

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SENTETİK ORGANOSELENYUM BİLEŞİKLERİNİN ANTIOKSİDATİF
ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

ZELİHA SELAMOĞLU

**DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

MALATYA

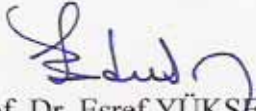
2005

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

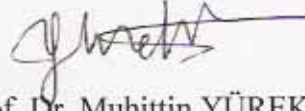
Bu çalışma Jürimiz tarafından Biyoloji Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Engin M. GÖZÜKARA
(Başkan)



Prof. Dr. Eşref YÜKŞEL
(Üye)



Prof. Dr. Muhittin YÜREKLİ
(Üye)



Doç. Dr. İsmet YILMAZ
(Danışman)



Yrd. Doç. Dr. Türkan KUTLU
(Üye)

Onay

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

.....

Prof. Dr. Ali ŞAHİN
Enstitü Müdürü

ÖZET

Doktora Tezi

SENTETİK ORGANOSELENYUM BİLEŞİKLERİNİN ANTIOKSİDATİF ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

Zeliha Selamoğlu

xi+102 Sayfa

2005

Danışman: Doç. Dr. İsmet Yılmaz

Oksidatif stres; hücrel antioksidan düzeyinin, reaktif oksijen düzeylerine karşı yetersiz kalması sonucu, toksik bir etkinin başlaması olarak tarif edilir. Bu durum ya antioksidan savunmaların yetersizliği, ya reaktif oksijen türlerinin aşırı üretimi, ya da her ikisinden dolayı olmaktadır. ROT üretiminin aşırı artması veya antioksidan savunmanın azalmasından dolayı her iki sistemin dengesizliği oksidatif strese yol açmaktadır. DNA'da zincir kırılmaları ve lipid peroksidasyonuna yol açan hücrel oksidatif hasarı içeren peroksitler, hidroksil radikalleri ve süperoksit anyon radikali gibi reaktif oksijen türlerinin üretilmesinde ve karsinogenezde ciddi bir rol oynayan DMBA'nın, sıçan karaciğer dokusunda lipid peroksidasyon düzeylerinde artış ve oksidatif hasarlara yol açtığı bilinmektedir. Çevresel ve hücrel faktörlerin etkisiyle oluşturulan reaktif oksijen türlerinin detoksifiye edilmesinde, ekzojen olarak alınan yada fizyolojik olarak yapılan antioksidanlar görev almaktadır.

Temel eser bir element olan selenyum, immün sistemin normal fonksiyonunda ve antioksidan mekanizmada görev yapan enzimlerin bir parçası olarak, savunma sisteminde yer almaktadır. Yaşamın uzaması ve hastalıkları önlemede, inorganik ve organik selenyum bileşiklerinin gösterdiği kimyasal koruyucu etkilere benzer etkiler gösteren, laboratuvarlarda hayvan çalışmalarında karsinogenez üzerine çalışılmış önemli sentetik organoselenyum bileşikleri mevcuttur. Selenyum içeren moleküllerin klasik antioksidanlardan daha iyi antioksidan özellik göstermesi, sentetik organoselenyum bileşiklerinin oluşturulmasına yol açmıştır. Selenyumun indüklenmiş hücrel hasarlara karşı korunmada etkili olmasından dolayı, laboratuvarlarımızda sentezlenmiş olan organoselenyum bileşiklerinin (Se I ve Se II) DMBA ile kimyasal olarak indüklenmiş sıçan kan ve karaciğer dokularında, hücrel hasarlara karşı koruyucu özelliklerinin araştırılması sonucu, endojen antioksidan enzim aktivitelerinde meydana gelen değişimler ve lipid peroksidasyonuna karşı *in vivo* olarak oksidatif zararı önleme yetenekleri dikkat çekmiştir. Elde edilen bulgular, karaciğer dokusunda meydana gelen değişimlerin histopatolojik olarak incelenmesiyle ve ayrıca *in vitro* çalışmalarla da desteklenmiştir.

ANAHTAR KELİMELELER: Antioksidan, DMBA, Eritrosit, Histoloji, Karaciğer, MDA, Oksidatif Stres, ROT, Sentetik Organoselenyum Bileşikleri, Sıçan

ABSTRACT

Ph.D Thesis

THE INVESTIGATION OF THE ANTIOXIDATIVE PROPERTIES OF THE SYNTHETIC ORGANOSELENIUM COMPOUNDS

Zeliha Selamoğlu

xi+102 pages

2005

Supervisor: Assoc. Prof. İsmet Yılmaz

Oxidative stress is described as the formation of toxic effect due to the deficiency of cellular antioxidative level toward the level of reactive oxygen species. This phenomenon is either described as the deficiency of antioxidative defense system, or the excess production of oxygen species enhances the stress, or else both are responsible for this. The excess production of ROS or the decrease in the antioxidative defense system could be the cause for oxidative stress. The peroxides that cause DNA chain breaking and lipid peroxidation, the reactive oxygen species such as hydroxyl radicals and super oxide radical etc. and carcinogenesis are the results of DMBA that is known to be the major cause the increment in lipid peroxidation level and the oxidative damage in the rat liver. The antioxidant formed either physiologically or taken as an exogen is responsible for the detoxification of reactive oxygen species that might be formed as a result of environmental and cellular factors.

As a fundamental trace elements, selenium as a part of antioxidative defense system is responsible for the immune system as part of enzymes in defense system. Organoselenium compounds present in the laboratories that were prepared synthetically that show the anti carcinogenesis effect in the animal studies, thus these compounds show the similar trend for the preventing illness, preservative effect, and the extension of life period. Due to the fact that organoselenium compounds show better antioxidative effect than classical selenium made a new era of preparing novel synthetic selenium compounds. Because the selenium has an antioxidative properties toward the damaged induced cells, organoselenium compounds prepared in our laboratories, Se I and Se II, have tested for DMBA and chemically induced rat blood and liver tissues, and the results showed that endogen antioxidant enzymatic activity change and the preventing of oxidative damage in lipid peroxidation are important findings *in vivo* of this research. The results are also rationalized with pathological *in vitro* studies in liver tissues.

KEY WORDS: Antioksidant, DMBA, Erythrocyte, Histology, Liver, MDA, Oxidative Stress, Rat, ROS, Synthetic Organoselenium Compounds.

TEŞEKKÜR

Öncelikle çalışmanın her aşamasında desteğini esirgemeyen Saygıdeğer Danışman Hocam Doç. Dr. İsmet Yılmaz'a teşekkür ederim.

Her türlü bilimsel destekleri için Prof. Dr. Bekir etinkaya, Prof. Dr. Eşref Yüksel, Prof. Dr. Turgay Seçkin ve Yrd. Doç. Dr. Türkân Kutlu'ya teőekkürlerimi sunarım.

Deneysel alışmalarımdaki yardımları için Dr. İlknur Özdemir, Dr. Yetkin Gök, Arő. Grv. Burhan Ateő ve Arő. Grv. M. Serdar Köksal'a, İstatistiksel analizler konusunda yardımcı olan Yrd. Doç. Dr. İbrahim Örün'e, İn vitro çalışmalar konusundaki desteklerinden dolayı Arő. Grv. Gökhan Durmaz'a, Histolojik analizlerde yardımcı olan Dr. Mehmet Gül ve Dr. Kenan Erdoğan'a, metot konusunda bilgilerine müracaat ettiğim Doç. Dr. Yusuf Türköz, Yrd. Doç. Dr. Engin őahna ve Dr. Nihayet Bayraktar'a, Grafik izimlerdeki yardımlarından dolayı Öğr. Grv. Yusuf Uçar'a, Dizideki katkılarında dolayı Dr. Murat Kütük'e ve ayrıca her zamanki mânevi desteği için Eőim Dr. Mustafa Talas'a teşekkür ederim.

Bu alışmayı TBAG-2259(102T185) no'lu proje ile destekleyen TÜBİTAK'a teőekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u> <u>No</u>
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	4
2.1. DMBA ve Toksisitesi.....	4
2.2. Oksidatif Stres ve Etkileri.....	6
2.3. Antioksidan Savunma Sistemleri.....	15
2.3.1. Enzimatik Savunma Sistemleri ve Özellikleri.....	16
2.3.1.1. Süperoksit Dismütaz (SOD)	16
2.3.1.2. Katalaz (CAT)	17
2.3.1.3. Glutatyon Redüktaz (GR)	17
2.3.1.4. Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px)	17
2.3.2. Enzimatik Olmayan Savunma Sistemleri ve Özellikleri.....	18
2.3.2.1. Vitaminler.....	18
2.3.2.2. Glutatyon.....	20
2.3.2.3. Bazı Eser elementler ve Mineraller.....	21
2.4. Selenyum ve Selenyum Bileşiklerinin Biyolojik Özellikleri.....	22
2.4.1. İnorganik Selenyum Bileşikleri ve Biyolojik Özellikleri.....	30
2.4.2. Organik Selenyum Bileşikleri ve Biyolojik özellikleri.....	33
2.4.3. Sentetik Organoselenyum Bileşikleri ve Biyolojik Özellikleri.....	36
2.5. Karaciğerin Yapı ve Fonksiyonları.....	38
3. MATERYAL VE METODLAR.....	45
3.1. Materyal.....	45
3.1.1. Yeni organoselenyum Bileşikleri (Se I ve Se II)'nin Sentezlenmesi ve Yapısı... ..	45
3.1.1.1. 1-izopropil-3-metilbenzimidazol-2-selenon (Se I) 'un Sentezi ve Yapısı.....	46
3.1.1.2. 1,3-di- <i>p</i> -metoksibenzilpirimidin-2-selenon (Se II)'un Sentezi ve Yapısı.....	48
3.1.2. Deneylerde Kullanılan Kimyasal Malzemeler.....	50

3.1.3. Deneylerde Kullanılan Aletler.....	50
3.1.4. Sıçanların Temini ve Deneysel Grupların Hazırlanışı.....	51
3.2. Metodlar.....	51
3.2.1. Diseksiyon İşlemi ve Doku Numunelerinin Hazırlanması.....	51
3.2.2. Kalpten Kan Alınması ve Eritrositlerin Saflaştırılması.....	52
3.2.3. Hemoglobin Miktar Tayini.....	52
3.2.4. Histopatolojik Çalışma için Numune Hazırlanması.....	52
3.2.5. Protein Tayini.....	53
3.2.5.1. Kullanılan Reaktifler.....	53
3.2.5.2. Deneyin Yapılışı.....	53
3.2.5.3. Protein miktarının Hesaplanması.....	54
3.2.6. Süperoksit Dismütaz (SOD) Aktivite Tayini ve Numunelerin Hazırlanışı.....	54
3.2.6.1. Kullanılan Reaktifler.....	54
3.2.6.2. Deneyin Yapılışı.....	55
3.2.6.3. SOD Aktivitesinin Hesaplanması.....	55
3.2.7. Katalaz (CAT) Aktivite Tayini ve Numunelerin Hazırlanışı.....	55
3.2.7.1. Kullanılan Reaktifler.....	55
3.2.7.2. Deneyin Yapılışı.....	56
3.2.7.3. CAT Aktivitesinin Hesaplanması.....	56
3.2.8. Glutasyon Redüktaz (GR) Aktivite Tayini ve Numunelerin Hazırlanışı.....	56
3.2.8.1. Kullanılan Reaktifler.....	56
3.2.8.2. Deneyin Yapılışı.....	57
3.2.8.3. G R Aktivitesinin Hesaplanması.....	57
3.2.9. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Aktivite Tayini ve Numunelerin Hazırlanışı.....	57
3.2.9.1. Kullanılan Reaktifler.....	57
3.2.9.2. Deneyin Yapılışı.....	58
3.2.9.3. GSH-Px Aktivitesinin Hesaplanması.....	58
3.2.10. Total Glutasyon (GSH) Analizi ve Numunelerin Hazırlanması.....	58
3.2.10.1. Kullanılan Reaktifler.....	58
3.2.10.2. Deneyin Yapılışı.....	59
3.2.10.3. Total GSH Miktarının Hesaplanması.....	59
3.2.11. Lipid Peroksidasyonunun Belirlenmesi ve Numunelerin Hazırlanması.....	59
3.2.11.1. Kullanılan Reaktifler.....	59
3.2.11.2. Deneyin Yapılışı.....	60

3.2.11.3. MDA Düzeyinin Hesaplanması.....	60
3.2.12. Karaciğer Dokusunun Histopatolojik Analizi.....	60
3.2.13. Selenyum Bileşiklerinin <i>in vitro</i> Özelliklerinin Analizi.....	61
3.2.13.1. Radikal süpürme gücü (RSG) ölçümü.....	61
3.2.13.2. β -Karoten bleaching metoduyla antioksidan aktivite ölçümü.....	61
3.2.13.3. İndirgeme gücü ölçümü.....	62
3.2.14. İstatistiksel Analiz.....	62
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	63
4.1. Çalışma Gruplarının Karaciğer Dokusunda Ölçülen Süperoksit Dismütaz (SOD) Aktiviteleri.....	63
4.2. Çalışma Gruplarının Karaciğer Dokusunda Ölçülen Katalaz (CAT) Aktiviteleri.....	64
4.3. Çalışma Gruplarının Karaciğer Dokusunda Ölçülen Glutasyon Redüktaz (GR) Aktiviteleri.....	65
4.4. Çalışma Gruplarının Karaciğer Dokusunda Ölçülen Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Aktiviteleri.....	66
4.5. Çalışma Gruplarının Karaciğer Dokusunda Ölçülen Total GSH Düzeyleri.....	67
4.6. Çalışma Gruplarının Karaciğer Dokusunda Ölçülen Malondialdehit (MDA) Düzeyleri.....	68
4.7. Çalışma Gruplarının Karaciğer Dokularının Histopatolojik Sonuçları.....	69
4.8. Çalışma Gruplarının Kan Dokusunda Ölçülen Süperoksit Dismütaz (SOD) Aktiviteleri.....	72
4.9. Çalışma Gruplarının Kan Dokusunda Ölçülen Katalaz (CAT) Aktiviteleri.....	73
4.10. Çalışma Gruplarının Kan Dokusunda Ölçülen Glutasyon Redüktaz (GR) Aktiviteleri.....	74
4.11. Çalışma Gruplarının Kan Dokusunda Ölçülen Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Aktiviteleri.....	75
4.12. Çalışma Gruplarının Kan Dokusunda Ölçülen Total GSH Düzeyleri.....	76
4.13. Çalışma Gruplarının Kan Dokusunda Ölçülen Malondialdehit (MDA) Düzeyleri.....	77
4.14. Yeni Sentetik Organoselenyum Bileşikleri (Se I ve Se II)' nin <i>In Vitro</i> Özelliklerinin Sonuçları.....	78
4.14.1. Radikal süpürme gücü (RSG) düzeyi.....	78

4.14.2. β -Karoten bleaching metoduyla antioksidan aktiviteleri.....	78
4.14.3. İndirgeme gücü düzeyi.....	79
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	80
6. KAYNAKLAR.....	87
ÖZGEÇMİŞ.....	102

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. DMBA'nın yapısı.....	4
Şekil 2.2. ROT üretiminin ve antioksidatif sistemlerin dengesi.....	8
Şekil 2.3. ROT oluşumu ve antioksidan savunma mekanizması.....	9
Şekil 2.4. Selenit'in Metabolik Yolu.....	32
Şekil 2.5. Selenosistin'in Metabolik Yolu.....	34
Şekil 2.6. Selenometiyonin'in Metabolik Yolu.....	35
Şekil 2.7. Karaciğer detoksifikasyon yolları.....	40
Şekil 3.1. Selenyum I (Se I) ve Selenyum II (Se II) Bileşiklerinin Kimyasal Yapıları...	45
Şekil 3.2. 1-izopropil-3-metilbenzimidazol-2-selenon (SeI) 'un sentezi.....	46
Şekil 3.3. 1,3-di- <i>p</i> -metoksibenzilpirimidin-2-selenon (SeII)'un sentezi.....	48
Şekil 4.1. Kontrol, mısır yağı, DMBA, DMBA+Se I ve DMBA+Se II grubu karaciğer SOD aktiviteleri.....	63
Şekil 4.2. Kontrol, mısır yağı, DMBA, DMBA+Se I ve DMBA+Se II grubu karaciğer CAT aktiviteleri.....	64
Şekil 4.3. Kontrol, mısır yağı, DMBA, DMBA+Se I ve DMBA+Se II grubu karaciğer GR aktiviteleri.....	65
Şekil 4.4. Kontrol, mısır yağı, DMBA, DMBA+Se I ve DMBA+Se II grubu karaciğer GSH-Px aktiviteleri.....	66
Şekil 4.5. Kontrol, mısır yağı, DMBA, DMBA+Se I ve DMBA+Se II grubu karaciğer GSH düzeyleri.....	67
Şekil 4.6. Kontrol, mısır yağı, DMBA, DMBA+Se I ve DMBA+Se II grubu karaciğer MDA düzeyleri.....	68
Şekil 4.7. Kontrol grubu karaciğer dokusunun histopatolojik görünümü; normal hepatositler (H-E x 20).	69
Şekil 4.8. Mısır yağı uygulama grubuna ait karaciğer doku kesitlerinde normal histopatolojik görünüm (H-E x 20).	69

Şekil 4.9. DMBA grubu karaciğer doku kesitlerinde hepatosit dejenerasyonu ve sinuzoidlerde dilatasyon ile parankimada yer alan lenfositlerler (H-E x 20)...	70
Şekil 4.10. DMBA grubu karaciğer doku kesitlerinde portal alanlarda yoğun lenfosit infiltrasyonu ile damar ve kanal yapılarında bozulmalar (H-E x 20)..	70
Şekil 4.11. DMBA+Se I bileşiği uygulama grubuna ait karaciğer doku kesitlerinde normal histolojik yapıda kontrol grubundakine benzer şekilde birer arter, ven, safra kanalı ve lenf damarları (H-E x 20).....	71
Şekil 4.12. DMBA+Se II bileşiği uygulama grubundaki karaciğer doku kesitlerinde normal karaciğer parankiması ve portal alanlarda safra kanalı proliferasyonu ile hafif lenfosit infiltrasyonu (H-E x 20).....	71
Şekil 4.13. Kontrol, mısır yağı, DMBA, DMBA+Se I ve DMBA+Se II grubu eritrosit SOD aktiviteleri.....	72
Şekil 4.14. Kontrol, mısır yağı, DMBA, DMBA+Se I ve DMBA+Se II grubu eritrosit CAT aktiviteleri.....	73
Şekil 4.15. Kontrol, mısır yağı, DMBA, DMBA+Se I ve DMBA+Se II grubu eritrosit GR aktiviteleri.....	74
Şekil 4.16. Kontrol, mısır yağı, DMBA, DMBA+Se I ve DMBA+Se II grubu eritrosit GSH-Px aktiviteleri.....	75
Şekil 4.17. Kontrol, mısır yağı, DMBA, DMBA+Se I ve DMBA+Se II grubu eritrosit GSH düzeyleri.....	76
Şekil 4.18. Kontrol, mısır yağı, DMBA, DMBA+Se I ve DMBA+Se II grubu eritrosit MDA düzeyleri.....	77
Şekil 4.19. Se I ve Se II bileşiklerinin antiradikal aktiviteleri.....	78
Şekil 4.20. Se I ve Se II bileşiklerinin antilipid peroksidatif etkileri.....	79
Şekil 4.21. Se I ve Se II bileşiklerinin indirgeme gücü düzeyleri.....	79

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Çizelge 2.1. Biyolojik Sistemlerde Bulunan Başlıca Selenyum Türlerinin Kimyasal Formülleri.....	23
Çizelge 2.2. Besinlerdeki Selenyum Miktarları.....	24
Çizelge 2.3. Canlı Organizmalardaki Selenyum Türleri.....	28
Çizelge 4.1. Grupların Karaciğer Dokusunda Ölçülen SOD Aktivitesi.....	63
Çizelge 4.2. Grupların Karaciğer Dokusunda Ölçülen CAT Aktivitesi.....	64
Çizelge 4.3. Grupların Karaciğer Dokusunda Ölçülen GR Aktivitesi.....	65
Çizelge 4.4. Grupların Karaciğer Dokusunda Ölçülen GSH-Px Aktivitesi.....	66
Çizelge 4.5. Grupların Karaciğer Dokusunda Ölçülen GSH Düzeyleri.....	67
Çizelge 4.6. Grupların Karaciğer Dokusunda Ölçülen MDA Düzeyleri.....	68
Çizelge 4.7. Grupların Eritrositlerinde Ölçülen SOD Aktivitesi.....	72
Çizelge 4.8. Grupların Eritrositlerinde Ölçülen CAT Aktivitesi.....	73
Çizelge 4.9. Grupların Eritrositlerinde Ölçülen GR Aktivitesi.....	74
Çizelge 4.10. Grupların Eritrositlerinde Ölçülen GSH-Px Aktivitesi.....	75
Çizelge 4.11. Grupların Eritrositlerinde Ölçülen GSH Düzeyleri.....	76
Çizelge 4.12. Grupların Eritrositlerinde Ölçülen MDA Düzeyleri.....	77

SİMGELER VE KISALTMALAR

BSA	Bovine Serum Albumin
CAT	Katalaz
DMBA	7,12 dimetil benzantrasen
DPPH	Difenil Pikril Hidrazil
GSH	Redükte Glutasyon
GSH-Px	Glutasyon Peroksidaz
GR	Glutasyon Redüktaz
GSSG	Okside Glutasyon
HE	Hematoksilen-Eosin
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
ICAM	İnterselüler Adezyon Molekülü
MDA	Malondialdehit
MMO	Mikrozomal monooksijenaz
4-HNE	4-Hidroksinonenal
NADH	Nikotinamid adenin dinükleotit (redükte)
NADPH	β- Nikotinamid adenin dinükleotit 3'-fosfat (redükte)
L-NAME	Nitro-L-Arjinin Metil Ester
NFκb	Nükleer faktör kappa b
PAH	Polisiklik aromatik hidrokarbon
PBS	Phosphate buffer saline (fosfat tamponu)
PUFA	Poli doymamış yağ asidi
ROT	Reaktif oksijen türleri
SOD	Süperoksit dismütaz
TNF-α	Tümör Nekrozis Faktör alfa
TGF-β	Ttransforming Growth Factor beta

1. GİRİŞ

Günümüz dünyasında, çevre kirleticileri ve toksik ajanlar, önüne geçilemeyen bir problem halini almıştır. Güncel hayata giren bu kirleticiler, beraberinde pek çok çözüm bekleyen problemleri de ortaya çıkarmıştır. Hiçbir şekilde ihmale gelmeyecek olan bu kirleticilerin toksik, mutajenik ve karsinogenik özelliklerinin olduğu bilinmektedir. Bu toksik ajanlara maruz kalma sonucunda ortaya çıkan yaşlanma ve kanser gibi bir takım olumsuzlukların temelinde, oksidatif hasarlar yer almaktadır. Hava ve çevre kirliliğine yol açan çevresel ajanlar, oksidatif strese yol açan başlıca faktörler arasındadır. Bu toksik maddeler, hücrede serbest oksijen radikallerinin üretimini arttırarak, hücresel düzeyde oksidatif hasara yol açmaktadırlar. Canlı hücrede kompleks kimyasal reaksiyonların başlamasına yol açan serbest radikal kimyası, ürettikleri radikal metabolitlerle ve çeşitli toksik ajanlarla kimyasal toksikolojide önemli rol oynamaktadırlar. Bu biyokimyasal süreç içinde, potansiyel hasar etkeni ürünler olarak sınıflandırılan toksik ajanlar, hücre ve dokularda hasara yol açabilen reaktif oksijen türleri (ROT)'nin oluşumuna yol açmaktadırlar [1].

Dünyadaki yaşam paradokslarından biri olarak düşünülebilecek olan oksijen, sadece enerji metabolizması ve solunum için temel gereksinim kaynağı değil, aynı zamanda pek çok hastalığa ve elverişsiz durumlara da yol açabilen bir unsurdur. Bizi canlı ve aktif kılan oksijenin kısmi indirgenmesi sonucu, serbest oksijen radikalleri olarak bilinen ürünler açığa çıkmaktadır. Bu ürünler, vücut için enfektif olan ajanların yok edilmesinde kullanılırken, aynı zamanda doku ve hücrelerde oksidatif hasarlar oluşturmaktadır. Hücrelerin proteinlerini ve yağlarını bozarak, hücre membran yapılarında hasarlara yol açıp, genetik kodlarını bozarak, hücre ölümlerine yol açmaktadırlar [2].

Reaktif oksijen türleri, biyolojik sistemlerde yaygın bir şekilde üretilmektedir. Eğer bu reaktif oksijen türlerinin oluşumu biyolojik sistemlerde kontrol edilmezse, bu süreç, membran fonksiyonlarında bozulma, protein inaktivasyonu ve DNA hasarıyla sonuçlanabilir. Kronik oksidatif stres yaşlanma, kanser, aterosklerozis ve nörodejeneratif düzensizlikleri içeren çeşitli dejeneratif hastalıklarda ana faktör olabilmektedir [3].

Kimyasal olarak serbest radikal, eksik bir elektronu olan ve herhangi bir diğer molekülden bir elektron yakalamaya çalışan tek moleküldür. Serbest radikallerin, elektronlarından birini veren bileşikler olan antioksidanlar tarafından nötrale

edilmesiyle, hücre hasar oluşturmaları engellenebilmektedir. Antioksidanlar olarak isimlendirilen enzimler ve diğer kimyasal bileşiklerden oluşturulan bu savunma depolarının varlığıyla vücut, serbest radikallerin yoğun saldırılarına kolayca boyun eğmemektedir [2].

Besinlerle vücuda alınan bazı mineraller, normal oksijen metabolizması boyunca üretilen serbest radikallerin etkilerine karşı hücreleri koruyan antioksidan enzimlerin önemli bir parçasıdır. Vücut, bazı kronik hastalıkların gelişimine katkıda bulunan ve hücre hasarına yol açabilen serbest radikallerin seviyelerini kontrol edebilmek için böyle antioksidan savunmalar geliştirmektedir. Temel eser bir element olan selenyum da, immün sistemin normal fonksiyonunda ve antioksidan mekanizmada görev yapan enzimlerin bir parçası olarak, savunma sisteminde yer almaktadır [4].

Günlük olarak tüketilen besinlerde, doğal olarak bulunan ajanların ve optimal diyetlerin araştırılması, kanser gelişiminin önlenmesinde ve kontrolünde çığır açıcı yaklaşımlar sağlamaktadır. İnsanlar için yapılan klinik uygulamalarda, mikrobese selenyumun kullanımı sınırlıdır, fakat bu araştırmalar selenyumun önemli ajanlar arasında yer aldığını ve biyolojik sistemlerde çok sayıda fonksiyonları olduğunu göstermektedir [5].

Yaşamın uzaması ve hastalıkları önlemede, inorganik ve organik selenyum bileşiklerinin gösterdiği kimyasal koruyucu etkilere benzer etkiler gösteren, laboratuvarlarda hayvan çalışmalarında karsinogenezis üzerine çalışılmış benziltiyosiyanat, benzilselenosiyanat, metoksifenol, metoksibenzenselenol gibi önemli sentetik organoselenyum bileşikleri mevcuttur [6].

Bitkisel ve hayvansal besinlerde toprağın içeriğine bağlı olarak değişik miktarlarda selenyum bulunmaktadır. Hayvansal organizmada en yüksek oranda karaciğer, kas, böbrek, pankreas ve hipofiz gibi organ ve dokularda yüksek miktarlardadır. Metabolik olarak besinsel kaynaklardan selenyumun eldesi ve yapımı imkansız olduğu için, organik selenyumun ek bir besin olarak dışardan alınması gerekmektedir [7].

Selenyuma, karaciğerin detoksifikasyon (sitokrom P₄₅₀) sistemlerinin fonksiyon görmesi için gereksinim duyulduğu ve selenyumun karaciğeri toksinlerden, serbest radikal hasarından koruyarak, karaciğer fonksiyonlarının normal işlemlerini sağlamak için yardımcı olduğu da bilinmektedir. Ayrıca azalan plazma selenyum konsantrasyonlarının, karaciğer kanseri riskinin artışında önemli rol oynadığı rapor edilmiştir [8].

Vücudu savunan sistemler toksik oksidatif hasarlardan hücreleri korumada ve reaktif oksijen radikallerini temizlemede etkili olmasına rağmen, bu sistemler bazı durumlarda yetersiz olabilmektedirler. Bu durumda defektif antioksidan sistemler, ilaç toksisitesi ve karsinogenlere karşı hassasiyeti arttırmaktadır. Böylece besinsel antioksidan bileşikler veya mikrobeyinler gibi uygun bütünleyiciler, ROT ile indüklenmiş hücresel hasarlara karşı korunmada gerekli olabilmektedir [3].

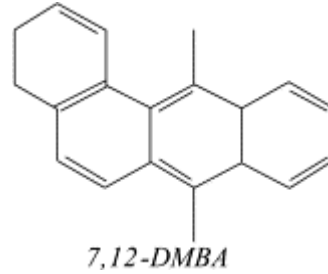
Bizim çalışmamızda, sıçan kan ve karaciğer dokularında, 7,12 dimetil benzantrasen (DMBA) ile kimyasal olarak indüklenmiş sitotoksitede, endojen antioksidan enzim aktiviteleri ve lipit peroksidasyonunun araştırılmasının yanı sıra, indüklenmiş hücresel hasarlara karşı sentetik organoselenyum bileşiklerinin antioksidan olarak koruyucu etkilerinin *in vivo* ve *in vitro* olarak araştırılması planlanmıştır. Ayrıca bu uygulamaların, karaciğer dokusunda meydana getirdiği etkilerin, histopatolojik verilerle de desteklenmesi hedeflenmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. DMBA ve Toksisitesi

DMBA, sıçanlarda meme tümörlerinin oluşmasına yol açtığı bilinen, dokularda DNA hasarının, mutagenезisin ve karsinogenезisin oluşmasında büyük rol oynayan, DNA'ya bağlanabilme özelliğinde, kimyasal karsinogenler sınıfında yer alan bir polisiklik aromatik hidrokarbon (PAH)'dur (Şekil 2.1.) [3, 4, 9-12]. Petrol ve petrol türevi olan PAH'lar, kullanım esnasındaki hatalar ve ihmaller sonucunda, petrol dökülmesi ve fosil yakıtların tamamen yanmadan atılmalarıyla çevreye bulaşan, yaygın organik kirleticilerdir [13].

Mutasyon ve kanser araştırmalarında prototip bir ajan olarak çok yaygın bir şekilde kullanılan ve sentetik bir PAH olan DMBA'nın temel hedef yerleri deri ve meme bezleridir. Uzun yıllardan beri gösterildiği gibi, tek bir DMBA dozu, kısa bir gecikme periyodundan sonra meme ve karaciğer hücrelerinde DNA adduct'larının oluşumu ve moleküler lezyonlar sonucu yüksek oranda tümörlerin oluşumuyla sonuçlanır [14].



Şekil 2.1. DMBA'nın yapısı [12]

Sucul ve karasal ekosistemlerde uzun süre kalabilen ve çevresel bileşikler sınıfında yer alan PAH'lar, çevreye dökülüp, birikmeleri sonucu çevre kirlenmelerine yol açarak, biyolojik dengeyi önemli ölçüde etkilemektedirler [13].

DMBA gibi PAH'ların serbest radikal oluşturduğu ve bu bileşiklerin karsinogenезisde ciddi bir rol oynadığı gösterilmiştir. Bu rol, DNA'da zincir kırılmaları ve lipit peroksidasyonuna yol açan hücresel oksidatif hasarı içeren peroksitler, hidroksil radikalleri ve süperoksit anyon radikali gibi reaktif oksijen türlerinin üretilmesi ile birlikte olmaktadır.

Bir PAH olan DMBA, ortamda radikal katyonu oluşturan bir elektron oksidasyonunu katalize eden sitokrom P₄₅₀ ve bay-region diol epoksitleri üreten monooksijenasyon şeklinde iki büyük metabolik yolla metabolize olur. PAH'ın diol epoksitlerinin DNA'ya kovalent bağlanmasının, tümör başlangıcı için bir ön gereksinim olduğu bilinmektedir [3, 5, 15, 16]. DMBA, mitokondriyal DNA'dakinin yanı sıra nükleer DNA'da da tek ve çift zincir kırılmalarını indükler ve mininükleazlar olarak etki gösterir. Bu durumda, diol epoksitleri detoksifiye eden Glutasyon- S-Transferazlar, katalize ettikleri hücrel reaksiyonlarla, tümör oluşma riskini azaltmada önemli bir yer tutmaktadırlar [3].

Dişi sıçanlarda meme dokusunda DMBA-DNA adduct'larının *in vivo* oluşumu ve DMBA ile indüklenmiş, sıçan meme bezlerinde DNA hasarları ve tümör oluşumlarıyla birlikte, meme adenokarsinomlarının oluşumuna ve karsinogenezisin başlamasına yol açtığı bir çok çalışmada rapor edilmiştir [5, 17, 18]. DNA adduct'larının oluşmasının yanı sıra, DMBA gibi mutajenlerin metabolize olmasıyla üretilen oksidatif ürünler, membranların lipit ve proteinlerinde hasarlar oluşturarak, yaşamsal hücre fonksiyonlarının bozulmasına da yol açmaktadırlar [3]. DMBA ile indükleme sonucu, hedef doku olan meme dokusunda meydana gelen tümörlerin [19, 20] ve DNA adduct'larının yanı sıra, deri, kolon, akciğer ve karaciğer gibi bir çok doku ve organda da oksidatif stresin etkisiyle kanser oluşumu ve gelişimi söz konusudur. DMBA ile indüklemeye bir cevap olarak tümör oluşumunun temelinde yine, reaktif oksijen türlerinin saldırısı ve oksidatif stres yatmaktadır [14, 16, 21-23].

Doku lezyonlarını indükleme yeteneğinde olan DMBA, karsinogen etkisini oluşturmak için metabolik aktivasyonlara gereksinim duyar. Cyp1A1 ve Cyp1B1, DMBA'nın metabolizması için temel olarak sorumlu olan Cyt P₄₅₀ ailesinin iki enzimidir. DMBA, DNA ile adduct oluşturan, karsinogen 1,2-epoksit-3,4-diol DMBA'yı oluşturmak için metabolize olur. Bu adductlar tümörlerin gelişmesi için bir ön gereksinim olan mutasyonlara yol açar. Bu tür tümör oluşumuna yol açan maddeler (tümör promotörleri), polimorfonükleer lökositler, makrofajlar ve non-fagositik hücreler tarafından reaktif oksijen türleri (ROT)'nin üretimini uyarır. ROT'nin mutagenesis ve karsinogenezisde, özellikle de tümör ilerlemesinde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir [24].

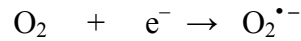
DMBA ile indüklenen sıçan karaciğer dokusunda genotoksisite ve oksidatif stres ile birlikte lipid peroksidasyon düzeylerinde artış ve genetik hasarlar gözlenmektedir [25, 26].

2.2. Oksidatif Stres Ve Etkileri

Oksijen aerobik yaşam için hem gereklidir, hem de reaktif oksijen türlerinin oluşumundan dolayı bütün canlılar için yüksek oranda tehlikelidir [27].

%21'in üstündeki atmosferik oksijen (O₂) miktarı, insanlar için toksiktir. O₂'in hasar verici etkisi serbest oksijen radikallerinden dolayıdır. Serbest radikal, eşlenmemiş en az bir elektrona sahip molekül ya da atomdur. Serbest radikaller; katyonik, anyonik ya da nötral yapıda olabilir ve aşırı derecede reaktiftirler [28].

ROT, serbest radikaller yanında hidrojen peroksit (H₂O₂), hipokloröz asit ve tekil oksijen gibi bir veya daha fazla eşlenmemiş elektron içermeyen, fakat ekstra ve intraselüler ortamda serbest radikal oluşturma kapasitesine sahip molekülleri de içerecek şekildedirler [29, 30]. Oksijenin bir elektron (e⁻) alarak indirgenmesi ile süperoksit anyon radikali (O₂^{•-}) oluşur.



