

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DİETİLNİTROZAMİN UYGULANAN RATLARDA
OKSİDATİF STRES VE DNA HASARI ÜZERİNE LİKOPENİN
ETKİSİ

DOKTORA TEZİ

Arş. Gör. Emre KAYA

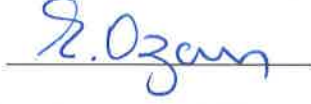
ELAZIĞ-2016

ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Mustafa KAPLAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Doktora Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.



Prof. Dr. P. Sema TEMİZER OZAN

Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Seval YILMAZ



Danışman

Doktora Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. P. Sema TEMİZER OZAN



Prof. Dr. Bahri PATIR



Prof. Dr. Seval YILMAZ



Prof. Dr. Yeter DEĞER



Prof. Dr. Fulya BENZER



TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca gerek tez konumun seçiminde, gerekse araştırmalarımın her aşamasında ilgisini ve desteğini esirgemeyen, bilgi ve tecrübeleri ile büyük katkıda bulunan, danışman hocam Sayın Prof. Dr. Seval YILMAZ'a şükranlarımı sunarım.

Tez çalışmam süresince yardımlarını gördüğüm Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Sema TEMİZER OZAN'a ve Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Sayın Prof. Dr. Necmi ÖZDEMİR'e, Sayın Prof. Dr. Mine ERİŞİR'e, Sayın Yrd. Doç. Dr. Gonca OZAN'a, Arş. Gör. Mehmet Ali KISAÇAM'a teşekkürlerimi sunarım.

Doktoram boyunca manevi desteklerini esirgemeyen, her zaman bana karşı anlayışlı olan eşim Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı öğretim elemanı Arş. Gör. Dr. Şeyma ÖZER KAYA'ya ve bana varlığı ile büyük güç veren biricik oğlum Yiğit KAYA'ya sonsuz teşekkürü bir borç bilirim. Ayrıca, beni bugünlere getiren, tüm hayatım boyunca karşılıksız destek ve sevgileriyle her koşulda yanımda olan aileme en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışması için maddi destek aldığımız Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (FÜBAP) Koordinasyon Birimine (Proje No: VF.14.19) teşekkür ederiz.

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	I
TEŞEKKÜR	I
İÇİNDEKİLER	II
TABLolar LİSTESİ	VI
ŞEKİLLER LİSTESİ	VIII
KISALTMALAR LİSTESİ	X
1. ÖZET	1
2. ABSTRACT	4
3. GİRİŞ	7
3.1. Nitrozaminler	10
3.1.1. Biyolojik Sıvılardaki Nitrozaminlerin Oluşumu	12
3.1.2. Gıdalarda Nitrozaminlerin Oluşumu	13
3.1.3. Çevresel Nitrozaminlerin Oluşumu	15
3.1.4. Nitrozaminlerin Etki Mekanizmaları	16
3.1.5. Nitrozaminlerin Çevre ve İnsan Sağlığına Etkileri	18
3.1.6. Nitrozaminlerin DNA Üzerine Etkileri	19
3.1.7. Nitrozo Bileşikleri ve Kansere İlişkisi	20
3.2. Dietilnitrozamin (DEN)	22
3.2.1. DEN'in Biyolojik Olarak Aktivasyonu	23
3.2.2. DEN ve Serbest Radikaller ile İlişkisi	25
3.2.3. DEN'in Karaciğerde Tümör Oluşumundaki Rolü	27
3.3. Serbest Radikaller	28
3.3.1. Serbest Radikal Türleri	30
3.3.2. Reaktif Oksijen Türleri (ROT)	31
3.3.3. Serbest Radikallerin Oluşumu	33
3.3.4. Hücrede Serbest Radikallerin Oluşum Yerleri	34
3.3.5. Biyolojik Sistemlerde Oluşan Serbest Radikaller ve ROT	35
3.3.5.1. Süperoksit Radikali ($O_2^{\cdot-}$)	35
3.3.5.2. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)	36
3.3.5.3. Hidroksil Radikali (OH^{\cdot})	37
3.3.5.4. Singlet Oksijen (1O_2)	38
3.3.5.5. Nitrik Oksit Radikali (NO^{\cdot})	38
3.3.6. Serbest Radikallerin Kaynakları	39
3.3.6.1. İntraselüler Kaynakları	39

3.3.6.2. Biyolojik Kaynakları	40
3.3.7. Serbest Radikallerin Organizmaya Etkileri	40
3.3.7.1. Lipidlere Etkileri	41
3.3.7.1.1. Lipid Peroksidasyonu (LPO)	41
3.3.7.2. Karbonhidratlara Etkileri	44
3.3.7.3. Proteinlere Etkileri	44
3.3.7.4. Enzimlere Etkileri	45
3.3.7.5. Nükleik Asitler Üzerine Etkileri	45
3.3.7.6. Hücresel Etkileri	48
3.3.7.7. Dokuya Etkileri	48
3.3.7.8. Serbest Radikallerin Etkili Bulunduğu Hastalıklar	49
3.4. Oksidatif Stres	49
3.5. Oksidatif DNA Hasarı	50
3.6. Antioksidan Savunma Sistemleri	53
3.6.1. Enzimatik Antioksidanlar	56
3.6.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD, E.C.1.15.1.1)	56
3.6.1.2. Katalaz (CAT, E.C.1.11.1.6)	57
3.6.1.3. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px, E.C.1.11.1.9)	59
3.6.1.4. Glutasyon-S-Transferaz (GST, E.C.2.5.1.18)	60
3.6.1.5. Glutasyon Redüktaz (GR, E.C.1.6.4.2)	61
3.6.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar	62
3.6.2.1. Glutasyon (GSH)	62
3.6.2.2. E vitamini (α - tokoferol)	63
3.6.2.3. C vitamini (Askorbik Asit)	63
3.6.2.4. Karotenoidler	64
3.6.3. Doğal Antioksidanlar	65
3.7. Likopen	66
3.7.1. Likopenin Yapısı	66
3.7.2. Likopenin Antioksidatif Etkisi	67
3.7.3. Likopenin Metabolizması ve Fonksiyonları	68
3.8. Moleküler Analizler ve Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR, Real Time Polymerase Chain Reaction)	71
4. GEREÇ VE YÖNTEM	74
4.1. Deney Hayvanlarının Bakım ve Beslenmeleri	74
4.2. Kullanılan Gereçler	75
4.2.1. Cihazlar	75

4.2.2. Kimyasal Maddeler	75
4.3. Yöntemlerin Uygulanması	76
4.3.1. Deney Hayvanlarının Hazırlanması	76
4.3.2. DEN ve Likopen Uygulaması	77
4.3.3. Örneklerin Toplanması ve Biyokimyasal Analizler	78
4.4. Kan Örneklerinin Hazırlanması	79
4.4.1. MDA Tayini için Hazırlanması	79
4.4.2. GSH Tayini için Hazırlanması	79
4.4.3. CAT Tayini için Hazırlanması	79
4.4.4. GSH-Px Tayini için Hazırlanması	79
4.4.5. SOD Tayini için Hazırlanması	79
4.5. Doku Örneklerinin Hazırlanması ve Homojenizasyonu	80
4.5.1. MDA, GSH, CAT, GST ve SOD Tayini için Doku Örneklerinin Hazırlanması ve Homojenizasyonu	80
4.5.2. GSH-Px Tayini için Doku Örneklerinin Hazırlanması ve Homojenizasyonu	80
4.6. Kanda ve Dokuda MDA, GSH, CAT, GSH-Px, GST, SOD, Protein ve Hemoglobin Analizleri için Kullanılan Yöntemler	81
4.6.1. Plazma ve Dokuda MDA Düzeyinin Tayini	81
4.6.2. Kan ve Dokuda GSH Düzeyinin Tayini	82
4.6.3. Kan ve Dokuda CAT Aktivitesinin Tayini	84
4.6.4. Kanda ve Dokuda GSH-Px Aktivitesinin Tayini	85
4.6.5. Dokuda GST Aktivitesinin Tayini	87
4.6.6. Kanda ve Dokuda SOD Aktivitesinin Tayini	88
4.6.7. Hemoglobin Tayini	91
4.6.8. Biyolojik Sıvılarda Protein Tayini	92
4.7. Moleküler Analizler için Kan ve Doku Örneklerinin Alınması ve RT-PCR Analizleri	94
4.7.1. RNA Ekstraksiyonu	94
4.8. Kandan RNA İzolasyonu	94
4.9. Karaciğer Dokusundan RNA İzolasyonu	96
4.10. RNA Konsantrasyonunun Hesaplanması	97
4.11. cDNA Sentezi	97
4.12. Real-Time PCR Analizleri	98
4.13. Verilerin Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analizler	99

5. BULGULAR	100
5.1. Kan Oksidan ve Antioksidan Düzeyleri	102
5.1.1. Plazma MDA Düzeyleri	102
5.1.2. Eritrosit GSH Düzeyleri	103
5.1.3. Eritrosit CAT Aktiviteleri	104
5.1.4. Eritrosit GSH-Px Aktiviteleri	105
5.1.5. Eritrosit SOD Aktiviteleri	106
5.2. Karaciğer Oksidan ve Antioksidan Düzeyleri	108
5.2.1. Karaciğer Dokusu MDA Düzeyleri	108
5.2.2. Karaciğer Dokusu GSH Düzeyleri	109
5.2.3. Karaciğer Dokusu CAT Aktiviteleri	110
5.2.4. Karaciğer Dokusu GSH-Px Aktiviteleri	111
5.2.5. Karaciğer Dokusu GST Aktiviteleri	112
5.2.6. Karaciğer Dokusu SOD Aktiviteleri	113
5.3. Real Time PCR Sonuçları	115
5.3.1. Kanda CAT Enzimi Ekspresyon Düzeyleri	115
5.3.2. Karaciğer Dokusunda CAT Ekspresyon Düzeyleri	116
5.3.3. Kan ve Karaciğer Dokusunda CAT ve β -Aktin Amplifikasyonları	117
5.4. Plazma AST, ALT, ALP, LDH Enzim Aktiviteleri ve Kolesterol	121
5.4.1. Plazma AST Aktiviteleri	121
5.4.2. Plazma ALT Aktiviteleri	122
5.4.3. Plazma ALP Aktiviteleri	123
5.4.4. Plazma LDH Aktiviteleri	124
5.4.5. Plazma Kolesterol Düzeyleri	125
6. TARTIŞMA	126
7. KAYNAKLAR	162
8. ÖZGEÇMİŞ	181

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 1: Kanserojen Etkileri Olan Bazı Nitrozaminlerin Kimyasal Yapıları ve Molekül Ağırlıkları	11
Tablo 2: Bazı Reaktif Oksijen Türleri	32
Tablo 3: Enzimatik ve Non-Enzimatik Antioksidanlar	55
Tablo 4: Rat Yeminin Bileşimi	74
Tablo 5: Deney Grupları ve Uygulama Süreleri	77
Tablo 6: MDA Düzey Ölçümü	81
Tablo 7: GSH Düzey Ölçümü	83
Tablo 8: CAT Aktivite Ölçümü	84
Tablo 9: GSH-Px Aktivite Ölçümü	86
Tablo 10: GST Aktivite Ölçümü	88
Tablo 11: SOD Aktivite Ölçümü	90
Tablo 12: Hemoglobin Düzey Ölçümü	91
Tablo 13: Protein Düzey Ölçümü	93
Tablo 14: cDNA Sentez Reaksiyonu	97
Tablo 15: RT-PCR Reaksiyonu	98
Tablo 16: RT-PCR Sıcaklık, Zaman ve Döngü Sayısı	98
Tablo 17: Kısa ve Uzun Süreli DEN Uygulanan Ratlarda Likopenin Plazma MDA, Eritrosit GSH Düzeyleri ile CAT, GSH-Px ve SOD Aktiviteleri	101
Tablo 18: Kısa ve Uzun Süreli DEN Uygulanan Ratlarda Likopenin Karaciğer MDA, GSH Düzeyleri ile CAT, GSH-Px, GST ve SOD Aktiviteleri	107
Tablo 19: Kısa ve Uzun Süreli DEN Uygulanan Ratlarda Likopenin Kan ve Karaciğerde CAT Enziminin Ekspresyon Düzeyleri	114

Tablo 20: Kısa ve Uzun Süreli DEN Uygulanan Ratlarda Likopenin Plazma AST, ALT, ALP, LDH Aktiviteleri ile Kolesterol Düzeyi

120



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: Nitrozamin Metabolizması	17
Şekil 2: DEN'in Moleküler Formülü	23
Şekil 3: DEN'in Metabolizması	24
Şekil 4: Oksijen Molekülündeki Elektronların Paralel Spin Yapısı	30
Şekil 5: Oksijenin Suyu İndirgenmesi Esnasında ROT Oluşumu	33
Şekil 6: Singlet Oksijen	38
Şekil 7: Lipid Peroksidasyonunun İlerlemesi ve Dallanması	42
Şekil 8: Lipid Peroksidasyonu ve MDA Oluşumu	43
Şekil 9: MDA ile TBA'nın Reaksiyonu	44
Şekil 10: DNA Üzerinde Oluşan Oksidatif Hasar Türleri	47
Şekil 11: Oksidatif Stres	50
Şekil 12: ROT'ne Karşı Antioksidan Savunma	57
Şekil 13: Glutatyonun Oksidasyon ve Redüksiyon Reaksiyonları	62
Şekil 14: Likopenin Kimyasal Yapısı	66
Şekil 15: Likopenin Etkileri	69
Şekil 16: RT-PCR Çalışma Akışı	71
Şekil 17: RT-PCR Reaksiyonu	72
Şekil 18: RNA'dan cDNA Sentezi ve RT-PCR Reaksiyonu	99
Şekil 19: DEN Uygulanan Ratlarda Plazma MDA Düzeyleri	102
Şekil 20: DEN Uygulanan Ratlarda Eritrosit GSH Düzeyleri	103
Şekil 21: DEN Uygulanan Ratlarda Eritrosit CAT Aktiviteleri	104
Şekil 22: DEN Uygulanan Ratlarda Eritrosit GSH-Px Aktiviteleri	105
Şekil 23: DEN Uygulanan Ratlarda Eritrosit SOD Aktiviteleri	106

Şekil 28: DEN Uygulanan Ratlarda Karaciğer GST Aktiviteleri	112
Şekil 29: DEN Uygulanan Ratlarda Karaciğer SOD Aktiviteleri	113
Şekil 30: DEN Uygulanan Ratların Kanında CAT Ekspresyon Düzeyleri	115
Şekil 31: DEN Uygulanan Ratların Karaciğerinde CAT Ekspresyon Düzeyleri	116
Şekil 32: DEN Uygulanan Ratların Kanında CAT Amplifikasyon Grafiği	118
Şekil 33: DEN Uygulanan Ratların Kanında β -Aktin Amplifikasyon Grafiği	118
Şekil 34: DEN Uygulanan Ratların Karaciğerinde CAT Amplifikasyon Grafiği	119
Şekil 35: DEN Uygulanan Ratların Karaciğerinde β -Aktin Amplifikasyon Grafiği	119
Şekil 36: DEN Uygulanan Ratlarda Plazma AST Aktiviteleri	121
Şekil 37: DEN Uygulanan Ratlarda Plazma ALT Aktiviteleri	122
Şekil 38: DEN Uygulanan Ratlarda Plazma ALP Aktiviteleri	123
Şekil 39: DEN Uygulanan Ratlarda Plazma LDH Aktiviteleri	124
Şekil 40: DEN Uygulanan Ratlarda Plazma Kolesterol Düzeyleri	125

KISALTMALAR LİSTESİ

μl	: Mikrolitre
$^1\text{O}_2$: Singlet oksijen
2-AAF	: 2-asetilaminofluoren
4-HNE	: 4-hidroksinoneal
8-OHdG	: 8-OH 2'deoksiguanozin
ADP	: Adenozin difosfat
Akr7a3	: Aldo-keto redüktaz ailesi 7, A3
ALP	: Alkalen fosfataz
ALT	: Alanin transaminaz
AST	: Aspartat transaminaz
Br	: Brom
BSA	: Sığır serum albumini
C	: Karbon
Ca	: Kalsiyum
CAT	: Katalaz
CCl_4	: Karbon tetraklorür
Cd	: Kadmiyum
CDNB	: 1-2 dikloro,4 nitrobenzenin
Cl	: Klor
Cu	: Bakır
CuCl_2	: Bakır (II) klorid
DEN	: Dietilnitrozamin
dk	: Dakika

DMBA	: 7,12-dimetilbenzantrasen
DMN	: Dimetilnitrozamin
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
DTNB	: 5.5'-dithiobis-(2-nitrobenzoik asit)
FAD	: Flavin adenin dinükleotit
FB	: Fenobarbital
Fe	: Demir
Fe⁺²	: Ferro demir
Fe⁺³	: Ferri demir
g	: Gram
G6PD	: Glikoz-6-fosfat dehidrojenaz
GGT	: Gama glutamil transferaz
GR	: Glutatyon redüktaz
GSH	: Redükte glutatyon
GSH-Px	: Glutatyon peroksidaz
GSSG	: Okside glutatyon
GST	: Glutatyon-S-transferaz
H	: Hidrojen
H₂O	: Su
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
Hb	: Hemoglobin
HDL	: Yüksek dansiteli lipoprotein
HOCl	: Hipokloröz asid
HOX	: Hipohalöz asid

HQ•	: Semikinon radikali
IARC	: Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı
i.p.	: İntra peritoneal
KCN	: Potasyum siyanid
L	: Litre
LDH	: Laktat dehidrogenaz
LDL	: Düşük dansiteli lipoprotein
LOOH	: Lipid hidroperoksit
LPO	: Lipid peroksidasyonu
M	: Molar
MDA	: Malondialdehit
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
Mn	: Mangan
Mo	: Molibden
N	: Azot
NaCl	: Sodyum klorür
NAD	: Nikotinamid adenin dinükleotit
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NBT	: Nitroblue tetrazolium
Ni	: Nikel
nm	: Nanometre
nmol	: Nanomol

NO	: Nitrik oksit
NO•	: Nitrik oksit radikali
NO₂	: Azot dioksit
Nqo1	: Dehidrogenaz kuinon 1
O₂	: Moleküler oksijen
O₂⁻	: Süperoksit radikali
OD	: Optik dansite
OH•	: Hidroksil radikali
ONOO⁻	: Peroksinitrit
R•	: Organik radikaller
RCOO•	: Organik peroksit radikali
RNA	: Ribonükleik asit
R-NH-X	: N-halojenli aminler
RNT	: Reaktif nitrojen türleri
RO•	: Alkoksil radikali
RO₂•	: Peroksil radikali
ROT	: Reaktif oksijen türleri
rpm	: Dakikadaki devir sayısı (Revolution per minute)
SOD	: Süperoksit dismutaz
TBA	: Tiyobarbitürik asit
TCA	: Triklorasetik asit
Zn	: Çinko

1. ÖZET

DIETİLNİTROZAMİN UYGULANAN RATLARDA OKSİDATİF STRES VE DNA HASARI ÜZERİNE LİKOPENİN ETKİSİ

Dietilnitrozamin (DEN) insektisit, tarımda kullanılan kimyasallar, peynir, süt, buğday, aşırı pişirilmiş unlu gıdalar, et ve balık ürünleri, sigara dumanı ve alkollü içeceklerde bulunan kanserojen bir maddedir. Çalışma DEN uygulanan ratlarda oksidatif stres ve DNA hasarı üzerine likopenin etkilerini araştırmak amacıyla gerçekleştirilmiştir.

Çalışmada Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezinden temin edilen 56 adet 3 aylık Wistar-Albino erkek ratlar kullanılmıştır. Ratlar her grupta 7 rat olacak şekilde 8 gruba ayrılmıştır. Gruplar; 1. Grup: Kontrol grubu, 2. Grup: Likopen (10 gün), 3. Grup: Kısa süreli DEN (30 gün), 4. Grup: Uzun süreli DEN (90 gün), 5. Grup: Likopen+DEN (30 gün), 6. Grup: Likopen+DEN (90 gün), 7. Grup: DEN+Likopen (30 gün), DEN, 8. Grup: DEN+Likopen (90 gün) uygulanan grup şeklinde oluşturulmuştur. Kontrol grubu ratlara herhangi bir tedavi uygulanmamıştır. Likopen gruplarına 10 mg/kg vücut ağırlığı dozunda 10 gün süre ile gün aşırı gavaj yoluyla likopen uygulanmıştır. DEN gruplarına 200 mg/kg vücut ağırlığı dozunda intra peritoneal (i.p.) olarak tek doz DEN uygulanmıştır. DEN 3, 5 ve 7. gruplarda 30 gün, 4, 6 ve 8. gruplarda 90 gün uygulanmıştır. Likopen, 5 ve 6. gruplarda DEN uygulamasından 10 gün önce, 7 ve 8. gruplarda ise DEN uygulaması ile beraber uygulanmaya başlanmıştır.

Uygulamalar sonunda kan ve karaciğer doku örneklerinde malondialdehit (MDA), redükte glutatyon (GSH) düzeyleri, katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz

(GSH-Px), glutatyon-S-trasferaz (GST), süperoksit dismutaz (SOD) aktivite tayinleri, RT-PCR kullanılarak CAT enziminin ekspresyon düzeyleri ile plazma aspartat transaminaz (AST), alanin transaminaz (ALT), alkalen fosfataz (ALP) laktat dehidrogenaz (LDH) aktiviteleri ve kolesterol düzeyleri ölçülmüştür.

Kısa ve uzun süreli DEN uygulanan gruplar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında plazma ve karaciğer MDA düzeyinde önemli artış, kan ve karaciğer GSH düzeyinde, CAT, GSH-Px, SOD ve GST aktivitelerinde ise önemli bir azalış gözlenmiştir ($p<0,001$). Likopen ve likopenin DEN ile beraber uygulanmaya başlandığı gruplar kontrol grubu ile ayrı ayrı karşılaştırıldığında MDA ve GSH düzeylerinde, CAT, GSH-Px, GST ve SOD aktivitelerinde istatistiksel olarak önemli bir fark saptanmamıştır. Likopen uygulamasının DEN uygulamasından önce ve DEN uygulaması ile başlandığı tüm gruplar DEN uygulanan gruplar ile karşılaştırıldığında MDA düzeyinde istatistiksel olarak önemli azalış, GSH düzeylerinde, CAT, GSH-Px, GST ve SOD aktivitelerinde ise artış saptanmıştır ($p<0,001$). Kanda GST aktivitesi okunamayacak düzeyde olduğu için ölçülememiştir.

Kan ve karaciğer CAT gen ekspresyon düzeylerinde DEN uygulanan gruplarda artış saptanmıştır ($p<0,05$, $p<0,001$). Likopen ve likopenin DEN uygulamasından önce ve DEN uygulaması ile başlandığı tüm gruplar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında CAT enziminin gen ekspresyon düzeylerinde önemli fark gözlenmemiştir. Likopen ve DEN uygulamalarının beraber yapıldığı tüm gruplar DEN uygulanan gruplar ile karşılaştırıldığında CAT enziminin gen ekspresyon düzeylerinde azalış saptanmıştır ($p<0,05$, $p<0,001$).

Plazma AST, ALT, ALP, LDH aktiviteleri ile kolesterol düzeylerinde DEN uygulanan gruplarda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında önemli derecede artış saptanmıştır ($p<0,05$, $p<0,001$). Likopen ve likopenin DEN uygulaması ile başlandığı gruplar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında AST, LDH aktiviteleri ve kolesterol düzeylerinde önemli fark gözlenmemiştir. Likopen uygulamasının DEN uygulamasından önce ve DEN uygulaması ile başlandığı tüm gruplar DEN uygulanan gruplar ile karşılaştırıldığında plazma AST, ALT, ALP, LDH aktiviteleri ile kolesterol düzeylerinde artış saptanmıştır.

CAT aktivitesi ile gen ekspresyon düzeyi arasındaki farklılığın mRNA ve protein dönüşümündeki varyasyondan kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Güçlü antioksidan özelliği olan likopenin DEN'e bağlı oluşan oksidatif stresi ve DNA hasarını önleyebileceği ve klinik olarak kullanılabileceği kanaatine varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Dietilnitrozamin, likopen, malondialdehit, antioksidan, katalaz ekspresyonu, RT-PCR

2. ABSTRACT

THE EFFECT OF LYCOPENE ON OXIDATIVE STRESS AND DNA DAMAGE IN DIETHYLNITROSAMINE ADMINISTERED RATS

Diethylnitrosamine (DEN) is a carcinogenic material that is present in insecticide, chemicals used in agriculture, cheese, milk, wheat, overcooked bakery products, meat and fish products, cigarette smoke and alcoholic beverages. The study was conducted to examine the effects of lycopene on oxidative stress and DNA damage in DEN administered rats.

In the study, 56 Wistar-Albino male rats of 3-months-old obtained from Firat University Experimental Research Center were used. The rats were divided in 8 groups as 7 rats in each group. The groups were formed as 1st Group: Control group, 2nd Group: Lycopene (10 days), 3rd Group: Short-term DEN (30 days), 4th Group: Long-term DEN (90 days), 5th Group: Lycopene+DEN (30 days), 6th group: Lycopene+DEN (90 days), 7th Group: DEN+Lycopene (30 days), 8th Group: DEN+Lycopene (90 days). No treatment was applied to the rats in the control group. Lycopene was administered to rats every other day at 10 mg/kg/bw, gavage for 10 days to the lycopene groups. DEN was administered to rats at 200 mg/kg/bw, a single dose intraperitoneal (i.p.) to the DEN groups. DEN was administered for 30 days in 3rd, 5th, and 7th groups and 90 days in 4th, 6th, and 8th groups. Lycopene was started to be administered 10 days before the DEN administration in 5th and 6th groups and together with the DEN administration in 7th and 8th groups.

At the end of the administrations, malondialdehyde (MDA), reduced glutathione (GSH) levels, catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px), glutathione-S-transferase (GST), superoxide dismutase (SOD) activity, expression levels of CAT enzyme by using RT-PCR in the blood and liver tissue samples and plasma aspartate transaminase (AST), alanine transaminase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), lactate dehydrogenase (LDH) activities and cholesterol levels were measured.

Plasma and liver MDA levels were observed to increase while blood and liver GSH level, CAT, GSH-Px, SOD and GST activities were observed to decrease in short- and long-term DEN administered groups compared with the control group ($p < 0.001$). MDA and GSH levels, CAT, GSH-Px, GST and SOD activities were not determined statistically significant difference in lycopene and lycopene groups were started together with the DEN administration individually compared with the control group. MDA levels were observed to decrease while GSH levels, CAT, GSH-Px, GST and SOD activities were observed to increase when all the groups in which lycopene administration was started before DEN and together with DEN administration compared with the DEN administered groups ($p < 0.001$). GST activity could not be measured in the blood to levels that can not be read.

Blood and liver gene expression levels of CAT were found increase in the DEN administered groups ($p < 0.05$, $p < 0.001$). Gene expression levels of CAT enzyme were not determined statistically significant difference in all groups which lycopene group and lycopene were started before DEN administration and together with DEN administration compared with the control group. Gene

expression levels of CAT enzyme were observed to decrease in all groups which DEN was administered together and lycopene compared with the DEN administered groups ($p < 0.05$, $p < 0.001$).

In plasma AST, ALT, ALP, LDH activities and cholesterol levels were observed in significant increased in DEN administered groups compared with the control group ($p < 0.05$, $p < 0.001$). In plasma AST, LDH activities and cholesterol levels were not determined significant difference in lycopene and lycopene groups were started together with DEN administered compared with the control group. In plasma AST, ALT, ALP, LDH activities and cholesterol levels were observed to increase in all groups which lycopene administration was started before DEN administration and together with the DEN administration were compared with the DEN administered groups.

It is thought that the difference between the CAT activity and gene expression level can be caused by the variation in mRNA and protein conversion. It has been reached conclusion that lycopene, having a strong antioxidant quality, may be used clinically and may prevent oxidative stress and DNA damage occurring due to DEN.

Key words: Diethylnitrosamine, lycopene, malondialdehyde, antioxidant, catalase expression, RT-PCR

3. GİRİŞ

Kanser, hücrelerin kontrolsüz (otonom), normal dışı büyümesi olarak tarif edilebilir. Kansere neden olan maddelere ise karsinojen adı verilir ve karsinojen maddeler; radyasyon gibi fiziksel, polisiklik hidrokarbon gibi kimyasal veya virüs gibi biyolojik ajan olabilir (1).

Günümüzün en önemli ölüm nedenlerinden olması sebebiyle kanser oluşumunun önlenmesi, üzerinde en çok çalışılan konulardan biridir. Kanser üzerine yapılan araştırmalar yaklaşık 14. yüzyıldan bu yana devam etmektedir. Söz konusu dönem içinde kanser ilaçlarının araştırılma ve geliştirilme çalışmalarında her zaman deneysel çalışmalara gereksinim duyulmuş ve çeşitli modeller kullanılmıştır (2, 3).

Hepatosellüler karsinoma, dünyada en yaygın kanserlerden biri olup, bunun oluşumunda dietilnitrozamin (DEN), 2-asetilaminofluoren (2-AAF), fenobarbital (FB), alkol gibi kimyasallar, aflatoksin B1 ya da hepatit virüsleri (B ve C) gibi ajanlar hepatosellüler karsinoma oluşumunda etken olabilmektedir (3).

Karsinogenez (neoplastik transformasyon) karsinojenlerin çoğunlukla sinyal iletim yollarıyla etkileşimi sonucu belirli bir süreçte gelişen ve birbirini izleyen çok basamaklı hücresel değişikliklerin yer aldığı kontrolsüz hücre çoğalmasıdır (3, 4).

Karsinogenez inisiyasyon (başlangıç), promosyon (gelişim) ve progresyon (ilerleme) olmak üzere herbiri kendine özgü üç safhaya ayrılmaktadır (5).

İnisiyasyon, normal dokuda yer alan hücrenin genotoksik bir karsinojenle karşılaşması sonucu DNA hasarı oluşması evresidir. Bu evrede mutant preneoplastik bir hücre oluşur. İnisiye olmuş hücre progenitör olarak da

adlandırılır. İnisiyasyon geri dönüşümsüz, doza bağımlı bir olaydır ve bu evrede kalıcı DNA hasarı (mutasyon) meydana gelmektedir (4, 5).

Promosyon evresi, inisiye hücrenin selektif klonal çoğalmasdır. Başka bir ifadeyle, sadece preneoplastik hasarlı hücre popülasyonunun aktif çoğalmasdır. Bu evreyi başlatan ajanlara promotör denir. Promotörlerin ortak özelliği hücrede proliferasyonu indüklemeleridir. Promotörler DNA dizisinde değişiklik yapmadan posttranslasyonel modifikasyonlarla proteinlerin aktivitelerini değiştirirler. Böylece ya proliferasyonda görevli proteinler daha aktif hale geçer, ya da apoptoziste görevli olanların aktiviteleri azalır (3-5).

Üçüncü evre olan progresyon ise hücresel ve moleküler değişikliklerin oluştuğu ve preneoplastik dönemden neoplastik döneme geçiş evresidir. Bu evre geri dönüşümsüzdür ve bu evrede genetik instabilite, moleküler değişiklikler ve kromozom bütünlüğünde bozulma meydana gelmektedir (4, 5).

Kanser genetik bir hastalıktır, yani genetik hasar sonucu oluşur. Ayrıca bazı kanser türleri kalıtsal bir özellik de gösterir. Bununla birlikte, her genetik hasar kanserle sonuçlanmaz. Kimyasal bir karsinogen veya metabolizması sırasında daha etkin hale gelmiş olan karsinogen eğer karaciğerde detoksifiye edilemezse DNA'yı değiştirebilir. DNA'da tek veya çift zincir kırıklarına, pürin ve pirimidin bazlarında modifikasyonlara, deoksiriboz fosfat iskeletinde hasara, DNA-protein ve DNA-DNA çapraz bağlarına neden olabilir. Bu durumda DNA'yı ve hücreyi bekleyen başlıca üç seçenek vardır. Öncelikle DNA'daki hasar hücre bölünmeye başlamadan önce çeşitli tamir mekanizmaları ile onarılmaya çalışılır. Eğer hasar onarılamayacak kadar büyükse hücre apoptozise giderek kendini yok

edebilir. DNA'sı onarılmadan hücre bölünmeye giderse hasar kalıcı hale gelir ve mutasyonlar oluşur (4, 5).

Kanser, vücudun herhangi bir organında veya dokusunda başlayabilmekte ve yaşamının herhangi bir döneminde herkesi etkileyebilmektedir. Canlı vücudundaki tüm organlar, ihtiyaç halinde yenilerini oluşturmak üzere bölünen hücrelerden oluşmaktadırlar. Hücrelerin aşırı çoğalmasıyla dokularda oluşan ve büyüme eğilimi gösteren doku kitlesi tümör olarak isimlendirilmektedir. Tümörler, hayatı tehdit etmeyen benign karakterli ya da kanseröz özellikte malignant karakterli olabilirler. Malignant tümörler, komşu doku ya da organları istila ederek onlara sonunda ölümlü sonuçlanacak zararlar verebilmektedirler (4, 6).

Kanser hücrelerinde karakteristik olarak birkaç önemli belirti bulunmaktadır. Bunlar; gelişim sinyalleri verebilme, sınırsız bölünme, büyümeyi önleyebilecek sinyallere karşı duyarsızlık, apoptozdan kaçma yetisi, invazyon ve metastaz yapabilme, çoğalma potansiyeline sahip olma, angiogenezi sürekli destekleyebilme gibi özelliklerdir (4-6).

İnsanlar çoğu zaman diyetlerle, çevresel nedenlerle, terapötik ya da mesleki sebeplerden dolayı karsinogenik etki gösteren doğal kaynaklı birçok kimyasal maddeyle karşı karşıya kalmaktadır. Bazı kimyasallar canlılarda günlük hayatta maruz kalma süre ve şekillerine bağlı olarak hepatoselüler karsinomu da içeren kötü huylu tümörlere neden olabilirler (4-7).

Nitrozaminler ve nitrozo bileşikleri yaygın olarak tümör oluşumuna neden olmakta ve insan sağlığını olumsuz etkilemektedir. Bu etkilerini nükleik asitler ve proteinler ile etkileşime geçerek gösterdikleri bilinmektedir. Nitrozaminlerin

metabolik aktivasyonu sonucu spontan olarak meydana gelen nitrozöre hedef doku veya hücrenin DNA'sı ile etkileşime geçerek bazların değişmesine sebep olmakta ve karsinojenezisin başlamasına neden olmaktadır (8, 9).

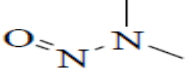
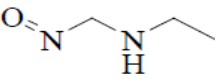
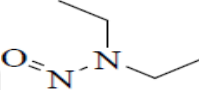
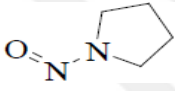
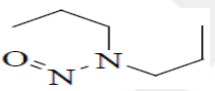
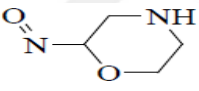
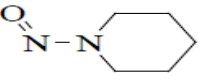
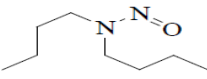
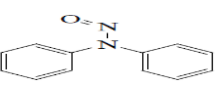
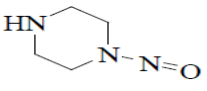
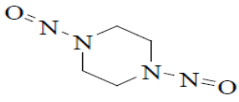
Sigara dumanı, su ve havanın yanı sıra peynir, balık ve et ürünlerinde bulunan, ayrıca tekstil ürünlerinin hazırlanmasında, yağ ve kauçuk endüstrisinde kullanılan DEN'in ratlarda karsinojenik ve mutajenik etkilerinin yüksek olduğu saptanmıştır. DEN'in metabolitleri, DNA'ya bir ya da iki oksidasyon sağlayan elektron ile kovalent bağlanarak tümör promotörlerinin bağlanmasına aracılık eder (8, 9).

3.1. Nitrozaminler

Nitrozo bileşikleri; nitrozamidler ve nitrozaminler olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Nitrozamidler; amid, guanidin, karbamat, karboksamid gibi maddelerin türevleridirler. Nitrozaminler ise nitrit ve aminlerin sindirim kanalında birleşmesiyle oluşan, hepatotoksik ve karsinojenik, alkilleyici bir grup kimyasal bileşiktir (10, 11).

Bu bileşikler insanlar tarafından tüketilen gıda maddelerinde yaygın olarak bulunabilen ve diğer çevre şartlarında oluşabilen genetik etkili kimyasal kanserojenlerin büyük bir grubunu oluştururlar (10, 11). Dünya Sağlık Organizasyonu "Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı" (IARC)'nın ve Amerikan Çevre Koruma Derneğinin hayvanlarda ve insanlardaki kanserojen etkilerini göz önüne alarak listelediği bazı nitrozaminler ve kimyasal yapıları Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1: Kanserojen Etkileri Olan Bazı Nitrozaminlerin Kimyasal Yapıları ve Molekül Ağırlıkları (10)

Kimyasal Yapısı	İsmi	Molekül Ağırlıkları (g/mol)
	Nitrozodimetilamin	74,05
	Nitrozometiletilamin	88,06
	Nitrozodietilamin	102,14
	Nitrozopirolidin	100,06
	Nitrozodipropilamin	130,11
	Nitrozomorfolin	116,06
	Nitrozopiperidin	114,08
	Nitrozodibutilamin	158,14
	Nitrozodifenilamin	198,08
	Mono-nitrozopiperazin	115,07
	Di-nitrozopiperazin	144,06

3.1.1. Biyolojik Sıvılardaki Nitrozaminlerin Oluşumu

Nitrozaminler canlı vücudunda endojen olarak oluşabildikleri gibi çeşitli gıdalardan alınan nitritin özellikle sekonder aminler ile reaksiyonu sonucunda da oluşabilirler (10-12).

Nitrozaminlerin canlı organizmada oluşumları deney hayvanları üzerinde yapılan birçok çalışma ile incelenmiştir. Bu çalışmalar sonucu, N-metilanilin, morfolin, ve N-metilbenzilamin gibi sekonder aminler ile nitritin reaksiyonu sonucunda nitrozaminlerin oluştuğu belirlenmiştir (11, 12). Canlı vücudundaki amino asitlerin nitrozolanmasıyla da nitrozaminler oluşmaktadır. Oluşan bu tür nitrozaminler zayıf kanserojen özellik gösterirler. Hücre içerisinde indirgenmeyle oluşan aromatik nitrozamin miktarı, diğer yollarla oluşan nitrozamin miktarından daha fazladır (13).

Canlı vücudunda nitrozaminin ilk oluşum yeri sindirim sisteminin başlangıcı olan ağızdır. Tükürük salgısı bol miktarda nitrat içerir ve bu nitrat, nitrat redüktaz enzimi ile nitrite indirgenir. Böylece oluşan nitrit, nitrozamin oluşumuna neden olur. Tükürük salgısının içerdiği nitrit ve nitrat miktarı alınan gıdalara bağlı olarak değişmektedir. Ayrıca, tükürükte oluşan tiyosiyanat iyonunun, nitrozolama hızını arttırarak nitrozamin oluşumunu katalizlediği belirtilmiştir. Bu iyon aynı zamanda mide suyunda da bulunabilir. Nitrozaminlerin oluşumunda bromür ve klorürün de benzer etkiye sahip olduğu belirtilmektedir. Nitrozaminler genellikle vücuttan idrar yoluyla atılmaktadır. Yapılan çalışmalarda idrar ile atılan günlük toplam nitrozamin miktarının 2,0-7,0 nmol ve günlük atılan dimetilnitrozamin (DMN) miktarının 1,2-2,9 nmol arasında olduğu tespit edilmiştir (13-15). Tricker ve ark. (16) tarafından yapılan çalışmada idrarla atılan günlük

mononitrozopiperazin miktarının 27 µg ve dinitrozopiperazin miktarının ise 0,73 µg olduğu tespit edilmiştir.

Nitrozaminlerin canlı vücudunda en sık bulunduğu organların başında mide gelmektedir. Bu bileşikler mide ortamına beslenme, sigara gibi çeşitli yollarla alındıkları gibi asidik koşullarda nitrit ve aminlerin reaksiyonuyla da oluşabilirler. Mide ve bağırsakta bulunan bazı bakteriler vücuda alınan nitratin nitrite dönüşmesine yardımcı olarak nitrozamin oluşumunu artırırlar (17, 18). Nitrit, midenin asidik ortamında nitroz aside dönüşür ve nitroz asit ortamdaki aminler ile reaksiyona girerek nitrozaminleri oluşturur. Bununla birlikte askorbik asit, polifenoller gibi oksitleyici maddeler nitrit oluşumunu inhibe ettiğinden, dolaylı olarak nitrozamin oluşumunun azalmasına sebep olurlar. Midede nitrozaminlerin oluşumu mide ortamının pH'sına, bakteriyel oluşuma, nitrit, nitrat ve amin miktarına bağlı olarak değişmektedir (19, 20). Yapılan çalışmalarda nitrozaminlerin oluşumu için en uygun pH aralığının 2,0-3,4 aralığında olduğu belirtilmiştir. Ayrıca nitrozamin oluşumunun, nitrozamin oluşturan bazı özel bakteriler tarafından doğal pH değerlerinde de gerçekleştiği tespit edilmiştir (11-14).

3.1.2. Gıdalarda Nitrozaminlerin Oluşumu

Nitrozaminler insanlar tarafından tüketilen gıda ürünlerinde yaygın olarak bulunabilen maddelerdir. Gıda maddelerinde, uygulanan çeşitli ısı işlemleri (pişirme, kızartma ve kavurma gibi), dumanlama ile saklama (salamura ve mayalanma gibi) sırasında insan sağlığını ciddi biçimde etkileyen ve

nitrozaminler gibi bazıları kanserojen olan çok sayıda zehirli ve zararlı madde oluşabilmektedir (21, 22).

Gıda maddelerindeki nitrozaminlerin oluşum şartları üzerinde geniş araştırmalar yapılan konulardan birisidir. Gıdalarda nitrozaminler, amin ve nitritin reaksiyonu ile oluşmaktadır. Nitrozaminlerin oluşumu kimyasal ve/veya mikrobiyal bir reaksiyon ile gerçekleşebilir. Nitrozamin oluşum miktarı ve reaksiyon mekanizması, amin yapısına, nitrit miktarına ve reaksiyon koşullarına bağlıdır. Bununla birlikte, pH, aminin alkalitesi ve sıcaklık nitrozamin oluşumunda rol alan en önemli faktörlerdir (23). Gıda maddelerindeki mikroorganizmalar nitrozamin oluşumunda önemli rol oynamaktadırlar. Nitratın nitrite dönüştürülmesi, proteinlerin bozularak amin ve amino aside dönüştürülmesi, uygun pH ortamının sağlanması ve nitrozolama için enzim üretimi mikroorganizmalar tarafından gerçekleştirilmektedir (20, 24).

Gıdalarda nitrozaminler, ikincil aminlerin yanı sıra üçüncül aminlerin ve kuaterner amonyum bileşiklerinin nitrozolanmasıyla da oluşurlar. Ancak üçüncül aminler ve kuaterner amonyum bileşiklerinden nitrozaminlerin oluşum hızları ikincil aminlerden nitrozamin oluşum hızlarına göre 2-5 kat daha düşüktür (22, 23).

Gıda maddelerindeki nitrozaminler doğal olarak oluşabildikleri gibi, gıda maddelerinin ambalaj malzemeleri ile etkileşmesi sonucunda da meydana gelebilirler. Gıda maddelerinin hazırlanması ve saklanması sırasında kullanılan materyaller, özellikle gıdayı hazırlamak için kullanılan plastik malzemeler ve saklamak amacıyla kullanılan ambalaj malzemelerinin nitrozamin oluşumuna neden olduğu gözlenmiştir (24, 25).

Gıda maddelerinde nitrozaminlerin oluşumu aşağıda belirtilen şekillerde farklı gruplara ayrılarak incelenebilmektedir (26-28).

- a) Özellikle tuzlanmış et ürünleri ve peynirler gibi gıda maddelerine ilave edilen nitrit ve nitrat tuzları nitrozamin oluşumunu arttırır.
- b) Balık ve et ürünleri için kullanılan tütsüleme işlemi sırasında havada azot (N) oksitlerinin oluşumu, bu gıdalardaki nitrozamin oluşumuna neden olur.
- c) Kurutma sırasında yanıcı gazların kullanıldığı, bira ve viski üretiminde maltın kurutulması, baharatların hazırlanması için bitkilerin kurutulması, süt tozu üretiminde yağsız süt ürünlerinin kurutulması gibi işlemleri sırasında azot oksitleri oluştuğu için nitrozaminlerin oluşumu da artar.
- d) Konserve ve turşular gibi tuzlanarak uzun süre bekletilen bitki kökenli gıda maddelerinde bulunan nitrat mikrobiyolojik olarak nitrite indirgenir ve nitrit miktarının artmasıyla nitrozamin oluşumu artar.
- e) Nemli şartlarda bekletilen gıda maddelerinde *Fusarium moniliforme* türü mantar oluşumuna bağlı olarak nitrozamin oluşumu artar.

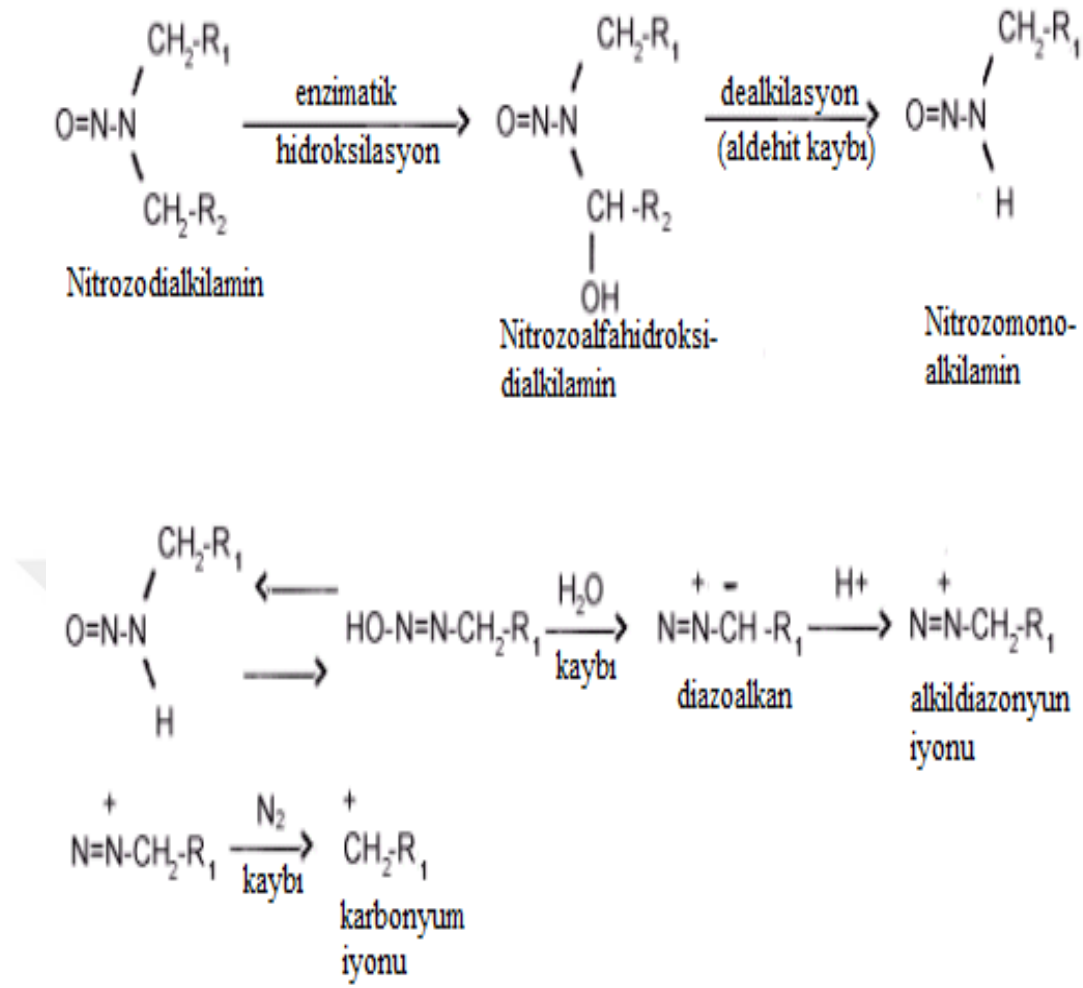
3.1.3. Çevresel Nitrozaminlerin Oluşumu

Nitrozaminler, içme suları, yüzey ve yeraltı suları, atık sular, toprak, partiküler madde, iç ve dış hava gibi çeşitli çevre ortamlarında bulunmaktadır. Bu bileşikler, endüstriyel kaynaklardan çevreye karışabildikleri gibi özellikle atık sular ve içme sularında, ortamdaki amin ve amid gibi N içerikli organik bileşiklerin nitrit ve nitratın kimyasal türevleri olan nitrozolama ajanlarıyla klasik nitrozlama veya oksitleme reaksiyonları sonucunda oluşabilmektedirler. Zirai kimyasalların bir çoğu bozulduklarında sekonder aminleri oluşturabilen yapılar

içermektedir. Bu tür pestisitlerin aşırı ve yaygın kullanımı sonucunda çevredeki sekonder aminlerin birikimi artmakta ve bu da nitrozaminlerin oluşumunu artırmaktadır. Toprağa karışan bu bileşikler yağmurla birlikte sulara da karışmaktadır. Topraktaki sekonder amin, nitrit/nitrat konsantrasyonu ve pH nitrozamin oluşumunda büyük rol oynamaktadır (19, 29).

3.1.4. Nitrozaminlerin Etki Mekanizmaları

Fizyolojik şartlar altında kararlı olan nitrozaminlerde nitrozo grubuna bağlı karbon (C) atomunda sitokrom P-450'ye bağlı olarak hidroksillenmesi sonucunda α -hidroksinitrozamin oluşur. Bu bileşikteki C-N bağının kopması sonucu bir aldehitin kendiliğinden ayrılmasıyla alkildiazo hidroksit oluşur. Alkildiazo hidroksitin parçalanması sonucunda oluşan elektrofilik alkildiazonyum iyonu, çeşitli hücrelerin nükleofilik bölgelerinde reaksiyona girerek tümör oluşmasında etkili olan ara ürünleri oluşturur. Kanser başlangıcını teşkil eden tümörleşme, genellikle DNA'ya akil gruplarının bağlanması sonucu önemli hücresel faaliyetlerin değişmesiyle oluşur (29, 30) (Şekil 1).



Şekil 1: Nitrozamin Metabolizması (31)

Çeşitli yollarla vücuda alınan nitrozaminlerin bir kısmı vücutta inaktivite edilir ve idrar yoluyla dışarı atılır. Herhangi bir gıda maddesiyle vücuda alınan belirli düzeydeki nitrozaminlerin insan vücudunda tek başına kanser oluşturma riski düşüktür. Ancak solunan hava ve sigara gibi değişik kaynaklardan sürekli alınan farklı türdeki nitrozaminler, kanser oluşum riskini artırırılar. Aynı zamanda insan vücudunda kendiliğinden oluşan nitrozamin bileşikleri de kanser oluşum riskinin artmasında rol oynayabilir (29, 32).

Başta DEN olmak üzere nitrozaminler toksik etkilerini öncelikle kanda, ama özellikle karaciğerde oluştururlar. Çok sayıda ilaç da sodyum nitritle birlikte alındıklarında, nitrozaminlerin oluşumuna ve karaciğerde kanserli hücrelerin artmasına yol açmaktadır. Aynı zamanda kan akımının fazla olduğu böbrekler gibi diğer organlar da bu durumdan karaciğere göre daha düşük düzeyde de olsa etkilenirler (9).

3.1.5. Nitrozaminlerin Çevre ve İnsan Sağlığına Etkileri

Nitrozaminler, kuvvetli kanserojen etkiye sahip maddeler olmaları yanında; mutajenik ve teratojenik etki de gösterirler. Değişik çevre örneklerine büyük ölçüde dağılmış olarak bulunan nitrozaminlerin, insanlar ve laboratuvar hayvanları üzerindeki etkileri uzun yıllardır bilinmektedir (22, 33). Günümüze kadar 300 civarında nitrozo bileşiği test edilmiş ve bunların %90'ının deney hayvanlarında kanser oluşumuna yol açabileceğine yönelik önemli bulgular elde edilmiştir (34). Fare, balık, tavşan gibi birçok hayvan türü üzerinde yapılan çalışmalarda nitrozaminlerin karaciğer, akciğer, böbrek, idrar kesesi, yemek borusu, mide, bağırsak beyin ve sinir sistemi gibi önemli organlarda tümör oluşturduğu tespit edilmiştir. Bu oluşumlar nitrozaminlerin yapısına ve alınan miktarına bağlı olarak bir veya birkaç organda görülebilmektedir (35-38). 1981'de Ulusal Bilimler Akademisi günlük çeşitli gıdalardan alınan 1 µg nitrozaminin kanser riskini arttırabileceğini belirtmiştir. Sigara içen bir kişinin günlük olarak 17 µg nitrozamine maruz kaldığı bilinmektedir. Bununla birlikte plastik fabrikaları gibi endüstrilerde çalışan kişilerin çok yüksek seviyelerde nitrozaminlere maruz kaldıkları tespit edilmiştir. Nitrozaminler tütün ürünlerindeki en önemli

kanserojen sınıftaki bileşiklerden olup tütün ürünleri ve kanser oluşumu arasındaki ilişkinin son derece yüksek olduğu bilinmektedir (30).

