

**ASETİLSALİSİLİK ASİT VE
SELENYUMUN, RATLARDA (*Wistar
albino*) CİSPLATİN İLE İNDÜKLENMİŞ
HİSTOLOJİK DEĞİŞİKLİKLER
ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCE YAPI
DÜZEYİNDE ARAŞTIRILMASI**

SEVCAN MERCAN

**DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ASETİLSALİSİLİK ASİT VE SELENYUMUN, RATLARDA (*Wistar albino*)
CİSPLATİN İLE İNDÜKLENMİŞ HİSTOLOJİK DEĞİŞİKLİKLER
ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCE YAPI DÜZEYİNDE ARAŞTIRILMASI**

SEVCAN MERCAN

DOKTORA TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

AKADEMİK DANIŞMAN

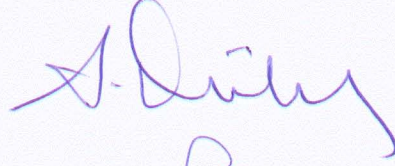
Yrd. Doç. Dr. Banu EREN

SAMSUN 2010

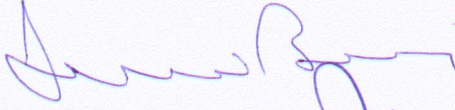
T.C
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Bu çalışma jürimiz tarafından 04/02/2010 tarihinde yapılan sınav ile BİYOLOJİ Anabilim Dalı'nda DOKTORA tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof.Dr. Adem GÜLEL



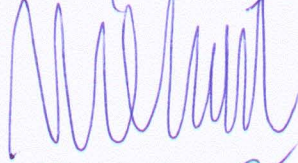
Üye: Prof.Dr. Sancar BARIŞ



Üye: Prof.Dr. Haluk KEFELİOĞLU



Üye: Prof.Dr. Mehmet ERSOY



Üye: Yrd.Doç.Dr. Banu EREN



ONAY:

Yukarıda adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

...../...../ 2010

Prof.Dr. Hasan GÜMÜŞ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

**ASETİLSALİSİLİK ASİT VE SELENYUM’UN, RATLARDA (*Wistar albino*)
CİSPLATİN İLE İNDÜKLENMİŞ HİSTOLOJİK DEĞİŞİKLİKLER
ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCE YAPI DÜZEYİNDE ARAŞTIRILMASI**

ÖZET

Bu çalışmada, sitotoksik etkisi bilinen, antineoplastik ajan olan cisplatinin karaciğerde meydana getirdiği histolojik değişiklikler ve bu değişiklikler üzerine antioksidan özellikleri bilinen asetilsalisilik asit (ASA) ve selenyumun etkileri ışık ve elektron mikroskobu düzeyinde araştırılmıştır.

Bu amaçla Kontrol, Cisplatin, ASA, SEL, Cisplatin+SEL, Cisplatin+ASA, Cisplatin+ASA+SEL grupları olmak üzere 7 grup oluşturulmuştur. Ratlara (*Wistar albino*) tek doz 10 mg/kg cisplatin, 5 mg/kg/gün asetilsalisilik asit, 1 mg/kg/gün selenyum intraperitoneal yolla enjekte edilmiştir. Hayvanlar, 1., 2., 4., 7. ve 14. günlerde servikal dislokasyon yöntemiyle sakrifiye edilerek karaciğerleri ışık ve elektron mikroskobik incelemeler için çıkarılmıştır.

Işık mikroskobik incelemeler için karaciğerler %10’luk tamponlanmış formaldehit, elektron mikroskobik incelemeler için % 2.5’luk gluteraldehit ile fikse edilmiştir. Işık ve elektron mikroskobu için rutin histolojik işlemler uygulanmış, ışık mikroskobik gözlemler için hematoksilen-eozin boyama, Masson’un üçlü boyaması, periyodik Asit-Schiff (PAS) boyama ve periyodik asit-Schiff diastaz (PAS-D) boyama uygulanmıştır. Transmisyon Elektron Mikroskobik görüntüler elde edilmiştir.

Çalışmamızdan elde edilen sonuçlara göre, ışık mikroskobik bulgulara cisplatin gruplarında hidropik değişiklikler, inflamasyon odakları, sitoplazma yoğunluğunda değişiklikler, sinüzoidlerde genişlemeler, hepatositlerde ve çekirdeklerinde büyüklük farklılıkları gibi değişiklikler belirlendi. Cisplatin ile birlikte antioksidan uygulaması yapılan gruplardan Cisplatin+SEL ve Cisplatin+ASA gruplarında cisplatin gruplarında gözlenen değişiklikler kadar belirgin olmamakla birlikte değişiklikler gözlemlendi. Cisplatin+ASA+SEL gruplarında değişiklikler belirgin değildi.

Transmisyon Elektron Mikroskobik bulgulara göre cisplatin gruplarında çekirdek şeklinde ve kromatin içeriğinde, mitokondri ve endoplazmik retikulum yapısında, glikojen dağılımında değişiklikler gözlemlendi. Cisplatin+ASA, Cisplatin+SEL ve

Cisplatin+ASA+SEL gruplarında gözlenen değışiklikler cisplatin gruplarındaki kadar belirgin değildi.

Bu bulgular, antioksidan özelliğı olan ASA ile selenyumun, cisplatinin serbest radikal oluşumunu indükleyerek karaciğerde meydana getirdiğı oksidatif hasar üzerinde koruyuculuk sağlayabildiğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Cisplatin, Asetilsalisilik asit, Selenyum, Karaciğer, Histolojik değışiklikler

**ANALYSIS OF THE EFFECT OF ACETYLSALICYLIC ACID AND
SELENIUM ON CISPLATIN-INDUCED HISTOLOGICAL CHANGES AT THE
ULTRASTRUCTURAL LEVEL IN RATS (*Wistar albino*)**

ABSTRACT

Histological changes in the liver caused by cisplatin, which is an anti-neoplastik agent with known sitotoxic effects, and the effects of Acetylsalicylic acid (ASA) and selenium, which are known for antioxidant effects, were studied in this research under light and electron microscopy.

Seven groups were formed as Control, Cisplatin, ASA, SEL, Cisplatin+ASA, Cisplatin+SEL, Cisplatin+ASA and SEL groups. 10 mg/kg single dose cisplatin, 5 mg/kg/day ASA, 1 mg/kg/day selenium were injected to rats (*Wistar albino*) intraperitonally. They were sacrificed by servical dislocation after 1st, 2nd, 4th 7th and 14th days and their livers were removed for light and electron microscopy analysis.

Their livers were fixed in 10% buffered neutral formalin for light microscopy and in 2.5% glutaraldehyde for electron microscopy analysis. After routine histological processes for light and electron microscopy analysis, sections were stained with hematoxilen-eosin (H-E), Masson's trichrome and periodic asit-Schiff diastase (PAS-D) for light microscopic examination. Transmission electron microscopy visions were reported.

As a result, histopathological changes such as hydropic degeneration, cell inflammation, modification in hepatocytes, differences in cytoplasm density, sinusoidal dilatation, size differences in hepatocytes and in their nucleuses were determinated. In Cisplatin+SEL groups and Cisplatin+ASA groups changes were reported though they were not as distinct as the cisplatin groups. There were not clear histological changes in Cisplatin+ASA and SEL groups.

Ultrastructural changes such as differences in conformation of mitochondria and endoplasmic reticulum, shape and choromatin intensity of nucleus and glycogen distribution were observed in cisplatin groups. In Cisplatin+ASA, Cisplatin+SEL and

Cisplatin+ASA and SEL groups changes were reported though they were not as distinct as cisplatin groups.

The results demonstrate that acetylsalicylic acid and selenium which have antioxidant effects induce free radical formation of cisplatin, therefore reduce the oxidative damage and provide protection in liver.

Keywords: Cisplatin, Acetylsalicylic acid, Selenium, Liver, Histological changes

TEŞEKKÜR

Akademik çalışmalarımın tümünde olduğu gibi bu tez çalışmasının da yürütülmesi ve sonuçlandırılmasındaki hoşgörülü rehberliği ve desteği için Danışmanım, hocam, Yrd.Doç.Dr. Banu EREN’e öncelikle teşekkür etmek isterim.

Tez çalışması süresince değerli fikirleri ile bana yol gösteren, Tez İzleme Komitesi’nde yer alan hocalarım, Prof. Dr. Adem GÜLEL’e ve Prof. Dr. Sancar BARIŞ’a yürekten teşekkür ediyorum.

Değerli hocalarım ve sevgili dostlarım ihtiyaç duyduğum her an yardımlarını esirgememişlerdir. Prof. Dr. Zafer EREN, Prof. Dr. Seyhun SOLAKOĞLU, Arş. Gör. Dilek SAĞIR, Doktora Öğrencisi Burcu DEMİREL, Doktora Öğrencisi Ayşe BAŞARDI, Arş. Gör. Gülhan ATAGÜN, Arş. Gör. İrem GÜRKANLI, Arş. Gör. Günnur DEMİRCAN, Arş. Gör. Özgür VARER İŞİTAN’a, Arş. Gör. Emel DEMİR’e ve Uzman Biyolog Hilal ALTINKAYNAK’a sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Ayrıca, çalışmamda kullandığım hayvanların sağlanmasında ve bakımında yardımcı olan O.M.Ü Tıbbi ve Cerrahi Araştırma Laboratuvarı’nın tüm çalışanlarına çok teşekkür ediyorum.

Lisans, Yüksek Lisans ve Doktora eğitimimi tamamladığım O.M.Ü Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’ndeki hocalarıma ve arkadaşlarıma teşekkür ediyorum.

Ve son olarak; sevgili annem ve babam; Reşide-Ramazan TÜLEK’e, ablam Sevtap TÜLEK’e ve eşim Levent MERCAN’a yürekten teşekkür ediyorum.

Ocak, 2010

Samsun

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET.....	I
ABSTRACT.....	III
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER.....	VI
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	IX
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	XI
ÇİZELGELER LİSTESİ.....	XIII
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	7
2.1. Hücre Zedelenmesi ve Nedenleri.....	7
2.1.1. Oksijen Yetersizliği (Hipoksi)	8
2.1.2. Kimyasal Etkenler.....	8
2.1.3. Fiziksel Etkenler.....	9
2.1.4. Enfeksiyöz Etkenler.....	10
2.1.5. İmmünolojik Reaksiyonlar.....	10
2.1.6. Genetik Bozukluklar.....	10
2.1.7. Beslenme Dengesizlikleri.....	10
2.1.8. Yaşlanma.....	11
2.2. Hücre Zedelenme Şekilleri ve Morfolojileri.....	12
2.2.1. Geri Dönüşümlü Hücre Zedelenmesi.....	12
2.2.2. Geri Dönüşümsüz Hücre Zedelenmesi.....	14
2.2.2.1. Nekroz ve Morfolojik Tipleri.....	14
2.2.2.2. Apoptozis.....	18
2.3. Hücre Zedelenmesinde Moleküler Hedefler	20
2.3.1. ATP Azalması	21
2.3.2. Oksijen Kaynaklı Serbest Radikaller	21
2.3.3. Hücre Membran Bütünlüğünün Bozulması	21
2.3.4. Kalsiyum Homeostazının Kaybı	22
2.3.5. Mitokondriyal Hasar	22
2.3.6. Fonksiyonel ve Yapısal Proteinler	23
2.4. Hücre Zedelenme Mekanizmaları	23
2.4.1. İskemik ve Hipoksik Zedelenme	23
2.4.2. İskemi/Reperfüzyon Zedelenmesi	24
2.4.3. Serbest Radikallerle Oluşan Hücre Zedelenmesi	25
2.5. Oksijen Radikalleri	25
2.6. Reaktif Oksijen Türleri (ROT) Üretim Yerleri	27
2.6.1. Mitokondri	28
2.6.2. Endoplazmik Retikulum.....	28
2.6.3. Mikroadiler	28
2.6.4. Plazma Membranları	29
2.7. Reaktif Oksijen Türleri ve Oksidatif Stres	29
2.7.1. Oksijen Radikallerinin Bazı Önemli Biyomoleküllerle Tepkimeleri	30
2.7.1.1. Lipid Peroksidasyonu ve Önemi	30
2.7.1.2. Proteinlerin Oksidasyonu	32

	Sayfa No:
2.7.1.3. DNA'nın Oksidasyonu	33
2.8. Reaktif Oksijen Türleri ve Diğer Serbest Radikallere Karşı Antioksidan Savunma Sistemleri.....	33
2.9. Karaciğer.....	36
2.9.1. İlaç ve Toksine Bağlı Karaciğer Hasarları.....	39
2.10. Kanser.....	41
2.11. Cisplatin.....	44
2.11.1. Cisplatinin Etki Mekanizması.....	44
2.11.2. Cisplatin ve Hepatotoksisite.....	47
2.12. Kanser Kemoterapisi ve Antioksidanlar.....	49
2.13. Antioksidanların Terapötik Kullanımı.....	49
2.14. Asetilsalisilik Asit.....	50
2.14.1. Asetilsalisilik Asit Metabolizması.....	51
2.14.2. Asetilsalisilik Asitin Antioksidan Özelliği.....	53
2.15. Selenyum.....	54
2.15.1. Selenyum Eksikliği ve Etkileri	56
2.15.2. Selenoproteinler	57
3. MATERYAL VE METOD.....	58
3.1. Hayvan Materyali.....	58
3.2. Hayvanlara Uygulanan Maddeler.....	58
3.3. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	59
3.4. Çalışmada Kullanılan Aletler.....	59
3.5. Deney Protokolü.....	60
3.5.1. Araştırma Gruplarının Oluşturulması.....	60
3.5.2. Enjeksiyon İşlemi ve Hayvanların Sakrifikasyonu.....	61
3.5.3. Karaciğerlerin Perfüzyonu, Çıkarılması ve Fiksasyonu... ..	62
3.5.4. Işık Mikroskopik İncelemeler İçin Yapılan İşlemler.....	64
3.5.4.1. Doku Takibi ve Dokuların Parafine Gömülmesi	64
3.5.4.2. Parafin Bloklardan Kesit Alınması.....	64
3.5.4.3. Kesitlerin Boyanması.....	64
3.5.5. Transmisyon Elektron Mikroskopik İncelemeler İçin Yapılan İşlemler.....	69
3.5.5.1. Fiksasyon ve Post Fiksasyon.....	69
3.5.5.2. Dehidratasyon.....	69
3.5.5.3. Dokuların Araldit Resin İçerisine Gömülmesi... ..	70
4. BULGULAR.....	72
4.1. Işık Mikroskopik Bulguların Değerlendirilmesi.....	72
4.1.1. Kontrol Gruplarının Karaciğer Histolojisi.....	72
4.1.2. Cisplatinin Karaciğer Üzerindeki Histolojik Etkileri.....	73
4.1.3. ASA'nın Karaciğer Üzerindeki Histolojik Etkileri	74
4.1.4. Selenyumun Karaciğer Üzerindeki Histolojik Etkileri.....	75
4.1.5. Cisplatin+ASA'nın Karaciğer Üzerindeki Histolojik Etkileri.....	76
4.1.6. Cisplatin +Selenyumun Karaciğer Üzerindeki Histolojik Etkileri.....	77
4.1.7. Cisplatin+ASA+Selenyumun Karaciğer Üzerindeki Histolojik Etkileri.....	78

	Sayfa No:
4.2. Elektron Mikroskopik Bulguların Değerlendirilmesi.....	93
4.2.1. Kontrol Gruplarının Karaciğer İnce Yapısının Değerlendirilmesi.....	93
4.2.2. Cisplatin Gruplarının Karaciğer İnce Yapısının Değerlendirilmesi.....	93
4.2.3. ASA Gruplarının Karaciğer İnce Yapısının Değerlendirilmesi.....	94
4.2.4. Selenyum Gruplarının Karaciğer İnce Yapısının Değerlendirilmesi.....	95
4.2.5. Cisplatin+ASA Gruplarının Karaciğer İnce Yapısının Değerlendirilmesi.....	95
4.2.6. Cisplatin+Selenyum Gruplarının Karaciğer İnce Yapısının Değerlendirilmesi.....	96
4.2.7. Cisplatin+ASA+Selenyum Gruplarının Karaciğer İnce Yapısının Değerlendirilmesi.....	97
5. TARTIŞMA.....	108
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	113
7. KAYNAKLAR.....	114
ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

DNA	: Deoksiribonükleik Asit
NAG	: N-asetil-beta-D-glukoz aminidaz
MDA	: Malondialdehit
NAG	: N-asetil-beta-D-glukoz aminidaz
ATP	: AdenozineThreePhosphate
ER	: Endoplazmik Retikulum
TEM	: Transmisyon Elektron Mikroskobu
SEM	: Tarayıcı Elektron Mikroskobu
ROT	: Reaktif Oksijen Türleri
O ₂	: Oksijen
HO ₂ [·]	: Hidroperoksil Radikali
O ₂ ^{·-}	: Süperoksit radikali
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
OH	: Hidroksil radikali
H ₂ O	: Su molekülü
HOCl	: Hipoklorik Asit
ROO [·]	: Peroksil Radikali
RO [·]	: Alkoksil radikal
HQ	: Semikinon radikal
NO ₂	: Azot dioksit
O ₃	: Ozon
LOOH	: Lipit hidroperoksit
HOX	: Hipohaloze asit
R-NH-X	: N-Halojenli aminler
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
I/R	: İskemi Referfüzyon
SOD	: Süperoksitdismutaz
GSH-Px	: Glutatyon Peroksidaz
CAT	: Katalaz
Fe ³⁺ ,	: Demir iyonu
Cu ²⁺ ,	: Bakır iyonu
Hem	: Hemoglobin

CoQ	: Coenzim Q
RNA	: Ribonükleik Asit
$\text{cis}-(\text{NH}_3)_2\text{PtCl}_2$	: Cisplatin [cis-diamminedichloroplatinum (II)]
ALT	: Alanin aminotransferaz
AST	: Aspartat aminotransferaz
ASA	: Asetilsalisilik Asit
TXA2	: Tromboksan A2
TXB2	: Tromboksan B2
PGI ₂	: Prostoglandin
HO-1	: Hem oksijenaz-1
NO	: Nitrik oksit
CO	: Karbonmonoksit
NAG	: N-Asetil- β -D Glukozamin
Se	: Selenyum
Na_2SeO_3	: Sodyum selenit
OsO_4	: Osmiumtetraoksit
NaCl	: Sodyumklorür
Na_2HPO_4	: Disodyumhidrojen fosfat
NaH_2PO_4	: Sodyumdihidrojen fosfat
KH_2PO_4	: Potasyumdihidrojen fosfat
μm	: Mikrometre
H-E	: Hematoksilen-Eozin
PAS	: Periyodik Asit-Schiff
PAS-D	: Periyodik Asit-Schiff-Diastaz
ml	: Mililitre
$^{\circ}\text{C}$	: Santigrad derece
Se-GSH-Px	: Selenyum bağımlı glutatyon peroksidaz
Sec	: Selenosistein

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil No	Şekil Adı	Sayfa No
2.1.	Hücresel fonksiyon, geri dönüşümsüz hücre zedelenmesi ve hücre zedelenmesinin morfolojik değişiklikleri arasındaki ilişki.....	12
2.2.	Karaciğerde hidropik değişiklikler.....	13
2.3.	Karaciğerde hidropik değişiklikler.....	13
2.4.	(A) Karaciğer parankimal hücrelerinde nekroz, (B) Karaciğerde geniş nekrozlu bir alanın görünümü.....	16
2.5.	Beyinde likefaksiyon nekrozun mikroskopik görüntüsü (A-B).....	16
2.6.	Akciğerde kazaöz nekrozun mikroskopik görünümü.....	17
2.7.	Pankreasdaki yağlı nekrozun mikroskopik görüntüsü.....	17
2.8.	Yüzey boğumlanması ve apoptotik çekirdek morfolojisinin TEM görüntüsü	19
2.9.	Apoptotik cisimciklerin elektron mikroskopik görüntüsü (A), Apoptotik Epitelial Hücreler, SEM (Tarayıcı Elektron Mikroskobu) görüntüleri(B)	19
2.10.	Apoptotik hücreleri temizleyen makrofajlar.....	20
2.11.	Hücre zedelenmesinde sitoplazmik kalsiyumun artışı ve sonuçları.....	22
2.12.	İskemik zedelenmede ATP sentezindeki azalma sonucu hücresel sistemler üzerindeki etkisi.....	24
2.13.	Serbest radikallerin normal koşullarda hücrede oluşum bölgeleri.....	27
2.14.	Hücre membranında lipit peroksidasyonu.....	30
2.15.	Karaciğerde kan damarları ve kanallar.....	36
2.16.	Karaciğerde klasik ve portal lobül.....	38
2.17.	Karaciğerde portal üçgen.....	38
2.18.	Cisplatinin kimyasal yapısı.....	44
2.19.	Cisplatinin DNA'ya bağlanması.....	45
2.20.	Cisplatinin hücre içine girişi ve DNA'ya bağlanması.....	46
2.21.	ASA'nın yapısal formülü.....	51
2.22.	ASA aktif bölgeye yakın olan serin aminoasitini asetilleyerek siklooksijenazı inhibe eder.....	53
2.23.	Bitki ve Hayvanlarda Selenyumun Alımı.....	55
3.1.	<i>Swiss albino</i> tipi Laboratuvar Hayvanı.....	58
3.2.	Hayvanlara uygulanan enjeksiyon işlemi.....	61
3.3.	A) Rat karaciğerinin perfüzyondan önceki görüntüsü B) Rat karaciğerinin perfüzyondan sonraki görüntüsü.....	62
3.4.	Perfüzyonu yapılmamış ve yapılmış karaciğerlerin mikroskopik görüntüsü.....	63
3.5.	Silikon kalıplarda araldit resin içerisine yerleştirilmiş olan dokular.....	70
4.1.	Kontrol grubunda karaciğerin histolojik görünümü.....	79
4.2.	Kontrol grubunda karaciğerde hepatositlerde glikojen taneciklerinin görünümü.....	80
4.3.	Kontrol grubunda portal alan etrafındaki bağ dokusunun görünümü.....	81
4.4.	Cisplatin 2. gün grubunda karaciğerin histolojik görünümü.....	82
4.5.	Cisplatin 4. gün grubunda karaciğerin histolojik görünümü.....	83
4.6.	Cisplatin 7. gün grubunda karaciğerin histolojik görünümü.....	84
4.7.	Cisplatin 14. gün grubunda karaciğerin histolojik görünümü.....	85

Şekil No	Şekil Adı	Sayfa No
4. 8.	Cisplatin 7. gün grubunda hepatositlerdeki glikojen taneciklerinin görünümü.....	86
4.9.	Cisplatin 4. gün grubunda karaciğerde portal alan çevresindeki bağ dokusu görünümü.....	87
4.10	ASA 7. gün grubunda karaciğerin histolojik görünümü.....	88
4.11.	SEL 7. gün grubunda karaciğerin histolojik görünümü.....	89
4.12.	Cisplatin+ASA 4. gün grubunda karaciğerin histolojik görünümü.....	90
4.13.	Cisplatin+SEL 14. gün grubunda karaciğerin histolojik görünümü.....	91
4.14.	Cisplatin+ASA+SEL 7. gün grubunda karaciğerin histolojik görünümü..	92
4.15.	Kontrol grubunun karaciğer elektronmikrografı.....	98
4.16.	Kontrol grubunun karaciğer elektronmikrografı.....	99
4.17.	Cisplatin 4. gün grubunun karaciğer elektronmikrografı.....	100
4.18.	Cisplatin 7. gün grubunun karaciğer elektronmikrografı.....	101
4.19.	Cisplatin 14. gün grubunun karaciğer elektronmikrografı.....	102
4.20.	ASA 4. gün grubunun elektronmikrografı.....	103
4.21.	SEL 4. gün grubunun karaciğer elektronmikrografı.....	104
4.22.	Cisplatin+ASA 14. gün grubunun elektronmikrografı.....	105
4.23.	Cisplatin + SEL 14. gün grubunun karaciğer elektronmikrografı.....	106
4.24.	Cisplatin+ASA + SEL 7.gün grubunun karaciğer elektronmikrografı.....	107

ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelge No	Çizelge Adı	Sayfa No
2.1.	Reaktif oksijen türleri (ROT).....	27
2.2.	Selenoproteinler ve fonksiyonları.....	57
3.1.	Çalışma Grupları ve Hayvan Sayıları.....	60
3.2.	Dehidratasyon aşamaları ve süreleri.....	70
4.1.	Cisplatin gruplarının yarı kantitatif değerlendirilmesi.....	73
4.2.	ASA gruplarının yarı kantitatif değerlendirilmesi.....	74
4.3.	SEL gruplarının yarı kantitatif değerlendirilmesi.....	75
4.4.	CİS+ASA gruplarının yarı kantitatif değerlendirilmesi.....	76
4.5.	CİS+SEL gruplarının yarı kantitatif değerlendirilmesi.....	77
4.6.	CİS+ASA+SEL gruplarının yarı kantitatif değerlendirilmesi.....	78
4.7.	Cisplatin gruplarının ince yapısının yarı kantitatif değerlendirilmesi.....	94
4.8.	ASA gruplarının ince yapısının yarı kantitatif değerlendirilmesi	94
4.9.	SEL gruplarının ince yapısının yarı kantitatif değerlendirilmesi	95
4.10.	Cisplatin+ASA gruplarının ince yapısının yarı kantitatif değerlendirilmesi.....	96
4.11.	Cisplatin+SEL gruplarının ince yapısının yarı kantitatif değerlendirilmesi.....	96
4.12.	Cisplatin+ASA+SEL gruplarının ince yapısının yarı kantitatif değerlendirilmesi.....	97

1. GİRİŞ

Vücudun tüm dokularında ortaya çıkabilen kanser türleri günümüzde önemini gittikçe artırmaktadır. Dünya genelinde kanser türleri ile ilgili erken tanı, nedenlerinin ortaya çıkarılması, patogenezinin açıklanması ve yeni tedavi şekilleri için ilaçların geliştirilmesi üzerine yapılan çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Bunun yanında kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılan antineoplastik ilaçların etkinliğini artırmak ve yan etkilerini azaltmak için yapılan çalışmalar da artarak devam etmektedir (Söğüt ve ark., 2004).

Cisplatin (cis-diamminedichloroplatinum (II), CDDP), üretilmeye başlandığı 70’li yıllardan beri çeşitli kanser tedavilerinde yaygın şekilde kullanılan güçlü bir kemoterapötik ajandır. Doza bağlı olarak sitotoksik etkiye sahip olabilmektedir. Yüksek antitümoral etkisinin yanı sıra klinik kullanımını sınırlayan önemli yan etkileri de bulunmaktadır. Cisplatin ile yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarla bu ajanın serbest radikallerin düzeyini artırdığı gösterilmiştir (Tarladaçalışır ve ark., 2005, Koç ve ark., 2005; Rybak ve ark., 2006).

Antikanser ilaçların yan etkilerinin görülmesiyle bazı alternatif denemeler yapılmaktadır. Çok etkili olan bir ilaç yerine daha az etkili bir ilacın kullanılması gibi tedavi protokolü değiştirilerek denemeler yapılmıştır. Diğer bir yol olarak tedavi dozunda kısıtlamaya gidilmesidir. Bu durum tümör dokusunun istenilen oranda sınırlandırılmasına engel olabilmektedir. Bir diğer seçenek ise ilacın istenmeyen yan etkilerini önleyecek veya azaltacak başka bir ajanın kullanılmasıdır (Weichert-Jacobsen ve ark., 1999).

Cisplatin yaygın olarak kullanılan bir antikanser ilacıdır. Etkileri birçok tümörde özellikle; boyun, baş, testis, ovaryum, mesane, böbrek üzerindeki tümörlerde gösterilmesine karşın yüksek doz cisplatinin karaciğer, böbrek ve testis gibi birçok farklı dokularda hasara neden olabildiği gösterilmiştir (Ateşşahin ve ark., 2006). Cisplatin hücre içersine girdiğinde pozitif yüklenir ve nükleofilik moleküller olan DNA, RNA ve proteinlerle etkileşir. Sitotoksitesini; DNA ile etkileşime girerek, hem RNA’nın transkripsiyonunu hem de DNA’nın replikasyonunu engelleyerek, hücre döngüsünü durdurarak ve apoptozis ile gösterir (Ho ve ark., 2003). Cisplatin, lipid

peroksidasyonuna neden olarak oksidatif hasara karşı dokuları koruyan enzimlerin aktivitesinin azalmasına neden olmaktadır (Ateşşahin ve ark., 2006).

Bazı bileşiklerin antioksidan aktivitesinin, cisplatinin neden olduğu oksidatif karaciğer hasarında koruyucu etkisi olduğu yapılan çalışmalarla desteklenmiştir (Santos ve ark., 2007). E vitamini, selenyum, C vitamini, karotenoidler gibi antioksidanların uygulanması cisplatinin neden olduğu hasara karşı dokunun korunmasını sağlar (Ateşşahin ve ark., 2006).

Ajith ve ark., (2006) tek doz 10 mg/ kg cisplatin intraperitoneal yolla enjekte ederek yaptıkları çalışmada böbrek antioksidan enzim aktivitelerinin cisplatin gruplarında önemli oranda düştüğünü belirlemişlerdir. Cisplatin ile birlikte askorbik asit ve α tokoferol uyguladıkları gruplarda bu antioksidan maddelerin koruyuculuğunu gözlemişlerdir.

Cisplatinin neden olduğu toksisitenin mekanizmasını aydınlatmaya yönelik yapılan çalışmalar cisplatinin neden olduğu çeşitli toksisitenin serbest radikaller veya reaktif oksijen türleri ile ilgili olduğunu göstermektedir.

Hücrel yaşamın sürekliliği karmaşık biyokimyasal reaksiyonların denge içinde yürütmesine bağlıdır. Bu dengeyi bozacak yönde ortaya çıkan endojen veya eksojen kaynaklı faktörler hücre zedelenmesine yol açarlar (Aksoy, 2002). Organizma farklı özellikler taşıyan hücrelerin oluşturduğu, farklı doku ve organlardan oluşur. Organlarda meydana gelecek hasarın tüm şekilleri hücrede moleküler ve yapısal değişikliklerin meydana gelmesi ile başlar (Şen, 2005).

Hücrelerde çeşitli sebeplerle meydana gelebilecek hasar, hücre yapısında ve fonksiyonunda değişiklik olarak kendini gösterir. Bu değişiklikler, hücrelerin normal fizyolojik adaptif mekanizmasını karşılamak için hücrelerin maruz kaldığı etkiler sonucunda gerçekleşir. Hücre zedelenmesi, iskemik ve hipoksik zedelenme, iskemi/reperfüzyon zedelenmesi ve serbest radikallerle oluşan hücre zedelenmesi olmak üzere üç farklı mekanizma ile meydana gelmektedir. Serbest radikaller aracılığıyla gelişen hücre zedelenmesinde özellikle membran lipid peroksidasyonu, DNA parçalanması ve proteinlerin çapraz bağlanması rol oynar (Kumar ve ark., 1999).

Serbest radikaller, hücrelerin lipid, protein, DNA, karbonhidrat ve enzim gibi tüm önemli bileşenlerine karşı zararlı etkiler göstermektedirler. Mitokondrilerdeki geçirgenliği bozmakta, hücrenin potasyum kaybını ve trombosit agregasyonunu artırmaktadır (Halliwell, 1994). Serbest radikaller son derece kararsız moleküllerdir.

Hızlı bir şekilde zincir reaksiyonları ile daha fazla serbest radikal oluşturmak üzere diğer bileşiklerle reaksiyona girerler. Yüksek konsantrasyondaki reaktif radikallerin lipid peroksidasyonu, protein modifikasyonu ve DNA fragmentasyonuna neden olarak biyolojik molekülleri yıktığı bilinmektedir (White ve Heckler, 1990).

Hara ve ark., (2001), cisplatinin böbrek dokusunda neden olduğu hasar üzerine melatoninin etkisini araştırmışlardır. Bunun için 7 mg/kg cisplatin tek doz olarak enjekte edilmiş ve glutatyon peroksidaz, protein, platinum ölçümleri yapılmış ve böbrek histolojik olarak değerlendirilmiştir.

Söğüt ve ark., (2004), 10 mg/kg cisplatin enjekte ederek böbrek toksisitesi oluşturdukları ratlarda E vitaminin toksisite üzerine etkisini araştırmışlardır.

Cisplatinin yan etkileri doza bağımlı olarak gözlenmektedir. Miyamoto ve Miyamoto'nun (2004), 3 mg/kg cisplatin uygulayarak yaptıkları çalışmada düşük doz cisplatinin böbrek üzerinde nefrotoksositeye neden olduğu halde ince barsak mukozasında değişikliğe neden olmadığını göstermişlerdir.

Koç ve ark., (2005), 10 mg/kg intraperitoneal yolla cisplatin uygulayarak yaptıkları çalışmada 5 günlük periyotta antioksidan enzimler ve lipid peroksidasyonu üzerine cisplatinin etkilerini moleküler ve histolojik olarak değerlendirmişlerdir.

Ateşşahin ve ark., (2006), 7 mg/kg cisplatin tek doz intraperitoneal yolla enjekte ederek yaptıkları çalışmada kısa dönem (5 gün) ve uzun dönem (50 gün) olarak testis üzerinde yaptıkları incelemelerde cisplatinin epididimis, seminal vezikül ve prostat ağırlıkları, sperm hareketliliği, sperm konsantrasyonu, sperm morfolojisi üzerine etkilerini değerlendirmişlerdir. Cisplatinin etkileri üzerine melatoninin etkisini araştırmışlardır.

Pratibha ve ark., (2006), yaptıkları çalışmada 8 hafta boyunca ratlara günlük 0.4 mg/kg cisplatin intraperitoneal olarak verilmiş ve karaciğerde meydana gelen oksidatif hasar enzimatik olarak değerlendirilmiştir.

İşeri ve ark., (2007), yapmış oldukları çalışmada cisplatinin lipid peroksidasyonunda artışa neden olduğunu, antioksidan enzim aktivitelerinde düşüşe neden olduğunu ve böbrek ve karaciğerde histolojik değişikliklerin meydana geldiğini göstermişlerdir.

Liu ve ark. (2008), intravenöz yolla 8 mg/kg cisplatin tek doz uygulayarak ratlarla yaptıkları çalışmada böbrek dokusunda çeşitli proteinler, üriner N-asetil-beta-D-glukoz aminidaz (NAG), antioksidant enzimler ve apoptozis değerlendirilerek cisplatinin neden olduğu nefrotoksosite belirlenmeye çalışılmıştır.

Liao ve ark., (2008), farelerle yaptıkları çalışmada 3.5 mg/kg cisplatin 5 gün boyunca intraperitoneal olarak uygulanmış ve karaciğerdeki hasar glutatyon peroksidaz ve Malondialdehit (MDA) seviyeleriyle değerlendirilmiştir. Cisplatinin karaciğerde oksidatif hasara neden olduğu ve bu hasar üzerinde çeşitli maddelerin hasarı indirgeyici rol oynadığı ortaya çıkarılmıştır.

Sohn ve ark. (2008) yüksek doz cisplatinin karaciğerde hepatik lezyonlara neden olduğunu göstermişlerdir. Karahan ve ark. (2006), yapmış oldukları çalışmada cisplatinin karaciğerde lipid peroksidasyonunu artırdığını MDA düzeyindeki artışla göstermişlerdir.

El Sayyad ve ark., (2009), yapmış oldukları çalışmada düşük doz (0.2 mg/kg) ve terapötik doz (1 mg/kg) olarak cisplatin uyguladıkları çalışmada özellikle terapötik doz cisplatinin karaciğerde neden olduğu histolojik değişiklikleri ışık ve elektron mikroskopik bulgularla ortaya çıkarmışlardır.

Cisplatinin yan etkilerini belirlemek amacıyla yapılan çalışmalarda dokularda görülen hasarı indirgeyebilmek için çeşitli kimyasal ajanlar kullanılmaktadır. Cisplatinin istenmeyen yan etkilerinin daha etkili, ekonomik ve kolay uygulanabilir ilaçlarla önleyebilmek ve azaltabilmek amacıyla yapılan bu çalışmalarda en çok kullanılan maddeler antioksidanlardır.

Yüzyılı aşkın süredir kullanılan ASA'nın kullanım alanları her geçen gün artmaktadır. ASA'nın ait olduğu bileşikler grubu olan salisilatların en zengin kaynağı, söğüt ağacı kabuklarıdır. Bu ağacın kabuklarında bulunan salisin maddesi, vücuda girdiğinde salisilik aside dönüşmekte, salisilik asitten elde edilen ASA ise ağrı kesici, ateş düşürücü, iltihap önleyici özellikleri nedeniyle yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Aydın, 2003). ASA'nın pek çok hastalık üzerindeki etkisinin yanı sıra antioksidan olarak rol oynadığı çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (Shi ve ark., 1999).

Ulubaş ve ark., (2003), yaptıkları çalışmada cisplatinin sebep olduğu nefrotoksisite üzerine ASA'nın etkilerini araştırmışlar ve bu iki maddenin kombine edilerek uygulandığı gruplarda antioksidan enzim aktivitelerinde artış olduğunu göstermişlerdir.

Drew ve ark., (2005), yapmış oldukları çalışmada salisilik asitin kolonda oksidatif stres ve glutatyon peroksidaz aktivitesini düzenlediğini göstermişlerdir. Bir başka çalışmada antiinflamatuvar ilaç olarak ASA'nın oksidatif/antioksidatif denge üzerine olan etkileri araştırılmış ve ASA'nın antioksidan aktivite gösterdiğini ortaya çıkarılmıştır (Kopff ve ark., 2007).

Selenyum insan sağlığı için gerekli iz elementlerden biridir. Son yıllarda çevredeki ve besinlerdeki seviyelerine bağlı olarak oluşan toksik etkilerinden ve insanlar için gerekli bir element olmasından dolayı selenyum ile ilgili çalışmalar artmıştır. Bu elementin siroz, kanser, diyabet veya kalp-damar rahatsızlıklarını önlemek veya tedavi etmek için optimum günlük alınımının ne kadar olacağı hakkında farklı görüşler vardır. Birçok hayvanda ve epidemiyolojik çalışmalardan elde edilen sonuçlar bir kaç dejeneratif hastalığa karşı selenyumun besinsel bir faktör olarak koruyucu etkisinin olabileceği belirlenmiştir (Simonoff ve ark., 1992). Selenyum bağımlı enzimlerin reaktif oksijen radikallerini yıkarak oksidatif hasarı önleyici etkiye sahip olduğuna dair çok sayıda çalışma vardır. İnsanlarda birçok biyolojik fonksiyona sahip olan selenyumun en önemli ve bilinen fonksiyonu antioksidan etkisidir (Tapiero ve ark., 2003, Ramoutar ve Brumaghim, 2007).

Selenyumun çeşitli ajanlarla oluşturulan hepatoksisite üzerine koruyucu etkisi çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. Karaciğerde alkolün sebep olduğu oksidatif strese karşı selenyumun askorbik asitle birlikte koruyuculuk sağladığı Sivaram ve ark., (2001) tarafından yapılan çalışma ile gösterilmiştir. Newairy ve ark., (2007) yapmış oldukları bir diğer çalışmada kadmiyum toksisitesine karşı selenyumun koruyuculuğu MDA seviyesindeki azalma ve antioksidan enzim aktivitelerindeki yükselmeyeyle gösterilmiştir.

Diğer yandan Camargo ve ark., (2001) yaptıkları çalışmada, cisplatinin sebep olduğu nefrotoksisite üzerinde selenyumun (sodyum selenit) erken tübüler hasar üzerinde kısmen koruyuculuk sağladığı belirlenmiştir.

Prostat, akciğer, mide, baş, boyun, özefagus, servikal kanserlerin tedavisinde yaygın olarak cisplatin kullanımının olumlu etkileri yanında pek çok olumsuzluklara neden olabileceği yapılan çalışmalarda ortaya çıkarılmıştır (Ajith ve ark., 2006). Serbest radikal mekanizmalı hücre hasarının engellenmesinde veya indirgenmesinde çeşitli antioksidanlar büyük rol oynamaktadır. Antioksidanlar okside edici serbest radikalleri elemine ederek veya reaksiyona girerek hücresel hasarı engellerler (Seven ve Candan, 1996). Baş ağrısından çeşitli kanser tiplerine kadar oldukça geniş bir kullanım alanı olan ASA ve besinlerde de bulunan iz elementlerden biri olan selenyumun antioksidan özellikleri ile oksidatif hasar üzerindeki etkileri birçok çalışmaya konu olmuştur.

Görüldüğu gibi cisplatinin toksik etkisi ve bu etkileri azaltacak değişik maddeler ile ilgili oldukça fazla çalışma olmasına rağmen bu maddenin karaciğerde ortaya

çıkardığı histolojik değişiklikler ve bu değişiklik üzerine ASA ve selenyumun etkisi ile ilgili yeterli çalışmaya rastlanamamıştır. Bu nedenle, bu çalışmada, sitotoksik etkisi bilinen kemoterapötik bir ajan olan cisplatinin karaciğerde meydana getirdiği histolojik değişiklikler ve bu değişiklikler üzerine ASA ve selenyumun etkilerinin ışık ve elektron mikroskobu düzeyinde belirlenmesi amaçlanmıştır. Cisplatinin karaciğerde meydana getirdiği histolojik değişikliklerin moleküler mekanizma veya mekanizmalarını açıklamayı hedefleyen çalışmalara katkı sağlamak, hasar oluşturma mekanizması olarak düşünülen oksidatif stres üzerine selenyum ve ASA gibi antioksidan özelliği bilinen maddelerin etkilerini araştırarak cisplatinin sebep olduğu karaciğer hasarı üzerine muhtemel koruyucu etkilerini açıklamak hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Hücre Zedelenmesi ve Nedenleri

Hücre, fizyolojik stresler ve patolojik uyaranlarla karşılaştığında duruma adapte olabilmekte ve hücrel homeostazı koruyarak canlılığını devam ettirebilmektedir. Eğer hücre adaptasyon yeteneğinin üzerinde bir strese maruz kalırsa geri dönüşümlü ya da geri dönüşümsüz olarak zedelenabilir, hatta ölebilir (Kumar ve ark., 1999).

Spesifik bir stres faktörüne karşı ister adaptasyon gerçekleşsin, ister geri dönüşümlü ya da geri dönüşümsüz zedelenme meydana gelsin bu sonuç sadece stresin özelliğine ve şiddetine değil aynı zamanda hücrenin yaralanmaya karşı hassasiyetine, farklılaşmasına, kan ihtiyacına, beslenme durumu ve genetik özellikleri gibi birçok değişkene de bağlıdır. Hücreler oldukça dar olan fizyolojik parametreler içinde çevrelerini ve iç ortamlarını koruyarak normal homeostazı sürdürürler (Kumar ve ark., 1999). Genetik bilgi, metabolik aktiviteler, besin gereksinimi gibi çevre faktörleri tarafından oluşturulan denge devam ettirilir (Garcia, 2005)

Hücreler ve dokular sürekli değişen mikro çevrede yaşamaktadırlar. Hücre ve dokular adaptif cevaplar yoluyla bu değişikliklere uyum sağlarlar ve fizyolojik durumlarını devam ettirirler (Garcia, 2005). Sürekli değişen mikro çevrelerine uyum sağlayabilme yetenekleri olan hücreler sağlıklı veya normal hücreler olarak ifade edilirler. Mikro çevrenin bazen zedeleyici olabilecek değişimleri hücrel adaptasyon mekanizmaları tarafından azaltılır ve olumsuz etki minimal düzeyde atlatılır (Kumar ve ark., 1999).

Normal bir hücrenin fonksiyon ve yapısı, metabolizma, farklılaşma, farklılaşmadaki genetik programlar, komşu hücre ile ilişkiler ve metabolik maddelerin uygunluğu gibi faktörler nedeniyle oldukça dar bir alanda sınırlıdır. Bazen aşırı fizyolojik stresler veya bazı patolojik uyarılar, fizyolojik ve morfolojik hücrel adaptasyonlara neden olabilirler. Bu sırada uyaran faktöre yanıt olarak hücre yaşamını devam ettirir ve fonksiyonunu düzenleyerek değişmiş olan duruma uyum sağlar. Eğer adaptasyon sınırlarını aşan bir uyarı olur veya adaptasyon gerçekleşmez ise “hücre zedelenmesi” olarak adlandırılan olaylar zinciri gelişir. Hücre zedelenmesi belli bir noktaya kadar geri dönebilir, uyaran yeteri kadar şiddetli ise geri dönüşümsüz

zedelenme oluşur ve hücre ölür. Uyarıcılara karşı oluşan diğer cevaplar ve morfolojik değişiklikler ise şunlardır (Şen, 2005);

- Subsellüler değişiklikler. Genellikle öldürücü olmayan, uzun süreli uyarılara karşı yanıt olarak hücre içinde görülen değişikliklerdir.
- Hücrel adaptasyonlar. Atrofi, hipertrofi, hiperplazi ve metaplazi gibi değişikliklerdir.
- Hücre içi birikimler: Hücrede metabolik yeni düzenlemeler sonucu protein, lipid ve karbonhidratların birikimidir.
- Patolojik kalsifikasyon: Hücre ve doku hasarının yaygın sonucu olarak kalsiyum birikimidir.
- Hücre yaşlanması: Hücre ve içeriğinin zamana bağlı olarak yıpranmasıdır.

Çok çeşitli hasar ajanları mevcuttur. Hücre zedelenmelerini oluşturan stresler trafik kazalarının gözle görülebilen fiziksel travmalarından, spesifik bir metabolik hastalığın temelini oluşturan defektif bir enzimle sonuçlanan tek gen hasarına kadar uzanan bir diziyi oluşturur (Kumar ve ark., 1999). Hücre zedelenmesinin nedenleri aşağıdaki başlıklar altında gruplandırılabilir.