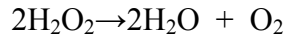
Süperoksit, hidroksil radikaline oranla reaktivitesi daha zayıftır, membranları geçemez ve az sayıda hücre sel hedeflere hasar verir. Spontan olarak sulu ortamda hidrojen peroksit ve tekil oksijene dismute olur ve hücre hasarı oluşturur. Ayrıca süperoksitin ortamdaki uzaklaştırılması süperoksit dismutaz (SOD) ile çok daha hızlı bir şekilde H₂O₂'e dismutasyonu ile gerçekleşmektedir [28, 29].



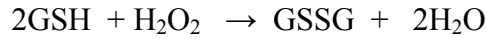
Oluşan tekil oksijen (¹O₂), serbest radikal olmamasına karşın kuvvetli okside edici ajandır ve birçok molekülle etkileşir. Membran lipidlerine etki ederek peroksitleri oluşturur [31].

Hidrojen peroksit, serbest radikal değildir ve nispeten reaktiftir. H_2O_2 , biyolojik membranları geçerek, intraselüler olarak fosfolipitler, karbonhidratlar, metalloproteinler ve DNA ile reaksiyona girerek hasara sebep olmaktadır [28].

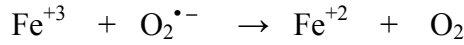
Süperoksitin dismutasyonu ile oluşan hidrojen peroksit, birçok fizyolojik fonksiyona sahiptir. Bazı enzimler (ksantin oksidaz gibi) direkt olarak hidrojen peroksit oluştururlar [29]. SOD tarafından oluşturulan hidrojen peroksit daha çok intraselüler ortamda bulunan katalaz enzimi ile suya ve oksijene dönüştürülür.



Ekstraselüler ortamda katalazın görevini daha çok selenyum bağımlı enzim olan glutatyon (GSH) peroksidaz üstlenir [32].



$O_2^{\bullet -}$, biyolojik materyallerde önemli indirgeyici reaksiyonları indükler; örneğin ferritin gibi metalloproteinlerde ferrik formdaki demir (Fe^{+3})'i ferrus form (Fe^{+2})'a indirgeyebilir.



Demir bağlı proteinin indirgenmesi, biyolojik materyallerde önemli bir reaksiyondur. Çünkü o, çok yüksek oranda reaktif olan hidroksil radikali (OH^{\bullet})'ne dönüşümü sağlayacaktır.

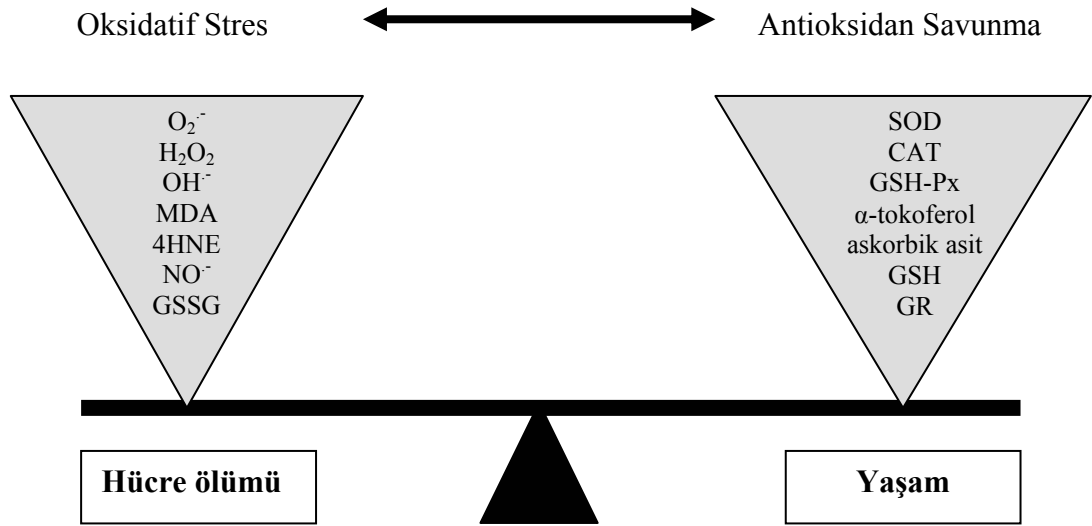
Hidroksil radikali en reaktif okside edici radikaldır ve *in vivo* koşullarda yüksek bir reaksiyon hızıyla hemen hemen her moleküle saldırır. Hidroksil radikali lipid peroksidasyon olarak bilinen klasik serbest radikal zincir reaksiyonunu başlatabilir.

Membran fosfolipitlerin yakınında hidroksil radikali olduğu zaman, peroksil radikali, lipid hidroperoksitler gibi radikaller oluşturur. Hidroperoksitlerin akümüülasyonu membran fonksiyonunu bozabilir ve sitotoksik aldehytler oluşturabilir [32].



Oksidatif stres; hücrel antioksidan düzeyinin, reaktif oksijen düzeylerine karşı yetersiz kalması sonucu, toksik bir etkinin başlaması olarak tarif edilir. Bu durum ya

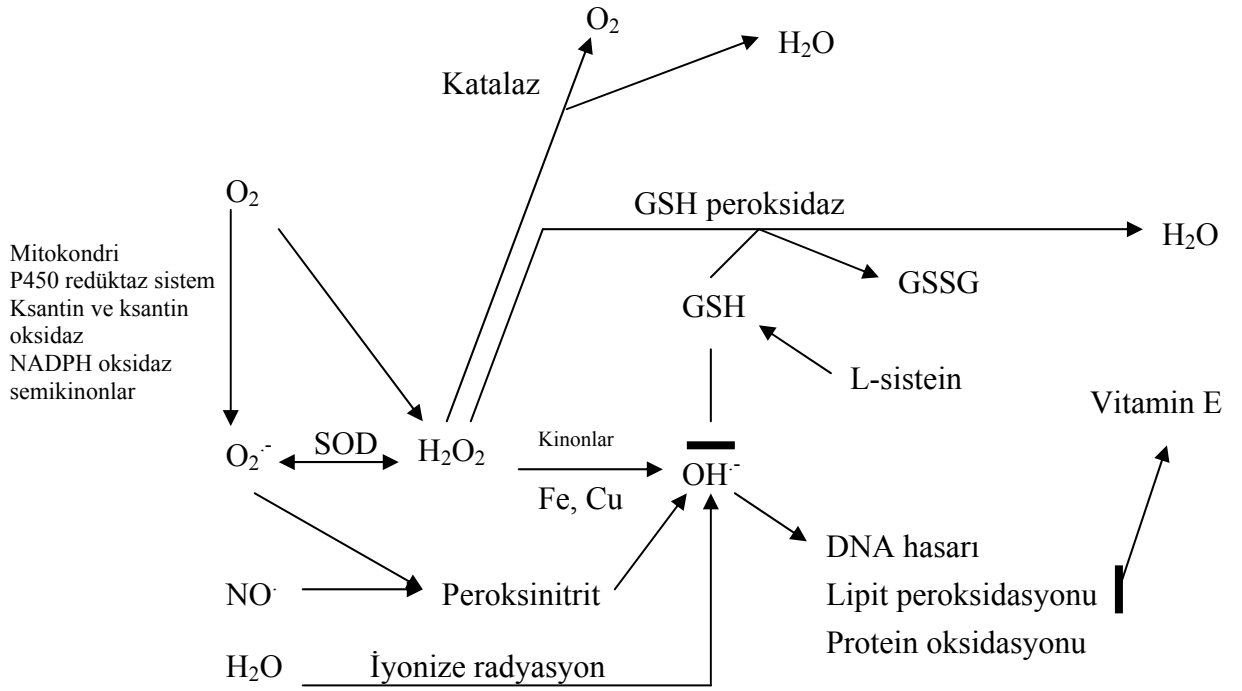
antioksidan savunmaların yetersizliği, ya reaktif oksijen türlerinin aşırı üretimi, ya da her ikisinden dolayı olmaktadır. ROT üretiminin aşırı artması veya antioksidan savunmanın azalmasından dolayı her iki sistemin dengesizliği oksidatif strese yol açmaktadır (Şekil 2.2.) [33-35].



Şekil 2.2. ROT üretiminin ve antioksidatif sistemlerin dengesi [36].

Oksidanlar, iyonize radyasyon, U.V. ışığı, kimyasal reaksiyonlar, enzimatik olarak metal iyonlarının serbest geçişini kapsayan redoks katalizleriyle veya enzimlere metal iyonlarının bağlanması gibi birçok yolla üretilmektedirler. Oksidanlar, sülfür merkezli radikaller, reaktif nitrojen türleri ve reaktif oksijen radikallerini kapsamaktadır. Eşlenmemiş bir veya daha çok elektronlu moleküller gibi olan reaktif türlerin hepsi radikal değildir, fakat birçok durumda, oksidasyonla biyomoleküllerin hasarlanması sonucu oluşan reaktif non-radikal türler, radikaller gibi davranırlar. Bu şekilde reaksiyonları çoğaltarak, radikallerin kendi kendine oksidasyon ürünlerini oluşturması, aşırı hasara yol açan, en tehlikeli reaksiyon tipidir [28, 33].

Reaktif oksijen türleri, lipitlere, proteinlere, nükleik asitlere hasar verebilen ve insan karsinogenezinde rol oynayan oksidatif metabolizmanın kaçınılmaz bir yan ürünüdür (Şekil 2.3.) [35, 37-39].



Şekil 2.3. ROT oluşumu ve antioksidan savunma mekanizması [40].

Aktive oksijen, bir çok kompleks kimyasal reaksiyonların gerçekleştiği metabolizmanın bir komponenti olarak sık sık oluşur, fakat çevresel veya kimyasal streslerin sebep olduğu metabolizmadaki karışık durumların bir sonucu olarak, elektron transport sistemleri veya enzimlerin disfonksiyonuyla, en başta mitokondri olmak üzere endoplazmik retikulum, plazma membranları, kloroplastlar, mikrobadiler ve hücre duvarlarında oluşturulur. Aktive edilmiş oksijenin organik substratlarla reaksiyonları, homojen çözeltilerde, *in vitro* şartlar altında komplekstir, fakat biyolojik sistemlerde membran yüzey özellikleri, elektriksel yükü, makromoleküllerin bağlayıcı özellikleri, enzim, substrat ve katalizörlerin kompartmanlaşmasından dolayı çok daha komplekstir.

Böylece tek bir hücre içinde bile çeşitli bölgelerde oksijenli reaksiyonların kapsamı ve doğası farklıdır [41].

Oksidatif stresin önemli hücresel kaynağı; mitokondrilerde solunum zincirinde, oksijenin tamamen indirgenmemesi ile reaktif oksijen türlerinin oluşumu ve hipoklorik asitin oluşumuna yol açan miyeloperoksidaz ve süperoksit radikali üreten NADPH oksidaz aracılığıyla oksidatif yanmayı içeren savunma sistemleridir. Bir diğer önemli molekül ise, anreaktif olarak L-arjini NO[•] ve L-sitruiline dönüştüren, nitrik oksit

sentazlar olarak isimlendirilen bir grup enzim ile sentezlenen, nitrik oksittir. Oksijen veya süperoksit varlığında NO^{\bullet} , nitrojen dioksit ve peroksinitrit olan daha reaktif türlere dönüştürülür.

Biyolojik sistemlerde, oksidatif stresle oluşturulan reaktif türler, genel olarak radikaller olarak düşünülür. Bunlar biyomoleküller için genellikle yüksek oranda reaktif olan bir veya daha çok eşlenmemiş elektronlu moleküllerdir. Özellikle hidrojen peroksit gibi radikal olmayan, oksijenden türetilmiş diğer reaktif moleküller de vardır. Eşlenmemiş iki elektronunun antiparalel spiniyle karakterize olan tekil oksijen ($^1\Delta\text{O}_2$), normal triplet oksijenle karşılaştırıldığında ($^3\Delta\text{O}_2$), yüksek oranda reaktiftir. Prensipite, her iki türde oksijen olmasına rağmen, radikaldir [33].

Aerobik organizmalarda, mitokondri tarafından oksijenin kullanılması sonucu, süperoksit ($\text{O}_2^{\bullet -}$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali ($\text{HO}^{\bullet -}$) gibi birkaç reaktif radikal üretilmektedir. Ayrıca nitrik oksit (NO^{\bullet}) de mitokondri tarafından üretilir ve yaşlanma ile oluşturulan birkaç hastalıkla birlikte yaşlanma süreçlerini de kapsayabilir. Oksidan ürünlerin bir diğer potent kaynağı fagositlerdir ve onlar süperoksit ($\text{O}_2^{\bullet -}$), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikali ($\text{HO}^{\bullet -}$), nitrik oksit (NO^{\bullet}) ve hipoklorik asit (HOCl) üretirler. HOCl , nitrit varlığında nitrojen dioksit (NO_2^{\bullet}) ve nitril klorür (NO_2Cl) gibi diğer reaktif metabolitleri oluşturabilen bir inflamasyon aracı ve güçlü bir oksidan olan klorlu bileşiklerdir.

Potansiyel olarak zararlı bileşiklerin oluşmasına önemli bir şekilde katkıda bulunabilen nitriti, NO_2Cl ve NO_2^{\bullet} 'ye dönüştüren, aktive edilmiş insan polimorfonülear nötrofillerinin varlığında söz konusudur.

Peroksinitrit (ONOO^{\bullet}), aktive olmuş makrofajlar ve endotelial hücrelerde keşfedilmiş olan nitratlayıcı ve güçlü bir okside edici ajandır. Makrofajlar ve nötrofiller gibi farklı hücre tiplerinin birçoğunda ortaya çıkarılmış olan nitrik oksit ve süperoksitin reaksiyonu sonucu üretilen peroksinitritin, DNA'da zincir kırılmaları ve yapı modifikasyonları gibi DNA hasarı, iskemi-reperfüzyon hasarı ve aterosklerozis gibi doku hasarı ve oksidatif stresle bağlantılı olduğu gösterilmektedir [42].

Basit bir şekilde oksidan veya radikal olarak tanımlanan reaktif oksijen, reaktif nitrojen ve klorlanmış türlerin potansiyel olarak açığa çıkarılmış etkileri, yaşlanma sürecinde etkili olabilir.

Aerobik organizmalar, kompleks antioksidan savunma sistemleri tarafından oksidatif saldırılara karşı iyi bir şekilde korunmaktadır. Oksidatif stres olarak tanımlanan, oksidanlar ve antioksidanlar arasında meydana gelen bir dengesizlik, yaşlanma süreci boyunca gözlenmektedir. Oksidan türler tarafından indüklenmiş oksidatif stres, antioksidan savunmaların tüketildiği ya da radikal reaksiyonların, antioksidan savunma mekanizmalarından daha büyük olduğu durumlarda meydana gelir [43].

Biz immün sistemde önemli pozitif rol oynayan oksidanların üretimine katkıda bulunan, oksijence zengin bir çevrede yaşıyoruz ve besinlerden enerji elde etmek için oksijeni kullanıyoruz. Bunun sonucu olarak salınan oksijen radikallerinin kontrolü ve üretimi hayat sürecinin bir parçası haline gelmektedir [34].

Oksijen, oksijenden türetilmiş serbest radikalleri oluşturmak için, diğer moleküllerden elektronları kolay bir şekilde alır. Oksijenin hücreler için toksik olması, bu özelliğinden dolayıdır. Solunum dahil bir çok hücre içi reaksiyonlarda oksijen, süperoksit ($O_2^{\bullet -}$) veya hidrojen peroksit (H_2O_2)'e indirgenir. Bu moleküller, diğer biyolojik moleküller ile sadece orta derecede reaktiftir, fakat onlar biyolojik sistemlerde reaktif oksijen türlerinden oluşturulan oksidatif hasarın en çoğu için doğrudan sorumlu olabilen ve en yüksek miktarda reaktif olan hidroksil radikalini oluşturabilir [40].

Aerobik hücreler reaktif oksijen türlerinin hasar etkilerini önlemek için, oksidatif kuşatmanın devam ettiği durumlarda gözlenen geniş bir savunma mekanizmasına sahiptirler ve bu hücrelerin hayatta kalması, antioksidanlar ve ROT arasında bir dengeye bağlıdır [40].

Canlıların hayatları boyunca etkilendiği reaktif oksijen türleri, oksidatif hasarlara yol açmaktadır. Kümülatif ve potansiyel olarak artan miktardaki hasar, yaşlanmadaki fonksiyonel ve patolojik bozukluklara yol açmaktadır. Serbest radikallerin DNA, proteinler ve lipitlerde hasarlara yol açtığı bir çok araştırmacı tarafından çalışmalarla bildirilmiştir [44-50].

Oksidatif stres, oksijen serbest radikallerinin oluşumu ve antioksidan savunma sistemleri tarafından bu türlerin inaktivasyonu arasındaki dengesizliğin bir sonucu olarak da meydana gelmektedir [51].

ROT'leri, mutagenesis, karsinogenesis ve tümör ilerlemesine sebep olan faktörler olarak önerilmekte ve birçok insan hastalıklarının patofizyolojisini ve sebeplerini ortaya çıkarmaktadır. ROT'leri DNA'da zincir kırılmalarını ve aynı zamanda mutagenik ve karsinogenik etkilere yol açan DNA yapısının oksidatif modifikasyonlarını da indükler [24].

ROT'leri normalde kısa yarılanma ömrüne sahip olmasına rağmen DNA, proteinler ve doymamış yağ asitleri ile reaksiyona girebilirler. Bu durum DNA'da zincir kırılmaları ve oksidatif hasar, protein-protein ve protein-DNA çapraz bağlanmaları ile sonuçlanır. Lipitlerin oksidasyonu, hücrede çok daha uzun reaksiyonlar ile devam eden lipit peroksitleriyle sonuçlanır. Onlar radikal zincir reaksiyonlarını başlatır ve böylece sebep oldukları oksidatif hasar artar [52, 53].

Bütün membran lipitleri polidoymamış yağ asitleri (PUFA)'ni içerir ve serbest radikal hasarına karşı hassastırlar. PUFA'lar C=C gibi çift bağlı karakteristik bir yapıya sahiptir. Bu yapı, peroksit ürünlerini oluşturan, dien konjugatlarına karşı ve moleküllerden hidrojen atomlarının çıkarılmasına yol açan hidroksil radikale karşı hassastır.

Reaktif oksijen türleri ya da diğer reaktif maddeler proteinleri oksitleyerek, onların oksidatif modifikasyonlarında rol oynayabilirler. Aromatik aminoasitlere, sisteine ve disülfid bağları (S-S)'na saldırırlar. Bu durum immünoglobulinler, albumin ve kollojeni kapsayan çeşitli ekstraselüler proteinlerin konformasyonel bütünlüğünü ciddi olarak etkilemektedir ve sonuçta bir çok fizyolojik bozukluk ve hastalıkların sebebi veya gelişiminden sorumlu olmaktadır. Proteinlere serbest radikal saldırısının karakteristik bir özelliği, otoflorescens oluşumdur. Bu florescent protein değişimleri, kataraktlı lenslerde ortaya çıkmaktadır [54].

Serbest radikaller karsinogenesis için de bir araçtır. Bu mekanizma, DNA'da tek ve çift zincir kırılmalarına, mutagenese ve hücre ölümlerine yol açar. Hidrojen peroksit'in metal iyonları (Fe ve Cu) ile DNA'da etkileştiği özel bir bölgede, hidroksil radikalinin hasarına yol açar.

DNA ile interşelat oluşturabilen ve bağlanabilen sigara dumanındaki semikinonlar normal olarak, süperoksit radikali ve hidrojen peroksit üretirler. Aktif

oksijen türleri, radyasyonla indüklenmiş karsinogenezisde bütün DNA zincir kırılmalarının %70'inden sorumludur.

Glukoz, mannoz ve deoksi şekerler gibi şekerler, hidrojen peroksit üretmek için okside olurlar. Monosakkaritlerin otooksidasyonu ile üretilen okzoaldehitler, diyabet, kanser ve sigara içimiyle ilgili hastalıkların bir göstergesi olarak ortaya çıkmaktadır. Diyabet hastalarının serumlarında bulunan florescent albumin kompleksleri ve florescent IgG kompleksleri, oksijen serbest radikalleri tarafından üretilmektedir. Fizyolojik şartlar altında otooksidize olabilen basit şekerler; diabetes mellitus'ta mikroanjyopatik komplikasyonlarda ortaya çıkan, çeşitli proteinlerin çapraz bağlanmasını ve oksidasyonunu arttırabilen süperoksit radikalini üretirler.

Oksijen radikalleri, yüksek vizkozitede kalmak için, sinoviyal sıvıda bulunan hiyaluronik asit gibi karbonhidrat polimerlerinin parçalanmasına da sebep olmaktadır. Romatoid artirit'te karbonhidrat polimerleri, oksijen radikalleri tarafından oluşturulan uyarılmış bir etki ile depolimerize olmuştur [28].

Oksijen, organik moleküllerin oksidasyonu ile enerji elde etmek için kurulmuş metabolik reaksiyonlarda primer oksidandır. Oksijen kullanılan metabolik reaksiyonlar, oksidatif stresle sonuçlanır ve bu bütün hücrelerde prooksidan /antioksidan denge durumunda bir bozulma olarak tanımlanır. Oksidatif stresin bu tanımında hücreler, normal aerobik metabolizma boyunca devamlı bir şekilde üretilen ve detoksifiye edilen oksidanların tamamını kapsayan prooksidan /antioksidan sistemlere sahiptir. Ek oksidatif olaylar meydana geldiğinde, prooksidan sistemler antioksidanların dengesini bozar ve potansiyel olarak lipitler, proteinler, karbonhidratlar ve nükleik asitler için oksidatif hasar üretir, son olarak aşırı oksidatif stres hücre ölümüne yol açar. Hafif ve kronik oksidatif stres, bu sistemlere katılan proteinlerin indüklenmesi veya baskılanmasıyla ve glutatyon, E vitamini gibi hücrel antioksidan depolarının tükenmesiyle antioksidan sistemleri değiştirebilir.

Prooksidan/antioksidan sistemler arasında bir bozukluk, radyasyon, çevre kirlenmeleri ve verilen ilaçlar (ksenobiyotikler, yabancı maddeler)'in metabolizması ve hastalık veya enfeksiyonlara immün sistemin cevabını içeren durumlar farklı oksidatif saldırılarla sonuçlanır. Radikal; oksijen veya nitrik oksit gibi küçük bir gaz molekülü olabilir veya protein, karbonhidrat, lipit veya nükleik asit gibi büyük bir biyomolekülün bir parçası da olabilir [55].

Reaktif oksijen türleri, mitokondriyal ve mikrozomal enzimatik reaksiyonlarda, aerobik metabolizmanın normal bir ürünü olarak oluşturulmaktadır. Fakat, reaktif oksijen türleri patofizyolojik şartlarda yüksek oranda üretilmektedir [56].

Membrana bağlı mikrozomal monooksijenaz (MMO) sistem çoğu hayvan dokularının endoplazmik retikulumunda lokalize olmuştur. MMO bileşikleri karaciğer hücrelerinde bulunmasına rağmen, bu sistem akciğer, böbrek, beyin, lenfositler, vasküler düz kaslar, burun, intestinal epitel ve nazal mukozada da mevcuttur. Çok sayıda eksojen ve endojen bileşiklerin oksijenasyonunu katalize eden MMO sistemi, terminal oksidazlar olarak hem-tiyol protein olan P₄₅₀ sitokromlardan oluşmaktadır. MMO'nun temel fonksiyonu, bazı endojen substratların yanısıra eksojen bileşiklerin (ilaçlar, karsinogenler ve ksenobiyotikler) oksijenasyonu olarak ortaya çıkmaktadır. Monooksijenaz reaksiyonları, flavoprotein NADPH-P₄₅₀ redüktaz ile P₄₅₀'ye aktarılan iki elektronun girişine ihtiyaç duyar. P₄₅₀ için elektron girişi, oksijen aktive etmek ve sonunda bir oksijen atomunu substrat molekülüne yerleştirmek için gereklidir. MMO sistemi reaktif oksijen türlerinin üretiminde rol oynayarak hücrelerde oksidatif stresin kaynağı olarak da yer almaktadır. Ökaryotik monooksijenazlarda, aktive edilmiş oksijenin önemli bir kısmı herhangi bir substrat modifikasyonu olmaksızın enzimden salınır. Pek çok hücrede MMO, mitokondri tarafından üretilen seviyelere benzer olarak ROT'un fizyolojik olarak önemli seviyelerini üretir. ROT, P₄₅₀ katalitik döngüsünün ayrışması ile primer olarak üretilir. ROT lipid peroksidasyonu, protein disfonksiyonu, nükleik asit oksidasyonu, hücre ölümü ve kanseri içeren çeşitli toksik etkilere yol açan hücresel makromolekülleri doğrudan modifiye edebilir [57].

Reaktif oksijen türleri, membran fonksiyon kaybına, membran akışkanlığının ve sonuçta membran yapısının bozulmasına yol açan lipid peroksidasyonunun oluşumunda, membran fosfolipitleriyle zincir reaksiyona neden olan yüksek derecede toksik oksidanlardır [58].

Vücutta çok sayıda biyokimyasal reaksiyon, hücresel hasara sebep olabilen eşleşmemiş elektronlu molekülleri, serbest radikalleri ve yüksek oranda reaktif oksijen içeren molekülleri üretirler [58].

Reaktif oksijen türleri ve serbest radikallerin çevresel kaynakları; kirleticiler, organik çözücüler, pestisitler, sigara dumanı, anestetikler, hiperoksiya ve belirli

ilaçlardan oluşur. Ayrıca aşırı egzersiz ve iskemi de serbest radikal üretimine yol açar [28, 58].

Eşlenmemiş bir elektron, stabil değildir ve yüksek oranda reaktiftir. Eşlenmemiş elektronun stabil duruma dönüşmesi için, bir diğer elektronla çiftleşmesi gerekir. Serbest radikaller, ihtiyaç duyulan elektronu yakalamak için girişimde bulunan diğer bileşiklerle hızlı bir şekilde reaksiyona girer.

Genel olarak serbest radikaller, vücutta en yakınındaki stabil moleküle kolayca saldırarak bir elektronu kaçıır. Bir elektronun kaybıyla, stabil molekülün kendisi bir serbest radikal olur ve bir zincir reaksiyonu başlar.

Antioksidanlar, kendi elektronlarından birini vererek serbest radikalleri nötralize eder, böylece elektron kaçıran reaksiyonlar sonlanır.

Serbest radikaller gittikleri her yerde hasara sebep olan kasırga gibidir. Onlar, yaygın olarak hücre membranlarında doymamış yağ asitleri ve lipoproteinlere saldırarak, lipit peroksidasyonu olarak isimlendirilen zincir reaksiyonlarını başlatırlar. Kontrol edilmeyen lipit peroksidasyonu, hücre yapılarına hasar verir ve onların fonksiyonlarını bozar. Serbest radikaller aynı zamanda proteinler ve DNA'ya da hasar verir. Önü alınamayan serbest radikallerin oluşumu ve beraberinde oluşturduğu hasarın her ikisi birden oksidatif stres olarak isimlendirilir. Bu stres kanser, artrit, katarakt, inme, yangı, otoimmün hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar ve kalp hastalığı gibi hastalıkların gelişimini ve yaşlanma sürecini kapsamaktadır [34, 56]. Araştırmacılar, oksidatif stresle vücudun savaşına besinsel antioksidanların yardım ettiğini ifade etmektedirler [58].

2.3. Antioksidan Savunma Sistemleri

Oksijen radikalleri (süperoksit anyon radikali, hidroksil radikali ve peroksi radikaller), hidrojen peroksit ve tekil oksijen gibi reaktif non-radikal oksijen türler, karbon, nitrojen ve sülfür radikalleri gibi çeşitli reaktif moleküllerin hücresel ve çevresel oluşumu oksidatif strese yol açmaktadır [58].

Serbest oksijen radikallerinin meydana getirdiği etkilerin giderilmesi için vücut savunma sistemi geliştirmiştir. Antioksidan savunma sistemi adı verilen savunma

sistemi, fizyolojik veya çevresel olarak meydana getirilen serbest oksijen radikallerini ortadan kaldırmaktadır.

Antioksidan savunma sistemi, süperoksit dismütaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve glutatyon redüktaz (GR) gibi antioksidan enzimleri ve glutatyon, vitaminler (A, C, E), melatonin ve bazı eser elementleri kapsayan enzim olmayan antioksidanları içermektedir [30, 37, 59, 60].

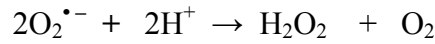
Çevresel ve hücrel faktörlerin etkisiyle oluşturulan reaktif oksijen türlerinin detoksifiye edilmesinde, ekzojen olarak alınan ya da fizyolojik olarak yapılan antioksidanlar görev almaktadır.

Bütün aerobik hücreler, oksidanların oluşturduğu hasara karşı hücreleri korumak için çok sayıda detoksifikasyon ve tamir mekanizmaları geliştirmiştir [27].

2.3.1. Enzimatik Savunma Sistemleri ve Özellikleri

2.3.1.1. Süperoksit Dismütaz (SOD)

SOD, süperoksit anyon radikali ($O_2^{\bullet -}$)'nin, daha az reaktif olan H_2O_2 'e indirgenmesini katalize eder.



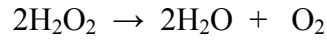
Bir radikal üzerine direkt olarak hareket eden tek enzimdir. Hidrojen iyonu kullanır ve oksijen üretir. Toksik ve reaktif olan $O_2^{\bullet -}$ 'ni süpürerek hücreleri korur. Kesin özgülüğe sahip olan bu enzim kofaktör olarak Cu, Zn, Mn ve Fe'i kullanır.

İntraselüler olarak; prokaryotlarda, matrikste Mn-SOD olarak, periplazmik boşlukta Fe-SOD olarak, ökaryotlarda ise, Cu-Zn SOD olarak sitozol ve nükleusta yer alır. Mitokondriyal matriks ve nükleusta ise Mn-SOD olarak bulunur.

SOD aktivitesindeki herhangi bir artış, SOD ürünü olan H_2O_2 'in üretimini de arttırdığı için beraberinde, katalaz ve GSH-Px aktivitesinde de artışlara yol açabilmektedir. Eğer SOD aktivitesi, H_2O_2 süpürücülerinin aktivitesini aşarsa, H_2O_2 birikiminden dolayı, süperoksit toksisitesinde artışlar ortaya çıkabilmektedir [28, 52, 61, 62].

2.3.1.2. Katalaz (CAT)

H₂O₂'i suya ve oksijene dönüştürerek süpüren bir diğer enzim katalazdır.



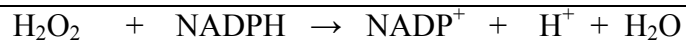
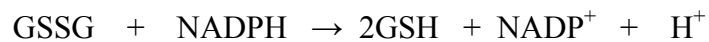
Tetramerik yapıda olan katalaz, dört tane ferri hem grubu içermektedir. En yüksek oranda karaciğer ve eritrositlerin peroksizomlarında lokalize olmuştur. Peroksitleri ortadan kaldırarak, lipid peroksidasyonuna karşı da koruyucu rol oynamaktadır [28, 52, 58, 63].

2.3.1.3. Glutatyon Redüktaz (GR)

Dimer yapılı bir enzim olan GR, hücrede indirgenmiş bir durumda glutatyon havuzu oluşturmak için, okside glutatyonu redükte glutatyona NADPH'a bağımlı olarak katalizleyen bir flavoproteindir [55, 62].



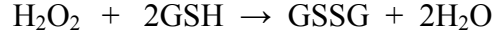
Bu enzim varlığında, H₂O₂'in arttığı durumlarda, glutatyon havuzu indirgeme olayında çok etkili olmaktadır. H₂O₂'i suya indirgemek için de NADPH'ı kullanır. İki elektron gerektiren bir süreç olan bu döngünün net sonucu aşağıdadır :



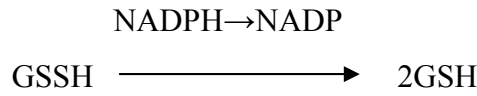
2.3.1.4. Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px)

Selenyum (Se) bağımlı glutatyon peroksidaz enzimi, hidrojen peroksit (H₂O₂) ve lipid peroksitlerine karşı aktiftir [64]. Enzimin aktivitesi, enzim için tek hidrojen veren glutatyon (GSH)'un bol miktarı ve enzimin dört subünitesinin her birindeki Se varlığına bağlıdır.

Se eksikliği GSH-Px aktivitesinde azalmaya ve lipit peroksidasyonunda artışlara yol açmaktadır [50]. GSH-Px, redükte glutatyon (GSH)'u okside glutatyon (GSSG)'a dönüştürerek, hidrojen peroksiti ortadan kaldırır [64].



Okside glutatyonun rejenerasyonu, NADPH- bağımlı glutatyon redüktaz ile olmaktadır [28].



GSH-Px, organik peroksitleri ise alkole indirger.



Selenyum bağımsız GSH-Px ise, sadece lipit hidroperoksitlerine etki eder [62].

2.3.2. Enzimatik Olmayan Savunma Sistemleri ve Özellikleri

α -tokoferol (E vitamini), β -karoten (A vitamini), askorbat (C vitamini) gibi vitaminler antioksidan savunma sisteminde yaygın bir şekilde yer alan vitamin grubudur.

Vitaminlerin yanı sıra glutatyon ve Cu, Zn, Fe, Mn, Se gibi mineraller de non-enzimatik antioksidan savunma sisteminin bir parçasıdır [30, 57, 60].

2.3.2.1. Vitaminler

E vitamini nonpolar izoprenoid yan zincirler ve polar hidroksile olmuş aromatik halkalara sahip, tokoferol bileşiklerine ait olan antioksidan ailenin bir üyesidir. Tokoferol, bir geranil zincirine sahip olan tokotrienol analogudur ve bir fitil zincirine sahip olan dört tokol'ü kapsayan tam bir antioksidandır [41, 55].

Membran yapısının stabilizasyonunda ve lipit peroksidasyonuna karşı korumada rol oynayan E vitamini, çok bol bulunan, yağda çözünen bir antioksidandır ve oksidanlara karşı vücudun ilkin savunucularından biridir. E vitamininin absorbe edilmesi için besinsel yağa ihtiyaç duyulur. LDL ile plazma lipoproteinlerinin lipit komponenti şeklinde kanda taşınır. Plazmada lipoprotein lipitlerini korur ve lipit peroksitleri (LOO[•]) süpürür. En etkili zincir kırıcı antioksidan olan E vitamini lipit peroksidasyonuna karşı zincir reaksiyonunu etkili bir şekilde kırarak, polidoymamış yağları serbest radikal hasarından korur [28, 58].

Tokoferoller, spesifik olarak α -tokoferol (E vitamini), serbest oksijen radikalleri, lipit peroksi radikalleri ve tekil oksijen süpürücü olan çok yönlü antioksidanlardır ve membran dengeleyiciler olarak, memeli araştırmalarında çok çalışılmıştır. Bu rol, onun tamamen benzokinon halkasının yakınında bulunması, hücre membranlarında yer alması ve indirgenmiş fitil zinciri ile ilişkilidir [42, 65].

Hücre membranında internal ve eksternal olarak üretilen oksidatif stresler sonucu meydana getirilen hasarların en etkili bir şekilde önlenmesi E vitamininin hidroksil ve peroksil radikalleri ile reaksiyona girmesi ile olmaktadır [55].

Askorbik asit, primatlar (insan dahil) hariç bir çok hayvan tarafından sentezlenir. Suda çözünen bu vitaminin temel gereksinimi, besinsel alım ile karşılanır. Ekstraselüler sıvıda işlev gören C vitamini çok bol bulunan bir antioksidandır. Serbest radikallerin süpürülmesinde rol oynayan C vitamini, aynı zamanda E vitamininin yeniden yapılanmasında ve aktif forma dönüşümünde de görev almaktadır [28, 58].

İnsan diyetinde önemli bir vitamin olan C vitaminiyle ilgili epidemiyolojik çalışmalar, mide, pankreas, ağız, özofagus kanserleri gibi kanser risklerinin oluşumu ve C vitamininin düşük alınımı ile arasında bir ilişki olduğunu göstermiştir [28].

Askorbat, oksidatif stres tarafından oluşturulan hasarı azaltır ve birçok serbest radikal için indirgen olarak fonksiyon görür. Askorbat direkt olarak enzim katalisti olmaksızın serbest radikalleri süpürebilir ve tokoferolleri yeniden indirgenmiş forma dönüştürerek de, serbest radikalleri indirekt olarak süpürebilir [41].

