

40703

T.C.
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

BEYİN TÜMÖRLERİNDE DOKU SUPEROKSİT DİSMUTAZ,
KATALAZ VE GLUTATYON PEROKSİDAZ AKTİVİTELERİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. Ömer AKYOL

Tez Yöneticisi: Doç. Dr. İlker DURAK

Ankara, 1994

İÇİNDEKİLER

| | |
|--|----------|
| 1. GİRİŞ VE AMAÇ | 4 |
| 2. GENEL BİLGİLER | 7 |
| 2.1. Beyin tümörleri | 7 |
| 2.1.1. Beyin tümörlerinin etyolojisi | 7 |
| 2.1.2. Beyin tümörlerinin insidansı ve histolojik olarak sınıflandırılması | 7 |
| 2.1.3. En sık görülen bazı santral sinir sistemi tümörleri | 9 |
| 2.1.3.1. Glioblastoma multiforme | 9 |
| 2.1.3.2. Meningioma | 9 |
| 2.2. Serbest radikaller | 10 |
| 2.2.1. Tanımı ve özellikleri | 10 |
| 2.2.2. Serbest oksijen radikalleri ve reaktif oksijen türleri | 10 |
| 2.2.2.1. Süperoksit radikali | 12 |
| 2.2.2.2. Hidrojen peroksit radikali | 12 |
| 2.2.2.3. Hidroksil radikali | 12 |
| 2.2.2.4. Singlet oksijen | 13 |
| 2.2.2.5. Karbon merkezli radikaller | 13 |
| 2.2.3. Hücrede serbest radikallerin üretilmesi | 13 |
| 2.2.4. Serbest radikallerin hasar oluşturan reaksiyonları | 14 |
| 2.2.4.1. Lipidlerde meydana gelen yapısal değişiklikler | 14 |
| 2.2.4.2. Proteinlerde ve nükleik asitlerde meydana gelen yapısal değişiklikler | 15 |

| | |
|--|-----------|
| 2.2.5. Serbest radikallerden koruyucu enzimatik ve non-enzimatik sistemler | 16 |
| 2.2.6. Serbest radikallerin direkt olarak ölçülmesinde kullanılan metodlar | 17 |
| 2.3. Karsinojenezde oksidatif mekanizmalar | 18 |
| 2.3.1. Çok safhalı karsinojenez | 18 |
| 2.3.2. Hidroksil radikallerinin DNA üzerine etkileri | 18 |
| 2.3.3. G-C etki alanları; oksidatif DNA hasarında hedef noktalar | 19 |
| 2.3.4. Oksidatif DNA hasarında DNA'ya bağlı olan Cu iyonlarının fonksiyonu | 19 |
| 2.3.5. 8-oxo-G: oksidatif stres ile oluşturulan mutajenezin mediatörü | 20 |
| 2.3.6. Tümörün ilerleme (progresyon) safhasında serbest radikallerin rolü | 20 |
| 2.3.7. Diğer mekanizmalar | 20 |
| 2.4. Beyin metabolizmasında serbest radikallerin rolü | 20 |
| 2.5. Serbest radikal hasarına karşı koruyucu enzimler | 21 |
| 2.5.1. Süperoksit dismutaz (SOD, EC 1.15.1.1) | 21 |
| 2.5.2. Glutasyon peroksidaz (GSH-Px, EC 1.11.1.9) | 22 |
| 2.5.3. Katalaz (KAT, EC 1.11.1.6) | 22 |
| 3. MATERYAL VE METOD | 24 |
| 3.1. Çalışma grupları (Hastalar ve kontrol grubu) | 24 |
| 3.2. Araç ve gereçler | 24 |
| 3.3. Beyin dokusu numunelerinin hazırlanması | 25 |
| 3.3.1. Deneylerde kullanılan maddeler | 25 |
| 3.3.2. Numunelerin korunması ve homojenizasyon | 25 |

| | |
|---|-----------|
| 3.3.2.1. Homojenizasyonda kullanılan reaktifler | 25 |
| 3.3.2.2. Homojenizasyonda yapılan işlemler | 25 |
| 3.4. Ekstraksiyonlu ve ekstraksiyonsuz numunelerde protein tayini | 26 |
| 3.5. Süperoksit dismutaz aktivitesinin tayini | 27 |
| 3.5.1. Deneyin prensibi | 27 |
| 3.5.2. Kullanılan reaktifler | 28 |
| 3.5.3. Deneyin yapılışı | 28 |
| 3.5.4. Süperoksit dismutaz aktivitesinin hesaplanması | 29 |
| 3.6. Glutasyon peroksidaz aktivitesinin tayini | 29 |
| 3.6.1. Deneyin prensibi | 29 |
| 3.6.2. Deneyde kullanılan reaktifler | 30 |
| 3.6.3. Deneyin yapılışı | 30 |
| 3.6.4. Enzimin aktivitesinin hesaplanması | 31 |
| 3.7. Katalaz aktivitesinin tayini | 31 |
| 3.7.1. Deneyin prensibi | 31 |
| 3.7.2. Kullanılan reaktifler | 31 |
| 3.7.3. Deneyin yapılışı | 32 |
| 3.7.4. Enzimin aktivitesinin hesabı | 32 |
| 4. SONUÇLAR | 33 |
| 5. TARTIŞMA | 38 |
| 6. ÖZET | 42 |
| 7. SUMMARY | 43 |
| 8. KAYNAKLAR | 44 |

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Vücutta fizyolojik şartlarda serbest radikaller belli bir oranda üretilmekte fakat hücreler, kendi yapıları içinde yer alan radikal yokedicilerle bu radikalleri enzimatik veya non-enzimatik yollarla yok etmektedirler. Dolayısıyla bu metabolizma kontrol altındadır, üretim ve tüketim denge altında tutulmaktadır. Üretimde bir artma veya üretilmiş radikallerin tüketiminde bir azalma olduğunda toksik etkileri ortaya çıkmaktadır.

Kanserin gelişmesi bir seri biyokimyasal, hücrel ve dokusal değişikliklerle meydana gelmektedir. Bu değişiklikler malign tümörün oluşumuyla sonuçlanmaktadır (36,40,99). Bu konuda serbest radikallerin, özellikle de moleküler oksijenden kaynak alanlarının karsinojenik süreçte rol aldığına dair bir hayli bilgi vardır (16,73). Klinik ve epidemiyolojik bulgular ve deneysel sistemlerde yapılan araştırmalar kanser etyolojisinde serbest radikallerin de bir rolü olabileceğini göstermiştir. C ve E vitaminleri gibi serbest radikalleri yok edici vitaminlerin hayvan modellerinde kanser gelişimine karşı koruyucu etkileri olduğu gösterilmiştir. Yine bu vitaminler insanlarda koruyucu olarak kullanılabilir (2,140). Serbest radikal yokediciler diğer sistemlerin ve inhibitörlerin neoplastik süreci geciktirdiği ve hatta önlediği, yapılmakta olan çalışmalarla gösterilmiştir (64,96,111). Aktif oksijen türlerinin üretimini hızlandıran demir gibi geçiş elementlerinin vücuda alınması ile insan ve hayvanlarda kanser gelişimi arasında yakın bir ilgi vardır (88,123). Nikel ve krom gibi diğer metallerin karsinojen etkisinin, oksidatif stresi artırma kapasitelerine bağlı olabileceği hakkında görüşler vardır. Ayrıca oksidatif stresin aşırı arttığı kronik enflamasyon durumları da insan malignansilerinin gelişmesiyle çok yakından ilişkilidir. Bütün bunların dışında, birçok kimyasal karsinojenlerin, serbest radikal metabolitleri veya serbest radikallerle ilişkili olaylar üzerinden etki ettiği görülmüştür.

Hücrede aktive olmuş oksijen formlarının, aşırı yapım veya tüketimdeki yetersizlik nedeniyle artması, moleküler yapının şiddetli bir şekilde hasara uğramasına yol açabilmektedir. Bunların sonucu olarak mutasyonlar, kromozomal anormallikler, hücrel hasar (37,83) ve karsinogenezis meydana gelebilmektedir (42,54,100). Bunlardan başka aktif radikaller,

promosyon fazında hücrelerin büyüme ve farklılaşmasını kontrol eden spesifik genleri hasara uğratabilmektedirler.

Hücrelerin en önemli savunma mekanizmaları; serbest radikalleri yok edici enzimler ve glutasyon, C vitamini, tokoferoller, karoten, vs. gibi bazı redükleyici maddelerdir. Katalaz (KAT), süperoksit dismutaz (SOD) ve glutasyon peroksidaz (GSH-Px) serbest radikalleri yok eden primer enzimlerdir. Bu enzimlerin aktivitesi, hücrelerin serbest radikallere maruziyetinin derecesini yansıtabilir. Böylece bu enzimlerin vücudun değişik dokularındaki aktivitelerinin ölçülmesi; doku dejenerasyonu, kanser oluşumu ve kanserin gelişim süreçlerine önemli bir bakış açısı sağlayabilecektir.

Bugüne kadar gerek kanserin etyolojisini aydınlatmak, gerekse belli tedavi protokolleri oluşturabilmek amacıyla yukarıda bahsi geçen 3 enzim birçok araştırmada ya birlikte veya ayrı ayrı çalışılmıştır. Değişik organ ve doku çalışmalarında elde edilen sonuçlar birbirleri ile tam bir uyum göstermemektedir. Bir kısım araştırmalarda kanserli dokularda süperoksit dismutaz ve katalaz enzim aktiviteleri azalmış olarak bulunurken (23,56,103,130,131,136) diğer bazı araştırmalarda kanserli hücre ve dokularda bu enzimlerin aktivitesinde artma tesbit edilmiştir (8,70,89). Bu farklılık, çalışılan dokuların farklılığından olabileceği gibi enzim çalışmalarının farklı şartlar altında yapılmış olmasından da kaynaklanabilir (29).

Beyin tümörlerinde gerek beyin dokusunun kendisi, gerekse beyin-omurilik sıvısında, plazma ve idrar gibi değişik vücut sıvılarında birçok enzim ve enzim dışı parametre araştırılmış olmasına rağmen (18,52,69,74,78,92,97,104) serbest radikalleri yok edici SOD, KAT ve GSH-Px gibi enzimler tek tek veya toplu olarak çok az araştırmacı tarafından çalışılmıştır. Literatürde bu konu ile ilgili yeterli bilgi bulunmamaktadır. Kökoğlu, E. ve arkadaşları yaptıkları bir araştırmada tümörlü ve normal beyin dokularının subsellüler fraksiyonlarında KAT enziminin aktivitesini araştırmışlar ve tümörlü dokuların normal dokulara göre daha az enzim aktivitesi içerdiğini göstermişlerdir (48). Yapılan araştırmalarda genellikle bir tek enzimin aktivitesi çalışıldığından ve aralarında bulunması muhtemel korelasyonlar araştırılmadığından bu konu halen tam olarak aydınlatılamamıştır.

Bu tez çalışması, tümörlü beyin dokularında oksidatif stresin indirekt bir göstergesi olan radikal yok edici enzimlerin aktivitesini ölçmek için planlanmıştır. Ayrıca birbirinden farklı tümör tipleri çalışmaya dahil edilerek (astrozitoma, glioblastoma multiforme, meningioma, melanoma, metastatik kanser) çalışmanın kapsamı geniş tutulmaya çalışılmıştır. Malign

hücrelerde meydana gelen yapısal, fonksiyonel ve metabolik değişiklikler hücrenin hemen hemen bütün organel ve metabolik yollarını etkilemektedir. Bu metabolik yolların içinde serbest radikal metabolizması beyin dokusunda önemli bir yere sahiptir. Çünkü beyin dokusu lipid yönünden çok zengindir ve serbest radikallerin sebep olduğu lipid peroksidasyonuna büyük bir yatkınlık göstermektedir. Öncelikle, tümör tipini göz önüne almadan genel olarak beyin tümörlerinde hücre ve dokuları serbest radikallere karşı koruyan enzim sistemlerinde meydana gelen değişiklikleri tesbit etmenin faydalı olacağını düşünüyoruz. Bu aşamadan sonra, farklı hücrelerden köken almış beyin tümörleri , adı geçen enzimler açısından araştırılarak -eğer varsa- farklılıklar ortaya konarak tartışılacaktır. Bu son nokta birkaç yönden önemlidir: Bazı tümör tipleri çok hızlı büyüme ve değişme göstermekte, diğer bazıları ise daha yavaş seyir göstermektedir. Ayrıca invazyon derecesinde tümörden tümöre değişiklik göstermektedir. Bu farklılıkların serbest radikallerin tümör hücresindeki miktarıyla bağlantılı olabileceği düşüncesindeyiz. Elde edilen sonuçlara göre bu konu tartışılacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Beyin Tümörleri:

2.1.1. Beyin Tümörlerinin Etyolojisi: Beyin tümörlerinin etyolojisi hakkında kesin birşey söylenememektedir. Genetik faktörlerin de rol aldığı multifaktöriyel bir durum olduğu şüphesizdir. Tümörler; tuberous sclerosis, von Hippel-Lindaus hemangioblastoma, veya Recklinghausen's neurofibromatosis gibi kesin bir şekilde herediter olduğu ispatlanmış bozukluklarla birlikte görülebilmektedir. Hayvan modellerinde karsinojenler ve viral enfeksiyonların beyin tümörü oluşumundaki rolü kesin olarak gösterilmesine rağmen insanlarda aynı şeyi iddia etmek oldukça zordur. Belli yaş gruplarında belli tip tümörlerin görülmesi, bazı hormonal faktörlerin etkisi olabileceğini göstermektedir. Bazı tümörlerin spesifik beyin bölgelerinde gelişmesi ise lokal bazı faktörlerin olayı etkileyebileceğini göstermektedir. Tümörün seyrinin, immünolojik mekanizmaların bozukluğu ile ilgili olması, sistemik kanserlerde olduğu gibi beyin tümörlerinin etyolojisinde de bu fonksiyon bozukluğunun önemli bir faktör olabileceğini göstermektedir.

2.1.2. Beyin Tümörlerinin İnsidansı ve Histolojik Olarak sınıflandırılması: Amerikan Kanser Cemiyetinin yaptığı bir araştırmaya göre; Amerika'da 1979 yılında 11,600 yeni primer beyin tümörü vakası tesbit edilmiş ve yine aynı yıl 9,500 şahıs beyin kanserinden ölmüştür. Bu rakam bütün kanserler arasında %2 gibi bir oranı teşkil etmektedir. 1985 yılında yayınlanan bir başka raporda primer kranial tümörlerin insidansı 17,000, metastatik beyin tümörlerinin insidansı 17,400 olarak bulunmuştur.

Bütün beyin tümörleri erkeklerde kadınlardan biraz daha sık görülmektedir. Meningiomalar biraz farklılık göstermektedir; kadın/erkek oranı 2/1' dir. Ayrıca beyin tümörlerinin insidansı yaş ile artmaktadır. 55-64 yaşlar arası pik değerlere ulaşmaktadır. Diğer taraftan intrakranial tümörler çocuklarda ikinci en sık görülen malignensi olma konumundadır. Sadece lösemiler beyin tümörlerinden daha yüksek insidansa sahiptir. Farklı histolojik yapıya sahip beyin tümörlerinin kendilerine özgü yaş insidansı, büyüme karakteristiği ve yerleşim

bölgeleri vardır. Çocukluk tümörlerinin %70'i infratentorialdir. Bunun aksine yetişkin beyin tümörlerinin %60'tan fazlası supratentorialdir.

Bugün geçerli olan sınıflandırmalar, daha önceden farklı çalışma grupları ve araştırmacılar tarafından yapılan tekliflerden esinlenerek yapılmıştır. Sınıflandırma konusunda hala devam eden küçük farklılıklara rağmen aşağıdaki konularda görüş birliğine varılmıştır:

1. Tümörlerin çoğu nöroektodermel kökenlidir.
2. İyi diferansiye nöronlar sınırlı büyüme ve çoğalma potansiyeline sahiptirler ve bunun sonucu olarak glia gibi destek dokulardan gelişen tümörler çok daha sıktır.
3. Tümörlerin önemli bir yüzdesi primitif nöronal hücre prekürsörleri (örneğin medullablastoma) ve vestigial dokulardan (örneğin kraniofaringoma) gelişmektedir.

