

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

N-NİTROZODİETİLAMİN'İN (NDEA) RAT KARACİĞER DOKULARINDA  
DNA TURN-OVER'INDA GÖREV ALAN ENZİM AKTİVİTELERİ ÜZERİNE  
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI: ELLAJİK ASİDİN ETKİSİ

UZMANLIK TEZİ  
Dr. ASLIHAN ÇAVUNT BAYRAKTAR

TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. MUSTAFA KAVUTÇU

ANKARA  
OCAK 2011

|                                                                   |             |
|-------------------------------------------------------------------|-------------|
| <b>İÇİNDEKİLER</b>                                                | <b>i</b>    |
| <b>Teşekkür</b>                                                   | <b>v</b>    |
| <b>Kısaltmalar</b>                                                | <b>vii</b>  |
| <b>Şekil, tablo ve grafik listeleri</b>                           | <b>viii</b> |
| <b>1. <u>GİRİŞ</u></b>                                            | <b>1</b>    |
| <b>2. <u>GENEL BİLGİLER</u></b>                                   | <b>2</b>    |
| <b>2.1. Kanser</b>                                                | <b>2</b>    |
| <b>2.1.1.Kanserin Tanımı</b>                                      | <b>2</b>    |
| <b>2.1.2.Kanserin Gelişimi ve Nedenleri</b>                       | <b>2</b>    |
| <b>2.2. Kimyasal Karsinogenez</b>                                 | <b>5</b>    |
| <b>2.2.1.Kimyasal Karsinogenezin Tanımı</b>                       | <b>5</b>    |
| <b>2.2.2.Kimyasal Karsinogeneze Tarihsel Bakış</b>                | <b>6</b>    |
| <b>2.2.3.Kimyasal Karsinojenlerin Sınıflandırılması</b>           | <b>8</b>    |
| <b>2.2.4.Karsinogenezin Evreleri</b>                              | <b>12</b>   |
| <b>2.2.4.1.Başlangıç Safhası (İnisiyasyon)</b>                    | <b>14</b>   |
| <b>2.2.4.2.İlerleme Safhası</b>                                   | <b>16</b>   |
| <b>2.2.4.3.Progresyon Safhası</b>                                 | <b>17</b>   |
| <b>2.2.5.Kimyasal Karsinojenlerin Absorbsiyonu ve Metabolizma</b> | <b>18</b>   |
| <b>2.2.6.Kimyasal Karsinojenlerin Moleküler Hedefleri</b>         | <b>22</b>   |
| <b>2.2.7.Kimyasal Karsinojenlerin Potensi</b>                     | <b>26</b>   |
| <b>2.3. N-Nitrozodietilamin (NDEA)</b>                            | <b>30</b>   |
| <b>2.3.1.NDEA'nın Fiziksel Özellikleri</b>                        | <b>31</b>   |

|                                                           |           |
|-----------------------------------------------------------|-----------|
| <b>2.3.2.NDEA’nın Toksik Etkileri</b>                     | <b>31</b> |
| <b>2.3.2.1.Akut Toksik Etkileri</b>                       | <b>31</b> |
| <b>2.3.2.2.Kronik Toksik Etkileri</b>                     | <b>31</b> |
| <b>2.3.3.NDEA Maruziyeti Oluşumu</b>                      | <b>32</b> |
| <b>2.3.4.N Nitrozo Bileşiklerinin Metabolizması</b>       | <b>34</b> |
| <b>2.4. Kanserin Önlenmesi</b>                            | <b>35</b> |
| <b>2.4.1.Diyetle Kanserin Önlenmesi</b>                   | <b>35</b> |
| <b>2.4.2.Kimyasal Ajanlarla Kanserden Korunma</b>         | <b>38</b> |
| <b>2.4.2.1.Kimyasal Koruyucuların Moleküler Hedefleri</b> | <b>40</b> |
| <b>2.4.2.2.Kimyasal Koruyucuların Sınıflandırılması</b>   | <b>42</b> |
| <b>2.4.3.Ellajik Asit (EA)</b>                            | <b>43</b> |
| <b>2.4.3.1.EA’nın Fiziksel Özellikleri</b>                | <b>43</b> |
| <b>2.5. Kanser ve Pürin Nükleotid Metabolizması</b>       | <b>46</b> |
| <b>2.5.1.Kurtarma Yolları (Salvaj Yollar)</b>             | <b>49</b> |
| <b>2.5.2.Pürin Nükleotidlerin Yıkımı (Katabolizma)</b>    | <b>51</b> |
| <b>2.6. DNA Turn-Over Enzimleri</b>                       | <b>53</b> |
| <b>2.6.1.Adenozin Deaminaz (ADA) Enzimi</b>               | <b>53</b> |
| <b>2.6.1.1.ADA’nın Yapısı</b>                             | <b>53</b> |
| <b>2.6.1.2.ADA’nın Görev Aldığı Reaksiyonlar</b>          | <b>54</b> |
| <b>2.6.1.3.ADA’nın İzoenzimleri</b>                       | <b>55</b> |
| <b>2.6.1.4.ADA’nın Lokalizasyonu</b>                      | <b>56</b> |
| <b>2.6.1.5.ADA’nın Substratları</b>                       | <b>56</b> |
| <b>2.6.1.6.dATP Birikmesinin Metabolik Sonucu</b>         | <b>57</b> |

|                                                                    |           |
|--------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.6.2.5' Nükleotidaz Enzimi (5'NT)                                 | 57        |
| 2.6.3.Ksantin Oksidaz Enzimi (XO)                                  | 60        |
| 2.6.3.1.XDH'nın XO'ya Dönüşümü                                     | 62        |
| 2.6.3.2.XOR Aktivitesinin Düzenlenmesi                             | 62        |
| 2.6.3.3.XOR Enziminin Fizyolojik Fonksiyonları                     | 63        |
| 2.6.4.Guanozin Deaminaz (Guanaz) Enzimi (GUA)                      | 64        |
| <b>3. <u>GEREC VE YÖNTEM</u></b>                                   | <b>66</b> |
| 3.1. Deney Hayvanlarının Hazırlanması                              | 66        |
| 3.2. Kullanılan Aletler                                            | 68        |
| 3.3. Yöntemlerin Uygulanması                                       | 69        |
| 3.3.1.Adenozin Deaminaz(ADA) Aktivitesinin Tayini                  | 69        |
| 3.3.2.Guanaz (GUA) Aktivitesinin Tayini                            | 70        |
| 3.3.3.Ksantin Oksidaz Aktivitesinin Tayini                         | 73        |
| 3.3.4.5'Nükleotidaz Aktivitesinin Tayini                           | 73        |
| 3.3.5.Total Protein Aktivitesinin Tayini                           | 76        |
| 3.3.6.Diğer Biyokimyasal Parametrelerin Ölçümü                     | 77        |
| 3.4. Dokuların Histopatolojik Değerlendirilmesi                    | 78        |
| 3.5. İstatistiksel Analiz                                          | 78        |
| <b>4. <u>BULGULAR</u></b>                                          | <b>79</b> |
| 4.1. Karaciğer Fonksiyonlarını Gösteren Parametrelere Ait Bulgular | 80        |
| 4.1.1.Rat Serum AST Aktiviteleri                                   | 80        |

|                                                  |     |
|--------------------------------------------------|-----|
| 4.1.2.Rat Serumu ALT Aktiviteleri                | 80  |
| 4.1.3.Rat Serumu GGT Aktiviteleri                | 81  |
| 4.1.4.Rat Serumu Albümin Düzeyleri               | 81  |
| 4.2. Rat Serumu DNA Turn-Over Enzim Aktiviteleri | 84  |
| 4.2.1.Rat Serumu ADA Aktiviteleri                | 84  |
| 4.2.2.Rat Serumu Guanaz Aktiviteleri             | 84  |
| 4.2.3.Rat Serumu 5'NT Aktiviteleri               | 85  |
| 4.2.4.Rat Serumu XO Aktiviteleri                 | 85  |
| 4.3. Histopatolojik Analiz Bulguları             | 87  |
| 5. <u>TARTIŞMA</u>                               | 91  |
| 6. <u>SONUC</u>                                  | 106 |
| 7. <u>KAYNAKLAR</u>                              | 108 |
| 8. <u>ÖZET</u>                                   | 137 |
| 9. <u>SUMMARY</u>                                | 139 |
| 10. <u>ÖZGEÇMİŞ</u>                              | 141 |

## **Teşekkür**

Uzmanlık eğitimim boyunca iyi niyet, hoşgörü, sabır ve anlayışla emeğini ve bilgisini esirgemeyen, biyokimya bilimini bana sevdiren ve önemini öğreten değerli hocam Prof. Dr. Mustafa Kavutçu'ya, bilimsel anlamda çalışmalarımızı sorgulamaya teşvik eden ve bizlere farklı bakış açıları kazandıran Prof. Dr. Orhan Canbolat'a, çalışkanlığı ve mütevazı kişiliği ile bizlere örnek olan, bilgi, deneyim ve her anlamda destekleri ile iyi bir uzman olarak yetişmemizdeki çabaları için Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Hatice Paşaoğlu'na;

Tez çalışmalarına destek ve katkılarından dolayı Gazi Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezi (GÜDAM) müdürü Prof. Dr. Nurten Türközkan ve tüm GÜDAM çalışanlarına, Öğr. Gör. Dr. Şehri Elbeğ'e, Dr. Gökçe F. Atikeler'e, Dr. Ümmügülsüm Yıldız'a, Dr. Muhammed Talat'a, ve merkez laboratuvarı çalışanlarına;

Güleryüzle, samimiyetle ve karşılık beklemeden yardımına koşan asistan arkadaşlarım Dr. Ayşe F. Tuncel'e, Dr. Uğur Erçin'e, Dr. Ulaş Gürakan'a, Dr. Sevim E. Eren'e, Dr. M. Zahid Çıracı'ya, Dr. Handan Nalbant'a ve Dr. Fatma Çıbık'a;

Hayatım boyunca her zaman insanlığa yararlı olmam için beni teşvik eden, yoluma ışık tutan, her zaman tüm imkanlarını sonuna kadar kullanarak maddi ve manevi yönden yanımda olan canım anneciğim ve babacığım, kardeşlerim Neslihan ve Yavuz Selim'e ve babaanneciğime;

Sabır ve anlayışla hiç bir fedakarlıktan kaçınmadan bu zor ve güzel süreci benimle paylaşan, hayatıma tad ve neşe katan sevgili eşim Dr. Serdar Bayraktar’a ve bu yıl aramıza katılacak olan ailemizin yeni üyesi miniciğıme şükranlarımı ve sevgilerimi sunarım.

Dr. Aslıhan Çavunt Bayraktar

## **Kısaltmalar**

ALT: Alanin Amino Transferaz

AST: Aspartat Amino Transferaz

ADA: Adenozin Deaminaz

AMP: Adenozin Monofosfat

ATP: Adenozin Trifosfat

CDP: Sitidin Difosfat

CTP: Sitidin Trifosfat

Cyt P450: Sitokrom P450

dATP: Deoksi Adenozin Trifosfat

dAMP: Deoksi Adenozin Monofosfat

DNA: Deoksi Ribonükleik Asit

EA: Ellajik Asit

GDA: Guanin Deaminaz

GUA: Guanaz

GGT: Gama Glutamil Transferaz

NDEA: N Nitrozodietilamin

5'NT: 5' Nükleotidaz

RNA: Ribonükleik Asit

ROT: Reaktif Oksijen Türleri

RNT: Reaktif Nitrojen Türleri

SR: Serbest Radikaller



## **Şekil listesi**

Şekil 1. Malign bir hücrenin özellikleri

Şekil 2. Bolt'a göre kimyasal karsinogenlerin sınıflandırması

Şekil 3. Kimyasal Karsinogenez Basamakları

Şekil 4. Kimyasal bileşenlerin metabolik aktivasyonu ve karsinogenlerin genotoksik non-genotoksik özellikleri

Şekil 5. Hücre siklusu ve moleküler hedefler (onkogenler ve tümör baskılayıcı genler) tarafından kontrolü

Şekil 6. N-Nitrozodietilamin'in Kimyasal Yapısı

Şekil 7. N-Nitrozo Bileşiklerinin Metabolizması

Şekil 8. Diyetle alınan fitokimyasalların meme kanserini önlemede etkisi

Şekil 9. Ellajik Asitin kimyasal yapısı

Şekil 10. Pürinlerin de-novo sentezi

Şekil 11. IMP'nin AMP ve GMP'ye çevrilmesi

Şekil 12. Nükleozid monofosfatların nükleozid difosfatlar ve nükleozid trifosfatlara çevrilmesi

Şekil 13. Adenin adenin fosforiboziltransferaz katalizlenen fosforibozilasyonu

Şekil 14. Hipoksantin ve guaninin sırasıyla IMP ve GMP vermek üzere fosforibozilasyonu

Şekil 15. Pürin yıkım yoluyla ürik asitin oluşması

Şekil 16. ADA'nın katalizlediği tepkimeler

Şekil 17. Guanin Deaminaz'ın katalizlediği tepkime

### **Tablo listesi**

Tablo 1. Kimyasal Karsinogenlerin Sınıflandırması

Tablo 2. Kimyasal karsinogenezi kontrol eden ve değiştiren faktörler

Tablo 3. Kimyasal koruyucu ajanların farmakolojik ve kimyasal yapıya göre sınıflandırılması

Tablo 4. 5' nükleotidaz ailesi ve doğal substratları

Tablo 5. XOR aktivitesinin düzenlenmesi

Tablo 6. XOR enziminin fizyolojik fonksiyonları

Tablo 7. Serum Karaciğer Fonksiyon Testleri Sonuçları

Tablo 8. ADA, GU, 5'NT ve XO enzim aktiviteleri

### **Grafik listesi**

Grafik 1. Pi Standart Grafiği

Grafik 2. Protein Standart Grafiği

Grafik 3. Tüm gruplara ait serum AST (ıu/l) enzimi aktiviteleri

Grafik 4. Tüm gruplara ait serum ALT (ıu/l) enzimi aktiviteleri

Grafik 5. Tüm gruplara ait serum GGT (ıu/l) enzimi aktiviteleri

Grafik 6. Tüm gruplara ait serum Albumin (gr/dl) düzeyleri

Grafik 7. Tüm gruplara ait sonuçların karşılaştırılması I

Grafik 8. Tüm gruplara ait serum ADA (ıu/mgprotein) enzimi aktiviteleri

Grafik 9. Tüm gruplara ait serum Guanaz (ıu/mgprotein) enzimi aktiviteleri

Grafik 10. Tüm gruplara ait serum 5'NT (ıu/mgprotein) enzimi aktiviteleri

Grafik 11. Tüm gruplara ait serum XO (ıu/mgprotein) enzimi aktiviteleri

Grafik 12. Tüm gruplara ait sonuçların karşılaştırılması II

## **Resim Listesi**

Resim 1. Deneyin yapıış süreci

Resim 2. NDEA grubuna ait rat karaciğerinin histolojik kesiti

Resim 3. Kontrol grubuna ait rat karaciğerinin histolojik kesiti

Resim 4. EA grubuna ait rat karaciğerinin histolojik kesiti

Resim 5. EZ grubuna ait rat karaciğerinin histolojik kesiti

Resim 6. P grubuna ait rat karaciğerinin histolojik kesiti

## **1. GİRİŞ**

Kanser, günümüzde görülme sıklığı hızla artan, ciddi mortalite ve morbiditeye sebep olan önemli bir sağlık sorunudur. Kanser tanısı almak, hasta ve hasta yakınları için hayatlarında hem maddi hem de manevi açıdan birçok değişikliğe yol açan, yaşam kalitesini olumsuz etkileyen zorlu bir sürecin başlangıcıdır. Kansere neden olan etkenlerin belirlenerek koruyucu ve erken tanı sağlayıcı yöntemlerin geliştirilmesi, kanserli hastaların tanı ve tedavi sürecinin maliyeti, iş gücü kaybı ve benzeri sorunlar dikkate alındığında sağlık hizmetleri açısından son derece önemli bir yere sahiptir.

Kanser oluşumunu tetikleyen birçok faktörün varlığı bilinmektedir. Bu faktörlerden birinin de serbest radikaller (SR) olduğu kabul edilmektedir. Serbest radikaller; lipidler, karbohidratlar ve benzeri makromoleküllere etki ederek ya kendi radikalik ara ürünlerini ya da oksijen ve/veya azot kökenli radikal yapıları ara ürünleri oluşturmaktadır. Buna benzer şekilde, radikallerin Deoksi Ribonükleik Asit (DNA) yapısında hasar oluşturmak suretiyle kanser gelişiminin başlangıç, ilerleme/metastaz evrelerinde etkili olabildiği yönünde değişik yayınlar vardır.

Bu araştırmada serbest radikal aracılı DNA hasarına yol açarak, çeşitli organ ve dokularda karsinogeneze sebep olduğu bilinen N-nitrozodietilamin ratlara verilerek, karaciğer dokularında DNA turn-over'ında görev alan enzim aktiviteleri araştırıldı. Ayrıca, son yapılan çalışmalarda antioksidan, antimutajenik ve antikanserojen etkileri ortaya çıkarılan fitokimyasal bir madde olan Ellajik Asit'in (EA) DNA turn-over'ında görev alan enzim aktiviteleri üzerine etkisi yönünden profilaktik ve tedavi edici etkiye sahip olup olmadığı incelendi.

## **2. GENEL BİLGİLER**

### **2.1 Kanser**

#### **2.1.1 Kanserin Tanımı**

Kanser, gen ekspresyonunda çoklu değişikliklerin sebep olduğu, hücre proliferasyonu ve hücre ölümü arasındaki dengenin bozulması ile çevre dokulara invaze olabilen, uzak organ ve dokulara metastaz yapabilen, önemli morbiditeye ve eğer tedavi edilmezse konağın ölümüne neden olabilen, anormal hücre büyümesidir. (1)

#### **2.1.2 Kanserin Gelişimi ve Nedenleri**

Kanser oluşumunda en önemli soru kanseri oluşturan hücresel değişikliklere sebep olan etken ya da etkenlerin neler olduğudur. Eğer bu değişikliklerin gerçek sebepleri bilinirse, kanseri üreten faktörlerin eliminasyonu ile daha iyi tedavi modalitelerinin geliştirilmesi sağlanabilecek ve kanserin önlenmesi gerçekleşecektir. Kanserlerin insidans hızı, çevresel faktörler ve yaşam tarzı ile güçlü şekilde ilişkilidir. (2)

Kanser gelişiminden sorumlu faktörler ekzojen ve endojen olarak sınıflandırılmıştır. (3)

Ekzojen nedenler arasında; diyet alışkanlıkları (gıdaların saklanması ve hazırlanması), sosyoekonomik düzey, yaşam biçimi, fiziksel ajanlar (iyonize ve non-iyonize radyasyon), kimyasal bileşikler (doğal ve sentetik), biyolojik ajanlar (*Helicobacter pylori*, EBV(Ebstein Barr Virüs), HTLV(İnsan T-Lymphotropic Virus) I ve II, HPV(İnsan Papiloma virüsü), HBV(Hepatit B Virüsü), *Schistosoma*

haemotobium, Clonorchis sinensis ve Opisthorchis vivarium) gibi çevresel faktörler sorumlu tutulmaktadır. (3)

Aşırı alkol tüketimi, tütün ve ilişkili ürünlerin inhalasyonu, bazı gıdaların tüketilmesi ve bunların mikotoksinlerle kontaminasyonu gibi sağlıksız yaşam biçimi alışkanlıkları da yine ekzojen faktörler olarak, bazı neoplazi tiplerindeki yüksek insidansın sorumludur. (3)

Endojen faktörler ise; immun sistem hasarı, kesin olmayan etyolojiye bağlı inflamatuvar rahatsızlıklar (ülseratif kolit, pankreatit vb), genetik nedenler, yaş, endokrin denge ve fizyolojik şartları kapsar. (3) Kanser insidansı ile ilgili epidemiyolojik çalışmalar kanser gelişme riskinin popülasyon grupları arasında yaşam biçimi alışkanlıklarına bağlı olarak farklılık gösterdiğini ortaya koymuştur. (3)

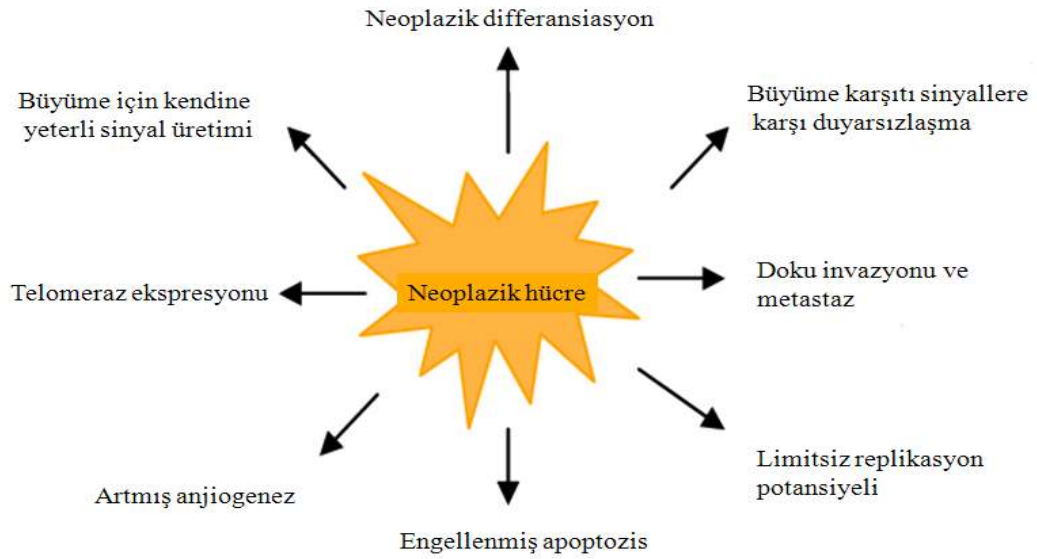
Popülasyon göçü de yine belirli coğrafik bölgelerin tipik kanser tipleri gelişiminde artışla kendini gösterir. (3)

Bazı meslek gruplarında, çalışma ortamındaki çeşitli kimyasal maddelerle belirli neoplazilerin gelişimi arasındaki ilişki karsinogenezin biyopatolojik sürecini daha iyi anlamaya yönelik deneysel model kavramına öncülük eder. (3)

Çoğu vakada kanser yaşlanmanın sonucudur. Lösemiler ve sarkomlar gibi çocukluk çağı malignansileri dışında kanser insidansı yaşla artar. Malign kanserlerin büyük bir kısmı DNA'nın yaşam boyu uğradığı hasarların birikmesi sonucu gelişir ve ortalama tanı yaşı 65'tir. Erişkinlerde sık görülen çoğu solid tümör 45 yaşından sonra ortaya çıkmaya başlar ve kolorektal kanserde olduğu gibi

yaşla logaritmik artış devam eder. Yaşla tümör insidansı artışı çoklu hücresel hasar fikrini gündeme getirmiştir. Bu hasarların çoğunun başlangıçta DNA'daki baz değişikliği ya da kromozomal hasardan kaynaklandığı ve mutasyonel kökenli olduğu düşünülür. Tam olarak invaziv kansere progresyon için çoklu hasar olması gerekir. Bu hasarlar; kimyasallar ve radyasyon gibi çevresel ajanlara genetik yatkınlığa, bakteriyel, viral, parazitik enfeksiyonlara ya da endojen olarak üretilen oksijen radikallerine bağlı olarak meydana gelir. (2)

Kanserin belirli büyüme karakteristikleri vardır. Bunlar kontrolsüz şekilde büyüme, çevre dokulara invaze olma ve metastaz yolu ile yayılımdır.



**Şekil 1. Malign bir hücrenin özellikleri (3)**

Mikroskopik olarak incelendiğinde; kanser hücrelerinin normal hücrelere göre daha az differansiye olduğu, büyük nükleus ve nükleolus gibi ayırıcı

özelliklere sahip olduğu gözlenmiştir. Çoğu kanser bir karsinojenin yaptığı değişikliklere bağlı olarak tek hücre klonundan gelişir. Başlangıçtaki hasar ile klinik olarak tespit edilebilen tümörün ortaya çıkışı arasında bazı vakalarda 20 yıl kadar uzun sürebilecek bir latent periyod vardır. İlk başta konağın savunma mekanizmaları tarafından tümör oluşumu sınırlandırılabilir. Tümör oluşumu ve progresyonu için latent dönem esnasında hücresel proliferasyon meydana gelmelidir. Bu aşamada tümör hücreleri konağın savunma mekanizmalarından kaçabilmeli ve sonuçta büyüyen tümör vaskülarize olabilmelidir. (2)

Kanser hücrelerinin genetik instabilitesi; sıklıkla daha agresif olarak büyüyen embriyonik fenotipin özelliklerini taşıyan kötü differansiye hücrelerle karakterize tümörün ortaya çıkmasına öncülük eder. Tümör progresyonu sırasında başlangıçta bütün neoplazik hücreler tek anormal hücreden gelişmesine rağmen büyüyen tümörde ve metastazlarında dikkate değer şekilde biyokimyasal heterojenite görülür. Tümörün başlangıç ve progresyonunu açıklamaya çalışan her teori bu ilkeleri göz önünde bulundurmalıdır. (2)

## **2.2. Kimyasal Karsinogenez**

### **2.2.1. Kimyasal Karsinogenezin Tanımı**

“Karsinojenik” kelimesi bir bileşiğin uygun şartlar altında insanlarda ve hayvanlarda çeşitli organ ve dokularda kanser gelişim sürecini başlatma kapasitesi olarak tanımlanmıştır. (4,5)

Karsinogenezin içerdiği farklı mekanizmaların keşfi ile bu tanım şu anda yeterli değildir.



Deneysel bir bakış açısıyla, bir bileşik laboratuvar hayvanlarına uygulandığı zaman, bu maddeye maruz kalmayan kontrol grubundaki hayvanlar ile kıyaslandığında bir ya da daha fazla histolojik neoplazi tipi insidansında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artışı indüklüyorsa o bileşik karsinojenik olarak değerlendirilmelidir. (6)

### 2.2.2 Kimyasal Karsinogeneze Tarihsel Bakış

Kanser ilk kez Hipokrat tarafından dev yengeç anlamına gelen “Karkinos” sözcüğü ile tanımlanmıştır. Galen ise 2. yy’da neoplazi kelimesini bir vücut alanının doğal yapısının aksine büyümesi olarak ifade etmiştir. (6) Edwin Smith papirusları 17. yy’da memede şişlikten bahsetmiştir. Hayes’e göre, İngiliz cerrah Percivall Pott 1775’te çevresel maddelere maruziyetle kanser gelişimi arasındaki sebepsel ilişkiyi ilk kez tanımlamıştır. Bu yazar Londra’da baca temizleyicilerinde kurumla tekrarlayan lokalize kontaminasyon sonucu skrotum derisinde kanseröz değişikliklerin oluşumunu gözlemlemiştir. Birkaç yıl sonra Danimarkalı baca temizleyicilerine böyle bir oluşumdan kaçınmak için günlük banyoyu tavsiye eden bir rehber dağıtılmıştır. (3,7) 18. yy’da John Hill hastalarında yüksek oranda nazal mukoza kanseri olduğunu saptayarak, bu durumu uzun süre lokalize enfiye maruziyetine bağlamıştır. 1890’da Avrupa’da kimya ve kauçuk sanayiinde çalışan işçilerde mesane kanserinin görülme sıklığında artış olduğu gözlenmiştir. (3,7) 19. yy sonunda bazı kimyasallara mesleki maruziyetin karsinojenik etkileri olduğu kanıtlanmıştır. (3)

Sonraki önemli basamak bu hastalıkları deneysel ortamda oluşturarak sistematik araştırmaların yapılması olmuştur. Kimyasal karsinogenez üzerinde ilk deneysel çalışma 1915'te patolog Katsusaburo Yamagiwa ve asistanı Koichi Ichikawa tarafından yürütülmüştür. (3,7) Bu araştırmacılar yaptıkları çalışmada tavşanların kulaklarına kömür katranı sürerek papillom ve karsinom gelişimini gözlemişlerdir. Bu arada birçok araştırmacı laboratuvar hayvanlarında mesane, böbrek, karaciğer, pankreas ve akciğer karsinogenezi üzerinde çalışma yapmışlardır. Bu alışmalar insan hastalıklarını ilgilendiren deneylerde hayvanların kullanılmasının temellerini ortaya koymuştur. (3)

Takip eden yıllarda Berenblum ve Shubik polisiklik aromatik hidrokarbonları ve kroton yağı farelerde deri karsinogenezi ve kanser gelişiminin basamaklarını araştırmak için kullanmıştır. Düşük dozlarda uygulandığında bu maddelerin hiç birinin kendi başına karsinojenik özelliğinin olmadığını, oysa eşit dozlarda karıştırıldığında neoplazik gelişimini indüklediğini bulmuşlardır. Bu maddelere maruziyetin şekli ve sırasının öneminin açıklanması karsinogenez sürecinin anlaşılması için temel oluşturmuştur. şöyle ki; araştırmacıların çalışma grubunda neoplazi gelişimi önce hidrokarbon ve sonrasında kroton yağı verildiğinde gerçekleşmiş, once kroton yağı verilen grupta neoplazi gelişmemiştir. Yazarlar, bu maddelerin karsinojenik etkisinin normal hücreleri neoplazik hücelere dönüştürmesinde sorumlu olduğunu düşünmüşler ve karsinogenezin kanser gelişimi için bir ya da daha fazla genetik değişim ile başlangıç ve ilerleme fazlarını içeren karmaşık bir süreç olduğunu belirtmişlerdir.

(3)

Sonraki dekatta Foulds (1954) dişi farelerde meme adenokarsinomunda çalışarak progresyon terimini tanımlamıştır. (3)

Watson ve Crick devri öncesinde karsinojenlerin DNA'ya bağlandığı bilinmediğinden kimyasal karsinojenlerin spesifik dokulardaki proteinlerle etkileşerek kansere sebep olduğuna inanılmıştır. (3)

1960'ların sonunda artan kanıtlar belirli bir karsinojenin DNA bağlama kapasitesi ile biyolojik potensi arasındaki ilişkiye işaret etmiştir. (3)

Günümüze kadar artarak devam eden çalışmalar sonucunda bugün elimizde kansere dair bir çok veri olmasına rağmen, karsinogenez hakkında bir çok soru işareti yerini korumaktadır.

### 2.2.3. Kimyasal Karsinojenlerin Sınıflandırılması

Kimyasal karsinojenlerin sınıflandırılması belirli esaslar göz önünde bulundurularak yapılmıştır. Farklı çalışmalardan elde edilen bilgiler karmaşık olduğu için karsinojenik bir bileşiği belli bir gruba dâhil etmek kolay değildir.

Yazarların bir kısmı, karsinojenleri karsinogenez basamaklarındaki fonksiyonlarına göre sınıflandırır. Bu sınıflandırmada adı geçen inkomplet karsinojenler, geri dönüşümsüz DNA hasarını arttıran mutajenik kimyasallardır. (8,9) Komplet bir karsinojen ise eş zamanlı dozaj ve maruziyet zamanına bağlı olarak hem başlatıcı hem de ilerleticilerin özelliklerini göstermelidir. (8,10,11)

Bazı yazarlar da kimyasal karsinojenleri etki mekanizmalarına göre genotoksik ve non-genotoksik olarak (mitojenik ve sitojenik) sınıflandırır.

(12,13,14). Non-genotoksik karsinojenlerin etki mekanizmaları hakkındaki bilgi genotoksik karsinojenlerden daha azdır. Genotoksik karsinojenler komplet karsinojenlerdir. Kalitatif ve kantitatif olarak bir hücrenin genetik bilgisini değiştirirler. (11) Yapıları ve aktiviteleri açısından birbirlerine direkt benzerlik gösterirler, in vitro deneylerde mutajeniktirler, yüksek dozlarda aktiftirler, birçok hayvan türünü etkileyebilirler, birçok değişik organa hasar verebilirler. (6,13,15) Yüksek dozlarda karsinojenik aktiviteyi etkileyerek ve DNA replikasyonunu arttırarak toksisiteye, bununla birlikte hücre proliferasyonuna sebep olurlar. (16) Transmembranal difüzyonu takiben elektrofilik bileşiklere metabolize edilirler. Bu bileşikler nükleusa girerler ve nükleofilik kısımlar ile (DNA, RNA ve proteinler) eklentiler olarak da bilinen kovalent bağlar kurarak yapısal bütünlüğü bozarlar.(14,17-21)

Non-genotoksik karsinojenler ilerleticiler gibi hareket ederler ve metabolik aktivasyona ihtiyaç duymazlar. Direkt olarak DNA ile etkileşmezler, eklentileri arttırmazlar. İn vivo ve in vitro yürütülen mutajenite testleri negatiftir (13,14,22)

Non-genotoksik bileşikler büyümeyi ve hücre ölümünü modüle ederler. Genotoksik bileşiklerin etkilerini potensiyalize eder, yapı ve aktivite arasında direkt korelasyon göstermezler ve etkileri konsantrasyonla sınırlıdır. Dokuya ve türe spesifiktirler. (13,22) Bu bileşikler hedef hücrelerde genetik yapısı değişmiş hücrelerden neoplazik gelişimi arttırarak ya da indirekt olarak neoplazik dönüşümü tetikleyerek ilerletici etki gösterirler. (14)

Melnick ve arkadaşları bu bileşiklere maruziyetin neoplazik gelişimden sorumlu diğer maddelerin sentezini desteklediğini ifade ederler. (22)

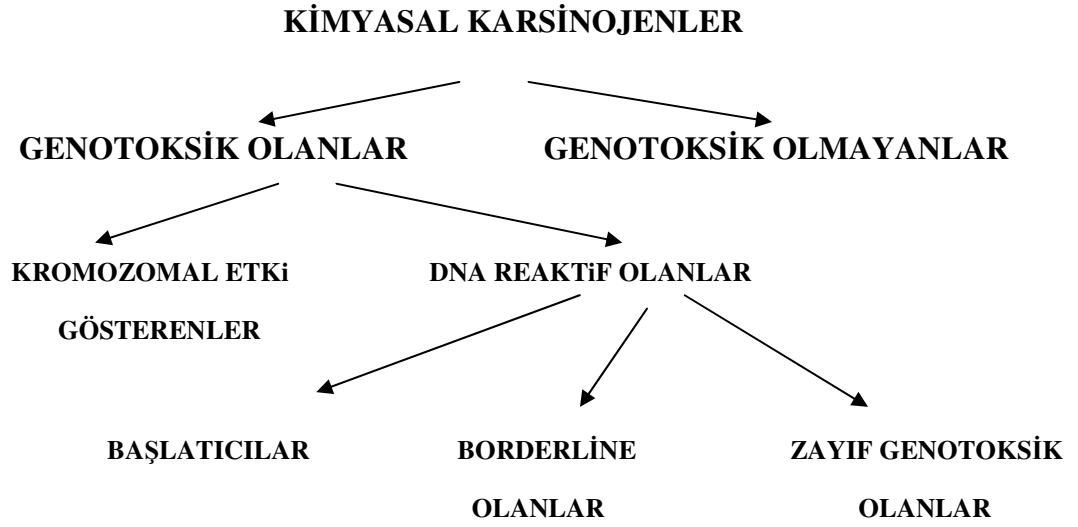
Non-genotoksik karsinojenler, aktivitelerinin reseptör aracılı olup olmamasına bağlı olarak sitotoksik veya mitojenik karsinojenler olarak sınıflandırılırlar. (23,24) Forbol esterleri, dioxinler ve fenobarbital gibi mitojenik bileşikler hedef dokularda spesifik hücresel reseptörlerle etkileşerek hücre proliferasyonunu indükler. (23) Sitotoksik karsinojenler (Örn: kloroform) duyarlı dokularda hücre ölümüne sebep olurlar ve kompensatuvar hiperplazi gelişir. (13)

Sitotoksik karsinojen dozu yüksekse bazı hücreler yaşayamaz. Rejeneratif prosedürler ile hücre bölünmesi ne kadar artarsa, hücre siklusunu bitirmemiş ve DNA tamiri için gerekli süreyi tamamlayamamış prematür hücrelerin sayısı o kadar artar, bu durum mutasyon oluşma ihtimalini arttırır. (22) Öte yandan nekroze hücreler, üretilen reaktif oksijen türleri (ROT), reaktif nitrojen türleri (RNT), proteolitik enzimler ve immun sistem tarafından yıkılır. ROT ve RNT'lerin üretimi hücresel antioksidan kapasiteyi aşarsa lipidlerde, proteinlerde, karbonhidratlarda oksidatif hasara yol açarak karsinogenezi veya hücre ölümünü tetikler. (25)

Mitojenik bileşikler aktivitelerini sürdürmek için belirli konsantrasyonlarda bulunmaya ihtiyaç duyar. Buna karşın, non-sitotoksik bileşiklerin etkisi konsantrasyondan bağımsızdır. (24)