2.1.1. Oksijen Yetersizliği (Hipoksi)

Dokunun oksijenden yoksun bırakılması zedelenmenin en yaygın nedenlerinden biridir (Garcia, 2005). Hipoksi, arteriyel akımın engellenmesi veya venöz drenajın azalması sonucu dokuda kanlanma kaybı (İskemi), pulmoner hastalık ve yetersiz havadan dolayı kanın oksijenlenmesinde yetersizlik, kalp disfonksiyonundan dolayı kanın yeterli pompalanamaması oksijen taşıma kapasitesinin zayıflaması (anemi, karbonmonooksit zehirlenmesi) sonucu meydana gelebilmektedir (Kumar ve ark., 1999).

2.1.2. Kimyasal Etkenler

İnorganik bileşikler, iyonlar ve organik moleküller kimyasal ajanlardır. Çoğu ilaç ve kimyasal ajanlar hücre zedelenmesine neden olmaktadır. Ayrıca normal metabolizmanın yan ürünleri ve mikroorganizmalar tarafından sentezlenen toksinler de kimyasal etken olarak hücre zedelenmesine neden olmaktadır (Robins ve Kumar, 1981).

Glikoz ve tuz gibi metabolizma için yararlı maddeler de yeterince yoğun olduğunda ozmotik çevreyi bozarak hücre zedelenmesine veya ölümüne yol açabilir. Hatta belirli bir düzeyin üzerindeki kısmi basınca sahip oksijen de toksiktir. Zehir olarak bilinen etkenler tüm organizmanın ölümü ile sonuçlanan membran geçirgenliğini, ozmotik homeostazı veya enzim ya da kofaktör bütünlüğünü değiştirerek hücre seviyesinde ağır hasara neden olurlar. Diğer potansiyel toksik etkenler, hava kirliliği, insektisitler, karbonmonoksit, asbestoz ve etanol gibi sosyal uyarıcıları kapsar (Robins ve Kumar, 1981; Kumar ve ark., 1999).

Kimyasal hasar iki yolla meydana gelmektedir:

- 1) Etken, hücrenin bazı kritik moleküler bileşenleri ile doğrudan reaksiyona girerek ve fonksiyonunu etkileyerek hasar meydana getirebilir. Örneğin siyanid aerobik solunum için gerekli mitokondrilerdeki sitokrom oksidazı inaktive etmektedir.
- 2) Metabolize edildikten sonra toksik duruma gelerek hasar oluşturabilir. Örneğin, asetaminofen'in aşırı dozu karaciğerde bu yolla toksik etki göstermektedir (Kumar ve ark., 1999).

2.1.3. Fiziksel Etkenler

Fiziksel etkenlerden bazıları aşağıdaki şekilde sıralanabilir;

- 1) Ezilme, kırılma, yaralanma gibi mekanik hasar ve travmalar.
- 2) Aşırı sıcak, aşırı soğuk: Düşük ısı birçok yolla etkili olmaktadır. Öncelikle vazokontraksiyonla hücre kanlanmasını engeller. Belirgin vazodilatasyonla sonlanan vazomotor kontrol zedelenmesi kan akımında kesintiye neden olmaktadır. Eğer ısı yeterince düşükse intrasellüler su kristalize olur. Yüksek ısıda, ısı artışı esnasında ısı giderek artarken kanlanma kapasitesinin artışıyla önlenebilecek olandan fazla metabolizma artışı olur. Metabolizma artışı zedelenmeye yol açar. Aynı zamanda kritik seviyelere doğru hücre pH'sını düşüren asit metabolitlerinin birikmesine yol açar (Robins ve Kumar, 1981).
- 3) İyonize ve noniyonize radyasyon ve elektrik şoku: Radyan enerjinin zedeleyici etkileri atom bombası patlamasından bu yana iyi bilinmektedir. Daha az dozdaki radyan enerji ya kimyasal bileşiklerle hücre içinde doğrudan iyonizasyon yaparak ya da hücre sıvısının iyonizasyonu ile sekonder olarak intrasellüler içeriğe katılan serbest radikaller

oluşturarak etken olmaktadır. Aynı zamanda mutasyonlarla hücre zedelenmesi hatta hücre ölümüne neden olur (Robins ve Kumar, 1981; Şimşek, 1993).

2.1.4. İnfeksiyöz Etkenler

Bu ajanlar submikroskopik virüslerden büyük barsak parazitlerine kadar değişirler (Garcia, 2005). Bu ajanların hücreyi nasıl zedelediği ve dokuda nasıl hasar oluşturduğu iki mekanizma ile açıklanır (Robins ve Kumar, 1981; Kumar ve ark., 1999).

1) Konağa zararlı toksinler üretimi

2) Virüs ya da virüsle değişmiş hücre antijenlerine karşı immünolojik yanıt uyarılır ve hücreyi ya antikorlar ya da hücresel reaksiyonlar yok eder. Örneğin; hepatit B virüsü T lenfositleri uyarak sitolizisle hepatosit hasarı yapmaktadır.

2.1.5. İmmünolojik Reaksiyonlar

Anaflaksi, alerji gibi aşırı immün reaksiyonlar vücudun kendi hücrelerine karşı reaksiyona neden olurlar bu da akut ve kronik inflamasyon ve hücre hasarı ile sonuçlanabilmektedir (Kumar ve ark., 1999).

2.1.6. Genetik Bozukluklar

Önemli hücresel proteinlerin kodlandığı bir gende meydana gelecek mutasyon sonucunda protein sentezlenemez bu da gelişimsel hasarlar ile anormal metabolik fonksiyonlara neden olmaktadır. Yaşam süresince somatik hücrelerdeki mutasyon hücre farklılaşmasını ve replikasyonu etkileyerek hücrelerde çeşitli hasarlara neden olmaktadır (Kumar ve ark., 1999).

2.1.7. Beslenme Dengesizlikleri

Beslenme dengesizlikleri açlık, vitamin eksikliği ve fazlalılığı ile obeziteyi içerir. Ayrıca hayvansal yağlarca zengin beslenme hücrelerde ve dokular üzerinde zedeleyici etki yapmaktadır (Robins ve Kumar, 1981; Kumar ve ark., 1999).

2.1.8. Yaşlanma

Yaşlanma, hücre ve dokuların çoğalma ve onarım yeteneğinde değişikliklere neden olarak zedelenmeye yol açar.

Hücrelerde çeşitli sebeplerle meydana gelebilecek hasar, hücre yapısında ve fonksiyonunda değişiklik olarak kendini gösterir. Bu değişiklikler, hücrelerin normal fizyolojik adaptif mekanizmasını karşılamak için hücrelerin maruz kaldığı etkiler sonucunda gerçekleşir.

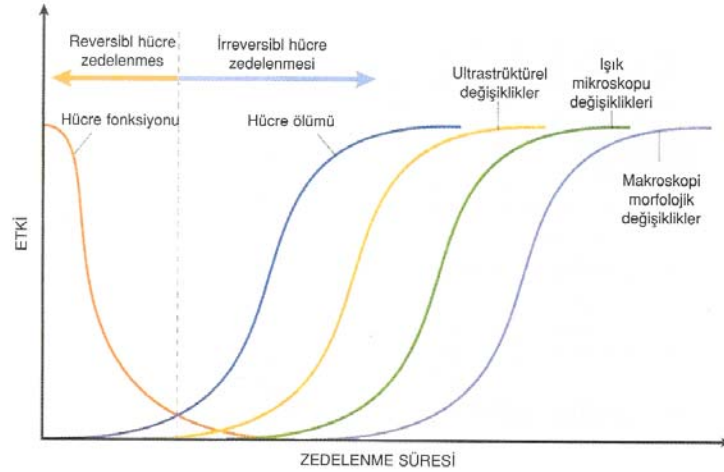
Hücrede meydana gelen değişiklikler, zedelenme bölgesine, uyarı sırasında hücrenin metabolik durumuna, oksijen ve besin durumuna, metabolik artıkların uzaklaştırılma durumuna, genetik yapısına, uyum yeteneğine bağlıdır. Örneğin; bacadaki iskelet kası, iskemiye maruz kaldığında 2-3 saat uyum gösterirken, kalp kası ise 20-30 dakika sonra ölür. Metabolik olarak aktif hücreler zedelenmelere karşı daha hassastırlar (Kumar ve ark., 1999).

Hücre zedelenmesi, hücrenin yapısal ve fonksiyonel moleküllerinde meydana gelecek değişiklikler ile ilişkilidir. Hücredeki biyolojik olarak önemli her molekül zedelenmenin hedefi olabilmesine karşın 4 biyokimyasal sistem özellikle etkilenmektedir. Bunlar;

- Hücre membranı
- ATP üretimi (Oksidatif Fosforilasyon)
- Protein Sentezi
- Genetik materyalin korunması

Organizma farklı özellikler taşıyan hücrelerin oluşturduğu, farklı doku ve organlardan oluşur. Organlarda meydana gelecek hasarın tüm şekilleri hücrede moleküler ve yapısal değişiklikler ile başlar (Şen, 2005).

Bir hücrenin yapısal ve biyokimyasal elemanları bir bütün halinde birbiriyle ilişkilidir. Zedelenmenin başlangıç noktası ne olursa olsun birçok zincirleme sekonder etki hızlı bir şekilde meydana gelir. Hücresel fonksiyon hücre ölümünden daha önce kaybolur, morfolojik değişiklikler ise daha sonra gelişir (Şekil 2.1)(Kumar ve ark., 1999).



Şekil 2.1. Hücresel fonksiyon, geri dönüşümsüz hücre zedelenmesi ve hücre zedelenmesinin morfolojik değişiklikleri arasındaki ilişki (Kumar ve ark., 1999)

2.2. Hücre Zedelenme Şekilleri ve Morfolojileri

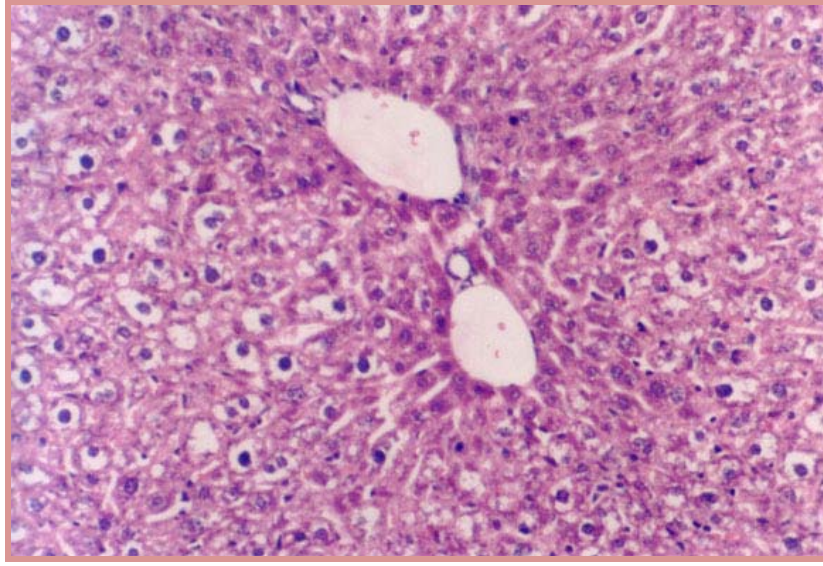
Hücre zedelenmesinde fonksiyonel değişiklikler morfolojik değişikliklerden daha önce meydana gelir. Hücre zedelenmesinde morfolojik değişikliklerin gözlenebilmesi için gerekli süre bu değişiklikleri tespit etmek için kullanılan metotların duyarlılığına bağlı olarak değişir. Çeşitli nedenlerle oluşan zedelenmeden sonra ortaya çıkan bu değişiklikler histokimyasal veya ultrastrüktürel tekniklerle dakikalar veya saatler sonra gözlenebilir. Işık mikroskopunda gözlenebilmesi için gerekli süre ise daha uzundur (Robins ve Kumar, 1981; Kumar ve ark., 1999).

2.2.1. Geri Dönüşümlü Hücre Zedelenmesi

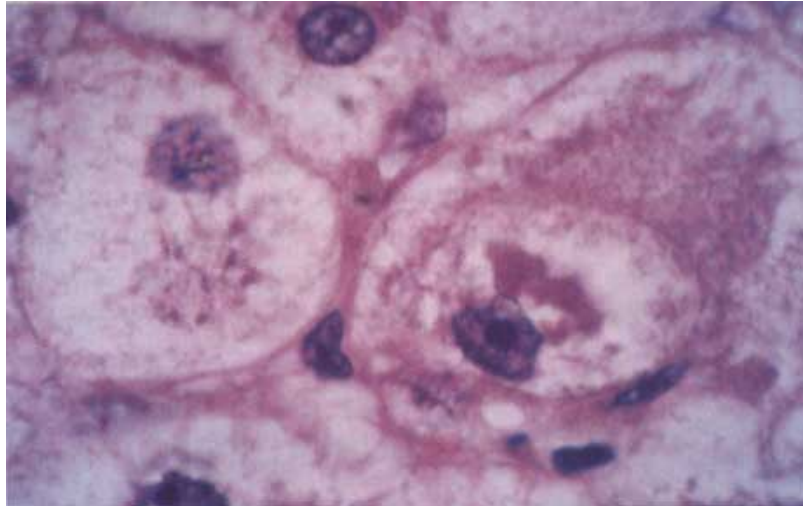
Geri dönüşümlü hücre zedelenmesinde ultrastrüktürel değişiklikler (Kılıç,2005);

- Plazma membran değişiklikleri: Mikrovillusların bozulması, hücre apikal yüzeyindeki kabarcıklar, hücrelerarası bağların gevşemesine neden olur.
- Mitokondriyal Değişiklikler: Mitokondrilerdeki şişme ve fosfolipit bakımından zengin yoğun materyallerin birikimi gerçekleşir.
- Endoplazmik Retikulum (E.R) genişlemesi: Ribozomlar E.R'den ayrılır
- Nükleer değişiklikler gözlenir.
- Lizozomlarda artış (otofaji) gözlenir.

Daha önce ifade edildiği gibi ışık mikroskobu düzeyinde değişiklikler diğerlerine göre daha geç ortaya çıkar. Fark edilen ilk değişiklik hücre çapının artmasıdır. Bu artış hücresel şişmeden dolayıdır. Mikroskopik olarak sitoplazmada küçük berrak vakuoller görülür. Bu görünüm endoplazmik retikulumun dilatasyonu sonucudur. Hücre şişmesi, hidropik dejenerasyon veya vakuoler dejenerasyon olarak adlandırılmaktadır (Şekil 2.2, 2.3) (Kılıç, 2005).



Şekil 2.2. Karaciğerde hidropik değişiklikler (Tülek, 2004)



Şekil 2.3. Karaciğerde hidropik değişiklikler (Kumar ve ark., 1999)

2.2.2. Geri Dönüşümsüz Hücre Zedelenmesi

Nekroz ve apoptozis olarak adlandırılan iki farklı mekanizma ile hücreler geri dönüşümsüz zedelenmeye uğrarlar (Öztürk, 2002; Ergin ve Alkan, 2002).

Hücre ölümü ile ilgili ilk bilgiler 1920’li yıllarda ışık mikroskopunun ve yeni boyama yöntemlerinin keşfiyle başlamış ve ilk olarak nekroz tanımlanmıştır (Öktem ve ark., 2001). Apoptozis ilk kez 1842 yılında Carl Vogt tarafından keşfedilmiş ve 1964 yılında tanıtılmıştır (Peter ve ark., 1997). Apoptozis terimi ise ilk kez 1972 yılında İskoçyalı araştırmacılar Kerr, Wyllie ve Currie adındaki patoloğlar tarafından kullanılmıştır (Wyllie ve Duvall, 1992; Peter ve ark., 1997; Thompson, 1999).

2.2.2.1. Nekroz ve Morfolojik Tipleri

Makroskobik ve histolojik olarak nekroz, geri dönüşümsüz ekzojen zedelenme sonucunda görülen hücre ölümüdür (Şen, 2005). Nekroz (hücre ölümü), belirli etkilere uzun süre maruz kalma sonucunda gerçekleşir. Hücrenin homeostaziyi sürdürme yeteneği aşıldığında “geri dönüşü olmayan nokta” da hücre ölümü meydana gelir (Kumar ve ark., 1999).

Nekroz, dışarıdan gelen hasarla plazma membranındaki değişiklikler sonucu oluşur. Böylece homeostaziyi koruyan hücre yeteneğinin zarar görmesi ile nekroz başlar. Bu durum su ve ekstrasellüler iyonların girişine neden olur. Hücre ve mitokondri gibi organeller şişer ve daha sonra parçalanır. Plazma membranının yırtılması yüzünden lizozomal enzimleri içeren sitoplazmik içerik ekstrasellüler sıvıya yayılır. Hücrenin nekrotik atıkları inflamatuvar hücreleri dokuya çekerek dokunun parçalanmasına yol açar ve nekrotik hücre ölümü gerçekleşir (Ergin ve Alkan, 2002).

Nekrozun morfolojik görünümü birlikte meydana gelen iki temel olay sonucudur:

- 1) Hücrenin enzimatik sindirimi
- 2) Proteinlerin niteliklerinin değişmesi

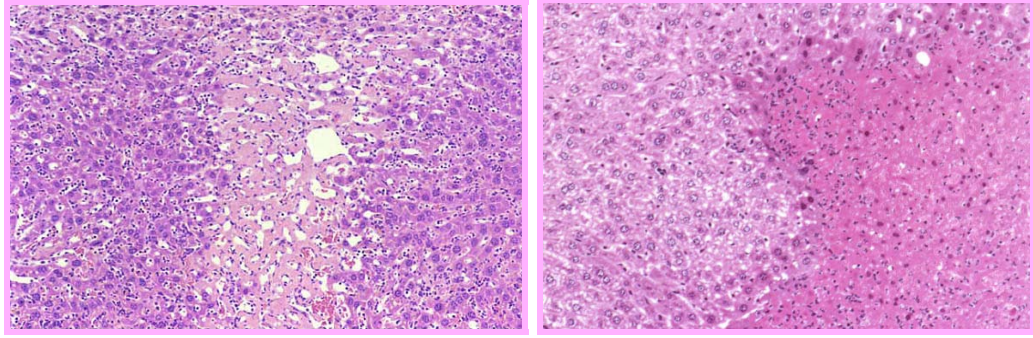
Sindirim ölü hücrelerden kaynaklanan hidrolitik enzimlerle oluşursa “otoliz”, nekroz alanına gelen lökositlerin lizozomlarından kaynaklanırsa “heteroliz” adı verilir. Bu olayların gelişmesi için saatler gereklidir (Kumar ve ark., 1999).

Nekroz sonucunda piknozis, karyolizis ve karyorheksis şeklinde nükleer değişiklikler ortaya çıkar. Piknozis, kromatininin yoğunlaştığı, çekirdeğin büzüldüğü, yoğun miktarda bazofilik bir hal aldığı durumdur. Piknotik çekirdeğin daha sonra çok sayıda küçük bazofilik partiküllere parçalanması karyorhekzis ya da piknotik çekirdeğin lizozomal deoksiribonükleaz etkisiyle lizise maruz kalması karyolizisdir. Hızlı bir şekilde meydana gelen nekrozda piknotik durum görülmeksizin çekirdek lizise uğrar. Çekirdekteki bu değişimler geri dönüşümsüz hücre zedelenmesi ve hücre ölümünün kesin göstergesidir (Chandrasoma ve Taylor, 1995).

Ölü hücrelerin eozinle boyanma özelliği artar. Bu durum hücrede denatüre olan proteinlere eozinle bağlanmanın artması ya da bazik boyalarla boyanmanın azalmasına bağlanabilir (Kumar ve ark., 1999).

Nekroz, hücrenin tipine, inflamatuvar cevap yeteneğine göre, içinde bulunduğu çevre şartlarına göre ve biyolojik ajanların varlığına göre farklı şekillerde sonuçlanır. Ölü hücrede tanımlanan bu erken değişiklikler bir kez meydana gelindiğinde, nekrotik doku kitlesi, enzim katabolizması ile proteinlerin niteliklerinin değişmesi arasındaki baskınlığın hangi tarafta olduğuna bağlı olarak farklı morfolojik değişiklikler gösterir. Denatürasyon primer şekilde olduğunda koagülasyon nekrozu denilen nekroz gelişir. Enzim sindiriminin hakim olduğu örneklerde sonuç likefaksiyon nekrozudur. Özel durumlarda kazeöz nekroz veya yağ nekrozu gelişebilir (Kumar ve ark., 1999).

Koagülasyon Nekrozu: Bu nekroza ait dokular, meydana gelişlerinden beri geçen süreye bağlı olarak makroskobik açıdan farklı görünümlere sahiptir. Henüz meydana gelmiş bir koagülasyon nekrozu odağı soluk renkli sert ve hafifçe şişmiş durumdadır. Zaman geçtikçe iltihabi hücrelerin toplanması nedeniyle rengi sarıya çalar ve otoliz nedeniyle de kıvamında bir yumuşama görülür. Mikroskobik olarak ise erken dönemde koagülasyon nekroz odağındaki hücreler hafifçe daha fazla eozinofil karakterdedir; hücrel ayrıntılarda ya hiç değişiklik yoktur ya da belli belirsiz bir değişiklik meydana gelmiştir. Zaman geçtikçe eozinofil durumu şiddet kazanır, hücreler şişer ve daha önceden tanımlanan değişiklikler ortaya çıkmaya başlar. Sonunda nekroz odağı iltihabi hücreler tarafından istila edilir ve nekrotik hücreler eriyerek geriye yalnızca hücre kırıntıları kalır (Şekil 2.4) (Anderson ve Kissane, 1997).

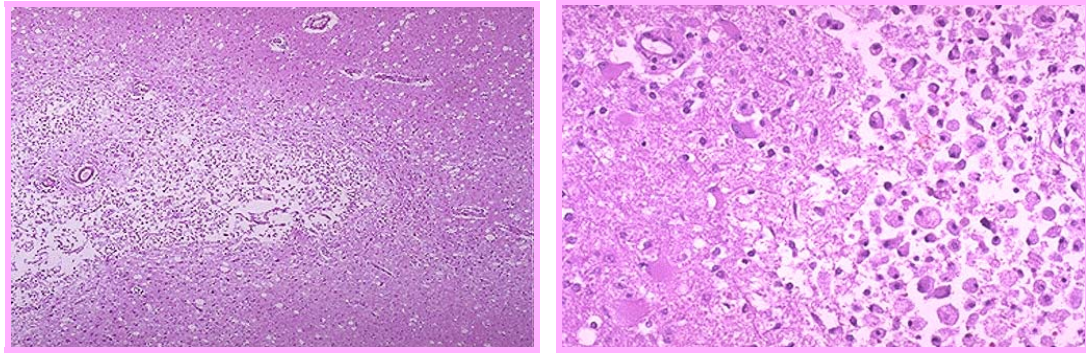


A

B

Şekil 2.4. (A) Karaciğer parankimal hücrelerinde nekroz görünümü (Anonim, 2006a), (B) Karaciğerde geniş nekrozlu bir alanın görünümü (Anonim, 2006b)

Likefaksiyon Nekrozu: Hızla yumuşayan ve eriyen dokudaki odaksal yıkıma verilen addır. Bir atardamarın primer olarak tıkanmasına bağlı iskemik hasardan veya şiddetli beyin travmalarından sonra en sık merkezi sinir sisteminde görülür. Makroskobik olarak nekroz bölgesi yumuşaktır ve merkezi erimiş durumdadır. Zamanla, çeperleri nekrotik olmayan dokuyla sınırlı kistik bir boşluk gelişir. Histolojik olarak bu kistik boşluğun içeriği nekrotik hücre kırıntılarından ibarettir (Şekil 2.5) (Anderson ve Kısane, 1997).

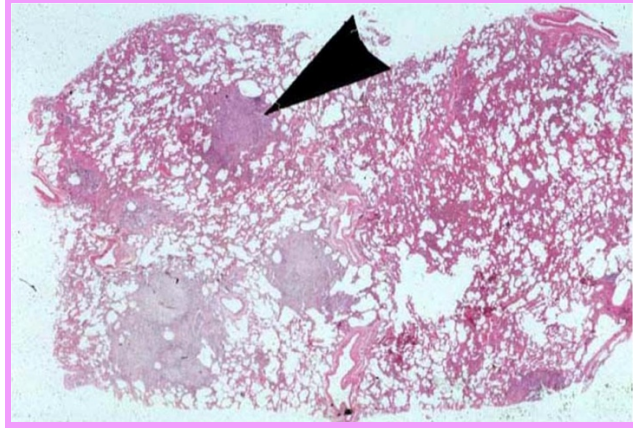


A

B

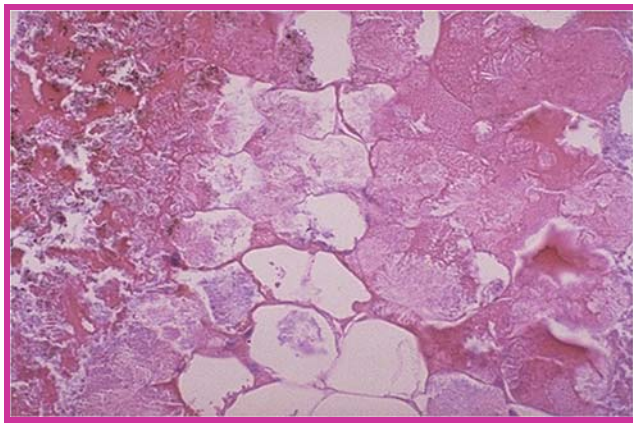
Şekil 2.5. Beyinde likefaksiyon nekrozun mikroskopik görüntüsü (A-B) (Anonim, 2006c, Anonim, 2006d)

Kazeöz Nekroz: Kazeifikasyon nekrozu çoğunlukla tüberküloz enfeksiyonunun odağında saptanan nekrozun karakteristik bir seklidir. ‘Kazeöz’ terimi santral nekrotik alanın beyaz, peynirimsi görünümünden kaynaklanmıştır. Mikroskopik olarak nekrotik odak karakteristik bir granülatöz iltihap halkası ile kuşatılan belli yapısı olmayan, şekilsiz, granüler artıktan oluşur. Doku yapısı koagülasyon nekrozundan farklı olarak tamamen silinmiştir (Şekil 2.6) (Kumar ve ark., 1999).



Şekil 2.6. Akciğerde kazaöz nekrozun mikroskopik görünümü

Yağlı Nekroz: Aslında spesifik bir nekroz şekli değildir. Daha çok, pankreas zedelenmesi sonrasında tipik olarak oluşan yağ yıkım alanlarını tanımlar. Aktifleşen pankreas enzimlerinin bitişik parankim veya periton boşluğuna patolojik sızıntısı sonucu meydana gelir (Şekil 2.7). Aktifleşen pankreatik enzimler asiner ve duktal hücrelerden çıkarak yağ hücre membranlarını eritir ve hücre içinde bulunan trigliserit esterlerini hidrolize eder. Serbestleşen yağ asitleri kalsiyumla birleşerek makroskopik olarak görülebilen tebeşirimsi beyaz alanlar meydana getirir (Robbins, 1996). Histolojik olarak nekrotik yağ hücrelerinin yalnızca bazofilik kalsiyum birikintili gölgeli hatları ve çevrelerinde bulunan iltihabi reaksiyon izlenebilir (Kumar ve ark., 1999).



Şekil 2.7. Pankreasdaki yağlı nekrozun mikroskopik görüntüsü (Anonim, 2006e)

2.2.2.2. Apoptozis

Apoptozis, organizmanın ihtiyaç duymadığı, biyolojik görevini tamamlamış veya hasarlı hücrelerin zararsız bir biçimde ortadan kaldırılmasını sağlayan ve genetik olarak kontrol edilen programlı hücre ölümüdür. Apoptozis veya programlı hücre ölümü, çok hücreli organizmaların gelişiminin normal bir sürecidir. Homeostazinin ve organ büyüklüklerinin korunmasında, konak savunmasında embriyogenez, metamorfoz ve yaşlanma da oldukça önemlidir (Vaux ve Strasser, 1996, Öztürk, 2002; Erdoğan, 2003).

Apoptozis hücre içinden veya dışından gelen sinyallerle başlatılan ve birbirini takip eden olaylar zinciri olarak seyreder. Bu aşamalar:

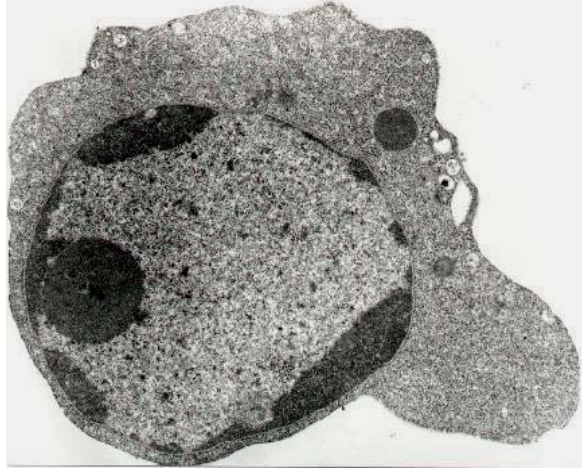
1. Apoptozisin başlaması
2. Hücre içi proteazların (kaspazların) aktivasyonu
3. Hücrede çeşitli biyokimyasal ve morfolojik değişikliklerin oluşması
4. Fagositoz olarak özetlenebilir (Vaux ve Strasser, 1996; Öztürk, 2002).

Hücre içinden veya dışından gelen sinyaller proteazları aktive eder. Aktive olan proteazlar hedef proteinleri yıkarak hücre içi değişikliklere neden olur. Sonuçta hücre parçalanarak apoptotik cisimlere ayrılır. Apoptotik cisimler fagositoz yoluyla yok edilirler (Öztürk, 2002).

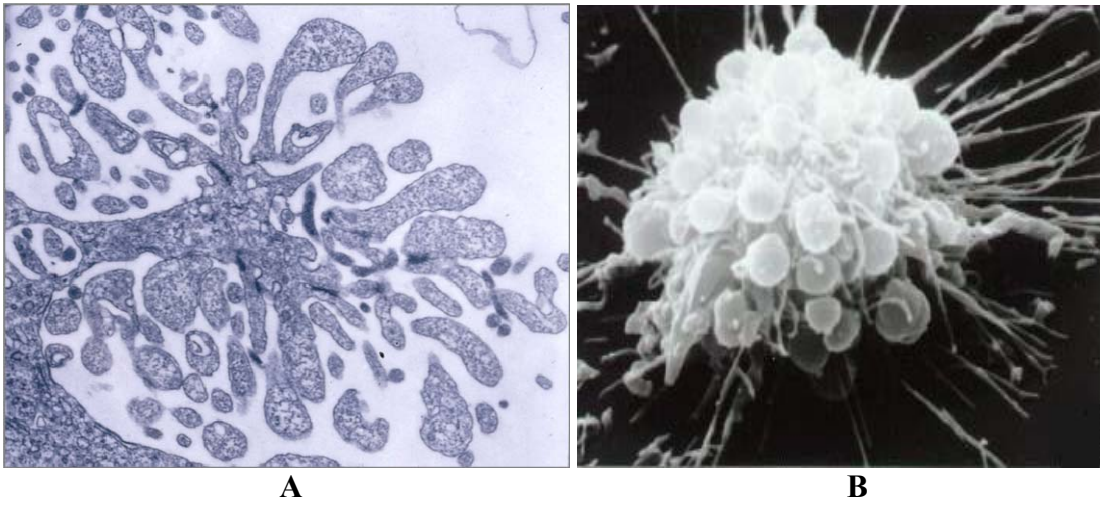
Apoptozis tipik morfolojik ve biyokimyasal özelliklere sahiptir. Göze çarpan morfolojik değişimler hücre küçülmesi, nükleer kromatinin yoğunlaşması ve çekirdeğin parçalanmasıdır (Göncü ve Pehlivan, 2001). Hücreler özelleşmiş yüzeysel yapılarını ve diğer hücrelerle olan temas yüzeylerini kaybederler su kaybederek küçülürler ve büzüşürler. Sitoplazmanın yoğunlaştığı, organellerin birbirine yakınlığı gözlenir. Membranlar bütünlüklerini korurlar. Sitoplazmada yüzeye paralel olarak yerleşmiş mikrofilyament kümeleşmeleri ve endoplazmik retikulumda geçici genişlemeler görülür. Bu genişlemelerin sitoplazmadaki suyun endoplazmik retikuluma geçmesi ile oluştuğu düşünülmektedir. Mitokondriler genellikle normal yapılarını korurlar (Strasser ve ark., 2000).

Apoptoziste en önemli morfolojik değişiklikler çekirdekte görülür. Kromatin, çekirdek membranına yakın kısımlarda yoğunlaşarak değişik şekil ve büyüklüklerde çöker (Reiter, 1997). Yarım ay, at nalı, orak gibi tipik görünümlere sahiptir (Şekil 2.8). Daha sonra çekirdek yıkıma uğrar. Bu durum karyorheksis olarak bilinir (Kumar ve

ark., 1999). Apoptotik süreç ilerledikçe sitoplazmik çıkıntılar oluşur. Hücre daha sonra membranla çevrili küçük parçalara bölünür. Bunlara “apoptotik cisim” adı verilir (Şekil 2.9) (Öztürk, 2002).

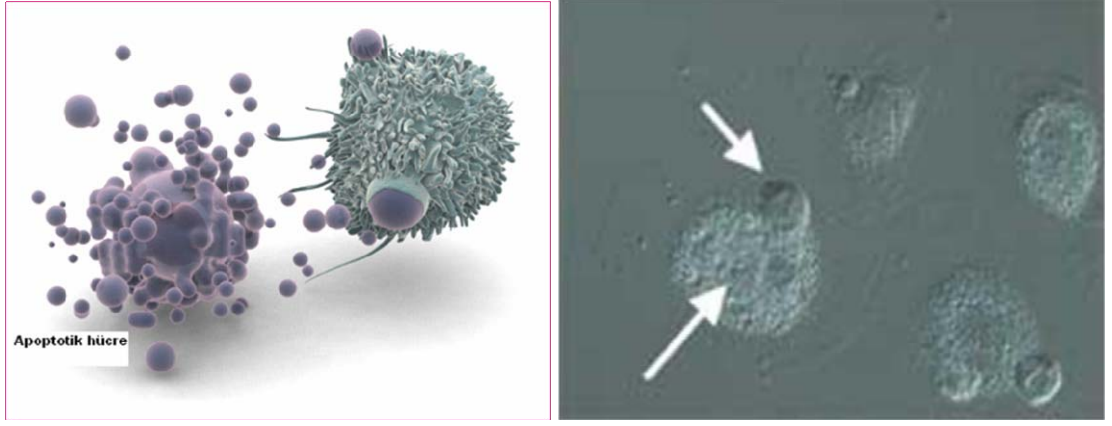


Şekil 2.8: Yüzey boğumlanması ve apoptotik çekirdek morfolojisinin TEM görüntüsü (Malorni ve ark.)



Şekil 2.9. Apoptotik cisimciklerin transmisyon elektron mikroskopik görüntüsü (A) (Jungueira ve Carneiro, 2006). Apoptotik Epitelial Hücreler, SEM (Tarayıcı Elektron Mikroskobu) görüntüleri (B) (Anonim, 2007a)

Apoptotik hücreler, makrofajlar ve doğal öldürücü hücreler tarafından tanınır ve fagosite edilir (Şekil 2.10) (Vaux ve Strasser, 1996). Eğer hücreler fagosite edilmezlerse ikincil nekroz olarak adlandırılan indirgenmeye uğrarlar (Göncü ve Pehlivan, 2001).



Şekil 2.10: Apoptotik hücreleri temizleyen makrofajlar (oklar) (Anonim, 2007b)

Apoptozis sırasında hücre yüzey moleküllerinde spesifik değişiklikler gözlenir. Örneğin fosfatidilserinin (PS) ve belirli proteinlerin ekspresyonu, glikolipit ve glikoproteinlerin şeker zincirlerinde değişimler gibi. Bu değişimler farklı biyolojik fonksiyonları özellikle fagositik tanıma ve apoptotik hücrelerin fagositozunu destekler (Azuma ve ark., 2002).

Apoptozisin en önemli biyokimyasal işareti, DNA'nın nükleozomal bölgelerden yaklaşık 180–200 baz çifti veya bunun katları şeklinde DNA parçaları oluşturacak şekilde parçalanmasıdır. Bu durum agaroz jel elektroforezinde merdiven görüntüsünün ortaya çıkmasına neden olur. Apoptotik hücrelerde görülen diğer önemli değişiklik, normalde plazma membranının iç yüzeyinde bulunan fosfatidilserinin apoptozisin erken evresinde membranın dış yüzeyine transloke olmasıdır. Bu mekanizma apoptotik hücrelerin komşu hücreler ve makrofajlar tarafından tanınmasını sağlar (Göncü ve Pehlivan, 2001).

Apoptozis ışık mikroskopik seviyede gözlenebilir. Hematoksilen-Eozin boyama tekniğiyle boyanmış kesitlerde, koyu eozinofilik sitoplazmalı, bir veya bir kaç parçalı piknotik çekirdekli olarak görülür. Kromatinin çekirdek membranının iç yüzüne lokalize olması nedeniyle çekirdek, yarım ay şeklinde gözlenir (Kumar ve ark., 1999; Öztürk, 2002).

2.3. Hücre Zedelenmesinde Moleküler Hedefler

Hücrelerde biyokimyasal sistemler birbirlerine bağımlıdır. Bir bölgede meydana gelen hasar, diğer hücresel işlemlerde sekonder hasara neden olmaktadır.

2.3.1. ATP Azalması

Evrensel enerji molekülü olan ATP (AdenozinTriFosfat) metabolizma ve biyosentez reaksiyonlarını sürdürmek için gereklidir ATP hücrelerde iki yolla sentezlenir: Bunlar oksidatif fosforilasyon ve glikolizdir (Şen, 2005). ATP sentezinin azalması bir çok gerekli homeostatik yolların hızla durmasına neden olur (Kumar ve ark., 1999). ATP üretiminde azalma, oksijen yokluğu ya da mitokondrilerdeki yapı veya fonksiyon bozukluğuna bağlı olarak görülmektedir (Anonim, 2009a).

2.3.2. Oksijen Kaynaklı Serbest Radikaller

Oksijen normal enerji metabolizması için çok önemli iken hücre hasarında da önemli rol oynamaktadır (Anonim, 2009a) Oksijen molekülü, aerobik çok hücreli organizmalarda temel ihtiyaç olan ATP'nin sentezlenmesi için gerekli bir moleküldür. Çünkü metabolizmada son elektron akseptörü olarak moleküler oksijen kullanılmaktadır (Gözükara, 2001). Mitokondriyal zincir reaksiyonları sırasında oksijenin % 95-98'i metabolik amaç doğrultusunda kullanılırken % 2-5'i organizma için zararlı olan reaktif oksijen türlerine (ROT) dönüşür (Reiter, 1997). Reaktif oksijen türleri, pek çok toksik madde ve patolojik şartlara yanıt olarak oluşan hücre ölümünde genel bir aracı olarak rol oynayabilirler (Gültekin ve ark., 2000).

Bu serbest radikallerin en büyük özelliği ortamda bulunan başka moleküllerle reaksiyona girerek yeni radikaller oluşmasıyla oksidatif hasara neden olmalarıdır (Halliwell, 1994). Radikaller, lipitler, proteinler ve DNA gibi makro moleküllere zarar verici reaksiyonları başlatırlar (Reiter, 1997).

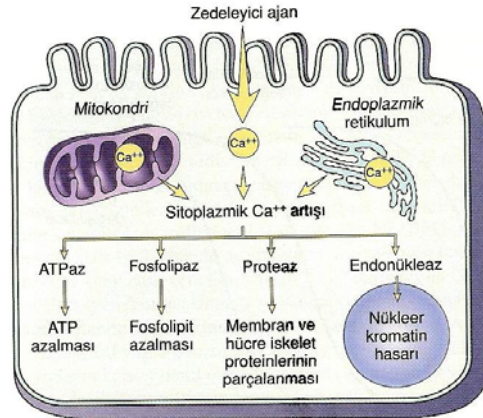
2.3.3. Hücre Membran Bütünlüğünün Bozulması

Hücrelerin sahip oldukları seçici geçirgen membranlar ile hücre içi homeostazı sürdürülür. Hücreye giren ve çıkan moleküllerin kontrolü ile extrasellüler sıvı ile osmotik denge devam ettirilir. Plazma membranına gömülü enerji pompaları ile hücre içi ve dışı arasında iyon gradiyenti ve elektrik yükü dengesi oluşturulur. Bu membran potansiyeli özellikle sinir, kas fonksiyonları için çok önemlidir. Diğer taraftan, mitokondri, lizozom ve endoplazmik retikulum gibi organellerin fonksiyonu membran

bütünlüğüne bağlıdır (Anonim, 2009a). Plazma membranı herhangi bir kimyasal etkenle zedelenabilir. Membran geçirgenliğindeki değişiklikler normal metabolik aktiviteleri sürdürmek için gerekli metabolitlerin konsantrasyon gradiyentlerinin bozulmasına neden olmaktadır (Kumar ve ark., 1999).

2.3.4. Kalsiyum Homeostazının Kaybı

Hücreler hücre içi kalsiyum iyon gradiyentini devam ettirmek için enerji bağımlı membran potansiyelini kullanırlar (Kumar ve ark., 1999). İskemi veya toksinler hücre dışı kalsiyumun plazma membranından içeri akışına yol açar ve bunu hücre içi stoklardan kalsiyumun serbest bırakılması izler. Artan sitoplazmik kalsiyum sırasıyla, membran hasarını ilerleten çeşitli fosfolipazları, yapısal ve fonksiyonel proteinleri katabolize eden proteazları, ATP kaybını hızlandıran ATPazları ve genetik materyali parçalayan endonükleazları aktive eder (Şekil 2.11) (Robins ve Kumar, 1981).



Şekil 2.11. Hücre zedelenmesinde sitoplazmik kalsiyumun artışı ve sonuçları (Kumar ve ark., 1999)

2.3.5. Mitokondriyal Hasar

Hücrelerin metabolizma ve biyosentez reaksiyonlarını sürdürmek için başlıca ATP formunda enerji sağlamaları gerekmektedir (Anonim, 2009a). Hücreler oksidatif metabolizmaya bağımlı olduğundan mitokondriyal bütünlük hücrelerin hayatta kalabilmeleri için gereklidir (Robbins ve Kumar, 1981; Kumar ve ark., 1999). ATP'nin mitokondrilerdeki oksidatif fosforilasyon yoluyla sentezlenememesi enerji

metabolizmasını glikolizis yönüne çevirir. ATP üretimi bakımından daha az verimli olan glikolizis aynı zamanda inorganik fosfat ve laktik asit birikmesine neden olarak hücre içi pH'nı düşmesine neden olur. Hücre içi asiditenin artması enzim fonksiyonlarını etkiler ve DNA hasarına neden olur (Anonim, 2009a).

2.3.6. Fonksiyonel ve Yapısal Proteinler

Hücre sel enzim ve proteinlerin denatürasyonu hücre fonksiyonlarını zayıflatmakta ve bozmaktadır. Tüm hücre sel reaksiyonlar biyolojik katölizörlere yani enzimlere bağımlıdır. Enzim aktiviteleri bozulduğunda metabolik reaksiyonlarda da düzensizlikler görülür. Yapısal proteinlerdeki denatürasyon, hücre nin intrasellular transport sistemini zayıflatır ve hücre iskeletinin bozulmasına neden olur (Robins ve Kumar, 1981).

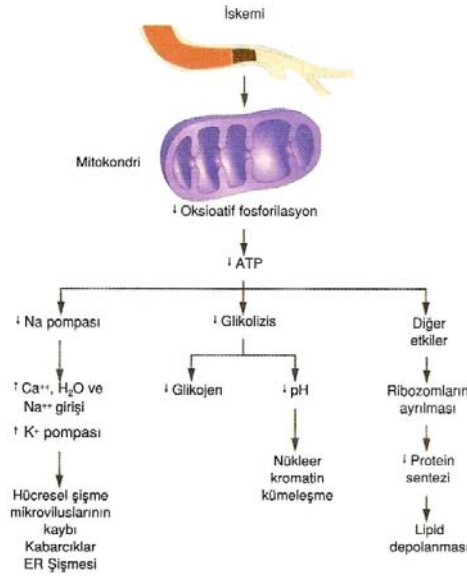
2.4. Hücre Zedelenme Mekanizmaları

2.4.1. İskemik ve Hipoksik Zedelenme

Hipoksinin ilk etkisi hücre nin aerobik solunumu yani mitokondrilerdeki oksidatif fosforilasyon üzerinedir. Hücre içi oksijen basıncının azalması sonucu hücre içi ATP üretimi belirgin olarak azalır. Bu da bir çok sistem üzerinde etkilidir (Kumar ve ark., 1999).

Plazma membranının ATP bağımlı Na pompasının aktivitesi bozulur. Bunun sonucunda sodyumun hücre içinde birikimi, potasyumun hücre dışına çıkışı gerçekleşir. Hücre içinde sodyum artışı hücre sel şişmeye neden olur (Robins ve Kumar, 1981; Kumar ve ark., 1999).

Oksidatif fosforilasyonla ATP üretilmemesi sonucu anaerobik glikolizis artar. Artan glikolizis sonucu fosfat esterlerinin hidrolizi ile laktik asit ve inorganik fosfat birikimi olur. Böylece hücre içi pH düşer. Azalan pH ve ATP ribozomların granüllü endoplazmik retikulumdan ayrılmasına ve polizomların monozomlara ayrışmasına neden olurken protein sentezinde de azalma olur (Şekil 2.12) (Kumar ve ark., 1999).



