

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SIÇANLARDA DOXORUBİCİN İLE İNDÜKLENMİŞ KROMOZOMAL
HASARLARDA VİTAMİN A'NIN KORUYUCU
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

118 849

BİYOLOG GÜRLER AKPINAR

118 849

Kocaeli Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin Tıbbi Biyoloji ABD.
Yüksek Lisans Programı için Öngördüğü
BİLİM UZMANLIĞI (YÜKSEK LİSANS) TEZİ
olarak hazırlanmıştır

TC YÖNEKÖRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

Danışman: Doç. Dr. M. DOĞAN GÜLKAÇ

KOCAELİ


2001

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

İşbu çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı BİLİM UZMANLIĞI (YÜKSEK LİSANS) TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Başkan Prof.Dr. Ali SAZCI

İMZA



Üye Prof.Dr. Hakkı DALÇIK

İMZA



Üye Doç.Dr. M. Doğan GÜLKAÇ

İMZA



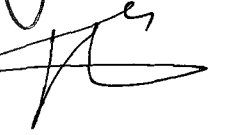
Üye Yrd.Doç.Dr. Hakan SAVLI

İMZA



Üye Yrd.Doç.Dr. Hasan ÜSTÜN

İMZA



ONAY

Yukarıda imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

03..105./2002



Prof.Dr. M. NEJAT GACAR
Enstitü Müdürü
Mühür

ÖZET

Bu tezin amacı, Doxorubicin'in (DXR) indüklediği kromozomal aberasyonlarda Vitamin A'nın koruyucu etkisinin araştırılmasıdır.

Doxorubicin, meme, akciğer karsinomaları gibi solid tümörlerin ve yumuşak doku sarkomalarının tedavisi için kullanılan çok önemli aktif kemoteropötik ajanlardan biridir. DXR normal ve tümör hücrelerinde kromozomal aberasyonları ve mutasyonları indükler ve ek olarak hücrel enzimler tarafından serbest radikal metabolitlerine çevrilebilir. Bu DXR'nin sitotoksitesinin ilaçtan kaynaklanan serbest radikaller aracılığı ile olduğuna açıklık getirmektedir.

Bazı vitaminler, DNA ve diğer hücrel hedeflerde hasar oluşturan serbest radikal veya elektrofiller gibi zararlı oluşumların etkisini ortadan kaldırabilir.

Vitamin A hayvansal orijinli pekçok besin maddesinde esterleşmiş formda bulunur. Ayrıca karaciğer karotenoidleri vit A'ya çevirir.

Vit A, özellikle normal gelişme ve farklılaşma için gerekli olan önemli besinlerden biridir. Vit A'nın, hücrel farklılaşmayı indüklediği, zararlı serbest radikallerden hücreyi koruduğu ve bazı onkogenlerin ekspresyonlarını azalttığı bilinmektedir.

Bu çalışma ratlarda (sıçanlarda), DXR'nin zararlı etkisine karşı vit A'nın iki farklı dozu (25 IU/kg b.w. ve 70 IU/ kg b.w.) koruyucu ajan olarak kullanılmıştır.

25 IU ile muamele edilen sıçanlar da, kemik iliği hücrelerinde DXR'nin oluşturduğu kromozomal anomalilerin anlamlı derecede azaldığı gözlemlenmiştir.

Anahtar Kelimeler : Vitamin A; Doxorubicin; Kromozomal aberasyon; Sıçan

ABSTRACT

The aim of this thesis was to investigate the protective role of Vitamin A in Doxorubicin induced chromosomal aberration.

Doxorubicin is one of the most important active chemotherapeutic agents for treatment of solid tumors such as carcinomas of the breast and lung, and soft tissue sarcomas. Doxorubicin induces mutations and chromosome aberrations in normal and tumor cells, and, in addition, cellular enzymes are capable of converting Doxorubicin into its free-radical metabolites. It puts forward clear that Doxorubicin cytotoxicity mediated by free radicals derived from this drug.

Some vitamins may scavenge harmful species, free radicals or electrophiles, which damage DNA and other cellular targets.

Vitamin A found in most of the foods of animal origin in the esterified form. The liver also converts carotenoids into Vitamin A.

Vitamin A is one of the most important nutrients essential for normal growth and differentiation. It induces cellular differentiation, protects cells from injury by free radicals, decreases the expression of certain oncogens.

In this study, two different doses of vitamin A (25 IU/kg b.w. and 70 IU/kg b.w.) have been used as a protective agent against to the toxic effects of DXR on rats.

We observed that DXR injected rats who pretreated with 25 IU of vitamin A per kg show significantly decreased chromosomal abnormalities in the bone marrow cells.

Key Words : Vitamin A; Doxorubicin; Chromosomal Aberration; Rat

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince kıymetli bilgileri, ilgisi ve katkıları ile her zaman yanımda olan değerli hocam ve danışmanım Doç. Dr. M. Doğan GÜLKAÇ'a,

Her türlü desteklerinden dolayı sayın hocalarım Prof. Dr. Ali SAZCI ve Yrd. Doç. Dr. Hakan SAVLI'ya,

Çalışma arkadaşlarım Arş.Gör. Aylin (ÖZÖN) KANLI ve Arş. Gör. Emel ERGÜL'e,

Her türlü manevi desteğinden dolayı Prof.Dr. Hakkı DALÇIK'a,

Deney sonuçlarının istatistiksel değerlendirmesinde yardımlarını esirgemeyen Yrd.Doç.Dr. T. Müge FİLİZ'e, Yrd.Doç.Dr. Pınar TOPSEVER'e, Yrd.Doç.Dr. Nilay ETİLER ve Arş.Gör. Cavit Işık YAVUZ'a,

Hayvan deneyleri ile ilgili bilgi ve deneyimlerini hiç sakınmadan paylaşan Arş. Gör. Sıtkı ÖZDEMİRCİ'ye,

Her zaman sevgi ve desteğini fazlasıyla hissettiğim aileme ve dostlarıma teşekkür ederim.

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

İÇİNDEKİLER

ÖZET	III
ABSTRACT	IV
TEŞEKKÜR	V
İÇİNDEKİLER	VI
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	X
ŞEKİLLER DİZİNİ	XI
ÇİZELGELER DİZİNİ	XII
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Sitotoksik ilaçlar.....	1
1.1.1. Sitotoksik ilaçların genel özellikleri.....	1
1.1.2. Bulantı ve kusma.....	1
1.1.3. Kemik iliği baskılanması.....	2
1.1.4. Bağışık yanıtın bozulması.....	2
1.1.5. Alopesi.....	2
1.1.6. Üreme İşlevi.....	2
1.2. Vitaminler.....	3
1.2.1. Bulunuşu.....	3
1.2.2. Vitaminlerin sınıflandırılması.....	5
1.2.2.1. Yağda çözüne vitaminlerin genel özellikleri.....	5
1.2.3. A vitamini.....	6
1.2.3.1. Vitamin A'nın sindirim ve emilimi.....	8
1.2.3.2. Vitamin A'nın karaciğerde depolanması.....	9
1.3. Antioksidantlar.....	10
1.3.1. Antioksidanların etki mekanizmaları.....	13
1.3.1.1. Scavenging (süpürücü) etki gösterenler.....	13
1.3.1.2. Quencher (giderici) etki gösterenler.....	13
1.3.1.3. Chain breaking (zincir kırıcı) etki gösterenler.....	13
1.3.1.4. Repair (tamir edici) etki gösterenler.....	13
1.4. Serbest radikaller.....	14
1.4.1. Oksijen metabolitlerinin biyolojik hasardaki rolleri.....	15
1.4.2. Proteinler üzerine etkileri.....	15