Karotenoidler, renkli meyve ve sebzelerle, bitkilerde bulunan moleküllerin bir sınıfıdır. İnsan hayatı için temel değildir. 600'den fazla karotenoid bilinir ve yaklaşık 50'si yağda çözünen A vitamininin öncülü (retinol olarak isimlendirilir) olarak çalışır. A vitaminine özellikle göz retinasının fonksiyonu için ihtiyaç duyulur. A vitamininin eksikliği dünyada, çocuklarda körlük ile sonuçlanır.

Besinsel bir antikarsinogen olan β -karoten, peroksi radikallerin süpürülmesinde α - tokoferollerin etkisini artırır ve kalp hastalığına karşı da koruyucu etki gösterir.

Bitkilerde bulunan bu antioksidan bileşikler, klorofil ile ışığın interaksiyonu sonucu oluşan tekil oksijeni süpürür ve ayrıca hidroksil radikalini süpürerek lipid peroksidasyonunu inhibe eder [28, 41, 65, 66].

2.3.2.2. Glutatyon

Glutatyon (GSH), mitokondri, nükleus ve sitoplazmada bol bulunan ve bu hücre kompartmanlarında çözünebilen büyük bir antioksidandır. GSH, Se-GSH-Px'ın H_2O_2 'i ortadan kaldırması ile disülfit'e (GSSG) okside olur. Diğer enzimler oksidan olan H_2O_2 'den daha çok lipid peroksitleri kullanarak da glutatyonu okside edebilirler. Böylece GSH, hem çözünebilir hem de lipid peroksitleri detoksifiye edebilir. GSSG, daha sonra indirgen olarak NADPH'ı kullanarak glutatyon redüktaz tarafından indirgenir. Birçok peroksitin detoksifiye edilmesinde indirgeyici güç kaynağı sağlayan NADPH, pentoz fosfat yolu ve diğer sitoplazmik kaynaklarla indirgenir [55].

GSH, hücrel antioksidan savunma sisteminde yer alan merkezi ajanlardan biridir. GSH, insan plazmasında mikromolar seviyelerde, intraselüler olarak milimolar konsantrasyonlarda bulunur. GSH, disülfit'e (GSSG) okside olarak bir antioksidan gibi davranır ve bu oran dokuda oksidatif stresi tanımlamak için kullanılır. GSH/GSSG oran değerleri, egzersiz, alzheimer hastalığı, tümör büyüme şartları ve yaşlanma gibi çeşitli durumlarda oksidatif stresle bağlantılı olmuştur [33].

Hücrel GSH konsantrasyonu, onun antioksidan fonksiyonu üzerinde büyük bir etkiye sahiptir. Oksidatif şartlar altında GSH konsantrasyonu, oksidatif stresten etkilenen hücrelerden glutatyon disülfit (GSSG) ve glutatyon konjugatlarının salınımı ile önemli oranda azalabilmektedir [55].

GSH, birçok durumda antioksidan olarak fonksiyon gösterebilir. GSH, tekil oksijen, süperoksit ve hidroksil radikalleri ile kimyasal olarak reaksiyona girebilir ve böylece direkt olarak, serbest radikal süpürücü gibi fonksiyon gösterebilir. GSH, lipid peroksidasyon reaksiyonları ile oluşan açıl peroksitleri ortadan kaldırarak membran yapısını kararlı hale getirebilir. Se-GSH-Px enzimi ile H_2O_2 'i GSSG'a dönüştürerek indirger ve böylece GSH, aktive oksijenin detoksifiye olmasında alternatif bir yol olarak görev alır [41].

2.3.2.3. Bazı Eser elementler ve Mineraller

1- Manganez: Mangan öncelikle SOD aktivitesine sahip olduğu bilinen bir elementtir. Bunun yanı sıra, katalitik olarak, hidrojen peroksiti oksijene dönüştüren katalaz aktivitesine de sahip olduğu rapor edilmiştir. Düşük moleküler ağırlığa sahip olan Mn, E vitamini gibi nonkatalitik ROT süpürücülerin etkilerini arttırarak, süperoksit anyon radikali, hidrojen peroksit ve diğer potansiyel ROT'ları ortadan kaldırma yeteneği ile çeşitli hastalık durumlarında dokuların korunmasına yardımcı olmaktadır [67].

Mn-SOD, mitokondride süperoksite karşı yer alan başlıca enzimatik savunma mekanizmalarındandır [28, 67].

2- Demir: Demir, katalazı içeren birçok enzimin, sitokromların aktivitesi ve memelilerde hemoglobin tarafından oksijenin taşınmasını kapsayan temel bir metaldir. Redoks döngüsü, demir içeren geçiş metallerinin bir karakteristiğidir [28, 67]. Eksikliği ve fazlalığı, insanlarda patolojik şartlarda sırası ile, mikrositik anemi ve hemokromatozisi indükler [2, 67].

Hem'de demir varlığı, demir-sülfür grupları veya proteinlerle yakın bir şekilde yer alması, oksijen transportu, enerji metabolizması, elektron transportu ve H₂O₂ seviyesinin ayarlanması gibi temel hücresel fonksiyonlarda önemli bir rol oynar [67].

3- Bakır: Radikal süpürücü antioksidanlar, oksidatif strese karşı *in vivo* total savunma sisteminde önemli rol oynamaktadırlar. Serbest radikallerin yol açtığı lipid peroksidasyonu, zincir sonlanmasının hızlanması ya da zincir reaksiyonlarının başlamasının baskılanmasıyla inhibe edilebilir. Zincir başlamasına yol açan aktif serbest radikallerin oluşumu, bakır gibi metal iyonlarının işe karışması ile inhibe edilebilir.

Bakır süperoksit radikallerinin indirgenmesinde ve ortamdan uzaklaştırılmasında rol oynayan Cu-Zn-SOD gibi enzimlerin fonksiyonu için temel olan bir elementtir [28, 67].

4- Çinko: Çinko immün sistemin fonksiyonu için temel bir maddedir. Genel bir antioksidan olan Cu-Zn-SOD'ın yapısında yer alan çinkonun bir antioksidan olarak fonksiyon görmesi ile yaşlanmaya karşı küresel bir koruma sağlar. Çinko eksikliği, vücutta hasar verici serbest radikallerin artmasına ve hücrelere saldırmasına, genel bir tahribata ve yaşlanmaya yol açmaktadır [2, 28].

5- Selenyum: Antioksidan sistemin bir parçası olan glutatyon peroksidaz enziminin oluşumu için temel olan selenyum, tiroid'in fonksiyonu için de önemli bir eser elementtir [2, 28].

2.4. Selenyum ve Selenyum Bileşiklerinin Biyolojik Özellikleri

Temel eser bir mineral olan selenyum, küçük miktarlarda serbest radikal hasarından hücreleri ve dokuları koruyan vitamin E ve C gibi çok önemli bir antioksidan, fakat daha büyük miktarlarda toksik olabilen bir mineraldir. Selenyum, periyodik cetvelde sülfür gibi kimyasal ve fiziksel karakterleri benzeyen elementlerin altında yer almaktadır. 1295'de Marco Polo tarafından hayvanlarda selenyum eksikliği ilk olarak rapor edilmiştir. 1930'larda çiftlik hayvanlarında alkali hastalıklara sebep olduğu gösterilmiştir ve 1957'de hayvanlar için temel olduğu saptanmıştır. 1969'da hayvanlarda selenyum yetersizliği ilk olarak tanımlanmıştır. 1973'de Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px) enziminin kofaktörü olarak keşfedilmiştir. 1979'da insan sağlığı için öneminin ilk raporları gözlenmiştir. Selenyum, Berzelius tarafından 1817'de tanımlandıktan sonra Ay Tanrıçası Selen'den esinlenerek bu isim verilmiştir [68-70]. Bitkilerde ve hayvanlarda doğal olarak, selenosistein, selenometionin ve diğer benzer sülfür aminoasit yapılarında bulunan selenyumun, organik ve inorganik olarak iki formu bulunmaktadır [70]. Biyolojik sistemlerde bulunan başlıca selenyum türlerinin kimyasal formülleri aşağıda Çizelge 2.1.'de gösterilmektedir.

Çizelge 2.1. Biyolojik Sistemlerde Bulunan Başlıca Selenyum Türlerinin Kimyasal Formülleri [71]

Selenit.....	(SeO ₃ ⁻²)
Selenat.....	(SeO ₄ ⁻²)
Trimetil selenonyum iyonu.....	Me ₃ Se ⁺
Dimetil selenit.....	Me ₂ Se
Monometil selenol.....	(CH ₃)SeH
Selenosistein.....	H ₃ N ⁺ -CH(COO ⁻)-CH ₂ -SeH
Selenosistin.....	H ₃ N ⁺ -CH(COO ⁻)-CH ₂ -Se-Se-CH ₂ -CH(COO ⁻)-NH ₃ ⁺
Selenometiyonin.....	H ₃ N ⁺ -CH(COO ⁻)-CH ₂ -CH ₂ -Se-Me
Se- metilselenosistein.....	H ₃ N ⁺ -CH(COO ⁻)-CH ₂ -Se-Me
Glutamil-Se-metilselenosistein.....	H ₃ N ⁺ -CH(COO ⁻)-CH ₂ -CH ₂ -CO-NH-CH(COO ⁻)-CH ₂ -Se Me
Selenosistatyonin.....	H ₃ N ⁺ -CH(COO ⁻)-CH ₂ -CH ₂ -Se-CH ₂ -CH(COO ⁻)-NH ₃ ⁺
Selenohomosistein.....	H ₃ N ⁺ -CH(COO ⁻)-CH ₂ -CH ₂ -Se-H
Selenosistamin.....	H ₂ N-CH ₂ -CH ₂ -Se-Se-CH ₂ -CH ₂ -NH ₂
Se-Adenozilselenohomosistein.....	NH ₂ CH(COOH)CH ₂ CH ₂ SeCH ₂ C ₄ H ₅ O ₃ C ₅ N ₄ NH ₂

Bitkisel ve hayvansal besinlerde toprağın içeriğine bağlı olarak değişik miktarlarda selenyum bulunmaktadır. Hayvansal organizmada en yüksek oranda böbrek korteksi, karaciğer, pankreas ve hipofiz gibi organ ve dokularda yüksek miktardadır ve birikime uğradığı saptanmıştır. En yüksek selenyum seviyesi kaslarda gözlenmiştir. Hemen hemen bütün hücrelere yayılmış olan selenyum, iskelet kasına göre kalp kasında daha yüksektir, akciğer ve beyinde düşük miktarlarda bulunmaktadır [7, 72].

Besinsel olarak bulunduğu en iyi kaynaklar; organ etleri (sakatat), deniz besinleri, selenyumca zengin topraklarda yetişen besinler, sarmısak, soğan, maya ve brokoli olarak sınıflandırılabilir [73, 74]. Aşağıda Çizelge 2.2.'de besinlerdeki selenyum miktarları µg olarak verilmiştir.

Selenyum çok potent antikarsinojen ve antimutajen bir eser elementtir. Aşırı derecede düşük mikrogram dozlarda koroner hastalıkların riskini önemli oranda düşürmektedir. Antiinflamatuvar özelliğinden dolayı günlük 100-150 µg'ı romatoid artrit olaylarının %40-45'inde olumlu klinik etkiler gözlenmektedir [75].

Çizelge 2.2. Besinlerdeki Selenyum Miktarları [76]

BESİN	SERVİS ŞEKLİ	SELENYUM (µg)
Brezilya fıncığı	28.4 gram (6-8 tane)	839
Karides	85 gram (10-12)	34
Yengeç eti	85 gram	40
Som Balığı	85 gram	40
Kalkan Balığı	85 gram	40
Şehriye (zenginleştirilmiş)	1 kase (pişirilmiş)	35
Pirinç (kahverengi)	1 kase (pişirilmiş)	19
Tavuk (beyaz et)	85 gram	20
Domuz eti	85 gram	33
Sığır eti	85 gram	48
Buğday Ekmeği	2 Dilim	15
Süt	85 gram veya 1 fincan	5
Ceviz	28.4 gram (kabuğu çıkarılmış)	5
Çiğ yumurta	1 tane (büyük)	15
Dana karaciğeri	85 gram	48
Ton balığı (suyu alınmış, yağda konserve)	100 gram	78
Morina (pişirilmiş)	85 gram	40

Prokaryotlarda formik dehidrogenaz ve ökaryotlarda glutatyon peroksidaz'ın bir bileşeni olan selenyum, hücre kültürlerinde hücrelerin büyümesi ve *in vivo* olarak normal büyüme ve gelişme için gereklidir. En yaygın formları selenit ve selenat olan selenyum, hayvanlarda selenosistein, bitkilerde selenometiyonin şeklinde bulunmaktadır. İnsanın selenyuma maruz kalması, sebze, tahıl ve tohumlarda yer alan organik form olan selenometiyoninin sindirimi ile meydana gelmektedir. Yetersiz selenyum alımı ve bir çok kanser türü riskinin artışı arasında bir ilişki olduğunu yapılan epidemiyolojik çalışmalar öne sürmektedir [77]. Metabolik olarak, besinsel kaynaklardan selenyumun eldesi ve yapımı hemen hemen imkansızdır. Vitamin E ile

sinerjistik etki gösteren maya bağımlı organik selenyumun ek bir besin olarak dışardan alınması gerekmektedir [72].

Temel olarak vücuttan atılımı üriner sistemle olmakta ve çok az olarak da feçes ve solunumla kaybı söz konusudur.

Selenyumun absorpsiyonu ise %80 oranında ince barsaklarda gerçekleşmektedir. Selenyumun selenometiyonin formunun vücut içine %90 kadarı absorbe edilir. Diğer bir çok formu ise %50-100 aralığında absorbe edilmektedir [78].

Glutasyon seviyesini korumada en temel iki besin, selenyum ve sistein amino asitidir. Vücutta en yaygın selenyum formu, glutasyon peroksidaz yapısında bulunan selenosisteindir. Memelilerde toplam vücut selenyumunun % 40'ı selenoenzim formundadır.

Selenyumun, mitokondrilerde ATP sentezinde, koenzimlerin biyosentezinde ve bazı immünolojik olaylarda önemli olduğu gösterilmiştir. 3 aminoasitlik bir peptit olan glutasyonun yükseltgenme ve indirgenmesini sağlayan sistemin bir parçası olan glutasyon peroksidazın her molekülü dört atom selenyum içermektedir. Glutasyon peroksidaz enziminin selenyuma bağımlı ve bağımsız iki izomeri vardır. Selenyum bağımlı glutasyon peroksidaz enziminin aktif merkezinde enzime kovalent bir şekilde bağlı selenosistein formunda selenyum bulunmaktadır. Bu enzim substrat olarak hidrojen peroksiti hem de organik peroksitleri (Kümene hidroperoksit) kullanabilir. Buna karşılık, selenyum bağımsız formu sadece lipit hidroperoksitlerini (kümene) substrat olarak kullanabilir. GSH-Px'in selenolat formu (E-Se) peroksit substratını alkole indirgerken, kendisi de okside selenik asite dönüşür (E-Se-OH). Glutasyon bu evrede reaksiyona katılarak selenosülfite (E-Se-S-G) oluşturur. İkinci bir glutasyonun selenosülfite bağlanması ile enzim, aktif formu olan selenolat formuna dönerken, glutasyon okside hale dönüşür. Serbest radikalleri nötralize etmede kullanılan glutasyon bileşiklerinin seviyesinin intraselüler olarak yükseltilmesinde, ilave edilen glutasyon etkili değildir. Bu koruyucu bileşiklerin düzeylerinin arttırılmasında en etkili faktörler ; prosistein, N-asetilsistein ve selenyum'dur [79-82].

Selenyumun yağ açıl peroksitleri ile hidrojen peroksidin yıkılmasında rolünün bulunduğu ve antioksidan bir etken olan E vitamininin de, selenyumun bu etkisini desteklediği düşünülmektedir. Serbest radikal süpürücü olarak rol oynayan selenyum, E vitamini ile birlikte çalışır ve oksidatif hasardan lipitleri koruyarak, hücre membran bütünlüğünün korunmasına yardım eder.

Temel eser bir element olan selenyum, kardiyovasküler sistemde koruyucu etkiler göstererek, lipit peroksidasyonu ile oluşturulan arter endotelium hasarını önlemekte ve trombosit agregasyonunu da engellemektedir. Hayvan çalışma modellerinde karaciğer nekrozları ve pankreatik atrofi, selenyum eksikliği veya düşük selenyum seviyeleri ile ilişkilendirilmiştir [83].

Selenyuma karaciğerin detoksifikasyon (sitokrom P₄₅₀) sistemlerinin fonksiyon görmesi için gereksinim duyulur. Karaciğeri toksinlerden, serbest radikal hasarından korur ve karaciğer fonksiyonlarının normal işlemlerini sağlar.

Nükleik asit metabolizmasına karşı da koruyucu rol oynayan selenyum, antikarsinogen özelliğe de sahiptir.

Oksijen yetersizliğine karşı hücreleri koruyarak, serbest radikal hasarını engelleyen ve mitokondrinin fonksiyonunu düzenleyen selenyum, kan basıncını düşüren prostaglandinlerin yapımına da yardım eder ve daha az yapışkan plak oluşumunu sağlar. Dokuların inflamasyonunda ve artritlerde faydalı olan antiinflamatuvar prostaglandinlerin üretilmesiyle de selenyum ilgilidir.

Dokudaki daha yüksek selenyum, bütün kardiyovasküler hastalık oluşumlarının azaltılması ile ilişkili olup, selenyum eksikliğinin yol açtığı konjestif kalp yetmezliğini de (Keshan Hastalığı) önlemektedir [7].

Selenyum; civa, kadmiyum, gümüş, arsenik ve kurşunun zararlı etkilerine ve ağır metal toksisitesine karşı korur ve böbrekler aracılığıyla vücuttan sodyumun ve suyun uzaklaştırılmasına da yardım eder.

Selenyum vitamin E ile birlikte immün sistemin koruyucu fonksiyonunu 20-30 kat daha fazla düzenler ve birlikte sinerjistik etki gösterirler. Selenyum immün baskılatıcı prostaglandinlerin üretimini inhibe eder. Ayrıca makrofajlar gibi bağışıklık hücrelerinin, bakterileri öldürmek için ürettikleri serbest radikallere karşı da hücreleri koruyabilir [84-87].

Pankreas, karaciğer ve immün sistemin metabolizmasında gerekli olan selenyum, yaşlanmanın temeli olan başlıca mekanizmaların bütününe inhibe eder ve hayvanlarda yaşam süresini uzatır.

Selenyum kas zayıflaması ve sistik fibrozis gibi akciğer hastalıklarının düzenlenmesinde de kullanılmaktadır (vitamin E ile). Saç (keratin proteini) ve deri elastikiyetinin korunmasında aktif olan selenyum, deri kanseri riskini de azaltmaktadır.

Yüksek kan basıncı, inme, kalp atakları ve hipertansif böbrek hasarının gelişmesine karşı koruduğu gözlenmiştir.

Detoksifiye antibadilerin artışında ve dolayısıyla hastalıklara karşı dirençte kullanılmaktadır.

Radyasyonun yol açtığı hasarlara karşı korumada kullanılmaktadır ve doku kültürlerinde kromozom kırılmalarını önler. Protein yetersizliği hastalığının (kwashiorkorlar) tedavisinde, proteinlerle birlikte kullanılır.

Çok düşük miktarlarda tiroid hormonunun biyolojik olarak aktif bir şekilde bezlerden salınımını sağlar, büyük miktarlarda ise tiroid hormonu inaktif hale geçer. Yani tiroid hormonunun düzenlenmesinde rol oynar. Çok fazla biyolojik fonksiyonu olan selenyumun, antioksidan besinlerle ilişkileri de çok önemlidir. Özellikle sülfür içeren besinlerle, vitamin A, C ve E ile bağlantılı besinlerle sinerjistik etkisi gözlenmiştir.

Metiyonin amino asitinin eksikliği de selenyum potansiyelini düşürmektedir. Selenometiyonin vücutta bulunan selenyumun doğal bir formudur. Eğer metiyonin yeterli miktarda bulunmazsa selenometiyonin protein yapımında kullanılamaz.

Selenometiyonin, temel metiyonin aminoasitine benzer, fakat sülfür atomunun yerine, selenyum atomu geçmiştir. Vücudun kullanabildiği selenometiyonin formu; L-selenometiyonin'dir. L-selenometiyonin, bilinen diğer herhangi bir selenyum formuna göre, vücut komponentlerine daha iyi katılır ve daha iyi absorbe edilir. D-selenometiyonin, inorganik selenyum formuna indirgenir ve vücudu inorganik selenyum havuzuna dönüştürür. DL-selenometiyonin ise, inorganik selenyum gibi çok fazla etkili değildir. Canlı vücudundaki selenyum türleri Çizelge 2.3.'de gösterildiği gibi gruplandırılabilir.

Çizelge 2.3. Canlı organizmalardaki selenyum türleri [71]

Proteinlerdeki selenyum

Selenoproteinlerselenosisteinil rezidülleri

Selenyum içeren proteinler.....selenometiyonil rezidülleri

Non-protein selenyum türleri

İnorganik selenyum.....selenit (SeO_3^{-2}), selenat (SeO_4^{-2})

Metile selenyum.....monometilselenol, dimetilselenit,
trimetilselenonyum iyonları

Selenoamino asitler.....selenosistin, selenometiyonin,
Se-metilselenosistein, selenoglutatyon

Bu selenyum türleri kendi içinde enzim ürünleri ve gen ürünleri olarak iki kategoriye ayrılmaktadır. Enzim ürünleri, selenoaminoasit sentezine yol açan reaksiyonlar ve metilasyon, redüksiyon gibi enzimatik reaksiyonların ürünü olarak bulunurlar. Selenyum, selenosisteinil rezidüllerini kodlayan UGA kodonuna göre gen ürünlerini kapsar. Selenoproteinler, selenosisteinil rezidülleri formunda selenyum içerirler [71].

UGA kodonu, selenosisteinil rezidüllerini kodlayarak, selenofosfat ve selenosisteinil tRNA'sına dönüştürüldükten sonra, büyük bir protein olan selenoprotein P, bir çok glutatyon peroksidazlar gibi selenoenzimler, tip1- iyodotironin deiyodinaz (DI) ve tiyoredoksin redüktaz (TR) gibi oksidatif streslere cevap vermede çok önemli olan selenoenzimler olarak, selenoproteinler oluşturulur [71].

Selenoproteinler 4 ayrı grupta ele alınmıştır. Bunlar:

1-Se iyonlu spesifik selenoproteinler

2-Selenometiyonin spesifik selenoproteinler

3-Selenosistein spesifik selenoproteinler

4-Selenyum bağımlı proteinler

Selenometiyonin, selenyumun gerekli bütün 4 formunu sağlayabilir. Halbuki, inorganik selenyum, selenosistein ve selenometiyonine dönüştürülmek zorundadır.

Selenyumun hayat için temel oluşunun nedeni; glutatyon peroksidaz, tiyoredoksin redüktaz ve diğer selenoenzimlerin aktif merkezinde bulunan selenol (-SeH) gruplarının yer almasından kaynaklanmaktadır [88, 89].

Birkaç enzimatik sistemde bir kofaktör olan selenyum, canlılarda vücudu oksijen kökenli serbest radikallerden korumak için etkilidir ve hücrel membranların lipit peroksidasyonuna karşı korunmasında rol oynamaktadır [90, 91].

Selenyum içeren enzimler antioksidan olarak, koruyucu özellik göstermektedirler. Kalp hastalıklarının oluşumuna yol açan hasarlara karşı, kolesterol taşıyan lipoproteinleri ve arterleri korumaktadırlar.

Selenyum, tiroid hormonu triiyodotronin'i (T3) üretmek için ihtiyaç duyulan enzimin bir komponentidir. Prohormon olan tiroksin (T4)'i hormonun aktif formu olan T3'e dönüştüren iyodotronin deiyodinaz enziminin yapısında selenyum yer almaktadır. Dolayısıyla selenyum eksikliği, tiroid hormon fonksiyonunu zayıflatır ve hipotiroidizm ortaya çıkar bu da bir çok vücut fonksiyonunu etkiler [92-95].

Yıllar boyu kanser ve beslenmede düşük selenyum miktarı arasında bağlantı bulunmuştur. İnsan klinik çalışmaları, kanser ölümleri ve hastalıklarını selenyumun %50 civarında indirgediğini açıklamaktadır. Toprakta selenyum kaybı ile hastalıkların oluşumu arasında ilgi bulunmaktadır.

Kuzey Amerika'da özellikle son buz çağı boyunca, ağır buzullarla kaplı geniş yayılım gösteren toprak yetersizliğinden kaynaklanan eksiklik ve toprak eksikliğini takip eden besinsel selenyum eksiklikleri gözlenmiştir.

Erken ölüm, görmede kayıplar, sinirsel düzensizlikler, zihinsel yavaşlamalar, sinir hücrelerinde lipit birikimi, kas ağrıları, Kashin –Beck hastalığında eklem ve kıkırdaklara etkileri, Keshan hastalığı- kalp kasında harabiyet, kardiyovasküler olaylarda ve kanser gibi semptomlarda selenyumun azlığı ile ilgili güçlü ilişkiler vardır [75].

Besinsel kas zayıflaması, kısırlık, kansızlık, katarakt oluşumu gibi erken yaşlanmanın işaretlerini içeren semptomlar da, selenyum eksikliği ile beraber gözlenmektedir. Bunun yanı sıra, hayvanlarda saç, kıl kaybı, büyümede yavaşlama, üremede başarısızlık, pankreatik atrofi, miyopati, nefrozis, karaciğer dejenerasyonu gibi durumlar da sayılabilir.

Yüksek dozlarda alındığında toksik bir element olan selenyum, kükürtlü proteinlerin yapısındaki kükürt ile yer değiştirerek hatalı yapısal oluşumlara yol açtığı için solunum enzimlerinin inhibisyonuna neden olmaktadır. İnorganik selenyum,

selenotrisülfidler formunda sülfidril grupları ile kendiliğinden reaksiyon verir. Bu da proteinlerin yapılarını şiddetle bozabilir. İnorganik selenyum, serbest selenit ve selenopersülfid şeklinde, glutasyonun sülfidril grupları ile reaksiyon verir. İnorganik selenyum, serbest radikal ileten oksidatif doğasından dolayı, mutajeniktir ve farelerde yüksek dozlarda kataraktlara sebep olur [88]. İnorganik selenyumun aksine, selenyum içerikli aminoasitler kararlıdır, daha az toksiktir ve oksidasyon veya mutajenik aktiviteye sahip değildir.

Çok daha büyük dozlarda inorganik selenyum, istenilmeyen lipofuskin üretimini arttırarak, oksidatif bir etkiye sahip olur. İnorganik selenit'te ki selenyum da çok oksidatif durumdadır [96]. Selenyum ölçüm miktarı mikrogram birimiyle ifade edilir. Optimum ortalama aralık tam olarak henüz tayin edilmiş değildir. Günlük ortalama 400-1000 µg arasında fertlerin optimum gereksinimi, her bir ferдин durumu için tayin edilmesi gerekmektedir. Erkekler için minimum günlük gereksinim 70 µg, kadınlar için 55 µg olarak kabul edilmiştir (US. RDA). Genel olarak 50-200 µg/gün arasında çeşitli alımlar önerilmiştir [97, 98]. Selenyum toksisitesi, maksimum tavsiye edilen dozun üzerine çıktığında gözlenmektedir. Maksimum tavsiye edilen doz günde 500 µg'dır. Günlük inorganik olarak 1000 µg, organik olarak 2000 ile 3000 µg selenyumun tırnaklarda ve saçta kayba ve gerilemeye yol açtığı saptanmıştır [99].

Cilt ve deride selenyum intoksikasyonunun varlığı, selenyumun keratini oluşturan proteinlerin veya keratinde sülfürün yerine geçmesi ile açıklanmıştır [100-103].

Toksik selenyum seviyesi ile, flor metabolizmasına müdahale ve dış çürümelerinde artış olmaktadır. Sinir sisteminde bozulma sırasıyla ellerde ve ayaklarda duyu kaybı, karıncalanma gözlenmektedir. Deride kırmızımtırak döküntüler, baş dönmesi, kırgınlık, mide-barsak bozuklukları, iştah kesilmesi ve kilo kaybı selenyum toksisitesine bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. Ayrıca bileşiminde selenyum sülfid bulunan şampuanların deri tarafından emilmesi de selenyum zehirlenmelerine yol açmaktadır. Selenyum sülfid, selenite oranla daha az toksiktir [101, 102, 104-107].

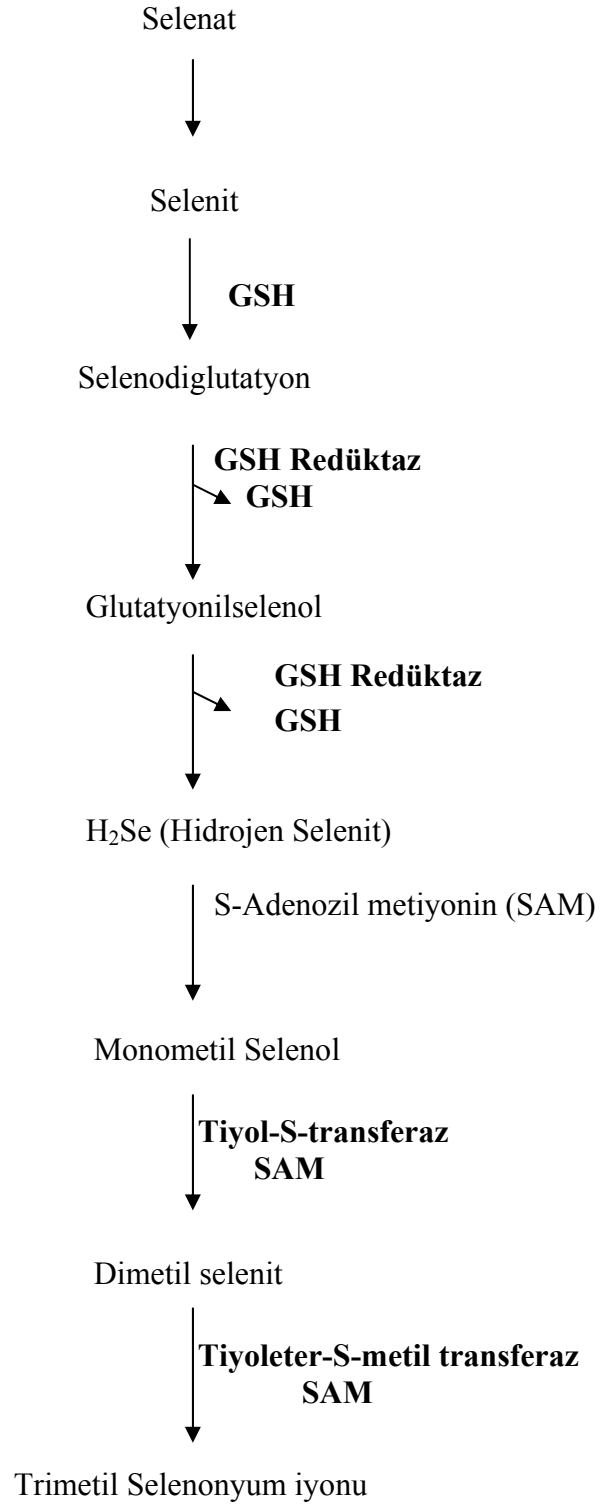
2.4.1. İnorganik Selenyum Bileşikleri ve Biyolojik özellikleri

Bitkisel kaynaklı olan ve toprakta da bol miktarda bulunan inorganik selenyumun, hayvan büyüme çalışmalarında normal gelişmeyi devam ettirmek için yüksek miktarlarda bulunduğu gösterilmiştir. Bitkisel kaynaklardan absorpsiyon % 60-

90, hayvansal kaynaklı selenyum için ise % 25 olarak karşılaştırılmıştır. İnorganik selenyum tuzlarından en önemlileri olan sodyum selenat ve sodyum selenit içme sularında da yer almaktadır [108]. Biyolojik sistemlerde, sayılamayacak kadar çok fonksiyonu olan selenyumun inorganik formu olan selenit metabolizması Şekil 2.4.'de kısaca özetlenmiştir.

Selenit vücutta, GSH tarafından H_2Se 'e metabolize olur. Bu arada sırasıyla; selenodiglutatyon ve glutatyonilselenol ara ürünleri oluşur. Selenat'ta aynı şekilde metabolize olur.

Hidrojen selenit'in metilasyonu ile dimetil selenit oluşur ve onu takip eden trimetilselenonyum iyonunu oluşturmak için, o da metile edilir. Trimetilselenonyum iyonu, inorganik selenyum metabolizmasının son ürünüdür ve selenosistein ile muamele edilmiş sıçanların idrarlarında da bulunmuştur [109].



Şekil 2.4. Selenit'in metabolik yolu [109].

2.4.2. Organik Selenyum Bileşikleri ve Biyolojik özellikleri

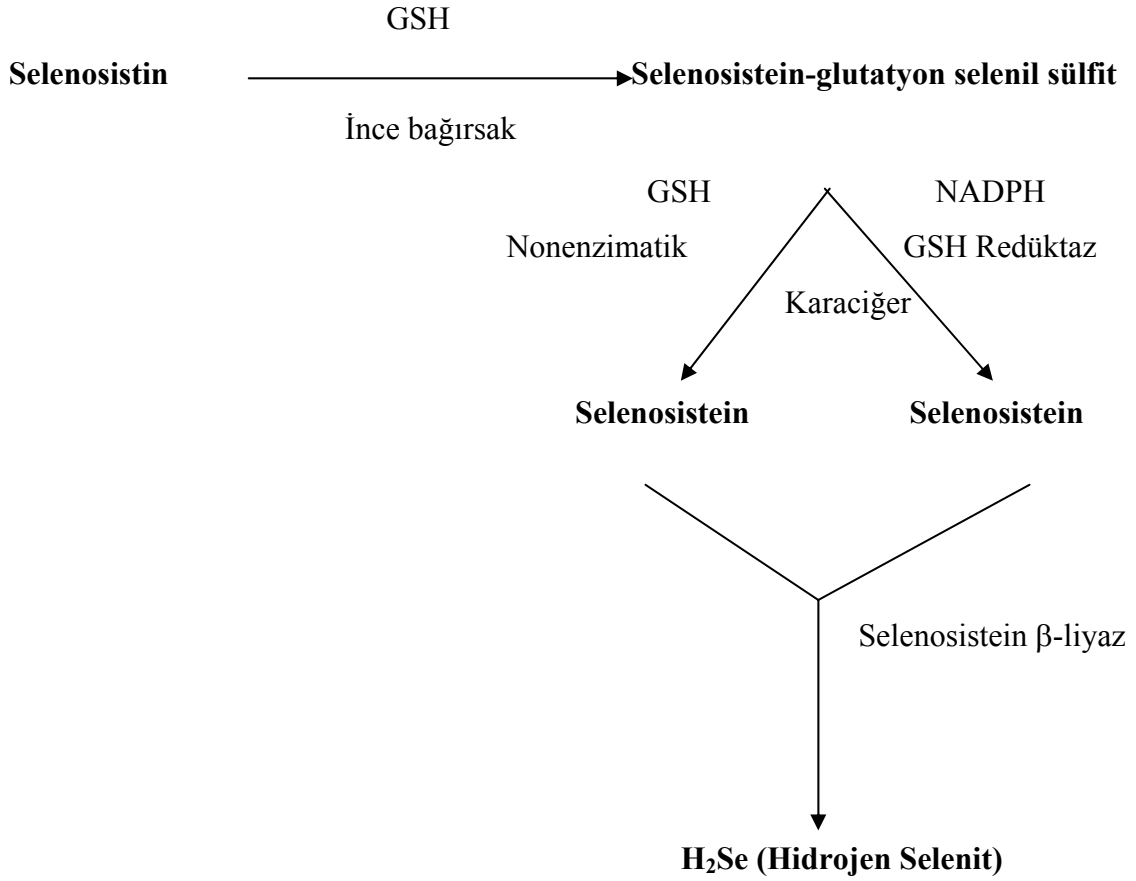
Selenyumun farklı kimyasal formları, kanserden korumada değişik dereceler göstermektedir. İlk olarak selenyumun ilave ya da besinsel formu, selenat ve selenit gibi selenyum tuzları ve metilselenosistein gibi aminoasit türevleri, selenometionin ve selenosistein aminoasitlerinin herbiri farklı noktalarda, selenyumun metabolik yoluna girerek farklı metabolik zenginlikler oluştururlar. Bu farklı selenyum formlarından dolayı, selenyumun korumada da farklı dereceleri oluşur. Metilselenol'e kolayca dönüşen selenyum formu, açık olarak karsinogenezise karşı ön koruma gösterir. Çünkü metilselenosistein *in vivo* olarak direkt metilselenole dönüştürülebilir ve o da kimyasal koruyucu bir ajan olarak bilimsel dikkatleri çekmektedir [110].