Şekil 2.12. İskemik zedelenmede ATP sentezindeki azalmanın hücresel sistemler üzerindeki etkisi (Kumar ve ark., 1999).

Hipoksi durumu devam ederse daha fazla morfolojik bozulmalar meydana gelir. Hücre iskeleti dağılırken mikrovilluslar gibi ultrastrüktürel özellikler kaybolur, hücre yüzeyinde kabarcıklar oluşur. Mitokondriler, endoplazmik retikulum ve tüm hücrede osmotik regülasyon kaybindan dolayı şişme görülür (Robbins ve Kumar, 1981).

2.4.2. İskemi/Reperfüzyon Zedelenmesi

İskemi sonucu dokuda meydana gelebilecek durumları değerlendirdikten sonra iskemik dokuların yeniden kanlanmasının (reperfüzyon) daha fazla hasar oluşturduğu bilinmektedir. Tam olarak mekanizmaları açık olmamakla birlikte dokuların yeniden kanlanmasının daha fazla hasar oluşturmalarının sebeplerini şöyle sıralayabiliriz (Robbins ve Kumar, 1981; Kumar ve ark., 1999);

- Dokuların yeniden kanlanması ile henüz kendi iyonik çevrelerini tam olarak düzeltememiş olan hücrelerin yüksek konsantrasyonda kalsiyumla karşı karşıya kalmasına neden olur. Hücre içi kalsiyumun artması, ATPaz, Fosfolipaz, Proteaz, Endonükleaz enzim sistemlerini aktive ederek hücre bütünlüğünün kaybına neden olur (Şekil 2.11).
- İskemik dokuların yeniden kanlanması inflamator hücrelerin lokal olarak o bölgede toplanmasına neden olmaktadır. Bu hücreler oksijen kaynaklı serbest

radikalleri serbest bırakırlar. Bu da membran hasarının yanı sıra mitokondrilerin permeabilitesini artırmaktadır.

2.4.3. Serbest Radikallerle Oluşan Hücre Zedelenmesi

Serbest radikaller birçok fizyolojik veya patolojik tepkimeler esnasında oluşabilen eşleşmemiş bir elektronu bulunan reaktif moleküllerdir. Eşleşmemiş elektron bu molekülleri oldukça reaktif hale getirir ve protein, lipid ve nükleik asitler gibi önemli molekülleri tahrip edecek tepkimeleri başlatabilir. Fakat canlılar serbest radikal ataklarından korunmak ve oluşabilecek hasarı azaltmak için oldukça kompleks bir defans mekanizması ile donatılmıştır. Son zamanlarda, katarakt, ateroskleroz, Parkinson hastalığı, reperfüzyon hastalığı gibi birçok hastalıkta serbest radikallerin rol oynadığı daha belirgin bir hale gelmiştir (Delibaş ve Özçankaya, 1995).

2.5. Oksijen Radikalleri

Anaerobik şartlarda yaşamaya alışmış canlılar dışında enerji üretmek için oksijene (O_2) ihtiyacı olan tüm hayvan ve bitkilerin yaşadıkları ortamda oksijenin bulunması gereklidir. Dünya atmosferinde O_2 yaklaşık 2×10^9 yıldan bugüne kadar vardır (Halliwell ve Gutteridge, 1989).

Oksijen oluşumunun O_2 üreten organizmaların evrimi ile ortaya çıktığı ileri sürülmektedir. Oksijen dünya üzerinde en çok bulunan elementlerden birisi olup, atmosferde yaklaşık % 21 oranında bulunmaktadır. Ayrıca deniz, göl, nehir gibi ortamlarda su içinde çözülmüş halde bulunan O_2 genelde atmosfer ile dengededir. Atmosferin O_2 içeriği arttığı zaman toksik olabilir. Oksidasyon organizma hücrelerine zararlı ve bazı durumlarda öldürücü etki yapabilmektedir (Halliwell ve Gutteridge, 1989).

Atmosferde bulunan 2 atomlu O_2 moleküllerinin 2 eşleşmemiş elektronu olup, bi-radikal bir elementtir (Halliwell ve Gutteridge, 1989). Elektronlar paylaşılmadığında, ayrı ayrı orbitallerde bulunduklarında ve spinleri aynı yönde oldukları zaman en düşük enerji seviyesindedirler. Bu durumdaki O_2 , tepkimeye girmek için fazla aktif değildir (Akkuş, 1995; Inan, 1998). Nadiren bile olsa dış yörüngedeki elektronların birbirine ters yönelmesi durumunda O_2 'nin organik moleküllerle tepkimeye girme oranı yükselir.

Ancak O_2 çoğunlukla sabit durumda bulunup, reaktif değildir. Bu O_2 'ye bir elektron bağlandığı takdirde süperoksit iyonu olarak adlandırılan bir radikal oluşmaktadır (Halliwell ve Gutteridge, 1989).

Aerobik organizmalar için serbest radikallerin başlıca kaynağı moleküler oksijendir. Çünkü oksijen ortamda sürekli bulunan ve elektrolitik ataklara en uygun olan moleküldür (Ceyhan ve ark. 1996; Şahinoğlu, 1996; İnan, 1998; Adalı, 1998)

Oksijen atomu kararsız yapısını giderebilmek için başka bir oksijen atomunun ya da elementin dış yörüngesindeki elektronu ortaklaşa kullanarak “Serbest Oksijen Radikallerini” veya başka bir ifadeyle “Reaktif Oksijen Türlerini” (ROT) oluşturabilirler (Harman, 1984).

Moleküler oksijenden ROT oluşumunu gösteren tepkimeler:

- (i) $O_2 + e + H^+ \rightarrow HO_2^\cdot$ (hidroperoksil radikali)
- (ii) $HO_2^\cdot \rightarrow H^+ + O_2^{\cdot-}$ (süperoksit radikali)
- (iii) $O_2^{\cdot-} + 2H^+ + e \rightarrow H_2O_2$ (hidrojen peroksit)
- (iv) $H_2O_2 + e \rightarrow OH^\cdot + OH^\cdot$ (hidroksil radikali)
- (v) $OH^\cdot + e + H^+ \rightarrow H_2O$ (su molekülü)
- (vi) $O_2^{\cdot-} + H_2O_2 \rightarrow OH^\cdot + OH^\cdot + O_2$ (Haber–Weiss tepkimesi)
- (vii) $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow OH^\cdot + OH^\cdot + Fe^{3+}$ (Fenton tepkimesi) (Cui ve ark. 2004)

Serbest oksijen radikalleri, oksijenin belirli koşullarda kısmen indirgenmesi sonucu oluşan çok kısa ömürlü ve güçlü oksidan nitelikli oksijen metabolitleridir (Cui ve ark. 2004).

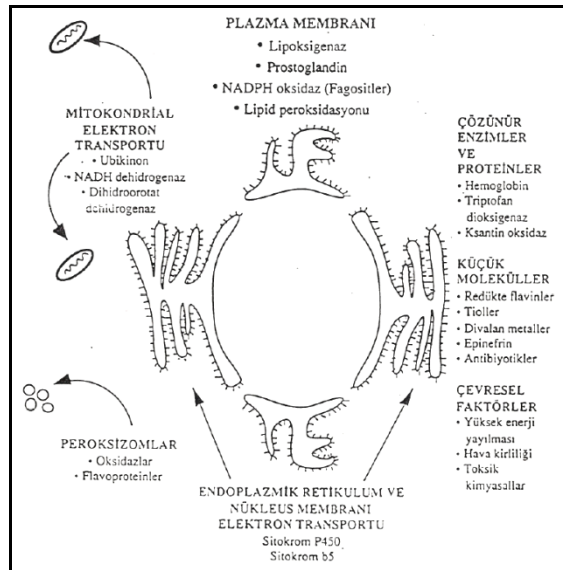
Bilimsel çalışmalarda genellikle bahsedilen oksijen radikali terimini süperoksit radikali ve Hidroksil radikallerinin yanında H_2O_2 gibi reaktif, fakat radikal olmayan türleri ifade etmek için kullanmak doğru olmayıp, daha genel olan reaktif oksijen türleri teriminin kullanılması uygundur (Çizelge 2.1). Oksidant terimi ise H_2O_2 , $OH^\cdot$ ve $HOCl$ (hipoklorik asit) gibi moleküller için geçerlidir. Oysa $O_2^{\cdot-}$ hem oksidant, hem reduktanttır (Bast ve ark. 1997).

Çizelge 2.1. Reaktif oksijen türleri (ROT) (Türe, 1998; Yanbeyi, 1999'dan)

Radikaller	Radikal olmayanlar
Süperoksit radikal (O_2^-)	Hidrojen peroksit (H_2O_2)
Hidroksil radikal ($OH^\cdot$)	Lipit hidroperoksit (LOOH)
Peroksil radikal ($ROO^\cdot$)	Hipohaloz asit (HOX)
Alkoksil radikal ($RO^\cdot$)	N-Halojenli aminler (R-NH-X)
Semikinon radikal (HQ)	Ozon (O_3)
Hemoproteine bağlı serbest radikaller	Azot dioksit (NO_2)

2.6. Reaktif Oksijen Türleri (ROT) Üretim Yerleri

Aktive olmuş oksijen çoğunlukla kompleks kimyasal tepkimelerin rol aldığı metabolizma bileşeni olarak çıkar. Diğer taraftan enzimlerin fonksiyonlarını gerçekleştirememesi sonucu ve elektron transport sistemlerinde oluşan fonksiyon bozuklukları sonucu ortaya çıkar. Hücrede ROT'un oluşabileceği bölgeler aşağıdaki organellerdir (Şekil 2.13) (Halliwell, 1984).



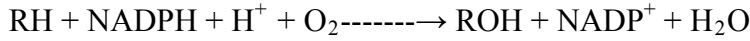
Şekil 2.13. Serbest radikallerin normal koşullarda hücrede oluşum bölgeleri (Yanbeyi, 1999'dan)

2.6.1.Mitokondri

Oksijen çoğunlukla mitokondriyel elektron transport sisteminde yer alan sitokrom oksidaz enziminin tüketilir. Bu sistemde 4 elektronun O_2 'ye aktarılması ile su oluşur. Bitki mitokondrisi sitokrom oksidazdan farklı alternatif oksidaz ve oksijen redüksiyon bölgesini bulundurur. Fakat bu bölgelerden her ikisinde önemli miktarda süperoksit üretmez. Ancak izole edilmiş mitokondri NADH varlığında H_2O_2 ve oksijen üretir. Ubiquinondan elektron akımını inhibe eden antimisin A oksijen indirgenmesini artırır (Rich ve Bonner, 1978). Çeşitli Fe-S proteinleri ve NADH dehidrogenaz de süperoksit ve H_2O_2 oluşuma katkı sağlar (Turrens ve ark. 1982).

2.6.2. Endoplazmik Retikulum (E.R)

Oksidasyon, hidroksilasyonlar, dealkilasyonlar, deaminasyonlar, dehalogenasyon ve deesterasyon gibi çeşitli oksitadif prosesler düz E.R'de gerçekleşir. "Heme" içeren karışık fonksiyonlu oksidazlar NAD(P)H'i elektron donörü olarak kullanarak oksijen atomunu organik substrata ekler. Sitokrom P450 ile katalizlenen bu tepkime şöyledir.



Sitokrom P450'nin rol aldığı mikrozomal NAD(P)H bağımlı elektron transportu sırasında süperoksit radikali oluşumu mümkündür (Winston ve Cederbaum, 1983).

Sitokrom P450 ilk olarak organik substrat olan RH ile tepkimeye girer. Bu kompleks, flavoprotein ile indirgenerek aracı radikal oluşturur. Bu radikal triplet O_2 ile birleşir, çünkü her ikisi eşleşmemiş bir elektron içerir. Bu oksijenlenen kompleks sitokrom b ile indirgenebilir veya arasıra kompleks parçalanarak süperoksit salgılar (Winston ve Cederbaum, 1983).

2.6.3.Mikrobadiler

Peroksizomlar ve glioksizomlar tek membranlı organellerdir. Burada bulunan enzimler glikolat oksidaz, katalaz ve çeşitli peroksidazlardır. Glikolat oksidaz glikolattan oksijene 2 elektron transfer ederek H_2O_2 üretir. Ksantin oksidaz, ürat oksidaz ve NADH oksidaz ürünlerinin oksidasyonu sonucu süperoksit meydana gelir.

Ksantin oksidaz *in vitro* tepkimelerde çoğunlukla süperoksit oluşturan kaynak olarak kullanılmaktadır. Böyle bir ortamda ksantinin ürik aside dönüşümü gerçekleşir (Lindqvist ve ark. 1991)

2.6.4. Plazma Membranları

Süperoksit oluşturan NAD(P)H oksidazın aktivitesi plazma membranı ile zengin fraksiyonlarda belirlenmiştir (Vianello ve Macri, 1991^x). Bu flavoproteinler, belirli quinonler veya nitrojen bileşiklerinin redüksiyonu ile süperoksit oluşturur. Bitki köklerinde NAD(P)H oksidaz Fe^{3+} 'ü Fe^{2+} 'ye dönüştürür. Bu enzimin fonksiyonu bozulursa süperoksit oluşturur (Cakmak ve Marschner, 1988). Bitki NAD(P)H oksidazı hayvan enzimine analog fonksiyona sahiptir. Lökositler dış membran yüzeylerinde NADH oksidaz içerir. Yabancı antijen varlığında bu enzim aktive olarak O_2^- oluşturur. O_2^- oksidasyon tepkimelerini başlatır ve potansiyel patojeni öldürür (Hohn ve Lehere, 1975).

2.7. Reaktif Oksijen Türleri ve Oksidatif Stres

Yüksek kimyasal reaktivitesi bulunduğundan Reaktif oksijen türlerinin seviyeleri normalin üzerine çıktığında yapısal ve fonksiyonel bütünlüğe zarar verebilir. Bu zarar ROT'un hücresel DNA, protein ve lipidleri direk modifiye etmesiyle ya da bu kritik moleküllere zarar verebilecek oksidatif hasarı oluşturmasıyla gerçekleşir. Hücreler ROT 'a karşı çeşitli savunma ve onarım mekanizmalarına sahip olmasına rağmen bu mekanizmaların yetersiz olduğu durumlarda oksidatif stres ortaya çıkmaktadır. Oksidatif stres serbest radikaller ve antioksidan savunma arasında dengesizlik olarak ifade edilmektedir. Akut ve kronik oksidatif stres birçok dejeneratif insan hastalıklarında rol alarak çeşitli fizyolojik fonksiyonları etkileyebilmektedir. Örneğin: ateroskleroz, diabet, iskemi/reperfüzyon (İ/R) hasarı, inflamatuvar hastalıklar (romatoid artrit, inflamatuvar barsak hastalıkları ve pankreatitis), kanser, nörolojik hastalıklar, hipertansiyon, oküler hastalıklar (katarakt, kas dejenerasyonu, retrolental fibroplaziya) pulmoner hastalık ve hematolojik hastalıklar (Halliwell ve Gutteridge, 1989; Maxwell, 1995; Opara, 2004). Yaşlılığa bağlı olarak fizyolojik formda kaybın

gerçekleşmesi, çeşitli biyolojik makromoleküller üzerinde ROT'un kronik etkileri ile bağlantılıdır (Droge, 2003; Cui ve ark. 2004).

2.7.1. Oksijen Radikallerinin Bazı Önemli Biyomoleküllerle Tepkimeleri

Serbest radikaller aracılığıyla gelişen hücre zedelenmesinde özellikle üç reaksiyon rol oynar (Karahana ve ark., 2006);

- Membran lipit peroksidasyonu
- DNA parçalanması
- Proteinlerin çapraz bağlanması

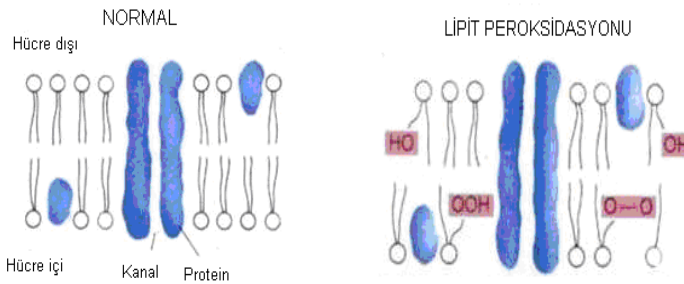
Serbest radikaller, hücrelerin lipit, protein, DNA, karbonhidrat ve enzim gibi tüm önemli bileşenlerine karşı zararlı etkiler göstermektedirler. Mitokondrilerdeki permeabiliteyi bozmakta, hücrenin potasyum kaybını ve trombosit agregasyonunu artırmaktadırlar (Halliwell, 1994).

2.7.1.1. Lipid Peroksidasyonu ve Önemi

Serbest radikal reaksiyonlarının ilk hedefi membran lipitlerindeki doymamış bağlardır. Meydana gelen peroksidasyon, membran akıcılığında, reseptör dizisinde ve hücresel dayanma potansiyelinde düşmeye neden olur.

Serbest radikallerin oluşturduğu ilk etki lipit peroksidasyonudur. Lipitler, serbest radikal tetikleyicisinin etkisiyle bir hidrojen kaybederek aktive olursa (R.) moleküler oksijenle hızla reaksiyona girerler ve serbest peroksil radikalleri ($ROO\cdot$) oluşur. Buna “Lipit Peroksidasyonu” denir (Halliwell, 1994; Reiter ve ark., 2000).

Lipid peroksidasyonu 2 karbon arasında çift bağ içeren doymamış çok karbonlu (poli) yağ asitlerinin oksidatif bozulması olarak ifade edilebilir (Şekil 2.14) (Halliwell, 1984).



Şekil 2.14. Hücre membranında lipit peroksidasyonu (Kılıç, 2005).

Membran ya da polidoymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu karbon zincirinde $-CH_2-$ gruplarından birinden hidrojen atomunun çıkarılması ile başlar. Bu olayı H_2O_2 ve $O_2^{\cdot-}$ gerçekleştiremez. Fakat hidroksil radikali ve muhtemelen $HO_2^{\cdot}$ başlar. Hidrojen atomu bir elektrona sahip olup, elektronunu karbon üzerinde eşleşmemiş elektron olarak bırakır. Oluşan $-CH-$ radikali moleküler düzenlemeye giderek konjuge dien oluşturur. Konjuge dien hızla $O_2^{\cdot-}$ 'ne birleşerek peroksi radikalini meydana getirir. Peroksi radikalleri diğer yağ asitlerinden bir hidrojen çıkararak zincir tepkimesini başlatır. Bu tepkime membran yağ asitleri tamamen hidroperoksitlere oksitleşene kadar devam eder (Halliwell, 1984).

Lipid hidroperoksitleri fizyolojik şartlar altında demir veya bakır tuzları gibi transizyon (geçiş) metali ile karşılaşana kadar sabittir. Cu^{2+} , Fe^{2+} veya Fe^{3+} ve ek olarak hem proteinleri (örneğin sitokrom, hemoglobin) lipid peroksidleri ile etkileşim yapabilir. Bu metal ve kompleksleri karmaşık yollarla lipid hidroperoksitlerini parçalayarak radikaller üretir. Bu radikaller de lipid peroksidlerinin zincir tepkimelerini devam ettirirler. Literatürde MDA'ya çok dikkat çekilmesine rağmen, MDA lipid peroksidasyonunun çok küçük bir son ürünüdür (Halliwell, 1984; McBrien ve ark. 1982).

Sağlıklı insan dokularında lipid peroksitleri veya onların parçalanma ürünleri konusunda çok az kanıt var. İnsanın dışa verdiği solukta gaz halinde hidrokarbonlar bulunur. Bu hidrokarbonlar lipid peroksidlerinin ayrışmasından kaynaklanabilir. Fakat onlar bağırsak bakterileri tarafından ya da deri tarafından da üretilmiş olabilir. Hayvan hücre membranları, lipid peroksidasyonunun kuvvetli inhibitörü olan tokoferol (Vitamin E) ve *in vivo*'da bu prosesi önleyen seruloplazmin ve glutatyon peroksidaz içerir (Halliwell ve Gutteridge, 1984).

Hasta dokular veya etanol, fenil hidrazin ve paraquat gibi toksinlerle etkileşimde kalmış hayvanlardan izole edilen dokular peroksidasyon varlığını göstermektedir. *In vitro*'da yapılan deneyler ölü veya hasar görmüş dokuların sağlıklı olanlardan daha hızla peroksidasyon gösterdiğini ortaya koymuştur. Bu muhtemelen lizozomlardan salınan enzimlerce membranın hasara uğramasından, metal iyonların depo yerlerinden salınmasından ve antioksidan mekanizmalarının başarısızlığa uğramasından kaynaklanır (Halliwell, 1984).

Toksinlerin lipid peroksidasyonunu başlatması 2 şekilde açıklanır.

Toksin $\rightarrow$ lipid peroksidasyonu $\rightarrow$ hasar (1)

Toksin → hücre hasarı yada ölüm → lipid peroksidasyonu (2)

Ölü yada ölmekte olan hücrelerden salınan toksinler sağlıklı olanlara zarar verebilir. Fakat bununla ilgili *in vivo*'da çok az kanıt var. Bu 2 yolun mekanizması konusunda bilim adamlarınca tartışmalar vardır. Bilim adamları 1. tepkimenin sadece karbon tetrakloridin hepatotoksik etkilerinden kaynaklanabileceğini 2. tepkimenin de paraquatın membran lipidlerine etkisi ile gerçekleşebileceğini savunmaktalar (McBrien ve ark. 1982).

Lipid peroksidasyonuna en iyi örnek olarak çeşitli insan dokularında yaşlılık pigmentlerinin birikmesi gösterilebilir. Yaşlılık pigmentlerinin kimyasal analizi onların lipidlere ait oksidatif hasar örneği olduğunu ortaya koymuştur. Normal olmayan hücre lipidleri parçalanmadan önce lizozomların içine girer. Lipidlerin burada hidrolitik enzimler ve metal iyonları ile etkileşimde kalması onların peroksidasyonunu kolaylaştırmaktadır. Hücreler içinde çok miktarda perokside edici materyal bulunduran lizozomlar yaşlandıkça daha fazla lipid hapsetmiş ve biriktirmiş olmaktadır (Sohal, 1981).

2.7.1.2. Proteinlerin Oksidasyonu

Proteinlerin oksidatif atağa maruz kalması sonucu bölgeye spesifik amino asit modifikasyonları, peptit zinciri fragmentasyonu, çapraz-bağlı tepkime ürünlerinin agregasyonu, elektrik yükünde değişim ve proteolizise artan duyarlılık görülmektedir. Peptit yapısında bulunan amino asitlerin oksidatif atağa duyarlılığı farklıdır ve aktive olmuş O_2 'nin farklı formlarının bu aminoasitlerle potansiyel reaktivitesi de farklıdır. Primer, sekonder ve tersiyer protein yapılarına bağlı olarak belirli amino asitlerin nispi duyarlılığı değişebilir. Sulfur içeren amino asitler ve tiyol grupları oksidatif atağa çok duyarlı bölgelerdir. Aktive olmuş oksijen, sistin rezidüelerinden bir H atomu çıkararak oluşan tiyol radikalleri arasında çapraz köprü meydana getirir. Alternatif olarak metionin rezidüesine oksijen eklenirse metionin sulfoksit türevleri oluşur. Bunların her ikisinde indirgenme olayı mikrobiyal sistemlerde tioredoksin ve tioredoksin reduktaz ile başarılabılır (Farr ve Kogoma, 1991).

2.7.1.3. DNA'nın Oksidasyonu

Aktive olmuş oksijen ve serbest oksijen radikallerini oluşturan iyonize radyasyon gibi ajanlar DNA'da çeşitli lezyonlar meydana getirirler. Bu lezyonlar kırılmalar, mutasyonlar ve diğer öldürücü genetik etkiler şeklindedir. DNA hasarının karakterizasyonu hem şeker, hem de baz yapılarının oksidasyona duyarlı olduğunu göstermektedir. Oksidasyon bazın parçalanmasına sebep olur, tek zincir kırığı ve proteinlere çapraz bağlanma meydana getirir. Bazın parçalanmasıyla çeşitli ürünler meydana gelir. Bunlar; 8-hidroksiguanin, hidroksimetil, üre, timin glikol, timin ve adenin halkası açılmış ürünlerdir (Imley ve Linn, 1986).

Ancak hücre bu hasarı önleyecek bir çok DNA onarım enzimlerine sahiptir. Ökaryotik organizmaların DNA'yı çekirdek içinde bulundurmasının bir sebebinin de onu NAD(P)H ve diğer indirgeyicilerden uzak tutarak oksidatif hasardan korumak olduğu düşünülmektedir (Beyer ve ark. 1991).

2.8. Reaktif Oksijen Türleri ve Diğer Serbest Radikallere Karşı Antioksidan Savunma Sistemleri

Hücrelerde, oksidanları inaktif hale getirerek, oksidatif hasarı önleyen, yok eden veya kısmen azaltan maddelere antioksidanlar adı verilmektedir (Onat ve ark., 2002). Antioksidan savunma sistemleri organizmaların evrimleri süresince serbest radikalleri inaktive etme zorunluluğu ile yüz yüze gelmişlerdir. Bu nedenle kendilerini oksidatif ataklardan korumak için çeşitli yollar geliştirmişlerdir (Leutner ve ark., 2001). Organizmalarda, serbest radikallerin zararlı etkilerini ortadan kaldıran güçlü savunma sistemleri bulunmaktadır. Serbest radikallerin oluşum hızı, bu savunma sistemlerinin etkisizleştirme hızı ile dengede olduğu sürece organizma oluşan radikallerden etkilenmemektedir. Denge bozulur, zararlı bileşiklerin oluşum hızı sistemin savunma gücünü aşarsa ya da sistemin savunma gücü azalırsa serbest radikaller zararlı olmaya başlar. Bunun sonucunda oksidatif hasar ortaya çıkar (Meram ve Aktaran, 2002).

Serbest radikallerin değişken tabiatlı ve genellikle kendiliğinden yok olması bir şanstır. Örneğin süperoksit, su varlığında hızla oksijen ve hidrojen perokside dönüşür. Bu dönüşümün oranı birçok hücre tipinde bulunan süperoksit dismutazların (SODs) etkisi ile anlamlı bir şekilde arttırılır. Glutatyon peroksidaz (GSH-Px) gibi diğer

enzimler de serbest radikal yıkımı katalize ederek zedelenmeye karşı koyucudur. Peroksizomlarda bulunan katalaz, hidrojen peroksitin parçalanmasını sağlar. Ayrıca vitamin E ve seruloplazmin gibi endojen veya ekzojen antioksidanlar ya serbest radikal oluşumunu engelleyebilir ya da oluştuklarında onları yok edebilirler (Kumar ve ark., 1999).

ROT fazlasının aktivitesi iç veya dış antioksidan molekülleri ile önlenebilmektedir. Bu moleküllerin düşük konsantrasyonları bile bir substratın oksidasyonunu inhibe edebilmekte veya geciktirebilmektedir (Gutteridge, 1995). Antioksidanlar etkilerini, oksidasyon tepkimesine katılan bir veya daha fazla katılımcının lokal konsantrasyonunu uzaklaştırarak ya da azaltarak gösterirler. Örneğin oksijen, ROT veya oksidasyonu kataliz eden metal iyonlarını (Fe^{3+} , Cu^{2+} , vs.) azaltma ya da yok etmekle etkilerini gösterebilirler. Ayrıca etkilerini oksidasyonu komşu moleküllere yayan zincir tepkimesini engellemekle ve hücre içi (endojenik) antioksidan savunmalarını artırarak da faaliyet gösterebilirler.

Antioksidanlar radikal tepkimelerinin 3 büyük aşamasının herhangi birisine karışabilirler. Bu aşamalar

- 1) Oksidatif stresin başlaması
- 2) Oksidatif stresin yayılması
- 3) Oksidatif stresin sonlanması şeklindedir.

Hücre içi kritik yapılar sadece birkaç antioksidan çeşitleri tarafından değil ilgili enzimler tarafından hasar gören moleküllerin uzaklaştırılması ya da onarılması gibi diğer mekanizmalarla da korunabilirler. Antioksidanlar kimyasal yapısı ve fonksiyon tarzına göre sınıflandırılabilirler (Cui ve ark. 2004).

- 1) Enzim antioksidanları; SOD, CAT, GSH-Px

Bu antioksidanlar ROT oluşunca onları daha zararlı ürünlere dönüştürürler. SOD süperoksit radikalini radikal olmayan H_2O_2 'ye dönüştürür. Fakat H_2O_2 yüksek derecede reaktif hidroksil radikalinin öncüsüdür. H_2O_2 detoksifikasyonu CAT ve GSH-Px tarafından sağlanır. Bu enzimler hücre içi antioksidanlar olup, hücre dışı antioksidanlar daha çok önleyici ve süpürücü tiplerdir.

- 2) Önleyici antioksidanlar;

Bunlar demir ve bakır gibi oksidasyon promotorları ve geçiş metali iyonlarına bağlanarak faaliyet gösterirler. Bilindiği gibi demir ve bakır, eşleşmemiş elektronlar

içermiş olup, serbest radikal oluşumunu kolaylaştırırlar. Önleyici antioksidanlara örnek olarak şunları verebiliriz;

- a) Transferin ve laktoferrin (ferrik iyonlarına bağlanır)
- b) Seruloplazmin (Cu iyonlarına bağlanır, ferrokسيداز aktivitesi olduğundan ferroz iyonlarının ferik iyonlarına dönüşümünü katalizler, demirin transferine bağlanmasını kolaylaştırır.
- c) Haptoglobulinler (hemoglobine bağlanır)
- d) Hemopeksin (hem'e bağlanır)
- e) Albumin (bakır ve hem'e bağlanır)

3) Süpürücü veya zincir kırıcı antioksidanlar (Cui ve ark. 2004):

Serbest radikal zincir tepkimesinin erken aşamasında kendilerini oksidasyona sunarak daha düşük enerjili ürünlerin oluşumunu sağlarlar. Böylece zincir tepkimelerinin daha fazla yayılmasını imkansızlaştırırlar. Lipide çözülebilir (hidrofobik) ve suda çözülebilir (hidrofilik) süpürücüler hücrel ortamlarda faaliyet gösterirler. Lipide çözülebilir süpürücüler; Vitamin E (alfa - tokoferol), beta-karoten, Coenzim Q (CoQ) vs'dir (Murthy, 2001; Cui ve ark. 2004). Suda çözülebilir süpürücüler; Askorbik asit, çeşitli tiyoller, ürik asit, bilirubin vs'dir (Cui ve ark. 2004).

Normal şartlar altında, antioksidan savunma mekanizmaları reaktif oksijen metabolitlerini zararsız seviyelerde tutar. Ancak, serbest radikallere uzun süre maruz kalınması hücrel hasarı önlemede yetersizlikle sonuçlanır (Matés ve Jiménez, 1999; Camougrand ve Rigoulet, 2001).

Antioksidan koruma sistemleri endojen ve ekzojen antioksidanlar olarak sınıflandırılabilir. Süperoksitdismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) endojen antioksidanlara örnek oluştururken, vitamin E, asetilsalisilik asit, selenyum, melatonin ise ekzojen antioksidanlara örnektir.

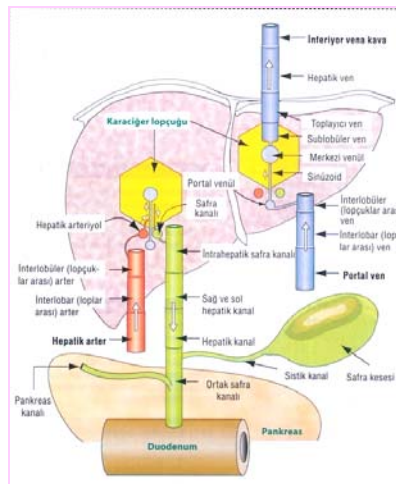
Süperoksitdismutaz (SOD), süperoksit radikalinin, moleküler oksijen ve daha az reaktif olan hidrojen peroksite dönüşümünü katalizlemektedir (Rojkind ve Dominguez-Rosales, 2002). Süperoksit dismutaz, oksijeni metabolize eden bütün hücrelerde bulunur, vücut tarafından üretilen en güçlü antioksidandır ve antioksidan savunmasının belirteci olarak kullanılır (Bagis ve ark., 2003). Katalaz enzimi hidrojen peroksiti su ve moleküler oksijene dönüştürmektedir (Alberts ve ark., 2008). Hücrenin özellikle peroksizom partikülleri ve mitokondrilerinde, daha az yoğunlukta ise sitoplazma ve endoplazmik retikulumunda bulunur (Akyol, 2004). Bir diğer antioksidan,

glutatyonperoksidaz (GSH-Px) enzimi; vücutta hidrojen peroksitin (H_2O_2) detoksifikasyonunda ve ayrıca lipid hidroperoksitlerin detoksifikasyonunda görev alır. Bu nedenle bu enzim hücreleri lipid peroksidasyonuna karşı korumada önemli bir role sahiptir (Rojkind ve Dominguez-Rosales, 2002; Akyol, 2004).

2.9. Karaciğer

Dört loptan oluşan karaciğer insan vücudundaki en büyük bezdir. Karaciğer kollajen ve elastik lif içeren bir kapsül (Glisson) ile çevrelenmiş olup periton ile kaplıdır (Kierszenbaum, 2006) Yaklaşık olarak 1.5 kg ağırlığında olan karaciğere hilum bölgesinden portal ven ve hepatik arter girer, sağ ve sol hepatik kanallar ve lenf damarları çıkar. Bu damarlar ve kanallar, klasik karaciğer lobüleri arasında sonlandıkları portal alanlara kadar bağ dokusu ile çevrilmiştir. Bu noktadan itibaren karaciğer lobüllerindeki hepatositlere ve sinüzoidal endotel hücrelerine destek sağlayan ince bir retiküler lif ağı oluşur (Junquera ve Carneiro, 2006).

Karaciğere kan iki kan damarı yolu ile gelmektedir. Gelen kan hacminin %75-80'i portal ven tarafından sindirim yolu, dalak ve pankreastan gelen kanı taşımaktadır. Hepatik arter oksijenlenmiş kanın %20 ila 25'ini interlobar arter ve interlobüler arter yolu ile portal alana ulaşmadan önce karaciğere ulaştırılır (Kierszenbaum, 2006). Hepatik arter, oksijen bakımından zengin kan ile karaciğere girer. Hepatik portal ven, dalaktan ve sindirim sisteminden kan taşır. Dalaktan alınan kan hemoglobin parçalanma ürünleri bakımından, barsaklardan alınan kan, aminoasitler, lipidler, karbonhidratlar bakımından zengindir (Stevens ve Lowe, 1993; Noyan, 1995).

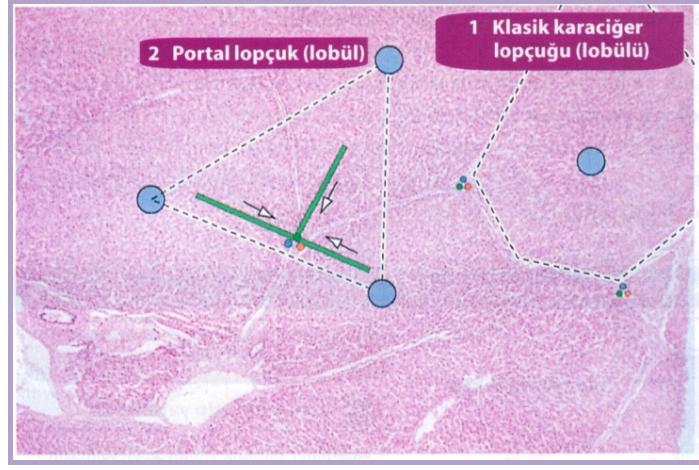


Şekil 2.15. Karaciğerde kan damarları ve kanallar (Kierszenbaum, 2006).

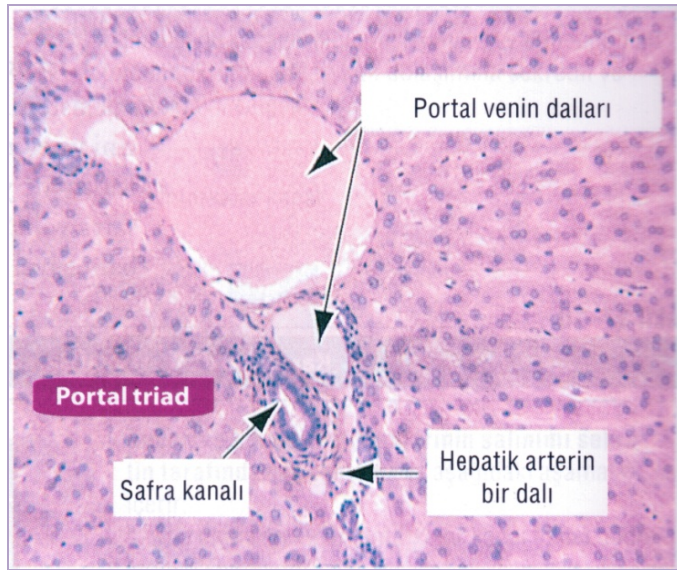
Karaciğerin temel fonksiyonel hücreleri hepatositlerdir. Oldukça fazla sayıda metabolik, endokrin ve salgı fonksiyonlarını gerçekleştirmekte olup karaciğer kütesinin yaklaşık % 80'ini oluşturmaktadırlar. (Smith ve ark., 1988). Hepatositler büyük poligonal hücrelerdir ve her birinin çapı 20-30 mikrometre arasında değişir. Hepatositlerini çekirdekleri büyük, yuvarlak ve merkezi yerleşimlidir. Hematoksilen-eozin ile yapılan boyamada hepatosit sitoplazması genellikle asidofiliktir. Sitoplazmalarında çok sayıda mitokondri ve düz endoplazmik retikulum bulunur (Ross ve ark., 1995). Hepatositler, karaciğer lobülü içinde ışınsal olarak dizilmişlerdir. Hücreler bir duvarın tuğlalarına benzer biçimde bir ya da iki hücre kalınlığında bir tabaka oluştururlar. Bu hücre plakları lobülün periferinden merkezine doğru yönelmişlerdir, labirent şeklinde ve sünger benzeri bir yapı oluşturacak biçimde serbestçe anastomozlaşmışlardır. Bu plaklar arasındaki boşlukta kapillerler bulunur ve bu kapillerlere “karaciğer sinüzoidleri” denir (Gartner ve Hiatt, 1997). Sinüzoidal kapillerler sadece kesintili bir pencereci endotel tabakasından oluşan düzensiz olarak genişlemiş damarlardır. Pencereci yaklaşık 100 nm çapındadır ve eleğe benzer bir görüntü oluşturan kümeler halinde toplanmışlardır (Junquera ve Carneiro, 2006). Endotel hücreleri, altında bulunan hepatositlerden “Disse aralığı” adı verilen subendotelyal bir boşlukla ayrılmıştır. Bu aralıkta hepatositlerin düzensiz mikrovillusları bulunur. Hepatositlerin bu bazal yüzeyindeki mikrovilluslar, yüzey alanını genişleterek hepatositler ve plazma arasındaki madde değişimini altı kat artırırlar (Ross ve ark., 1995). Sonuç olarak kan endotel duvarından kolayca geçer ve hepatosit yüzeyi ile temas eder. Böylece sinüzoid lümeniyle karaciğer hücreleri arasında makromoleküllerin alışverişi kolaylıkla sağlanır. Bu geçiş sadece çok sayıda makromoleküllerin (Örn: lipoproteinler, albumin, fibrinojen) hepatositler tarafından kana verilmesi nedeniyle değil, aynı zamanda bu makromoleküllerin çoğunun hepatositlerce alınıp katabolize edilmesi nedeniyle de fizyolojik önem taşır. Sinüzoid ince bir retiküler lif kılıfıyla sarılıp desteklenmiştir. Endotel hücrelerine ek olarak, sinüzoidler mononükleer fagositik serilerinin fagositik hücrelerini de içerir. Kupffer hücreleri adı verilen bu hücreler endotel hücrelerinin lümene bakan yüzeyinde bulunur (Junquera ve Carneiro, 2006). Kupffer hücreleri monositlerden köken almaktadır (Akay, 2001). Kupffer hücreleri tipik makrofajlardır. Başlıca fonksiyonları yaşlı eritrositleri metabolize etmek, hemoglobini sindirmek ve immünolojik olaylarla ilgili proteinleri salgılamaktır. Yağ depolayıcı hücreler (Ito hücreleri) disse aralığına

yerleşmiş yıldızlı hücrelerdir. Bu hücreler dışarıdan verilen A vitaminini lipid damlaları içinde retinil esterler halinde biriktirme kapasitesine sahiptir. Ancak bu hücrelerin A vitamini metabolizmasındaki rolü tam olarak bilinmemektedir (Junquera ve Carneiro, 2006).

Karaciğerin yapısındaki diğer fonksiyonel birim ise portal lobüldür. Bu lobülün merkezinde portal üçgen yer alır. Lobülün her köşesinde bir santral ven ve birbirine bitişik üç hepatik lobül bulunur. Hepatik lobül poligonal olmasına karşın portal lobül üçgen şeklindedir. Bu lobülde safra lobülün merkezindeki portal üçgende bulunan safra kanalı içine boşalır (Fawcett, 1986).



Şekil 2.16. Karaciğerde klasik ve portal lobül (Kierszenbaum, 2006)



Şekil 2.17. Karaciğerde portal üçgen (Kierszenbaum, 2006)

Karaciğer hem duodenuma safra salgılayarak bir ekzokrin bez olarak görev yapar, hem de direkt olarak kan dolaşımına salınan çeşitli maddeleri sentezleyen bir endokrin bez olarak görev yapar (Fawcett, 1986). Karaciğerin dolaşım sistemindeki konumu, metabolitlerin bir araya getirilmesi, dönüştürülmesi, biriktirilmesi ve toksik maddelerin nötralize ve elimine edilmesi için çok uygundur. Bu eliminasyon karaciğerin lipid sindirimi için önemli bir ekzokrin salgısı olan safrada gerçekleşir (Junquera ve Carneiro, 2006). Salgı yapma fonksiyonundan başka, yaşamla ilgili çok çeşitli işlevleri yerine getiren bir organdır. Sindirim kanalı ile vücudun diğer kısımları arasında kalan tam bir kesişme noktasında yer alan karaciğer, vücudun metabolik dengesini sağlamada görevlidir. Bunlar, sindirilen aminoasitlerin, karbonhidratların, lipidlerin ve vitaminlerin işlenmesi, serum proteinlerinin sentezi, endojen atık ürünlerin ve zararlı ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu ve safra ile atılmasıdır (Kumar ve ark., 1999).

2.9.1. İlaç ve Toksine Bağlı Karaciğer Hasarları

Karaciğer gastrointestinal sistemdeki konumu nedeniyle birçok yabancı maddenin metabolizmasından sorumludur ve ilaç toksitesi için hedef organdır. İlaça bağlı karaciğer zedelenmesi onay almış bir ilacın piyasadan çekilmesinde en önemli faktördür.

Karaciğer hücre zedelenmesinin mekanizmaları;

A) Hücre içi iyon dengesinin bozulması: İlacın intrasellüler proteinlere kovalent bağ ile bağlanması sonucunda hücre içi kalsiyum dengesinin bozulması; aktin yapısının dağılmasına neden olup hücrede şişmeye, hücre zarında parçalanmaya ve hücre yıkımına neden olur.

B) Safra asiti ile oluşan apoptozis: Bazı ilaçlar safra kanaliküler membranındaki transport proteinini etkiler yada safra kanaliküllerine yakın, safra sekresyonundan sorumlu bölgedeki aktin liflerinin yıkımına neden olup safra sekresyonuna engel olabilir. Bu durumda safra asitleri karaciğerde birikir. Başlangıçta hafif hücre zedelenmesi oluşurken belirgin kolestaz ön plandadır. Safra asitlerinin hücre içindeki birikimi sitoplazmada bulunan ve hücre ölümünü tetikleyen reseptörlerin plazma membranına geçişine ve apoptozise neden olur.

C) Programlanmış hücre ölümü (Apoptozis) : Hücre zedelenmesi ile uyarılan immün sistem sitokinleri aktif hale getirip, hücre içi kaspazlarını tetikleyip, hücre ölümüne ve nükleer kromatinin kaybına neden olur.

D) İmmün mekanizma : İlaçlar immün cevap oluşturmayacak kadar küçük moleküllerdir. Ancak biyotransformasyon sonrasında P 450 enzim reaksiyonları sırasında oluşan ara metabolitler enzimlere kovalent olarak bağlanıp ‘adduct’ adı verilen bileşikler oluştururlar. Yeterince büyük olan bileşikler hepatosit yüzeyine taşınıp ya antikör oluşumuna neden olup humoral immüniteyi uyarırlar ya da direkt sitotoksik T hücre cevabı ile sitolizise (hücre sel immünite) neden olurlar.