Gliomalar bütün intrakraniyel tümörler içinde (hem primer hem de metastatik) %40-50 gibi bir yüzdeye sahiptir ve bütün yaş gruplarında primer beyin tümörlerinin %62'sini oluşturmaktadır. Beyin tümörleri ile ilgili istatistiklerin ortaya çıkardığı tablo şöyledir (109,110,133):

| Tümörün yeri | İnsidansı (%) |
|-------------------------------------|---------------|
| Nöronal elemanlar (medullablastoma) | 3-4 |
| Nöroglial elemanlar (gliomalar) | 40-67 |
| Meningeal elemanlar (meningioma) | 12-20 |
| Perinöral elemanlar (schwanoma) | <2 |
| Lenforetiküler elemanlar | <1 |
| Vasküler elemanlar | 2 |
| Koroid pleksus | <1 |
| Pineal bez | <2 |
| Hipofiz bezi | 2-17.8 |

Metastatik beyin tümörlerinin istatistik sonuçları daha değişkendir (95). Metastatik beyin tümörlerinin son zamanlardaki insidans artışı; gelişmiş diagnostik tekniklere, daha iyi

araştırılıp rapor edilmesi için gösterilen hassasiyete ve daha etkili sistemik tedavilerin geliştirilmiş olmasına bağlıdır. Malign hücreler beyine ulaştığı zaman kan-beyin bariyeri nedeniyle sistemik kemoterapiden korunmaktadır. Malign hücreler beyine hematolojik yolla gelmektedir. En önemli kaynak akciğerdir. Daha az sıklıkla kanser hücreleri beyine kafa derisi ve duradan direkt invazyon şeklinde Batson'un venöz pleksusu yoluyla ulaşırlar. En sık metastazlar sırasıyla şu organ veya dokulardan olmaktadır: Akciğer, meme, melanositler, genito-üriner sistem (testis, böbrek). Akciğer karsinomları ve melanomalar beyine metastaz yapmaya daha çok meyillidirler. Melanoma gibi bazı tümörler birden fazla yere metastaz yapmaya meyilli iken metastatik renal hücre karsinomları gibi tümörler ise tek yerde gelişmeye meyillidirler.

2.1.3. En Sık Görülen Bazı Santral Sinir Sistemi Tümörleri

2.1.3.1. Glioblastoma Multiforme: Bütün gliomaların %33-50'sini oluştururlar. Erkeklerde kadınlardan iki kat daha fazla görülmektedir. Gliomaların en malignidir. Genç bir bayanda primer bir beyin tümörü geliyorsa bu, çok büyük bir ihtimalle glioblastoma multiformedir. Glioblastomanın orijini tam aydınlatılamamıştır. Bazıları 'primer' bir kanser olarak geliştiğini ileri sürmektedir. Her ne kadar glioblast diye bir hücre tipi olmasa da, anaplastik hücreler, hücresel elemanların birçok şekline farklılaşabilirler. Diğer bazılarına göre ise bu tümörler büyük bir ihtimalle iyi gelişmiş glial hücrelerden (çoğunlukla astrositlerden) orijin almaktadır, veya agresif olarak yeniden farklılaşmayla malign gliomlardan köken almaktadırlar. Genellikle beyaz cevherden köken alırlar, fakat kortekse de uzanabilirler. En az oksipital loblarda bulunurlar. Patolojik tanıları histolojik görünümleri ile konur.

2.1.3.2. Meningioma: İkinci en sık görülen kafa içi tümördür. Glioma ve meningiomalar tüm erişkin primer intrakraniyel tümörlerin %80'ni teşkil ederler. Her ne kadar gerçek orijinleri halen tartışma konusu ise de bütün sınıflayıcılar bunların araknoid elemanlardan köken aldıkları konusunda hemfikirdirler. İnsidansları yaş ile artar ve 7. dekatta maksimuma ulaşır (134). Kadında ortaya çıkması daha erken olur; meme kanseri olan kadınlarda insidansın biraz daha yüksek olduğu bildirilmektedir. Her ne kadar parasagittal bölge en sık yerleşim yeri ise de (%25) bu tümörler beyin kıvrımları üzerinde de gelişebilmektedir (%18). Ayrıca sfenoid çıkıntıda (%18) ve olfaktör olukta (%10) meydana gelme ihtimalleri de vardır. Genellikle sağlam bir kapsülle çevrilmişlerdir, beyine invazyon göstermez ancak bası yaparak korteksi irrite ederler. Histolojik görünümdeki yaygın farklılıklar birçok yolla

sınıflandırılmıştır. Her ne kadar bu gruptaki tümörlerin bir çoğu yavaş büyüyen tipte ise de bazıları oldukça hızlı büyürler ve potansiyel olarak malign karakter arzederler. Meningiomun klinik davranışı ve histolojik görünümü birbiriyle korelasyon göstermektedir.

2.2. Serbest Radikaller

2.2.1. Tanımı ve Özellikleri: Serbest radikaller ortaklanmamış bir elektron taşıyan kimyasal bir yapı olarak tarif edilmektedir. Serbest radikaller, bir molekülün bir parçası olarak da kabul edilebilirler. Serbest radikaller 3 yolla meydana gelebilmektedir:

- Normal bir molekülün kovalent bir bağının, her kısımda bir ortaklanmamış elektron kalacak şekilde, homolitik parçalanması.
- Normal bir molekülün tek bir elektronunu kaybetmesi.
- Normal bir moleküle tek bir elektronun ilavesi.

Elektron transferi, biyolojik sistemlerde homolitik füzyondan çok daha yaygındır. Homolitik füzyon; yüksek sıcaklık, ultraviyole ışığı veya iyonize radyasyondan elde edilecek yüksek enerjiye ihtiyaç duymaktadır. Parçalanma olduktan sonra kovalent olarak bağlı elektronların ikiye ayrılmış ana molekülün kısımlarının sadece birinde kaldığı heterolitik füzyonda ürün olarak serbest radikaller oluşmamaktadır. Ürünü sadece yüklü gruplardır. Serbest radikaller pozitif yüklü, negatif yüklü veya elektriksel olarak nötral olabilirler. Serbest radikaller ve iyonların oluştuğu reaksiyonlar şöyledir:

Elektron transferiyle radikal oluşumu: $A + e \longrightarrow A\cdot$

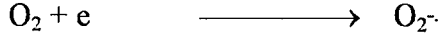
Homolitik füzyonla radikal oluşumu: $X : Y \longrightarrow X\cdot + Y\cdot$

Heterolitik füzyonla iyon oluşumu: $X : Y \longrightarrow X^- + Y^+$

Genellikle karıştırılan bir konu vardır: Serbest radikal biyokimyasındaki en önemli moleküllerden biri olan oksijenin elektronlarından ikisi paylaşılmamıştır. Böylece oksijen bazen "diradikal" olarak kabul edilmektedir. Oksijen diradikal halde iken birçok diğer serbest radikallerle kolayca reaksiyona girebilme yeteneğine sahiptir. Genellikle diradikal oksijen, radikal olmayan türlerle bağlı olarak daha yavaş bir şekilde reaksiyona girmektedir.

2.2.2. Serbest Oksijen Radikalleri ve Reaktif Oksijen Türleri: Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller tartışmasız oksijen radikalleridir. Tek bir elektronun

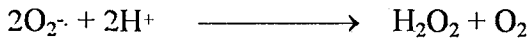
transfer yoluyla oksijene verilip redüklenmesi süperoksit serbest radikal anyonunu (süperoksit) oluşturmaktadır.



Oksijenin 2 elektronla redüklenmesi hidrojen peroksiti oluşturmaktadır.

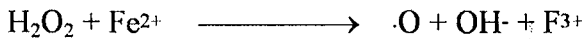


Hidrojen peroksit biyolojik sistemlerde sıklıkla süperoksitin üretimi yoluyla oluşturulmaktadır: İki süperoksit molekülü birbiriyle, hidrojen peroksit ve oksijeni verecek şekilde reaksiyona girerler.



Serbest radikal reaktanları, radikal olmayan ürünler oluşturduğu için bu bir dismutasyon reaksiyonu olarak bilinir. Bu işlem spontan olarak olabilir veya Süperoksidadaz enziminin kataliziyle gerçekleşebilir. Hidrojen peroksit bir serbest radikal türü değildir fakat 'reaktif oksijen türleri' (ROS) kategorisine dahil edilir. ROS sadece serbest oksijen radikallerini değil, aynı zamanda oksijen radikali üretiminde görev alan ve radikal olmayan oksijen türevlerini de ihtiva etmektedir.

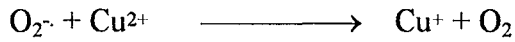
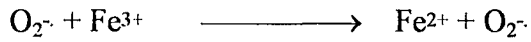
Hidrojen peroksit, serbest radikal biyokimyasında önemli bir bileşiktir. Çünkü geçiş metal iyonlarının varlığında kolaylıkla parçalanır; oksijen radikallerinin daha reaktifi ve biyolojik sistemlerde daha fazla hasar oluşturanı olan hidroksil radikalini ($\cdot\text{OH}$) oluşturur.



Burada, yazılandan daha karmaşık olarak meydana geldiğine inanılan yukarıdaki reaksiyon demir-katalizli Haber-Weiss reaksiyonu olarak adlandırılmaktadır. Bir diğer mekanizma, süperoksitin direkt olarak hidrojen peroksitle reaksiyona girmesidir:



Biyolojik sistemlerde daha az ihtimalle meydana gelen spontan reaksiyon, reaktanların düşük denge konsantrasyonlarına bağlıdır. Demir (veya bakır) katalizli reaksiyon; hem hidrojen peroksitin kaynağına (yukarıda bahsedilen dismutasyon yoluyla) ve hem de geçiş metal iyonlarının indirgeyici özelliklerine bağlı olduğu gibi aynı zamanda süperoksit yokluğuna da bağlı olduğu halen kabul edilmektedir.



Ferröz demir (Fe^{+2}) ve küpröz bakır (Cu^+) hidrojen peroksit ile, oksitlenmiş eşleri olan ferrik demir (Fe^{+3}) ve küprük bakır (Cu^{+2}) dan çok daha fazla reaksiyona girebilmektedir. Bu arada geçiş metallerinin otooksidasyonu da süperoksit üretebilmektedir:



Geçiş metal iyonlarının oksijen ile reaksiyonları geriye dönüşlü redoks reaksiyonları olarak kabul edilmektedir ve serbest radikal reaksiyonlarının hızlanmasında çok büyük öneme sahiptir (50).

Yukarıdaki bilgilerden açıkça görülmektedir ki serbest oksijen radikallerinin biyokimyasında 'anahtar yapılar', oksijenin kendisi, süperoksit, hidrojen peroksit, geçiş metal iyonları ve hidroksil radikalidir.

2.2.2.1. Süperoksit radikali: Her ne kadar bir serbest radikal ise de özellikle hasar oluşturucu bir tür değildir. Asıl önemi; hidrojen peroksitin kaynağı olması ve geçiş metal iyonlarının redükleyicisi olmasıdır. NO^- ile reaksiyonu sonucu, bugünlerde tarif edilmeye çalışılan, 'Endothelium Derived Relaxing Factor' ün oluştuğuna inanılmaktadır (112). Süperoksit, düşük pH değerlerinde daha reaktif olan perhidroksil radikaline (HO_2^-) protonlanır, fakat fizyolojik pH'da bu protonlanmış form %1'in altındadır.

2.2.2.2. Hidrojen peroksit radikali: Okside edici bir ajandır fakat özellikle reaktif değildir. Asıl önemi, geçiş metal iyonlarının varlığında hidroksil radikallerini oluşturmasıdır. Metal katalizörlerin yokluğunda süperoksit ve hidrojen peroksit kolaylıkla uzaklaştırılır ve hayat için zararsız hale getirilir.

2.2.2.3. Hidroksil radikali: Difüzyon kontrollü hızlarda hemen hemen bütün biyomoleküllerle reaksiyona girebilen yüksek reaktiviteli bir yapıdır. Reaksiyona girmeden önce hücrede önemli çapta difüze olamaz, çok kısa ömürlüdür. Fakat küçük miktarlarda bile üretildiği yerde aşırı hasar yapabilecek kapasiteye sahiptir.

2.2.2.4. Singlet oksijen: Radikal olmayan, sıklıkla serbest oksijen radikalleriyle birlikte mütalaa edilen reaktif oksijen türüdür. Serbest radikal reaksiyonlarıyla üretilebilir. Önemli diğer bir kısım radikaller de vardır.

2.2.2.5. Karbon merkezli radikaller (R·): Lipid, nükleik asit, karbohidrat veya protein gibi biyolojik bir moleküle okside edici bir radikalın (örneğin OH·) etki etmesiyle oluşur. Bunlar oksijenle birlikte çok hızlı bir şekilde ilgili peroksil radikallerini (ROO·) oluşturmak üzere birleşirler. Diğer taraftan bu peroksil radikalleri alkoksil radikalleri (RO·) üreten reaksiyonlara iştirak edebilirler. Sülfür atomları, oluşmuş serbest radikaller (thiyl (tiyo) radikaller, RS·) için merkez olabilirler (ör: glutatyonun oksidasyonunda).

2.2.3. Hücrede Serbest Radikallerin Üretilmesi: İyonize radyasyon gibi alışılmışın dışındaki durumlar hariç tutulacak olursa serbest radikaller hücrelerde genellikle elektron transfer zincir reaksiyonlarında üretilirler. Bu işlemler sıklıkla geçiş metal iyonlarının redoks kimyası yoluyla enzimatik veya non-enzimatik yollarla yapılabilir.

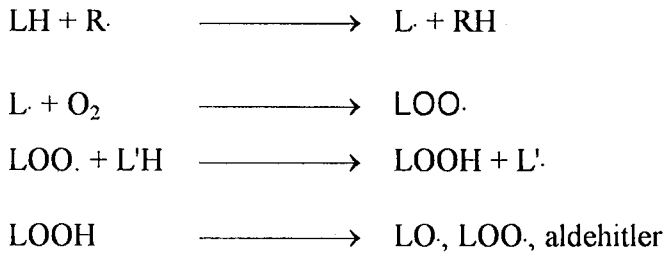
Belli bazı özel durumlarda hayvan hücreleri tarafından serbest radikal üretilir. Zira bu radikaller belli yerlerde kullanılabilir. Bazı enzimler kataliz esnasında aktif bölgelerindeki serbest radikali kullanırlar. Buna örnek ribonükleotid redüktazdır (106,126). Bu durumlarda serbest radikaller gerçekte 'serbest' değildir. Çünkü reaktivitesi spesifik bir reaksiyona doğru yönlendirilmiştir. Aktive olmuş fagositler bakterisidal fonksiyonunun bir gereği olarak süperoksit üretirler. Her ne kadar serbest radikaller yalnızca fagosit plazma membranı ve bakterinin iç yüzeyinde üretilse de süperoksit, hidrojen peroksit ve diğer reaktif oksijen türlerinin bazı sızıntıları kaçınılmazdır.

Normal şartlar altında hücrelerdeki serbest radikallerin ana kaynağı; süperoksit oluşturmak üzere elektron transport zincirinden ve de mitokondri ve endoplazmik retikulumdan moleküler oksijene doğru olan elektron akışıdır. Peroksizomlarda yerleşen flavin oksidazlar tipindeki enzimler süperoksit veya hidrojen peroksit oluştururlar. Hayvan hücrelerinde süperoksitin diğer bir kaynağı, içine askorbik asit (C vitamini), thioller (glutatyon, sistein gibi), adrenalin ve flavin koenzimlerinin de dahil olduğu, bazı bileşiklerin otooksidasyonudur. Bu otooksidasyon reaksiyonları geçiş metal iyonlarının varlığıyla büyük oranda artırılabilir. Serbest radikallerin bu şekildeki üretimi enzim kontrollü elektron transferinin yüksek etkinliğiyle ve metal iyonlarının kuvvetli bağlanmasıyla minimumda tutulur; bunlar önleyici savunmanın temelleridir.