Organik selenyum formları; selenosistein, selenometiyonin, dimetilselenit gibi aminoasitlere bağlı metile formlardır. Çoğunlukla kanser önleme çalışmalarında kullanılan selenyum formları, selenometiyonin ve inorganik selenyum tuzu olan sodyum selenit'tir. Organik selenyum bileşikleri ağır metallerle bağlanır ve onların vücuttan atılmasına yardım eder [111, 112]. Organoselenyum bileşiklerinin hidroperoksitlerle ve son zamanlarda daha çok peroksinitritlerle çok etkili bir şekilde reaksiyon gösterdiği, ayrıca hücrel metabolizmada üretilen bir çok reaktif oksidize edici türlere karşı da savunmada koruyucu bir rol oynayabildiği gösterilmektedir [42].

Selenyum, serbest radikaller tarafından indüklenen lipit peroksidasyonu sonucu hücrel membranların doymamış yağ asitlerinde oluşabilecek hasara karşı koruma sağlayabilir. Bu durum, eser element selenyumun oksidatif hasarı azaltması ile kimyasal koruyucu ve direnç gösterici etkilere sahip olduğuna işaret eder. Selenyum bileşikleri, birçok karsinogenler tarafından *in vivo* olarak üretilen serbest radikalleri ortadan kaldıracaktır ve onları daha kararlı bileşikler haline dönüştürebilir [113, 114].

Organik selenyum formlarından selenosistein'in (Cy Se Se Cy) metabolik yolu aşağıda Şekil 2.5.'de gösterilmektedir.

İnce barsaklarda GSH ve selenosistein arasındaki reaksiyonla, ilk adımda selenosistein içeren metabolitler ve selenosistein-glutatyon selenil sülfid (CySeSG) oluşur. İkinci adımda, CySeSG nonenzimatik olarak karaciğerde GSH varlığıyla CySeH (selenosistein)'e dönüşür. Glutatyon selenil sülfid (CySeSG)'in enzimatik olarak da, NADPH varlığında glutatyon redüktaz tarafından selenosistein'e dönüştüğü kabul edilmektedir. Üçüncü adımda, selenosistein, selenosistein β -liyaz tarafından, hidrojen selenit'e ayrıştırılır [109].



Şekil 2.5. Selenosistin'in metabolik yolu [109].

Selenyum ve glutatyon sistemi, prooksidanlara karşı savunma olayında anahtar fonksiyon göstermektedir. Glutatyonun önemli rolleri, antioksidanların okside formlarının indirgenmeleri gibi prooksidanların doğrudan engellenmelerini içermektedir. Ayrıca glutatyon, oksidanlara karşı savunmayı ayarlayabilen protein interaksyonu, hücre sinyal iletimi ve metabolizma gibi yardımcı fonksiyonlara sahiptir. Memeli hücrelerinde selenyum tarafından sağlanan koruma, selenosistein veya selenometiyonin gibi selenol aminoasitleri tarafından ayarlanmaktadır. Potent haldeki GSH-Px'in aktif bölgesi selenosistein rezidüllerini içerir. Ayrıca selenoprotein P ve tiyoredoksin redüktaz gibi selenoproteinlerin de antioksidan özelliklere sahip olduğu gösterilmektedir [115, 116].

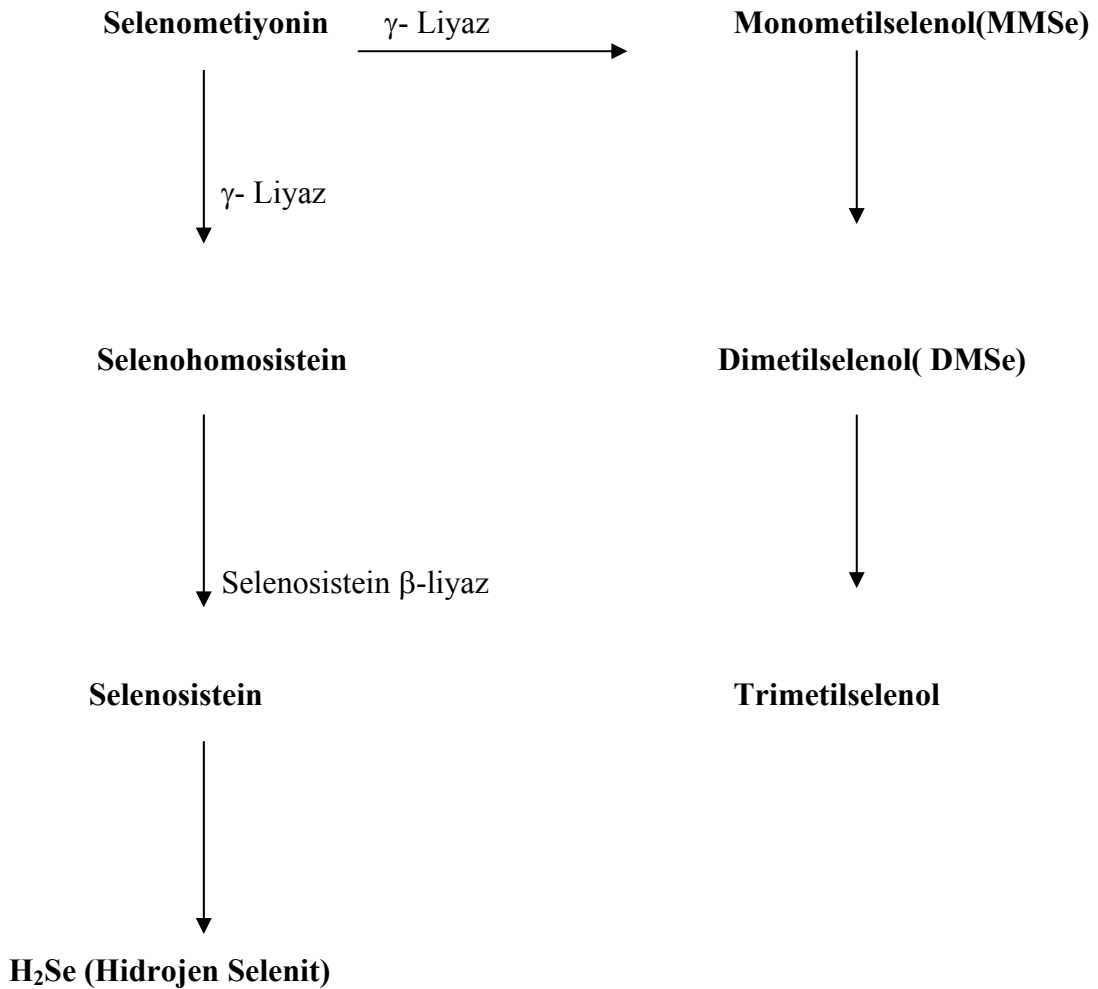
Selenoenzimler olarak tanımlanan selenyum formları, en az dört farklı selenoenzim içeren glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ailesi, tip I, II ve III deiyodinaz'ı içeren iyodotronin deiyodinaz ailesi, tiyoredoksin redüktaz ve selenofosfat sentetaz

şeklinde bulunmaktadır. GSH-Px enzimlerinin bazıları multimerik proteinler olmasına rağmen, bu selenoenzimlerin tamamı, her polipeptit zincirinde bir Se atomu içermektedir [117].

Hidrojen selenit, selenit metabolizmasında olduğu gibi, aynı metilasyon yoluyla, enzimatik olarak metile selenyum metabolitlerine dönüştürülür [109].

Selenometiyonin, karaciğerde γ - liyaz tarafından ayrışır ve selenohomosistein ve selenosistein vasıtasıyla, metiyonine benzer bir metabolizmayla, hidrojen selenit'e metabolize olur. Ayrıca γ - liyaz enzimi ile direkt olarak da, diğer selenyum formlarının metabolik yolunda olduğu gibi, selenyumun metile formlarına dönüşür [109].

Selenometiyonin'in metabolik yolu Şekil 2.6.'da gösterilmektedir.



Şekil 2.6. Selenometiyonin'in metabolik yolu [109].

2.4.3. Sentetik Organoselenyum Bileşikleri ve Biyolojik özellikleri

Yapay ve doğal olarak meydana gelen antioksidanların, membran ve dokularda serbest radikaller tarafından indüklenen peroksidatif hasarın düzeltilmesinde temel olarak rol oynadığı kaydedilmiştir. Kardiyovasküler hastalıklar, karsinogenezis ve yaşlanma sürecinin yönetiminde bu antioksidanların önemi iyi bir şekilde belgelenmiştir [118].

Epidemiyolojik çalışmalar, kanseri de içeren belirli hastalık risklerinin yetersiz selenyum alımı ile ilgili olduğunu öne sürmektedir. Klinik çalışmalar kanser gelişimi karşısında selenyumun koruyucu rolünü desteklemektedirler. Ön klinik incelemeler, geniş boyutlu araştırmalarla değer kazanan, önemli kanser koruyucu ajan grubu olarak selenyum bileşiklerinin sistematik olarak çalışılmasına yol açmaktadır. Geçmişte kullanılmış olan inorganik selenyum formlarını da içeren bazı selenyum bileşiklerinin toksisitesi, yeni sentetik organoselenyum bileşiklerinin takdimine kadar daha sonraki çalışmaları engellemiştir. Bu yeni sentetik bileşikler birkaç hayvan modellerinde kimyasal koruyucu olarak çalışılmıştır ve geçmişte kullanılan diğer bileşiklerden çok daha mükemmel olarak bulunmuştur. Kullanılan yeni sentetik bileşiklerin antikarsinogenik etkileri için multi-organ duyarlılıkları bazı araştırma grupları tarafından ön klinik çalışmalarla gösterilmiştir [119].

Kanser önleme; doğal olarak meydana gelen veya sentetik ajanların verilmesi ile karsinogenezis sürecinin tersine dönmesi, baskılanması veya inhibisyonu ile kanser kontrolü ve önlenmesinin araştırılması şeklinde çalışılmaktadır. Kanser önlemedeki bu ilerleme; uzun yıllar karsinogenlere maruz kalmayı takiben meydana gelen birkaç moleküler ve hücreyel olayların ve multifaktoriyel sebeplere sahip olan insan kanserlerinin tanınması üzerine temellendirilmiştir. Son yıllarda, birçok inorganik ve organik selenyum formları muhtemel kanser önleyici ajanlar olarak büyük oranda dikkat çekmektedir. Bu bileşiklerin, hayvanların farklı dokularında DMBA gibi kimyasal karsinogenler tarafından indüklenen karsinogenezis sürecini geciktirdiği veya inhibe ettiği bulunmuştur. Epidemiyolojik çalışmalar, selenyum alımı ve plazmadaki selenyum seviyesi ile kanserden ölümler arasında zıt bir ilişki bulunduğunu ve selenyum alımının nispeten yüksek olduğu bölgelerde daha düşük kanser oluşumlarını ortaya çıkarmıştır. Selenyum, karsinogenezis sürecinin bütün basamakları (başlama, gelişme ve ilerleme) üzerinde koruyucu etkilerini kullanmaktadır. Artan kanser önleme

çalışmaları ve azaltılan toksisite ile yeni sentezlenen selenyum bileşiklerini geliştirmek için, çeşitli laboratuvarlarda bir çok girişimler yapılmaktadır [24].

İnorganik ve organik selenyum bileşiklerinin gösterdiği kimyasal koruyucu etkilere benzer etkiler gösteren, laboratuvarlarda hayvan çalışmalarında karsinogenezis üzerine çalışılmış benziltiyosiyanat, benzilselenosiyanat, metoksifenol, metoksibenzenselenol gibi önemli sentetik organoselenyum bileşikleri de mevcuttur [6]. Bunların yanı sıra ebselen gibi sentetik organoselenyum bileşiklerinin de, oksidatif stresten dolayı gerçekleşen doku hasarlarında *in vivo* modellerde farmakolojik antioksidan olarak işlev gördüğü bir çok çalışmada gösterilmektedir [115, 120-126].

Selenyum içeren moleküllerin klasik antioksidanlardan daha iyi antioksidan özellik göstermesi, sentetik organoselenyum bileşiklerinin oluşturulmasına yol açmıştır. Selenyumun redoks döngüsünde, doğal enzimler gibi güvenilir olduğu ve GSH-Px'i taklit eden bileşiklerinin bulunduğu birçok çalışmada rapor edilmiştir [127]. Böyle bileşiklerin ilk örneği, iskemi ve inmelere karşı koruyucu bir rolünün olduğu gösterilen ebselendir [127].

Fizyolojik antioksidan özellikleri olan selenoaminoasitler ve türevleri şeklinde olan bileşiklere benzeyen organoselenyum bileşikleri, besinlerdeki selenyumun kimyasal formlarından biridir. Bazı selenoaminoasit türevlerinin sahip olduğu antitümör özelliklere sahip olan ebselen ve basit diorganik kalkojenidler gibi bazı organoselenyum bileşiklerinin de anti-inflamatuar özelliklere ve GSH-Px'a benzer aktivitelere sahip olduğu gösterilmiştir. Ayrıca bu tür bileşiklerin doğrudan peroksidaz aktivitesiyle ilgili olmayan antioksidan özellikleri de vardır. Serbest radikallerin aşırı üretimi ile oluşturulan hastalıkların tedavisinde özellikle önemli olan ebselen'in, iskemi ve oksidatif hasara karşı nöroprotektif özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir. Ayrıca insanlar üzerinde yapılan klinik denemeler, beyin kanaması ve beyin felci gibi patolojik durumlarda ebselen'in faydalı etkilerini göstermektedir [128].

GSH-Px, selenoprotein P, tip I iyodotronin 5'-deiyodinaz ve tiyoredoksin redüktaz hayvanlarda ve insanlarda tanımlanmıştır. Tanımlanan selenoproteinlerin yaklaşık yarısının antioksidan fonksiyonlara sahip olduğu dikkati çekmiştir. Böylece selenyum eksikliği ile oluşan insan hastalıklarının artan riskleri, redoks'ta oluşan değişimler ve artan oksidatif strese atfolunur. Selenyum eksikliği, bir ferden ilaçları metabolize etme yeteneğini etkiler ve bazı ilaçların toksisitesinin artması ve bazılarının da etkisinin azalmasıyla da ilişkilendirilebilir. Çeşitli populasyonlarda kanser oluşum oranı arasındaki farklar, selenyum alımı ile ilişkili olabilir. Sentetik organoselenyum

bileşikleri, toksik yan etkileri azaltmak ve daha büyük koruyucu etkileri başarmak için dizayn edilmişlerdir. Sentetik organoselenyum bileşiklerinin DMBA-DNA adduct'larının oluşumunu baskılayarak, başlama safhasındaki DMBA ile indüklenmiş meme karsinogenezisini inhibe ettiği gösterilmiştir. Selenyumun endojen antioksidatif sistemlere takviye olarak ilave edilmesi, bazı insan patolojileri için yardımcı bir tedavi olarak faydalı olabilmektedir [129].

2.5. Karaciğerin Yapı ve Fonksiyonları

Karaciğer, vücudun hemen hemen bütün sistemleriyle ilişkisi bulunan ve son derece karmaşık ve önemli fonksiyonları olan bir organdır. Karaciğerin, karbonhidratların depolanması ve metabolizmanın kontrolü, safra yapımı, keton bileşiklerinin yapımı, plazma proteinlerinin sentezi, çeşitli ilaç ve zehirlerin detoksifikasyonu, üre yapımı, bazı hormonların inaktivasyonu, yağ metabolizması gibi fonksiyonları vardır [130, 131].

Karaciğer kan temizleyici ve süzücü özelliği ile hayati öneme sahip olup, anahtar fonksiyonlarından biri transformasyon veya ilaç metabolizmasıdır. İlaçlar veya ksenobiyotikler canlı bir organizmaya ya da dokuya verildiğinde, onlar ilaç metabolizması veya biyotransformasyon olarak bilinen işlemlerle (biyo) kimyasal olarak değiştirilebilirler. Çeşitli kimyasal yapılara sahip olan çok sayıda terapötik ajanların, endüstriyel kimyasalların ve çevresel kirleticilerin karaciğerde peroksizom proliferasyonuna sebep olduğu bilinmektedir. Bu grup kimyasallar, peroksizom proliferasyonu olarak müşterek bir şekilde etkilerini göstermektedirler. Peroksizom sayısındaki artışlara ilave olarak, bu kimyasallar peroksizomal enzimlerin aktivitesini indükler ve hepatomegaliye sebep olurlar. Bu etkiler muhakkak olarak bir arada bulunmayabilir, fakat bunlar doza, zamana, dokuya ve türe bağlı olarak etkilerini gösterebilirler. Sıçanlar ve fareler, peroksizom proliferasyonunun etkilerine aşırı bir şekilde duyarlı iken, gine domuzları değildirler ve hamsterler orta şiddette bir duyarlılık göstermektedirler [132-137].

Vücut her zaman çok sayıda yabancı kimyasallara maruz kalmaktadır. Bunların çoğu bizim besin, hava ve suyumuzun son ürünü şeklinde olan kimyasallar ya da ilaç formunda alınanlardır. Karaciğer detoksifikasyonu kapsayan, vücuttaki en önemli

organdır. İlaçlar, alkol ve çevresel toksinler gibi toksik maddelerin yer aldığı karaciğer dokusunda meydana gelen detoksifikasyon işlemi, bu toksik maddelerin vücuttan atılmasını kolaylaştırmaya yardım eden ve daha az zararlı forma dönüştüren, biyotransformasyon olarak isimlendirilen bir süreci içermektedir.

Karaciğer detoksifikasyon işlemi, Faz I ve Faz II şeklinde iki genel aşamaya bölünen pek çok enzimatik sistemleri kapsamaktadır. Faz I, sitokrom P₄₅₀ karışık fonksiyonlu oksidazlar olarak tanımlanan bir dizi enzim aktivasyonlarından oluşmaktadır. Faz II enzimleri, Faz I'den biyotransforme edilmiş, vücuttan kolaylıkla atılan ya da elimine edilen suda çözünür ve daha az toksik maddelere dönüşmesine yardım eden konjuge reaksiyonları yürütmektedir. Bir bireyin toksin yükü arttığında, karaciğeri daha büyük oksidatif strese maruz bırakabilen, sitokrom P₄₅₀ aktivitesi de artmaktadır. Bu durumda yeterli düzeyde antioksidan girişi, karaciğeri serbest radikal hasarına karşı korumaktadır. Yeterli düzeyde antioksidan alımı, hem Faz I hem de Faz II detoksifikasyonunun gerçek fonksiyonunu gerçekleştirmeye ve detoksifikasyon sürecinde üretilen serbest radikal hasarının riskini azaltmaya yardımcı olmaktadır (Şekil 2.7.) [137, 138].



Şekil 2.7. Karaciğer detoksifikasyon yolları [136]

Serbest radikaller yoğun metabolik aktivitenin olduğu organlarda fizyolojik koşullarda da ortaya çıkmaktadır. Karaciğer vücudumuzun en büyük organlarından olup yoğun metabolik aktiviteye sahiptir. Karaciğerde beş türde hücre bulunmaktadır: hepatositler, endotel hücreleri, kuppfer hücreleri, stellat hücreler ve safra kanalı epitel hücreleri. Tüm hücrelerin %80'ini hepatositler teşkil etmektedir. Bu beş hücre türünün hepsi oksidatif stresle ilişkili hücrelerdir.

1-Hepatosit: Bu hücreler, organizmada yağ metabolizmasının merkezi konumundadırlar. İntestinal lümeninden hepatositlerin oluşturdukları safra tuzlarının teşkil ettiği miçeller sayesinde absorbe olan yağ asitleri, karaciğere gelerek metabolize olmakta veya kahverengi yağ dokusunda trigliserit olarak depolanmaktadır.

Karaciğer, yağ asitlerinin beta-oksidasyonunu gerçekleştiren mitokondrice oldukça zengin bir organdır. Mitokondri'de iç ve dış olmak üzere iki membran bulunmaktadır ve yağ asitlerinin oksidasyonu iç membrana yakın bir bölgede yer

almaktadır. Bilindiği gibi organizmada enerji açığa çıkmasını sağlayan prosesler metabolik süreçlerde ortaya çıkan serbest elektronların bir sistemden diğerine aktarılmasının sonucudur. Bu elektronlar son olarak sitokrom sisteminde oksijene aktarılmakta ve su oluşturulmaktadır. Her iki H₂O molekülü oluşumu için oksijene 4 elektron aktarılmaktadır. İşte henüz elektron sayısını tamamlayarak nötral hale gelmemiş ve tek elektron ihtiva eden oksijen molekülü (O₂^{•-}), serbestleşmesi tehlikeli bir yapıdır ve sitokrom-c sistemi içinde elektronları tamamlanmaya kadar sıkı bir şekilde tutulmaktadır. Serbestleştiği takdirde bu radikal bulabildiği her sistemden elektron koparmaya çalışmakta ve özellikle mitokondri ve hücre membranına lipit peroksidasyonu yoluyla hasar vermektedir. Ancak, daha önce de belirtildiği gibi, fizyolojik koşullarda da az miktarda serbestleşen oksijen radikallerini fizyolojik antioksidan savunma sistemi, ciddi bir hasar oluşmadan nötralize edebilmektedir.

Hepatositteki serbest oksijen radikallerinin tek kaynağı mitokondri değildir. Sitozolda bulunan P_{450E1} (CYP2E1) mikrozomal oksidasyon sistemi de özellikle fazla miktarda alkol alımında ve ilaç metabolizması esnasındaki indüksiyonla önemli bir ROT kaynağı haline gelebilmektedir. Sitokrom P₄₅₀ enzimleri bitkiler ve hayvanlar aleminde yer alan monooksijenaz enzimlerinin büyük bir ailesidir. Büyük bir monooksijenasyon kapasitesine sahip olan bu enzimler çevre kirliliğine yol açan polisiklik aromatik bileşikler ve ksenobiyotiklerle birlikte, endojen bileşiklerin biyotransformasyonunda önemli bir rol oynar [139, 140].

Hepatositin çeşitli nedenlerle strese maruz kalması (alkol, ilaç, hipoksi, viral enfeksiyon, immunolojik hasar) halinde serbestleşen oksijen radikalleri, antioksidan savunma sisteminin koruma kapasitesini aştıklarında hücre hasarı ve ölümüne yol açabilmektedirler. Bunun nedeni oksidatif potansiyelin çok güçlü olması olabileceği gibi, antioksidan sistemin zayıflığı da olabilir [141].

2- Endotel hücreleri: Karaciğer oldukça vasküler bir organ olduğundan endotel hücrelerince zengindir. Karaciğer, vasküler yapısı açısından özgün bir organdır, çünkü arteriyel sistem yanında, aynı zamanda, venöz bir sistemden (portal ven) de kanlanmaktadır. Portal ven intestinal sistemle, sistemik dolaşım arasında çok komplike bir giriş kapısı olan karaciğere karbonhidrat, yağ ve protein tabiatındaki yapıtaşlarını getirmektedir. Karaciğer aynı zamanda barsaklardan gelen ve organizmaya zararlı olabilecek çeşitli kimyasal maddeler (ksenobiyotikler) ve mikroorganizmalar için de kompleks bir filtre görevi yapmaktadır. Endotel hücreleri de oksidatif hasardan ciddi şekilde etkilenmektedirler [141].

Aslında fizyolojik dozlardaki bazı serbest radikaller karaciğer sirkülasyonunun optimal olarak gerçekleşmesinde yararlıdır ve bunların başında NO (nitrik oksit) gelmektedir. Endotel hücrelerinde eNOS (endotelyal nitrik oksit sentetaz) ve kuppfer hücresinde iNOS (inducible nitrik oksit sentetaz) tarafından üretilen NO karaciğer mikrosirkülasyonunun sürdürülmesine hem gerektiğinde vazodilatasyon sağlayarak, hem de kanın şekilli elemanlarının endotel duvarına adezyonunu engelleyerek yararlı olmaktadır. Ancak serbest oksijen radikallerinin suprafizyolojik dozlara çıkmasıyla kuppfer hücrelerinden fazla miktarda serbestleşen ICAM gibi adezyon molekülü yapısındaki sitokinler, kanın şekilli elmanlarının endotel hücrelerine adezyonuna yol açarak mikrosirkülasyonu tıkayabilmektedirler. Bu, hepatositlerde iki yönlü zarara yol açmaktadır: Bir yandan hepatositler hipoksiye maruz kalırken, diğer taraftan da endotel hücrelerinin tahrip olmasıyla önlerindeki bariyerden mahrum kalmaları dolayısıyla immün hücrelerin atağına karşı açık hale gelmektedirler. Alkole bağlı karaciğer hasarında lipit peroksidasyonunun ürünü olan malondialdehit (MDA) ve 4-hidroksinonenal gibi ürünler, alkol metabolizması ürünü olan asetaldehit ile kompleks yapılar oluşturmakta ve bu antijenik yapılar CYP2E1 sistemine bağlanıp hücre yüzeyinde eksprese olarak, T lenfositlerini uyarmaktadırlar. Benzer antijenik yapıların ilaç toksisitesi esnasında da oluştuğu bilinmektedir [141].

3- Kuppfer hücreleri: Kuppfer hücreleri perisinüsoidal alanda yer alan lokal makrofajlardır. Karaciğeri, barsak ve sistemik sirkülasyon arasında kompleks bir kapı olarak kabul edersek, kuppfer hücreleri de bu kapının davranış tarzı bazen tuhaf olabilen bekçileri olarak tanımlanabilirler. Aslında Kuppfer hücreleri sağkalım faktörü de denilen NF κ b sisteminin lokalize olduğu yerdir ve fizyolojik koşullarda bu sistemin aktive ettiği kaskad ile oluşan sitokinler hepatosite, çeşitli zararlı etkenlere karşı savunma şansı sağlamaktadırlar. Ancak bu sitokinler aşırı miktarlarda ve sürekli salgılanmaları halinde, hepatositlerde bizzat hasar nedeni de olabilmektedirler. Bu sitokinlerin başında TNF- α gelmektedir ve hepatositde (mitokondri veya CYP2E1'de) oluşan ROT kuppfer hücresini uyarak TNF- α oluşumuna sebep olmaktadır.

Yine oksidatif strese yanıt olarak kuppfer hücresi fazla miktarda NO ve TGF- β da üretmektedir. NO bir bakıma oksidatif stresin zararının sınırlanmasına katkıda bulunmaktadır, çünkü serbest oksijen radikallerini bağlamaktadır. Ancak bu bağlanma esnasında oluşan peroksinitrat süratle dispose edilemediği takdirde nitrosative strese yol açmakta ve lipit peroksidasyonu ile sonuçlanmaktadır. Deneysel olarak karaciğer toksisitesi oluşturulmadan önce NO oluşumunu bloke eden L-NAME gibi ajanlar

kullanılması halinde karaciğer hasarının sınırlanabilmesine karşılık, hasar başladıktan sonra uygulama yapıldığı takdirde tablo ağırlaşmaktadır. TGF- β ise fibroza yol açmaktadır. Hedef hücresi stellat hücredir. Kuppfer hücreleri bunun yanında antijen sunan hücre olarak da görev yapmaktadırlar ve hücresele immüniteyi aktive etmektedirler [141].

4- Stellat hücreler: Bir deniz yıldızı görünümünde olan bu hücreler, sinüzoid duvarında bulunmakta ve yüksek miktarda retinol içermektedirler. Doğrusu organizmadaki retinol deposunun çok önemli bir kısmı stellat hücrelerde bulunmaktadır. Fizyolojik koşullarda inaktif haldedirler. Yukarıda bahsedildiği gibi kuppfer hücrelerinin, örneğin oksidatif stres ile uyarılmalarıyla ortaya çıkan TGF- β , stellat hücrelerini aktif hale getirmekte ve bu hücreler retinol kaybetmektedirler. Aktif stellat hücre disse mesafesine kollajen salgılamaya başlamaktadır. İşte bu durum, fibrozun başlangıcıdır, ancak dönüşümsüz değildir [141].

5- Safra kanalı epitel hücresi: Safra kanalları başlangıç noktalarını iki hepatosit arasındaki safra kanalcığından almakta ve gitgide birleşerek büyük safra kanallarını oluşturmaktadırlar. Sonunda ana safra kanalını teşkil ederek, duodenum'un ikinci kısmında sonlanmaktadırlar. Hepatositler tarafından çevrili olan safra kanalcıklarını, safra kanalı epitel hücreleri ile çevrili kanallara birleştiren yapılara Herring kanalı denilmektedir ve bu bölge stratejik bir öneme sahiptir. Çünkü hepatosit kök hücrelerine ev sahipliği yapmaktadır. Safra kanalı epitel hücrelerinin tahribatıyla karakterize immünolojik hasara örnek hastalıklardan birisi olan primer sklerozan kolanjit'de ROT hasarının da rol oynadığı bilinmektedir. Görüldüğü gibi ROT hasarı karaciğerde yer alan tüm hücreleri etkisi altına almaktadır [141].

Kronik hepatitlerde ve karaciğer fibrozunun patogeneğinde oksidatif değişimler etkin bir rol oynamaktadır [142]. Kronik hepatitlerde ve sirozda karaciğerde prooksidan-antioksidan sistemde değişiklikler olduğu insanlarda [143-145] ve deney hayvanlarında [146-149] yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Bu değişikliklerin plazma ve eritrositleri [143-145, 150] de etkilediği bildirilmiştir. Buna dayanarak, prooksidan-antioksidan sistemdeki değişimleri plazma ve eritrositlerde inceleyerek karaciğer hasarındaki gelişimin izlenebileceği ileri sürülmüştür [150].

Oksidatif stres, hepatik sinüzoidlerde yaşlanma ve hastalıkla oluşturulan patogenezişte ortaya çıkmaktadır. Örneğin; karaciğer doku nakillerinde meydana gelen disfonksiyonlar, aşırı akut ve kronik etanol alımı ile meydana gelen karaciğer hasarı,

reaktif oksijen türlerinin üretimini arttırmak için katkıda bulunur. Yaşlanma ile mitokondride oksidatif hasar ve reaktif oksijen türleri artar. Karaciğer, portal ven tarafından gönderilen ve sindirim sonucu oluşturulan toksinlere maruz kalmasından dolayı, patolojik olmayan durumlarda bile oksidatif stresin bölgesidir. Özellikle hepatik sinüzoidal endotelyum, böyle oksidatif stresler için büyük bir hedef olarak uygun olmaktadır. Sinüzoidal endotelyum, “karaciğer süzgeci” olarak ifade edilen tek bir yapıya sahiptir. Süzgeç olarak isimlendirilen ve kümeler halinde, içe doğru porlarla delinmiş ince bir yapıdır. Sinüzoidal endotelyum, proteinler ve diğer besinlerin, kan ve karaciğer hücreleri (hepatosit) arasında serbest değişimi için stratejik bir yapı ve konumdadır. Sinüzoidal endotelyum, ayrıca şilomikronlar ve virüsler gibi koloitler, trombositler ve bir çok kan hücrelerinden hepatositleri korur [151].

3. MATERYAL VE METODLAR

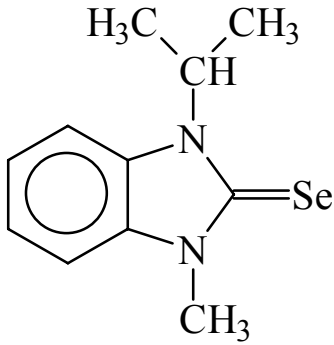
3.1. Materyal

3.1.1. Yeni organoselenyum Bileşikleri (Se I ve Se II)'nin Sentezlenmesi ve Yapısı

Yeni sentetik organoselenyum bileşikleri (Se I ve Se II) İnönü Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Organik Kimya Araştırma Laboratuvarında literatüre göre sentezlendi (Şekil 3.1.) [152-154]. Yeni sentetik organoselenyum bileşikleri (Se I ve Se II)'nin sentez aşamaları Şekil 3.2. ve Şekil 3.3.'de gösterilmektedir.

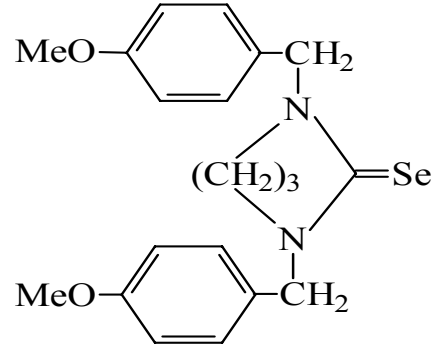
Sentezlenen yeni bileşiklerin yapısı, mikroanalizler ve spektroskopik teknikler (1H-NMR (300 MHz), 13C-NMR (75.5 MHz), FT-IR) kullanılarak aydınlatıldı.