E) Mitokondriyal fonksiyon bozukluğu: Üç şekilde gerçekleşebilir; Yağ asiti beta-oksidasyonunun inhibisyonu, solunum zinciri enzimlerinin inhibisyonu ya da mitokondriyal DNA’ ya doğrudan etki ile gerçekleşir. Bazı ilaçlar hem beta-oksidasyonu hem de solunum zincirleri fonksiyonlarını inhibe ederler. Serbest yağ asitleri metabolize olmayıp laktat ve reaktif oksijen radikallerinin birikimine yol açar. Bu radikaller mitokondriyal DNA’yı da zedeler. Bu üç olay sonrasında hücrede enerji sıkıntısı çekilir. Mikrovesiküller steatosis, steatohepatitis ve sitolitik hepatitis gerçekleşir. Anaerobik metabolizma ile laktik asidoz ve trigliserid birikimi olur (hücre içi mikrovesiküler yağ birikimi). Nonalkolik steatohepatitis (hücre dışında büyük vesiküllerle enflamasyonun da eşlik ettiği yağ birikimi) ilerleyici olarak makrovesiküler steatohepatitis sonrası gelişir. Hücre ölümü, Mallory cisimciği oluşumu, polimorfonükleer hücre infiltrasyonu, fibrozis ve sirozla sonlanır. Karaciğerin diğer hücreleri de ilaç hasarının hedefi haline gelebilir. Örneğin kupffer hücreleri sitokinleri aktive edip zedelenmenin artmasına neden olabilirler (Eren ve ark., 2004).

Aşırı duyarlı bir reaksiyonun klinik işaretleri tüm durumlarda oluşmayabilir. Ayrıca, çoklu ilaç terapisi alan hastalarda buna sebep olan ajanı belirlemek imkânsızdır. Aynı ilaç farklı hastalarda farklı karaciğer hasar örneklerine neden olabilir. Karaciğer hasar etkisi, diğer farmakolojik ajanların verilmesiyle uyarılmış olabilir. Tanıyı koyacak olan histopatoloğun ilaca bağlı olarak oluşan lezyonların tipini ve bunların ilacın neden olmadığı lezyonların özelliklerinden farkını iyi bilmesi gerekmektedir (Damjanov ve Linder, 1996).

Beklenen toksik etkiler ve beklenmeyen reaksiyonlar arasında ayırım yapılabilir. Beklenen reaksiyonlar molekülün gerçek hepatotoksitesinden kaynaklanır, doza bağlıdır ve kısa latent periyotta oluşurlar. Belirli bir dozu depolayan herhangi bir kişide

meydana gelebilir. Beklenmeyen reaksiyonlar ise; kişinin antijenik bir uyarıya karşı artmış bir bağışıklık yanıt verme eğilimine ve kişinin ajanı metabolize etme hızına bağlıdır (Kumar ve ark., 1999). Beklenmeyen reaksiyonların doz ilişkisi belirgin değildir, latent periyodu haftalar veya aylar sürece kadar uzun olabilir (Damjanov ve Linder, 1996).

Karaciğerdeki ilaca bağlı reaksiyonlar organın hücresel elemanlarında yapısal ve fonksiyonel değişikliklere neden olabilir. (Damjanov ve Linder, 1996).

Klinik alanda toksik hepatik hasarın çoğu önemli formu terapötik ajanlar yoluyla oluşmaktadır. Altıyüz ilaçtan daha fazlasının hepatotoksisite ile ilişkisi bilinmektedir. Hepatotoksisiteye sebep olduğu bilinen ilaçların etkilerini reaktif metabolitler aracılığıyla gösterdiklerini kanıtlayan çok sayıda çalışma bulunmaktadır (Sohn ve ark., 2008).

2.10. Kanser

Normal dokuyu aşan ve onunla koordine olmayan, değişime yol açan, uyarı durduktan sonra bile aynı şekilde aşırı büyümeye devam eden anormal doku kütesine tümör (neoplazm) denir. Neoplastik hücreler belirgin derecede normal hücre büyümesini kontrol eden düzenleyici etkilerden bağımsız çoğalmaya devam ettiğinden, değişime uğrar. Örneğin; zar yapısında bazı glikoproteinlerin sentezi tamamlanamadığı için kontak inhibisyon yok olur, bu nedenle büyüme kontrolsüz olarak gerçekleşir (Kumar ve ark., 1999). Onkolojide neoplazmlar “İyi huylu (benign)” ve “kötü huylu (malign)” olmak üzere 2 kategoriye ayrılır (Kumar ve ark. 1999).

Neoplastik hücreler tek bir kütle içinde küme halinde durdukları sürece bu tümör iyi huylu olarak isimlendirilir. Bu durumda kütle cerrahi yolla çıkarılarak tam tedavi genellikle sağlanabilir. Bir tümör ancak kötü huylu (malin) ise yani hücreleri etrafındakileri istila yeteneği kazanmışsa kanser olarak kabul edilir. İstila genellikle bütünlüğü bozma, kan dolaşımına veya lenf damarlarına girme ve vücudun diğer bölgelerinde, metastaz olarak adlandırılan ikincil tümörler oluşturma yeteneğini ifade etmektedir. Kanser daha geniş alanlara yayılmışsa yok etmek o kadar zorlaşır (Alberts ve ark., 2008).

Normal hücrelerin normal çevrelerine özgü moleküler yaşam sinyallerine bağımlı oldukları düşünülmektedir, bu sinyallerden mahrum kaldıkları zaman hücreler

kendi hücre ölüm mekanizmalarını etkinleştirir ve apoptozise girerler. Metastaz yapabilen kanser hücreleri çoğunlukla normal hücrelerle karşılaştırıldıklarında apoptozise karşı dirençlidirler ve bundan dolayı asıl ortamlarından ayrıldıktan sonra bile yaşayabilir ve büyümeye devam ederler.

Bir hücrenin kanser hücresi olarak başarılı olabilmesi için evrimleştikçe yıkıcı yeni becerilere, bir dizi farklı özellikler bütününe sahip olması gerekir. Farklı kanserler bu özelliklerin farklı bileşimini gerektirir. Bununla birlikte, kanser hücrelerinin genel anahtar davranışlarının aşağıdaki şekilde sıralayabiliriz (Alberts ve ark., 2008);

- 1) Hücre çoğalmasını düzenleyen dıştan ve içten gelen sinyallere itibar etmezler.
- 2) Apoptozis yoluyla intihardan kaçınma eğilimindedirler.
- 3) Tıpkı yapımsal yaşlanmadan ve farklılaşmadan kaçınarak, çoğalmaya karşı programlanmış çoğalma kısıtlamalarını atlatırlar.
- 4) Genetik olarak kararsızdırlar.
- 5) Köken aldıkları dokulardan kaçarlar (istilacıdırlar).
- 6) Yabancı bölgelelerde yaşar ve çoğalırlar (metastaz yaparlar).

Kansere yol açan maddelere karsinojen denir ve bunlar gerek deney hayvanları üzerinde yapılan araştırmalarla gerekse insan topluluklarında kanserlerin rastlanma sıklığını irdeleyen (örn. Sigara içenlerde akciğer kanserinin sık görülmesi gibi) epidemiyolojik çalışmalarla belirlenmiştir. Tümörlerin gelişimi çok aşamalı bir işlem olduğundan birçok değişik faktör kanserin ortaya çıkma olasılığını etkileyebilir. Bu nedenle bir tek maddeyi kanserin nedeni olarak göstermekle olay çok basite indirgenmiş olur. Ancak yine de, radyasyon, kimyasallar ve virusların gerek deney hayvanlarında, gerekse insanlarda kansere neden olduğu gösterilmiştir.

Radyasyon ve birçok kimyasal karsinojen etkilerini DNA hasarı yaparak ve mutasyonları uyarak gösterirler. İnsanda kanser gelişimine neden olabilen karsinojenler arasında, mor ötesi ışını, tütün dumanındaki karsinojenik kimyasallar benzopiren, dimetilnitrozamin ve nikel bileşikler) ve aflatoksin sayılabilir. Bazı diğer karsinojenler mutasyon oluşturmak yerine hücre çoğalmasını uyarak kanser gelişimine zemin hazırlarlar. Tümör gelişimin erken aşamalarında gelişim hızı yüksek hücre topluluğunun aşırı büyümesine neden olacak şekilde hücre bölünme hızını

artırdıklarından bu tür maddelere tümör kamçılayıcılar denir (Cooper ve Hausman, 2006).

Neoplastik hücreleri öldürmek veya yok etmek için çeşitli kombinasyonlar halinde kimyasalların kullanılmasıyla gerçekleştirilen tedavi yöntemine kemoterapi denir. Bu tedavi yönteminde tek bir ilaç kullanıldığı gibi çeşitli ilaç kombinasyonları da kullanılabilir. Kemoterapi, kanserle savaşta en etkili silahlardan biridir. Bu amaçla kullanılan ilaç veya kimyasallara kemoterapötikler denir. Kemoterapötik ajanlar sentetik veya semisentetik olabildiği gibi geniş oranda doğadan izole edilenleri de vardır. Kemoterapötik kullanımındaki en olumsuz belirtilerden biri, kemoterapötik maddenin kanserli hücre üzerine etkili olmasına karşın normal hücrelere de zarar vermesidir (Baloglu, 2001). Birçok kemoterapötik ilaç, etki mekanizmaları temel alınarak 6 sınıfa ayrılır(Baloglu, 2001) :

1- Alkilleyici Ajanlar: Bunlar hücre ölümüne sebep olan, DNA sarmalının açılmasını engelleyerek hücre bölünmesini, DNA replikasyonunu bloke ederler. Cisplatin bu şekilde etkisini gösteren en etkili kematerapötik ajanlardan biridir..

2- Antimetabolitler: Bunlar ya DNA/RNA'nın biyosentetik öncüllerinin yerine geçerek ya da normal öncül biyosentezini inhibe ederek nükleik asit sentezini bozarlar.

3- Karsinolitik antibiyotikler: Bunlar DNA'ya bağlanarak DNA-RNA sentezini engellerler.

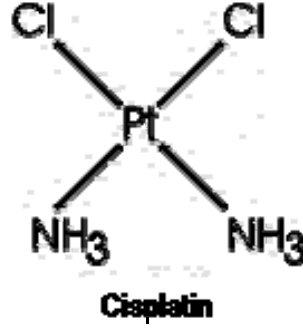
4- Hormonal ajanlar: Over, meme ve prostat tümörleri östrojen ve/veya androjenik hormonlara bağlıdır. Kanseröz durum bu hormonların kaynakları minimize edildiğinde tedavi edilebilir.

5- Mitotik inhibitörler: Mitoz için oldukça önemli olan mikrotübüllerin oluşumunu engellerler. Doğal ürünlerden izole edilen, klinik olarak kullanılan taksol anti-kanser ajanlarının en önemlisidir ve bu grubun bir üyesidir. Ancak bu gruptaki kolçisin ve vinka alkaloidler gibi antimikrotübül ajanlarıncinden farklı bir etki mekanizmasına sahiptir.

6- Misellenöz kemoterapötik ajanlar

2.11. Cisplatin

Cisplatin ($[\text{cis}-(\text{NH}_3)_2\text{PtCl}_2]$, cis-diamminedichloroplatinum (II), cis-platinum (II) veya cis-DDP), iki değerlikli platin atomunun etrafında klor ve amonyum atomlarının bulunduğu horizontal bir yüzeyin cis pozisyonunda inorganik bir bileşiktir (Şekil 2.18). Cisplatin ilk olarak 1845 yılında Micheal Peryon tarafından sentezlenmiş, 1893 yılında Alfred Wegner tarafından yapısı tanımlanmıştır. Sitotoksik özellikleri ise 1965 yılında Barnett Rosenberg tarafından ortaya çıkarılmıştır. *Eschrichia coli*'de platin elektrotunun elektroliz ürünlerinin mitozu inhibe ettiğini ortaya çıkarmıştır bu çalışma esnasında, elektrottan sıvıya geçen platin türevlerinin antibakteriyel ve antineoplastik etki yaptıkları da fark edilmiş ve cisplatin türevlerinin bu amaçla da kullanılabileceği anlaşılmıştır. 1978' yılında Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) cisplatinin servikal, baş, boyun, yumurtalık, testis, mesane gibi kanserlerin tedavisinde klinik kullanımını onaylamıştır (Chirino ve Chaverri, 2009).



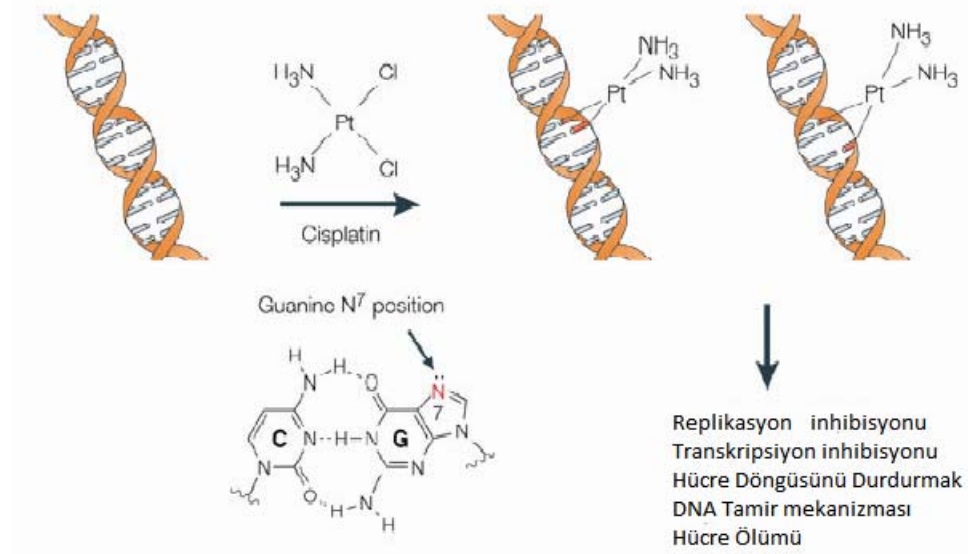
Şekil 2.18. Cisplatinin $[\text{cis}-(\text{NH}_3)_2\text{PtCl}_2]$ kimyasal yapısı (Anonim, 2009c)

2.11.1. Cisplatinin Etki Mekanizması

Cisplatinin moleküler mekanizması üzerine detaylı çalışmalar x-ray, Nükleer magnetik rezonans ve diğer fiziksel-kimyasal metodları içeren çeşitli spektroskopik metodlar kullanılarak açıklanmaya çalışılmıştır.

Yapılan çalışmalarla, cisplatinin başlıca pasif difüzyonla hücreye alındığı ortaya çıkarılmıştır. Alınımı 60 dakika boyunca lineer olarak devam eder ve 1.0mM konsantrasyonun üzerine çıkamaz. Ayrıca, cisplatin absorpsiyonu yapısal analoglar tarafından inhibe edilmez ve hücre içine girişi için bir optimum pH gerekmez. (Tarladaçalışır ve ark., 2005).

Cisplatinin yapısında bulunan klor atomları ayrıldığında nükleik asitler ile kompleks oluşturarak reaktif bileşiğe dönüşür. Daha sonra cisplatin yan yana bulunan guanin molekülünün N7 ve O6 pozisyonlarındaki molekülleri arasında çapraz bağlara sebep olur, bu durum DNA zincirinde lokal denatürasyonla sonuçlanır. Cisplatin DNA addukları replikasyonun inhibe edilmesi, transkripsiyonun inhibe edilmesi, hücre döngüsünün durdurulması, DNA tamir mekanizmalarının aktivasyonu ve hücre ölümü gibi çeşitli hücresel cevaplara neden olur (Şekil 2.19) (Santos ve ark., 2007).

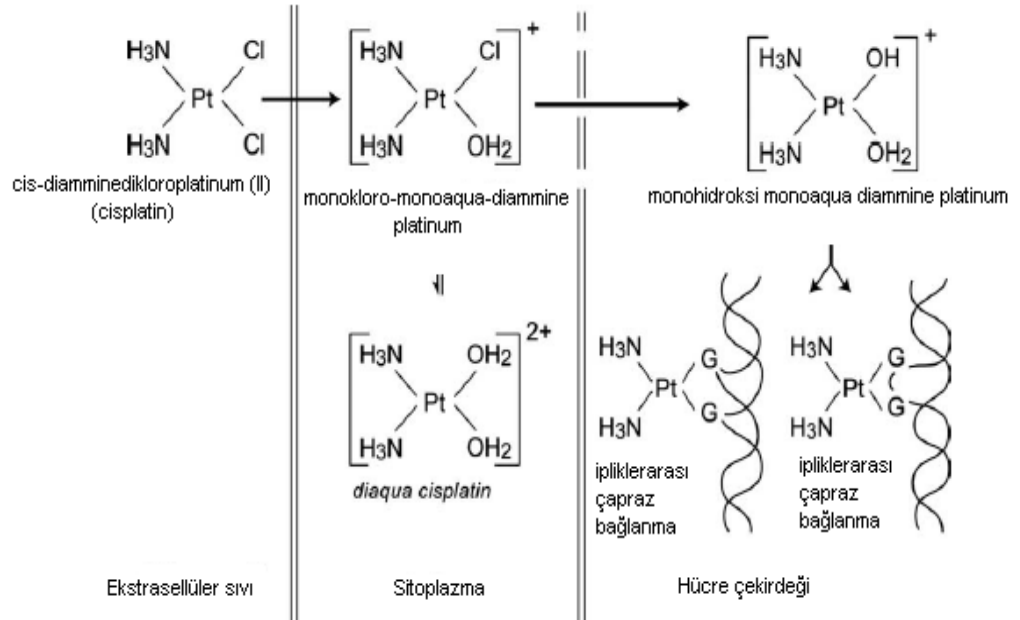


Şekil 2.19: Cisplatinin DNA'ya bağlanması (Anonim, 2009b)

Cisplatin bakır taşıyıcısı olan Ctr 1 yoluyla hücrelere taşınır, karaciğer, böbrek, kalın ve ince barsaklarda toplanır. Hücre içinde ilk olarak cisplatinin kararsız klorid ligandları su molekülleriyle yer değiştirir ve böylece pozitif yüklü ve yüksek oranda reaktif elektrofilik ürünlere (mono-chloro-mono-aquo-diamminne-platinum veya diaquo-diamminne-platinum) dönüşür. Bu toksik türevler lipitler, proteinler gibi makromoleküllerle reaksiyona girerek oksidatif hasara neden olabilmektedirler (Şekil 2.20.). (Hanigan ve Devarajan, 2003, Santos ve ark., 2007) .

Cisplatin reaktivitesi, etrafındaki klorid konsantrasyonundan etkilenir (Topçu, 2003; Tarladaçalışır ve ark., 2005). Cisplatin, az reaktif olduğu ve klorid konsantrasyonunun yaklaşık 100 mM olduğu ekstraselüler alandan, konsantrasyonun aniden 3 mM' ye düştüğü intraselüler sahaya geçince aktive olur (Topçu, 2003). Kandan hücreye basit difüzyon yoluyla giren cisplatinin klor atomları hidrolize olur

(Topçu, 2003; Al Moundhri ve Ali, 2006) ve ilacın nükleik asit ve proteinler ile reaksiyona giren aktif şekillerini oluşturmak için su aracılığıyla yer değiştirir. Sulu ortamda çiftleşmiş elektron içeren oksijen, sülfür ve nitrojen atomları gibi nükleofilik gruplar, klor iyonlarının yerine geçmek üzere platine bağlanır. Bağlanan gruplar deoksiribonükleik asit (DNA) veya ribonükleik asit (RNA)'ın pürin bazında ve birçok aminoasit yan zincirlerinde yer alır. Cisplatin DNA ile etkileşerek, zincir içi ve zincirler arası çapraz bağlar oluşturur. Guanin bazının 7. Azot atomu (N₇) oldukça reaktiftir ve cisplatinin en fazla aynı DNA zincirindeki komşu guaninler arasında çapraz bağ oluşturduğu görülür (Topçu, 2003). DNA zincirinde bölgesel hasara neden olan guanin molekülünün komşu N₇ ve O₂ bölgelerinde çapraz bağların oluşumuna neden olur (Al Moundhri ve Ali, 2006). Guanin-adenin çapraz bağları ikinci sıklıkla oluşur. Zincirler arası çapraz bağ oluşumuna ise daha az rastlanır. Bu bağların ortaya çıkması; DNA'nın transkripsiyon ve replikasyonunu inhibe eder. Ayrıca bu bağlar DNA çift zincirlerinin kıvrılarak, açılmasına neden olur. Böylece DNA molekülü, mobilitesi yüksek grupları ve diğer proteinleri kendine çeker. Cisplatinin modifiye ettiği DNA, yeterince yenilenemediğinden ortaya çıkan bu DNA hasarı apoptozisi başlatır. Bu hasar onarılamayacak boyutlarda ise, hücre tarafından tolere edilemez, hücrenin ölümüne neden olur (Topçu, 2003).



Şekil 2.20. Cisplatinin hücre içine girişi ve DNA' ya bağlanması. (Rujiven ve ark., 2005)

2.11.2. Cisplatin ve Hepatotoksisite

Cisplatin, testis ovaryum, mesane ve boyun kanserlerinin tedavisinde kullanılan en etkili ilaçlardan birisidir. Aynı zamanda endometriyum kanseri, küçük hücreli akciğer kanseri, malignant melanoma ve adrenokortikol kanserlerinde kullanılmaktadır. Cisplatin kemoterapisinin en yaygın yan etkisi nefrotoksisite ve nörotoksitedir. Cisplatinin etkisi doz artırma yoluyla genişletilebilir fakat daha yüksek doz hepatotoksisite gibi daha az yaygın olan toksik etkilere neden olabilmektedir. Cisplatinin sebep olduğu karaciğer hasarı ve bu hasar sonucu oluşan hepatotoksitenin mekanizması hakkında yeterli bilgi bulunmamaktadır (Karahan ve ark., 2006; İşeri ve ark., 2006; Sohn ve ark., 2008).

Karaciğer; toksik kimyasal maddelerin ve diğer materyallerin atılım ve detoksifikasyonunda önemli rolü olan bir organdır ve aynı zamanda toksinlerin ilk hedefidir. Cisplatin ve metabolitlerinin vücuttan atılımında, hepatobilier sistem ile böbrekler birlikte çalışır (Tarladaçalışır ve ark., 2005). Cisplatin böbreklerden sonra en fazla karaciğerde biriktiğinden, yüksek doz uygulamasıyla hepatoksisite gerçekleşir (Zicca ve ark., 2002; Tarladaçalışır ve ark., 2005; İşeri ve ark., 2007). Uozumi ve ark., (1993) tarafından yapılan çalışmada karaciğer ve böbrekte biriken platin miktarı karşılaştırılmış ve karaciğerde birikimin daha fazla olduğu belirtilmiştir. Ayrıca Steward ve ark., (1985) tarafından yapılan bir diğer çalışmada insandan alınan karaciğer ve böbrek örneklerinde, hepatositlerde biriken platin konsantrasyonunun doza bağlı olduğunu fakat böbrek tübüllerdeki birikim için dozun önemli olmadığı belirlenmiştir (Martins ve ark., 2008). Cisplatin, hepatik hasarın belirteçleri olan transaminaz (ALT ve AST) serum miktarlarının artışına neden olur. ALT (alanin aminotransferaz), hepatositlerde bulunan başlıca enzimdir ve hücre hasarına karşı oldukça duyarlıdır. AST (aspartat aminotransferaz) de karaciğer sitoplazması ve mitokondrisinde ayrıca diğer dokularda bulunan karaciğer hasarını yansıtan bir enzimdir. Hepatik hücreler hasar gördüğünde bu enzimler kan dolaşımına serumdaki miktarlarını arttırmak için geçerler (Provan ve Krentz, 2002; Martins ve ark., 2008). Mitokondriler cisplatin toksisitesinde en önemli ve ilk hedef olan organellerdir. Martins ve ark., (2008), bu durumu desteklemiş ve cisplatinin mitokondri fonksiyonu ve yapısında hasara neden olarak antioksidan sistem faaliyetlerini azaltmakta olduğunu, apoptozisin meydana geldiğini belirtmişlerdir. Serbest radikaller mitokondrilerin fonksiyonunda bozukluklara neden

olmaktadır. Yapılan çalışmalarda cisplatinin, lipid peroksidasyonuna, bazı enzim aktivitelerinde değişikliklere ve kromozom anomalilerine neden olduğu belirtilmiştir (Yılmaz ve ark., 2004). Bazı araştırmacılar cisplatin hepatotoksitesinin mitokondrilerde meydana gelen hasarlardan kaynaklandığını bildirmişlerdir. Hepatotoksitede mitokondri ile nükleer bölgedeki platin konsantrasyonu karşılaştırıldığında mitokondrilerde daha yüksek oranda bulunduğu anlaşılmıştır. Böbrekler üzerindeki toksitenin karaciğerden yüksek olmasını, mitokondriyal DNA hasarının böbreklerde daha ileri seviyede olmasına ve böbreklerin hasarlı DNA'yı kompanse etmede karaciğerden daha başarısız olmasına bağlıdır (Tarladaçalışır ve ark., 2005).

Diyabet ve obezite gibi bazı patofizyolojik şartlar, etanol, nikotin gibi bazı kimyasallar cisplatinin neden olduğu hepatotoksiteyi şiddetlendirebilmektedir. Bu durum muhtemelen sitokrom P450 2E1'in artan ekspresyonu yoluyla olmaktadır. Bu izoenzim başlıca karaciğerde ekspresse edilir ve hidrojen peroksit ve süperoksit anyonu gibi reaktif oksijen türlerinin etkili bir üreticisidir. Üstelik CYP2E1 demir katalizli fenton reaksiyonlarının etkinliğini artırabilmektedir. Fenton reaksiyonu güçlü oksidant olan hidroksil radikallerinin üretimine neden olur. Hepatotoksite cisplatinin en sık görülen toksik etkisi olmamasına karşın spesifik şartlar altında meydana gelmektedir. Platinum içeren çok sayıda yeni ajan daha az toksik olabilir diye antineoplastik ajan olarak test edilmiştir ancak cisplatin kemoterapide kullanılan en etkili neoplastik ajan olarak kalmıştır. Bu sebeple cisplatin toksitesine karşı normal dokuları korumak için birçok kimyasal madde çalışmalara konu olmuştur (Santos ve ark., 2007).

Son yapılan çalışmalar cisplatinin sebep olduğu karaciğer hasarında oksidatif stresin önemli rol oynadığını desteklemektedir. Üstelik oksidatif stres antineoplastik aktiviteyi engelleyebilir antioksidan uygulayarak oksidatif stresin azaltılmasıyla tedavinin etkinliği artırılabilir (Conklin, 2004; Pratibha ve ark., 2006). Belirli bileşiklerin antioksidan aktivitesi ile karaciğerde cisplatinin sebep olduğu oksidatif hasara karşı koruyuculuk sağlandığı desteklenmektedir fakat mitokondriyal olaylar vurgulanmamıştır (Koç ve ark., 2005). Çeşitli antioksidan korumalara rağmen mitokondri reaktif oksidant türlerinin başlıca intrasellüler kaynağıdır ve mitokondriyal oksidatif hasarın toksik oksidatif stresdeki temel olay olduğu düşünülmektedir. Mitokondriyal reaktif oksijen türleri programlanmış hücre ölümünün meydana gelmesinde önemlidir. İntrasellüler kaspaz aktivasyonuna öncülük eden apoptotik metabolik yolların farklı fazlarında ve DNA hasarında ROT'un ilişkisi açıkça

kanıtlanmıştır. Cisplatinin sebep olduğu toksisitenin erken hücrel bir bölgesi olarak mitokondrinin rolü önemli kanıtlarla desteklenir. Bu yüzden hücrel korumada gerekli mitokondriyal prosesin anlaşılması büyük oranda cisplatinin sebep olduğu toksisiteye karşı koymak için terapötik stratejilerin geliştirilmesine katkı sağlayacaktır ve sonuçta bu önemli antikanser ilacın etkisinin artması sağlanacaktır (Santos ve ark., 2007).

2.12. Kanser Kemoterapisi ve Antioksidanlar

Kanser kemoterapisi sırasında antioksidantların verilmesi, antineoplastik etkinliği yan etkilerin gelişimini etkiler mi? Her ne kadar invitro sistemlerin ve hayvan modellerinin kullanıldığı klinik öncesi çalışmaların büyük bir çoğunluğu, antioksidantların yararlı olduğu konsantrasyonları desteklese de şu ana kadar sadece birkaç klinik çalışma yapılmıştır. Yukarıdaki soruyu cevaplamak için çalışmaların planlanmasında düşünülmesi gereken faktörler, antioksidantların özellikleri antineoplastik ajanların hareket mekanizmaları ve bu ajanların yan etkilere neden olduğu mekanizmalardır (Conklin, 2004).

Kanser kemoterapisi üzerinde potansiyel etkileri değerlendirildiğinde bütün antioksidanlar eşit olarak değerlendirilemez. Bir antioksidan bütün kanser kemoterapötik ajanların aktivitesi üzerinde aynı etkiye sahip olması beklenemez (Conklin, 2004).

Eğer bir kanser kemoterapötik ajan tarafından ROT oluşumu veya ilacın serbest radikal ara ürünü, ilacın sitotoksitesinde rol oynuyorsa, antioksidanlar ilacın antineoplastik etkisini engelleyebilir. Bununla beraber, eğer reaktif türler sadece ilacın yan etkilerinden sorumlu ise, antioksidanlar, ilacın antineoplastik etkisini engellemeksizin yan etkilerin şiddetini indirgeyebilir. Bu yüzden eğer ROT veya serbest radikal ara ürünler ilacın hareket mekanizmasında rol alıyorsa, ilacın biyolojik sistemlerde oksidatif strese yol açma yeteneği ve rolü arasındaki ayrımı yapmak önemlidir (Conklin, 2004).

2.13. Antioksidanların Terapötik Kullanımı

Diyetle alınan ve endojen antioksidanlar okside edici serbest radikalleri elemine ederek veya reaksiyona girerek hücrel hasarı engellemektedirler. Bununla birlikte

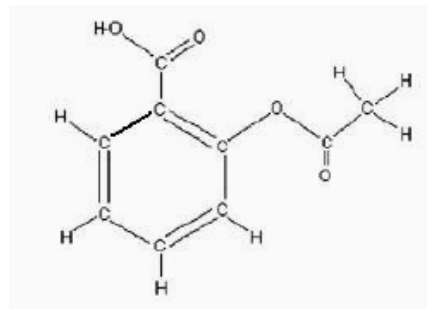
kanser tedavisinde bazı kemoterapötik ajanların hareket mekanizması, malignant hücrelerin hücresel hasarı ve nekrozuna yol açan serbest radikallerin oluşumunu gerektirmektedir (Lamson ve Brignall 1999).

Antioksidanlar, kemoterapinin bazı formlarında oluşan okside edici serbest radikalleri indirgeyebilir ve ayrıca tedavinin etkinliğini azaltabilir. Ayrıca ekzojen antioksidanlar tek başlarına farklı kanser tiplerinde faydalı etkiler gösterebilirler. Hayvan ve insan çalışmaları, antioksidan verildiğinde kemoterapi etkinliğinin indirgendiğini göstermektedir. Bunun yanında antioksidanların yan etkilerinin azalmasına ek olarak pek çok kanser kemoterapötik ajanının artan etkinliğini gösteren kanıtlar da vardır (Lamson ve Brignall 1999).

Cisplatin ile birlikte verilen çeşitli antioksidanlarla yapılan pek çok çalışmada cisplatinin hasar verici etkisinin uygulanan bu antioksidanlarla indirgendiği gösterilmiştir (Liao ve ark., 2008; Liu ve ark., 2008; Maliakel ve ark., 2008).

2.14. Asetilsalisilik Asit

Asetilsalisilik Asit (ASA), ilk kez 1853 yılında Carl R. Gerhart tarafından sentezlenmiştir. 1897 yılında Bayer AG’de işçi olarak çalışan Felix Hoffman, rheumatoid arthritis hastası olan babasına bu ilacı vermesi ile ilacın terapötik kullanımı başlamıştır (Kauffman, 2000). İlk olarak 1853 yılında keşfedilmesine rağmen klinik kullanımına 1899 yılında başlanmıştır (Yanbeyi, 1999). ASA, 1899 yılında Bayer AG Leverkuser, Almanya’da “Aspirin” adıyla ticari olarak markalanmıştır (Kauffman, 2000). Aynı yıl Berlin’deki Imperial Patent Ofisi’ne aspirin ismiyle kimyasal formülü resmi olarak kayıt ettirilerek toz halinde endüstriyel üretimine başlanmıştır (Yanbeyi, 1999). Çok sayıda ticari ismi bulunan ASA’nın kimyasal formülü Şekil 2.21’de gösterilmektedir.



Şekil 2.21: ASA’nın yapısal formülü (Kauffman, 2000)

Yüzyılı aşkın süredir kullanılan ASA'nın kullanım alanları her geçen gün artmaktadır. Ağrı giderici (analjezik), ateş düşürücü (antipiretik) ve anti-inflamatuar etkileri temel kullanım alanlarını oluşturmaktadır (Aydın, 2003). Son 10 yıldır kalp krizinin önlenmesinde kullanılan ASA tarihteki en başarılı ilaç olarak nitelendirilir (Kauffman, 2000).

1970'li yıllara kadar ASA'nın etki mekanizması belirlenememiştir. Etki mekanizması ile ilgili olarak ilk açıklama 1971 yılında Jonh Vane ve ark. tarafından yapılmıştır (Vane, 1971, Yanbeyi, 1999). John Vane, ASA'nın hareket mekanizmasının belirlenmesi konusunda yaptığı çalışmalarla Nobel ödülü kazanmıştır.

2.14.1. Asetilsalisilik Asit Metabolizması

ASA basit bir organik asit olup oral alınımından sonra hızlı bir şekilde mideden ve üst gastrointestinal sistemden absorbe edilir. Plazma pik seviyesi 1-2 saat içinde oluşur, %80 oranında kanda plazma proteinlerine bağlanır. % 80'i karaciğerde glisinle birleşerek salisilürik asit şeklinde çok az bir miktarı da gentisik asit, glukuronoidler ve serbest salisilatlar olarak idrarla atılmaktadır.

ASA'nın klinik kullanımda 4 temel etkisi vardır (Yanbeyi, 1999).

- 1) Analjezik
- 2) Antipiretik
- 3) Anti-inflamatuar
- 4) Antiagregan

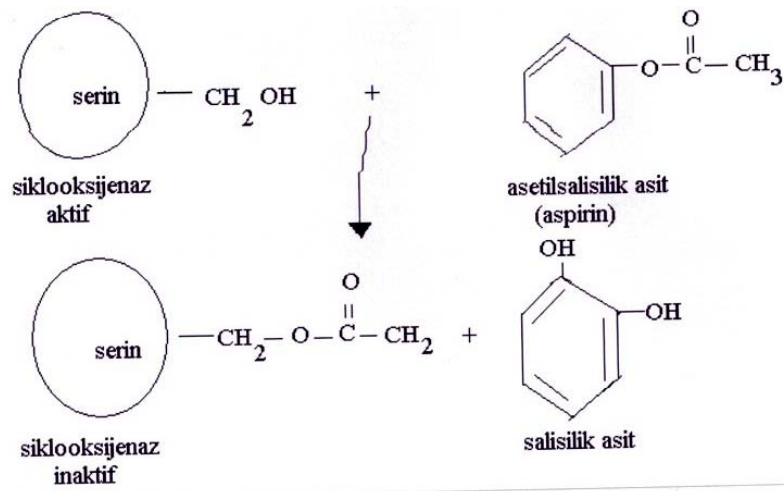
ASA'nın temel etki mekanizması siklooksijenazların ve prostoglandin sentezinin inhibisyonudur. Bu mekanizma analjezik, antipiretik ve trombosit agregasyonunun inhibisyonunu açıklamaktadır (Yanbeyi, 1999).

ASA güçlü bir prostoglandin sentez inhibitörüdür (Riedel ve ark., 2003). prostoglandin sentezinin inhibisyonu ASA'nın etki mekanizmasının temelini oluşturmaktadır. Prostoglandinler 20 karbonlu doymuş bir yağ asiti olan araşidonik asit metabolitlerinden biridir. Tromboksanlar (TXA2 ve TXB2), hidroperoksiykosatekronik asitler (5-HPETE), lökotrienler ve lipoksinler araşidonik asit metabolizmasının diğer ürünleridir (Aydın, 2003).

Araşidonik asitler hücre dışı haberci moleküller olarak kabul edilirler. Hücrede depolanmazlar, kimyasal ya da mekanik bir uyarı olduğunda fosfolipaz A ve fosfolipaz C enzimleri tarafından membran fosfolipitlerinden sentezlenirler. Araşidonik asit metabolitleri lokal hormon olarak işlev görürler. Gerek işlevleri gerekse dokulardaki lokalizasyonları bakımından farklılık gösterirler. Örneğin plateletlerden salınan bir prostoglandin molekülü plateletlerde agregasyona neden olurken düz kas endotelinde prostosiklin (PGI_2) platelet agregasyonunu inhibe etmektedir (Aydın, 2003).

Araşidonik asitten prostoglandinlerin sentezinin gerçekleştiği enzimatik basamak, ASA'nın etki bölgesini oluşturmaktadır. ASA bu etkiyi araşidonik asitten prostoglandin sentezini gerçekleştiren prostoglandin endoperoksit sentetaz enzimini inhibe ederek gerçekleştirir. Bu enzim siklooksijenaz ve peroksidaz olmak üzere iki alt birimden meydana gelmektedir. ASA siklooksijenaz kompleksinin aktif merkezindeki serin aminoasitinin asetillenmesini sağlayarak inhibisyona neden olmaktadır (Şekil 2.22) (Zubay, 1995; Aydın, 2003).

ASA, mide ve ince barsakta emildikten sonra hızlı bir şekilde salisilik aside hidrolize edilir (2 hidroksi benzoik asit), güçlü bir şekilde karaciğerde ve plazma proteinlerine bağlanır, vücuttaki tüm dokulara dağılır. Glutasyon peroksidaz, araşidonik asit kaskadı yoluyla COX-2 ve prostoglandinlerin oluşumunda rol oynamaktadır. Bu durum salisilik asitin koruyuculuğu için önemlidir (Drew ve ark., 2005).



Şekil 2.22. ASA aktif bölgeye yakın olan serin aminoasitini asetilleyerek siklooksijenazı inhibe eder (Zubay, 1995).

2.14.2. Asetilsalisilik Asitin Antioksidan Özelliği

ASA, pek çok hastalık üzerindeki etkisinin yanı sıra güçlü bir antioksidan olduğu bilinmektedir. ASA'nın hidroksil radikalini süpürerek biyolojik hedefleri bu radikalın sebep olduğu hücresel hasardan koruduğu gösterilmiştir (Riedel ve ark., 2003).

ASA'nın $O_2^{\cdot-}$, $OH^{\cdot}$ ve H_2O_2 gibi reaktif oksijen türlerine karşı reaksiyonlarını araştırmak için elektron spin rezonans kullanılarak yapılan çalışma sonucunda ASA'nın askorbat ($k=1.2 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{saniye}^{-1}$), glutatyon ($k=1.5 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{saniye}^{-1}$) ve sistein ($k=1.3 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{saniye}^{-1}$) gibi iyi bilinen antioksidanlardan daha hızlı reaksiyon sabitesi ile ($k = 3.6 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{saniye}^{-1}$) etkili bir hidroksil radikali süpürücüsü olduğu gösterilmiştir (Shi ve ark., 1999). Diğer yandan ASA süperoksit radikali ve hidrojen peroksit üzerinde etkili değildir (Tuvdendorj ve ark., 2003).

Yapılan çalışmalarla Hem oksijenaz-1 (HO-1)'in antioksidan ve doku koruyucu mekanizmalarda önemli bir aracı enzim olduğu ortaya çıkarılmıştır. Artan HO-1 ekspresyonu, Hemoglobin yıkımına, demir, bilirubin ve karbonmonoksit (CO) birikimine yol açar, dokuların oksidatif hasara hassasiyeti azalır (Grosser ve ark., 2003).

Bilirubin doğrudan peroksil radikalini süpürerek antioksidan olarak davranır (Gutteridge, 1995). CO, vasodilatör ve anti-trombosit etkisi ile doku koruyucu olarak etkisini göstermektedir. Nitrik oksit (NO) HO-1'in önemli bir indükleyicisidir. Özellikle endotelde NO'nin hücre koruyucu etkileri, artan HO-1 ekspresyonu ve sonuçta bilirubin ve CO oluşumuna bağlanabilir. ASA'nın yalnızca NO oluşumunu aktive etmediği aynı zamanda sekonder antioksidan olan ve HO-1 ile uyarılan Ferritinin ekspresyonunu artırdığı da bilinmektedir (Grosser ve ark., 2003).

Grosser ve ark. (2003) yapmış oldukları çalışma ile ASA'nın endotel hücrelerinde antioksidan savunma proteini olan HO-1'in enzimatik aktivitesine ek olarak bu proteinin ekspresyonunu artırdığını gösterilmiştir. *In vivo* ve *in vitro* çalışmalar HO-1'in indüklenmesinin anti-inflamatuar, anti-atherojenik ve hücre koruyucu etkilere neden olduğunu göstermektedir. ASA'nın etkisi altında oluşan HO'nun metabolitlerinden bilirubin biyolojik olarak önemli bir antioksidandır. Diğer bir metabolit CO, antiplatellet ve vasodilatör etkisi ile doku koruyucu olarak etkili olmaktadır. CO'nin anti-inflamatuar özellikleri, bilirubinin hücre koruyucu ve antioksidan fonksiyonlarını tamamlayabilir ve destekleyebilir. HO-1'in indüklenmesi ile

oluşan CO ve bilirubinin yanında üçüncü bir metabolit ferritin gibi sekonder antioksidanların indüklenmesidir (Grosser ve ark., 2003). Demir, oksidatif stresin neden olduğu hasarın önemli bir parçasıdır. Ferritin demiri bağlar ve böylece demirin oksidatif hasara katılması engellenir. Bu nedenle ferritin koruyucu antioksidan olarak kabul edilmektedir. ASA ferritin artışını sağlayarak oksidant hasarın neden olduğu doku hasarını azaltabilir (Oberle ve ark., 1998; Wolin, 1998).

2.15. Selenyum

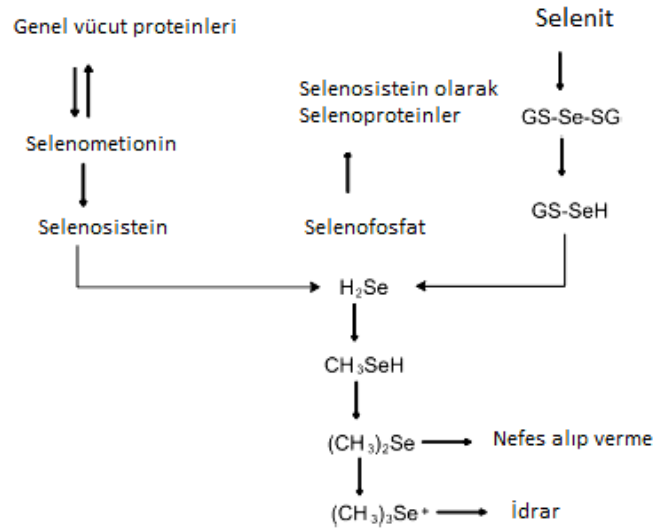
Selenyum insan sağlığı için gerekli iz elementlerden biridir. Selenyum selenoproteinlerin bir parçasıdır, yapısal ve enzimatik özelliklere sahiptir. İmmün düzenleme, ağır metallerin ve karsinogenik organik bileşiklerin detoksifikasyonu gibi önemli düzenleyici ve koruyucu fonksiyonlarda rol oynamaktadır.

Selenyum, 1817 yılında İsveçli kimyacı Berzelius tarafından keşfedilmiştir. Berzelius tellür çeşidi yeni bir element olarak düşünmüştür. Selenyum bir metaldir ve metalloidler içerisinde tellür ve sülfür arasında yer alır. Selenyumun atom numarası 34 ve atomik ağırlığı 78.96'dır (Alexandrova ve ark., 2003).

1951-1957 yılları arasında Schwartz ve Foltz tarafından selenyumun esansiyel bir besin olduğu gösterilmiştir. Selenyum oksidatif hasara karşı koruyucu bir enzim olan glutatyon peroksidaz yapısında yer alarak antioksidan etki gösterdiği 1973 yılında Rotruck ve arkadaşları tarafından ortaya çıkarılmıştır (Alexandrova ve ark., 2003). Aktivitesi 1957 yılında Mills tarafından keşfedilen Glutatyon peroksidaz (GSH-Px), normal koşullarda hücrede bulunan Hidrojen peroksitin detoksifikasyonundan sorumlu enzimdir. (Gamble ve ark., 1997). GSH-Px, lipid peroksidasyonunun başlamasını ve gelişmesini engellemektedir (Seven ve Candan, 1996). Her biri 23 kD olan 4 alt ünitelerden oluşan bir selenoprotein olan GSH-Px, aktif bölgesinde selenosistein formunda selenyum atomu içerir. Selenyum içeren GSH-Px'in bilinen dört formu (GSH-Px1, GSH-Px2, GSH-Px3, GSH-Px4) vardır. Selenyum bağımlı GSH-Px, memeli eritrositlerinde bulunan önemli antioksidan enzimdir. Ayrıca akciğerlerde, kalp, karaciğer ve böbreklerde bulunur (Gamble ve ark., 1997). Hepatositlerde Selenyum bağımlı GSH-Px özellikle sitozol ve mitokondri matriksinde bulunmaktadır (Mimić ve ark., 1999.)

Hayvanlar ve insanlar için esasi bir iz element olan selenyum tahıl, hububat ve sebzeleri içeren besin kaynaklarından sağlanır. Bitkilerin selenyum içeriği de topraktaki selenyum konsantrasyonuna göre farklılık göstermektedir. Volkanik topraklar özellikle minerallerin süzülmesine duyarlıdır. Dünyada selenyum bakımından fakir olan bölgeler, Avustralya, Kuzey Çin, Kuzey Kore, Güney merkezi Çin, Nepal ve Tibet'in kurak bölgeleridir (Tapiero ve ark., 2003).