**Tablo 1. Kimyasal Karsinojenlerin Sınıflandırması (3,26)**

| KİMYASAL KARSİNOJENLER             |                                                       |                                                                                                                                   |                                                       |
|------------------------------------|-------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| Grup                               | Bileşik                                               | Etki Mekanizması                                                                                                                  | Etkilenen organ/<br>Kanser tipi                       |
| Polisiklik aromatik hidrokarbonlar | Benzo[a]piren<br>Poliklorinatlı bifeniller            | DNA'nın pürin bazları ile eklentiler oluşturur, genelde transversiyonlar oluşur.                                                  | Deri, AC, Mide,<br>KC, Deri                           |
| Aromatik aminler/ amidler          | 2-Asetilaminofloren<br>4-Aminobifenil<br>2-Naftilamin | Genotoksik bileşikler hücre duplikasyonun hızını artırırlar.                                                                      | KC, Mesane<br>Mesane<br>Mesane                        |
| Aminoazo boyaları                  | o-Aminoazotoluen<br>N, N-dimetil-4-Aminoazobenzen     | DNA ve hemoglobinle eklentiler oluştururlar.                                                                                      | KC,AC,Mesane<br>AC, KC                                |
| N Nitrozo bileşikleri              | N-Nitrozodimetilamin                                  | DNA bazlarındaki N ve O atomlarıyla eklentiler oluştururlar.                                                                      | Karaciğer,AC,<br>Böbrekler                            |
| Karbamatlar                        | N-metilkarbamat esterleri                             | Kromozom anomalisi, gen mutasyonu, hücre transformasyonu                                                                          | KC, Böbrek Testis<br>dejenerasyonu                    |
| Halojenli bileşikler               | Trikloroetilen                                        | Somatik mutasyonlar, hücre siklus yollarının modifikasyonu                                                                        | Böbrek, KC, AC                                        |
| Doğal karsinojenler                | Aflatoksin B1<br>Asbestos                             | Guanin ile eklentiler oluşturur,RNA ve proteinlerle etkileşir                                                                     | KC<br>AC                                              |
| Metaller                           | Arsenik<br>Kadmiyum<br>Nickel                         | Oksidatif stress<br>DNA tamir yollarını ve nükleotid eksizyon tamirini inhibe eder<br>Histon asetilasyonu ve DNA hipermetilasyonu | Deri, AC,KC<br>AC,Prostat, Böbrek<br>AC, Nasal Kavite |
| Antikanser ilaçlar                 | Alkilleyici ajanlar                                   | Zincir içi ve zincirler arası çapraz bağlar                                                                                       | Lösemi                                                |



**Şekil 2. Bolt’a göre kimyasal karsinojenlerin sınıflandırması (27)**

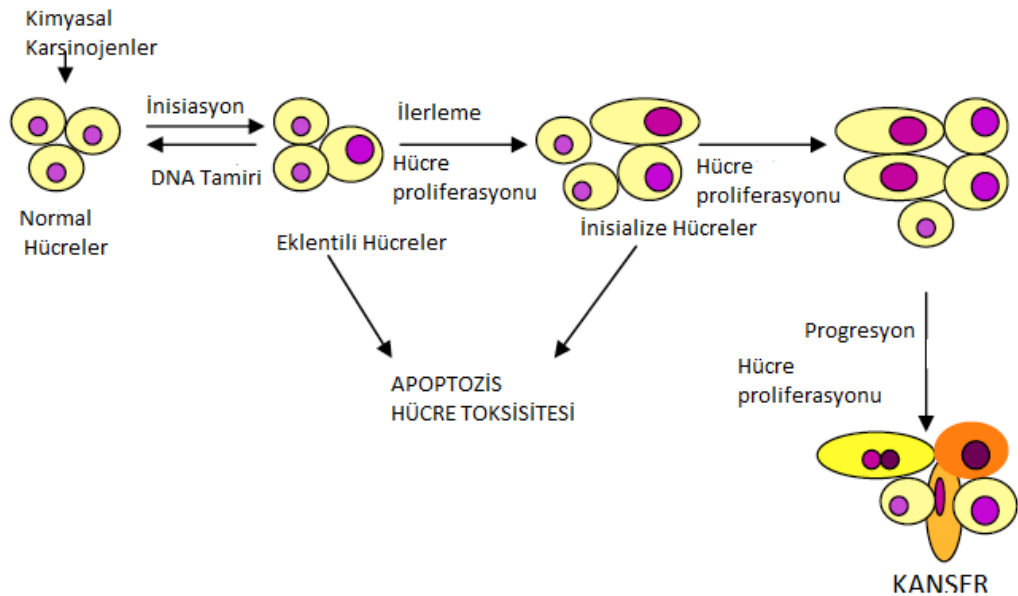
Kimyasal karsinojenler farklı metabolik yollarda eş zamanlı olarak bulunduğunda ilave sinerjik ve antagonistik etkilere sahip olabilirler. (20) Sigara içme ve asbest maruziyeti arasındaki sinerji kronik inflamasyon ve kompanzatuvar hücre proliferasyonunun sonucu olarak akciğer kanseri gelişimini artırır. Neoplazik gelişime bireysel yatkınlığın modulasyonunda meyve ve sebzelerin koruyucu etkisi antagonizmaya örnek olarak verilebilir. (20,28)

#### 2.2.4 Karsinogenezin Evreleri

Hayvan modelleri kullanılarak yapılan çalışmalar, “in vitro” çalışmalar ve epidemiyolojik analizler; araştırmacıların neoplazik patogenezin 3 ayrı aşamadan oluşan karmaşık bir süreç olduğu sonucuna varmalarını sağlamıştır. Bunlar: başlangıç, ilerleme ve progresyon safhalarıdır. (6,10,11,29) Neoplazik gelişimin 3 safhası boyunca genom yapısında değişiklikler oluşur. (15,30)

Gen ekspresyonundaki değişiklikler inisiyalize olmuş hücrelerin selektif proliferasyonu ve pre-neoplastik hücrelerin gelişimi ile ilerleme safhası sırasında yer alır. (6,31) Başlangıç ve ilerleme sırasında, apoptozis ve hücre proliferasyonu dengede kalarak farklı hızlarda meydana gelebilir. Progresyon safhasında bu denge değişir ve buradan malignansi ortaya çıkar. (29)

İnsan yaşamı bu deneysel prosedürlerden farklı olarak çok çeşitli koşullar altında sürmektedir. Karsinogenez süreci, deney hayvanları ve insanlar için benzer olmasına rağmen insanların yaşamları boyunca maruz kaldığı değişik kimyasal bileşikler bu sürecin hızını, mutasyon sıklığını, hücre büyümesinin hızını ve değişen genlerin fenotipik ekspresyonunu değiştirir. Diğer taraftan bireyin yatkınlığı ve savunma mekanizmaları neoplazik basamakların herbirini değiştirir. (3)



Şekil 3. Kimyasal Karsinogenez Basamakları (3)



#### 2.2.4.1 Başlangıç Safhası (İnisiyasyon)

Karsinogenezin birinci safhası 1947’de “İnisiyasyon Safhası” olarak isimlendirilmiştir. (32) Birçok deneyden elde edilen veriler göstermiştir ki; inisiyasyona, normal hücreleri malign dönüşüme ve immortaliteye yatkınlaştıran geri dönüşümsüz bir takım genetik değışiklikler sebep olmaktadır. (11,29,32,33)

İnisiyal hücre neoplazik bir hücre olmamasına rağmen birbirini izleyen genotipik ve fenotipik değışiklikler sonrası bu duruma doğru yönelme gösterebilir. (33) Fenotipik bakımdan inisiyal hücre diğer hücelere benzerdir. İnisiyal hücre mutasyonlara gider ve mutasyonlar differensiasyonu değil proliferasyonu indükler. (11)

İnisiyasyon safhasında inisiyal hücreler haftalarca, aylarca hatta yıllarca latent kalabilir ya da otonom olarak ve klonal biçimde büyüeyebilirler. (34) İnisiyasyon sürecinde hücrel bölünme simetrik, bölünme sonucunda iki yeni inisiyal hücre oluşur. (33) Yeni hücrelerin sayısındaki artış ve apoptozis inhibisyonu ile oluşan mitojenik süreç sonucu inisiyal hücrelerin klonal büyümesi gerçekleşir. (11)

Kimyasal karsinogenezde tetiğe basan olay DNA hasarıdır. (35) DNA hasarı enzimatik mekanizmalarla tamir edilebilir. (17,36) Çoğalan hücrelerin hasarlı DNA’yı tamir etmek ve kimyasalların DNA ile kurduğı eklenti denilen kovalent bağları uzaklaştırmak için çok az zamanı vardır. (37)

DNA hasarında artış özellikle kök hücreler için önemlidir. Çünkü kök hücreler uzun süre yaşarlar ve birçok dokuda bulunurlar. (11,14,38) 1978’de

Potter neoplazik hücrelerin embriyonik durum ve terminal farklılaşma arasında bir fenotip sergileyebileceğini ve bütün neoplazik hücrelerin bir kök hücreden köken alan monoklonal orijine sahip olduğunu açıklamıştır. Bu tanımlamaya göre, kök hücreler farklılaşmaya kadar ya da ölümleri indükleninceye kadar ölümsüz hücrelerdir. Eğer dönüşümleri geciktirilirse inisiyalizasyon olarak anormal hücre klonları halinde dokularda birikirler. (33) Kök hücreler çoğu dokuda tanımlanamamasına rağmen her dokunun kök hücre popülasyonu olduğuna inanılmaktadır. (34)

İnisiyasyon; hızlı, geri dönüşümsüz ve yeni nesil hücrelere aktarılan bir fenomendir. (39) Hücre çoğalması bu safha için esastır. Hücresel bölünme DNA tamir mekanizmalarının aktivitesinden önce oluşursa hasar kalıcı ve geri dönüşümsüz hale gelir. İnisiyasyon aynı zamanda katkılarla gelişebilecek bir süreçtir. Şöyle ki; neoplazik gelişim karsinogenik doza bağlıdır. Karsinogenik dozun arttırılması ile neoplazi insidansı ve çeşitliliği artar ve aynı zamanda neoplazi ortaya çıkışı için geçen latent süre kısalır. İnisiyatör bir ajana maruz kalan tüm hücrelerde mutasyonlar meydana gelse bile inisiyasyon için terminal farklılaşmayı düzenleyen genlerde de mutasyon olmalıdır. (3)

Spontan olarak inisiyalizasyon olan hücreler tüm canlı organizmalarda bulunur. (4,11) İnisiyasyon DNA depürinasyonu ve deaminasyon gibi normal olaylarla desteklenen spontan mutasyonla başlayabilir. DNA replikasyonundaki hatalar da inisiyasyonla ilişkilidir. Spontan inisiyasyon indüklenmiş inisiyasyondan nadir olmasına rağmen varlığı deney hayvanlarında spontan neoplazilerin oluşumuyla doğrulanmıştır. (4,8)

#### 2.2.4.2 İlerleme Safhası

İlerleme kavramı deneysel koşullar altında kanser gelişimini indükleyebilen düşük karsinojenik aktiviteli kimyasal maddelerin keşfi ile tanınmıştır. (32) İlerletici bileşikler DNA ile direkt olarak etkileşmezler ve metabolik olarak aktive edilmedikçe biyolojik aktivitelerini göstermezler. (14,18,40)

Bu ajanlar duyarlı dokularda hücre proliferasyonunu artırır, mutasyonların fikse edilmesine katkıda bulunur, genetik ekspresyonda değişiklikleri artırır ve hücresel büyüme kontrolünde değişikliklere sebep olurlar. (4,29) Diğer taraftan, ilerleticiler oksidasyon yoluyla DNA'ya indirekt olarak hasar verebilirler. (6) Bu olaylar önceleri epigenetik mekanizmalarla ilişkili bulunmuştur, fakat günümüzde büyük çoğunluk ilerlemenin genetik değişiklikleri de içerdiği fikrini paylaşmaktadır. (41)

İlerleticiler gap junctionlar aracılığı ile  $G_0$ 'da ya da istirahat halinde bulunan hücrelerin doğal inhibisyonunu geciktirirler. (11,17,38)

İlerleticilerin en önemli aktivitesi mitogenezdir. Genotoksik ve mutasyonel olaylar bu basamakta gerekli değildir. (8)

İlerleticinin etkili olabilmesi için haftalarca, aylarca ve yıllarca bulunması gerekir ve etkinliği hedef dokudaki konsantrasyonuna bağlıdır. (42)

İlerleme geri dönüşümlü bir basamaktır. Bir ilerleticinin ortadan kaybolmasından sonra hücre proliferasyonunda muhtemelen apoptozisle bir

gerileme meydana gelebilir. İlerleme fizyolojik faktörlerle şekillendirilebilecek bir basamaktır. Bu yüzden deneysel karsinogenezin boyutlarını sınırlar. Bazı ilerletici ajanlar belirli dokular için spesifik iken bazıları eş zamanlı olarak bir çok doku üzerine etki eder. (6,40,43)

Uzun süreli ve yüksek doz maruziyetle kimyasal karsinogenez çalışmalarında hemen hemen çoğu ilerletici ajanın inisiasyon fazı olmadan neoplaziyi indüklediği gösterilmiştir. (6,8) Fenobarbital, Benzen, Asbest ve Arsenik maruziyeti, başlatıcı ajan uygulaması olmaksızın bile neoplazi gelişimine öncülük eder. (11,22) Bu çelişkinin iki açıklaması vardır: ya genotoksik etki mutajenite ve genotoksisite metodları ile tanımlanmamıştır ya da inisiyal hücreler spontan olarak ortaya çıkmıştır. Bu son olay ilerleticilerin hücresel bölünme sıklığını arttırarak mutasyonların yanı sıra DNA replikasyonunda hataların ortaya çıkmasına sebep olduğu fikrini düşündürür. (3)

İlerleme basamağında ilerleticilere maruz kalan bütün hücreler yer almaz, sadece bölünmek için uyarılmış, farklılaşmamış, apoptozisten kurtulmuş hücreler büyüme ve hücre ölümü arasındaki instabiliteye katkıda bulunabilir ve malign neoplazi ortaya çıkışına öncülük edebilir. (11)

#### 2.2.4.3 Progresyon Safhası

Histopatolojik olarak değerlendirilirse başlangıç ve ilerleme fazları sırasında tanımlanan lezyonlar preneoplazik ve/veya benign lezyonlar olarak adlandırılır. (6) Malign lezyonlara transformasyon karsinogenezin en uzun ve son basamağıdır. Bu basamak progresyon olarak adlandırılır. (13,14)

Progresyonda neoplazik fenotip, genetik ve epigenetik mekanizmalar yolu ile kazanılır. (44) Progresyon sırasında hücre çoğalması uyarı varlığından bağımsızdır. (6,45)

Progresyonun geri dönüşümsüz olması, genetik instabilite, hızlı büyüme, invazyon, metastaz, hücrelerin biyokimyasal, metabolik ve morfolojik karakteristiklerinde değişiklikler ile karakterizedir. (6,8,13,46)

Epigenetik bir oluşum olan anjiogenez neoplazik progresyonda temeldir. Anjiogenik fenotipin kazanılması maligniteye katkıda bulunan karakteristiklerin gelişiminden önce gelir ve inhibisyonu neoplazik gelişimi geciktirir. (47)

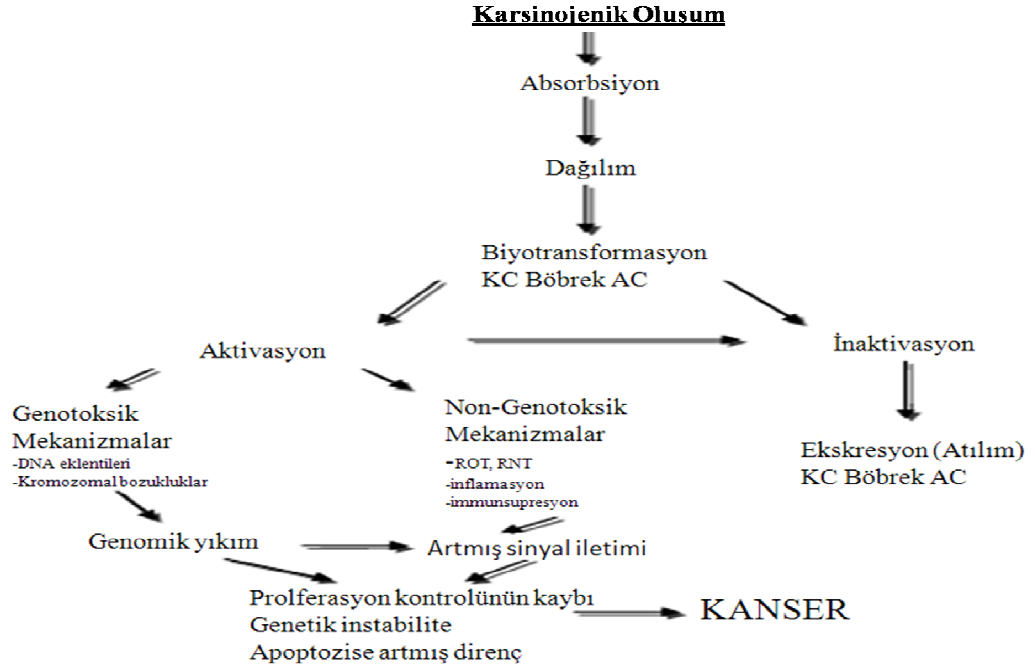
#### 2.2.5 Kimyasal Karsinojenlerin Absorbsiyonu ve Metabolizması

Maruziyeti takiben, kimyasal karsinojenler birçok yolla absorbe edilebilir (oral yolla, solunum yoluyla, deri yoluyla ve enjeksiyonla) ve birçok dokuya dağılabilirler. (3)

Absorbsiyon maddenin fizikokimyasal özelliklerine bağlıdır. Pasif ya da aktif taşıma yolu ile olabilir. Oral yoldan absorbe edilen maddeler önce karaciğere geçer sonra vücuda dağılır, akciğerden absorbe edilenler ise karaciğere ulaşmadan önce kan yolu ile dağılırlar. (3)

Direkt olarak DNA üzerine etki eden karsinojenlere direkt karsinojenler, enzimatik dönüşüm gerektirenlere ise indirekt ya da prokarsinojenler denir. (13,15,49,50)

Metabolik aktivasyon faz I reaksiyonları ile kontrol edilir, Faz II reaksiyonları ise aktive bileşikleri vücuttan kolaylıkla elimine edilen inert ürünlere dönüştürerek vücudu korur. (13,51,52,53).



**Şekil 4. Kimyasal bileşenlerin metabolik aktivasyonu ve karsinojenlerin genotoksik non-genotoksik özellikleri**

Metabolik enzimlerin performansı, kimyasal karsinogenezi anlamak, türler arasındaki farklılıkları ve türlerin neoplazik gelişime yatkınlığını öğrenmek için temel teşkil eder. (54,55)

Faz I enzimleri oksidasyon, redüksiyon ve hidroliz reaksiyonlarına katılır. Oksidoredüktazlar (Sit P450 bağımlı monooksijenazlar, flavin monooksijenazlar, siklooksijenazlar ve alkol dehidrogenaz) ve Hidrolazlar (Epoksit hidrolazlar) olarak sınıflandırılırlar. (49,51,56,57).

Faz II enzimleri konjugasyonda ve kimyasal karsinojenlerin inaktivasyon işlemlerinde yer alırlar ve transferazları (Glutatyon S-Transferaz, N-Asetil Transferaz, UDP-Glukuronil Transferaz, Sulfotransferazlar) kapsarlar. (49,51,56,57) Bu enzimler esas olarak biyotransformasyonun detoksifikasyon basamaklarında yer alıyorsa da bazı prokarsinojenlerin in vivo aktivasyonuna da katkıda bulunurlar. (15)

Metabolik aktivasyon, esas olarak sit P450 enzimlerinin baskın olarak bulunduğu karaciğer endoplazmik retikulumlarında, daha az derecede de mesane, deri, gastrointestinal sistem, özefagus, böbrekler ve akciğerlerde meydana gelir. (55,58) Bu faz sırasında Sit P450 monooksijenazları karsinojenik bileşik içine reaktif bir polar grup alarak onu lipofilik yaparlar. Daha sonra DNA ile bağlar kurabilen güçlü bir elektrofilik ürün haline dönüştürürler. (53,56) Faz II reaksiyonları, hepatik ve ekstrahepatik, sitoplazmik ve sitokromik enzimler tarafından ayrı ya da beraber olarak katalizlenir. (52) Bu enzimler konjugasyon reaksiyonları sırasında glukoz, aminoasitler, glutatyon ve sülfattaki polar grupları ayırarak daha az toksik, suda daha iyi çözünen, idrarla ve safrayla daha kolay atılan metabolitler haline getirirler. (49,52,56)

Peroksidasyonlar reaktif oksijen türlerinin devamlı üretimi ile metabolik reaksiyonlara paralel olarak oluşurlar. (13,25) Bu radikaller kimyasal karsinogenezi de içeren birçok kronik hastalıkla ilişkilidir. (13) Reaktif oksijen türleri oksidasyon/nitrasyon ve halojenasyon gibi kimyasal reaksiyonlar yolu ile DNA, RNA ve proteinlerde hasara yol açar. Bu hasar sonucunda mutasyonlarda artış ile beraber önemli enzim ve proteinlerin fonksiyonlarında değişiklikler

meydana gelir. (53) Birçok deneyde reaktif oksijen türlerini arttıran kimyasal bileşiklerin genotoksisite yolu ile inisiasyon, ilerleme ve neoplazik progresyonu tetiklediği kanıtlanmıştır. (44,56) Reaktif oksijen türlerinin etkisi; hücrel mekanizmalar tarafından metabolizma, hücrelerdeki redoks dengesini sürdüren reaksiyonlar, oksidasyonun sinyal düzenleyicisinin transdüksiyonu ve DNA tamiri gibi değişik seviyelerde kontrol edilir. (27)

Park ve arkadaşlarına göre, aynı enzim bir kimyasalı, kimyasal yapısına bağlı olarak aktive ederken diğerini inaktive edebilir. (53) Farklı dokuların aktivasyon sistemlerinin spesifitesi, faz I ve II reaksiyonlarını içeren enzimlerin ekspresyonunu ve dağılımını içeren genetik polimorfizme ve kanser gelişimine yakınlığa bağlıdır.(6,28,51,54,59) Faz I enzim miktarı yüksek faz II enzim miktarı düşük insanlarda ara bileşikleri sentezleme olasılığı yüksektir ve daha fazla DNA hasarı oluşur. (60)

Daha önce tanımlanmış metabolik metodlar; kalitatif ve kantitatif farklar içermesine rağmen hem insanlar hem de hayvanlar için eşit derecede önemlidir. Hayvan deneyleri kimyasal bileşiklerin karsinogenik özelliklerinin analizinde kullanıldığında bu metabolik metodlar yanlış yorumlamalara sebep olmuştur. (52,54)

Karsinogeneze bireysel yakınlık üzerinde endojen ve eksojen faktörler arasındaki farklılıkları değerlendirmek için birçok çalışma geliştirilmiştir. (61,62,63) Kimyasal karsinogenezi kontrol eden ve etkileyen faktörler Tablo 2’de özetlenmiştir.



|                 |                                  |
|-----------------|----------------------------------|
| Yaş             | Virüsler                         |
| Cinsiyet        | Diyet ve beslenme ve yaşam tarzı |
| Endokrin sistem | Genetik yatkınlık                |
| İmmün sistem    | Metabolik yollar                 |
| Travma          | DNA Tamiri                       |

**Tablo 2. Kimyasal karsinogenezi kontrol eden ve değiştiren faktörler (3)**

#### 2.2.6. Kimyasal Karsinojenlerin Moleküler Hedefleri

Onkogenlerin neoplazik transformasyonunun keşfi başlangıçta kanserin moleküler temelleri hakkındaki pek çok temel soruya cevap veriyor gibi görünmüştür. Fakat sonradan neoplazik transformasyonu etkileyen başka genlerin de varlığı anlaşılmıştır. (17)

Karsinogeneze aracılık eden birçok gen vardır, bu genlerin tanımlanması onkolojide ve kimyasal karsinogeneze devrim niteliğindedir. (17,64) Bunların arasında protoonkogenler, tümör baskılayıcı genler ve hücre siklus düzenleyici genleri özel öneme sahiptir. (51,12,13) DNA'daki eklentilerin oluşumu karsinogenezin birinci basamağını teşkil eder ve eğer bunlar DNA replikasyonundan önce tamir edilmezse başlangıç fazında temel olan protoonkogenlerde ve tümör baskılayıcı genlerde mutasyonlar meydana gelebilir. (14,20,65) Karsinojenler tarafından oluşturulan bu eklentiler değişken olabilir ve her biri DNA'ya spesifik hasara sebep olabilir. (66) Eklentilerle ilgili mutasyonlar delesyon, çerçeve kayması, nükleotid yer değiştirmesi şeklinde ortaya çıkabilir. (67) Mutasyonlar sayısız hücresel değişikliğe yol açar. Anormal protein

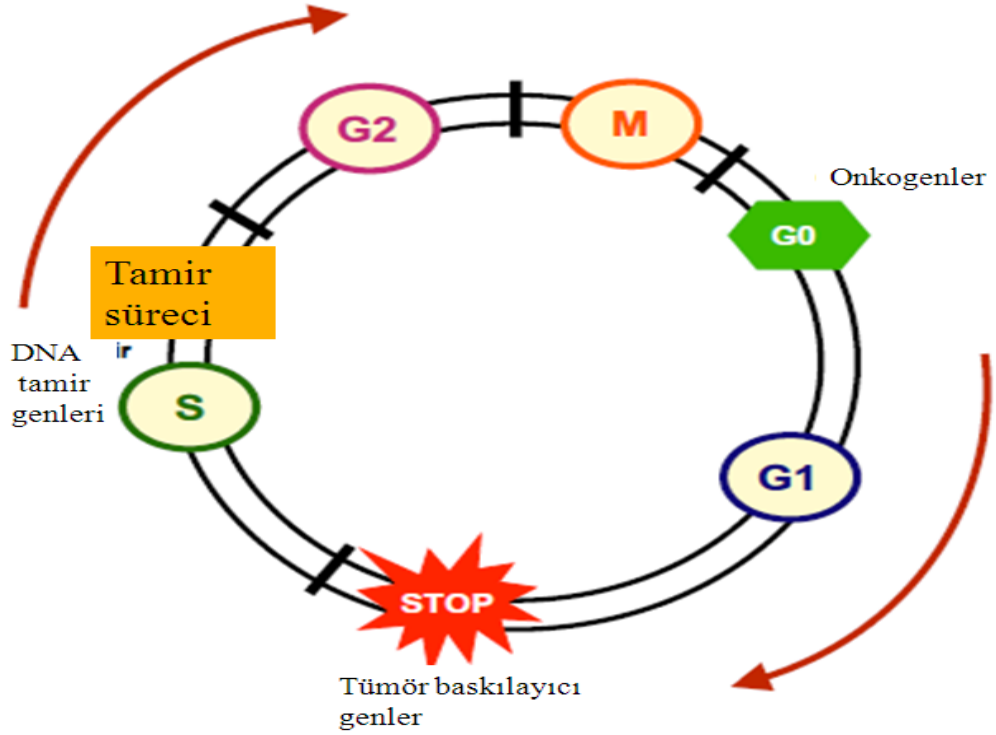
ekspresyonu ve hücre siklus kontrolünde değişiklikler bunlardan bazılarıdır. Eklentiler kimyasal karsinogenezde önemlidir, çünkü yanlış transkripsiyonu indükleyerek yeni DNA zincirinde mutasyonlara yol açarlar. Fazla sayıda eklentinin varlığı DNA zincirinde kırılmalara yol açar, mutasyona ve genetik materyal kaybına sebep olur. (11,68) Hayvan deneylerinde tespit edilen eklentilerin miktarı ile gelişen neoplazilerin sayısı arasında pozitif korelasyon vardır. (14,21)

Eklenti tamiri birçok enzim tarafından koordine edilir ve farklı genlerle kontrol edilir. Bazı ya da nükleotid eksizyonu, rekombine ya da mismatch tamir yoluyla yapılabilir. (63,69)

Eklentilerin tanımlanması sonucu, kimyasal karsinojenlerin dokular tarafından absorbe ve metabolize edildiği, dağıtıldığı, böylece tamir mekanizmalarından ve detoksifikasyondan kaçtığı açığa çıkmıştır. (67,70) Eklentilerin tanımlanması ve analizi  $^{14}\text{C}$  ve Tritium gibi radyoaktif işaretli karsinojenler kullanılarak yapılabilir. (67) Bununla beraber en çok kullanılan teknikler kütle spektrometrisi ile ilişkili gaz kromatografisi ve floresan spektroskopisi ile ilişkili yüksek performanslı likit kromatografisi (HPLC) dir. (70) Ayrıca immunohistokimyasal olarak da tayin edilebilirler. (35)

Neoplazi gelişiminin moleküler ve genetik temellerini daha ayrıntılı irdelenecek olursak; Kistik fibrozis ve musküler distrofi gibi tek gen mutasyonuna bağlı hastalıklar dışında, tek gen defekti kansere sebep olmaz. Memeli hücreleri kendilerini kansere neden olan gen mutasyonlarının ölümcül etkisine karşı

korumak için çoklu koruma sistemlerine sahiptir ve sadece birçok gen defektli ise invaziv kanser gelişebilir. Böylece mutasyonların kansere sebep olmaktan çok kansere katkıda bulunduğunu ifade etmek daha doğru bir yaklaşım olacaktır. (71)



**Şekil 5. Hücre siklusu ve moleküler hedefler (onkogenler ve tümör baskılayıcı genler) tarafından kontrolü**

Neoplazik gelişimin olması için DNA hasarı olan hücrelerin DNA tamirinden önce (G1’de bloke edilir) ve hücre bölünmeden önce (G2’de bloke edilir) hücre siklusuna girmesini engelleyen hücresel savunma mekanizmalarında hatalar olmalıdır. Hücresel savunma mekanizmasından kaçan hücrelerin kapasitesinin de karsinogeneze şüphesiz katkısı vardır. (72,73)

Tümör baskılayıcı proteinler olan p53, p21 ve pRb hücresel savunmada can alıcı noktadır, çünkü bu proteinler hücre siklusunun G1 fazında blokaj sağlarlar. (73) pRb (Retinoblastom proteini) proteininin fonksiyonunun kaybı

hücre proliferasyonu hızında artışı ve terminal differensiasyon kaybını provake eder. p53 ise hücre siklusunu G1 fazında durdurabilir ve hücre DNA hasarı tamirine devam edebilir. (46,72,74) En göze çarpan ve üzerinde en çok çalışma yapılan tümör baskılayıcı geni p53'tür. Eğer DNA hasarlanırsa p53 hücre genomunun stabilitesini sürdürmek için apoptozisi indükler. (13,69,75) Karsinogenez sırasında p53 kaybı genetik hasara karşı normal apoptotik yanıtı bloke ederek, preneoplazik hücreleri ilave mutasyonların çoğalmasına yatkın hale getirebilir. (13) p53 fonksiyon kaybı protoonkogenleri aktive ve tümör baskılayıcı genleri inaktive eder bu yüzden kimyasal karsinogenezde olağanüstü rol üstlenir. (15) p53 proteininin biyolojik aktivitesi DNA'daki transkripsiyonal düzenleyici elementlere bağlanma yeteneğine bağlıdır. p53 tarafından regüle edilen genlerle ilgili çalışmalar p21 geninin keşfini sağlamıştır. p21, p53 proteini ve hücre siklusu arasında fonksiyonel bağlantı sağlayarak siklin bağımlı kinazların inhibitörü olarak rol oynar. (17)

DNA tamiri bir hücrenin genomunun doğruluğunu sürdürmesine olanak sağlayan bir süreçtir. DNA tamirinde birçok yol vardır. Örnek olarak her iki nükleotid eksizyon tamiri, baz eksizyon tamiri, mismatch tamiri ve çift zincir kırık tamiri gibi eksizyon tamirleri verilebilir. (76)

Bir onkogen olan Ras genindeki değişiklikler ise rodentlerde kimyasal olarak indüklenen birçok neoplazide tanımlanmıştır. İnsanda kolon, meme, AC ve mesane yerleşimli kanserlerin %20'sinde Ras gen mutasyonu mevcuttur. (74) Bu neoplazilerin DNA'larından izole edilen ras geni analizi karsinojenlerin DNA ile

etkileştiği bölgelere karşılık gelen nükleotid sekanslarındaki değişiklikleri ortaya koyar. Her kimyasal bileşik DNA üzerinde adeta kendi parmak izini bırakır. (77)

Bazı yazarlar karsinogenez ile ilişkili genleri bekçiler ve muhafızlar olarak sınıflandırır. (64) Bu sınıflandırma sırayla genom bütünlüğü ve DNA tamirini sürdürme ile olan ilişkilerine dayanır. (78)

Bekçi genler genom stabilitesinin devamından sorumludur. Tipik tümör baskılayıcı genler olduğu düşünölen bekçi genlerde meydana gelen mutasyonlar genom stabilitesini tehlikeye atar ve daha spesifik olarak tümör baskılayıcı genleri ve onkogenlerin her ikisini de kapsayan muhafız genlerde mutasyon ihtimalini arttırırlar. (71,79) Muhafız genler ise neoplazik gelişimin büyümesini inhibe ederek ya da neoplazik hücre ölümünü indükleyerek neoplazi gelişimini düzenlerler. (64) Muhafız genlerin inaktivasyonu sonucu başlatılan bir neoplazi hücre ölümünü direkt olarak kontrol eden genler üzerinde ortaya çıkan etkinin bir sonucu olarak hızla ilerleyebilir. (64)

#### 2.2.7. Kimyasal Karsinojenlerin Potensi

Bir ilacın etki gösterebilmesi için gerekli olan doz ile o ilacın terapötik etkisi arasındaki ilişkiye ‘Potens’ denir. (80) Kanseri gelişme olasılığı ile doz arasında bir ilişki vardır. Bu yüzden doz-cevap ilişkisi kurmak mümkündür. Şöyle ki; doz yükseldikçe kanser gelişme riski artar.(81)

Potensi araştırmanın bir yolu doz-cevap ilişkisinin farklı bileşikler için karşılaştırılmasıdır. Tümör oluşumu için gereken doz ne kadar düşükse karsinojen maddenin potensi o kadar yüksektir. (81) Karsinojenik riskin kantitatif ve

semikantitatif olarak belirlenmesi ve değerlendirilmesi için potensin değerlendirilmesi ön koşuldur. (81) Aslında, potensi gösteren en önemli bilgi insanda elde edilen geçerli doz-cevap ilişkisidir. Fakat sıklıkla insan epidemiyolojisinden yola çıkarak bu doz-cevap ilişkisini belirlemek zordur. Öncelikle doz-cevap ilişkisini belirleyen bir çalışmada yeterli istatistiksel gücü elde etmek için gerekli çalışma büyüklüğü ile ilişkili zorluklar, “Kimyasal bir madde karsinojen midir?” sorusuna verilen basit evet ya da hayır cevabı ile ilişkili zorluklardan kat kat büyüktür. İkincisi; sonucu etkileyebilecek örneğin sigara dumanında bulunan kimyasal karsinojenleri dışlamak sıklıkla mümkün değildir. Üçüncüsü; karsinojen olarak tanımlanmış bir kimyasalla kaliteli doz-cevap ilişkisi kurmak için bir çalışma yapmak etik değildir. Bunun yanı sıra doz cevap ilişkisi ile ilgili yararlı bilgiyi veren retrospektif çalışmalar sınırlı ve yetersizdir. (81)

İyi planlanmış uzun dönem hayvan çalışmaları en azından prensipte karsinojenik aktivite ya da potensi miktar olarak gösteren doz-cevap ilişkisini belirlemede yarar sağlayabilir. Hayvan çalışmalarında doz-cevap ilişkisini değerlendirirken birçok faktör hesaba katılmalıdır. İlk ve en açık olanı günlük dozdur. Bir çalışmada farklı günlük doz grupları ve kontrol grubu oluşturularak ağırlık başına verilen doza bağlı tümör insidansı değişimi belirlenebilir ya da tahmin edilebilir. Bazı yüksek potensli karsinojenler tek doz ile bile tümörü indükleyebilirken düşük potensli karsinojenlerden anlamlı yanıt elde etmek için uzun süre günlük maruziyet gerekebilir. İndüksiyon zamanının kendisi doz ile ters

ilişkili olmasına rağmen hayvanlara göre insanlar için indüksiyon zamanını tahmin etmek pratik değildir. (81)

Karsinojenik yanıt türe, cinsiyete, soya ve beslenme durumuna göre çeşitlilik gösterir. Maruziyet şekli (oral, dermal, solunum yolu, parenteral) bir kimyasalın ya da aktif metabolitinin karsinojenik aktivitesinin yeri ve metabolik transformasyonu açısından önemlidir. Diğer bir sorun; bazı kimyasallar enjeksiyon yerinde lokal tümörleri indükleyebilirler. Yine de; bu değişkenleri dikkate almak mümkündür ve bundan dolayı doz-cevap ilişkilerinden en azından karsinojenik potensin semikantitatif ölçümünü türetmek mümkündür. (81)

Kimyasal karsinojenlerin potensi ile ilgili akla gelecek diğer bir soru eşik değerin olup olmadığı ile ilgilidir. Birleşik Krallık yönergelerine göre; sağlık riski olmaksızın popülasyonun çoğunluğunun genotoksik karsinojenlere günlük olarak maruz kalabileceği dozun altında, genotoksik karsinojenlere maruziyetin eşik değeri yoktur. Buna karşın Birleşik Krallık yönergelerinde, en azından bazı non-genotoksik karsinojenler için eşik değerin ortaya çıkabileceği kabul edilmiştir. (81)