Hücrede serbest radikal üretimi bazı yabancı toksik maddelerle büyük oranda artırılabilir. Buna klasik örnek karbon tetraklorürdür (CCl₄). CCl₄, karaciğerde sitokrom p-450'nin aktivasyonu ile triklorometil serbest radikale metabolize edilerek aktive olur. Reaktif serbest radikallerin üretimi karaciğerdeki antioksidan barajları aşar ve hücrel membranların oksidatif yıkımı ve ciddi doku harabiyetiyle sonuçlanır. Serbest radikallerin üretimi yoluyla toksisite oluşturan toksik bileşiklerin diğer örnekleri henüz iyi aydınlatılmamıştır. Bunların birçoğu serbest radikal oluşturmak için kolaylıkla bir elektron alabilir ve daha sonra bu elektronu sırasıyla süperoksit veya hidrojen peroksit oluşturmak üzere moleküler oksijene transfer edebilirler. GSH-Px'in sürekli olarak üretilmekte olan hidrojen peroksiti uzaklaştırması sonucu GSH seviyesinde bir azalma meydana gelir ve bunu hücrenin oksidatif hasarı izler (107,108).

2.2.4. Serbest Radikallerin Hücrelerde Hasar Oluşturan Reaksiyonları: Moleküler seviyede, bütün major biyomolekül sınıfları serbest radikallerce hasara uğratılabilmekle beraber bunların içinde en hassas olanı lipidlerdir.

2.2.4.1. Lipidlerde meydana gelen yapısal değişiklikler: Hücre membranları, okside edici radikallerle kolaylıkla etkilenebilen poliansatüre yağ asitlerince (PUFAs) zengindir. Lipid peroksidasyonu olarak bilinen PUFAs'nın oksidatif hasarı, sonuçta kendi kendine zincir reaksiyonları başlatarak işin kendiliğinden devam etmesine yolaçar. Hasar oluşum mekanizması şöyledir:



LH : hedef poliansatüre yağ asidi

R· : olayı başlatıcı okside edici radikal

L· : yağ asidi radikali

LOO· : peroksil radikali

LOOH : lipid hidroperoksitler

Buradaki peroksil radikalleri (LOO \cdot) zincir reaksiyonunun araçlarıdır ve bir sonraki PUFA'ni okside ederek yeni zincir reaksiyonları başlatırlar. Bu işlemlerin sonunda oluşan ürün hidroperoksitlerdir (LOOH) ve bunlar da daha şiddetli radikal özelliği olan türlere, özellikle aldehitlere çevrilirler. Aldehitler daima lipid hidroperoksitler parçalandığı zaman oluşurlar ve çoğu biyolojik olarak aktiftirler. Bunlardan en çok bilineni 'hidroksialkenoller' dir ve bunun da 4-hidroksinonenal üyesidir (32,34). Bu bileşikler normal olarak oluştukları yerden difüze olmak suretiyle hücrenin diğer kısımlarına gidip hasar oluşturabilirler. Lipid peroksidasyonu çok geniş bir doku yaralanması ve hastalık grubunda rol oynamaktadır. CCl $_4$ hepatoksisitesi (102) ve aterosklerozdur (75) bunun tipik misalidir.

2.2.4.2. Proteinlerde ve Nükleik Asitlerde meydana gelen yapısal değişiklikler:

Protein ve nükleik asitler serbest radikal saldırılarına PUFA'lerden daha az duyarlıdır. Zira bunlarda hasar oluşturucu zincir reaksiyonlarının oluşma ihtimali çok azdır. Radikallerin proteinlere yaygın olmayan ani saldırıları fazla hasar oluşturmaz. Serbest radikallerin proteinlere olan saldırıları; şayet radikal yığılımı varsa hücrenin hayatını önemli ölçüde etkiler. Bu sonuç ise ancak özel proteinlerin spesifik bazı yerlerinde hasar olduğu zaman meydana gelir. Şayet bir proton bir geçiş metal iyonuna özel bir bölgesinden bağlı ise -mesela bakırın bir histidin bakiyesine bağlanması- hasar oluşturmanın tek yolu özel proteinin spesifik bölgelerine odaklanmaktır. Bu durumda geçiş metalinin hidrojen peroksitle olan reaksiyonu hidroksil radikalini üretebilir. Bu da metal bağlanma bölgesinde veya ona yakın olan bölgelerde reaksiyon oluşturur. Bu fikir 'alan-spesifik' hasar olarak bilinmektedir (81,122). Proteinlere olan serbest radikal atağının mekanizması son yıllarda artan bir ilgi odağı haline gelmiştir. Burada peroksitlerin (118) ve karbonillerin (111) oluşumlarında gözleendiği gibi bakiye modifikasyonları görülebilir. Karbonillerin ölçülmesi, proteinlerin oksidatif hasarı için kullanışlı bir materyal olabilir. Proteinlerin serbest radikallerce etkilenmesinin mekanizmasını açıklamaya yönelik birçok çalışma yapılmıştır. Bunlarda en çok göze çarpanı ise kataraktın patogenezesinden bazı serbest radikallerin sorumlu tutulmasıdır (114,120,145).

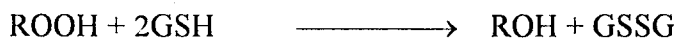
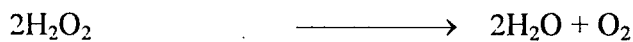
DNA, okside edici radikaller tarafından kolaylıkla hasara uğratılabilmektedir. Bunun şartı radyasyon biyologlarınca da açıkça gösterildiği üzere radikallerin DNA'ya yakın bölgelerde meydana gelmeleridir. Böylece DNA hücumu açık ve kolaylıkla etkilenebilir önemli bir hedef olmaktadır. Proteinlerde olduğu gibi hızlı zincir reaksiyonlarının olma ihtimali çok azdır. Hasarın oluşması için serbest radikallerin 'alan-spesifik' yerlere yüksek konsantrasyonda

bağlanarak zincir kırılmalarına yol açmaları veya replikasyon olmadan önce tamir sistemlerini etkisiz hale getirerek mutasyonlara yol açmaları gerekir. İnsanların idrarında oksitlenmiş nükleobazların ölçümü DNA'ya olan ve devam eden atakların tesbiti açısından büyük öneme sahiptir (41,62). Tamir sisteminin çok yüksek seviyede çalışmasıyla bile bir insanın hayatı boyunca DNA'da hasar oluşturup mutasyonlara ve sonunda kansere yol açabilecek yeterli DNA değişiklikleri (iplik kopmaları, baz değişiklikleri) meydana gelebilmektedir.

2.2.5. Serbest radikallerden koruyucu enzimatik ve non-enzimatik sistemler:

Hayvan hücrelerinde serbest radikal üretiminin kaçınılmaz olmasından ve çok hasar verici olmasından dolayı serbest radikallerin bu sağlığa zararlı etkilerine karşı defans mekanizmaları gelişmiştir. Bunlar antioksidan defanslar olarak bilinirler ve iki sınıfa ayrılırlar: Serbest radikallerin üretimini engelleyenler ve üretilmiş olanları tüketenler (24). Hücrelerin hem aköz hem de membran bölümlerinde bulunurlar ve enzim veya enzim dışı yapılar olabilirler.

Serbest radikallerin üretilmesini önleyici sistemler elektron transferinin kusursuz bir şekilde yapılması ve geçiş metal iyonlarının zaptedilmesi olaylarını yönetir. Örneğin demir, transferrin ve ferritin gibi özel proteinlere sıkıca bağlanır (49,51). Önleyici antioksidan defans mekanizmalarının diğer şekli, geçiş metal iyonlarıyla reaktif serbest radikallerini oluşturmak üzere reaksiyona giren peroksitlerin uzaklaştırılmasıdır. Bu sınıfa hidrojen peroksit ve lipid peroksidasyonu sırasında üretilen lipid hidropersitler de dahildir. Katalaz ve glutatyon peroksidaz peroksitlerin yapısını bozan ve onları tüketen enzimlerdir. Katalaz esas olarak peroksizomlarda yerleşmiştir ve hidrojen peroksit üzerine etkilidir. GSH-Px'in çoğu hücrenin sitozolünde bulunur ve hem hidrojen peroksit üzerine hem de, şayet bir fosfolipaz tarafından membran fosfolipidlerinden ayrılmış ise, yağ asidi hidropersitler üzerine etkilidir (139).



Diğer defans mekanizmalarından birisi substrat olarak bir serbest radikal kullanan süperoksit dismutazdır. Bütün bunlarla beraber serbest radikalleri yok eden sistemlerin çoğu enzim değildir. Hücre membranlarında en iyi tanımlanan ve muhtemelen en önemlisi alfa-tokoferoldür. Bu vitamin, E vitamini ailesinin major üyesidir (11,12,13). Lipid peroksil radikallerini (LOO \cdot) tutarak lipid peroksidasyon zincir reaksiyonlarını durdurduğu için 'zincir kırıcı antioksidan' olarak bilinmektedir.



Sonuç tokoferoksil radikali bağıl olarak stabildir ve normal şartlarda lipid peroksidasyonunu başlatmaz. Bu da iyi bir antioksidanın esas kriteridir. Ubiquinol (124) gibi diğer lipidde eriyen zincir-kırıcı antioksidanlar fizyolojik önemini ortaya koyacak derecede araştırılmamıştır.

Aköz fazda diğer bileşikler serbest radikal yok ediciler olarak işlev görürler. Askorbik asit (C vitamini) plazmada ve hücre içinde önemli bir antioksidandır (125). C vitamini, invitro tokoferoksil radikalinden tekrar alfa-tokoferolü oluşturur (91), fakat E vitamini için C vitamininin bu boşaltıcı etkisi invivo olarak gösterilememiştir (14). Plazma ürik asit (125) ve hücre sitozolünde glutasyon (49) kuvvetli radikal yokediciler özellikler taşırlar.

Birçok biyolojik bileşik okside edici serbest radikallerle reaksiyona girer ve bunların hepsi antioksidan olarak düşünülmelidir. Doğal antioksidan defansın 3. sınıfı hasara uğramış biyomolekülleri, birikmeden önce ve hücre metabolizmasını ve canlılığını değiştirmeden önce uzaklaştıran tamir süreçleridir. Oksidatif olarak hasara uğramış nükleik asitler spesifik enzimlerce tamir edilir, okside olmuş proteinler proteolitik sistemlerce uzaklaştırılır ve okside olmuş membran lipidleri üzerine lipazlar, peroksidazlar ve açıl transferazlar etki ederler.

Son zamanlarda tedavi için, etkili antioksidan ilaçların bulunması ve böylece serbest radikal kaynaklı doku hasarının önlenmesi için yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Bu bileşikler metal-şelasyon yapıcı ajanlar ve radikal yok edicilerdir. Bu çeşit bileşikler halen bazı ülkelerde klinik olarak kullanılmakta, hatta uygun sağlıklı yiyecek maddeleri satan merkezlerden elde edilebilmektedir. Bir örneği probukoldür. Klinikte lipid düşürücü bir ilaç olarak kullanılmaktadır. Düşük dansiteli lipoproteinlerin oksidasyonunu engelleyerek ateroskleroza karşı vücudu korumaktadır (94).

Epidemiyolojik araştırmalarda doğal antioksidanların düşük seviyelerinin kalp hastalıkları ve kanser ile ilişkisi bulunmuştur. antioksidan ilaçların diyetler yoluyla alınması veya antioksidan vitamin ilaçları şeklinde alınması bu hastalıkların insidansında etkili bir azalmaya yol açmıştır.

2.2.6. Serbest radikallerin direkt olarak ölçülmesinde kullanılan metodlar:

1. Elektron spin rezonans ve radikal yakalayıcı metodlar (7,19,47)
2. Lipid peroksidasyon ürünlerinin ölçülmesi
 - a. Lipid hidroperoksitlerin ölçülmesi (59,72)
 - b. Konjuge dienlerin ölçülmesi (22,28)
 - c. Thiobarbitirik asit ile reaksiyon verebilen maddeler (TBARs) ve malondialdehitlerin (MDA) ölçülmesi (31,142)
 - d. MDA dışındaki diğer aldehitlerin ölçülmesi (33,143)
 - e. Uçucu hidrokarbonların ölçülmesi (67)
 - f. Lipid peroksidasyonunun floresan ürünlerinin ölçülmesi (66)
3. Protein hasarının ölçülmesi (77)
4. DNA hasarının ölçülmesi (15,116)
5. Antioksidanların ölçülmesi (135).

2.3. Karsinojenezde oksidatif mekanizmalar

2.3.1. Çok safhalı karsinojenez: Başlangıç safhasında tek bir somatik hücre, öldürücü olmayan genetik geçişli bir mutasyona uğrar. Büyüme veya farklılaşmayı kontrol eden hücresel yapıdaki mutasyon 'başlangıç' safhasında görülen genetik değişikliğin örnek bir tipidir. Bu başlatıcı mutasyon, ikinci safha olan 'ilerleme' safhasında bir büyüme avantajı sağlayabilir. Tümörün ilerlemesi bağıl olarak benign bir seyir gösterir. Daha da ilerleyince malign değişimin meydana geldiği üçüncü safhaya gelinmiş olur, sonuçta kanser oluşur.

Oksidatif stres çok çeşitli hücresel etkilere sahiptir. Bu etkiler mutajenite, sitotoksisite oluşturabilir ve gen ekspresyonundaki değişiklikleri stimüle edebilir. Ayrıca bu etkiler oksidanlar tarafından karsinojenezin gelişmesinde rol oynamaktadırlar. Oksidanlar tarafından oluşturulan mutasyonlar karsinojenez başlatabilir, genetik materyalin oksidatif yolla değiştirilmesi vakanın benigninden, malign neoplazmaya ilerlemesinde kendini göstermektedir.

Oksidanlarca gen ekspresyonu kalıbının değiştirilmesi, tümörün ilerlemesinde ve başlangıç hücrelerinin uyarılmasında fonksiyon görebilir.

2.3.2. Hidroksil radikallerinin DNA üzerine etkileri: Aktif oksijen türleri üreten ajanlar (kimyasal maddeler, radyasyon) veya aktive olmuş nötrofillerce üretilen oksidanların sebep olduğu hiperoksi'nin insan ve hayvan hücrelerinde DNA hasarı ve mutajenez oluşturduğu gösterilmiştir (53,57,90,137,144). Bir adım daha ileri atılarak, kültürü yapılmış hücrelerde aktif oksijen türlerinin malign transformasyon oluşturduğu gösterilmiştir (138). Oksijenin mutajenik kapasitesinin hidroksil radikallerinin DNA ile direkt etkileşiminden kaynaklandığı düşünülmektedir. Hidroksil radikallerinin üretim ve salınımını bloke eden metal şelatörler; hidroksil radikallerini ve prekürsörlerini detoksifiye edebilen ajanlara benzer olarak, hücrel sistemlerde ve hücre dış ortamlarda aktif oksijen türleri ile oluşturulan DNA hasarını, mutasyonları ve malign transformasyonu inhibe edebilir (4,10,76,87).

Hem demir hem de bakır iyonları invitro aktif oksijen türleri yoluyla oksidatif DNA hasarını arttırabilirler (5). Stabil olmayan bir radikal konumundaki hidroksil radikali DNA molekülünün bütün birimleriyle hiçbir fark gözetmeksizin etkileşime girip büyük bir DNA hasar spektrumu oluşturabilir.

2.3.3. G-C Etki Alanları; Oksidatif DNA hasarında hedef noktalar: Oksidatif stresin G-C alanlarında, replikasyon ve tamiri takiben de değişmeyen mutasyonlar oluşturma eğilimleri Moraes ve çalışma arkadaşları tarafından bir mutasyon-gösterici plazmid sisteminde gösterilmiştir. Fakat DNA'da G-C baz çiftlerindeki mutasyonların sıklığı bütün model sistemlerinde tekdüze bir şekilde bulunamamıştır. Mesela Moraes ve arkadaşları CV-1 hücrelerinde demirli deney ortamında esas lezyonların A ve T bölgelerinde olduğunu göstermişlerdir. (85).