Bitkiler selenyumu başlıca Selenyum-metionine (Se-Met) çevirirler. Se-Met bitkilerin toplam selenyum içeriğinin yaklaşık % 50'sine karşılık gelmektedir. Yüksek yapılı hayvanlarda Se-Met sentez edilemez, yalnızca selenit olarak verildiğinde Selenosistein (Se-Cys)'e dönüştürülebilmektedir. Memelilerde sindirilen Se-Met, ince barsakta Na^+ bağımlı nötral aminoasit transport sistemi tarafından absorbe edilmektedir (Şekil 2.23) (Burk ve ark., 1995, (Tapiero ve ark., 2003).



Şekil 2.23. Bitki ve Hayvanlarda Selenyumun alımı (Tapiero ve ark., 2003).

Selenyum coğrafik olarak Çin'in, eski Sovyetler Birliği'nin, Venezuela ve Amerika Birleşik Devletleri'nin belirli bölgelerindeki topraklarda yüksek konsantrasyonlarda bulunmaktayken Yeni Zelanda ve Finlandiya'da oldukça düşük konsantrasyonlarda bulunur. Selenyum yaklaşık 40 mikro mineralin yapısında yer alır (Alexandrova ve ark., 2003).

Organlarda selenyum birikimini sıralayacak olursak böbrekler, karaciğer, endokrin bezler, pankreas, kalp, dalak ve beyin olarak sıralanmaktadır. Selenyum

bileşikleri sütte biriktirilir, plasental bariyerden geçebilir. Plasentada ve embriyo karaciğerinde oldukça fazla miktarda selenyum bulunmaktadır. Erkeklerde serum selenyum seviyesi bayanlara göre daha yüksektir. Serum selenyum seviyesi yaş ile birlikte düşme eğilimindedir (Alexandrova ve ark., 2003).

Çeşitli kanser tiplerinde besinsel selenyumun koruyucu olduğu yapılan temel ve klinik çalışmalarla desteklenmiştir. Selenyumun antikanser ajan olarak rolünün muhtemel mekanizması DNA'nın antioksidan korunması, artan karsinojen detoksifikasyonu, hücre döngüsü sürekliliğinin değişimi, tümör hücre istilasının ve angiyojenez inhibisyonunu içermektedir (Hoffmann ve Berry, 2000).

2.15.1. Selenyum Eksikliği ve Etkileri

Toprakta selenyum seviyesinin düşük olduğu coğrafik bölgelerde çoğunlukla eritrositlerin yükselen osmofragilitesine bağlı olarak bazı kardiyovasküler hastalıklar yaygın olarak görülmektedir. Keshan hastalığı ve Keshin Back Hastalığı gibi hastalıklar genellikle diyete Selenyum ilavesiyle geri dönüşümlü olabilmektedir. Selenyum seviyesi eritrositlerdeki bu durum ile yakından ilişkilendirilir (Gamble ve ark., 1997).

Selenyum eksikliği glutatyon (GSH) metabolizmasını etkilemektedir. Bu etkisini GSH'nın sentezini ve karaciğerde serbest bırakılmasını artırarak plazmadaki GSH seviyesinin yükselmesiyle göstermektedir. Selenyum eksikliği aynı zamanda GSH-Px aktivitesinde azalmaya neden olmaktadır (Tapiero ve ark., 2003). Lipit peroksidasyonu üzerine selenyum eksikliğinin potansiyel etkisi bakır veya manganez eksikliğinin aynı anda meydana gelmesi sonucu bazı dokularda artmaktadır. *In vitro* sistemlerde selenyumunun kimyasal formu hücresel cevabın oluşmasında önemli bir faktördür (Camargo ve ark. 2001). Bayanlarla yapılan çalışmada selenometiyonin veya selenat bakımından zengin besin verildiğinde Se-GSH-Px seviyesinde artış olduğu, selenatı verilenlerde bu artışın daha fazla olduğu gösterilmiştir (Gamble ve ark., 1997).

Selenyum eksikliği ile ilişkili muhtemel hastalık durumlarını aşağıdaki şekilde sıralayabiliriz:

Keshan hastalığı, kas zayıflığı ve ağrısı, tırnak değişiklikleri, T ve B hücrelerinde disfonksiyon, koroner arter hastalığı, kesinliği tam olmamakla birlikte kanserdir (Tapiero ve ark., 2003).

2.15.2. Selenoproteinler

Tüm memeli selenoproteinleri UGA kodonu tarafından kodlanan aminoasit selenosistein (Sec) formunda selenyum içermektedir. Bilinen 22 ökaryotik selenoprotein, Sec'in lokasyonuna ve fonksiyonel özelliklerine dayalı olarak farklı selenoprotein grupları şeklinde sınıflanmaktadır. Tanımlanan selenoproteinlerin yarısı antioksidan özellik göstermektedir (Tapiero ve ark., 2003). Selenoprotein ailesinin bazı üyeleri ve fonksiyonları Çizelge 2.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.2. Selenoproteinler ve fonksiyonları (Rayman, 2000)

SELENOPROTEİN	FONKSİYONU
Glutasyon peroksidazlar: GSHPx1, GSHPx2, GSHPx3, GSHPx4 (Sperm) Mitokondriyal kapsül Selenoprotein	Antioksidan Enzimler: Hidrojen peroksit, lipid ve fosfolipit peroksitleri uzaklaştırır. GSHPx'in bir formudur (GSHPx4); sperm hücrelerini oksidatif hasardan korur.
İdotronin deidodinazlar, tioredoksin redüktazlar	Aktif tiroid hormonunun (T3) üretimi ve düzenlenmesi, DNA sentezinde nükleotitlerin indirgenmesi, antioksidan sistemlerin yenilenmesi, hücre içi redoks stabilitesi, transkripsiyon faktörlerinin DNA'ya bağlanması ile gen ifadesinin düzenlenmesi.
Selenofosfat sentaz (SPS2)	Selenofosfatın biyosentezi için ve selenosistein sentezi için gereklidir.
Selenoprotein P	Plazmada bulunur ve endotelial hücrelerle ilişkilidir. Endotelial hücreleri peroksinitrit zararından korur.
Selenoprotein W Prostat Epitelial Selenoprotein (15 kDa)	Kas fonksiyonu için gereklidir. Ventral prostatın epitel hücrelerinde bulunur. Salgı hücrelerini karsinoma gelişimine karşı koruduğu bilinmektedir.
DNA bağlama spermatid selenoprotein (34 kDa)	Glutasyon peroksidaz benzeri aktivite gösterir. Sperm çekirdeğinde, mide ve böbrekte bulunur.

3. MATERİYAL VE METOD

3.1. Hayvan Materyali

Çalışma, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun izniyle yapılmıştır. Çalışmada, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi ve Cerrahi Araştırma Laboratuvarı'nda üretilen *Wistar albino* ratlar kullanıldı. Hayvanlar plastik kafeslerde Samsun Yem Fabrikası tarafından üretilen standart rat yemi ile beslendi. 18–22 °C oda sıcaklığında 12 saat aydınlık/karanlık sağlandı. Aynı jenerasyondan olmalarına özen gösterilerek, 250-320 gr ağırlığında erkek ratlar kullanıldı. Enjeksiyondan önceki 24 saat aç bırakıldı ve su serbest olarak verildi.



Şekil 3.1. *Swiss albino* tipi Laboratuvar Hayvanı (*Wistar albino*)

3.2. Hayvanlara Uygulanan Maddeler

Çalışmamızda kullandığımız cisplatinin, DBL 50mg/50 ml Enjektabl Solüsyon olarak hazırlanan, 1 flakon içeren ambalajlarda satılan formu kullanıldı. Formül içeriği: Cisplatin 50 mg, Mannitol 50 mg, sodyum klorür 450 mg ve enjeksiyonluk su k.m. 50 ml olup, Mayne Pharma Plc firmasından temin edilmiştir. Enjeksiyona hazır olan

cisplatin, 10 mg/kg olarak tek enjeksiyonla intraperitoneal yolla ratlara enjekte edildi (Ajith ve ark., 2006; Santos ve ark., 2007; Avcı ve ark., 2008, Martins ve ark., 2008).

Asetilsalisilik Asit Sigma-Aldrich Germany firmasından temin edilmiştir. Ratlar için, % 0.9'luk serum fizyolojik çözeltisindeki 5 mg/kg/gün'lük dozu intraperitoneal yolla enjekte edildi (Ishizuka ve ark., 2008).

Selenyum, sodium selenit formu olarak (Na_2SeO_3) Sigma-Aldrich Germany firmasından temin edilmiştir. % 0.9'luk serum fizyolojik çözeltisindeki 1 mg/kg/gün'lük dozu intraperitoneal yolla enjekte edildi (Antunes ve ark., 2001, Newairy ve ark., 2007).

3.3. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmamızdaki histolojik takip, gömme ve boyama işlemlerinde kullanılan kimyasal maddeler; Cisplatin, Mayne Pharma Plc firmasından, Hematoksilen, Sodyum iodat (NaIO_3), Eozin, Fosfomolibdik asit, Periodik asit, entellan ve parafin Merck W.Germany firmasından, Asetilsalisilik asit, Sodium selenit, Glasial asetik asit, Ferrik klorid, Biebrich-Scarlet Solusyonu, Asit fuksin, Fosfotungstik asit, Gluteraldehit Sigma Aldrich Germany firmasından, Amonyum alüminyum sülfat, Sitrik asit Aklar Kimya firmasından, Kloral hidrat, Anilin mavisi, Bazik fuksin, Potasyum metabisülfid, Pikrik asit, Aktif kömür Carlo Erbaa firmasından, Absolü Etil Alkol ve Ksilen Riedel-de Haën Firmasından, Formaldehit, Lab Scan Analitical Sciences Firmasından, Osmiumtetraoksit (OsO_4) ve Propilen oksit, Electron Microscopy Sciences firmasından temin edildi. R1030 Agar Scientific Epoksi Rezin Kit kullanıldı.

3.4. Çalışmada Kullanılan Aletler

Çalışmamızda; Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Histoloji Araştırma Laboratuvarında bulunan:

Sartorius CP 224 S Hassas Terazî

Electromag M 6040 BP İnkübatör

Reichert-Jung 2030 Rotary Mikrotom

Cyberscan 500 pH metre

Parafin Su Banyosu

Yellowline MSH Isıtıcı

Beko D 9330 NM Nofrost Buzdolabı
 Leica D 1000 Işık Mikroskobu
 Leica DFC 290 Görüntü Aktarım Aparatı.
 Dell Inspiron Bilgisayar kullanıldı.

Ayrıca OMÜ, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Araştırma Laboratuvarında bulunan:

Clifton Bath Shaker
 Jencons Scientific Limited Su Arıtma Cihazı kullanıldı.

İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda bulunan:

C. Reichert OM U3 Ultramikrotom
 Jeol -Jem 1011 Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) kullanıldı.

3.5. Deney Protokolü

3.5.1. Araştırma Gruplarının Oluşturulması

Çalışmada, Kontrol (K), Cisplatin (CİS), Selenyum (SEL), Asetilsalisilik Asit (ASA), Cisplatin+Selenyum (CİS+SEL), Cisplatin+Asetilsalisilik asit (CİS+ASA), Cisplatin+Selenyum+Asetilsalisilik Asit (CİS+SEL+ASA) grupları olmak üzere 7 grup oluşturuldu. Her grupta 1., 2., 4., 7. ve 14. günlerde 5'er hayvan kurban edildi. (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Çalışma Grupları ve Hayvan Sayıları

Gruplar	1.Gün	2.Gün	4.Gün	7.Gün	14.Gün
Kontrol K(CİS)	5	5	5	5	5
Kontrol K(SEL)	5	5	5	5	5
Kontrol K(ASA)	5	5	5	5	5
Cisplatin (CİS)	5	5	5	5	5
Selenyum (SEL)	5	5	5	5	5
Asetilsalisilik Asit (ASA)	5	5	5	5	5
Cisplatin + SEL	5	5	5	5	5
Cisplatin + ASA	5	5	5	5	5
Cisplatin + SEL+ASA	5	5	5	5	5

3.5.2. Enjeksiyon İşlemi ve Hayvanların Sakrifikasyonu

Kontrol gruplarına deney gruplarında uygulanan maddelerin hacimlerine uygun olarak serum fizyolojik enjekte edildi. Cisplatin (CİS) gruplarına 10 mg/kg madde intraperitoneal (i. p.) yolla tek doz olarak enjekte edildi (Ajith ve ark., 2006; Santos ve ark., 2007; Avcı ve ark., 2008, Martins ve ark., 2008) (Şekil 3.2). Asetilsalisilik asit (ASA) gruplarına 5 mg/kg/gün intraperitoneal yolla enjekte edildi (Ishizuka ve ark., 2008). Selenyum (SEL) gruplarına 1 mg/kg/gün intraperitoneal yolla enjekte edildi (Antunes ve ark., 2001, Newairy ve ark., 2007). CİS+ASA gruplarına 10 mg/kg (i.p.) cisplatin enjeksiyonundan sonra 5 mg/kg (i.p.) Asetilsalisilik asit enjekte edildi. CİS+SEL gruplarına 10 mg/kg (i.p.) cisplatin enjeksiyonundan sonra 1 mg/kg (i.p.) selenyum enjeksiyonu yapıldı. CİS+ASA+SEL gruplarına ise 10 mg/kg (i.p.) cisplatin enjeksiyonundan sonra sırasıyla 5 mg/kg (i.p.) ASA ve 1 mg/kg (i.p.) selenyum enjeksiyonu yapıldı. Cisplatin enjeksiyonu tüm gruplarda tek doz olarak yapıldı. Antioksidan maddelerin enjeksiyonu tüm gruplarda sakrifikasyon gününe kadar her gün uygulandı.



Şekil 3.2. Hayvanlara enjeksiyon işleminin uygulanması

Hayvanların enjeksiyonları ve sakrifikasyon işlemleri gruplar halinde gerçekleştirildi. İlk olarak 4. gün gruplarının, daha sonra 1. ve 2. gün gruplarının, son

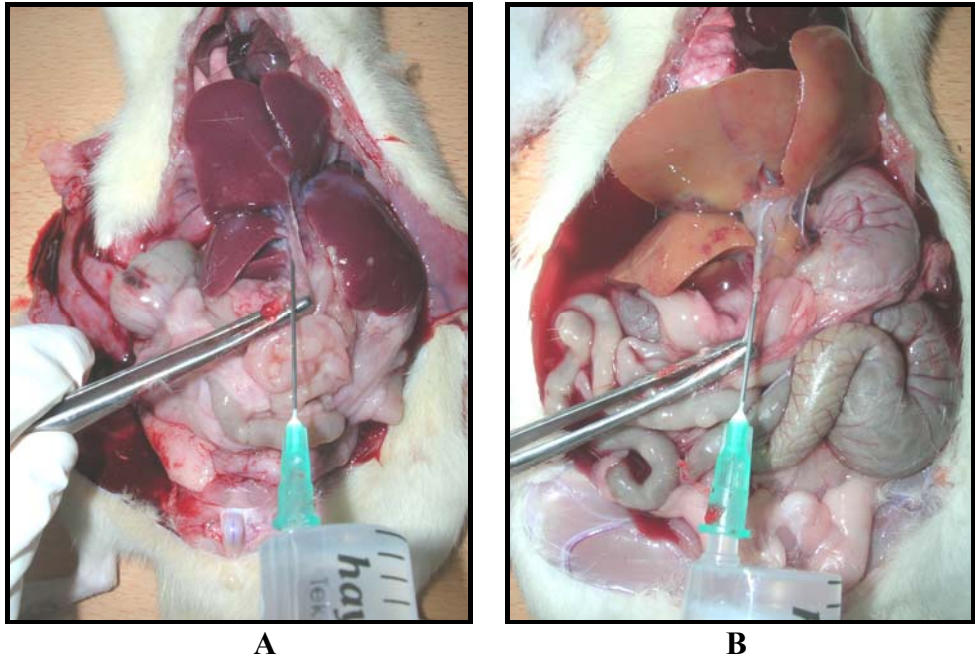
olarak da 7. ve 14. gün gruplarının enjeksiyon ve sakrifikasyon işlemleri gerçekleştirildi.

Gruplar için ratlar, tartılarak ayrı kafeslere ayrıldı, kuyruklarına işaretleme yapılarak hayvan numaraları belirlendi. Hayvanların kilolarına göre doza uygun hacimde madde enjekte edildi. Enjeksiyonlar her gün 10:00-11:00 saatleri arasında yapıldı. Enjeksiyon işleminden sonra hayvanlara günlük yem ve su verildi.

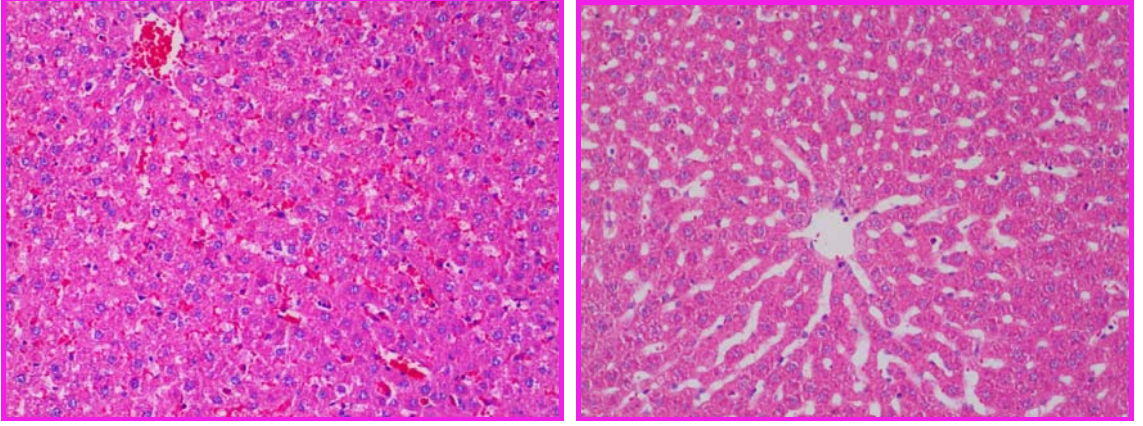
Hayvanlar belirlenen günlere göre servikal dislokasyon yöntemiyle sakrifiye edildi. Hayvanların ağırlıkları sakrifiye edilmeden önce tartıldı. 4., 7. ve 14. gün gruplarının haftalık ağırlıkları kontrol edildi. Bu şekilde hayvanlarda görülen kilo değişimi belirlendi. Buna göre cisplatin gruplarında 7. ve 14. günlerde hayvanlarda kilo kaybı gözlenmiştir. Cisplatin ile birlikte antioksidan uygulanan gruplarda gözlenen kilo kaybı cisplatin gruplarındaki kadar değildi. Ayrıca günlük kontrollerde ve dokuların çıkarılması sırasında görülen farklılıklar not edildi ve fotoğraflandı.

3.5.3. Karaciğerlerin Perfüzyonu, Çıkarılması ve Fiksasyonu

Sakrifiye edilen hayvanın çok kısa süre içerisinde karın bölgesi açıldı, karaciğerlere vena portadan girilerek % 0.9'luk NaCl ile perfüzyon yapıldı.



Şekil 3.3. A) Rat karaciğerinin perfüzyondan önceki görüntüsü B) Rat karaciğerinin perfüzyondan sonraki görüntüsü



Şekil 3.4. Perfüzyonu yapılmamış ve yapılmış karaciğerlerin mikroskobik görüntüsü

Perfüzyonu yapılmış karaciğerin büyük bir kısmı ışık mikroskobik incelemeler için hızlı bir şekilde içerisinde %10'luk tamponlanmış nötral formaldehit bulunan petri içerisine alınarak 1 cm³'lük parçalara ayrıldı ve önceden etiketlenerek hazırlanmış içerisinde %10'luk tamponlanmış nötral formaldehit bulunan kavonozlara alındı. Transmisyon Elektron Mikroskobik (TEM) incelemeler için ise her hayvandan karaciğerin aynı bölgesinden olmak koşuluyla küçük bir parça, içerisinde gluteraldehit bulunan petri içerisinde yaklaşık 1 mm³ 'lük büyüklükte parçalara ayrılarak daha önceden etiketlenerek hazırlanmış ve buz kuveti üzerinde bekletilen içerisinde %2.5'luk tamponlanmış gluteraldehit bulunan ependorf tüplere alındı. Fiksasyon işlemi ışık mikroskobik incelemeler için %10'luk tamponlanmış nötral formaldit içerisinde 8-10 gün, elektron mikroskobik incelemeler için gluteraldehit içerisinde 24 saat uygulandı.

% 10'luk Tamponlanmış Nötral Formaldehitin Hazırlanması

- Na₂HPO₄ 6.5 gr
- NaH₂PO₄.....4 gr
- Formaldehit..... 100 ml
- Distile su..... 900 ml

Gluteraldehit Fiksatifinin Hazırlanması

- 1.484 gr Na₂HPO₄ 82.5 ml distile su içinde çözüldü
- 1.135 gr KH₂PO₄ 82.5 ml distile su içinde çözüldü

- 72 ml Na_2HPO_4 ve 11 ml KH_2PO_4 oranlarında karıştırılarak tampon solüsyonu hazırlandı (pH: 7.4).

- 20 ml Tampon çözeltisinden alınarak 3-3.5 ml % 25'lik gluteraldehit ilave edildi (pH: 7.2).

3.5.4. Işık Mikroskopik İncelemeler İçin Yapılan İşlemler

3.5.4.1. Doku Takibi ve Dokuların Parafine Gömülmesi

Fiksasyon işlemi süresi sonunda dokular etiketlenerek hazırlanan histolojik doku takip kasetlerine yerleştirildi ve fiksatif uzaklaştırmak için 12 saat musluk altında yıkama işlemi uygulandı. Fiksatif dokulardan uzaklaştırıldıktan sonra dokular dereceli etil alkol serilerinden (%70, %80, %90, %96, %100, %100) geçirilerek dehidrate edildi. Bu işlem her bir seride birer saat uygulandı. Dehidratasyon işleminden sonra şeffaflaştırıcı olarak ksilen kullanıldı. 45'şer dakikalık ksilen ve ksilen+parafin işlemlerinden sonra parafinizasyon işlemine geçildi. Yumuşak parafin, yumuşak+sert parafin ve sert parafin içerisinde dokular birer saat bekletildi. İşlemler sonunda L demirleri kullanılarak dokular parafine gömüldü ve etiketlendi.

3.5.4.2. Parafin Bloklardan Kesit Alınması

Parafin bloklardan Rotary mikrotom kullanılarak 5µm kalınlığında kesitler alındı. Parafin şeritler halinde alınan kesitler öncelikle 45-50 °C'ye ayarlı su banyosu içerisine alınıp, açılmaları sağlandıktan sonra lam üzerine alındı.

3.5.4.3. Kesitlerin Boyanması

Alınan kesitlerdeki dokular; genel doku görünümünü gözlemek için Hematoksilen-Eozin (H-E) boyaması, bağ dokusunu gözlemek amacıyla Masson'un üçlü boyaması, hepatositlerdeki glikojeni değerlendirmek amacıyla Periyodik Asit-Schiff (PAS) ve PAS Diastaz boyaması uygulandı (AFIP, 1992; Bancroft ve Stevens, 1996).

Hematoksilen Stok Solusyonu (AFIP, 1992).

- Amonyum alum.....50gr
- Distile Su.....1000 ml
- Hematoksilen kristalleri.....1 gr
- Sodyum Iodat.....0.2 gr
- Sitrik Asit.....1 gr
- Kloral Hidrat.....50 gr

Eozin Stok Solusyonu

- Eozin.....6 gr
- Distile Su.....450 ml
- %100'lük Alkol.....1050 ml
- Glasial Asetik Asit.....60 ml

Mayer'in Hematoksilen&Eozin Boyama Psosedürü (AFIP, 1992).

1) Deparafinizasyon yapıldı:

- 10 dakika ksilende bekletildi X 2
- Kurutulduktan sonra Alkol serilerinden (%100, %96, %90, %80, %70) geçirildi.

- Her alkol serisinde 2'ser dakika bekletildi.
- 5 dakika musluk altında yıkandı.

2) Mayer Hematoksilende 3 dakika bekletildi.

3) Musluk altında yıkandı.

4) %75'lik alkolde 1 dakika bekletildi.

5) Eozinde 3-15 saniye bekletilerek boyama yapıldı.

6) Alkol serilerinden (%70, %80, %90, %96, %100) geçirildi.

7) Kurutulduktan sonra ksilende bekletilerek entellanla kapatıldı.

Her bir gruptan üçer preparat boyanmıştır. Boyama sonucunda hücrelerin çekirdekleri mavi-mor, sitoplazması pembe renge boyanır.

Masson'un Üçlü Boyaması için Solusyonlar (AFIP, 1992; Bancroft and Stevens, 1996)

Bouin Solusyonu

- Pikrik Asit.....75 ml
- Formaldehit.....25 ml
- Glasiyal Asetik Asit...5 ml

Weigert'in Demirli Hematoksileni

Solusyon A

- Hematoksilen.....1 gr
- %96'lık EtilAlkol.....100 ml

Solusyon B

- Ferrik Klorid.....4 ml
- Distile Su.....95 ml
- Konsantre HCl.....1 ml

Biebrich Scarlet- Asit Fuksin Solusyonu

- Biebrich Scarlet.....0.9 gr
- Distile Su.....100 ml
- Asit Fuksin.....0.1 gr
- Glasial Asetik Asit.....1 ml

Fosfomolibdik Asit-Fosfotungstik Asit Solusyonu

- Phosphomolybdic Asit.....2.5 gr
- Phosphotungstic Asit.....2.5 gr
- Distile Su.....100 ml

Anilin Mavisi Solusyonu

- Anilin mavisi..... 2.5 gr
- Glasial Asetik Asit.....2 ml
- Distile Su..... 100 ml

Asetik Asit Solusyonu

- Glasial Asetik Asit.....1 ml
- Distile Su.....100 ml

Masson'un Üçlü Boyaması Prosedürü (AFIP, 1992)

- 1) Kesitler deparafinize ve hidrate edildi,
- 2) Bouin solüsyonunda 56°C'de 30 dakika bekletildi,
- 3) Ilık akarsuda yıkama yapıldı,
- 4) Weigert'in demirli hematoksilin boyasında 7 dakika bekletildi,
- 5) Akarsuda 5 dakika yıkandı,
- 6) Distile suda 1 dakika yıkandı,
- 7) Biebrich Scarlett-Asit fuksin solüsyonunda 2 dakika bekletildi,
- 8) Distile suda 1 dakika yıkandı,
- 9) Fosfomolibdik Asit – fosfotunstik Asit solusyonunda 10 dakika bekletildi,
- 10) Anilin mavisi solusyonunda 5 dakika bekletildi,
- 11) Distile suda 1 dakika yıkadı,
- 12) %1'lik asetik asit solüsyonunda 3-5 dakika bekletildi,
- 13) Distile suda yıkandı,
- 14) Alkol serilerinden geçirilir, kurutma yapıldıktan sonra ksilende bekletildi ve entellanla kapatıldı

Her bir gruptan üçer preparat boyanmıştır. Boyama sonucunda, hücrelerin çekirdekleri siyah, sitoplazma kırmızı, kollajen mavi olarak gözlenir.

Periyodik Asit-Shiff Boyaması için Solusyonların Hazırlanışı (AFIP, 1992)**Periyodik asit**

Periyodik Asit.....0.5 gr

Distile Su.....100ml

Shiff Solusyonu

Bazik fuksin.....1 gr

Distile su.....200 ml

HCl (1N).....20 ml

Potasyummetabisülfid....1 gr

Aktif kömür.....2 gr (Solusyon, tepkimeye girmeyen maddelerin alınması için aktif kömür ile muamele edilip, filtre edildi).

Periyodik asit - Schiff (PAS) Boyaması Prosedürü (AFIP, 1992)

- 1) Kesitler deparafinize ve hidrate edildi,
- 2) % 0,5'lik periyodik asit solüsyonunda 5 dakika bekletildi,
- 3) Akarsuda 1 dakika yıkandı,
- 4) Schiff solüsyonunda 15 dakika bekletildi,
- 5) Akarsuda 5 dakika yıkandı,
- 6) Mayer'in hematoksileninde 3 dakika çekirdek boyaması yapıldı,
- 7) Akarsuda yıkandı,
- 8) Absolü alkolde bekletildi, kurutulduktan sonra ksilende bekletilip entellanla kapatıldı.

Ayrıca PAS Diastaz boyama uygulanmıştır. Bunun için deparafinizasyon aşamasından sonra PAS boyama prosedürünü uygulamadan önce dokular amilaz ile muamele edildi. Bunun için tükürük amilazı kullanılmıştır. Böylece hepatositlerde gözlenen boyanmanın glikojen miktarıyla ilgili karşılaştırması yapılmıştır.

Her bir gruptan üçer preparat boyanmıştır. Boyama sonucunda, hepatositlerin sitoplazmalarında depolanmış olan glikojen tanecikleri magenta rengi tanecikler olarak gözlenirler.

Hazırlanan preparatlar, her grup için rastgele numaralandırma uygulanarak etiketlendi ve mikroskopta değerlendirilmeleri yapıldı.

Değerlendirilmede karaciğerdeki hidropik dejenerasyon, inflamasyon odakları, sinüzoidlerde genişleme, sentral ven çevresindeki parankima hücrelerindeki yapısal değişiklikler, hepatositlerde sitoplazmik değişiklikler, hücre şekilleri ve farklılıkları, hücre çekirdeklerinin çaplarındaki farklılıklar, fibrozis, hepatositlerde glikojen yoğunluğundaki değişimler dikkate alınarak, gruplar arasında karşılaştırmalı olarak yarı kantitatif değerlendirme yapıldı.

Pereparatlar, Leica DM 1000 ışık mikroskobu ile değerlendirildikten sonra Leica DFC 290 görüntü aktarım aparatı ile görüntüler bilgisayara aktarıldı ve mikrofotografları elde edildi.

3.5.5. Transmisyon Elektron Mikroskopik İncelemeler İçin Yapılan İşlemler

3.5.5.1. Fiksasyon ve Post Fiksasyon

Hayvanların sakrifikasyonu esnasında tamponlanmış gluteraldehit içerisine alınan 1mm³ büyüklüğündeki dokuların fiksasyon işlemi +4 °C'de 24 saat olarak uygulandıktan sonra dokular 10 ml'lik doku takip şişelerine alındı ve fiksatifi uzaklaştırmak için 15'şer dakika 3 defa sodyum-potasyum tamponu ile yıkama gerçekleştirildi.

Post-fiksasyon işlemi için Osmiumtetraoksit (OsO₄) kullanıldı. Son derece toksik olan OsO₄, kullanılan her aşamada işlemler çeker ocak altında ve maske kullanılarak gerçekleştirildi.

Doku takip şişeleri içerisindeki dokuların üzerine öncelikle 1 ml tampon çözeltisi koyuldu, üzerine 1 ml OsO₄ koyularak çalkalayıcı üzerinde 2 saat karanlık ortamda bekletildi. Süre sonunda dokular 3 defa 15'er dakika tampon çözeltisinde bekletilerek OsO₄ uzaklaştırıldı.

OsO₄ Fiksatifinin Hazırlanması

Çeker ocak altında kapağı güvenli bir şekilde kapatılabilen ve içerisine 5ml distile su koyulmuş olan cam şişe içerisinde 1 mg'lık OsO₄ ampülü kırıldı. OsO₄'in çözünmesi için bir gece +4°C'de bekletildi.

3.5.5.2. Dehidratasyon

Dehidratasyon aşaması +4 °C'de gerçekleştirildi. Bu aşamada dokular etil alkol serilerinden geçirildi (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. Dehidratasyon aşamaları ve süreleri

Etil alkol yoğunluğu	Süre x seri	Sıcaklık
% 50 Etil Alkol	15 dakika x 2	+4 °C
% 70 Etil Alkol	15 dakika x 2	+4 °C
% 90 Etil Alkol	15 dakika x 2	+4 °C
% 96 Etil Alkol	30 dakika x 2	+4 °C
% 100 Etil Alkol	30 dakika x 1	+4 °C
% 100 Etil Alkol	30 dakika x 1	Oda sıcaklığı
Propilen oksit	30 dakika x 2	Oda sıcaklığı
Propilen oksit+Araldit (1/1)	2 saat	Aydınlık ortam
Araldit resin	1 gece	Aydınlık ortam

3.5.5.3. Dokuların Araldit Resin İçerisine Gömülmesi

Dehidratasyon aşamasından sonra dokular propilen oksitle muamele edildi. Dokular propilen oksit içerisinde 30 dakika x 2 (oda sıcaklığında) bekletildikten sonra propilen oksit + araldit resin (1/1) karışımında 2 saat çalkalayıcı üzerinde aydınlık ortamda bekletildi. Daha sonra dokular saf Araldit resin içerisine alınarak 1 gece çalkalayıcı üzerinde aydınlık ortamda bekletildi. Silikon kalıplarda yeni hazırlanmış Araldit resin içerisine etiketlenerek yerleştirilen dokular 60 °C'ye ayarlanmış inkübatör içerisinde 2 gün bekletildi.

**Şekil 3.5.** Silikon kalıplarda araldit resin içerisine yerleştirilmiş olan dokular

Araldit Resin Hazırlanması

R1030 Epoksi Resin Kit kullanılmıştır.

- Araldit CY 212.....20 ml
- DDSA (Sertleştirici).....20 ml
- Dibutil fitalat.....1 ml
- BDMA (katalizör).....0.6 ml

Araldit CY212 ve DDSA yukarıda belirtilen hacimde hava kabarcığı oluşumunu önlemek için çok yavaş bir şekilde karıştırılır. Karışımın üzerine Dibutil Fitalat eklenir ve karıştırılır. Son olarak BDMA eklenerek karışım homojen hale getirilir.

Araldit resin içerisine yerleştirilerek bloklanan dokuların ultramikrotom ile yarı ince ve ince kesitlerinin alınması, yarı ince kesitlerin boyanması ve ince kesitlerden görüntü elde edilmesi işlemleri İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi (ÇAPA), Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda yapılmıştır.

Hazırlanan bloklardan alınan yarı ince kesitler toluidin mavisiyle boyanıp, hedef bölümler tespit edildi ve ince kesit alınacak bölgeler belirlendi. C. Reichert OM U3 marka ultramikrotom ile 400-600 nanometre kalınlığında alınan ince kesitler, piyeoform ile kaplanmış 100 meşlik bakır veya nikel gridler üzerine alındı. Kontrastlama için 30 dakika uranil asetat ve 10 dakika kurşun sitrat (Reynold's) çözeltisinde bekletildikten sonra Jeol -Jem 1011 transmisyon elektron mikroskobu (TEM) ile incelenerek sayısal kamera (Mega View III) ve görüntüleme yazılımı (AnalySIS, Soft Imaging System GmbH, Almanya) kullanılarak fotoğraflandı.

Transmisyon Elektron Mikroskopik değerlendirmede hepatositlerin ve çekirdeklerin şekli, mitokondrilerin matriks yoğunlukları ve krista durumu, E.R. yapıları, glikojen miktarı dikkate alınarak ışık mikroskopik bulgularla karşılaştırmalı olarak gruplar arasında yarı kantitatif bir değerlendirme yapıldı.

4. BULGULAR

4.1. Işık Mikroskopik Bulguların Değerlendirilmesi

Işık mikroskopik incelemelerde hidropik dejenerasyon, inflamasyon odakları, sinüzoidlerdeki genişlemeler ve hepatositlerdeki sitoplazmik değişiklikler, hücre ve çekirdek çaplarındaki değişiklikler ve hepatositlerdeki glikojen yoğunluğu ve fibrozis yarı kantitatif olarak değerlendirildi. Değerlendirme her bir gruptaki değişikliklerin modu alınarak yapıldı.

4.1.1. Kontrol Gruplarının Karaciğer Histolojisi

Hemetoksilen-Eozin boyama ile karaciğerin genel histolojisi ışık mikroskopunda değerlendirildi. Hepatositler normal yapıda gözlemlendi. Hepatositlerin lobül periferine doğru ışınsal olarak dizilim gösterdikleri, hepatositlerin aralarında santral vene açılan sinüzoidlerin normal genişlikte olduğu gözlemlendi. Hepatosit sitoplazmasının çoğunlukla açık pembe renk boyandığı ve çekirdeklerinin yuvarlak, büyük ve ökromatik olduğu görüldü. Portal alanlarda rastlanan portal ven ile hepatik arterin dalları ve safra kanallarının normal görünümde oldukları belirlendi (Şekil 4.1).

PAS-D boyamada, glikojenin hepatositlerdeki dağılımının fazla olmadığı fakat karaciğer genelinde dağılımın orantılı olduğu gözlemlendi (Şekil 4.2).

Masson'un üçlü boyamasında periportal alanlarda ve santral ven çevresinde yoğun olmayan bağ dokusu belirlendi (Şekil 4.3).

4.1.2. Cisplatinin Karaciğer Üzerindeki Histolojik Etkileri

Bu gruba ait ratların karaciğer dokularının, ışık mikroskopik incelenmesinde Hematoksilen-Eozin boyama ile genel yapısında değişiklikler gözlemlenmiştir.

Cisplatin 1. gün grubunda belirgin bir hasar oluşumu gözlemlenmedi. Genel görüntüde yuvarlak çekirdekli, poligonal hücreler santral venden periferine doğru ışınsal olarak dizilim gösterdiği belirlendi. Hidropik dejenerasyon ve inflamasyon odaklarına rastlanmadı. 2. günde santral ven çevresinde hidropik dejenerasyonun görülmeye

başladığı, sinüzoidlerde fazla olmayan genişlemeler belirlendi (Şekil 4.4). 4. günde santral ven çevresinde daha belirgin olmakla birlikte hücrelerde hidropik dejenerasyon gözlemlendi. Santral ven, portal alan çevresinde inflamasyon odakları belirlendi (Şekil 4.5). 7. günde hücrelerin ışınsal diziliminin düzensizleştiği, santral ven ve portal alan çevresindeki hepatositlerin poligonal şekillerini kaybettikleri, hücreler arasında boyut farklılıklarının olduğu görüldü. Hidropik dejenerasyonda artış belirlendi Ayrıca inflamasyon odaklarında artış görüldü (Şekil 4.6). 14. günde inflamasyon odaklarında hidropik dejenerasyonda 7. güne göre azalma belirlendi (Şekil 4.7).

PAS-D boyama ile cisplatin verilmiş grupların karaciğerlerindeki glikojen miktarı bakımından gruplar arasında farklılıklar görülmekle birlikte glikojen yoğunluğunda az miktarda azalma olduğu belirlendi (Şekil 4.8).

Masson'un üçlü boyamasıyla cisplatin verilmiş olan gruplarda santral ven ve özellikle portal alanlardaki bağ dokusu görüntüsünde gruplar arasında çok belirgin olmamakla birlikte değişiklikler gözlemlendi (Şekil 4.9).

Işık mikroskopik incelemelerin yarı kantitatif değerlendirilmesi Çizelge 4.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. Cisplatin gruplarının yarı kantitatif değerlendirilmesi

Belirlenen değişiklikler	Günler				
	1.Gün	2.Gün	4. Gün	7. Gün	14. Gün
Hidropik dejenerasyon	-	+	++	++	+
Sinüzoidlerde genişleme	-	+	++	+++	+
İnflamasyon odakları	-	-	+++	+++	+
Hepatositlerdeki sitoplazmik değişiklikler	-	-	++	++	+
Hücre ve çekirdek çaplarındaki değişiklikler	-	-	++	++	+++
Hepatositlerdeki glikojen yoğunluğu	+++	+++	++	++	++
Fibrozis	-	-	+	+	+

Santral ven ve portal bölge etrafındaki alanlarda +

Santral ven ile portal bölge etrafındaki ve yakınındaki alanlarda ++

Santral ven ile portal bölge etrafındaki ve daha uzaktaki alanlarda +++

Tüm karaciğerde ++++

Hiçbir değişiklik yok -

4.1.3. ASA'nın Karaciğer Üzerindeki Histolojik Etkileri

Hematoksilen-Eozin boyama ile 1. ve 2. gün grupları kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, kontrol grubundan farklı bir histolojik görünüm gözlenmedi. Santral ven çevresindeki hücrelerin yerleşiminde, hücrelerin ve çekirdeklerinin büyüklüklerinde belirgin bir değişiklik tespit edilmedi. 2. gün gruplarında çok az oranda hidropik dejenerasyon gözlemlendi. 4., 7. ve 14. günlerde ise santral ven çevresindeki sinüzoidlerde az oranda genişleme gözlemlendi (Şekil 4.10).

PAS-D boyama ile ASA verilmiş grupların karaciğerlerindeki glikojen alanları ve glikojen yoğunluğunda fark edilebilir bir değişiklik gözlenmedi.

Masson'un üçlü boyamasıyla ASA verilmiş olan gruplarda fark edilebilir bir fibrozis gözlenmedi.

Işık mikroskopik incelemelerin yarı kantitatif değerlendirmesi Çizelge 4.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. ASA gruplarının yarı kantitatif değerlendirilmesi

Belirlenen değişiklikler	Günler				
	1.Gün	2.Gün	4. Gün	7. Gün	14. Gün
Hidropik dejenerasyon	-	+	+	+	+
Sinüzoidlerde genişleme	-	-	+	++	++
İnflamasyon odakları	-	-	-	-	-
Hepatositlerdeki sitoplazmik değişiklikler	-	-	-	-	-
Hücre ve çekirdek çaplarındaki değişiklikler	-	-	-	-	-
Hepatositlerdeki glikojen yoğunluğu	+++	+++	+++	+++	+++
Fibrozis	-	-	-	-	-

* + ve – ifadeleri Çizelge 4.1.' de verildiği gibidir.

4.1.4. Selenyumun Karaciğer Üzerindeki Histolojik Etkileri

Hematoksilen-Eozin boyama ile selenyum gruplarını kontrol grubuyla karşılaştırdığımızda 1. ve 2. gün gruplarında kontrol grubundan farklı bir histolojik görünüm gözlenmezken 4., 7. ve 14. günlerde santral ven çevresindeki sinüzoidlerde çok belirgin olmayan genişlemeler ve çok az oranda hidropik dejenerasyon gözlendi (Şekil 4.11).

PAS-D boyama ile selenyum verilmiş grupların karaciğerlerindeki glikojen yoğunluğunda fark edilebilir bir değişiklik gözlenmedi.

Masson'un üçlü boyamasıyla selenyum verilmiş olan gruplarda fark edilebilir bir fibrozis gözlenmedi.

Işık mikroskopik incelemelerin yarı kantitatif değerlendirmesi Çizelge 4.3'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.3. SEL gruplarının yarı kantitatif değerlendirilmesi

Belirlenen değişiklikler	Günler				
	1. Gün	2. Gün	4. Gün	7. Gün	14. Gün
Hidropik dejenerasyon	-	-	+	+	+
Sinüzoidlerde genişleme	-	-	+	++	++
İnflamasyon odakları	-	-	-	-	-
Hepatositlerdeki sitoplazmik değişiklikler	-	-	-	-	-
Hücre ve çekirdek çaplarındaki değişiklikler	-	-	-	-	-
Hepatositlerdeki glikojen yoğunluğu	+++	+++	+++	+++	+++
Fibrozis	-	-	-	-	-

* + ve – ifadeleri Çizelge 4.1.' de verildiği gibidir.

4.1.5. Cisplatin+ASA'nın Karaciğer Üzerindeki Histolojik Etkileri

Hematoksilen-Eozin boyama ile 1. günde belirgin bir değişiklik gözlenmedi. 2. günde sinüzoidlerde hafif şiddette genişlemeler, belirgin olmayan hidropik dejenerasyon gözlemlendi. 4.ve 7. günlerde cisplatin gruplarına göre daha az oranda inflamasyon odakları, hidropik dejenerasyon ve sinüzoidlerde fazla olmayan genişlemeler belirlendi (Şekil 4.12). 14. günde kontrol grubuna yakın histolojik görünüm elde edildi. İnflamasyon odaklarına ve hidropik dejenerasyona rastlanmadı.

PAS-D boyama ile cisplatin+ASA verilmiş grupların karaciğerlerinde glikojen miktarında çok az oranda azalma olduğu belirlendi.

Masson'un üçlü boyamasıyla cisplatin+ASA verilmiş olan gruplarda fark edilebilir bir fibrozis gözlenmedi.

Işık mikroskopik incelemelerin yarı kantitatif değerlendirmesi Çizelge 4.4'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.4. CİS+ASA gruplarının yarı kantitatif değerlendirilmesi

Belirlenen değişiklikler	Günler				
	1.Gün	2.Gün	4. Gün	7. Gün	14. Gün
Hidropik dejenerasyon	-	+	++	++	-
Sinüzoidlerde genişleme		+	+	+	-
İnflamasyon odakları	-	-	+	-	-
Hepatositlerdeki sitoplazmik değişiklikler	-	+	+	+	-
Hücre ve çekirdek çaplarındaki değişiklikler	-	-	++	++	++
Hepatositlerdeki glikojen yoğunluğu	++	++	++	++	++
Fibrozis	-	-	-	-	-

* + ve – ifadeleri Çizelge 4.1.' de verildiği gibidir.

4.1.6. Cisplatin+Selenyumun Karaciğer Üzerindeki Histolojik Etkileri

Hematoksilen-Eozin boyama ile 1. günde inflamasyon odakları ve hidropik dejenerasyon gözlenmezken sinüzoidlerde hafif şiddette genişlemeler belirlendi. Genel görünüm normale yakındı. 2. günde az olmak üzere inflamasyon odakları, santral ven çevrelerinde hidropik dejenerasyonun başladığı, sinüzoidlerde fazla olmayan genişlemeler belirlendi. 4. Günde az da olsa inflamasyon odakları ve sinüzoidlerde genişlemeler gözlemlendi. 7. günde fazla olmayan inflamasyon odakları, sinüzoidlerde az oranda genişlemeler ve fazla olmayan hidropik dejenerasyon belirlendi. 14. günde kontrol grubuna yakın histolojik görünüm elde edildi. İnflamasyon odaklarına ve hidropik dejenerasyona rastlanmadı (Şekil 4.13).