1.4.3. DNA hasarı.....	15
1.4.4. Lipid peroksidasyonu (membran lipidleri).....	17
1.5. Kemoterapi ve antineoplastik ajanlar.....	18
1.5.1. Antineoplastiklerin faza özgü etki göstermeleri.....	19
1.5.1.1. Hücre siklusuna spesifik olanlar.....	19
1.5.1.2. Faza spesifik olanlar.....	19
1.5.1.3. Hücre siklusuna spesifik olmayanlar.....	20
1.5.2. Etki mekanizmalarına göre antineoplastik ajanlar.....	20
1.5.2.1. Alkilleyiciler.....	20
1.5.2.2. Antimetabolitler.....	20
1.5.2.3. Bitki Alkoloidleri.....	21
1.5.2.4. Antibiyotikler.....	21
1.5.2.5. Nitrosoüreler.....	21
1.5.2.6. Enzimler.....	21
1.5.2.7. Çeşitli sentetik ilaçlar.....	22
1.5.2.8. Hormonlar.....	22
1.6. Doksorubisin.....	22
1.6.1. Doxorubicin'in biyokimyasal etkisi.....	23
1.6.2. Klinik toksisite.....	26
1.7. Kromozomlar.....	29
1.7.1. Kromozomun morfolojik kısımları.....	29
1.7.1.1. Sentromer (centromere).....	29
1.7.1.2. Sekonder darlık (secondary constriction).....	30
1.7.1.3. Uydu (satellit).....	30
1.7.1.4. Kromomer (chromomere).....	30
1.7.1.5. Kromatin (chromatin).....	30
1.7.1.6. Kromonema (chromonema).....	31
1.7.2. Metefaz ve anafaz kromozomlarının şekli.....	31
1.7.2.1. Metasentrik (median) kromozom.....	31
1.7.2.2. Submetasentrik (submedian) kromozom.....	31
1.7.2.3. Akrosentrik kromozom.....	31
1.7.2.4. Telosentrik kromozom.....	31

1.8. Kromozom anomalileri.....	31
1.8.1. Translocation (yer değiştirme).....	32
1.8.1.1. Reciprocal translocation (karşılıklı translokasyon).....	32
1.8.1.2. Centric fusion (sentrik kaynaşma tipi translokasyon).....	32
1.8.1.3. İnsertional translocation (araya girmetipi translokasyon).....	32
1.8.2. Deletion (eksilme, delesyon).....	33
1.8.3. Duplication (artma, duplikasyon).....	33
1.8.3.1. Tandem duplikasyon.....	33
1.8.3.2. Ters tandem duplikasyon.....	33
1.8.4. İnversion (ters dönme).....	34
1.8.4.1. Paracentrik inversiyon.....	34
1.8.4.2. Perisentrik inversiyon.....	34
1.8.5. Ring kromozom (halka kromozom).....	34
1.8.6. Isochromosome (izokromozom).....	34
1.8.7. Break (Kromozom kırıkları).....	35
1.8.7.1. Kromozom tipi kırıklar	35
1.8.7.2. Kromatid tipi kırıklar	35
1.9. Gap ve kırıkların karşılaştırılması.....	36
2. AMAÇ VE KAPSAM.....	37
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	39
3.1. Gereçler.....	39
3.1.1. Kimyasal maddeler.....	39
3.1.2. Kullanılan tampon ve çözeltiler.....	39
3.1.3. Deneyde kullanılan araçlar.....	41
3.1.4. Kolşisin (colchicine) hazırlanışı.....	41
3.1.5. DXR dozu ve uygulanışı.....	42
3.1.6. Vitamin a'nın dozu ve uygulanışı.....	42
3.1.7. Deneylerde kullanılan hayvanlar.....	43
3.1.8. Kontrol ve deney grupları.....	43
3.1.8.1. Kontrol Grubu	43
3.1.8.2. DXR Grubu.....	44
3.1.8.3. Vitamin A Grupları.....	44

3.2. Yöntem.....	44
3.2.1. Materyalin alınışı ve hipotonik şok.....	45
3.2.2. Fiksasyon işlemi.....	45
3.2.3. Preparatların hazırlanışı.....	46
3.2.4. Preparatların boyanması.....	46
3.2.5. Preparatların incelenmesi.....	46
3.3. İstatistiki değerlendirme.....	46
4. BULGULAR.....	47
4.1. Kontrol grubuna ait bulgular.....	48
4.2. Vit A ₂₅ grubuna ait bulgular.....	48
4.3. Vit A ₇₀ grubuna ait bulgular.....	49
4.4. DXR grubuna ait bulgular.....	50
4.5. Vit A ₂₅ +DXR ₅₀ grubuna ait bulgular.....	50
4.6. Vit A ₇₀ +DXR ₅₀ grubuna ait bulgular.....	51
4.7. Tüm deney gruplarına ait toplam bulgular.....	52
4.8. Mikroskop görüntüleri.....	53
5. TARTIŞMA.....	62
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	72
KAYNAKLAR.....	73
ÖZGEÇMİŞ.....	82

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

DXR:	Dokсорubisin
Vit A:	Vitamin A
K:	Kromatid tipi kırık
İK:	İzokromatid tipi kırık
E:	Exchange figür
T:	Triradial figür
AF:	Asentrik fragman
TAO:	Toplam anomalilerin ortalaması
TK:	Translokasyon kromozomu
IU:	International unit
DM:	Double minute
Mİ:	Mitotik indeks

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1: β -Karotenin, retinaldehid'e parçalanması. Retinol (vit A) ve retinoik asid oluşumu.....	8
Şekil 1.2: Doksorubisin'in yapısı.....	23
Şekil 1.3: Mitokondri seviyesinde, doxorubicin'nin oksidasyonu esnasında süperoksit radikal anyonlarının üretilmesi.....	25
Şekil 1.4: Doksorubisin toksisitesi.....	28
Şekil 4.1 : Herhangi bir anomali bulunmayan tam bir kromozom plağı.....	53
Şekil 4.2 : Tam kromozom plağı (Metefaz başlangıcı).....	54
Şekil 4.3 : Translokasyon kromozomu.....	54
Şekil 4.4 : Kromozomal kırık.....	55
Şekil 4.5 : Triradial figür.....	55
Şekil 4.6 : Asentrik fragment ve triradial figür.....	56
Şekil 4.7 : Kırık ve delesyon.....	56
Şekil 4.8 : İzokromatit, kromatid kırıklar ve DM.....	57
Şekil 4.9 : Kırık ve gap anomalileri.....	57
Şekil 4.10 : Exchange figür.....	58
Şekil 4.11 : Kırık ve exchange figür.....	58
Şekil 4.12 : Kromatid tip kırık.....	59
Şekil 4.13 : Triradial figür.....	59
Şekil 4.14 : Kırık, gap ve quadriradial figür.....	60
Şekil 4.15 : Kırık ve asentrik fragment.....	60
Şekil 4.16 : Exchange figür ve kırık.....	61

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1: Vitaminler ve kimyasal adları.....	6
Çizelge 1.2: Günlük diette alınması uygun bulunan vit A miktarı.....	10
Çizelge 1.3: Doğal ve doğal olmayan antioksidanlar.....	11
Çizelge 3.1: Carnoy's fiksatif solüsyonu.....	39
Çizelge 3.2: Hipotonik solüsyon.....	40
Çizelge 3.3: Kolşisin solüsyonu.....	40
Çizelge 3.4: Fosfat AB buffer.....	40
Çizelge 3.5: Giemsa boya solüsyonu.....	40
Çizelge 4.1 : Deney grupları.	47
Çizelge 4.2 : Kontrol grubunda gözlenen yapısal anomalilerin sayı ve çeşitleri...	48
Çizelge 4.3 : 25 IU/Kg b.w. 'lik vit A doz grubunda gözlenen yapısal anomalilerin sayı ve çeşitleri.....	49
Çizelge 4.4 : 70 IU/Kg b.w. 'lik vit A doz grubunda gözlenen yapısal anomalilerin sayı ve çeşitleri.....	49
Çizelge 4.5 : DXR 50 mg/kg b.w. doz grubunda gözlenen yapısal anomalilerin sayı ve çeşitleri.....	50
Çizelge 4.6 : VA ₂₅ + DXR ₅₀ 'lik kombine doz grubunda gözlenen yapısal anomalilerin sayı ve çeşitleri.....	51
Çizelge 4.7 : VA ₇₀ + DXR ₅₀ 'lik kombine doz grubunda gözlenen yapısal anomalilerin sayı ve çeşitleri.....	51
Çizelge 4.8 : Tüm grupların, Mİ ve toplam anomalileri.....	52
Çizelge 4.9 : Yapısal anomalileri ortalaması \pm SD değerleri.....	52
Çizelge 5.1 : İncelenen her anomali cinsinin One Way-ANOVA testine göre gruplar arası anlamlılıkları.....	63
Çizelge 5.2 : Tukey çoklu karşılaştırma yöntemine göre kromatid tipi kırıkların gruplara göre anlamlılıkları.....	64
Çizelge 5.3 : Tukey çoklu karşılaştırma yöntemine göre izokromatid tipi kırıkların gruplara göre anlamlılıkları.....	65