2.3.4. Oksidatif DNA hasarında DNA'ya bağlı olan Cu iyonlarının fonksiyonu: DNA çözeltisine metal ilavesi DNA'daki bazlarda hasar yapabilen aktif oksijen türlerinin üretimini hızlandırabilir. Demir ile karşılaştırıldığında, bakırın DNA çözeltisine katılması daha fazla mutasyonlar oluşturur (129) ve oksidan maddelerin varlığında daha şiddetli DNA baz hasarının oluşmasına neden olur (5). Doğal DNA kuvvetlice bağlı bakır iyonları ihtiva etmektedir (30). Bakırın buradaki görevi DNA'yı stabilize etmektir. Gerçekten bakır, invitro şartlarda tek zincirden DNA'nın renatürasyonuna aracılık etmektedir (98). Koordine bağlar ile bakır DNA ve nükleer proteinler arasında bir bağlayıcı olarak da kabul edilebilir. Genel olarak

kabul edilen görüşe göre bakırın DNA ile etkileşime girmesi, spesifik olarak DNA'daki G-C bölgelerine bağlanarak olmaktadır (98).

DNA'nın stabilizasyonu ve fonksiyonu için bakırın bağlanması şart olmakla beraber, bağlı bakır iyonları şiddetli hasar oluşturucu redoks reaksiyonları için hedef bir alan sağlayabilir. Bakırın varlığında, elektronların metal katalizli redoks döngüsü, daha az reaktif olan süperoksit ve hidrojen peroksitten, stabil olmayan aşırı reaktif hidroksil radikallerinin oluşumunu sağlayabilir.

2.3.5. 8-oxo-G: Oksidatif stres ile oluşturulan mutajenezin mediatörü: dG'nin (deoksiguanin) 8-hidroksil türü, invitro fizyolojik şartlarda üretilmekte olan DNA'nın en yaygın oksitlenmiş ürünüdür (4,5). Bazı araştırmalar; farklı deneysel karsinojen uygulamalı protokoller ile 8-hidroksi-G'nin oluştuğunu gösterdiler (38). 8-hidroksi-G'nin idrar ile atılımı yaş ile, metabolik hız, kalori alımı ve diyetin antioksidan içeriği ile ilişkilidir (41,117,118). Bu konudaki en belirgin bulgular Kuchino ve arkadaşlarının invitro şartlarda 8-oxo-G'nin mutajen olduğunu göstermesiyle elde edilmiştir (71).

2.3.6. Tümörün ilerleme (progresyon) safhasında serbest radikallerin rolü: Karsinogenezisin daha ileri safhalarında da serbest radikallerin önemli rolleri olduğu düşünülmektedir (43,65,86,127,141). İleri sürülen hipotez şudur: Serbest radikaller direkt olarak veya indirekt yollarla tümör gelişimine aracılık edebilirler. Özellikle bir çok çalışma antioksidanların veya oksidan detoksifiye edicilerin "progresyon" ile bağlantılı birçok biyokimyasal süreçlerini inhibe ettiklerini göstermiştir. Bu sonuçlar, serbest radikallerin neticede tümör ilerlemesine yol açan birçok biyokimyasal ve moleküler değişikliklerde önemli rolleri olabileceğini göstermektedir. Serbest radikal üreten bileşiklerin, özellikle peroksitler ve hidroperoksitler, invivo olarak tümörün safhasını ilerletme aktiviteleri olduğu ve tümör ilerlemesiyle ilgili hücrel değişiklikleri etkileyebileceği iddia edilmektedir.

2.3.7. Diğer mekanizmalar: Kansere oluşumunda oksidasyon ile bağlantılı başka mekanizmalar da vardır; a) Gen regülasyonunda oksidasyon-redüksiyon mekanizmalarının fonksiyonu. b) Sistein bakiyelerinin tümörün ilerlemesini sağlayan maddelerce oksidatif olarak modifikasyonu.

2.4. Beyin metabolizmasında serbest radikallerin rolü:

Yukarıda anlatılan mekanizmaların hepsi organ ve doku farkı olmaksızın bütün kanserlerde geçerli olan mekanizmalardır. Dolayısıyla beyinde de aynı mekanizmalar mevcuttur. Yalnız, beyini diğer organlardan farklı kılan bazı özellikleri vardır. Bu özellikleri nedeniyle serbest radikal kaynaklı olaylar diğer dokulara göre daha şiddetli olmaktadır.

Vücudun diğer organlarına göre sinir sistemi reaktif oksijen metabolitlerinin (ROM) hasarlarına biyokimyasal, fizyolojik ve anatomik açıdan aşağıda belirtilen sebeplerden dolayı (35) daha fazla maruz kalmaktadır:

1. Beyinde oksidatif metabolik aktivite yüksektir.
2. Beyinde kolaylıkla okside olabilen substratlar yüksek konsantrasyonda bulunur. Özellikle poliansatüre yağ asitleri.
3. Koruyucu antioksidan enzimlerin miktarlarının az olması (özellikle katalaz ve glutatyon peroksidaz).
4. Spesifik bazı nörokimyasal reaksiyonlarla ROM'un endojen üretimi. Örnek: Dopamin oksidasyonu.
5. Membran yüzey alanının sitoplazmik volüme oranla daha fazla olması.
6. Periferal hasar için uygun genişlemiş akson morfolojisi.
7. Dağılıp bozulmaya ve etkilenmeye yatkın nöronal anatomik ağ.
8. Nöron hücreleri son bölünmesini tamamlamıştır ve çoğalma olayı yoktur.

Şu hastalıkların direkt veya indirekt olarak serbest radikallerle yakından ilişkisi vardır:

Parkinson hastalığı (101)

Down Sendromu (3)

Alzheimer Hastalığı (132)

Lipofuksin (61)

Multiple sklerozis (68)

Serebrovasküler yaralanma: Travma ve iskemi (9,26).

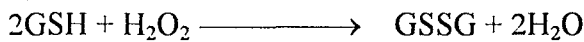
2.5. Serbest radikal hasarına karşı koruyucu enzimler

2.5.1. Süperoksit dismutaz (SOD, EC 1.15.1.1): Katalizlediği reaksiyon aşağıdaki gibidir.



Süperoksit radikallerinin hidrojen peroksit'e dismutasyonunu katalizleyen enzim grubudur. Metal ihtiva ettiği için metalloenzim grubunda mütalaa edilmektedir. İnsanda Cu,Zn-SOD ve Mn-SOD bulunmaktadır. Fe-SOD ise mikroorganizmalarda ve bazı bitkilerde bulunmaktadır. Cu,Zn-SOD ilk defa 1969'da McCord ve Fridovic tarafından tanımlanmıştır (84). Hayvan (39), bitki (113) ve mayadan (46) saflaştırılmıştır. Hücrenin sitoplazmasında bulunmaktadır. Molekül kütlesi 32,000 daltondur. İki alt ünitesi vardır ve bunların herbirinde bir Cu ve bir Zn atomu bulunmaktadır. Ayrıca her alt birimde bir zincir içi disülfür köprüsü, bir sülfidril grubu ve bir de asetillenmiş terminal amino grubu bulunmaktadır (44). Cu,Zn-SOD enziminin ayrı formları bulunmaktadır: Sitoplazmada bulunanın dışında bazı hayvanların plazmasında tesbit edilmiş olan 130,000 dalton molekül kütleli Cu,Zn-SOD mevcuttur (80). Mn-SOD mitokondrial bir enzimdir. Prokaryotların sitozolünden elde edilebilmektedir. İlk kez 1970 yılında Keele ve arkadaşları tarafından izole edilmiştir (63). Buradaki Mangan +3 değerliklidir. İki alt birimden yapılmıştır, her alt birimde bir Mn atomu vardır ve 23,000 dalton molekül kütlesine sahiptir.

2.5.2. Glutasyon peroksidaz (GSH-Px, EC 1.11.1.9): Memeli eritrositlerinde bulunduğu ilk defa Mills (45,82) ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir. Daha sonra yapılan araştırmalarla enzim hakkındaki bilgiler kesinleştirmiştir (20,21,55). Prostetik grup olarak Selenyum (Se) taşımaktadır. O yüzden metalloenzimler bölümünde mütalaa edilir. Hidrojen peroksidin invitro detoksifikasyonunu büyük bir spesifiklikle katalizlemektedir. Bu arada redükte glutasyon okside glutasyona çevrilmektedir. Enzimin katalizlediği reaksiyon şöyledir:



2.5.3. Katalaz (KAT, EC 1.11.1.6): (1)Tabiatta yaygın bir şekilde mevcut olduğu ilk kez 1901'de O.Leew tarafından bulunmuştur. Yine ilk defa 1937'de Sumner ve Dounce tarafından karaciğerden kristal formda elde edildi. Molekül kütlesi 240,000 daltondur. Dört alt ünitelerden oluşmuştur. Bu alt üniteler ferriprotoporfirin grupları şeklindedir. Yani prostetik

grubunun yapısında FeIII bulunan protoporfirin IX ihtiva etmektedir. Doku katalaz aktiviteyi büyük farklılık göstermektedir. Karaciğer ve böbrekte en yüksek aktivite değerleri vardır. En az aktivite ise destek dokusunda bulunmaktadır. Dokularda esas olarak mitokondri ve peroksizom partiküllerine bağlı olarak bulunur. Oysa eritrositlerde çözülmüş halde bulunmaktadır. Kandaki katalaz aktivitesi büyük ölçüde eritrositlerden kaynaklanmaktadır. İnsan eritrositleri katalaz yönünden çok zengindir. Karaciğer hücrelerinde enzim aktivitesinin en yüksek olduğu organeller peroksizomlardır. Ayrıca sitoplazma ve endoplazmik retikulumda da aktivite vardır. GSH-Px ile aynı fonksiyonu üstlenmiştir. Fakat hücre içi dağılım açısından farklılık vardır. GSH-Px esas olarak mitokondri ve sitozolde bulunurken katalaz peroksizomlarda bulunur. Eritrositlerde mitokondri olmadığı halde yüksek aktivitede CAT ve GSH-Px vardır.

Katalizlediği reaksiyon:



(ROOH: metanol, etanol, formik asit, fenoller gibi bir elektron verici)

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Çalışma grupları (Hastalar ve Kontrol Grubu)

Çalışmada Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ankara Hastanesi ve Nümune Hastanesi Beyin Cerrahisi Kliniklerine teşhis ve tedavi amacıyla yatırılmış olan beyin tümörlü 48 hastadan operasyon ile alınmış beyin dokuları kullanılmıştır. Yirmisekizi erkek ve 20'si kadın olan bu hastaların yaş ortalamaları sırasıyla 41.37 ± 18.64 (yaş sınırı:11-74) ve 46.4 ± 18.8 (yaş sınırı:5-68) idi. Çalışmaya 5 değişik tümör tipine sahip hastalar dahil edilmiştir:

- 6 melanoma
- 7 metastatik beyin tümörü (Akciğer orjinli)
- 11 glioblastoma multiforme
- 10 astrositoma
- 14 meningioma

Tanımlar histopatolojik incelemelerden sonra her hastanenin patoloji kliniğinde konulmuştur. Çalışmanın kontrol grubunu, ölümü üzerinden henüz 6 saat geçmeden otopsi amacıyla Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Adli Tıp Kurumuna getirilmiş, yaş ortalaması 44.14 ± 16.82 (yaş sınırı:12-63) olan 17 şahsın otopsileri sırasında sağlam beyin dokularından alınan örnekler oluşturmuştur.

Hastaların kliniğe başvurmaları genellikle tümör bası bulguları ortaya çıktıktan sonra olmuştur.

3.2. Araç ve Gereçler

Çalışmada şu aletler kullanılmıştır: Hitachi Model 100-30 Spectrophotometer, Beckman Model 25 Spektrofotometre, Linear Instruments Corp. Model 282 recorder (kaydedici), B.Braun Melsungen AG Model 853202 homojenizatör, Bosch Model S2000/10 hassas terazi, Sartorius

Basic Model BA210S hassas terazi, Uğur marka derin dondurucu, Cenco Whirlmix Vortex, Beckman Expandomatic Model pH metre, Rührwerk Martin marka manyetik karıştırıcı, AB Lars Ljunberg & Co. marka küçük boy santrifüj, Sorvall Superspeed Model SS-1 santrifüj.

3.3. Beyin Dokusu Numunelerinin Hazırlanması

3.3.1. Deneyleerde kullanılan maddeler: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, Na_3 -sitrat, Na_2CO_3 , NaOH , Sodyum tungstat ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), Sodyum molibdat ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), fosforik asit, H_2SO_4 , lityum sülfat, bromür, Tris (hydroxymethyl amino methane), HCl , Na_2EDTA , Triton X-100 (Merk), Xanthine (Merk), NBT (Sigma), bovine serum albumine, Xanthine oxidase (Sigma), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, CuCl_2 , H_2O_2 , KH_2PO_4 , $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Redükte GSH (Sigma), NADPH (Sigma), Glutasyon redüktaz (GSH-Px)(Sigma), Sodium Azid (NaN_3).

3.3.2. Numunelerin korunması ve homojenizasyon: Tümörlü beyin dokuları ve kontrol grubundan elde edilen normal beyin dokuları deneyler yapılacağı ana kadar $-30\text{ }^\circ\text{C}$ 'ye ayarlı derin dondurucuda bekletildi. Dokular herhangi bir koruyucu sıvı içerisine değil, doğrudan temiz cam bir tüpe kuru olarak konuldu. Her nümune en fazla bir hafta içerisinde çalışıldı. Derin dondurucudan çıkarılan nümuneler önce bir petri kutu içerisinde bir bistüri yardımıyla küçük parçalara ayrıldı. Soğuk bidistile su ile yıkanarak kontaminasyon materyali ve kan bulaşığı giderildi. Bu işlem her nümune için 3 defa tekrarlandı. Buradaki bütün işlemler $+4\text{ }^\circ\text{C}$ 'de yapıldı.

3.3.2.1. Homojenizasyonda kullanılan reaktifler: pH 7.5, 80mM Tris-HCl tamponu: 2.51g Tris bir miktar suda çözülür, 253ml 0.1N HCl eklenir ve bidistile su ile 500ml'ye tamamlanır. Üzerine koruyucu olarak (metal iyonlarını bağlayıcı) 93mg Na_2EDTA ve özellikle katalaz enzimi için subsellüler yapılarıdaki enzimi ortaya çıkarmak için membran parçalayıcı ajan olarak 0.25ml Triton X-100 eklendi.

3.3.2.2. Homojenizasyonda yapılan işlemler: Bir kısım doku ile 5 kısım tampon karıştırılarak %20'lik bir homojenat hazırlandı. Homojenizasyonun süresi bütün enzimler için optimal olacak şekilde 10 dak. olarak belirlendi. Homojenizasyon işlemi tamamlandıktan sonra homojenat tüplere konarak $10,000\text{g}$ 'de 40 dak santrifüj edildi. Üstte kalan süpernatant kısmı bir pipetle nazikçe alındı ve ilk protein tayini ile katalaz enziminin aktivite tayini bu fraksiyonda yapıldı. Daha sonra bu süpernatant 1/1 oranında Kloroform-etanol (3/5, v/v) (128) ile

karıştırılarak yeniden 10,000xg'de 30 dak. santrifuj edildi. Üstteki etanol fazında 2. protein tayini ile GSH-Px ve Total SOD enzimlerinin aktivite tayini yapıldı.

3.4. Ekstraksiyonlu ve ekstraksiyonsuz nümunelerde protein tayini:

Deneyin prensibi (Lowry Metodu): (79) Alkali çözeltide bakır-protein kompleksi oluşur. Bu kompleks fosfomolibdat-fosfotungstat reaktifini (Folin-Ciocalteu-Phenol reaktifini) redükler ve koyu mavi bir renk oluşur. Burada rengin koyuluğu ortamdaki protein konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Folin reaktifinin ilavesinde şu önemli kaideye dikkat etmek gerekir: Bu reaktif yalnız asit ortamda dayanıklıdır. Tarif edilen bu redükleme ise pH 10'da gerçekleşmektedir. Bundan dolayı folin reaktifi alkali bakır-protein çözeltisine hemen ilave edilmeli ve derhal şiddetle karıştırılmalıdır. Bu suretle fosfomolibdat-fosfotungstat (folin) reaktifi parçalanmadan önce redüklenme olayı gerçekleşir.

Kullanılan reaktifler:

A Reaktifi: 0.5g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ve 1.0g Na_3sitrat 100ml bidistile suda çözülür.