Genellikle karsinojenik etki insidansı, kimyasalın ya da aktif metabolitinin etki yerinde kalıcılığına ve konsantrasyonuna bağlıdır. Bu durum sırasıyla kimyasalın ya da aktif metabolitinin etki yerinde ortaya çıkış hızı ile metabolik transformasyon ve salınımı arasındaki dengeye bağlıdır. (81)

Metabolizma genellikle enzim sistemlerinin aralığına bağıdır. Substratın eşik düzeylerinin üstünde bu sistemler fazla çalışabilir ya da inhibe olabilir. Eşik değerin altında substrat metabolize edilir ve uzaklaştırılır, üzerinde ise birikir. (81)

Non-genotoksik karsinojenlerin dokuda spontan mutasyonlara yol açma gibi çeşitli mekanizmalarla kansere sebep olduğu düşünülmektedir. Bazı vakalarda tümör formasyonu, anlamlı etki oluşturmak için bir eşik değerin bulunduğu organ değışiklikleri veya hücrese proliferasyona sekonder gelişir. Örneğın; 3-amino-1,2,4-triazol isimli kimyasala yüksek dozda maruziyet sonucu tiroid büyümesine sekonder tümör gelişir. Tiroid hiperaktivite semptomlarının görölmesine cevap olarak maruziyetin kesilmesi tümör oluşumunu önler. Bu örnek, adı geçen kimyasala maruziyet sonucu gelişen ve geri dönüşebilen primer tümör meydana gelebileceğini gösteren bir karsinojenite tipi olduğunu gözler önüne serer. (81)

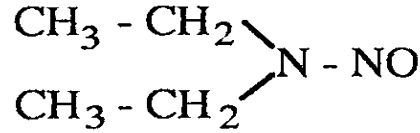
Eşik değerler türler arasında farklılık gösterebilir. İnsanlar bazen hayvanlara göre daha az duyarlı olabilir. (81)

İnsanlarda DNA reaktif karsinojenler için pratik bir eşik değeri olduğuna dair farklı kanıtlar vardır. Örneğın; karaciğer karsinojenleri olan aflatoksin ve dimetilnitrozamin kontaminasyonunu önlemek kaçınılmaz olmasına rağmen batı dünyasında hepatosellüler karsinom (HCC) relatif olarak nadir görölün bir kanserdir. Bu nedenle; özellikle tümör gelişimini destekleyen hızlandırıcı faktörlerin yokluğunda, potent karsinojenler için bile pratik olarak etkinin oluşmadığı bir düzey var olabilir. (81)



Günümüzde karsinogen olduğu söylenen ve daha az sıklıkla görülen kimyasalların çoğu için eşik değer kavramının uygulanıp uygulanmadığını doğrulamak için doz-cevap ilişkileri yeterli biçimde test edilmemiştir. Bunu yapmanın maliyeti de oldukça yüksektir. Kontrollerle karşılaştırıldığında tümör indüksiyonu için genellikle bulunan etkinin oluşmadığı doz, düşük doz alt sınırını test etmeyi sağlar. Bununla beraber; potent bir karsinogen için etkinin görülmediği aşikâr doz düzeyi çok düşük olabilir. Pragmatik olarak anlamlı cevap için gerekli eşik doz düzey kavramı mantıklı görünmektedir ve en azından kontrol için pratik bir temel sağlar. (81)

### 2.3. N-Nitrozodietilamin (NDEA)



Şekil 6. N –Nitrozodietilamin’in Kimyasal Yapısı

N-nitrozodietilamin (NDEA) hayvan modellerinde karaciğer kanserini indüklemek için kullanılan bir dialkilnitrozamindir. Bütün hayvan türlerinde çeşitli tümörlere sebep olmakla birlikte insan sağlığına da zararlı olduğu düşünülmektedir. (82,83) NDEA maruziyeti, diyetle NDEA içeren ürünlerin tüketimi ve mesleki maruziyet yolu ile görülebilir. NDEA tütülenmiş ette, salamda, süttozunda, tuzlanmış kurutulmuş balıkta, tütün ürünlerinde, kozmetiklerde, farmasötik ürünlerde ve tarımla ilgili kimyasallarda da bulunmaktadır. (82,83) NDEA maruziyeti sonucu serbest oksijen radikallerinin oluşumunun karaciğer kanseri indüksiyonunda anahtar rol oynadığı

düşünülmektedir. (83) NDEA karaciğerde sitokrom P450 enzimleri tarafından etil-asetoksietil-nitrozamine metabolize olur. Bu bileşik faz II enzimleri vasıtasıyla toksik olmayan bir bileşiğe konjuge edilebilir, ya da hücrel makromolekülleri direkt olarak etilleyen etil-diazonyum iyonuna dönüşebilir. (84) NDEA'nın sit P450 enzimleri tarafından metabolik aktivasyonunun sitotoksik, mutajenik ve karsinojenik etkilerinden sorumlu olduğu ve artmış serbest oksijen radikallerinin buna aracılık ettiği bildirilmektedir. (85,86)

### 2.3.1 NDEA'nın Fiziksel Özellikleri

*Moleküler ağırlığı:* 102.1

*Fiziksel görünümü:* Sarı, uçucu sıvı

*Yoğunluğu:* 0.9422(20/4°C)

*Çözünürlük:* Suda, organik çözücülerde ve yağda % 10

### 2.3.2 NDEA'nın Toksik Etkileri

#### 2.3.2.1 Akut Toksik Etkileri

NDEA için LD 50 değeri; ratlara intraperitoneal yolla uygulandığında 216 mg/kg'dır. En düşük toksik doz 100 mg/kg'dır. (87) NDEA maruziyetinin en önemli akut toksik etkisi ciddi karaciğer hasarıdır. (88)

#### 2.3.2.2 Kronik Toksik Etkileri

Nitrozaminlerin karsinojenik potansiyelleri ve akut toksik etkileri arasında korelasyon yoktur. N-Nitrozodimetilamin'in akut toksik etkisi N-Nitrozo

dietilamin'e göre daha yüksek olmasına rağmen (87) N-nitrozodietilamin ratlara sürekli uygulandığında karaciğer için karsinogenik potansiyeli daha yüksek olabilir. (89)

NDEA'nın fare, rat, hamster, guinea-pig, tavşan, köpek, domuz, maymun ve akvaryum balıkları için karsinogen olduğu gösterilmiştir. Primer olarak nazal kavite, trakea, özefagus ve karaciğer tümörlerini indükler. Kanseri oral yoldan besinlerle alımla, inhalasyonla ya da deri yoluyla maruziyet sonucu tetikleyebilir. Prenatal tek doz NDEA maruziyeti ile bile kanser gelişebilir. (90)

### 2.3.3 NDEA Maruziyeti Oluşumu

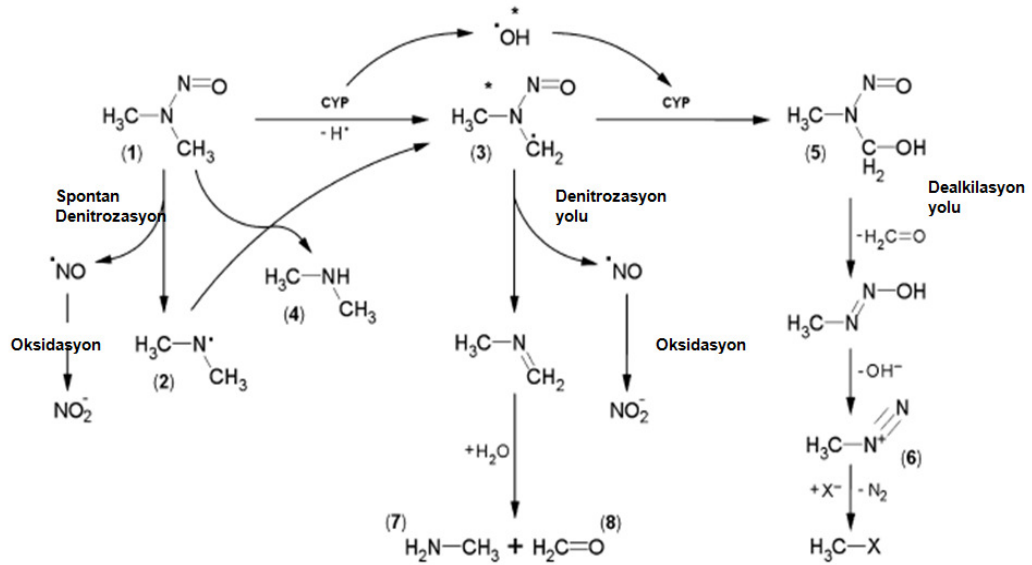
NDEA'yı oluşturan nitroz asit ve dietilamin ya da trietilamin arasındaki kondanase fazdaki kimyasal reaksiyon iyi bilinmektedir. (91) Dietil içeren herhangi bir tersiyer amin nitroze edici bir ajan ile etkileşerek NDEA oluşturabilir. Son zamanlarda her iki aminin de buhar fazında nitrojen oksitleri ile reaksiyona girerek reaksiyon ürünü olarak NDEA verdikleri gösterilmiştir. (92) Bu da NDEA'nın kendisi kullanılsa bile prekürsörleri yolu ile oluşarak endüstriyel ortamlarda bulunabileceğini gösterir.

Dietilamin ya da trietilaminin kullanıldığı ya da üretildiği durumlarda NDEA maruziyeti oluşabilir. Maruziyet her iki aminin de sıklıkla nitrozaminle kontamine olmasından kaynaklanır. Dahası, kimyasal bir ara bileşik olarak amin kullanılırsa NDEA reaksiyon ürünü olarak ortaya çıkabilir. (93)

NDEA kanser çalışmalarında sıklıkla kullanıldığı için laboratuvar hayvanlarının boşaltım atıklarıyla insanlarda maruziyet söz konusu olabilir. (94)

NDEA günümüzde endüstride geniş bir alanda kullanılmaktadır. Fiber endüstrisinde kopolimerler için yumuşatıcı olarak, gres yağı için katkı olarak, dielektrik sabitini yükseltmek ve 1,1-dietilhidrazin sentezi için kullanılır. (90)

NDEA'ya mesleki olmayan maruziyet normal batı diyeti ile beslenmenin bir sonucu olabilir. Normal bir İngiliz diyetinde bir kişinin haftalık dialkil ve heterosiklik nitrozamin alımı yaklaşık olarak 1-3µg/haftadır. (94) Diğer bir maruziyet yolu da NDEA'nın gastrointestinal yolda endojen oluşumudur. Dietilamin insan mide sıvısında nitritle reaksiyona girerek NDEA'yı oluşturur. (90) NDEA'nın sigara ve sigara dumanının bir bileşeni olduğu da rapor edilmiştir. (96)



Şekil 7. N-Nitrozo Bileşiklerinin Metabolizması

#### 2.3.4 N-Nitrozo Bileşiklerinin Metabolizması

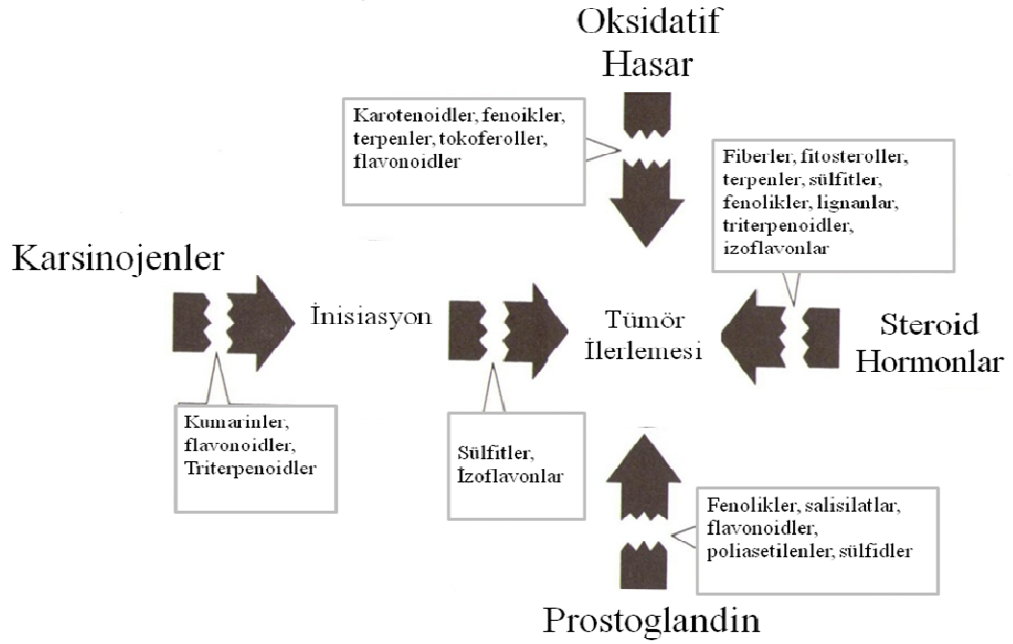
N-Nitrozaminler ortak karsinojenik mekanizmalara sahip, fizyolojik şartlarda oldukça kararlı ve aktif karsinojenlere dönüşmek için metabolik transformasyon gerektiren bileşiklerdir. Dialkilnitrozaminler  $\alpha$  C atomunun Sit P 450 monooksijenaz sistemi oksidasyonu ile kararlı olmayan ara bileşiklere dönüşerek, DNA'da alkil eklentiler oluşturan alkilleyici ajanlar haline gelirler. (97) Şekil 7'de nitrozaminlerden N-Nitrozodimetilamin'in (NDMA) metabolizması görülmektedir. Spontan denitrozasyon sonucu NDMA, alkilaminil radikaline (Şekil 7[2]) dönüşür. Alkilaminil radikali NDMA ile reaksiyona girerek  $\alpha$  nitrozamino C merkezi radikali (Şekil 7[3]) ve bir amin oluşturur (Şekil 7[4]). Sit P 450 (CYP) metabolizması sırasında dealkilasyon yolunda rekombine edilerek  $\alpha$  hidroksinitrozaminleri oluşturan hidroksil radikali ve C merkezli radikaller ortaya çıkar. (Şekil 7[5])  $\alpha$  hidroksinitrozaminler de DNA gibi nükleofilik bileşiklere (X) hasar veren reaktif diazonyum türlerine dönüşür. (Şekil 7[6]) Alternatif bir yolda denitrozasyon meydana gelebilir. Bu yolda NO, metilamin (Şekil 7[7]) ve formaldehit (Şekil 7[8]) oluşur. (98)

## 2.4 Kanserin Önlenmesi

Kanserin önlenmesi için tümör gelişim mekanizmaları kadar kanser sebepleri ve kanser epidemiyolojisi de göz önünde bulundurulmalıdır. İnsanlar modern hayatta karsinojen denizinde yaşamaktadır ve bu durum artık hayatın bir gerçeğidir. Sürekli olarak kanser oluşturma potansiyeli taşıyan çevresel ajanlara maruz kalınmaktadır. Buradaki anahtar sorular şunlardır. Yaşam biçimi değiştirilerek risk azaltılabilir mi? Riski azaltan kimyasallar kullanılabilir mi? Birinci sorunun cevabı oldukça nettir. Sigara içmenin tehlikeleri açıkça tanımlanmıştır. Obezite belli kanser tipleriyle ilişkilidir. Erken ve uzun süreli östrojen ve diğer hormonlara maruziyet meme kanserinde rol oynar. Öyleyse riski azaltmaya yönelik yapılabilecek bir şeyler var demektir. İkinci sorunun cevabı net olmasa da bu olasılığı gösteren veriler cesaret vericidir. (99)

### 2.4.1 Diyetle Kanserin Önlenmesi

Birçok çalışma yağdan zengin, karbonhidrat, sebze-meyve ve liften fakir diyetle beslenmenin kolorektal kanser ve diğer kanser tipleri riskini arttırdığı hipotezini destekler. Hem hayvan deneylerinden hem insanlarda yapılan epidemiyolojik çalışmalardan elde edilen kanıtlar yüksek yağlı ve yüksek kalorili diyetin kanser riskini arttırdığını gösterir. Buna zıt olarak; kalori kısıtlamasının hayvan deneylerinde kimyasallarla indüklenmiş deri ve pankreas tümörü insidansını azalttığı gösterilmiştir. (157) Diyet yolu ile kanserden korunulabileceğine dair bir diğer örnek Şekil 8’de gösterilmiştir.



**Şekil 8. Diyetle alınan fitokimyasalların meme kanserini önlemede etkisi**

Gıdalarda tümörün başlangıç ve ilerleme safhalarında çeşitli basamaklarda etkili olabilecek potansiyel olarak kanser önleyici çok sayıda içerik vardır. Doğal yolla oluşan gıda bileşenleri ve vitaminler hakkındaki bu bilgi diyet modifikasyonunun kanseri önlemede bir yol olduğu fikrini oluşturmuştur.

Dünyada özefageal ve gastrik kanser mortalite oranlarının en yüksek olduğu Çin’de bir bölgede böyle bir besinsel müdahale çalışması sürdürülmüştür. Bu çalışmada diyetle vitamin A ve çinko desteği gastrik kanser;  $\beta$  Karoten, vitamin E ve selenyum desteğinin de özefageal kanser insidansını azalttığı gösterilmiştir. Selenyumun ayrıca prostat kanserinden koruyucu etkileri de gösterilmiştir. Süt ve kalsiyumun fazla tüketilmesi düşük kolorektal kanser riski ile ilişkilidir.  $\beta$  Karoten vitamin A’nın doğal besinsel kaynağıdır. (Retinol) Birçok

bitkisel kaynaktan (yeşil ve sarı sebzelerde) bulunur. Fakat insan ve hayvanlar tarafından sentezlenmez. Vitamin A'nın diğer besinsel kaynağı sütte, yumurtada ve ette bulunan alkol ve aldehid formları ve onların esterleridir.  $\beta$  karoten, vitamin A ve sentetik retinoidler koruyucu ajanlar olarak göze çarparlar.  $\beta$  karoten elektron çöpçüsü antioksidan olarak fonksiyon gösterir, oysa ki retinol ve retinoidler gen ekspresyonunu, doku differensiasyonunu ve hücre proliferasyonunu düzenleyen spesifik nükleer reseptör proteinleri aracılığıyla hücresel differensiasyonu artırır.  $\beta$  karotenin kanserden koruyucu olarak rol oynadığını araştıran çok sayıda çalışma yapılmıştır.

Vitamin D'nin de kolorektal kanseri önleyici rolü olduğunu destekleyen deneysel kanıtlar vardır. Vitamin D'nin hücresel proliferasyonunu ve differensiasyonunu düzenlediği ve anjiogenezi inhibe ettiği rapor edilmiştir.

Çok sayıda gözlemsel epidemiyolojik çalışmaya göre; diyetle sebze, meyve, vitamin mineral alımı ile özellikle meme kanseri olmak üzere kanser insidansı arasında ters ilişki bulunmuştur. Fakat gözlemsel epidemiyolojik çalışmalarla randomize klinik çalışmalar arasında kopukluk devam etmektedir. Bunun sebeplerinden biri, sebze ve meyvelerin alımı ile kanser arasındaki ilişkinin birçok koruyucu ajanı birlikte içeren bu diyetel ürünlerin birlikte alınımına dayalı olmasıdır. Diğer bir neden ise, tek bir maddenin koruyucu etkisini araştıran randomize klinik çalışmaların, o maddenin diğer ajanlarla etkileşimlerini ve buna bağlı koruyucu etkileri tam olarak göstermemesi nedeni ile genellikle başarısız olmasıdır. (100)



#### 2.4.2. Kimyasal Ajanlarla Kanserden Korunma

Bazıları diyet bileşenleri olan belirli kimyasalların, hayvanlarda tümör oluşum insidansını azalttığı gözlenmiştir. Epidemiyolojik araştırmalar insanlarda bazı kimyasalların kanseri önleyebileceği ya da progresyonunu yavaşlatabileceği fikrini oluşturmuştur. Çok sayıda kimyasal bileşik deneysel hayvan çalışmalarında kullanılmıştır, birçoğu da kullanılmaya devam edilmektedir. Karsinogenik süreci inhibe eden ajanların uygulanması ile karsinogenezisin önlenebileceği fikri ilgi çekici bulunmuştur. (100)

Teorik olarak karsinogenezin önlenmesi başlangıç, ilerleme ve progresyon aşamalarının blokajı ile başarılabilir. Başlangıç olaylarının blokajı kimyasalların nihai karsinogene metabolik aktivasyonunu azaltan, kimyasal karsinogenlerin detoksifikasyonunu arttıran, ya da hücrel hedeflere karsinogenlerin bağlanmasını önleyen ajanlar tarafından gerçekleştirilebilir. (100)

Kanserin kimyasal ajanlarla önlenmesi; diyet içerikleri, vitaminler, hormonlar, antihormonlar, terapötik amaçlı kullanılan aspirin, oltipraz ya da sentetik ajanların kanser insidansını azaltmak için kullanılmasıdır. Kanser önleyici ajanlar; antimutajenler ve karsinogen bloke edici ajanlar, antiproliferatifler, antioksidanlar olarak sınıflandırılırlar. Bu ajanlardan bazıları birden fazla mekanizma yolu ile etki göstermeleri nedeni ile aynı anda diğer kategorilere de dahil edilebilirler. (100)

Kimyasal önleyici ajanların keşfi kadar önemli olan diğer bir ihtiyaç ise kimyasal önleyici ajanların etkisini izlemeye kullanılabilecek biyokimyasal

belirteçlerin tespiti. Bu konuda anlamlı verilere ulaşmak için geniş popülasyonları kapsayan uzun süreli çalışmaların yapılması gerekir. Bu nedenle biyokimyasal ve histopatolojik belirteçler çalışmaya dâhil olan popülasyonun progresyonunu izlemede kritik öneme sahiptir. Fakat ne yazık ki çoğu kanser tipi için bu izlemi başarmada yüzde yüz garantili belirteç yoktur. Oral kavite gibi eksternal yüzeylerde gelişen ya da endoskopik tekniklerle lezyonun gözlemlenebildiği ve displazi derecesinin belirlenebildiği kanser tiplerinde (serviks ve mesane) izlem mümkün olabilirken birçok kanser türünde bu mümkün değildir. Bu nedenle bu tür vakalar için invaziv olmayan biyokimyasal testler geliştirilmelidir. (100)

Kimyasal ajanlar ile kanserin önlenmesinde klinik strateji 3 kısımdan oluşmaktadır:

- 1) İnvaziv kanser gelişmeden karsinojenleri bloke etmek ya da geri döndürmek
- 2) Hastalık progresyonunu önlemek
- 3) İkinci primer tümör oluşumunu önlemek

Bazı durumlarda ise bu önleyici ajanlar kemoterapide ya da cerrahide adjuvanlar olarak kullanılmaktadırlar.

Kanserin klinik olarak önlenmesi iki temel kavrama dayanır. Birincisi karsinogenezin premalign değişikliklerle başlayıp sonunda invaziv kansere ilerleyen çoklu basamaklı bir süreç olmasıdır. İkincisi ise ‘karsinogenez sahası’

denilen bir kavrama göre karsinojen maruziyetinin yaygın olarak epitele hasar vererek karsinojene maruz kalmış bütün sahayı çoklu bağımsız kanserlerin gelişmesine yatkınlaştırmasıdır. Bunun örnekleri derinin güneş ışığına, kolonun yağ asitlerine ya da akciğerlerin sigara dumanına maruziyeti sonucunda epitelyal dokuların geniş olarak hasarına bağlı, multipl primer tümörlerin oluşmasıdır. (100)

#### 2.4.2.1 Kimyasal Koruyucuların Moleküler Hedefleri

Kanser gelişiminin inisiasyon ve progresyon basamakları hakkında bilgilerin giderek artması moleküler hedefleri kullanan terapötik etkili antikanser ilaçların geliştirilmesini sağlamıştır. Kanser oluşumu apoptozisten kaçış, büyüme faktörlerinin aşırı ekspresyonu, hücre proliferasyonu artışı ve anjiogenezi içeren moleküler temellere dayanır. Bu moleküler temeller hem kanserde hem de premalign lezyonlarda çoğunlukla aynıdır. (101)

İntraepitelyal neoplazi olarak adlandırılan kanserin erken fazı kimyasal önleyici ajanların klinik olarak değerlendirilmesi için en iyi çalışma modelidir. İntraepitelyal neoplazi normal epitel ile invaziv kanser arasında invaziv olmayan ara bir lezyondur. Bu lezyon ilerlemiş kanserlerin bazı genetik ve fenotipik karakteristiklerini taşıdığı için kanseri önleme ve kanser tedavisinin hedefleri çakışabilir. Kanseri saptayan daha sensitif metodlar ile kanserler intraepitelyal neoplazi safhasında tanı alabilir. (101)

Önleme ve tedavinin çakışan hedefleri Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (EGFR), HER-2/neu (İnsan Epidermal Büyüme Faktörü reseptörü

benzeri onkogen) p53,  $\beta$  katenin, PPAR- $\delta$  (peroxisome proliferator-activated receptor- $\delta$ ), COX-2 (Siklooksijenaz 2), SERM (Selektif Östrojen Reseptörü Modölatörü) ve aromataz inhibitörleridir. Fakat önleme ve tedavi girişimlerinin son noktaları bir bakıma farklıdır. Faz I terapötik çalışmalarda primer sonuç maksimum tolere edilen doz (MTD) iken, önleme çalışmasında primer sonuç genellikle intraepitelyal neoplazinin invaziv kansere progresyonunun ya da ikincil tümörün oluşumunun inhibisyonudur. (Örn: karşı memede meme kanseri) Buna ilave olarak önleme çalışmasının amacı predispozan lezyonların (Örn: kolon polipleri) kansere dönmesinin önlenmesi olabilir. Önleme çalışmalarında son noktaya ulaşmak için daha uzun süre gerekebilir. Bu da şu anlama gelir; kullanılan ajanlar ve dozları uzun dozaj periyodu boyunca (bazı vakalarda yaşam boyunca) tolere edilebilir olmalıdır. Önleme çalışmaları pahalıdır ve değerlendirmesi daha zordur. İlaç firmaları bu nedenle bu tür çalışmalardan kaçınırlar. Abbruzzese ve Lippman bunun için şöyle bir çözüm önermiştir. Önleyici ve tedavi edici etki için ortak hedefler biliniyorsa intraepitelyal neoplazili ve ilerlemiş kanserli hastaları birlikte içeren çalışmalar planlanabilir. Böylece bir grup hastada biyopsi ve cerrahi sonrası alınan doku örnekleri kullanılarak İEN'nin progresyonunun yavaşladığı ve hedefin ilaç tarafından etkilendiğini görmek için mümkün olabilir. Plazmadan elde edilen beyaz kan hücreleri her iki ajan tipinin hedeflerini valide etmek için kullanılabilir. (101)

#### 2.4.2.2. Kimyasal Koruyucu Ajanların Sınıflandırılması

##### **Antimutajenler ve Karsinojenleri Bloke Eden Ajanlar :**

- **Faz II metabolik enzim indükleyicileri:** N-Asetil-L-Sistein, S-Allil-L-Sistein, Oltipraz, Fenheksil İzotiyosiyanat
- **Polifenoller:** Ellajik Asit
- **Diğer:** Curcumin, DHEA(Dehidroepiandrostenodion), Fluastreone (16-fluoro-DHEA)

##### **Antiproliferatifler:**

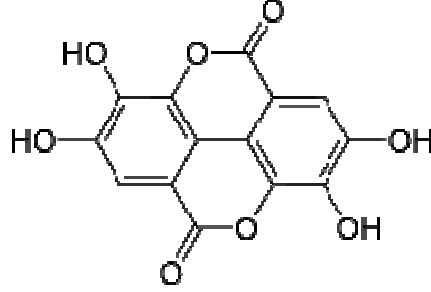
- **Retinoidler ve Karotenoidler:**  $\beta$  Karoten, 4-HPR, 13-cis-retinoik asit, vitamin A
- **Antihormonlar:** Finasterid, Tamoksifen
- **Antiinflamatuvarlar:** Aspirin, Karbenoksolon, Curcumin, 18  $\beta$ -glisirretinik asit, İbuprofen, Piroksikam, Sulindak
- **G6PDH inhibitörleri:** DHEA, Fluasteron
- **Ornitin Dekarboksilaz inhibitörleri:** N-Asetil-L-Sistein , Aspirin, Karbenoksolon, Curcumin, DFMO( 2-diflorometilornitin), 18  $\beta$ -glisirretinik asit , 4-HPR( all-trans-N-(4-hidroksifenil)-retinamid), İbuprofen, Piroksikam, Sulindak, 13-cis-retinoik asit, vitamin A
- **Protein Kinaz C İnhibitörleri:** Karbenoksolon , 18  $\beta$ -glisirretinik asit, 4-HPR( all-trans-N-(4-hidroksifenil)-retinamid), Tamoksifen
- **Diğer:** Kalsiyum

##### **Antioksidanlar :**

- **Antiinflamatuvarlar:** Bakınız antiproliferatifler.
- **Antioksidanlar:** N-Asetil-L-Sistein,  $\beta$  Karoten, Curcumin, Ellajik Asit, Fumarik asit
- **Faz II metabolik enzim indükleyicileri:** N-Asetil-L-Sistein, S-Allil-L-Sistein, Oltipraz, Fenheksil İzotiyosiyanat
- **Tiyoller:** N-Asetil-L-Sistein, S-Allil-L-Sistein, Oltipraz
- **Retinol**
- **Vitamin C**
- **Vitamin E**

**Tablo 3: Kimyasal koruyucu ajanların farmakolojik ve kimyasal yapıya göre sınıflandırılması**

#### 2.4.3.Ellajik Asit (EA)



Şekil 9. Ellajik Asitin kimyasal yapısı

##### 2.4.3.1. EA'nın Fiziksel Özellikleri

*Molekül Formülü:* C<sub>14</sub>H<sub>6</sub>O<sub>8</sub>

*Molekül Ağırlığı:* 302.1 g/mol

*Yoğunluğu:* 1.67g/cm<sup>3</sup>

Ellajik Asit (EA) (4,4',5',5,6,6'- hekzahidroksi difenik asit 2,6,2',6'- dilakton), kırmızı meyveler (çilek, böğürtlen, ahududu v.b), nar, ceviz, pekan cevizi ve diğer bitkisel gıdalarda doğal olarak oluşan fenolik lakton bileşiğidir. (102) EA, Ellajitaninlerin hidrolizi sonucu açığa çıkar, 4 hidroksil grubu ve 2 lakton grubu içerir. Hidroksil grubu antioksidan aktiviteyi artırır ve hücreleri oksidatif hasardan korur. (103)

Saf Ellajik Asitin biyoyararlanımı ellajitaninlerle karşılaştırıldığında düşüktür. EA'nın zayıf emilimi suda az çözünmesi, fizyolojik pH'da bağirsakta Ca ve Mg ile iyonize olarak daha az çözünen bileşiklere dönüşmesi ve aynı zamanda intestinal epitele bağlanma kapasitesi ile ilişkilidir. EA'nın intestinal mikroflora tarafından biyotransformasyonu sonucu EA'nın üriner metabolitleri olan 'Ürolitinler' ortaya çıkar. Absorbsiyonu takiben EA ve ürolitinler

konjugasyona uğrar. İdrarda ve plazmada metil, glukuronil ve sülfat grupları ile konjuge formları bulunur. (104)

Ellajitaninlerin hidrolizi sonucu ortaya çıkan plazma EA, 2 ortodihidroksil grubu içerir ve Katekol-O-Metil Transferaz (COMT) aktivitesi aracılığı ile dimetilellajik aside transforme olabilir. (104) Dimetilellajik Asit daha sonra glukuronize olarak dimetilellajikasit glukuronid'e (DMEAG) dönüşür.

EA antioksidan, antiinflamatuvar, antikarsinojenik, antiviral, antibakteriyel, antiproliferatif olmak üzere bir dizi biyolojik özelliğe sahiptir. (105)

EA; Nitrozaminler, Azoksimetan, Mikotoksinler ve Polisiklik aromatik hidrokarbonlar gibi çeşitli karsinojenlere karşı koruyucu özelliklere sahiptir. (106)

EA, doğal, diyetel fenolik bir antioksidandır, hücre siklusunun G0/G1 fazını durdurup, hücrenin yaşayabilirliğini azaltır ve apoptozisi indükler. (107) EA'nın insan mesane kanseri hücre kültürü hücrelerinde (T24) p53 ve p21 gen ekspresyonunu arttırdığı, Siklin Bağımlı Kinaz 2 (CDK2) gen ekspresyonunu azalttığı, böylece G0/G1 fazını durdurduğu bildirilmiştir. (108) Son zamanlarda EA tedavisinin insan kolon kanseri hücre kültüründe (SW 480) IGF II tarafından aktive edilmiş p21 (waf1/Cip1)'in down regülasyonuna sebep olduğu ve G1/S geçiş fazı üzerinde kümülatif etkiye aracılık ederek apoptozise öncülük ettiği rapor edilmiştir. (109)

EA, hepatoprotektif özelliklere sahiptir. İn vitro ortamda EA'nın ekstrasellüler matriks üretimini arttıran hepatik satellit hücrelerin aktif şekle dönüşümünü yavaşlatarak hepatik fibrozisi geriletmediği gösterilmiştir. Serbest

radikal çöpçüsü gibi görev yaparak karaciğere spesifik ekstrasellüler homeostazı düzenler  $H_2O_2$ 'nin hasar verici etkisini azaltarak, hidroksil ve süperoksit anyonlarını toplayarak güçlü antioksidan etki gösterir. DNA ile direkt etkileşerek intrasellüler mekanizmaları düzenler. Yapılan çalışmalarda DNA ve proteinlere geri dönüşümsüz olarak bağlandığı rapor edilmiştir.  $Zn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  and  $Cu^{2+}$  gibi divalen katyonlarla şelasyon yapması nedeni ile metalloproteinazları inhibe eder ve anjiogenezi önler. HbeAg (Hepatit e antijeni) sekresyonunu azaltarak anti HBV (anti hepatit B virüs) aktivite gösterir. Vasküler endotelial hücrelerde vasküler patolojilerle ilişkili olan NF- $\kappa$ B (Nükleer Faktör  $\kappa$  Beta) aktivasyonunu baskılar. Karsinojenlerin DNA'ya bağlanmasını inhibe ederek karsinojenlerin biyoaktivasyonunu önler ve kanser hücrelerinin büyümesini yavaşlatır. Antikanser özelliklerinden antioksidan, antiinflamatuvar, anti proliferatif etkileri, hücre içi sinyal yollarına etkileri, hücre siklusunu durdurucu etkisi ve apoptozis sorumludur. Hidrofobik bileşiklerin glutatyon ile konjugasyonunu katalizleyerek detoksifikasyon ve biyotransformasyonunu sağlayan GST (Glutatyon S-Transferaz) enzimini süre ve konsantrasyona bağlı olarak inhibe eder. Bu özelliği nedeni ile kemoprotektif bir ajan olarak kullanılabileceği öne sürülmüştür. (110)



## 2.5. Kanser ve Pürin Nükleotid Metabolizması

Pürinler, heterosiklik bileşikler olup hem karbon hem de karbon dışı (hetero) atomlar içeren halkalı yapılardır. Pürinlerin başlıca türevleri nükleozidler ve nükleotidler olup bunların her ikisi de, azot hetero atomuna bir  $\beta$ -N- glikozid bağı ile bağlanmış siklik şeker (çoğunlukla bir pentoz) içerir. Nükleozidler buna ek olarak, şekerin hidroksil grupları ile esterlenmiş bir veya daha fazla sayıda fosfat grubu içerirler.