PAS-D boyama ile cisplatin+selenyum verilmiş grupların karaciğerlerindeki glikojen yoğunluğunda fark edilebilir bir değişiklik gözlenmedi.

Masson'un üçlü boyamasıyla cisplatin+selenyum verilmiş olan gruplarda fark edilebilir bir fibrozis gözlenmedi.

Işık mikroskopik incelemelerin yarı kantitatif değerlendirmesi Çizelge 4.5'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.5. CİS+SEL gruplarının yarı kantitatif değerlendirilmesi

Belirlenen değişiklikler	Günler				
	1. Gün	2. Gün	4. Gün	7. Gün	14. Gün
Hidropik dejenerasyon	-	+	+	+	-
Sinüzoidlerde genişleme	+	+	+	+	-
İnflamasyon odakları	-	+	+	+	-
Hepatositlerdeki sitoplazmik değişiklikler	-	+	+	+	-
Hücre ve çekirdek çaplarındaki değişiklikler	-	-	++	+	+
Hepatositlerdeki glikojen yoğunluğu	+++	+++	+++	+++	+++
Fibrozis	-	-	-	-	-

* + ve – ifadeleri Çizelge 4.1.' de verildiği gibidir.

4.1.7. Cisplatin+ASA+Selenyumun Karaciğer Üzerindeki Histolojik Etkileri

Hematoksilen-Eozin boyama ile 1. günde fark edilebilir bir değişiklik gözlenmedi. Genel görünüm normale yakındı. 2. günde çok az oranda inflamasyon odakları, santral ven çevrelerinde hidropik dejenerasyon, sinüzoidlerde fazla olmayan genişlemeler belirlendi. 4. ve 7. günde, sinüzoidlerde az oranda genişlemeler ve fazla olmayan hidropik dejenerasyon belirlendi. 14. günde kontrol grubuna yakın histolojik görünüm elde edildi. Hepatositlerin ışınsal düzenlenmesinin normale yakın olduğu belirlendi. İnflamasyon odaklarına ve hidropik dejenerasyona rastlanmadı (Şekil 4.14).

PAS-D boyama ile cisplatin+selenyum verilmiş grupların karaciğerlerindeki glikojen yoğunluğunda fark edilebilir bir değişiklik gözlenmedi.

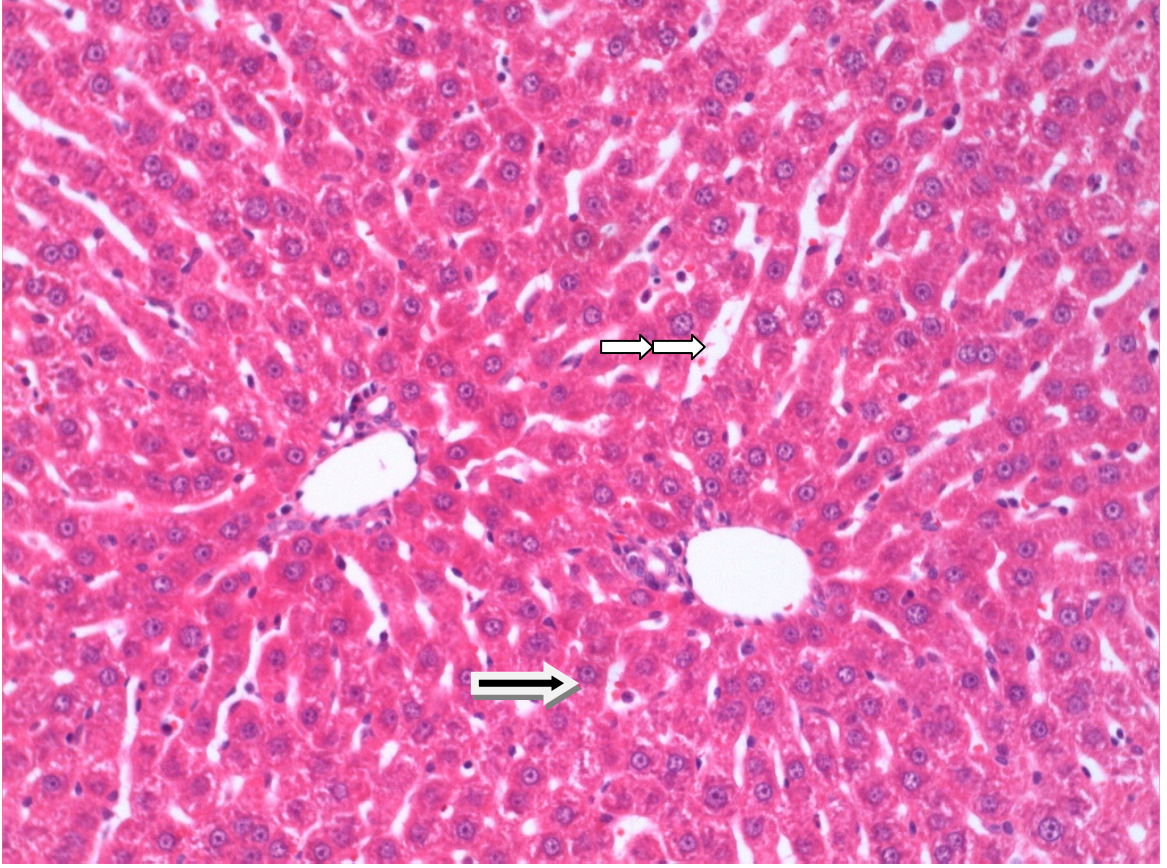
Masson'un üçlü boyamasıyla cisplatin+selenyum verilmiş olan gruplarda fark edilebilir bir fibrozis gözlenmedi.

Işık mikroskopik incelemelerin yarı kantitatif değerlendirmesi Çizelge 4.6'da gösterilmiştir.

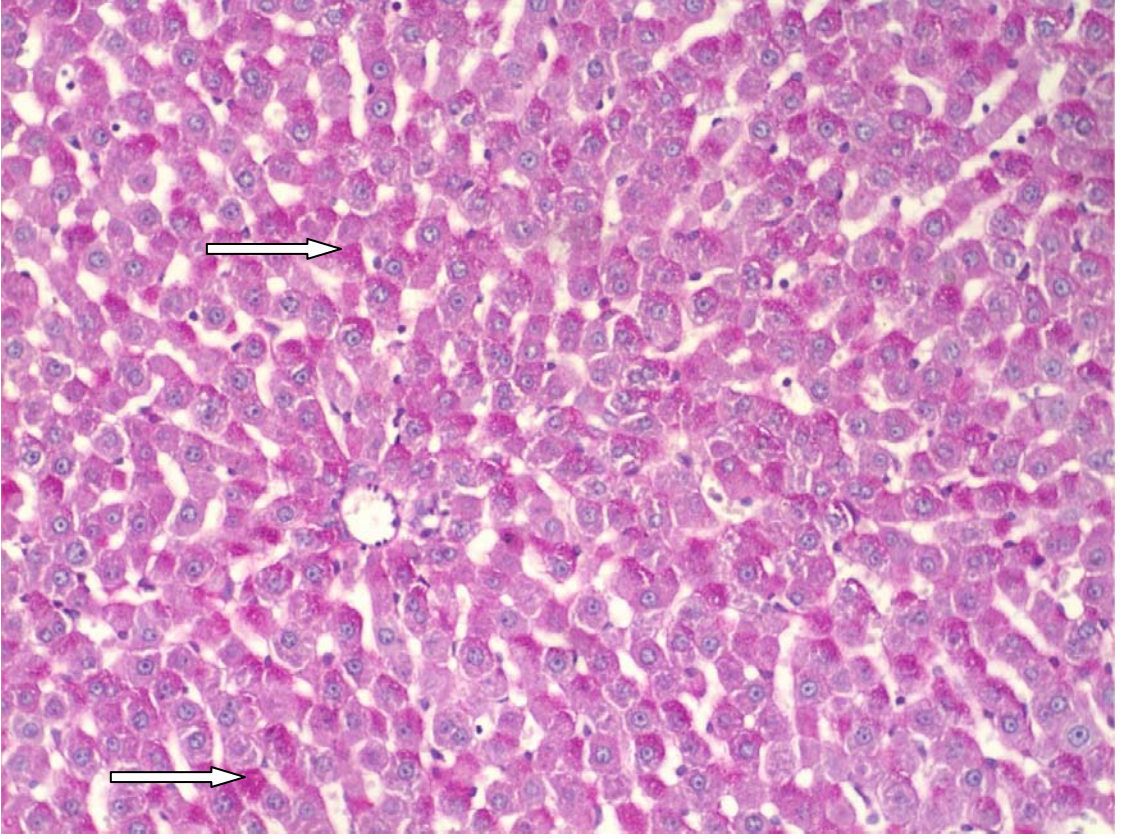
Çizelge 4.6. CİS+ASA+SEL gruplarının yarı kantitatif değerlendirilmesi

Belirlenen değişiklikler	Günler				
	1. Gün	2. Gün	4. Gün	7. Gün	14. Gün
Hidropik dejenerasyon	-	+	++	++	-
Sinüzoidlerde genişleme	-	+	+	+	-
İnflamasyon odakları	-	+	+	-	-
Hepatositlerdeki sitoplazmik değişiklikler	-	+	+	+	-
Hücre ve çekirdek çaplarındaki değişiklikler	-	-	+	+	+
Hepatositlerdeki glikojen yoğunluğu	+++	+++	+++	+++	+++
Fibrozis	-	-	-	-	-

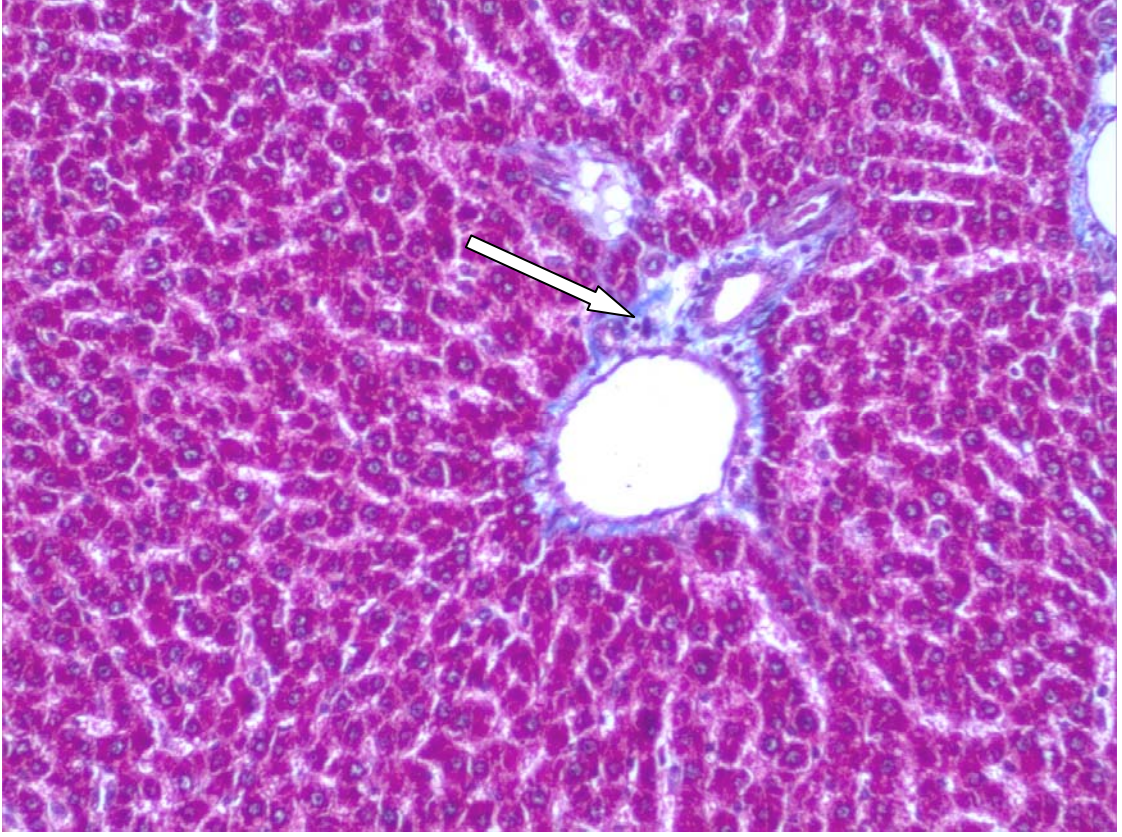
* + ve – ifadeleri Çizelge 4.1.' de verildiği gibidir.



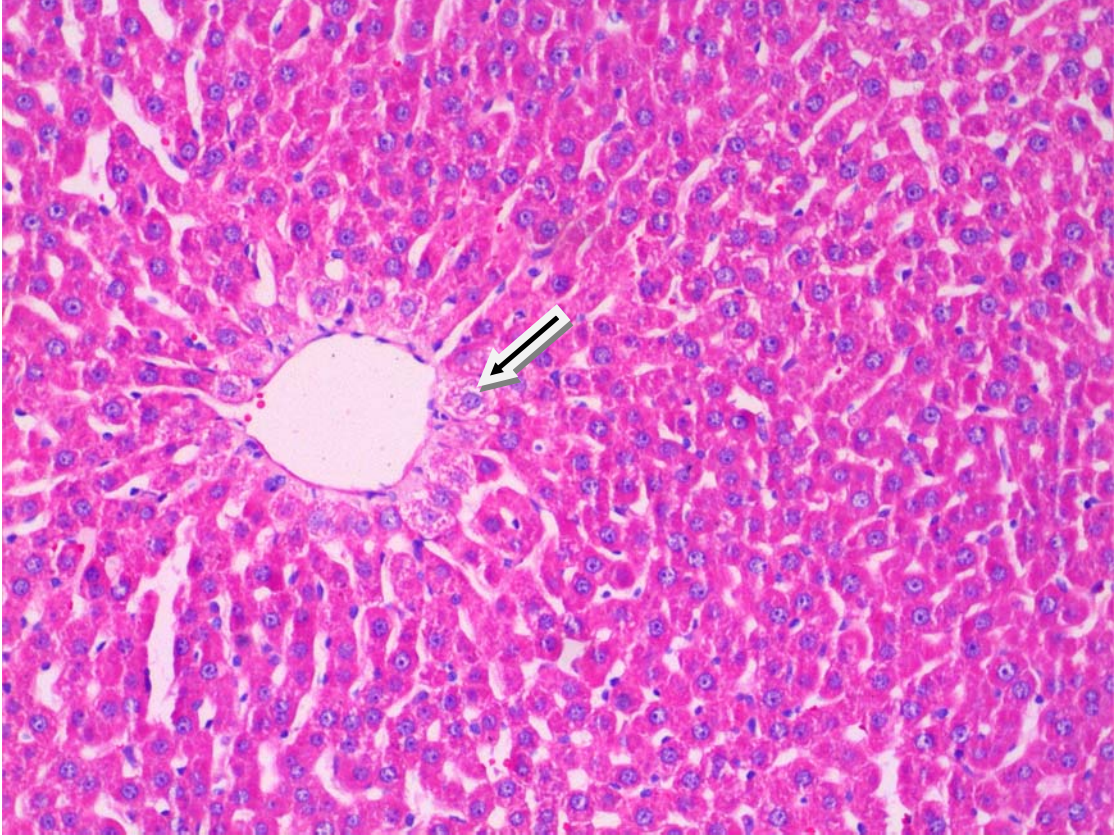
Şekil 4.1. Kontrol grubunda karaciğerin histolojik görünümü (Hepatosit (→), sinüzoid (→→) H-E x 200)



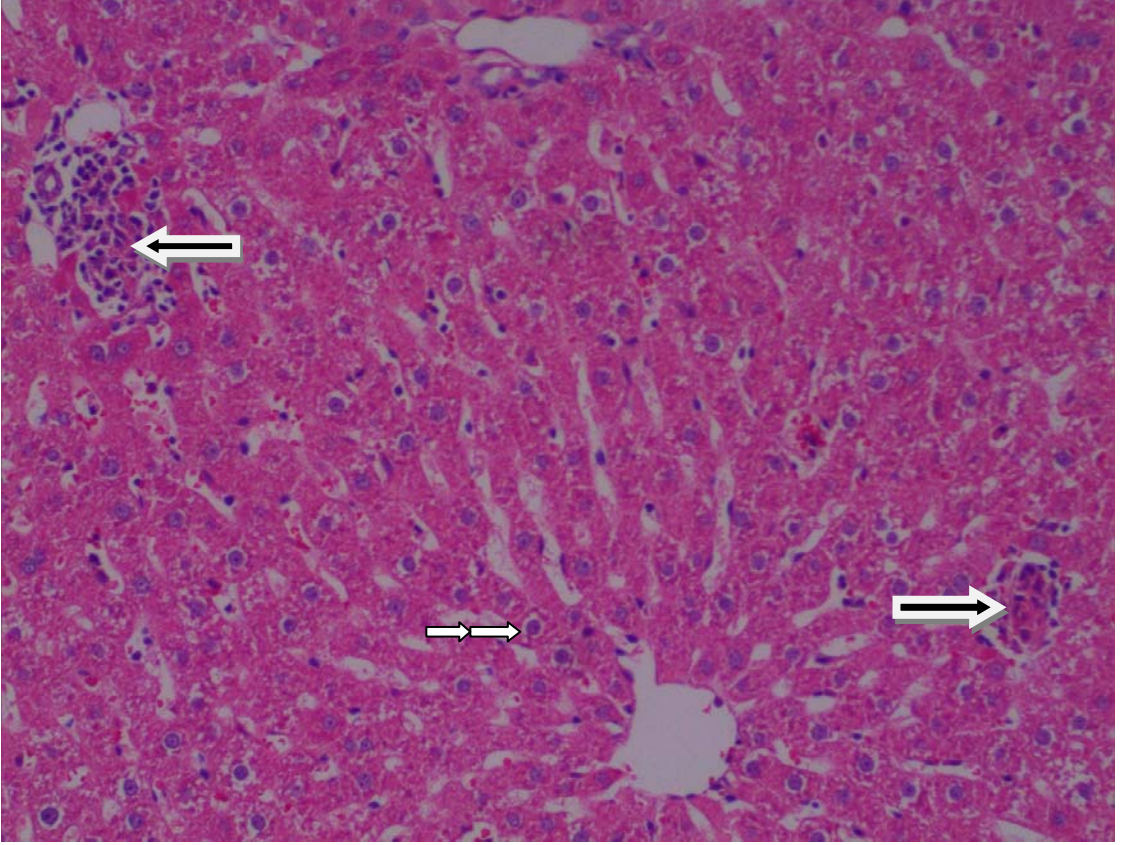
Şekil 4.2. Kontrol grubunda karaciğerde hepatositlerde glikojen taneciklerinin görünümü ((→) PAS-D x 200)



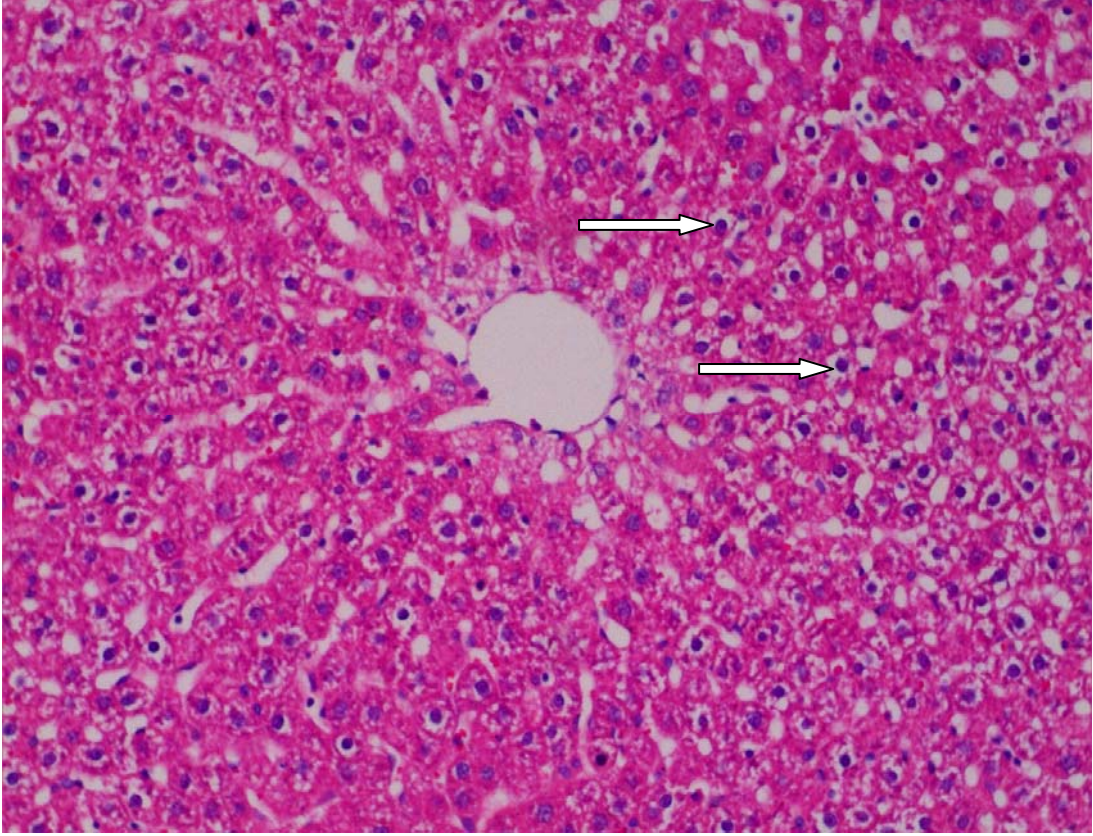
Şekil 4.3. Kontrol grubunda portal alan etrafındaki bağ dokusunun görünümü ((→) Masson'un üçlü boyaması x 200)



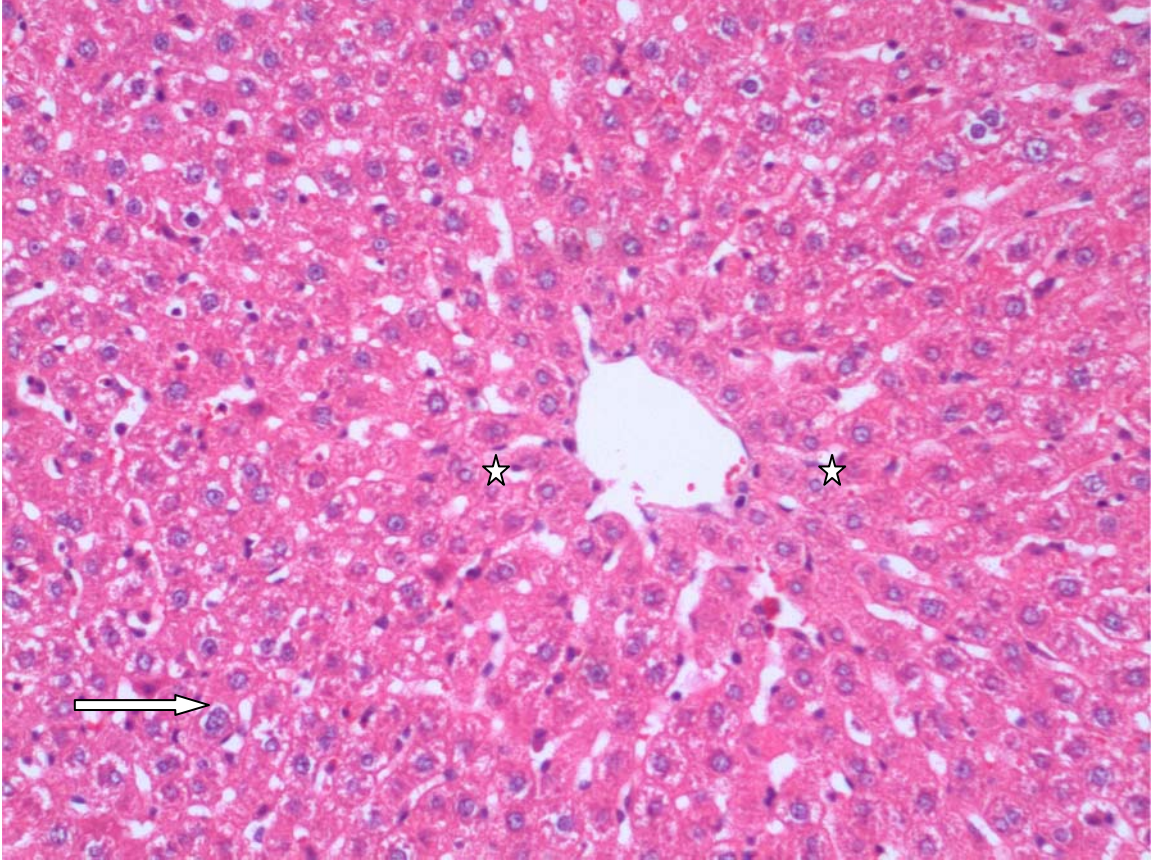
Şekil 4.4. Cisplatin 2. gün grubunda karaciğerin histolojik görünümü (Santral ven çevresinde hidropik dejenerasyon görülmektedir (→) H-E x 200)



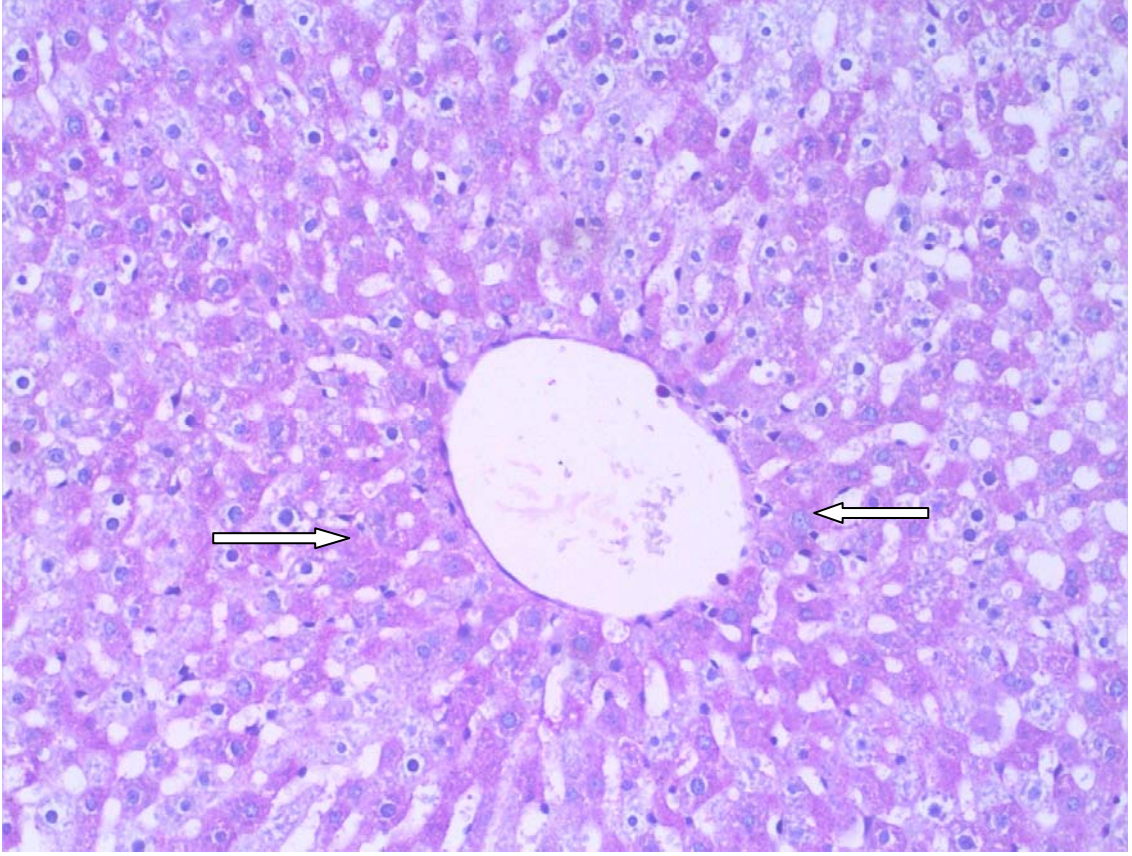
Şekil 4.5. Cisplatin 4. gün grubunda karaciğerin histolojik görünümü (Hidropik dejenerasyon (→→) ve inflamatuvar hücre odakları görülmektedir (→). H-E x 200)



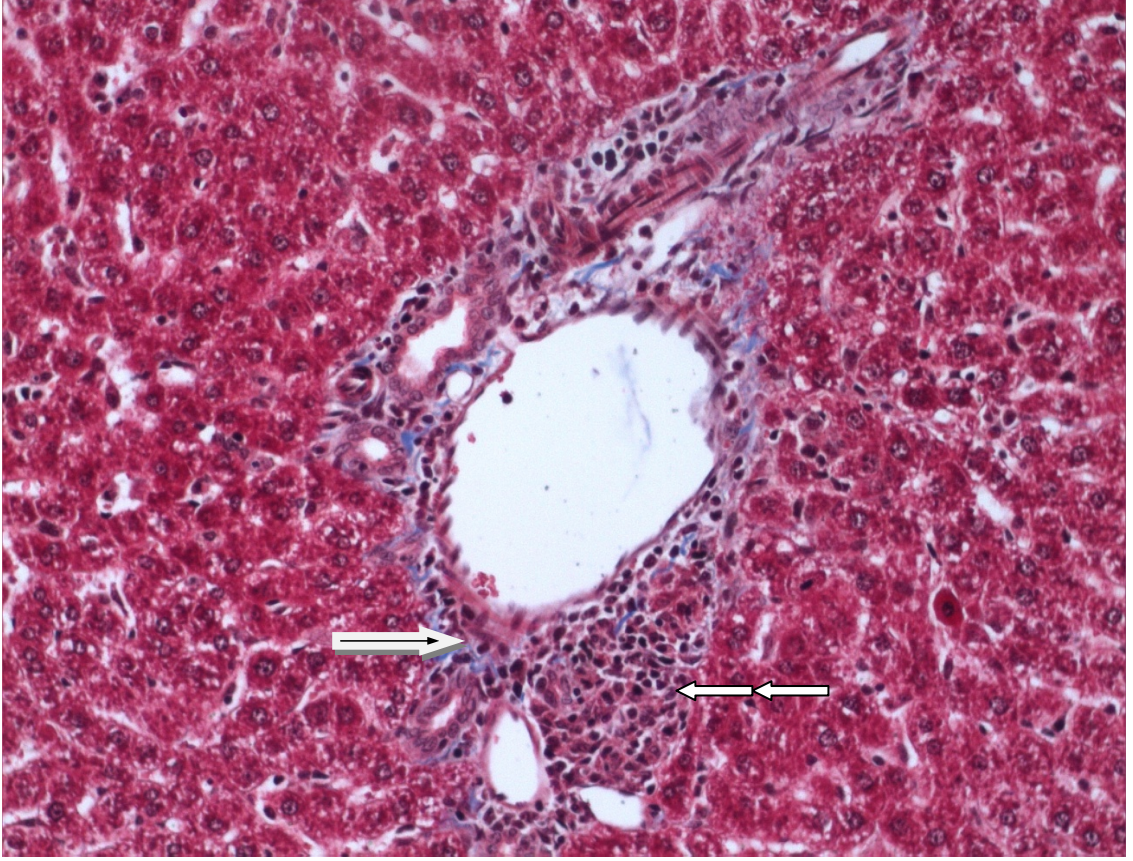
Şekil 4.6. Cisplatin 7. gün grubunda karaciğerin histolojik görünümü (Hepatositlerin diziliminin düzensizleştiği ve belirgin hidropik dejenerasyon görülmektedir (→) H-E x200)



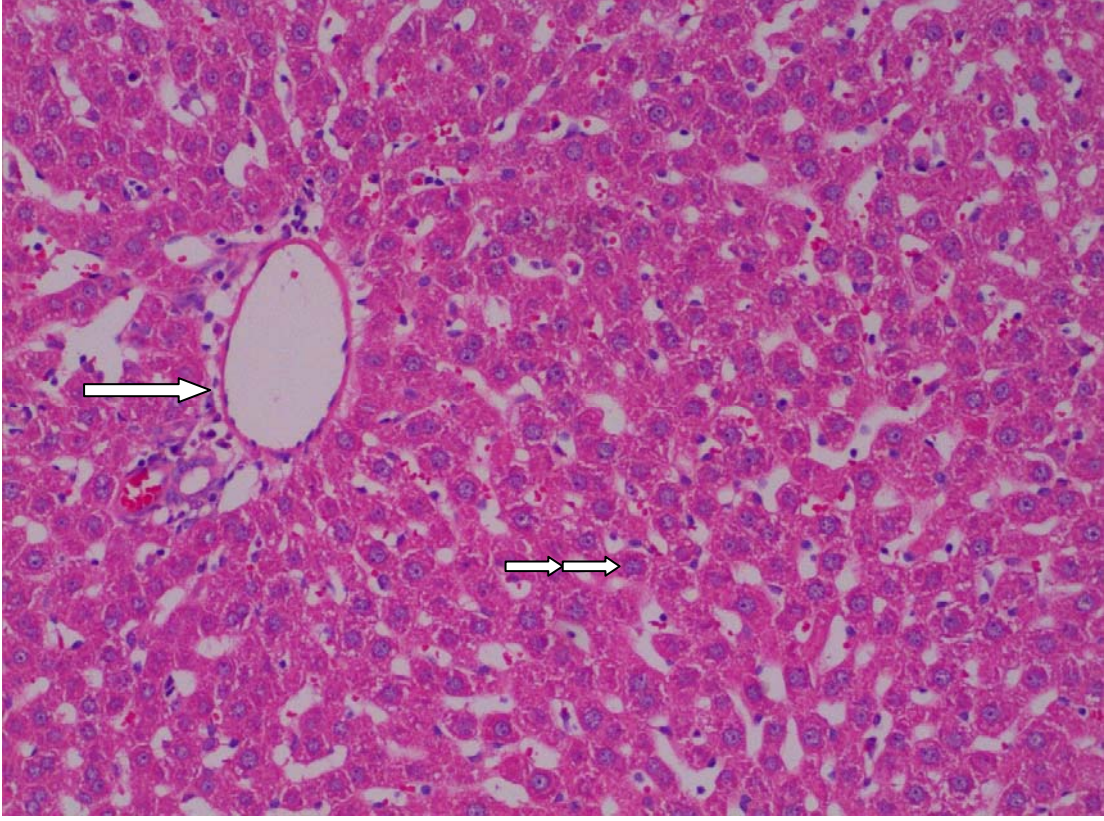
Şekil 4.7. Cisplatin 14. gün grubunda karaciğerin histolojik görünümü (Hücre ve çekirdek boyutlarındaki değişiklikler dikkati çekmektedir (*). Hidropik dejenerasyonun bulunduğu hepatositler görülmektedir (→). H-E x 200)



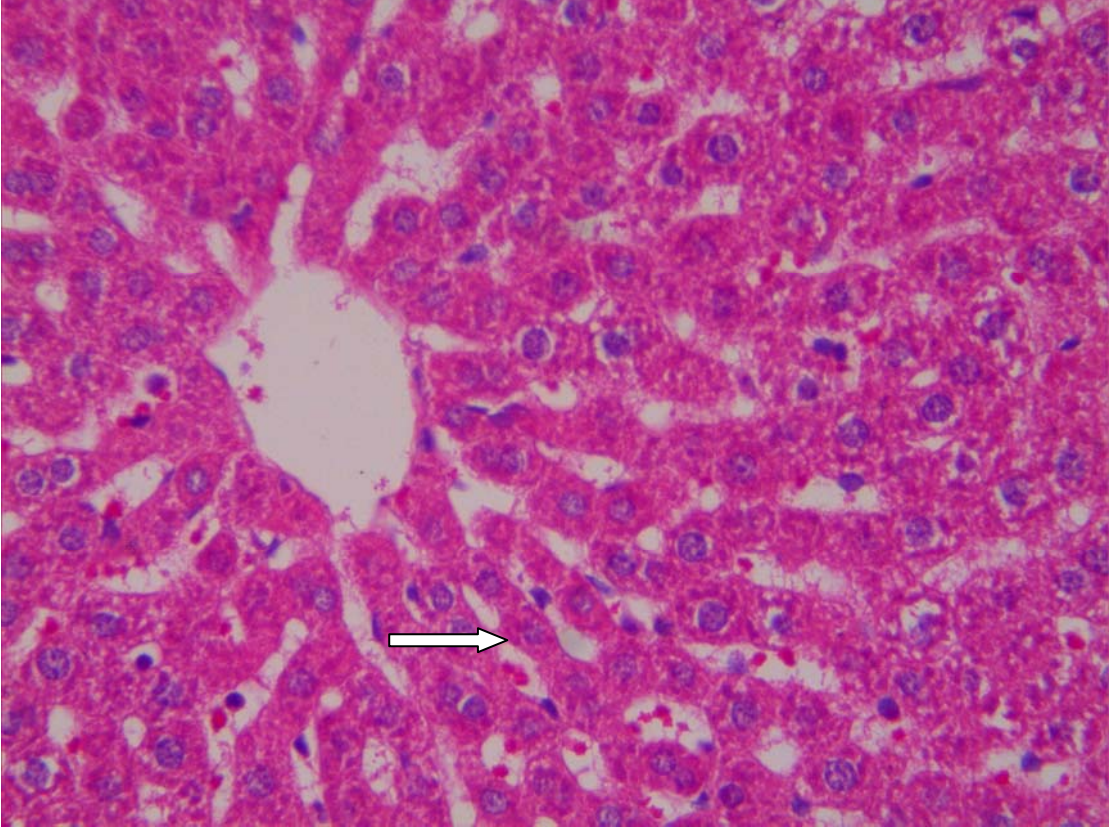
Şekil 4. 8. Cisplatin 7. gün grubunda hepatositlerdeki glikojen taneciklerinin görünümü (Özellikle santral ven çevresinde glikojen taneciklerinin daha yoğun miktarda bulunduğu görülmektedir (→). PAS-D x 200)



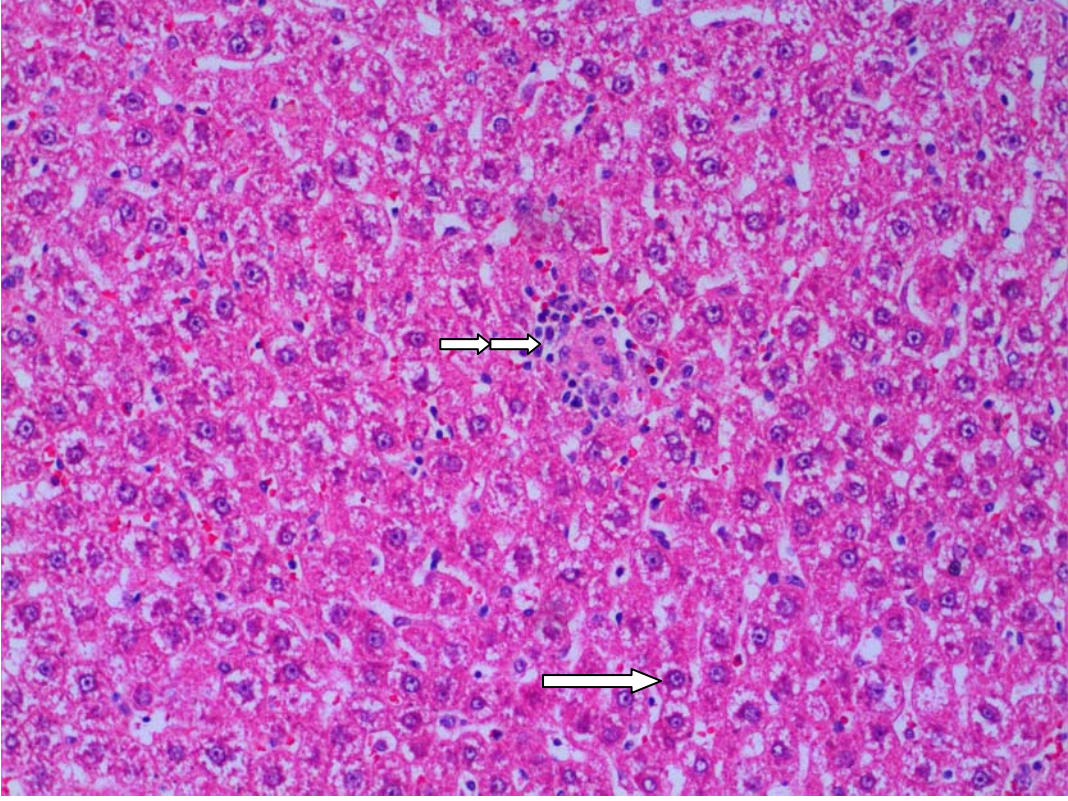
Şekil 4.9. Cisplatin 4. gün grubunda portal üçgen çevresindeki bağ dokusu (→) görünümü (Periportal alandaki inflamatuvar hücre odakları (→→) görülmektedir. Masson'un üçlü boyaması x 200)



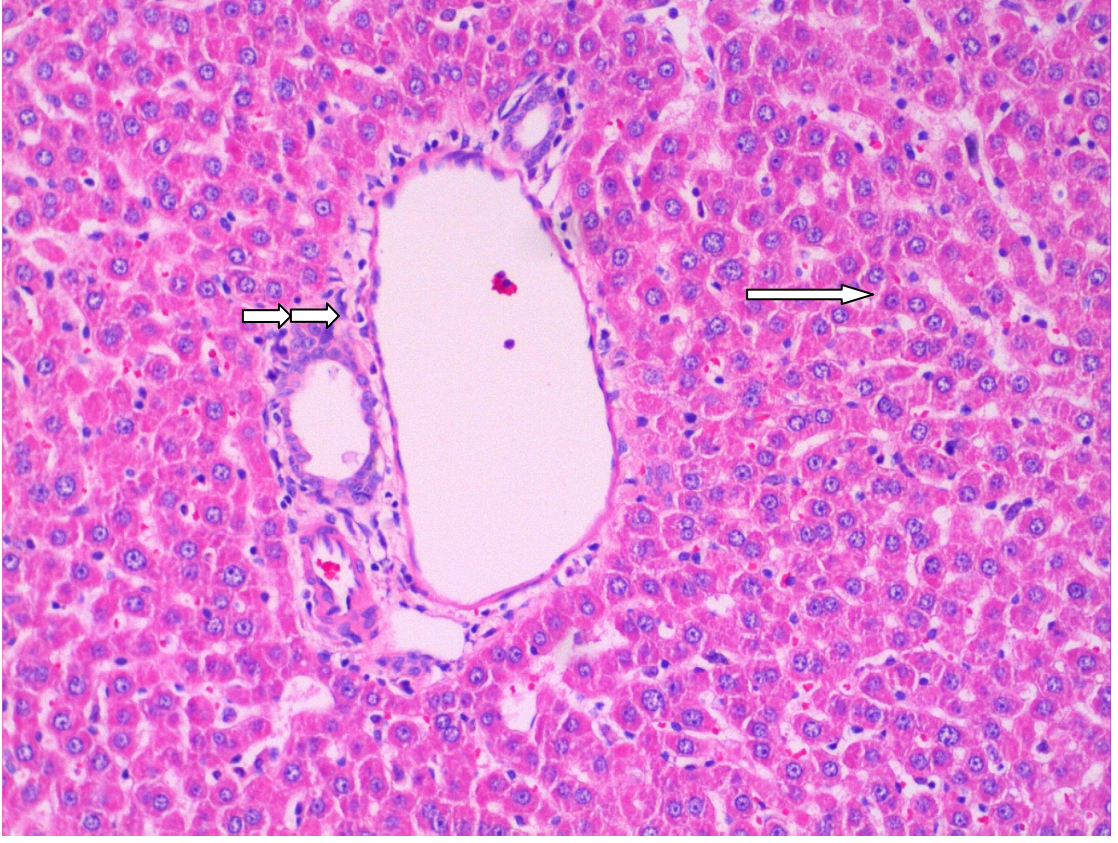
Şekil 4.10. ASA 7. gün grubunda karaciğerin histolojik görünümü (Portal alan (→) ve hepatositler (→→) görülmektedir. H-E x 200)



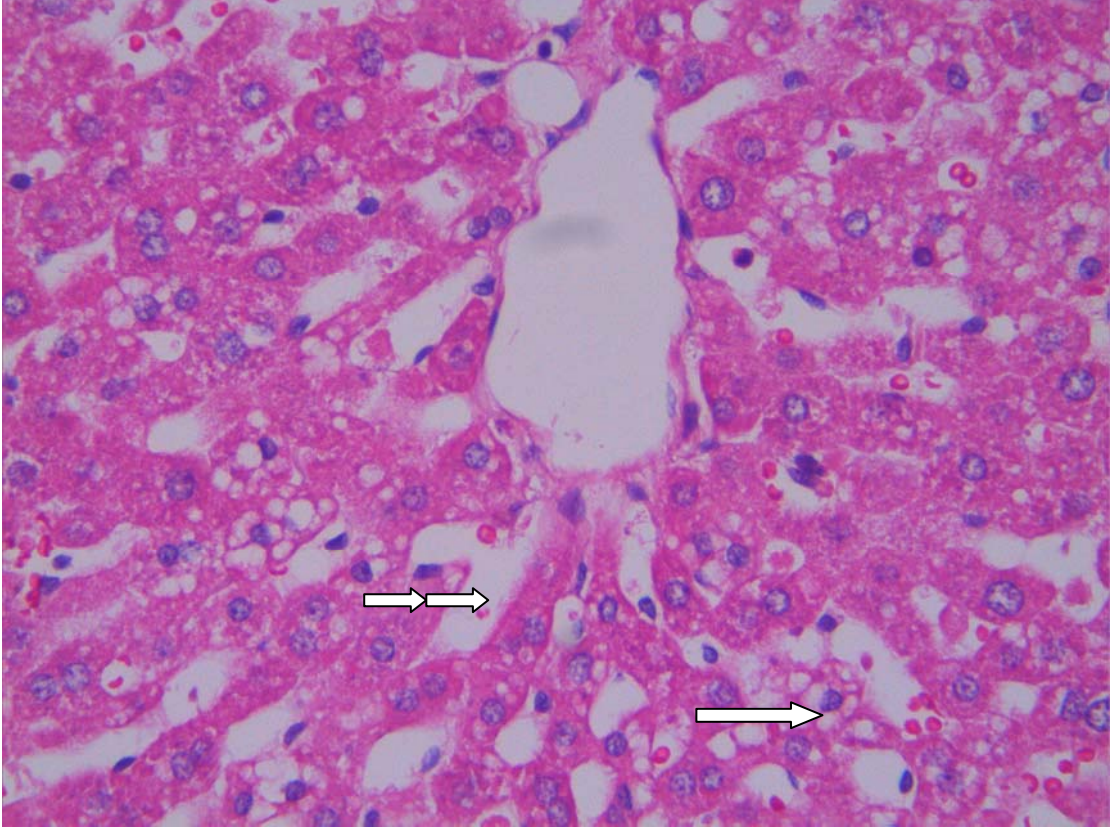
Şekil 4.11. SEL 14. gün grubunda karaciğerin histolojik görünümü (Santral ven ve ışımsal dizilim gösteren hepatositler görülmektedir (→). H-E x 400)



Şekil 4.12. Cisplatin+ASA 4. Gün grubunun histolojik görünümü (Hepatositlerde az oranda hidropik dejenerasyon (→) ve inflamatuvar hücre grubu görülmektedir(→→). H-E x 200)



Şekil 4.13. Cisplatin+SEL 14.gün grubunun histolojik görünümü (Portal alan (→→) ve hepatositler (→) görülmektedir. H-E x200)



Şekil 4.14. Cisplatin+ASA+SEL 7. Gün grubunun histolojik görünümü (Hidropik dejenerasyon (→) ve sinüzoidlerde genişlemeler (→→) görülmektedir. H-E x 400)

4.2. Elektron Mikroskopik Bulguların Değerlendirilmesi

Transmisyon Elektron Mikroskopik değerlendirmede hepatositlerin ve çekirdeklerin şekli, organellerin durumu, mitokondrilerin matriks yoğunlukları ve krista durumu, glikojen miktarının yarı kantitatif değerlendirmesi yapıldı.