Se I Bileşiği



1-izopropil-3-metilbenzimidazol-2-selenon (Se I)

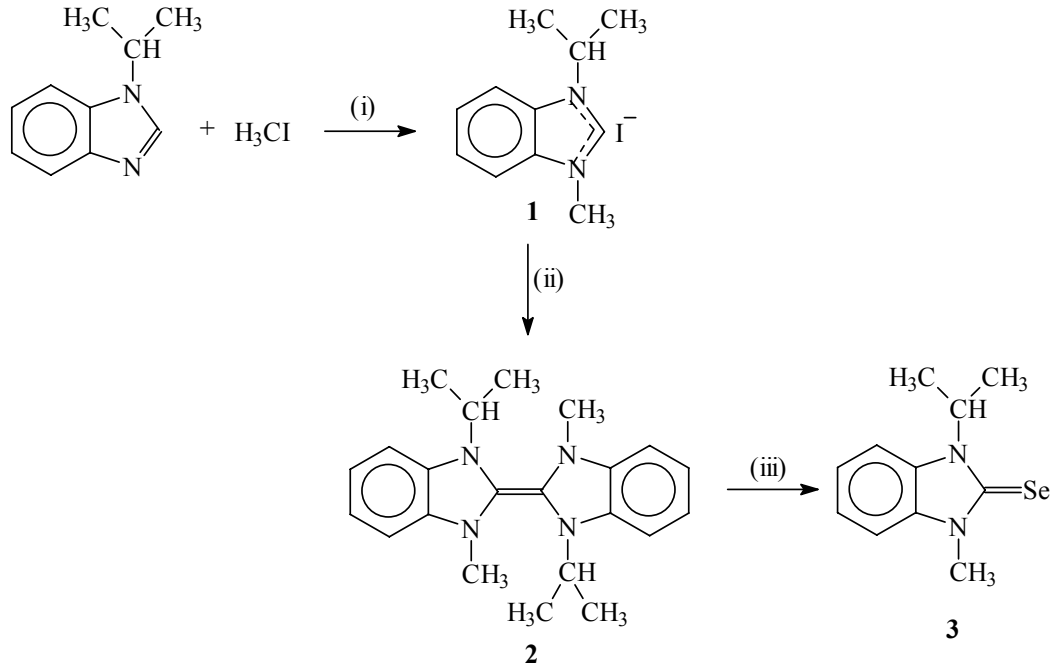
Se II Bileşiği



1,3-di-*p*-metoksibenzilpirimidin-2-selenon (Se II)

Şekil 3.1. Selenyum I (Se I) ve Selenyum II (Se II) bileşiklerinin kimyasal yapıları

3.1.1.1. 1-izopropil-3-metilbenzimidazol-2-selenon (Se I) 'un Sentezi ve Yapısı



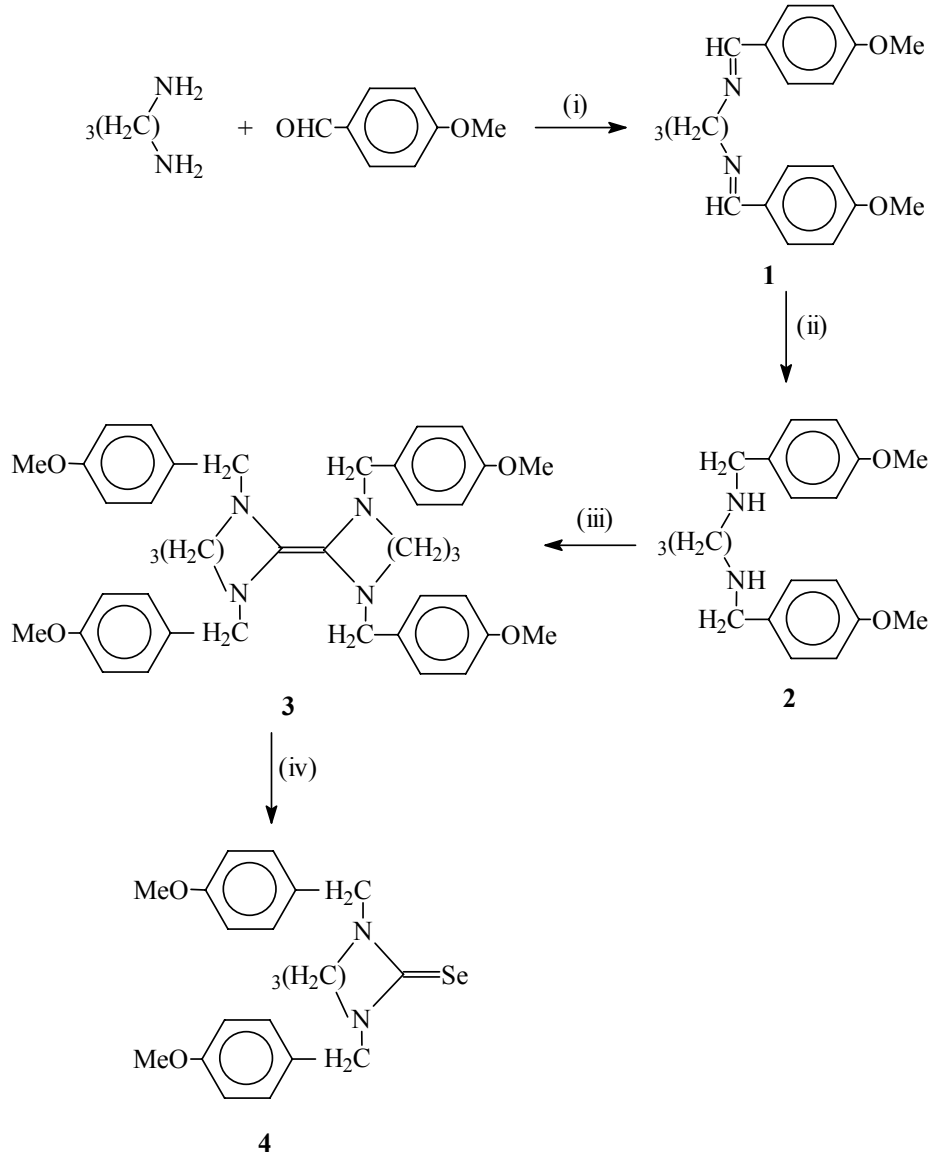
Şekil 3.2. 1-izopropil-3-metilbenzimidazol-2-selenon (Se I) 'un sentezi. Reaksiyon şartları: (i) $\text{CH}_3\text{-I}$, toluen, 25°C ; (ii) NaH , THF, 25°C ; (iii) Se , toluene, 110°C .

1-izopropil-3-metilbenzimidazolyum iyodür (1) Sentezi: 1-izopropilbenzimidazol (5.20 g; 32.50 mmol) toluende (20 mL) çözüldü. Çözelti üzerine damla damla metil iyodür (3 mL; 48.18 mmol) ilave edildi. Oda sıcaklığında 12 saat karıştırıldı. Bu süre sonunda kuru dietil eter ilave edilerek süzüldü ve vakumda kurutuldu. Verim: 9 g; %92; e.n: $195\text{-}196^\circ\text{C}$. *Anal. Found For:* C, 43.75, H, 5.02, N, 9.30. *Cald.:* C, 43.70, H, 4.96, N, 9.27. $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.85 (d, 6H, $J= 6.7$ Hz, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 4.25 (s, 3H, CH_3), 5.09 (hep., 1H, $J= 6.7$ Hz, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 7.78-7.79 (m, 4H, Ar-H), 9.45 (s, 1H, 2-CH). $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3) δ : 18.2 ($\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 30.4 ($\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 49.1 (CH_3), 110; 110.3; 110.4; 113.1; 116; 125 (Ar-C), 135.7 (2-CH).

Bis-[(1-izopropil-3-metil)benzimidazol-2-iliden] (2) Sentezi: 1-izopropil-3-metilbenzimidazol-2-iliden (8 g; 26.49 mmol) thf'deki (30 mL) süspansiyonuna, parafinden arındırılmış NaH (1.10 g; 45.83 mmol) yavaş yavaş eklendi. Tepkime karışımı oda sıcaklığında 12 saat karıştırıldı. Daha sonra thf vakumda çekildi. Kuru toluen (30 mL) ilave edilerek NaI süzüldü. Toluenin hacmi yarıya indirilerek kuru n-hekzan (15 mL) ilave edilerek kristallendirildi. Bununla birlikte elde edilen olefin havaya hassas olduğu için element analizi ve NMR spektroskopisi ile yapı aydınlatılmadan kullanıldı.

1-izopropil-3-metilbenzimidazol-2-selenon (3) Sentezi: Bis-[(1-izopropil-3-metil)benzimidazol-2-iliden] (0.5 g; 1.33 mmol) kurutulmuş toluende (15 mL) çözüldü ve üzerine selenyum (0.25 g; 3.16 mmol) ilave edilerek karışım iki saat karıştırıldı. Sonra karışım oda sıcaklığına kadar soğutuldu, toluenin hacmi vakumda yarıya indirildi. Selenyumun fazlası süzülerek uzaklaştırıldı. Verim: 0.42 g; %61; e.n: 96-97°C. *Anal.* Found For: C, 51.86, H, 5.44, N, 11.12. *Calcd.:* C, 51.96, H, 5.55, N, 11.02. IR, ν : 1408 (C=Se). ^1H NMR (CDCl_3) δ : 1.61 (d, 6H, $J=7$ Hz, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 3.91 (s, 3H, CH_3), 5.70 (hep., 1H, $J=7$ Hz, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 7.23-7.50 (m, 4H, Ar-H). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 20 ($\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 33.5 ($\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 51.6 (CH_3), 109.7; 111.2; 122.8; 123; 131.2; 134.2 (Ar-C), 167.3 (C=Se).

3.1.1.2. 1,3-di-*p*-metoksibenzilpirimidin-2-selenon (Se II)'un Sentezi ve Yapısı



Şekil 3.3. 1,3-di-*p*-metoksibenzilpirimidin-2-selenon (Se II)'un sentezi. Reaksiyon şartları: (i) EtOH, 76⁰C; (ii) Pd/C(5%), H₂; (iii) CH(OMe)₂NMe₂, 100-130⁰C; (iv) Se, toluene, 110⁰C.

1,3-bis(*p*-metoksibenzilidenamino) propan (1) Sentezi: 1,3-Diaminopropan (1.0 mmol) *p*-metoksibenzaldehitin (2.0 mmol) alkoldeki çözeltisi üzerine damla damla ilave edildi. Bir saat refluks edildikten sonra oda sıcaklığına soğutuldu. Oluşan krem renkli kristaller süzüldü ve dietil eter (3x20 mL) ile yıkandı. % 80; e.n: 76-78°C. ¹H NMR (CDCl₃) δ: 2.18 (quin., 2H, *J*= 6 Hz, NCH₂CH₂CH₂N), 3.74 (t, 4H, *J*= 6 Hz, NCH₂CH₂CH₂N), 3.90 (s, 6H, OCH₃), 7.02 ve 7.80 (d, 8H, *J*= 8 Hz, Ar-*H*) 8.35 (s, 2H, N=CH).

1,3-bis(*p*-metoksibenzilamino) propan (2) Sentezi: 1,3-bis(*p*-metoksibenzilidenamino) propan'ın (5.5 g) metanoldeki (50 mL) çözeltisine kısım kısım sodyum borhidrür ilave edildi. Bir gece oda sıcaklığında karıştırıldı. Metanol uzaklaştırıldıktan sonra su ilave edildi ve önce der. HCl ile sonra NaOH ile muamele edildikten sonra Diklormetan ile ürün ekstrakte edildi. MgSO₄ üzerinde kurutuldu. Vakumda çözügen uzaklaştırıldı. Verim: 3 g; % 65; k.n: 160-165 (0.3 mmHg). ¹H NMR (CDCl₃) δ: 1.30 (s, 2H, NH), 1.59 (quin., 2H, *J*= 6 Hz, NCH₂CH₂CH₂N), 2.56 (t, 4H, *J*= 6 Hz, NCH₂CH₂CH₂N), 3.56 (s, 2H, NCH₂), 3.67 (s, 6H, OCH₃), 6.68 ve 7.10 (d, 8H, *J*= 8 Hz, Ar-*H*).

Bis[(1,3-di-*p*-metoksibenzil)-1,3-pirimidin-2-iliden] (3) Sentezi: 1,3-bis(*p*-metoksibenzilamino) propan ve N,N-dimetilformamid dimetil asetalin kuru toluendeki çözeltisi 3 saat 90°C'de, argon atmosferinde ısıtıldı. Daha sonra reaksiyon karışımı 120°C'de 1 saat yan ürün metanol ve dimetilaminin uzaklaşmasına izin verilecek şekilde, distillenme şartları altında ısıtıldı. Beyaz katı toluen (5 mL) ve n-hekzan (10 mL) karışımında kristallendirildi. Bununla birlikte elde edilen olefin havaya hassas olduğu için element analizi ve NMR spektroskopisi ile yapı aydınlatılmadan kullanıldı.

1,3-di-*p*-metoksibenzilpirimidin-2-selenon'un (4) Sentezi: Bis[(1,3-di-*p*-metoksibenzil)-1,3-pirimidin-2-iliden] (1.2 g; 1.92 mmol) kurutulmuş toluende (15 mL) çözüldü ve üzerine selenyum (0.3 g; 3.79 mmol) ilave edilerek karışım iki saat karıştırıldı. Sonra karışım oda sıcaklığına kadar soğutuldu, toluenin hacmi vakumda yarıya indirildi. Selenyumun fazlası süzülerek uzaklaştırıldı. Verim: 1.19 g; % 79; e.n: 164-165°C. *Anal.* Found For: C, 59.39, H, 6.18, N, 6.99. *Cald.:* C, 59.42, H, 6.37, N, 7.17. IR, ν: 1511 (C=Se). ¹H NMR (CDCl₃) δ: 1.74 (quin., 2H, *J*= 5.9 Hz,

NCH₂CH₂CH₂N), 3.12 (t, 4H, *J* = 5.9 Hz, NCH₂CH₂CH₂N), 3.70 (s, 6H, OCH₃), 5.34 (s, 4H, NCH₂), 6.79 ve 7.28 (d, 8H, *J* = 8.8 Hz, Ar-*H*). ¹³C NMR (CDCl₃) δ: 21.2; 46 (NCH₂CH₂CH₂N), 55.7 (OCH₃), 114.4; 129.4; 129.5; 159.6 (Ar-*C*), 180.8 (C=Se).

3.1.2. Deneyleerde Kullanılan Kimyasal Malzemeler

Deneysel çalışmalarda, analitik saflıkta olan sitokrom – *c* (Merck), ksantin (Sigma), ksantin oksidaz (Sigma), GSH (redükte glutatyon) (Sigma), GSSG (okside glutatyon) (Sigma), BSA (Bovine serum albumin) (Sigma), GSSG Redüktaz (Sigma), SOD (Süperoksit dismutaz) (Sigma), EDTA (Etilen diamintetraasetik asit) (Sigma), Folin fenol reagent (sigma), NADPH (β -Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (redükte)) (Merck), dihidronikotinamid adenin dinükleotid fosfat (Merck), NaN₃ (Sodyum azid) (Merck), Na₂CO₃ (Merck), CuSO₄ (Merck), Na, K-Tartarat (Merck), NaOH (Merck), KH₂PO₄ (Merck), K₂HPO₄ (Merck), Na₂HPO₄ (Merck), NaH₂PO₄ (Merck), H₂O₂ (Merck), HCl (Merck), NaCl (Merck), TBA(2-tiyobarbütrik asit) (Merck), TCA (Trikloroasetik asit) (Merck), DTNB (5,5'-ditiyobis-2 nitrobenzoik asit) (Sigma), NBT(nitro blue tetrazolyum klorid) (Merck), KCl (potasyum klorür) (Merck), H₂SO₄ (sülfürik asit) (Merck), DPPH (difenil pikril hidrazil) (Sigma), Etanol (Merck), Metanol (Merck), Tween 20 (merck), DMBA (Sigma), potasyum ferri siyanür (Sigma), Trikloro asetik asit (Merck), FeCl₃.6H₂O (Sigma), linoleik asit (Sigma), Trans-beta-karoten (Sigma), kloroform (Merck) kullanılmıştır.

3.1.3. Deneyleerde Kullanılan Aletler

Deneysel alışmalar boyunca, otomatik pipetler, vortex, terazi, soğutmali santrifüj (NF-800-R), spektrofotometre (Shimadzu UV-1601-UV visible), manyetik karıştırıcı, pH metre (PH 1000, masa tipi), homojenizatör (Ultra- Turrax T 25), derin dondurucu, su banyosu (Clifton), Olympus BH2 araştırma mikroskopu ve evaporatör kullanılmıştır.

3.1.4. Sıçanların Temini ve Deneysel Grupların Hazırlanışı

Bu çalışmada, ağırlıkları 150-200 gram arasında değişen 35 adet, dört aylık sağlıklı dişi albino Wistar sıçanları kullanıldı. Bu sıçanlar İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Araştırma Merkezinden temin edildi. Sıçanlar çalışma boyunca oda sıcaklığında tutulup, su ve sıçan yemi verilerek beslenmiştir. Her biri 6 ile 8 adet hayvan içeren beş gruba ayrılan sıçanlar, çalışma başlangıcından önce tartıldı. Beş gruba ayrılan hayvanlardan, birinci grup kontrol grubu olarak kullanıldı. İkinci gruptaki hayvanlara Se I, Se II ve DMBA bileşiklerimizi çözdüğümüz mısır yağı belli hacimde iki günde bir olacak şekilde 4 hafta boyunca uygulandı. Üçüncü gruptaki hayvanlara 50 mg/kg DMBA tek doz olarak uygulandı ve dört hafta sonra sakrifiye edildi. Dördüncü gruptaki hayvanlara DMBA üçüncü gruptaki gibi uygulandı ve DMBA uygulamasından 6 saat sonra Se I bileşiği 25 µmol/kg olacak şekilde 4 hafta boyunca iki günde bir uygulandı (DMBA+Se I). Beşinci gruptaki hayvanlara ise, Se I bileşiği yerine Se II bileşiğinin kullanılması dışında, dördüncü gruptaki hayvanlara uygulanan işlemler yapıldı (DMBA+Se II).

3.2. Metodlar

3.2.1. Diseksiyon İşlemi ve Doku Numunelerinin Hazırlanması

Bütün hayvanlar 75 mg/kg sodium pentobarbital ile bayıldıktan sonra başarılı bir şekilde sakrifiye edildi. Bu uygulamalardan sonra sıçanların kalplerinden sağ ventriküle girilerek 4 mL kan alındı ve heparinize edildi.

Sıçanların karaciğer dokuları, serum fizyolojik ile perfüze edilip tamamen kanından temizlendikten sonra, sıvı azotta dondurulup, biyokimyasal analizler yapılincaya kadar -80 °C'de derin dondurucuda saklandı.

Enzim (SOD, CAT, GR, GSH-Px) aktivite tayini, total protein tayini ve total GSH tayini yapacağımız dokunun homojenizasyonunda, öncelikle doku tartıldı ve 1/5 w/v oranında PBS tamponu (pH 7.4) eklenerek buz izolasyonu altında homojenizatör ile tüm doku parçalanıncaya kadar homojenize edildi. Homojenizasyon işleminin ardından 17.000 g' de +4 °C' de 15 dakika mikrosantrifüj aletiyle santrifüj işlemi yapıldı. Böylece enzim aktiviteleri ve protein tayinin yapılacağı süpernatant elde edildi.

Süpernatant örnekleri ölçüm işlemleri yapıncaya kadar – 80 °C 'de derin dondurucuda saklandı.

Lipit peroksidasyonunu belirleyeceğimiz dokunun homojenizasyonu ise % 1,15'lik KCl ile 1/10 w/v oranında eklenerek homojenize edildi. Homojenat analiz yapıncaya kadar yine –80 °C' de derin dondurucuda saklandı.

3.2.2. Kalpten Kan Alınması ve Eritrositlerin Saflaştırılması

Sıçanların kalplerinden sağ ventrikülüne girilip 4 mL kan alınarak heparinize edildi ve bu kanlar zaman geçirilmeden 3000 g'de 5 dk. santrifüj edilerek, üstteki plazma kısmı ayrıldı. Alttaki korpüskül kısımları ise izotonik sodyum klorür çözeltisi eklenerek, orijinal hacme (tam kandaki gibi) tamamlanıp 1000 g'de 10 dk. santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Üstte oluşan '*buffy coat*' tabakası aspire edilerek uzaklaştırıldı. Bu işlemler üç kez tekrarlanarak eritrositler iyice saflaştırıldı [155]. Daha sonra 1.5 mL saf eritrosit örnekleri alınarak ölçümler yapıncaya kadar derin dondurucuda saklandı.

3.2.3. Hemoglobin Miktar Tayini

1.5 mL eritrosit paketi bulunan örnekler oda sıcaklığında çözünmeye bırakıldı ve bir miktar hemolizi sağlandı. Eritrosit örneklerine 0°C 'de soğutulmuş 1.5 mL bidistile su eklenerek 1dk. boyunca vorteksle karıştırıldı ve eritrositlerin tam olarak lizisi sağlandı. Lizise uğrayan numuneler, 5000 g'de 20 dk. santrifüj edilerek hücresel partiküller çöktürüldü. Sonra üstteki süpernatant, içerik olarak normal kandaki konsantrasyonlarına çok yakın değerlere geldi (normal kan korpüskülü= kan plazması) ve hemoglobin miktar ölçümü ile eritrosit içi enzim aktiviteleri için kullanıldı. Elde edilen süpernatanda Drabkin yöntemiyle [156] hemoglobin düzeyleri ölçüldü.

3.2.4. Histopatolojik Çalışma için Numune Hazırlanması

Zedelenmeden çıkarılan sıçan karaciğer dokularının bir parçası, %10'luk nötral tamponlanmış formalin (NTF) solüsyonunda 24 saat (+4°C'de) boyunca bekletilerek fikse edildi. Fikse edildikten sonra dokular, 3-4 mm'lik daha küçük parçalara ayrılıp, plastik doku takip kasetleri içerisine konuldular.

3.2.5. Protein Tayini

Lipit peroksidasyonu ve enzim aktivitesi ölçümleri yapılmadan önce, protein tayininde kullanılacak olan karaciğer doku süpernatantlarından 1 mL süpernatandaki protein miktarını belirlemek için Lowry yöntemi kullanıldı [157]. Bu yöntemde kullanılan çözeltiler ve bunların hazırlanışları aşağıda yer almaktadır :

3.2.5.1. Kullanılan Reaktifler

A çözeltisi:

- % 2'lik Na_2CO_3 'ın 0.1 N NaOH' teki çözeltisi : 100 hacim
- % 2'lik Na,K- Tartarat çözeltisi : 1 hacim
- % 1'lik CuSO_4 çözeltisi : 1 hacim

A çözeltisi, yukarıda belirtilen üç çözeltinin hazırlanıp deneye başlamadan önce belirtilen hacim oranlarıyla karıştırılmasıyla hazırlandı.

B çözeltisi :

- Folin Fenol Belirteci : 1 hacim
- Bidistile su : 1 hacim

B çözeltisi, belirtilen hacim oranlarında karıştırılarak hazırlandı.

BSA çözeltisi :

Standart protein çözeltisi olan BSA (Bovine Serum Albumin) 1mg/mL konsantrasyonunda stok çözelti olarak hazırlandı. Örneklerin çalışma aralığına göre 10, 20, 30, 40, 50, $\mu\text{g/mL}$ 'lik çözeltileri hazırlanıp kullanıldı.

3.2.5.2. Deneyin Yapılışı

- 1) Her deney için 2 kör, örneğin çalışma aralığına göre değişik konsantrasyonlarda BSA'lar ve örnek tüpleri hazırlanıp, bütün tüplere A çözeltisinden 2.5 mL kondu.

- 2) BSA tüplerine belirtilen hacimlerde BSA çözeltilerinden örnek tüplerine ise deney şartlarına göre 5, 10, μL 'lik örnek çözeltileri tüpün duvarlarına damlacıklar şeklinde bırakıldı.
- 3) Vorteksle iki defa karıştırılan tüpler 10 dk. bekletildi.
- 4) 1:1 oranında hazırlanmış olan Folin-fenol belirtecinden (B çözeltisi) tüm tüplere 250 μL ilave edilip, vorteksle iki defa tekrar karıştırılan tüpler, renk oluşumu için karanlıkta 45 dk. bekletildi.
- 5) Bu sürenin bitiminde örnekler karanlık ortamdan çıkarılıp, spektrofotometre ile örneklerin 695 nm'deki absorbans değişimi okundu.

3.2.5.3. Protein Miktarının Hesaplanması

Örnek tüpündeki süpernatanın 1 mL' sindeki protein miktarı, standart BSA çözeltileri ile hazırlanan kalibrasyon grafiği kullanılarak hesaplandı.

3.2.6. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivite Tayini ve Numunelerin Hazırlanışı

Süperoksit radikallerinin dismutasyonunda görevli olan SOD enziminin aktivite tayini McCord J.M, Fridovich I [158] yöntemiyle yapılmıştır. Bu yöntem, ksantin-ksantin oksidaz sisteminde üretilen süperoksit radikallerinin sitokrom-c'yi indirgememesinin SOD tarafından inhibisyonu temeline dayanmaktadır.

3.2.6.1. Kullanılan Reaktifler

A çözeltisi:

5 μmol ksantin 0.001 N NaOH' daki çözeltisi : 10 hacim.

2 μmol sitokrom-c'nin 50 mM pH 7.8 ve 0.1 mM EDTA içeren fosfat tamponundaki çözeltisi : 100 hacim.

Yukarıda verilen hacim oranlarında karıştırılarak hazırlanan A çözeltisi, +4 °C ' de 3 gün kararlıdır.

B çözeltisi:

Deneyden önce taze olarak hazırlanan ksantin oksidazın 0.1 mM EDTA'daki çözeltisi 0.2 U/mL şeklindedir.

3.2.6.2. Deneyin Yapılışı

- 1) A çözeltisi 3 mL'lik spektrofotometre küvetine 2.9 mL olarak eklendi.
- 2) 50 µL numune eklendi.
- 3) Tepkime 50 µL B çözeltisinin ilavesiyle başlatıldı.
- 4) 550 nm deki absorbans değişimi (1dk.) spektrofotometre ile okundu.
- 5) Kör okuması esnasında numune yerine 50 µL bidistile su ilave edildi.
- 6) Kalibrasyon grafiği oluşturmada, $5 \cdot 10^{-7}$ M konsantrasyondaki SOD çözeltisinin 5 µL, 10 µL ve 15 µL deki bilinen değerlerine karşılık elde edilen % inhibisyon değerleri grafik olarak çizildi.

3.2.6.3. SOD Aktivitesinin Hesaplanması

Aşağıdaki formüle göre örneklerin % inhibisyon değerleri hesaplandı.

$$C = \frac{\Delta OD (\text{Örnek})}{\Delta OD (\text{Kör})} \times 100$$

3.2.7. Katalaz (CAT) Aktivite Tayini ve Numunelerin Hazırlanışı

Luck H [159] yöntemine göre katalaz aktivite tayini yapıldı.

3.2.7.1. Kullanılan Reaktifler

1/15 M konsantrasyonlu Na, K-fosfat tamponu (Na_2HPO_4 - KH_2PO_4) pH: 7
Derişik H_2O_2 çözeltisi.

3.2.7.2. Deneyin Yapılışı

160 µL H₂O₂ çözeltisi Na, K-fosfat tampon çözeltisine 100 mL'sine ilave edilerek hazırlanan bu çözeltiden 1000 µL alındı ve kör olarak kullanıldı. Örneklerin katalaz içeriğini belirlemek için, bu karışımdan 1000 µL alınıp küvete kondu ve üzerine çalışma aralığına bağlı olarak 30 µL başlayarak gittikçe artan konsantrasyonlarda süpernatant ilave edildi. Bir defa karıştırılarak spektrofotometrede 240 nm dalga boyunda 30 sn. süreyle absorbans değişimleri elde edildi.

3.2.7.3. CAT Aktivitesinin Hesaplanması

Elde edilen optik dansite farkından mL'deki enzim ünite sayısı aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$C = \frac{\Delta OD \times 1dk \times 1000}{0.036 \times \mu L \text{ süpernatant}}$$

3.2.8. Glutasyon Redüktaz (GR) Aktivite Tayini ve Numunelerin Hazırlanışı

NADPH'a bağlı olarak okside glutasyonun (GSSG) redükte glutatyona (GSH) dönüşümünü katalizleyen bir enzim olan glutasyon redüktazın aktivite tayini ise Carlberg I. yöntemi [160] kullanılarak yapılmıştır.

3.2.8.1. Kullanılan Reaktifler

0.2 mM Fosfat tamponu – 2 µM EDTA

pH =7.2 Tris-HCl tamponu

2 mM pH =7.2 NADPH/ Tris-HCl çözeltisi

20 mM GSSG çözeltisi

3.2.8.2. Deneyin Yapılışı

Fosfat tamponu 30°C'de 30 dakika inkübe edildi. İnkübe edilmiş fosfat tamponundan 0.5 mL alınıp, üzerine 50 µL NADPH ve GSSG eklendi. Toplam hacim 1mL olacak şekilde hazırlanan numunelerin, 340 nm'de 60 saniye süre ile spektrofotometrik olarak okumaları yapıldı.

3.2.8.3. GR Aktivitesinin Hesaplanması

Okunan bu optik dansite farkından 1mL numunedeki enzimin aktivite tayini aşağıdaki formülle hesaplandı.

$$C = \frac{\Delta OD \times \text{Toplam hacim (mL)}}{6,22 \times \text{Numune hacmi (mL)}}$$

3.2.9. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Aktivite Tayini ve Numunelerin Hazırlanışı

Lawrance R.A, Burk R.F yöntemi kullanılarak [161] Se-bağımlı GSH-Px enziminin aktivite tayini yapılmıştır.

3.2.9.1. Kullanılan Reaktifler

Tampon Çözelti: 50 mM KH₂PO₄ + K₂HPO₄ + 5 mM EDTA içeren pH:7
şeklinde hazırlanmıştır.

NaN₃ (Sodyum azid) : 1 mM

H₂O₂ : 0.25 mM

NADPH : 0.2 mM

GSH (Redükte glutatyon) : 2 mM

GSSG Redüktaz : 1.2 U/mL

3.2.9.2. Deneyin Yapılışı

Belirtilen derişimlerde hazırlanan çözeltilerle, önce kör ardından da numune deneyleri yapılmıştır. Spektrofotometre küvetine kör için 1 mL tampon, 10 µL NADPH, 10 µL GSH, 10 µL NaN₃ ve 2 µL GSSG redüktaz çözeltileri ilave edildi. 37°C de 5 dk süre ile inkübasyona tabi tutulan çözelti karışımına 10 µL H₂O₂ eklerek, spektrofotometrede 340 nm deki absorbans değişimi (1 dk.) elde edildi. Örnek deneyleri için ise belirli miktarlarda süpernatant eklendikten sonra 37°C de 5 dk. süre ile inkübasyona tabi tutularak kör denemedeki gibi 340 nm deki absorbans değişimi saptandı.

3.2.9.3. GSH-Px Aktivitesinin Hesaplanması

GSH-Px aktivitesinin tayini aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$C = \frac{\Delta OD}{6220/mL}$$

Δ OD: Optik Dansite Farkı

3.2.10. Total Glutasyon (GSH) Analizi ve Numunelerin Hazırlanması

Bir δ-glutamil-sistein-glisin olan ve aerobik yaşamın zararlı yan ürünlerinden hidrojen peroksit ve organik peroksitler ile tepkimeye girerek detoksifikasyonda önemli bir rol oynayan glutasyon miktar tayini Theodorus P. yöntemine [162] göre yapıldı.

3.2.10.1. Kullanılan Reaktifler

0.1M, pH=7 potasyum fosfat tamponu

DTNB (5,5'-ditiyobis (2-nitrobenzoik asit)): 1.5 mg/ml DTNB, stok tampon çözeltisiyle günlük olarak hazırlandı.

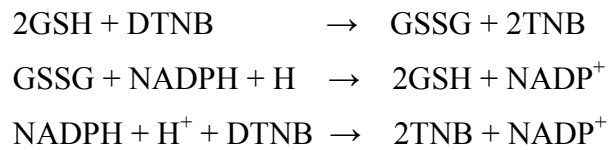
GSSG Redüktaz: Enzim konsantrasyonu 6 U/mL olacak şekilde stok tampon çözeltisiyle günlük olarak hazırlandı.

NADPH: 4 mg/mL olacak şekilde stok tampon çözeltisiyle hazırlandı.

3.2.10.2. Deneyin Yapılışı

Total glutasyon (GSH+GSSG) miktar tayininde hesaplanan hacimlerde tampon çözelti, DTNB ve NADPH tüplere kondu. Spektrofotometre küvetine alınan karışıma glutasyon redüktaz ve süpernatan eklenmesiyle spektrofotometrede 412 nm de 1 dakikadaki absorbans değişimine karşılık gelen total glutasyon değerleri, standart grafikten okundu.

3.2.10.3. Total GSH Miktarının Hesaplanması



Total glutasyon miktarı, reaksiyonlar sonucu oluşan TNB miktarı 412 nm'de spektrofotometrik olarak okundu. Okunan absorbans değerlerine karşılık gelen total glutasyon miktarı: nmol / protein (Lowry) olarak kaydedildi.

3.2.11. Lipit Peroksidasyonunun Belirlenmesi ve Numunelerin Hazırlanması

Hücre zarında bulunan lipitlere serbest radikallerin saldırıları sonucu oluşan lipit peroksidasyonu, son ürün olan malondialdehit (MDA) miktarının Beuge J.A [163] yöntemiyle belirlenmesiyle bulundu.

3.2.11.1. Kullanılan Reaktifler

- % 15 'lik TCA çözeltisi : 1 hacim
- % 0.375 'lik TBA çözeltisi : 1 hacim
- 0.25 N 'lik HCl çözeltisi : 1 hacim

Bu üç çözeltinin hassas bir şekilde hazırlanarak, belirtilen hacimlerde karıştırılmasıyla bir solüsyon hazırlandı.

3.2.11.2. Deneyin Yapılışı

- 1-10 mL' lik santifüj tüplerine hazırladığımız solüsyondan 4 mL ilave edildi.
- 2- Kör tüpleri hariç, örnek tüplerine 1 mL homojenat eklendi.
- 3- Bir defa şiddetli bir şekilde karıştırıldı.
- 4- Kaynar suda (95-100 °C 'de) 15 dk. beklemeye bırakıldı.
- 5- Sonra tüpler soğutulularak, 3500 rpm' de 10 dk. santrifüj yapıldı.
- 6- Elde edilen süpernatanın spektrofotometre ile 535 nm'deki absorbanansı okundu.

3.2.11.3. MDA Düzeyinin Hesaplanması

Malondialdehit miktarı aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

MDA-TBA kompleksi için molar absorbanans katsayısı: $\epsilon : 1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

$$C = \frac{OD}{1.56 \times 10^5} \times \frac{\text{Total Hacim}}{\text{Numune hacmi}}$$

3.2.12. Karaciğer Dokusunun Histopatolojik Analizi

NTF'de fiksasyon işlemleri tamamlanmış olan doku numuneleri 24 saat boyunca akan çeşme suyunda yıkandıktan sonra % 70'den absolye kadar dereceli etil alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edildiler. Tüm örnekler dehidratasyonu takiben toplam 1.5 saat süre ile ksilolde şeffaflandırılarak 60°C'de erimiş olan parafine konuldular. 6 saat süre ile erimiş haldeki parafinde bekletilen dokular, parafin içerisine gömülerek bloklandı. Parafin bloklardan Lipshaw marka rotary mikrotom ile 5-6 µm kalınlığında kesitler alındı. Alınan kesitlere genel histolojik yapıyı gözlemlemek amacıyla Hematoksilen-eosin (H-E) boyama yöntemi uygulandı [164, 165]. Hazırlanan preparatlar araştırma mikroskopu ile incelenerek fotoğrafları çekildi.

3.2.13. Selenyum Bileşiklerinin *in vitro* Özelliklerinin Analizi

3.2.13.1. Radikal Süpürme Gücü (RSG) Ölçümü

Difenil Pikril Hidrazil (DPPH) sentetik radikali kullanılarak selenyum bileşikleri (Se I ve Se II)'nin RSG değerinin ölçümü [166-169]'a göre ve deney şartlarının gerektirdiği bazı değişiklikler yapılarak gerçekleştirilmiştir.

DPPH çözeltisi, her deney için günlük hazırlanmış olup, 0.025 g.L⁻¹ 'lik DPPH çözeltisi için 2.5 mg DPPH radikali 100 mL metanol içinde çözülmüş ve kullanılıncaya kadar ağzı kapalı bir kapta derin dondurucuda saklanmıştır. Spektrofotometre küvetlerine (2.5 mL-disposable) 50, 100, 200, 300 ve 500 µL Se I ve Se II çözeltisi konulmuş ve metanolla 500 µL'ye tamamlanmış, kör numune için küvete 500 µl saf metanol konmuştur. Böylece sentetik organoselenyum bileşikleri (Se I ve Se II)'nin farklı konsantrasyonları elde edilmiştir. Her bir küvete 2 mL DPPH çözeltisi pipetlenmiş ve küvetler birkaç kez ters-düz edildikten sonra karanlık bir yerde, oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. 15 dakika sonra küvetlerin 517 nm'deki absorbansı saf metanole karşı okunmuş, RSG değerleri aşağıdaki formülle hesaplanmıştır;

$$RSG = \left[1 - \frac{A_{\text{Ö:15}}}{A_{\text{K:15}}} \right] \times 100$$

A_{Ö:15}: Örneğin 15. dakikadaki absorbansı, A_{K:15}: Kontrolün 15. dakikadaki absorbansı

3.2.13.2. β-Karoten Bleaching Metoduyla Antioksidan Aktivite Ölçümü

Antioksidan aktivite ölçümü, [170]'e göre ve deney şartlarının gerektirdiği bazı değişiklikler yapılarak uygulanmıştır. 2 mg kristal Trans-beta-karoten, 10 mL kloroform içinde çözülerek stok beta-karoten çözeltisi hazırlanmıştır. 250 mL'lik yuvarlak tabanlı bir balona; 40 µL linoleik asit ve emülgatör olarak 500 µL tween-20 konularak üzerine beta-karoten çözeltisinden 1 mL eklenip ve hızla karıştırılarak balon içeriğinin homojen bir şekilde çözünmesi sağlanmıştır. Kloroform rotary evaporatörde 40 °C'de vakum

altında 5 dakika uzaklaştırılmış, balona 100 mL distile su, yavaşça konularak ve kuvvetlice çalkalanarak tam bir emülsiyon oluşması sağlanmıştır. Bu emülsiyon ışıktan ve havadan etkilenmeyeceği soğuk bir yerde kullanılıncaya kadar saklanmıştır. Deney tüplerine 10 µL yeni sentetik organoselenyum bileşikleri (Se I ve Se II) konularak etanolle 0.1 mL'ye tamamlanmış, kontrolde örnek yerine saf etanol kullanılmıştır. Her bir tüpe 4.9 mL β-karoten emülsiyonu konulup tüpler iyice çalkalanıp derhal 470 nm'de absorbans okunmuştur. Spektrofotometriyi sıfırlamak için β-karoten içermeyen emülsiyon kullanılmıştır (Bu amaçla başka bir balona yalnızca linoleik asit ve tween-20 konulmuş ve distile su eklenerek bir emülsiyon oluşturulmuştur). Daha sonra tüpler 50 °C'de su banyosuna konulmuş, 90 dakika boyunca her 10 dakikada bir ölçüm alınarak grafiğe geçirilmiştir.