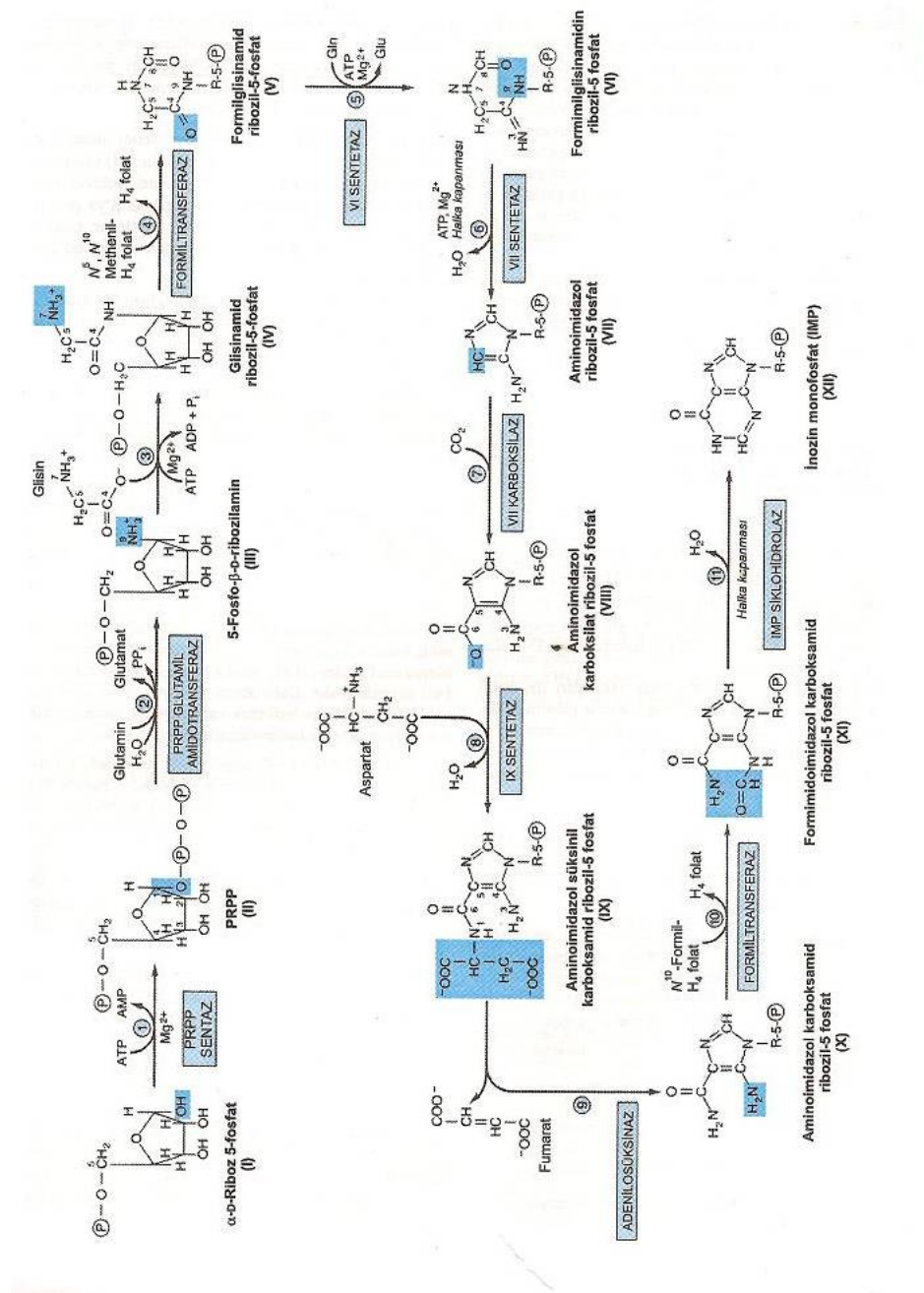
Sentezi sırasıyla;

1. Amfibolik ara maddelerden sentez (de novo sentez),
2. Pürinlerin fosforibozilasyonu ve
3. Pürin nükleozidlerinin fosforilasyonu ile olur.

Pürinlerin de-novo sentezi (Şekil 10), Riboz-5 Fosfat'la başlar. Sentez yolunun 1. basamağında, ATP girişi ile 5- fosforibozil-1 –pirofosfat (PRPP) meydana gelir. Bu madde de novo pürin biyosentez yolunda ilk oluşan ara madde olmasının yanı sıra, pürin kurtarma yolunda,  $\text{NAD}^+$  ve  $\text{NADP}^+$  biyosentezinde yer alan bir ara maddedir. Bu reaksiyon PRPP sentetaz enzimi tarafından katalize edilir.

Sentezin 2. basamağında 1. karbona bağlı pirofosfat grubu glutaminin amid grubuyla yer değiştirir. Böylece 5'-Fosfo- $\beta$ -D-ribozilamin (Fosforibozilamin) oluşur. Bu reaksiyonu PRPP glutamil amidotransferaz katalizler. Bu ilk iki reaksiyon de novo sentez yolunda hız kısıtlayıcı basamaklardır.

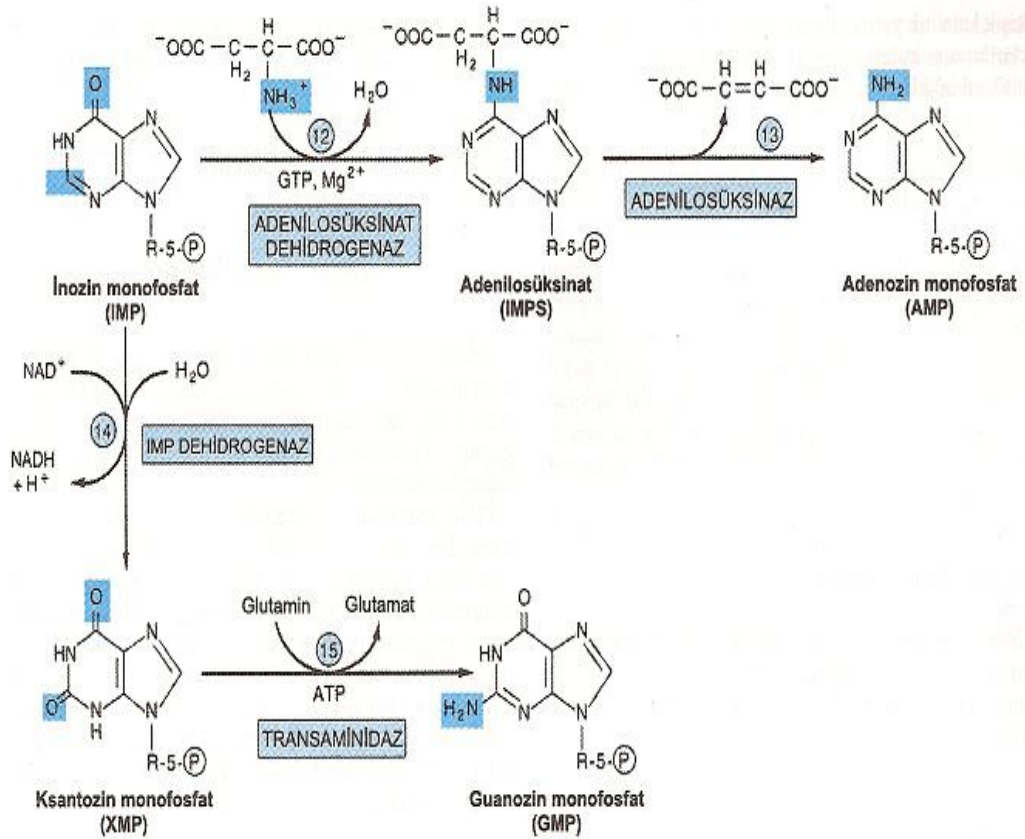
Diğer reaksiyonlar, 3. - 11. basamağa kadar ardışık reaksiyonlar şeklinde devam ederek, son basamak olan 11. basamakta IMP siklohidrolaz tarafından katalizlenen formimidoimidazol karboksamid ribozil-5-fosfatın halkasının kapanması ile, ilk pürin nükleotidi olan inozin monofosfat (IMP) oluşur.(111)



Şekil 10: Pürinlerin de-novo sentezi

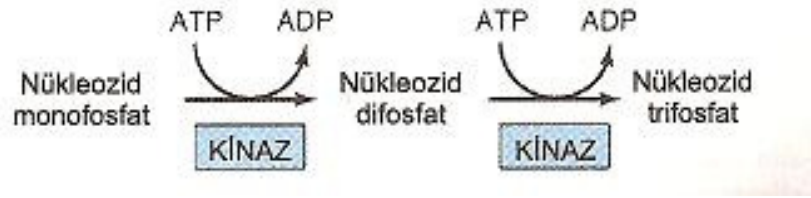
IMP sentezinden sonra yol dallanır ve iki kısa tepkime dizisi, AMP ve GMP oluşumuna yol açar. IMP'ye aspartat eklenmesi adenilosüksinat oluşturur. Bu tepkimede GTP'ye ihtiyaç vardır. Adenozin 5'-monofosfat (AMP) oluşturmak üzere fumaratın serbest bırakılması adenilosüksinaz tarafından katalizlenir.

IMP'nin, IMP dehidrogenaz tarafından katalizlenen bir tepkimede  $\text{NAD}^+$  tarafından oksidasyonu ksantozin monofosfat (XMP) oluşturur. XMP'nin 6-okso grubunun glutaminin amid azotu tarafından transamidasyonu, 5. tepkimeye benzer. (111)



Şekil 11: IMP'nin AMP ve GMP'ye çevrilmesi

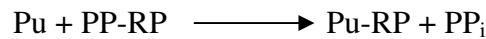
AMP ve GMP mononükleotidleri, nükleozid monofosfat kinaz tarafından katalizlenen ATP'den fosforil aktarılması yoluyla nükleozid difosfatlarına (ADP ve GDP) çevrilir. GDP, daha sonra, bir diğer ATP tüketilerek nükleozid difosfat kinaz tarafından GTP'ye çevrilir. (Şekil 12) ADP'nin ATP'ye çevrimi, birincil olarak oksidatif fosforilasyon ikincil olarak glikoliz ve sitrik asit döngüsü tepkimeleri ile başlarılır.



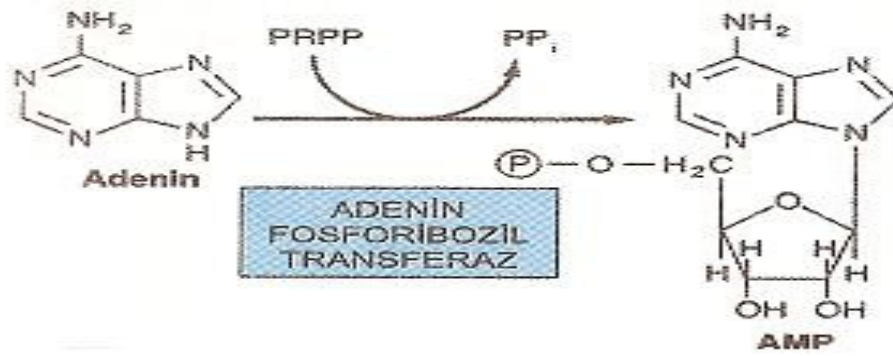
**Şekil 12: Nükleozid monofosfatların nükleozid difosfatlar ve nükleozid trifosfatlara çevrilmesi**

#### 2.5.1 Kurtarma Yolları (Salvaj Yollar)

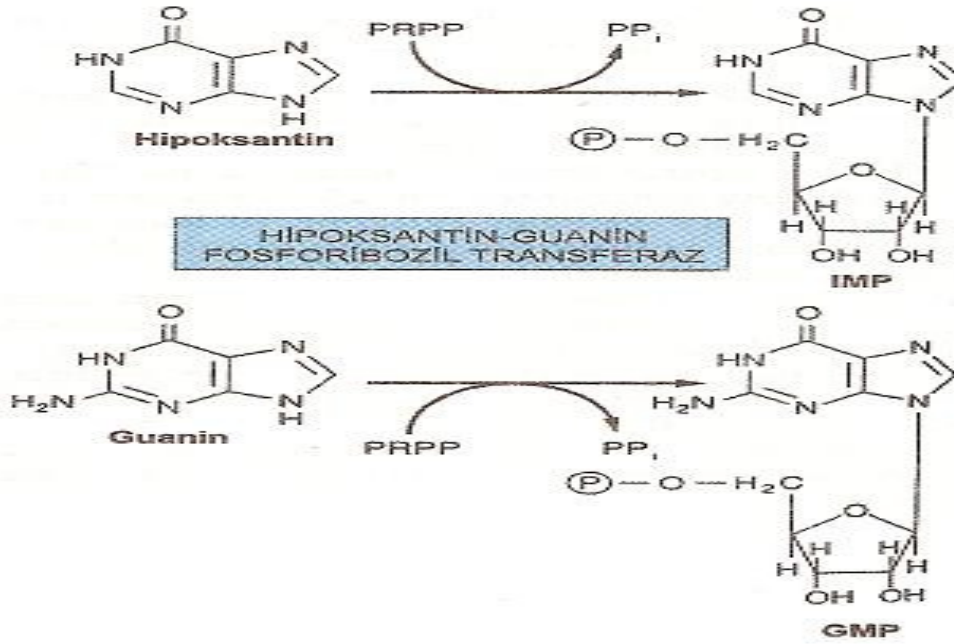
Pürin, pürin ribonükleozidleri ve pürin deoksiribonükleozidlerinin mononükleotidlere çevrimi, de novo senteze oranla daha az enerji gerektiren ve kurtarma tepkimeleri olarak bilinen olayları kapsar. Miktar olarak daha önemli olan bu mekanizma, serbest bir pürinin (Pu), PRPP tarafından, pürin 5'-mononükleotid (Pu-RP) oluşturmak üzere fosforibozilasyonunu kapsar:



Pürinlerin, PRPP'ye bağımlı fosforibozilasyonu, adenin fosforibozil transferaz ( adenini AMP'ye çevirir) (Şekil 13) ve hipoksantin-guanin fosforibozil transferaz (hipoksantin veya guanini IMP veya GMP'ye çevirir) (Şekil 14) tarafından katalizlenir.

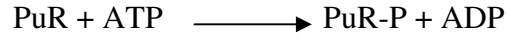


Şekil 13. Adenin adenin fosforiboziltransferaz katalizlenen fosforibozilasyonu



Şekil 14. Hipoksantin ve guaninin sırasıyla IMP ve GMP vermek üzere fosforibozilasyonu

İkinci bir kurtarma mekanizması, bir pürin ribonükleozidin (PuR) ATP tarafından direkt fosforilasyonunu kapsar:



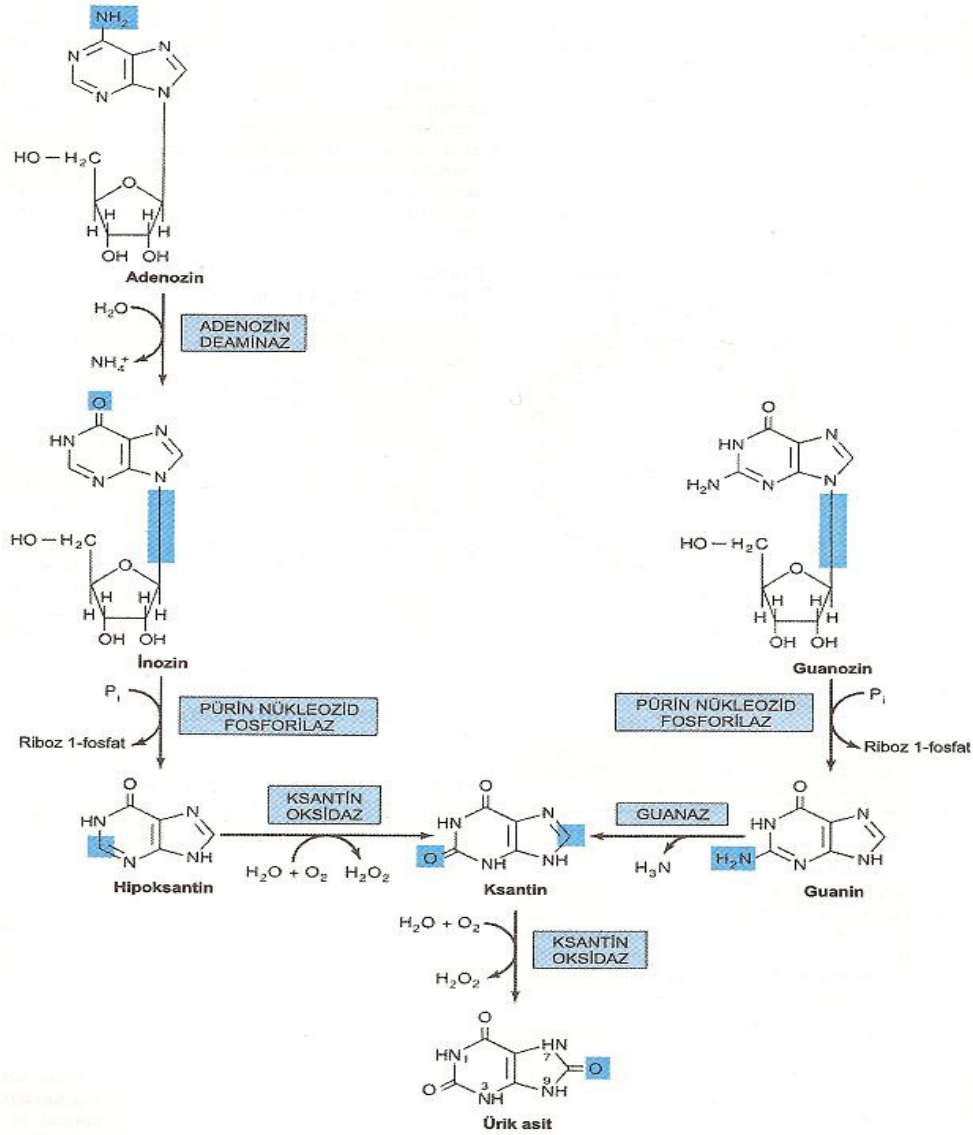
Adenozin kinaz, adenozinin AMP'ye veya deoksiadenozinin dAMP'ye fosforilasyonunu katalizler. Deoksisitidin kinaz, deoksitidin, deoksiadenozin ve 2'-deoksiguanozinin sırasıyla, dCMP, dAMP ve dGMP'ye fosforilasyonunu katalizler.

Pürin nükleotid biyosentezinin ana yeri olan memeli karaciğeri, kendi biyosentezlerini yapamayan dokular tarafından kurtarılmak ve kullanılmak üzere pürin ve bunların nükleozidlerini sağlar. (111)

#### 2.5.2 Pürin Nükleotidlerin Yıkımı (Katabolizma)

Adenozin deaminaz enzimi, adenozin ve 2'-adenozini sırasıyla inozin ve 2'-deoksiinozine dönüştürmektedir. (Şekil 15) Pürin yıkım yolunda pürin nükleotidleri, 5'-nükleotidaz enziminin etkisiyle fosfat gruplarını kaybederek adenozin monofosfata (AMP) dönüşmektedirler. Elde edilen AMP ya 5'-nükleotidaz ile adenozine ya da AMP deaminaz ile deamine edilerek inozin monofosfata (IMP) dönüşmektedirler. Daha sonra adenozin, adenozin deaminaz ile inozine, IMP ise 5'-nükleotidaz tarafından inozine çevrilmektedir.

Bundan sonraki basamak diğer pürin bazı olan guanozinle ortak yürür ve bu reaksiyonları pürin nukleozit fosforilaz (PNP) enzimi katalizler.



Şekil 15. Pürin yıkım yoluyla ürik asitin oluşması (111)

Kanser hücrelerinde DNA turn-over'ı ve buna bağlı olarak nükleotidlerin salvaj ara yolu normal hücreye göre çok hızlıdır. Bu olay kanser hücresinin ihtiyaç duyduğu pürin nükleotidlerin artışı ile birlikte seyretmektedir. Kanserli hücrelerde metabolik yolda görev alan enzimlerin aktivitelerindeki değişimler kanser hücresinin enzimatik profilini yansıtmaları açısından önemlidir. (112,113)

## 2.6 DNA Turn Over Enzimleri

### 2.6.1 Adenozin Deaminaz (ADA) Enzimi (adenozin amino hidrolaz EC 3.5.3.3)

Adenozin deaminaz enzimi (ADA; EC 3.5.4.4, Adenozin aminohidrolaz) adenozin ve deoksiadenozinden amonyağın ayrılması ile inozin ve deoksiinozin oluşumunu katalizler.(114,115) Pürin yıkım yolunda, inozin ve deoksiinozinin oluşumundan sonra hipoksantin oluşur. Hipoksantin salvaj yolun en önemli substratlarındandır. Bu yüzden ADA aynı zamanda salvaj yolun da enzimi olarak da kabul edilmektedir. (116,117)

#### 2.6.1.1 ADA'nın Yapısı

Adenozin deaminaz, sekiz  $\beta$  zinciri ve periferde sekiz  $\alpha$  heliks içeren paralel bir  $\alpha\beta$  kompleksi içerir. Bu protein 1088 nükleotid tarafından şifrelendirilmektedir. Protein zinciri başlangıçtaki metiyonin hariç 362 aminosit içerir. N- terminal uçtaki aminoasit alanin, C- terminal uçtaki aminoasit ise lösin'dir. (118)

ADA'nın atomik absorpsiyon spektroskopisine göre her enzim molekülü başına  $0,9 \pm 0,1$  Zn atomu bağlar. Aktif merkezdeki Zn iyonu, His<sup>15</sup>, His<sup>17</sup> ve His<sup>214</sup>, ün N atomlarına, Asp<sup>295</sup>, in O atomuna ve hidroksipürin ribonükleozid' in (HDRP) O atomuna koordine bağlarla bağlanmıştır. (119)

Spesifik olarak adenozin ve bazı diğer nükleozit analoglarını substrat olarak kullanır. (120) Hayvan dokularında yaygın olarak bulunur. En yüksek aktivite çekum, intestinal mukoza ve dalakta bulunur. Buna karşılık iskelet

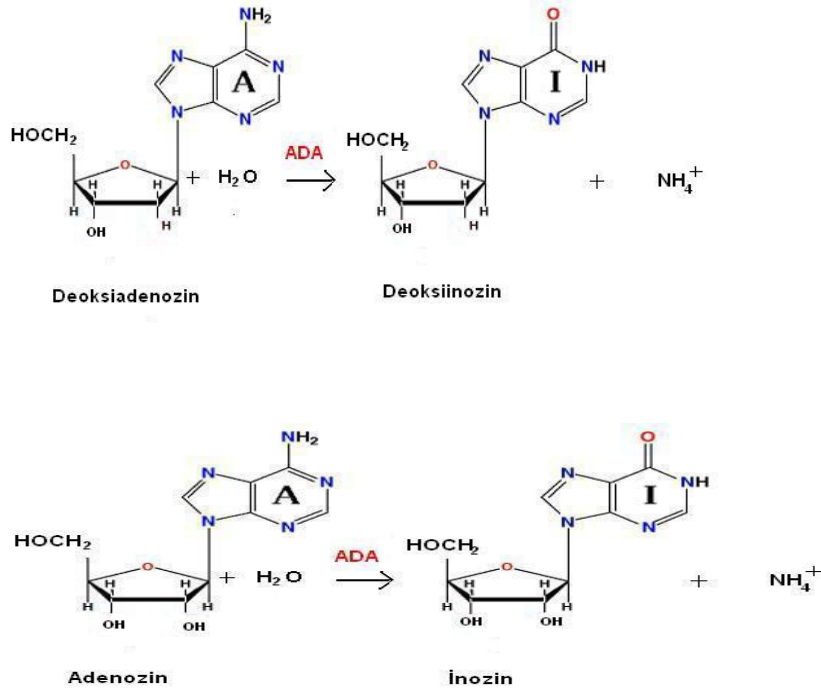


kasında, deride ve kemikte de çok az aktivite vardır. Enzim büyük ölçüde hücrenin sitoplazmasında bulunmasına karşılık, kısmen nükleusta da mevcuttur. (121,122)

ADA enziminin substrat spesifikliğı, elde edildiğı kaynaklara göre değışiklik gösterir. Aynı şekilde farklı organ ve dokulardan elde edilen enzim farklı optimal pH, elektroforotik mobilite ve substrat spesifikliğı gösterir. Buna karşılık aynı organizmanın farklı dokularında aynı enzim mevcuttur. (123) Malign tümörlerde, viral hepatitte ve sirozda serumda ADA enzim aktivitesinin arttığı görülmüştür. Özellikle günümüzde serum ADA aktivitesi, akciğer kanseriyle akciğer tüberkülozunun ayırıcı teşhisinde de kullanılmaktadır. (124) Tüberkülozda serum ADA aktivitesinde anlamlı derecede yükselme görülürken, akciğer kanserinde anlamlı derecede değışiklik görülmemektedir.

#### 2.6.1.2. ADA'nın Görev Aldığı Reaksiyonlar

ADA, adenosin ve 2'- deoksiadenosinin sırası ile inosin ve 2'- deoksiinosine yıkım yolunu katalize etmektedir. Bu reaksiyon geri dönüşümsüz olduğu için, adenosinin yıkılmasında kontrol basamağını oluşturur. Adenosin ve deoksiadenosin moleküllerinin yüksek konsantrasyonları hücre için toksik olduğundan bu nükleozidlerin hücre içi seviyelerinin düzenlenmesi açısından ADA'nın katalizlediğı reaksiyon oldukça önemlidir. (125)



Şekil 16: ADA'nın katalizlediği tepkimeler

#### 2.6.1.3. ADA İzoenzimleri

ADA enziminin iki izoformu vardır. Düşük molekül ağırlıklı olan ADA1 izoformu, timus, eritrosit ve kalpte bulunurken, yüksek molekül ağırlıklı ADA2 izoformu karaciğer, böbrek ve bağırsaklarda bulunur.(126) İki molekül ADA1, glikoprotein yapısındaki bir proteinle birleşerek ADA2 formunu meydana getirdiği gösterilmiştir. (127,128)

ADA bağlayıcı protein (CD26); lenfoid ve epitelyal hücrelerde ekspresse edilen 110kDa'luk bir glikoproteindir. Bu protein ekstrasellüler ADA enzimi ile kompleks oluşturur, bunun yanısıra intrinsik serin proteaz aktivitesi de gösterir.

(129) CD26-ADA kompleksi'nin ekstrasellüler adenozin konsantrasyonlarının düzenlenmesinde rol aldığı düşünülmektedir.(130)

#### 2.6.1.4. ADA'nın Lokalizasyonu

ADA, insan ve hayvan dokularının hemen hemen hepsinde bulunmaktadır. Lenfoid dokularda diğer dokulara göre daha fazla ADA aktivitesi olduğu tespit edilmiştir. ADA'nın esas fizyolojik aktivitesi lenfoid çoğalma ve farklılaşma ile ilgilidir. (210) ADA düzeyi lenfositlerde eritrositlere göre 10 kat daha yüksektir. T lenfositlerinde B lenfositlerine göre daha yüksek oranlarda bulunurken, daha az farklılaşmış T hücrelerinde daha fazla bulunmaktadır. Bu nedenle, ADA hücresel immüitenin bir göstergesi olarak da kabul edilmektedir. (131-133)

ADA aktivitesi; insanda lenfoid olmayan dokular arasında özellikle duodenal epitelyal hücre villuslarında, daha az olarakta gastrointestinal sistemin diğer bölümlerinde, santral sinir sisteminin tüm hücre tiplerinde, kas, akciğer, pankreas ve böbrek gibi organlarda çeşitli miktarlarda bulunur. (134)

#### 2.6.1.5 ADA'nın Substratları (Adenozin ve 2'-deoksiadenozin)

Adenozin, ADA enzimi için doğal bir substrattır. Adenozin hücre içine girdiği zaman üç alternatif metabolizma ile karşı karşıya gelmektedir. Birincisi SAH(S-Adenozil Homosistein) hidrolaz ile S-adenozil homosistein oluşumu, ikincisi adenozin kinaz ile adenilik asite ( $AMP \rightarrow ATP$ ) fosforilasyonu ve üçüncüsü de ADA ile inozine deaminasyonudur. Bu üç alternatif yoldan enzim substrat ilgisi en fazla olan birinci reaksiyon olup bunu ikinci ve üçüncü reaksiyon izlemektedir. Bunun için adenozin konsantrasyonu düşük olduğunda adenozinin

büyük kısmı ATP' ye fosforillenirken, adenozinin yüksek konsantrasyonunda ise inozine deaminasyonu görülmektedir. Substrat olarak 2'-deoksiadenozin kullanıldığında iki alternatif metabolizma bulunmaktadır. Bunlardan birincisi ADA ile deoksiinozin oluşturmak üzere deaminasyonu, ikincisi deoksiadenozin kinaz ile deoksiadenilik asite fosforilasyonudur. 2'-deoksiinozin oluşurken yüksek konsantrasyonunda dAMP meydana gelmektedir. (135)

#### 2.6.1.6 dATP Birikmesinin Metabolik Sonucu

Deoksiadenozin trifosfat (dATP) adenozin metabolizmasının bir ürünüdür. dATP, DNA sentezi için gerekli olan normal bir ön maddedir. Bununla beraber yüksek konsantrasyonlarda zararlı etkiler göstermektedir. ADA eksikliğinin bir sonucu olarak ortamda dATP konsantrasyonu artmaktadır. dATP hücrenin büyümesi için gerekli olan bir enzim olan ribonükleotid redüktazı inhibe etmektedir. Bunun sonucu olarak DNA yapımı inhibe olmakta ve DNA iplik kırılmaları artmaktadır. (136) Sonuç olarak dNDP ya hızla DNA'ya dönüşmekte ya da deoksinükleozidlere yıkılmaktadır. Lenfositlerde ve diğer memeli hücrelerinde deoksinükleotid havuz büyüklüğü az olup, DNA sentezi için çok kısa bir süre yeterli olmaktadır. dATP, ribonükleotid redüktazı inhibe ettiği için dNDP yeterli sentezlenememektedir. (137)

#### 2.6.2. 5'Nükleotidaz Enzimi (5'NT)

5'Nükleotidazlar farklı substrat spesifitesine sahip bir grup enzimden oluşur. Ribo ve Deoksiribonükleozid fosfatların defosforilasyonunu katalizleyerek hücrelerde nükleotid havuzu dengesinin korunmasını sağlarlar. (138)

Bugüne kadar 7 adet insan 5' nükleotidazı izole edilmiştir. (139) Bunlar;

**Tablo 4. 5' nükleotidaz ailesi ve doğal substratları**

| <b>5' NÜKLEOTİDAZ AİLESİ</b>                 | <b>DOĞAL SUBSTRATLARI</b>                                                                                                                                                                                                                                       |
|----------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. Ekto-5'-nükleotidaz (eN)                  | <i>Geniş substrat spesifitesi; Pürin ve pirimidin deoksi- ve ribonükleozid monofosfatlar</i>                                                                                                                                                                    |
| 2. Sitozolik 5'-nükleotidaz IA (cN-IA)       | AMP, dTMP, dCMP, dGMP, dAMP, dIMP (dUMP?)                                                                                                                                                                                                                       |
| 3. Sitozolik 5'-nükleotidaz IB (cN-IB)       | AMP                                                                                                                                                                                                                                                             |
| 4. Sitozolik 5'-nükleotidaz II (cN-II)       | <i>6-Hidroksi Pürinler; IMP, dIMP, GMP, dGMP ve XMP</i><br><i>Fosfotransfer reaksiyonu: İnozin ve Deoksiinozin</i>                                                                                                                                              |
| 5. Sitozolik 5'-nükleotidaz III (cN-III)     | <i>Pirimidin monofosfatlara sınırlı nükleotidaz aktivitesi: CMP, UMP, dUMP, dCMP ve dTMP</i><br><i>Fosfotransfer reaksiyonu: Üridin, Sitidin ve Deoksisitidin</i>                                                                                               |
| 6. Sitozolik 5'3'deoksiribonükleotidaz (cdN) | <i>2' ve 3' monofosfatlar için en yüksek nükleotidaz aktivitesi: 3'-dUMP, 3'-dTMP, 3'-UMP ve 2'-UMP; 5'-dIMP, 5'-dUMP, 5'-dCMP, 5'-dTMP ve 5'-dAMP için daha düşük nükleotidaz aktivitesi</i><br><i>Fosfotransfer reaksiyonu: Deoksiüridin ve Deoksitimidin</i> |

5' Nükleotidazlardan beşi sitozolde, biri mitokondriyel matrikste lokalizedir. Bir tanesi de dış plazma membranına tutunmuştur. (139) Bu enzimler 5' nükleozid monofosfatları hidroliz etme ortak özelliğine sahiptir ve çoğunlukla substrat spesifiteleri çakışır. Fakat 5'(d)NMP(Nükleozit monofosfat)' lere affiniteleri ve 2' ve 3'- NMP substratlarını hidroliz etme yetenekleri farklılık gösterebilir. 5' Nükleotidazların birçoğu sınırlı doku dağılımına sahip iken, bazıları birçok dokuda aynı anda bulunabilir. Nükleotidazların dokuya spesifik ekspresyonundaki, subsellüler lokalizasyonundaki ve substrat spesifitesindeki farklılıklar belirli bir hücre ya da doku tipinin metabolik ihtiyaçlarına göre nükleotid havuzlarının düzenlenmesini sağlar. Çünkü mitokondri ve sitoplazma kendi kinaz ve nükleotidaz takımlarına sahip olduğu için, substrat döngüleri bu kompartmanlardaki nükleotid havuz dengesini sağlayabilmek için bağımsız olarak işleyebilir. (139)

Sitozolik 5'-NT-I [cN-I] ve ekto-5'-NT'nin adenosin oluşumunda görev aldığı düşünülmektedir. (140) Kalp, meme dokusu ile beyin dokusunun bazı alanlarında adenosin AMP-selektif (cN-I) 5 '-NT tarafından üretilir. (140)

Sitozolik 5' nükleotidaz II (cN-II), insanda birçok dokuda ekspresse edilir. cN-II İnozin monofosfata selektif bir nükleotidazdır ve yüksek ekspresyonu in vivo ve in vitro çalışmalarda ara-C (Sitarabin), Kladribin ve Gempitabin gibi klinik açıdan önemli olan nükleozid analoglarına direnç gelişimi ile ilişkili bulunmuştur. (139) cN-II nükleozid analoglarının monofosfat formlarının inaktivasyonunda yer alarak direnç gelişimine sebep olmasına rağmen aynı

zamanda lösemik hücrelerin proliferasyon durumunu yansıtan ve hastalığın agresivitesini gösteren bir belirteç olarak da rol oynayabilir. (141)

Ekto-5' -NT (CD73) adenzinin ekstrasellüler üretimini sağlayan bir enzimdir.(142) Aynı anda pekçok dokuda değişken düzeylerde ekspresse edilir Fibroblastlarda çok yüksek düzeylerde ekspresse edilirken, bazı kanserlerde çok düşük düzeyde ekspresse edilir ya da hemotopoetik orijinli hücrelerde hiç bulunmaz. Ekto-5 ' -NT (CD73) plazma membranına glikozil fosfatidilinozitol ile bağlıdır. Bazı hücrelerden ya da solid tümörlerdeki iskemi ve nekroza sekonder ekstrasellüler olarak biriken adenin nükleotidlerden aktif olarak salınan AMP'den adenzin üretir. (143)

### 2.6.3. Ksantin Oksidaz Enzimi (XO)

1902'de Schardinger tarafından formaldehit varlığında metilen mavisini dekolorize eden, sütte bulunan bir enzim fraksiyonu keşfedilmiş, (144) 20 yıl sonra aynı enzim fraksiyonunun urat üretiminde rol aldığı bulunmuştur. (145) Daha sonra aynı 'Schardinger' ya da ksantin oksidoredüktaz (XOR) enziminin pürin nükleotid yıkım ürünleri olan ksantin ve hipoksantinden urat üretiminin gerçekleştiği insan pürin katabolizmasındaki terminal hız kısıtlayıcı basamaklara ait olduğu gösterilmiştir. İnsanlarda urat terminal bir metabolittir. Rat karaciğerinde ise urat allantoin okside olur. (146)

XOR'nin ksantin dehidrogenaz (XDH) ve ksantin oksidaz (XO) olmak üzere iki izoformu bulunur. XO; ksantin dehidrogenazdan posttranslasyonal

modifikasyonla oluşur. Ratlarda XDH proteinini kodlayan gen kromozom 6(6q13)'da ve insan sekansı kromozom 2 (2p23.1) üzerinde lokalizedir. (147)

XO izoformu; Hipoksantin ya da Ksantin'in substrat olduğu reaksiyonda moleküler oksijene elektron transfer ederek süperoksit anyonu ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türlerini oluşturur. XDH; hipoksantin ve ksantinden ürat üretimi sırasında oluşan elektronları  $\text{NAD}^+$  ye transfer eder ve  $\text{NAD}^+$  nin indirgenmesi ile NADH oluşur. (148)

XOR iki eşdeğer 145 kDa'luk subünite içeren nonglikozile bir metalloflavoproteindir. Her subünite bir molibdopterin, bir FAD ve iki Fe-S merkezi içerir. XOR sekansı diğer molibdoenzimlerle dikkat çekici benzerliğe sahiptir. Aldehid oksidazla kısmen aynı substrat spesifitesine sahiptir. (149)

XOR bütün memelilerde ve bunun yanı sıra omurgalılarda, omurgasızlarda, yüksek bitkilerde, mantarlarda ve bakterilerde tespit edilmiştir. Bütün hücrelerde pürin katabolizmasının tamamlayıcı parçasıdır. Memelilerde bağırsakta, karaciğerde, meme bezinde ve safra kanallarında yüksek aktivite gösterir. (146)

ROT ve endojen adjuvan olan üratı üreten bir enzim olarak XOR doğal immunité ile ilişkilidir ve diğer antimikrobiyal bir enzim olan lizozim ile birlikte kapiller endotelial yüzeylerde (150), meme bezi epitelinde ve diğer epitelyal yüzeylerde, epitelyal sekresyonlarda, sütte ve fagositlerde ekspresse edilir. (151). Dolaşımda XO izoformu hâkimdir. Dolaşımda en yüksek XO aktivitesi ratlarda bulunmuştur. Sağlıklı bireylerde dolaşımda XOR'a karşı antikorlar bulunur.