Nitrozaminlerin insanlar üzerinde hangi miktarda kanserojen etki gösterdiği tam olarak bilinmemektedir. Deney hayvanlarından elde edilen sonuçlar, bu hayvanların morfolojik ve biyokimyasal özellikler yönünden insanlara benzemelerinden dolayı insanlara uyarlanmaktadır. Deneysel çalışmalar ve epidemiyolojik bulgular insanın kanserojenik nitrozaminlerden çok çabuk etkilendiğini ve birçok gıda ürünüde oluşabilen bu bileşiklerin insanda kanser oluşmasında etkili bir risk faktörü olduğunu göstermiştir (35, 39). IARC nitrozaminlerin insanlar üzerindeki etkisini iki grupta toplamıştır. Grup 2A nitrozaminler (DMN ve DEN gibi); insanlar için kanserojen etkisi muhtemel, Grup 2B nitrozaminler ise (nitrozomorfolin, nitrozopiperidin, nitrozodietanolamin gibi); insanlar için kanserojen etkisi yüksek bileşiklerdir (40).

3.1.6. Nitrozaminlerin DNA Üzerine Etkileri

DNA'nın dialkilnitrozaminlerle alkilenmesi bir seri değişik reaksiyonlar sonucunda gerçekleşir. Fare akciğeri üzerinde yapılan bir çalışmada DNA'ya metil grubunun bağlanmasıyla oluşan ürünlerin %90'ının DMN'nin metabolik aktivasyonu sonucu oluştuğu tespit edilmiştir. Nitrozaminlerin canlı vücudunda meydana getirdikleri değişimlerden bazıları biyolojik bakımdan önemlidir. Bu reaksiyonlar DNA'nın anormal eşleşmesine ve tümör oluşmasına neden olmaktadır (30, 41).

Nitrozaminlerin canlı organlarında meydana getirdiği kanserojenik etkilerin farklılığı, vücutta meydana gelen iki olaya bağlı olarak açıklanabilir.

Bunlardan birincisi; canlı vücudunda farklı dokulardaki enzim alt sınıflarının farklı aktivasyon kapasitesine sahip olması, ikincisi ise; aynı organdaki farklı hücre tiplerinin veya farklı organlardaki aynı hücre tiplerinin alkil guanini farklı yenileme tiplerine sahip olmasıdır. Nitrozaminler genellikle uygulama yerinden uzakta sistematik tümörler oluştururlar (30, 41).

Nitrozaminlerin metabolik aktivasyonu sonucu spontan olarak oluşan nitrozoüre, hedef doku veya hücrenin DNA'sı ile etkileşime geçerek bazların değişimine sebep olmakta ve tümör oluşum mekanizmasını başlatmaktadır. Üzerinde çalışılan tüm deney hayvanı modellerinde nitrozaminlerin mutasyonlara sebep olduğu, tümör oluşum ihtimalini artırdığı, kanserojen ve mutajenik etkisini çoğu zaman mikrozomal sistem vasıtasıyla aktive olduktan sonra gösterdiği bildirilmiştir (42). Phillipson ve Ioannides (43) insan, fare, sıçan, hamster ile domuzda farklı nitrozaminlerin mutajen özellikleri incelemişler ve bu kimyasal bileşiklerin farklı oranlarda mutajenik etki gösterdiklerini bildirmişlerdir.

3.1.7. Nitrozo Bileşikleri ve Kanser ile İlişkisi

Epidemiyolojik araştırmaların sonuçlarına göre, insanda kanserin başlıca sebebinin (%60) beslenme ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Kanseri oluşumunda gıda maddelerindeki hangi katkı maddelerinin sorumlu olduğu araştırılmaktadır. Nitrozo bileşikleri 20. yüzyılın başından beri kimya literatüründe tanımlanmış olsa da, 1956 yılına kadar dikkat çekmemiştir. Kuru temizlemede çözücü olarak kullanılması önerilen maddelerin kanserojen potansiyellerinin rutin taraması sırasında, DMN'nin farelerde karaciğer kanserine neden olduğunun rapor edilmesiyle, nitrozo bileşikleri ve nitrozaminlerin toksik

etkilerinin araştırılması hız kazanmıştır. Bir diğer bulgu ise, canlılarda hangi organın hangi nitrozo bileşiğinden etkileneceğinin canlının türüne ve kanserojenin kimyasal yapısına göre değişkenlik göstermesidir. Bazı nitrozo bileşiklerinin ise kanserojen olmadığı tespit edilmiş ve bu sonuçlar bileşiklerin kanser oluşum mekanizmalarının ortaya konulması bakımından önemli bilgiler elde edilmesine imkân sağlamıştır. Elde edilen verilere rağmen, herhangi bir nitrozo bileşiğinin belirli tümör oluşum mekanizmasındaki rolünü tam olarak açıklamak henüz mümkün olmamaktadır. Doz, alım sıklığı ve şekli, etkilenen organın farklı olmasına neden olabilmekte (akciğer, böbrek ya da karaciğer gibi) ve tümörün oluştuğu hedef hücrenin değişmesine yol açabilmektedir (34, 35, 44).

Kolon kanseri riskinin, günlük 25 g kurlenmiş (nitritle korunan) kırmızı et tüketimiyle %49 oranında arttığı, buna karşın günlük 100 g kurlenmemiş et tüketimiyle yalnızca %12-17 düzeyinde artış gösterdiği ortaya konmuştur (45).

Araştırılan birçok nitrozo bileşiği içinde, insanların laboratuvar dışında maruz kalabileceği çok az sayıda, kararlı ve doğrudan etkili olmayan nitrozamin mevcuttur. Bu nitrozaminlerin deney hayvanlarında karaciğer, akciğer, böbrek, mesane, pankreas, yemek borusu ve dil gibi çeşitli organlarda kanser oluşumunu tetiklediği ancak cilt, beyin, kolon ve kemiklerde kanser oluşumuna sebep olmadığı rapor edilmiştir. Alkilnitrozoüreler veya alkilnitrozokarbamatlar gibi doğrudan etkili nitrozaminlerin ise sinir sistemi, mide, gastrointestinal sistem ve kemiklerde tümör oluşturduğu bildirilmiştir (46). Alkilnitrozoürelerin özellikle gebeliğin son döneminde plasenta yoluyla fare yavrularına geçerek beyin ve sinir sisteminde tümör oluşumunun potansiyel tetikleyicisi olduğu uzun zamandır bilinmektedir. Bundan dolayıdır ki, insanlarda özellikle çocuklarda görülen beyin

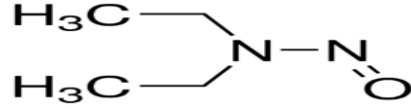
tümörlerinin sebebi olarak besinler ile alınan alkilnitrozöre ile ilgili araştırmalar hız kazanmıştır. Sinir sistemi için kanserojen olduğu bilinen pek az madde vardır. Bunların hiçbirini alkilnitrozöreler kadar etkili değildir. Amerika Birleşik Devletlerinde yapılan bir çalışmada haftada beş veya daha fazla sosisli sandviç tüketen çocuklarda pediatrik sinir sistemi tümörlerinin daha yüksek oranda olduğu rapor edilmiştir (46, 47).

Hayvanlarda nitrozo bileşiklerinin neden olduğu tümörlerin birçoğunun insanlarda görölen tümörlere benzerlik göstermesi, insanlarda görölen tümörlerin kaynağında da nitrozo bileşiklerine maruz kalmanın etkili olabileceği belirtilmiştir. İnsanlarda görölen pek çok kanser türünün kesin kaynağı bilinmemektedir. Ancak gıda maddelerinin tüketilmesiyle nitrozo bileşiklerine yaygın maruziyet ile kanser arasındaki ilişki dikkat edilmesi gereken önemli bir faktördür (45, 46).

3.2. Dietilnitrozamin (DEN)

Karsinojen bir madde olan DEN tarımda kullanılan kimyasallardan, insektisitlerden ve nitrattan şekillenebildiği gibi, sigara dumanında var olduğu ve bunun yanında besinlerde bulunan nitratın midede sekonder ve tersiyer aminlerle birleşmesi neticesinde de oluşabildiği bildirilmektedir. Ayrıca DEN, kauçuk endüstrisi gibi iş sahalarında, alkollü içkiler ve işlenmiş et ürünlerinde bulunmakta, bazı terapötik ilaçların karaciğerde metabolize edilmesi sırasında da ortaya çıkabilmektedir (48).

DEN, moleküler formülü (C₂H₅)₂NNO, molekül ağırlığı 102,14 g/mol, kaynama noktası 177°C, yoğunluğu 0,95 g/ml olan, suda, lipitlerde ve çeşitli organik çözücülerde çözünebilen bir hepatokarsinojendir (49) (Şekil 2).

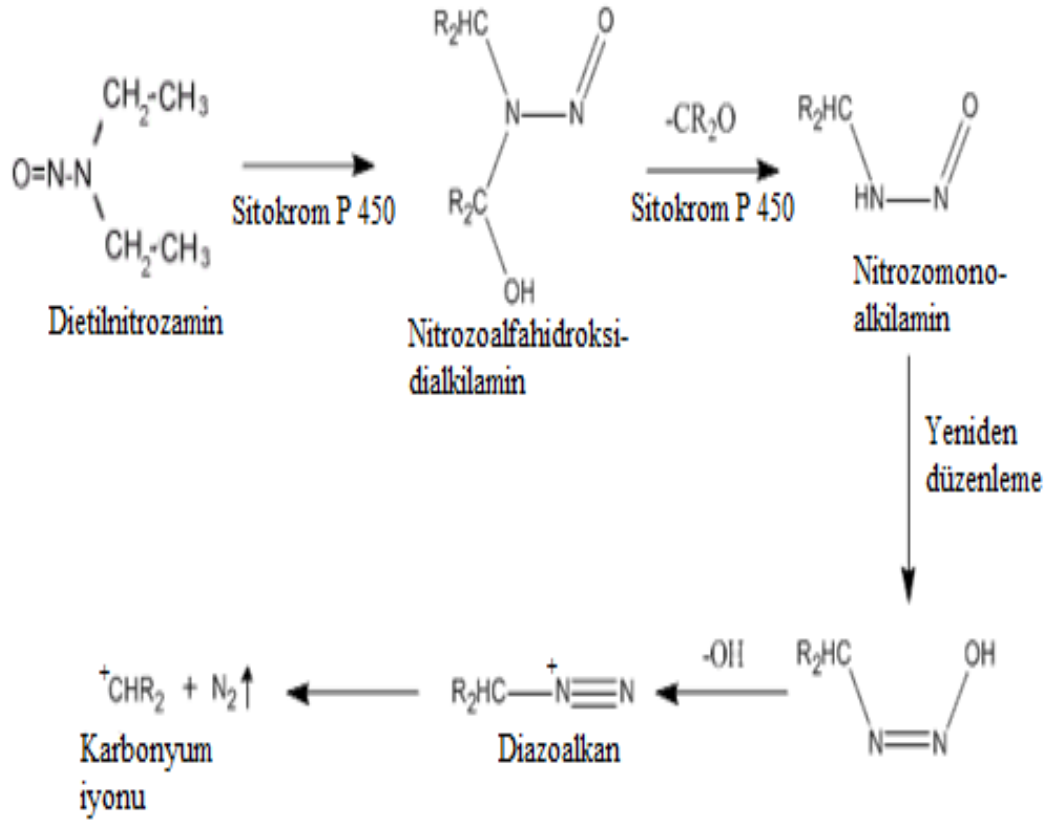


Şekil 2: DEN'in Moleküler Formülü (49)

Çevresel bir karsinojen ve hepatotoksin olan DEN deneysel hayvan modellerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. DEN insanların maruz kaldığı sigara dumanı, et ve viski gibi birçok çeşit üründe bulunmaktadır ve karaciğerde dejeneratif, proliferatif ve neoplastik lezyonlara sebep olmaktadır (48, 50).

3.2.1. DEN'in Biyolojik Olarak Aktivasyonu

DEN karaciğerde sitokrom P-450 izoenzimleri tarafından hidroksile edilmekte ve alkilasyon mekanizması ile biyoaktif hale gelmektedir. Aktivasyon sonucu başlıca etil radikali (CH₃CH₂·) olmak üzere radikal karakterde metabolitler meydana gelir (Şekil 3). DEN tarafından üretilen bu radikaller karsinogenez sürecinde başlıca stimülatördür. Kararsız yapıları nedeniyle başta lipitler, proteinler ve nükleik asitler olmak üzere tüm hücre bileşenleri ile etkileşebilme ve onlara zarar verme özelliğindedir. DNA ile etkileştiklerinde O⁶-etil deoksi guanozin, O⁴ ve O⁶ -etil deoksi timidin gibi promutajenik ürünler oluştururlar. Bu ürünler DNA'da hasara, depürinasyona, zincir kırıklarına ve sıklıkla kodlayıcı gen dizilerinde bozulmaya yol açabilir (51, 52).



Şekil 3: DEN'in Metabolizması (52)

DEN'ler elektrofilik maddeler olmaları nedeniyle nükleik asit ve proteinlerdeki nükleofilik atomlara bağlanırlar. Karsinojenik elektrofiller tarafından proteinlerde değişikliğe uğratılan nükleofilik atomlar, methionin ve sisteindeki kükürt, histidindeki halka N'u ve tirozindeki 3. C atomu olarak belirlenmiştir (51-53).

3.2.2. DEN ve Serbest Radikaller ile İlişkisi

Tümör oluşumundan sorumlu olan lipid peroksidasyonu (LPO) ile DEN aktivasyonu ile çevresel serbest radikaller arasında ilişki gösterilmektedir. Özellikle karaciğer DNA'sında DEN'in doz bağımlı davranışı ile yükselen 8-hidroksi-2'- deoksiguanozin (8-OHdG) düzeylerinin DNA'nın oksidatif hasarını belirttiği rapor edilmiştir. 8-OHdG miktarı DEN verilmesinden 6 saat sonra yükselmektedir. Bununla beraber antioksidanların DEN'in meydana getirdiği hepatik karsinomaya karşı koruyucu etkileri için kullanıldığı gösterilmektedir. Bu olay DEN ile başlayan hepatik karsinogenezde serbest radikallerin önemli bir yere sahip olduğunu göstermektedir. DEN'den türeyen serbest radikaller in vitro deneyler sırasında mikrozomal metabolizma yoluyla oluşmaktadır, bununla beraber in vivo serbest radikallerin yükselmesinin doku hasarıyla ilgili olduğu daha kesin değildir. Bu sonuçlar DEN'in metabolizmasının sitokrom P-450 ile olduğu ve oluşan serbest radikallerin göze çarpan biçimde artmasının DEN'in sitokrom P-450 yoluyla metabolizmasına ve serbest radikallerine bağlanabileceğini göstermektedir (54).

DEN, reaktif oksijen türleri (ROT)'nin artmasına sebep olarak oksidatif stres ve hücre hasarına neden olur. ROT'nin üretimi DEN'in karsinojenik etkilerinden sorumlu olabilir (54, 55). ROT'nin hücre içi yüksek seviyeleri mitokondrial hasar, DNA modifikasyonu ve LPO'na yol açıyor olması nedeniyle, insanlarda kanserde içeren birçok hastalık durumuyla sonuçlanır. DEN'e maruziyette nonparenkimal hücrelerde bir inflamatuvar yanıt ortaya çıkar. Birçok sitokin ve büyüme faktörü salgılanır. Bunlar DEN indüklü mutasyonları taşıyan sessiz hepatosit hücrelerini proliferasyona teşvik eder. Bu proses yavru hücrelere

genetik değişimlerin transmisyonunu sağlar. Bunu karaciğer neoplastik progresyonu, artmış proliferasyonu, displazi, hepatosellüler adenom ve hepatosellüler karsinomaya dönüşüm takip eder (54, 56).

DEN'in metabolitleri, DNA'ya bir veya iki oksidasyon sağlayan elektron ile kovalent bağlanarak tümör promotörlerinin bağlanmasına yardım eder. Tümör promotörü de bir süperoksit radikali (O_2^-) indükleyicisi gibi davranarak reaktif oksijen molekülleri ve hidrojen peroksit (H_2O_2) meydana gelmesine neden olur. Bu olay ile O_2^- ve H_2O_2 miktarının artışı gerçekleşir. Bu artış, koruyucu antioksidan mekanizmanın azalması ve fazla miktarda hidroksil radikali ($OH\cdot$) meydana gelmesine neden olur. Bunun sonucunda da DNA'nın yapısında kopmalar ve deoksiriboz parçalanmaları meydana gelir. Reaktif $OH\cdot$ ayrıca, lipid membran yağ asitlerinin yapısından hidrojen (H) atomlarını ayırır. Hidroperoksit radikalleri, H atomları ile doymamış çok karbonlu yağ asitlerinin karbonil gruplarıyla birleşerek, lipid H_2O_2 düzenlenmesindeki zincir reaksiyonundan H'i ayırır. Dolayısıyla O_2^- ve hidroperoksit radikalleri LPO'nun artmasına sebep olur ve hücre membranında hasar artışı oluşur (54, 55, 57).

Sonuç olarak DEN ile tümör gelişimi ve erken aşamalarda serbest radikal meydana gelişi arasındaki klinik belirginlik dikkat çekicidir. DEN gibi nitrozaminler başlıca sitokrom P-450 monooksijenazlar vasıtasıyla metabolize olmaktadır ve lipid radikaller in vivo mikrozomal metabolizma yoluyla oluşmaktadır. Bu sonuçlar karaciğerde lipid bağlı serbest radikallerin DEN verilmesinden 1-24 saat içinde oluştuğunu belirtmektedir (54, 55).

3.2.3. DEN'in Karaciğerde Tümör Oluşumundaki Rolü

Kanser araştırmalarında tümör indükleyici olarak genellikle DEN kullanılmaktadır (58-60). DEN'in yapısında amid, üreaz ve C içeren bileşikler bulunur. Amin içeren gıdaların alınmasında, mide suyunda nitrit ile birleşen amin son ürün olarak DEN'in oluşumunu sağlar. DEN sanayide, fiber endüstrisinde kopolimerlerin yumuşatıcısı ve yağ üretiminde katkı maddesi olarak kullanılır. DEN, kanser oluşumunda direkt etkiye sahiptir. Bunun anlamı enzimlere bağı olmaksızın DEN'in kendiliğinden hidrolize olmasıdır (61). İki hidroksilasyon reaksiyonu ile aktive olan DEN'in bu biyolojik aktivasyonu sitokrom P-450 tarafından katalizlenir. Elde edilen verilerden biri DEN'e maruz bırakılan 40 veya daha fazla tür canlının tamamının kanserojenik etkiden payını almasıdır (62, 63).

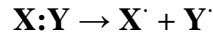
DEN'in test edildiği kemirgen, sürüngen, yumuşakça, kuş ve maymun gibi farklı canlılarda karaciğer tümörü oluşumunu tetiklediği görülmüştür (63, 64). Bununla birlikte anatomik, fizyolojik ve biyokimyasal bakımdan insana daha yakın olan primatlarda yapılan ve nitrozaminlere uzun süreli maruz kalmanın etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, DEN verilen tüm maymunlarda iki yıl içinde karaciğer kanseri meydana geldiği, vakaların çoğunun malign tümör oluşumu ve ölümlerle sonuçlandığı rapor edilmiştir. Nitrozopiperidin ve nitrozodipropilaminin ise daha az ölüm oranlarıyla sonuçlanan kansere neden oldukları bildirilmiştir (65).

3.3. Serbest Radikaller

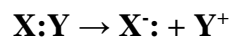
Serbest radikal terimi bağımsız olarak bir veya daha fazla ortaklanmamış elektronu bulunan atom veya moleküller için kullanılmaktadır. Atomlar bir çekirdek ve çevresinde bulunan farklı sayıdaki elektronlardan meydana gelirler. Elektronlar orbital adı verilen yörüngelerde enerji düzeylerine göre belirli bir düzende yerleşmiş olarak hareket halindedirler. Her orbitalde zıt yönlerde dönen iki elektron mevcuttur. Bu haliyle elektronlar stabildir. Radikaller ise ortaklanmamış elektronları yüzünden non-radikallere göre kararsız, kısa ömürlü ve daha az stabildirler. Ortaklanmamış elektronlar atom veya molekülün kimyasal reaktivitesini arttırarak, daha aktif hale getirirler. Organik veya inorganik molekül olabilen serbest radikaller, pozitif yüklü, negatif yüklü ya da nötr halde bulunabilirler (66, 67).

Serbest radikaller üç yolla meydana gelir:

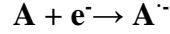
1. Kovalent bağlı normal bir molekülün, her bir parçasında ortak kullanılan elektronlardan biri kalacak şekilde homolitik bölünmesi ile;



2. Normal bir molekülden tek bir elektron kaybı veya bir molekülün heterolitik bölünmesi: Heterolitik bölünmede kovalent bağı oluşturan her iki elektron atomların birinde kalır. Böylece serbest radikaller değil, iyonlar meydana gelir. Askorbik asit, redükte glutatyon (GSH) ve tokoferoller gibi hücreyel antioksidanlar radikal türlere tek elektron verip radikalleri indirgerken, kendilerinin radikal formu oluşur.



3. Normal bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi ile; radikal özelliği taşımayan bir moleküle tek elektron transferi ile dış orbitalinde paylaşılmamış elektron oluşuyorsa bu tür indirgenme radikal oluşumuna sebep olabilir. Moleküler oksijen (O₂)'in tek elektron ile indirgenmesi, radikal formu olan O₂⁻ oluşumuna neden olur (68).



Serbest radikaller organizmada normal olarak meydana gelen metabolik olayların işleyişi esnasında meydana geldiği gibi çeşitli dış etkenlerin etkisi ile de meydana gelmektedir. Kısa yaşam süresine sahip, fakat yapılarındaki dengesizlik nedeniyle çok aktif yapıda olan serbest radikaller tüm hücre bileşenleri ile etkileşime girebilme yeteneği göstermektedir. Eşlenmemiş elektron bu molekülleri oldukça reaktif hale getirir. Etkileşime girdikleri molekülden bir elektron alarak veya ona bir elektron vererek molekülün yapısını bozarlar. Böylece radikal olmayan bir yapı, radikale dönüşmüş olur (66, 69).

H atomu eşleşmemiş elektronu ile bir radikaldir. Halojen atomlar, oksijen türleri, klor (Cl) ve brom (Br) gibi tek atomlu yapılar, sodyum, potasyum gibi alkali metal atomları ile nitrik oksit (NO) ve nitrojen dioksit gibi atom kombinasyonları radikal olarak tanımlanmaktadır. Geçiş metalleri (bakır (Cu), demir (Fe), mangan (Mn), molibden (Mo)) ortaklanmamış elektronlara sahip oldukları halde serbest radikal olarak sayılmazlar. Ancak reaksiyonları katalizledikleri için serbest radikal oluşumuna yardımcı olurlar. Biyolojik moleküller genellikle kovalent bağlı olup non-radikaldirler (66, 67).

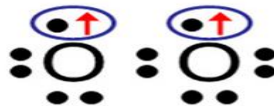
Bugün hastalıklarda serbest radikallerin rolünün araştırılması hız kazanmıştır. Özellikle başta kanser olmak üzere kardiyovasküler hastalıklar,

diyabet, romatoid artrit gibi pek çok hastalıkta ve yaşlanma olayında etkileri açığa kavuşmuştur (66, 67, 69, 70). Son yıllarda serbest radikallerin beslenmeyle olan ilişkileri de ortaya çıkınca, konu bilim adamlarınca daha yoğun ve geniş çapta araştırılmaya başlanmıştır.

3.3.1. Serbest Radikal Türleri

Aerobik metabolizması olan memelilerde başlıca serbest radikal kaynağının O_2 türeyen serbest radikaller olduğu kabul edilmektedir. Aerobik organizmaların yaşamlarını devam ettirebilmeleri için organik moleküllerden enerji açığa çıkarmada O_2 'i kullanma mecburiyetinde olmaları, bu canlıları, O_2 'in toksik metabolik ürünleri ile beraber yaşamak zorunda bırakmıştır (66, 67).

O_2 'in eşlenmemiş elektron içerdiği, atomik O_2 molekülünün ise eşlenmemiş iki elektrona sahip olduğu bilinmektedir. Bunun için O_2 bazen bir diradikal olarak da değerlendirilir. O_2 'in bu özelliği onun diğer serbest radikallerle kolayca reaksiyona girmesini sağlar. Radikal olmayan maddelerle ise çok daha yavaş bir şekilde reaksiyona girer. Çünkü O_2 'in son yörüngesindeki elektronların paralel spinlerde olması, O_2 molekülünün iki elektronu birden almasını ve kimyasal bağ oluşturabilmesini engeller. Bu nedenle O_2 molekülü tek elektron almaya daha yatkındır (66, 69) (Şekil 4).



Şekil 4: Oksijen Molekülündeki Elektronların Paralel Spin Yapısı (66)

O₂ tam olarak indirgenmediği metabolik reaksiyonlarda son ürün olarak su (H₂O)'ya indirgenir. O₂'in H₂O'ya indirgenmesi sırasında, kısmi redüksiyonla ya da redüksiyonun ara basamaklarında metabolit olarak çok sayıda yüksek derecede reaktif ara ürünler açığa çıkar. Bu ara ürünlerin hepsi radikal olmadığı için ROT terimi kullanılmaktadır (66, 70, 71).

Biyolojik sistemlerde meydana gelen serbest radikallerden en önemli olanları, O₂'den oluşan serbest radikallerdir. Bununla birlikte organizmada O₂ türevi serbest radikaller haricinde az miktarda C ve kükürt merkezli radikaller de meydana gelmektedir (72, 73).

- ROT; O₂ radikallerini ve oksitleyici ajanları kolayca radikal haline dönüştüren, radikal ve radikal olmayan O₂ bileşikleri içeren kompleks bir tanımdır.
- Reaktif Nitrojen Türleri (RNT); ise nitrik oksit radikali (NO•), nitrojen dioksit radikali (NO₂•) ve radikal olmayan N bileşikleri içeren kompleks bir tanımdır.

3.3.2. Reaktif Oksijen Türleri (ROT)

Aerobik organizmalar yaşadığı sürece, O₂'den elde edilen ve ROT olarak isimlendirilen metabolitlere maruz kalırlar. Bu metabolitlere, O₂'in indirgenmesi ile meydana gelen O₂^{•-}, H₂O₂ ve OH•; karbon merkezli radikaller ile O₂'in reaksiyonu ile oluşan peroksil radikali (RO₂•), alkoksil radikali (RO•) ve organik hidroperoksitler (ROOH) ile diğer serbest radikal formundaki hipokloröz asit (HOCl), peroksinitrit (ONOO⁻), NO•, NO₂• ve singlet oksijen (¹O₂) dahil edilebilir (66, 73, 74).

ROT'ni radikal olan ROT'leri ve radikal olmayan ROT'leri olarak ayırabiliriz (Tablo 2).

Tablo 2 : Bazı Reaktif Oksijen Türleri (66)

Radikal Olan ROT'lar	Radikal Olmayanlar ROT'lar
Süperoksit anyon radikali ($O_2^{\bullet-}$)	Hidrojen peroksit (H_2O_2)
Hidroksil radikali (OH^{\bullet})	Lipid hidroperoksit (LOOH)
Peroksil radikali (RO_2^{\bullet})	Hipohalöz asid (HOX)
Alkoksil radikali (RO^{\bullet})	N-halojenli aminler (R-NH-X)
Semikinon radikali (HQ $^{\bullet}$)	Singlet oksijen (1O_2)
Organik radikaller (R $^{\bullet}$)	Ozon (O_3)
Organik peroksit radikali (RCOO $^{\bullet}$)	Azot dioksit (NO_2)
Nitrik oksit radikali (NO $^{\bullet}$)	Hipokloröz asid (HOCl)
Hemoproteine bağlı radikaller	Peroksinitrit ($ONOO^{\bullet}$)

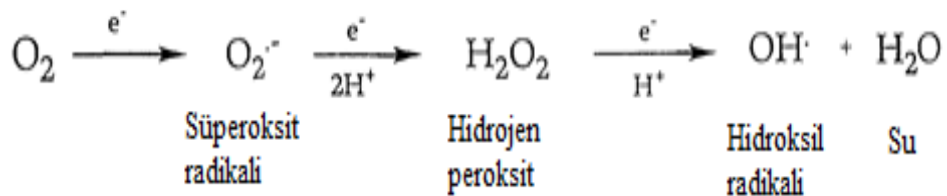
Elektron transport sistemde bulunan nikotinamid adenin dinükleotit (NAD), flavin adenin dinükleotit (FAD) ve koenzim Q gibi birçok bileşik O_2 ile reaksiyon oluşturarak $O_2^{\bullet-}$ salınımına sebep olmaktadır. Metabolizmada oksijenazların katalizlediği enzimatik tepkimelerde endojen olarak O_2 metabolitleri meydana gelmekte, ayrıca otooksidasyon tepkimeleri sonucu enzimatik olmayan kaynaklardan ROT'i oluşabilmektedir. Bunların dışında radyasyon, karbon tetraklorür (CCl_4), halojenlenmiş hidrokarbonlar gibi toksik kimyasallar, hava kirliliği, fenthion, malathion gibi pestisitler, ağır metaller, antibiyotikler, alkol, sigara ve uyuşturucu gibi dış etkenlerde ROT üretiminde etkili olurlar (75).

3.3.3. Serbest Radikallerin Oluşumu

ROT, hücrenin tüm fraksiyonlarında oluşabilme özelliğindedir. Hücrede zara bağlı veya serbest olarak bulunan değişik enzimlerin etkisi ile serbest radikal oluşmaktadır. Ayrıca enzimatik olmayan tepkimeler sonucu gerçekleşen otooksidasyon sırasında ve radyasyon, hava kirliliği, toksik kimyasallar, sigara dumanı, pestisitlere maruz kalma gibi birçok dış etkenler ROT oluşumuna neden olmaktadır. Bu radikal meydana gelişi hücre tiplerine göre farklılık göstermesine rağmen, tüm aerobik hücrelerde belirli düzeylerde radikal oluşmaktadır (69, 71, 76).

Elektron sayısının çekirdekdeki proton sayısı ile eşit olmadığı için dayanıklı olmayan serbest radikaller, elektron konfigürasyonlarını pozitif yükle dengelemeleri gerektiğinden çok reaktiftirler. Tek elektronunu başka bir moleküle verebilen bu radikaller, başka bir molekülden elektron alarak elektron çifti oluşturabilmektedirler (66, 69).

Aerobik canlılarda O_2 'in H_2O 'ya indirgenmesi esnasında oluşan ROT sağlıklı durumlarda belirli oranlarda canlılığın devamı için gereklidir (66, 71). O_2 'in bir elektron alarak indirgenmesi sonucu $O_2^{\cdot-}$, $O_2^{\cdot-}$ 'in bir elektron alması sonucu ise peroksit oluşur. Peroksit molekülü de iki H atomu ile birleşerek H_2O_2 meydana getirir (Şekil 5).



Şekil 5: Oksijenin Suya İndirgenmesi Esnasında ROT Oluşumu (69)

Ancak biyolojik sistemlerde H_2O_2 'in asıl üretimi O_2^{\bullet} dismutasyonu vasıtasıyla gerçekleşir. İki O_2^{\bullet} molekülü iki proton alarak H_2O_2 ve O_2 'i meydana getirirler. H_2O_2 bir serbest radikal olmamasına rağmen, ROT içinde yer alır ve serbest radikal biyokimyasında önemli bir rol oynar. Reaksiyon sonucu radikal olmayan ürünler olduğu için bu bir dismutasyon reaksiyonu olarak da bilinir (66, 71).

3.3.4. Hücrede Serbest Radikallerin Oluşum Yerleri

Serbest radikaller hücrenin tüm fraksiyonlarında oluşabilme özelliğindedirler (76). Bunlar;

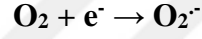
- a) Mitokondirideki elektron transport zincir reaksiyonları
- b) Endoplazmik retikulumdaki karma fonksiyonlu oksidaz sistemi
- c) Ksantin oksidaz, dopamin, β -hidroksilaz, ürat oksidaz, D-amino oksidaz gibi enzimlerin etkinliği
- d) Hücre zarına bağlı nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) oksidaz, prostaglandin sentetaz ve lipoksijenazların faaliyeti
- e) Peroksizomlarda ve lizozomlardaki metabolik olaylardır.

Serbest radikallerin katıldıkları reaksiyonlar enzimatik ve enzimatik olmayan kaynaklara bağlı olabilir. Enzimatik serbest radikal reaksiyonları arasında solunum zinciri, fagositoz, prostaglandin sentezi ve sitokrom P-450 sisteminin çalışması sırasında oluşan reaksiyonlar sayılabilir. O_2 türlerinin organik bileşiklerle Cu veya Fe katalizörlüğünde girdiği reaksiyonlar ise enzimatik olmayan serbest radikal reaksiyonlarıdır (66, 69).

3.3.5. Biyolojik Sistemlerde Oluşan Serbest Radikaller ve ROT

3.3.5.1. Süperoksit Radikali ($O_2^{\bullet-}$)

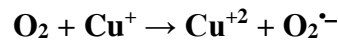
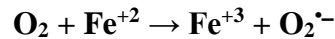
Aerobik hücrelerde O_2 'in bir elektron alarak indirgenmesiyle oluşan ilk ürün $O_2^{\bullet-}$ 'dir. O_2 'in potansiyel olarak toksik bir madde sayılmasının asıl nedeninin bu dönüşüm olduğu ileri sürülmektedir. Endojen O_2 radikallerinin en büyük kaynağı olan $O_2^{\bullet-}$ hem oksitleyici, hem de redükleyici özelliğe sahiptir. $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 kaynağı olması ve geçiş metalleri iyonlarını indirgemesi nedeniyle çok önemlidir (66, 70).



Mitokondri, endoplazmik retikulum gibi sellüler trasport zincirinin çeşitli komponentlerinden O_2 'e elektron sızmasıyla $O_2^{\bullet-}$ oluşur. Fagositik hücrelerdeki solunumsal patlama $O_2^{\bullet-}$ kaynağıdır. Nötrofillerin plazma membranının dış yüzünde yerleşmiş olan NADPH oksidaz, nötrofilin uyarılmasıyla O_2 'e iki elektron aktararak iki molekül $O_2^{\bullet-}$ oluşturur (66, 71).

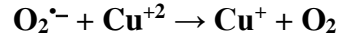
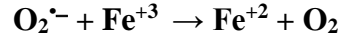
Hücrelerde $O_2^{\bullet-}$ üreten bir başka enzim de ksantin oksidazdır. Ksantinin ürik aside dönüşümünü katalizleyen ksantin oksidaz, bu arada $O_2^{\bullet-}$ oluşumuna da neden olur (71).

İndirgen geçiş metallerinin otooksidasyonu sonucu $O_2^{\bullet-}$ radikali oluşur.



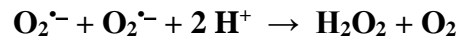
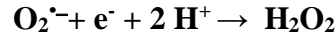
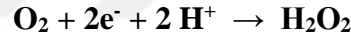
Geçiş metal iyonlarının O_2 ile reaksiyonları geri dönüşümlü redoks reaksiyonlarının ve serbest radikal reaksiyonlarının ilerlemesinde çok önemlidir.

$O_2^{\bullet-}$ okside haldeki Fe veya Cu ile reaksiyona girebilir.



3.3.5.2. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

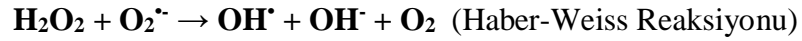
O_2 'in çevre moleküllerden 2 elektron alması ya da $O_2^{\bullet-}$ 'nin bir elektron almasıyla H_2O_2 oluşur. $O_2^{\bullet-}$ 'nin 2 H atomu ile birleşmesi sonucunda da H_2O_2 meydana gelir (66, 76). H_2O_2 , OH^{\bullet} kaynağı olduğu için reaktif oksijen metabolitleri arasında önemli bir yeri vardır. H_2O_2 'nin organizmada asıl üretimi $O_2^{\bullet-}$ dismutasyonu ile olur. Bu reaksiyon spontan olarak gelişebildiği gibi süperoksit dismutaz (SOD) enzimi tarafından da katalizlenebilir. Enzimatik dismutasyon geniş bir pH aralığında geçerlidir (66, 77).



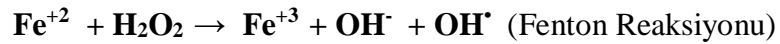
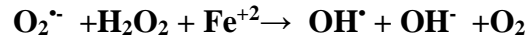
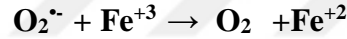
Glikoz oksidaz ve D-amino asit oksidaz içeren enzimler de H_2O_2 üretimine sebep olabilir. H_2O_2 mitokondriyal membranlar, peroksizomal membranlar ve plazma membranından difüzyon ile kolayca geçip birçok bileşiği yavaş yavaş okside edebilir. Uzun ömürlü bir oksidan olarak mutajen ve karsinojen etki gösterir. H_2O_2 serbest radikallerin neden olduğu hücrel değişikliklerde kritik bir öneme sahiptir (67, 70, 78).

3.3.5.3. Hidroksil Radikali (OH[•])

OH[•], H₂O₂'in O₂^{•-} ile reaksiyona girmesi sonucunda da açığa çıkar. Bu reaksiyona ise ‘Haber-Weiss Reaksiyonu’ adı verilmektedir. Reaksiyon katalizör varlığında veya katalizörsüz oluşabilir. Fakat katalizörsüz reaksiyon çok yavaş ilerler (66, 70).



OH[•], geçiş metallerinin varlığında H₂O₂'nin indirgenmesiyle oluşan çok reaktif bir radikaldir. Bu reaksiyon ilk kez Fenton tarafından tanımlandığı için ‘Fenton Reaksiyonu’ olarak isimlendirilmektedir. Bu reaksiyonda önce ferri demir (Fe⁺³) O₂^{•-} tarafından ferro demire (Fe⁺²) indirgenir. Sonra bu Fe⁺² kullanılarak Fenton reaksiyonu ile H₂O₂'ten OH[•] ve OH⁻ üretilir (66, 70).



OH[•] bütün organizmalarda, yüksek enerjili iyonize edici radyasyon etkisi altında H₂O'yun O-H bağlarının homolitik parçalanmasıyla in vivo olarak meydana gelebilir (71). OH[•] yarılanma ömrü çok kısa olmasına rağmen, oluştuğu yerdeki bütün biyolojik molekülleri etkileyebilir. Proteinler, DNA ve membranlardaki poliansature yağ asitleri ile etkileşime girerek zincir reaksiyonları başlatabilir. Özellikle metalloproteinler OH[•]'nin spesifik hedefleridir. En aktif ve en toksik serbest radikal olan OH[•], açığa çıktığı hücre kompartmanından uzaktaki hücre bileşenleri ile difüzyona bile gerek kalmadan reaksiyona girebilir. Bu

nedenle, endojen olarak şekillenen çoğu prooksidanların ve onların zararlı etkilerinin asıl sorumlusu OH•'dir (66, 77, 79).

3.3.5.4. Singlet Oksijen (1O_2)

1O_2 ortaklanmamış elektronu bulunmaması nedeniyle bir radikal olarak değerlendirilmez. Ancak birçok serbest radikal reaksiyonlarının başlamasına aracılık edebilir. O_2 'in elektronlarından bir tanesinin enerji alması sonucunda, kendi yörüngesinin tersi yönde başka bir orbitale geçmesiyle 1O_2 meydana gelir (66, 67) (Şekil 6).



Şekil 6: Singlet Oksijen (66)

Serbest radikal reaksiyonları sonucunda da açığa çıkabilen 1O_2 'in delta ve sigma olmak üzere iki şekli vardır. Lökositlerden salınan miyeloperoksidaz enziminin reaksiyonuyla HOCl oluşur. H_2O_2 ile HOCl arasındaki reaksiyonda da 1O_2 meydana gelir. Membran LPO'nda etkili bulunan 1O_2 aynı zamanda mutajeniktir (66, 76).

3.3.5.5. Nitrik Oksit Radikali (NO•)

NO•'in hücresel düzeyde koruyucu etkileri vardır. Ancak oksidatif stres altında $O_2^{\cdot-}$ ile reaksiyona girerek oluşturduğu ONOO• çok güçlü bir oksidandır. ONOO• birçok biyolojik materyali direkt olarak etkilemesinin yanı sıra proteinlerdeki tirozini nitratlaştırarak bazı hastalıkların patogenezinde önemli rol oynamaktadır. NO• vazomotor tonusun sağlanmasının yanı sıra enflamasyon

yanıtlarında, homeostazisde, vasküler hücre büyümesinde de önemli rollere sahiptir (73).

NO•'in fizyolojik şartlarda O₂⁻ ile birleşmesi oldukça sınırlıdır. Çünkü oluşan O₂⁻, hücrede yüksek konsantrasyonda bulunan SOD tarafından kolaylıkla ortadan kaldırılabilir. Patolojik şartlarda ise hem NO• hem de O₂⁻ sentezi artmakta, oluşan O₂⁻ SOD enzimi tarafından yeterli bir şekilde yok edilemediği için ONOO⁻ radikali oluşmaktadır (73).

3.3.6. Serbest Radikallerin Kaynakları

3.3.6.1. İntraselüler Kaynakları

- Küçük moleküllerin otooksidasyonu: Tioller, hidrokinonlar, katekolaminler, flavinler, tetrahidropterinler, antibiyotikler
- Enzimler ve proteinler: Ksantin oksidaz, triptofan dioksijenaz, hemoglobin (Hb)
- Mitokondrial elektron transportu
- Endoplazmik retikulum ve nükleer membran elektron transport sistemleri (sitokrom P-450, sitokrom b5)
- Peroksizomlar: Oksidazlar, flavoproteinler
- Plazma membranı: Lipoksijenaz, prostaglandin sentetaz, fagositlerde NADPH oksidaz, LPO
- Oksidatif stres yapıcı durumlar: İskemi, travma, intoksikasyon (66, 67, 80).

3.3.6.2. Biyolojik Kaynakları

- Aktive olmuş fagositler (solunum patlaması)
- Antineoplastik ajanlar: Nitrofurantoin, bleomisin, doksorubisin ve adriamisin
- Radyasyon
- Alışkanlık yapan maddeler: Alkol ve uyuşturucular
- Çevresel ajanlar (hava kirliliği yapan fotokimyasal maddeler, hiperoksi pestisidler, sigara dumanı, solventler, anestezikler, aromatik hidrokarbonlar)
- Stres (66, 67, 80).

3.3.7. Serbest Radikallerin Organizmaya Etkileri

Serbest radikaller oldukça reaktif özellikte olduklarından hücre organellerine zarar verebilirler ve birçok hastalıkta rol oynayabilirler. Dejeneratif hastalıkların çoğunun serbest radikal reaksiyonları kaynaklı olduğunu gösteren kanıtlar bulunmaktadır. Bu hastalıklar arasında ateroskleroz, kanser, enflamatuar eklem hastalığı, astım, diyabet ve dejeneratif göz hastalığı, nörolojik hastalıklar, romatoid artrit gibi romatolojik hastalıklar ve yaşlanma sayılabilir (67, 69, 81).

Serbest radikal patolojisi, hücre membranlarındaki makromoleküllerin ve diğer makromoleküllerin yüksek oranda radikal reaksiyonlarına maruz kalmasını içerir. Serbest radikaller reaktif yapılarından dolayı, başta lipitler, proteinler ve nükleik asitler olmak üzere yükseltgenebilen tüm hücre bileşenleriyle etkileşime girebilmektedirler (67, 69, 82).

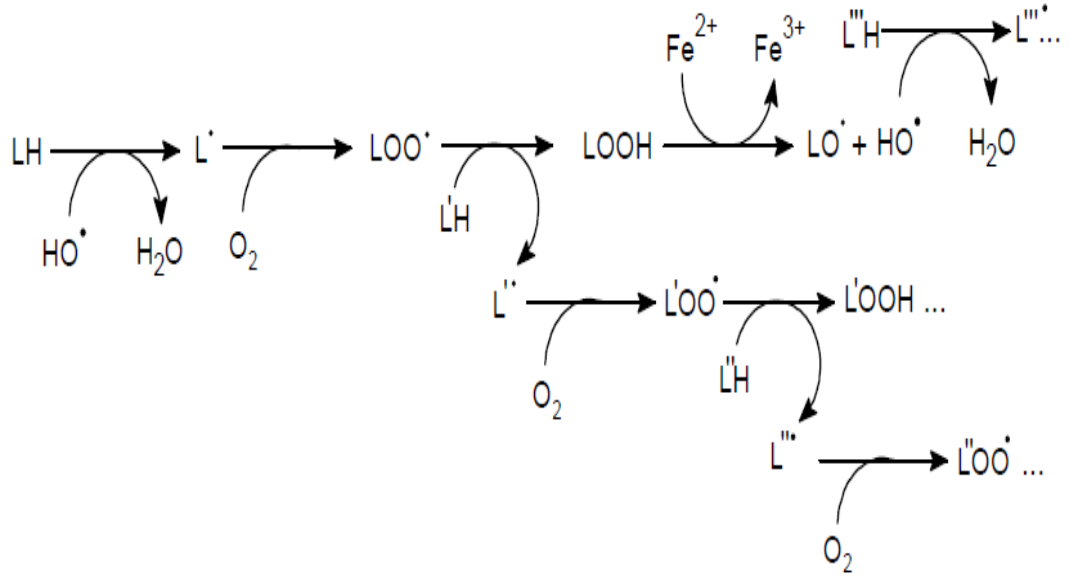
Reaktivitelerine bağlı olarak, serbest radikaller tüm hücrenel komponentlerle defalarca reaksiyona girer ve hücre için çok toksiktir. Tüm hücrenel komponentler doymamış bağlar ve tiyol grupları seviyesinde serbest oksijen radikalleriyle reaksiyona girebilir (70, 71, 82, 83).

3.3.7.1. Lipidlere Etkileri

Biyomoleküllerin hemen tümü serbest radikaller tarafından tutulabilir. Ama en çok maruz kalan lipitlerdir. Hücre membranları doymamış yağ asitlerinden zengindir ki bunlar okside edici radikaller tarafından kolayca tutulurlar. Doymamış yağ asitlerinin oksidatif yıkımı olan LPO hasar vericidir. Çünkü kendiliğinden ilerleyen zincir reaksiyonları devam eder. LPO ürünlerinden malondialdehit (MDA), membran komponentlerinde çapraz bağlanma ve polimerizasyona yol açmakta ve DNA'nın nitrojen bazları ile reaksiyona girerek karsinojenik özellik taşımaktadır (83).

3.3.7.1.1. Lipid Peroksidasyonu (LPO)

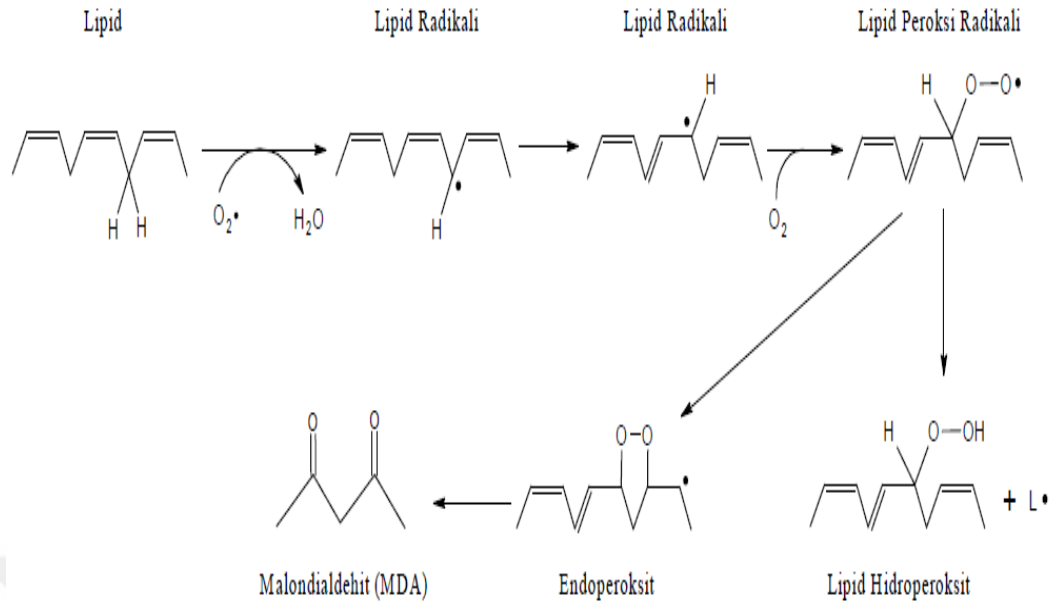
Serbest radikallerce başlatılan ve hücre membranının yapısında bulunan lipidlerin oksidasyonu ile sonuçlanan bu olay LPO olarak bilinir. LPO fosfolipid, glikolipid, gliserid ve sterollerin yapısında bulunan poliansature yağ asitlerinin ROT'nin etkisiyle alkol, aldehit, hidroksi asit, etan ve pentan gibi çeşitli ürünlere yıkılmasını kapsayan reaksiyonlar dizisidir. Bu kimyasal reaksiyonlar organizmada meydana gelen kuvvetli oksitleyici bir radikalın zar yapısındaki poliansature yağ asidi zincirindeki α -metilen gruplarından H atomunu uzaklaştırması ile başlamaktadır (83, 84) (Şekil 7).



Şekil 7: Lipid Peroksidasyonunun İlerlemesi ve Dallanması (66)

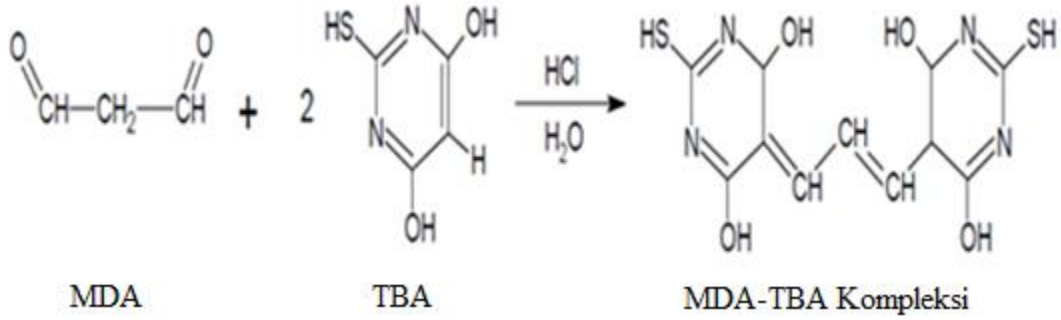
Kuvvetli oksitleyici radikal çoğu zaman $\text{OH}\cdot$ 'dir. $^1\text{O}_2$ ve $\text{NO}\cdot$ 'inde LPO başlatıcısı olduğu bilinmektedir. H atomunun uzaklaşmasıyla lipit radikalleri meydana gelmekte ve bu lipit radikalleri otooksidasyona neden olarak LPO'nun zincir reaksiyonu şeklinde ilerlemesini sağlamaktadır (83, 84).

Zincir reaksiyonu kendi kendini devam ettirme özelliği bulunduğundan ve geri dönüşümsüz olduğundan ötürü LPO metabolizma için en zararlı reaksiyonlardan biridir (66, 83, 84) (Şekil 8).



Şekil 8: Lipid Peroksidasyonu ve MDA Oluşumu (66)

LPO'nun sonlanma basamağında oluşan en önemli ürün MDA'dır. Üç ya da daha fazla çift bağa sahip yağ asitlerinin peroksidasyonu ile oluşan MDA, membran bileşenlerinin polimerizasyonuna ve çapraz bağlanmalarına sebep olur. Ayrıca deformabilite, iyon transportu, enzim aktivitesi ve hücre yüzeyindeki determinantların birikimi gibi membran özelliklerini değiştirebilir. Bunların dışında MDA, hücre membranından kolayca geçip, DNA'nın N'lu bazları ile tepkimeye girmekte ve DNA zincirlerinde kopmaları meydana getirmektedir (66, 84). MDA yağ asidi oksidasyonunun bire bir göstergesi değildir, ancak LPO'nun derecesiyle ilgili iyi bir ilişki gösterir. Bu sebeple organizmada oluşan LPO düzeyini ölçmek için MDA seviyelerinin ölçümü, sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Metot MDA ile tiyobarbitürik asit (TBA)'in reaksiyon oluşturması esasına dayanır. MDA, TBA ile pembe renkli bir kompleks oluşturmakta ve oluşan bu çözeltinin absorbans değerlerinden LPO'nun derecesi saptanmaktadır (83-85) (Şekil 9).



Şekil 9: MDA ile TBA'nın Reaksiyonu (66)

3.3.7.2. Karbonhidratlara Etkileri

Monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucunda peroksitler, H_2O_2 , glioksal ve okzoaldehitler meydana gelirler. Okzoaldehitler DNA, RNA ve proteinlere bağlanarak antimitotik etki gösterirler. Böylece kanser ve yaşlanma olaylarında rol oynarlar. Yine bağ dokunun önemli mukopolisakkariti olan hiyalüronik asit, H_2O_2 ve O_2^- 'nin etkisi altında parçalanmaktadır. Bu durumda hiyalüronik asidin bol bulunduğu yerlerde patolojik lezyonlar meydana gelir (66, 83).