B Reaktifi: 20.0g Na_2CO_3 ve 4g NaOH 1L bidistile suda çözülür.

C Reaktifi: 50.0ml B çözeltisine 1.0ml a çözeltisi ilave edilir (Taze hazırlanmalıdır)

D Reaktifi: (Phenol-Folin-Ciocalteu reaktifi): 1500ml lik bir balona 100g sodyum tungstat ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 25g sodyum molibdat ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 700ml bidistile su, 50ml %85 fosforik asit ve 100ml konsantre hidroklorik asit (HCl) konulur. 10 saat geri soğutucu altında yavaşça ısıtılır. Soğuduktan sonra üzerine 100g lityum sülfat, 50ml bidistile su ve 5 damla brom ilave edilir. 15 dakika kaynatılarak bromun fazlası uçurulur. Bu kaynatma geri soğutucusuz olarak yapılır. Muhteviyat soğutulur ve 1L'lik balona aktarılır. Distile su ile litreye tamamlanır. Koyu renkli şişede muhafaza edilir. Uygun şartlarda reaktifin rengi sarıdır. Yeşil renk, reaktifin bözülmesini gösterir. Kullanılacağı zaman 1/1 oranında bidistile su ile seyreltilir.

Not: Bu metod biüre metodunun geliştirilmiş şeklidir ve daha hassastır.

Deneyin yapılışı: Önce değişik konsantrasyonlarda protein standartı kullanılarak (bovine serum albümin standartı kullanılmıştır) "Optik dansite (OD) - mg/ml protein konsantrasyonu" grafiği çizildi. Numunenin protein değerleri bu grafikten okundu.

| | Kör | Nümune |
|----------------------------------|------|--------|
| Nümune (μL) | - | 10 |
| Su (μL) | 500 | 490 |
| C Reaktif (ml) | 2.5 | 2.5 |
| Karıştırılır, 10 dakika beklenir | | |
| D Reaktif (ml) | 0.25 | 0.25 |

Tüplerin ağzı parafilm ile kapatılarak 25 °C'de 20-30 dakika beklenir ve 700nm'de nümunenin absorbansı köre karşı okunur.

Hesabı

Protein (mg/ml)= grafikten okunan değer x faktör

$$F \text{ (faktör)} = \frac{\text{standart hacmi (0.5ml)}}{\text{nümune hacmi (0.01ml)}} = 50$$

Not: Faktör kullanılan numunenin miktarına göre değişir.

3.5. Süperoksit dismutaz aktivitesinin **tayini**:

3.5.1. Deneyin prensibi: (128) Bu metotta süperoksit dismutaz aktivitesi, ksantin-ksantin oksidaz sistemi ile üretilen süperoksitin nitroblue tetrazoliumu indirge mesi esasına dayanır. Oluşan süperoksit radikalleri NBT'yi indirgeyerek renkli formazanı oluşturur. Bu kompleks 560nm'de maksimum absorbans verir. Enzimin olmadığı ortamda bu indirgenme meydana gelip mavi bir renk oluşmaktadır. Ortamda SOD olduğunda ise indirgenme olayı olmayıp mavi-mor renk meydana gelmemekte veya enzimin miktar ve aktivitesine bağlı olarak açık renk oluşmaktadır.

3.5.2. Kullanılan reaktifler:

1. Çalışma Çözeltisi: Aşağıdaki maddeler (a,b,c,d,e) belirtilen molaritede hazırlanarak karıştırılır ve buzdolabında +4 °C'de saklanır.

a) 0.3mmol/L ksantin: 9.13mg ksantin alınıp 200ml bidistile suda çözülür. Çözme işlemi birkaç damla 1M NaOH'lı ortamda hafifçe ısıtılarak yapılır.

b) 0.6mmol/L Na₂EDTA: 25mg EDTA alınıp 100ml bidistile suda çözülür.

c) 150µmol/L NBT: 12.3mg NBT alınıp 100ml bidistile su ile çözülür.

d) 400mmol/L Na₂CO₃: 2.54g Na₂CO₃ alınıp 60ml bidistile suda çözülür.

e) 1g/L bovine serum albumin (BSA): 30 mg alınıp 30ml bidistile suda çözülür.

2. Ksantin oksidaz (167U/L): 10µL ksantin oksidaz (U, spesifik aktivite) alınıp 1ml buz gibi soğuk 2M (NH₄)₂SO₄ ile karıştırılır. Enzim çözeltileri deney esnasında hazırlanır.

2M (NH₄)₂SO₄: 2.64g (NH₄)₂SO₄ alınıp 10ml bidistile suda çözülür. Buzlukta saklanır.

3. 0.8mmol/L CuCl₂: 10.8mg CuCl₂ alınıp bir miktar bidistile suda çözülerek 100ml'ye tamamlanır.

3.5.3. Deneyin yapılışı:

| | Kör | Nümune |
|---------------------------------------|------|--------|
| Çalışma çözeltisi (ml) | 2.85 | 2.85 |
| Süpernatant (ml) | - | 0.10 |
| Bidistile su (ml) | 0.10 | - |
| Ksantin oksidaz (ml) | 0.05 | 0.05 |
| 25 °C sıcaklıkta 20 dakika inkübasyon | | |
| CuCl ₂ (ml) | 1.0 | 1.0 |

Numune ve kör 560nm dalga boyunda suya karşı okunur

3.5.4. Süperoksit dismutaz aktivitesinin hesaplanması:

$$\% \text{inhibisyon} = \frac{\text{Absorbans(kör)} - \text{Absorbans(nümune)}}{\text{Absorbans(kör)}} \times 100$$

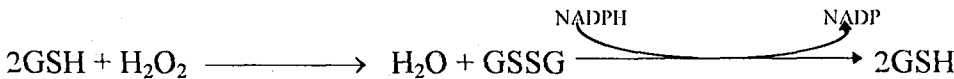
$$\text{Aktivite (U/ml)} = \frac{\% \text{inhibisyon}}{50 \times 0.1}$$

$$\text{Spesifik aktivite (U/mg protein)} = \frac{\text{U/ml}}{\text{mg/ml protein}}$$

Ünite tarifi: Bir SOD ünitesi, NBT redüksiyonunu %50 oranında inhibe eden enzim aktivitesidir.

3.6. Glutatyon peroksidaz aktivitesinin tayini:

3.6.1. Deneyin prensibi: (93) Deney, ortamda bulunan GSH-Px enziminin kataliziyle H_2O_2 'nin H_2O ve singlet oksijene çevrilmesi ve bunun da redükte GSH'ı okside GSH'a (GSSG) çevirmesinin hızı prensibine dayanmaktadır. GSSG'nin oluşum hızı deney ortamındaki NADPH'nin NADP'ye çevrilmesi ile optik dansitede meydana gelen azalmanın 340nm'de takibiyle hesaplanır.



Enzim ünitesi: Birim zamanda okside olan NADPH'nin mikromol miktarıdır.

3.6.2. Deneyde kullanılan reaktifler:

GSH (150mM): 50mg GSH 1ml tamponda çözülür

NaN₃ (1M): 65mg NaN₃ 1ml tamponda çözülür

NADPH (3mM): 5mg NADPH alınır 1ml tamponda çözülür.

GSH-Redüktaz: Ticari preparattan (U/ml, spesifik aktivite) direkt olarak seyreltme olmaksızın kullanılır.

H₂O₂ (50mM): 15µL H₂O₂ alınıp 5ml tampona konulur.

Tampon (pH 7, 50mM fosfat tamponu):

A: Na₂HPO₄, 50mM, 7.1g/L B: KH₂PO₄, 50mM, 6.8g/L

600ml A + 400ml B + 2.08g Na₂EDTA şeklinde hazırlanır.

3.6.3. Deneyin yapılışı:

| | Nümune | Kör |
|---|--------|------|
| Fosfat tamponu (ml) | 2.65 | 2.67 |
| Redükte GSH (ml) | 0.10 | 0.10 |
| NADPH (ml) | 0.10 | 0.10 |
| GSH-Redüktaz (ml) | 0.01 | 0.01 |
| NaN ₃ (ml) | 0.01 | 0.01 |
| Nümune(süpernat) (ml) | 0.02 | - |
| Karıştırılıp 25 °C sıcaklıkta 30 dakika inkübe edilir | | |
| H ₂ O ₂ (ml) | 0.10 | 0.10 |

5 dakika boyunca 340nm'de meydana gelen optik dansite azalması recorder ile takip edilir.

3.6.4. Enzimin aktivitesinin hesaplanması:

$$\text{NADPH (epsilon)} = 6.22 \times 10^3 \text{M}^{-1} = 6.22 \text{ mM}^{-1}$$

$$\Delta \text{OD} / \text{dak.} = (\Delta \text{OD} / \text{dak})_{\text{nümunce}} - (\Delta \text{OD} / \text{dak})_{\text{kör}}$$

$$\mu\text{mol/dakika/L} = \text{U/L} = \frac{\Delta \text{OD/dak}}{6.22} \times 10^3 \mu\text{mol/L} \times \frac{1}{0.02}$$

$$\text{U/L} = \Delta \text{OD/dak} \times 24.1 \times 10^3$$

$$\text{Spesifik aktivite (U/mg protein)} = \frac{\text{U/L}}{\text{mg/L protein}}$$

3.7. Katalaz aktivitesinin tayini

3.7.1. Deneyin prensibi: (1) Hidrojen peroksit (H_2O_2), ultraviyole spektrumu aralığında dalga boyunun azalması ile artan bir absorpsiyon verir. Deney ortamında, katalaz enziminin kataliziyle H_2O_2 'nin parçalanması, 240nm dalga boyunda ($E_{240} = 40.0 \text{cm}^2/\mu\text{mol}$) bir azalma olarak takip edilir. Absorbanstaki dakikalık düşme hızı enzim aktivitesi ile doğru orantılıdır.

3.7.2. Kullanılan reaktifler:

Fosfat tamponu pH 7 (50mM): 50mM, 7.1g/L Na_2PO_4 'ün 600ml'si ile 50mM, 6.8g/L KH_2PO_4 'ün 400ml'si karıştırılır. Soğuk ortamda muhafaza edilir.

H_2O_2 : 100ml tampona optik dansite 0.50 olana kadar azar azar (mikrolitreler halinde) H_2O_2 eklenir. Her seferinde küvete konarak optik dansite ölçülür.

3.7.3. Deneyin yapılışı:

| | Nümune | Kör |
|------------------------------------|--------|------|
| Fosfat tamponu (ml) | - | 2.99 |
| | 2.99 | 0.01 |
| H ₂ O ₂ (ml) | | |
| Süpernatant (ml) | 0.01 | - |

240nm'de 5 dakika recorder ile takip edilir.

3.7.4. Enzimin aktivitesinin hesaplanması

$$k/\text{sec} = k \times \text{sec}^{-1} = \frac{2.3 \log OD_1/OD_2}{60\text{sn}}$$

$$k/\text{gram protein} = \frac{k \times \text{sec}^{-1}}{\text{mg/ml protein} \times 1000 \times 0.01}$$

4.SONUÇLAR

Tablo 1'de kontrol grubunda ve farklı türde beyin tümörlerinde beyin dokusunda enzim aktiviteleri görülmektedir. Tablo 2'de ise kontrol grubu enzim aktivitesi ortalamaları ile hasta grubu enzim aktivite ortalamalarının anlamlılık testi olan Mann-Witney-U testinin sonuçları görülmektedir. Tabloda görüldüğü gibi, SOD aktivitesi glioblastoma multiforme grubunda kontrol grubundan farklılık göstermemektedir ($p<0.219$). Astrositoma ve melanomada SOD aktivitesi kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma göstermiştir (sırasıyla $p<0.017$, $p<0.001$). Metastatik beyin tümörü ve meningioma gruplarında ise SOD aktivitesi kontrol dokularına göre anlamlı bir artış göstermiştir (sırasıyla $p<0.008$, $p<0.031$). GSH-Px aktivitesi açısından astrositoma ve glioblastoma multiforme gruplarında, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık gözlenmemektedir. Buna karşılık melanomada kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma mevcutken ($p<0.014$) metastatik beyin tümörü ve meningioma gruplarında anlamlı bir artma gözlenmektedir (sırasıyla $p<0.015$, $p<0.008$). Katalaz aktivitesi metastatik beyin tümörü grubunda kontrole göre anlamlı olmayan bir azalma göstermiştir ($p<0.071$). Astrositoma grubunda kontrole göre anlamlı bir azalma olduğu gözlenmiştir ($p<0.004$). Bunlara karşılık melanoma, meningioma ve glioblastoma multiforme gruplarında kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı aktivite artmaları gözlenmiştir (sırasıyla $p<0.0004$, $p<0.0001$, $p<0.0001$).

Değerlere dikkat edildiğinde, kanserli dokuların tipleri esas alındığında, serbest radikallerden koruyucu enzimlerin aktivitelerinde kontrol grubu değerlerine göre azalmalar ve artmalar görülmektedir. Örneğin Grup 2 ve 3'te SOD aktiviteleri kontrol grubundan daha düşük ve diğer kanser gruplarında kontrol grubundan daha yüksektir. Buna benzer olarak Grup 2 ve 4'te katalaz aktivite değerleri kontrol grubuna göre düşükken diğer gruplarda kontrole göre daha yüksektir.

Beynin değişik bölgelerinde ve loblarında, serbest radikallerden koruyucu enzimlerin aktivitelerinde farklılıklar bulunabileceği ihtimaline binaen kontrol grubunda beyin parietal,

oksipital ve frontal loblarından alınan örneklerde enzim aktiviteleri ölçülmüş olup her üç enzim için de anlamlı farklılıklar tesbit edilememiştir. Bu deneme, hasta ve kontrol gruplarına geçmeden önce koyun beyininde de yapılmış olup SOD, GSH-Px ve katalaz enzimlerinde lokal farklılıklar olmadığı tesbit edilmiştir. Böylece hasta gruplarında ve kontrol grubunda alınan materyalin bulunduğu bölgeye bağlı olarak gelebilecek bir yanılma ihtimali ortadan kaldırılmış olmaktadır. Bu yüzden tümör dokusunun veya kontrol dokusunun alındığı yer ile ilgili herhangi bir sınıflama yapılmamıştır.

Kontrol grubu ve kanser grupları arasında korelasyon katsayıları açısından bazı önemli farklılıklar tesbit edilmiştir. Bunlar Tablo 3'te görülmektedir. SOD/GSH-Px arasında metastatik akciğer kanseri ve glioblastoma multiforme gruplarında negatif korelasyonlar tesbit edilmiştir. SOD/KAT arasında kontrol grubunda negatif, diğer bütün kanser grupları arasında ise pozitif korelasyonlar tesbit edilmiştir. Son olarak GSH-Px/KAT arasında kontrol ve glioblastoma multiforme gruplarında negatif korelasyon mevcutken meningiomada pozitif korelasyonlar tesbit edilmiştir.

Şekil 1, 2 ve 3'te ise kontrol ve tümör gruplarının ortalamaları grafik şeklinde verilmektedir.

Tablo 1. Kontrol grubu ve hasta gruplarında SOD, GSH-Px ve KAT aktiviteleri.

| | SOD U/mg protein | GSH- Px U/mg protein | KAT k/gr protein (x 10 ⁻⁴) |
|-----------------------|---------------------|-------------------------|---|
| 1.Kontrol (n=17) | 15.74±7.84 | 1.88±1.16 | 3.79±1.75 |
| 2. Astrositoma (n=10) | 6.98±6.74 | 1.45±0.74 | 1.74±1.01 |
| 3. Melanoma (n=6) | 8.05±1.26 | 0.68±0.33 | 16.4±4.51 |
| 4. M.B.T. (n=7) | 35.07±3.75 | 3.94±1.53 | 2.12±1.74 |
| 5. Meningioma (n=14) | 27.85±17.20 | 6.28±4.66 | 17.8±12.25 |
| 6. G.M. (n=11) | 16.15±3.79 | 1.15±0.33 | 23.15±7.69 |

M.B.T.: Metastatik beyin tümörü, G.M.: Glioblastoma multiforme

Tablo 2. Mann-Witney U Testinin Sonuçları.