Antikorlar enzimi inhibe etmez fakat ROT üreten enzimin turn-over'ında artışa sebep olabilir. (152)

#### 2.6.3.1. XDH'nın XO'ya dönüşümü

XDH'nın posttranslasyonel modifikasyonu sonucu enzim aktivitesi ve spesifitesinde değişiklikler meydana gelir ve XDH, XO'ya dönüşür. Dönüşüm sistein rezidülerinin -SH birimlerinin oksidasyonu ile disülfid köprülerinin oluşumu ile gerçekleşir ve geri dönüşümlüdür. XOR kendini redoksa duyarlı hale getiren sistein kümelerine sahiptir. (146) XDH ve XO termal dengededir, proteoliz ya da tiol oksidasyonu proteini XO formunda kilitleyebilir. (153) XDH, XO'a geri dönüşümsüz olarak dönüşümü Molibden ve NAD birimlerini bağlayan bir bağlayıcı peptidin proteolizi sonucu in vitro ortamda gerçekleşebilir. Örneğin Ca Proteazlar ve tripsin enzimi 20kDa'luk kısmından ayırabilir ve irreversibl dönüşüm gerçekleşir. (146)

#### 2.6.3.2. XOR Aktivitesinin Düzenlenmesi

Tablo 5. XOR aktivitesinin düzenlenmesi (146)

| DÜZENLEYİCİ FAKTÖR                                  | ETKİLERİ                                                                    |
|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| Hipoksi                                             | Aktivitede artış (Başlangıçta translasyon ya da transkripsiyon gerektirmez) |
| İntrasellüler Fe                                    | Translasyonel up-regülasyon                                                 |
| Proinflamatuvar medyatörler, lipopolisakkarit, IL 3 | XDH'nın XO'a dönüşümü                                                       |
| nNOS                                                | XOR down-regülasyonu                                                        |
| Anjiotensin II                                      | Bovine endotel hücre kültüründe XOR indüksiyonu                             |

|                    |                                                                   |
|--------------------|-------------------------------------------------------------------|
| NAD(P)H Oksidaz    | Bovin endotelyal hücre kültüründe XOR indüksiyonu                 |
| Toksik kimyasallar | TCDD gibi dioksinler fare karaciğerinde XOR aktivitesini indükler |

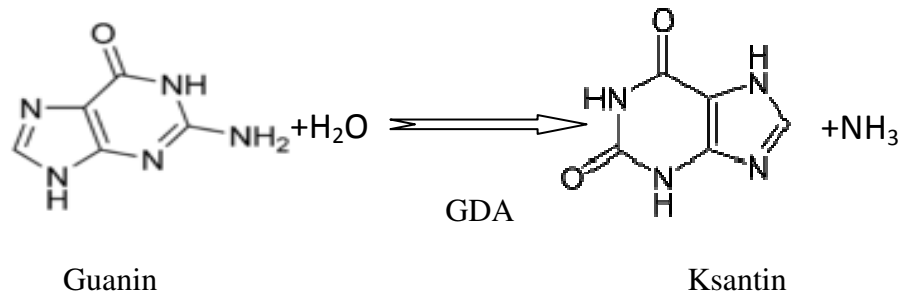
### 2.6.3.3 XOR Enziminin Fizyolojik Fonksiyonları

**Tablo 6. XOR enziminin fizyolojik fonksiyonları (146)**

| Fizyolojik Fonksiyon          | Özellikler                                                                                                                                                 |
|-------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Pürin metabolizması           | Ürik asit üretimi Allopurinol ve oxopurinol ile inhibe edilir.                                                                                             |
| BH <sub>4</sub> metabolizması | 5,6,7,8 tetrahydro-biopterin (BH <sub>4</sub> ) pterine ve pterin de isoxanthopterine dönüşür. BH <sub>4</sub> NOS kofaktürüdür.                           |
| Ksenobiyotik metabolizması    | Aldehitler, İlaçlar, Nitrofuran deriveleri, Heterosiklikler, Tiopürinler                                                                                   |
| Ferooksidaz aktivitesi        | Fe ile Seruloplazminden 1000 kat daha aktif etkileşme (XO XDH'dan daha etkili)                                                                             |
| Nitrik Redüktaz aktivitesi    | NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> , NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> NO'e, nitrosotiyoller NO'e ve Organik nitratları NO'e indirger. |
| Retinol metabolizması         | Meme epitelyum hücre kültüründe all-trans-retinol , all-trans-retinaldehide'e dönüşür.                                                                     |
| NADH Oksidaz aktivitesi       | Difenileniyodoyum inhibe eder, Allopürinol inhibe etmez. XDH XO'dan daha yüksek aktiviteye sahiptir.                                                       |
| nNOS ile etkileşim            | nNOS -/- farelerde kardiyak dokuda XOR upregüle olur.XOR ve nNOS kardiyak miyositlerde aynı lokalizasyonda bulunur.(247)                                   |
| Renal COX 2'nin düzenlenmesi  | Renal gelişim sırasında (COX 2 ile benzer) XOR'un 30 kat upregülasyonu. (XOR-/- farelerde COX 2-/- farelere benzer renal fenotip)                          |
| Adipogenez                    | XOR tarafından PPAR $\gamma$ 'nın düzenlenmesi                                                                                                             |
| Sütte yapısal element         | XDH ve butyrophilin süt yağ salgılamında rol oynar.                                                                                                        |

|                       |                                                                                                                                                                     |
|-----------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Doğal immun fonksiyon | XOR epitelyal ve endotelyal yüzeylerde ekspresse edilir ve TLR-NF-kappa-B yolaklarıyla yakından ilişkilidir. Direkt olarak NF-κ-B ve AP-1 tarafından aktive edilir. |
| İmmun fonksiyon       | Epitelde bakterisidal ROT ve adjuvan üratın üretimi. Virüsler XDH'ın XO'a proteolizini indükler.                                                                    |

#### 2.6.4. Guanozin Deaminaz (Guanaz) Enzimi:



**Şekil 17. Guanin Deaminaz (Guanaz) Enziminin katalizlediği Reaksiyon**

Guanin deaminaz (guanaz, guanin deaminaz, guanin aminohidrolaz, EC 3.5.4.3) (GDA) enzimi tavşan karaciğer homojenatında Schmidt tarafından keşfedilen guaninin hidrolitik deaminasyonunu katalizleyen pürin katabolizma yolu enzimidir. (154) Bu reaksiyon sonucunda ksantin ve amonyak oluşurken memelilerde guanin bazının guanilat nükleotidi olarak tekrar kullanımı geri dönüşümsüz olarak engellenir. GDA Pürin katabolizmasında yer almasına rağmen dokulardaki ekspresyonu değişkendir ve lenfoid dokularda eksprese edilmez. (155,156) Farelerde enzimin incebağırsağın proksimal kısmında en fazla bulunduğu, fare beyninin değişik bölgeleri arasında guanin deaminaz aktivitesinde 50 kattan fazla farklılık bulunduğu gösterilmiştir. (157) Fare beyinde en yüksek guanaz aktivitesi serebral korteks ve amigdalada bulunmuştur. Ratlarda guanin deaminaz aktivitesinde 40 günlük postnatal gelişim sırasında karaciğer, böbrek ve

beyinde 10 kattan fazla artış izlenmiştir. (158) Erişkin farelere intraperitoneal guanin uygulanması sonrası karaciğer ve beyin enzim aktivitelerinde fraksiyonel artışlar meydana gelmiştir. (159) Guanin deaminazın dokuya özgü ekspresyonu ve ekspresyonundaki indüklenebilir değişiklikler guanin nükleotid havuzunun düzenlenmesinde potansiyel rolü olduğunu gösterir. (160)

İto ve arkadaşları tarafından Guanin deaminaz enziminin insanlarda hepatik portal veni etrafındaki hepatositlerin sitoplazamasında, renal proksimal tübülde ve incebağırsak mukoza epitelinde lokalize olduğu histokimyasal ve immunohistokimyasal boyama ile gösterilmiştir; fakat enzimin fonksiyonu tam olarak anlaşılamamıştır. (161-163)

İnsan GDA'sı en fazla karaciğer, beyin ve böbrekte bulunmasına rağmen AST ve ALT'nin relatif olarak yüksek bulunduğu iskelet kası, kalp kası, pankreas ve diğer dokularda hemen hemen hiç bulunmaz. Bu nedenle serum guanaz aktivitesindeki artışın karaciğer hastalıklarının spesifik bir göstergesi olarak kabul edilebileceği (164) ve özellikle akut hepatit ve hepatomanın tanısında diagnostik bir belirleyici olarak kullanılabileceği (161) öne sürülmüştür.

### **3.GEREC VE YÖNTEM**

Bu çalışma Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi (GÜDAM) ve Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma için Gazi Üniversitesi Rektörlüğü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan 08/01/2010 tarihinde 8-451 sayı numarası ile onay alınmıştır. Ayrıca proje Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimi tarafından 01/2010-129 proje kodu ile desteklenmiştir.

#### **3.1. Deney Hayvanlarının Hazırlanması:**

Deneylerde ağırlıkları yaklaşık 200-250 gr olan 30 adet 3 aylık dişi Wistar Albino rat kullanıldı. Denekler 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık sürecinde tutuldu. Serbest diyet ve çeşme suyu ile beslenmeleri sağlandı.

Deneyler rastgele oluşturulan beş grup üzerinde gerçekleştirildi.

1. Kontrol grubu (K)
2. N-Nitrozodietilamin grubu (NDEA)
3. Ellajik Asit grubu (EA)
4. Eş zamanlı N-Nitrozodietilamin + Ellajik Asit Grubu (EZ)
5. Profilaktik Ellajik Asit + N-Nitrozodietilamin Grubu (P)

Kontrol grubu: Bu gruptaki 6 rat deney süresince (10 hafta) normal laboratuvar diyeti ve içme suyu ile beslendi.

N-nitrozodietilamin (NDEA) grubu: Bu gruptaki 6 rata deneyin 15. gününde tek doz N-nitrozodietilamin (NDEA) intraperitoneal olarak 200mg/kg dozunda uygulandı. (174,175)

*Ellajik Asit grubu (EA)*: Bu gruptaki 6 rata deneyin 15. Gününden itibaren 8 hafta süre ile 25 mg/kg/gün dozunda Ellajik Asit gün aşırı olmak üzere serum fizyolojik (SF) içerisinde gavaj yolu ile oral yoldan uygulandı.

*Eş zamanlı N Nitrozodietilamin + Ellajik Asit Grubu (EZ)*: Bu gruptaki 6 rata deneyin 15. gününden itibaren 8 hafta süre ile EA 25 mg/kg/gün dozunda gün aşırı olmak üzere SF içerisinde gavaj yolu ile oral yoldan uygulandı. Buna ilave olarak deneyin 15. gününde tek doz N-nitrozodietilamin (NDEA) intraperitoneal olarak 200mg/kg dozunda uygulandı.

*Profilaktik Ellajik Asit + N Nitrozodietilamin Grubu (P)*: Bu gruptaki 6 rata deneyin 1. gününden itibaren 10 hafta süre ile EA 25 mg/kg/gün dozunda gün aşırı olmak üzere SF içerisinde gavaj yolu ile oral yoldan uygulandı. Buna ilave olarak deneyin 15. gününde tek doz N-nitrozodietilamin (NDEA) intraperitoneal olarak 200mg/kg dozunda uygulandı.

Çalışma süresinin sonunda hayvanların anestezi altında kanları alındıktan sonra sakrifiye edildi. Karaciğer dokuları çıkarıldı ve soğuk (+4°C) SF ile dokuların temizliği yapıldı. Bir miktar doku, içerisinde formol bulunan temiz şişelere konularak histopatolojik inceleme için ayrıldı. Kalan karaciğer dokuları sıvı azot içinde dondurularak analiz gününe kadar -74°C de saklandı. (Resim 1)

Ratlardan alınan kanlar 3000 g'de 5 dakika sentrifüj edildi. Serum kısımları ayrılıp porsiyonlanarak -20°C'de saklandı.

Enzim analizlerinden önce her bir gruba ait karaciger dokuları tartılarak 5 katı serum fizyolojik içerisinde Heidolph DIAX 900 marka homojenizatör ile 1-

1,5 dakika 4000 devir/dk. homojenize edildi. Homojenat soğutmalı santrifüjde 5000g'de 20 dakika santrifüj edilerek süpernatant kısımları ayrıldı.



**Resim 1. Deneyin yapılış süreci**

### **3.2. Kullanılan Aletler**

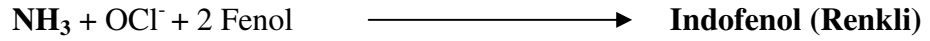
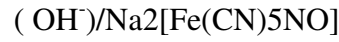
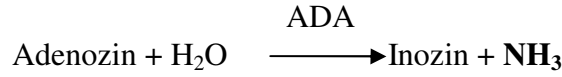
- Hassas terazi ( Schimadzu, Libror, AEG 220 )
- Homojenizatör ( Heidolph DIAX 900 )
- Vortex ( Heidolph Reax 2000 )
- Santrifüj ( Hermle Z 380 K )
- Soğutmalı Santrifüj ( Damon IEC, B-20A soğutmalı, Hermle Z 323 K )
- Spektrofotometre ( Schimadzu, UV 1601 )
- pH metre ( Jenway )
- Manyetik Karıştırıcı, Otomatik ve cam pipetler

### 3.3. Yöntemlerin Uygulanması

#### 3.3.1. Adenozin Deaminaz (ADA) Aktivitesinin Tayini

ADA aktivite tayini Giuseppe Giusti'nin tarif ettiği metoda göre yapılmıştır. (165)

##### *Metodun Prensi:*



Reaksiyonu gereği, ADA aktivitesinin ölçümü için substrat olarak adenozin/deoksiadenozin kullanılır. ADA adenozinden inozin/deoksiinozin oluşumunu katalizler. Bu sırada açığa çıkan amonyak, sodyum hipoklorit ve fenol/nitroprussid ile birlikte alkali çözeltide koyu mavi indofenol şeklini alır. Sodyum nitroprussid katalizör olarak görev yapar. Bu reaksiyon gereği amonyak konsantrasyonu indofenol konsantrasyonu ile (absorbansıya) doğru orantılıdır.

##### *Reaktifler:*

- 1) Fosfat Tamponu ( 50 mM; pH: 6,5)
- 2) Tamponlanmış Adenozin Çözeltisi (Substrat 21 mM )
- 3)  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  stok çözeltisi (15 mM)
- 4)  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  standart çözeltisi (75 mM; 0,15 µval,  $\text{NH}_3/\text{ml}$ )



5) Fenol- Nitroprussid çözeltisi (106 mM Fenol, 0.17 mM Na nitroprussid)

6) Alkali Hipoklorit çözeltisi (11 mM NaOCl, 125 mM NaOH)

**Deneyin Yapılışı:** Karaciğer doku örneklerinde ADA aktivitesi ölçümü için; numune tüplerine 1ml Adenozin çözeltisi ve 0.05 ml süpernatant, numune körü tüplerine de 1ml Adenozin çözeltisi eklenerek tüplerin ağzı parafilmle kapatıldı. Tüpler karıştırıldıktan sonra 37°C’de 60 dakika su banyosunda inkübe edildi. Daha sonra numune tüplerine 3 ml FNP çözeltisi ve 3 ml alkali HOCl çözeltisi, numune körü tüplerine de 3 ml FNP çözeltisi, 0.05 ml süpernatant ve 3 ml alkali HOCl çözeltisi eklendi. Tüpler karıştırılıp 37°C’de su banyosunda 30 dakika inkübe edildi. Numune ve körlerin absorbansı 628 nm’de distile suya karşı okundu. Absorbansın 1.00’in üstüne çıktığı durumlarda örnekler distile su ile 2-5 kat seyreltilerek deney tekrarlandı.

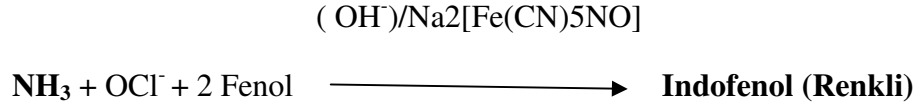
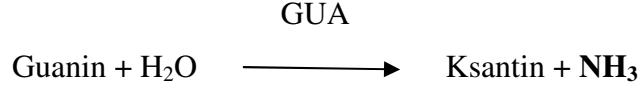
ADA aktivitesi 75 µM’lık (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> standart çözeltisi ile mukayese edilerek aşağıdaki formüle göre hesaplandı. Sonuçlar spesifik aktivite (IU/mg protein) olarak verildi. (1 IU: 1 dakikada 1µmol adenozini inozine dönüştüren ADA aktivitesi)

$$\text{ADA Aktivitesi (IU/L)} = \{ (A)_N - (A)_K / (A)_S - (A)_{SK} \} \times 50$$

3.3.2. Guanaz, Guanin Aminohidrolaz, Guanin Deaminaz Aktivitesinin Tayini

Guanaz enzim aktivitesi tayini Caraway VT’nin tarif ettiği metoda göre yapıldı.(166)

**Metodun Prensibi:**



Yukarıdaki reaksiyon gereği ilk aşamada guanazdan deaminasyon sonucu  $\text{NH}_3$ 'ün hidrolizi, daha sonra ise  $\text{NH}_3$ 'ün fenol ile kompleksleşmesi esasına dayanmaktadır.

**Reaktifler:**

- 1) Stok guanin çözeltisi: 2mg/mL

Guanin çalışma çözeltisi: 0.2 mg/mL

Substrat çözeltisi günlük olarak hazırlanmalıdır.

- 2) Tampon çözelti: 50 mM pH= 7.5 fosfat tamponu

- 3) Na tungstat: %10 luk (w/v)

- 4) Fenol renk reaktifi: 0.125 g sodyum nitropürüsit içerisinde bir miktar distile su bulunan 500 mL'lik balon jojeye konur. Üzerine 25 mL fenol çözeltisi ilave edilir. Distile suyla 500 mL' ye tamamlanır.

- 5) Alkali hipoklorit: İçerisinde bir miktar distile su bulunan 500 mL'lik balon jojeye 12.5 g NaOH eklenerek çözülür. Bunun üzerine 20 L % 5.25' lik

sodyum hipoklorit çözeltisi ilave edilir. Distile suyla 500 mL'ye tamamlanır.

6) Stok standart çözelti: 2 mg/mL saf,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

7)  $\text{H}_2\text{SO}_4$ : 0.67 normal

**Deneyin Yapılışı:** Karaciğer doku örneklerindeki Guanaz enzim aktivitesi ölçümü için numune tüplerine 2 ml fosfat tamponu, 0.5 ml guanin çözeltisi, 0.2 ml süpernatant, numune körü tüplerine ise 2 ml fosfat tamponu ve 0.2 ml süpernatant eklenerek tüplerin ağzı parafilmle kapatılıp karıştırıldıktan sonra  $37^\circ\text{C}$  de 30 dakika su banyosunda inkübe edildi. Daha sonra numune tüplerine 0.4 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  çözeltisi ve 0.2 ml Na-Tungstat çözeltisi; numune körü tüplerine ise 0.4 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 0.5 ml guanin çözeltisi ve 0.2 ml Na-Tungstat çözeltisi eklenerek tüpler karıştırılıp 10 dakika 5000 rpm de santrifüj edildi ve süpernatantlar ayrıldı. Daha sonra temiz numune ve numune körü tüplerinin her ikisine de 2 ml süpernatant, 2 ml FNP çözeltisi ve 2 ml alkali HOCl çözeltisi eklenerek tüpler karıştırılıp 15 dakika  $37^\circ\text{C}$ 'lik su banyosunda bekletildikten sonra 630 nm de her bir tüpün absorbansı distile suya karşı okundu.

Guanaz aktivitesi ADA'da olduğu gibi  $75\mu\text{M}$ 'lık  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  standart çözeltisi ile mukayese edilerek aşağıdaki formüle göre hesaplandı. Sonuçlar spesifik aktivite (IU/mg protein) olarak verildi.

GUA Aktivitesi (IU/L) = {  $(\Delta A)_{\text{numune}} / (\Delta A)_{\text{standart}}$  } x 13.12 hesaplandı.

### 3.3.3. Ksantin Oksidaz Aktivitesinin Tayini

Ksantin oksidaz tayini Hashimoto S' nin tarif ettiği metoda göre yapıldı. Ksantin oksidaz pürin bazları olan hipoksantin ve ksantini ürik aside dönüştüren enzimdir. Reaksiyon sonucunda oluşan ürik asit 293 nm' de maximum absorbans vermektedir. (167)

#### ***Reaktifler***

- 1) Tampon çözelti: 50mM, pH: 7.5 ve 0.1 mM EDTA içeren fosfat tamponu
- 2) Ksantin: 0.17 mM ksantin, tampon içerisinde çözüldü.
- 3) %20'lik TCA çözeltisi

#### ***Deneyin Yapılışı:***

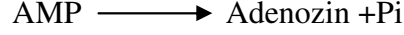
Numune tüplerine 2,7 ml fosfat tamponu, 0,1 ml ksantin ve 10 µl süpernatant ve kör tüplerine 2,7 ml fosfat tamponu, 0,1 ml ksantin, 10 µl süpernatant ve 0,1 ml TCA eklendi. Tüpler 37°C'de 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra numune tüplerine de 0,1 ml TCA eklendi. Tüpler 5000 g'de 10 dakika santrifüj edildi ve absorbansları 293nm'de distile suya karşı okundu.

Ksantin oksidaz aktivitesi ürik asidin  $\epsilon$  katsayısından yararlanılarak hesaplandı. ( $\epsilon$ : 9500 M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>) Sonuçlar spesifik aktivite (SA), mIU/mg.protein olarak verildi.

### 3.3.4. 5' Nükleotidaz Aktivitesi Tayini

5'NT aktivitesi Donald WM'nin tarif ettiği metoda göre yapıldı. (168)

[5'NT]



**Metodun prensibi:** Yukarıdaki reaksiyon gereği ilk aşamada 5'AMP den fosfatın hidrolizini daha sonra ise açığa çıkan fosfatın molibdat ile sarı renkli fosfo molibdik asite dönüştürülerek 680 nm'de spektrofotometrik olarak Pi ölçülmesi esasına dayanmaktadır.

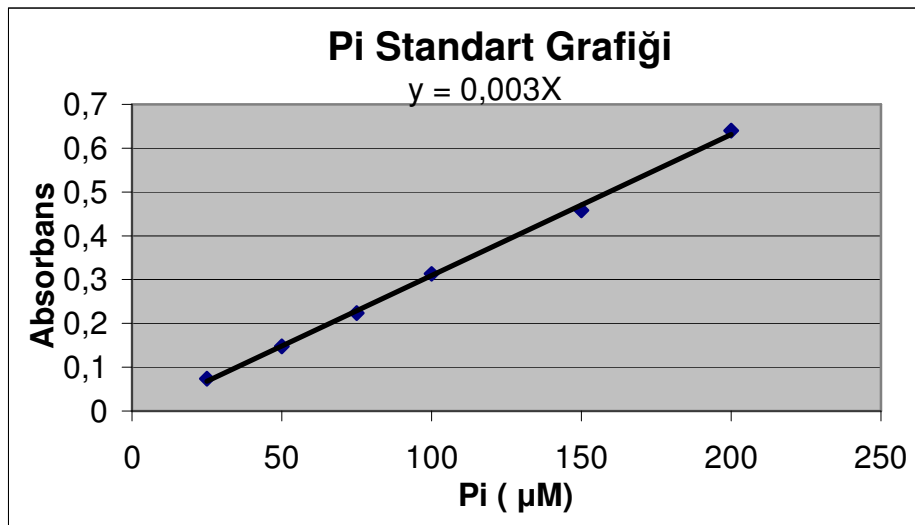
**Reaktifler:**

- 1)  $\text{MnSO}_4$ : 20 mM
- 2) Tampon: 40 mM; pH: 7.5 Na-Barbiturat tamponu
- 3)  $\text{NiCl}_2$ : 100 mM
- 4) AMP: Substrat 10 mM
- 5) TCA: 0.68M
- 6)  $\text{NH}_4$ -Molibdate: 40 mM
- 7) İndirgeyici Çözelti: 60 mL distile suda 25 g potasyum bisulfate çözülür; 10 mL distile suda 200 mg metilaminofenol sülfat çözülür, iki çözelti karıştırılır ve 100 mL distile suyla seyreltilir.
- 8) Na-Asetat: 2.5 mM
- 9) Stok P. çözeltisi: 1.0 mg P/mL,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- 10) Standart P çözelti: 10 µg/mL stok P çözeltisinden hazırlanır

### ***Deneyin Yapılışı:***

Numune tüplerine 1,3 ml tampon, 0,1 ml  $\text{MnSO}_4$ , 0,2 ml numune, 0,2 ml substrat; numune körü tüplerine ise 1,3 ml tampon, 0,1ml  $\text{MnSO}_4$ , 0,2 ml  $\text{NiCl}_2$ , 0,2 ml numune, 0,2 ml substrat eklendi. Tüplerin ağzı parafilmle kapatılarak karıştırıldı ve 30 dakika  $37^\circ\text{C}$  su banyosunda inkübe edildi. Daha sonra tüm tüplere 2ml TCA ve sadece numune tüplerine 0,2ml  $\text{NiCl}_2$  eklenerek tüpler 3000 g'de 15 dakika santrifüj edildi ve supernatan kısımları ayrıldı. Yeni hazırlanan numune ve numune körü tüplerine 2 ml süpernat, 3 ml Na-Asetat, 0,5 ml  $\text{NH}_4$ -Molibdat ve 0,5 ml İndirgeyici çözelti eklendi. Tüplerin ağzı parafilmle kapatıldıktan sonar karıştırıldı ve 5 dk  $37^\circ\text{C}$ 'de su banyosunda inkübe edildi ve 680 nm'de distile suya karşı her bir tüpün absorbansı okundu.

5'NT aktivitesi daha önce çizilen Pi grafiğinin eğiminden yararlanılarak hesaplandı ve spesifik aktivite cinsinden (IU/mg protein) ifade edildi.



**Grafik 1.**  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ile çizilen standart grafiğın eğiminden P miktarı belirlenmiştir

### 3.3.5. Total Protein Tayini

Homojenat süpernatantlarındaki total protein miktarı tayini Lowry metoduna göre yapıldı. (169)

**Metodun Prensipleri:** Alkali ortamda proteinlerin  $\text{Cu}^{2+}$  ile  $\text{Cu}^{++}$  - protein kompleksi oluşturarak fosfomolibdat- fosfo tungstat reaktifini ( Folin-Ciocalteu- Phenol reaktifini) indirgeyerek mavi-mor renkli ürün oluşturması esasına dayanır. Rengin koyuluğu ortamdaki protein konsantrasyonuyla doğru orantılıdır.

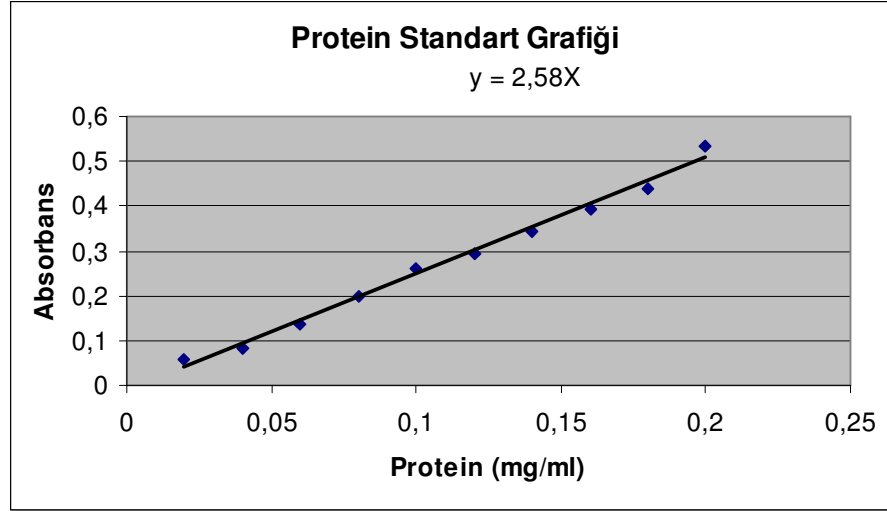
#### **Reaktifler:**

- 1) A reaktifi: 0.5 gr  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  ve 1.0 gr  $\text{Na}_3\text{-Sitrata}$  bir miktar distile suda çözüldükten sonra 100ml'ye tamamlandı.
- 2) B reaktifi: 20gr  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ve 4.0 gr NaOH bir miktar distile suda çözüldükten sonra 1 L'ye tamamlandı.
- 3) C reaktifi: 50 ml B çözeltisi + 1.0 ml A çözeltisi karışımı hazırlandı.
- 4) D reaktifi (Folin-Ciocalteu Çözeltisi): 10 ml Folin-Ciocalteu çözeltisi 10 ml distile su ile karıştırılarak hazırlandı.

#### **Deneyin Yapılışı:**

Kör ve numune tüplerine 2.5 ml C reaktifi ve numune tüpüne 10µl süpernatant eklendikten sonra iyice karıştırılarak laboratuvar sıcaklığında 10 dakika bekletildi. Kör ve numune tüplerine 250 µl D reaktifi eklendikten sonra laboratuvar sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi ve 700nm'de numunelerin

absorbansları köre karşı okundu. Sonuçlar standart eğim grafiğinden yararlanılarak hesaplandı.



**Grafik 2: Protein Standart Grafiği**

### 3.3.6. Diğer Biyokimyasal Parametrelerin Ölçümü

Rat serumlarında AST (Aspartat aminotransferaz), ALT (Alanin aminotransferaz), Gama Glutamil Transferaz (GGT) enzim aktiviteleri ve Albumin düzeyleri Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı'nda Abbott Architect ci16200 cihazında spektrofotometrik olarak ölçüldü.



### **3.4. Dokuların Histopatolojik Değerlendirilmesi**

Karaciğer dokuları %10 luk formalinde tesbit edildikten sonra ince dilimler halinde kesilip parafin bloklara gömüldü. Her bir parafin bloktan seri kesitler yapıp Hematoksilen ve Eozin ile boyandı. Histopatolojik değişiklikler mikroskop altında incelendi.

### **3.5. İstatistiksel Analiz**

Verilerin istatistiksel değerlendirilmesi SPSS for Windows 15.0 paket programında yapıldı. Değerlendirmelerde gruplar arası karşılaştırmalar için normal dağılım gösteren parametrelerde Tek Yönlü Varyans Analizi ve bağlı olarak Bonferroni testi, normal dağılım göstermeyen parametreler için Kruskal-Wallis Tek Yönlü Varyans Analizi ve Mann-Whitney U testi uygulandı. İstatistiksel değerlendirmelerde anlamlılık sınırı  $p<0.05$  olarak kabul edilmiştir.

#### 4. BULGULAR:

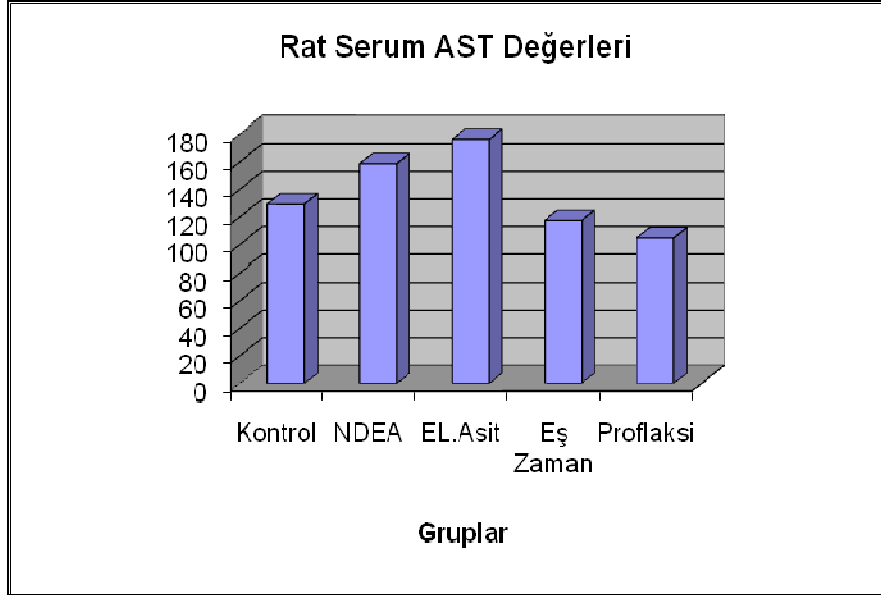
Deney sonrası rat serumları karaciğer fonksiyon testleri parametrelerine ait ortalama  $\pm$  standart sapma değerleri Tablo 8’de görülmektedir.

**Tablo 8. Ortalama $\pm$ standart sapma (X  $\pm$  SD) olarak Serum Karaciğer Fonksiyon Testleri Sonuçları**

| Grup                           | AST              | ALT             | GGT             | ALBUMİN       |
|--------------------------------|------------------|-----------------|-----------------|---------------|
| 1.Kontrol                      | 129.5 $\pm$ 14.3 | 64.5 $\pm$ 3.7  | < 0.4 $\pm$ 0.0 | 3.8 $\pm$ 0.4 |
| 2.NDEA                         | 158.8 $\pm$ 30.0 | 59.8 $\pm$ 13.2 | < 0.4 $\pm$ 0.0 | 3.8 $\pm$ 0.3 |
| 3.EL.Asit                      | 176.3 $\pm$ 95.2 | 53.7 $\pm$ 13.8 | < 0.4 $\pm$ 0.0 | 3.7 $\pm$ 0.2 |
| 4.Eş Zaman                     | 117.3 $\pm$ 47.0 | 47.5 $\pm$ 8.6  | < 0.4 $\pm$ 0.0 | 3.8 $\pm$ 0.3 |
| 5.Profilaksi                   | 104.7 $\pm$ 43.5 | 53.3 $\pm$ 3.3  | < 0.4 $\pm$ 0.0 | 3.5 $\pm$ 0.3 |
| İstatistiksel analiz sonuçları |                  |                 |                 |               |
| 1-2                            | p>0.05           | p>0.05          | p>0.05          | p>0.05        |
| 1-3                            | p>0.05           | p>0.05          | p>0.05          | p>0.05        |
| 1-4                            | p>0.05           | p>0.05          | p>0.05          | p>0.05        |
| 1-5                            | p >0.05          | p>0.05          | p>0.05          | p>0.05        |
| 2-3                            | p >0.05          | p>0.05          | p>0.05          | p>0.05        |
| 2-4                            | p>0.05           | p>0.05          | p>0.05          | p>0.05        |
| 2-5                            | p>0.05           | p>0.05          | p>0.05          | p>0.05        |
| 3-4                            | p>0.05           | p>0.05          | p>0.05          | p>0.05        |
| 3-5                            | p>0.05           | p>0.05          | p>0.05          | p>0.05        |
| 4-5                            | p>0.05           | p>0.05          | p>0.05          | p>0.05        |

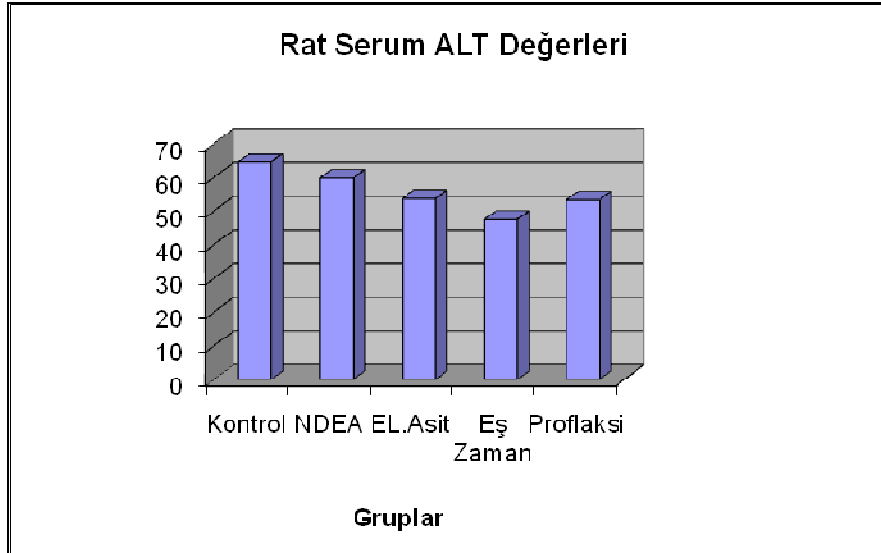
#### 4.1 Karaciğer Fonksiyonlarını Gösteren Parametrelere Ait Bulgular

#### 4.1.1. Rat Serum AST Aktiviteleri



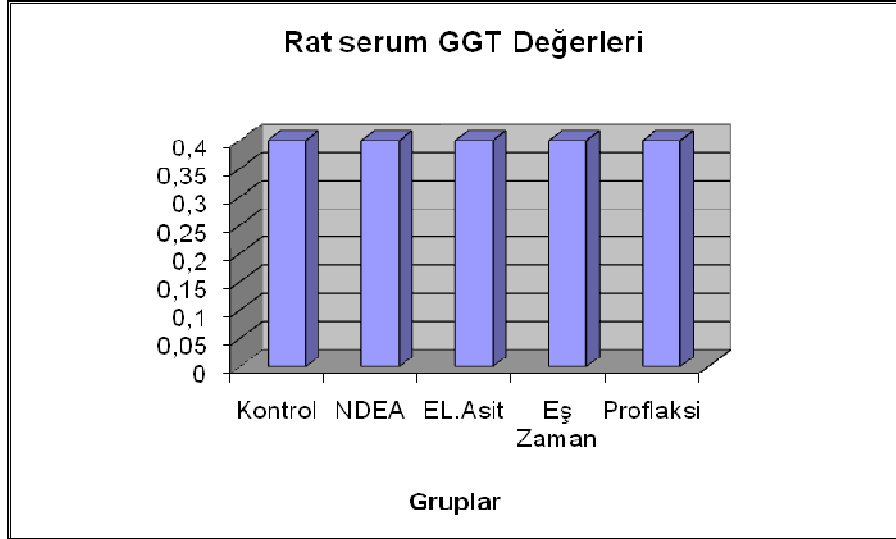
**Grafik 3.** Tüm gruplara ait serum AST (iu/l) enzimi aktiviteleri (ortalama  $\pm$  standart hata olarak verilmiştir)

#### 4.1.2. Rat Serum ALT Aktiviteleri



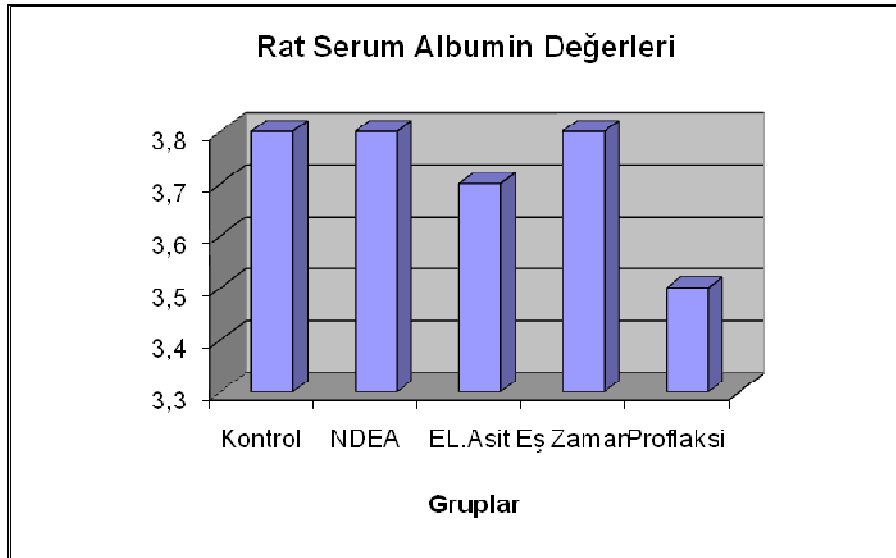
**Grafik 4.** Tüm gruplara ait serum ALT (iu/l) enzimi aktiviteleri (ortalama  $\pm$  standart hata olarak verilmiştir)

#### 4.1.3. Rat Serumu GGT Aktiviteleri

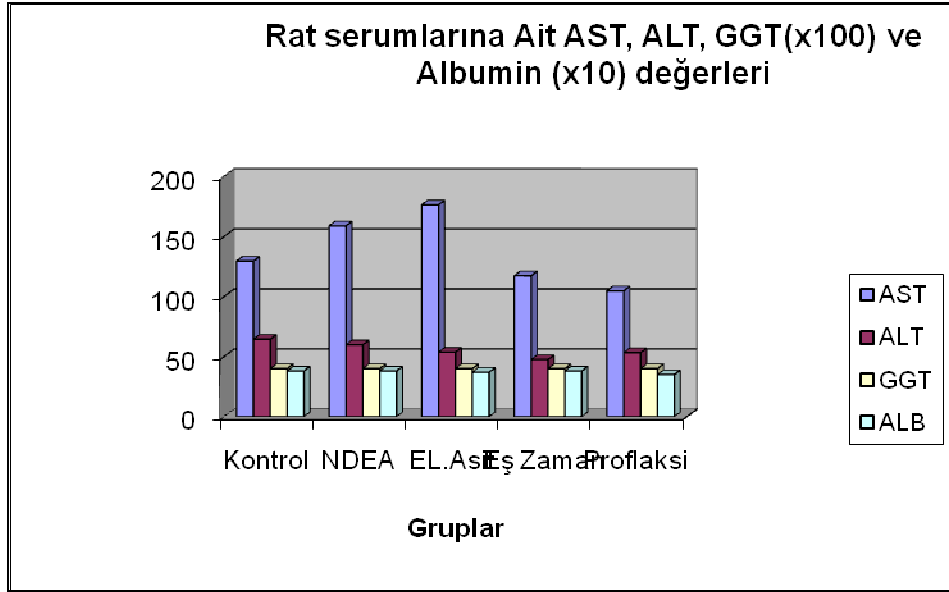


**Grafik 5. Tüm gruplara ait serum GGT (u/l) enzimi aktiviteleri (ortalama  $\pm$  standart hata olarak verilmiştir.)**

#### 4.1.4. Rat Serumu Albumin Düzeyleri :



**Grafik 6. Tüm gruplara ait serum Albumin (gr/dl) düzeyleri ortalama  $\pm$  standart hata olarak verilmiştir**



**Grafik 7. Karaciğer Fonksiyonlarını Gösteren Parametrelere Ait Sonuçların Gruplar Arası Karşılaştırılması**

Tablo 8 ve Grafik 3-7’de de görüldüğü gibi; AST enzimine ait sonuçlar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında NDEA ve Ellajik Asit grubunda yükselme, eş zamanlı ve profilaksi grubunda azalma görülmekte olup, bu değişikliklerin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmektedir. ALT enzimi kontrol grubuna göre kıyaslandığında, genel olarak tüm gruplarda aktivitede bir azalma görülmekte ancak istatistiksel bir fark bulunmamaktadır. GGT enzim aktivitesi ve Albumin seviyeleri açısından değerlendirildiğinde gruplar arasında herhangi bir değişiklik bulunamamıştır.