Çizelge 5.4 : Tukey çoklu karşılaştırma yöntemine göre exchange tipi anomali- lerin gruplara göre anlamlılıkları.....	66
Çizelge 5.5 : Tukey çoklu karşılaştırma yöntemine göre triradial figürlerin gruplara göre anlamlılıkları.....	66
Çizelge 5.6 : Tukey çoklu karşılaştırma yöntemine göre asentrik fragmentlerin gruplara göre anlamlılıkları.....	67
Çizelge 5.7 : Tukey çoklu karşılaştırma yöntemine göre translokasyon kromo- zomu tipi anomalilerin gruplara göre anlamlılıkları.....	68
Çizelge 5.8 : Tukey çoklu karşılaştırma yöntemine göre toplam anomali ortalamalarının gruplara göre anlamlılıkları.....	69



1. GENEL BİLGİ VE İLGİLİ ÇALIŞMALAR

1.1 Sitotoksik İlaçlar

1.1.1 Sitotoksik ilaçların genel özellikleri

Sitotoksik ilaçların kansere karşı etkisinin yanı sıra normal dokuya zarar verme potansiyeli de vardır. Kemoterapi radikal tedavi yapma amacıyla olduğu gibi, yaşamı uzatma ya da belirtileri hafifletmek için de uygulanabilir. Kemoterapi, giderek daha fazla sayıda vakada radyoterapi ile ve cerrahi tedaviyle ya da her ikisiyle kombine edilerek ya neoadjuvan tedavi (başlangıçta kemoterapi ile birincil tümörün küçültülmesi ve böylece lokal tedavinin daha az zarar verici ya da etkili olmasının sağlanması) şeklinde ya da adjuvan tedavi (subklinik metastaz riskinin yüksek olduğu bilinen zamanlarda, birincil hastalığın kesin tedavisinin ardından yapılan uygulama) şeklinde gerçekleştirilmektedir. Kemoterapide kullanılan bütün ilaçların yan etkileri vardır, beklenen yarar ile kabul edilebilir toksik etki arasında bir denge kurulmalıdır. Hastalık sonucunda ilacın vücutta maruz kaldığı işlemlerin bozulmasına sık rastlandığından ve bu da toksik etkinin artmasına neden olabileceğinden, ilacın metabolize olduğu ve vücuttan atıldığı yerlerin bilinmesi büyük önem taşır. Bu tür ilaçlar kullanıldığında sık görülen toksik etkilerin en önemlileri şunlardır (Ağabeyoğlu et al, 1999; Kayaalp, 1991).

1.1.2 Bulantı ve kusma

Kemoterapi uygulanan pek çok hasta bulantı ve kusma nedeniyle önemli ölçüde rahatsızlık çeker ve tedaviye devam etmek istemez. Bulantı ve kusma akut (tedavi başladıktan 24 saat içinde), gecikmiş (ilk kez tedaviden 24 saat sonra ortaya çıkar) ya da beklentiyle psikolojik olarak (daha sonraki dozlardan önce ortaya çıkar) gelişebilir. Gecikmiş ve beklentiyle gelişen belirtiler akut olanlardan daha güç kontrol altına alınır ve farklı bir tedavi gerektirir .

İlaçlar emotejen potansiyellerine göre; hafif derecede, orta derecede ve yüksek derecede emotejen olan tedavi olarak sınıflandırılabilir. Doksorubisin orta derecede emotejen olan tedavi sınıfına girmektedir (Ağabeyoğlu et al, 1999; Kayaalp, 1991).

1.1.3 Kemik iliği baskılanması

Hemen hemen bütün sitotoksik ilaçlar kemik iliğinde baskılamaya yol açarlar. Bu etki genellikle tedavinin uygulanmasından 7- 10 gün sonra ortaya çıkarsa da bazı sitotoksiklerde daha geç görülür. Her tedaviden önce periferik kan sayımı yapılmalı, kemik iliği toparlanmamış ise doz azaltılmalı yada tedavi ertelenmelidir (Ağabeyoğlu et al, 1999; Kayaalp, 1991).

1.1.4 Bağışık yanıtın bozulması

Kortikosteroidler ve diğer bağışıklığı baskılayan ilaçların doku reaksiyonlarını değiştirmesi sonucunda enfeksiyon hızla yayılabilir. Klinik bulguların baskılanması septisemi ya da tüberküloz gibi hastalıkların tanı konmadan önce çok ilerlemiş olmasına neden olabilir (Ağabeyoğlu et al, 1999).

1.1.5 Alopesi

Geri dönüşümlü saç dökülmesi sık rastlanan bir komplikasyondur, ancak derecesi ilaca ve hastaya göre değişir (Ağabeyoğlu et al, 1999; Kayaalp, 1991).

1.1.6 Üreme işlevi

Sitotoksik ilaçların çoğu teratojendir ve gebelikte, özellikle ilk üç ayda uygulanmamalıdır. Sitotoksik tedaviye başlanılmadan önce gerekiyorsa gebeliği önleme konusunda hastaya tavsiyelerde bulunulmalı, doğum kontrolüne tedavi sona erdikten sonra ne kadar süreyle devam edilmesi gerektiği de belirtilmelidir. Alkilleyici bir ilaç içermeyen tedavi rejimlerinin fertilité üzerinde fazla etkisi

olmayabilir, ancak alkilleyici bir ilaç içeren rejimlerde erkekte kalıcı steriliteye yol açma riski vardır. Kadınlar bu denli etkilenmese de, menapozun erken başlaması nedeniyle doğurganlık süreleri kısalmış olabilir.

Sitotoksik kemoterapiden sonra fertilitenin etkilenmediği hastalarda fetal anomaliler ya da düşük oranında herhangi bir artış kaydedilmemiştir.

Sitotoksik antibiyotiklerin çoğu radyomimetik etki gösterir; normal dokulardaki toksik etkiyi önemli ölçüde artıracığından aynı zamanda radyoterapi uygulanmamalıdır (Ağabeyoğlu et al, 1999; Kayaalp, 1991).

1.2 Vitaminler

1.2.1 Bulunuşu

Vitaminler ile ilgili araştırma ve buluşların yeni olmasına karşın insan sağlığı üzerindeki etkilerinin oldukça eski bir tarihçesi vardır. Eski Mısırlılarda gece körlüğü karaciğer yedirmekle tedavi edilirmiş. Onaltıncı yüzyılda uzun deniz yolculuklarında, yeteri kadar taze meyve ve sebze yiyemeyen gemicilerde “iskorbüt” hastalığını önlemek için günlük yiyeceklerle biraz limon alınması öngörülmüştür. J. Lind limonla iskorbütü iyileştirdiğini 1747’deki yayını ile bildirmiştir (Baysal, 1990).

Ondokuzuncu yüzyıl sonlarına değin bu gözlemlerin bilimsel esasları üzerinde fazla düşünülmemiştir. O zamana değin canlıların beslenmesinde yalnız enerji veren öğelerle protein ve minerallerin gerekli olduğu sanılmaktaydı. İlk bilimsel gözlem Lunin’e aittir. Lunin, 1880 yıllarındaki deneyinde, sütün bileşimindeki bütün öğeleri yapay olarak sıçanlara yedirmesine rağmen, hayvanların öldüğünü görmüş ve gözlemini “ sütün gibi doğal bir yiyeceğin bileşimindeki bilinen öğeler yanında yaşam için gerekli diğer bazı öğeler de vardır” diyerek açıklamış, fakat konu üzerine gereken dikkati çekememiştir.

İngiltere’de, Hopkins, 1906-1912 yılları arasında yaptığı çalışmalar sonunda yiyeceklerin bileşiminde o zamana değin bilinen besin öğelerinden protein, yağ, karbonhidrat ve minerallerden başka büyüme için gerekli olan bir

takım moleküllerinde bulunduğunu ortaya koymuştur. Bu bilinmeyen moleküllerin alkolde eriyen organik bileşikler olabileceğini ileri sürmüştür. Bu buluşundan dolayı sonradan Nobel ödülü kazanmıştır (Baysal, 1990).

Amerika Birleşik Devletleri'nde, Osborne ve Mendel, 1908-1911 yıllarında laboratuvar hayvanları ile yaptığı deneyler sonucunda sütün sulu kısmında bulunan bilinmeyen bazı moleküllerin yaşam üzerinde etkili olduklarını gözlemlemişlerdir. Bu araştırmacılarla, Mc Collum ve Davis, 1913 yılında, birbirinden ayrı olarak tereyağında ve yumurtada suda erimeyen bazı öğelerin bulunduğunu ve bunların yaşam için gerekli olduğunu ortaya koymuşlardır. Bu araştırmaların sonucu olarak o zamana kadar bilinen karbonhidrat, protein, yağ ve minerallerden ayrı olarak, doğal yiyeceklerin bileşiminde organik yapıda, bazıları suda, bazıları yağda eriyen etmenlerin beslenme için gerekli olduğu ortaya konmuştur (Baysal, 1990).