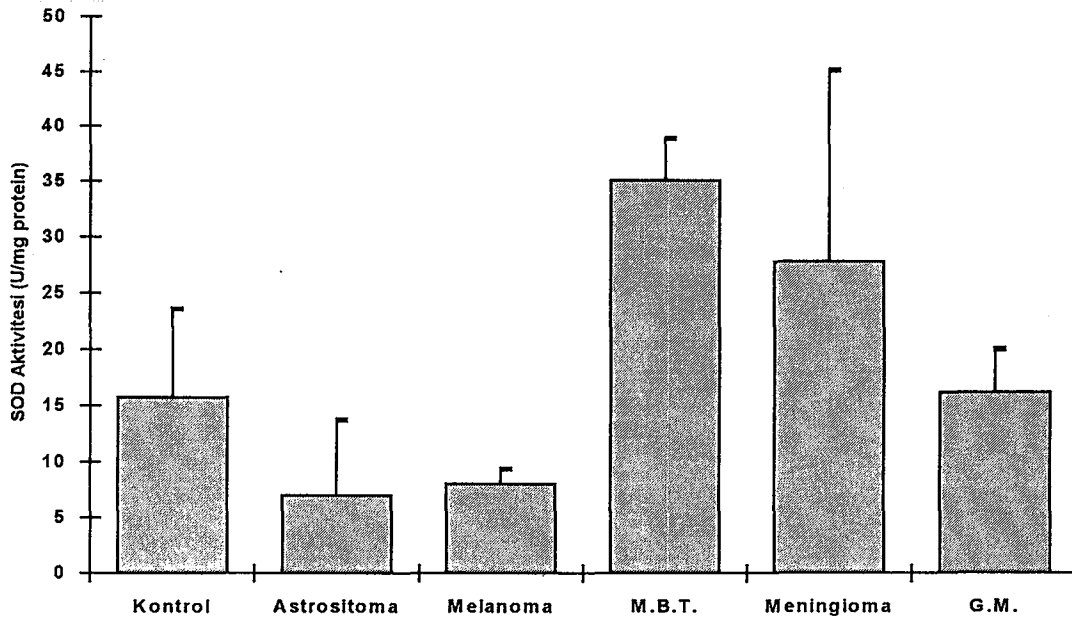
| | SOD | GSH-Px | KAT |
|------------|------------|---------------|------------|
| 1-2 | p<0.017 | p<0.514 | p<0.004 |
| 1-3 | p<0.001 | p<0.014 | p<0.0004 |
| 1-4 | p<0.008 | p<0.015 | p<0.071 |
| 1-5 | p<0.031 | p<0.008 | p<0.0001 |
| 1-6 | p<0.219 | p<0.138 | p<0.0001 |

- 1: Kontrol grubu
2: Astrojitoma grubu
3: Melanoma grubu
4: Metastatik beyin tümörü grubu
5: Meningioma grubu
6. Glioblastoma multiforme grubu

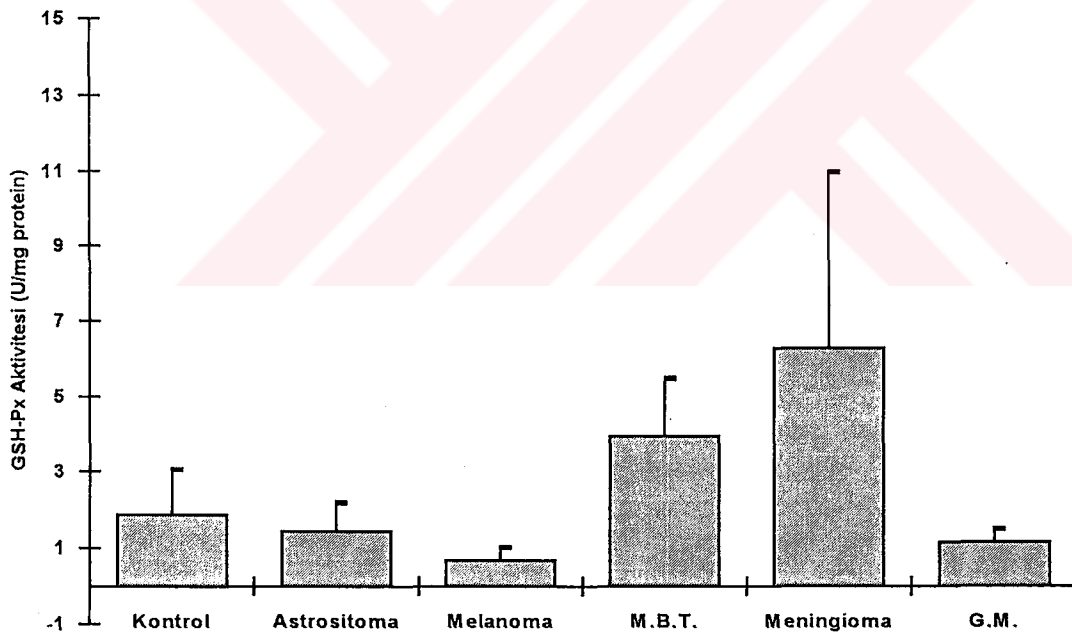
Tablo 3. Kontrol ve hasta gruplarında intra-korelasyon analizleri.

| | SOD/GSH-Px | SOD/KAT | GSH-Px/KAT |
|-------------|-------------------|----------------|-------------------|
| Kontrol | k.y. | -0.37 | -0.45 |
| Astrojitoma | k.y. | 0.32 | k.y. |
| Melanoma | k.y. | 0.93 | k.y. |
| M.B.T. | -0.33 | 0.46 | k.y. |
| Meningioma | k.y. | 0.39 | 0.49 |
| G.M. | -0.62 | 0.57 | -0.40 |

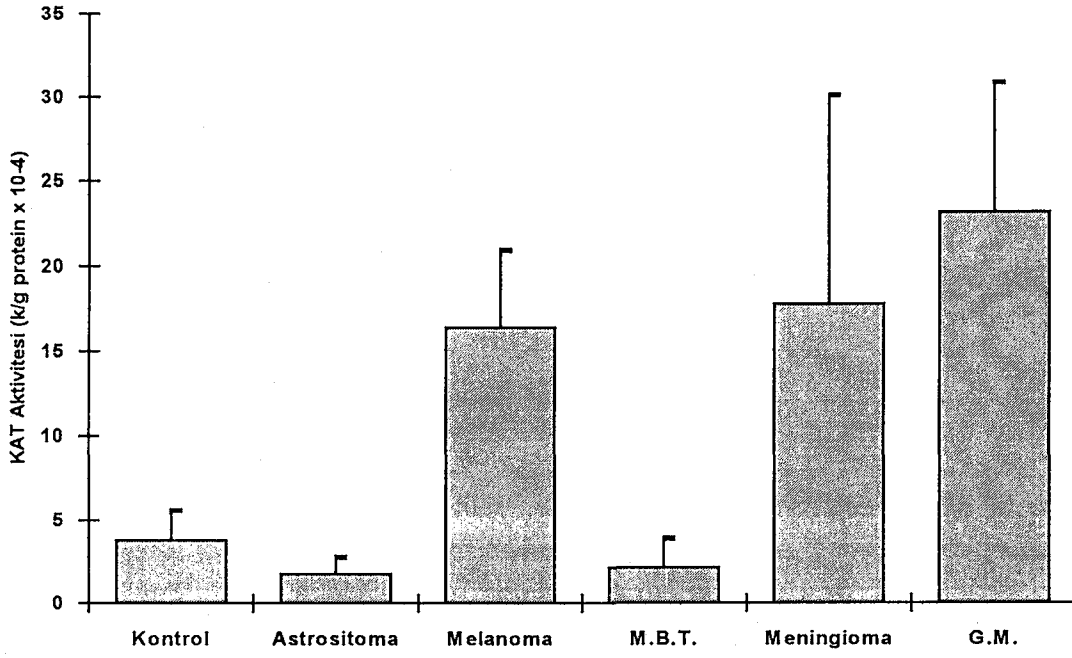
k.y.: korelasyon yok, M.B.T.: Metastatik beyin tümörü, G.M.: Glioblastoma multiforme



Şekil 1. Kontrol ve hasta gruplarında beyin dokusundaki SOD aktiviteleri
(M.B.T.: Metastatik beyin tümörü, G.M.: Glioblastoma multiforme)



Şekil 2. Kontrol ve hasta gruplarında beyin dokusundaki GSH-Px aktiviteleri
(M.B.T.: Metastatik beyin tümörü, G.M.: Glioblastoma multiforme)



Şekil 3. Kontrol ve hasta gruplarında beyin dokusundaki CAT aktiviteleri (M.B.T.: Metastatik beyin tümörü, G.M.: Glioblastoma multiforme)

5.TARTIŞMA

Öncelikle şunu belirtmek gerekir ki, bu çalışmada araştırılan süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz enzimleri başta akciğer, karaciğer ve kolon olmak üzere birçok tümör tipinde çalışılmasına rağmen beyin tümörlerinde çok az sayıda araştırma yapılmıştır. Bu yüzden çalışma, literatür bulgularıyla istenen ölçüde mukayese edilememektedir. Karşılaşılan bir diğer güçlük ise bazı beyin tümörü tiplerinin orjininin henüz tam olarak aydınlatılamamış olmasıdır. Örneğin glioblastoma multiforme gliomaların en maligni olmasına rağmen hangi hücreden köken aldığı halen tartışma konusudur. Bazı araştırmacılar primer bir kanser olarak geliştiğini ileri sürmektedir. Her ne kadar glioblast diye bir hücre tipi olmasa da, anaplastik hücrelerin, hücresel elemanların birçok şekline farklılaşabildiği bilinmektedir. Diğer bazılarına göre ise bu tümörler büyük bir ihtimalle iyi gelişmiş glial hücrelerden (özellikle astrositlerden) köken almaktadır.

Vücutta üretilen serbest radikallerin, özellikle de serbest oksijen radikallerinin, kanserin başlangıç ve ilerleme safhalarında önemli fonksiyonları olduğu bazı araştırmacılar tarafından gösterilmiştir. Bu konudaki çalışmalar birçok merkezde devam etmektedir (2). Serbest radikal üreten bazı maddelerin kanseröz değişimi başlatıcı (119), bazı antioksidan özelliğe sahip maddelerin kullanımının da kanseröz değişimin başlamasını önleyici (70) özelliğe sahip olmaları bu iddiaları doğrulamaktadır. C ve E vitamini gibi vitaminler insanlarda koruyucu olarak kullanılabilir (2,140). Serbest radikalleri yok edici diğer sistemlerin ve inhibitörlerin neoplastik süreci geciktirdiği ve hatta önlediği yapılan ve yapılmakta olan çalışmalarla gösterilmiştir (64,111). Bu süreçte görev alan enzimler ise SOD, KAT ve GSH-Px'tir.

Serbest radikallerin herhangi bir sebeple üretimlerindeki artma veya tüketimlerindeki azalma (bunun sebeplerinden biri enzimatik sistemin yeteri kadar aktif olmamasıdır) DNA'nın yapısında değişikliklere (kırılmalar, baz değişiklikleri gibi), mutasyonlara, kromozomal değişikliklere ve sonuçta kansere yol açabilir (100). Yine serbest radikaller hücre büyümesini kontrol eden ve farklılaşmayı sağlayan genleri stimüle edebilirler (42,54).

Ikeda, I. ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada; serbest radikallerin endotel hücrelerinin yapısını bozarak kan-beyin bariyerini ortadan kaldırdıklarını ve beyinde direkt hasar meydana getirdiklerini, bunun da nöron ve glialardaki yapısal değişikliklerin dışında beyin ödemeine de neden olduğunu göstermişlerdir (60). Bu vazojenik beyin ödeminden, bozulan kan-beyin bariyeri ile vasküler permeabilitenin artması sorumlu tutulmuştur (58,105). Beyin tümörlerinde de, önce tümörün içinde daha sonra da peritümöral sahada ödem gelişmektedir. Peritümöral ödemden vasküler permeabiliteyi artırma özelliğine sahip olan serbest radikaller sorumlu tutulmaktadır (17,25). Bunların ışığında, tümör hücrelerinin serbest radikal ürettikleri ve serbest radikalleri yok eden sistemlerin bu hücrelerde bozulduğu gözlenmiştir (6,8,16,27).

Bu çalışmada temel amaç, serbest radikalleri metabolize eden enzim sistemlerinin değişik beyin tümörü dokularındaki durumunu ortaya çıkarmaktır. Bu amaçla aşağıdaki tabloya göz gezdirdiğimizde;

Tablo 4: Tümörlü dokularda enzimatik değişim

| Tümör tipi | SOD | GSH-Px | KAT |
|-------------|-----|--------|-----|
| Astrojitoma | ↓ | → | ↓ |
| Melanoma | ↓ | ↓ | ↑ |
| M.B.T. | ↑ | ↑ | → |
| Meningioma | ↑ | ↑ | ↑ |
| G.M. | → | → | ↑ |

M.B.T.: Metastatik beyin tümörü, G.M.: Glioblastoma multiforme

astrojitomada GSH-Px, metastatik beyin tümöründe katalaz ve glioblastoma multiformede SOD ile GSH-Px aktiviteleri değişmeden kalmış, dolayısıyla tümöral değişim dengeyi bozmamıştır. Fakat bunların dışında kalan diğer parametrelere bakıldığında enzim aktivitelerinde hem artma hem de azalmalar görülmektedir. Dolayısıyla bir genelleme yapılarak, "tümörlü beyin dokularında serbest radikalleri metabolize eden enzimlerin aktivitesi azalmaktadır" veya "artmaktadır" gibi bir sonuca varmak oldukça zordur. Bu zorluk nedeniyle her grup kendi içinde değerlendirilmiştir. Ayrıca meningioma dışında diğer tümörlerde tümörün köken aldığı hücre tipi ile enzim aktivitesi arasında anlamlı bir bağlantı yoktur. Diğer organ tümörlerinde elde edilen sonuçlara bakıldığında (Tablo 5) bu enzim sistemlerinin hemen hemen

tümünün baskılandığını görmekteyiz. Sadece akciğer, mide ve meme kanserlerinde GSH-Px aktivitesinde artma tesbit edilmiştir. Diğer tümör tiplerinde azalma mevcuttur.

Tablo 5: Farklı tip organ tümörlerinde enzimatik değişim

| Kanser tipi | SOD | GSH-Px | KAT |
|-------------------------------|-----|--------|-----|
| Deri tümörü (fare) | ↓ | ↓ | ↓ |
| Akciğer tümörü (fare) | ↓ | | |
| Hepatoma (fare) | ↓ | | |
| Kolorektal kanser (insan) | ↓ | → | ↓ |
| Hepatoma (insan) | ↓ | ↓ | ↓ |
| Böbrek kanserleri (insan) | ↓→ | ↓ | |
| Akciğer, mide ve meme kanseri | | ↑ | |

Tümör grupları ayrı ayrı değerlendirildiğinde; Astrositomada, serbest radikallerden koruyucu sistemin bozulduğunu görmek mümkündür. Melanomada ise SOD ve GSH-Px aktiviteleri kontrole göre düşük bulunurken KAT aktivitesinin kontrole göre yüksek olduğu bulunmuştur. Artmış KAT aktivitesi, azalmış GSH-Px aktivitesini kompanse etmek için hücre tarafından seçilen bir yol olabilir. Metastatik beyin tümöründe (akciğer orjinli), astrositoma ve melanoma gruplarına göre tam ters bir durum sözkonusudur. SOD ve GSH-Px aktiviteleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında yüksek, KAT aktivitesi düşük bulunmuştur. SOD ve GSH-Px'in indüksiyonunu sağlayan bir faktör bu enzimlerde yükselmeye sebep olmuş olabilir. Yine düşük KAT aktivitesi artmış GSH-Px aktivitesinin bir sonucu olabilir. Çünkü her iki enzim de substrat olarak H_2O_2 'i kullanmaktadır.

Meningiomada bütün serbest radikal enzimlerinin aktiviteleri kontrole göre yüksek bulundu. Muhtemelen, değişik kanserojenik süreçlerle üretilerek artmış olan serbest radikalleri yok etmek için bu serbest radikal defans sistemi indüklenmektedir. Glioblastoma multiforme ise SOD ve GSH-Px aktiviteleri kontrole göre farklılık göstermezken KAT aktiviteleri önemli bir artış göstermiştir.

