bölgelere metastaz yapabilme gibi yaygın bulgular da gözlenir.

Günümüzde hücre çoğalmasını düzenleyen mekanizmanın basamakları tanımlanmış olup, bu aşamalardan sorumlu olan olası faktörlerle ilgili pek çok araştırma yapılmaktadır.

Son çalışmalar normal büyümenin düzenlenmesinde veya mutasyonda ROS aracılı sinyal mekanizmasının önemli olduğunu göstermiştir¹. Karsinogenezis' in bilinen basamaklarında bilinen basamaklarında oksidatif stresin etkisi radikalın tipine, aktivitesine ve konsantrasyonuna bağlı olarak değişmektedir. Birçok kanser hücresinde kümülatif ROS yapımı DNA' yı etkileyerek karsinogenezde anahtar rolü oynar¹. Bunu destekler yöndeki bulgulardan birisi de lipid peroksidasyonunun son ürünü olan MDA' nın normal dokuya kıyasla, tümör dokusunda çok yüksek olmasıdır². Tümör dokusundaki oksidatif değişiklikler diğer organların fonksiyonlarını da etkileyebilir³. Çünkü ROS artışı proteinlerin fragmentasyonuna, agregasyonuna ve enzim bozukluklarına, lipid peroksidasyonuna sebep olur⁴.

Özellikle karaciğer, kalp ve akciğer başlıca etkilenebilecek organlardandır⁵. Organizmada ROS'un zararlı etkileri antioksidan özelliği olan enzimler veya enzimatik olmayan antioksidanlarla önlenmeye çalışılır. SOD, katalaz, glutatyon redüktaz gibi antioksidan enzimlerin veya GSH,

vitamin C, thioredoxin gibi nonenzimatik antioksidanların birçok kanser hücrelerinde oksidan aktiviteyi değiştirdiği gösterilmiştir ⁶.

Tümör tedavisinde antioksidan özellikteki ajanların uygulandığı şartlarda periferik organların radikal etkisinden korunduğunu gösteren araştırmalar bulunmaktadır ⁷. Fakat genelde tedavi amaçlı kullanılan ajanların toksik etkileri de gözlenebilmektedir. Bu nedenle doğal antioksidanların son çalışmalarda sıklıkla denendiği görülmektedir ⁸. E vitamini doğal antioksidanların içinde en etkili olanlardan birisidir ve koruyucu etkisini göstermek amacı ile tek başına veya diğer antioksidanlarla birlikte verilerek çalışmalar yapılmıştır ⁹.

Besinlerle aldığımız bir diğer doğal antioksidan C vitaminidir. Yapılan çalışmalarda Askorbik Asit (AA) ile kanser arasında önemli bir ilişki olduğu gösterilmiştir ¹⁰. AA' nın antikanserojenik etkisinin de büyük ölçüde ROS hasarının önlenmesi ile ilgili olduğu bildirilmiştir ^{11, 12}.

Bu bilgiler doğrultusunda çalışmamızda önemli hayati organlardan olan karaciğerin, EAT' den kaynaklanan ROS ürünlerinden korunmasında, AA ve alfa-tokoferol' ün etkilerini incelemeyi amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser Nedir ?

Kanser, Yunanca' dan köken alan , " Karkinos " (yengeç) kelimesinden türemiş bir terim olup antik çağdan beri bilinmektedir. Yunanlılar ve Romalılar tarafından tanımlanmıştır. Beş bin yıl öncesine ait Mısır yazıtlarında belirtilen tümörler ilk bilinen insan malign tümörleridir ¹³.

Kanserli dokular, normal düzenleyici faktörlere cevap vermeyen, farklılaşma karakterlerini ve orijine ait normal fonksiyonlarını progressif şekilde kaybeden yapılardır. Bütün bu özellikler pek çok tümör için tipiktir. Bazı endokrin tümörler sadece morfolojik özellikler açısından değil, fonksiyonel yönden de farklıdırlar ¹³.

Tümör oluşumuna neden olan kontrolsüz hücre çoğalmasıyla karakterize olan neoplazi' nin kesin formları için de kanser tanımı kullanılır. Malign bir neoplazi, kontrolsüz hücre proliferasyonu, komşu hücre istilası ve daha uzak bölgelere metastaz yapabilme gibi çeşitli özelliklere sahiptir. Bu özellikler aşamalı bir şekilde kazanılır ve bu süreç "tümör progresyonu" olarak tanımlanır. Neoplazi, hücre proliferasyonu ile hücre ölümü arasındaki dengenin bozulması sonucu meydana gelmektedir. Her hücre hücre siklusuna girer ve mitozu uğrayarak yavru hücrelerini oluşturur. Normal koşullarda her hücrenin belirli bir yaşam süresi vardır. Hücre gelişimi, farklılaşması, yaşlanması ve ölümü belirli bir program dahilinde gerçekleşir ve her aşama farklı gen ürünleri ile gerçekleştirilir ve kontrol edilir. Bir dokuda çoğalan hücre miktarı ile ölen hücre miktarı arasında sabit bir oran vardır. Ancak hücrenin normalin dışında çoğalması, buna karşılık ölmesi gereken hücrelerin sonsuz yaşayabilme yeteneği kazanması dengenin bozulmasına

ve dolayısıyla da hücre birikimine neden olur. Tüm bu mekanizmalar, gen ürünleri olan proteinler tarafından düzenlendiğinden, bir gendeki başkalaşım ya da “epigenetik olay” o genin kodladığı protein ya da polipeptidin üretilmemesi, yanlış üretilmesi ya da normalden az üretilmesi ile sonuçlanır. Dolayısıyla da ilgili proteinlerin rol aldığı mekanizmalarda normalden sapmalar ortaya çıkar ^{1,14, 15}.

Kanser hücresinin büyüme ve çoğalma süreci, meydana gelen genetik değişiklikler (onkogenler, tümör süpresör genler), konakçı faktörleri (enzim polimorfizmi) ve tümör konakçı etkileşimi (anjiogenez, invazyon, metastaz) ile yakından ilişkilidir ¹⁶. Kanser, hücredeki bu temel düzenleyici mekanizmalardaki kusurlardan kaynaklandığı için, özellikle moleküler ve hücresel düzeyde değerlendirilmesi gereken bir hastalıktır ¹⁷.

2.1.1. Kanser Türleri

Kanserin yüzden fazla değişik türü mevcuttur, onkolojide klinik davranışının değerlendirilmesine göre benign ve malign olarak ikiye ayrılır.

“Benign” tümör sitolojik ve gros özellikleri nisbeten masum yani çevredeki dokuya zarar vermeyen ve yayılmayan ve lokal cerrahi rezeksiyonla alınıp, hastanın sağ kalımını etkilemeyen türüdür. Malign tümörler komşu yapılara invaze olup, onları harap edebilir ve uzak bölgelere yayılarak (metastaz yaparak) ölüme yol açabilir.

Benign ve malign tümörlerin ayırt edilebileceği güvenilir kriterler bulunmaktadır ⁷. Bu farklar dört ana başlık altında toplanabilir:

1. Diferansiasyon ve Anaplazi: Benign tümörlerin yapıları orjin aldıkları doku için tipik iken, malign tümörlerde atipiktir.

2. Büyüme Hızı: Benign tümörler genellikle yavaş büyürler. Malign tümörlerde ise büyüme hızı kararsızdır.

3. Lokal İnvazyon: Benign tümörler, genellikle yapışık, çevre dokulara invaze ve infiltre etmez. Malign tümörler, normal çevre dokulara infiltre eder.

4. Metastaz: Benign tümörlerde yoktur, fakat malign tümörlerde sıklıkla görülür. Gerek malign gerekse benign tümörler türedikleri hücreye göre sınıflandırılır. Karsinomlar, sarkomlar ve lösemi/lenfomalardır ^{1, 14, 15, 18}.

2.1.2. Kanserin Nedenleri

Kansere yol açan maddelere karsinojen denir ve yapılan epidemiyolojik çalışmalara göre bunlar radyasyon, kimyasal bileşikler ve virüsler olarak genellenebilir ¹⁴. Işınlama enerjisinin neden olduğu karsinogenezde temel mekanizmanın DNA hasarı olduğu varsayılmaktadır. Ayrıca X ışınları ve gama ışınları dokularda serbest radikallerin oluşmasına neden olurlar ¹⁹.

Kimyasal bileşiklerin pek çoğu karsinojeniktir. Karsinogenez benzen, asbest v.b. kimyasallara maruz kalmaktan, beslenme alışkanlıklarından (aflatoksin), yaşam tarzından (sigara, alkol kullanımı) veya diğer nedenlerden (ilaç kullanımı) dolayı olabilir ^{14, 19} veya östrojen gibi mutasyon oluşturmak yerine hücre çoğalmasını uyararak (tümör kamçılayıcılar) kanser gelişimine zemin hazırlar ¹³. İnsanda kanser oluşturan virüsler, kendi genetik materyalinin, insan hücre DNA dizisinde kendisine

homolog bölgelere invaze olması sonucunda gen yapısında mutasyon oluşturur. Sonuçta normal hücredeki ilgili gen ürünü hatalı kodlanır ve farklı bir polipeptid sentezi dolayısıyla fonksiyon değişikliği oluşur^{14, 15}.

2.3. Ehrlich Asit Tümörü (EAT)

Deneysel hayvan tümörlerinden biri olan EAT, ilk olarak dişi bir farede spontan meme adenokarsinoması olarak ortaya çıkmış^{20, 21, 22} ve Ehrlich & Apolant (1905) tarafından tümör parçaları fareden fareye deri altına transplante edilerek pasajlanmıştır. EAT diferansiye olmamış bir tümördür. Transplante edilebilme oranı yüksek olup, regresyon göstermeyen, hızlı proliferasyona, kısa yaşama süresine sahip, %100 ölüme götüren ve immünolojik açıdan tümör spesifik transplantasyon antijenleri (TSTA)' ne sahip değildir²³. 1932 yılında Loewenthal ve Jahn (1932) bu tümörün fare peritonunda sıvı halde büyüyen formunu elde etmeyi başarmışlar. Peritonda hücrelerin yanı sıra asit sıvısı da olduğu için tümör Ehrlich Ascites Tümörü adını almıştır. Tümör hücrelerinin herhangi bir vücut boşluğuna enjekte edilmesinden sonra orada çoğalmaları ile neoplastik hücreler içeren bir effüzyon meydana gelmesi, asit terimi ile ifade edilir. Genellikle tümörler tekrarlayan pasajlarla virülanslarını arttıırırlar. Bu gibi tümörlerin büyüme hızı artar. Heterotransplantabilite kabiliyeti kazanır ve nihayet asit formuna dönüşebilirler ve böyle bir effüzyon 0.1 ml' de yaklaşık 10 milyon neoplastik hücre içerir^{21, 23, 24}.

Tümör hücrelerini içeren asit sıvısının deney hayvanına intraperitoneal (İP) yolla enjekte edilmesiyle asit form, subkutan (SC) yolla enjekte edilirse solid form elde edilmektedir^{24, 25, 26}. Genelde pasajdan 4-6 gün sonra asit oluşur ve toplam 5-12 ml asit teşekkül eder^{27, 28}.

EAT hücreleri, inokulasyonu takiben 2 fazda çoğalırlar. Bu fazlar, hücre sayısının eksponansiyel olarak arttığı çoğalma fazı ve bunu izleyen, hücre sayısının hemen hemen sabit kaldığı plato fazıdır ^{27, 29, 30}. Yapılan araştırmalarda, 3x10⁶ EAT hücrelerinin intraperitoneal enjeksiyonundan sonra hücre sayısının 9. güne kadar eksponansiyel olarak arttığı, 9. ve 10. günden itibaren de plato fazının başladığı görülmüştür ^{31, 32}. Başka bir araştırmada ise EAT hücrelerinin çoğalma hızları 4 faz olarak karakterize edilmiştir. Sızıkla ve arkadaşları tarafından yapılan bu çalışmada; İP enjeksiyonla pasajladıkları 107 tümör hücrelerinin ilk 4 ile 5 günde logaritmik olarak çoğaldığı, 5. ile 13. günlerde hücre sayısında önemli bir artışın gözlemlenmediği plato fazına geçtiği 13. ile 15. günlerde ise hücre sayısında geçici artışın olduğu 3. faza, 15. ile 18. günlerdeki son dönemde ise 2. plato fazına girdiği bulunmuştur ³³.

3 H-timidin kullanılarak yapılan diğer bir araştırmada, tümör hücrelerinin transplantasyonlarından sonraki 13. günde hücre siklus süresinin arttığı ve DNA sentez fazının da oldukça uzadığı gösterilmiştir. EAT hücrelerinin çoğalma fazından plato fazına geçişleri boyunca, yapısal bozulmalar ^{21, 34, 35, 36, 37, 38, 39}, mitokondri sayısında azalma ^{34, 35}, DNA ve RNA biyosentezinde azalma ^{21, 31, 34}, intrasellüler pürin, pirimidin nükleotidleri, nükleosidleri ve bazlarının kaybı ^{29, 34, 35}, ATP içeriği ve ATP dönüşümünde azalma ³⁶, protein sentezinde azalma ³⁴, timidin kinaz aktivitesindeki azalmadan dolayı timidin konsantrasyonunda artış ^{21, 30, 33}, glutatyon (GSH) içeriğinde azalma ⁴⁰ ve trigliseritlerin, kolesterol esterlerinin ve serbest yağ asitlerinin artması gibi metabolik değişiklikler meydana gelir ²¹. Ayrıca hücrelerin immün cevaplarında da değişiklikler olduğu bildirilmiştir. Örneğin, baskılanmış makrofaj aktivitesi ve down-regülatör hümmoral faktörlerdeki artışa paralel olarak NK ve T hücre cevaplarında ileri derecede inhibisyonun meydana geldiği rapor edilmiştir ^{38, 41, 42, 43, 44, 45}.

Tümörlü hayvanların periton boşluğunda bulunan damarların kontrol hayvanlardakine oranla önemli derecede geçirgen olduğu bulunmuştur. Bunun tümör hücrelerinden salgılanan etkili bir permeabilite faktörü ile ilgili olduğu tespit edilmiştir ³⁶.

Periton sıvısının immün aktiviteyi baskılama kapasitesi incelendiğinde tümör çoğalmasının erken evresinde zayıf veya baskılayıcı etkisi olmadığı, fakat terminal safhada baskılayıcı etkisinin ortaya çıktığı tespit edilmiştir ^{38, 39, 41, 42, 43, 44, 45}.

EAT' li farelerde, çoğalmanın plato fazında asit sıvısının çoğunun boşaltılması ile tümörün çoğalmasında yeni bir artış meydana gelir ⁴⁶. Bu artış eğer aynı tümörü plato fazında taşıyan bir diğer fareden alınan hücresiz asit sıvısı enjekte edilirse yeniden inhibe edilir. Bu bulgular da asit sıvısında çoğalmayı inhibe eden bir faktörün mevcut olduğunu göstermektedir ^{46, 47, 48}. Ehrlich asit sıvısındaki inhibitör faktörlerin konak hayvanın normal hücre popülasyonlarına da inhibe edici etkisi olduğunu veya büyümeyi tersine ettirici olduğunu bildiren çalışmalar mevcuttur. Altun, EAT'li farelerde karaciğer rejenerasyonunu da incelemiş ve tümöral büyümenin rejeneratif büyümeyi stimüle edici bir etkiye sahip olduğunu tespit etmiştir ³².

2.4. Serbest Oksijen Radikalleri ve Oksidatif Stres

Serbest oksijen radikalleri (ROS), dış orbitallerinde bir veya birden fazla paylaşılmamış elektron içeren moleküllerdir ⁴⁹. Kimyasal ve biyokimyasal tepkimeler daima atomların dış orbitallerindeki elektronlar sayesinde gerçekleşir. Dış orbitallerde paylaşılmamış elektron bulunması kimyasal aktifliği artırır ^{50, 51}.

ROS oluşumunda ki üç temel mekanizma ⁵¹:

- I. Kovalent bağların homolitik kırılması,
- II. Normal bir molekülün elektron kaybetmesi,
- III. Normal bir moleküle elektron transferidir.

ROS oluşumunu arttıran faktörler ⁵¹:

1. Ekzojen Faktörler

I. Diyetel Faktörler: Doymamış yağ asitlerinden zengin beslenme, yüksek kalorili beslenme, hayvansal proteinlerden zengin beslenme, alkol ve uygun koşullarda hazırlanmamış yiyeceklerle beslenme.

II. Çevresel Faktörler: Sigara dumanı, hava kirliliği (O₃, NO₂, SO₂, Hidrokarbonlar), radyasyon ve diğer kirlleticiler (aspest, pestisitler vs.).

III. İlaçlar: Anti-kanserojenik ilaçlar, glutatyon tüketen ilaçlar.

2. Endojen Faktörler

I. Sedanter yaşam

II. Stres

III. Yaşlanma

IV. Doku hasarı ve kronik hastalıklar (ateroskleroz, kanser, kronik inflamasyon, iskemi-reperfüzyon hasarı vs.)

V. Diyetle antioksidan alınının etkileyen koşullar (iştahsızlık, malabsorbsiyon, kolestaz) ⁵¹.

Fizyolojik şartlarda, organizmada oksidan etkenler ve antioksidan mekanizmalar bir denge halinde bulunmaktadır. Serbest radikallerle antioksidan savunma sistemi arasındaki dengenin bozulması oksidatif strese ve oksidatif hasara neden olmaktadır. Oksidatif stres ve oksidatif hasarın inflamasyon, yaşlanma, ateroskleroz, hipertansiyon, iskemik hasar, karsinogenez, mutagenez, immünolojik, nörolojik, ürolojik hastalıklar ve sindirim sistemi, göz, deri, akciğer ve karaciğer hastalıklarının patogeneğinde ve ilerlemesinde rolü olduğu kanıtlanmıştır⁵².