Bu bilinmeyen etmenlere önce besin hormonları denmiş, sonradan Mc Collum, bunlara tereyağında bulunan için “ yağda eriyen A” ve sütte bulunan içinde “suda eriyen B” etmenleri deyimini teklif etmiştir. Funk 1912 yılında, pirinç kabuğundan elde ettiği molekülün kimyasal yapısında “amin” gurubunun bulunduğunu ve canlıların yaşamı için elzem olduğunu görerek “vitalamine” (yaşam için gerekli amin) deyimini kullanmıştır. Sonrada deyim “VİTAMİN” şeklini almıştır (Baysal, 1990).

Vitaminleri “daha önce bilinen besin öğelerinden ayrı yapıda, normal büyüme ve yaşamın sürdürülmesi için gerekli organik öğelerdir” şeklinde basitçe tanımlayabiliriz. İleri yapılı bitkiler vitaminleri kendileri yapabilirler. Hayvanlar ise vitaminlerin büyük bir çoğunluğunu vücutlarında yapamazlar ve besinlerle almak zorundadırlar (Baysal, 1990).

Vitaminlerin vücut çalışmasındaki etkileri, biyokimyasal tepkimelerin düzenlenmesi ile ilgilidir. Bazıları koenzim şeklinde, bazıları da hormonlara benzeyen etkinlik gösterirler. Vitaminlerin insan sağlığına etkisini genel olarak üç grupta toplayabiliriz: (1) Büyümeye yardım, (2) Sağlıklı nesillerin oluşmasına yardım, (3) Sinir ve sindirim sistemini normal çalışması, besin maddelerinin elverişli olarak kullanılması ve vücut direncine yardım (Baysal, 1990).

1.2.2 Vitaminlerin sınıflandırılması

Vitaminler, fiziksel özelliklerine (suda ve yağda erime) göre daha başlangıçta (1906-1913), A ve B diye gruplandırılmışlar. Sonradan (1926-1938), bu grupların içinde kimyasal özellikleri ve vücut çalışmasındaki işlevleri yönünden birbirinden ayrı birçok vitaminin varlığı ortaya konulmuştur. Bu vitaminler bulunuş sıralarına veya vücut çalışmasındaki görevlerini tanımlayan kelimelerin baş harflerine göre harflerle adlandırılmışlardır. Daha sonları (1932-1948) bu vitaminlerin kimyasal yapılarının gösterilmesi ile kimyasal isimleri de açıklanmıştır. Vitaminlerin kimyasal isimleri ve sınıflandırılması Çizelge 1.1'de verilmiştir (Baysal, 1990).

1.2.2.1 Yağda çözünen vitaminlerin genel özellikleri

Yağda (lipitde) çözünen vitaminlerin tümü izopren türevleri olan apolar hidrofob moleküllerdir. Vücuda gıdalarla alınmaları zorunludur, bu vitaminler ancak yağ emilimi normal olduğu zaman etkin şekilde emilebilirler. Kanda tıpkı diğer apolar lipitler gibi lipoproteinler içinde veya özgül bağlayıcı proteinlere bağlanmış olarak taşınmaları zorunludur (Murray et al, 2000).

Steatore ve safra sistemi bozuklukları gibi yağda çözünen vitaminlerin sindirim ve emilimini etkileyen hastalıkların tümü bu vitaminlerin eksikliğine yol açabilir. Diyetle yetersiz bulunmaları veya malabsorpsiyona bağlı eksiklik halleri vitaminlerin fizyolojik işlevlerini yerine getirmemeleri sonucu ortaya çıkan sendromlara neden olur. Vücudun yağda çözünen vitaminleri gereksinim dışında fazla depo edebilme gücünden ötürü aşırı A ve D vitamini alınması halinde zehirlenme görülebilir. A vitamini ve provitamin A olan β -karoten ile E vitamini antioksidandırlar. Bunların ateroskleroz ve kanser önlemedeki rolleri antioksidan niteliklerine bağlanmıştır (Murray et al, 2000).

Çizelge 1.1: Vitaminler ve kimyasal isimleri.

<u>Vitaminler</u>	<u>Kimyasal adı</u>
Yağda Eriyenler :	
Vitamin A	Retinoidler (Retinol, retinal, retinoik asit)
Vitamin D	Calciferol, Cholecalciferol (Kolekalsiferol)
Vitamin E	Tocopherol (alfa, beta, gamma)
Vitamin K	Phylloquinones
Suda eriyenler :	
Vitamin C	Ascorbic acid (askorbik asit)
Vitamin B ₁	Thiamin, Aneurine (tiamin)
Vitamin B ₂	Riboflavin
Niasin, (PP vitamini)	Nicotinic acid, nicotinamid
Vitamin B ₆	Pyridoxin, pyridoxamin, pyridoxal
Pantotenik asit	Pantothenic acid
Biotin	Biotin
Folik asit	Peteroylglutamic acid
Vitamin B ₁₂	Cobalamin
Kolin	Cholin

1.2.3 A vitamini

Vitamin A, ilk olarak tanımlanan vitaminlerdendir. Mc Collum ve Davis ile Osborne ve Mendel 1913 yılındaki çalışmalarında bazı yağların büyümeye yardım ettikleri ve dolayısıyla bu yağların içinde genç farelerin büyümeleri ve sağlıklı olmaları için gerekli önemli bir etmenin olduğunu ortaya koymuşlardır. Vitamin A (vit A), 1937 yılında balık karaciğeri yağından kristaller olarak ayrılmış ve kimyasal yapısı ortaya konmuştur. Bugün, yapay vit A preparatları kolaylıkla bulunabilmektedir. Bu preparatlar daha çok asetik ve palmitik asitle esterleşmiş

şekildedir. Örneğin, A vitamini asetat, A vitamini palmitat gibi. Suda çözünebilen preparatları da vardır (Marcus and Coulston, 2001).

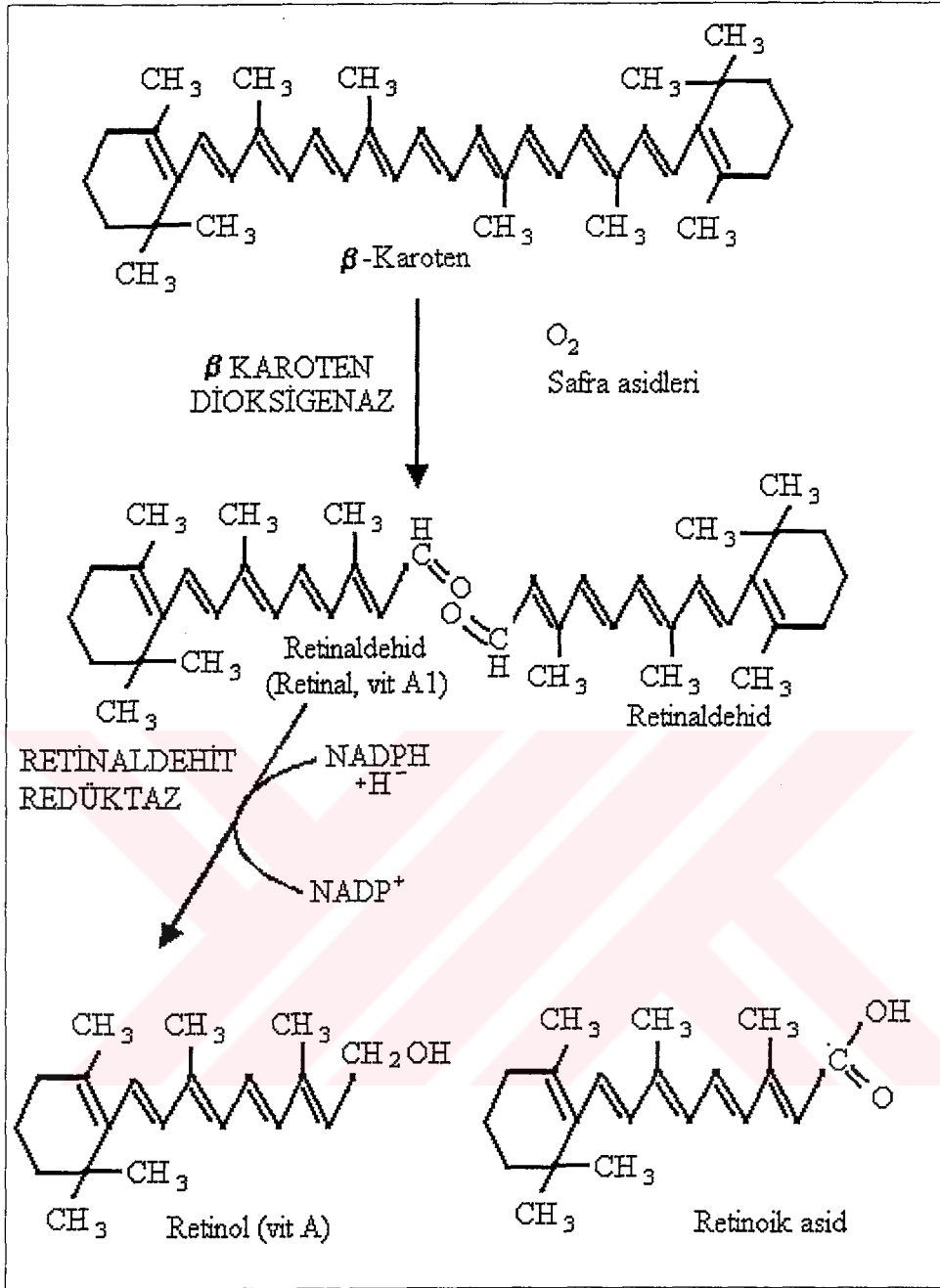
A vitamini aktivitesi taşıyan öğeler steroid grubuna dahildir. Bunların yapı taşı izopren $\text{CH}_3=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CH}=\text{CH}_2$ üniteleridir. Biyosentezde bu üniteler asetil gruplarının birleşmesi sonucu oluşur. İsooprenler birleşerek vit A aktivitesi taşıyan molekülleri yaparlar.