3.2.13.3. İndirgeme Gücü Ölçümü

İndirgeme gücü ölçümünde [171]'un kullandığı yöntemler değiştirilerek uygulanmıştır. Cam tüplere 10, 25, 50 µL yeni sentetik organoselenyum bileşikleri (Se I ve Se II) konularak etanol ile 0.1 mL'ye tamamlanmış, kontrolde örnek yerine etanol kullanılmıştır. Her tüpe 2.5 mL 0.2 M fosfat tamponu (pH: 6.6) ve 2.5 mL % 1'lik potasyum ferri siyanür ilave edilerek karışım su banyosunda 50 °C'de 20 dk. inkübasyona bırakılmıştır. Su banyosundan alınan tüplerin üzerine 2.5 mL % 10'luk Trikloro asetik asit eklenip tüpler çalkalanmış daha sonra santrifüj cihazının tüplerine alınan örnekler, 4000 dev/dak'da 10 dk santrifüj işlemine tabii tutulmuştur. Santrifüj sonucu ayrılan serumdan 2.5 mL alınarak üzerine 2.5 mL distile su ve 0.5 mL % 0.1'lik FeCl₃.6H₂O çözeltisi ilave edilmiş renklenen çözeltinin 700 nm'deki absorbansı distile suya karşı okunmuştur.

3.2.14. İstatistiksel Analiz

Elde edilen verilerin istatistiksel hesaplamaları SPSS paket programı kullanılarak tek yönlü varyans analizinde Duncan's modeline göre yapılmıştır.

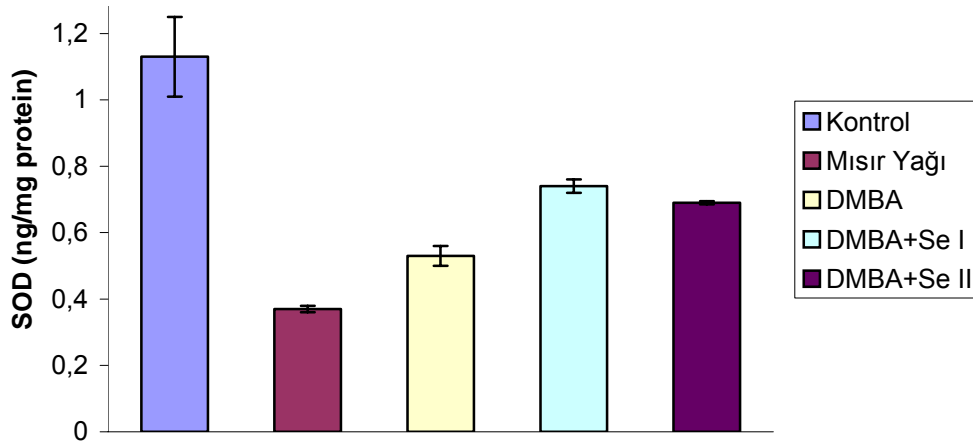
4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Çalışma Gruplarının Karaciğer Dokusunda Ölçülen Süperoksit Dismütaz (SOD) Aktiviteleri

Çalışılan karaciğer dokusunda SOD aktivitesi, kontrol grubuna göre DMBA grubunda istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalmıştır ($P>0.05$). DMBA+Se I ve DMBA+Se II gruplarında ise SOD aktivitesi DMBA grubuna göre anlamlı bir şekilde artmıştır ($P<0.05$). Bu artış ile DMBA+Se I ve DMBA+Se II gruplarındaki değerler kontrol grubu değerlerine yaklaşmıştır (Çizelge 4.1. ve Şekil 4.1.).

Çizelge 4.1. Grupların Karaciğer Dokusunda Ölçülen SOD Aktivitesi

GRUPLAR	SOD (ng/mg protein)
Kontrol	1.13±0.12 ^a
Mısır Yağı	0.37±0.01 ^d
DMBA	0.53±0.03 ^{cd}
DMBA+Se I	0.74±0.02 ^b
DMBA+Se II	0.69±0.005 ^{bc}
P	$P<0.05$



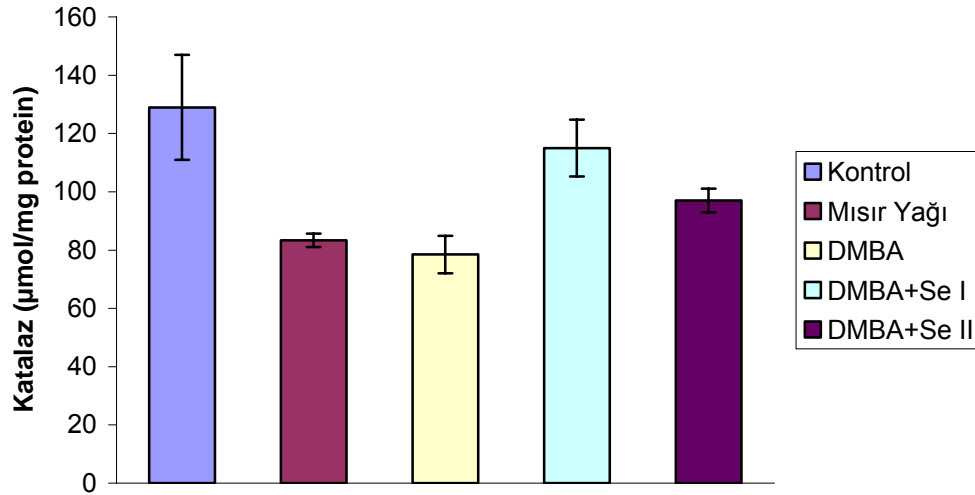
Şekil 4.1. Kontrol, mısır yağı, DMBA, DMBA+Se I ve DMBA+Se II grubu karaciğer SOD aktiviteleri

4.2. Çalışma Gruplarının Karaciğer Dokusunda Ölçülen Katalaz (CAT) Aktiviteleri

Çalışılan karaciğer dokusunda katalaz aktivitesi, kontrol grubuna göre DMBA grubunda istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalmıştır ($P>0.05$). DMBA+Se I ve DMBA+Se II gruplarında ise katalaz aktivitesi DMBA grubuna göre anlamlı bir şekilde artmıştır ($P<0.05$). Bu artış ile DMBA+Se I ve DMBA+Se II gruplarındaki değerler kontrol grubu değerlerine yaklaşmıştır (Çizelge 4.2. ve Şekil 4.2.).

Çizelge 4.2. Grupların Karaciğer Dokusunda Ölçülen CAT Aktivitesi

GRUPLAR	CAT ($\mu\text{mol}/\text{mgprotein}$)
Kontrol	129.00 \pm 18 ^a
Mısır Yağı	83.33 \pm 2.29 ^{bc}
DMBA	78.48 \pm 6.43 ^c
DMBA+Se I	115.00 \pm 9.72 ^{ab}
DMBA+Se II	96.98 \pm 4.08 ^{ab}
P	$P<0.05$



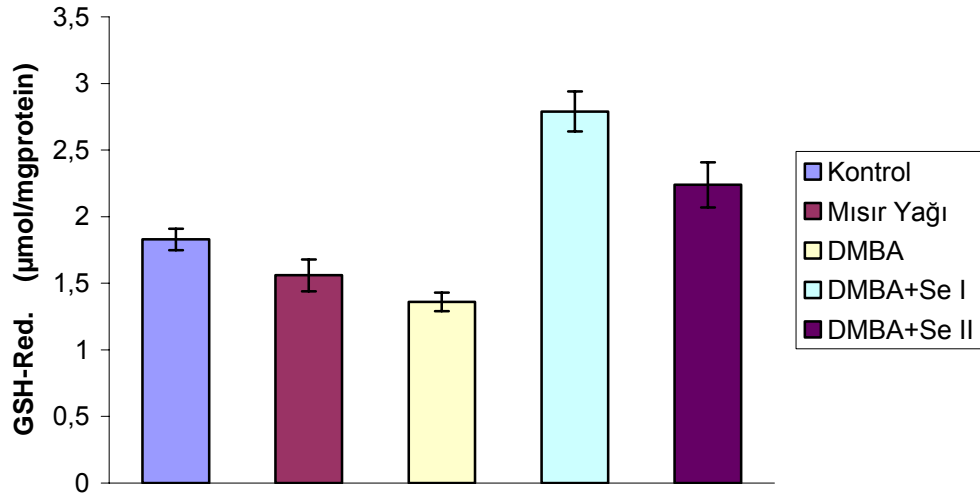
Şekil 4.2. Kontrol, mısır yağı, DMBA, DMBA+Se I ve DMBA+Se II grubu karaciğer CAT aktiviteleri

4.3. Çalışma Gruplarının Karaciğer Dokusunda Ölçülen Glutasyon Redüktaz (GR) Aktiviteleri

Çalışılan karaciğer dokusunda glutasyon redüktaz aktivitesi, kontrol grubuna göre DMBA grubunda istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalmıştır ($P>0.05$). DMBA+Se I ve DMBA+Se II gruplarında ise glutasyon redüktaz aktivitesi kontrol ve DMBA grubuna göre anlamlı bir şekilde artmıştır ($P<0.05$) (Çizelge 4.3. ve Şekil 4.3.).

Çizelge 4.3. Grupların Karaciğer Dokusunda Ölçülen GR Aktivitesi

GRUPLAR	GR ($\mu\text{mol}/\text{mgprotein}$)
Kontrol	1.83 ± 0.08^c
Mısır Yağı	1.56 ± 0.12^{cd}
DMBA	1.36 ± 0.07^d
DMBA+Se I	2.79 ± 0.15^a
DMBA+Se II	2.24 ± 0.17^b
P	$P<0.05$



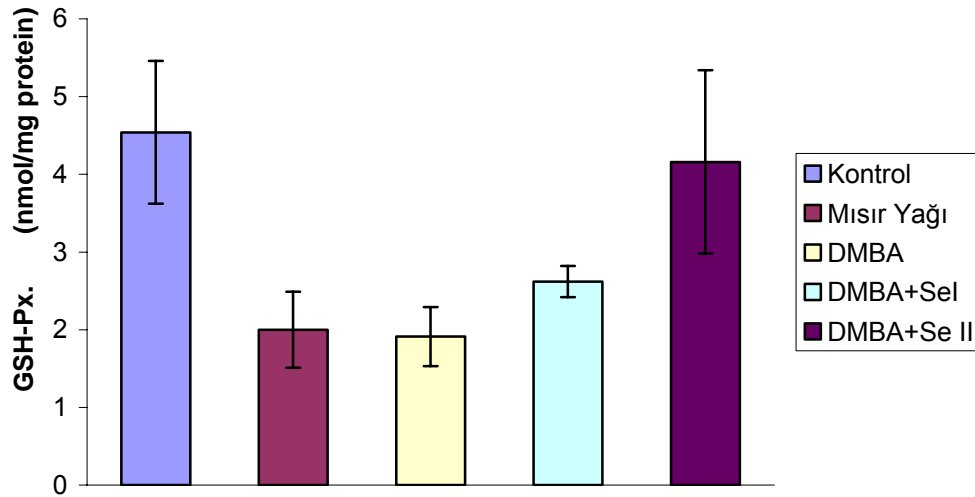
Şekil 4.3. Kontrol, mısır yağı, DMBA, DMBA+Se I ve DMBA+Se II grubu karaciğer GR aktiviteleri

4.4. Çalışma Gruplarının Karaciğer Dokusunda Ölçülen Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Aktiviteleri

Çalışılan karaciğer dokusunda glutasyon peroksidaz aktivitesi, kontrol grubuna göre DMBA grubunda istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalmıştır ($P>0.05$). DMBA+Se I ve DMBA+Se II gruplarında ise glutasyon peroksidaz aktivitesi DMBA grubuna göre anlamlı bir şekilde artmıştır ($P<0.05$). Bu artış ile DMBA+Se I ve DMBA+Se II gruplarındaki değerler kontrol grubu değerlerine yaklaşmıştır (Çizelge 4.4. ve Şekil 4.4.).

Çizelge 4.4. Grupların Karaciğer Dokusunda Ölçülen GSH-Px Aktivitesi

GRUPLAR	GSH-Px (nmol/mg protein)
Kontrol	4.54±0.92 ^a
Mısır Yağı	2.00±0.49 ^b
DMBA	1.91±0.38 ^b
DMBA+Se I	2.62±0.20 ^{ab}
DMBA+Se II	4.16±1.18 ^{ab}
P	$P<0.05$



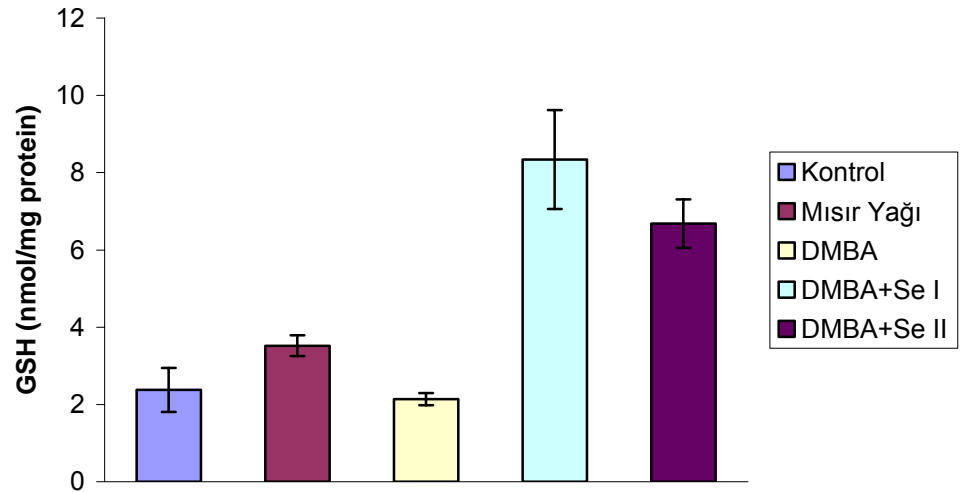
Şekil 4.4. Kontrol, mısır yağı, DMBA, DMBA+Se I ve DMBA+Se II grubu karaciğer GSH-Px aktiviteleri

4.5. Çalışma Gruplarının Karaciğer Dokusunda Ölçülen Total GSH Düzeyleri

Çalışılan karaciğer dokusu GSH seviyesinde, kontrol grubuna göre DMBA grubunda meydana gelen azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($P>0.05$). DMBA+Se I ve DMBA+Se II gruplarında ise GSH seviyesi kontrol ve DMBA grubuna göre anlamlı bir şekilde artmıştır ($P<0.05$) (Çizelge 4.5.ve Şekil 4.5.).

Çizelge 4.5. Grupların Karaciğer Dokusunda Ölçülen Total GSH Düzeyleri

GRUPLAR	GSH (nmol/mg protein)
Kontrol	2.38±0.57 ^b
Mısır Yağı	3.52±0.27 ^b
DMBA	2.14±0.16 ^b
DMBA+Se I	8.34±1.28 ^a
DMBA+Se II	6.68±0.63 ^a
P	$P<0.05$



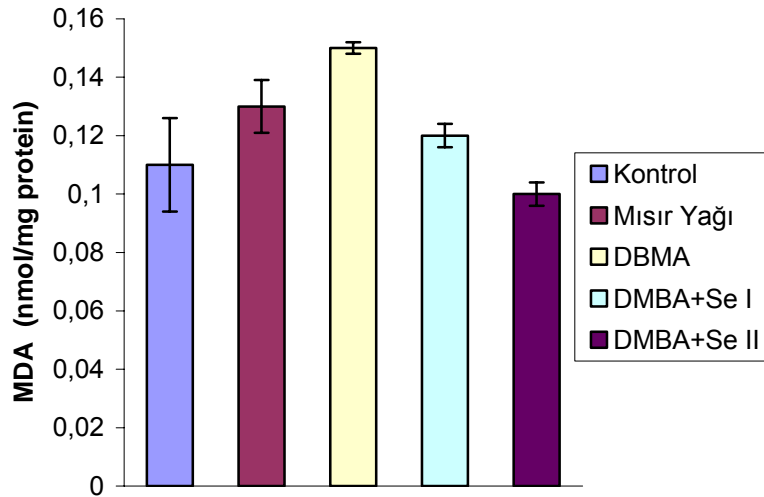
Şekil 4.5. Kontrol, mısır yağı, DMBA, DMBA+Se I ve DMBA+Se II grubu karaciğer total GSH düzeyleri

4.6. Çalışma Gruplarının Karaciğer Dokusunda Ölçülen Malondialdehit (MDA) Düzeyleri

Çalışılan karaciğer dokusunda MDA seviyesi kontrole göre DMBA grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmıştır ($P<0.05$). DMBA+Se I ve DMBA+Se II gruplarında ise MDA seviyesi DMBA grubuna göre anlamlı bir şekilde azalmıştır ($P<0.05$). Bu azalma ile DMBA+Se I ve DMBA+Se II gruplarındaki değerler kontrol grubu değerlerine yaklaşmıştır (Çizelge 4.6. ve Şekil 4.6.).

Çizelge 4.6. Grupların Karaciğer Dokusunda Ölçülen MDA Düzeyleri

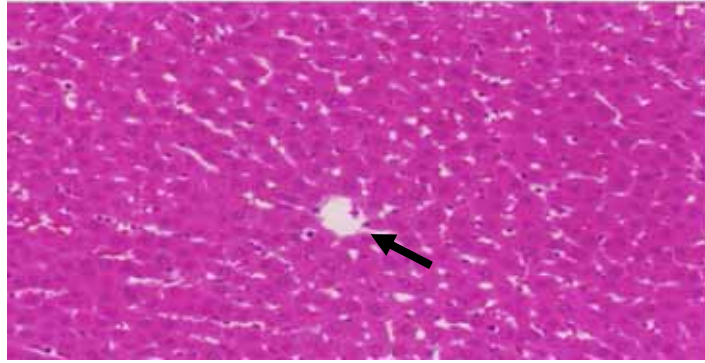
GRUPLAR	MDA (nmol/mg protein)
Kontrol	0.11 ± 0.016^b
Mısır Yağı	0.13 ± 0.009^{ab}
DMBA	0.15 ± 0.002^a
DMBA+Se I	0.12 ± 0.004^{ab}
DMBA+Se II	0.10 ± 0.004^b
P	$P<0.05$



Şekil 4.6. Kontrol, mısır yağı, DMBA, DMBA+Se I ve DMBA+Se II grubu karaciğer MDA düzeyleri

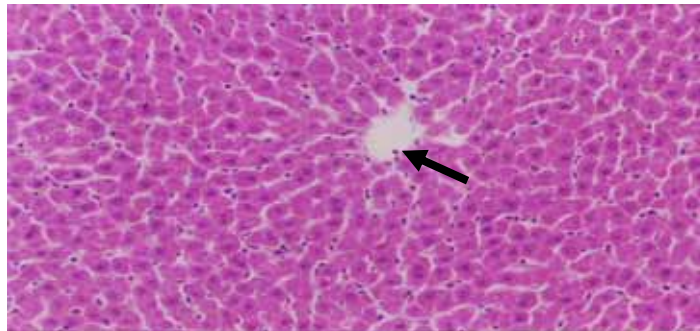
4.7. Çalışma Gruplarının Karaciğer Dokularının Histopatolojik Sonuçları

Hematoksilen-Eosin (HE) ile boyanan kontrol grubu karaciğer doku kesitleri incelendiğinde, eozinofilik boyanmış poligonal şekilli hepatositlerin genellikle tek, yer yer ökromatik nükleus içerdiği, santral ven (ok) çevresinde ışınsal tarzda düzenlenerek hepatosit kordonları oluşturduğu gözlemlendi. Bu hepatosit kordonları arasında sinuzoidler mevcuttu. Portal alanlarda bağ dokusu ile çevrelenmiş genellikle birer adet arter, ven ve safra kanalı kesitleri görüldü. Genel histolojik görünüm normal karaciğer histolojisi ile uyumlu idi (Şekil 4.7.).



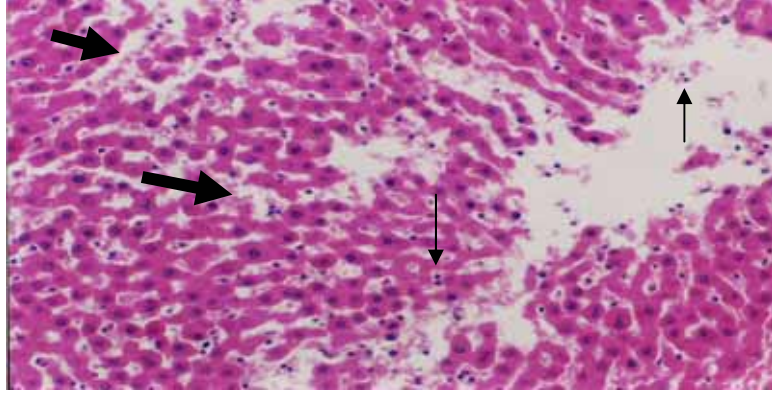
Şekil 4.7. Kontrol grubu karaciğer dokusunun histopatolojik görünümü; normal hepatositler (H-E x 20)

Mısır yağı uygulama grubuna ait karaciğer doku kesitlerinde, hepatositler poligonal şekilli, tek ve çift ökromatik nükleus içeren, eozinofilik boyanmış normal görünümde izlendi. Hepatosit kordonları ve sinuzoidler vena sentralis (ok) çevresinde ışınsal tarzda düzenlenmişti. Genel görünüm klasik karaciğer lobülünü temsil etmekte idi (Şekil 4.8.).

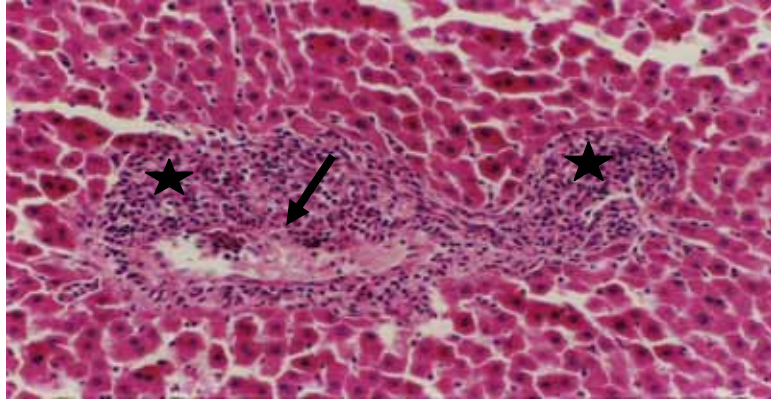


Şekil 4.8. Mısır yağı uygulama grubuna ait karaciğer doku kesitlerinde normal histopatolojik görünüm (H-E x 20)

DMBA uygulama grubuna ait deneklerin karaciğer doku kesitleri incelendiğinde, karaciğer parankimasında geniş alanlar tarzında hepatosit dejenerasyonu (kalın ok) ve sinuzoidlerde dilatasyon saptandı. Parankima içinde seyrek olarak lenfositler izlendi (ince ok) (Şekil 4.9.). Portal alanlarda yoğun lenfosit infiltrasyonunun (yıldız) olduğu ve portal alandaki normal damar ve kanal yapılarının yer yer bozulduğu (ok) gözlemlendi (Şekil 4.10.).



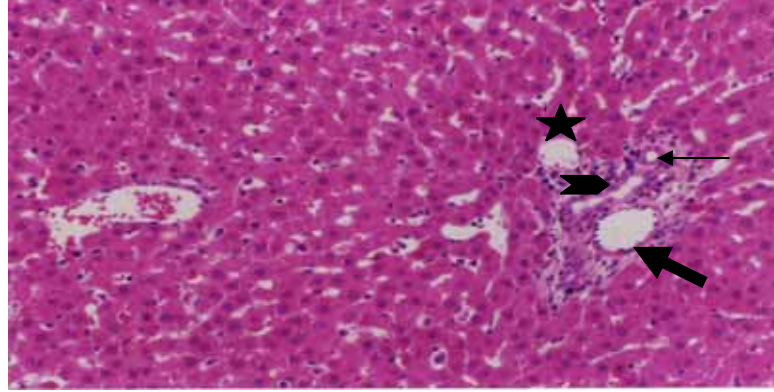
Şekil 4.9. DMBA grubu karaciğer doku kesitlerinde hepatosit dejenerasyonu ve sinuzoidlerde dilatasyon ile parankimada yer alan lenfositler (H-E x 20)



Şekil 4.10. DMBA grubu karaciğer doku kesitlerinde portal alanlarda yoğun lenfosit infiltrasyonu ile damar ve kanal yapılarında bozulmalar (H-E x 20)

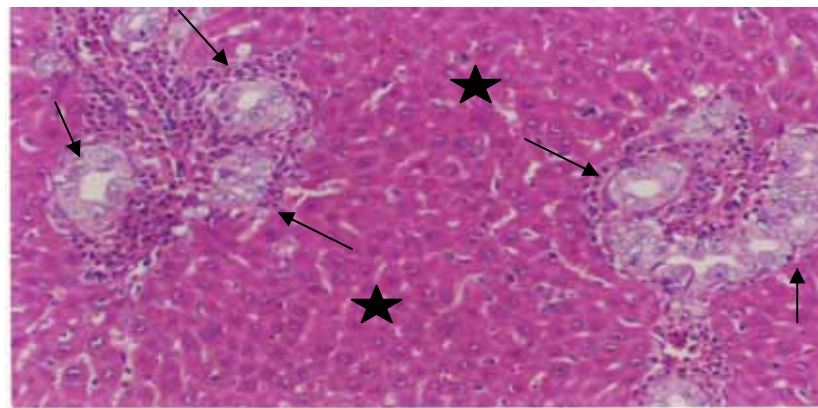
DMBA+Se I bileşiği uygulama grubuna ait karaciğer kesitleri incelendiğinde, hepatositlerin normal morfolojide oldukları görüldü. Parankimal yapının ve portal alanların normal histolojik yapıda kontrol grubundakine benzer şekilde birer arter (ince

ok), ven (kalın ok), safra kanalı (ok başı) ve lenf damarı (yıldız) içerdiği saptandı (Şekil 4.11.).



Şekil 4.11. DMBA+Se I bileşiği uygulama grubuna ait karaciğer doku kesitlerinde normal histolojik yapıda birer arter, ven, safra kanalı ve lenf damarları (H-E x 20)

DMBA+Se II bileşiği uygulama grubundaki karaciğer kesitlerinde ise, poligonal şekilli, yuvarlak ökromatik nükleuslu, eozinofilik boyanmış hepatositler normal histolojik görünüm sergilemekteydi. Hepatosit kordonlarının dizilimi ve aralarındaki sinuzoidal yapılar ışınal tarzda olup, normal karaciğer parankiması özelliklerini temsil etmekteydi (yıldız). Ancak portal alanlardaki yoğun safra kanalı proliferasyonu ve yer yer bu portal alanlardaki hafif lenfosit infiltrasyonu dikkati çaktı (ok) (Şekil 4.12.).



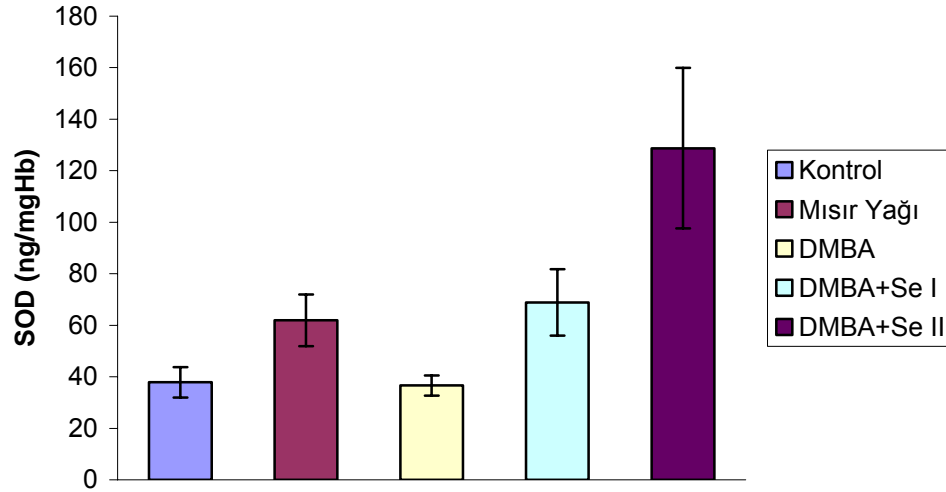
Şekil 4.12. DMBA+Se II bileşiği uygulama grubundaki karaciğer doku kesitlerinde normal karaciğer parankiması ve portal alanlarda safra kanalı proliferasyonu ile hafif lenfosit infiltrasyonu (H-E x 20)

4.8. Çalışma Gruplarının Kan Dokusunda Ölçülen Süperoksit Dismütaz (SOD) Aktiviteleri

Eritrosit SOD aktivitesinde, kontrol grubuna göre DMBA grubunda meydana gelen azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($P>0.05$). DMBA+Se I ve DMBA+Se II gruplarında ise SOD aktivitesi kontrol ve DMBA grubuna göre anlamlı bir şekilde artmıştır ($P<0.05$) (Çizelge 4.7. ve Şekil 4.13.).

Çizelge 4.7. Grupların Eritrositlerinde Ölçülen SOD Aktivitesi

GRUPLAR	SOD (ng/mgHb)
Kontrol	37.85±5.86 ^c
Mısır Yağı	61.92±10.05 ^b
DMBA	36.62±3.95 ^c
DMBA+Se I	68.87±12.87 ^b
DMBA+Se II	128.75±31.19 ^a
P	$P<0.05$



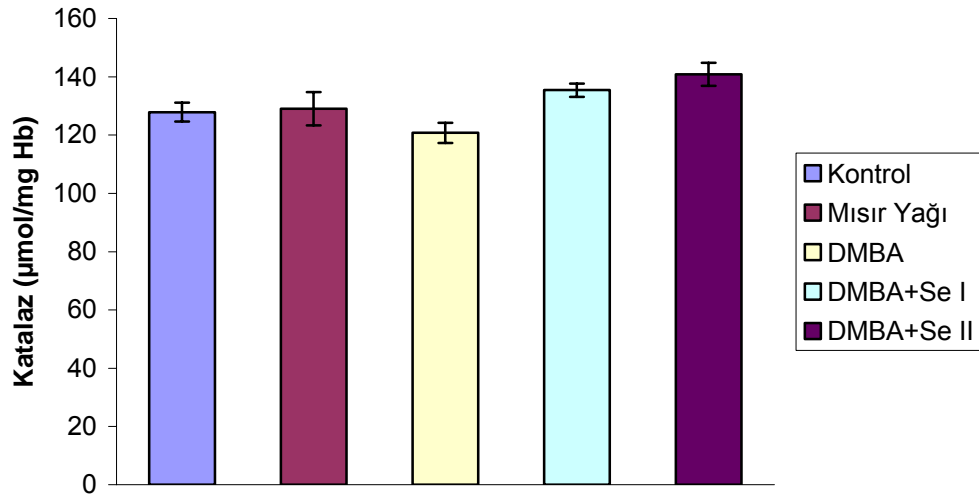
Şekil 4.13. Kontrol, mısır yağı, DMBA, DMBA+Se I ve DMBA+Se II grubu eritrosit SOD aktiviteleri

4.9. Çalışma Gruplarının Kan Dokusunda Ölçülen Katalaz (CAT) Aktiviteleri

Eritrosit katalaz aktivitesinde kontrol grubuna göre DMBA grubunda meydana gelen azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($P<0.05$). DMBA+Se I ve DMBA+Se II gruplarında ise katalaz aktivitesi kontrol ve DMBA grubuna göre anlamlı bir şekilde artmıştır ($P<0.05$) (Çizelge 4.8. ve Şekil 4.14.).

Çizelge 4.8. Grupların Eritrositlerinde Ölçülen CAT Aktivitesi

GRUPLAR	CAT ($\mu\text{mol}/\text{mg Hb}$)
Kontrol	127.87 \pm 3.25 ^{ab}
Mısır Yağı	129.02 \pm 5.74 ^{ab}
DMBA	120.78 \pm 3.47 ^b
DMBA+Se I	135.43 \pm 2.27 ^a
DMBA+Se II	140.80 \pm 3.97 ^a
P	$P<0.05$



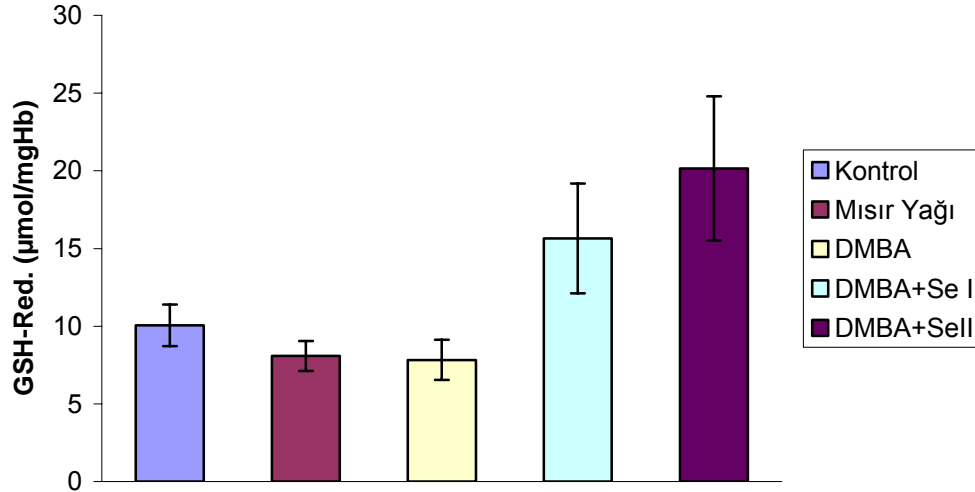
Şekil 4.14. Kontrol, mısır yağı, DMBA, DMBA+Se I ve DMBA+Se II grubu eritrosit CAT aktiviteleri

4.10. Çalışma Gruplarının Kan Dokusunda Ölçülen Glutasyon Redüktaz (GR) Aktiviteleri

Eritrosit glutasyon redüktaz aktivitesinde, kontrol grubuna göre DMBA grubunda meydana gelen azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($P<0.05$). DMBA+Se I ve DMBA+Se II gruplarında ise glutasyon redüktaz aktivitesi, kontrol ve DMBA grubuna göre anlamlı bir şekilde artmıştır ($P<0,05$) (Çizelge 4.9. ve Şekil 4.15.).