4.2.1.Kontrol Gruplarının Karaciğer İnce Yapısının Değerlendirilmesi

Transmisyon elektron mikroskopik incelemelerde kontrol grubuna ait ratların karaciğerinde hepatositlerin normal yapıda olduğu tespit edildi. Hepatositlerde sitoplazma içinde bol miktarda bulunan endoplazmik retikulum ve mitokondriler normal yapıda gözlemlendi. Genellikle hücrenin merkezinde yer alan çekirdek büyük ve yuvarlak, ökromatik olarak gözlemlendi. Glikojenin hücre içinde muntazam bir dağılım gösterdiği belirlendi (Şekil 4. 15).

4.2.2. Cisplatin Gruplarının Karaciğer İnce Yapısının Değerlendirilmesi

Cisplatin 1. gün grubunda ratların karaciğerinde hepatositlerde herhangi bir sitopatolojik değişiklik belirlenmedi. Çekirdek, mitokondri, E.R kontrol grubundakine benzer görünümdeydi. 2. gün gruplarında hücrelerde mitokondri, E.R normal görünüm ve dağılımda, çekirdek görünümü normal olarak gözlemlendi. 4. ve 7. gün gruplarında çekirdeğin düzgün membran yüzeyini kaybettiği ve kromatin yoğunluğunda kayıp gözlemlendi (Şekil 4.17). 7. Gün gruplarında mitokondrilerde ve E:R'da genişlemeler belirlendi (Şekil 4.18). 14. gün gruplarında çekirdeğin görünümü 4. ve 7. gün gruplarındaki görünüme yakındı. Cisplatin gruplarında glikojenin hücre içerisindeki dağılımı düzensiz olarak gözlemlendi (Şekil 4.19).

Transmisyon Elektron Mikroskopik incelemelerin yarı kantitatif değerlendirmesi Çizelge 4.7'de gösterilmiştir.

Çizelge. 4.7. Cisplatin gruplarının ince yapısının yarı kantitatif değerlendirilmesi

Belirlenen değişiklikler	Günler				
	1. Gün	2. Gün	4. Gün	7. Gün	14. Gün
Çekirdek durumu	-	-	+	+	+
Mitokondri matriks yoğunluğu ve krista durumu	-	-	+	+++	++
E.R. durumu	-	-	-	++	+
Yağ damlacığı	-	-	-	-	-
Hepatositlerdeki glikojen yoğunluğu	+++	+++	++	++	++

+ az

++ orta

+++ fazla

++++ çok fazla

- hiçbir değişiklik yok

4.2.3. ASA Gruplarının Karaciğer İnce Yapısının Değerlendirilmesi

ASA 1., 2. ve 4. gün gruplarında kontrol gruplarından farklı bir görüntü gözlenmedi. 7. ve 14. gün gruplarında mitokondrilerde, E.R.'da çekirdeğin sınırlarında ve kromatin durumunda çok belirgin değişiklikler gözlenmedi. Glikojen yoğunluğunda kısmen azalma belirlendi. (Şekil 4. 20)

Transmisyon Elektron Mikroskopik incelemelerin yarı kantitatif değerlendirmesi Çizelge 4.8'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.8. ASA gruplarının ince yapısının yarı kantitatif değerlendirilmesi

Belirlenen değişiklikler	Günler				
	1. Gün	2. Gün	4. Gün	7. Gün	14. Gün
Çekirdek durumu	-	-	+	+	+
Mitokondri matriks yoğunluğu ve krista durumu	-	-	-	-	-
E.R. durumu	-	-	-	-	-
Yağ damlacığı	-	-	-	-	-
Hepatositlerdeki glikojen yoğunluğu	+++	+++	++	++	++

+ ve – ifadeleri Çizelge 4.7' de verildiği gibidir

4.2.4. SEL Gruplarının Karaciğer İnce Yapısının Değerlendirilmesi

SEL gruplarında mitokondri ve E.R yapılarında, çekirdek durumunda herhangi bir değişiklik gözlenmedi. Glikojenin hücre içerisinde düzenli dağılım gösterdiği belirlendi (Şekil 4.21).

Transmisyon Elektron Mikroskopik incelemelerin yarı kantitatif değerlendirmesi Çizelge 4.9’da gösterilmiştir.

Çizelge 4.9. SEL gruplarının ince yapısının yarı kantitatif değerlendirilmesi

Belirlenen değişiklikler	Günler				
	1. Gün	2. Gün	4. Gün	7. Gün	14. Gün
Çekirdek durumu	-	-	-	-	-
Mitokondri matriks yoğunluğu ve krista durumu	-	-	-	-	-
E.R. durumu	-	-	-	-	-
Yağ damlacığı	-	-	-	-	-
Hepatositlerdeki glikojen yoğunluğu	+++	+++	+++	+++	+++

+ ve – ifadeleri Çizelge 4.7’ de verildiği gibidir.

4.2.5. Cisplatin+ASA Gruplarının Karaciğer İnce Yapısının Değerlendirilmesi

Cisplatin+ASA 1. ve 2. gün gruplarında kontrol gruplarındaki görünüme benzerdi. 4., 7., ve 14., gün gruplarında gözlemlendiği kadar belirgin olmamakla birlikte mitokondri matriksinde, E.R yerleşiminde, çekirdek sınırlarında, glikojen dağılımında değişiklikler gözlemlendi (Şekil 4.22)

Transmisyon Elektron Mikroskopik incelemelerin yarı kantitatif değerlendirmesi Çizelge 4.10’da gösterilmiştir.

Çizelge. 4.10. Cisplatin+ASA gruplarının ince yapısının yarı kantitatif değerlendirilmesi

Belirlenen değişiklikler	Günler				
	1. Gün	2. Gün	4. Gün	7. Gün	14. Gün
Çekirdek durumu	-	-	++	++	++
Mitokondri matriks yoğunluğu ve krista durumu	-	-	+	+	+
E.R. durumu	-	-	+	+	+
Yağ damlacığı	-	-	-	-	-
Hepatositlerdeki glikojen yoğunluğu	+++	+++	++	++	++

+ ve – ifadeleri Çizelge 4.7’ de verildiği gibidir.

4.2.6. Cisplatin+SEL Gruplarının Karaciğer İnce Yapısının Değerlendirilmesi

Cisplatin+SEL 1. ve 2. gün gruplarında kontrol gruplarındaki görünüme benzerdi. 4., 7., ve 14., gün gruplarında mitokondri matriksinde, E.R yerleşiminde, çekirdek sınırlarında, Glikojen dağılımında değişiklikler cisplatin gruplarındaki kadar belirgin değildi (Şekil 4.23).

Transmisyon Elektron Mikroskopik incelemelerin yarı kantitatif değerlendirmesi Çizelge 4.11’de gösterilmiştir.

Çizelge.4.11. Cisplatin+SEL gruplarının ince yapısının yarı kantitatif değerlendirilmesi

Belirlenen değişiklikler	Günler				
	1. Gün	2. Gün	4. Gün	7. Gün	14. Gün
Çekirdek durumu	-	-	++	++	++
Mitokondri matriks yoğunluğu ve krista durumu	-	-	+	+	+
E.R. durumu	-	-	+	+	+
Yağ damlacığı	-	-	-	-	-
Hepatositlerdeki glikojen yoğunluğu	+++	+++	++	++	++

+ ve – ifadeleri Çizelge 4.7’ de verildiği gibidir.

4.2.7. Cisplatin+ASA+SEL Gruplarının Karaciğer İnce Yapısının Değerlendirilmesi

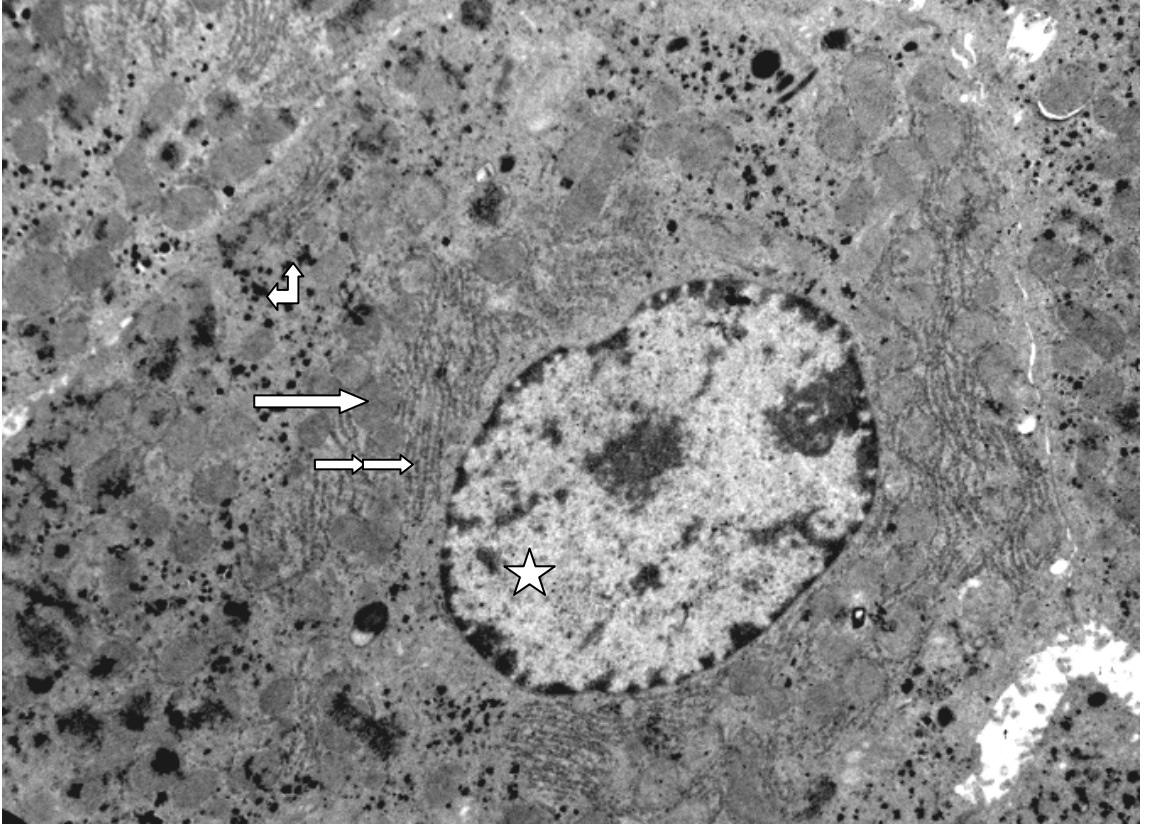
Cisplatin ile birlikte ASA ve selenyum verilen gruplarda 1. ve 2. Gün gruplarında sitoptolojik değişiklik belirlenmedi. 4. 7. ve 14. gün gruplarında ise mitokondri matriksindeki ve E.R sisternalarındaki değişiklikler çok belirgin değildi. Çekirdek sınırının korunması ve kromatin içeriği bakımından değişiklikler dikkat çekmektedir. Glikojenin hücre içerisinde düzenli dağılmadığı gözlemlendi (Şekil. 4.24).

Transmisyon Elektron Mikroskopik incelemelerin yarı kantitatif değerlendirmesi Çizelge 4.12’de gösterilmiştir.

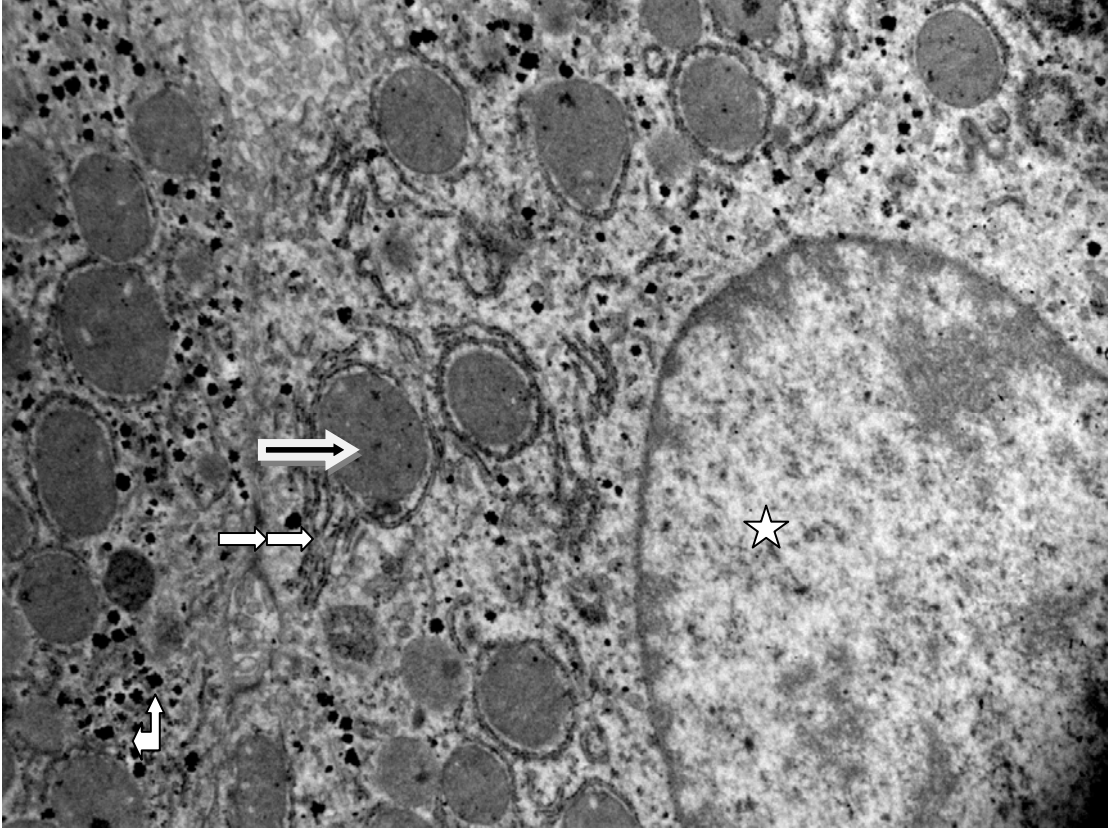
Çizelge 4.12. Cisplatin+ASA+SEL gruplarının ince yapısının yarı kantitatif değerlendirilmesi

Belirlenen değişiklikler	Günler				
	1. Gün	2. Gün	4. Gün	7. Gün	14. Gün
Çekirdek durumu	-	-	++	++	++
Mitokondri matriks yoğunluğu ve krista durumu	-	-	+	+	+
E.R. durumu	-	-	+	+	+
Yağ damlacığı	-	-	-	-	-
Hepatositlerdeki glikojen yoğunluğu	+++	+++	+++	+++	+++

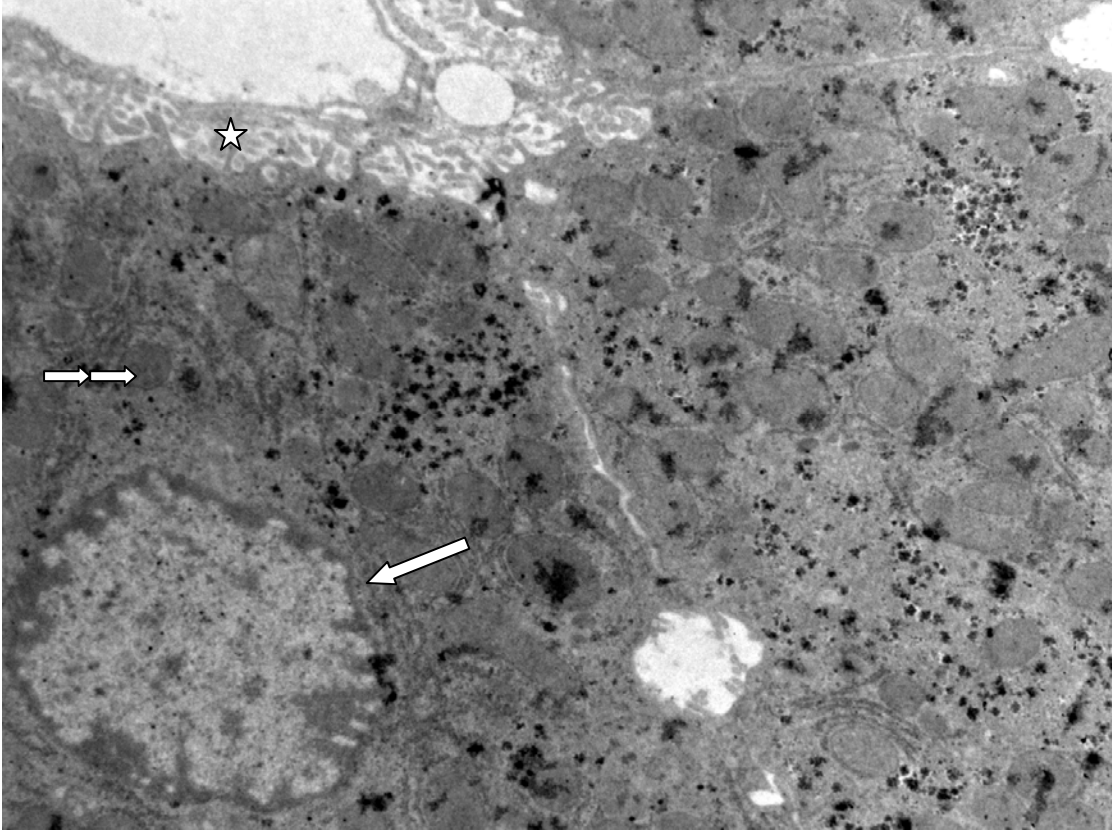
+ ve – ifadeleri Çizelge 4.7’ de verildiği gibidir.



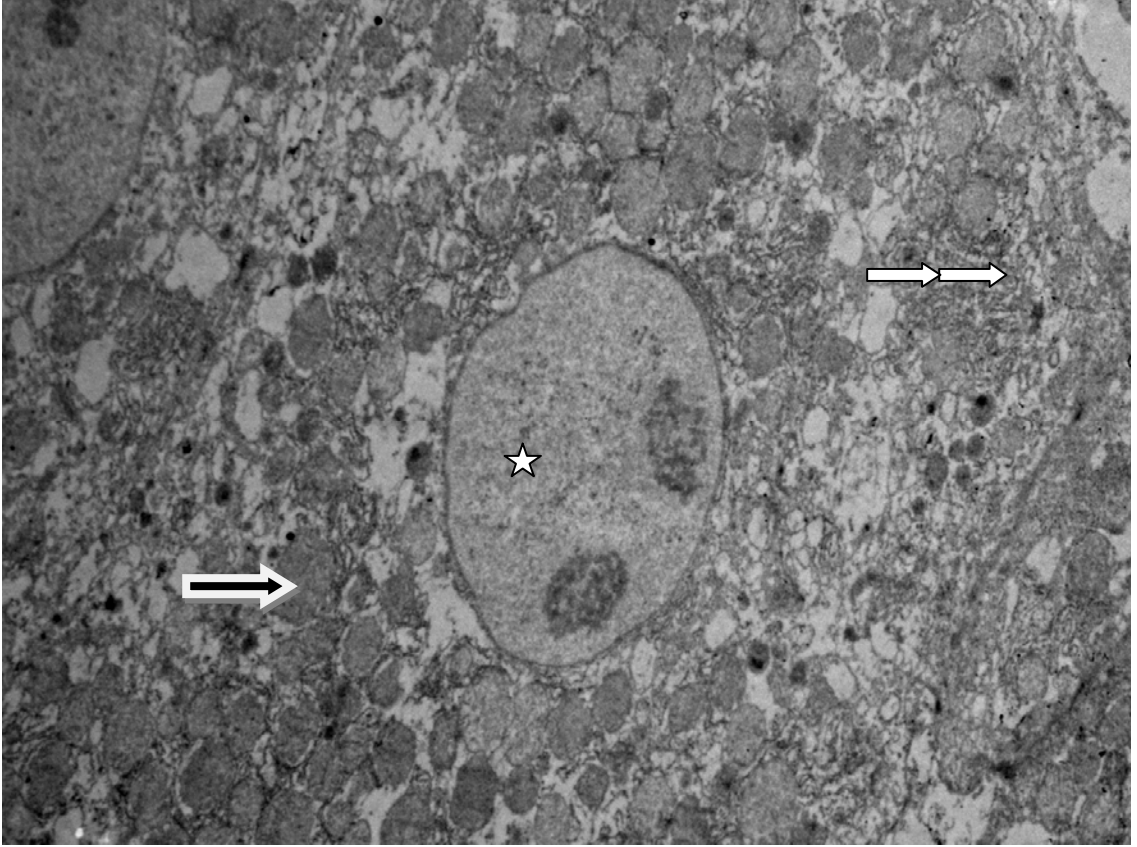
Şekil 4. 15. Kontrol grubunun elektronmikrografı (Çekirdek (*), Mitokondri (→), Endoplazmik retikulum (E.R) (→→), glikojen tanecikleri(↙) X 7500)



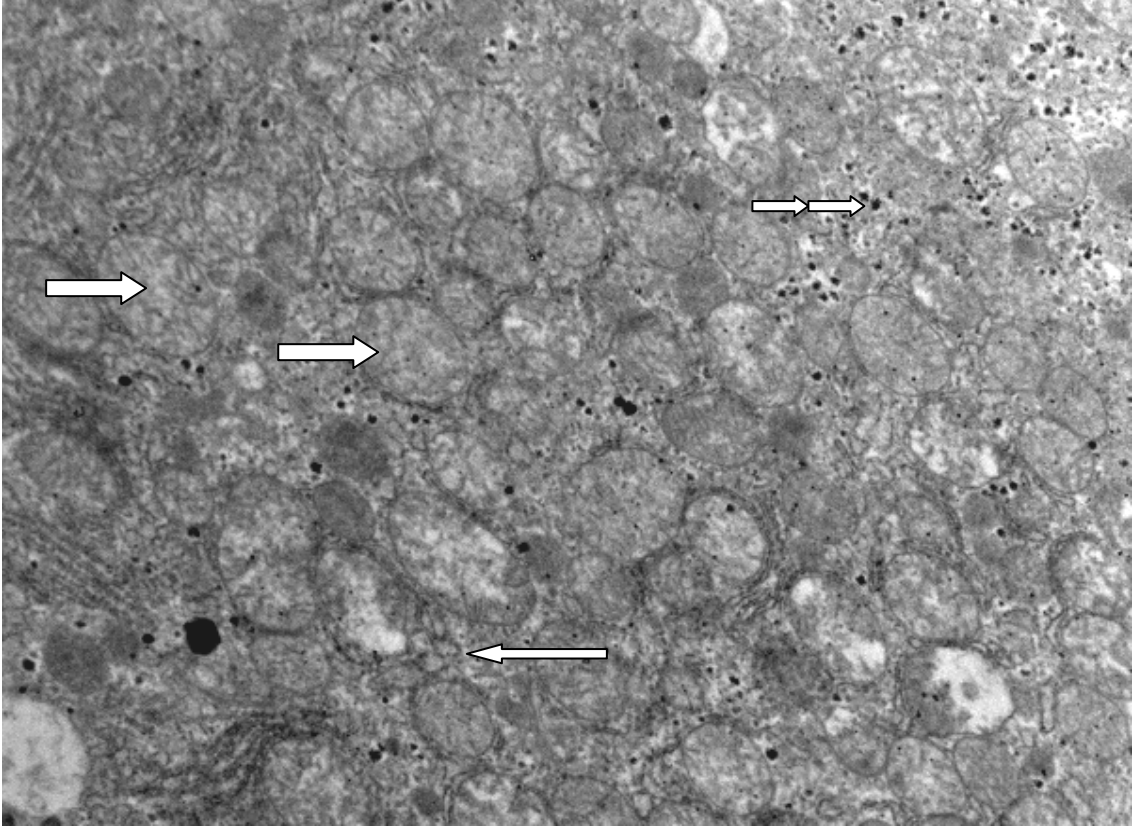
Şekil 4.16. Kontrol grubunun elektronmikrografı (Çekidek (*), Mitokondri (→), E.R (→→), Glikojen tanecikleri (↙) X 10000)



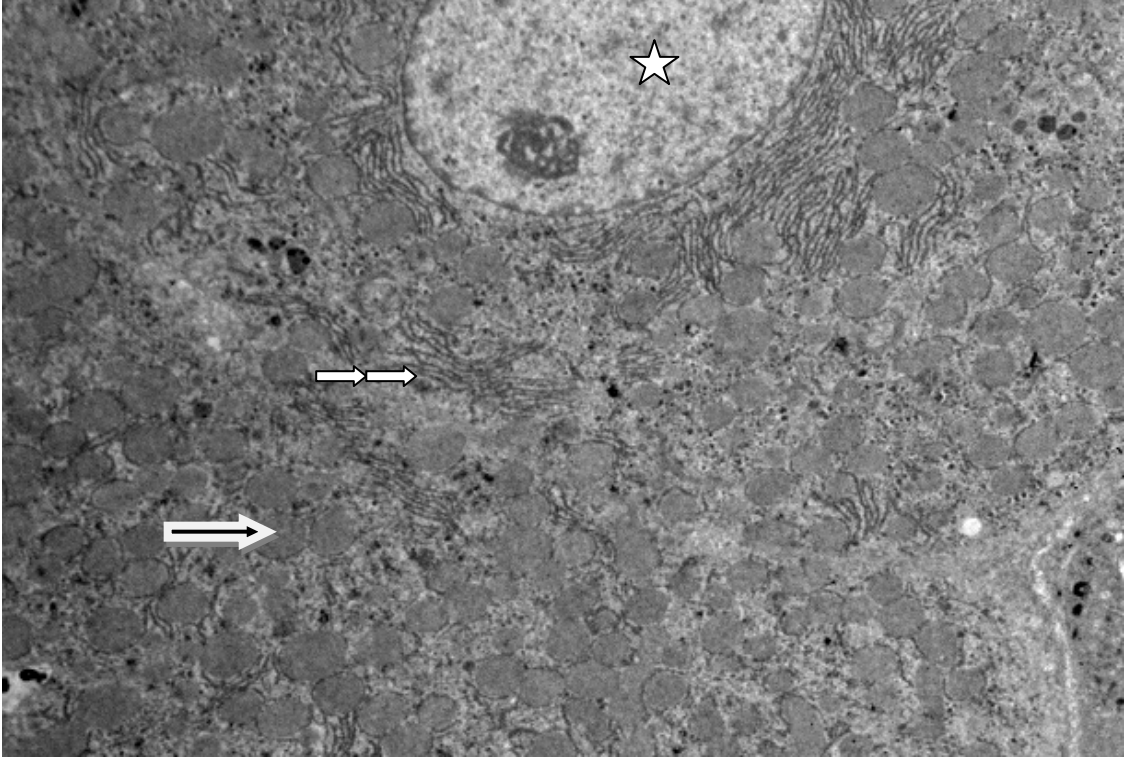
Şekil 4.17. Cisplatin 4. gün grubunun elektronmikrografı (Çekirdeğin düzgün yüzey görüntüsünde değişmelerin başladığı görülmektedir (→). Mitokondri (→→), Disse Aralığı (*) X 7500)



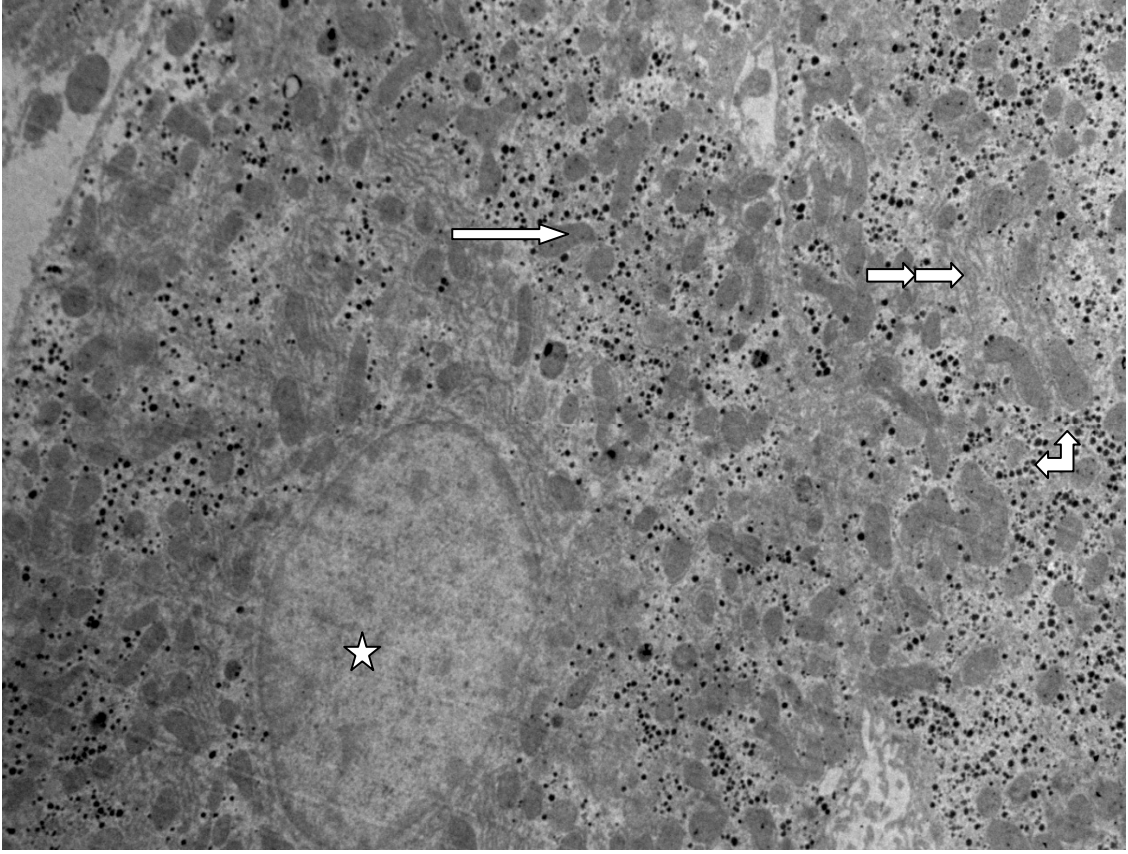
Şekil 4.18. Cisplatin 7. gün grubunun elektronmikrografı (Çekirdekte kromatinde azalma (*), mitokondri matriksinde çözülmeler (->), E.R yapısında değişiklikler (->->) gözlenmektedir. Glikojen miktarında azalma dikkat çekmektedir. X 7500)



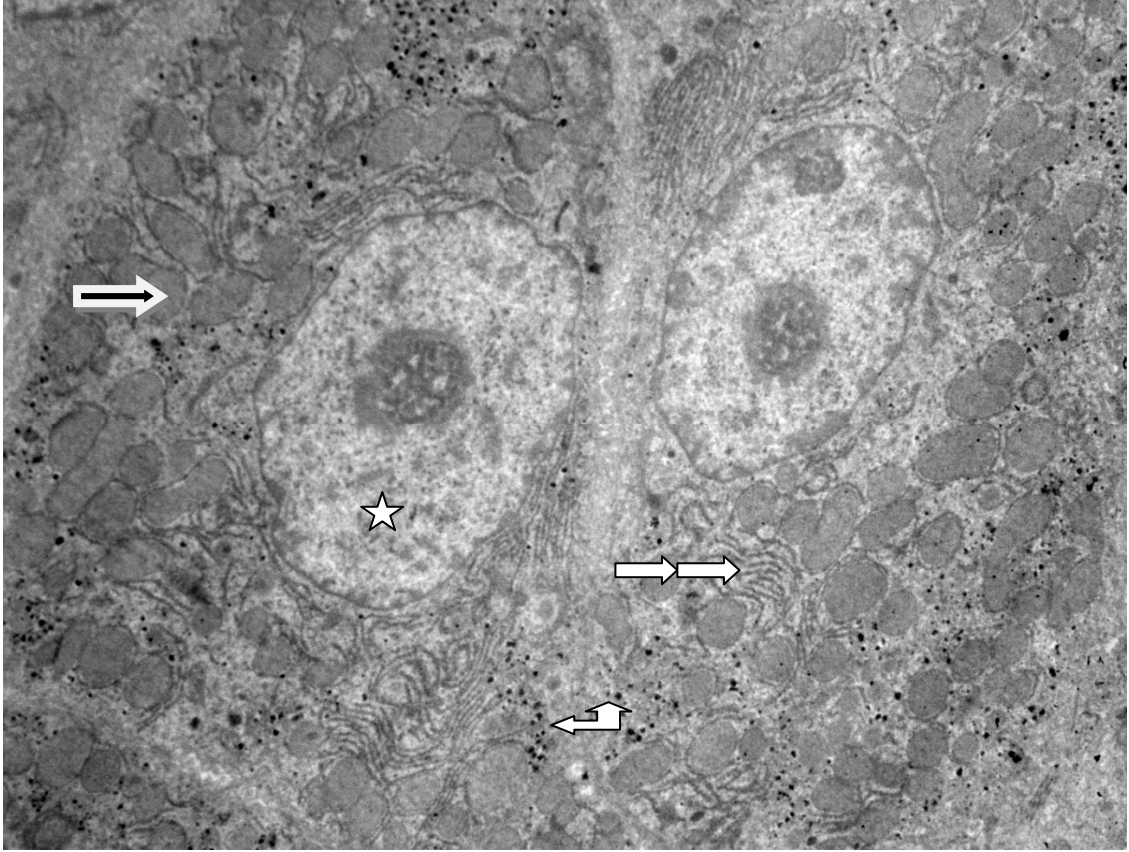
Şekil 4. 19. Cisplatin 14. gün grubunun elektronmikrografı (Mitokondri matriksinde kısmen çözülmeler (→), E.R sisternelerinde genişlemeler (←) görülmektedir. Glikojen dağılımındaki azalma dikkat çekmektedir (→→). X 7500)



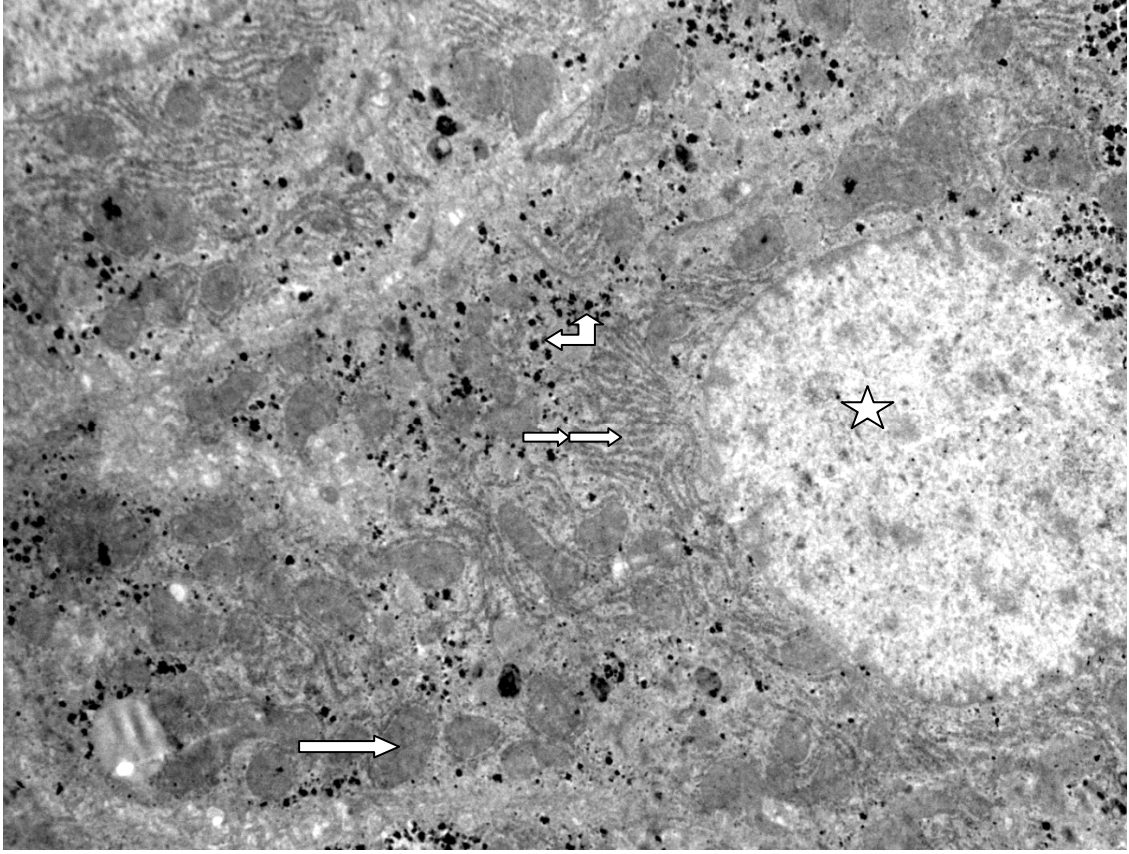
Şekil 4.20. ASA 4. gün grubunun elektronmikrografı (Çekirdek (*), Mitokondri (→), E.R (→→) X 7500)



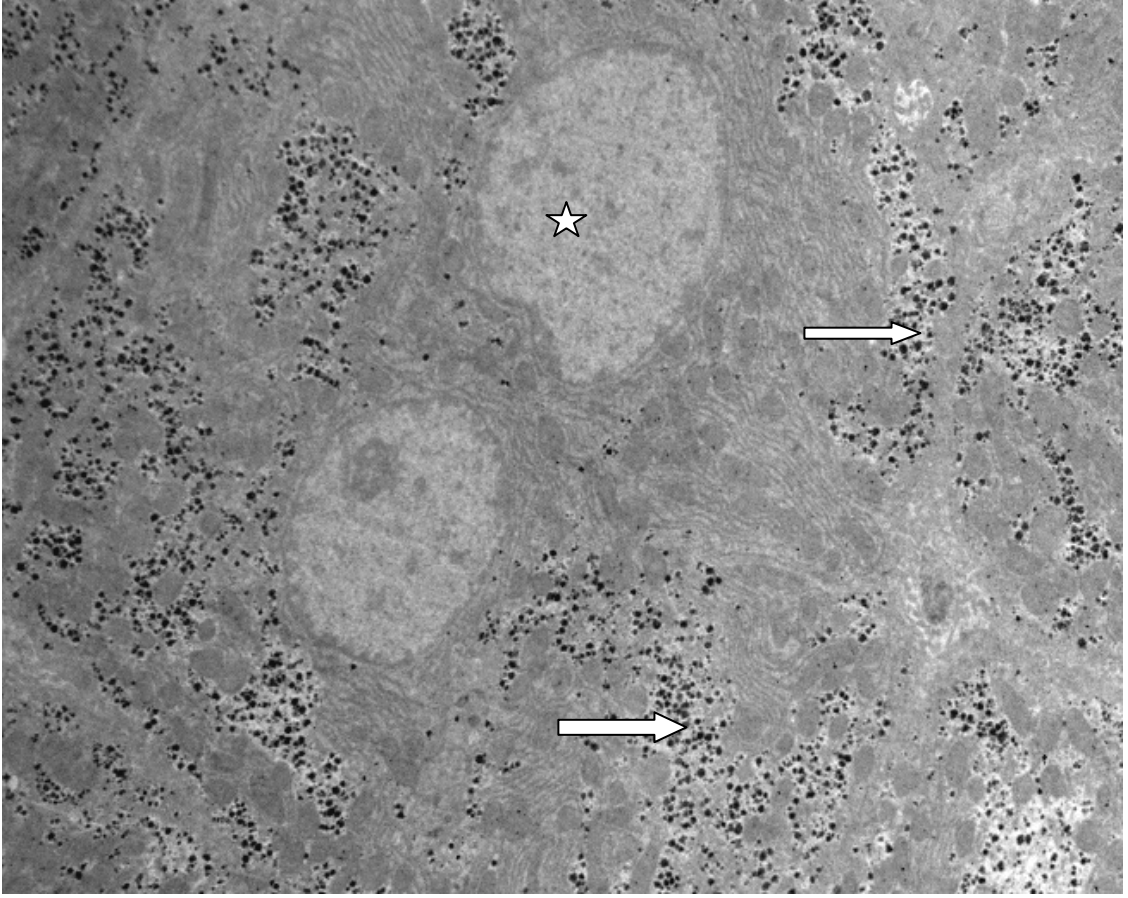
Şekil 4.21. SEL 4. gün grubunun elektronmikrografı (Çekirdek (*), Mitokondri →, E.R. (→→) (↕), Glikojen tanecikleri (↕) X 7500)



Şekil 4.22. Cisplatin+ASA 14. gün grubunun elektronmikrografı (Sınırlarının kısmen bozulduğu çekirdek (*), Mitokondri (→), E.R (→→), azalan glikojen tanecikleri (↱) görülmektedir X 7500)



Şekil 4.23. Cisplatin+SEL 14. gün grubunun elektronmikrografı (Çekirdekte kromatinde azalma görülmektedir (*). Mitokondri (→), E.R.(→→), Glikojen tanecikleri (↵) X 7500)



Şekil 4.24. Cisplatin+ASA+SEL 7. gün grubunun elektronmikrografı (Çekirdeklerin kromatin yoğunluğunda azalma ve sınırlarında bozulma gözlenmektedir (*). Glikojen hücre içerisinde düzenli dağılmamıştır (→) X 7500)

5. TARTIŞMA

Klinikte yaygın olarak kullanılan antineoplastik ajanlardan biri olan cisplatinin kanser hücreleri üzerinde nasıl bir mekanizmayla etkisini gösterdiğini açıklamaya yönelik çalışmaların yanında bu etkili ajanın yan etkileri üzerine yapılan çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Özellikle ovaryum, testis, baş ve boyun kanserlerinin tedavisinde kullanılan cisplatinin bilinen en yaygın yan etkileri nefrotoksisite, ototoksisite, mide bulantısı, kusma, kemik iliğinde gözlenen hasarlardır. Uygulanan doza bağlı olarak hepatoksisiteye de neden olmaktadır (Söğüt ve ark., 2004).

Klinik alanda toksik hepatik hasarın çoğu önemli formu, terapötik ajanlar yoluyla oluşmaktadır. 600 ilaçtan daha fazlasının hepatoksisite ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Hepatoksisiteye sebep olan ilaçların reaktif metabolitlerinin sorumlu olduğunu gösteren birçok çalışma vardır. Cisplatinin sebep olduğu toksisitede oksidatif stres, inflamasyon, genotoksik hasar ve hücre döngüsünde duraklamayı içeren birkaç mekanizma araştırılmıştır. Bununla birlikte cisplatinin sebep olduğu hepatotoksisite ve mekanizması hakkında klinik raporlar dışında yeterli çalışma bulunmamaktadır (Sohn ve ark., 2008).