Vit A, hayvanlarda bulunan retinol, retinal ve retinoik asit için kullanılan genel bir terimdir. Retinoidler terimi ise bu üç bileşiği ve vit A ile benzer aktivite gösteren diğer sentetik bileşikleri tanımlamakta kullanılır. Sebzelerde A vitamini, sarı bir pigment olan β -karoten halinde bir provitamin olarak bulunmakta olup bu madde karbon zincirlerinin aldehid uçlarından birbirine bağlanmış iki molekül retinalden oluşur. β -karoten, ince bağırsakta β -karoten dioksigenaz enzimi tarafından retinaldehid'e çevrilir. Daha ileri hücre içi metabolizmayla retinol ve retinoik asite dönüştürülürler. Bu bileşikler karaciğere taşınır ve burada vit A, lipositlerde ester formunda depo edilir (Broom, 1999) (Şekil 1.1).

Son zamanlardaki çalışmalar β -karotenin bir antioksidan olarak rolüne dikkat çekmektedir. Bu rolün serbest oksijen radikallerinin yol açtığı hastalıkların gelişimini engellediği düşünülmektedir (Dragnev et al, 2000).

Amerika Birleşik Devletleri ve Avrupa'da vit A'nın kansere ve kardiyovasküler hastalıklara karşı koruyucu rolünün değerlendirildiği geniş klinik deneyler ve epidemiyolojik çalışmalar devam etmektedir (Dragnev et al, 2000).

Normal epitel hücrelerinin gelişmesi ve farklılaşması retinoidlere yakından ilişkilidir. Pek çok tümörün epitel hücrelerinden (karsinomlar) kaynaklandığı göz önüne alındığında, vit A'nın kritik bir role sahip olduğu düşünülmektedir. Epidemiyolojik çalışmalar vit A içeren diet ve kanser riski arasında ters bir ilişki olduğunu göstermişlerdir (Marcus and Coulston, 2001).



Şekil 1.1: β -Karotenin, retinaldehid'e parçalanması. Retinol (vit A) ve retinoik asit oluşumu.

1.2.3.1 Vitamin A'nın sindirim ve emilimi

Diyetteki yağlarda çözülmüş olan retinol esterleri barsak lümeninde safra damlacıkları halinde dağılır ve hidrolize olur, bunu barsak epiteline doğrudan emilim izler. Alınan β -karotenler, β -karoten dioksigenaz tarafından oksidatif

olarak kesilir. Bu kesilmede moleküler oksijen kullanılır, safra tuzlarının varlığında reaksiyon hızlanır ve iki molekül retinaldehid üretilir. Barsak mukozasında retinaldehid NADPH kullanan özgül bir retinaldehid redüktaz ile retinol'e indirgenir. Retinaldehidin küçük bir kısmı retinoik asid'e okside olur. Retinol n büyük kısmı doymuş yağ asitleri ile esterlenir ve kan dolaşımına geçen lenf şilomikronları içine yerleştirilir. Bunlar şilomikron kalıtları haline çevrilir ve karaciğer tarafından, retinol içerikleri ile birlikte alınır (Murray et al, 2000).

1.2.3.2 Vitamin A'nın karaciğerde depolanması

Vit A karaciğerde, olasılıkla lipoprotein karışımı halinde lipositler içersinde ester halinde depolanır. Dokulara aktarılması için hidroliz edilir ve retinol, aporetinol-bağlayıcı protein'e (RBP) bağlanır. Oluşan holo-RBP golgide işlenir ve plazmaya salınır. Dokulara yüzey reseptörleri vasıtası ile alınır. Retinoik asit plazmada albümine bağlı olarak taşınır. Karaciğer dışı hücrelere girdiği zaman retinol hücresel bir retinol bağlayıcı proteine bağlanır.

A vitamini toksisitesi (A hipervitaminozu) RBP'nin kapasitesi aşıldıktan sonra görülür ve hücreler bağlı olmayan retinole maruz kalır (Murray et al, 2000).

Günlük dietteki vit A ihtiyaı izelge 1.2'de gösterilmiştir. Bu tabloda belirtilen değerler sağlıklı ABD bireyleri göz önünde tutularak hazırlanmıştır (Murray et al, 2000).

Çizelge 1.2: Günlük diette alınması uygun bulunan vit A miktarı.

	Yaş (yıllar)	Ağırlık (kg)	Boy (cm)	Vit A (µg RE)*
Yeni doğan	0.0-0.5	6	60	375
	0.5-1.0	9	71	375
Çocuklar	1-3	13	90	400
	4-6	20	112	500
	7-10	28	132	700
Erkekler	11-14	45	157	1000
	15-18	66	176	1000
	19-24	72	177	1000
	25-50	79	176	1000
	51+	77	173	1000
Kadınlar	11-14	46	157	800
	15-18	55	163	800
	19-24	58	164	800
	25-50	63	163	800
	51+	65	160	800
Hamilelik				800
Emzirme Dönemi	1. 6 ay			1300
	2. 6 ay			1200

* Retinol eşdeğerleri. 1 retinol eşdeğeri = 1 µg retinol veya 6 µg β-karoten

1.3 Antioksidanlar

Normal metabolizmanın yan ürünü olarak veya iyonlaştırıcı radyasyon, ilaçlar çevre kirliliği ve diğer zararlı kimyasal maddelerin etkisi ile ortaya çıkan oksidanlarla organizmanın savunması dört başlıkta incelenebilir (Kayaalp, 1991).

1. Oksidanları artırıcı etkileri azaltmak; Oksidatif stress yapıcı nedenler ve risk faktörlerinin iyi belirlenmesi, bunlardan uzak durulması ve oluşmuş ise etkileri ile mücadele edilmesi ilk aşamadır.
2. Başlatılan biyokimyasal reaksiyonların kırılması; Başlatılan biyokimyasal reaksiyonlar sonucunda hasarlı dokuda ve çevresinde oksidanların miktarı zararlı düzeye çıkmaktadır. Bu yüzden, bu reaksiyonları kırmaya yönelik girişimler dolaylı olarak oksidanların miktarını azaltacaktır.
3. Oluşan mediyatörlerle aktive olan, başta nötrofiller olmak üzere oksidan salgılayan inflamatuvar hücreleri inaktive etmek için non-steroid antiinflamatuvar ilaçlardan yararlanılması.
4. Oksidanlarla asıl mücadele belirli düzeyi aşmış oksidanlarla doğrudan etkileşip onları inaktif hale getiren “Antioksidanlar” ile olmaktadır.