Çizelge 4.9. Grupların Eritrositlerinde Ölçülen GR Aktivitesi

GRUPLAR	GR ($\mu\text{mol}/\text{mgHb}$)
Kontrol	10.05 ± 1.34^{bc}
Mısır Yağı	8.09 ± 0.96^c
DMBA	7.83 ± 1.29^c
DMBA+Se I	15.66 ± 3.53^{ab}
DMBA+Se II	20.16 ± 4.64^a
P	$P<0.05$



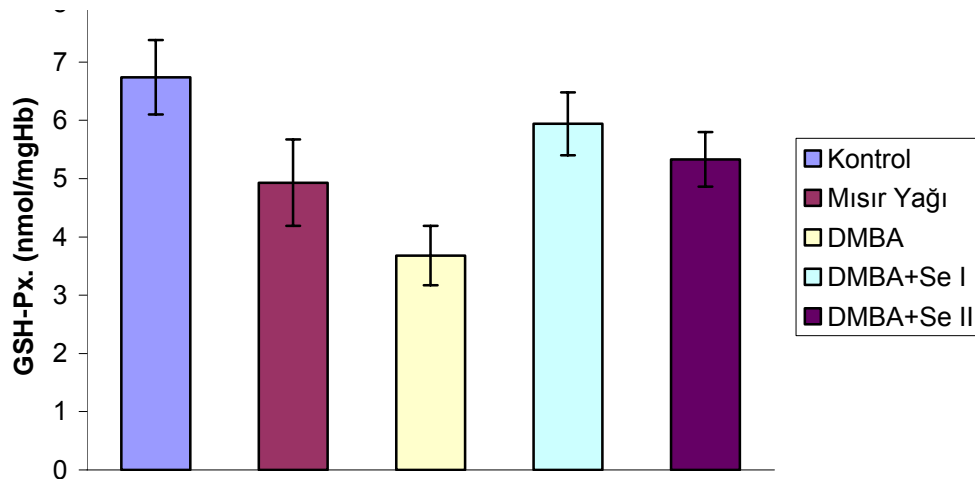
Şekil 4.15. Kontrol, mısır yağı, DMBA, DMBA+Se I ve DMBA+Se II grubu eritrosit GR aktiviteleri

4.11. Çalışma Gruplarının Kan Dokusunda Ölçülen Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Aktiviteleri

Eritrosit glutasyon peroksidaz aktivitesinde, kontrol grubuna göre DMBA grubunda meydana gelen azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($P<0.05$). DMBA+Se I ve DMBA+Se II gruplarında ise glutasyon peroksidaz aktivitesi DMBA grubuna göre anlamlı bir şekilde artmıştır ($P<0.05$). Bu artış ile DMBA+Se I ve DMBA+Se II gruplarındaki değerler kontrol grubu değerlerine yaklaşmıştır (Çizelge 4.10. ve Şekil 4.16.).

Çizelge 4.10. Grupların Eritrositlerinde Ölçülen GSH-Px Aktivitesi

GRUPLAR	GSH-Px (nmol/mgHb)
Kontrol	6.74±0.64 ^a
Mısır Yağı	4.93±0.74 ^{bc}
DMBA	3.68±0.51 ^c
DMBA+Se I	5.94±0.54 ^{ab}
DMBA+Se II	5.33±0.47 ^{ab}
P	$P<0,05$



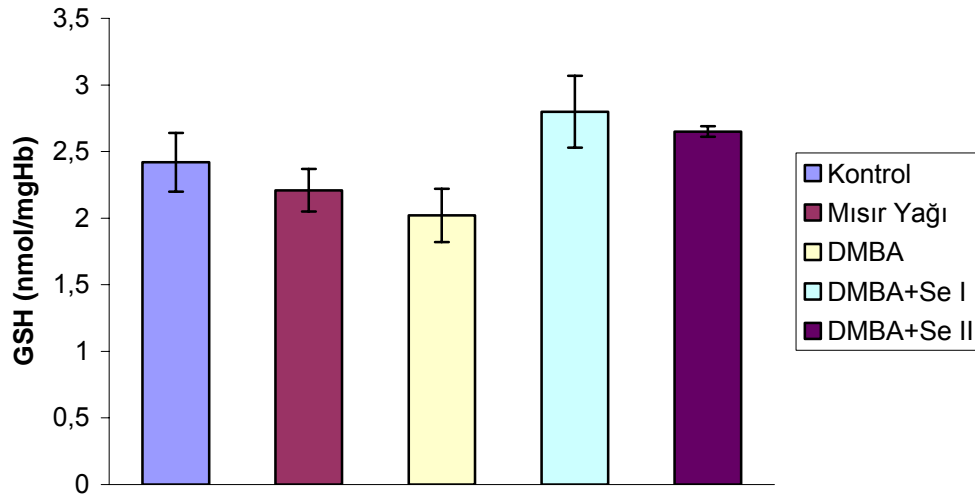
Şekil 4.16. Kontrol, mısır yağı, DMBA, DMBA+Se I ve DMBA+Se II grubu eritrosit GSH-Px aktiviteleri

4.12. Çalışma Gruplarının Kan Dokusunda Ölçülen Total GSH Düzeyleri

Eritrosit GSH seviyesinde, kontrol grubuna göre DMBA grubunda meydana gelen azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($P<0.05$). DMBA+Se I ve DMBA+Se II gruplarında ise GSH seviyesi DMBA grubuna göre anlamlı bir şekilde artmıştır ($P<0.05$). Kontrol grubuna göre ise DMBA+Se I grubunda meydana gelen artış anlamlı bulunurken ($P<0,05$) DMBA+Se II grubunda meydana gelen artış anlamlı bulunmamıştır ($P>0.05$) (Çizelge 4.11. ve Şekil 4.17.).

Çizelge 4.11. Grupların Eritrositlerinde Ölçülen Total GSH Düzeyleri

GRUPLAR	GSH (nmol/mgHb)
Kontrol	2.42±0.22 ^{ab}
Mısır Yağı	2.21±0.16 ^{ab}
DMBA	2.02±0.20 ^b
DMBA+Se I	2.80±0.27 ^a
DMBA+Se II	2.65±0.04 ^{ab}
P	$P<0,05$



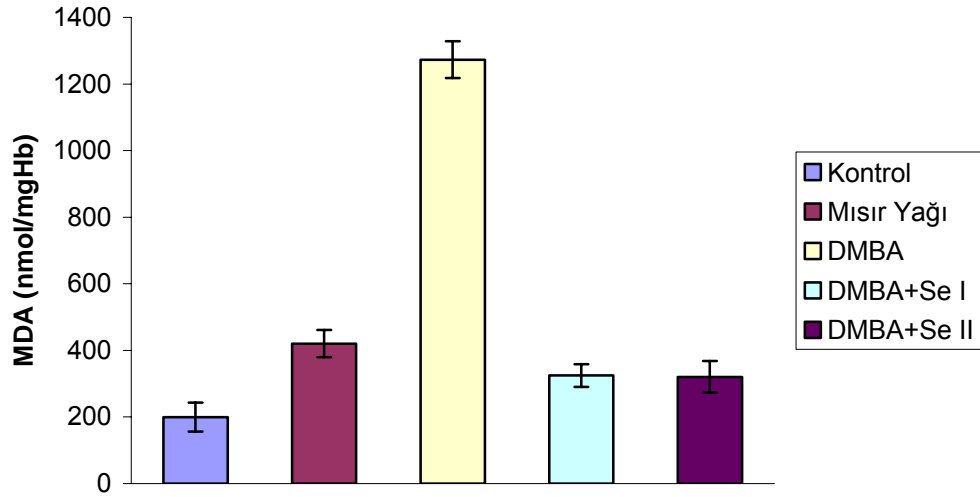
Şekil 4.17. Kontrol, mısır yağı, DMBA, DMBA+Se I ve DMBA+Se II grubu eritrosit total GSH düzeyleri

4.13. Çalışma Gruplarının Kan Dokusunda Ölçülen Malondialdehit (MDA) Düzeyleri

Eritrosit MDA seviyesi kontrole göre DMBA grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmıştır ($P<0.05$). DMBA+Se I ve DMBA+Se II gruplarında ise MDA seviyesi DMBA grubuna göre anlamlı bir şekilde azalmıştır ($P<0.05$). Bu azalma ile DMBA+Se I ve DMBA+Se II gruplarındaki değerler kontrol grubu değerlerine yaklaşmıştır (Çizelge 4.12. ve Şekil 4.18.).

Çizelge 4.12. Grupların Eritrositlerinde Ölçülen MDA Düzeyleri

GRUPLAR	MDA (nmol/mgHb)
Kontrol	199.60±43.16 ^c
Mısır Yağı	420.25±40.98 ^b
DMBA	1273.14±55.63 ^a
DMBA+Se I	324.65±34.18 ^{bc}
DMBA+Se II	320.07±47.79 ^{bc}
P	P<0,05

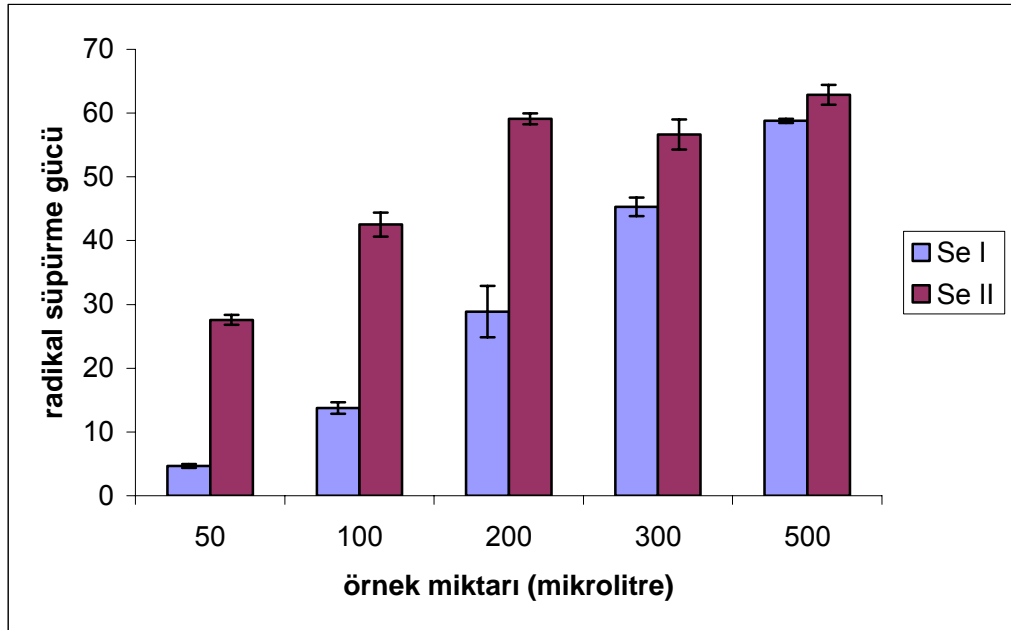


Şekil 4.18. Kontrol, mısır yağı, DMBA, DMBA+Se I ve DMBA+Se II grubu eritrosit MDA düzeyleri

4.14. Yeni Sentetik Organoselenyum Bileşikleri (Se I ve Se II)' nin *In Vitro* Özelliklerinin Sonuçları

4.14.1. Radikal Süpürme Gücü (RSG) Düzeyi

DPPH sentetik radikali *in vitro* antiradikal aktivite ölçümlerinde sıklıkla kullanılan sentetik bir radikaldir. Bu bileşiğin etanol veya metanol çözeltilisinin 517 nm'de sahip olduğu menekşe-mor renk, ortamdaki H⁺ donörlerinin konsantrasyonu ve gücü oranında kaybolmaktadır. Bu renk kaybı spektrofotometrik olarak ölçülerek antiradikal aktivite belirlenmektedir. Bu ölçümler sonucunda, renk kaybının Se I bileşiğine göre Se II bileşiğinde daha yüksek olduğu ve Se II bileşiğinin Se I bileşiğine göre daha fazla antiradikal güce sahip olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.19.).

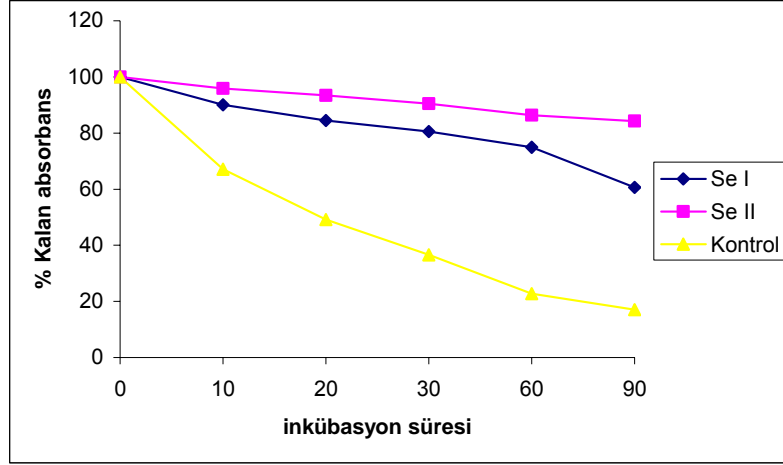


Şekil 4.19. Se I ve Se II bileşiklerinin antiradikal aktiviteleri

4.14.2. β -Karoten Bleaching Metoduyla Antioksidan Aktiviteleri

β -karoten bleaching (beyazlatma) metodunda ortamda oluşturulan "*in vitro*" lipit peroksidasyonunu test bileşiklerimizin engelleme kapasiteleri belirlenmiştir. β -karoten'in 470 nm'de ölçülebilen karakteristik renginin muhafazası ile antilipit peroksidatif etki arasında lineer bir ilişki vardır. Bu temele dayanarak Se I'in relatif

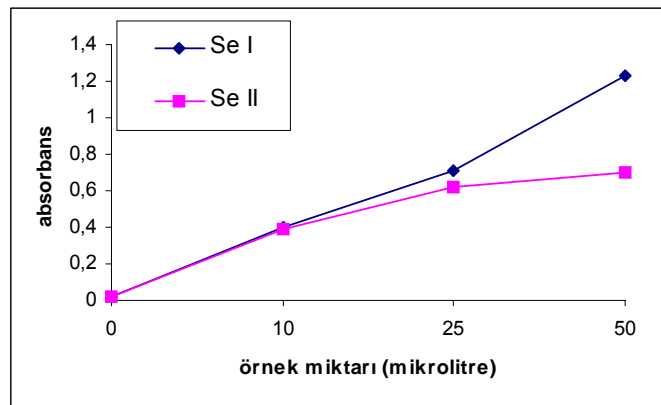
olarak Se II'den daha yüksek anti-lipit peroksidatif etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.20.).



Şekil 4.20. Se I ve Se II bileşiklerinin antilipit peroksidatif etkileri

4.14.3. İndirgeme Gücü Düzeyi

İndirgeme gücü örneklerin H^+ veya elektron verme yetenekleriyle ilgili bir özelliktir ve antioksidan aktivite ile bağlantılı bir parametredir. Deney sonuçlarına göre 10 μ l hacimde organoselenyum bileşikleri (Se I ve Se II) arasında herhangi bir fark görülmezken, artan konsantrasyonlarda (25, 50 μ l) Se I'in daha yüksek indirgeme gücü gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.21.).



Şekil 4.21. Se I ve Se II bileşiklerinin indirgeme gücü düzeyleri

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Çevresel toksik ajanlar tarafından indüklenen oksidatif stres ve organizmaya karşı zararlı etkilerinin oluşumu ROT ile meydana gelmektedir. ROT membran lipitleri, proteinler, nükleik asitler ve karbonhidratları etkileyerek birçok doku ve molekülde oksidatif hasara yol açmaktadır. Oluşturulan bu hasarlar hücrel antioksidan savunma sistemi tarafından kontrol edilmektedir. Hava ve çevre kirliliğine yol açan çevresel toksik ajanların zararlı etkilerinin çoğu, memeli organizmalarda biyotransformasyonları esnasında oluşan reaktif ürünlerden kaynaklanmaktadır.

Serbest radikal kökenli hasar, çoğu patolojik ve toksikolojik olayda önemli bir faktördür. Bazı kimyasal maddeler serbest radikal oluşumuna yol açmaktadır ve bu kimyasallardan biri olan DMBA gibi mutajenlerin metabolize olmasıyla üretilen oksidatif ürünler, membranların lipit ve proteinlerinde hasarlar oluşturarak, yaşamsal hücre fonksiyonlarının bozulmasına da yol açmaktadırlar [3].

DMBA ile indüklemeye bir cevap olarak tümör oluşumunun temelinde yine, reaktif oksijen türlerinin saldırısı ve oksidatif stres yatmaktadır [14, 16, 21-23].

DMBA gibi PAH'ların serbest radikal oluşturduğu ve bu bileşiklerin karsinogenezi de ciddi bir rol oynadığı gösterilmiştir. Bu rol, DNA'da zincir kırılmaları ve lipit peroksidasyonuna yol açan hücrel oksidatif hasarı içeren peroksitler, hidroksil radikalleri ve süperoksit anyon radikali gibi reaktif oksijen türlerinin üretilmesi ile birlikte olmaktadır [3, 5, 15, 16].

Canlı organizmalarda toksik ürünleri ve metabolitleri tutan ve inaktif hale getiren koruyucu savunma sistemleri yer almaktadır. Bu sistemler sayesinde hücre ve dokularda bu metabolitlerin birikimi ve dolayısıyla toksik etkileri de engellenebilmektedir.

Çevresel ve hücrel faktörlerin etkisiyle oluşturulan reaktif oksijen türlerinin detoksifiye edilmesinde, ekzojen olarak alınan ya da fizyolojik olarak yapılan antioksidanlar görev almaktadır. Bütün aerobik hücreler, oksidanların oluşturduğu hasara karşı hücreleri korumak için çok sayıda detoksifikasyon ve tamir mekanizmaları geliştirmiştir [27]. Antioksidan savunma sistemi adı verilen savunma sistemi, fizyolojik veya çevresel olarak meydana getirilen serbest oksijen radikallerini ortadan kaldırmaktadır.

Antioksidan savunma sistemi, SOD, CAT, GSH-Px ve GR gibi antioksidan enzimler ile glutasyon ve bazı eser elementleri kapsayan enzim olmayan antioksidanları içermektedir [30, 37, 59, 60] .

Vücudu savunan sistemler toksik oksidatif hasarlardan hücreleri korumada ve reaktif oksijen radikallerini temizlemede etkili olmasına rağmen, bu sistemler sık sık yetersiz olabilmektedirler. Bu durumda defektif antioksidan sistemler, ilaç toksisitesi ve karsinogenlere karşı hassasiyeti arttırmaktadır. Böylece besinsel antioksidan bileşikler veya mikrobeseinler gibi uygun bütünleyiciler, ROT ile indüklenmiş hücresel hasarlara karşı korunmada gerekli olabilmektedir [3].

Besinlerle vücuda alınan bazı mineraller, normal oksijen metabolizması boyunca üretilen serbest radikallerin etkilerine karşı hücreleri koruyan antioksidan enzimlerin önemli bir parçasıdır. Vücut, bazı kronik hastalıkların gelişimine katkıda bulunan ve hücre hasarına yol açabilen serbest radikallerin seviyelerini kontrol edebilmek için böyle antioksidan savunmalar geliştirmektedir. Temel eser bir element olan selenyum da, immün sistemin normal fonksiyonunda ve antioksidan mekanizmada görev yapan enzimlerin bir parçası olarak, savunma sisteminde yer almaktadır [4].

Günlük olarak tüketilen besinlerde, doğal olarak bulunan ajanların ve optimal diyetlerin araştırılması, kanser gelişiminin önlenmesinde ve kontrolünde çığır açıcı yaklaşımlar sağlamaktadır. İnsanlar için yapılan klinik uygulamalarda, mikrobesein selenyumun kullanımı sınırlıdır, fakat bu araştırmalar selenyumun önemli ajanlar arasında yer aldığını ve biyolojik sistemlerde çok sayıda fonksiyonları olduğunu göstermektedir [5].

Bu çalışmada, erişkin dişi Wistar cinsi sıçanlara uygulanan DMBA ve yeni sentezlenmiş organoselenyum bileşikleri (Se I ve Se II)'nin sıçan karaciğer dokusu ve eritrositlerinde SOD, CAT, GR ve GSH-Px aktiviteleri ile MDA seviyeleri ve GSH miktarında meydana gelen değişimlerin ve karaciğer dokusu histolojik preparatların gözlenmesi sonucu, sıçanlarda organoselenyum bileşiklerinin, DMBA tarafından oluşturulan oksidatif zararı önleme yetenekleri dikkat çekmiştir.

Karaciğer dokusunda DMBA uygulanması sonucu, SOD, CAT, GR ve GSH-Px aktiviteleri, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalmıştır ($P>0.05$).

Karaciğer dokusu DMBA grubu GSH seviyesinde, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmayan azalmalar meydana gelmiştir ($P>0.05$). DMBA'nın antioksidan sistem üzerindeki olumsuz etkileri GSH miktarını azaltması ile de kendini

göstermektedir. DMBA'nın, hücrelerin metabolizmaları esnasında, oksidatif stresi arttıran, DNA ile reaksiyon veren kimyasallar ürettiği bilinmektedir. Bunun yanısıra, DMBA gibi mutajenlerin metabolizmasından kaynaklanan oksidatif ürünler olan ve DNA'ya bağlanan kimyasalların oluşumu, proteinlere ve lipit membranlara zarar vererek canlı hücre fonksiyonlarını sekteye uğrattığı bilinmektedir. Bizim çalışmalarımızda gözlediğimiz, antioksidan enzim aktivitelerinde meydana gelen azalmaların, DMBA'nın oksidatif stresi indükleyici ve doku hasarlarına yol açacak oksidatif ajanlar oluşturmasından kaynaklanabileceği fikrini akla getirmektedir [25, 26].

DMBA+Se I ve DMBA+Se II gruplarında ise SOD, CAT, GR ve GSH-Px aktiviteleri DMBA grubuna göre anlamlı bir şekilde artmıştır ($P<0.05$). DMBA+Se I ve DMBA+Se II gruplarında, GSH düzeyi kontrol ve DMBA grubuna göre anlamlı bir şekilde artmıştır ($P<0.05$). Meydana gelen bu artışlar ile sentetik organoselenyum bileşiklerinin antioksidan sistem üzerinde olumlu etkiler yapabildiği öngörülmektedir. Antioksidan sistem üzerine sentetik organoselenyum bileşiklerinin, inorganik ve organik selenyum bileşiklerinin gösterdiği etkilere benzer bir şekilde, *in vivo* olarak, hedef organda, DMBA-DNA birleşimini engelleyerek, karsinogenezin başlangıç safhasını engellediği ve dokularda oluşacak oksidatif hasarlara karşı kimyasal koruyucu etkiler gösterdiği bir çok laboratuvarlarda hayvan çalışmalarında gösterilmiştir [6].

Laboratuvarlarımızda sentezlenmiş olan organoselenyum bileşikleri (Se I ve Se II)'nin antioksidan enzim aktivitelerinde ve total GSH miktarlarında artışlara yol açarak antioksidan sistem üzerinde koruyucu etkiler gösterdiği çalışmalarımız sonucunda gözlenmiştir. Bu çalışmada sıçan karaciğerinde DMBA'nın oluşturduğu toksisiteye karşı laboratuvarımızda yeni sentezlenen organoselenyum bileşikleri (Se I ve Se II)'nin literatürde de yer aldığı gibi koruyucu etkilerinin bulunduğu araştırmalar sonucu saptanmıştır. Yaşamın uzaması ve hastalıkları önlemede, inorganik ve organik selenyum bileşiklerinin gösterdiği kimyasal koruyucu etkilere benzer etkiler gösteren, laboratuvarlarda hayvan çalışmalarında karsinogenezis üzerine çalışılmış benziltiyosiyanat, benzilselenosiyanat, metoksifenol, metoksibenzenselenol gibi önemli sentetik organoselenyum bileşikleri de mevcuttur [6].

Karaciğer dokusu MDA seviyesinde kontrole göre DMBA grubunda istatistiksel olarak anlamlı olarak artışlar gözlenmiştir ($P<0.05$). DMBA uygulaması sonucu dokularda oluşan oksidatif hasarların ve lipit peroksidasyonunun bir göstergesi olarak MDA düzeylerinde artışlar meydana gelmiştir. DMBA ile indüklenen sıçan karaciğer

dokusunda hasarlarda, genotoksisite de ve oksidatif stres ile birlikte lipit peroksidasyon düzeylerinde artış ve genetik hasarların olduğu bir çok çalışmada da gözlenmektedir [25, 26]. Se I ve Se II bileşiklerinin uygulandığı gruplarda karaciğer dokusu MDA seviyesi, DMBA grubuna göre anlamlı bir şekilde azalmıştır ($P<0.05$). Bu azalma ile Se I ve Se II gruplarındaki değerler kontrol grubu değerlerine yaklaşmıştır. Organoselenyum bileşiklerinin oksidatif stres sonucu oluşan doku hasarlarının giderilmesinde antioksidan bir ajan olarak fonksiyon gösterdiği çalışmalarımız sonucu elde edilen bulgularla da saptanmıştır. Sentetik organoselenyum bileşiklerinin oksidatif stresten dolayı gerçekleşen doku hasarlarının *in vivo* modellerde farmakolojik antioksidan olarak işlev gördüğü bir çok çalışmada da gösterilmektedir [115, 120-126].

DMBA uygulama grubuna ait Hematoksilin-Eosin (HE) ile boyanan sıçan karaciğer doku kesitleri incelendiğinde, karaciğer parankimasında hepatosit dejenerasyonu ve sinüzoidlerde dilatasyonların varlığı gözlenmiştir. Parankima içinde lenfositler yer almaktaydı. Portal alanlarda yoğun lenfosit infiltrasyonunun olduğu ve portal alandaki normal damar ve kanal yapılarının bozulduğu saptanmıştır. Çevresel bir toksik ajan olan DMBA'nın karaciğer dokusunda da histolojik olarak hasarlara yol açtığı izlenmiştir. Çeşitli kimyasal yapılara sahip olan çok sayıda terapötik ajanların, endüstriyel kimyasalların ve çevresel kirleticilerin karaciğerde peroksizom proliferasyonuna sebep olduğu bilinmektedir. Bu grup kimyasallar, peroksizom proliferasyonu olarak müşterek bir şekilde etkilerini göstermektedirler [133-137].

DMBA+Se I bileşiği uygulama grubuna ait karaciğer doku kesitleri incelendiğinde, hepatositlerin normal morfolojide oldukları gözlemlendi. Parankimal yapının ve portal alanların normal histolojik yapıda kontrol grubundakine benzer olarak birer arter, ven, safra kanalı ve lenf damarı içerdiği saptandı.

DMBA+Se II bileşiği uygulama grubundaki karaciğer doku kesitlerinde ise, poligonal şekilli, yuvarlak ökromatik nükleuslu, eozinofilik boyanmış hepatositler normal histolojik görünüm sergilemekteydi. Hepatosit kordonlarının dizilimi ve aralarındaki sinüzoidal yapılar ışınal tarzda olup, normal karaciğer parankiması özelliklerini temsil etmekteydi.

Temel eser bir element olan selenyumun hayvan çalışma modellerinde karaciğer nekrozları ve pankreatik atrofi, selenyum eksikliği veya düşük selenyum seviyeleri ile ilişkilendirilmektedir [83]. Laboratuvarımızda sentezlenen organoselenyum

bileşiklerinin histolojik incelemeler sonucunda da, oksidatif doku hasarlanmalarına ve hepatosit dejenerasyonuna karşı koruma sağladığı tespit edilmiştir.

Çalışmamızda, sıçan karaciğerinde DMBA'nın oluşturduğu toksik etkilere karşı yeni sentezlenen organoselenyum bileşiklerinin antioksidan özellik gösterdiği saptanmıştır.

Selenyuma karaciğerin detoksifikasyon (sitokrom P₄₅₀) sistemlerinin fonksiyon görmesi için de gereksinim duyulmaktadır. Selenyumun; karaciğeri toksinlerden, serbest radikal hasarından koruduğu ve karaciğer fonksiyonlarının normal işlemini sağladığı gösterilmiştir [7].

Vücut her zaman çok sayıda kimyasallara maruz kalmaktadır. Bunların çoğu besin, hava ve suyun son ürünü şeklinde olan kimyasallar ya da ilaç formunda alınmaktadır. Karaciğer detoksifikasyonu kapsayan, vücuttaki en önemli organdır. Vücudun toksin yükü arttığı zaman, karaciğer daha büyük oranda oksidatif strese maruz kalmakta ve sitokrom P₄₅₀ aktivitesi de artmaktadır. Bu durumda yeterli düzeyde antioksidan girişi, karaciğeri serbest radikal hasarına karşı korumaktadır. Yeterli düzeyde antioksidan alımı, hem Faz I hem de Faz II detoksifikasyonunun gerçek fonksiyonunu gerçekleştirmeye ve detoksifikasyon sürecinde üretilen serbest radikal hasarının riskini azaltmaya yardımcı olmaktadır [138].

Bu çalışmada, yeni sentetik organoselenyum bileşiklerinin, DMBA tarafından oluşturulan sıçan eritrositlerindeki oksidatif hasara karşı koruyucu etkileri SOD, CAT, GR, GSH-Px aktiviteleri, GSH ve MDA düzeylerindeki değişimlerin ölçülmesiyle de belirlenmiştir.

DMBA uygulanan sıçan eritrositlerinde SOD, CAT, GR ve GSH-Px aktivitelerinde, kontrol grubuna göre azalmalar meydana gelmiştir. Eritrosit GSH seviyesinde, kontrol grubuna göre DMBA grubunda meydana gelen azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (P<0.05). Karaciğer dokusunda olduğu gibi, DMBA'nın antioksidan sistem üzerindeki olumsuz etkileri, eritrositler üzerinde de gözlenmiştir.

Bizim çalışmamızda, sıçan kan ve karaciğer dokularında, DMBA ile kimyasal olarak indüklenmiş sitotoksitede, endojen antioksidan enzim aktivitelerinin azalması, indüklenmiş hücrel hasarların meydana gelmiş olabileceğini düşündürmektedir.

Se I ve Se II bileşiklerinin uygulandığı sıçan eritrositlerinde, SOD, CAT, GR ve GSH-Px aktivitelerinde, artışlar gözlenmiştir. Aynı şekilde, Se I ve Se II gruplarında total GSH miktarında da artışlar tespit edilmiştir. Sıçan eritrosit MDA seviyeleri incelendiğinde, DMBA uygulama grubunda, kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı

bir şekilde artış gözlenmiştir ($P<0.05$). Se I ve Se II gruplarında ise MDA seviyesi DMBA grubuna göre anlamlı bir şekilde azalmıştır ($P<0.05$). Bu azalma ile Se I ve Se II gruplarındaki değerler kontrol grubu değerlerine yaklaşmıştır.

Bizim çalışmamızda, sıçan eritrositlerinde, DMBA ile kimyasal olarak indüklenmiş sitotoksitede, lipit peroksidasyonuna ve bununla birlikte oluşan indüklenmiş hücresel hasarlara karşı sentetik organoselenyum bileşiklerinin antioksidan olarak koruyucu etkilerinin olduğu *in vivo* olarak yapılan araştırmalarla saptanmıştır.

Selenyum fizyolojik olarak antioksidan özelliklere sahip esansiyel eser bir elementtir. Selenyumun organik formları muhtemel antioksidan ajan olarak düşünülmektedir [115, 120-126].

Se I ve Se II tamamıyla veya kısmi olarak enzim inhibisyonunu etkilemektedir. Lipit peroksidasyonu da Se I ve Se II uygulanmış gruplarda azalmaktadır. Yeni sentetik organoselenyum bileşikleri (Se I ve SeII)'nin, antioksidatif sistemde koruyucu özellikler gösterdiği çalışmalar sonucunda gözlenmiştir. Lipit peroksidasyonuna karşı koruma, yeni sentezlenmiş organoselenyum bileşiklerinin uygulandığı Se I ve Se II gruplarında, MDA seviyesinin ölçümü ile belirlendi. Hem Se I hem de Se II, sıçan eritrositlerinde DMBA tarafından oluşturulan oksidatif hasara karşı kimyasal koruma sağladı.

Sağlık problemlerinin birçoğu çevresel kirleticiler tarafından oluşturulduğundan dolayı, çok sayıda çalışma selenyum ve sentetik organoselenyum bileşiklerinin bağlı antioksidan potansiyelini değerlendirme üzerine odaklanmaktadır.

Çalışmalarımızda yaptığımız *in vivo* araştırmaları desteklemesi açısından yeni sentezlenmiş organoselenyum bileşiklerinin antioksidan kapasiteleri *in vitro* çalışmalarla da saptanmıştır. Bu çalışmalar ışığında, sentetik bir radikal olan DPPH'a karşı *in vitro* olarak antiradikal aktivite gösteren Se I ve Se II bileşiklerinin antiradikal aktiviteleri belirlenmiştir. Spektrofotometrik olarak ölçülen aktivite sonucunda her iki bileşiminin de antiradikal aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Bileşiklerimizi kendi içinde karşılaştırırsak; Se I bileşiğine göre Se II bileşiğinde daha yüksek aktivite olduğu ve Se II bileşiğinin Se I bileşiğine göre daha fazla antiradikal güce sahip olduğu söylenebilir. Ayrıca sentetik organoselenyum bileşiklerimiz için bir başka *in vitro* test olarak uyguladığımız β -karoten bleaching (beyazlatma) metodunda ise bileşiklerimizin (Se I ve Se II) "*in vitro*" lipit peroksidasyonunu engelleme kapasiteleri belirlenmiştir.

Araştırma sonucunda her iki bileşiminin de anti-lipit peroksidatif etkiye sahip olduğu gözlenmiştir. Bu çalışma sonucunda da, Se I'in relatif olarak Se II'den daha

yüksek anti-lipit peroksidatif etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Üçüncü bir *in vitro* test olarak çalıştığımız indirgeme gücü kapasitesinin belirlenmesi sonucu, organoselenyum bileşiklerimizin (Se I ve Se II) H⁺ veya elektron verme yetenekleri tespit edilerek antioksidan aktiviteleri belirlenmiştir. Deney sonucunda, her iki bileşiğimizin (Se I ve Se II) indirgeme gücü kapasiteleri karşılaştırıldığında; 10 µl hacimde organoselenyum bileşikleri (Se I ve Se II) arasında herhangi bir fark görülmezken, artan konsantrasyonlarda (25, 50 µl) Se I'in daha yüksek indirgeme gücüne sahip olduğu saptanmıştır.

Uzun yıllar sadece yüksek toksik ve karsinogen özelliğiyle bilinen selenyum, yapılan çalışmalar sonucunda biyolojik sistemler için önemli ve faydalı bir element olarak değerlendirilmiştir. 1957 yılında selenyumun hayvanlar için önemli bir eser element olduğunun anlaşılmasının ardından, deneysel olarak oluşturulan karaciğer tümörlerinin insidansında selenyum uygulayarak % 50 oranında bir azalma olduğu görülmüştür. Ayrıca selenyumun, lipit metabolizması sonucu oluşan peroksitlerin neden olduğu oksidatif hasarlardan hücre membranının korunmasında etkili olduğu tespit edilmiştir. Özellikle spesifik organoselenyum bileşiklerinin antikarsinogenik ve antioksidatif karaktere sahip olmaları son yıllarda bilim dünyasında son derece ilgi uyandırmıştır.

Bu çalışma kapsamında elde edilen bulgular, bu tür sentetik bileşiklerle ilgili gelişmelere ve bileşiklerin diğer özelliklerinin araştırılması doğrultusunda yapılacak olan daha sonraki çalışmalara temel teşkil edebilecek niteliktedir. Aynı zamanda bu tür bileşiklerle yapılacak olan çalışmaların, ülke ve dünya literatürüne önemli katkılar sağlayacağı düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

- [1] R.C. Murphy, *Free-Radical-Induced Oxidation of Arachidonoyl Plasmalogen Phospholipids: Antioxidant Mechanism and Precursor Pathway for Bioactive Eicosanoids*, **Chem. Res. Toxicol.**, 14 (2001) 463.
- [2] J. Carper, *Stop Aging Now*, New York, 1996, p. 40-199.
- [3] V.G. Desai, D. Casciano, R.J. Feuers and A. Aidoo, *Activity Profile of glutathione-Dependent Enzymes and Respiratory Chain Complexes in Rats Supplemented with Antioxidants and Treated with Carcinogens*, **Arch. Biochem. Biophys.**, 394 (2001) 255-264.
- [4] G.F.J. Combs, W.P. Gray, *Chemopreventive agents: Selenium*, **Pharmacol. ther.**, 79 (1998) 179-192.
- [5] K. El-Bayoumy, R. Sinha, *Mechanisms of Mammary Cancer Chemoprevention by Organoselenium Compounds*, **Mutat. Res.**, 551 (2004) 181-197.
- [6] S. Sugie, T. Tanaka and K. El-Bayoumy, *Chemoprevention of Carcinogenesis by Organoselenium Compounds*, **J. Health Sci.**, 46 (2000) 422-425.
- [7] B. Wachowicz, H.M. Zbikowska, P. Nowak, *Selenium compounds in the environment; their effect on human health*, **Cell. Biol. Mol. Lett.**, 6 (2001) 375-381.
- [8] P.D. Whanger, *Selenocompounds in plants and animals and their biological significance*, **J Am Coll Nutr.**, 21 (2002) 223-232.
- [9] J.W. Flesher, J. Horn and A.F. Lehner, *Molecular modeling of carcinogenic potential in polycyclic hydrocarbons*, **J. Mol. Struct.**, 362 (1996) 29-49.
- [10] A.F. Lehner, J. Horn, and J.W. Flesher, *Benzylic carbonium ions as ultimate carcinogens of polynuclear aromatic hydrocarbons*, **J. Mol. Struct.**, 366 (1996) 203-217.
- [11] J.W. Flesher, J. Horn and A.F. Lehner, *Role of Hydroxymethyl Sulfate Esters in Aromatic Hydrocarbon carcinogenesis*, **Polycycl Aromat Comp.**, 16 (1999) 1-11.
- [12] K. Batcioglu, A.A. Karagözler, I.C. Ozturk, M. Genc, A. Bay, F. Ozturk and N. Aydogdu, *Comparison of chemopreventive effects of Vitamin E plus selenium versus melatonin in 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced Mouse brain damage*, **Cancer Detect Prev.**, 29 (2005) 54-58.
- [13] İ. Demir and Z. Demirbağ, *Polisiklik Aromatik Hidrokarbonların Biyolojik olarak Parçalanması*, **Tr. J.of Biology**, 23 (1999) 293-302.