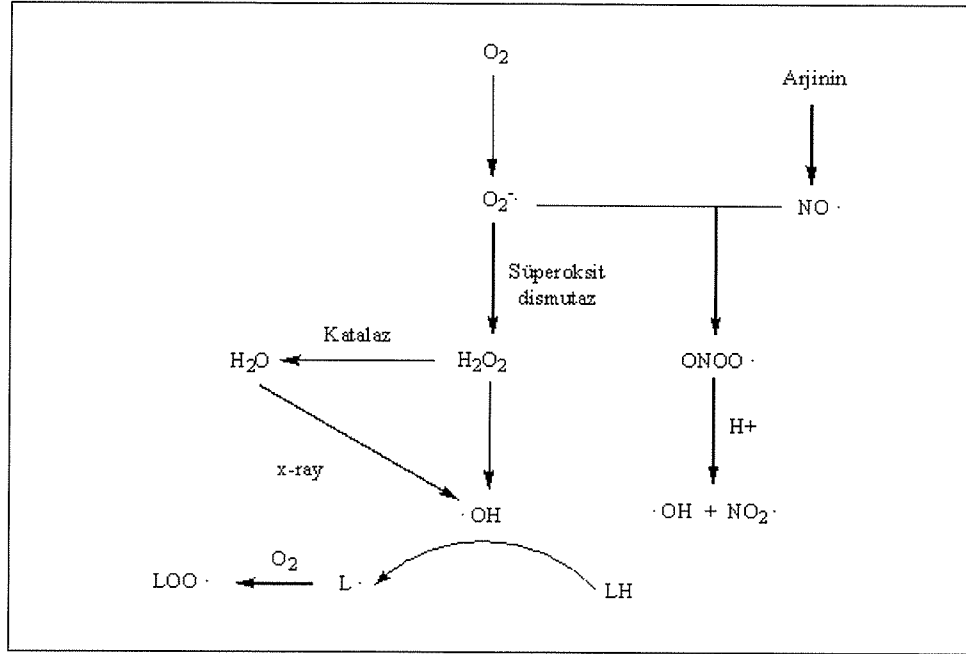
2.4.1. Serbest Oksijen Radikalleri

Serbest oksijen radikalleri hidroksil radikali, peroksi radikali, singlet oksijen radikali, peroksinitrit ve hidrojen peroksit olup bu radikaller oksijenli solunum metabolizması esnasında oluşurlar. Bu radikallerin yarılanma ömürleri birkaç birkaç mili saniye ile dakikalar hatta saatler arasında değişmektedir⁵³.

Tablo 1: Reaktif oksijen türlerinin simgeleri ve elektron yapıları

Reaktif Oksijen Türleri	Simgesi	Elektron Yapısı
Süperoksit radikali	$O_2 \cdot$	$(OO)^{\cdot -}$
Hidroksil radikali	$\cdot OH$	OH
Peroksit radikali	$O_2^{\cdot -2}$	$(OO)^{-2}$
Hidrojen peroksit	H_2O_2	$HOOH$
Singlet oksijen	1O_2	OO

Moleküler oksijenin toksik etkisi yoktur ancak aerobik hücre metabolizması sırasında moleküler oksijen, ROS' a dönüşür⁵⁴.



Şekil 1: Serbest oksijen radikallerinin oluşumu

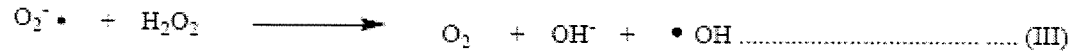
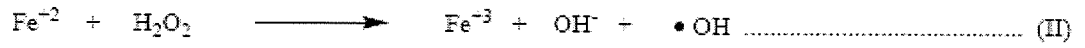
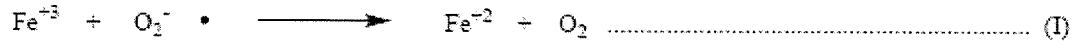
2.4.1.1. Süperoksit Radikali (O₂^{•-})

Moleküler oksijenin oksidatif fosforilasyon esnasında NADPH-oksidadaz veya ksantin-oksidadaz gibi enzimlerin katalizörlüğünde bir elektron indirgenmesi sonucunda süperoksit radikali meydana gelmektedir. Süperoksit radikalının yarılanma ömrü hücrelerin farklı yerlerinde bulunan süperoksit dismutaz enziminin varlığına bağlıdır⁵⁴. Ayrıca indirgeyici moleküler oksijene tek elektron verip kendileri oksitlenirken süperoksit radikali oluşur.

Süperoksit radikali, yüksek katalitik etkiye sahip süperoksit dismutaz (SOD) enziminin etkisiyle dismutasyona girerek azaltır⁵⁵.

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

Hidroksil radikali, en aktif ve en toksik oksijen radikali olup üretildiği her yerde birçok molekül ile reaksiyon verir. Hidroksil radikali, iyonlaştırıcı radyasyonun (x-ışınları) etkisiyle su moleküllerinin homolitik kırılması sonucunda oluşabildiği gibi hidrojen peroksit molekülünün metaller ile reaksiyonu sonucunda eksik indirgenmesi ile de oluşabilmektedir ⁸². Fe, Cu gibi metal iyonları tarafından katalizlenen bu indirgenme reaksiyonu Haber-Weiss tepkimesi olarak bilinmektedir ⁵⁵.



Biyolojik sistemlerin en reaktif türü olan $\cdot\text{OH}$, su dahil ortamda rastladığı her molekül ile tepkimeye girer. Bütün bu tepkimeler, $\cdot\text{OH}$ 'ın paylaşılmamış elektron içeren dış orbitaline elektron alma ilgisinden kaynaklanır ⁵⁵.

Hidroksil radikalının sebep olduğu en önemli hasar, lipid peroksidasyonu olarak bilinen serbest radikal zincir reaksiyonudur. Hücre zarı su içermediğinden $\cdot\text{OH}$ 'ın başlıca hedefi yağ asididir. Zar lipidlerinin peroksidasyonu zarın yapısını bozar ve geçirgenliğini artırıp hücre ölümüne sebep olabilir ⁵⁴.

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

Singlet oksijen, moleküler oksijenin yüksek enerji ile uyarılmış formu olup biyolojik sistemlerde fotosentez reaksiyonları sırasında oluşmaktadır. Barındırdığı yüksek enerjiyi çevreye dalga enerjisi şeklinde vererek yeniden oksijene dönebilir veya kovalent tepkimelere girer. Singlet oksijenin yarılanma ömrü 10^{-6} ile 10^{-5} saniye arasında olup karbon-karbon çift bağları ile tepkimeye girme eğilimi yüksektir ⁵⁴.

2.4.1.4. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

Hidrojen peroksit, oksijenin enzimatik olarak iki elektron ile indirgenmesiyle ya da süperoksitlerin enzimatik veya non-enzimatik dismutasyonu tepkimeleri sonucu oluşur. Yapısında paylaşılmamış elektron içermediğinden radikal özellik taşımaz, reaktif bir tür değildir. Hidrojen peroksitin oksitleyici bir tür olarak bilinmesinin sebebi demir, bakır gibi metal iyonlarının varlığında hidroksil radikalinin öncülü olarak davranmasıdır.

Hidrojen peroksit özellikle proteinlerdeki hem grubunda bulunan demir ile tepkimeye girerek yüksek oksidasyon düzeyindeki reaktif demir formlarını oluşturur. Bu formdaki demir çok güçlü oksitleyici özelliklere sahip olup, hücre zarlarında lipid peroksidasyonu gibi radikal tepkimeleri başlatabilir. Oksitleyici özelliği nedeniyle biyolojik sistemlerde oluşan H_2O_2 'nin derhal ortamdan uzaklaştırılması gerekir. Bu görevi hücrelerdeki önemli antioksidan enzimler olan katalaz ve peroksidaz enzimleri yerine getirir ⁵⁵.

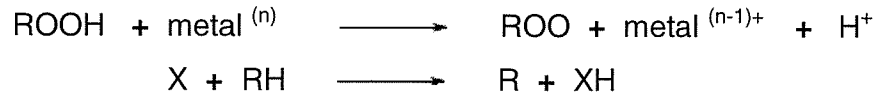
2.5. Lipid Peroksidasyonu Hakkında Genel Bilgi

2.5.1. Lipid Peroksidasyonu ve Etki Mekanizması

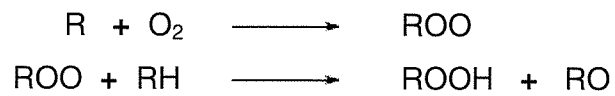
Lipid peroksidasyonu, zar fosfolipidlerindeki çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonuna neden olan ve böylece zar lipid yapısını değiştirerek hücre yapı ve fonksiyonlarını bozan bir olaydır.

Lipid peroksidasyonu kimyasal bir olay olup serbest radikallerin membrandaki doymamış yağ asitlerini etkilemesi ile başlar ⁵⁶. Kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonları şeklinde gelişir, hücre membranına yaptığı hasar geri dönüşümsüzdür. Zincir reaksiyonlarının tamamı Şekil 2 'de özetlenmiştir ⁵⁶.

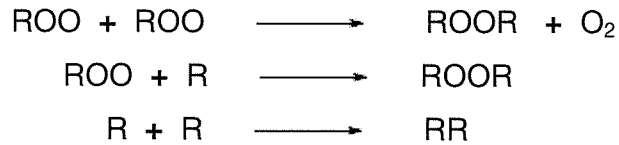
(1) Başlatılma:



(2) İlerleme:



(3) Sonlanma:



Şekil 2: Lipid peroksidasyonunun zincir reaksiyonları

2.5.2. Lipid Peroksidasyonunun Patolojik Etkileri

Lipidlerden, araşidonik asit metabolizması sonucu serbest radikal üretimine “enzimatik lipid peroksidasyonu”, diğer radikallerin sebep olduğu LPO’ na ise “non-enzimatik lipid peroksidasyonu” adı verilir ⁵⁷.

Lipid peroksidasyonu tepkimeleri sonucunda oksidatif hasarı arttıran başta aldehitler olmak üzere çok sayıda ürün oluşmaktadır ⁵⁶. LPO sonucunda ortaya çıkan çeşitli aldehitlerden en iyi bilinenleri MDA ve 4-hidroksinonenal (HNE)’dir. MDA ölçümü ile LPO’ nun değerlendirilmesi yapılabilmektedir. Bu bileşikler ya hücrel olarak metabolize olurlar ya da başlangıçta etkili oldukları bölgeden diffüze olup hasarı hücrenin diğer bölümlerine yayarlar ⁵⁷. Örneğin membran akıcılığının azalmasına, membran fonksiyonlarının yavaşlamasına, reseptör ve enzimlerin inaktive olmasına ve Ca^{+2} girişinin artmasına neden olurlar ⁵⁸.

Dokulardaki MDA artışının koroner arter hastalığına ⁵⁸, akciğer kanseri ve diğer akciğer hastalıklarına, DNA’ya bağlı mutasyonlara ve iltihaplanmalara yol açtığı bildirilmektedir ⁴⁹.

Tablo 2: Serbest radikallerin hücredeki başlıca zararlı etkileri

Doymamış yağlar	Kolesterol ve yağ asitlerinde oksidasyon Lipidlerde çapraz bağlanmalar Organel ve hücrelerde çapraz bağlanmalar
Karbonhidratlar	Polisakkaritlerin depolimerizasyonu
Nükleik asit bazları	Hidroksilasyonlar Mutasyonlar, kimyasal modifikasyonlar Şekerlerde benzer reaksiyonlar
Kükürtlü amino asitler	Protein denatürasyonu ve çaprazlanma Enzimlerde inhibisyon
Proteinler	Peptid zincirlerinde kopma Denatürasyon
Nükleik asitler	Tek ve çift iplikçik kırılmaları Proteinlerde çapraz bağlar Baz içermeyen bölgeler
Hiyaluronik asit	Sinovyal sıvı akışkanlığında değişme

2.5.2.1. Proteinler Üzerine Etkileri

Proteinler radikallere, lipidlerden daha az hassastır. Etkilenme dereceleri içerdikleri aminoasit kompozisyonuna bağlıdır. Doymamış bağ ve sülfür içeren amino asitlerden (triptofan, tirozin, fenil alanin, histidin, metiyonin, sistein gibi) meydana gelmiş proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenir. Karbon merkezli radikaller ve sülfür radikalleri meydana gelir. Karbonillerin ölçülmesi ile karbon merkezli radikaller belirlenebilir. Radikal hasarı sonucunda protein fragmentasyonu, çapraz bağlanmalar ve proteinlerin agregasyonu meydana gelir. Enzimlerin aktiviteleri değişebilir ⁵⁷.

2.5.2.2. Karbonhidratlar Üzerine Etkileri

Glukoz, mannoz ve deoksi şekerler fizyolojik şartlarda otooksidasyona uğrayarak, süperoksit ve hidrojen peroksiti meydana getirirler. Monosakkaritlerin otooksidasyonu, proteinlerdeki çapraz bağlanmalara yol açarak onların agreg olmalarına sebep olur ⁵⁹. Bu etkilerinden dolayı bazal membran kalınlaşmasında ve çeşitli hastalıkların patogenezinde önemli rol oynarlar ^{55, 59}.

Glikozaminoglikan yapısında olan ve sinovyal sıvının viskozitesinde önemli rol oynayan hyalüronik asitin, reaktif oksijen türleri ile etkilenmesi sonucunda bağ dokusu stabilitesi bozulur. Hyaluronik asit parçalanması inflamatuvar eklem hastalıklarının karakteristik bir özelliğidir. Gözün vitreous humourunda bulunan hyluronik asit' in oksidatif hasarı ise katarakt oluşumuna neden olur ^{59, 60}.

2.5.2.3. Nükleik Asitler ve DNA Üzerine Etkileri

İyonize edici radyasyona bağlı hücre ölümünün başlıca nedeni nükleik asitlerin reaktif oksijen türleri ile reaksiyonudur. Reaktif oksijen türleri DNA çift sarmalının ayrılmasına veya nükleik asit baz değişimlerine neden olabilir. Bu da kromozal mutasyonlar ve sitotoksosite ile sonuçlanır ^{55, 59}.

Hidroksil radikali, deoksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyona girer ve değişikliklere yol açar. Eğer hidroksil radikali DNA' nın yakınında meydana gelirse pürin ve pirimidin bazlarını etkiler. Singlet oksijenin nükleik

asitlerle tepkimeye girme yeteneği sınırlıdır. Süperoksit anyonu ise güçlü bir oksitleyici olduğundan, guanin gibi yüksek elektron içeren moleküllerle daha kolay tepkimeye girer^{58, 59}.

Organizmada aktive olmuş nötrofillerden kaynaklanan hidrojen peroksit, membranlardan kolayca geçer ve hücre çekirdeğine ulaşarak DNA hasarına, hücre disfonksiyonuna ve hatta hücre ölümüne yol açabilir^{55, 57, 59}.

2.6. Vücutun Antioksidan Savunma Mekanizmaları

Serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı organizmada koruyucu mekanizmalar vardır. Bu mekanizmalardan bir kısmı serbest radikal oluşumunu, bir kısmı ise oluşmuş serbest radikallerin zararlı etkilerini önler. Bu işlevleri yapan maddelerin tümüne birden genel olarak antioksidanlar denir^{57, 59, 61}.

Antioksidanlar lokalizasyonlarına göre intrasellüler ve ekstrasellüler olarak iki grupta incelenir. Ayrıca fonksiyonlarına göre de sınıflandırılmaktadır. Genelde, radikal oluşumunu önleyen (metal şelatörler, SOD, katalaz, glutatyon peroksidaz) ve oluşan radikallerin dokudaki etkilerini önleyen (E vitamini, ubikinon, retinoik asit, betakaroten, glutatyon, ürat) antioksidanlar olarak iki kategoride incelenirler. Ayrıca enzim ve enzim olmayanlar şeklinde de sınıflandırılırlar. Hücrelerin hem sıvı hem de membran kısımlarında bulunabilirler⁵⁹.

Tablo 3: Biyolojik sistemlerde antioksidan savunma sistemi

Enzimatik	Nonenzimatik	
Süperoksit dismutaz (SOD)	Glutasyon (GSH)	Albümin
Katalaz (KAT)	α -Tokoferol (vit E)	Seruloplazmin
Glutasyon peroksidaz (GSH-Px)	Askorbat (vit C)	Transferrin
Fosfolipid hidroperoksit glutasyon	β -Karoten	Ferritin
Peroksidaz (PLGSH-Px)	Flavonoidler	Laktoferrin
Glutasyon S-transferaz (GST)	Ürat	Melatonin
Glutasyon redüktaz (GSSG-R)	Bilirubin	Sistein

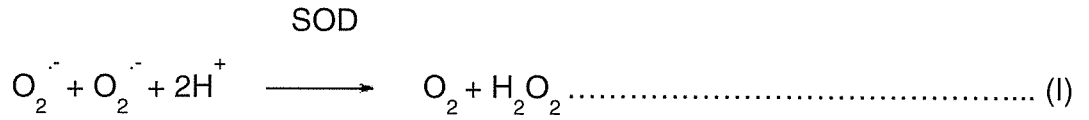
Antioksidanların, genellikle mutajenik olmadığı; hatta bazı kimyasalların mutajenik etkisini inhibe edebildiği gösterilmiştir. Antioksidanların belirli karsinojenlerden önce veya aynı zamanda verildiği bazı hayvan deneylerinde, kanser oluşumunu önledikleri açıklanmıştır. Bununla birlikte antioksidanların, karsinojenlere maruz kaldıktan sonra verildiği diğer bazı deneylerde kanser oluşumunu artırdığı da gözlenmiştir ⁶².