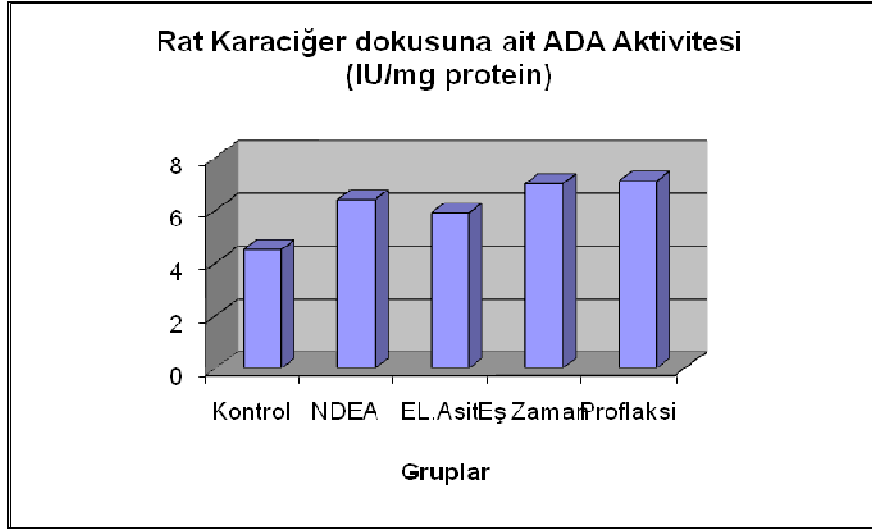
Deney sonrası rat serumları DNA Turn-over enzimleri aktivitelerine ait ortalama  $\pm$  standart sapma değerleri Tablo 9’ da görülmektedir.

**Tablo 8. Ortalama $\pm$ standart sapma (X  $\pm$  SD) olarak Serum Karaciğer Fonksiyon Testleri Sonuçları**

| Grup                 | ADA           | GUA           | 5’ NT         | XO            |
|----------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| 1.Kontrol            | 4.5 $\pm$ 0.2 | 2.0 $\pm$ 0.2 | 4.5 $\pm$ 2.5 | 5.2 $\pm$ 1.7 |
| 2.NDEA               | 6.4 $\pm$ 1.4 | 2.2 $\pm$ 0.5 | 4.7 $\pm$ 1.4 | 8.0 $\pm$ 1.8 |
| 3.EL.Asit            | 5.9 $\pm$ 0.1 | 1.9 $\pm$ 0.6 | 4.2 $\pm$ 2.7 | 5.5 $\pm$ 6.0 |
| 4.Eş Zam             | 7.0 $\pm$ 0.6 | 2.5 $\pm$ 0.6 | 3.8 $\pm$ 1.7 | 5.3 $\pm$ 1.3 |
| 5.Profilaksi         | 7.1 $\pm$ 1.5 | 2.6 $\pm$ 1.1 | 5.3 $\pm$ 3.9 | 5.2 $\pm$ 1.2 |
| İstatistiksel analiz |               |               |               |               |
| 1-2                  | P<0.05        | p>0.05        | p>0.05        | P<0.05        |
| 1-3                  | p>0.05        | p>0.05        | p>0.05        | p>0.05        |
| 1-4                  | P<0.006       | p>0.05        | p>0.05        | p>0.05        |
| 1-5                  | P<0.004       | p>0.05        | p>0.05        | p>0.05        |
| 2-3                  | p>0.05        | p>0.05        | p>0.05        | P<0.05        |
| 2-4                  | p>0.05        | p>0.05        | p>0.05        | P<0.05        |
| 2-5                  | p>0.05        | p>0.05        | p>0.05        | P<0.05        |
| 3-4                  | p>0.05        | p>0.05        | p>0.05        | p>0.05        |
| 3-5                  | p>0.05        | p>0.05        | p>0.05        | p>0.05        |
| 4-5                  | p>0.05        | p>0.05        | p>0.05        | p>0.05        |

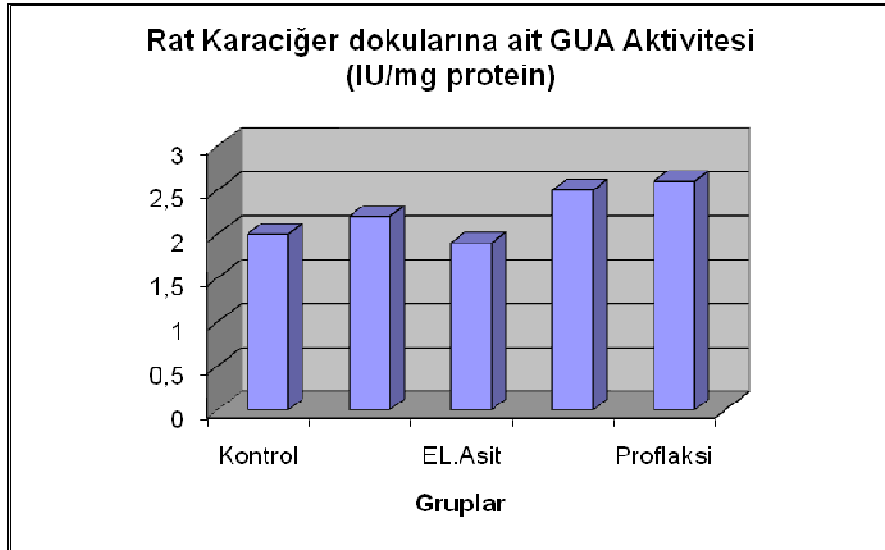
## 4.2 Rat Serumu DNA Turn-Over Enzim Aktiviteleri

### 4.2.1. Rat Serumu ADA Aktiviteleri



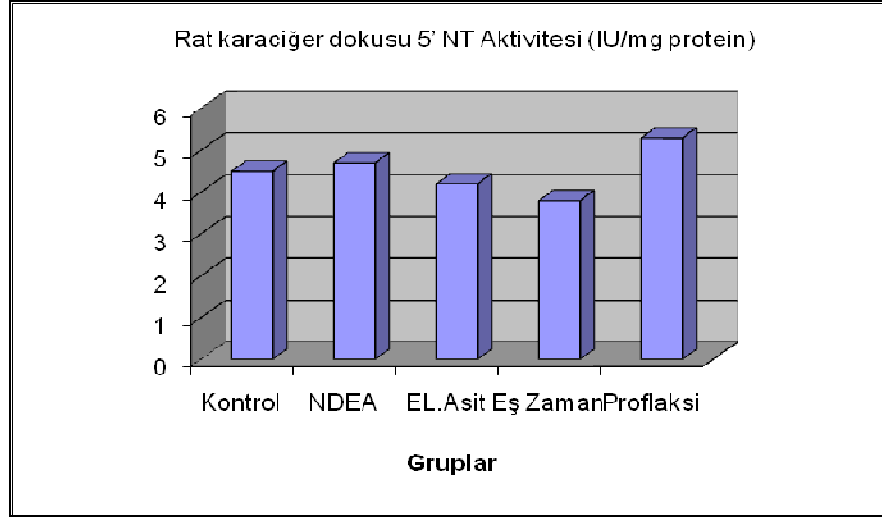
**Grafik 8:** Tüm gruplara ait serum ADA (iu/mgprotein) enzimi aktiviteleri ortalama  $\pm$  standart hata olarak verilmiştir.

### 4.2.2. Rat Serumu Guanaz Aktiviteleri



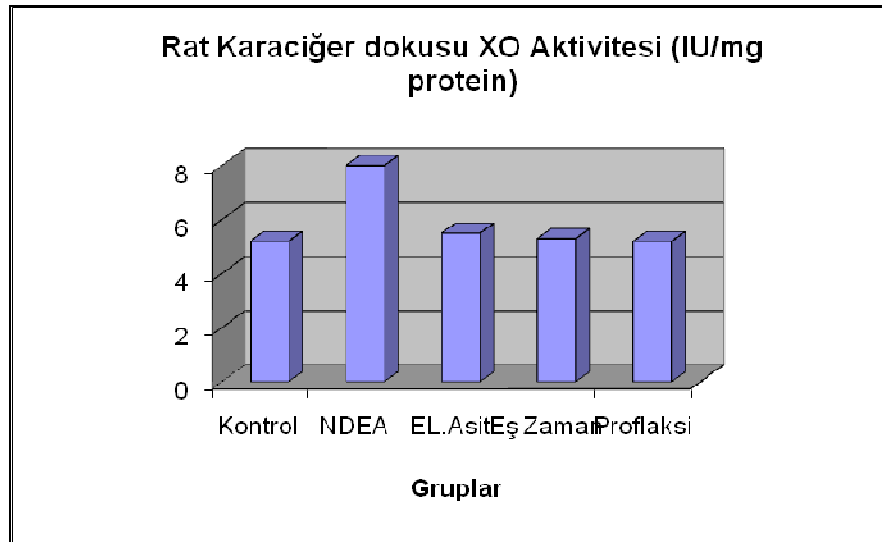
**Grafik 9:** Tüm gruplara ait serum Guanaz (iu/mgprotein) enzimi aktiviteleri ortalama  $\pm$  standart hata olarak verilmiştir

#### 4.2.3. Rat Serumu 5' NT Aktiviteleri



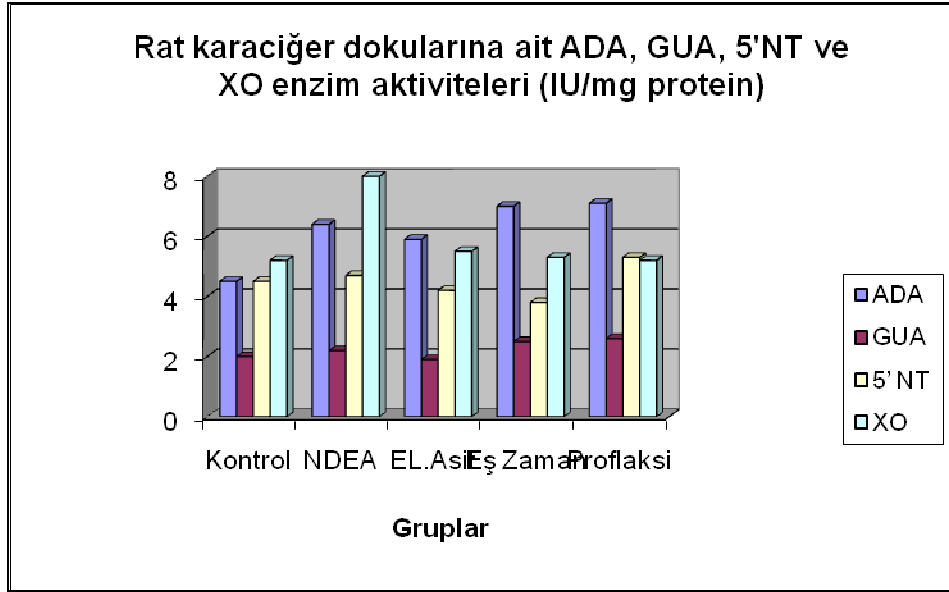
**Grafik 10:** Tüm gruplara ait serum 5'NT (iu/mgprotein) enzimi aktiviteleri ortalama  $\pm$  standart hata olarak verilmiştir.

#### 4.2.4. Rat Serumu XO Aktiviteleri



**Grafik 11:** Tüm gruplara ait serum XO (iu/mgprotein) enzimi aktiviteleri ortalama  $\pm$  standart hata olarak verilmiştir.





**Grafik 12. Tüm gruplara ait DNA Turn-Over Enzimleri Aktivitelerinin karşılaştırılması**

Tablo 9 ve Grafik 8-12’de de görüldüğü gibi; ADA aktivitesi kontrol grubu ile kıyaslandığında tüm gruplarda bir yükselmenin olduğu görülmektedir. Bu yükselmelerden Ellajik Asit hariç NDEA, eş zamanlı ve profilaksi grubundaki artışların istatistiksel olarak anlamlı derecede yükseldiği dikkati çekmektedir. ( $p<0.05$ ,  $p<0.006$  ve  $p<0.004$  sırası ile) Grup içi diğer karşılaştırmalara bakıldığında anlamlı bir farkın olmadığı görülmektedir.

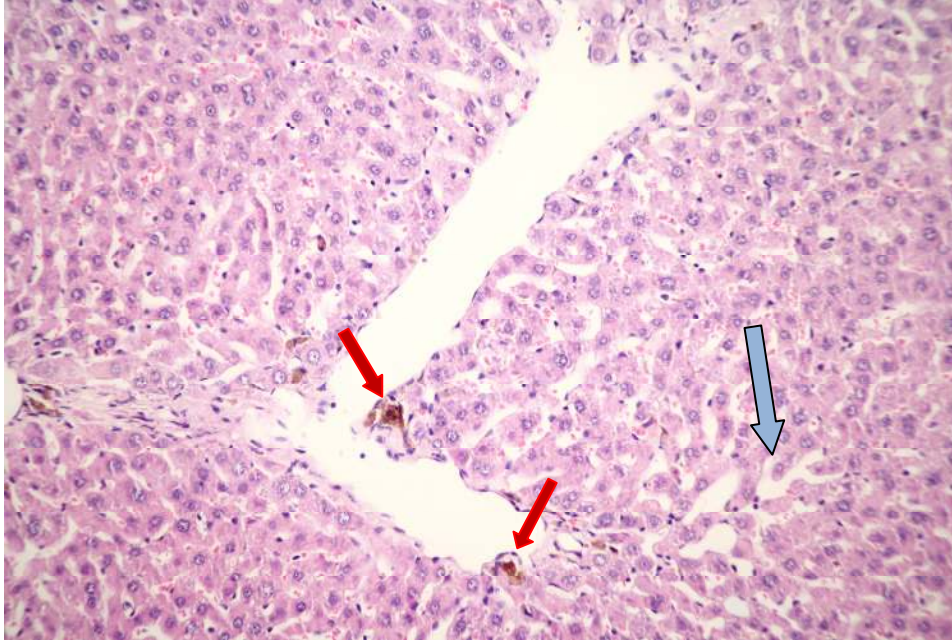
Tüm grupların GUA ve 5’NT aktiviteleri incelendiğinde, her iki enzim aktivitelerinde de kontrol gruplarına göre bariz dalgalanmalar olmakla birlikte, en belirgin değişiklik her iki enzim için de NDEA ve profilaksi grubunda görülmesine rağmen, istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır.

XO enzim aktivitesi incelendiğinde kontrol grubuna göre profilaksi grubu hariç diğer gruplarda aktivitede artışların olduğu görülmektedir. Ancak istatistiksel olarak irdelendiğinde, tüm gruplar ile NDEA grubu arasında anlamlı

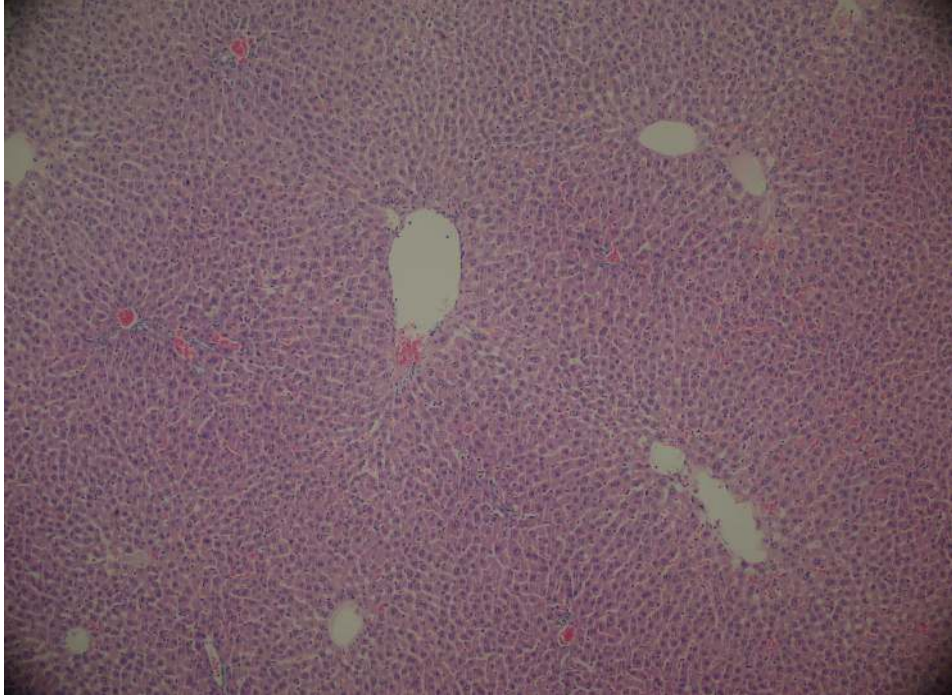
farklar bulunmuştur. ( $p < 0.05$ ) NDEA grubu dışında diğer gruplar arasında istatistiksel anlamda bir değişikliğin olmadığı görülmektedir.

Tablo 8 ve Tablo 9 birlikte incelendiğinde, hem karaciğer enzimleri hem de DNA turn-over'i enzim aktivitelerinde ortak olarak NDEA grubunda kontrol grubuna göre bariz derecede bir artışın söz konusu olduğu görülmektedir.

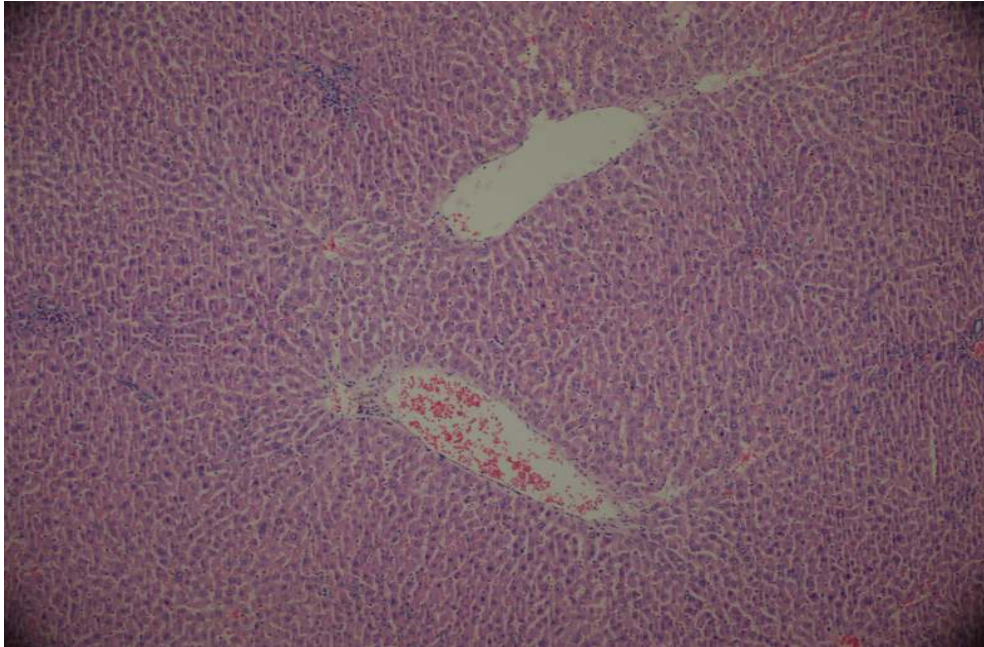
#### 4.3. Histopatolojik Analiz Bulguları



**Resim 2.** NEDA verilen rat karaciğerine ait histolojik kesitlerde santral ven çevresinde sinusoidlerde dilatasyon (mavi ok ile gösterilmektedir) ve safra pigmentinde artış (kırmızı oklar ile gösterilmektedir) dikkati çekmektedir (HE, X200).

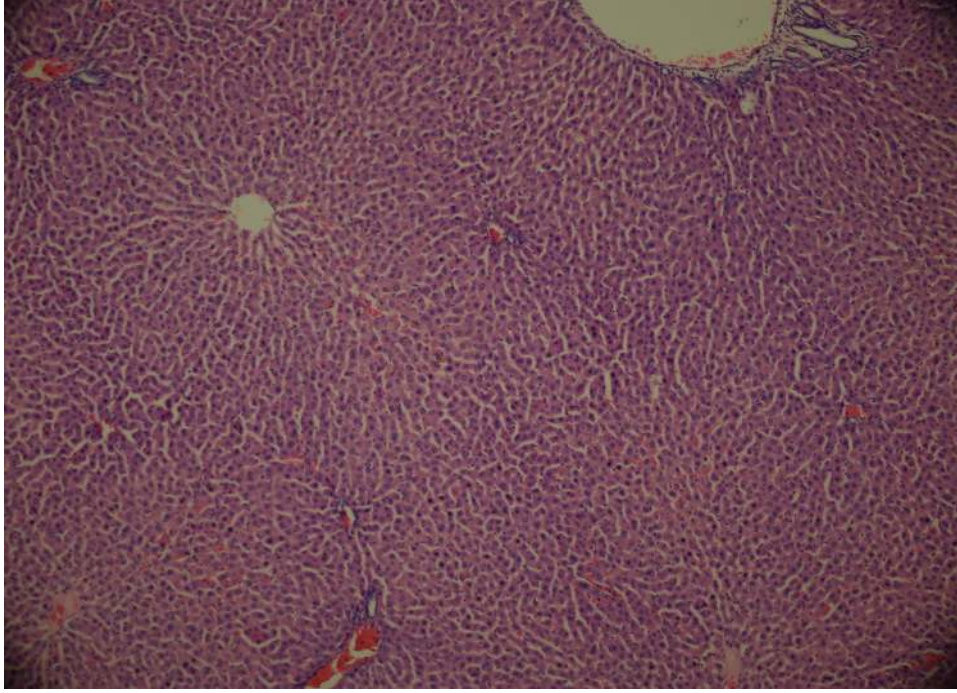


**Resim 3. Kontrol Grubuna ait rat karaciğerinin histolojik kesiti. (HE, X40)**

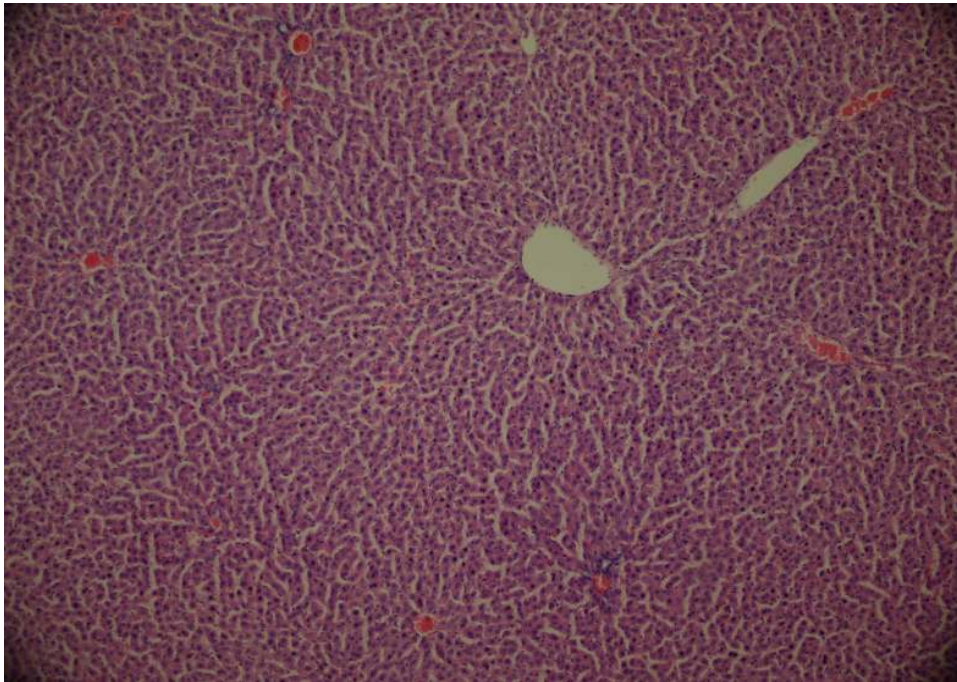


**Resim 4. EA grubuna ait rat karaciğerinin histolojik kesiti. (HE, X40)**





**Resim 5. EZ grubuna ait rat karaciğerinin histolojik kesiti. (HE, X40)**



**Resim 6. P grubuna ait rat karaciğerinin histolojik kesiti. (HE, X40)**

200 mg/kg tek doz NEDA tedavisi sonrası yapılan histopatolojik inceleme sonucunda NDEA verilen gruplarda karaciğer dokusunda tümöral gelişim izlenmedi. Sadece NDEA verilen grupta santral ven çevresinde kanaliküler ya da intrasitoplazmik safra pigment artışı ve yer yer sinusoidlerde dilatasyon dışında patoloji saptanmadı. Diğer gruplara ait dokuların histopatolojik değerlendirmesinde EZ ve Profilaksi gruplarında hafif sinusoidal dilatasyon dışında herhangi bir spesifik bulguya rastlanmadı.

## **5.TARTIŞMA**

Kanser, gen ekspresyonunda çoklu değişikliklerin sebep olduğu, hücre proliferasyonu ve hücre ölümü arasındaki dengenin bozulması ile çevre dokulara invaze olabilen, uzak organ ve dokulara metastaz yapabilen, önemli morbiditeye ve eğer tedavi edilmezse konağın ölümüne neden olabilen anormal hücre büyümesi olarak tanımlanmaktadır. (1)

Dünya Sağlık Örgütü'nün verilerine göre kanser, dünya genelinde en önemli ölüm sebeplerden biri olarak gösterilmektedir. Dünya sağlık örgütünün verilerine göre, 2007 yılında 7.9 milyon kişi ( bütün ölümlerin % 13'ü ) kanser sebebi ile hayatını kaybetmiştir. Kansere bağlı ölümlerin % 30'u önlenabilir olmasına karşılık akciğer, mide, karaciğer, kolon ve meme kanseri sebebi ile ölenlerin sayısı diğer kanser türlerine göre en fazladır. 2007'de kanser ölümlerinin %72'si geri kalmış ve gelişmekte olan ülkelerde görülmüş; 2030 yılında ise dünya genelinde kanserden ölümlerin 12 milyona ulaşacağı tahmin edilmektedir. Tütün kullanımı kanser için tek başına en önemli risk faktörü olarak kabul edilmektedir. (170)

Normal hücrenin tümör hücresine dönüşümü çok basamaklı bir süreç olup, tipik olarak prekanseröz bir lezyonun malign tümöre dönüşümü şeklinde gerçekleşmektedir. Kanser, tek bir hücredeki eksternal ajanlar ve kalıtılmış genetik faktörlere bağlı olarak ortaya çıkan değişikliklerden köken almaktadır. Kansere sebepleri 3 grupta incelenebilir:

1. Fiziksel karsinojenler ( UV ve iyonize radyasyon),
2. Kimyasal karsinojenler (asbest, tütün dumanı componentleri, aflatoksin, arsenik), biyolojik karsinojenler (bakteri, virüs ve parazit enfeksiyonları).
- 3 Yaşlanma da kanser gelişimine neden olan temel faktörlerden biridir. Yaşla beraber kanser insidansı artmakta olup, bu artış hücrel tamir mekanizmalarının yetersiz kalmasına bağlanmaktadır.

Tütün kullanımı, alkol kullanımı, sebze-meyveden fakir diyet, HBV ve HCV gibi kronik enfeksiyonlar, HPV enfeksiyonu geri kalmış ve gelişmekte olan ülkelerde kanserin sebepleri arasındadır. Gelişmiş ülkelerde ise tütün, alkol kullanımı ve obezite major risk faktörleri olarak belirtilmektedir. (170)

Hücrenin malign transformasyonu, mutasyonların progresif birikimi, gen ekspresyonunda ve/veya gen ürününde (protein) stabil mutasyondan bağımsız (epigenetik) değişiklikler ile de ilişkilidir. (171)

Kimyasal karsinojenler genotoksik ve genotoksik olmayanlar şeklinde de sınıflandırılabilirler. (171) Genotoksik olmayan karsinojenler, mutajenik olmamasına rağmen hücre proliferasyonunu stimule ederler, apoptozisi inhibe ederler, inflamasyonu arttırırlar ve/veya terminal olarak çoğalan hücrelerin kritik genlerinde stabil ya da geçici epigenetik değişiklikleri indükleyebilirler. (171)

Nitrozaminlerin farklı hayvan türlerinde tümör oluşumunu indüklediği bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda bir karsinojen olarak nitrozaminlerin

insanlarda görülen bazı tümörleri indüklediği de belirtilmektedir. (171) NDEA çevresel atıklarda, sigara dumanında bulunur ve endojen olarak da sentezlenebilir. (171) Yapılan değişik çalışmalarda NDEA' nın birçok türde tümörleri indüklediği gösterilmiştir. Buna karşın Andrzejewski ve arkadaşları NDEA'nın epigenetik olduğunu ileri sürmektedirler. (171)

NDEA maymun kolonilerinde yapılan çalışmalarda, tüm bileşikler içinde iki yıl içerisinde hemen hemen %100 kanser gelişim insidansı ile en potent ve tutarlı karaciğer karsinogeni olarak tespit edilen bir ajandır. NDEA intraperitoneal yolla verildiğinde latent dönem peroral yolla verilmesine göre daha kısa bulunmuştur. (minimum 6 ay) NDEA tümör oluşumu ve doz bağımlılığı için latent dönem ile kümülatif doz arasındaki ilişkiyi araştırmak için model hepatokarsinogen olarak kullanılmıştır. Altı aydan uzun yaşayan hayvanlarda toksik hepatit, siroz ve adenomatöz hipreplazi gözlenmiştir. Karaciğer tümörü indüksiyonu ise lineer doz bağımlılığı göstermiştir. (172,173)

NDEA maruziyeti sonucu serbest oksijen radikallerinin oluşumunun karaciğer kanserinin indüksiyonunda anahtar rol oynadığı düşünülmektedir. (83) NDEA karacigerde sitokrom P450 (Sit P450) enzimleri tarafından etil-asetoksietil-nitrozamine metabolize olur. Bu bileşik faz II enzimleri vasıtasıyla nontoksik bir bileşige konjuge edilebilir, ya da hücrel makromolekülleri direk olarak etilleyen etil- diazonium iyonuna dönürebilir. (84) NDEA, Sit P450 enzimleri tarafından metabolik aktivasyona uğrayarak sitotoksik, mutajenik ve karsinogenik etkilerinden sorumlu olduğu ve artmış serbest oksijen radikalleri'nin buna aracılık ettiği bildirilmektedir. (86)



NDEA tek başına karaciğer hasarı oluşturmak ve hepatokarsinogenezi başlatmak amacı ile daha önce birçok çalışmada kullanılmıştır. (174-179) Buna karşın hepatokarsinogenez oluşturmak amacı ile yapılan ve tek doz NDEA uygulamasına ilave olarak çeşitli ilerletici ajanların kullanıldığı çalışmalar da yapılmıştır. (180-183) Biz yaptığımız çalışmada ratlara NDEA'yı intraperitoneal yolla 200mg/kg tek doz halinde verdik. Çalışmamızda ilave ajan kullanılmaması NDEA'nın tek başına oluşturduğu etkileri araştırma açısından önemlidir.