3.3.7.3. Proteinlere Etkileri

Proteinler de serbest radikallerin hedefleridirler. Proteinlerin serbest radikallerden etkilenme dereceleri amino asit kompozisyonlarına bağlıdır. Doymamış bağ ve -SH grubu ihtiva eden proteinler (triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metionin, sistein) kolayca okside olabilirler. Oksijen radikalleri proteinlerin primer, sekonder ve tersiyer yapılarını etkileyebilir. Primer yapının oksidatif modifikasyonu sekonder ve tersiyer yapı değişmelerine neden olur. Proteolitik hassasiyette artışı beraberinde getiren bu olaylar sonucunda membran

proteinlerinin yapı ve fonksiyonlarında değişmeler olabilir. Sitoplazma ve membran proteinleri okside olduklarında, çapraz bağlanarak dimerleşir ve daha büyük agregatlara dönüşürler. Hem proteinleri önemli derecede hasar görürler. H_2O_2 ve O_2^- , oksihemoglobinin methemoglobine dönüşmesine sebep olurlar. Proteinlerdeki in vivo oksidatif hasar, taşıyıcı proteinlerini, enzimleri, reseptör fonksiyonunu ve belki de immün sistemi etkileyebilir. Açığa çıkan oksidatif protein hasarı ürünleri diğer biyomoleküller üzerinde sekonder hasarlara yol açarlar (DNA enzimlerinin inaktivasyonu gibi) (67, 83).

3.3.7.4. Enzimlere Etkileri

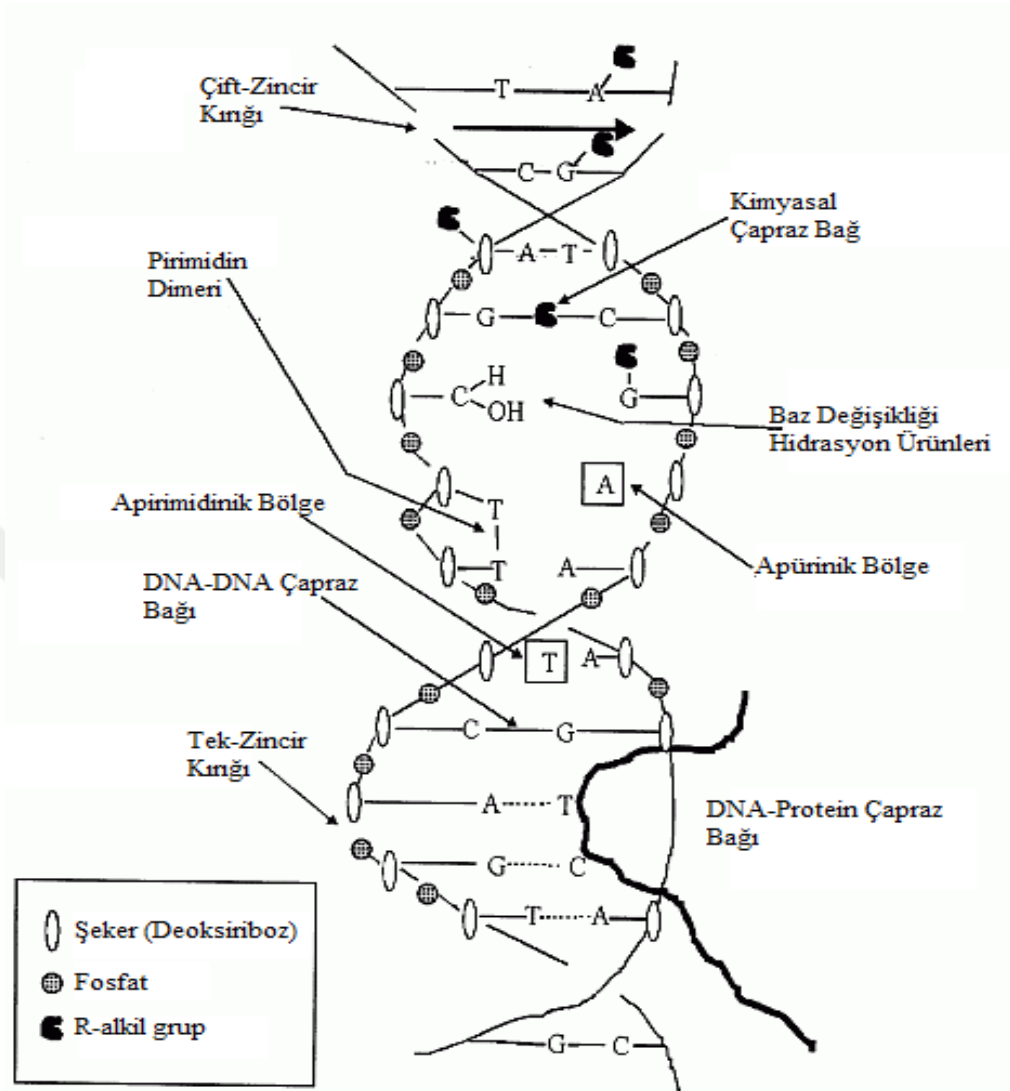
Serbest radikaller proteolitik ve katabolik enzimleri artırır. Proteaz, fosfolipaz, elastaz, siklooksijenaz, lipoksijenaz, ksantin oksidaz, triptofan dioksijenaz ve galaktoz oksidaz gibi enzimleri aktifleştirir. α -1-antitripsini inaktive ederler (66, 67).

3.3.7.5. Nükleik Asitler Üzerine Etkileri

Serbest radikaller ve oksidatif mekanizmalarla ortaya çıkan ürünler DNA'nın bileşenleri ile reaksiyona girerek DNA'nın yapısını bozarlar. DNA'nın bu tipteki hasarı oksidatif DNA hasarı olarak adlandırılmaktadır (86, 87).

Oksidatif mekanizmalarla oluşan DNA hasarlanma tipleri şunlardır:

1. DNA baz hasarı: DNA bazlarının serbest radikallerle etkileşime geçmesiyle ortaya çıkan hasar süreçleri DNA baz hasarı olarak tanımlanmaktadır.
2. DNA şeker hasarı: DNA'daki şeker artıklarının OH[·] ile etkileşmesiyle ortaya çıkan şeker modifikasyonlarını tanımlar.
3. 8-5'-siklopürin-2'-deoksिनüklozidler: Şeker radikalinin aynı pürin nükleozitindeki C8 pozisyonuna eklenmesi ile oluşan lezyonlardır.
4. DNA protein çapraz bağları: Hücrelerin iyonize radyasyon gibi serbest radikal üreten sistemlere maruz kalmaları sonucu kovalent DNA-protein çapraz bağlanmaları oluşur. Reaksiyon DNA baz radikalinin proteinin aromatik amino asidine eklenmesi ile ya da DNA baz radikali ile bir amino asit radikalinin kombinasyonu sonucu oluşur.
5. Abazik bölgeler: Modifiye şekerlere ek olarak, DNA içinde bulunan şeker parçasına bağlanan modifiye bazların zayıflamış glikozidik bağlardan kurtularak o bölgede boşluk oluşturmasıdır.
6. Tek ve çift DNA zincir kırıkları: Zincir kırıkları, DNA onarımı esnasında nükleaz aktivitesi sonucuyla da meydana gelebileceğinden her zaman oksidatif DNA hasarını belirtmez. Tek zincir kırıklarında, diğer zincirdeki bilgi doğru bir şekilde okunarak hasarlı zincir onarıcı enzimlerle onarılabilirdiğinden çift zincir kırıklarında meydana gelen hasar daha önemlidir (86, 87) (Şekil 10).



Şekil 10: DNA Üzerinde Oluşan Oksidatif Hasar Türleri (86)

DNA baz hasarı, DNA'daki pürin veya pirimidin bazlarının serbest radikallerle etkileşime geçmesiyle ortaya çıkan hasarı tanımlar. Serbest radikaller organik bileşikler ile ekleme veya çıkarma reaksiyonu gerçekleştirirler. OH[•] pürin ve pirimidin bazlarının çift bağlarına difüzyon-kontrollü olarak bağlanır (87).

3.3.7.6. Hücresel Etkileri

Serbest radikallerin hücrelerde; K ve fosfolipid kaybının artması, kapiller permeabilitenin ve mitokondride aerobik solunumun bozulması, hücreye kalsiyum (Ca), Fe girişinin ve trombosit agregasyonunun artması şeklinde zararlı etkileri vardır. Fakat hücrenin ölümüne yol açan kritik olay Ca dengesinin kaybıdır (69, 70).

Alveoler epitel hücreleri, dolaşım sisteminin iç yüzünü kaplayan endotelial hücreler, hepatositler ve eritrositler hem serbest radikallere en yakın hedefler, hem de serbest radikal reaksiyonlarına en duyarlı hücrelerdir. Özellikle poliansature yağ asitleri, Fe iyonu ve O₂ ihtiva eden eritrositler Fenton ve Haber-Weis reaksiyonları, oksihemoglobinin methemoglobine oksidasyonu gibi serbest radikal ürünleri oluşturan faktörlerle her an karşı karşıyadır (88).

Ağır oksidatif stres, hücrelerin hasar görmesine ve hatta ölümüne bile sebep olmaktadır. Bu yüzden serbest radikal şekillenme hızı çoğu hastalıklarda artmış durumdadır (70, 77, 79).

3.3.7.7. Dokuya Etkileri

Oksidatif stresten canlı vücudundaki birçok organ etkilenmektedir. En çok etkilenen organlardan biri ise karaciğerdir. Kronik hepatoselüler hasar, karaciğerde siroz ve fibrozise neden olur. Bu süreç karaciğer yetmezliğine, portal hipertansiyona ve hepatik ensefalopatiye zemin hazırlar. Hepatotoksinler, LPO ve çok reaktif aldehydik son ürünleri (MDA, 4-hidroksinoneal (4-HNE)) gibi etkenler, ağır metal iyonları ve özellikle serbest Fe gibi yardımcı faktörlerin katkısıyla hepatositlerdeki oksidatif stres artar. ROT'nin üretiminin artışı, sinyal

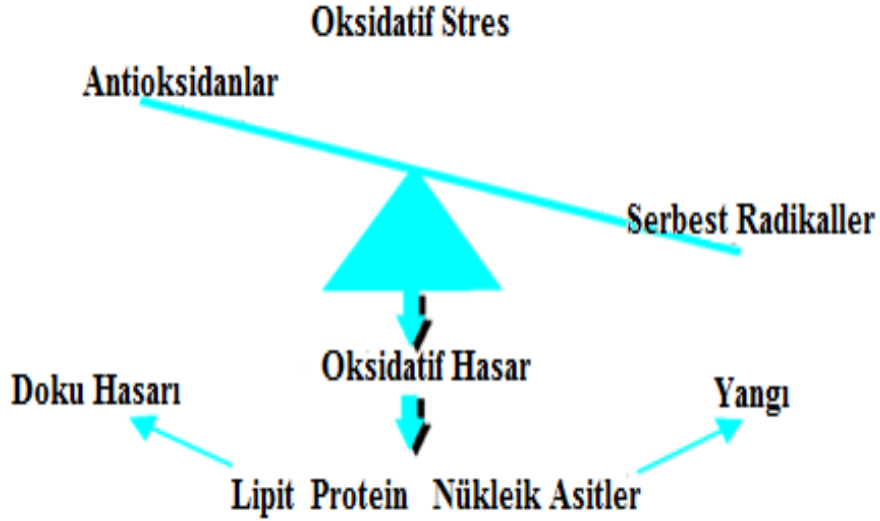
üretimini, gen yazılımını, redoks durumunu değiştirir, GSH seviyesini düşürerek apoptozis ve nekrozisi uyarır. Sonuçta organ hasarı gelişir (89).

3.3.7.8. Serbest Radikallerin Etkili Bulunduğu Hastalıklar

Günümüzde serbest radikallerin etkili olduğu pek çok hastalık bildirilmiştir. Bunların en önemlisi kanserdir. Birçok doku ve organ kanserinde serbest radikallerin etkileri kanıtlanmıştır. Bunun yanı sıra, alzheimer, parkinson, huntingtons hastalıkları ve multiple skleroz gibi nörodejeneratif hastalıkların, romatoid artrit, glomerulonefrit gibi immun sistem hastalıklarının, ateroskleroz, iskemi gibi dolaşım sistemi hastalıklarının, gastrointestinal sistem yangı ve hastalıklarının, down sendromu ve diyabet gibi genetik ve metabolik hastalıkların, nefrit ve hepatit gibi organ hastalıklarının, katarakt, glokom gibi oftalmik problemlerin, pnömoni, astım, hipoksi gibi akciğer hastalıklarının serbest radikallerle bağlantılı olduğu tespit edilmiştir (67, 77).

3.4. Oksidatif Stres

Oksidatif stres; oksidan ve antioksidan sistemler arasındaki dengenin oksidanlar lehine bozulması olarak tanımlanmaktadır ve oksidan oluşumunun büyüklüğü veya oranındaki bir artıştan meydana gelebileceği gibi koruyucu sistemlerdeki bir hata veya eksilme sonucu da şekillenebilmektedir. Oksidatif stres; diyabet, alzheimer, böbrek yetmezliği gibi birçok patolojik durumda, yaşlılıkta ve pestisitler, uyuşturucu, radyasyon, gibi biyolojik kaynaklı oksidan maddelere yoğun bir şekilde maruz kalma sonucunda da ortaya çıkmaktadır (67, 90, 91) (Şekil 11).



Şekil 11: Oksidatif Stres (91)

3.5. Oksidatif DNA Hasarı

ROT, vücutta DNA, RNA, enzimler, proteinler ve membran geçirgenliğinden sorumlu fosfolipitler gibi temel biyolojik moleküllerin yapısal bütünlüğünü tehdit ederler ve fonksiyonlarında anomalilere neden olurlar. Özellikle mitokondriyel DNA, oksidatif hasara oldukça duyarlıdır. İnsan vücudunun her hücresinde DNA'nın günde çeşitli yollardan 10^3 kez oksidatif hasara maruz kaldığı öne sürülmektedir. Başta mitokondriyal elektron transportu olmak üzere ksenobiyotik metabolizması, fagositik aktivasyon, çeşitli sentez ve degradasyon reaksiyonlarında ROT meydana gelmekte ve prooksidan/antioksidan dengenin prooksidanlar lehine bozulması vasıtasıyla meydana gelen oksidatif stres, çeşitli mekanizmalar ile DNA'ya hasar vermektedir. DNA'da ROT vasıtasıyla meydana gelen oksidatif hasar, yaşlanma, kanser, kardiyovasküler hastalıklar gibi doku fonksiyonlarının kaybı ile meydana gelen hastalıkların

başlıca sebebi ve göstergesi olarak görülmektedir. ROT, DNA'da oksitlenmiş bazlar, abazik bölgeler, DNA sarmal kırıkları, DNA ve protein arasında çapraz bağlanma gibi çeşitli lezyonları oluştururlar. Bu lezyonlar direkt olarak oluşabildiği gibi, DNA onarımı sırasında da meydana gelebilir (86, 87, 92).

ROT normal oksidatif metabolizmanın bir parçası olmasının yanında aşırı üretildiklerinde DNA hasarına sebep olabilirler. Farklı ROT farklı yollardan DNA hasarlarına neden olurlar (86, 93).

Serbest radikaller, özellikle de OH[•], organik bileşiklerle katma ve çıkarma reaksiyonları ile etkileşirler. OH[•], DNA çift sarmalına katılarak DNA bazlarından ve şeker molekülündeki C-H bağlarından H atomunun çıkmasına neden olur. Bundan sonraki reaksiyonlar DNA bazlarının C veya N merkezli radikalleri üzerinden ve şeker kalıntısının C merkezli radikalleri üzerinden yürür ve modifiye olmuş şeker ve bazlar, abazik bölgeler, sarmal kırıkları ve DNA-protein çapraz bağlanmaları gibi çeşitli ürünler meydana gelir. Oksidatif baz hasarları genellikle mutasyonlarla sonuçlanırken, deoksiriboz şekerinin hasarı baz çıkarımı veya DNA sarmal kırıkları ile sonuçlanır (87, 94).

Aktive olmuş nötrofillerden kaynaklanan H₂O₂, membranlardan kolay bir şekilde geçerek hücre çekirdeğine ulaşır ve DNA hasarına, hücre disfonksiyonuna ve hücre ölümüne neden olur (66, 86).

¹O₂'nin nükleik asitlerle reaksiyona girme kabiliyeti daha azdır. ¹O₂ guanine spesifik bağlanarak hasar oluşturur. O₂⁻ anyonu güçlü bir oksitleyici olduğundan guanin gibi yüksek elektron yüklü yoğunluklu alanlar barındıran moleküllerle daha kolay reaksiyona girer (95).

DNA baz hasarları; OH \cdot dört bazdan farklı pek çok ürün oluşmasına neden olurken, $^1\text{O}_2$ genellikle guanin bazının 8-hidroksiline neden olur. OH \cdot pirimidin (timin ve sitozin) ve pürin (adenin, guanin) bazları ile etkileşir. Bu etkileşmenin pozisyonu moleküldeki elektron yoğunluğu ile ilgilidir ve OH \cdot en fazla elektron yoğunluğu olan bölgeyi tercih eder (94).

DNA şeker hasarları; OH \cdot DNA'daki şeker molekülünün her bir C atomundan, H atomunun çıkarılmasına neden olur. C merkezli bu radikaller daha sonraki reaksiyonlar sonucunda çeşitli şeker ürünlerinin, DNA sarmal kırıklarının veya abazik bölgelerin oluşmasına neden olurlar. Bazı şeker ürünleri DNA'dan modifiye olmuş serbest ürünler olarak ayrılırken, bazıları da DNA'nın yapısında kalır veya kırık DNA sarmallarının uçlarına eklenirler (86, 94).

DNA-protein çapraz bağları da serbest radikallere bağlı reaksiyonlar sonucunda meydana gelir. Örneğin timin-tirozin çapraz bağının hem in vitro ortamda hem de memeli kromatininde serbest radikallere maruziyet sonucunda meydana geldiği gösterilmiştir. Bu hasarın büyük ihtimalle timinin allil radikalinin, tirozin halkasının C3 pozisyonuna bağlanması ve oksidasyonu sonucunda oluştuğu düşünülmektedir (86, 87, 92).

Oksidatif stresle oluşan hastalıklar başlıca, antioksidanların azalması (örneğin mutasyonlar antioksidan savunma enzimlerine etki edebilir) ve/veya artmış ROT/RNT üretimi veya ROT/RNT üreten doğal sistemlerin aşırı aktivasyonu (örneğin kronik enflamatuvar hastalıklarda fagositik hücrelerin uygunsuz aktivasyonu) sonucunda tetiklenebilir. Oksidatif stres sonucunda oluşan hastalıklar, genellikle kronik enflamasyon kaynaklıdır ve bunlar kalıtsal olabileceği gibi sonradan kazanılan viral, bakteriyel, parazitik enfeksiyonlar veya

kimyasal indüksiyonlar sonucunda da oluşabilirler. Kanser de genellikle artmış oksidatif stresin sonucu olabildiği gibi, yine oksidatif stresin indüklediği prekanseröz hastalıkların da bir sonucu olabilir (96).

DNA'da oksidatif hasar meydana gelişi iki hipotez ile açıklanmıştır. Bunlar; “Fenton Kimyası Hipotezi” ve “Nükleaz Aktivasyonu Hipotezleridir”. Fenton kimyası hipotezine göre OH⁻leri DNA'ya saldırarak hasar meydana getirirler. O₂⁻ gibi H₂O₂'de direk olarak DNA'da hasar meydana getirmez. OH⁻'nin DNA üzerine etkili olabilmesi için DNA'da ya da DNA'ya çok yakın bölgelerde oluşması gerekmektedir. Nükleaz aktivasyonu hipotezinde ise oksidatif stres, sitozolik Ca⁺² iyon konsantrasyonunda büyük bir yükselişe neden olarak nükleusdaki Ca⁺² bağımlı endonükleazları aktive etmekte ve DNA da kırılmalara sebep olmaktadır. Nükleaz aktivasyonu DNA bazlarında kimyasal değişikliklere sebep olmamaktadır. Oksidatif DNA hasarı, toksik etkenlere bağlı olarak, seviyesinde artış eğilimi olan hücrel metabolizmanın kaçınılmaz bir sonucudur (92, 95).

Canlı organizmalar da DNA'ların korunması için çeşitli DNA onarım mekanizmaları bulunmaktadır. Oksidatif DNA hasarına karşı savunma ve onarma yolları mevcuttur. Bunlar, ROT'ni inaktive eden ve bu nedenle oksidatif hasarı önleyen antioksidanlar ile DNA tamir mekanizmalarıdır (87, 92).

3.6. Antioksidan Savunma Sistemleri

O₂'li yaşamla birlikte aerobik organizmalar O₂ kaynaklı radikalleri oluşturmaya başlamışlardır. Bununla eş zamanlı olarak, serbest radikallerin zararlı etkilerini engellemek üzere organizmada antioksidan savunma sistemleri veya

kısaca antioksidanlar olarak adlandırılan çeşitli savunma mekanizmaları gelişmiştir. Serbest radikallerin ve antioksidanların düzeyleri arasındaki hassas denge korunamadığı takdirde hücre hasarına kadar giden birçok patolojik değişiklik ortaya çıkmaktadır. Antioksidanlar, ya enzimatik şekilde reaktif bileşiklerin dengeli indirgenmesini sağlayarak, peroksidasyon zincir reaksiyonunu engelleyerek ve ROT'ni toplayıp, metal iyonlarını inaktive ederek LPO'nu spesifik enzim aktivitesiyle ya da radikal ve toksinlerle direkt reaksiyona girerek non-enzimatik şekilde inhibe ederler (67, 77).

Antioksidanlar etkilerini başlıca iki şekilde gösterirler (66, 97);

- 1-** Serbest radikal oluşumunun engellenmesi
 - a-** Başlatıcı reaktif türevleri uzaklaştırarak
 - b-** O₂'i uzaklaştırarak veya konsantrasyonunu azaltarak
 - c-** Katalitik metal iyonlarını uzaklaştırarak
- 2-** Oluşan serbest radikallerin etkisiz hale getirilmesi
 - a-** Toplayıcı etki: ROT'ni etkileyerek onları tutmaya ve daha az reaktif başka moleküllere çevirmeye yönelik etki (enzimler)
 - b-** Bastırıcı etki: ROT'lar ile etkileşip onlara bir proton ekleyerek aktivite kaybına neden olan etki (flavinoidler, vitaminler)
 - c-** Onarıcı etki
 - d-** Zincir kırıcı etki: ROT'ni ve zincirleme reaksiyon başlatacak olan diğer maddeleri kendilerine bağlayıp reaksiyon zincirini kırarak fonksiyonlarını önleyici etki (Hb, seroplazmin, mineraller, vitaminler)

Antioksidanlar enzimatik ve non-enzimatik olarak sınıflandırılırlar (Tablo 3). Hücresel seviyede etkili olan enzimatik sistemler içinde birincil olan antioksidan enzimler arasında SOD, katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon-S-trasferaz (GST) yer alır. Bu birincil savunma enzimlerinden başka dolaylı olarak antioksidan sistem içinde yer alan glutatyon redüktaz (GR) ve glikoz-6-fosfat dehidrojenaz (G6PD) enzimleride vardır ve bunlara ikincil antioksidan enzimler denilmektedir. Non-enzimatik antioksidan savunma sistemleri ise başlıca GSH, vitamin A, C, E, melatonin, albümin, bilirubin, ürik asit vb. den meydana gelmektedir (89, 95, 98).

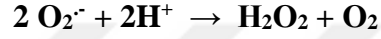
Tablo 3 : Enzimatik ve Non-Enzimatik Antioksidanlar (98)

Antioksidan Ajanlar	Etkileri
Enzimatik Antioksidanlar	
SOD	$O_2^{\cdot -}$ detoksifiye eder
CAT	H_2O_2 detoksifiye eder
GSH-Px	H_2O_2 detoksifiye eder
Peroksidaz	H_2O_2 detoksifiye eder
Sitokrom oksidaz sistemi	Hücredeki O_2 'in %95-96'sını detoksifiye eder
Non-Enzimatik Antioksidanlar	
Alfa-tokoferol	$O_2^{\cdot -}$ ve OH^{\cdot} , 1O_2 detoksifiye eder
Beta-karoten	1O_2 , $O_2^{\cdot -}$ ni temizler
Askorbik asit	$O_2^{\cdot -}$ ve OH^{\cdot} detoksifiye eder
Ürat	$O_2^{\cdot -}$, OH^{\cdot} tutar
Sistein	$O_2^{\cdot -}$, OH^{\cdot} tutar
Albumin	LOOH, HOCl'i tutar
Bilirubin	$O_2^{\cdot -}$, OH^{\cdot} tutar
Seruloplazmin	SOD'a benzer mekanizma
Transferin	Dolaşan Fe'i bağlar
Laktoferrin	Dolaşan Fe'i bağlar
Ferritin	Dolaşan Fe'i bağlar
Sistein	$O_2^{\cdot -}$ ve OH^{\cdot} , 1O_2 detoksifiye eder

3.6.1. Enzimatik Antioksidanlar

3.6.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD, E.C.1.15.1.1)

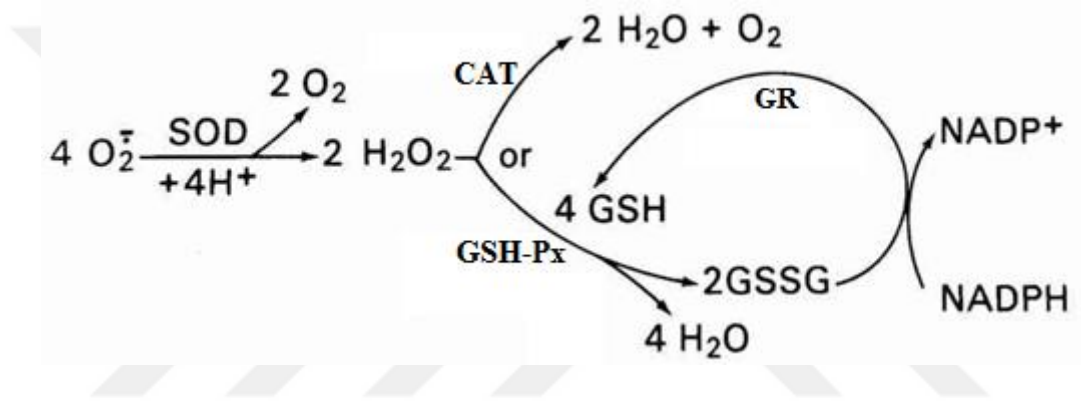
İlk kez 1969 yılında McCord ve Fridovich (99) tarafından tanımlanmış olan SOD enzimi, aerobik metabolik reaksiyonlar esnasında oluşan $O_2^{\cdot-}$ 'in, H_2O_2 ve O_2 'e dönüşümünü katalizler. Hücresel bölmelerde $O_2^{\cdot-}$ düzeylerini kontrol etmede, direkt oksidatif hasara karşı hücreleri korumada anahtar role sahip bir enzimdir (100).



SOD enziminin hepsi metalloprotein yapısında olan dört izoenzimi bulunmaktadır. İntraselüler izomerlerinden sitozolik SOD Cu ve çinko (Zn)'ya bağlı iken (CuZn-SOD) mitokondriyal SOD Mn'a bağlıdır (Mn-SOD). Genel olarak hücrede sitozolik SOD daha çoktur ve özellikle Hb'in otooksidasyonundan oluşan $O_2^{\cdot-}$ 'ni temizlediği için eritrositlerin en önemli antioksidanıdır (101). Mitokondrideki solunum zincirinin O_2 radikallerinin en büyük kaynağı olduğu hatırlanırsa Mn-SOD'nin önemli bir antioksidan olduğu görülür (78). Mn-SOD tümör nekrozis faktörü ve interlökin-1 tarafından uyarılmaktadır. SOD enziminin az bir kısmı da sinoviyal sıvı ve plazma gibi ekstraselüler sıvılarda bulunur (100, 102). Yine bazı bakteri ve kloroplastlarda bulunduğu bildirilen Fe'e bağlı bir SOD (Fe-SOD) ile nikel (Ni)'e bağlı bir SOD (Ni-SOD) da tarif edilmiştir (70, 82, 101).

ROT'ne karşı antioksidan savunma enzimatik bir yol oluşturmuştur. Bu yolun ilk savunmasını SOD oluşturur. SOD aktivitesiyle açığa çıkan H_2O_2 'i H_2O 'ya indirgeyen GSH-Px ve CAT ikinci savunmayı kurarlar. Bu nedenle SOD

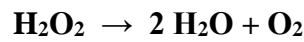
aktivitesindeki herhangi bir artış, ikinci kademe enzimlerinin aktivitesinde artış gerektirir. Yüksek O_2^- üretimine adaptasyonu gösteren SOD artışı ile GSH-Px arasındaki dengesizlik, hücrelerdeki oksidatif strese işaret eder. Bir başka ifadeyle SOD/GSH-Px oranındaki yükselme oksidatif hasarı ve patolojik olayları başlatabilir. SOD enziminin fizyolojik önemi; O_2^- 'i metabolize eden hücreleri O_2^- 'nin zararlı etkilerine karşı korumak ve böylece LPO'nun başlamasını engellemektir (76) (Şekil 12).



Şekil 12: ROT'ne Karşı Antioksidan Savunma (66)

3.6.1.2. Katalaz (CAT, E.C.1.11.1.6)

CAT yapısında dört adet hem grubu bulunan bir hemoproteindir. CAT esas olarak peroksizomlarda daha az olarak sitozolde ve mikrozomal fraksiyonda bulunur. CAT enzimi, H_2O_2 'i H_2O 'ya ve O_2 'e parçalar (82, 102, 103).



Granulomatöz hücrelerde CAT, hücreyi kendi solunumsal patlamasına karşı koruma işlevini de görür. Hücrede oluşan H_2O_2 'i OH^\cdot oluşumunu önlemek için ortadan kaldırır. H_2O_2 düzeyi düşük olduğunda veya elektron donörü konsantrasyonu yüksek olduğunda peroksidatik reaksiyonla, H_2O_2 'in oluşum

hızının yüksek olduğu durumlarda katalitik reaksiyonla H_2O_2 'i H_2O 'ya dönüştürerek ortadan kaldırır (82, 103).

Peroksidaz aktivitesi gösteren CAT enzimi peroksizomlarda lokalize olduğundan büyük moleküllü lipid peroksitlerine etki etmez. Bu enzim bir molekül H_2O_2 'i elektron verici substrat, diğerini de elektron alıcısı olarak kullanabilir. CAT enziminin yaşla birlikte aktivitesi azalmaktadır (88).

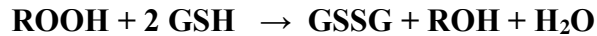
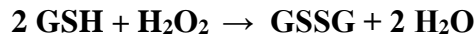
Birçok memeli hücre tipinde bulunan CAT çok farklı konsantrasyonlarda bulunur. Enzim böbrek ve karaciğerin peroksizomları gibi subselüler organellerde veya diğer hücre çeşitlerinde bulunan mikroperoksizomlar gibi daha küçük organellerde yerleşirler. Karaciğer, böbrek gibi yüksek CAT içeriği olan organlarda düşük H_2O_2 konsantrasyonu, düşük CAT içeriği olan kalp, beyin gibi dokularda daha fazla H_2O_2 konsantrasyonu vardır (98, 103, 104).

Karaciğerde endojen olarak üretilen H_2O_2 'in dekompozisyonunu sağlayan iki sistem CAT ve GSH-Px'dır. CAT ve GSH-Px arasındaki karakteristik H_2O_2 metabolizmasını paylaşma, iki enzim dağılımına da yansımıştır. Endoplazmik retikulumdan salgılanan H_2O_2 'in dekompozisyonundan primer olarak GSH-Px sorumludur. H_2O_2 konsantrasyonu artığında H_2O_2 'in yıkımı için CAT'ın katılım oranı artar. Eritrositlerle yapılan H_2O_2 metabolizması çalışmalarında düşük H_2O_2 salınımlarında, GSH-Px'in başlıca rolü oynadığını, yüksek hızlı H_2O_2 salınımlarında CAT'ın rolünün daha önemli olduğunu saptamışlardır (105).

3.6.1.3. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px, E.C.1.11.1.9)

GSH-Px enzimi ilk kez 1957 yılında Mills (106) tarafından sığır eritrositlerinden izole edilmiş, sonraki çalışmalarda yapısının selonoprotein olduğu gösterilmiştir. İnsan hücrelerinde GSH-Px enziminin sitozolik GSH-Px (C-GSH-Px=GSH-Px-1), plazma GSH-Px (P-GSH-Px=GSH-Px-2), gastro-intestinal GSH-Px (GI-GSH-Px=GSH-Px-3), fosfolipid GSH-Px (PL-GSH-Px=GSH-Px-4) olmak üzere başlıca dört tipi vardır (82).

Hücrelerdeki GSH redoks döngüsünün, H₂O₂ ve hidroperoksitlerin indirgenmesinde hayati önemi vardır. Bu döngünün anahtar enzimi GSH-Px, substratı ise redükte GSH'dır. Okside glutasyon (GSSG)/GSH oranı oksidatif stresin bir başka göstergesi olarak kabul edilmektedir. Örneğin eritrositlerdeki bu oran 1/500 seviyesinde tutulur. Bu dengenin bozulması oksidatif strese yol açarak eritrosit hasarına neden olabilir (82, 107).



GSH-Px selenyum ve E vitamini arasında kuvvetli ilişki vardır. Oksijen varlığında, ansature yağ asitlerinin çift bağlarını kıran zincirleme reaksiyonlar meydana gelir. Bu reaksiyonlar, oluşmuş kimyasal radikaller ortadan kalkıncaya kadar sürer. Özellikle GSH-Px enziminin kofaktörü olan selenyum, bu radikallerin ortadan kaldırılmasında önemlidir. Bu yüzden E vitamini ve selenyum eksikliği sonucunda, enzimin aktivitesinde azalma meydana gelir. GSH-Px enziminin, SOD ve CAT enzimlerinin aksine yaşla birlikte kandaki seviyesinin yükseldiği belirtilmiştir (101).

GSH-Px'in fagositik hücrelerde önemli fonksiyonları vardır. Diğer antioksidanlarla birlikte GSH-Px, solunum patlaması sırasında oluşan serbest radikal peroksidasyonundan fagositik hücrelerin zarar görmelerini engeller. GSH-Px aktivitesi düşük olan makrofajlarda zimosanla başlatılan solunum patlamasını takiben H₂O₂ salınımının arttığı gösterilmiştir. Eritrositlerde de GSH-Px oksidatif strese karşı en etkili antioksidandır. GSH-Px aktivitesinde azalma, H₂O₂'in artmasına ve şiddetli hücre hasarına yol açar (69, 104, 105).

3.6.1.4. Glutasyon-S-Transferaz (GST, E.C.2.5.1.18)

GST'ler üç sitozolik, bir de mikrozomal gruba ayrılırlar. Yabancı maddeleri GSH'daki -SH grubu ile bağlayarak nötralize ederler. Bu şekilde ürünün daha fazla H₂O'da çözünür hale gelmesini sağlayarak, organizmadan atılımını kolaylaştırırlar. GSH-Px ve PL-GSH-Px enzimlerinden sonra lipid hidroperoksitlerinin detoksifikasyonunda önemli olan bir enzimdir (101). Detoksifikasyon metabolik yolunda son ürün olan merkaptürik asit oluşumundaki ilk basamağı katalizleyerek homeostasisi sağlayan çok işlevli bir enzimdir. Bu basamakta, GSH ile endojen ve ekzojen hidrofobik elektrofilik bileşiklerin bağlanması gerçekleşmektedir (108).

GST, besinlerle birlikte alınan toksik maddelerin eliminasyonunu sağladığı gibi, prostoglandinlerin izomerizasyonu, hem, bilirubin, safra tuzları ve yağ asitleri gibi nonsubstrat ligandları GSH ile bağlayarak taşınmasını da sağlamaktadır. Ayrıca reaktif elektrofilik bileşiklerin vücuda zarar vermesini, aynı tür bileşikleri birbirine kovalent bağlayarakta önleyebilmektedir. GST'nin

etkilediği bu ksenobiyotik akseptörler içinde nitrojenli, halojenli bileşikler, organofosfatlar, polisiklik aromatik hidrokarbonlar yer almaktadır (109).

3.6.1.5. Glutasyon Redüktaz (GR, E.C.1.6.4.2)

Moleküler ağırlığı 120.000 dalton olan GR enzimi, GSSG'ü indirgenmiş hale çeviren 2 subüniteden oluşmuş bir dimerdir (110). Her bir subünit; NADPH bağlayan alan, FAD bağlayan alan ve ara yüz alan olmak üzere üç tane yapısal alan içerir. GSH'un indirgenme reaksiyonu sırasında sıklıkla elektronlar NADPH'dan FAD'ye transfer edilir. Daha sonra bu elektronlar, subünitelerdeki iki sistein arasında bulunan disülfid köprüsüne transfer edilmek suretiyle okside GSH'a aktarılmış olur (111).

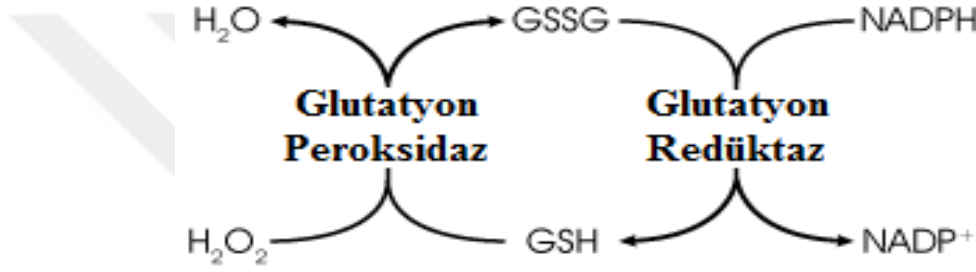


Tepkime GSSG'a özgüdür, ancak elektron vericisi olarak NADH'ye düşük de olsa ilgisi vardır. GR'ın bu tepkimenin tersini yüksek GSH ve NADP⁺ derişimlerinde in vitro koşullarda gerçekleştirebildiği gösterilmiştir. Ancak bunun in vivo koşullarda gerçekleşmesi, kullanılması gereken substrat derişimlerinin fizyolojik koşullarla uymaması nedeniyle mümkün görülmemektedir (112).

3.6.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar

3.6.2.1. Glutatyon (GSH)

GSH, biyolojik olarak iki önemli yapıyı (tiyol grubu ve γ -glutamin bağı) yapısında bulundurur. İndirgenmiş formda tutulabilmesi pentoz fosfat metabolik yoluna bağlıdır. Bu yolda üretilen NADPH, GR'ın katalize ettiği reaksiyonda koenzim olarak görev alır (113) (Şekil 13).



Şekil 13: Glutatyonun Oksidasyon ve Redüksiyon Reaksiyonları (66)

GSH, hücre içi proteinlerin, sistein, dihidrolipoat ve koenzim A gibi moleküllerin tiyol gruplarının, askorbat, α -tokoferol gibi antioksidan moleküllerin korunmasında, ayrıca DNA'nın deoksiribonükleozid öncüllerinin oluşması için ribonükleotidlerin indirgenmesinde kullanılır. GSH ayrıca hücrelerin oksidatif hasara, toksik bileşiklere, radyasyona karşı korunmasında, bazı ilaçların inaktivasyonunda, östrojen, prostoglandin ve lökotrienler gibi bazı endojen bileşiklerin metabolik işlemlerinde yer alır. Hücresel GSH taşınımı, tiyol gruplarını ve α -tokoferol gibi diğer membran bileşiklerini koruyarak hücre membranının oksidan hasara karşı korunmasını sağlamakta ve serbest radikallerle direkt reaksiyonu ile, GSH'lara ve GST'lara substrat olmasıyla bir antioksidan olarak davranmaktadır (81, 113).

3.6.2.2. E vitamini (α -tokoferol)

E vitamininin dokulardaki doymamış yağ asitlerinin oksidasyonunu önlediği bilinmektedir. Yapısında bulunan fenolik hidroksil grubu taşıyan aromatik halka, vitaminin kimyasal olarak aktif kısmını oluşturarak antioksidan özelliğini sağlar (102). E vitamini, birbiriyle yakın ilişkisi olan tokoferoller denen bileşiklerin karışımıdır. Besinlerdeki E vitamini yavaş yavaş oksitlenirken, ısıtma ve ışık oksitlenmeyi hızlandırır (102, 114).

GSH-Px ile E vitamini serbest radikallere karşı birbirlerini tamamlayıcı etki gösterirler. Selenyum ve E vitamini sinerjik davranarak, birbirlerinin organizma için gerekli miktarlarını azaltırlar. Selenyum, E vitamininin lipoproteinlerde tutulmasını sağlarken, E vitamini de selenyum kaybını önler ve onu organizmada aktif halde tutar. Dolaşımdaki E vitamini seviyesi düşmesinin oksidatif stresin en erken ve en hassas göstergelerinden biri olduğu ileri sürülmektedir (114, 115).

3.6.2.3. C vitamini (Askorbik Asit)

C vitamini, organizmada pek çok hidroksilasyon reaksiyonlarında indirgeyici ajan olarak görev yapar. O_2^- , H_2O_2 , $RO_2^.$, aktive nötrofil, aktif Fe, sigara gibi oksidatif streslerin başlattığı LPO'nun inhibisyonunda özellikle önemlidir. C vitamini, semidehidroaskorbat (askorbil) radikal ara ürünü üzerinden kolaylıkla dehidroaskorbik aside okside olur (114).

C vitamini aynı zamanda güçlü bir antioksidandır. O_2^- , H_2O_2 ve 1O_2 ile kolayca reaksiyona girerek, onları etkisizleştirir. Sulu fazda bulunmasına karşın LPO'yu başlatıcı radikalleri temizleyerek, lipidleri ve membranları da oksidan

hasara karşı korur. E vitamininin rejenerasyonunda görev alır, tokoferoksil radikalının α -tokoferole indirgenmesini sağlar. Böylece E vitamini ile birlikte etkin bir şekilde düşük dansiteli lipoprotein (Low Density Lipoprotein-LDL)'i oksidasyona karşı korur. Ayrıca antiproteazların oksidan maddelerle inaktive olmasını engeller. C vitamininin iki önemli özelliği onu ideal bir antioksidan yapmaktadır. Birincisi, düşük elektron indirgeme potansiyeli ile biyolojik sistemlerde suda çözülebilen küçük moleküllü antioksidan olarak hareket eder. İkincisi ise, ROT ve RNT'ni temizlerken şekillenen askorbil radikalının düşük reaktivitesi ve stabilitesidir (72, 114).

C vitamini, DNA oksidasyonunun inhibisyonuyla kansere karşı koruyucudur. Bunun potansiyel mekanizması nitrozaminler gibi mutajenik bileşiklere karşı kimyasal korumadır. Ayrıca C vitamini immun sistemi uyararak da karsinogenezi azaltır. Plazma C vitamini konsantrasyonu artışıyla, yüksek dansiteli lipoprotein (High Density Lipoprotein-HDL) kolesterol konsantrasyonu artışı ve LDL kolesterol konsantrasyonu azalması arasında anlamlı ilgi bulunduğu bildirilmiştir (72). C vitamini, tokoferol, β -karoten ve selenyum kombinasyonunun verilmesinin plazma lipid peroksitlerinde azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (116).

3.6.2.4. Karotenoidler

Karotenoidler, doğada yaygın olarak bulunan havuç, brokoli, domates, kırmızı biber, su kabağı gibi sebze ve meyvelere parlak rengini veren moleküllerdir. Karotenoidler meyve, sebze ve bitkilerde, kırmızı, sarı ve turuncu renklerden sorumlu doğal pigmentlerden oluşur. Sebze ve meyvelerde bulunan

karotenoidler oksidatif hasarlara karşı koruyucu etkiye sahiptir. Oksidanların zararlı etkisini önleyen enzimlerin aktivasyonu, immün sistemin uyarılması, hücre çoğalması ve apoptozuna ilişkin gen ekspresyonunu, hormon metabolizması ve antibakteriyel ve antiviral etkileri düzenleyerek etkilide olmaktadır (117).

β -karoten O_2^- temizler, 1O_2 bastırır ve peroksit radikalleriyle etkileşerek antioksidan vazife görür. Bu etkisi konjuge alkil yapısında serbest organik peroksit radikallerinin stabilizasyonu ile gerçekleşir. β -karotenin insanlarda ışığa duyarlı (fotosensitiv) hastalıklara karşı koruyucu olduğu bildirilmiştir (102, 114).

LDL yapısında bulunan β -karotenler, LDL'yi oksidasyondan korur. Dolaşımdaki A vitamini konsantrasyonu, oksidatif stresin öncü göstergelerinden birisidir. Kansersiz vakalarda β -karoten düzeyinin düşük bulunması, β -karotenden zengin diyetle beslenmenin kanserlerin gelişme riskini azaltacağı fikrini doğrulamaktadır (114, 117, 118).

3.6.3. Doğal Antioksidanlar

Son derece zengin bitki örtüsüne sahip olduğumuz ve günümüzde değerini arttıran fotokimyasalların bol bulunduğu sebze, meyve, kabuklu yiyecekler ve tahılların insanlardaki çeşitli hastalıklara karşı içerdikleri antioksidanlardan dolayı koruyucu olduğu, ayrıca gıda teknolojisinde kullanılan sentetik antioksidanların kanserojen etkiler yaratabildiğini düşündüğümüzde, bitkisel doğal ürünlerin kullanımının ve biyokimyasal yaklaşımın nedenli önemli olduğu anlaşılmaktadır (119).

Vitamin C, vitamin E ve karotenoidlerden başka antioksidanların çoğu gıda bileşiği olarak bulunur. Önemli aktiviteye sahip antioksidanlar çilek, kiraz,

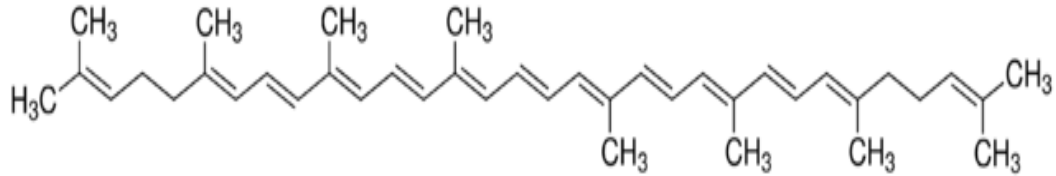
turunçgiller ve kivide, kuru erik ve zeytinde, aynı zamanda zeytinyağı ve meyve sularında da yüksek antioksidan aktivite belirlenmiştir (119).

3.7. Likopen

Altıyüzün üzerinde karotenoid çeşidi bilinmektedir. Likopen karoten gurubunun en önemli üyesi olup sadece C ve H atomlarından oluşmakta ve karotenoidleri içeren sebze ve meyvelerde bulunmaktadır. Likopen insan vücudunda sentezlenememekte, ancak depo edilebilmektedir. Kuvvetli bir antioksidan olan likopen, aynı zamanda yangı giderici ve antikanserojen özelliklere sahip bir vitamindir (120).

3.7.1. Likopenin Yapısı

Likopen; simetrik düzlemde alifatik, yani düz zincirli bir hidrokarbondur. Özellikle yağdan zengin dokular olan deride, karaciğerde, testisler ve prostatta bol miktarda bulunur. Tetraterpen ($C_{40}H_{64}$) yapıda olup, 8 tane izopren (C_5H_8) ünitesinin birleşmesinden meydana gelmektedir. Likopen, yapısında 11 tane konjuge ve 2 tane konjuge olmayan toplam 13 tane çift bağ ve β -iyonon halkası içermemektedir (121, 122) (Şekil 14).



Şekil 14: Likopenin Kimyasal Yapısı (122)

Likopenin diyet içerisindeki başlıca kaynakları domates ve bu sebzeden elde edilen ketçap, sos ve domates suyu gibi ürünlerdir. Karpuz, greyfurt ve kavun likopen içeren diğer besin gruplarıdır (120, 123).

Uzun zincir şeklindeki asiklik, aşırı hidrofobik yapısı ve içerdiği konjuge çift bağ nedeniyle antioksidan aktivite gösterir. Likopen; retinol, α -tokoferol ve karotenoidler gibi oksijen radikallerini yok ederek antioksidan özellik gösterir (120, 124). Anguelova ve Warthesen (125), likopenin antioksidan aktivitesinin α -karoten ve β -karotenin antioksidan aktivitelerinden daha yüksek olduğunu saptamışlardır.

Likopen siklooksijenaz ve lipooksijenaz enzimlerini düzenleyerek pro-enflamatuar moleküllerden prostoglandin, prostasiklin, trombonsan ve lökotrien sentezini baskılar. Bu sebeple yangıya yol açan reaksiyonlar önlenmiş olur (120, 124).

3.7.2. Likopenin Antioksidatif Etkisi

Likopen, diğer serbest radikallerin oluşumuna sebep olan 1O_2 'yi ortadan kaldırmada etkilidir. 1O_2 'nin giderildiği süreçte enerji likopen molekülüne transfer edilir. Değişim sırasında enerji bakımından zengin bir bileşik oluşur. Likopen, enerjiiyi fiziksel dönme veya ısı şeklinde dağıtarak eski haline döner ve başka serbest radikalleri ortadan kaldırmak için bileşikten ayrılır. Likopenin SOD ve GSH-Px aktivitesini artırdığı, LPO'nun son ürünü olan MDA düzeyini düşürdüğü ve GSH'ı artırdığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (126-128).

Likopen, biyolojik membran modelleri içinde lipozomlara benzeyen mükemmel bir O_2^- temizleyicisidir. Likopen hücre dışında güçlü bir antioksidan

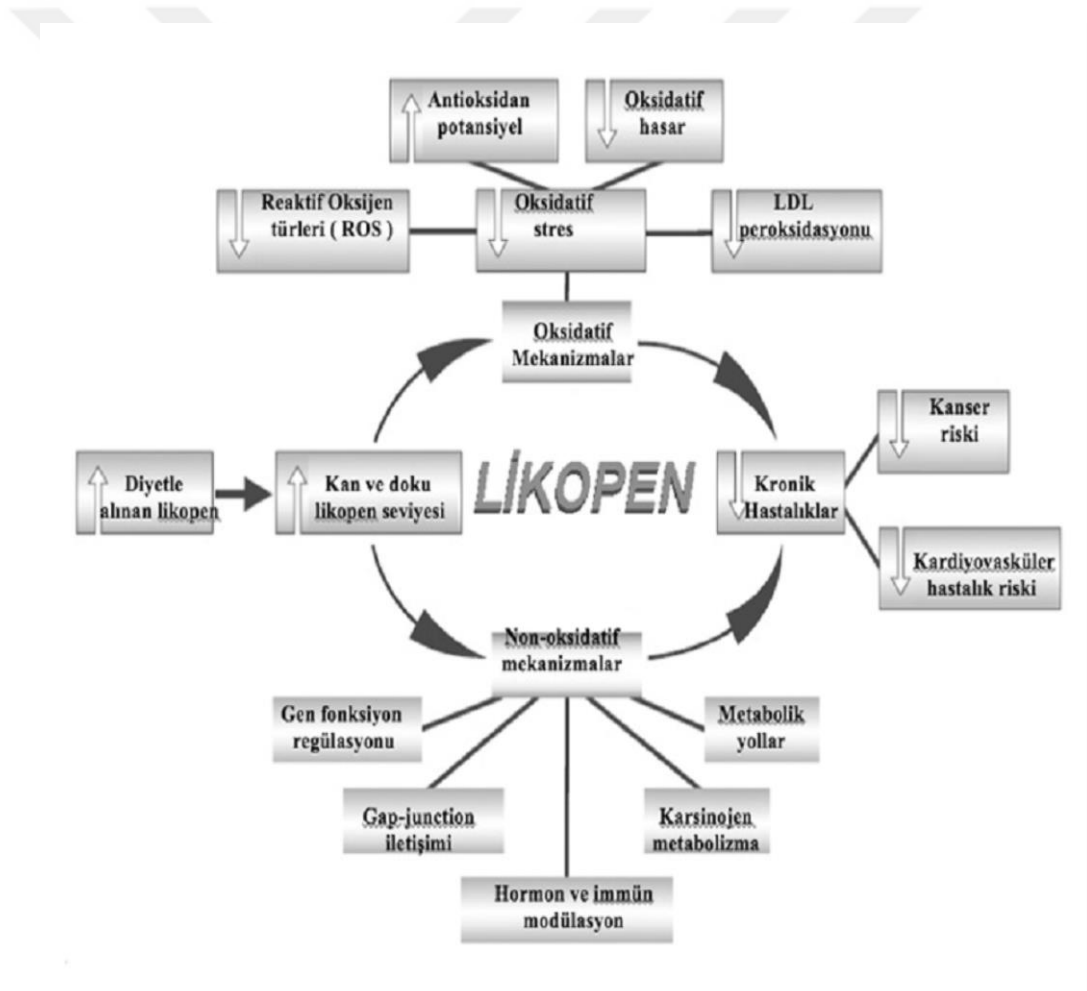
özelliik gösterirken hücre içinde DNA, protein ve lipidlerin oksidasyonuna karşı koruyucu etkiye sahiptir. Likopenin ratlarda in vivo olarak ve hücre kültüründe oksidatif DNA hasarını azalttığı da tespit edilmiştir (129, 130). Ayrıca çok sayıda yapılan klinik çalışmalarda domates tüketiminin, insan lökositlerin deoksidatif DNA hasarını önlediği bulunmuştur (131, 132). Yapısında β -iyonon halkası içeren β -karoten ile karşılaştırıldığında, likopenin β -iyonon halkası içermemesi veya diğer bir deyişle β -iyonon halkasının açık olması sebebiyle, ROT'ni daha etkin olarak tutabilmektedir. Ayrıca, konjuge çift bağ sayısı çoğaldıkça O₂ tutma yeteneği de çoğalmaktadır. Yapısında 11 tane konjuge çift bağ içeren likopen, 9 tane konjuge çift bağ içeren β -karotene göre aktif oksijen türlerini çok daha etkin tutabilmektedir (133).