Antioksidanların oksidatif hasarlara karşı dokuları veya hücreleri koruyucu özellikleri göz önüne alındığında, yaşlanmaya, doku hasarlarına ve toksik ajanlar ile zehirlenmeye karşı koruyucu ajanlar olarak gösterilmektedir ⁶².

2.6.1. Enzimatik Antioksidanlar

2.6.1.1. Süperoksit Dismutaz

Antioksidan savunmanın ilk basamağı süperoksitin H_2O_2 'e dismutasyonunu katalizleyen süperoksit dismutaz enzimidir ^{61, 63, 64, 65}.



Bu enzim ksantin-ksantin oksidaz sistemine eklendiğinde sitokrom c'nin indirgenmesini inhibe eder.

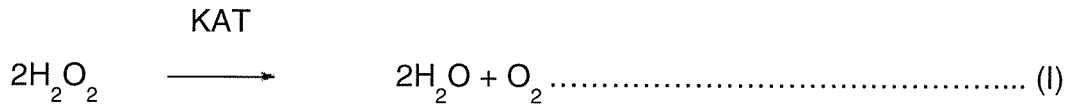
SOD ile katalizlenen tepkime sonunda oluşan ürün, oksijenin toksik türlerinden biridir ve KAT tarafından birikimi önlenmektedir ^{65, 66}.

SOD, intrasellüler savunmada büyük rol oynar ve yaşlanmaya bağlı olarak azalır ⁶⁵.

İnsanda SOD' un iki tipi bulunmaktadır; sitozolde bulunan, dimerik, Cu ve Zn içeren izomer (Cu-Zn SOD) ile mitokondride bulunan tetramerik Mn içeren izomerdir (Mn-SOD) ⁶⁵.

2.6.1.2. Katalaz

Katalaz (KAT), tüm hücre tiplerinde değişik konsantrasyonlarda bulunan dört tane hem grubu içeren bir hemoproteindir. Hidrojen peroksidi moleküler oksijen ve suya katalizler ^{57, 59}.



Daha çok peroksisomlarda lokalizedir. KAT'ın indirgeyici aktivitesi hidrojen peroksit ile metil, etil hidroperoksitleri gibi küçük moleküllere karşıdır. Büyük moleküllü lipid hidroperoksitlerine etki etmez. Kan, kemik iliği, mukoz membranlar, karaciğer ve böbreklerde yüksek miktarda bulunmaktadır ^{57, 61, 64}.

2.6.1.3. Glutasyon Peroksidaz

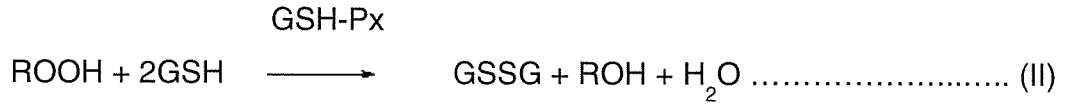
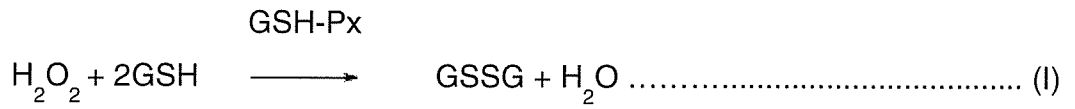
Hücrelerde oluşan hidroperoksitlerin uzaklaştırılmasından sorumlu olan bir enzimdir. Birbirinin aynı dört subünitten oluşan tetramerik bir enzimdir. Her subünit bir selenyum atomu içerir. Bu nedenle hücreleri çeşitli hasarlara karşı koruyan bir selenoenzim olduğu düşünülür ^{59, 60, 67, 68}.

Enzim aktivitesinin en fazla olduğu dokular ise eritrositler, karaciğer ⁶⁰, akciğerler ve endoteldir ⁶⁷.

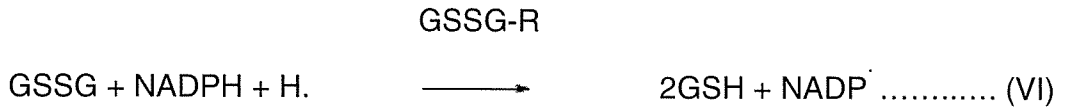
GSH-Px, intrasellüler mesafede lipidleri peroksidasyondan koruyan en önemli enzimdir. Bu nedenle hücrenin özellikle sitozolik

kompartmentmanında yer alan bu enzim hücrenin yapısını ve fonksiyonunu korur
59, 60, 69, 70

GSH-Px, aşağıdaki reaksiyonları katalizler ^{60, 71}.

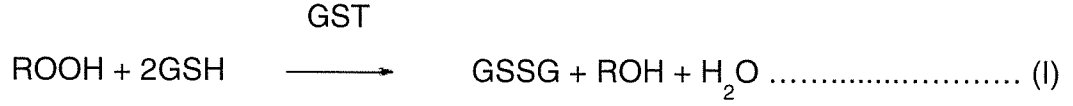


Hidroperoksitlerin redükte olması ile meydana gelen GSSG, glutasyon redüktazı (GSSG-R) katalizlediği reaksiyon ile tekrar GSH' a dönüşür.



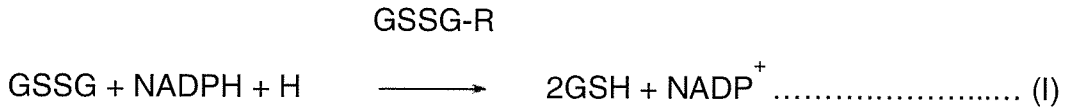
2.8.1.4. Glutasyon S-Transferaz

“Selenyuma bağlı olmayan GSH-Px” olarak adlandırılır. Membran LPO' yu yalnızca fosfolipaz A2' nin varlığında inhibe eder. Öncelikle araşidonik asit ve lineolat hidroperoksitleri olmak üzere lipid peroksitlerine karşı Se bağımsız GSH peroksidaz gibi aktivite göstererek antioksidan etki gösterir ^{55, 59}.



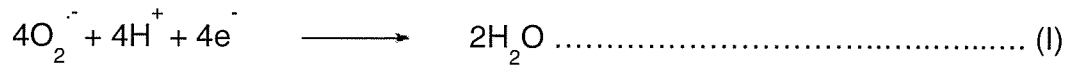
2.6.1.5. Glutasyon Redüktaz

Hidroperoksitlerin redükte olması esnasında meydana gelen okside glutasyon GSSG), GSSG-R' ın katalizlediği reaksiyonla tekrar redükte hale (GSH) dönüşür. Reaksiyonun gerçekleşmesi için NADPH' a ihtiyaç vardır ⁵⁷.



2.6.1.6. Mitokondriyal Sitokrom Oksidaz

Solunum zincirinin son enzimi olan sitokrom oksidaz, aşağıdaki reaksiyonla süperoksidi detoksifiye eden enzimdir ^{55, 59, 61}.



2.6.2. Nonenzimatik Antioksidanlar

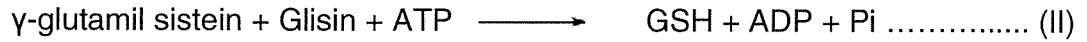
2.6.2.1. Glutasyon

Redükte glutasyon (GSH); glutamik asit, sistein ve glisin içeren bir tripeptit olup, aktif bir sülfidril (-SH) grubuna sahiptir. Vücuttaki GSH' nun büyük bölümü karaciğerde genetik bilgiye ihtiyaç duyulmadan iki aşamada sentezlenebilen bir tripeptittir ^{57, 59, 60, 72}.

γ -glutamil sistein sentetaz

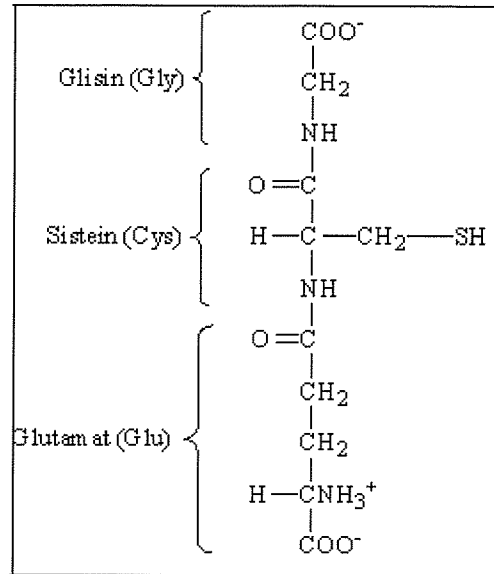


Glutasyon sentetaz



Vücutta enzimatik olmayan önemli bir antioksidan olan GSH, serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı korur ^{57, 59, 60}.

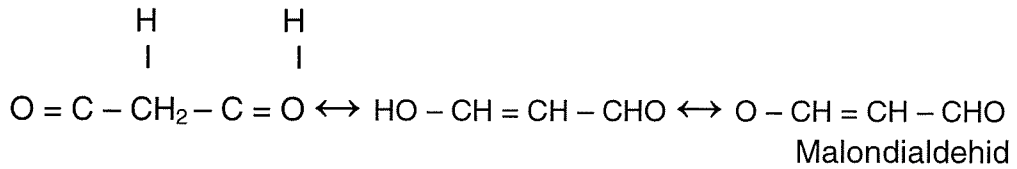
En önemli görevi, enzim ve proteinlerin tiyol gruplarının (-SH) indirgenmesi ile redükte formlarının kontrolünü sağlamaktır. Tiyol grubuna sahip birçok enzim düşük hızda fakat okside olarak ya da O₂'nin direkt etkisiyle hızla aktivitelerini yitirirler ^{59, 60, 72}.



Şekil 3: Glutatyonun yapısı

2.7. Malondialdehid (MDA)

Malondialdehid (MDA), poliansatüre yağ asitlerinin oksidatif yıkımı sonucu son ürün olarak açığa çıkar. Memelilerde yağ asitleri en çok araşidonik asit dokosahekzanoik asit şeklindedir ⁷³.



MDA sulu çözeltilerde pH' a bağlı olarak çeşitli formlarda bulunabilir. MDA' nın sulandırılmış asit veya nötral çözeltileri (<25 mM) 4 °C' de 20 gün saklanabilir. Yüksek konsantrasyonlarda özellikle oda sıcaklığında veya uzun süre bekletildiğinde MDA çözeltilerinde aldol tipi kondensasyon oluşur.

MDA proteinlerin amino gruplarına, fosfolipidler veya nükleik asitlere bağlanarak toksik etkisini gösterir. MDA miktarı tiyobarbitirik asit testi ile ölçülmekte ve bu yöntem lipid peroksid düzeylerinin saptanmasında sıklıkla kullanılmaktadır ⁷⁴. Serbest oksijen radikallerinin ve lipid peroksitlerinin bazı patolojik bozuklukların önemli bir rol oynadığı kabul edilmektedir. Yaşlanma, alkol ve ateroskleroz oluşumunda ⁷⁵ lipid peroksidasyonu ve antioksidan sistemdeki değişikliklerin etkin bir rol oynadığı saptanmıştır. Öte yandan serbest oksijen radikallerinin ve buna bağlı oksidatif stresin karsinogeneizde de önemli bir rolü olduğu ileri sürülmektedir ⁷⁶.

2.8. Serbest Oksijen Radikalleri ve Kanser

Oksidatif stres sonrası oluşan serbest oksijen radikalleri geri dönüşümlü ya da geri dönüşümsüz hücre hasarına, DNA, lipid ve protein hasarına yol açarlar ⁷⁷.

Oksidatif stres akut ya da kronik olabilir. İskemi-reperfüzyonda, akut enflamasyonda ve hiperokside kısa süreli bir oksidatif hasar varken; kronik enflamasyonda uzun süreli bir oksidatif hasar görülür. Uzun süreli bir oksidatif hasar kanser gelişiminde de rol oynar ⁷⁷.

Kanser gelişiminin ilk aşamasında günde yaklaşık 10 bin hücrenin DNA' sında oksidatif stres geliştiği ve kalıcı hasar olduğu tahmin edilmektedir ⁷⁸. DNA, çok küçük oranda ki tamir mekanizmasıyla onarılamaz ve mutasyonuna uğrar. Oksidatif stresin çok fazla olduğu şartlarda hücre ölümü görülür. Orta düzeydeki oksidatif stres şartlarında mutajenik potansiyel yüksektir ⁷⁷. DNA hasarında kimyasal yapıda ya da sarmal yapıda bozulma olur. Özellikle hidroksil radikali deoksiribozla ilişkiye girerek pürin ve pirimidin bazlarının ayrılmasına yol açar. Ayrılan bazlar nedeniyle DNA üzerinde abazik alanlar oluşur. Hidroksil radikali ayrıca adenin ve guaninin halka yapısını bozarak da mutasyona yol açar ⁵⁵. Bu değişimler sonucunda onkogenler aktive olabilir ya da tümör supresör genler inaktif hale geçebilir ⁷⁷.

Kanser gelişiminde 2. basamak "promosyon" aşamasıdır. Bu fazda, "inisiyasyon" aşamasında mutasyona uğrayan hücre klonları çoğalmaya başlar. Serbest oksijen radikalleri bu aşamada daha çok indirekt etkiye sahiptirler. Radikaller hücre içindeki Ca^{+2} konsantrasyonunu artırır. Bu artış başta fosfokinaz C (PKC) olmak üzere proliferatif faktörleri uyarır. Ayrıca PKC ve NF-kappa B, serbest oksijen radikalleri tarafından uyarılan diğer faktörlerdir ⁷⁷. Kanser

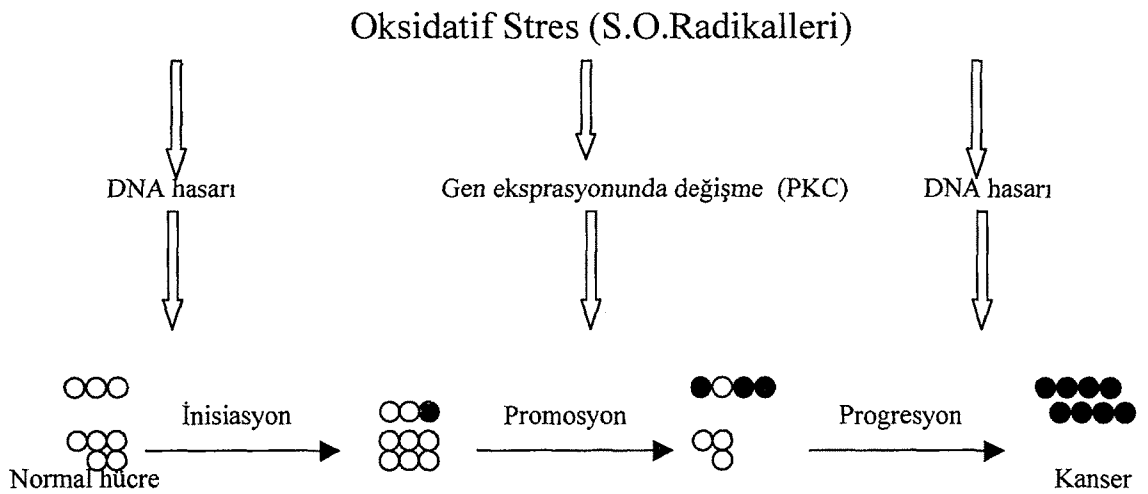
gelişiminin son dönemi progresyon aşamasıdır. Bu fazda tümör büyümesi hızlanır, immün sistemden kaçış, doku invazyonu ve metastaz görülür ve birçok DNA' da mutasyonu vardır ve serbest oksijen radikalleri tümörden devamlı şekilde salınır. Aynı zamanda antioksidatif kapasite oldukça azalmıştır ⁷⁹.

Serbest oksijen radikalleri ile okside olan yağ asitleri lipid peroksi radikallerine ve lipid hidroperoksitlere dönüşürler. Lipid peroksi radikalleri ise MDA' ya dönüşür. Lipidlerde oluşan bu hasar proteinleri de etkiler. Lipid radikalleri hücre membranını rahatlıkla geçerek hücredeki homeostazisi bozar, DNA-MDA ürünleri oluşturur ⁸⁰.

Protein hasarı sonrası hücrede enzim aktivasyonunda değişimler olur. Reseptör proteinlerdeki ve gap junction proteinlerindeki hasar da hücrede sinyal iletimini bozar ⁸⁰.

Oksidatif stres sonrası oluşan serbest oksijen radikallerinin çok basamaklı kanser oluşumundaki yeri tablo 4' de gösterilmiştir.

Tablo 4: Kanser oluşumunda oksidatif stres



2.9. Askorbik Asit (Vitamin C, Antiskorbit Vitamin)

1790 yıllarından beri bilinen AA, 1933 yılında C. Glen King tarafından izole edilmiştir. İzole edilmesinden hemen sonra kimyasal yapısı da açıklanmıştır. AA, moleküler ağırlığı 176 olan basit bir monosakkarit türevidir ⁸¹.

Yağda ve organik eriticilerde erimeyen AA, beyaz kristaller halinde, katı yapıda ve suda erir özelliktedir ^{81, 82}. AA yapısı glikozun okside formu şeklindedir. pH'ının artması ile birlikte gümüş ve bakır iyonları tarafından AA' nın oksidatif parçalanması hızlanır. Dehidrate formu indirgenmiş formundan daha dayanıklıdır ⁸¹.