Karaciğer toksik kimyasal maddelerin ve diğer materyallerin atılım ve detoksifikasyonunda rolü olan bir organdır ve aynı zamanda toksinlerin ilk hedefidir. Ekzojen yollarla vücuda alınan toksik maddelerin, organizmada metabolize edilememesi sonucu hücrelerde açığa çıkan serbest radikaller karaciğer hasarına neden olmaktadır (Ayla ve ark., 2009).

Serbest radikal hasarı için en kritik bölgeyi plazma membranı oluşturur. Hücre dışı kompartmanlarda meydana gelen serbest radikaller, hücre içi kompartmanlarla reaksiyona girebilmek için plazma membranını geçmek zorundadırlar. Bu yüzden zararlı etkilerini membranlarda başlatırlar. Hücre membranındaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları serbest radikaller ile kolayca etkileşirler ve peroksidasyon ürünlerini açığa çıkarırlar. Poliansatüre yağ asitlerinin bu oksidatif yıkımı, lipid peroksidasyonu olarak adlandırılır (Ayla ve ark., 2009).

Cisplatinin neden olduğu toksisitenin mekanizmasını aydınlatmaya yönelik yapılan çalışmalar cisplatinin neden olduğu çeşitli toksisitenin serbest radikaller veya

reaktif oksijen türleri ile ilgili olduğunu göstermektedir. Farklı dozlarla yapılan çalışmalarla cisplatinin sebep olduğu hasarlar ortaya çıkarılmıştır.

Çalışmamızda cisplatin gruplarında karaciğer dokusunda kontrol gruplarına göre değişiklikler gözlemlendi. Işık mikroskopik incelemelerde farklı günlerde görülme şiddeti değişiklik göstermekle birlikte hepatositlerde hidropik dejenerasyon, inflamatuvar hücre odakları, sinüzoidlerde genişlemeler, hücre ve çekirdek boyutunda değişiklikler, karaciğer parankima genel yapısında bozukluklar gözlemlendi. Elektron mikroskopik incelemelerde ise cisplatin gruplarında mitokondrilerde ve E.R. yapısında değişiklikler, çekirdek kromatininde ve sınırlarında bozulmalar, glikojen yoğunluğunda ve dağılımda değişiklikler gibi sitopatolojik bulgulara rastlanmıştır. Çalışmamızda ortaya çıkan değişiklikler yapılan diğer çalışmaların sonuçlarıyla paralellik göstermektedir. Koç ve ark. (2005), 10 mg/kg cisplatin uygulayarak yaptıkları çalışmada parankimada yapısal değişiklikler, sentral ven çevresinde sitoplazmik değişiklikler, hepatosellüler vakualizasyon, sinüzoidal genişleme, portal alan çevresinde inflamatuvar hücre toplulukları gibi bizim çalışmamıza benzer bulgular gözlemişlerdir.

Diğer yandan oksidatif hasarın varlığının tespitinde önemli parametreler olan antioksidan enzim aktivitelerinin belirlendiği çalışmalarla cisplatinin karaciğerde oluşturduğu hepatotoksisite ortaya çıkarılmıştır. İşeri ve ark. (2007), yapmış oldukları çalışmada cisplatinin lipid peroksiyonunda artışa neden olduğunu, antioksidan enzim aktivitelerinde düşüşe neden olduğunu, böbrek ve karaciğerde histolojik değişikliklerin meydana geldiğini göstermişlerdir. Liao ve ark., (2008), farelerle yaptıkları çalışmada 3.5 mg/kg cisplatin 5 gün boyunca intraperitoneal olarak uygulanmış ve karaciğerdeki hasar GSH ve MDA seviyeleriyle değerlendirilmiştir. Cisplatinin karaciğerde oksidatif hasara neden olduğu ve bu hasar üzerinde çeşitli maddelerin hasarı indirgeyici rol oynadığı ortaya çıkarılmıştır.

Cisplatinin sebep olduğu hepatotoksisitenin mekanizması tam olarak açıklanamamıştır. Yüksek doz cisplatinin karaciğerde toksik etki gösterdiği bilinmektedir. Cisplatin, ksantin dehidrojenazın ksantin oksidaza dönüşüm reaksiyonu sırasında ksantin oksidaz aktivitesinin yükselmesine neden olmaktadır. Ksantin oksidaz aktivitesindeki artış karaciğerde oksidan yükün artmasına yol açar ki ksantin oksidaz toksik süperoksit radikallerini üreten başlıca enzimdir. Ayrıca ksantin oksidaz enzim aktivitesi GSH-Px ve CAT gibi antioksidan enzimlerin aktivitesinde azalmaya neden olmaktadır (Avcı ve ark., 2008).

Cisplatin sitokrom oksidaz ve ATPaz gibi önemli iç membran proteinlerinin kodlandığı mitokondriyal DNA üzerinde sitotoksik etki göstererek mitokondriyal proteinlerin sentezini engellemekte bu da organelin bozulmasına mitokondriyal enzim aktivitelerinin zarar görmesine ve oksidatif fosforilasyonun durmasına neden olmaktadır (Tarladaçalışır ve ark., 2005).

Cisplatinin neden olduğu hepatotoksisitede gerek reaktif oksijen türlerindeki artış gerekse antioksidan enzim aktivitelerinde azalma rol oynamaktadır.

Pratibha ve ark., (2006), yaptıkları çalışma ile 8 hafta boyunca ratlara günlük 0.4 mg/kg cisplatin intraperitoneal yolla verilmiş ve karaciğerde meydana gelen oksidatif hasar enzimatik olarak değerlendirilmiştir. Sohn ve ark. (2008) yüksek doz cisplatinin karaciğerde hepatik lezyonlara neden olduğunu göstermişlerdir. Karahan ve ark. (2006), yapmış oldukları çalışmada cisplatinin karaciğerde lipit peroksidasyonunu artırdığını MDA düzeyindeki artışla göstermişlerdir.

Yapılan çeşitli çalışmalarda farklı doz uygulamalarında cisplatinin dokular üzerinde oluşturduğu toksisite şiddetinde farklılıklar gözlenmesi ilacın toksisitesini doza bağlı olarak gösterdiğini ortaya koymaktadır. Hepatotoksisitede cisplatin dozu önemli rol oynamaktadır. İşeri ve ark., (2007) yapmış oldukları çalışma ile karaciğerde cisplatin muamelesi sonucunda artan miyeloperoksidaz aktivitesi hasarlanmış dokuda nötrofillerin oksidan kaynaklarından biri olduğunu desteklemektedir.

Cisplatinin neden olduğu oksidatif hasarlar üzerine çeşitli antioksidan maddelerin etkilerinin araştırılması çok sayıda çalışmaya konu olmuştur. Çalışmamızda daha yaygın olarak ağrı kesici olarak kullanılan Asetilsalisilik asitin antioksidan olarak cisplatinin neden olduğu değişiklikler üzerinde ne yönde etkisinin olduğu araştırılmıştır.

Çalışmamızda cisplatin ile birlikte asetilsalisilik asit verilmiş olan gruplarda gözlenen değişikliklerin cisplatin gruplarında karaciğerde gözlenen değişiklikler kadar belirgin olmadığı görüldü. Ulubaş ve ark., (2003) yapmış oldukları çalışmada cisplatinin neden olduğu nefrotoksisitede 2.5 mg/kg/gün olarak uyguladıkları asetilsalisilik asitin serbest radikal üretimine karşı koruyuculuk sağladığını göstermişlerdir. Kopff ve ark., (2007) ASA'nın oksidatif/antioksidatif denge üzerine olan etkilerini araştırdıkları çalışmada ASA'nın antioksidan aktivite gösterdiği ortaya çıkarılmıştır

Günümüzde etki mekanizmaları hala çalışmalara konu olan asetilsalisilik asitin antioksidan etkisinin, *in vivo* hayvansal çalışmalarda lipit peroksidasyonunu baskıladığı belirlenmiştir. Ayrıca yapılan çalışmalar ASA'nın antioksidan enzimlerin aktivitelerine

ek olarak bu enzimlerin ekspresyonunu da uyardığını göstermektedir (Grasser ve ark., 2003).

Antioksidan olarak etki mekanizmaları bilinen maddelerin cisplatin ile birlikte uygulanması ve sonuçta hem biyokimyasal hem de morfolojik olarak etkilerinin değerlendirilmesi cisplatinin serbest radikal üretimi yoluyla neden olduğu toksik etkileri açıklamaktadır. Güçlü hidroksil radikal süpürücüsü olarak bilinen Dimetiltioüre (DMTU)'nin cisplatin muamelesi sonucunda oluşan hasarı azaltması cisplatinin hidroksil radikali üretimi yoluyla hasara neden olduğunu göstermektedir (Santos ve ark., 2007). Cisplatin ile birlikte ASA uygulanan gruplarda cisplatinin tek başına verildiği gruplardaki kadar değişikliklerin gözlenmemesi hidroksil radikallerini süpürerek antioksidan etki gösteren ASA'nın koruyuculuğunu açıklamaktadır.

Vücut için gerekli bir iz element olan selenyum, önemli bir radikal süpürücü olan GSH-Px'in yapısına katılarak antioksidan etki göstermektedir. Çalışmamızda cisplatin ile birlikte selenyum uyguladığımız gruplarda cisplatin gruplarında gözlenen değişiklikler kadar belirgin değişiklikler gözlenmedi. Selenyumun cisplatinin neden olduğu hasarlar üzerinde koruyucu etki gösterdiğini kanıtlayan çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Camargo ve ark. (2001), oral yolla uyguladıkları selenyumun erken proksimal tübül hasarı üzerinde koruyucu etkisinin olduğunu göstermişlerdir. Sivaram ve ark., (2001), karaciğerde alkolün sebep olduğu oksidatif strese karşı selenyumun askorbik asitle birlikte koruyuculuk sağladığı gösterilmiştir.

Hücrelerde Selenyum bağımlı glutatyon peroksidaz (Se-GSH-Px) hem hidrojen peroksiti hem de lipid peroksitleri metabolize eder. Bir selenoprotein olan Glutatyon peroksidazın aktif bölgesinde selenyum bulunur ve lipid peroksitlerin indirgenmesinden ve hidrojen peroksitin suya indirgenmesinden sorumludur. Cisplatinin neden olduğu hepatotoksisitede karaciğerde ekspresse edilen izoenzim sitokrom P450 2E1 hidrojen peroksit ve süperoksit anyonu gibi reaktif oksijen türlerinin etkili bir üreticisidir (Santos ve ark., 2007). Selenyum, hidrojen peroksitin indirgenmesinden sorumlu glutatyon peroksidazın yapısına katılarak antioksidan aktivite göstermektedir. Cisplatin ile birlikte selenyum muamele edilen gruplarda cisplatin gruplarında gözlemlendiği kadar belirgin değişikliklerin gözlenmemesi selenyumun antioksidan olarak koruyuculuğunu göstermektedir.

Cisplatinin neden olduğu oksidatif hasar üzerinde antioksidan olarak etkili olan ASA ve selenyumun birlikte verildiği gruplarda gözlenen değişiklikler cisplatin

gruplarında gözlenen değişiklikler kadar belirgin değildi. Bu bulgular antioksidan maddelerin birbiri üzerinde olumsuz etki göstermedikleri farklı mekanizmalarla antioksidan etki göstererek maddelerin ayrı ayrı koruyuculuk sağladığını düşündürmektedir.

Cisplatinin sebep olduğu oksidatif hasar sonucu hücrelerde membran yapısında bozulmaların meydana geldiği, sonuçta histopatolojik ve sitopatolojik değişikliklerin ortaya çıktığı gözlenmiştir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Çalışmamızda cisplatinin karaciğer üzerine spesifik etkisi araştırılarak, ilacın etki mekanizması anlaşılmaya çalışılmıştır. Bu doğrultuda elde ettiğimiz sonuçların ve bulguların ışığında, cisplatinin serbest radikal salınımını indükleyerek karaciğerde meydana getirdiği oksidatif hasarı, serbest radikal süpürücüsü etkilerinin de olduğu bilinen bilinen ASA ve selenyumun azalttığını söyleyebiliriz.

Cisplatin ve antioksidan olarak etkilerini araştırdığımız ASA ve Selenyumu ayrı ayrı ve birlikte vererek yaptığımız çalışmada, cisplatinin serbest oksijen radikallerinin salınımını uyarak karaciğerde histopatolojik değişikliklere neden olduğu düşünülebilir. Cisplatin ve antioksidan olarak verilmiş ASA ve Selenyumun antioksidan özelliklerinden dolayı, cisplatinin neden olduğu serbest oksijen radikallerini süpürdüğü, bu nedenle de histolojik olarak karaciğerde cisplatinin meydana getirdiği hasarı azalttığı söylenebilir.

Antioksidanların oksidatif hasar üzerine etkilerinin tam olarak ortaya çıkarılabilmesi ve cisplatinin istenmeyen yan etkilerinin daha etkili, ekonomik ve kolay uygulanabilir ilaçlarla ortadan kaldırılabilmesi için farklı kombinasyonlarla antioksidanların uygulandığı çalışmalara ihtiyaç vardır. Yapılan çalışmalarla terapötik ajanların istenmeyen yan etkilerinin azaltılması hedeflenmektedir.

Doktora tez çalışması sonucunda elde edilen verilerin ve bu süreçte kazanılan deneyimin planlanan ileri projeler için de temel teşkil edeceği umulmaktadır.

7. KAYNAKLAR

- Adalı, M., 1998. Hipertiroidli hastalarda lipid peroksidasyonu ve antioksidan duruma propitiyoursil, propanol ve vitamin E'nin etkisi. Osmangazi Üni. Tıp Fak. Biyokimya A.B. Dalı, Uzm. Tezi. Eskişehir.
- AFIP, 1992. Laboratory Methods in Histotechnology, 53-58, 132.
- Ajith, T. A., Usha, S., Nivitha, N., 2006. Ascorbic acid and α -tocopherol protect anticancer drug cisplatin induced nephrotoxicity in mice: a comparative study. Clinica Acta, 375 (82-86).
- Akay, M.T., 2001. Genel Histoloji. Beşinci Baskı, Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Beytepe, Ankara, Palme Yayıncılık.
- Akkuş, İ., 1995. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Mimoza Yayınları, 38, Kuzucular Ofset, Konya-Türkiye.
- Aksoy, Y., 2002. Antioksidan Mekanizmada Glutasyonun Rolü, T Klin. Tıp Bilimler. 22:442-448.
- Akyol, Ö., 2004. Şizofrenide Oksidatif Stres. Kocatepe Tıp Dergisi 5, ek Sayı 15-25.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., 2008. Hücrenin Moleküler Biyolojisi (Çeviri Editörleri: N. Buyru, N. Dalay, M. Özgüç, M. Öztürk, M. Sakızlı), 1530 s. TÜBA Ders Kitapları 3, Sistem Ofset, Ankara.
- Alexandrova, R., Rashkova, G., Tsenova, W., 2003. Selenium-The known and unknown. Experimental Pathology and Parasitology, Bulgarian Academy of Sciences, 6/12.
- Al Moundhri, M.S., Ali, B.H., 2006. Agents Ameliorating or Augmenting the Nephrotoxicity of Sisplatin and Other Platium Compounds: a Review of Some Recent Research. Food and Chemical Toxicology, 44:1173-1183
- Anderson, W.A.D., Kissane, J. M., 1997. Pathology, Seven Edition, The C.V. Mosby Company, Sf: 131-204.
- Anonim, 2006a. Karaciğer parankimal hücrelerinde nekroz. <http://www.md.huji.ac.il/mirrors/webpath/LIVER038.jpg>. Erişim tarihi: 08.12.2006.
- Anonim, 2006b. Karaciğerde geniş nekrozlu bir alanın görünümü. [http://ntp-server.niehs.nih.gov/lesions/liver mlvr/mlvrinfl/NecrosisA2.jpg](http://ntp-server.niehs.nih.gov/lesions/liver/mlvr/mlvrinfl/NecrosisA2.jpg). Erişim tarihi: 08.12.2006.

- Anonim, 2006c. Beyinde likefaksiyon nekrozun mikroskopik görüntüsü. <http://www-medlib.med.utah.edu/WebPath/CINJHTML/CINJ023.html>. Erişim tarihi: 01.12.2006.
- Anonim, 2006d. Beyinde likefaksiyon nekroz. <http://www.medlib.med.utah.edu/WebPath/CINJHTML/CINJ022.html>. Erişim tarihi: 01.12.2006.
- Anonim, 2006e. Pankreasdaki yağlı nekrozun mikroskopik görüntüsü. <http://www.medlib.med.utah.edu/WebPath/CINJHTML/CINJ027.html>. Erişim tarihi:01.12.2006.
- Anonim, 2007a. Apoptotik Epitelial Hücreler, Tarayıcı Elektron Mikroskobu görüntüleri. <http://imoax1.unimo.it/~cossarizza/apobook98/malorni/malorni.htm>. Erişim tarihi: 05.05.2007.
- Anonim, 2007b. Apoptotik hücreleri temizleyen makrofajlar. <http://www.apocyte.com/apocyte/science> 'den alınmıştır. Erişim tarihi: 05.05.2007.
- Anonim, 2009a. Cell Injury and Disease. <http://medinfo.ufl.edu/pa/chuck/fall/handouts/injury.htm>. Erişim tarihi:07.01.2009.
- Anonim, 2009b. Cisplatinin DNA'ya bağlanması. <http://www.nature.com/.../v4/n4/images/nrd1691-f3.jpg>. Erişim tarihi: 20.10.2009.
- Anonim, 2009c. Cisplatinin kimyasal yapısı. http://www.ch.ic.ac.uk/.../s_liu/Html/Cisplatin.html. Erişim Tarihi: 01.11.2009.
- Antunes, L.M.G., Darin, J.D.C., Bianchi, M.L.P., 2001. Effects of the Antiozidants Curcumin or Selenium on Cisplatin-İnduced Nephrotoxicity and Lipid Peroxidation in Rats. Pharmacological Research. Vol 43, No.2
- Ateşşahin, A., Şahna, E., Türk, G., Çeribaşı, A.O., Yılmaz, S., Yüce, A., Bulmuş , Ö., 2006. Chemoprotective effect of melatonin against cisplatin-induced testicular toxicity in rats. J. Pineal Res. 41:21-27.
- Avcı, A., Çetin, R., Ergüder, İ.B., Devrim, E., Kılıçoğlu, B., Çandır, Ö., Öztürk, H.S., Durak, İ., 2008. Cispaltin Causes Oxidation in Rat Liver Tissues: Possible Protective Effects of Antioxidant Food Supplementation. Turk J. Med Sci. 38 (2):117-120.

- Aydın, B.K., 2003. Aspirin ve Vitamin E (α tokoferol) verilmiş ratlarda karaciğerde yapılan iskemi/perfüzyon sonrası eritrosit radikal süpürücü enzim (Süperoksit Dismutaz, Katalaz, Glutasyon Peroksidaz) aktivitelerindeki değişiklikler, Doktora Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun, 79s.
- Ayla, Ş., Oktar, H., Tanrıverdi, G., Cengiz, M., Özkılıç, A.Ç., Can, G., Özücer, B., Eser, M., Demirci, S., Batur, Ş., 2009. Doksorubisin Nedenli Sıçan Hepatoksisisine Nikotinaindin (Koruyucu) Etkisi. Anadolu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi, Cilt/Vol.:10-Sayı/No:1 : 229-238.
- Azuma, Y., Imani, Y. and Matsumoto, K., 2002. Alterations in Cell Surface Phosphatidylserine and Sugar Chains During Apoptosis and Their Time-Dependent Role in Phagocytosis by Macrophages. Biol. Pharm.bull. 25(10): 1277-1281.
- Bagis, S., Tamer, N., Şahin, G., Bilgin, R., Güler, H., Ercan, B., Erdoğan, C., 2003. Free Radicals and Antioksidants in Primary Fibro Myalgia: and Oxidative Stres Disorder. Rheumatol Int., 25: 188-190.
- Baloglu, E., 2001. Synthesis and Biological Evaluation of Paclitaxel Analogs, Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University. Blacksburg, Virginia.
- Bast, A., Haenen, G. R. M. M., Cees, J. A. D., 1997. Oxidants and antioxidants. State of the art. The American Journal of Medicine, 91 (Suppl 3C), 30, 3C-2S-3C-13S.
- Beyer, W., Imlay, J., Fridovich, I., 1991. Superoxide Dismutases. Prog. Nucl. Acid Res. 40, 221-253.
- Bancroft, J.D., Stevens, A., 1996. Theory and Practice of Histological Techniques, Fourt Edition. Churchill Livingstone Medical Division of Pearson Professional Limited, Pp.136.
- Burk, RF., Hill KE., Awad JA., Marrow, JD, Lyons, PR., 1995. Liver and kidney necrosis in selenium deficient rats depleted of glutathione. Lab. Invest, 72: 723-30.
- Cakmak, I., Marschner, H., 1988. Enhanced superoxide radical production in roots of zinc-deficient plants. J. Expt. Bot. 39, 1449-1460.
- Camargo, SM., Francescato, HD., Lavrador, MD., Bianchi, ML., 2001. oral administraton of sodium selenite minimizes cisplatin toxicity on proximal tubuls of rats. Biol trace elem res. December; 83 (3): 251-62.

- Camougrand, N., Rigoulet, M., 2001. Aging and oxidative Stres: Studies of Some Genes Involved Both in Aging and in Response to Oxidative Stres. *Respiration Physiology*, 128:393-401.
- Ceyhan, A., Günal, S., Çakan, T., Bababalım, M., Ünal, N., 1996. Serbest radikaller ve anestezi. *Sendrom*, 65-69.
- Chandrasoma, P., Taylor, C.R., 1995. *Concise Pathology*, Second Edition. A Lange Medical Book, Sf-3-20.
- Chirino, Y.I., Chaverri, J.P., 2009. Role of oxidative and nitrosative stres in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 61, 223-242.
- Conklin, K.A., 2004. Cancer Chemotherapy and Antioxidants *J. Nutr.* 134 (11):3021-3204.
- Cooper, G.M., Hausman, R.E., 2006. *Hücre: Moleküler Biyolojisi*. (Çeviri Editörleri: M. Sakızlı, N. Atabey) İzmir Tıp Kitapevi, 714 s.
- Cui, K., Luo, X., Xu, K., Murthy Ven, M. R., 2004. Role of oxidative stress in neurodegeneration: recent developments in assay methods for oxidative stress and nutraceutical antioxidants. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 8, 771–799.
- Damjanov, I., Linder, J., 1996. *Anderson's Pathology*, Tenth Edition, the V.Mosby Company, 2:1793-1794.
- Delibaş, N., Özcankaya, R., 1995. Serbest Radikaller. *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 2 (3), 11-17.
- Drew, J.E., Arthur, J.R., Farquharson, A.J., Russel, W.R., Morrice, P.C., Duthie, G.G. 2005. Salicylic acid modulates otidative stres and glutathione prooxidase activity in rat colon. *Biochemical Pharmacology*. 70:888-893.
- Droge, W., 2003. Oxidative stress and aging. *Adv. Exp. Med. Biol.* 543, 191–200.
- El-Sayyad HI, Ismail MF, Shalaby FM, Abou-El-Magd RF, Gaur RL, Fernando A, Raj MH, Ouhtit A., 2009. Histopathological effects of cisplatin, doxorubicin and 5-flurouracil (5-FU) on the liver of male albino rats. *Int J Biol Sci.* Jun 28;5(5):466-73.
- Erdoğan, B.B., 2003. Apoptozis Mekanizmaları: Tümör Gelişiminde Fas-FasL Bağımlı Apoptozis. *Akciğer Arşivi*, :4: 165-174.
- Eren, M., Saltık-Temizel, İ.N., Koçak, N., 2004. İlaça Bağlı hepatoksisite. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*, 47:222-227.

- Ergin, M., Alkan, S., 2002. Apoptozis. Arşiv, 11:495.
- Farr, S. B., Kogoma, T., 1991. Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Microbiol. Rev. 55, 561-585.
- Fawcett, Don W., 1986. A Text Book of Histology, Eleventh Edition, W.B. Saunders Company, Sf: 535-542.
- Gamble, S.C., Wiseman, A., Goldfarb, P.S., 1997. Selenium-Dependent Glutathione Peroxidase and other Selenoproteins: Their Synthesis and Biochemicel Roles. J. Chem. Tech. Biotechnol. 68, 123-134.
- Garcia, B., 2005. Cellular Injury. Pathology. UWO&LHSH. University Campus. Introduction to Medicine, August.
- Gartner, L.P., Hiatt, J.L., 1997. Color Textbook of Histology. Philadelphia: W.B. Saunders Company, pg: 346-335.
- Grosser, N., Abate, A., Oberle, S., Vreman, H.J., Dennery, P.A., Becker, J.C., Pohle, T., Seidman, D.S., Schroder, H., 2003. Heme oxygenase-1 induction may explain the antioxidant profile of aspirin. Biochem. Biophys. Res. Commun. Sep. 5; 308(4):956-60.
- Göncü, N.E., Pehlivan, S., 2001. Apoptozisin Morfolojik, Biyokimyasal ve Moleküler işaretleri. Arsiv, 10: 292.
- Gözükara, E.M., 2001. Biyokimya, Dördüncü Baskı. 2.Cilt. Nobel Tıp Kitapevleri, 1258 sf.
- Gutteridge, J.M., 1995. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. Clin Chem. Dec; 41(12 Pt 2):1819-28.
- Gültekin, F., Kaleli, S., Altuntaş, İ., Öncü, M., Gökçimen, A., Sütçü, R., 2000. Chlorpyriphos-ethylin rat testis dokusunda in vivo lipoperoksidatif etkisi, Genel Tıp Dergisi, 10 (4) : 147-152.
- Halliwell, B., 1984. Oxygen Radicals; A Commonsense look at their Nature and Medical Importance: Medical Biology, 62, 71-77.
- Halliwell, B., 1994. Free radicals, Antioxidants, and human disease: Curiosity, Cause or Consequence, The Lancet, Vol. 344, Sep. 10: 721-724.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C., 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. Biochem J. 219, 1-14.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M., 1989. Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford University Press/Clarendon Press 2nd ed. New York-USA.

- Hanigan, M.H., Devarajan, P., 2003. Cisplatin nephrotoxicity: molecular mechanisms. National Institutes Health Public Access, Cancer Ther. 1:47-61.
- Harman, D., 1984. Free radical theory of aging: The 'Free Radical'diseases. Age, 7, 111-131.
- Ho, Y., Au-Yeung, S.C.F., To, K.K.W., 2003. Platinum-Based Anticancer Agents: Innovative Design Strategies and Biological Perspectives. Medicinal Research Reviews, Vol.23, No. 5:633-655.
- Hoffmann, P.R., Berry, M.J., 2000. The influence of selenium on immune responses. Mol. Nutr. Food Res. 52, 000-000.
- Hohn, D. C., Lehere, R. L., 1975. NADPH oxidase deficiency in X-linked chronic granulomatous disease. J. Clin Invest. 53, 707-713.
- Imlay, J. A., and Linn, S., 1986. DNA damage and oxygen radical toxicity. Science. 240, 1302-1309.
- Ishizuka, T., Niwa, A., Tabuchi, M., Ooshima, K., Higashino, H., 2008. Acetylsalicylic acid provides cerebrovascular protection from oxidant damage in salt-loaded stroke-prone rats. Life Science. March,26,82 (13-14):806-15.
- İnan, D., 1998. Cu Zn SOD, GSH-Px ve TAS düzeylerinin diabetik vakalara verilen antioksidan tedavi sonrası değişimi. T.C. Sağlık Bakanlığı, Ankara Numune Hastanesi Biyokimya Uzm. Tezi.
- İşeri, S., Ercan, F., Gedik, N., Yüksel, M., Alican, İ., 2007. Simvastatin attenuate cisplatin-induced kidney and liver damage in rats. Toxicology, 230, 256-264.
- Junqueira, L.C., Carneiro, J., 2006. Temel Histoloji. Çeviri Editörleri: Y. Aytekin, S. Solakoğlu, Nobel Matbaacılık, İstanbul. 512 sf.
- Kaufmann, J.M., 2000. Should you take aspirin to preent heart attack? J. Scientific Exploration, 14, 4, 623-641.
- Karahan, İ., Yılmaz, S., Ateşşahin, A., 2006. Ratlarda Cispaltin ve Gentamisinin Kan İle Karaciğerde Oluşturdukları Oksidatif Stress üzerine Likopenin Etkileri. F.Ü. Sağlık Bil. Dergisi, 20(1), 39-43.
- Kılıç, N. 2005. Lehninger Biyokimyanın İlkeleri. Üçüncü Baskıdan Çeviri. Palme Yayıncılık.
- Kierszenbaum, A.L., 2006. Histology and Cell Biology, Mosby. Çeviri: Ramazan Demir, Palme Yayıncılık, Sf: 458-464.

- Koç, A., Duru, M., Cıralık, H. Akcan, R., Soğut, S., 2005. Protective agent, erdostein, again cisplatin-induced hepatic oxidant injury in rats. *Mol cell biochem.* October; 278(1-2): 79-84.
- Kopff, M., Kopff, A., Kowalczyk, E., 2007. The effect of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on oxidative/antioxidative balance. *Pol. Merkur Lekarski.* Sep, 23 (135):184-7.
- Kumar, V., Cotran, R.S., Robbins, S.L., 1999. *Basic Pathology*, WD Saunders Company, Çeviri: Çevikbaş, U. 2000. *Temel Patoloji*, Nobel Tıp Kitapevleri Ltd. Şti. Sf: 4-24.
- Lamson, D.W., Brignall, M.S., 1999. Antioxidants in cancer therapy; Their actions and interactions with onkologic therapies. *Alternative Medicine Review*, 4,5, 304-329.
- Leutner, S., Ecker, A., Müller, W.E., 2001. Ros Generation, Lipid Peroxidation and Antioksidant Enzyme Activities in the Aging Brai., *J. Neural transm*, 108: 955-967.
- Liao, Y., Lu, X., Lu, C., Li, G., Jin, Y. and Tang, H., 2008. Selection of Agents for Prevention of Cisplatin–Induced Hepatotoxicity. *Pharmacological Research*, 57, 125-131.
- Lindqvist, Y., Branden, C. L., Mathews, F. S., and Lederer, F., 1991. Spinach glycolate oxidase and yeast flavocytochrome b2 are structurally homologous and evolutionarily related enzymes with distinctly different function and flavin mononucleotide binding. *J. Biol. Chem.* 266, 3198-3207.
- Liu, X., Li, J., Li, Q., Ai, Y. and Zhang, L., 2008. Protective Effects of Ligustrazine on Cisplatin-Induced oxidative stres, Apoptosis and Nephrotoxicity in Rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 26, 49-55.
- Maliakel, D.M., Kagiya, T.V., Nair, C.K.K., 2008. Prevention of cisplatin-induced nephrotoxicity by glucosides of ascorbic acid and α -tocopherol. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 60, 521-527.
- Malorni, W., Fais, S., and Fiorentini, C., Morphological Aspects of Apoptosis. Laboratory of Ultrastructures and (¹) Virology, Istituto Superiore di Sanita',viale Regina Elena 299, 00161, Rome, Italy. E-mail: Malorni@ul.net.iss.it
- Martins, N.M., Santos, N.A.G., Curti, C., Bianchi, M.L.P., Santos, A.C., 2008. Cisplatin Induces Mitochondrial Oxidative Stress with Resultant Energetic Metabolism

- Impairment, Membrane Rigidification And Apoptosis In Rat Liver. *Journal Of Applied Toxicology*, 28:337-344.
- Mates, J.M., Jiménez, F.S., 1999. Antioksidant Enzymes nd Their Application in Pathophysiologic Processes. *Frontiers in Bioscience*, 4, d339-345.
- Maxwell, S. R. J., 1995. Prospects for the use of antioxidant therapies. *Drugs*. 49, 345–361.
- McBrien, D. C. H., Slater, T. F., (eds). 1982. Free radicals, lipid peroxidation and cancer. Academic Press, London.
- Meram, İ., Aktaran, Ş., 2002. Serbest Radikallerin Biyomoleküller Üzerine Etkileri. *Arşiv*, 11, 299.
- Miyamoto, Y., Miyamoto, M., 2004. Immunohistochemical localizations of secretin, cholecystokinin, and somatostatin in the rat small intestine after acute cisplatin treatment. *Experimental and molecular pathology*. vol. 77, 238-245.
- Mimić Oka, J., Simić, D.V. and Simić, T., 1999. Free radicals in cardiovascular diseases. *Medicine and Biology*, 6, 1, 11-22
- Murthy, M. R. V., 2001. Coenzyme-Q and related isoprenoid compounds: biosynthesis, regulation, functions and biomedical implications. In: Ebadi, M., Marwah, J., Chopra, R. (Eds.), *Mitochondrial Ubiquinone (Coenzyme Q-10)*. Prominent Press, Arizona, pp. 231– 346.
- Newairy, A.A., El-Sharaky, A.S., Badreldeen, M.M., Eweda, S.M., Sheweita, S.A., 2007. The Hepatoprotective effects of selenium against cadmium toxicity in rats. *Toxicology*, 242, 23-30.
- Noyan, A., 1995. *Fizyoloji Ders Kitabı*, 7. Baskı, Sf: 1094-1098.
- Oberle, S., Polte, T., Abate, A.; Podhaisky, H.P., Schröder, H., 1998. Aspirin Increases Ferritin Synthesis in Endothelial Cells. *Circulation Research*, 82:1016-1020.
- Onat, T., Emerk, K., Sözmen, E.Y., 2002. *İnsan Biyokimyası*, Palme Yayıncılık, Ankara, 711 sf.
- Opara, E. C., 2004. Role of oxidative stress in the etiology of type 2 diabetes and the effect of antioxidant supplementation on glycemic control. *J. Inv. Med.* 52, 19–23.
- Öktem, S., Özhan, M. H., Özol, D., 2001. Apoptozisin Önemi. *Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı Toraks Dergisi*, 1:91-9
- Öztürk, F., 2002. Apopitoz. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 9(2):143-148.

- Peter, M. E., Heufelder, A. E., and Hengarter, M. O., 1997. Advances in apoptosis research. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94:12736-12737.
- Pratibha, R., Sameer, R., Rataboli, P.V., Bhiwgade, D.A., Dhume, C.Y., 2006. Enzymatic Studies of Cisplatin Induced Oxidative Stress in Hepatic Tissue of Rats. *European Journal of Pharmacology*, 532, 29-293.
- Provan D., Krentz A., 2002. Gastroenterology. In *Oxford Handbook of Clinical and Laboratory Investigation*, Provan D, Krentz A (eds). Oxford University Press: New York; 325–354.
- Ramoutar, R.R., Brumaghim, J.L., 2007. Effects of Inorganic Selenium Compounds on Oxidative DNA Damage. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 10. 1016.
- Rayman, MP., 2000. The importance of selenium to human health. *Lancet*; 356:233-41.
- Reiter, R.J., 1997. Aging and Oxygen Toxicity: Relation to Changes in Melatonin, *Age*, Vol. 20, 201-213.
- Reiter, R.J. , Tan, D.X., Acuna-Castrovejo, D., 2000. Melatonin: Mechanisms and actions as an antioxidant, *Curr. Topics Biophys.* 24:171-183
- Rich, P. R., Bonner, W. D. J., 1978. The sites of superoxide anion generation in higher plant mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* 188, 206-213.
- Riedel, W., Lang, U., Oetjen, U., Schlapp, U. and Shibata, M., 2003. Inhibition of Oxygen radical formation by methylene blue, aspirin, or alpha-lipoic acid, prevents Bacterial-lipopolysaccharide –induced fever. *Molecular and cellular Biochemistry*, 247, 83-94.
- Robbins, S.L., 1996. *Textbook of Pathology with Clinical Application*. W.B Saunders Company. Sf: 5-29.
- Robbins, S.L., Kumar, V., 1981. *Basic Pathology*. W.B. Saunders Company. Çeviri: Uluoğlu, Ö., 1987. *Patoloji*. Güneş Kitabevi. Sayfa: 1-32.
- Rojkind, M., Domínguez -Rosales, J.A., 2002. Role of Hydrogen Peroxide and Oxidative Stress in Healing Responses. *CMLS, Cellular and Molecular Life Sciences*, 59:1872-1891.
- Ross, M.H., Romrell, L.J., Kaye, G.I., 1995. *Histology: a Text and Atlas*. 3rd ed. Baltimore: Williams & Wilkins, Pg: 496-507.
- Ruijven, M.W.M., Groot, J.C.M.J., Hendriksen, F., Smoorenburg, G.F., 2005. Immunohistochemical Detection of Platinated DNA in the cochlea of cisplatin-treated guinea pigs. *Hearing Research*, 203, 112-121.

- Rybak, L. P., Whitworth, Craig, A., Mukherjea, D. and Ramkumar, V., 2006. Mechanism of cisplatin-induced ototoxicity and prevention. *Hearing Research*, 226, 157-167.
- Santos, N.A.G., Martins, N.M., Curti, C., Bianchi, M.L.P. and Santos, A.C., 2007. Dimethylthiourea Protects Against Mitochondrial Oxidative Damage induced by Cisplatin in Liver of Rats. *Chemico-Biological Interactions*, 170, 177-186.
- Seven, A. ve Candan, G., 1996. Antioksidan Savunma Sistemleri. *Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Dergisi*, 27, 1, 41-50.
- Shi, X., Ding, M., Dong, Z., Chen, F., Ye, J., Wang, S., Leonard, S.S., Castranova, V., Vallyathan, V. 1999. Antioxidant properties of aspirin: characterization of the ability of aspirin to inhibit silica-induced lipid peroxidation, DNA damage, NF-kappaB activation, and TNF-alpha production. *Mol Cell Biochem*. 199(1-2):93-102.
- Simonoff, H., Sergeant, C., Garnier, N. et. Al, 1992. Antioxidant status (selenium, vitamin A and E) and ageing. In: emeritl, Change B, editors. *Free radicals and ageing*. Basel: Birkhauser, 368-396
- Sivaram, A.G., Suresh, M.V., Indira, M., 2003. Combined effect of ascorbic acid and selenium supplementation on alcohol-induced oxidative stress in guinea pigs. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 134, 397-401.
- Smith, A.P., Leekham, S., Ralph, A., McNeill, G., 1988. The Influence of Meal Composition on Post-Lunch Performance Efficiency and Mood. *Appetite*, 10: 195-203.
- Sohal, R:S., 1981. *Age Pigments*, Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam.
- Sohn, J.H., Han, K., Kim, J.H., Rukayadi, Y. and Hwang, J.K., 2008. Protective Effects of Macelignan on Cisplatin-Induced Hepatotoxicity Is Associated with JNK Activation. *Biol Pharm. Bull.*, 31 (2) 173-277.
- Söğüt, S., Yılmaz, H.R., Songur, A., Güleç, M., Kotuk, M., Ağlamış, S., 2004. Sıçanlarda Cisplatin ile oluşturulan nefrotoksistide bazı metabolik enzim aktiviteleri ve bunlar üzerine E Vitaminin etkileri. *Tıp Araştırmaları Dergisi*, 2(1): 23-28.
- Stevens, A., Lowe, J.S., 1993. *Histology*. Mosby-Year Book Europe Ltd., Sf: 176-184.

- Stewart, D.J., Mikhael, N.Z., Nanji, A.A., Nair, R.C., Kacew, S., Howard, K., Hirte, W., Maroun, J.A., 1985. Renal and hepatic concentrations of platinum: relationship to cisplatin time, dose, and nephrotoxicity. *J. : 1251–1256.*
- Strasser, A., O'Connor, L., Dixit, V.M., 2000. Apoptosis signals, *Annu.Rev.Biochem.* 69: 217-245.
- Şahinoğlu, S., 1996. Diabetes mellitus'lu olgularda total antioksidan status ve Superoxide dismutase düzeyleri. Haydarpaşa Numune Hastanesi, Biyokimya ve Klinik Biyokimya, Uzm. Tezi.
- Şen, S., 2005. Hücre Zedelenmesi Ders Notları. Ege Üniversitesi, Patoloji ABD.
- Şimşek, T., 1993. Patoloji. İkinci baskı, Sayfa: 1-7, 156-159.
- Tapiero, H., Townsend, D.M, Tew, K.D., 2003. The Antioxidant Role of Selenium and Seleno-Compound. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 57: 134-144.
- Tarladaçalışır, Y.T., Uygun, M., Akpolat, M., Uz, Y.H., 2005. E ve C Vitaminlerinin Cisplatin Hepatotoksitesini Önlemedeki Etkilerinin Histolojik Olarak İncelenmesi. *Trakya Üniv., Tıp Fak. Dergisi*, 22(3): 124-131.
- Thompson, C.B., 1999. Apoptosis. *In Fundamental Immunology*. W.E. Paul, editor. Lippincott Raven Publishers, Philadelphia. 813-829.
- Topçu, Y., 2003. Sisplatinin Oluşturduğu Böbrek Korteks Hasarlarında E ve C Vitamini Etkilerinin Işık ve Elektron Mikroskopik Düzeyde İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Morfoloji Anabilim Dalı Histoloji Ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Edirne, 81 s.
- Turrens, J.F., Freeman, B.A., Crapo, J.D. 1982. Hyperoxia increases H₂O₂ release by lung mitochondria and microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.* 217, 411-421.
- Tuvdendorj, D., Oketani, M., Ikeda, R., Kohara, K., Komorizono, Y., Ishibashi, K., Munk Htuvshin, N., and Arima, T., 2003. Aspirin induces hepatoma-derived cell apoptosis via a hydrogen peroxide-dependent pathway. *Hepatology Research*, 26, 47-54.
- Tülek, S., 2004. Nikotin ve Melatonin Verilmiş Farelerde Karaciğerde Oluşan histolojik Değişikliklerin Işık mikroskobu Düzeyinde Araştırılması. Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 65 Sf.
- Türe, T., 1998. Akut myokard infarktusunda Superoxide dismutase ve Glutathion peroxidase enzimleri ile E ve C vitamini düzeyleri. Sağlık Bakanlığı, İzmir Atatürk Eğitim Hastanesi Biyokimya A.B.Dalı Uzm. Tezi.

- Ulubaş, B., Çimen, M.Y., Apa, D.D., Sarıtaş, E., Muşlu, N., Çimen, O.B., 2003. The Protective Effects of Acetylsalicylic Acid on Free Radical Production in Cisplatin Induced Nephrotoxicity: An Experimental Rat Model. *Drug Chem Toxicol.* Nov, 26 (4): 259-270.
- Uozumi J., Ueda T., Yasumasu T., Koikawa Y., Naito S., Kumazawa J., Sueishi K., 1993. Platinum accumulation in the kidney and liver following chemotherapy with cisplatin in humans. *Int. Urol. Nephrol.* 25: 215–220.
- Vane, J.R., 1971. Inhibition of Prostaglandin Synthesis as a Mechanism of Action for Aspirin-Like Drugs, *Nature-New. Biolog.* 231(25),232-235.
- Vaux, D. L., and Strasser, A., 1996. The molecular biology of apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93:2239-2244
- Vianello, A., Macri, F. 1991. Generation of superoxide anion and hydrogen peroxide at surface of plant cells. *J. Bioenerg. Biomemb.* 23, 409-423.
- Weichert-Jacobsen K.J., Bannowski, A., Kuppers, F., Loch, T., Stöckle, M., 1999. Direct amifostine effect on renal tubule cells in rats. *Cancer Res.* 59: 3451-3.
- White, M. J., Heckler, F. R., 1990. Oxygen free radicals and wound healing. *Clinics in plastic surgery.* Vol 17, No 3. Pages 473-84.
- Winston, G.W., Cederbaum, A.I., 1983. Oxyradical production by purified components of the liver microsomal mixed-function oxidase system I: Oxidation of hydroxyl radical scavenging agents. *J. Biol Chem.* 258, 1508-1513.
- Wolin, M.S., 1998. Novel antioxidant action of aspirin may contribute to its beneficial cardiovascular actions. *Circ Res.* 18;82(9):1016-20.
- Wyllie, A., Duvall, E., 1992. Cell death. *Oxford Textbook of Pathology*, 1:142-147.
- Yanbeyi, S., 1999. Aspirin ve antioksidant butylated hydroxyanisole'ün tavşanlarda eritrosit total katalaz, süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz aktiviteleri üzerine etkileri. Ondokuz Mayıs Üni. Biyoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Samsun, 88s.
- Yılmaz, H.R., Söğüt, S., Özyurt, H., Iraz, M., Yıldırım, Z., Akyol, Ö., 2004. Sıçanlarda Sisplatinle Oluşturulan Nefrotoksisitede Metabolik Enzim Aktivitelerine Kafeik Asit Feneti Ester' in Etkisi. *Van Tıp Dergisi*, 11(1):1-6
- Zicca, Antonio., Cafaggi, S., Mariggio, M.A., Vannozzi, M.O., Ottone, M., Bocchini, Vittorio., Caviglioli, G., Viale, M., 2002. Reduction of Sisplatin Hepatotoxicity

by Procainamide Hydrochloride in Rats. *European Journal of Pharmacology*, 442: 65-272.

Zubay, G., 1995. *Biochemistry*. Colombia University, Third Edition, Chapter 22, 629-633.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Sevcan MERCAN

Doğum Yeri : Kastamonu

Doğum Tarihi : 14.09.1979

Medeni Hali : Evli

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce

Eğitim Durumu:

Lise : Kastamonu Abdurrahmanpaşa Lisesi, 1993-1996.

Lisans : Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü,
1996-2000.

Yüksek Lisans: Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim
Dalı, 2001-2004.

Çalıştığı Kurum ve Yıl: Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, 2001-

İletişim Bilgileri:

Cep No: 0 542 268 37 79

e-posta: sevcant@omu.edu.tr