Likopen bakımından zengin diyetin prostattaki oksidatif DNA zararını azalttığı tespit edilmiştir. Likopenin antioksidan özellikleri yanı sıra antikanserojen, gelişim faktörleri, bazı hormonlar ve sitokinlerin sinyal iletimi, hücresel haberleşme ve hücre nekrozlarını düzenleme gibi önemli biyolojik süreçlerde rol oynadığı belirlenmiştir (134).

3.7.3. Likopenin Metabolizması ve Fonksiyonları

İnsanlar 50'den fazla diyete bağlı karotenoidi absorbe ve metabolize edebilir. α -karoten, β -karoten, β -kriptoksantin, lutein ve likopen insan kanında en bol bulunan karotenoidlerdir. Likopen, insan metabolizmasında en baskın karotenoiddir. Likopen seviyeleri, çeşitli biyolojik durumlarda ve yaşam şartlarında etkilidir (135).

Likopen, hücreleri serbest radikal hasarından korumasının yanı sıra, hücreler arasındaki bağları güçlendirmekte ve hücre metabolizmasını geliştirmektedir. Yağda çözünen yapısı nedeniyle ciltte de antioksidan koruyucu etki gösterir. Ultraviyole ışınlarına karşı koruma sağlar. Aynı zamanda kolesterol düşürücü özelliği vardır. Göğüs, rahim, karaciğer, prostat kanserlerinden koruyan, alzheimer hastalığını önleyen, kalp damar hastalıkları, kemik ve cilt sağlığı açısından koruyucu etkisi bulunan likopen, antioksidan özelliğiyle yaşlanma sürecini yavaşlatmaktadır (136, 137) (Şekil 15).



Şekil 15: Likopenin Etkileri (136)

Diyetle alınan likopen, vücuttaki likopen düzeyini artırabilir ve bir antioksidan olarak hareket eder. ROT'ni yakalayarak toplam antioksidan potansiyeli arttırarak oksidatif hasarı azaltır. Düşük oksidatif stres, kanser ve kardiyovasküler hastalık riskinin azalmasına yol açabilir. Alternatif olarak, vücutta artan likopen durumu, gen fonksiyonlarını düzenleyerek hücre içi iletişimi geliştirir, hormon ve bağışıklık yanıtı harekete geçirir veya metabolizmayı düzenler, böylece kronik hastalık riskini azaltır (137, 138).

Likopenin bağışıklık sistemi üzerindeki etkilerinin araştırıldığı çalışmalarda, serum likopen seviyesi ile immünoglobulin arasında önemli bir negatif korelasyon bulunmuştur. Serum likopen seviyeleri ve immünoglobulin G ve immünoglobulin M ile ilişkilidir. Yağ kütlelerinin miktarının değişmesi serum immünoglobulin G ile direkt ilişkilidir fakat serum immünoglobulin M ile ters ilişkilidir. Likopen T hücrelerine bağlı adaptif (pro-atherjenik) humoral immün etkiyi azaltarak uzun süreli diyabet komplikasyonlarında özellikle aterogenezisde önleyici etkiler sağlayabilir. Sitokin etkiyi azaltarak, akciğerlerdeki alerjik inflamasyonu sistematik olarak azaltmaktadır. Ayrıca likopen takviyesinin astıma karşı koruyucu bir etkiye sahip olabileceği bildirilmektedir (138, 139).

Shidfar ve ark. (140), likopen ve diğer antioksidanlar bakımından zengin olan çığ domatesin günlük 200 g tüketiminin Tip 2 diyabetlilerde kan basıncına ve apolipoproteine etki ederek kardiyovasküler riskin düşürülmesinde faydalı olabileceğini bildirmektedirler. Karoten türevleri olan β -kriptoksantin, likopen ve α -karotenin yüksek plazma konsantrasyonlarının karotid atherosklerozis ile ilişkili olabileceği de gösterilmiştir (141).

3.8. Moleküler Analizler ve Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR, Real Time Polymeraze Chain Reaction)

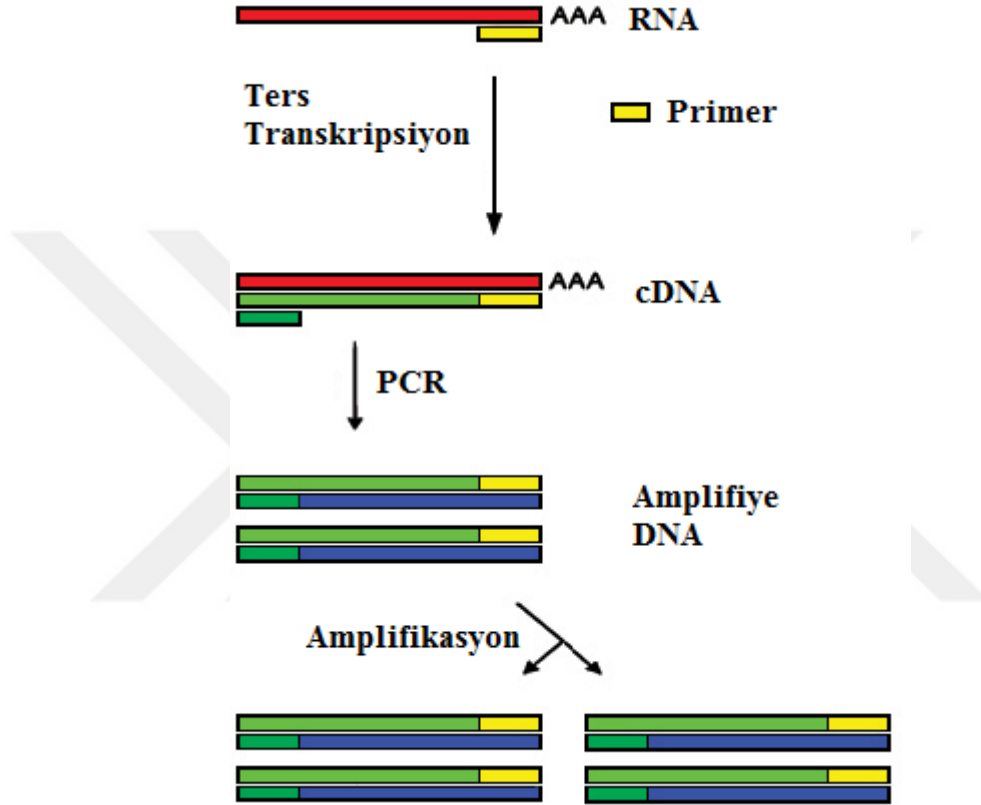
RT-PCR, DNA amplifikasyonu ile eş zamanlı olarak artış gösteren floresans sinyalin ölçülmesi ile kantitatif sonuç verebilen bir PCR yöntemidir (142).

Bilim ve tıp alanındaki çalışmalarda nükleik asit miktarı belirleme analizleri içerisinde en etkili tekniğin RT-PCR olduğu ortaya konmuştur. Bu teknik seksenli yılların ortasında Kary Mullis ve çalışma arkadaşları tarafından geliştirilen PCR'ın ileri bir versiyonudur. Klasik PCR ile çok karmaşık bir örnekten herhangi bir nükleik asit dizisini analiz etmek için çok sayıda döngüsel işlemle istenilen miktarda çoğaltmak mümkündür. Ancak bu işlem tek başına matematiksel olarak ürün miktarı hakkında bilgi sağlamamakla birlikte sonrasında da ürün miktarını net olarak belirlemek oldukça güçtür. Çünkü klasik PCR başlangıçta var olan DNA miktarından bağımsız olarak bir ürün miktarı ortaya çıkar. RT-PCR tekniği ile DNA dizileri eş zamanlı olarak çoğaltılmış ve belirlenebilmiş, reaksiyon süresi boyunca oluşan ürünün miktarını RT-PCR sırasında gözlemek mümkün olmuştur (142, 143) (Şekil 16).



Şekil 16: RT-PCR Çalışma Akışı

Amplifikasyonun her basamağının takip edilebilmesi RT-PCR'ı özel kılan en önemli özelliğidir. Amplifikasyon eğrileri üzerinde tüm amplifikasyon profili gözlenebilmektedir. Bu imkan reaksiyon için kullanılan primerler ve hedefe özgü floresan işaretli probalar ile sağlanır (142-144) (Şekil 17).



Şekil 17: RT-PCR Reaksiyonu (144)

PCR tıp alanında konvensiyonel metodlar ile tanısı mümkün olmayan birçok hastalığın tanımlanmasında (145, 146), genetik yapısı değiştirilmiş bitki ve mikroorganizmaların tanımlanmasında (147) moleküler klonlama alanında (148) yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca PCR analizlerinin; Engelke ve ark. (149) tarafından genetik bozuklukların teşhisinde, Ou ve ark. (150) tarafından patojen organizmaların nükleik asit dizilerinin belirlenmesinde, Higuchi ve ark. (151) tarafından adli örneklerin genetik tanımlanmasında, Farr ve ark. (152) tarafından

aktif onkojenlerdeki mutasyonların analizlerinde kullanılmaya başlanmış olması PCR analizlerinin üst düzeyde uygulama alanı bulduğunu göstermektedir.

Analizlerde farklı kantitatif RT-PCR metodları kullanılmaktadır (153).

- **Mutlak Kantifikasyon (Absolute Quantification):** Hedefin konsantrasyonu mutlak değerler olarak ifade edilir. Mutlak kantifikasyon konsantrasyonları önceden bilinen seri olarak dilüe edilmiş eksternal standartların kullanımıyla oluşturulan standart bir eğri yardımıyla yapılır. Konsantrasyonları bilinmeyen örneklerin konsantrasyonlarının belirlenmesi crossing points (Cp) değerlerinin belirlenmesi ile sağlanır. (Cp değeri, PCR içindeki her eğriye ait PCR ürünü miktarını gösterdiği varsayılan bir örneğin PCR amplifikasyonuna başladığı noktayı ifade eder) (153).

- **Rölatif Kantifikasyon (Relative Quantification):** Hedefin konsantrasyonu hedefin belli bir referansa oranı olarak ifade edilir. Bu metot ile hedef ve referans genin konsantrasyonlarını belirleyebilmek için her ikisine ait standart eğrilerin kullanımına ihtiyaç duyulur (153).

Çalışmada; DEN'in kan ve karaciğer dokularında MDA, GSH düzeyleri ile CAT, GSH-Px, GST ve SOD aktiviteleri ve CAT enziminin gen ekspresyonları üzerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. DEN'in oluşturacağı hasarı göstermek amacıyla plazma AST, ALT, ALP, LDH enzim aktiviteleri ve kolestrerol düzeyindeki değişimler de belirlenmiştir.

4. GEREÇ VE YÖNTEM

4.1. Deney Hayvanlarının Bakım ve Beslenmeleri

Çalışmada 3 aylık toplam 56 adet Wistar-Albino ırkı erkek rat kullanılmıştır. Araştırmaya başlamadan önce Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan araştırma için etik kurul izni (2014/18) alınmıştır. Deney hayvanları Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezinden temin edilmiştir. Deneysel uygulamalar laboratuvar hayvanlarının bakımı ve kullanımı şartlarına (12 saat aydınlık: 12 saat karanlık ve 24±3°C) uygun olarak yürütülmüştür. Deneysel uygulamalar süresince ratlara standart ticari rat yemi (pellet yem) ve musluk suyu *ad libitum* sağlanmıştır (Tablo 4).

Tablo 4: Rat Yeminin Bileşimi

Maddenin Adı	Değer
Su	En çok (%) 12
Ham Protein	En az (%) 24
Ham Selüloz	En çok (%) 7
Ham Kül	En çok (%) 8
Hidroklorik Asitte Çözünmeyen Kül	En çok (%) 2
Sodyum Klorür (NaCl)	En çok (%) 1
Ca	En az – En çok (%) 1 – 2,8
Fosfor	En az (%) 0,9
Sodyum	En az – En çok (%) 0,5 – 0,7
Metabolik Enerji Kcal/kg	En az (%) 2,65

Kullanılan Ham Maddeler: Buğday, Arpa, Soya Küspesi, Fındık Küspesi, Ayçiçek Tohumu Küspesi, Pamuk Tohumu Küspesi, Mısır Proteini, Rasmol, Balık Unu, Tuz, Mermer Tozu, Melas, Tapiyoka, Sorgum, Kolza Küspesi, Sentetik Lisin, Sentetik Methionin, Premiksler, Kepek, Süt Tozu

4.2. Kullanılan Gereçler

4.2.1. Cihazlar:

- Real-Time PCR Cihazı (Applied Biosystem 7500 Fast)
- Spektrofotometre (Thermo-Genesis 10S UV-VIS)
- Soğutmalı Santrifüj (NÜVE NF800R)
- Mikrosantrifüj (Hettich Mikro 200R)
- Tissue-Lyser (Next Advance Bullet Blender)
- Homojenizatör (CAT R50D)
- Derin Dondurucu (İlShin)
- pH Metre (Thermo Scientific Orion Star A111)
- Su Banyosu (NÜVE ST 402)
- Hassas Terazi (Sartorius)
- Vorteks (Heidolph)

4.2.2. Kimyasal Maddeler

Çalışmamızda kullanılan bütün kimyasal maddeler analitik saflıkta olup Qiagen, Sigma, Merck, DMS firmalarından satın alınmıştır. RNAlater (Qiagen), RNAesy Plus Mini Kit (Qiagen), RNAesy Protect Animal Blood Kit (Qiagen), First Strand Kit (Qiagen), RT² SYBR qPCR Green Master Mix (Qiagen), RT² qPCR Primer Assay for Rat CAT (Qiagen), RNAprotect Animal Blood Tubes (Qiagen), Glutatyon redüktaz (Sigma), NADPH (Sigma), Ksantin (Sigma), Sığır Serum Albumini (Sigma), TBA (Merck), Folin-Ciocaltu's phenol (Merck), Likopen (DSM).

4.3. Yöntemlerin Uygulanması

4.3.1. Deneysel Hayvanlarının Hazırlanması

Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezinden temin edilmiş 56 adet Wistar-Albino erkek rat her grupta 7 rat olacak şekilde rastgele seçilerek 8 gruba ayrılmıştır. Kontrol grubu ratlara herhangi bir işlem uygulanmamıştır. Diğer gruplar ise aşağıdaki şekilde oluşturulmuştur (Tablo 5).

Hayvanlar 8 gruba ayrılmıştır:

- 1. Grup:** Kontrol grubu (Ratlara tedavi verilmemiştir)
- 2. Grup:** Likopen uygulanan grup (10 mg/kg, gün aşırı, gavaj, 10 gün)
- 3. Grup:** Kısa süreli DEN uygulanan grup (200 mg/kg, i.p., tek doz, 30 gün)
- 4. Grup:** Uzun süreli DEN uygulanan grup (200 mg/kg, i.p., tek doz, 90 gün)
- 5. Grup:** Likopen (DEN uygulamasından 10 gün önce başlanmış, 10 mg/kg, gün aşırı, gavaj, 10 gün) + DEN (200 mg/kg, i.p., tek doz, 30 gün)
- 6. Grup:** Likopen (DEN uygulamasından 10 gün önce başlanmış, 10 mg/kg, gün aşırı, gavaj, 10 gün) + DEN (200 mg/kg, i.p., tek doz, 90 gün)
- 7. Grup:** DEN (200 mg/kg, i.p., tek doz, 30 gün) + Likopen (10 mg/kg, gün aşırı, gavaj, 10 gün, DEN uygulaması ile beraber başlanmış)
- 8. Grup:** DEN (200 mg/kg, i.p., tek doz, 90 gün) + Likopen (10 mg/kg, gün aşırı, gavaj, 10 gün, DEN uygulaması ile beraber başlanmış)

Tablo 5: Deney Grupları ve Uygulama Süreleri

Deney Grupları	Yapılan Uygulamalar	Süre (Gün)
Grup 1 (Kontrol)	Herhangi bir uygulama yapılmamıştır.	30
Grup 2 (Likopen)	Likopen uygulanmıştır.	10
Grup 3 (DEN1)	Kısa süreli DEN uygulanmıştır.	30
Grup 4 (DEN2)	Uzun süreli DEN uygulanmıştır.	90
Grup 5 (Likopen+DEN1)	Likopen, DEN uygulamasından 10 gün önce başlanmıştır.	10+30
Grup 6 (Likopen+DEN2)	Likopen, DEN uygulamasından 10 gün önce başlanmıştır.	10+90
Grup 7 (DEN1+Likopen)	Likopen, DEN uygulaması ile başlanmıştır.	30
Grup 8 (DEN2+Likopen)	Likopen, DEN uygulaması ile başlanmıştır.	90

4.3.2. DEN ve Likopen Uygulaması

DEN, her rat için 200 mg/kg dozunda serum fizyolojik (%0,9'luk NaCl) içinde çözülerek hazırlanmıştır. DEN, 3, 4, 5, 6, 7 ve 8. gruplardaki (DEN1, DEN2, Likopen+DEN1, Likopen+DEN2, DEN1+Likopen ve DEN2+Likopen grupları) ratlara i.p. olarak tek doz uygulanmıştır. 3, 5 ve 7. gruplardaki ratlar DEN uygulamasından 30 gün sonra; 4, 6 ve 8. gruplardaki ratlar ise DEN uygulamasından 90 gün sonra sakrifiye edilmiştir (154).

Likopen 10 mg/kg dozunda gavaj yoluyla gün aşırı uygulanmıştır. Likopen uygulamasına, 5. ve 6. gruplarda (Likopen+DEN1, Likopen+DEN2) DEN uygulamasından 10 gün önce, 7. ve 8. gruplarda (DEN1+Likopen, DEN2+Likopen) ise DEN uygulaması ile beraber başlanmış ve toplam 10 gün süre ile uygulanmıştır (155).

4.3.3. Örneklerin Toplanması ve Biyokimyasal Analizler

Uygulamaların sonunda ratlar sakrifiye edilerek kan ve karaciğer doku örnekleri alınmıştır. Kan örnekleri antikoagülan (EDTA) içeren tüplerde toplanmış ve plazmalarını ayırmak için +4°C'de 3.000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Plazma örneklerinde aspartat transaminaz (AST), alanin transaminaz (ALT), alkalen fosfataz (ALP), laktat dehidrogenaz (LDH) enzim aktiviteleri ve kolesterol düzeyi tayinleri otoanalizörde (Cobas 8000 modular analyzer series: Roche) yapılmıştır. Tam kan GSH ve GSH-Px, serum fizyolojik ile yıkanmış eritrositler CAT, SOD, plazmalar ise MDA tayini için kullanılmıştır. Kan örnekleri ile karaciğer doku örnekleri biyokimyasal analizler yapılncaya kadar -80°C'de saklanmıştır. Analizler öncesinde karaciğer dokuları serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra distile su ile 1:10 oranda sulandırılarak homojenizatörde homojenize edilmiştir. Homojenat soğutmalı santrifüjde (NÜVE NF 800R) MDA, GSH, CAT, GST ve SOD analizleri için 3.500 rpm'de 15 dk, GSH-Px analizi için ise 14.000 rpm'de 55 dk santrifüj edilmiş ve süpernatantlar alınmıştır.

RT-PCR analizleri için kan örnekleri RNA stabilizasyon solüsyonu içeren tüplere (RNAprotect Animal Blood Tubes) alınarak saklanmış, doku örnekleri ise analizler için RNAlater solüsyonu içine alınarak çalışılacağı güne kadar -80°C'de muhafaza edilmiştir.

4.4. Kan Örneklerinin Hazırlanması

4.4.1. MDA Tayini için Hazırlanması

MDA tayini için alınan EDTA'lı kan örnekleri 3.000 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek plazmaları ayrılmış ve plazmada MDA düzeylerine bakılmıştır.

4.4.2. GSH Tayini için Hazırlanması

Tam kanın distile su ile 1:10 oranında sulandırılması ile elde edilen hemolizatlarda Hb tayini yapılmıştır, dilüe edilen kanın 1:2,5 oranında çöktürücü solüsyonuyla sulandırılması ile elde edilmiş hemolizatlarda ise GSH düzeyleri ölçülmüştür.

4.4.3. CAT Tayini için Hazırlanması

Plazması ayrılan EDTA'lı kan örnekleri, serum fizyolojik ile 3 kez yıkandıktan sonra eritrositler 1:5 oranında distile su ile sulandırılarak Hb tayini yapılmıştır. Daha sonra dilüe edilmiş bu kan örnekleri 1:100 oranında fosfat tamponuyla (50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, pH:7.0) tekrar sulandırılmış ve hazırlanmış bu hemolizatlarda CAT aktivite tayini yapılmıştır.

4.4.4. GSH-Px Tayini için Hazırlanması

Tam kanın distile su ile 1:20 oranında sulandırılmasıyla elde edilen hemolizatlarda GSH-Px aktivite tayini, 1:5 oranında sulandırılması ile elde edilmiş hemolizatlarında ise Hb tayini gerçekleştirilmiştir.

4.4.5. SOD Tayini için Hazırlanması

Plazması ayrılan EDTA'lı kan örnekleri, serum fizyolojik ile 3 kez yıkandıktan sonra, eritrositler 1:5 oranında deiyonize su ile sulandırılarak Hb tayini yapılmıştır. Daha sonra dilüe edilmiş bu kan örnekleri 1:2 oranında

kloroform/etanol solüsyonu (3/5-V/V) ile tekrar dilüe edilerek SOD aktivite tayini yapılmıştır.

4.5. Doku Örneklerinin Hazırlanması ve Homojenizasyonu

4.5.1. MDA, GSH, CAT, GST ve SOD Tayini için Doku Örneklerinin Hazırlanması ve Homojenizasyonu

Doku örnekleri iki süzgeç kağıdı arasında suyu alındıktan sonra tartılarak distile su ile 1:10 oranında (ağırlık/hacim) sulandırılıp, kırılmış buz içerisinde Potter-Elvehjem cam-cam homojenizatör vasıtasıyla homojenize edilmiş ve soğutmalı santrifüjde 3.500 rpm'de 15 dk santrifüj edildikten sonra elde edilen süpernatantlarda MDA, GSH, CAT, GST, SOD ve protein tayini yapılmıştır.

4.5.2. GSH-Px Tayini için Doku Örneklerinin Hazırlanması ve Homojenizasyonu

Doku örnekleri iki süzgeç kağıdı arasında kurutulduktan sonra tartılarak distile su ile 1:10 oranında (ağırlık/hacim) sulandırılıp, kırılmış buz içerisinde homojenize edilmiş ve oluşan homojenatlar 1,5 ml'lik ependorflara konularak soğutmalı santrifüjde 14.000 rpm'de 55 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonunda süpernatantlar ayrılmış ve alınan bu süpernatantlarda GSH-Px aktivitesi ve protein düzey tayini gerçekleştirilmiştir.

4.6. Kanda ve Dokuda MDA, GSH, CAT, GSH-Px, GST, SOD, Protein ve Hemoglobin Analizleri için Kullanılan Yöntemler

4.6.1. Plazma ve Dokuda MDA Düzeyinin Tayini

Prensip: MDA tayini Placer ve ark. (156) tarafından modifiye edilen yönteme göre yapılmıştır. Bu yöntem LPO'nun aldehit ürünlerinden biri olan MDA ile TBA'nın reaksiyonu temeline dayanmaktadır. Oluşan MDA, TBA ile pembe renkli bir kompleks oluşturmakta ve bu çözeltinin absorbanı 532 nanometre (nm)'de spektrofotometrik olarak ölçülerek LPO'nun derecesi saptanmıştır (Tablo 6).

Metodun Ayıraçları

- 1- TBA:** 0,67 g TBA 80 ml %10'luk perklorik asitte çözülür ve 100 ml'ye distile su ile tamamlanır.
- 2- %10'luk Triklorasetik Asit (TCA):** 10 g TCA distile suda çözülerek 100 ml'ye tamamlanır. Ayıraç koyu renkli şişede oda sıcaklığında saklanır.
- 3- Standart:** 1,1,3,3 Tetraetoksiopropan
- 4- Renk Ayıracı:** 3 kısım TCA solüsyonu ve 1 kısım TBA solüsyonu reaktif şişeye konularak 1 dk magnetik karıştırıcıda karıştırılır. Ayıraç günlük hazırlanır.

Deneyin Yapılışı

Tablo 6: MDA Düzey Ölçümü

	Kör (ml)	Standart (ml)	Örnek (ml)
Örnek	-	-	0,25
Standart	-	0,25	-
Serum Fizyolojik	0,25	-	-
Renk Ayıracı	2,25	2,25	2,25

Tüpler karıştırıldıktan sonra 100°C 20 dk bekletilmiştir. Musluk suyu altında soğutma işleminden sonra tüpler 3.000 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek üst faz absorbansı 532 nm'de okunmuştur.

Kanda ve Dokuda MDA Düzeyinin Hesaplanması

$$\text{MDA} = \frac{\text{Örneğin Absorbansı}}{\text{Standartın Absorbansı}} \times \text{Standartın Konsantrasyonu}$$

Plazmadaki MDA düzeyi nmol/ml, dokudaki MDA düzeyi nmol/g doku olarak hesaplanmıştır.

4.6.2. Kan ve Dokuda GSH Düzeyinin Tayini

Prensip: GSH tayini Ellman ve ark. (157) tarafından bildirilen metotla yapılmıştır. 5.5'-dithiobis-(2-nitrobenzoik asit) (DTNB), NADPH ve GR varlığında enzimatik döngü prosedürü ile ölçülmektedir. Bu metot DTNB eklendiğinde sülfidril gruplarının oldukça stabil sarı renk oluşturması temeline dayanan spektrofotometrik bir yöntemdir (Tablo 7).

Metodun Ayraçları

- 1- Çöktürücü Solüsyon:** 1,67 g glasiyel metafosforik asit, 0,20 g disodyum EDTA, 30 g NaCl tartılır 100 ml distile suda çözülür. +4°C'de 3 hafta dayanıklıdır.
- 2- 0,3 M Na₂HPO₄:** 42,60 gNa₂HPO₄ tartılır ve distile ile 1 L'ye tamamlanır. +4°C'de saklanır.
- 3- DTNB:** 20 mg DTNB %1'lik Na-sitrat çözeltisi ile 100 ml'ye tamamlanır. +4°C'de saklanır.
- 4- GSH Standartı:** 2 mg/dl GSH solüsyonu hazırlanır.

Deneyin Yapılışı

Deney esnasında örnekler üzerine çöktürücü solüsyondan konulup, vortekslenmiş ve 3.000 rpm'de 30 dk santrifüj edilmiştir. Elde edilen süzöntü deney ortamında kullanılmıştır.

Tablo 7: GSH Düzey Ölçümü

	Kör (ml)	Standart (ml)	Örnek (ml)
Örnek	-	-	1
Standart	-	1	-
Distile Su	1	-	-
Çöktürücü	1,5	1,5	1,5
	3.000 rpm de 30 dk santrifüj		
Süzöntü	0,25	0,25	0,25
Na ₂ HPO ₄	1	1	1
DTNB	0,125	0,125	0,125

Deney tüpleri hazırlandıktan sonra vortekslenmiş ve 412 nm'de köre karşı absorbanslar okunmuştur.

Kanda ve Dokuda GSH Düzeyinin Hesaplanması

$$\text{GSH } (\mu\text{mol/ml}) = \frac{(\text{Standartın Konsantrasyonu}) \times (\text{Örneğin Absorbansı}) \times \text{Dilüsyon}}{(\text{Standartın Absorbansı})}$$

Kanda ve dokuda GSH düzeyi $\mu\text{mol/ml}$ olarak hesaplanmıştır.

4.6.3. Kan ve Dokuda CAT Aktivitesinin Tayini

Prensip: CAT aktivitesini ölçmek için Aebi (158) metodu kullanılmıştır. CAT, H₂O₂'in yıkımını katalize eder. H₂O₂'in CAT tarafından yıkım hızı, H₂O₂'in 240 nm dalga boyunda ışığı absorbe etmesinden yararlanılarak spektrofotometrik olarak ölçülmüştür (Tablo 8).

Metodun Ayıraçları

- 1- **50 mM Fosfat Tamponu (pH: 7.0):** 6,81 g KH₂PO₄ ve 8,90 g Na₂HPO₄ (2H₂O) tartılarak 1 L distile suda çözülerek hazırlanır. Na₂HPO₄ (2H₂O) çözeltisi üzerine KH₂PO₄ ilave edilerek pH 7.0'ye ayarlanır.
- 2- **30 mM H₂O₂:** 0,34 ml %30'luk H₂O₂ fosfat tamponu ile 100 ml'ye tamamlanır.

Deneyin Yapılışı

Tablo 8: CAT Aktivite Ölçümü

	Kör (ml)	Örnek (ml)
Örnek	2	2
Fosfat Tamponu	1	-
H ₂ O ₂ Çözeltisi	-	1

240 nm'de kör ile sıfır ayarı yapıldıktan sonra örneğin 0. (A1) ve 30. (A2) saniye içindeki absorbans farkı ölçülmek suretiyle CAT aktivitesi hesaplanmıştır.

Kan ve Doku CAT Aktivitesinin Hesaplanması

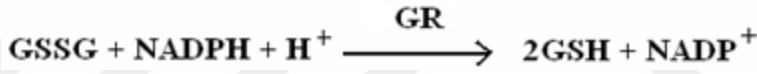
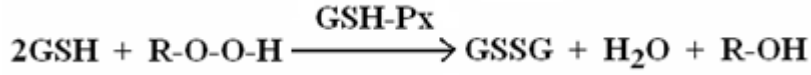
$$k = (2,3/30) \times (\log A1/A2) \times \text{Dilüsyon}$$

Eritrositte CAT aktivitesi k/g Hb, dokuda CAT aktivitesi k/mg protein olarak hesaplanmıştır.

4.6.4. Kanda ve Dokuda GSH-Px Aktivitesinin Tayini

Prensip: Eritrosit ve doku GSH-Px aktivite ölçümü için Beutler (159) metodu kullanılmıştır. GSH-Px, GSH'un GSSG'a oksidasyonunu H₂O₂ kullanarak katalizler. GSSG'nin oluşum hızı GR reaksiyonu vasıtasıyla ölçülür (Tablo 9).

Reaksiyon ortamındaki t-butilhidroperoksidin (t-BOOH) (bu enzim ölçümlerinde en uygun peroksit substratıdır) her bir molekülünün redüksiyonu için 1 mol GSSG oluşur. GSSG'nin GSH'a redüksiyonu ise GR enziminin katalizlediği reaksiyonla oluşur. Bu reaksiyonda GSSG'nin her bir molünün redüksiyonu için 1 mol NADPH okside olur.



GSH-Px aktivitesi NADPH oksidasyonunu takiben spektrofotometrik olarak 340 nm'deki sistemin optik dansite (OD)'sindeki düşüşten hesaplanır.

Metodun Ayraçları

- 1- 1 M Tris Tamponu (pH: 8.0):** 121,14 g Tris tartılarak distile suda çözülür, pH 8.0'e ayarlanır ve 1,68 g EDTA (5 mM EDTA) ilave edilerek 1 L'ye tamamlanır.
- 2- 0,1 M GSH:** 0,31 g GSH 10 ml distile suda çözülür. GSH solüsyonları taze hazırlanmış olmalıdır.
- 3- 10 U/ml GR:** 1 ml'de 10 ünite olacak şekilde distile su ile hazırlanır. 7,22 µl GR 1 ml distile suda çözülür.

4- **2 mM NADPH:** 0,07 g NADPH 30 ml distile suda çözülür.

5- **7 mM t-BOOH:** 10 µl t-BOOH 10 ml distile suda çözülür. t-BOOH günlük olarak hazırlanır.

Deneyin Yapılışı

Tablo 9: GSH-Px Aktivite Ölçümü

	Kör (µl)	Örnek (µl)
Örnek	10	10
Distile Su	670	660
Tris Tampon	100	100
GSH	20	20
GR	100	100
NADPH	100	100
37 °C'de 10 dk preinkübe edilir.		
t-BOOH	-	10

Karışımın 0. ve 2,5. dk'daki OD'sindeki azalma 340 nm'de belirlenmiştir.

Kanda GSH-Px Enzim Aktivitesinin Hesaplanması

$$U/g \text{ Hb} = \frac{\frac{OD_2 - OD_1}{t} \times \frac{1}{6.22 \times 0.01}}{\text{Hb (g/ml)}}$$

Dokuda GSH-Px enzim aktivitesinin hesaplanması

$$U/g \text{ Protein} = \frac{\frac{OD_2 - OD_1}{t} \times \frac{1}{6.22 \times 0.01}}{\text{Protein (g/ml)}}$$

OD₁: 0. dk'daki absorbans

OD₂: 2,5 dk sonundaki absorbans

t: 2,5 dk

1: Küvetin toplam hacmi (ml)

0,01: Hemolizatın hacmi (ml)

6,22: 1 µmol NADPH'in verdiği absorbans

Hb: Hemoglobin

Eritrositte GSH-Px aktivitesi U/g Hb, dokuda GSH-Px aktivitesi U/g protein olarak hesaplanmıştır.

4.6.5. Dokuda GST Aktivitesinin Tayini

Prensip: GST aktivitesi, GSH ve 1-2 dikloro,4 nitrobenzenin (CDNB) konjugasyonu sonucu oluşan ürünün (1-(S-glutatyonyl)- 2,4 dinitrobenzen)) 340 nm dalga boyunda verdiği absorbansın spektrofotometrede ölçülmesi esasına dayanan Habig ve ark. (160)'nın metoduna göre gerçekleştirilmiştir (Tablo 10).

Bir ünite enzim, 25°C'de bir dk'da 1 µmol substratı (CDNB), 1-(S glutatyonyl)-2,4 dinitrobenzene çeviren enzim aktivitesidir.

Metodun Ayıraçları

- 1- 1 mM CDNB:** 2 mg CDNB tartılır ve 10 ml etanolde çözülür.
- 2- 5 mM GSH:** 15 mg GSH tartılır ve 10 ml distile suda çözülür.
- 3- 0,1 M Tris Tamponu (pH: 7.4):** 12,10 g Tris tartılır ve distile suda çözülür.
pH 7.4'e ayarlandıktan sonra toplam hacim 1 L'ye tamamlanır.

Deneyin Yapılışı

Tablo 10: GST Aktivite Ölçümü

	Kör (ml)	Örnek (ml)
Örnek	-	0,1
Distile Su	0,1	-
CDNB	0,1	0,1
GSH	0,1	0,1
Tris Tamponu	2,2	2,2

340 nm'de 0. dk'daki ve 2. dk'daki OD'ler okunmuştur.

Dokuda GST Aktivitesinin Hesabı

$$U = \frac{OD_2 - OD_1}{\epsilon} \times \text{Dilüsyon}$$

$\epsilon=1\mu\text{mol } 1\text{-(S-glutatyonil)-2,4 dinitrobenzen'in } 1 \text{ dk'daki ekstinksiyon katsayısı.}$

Dokuda GST aktivitesi U/mg protein olarak hesaplanmıştır.

4.6.6. Kanda ve Dokuda SOD Aktivitesinin Tayini

Prensip: Bu metotta SOD aktivite ölçümü ksantin-ksantin oksidaz sistemi ile üretilen $O_2^{\cdot-}$ 'nin nitroblue tetrazolium (NBT)'u indirgeyerek renk oluşması esasına dayanır. Bu şekilde üretilen $O_2^{\cdot-}$ 'nin NBT'u indirgemesi 560 nm'de maksimum absorbands veren mavi renkli formazon oluşumu ile sonlanır (161).

Ortamda enzim olmadığı durumda bu indirgenme maksimal olup, koyu mavi bir renk oluşmaktadır. Ortamda SOD varlığında ise enzim $O_2^{\cdot-}$ 'ni H_2O_2 'e çevirmekte böylece NBT indirgenmesi azalmakta ve renk değişikliği meydana gelmemektedir. Renkli formazon oluşumu ortamın enzim konsantrasyonu ile ters

orantılı olarak gerçekleşmektedir. Böylece oluşan formazonun 560 nm'de verdiği absorbanstan SOD aktivitesi hesap edilmektedir (Tablo 11).

Metodun Ayıraçları

1- Assay Reaktifi

- a) **0,3 mM Ksantin:** 9,13 mg alınıp 200 ml distile suda çözülür.
- b) **0,6 mM Na₂EDTA:** 23 mg alınıp 100 ml distile suda çözülür.
- c) **0,15 mM NBT:** 12,3 mg alınıp 100 ml distile suda çözülür.
- d) **400 mM Na₂CO₃:** 2,54 g alınıp 60 ml distile suda çözülür.
- e) **1 g/L Sığır Serum Albumini (BSA):** 30 mg alınıp 30 ml distile suda çözülür.

Hepsi karıştırılarak (toplam 490 ml) koyu renkli şişede +4°C'de saklanır.

- 2- **Ksantin Oksidaz (167 U/L):** 0,167 U/ml olacak şekilde 2 M amonyum sülfat ((NH₄)₂SO₄) içinde çözülür.
- 3- **2M (NH₄)₂SO₄:** 2,64 g (NH₄)₂SO₄ tartılır bir miktar distile suda çözülür ve total hacim 10 ml'ye tamamlanır.
- 4- **0,8 mM Bakır (II) Klorid (CuCl₂):** 10,75 mg CuCl₂ alınıp bir miktar distile suda çözülerek total hacim 100 ml'ye tamamlanır.

Deneyin Yapılışı

1/5 oranında dilüe edilmiş eritrosit hemolizati eşit hacimde kloroform/etanol (3/5-V/V) ile karıştırılmış ve 5.600 rpm'de 45 dk santrifüj edilmiştir. En üstteki berrak kısım SOD aktivite tayininde kullanılmak üzere ayrılmıştır.

Tablo 11: SOD Aktivite Ölçümü

	Kör (ml)	Örnek (ml)
Süpernatant	-	0,1
Deiyonize Su	0,1	-
Reaksiyon Çözeltisi	2,85	2,85
Ksantin Oksidaz	0,05	0,05
25°C'de 20 dk süreyle inkübe edilmiştir.		
CuCl₂	1	1

CuCl₂ ilave edilerek reaksiyon durdurulmuştur. Reaksiyon çözeltisine karşı kör ve numunenin absorbanslarının ölçümü spektrofotometrede 560 nm'de yapılmıştır.

Kanda ve Dokuda SOD Aktivitesinin Hesabı

$$\% \text{ İnhibisyon} = \frac{\text{Örneğin Absorbansı} - \text{Körün Absorbansı}}{\text{Körün Absorbansı}} \times 100$$

1 Ünite SOD: %50'lik NBT inhibisyonu meydana getiren enzim miktarıdır.

$$\text{U/ml SOD} = \frac{\% \text{ İnhibisyon}}{\%50 \text{ İnhibisyon}} \times \text{Dilüsyon}$$

Eritrositlerde SOD aktivitesi U/g Hb, dokuda SOD aktivitesi U/mg protein olarak hesaplanmıştır.

4.6.7. Hemoglobin Tayini

Prensip: Hemolizatlarda Hb tayini siyanomethemoglobin yöntemi (162) ile yapılmıştır. Ferrisiyanür Hb'deki Fe⁺²'yi oksitleyerek +2 değerden +3 değerli Fe'e çevirir, methemoglobine dönüşmesini sağlar. Bunu takiben potasyum siyanid (KCN) ile stabil bir pigment olan siyanomethemoglobin meydana gelir. Siyanomethemoglobinin absorbanansı 546 nm'de okunur (Tablo 12).

Metodun Ayraçları

- 1- Drabkin Çözeltisi:** 50 mg KCN, 200 mg potasyum ferrisiyanid ve 1 g sodyum bikarbonat tartılarak bir miktar distile suda çözülür ve 1 L'ye tamamlanır. Koyu renkli şişede 1 yıl kadar dayanır.
- 2- Hb Standartı:** 18 g liyofilize Hb standartı 100 ml distile suda çözülür. Bu standart 18 g/dl Hb içerir.

Deneyin Yapılışı

Tablo 12:Hemoglobin Düzey Ölçümü

	Kör (ml)	Standart (ml)	Örnek (ml)
Hemolizat	-		0,02
Standart	-	0,02	
Drabkin Çözeltisi	5	5	5

Tüpler iyice karıştırılarak oda ısısında 20 dk bekletilmiştir. 546 nm'de köre karşı diğer tüplerin absorbanansları okunmuştur.

Kanda Hb Düzeyinin Hesaplanması

$$\text{Hb (g/dl)} = \frac{\text{Örneğin Absorbansı}}{\text{Standartın Absorbansı}} \times 18$$

4.6.8. Biyolojik Sıvılarda Protein Tayini

Prensip: Homojenatlardaki protein miktarı modifiye Lowry (163) yöntemine göre ölçülmüştür. Alkali bakır tartarat ayıracı peptit bağları ile kompleks yapar. Her 7 veya 8 amino asit artığı 1 atom Cu bağlar. Fenol ayıracı, Cu ile muamele edilmiş karışıma ilave edildiğinde mor-mavi renk şekillenir. Bu renk şiddeti 650 nm dalga boyunda okunmuştur. Protein konsantrasyonu ile oluşan renk arasında yüksek konsantrasyonlar için lineer bir ilişki olmadığından örnekler sulandırılarak ölçümler yapılmıştır (Tablo 13).

Metodun Ayıraçları

- 1- **Alkali Bakır Ayıracı:** 10 g sodyum karbonat (Na_2CO_3), 0,10 g potasyum tartarat ve 0,05 g bakır sülfat, 0,5 N sodyum hidroksit (NaOH) içinde çözülür ve 100 ml'ye tamamlanır. Bu çözelti oda ısısında 30 gün dayanıklıdır.
- 2- **Fenol Ayıracı:** 2 N Folin-Ciocaltue-Fenol ayıracından 3,75 ml alınır, distile su ile 67,50 ml'ye tamamlanır. Bu çözeltideki örnek sayısına göre çalışma esnasında günlük olarak hazırlanır.
- 3- **Okuma Sınırına Getirilmiş (Sulandırılmış) Örnek**
- 4- **Protein Standartı:** 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ BSA

Deneyin Yapılışı

Tablo 13: Protein Düzey Ölçümü

	Kör (ml)	Standart (ml)	Örnek (ml)
Örnek	-	-	1
Distile Su	1	-	-
Standart	-	1	-
Alkali Bakır Ayıracı	1	1	1
Tüpler iyice karıştırılmış ve 10 dk oda ısısında bekletilmiştir.			
Fenol Ayıracı	4	4	4

Tüpler hemen vortekste iyice karıştırılmış ve 55°C’de 5 dk bekletilmiştir. İnkubasyon sonrası musluk suyu altında hemen soğutulmuştur. Daha sonra 650 nm’de örnek tüplerinin absorbansı kör tüpüne karşı okunmuştur.

Dokuda Protein Düzeyinin Hesaplanması

$$\text{Protein (mg/ml)} = \frac{\text{Örneğin Absorbansı}}{\text{Standartın Absorbansı}} \times \text{Standartın Konsantrasyonu} \times \text{X Dilüsyon}$$

4.7. Moleküler Analizler için Kan ve Doku Örneklerinin Alınması ve RT-PCR Analizleri

Deney süresi sona erdiğinde ratlar sakrifiye edilmiştir ve hızlı bir şekilde RT-PCR analizleri için kan örnekleri RNA stabilizasyon solüsyonu içeren tüplere (RNAprotect Animal Blood Tubes) alınarak saklanmıştır. Doku örnekleri ise analizler için RNA stabilizasyon solüsyonu (RNAlater) içeren tüpler içine alınarak 24 saat oda ısısında bekletilmiş ve tüm örnekler çalışılacağı güne kadar -80°C’de muhafaza edilmiştir.

4.7.1. RNA Ekstraksiyonu

Kan ve doku örnekleri ekstraksiyon öncesinde oda ısısında çözünmeye bırakılmış ve çözünen örneklerden RNA ekstraksiyonu yapılmıştır. RNA konsantrasyonları nanodrop spektrofotometre (Thermo-Genesis 10S UV-VIS) kullanılarak ölçülmüştür. Elde edilen RNA ekstraktlarından cDNA elde edilmiştir.

4.8. Kandan RNA İzolasyonu

1. RNAprotect Animal Blood tüp içindeki kanlar 5.000 g’de 3 dk santrifüj edilmiştir.
2. Üst kısımdaki süpernatant boşaltılarak uzaklaştırılmıştır.
3. Pelet üzerine 1 ml RNAaz içermeyen su eklenmiştir. Pelet çözünene kadar vortekslenmiş ve tüpler 5.000 g’de 3 dk santrifüj edilmiştir.
4. Tüplerdeki süpernatant boşaltılarak uzaklaştırılmıştır.
5. Tüplere 240 µl RSB tamponu eklenerek vortekslenmiştir.
6. Daha sonra tüplere 200 µl RBT tamponu ve 20 µl proteinaz K eklenmiştir.

7. Tüpler vorteksleyerek karıştırılmış ve 10 dk 55°C de sallantılı inkübatörde inkübe edilmiştir.
8. Örnekler QIAshredder spin kolonlara pipetlenmiş ve 20.00 g'de 3 dk santrifüj edilmiştir.
9. Tüplere 240 µl etanol eklenmiştir.
10. Örnekler RNeasy MinElute spin kolona pipetlenmiştir. 8.000 g'de 1 dk santrifüj edilmiştir.
11. RNeasy MinElute spin kolona 350 µl RW1 tamponu eklenmiştir. 8.000 g'de 15 sn santrifüj edilmiştir.
12. Örnekler üzerine 70 µl RDD tamponu ve 10 µl DNase I eklenmiş ve oda ısısında inkübe edilmiştir.
13. RNeasy MinElute spin kolona 350 µl RW1 tamponu eklenmiş ve 8.000 g'de 15 dk santrifüj edilmiştir.
14. Daha sonra RNeasy MinElute spin kolona 500 µl RPE tamponu eklenmiş ve 8.000 g'de 15 sn santrifüj edilmiştir.
15. RNeasy MinElute spin kolona 500 µl etanol eklenmiş ve 8.000 g'de 2 dk santrifüj edilmiştir.
16. RNeasy MinElute spin kolon 2 ml'lik yeni tüplere yerleştirilmiş, 20.000 g'de 5 dk santrifüj edilmiştir.
17. Spin kolona 30 µl REB eklenmiş ve 8.000 g'de 1 dk santrifüj edilmiştir.

4.9. Karaciğer Dokusundan RNA İzolasyonu

- 1.** Karaciğer dokusu eppendorf tüp içerisine alınmış ve RNAlater stabilizasyon solüsyonu ilave edilmiş, analiz zamanına kadar -80°C'de muhafaza edilmiştir.
- 2.** Dokular RNAlater içerisinden çıkartılarak 600 µl Buffer RLT + 6 µl β-merkaptoetanol solüsyonu ilave edilerek Tissue Lyser homojenizasyon cihazı (Next Advance Bullet Blender) ile homojenize edilmiştir.
- 3.** Homojenizasyon işleminden sonra tüpler 3 dk santrifüj edilmiştir.
- 4.** Süpernatantla aynı oranda %70'lik etanol eklenip pipetleyerek karıştırılmış ve RNAasy spin kolon içine pipetlenmiştir
- 5.** Örnekler 8.000 g'de 15 sn santrifüj edilmiştir.
- 6.** Spin kolon üzerine 700 µl RW1 tamponu eklenmiş ve 8.000 g'de 15 sn santrifüj edilmiştir.
- 7.** Spin kolon üzerine 500 µl RPE tamponu eklenmiş ve 8.000 g'de 15 sn santrifüj edilmiştir.
- 8.** Spin kolon üzerine 500 µl RPE tamponu eklenmiş ve 8.000 g'de 2 dk santrifüj edilmiştir. Bu sayede membran yıkanmıştır.
- 9.** Spin kolon membranının tam ortasına 50 µl RNAaz içermeyen su eklenip ve 8.000 g'de 1 dk santrifüj edilmiştir.
- 10.** İzolasyon sonrası elde edilen RNA miktarları nanodrop spektrofotometrede ölçülmüştür.
- 11.** Elde edilen RNA'lardan cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir.

4.10. RNA Konsantrasyonunun Hesaplanması

RNA konsantrasyonunun ve saflık derecesinin belirlenmesi nanodrop spektrofotometre ile yapılmıştır. RNA örneğinin içerisinde bulunduğu solüsyon tarafından absorbe edilen UV miktarı örnekteki RNA miktarı ile doğru orantılıdır. Absorbanslar 260 nm dalga boyunda ölçülmüştür. UV absorbansı RNA'nın saflığının belirlenmesinde de kullanılabilir (260 nm'de nükleik asitler, 280 nm'de proteinler pik verir). Saf bir RNA örneğinin 260 ve 280 nm'deki absorbans oranı ($A_{260 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}}$) 1,8-2'dir. Bu değer elimizdeki RNA örneğinin verimini gösterir. Dolayısıyla değer 1,8-2'ye ne kadar yakınsa verim o kadar yüksektir. 1,8-2'den düşük değerler örnekte fenol ya da protein kontaminasyonu, 1,8-2'den büyük değerler ise DNA kontaminasyonu varlığını gösterir (164). Absorbans oranı 1,8-2'e yakın değerlere sahip olan RNA'lar çalışmada kullanılmıştır.

4.11. cDNA Sentezi

cDNA sentez işlemi aşağıdaki koşullarda gerçekleştirilmiştir (Tablo 14).

Tablo 14: cDNA Sentez Reaksiyonu

Maddeler	Miktar
Ters Transkriptaz Karışımı	6 µl
RNAaz İçermeyen Su	4 µl
Örnek	10 µl
Toplam	20 µl

4.12. Real-Time PCR Analizleri

RT-PCR analizleri aşağıdaki koşullarda gerçekleştirilmiştir (Tablo 15, 16)

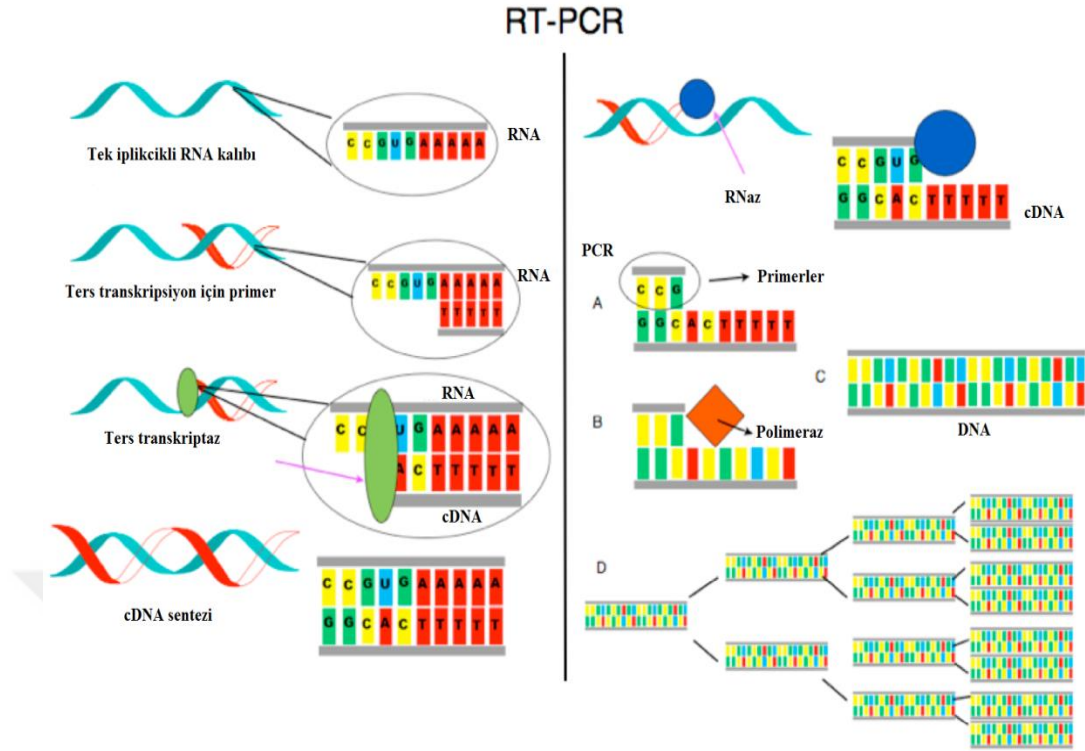
Tablo 15: RT-PCR Reaksiyonu

Maddeler	Miktar
qPCR Master Karışımı	12,5 µl
RNAaz İçermeyen Su	6,5 µl
Primer	1 µl
Örnek	5 µl
Toplam	25 µl

Tablo 16: RT-PCR Sıcaklık, Zaman ve Döngü Sayısı

Döngüler	Süre	Sıcaklık
1	10 dk	95°C
	15 sn	95°C
40	1 dk	60°C

Hazırlanan plateler RT-PCR cihazına yerleştirilmiştir. 95°C’de 10 dk bekletilerek bu ısıtma aşamasında HotStart DNA *Taq* polimeraz aktive edilir. Hibridizasyon basamağı ile primerler bağlanır ve amplifiye edilecek bölge kesilir. Ardından polimerizasyon basamağında ise sentez gerçekleştirilir. Hibridizasyon ve polimerizasyon basamağı 40 döngü devam ettirilmiştir. 60°C de ise floresan veri toplama gerçekleşmektedir.