İnsanlarda AA' nın dışarıdan alınması zorunlu iken, bazı memeliler ve sıçanlar glukoz üzerinden AA sentezleyecek enzim sistemlerine sahiptirler. İnsanda AA sentezinin olmayışı L-gulono-gama-lakton oksidaz enzim eksikliğine bağlıdır ^{83, 84}. Primatlar, kobaylar, yarasalar ve çeşitli türdeki kuşları kapsayan diğer hayvanlar, AA' yı sentezleyemezler ⁸³. AA memelilerde karaciğerde, kuşlarda, kurbağa ve sürüngenlerde ise böbreklerde sentez edilir. En önemli AA kaynakları yeşil sebzeler, meyvalar, domates ve turunçgillerdir ⁸¹. Oksidasyona karşı oldukça duyarlı olan AA pişirme ve depolama sırasında, işlemin niteliğine göre kayba uğrar. AA' nın bağırsaklardan emilmesi monosakkaritler gibidir. Vitamin hücreye girmeden Dehidro Askorbik Asit (DHAA) şeklindedir, hücreye girdikten sonra AA şeklini alır ⁸¹.

AA' nın emilimi daha çok dehidro şekline çevrildiği yer olan midede olmaktadır. Yüksüz olan DHAA fizyolojik pH' da hücre membranlarını mono anyonik L-askorbattan daha kolay geçerler. Lökosit ve eritrosit gibi hücreler, AA' nın büyük çoğunluğunu basit difüzyonla geçirirler, fakat bazı hücre ve dokularda aktif transport söz konusudur ⁸¹.

AA çoğu dokuda, hipofiz, adrenal korteks, korpus luteum ve timus gibi bezlerde plazmadaki düzeyinden 20-30 kat daha fazladır. İnsanlarda normal olarak 100 ml kanda 1.0 mg AA bulunur. AA' nın yarı ömrü 16 gündür. Fare ve kobaylarda ise radyoaktif AA' nın yarı ömrü 3-4 gün olarak bulunmuştur ⁸¹.

Yetişkin insanlarda günlük olarak 70 mg, süt emen çocuklarda ise 30 mg AA' ya ihtiyaç vardır. Bu miktarlar gebelik ve laktasyonda artar ⁸¹.

İnsanda AA atım formları absorbat-2-sülfat, liksonik asit, ksilonik asit ve ksilozdur. Az miktarda AA (%2) karbondioksite metabolize olur ve solunum ile uzaklaştırılır ⁸⁵. AA' nın fazlası idrarla atılır ⁸⁶. AA' nın oksidatif metabolizması hemosiderozlu hastalarda yüksektir ⁸⁵.

2.9.1. Askorbik Asit' in Fonksiyonları

Plazmada bulunan antioksidan olarak görev yapan endojen AA, sıvı ortamlarda oksidazları tutarak fonksiyonunu sürdürür ⁸¹.

AA güçlü bir antioksidan olup, bir ya da iki elektron verir, monodihidroaskorbik asit yoluyla dehidroaskorbata okside olur. Bu ara ürün vücudun antioksidan savunmasında reaktif oksijen ve serbest radikallere karşı doku tahribatını önler. AA'nın antioksidan hareketi diğer indirgen ajanların varlığında (GSH ve NAD gibi), daha güçlüdür. Meydana gelen radikaller, lipidlere, enzimlere, proteinlere ve DNA' ya bağlanarak patolojik bozuklukları ve kanseri ortaya çıkarır. Noradrenalin sentezi için de AA gereklidir. Adrenalin fizyolojik şartlar altında okside olmaya eğilimlidir. Fakat bu oksidasyonu AA önler. ATP den cAMP oluşumunu

adenil siklaz aktive eder. AA cAMP' yi 5'-cAMP' ye fosfodiesteraz enzimini inhibe ederek indirger. Böylece AA cAMP' nin doku düzeyini onun sentezini uyararak ve parçalanmasını azaltarak artırır ⁸¹.

AA, vertebralıların kollegen ve bağ dokularındaki prolin' in enzimatik olarak hidroksilasyonla, 4-hidroksiprolin' e dönüşmesinde etkilidir. Hidroksiprolin artıkları yalnızca kollegen dokuda bulunur. Dolayısıyla AA evrimleşmiş hayvanların bağ dokularının şekillenmesine etki eder. Son çalışmalardan, tokoferol ve AA' nın antioksidan etki gösterdikleri bilinmektedir ⁸¹.

AA, güçlü bir indirgeyici ajan olmasından dolayı nitrit toplar. Nitritin kaynağı gıdalardaki nitrattır. Nitrat emildikten sonra bukkal kavitedeki mikroorganizmalar tarafından nitrite çevrilir, mideye gelerek amin veya amidlerle nitros bileşiklerini oluşturur . AA nitrosaminlerin oluşumunu önleyen güçlü bir ajandır. Çünkü nitritle aminlerden daha hızlı reaksiyona girer. Böylece nitriti indirger, kendisi de okside DHAA (Dehidro Askorbik Asit) olur ve amin oluşumu önlenir ⁸⁵.

Tetrahidrofolik asit sentezi AA'nın varlığına bağlıdır. AA yetersizliğinde tetrahidrofolik asit sentezinin yetersizliği de söz konusudur . Kapiller damarların hücre arası maddesi, interstisiyel madde, dentin ve osteolit dokuların normal teşekkül etmesi için AA' ya ihtiyaç vardır ⁸¹. İnsanlarda AA eksikliğinin klasik sendromu skorbüttür ⁸⁴.

Bu hastalarda kollegen metabolizmasındaki aksaklığa bağlı olarak, kemiklerde bozukluk ve gelişme yetersizliği görülür. Deri altında, diş etlerinde, kaslarda, yağ dokusunda ve iç organlarda kanamalar meydana gelir. Ayrıca deride sertlik ve şişmeler oluşur. Bu bozukluklar uzun süre AA' dan yetersiz beslenmede görülür. AA' nın normal depoları skorbüte ait işaretlerin belirmesinden önce 3 - 4 ay yetecek düzeydedir ⁸⁴.

Çok hafif görülen AA yetersizliklerinde, bazı enfeksiyöz hastalıklara yakalanma kabiliyeti artar, bunun da teşhisi için en iyi yol kandaki AA düzeyinin tesbit edilmesidir⁸¹.

Yukarıda sayılan bozuklukların dışında AA yetersizliğinde görülen en önemli bozukluklar okuler hemoraji, tükürük ve gözyaşı bezi kuruluşudur. AA, gözleri fotooksidatif ve serbest radikal zararlarına karşı korur. AA postabsorbtif durumda bakırın emilmesine etki ettiği için AA eksikliği sonunda bakır yetersizliği de görülebilir⁸¹.

AA folik asidin aktif forma dönüşmesinde ve demirin emilmesindeki fonksiyonundan dolayı yetersizliği halinde sekonder megaloblastik anemi ve hipokromik anemi gelişmektedir⁸⁵.

Eğer yüksek dozda ve uzun süre AA alınırsa AA' nın yıkılması sonucu oluşan okzalik asit idrar yollarında taş oluşturur⁸¹. AA' nın yüksek dozda alınması, özellikle dehidroaskorbatı askorbata tekrar okside eden enzim sisteminde eksiklik olan kişilerde DHAA birikimine yol açabilir. Bu nedenle AA' nın okside olmuş şekli DHAA toksiktir. Ancak akut olarak AA toksisitesi gözlenmemiştir⁸⁶.

2.9.2. Askorbik Asit ile Kanseri ve Serbest Radikallerin İlişkisi

Yapılan araştırmalar AA ile kanser arasında önemli bir ilişki bulunduğunu ortaya koymuştur¹⁰. AA, diğer antioksidanlar gibi önemli antikanser etkilere sahip olabilir. Epidemiyolojik çalışmalarda AA' nın çok önemli koruyucu etkilere sahip olduğu bulunmuştur. Bu mekanizmanın serbest radikallerden oluşan hasarın önlenmesi ile ilgili olması muhtemeldir^{11, 12, 82}.

AA, kanserin tabii kimyasal önleyici ajanlarının başında gelmektedir ¹⁰. Kanser gelişimi ile ilgili önemli bir mekanizma, AA tarafından N-nitrozamin oluşumunun inhibisyonudur ^{10, 87}. Nitrozaminler, güçlü kanserojen maddeler olup nitritlerle çeşitli bileşiklerin reaksiyona girmesi sonucu meydana gelirler ^{10, 85, 88, 89}.

Nitrit, nitratın bakteriyel redüksiyonu yolu ile ve aktive makrofajlar ve endotelial hücreler tarafından oluşabilmektedir. Sindirilen sekonder aminler ve nitrit arasındaki reaksiyonunun in vivo ortamda oluşabildiği ve laboratuvar hayvanlarında karsinojenik nitrozaminleri meydana getirebildiği gösterilmiştir. Endojen nitroze edici ajanların iki olası kaynağı; diyet nitrata ilaveten atmosferik nitrojen oksitler ve hücreler tarafından endojen olarak üretilen nitrik oksittir. Sigara maruziyetin önemli bir kaynağıdır; sigara içimi 1000 ppm. kadar nitrojen oksit kapsamaktadır ⁸⁹.

AA' nın insan midesinde karsinojenik N-nitrozo bileşiklerinin oluşumunu inhibe etme yeteneğinden dolayı, gastrik kanserin önlenmesinde potansiyel olarak koruyucu bir etkiye sahip olabileceği ileri sürülmüştür ^{12, 90, 91, 92}.

Schorah ve Sobala' nın elde ettiği bulgular, AA' nın gastrik lümene sekrete edildiğini göstermiştir. Gastrik patoloji ve Helicobakter pylori ile ilgili kronik gastritin varlığında bu sekresyon bozulmaktadır ^{90, 91, 92, 93}. AA' nın bazı triptofan metabolitlerinin, sigaranın, ultraviyole ışınlarının ve virüslerin kanserojen etkilerini önemli ölçüde engellediği, invitro çalışmalarda da karsinojenik hidrokarbonlara karşı organizmayı koruduğu saptanmıştır ¹⁰.

Derideki UV-radyasyon hasarının nedeni, reaktif oksijen türleridir. Topikal AA' nın reduktan bir kofaktör olarak deriyi korumada etkili olduğu ileri sürülmektedir ^{94, 95, 96}.

Bilindiği gibi malign invazyonun en önemli unsurlarından biri, malign hücreler tarafından salgılanan lizozomal enzimlerdir. Bunların başında hyaluronidaz, kollejenaz ve nötral proteazlar gelir ^{10, 11}. Lizozomal enzimler, organ ve dokularda matriksin yapısını bozarak çözülme ve depolimerizasyona yol açar. Bu nedenle tümör hücrelerinin salgıladığı enzimleri inhibe edecek bir sistem, sadece malign invazyonu önlemekle kalmaz, aynı zamanda tümör hücrelerinin beslenmesini de bir ölçüde engellemiş olur. Yapılan çalışmalar serumda bulunan “Fizyolojik Hyaluronidaz İnhibitörü” (PIH) isimli özel bir proteinin infeksiyon, kanser, yara iyileşmesi ve romatoid artrit olaylarında oldukça yüksek seviyelere ulaştığını göstermiştir. Ayrıca kanserli hastalardan alınan serumun in vitro çalışmalarda hyaluronidazı inhibe ettiği bulunmuştur. PIH sentezinde yapı benzerliğinden dolayı AA’ ya ihtiyaç olduğu düşünülmektedir. Bu bilgilere dayanarak AA’ nın primer fonksiyonunun, bütün hücrelerin aslında var olan proliferatif kapasitesini düzenli ve birbirinden farklı bir davranış biçimine sokmak şeklinde olabileceği ileri sürülmüştür. AA – DHAA sisteminin adrenal ve pituitar hormonların sentez ve salgılanmasında da önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. Bu hormon değişikliklerine bağlı olarak kansere karşı hasta direncini etkileyebileceği bildirilmiştir ¹⁰.

Vitamin, birlikte kullanıldığı bazı şartlarda, kemoteropötiklerin tümör öldürücü etkilerini artırmak ve uygulanan doz ihtiyacını azaltmak suretiyle tedavide büyük ölçü de faydalı olmaktadır. Bu kombinasyonda muhtemelen hastanın immün sistemi daha az zarar görmektedir ^{10, 97}. Benzer şekilde kanser vakalarında iyonize radyasyonla AA kombine edildiğinde yaşam süresinin arttığı bildirilmektedir ^{10, 87}.

2.10. Vitamin E

Vitamin E tokoferol yapısına sahiptir. Doğal olarak alfa, beta, gama, delta, eta ve zeta gibi çeşitli tokoferoller bulunmaktadır. D-alfa-tokoferol en geniş doğal dağılımı ve en büyük biyolojik aktiviteyi gösterir. Antioksidan aktivitesi en yüksek olan α -tokoferoldür ve dokularda değişik konsantrasyonlarda bulunur^{57, 98}.

Yağda çözünen α -tokoferol, dokuda organik peroksil radikalleri ile reaksiyona girerek, radikal kaynaklı lipid peroksidasyonunu engelleyebilmektedir ve bu özellik molekülün antioksidan aktivitesini yansıtmaktadır^{81, 98, 99}.

E vitamini bitkiler tarafından sentezlenir. Oksijen yokluğunda asit ve ısıya dayanıklıdır, fakat alkali solüsyonlarda oksijen ve ultraviyole ışığına karşı dayanıksızdır^{100, 101}.

Besinle alınan E vitamini safra varlığında ince bağırsaktan emilir. Tokoferollerin çoğu kan dolaşımına lenf yolu ile girer ve dokulara taşınır. En çoğu yağ dokusunda olmak üzere, birçok dokularda depolanır. Bir kısmı da hücre zarlarında lipoproteinlerle birlikte depolanır. Fizyolojik miktarlarda verildiğinde çok az bir kısmı idrarda görülür. Plazma lipoproteinleri ve eritrosit zarı arasında hızlı bir tokoferol değişimi vardır⁸¹.

E vitamini buğday, ayçiçeği tohumu, mısır, soya fasülyesi yağlarında bulunur. Pişirme ve dondurma işlemleri sırasında kolayca harabiyete uğrayabilir⁴⁸.

2.10.1. Vitamin E' nin Fonksiyonları

En yüksek vitamin E konsantrasyonu mitokondri ve mikrozomlar gibi membranlardan zengin hücre kısımlarında bulunur. Dolayısıyla lipit peroksidasyonunun erken aşamalarında serbest radikal toplayıcı özelliği ile hücre membran fosfolipitlerinin çoklu doymamış yağ asitlerini serbest radikal etkisinden koruyarak, lipit peroksidasyonuna karşı ilk savunma hattını oluşturur. Vitamin E, lipit peroksit radikallerini parçalayarak lipit peroksit zincir reaksiyonlarını sonlandırır^{57, 98, 99, 101}.

E vitamini antioksidan özelliği nedeniyle, yağların oksitlenerek bozulmasını önler. Bu sebeple, gıdalara koruyucu katkı maddesi olarak katılır. Hücre yenileyici etkisi vardır⁸¹. E vitamininin özellikle fagositik ve diğer hücre membranlarının korunması için de gerekli olduğu da belirtilmektedir¹⁰².

Eritrositlerde tokoferolün tümü hücre membranlarında lokalize olmuştur ve membranın stabilizasyonunda önemli bir görev üstlendiği belirtilmiştir¹⁰³.

E vitamininin serumda yetersiz olması eritrositlerin yaşam süresini kısaltarak hemolitik anemiye neden olmaktadır. İn vivo ve in vitro şartlarda E vitamini ilavesinin eritrosit hemolizini azalttığı belirtilmektedir^{103, 104}.

Ayrıca E vitamininin trombositlerin agregasyonunu uyarıcı ve lökositlerin, periton ve alveolar makrofajların fagositik aktivitesini artırıcı yönde etkileri olduğu da bildirilmiştir^{103, 105}.

2.10.2. Vitamin E ile Kanser ve Serbest Radikallerin İlişkisi

Doğal antioksidanların içinde en etkili olan E vitaminidir. Bu nedenle koruyucu etkisini göstermek amacı ile tek başına veya diğer antioksidanlar ile birlikte verilerek pek çok çalışma yapılmıştır ¹⁰⁶.

E vitamini ortamlardaki serbest radikal türlerini bağlayarak zar fosfolipidlerindeki çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidatif strese karşı korunmasını sağlar ¹⁰⁶.

Nötrofillerde hücre membranlarında bulunan α - tokoferol oksidasyonu en engeller ¹⁰⁶. Enfeksiyon ve doku yıkımları sırasında yangı reaksiyonu ve hipoksi gibi durumlarda, dokularda lipid peroksidasyonu ve serbest radikaller artmaktadır. Hücrelerin aktivitesi ile lipit peroksidasyonu arasında ilişki vardır. Nötrofillerin aktivite değişikliğine bağlı olarak endotel hücrelerde meydana gelen yangıya karşı E vitamini koruyucudur. Benzer şekilde eritrositleri de hemolizden ve oksidatif hasardan korur ¹⁰⁷.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3. 1. Kullanılan Gereçler, Maddeler ve Denekler

3. 1.1. Deney Hayvanları

Çalışmamızda, 2,5-3 aylık Swiss-Albino erkek fareler kullanıldı. Denekler, Ankara Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi'nden temin edildi. Bu çalışma, Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu' nun 27.12.2007 tarihli ve 07.067 nolu kararı ile kabul edildi (karar örneği ek-2' dedir) ve Deney Hayvanları Araştırma Merkezi (GÜDAM) bünyesinde gerçekleştirildi.

3. 1. 2. Laboratuvar Koşulları

Deneyler ortalama sıcaklığı $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, ortalama nisbi nem $\%50 \pm 5$ olan laboratuvarda, 12 saat aydınlık 12 saat karanlık şartlarında yapıldı. Deneklere içme suyu olarak çeşme suyu verildi ve standart fare yemi ile sınırsız beslenmeleri sağlandı.