Antioksidan moleküller endojen (organizma tarafından sentezlenen) veya ekzojen (dışarıdan besinlerle alınan) kaynaklı yapılar olup, oluşan oksidan moleküllerin hücreye zarar vermesini engellemektedir.

Antioksidanları doğal antioksidanlar ve dışarıdan verilen ilaçlar olmak üzere başlıca iki ana grupta toplayabiliriz (Kayaalp, 1991) (Çizelge 1.3).

Çizelge 1.3: Doğal ve doğal olmayan antioksidanlar.

Doğal Antioksidanlar

- A. Enzimler
 - ⇒ Süperoksit dismutaz (SOD)
 - ⇒ Katalaz (CAT)
 - ⇒ Glutasyon Peroksidaz (Gpx)
 - ⇒ Hidroperoksidaz
 - ⇒ Sitokrom-C Oksidaz
- B. Makromoleküller
 - ⇒ Seruloplazmin
 - ⇒ Transferrin
 - ⇒ Ferritin
 - ⇒ Hemoglobin

- ⇒ Miyoglobin
- ⇒ Haptoglobin

C. Mikromoleküller

- ⇒ A vitamini ve Beta karoten
- ⇒ C vitamini
- ⇒ E vitamini ve tokoferoller

D. Tiyol Kapsayan Mikromoleküller

- ⇒ Glutasyon (GSH)
- ⇒ N-Asetil Sistein
- ⇒ Ubikinon

İLAÇLAR

- ⇒ Demir Şelatörleri(Desferoksamin ve diğerleri)
- ⇒ Ebselen ve Selenyum
- ⇒ Sitokinler (TNF ve İnterlökin-1)
- ⇒ Ksantin oksidaz inhibitörleri (Allopurinol vb.)
- ⇒ Trimetazdin
- ⇒ İndipamid
- ⇒ Mannitol
- ⇒ 21-Aminosteroidler
- ⇒ Rekombinant SOD
- ⇒ Flavonoidler
- ⇒ Kaptopril
- ⇒ Probucol

1.3.1 Antioksidanların etki mekanizmaları

Antioksidan ajanlar, oksidan moleküllere karşı etkilerini dört yolla gösterirler. Bunlar:

1.3.1.1 Scavenging (süpürücü) etki gösterenler;

Yeni radikal oluşumunu engellerler. Bu gruba örnek olarak bazı enzimleri ve metal bağlayıcı bazı proteinleri verebiliriz. Örnek olarak; süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, katalaz, ferritin ve seruloplazmin verilebilir (Kayaalp, 1991; Winrow et al, 1993).

1.3.1.2 Quencher (giderici) etki gösterenler;

Oksidanlarla etkileşip onlara bir H⁺ aktararak aktivitelerini söndüren ve inaktif hale getiren bileşiklerdir. Örnek olarak; vitaminler, flavonoidler ve mannitol verilebilir (Kayaalp, 1991; Winrow et al, 1993).

1.3.1.3 Chain breaking (zincir kırıcı) etki gösterenler;

Zincirleme olarak devam eden reaksiyonları belli yerlerden kırarak, oksidan etkiyi durdururlar. Örnek olarak ; bazı vitaminler, ürik asit, bilirubin ve albumin gösterilebilir (Kayaalp, 1991; Winrow et al, 1993).

1.3.1.4 Repair (tamir edici) etki gösterenler;

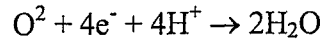
Bu grupta DNA tamir enzimleri ve metiyonin sülfoksid redüktaz sayılabilir (Kayaalp, 1991; Winrow et al, 1993).

1.4 Serbest radikaller

Serbest radikaller, dış orbitallerinde eşleşmemiş bir elektrona sahip atom ya da moleküllerdir. Bir atomdaki elektronların durumları çeşitli parametrelerle tanımlanır. Bunların bir tanesi de elektron spinidir. Spin, elektronun kendi ekseninde etrafında dönmesinden doğan parametredir. Kararlı atom ve moleküllerde arkadaş elektronlar, zıt spin değerlerine sahip çiftler oluştururlar. Eğer atomda eşleşmemiş tek bir elektron varsa elektron kendi zıt spin değerindeki başka bir elektron ile eşleşmek için büyük bir eğilim gösterir. Serbest radikaller bu sebepten dolayı son derece aktif bileşiklerdir (Basaga, 1990; Naqui and Chance, 1986).

Serbest radikaller hücre ve dokularda normal metabolizma sırasında oluşabileceği gibi, organizmanın ısı, ışık, radyasyon, antineoplastik ilaçlar, fotoliziz, anestezipler, aromatik hidrokarbonlar, sigara dumanı ve hava kirliliği gibi dış etmenlere maruz kalması ile de oluşabilirler (Freeman and Crapo, 1982).

Organizmadaki radikaller daha çok oksijen radikalleri şeklinde kendini gösterir. Karasız bir yapıda olan oksijen molekülü biyolojik sistemlerde genelde indirgenerek yani son yörüngesine "e⁻" girişi ile oksijen radikalini oluşturur (Naqui and Chance, 1986). Normal şartlarda O₂'nin %98'i mitokondride yer alan sitokrom oksidaz tarafından indirgenir. O₂ dört elektron alarak tam redüksiyona uğrayarak su molekülünü oluşturur ve reaksiyonlar sırasında serbest radikal oluşmaz. Ancak redüksiyon tam olmazsa oksijen molekülü serbest radikal oluşturabilir (Barber and Harris, 1994; Weiss, 1986).



Solunumda kullanılan oksijenin sadece %3-5'i süperoksit anyon oluşumuna yol açar.

Moleküler oksijenin suya indirgenmesi sırasında oluşan serbest radikaller şu şekilde sıralanabilir (Gutteridge, 1995):

1. Süperoksit radikali (O^{o-}₂)
2. Hidroperoksit radikali (HO^o₂) ve hidrojen peroksit (H₂O₂)
3. Hidroksil radikali (OH^o)
4. Singlet oksijen (¹O₂)

1.4.1 Oksijen metabolitlerinin biyolojik hasardaki rolleri

Organizmada oluşan serbest radikaller doğal antioksidan sistemler ile ortadan kaldırılmazlarsa hücreler için toksik etki gösterirler. O_2^- ve H_2O_2 radikalleri hedeflerine ulaşmak için plazma membranını geçebilirler. H_2O_2 yüksüz ve küçük bir molekül olduğu için membranı kolayca aşabilir. OH° ve hipohaloz asitleri ise buldukları bölgedeki hedefleriyle reaksiyona girerler (Halliwell, 1999).

Hücredeki tüm komponentler serbest radikallerle reaksiyona girebilirler. Bunlar proteinler, nükleik asitler, membran lipitleri ve sitozolik moleküllerdir, bu reaksiyonlar sonucunda hücrede fonksiyonel ve yapısal bozukluklar meydana gelir (Gutteridge and Halliwell, 2000).

1.4.2 Proteinler üzerine etkileri

Fenilalanin, metiyonin, sistein, histidin, triptofan ve tirozin içeren proteinler serbest radikallere karşı oldukça duyarlıdır.

Serbest radikaller amino asitlerin oksidasyonu yanında, peptit bağlarının hidrolizi, disülfit bağlarının oluşumu ve çapraz bağlanmalara yol açabilirler. Bunun sonucunda enzimler fonksiyon kaybına uğrayabilirler. Ör: Ca^{+} -ATPaz ve $(Na^{+}K^{+})$ ATPaz tiyol gruplarının oksidasyonu ile aktive kaybına uğrayabilir. Hücre içi ve dışı iyon dağılımı bozulur (Risberg et al, 1991).

Proteinler üzerindeki hasarın artması hücre canlılığını etkiler. Amino asitler konformasyonel değişikliğe uğrayabilir. HO° radikali de protein çapraz bağlanmalarını başlatabilir ve amino asit bağlarını yıkabilir (Risberg et al, 1991).

1.4.3 DNA hasarı

Serbest radikallerin hastalıklardaki ve genetik materyalin harabiyetindeki rolü son birkaç yıl içerisinde önemli çalışmalara konu olmuştur. Son yapılan araştırmalarda lipid peroksidasyon olayı genotoksite ve karsinogenezis arasında

yakın bir ilişkinin varlığı vurgulanmaktadır. DNA harabiyeti serbest radikallerin oluşturduğu lipid peroksidasyonunun basamaklarında meydana gelebilmektedir (Vaca et al, 1988).