Şekil 18: RNA'dan cDNA Sentezi ve RT-PCR Reaksiyonu (165)

4.13. Verilerin Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analizler

Çalışma sonucunda elde edilen veriler ortalama ve standart hata olarak ifade edilmiştir. İstatistiksel yönden $p < 0,05$ ve $p < 0,001$ değerleri anlamlı olarak kabul edilmiştir.

Ölçülen tüm parametrelere ait ham değerlerin normal dağılım gösterip göstermediklerini belirlemek için Shapiro-Wilk normallik testi uygulanmış ve testin sonucunda tüm parametrelerdeki değerlerin normal dağılım gösterdiği tespit edilmiştir. Bu testin sonucuna istinaden gruplar arasındaki farklılıkları belirlemek amacıyla tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve ikili karşılaştırmalar için de *post hoc* Duncan testi uygulanmıştır.

Yapılan tüm istatistiki analizlerde farklı gruplar arasında istatistiksel anlamlılık SPSS 22 yazılım paketi kullanılarak yapılmıştır.

5. BULGULAR

Kısa ve uzun süreli DEN uygulanan ratlarda kan ve karaciğer dokularında MDA, GSH düzeyleri ile CAT, GSH-Px, GST ve SOD aktiviteleri tablo 17 ve 18’de gösterilmiştir.

Kısa ve uzun süreli DEN uygulanan ratlarda kan ve karaciğer dokularında CAT enziminin ekspresyon düzeyleri tablo 19’da gösterilmiştir.

Kısa ve uzun süreli DEN uygulanan ratlarda plazma AST, ALT, ALP, LDH enzim aktiviteleri ve kolesterol düzeyi tablo 20’de gösterilmiştir.

Tablo 17: Kısa ve Uzun Süreli DEN Uygulanan Ratlarda Likopenin Plazma MDA, Eritrosit GSH Düzeyleri ile CAT, GSH-Px ve SOD Aktiviteleri

Parametreler	KONTROL (1. Grup)	LİKOPEN (2. Grup)	DEN 1 (3. Grup)	DEN 2 (4. Grup)	L+DEN1 (5. Grup)	L+DEN2 (6. Grup)	DEN1+L (7. Grup)	DEN2+L (8. Grup)	p
MDA (nmol/ml)	8,34±0,04 ^{abc}	8,00±0,10 ^{ab}	11,41±0,22 ^d	11,50±0,17 ^d	8,50±0,14 ^{bc}	8,57±0,10 ^c	7,93±0,13 ^a	8,79±0,14 ^c	p<0,001
GSH (µmol/ml)	47,21±0,22 ^a	47,01±0,40 ^a	38,02±0,53 ^c	36,03±0,84 ^c	43,25±0,50 ^b	45,58±0,38 ^a	46,16±0,49 ^a	45,60±0,38 ^a	P<0,001
CAT (k/g Hb)	65,33±0,78 ^a	65,22±0,52 ^a	48,63±0,74 ^c	44,37±0,63 ^d	56,20±1,21 ^b	62,81±0,99 ^a	65,08±1,90 ^a	61,84±1,40 ^a	p<0,001
GSH-Px (U/g Hb)	86,07±1,74 ^a	82,41±2,11 ^a	62,52±1,54 ^b	60,63±2,74 ^b	78,47±2,48 ^a	78,55±2,43 ^a	80,79±2,62 ^a	79,16±0,41 ^a	p<0,001
SOD (U/g Hb)	72,93±0,49 ^a	72,01±0,44 ^a	66,71±0,46 ^b	65,84±0,67 ^b	71,77±0,28 ^a	71,52±0,41 ^a	72,61±0,32 ^a	72,34±0,33 ^a	p<0,001

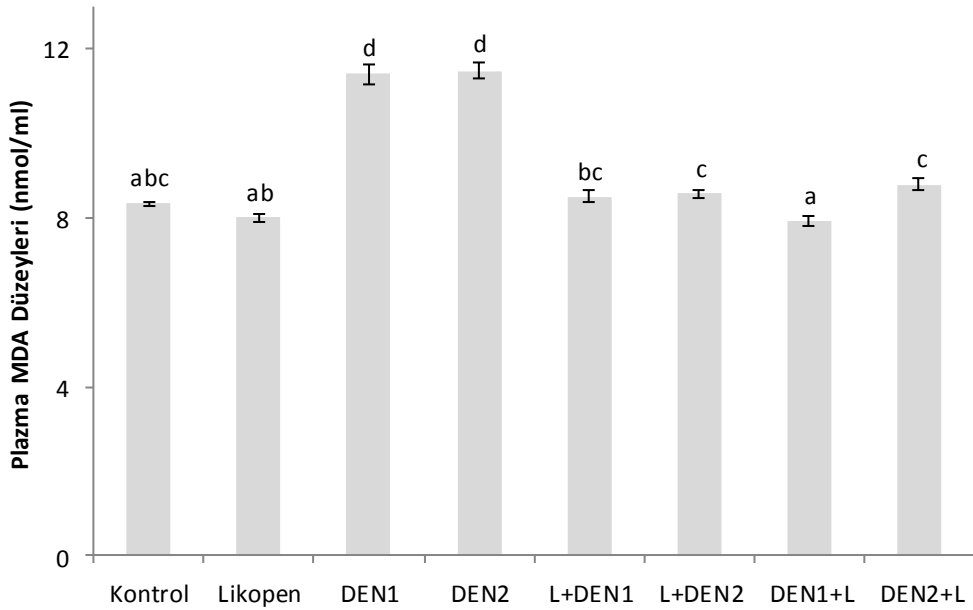
a, b, c, d: Aynı satırda farklı harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemlidir.

5.1. Kan Oksidan ve Antioksidan Düzeyleri

Kısa ve uzun süreli DEN uygulanan ratlarda kan MDA, GSH düzeyleri ile CAT, GSH-Px ve SOD aktiviteleri tablo 17’de gösterilmiştir.

5.1.1. Plazma MDA Düzeyleri

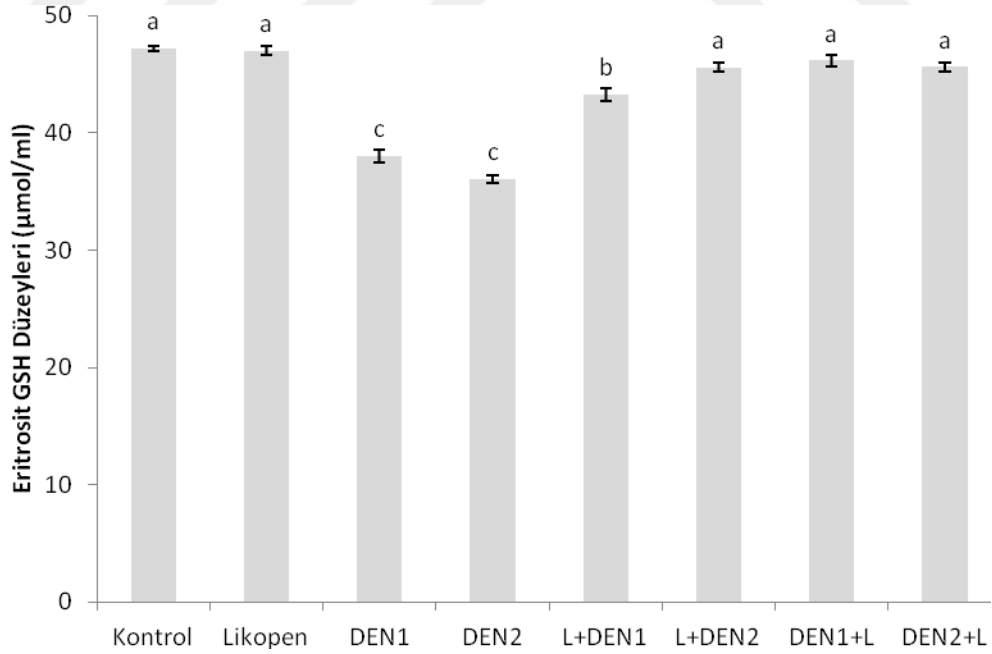
Plazma MDA düzeyinde kontrol grubuna göre DEN1 ve DEN2 gruplarında anlamlı bir artış saptanmıştır ($p<0,001$). Likopen ve likopenin DEN uygulamasından önce veya DEN ile beraber uygulandığı tüm gruplarda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. Plazma MDA düzeyleri, likopenin DEN uygulamasından önce veya DEN ile beraber uygulandığı tüm gruplarda DEN1 ve DEN2 gruplarına göre daha düşük bulunmuş ve kontrol grubuna yaklaşmıştır ($p<0,001$). DEN1+L grubunda plazma MDA düzeyindeki düşüşün diğer likopenli gruplara göre daha fazla olduğu gözlenmiştir ($p<0,001$).



Şekil 19: DEN Uygulanan Ratlarda Plazma MDA Düzeyleri

5.1.2. Eritrosit GSH Düzeyleri

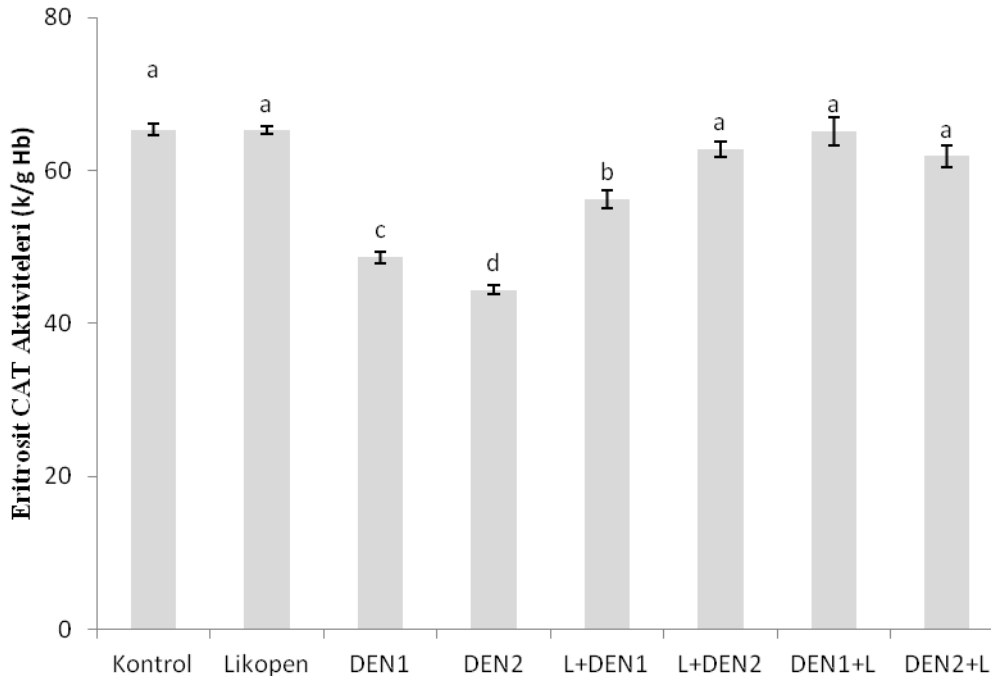
Eritrosit GSH düzeylerinde kontrol grubuna göre DEN1 ve DEN2 gruplarında anlamlı bir düşüş olduğu belirlenmiştir ($p<0,001$). Likopen ve L+DEN2, DEN1+L ve DEN2+L grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. Eritrosit GSH düzeyleri, likopenin DEN uygulamasından önce veya DEN ile beraber uygulandığı tüm gruplarda DEN1 ve DEN2 gruplarına göre daha yüksek bulunmuş ve kontrol grubuna yaklaşmıştır ($p<0,001$). L+DEN1 grubunda ise diğer likopenli gruplara göre daha az bir artış saptanmıştır ($p<0,001$). Likopenin kısa süreli DEN uygulaması ile beraber başlandığı grupta (DEN1+L) eritrosit GSH düzeyindeki artışın diğer gruplara göre daha fazla olduğu gözlenmiştir ($p<0,001$).



Şekil 20: DEN Uygulanan Ratlarda Eritrosit GSH Düzeyleri

5.1.3. Eritrosit CAT Aktiviteleri

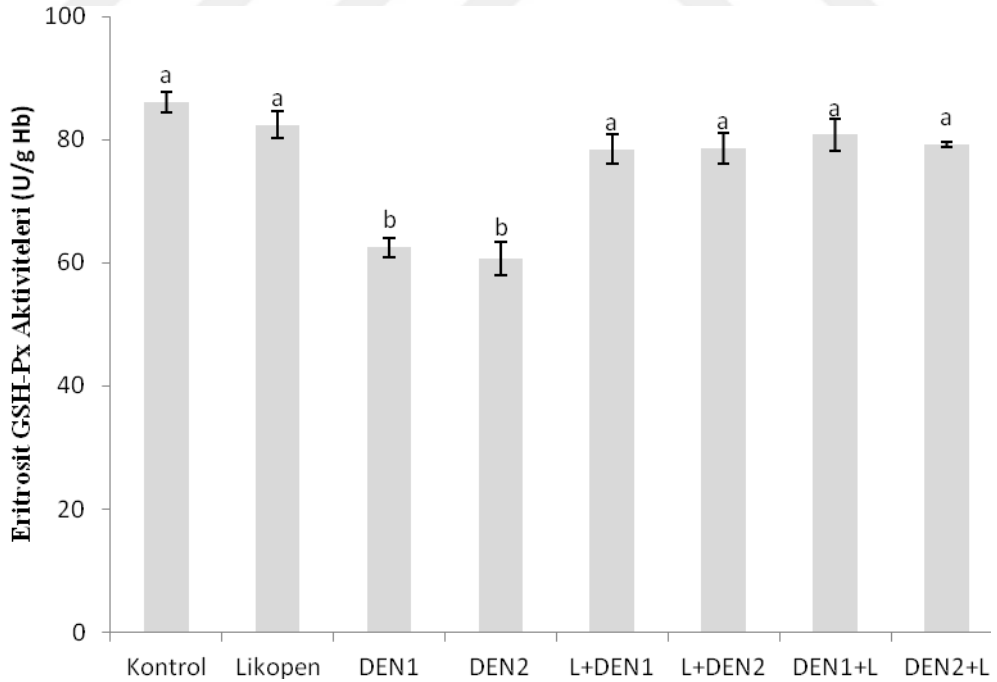
Eritrosit CAT aktivitelerinde kontrol grubuna göre DEN1 ve DEN2 gruplarında anlamlı bir düşüş olduğu belirlenmiştir ($p<0,001$). DEN'in uzun süreli uygulandığı grup olan DEN2'de CAT aktivitesindeki düşüş daha belirgin bulunmuştur ($p<0,001$). Likopen ve L+DEN2, DEN1+L ve DEN2+L grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. Eritrosit CAT aktiviteleri, likopenin DEN uygulamasından önce veya DEN ile beraber uygulandığı tüm gruplarda DEN1 ve DEN2 gruplarına göre daha yüksek bulunmuş ve kontrol grubuna yaklaşmıştır ($p<0,001$). L+DEN1 grubunda diğer likopenli gruplara göre daha az bir artış gözlenmiştir ($p<0,001$). Likopenin DEN uygulaması ile beraber başlandığı ve DEN'in kısa süreli uygulandığı grup olan DEN1+L grubunda CAT aktivitelerindeki artışın diğer gruplara göre daha fazla olduğu gözlenmiştir ($p<0,001$).



Şekil 21: DEN Uygulanan Ratlarda Eritrosit CAT Aktiviteleri

5.1.4. Eritrosit GSH-Px Aktiviteleri

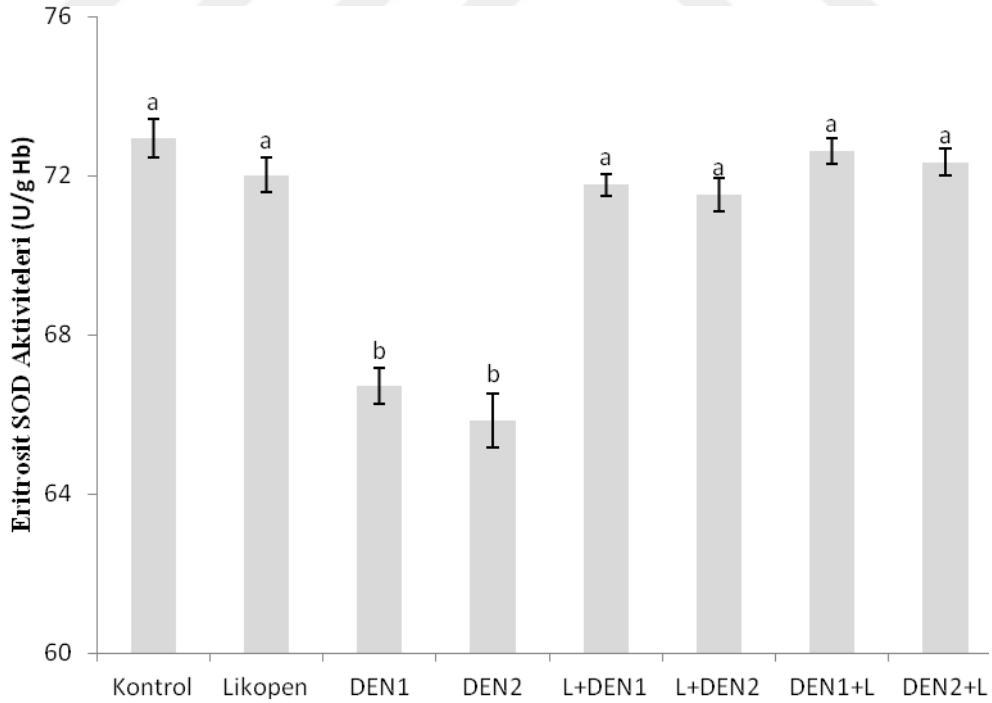
Eritrosit GSH-Px aktivitelerinde kontrol grubuna göre DEN1 ve DEN2 gruplarında anlamlı bir düşüş olduğu saptanmıştır ($p<0,001$). Likopen ve L+DEN1, L+DEN2, DEN1+L ve DEN2+L grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. GSH-Px aktiviteleri, likopenin DEN uygulamasından önce veya DEN ile beraber uygulandığı tüm gruplarda DEN1 ve DEN2 gruplarına göre daha yüksek bulunmuş ve kontrol grubuna yaklaşmıştır ($p<0,001$). Likopenin DEN uygulaması ile beraber uygulanmaya başlandığı ve DEN'in kısa süreli uygulandığı grupta (DEN1+L) GSH-Px aktivitelerindeki artışın diğer likopenli gruplara göre daha fazla olduğu gözlenmiştir ($p<0,001$).



Şekil 22: DEN Uygulanan Ratlarda Eritrosit GSH-Px Aktiviteleri

5.1.5. Eritrosit SOD Aktiviteleri

Eritrosit SOD aktivitelerinde kontrol grubuna göre DEN1 ve DEN2 gruplarında anlamlı bir düşüş olduğu belirlenmiştir ($p<0,001$). Likopen ve L+DEN1, L+DEN2, DEN1+L ve DEN2+L grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. SOD aktiviteleri, likopenin DEN uygulamasından önce veya DEN ile beraber uygulandığı tüm gruplarda DEN1 ve DEN2 gruplarına göre daha yüksek bulunmuş ve kontrol grubuna yaklaşmıştır ($p<0,001$). Likopenin DEN uygulaması ile beraber uygulanmaya başlandığı ve DEN'in kısa süreli uygulandığı grupta (DEN1+L) SOD aktivitelerindeki artışın diğer gruplara göre daha fazla olduğu gözlenmiştir ($p<0,001$).



Şekil 23: DEN Uygulanan Ratlarda Eritrosit SOD Aktiviteleri

Tablo 18: Kısa ve Uzun Süreli DEN Uygulanan Ratlarda Likopenin Karaciğer MDA, GSH Düzeyleri ile CAT, GSH-Px, GST ve SOD Aktiviteleri

Parametreler	KONTROL (1. Grup)	LİKOPEN (2. Grup)	DEN 1 (3. Grup)	DEN 2 (4. Grup)	L+DEN1 (5. Grup)	L+DEN2 (6. Grup)	DEN1+L (7. Grup)	DEN2+L (8. Grup)	p
MDA (nmol/g doku)	0,63±0,01 ^{abc}	0,61±0,01 ^a	0,97±0,02 ^e	0,93±0,02 ^d	0,67±0,01 ^{bc}	0,68±0,01 ^c	0,62±0,01 ^{ab}	0,65±0,01 ^{abc}	p<0,001
GSH (µmol/ml)	17,12±0,23 ^a	17,08±0,10 ^a	15,03±0,07 ^c	15,10±0,07 ^c	16,51±0,07 ^b	16,39±0,05 ^b	17,01±0,08 ^a	16,93±0,05 ^a	p<0,001
CAT (k/mg protein)	0,378±0,01 ^a	0,381±0,01 ^a	0,181±0,01 ^c	0,183±0,01 ^c	0,240±0,01 ^b	0,332±0,02 ^a	0,353±0,01 ^a	0,335±0,01 ^a	p<0,001
GSH-Px (U/g protein)	34,19±1,31 ^a	35,07±0,88 ^a	26,29±0,57 ^b	28,43±1,11 ^b	32,52±0,84 ^a	32,61±1,06 ^a	33,25±0,54 ^a	32,28±1,59 ^a	p<0,001
GST (U/mg protein)	20,92±0,28 ^a	20,56±0,46 ^a	16,51±0,22 ^d	17,44±0,26 ^c	19,43±0,10 ^b	19,37±0,23 ^b	20,21±0,26 ^{ab}	19,96±0,30 ^{ab}	p<0,001
SOD (U/mg protein)	0,646±0,01 ^a	0,645±0,01 ^a	0,628±0,01 ^c	0,629±0,01 ^c	0,635±0,01 ^{bc}	0,643±0,01 ^a	0,644±0,01 ^a	0,639±0,01 ^{ab}	p<0,001

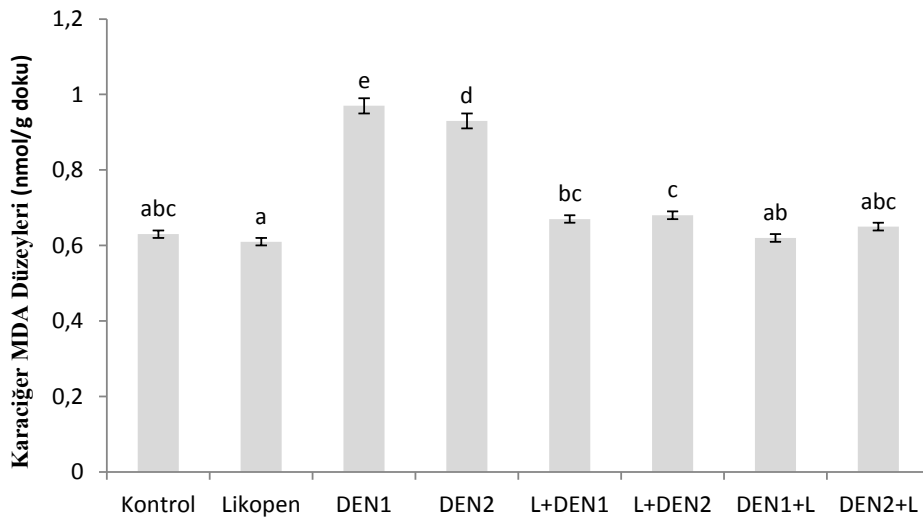
a, b, c, d, e: Aynı satırda farklı harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemlidir.

5.2. Karaciğer Oksidan ve Antioksidan Düzeyleri

DEN uygulanan ratlarda karaciğer dokusunda MDA, GSH düzeyleri ile CAT, GSH-Px, GST ve SOD aktiviteleri tablo 18’de gösterilmiştir.

5.2.1. Karaciğer Dokusu MDA Düzeyleri

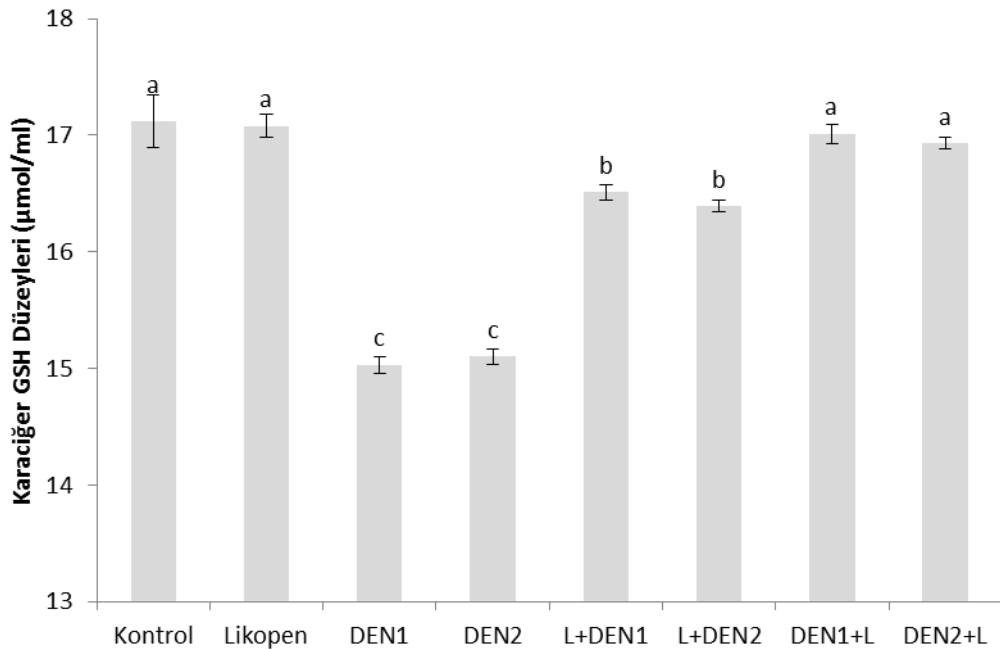
Karaciğer MDA düzeylerinde kontrol grubuna göre DEN1 ve DEN2 gruplarında anlamlı bir artış olduğu belirlenmiştir ($p<0,001$). DEN’in kısa süreli uygulandığı grup olan DEN1’de MDA düzeyindeki artışın daha fazla olduğu saptanmıştır ($p<0,001$). Likopen ve L+DEN1, L+DEN2, DEN1+L ve DEN2+L grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. Karaciğer MDA düzeyleri, likopenin DEN uygulamasından önce veya DEN ile beraber uygulandığı tüm gruplarda DEN1 ve DEN2 gruplarına göre daha düşük bulunmuş ve kontrol grubuna yaklaşmıştır ($p<0,001$). Likopenin DEN uygulaması ile beraber başladığı ve DEN’in kısa süreli uygulandığı grupta (DEN1+L) MDA düzeyindeki düşüşün diğer gruplara göre daha fazla olduğu gözlenmiştir ($p<0,001$).



Şekil 24: DEN Uygulanan Ratlarda Karaciğer MDA Düzeyleri

5.2.2. Karaciğer Dokusu GSH Düzeyleri

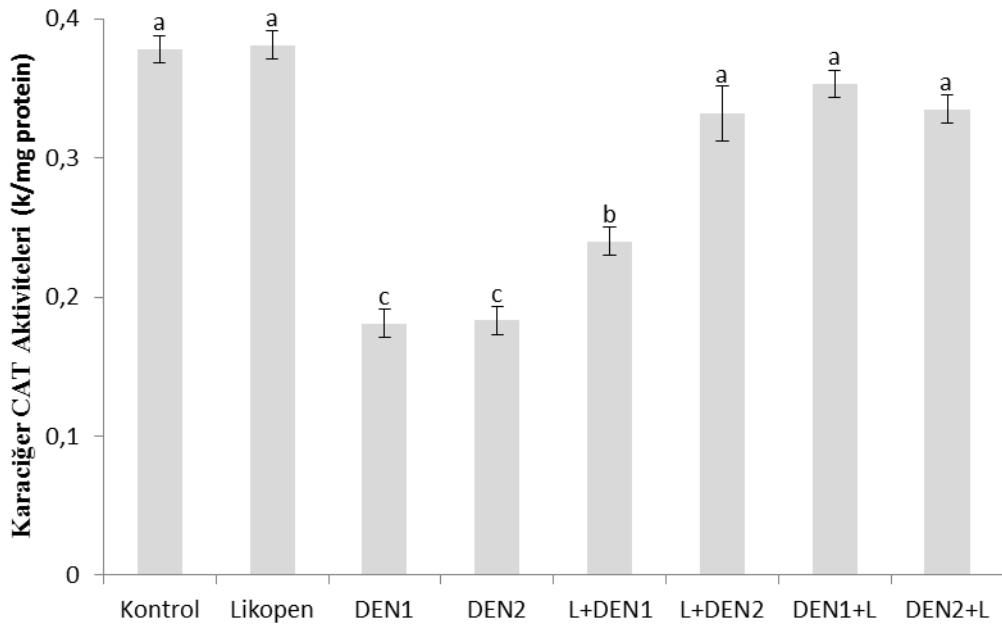
Karaciğer GSH düzeyinde kontrol grubuna göre DEN1 ve DEN2 gruplarında anlamlı bir düşüş belirlenmiştir ($p<0,001$). Likopen ve likopenin DEN ile beraber uygulanmaya başlandığı ve DEN'in kısa ve uzun süreli uygulandığı gruplar olan DEN1+L ve DEN2+L gruplarında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. L+DEN1 ve L+DEN2 gruplarında ise artışın diğer likopenli gruplara göre daha düşük düzeyde olduğu gözlenmiştir. Karaciğer GSH düzeyleri, likopenin DEN uygulamasından önce veya DEN ile beraber uygulandığı tüm gruplarda DEN1 ve DEN2 gruplarına göre daha yüksek bulunmuş ve kontrol grubuna yaklaşmıştır ($p<0,001$). Likopenin DEN uygulaması ile beraber başlandığı ve DEN'in kısa süreli uygulandığı grupta (DEN1+L) GSH düzeyindeki artışın diğer gruplara göre daha fazla olduğu gözlenmiştir ($p<0,001$).



Şekil 25: DEN Uygulanan Ratlarda Karaciğer GSH Düzeyleri

5.2.3. Karaciğer Dokusu CAT Aktiviteleri

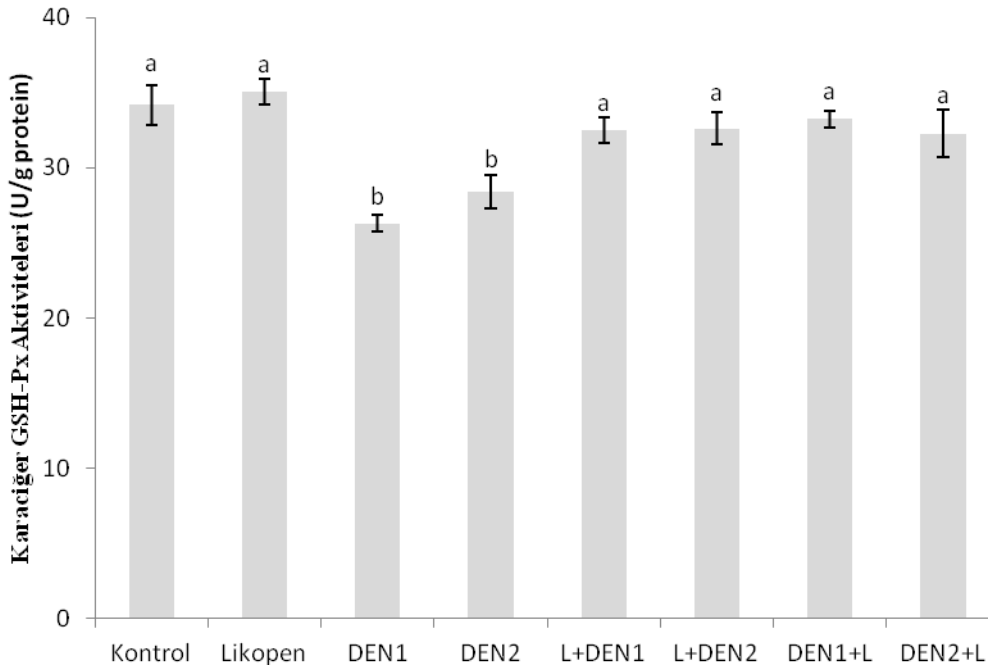
Karaciğer CAT aktivitelerinde kontrol grubuna göre DEN1 ve DEN2 gruplarında anlamlı bir düşüş belirlenmiştir ($p<0,001$). Likopen ve likopenin DEN uygulamasından önce veya DEN ile beraber uygulandığı gruplardan L+DEN2, DEN1+L ve DEN2+L grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. Karaciğer CAT aktiviteleri, likopenin DEN uygulamasından önce veya DEN ile beraber uygulandığı tüm gruplarda DEN1 ve DEN2 gruplarına göre daha yüksek bulunmuş ve kontrol grubuna yaklaşmıştır ($p<0,001$). L+DEN1 grubunda ise artışın diğer likopenli gruplara göre daha düşük düzeyde olduğu gözlenmiştir. Likopenin DEN uygulaması ile beraber başlandığı ve DEN'in kısa süreli uygulandığı grupta (DEN1+L) CAT aktivitelerindeki artışın diğer gruplara göre daha fazla olduğu gözlenmiştir ($p<0,001$).



Şekil 26: DEN Uygulanan Ratlarda Karaciğer CAT Aktiviteleri

5.2.4. Karaciğer Dokusu GSH-Px Aktiviteleri

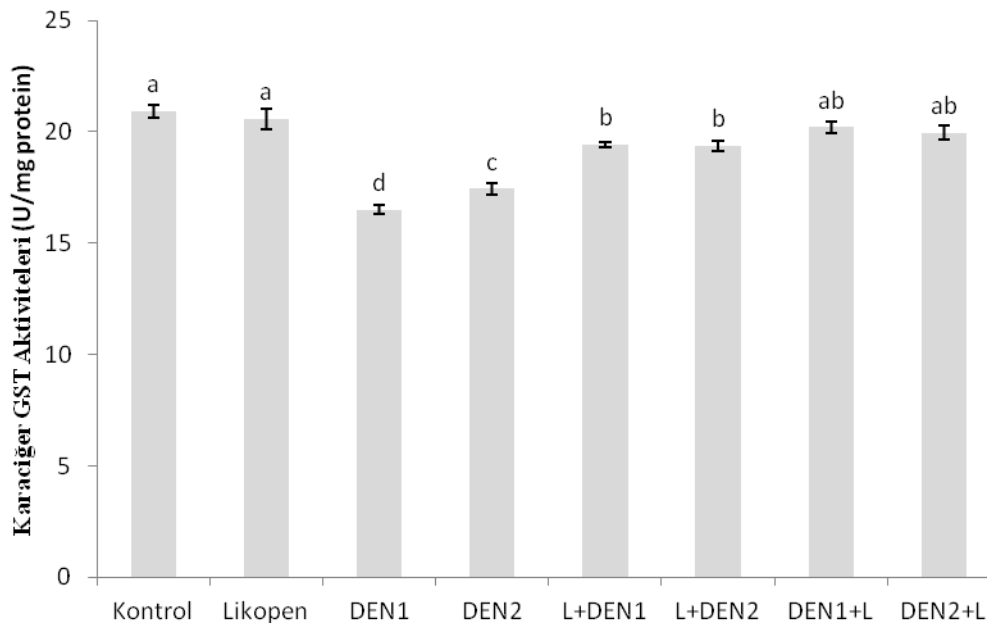
Karaciğer dokusu GSH-Px aktivitelerinde kontrol grubuna göre DEN1 ve DEN2 gruplarında anlamlı bir düşüş olduğu belirlenmiştir ($p<0,001$). Likopen ve likopenin DEN uygulamasından önce veya DEN ile beraber uygulandığı tüm gruplar (L+DEN1, L+DEN2, DEN1+L ve DEN2+L) kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. Karaciğer GSH-Px aktiviteleri, likopenin DEN uygulamasından önce veya DEN ile beraber uygulandığı tüm gruplarda DEN1 ve DEN2 gruplarına göre daha yüksek bulunmuş ve kontrol grubuna yaklaşmıştır ($p<0,001$). Likopenin DEN uygulaması ile beraber başlandığı ve DEN'in kısa süreli uygulandığı grupta (DEN1+L) GSH-Px aktivitelerindeki artışın diğer gruplara göre daha fazla olduğu gözlenmiştir ($p<0,001$).



Şekil 27: DEN Uygulanan Ratlarda Karaciğer GSH-Px Aktiviteleri

5.2.5. Karaciğer Dokusu GST Aktiviteleri

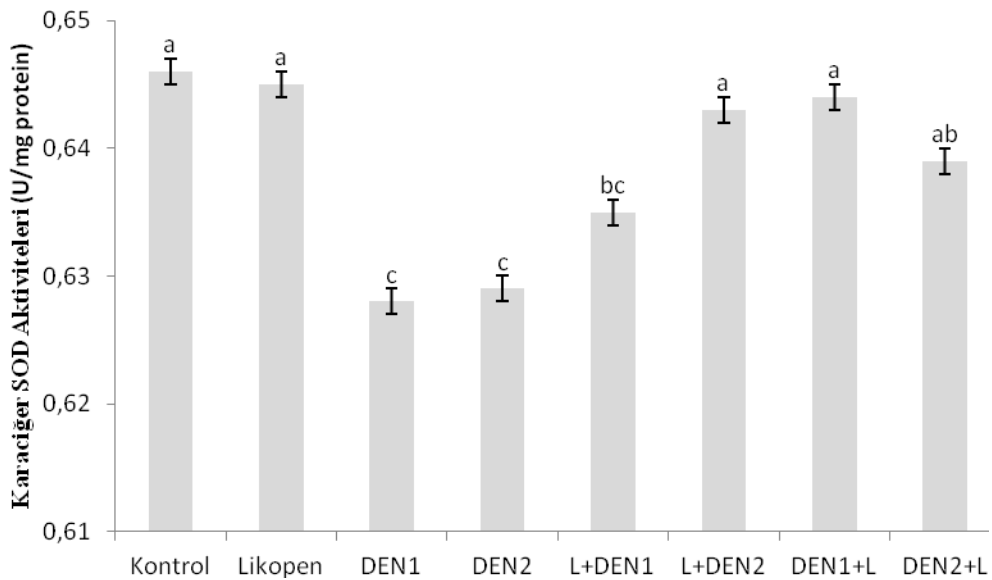
Karaciğer GST aktivitelerinde kontrol grubuna göre DEN1 ve DEN2 gruplarında anlamlı bir düşüş olduğu belirlenmiştir ($p<0,001$). DEN1 grubunda GST aktivitesindeki düşüş daha belirgin bulunmuştur ($p<0,001$). Likopen ve likopenin DEN uygulaması ile beraber uygulanmaya başlandığı DEN'in kısa ve uzun süreli uygulandığı gruplar olan DEN1+L ve DEN2+L gruplarında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. Karaciğer GST aktiviteleri, likopenin DEN uygulamasından önce veya DEN ile beraber uygulandığı tüm gruplarda DEN1 ve DEN2 gruplarına göre daha yüksek bulunmuş ve kontrol grubuna yaklaşmıştır ($p<0,001$). L+DEN1 ve L+DEN2 gruplarında ise artışın diğer likopenli gruplara göre daha düşük düzeyde olduğu gözlenmiştir ($p<0,001$). Likopenin DEN uygulaması ile beraber başlandığı ve DEN'in kısa süreli uygulandığı grupta (DEN1+L) karaciğer GST düzeyindeki artışın diğer likopenli gruplara göre daha fazla olduğu gözlenmiştir ($p<0,001$)



Şekil 28: DEN Uygulanan Ratlarda Karaciğer GST Aktiviteleri

5.2.6. Karaciğer Dokusu SOD Aktiviteleri

Karaciğer SOD aktivitelerinde kontrol grubuna göre DEN1 ve DEN2 gruplarında anlamlı bir düşüş olduğu belirlenmiştir ($p<0,001$). Likopen ve likopenin DEN uygulamasından önce veya DEN ile beraber uygulandığı gruplardan L+DEN2, DEN1+L ve DEN2+L grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. L+DEN1 grubu DEN1 ve DEN2 grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. Karaciğer SOD aktiviteleri, L+DEN2, DEN1+L ve DEN2+L gruplarında DEN1 ve DEN2 gruplarına göre daha yüksek bulunmuş ve kontrol grubuna yaklaşmıştır ($p<0,001$). Likopenin DEN uygulaması ile beraber başlandığı ve DEN'in kısa süreli uygulandığı grupta (DEN1+L) SOD aktivitelerindeki artışın diğer likopenli gruplara göre daha fazla olduğu gözlenmiştir.



Şekil 29: DEN Uygulanan Ratlarda Karaciğer SOD Aktiviteleri

Tablo 19: Kısa ve Uzun Süreli DEN Uygulanan Ratlarda Likopenin Kan ve Karaciğerde CAT Enziminin Ekspresyon Düzeyleri

Parametreler	KONTROL (1. Grup)	LİKOPEN (2. Grup)	DEN 1 (3. Grup)	DEN 2 (4. Grup)	L+DEN1 (5. Grup)	L+DEN2 (6. Grup)	DEN1+L (7. Grup)	DEN2+L (8. Grup)	p
Kan CAT Ekspresyon Düzeyleri	0,15±0,01 ^{ab}	0,14±0,02 ^{ab}	0,21±0,02 ^c	0,19±0,01 ^{bc}	0,11±0,02 ^a	0,12±0,01 ^a	0,12±0,01 ^a	0,13±0,01 ^a	p<0,05
Karaciğer CAT Ekspresyon Düzeyleri	0,67±0,08 ^a	0,88±0,07 ^{ab}	1,44±0,13 ^c	1,43±0,13 ^c	1,07±0,27 ^{abc}	1,14±0,09 ^{bc}	0,94±0,07 ^{ab}	0,92±0,18 ^{ab}	p<0,001

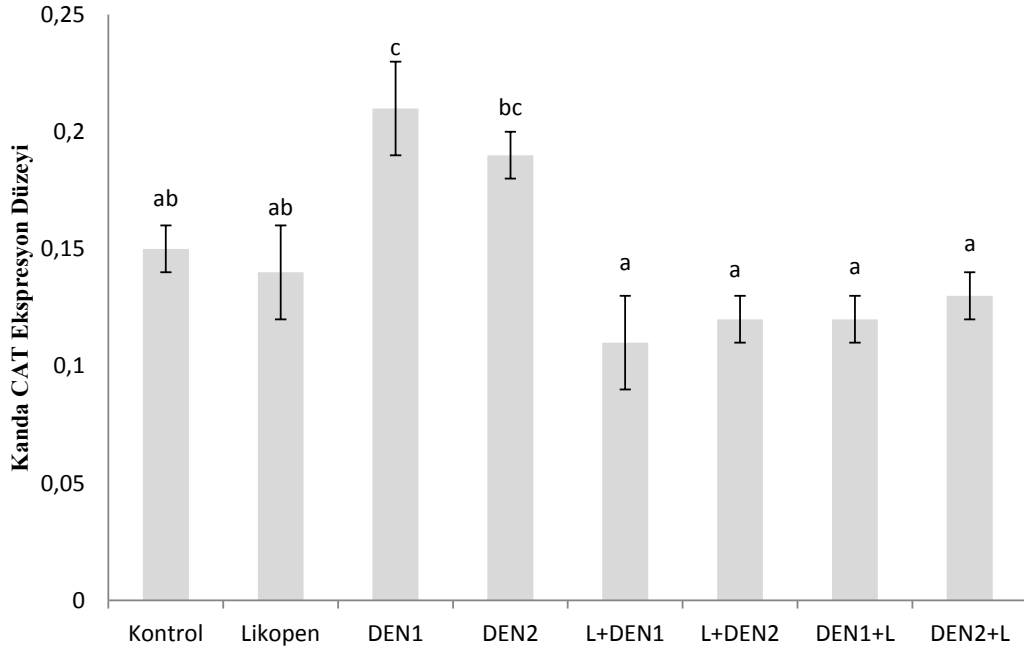
a, b, c: Aynı satırda farklı harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemlidir.

5.3. Real Time PCR Sonuçları

Kısa ve uzun süreli DEN uygulanan ratlarda kan ve karaciğer dokularında CAT enziminin ekspresyon düzeyleri tablo 19'da gösterilmiştir.

5.3.1. Kanda CAT Enzimi Ekspresyon Düzeyleri

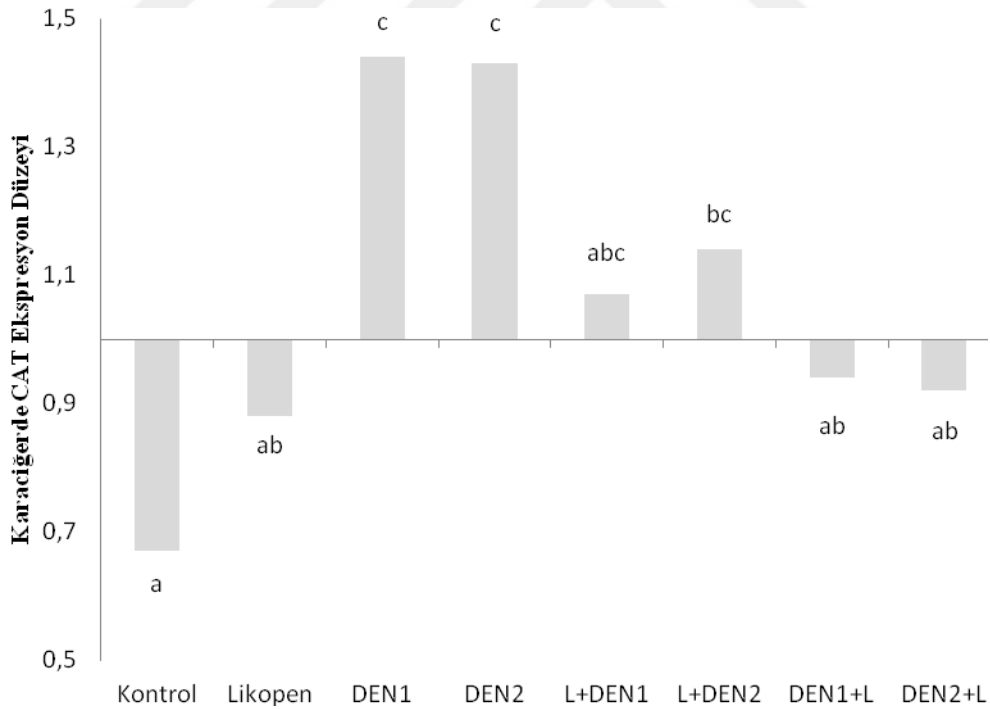
Kan CAT ekspresyon düzeylerinde kontrol grubuna göre DEN1 grubunda anlamlı bir artış gözlenmişken ($p < 0,05$). DEN2 grubunda istatistiksel olarak önemsiz bir artış olduğu belirlenmiştir. Likopen ve likopenin DEN uygulamasından önce veya DEN ile beraber uygulandığı tüm gruplar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. Kanda CAT ekspresyon düzeyleri, likopenin DEN uygulamasından önce veya DEN ile beraber uygulandığı tüm gruplarda DEN1 ve DEN2 gruplarına göre daha düşük bulunmuş ve kontrol grubuna yaklaşmıştır ($p < 0,05$).



Şekil 30: DEN Uygulanan Ratların Kanında CAT Ekspresyon Düzeyleri

5.3.2. Karaciğer Dokusunda CAT Ekspresyon Düzeyleri

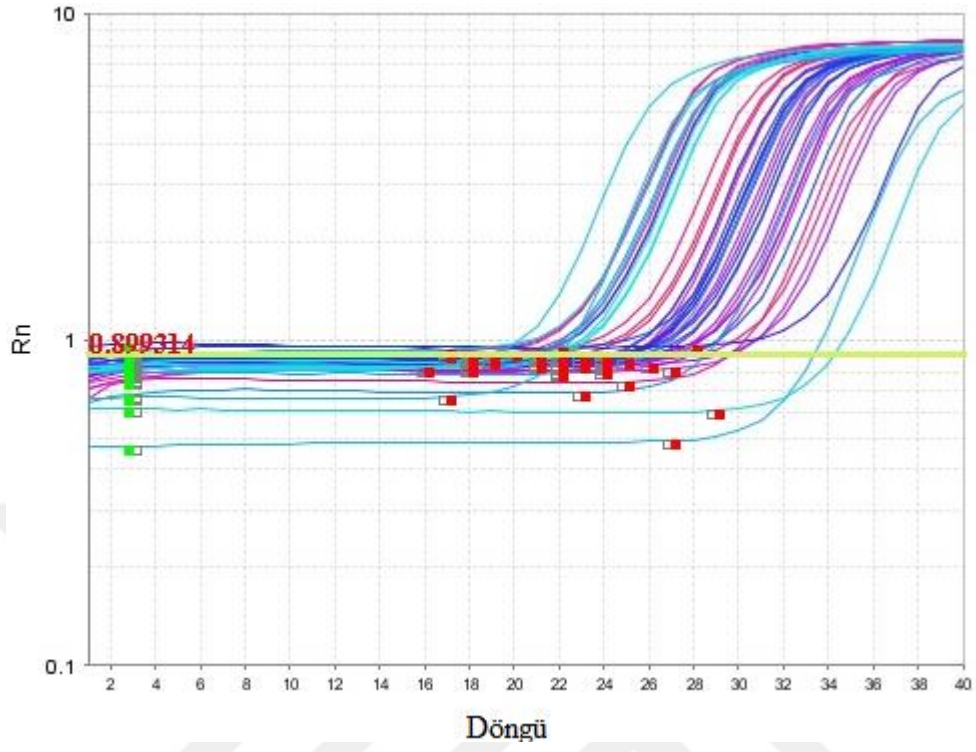
Karaciğer dokusunda CAT ekspresyon düzeylerinde kontrol grubuna göre DEN1 ve DEN2 gruplarında anlamlı bir artış olduğu belirlenmiştir ($p<0,001$). Likopen ve likopenin DEN uygulamasından önce veya DEN ile beraber uygulandığı gruplardan L+DEN1, DEN1+L ve DEN2+L grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. Likopenin DEN uygulamasından önce uygulandığı L+DEN2 grubunda DEN1 ve DEN2 grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. Karaciğer ekspresyon düzeyleri, DEN1+L ve DEN2+L gruplarında DEN1 ve DEN2 gruplarına göre daha düşük bulunmuş ve kontrol grubuna yaklaşmıştır ($p<0,001$).



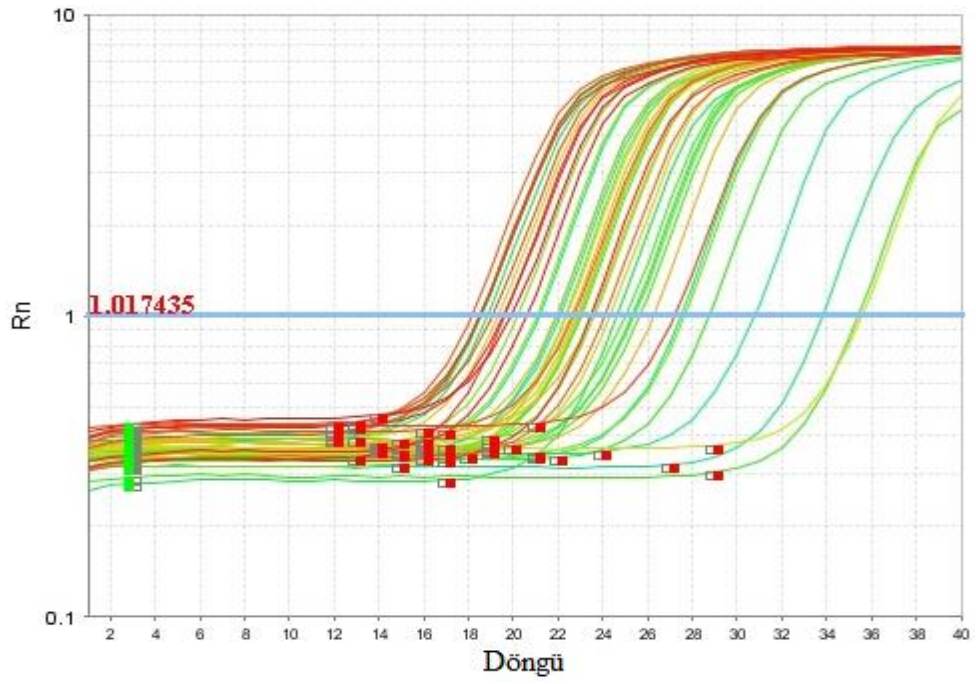
Şekil 31: DEN Uygulanan Ratların Karaciğerinde CAT Ekspresyon Düzeyleri

5.3.3. Kan ve Karaciğer Dokusunda CAT ve β -Aktin Amplifikasyonları

Gerçekleştirilmiş olan her RT-PCR sonunda, hedef gene özgü primerlerin örnek cDNA'sı üzerinde uygun bölgelere bağlanması ve bu transkriptin logaritmik olarak artışı gösteren amplifikasyon eğrisi grafikleri oluşmaktadır. Oluşan ürün miktarının artmasıyla beraber SYBR Green daha çok bağlanmakta ve böylelikle floresan ışımaya artmaktadır. Bu floresan ışımaların eşik değerini geçtiği döngü sayısına Ct (Cycle Threshold) veya Cp (Crossing point) denilmektedir. Şekil 32 ve 33'de kanda CAT geni ve β -Aktin housekeeping genine ait amplifikasyon eğrisi grafiği gösterilmiştir.