3. 1. 3. Kullanılan Laboratuvar Cihazları ve Kimyasal Maddeler

Laboratuvar Cihazları

- Spektrofotometre (UV-1208 Shimadzu)
- Homojenizatör (Hiedolph DiAx 900)
- Soğutmalı santrifüj (MPW - 350)
- Elektronik tartı (Sartorius basic)
- Su banyosu (Guft DBS 12734)
- Vorteks (Nüve NM 110-02488)

- Mikropipet (10-100 Transferpette 01 Z 2517, 100-1000 Genex Beta CR 59389)
- ELx 800 Bioelisa Reader
- Derin dondurucu (Sanyo CFC Free Japan)
- Santrifüj (Hermle Z 380 K)

Kimyasal Maddeler

- Triklorasetik asit (TCA, Sigma T-9759)
- Bütilhidroksitoluen (BHT, Sigma B-1378)
- Tiyoarbitürik asit (TBA, Sigma T- 5500)
- Di tiyobis nitro benzoik asit (DTNB) (Sigma D-8130)
- NaH_2PO_4
- Kloroform
- Etanol
- Stok ksantin: mmol/l, 6-7 damla 2.5 N NaOH eklenir.
- EDTA: 0.6 mmol/l
- NBT: 150 $\mu\text{mol/l}$
- Na_2CO_3 : 400 mmol/l
- BSA: 1 gr/l
- CuCl_2 : 0.8 mmol/l
- Ksantin Oksidaz: 16.66 Ü/ml'lik aktiviteye sahip çözeltiden 20 μ alınır, üzerine 2ml, 2M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ eklenir.

3.2. Deney Hayvanlarının Hazırlanması

Denek grupları Tablo 5’ de gösterildiği gibi dört gruba ayrıldı, her bir farenin uygulama öncesi başlangıç ağırlığı tespit edildi.

Tablo 5: Denek Grupları

No	Gruplar	Uygulama	Denek Sayısı
1	Kontrol (tümörlü)	Serum Fizyolojik	9
2	Deney (tümörlü)	Askorbik Asit	9
3	Deney (tümörlü)	Alfa-Tokoferol	9
4	Deney (tümörlü)	Askorbik Asit + Alfa-Tokoferol	9

Donör farenin periton sıvısındaki EAT hücreleri enjektör yardımıyla alındı. EAT hücre süspansiyonundan tüm deneklerin sırt bölgesine deri altına (SC) 0.5 ml olacak şekilde enjekte edilerek solid tümör gelişimi sağlandı. Bu yöntemle her fareye yaklaşık 1.5×10^5 tümör hücresi transplante edildi ve uygulama günü 0. gün olarak kabul edildi.

1. Grup Kontrol (Tümör + SF grubu) : Deneklere SC EAT enjeksiyonu yapıldıktan sonra 1. günden itibaren 10 gün süreyle periton içine (İP) 0.5 ml serum fizyolojik (SF) enjekte edildi.

2. Grup (Tümör + AA grubu) : Bu gruptaki farelere EAT uygulamalarından sonra 10 gün süreyle 0.5 ml, 200 mg/kg/gün AA İP olarak enjekte edildi ¹⁰⁸.

3. Grup (Tümör + Alfa-Tokoferol grubu) : EAT enjekte edilen deneklere 10 gün süreyle İP olarak 40 mg/kg/gün Alfa-Tokoferol uygulandı ¹⁰⁹.

4. Grup (Tümör + AA + Alfa-Tokoferol grubu) : Bu gruptakilere EAT uygulamasından sonra 1. günden itibaren 10 gün süreyle 200 mg/kg/gün AA ile birlikte 40 mg/kg/gün Alfa-Tokoferol İP olarak enjekte edildi.

Tüm gruptaki fareler son uygulamadan 24 saat sonra (11. gün) kas içine (İM) Xylazin + Ketamin (10+75-100mg/kg) anestezisi verilerek feda edildi. Deneklerin uygulama sonrası vücut ağırlıkları, karaciğer dokusu ve tümör kitlesi ağırlıkları ölçüldü. Ayrıca karaciğer dokuları SF' de yıkandı ve alüminyum folyo içinde sıvı azotta donduruldu, deney parametreleri çalışılincaya kadar -80°C de saklandı. Bu dokuda MDA (Malondialdehit), Glutasyon (GSH) düzeylerine ve SOD (Süperoksit Dismutaz) aktivitesine bakıldı. Aktivitelerin standart olarak gr. protein başına hesaplanabilmesi için Lowry metodu ile protein tayini yapıldı.

3. 3. Tayin Yöntemleri

3. 3. 1 Dokuda MDA Tayin Yöntemi

Karaciğer dokusundaki MDA düzeyleri tiyobarbitürik asit reaktif madde oluşumu yöntemiyle çalışıldı ¹¹⁰.

Kullanılan Solüsyonlar:

- %10'luk TCA
- %1'lik BHT (%95'lik alkol içinde)
- %0.67'lik TBA

Tartılan doku örnekleri, buzlu ortamda soğuk TCA (1 gr doku + 9 ml %10'luk TCA) içinde homojenize edildi. Daha sonra homojenat 15 dk süre ile 4000 rpm'de, +4°C de ayrıştırıldı ve süpernatant alınarak 4000 rpm'de 8 dk tekrar santrifüj edildi. Süpernatandan 750 µl alınarak üzerine aynı hacimde %67'lik TBA ve 10 µl %1'lik BHT eklendi. Vorteksle iyice karıştırılarak kaynayan su banyosunda 15 dk bekletilen karışım daha sonra oda ısısına kadar soğutuldu ve 4000 rpm' de santrifüj edildi. Üst fazdan alınan numunelerin optik dansitesi ELISA okuyucusunda 540 nm' de, köre karşı okundu. Lipid peroksit seviyeleri $1,56 \times 10^{-5} \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ katsayısı ile çarpılarak MDA ekivalan/nmol olarak gr doku başına hesaplandı.

3. 3. 2. Dokuda Glutasyon Tayin Yöntemi

Karaciğer dokusunda GSH tayini için modifiye Ellman yöntemi kullanıldı ¹¹¹.

Kullanılan solüsyonlar:

- 0,3 M NaH₂PO₄
- DTNB (0,4 mg / ml %1'lik sodyum sitrat)

Karaciğer doku örnekleri TBARS yöntemindeki gibi homojenize edilip santrifüj edildikten sonra 2 hacim süpernatant, 8 hacim NaH₂PO₄ ve 1 hacim DTNB çözeltisi ile karıştırıldı. Oda ısısında 5-10 dk bekletildikten sonra karışımın absorbansı ELISA okuyucusunda 405 nm dalga boyunda köre karşı okundu. GSH düzeyleri $13,600 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ katsayısı kullanılarak µmol / gr doku olarak ifade edildi.

3. 3. 3. Dokuda Süperoksit Dismutaz Aktivitesinin Tayin Yöntemi

Karaciğer dokusundaki SOD aktivitesinin ölçümünde, Sun' un yöntemi kullanıldı ¹¹². Yöntemin prensibi, ksantin' in, ksantin oksidaz ile reaksiyona girip oksijen oluşturmaması, oluşan oksijenin NBT ile renkli bir bileşik meydana getirmesi ve bu rengin spektrofotometrik olarak ölçümüne dayanmaktadır. Dokuda SOD aktivitesi ne kadar çok ise SOD dokudan o oranda oksijeni ortadan kaldırır. Bu nedenle numune tüpündeki SOD ne kadar fazla ise tüpte oluşan renk o oranda açık olur.

Kullanılan solüsyonlar:

- Kloroform
- Etanol
- Stok ksantin: mmol/l, 6-7 damla 2.5 N NaOH eklenir.
- EDTA: 0.6 mmol/l
- NBT: 150 µmol/l
- Na₂CO₃: 400 mmol/l
- BSA: 1 gr/l
- CuCl₂: 0.8 mmol/l
- Ksantin Oksidaz: 16.66 Ü/ml'lik aktiviteye sahip çözüldüden 20µ alınır, üzerine 2ml, 2M (NH₄)₂SO₄ eklenir.
- Reaktif Karışımı: 4ml ksantin + 36 ml distile su, 20 ml EDTA, 20 ml NBT, 12 ml Na₂CO₃ ve 6 ml BSA.

Bu yöntemde karaciğer dokuları 1/10 oranında distile su ile soğuk su banyosunda homojenize edildi. Homojenizat 5000 g (7000 rpm) de, +4 °C'de 30 dakika santrifüj edildi. Alınan süpernatant 1/1 (hacim/hacim) olacak şekilde kloroform/etanol [3/5(v/v)] karışımıyla seyreltilerek tekrar 5000 g de +4 °C'de 2 saat santrifüj edildi. Her bir numune tüpüne 2900 µl reaktif karışımı, 50 µl numune, 50 µl ksantin

oksidaz eklendi. Kör olarak kullanılan tüpe 2900 µl reaktif karışımı, 50 µl distile su ve 50 µl ksantin oksidaz eklendi. Tüpler 25°C'de 20 dakika inkübe edildikten sonra her bir tüpe 1 ml CuCl₂ eklendi ve 560 nm'de distile suya karşı absorbanans ölçüldü.

Karaciğer Dokusu Süperoksit Dismutaz Aktivitesinin Hesaplanması:

% inhibisyon: $[(\text{Kör absorbanansı} - \text{Numune absorbanansı}) / \text{Kör absorbanansı}] \times 100$

1 ünitelik aktivitenin %50 inhibisyon yaptığı varsayılarak hesaplama yapıldı. Aktivite Lowry yöntemiyle elde edilen protein miktarı üzerinden ünite/mg protein olarak hesaplandı.

3.3.4. Protein Tayini:

Karaciğer dokusunun protein düzeyleri, sığır serum albumini (BSA)'nın standart olarak kullanıldığı Lowry yöntemi ile ölçüldü ¹¹³.

Kullanılan solüsyonlar:

- BSA (sığır serum albumini): 1 mg/ ml
- Alkalen reaktif: 0,1 N NaOH içinde % 2'lik Na₂CO₃: 32 kısım
- NaK tartarat: % 2: 1 kısım
- CuSO₄5H₂O: % 1: 1 kısım
- Folin Ciocalteu fenol reaktifi: 1/ 1 oranında distile su ile seyreltilir.

Her bir numune tüpüne 20 µl süpernatant, 80 µl distile su, 2 ml alkalen reaktif eklenip, karıştırıldı. Tüpler oda ısısında, karanlıkta 15 dk. inkübe edildikten sonra, 0,2 ml Folin Ciocalteu's fenol reaktifi eklenip, karıştırıldı. Tüpler oda ısısında, karanlıkta 1 saat inkübe edildi. 750 nm'de köre karşı absorbanans ölçüldü. BSA'ın ölçülen absorbanansı, standart olarak kullanıldı.

Protein Miktarının Hesaplanması:

$$\text{Protein Miktarı (mg/ml)} = \frac{(\text{Numune absorbansı} / \text{Standart absorbansı}) \times \text{Standart Konsantrasyonu}}{1}$$

3. 4. İstatistiksel Değerlendirme

Deneylerden elde edilen veriler bilgisayarda SPSS istatistik paket programı kullanılarak analiz edildi. Gruplar arası karşılaştırmalarda ANOVA varyans analizi kullanıldı. İkili karşılaştırmalar için denek sayısının az olması nedeniyle non parametrik "Mann Whitney U" testi kullanıldı. Tüm değerler ortalama $\pm$ Standart Hata (SH) olarak verildi.

P < 0.05 değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Vücut Ağırlıkları:

Deneklerin deney başlangıcındaki ve bitimindeki ağırlık farkı ölçüldü. Değişiklikler başlangıçtaki ağırlığının %' si olarak hesaplandı. Grupların tablo 5' de gösterilen ortalama % vücut ağırlığı değişiklikleri istatistiksel olarak karşılaştırıldı ve fark anlamsız bulundu ($P>0.05$).

Tümör Ağırlıkları:

Grupların çıkarılan doku kitlelerinin ortalama ağırlıkları arasında fark bulunamadı ($P>0.05$).

Karaciğer Ağırlıkları:

Grupların karaciğer ağırlıkları arasında fark bulunamadı ($P>0.05$).

Çalışmamızda, Ehrlich asit tümörü enjekte edilmiş farelerde, AA ve α - tokoferol uygulamalarından sonra karaciğer dokusunda oksidan stresin göstergesi olarak MDA düzeyleri, SOD aktivitesi ve antioksidan fonksiyon göstergesi olarak da GSH düzeyleri incelendi.

4.1. Karaciğer Dokusu Malondialdehit (MDA) Düzeyleri:

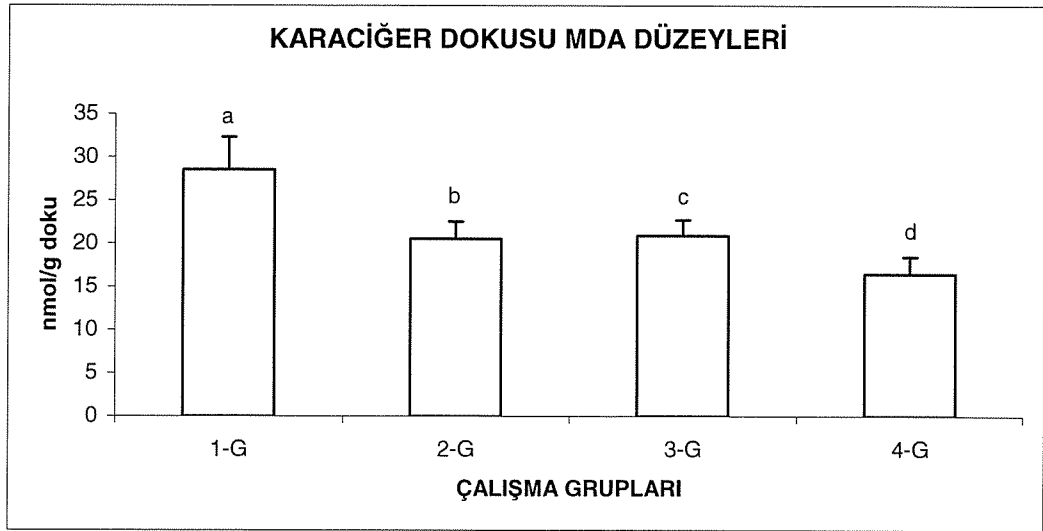
Üç farklı tedavi grubunun karaciğer MDA düzeyleri ile tümörlü kontrol grubu (1. Grup) ayrı ayrı karşılaştırıldığında farkların anlamlı olduğu saptandı ($p<0.001$).

Her üç tedavide de MDA düzeylerinin kontrollerle kıyasla azalmış olduğu görüldü. Uygulamalar arasındaki farkları belirlemek amacıyla yapılan ikili karşılaştırmalarda ise; AA uygulanan grup (2. Grup)

ile α -tokoferol uygulanan grup (3. Grup) arasında doku MDA düzeylerinin anlamlı bir fark göstermediği anlaşıldı ($p=0.6$).

Tek başına AA uygulananlara kıyasla (2. Grup) AA + α -tokoferol ikili tedavisinin (4. Grup) doku MDA düzeylerini anlamlı olarak azalttığı bulundu. ($p=0.0012$).

Alfa -tokoferol verilenlerle (3. Grup), AA + α -tokoferol uygulanan grup (4. Grup) karşılaştırıldığında da doku MDA düzeylerinin ikili uygulama yapılanlarda anlamlı şekilde düşük olduğu görüldü ($p<0.001$).



Grafik 1: Doku MDA düzeyleri

T: 1. Grup, T+VitC: 2. Grup, T+VitE: 3. Grup, T+VitC+VitE: 4. Grup

Sonuçlar Mann-Whitney U testi ile değerlendirildi.

Değerler aritmetik ortalama $\pm$ standart hata olarak verildi.

$P < 0.001$: a-b, a-c, a-d, b-d, c-d

$P > 0.05$: b-c

4.2. Karaciğer Dokusu Glutasyon (GSH) Düzeyleri:

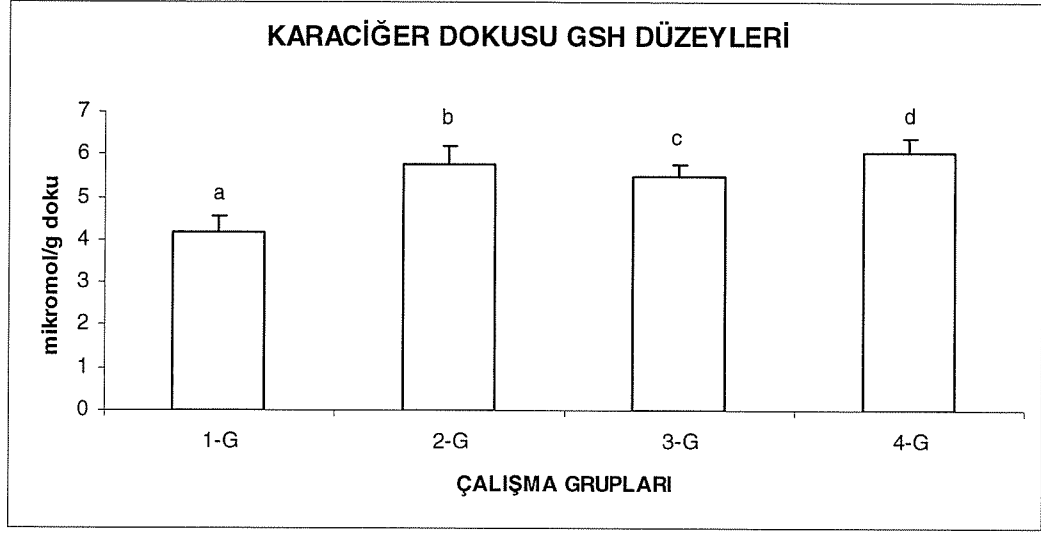
Kontrol grubu (1. Grup) ile AA uygulanan grup (2. Grup) karşılaştırıldığında doku GSH düzeyleri arasında fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.001$).