DNA'nın etkilendiği ilk basamak lipid peroksidasyonunun başlaması için gerekli olan serbest radikaller aracılığı ile olmaktadır. İkincisi lipid peroksidasyonunun ilerlemesi sırasında oluşan lipid radikali ile DNA arasındaki reaksiyonla gerçekleşmektedir. Üçüncü ve en büyük mekanizma lipid peroksidasyonunun radikal olmayan değişik ürünleriyle DNA arasındaki reaksiyonla ortaya çıkmaktadır. Bütün bu reaksiyonlar DNA'daki nükleobazların modifikasyonunun ve DNA'nın yapısal olarak harabiyetine neden olmaktadır. Eğer endojen tamir mekanizmaları yeterli değilse bu harabiyet DNA aktivitesinin bozulmasını ve sonuç olarak hücrenin metabolik aktivitesinin ve özel fonksiyonlarının zarar görmesine neden olmaktadır (Hruszkewycz, 1988).

Berger ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada demir içeren çeşitli minerallerin radikal oluşturma kapasitesi ve bu radikallerin oluşturduğu DNA harabiyeti incelenmiştir. Oluşan radikallerin purin bazlarını hidroksillediği ve sonuçta 8-OH Guanin ve 8-OH Adenin olduğu vurgulanmıştır. 8-OH Guaninin karsinojenik ve mutajenik etkisi üzerinde durulmuştur (Berger et al, 1993).

Yapılan bir başka çalışmada pH: 7.04 de H_2O_2 ile demir iyonlarının inkübasyonu OH^\bullet radikalinin oluşumuna neden olurken bu OH^\bullet Radikali de DNA bazlarının kimyasal modifikasyonlarını oluşturmaktadır. OH^\bullet radikal temizleyicilerinden superoksit dismutaz (SOD) kullanılması DNA'dan oluşan modifikasyon ürünlerinde önemli bir düşmeyi sağlayabileceği gösterilmiştir. Yine bu çalışmada bu modifikasyon ürünlerinin karsinojenik ve mutajenik olduğu belirlenmiştir (Aruoma et al, 1989).

Mitokondriyal DNA'nın da lipid peroksidasyonu ürünleri için diğer bir hedef yapı olabileceği bildirilmiştir. Oksidatif stress ve yaşa bağlı mitokondriyal DNA seviyesinde azalma olduğu bilinmektedir (Vaca et al, 1988).

Hruszkewcz ve Bergtold tarafından yapılan bir çalışmada, izole mitokondrilerde lipid peroksidasyonu sonucu bu mitokondrilerden elde edilen

**Y.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

nükleik asitlerin 8-OH Guanin içeriğinde belirgin bir artış olduğu gösterilmiştir (Hruszkewycz and Bergtold, 1990).

Oksidatif stresin artmasıyla, oksidize olmuş nükleotidler, zincir kırıkları veya DNA-protein cross-linkleri artmaktadır. DNA hasarlarının artması, DNA tamir mekanizmaları ile önlenmeye çalışılmakta, tamir gerçekleşmeyecek boyutta ise hücre apoptosise girmektedir. Hatalı tamirler ise DNA dizisinde değişikliklere sebep olmakta ve dolayısıyla bunun sonucu olarak kanser gelişimi, metabolik fonksiyon bozuklukları ortaya çıkmaktadır (Fehrenbach and Northoff, 2001).

1.4.4 Lipid peroksidasyonu (membran lipidleri)

Serbest radikallerin dokularda en önemli toksik etkilerinden biri de lipid peroksidasyonudur. Lipid peroksidasyonuna en duyarlı bileşikler membran fosfolipidleri yapısında yer alan doymamış yağ asitleridir. Doymamış yağ asitlerinin oksidatif yıkımı olan lipid peroksidasyonu hücre için zarar vericidir.

Lipid peroksidasyonu serbest radikallerin (R°) etkisi ile doymamış yağ asitlerinin yan zincirindeki metilen karbonundan bir hidrojen atomunun çıkarılması ile başlar ve lipid radikali (L°) oluşur. Lipid peroksidasyonu üç aşamada incelenebilir (Sevanian and Hochstein, 1985).

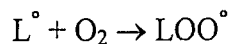


2. İlerleme.

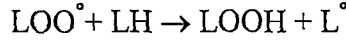
3. Sonlanma.

(LH: Yağ Asidi, R° : Radikal, L° : Lipid radikali, RH : İndirgenmiş Radikal, LO : Alkoksil Radikali, LOO° : Peroksi Radikali.)

Dayanaksız bir bileşik olan lipid radikali oksijen ile reaksiyona girerek lipid peroksil radikalini oluşturur.



Lipid peroksil radikali başka bir radikal tepkimesini başlatarak kendisi lipid hidroksiperokside indirgenir. Böylece ilerleme basamağında tek bir yağ asidinin etkilenmesi ile başlayan reaksiyon yüzlerce yağ asidi yan zincirinin lipid hidroksiperoksitlerine ($LOOH$) dönüşmesi ile devam eder.



LOO° radikali, hidroksil radikali ve singlet oksijenden daha uzun ömürlü olduğu için hücrede difüzyon ile yer değiştirerek başka radikal tepkimelerini başlatır.

Lipid peroksidasyonu iki radikalın birleşmesi veya bir antioksidanla reaksiyona girmesi ile lipid hiperoksidlerinin aldehit veya diğer karbonil bileşiklerine dönüşmesi ile sona ermektedir.

Lipid peroksidasyonu ortamda serbest olarak Fe^{+2} , Cu^{+2} gibi metal iyonların bulunması durumunda yeniden başlayabilir (Gregus and Klaassen, 2001).

1.5 Kemoterapi ve antineoplastik ajanlar

Antikanser kemoterapisinin amacı, kanserli hücrelerin elemine edilmesi ya da metastaz oluşumunun önlenmesidir. Bakteri ve protozoon infeksiyonlarında kemoterapinin başarılı sonuçlar vermesi, memeli hücrelerinin kontrolsüz, aşırı ve istilacı bir şekilde patolojik proliferasyonuna bağlı olan malign neoplazmalarında kimyasal ajanlar tarafından iyi edilebileceği olasılığını düşündürmüştür. İlk kez Huggins ve Hoges'in prostat kanserinde östrojen kullanması ile kanserin ilaçla tedavisine başlanılmıştır. Bu noktadan hareketle "antineoplastik ilaçlar" konusunda geniş araştırmalar yapılmış ve birçok sentetik ve doğal kaynaklı ilaç tedaviye sokulmuştur (Kayaalp, 1991).

Antineoplastik kemoterapinin ana ilkesi, hastanın normal hücrelerine zarar vermeksizin tümör hücresinin büyümesini ve çoğalmasını durdurmak veya onları yok etmektir. Kanserli bir hücreyle normal bir hücreyi birbirinden ayıran spesifik bir karakter olmamasına karşın, genetik, metabolik, kinetik ve membran farklılıkları ayırt edilebilmektedir. Antikanser ilaçlarının hedefi olan selektif bir şekilde tümör hücresini öldüren antikanser ilacı bulunmamıştır. Normal hücreye en az düzeyde etki yapan ilaç, kanser kemoterapisinde ideal ilaçtır. Kullanılan ilacın hedefi daha çok DNA sentezi veya fonksiyonlarıdır. En büyük toksik antitümör etkilerini hücre siklusu içinde DNA sentezine giden hücreleri inhibe etmek sureti ile yaparlar (Kayaalp, 1991).

Son yıllarda kanser kemoterapisinin ikinci malinitelere yol açtığı konusundaki bulgular artmıştır. Klinik olarak vakaların artması, tedavi ve lösemi arasındaki ilişkiyi kuvvetlendirmektedir. Bu nedenle tedavide kullanımı düşünülen bütün antineoplastik ilaçların etki mekanizmaları araştırılmalıdır (Kirkwood, 1996).

Kemoterapotik ilaçların etkileri şu şekilde özetlenebilir;

1. Nükleik asit biyosentezinin inhibisyonu
2. Nükleik asit yapısının bozulması
3. Protein sentezinin inhibisyonu
4. Mitozun inhibisyonu
5. Hormonal çevrenin değişimi

1.5.1 Antineoplastiklerin faza özgü etki göstermeleri

Kemoterapide kullanılan ilaçlar hücre siklusu fazlarından birinde veya birkaçında etkili olmaktadır. Buna bağlı olarak da bu ajanlar üç büyük grupta toplanır (Kayaalp, 1991).