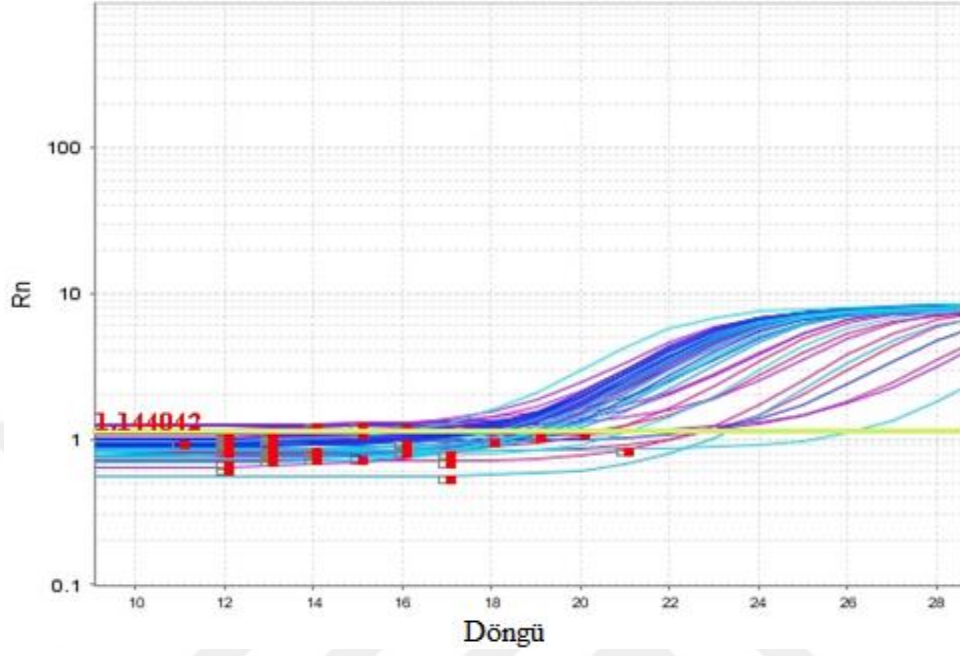


Şekil 32: DEN Uygulanan Ratların Kanında CAT Amplifikasyon Grafiği

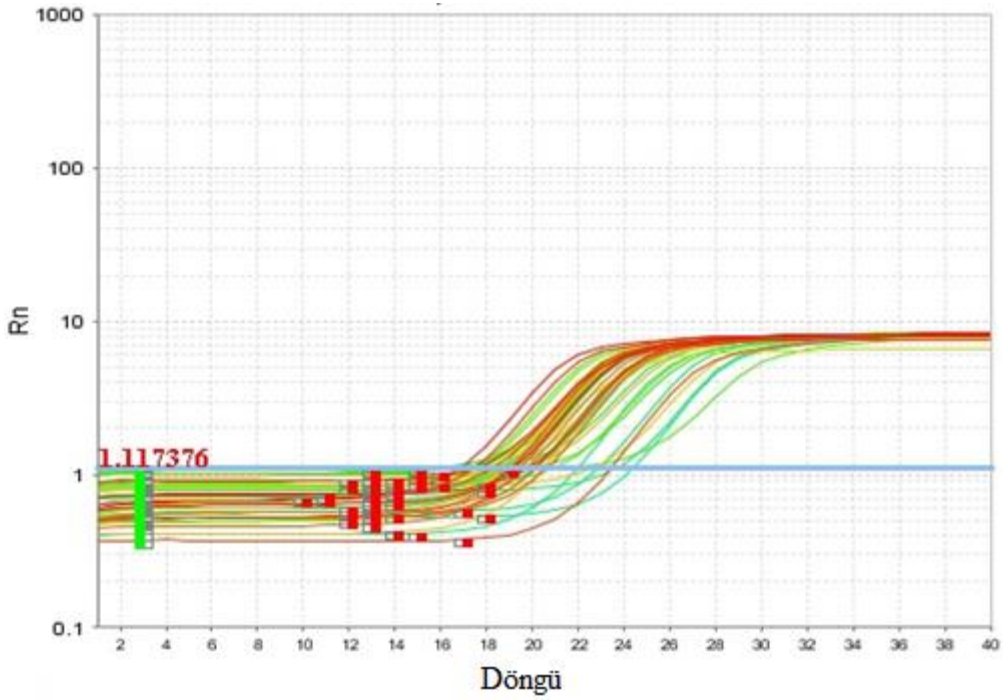


Şekil 33: DEN Uygulanan Ratların Kanında β -Aktin Amplifikasyon Grafiği

Karaciğerde CAT genine ve β -Aktin housekeeping gene ait amplifikasyon eğrisi grafiği şekil 34 ve 35’de gösterilmiştir.



Şekil 34: DEN Uygulanan Ratların Karaciğerinde CAT Amplifikasyon Grafiği



Şekil 35: DEN Uygulanan Ratların Karaciğerinde β -Aktin Amplifikasyon Grafiği

Tablo 20: Kısa ve Uzun Süreli DEN Uygulanan Ratlarda Likopenin Plazma AST, ALT, ALP, LDH Aktiviteleri ile Kolesterol Düzeyi

Parametreler	KONTROL (1. Grup)	LİKOPEN (2. Grup)	DEN 1 (3. Grup)	DEN 2 (4. Grup)	L+DEN1 (5. Grup)	L+DEN2 (6. Grup)	DEN1+L (7. Grup)	DEN2+L (8. Grup)	p
AST (U/L)	171,00±5,77 ^{ab}	146,33±2,87 ^a	230,00±9,81 ^d	225,00±5,97 ^d	200,00±11,11 ^c	242,50±5,71 ^d	165,80±7,77 ^{ab}	189,66±12,51 ^{bc}	p<0,001
ALT (U/L)	78,25±6,10 ^a	83,75±2,32 ^{ab}	111,75±5,05 ^c	96,00±2,22 ^{bc}	97,25±2,74 ^{bc}	88,71±5,62 ^{ab}	93,00±3,90 ^{ab}	87,50±6,63 ^{ab}	p<0,001
ALP (U/L)	6,50±0,22 ^a	7,00±0,28 ^a	14,60±0,69 ^b	15,00±0,88 ^b	11,33±0,33 ^b	14,33±2,92 ^b	15,00±1,34 ^b	13,50±2,46 ^b	p<0,001
LDH (U/L)	794,00±49,07 ^{ab}	724,57±63,34 ^a	1235,75±93,85 ^c	1363,20±73,63 ^c	895,00±61,37 ^{ab}	980,66±27,79 ^b	744,50±49,84 ^a	853,00±28,98 ^{ab}	p<0,001
Kolesterol (mg/dl)	38,00±2,08 ^a	39,66±0,42 ^a	49,66±3,41 ^b	48,00±2,55 ^b	39,33±1,52 ^a	39,75±1,76 ^a	38,20±1,98 ^a	40,50±1,70 ^a	p<0,05

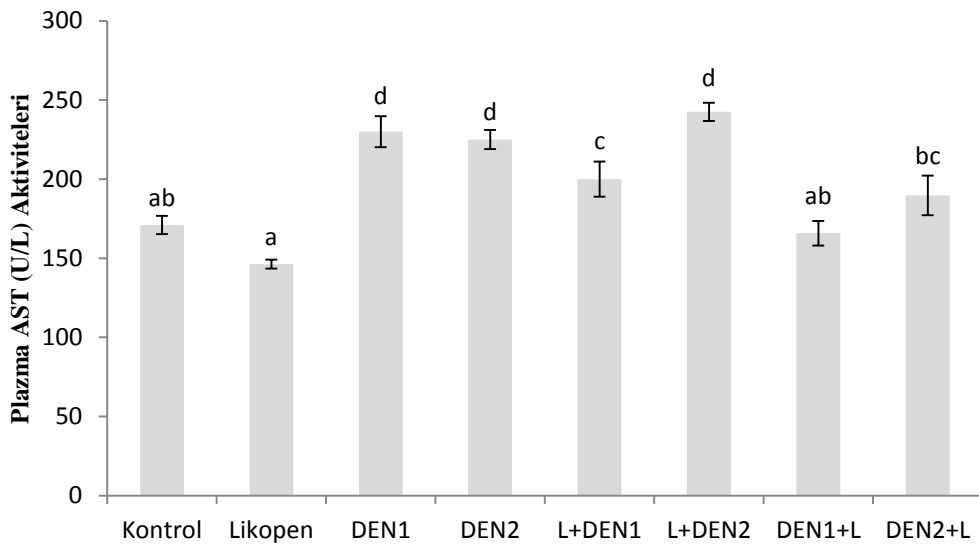
a, b, c, d, e, f: Aynı satırda farklı harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemlidir.

5.4. Plazma AST, ALT, ALP, LDH Enzim Aktiviteleri ve Kolesterol Düzeyleri

Kısa ve uzun süreli DEN uygulanan ratlarda plazma AST, ALT, ALP, LDH aktiviteleri ile kolosterol düzeyleri tablo 20’de gösterilmiştir.

5.4.1. Plazma AST Aktiviteleri

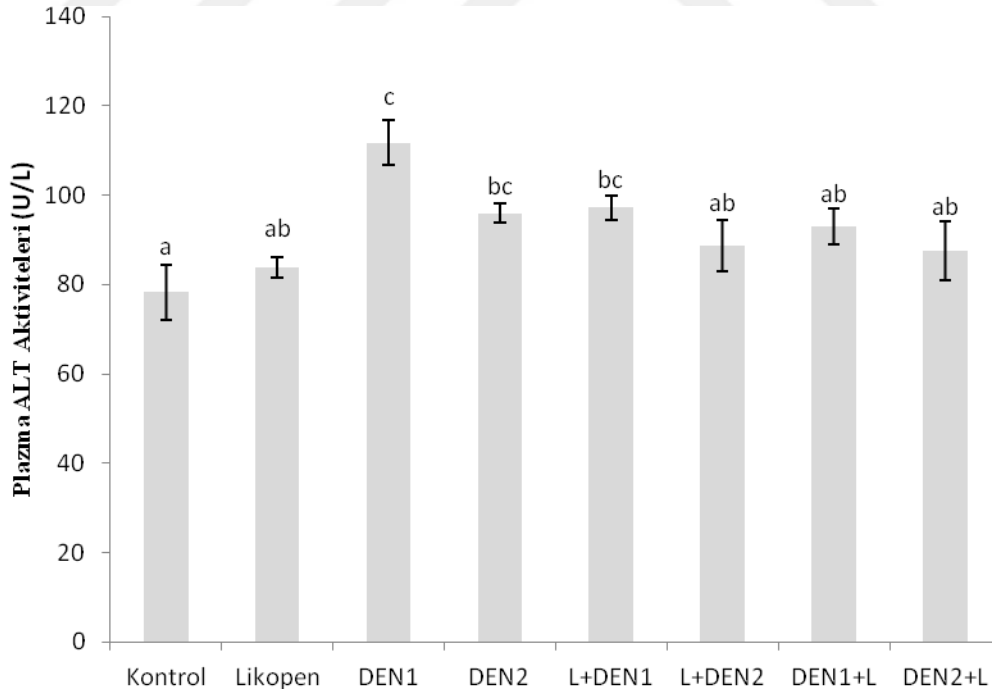
Plazma AST aktivitesinde kontrol grubuna göre DEN1 ve DEN2 gruplarında anlamlı bir artış belirlenmiştir ($p<0,001$). Likopen, DEN1+L ve DEN2+L grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. Plazma AST aktivitesi, L+DEN1, DEN1+L ve DEN2+L gruplarında DEN1 ve DEN2 gruplarına göre daha düşük bulunmuş ve kontrol grubuna yaklaşmıştır ($p<0,001$). Likopenin DEN uygulaması ile beraber başlandığı ve DEN’in kısa süreli uygulandığı grupta (DEN1+L) AST aktivitesindeki düşüşün diğer gruplara göre daha fazla olduğu gözlenmiştir ($p<0,001$).



Şekil 36: DEN Uygulanan Ratlarda Plazma AST Aktiviteleri

5.4.2. Plazma ALT Aktiviteleri

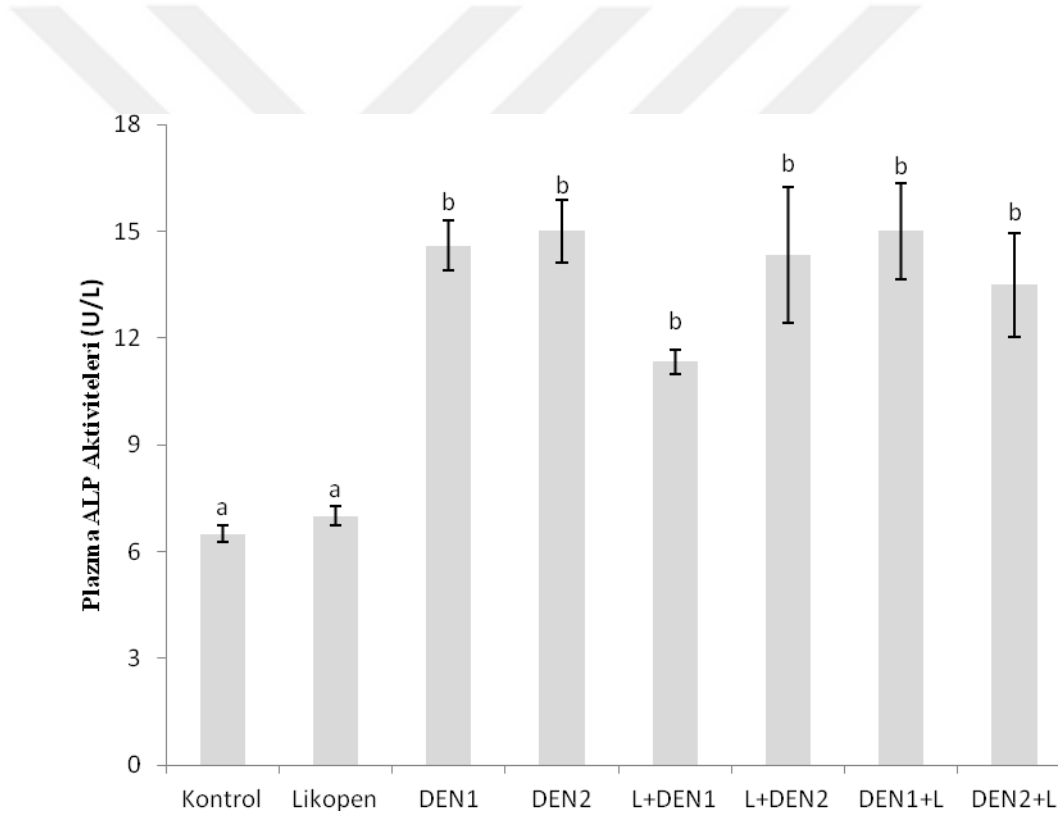
Plazma ALT aktivitesinde kontrol grubuna göre DEN1 ve DEN2 gruplarında anlamlı bir artış olduğu belirlenmiştir ($p<0,001$). Likopen ve likopenin DEN uygulamasından önce veya DEN ile beraber uygulandığı gruplardan L+DEN2, DEN1+L ve DEN2+L grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. Plazma ALT aktivitesinde, likopenin DEN uygulamasından önce veya DEN ile beraber uygulandığı tüm gruplarda kısa ve uzun süreli uygulamalar ayrı ayrı karşılaştırıldığında L+DEN1 grubu ile DEN1 grubu, L+DEN2 ve DEN2+L grupları ile DEN2 grubu arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır.



Şekil 37: DEN Uygulanan Ratlarda Plazma ALT Aktiviteleri

5.4.3. Plazma ALP Aktiviteleri

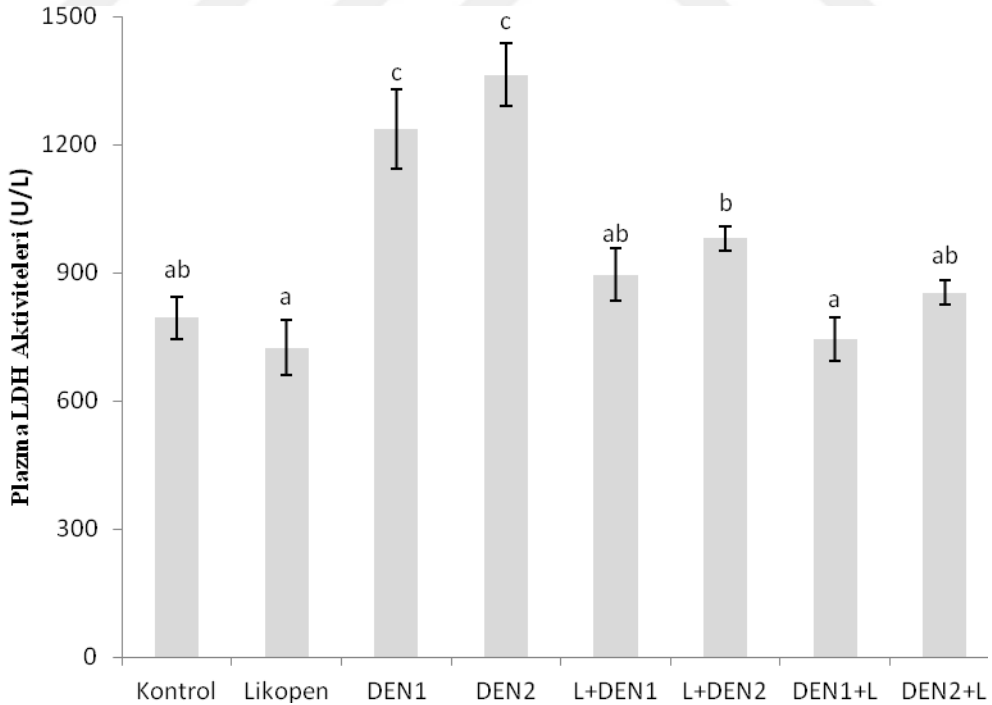
Plazma ALP aktivitesinde kontrol grubuna göre DEN1 ve DEN2 gruplarında anlamlı bir artış belirlenmiştir ($p<0,001$). Likopen uygulanan grup kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. Plazma ALP aktivitesinde, likopenin DEN uygulamasından önce veya DEN ile beraber uygulandığı tüm gruplar DEN1 ve DEN2 grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olmayan azalış belirlenmiştir.



Şekil 38: DEN Uygulanan Ratlarda Plazma ALP Aktiviteleri

5.4.4. Plazma LDH Aktiviteleri

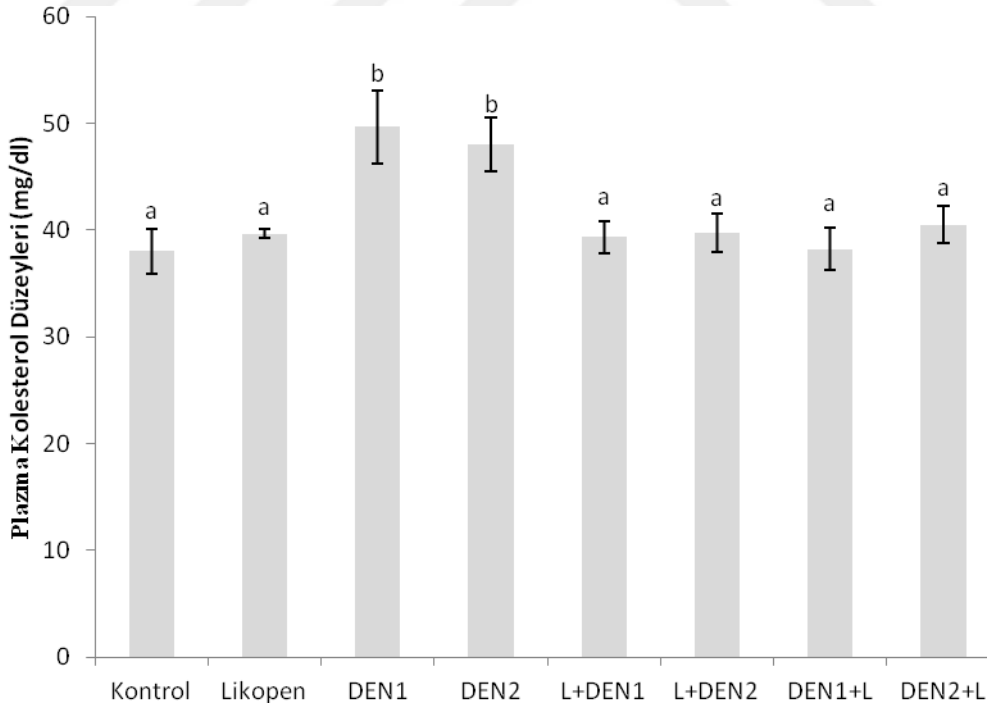
Plazma LDH aktivitesinde kontrol grubuna göre DEN1 ve DEN2 gruplarında anlamlı bir artış belirlenmiştir ($p<0,001$). Likopen ve likopenin DEN uygulamasından önce veya DEN ile beraber uygulandığı tüm gruplar (L+DEN1, L+DEN2, DEN1+L ve DEN2+L) kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. Plazma LDH aktivitesi, likopenin DEN uygulamasından önce veya DEN ile beraber uygulandığı tüm gruplarda DEN1 ve DEN2 gruplarına göre daha düşük bulunmuş ve kontrol grubuna yaklaşmıştır ($p<0,001$). Likopenin DEN uygulaması ile beraber başlandığı ve DEN'in kısa süreli uygulandığı grupta (DEN1+L) LDH aktivitesindeki düşüşün diğer gruplara göre daha fazla olduğu gözlenmiştir ($p<0,001$).



Şekil 39: DEN Uygulanan Ratlarda Plazma LDH Aktiviteleri

5.4.5. Plazma Kolesterol Düzeyleri

Plazma kolesterol düzeylerinde kontrol grubuna göre DEN1 ve DEN2 gruplarında anlamlı bir artış belirlenmiştir ($p<0,05$). Likopen ve likopenin DEN uygulamasından önce veya DEN ile beraber uygulandığı tüm gruplar (L+DEN1, L+DEN2, DEN1+L ve DEN2+L) kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. Plazma kolesterol düzeyleri, likopenin DEN uygulamasından önce veya DEN ile beraber uygulandığı tüm gruplarda DEN1 ve DEN2 gruplarına göre daha düşük bulunmuş ve kontrol grubuna yaklaşmıştır ($p<0,05$). Likopenin DEN uygulaması ile beraber başlandığı ve DEN'in kısa süreli uygulandığı grupta (DEN1+L) kolesterol düzeyindeki düşüşün diğer likopenli gruplara göre daha fazla olduğu gözlenmiştir ($p<0,05$).



Şekil 40: DEN Uygulanan Ratlarda Plazma Kolesterol Düzeyleri

6. TARTIŞMA

Bütün organizmalar kaçınılmaz bir şekilde ve sürekli olarak yabancı kimyasallara ve ksenobiyotiklere maruz kalırlar. Bunlar; ilaçlar, endüstriyel kimyasallar, pestisidler, pişmiş gıdaların piroliz ürünleri, alkaloidler, sekonder bitki metabolitleri, küfler, bitkiler ve hayvanlar tarafından üretilen toksinler gibi doğal ve insan yapımı kimyasallardır (166).

Bir kimyasal bileşiğin kendisi toksik olabileceği gibi organizmada biyotransformasyon sonucu toksik bileşiklere dönüşebilmektedir. Karsinojenik ve mutajenik bileşikler kuvvetli elektrofilik özellik taşırlar. Elektrofilik ara ürünlere dönüşerek metabolize olan bileşikler genellikle alkilleyici ajanlar olarak bilinirler. Reaktivitesi yüksek olan bu bileşikler organizmada nükleofilik özellikli -SH, -NH₂ ya da OH gruplarını içeren proteinlerle, RNA ve DNA gibi makromoleküllerle kovalent bağ yapabilirler. Bu bağlanmanın kimyasal karsinogenez olgusunda neoplastik gelişimi başlattığı düşünülmektedir (166, 167).

Günümüz insanı, besinlerdeki doğal veya katkı maddeleri, ilaçlar ve çevre kirleticileri gibi çeşitli yabancı kimyasal maddelerden gün geçtikçe daha fazla etkilenmektedir. Bu kimyasal maddelerden en sık karşılaşılanı ve en zararlı olanları nitrozamin grubudur. Nitrozaminler önemli mutajen ve kanserojen maddelerdir (36).

Nitrozaminler çevremizde farklı şekillerde ve yaygın olarak bulunabilen karsinojenik bileşiklerdir. Canlı vücuduna dışarıdan alınan veya vücutta oluşabilen nitrit ikincil ve üçüncül aminlerle etkileşime girerek nitrozaminleri oluşturur. Nitrozaminlerin oluşumunda etkili olan nitrit ve nitratlar (E250, E251); kimyasal maddelerde, zirai ilaçlarda, su ve bitkilerde bulunabilmektedir. Gıdaları

küf, maya ve bakterilere karşı korumak, raf ömrünü daha da uzatmak, gıdaların doğal renk ve aromasını korumak sebebiyle kullanılmaktadır. İkincil aminler ise balık ürünlerinde, tahıllarda, çayda, sigara dumanında ve birçok ilacın yapısında bulunabilmektedir. DEN karaciğer, akciğer, böbrek, safra kesesi, yemek ve soluk borusu ile burun boşluğunda tümör oluşturan kuvvetli bir nitrozamin bileşiğidir. DEN'in aşırı pişirilmiş unlu gıdalarda olduğu, peynir, süt, buğday, et ve balık ürünleri gibi doğal besinlerin yanında sigara dumanı ve alkollü içkilerde de bulunduğu saptanmıştır. DEN sanayide, fiber endüstrisinde kopolimerlerin yumuşatıcısı ve yağ üretiminde katkı maddesi olarak kullanılır (54, 60). Canlılarda vücuda giren nitrit oranına bağlı olarak akut veya kronik zehirlenmeler oluşabilmektedir. Nitrit, Hb'i methemoglobine çevirerek toksik etki gösterebileceği gibi nitrit iyonları direk olarak damar düz kaslarının dilatasyonuna neden olarak sistemik arteriyel kan basıncında düşüslere, dolaşım bozukluklarına ve şoka neden olabilmektedir (168).

Kanser araştırmalarında tümör indükleyici olarak genellikle DEN kullanılmaktadır. Farelere ³H-DEN tek tozda verildikten 10 gün sonra karaciğer, böbrek, dalak ve bağırsaktaki bağlı ³H aktivitesi sırasıyla; 100: 74: 40: 17 oranlarda bulunmuştur. Bu şekilde farklı değerlerin bulunması DEN'in kanser yapıcı özelliğinin organlara özgül olduğunu göstermektedir (169, 170). Başta DEN olmak üzere nitrozaminler toksik etkilerini öncelikle kanda ve özellikle karaciğerde oluştururlar. Aynı zamanda kan akımının çok olduğu böbrek gibi diğer organlar da nitrozaminlerin toksik etkilerinde karaciğere göre daha düşük düzeyde de olsa etkilenmektedirler (54). Yapılan çalışmalarda DEN'in hücre bölünmesini durdurduğu, malat dehidrogenaz, glikoz-6-fosfat dehidrogenaz ve

GST enzimini inhibe ettiği gözlenmiştir. Ayrıca DEN'in rat karaciğerinde amino asit metabolizması enzimlerinden triptofan oksijenaz, tirozin ve ornitin amino transferaz, serin dehidrataz ve histidazı da inhibe ettiği bildirilmiştir (171, 172).

Çalışmada kısa ve uzun süreli uygulanan DEN'in ratların kan ve karaciğer dokusunda oluşturacakları oksidatif stres ve DNA hasarına karşı likopenin etkisi araştırılmıştır. Likopenin; kan ve karaciğer dokusunda MDA, GSH düzeyleri ile CAT, GSH-Px, GST ve SOD aktiviteleri üzerine etkileri ve ayrıca CAT enziminin gen ekspresyonlarının oksidan-antioksidan dengeyi nasıl etkilediği belirlenmeye çalışılmıştır. Bu amaçla kan ve karaciğer dokusunda MDA ve GSH düzeyi ile antioksidan enzim aktiviteleri ölçülmüş, kan ve karaciğer dokularda CAT enziminin ekspresyon düzeyleri arasındaki farklılıklar RT-PCR kullanılarak belirlenmiştir. Ayrıca DEN'in oluşturacağı hasarı göstermek amacıyla plazma AST, ALT, ALP, LDH enzim aktiviteleri ve kolestrerol düzeyindeki değişimler de belirlenmiştir.

LPO iki tabakalı yapıyı bozmakta ve membran akışkanlığını değiştirmektedir. Yağ asidinin bozulması ve aşırı H₂O₂ üretimi sonucu oluşan oksidatif stres lipit, protein, karbonhidrat ve DNA gibi makromoleküllere hasar vermekte ve hepatokarsinogenesis nedeni olarak bilinmektedir. NADPH'a bağımlı mikrozomal LPO'nun stimülasyonu adozin difosfat (ADP)/Fe⁺², NADPH-sitokrom P-450 redüktaz ve sitokrom P-450 aracılığıyla olmaktadır (173).

Organizmada metabolik ve fizyolojik olaylar sonucu ROT üretilmekte ve zararlı oksidatif reaksiyonlar oluşabilmektedir. Çağımızda çok sayıda araştırmacı serbest radikallerin DNA, proteinler, lipitler ve hücrenin diğer bileşenleri üzerinde

neden olduğu oksidatif hasarı incelemektedir. Serbest radikallerin nükleusta ve DNA'daki etkileri genotoksik ve mutajeniktir. Serbest radikaller pürin ve pirimidin modifikasyonuna veya DNA iplikleri ve kromozom kırılmalarına, onkojen aktivasyonuna neden oldukları için karsinogeneziste önemlidirler (174).

DEN membran lipitlerini etkileyerek serbest radikal oluşumuna sebep olan çevresel bir karsinojendir. DEN ve DMN gibi nitrozaminlerin kendilerinin fazla mutajenik olmadığı fakat memeli enzim sistemleri tarafından kuvvetli mutajenik ara ürünlere metabolize edilmeleri sonucunda etkili oldukları bildirilmiştir. DEN, ROT'nin artmasına sebep olarak oksidatif stres ve hücre hasarına neden olur (55, 175). ROT'nin yüksek seviyeleri mitokondrial hasar, DNA modifikasyonu ve LPO'na yol açıyor olması nedeniyle insanlarda kanseri de içeren birçok hastalıkla sonuçlanır (56). Yapılan bir çalışmada, DEN uygulanan ratlarda karaciğer LPO düzeyinin arttığı, quercetin LPO'nu ve preneoplastik lezyon indüksiyonunu engellediği bildirilmiştir. LPO ve preneoplastik lezyonlar arasındaki ilişki karsinogeneziste ROT katılımının göstergesi olarak kabul edilmiştir (176).

Kimyasal olarak indüklenmiş hepatoselüler nodüllerin sitokrom P-450 gibi ksenobiyotik enzimlerin seviyelerini düşürdüğü ve detoksifikasyon enzim seviyesini artırdığı bilinmektedir. DEN karaciğerde sitokrom P-450 izoenzimleri tarafından hidroksile edilmekte ve alkilasyon mekanizması ile biyoaktif hale gelmektedir. DEN ile beslenen farelerde birkaç hafta sonra DNA replikasyonunda artma olduğu ve daha sonra normal düzeye indiği bildirilmiştir. Kanser oluşumu sırasında DNA polimeraz α aktivitesinde artış olurken, DNA polimeraz β aktivitesinde daha yavaş bir artış olduğu bildirilmiştir. Ayrıca DEN ile başlayan kanserleşme sırasında DNA polimeraz α - β enzimlerinde ardışık dizi değişiklikleri

olduğu ve DNA'yı alkillediği bildirilmiştir (177, 178). DNA'nın alkillenmesi, DNA yapısında bulunan pürin bazlarından adeninin N-1, N-3, N-7, guaninin N-3, N-7, O-6, C-8 ve pirimidin bazlarından sitozinin N-3 nolu atomlarından olduğu bildirilmiştir. DNA'nın alkillenme miktarı 7-etilguaninin ölçümüyle tespit edildiği ve yüksek dozlarda DEN uygulandığında O⁶-etilguaninin, düşük dozlarda DEN uygulandığında ise N⁷-etilguaninin olduğu bildirilmiştir (179). Ayrıca Dyroff ve ark. (180) tarafından yapılan çalışma sonucunda uzun süre DEN'e maruz kalan hayvanlarda O⁴-etiltiminin olduğu, bunun da önemli lezyonlara sebep olabileceği bildirilmiştir. DEN uygulaması ile oluşan radikaller, DNA'yı alkillemekte ve böylece mutajenik ve kanserojenik etki göstermektedir (179). Biyoaktif hale gelen DEN, DNA ile reaksiyona girer ve bazların etilasyonuna neden olur. Etil DNA adduktları baz çiftlerini kesebilir, mutasyonlara ve p53 gibi tümör supresör genlerin inhibisyonuna sebep olabilir. Bu durum sıklıkla hepatoselüler karsinoma ile sonuçlanmaktadır (178, 181).

Yapılan çalışmalarda fenofibrat, piperonil butoksit, p,p'-DDT gibi ajanların ROT'nin aşırı üretimine ve oksidatif DNA hasarına sebep olduğu, hepatoselüler tümör gelişimini artırdığı bildirilmiştir. Bu bileşikler GSH-Px2, GSTM1, NADPH dehidrogenaz kuinon 1 (Nqo1) ve Aldo-keto redüktaz ailesi 7, A3 (Akr7a3) gibi transkripsiyon faktör Nrf2 regüle genlerin gen ekspresyonu düzeylerini artırmaktadır. Ksenobiyotik metabolizmasında GSH'ın rolü; faz I enzimleri tarafından oluşturulan reaktif türlerin GSH ile konjugasyona girmesi ve hücre makromolekülleri (DNA, RNA, protein) ile bağlanmasına engel olarak hücre hasarının önlemesi şeklinde gerçekteşmektedir. GST ksenobiyotik elektrofiller ve endojenlerin çeşitlerinde GSH konjugasyonları ve ROT

temizleyicileri gibi davranarak önemli bir hücrel savunmayı temsil eder. GSTM1 in vitro H₂O₂ ve 4-HNE'in sebep olduğu oksidatif strese karşı savunmada koruyucu rol oynar (182, 183).

Birçok araştırmacı DEN'in tek başına veya bir promotör ile birlikte kullanımıyla oluşturulan karaciğer hasarında oksidatif stres parametrelerini incelemişlerdir. Çeşitli araştırmacılar kan ve karaciğerde prooksidan durumu gösteren 8-OHdG (184), MDA (50, 51, 185-187), protein karbonil (50, 188) ve NO (185) düzeylerinde artış bulmuşlardır. Antioksidan sistemi belirlemek amacıyla GSH (185-187), vitamin E (51) ve vitamin C düzeyleri (51) ile SOD (51, 189, 190), CAT (51, 185, 187, 189, 190), GSH-Px (51, 185, 187, 189, 190), GST (187, 191) ve GR (190, 191) aktiviteleri araştırılmış ve genellikle antioksidan sistemde bir baskılanma olduğu bildirilmiştir.

DEN'in hepatokarsinojenik etkinliğini erkek ve dişilerde karşılaştırarak araştıran çalışmalar da bulunmaktadır. Nakatani ve ark. (192) 32 haftalık sürede toplam 2,5 mg/kg DEN (i.p. tek doz) uyguladıkları erkek ve dişi farelerde tümör oluşumunun ve oluşan tümörlerin çapının erkek farelerde dişi farelere göre daha fazla olduğunu bulmuşlardır. Orşiektomi yaptıkları erkek farelerde tümör oluşumunun azaldığını, buna karşılık overektomi yapılan farelerde ise tümör oluşumunun arttığını göstermişlerdir. Araştırmacılar hepatokarsinojenezde östrojenlerin koruyucu/engelleyci, androjenlerin ise artırıcı etkileri olduğunu ileri sürmüşlerdir. Benzer şekilde, Naugler ve ark. (193) 6-8 haftalık erkek ve dişi farelere tek doz DEN (100 mg/kg i.p.) uygulamışlar ve 24 ve 48. saatlerde karaciğerdeki hasarı değerlendirmişlerdir. Bu araştırmacılar serum ALT düzeylerinin erkek farelerde dişilere kıyasla 24 ve 48. saatlerde 1,5-2 kat,

inflamasyon, proliferasyon, apoptozis ve nekroz göstergelerinin ise 2-3 kat daha yüksek olduğunu bulmuşlardır.

Kim ve ark. (194) ise farelerde farklı nitrozaminler (DEN, N-metil-N-nitrosüre ve 1,2-dimetilhidrazin) ile gerçekleştirdikleri çalışmada 32 hafta sonunda DEN (10 mg/kg i.p.) ve diğer nitrozaminlerin birlikte kullanımının farelerin akciğerinde neoplazilerin ve oksidatif stresin arttığını belirlemişlerdir.

Dhanasekaran ve ark. (195) gerçekleştirdikleri çalışmada DEN uygulanan ratlarda *Tinospora cordifolia*'nın etkilerini incelemişlerdir. Hepatotoksisite için DEN'i 20 hafta boyunca %0,01 oranında ratların içme sularına ilave etmişlerdir. Çalışmalarında GSH düzeyi, CAT, GSH-Px, GST ve SOD aktiviteleri ile AST, ALT, LDH aktivitelerindeki değişiklikleri araştırmışlardır. Çalışma sonunda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında karaciğer hasarını göstergesi olan AST, ALT, LDH aktivitelerinde anlamlı yükselme bilirmişlerdir. GSH düzeyi, CAT, GSH-Px ve SOD aktivitelerinde istatistiki olarak önemli düşüş gözlemlemişlerken, GST aktivitesinde artış belirlemişlerdir.

Kanser hastalarında oksidatif stres biomarkırlarının artışı, enzimatik ve non-enzimatik antioksidanların azalması rapor edilmiştir (77, 78, 90, 196). Karaciğer kanseri oluşturma ve geliştirme sırasında oksidatif stres olduğu bazı çalışmalarda gösterilmiştir. Şahin ve ark. (197) yaptıkları çalışmalarında 24 hafta boyunca tek doz i.p. olarak 200 mg/kg vücut ağırlığı dozunda DEN uygulaması ile oluşturulmuş hepatokarsinogenez gelişiminde altta yatan mekanizmaları araştırmışlardır. Hepatokarsinogenez oluşturmak için DEN ve FB uygulaması yapmışlardır. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında DEN uygulanan ratlarda karaciğer dokusunda GSH düzeyinin ve CAT, SOD, GSH-Px gibi antioksidan

enzimlerin aktivitelerinin düştüğünü, serum ALT, AST, total bilirubin ve MDA düzeylerinin ise yükseldiğini tespit etmişlerdir.

Çeşitli çalışmalar karaciğer koruyucu mekanizmalar ile oksidatif hasar ve LPO'nun inhibisyonunu göstermektedir. Sayed-Ahmed ve ark. (187) DEN ile oluşturulmuş hepatotoksisiteye karşı çörek otunun, Bishayee ve ark. (198) nar emülsiyonunun, Bishayee ve ark. (199) yaptıkları başka bir çalışmada ise siyah üzüm ekstresinin karaciğer koruyucu etkilerini incelemişler ve antioksidanların DEN'in hepatotoksisitesine karşı olumlu etkilerini gözlemlemişlerdir.

DEN ile oluşturulmuş hepatoselüler karsinoma modelinde, ROT'nin artışı, kan ve karaciğer dokularında antioksidan enzim aktivitelerinin düşüşü birçok çalışma ile rapor edilmiştir. Bu amaçla birçok bileşik test edilmiş ve deneysel olarak oluşturulan hepatokarsinogeneze karşı morin, silymarin, sarımsak, yıldız anason, ganfujian granüle bitkisi, apigenin ve *agaricus blazei* mantarı ekstresinin etkileri incelenmiştir (190, 191, 200-204).

Gayathri ve ark. (50) ratlarda DEN ile oluşturulmuş hepatokarsinogeneze karşı ursolik asitin, Janani ve ark. (51) ise ratlarda DEN ile oluşturulmuş hepatokarsinogeneze karşı kekik yaprağı bitkisinin etkilerini incelemişlerdir ve DEN uygulaması ile LPO'nun arttığını ursalik asit ve kekik yaprağı uygulamalarının ise DEN uygulanan gruba göre LPO'nu azalttığını belirlemişlerdir.

Yapılan birçok çalışmada DEN tek başına (154, 187, 205, 206) veya bir promotör ajanla birlikte kullanılmıştır (189, 207-209). Promotör olarak FB (198, 199, 207), CCl₄ (185, 209, 210), 2-AAF (189, 211) gibi ajanlar ve parsiyel hepatektomi (201, 208) gibi yöntemler kullanılmıştır. Bazı çalışmalarda DEN

promotör kullanmaksızın düşük dozda i.p. (184, 212) veya oral yolla (51, 190, 191, 195) uzun süreli uygulanarak karaciğer kanseri oluşturulmuştur (51, 185, 187, 189-191, 195, 198, 207, 209, 211). Bu bulgulara dayanarak çeşitli araştırmacılar birçok antioksidan bileşiğin DEN'e bağlı karaciğer kanser oluşumunu önleyici/azaltıcı etkisini araştırmıştır. Bu çerçevede çeşitli sülfidril bileşikler, fitokimyasallar ve melatonin gibi antioksidanlar araştırılmış, bazılarında olumlu bazılarında ise olumsuz yanıtlar elde edilmiştir (187, 189-191, 198, 210, 211).

Oksidatif strese hücrede bir takım değişiklikler olmaktadır. LPO sonucunda ortaya çıkan en önemli ürünlerden biri olan MDA, LPO'nu gösteren parametrelerden birisidir. Pek çok deneysel çalışmada DEN'in karaciğer başta olmak üzere oluşturdukları doku hasarlarında artmış olan MDA düzeyleriyle karakterize LPO'na yol açtığı bildirilmektedir (211, 213-218). DEN LPO'nun dolayısı ile de onun bir ürünü olan MDA miktarının artmasına neden olur. Yaptığımız çalışmada; 30 ve 90 gün süre ile uygulanan DEN'in kan ve karaciğer dokularında LPO'nun göstergesi olan MDA düzeylerinde önemli derecede artışa neden olduğu gözlenmiştir. DEN'in kısa ve uzun süreli uygulamasında MDA düzeylerinde istatistiksel olarak önemli artıştan LPO'nun önlenemediği tespit edilmektedir. Çalışmadaki bulgular yukarıdaki araştırmacıların bulgularına paralel olarak DEN'in oluşturduğu oksidatif stresteki artışa bağlı olarak etkin oksijen radikallerinin oluşumuna sebep olduğunu göstermektedir. DEN ile muamele edilmiş ratların plazma ve karaciğerinde MDA düzeylerindeki artış DEN'in toksik özelliği nedeniyle olabilir. MDA düzeylerindeki artış DEN'in hücrel antioksidan savunma sistemi tarafından tolere edilemeyen yüksek düzeyde serbest radikallerin oluşumuna neden olduğunu göstermektedir. Bu değişiklikleri DEN'in

doğrudan etkileri ya da DEN tarafından oluşan metabolitler ve bu metabolitlerin oluşumu sırasında üretilen serbest radikaller tetiklenmiş olabilir.

Gerçekleştirdiğimiz çalışmada kısa süreli DEN uygulamasında LPO'nun ve bazı antioksidan enzim etkinliklerindeki değişimin uzun süreli DEN uygulamasına göre daha fazla olduğu gözlenmiştir. DEN lipitlerde çözünebilen ve toksik etkisini akut olarak gösteren bir hepatotoksindir. Karaciğer ise biyotransformasyondan sorumlu ana organdır ve aynı zamanda birçok zararlı kimyasal madde toksisitesinin hedefi halindedir. Maruz kalınan maddenin dozu, enzim sisteminin genetik polimorfizmi, yaş, cinsiyet farklılıkları, enfeksiyonlar, eşlik eden karaciğer hastalıkları gibi nedenlerle değişmekle birlikte DEN veya metabolitleri direk etki ile hücrelerde ve organellerde yapısal bozukluklar yapabilir, indirek etki ile ise bazı metabolik yollarla ilişki kurarak veya immun mekanizmalarla zarar verebilir akut hepatotoksisite gelişimine neden olabilir.

Önemli bir indirgeyici ajan ve antioksidan olan GSH, hücrenin oksido-redüksiyon dengesini sürdürüp hücreleri endojen ve eksojen kaynaklı oksidanların zararlı etkilerinden korumaktadır. GSH vücutta redükte ve okside olmak üzere iki formda bulunur. GSH akciğer, bağırsak, böbrek ve kısmen karaciğer gibi eksojen toksinlere direkt olarak maruz kalabilen organlar için çok önemlidir. Karaciğer, ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu ile devreye giren ve aynı zamanda GSH için ana depo olan bir organdır. GSH en yüksek hücre içi derişimine (~10 mM) hepatositlerde ulaşır. GSH'un en önemli görevi, enzim ve proteinlerin tiyol gruplarının indirgenmesi ile redükte formlarının yeterli düzeylerde kontrolünü sağlamaktır. Tiyol grubuna sahip birçok enzim düşük hızda fakat okside olarak ya da oksijenin direk etkisi ile hızla aktivitelerini yitirirler. İşte GSH kendisi okside

olup tiyol gruplarını tekrar indirgeyerek bunların aktivasyonunu sağlar. Özellikle H_2O_2 'nin elimine edilmesinde GSH'un oksitlenebilirliğinden faydalanılır (219, 220).

GSH, hücre metabolizmasına katılan, hücre bütünlüğünün muhafazası için esansiyel bir bileşiktir ve karaciğer vücut GSH içeriğinin en önemli kaynağını oluşturur. LPO'nun artması sonucu GSH'nın konjuge bileşiklerinin oluşması dokularda GSH düzeylerinin azalmasına sebep olabilir (219, 220). Diğer yandan ksenobiyotikler ve diğer toksik maddelerin oluşturdukları oksidatif hasarlarda oluşan doku GSH seviyeleri ve antioksidan enzim aktivitelerindeki değişiklikler halen tartışmalı bir problemdir.

GSH ve GST dokuların DEN'in zararlı etkilerinden korunmasında önemli rol oynarlar. GSH indirgeyici etki ile birlikte reaktif -SH grubuna sahip sistin içeren bir tripeptiddir. GSH, ROT ile -SH grubunun doğrudan etkileşimi ile enzimatik olmayan bir antioksidan olarak hareket edebilir veya bir kofaktör veya bir koenzim olarak, ROT'lerini enzimatik olarak detoksifiye edebilir (219, 220).

Bazı araştırmacılar (214, 221) oksidatif strese bağlı olarak dokularda GSH düzeylerinde azalma gözlemlerken, bazı araştırmacılar (222, 223) ise oluşan hasarın GSH düzeylerini değiştirmedeğini ve hatta artırabileceğini belirlemişlerdir. Bansal ve ark. (222) tarafından DEN verilmesinin kan ve karaciğerde GSH düzeylerini azalttığı; buna karşın bir başka çalışmada eritrositlerde total GSH düzeylerinin arttığı bildirilmektedir (214). Yapılan çalışmada DEN uygulaması ile kan ve karaciğer GSH düzeylerinin istatistiksel olarak önemli düzeyde azaldığı belirlenmiştir. Bundan dolayı GSH düzeylerindeki bu azalmalar dokuların oksidatif strese karşı bir tepkisi olarak değerlendirilebilir.

CAT primer enzimatik savunma sistemlerinden birisidir ve kanser, diyabet, katarakt, ateroskleroz, iskemik-reperfuzyon hasarı, artrit, norodejeneratif hastalıklar, beslenme yetersizliği ve yaşlanmayı içine alan pek çok patolojik şartlarda ortaya çıkan oksidatif strese karşı savunmada antioksidan sistemin öncelikli bir enzimidir (224).

Çimen ve ark. (225) tarafından rat eritrositlerinde CAT enziminin karakterizasyonu ve kinetiğini incelenmiş ve CAT enziminin birçok şekli saptanmıştır. İlaç ve kimyasal maddelerin büyük kısmının vücudun belli organlarında serbest radikal oluşum hızını artırabildiği, bu nedenle, antioksidan enzimlerin hem hücrenin kararlılığını korumada hem de serbest radikalleri yok etmede çok önemli olduğu söylenmiştir. Çalışmada DEN'in CAT aktivitesi üzerine olan etkisi araştırılmış ve DEN uygulanan gruplar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında CAT aktivitesinde istatistiksel olarak önemli azalma bulunmuştur.

GSH-Px detoksifikasyon sırasında yükseltgenmiş endojen antioksidanları indirgeyerek rejenerasyonlarını sağlar. Bu esnada kendisi de yükseltgenmiş olur. GSH-Px'in katalizlediği bu reaksiyonda, GSH'ın enzim aktivitesi için esas olduğu açıktır. GSH sürekli olarak hücreler tarafından kullanıldığından, sentezinin inhibisyonu hızlı tükenmesine yol açabilir (224).

LPO'na karşı oluşan korunma mekanizmasında GSH-Px ve CAT etkili antioksidan enzimler olarak bilinirler. GSH-Px, GSSG oluşumunda GSH aracılığıyla H₂O₂ gibi etkin radikallerin indirgenmesinde; CAT ise karaciğerde çok bulunan ve H₂O₂'in O₂ ve H₂O'ya indirgenmesinde GSH-Px'la birlikte etkiyen önemli bir enzimidir. Her iki enzim vücuttaki hücresel korunmada önemli

rol oynarlar. Bu nedenle oksidatif strese bağlı olaylarda GSH-Px ve CAT aktivitelerinde değişmelerin oluştuğu bildirilmektedir (226). Yapılan araştırmalarda, nitrosoaminler ve diğer ksenobiotiklerle oluşturulan LPO olaylarında GSH-Px ve CAT gibi antioksidan enzimlerin düzeylerinde azalmaların oluştuğu gösterilmiştir (214, 222, 227, 228). Çalışmada, hem GSH-Px hem de CAT aktivitelerinin kontrol grubuna göre DEN verilen gruplarda önemli düzeyde azaldığı tespit edilmiştir. GSH-Px ve CAT aktivitelerindeki bu azalma etkin oksijen radikallerine karşı dokularda koruyucu bir etkinlik oluştuğunu ortaya koymaktadır.

Karahan ve ark. (229) yaptıkları çalışmada ratlarda bazı nitrosoaminlerin uzun süreli uygulanmasını takiben kan, karaciğer ve böbrekte LPO'nun göstergesi olan MDA ve GSH düzeyleri ile GSH-Px ve CAT aktivitelerini araştırmışlardır. Ratlara DEN, nitrosopiperidin ve nitrosopirolidini içme suyuyla 200 ppb miktarında 30 gün süreyle uygulamışlardır. Biyokimyasal analizler sonucunda kontrol grubuna göre plazma, karaciğer ve böbrek dokularında MDA düzeylerinin önemli düzeyde arttığını; GSH düzeyleri ile GSH-Px ve CAT aktivitelerinin ise azaldığı belirlemişlerdir. Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar Karahan ve arkadaşlarının yapmış oldukları bu çalışmanın sonuçları ile paralellik göstermektedir.

Ramakrishnan ve ark. (190) yaptıkları çalışmada ratlarda DEN ile oluşturulan hepatokarsinogenezis üzerine silmarinin etkilerini incelemişlerdir. On beş hafta boyunca ratların içme sularına %0,01 oranında DEN ilave etmişlerdir. DEN uygulanan grupta MDA düzeyinin yükseldiğini, GSH düzeyi ve CAT, GSH-Px, SOD aktivitelerinin ise düştüğünü, silmarinin ise önce ve sonra uygulamalarla

bu yükseliş ve düşüşleri normal düzeylere getirdiğini tespit etmişlerdir. Benzer şekilde Karaca ve Sözbilir (230) DEN verilen ratlarda alfa lipoik asidin koruyucu etkilerini araştırmışlardır. Tek doz 150 mg/kg ip. DEN verilen ratlarda oksidatif stres ve hepatotoksisite oluşturmak amaçlanmış ve DEN verilen ratlarda LPO ürünü olan MDA parametresinde artma, antioksidan kapasitenin göstergesi olan GSH düzeyinde ve vücut ağırlıklarında azalma tespit edilmişlerdir. Araştırmacılar α -lipoik asiti ise 100 mg/kg/gün dozunda 7 ve 14 gün oral gavaj yoluyla uygulanmışlar ve yükselmiş olan MDA düzeylerinde belirgin azalma, azalmış olan GSH parametresinde belirgin artma tespit etmişlerdir. Bu verilere dayanarak DEN'in oksidatif stresi arttırdığı ve hepatotoksisite meydana getirdiği teyit edilmiştir.