Kontrol grubu (1. Grup) ile α - tokoferol uygulanan grubun (3. Grup) ve kontrol grubu (1. Grup) ile AA + α - tokoferol (4. Grup) uygulanan deneklerin bulguları karşılaştırıldığında, kontrollerdeki GSH düzeylerinin anlamlı şekilde düşük olduğu görüldü ($p<0.001$).

Sadece AA tedavisi yapılanlarla (2. Grup) tek başına α - tokoferol uygulananların (3. Grup) karşılaştırıldığında doku GSH düzeyleri karşılaştırıldığında aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptandı ($p=0.19$).

AA' nın tek başına (2. Grup) veya α - tokoferol ile birlikte uygulanmasının (4. Grup), doku GSH düzeylerinde anlamlı bir değişiklik yapmadığı görüldü ($p=0.16$).

AA + α - tokoferol ikilisine kıyasla (4. Grup) α - tokoferol' ün tek başına verildiği grupta (3. Grup) doku GSH düzeylerinin anlamlı olarak düşük olduğu bulundu ($p<0.05$).



Grafik 2: Doku GSH düzeyleri

T: 1. Grup, T+VitC: 2. Grup, T+VitE: 3. Grup, T+VitC+VitE: 4. Grup

Sonuçlar Mann-Whitney U testi ile değerlendirildi.

Değerler aritmetik ortalama $\pm$ standart hata olarak verildi.

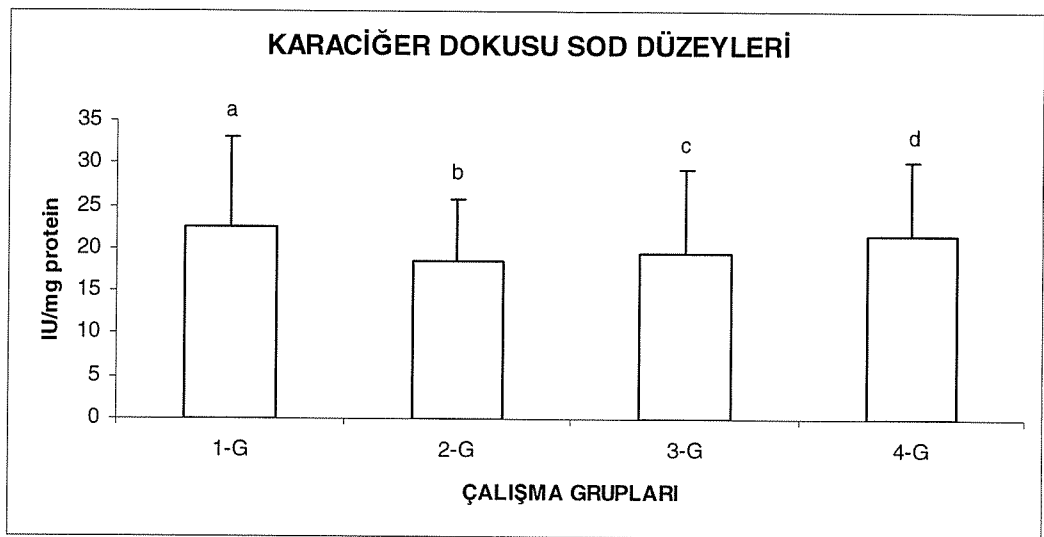
$P < 0.001$: a-b, a-c, a-d

$P < 0.05$: c-d

$P > 0.05$: b-c, b-d

4.3. Karaciğer Dokusu Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi:

Deneklerin karaciğer dokularında ölçülen SOD değerleri gruplar arası farkın saptanması amacıyla karşılaştırıldı. Uygulamaların doku SOD düzeylerine etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0.05$).



Grafik 3: Doku SOD aktivitesi

T: 1. Grup, T+VitC: 2. Grup, T+VitE: 3. Grup, T+VitC+VitE: 4. Grup

Sonuçlar Mann-Whitney U testi ile değerlendirildi.

Değerler aritmetik ortalama $\pm$ standart hata olarak verildi.

$P > 0.05$: a-b, a-c, a-d, b-c, b-d, c-d

5. TARTIŞMA

Kanser çalışmalarında genellikle toksik ajanlar veya ajanların toksik dozları kullanılmaktadır ve ana hedef bu ajanlarla en iyi tedavi sonuçlarının alınabilmesidir ¹¹⁴. Tedavide ise hedeflenen invazyonun, metastazın engellenmesi ve yaşam periyodunun uzamasıdır. Böyle bir ajanın araştırılmasında akla gelebilecek ilk kaynak doğal olarak besinlerimiz ve onların içerikleridir. Olumlu bulguların elde edildiği çalışmalar arasında vitamin uygulamaları da bulunmaktadır. Özellikle α -tokoferol ve AA bunların en önde gelenlerindendir. Bu nedenle çalışmamızda vitamin C ve E tedavisi yapılan EAT' li deneklerin karaciğer dokularındaki MDA, GSH ve SOD değişikliklerini incelemesi amaçlandı.

Bilindiği gibi kanser, hücre çoğalmasının kontrolsüz ve normal dışı büyümesi olarak tanımlanır. Fakat kanserin en bilinen özelliklerinden birisi hızlı kilo kaybıdır. Bu nedenle araştırmanın bitiminde grupların vücut ağırlıkları ile tümör kitlesi ve karaciğer ağırlıkları karşılaştırıldı. Çünkü tümör dokusundan salgılanan bazı faktörlerin diğer organlarda infiltrasyon veya invazyon olmaksızın büyümeye neden olduğu bilinen bir bulgudur ¹¹⁵.

Çalışmada deneklerin % ağırlık artışları karşılaştırıldığında E vitamini verilenlerde en yüksek kilo alınımları olduğu görüldü. Literatürde E vitamininin Leptin salınımını azalttığı gösterilmiştir ¹¹⁶. Bu hormon gıda alınımlarını azaltıcı, vücut ağırlığını azaltıcı ve enerji kullanımını uyarıcı bir etkiye sahiptir. Bizim E vitamini verilen grubumuzda da muhtemelen bu hormon salınımının azalmasına bağlı olarak gıda alınımları artmış ve enerji kullanımı önlenmiş olabilir. En düşük kilo artışı %8.8' lik oranla C vitamini uygulanan grubumuzda görüldü. Bu sonuç literatürde AA' nın retroperitoneal ve subkutan yağ depolarını azaltıcı etkisi olduğunu gösteren çalışmalara uygunluk göstermektedir ¹¹⁷. AA' nın glukokortikoid

metabolizması, adipogenezis ve pentozfosfat yolu veya TCA siklusu ile ilgili metabolik olaylarda yer alan gen ekspresyonlarında da rolü olduğu ve özellikle yağ içeriği yüksek gıda ile beslenmede, birikimi önleyici olduğu gösterilmiştir.

Deneylerimizde her iki vitaminin birlikte uygulandığı grupta vücut ağırlığı değişikliği E vitamini grubundakilerle benzerdi. Bu bulgu muhtemelen bizim deney şartlarımızda E vitamininin gıda alınımlarını artırıcı etkisinin, C vitamininin adipogenezis önleyici etkisinden daha baskın olduğunun göstergesidir. Bu konunun aydınlatılması için ilgili parametrelerin incelenmesi gerekmektedir.

Deney sonunda çıkartılan tümör kitlesinin grup ortalama ağırlıkları ve/veya vücut ağırlığına % oranı birbirine yakın bulundu. Karaciğer ağırlık ortalamasının ise tedavi edilmemiş tümörlü grupta en yüksek olması, diğer 3 grupta ise aynı seviyelerde ve daha düşük ağırlıklarda bulunması, kullanılan vitaminlerin karaciğer dokusunu koruyucu etkisi ile ilgili bir gösterge olarak düşünüldü. Mazumderi ve arkadaşlarının bulgularına göre sağlıklılara kıyasla EAT' lilerin karaciğer dokusunda lipid peroksidasyonu % 48.9 oranında artmaktadır ¹¹⁸.

Oksidan stres' in incelendiği çalışmamızda biri lipofilik diğeri hidrofilik olan iki vitaminin ayrı ayrı uygulandığı şartlarda doku MDA düzeylerinin azaldığı, birlikte uygulandığı şartlarda ise düşüşün daha da önemli olduğu görüldü. İki vitaminin birlikte verilmesi etkinin güçlenmesini sağlamış olabilir. Obajimia ve arkadaşları insan lenfoma U937 hücreleri ile yaptıkları bir çalışmada ¹¹⁹ antioksidan kombinasyonlarının monoterapötik tedaviden daha etkili olabileceğini göstermişlerdir. Bu araştırmacılar, α - tokoferolün Arakidonik asit salınımlarını azaltarak, AA' nın ise Arakidonik Asit' in hücre içine alınımlarını baskılayarak birbirinin etkilerini desteklediklerini göstermişlerdir. Araştırmacılar bunun sonucunda da PLA₂'

nin katalizlediği Arakidonik Asit' e bağımlı sinyal mekanizmaları aracılığı ile ortaya çıkması beklenen hücresel fonksiyon bozuklukları ve ölümü ¹²⁰ gibi olayların engellendiğini ileri sürmüşlerdir.

Genelde kanser hücresinde apoptozis' in tetiklenmesinde ROS aracıdır. Çünkü ROS artışı sitokrom-C salınımını tetikleyerek hücre ölümünü başlatır ¹²¹. Tedavide kullanılan bazı ajanların kanser hücrelerinin apoptozisini indüklemeye yeteneği, kanser hücrelerinde ROS çıkışını artırma yeteneğine bağlıdır ¹²². Bu nedenle kemoterapötik ilaçların bir kısmı malign hücreler kadar normal hücreler için de sitotoksik olabilmektedir.

Örneğin antimetabolit ve alkilleyici ajanlar gibi bazı kemoterapötik ilaçların, malign hücreler kadar normal proliferasyon gösteren hücreler için de sitotoksik olduğu gösterilmiştir ¹²³. Vitamin kombinasyonu uygulandığında ise tümör hücrelerinin mitotik aktivitesini inhibe edebilen dozların, selektif etkili olduğu, normal hücreleri etkilemediği gösterilmiştir ¹²⁴.

Gerek mitokondrial apoptotik aktivitenin kontrolünde gerekse ROS ürünlerinin yıkıcı etkilerine karşı savunmada GSH önemli rol oynar ¹²⁵. GSH hepatositlerde hücre proteinlerinin sülfidril gruplarının redoks dengesini sağlar. GSH eksikliğinde mitokondri membranlarının geçirgenliğindeki artışa bağlı olarak apoptotik faktör salınımı olur ve hücre ölümü tetiklenir.

Çalışmamızda vitamin tedavisinin EAT' li farelerin karaciğerinde GSH düzeylerini anlamlı şekilde arttırdığı saptandı. E veya C vitaminin GSH düzeylerine etkileri arasında ise fark bulunamadı. Fakat vitaminlerin birlikte uygulanması, E vitamininin tek başına verilmesinden daha etkili bulundu. Tek başına C vitamini uygulananların kombine

verilenlerden veya E vitamini ile tedavi edilenlerden farklı bir GSH düzeyi sağlamadığı görüldü. Literatürde Glutasyon eksikliği yapılan, H₂O₂' ye duyarlı HL-60 hücrelerinde dehidroksiasetik asidin reaktif oksijenleri azalttığı, prooksidan olduğu gösterilmiştir ¹²⁶. Başka bir çalışmada AA' nın FOS ve JUN süperfamilyasının içerdiği AP-1 (Activating protein-1) kompleksini regüle ederek hücre fonksiyonlarını etkilediği bildirilmiştir ¹²⁷.

Bu çalışmalar C vitamininin oksidatif olaylardaki koruyucu etkisinde GSH' ın tek aracı olmadığını akla getirmektedir. Fakat C vitaminini hücre içinde dihidroaskorbik formundan redükte AA' ya dönüşmesinde GSH' ya gereksinim vardır ¹²⁸. Yukarıda belirtildiği gibi EAT' li deneklerimizden AA uygulananlarla α - tokoferol verilenlerin karaciğer GSH düzeyleri arasında önemli bir fark saptanmamıştır fakat MDA' da AA lehine azalma gözlenmiştir. MDA' nın, C vitamininin tek başına verildiği deneklerde kombine verilenlere kıyasla anlamlı şekilde yüksek olmasına karşılık, GSH' ın iki grup arasında farkının bulunmaması dikkati çekmiştir. Bu bulgular muhtemelen C vitamininin GSH' dan bağımsız etkisine ve/veya vitamin E ve C' nin organizmada birbirlerini destekleyerek görev yapmasına bağlıdır ¹²⁹. Bilindiği gibi antioksidan reaksiyonları sırasında oluşan α - tokoferol radikali, C vitamini tarafından α - tokoferol' e dönüştürülür. Buna karşılık vitamin E' de C' nin oksidatif hasarını önler. İki vitaminin birlikte kullanıldığı şartlarda endojen antioksidan oluşumunda artış olmamasına rağmen ROS ürünlerinde anlamlı azalışın olması muhtemelen yukarıda belirtilen ilişkilere bağlıdır.

Literatürde EAT oluşumunda karaciğer CAT ve SOD aktivitelerinin azaldığı bildirilmiştir ¹³⁰. Sun ve ark. EAT ile ilgili çalışmalarında karaciğerdeki total SOD aktivitesinin sağlıklı kontrollerdekinden daha düşük olduğunu ve bunun karaciğerdeki total mitokondri kaybı ile ilgili olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda vitamin tedavisinin etkilerini incelemek amaçlandığından, sağlıklı kontrol grubu

kullanılmadı. Fakat deneylerimizde kontrol grubu ile tedavi gruplarının karaciğer SOD aktivitelerinde farklılık bulunmaması, α - tokoferol ve AA' nın bu enzim sistemini etkilememiş olduğunu düşündürmektedir.

Sonuç olarak çalışmamızda α - tokoferol ve AA tedavisi uygulanan EAT' li deneklerin karaciğerlerinde ROS ürünü MDA' nın azaldığı, GSH düzeylerinin arttığı, SOD düzeylerinin ise değişmediği görülmüştür. Bu vitaminlerin uygulanmasının tümör gelişiminde ROS artışına bağlı olarak hayati organlarda görülen etkilerin yanı sıra tümör hücrelerinin adesive ve invaziv davranışlarının da etkilenebileceğini düşündürmektedir.

6. SONUÇ

Bu çalışmada EAT oluşturulmuş farelerin karaciğer dokularında vitamin C ve E' nin, koruma ve/veya tedavi amaçlı etkileri araştırıldı. Değişikliklerin saptanması için karaciğer dokusundaki malondialdehit (MDA), glutatyon (GSH) ve süperoksit dismutaz (SOD) düzeyleri incelendi.

Çalışma da 36 adet 2,5-3 aylık Swiss Albino erkek fareler kullanıldı. Denekler 4 gruba ayrıldı: 1. grup; tümörlü kontrol, 2. grup; tümörlü vitamin C, 3. grup; tümörlü vitamin E , 4. grup; tümörlü vitamin C ve E grubu.

Üç farklı tedavi grubunun karaciğer MDA düzeylerinin kontrollere kıyasla düşük olduğu görüldü ($p<0.05$). Vitamin tedavisinin EAT' li farelerin karaciğerinde GSH düzeylerini anlamlı şekilde arttırdığı saptandı ($p<0.05$). Deneklerin karaciğer dokularında ölçülen SOD değişiklikleri istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0.05$).

Sonuç olarak çalışmamızda α - tokoferol ve AA tedavisi uygulanan EAT' li deneklerin karaciğerlerinde ROS ürünü MDA' nın azaldığı, GSH düzeylerinin arttığı, SOD düzeylerinin ise değişmediği görülmüştür. Tümör oluşturulan deneklere vitamin uygulamasının antioksidan mekanizmayı arttırdığı, oksidan stresi azalttığı gözlemlenmiştir.

7. ÖZET

Ehrlich Asit Tümörü İmplant Edilen Deneklerde Oksidan Stresin İncelenmesi

Bu çalışmada EAT oluşturulmuş farelerin karaciğer dokularında vitamin C ve E' nin, koruma ve/veya tedavi amaçlı etkileri araştırıldı. Değişikliklerin saptanması için karaciğer dokusundaki malondialdehit (MDA), glutatyon (GSH) ve süperoksit dismutaz (SOD) düzeyleri incelendi.

Çalışma da 36 adet 2,5-3 aylık Swiss Albino erkek fareler kullanıldı. Denekler 4 gruba ayrıldı ve gruplara aşağıdaki uygulamalar 10 gün süre ile İP olarak yapıldı: 1. grup; tümörlü kontrol (SF), 2. grup; tümörlü vitamin C (200 mg/kg/gün), 3. grup; tümörlü vitamin E (40mg/kg/gün), 4. grup; tümörlü vitamin C ve E (200 mg/kg/gün C vitamini ve 40mg/kg/gün E vitamini) grubu.

Deneklerin ortalama % vücut ağırlığı değişiklikleri hesaplandı ve istatistiksel olarak karşılaştırıldı, fark anlamsız bulundu ($p>0.05$). Deneklerin ortalama tümör dokusu ağırlığı ve karaciğer ağırlıkları yapılan gruplar arası karşılaştırmalarda önemsiz bulundu ($p>0.05$).

Üç farklı tedavi grubunun karaciğer MDA düzeylerinin kontrollerle kıyasla düşük olduğu görüldü ($p<0.05$). Vitamin tedavisinin EAT' li farelerin karaciğerinde GSH düzeylerini anlamlı şekilde arttırdığı saptandı ($p<0.05$). Deneklerin karaciğer dokularında ölçülen SOD değişiklikleri istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0.05$).