Tablo 3'te serbest radikal enzimlerinin değişik tümör tiplerinde birbirleriyle hem pozitif hem de negatif ilişkiler gösterdiği görülmektedir.

Güner, G. ve arkadaşları tarafından yapılan bir araştırmada (48) beyin tümörlerinde subsellüler fraksiyonlarda katalaz aktivitesi ölçülmüştür. Sonuçta total olarak kanserli dokularda normal dokulara göre katalaz enzim aktivitesinde önemli bir azalma tesbit edilmiştir. Buna karşılık subsellüler yapıların enzim aktivitesi araştırıldığında süpernatant ve ribozomal fraksiyonlarda kanserli dokularda katalaz enzim aktivitesi normal gruba göre çok az yüksek bulunmuştur.

Sonuç olarak, kanserli hücrelerde birçok araştırıcı tarafından gösterilen (29,64) serbest radikal düzeyindeki artış, enzim dengesini değiştirmektedir. Enzimatik serbest radikal sistemi, gelişen kanser türüne bağlı olarak baskılanmakta veya indüklenmektedir. Bu değişimlerin karsinogenезin normal bir sonucu olabileceğini iddia eden araştırmacıların yanısıra, bunun kanserin oluşumu ve gelişmesinde ilave bir faktör olabileceğini iddia araştırmacılar da bulunmaktadır. Kanaatimize göre, her iki durumun bir arada olması da muhtemel gözükmektedir. Yani bir taraftan karsinogenезe bağlı olarak serbest radikal metabolizması bozulabilmekte, diğer taraftan da bozulan serbest radikal metabolizması karsinogenезisin oluşması ve gelişmesinde ilave bir faktör olabilmektedir. Bu konuların açıklığa kavuşturulması için ek çalışmalara ihtiyaç vardır.

6. ÖZET

Bu çalışmada, beyin tümörü olan hastaların tümör dokularında serbest radikalleri yok edici enzimler olan Süperoksit dismutaz (SOD), Katalaz (KAT) ve Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) aktiviteleri ölçülmüştür. Bu amaçla melanoma (6), metastatik beyin tümörü (akciğer orjinli)(7), glioblastoma multiforme (11), astrositoma (10) ve menengioma (14) olmak üzere toplam 48 hastadan postoperatif tümör dokusu örnekleri alınmıştır. Çalışmanın kontrol grubunu otopsi yapılan 17 şahıstan alınan tümörsüz beyin dokuları oluşturmuştur.

Astrositoma ve melanomada SOD aktivitesinde kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma gözlenmiştir (sırasıyla $p<0.017$ ve $p<0.001$). Metastatik beyin tümörü ve menengioma gruplarında ise SOD aktivitesinde kontrol grubuna göre anlamlı bir artış gözlenmiştir (sırasıyla $p<0.008$ ve $p<0.031$). Melanomada GSH-Px aktivitesinde kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma mevcutken ($p<0.014$) metastatik beyin tümörü ve menengioma gruplarında anlamlı bir artma tesbit edilmiştir (sırasıyla $p<0.015$ ve $p<0.008$). Son olarak katalaz aktivitesi astrositoma grubunda kontrole göre düşük bulunurken ($p<0.004$) melanoma, meningioma ve glioblastoma multiforme gruplarında yüksek bulunmuştur (sırasıyla $p<0.0004$, $p<0.0001$ ve $p<0.0001$).

Enzim aktivitelerinde gruplar arasında önemli farklılıklar mevcuttur. Bu yüzden beyin tümörlerinde serbest radikalleri yok edici enzimlerin durumu hakkında genel bir şey söylemek yerine her tümör grubunu kendi içinde değerlendirmek daha uygun olacaktır. Enzim aktivitelerinde grup içinde ve gruplar arasında tesbit edilen bu artma-azalmaların, enzimler arasındaki kompensasyon mekanizmalarına, enzimlerin indüksiyonuna ve bazı substratların bir'den fazla enzim tarafından ortak olarak kullanılmasına bağlı olabileceği düşünülmüştür.

7. SUMMARY

In this study, activities of some scavengers of free radicals (ie. Superoxide dismutase (SOD), Catalase (CAT) and Glutathione peroxidase (GSH-Px)) are measured in human brain tumor tissues. Forty-eight tumor tissue samples were obtained postoperatively and five different groups were formed according to tumor histopathologically: Menengioma (14), glioblastoma multiforme (11), astrocytoma (10), metastatic brain tumors (from lung)(7), and melanoma (6). Brain tissues without tumor taken from 17 autopsied patients constituted the control group.

A significant decrease in SOD activity was observed in astrocytoma and melanoma groups ($p < 0.017$ and $p < 0.001$, respectively) and a significant increase in same activity was detected in menengioma and metastatic brain tumor groups compared to control group ($p < 0.008$ and $p < 0.031$, respectively). While there was a significant decrease in GSH-Px activity of melanoma group ($p < 0.014$), a significant increase was observed in the metastatic brain tumor and menengioma groups compared to control group ($p < 0.015$ and $p < 0.008$). Finally, catalase activity in astrocytoma group was found decreased when compared to control group ($p < 0.004$), it was found increased in melanoma, menengioma, and glioblastoma multiforme groups ($p < 0.0004$, $p < 0.0001$ and $p < 0.0001$, respectively).

According to these results, instead of expressing a general concept about the state of free radical scavenger enzymes in brain tumors, it will be much more accurate to evaluate every individual tumor group within itself. It is suggested that these increases and decreases of enzyme activities determined between groups or within groups may be due to compensation mechanisms between enzymes, induction of enzymes, and utilization of some substrates by more than one enzyme.

8. KAYNAKLAR

1. Aebi H. Catalase In: Bergmeyer, U., ed. Methods of enzymatic analysis. New York and London: Academic Press, 1974; pp. 673-677.
2. Ames B.N. Dietary carcinogens and anticarcinogens: Oxygen radicals and degenerative diseases. *Science* 1983, 221:1256-1264.
3. Antila E., Westermark T. On the etiopathogenesis and therapy of Down's syndrome. *Int J Dev Biol* 1989, 33:183-188.
4. Aruoma O.I., Hallivell B., Dizdaroğlu M. Iron-iron-dependent modification of bases in DNA by the superoxide radical-generating system hypoxanthine/xanthine oxidase. *J Biol Chem* 1989, 264:13024-13028.
5. Aruoma O.I., Hallivell B., Gajevski E., Dizdaroğlu M. Copper-iron-dependent damage to the bases in DNA in the presence of hydrogen peroxide. *Biochem J* 1991, 273:601-604.
6. Bannister W.H., Frederici G., Heath J.K., Bannister J.V. Antioxidant systems in tumor cells: The levels of antioxidant enzyme, ferritin and total iron in a human hepatoma cell line. *Free Radic Res Common* 1986, 6:361-367.
7. Benedetto C., Bocci A., Diazoni M. et al. Electrospin resonance studies on normal human uterus and cervix and in benign and malignant uterine tumors. *Cancer Res* 1981, 41:2936-2942.
8. Bize I.B., Oberley L.W., Harold P.N. Superoxide dismutase and superoxide radical in morris hepatoma. *Cancer Res* 1980, 40:3686-3693.
9. Braughter J.M., Hall E.D. Central nervous system trauma and stroke. *Free Radic Biol Med* 1989, 6:289-301.
10. Brawn K., Fridowich I. DNA strand scission by enzymatically generated oxygen radicals. *Arch Biochem Biophys* 1981, 206:414-419.
11. Burton G.W., Cheeseman K.H., Doba I., Ingold K.U., Slater T.F. Vitamin E as an antioxidant invitro and invivo. In: *Biology of Vitamin E*. Ciba Foundation Symposium 101. London: Pitman Press, 1983 pp.4-18.
12. Burton G.W., Ingold K.U. Vitamin E: application of the principles of physical organic chemistry to the exploration of its structure and function. *Acc Chem Res*. 1986, 19:194-201
13. Burton G.W., Joyce A., Ingold K.U. Is vitamin E only lipid soluble chain-breaking antioxidant in human blood plasma and erythrocyte membranes? *Arch Biochem Biophys*. 1983, 221:281-290
14. Burton G.W., Wronska U., Stone L., Foster D.O., Ingold K.U. Biokinetics of dietary RRR- α -tocopherol in the male guinea pig at three dietary levels of vitamin C and two levels of vitamin E. Evidence that vitamin C not "spare" vitamin E in vivo. *Lipids*. 1990, 25:199-210

15. Cathcart R., Schwieters E., Saul R.L., Ames B.N. Thymine glycol and thymidine glycol in human and rat urine. A possible assay for oxidative DNA damage. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1984, 81:5633-5637.
16. Cerutti P.A. Prooxidant status and tumor promotion. *Science* 1985, 227:375-381.
17. Chan P.H., Schmidley J.W., Fishman R.A., Longar S.M. Brain injury, edema and vascular permeability changes induced by oxygen derived free radicals. *Neurology* 1984, 34:315-320.
18. Chandler W.L., Clayson K.J., Longstreth W.T., Fine J.S. Creatine kinase isoenzymes in human cerebrospinal fluid and brain. *Clin Chem* 1984, 30(11):1804-1806.
19. Coghlan J., Flitter W., Holley A. et al. Detection of free radicals and lipid hydroperoxides in blood taken from the coronary sinus of man during percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Free Radic Res Commun* 1991, 14:409-410.
20. Cohen G. and Hochstein P. Glucose-6-phosphate dehydrogenase and detoxification of hydrogen peroxide in human erythrocytes. *Science* 1961, 134:1756.
21. Cohen G. and Hochstein P. Glutathione peroxidase. The primary agent for the elimination of hydrogen peroxide in erythrocytes. *Biochemistry* 1963, 2:1420.
22. Corongui F., Poli G., Dianzoni M., Cheeseman K., Slater T. Lipid peroxidation and molecular damage to polyunsaturated fatty acids in rat liver. Recognition of two classes of hydroxides formed under conditions in vitro. *Chem Biol Interact* 1986, 59:147-155.
23. Corrocher R., Casaril M., Bellisola G. et al. Severe impairment of antioxidant system in human hepatoma. *Cancer* 1986, 58:1658-1662.
24. Cotgreave I., Moldeus P., Orrenius S. Host biochemical defense mechanisms against prooxidants. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1988, 28:189-202.
25. Del Maestro R.F., Björk J., Affors K.E. Increase in microvascular permeability induced by enzymatically generated free radicals. 2. Role of superoxide anion radical, hydrogen peroxide and hydroxyl radical. *Microvasc Res* 1981, 22:255-270.
26. Demopoulos H.B., Flomn E.S., Peitronigro D.D., Seligman M.L. The free radical pathology and the microcirculation in the major central nervous system disorders. *Acta Physiol Scand* 1980, 492:91-119.
27. Dionisi O., Galeotti T., Terranova T., Azzi A. Superoxide radicals and hydrogen peroxide formation in mitochondria from normal and neoplastic tissues. *Biochim Biophys acta* 1975, 403:292-300.
28. Dormandy T., Wickens D. The experimental and clinical pathology of diene conjugation. *Chem Phys Lipids* 1987, 45:353-364.
29. Durak I., Işık A.C.Ü., Canbolat O., Akyol Ö., Kavutçu M. Adenosine deaminase, 5'nucleotidase, xanthine oxidase, superoxide dismutase and catalase activities in cancerous and non-cancerous human laryngeal tissues. *Free Radic Biol Med* 1993, 15:681-684.
30. Eichorn L.E., Shin Y.A. Interaction of metal ions with polynucleotides and related compounds XII. The relative effect of various metal ions on DNA helicity. *J Am Chem Soc* 1968, 90:7323-7328.

31. Esterbauer H., Cheeseman K. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol* 1990, 186:407-421.
32. Esterbauer H., Schaur R.J., Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malondialdehyde on related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 1991, 11:81-128.
33. Esterbauer H., Zollner H., Schaur R.J. Aldehydes formed in lipid peroxidation: mechanisms of formation, occurrence and determination. In: Vigo-Pelfry C ed. *Membrane Lipid Oxidation*, vol 1. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1990; pp. 239-283.
34. Esterbauer H., Zollner H., Schaur R.J. Hydroxyalkenals: cytotoxic products of lipid peroxidation. *ISI Atlas Sci* 1988, 1:311-317.
35. Evans P.H. Free radicals in brain metabolism and pathology. *British Medical Bulletin* 1993, 49(3):577-587.
36. Farber E., Cameron R. The sequential analysis of cancer development. *Adv Cancer Res* 1980, 35:126-127.
37. Floke L., Zimmerman R. The role of GSH-peroxidase in protecting the membrane of rat liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1970, 223:210-213.
38. Floyd R.A. The role of 8-hydroxyguanine in carcinogenesis. *Carcinogenesis* 1990, 11:1447-1450.
39. Forman H.J., Fridovich I. Superoxide dismutase: A comparison of rate constants. *Arch Biochem Biophys* 1973, 158:396-400.
40. Foulds L. *Neoplastic Development*, Vols 1 and 2. London, Academic Press 1969/1975.
41. Fraga C.G., Shigenaga M.K., Park J.W., Degan P., Ames B.N. Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2'-guanosine in rat organ DNA and urine. *Proc Natl Acad Sci* 1990, 87:4533-4537.
42. Freeman B.A., Crapo J.D. Biology of disease, free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 1982, 47:412-426.
43. Frenkel K. Carcinogen-mediated oxidant formation and oxidative DNA damage. *Pharmacol Ther* 1992, 53:127-166.
44. Fridovich I. Superoxide dismutases. *Adv Enzymol* 1986, 58:61-97.
45. Garner R.L., Mills G.C. and Christman A.S. The degradation of hemoglobin by tissue extracts and by ascorbic acid. *Fed Proc* 1951, 10:187.
46. Gosciniak S.A., Fridovich I. The purification and properties of superoxide dismutase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* 1973, 289:276-280.
47. Grootsweld M., Halliwell B. Aromatic hydroxylation as a potential means of measuring radical formation in vivo. *Biochem J* 1986, 273:499-502.
48. Güner G., Kökoğlu E., Güner A. Hydrogen peroxide detoxication by catalase in subcellular fractions of human brain tumors and normal brain tissues. *Cancer Letters* 1985, 27:221-224.
49. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* 1984, 219:1-4.

-
-
50. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol* 1990, 186:1-85.
 51. Halliwell B., Gutteridge J.M.C., Cross C.E. Free radicals, antioxidants and human disease: where are we now? *J Lab Clin Med* 1992, 119(6):598-620.
 52. Hara A., Yamada H., Sakai N., Hirayama H., Tanaka T., Mori H. Immunohistochemical demonstration of the placental form of glutathione S-transferase, a detoxifying enzyme in human gliomas. *Cancer* 1990, 66:2563-2568.
 53. Harris C. Individual variation among human in carcinogen metabolism, DNA adduct formation and DNA repair. *Carcinogenesis* 1989, 10:1563-1566.
 54. Hecker E., Fusening N., Marks W.T. *Carcinogenesis: A comprehensive survey. vol.7* New York, Raven Press, 1982.
 55. Hill A.S., Haut A., Cartwright G.E. and Wintrobe M.M. The role of non-hemoglobin proteins and reduced glutathione in the protection of hemoglobin from oxidation in vitro. *J Clin Invest* 1964, 43:17.
 56. Hoffman C.E.J., Webster N.R., Wiggins P.A. et al. Free radical detoxifying systems in human colorectal cancer. *Br J Cancer* 1985, 51:127-129.
 57. Hoffmann M.E., Meneghini R. Action of hydrogen peroxide on human fibroblasts in culture. *Photochem Photobiol* 1979, 30:151-155.
 58. Hossman K-A., Hürter T., Oschlies U. The effect of dexamethasone on serum protein extravasation and edema development in experimental brain tumors of cat. *Acta Neuropathol (Berl)* 1983, 60:223-231.
 59. Hughs H., Smith C., Tsokos-Kuhn J., Mitchell J. Quantitation of lipid peroxidation by gas chromatography mass spectrophotometry. *Anal Biochem* 1986, 152:107-112.
 60. Ikeda Y., Anderson J.H., Long D.M. Oxygen free radicals in the genesis of traumatic and peritumoral brain edema. *Neurosurgery* 1989, 24(5):679-685.
 61. Ivy G.O. Kanai S., Ohta M. et al. Lipofuscin-like substances accumulate in brain, retina, and internal organs with cysteine protease inhibition. In: Porta E.A. ed. *Lipofuscin and Ceroid Pigments*. New York: Plenum, 1989; pp.31-47.
 62. Kasai H., Nishimura S. Formation of 8-hydroxyguanosine in DNA by oxygen radicals and its biological significance. In: Sies H. ed. *Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants*, London: Academic Press 1991 pp. 99-116.
 63. Keele B.B., Mc Cord J.M., Fridovich I. Superoxide dismutase from *Escherichia Coli*. A new manganese-containing enzyme. *J Biol Chem* 1970, 245:6176-6181.
 64. Kensler T.W., Bush D.M., Kozumbo W.J. Inhibition of tumor promotion by a biomimetic superoxide dismutase. *Science* 1983, 221:75-77.
 65. Kensler T.W., Taffe B.G. Free radicals in tumor promotion. *Adv Free Radic Biol Med* 1986, 2:347-387.
 66. Kikugawa K., Beppu M. Involvement of lipid oxidation products in the formation of fluorescent and cross-linked proteins. *Chem Phys Lipids* 1987, 44:277-296.