Sanchez-Perez ve ark. (213), Chakraborty ve ark. (231) tek doz 200 mg/kg ip. ve Atakişi ve Özcan (232) tek doz 150 mg/kg ip. DEN uygulamışlar ve DEN uygulamasından sonra LPO düzeylerinde artma GSH düzeylerinde ise bir düşüş tespit etmişlerdir. Yapılan çalışmalarda karaciğer karsinogenezinde oksidatif stresin önemli bir role sahip olduğunu ve hepatokarsinogenez ile LPO arasında korelasyon olduğunu göstermişlerdir. Atakişi ve Özcan (232) antioksidan olan omega-3, Chakraborty ve ark. (231) ise vanadyum vererek MDA ve GSH düzeylerinde düzelme kaydetmişlerdir. Çalışmamızda DEN'in MDA ve GSH düzeylerinde meydana getirdiği değişiklikleri likopenin önemli ölçüde düzelttiği tespit edilmiştir.

Thirunavukkarasu ve Sakthisekaran (233) DEN ve FB ile oluşturdukları hepatik tümör oluşumu ile antioksidanlar arasındaki ilişkiyi şu şekilde açıklamışlardır; DEN'in metabolitleri DNA'ya bir ya da iki oksidasyon sağlayan

elektron ile kovalent bağlanarak tümör promotörlerinin bağlanmasına aracılık ederler. Tümör promotörü, bir $O_2^{\cdot-}$ indükleyicisi olarak görev yaparak ROT ve H_2O_2 oluşumuna neden olur. Bunun sonucunda $O_2^{\cdot-}$ ve H_2O_2 birikimi gerçekleşir. Bu birikim, koruyucu antioksidan mekanizmanın azalmasını ve yüksek oranda reaktif OH^{\cdot} oluşmasına neden olur. Oluşan OH^{\cdot} deoksiribozda parçalanmalara dolayısıyla DNA kırıklarına neden olur. Reaktif OH^{\cdot} , lipid membranda yer alan yağ asitlerindeki H atomlarını ayırır. Bu H atomları da poliansature yağ asitlerinin karbonil gruplarıyla birleşerek H_2O_2 radikallerini oluşturur. Bu durum, $O_2^{\cdot-}$ ve H_2O_2 radikallerinin LPO artışına, dolayısıyla hücre zarında hasara neden olduklarını ortaya koymaktadır. Banakar ve ark. (234) DEN ve FB uyguladıkları sıçanların karaciğer doku hücrelerinde, radikal oluşumu sonucunda oluşan LPO'nun bir ürünü olan MDA düzeyinin arttığını, CAT, GSH-Px, GST ve SOD aktivitelerinin ise azaldığını belirlemişlerdir. Bu enzimlerin savunma sisteminde rol aldığını ve savunma sistemi için çok önemli olduğunu ortaya koymuşlardır. SOD ve CAT'ın, $O_2^{\cdot-}$ 'ni H_2O_2 ve H_2O haline dönüştürdüğü ve bu oluşan H_2O_2 'nin de, GSH-Px tarafından yakalanarak, CAT ya da diğer enzim sistemleri tarafından yok edildiğini ortaya koymuşlardır.

Çalışmada DEN uygulanan ratlarda kan ve karaciğer dokularında MDA düzeyinde artış, GSH düzeyi, CAT, GSH-Px, GST ve SOD aktivitelerinde anlamlı düşüş gözlenmiş olup literatür bulgularını desteklemektedir.

Pradeep ve ark. (55, 235) gerçekleştirmiş oldukları çalışmada 30 gün süre ile DEN (200 mg/kg i.p.) ile oluşturulmuş hepatotoksisite üzerine silmarinin etkilerini incelemişlerdir. Çalışmada 30 gün sonunda DEN grubunda bazı karaciğer spesifik enzimlerin ve LPO'nun arttığını antioksidan enzim düzeylerinin

ise azaldığını tespit etmişlerdir. Yine 30 gün süre ile DEN (100 mg/kg i.p.) ile oluşturulmuş hepatotoksisite üzerine *Cassina fistula*'nın etkilerini inceledikleri başka bir çalışmada da diğer çalışmalarına benzer şekilde bazı karaciğer spesifik enzimlerin ve LPO'nun arttığını antioksidan enzim düzeylerinin ise azaldığını belirlemişlerdir. Rezaie ve ark. (236) ratlarda 30 gün süre ile tek doz DEN (200 mg/kg i.p.) ile oluşturulan hepatik ve renal toksisite üzerine *Echinaceo purpurea*'nın etkilerini incelemişlerdir. DEN uygulanan grupta AST, ALP aktiviteleri ile üre, kreatinin, total bilirubin ve direk bilirubin düzeylerinin yükseldiğini belirlemişlerdir. Bansal ve ark. (214) ise rat eritrositlerinde 7, 14 ve 21 gün süre ile uyguladıkları DEN (200 mg/kg i.p.)'in etkilerine karşı vitamin E'nin etkilerini incelemişler ve 7, 14, 21 gün süre ile uygulanan DEN gruplarında LPO düzeylerinde belirgin artış belirlemişlerdir. Sanchez-Perezve ark. (213) ratlarda 2-AAF ve partiyel hepatektomiye takiben tek doz DEN (200 mg/kg i.p.) uygulanan ratların karaciğerlerinde 25 gün sonunda LPO ile preneoplastik lezyon oluşumu arasında pozitif bir korelasyon belirtilmiştir. Bu araştırmacılar DEN uygulamasından sonra DEN'in veya metabolitlerinin etkilerinin kısa süre sonra ortaya çıkabileceğini yaptıkları çalışmalarda göstermişlerdir.

DEN'in kısa ve uzun süre uygulaması sonunda meydana gelen değişiklikleri araştırdığımız çalışmada toksik etkilerin biyotransformasyondan sorumlu ana organ olan karaciğerde akut olarak geliştiği ve kısa süreli DEN uygulanan grupta belirgin değişikliklerin olduğu gözlemlenmiştir. Likopen ile tedavi edilen ratlarda ise DEN metabolizmasına bağlı olarak oluşan oksidatif stresin üstesinden gelmek için kan ve karaciğer antioksidan enzim aktiviteleri artış ile sonuçlanmıştır.

RT-PCR analizlerinden, biyolojik örneklerden elde edilen DNA'nın kopya sayısının ve mRNA düzeyinin sayısal olarak belirlenebilmesi amacıyla faydalanılmaktadır. Gen ekspresyonunda istatistiksel sonucun önemli çıkması genin modifikasyonu ile ifade edilebilir. Ekspresyonların düşük oluşu genin kodladığı protein oluşumunun baskılandığını, yüksek oluşu ise daha fazla protein oluşumunu belirtmektedir (142, 143). Çalışmamızda kan ve karaciğer doku örneklerinde oksidatif stres ile ilgili CAT enziminin gen ekspresyon düzeyleri RT-PCR ile belirlenmiştir. DEN'in yalnız CAT enzim aktivitesini değil aynı zamanda ekspresyon düzeyini de etkilediği saptanmıştır.

Yapılan bir çalışmada, çörek otu (*Nigella Sativa*)'nun biyoaktif komponenti olan timokinonun ratlarda DEN ile oluşturulmuş hepatik karsinogenezi bazı antioksidan enzimlerin gen ekspresyonları üzerine etkileri incelenmiştir. Ratlar 4 gruba ayrılarak 1. grup kontrol, 2. grup 4 mg/kg/gün dozunda içme sularına timokinon ilave edilen grup, 3. grup 200 mg/kg tek doz i.p. DEN uygulanan grup ve 4. grup ise timokinon ve DEN uygulanan grup şeklinde oluşturulmuştur. Araştırmacılar çalışmanın sonunda DEN uygulanan grupta GSH düzeyi ile CAT, GSH-Px ve GST gibi antioksidan enzim aktivitelerinde düşüş belirlemişlerdir. Bununla beraber MDA düzeyinde ise belirgin artış tespit etmişlerdir. Timokinonun ise tüm bu parametrelerde düzelme sağladığı belirlenmiştir. Ayrıca çalışmada antioksidan enzim aktivitelerindeki düşüşe paralel şekilde DEN uygulanan grupta GST, CAT ve GSH-Px enzimlerinin gen ekspresyon düzeylerinde de anlamlı bir düşüş gözlemlenmiştir. DEN uygulaması sonrası antioksidan enzim aktivitelerindeki ve CAT gen ekspresyonundaki düşüş

DEN metabolizması sırasında serbest radikal üretimindeki artışla açıklanmıştır (187).

Yapılan başka bir çalışmada Kasperczyk ve ark. (237) kurşuna maruz kalan insanların eritrositlerinde bazı antioksidan enzimlerin (CAT, GSH-Px, SOD) aktiviteleri ile bu enzimlerin gen ekspresyon düzeylerini incelemişlerdir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında düşük doz kurşuna maruz kalan grupta SOD1 ve GSH-Px1 gen ekspresyon düzeylerinin, aktivitelerine paralel olarak belirgin olarak arttığını gözlemlemişlerdir. Araştırmacılar CAT aktivitelerinde ve gen ekspresyon düzeylerinde kurşun maruziyeti sonrasında önemli bir fark gözlemlememişlerdir. Araştırmacılar kurşunun yalnız antioksidan enzim aktivitelerini değil aynı enzimlerin ekspresyon düzeylerini de etkilediğini belirlemişlerdir.

Bingül ve ark. (238) çalışmalarında ratlarda DEN (200 mg/kg i.p.) enjeksiyonuna bağlı karaciğer hasarını ve oksidatif stresin rolünü karşılaştırmışlardır. Ayrıca, yaban mersininin karaciğer toksisitesindeki antioksidan etkinliğini araştırmışlardır. Bu amaçla karaciğer dokusunda MDA, dien konjugat ile GSH-Px, SOD, GST aktiviteleri ile serum AST, ALT, LDH, gama glutamil transferaz (GGT) aktivitelerini ölçmüşlerdir. DEN uygulamasıyla; karaciğerde nekrotik değişimler ile MDA, dien konjugat, serum AST, ALT, LDH ve GGT aktivitelerinde artış, antioksidan enzim aktivitelerinde azalış tespit etmişlerdir. Çalışmalarında antioksidan enzimlerden GST ekspresyon düzeyinde anlamlı artış, CAT, SOD ve GSH-Px ekspresyon düzeyinde ise düşüş tespit etmişlerdir. Çalışmamızda da benzer şekilde DEN uygulaması sonrası MDA düzeyleri ile AST, ALT, LDH artış, antioksidan enzim aktivitelerinde ise azalış

tespit edilmiştir. Bunun yanında çalışmamızda araştırmacıların sonuçlarının aksine CAT enzimi ekspresyon düzeylerinde DEN uygulanan gruplarda artış tespit edilmiştir. Enzim aktivitesi ile gen ekspresyon düzeyi arasındaki farklılığın posttranskripsiyonel faktörlerden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Thijssen ve ark. (239) çalışmalarında farelerin böbrek dokularında farklı doz (10 ve 100 mg/L içme suyu) ve sürelerde (1, 8 ve 23 hafta) kadminyum (Cd) uygulamasının antioksidan enzimlerin (SOD1, SOD2, CAT, GSH-Px4) gen ekspresyon düzeylerindeki değişimleri incelemiştir. Sekizinci hafta sonunda SOD1'in ekspresyon düzeyinin yüksek doz Cd uygulanan grupta düştüğünü, SOD2'de ise tüm uygulama sürelerinde ve dozlarında anlamlı bir değişim olmadığını belirtmişlerdir. Yirmi üçüncü hafta sonunda CAT'ın ekspresyon düzeyinin yüksek doz Cd uygulanan grupta, GSH-Px4'ün ekspresyon düzeyinin ise düşük doz Cd uygulanan grupta arttığını gözlemlemişlerdir. Sekizinci haftada SOD'un ekspresyon düzeyindeki azalışın oksidatif hasardan olmadığını, bunun yüksek Cd konsantrasyonuna maruziyet sonrası geçici olarak transkripsiyonel değişikliklerden kaynaklanabileceğini düşünmüşlerdir. Çünkü 23. haftada SOD'un ekspresyon düzeyinde gruplar arasında fark gözlenmemiştir. CAT ve GSH-Px4'ün ekspresyon düzeyleri 8. haftada değişmediği için bu enzimleri savunmaya geç cevap veren enzimler olarak değerlendirmişler ve Cd'un oksidatif stresi artırarak antioksidan enzimlerin ekspresyon düzeylerinde değişimlere sebep olduğunu belirlemişlerdir.

Mohamed ve ark. (240) çalışmalarında rat karaciğerinde kurşun ile oluşturulmuş hepatik oksidatif stres ve antioksidan genlerin ekspresyonları üzerine zencefil ekstresinin etkilerini incelemiştir. Çalışmalarında özellikle 6. haftada

kurşun verilen grupta karaciğer dokusunda MDA düzeyi ile GST ve SOD aktivitelerinin yükseldiğini, CAT ve GSH-Px aktivitelerinin ise azaldığını göstermişlerdir. RT-PCR gen ekspresyon verileri, mRNA hepatic antioksidan enzimleriyle ilgili olan genlerin (GST- α 1, GSH-Px1, CAT ve SOD2) kurşuna maruz kaldıktan sonra down regüle olduğunu göstermiştir. Bu değişimler ratların karaciğerinde kurşun tarafından tetiklenen oksidatif DNA hasarından kaynaklanabilmektedir. Toksik madde kaynaklı ROT, redoksa duyarlı düzenleyici genlerde ve sinyal iletişim yollarında gen ekspresyonunu değiştirmek için hücre içi haberciler olarak da hareket edebilirler. Yaptıkları çalışmanın sonuçları zencefil ekstresinin hepatic GST- α 1, CAT ve SOD2'nin mRNA ekspresyonunu engellediğini, hepatic GSH-Px1'in mRNA seviyesini uyardığını göstermiştir.

Limaye ve ark. (241) ratlarda streptozotosin ile oluşturulmuş diyabet modelinde böbrek dokusunda oksidatif stres ve antioksidan enzimlerin gen ekspresyonlarındaki değişimleri incelemişlerdir. Çalışmalarında LPO düzeyi ile CAT, SOD ve GSH-Px enzim aktivitelerini ve bu enzimlerin ekspresyon düzeylerindeki değişimleri belirlemişlerdir. Çalışma sonunda streptozotosin grubunda kontrol grubuna göre LPO ile SOD, GSH-Px aktivitelerinde artış, CAT aktivitesinde ise belirgin düşüş saptamışlardır. Kontrol grubuna göre CAT, SOD ve GSH-Px gen ekspresyon düzeylerinde ise anlamlı bir artış belirlemişlerdir. Araştırmacılar, CAT aktivitesi ile ekspresyon düzeyi arasındaki farklılık durumunun posttranslasyonel dönüşümler sonrası işlemlerden kaynaklanabileceğini ve glikozun proteinle birleşmesinin buna sebep olabileceğini düşünmektedirler.

Oksidatif streste farklı dokularda oksidantlara karşı antioksidan bileşiklerin kullanıldığı ve bu oksidan bileşiklerin antioksidan enzimlerden özellikle CAT gen

ekspresyon düzeylerini artırdığını (242-244) ya da azalttığını (245, 246) gösteren çalışmalar mevcuttur. Chen ve ark. (243) ratların karaciğerinde reperfüzyon modeli ile oluşturdukları oksidatif stres üzerine N-asetil sisteinin etkilerini inceledikleri çalışmalarında karaciğerde iskemi ve reperfüzyon sonrasında CAT ve SOD'un ekspresyon düzeyleri ile kan örneklerinde OH⁻, NO düzeyleri ve ALT aktivitesini araştırmışlardır. Çalışmalarının sonunda kanda OH⁻, NO düzeyleri ve ALT aktivitelerinin ve karaciğerde CAT ve SOD enzimlerinin ekspresyon düzeylerinin anlamlı bir şekilde arttığını, N-asetil sisteinin ise karaciğer hasarını hafiflettiğini belirlemişlerdir. Araştırmacılar iskemik karaciğerin reperfüzyonu sonrası serbest radikallerinin temizlenmesi için antioksidan enzimlerin ekspresyon düzeylerinin arttığını düşünmüşlerdir.

Yapılan başka bir çalışmada ise Gomez ve ark. (244) ratların hipokampusünde alüminyumun oksidan aktivitesi üzerine melatoninin etkilerini incelemişlerdir. Ratların hipokampusünde oksidatif stres belirteçlerinden MDA, GSH, GSSG düzeylerini, CAT, GSH-Px, GST, SOD ve GR aktivitelerini ve CAT, SOD, GSH-Px enzimlerinin ekspresyon düzeylerini belirlemişlerdir. Çalışmalarının sonunda oksidan olarak alüminyum uygulanan grupta MDA, GSH, GSSG düzeyleri, CAT, GSH-Px, GST, SOD ve GR aktiviteleri ve CAT, SOD ekspresyon düzeylerinde artış, GSH-Px ekspresyon düzeyinde ise düşüş belirlemiştir. GSH-Px ekspresyon düzeyindeki düşüşün gen ürünlerinin transportu ve translasyonu gibi transkripsiyon sonrası değişikliklerden kaynaklanabileceğini düşünmüşlerdir. Yukarıda belirtilmiş çalışmalarla uyumlu olarak çalışmamızda DEN uygulanan gruplarda CAT ekspresyonunda anlamlı artışlar belirlenmiştir. Çalışmamızda DEN uygulanan ratlarda kan ve karaciğerinde CAT ekspresyon

düzeşinin arttığı saptanmıştır. Bu değışiklikler rat karaciğerinde DEN'e bağlı oluşan oksidatif DNA hasarından ileri gelebilir. DEN'in sitokrom P-450 yoluyla metabolizması sırasında oluşan metabolitler dokularda oksidatif, mutajenik ve genotoksik hasarlanmalara sebep olmaktadır.

Kim ve ark. (242) gerçekteşirdikleri çalışmada insan hepatoma hücrelerinde gümüş nanopartikülleri ve gümüş nitratin toksisitesine bağlı olarak oluşan oksidatif stresi araştırmışlardır. İnsan hepatoma hücrelerinde gümüş nanopartikülleri ve gümüş nitratin oksidatif stresle ilişkili CAT ve GSH-Px enzimlerinin ekspresyon düzeylerinde önemli artışa neden olduğunu ve bunun meydana gelen oksidatif stresten kaynaklandığını belirtmişlerdir. Rohrdanz ve ark. (247) ise beyin astrosit hücrelerinde CAT ve SOD enzimlerinin ekspresyon düzeyleri üzerine oksidatif stresin etkilerini incelemişlerdir. Çalışmalarında astrosit hücrelerinde H₂O₂ ve doğrudan ya da redoks döngüsünü etkileyerek oksidatif strese neden olan parakuatin artan konsantrasyonlarıyla orantılı olarak CAT ve SOD enzimlerinin ekspresyon düzeylerinde artışa neden olduğunu belirlemişlerdir. Araştırmacılar astrositlerde oksidatif strese karşı CAT ve SOD ekspresyon düzeylerinde artış olduğunu belirtmişlerdir.

Enzimler aynı zamanda birer proteindir. CAT'ın gen ekspresyonu sonucu oluşan proteinler CAT enzimini oluştururlar (248). Bu bağlamda enzim aktivitesi ile gen ekspresyonları arasında bir ilişki bulunması gerekir. Çalışmada CAT enzim aktiviteleri ile CAT mRNA düzeylerinde farklılıklar saptanmıştır. Hepatotoksik bir madde olan DEN uygulanan gruplarda kan ve karaciğer dokularında CAT enzim aktivitesi kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde düşmüş, aynı enzimin ekspresyon düzeyi ise artmıştır. CAT aktivitesi ile gen

ekspresyon düzeyi arasındaki farklılığın protein ve mRNA dönüşümündeki varyasyondan kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Genotip ile mRNA/protein seviyeleri arasındaki ilişkinin çeşitli faktörlerden etkilendiği (çevre, transkripsiyonel regülasyon gibi) düşünülebilir. Likopen uygulaması ile CAT ekspresyon düzeyinin azaldığı belirlenmiş ve bunun, likopenin transkripsiyonel faktörlerin radikal ilişkili oksidasyonunu engellemelerine bağlı olabileceği düşünülmüştür.

Oksidatif stres veya hücrede redüksiyon ve oksidasyon arasındaki dengesizlik, çekirdekte redoks-duyarlı transkripsiyon faktörlerinin translokasyonunu etkiler (248). Bu nedenle, CAT aktivitesi ile ekspresyon düzeyi arasındaki farklılık CAT enziminin transkripsiyon süreçlerindeki başlangıç mekanizmasından sorumlu transkripsiyonel faktörlerin oksidasyonundan kaynaklanıyor olabilir. Ayrıca enzimin ekspresyonunda tespit edilen değişim, mRNA'ların yarı ömürleri ile ilgili de olabilir. Artan oksidatif stresin mRNA'nın kararsızlığını tetiklemiş olabileceği de bilinmektedir.

Transkripsiyon ve translasyon arasında çeşitli süreçler mevcut olup, protein stabilitesi enzimatik aktivitede önemli bir rol oynar. mRNA'ların degradasyon oranı küçük aralıklarda (memeli mRNA'ları için 2-7 saat) iken, farklı proteinlerin yarılanma ömürleri birkaç dakikadan birkaç güne kadar değişebilir. Ortalama 2 mRNA bir saatte kopyalanırken onlarca protein, mRNA tarafından bir saatte sentezlenir. Tüm bunlar gen ekspresyon düzeyindeki değişimlerin çoğunlukla protein seviyesinde yansıtılmadığını göstermektedir. Ayrıca transkript, protein ve onların aktiviteleri arasındaki ilişkinin açıklanması fonksiyonel olarak aktif proteini oluşturmak için proteinlerin transkripsiyonu,

translasyonu ve posttranslasyonunun modifikasyonunda çeşitli kontrol noktalarının varlığından dolayı zordur (240).

Karotenoidler arasında en güçlü antioksidan olarak likopen bulunur. Fazlaca tüketilen domates sonucunda, yüksek antioksidan düzeye ulaşılmakta ve böylece yağ, DNA ve proteinlerin oksidasyonunda azalmaya neden olmaktadır. Karotenoidler içinde likopenin ROT'nin etkilerini önleme açısından yüksek antioksidan özelliğe sahip olduğu, bu güçlü antioksidan aktivite ile hücresel yapıların, lipidlerin, proteinlerin ve DNA'nın iç oksidasyonuna karşı koruyucu etkiye sahip olduğu ve bazı hastalıkların önlenmesine katkıda bulunduğu bildirilmektedir (249).

Likopen hücre membranlarında bölgesel olarak, membran lipidlerinde meydana gelen oksidatif stresi engellemede önemli bir yere sahiptir. Bu etkisini kalınlığa dayanıklılık ve akışkanlığına etki ederek sağladığı bildirilmektedir. Yapılan birçok çalışma karotenoidlerin, özellikle likopenin, LDL oksidasyonunu ve LPO'nu engellediğini kanıtlanmıştır. Ayrıca karotenoid bakımından yetersiz gıdaların tüketiminin MDA düzeylerinde belirgin bir yükselişe neden olduğu gösterilmiştir (250, 251).

Likopenin antioksidan enzim aktivitelerini anlamlı ölçüde arttırdığını bildiren araştırmalar bulunmaktadır (120, 252). Briviba ve ark. (253)'nın sağlıklı insanlarda likopenin ve diğer karotenoidlerin oksidatif strese ve LDL oksidasyonuna karşı koruyucu etkilerinin olmadığını ve antioksidan enzimlerde değişiklik gözlenmediğini bildirmişlerdir. Ayrıca likopenin ve β -karotenin oksidatif DNA hasarına etkisini incelemek için yapılan bir çalışmada, her iki karotenoidin düşük dozlarda (1-3 μ M) ilavesinin ksantin/ksantin oksidaz kaynaklı

oksidatif DNA hasarını azalttığını, daha yüksek dozlarda (4-10 μ M) ise hücreleri oksidatif strese karşı koruma özelliğini yitirdiğini belirtmişlerdir (254).

Hayvan modellerinde gözlenen likopenin kanser önleyici mekanizması likopenin antioksidan aktivitesini, hücreler arası iletişimi sağlayan gap-junctionların stimülasyonunu, detoksifikasyon enzimlerinin indüksiyonunu ve hücrel proliferasyonun inhibisyonunu kapsayabilir. Giovannucci (255) likopenin lipitleri, nükleik asitleri ve proteinleri kanserde yol açabilecek olan oksidatif stresten koruyabileceğini rapor etmiştir.

He ve ark. (256), karotenoidden zengin domates püresinin ratlara uygulanması ile başlangıç dönemlerinde aflatoxin ile oluşmuş olan preneoplastik odakları azalttığını bulmuşlardır ve buda hepatokarsinogenezin erken aşamalarında likopenin yararlı bir rolü olduğunu düşündürmektedir. Benzer şekilde Astorg ve ark. (257) likopen uygulamasından sonra rat karaciğerinde preneoplastik odakların boyutunda bir azalma belirlemişlerdir, fakat bu azalmayı β -karoten, kantaksantin ve astaksantin uygulamalarından sonra gözlemleyememişlerdir.

Blanche ve ark. (258) 24 hafta boyunca DEN ile başlatılan ve yüksek yağlı diyet ile beslenen farelerde bir likopen metaboliti olan Apo-10'-likopenik asidin (10 mg/kg diyet) etkilerini incelemişler ve hem hepatik karsinogenezis gelişiminde hem de akciğerde tümör insidensinde bir azalma gözlemlemişlerdir. Gene Astorg ve ark. (257) ratlarda 3 hafta boyunca DEN (100 mg/kg vücut ağırlığı) ile oluşturulan karaciğer preneoplastik odaklarını likopenin (300 mg/kg diyet) azalttığını gözlemlemişlerdir. Abdallah ve ark. (259) ise DEN (200 mg/kg vücut ağırlığı) kaynaklı deneysel hepatokarsinogeneziste likopenin koruyucu

rolünü araştırmışlardır. Ratlarda 6 hafta sonunda hepatoselüler karsinoma geliştiğini likopenin ise hepatoselüler karsinoma gelişimini inhibe ettiğini gstemişlerdir.

Yapılan bir çalışmada hepatokarsinogenez üzerine likopenin olumlu etkilerini incelemişlerdir. Araştırmacılar DEN uygulamasından sonra 4 hafta boyunca haftada 3 kez olmak üzere 20 mg/kg vücut ağırlığı dozunda likopen uygulamışlardır. Likopenin hepatik nodüllerin hacmini, boyutunu, sayısını ve insidensini azalttığını tespit etmişlerdir. DEN metabolizması sırasında artmış serbest radikal üretimi ile mücadelenin likopenin koruyucu etkisi sayesinde olabileceğini ve ratlarda DEN ile başlatılan ve FB ile desteklenen hepatokarsinogeneziste likopenin Nrf2 sinyal yolunun aktivasyonu yoluyla oksidatif stresi ortadan kaldırabileceğini ileri srmişlerdir (197).

Çalışmada ratlara antioksidan etkisi olan likopen DEN ile birlikte verildiğinde genel olarak MDA, GSH düzeyleri ve CAT, GSH-Px GST, SOD gibi antioksidan enzim aktivitelerinin kontrol grubuna yaklaştığı saptanmıştır. Bu durum likopenin serbest radikal üretilmesini sınırlayarak oksidatif stres ve serbest radikalleri nleme yeteneğine sahip olması ile açıklanabilir. Likopen tarafından GSH konsantrasyonu ve GST aktivitesinin düzelmesi DEN kaynaklı oksidatif stresi ve karaciğer hasarını azaltıcı bir rol oynadığını göstermektedir.

Aydın ve ark. (260) yaptıkları çalışmada streptozotosin ile indüklenmiş diyabetik ratlarda oksidatif stres parametrelerini incelemişlerdir. Ratların kan ve beyinlerinde MDA, GSH düzeyleri ile CAT, GSH-Px ve SOD aktivitelerinde diyabet oluşturulan grupta artış belirlemişlerdir. Antioksidan enzimlerden CAT, GSH-Px ve SOD enzimlerinin gen ekspresyon düzeylerinde istatistiksel olarak

önemli olmayan bir düşüş saptamışlardır. Likopen uygulaması ile hem antioksidan enzim aktivitelerinde hem de ekspresyon düzeylerinde düzelmeler gözlemlenmiştir.

Membran yağ asitlerinin LPO ile O_2^- ve DNA'ya bağlanan etil karbonyum iyonlarını içeren ROT'nin üretimi ile hepatokarsinogenez başlatılabilir (56). Likopen ise serbest radikalleri temizleyerek etki edebilir (261). Moselhy ve Al Mslmani (262) 7,12-dimetilbenzantrasen (DMBA) enjekte edilen ratların göğüs dokusunda ve serumunda MDA ve NO düzeylerinde yükselme rapor etmişlerdir. Buna ilaveten Wang ve ark. (263) rat karaciğerinde yağlı diyetle ilgili olarak MDA ve 4-HNE düzeylerinin yükseldiğini belirlemişlerdir. Her iki çalışmada da araştırmacılar MDA düzeylerindeki bu yükselmenin likopen uygulaması ile önemli bir düzeyde düştüğünü göstermişlerdir.

Biyolojik olarak, antioksidan alınımı antioksidan yanıt elementlerinin homeostatik down regülasyonuna yol açar. Çalışmada likopen ile tedavi edilen ratlarda kan ve karaciğer CAT gen ekspresyonu down regülasyon ile sonuçlanmıştır. CAT enziminin gen ekspresyonunda likopenin inhibitör etkisi antioksidanların diyetle ilavelerinin antioksidan yanıt elementlerinin down regülasyonuna yol açtığı gibi feedback mekanizması ile ilgili olabilir.

Yapılan bir çalışmada prostat kanseri olan erkek hastalara cerrahi müdahale öncesinde 3 hafta süreyle günde iki kez 15 mg dozunda likopen uygulanmıştır. Likopen uygulanan hastalardaki tümörün, likopen verilmeyen erkeklerde bulunan tümörlere göre daha küçük olduğu saptanmıştır. Ayrıca, likopen tüketen hastalarda tümörlerde gerileme ve malignitesinde azalma ortaya

çıkıştır. Bu da likopenin prostat kanseri tedavisine yardımcı olabildiğini ve hastalığı engelleyebileceğini göstermektedir (264).

Karsinogenezisde başlangıç sonrası aşamada uygulanan likopenin kimyasal olarak kanseri durdurma potansiyelini araştırmak amacıyla yapılan bir çalışmada, doğumdan sonraki 11. günden itibaren DEN, N-metil-N-nitrozoüre ve 1,2-dimetilhidrazin ile muamele edilen dişi ve erkek 118 fareye çeşitli dozlarda likopen uygulanmıştır. Çalışmanın sonunda likopenin erkek farelerde akciğer neoplazisi gelişimini engellediği görülmüştür. Dişilerde ise önemli bir etki görülmemiştir (265).

Bir başka çalışmada ise likopenin ferrik nitritotriasetat ve askorbata maruz bırakılan maymun hücrelerindeki LPO ve 8-oxo-2'-deoxyguanosine oluşumu üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Sonuçta likopenin memeli hücrelerini hem membran ve hem de DNA hasarına karşı koruyabildiği ve oksidatif hasarla ilgili ortaya çıkan tümör ilerlemesine karşı koruyucu bir rol oynadığı gösterilmiştir (130). Yine deri, akciğer ve karaciğer karsinogenez çalışmaları için karsinogen maddelere maruz bırakılan çeşitli ırklarda farelere, kolon karsinogenezi için de ratlara içerisinde likopenin de bulunduğu çeşitli karotenoid uygulaması yapılmıştır. Çalışma sonucunda likopenin tümör ilerlemesini durdurduğu, tümör oluşumunu azalttığı ve karsinogenezi baskıladığı bulunmuştur (266).

Yetişkin 9 kadın ile yapılan bir çalışmada 14 gün süre ile günde 25 g domates püresi tüketiminin, plazmada ve lenfositlerde likopen konsantrasyonunu arttırdığı ve 5 dk süre ile uygulanan 500 µmol/L H₂O₂'in neden olduğu oksidatif strese karşı direnç sağladığı gösterilmiştir (132).

Likopenin lenfositlerdeki oksidatif DNA hasarı üzerindeki etkilerini incelemek amacı ile yapılan bir çalışmada herhangi bir ilaç kullanmayan sağlıklı gönüllülere 1 hafta süre ile günde 15 mg lutein, likopen ve β -karoten takviyesi yapılmıştır. Takviye süresi sonunda alınan kan örneklerinden izole edilen lenfositler H_2O_2 ile muamele edilmiş ve DNA hasarı ölçülmüştür. Çalışma sonucunda likopenin lenfositlerdeki oksidatif DNA hasarının iyileşmesini hızlandırdığı ortaya konmuştur (267).

Yeh ve Hu (268) tarafından yapılan bir çalışmada likopenin, Hs68 insan deri fibroblastlarındaki oksidan nedenli hasar üzerindeki antioksidan ve prooksidan etkileri araştırılmıştır. İnsan deri fibroblastları, çeşitli oksidanlarla inkübe edildikten sonra likopen ve β -karotenle muamele edilmiştir. Sonuçta likopenin kullanılan oksidanlara bağlı olarak antioksidan ya da prooksidan olabildiği, ayrıca likopenin β -karotenden daha güçlü antioksidan ve prooksidan etkileri olduğu görülmüştür.

DMBA tarafından hamsterlerde oluşturulan yanak tümöründe 2,5 mg/kg likopenin tümörü önemli ölçüde baskıladığı ortaya konmuş ve likopenin antikarsinojen etkisi olduğu gösterilmiştir (269).

Likopenin özellikle kanser hücrelerinde, hücre yüzeyindeki reseptörleri etkileyerek hücrelerarası haberleşmeyi engellemek suretiyle proliferasyonu baskılayarak koruyucu etki gösterdiği bilinmektedir. Karas ve ark. (270) insan göğüs adenokarsinoma hücre hattı (Michigan Cancer Foundation 7-MCF7) memeli kanser hücreleriyle yaptıkları çalışmada likopenin, insülin benzeri büyüme faktörü I reseptörlerinin aktivitesini azaltarak hücre büyümesini durdurucu etki yaptığını, hücrelerde apoptotik veya nekrotik ölümlere yol

açmadığını ve bu etkinin hücre döngüsünün ilerlemesini etkilemesiyle ilgili olduğunu saptamışlardır.

Likopen ile ön tedavinin etkili olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (271, 272). Srinivasan ve ark. (138) rat hepatositlerinden elde edilen hücre kültürlerinde gama radyasyonun meydana getirdiği DNA hasarı, LPO ve antioksidan durum üzerine likopenin koruyucu amaçla önce kullanımının etkilerini incelemişler ve likopen ile ön tedavinin etkili olabileceğini belirtmişlerdir. Matos ve ark. (129) likopen ile ön tedavinin ferrik nitriлотriasetat maruz bırakılan ratlarda DNA'nın oksidatif hasarı, LPO ve histopatolojik değişiklikler üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Sonuçta likopen ile ön tedavinin ratların karaciğerini hem membran ve hem de DNA hasarına karşı koruyabildiği ve oksidatif hasarla ilgili ortaya çıkan tümör ilerlemesine karşı koruyucu bir rol oynadığını göstermişlerdir. Çalışmada antioksidan olarak likopen; kısa ve uzun süreli DEN uygulanan gruplarda hem DEN uygulamasından önce hem de DEN ile birlikte verilmiştir. Likopen ile ön tedavinin yapıldığı kısa ve uzun süreli DEN uygulanan gruplarda likopenin düzenleyici etkisi olduğu fakat bu etkinin, likopenin DEN uygulaması ile başladığı gruplara göre daha düşük düzeyde olduğu gözlenmiştir.

Likopenin toksik maddeler ile beraber uygulandığında etkili olduğunu gösteren çalışmalar da mevcuttur (273, 274). Yılmaz ve ark. (273) gerçekleştirdikleri çalışmada ratlarda tek doz adriamisin (10 mg/kg i.p.) kardiyotoksitesisi ve nefrotoksitesisi üzerine likopenin (4 mg/kg gavaj) önce ve birlikte uygulamalardaki etkisini incelemişlerdir. Bu amaçla ratların dokularında MDA, GSH düzeyleri, CAT, GSH-Px aktiviteleri ile plazma üre ve kreatin

düzelelerini belirlemiştirler. Plazmada adriamisın uygulaması ile artmış olan üre ve kreatin düzelelerinin, kalp ve karaciğer MDA, GSH düzeleleri ile CAT, GSH-Px aktivitelelerinin likopen ile ön tedaviye göre birlikte uygulandığında belirgin olarak azaltığını belirlemiştirler. Araştırmacılar adriamisın ile oluşturulmuş kardiyak ve renal hasara karşı likopen kullanımının toksisitenin önlenmesinde etkili olabileceğini göstermiştirlerdir.

Luo ve ark. (275) gerçekleştirdikleri çalışmada ratlarda N-metil-N-nitro-N-nitrozoguanidinın sebep olduğu gastrik kanserde toksik madde ile beraber uygulanan likopenin antioksidan enzim aktiviteleri üzerine etkilerini incelemiştirler ve antioksidan enzimlerin düzenlenmesinde likopenin etkili olduğunu göstermiştirlerdir. Jamshidzadeh ve ark. (276) ratlarda sırasıyla asetaminofen, amiodaron ve siklosporin A ile oluşturulan karaciğer, akciğer ve böbrek toksisitesi üzerine domates ekstresinin etkilerini inceledikleri çalışmalarında likopenin toksik maddeler ile beraber uygulandığı gruplarda biyokimyasal ve histopatolojik düzelmeler gözlemlemiştirlerdir. Çalışmamızda DEN ile oluşturulan hepatotoksositeye karşı likopenin DEN ile beraber uygulanmaya başlandığı gruplarda daha etkili olduğu gözlenmiştir. Elde edilen sonuçlar, likopenin DEN'e bağlı karaciğer hasarına karşı etkisinin likopenin DEN uygulaması ile beraber başlandığı ve DEN'in kısa süreli uygulandığı grupta (DEN+L1), likopenin DEN uygulamasından önce uygulandığı gruplara göre (L+DEN1 ve L+DEN2) daha belirgin olduğunu ortaya koymaktadır.

Colitti ve ark. (277) tarafından gerçekleştirilen çalışmada ineklerin kanlarında doğum öncesi ve doğum sonrası dönemde bazı antioksidan enzimlerin (SOD ve GSH-Px) ekspresyon düzeleleri üzerine diyeteye ilave edilen likopen (540

mg/gün diyet) ve üzüm polifenollerinin (10 g/gün diyet) etkileri araştırılmıştır. Araştırmacılar lökositlerde GSH-Px'in ekspresyon düzeyinde doğum öncesi ve sonrası dönemde istatistiksel olarak önemli bir fark tespit edememişlerdir. SOD'un ekspresyon düzeylerinde ise doğum öncesi ile karşılaştırıldığında doğum sonrası 15. günde bazal diyet uygulanan kontrol ve bazal diyete ilave olarak likopen uygulanan gruplarda anlamlı bir artış belirlemişlerdir. Üzüm polifenollerini uygulanan grupta ise bu artışın daha düşük düzeylerde kaldığını gözlemlemişlerdir. Araştırmacılar doğum öncesi dönemde kullanılan doğal antioksidanların SOD'un ekspresyonunun düzenlenmesi yoluyla stres üzerine kontrol edici etkisinin olabileceğini belirtmişlerdir.

Bazı karaciğer spesifik enzimlerin değişen aktiviteleri, hücre proliferasyonunun etkilerini yansıtmaktadır ve tümör hücrelerinde metabolik dönüşümleri normal hücrelerden oldukça farklıdır. Aktivitelerindeki artış kanser durumunda transformasyona uğrayan hücrelerin sayısı ile korelasyon göstermektedir (8).

Serum transaminaz (AST ve ALT) enzimleri hepatik hasarın teşhisinde kullanılan çok hassas belirteçlerdir, çünkü bu enzimler sitoplazmada lokalize olmuşlardır ve hücre hasar sonrasında dolaşıma karışmaktadır. AST ve ALT vücutta birçok organ ve dokuda yaygın olarak bulunan enzimlerdir. Transaminazların seviyesi karaciğer fonksiyonunu göstermektedir ve bu enzimlerin serumda artmış seviyeleri karaciğer hasarının bir göstergesidir. Biyolojik sistemlerde transaminasyonun rolü iyi bilinmektedir (8, 183).

ALT karaciğer hastalıkları için AST'den daha spesifik olmakla birlikte bazı karaciğer hastalıklarında AST'nin daha fazla artış göstermesi mümkündür.

Serum AST ve ALT hepatik hasarın teşhisinde biomarkırdırlar, çünkü hepatik hasar sonrasında kana salınırlar. ALT karaciğerde hasar meydana geldiğinde teşhiste kullanılan ilk enzimdir. Karaciğer dokusunda karsinojenler nedeniyle inflamasyon ve nekrozun oluşması bu enzimlerin karaciğer hücrelerinden plazmaya sızmalarına sebep olur. Kanserli hayvanlarda artmış ALT aktivitesi gözlenmiştir. Hepatosellüler karsinomada artmış transaminaz aktivitesi belirlenmiştir ve tedavi sırasında tümör kütlesi ile AST ve ALT arasında bir korelasyon olduğu gösterilmiştir (8, 278).

DEN'in toksin düzeyine ve maruz kalma süresine göre hücre ve dokularda görülen hasara bağlı olarak biyokimyasal değişiklikler şekillenir. Serum AST, ALT, ALP, aldolaz, GGT, asit fosfataz, LDH, ornitin karbamoil transferaz, lipit peroksidaz ve izositrat dehidrojenaz, kolesterol ve bilirubin düzeyi artar (279).

Shaarawy ve ark. (280) çalışmalarında tek doz DEN (200 mg/kg i.p.) uygulamasının ratlarda AST ve ALT seviyelerini artırdığını göstermişlerdir. DEN uygulaması, hücre membranının bozulmasına ve tahrip olmasına neden olarak transaminazların karaciğer dokusundan sızmasına yol açmaktadır. DEN verilen hayvanlarda AST ve ALT seviyelerindeki artış, hepatotoksisite ve karsinogenezde preneoplastik değişimlerin gelişimi, artmış çeşitlilik ve karaciğer karsinomasının ilerleyen evreleri ile ilişkilidir (8).

Sun ve ark. (281) farelerde DEN (200 mg/kg i.p. tek doz) ve FB ile oluşturulan tümör modelinde ALT seviyelerinde kontrole göre artış olduğunu ancak AST seviyesinde ise önemli bir değişme olmadığını belirtmiştir. Jahan ve ark. (8) sıçanlarda DEN (200 mg/kg i.p. tek doz) ve FB ile indüklenen hepatokarsinogenez modelinde serum AST ve ALT seviyelerinin arttığını

göstermişlerdir. El Mesallamy ve ark. (282) kimyasal olarak DEN (10 mg/kg gavaj) ile ratlarda oluşturulan hepatokarsinogenezis modelinde AST ve ALT düzeylerindeki artışı, DEN uygulaması ile serbest radikal üretiminin artmasına bağlı olarak hepatosellüler membranın zarar görmesi ve sitoplazmik enzimlerin sistemik sirkülasyona salınmasına bağlamışlardır. Taha ve ark. (211), DEN (200 mg/kg i.p. tek doz) ve 2-AAF ile oluşturulan sıçan hepatokarsinogenezis modelinde benzer şekilde AST ve ALT seviyelerinin kontrol grubuna göre arttığını ve bu durumun karaciğer hasarının bir göstergesi olduğunu belirtmişlerdir. Literatürlerle uyumlu olarak çalışmamızda DEN uygulanan gruplarda AST ve ALT aktivitelerinde belirgin artışlar gözlenmiş olup, DEN'in kısa süreli uygulandığı grupta bu artışın daha belirgin olduğu dikkati çekmiştir.

Antioksidan olarak likopenin kullanıldığı bir çalışmada, ratlarda kronik alkolizm oluşturulmuş, serum AST ve ALT serum değerleri ve AST/ALT oranının alkolik karaciğer hasarının bir göstergesi olduğu saptanmıştır. Karaciğer doku örneklerinin patolojik incelenmesi sonucu alkolün karaciğer hasarı yaptığı tespit edildikten sonra, ratlarda alkol+likopen grubunda serum AST, ALT değerleri alkol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunmuş ve sonuçlar kontrol grubuyla yakınlık göstermiştir. Karaciğer doku kesitlerinin patolojik incelenmesi sonucu bu gruptaki karaciğer hasarının alkol grubuna göre daha az olduğu saptanmıştır. Tüm bu sonuçlarla beraber oksidatif stres ile açıklanan alkolik karaciğer hastalıklarının gelişim sürecinde deneysel olarak antioksidan özellikleri bilinen likopenin koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir (263).

ALP hidrolaz bir enzimdir. Nükleotidler, proteinler ve alkaloidler dahil olmak üzere çeşitli moleküllerden fosfat gruplarının koparılmasını sağlar.

Kemik, karaciğer, bağırsak ve plasenta tarafından oluşturulan enzim, safra yoluyla itrah edilir. Serumda ALP aktivitesi; kemik, karaciğer ve safra yolları hastalıklarında anlamlı olarak değiştiğinden klinikte bu enzimin değeri önem taşımaktadır. Kemik tümörleri, karaciğer hasarı, safra yollarının tıkanıklığı gibi patolojilerde bu enzimin seviyeleri artar (283).

Liu ve ark. (62) yaptıkları çalışmada, ratların içme sularına 16 hafta boyunca haftada iki defa 100 mg/kg DEN ilave ederek hepatotoksisite oluşturmuşlar, serum ALT, ALP ve GGT'da meydana gelen yükselmenin antioksidan olan selenyumla zenginleştirilmiş arpa verildiğinde düzeldiğini bildirmişlerdir. Çalışmamızda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında DEN uygulanan gruplarda ALP aktivitesinin istatistiksel olarak belirgin şekilde arttığı saptanmıştır.

LDH enzimi glikolizin anahtar enzimidir ve laktat üretimini katalizler. Karaciğer dokusu LDH5 yönünden daha zengindir. Kardiyolojik problemler dışında LDH ve izoenzimleri ile ilgili çalışmalar, genellikle karaciğer maligniteleri başta olmak üzere çeşitli malignitelere ve bazı karaciğer hastalıklarına yöneliktir. Karaciğer parankimasının hasarlanmasından sonra bu izoenzimler yükselebilmektedir. Yükselmiş serum LDH'ı genellikle karaciğer hasarı ile ilişkilidir ve hasarlanan hücrelerden kana salınır (7). Jahan ve ark. (8) sıçanlarda DEN ve FB ile indüklenen hepatokarsinogenez modelinde serum LDH seviyelerinin arttığını göstermişlerdir. Benzer şekilde Jagadeesh ve ark. (284) DEN/FB ile oluşturdukları sıçan hepatokarsinogenez modelinde LDH seviyelerinin sağlıklı sıçanlara kıyasla artış gösterdiğini gözlemlemişlerdir. Toksik karaciğer hasarında LDH seviyelerinde kritik değişimler olabileceğini ve membran

bütünlüğünün ve geçirgenliğinin toksik ajanlara yanıt olarak nonspesifik değişimler gösterebileceğini belirtmişlerdir. Çalışmamızda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında DEN uygulanan gruplarda LDH aktivitesinde belirgin bir artış olduğu belirlenmiştir. DEN uygulaması ile LDH seviyelerinin artış göstermesi muhtemelen bu toksik ajanlarının membran bütünlüğüne ve geçirgenliğine zarar vermesi nedeni ile gerçekleşmektedir.

Çalışmada kısa ve uzun süreli DEN uygulanan gruplarda plazma AST, ALT, ALP ve LDH aktiviteleri ile kolestrerol düzeyindeki artışlar karaciğer hasarının diagnostik göstergeleri olarak değerlendirilebilir. Likopen ile tedavi bu enzim düzeylerini belirli oranlarda düşürmüştür. Bu likopenin hepatoprotektif rolünü düşündürmektedir.

Sonuç olarak; artmış MDA ve kolesterol düzeyleri ile AST, ALT, ALP, LDH aktiviteleri, azalmış GSH düzeyi ile CAT, GSH-Px, GST ve SOD aktiviteleri karaciğer hasarını ortaya koymaktadır. Ayrıca oksidatif stresin artışı sonucu yükselen CAT ekspresyon düzeyleri de bu durumu destekler niteliktedir. Çalışmamızın sonuçları oksidatif stresin DEN'e bağlı karaciğer hasarında önemli bir rol oynadığını düşündürmektedir. DEN ile birlikte uygulanan likopenin doku hasarını azalttığı ve karaciğer dokusunu oksidatif hasara karşı koruduğunu göstermektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Chan DW, Sell S. Tumor markers. In: Burtis CA and Ashwood ER (Editors). Tietz Textbook of Clinical Chemistry. 2th Edition, Philadelphia: Soundes Company 1996: 897-927.
2. Manson MM, Gecher A, Hudson EA, et al. Blocking and supressing mechanisms of chemoprevention by dietary constituents. Toxicol Lett 200; 112-113: 449-505.
3. Klaunig JE, Wang Z, Pu X, Zhou S. Oxidative stress and oxidative damage in chemical carcinogenesis. Toxicol Appl Pharmacol 2011; 254: 86-99.
4. Oláh E, Olah E. Basic concepts of cancer: genomic determination. J Intl Fed Clin Chem Lab Med 2005; 16(2).
5. Elson CE, Maltzman TH, Boston JL, Tanner MA, Gould MN. Anti-carcinogenic activity of d-limonene during the initiation and promotion/progression stages of DMBA-induced rat mammary carcinogenesis. Carcinogenesis 1988; 9(2): 331-332.
6. Vineis P, Wild CP. Global cancer patterns: causes and prevention. The Lancet 2014; 383(9916): 549-557.
7. Kuntz E, Kuntz HD. Hepatology Principles and Practice. 2nd Edition, Springer Medizin Verlag Heidelberg, 2006.
8. Jahan MS, Vani G, Shyamaladevi CS. Effect of Solanum trilobatum on hepatic drug metabolising enzymes during diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis promoted by Phenobarbital in rat. Hepatol Res 2007; 37(1): 35-49.
9. Yılmaz S, Karahan İ, Kandemir FM. Bazı nitrozaminlerin ratlarda doku pirüvat kinaz aktivitesi üzerine etkileri. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi 2008; 22(3): 163-168.
10. International Agency for Research on Cancer (IARC) Some N-nitroso compounds. IARC Monographs on the Evaluation of Risks to Humans.17: ISBN-109283212177, 1978.
11. Bartsch JM, Spiegelhander B. Environmental exposure to N-nitroso compounds (NNOC) and precursors: an overview. Eur J Cancer Prev 1996; 5: 11-17.
12. Dallinga JW, Pachen DMFA, Lousberg AHPI, et al. Volatile N-nitrosamines in gastric juice of patients with various conditions of the gastrointestinal tract determined by gas chromatography–mass spectrometry and related to intragastric pH and nitrate and nitrite levels. Cancer Lett 1998; 124(2): 119-125.
13. Hall CN, Kirkham JS, Northfield TC. Urinary N-nitrosoproline excretion: a further evaluation of the nitrosamine hypothesis of gastric carcinogenesis in precancerous conditions. Gut 1987; 28: 216-220.
14. Krul CA, Zeilmaker MJ, Schothorst RC, Havenaar R. Intragastric formation and modulation of N-nitrosodimethylamine in a dynamic in vitro gastrointestinal model under human physiological conditions. Food Chem Toxicol 2004; 42(1): 51-63.
15. Levallois P, Ayotte P Van, Maanen JMS, et al. Excretion of volatile nitrosamines in a rural population in relation to food and drinking water consumption. Food Chem Toxicol 2000; 38: 1013-1019.