Sonuç olarak çalışmamızda α - tokoferol ve AA tedavisi uygulanan EAT' li deneklerin karaciğerlerinde ROS ürünü MDA' nın azaldığı, GSH düzeylerinin arttığı, SOD düzeylerinin ise değişmediği görölmüştür. Bu vitaminlerin uygulanmasının tümör gelişiminde ROS artışına bağlı olarak hayati organlarda görölen etkilerin yanı sıra tümör hücrelerinin adesive ve invaziv davranışlarının da etkilenebileceğini düşöndürmektedir.

Anahtar kelimeler: Vitamin C, vitamin E, serbest radikaller, antioksidanlar, oksidatif stres.

8. SUMMARY

Examination of oxidant Stress on Ehrlich Ascites Carcinoma

Implanted Subjects

In this study we researched the effects of vitamin C and vitamin E in erlich ascites tumor implanted mouse liver tissues for both protection and treatement purposes. In order to determine changes in liver tissues of the mice the levels of Malondialdehyde (MDA), Glutathione (GSH) and Super Oxide Dismutase (SOD) were analyzed.

36 Swiss Albino male mice (2.5-3 months old) were utilized in the study. Mice are grouped randomly as follows: Group I: Control Group tumor (SF) , Group II: Vitamin C tumor (200 mg/kg/day C vitamin), Group III: Vitamin E tumor (40mg/kg/day E vitamin), Group IV: Vitamin C and Vitamin E tumor (200 mg/kg/day C vitamin and 40mg/kg/day E vitamin). The applications were done as IP for 10 days.

The average body weight % changes of the subjects were calculated and compared between each groups statistically, the differences were found insignificant ($p>0.05$). The average tumor and liver tissue weight of the subjects were found statistically insignificant ($p>0.05$).

Liver MDA levels of three different treatment groups were lower than control group ($p<0.05$). It was seen that vitamin treatments increased GSH level in erlich acid tumor implanted mouse livers ($p<0.05$). SOD levels in liver tissue of the subjects were found insignificant ($p>0.05$).

As a result we observed that MDA, the product of ROS, decreased and GSH increased significantly in erlich acid tumor implanted

subjects that are cured with α -tokoferol and AA. No statistically differences were found in terms of SOD levels. We think that the applications of vitamin C and vitamin E may effect the adhesive and invasive behaviour of tumors in addition to the effects seen in vital organs due to ROS increase in tumor development.

Keywords: Vitamin C, vitamin E, free radicals, antioxidants, oxidative stres.

9. KAYNAKLAR

1. Nussbaum, R.L., McInnes, R.R., Willard, H.F., Thompson&Thompson Tıbbi Genetik. 6. Baskı. İstanbul: Güneş Kitabevi 2005; 312-313.
2. Gupta M, Mazumder UK, Sambath Kumar R, Sivakumar T, Vamsi MLM. Antitumour Activity And Antioxidant Status Of Caesalpinia Bonducella Against Ehrlich Ascites Carcinoma In Swiss Albino Mice. J Pharmacol Sci. 2004; 94: 177–184.
3. De Wys WD. Pathophysiology Of Cancer Cachexia: Current Understanding And Areas For Future Research. Cancer Res. 1982; 42: 721–726.
4. Levine RL. Carbonyl Modified Proteins In Cellular Regulation, Aging And Disease. Free Radic Biol Med. 2002; 32: 797–803.
5. Mookerjee, A., Basu, J.M., Majumder, S., Chatterjee, S., Dutta, P., Pal, S., Mukherjee, P., Efferth, T., Roy, S., Choudhuri S.K. A Novel Copper Complex Induces ROS Generation In Doxorubicin Resistant Ehrlich Ascitis Carcinoma Cells And Increases Activity Of Antioxidant Enzymes In Vital Organs In Vivo. BMC Cancer 2006; 6: 267.
6. McEligot, A.J., Yang, S., Meyskens, F.L. Redox Regulation By Intrinsic Species And Extrinsic Nutrients In Normal And Cancer. Cells, Ann. Rev. Nutr. 2005; 25: 261-295.
7. Baysal, A. Beslenme ve Diyetetik. 1. Baskı. Ankara: Hatiboğlu Yayınları; 2002.
8. Segura, J.A., Ruiz-Bellido, M.A., Arenas, M., Lobo, C., Marquez, J., Alonso, F.J. Ehrlich Ascites Tumor Cells Expressing Anti-Sense Glutaminase RNA Lose Their Capacity to Evade the Mouse Immune System. International Journal of Cancer 2001; 91: 379-384.
9. Dostenburg GS. Mensing RP, Hovwelingen AC, Hornstra G. Maternal And Neonatal Plasma Antioxidant Levels In Normal

Pregnancy And The Relationship With Fatty Acid Unsaturation. Br J Nutr. 1998; 80: 67-73.

10. Szikla, K., Pokorny, E., Hullan, L., Holczinger, L. Variations of Thymidine Kinase Activity and DNA Content in Ehrlich and L1210 Ascites Tumor Cells During Tumor Growth. Cancer Biochemistry and Biophysics 1981; 5: 259-264.
11. Barber, D.A., Harris, S.R. Oxygen Free Radicals and Antioxidants. A Review. Am.Pharm. 1994; 34 (9): 26-35.
12. Ziegler, R.G., Byerst, T. Health Claims About Vitamin C and Cancer. J. Nati. Can. Inst. 1994; 86(11): 871 – 872.
13. Laszlo J. Onkology. Wyngaarden JB, Smith LH. Cecil Textbook of Medicine. 18th edition. Philadelphia: W. B. Saunders Company 1988; 1082-89.
14. Geoffey, M.C., Hausman, E.R., Hücre. Moleküler Yaklaşım, (Çev.: Sakızlı M., Atabey N.). 1. Baskı. İzmir: İzmir Tıp Kitabevi; 2006; 592-640 .
15. Kumar, V., Cotran, R.S., Robbins, S.L., Robbins. Temel Patoloji, (Çev: Çevikbaş U.). 1. Baskı. İstanbul.Nobel Tıp Kitabevi; 2003:172-195 .
16. Roth, J.A., Molecular Events İn Lung Cancer. Lung Cancer, 1994; 10: 3-15.
17. Groeger, A.M., Esposito, V., Mueller, M.R. Advances İn The Understanding Of Lung Cancer, Anticancer Research, 1997; 17: 2519-2522 .
18. William, S.K., Cummings, M.R., Genetik Kavramlar (Çev.: Öner C.). 6. Baskı. Ankara. Palme Yayıncılık, 2000; 635-636.
19. Robert, K.M, Peter, A.M., Granner, D.K, Rodwell, V.W., Harper' s Biochemistry. Appleton and Lange, 1990; 819-820 .
20. Zeybek, Ü. Deneysel Kanser Modelleri. Kalıtsal Hastalıklara Moleküler Tıp Açısından Bakış Sempozyumu. 2003; 283-310.

21. Aktaş, E. Ehrlich Asit Sıvısının L-Hücrelerinin Çoğalma Hızına Etkisi. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul: İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü; 1996.
22. Taşkın, E.İ. Ehrlich Ascites Tümörü ile Balb-C Farelerde Oluşturulmuş Solid Tümör Modelinde Curcuminin Apoptoz Üzerine Etkileri. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul: İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı; 2002.
23. Kaleoğlu, Ö., İşli, N. Ehrlich-Lettre Asit Tümörü. İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası, 1977; 40: 978 - 984.
24. Ekinci, G. Katı Ehrlich Ascites Tümörünün Büyüme Kinetiği. İstanbul: İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü; 2000.
25. Okay, H.G. Deneysel EAT Oluşturulan Fare Karaciğer Plazmasında Nitrik Oksit Metabolizmasının İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul: İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya ABD; 1998.
26. Zeybek, Ş.Ü. En Uygun Ehrlich Ascites Tümör Modellerinin Farklı Soy ve Cinsiyetteki Farelerde Gösterilmesi. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul: İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Deney Hayvanları Biyolojisi ve Biyomedikal Uygulama Teknikleri Anabilim Dalı; 1996.
27. Lazebnik, Y.A., Medvedeva, D.N., Zenin, V.V. Reversible G2 Block in the Cell Cycle of Ehrlich Ascites Carcinoma Cells. Experimental Cell Research, 1991; 195: 247-254.
28. Gümüşhan, H. İP, İV, SC, Yollarla Uygulanan Adriamycin'in Ehrlich Asit Tümörü (EAT) Taşıyan Farelere Etkileri Üzerine Bir Çalışma. Yüksek Lisans Tezi. Şanlıurfa: Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü; 2002.
29. Grune, T., Siems, W., Uhlig, R., Jakstadt, M. Adenine Metabolism of Ehrlich Mouse Ascites Cells in Proliferating and Resting Phases of Tumor Growth. Biochemical Int. 1992; 26 (2): 199-209.

30. Skog, S., He, Q., Tribukait, B. Lack of Correlation Between Thymidine Kinase Activity and Changes of DNA Synthesis With Tumour Age: An In Vivo Study in Ehrlich Ascites Tumour. *Cell Tissue Kinetics* 1990; 23: 603-617.
31. Bulan, Ö. Ehrlich Ascites Tümör Hücrelerinde Yaşlanma ile Hücre Kinetiği Arasındaki İlişkiler. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul: İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü; 1990.
32. Altun, S. Normal, Tümoral ve Rejeneratif Büyümler Arasındaki Kinetik İlişkiler. *Traditional Journal of Biology, Tübitak*, 1996; 20 (3): 153-173.
33. Fong, K.W., Sekido, Y., Minna, J.D. Molecular Pathogenesis Of Lung Cancer, *J Thorac Cardiovasc Surg*, 1999; 118: 1136-1152.
34. Schmidt, H., Siems, W., Müller, M., Dumdey, R., Rapoport, S.M. ATP Producing and Consuming Processes of Ehrlich Mouse Ascites Tumor Cells in Proliferating and Resting Phases. *Experimental Cell Res.* 1991; 194: 122-127.
35. Schwendel, A., Siems, W.G., Grune, T., Holzhütter, G.H. Transitions of Hepatic Purine Metabolism of Ehrlich Ascites Tumor Bearing Mice in Different Phases of Tumor Growth. *Biochem. and Molecular Bio. Int.* 1994; 34(3): 457-463.
36. Senger, D.R., Gali, S.J., Dvorak, M.A., Perruzzi, C.A., Harvey, V.S., Dvorak, H.F. Tumor Cells Secrete a Vascular Permeability Factor That Promotes Accumulation of Ascites Fluid. *Science*, 1983; 219: 983-985.
37. Latha, P.G., Evans, D.A., Panikkar, K.R., Jayavardhanan, K.K. Immunomodulatory and Antitumor Properties of *Psoralea corylifolia* Seeds. *Fitoterapia* 2000; 71: 223-231.
38. Justo, G.Z., Duran, N., Queiroz, M.L.S. Myelopoietic Response in Tumour-Bearing Mice by an Aggregated Polymer Isolated from *Aspergillus oryzae*. *European Journal of Pharmacology* 2000; 388: 219-226.

39. Justo, G.Z., Duran, N., Queiroz, M.L.S. Natural Killer Cell Activity, Lymphocyte Proliferation and Cytokine Profile in Tumour-Bearing Mice Treated with MAPA, a Magnesium Aggregated Polymer from *Aspergillus oryzae*. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 2003; 25: 305-319.
40. Marquez, J., Sanchez-Jimenez, F., Medina, M.A., Quesada, A.R., De Castro, I.N. Nitrogen-Metabolism in Tumor-Bearing Mice. *Arch. Biochemical Biophysics* 1989; 268: 667-675.
41. Fecchio, D., Russo, M., Sirois, P., Braquet, P., Jancar, S. Inhibition of Ehrlich Ascites Tumor In vivo by PAF Antagonists. *International Journal of Immunopharmacology* 1990a; 12: 57-65.
42. Fecchio, D., Sirois, P., Russo, M., Jancar, S. Studies on Inflammatory Response Induced by Ehrlich Tumor in Mice Peritoneal Cavity. *Inflammation* 1990b; 14: 125-132.
43. Segura, J.A., Barbero, L.G., Marquez, J. Early Tumor Effect on Splenic the lymphocytes in Mice. *FEBS Letters* 1997; 414: 1-6.
44. Segura, J.A., Barbero, L.G., Marquez, J. Ehrlich Ascites Tumour Unbalances Splenic Cell Populations and Reduces Responsiveness of T Cells to *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B Stimulation. *Immunology Letters* 2000; 74:111-115.
45. Ruiz De Morales, J., Velez, D., Subiza, J.L. Ehrlich Tumor Stimulates Extramedullar Hematopoiesis in Mice Without Secreting Identifiable Colony- Stimulating Factors and Without Engagement of Host T Cells. *Experimental Hematology* 1999; 27: 1757-1767.
46. Bichel, P. Autoregulation of Ascites Tumour Growth by Inhibition of the G-1 and the G-2 Phase. *European Journal of Cancer* 1971; 7: 349-355.
47. Bichel, P. Tumor Growth Inhibiting Effect of JB-1 Ascitis Fluid-1, An In Vivo Investigation, *European Journal of Cancer* 1970; 6: 291.
48. Burns, E.R., Solofy, B.L. Further Studies on the Recurrent Growth of the Ehrlich Ascites Tumor. *Anat. Rec.* 1970;166: 285.

49. Uzun, K., Vural, H., Öztürk, T., Özer, F., İmecik, İ. Diagnostic Value Of Lipid Peroxidation İn Lung Cancer. Eastern Journal of Medicine 2000; 5(2):48-51.
50. Mcgee, S.A., Wiggins, S.A., Pierce, J.D. What Advanced Practise Nurses To Know About Free Radicals. The İnternet Journal Of Advanced Nursing Practice 2003; 6:1-10.
51. Wu, D., Cederbaum, A.I. Alcohol, oksidative stres and free radical damage. Alcohol Research & Health 2003; 27(4): 277-284.
52. Sodergeren, E. 2000. Lipid Peroxidation İn Vivo. Genet. Mol. Biol. 2000; 23 (3): 61
53. Yeh, C.C., Hou, M.F., Tsai, S.M., Lin, S.K., Hsiao, J.K., Huang, J.C., Wang, L.H., Wu, S.H. Superoxide Anion Radical, Lipid Peroxides And Antioxidant Status İn The Blood Of Patients With Breast Cancer. Clin. Chim. Acta. 2005; 361(1-2): 104-111.
54. Stahl, W., Sies, H. Reactive Oxygen Species. The Toxicology Of Fishes Journal 2002; 1-2.
55. Halliwell B, Auroma OI. DNA Damage By Oxygen Derived Species. Its Mechanisms Of Action And Measurements İn Mamalian System.FEBS Lett. 1991; 281: 9.
56. Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, R.A., Rodwell, V.W. Fizyolojik Öneme Sahip Lipidler, (Çev: N. Dikmen, T. Özgönen. Harper'ın Biyokimyası). 24. Baskı. İstanbul: Barış Kitabevi;1996.
57. Akkus, İ. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. 1. Baskı. Konya: Mimoza Yayınevi; 1995.
58. El-Yassin, H.D., Hasso, N.M.A., Al-Rubayi, H.A. Lipid Profile And Lipid Peroxidation Pattern Pre And Post Exercise İn Coronary Artery Disease. Turk J Med Sci. 2005; 35: 223-228.
59. Yanbeyi, S. Aspirin Ve Antioksidant Buthylated Hydroxyanisole'ün Tavşanlarda Eritrosit Total Katalaz, Süperoksit Dismutaz Ve Glutatyon Peroksidaz Aktiviteleri Üzerine Etkileri. Doktora Tezi, Samsun: Ondokuz Mayıs Üni. Biyoloji Anabilim Dalı; 1999: 88.

60. Fırat, S. Kobaylarda Radyasyonla Oluşan Akciğer Hasarında Doku Glutasyon , Glutasyon Peroksidaz, Glutasyon- S-Transferaz Düzeyleri Ve N-Asetil Sistein'in Bu Sistem Üzerindeki Etkisi. Uzm.Tezi. Ankara: Gazi Üni. Tıp Fak. Biyokimya ABD; 1997: 95.
61. Bast, A., Haenen, G.R.M.M., Cees, J.A.D. Oxidants And Antioxidants:State Of The Art. The American Journal Of Medicine, 1997; 91(3c): 30.
62. Ito, N., Hirose, M. Antioxidants-Carcinogenic And Chemopreventive Properties. Adv Cancer Res. 1989; 53: 247-302
63. Flohe, L., Otting, F. SOD Assays. Annu Rev. Biochem. 1984; 44: 147-59.
64. Gonzales, R., Auclair, C., Voisin, E., Gautero, H., Dhermy, D., Boivin, P. Superoxide Dismutase, Catalase and Glutathione Peroxidase in Red Blood Cells From Patients With Malignant Diseases. Cancer Res.1984; 44(9): 4137-9.
65. Çakır, M. Aspirin Ve Vitamin E (A-Tokoferol)' nin Farelerde (Mus Musculus) Karaciğer Total Süperoksit Dismutaz Ve Katalaz Aktivitelerine Etkileri. Yüksek Lisans Tezi. Samsun: Ondokuz Mayıs Üni. Biyoloji Anabilim Dalı; 1997: 50.
66. Breckta, A., Greenstock, C.L., Tambo, M. Advances On Oxygen Radicals, And Radioprotectors: Mavelli, I. Ratilio, G. Enzymatic Protection Against Intracellular Oxidative Processes 1984: 65-80.
67. Mungan, G. Kan Bankalarında Cpda-1 (Citrate Phosphate Dextrose Adenine) İle Saklanan Kanlarda Allopürinolün Lipid Peroksidasyonu Ve Biyokimyasal Parametrelere Etkisinin İncelenmesi. Uzm. Tezi. Ankara: Ankara Hastanesi Biyokimya Ve Klinik Biyokimya; 1996: 67.
68. Mc Millan, Tj., Steel, Gg. Molecular Aspects Of Radiation Biology: Basic Clinical Radiobiology. 1. Baskı. London: Steel GG (Ed) Edward Arnold Publishers; 1993: 211-223.