- [14] A. Izzotti, A. Camoirano, C. Cartiglia, C.J. Grubbs, R.A. Lubet, G.J. Kelloff and S. De Flora, *Patterns of DNA Adduct Formation in Liver and Mammary Epithelial Cells of Rats Treated with 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene, and Selective Effects of Chemopreventive Agents*, **Cancer Res.**, 59 (1999) 4285-4290.
- [15] T.A. Smolarek, W.M Baird, *Benzo(e)pyrene-induced alterations in the stereoselectivity of activation of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene to DNA-binding metabolites in hamster embryo cell cultures*, **Cancer Res.**, 46 (1986) 1170-1175.
- [16] T.L. Weimer, A.P. Reddy, U. Harttig, D. Alexander, S.C. Stamm, M.R. Miller, W. Baird, J. Hendricks and G. Bailey, *Influence of β -Naphthoflavone on 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene Metabolism, DNA Adduction, and Tumorigenicity in Rainbow Trout*, **Toxicol Sci.**, 57 (2000) 217-228.
- [17] K. Singletary, C. MacDonald, M. Walling and C. Fisher, *Inhibition of 7,12 dimethylbenz[a]anthracene(DMBA)- induced mammary tumorigenesis and DMBA-DNA adduct formation by curcumin*, **Cancer Lett.**, 103 (1996) 137-141.
- [18] K. Singletary, C. MacDonald and M. Walling, *Inhibition by Rosemary and Carnosol of 7,12 dimethylbenz[alpha]anthracene(DMBA)- induced rat mammary tumorigenesis and iv vivo DMBA-DNA adduct formation*, **Cancer Lett.**, 104 (1996) 43-48.
- [19] Y. Kaufmann, S. Luo, A. Johnson, K. Babb and S. Klimberg, *Timing of Oral Glutamine on DMBA-induced Tumorigenesis*. **J Surg Res.**, 111 (2003) 158-165.
- [20] K. Nesaretnam, E. Hales, M. Sohail, T. Krausz, P. Darbre, *3,3',4,4'-Tetrachlorobiphenyl (TCB) can Enhance DMBA-induced Mammary Carcinogenesis in the Rat*, **Eur J Cancer.**, 34 (1998) 389-393.
- [21] S. Zhaorigetu, N. Yanaka, M. Sasaki, H. Watanabe and N. Kato, *Silk Protein, Sericin, Suppresses DMBA-TPA-Induced Mouse Skin Tumorigenesis by Reducing Oxidative Stress, Inflammatory Responses and Endogenous Tumor Promoter TNF- α* , **Oncol Rep.**, 10 (2003) 537-543.
- [22] C.C. Lin, C.T. Ho and M.T. Huang, *Mechanistic Studies on the Inhibitory Action of Dietary Dibenzoylmethane, $\alpha\beta$ - diketone Analogue of Curcumin, on 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene-induced Mammary Tumorigenesis*, **Proc.Natl.Sci.Counc.**, 25 (2001) 158-165.

- [23] K.J. Jung, K.W. Singletary, *Effect of grape juice consumption on 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)-induced rat mammary tumorigenesis and in vivo DMBA-DNA adduct formation*, *Nutraceuticals & Functional Foods: Bioactivity measurement and mechanism*, **IFT Annual Meeting**, July 12-16, 2004, Las Vegas NV.
- [24] R.K. Das, S. Ghosh, A. Sengupta, S. Das, and S. Bhattacharya, *Inhibition of DMBA/ croton oil- induced two-stage mouse skin carcinogenesis by diphenylmethyl selenocyanate*, **Eur J Cancer Prev.**, 13 (2004) 411-417.
- [25] V. Bhuvanewari, B. Velmurugan, S.K. Abraham and S. Nagini, *Tomato and garlic by gavage modulate 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced genotoxicity and oxidative stress in mice*. **Braz J Med Biol Res.**, 37 (2004) 1029-1034.
- [26] S.T. Vater, D.M. Baldwin and D. Warshawsky, *Hepatic metabolism of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene in male, female, and ovariectomized Sprague-Dawley rat*, **Cancer Res.**, 51 (1991) 492-498.
- [27] K. Merker and T. Grune, *Proteolysis of oxidised proteins and cellular senescence*, **Exp Gerontol.**, 35 (2000) 779-786.
- [28] CW. Lam, *Free Radicals, Nutritional Anti-oxidants and Trace Elements. Adapted from Dr Mano Arumanayagam's Lecture Notes*, 2000.
- [29] B. Halliwell, *Antioxidants: The basics-What they are and how to evaluate them*, **Adv. Pharmacol.**, 38 (1997) 3-20.
- [30] H.D. Scheibmeir, K. Christensen, S.H. Whitaker, J. Jegaethesan, R. Clancy and J.D. Pierce, *A review of free radicals and antioxidants for critical care nurses*, **Intensive And Critical Care Nursing**, 21 (2005) 24-28.
- [31] P. Di Mascio, *Singlet molecular oxygen production in the reaction of peroxynitrite with hydrogen peroxide* **FEBS Lett.**, 355 (1994) 287-289.
- [32] B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, *Free radicals in biology and medicine*. Third Edition, Oxford University Press, UK, 1999.
- [33] P.M Abuja and R. Albertini , *Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins*, **Clinica Chimica Acta**, 306 (2001) 1-17.
- [34] C. Winterbourn, *Oxidative Stress in Health and Diseases*, http://www.otago.ac.nz/research/themes/theme_oxidative.html, (2004).

- [35] S.T. Mayne, *Antioxidant nutrients and chronic disease: Use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research*, **J Nutr.**, 133 (2003) 933-940.
- [36] C.M. Deaton and D.J. Marlin, *Exercise-associated oxidative stress*, **Clinical Techniques in Equine Practice**, 2 (2003) 278-291.
- [37] T.C. Squier, *Oxidative stress and protein aggregation during biological aging*, **Exp. Gerontol.**, 36 (2001) 1539-1550.
- [38] H. Van Remmen and A. Richardson, *Oxidative damage to mitochondria and aging*, **Exp. Gerontol.**, 36 (2001) 957-968.
- [39] W.A. Van Voorhies, *Metabolism and life span*, **Exp. Gerontol.**, 36 (2001) 55-64.
- [40] M.D. Jacobson, *Reactive oxygen species and programmed cell death*, **Talking Point, TIBS**, 21st March 1996.
- [41] B.D. McKersie, *Oxidative Stress*, Dept of Crop Science, University of Guelph, 1996.
- [42] M.M. Woznichak, J.D. Overcast, K. Robertson, H.M. Neumann and S.W. May, *Reaction of Phenylaminoethyl Selenites with Peroxynitrite and Hydrogen Peroxide*, **Arch Biochem Biophys.**, 379 (2000) 314-320.
- [43] M. Mangel and M.B. Bonsall, *The shape of things to come: using models with physiological structure to predict mortality trajectories*, **Theor Popul Biol.**, 65 (2004) 353-359.
- [44] D.A. Butterfield, T. Koppal, B. Howard, B. Subramaniam, N. Hall, K. Hensley, S. Yatin, K. Allen, M. Aksenov, M. Aksenova and Carney J., *Structural and functional changes in proteins induced by free radical-mediated oxidative stress and protective action of the antioxidants N-tert-butylalpha-phenylnitron and vitamin E*, **Ann N.Y. Acad.Sci.**, 854 (1998) 448-462.
- [45] R.S. Sohal, S. Agarwal and B.H. Sohal, *Oxidative stress and aging in the Mongolian Gerbil*, **Mech. Ageing Dev.**, 81 (1996) 15-25.
- [46] J. Liu, X. Wang, M.K. Shigenaga, Yeo H.C. and A. Mori, *Immobilization stress causes oxidative damage to lipid, protein and DNA in the brain of the rats*, **Faseb J.**, 10 (1996) 1532-1538.
- [47] C.P. De La Cruz, E. Revilla, J.L. Venero, A. Ayala, J. Cano and A. Machado, *Oxidative inactivation of tyrosine hydroxylase in substantia nigra of aged rat*, **Free Radic. Biol. Med.**, 20 (1996) 53-61.

- [48] C. Leeuwenburgh, P.A. Hansen, J.O. Holloszy, J.W. Heinecke, *Oxidized amino acids in the urine of aging rats: Potential markers for assessing oxidative stress in vivo*, **Am. J Physiol.**, 276 (1999) 128-135.
- [49] M. Cini and A. Moretti, *Studies on lipid peroxidation and protein oxidation in the aging brain*, **Neurobiol. Aging**, 16 (1995) 53-57.
- [50] L. Cai Q Tian and H. Wei, *Age dependent increase of indigenous DNA adducts in rat brain is associated with lipid peroxidation product*, **Exp. Gerontol.**, 31 (1996) 373-385.
- [51] P. Gupta, M. Narang, B.D. Banerjee and S. Basu, *Oxidative stress in term small for gestational age neonates born to undernourished mothers; a case control study*, **BMC Pediatrics**, 4 (2004) 14.
- [52] D.P.T. Steenvoorden and G.M.J. Beijersbergen van Henegouwen *The use of endogenous antioxidants to improve photoprotection*, **J Photoch. Photobio.**, B, 41 (1997) 1-10.
- [53] A. Bokov, A. Chaudhuri, A. Richardson, *The role of oxidative damage and stress in aging*, **Mech. Ageing Dev.**, 125 (2004) 811-826.
- [54] E.R. Stadtman and B.S. Berlett, *Reactive Oxygen-Mediated Protein Oxidation in Aging and Disease*, **Chem. Res. Toxicol.**, 10 (1997) 485-494.
- [55] J.A. Thomas, *Oxidative stress and oxidant defense, Modern Nutrition in Health and Disease*. 9th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1999, p. 751-760.
- [56] A. Sabo, L. Samanta, G.B.N. Chainy, *Mediation of Oxidative Stress in HCH-Induced Neurotoxicity in Rat*, **Arch Environ Con Tox.**, 39 (2000) 7-12.
- [57] R.C. Zangar, D.R. Davydov and S. Verma, *Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P₄₅₀*, **Toxicol Appl Pharm.**, 199 (2004) 316-331.
- [58] M.R. Naghii, *Sulfur mustard intoxication, oxidative stress, and antioxidants*, **Mil Med.**, 167 (2002) 573-577.
- [59] L.L. De Zwart, J. Meerman, J.N.M. Commandeur and N.P.E. Vermeulen, *Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans*, **Free Radical Bio Med.**, 26 (1999) 202-226.
- [60] D.D. Mruk, B. Silvestrini, M.Y. Mo, C.Y. Cheng, *Antioxidant superoxide dismutase- a review: its function, regulation in the testis, and role in male fertility*, **Contraception**, 65 (2002) 305-311.

- [61] L.J. Machlin and B. Adrienne, *Free radical tissue damage protective role of antioxidant nutrients*, **Clin Nutr.**, 1 (1987) 441-445.
- [62] J. Chaudiere and R. Ferrari-Iliou, *Intracellular antioxidants:from chemical to biochemical mechanisms*, **Food Chem Toxicol**, 37 (1999) 949-962.
- [63] İ. Yılmaz, *3-metilkolantren'in sıçanların yaşlanma sürecinde radikal süpürücü enzimler ve toplam glutatyon düzeyine olan etkisi*, PhD Thesis, İnönü University Turkey, 1996.
- [64] G.E.Arteel, K. Briviba and H.V. Sies, *Protection against peroxynitrite*, **Febs Lett.**, 445 (1999) 226-230.
- [65] F.E. Domann, *Reactive Forms of Oxygen I, II and III*, 71, (2001) 190.
- [66] H. Tapiero, D.M. Townsend, K.D. Tew, *The role of carotenoids in the prevention of human pathologies*, **Biomed Pharmacother.**, 58 (2004) 100-110.
- [67] R.G. Cutler, H. and Rodrigez H., *Critical Reviews of Oxidative Stress and Aging: Advances in Basic Science*, Diagnostics and Intervention, Volume II, World Scientific Publishing Co., London, 2003, p. 1327.
- [68] R. Brigellus, M. Maiorino, F. Ursini and L. Flohê, *Selenium: An Antioxidant?*, *Handbook of Antioxidants*, Second Edition, Revised and Expanded, New York, USA, 2001, p. 633-553.
- [69] J.T. Rotruck, A.L. Pope, H.E. Ganther, A.B. Swanson, D.G. Hafeman, W.G.Hoekstra, *Selenium: biochemical roles as a component of glutathione peroxidase*, **Science**, 179 (1973) 588-590.
- [70] J.T. Deagen, J.A. Butler., M.A. Beilstein, P.D. Whanger, *Effects of dietary selenite, SeCys and selenomethionine on selenocysteine lyase and glutathione peroxidase activities and on selenium levels in rat tissues*, **J. Nutr.**, 117 (1987) 91-98.
- [71] R. Lobinski, J. S. Edmonds, K.T. Suzuki and P. C. Uden, *Species-selective determination of selenium compounds in biological materials*, **Pure Appl. Chem.**, 72 (2000) 447-461.
- [72] *National Research Council: Recommended Dietary Allowances*, 10th Ed., National Academy of Sciences, Washington D.C., 1989. Ct.
- [73] J.A. Pennington and S.A. Schoen, *Contributions of food groups to estimated intakes of nutritional elements: Results from the FDA total diet studies*, **Int. J Vitam. Nutr. Res.**, 66 (1996) 342-349.

- [74] J.A. Pennington and B.E. Young, *Total diet study nutritional elements*. **J Am Diet Assoc.**, 91(1991)179-83.
- [75] P. Knekt, U. Tarp, K. Overvad E.B. Thorling, H. Graudal J.C. Hansen, *Selenium treatment in rheumatoid arthritis*. **Acta Pharmacologica at Toxicologica**. 59 (1986) 382-385.
- [76] J.A. Pennington, B.E. Young, D.B. Wilson, R.D. Johnson, J.E. Vanderveen, *Mineral content of foods and total diets: The Selected Minerals in Foods Survey, 1982-1984*. **J Am Diet Assoc.**, 86 (1986) 876-91.
- [77] A. Stoica, E. Pentecost and M.B. Martin, *Effects of Selenite on Estrogen Receptor- α Expression and Activity in MCF-7 Breast Cancer Cells*, **J Cell Biochem.**, 79 (2000) 282-292.
- [78] G.F. Combs, S.B. Combs, *The role of selenium in nutrition*, Orlando Academic Press, 1986.
- [79] İ. Akkuş, *Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri*, Mimoza Yay., Konya, 1995.
- [80] C.L. Nata, I.C. Chen and C.K. Chow, *Selenium and Glutathione Peroxidase Levels in Sickle Cell Anemia*, **Acta Haematol.**, 83 (1990) 130-132.
- [81] D.C. Wilson, R.B. Tumban, H. Noel, L. Henry and D. McMaster, *Plasma manganase, selenium and glutathione peroxidase levels in the mother and newborn infant*, **Early Hum Dev.**, 26 (1991) 223-226.
- [82] M. Chang and C.C. Reddy, *Active Transpiration of the Selenium-Dependent Glutathione Peroxidase Gene in selenium-Deficient Rats*, **Biochem Bioph Res Co.**, 181 (1991) 1431-1436.
- [83] V. Regitz-Zagrosek, A. Kyriakopoulos, K.P. Pleissner, P. Jungblut, E. Fleck and D. Behne, *Effects of selenium deficiency on the rat myocardial protein pattern-investigation by two-dimensional gel electrophoresis*, **Basic Res. Cardiol.**, 95 (2000) 199-207.
- [84] L.C. Clark, K. Cantor and W.H. Allaway, *Selenium in forage crops cancer mortality in US counties*, **Arch Environ. Health.**, 46 (1991) 37-42.
- [85] G.N. Schrauzer, D.A. White, C.J. Schneider, *Cancer mortality correlation studies. III. Statistical associations with dietary selenium intakes*, **Bioinorg.Chem.**, 7 (1977) 23-31.

- [86] S.Y. Yu, Y.J. Chu, X.L. Gong, C. Hou, W.G. Li, H.M. Gong and J.R. Xie, *Regional variation of cancer mortality incidence and its relation to selenium levels in China*, **Biol. Trace Elem. Res.**, 7 (1985) 21-29.
- [87] C. Ip, *Lessons from basic research in selenium and cancer prevention*, **J. Nutr.**, 128 (1998) 1845-1854.
- [88] H.J. Thompson, L.D. Meeker and S. Kokoska, *Effect of an inorganic and organic form of dietary selenium on the promotional stage of mammary carcinogenesis in the rat*, **Cancer Res.**, 44 (1984) 2803-2806.
- [89] C.D. Thomson, M.F. Robinson, D.R. Campbell, H.M. Rea, *Effect of prolonged supplementation with daily supplements of selenomethionine and sodium selenite on glutathione peroxidase activity in blood of New Zealand residents*, **Am J Clin. Nutr.**, 36 (1982) 24-31.
- [90] K. Görür, C. Özcan, A. Polat, M. Unal, L. Tamer, İ. Cinel, *The anti-oxidant and anti-apoptotic activities of selenium in the prevention of myringosclerosis in rats*, **J Laryngol Otol.**, 116 (2002) 426-431.
- [91] K. Matsumoto, R. Hirunuma, S. Enomoto and K. Endo, *Evaluation of in vivo oxidative stress in liver of selenium-deficient rat*, **Focused on New Trends in Bio-Trace Elements Research**, 35 (2001) 14-18.
- [92] M.J Berry, L. Banu and P.R. Larsen, *Type I iodothyronine deiodinase is a selenocysteine-containing enzyme*, **Nature**, 349 (1991) 438-440.
- [93] R.A. Passwater and P.A. Welker, *Human Aging Research*, **Amer. Lab.**, 3 (1971) 21-26.
- [94] J.R. Arthur, *The role of selenium in thyroid hormone metabolism*, **Can J Physiol Pharmacol.**, 69 (1991) 1648-1652.
- [95] B. Corvilain, B. Contempre, A.O. Lengombe, P. Goyens, C. Gervy-Decoster, F. Lamy, J.B. Vanderpas, J.E. Dumont, *Selenium and the thyroid: How the relationship was established*, **Am J Clin. Nutr.**, 57 (1993) 244-248.
- [96] L.C. Clark, G.F.J. Combs, B.W. Turnbull, E.H. Slate, E. H. Chalker, J. Chow, L.S. Davis, R.A. Glover, G.F. Graham, E.G. Gross, A. Krongrad, J.L.J. Leshner, H.K. Park, B.B.J. Sanders, C.L. Smith & J.R. Taylor, *Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin. A randomized controlled trial*. **J. Am. Med. Assoc.**, 276 (1996) 1957-1963.

- [97] R.A. Passwater, *New Discoveries Expand Our Knowledge About Selenium's Importance*, http://www.drpasswater.com/nutrition_library/selenium.html, (2004).
- [98] M.F. McCarty., *Selenium Backgrounder*, <http://www.luminet.net/~wenonah/hydro/sebacker.htm>, (2004).
- [99] R.F. Whiting, L. Wei and H.F Stich., *Unscheduled DNA synthesis and chromosome aberrations induced by inorganic and organic selenium compounds in the presence of glutathione*, **Mutat. Res.**, 78 (1980) 159-169.
- [100] K.M. Abdo, *NTP (National Toxicology Program) technical report on toxicity studies of sodium selenate and sodium selenite (CAS No. 13410-01-0 and 10102-18-8) administered in drinking water to F344/N rats and B6C3F1 mice*. PB94-215753. Springfield, VA: NTIS. 1994.
- [101] G.Q. Yang, S.Z. Wang, R.H. Zhou, S.Z. Sun, *Endemic selenium intoxication of humans in China*, **Am J Clin. Nutr.**, 37 (1983) 872–881.
- [102] G. Yang, and R. Zhou, *Further observations on the human maximum safe dietary selenium intake in a seleniferous area in China*, **J Trace Elem., Electrolytes in Health and Dis.**, 8 (1994) 159-165.
- [103] *IOM, Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium and Carotenoids. Institute of Medicine, Food and Nutrition Board, National Academy Press, Washington, D.C., 2000.*
- [104] J. Hathcock, *Vitamins and minerals: Efficacy and safety*, **Am J Clin. Nutr.**, 66 (1997), 427-437.
- [105] M.F. Raisbeck, E.R. Dahl, D.A. Sanchez, E.L. Belden and D. O'Toole, *Naturally occurring selenosis in Wyoming*, **J Vet. Diagn. Invest.**, 5 (1993) 84-87.
- [106] G. Yang, R. Zhou, S. Yin, L. Gu, B. Yan, Y. Liu, Y. Liu, X. Liu, *Studies of safe maximal daily dietary selenium intake in a seleniferous area in China*, **J Trace Elem. Electrolytes Health Dis.**, 3 (1989) 77-87.
- [107] G.Q. Yang and Y.M.Xia, *Studies on human dietary requirements and safe range of dietary intakes of selenium in China and their application in the prevention of related endemic diseases*, **Biomed. Environ. Sci.**, 8 (1995) 187–201.

- [108] A.S. Csallany, L.C. Su and B.Z. Menken, *Effect of selenite, vitamin E, and n,n'-diphenyl-p-phenylenediamine on liver organic solvent-soluble lipofuscin pigments in mice*, **J. Nutr.**, 114 (1984) 1582-1587.
- [109] U. Tinggi, *Essentiality and toxicity of selenium and its status in Australia: a review*, **Toxicol. Lett.**, 137 (2003) 103-110.
- [110] J.W. Finley, C. Ip, D.J. Lisk., C.D. Davis, K.J. Hintze, and P.D. Whanger, *Cancer-Protective Properties of High-Selenium Broccoli*, **J. Agric. Food Chem.**, 49 (2001) 2679-2683.
- [111] C. Sasakura and K.T. Suzuki, *Biological interaction between heavy metals (Ag, Cd and Hg), selenite/sulfide and selenoprotein P*, **J. Inorg. Biochem.**, 71 (1998) 159-162.
- [112] K.T. Suzuki and Y. Ogra, *Speciation of biological trace elements by HPLC-ICP MS: Application to elucidate mechanisms underlying the interaction between mercury and selenium*, **Biomed. Res. Trace Elements**, 10 (1999) 95-102.
- [113] K. Sieja and M. Talerczyk, *Selenium as an element in the treatment of ovarian cancer in women receiving chemotherapy*, **Gynecol Oncol.**, 93 (2004) 320-327.
- [114] F.M. El Demerdash, *Antioxidant effect of vitamin E and selenium on lipid peroxidation, enzyme activities and biochemical parameters in rats exposed to aluminium*, **J Trace Elem Med Bio.**, 18 (2004) 113-121.
- [115] G.E. Arteel and H. Sies, *The biochemistry of selenium and the glutathione system*, **Environ Toxicol Phar.**, 10 (2001) 153-158.
- [116] C.M. Deaton, D.J. Marlin, *Reactive oxygen species and antioxidants –a war of nutrition*, **Vet J.**, 169 (2005) 7-9.
- [117] Y. Sun, J.A. Butler and P.D. Whanger, *Glutathione peroxidase activity and selenoprotein W levels in different brain regions of selenium-depleted rats*, **J Nutr Biochem.**, 12 (2001) 88-94.
- [118] E.O. Farombi, G. Britton and G.O. Emerole, *Evaluation of the antioxidant activity and partial characterisation of extracts from browned yam flour diet*, **Food Research International**, 33 (2000) 493-499.
- [119] K. El-Bayoumy, A. Das, T. Boyiri, D. Desai, R. Sinha, B. Pittman and S. Amin, *Comparative action of 1,4-phenylenebis(methylene)selenocyanate and its*

- metabolites against 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-DNA adduct formation in the rat and cell proliferation in rat mammary tumor cells*, **Chemico-Biological Interactions**, 146 (2003) 179-190.
- [120] H. Sies, *Ebselen, a selenoorganic compound as glutathione peroxidase mimic*, **Free Radical Bio Med.**, 14 (1993) 313-323.
- [121] T. Schewe, *Molecular actions of ebselen - an antiinflammatory antioxidant*, **Biochem. Pharmacol.**, 26 (1995) 1153-1169.
- [122] H. Sies and G.E. Arteel, *Interaction of peroxynitrite with selenoproteins and glutathione peroxidase mimics*, **Free Radical Bio Med.**, 28 (2000) 1451-1455.
- [123] M.J. Parnham, E. Graf, *Pharmacology of synthetic organic selenium compounds*, **Prog Drug Res.**, 36 (1991) 9-47.
- [124] I.A. Cotgreave, S.K. Duddy, G.E.N. Kass, D. Thompson and P. Moldeus, *Studies on the anti-inflammatory activity of Ebselen: Ebselen interferes with granulocyte oxidative burst by dual inhibition of NADPH oxidase and protein kinase C*, **Biochem. Pharmacol.**, 38 (1989) 649-656.
- [125] M. Walther, H.G. Holzutter, R.J. Kuban, R. Wiesner, J. Rathmann and H. Kuhn, *The inhibition of mammalian 15-lipoxygenases by the anti-inflammatory drug ebselen: dual-type mechanism involving covalent linkage and alteration of the iron ligand sphere*, **Mol. Pharmacol.**, 56 (1999) 196-203.
- [126] G. Muges, W.W. Du Mont, H. Sies, *Chemistry of Biologically Important Synthetic Organoselenium Compounds*, **Chem. Rev.**, 101 (2001) 2125-2179.
- [127] F.C. Meotti, E.C. Stangherlin, G. Zeni, C.W. Nogueira, and J.B.T. Rocha, *Protective role of aryl and alkyl diselenites on lipid peroxidation*, **Environ. Res.**, 94 (2004), 276-282.
- [128] J. Perotoni, O:E.D.Rodrigues, M.W. Paixao, G. Zeni, L.P. Lobato, A.I. Braga, J.B.T. Rocha, T. Emanuelli, *Renal and hepatic ALA-D activity and selected oxidative stress parameters of rats exposed to inorganic mercury and organoselenium compounds*, **Food Chem. Toxicol.**, 42 (2004) 17-28.
- [129] H. Tapiero, D.M. Townsend and K.D. Tew, *The antioxidant role of selenium and seleno-compounds*, **Biomed. Pharmacother.**, 57 (2003) 134-144.
- [130] E. Bakan, *Klinik Biyokimya Laboratuvar El Kitabı*, Aktif Yayınevi, İstanbul, 2001.

- [131] M.F. Laker, *Clinical Chemistry for Medical Students*, W.B. Saunders Company, Leeds, 1996.
- [132] A. Noyan, *Fizyoloji Ders Kitabı*, 8. baskı. Meteksan, Ankara, 1993.
- [133] M. Monshouwer and K.H.N. Hoebe, *Hepatic (dys-)function during inflammation*, **Toxicol. in Vitro**, 17 (2003) 681-686.
- [134] J.S. Bland, J.A. Bralley and S. Rigden, *Management of chronic fatigue symptoms by tailored nutritional intervention using a program designed to support hepatic detoxification*, Gig Harbor, WA: Health Comm. Inc., 1997.
- [135] S. Cabot, *The Liver and Detoxification*.
http://www.liverdoctor.com/02_liverdetox.asp, (2005).
- [136] Cabot S. The Liver and Detoxification Pathways.
http://www.liverdoctor.com/03_detoxpathways.asp. (2005).
- [137] J.A. Youssef, M.Z. Badr, *Aging and enhanced hepatocarcinogenicity by peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonists*, **Ageing Res. Rev.**, 4 (2005) 103-118.
- [138] M. Percival, *Phytonutrients and Detoxification*, **Clinical Nutrition Insights**, 5 (1997) 1-4.
- [139] S.M. Boyle, R.M.Greenberg and M.O James., *Isolation of CYP2L2 and Two other Cytochrome P₄₅₀ Sequences from a Spiny Lobster, Panulirus argus, Hepatopancreas cDNA Library*, **Mar. Environ. Res.**, 46 (1998) 21-24.
- [140] M.O. James and S.M. Boyle, *Cytochromes P₄₅₀ in crustacea*, **Comp. Biochem. Phys. C**, 121 (1998) 157-172.
- [141] H. Şentürk, *Serbest Radikal Hasarının Hepato-Biliyer Sistem Hastalıklarındaki Rolü*, **Kocatepe Tıp Dergisi**, 5 (2004) 1-8.
- [142] K. Mehta, Van D.H. Thiel, N. Shah and S. Mobanhan, *Nonalcoholic fatty liver disease; pathogenesis and and the role of antioxidants*, **Nutr. Rev.**, 60 (2002) 289-293.
- [143] S. Seki, T. Kitada, H. Sakaguchi, K. Nakatani, K. Wakasa, *Pathologic significance of oxidative cellular damage in human alcoholic liver disease*, **Histopathology**, 42 (2003) 365-371.
- [144] C. Loguercio, A. Federico, *Oxidative stress in viral and alcoholic hepatitis*, **Free Radic. Biol. Med.**, 34 (2003) 1-10.
- [145] L. Serfaty, A. Poujol-Robert, N. Carbonell, O. Chazouilleres, R.E. Poupon, R. Poupon, *Effect of interaction between steatosis and alcohol intake on liver*

- fibrosis progression in chronic hepatitis C*, **Am J. Gastroenterol.**, 97 (2002) 1807-1812.
- [146] C. Rigamontci, E. Mottaran, E. Reale et al., *Moderate alcohol consumption increases oxidative stress in patients with chronic hepatitis C*, **Hepatology**, 38 (2003) 42-49.
- [147] E. Schwedhelm, R. Maas, R. Troost, R. Boger, *Clinical pharmacokinetics of antioxidants and their impact on systemic oxidative stress*, **Clin. Pharmacokinet.**, 42 (2003) 437-459.
- [148] I.A. Leclercq, G.C. Farrell, R. Schriemer and G.R. Robertson, *Leptin is essential for the hepatic fibrogenic response to chronic liver injury*, **J Hepatol.**, 37 (2002) 206-213.
- [149] D.J. Tuma, *Role of malondialdehyde-acetaldehyde adducts in liver injury*, **Free Radic. Biol. Med.**, 32 (2002) 303-308.
- [150] J. Liu, C. Li, M.P. Waalkes et al., *The nitric oxide donor, V-PYRRO/NO protects against acetaminophen induced hepato-toxicity in mice*, **Hepatology**, 37 (2003), 324-333.
- [151] V.C. Cogger, M. Muller, R. Fraser, A.J. McLean, J. Khan, D.G. Le Couteur, *The effects of oxidative stress on the liver sieve*, **J. Hepatol.**, 41 (2004) 370-376.
- [152] M. Aygun, E. Cetinkaya E, Y. Gok, E. Kendi and Cetinkaya B., *Synthesis and Crystal Structure of Hexahydrobis [(1,3-p-dimethylaminobenzyl)-1,3-diazepine]-2-selenone, C₂₃H₃₂N₄Se*, **Anal. Sci.**, 19 (2003) 1093-1094.
- [153] Y. Gok and E. Cetinkaya, *Chalcogeno Ureas Derived from Bis (1,3-diazepan-2-ylidene)*, **Turk J. Chem.**, 28 (2004) 157-162.
- [154] Y. Gok, E. Cetinkaya, İ. Ozdemir, Cetinkaya B. and Lappert M.F., *Synthesis and Characterisation of N- Functionalized Enetetramines, and Their Properties*, **Acta. Chim. Slov.**, 51 (2004) 437-446.
- [155] K.V.P. Chandra Mohan and S. Nagini, *Dose-response effects of tomato lycopene on lipid peroxidation and enzymic antioxidants in the hamster buccal pouch carcinogenesis model*, **Nutr. Res.**, 23 (2003)1403-1416._
- [156] D.L. Drabkin and J.M. Austin, *Spectrophotometric studies, spectrophotometric constants for common haemoglobin derivatives in human, dog and rabbit blood*, **J. Biol. Chem.**, 98 (1932) 719–733.

- [157] O. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall, *Protein measurements with the folin phenol reagent*, **J. Biol. Chem.**, 193 (1951) 265-275.
- [158] J.M. McCord, I. Fridovich, *Superoxide dismutase: An enzymatic function for erythrocyte (hemocuprein)*, **J. Biol. Chem.**, 244 (1969) 6049-6055.
- [159] H. Luck, *Methods of enzymatic analysis*, Verlag Chemie, Academic Press, New York, 1963, p 885-888.
- [160] I. Carlberg and B. Mannervik, *Glutathione reductase*, **Methods Enzymol.**, 113 (1985) 484-490.
- [161] R.A. Lawrance, R.F. Burk, *Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver*, **Biochem. Biophys. Res. Co.**, 71 (1976) 952-958.
- [162] P. Theodorus, M. Akerboom and H. Sies, *Assay of glutathione, glutathione disulfide and glutathione mixed disulfides in biological samples*, **Methods Enzymol.**, 77 (1981) 373- 383.
- [163] J.A. Beuge, S.D. Aust, *Microsomal lipids peroxidation*, **Methods Enzymol.**, 52 (1978) 302-310.
- [164] J.D. Bancroft, A. Stevens and D.R. Turner, *Theory and Practice of Histological Techniques*, USA: Churchill Livingstone, 1990.
- [165] Y. Toyoshima, S. Ohsako, M. Matsumoto, S. Hidaka, H. Nishinakagawa, *Histological and morphometrical studies on the rat nipple during the reproductive cycle*, **Exp. Anim.**, 47 (1998) 29-36.
- [166] Q. Guo, B. Zhao, S. Shen, J. Hou and W. Xin, *ESR study on the structure-antioxidant activity relationship of tea catechins and their epimers*, **Biochim. Biophys. Acta**, 1427 (1999) 13–23.
- [167] G.C. Yen, C.Y. Hung, *Effects of alkaline and heat treatment on antioxidative activity and total phenolics of extracts from Hsian-tsao (Mesona procumbens Hemsl)*, **Food Res. Int.**, 33 (2000) 487-492.
- [168] A. Yildırım, A. Mavi, A.A. Kara, *Determination of Antioxidant and Antimicrobial Activities of Rumex crispus L. Extracts*, **J. Agric. Food Chem.**, 49 (2001) 4083-4089.
- [169] V. Bondet, W.B. Williams and C. Berset, *Kinetics and Mechanisms of Antioxidant Activity using the DPPH*, **Free Radical Method. Food Sci. Technol.**, 30 (1997) 609–615.

- [170] P.A. Hammerschmidt and D.E. Pratt, *Phenolic antioxidants of dried soybeans*, **J. Food Sci.**, 43 (1978) 556–559.
- [171] M. Oyaizu, *Antioxidative activity of browning products of glucosamine fractionated by organic solvent and thin-layer chromatography*, **Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi**, 35 (1986) 771–775.

ÖZGEÇMİŞ

1973 Yılında Mersin'de doğdu. İlk, orta ve liseyi Mersin'de tamamladı. 1992'de İnönü Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde başladığı yüksek öğrenimini 1996 yılında dereceyle tamamladı. Aynı yıl başladığı yüksek lisans öğrenimini 2000 yılında tamamladı. Yine aynı yıl doktora başladı. 1998 yılında Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda araştırma görevlisi olarak göreve başladı. Evli olan Zeliha Selamoğlu Talas İngilizce bilmektedir.