16. Tricker AR, Kalble T, Preussmann R. Comparative metabolism and urinary excretion of N-mononitrosopiperazine and N,N'-dinitrosopiperazine in the rat. *Cancer Lett* 1991; 59: 165-169.
17. Hinuma K, Matsuda J, Tanida N, et al. N-nitrosamines in the stomach with special reference to in vitro formation, and kinetics after intragastric or intravenous administration in rats. *Gastroenterol Jpn* 1990; 25(4): 417-424.
18. Walters CL, Smith PLR. The effect of water-borne nitrate on salivary nitrite. *Food Chem Toxicol* 1981; 19: 297-302.
19. Vermeer IT, Pachon DM, Dallinga JW, Kleinjans JC, Van Maanen JM. Volatile N-nitrosamine formation after intake of nitrate at the ADI level in combination with an amine-rich diet. *Environ Health Persp* 1998; 106(8): 459.
20. Larsson SC, Bergkvist L, Wolk A. Processed meat consumption, dietary nitrosamines and stomach cancer risk in a cohort of Swedish women. *Int J Cancer* 2006; 119(4): 915-919.
21. Yurchenko S, Molder U. Volatile N-Nitrosamines in various fish products. *Food Chem* 2006; 96: 325-333.
22. Byun MW, Ahn HJ, Kim JH, et al. Determination of volatile N-nitrosamines in irradiated fermented sausage by gas chromatography coupled to a thermal energy analyzer. *J Chromatogr A* 2004;1054: 403-407.
23. Rostkowska K, Zwierz K, Rozanski A, Moniuszko-Jakoniuk J, Roszczenko A. Formation and metabolism of n-nitrosamines. *Pol J Environ Stud* 1998; 7: 321-325.
24. Rywotycki R. The effect of baking of various kinds of raw meat from different animal species and meat with functional additives on nitrosamine contamination level. *Food Chem* 2007; 101: 540-548.
25. Feng D, Wang H, Cheng X, et al. Detection and toxicity assessment of nitrosamines migration from latex gloves in the Chinese market. *Int J Hygiene Environ Health* 2009; 212: 533-540.
26. Lijinsky W. N-Nitroso compounds in the diet. *Mutat Research* 1999; 15: 129-138.
27. Havery DC, Hotchkiss JH, Fazio T. Rapid determination of volatile nitrosamines in nonfat dry milk. *J Dairy Sci* 1982; 65: 182-185.
28. Singer GM, Chuan J, Roman J, Min-Hsin L, Lijinsky W. Nitrosamines and nitrosamine precursors in foods from Linxian, China, a high incidence area for esophageal cancer. *Carcinogenesis* 1986; 5: 733-736.
29. Mallik MAB, Tesfai K, Pancholy SK. Formation of carcinogenic nitrosamines in soil treated with pesticides, and in sewage amended with nitrogen compounds. *Pro Oklahoma Acad Sci* 1981; 61: 31-35.
30. Hecht SS. DNA adduct formation from tobacco-specific N-nitrosamines. *Mutat Res* 1999; 424: 127-142.
31. Wassenaar CA, Ye Y, Cai Q, et al. Genetic variation in CYP2A6, a nicotine/nitrosamine metabolism enzyme, influences lung cancer risk in two independent case-control studies of African American smokers. *Cancer Res* 2014; 74(19): 4149-4149.

32. Tricker AR, Preussmann R. Carcinogenic N-nitrosamines in the diet: occurrence, formation, mechanism and carcinogenic potential. *Mutat Res* 1991; 259: 277-289.
33. Kodamatani H, Yamazaki S, Saito K, et. al. Highly sensitive method for determination of N-nitrosamines using high-performance liquid chromatography with online UV irradiation and luminol chemiluminescence detection. *J Chromatogr A* 2009; 1216: 92-98.
34. Lijinsky W. *Chemistry and Biology of N-nitroso Compounds*. Cambridge, UK: Cambridge Univ. Pres, 1992.
35. Magee PN. Toxicity of nitrosamines: Their possible human health hazards. *Food Cosm Toxicol* 1971; 9: 207-218.
36. Mitacek EJ, Brunnemann KD, Suttajit M, et al. Exposure to N-nitroso compounds in a population of high liver cancer regions in thailand: volatile nitrosamine (VNA) levels in thai food. *Food Chem Toxicol* 1999; 37: 297-305.
37. Proksch E. Review, Toxicological evaluation of nitrosamines in condoms. *Int J Hygiene Environ Health* 2001; 204: 103-110.
38. Sasazuki S, Sasaki S, Tsugane S. Cigarette smoking, alcohol consumption and subsequent gastric cancer risk by subsite and histologic type. *Int J Cancer* 2002; 101: 560-566.
39. Rywotycki R. Meat nitrosamine contamination level depending on animal breeding factors. *Meat Sci* 2003; 65: 669-676.
40. International Agency for Research on Cancer (IARC). *Monographs on The Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Smokeless Tobacco and Some Tobacco-Specific N-Nitrosamines*. Lyon, France, 2007.
41. Kokkinakis DM. Differences between pancreatropic nitrosamine carcinogens and N-nitrosodimethylamine in methylating DNA in various tissues of hamsters and rats. *Chemico-Biolog Interact* 1991; 78(2): 167-181.
42. Farombi EO, Shrotriya S, Surh YJ. Kolaviron inhibits dimethyl nitrosamine induced liver injury by suppressing COX-2 and iNOS expression via NF- κ B and AP-. *Life Sci* 2009; 84: 149-155.
43. Phillipson CE, Ioannides C. A comparative study of the bioactivation of nitrosamines to mutagens by various animal species including man. *Carcinogenesis* 1984; 5(8): 1091-1094.
44. Lijinsky W, Kovatch RM. Carcinogenesis by nitrosamines and azoxyalkanes by different routes of administration to rats. *Biomed Env Sci* 1989; 2: 154-159.
45. Mirvish SS, Haorah J, Zhou L, et al. Total N-nitroso compounds and their precursors in hot dogs and in the gastrointestinal tract and feces of rats and mice: possible etiologic agents for colon cancer. *J Nutrition* 2002; 132(11): 3526-3529.
46. Lijinsky W. In vivo testing for carcinogenicity. In: Grover PL, Cooper CS. (Editors). *Chemical Carcinogenesis and Mutagenesis*. Berlin: Springer 1990: 179-209.
47. Lijinsky W, Davis RL. Maternal consumption of cured meats and vitamins in relation to pediatric brain tumors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1996; 5: 599-605.

48. Akyuz F, Inal M, Baycu C, Kanbak G. Changes in antioxidant status and lipid peroxidation at liver and kidney tissues of the rats that were given diethylnitrosamine. *Ann Med Sci* 2001; 10: 2, 50-54.
49. Sigma Aldrich. [http:// www.sigmaaldrich.com/catalog/ search?term=N-Nitrosodiethylamine & interface](http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search?term=N-Nitrosodiethylamine&interface). 21.06.2016.
50. Gayathri R, Priya DKD, Gunassekaran GR, Sakthisekaran, D. Ursolic acid attenuates oxidative stress-mediated hepatocellular carcinoma induction by diethylnitrosamine in male Wistar rats. *Asian Pacific J Cancer Prev* 2009; 10: 933-938.
51. Janani P, Sivakumari K, Geetha A, Ravisankar B, Parthasarathy C. Chemopreventive effect of bacoside A on N-nitrosodiethylamine-induced hepatocarcinogenesis in rats. *J Cancer Res Clin Oncol* 2010; 136: 759-770.
52. <http://www.wikiwand.com/nl/Nitrosamine>. 18.05.2016
53. Atalay A. Nitrozaminlerin proteinlerle etkileşimi. *Biyokimya Dergisi* 1989; 14(3): 30-33.
54. Yamada K, Yamamiya I, Utsumi H. In vivo detection of free radicals induced by diethylnitrosamine in rat liver tissue. *Free Radic Biol Med* 2006; 40: 2040-2046.
55. Pradeep K, Mohan CVR, Gobianand K, Karthikeyan S. Silymarin modulates the oxidant-antioxidant imbalance during diethylnitrosamine induced oxidative stress in rats. *Euro J Pharmacol* 2007; 560: 110-116.
56. Kang JS, Wanibuchi H, Morimura K. Role of CYP2E1 in Diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in vivo. *Cancer Res* 2007; 67(23): 11141-11146.
57. Tharappel JC, Spear BT, Glauert HP. Effect of phenobarbital on hepatic cell proliferation and apoptosis in mice deficient in the p50 subunit of NF- κ B. *Toxicol Appl Pharmacol* 2008; 226(3): 338-344.
58. Arora A, Shukla Y. Induction of preneoplastic altered hepatic foci following dietary sulphur supplementation. *Human Experiment Toxicol* 2004; 23: 229-234.
59. Chakraborty T, Ghosh S, Datta S, Chakraborty P, Chatterjee M. Vanadium suppresses sister-chromatid exchange and DNA protein crosslink formation and restores antioxidant status and hepatocellular architecture during 2-acetylaminofluorene induced experimental rat hepatocarcinogenesis. *J Exp Therap Onc* 2003; 3: 346-362.
60. Finnberg N, Silins I, Stenius U, Hogberg J. Characterising the role of MDM2 in diethylnitrosamine induced acute liver damage and development of pre-neoplastic lesions. *Carcinogenesis* 2004; 25: 113-122.
61. Mitsumori K, Onodera H, Shoda T, et. al. Liver tumour-promoting effects of oxfendazole in rats. *Food Chem Toxicol* 1997; 35: 799-806.
62. Liu LL, Gong LK, Qi XM, et al. Altered expression of cytochrome p450 and possible correlation with preneoplastic changes in early stage of rat hepatocarcinogenesis. *Acta pharmacol Sinica* 2005; 26(6): 737-744.
63. Bogovski P, Bogovski S. Animal species in which N-nitroso compounds induce cancer. *Int J Cancer* 1981; 27: 471-474.

64. Lijinsky W. Lifespan and cancer: the induction time of tumors in diverse animal species treated with nitrosodiethylamine. *Carcinogenesis* 1993; 14: 2373-2375.
65. Takayama S, Thorgeirsson UP, Adamson RH. Chemical carcinogenesis studies in nonhuman primates. *Proc Jpn Acad* 2008; 84: 176-188.
66. Akkuş İ. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri, Mimoza Basım, Yayım ve Dağıtım A.Ş., Konya, 1995.
67. Aruoma OI. Free radicals, oxidative stress and antioxidants in human health and disease. *Am Oil Chemists Soc* 1998; 199-209.
68. Altıntaş S. Kahramanmaraş'ta Bazı İş Kollarında Çalışan Boya İşçilerinde Plazma ve Eritrosit Membranı Sialik Asit, Glutasyon, Plazma Nitrik Oksit ve Lipid Peroksidasyonu Düzeylerinin Değerlendirilmesi. Yüksek lisans tezi. Kahramanmaraş: Sütçü İmam Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2006.
69. Onat T, Emerk K. Temel Biyokimya I. Saray Medikal Yayıncılık, 1997.
70. Scandalios JG. The rise of ROS. *Trends in Biochem Sci* 2002; 27(9): 483-486.
71. Bast A, Haenen M, Cees J, Doelwan A. Oxidants and antioxidants: state of the art. *Am J Med* 1991; 91: 2-10.
72. Carr AC, Frei B. Toward a new recommended dietary allowance for vitamin C based on antioxidant and health effect in humans. *Am J Clin Nutr* 1999; 69(6): 1086-1107.
73. Haklar G, Yüksel M, Soybaşı H, Yalçın AS. Süperoksit radikali, nitrik oksit ve peroksinitritin hasar oluşturucu metabolizmadaki rolleri. *Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 1999; 1: 53-67.
74. Yazıcı C, Köse K. Melatonin, karanlığın antioksidan gücü. *Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi* 2004; 13: 56-65.
75. Onat T, Emerk K, Sozmen EY. İnsan Biyokimyası. Ankara: Palme Yayıncılık, 2002.
76. Çelik S. APS ile Opere Edilen Tavşanların Kan ve Karaciğer Dokularındaki Serbest Oksijen Radikalleri ve Antioksidan Enzim Düzeylerinin Tayini. Yüksek Lisans Tezi, Kütahya: Dumlupınar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2001.
77. Halliwell B. Free radicals antioxidants and human disease: curiosity, cause or consequence. *The Lancet* 1994; 344: 721-724.
78. Mates JM, Gomez C, De Castro IN. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem* 1999; 32(8): 595-603.
79. Aruoma OI. Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. *Food Chem Toxicol* 1994; 32: 671-683.
80. Kaya E. Sigara İçen ve İçmeyen Hemodiyaliz Hastalarında Eritrositlerin İnvitro Oksidasyonuna Duyarlılığı, Yüksek Lisans Tezi, Van: Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2006.
81. Engin A, Altan N, Isık E. Erythrocyte glutathione levels in lithium-induced hypothyroidism. *Drugs RD* 2005; 6(1): 35-40.

82. Michiels C, Raes M, Toussaint O, Remacle J. Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 1994; 17(3): 235-248.
83. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction free radical biochemistry. *Br Med Bull* 1993; 49(3): 481-493.
84. Uysal M. Serbest radikaller, lipid peroksitleri ve organizmada prooksidan dengeyi etkileyen koşullar. *Klinik Gelişim* 1998; 11: 336-341.
85. Yılmaz S, Bahcecioğlu IH. Lipid peroxidation, antioxidant enzymes and pyruvate kinase activity in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *Turk J Vet Anim Sci* 2000; 24: 25-28.
86. Dizdaroglu M, Jaruga P, Birincioglu M, Rodriguez H. Free radical induced damage to DNA: Mechanisms and measurement. *Free Radic Biol Med* 2002; 32(11): 1102-1115.
87. Dizdaroglu M. Oxidatively induced DNA damage: Mechanisms, repair and disease. *Cancer Lett* 2012; 327: 26-47.
88. Atamer Y, Koçyiğit Y, Atamer A, et al. Alterations of erythrocyte and plazma lipid peroxides as well as antioxidant mechanism in patient with type II diabetes mellitus (NIDDM). *Turkish J Med Sci* 1998; 28: 143-148.
89. Gerbhart R. Oxidative stress, plant derived antioxidants and liver fibrosis. *Planta Med* 2002; 68: 289-296.
90. Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarani D, Milzani A, Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta* 2003; 329: 23-38.
91. [http://www. slideshare. net/ rawanayman/ oxidative- stress- and- disease-45205741,](http://www.slideshare.net/rawanayman/oxidative-stress-and-disease-45205741) 18.05.2016.
92. Halliwell B, Aruoma OI. DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Letters* 1991, 281:9-19.
93. Dal-Pizzol F, Klamt F, Benfato MS, Bernard EA, Moreira JC. Retinol supplementation induces oxidative stress and modulates antioxidant enzyme activities in rat sertoli cells. *Free Radic Res* 2001; 34: 395-404.
94. Evans MD, Dizdaroglu M, Cooke MS. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mut Res* 2004; 567: 1-61.
95. Halliwell B, Gutteridge JM. Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage, and antioxidant therapy. *Lancet* 1984, 1:1396-1397.
96. Hussain SP, Hofseth LJ, Haris CC. Radical causes of cancer. *Nature* 2003; 3: 276-285.
97. Hermes-Lima M, Storey JM, Storey KB. Antioxidant defenses and animal adaptation to oxygen availability during environmental stress. *Cell Mol Response to Stress* 2001; 2: 263-287.
98. Altay Z. Siklofosamid Uygulanan Ratlarda Nefrotoksisite Üzerine Propolisin Etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Elazığ: Fırat Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2016.

99. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase an enzymatic function for erythrocyte. J Biol Chem 1969; 244: 6049-6055.
100. Sankarapandi S, Zweier JL. Evidence against the generation of free hydroxyl radicals from the interaction of copper, zinc-SOD and hydrogen peroxide. J Biol Chem 1999; 274(49): 34576-34583.
101. Ceballas-Picot I, Trivier JM, Nicole A, Thevenin M., Age-correlated modifications of CuZn-SOD and glutathione-related enzyme activities in human erythrocytes. Clin Chem 1992; 38(1): 66-70.
102. Yalçın AS. Antioksidanlar. Klinik Gelişim 1998; 11: 342-346.
103. Çetin Ç. Koroner Arter Ektazi Hastalarda Oksidatif DNA Hasarı, Lipid Peroksidasyonu ve Bazı Antioksidant Enzimler. Yüksek Lisans Tezi, Van: Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2011.
104. Altan N, Altan M, Mikolay L, Schwartz CFW. Insulin-like and insulin enhancing effects of the sulfonyleurea glyburide on rat adipose glycogen synthase. Diabetes 1985; 34: 281-286.
105. Jones DP, Eklow L, Thor H, Orrenius S. Metabolism of hydrogen peroxide in isolated hepatocytes: relative contributions of catalase and glutathione peroxidase in decomposition of endogenously generated H₂O₂. Arch Biochem Biophys 1981; 210(2): 505-516.
106. Mills GC. Hemoglobin catabolism, glutathione peroxidase and erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. J Biol Chem 1957; 229: 189-197.
107. Inal M, Erkut I, Kanbak G. Hepatic MDA and whole blood GSH levels in benzene-treated rats: effect of - tokoferol. Ann Med Sci 1998; 17: 7-12.
108. Andersson C, Söderström M, Mannervik B. Activation and inhibition of microsomal glutathione transferase from mouse liver. Biochem J 1988; 249(3): 819-823.
109. Puchalski RB, Fahl WE. Expression of recombinant glutathione S-transferase pi, Ya, or Yb1 confers resistance to alkylating agents. Proc Natl Acad Sci 1990; 87(7): 2443-2447.
110. Özkan A, Gündüz G, Çıplak B, Fıskın K. Kimyasal mücadele uygulanmış *dociostaurus maroccanus* epidemik popülasyonundan alınan örneklerde antioksidan enzim aktiviteleri. Türk J Biol TÜBİTAK 2000; 24: 141-149.
111. Cherubini A, Ruggiero C, Polidori MC, Mecocci C. Potential markers of oxidative stress in stroke. Free Radic Biol Med 2005; 39:841-852.
112. Mullineaux PM, Creissen GP. Glutathione reductase: Regulation and role in oxidative stress. In: Scandallos JG(Editor). Oxidative Stress and The Molecular Biology of Antioxidant Defences. USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997: 667-713.
113. Aksoy Y. Antioksidan mekanizmada glutatyonun rolü. Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi 2002; 22: 442-448.
114. Tanakol R. Antioksidan vitaminler: Hastalıkta ve sağlıkta önemleri. Klinik Gelişim II 1998; 347-352.

115. Guertin KA, Grant RK, Arnold KB, et al. Effect of long-term vitamin E and selenium supplementation on urine F 2-isoprostanes, a biomarker of oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2016; 95: 349-356.
116. Heo JH, Lee KM. The possible role of antioxidant vitamin C in Alzheimer's disease treatment and prevention. *Am J Alzheimer's Dis Oth Dem* 2013; 28(2): 120-125.
117. Stahl W, Sies H. Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1740: 101-107.
118. Önder E, Güler M, Khal S, Kalyoncu C. Beta karoten ve A vitamininin lipid parametreleriyle ilgileri, solunum ve sindirim sistemi kanserlerindeki düzeyleri. *Anadolu Tıp Dergisi* 1988; 10: 45-59.
119. Yaping Z, Suping Q, Wenli Y, et al. Antioxidant activity of lycopene extracted from tomato paste towards trichloromethyl peroxy radical CCl_3O_2 . *Food Chem* 2002; 77: 209-212.
120. Rao AV, Agarwal S. Role of lycopene as antioxidant carotenoid in the prevention of chronic diseases. *Nutr Res* 1999; 19: 199-203.
121. Sevindik H. Pembe Greyfurt Suyu ve Domates Pulpunda Likopen ve β - Karotenin Isıl Stabiliteleri. Yüksek Lisans Tezi, Ankara: Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2007.
122. Sigma Aldrich. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/lycopene5368750265811?lang=en®ion=TR>. 11.04.2016.
123. Edwards AJ, Vinyard BT, Wiley ER, et al. Consumption of watermelon juice increases plasma concentrations of lycopene and carotene in humans. *J Nutr* 2003; 133: 1043-1050.
124. Bast A, Haenen GR, Van Den Berg R, Van Den Berg H. Antioxidant effects of carotenoids. *Int J Vitam Nutr Res* 1998; 68: 399-403.
125. Anguelova T, Warthesen J. Lycopene stability in tomato powders. *J Food Sci* 2000; 65, 67-70.
126. Stahl W, Junghans A, De Boer B, et al. Carotenoid mixtures protect multilamellar liposomes against oxidative damage: Synergistic effects of lycopene and lutein. *FEBS Lett* 1998; 427: 305-308.
127. Bramley PM. Is lycopene beneficial to human health? *Phytochemistry* 2000; 54: 233-236.
128. Atessahin A, Yilmaz S, Karahan I, Ceribasi AO, Karaoglu A. Effects of lycopene against cisplatin-induced nephrotoxicity and oxidative stress in rats. *Toxicology* 2005; 212(2-3): 116-123.
129. Matos HR, Capelozzi VL, Gomes OF, Mascio PD, Medeiros MH. Lycopene inhibits DNA damage and liver necrosis in rats treated with ferric nitrilotriacetate. *Arch Biochem Biophys* 2001; 396, 171-177.
130. Matos HR, Di Mascio P, Medeiros MH. Protective effect of lycopene on lipid peroxidation and oxidative DNA damage in cell culture. *Arch Biochem Biophys* 2000; 383: 56-59.
131. Rehman A, Bourne LC, Halliwell B, Rice-Evans CA. Tomato consumption modulates oxidative DNA damage in humans. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 262: 828-831.

132. Porrini M, Riso P. Lymphocyte lycopene concentration and DNA protection from oxidative damage is increased in women after a short period of tomato consumption. *J Nutr* 2000; 130: 189-192.
133. Cemeroglu B, Yemenicioglu A, Özkan M. Meyve ve Sebzelerin Bileşimi, Meyve ve Sebze İşleme Teknolojisi. Cemeroglu B. (Editör), Cilt I, Ankara Başkent Klise Matbaacılık, 2004: 1-188.
134. Wertz K, Siler U, Goralczyk R. Lycopene: modes of action to promote prostate health. *Arch Biochem Biophys* 2004; 430, 127-134.
135. Erhardt JG, Meisner C, Bode JC. Lycopene, beta-carotene and colorectal adenomas. *Am J Clin Nutr* 2003; 78, 1219-1224.
136. Boileau TW, Clinton SK, Zaripheh S, et al. Testosterone and food restriction modulate hepatic lycopene isomer concentrations in male F344 rats. *J Nutr* 2001; 131(6): 1746-1752.
137. Neyestani TR, Shariatzadeh N, Gharavi A, Kalayi A, Khalaji N. Physiological dose of lycopene suppressed oxidative stress and enhanced serum levels of immunoglobulin M in patients with Type 2 diabetes mellitus: a possible role in the prevention of long-term complications. *J Endocrinol Invest* 2007; 30(10): 833-838.
138. Srinivasan M, Sudheer AR, Pillai KR, et al. Lycopene as a natural protector against gamma-radiation induced DNA damage, lipid peroxidation and antioxidant status in primary culture of isolated rat hepatocytes in vitro. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1770(4): 659-665.
139. Hazlewood LC, Wood LG, Hansbro PM, Foster PS. Dietary lycopene supplementation suppresses Th2 responses and lung eosinophilia in a mouse model of allergic asthma. *J Nutr Biochem* 2011; 22(1): 95-100.
140. Shidfar F, Froghifar N, Vafa M, et al. The effects of tomato consumption on serum glucose, apolipoprotein B, apolipoprotein A-I, homocysteine and blood pressure in type 2 diabetic patients. *Int J Food Sci Nutr* 2011; 62(3): 289-294.
141. Karppi J, Kurl S, Laukkanen JA, Rissanen TH, Kauhanen J. Plasma carotenoids are related to intima-media thickness of the carotid artery wall in men from eastern Finland. *J Intern Med* 2011; 270(5): 478-485.
142. Kubista M, Andrade JM, Bangtsson M, Forootan A. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* 2006; 27(2-3): 95-125.
143. Wilhelm J, Pingoud A. Real-time polymerase chain reaction. *Chembiochem* 2003; 4(11): 1120-1128.
144. Wikipedia. https://en.wikipedia.org/wiki/Reverse_transcription_polymerase_chain_reaction. 18.07.2016.
145. Johnson JR, Development of polymerase chain reaction based assays for bacterial gene detection. *J Mic Meth* 2000; 41: 201-209.
146. Mandrell RE, Wachtel MR. Novel Detection techniques for human pathogens that contaminate. *Poultry Curr Opi Biot* 1999; 10: 273-278.

147. Jansson JK. Tracking genetically engineered microorganisms in nature. *Curr Opin Biotech* 1995; 6: 275-283.
148. Rashtchian A. Novel Methods for cloning and engineering genes using the polymerase chain reaction. *Curr Opin Biotech* 1995; 6: 30-36.
149. Engelke DR, Hoener PA, Collins FS. Direct sequencing of enzymatically amplified human genomic DNA. *Pro Nat Academy Sci* 1988; 85(2), 544-548.
150. Ou CY, Kwok S, Mitchell SW, Warfield D, Schochetman G. DNA amplification for direct detection of HIV-1 in DNA of peripheral blood mononuclear cells. *Science* 1988; 239: 295-297.
151. Higuchi R, Krummel B, Saiki R. A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucleic Acids Res* 1988; 16(15), 7351-7367.
152. Farr CJ, Saiki RK, Erlich HA, McCormick F, Marshall CJ. Analysis of RAS gene mutations in acute myeloid leukemia by polymerase chain reaction and oligonucleotide probes. *Pro Nat Academy Sci* 1988; 85(5), 1629-1633.
153. Vert V, Kenneth WK. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* 2004; 10: 789-99.
154. El-Shahat M, El-Abd S, Alkafafy M, El-Khatib G. Potential chemoprevention of diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in rats: myrrh (*Commiphora molmol*) vs. turmeric (*Curcuma longa*). *Acta Histochem* 2012; 114(5): 421-428.
155. Rencuzogullari N, Erdogan S. Oral administration of lycopene reverses cadmium-suppressed body weight loss and lipid peroxidation in rats. *Biol Trace Elem Res* 2007; 118(2): 175-183.
156. Placer ZA, Cushman L, Johnson BC. Estimation of products of lipid peroxidation in biological fluids. *Anal Biochem* 1966; 16: 359-364.
157. Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 1961; 7: 88-95.
158. Aebi H. Catalase. In vitro. *Methods in Enzymology*. 1984; 105: 121-126.
159. Beutler E. Red cell metabolism. A manual of biochemical methods. Grune and Starton (Editors) 2nd Edition, New York 1984: 160.
160. Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 1974; 249: 130-139.
161. Sun Y, Oberly LW, Ying LA. Simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988; 34: 497-500.
162. Frankel SS, Reitman S, Sonnenwirth AC. Grandwohl's clinical laboratory methods and diagnosis. In: Reading CA, Glynn LE (Editors). 7th Edition, The C. V. Mosby Company, St Louis, USA. 1970: 403-404.
163. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-257.

164. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001; 29(9): 45.
165. <http://www.emerginginvestigators.org/2014/02/knox-expression/> 08.07.2016.
166. Klaassen CD. Absorption, distribution, and excretion of toxicants. Casarett and Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons, Doull J, Klaassen CD, Amdur MO (Editors), MacMillan, New York: 1980: 28-55.
167. Gürbüz N. Antimutajenler ve antikarsinojenler (kanser gelişiminin kimyasal bileşiklerle önlenmesi). *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2006; 26(3): 312-318.
168. Kaplan A, Smith C, Promnitz DA, Joffe B, Senel HC. Methaemoglobinemia due to accidental sodium nitrite poisoning. *S Afr Med J* 1990; 77: 300-301.
169. Dahl AR. Aktivasyon of nitrosamines to mutagens by rat and rabbit nasal, lung and liver S-9 homogenates. *Adv Exp Med Biol* 1986; 97: 367-372.
170. Weckes U, Gletten F, Brusick D. Conversion of DENA and DMNA to mutagenic metabolites by microsome fractions from liver, lung and kidney tissues of 4 mouse strains. *Mut Res Sect Environ Mutagenesis Relat Subs* 1974; 26: 453.
171. Atalay A, Aker A. Maya glukoz-6-fosfat dehidrogenazın dietilnitrozamin tarafından inhibisyonu. *Doğa Türk Tıp ve Eczacılık Dergisi* 1987; 11: 8-12.
172. Tüken F. Bazı Nitrozaminlerin Glutasyon-S-Transferaz Enzimi Üzerindeki İn Vitro Etkileri ve Bağlanma Özellikleri. Doktora tezi, Sivas: Cumhuriyet Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 1993.
173. Sugino K, Dohi K, Yamada K, Kawasaki T. The role of lipid peroxidation in endotoxin-induced hepatic damage and the protective effect of antioxidants. *Surgery* 1987; 101(6): 746-752.
174. Seven A, Candan G. Radikal ve lipid peroksid düzeyini arttıran etkenler. *Biyokimya Dergisi* 1995; 20(4): 43-56.
175. Malling HV, Frantz CN. Metabolic activation of dimethylnitrosamine and diethylnitrosamine to mutagens. *Mut Res* 1974; 25: 176-186.
176. Aherne SA, O'Brien NM. Protection by the flavonoids myricetin, quercetin, and rutin against hydrogen peroxide induced DNA damage in Caco and HepG2 cells. *Nutr Cancer* 1999; 34: 160-166.
177. Farber E. Clonal adaptation during carcinogenesis. *Biochem Pharmacol* 1990; 39: 1837-1846.
178. Swan PF, Magee FN. Nitrosamine-induced carcinogenesis. *Biochem J* 1986; 110: 39-47.
179. Pegg EA, Balog B. Formation on subsequent excision of O⁶-Ethylguanine from DNA of rat liver following administration of diethylnitrosamine. *Cancer Res* 1979; 39: 5003-5009.
180. Dyroff MC, Richardson FC, Popp JA, Bedell MA, Swenberg JA. Correlation of O⁴-ethyldeoxythymidine accumulation, hepatic initiation and hepatocellular carcinoma induction in rats continuously administered diethylnitrosamine. *Carcinogenesis* 1985; 7(2): 241-246.

181. Matsuda M, Nakamoto Y, Suzuki S, Kurata T, Kaneko S. Interferon-c-mediated hepatocarcinogenesis in mice treated with diethylnitrosamine. *Lab Invest* 2005; 85: 655-663.
182. Nishimura J, Dewa Y, Muguruma M, et al. Effect of fenofibrate on oxidative DNA damage and on gene expression related to cell proliferation and apoptosis in rats. *Toxicol Sci* 2007; 97: 44-54.
183. Raza H, Robin MA, Fang JK, Avadhani NG. Multiple isoforms of mitochondrial glutathione S-transferases and their differential induction under oxidative stress. *Biochem J* 2002; 366: 45-55.
184. Nagahara T, Okano J, Fujise Y, Abe R, Murawaki Y. Preventive effect of JTE-522, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, on DEN-induced hepatocarcinogenesis in rats. *Biomed Pharmacother* 2010; 64: 319-326.
185. Al-Rejaie SS, Aleisa MA, Al-Yahya AA, et al. Progression of diethylnitrosamine-induced hepatic carcinogenesis in carnitine-depleted rats. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 1373-1380.
186. Poojari R, Gupta S, Maru G, Khade B, Bhagwat S. *Sida frombifolia* ssp. Retusa seed extract inhibits DEN induced murine hepatic preneoplasia and carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Asian Pacific J Cancer Prev* 2009; 10: 1107-1112.
187. Sayed-Ahmed MM, Aleisa AM, Al-Rejaie S, et al. Thymoquinone attenuates diethylnitrosamine induction of hepatic carcinogenesis through antioxidant signaling: *Oxid Med Cell Longev* 2010; 3: 254-261.
188. Shaban NZ, El-Kersh MA, El-Rashidy FH, Habashy NH. Protective role of *Punica granatum* (pomegranate) peel and seed oil extracts on diethylnitrosamine and phenobarbital-induced hepatic injury in male rats. *Food Chem* 2013; 141(3): 1587-1596.
189. Amin A, Hamza AA, Bajbouj K, Ashraf SS, Daoud S. Saffron: A potential candidate for a novel anticancer drug against hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2011; 54: 857- 867.
190. Ramakrishnan G, Raghavendran HRB, Vinodhkumar R, Devaki T. Suppression of N-nitrosodiethylamine induced hepatocarcinogenesis by silymarin in rats. *Chem Biol* 2006; 101: 104-114.
191. Sivaramakrishnan V, Shilpa PN, Praveen Kumar VR, Niranjali Devaraj S. Attenuation of N-nitrosodiethylamine-induced hepatocellular carcinogenesis by a novel flavonol-Morin. *Chem Biol Interact* 2008; 171: 79-88.
192. Nakatani T, Roy G, Fujimoto N, Asahara T, Ito A. Sex hormone dependency of diethylnitrosamine-induced liver tumors in mice and chemoprevention by leuprorelin. *Jpn J Cancer Res* 2001; 92: 249-256.
193. Naugler WE, Sakurai T, Kim S, et al. Gender disparity in liver cancer due to sex differences in MyD88-dependent IL-6 production. *Science* 2007; 317: 121-124.
194. Kim DJ, Takasuka N, Kim JM, et al. Chemoprevention by lycopene of mouse lung neoplasia after combined initiation treatment with DEN, MNU and DMH. *Cancer Lett* 1997; 120(1), 15-22.

195. Dhanasekaran M, Baskar AA, Ignacimuthu S, Agastian P, Duraipandiyan V. Chemopreventive potential of Epoxy clerodane diterpene from *Tinospora cordifolia* against diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma. *Invest New Drugs* 2009; 27: 347-355.
196. Darvesh AS, Bishayee A. Selenium in the prevention and treatment of hepatocellular carcinoma. *Anticancer Agents Med Chem* 2010; 10: 338-345.
197. Sahin K, Orhan C, Tuzcu M, et al. Orally administered lycopene attenuates diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in rats by modulating Nrf-2/HO-1 and Akt/mTOR pathways. *Nutr Cancer* 2014; 66(4): 590-598.
198. Bishayee A, Bhatia D, Thoppil JR, et al. Pomegranate-mediated chemoprevention of experimental hepatocarcinogenesis involves Nrf2-regulated antioxidant mechanisms. *Carcinogenesis* 2011; 32: 888-896.
199. Bishayee A, Mbimba T, Thoppil RJ, et al. Anthocyanin-rich black currant (*Ribes nigrum L.*) extract affords chemoprevention against diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinogenesis in rats. *J Nutr Biochem* 2011; 22: 1035-1046.
200. Qian Y, Ling CQ. Preventive effect of ganfujian granule on experimental hepatocarcinoma in rats. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 755-757.
201. Kweon S, Park KA, Choi H. Chemopreventive effect of garlic powder diet in diethylnitrosamine-induced rat hepatocarcinogenesis. *Life Sci* 2003; 73: 2515-2526.
202. Yadav AS, Bhatnagar D. Chemo-preventive effect of Star anise in N-nitrosodiethylamine initiated and phenobarbital promoted hepato-carcinogenesis. *Chem Biol Interact* 2007; 169: 207-14.
203. Singh JP, Selvendiran K, Banu SM, Padmavathi R, Sakthisekaran D. Protective role of Apigenin on the status of lipid peroxidation and antioxidant defense against hepatocarcinogenesis in Wistar albino rats. *Phytotherapy* 2004; 11: 309-314.
204. Barbisan LF, Scolastici C, Miyamoto M, et al. Effects of crude extracts of *Agaricus blazeion* DNA damage and on rat liver carcinogenesis induced by diethylnitrosamine. *Genet Mol Res* 2003; 2: 295-308.
205. Khan MS, Devaraj H, Devaraj N. Chrysin abrogates early hepatocarcinogenesis and induces apoptosis in N-nitrosodiethylamine-induced preneoplastic nodules in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 2011; 251: 85-94.
206. Shizuma T, Ishiwata K, Nagano M, Mori H, Fukuyama N. Protective effects of fermented rice vinegar sediment (Kurozu moromimatsu) in a diethylnitrosamine induced hepatocellular carcinoma animal model. *J Clin Biochem Nutr* 2011; 49: 31-35.
207. Bishayee A, Barnes KF, Bhatia D, Darvesh AS, Carroll RT. Resveratrol suppresses oxidative stress and inflammatory response in diethylnitrosamine-initiated rat hepatocarcinogenesis. *Cancer Prev Res* 2010; 3: 753-763.
208. Higgins GF, Anderson RM. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch Path* 1931; 12: 186-202.

209. Sundaresan S, Subramanian P. S-allylcysteine inhibits circulatory lipid peroxidation and promotes antioxidants in N-nitrosodiethylamine-induced carcinogenesis. *Pol J Pharmacol* 2003; 55: 37-42.
210. Sunderasan S, Subramanian P. Prevention of N-nitrosodiethylamine-induced hepatocarcinogenesis by S-allylcysteine. *Mol Cell Biochem* 2008; 310: 209-214.
211. Taha MM, Abdul AB, Abdullah R, et al. Potential chemoprevention of diethylnitrosamine-initiated and 2-acetylaminofluorene-promoted hepatocarcinogenesis by zerumbone from the rhizomes of the subtropical ginger (*Zingiber zerumbet*). *Chem Biol Interact* 2010; 186: 295-305.
212. Kushida M, Kamendulis LM, Peat TJ, Klaunig JE. Dose-related induction of hepatic preneoplastic lesions by diethylnitrosamine in C57BL/6 mice. *Toxicol Pathol* 2011; 39: 776-86.
213. Sanchez-Perez Y, Carrasco-Legleu C, Garcia-Cuellar C, et al. Oxidative stress in carcinogenesis. Correlation between lipid peroxidation and induction of preneoplastic lesions in rat hepatocarcinogenesis. *Cancer Lett* 2005 ; 217, (1): 25-32.
214. Bansal AK, Bansal M, Soni G, Bhatnagar D. Modulation of N-nitrosodiethylamine (NDEA) induced oxidative stress by vitamin E in rat erythrocytes. *Hum Exp Toxicol* 2005; 24, (6): 297-302.
215. Shen M, Yin Z. Effect of *Boschniakia rossica* extract on antioxidative activities in rat hepatic preneoplasia induced by diethylnitrosamine. *Chin J Chin Mat Med* 1999; 24(12): 746-748.
216. Zhang XW, Sun Q, Jin M, Piao CM, Li LH. [Effect of *Sorbaria Sorbifolia* extract on antioxidative activities in rats with precancerosis induced by diethylnitrosamine. *J Chin Integ Med* 2003; 1(1): 47-50.
217. XiaoGang W, ChunJi H, Xing Y, ChunJi Z, ZhenHua L. The protective effect of inonotus obliquus polysaccharide (IOP) on the hepatic injury induced by diethylnitrosamine. *J Environ Occup Med* 2010; 27(7): 407-410.
218. Man S, Fan W, Gao W, et. al. Anti-fibrosis and anti-cirrhosis effects of *Rhizoma paridis* saponins on diethylnitrosamine induced rats. *J Ethnopharmacol* 2014; 151(1): 407-412.
219. Farombi EO, Fakoya A. Free radical scavenging and antigenotoxic activities of natural phenolic compounds in dried flowers of *Hibiscus sabdariffa* L. *Mol Nutr Food Res* 2005; 49(12): 1120-1128.
220. Aiub CA, Pinto LF, Felzenszwalb I. N-Nitrosodiethylamine mutagenicity at low concentrations. *Toxicol Lett* 2003; 145(1): 36-45.
221. Velmurugan B, Bhuvaneswari V, Nagini S. Antiperoxidative effects of lycopene during N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine induced gastric carcinogenesis. *Fitoterapia* 2002; 73(7-8): 604-611.
222. Bansal AK, Bansal M, Soni G, Bhatnagar D. Protective role of vitamin E pre-treatment on N-nitrosodiethylamine induced oxidative stress in rat liver. *Chem Biol Interact* 2005; 156(2-3): 101-111.

223. Mizuoka H, Shikata N, Yang J, et al. Biphasic effect of colchicine on acute liver injury induced by carbon tetrachloride or by dimethylnitrosamine in mice. *J Hepatol* 1999; 31(5): 825-833.
224. Ozkan A, Fiskin K. Free radicals, carcinogenesis and antioxidant enzymes. *Tr J Hematol Oncol* 2004; 14: 52-60.
225. Çimen Ç, Öter Ç, Demir H, Savran A. Rat eritrositlerinden elde edilen katalaz enziminin karakterizasyonu ve kinetiğinin incelenmesi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2005; 16(1), 15-20.
226. Mittal G, Kaur, M, Soni G. Impact of hypercholesterolemia on in vitro toxicity on N-nitrosodiethylamine: Effect on lipidperoxidation of blood and tissue. *Indian J Exp Biol* 2002; 40(9): 1071-1073.
227. Karahan I, Atessahin A, Yılmaz S, et al. Protective effect of lycopene on gentamicin-induced oxidative stress and nephrotoxicity in rats. *Toxicology* 2005; 215(3): 198-204.
228. Celik S, Bal R, Yarsan E, Durgut R. Effects of lead on lipid peroxidation in rabbits. *Indian Vet J* 2004; 81: 765-768.
229. Karahan I, Yılmaz S. Ratlarda bazı nitrosoaminlerin düşük miktarda-uzun süreli verilmesinin kan, karaciğer ve böbreklerde oksidatif stres üzerine etkileri. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi* 2006; 20(1): 73-78.
230. Karaca EG, Sözbilir NB. Dietilnitrozamin verilen ratlarda alfa lipoik asidin koruyucu etkilerinin araştırılması. *Kocatepe Tıp Dergisi* 2007; 8(2).
231. Chakraborty A, Selvaraj S, Sudarshan M, et al. Modulatory role of vanadium on trace element profile in diethylnitrosamine-induced rat hepatocarcinogenesis. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* 2000; 170(1): 156-162.
232. Atakişi E, Özcan A. Dietilnitrozamin verilen ratlarda omega-3 yağ asitlerinden zengin balık yağının koruyucu rolünün araştırılması. *Türk Biyokimya Dergisi (Turk J Biochem)* 2005; 30 (4): 279-284.
233. Thyrnavukkarasu C, Sakthisekaran D. Stabilization of membrane bound enzyme profiles by sodium selenite in N-nitrosodiethylamine induced and phenobarbital promoted hepatocarcinogenesis in rats. *Biomed Pharm* 2003; 57: 117-123.
234. Banakar MC, Paramasivan SK, Chattopadhyay MB, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 prevents DNA damage and restores antioxidant enzymes in rat hepatocarcinogenesis induced by diethylnitrosamine and promoted by phenobarbital. *World J Gastroenterol* 2004; 10(9): 1268-1275.
235. Pradeep K, Raj Mohan CV, Gobianand K, Karthikeyan S. Protective effect of *Cassia fistula Linn.* on diethylnitrosamine induced hepatocellular damage and oxidative stress in ethanol pretreated rats. *Biol Res* 2010; 43(1): 113-125

236. Rezaie A, Fazlara A, Karamolah MH, et al. Effects of *Echinacea purpurea* on hepatic and renal toxicity induced by diethylnitrosamine in rats. *Jundishapur J Nat Pharm Prod* 2013; 8(2), 60.
237. Kasperczyk A, Machnik G, Dobrakowski M, et al. Gene expression and activity of antioxidant enzymes in the blood cells of workers who were occupationally exposed to lead. *Toxicology* 2012; 301(1): 79-84.
238. Bingül I, Başaran-Küçükgergin C, Aydın AF et al. Blueberry treatment attenuated cirrhotic and preneoplastic lesions and oxidative stress in the liver of diethylnitrosamine-treated rats. *Int J Immunopathol Pharm* 0394632015621319, 2015.
239. Thijssen S, Cuypers A, Maringwa J, et al. Low cadmium exposure triggers a biphasic oxidative stress response in mice kidneys. *Toxicology* 2007; 236(1): 29-41.
240. Mohamed OI, El-Nahas AF, El-Sayed YS, Ashry KM. Ginger extract modulates Pb-induced hepatic oxidative stress and expression of antioxidant gene transcripts in rat liver. *Pharm Biol* 2015; 1-9.
241. Limaye PV, Raghuram N, Sivakami S. Oxidative stress and gene expression of antioxidant enzymes in the renal cortex of streptozotocin-induced diabetic rats. *Mol Cell Biochem* 2003; 243(1-2): 147-152.
242. Kim S, Choi JE, Choi J, et al. Oxidative stress-dependent toxicity of silver nanoparticles in human hepatoma cells. *Toxicol In Vitro* 2009; 23(6): 1076-1084.
243. Chen CF, Hsueh CW, Tang TS, et al. Reperfusion liver injury-induced superoxide dismutase and catalase expressions and the protective effects of N-acetyl cysteine. *Transplant Proceed* 2007; 39(4): 858-860.
244. Gómez M, Esparza JL, Nogués MR, et al. Pro-oxidant activity of aluminum in the rat hippocampus: gene expression of antioxidant enzymes after melatonin administration. *Free Radic Biol Med* 2005; 38(1): 104-111.
245. Fustinoni-Reis AM, Arruda SF, Dourado LP, Cunha da MS, Siqueira E. Tucum-Do-Cerrado (*Bactris setosa* Mart.) consumption modulates iron homeostasis and prevents iron-induced oxidative stress in the rat liver. *Nutrients* 2016; 8(2): 38.
246. Mauriz JL, Molpeceres V, Garcia-Mediavilla MV, et al. Melatonin prevents oxidative stress and changes in antioxidant enzyme expression and activity in the liver of aging rats. *J Pineal Res* 2007; 42(3): 222-230.
247. Röhrdanz E, Schmuck G, Ohler S, Kahl R. The influence of oxidative stress on catalase and MnSOD gene transcription in astrocytes. *Brain Res* 2001; 900(1): 128-136.
248. Sen CK, Packer L. Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *FASEB J* 1996; 10(7): 709-720.
249. Türkoğlu S. Oleik Asit ile Oluşturulan Akut Akciğer Hasarı Modelinde Likopenin Etkileri. Uzmanlık Tezi, Elazığ: Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2008.

250. Dixon ZR, Shie FS, Warden BA, Burri BJ, Neidlinger TR. The effect of a low carotenoid diet on malondialdehyde-thiobarbituric acid (MDA-TBA) concentrations in women: a placebo-controlled double-blind study. *Am J Coll Nutr* 1998; 17: 54-58.
251. Agarwal S, Rao AV. Tomato lycopene and low density lipoprotein oxidation, a human dietary intervention study. *Lipids* 1998; 33: 981-984.
252. Chandra Mohan KVP, Nagini S. Dose-response effects of tomato lycopene on lipid peroxidation and enzymic antioxidants in the hamster buccal pouch carcinogenesis model. *J Nutr Res* 2003; 23(10): 1403-1416.
253. Briviba K, Schna K, Rechkemmer G, Bub A. Supplementation of a diet low in carotenoids with tomato or carrot juice does not affect lipid peroxidation in plasma and feces of healthy men. *J Nutr* 2004; 134: 1081-1083.
254. Lowe GM, Booth LA, Young AJ, Bilton RF. Lycopene and β -carotene protect against oxidative damage in HT29 cells at low concentrations but rapidly lose this capacity at higher doses. *Free Radic Res* 1999; 30(2): 141-151.
255. Giovannucci E. Tomatoes, tomato-based products, lycopene, and cancer: review of the epidemiologic literature. *J National Cancer Ins* 1999; 91(4): 317-331.
256. He Y, Root MM, Parker RS, Campbell TC. Effects of carotenoid-rich food extracts on the development of preneoplastic lesions in rat liver and on in vivo and in vitro antioxidant status. *Nutr Cancer* 1997; 27(3): 238-244.
257. Astorg P, Gradelet S, Bergès R, Suschetet M. Dietary lycopene decreases the initiation of liver preneoplastic foci by diethylnitrosamine in the rat. *Nutr Cancer*. 1997; 29(1): 60-68.
258. Blanche CIP, Hu KQ, Liu C, et al. Lycopene Metabolite, Apo-10'-Lycopenoic acid, inhibits diethylnitrosamine-initiated, high fat diet-promoted hepatic inflammation and tumorigenesis in mice. *Cancer Prev Res* 2013; 6(12): 1304-1316.
259. Abdallah IZ, Khattab HA. Protective role of lycopene against diethylnitrosamine induced experimental hepatocarcinogenesis. *Egypt J Hosp Med* 2004; 16, 1-13.
260. Aydin M, Celik S. Effects of lycopene on plasma glucose, insulin levels, oxidative stress, and body weights of streptozotocin-induced diabetic rats. *Turk J Med Sci* 2012; 42(2): 1406-1413.
261. Böhm F, Edge R, Truscott TG. Interactions of dietary carotenoids with singlet oxygen (1O_2) and free radicals: potential effects for human health. *Acta Biochim Pol* 2012; 59: 27-30.
262. Moselhy SS, Al Mslmani MA. Chemopreventive effect of lycopene alone or with melatonin against the genesis of oxidative stress and mammary tumors induced by 7,12 dimethyl(a)benzanthracene in sprague dawely female rats. *Mol Cell Biochem* 2008; 319: 175-180.
263. Wang Y, Ausman LM, Greenberg AS, Russell RM, Wang XD. Dietary lycopene and tomato extract supplementations inhibit nonalcoholic steatohepatitis-promoted hepatocarcinogenesis in rats. *Int J Cancer* 2010; 126, 1788-1796.

264. Kuçuk O, Sarkar H, Sakr W and et. al. Phase II randomized clinical trial of lycopene supplementation before radical prostatectomy. *Cancer Epidemiol, Biomarkers Prev* 2001; 10: 861-868.
265. Kim DJ, Takasuka, N, Tsuda H, Nishino H. Chemoprevention of lung cancer by lycopene. *Biofactors* 2000; 13(1/4): 95-102
266. Nishino H, Tokuda H, Satomi Y, et al. Cancer prevention by natural carotenoids. *Biofactors* 2000; 13(1-4): 89-94.
267. Torbergson AC, Collins AR. Recovery of human lymphocytes from oxidative DNA damage; the apparent enhancement of DNA repair by carotenoids is probably simply an antioxidant effect. *Eur J Nutr* 2000; 39: 80-85.
268. Yeh SL, Hu ML. Anti-oxidant and pro-oxidant effects of lycopene in comparison with β -carotene on oxidant-induced damage in Hs68 cells. *J Nutr Biochem* 2000; 11: 548-554.
269. Bhuneswari V, Velmurugen B, Nagini S. Lycopene modulates circulatory antioxidants during hamster buccal pouch carcinogenesis. *Nutr Res* 2001; 21: 1447-1453.
270. Karas M, Amir H, Fishman D, et al. Lycopene interferes with cell cycle progression and insulin-like growth factor I signaling in mammary cancer cells. *Nutr Cancer* 2000; 36: 101.
271. Ozkan E, Akyüz C, Dulundu E, et al. Protective effects of lycopene on cerulein-induced experimental acute pancreatitis in rats. *J Surg Res* 2012; 176(1): 232-238.
272. Qu M, Nan X, Gao Z, et al. Protective effects of lycopene against methylmercury-induced neurotoxicity in cultured rat cerebellar granule neurons. *Brain Res* 2013; 1540: 92-102.
273. Yilmaz S, Atessahin A, Sahna E, Karahan I, Ozer S. Protective effect of lycopene on adriamycin-induced cardiotoxicity and nephrotoxicity. *Toxicology* 2006; 218(2): 164-171.
274. El-Gerbed MS. Protective effect of lycopene on deltamethrin-induced histological and ultrastructural changes in kidney tissue of rats. *Toxicol and Health* 2014; 30(2): 160-173
275. Luo C, Wu XG. Lycopene enhances antioxidant enzyme activities and immunity function in N-methyl -N'-nitro- N- nitrosoguanidine-induced gastric cancer rats. *Int J Mol Sci* 2011; 12(5): 3340-3351.
276. Jamshidzadeh A, Baghban M, Azarpira N, Bardbori AM, Niknahad H. Effects of tomato extract on oxidative stress induced toxicity in different organs of rats. *Food Chem Toxicol* 2008; 46(12): 3612-3615.
277. Colitti M, Stefanon B. Effect of natural antioxidants on superoxide dismutase and glutathione peroxidase mRNA expression in leukocytes from periparturient dairy cows. *Vet Res Commun* 2006; 30(1): 19-27.
278. Ajith TA, Janardhanan KK. Chemopreventive activity of a macrofungus *Phellinus rimosus* against N-nitrosodiethylamine induced hepatocellular carcinoma in rat. *J Exp Ther Oncol* 2006; 5(4): 309-321.
279. Lott JA, Wolf PL. Alanine and aspartate aminotransferase (ALT and AST). *Clinical enzymology: a case-oriented approach*. In: Lott JA, Wolf PL (Editors). Chicago: Year Book Medical Publishers 1986; 111-138.

- 280.** Shaarawy SM, Tohamy AA, Elgendy SM, et al. Protective effects of garlic and silymarin on NDEA-induced rats hepatotoxicity. *Int J Biol Sci* 2009; 5(6): 549-557.
- 281.** Sun H, Yu L, HuailingWei Liu G. A novel antihepatitis drug, bicyclol, prevents liver carcinogenesis in diethylnitrosamine-initiated and phenobarbitalpromoted mice tumor model. *J Biomed Biotech* 2012.
- 282.** El Mesallamy HO, Metwally NS, Soliman MS, Ahmed AK, Abdel Moaty MM. The chemopreventive effect of *Ginkgo biloba* and *Silybum marianum* extracts on hepatocarcinogenesis in rats. *Cancer Cell Int* 2011; 11(1): 38.
- 283.** Wikipedia. https://en.wikipedia.org/wiki/Alkaline_phosphatase. 16.07.2016
- 284.** Jagadeesh MC, Sreepriya M. Bali G, Manjulakumari D. Protective effects of embelin and curcumin against diethylnitrosamine/phenobarbital induced experimental hepatocarcinogenesis in rats. *Int J Life Sci* 2012; 5(1), 51-56.

8. ÖZGEÇMİŞ

Sinop'ta 18 Mayıs 1987 tarihinde doğdum. İlk, orta ve lise eğitimimi aynı şehirde tamamladım. 2005 yılında başladığım Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesinden 2010 yılında fakülte birincisi olarak mezun oldum. 2010 yılı Ekim ayında Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalına Araştırma Görevlisi olarak atandım ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalında Doktora eğitimime başladım. Evli ve bir çocuk babasıyım.