69. Mc Cray, Pb., Gibson, Dd., Fong, Kl., Hornbrook, Kr. Effect Of Glutathione Peroxidase Activity On Lipid Peroxidation In Biological Membranes. *Biochim Biophys Acta*. 1976; 431(3): 459-68.
70. Michiels, C., Raes, M., Toussaint, O., Remacle, J. Importance Of Se-Glutathione Peroxidase, Catalase, And Cu/Zn-Sod For Cell Survival Against Oxidative Stress. *Free Radic Biol Med*. 1994; 17(3): 235-48.
71. Flohe, L. Glutathione Peroxidase. *Basic Life Sci*, 1988; 49:663-668.
72. Champe, P.C., Harvey, R.A. Glikozaminoglikanlar. A. Tokullugil, M. Dirican, E. Ulukaya. Lippincott's Illustrated Reviews Serisinden: *Biyokimya*. 2. Baskı. İstanbul. Nobel Tıp Kitabevi; 1997: 147-156.
73. Hunt J.V., Battoms M.A., Mitchinson M.J.: Ascorbic Acid Oxidation: A Potential Cause Of The Elevated Severity Of Atherosclerosis In Diabetes Mellitus. *Clin. Cardiol*. 1992; 311(2): 161-164.
74. Dianzoni M.V. Lipid Peroxidation And Cancer. *Critical Reviews In Oncology/Hematology*, 1993; 15: 125-147.
75. Plachta H., Bartnikowska E., Obara A. Lipid Peroxides In Blood From Patients With Atherosclerosis Of Coronary And Peripheral Artheries. *Clin. Chem. Acta* 1992; 211: 101-112.
76. Babs C.F.: Free Radicals and The Etiology Of Colon Cancer. *Free Radical Biol Med* 1990; 8:191-200.
77. Dreher D, Junod A.F. Role Of Oxygen Free Radicals In Cancer Development. *Eur.J.Cancer*. 1996; 32a:1.
78. Bulger Em, Helton Ws. Nutrient Antioxidants In gastrointestinal Disease. *Gastroenterol.Clin.North Am*. 1998; 27:43.
79. Toyokuni S, Okamoto K, Yodoi J, Hiai H. Persistent Oxidative Stress in Cancer. *Febs Lett*. 1995; 358: 1.
80. Klauning Je, Xu Y, Isenberg Js Et Al. Toxicological Defence Mechanisms And The Shape Of Dose Response Relationships. *Environ.Healt.Perspect*. 1995; 106(1): 289.

81. Kolaycıoğlu, L., Serpek, B., Nizamlioğlu, M., Başpınar, N., Tiftik, A.M. Biyokimya. 2. Baskı. Ankara. Nobel Yayınevi; 2000: 300-302.
82. Elizabeth Kaegi, MB, ChB, MSc. Unconventional therapies for cancer: 5. Vitamins A, C and E, on behalf of the Task Force on Alternative Therapies of the Canadian Breast Cancer Research Initiative . CMAJ 1998; 158: 1483-8.
83. Bender, D., A. Nutritional Biochemistry of the Vitamins. First published. New York :Cambridge University Press ;1992.
84. Murracy, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A., Rodwell, V.W.: A Lange Medical Book Proteinlerin ve Aminoasit Azotun Katabolizması (Çev: Menteş G., Esöz B. Harper'in Biyokimyası). 22. Baskı. İzmir. Barış Kitabevi 1993; 340-35.
85. Aksoy, M. Beslenme Biyokimyası. 1. Baskı. Ankara: Hatiboğlu Yayınevi; 2000.
86. Champe, P.C., Harvey, R.A. Lippincott's Illustrated Reviews Serisinden Biyokimya. 2. Baskı. Nobel Tıp Yayınları 1997; 330-352.
87. Byers, T., Perry, G.: Dietary Carotenes, Vitamin C, and Vitamin E as Protective Antioxidants in Human Cancers. Annu. Rev. Nutr. 1992; 12: 139 -159
88. Glatthaar, B.E., Hornig, D.H., Moser, U. The Role of Ascorbic Acid in Carcinogenesis. Adv. Exp. Med. Biol. 1986; 206: 357 – 377.
89. Birt, D.F. Effects of the Intake of Selected Vitamins and Minerals on Cancer Prevention. Magnesium 1989; 8: 17 – 30.
90. Hansson, L.E., Nyren, O., Bergström, R., Wolk, A., Lindgren, A.: Nutrients and Gastric Cancer Risk. A Population – Based Case-Control Study in Sweden. Int.J.Cancer 1994; 57: 638 – 644.
91. Rathbone, B.J., Johnson, A.W., Wyatt, J.I., Kelleher, J., Heatley, R.V., Losowsky, M.S. Ascorbic Acid. A Factor Concentrated in Human Gastric Juice. Clin. Science 1989; 76: 237 – 241.

92. Schorah, C.J., Sobala, G.M., Sanderson, M., Collis, N., Primrose, J.N. Gastric Juice Ascorbic Acid: Effect of Disease and Implications for Gastric Carcinogenesis. *Am.J.Clin.Nutr.* 1991; 53: 287–293.
93. Sobala, G.M., Crabtree, J.E., Dixon, M.F., Schorah, C.J., Taylor, T.D., Rathbone, B.J., Heatley, R.V., Axon, A.T.R.: Acute Helicobacter Pylori Infection: Clinical Features, Local and Systemic Immune Response, Gastric Mucosal Histology, and Gastric Juice Ascorbic Acid Concentrations. *Gut* 1991; 32: 1415 – 1418.
94. Darr, D., Combs, S., Dunston, S., Manning T., Pinnel, S.: Topical Vitamin C Protects Skin from Ultraviolet Radiation – Induced Damage. *Br.J.Dermatol.* 1992; 127: 247 – 253.
95. Keino, H., Mimura, S., Nagae, H., Banno, T., Kashiwamata, S. Protection by L-Ascorbic Acid Against Phototoxicity in Tin-Protoporphyrin-Treated Suckling rats. *Biol. Neonate* 1993; 63: 183-190 .
96. Shindo, Y., Witt, E., Packer, L.: Antioxidant Defense Mechanisms in Murine Epidermis and Dermis and Their Responses to Ultraviolet Light. *J.Invest. Dermatol.* 1993; 100: 260 – 265.
97. Gershoff, S.N. Vitamin C (Ascorbic Acid): New Roles, New Requirements *Nutr. Rev.* 1993; 11: 313 – 326.
98. Öter Ş., Korkmaz A. Hiperbarik Oksijen ve Antioksidan Vitamin Kombinasyonunun Deneyisel Random-Patern Deri Fleplerindeki Canlı Doku Alanına Etkisi. *T Klin Tıp Bilimleri* 1998; 18: 299-303.
99. Mayes, P.A., “Structure and Function of the Water-soluble Vitamins”, In: Murray R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A., Rodwell, V.W., Harper’s Biochemistry. 23. ed. London. Lange Medical Publication. 1993; 573-587.
100. Tietze, N.W., Sounders, W.B. *Clinical Chemistry*, Washington Square Filedelfiya P.A. 1986; 932–938, 960–962, 1850–1851.

- 101.** Tuchschnid, P. Et al: Biochemical Role and Clinical Significance of Vitamin E in Red Cell Membranes. In: Stern, L (ed) : Physiological Foundations of Perinatal Care, (Çev.: Egemen, A. Vitaminlerin Sağlığımızdaki Önemi) Vol. 2. in Pres, İstanbul, New York. Elsevier Science Publ. Co.;1986: 70–83.
- 102.** Nevberne P. M. anedcorner M. W. The Vitamins. Ed. Koneko J. J. In: "Clinical Biochemistry of Domestic Animals" 4 th ed, AcademicPress Inc New York,1989; 796 – 834.
- 103.** Chow C. K. Vitamin E and Blod Wld. Rew. Nutr. Diet. 1985; 45: 133 – 166.
- 104.** Siddons R. C. and Mills C. F. Glutathione Peroxidase Activity and Eryrocyte Stability in Calves Differing in Selenium and Vitamin E Status. Brit. J. Nutr. 1981; 46: 345 – 355.
- 105.** Aksakal M., Çay M., Nazıroğlu M. Ratlarda E Vitamininin Alveolar ve Peritonal Makrofajların Fagositik Aktivitesi Üzerindeki Etkisi. F.Ü.Sağ. Bil. Derg. 1997;11(2):183 – 189.
- 106.** Stratton S. P. And Liebler D. C. Determination of Siglet Oxygen-Specific Versus Radical-Mediated Lipid Peroxidation in Photosensitized Oxidation of Lipid Bilayers; Effect of Beta-Carotene and Alfa-Tokoferol. Biochem. 1997; 36: 42,12911–12920.
- 107.** Hogan J. S., Weiss W. P., Smith K. L., Soridillo L. M. and Williams S. N. Alfa-Tokoferol Concentrations in Milk and Plasma During Clinical Escherichia Coli Mastitis. J. Dairy Sci. 1996; 79: 71 -75.
- 108.** Atalay, N., G. Sıçanlarda Akut ve Kronik Egzersizde Askorbik Asit Yüklemesinin Lipid Peroksidasyona ve Antioksidan Systeme Etkisi. Doktora Tezi. Ankara: Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü tTıp Fakültesi Fizyoloji ABD; 2001.
- 109.** Ergönül, Z., Balkancı, D., Erdem, A., Çakar, N., Atilla, P. Sülfür Dioksit ve Sülfür Diokside Maruz Kalan Farelerde E Vitamini ve N-Asetilsisteinin Işın Mikroskobu İle İncelenmesi. T Klin J Med Sci. 2001;21 (3): 186-191.

110. Casini A, Ferrali M, Pompella A: Lipid peroxidation and cellular damage in extrahepatic tissue of bromobenzene intoxicated mice, *Am. J. Pathol.* 1986; 123, 520-531.
111. Elman, G.,L. Tissue Sulfhydryl Groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 1959; 82: 70-77.
112. Sun Y., Oberley L. W., Elwell J. H., Sierra-Rivera E. A Simple Method For Clinical Assay Of Superoxide Dismutase. *Clin. Chem.* 1988; 34 (3): 497-500.
113. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Far AL, Randall RJ, et al. Protein measurement with folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193: 265-275.
114. Liu, J., Zhang, X., Yang, F., Li, T., Wei, D., Ren, Y. Antimetastatic Effect Of A Lipophilic Ascorbic Acid Derivative With Antioxidation Through Inhibition Of Tumor Invasion. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2006; 57: 584–590.
115. Nair, BK., and Deome K.B: A Growth Stimulating Factor Released by Cultured Mouse Mammary Tumor Cells. *Cancer. Res.* 1973; 33: 2754-2760.
116. Al-Sowyan NS. Difference In Leptin Hormone Response To Nutritional Status In Normal Adult Male Albino Rats. *Pak J Biol Sci.* 2009 15; 12 (2): 119-26.
117. Campión, J., Milagro, FI., Fernández D, Martínez JA. Differential Gene Expression And Adiposity Reduction Induced By Ascorbic Acid Supplementation In A Cafeteria Model Of Obesity. *J Physiol Biochem.* 2006; 62 (2): 71-80.
118. Mazumder, U.K., Kumar, R.S., Sivakumar, T. and Lakshmi, M . Antitumor Activity and Antioxidant Status of *Caesalpinia bonducella* Against Ehrlich Ascites Carcinoma in Swiss Albino Mice *J Pharmacol Sci.* 2004; 94: 177 – 184.
119. Obajimia, O., Kenneth, D.B., Glenb, L. And L., Rossc, B.M. Antioxidant Modulation Of Oxidant-Stimulated Uptake And Release

Of Arachidonic Acid In Eicosapentaenoic Acid-Supplemented Human Lymphoma U937 Cells. Elsevier Ltd All Rights Reserved. February 2007; 76 (2): 65-71.

120. Gardell, S.E., Dublin A.E. and Chun, J. Emerging Medicinal Roles For Lysophospholipid Signaling, Trends Mol. Med. 2006: 65-75.
121. Fleury C, Mignotte B, Vayssiere JL. Mitochondrial Reactive Oxygen Species In Cell Death Signaling. Biochimie. 2002; 84: 131–41.
122. Kang, Y.H., LEE, E., Moon-Kyung CHOI, KU, L., KIM, S.H., PARK, Y.G. and LIM, S.J. Role Of Reactive Oxygen Species In The Induction Of Apoptosis By Alfa-Tocopheryl Succinate. Int. J. Cancer, 2004; 112; 385–392.
123. Poydock ME, Fandon JC, Gallina D, Ferro V, Heher C. Inhibiting effect ofvitamins C and B12 on the mitotic activity ofascites tumors. Exp Cell Biol 1979; 47: 210-7.
124. Poydock, M.E. Effect Of Combined Ascorbic Acid And B-12 On Survival Of Mice With Implanted Ehrlich Carcinoma And L1210 Leukemia. Am J Clin Nutr 1991; 54: 1261-5.
125. 198 Yuana, L., And Kaplowitzc, N. Glutathione In Liver Diseases And Hepatotoxicity. 2009; 30 (1-2): 29-41.
126. Guaiquil, Vh., Vera, Jc., Golde, Dw. Mechanism Of Vitamin C Inhibition Of Cell Death Induced By Oxidative Stress In Glutathione-Depleted HL-60 Cells. J Biol Chem. Nov 2001 ;276 (44): 40955-61.
127. W.C. You, L. Zhang, M.H. Gail, Y.S. Chang,W.D. Liu, J.L. Ma, J.Y. Li, M.L. Jin, Y.R. Hu, C.S. Yang, M.J. Blaser, P. Correa, W.J. Blot, J.F. Fraumeni, G.W. Xu, Gastric Cancer: Helicobacter Pylori, Serum Vitamin C, And Other Risk Factors, J. Natl. Cancer Inst. 2000; 92: 1607–1612.

- 128.** Guaiquil VH, Vera JC, Golde DW. Mechanism of vitamin C inhibition of cell death induced by oxidative stress in glutathione-depleted HL-60 cells. *J Biol Chem.* 2001; 276 (44): 40955-61.
- 129.** D. Dreher, A.F. Junod, Role of oxygen free radicals in cancer development, *Eur. J. Cancer.* 1996; 32A: 30–38.
- 130.** Sun Y., Oberley L. W., Elwell J. H., Sierra-Rivera E., *Int. J. Cancer*, 1989; 44: 1028-1033.

10. EKLER

EK-1: TEŞEKKÜR

G.Ü. Tıp Fakültesi Fizyoloji AD' de ki yüksek lisans eğitimim boyunca bana her konuda göstermiş oldukları yardım ve destekten ötürü Prof. Dr. Deniz Erbaş' a, Prof. Dr. Lamia Pınar' a, Prof. Dr. Sibel Dinçer' e, Prof. Dr. Eser Öz Oyar' a, Doç. Dr. Kazime Gonca Akbulut' a ve Doç. Dr. Çiğdem Özer' e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam süresince bilgi ve deneyimlerini aktararak, çalışmalarımın alt yapısını ve planlamasını oluşturarak üzerimde sonsuz emeği olan, desteğini esirgemeyen tez danışmanım ve değerli hocam Prof. Dr. Aydan BABÜL' e sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi değerli hocam Nedret KILIÇ' a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım boyunca, yardımlarını, emeklerini benden esirgemeyen güzel arkadaşlarım Dr. Şevin Güney' e, Dr. Osman Fuat Sönmez' e, Araş. Gör. A. Şebnem İlhan' a, Duygu Tozcu' ya, Ayhan Korkmaz' a sonsuz teşekkür ederim.

Yaşamımın her anında sonsuz sevgileri, emekleri ve destekleriyle yanımda olan çok değerli aileme tüm kalbimle teşekkür ederim.

EK-2: ETİK KURUL KARARI



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
REKTÖRLÜĞÜ
Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanlığı

SAYI : B.30.2.GÜN.0.EU.00.00/14-21240
KONU:

27.12.2007

Sayın

Prof.Dr.Aydan BABÜL
Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
Fizyoloji Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi

G.Ü.ET-07.067 kod numaralı ve "Erlili Asit Tümörlü Farelerde Oksidan Stres'in İncelenmesi" başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi saygılarımla rica ederim.

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-07.067 and entitled "An investigation into the oxidant stres in mice bearing Ehrlich Ascites tumor" is in compliance with Gazi University Ethical Council regulations.

With my best regards.

Prof.Dr.Gökhan ALPASLAN
Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanı
Chairman
Gazi University Experimental Animals Ethical Council

Prof.Dr.Engin ÇALGÜNER

Prof.Dr.Nedret KILIÇ

Prof.Dr.Sevil PEHLİVAN

Prof.Dr.Deniz ERDOĞAN

Prof.Dr.Deniz ERBAŞ

Prof.Dr.Fatma AKAR

Prof.Dr.Altan DOĞAN

Doç.Dr.Nesrin ÇOBANOĞLU

Uzman Dr.Şeyda DİKER

11. ÖZGEÇMİŞ

Adı: İlknur
Soyadı: Karayel
Doğum Yeri ve Tarihi : Kırıkkale / 3 Eylül 1980

EĞİTİMİ:

2006 – 2009 Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü;
Fizyoloji Anabilim Dalı
(Yüksek Lisans Eğitimi)

2000 – 2004 Gazi Üniversitesi Çorum Sağlık
Yüksek Okulu;
Hemşirelik Bölümü
(Lisans Eğitimi)

1995 – 1999 Gölbaşı Sağlık Meslek Lisesi
Hemşirelik Bölümü (Ank)

1992 – 1995 Atasülün İlköğretim Okulu (Ank)

1987 – 1992 Fahri Çağdağ İlköğretim Okulu (Ank)

Yabancı Dili: İngilizce