Ellajik Asit (EA), güçlü antioksidan etkilere sahip bitkisel bir polifenol olup, nitrozaminler, azoksimetan, mikotoksinler ve polisiklik aromatik hidrokarbonları da kapsayan çeşitli karsinojenlere karşı açık kemoprotektif özelliklere sahip bir moleküldür. (173) Hwang Me ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada; in vitro ortamda peroksit ve süperoksit radikallerini arttırarak ve mitokondriyel membran potansiyeli kaybına yol açarak apoptozisi indükleyen Vitamin K3'ün yol açtığı hepatosit hasarına karşı, EA'nın mitokondriyal membran potansiyel kaybı ve böylece kaspaz aktivasyonuna yol açan ROT üretimini baskılayarak koruyucu olduğunu göstermişlerdir. Aynı çalışmada in vivo ortamda (Balb/c farelerinde) c-jun N-terminal kinaz (JNK) aktivasyonu ile hem apoptozis hem de nekroz yolu ile fulminan hepatik yetmezliğe sebep olan Konkanavalin A'nın hepatotoksik etkilerine karşı Ellajik Asit'in güçlü antioksidan etki ile oksidatif stresi azaltarak fulminan hepatiti önlediği gösterilmiştir. (184) Bu yayınların aksine, EA 'in çeşitli hücre kültürlerinde hücre siklusunu durdurduğuna ve apoptozisi indüklediğine dair yayınlar da bildirilmiştir. EA'nın bu etkilerini p21<sup>waf1/cip1</sup> (185) artışı, p53 artışı ve kaspaz 3 aktivasyonu, (108,186,187) Siklin

A ve B1 down-regülasyonu ve Siklin E up-regülasyonu aracılığı (186) ile gerçekleştirdiği öne sürülmüştür. Nånberg ve arkadaşları insan nöroblastoma hücre kültüründe EA'nın hücre büyümesi ve apoptozis üzerine potent inhibitör etki ile hücre sayısında azalmayı sağladığını göstermişlerdir. (188) Larrosa ve arkadaşları ise Caco-2 insan kolon kanseri hücre kültüründe 1, 10 ve 30  $\mu$ M Ellajik Asit uygulaması sonrası proliferasyonun inhibe olduğunu göstermişlerdir. (186) Li ve arkadaşları ise 5, 10, 25 ya da 50  $\mu$ M Ellajik Asit uygulaması sonrası insan mesane kanseri T24 hücre kültüründe G0/G1 fazındaki hücre yüzdesinin artmış, G2/M fazındaki hücre yüzdesinin azalmış olduğunu bildirmişlerdir.(108) Narayanan ve arkadaşları servikal karsinoma hücre kültürüne 72 sa. 100  $\mu$ M Ellajik Asit uygulamasının hücrelerinde G0/G1 geçişini durdurduğunu, 96 sa uygulamanın ise BrdU işaretli hücre sayısını azalttığını göstermişlerdir.(185) Buna karşın Mertens-Talcott ve arkadaşları ne 5 ne de 10  $\mu$ M Ellajik Asit'in insan lösemi MOLT-4 hücrelerinde hücre siklus kinetikleri üzerine anlamlı etkisinin olmadığını farklı yayınlarla bildirmişlerdir.(187,189,190) Bu çelişki Mertens-Talcott ve arkadaşlarının çalışmalarında EA ile Quercetin arasındaki sinerjik etkiye odaklanarak düşük doz EA kullanmalarına bağlanabilir.(188). Diğer muhtemel bir açıklama ise, çalışmalarda kullanılan hücre kültürünün köken aldığı dokuya bağlı olarak farklı sonuçlar elde edilmiş olabileceği yönündedir. Hücre siklusunu güçlü şekilde inhibe edici etkiler daha önce epitelyal hücrelerin kullanıldığı çalışmalarda gösterilmişken, (107,185,186) Gerek Mertens-Talcott ve arkadaşları'nın T lenfoblastlar üzerinde yaptığı çalışmada gerekse nöroblastoma

hücrelerinde yapılmış başka çalışmalarda hücre siklusunda sınırlı değişiklikler gözlenmiştir. (187-190)

Biz çalışmamızda muhtemel artmış hücre proliferasyonunun DNA turn-over'ında görev alan enzim aktivitelerinde artışa yol açabileceği ön fikrine dayanarak hem NDEA uygulaması ile birlikte başlatılan EA uygulamasının, hem de NDEA uygulaması yapılmadan önce başlatılan EA uygulamasının DNA turn-over'ında görev alan enzim aktiviteleri üzerine etkisini araştırdık. Bunlara ilave olarak, NDEA uygulamasının yol açabileceği muhtemel karaciğer hasarını ve EA'nın karaciğer hasarından koruyucu etkisini değerlendirmek amacı ile de rat serumlarında hepatik fonksiyon belirteci olan AST, ALT, GGT enzim aktiviteleri ile albumin düzeylerini ölçtük.

Bansal K. ve arkadaşlarının vitamin E'nin NDEA ile indüklenmiş oksidatif hasara karşı koruyucu etkilerini araştırdığı bir çalışmada, serum AST ve ALT düzeyleri NDEA verilen gruplarda yüksek bulunmuştur. (175) Başka bir çalışmada ise Janani ve arkadaşları NDEA ile indüklenmiş karaciğer toksisitesinde Bacosid A'nın hepatoprotektif etkisini araştırmışlar ve NDEA verilen gruplarda serum AST, ALT ve GGT enzim aktivitelerini yaklaşık 4 kat yüksek bulmuşlardır. (176) NDEA kullanılarak yapılan diğer çalışmalarda da serumda ve plazmada karaciğer hasarını gösteren AST, ALT, GGT, ALP ve LDH gibi enzim aktivitelerinin arttığı gösterilmiştir. (177,179,191,192).

Çalışmamızda NDEA verilen grupta AST enzim aktivitesi kontrol grubuna göre yüksek, ALT enzim aktivitesi ise düşük olarak bulunmuştur, fakat bu

sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı değildir. Bu gruba ait GGT enzim aktiviteleri ve albumin düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bariz yükselmeler olmasına karşılık, istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır.

Tasaki ve arkadaşları ratlarda EA'nın gıdalarla birlikte alımının güvenilirliğini araştırdıkları bir çalışmada erkek ratlarda %1.25 ve %5 EA ilavesinin olduğu gruplarda AST enzim aktivitesinde kontrol grubuna göre dūřme, dişilerde ise yükselme saptamışlar. ALT ve GGT enzim aktivitelerinde ve albumin düzeylerinde her iki cinste de gruplar arasında fark bulunamamıştır. Bu alışmada AST düzeyindeki dalgalanmalar tedavi ile ilişkilendirilmemiştir. (193)

Alkole bağlı karaciğer toksisitesi üzerine EA'nın etkisini konu alan bir çalışmada sadece alkol verilen grup ile karşılaştırıldığında, EA'nın farklı dozlarının AST, ALT, GGT enzim aktivitelerini dūřürdüėü bulunmuştur. Fakat bu çalışmada EA'nın bu enzim aktivitelerine tek başına etkisi araştırılmamıştır. (194)

Rat karaciğer dokusunda Siklosporin ile indüklenen oksidatif hasara EA'nın etkisinin araştırıldığı bir çalışmada sadece EA verilen grupta kontrol grubuna göre AST enzim aktivitesi hafif artarken, ALT enzim aktivitesi değişmemiştir, AST aktivitesindeki artış anlamlı bulunmamıştır. (103)

Çalışmamızda AST enzim aktivitelerinde, kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında EA grubunda artış, eř zamanlı (EZ) ve Profilaksi gruplarında ise azalma saptandı. ALT enzim aktivitesi ise kontrol grubuna göre tüm gruplarda dūřük bulundu. Fakat bu sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı değildi. GGT aktivitesi ve albumin düzeyleri açısından gruplar arasında fark tesbit edilmedi. Rat serumlarında karaciğer fonksiyonlarını gösteren belirteçlerin bizim kullandığımız

cihazın ve metodun kullanılarak ölçüldüğü yayınlar bulunmaktadır. (195-197) Fakat bu metoda ait ölçüm aralıkları gözönünde bulundurulduğunda çalışmamızda karaciğer fonksiyonlarını gösteren belirteçlerdeki dalgalanmalar ve literatürle uyumsuzluklar ölçüm metodumuza ve beraberinde tür ve cins özelliklerine de bağlanabilir.

Adenozin deaminaz, adenozin ya da deoksiadenozinin deaminasyonunu katalize ederek pürin nükleotidlerin yıkımında görev alan bir enzimdir. ADA'nın katalizlediği bu basamak geri dönüşümsüzdür ve adenozin yıkımının hız kısıtlayıcı basamaklarından biridir. Çalışmamızda tüm gruplarda ADA aktivitesi kontrol grubuna göre yüksek bulundu ( $p<0.025$ ). Bunlardan NDEA, Eş zamanlı ve Profilaksi gruplarında ADA aktivitesinin istatistiksel olarak anlamlı derecede yükseldiği görüldü. ( $p<0.05$  ve  $p<0.025$  sırası ile)

ADA aktiviteleri daha önce yapılan pek çok çalışmada kanseröz hücre ve dokularda artmış ya da azalmış bulunmuştur. (198) Son zamanlarda yapılan çalışmalar ADA aktivitesi ölçümünün malignansi tanısı ve monitörizasyonunda yararlı olabileceğine işaret etmektedir. (198)

ADA hızlı doku proliferasyonu esnasında büyüme faktörleri ve sitokinler tarafından uyarılmaya özellikle duyarlıdır. (199) Birçok çalışmada çok hızlı büyüyen tümörlerde ADA aktivitesi artışı gözlenirken, yavaş büyüyen iyi diferensiye tümörlerde bu aktivite artışı görülmemiştir (200,201).

Suchitra ve arkadaşları gastrik kanserli hastalarda serumda ADA aktivitelerinin anlamlı düzeyde yükseldiğini bulmuşlardır. Bu çalışmada ADA

aktivitesi tanısal değer açısından CEA ile karşılaştırılmış ve ROC eğrilerine göre ADA için eğri altında kalan alan daha yüksek bulunmuş ve CEA'ya göre ADA aktivitesinin tanısal açıdan daha yararlı olduğu kabul edilmiştir. (202)

Aghaei ve arkadaşları meme kanseri olan hastalarda yaptıkları çalışmada serumda ve meme kanserli dokuda total ADA ve ADA2 aktivitelerinin arttığını gösterdiler. Kanseröz dokudaki ADA aktivitesi artışı bazı araştırmacılar tarafından ADA'nın salvaj yoldaki rolüne bağlanırken, bazı araştırmacılar bunu ADA enzimi substratlarının (adenozin) birikimi sonucu oluşan toksisiteye karşı koyan bir kompanzasyon mekanizması olarak görmektedirler. (198) Tümör hücrelerinde Adenozin pürin ve pirimidin metabolizma artışına, hücre ölümüne ve nükleotid yıkımına, iskemi ve ATP yıkımına, AMP salınımına ve S- Adenozil homosistein hidrolizine bağlı olarak oluşabilir. Deoksiadenozin ve deriveleri olan dAMP, dADP, dATP nükleik asit biyosentezinin potent inhibitörleridir. (198) Malign tümörlerde ADA aktivitesi artışı kanser hücrelerine salvaj yolda HGPRT enziminin substratı olan hipoksantin üretimini arttırarak selektif avantaj sağlayabilir. (198) Bunun aksine bazı yayınlarda adenozinin bazı tümörlerin büyümesini uyardığı rapor edilmiştir. Örneğin insan meme kanseri hücrelerinde adenozinin mitojenik etki gösterdiği bulunmuştur (205). Bunu destekleyen başka bir görüş de adenozinin adenozin reseptörleri aracılığı ile VEGF (Vasküler endotelial büyüme faktörü) ekspresyonunu arttırarak anjiogenezi stimule ettiği ve böylece de tümör hücresinin yaşam süresini uzatabileceği yönündedir. (205) Tümör çevresinde adenozin konsantrasyonunun artışı A<sub>2A</sub> reseptörleri aracılığı ile

MHC (Major Histokompatibilite proteinleri)'ler üzerindeki tümör antijenlerinin T hücre reseptörlerine sunumunu ve böylece T hücre aktivasyonunu baskılar. (205)

Bizim çalışmamızda NDEA, EZ ve Profilaksi grubunda ADA aktivitesi istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu. ( $p<0.05$ ,  $p<0.006$ ,  $p<0.006$  sırasıyla) Sadece NDEA verilen grupta ADA aktivitesi artışı pürin metabolizması artışı lehine yorumlanabilir. Sadece EA verilen grupta da kontrol grubuna göre ADA aktivitesi yüksek bulunmasına rağmen bu artış anlamlı değildi. Hem NDEA hem EA verilen EZ ve Profilaksi gruplarında ADA aktivitesi artışı, pürin nükleotidlerin yıkımında hız kısıtlayıcı basamak olan ADA enziminin substratı olan adenozin düzeylerinin artışına sekonder olarak EA'nın kompanzatuvar bir mekanizma ile adenoziyi uzaklaştırma mekanizması olarak yorumlanabilir. Yaptığımız literatür taramalarında EA'nın ADA enzimi ile ilişkisini açıklayan bir yayına rastlayamadık. Yeni yapılacak çalışmalarla EA'nın ADA enzimi üzerindeki etkisi ve etki mekanizması araştırılarak daha aydınlatıcı bilgiler ortaya koyulabilir.

XO Hipoksantin ve Ksantine, Ksantin de ürik asite oksidatif hidroksilasyonunu katalizler. (151) XO esas olarak hepatosit sitoplazmasında, intestinal enterositlerde, goblet hücrelerinde, vasküler endotelial hücrelerde ve meme epitelinde ekspresse edilir. (206) Ürik asit ve oksidasyon ürünü olan Allantoin, serbest radikal çöpçüsü görevi yaparak hücreyi doğal olarak oluşan reaktif oksijen ve reaktif nitrojen türlerinin sebep olduğu oksidatif hasardan korurlar. (151) XO bu yönü ile oksidatif strese karşı savunma enzimidir. Öte yandan ilginç bir şekilde XO'nun kendisi çok sayıda ROT ve RNT sentezine

katkıda bulunur. (151) XO'nun iki formu vardır. Primer gen ürünü Ksantin Dehidrogenazdır. XO posttranslasyonal modifikasyonla oluşur. Bilhassa XO tarafından çok sayıda ROT ve RNT üretilir. XO elektron alıcısı olarak O<sub>2</sub>'ni kullanır. (151) Bu özelliklerinden dolayı XO hücrel redoks potansiyelini düzenleyen önemli bir enzimdir. Hipoksi XO'yu transkripsiyonal ve post-transkripsiyonal seviyede aktive eder. Proinflamatuvar sitokinler hücre kültüründe XO transkripsiyonunu indükler. (206) XO hakkında biyokimyasal bilgi zenginliğine rağmen özellikle insanlarda fizyolojik fonksiyonları hakkında bilgi yetersizdir. Linder ve arkadaşları meme, mide ve kolon kanserinde XO down regülasyonunun kötü prognozla ilişkili olduğunu göstermişlerdir. (207,208) Pürin nükleotidleri metabolizmasında XO ve pürin salvaj yolu enzimi olan HGPRT enzimi hipoksantin için yarışır. Pürin salvaj yolu ATP açısından de novo senteze göre 6 kat daha kazançlı olduğu için salvaj yola şant olması kanser hücrelerine büyüme için avantaj sağlar. Bu şanta bağlı olarak kötü prognozlu kanserlerde XO aktivitesinin azaldığı öne sürülmüştür. (207,208) Bizim çalışmamızda XO aktivitesindeki artış NDEA verilen grupta tüm gruplarla karşılaştırıldığında anlamlı derecede yüksek olarak bulundu (p<0.005) Literatürdeki bilgiler yorumlandığında NDEA grubunda XO aktivitesinde azalma beklense de çalışmamızda görülen bariz artış XO'nun serbest radikal metabolizmasındaki rolüne bağlanabilir.

5'Nükleotidaz, AMP'nin defosforilasyonu ile Adenozinin olduğu basamağı katalizleyen enzimdir. AMP bazı hücrelerden aktif olarak salınan (143), ya da solid tümörlerdeki iskemi ve nekroza sekonder olarak aktif salınım ya da



pasif taşınma ile ekstrasellüler olarak biriken adenin nükleotidlerden kaynaklanır. Bu enzimin birçok formu tanımlanmıştır. Bunlardan Ekto-5' -NT (CD73) adenzinin ekstrasellüler üretimini sağlar. (142) Fibroblastlarda ve bazı kanserlerde çok yüksek düzeyde ekspresse edilirken hemotopoetik orijinli hücrelerde ya çok az ekspresse edilir ya da hiç bulunmaz. Malign hücrelerde Ekto-5' -NT aktivitesi değişkendir. Meme karsinomunda, mide kanserinde, pankreas kanserinde, kronik myeloid lösemide, kutanöz T hücreli lenfomada, glioblastomda, Walker 256 karsinomunda Ekto 5'NT aktivitesi yüksek olarak bulunmuştur. (209) Glioblastomda Ekto 5'NT ve tümör rekürrensini göstermede önemli prognostik faktör olan epidermal büyüme faktörü reseptörü arasında pozitif korelasyon bulunmuştur. (209) Bizim çalışmamızda 5'NT aktiviteleri gruplar arasında dalgalanma göstermekte idi. Kontrol grubuna göre NDEA ve Profilaksi gruplarında 5'NT aktivitelerinde artış, EA ve EZ gruplarında azalma görülmesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. Literatürde EA'nın 5'NT üzerine etkilerini konu alan yayınların yetersizliği nedeni ile çalışmamızdan elde edilen bulguların yeni yapılacak çalışmalarla özellikle etki mekanizması açısından aydınlatılması gerektiğini düşünmekteyiz.

Guanin deaminaz (guanaz, guanin aminohidrolaz, EC 3.5.4.3) guaninin hidrolitik deaminasyonunu katalizler. Bu reaksiyon sonucunda ksantin ve amonyak oluşur. (154) İnsan guanazı en fazla karaciğer, beyin ve böbrekte bulunmasına rağmen AST ve ALT'nin rölatif olarak yüksek bulunduğu iskelet kası, kalp kası, pankreas ve diğer dokularda hemen hemen hiç bulunmaz. Bu nedenle serum guanaz aktivitesindeki artış karaciğer hastalıklarının spesifik bir

göstergesi olarak kabul edilebileceği (164) ve özellikle akut hepatit ve hepatoma'nın tanısında diagnostik bir belirleyici olarak kullanılabileceği (161) öne sürülmüştür. Durak ve arkadaşları guanin deaminaz aktivitesinin kanseröz böbrek dokusunda yükselmiş olduğunu (210) Canbolat ve arkadaşları ise meme kanseri dokularında enzim aktivitesinin düşük olduğunu göstermişlerdir. (211) Rutinde ölçülen diğer enzimlere göre GDA aktivitesi normal insan plazmasında çok düşük ve refereans aralığı çok dardır. (0-1.2IU/L) Kolorimetrik metodlar karaciğer hastalıklarında yapılmış çalışmalarda karşılaşılan yüksek GDA aktiviteleri için yeterince sensitif iken normal ve orta derede artmış aktiviteleri saptamada bazı metodlar ile ilgili çekinceler mevcuttur. (212) Biz çalışmamızda guanin deaminaz aktivitelerini NDEA, EZ (NDEA ve EA) ve Profilaksi gruplarında kontrol grubuna göre hafif artmış bulduk. Bu artış Eş zamanlı ve Profilaksi gruplarında daha belirgindi. Fakat gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmedi. Yaptığımız literatür taramalarında GUA, NDEA ve EA'nın birlikte çalışıldığı bir yayına rastlayamadık. Bu sebeple literatür kıyaslaması yerine bulduğumuz sonuçlar göz önüne alınırsa; GUA aktivitesinin belki de daha uzun bir sürede değişiklik gösterebileceğine işaret etmektedir.

Çalışmamızda karaciğer dokularının histopatolojik incelemesinde sadece NDEA verilen grupta santral ven çevresinde kanaliküler ya da intrasitoplazmik safra pigment artışı ve yer yer sinusoidlerde dilatasyon dışında patoloji saptanmadı. Diğer gruplara ait dokuların histopatolojik değerlendirmesinde EZ ve Profilaksi gruplarında hafif sinusoidal dilatasyon dışında herhangi bir spesifik bulguya rastlanmadı. Bansal AK ve arkadaşlarının i.p 200 mg/kg tek doz NDEA

ile indüklenen oksidatif hasara karşı E vitaminin etkisini araştırdıkları bir çalışmada NDEA tedavisi sonrası 7. günde rat karaciğer dokusunun histopatolojik incelemesinde akut inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve hepatosit sitoplazmalarında vakuolizasyon, 14. günde yapılan incelemede ise hepatositlerde nekroz olduğunu tespit etmişlerdir. (175) Diğer bir çalışmada ise tek i.p tek doz 200 mg/kg NDEA uygulamasını takiben 7.günde sakrifiye edilen ratlardan alınan karaciğer dokularının histopatolojik incelemesinde, hepatonekroz alanları ile birlikte karaciğer hücrelerinde displazik değişiklikler gözlenmiştir. (176) Liu ve arkadaşlarının C57BL/6j farelerine 3 hafta (haftada 1 kez) i.p 75µg/g ve ardından 3 hafta i.p 100 µg/g NDEA vererek HCC ve kolonjiosellüler karsinom gelişimini takip ettikleri bir araştırmada; NDEA uygulaması sonrası 23. Haftada sakrifiye edilen farelere ait karaciğer dokularının histopatolojik incelemesinde safra kanallarında dilatasyon ile birlikte safra kanalı hücrelerinde kolonjiosellüler karsinom gelişimi başlangıcı görülmüş fakat HCC oluşumu gözlenmemiştir. HCC oluşumu ise NDEA uygulaması sonrası 30. haftada kolonjiosellüler karsinom gelişimi sonrası görülmüştür. (213) Oral yoldan ratlara 9 hafta 20 mg/kg (haftada 5 gün) ardından 6 hafta 10 mg/kg (haftada 5 gün) NDEA uygulamasının yapıldığı başka bir çalışmada karaciğer dokusunun histopatolojik incelemesinde nükleuslarda polimorfizm ve hiperkromazi, nükleoluslarda piknozis ve sayıca artış, intranükleer ve intrasitoplazmik vakuolizasyon ve çok sayıda Kupffer Hücreleri görülmüştür. (171) Yukarıdaki bilgiler ışığında tek başına NDEA etkisi ile kanser oluşumu için gerekli sürenin daha uzun olduğu, ayrıca kanser gelişim sürecinin türe ve doza bağlı olarak değişiklik gösterdiğini söylemek mümkündür.

Ellajik Asit'in antioksidan yönünün bilinmesine rağmen NDEA'nın etkisini azaltmada da etkin olup olmadığını göstermek için birlikte ve daha uzun sürelerde kullanmak ve kinetik çalışmalarla desteklemenin daha faydalı olacağı kanaatindeyiz.

## **6.SONUC**

Sonuç olarak AST enzimine ait sonuçlar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında NDEA ve Ellajik Asit grubunda yükselme; eş zamanlı ve profilaksi grubunda azalma bulundu fakat bu değişikliklerin istatistiksel olarak anlamlı değildi. ALT enzimi kontrol grubuna göre kıyaslandığında, genel olarak tüm gruplarda aktivitede bir azalma görülmekte idi ancak istatistiksel bir fark bulunmadı. GGT enzim aktivitesi ve Albumin seviyeleri açısından değerlendirildiğinde gruplar arasında herhangi bir değişiklik bulunamadı. Çalışmamızda karaciğer fonksiyonlarını gösteren belirteçlerdeki dalgalanmalar ve literatürle uyumsuzluklar ölçüm metodumuza ve beraberinde tür ve cins özelliklerine bağlanabilir.

ADA aktivitesi kontrol grubu ile kıyaslandığında tüm gruplarda bir yükselmenin olduğu ve bu yükselmelerden EA hariç NDEA, eş zamanlı ve profilaksi gruplarındaki artışların istatistiksel olarak anlamlı derecede yükseldiği görüldü. ( $p<0.05$ ,  $p<0.006$  ve  $p<0.004$  sırası ile) NDEA grubunda ADA aktivitesindeki artış pürin metabolizmasının hızlanması lehine yorumlanabilir. EZ ve Profilaksi gruplarındaki bariz artışın ise kompanzasyon sonucu olduğu düşünülebilir. Tüm grupların GUA ve 5'NT aktiviteleri incelendiğinde, her iki enzim aktivitelerinde de kontrol gruplarına göre bariz dalgalanmalar olduğu görüldü. En belirgin değişiklik her iki enzim için de NDEA ve profilaksi grubunda görülmesine rağmen, istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı..Literatürde benzer yayına rastlanmadı. Bu sonuçlardan yola çıkarak Guanaz ve 5'NT aktivitelerinin daha uzun süre NDEA maruziyeti sonucu

değişiklik gösterebileceği fikrine ulaşılabilir. XO enzim aktivitesi incelendiğinde, NDEA grubunda diğer gruplara göre XO aktivitesinin anlamlı ölçüde arttığı bulundu. ( $p < 0.05$ ) Diğer gruplar kendi arasında karşılaştırıldığında XO aktivitesinde anlamlı farklılık bulunamadı. Literatürdeki bilgiler yorumlandığında NDEA grubunda XO aktivitesinde azalma beklense de çalışmamızda görülen bariz artış XO'nun serbest radikal metabolizmasındaki rolüne bağlanabilir.

Çalışmamızda karaciğer dokularının histopatolojik incelemesinde sadece NDEA verilen grupta santral ven çevresinde kanaliküler ya da intrasitoplazmik safra pigment artışı ve yer yer sinusoidlerde dilatasyon dışında patoloji saptanmadı. Diğer gruplara ait dokuların histopatolojik değerlendirmesinde EZ ve Profilaksi gruplarında hafif sinusoidal dilatasyon dışında herhangi bir spesifik bulguya rastlanmadı.

Yukarıdaki bilgiler ışığında tek başına NDEA etkisi ile kanser oluşumu için gerekli sürenin daha uzun olduğu, ayrıca kanser gelişim sürecinin türe ve doza bağlı olarak değişiklik gösterdiğini söylemek mümkündür.

## **7.KAYNAKLAR**

1. Raymond W. Ruddon Cancer Biology. 4th ed., Michigan, Oxford University Pres,2007;4
2. Raymond W. Ruddon Cancer Biology. 4th ed., Michigan, Oxford University Pres,2007;17-19
3. Oliveira PA, Colaço A, Chaves R,Guedes-Pinto H, De-La-Cruz P L F, Lopez C Chemical carcinogenesis.An Acad Bras Cienc 2007;79(4):593-616
4. Gomes-Carneiro MR, Ribeiro-Pinto LF, Paumgartten FJ. Environmental risk factors for gastric cancer: the toxicologist's standpoint. Cad Saúde Pública 1997; 13 : 27–38.
5. Huff J. Chemicals associated with tumours of the kidney, urinary bladder and thyroid gland in laboratory rodents from 2000 US National Toxicology Program / National Cancer Institute bioassays for carcinogenicity. IARC Sci Pub 1999;147: 211–225.
6. Gutierrez JB, Salsamendi AL. Fundamentos de ciência toxicológica. Diaz de Santos, Madrid, 2001;155–177.
7. Raymond W. Ruddon Cancer Biology. 4th ed., Michigan, Oxford University Pres,2007;19-21
8. Pitot HC, Dragan YP. Facts and theories concerningthe mechanisms of carcinogenesis. FASEB J 1991;5: 2280–2286

9. Mirsalis JC, Steinmetz KL, Hamilton CM, Bakke JP, Garin KE. The role of cell proliferation in chemical carcinogenesis. *Prog Clin Biol Res* 1990;340: 113–122.
10. Hasegawa R, Futakuchi M, Mizoguchi Y, Yamaguchi T, Shirai T, Ito N, Lijinsky W. Studies of initiation and promotion of carcinogenesis by N-nitroso compounds. *Cancer Lett* . 1998;123: 185–191.
11. Trosko JE. Commentary: is the concept of “tumor promotion” a useful paradigm? *Mol Carcinog* 2001; 30: 131–137.
12. Nguyen-Ba G, Vasseur P. Epigenetic events during the process of cell transformation induced by carcinogens (review). *Oncol Rep* 1999; 6: 925–932.
13. Klaunig JE, Kamendulis LM, Xu Y. Epigenetic mechanisms of chemical carcinogenesis. *Hum Exp Toxicol* 2000;19: 543–555.
14. Williams GM. Mechanisms of chemical carcinogenesis and application to human cancer risk assessment. *Toxicology* 2001; 161: 3–10.
15. Luch A. Nature and nurture – lessons from chemical carcinogenesis. *Nat Rev Cancer* 2005; 5:113–125
16. Cohen SM. Cell proliferation and carcinogenesis. *Drug Metab Rev* 1998; 30:339–357.
17. Bertram JS. The molecular biology of cancer. *Mol Aspects Med* 2001; 21:167–223.



18. Weisburger JH. Worldwide prevention of cancer and other chronic diseases based on knowledge of mechanisms. *Mutat Res* 1998;402: 331–337.
19. Frowein J. Hypothesis: chemical carcinogenesis mediated by a transiently active carcinogen receptor. *Cytogenet Cell Genet* 2000; 91: 102–104.
20. Lutz WK. Susceptibility differences in chemical carcinogenesis linearize the dose-response relationship: threshold doses can be defined only for individuals. *Mutat Res* 2001; 482: 71–76.
21. Baird WM, Mahadevan B. The uses of carcinogen- DNA adduct measurement in establishing mechanisms of mutagenesis and in chemoprevention. *Mutat Res* 2004;547:1–4.
22. Melnick RL, Kohn MC and Portier CJ. Implications for risk assessment of suggested non-genotoxic mechanisms of chemical carcinogenesis. *Environ Health Perspect* 1996;104: 123–134
23. Cohen SM, Garland EM, Ellwein LB. Cancer enhancement by cell proliferation. *Prog Clin Biol Res* 1992; 374: 213–229.
24. Butterworth BE, Bogdanffy MS. A comprehensive approach for integration of toxicity and cancer risk assessments. *Regul Toxicol Pharmacol* 1999; 29: 23–36.
25. Ohshima H, Tazawa H, Sylla BS, Sawa T. Prevention of human cancer by modulation of chronic inflammatory processes. *Mutat Res* 2005; 591: 110–122.

26. Raymond W. Ruddon Cancer Biology. 4th ed. Oxford University Pres,2007;22
27. Bolt HM, Foth H, Hengstler JG And Degen GH. Carcinogenicity categorization of chemicals-new aspects to be considered in a European perspective. Toxicol Lett 2004; 151: 29–41
28. Lutz WK. Differences in individual susceptibility to toxic effects of chemicals determine the dose-response relationship and consequences of setting exposure standards. Toxicol Lett 2002; 126: 155–158.
29. Mehta R. The potential for the use of cell proliferation and oncogene expression as intermediate markers during liver carcinogenesis. Cancer Lett 1995;93: 85–102.
30. Pitot HC. Animal models of neoplastic development. Dev Biol (Basel) 2001;106: 53–57.
31. .Grisham JW, Kaufmann WK, Kaufman DG. The cell cycle and chemical carcinogenesis. Surv Synth Patho Res 1984;1: 49–66.
32. .Beremblum I, Shubik P. The role of croton oil applications, associated with a single painting of a carcinogen, in tumor induction of the mouse's skin. Br J Cancer 1947;1: 379–382.
33. Trosko JE. The role of stem cells and gap junctional intercellular communication in carcinogenesis. JBiochem Mol Biol 2003;36: 43–48.

34. .Player A, Barrett JC, Kawasaki ES. 2004. Laser capture microdissection, microarrays and the precise definition of a cancer cell. *Expert Rev Mol Diagn* 2004;4:831–840.
35. Santella RM, Gammon M, Terry M, Senie R, Shen J, Kennedy D, Agrawal M et al. DNA adducts, DNA repair genotype/phenotype and cancer risk. *Mutat Res* 2005;592:29–35.
36. Jeng JH, Chang MC, Hahn LJ. 2001. Role of areca nut in betel quid-associated chemical carcinogenesis: current awareness and future perspectives. *Oral Oncol* 2001;37:477–492.
37. Frowein J. Hypothesis: chemical carcinogenesis mediated by a transiently active carcinogen receptor. *Cytogenet Cell Genet* 2000;91:102–104..
38. Simons JW. 1999. Genetic, epigenetic, dysgenetic and nongenetic mechanisms in tumorigenesis. II. Further delineation of the rate limiting step. *Anticancer Res* 1999;19:4781–4789.
39. Farber E. The multi-step nature of cancer development. *Cancer Res* 1984;44:4217–4223.
40. Yuspa SH, Hennings H, Lichti U, Kulesz-Martin M. Organ specificity and tumor promotion. *Basic Life Sci* 1983;24:157–171.
41. Hanahan D And Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100:57–70.

42. Butterworth BE, Popp JA, Conolly RB, Goldsworthy TL. 1992. Chemically induced cell proliferation in carcinogenesis. IARC Sci Publ 1992;116:279–305.
43. Scott RE, Wille JR JJ And Wier ML. Mechanisms for the initiation and promotion of carcinogenesis. Mayo Clin Proc. 1984;59(2):107-17.
44. Shacter E, Weitzman SA. Chronic inflammation and cancer. Oncology 2002;6:217–226.
45. Lutz WK. A true threshold dose in chemical carcinogenesis cannot be defined for a population, irrespective of the mode of action. Hum Exp Toxicol 2000;19:566–568.
46. Dixon K And Kopras E. Genetic alterations and DNA repair in human carcinogenesis. Semin Cancer Biol 2004;14:441–448.
47. Hawighorst T, Velasco P, Streit M, Hong YK, Kyriakides TR, Brown LF, et al. Thrombospondin-2 plays a protective role in multistep carcinogenesis: a novel host anti-tumor defense mechanism. EMBO J 2001;20:2631–2640.
48. Connolly RB, Reitz RH, Clewell 3rd HJ, Anderson ME. Pharmacokinetics, biochemical mechanism and mutation accumulation: a comprehensive model of chemical carcinogenesis. Toxicol Lett 1988;43:189–200.
49. Oesch F, Herrero ME, Hengstler JG, Lohmann M, Arand M. Metabolic detoxification: implications for thresholds. Toxicol Pathol 2000;28:382–387.

50. Poirier MC, Santella RM, Weston A. Carcinogen macromolecular adducts and their measurement. *Carcinogenesis* 2000;21: 353–359.
51. Hayes RB. Genetic susceptibility and occupational cancer. *Med Lav* 1995;86:206–213.
52. Gonzalez FJ, Kimura S. Understanding the role of xenobiotic-metabolism in chemical carcinogenesis using gene knockout mice. *Mutat Res* 2001;477:79–87.
53. Park BK, Kitteringham NR, Maggs JL, Pirmohamed M, Williams DP. The role of metabolic activation in drug-induced hepatotoxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2005;45:177–202.
54. Gonzalez FJ. The use of gene knockout mice to unravel the mechanisms of toxicity and chemical carcinogenesis. *Toxicol Lett* 2001;120:199–208.
55. Guengerich FP. Forging the links between metabolism and carcinogenesis. *Mutat Res* 2001;488:195–209.
56. Galati G, Teng S, Moridani MY, Chan TS, O'Brien PJ. Cancer chemoprevention and apoptosis mechanisms induced by dietary polyphenolics. *Drug Metabol Drug Interact* 2000;17:311–349.
57. Garcea G, Dennison AR, Steward WP, Berry DP. Chemoprevention of gastrointestinal malignancies. *ANZ J Surg* 2003;73:680–686.

58. Oda Y. Analysis of the involvement of human N-acetyltransferase 1 in the genotoxic activation of bladder carcinogenic arylamines using a SOS/umu assay system. *Mutat Res* 2004;554:399–406.
59. Mostafa MH, Sheweita SA, O’connor PJ. Relationship between schistosomiasis and bladder cancer. *Clin Microbiol Rev* 1999;12:97–111.
60. Rojas M, Cascorbi I, Alexandrov K, Kriek E, Auburtin G, Mayer L et al. Modulation of benzo[a]pyrene diolepoxide-DNA adduct levels in human white blood cells by CYP1A1, GSTM1 and GSTT1 polymorphism. *Carcinogenesis* 2000;21:35–41.
61. Lutz WK. Dose-response relationships in chemical carcinogenesis: superposition of different mechanisms of action, resulting in linear-nonlinear curves, practical thresholds, J-shapes. *Mutat Res* 1998;405:117–124.
62. Ishikawa T, Ide F, Qin X, Zhang S, Takahashi Y, Sekiguchi M. Importance of DNA repair in carcinogenesis: evidence from transgenic and gene targeting studies. *Mutat Res* 2001;477:414–419.
63. Miller 3rd MC, Mohrenweiser HW, Bell DA. Genetic variability in susceptibility and response to toxicants. *Toxicol Lett* 2001;120:269–280.
64. Kinzler KW, Vogelstein B. Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. *Nature* 1997;386:761–763.

65. Li H, Ung CY, Yap CW, Xue Y, Li ZR, Cao ZW, Chen YZ. Prediction of genotoxicity of chemical compounds by statistical learning methods. *Chem Res Toxicol* 2005;18:1071–1080.
66. Otteneder M, Lutz WK. Correlation of DNA adduct levels with tumor incidence: carcinogenic potency of DNA adducts. *Mutat Res* 1999;424:237–247.
67. Garner RC. The role of DNA adducts in chemical carcinogenesis. *Mutat Res* 1998;402:67–75.
68. Hayes JD, Pulford DJ. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1995;30:445–600.
69. Hanawalt PC, Ford JM, Lloyd DR. Functional characterization of global genomic DNA repair and its implications for cancer. *Mutat Res* 2003;544:107–114.
70. Airoidi L, Pastorelli R, Magagnotti C, Fanelli R. Carcinogen-DNA adducts as tools in risk assessment. *Adv Exp Med Biol* 1999;472:231–240.
71. Vogelstein B, Kinzler KW. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* 2004;10:789–799.
72. Khan QA, Dipple A. Diverse chemical carcinogens fail to induce G(1) arrest in MCF-7 cells. *Carcinogenesis* 2000;21:1611–1618.

73. Khan QA, Vousden KH, Dipple A. Lack of p53-mediated G1 arrest in response to an environmental carcinogen. *Oncology* 1999;57:258–264.
74. Pritchard JB, French JE, Davis BJ, Haseman JK. The role of transgenic mouse models in carcinogen identification. *Environ Health Perspect* 2003;111:444–454.
75. Babenko VN, Basu MK, Kondrashov FA, Rogozin IB, Koonin EV. Signs of positive selection of somatic mutations in human cancers detected by EST sequence analysis. *BMC Cancer* 2006;9:26–36.
76. Friedberg EC. DNA damage and repair. *Nature* 2003;421:436–440.
77. Robbins D, Cotran R. Pathologic basis of disease. 7th ed., Philadelphia: Elsevier Saunders, 2005;319–323.
78. Lai C, Shields PG. The role of interindividual variation in human carcinogenesis. *J Nutr* 1999;29:552–555.
79. Blagosklonny MV. Molecular theory of cancer. *Cancer Biol Ther* 2005;4:621–627.
80. Walker MG, Page CP, Hoffman BF, Curtis M. Integrated Pharmacology (3rd ed.). St. Louis: Mosby 2006.
81. Potency of Chemical Carcinogens. Royal Society of Chemistry, EHSC Note 2004.