67. Kneepkins C., Ferreira C., Lepage G., Roy C. The hydrocarbon breath test in the study of lipid peroxidation: principles and practice. *Clin Invest Med* 1992, 15:163-186.
68. Korpela H., Kinnunen E., Jintunen J., Kumpulainen J., Koskenvuo M. Serum selenium concentration, glutathione peroxidase activity and lipid peroxides in a co-twin control study on multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 1989, 91:79-84.
69. Koskiniemi M. Malignancy markers in the cerebrospinal fluid. *Eur J Pediatr* 1988, 148:3-8.
70. Kökoğlu E., Aktuğlu G., Belce A. Leukocyte superoxide dismutase levels in acute and chronic leukemia. *Leuk Res* 1989, 13:457-458.
71. Kuchino Y., Mori F., Kasai H., et al. Misreading of DNA templates containing 8-hydroxyguanosine at the modified base and at adjacent residues. *Nature* 1987, 327:77-79.
72. Kulmacz R., Miller J.J., Pendleton R., Lands W. Cyclooxygenase initiation assay for hydroperoxydes. *Methods Enzymol* 1990, 186:431-438.
73. Kuzombu W.J., Trush M.A., Kensler T.W. Are free radicals involved in tumor promotion? *Chem Biol Interact* 1985, 54:199-207.
74. Lampl Y., Paniri Y., Eshel Y., Saranova-Pinhas I. LDH isoenzymes in cerebral fluid in various brain tumors. *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry* 1990, 53:697-699.
75. Lang J., Esterbauer H. Oxidised LDL and atherosclerosis. In: Viyo-Pelfrey C ed. *Membrane Lipid Oxidation*. Boca Raton: CRC, 1991 pp.265-282.
76. Lesko S.A., Lorentzen R.J., Ts'O P.O.P. Role of superoxide in deoxyribonucleic acid strand scission. *Biochemistry* 1980, 19:3023-3028.
77. Levine R., Garland D., Oliver C., et al. Determination of carbonyl content of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 1990, 186:464-478.
78. Lichtor T., Dohrmann G.J. Oxidative metabolism and glycolysis in benign brain tumors. *J Neurosurg* 1987, 67:336-340.
79. Lowry O., Rosenbraugh N., Farr L., Randall R. Protein measurement with theophyllin-phenol reagent. *J Biol Chem* 1951, 183:265-275.
80. Marklund S.L., Holme E., Hellner L. Superoxide dismutase in extracellular fluids. *Clin Chim Acta* 1982, 126:41-51.
81. Marx G., Chevion M. Site-specific modification of albumin by free radicals. Reaction with copper II and ascorbate. *Biochem J* 1986, 236:397-400.
82. Mills G.C. Hemoglobin catabolism. 1. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protect hemoglobin from oxidative breakdown. *J Biol Chem* 1957, 229:189.
83. Mc Cay P.B., Gibson P.D., Fong K-L, Hornbrook K.R. Effect of glutathione peroxidase activity on lipid peroxidation in biological membranes. *Biochem Biophys Acta* 1976, 431:459-468.
84. Mc Cord J.M., Fridowich I. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocyte. *J Biol Chem* 1969, 244:6049-6055.

85. Moraes E.C., Keyse S.M., Tyrell R.M. The spectrum of mutations generated by passage of a hydrogen peroxide damaged shuttle vector plasmid through a mammalian host. *Nucleic Acid Res* 1989, 17:8301-8312.
86. Muehlematter D., Larsson R., Cerutti P. Active oxygen induced DNA strand breakage and poly ADP-ribosylation in promotable and non-promotable JB6 mouse epidermal cells. *Carcinogenesis* 1988, 9:239-245.
87. Nassi- Calo, Mello-Philko A.C., Meneghini R. o-phenantroline protects mammalian cells from hydrogen peroxide-induced gene mutation and morphological transformation. *Carcinogenesis* 1989, 10:1055-1057.
88. Nelson R.L. Dietary iron and colorectal cancer risk. *Free Radic Biol Med* 1992, 12:161-168.
89. Nishihide Y.N.K., Otu K. Increase of superoxide dismutase activity in various leukemia. *Physiol Chem Phys* 1979, 11:253-256.
90. Nyugen T., Brunson D., Cerepsi C.L., Penman B.W., Wishnok J.S., Tannenbaum S.R. DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992, 89:3030-3034.
91. Packer J.E., Slator T.F., Willson R.L. Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C. *Nature* 1979, 278:737-738.
92. Paggi M.G., Fanciulli M., Carlo C.D., Citro G., Carapella C.M., Floridi A. The membrane-bound hexokinase as a potential marker for malignancy in human gliomas. *J Neurosurg Sci* 1990, 34(3-4):209-213.
93. Paglia D.E. and Valentine W.N. Studies on the quantitative and qualitative characterisation of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab & Clin Med* 1967, 70(1):158-169.
94. Parthasarathy S., Young S.G., Witzum J.L., Pittman R.C., Steinberg D. Probucol inhibits oxidative modification of low density lipoprotein. *J Clin Invest* 1986, 77:641-644.
95. Patchell R.A., Ponsler J.B. Neurologic complications of systemic cancer. In: *Neurologic Clinics: neurooncology*, Philadelphia; Saunders, 1985, 3(4):729-750.
96. Perchellet J-P., Perchellet E.M. Antioxidants and multistage carcinogenesis in mouse skin. *Free Radic Biol Med* 1989, 7:377-408.
97. Persson L., Boethius J., Granowitz J.S., Kallander C., Lindgren L. Thymidine kinase in brain- tumor cysts. *J Neurosurg* 1985, 63:568-572.
98. Pezzano H., Podo F. Structure of binary complexes of mono- and polynucleotides with metal ions of the first transition group. *Chem Rev* 1980, 80:365-399.
99. Pitot H.C. Biological and enzymatic events in chemical carcinogenesis. *Annu Rev Med* 1979, 30:25-39.
100. Player T.J., Mills P.L., Horton A.A. Age dependent changes in rat liver microsomal and mitochondrial NADPH-dependent lipid peroxidation. *Biochem Biophys Res Commun* 1977, 78:397-402.
101. Poirier J., Kogan S., Gauthier S. Environment, genetics and idiopathic Parkinson's disease. *Can J Neurol Sci* 1991, 18:70-76.

-
-
102. Poli G., Albano E., Dianzani M.U. The role of lipid peroxidation in liver damage. *Chem Phys Lipids* 1987, 45:117-142.
 103. Prajda N., Morris H.P., Weber G. Imbalance in purine metabolism in hepatomas of different growth rates as expressed in behavior of xanthine oxidase (EC. 1.2.3.2). *Cancer Res* 1979, 36:4639-4646.
 104. Quindlen E.A., Bucher A.D. Correlation of tumor plasminogen activator with peritumoral cerebral edema. *J Neurosurg* 1987, 66:729-733.
 105. Reichman H.R., Farrel C.L., Del Maestro R.F. Effect of steroids and nonsteroid anti-inflammatory agents on vascular permeability in a rat glioma model. *J Neurosurg* 1986, 65:233-237.
 106. Richard P., Ehrenberg A. Ribonucleotide reductase: a radical enzyme. *Science* 1983, 221:514-519.
 107. Ross D. Glutathione, free radicals and chemotherapeutic agents. Mechanisms of free radical-induced toxicity and glutathione-dependent protection. *Pharmacol Ther* 1988, 37:231-243.
 108. Ross D., Moldeus P.R. Antioxidant defense systems and oxidative stress. In: Vigo-Pelfrey, ed. *Membrane Lipid Oxidation Vol.II* Boca Raton: CRC, 1991; pp. 151-170.
 109. Rubinstein L.J. Tumors of the central nervous system. *Atlas of Tumor Pathology* (2nd series, fassicle 6). Washington, D.C.: Armed Forces Intitute of Pathology, 1972.
 110. Russel D.S., Rubinstein L.J. *Pathology of tumors of the nervous system*. 5th. ed. Baltimore: Williams and wilkins, 1989.
 111. Salim A.S. Removing oxygen-derived free radicals delays hepatic metastases and prolongs survival in colonic cancer: a study in a rat. *Oncology* 1992, 49:58-62.
 112. Saran M., Mictel C., Bors W. Reactions of NO with O₂⁻. Implications for the action of endothelium-derived relaxing factor. *Free Radic Res Commun* 1989, 83:1705-1715.
 113. Sawada Y., Ohyama T., Yamazaki I. Preparation and physiochemical properties of green pea superoxide dismutase. *Biochem Biophys Acta* 1972, 268:305-311.
 114. Seccina M., Brasso O., Gravela E., Slater T.F., Cheeseman K.H. Exposure of Beta-L-crystallin of oxidising free radicals enhances its susceptibility to transglutaminase activity. *Biochem J* 1991, 274:869-873.
 115. Simic M.G. DNA damage, environmental toxicants, and rate of aging. *Environ Carcinog Ecotox Revs* 1991, C9:113-153.
 116. Simic M. Urinary biomarkers and the rate of DNA damage in carcinogenesis and anticarcinogenesis. *Mutation Res* 1992, 267:277-290.
 117. Simic M.G., Bergtold D.S. Dietary modulation of DNA damage in human. *Mutat Res* 250:17-24, 1991.
 118. Simpson J.A., Narita S., Gieseg S., Gebicki S., Gebicki J.M., Dean R.T. Long-lived reactive species on free-radical-damaged proteins. *Biochem J* 1992, 282:621-624.

-
119. Slaga T.J., Klein-Szantu A.J.P., Triplett L.L., Yotti L.P. and Trosko J.E. Skin tumor promoting activity of benzoyl peroxide, a widely used free radical generating compound. *Science* 1981, 213:1023-1025.
 120. Spector A. Aspects of the biochemistry of cataract. In: Haisel H., ed. *The Ocular Lens*. New York: Marcel Dekker, 1985; pp. 405-438.
 121. Stadtman E.R. Metal-ion catalyzed oxidation of proteins: biochemical mechanism and physiological consequences. *Free Radic Biol Med* 1990, 9:315-325.
 122. Stadtman E.R., Oliver C.N. Metal catalyzed oxidation of proteins. Physiological consequences. *J Biol Chem* 1991, 266:2005-2008.
 123. Stevens R.G., Nerishi K. Iron and oxidative damage in cancer. In: Spatz L., Bloom A.D., ed. *Biological consequences of oxidative stress: implications for cardiovascular disease and carcinogenesis*. New York: Oxford University Press; pp. 138-161.
 124. Stocker R., Bowry V.W., Frei B. Ubiquinol-10 protects human low density lipoprotein more efficiently against lipid peroxidation than those alpha-tocopherol. *Proc Natl Acad Sci* 1991, 88:1646-1650.
 125. Stocker R., Frei B. Endogenous antioxidant defences in human blood plasma. In: Sies H. ed. *Oxidative Stress: Oxidants and antioxidants*. London: Academic Press, 1991, pp.213-242.
 126. Stubble J. Ribonucleotide reductase: Amazing and confusing. *J Biol Chem*. 1990, 265:5329-5332
 127. Sun Y. Free radicals; antioxidant enzymes and carcinogenesis. *Free Radic Biol Med*. 1990, 8:583-599
 128. Sun Y., Oberley L.W., Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem*. 1988, 34(3):497-500
 129. Tkeshelashvili L.K., McBride T., Spence K., Loeb L.A. Mutation spectrum of copper induced DNA damage. *J Biol Chem*. 1991, 266:6401-6406
 130. Van Balgooy J.N.A., Roberts E. Superoxide dismutase in normal and malignant tissues in different species. *Comp Biochem Physiol* 1979, 62B:263-268.
 131. Vo T.K.O., Druetz C., Delzenne N. et al. Analysis of antioxidant defense systems during rat hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis* 1988, 9:2009-2013.
 132. Volicer L., Crino P.B. Involvement of free radicals in dementia of the Alzheimer type: a hypothesis. *Neurobiol Aging* 1990, 11:567-571.
 133. Walker A.E., Robins M., Weinfeld F.D. Epidemiology of brain tumors: the national survey of intracranial neoplasms. *Neurology* 1985, 35:226.
 134. Walsche F.M.R. Critical reviews; intracranial tumors. *Quart J Med* 1930-1931, 24:587.
 135. Wayner D., Burton G., Ingold K.U., Barclay L., Locke S. The relative contribution of vitamin E, urate, ascorbate and proteins to the total peroxy radical-trapping antioxidant activity of human blood plasma. *Biochem Biophys Acta* 1987, 924:408-419.
 136. Weber G., Hager J.C., Lui M.S. et al. Biochemical programs of slowly and rapidly growing human colon carcinoma xenograft. *Cancer Res* 1981, 41:854-859.

-
-
137. Weitberg A.B., Weitzman S.A., Destrempe M., Latt S.A., Stossel T.P. Stimulated human phagocytes produce cytogenetic changes in cultured mammalian cells. *N Eng J Med* 1983, 308:26-30.
 138. Weitzman S.A., Weitberg A.B., Clark E.P., Stossel T.P. Phagocytes as carcinogens: malignant transformation produced by human neutrophils. *Science* 1985, 227:1231-1233.
 139. Wendel A. Glutathione peroxidase. In: Jakoby W.B., Bend J.R., Caldwell J. ed. *Enzymatic Basis of Detoxication*. New York: Academic Press, 1980; pp. 333-348.
 140. Willet W.C., McMahon B. Diet and cancer- an overview. *N Eng J Med* 1984, 310:633-638.
 141. Witz G. Active oxygen species as factors in multistage carcinogenesis. *Proc Exp Biol Med* 1991, 198:675-682.
 142. Yagi K. Assay for blood plasma or serum lipid peroxides. *Methods Enzymol* 1984, 105:328-331.
 143. Yoshino K., Matsuura T., Sano M., Saiyo S., Tomita I. Fluorimetric liquid chromatographic determination of aliphatic aldehydes arising from lipid peroxides. *Chem Pharm Bull* 1986, 34:1694-1700.
 144. Ziegler S.K., Andrae U. Mutagenicity of hydrogen peroxide in V79 Chinese hamster cells. *Mutat Res* 1987, 192:65-67.
 145. Zengin N., Akyol Ö., Balcı M., Durak İ. Xanthine oxidase in human lens. Its possible role in cataractogenesis. *Tr J Med Sci* 1994, 20:91-93.

TEŐEKKÜR

Bu tezi hazırlamamda büyük katkıları bulunan Doç. Dr. İlker Durak'a, yardımlarını esirgemeyen bölüm başkanımız Prof. Dr. Zühal Yurtarlanı'na materyal toplama işinde bana yardımcı olan Dr. Rafet Arslanođlu, Dr. Hakan Ulucan ve Dr. Metin Özsoylu'ya teşekkürü borç bilirim.