82. IARC. N-nitrosodiethanolamine. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum 2000;77:403–438.
83. Loeppky RN. The mechanism of bioactivation of N-nitrosodiethanolamine. Drug Metab Rev 1999;31:175–193.
84. Muzio G, Marengo B, Salvo R et al. Liver cancer is induced by a subnecrogenic dose of DENA when associated with fasting/refeeding: role of glutathione-transferase and lipid peroxidation. Free Radic Biol Med 1999;26:1314–1320.
85. Archer MC. Mechanisms of action of N-nitroso compounds. Cancer Surv 1989;8:241–250.
86. Bansal AK, Trivedi R, Soni GL, Bhatnagar D. Hepatic and renal oxidative stress in acute toxicity of N-nitrosodiethylamine in rats. Indian J Exp Biol 2000;38:916–
87. H.E. Christensen, E.J. Fairchild, Eds., B.S. Carroll, R.J. Lewis Registry of Toxic Effects of Chemical Substances.. U.S. Department of Health, Education, and Welfare, Public Health Service, Center for Disease Control, National Institute for Occupational Safety and Health, U.S. Government Printing Office, Washington, D.C. 1976.
88. P.N. Magee, J.M. Barnes. Carcinogenic Nitroso Compounds, Advances in Cancer Research 1967;10:163-247.

89. Druckey D, Preussmann R, Ivankovic S, Schmahl D. Organotrope Carcinogene Wirkany bei 65 Verschiedenen N-Nitroso-ver-bindungen and BD-Ratten, Z. Krebsforsch, 1967;69(103):103-201.
90. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Man, Vol. 1, International Agency for Research on Cancer, Lyon, France, World Health Organization, 1971;107-124.
91. J. March, Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms and Structure, McGraw-Hill Book Company, New York, 1968;486.
92. J.N. Pitts, P. Grosjean, K.V. Cauwenberghe, J.P. Schmid, and D.R. Fitz, Photooxidation of Aliphatic Amines Under Simulated Atmospheric Conditions: Formation of Nitrosamines, Nitramines, Amides and Photochemical Oxidant, Environmental Science and Technology, 1978;12(8) 946-953.
93. B. Spiegelhandler, G. Eisenbrand and R. Preussman, Contamination of Amines With N-Nitrosoamines, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 1978;17(5) 367-368
94. P. Issenberg, H. Sornson, A Monitoring Method for Volatile Nitrosamine Levels in Laboratory Atmospheres, Environmental N-Nitroso Compounds Analysis and Formation, E.A. Walker and P. Bogovski, Eds., Lyon, France, IARC Scientific Publication 1976;14:97-108.
95. T. Kakizoe, T.T. Wang, VW.S. Eng., R. Farrer, P. Dion, R. Bruce, Volatile N-Nitrosoamines in the Urine of Normal Donors and of Bladder Cancer Patients, Cancer Research 1979;39:829-832.

96. Brunnemann KD, Ye L, Hoffmann D. Assessment of Carcinogenic Volatile N-Nitrosamines in Tobacco and in Mainstream and Sidestream Smoke from Cigarettes, *Cancer Research* 1977;37:3218-3333.
97. Arimoto-Kobayashi S, Sano K, Machida M, Kaji K, Yakushi K. UVA activation of N-dialkyl nitrosamines releasing nitric oxide, producing strand breaks as well as oxidative damages in DNA, and inducing mutations in the Ames test. *Mutation Research* 2010;691:47–54.
98. Hebel DG, Briede JJ, Khampang R, Kleinjans JCS, Kok TMCM. Radical Mechanisms in Nitrosamine- and Nitrosamide-Induced Whole- Genome Gene Expression Modulations in Caco-2 Cells. *Toxicological Sciences* 2010;116(1):194–205.
99. Raymond W. Ruddon *Cancer Biology*. 4th ed., Michigan, Oxford University Press, 2007;487
100. Raymond W. Ruddon, *Cancer Biology* ,4th ed, Michigan, Oxford University Press 2007;491-493
101. Raymond W. Ruddon, *Cancer Biology* ,4th ed, Michigan, Oxford University Press 2007;494
102. Talcott ST, Lee JH. Ellagic acid and flavonoid antioxidant content of muscadine wine and juice. *J Agric Food Chem* 2002;50:3186–3192.
103. Pari L, Sivasankari R. Effect of ellagic acid on cyclosporine A-induced oxidative damage in the liver of rats. *Fundam Clin Pharmacol* 2008;22:395–401.

104. Seeram NP, Henning SM, Zhang Y, Suchard M, Li Z, Heber D. Pomegranate Juice Ellagitannin Metabolites Are Present in Human Plasma and Some Persist in Urine for Up to 48 Hours. *J.Nutr.* 2006;136:2481-2485.
105. Umesalma S and Sudhandiran G. Chemomodulation of the Antioxidative Enzymes and Peroxidative Damage in the Colon of 1,2-dimethyl hydrazine-induced Rats by Ellagic acid. *Phytother. Res.* 2010;24:114–119.
106. Chauuin C, Oliveria F, Ronot X, Fontaine E. Rotenone inhibits the mitochondrial permeability transition-induced cell death in U937 and KB cells. *J Biol chem* 2001;276:41394–8.
107. Bhosle SM, Ahire VR, Henry MS, Thakur VS, Huilgol NG, Mishra KP. Augmentation of radiation-induced apoptosis by ellagic acid. *Cancer Invest* 2010;28:323-330.
108. Li, T.M.; Chen, G.W.; Su, C.C.; Lin, J.G.; Yeh, C.C.; Cheng, K.C.; Chung, J.G. Ellagic acid induced p53/p21 expression, G1 arrest and apoptosis in human bladder cancer T24 cells. *Anticancer Res* 2005;25:971–979.
109. Narayanan, BA, Re GG. IGF-II down regulation associated cell cycle arrest in colon cancer cells exposed to phenolic antioxidant ellagic acid. *Anticancer Res* 2001;21,359–364.
110. Girish C, Pradhan SC. Drug development for liver diseases: focus on picroliv, ellagic acid and curcumin *Fundamental & Clinical Pharmacology* 2008;22:623–632.

111. Levine R, Hall TC, Harris CA. Guanase activity in normal and neoplastic human tissue. *Cancer* 1963;16:269-272.
112. Weber G. Ordered Biochemical Program of Gene Expression in Cancer Cells. *Biochemistry* 2001;66:1164-1173.
113. Murray JL, Perez-Soler R, Bywaters D, Hers E. Decreased Adenosine Deaminase (ADA) and 5'Nucleotidase (5'NT) Activity in Peripheral Blood T Cells in Hodgkin Disease. *American Journal of Hematology* 1986;21:57-66.
114. Trangas T, Courtis N, Gounaris A. Patterns of Adenosine Deaminase, Ecto-5- Nucleotidase, Poly (A ) Polymerase and Surface Light Chain Expression in Chronic Lymmpocytic Leukemias. *Blut* 1989;58:187-193.
115. Vivekanandhan S, Soundararajan C C, Tripathi M, Maheshwari MC. Adenosine Deaminase and 5' Nucleotidase Activities in Peripheral Blood T Cells of Multiple Sclerosis Patients. *Neurochemical Research* 2005;30:453–456.
116. Ratech H, Martinuik F, Borer WZ. Differential Expression of Adenosine Deaminase Isoenzymes in Acute Leukemia. *Blood* 1988;72:1627-1632.
117. Vives JL, Rozman C, Pujades MA. Combined Assay Adenosine Deaminase, Purine Nucleoside Phosphorylase and Lactate Dehydrogenase in the Early Clinical Evaluation of B-Chronic Lymphocytic Leukemia. *American Journal of Heamatology* 1988;27:157-162.
118. Goldberg, DM. Serum Adenosine Deaminase in the Differential Diagnosis of Jaundice. *Brit Med J.* 1995;1:353-355.

119. Solomon JB. Constitutive Enzymes of the; Developing Chick Embryo:Adenosine Deaminase. *Biochem J.* 1959;75:278-284.
120. Kaplan NO, Colowick SP. *Methods in Enzymology.* Academic Press, New York 1951;2:473.
121. Smillie RM. The breakdown of the adenosine phosphates by brain tissues. *Arch. Biochem.* 1957;67(1):213-24.
122. Jordan WK, March R, Houchin OB, Popp E. Intracellular partition of purine deaminases in rodent brain. *Neurochem. J.* 1959;4(2):170-4.
123. Brady TG , Donovan CIO. Survey of the distribution and nature of mammalian adenosine deaminases. *Biochem. J.* 1961;80:17.
124. Giusti G, Pol. *Arch. Med. Wewn.*1970;44:524.
125. Wilson DK, Rudolph FB, Quioco FA. Atomic Structure of Adenosine Deaminase Complexed with Transition-State Analge: Understanding Catalysis and Immunodeficiency Mutations. *Science.* 1991;252:1278-1284.
126. Bloom GE. Leukocyte adenosine deaminase phenotypes in acute leukemia. *Cancer* 1972;29:1357-60.
127. Koizumi H, Tomizawa K, Tanaka H, Kumakiri M, Ohkawara A. Clinical significance of serum adenosine deaminase activity in patients with mycosis fungoides. *J Dermatol* 1993;20:394-399.

128. Balis ME. Adenosine Deaminase and Malignant Cells. *Annals New York Academy of Sciences* 1985;45:142-149.
129. Fleischer, B. CD26: a surface protease involved in T-cell activation. *Immunol Today*. 1990;15:180-184.
130. Dang, N., Torimoto, Y., Deusch, K., Schlossman, S., and Morimoto, C. (1990). Comitogenic effect of solid-phase immobilized anti-1F7 on human CD4 T cell activation via CD3 and CD2 pathways. *J Immunol* 1990;144,4092-4100.
131. Aoki Y, Katoh O, Nakanishi Y, Kuroki S, Yamada H. A Comparison Study of IFN  $\gamma$ , ADA, and CA 125 as Diagnostic Parameters in Tuberculous Pleuritis. *Respiratory Medicine* 1994;88:139-143.
132. Fontan Bueso J, Vereá Hernando H, Garcia-Buela JP, Dominguez Juncal L, Martín Egana MT et al. Diagnostic Value of Simultaneous Determination of Pleural Adenosine Deaminase and Pleural Lysozyme/Serum Lysozyme Ratio in Pleural Effusions. *Chest* 1998;93(2):303-307.
133. Orphanidou, D., Gaga, M., Rasidakis, A., Dimakou, K., Toumbis, M., Latsi, P., Pandalos, J., Christacopoulo, J., Jordanoglou, J.: Tumor Necrosis Factor, Interleukin-1 and Adenosine Deaminase in Tuberculous Pleural Effusion. *Respiratory Medicine* 1996;90:95-98.
134. Dolezal T. Adenosine deaminase review of physiological roles 2001. URL: <http://www.entu.cas.cz/fyziol/seminars/ada.html>.

135. Kane BJ, Kuhn JG, Roush MK. Pentostatin: An Adenosine Deaminase Inhibitor for the Treatment of Hairy Cell Leukemia. *Ann Pharmacother*. 1992;26:939-947.
136. Carson DA, Iizasa T, Seto S, Carrera CJ, Kubota M, Willis EH et al. Metabolic Basis for Immune Dysfunction in Adenosine Deaminase Deficiency. *Ann N Y Acad Sci*. 1985;451:34-41.
137. Dikmen N, Özgünen T. Harper Biyokimya .25.Baskı. İstanbul: Nobel Kitapçılık 2004;375-401.
138. Bianchi V, Pontis E, Reichard P. Interrelations between substrate cycles and de novo synthesis of pyrimidine deoxyribonucleoside triphosphates in 3T6 cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1986;83:986–990.
139. Hunsucker SA, Mitchell BS, Spychalaa J. The 5'-nucleotidases as regulators of nucleotide and drug metabolism. *Pharmacology & Therapeutics US* 2005;107:1–30.
140. Sala-Newby GB, Skladanowski AC, Newby AC. The mechanism of adenosine formation in cells. Cloning of cytosolic 5'- nucleotidase-I. *J Biol Chem* 1999;274:17789–17793.
141. Lamba JK. Genetic factors influencing cytarabine therapy. *Pharmacogenomics* 2009;10(10):1657–1674.
142. Zimmermann, H. 5'-Nucleotidase: molecular structure and functional aspects. *Biochem J*. 1992;285,345–365.



143. Resnick MB, Colgan SP, Patapoff TW, Mrsny RJ, Awtrey CS. Delp-  
Archer C et al. Activated eosinophils evoke chloride secretion in model intestinal  
epithelia primarily via regulated release of 5'-AMP. *J Immunol* 1993;151:5716–  
5723.
144. Schardinger R. Ueber das Verhalten der Kuhmilch gegen Methylblau und  
seine Verwendung zur Unterscheidung von ungekochter und gekochter Milch. *Z.*  
*Untersuch Nahrungs Genussmittel*. 1902;5:1113–1121.
145. Morgan EJ, Stewart CP, Hopkins FG. On the anaerobic and aerobic  
oxidation of xanthin and hypoxanthin by tissues and milk. *Proc R Soc London Ser*  
*B*. 1922;94:109–131.
146. Laakso J. Xanthine oxidoreductase in essential hypertension and metabolic  
syndrome, institute of biomedicine pharmacology University of Helsinki,  
Finland. Layout martti ruokonen university press Helsinki 2009;ISBN:978-952-  
92-6095-9 (paperback) ISBN:978-952-10-5720-5.
147. Rytkönen EM., Halila R., Laan M, Saksela M, Kallioniemi OP, Palotie A,  
Raivio KO. (1995). The human gene for xanthine dehydrogenase (XDH) is  
localized on chromosome band 2q22. *Cytogenet Cell Genet*. 1995;68,61–3.
148. Hille R, Nishino T. Flavoprotein structure and mechanism of. Xanthine  
oxidase and xanthine dehydrogenase. *FASEB J*. 1995;9:995–1003.
149. Garattini, E., Fratelli, M. & Terao, M. (2008). Mammalian aldehyde  
oxidases: genetics, evolution and biochemistry. *Cell Mol Life Sci*, 65, 1019–48.

150. Spiekermann S, Landmesser U, Dikalov S, Brecht M, Gamez G, Tatge H et al. Electron spin resonance characterization of vascular xanthine and NAD(P)H oxidase activity in patients with coronary artery disease: relation to endothelium-dependent vasodilation. *Circulation* 2003;107:1383–9.
151. Vorbach C, Harrison R, Capecchi MR. Xanthine oxidoreductase is central to the evolution and function of the innate immune system. *Trends Immunol.* 2003;24:512–7.
152. Benboubetra M, Gleeson A, Harris CP, Khan J, Arrar L, Brennan D, et al. Circulating anti-(xanthine oxidoreductase) antibodies in healthy human adults. *Eur J Clin Invest.* 1997;27:611–9.
153. Nishino T, Okamoto K, Kawaguchi Y, Hori H, Matsumura T, Eger BT et al. Mechanism of the conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase: identification of the two cysteine disulfide bonds and crystal structure of a non-convertible rat liver xanthine dehydrogenase mutant. *J Biol Chem.* 2005;280:24888–94.
154. Schmidt G. Über den Fermentativen Abbau der Guanysäure in den Kaninchenleber. *Z Physiol Chem* 1932;208:85-224.
155. Kuzmits R, Seyfried H, Wolf A, Müller MM. *Enzyme(Basel).* 1980;25:148-152.
156. Scholar EM, Calabresi P. *Cancer Res.* 1973;33:94–103.

157. Mohamedali KA, Guicherit OM, Kellems RE, Rudolph FB. *J. Biol. Chem.* 1993;268:23728–23733
158. Nardiello S, Galanti B, Russo M, Guarino F. *Enzyme (Basel)* 1978;23:353–355.
159. Sitaramayya A, Ali S, Sree Kumar K, Krishnan PS. (1974) *Biochem. J.* 1974;138, 143–146.
160. Yuan G, Bin JC, McKay DJ, and Snyder FF. Cloning and Characterization of Human Guanine Deaminase (Purification and partial amino acid sequence of the mouse protein) *The Journal Of Biological Chemistry* 1999;274:12:8175-8180.
161. Ito S, Hayashi K, Iwasaki A, Syundo J, Tamura Y, Kishi S et al. Characterization of antibody against human liver guanase by immunoblotting and immunohistochemical staining of human liver guanase by a direct labeling and antibody-enzyme method. *J Histochem Cytochem* 1989;37:611-615.
162. Ito S, Iwasaki A, Mizobuchi M, Matsuda Y: Purification of human liver guanase and spesific antibody. *Jpn L Gastroenterology* 1990;82:113-120.
163. Ito S, Maeda T, Iwasaki A, Fujikawa H, Okahisa T, Saijou T. Histochemical and biochemical studies on guanase in the human and rat kidney. *Acta Histochem Cytochem* 1991;24:591-596.
164. Kubo K, Honda H, Sannomiya K, Aying Y, Mei W, Mi S. Histochemical and Immunohistochemical investigation of guanase and nedasin in human tissues. *J. Med. Invest.* 2006;53:264-270.

165. Guisti G. Adenosine Deaminase. In: Methods of Enzymatic Analysis, (2nd Ed.), Bergmeyer HV. New York, Academic Press, 1974;1092-1099.
166. Caraway VT. Colorimetric Determination of Serum Guanase Activity. Clinical Chemistry 1966;12(4):187-193.
167. Hashimoto S. A new spectrophotometric assay method of xanthine oxidase in crude tissue homogenate. Anal Biochem. 1974;62:425-35.
168. Donald WM. Enzymes. In: Tietz NW, ed. Text book of clinical chemistry. W.B. Saunders Company: Philadelphia, USA, 1986;718–720.
169. Lowry O. Rosenbraugh N, Farr L, Randall R. Protein measurement with folin phenol reagent . J. Biol. Chem 1951;182:265-75.
170. WHO. Cancer. World Health Organization.  
  
URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/> Retrieved 2007-06-25.
171. Seufi AM, Ibrahim SS, Elmaghraby, Hafez EE. Preventive effect of the flavonoid, quercetin, on hepatic cancer in rats via oxidant/antioxidant activity: molecular and histological evidences. Journal of Experimental and Clinical Cancer Research. 2009;28:80
172. Thorgeirsson UP, Dalgard DW, Reeves J, Adamson RH (1994) Tumor incidence in a chemical carcinogenesis study of nonhuman primates. Regul. Toxicol. Pharmacol. 1994;19:130–151.

173. Lapis K, Zalatnai A, Timar F., Thorgeirsson UP. Quantitative evaluation of lysozyme- and CD68-positive Kupffer cells in diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinomas in monkeys. *Carcinogenesis* 1995;16:3083–3085.
174. Ramírez OB, Sokol S, Berre VL, François JM and Treviño SV. An Approach to the Study of Gene Expression in Hepatocarcinogenesis Initiation *Translational Oncology* 2010;3:2:142-148.
175. Bansal KA, Bansal M, Soni G, Bhatnagar D. Protective role of Vitamin E pre-treatment on N-nitrosodiethylamine induced oxidative stress in rat liver. *Chemico-Biological Interactions* 2005;156:101–111.
176. Janani P, Sivakumari K, Parthasarathy C. Hepatoprotective activity of bacoside A against N-nitrosodiethylamine-induced liver toxicity in adult rats. *Cell Biol Toxicol* 2009;25:425–434.
177. Gupta C, Vikram A, Tripathi DN, Ramarao P, Jena GB. Antioxidant and Antimutagenic Effect of Quercetin against DEN Induced Hepatotoxicity in Rat. *Phytother. Res.* 2010;24:119–128.
178. Chakraborty T, Pandey N, Chatterjee C, Ghosha B, Ranab B, Chatterjee M. Molecular basis of anticlastogenic potential of vanadium in vivo during the early stages of diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in rats. *Mutation Research* 2006;609:117–128.

179. Dias MC, Rodrigues MAM, Reimberg MCH, Barbisan LF. Protective effects of *Ginkgo biloba* against rat liver carcinogenesis. *Chemico-Biological Interactions*. 2008;173:32–42.
180. Singh BH, Singh BR, Sarmaa BK, Singh HB. Potential chemoprevention of N-nitrosodiethylamine-induced hepatocarcinogenesis by polyphenolics from *Acacia nilotica* bark. *Chemico-Biological Interactions* 2009;181:20–28.
181. Yadav S, Bhatnagar D. Chemo-preventive effect of Star anise in N-nitrosodiethylamine initiated and phenobarbital promoted hepato-carcinogenesis. *Chemico-Biological Interactions* 2007;169:207–214.
182. Alwahaibi N, Mohameda J, Alhamadani A. Supplementation of selenium reduces chemical hepatocarcinogenesis in male Sprague-Dawley rats. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 2010;24:119–123.
183. Woo GH, Shibutani M, Inoue K, Fujimoto H, Takahashi M, Youl Lee K, Hirose M. Promoting potential of a Jamaica quassia extract in a rat medium-term hepatocarcinogenesis bioassay. *Food and Chemical Toxicology* 2007;45:1160–1164.
184. Hwang JM, Cho JS, Kim tH, Lee YI. Ellagic acid protects hepatocytes from damage by inhibiting mitochondrial production of reactive oxygen species. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2010;64(4):264-70.

185. Narayanan BA, Geoffroy O, Willingham MC, Re GG, Nixon DW. p53/p21 (WAF1/CIP1) expression and its possible role in G1 arrest and apoptosis in ellagic acid treated cancer cells. *Cancer Lett* 1999;136:215-21.
186. Larrosa M, Thoma's-Barbera'n FA, Espi'n JC. The dietary hydrolysable tannin punicalagin releases ellagic acid that induces apoptosis in human colon adenocarcinoma Caco-2 cells by using the mitochondrial pathway. *J Nutr Biochem* 2006;17:611-25.
187. Mertens-Talcott SU, Percival SS. Ellagic acid and quercetin interact synergistically with resveratrol in the induction of apoptosis and cause transient cell cycle arrest in human leukemia cells. *Cancer Lett* 2005;218:141-51.
188. Na'nberg E, Fjaeraa C. Effect of ellagic acid on proliferation, cell adhesion and apoptosis in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2009; 63:254-261.
189. Mertens-Talcott SU, Bomser JA, Romero C, Talcott ST, Percival SS. Ellagic acid potentiates the effect of quercetin on p21waf1/cip1, p53 and MAP-kinases without affecting intracellular generation of reactive oxygen species in vitro. *J Nutr* 2004;135:609-14.
190. Mertens-Talcott SU, Talcott ST, Percival SS. Low concentrations of quercetin and ellagic acid synergistically influence proliferation, cytotoxicity and apoptosis in MOLT-4 human leukemia cells. *J Nutr* 2003;133:2669-74.

191. Pradeep K, Mohan CVR, Gobianand K, Karthikeyan S . Effect of Cassia fistula Linn. leaf extract on diethylnitrosamine induced hepatic injury in rats. *Chemico-Biological Interactions* 2007;167:12–18.
192. Sayed-Ahmed MM, Aleisa AM, Al-Rejaie SS, Al-Yahya AA, Al-Shabanah OA, Hafez MM and Nagi MN. Thymoquinone attenuates diethylnitrosamine induction of hepatic carcinogenesis through antioxidant signaling. 2010;3:4:254-261.
193. Tasaki M, Umemura T, Maeda M, Ishii Y, Okamura T, Inoue T, Kuroiwa Y, Hirose M, Nishikawa A. Safety assessment of ellagic acid, a food additive, in a subchronic toxicity study using F344 rats. *Food and Chemical Toxicology* 2008;46:1119-1124.
194. Devipriya N, Sudheer AR, Menon VP. Dose-response effect of ellagic acid on circulatory antioxidants and lipids during alcohol-induced toxicity in experimental rats. *Fundamental and Clinical Pharmacology*, 2007;21:621-630.
195. Çerkezayabekir A, Kızılay G, Ertan F. Ultrastructural changes in rat liver by methyleugenol and evaluation of some biochemical parameters. *Turk J Biol* 2010;34.
196. Wang N, Yu H, Ma J, Wu W, Zhao D, Shi X et al. Evidence for tight junction protein disruption in intestinal mucosa of malignant obstructive jaundice patients. *Scand. J. Gastroenterol.* 2010;45(2):191-9.



197. Cöl C, Dinler K, Hasdemir O, Buyukasik O, Bugdaycı G, Terzi H. Exogenous melatonin treatment reduces hepatocyte damage in rats with experimental acute pancreatitis. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 2010;17:682–687.
198. Aghaei M, Karami-Tehrani F, Salami S, et al. Adenosine deaminase activity in the serum and malignant tumors of breast cancer: The assessment of isoenzyme ADA1 and ADA2 activities. *Clin Biochem* 2005;38:887-891.
199. Kocic, G, Vlahovic P, Djordjevic V, Bjelakovic G, Koracevic D, Savic V. Effect of growth factors on the enzymes of purine metabolism in culture of regenerating rat liver cells . *Arch Physiol Biochem*, 1995;103:715-9.
200. Balıs ME. Adenosine Deaminase and Malignant Cells. *Annals New York Academy of Sciences* 1985;45:142- 149.
201. Hofbrand, AV, Janossy G. 1981. Enzyme and membrane markers in leukemia: recent developments . *J Clin Pathol.*, 1981;34:254-62.
202. Suchitra MM, Prabhakar Reddy E, Muni Sudhakar G, Ramesh B, Sambasivaiah K, Bitla AR, Srinivasa Rao PVLN. Evaluation of Serum Adenosine Deaminase as a Tumor Marker in Gastric Cancer. *Res. J. Medicine & Med. Sci.* 2009;4(2):411-414.
203. Camici M, Tozzi MG, Allergrini S et al. Purine salvages enzyme activities in normal and neoplastic human tissues. *Cancer Biochem Biophys* 1990;11:201-209.

204. Dornard J, Bonnafeous JC, Favero J, et al. Ecto 5-nucleotidase and adenosine deaminase activities of lymphoid cells. *Biochem Med* 1982;28:144-156.
205. Linden J. Adenosine Metabolism and Cancer. *Articles in Press. Am J Physiol Cell Physiol* 2006;291:405-406.
206. Linder N, Martelin E, Lundina M, Louhimod J, Nordlinge S, Haglund C, Lundina J. Xanthine oxidoreductase Clinical significance in colorectal cancer and in vitro expression of the protein in human colon cancer cells. *European Journal Of Cancer* 2009;45:648–655.
207. Linder N, Lundin J, Isola J, Lundin M, Raivio KO, Joensuu H. Down-regulated xanthine oxidoreductase is a feature of aggressive breast cancer. *Clin Cancer Res* 2005;11:4372–81.
208. Linder N, Haglund C, Lundin M, et al. Decreased xanthine oxidoreductase is a predictor of poor prognosis in early-stage gastric cancer. *J Clin Pathol* 2006;59:965–71.
209. Spychala J. Tumor-promoting functions of adenosine. *Pharmacology & Therapeutics* 2000;87:161–173.
210. Durak I, Beduk Y, Kavutcu M, Suzer O, Yaman O, Oztura HS, Canbolat O, Ulutepe S. Activity of enzymes participating in purine metabolism of cancerous and non-cancerous human kidney tissue, *Cancer Invest.* 1997;15:3:212–216.

211. Canbolat O, Durak I, Cetin R et al. Activities of adenosine deaminase, 5'-nucleotidase, guanase and cytidine deaminase enzymes in cancerous and noncancerous human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1996;37:189-193.
212. Roberts ELL, Newton RP. Estimation of guanine deaminase using guanosine as a "prosubstrate" *Analytical Biochemistry* 2004;324:250–257.
213. Liu X, Dewaele S, Vanhooren V, Fan YD, Wang L, Huysse JV et al. Alteration of N-glycome in diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma: a non-invasive monitoring tool for liver cancer. *Liver International* 2010;ISSN 1478-3223.

## **8. ÖZET**

NDEA (N-nitrozodietilamin); serbest oksijen radikalleri oluşumu ile karaciğer kanseri indüksiyonunda anahtar rol oynadığı düşünülen bir nitrozamindir. (82,83) EA (Ellajik Asit) antioksidan, antiinflamatuvar, antikarsinojenik, antiviral, antibakteriyel, antiproliferatif özelliklere sahip fenolik lakton bileşiğidir. (102) Kanserli hücrelerde pürin metabolizma yolunda görev alan enzimlerin aktivitelerindeki değişimler kanser hücrelerinin enzimatik profilini yansıtmaları açısından önemlidir. (112,113) Bu çalışmada NDEA ve EA'nın rat karaciğer dokularında DNA turn-over'ında görev alan enzimler (ADA, GUA, 5'NT, XO) ile serumda karaciğer fonksiyonlarını gösteren parametreler (AST, ALT, GGT, Albumin) üzerine etkilerini ve histopatolojik etkilerini inceledik.

Çalışmada ağırlıkları yaklaşık 220-250 gr olan 30 adet dişi wistar albino rat kullanıldı. Ratlar Kontrol grubu (K), NDEA grubu (NDEA), Ellajik Asit grubu (EA),Eş zamanlı NDEA+EA grubu (EZ) ve Profilaksi EA+NDEA grubu (P) olmak üzere 5 gruba bölündü. NDEA uygulaması 200mg/kg tek doz şeklinde intraperitoneal yoldan yapıldı. EA, oral yoldan gavaj yolu ile 25 mg/kg dozunda verildi. Rat karaciğer dokularında DNA turn-over enzimleri spektrofotometrik olarak, karaciğer fonksiyonlarını gösteren belirteçler Architect Ci 16200 cihazında ölçüldü. Dokuların histopatolojik incelemesi yapıldı.

Sonuç olarak AST, ALT, GGT ve Albumin seviyelerinde gruplar arasında değişiklikler gözlenmesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadı. ADA aktivitesinde kontrol grubuna göre NDEA, EZ ve profilaksi gruplarında

anlamli derecede artiş görüldü. ( $p<0.05$ ,  $p<0.006$  ve  $p<0.004$  sırası ile) Tüm grupların GUA ve 5'NT aktiviteleri incelendiğinde, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamli bir fark bulunamadı. NDEA grubunda diğer gruplar ile karşılaştırıldığında XO aktivitesinin anlamli olarak yükseldiği görüldü. ( $p< 0.05$ ) Histopatolojik incelemede, NDEA grubunda santral ven çevresinde kanaliküler ya da intrasitoplazmik safra pigment artışı ve yer yer sinusoidlerde dilatasyon görülürken diğer gruplarda spesifik bulguya rastlanmadı. Ellajik Asit'in antioksidan yönünün bilinmesine rağmen NDEA'nın etkisini azaltmada da etkin olup olmadığını göstermek için birlikte ve daha uzun sürelerde kullanmak ve kinetik çalışmalarla desteklemenin daha faydalı olacağı kanaatindeyiz.

Anahtar Kelimeler: NDEA, Ellajik Asit, ADA, GUA, 5'NT, XO.

## **9. SUMMARY**

N-Nitrosodiethylamine(NDEA) is a potent carcinogenic dialkyl nitrosamine used to induce liver cancer in animal models. Ellagic Acid (EA), a polyphenol found in berries, grapes and nuts, exhibits important health promoting effects via its antioxidant, antiproliferative, anticarcinogenic, antiviral, antibacterial activities. In this study, we aim to investigate the effects of NDEA on DNA turn-over enzyme activities in NDEA treated rat liver tissues and proflactic/therapeutic effects of EA in these rat liver tissues.

30 female wistar albino rats were divided into 5 groups randomly. 1) Control (C), 2) NDEA alone, 3) EA alone, 4) NDEA+EA simultaneously (S), 5) Prophylactic EA+NDEA (P). A single dose of 200mg/kg NDEA was administered i.p to the rats. Also, EA was administered every other day dose of 25mg/kg via gavage. DNA turn-over enzyme activities were measured in rat liver tissues spectrophotometrically. Liver function tests were analysed in serum by Abbott Architect Ci 16200. Additionally rat liver tissues were analysed histopathologically.

There were alterations in liver function tests, but no statistically significant differences were determined between the groups. ADA activities were significantly elevated in NDEA, S and P groups compared to controls ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.006$ ,  $p < 0.004$ , respectively). There were no significant differences in GUA and 5'NT activities between the groups, XO activities were significantly increased in NDEA group compared to other groups. ( $p < 0.05$ ) Histopathological analyses revealed that there were cystical dilatations around central vein, intrastoplasmic

biliary pigment increase and sinusoidal dilatation in the NDEA group. There were no histopathological alterations in other groups.

As a result, new long term studies have to be planned to reveal whether EA has chemopreventive effects and to determine the mechanisms of action of EA in NDEA treatment.

Key words: NDEA, Ellagic acid, ADA, GUA, 5'NT, XO.

## **10.ÖZGEÇMİŞ**

**Adı:** Aslıhan

**Soyadı:** Çavunt Bayraktar

**Doğum yeri ve tarihi:** Konya, 04.07.1981

**Eğitimi:** 2006-2011 Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya AD,Ankara

1999-2005 Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi, Konya

1992-1999 Selçuklu Anadolu Lisesi; Konya

1987-1992 Gazi Mustafa Kemal İlkokulu, Konya

**Yabancı dili:** İngilizce (iyi)

**Üye olduğu bilimsel kuruluşlar:**

Klinik Biyokimya Uzmanları Derneği

Türk Klinik Biyokimya Derneği

Türk Biyokimya Derneği

Türk Tabipler Birliği

**Bilimsel Etkinlikler:**

Yurt dışı yayınlar:

1. Ceylan M, Sener S, Bayraktar AC, Kavutcu M. Oxidative imbalance in child and adolescent patients with attention-deficit/hyperactivity disorder. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2010;1;34(8):1491-4.



Poster Sunumları:

1. Bayraktar C. Aslihan, Kavutcu Mustafa, Yagmurdur Hatice, Ongen Ercin. The Effects Of Dexketoprofen On Paraoxanase And Nitric Oxyde Synthase Activities In Rat Liver Tissues. 35<sup>th</sup> FEBS CONGRESS ‘Molecules Of Life’ 26 Haziran-1 Temmuz 2010, Göteborg, İsveç.

2. Çavunt A, Elbeğ Ş, Paşaoğlu H. Birinci ve İkinci Trimester tarama testleri medyan değerleri 9. Ulusal Klinik Biyokimya Kongresi 23-26 Nisan 2009, Antalya, Türkiye.

3. Reisli İ, Özel A, Çavunt A, Bayraktar S, Van Dongen JJM, Van der Burg M. Agammaglobulinemili bir kız olgu. Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırma Topluluğu İmmunoloji Günleri, 12-14 Eylül 2003, Konya, Türkiye.

Katıldığı Kongreler ve Kurslar:

1. 22. Ulusal Biyokimya Kongresi; 27- 30 Ekim 2010, Eskişehir, Türkiye.
2. 35th FEBS CONGRESS ‘Molecules Of Life’; 26 Haziran-1 Temmuz 2010, Göteborg,
3. Tıbbi Laboratuvarlarda Bilişim Teknolojileri Sempozyumu; 7-8 Mayıs 2010, Ankara, Türkiye .
4. 3. Ankara Tıp Biyokimya Günü; 13 Nisan 2010, Ankara, Türkiye.
5. Pratisyen Hekimlere Yönelik Klinik Biyokimyasal Yaklaşım Toplantısı, 28 Aralık 2009, Ankara, Türkiye.

6. Laboratuvar Yönetimi Sempozyumu; 7-10 Ekim 2009, Gaziantep, Türkiye.
7. TKBD Tıbbi Laboratuvar Gereksinimlerinin Karşılama Süreçleri Kursu; 27-28 Eylül 2009, Zonguldak, Türkiye.
8. TKBD Güz Okulu; 24-27 Eylül 2009, Zonguldak, Türkiye.
9. 9. Ulusal Klinik Biyokimya Kongresi, 23-26 Nisan 2009, Antalya, Türkiye
10. 2. Ankara Tıp Biyokimya Günü; 30 Nisan 2009, Ankara, Türkiye.
11. Hastane Enfeksiyonları Mezuniyet Sonrası Eğitim Kursu; 11 Ocak 2007, Ankara, Türkiye.
12. Hacettepe Ün. Tıp Fak Bilimsel araştırma Topluluğu Ulusal Cerrahi Acil Sorunlar Öğrenci Kursu; 20-21 Mart 2004 Ankara,Türkiye.
13. Erciyes Ün. Tıp Fak Bilimsel araştırma Topluluğu Genel Tıp Öğrenci Kongresi; 27-29 Şubat 2004, Kayseri, Türkiye.
14. Ege Üniversitesi (Uluslararası katılımlı) 17. Ulusal İmmunoloji Kongresi; 8-11 Ekim 2003, Kuşadası, Türkiye.
15. Selçuk Ün. Tıp Fak Bilimsel Araştırma Topluluğu İmmunoloji Günleri; 12-14 Eylül 2003, Konya, Türkiye.
16. Ege Ün. Tıp Fak Bilimsel Araştırma Topluluğu Ulusal Moleküler Biyoloji ve Genetik Öğrenci Kongresi; 2-4 Mayıs 2003, İzmir, Türkiye.