1. Hücre siklusuna spesifik olanlar (Siklus spesifik)
2. Faza spesifik olanlar (Faz spesifik)
3. Hücre siklusuna spesifik olmayanlar

1.5.1.1 Hücre siklusuna spesifik olanlar

Toksik etkilerini bu siklusun herhangi bir devresindeki hücreler üzerinde gösterirler. Fakat G_0 gibi dinlenme periyodunda olan hücreler üzerinde bir etkileri yoktur. Mekloreタミン, Karmustin bu gruba giren ilaçlardır (Chamber et al, 2001).

1.5.1.2 Faza spesifik olanlar

Siklusun özel bir fazında etkilidirler. Örneğin; antimetabolitler S fazında, vincristine (VCR), vinblastin (VBL) M fazındaki hücrelere etkilidir (Chamber et al, 2001).

1.5.1.3 Hücre siklusuna spesifik olmayanlar

Hem çoğalan hem de dinlenme anındaki tüm hücrelere toksik etkide bulunurlar. Mitomycin C, Chlorombusil bu gruba giren antineoplastiklerdendir (Chamber et al, 2001).

1.5.2 Etki mekanizmalarına göre antineoplastik ajanlar

1.5.2.1 Alkilleyiciler

DNA çift zincirinde birden fazla noktaya kovalent bağla bağlanmak suretiyle DNA molekülünü alkilerler. Bu bağlanma, bir purin bazı olan guaninin 7 sayılı azot atomu üzerinden olur. Guaninin 7N'den alkilenmesi, bu maddenin 1 numaralı azot atomunun asiditesini artırır. Molekülde oluşan söz konusu değişme, onun sitozin yerine timin ile baz çifti yapmasını teşvik eder. Oluşan “anormal baz çifti” genetik kodun yanlış okunmasına yani replikasyon ve transkripsiyon sırasında guaninin adeninmiş gibi okunmasına neden olur. Bu olay yeni DNA zincirinde ve mRNA moleküllerinde önemli bozukluklara yol açar. En önemlisi oluşan aktif ilaç iki ayrı zincir arasında köprü yapar ve bu durumda DNA'nın replikasyonu mümkün olmaz (Chamber et al, 2001).

Chlorambusil, Cyclophosphamide, onun yapısal izomerleri olan Trofosfamide bu grup ilaçlardandır (Ağabeyoğlu et al, 1999).

1.5.2.2 Antimetabolitler

Bu grup ilaçlar kendi metabolitlerinin yapısına benzerler. Hücresel enzimlerle kolay etkileşim gösterirler. Fakat fonksiyon açısından hücre metabolizmasını bozarlar. Bu gruba giren ilaçlardan bazıları Cytosine Arabinoside, Metatoraxat, 6- Merkaptopurin'dir (Chamber et al, 2001).

1.5.2.3 Bitki Alkaloidleri

Bu maddeler hücre bölünmesini mitozda durdurur ve hücrenin ölümüne yol açar. Vincristine, vinblastin gibi Vinca alkaloidleri bu gruba dahildir (Chamber et al, 2001).

1.5.2.4 Antibiyotikler

Bunlar genellikle streptomyces grubu mantarlardan elde edilmişlerdir. DNA molekülünün bazıları arasına girerek replikasyona engel olmak suretiyle tümör hücreleri üzerine etkili olduğu gibi (Actinomycine-D gibi) DNA'ya bağlanarak mRNA yapımını engelleyerek de (Daunorubicine, Doxorubicin, Mithramycin gibi) etki gösterirler (Chamber et al, 2001).

1.5.2.5 Nitrosoüreler

Çift zincirli DNA'yı çapraz olarak bağlarlar. Lipidlerde süratle eridikleri için kan beyin bariyerini kolayca aşabilirler. Carmustine, Lomustine bu gruba örnek ilaçlardır (Chamber et al, 2001).

1.5.2.6 Enzimler

En sık kullanılan L-Asparaginase (L-Asp)'dır. Asparagine'nun Aspartik asit ve Amonyak'a hidrolizini kataliz eder. Asparagine esansiyel bir amino asittir. Tümör hücreleri böylece L- asparagine kullanamaz. Protein sentezi bozulur. RNA ve DNA'nın sentezleri engellenmiş olur. L- Asparaginase hücre siklusunun G₁ evresine etki yaparak zararlı olur (Chamber et al, 2001).

1.5.2.7 Çeşitli sentetik ilaçlar

Bu ilaçlardan biri olan Cisplatinum DNA sentezini inhibe ederken, Dacarbazine ise DNA'ya bağlanıp RNA yapımına engel olurlar (Chamber et al, 2001).

1.5.2.8 Hormonlar

Bazı tümör hücrelerinin hormonal mikro çevrelerini bozarak bunların çoğalmasını engellerler. Bu gruba giren bazı ilaçlar Tamoxifen, Mafoxidin, Prednisol'dur (Chamber et al, 2001).

1.6 Doksorubisin

Kemoterapotik ajanların antibiyotikler sınıfına dahil edilen Doksorubisin (DXR) bir antrasiklin bileşigidir. *Streptomyces peucetius* var. *caesius* kültürlerinden izole edilmiş bir antibiyotiktir (www.artemis.unmc.edu:82).

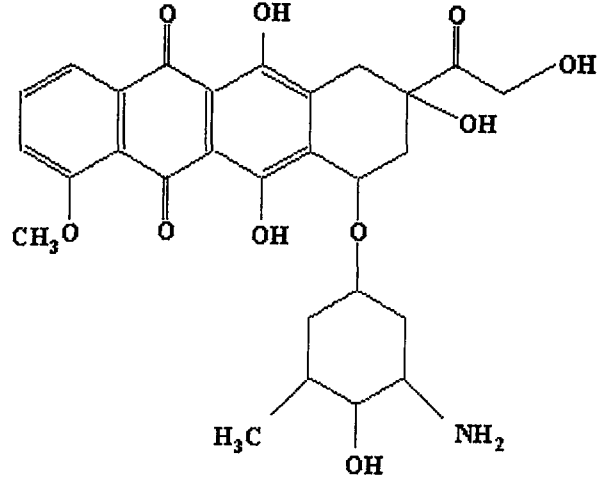
İlacın moleküler formülü $C_{27}H_{29}NO_{11} \cdot HCl$ 'dir (<http://www.rxlist.com/cgi/generic2/doxor.htm>).

Antrasiklin antibiyotikler geçen onbeş yıl içinde kanser tedavisi için kullanıma sunulmuş en aktif bileşiklerdir. Şu an genel kullanımda olan DXR ve Daunorubicin olup birçok analogları için yoğun çalışmalar söz konusudur (<http://www.cancerhelp.org.uk/help/default.asp?page=4025>).

DXR'nin geniş bir klinik kullanım alanı vardır. Hodgkin, Hodgkin dışı lenfomalar, sarkomalar, akut lösemi, aynı zamanda meme, akciğer ve over karsinomalarının tümünü etki alanına alabilmektedir. Ayrıca safra tümörleri ve prostat karsinomaları, tiroid, endometrium, baş, boyun ve diğer solid tümörler üzerine de etkisi tespit edilmiştir (Kirkwood et al., 1996).

DXR dört antrasiklin çekirdeğin bir şeker molekülüne bağlanması ile meydana gelmektedir (http://dtp.nci.nih.gov/docs/static_pages/compounds/123127.html, 2001) (Şekil 1.2).

Doxorubicin



Şekil 1.2: Doxorubicin'in yapısı

Bu yapının özelliği DXR molekülüne hem lipofilik hem de hidrofilik özellik kazandırmasıdır. Yapıya şekerin katılması ve tetrasiklin halkasının varlıkları antitümör aktiviteyi sağlayan etmenler olarak kabul edilmektedir (Chochoua et al, 1988).

Molekülün glikozidik bağın bulunduğu noktadan ayrılması, çözünürlüğü olmayan inaktif bir aglikon oluşmasına sebep olur. Glikozidik bağ enzim ve asit katalizi ile kopmaya elverişli olduğundan oral kullanım ilacın inaktivasyonu ile sonuçlanır.

Antikanser ilaçlarının büyük bir çoğunluğu son derece sitotoksik olup çoğu mutajeniktir. DXR, insan neoplazmalarına karşı etkili bir şekilde geniş olarak kullanılan bir antikanser ilacıdır. Bununla birlikte mutajenik ve kanserojenik olup, şiddetli kromozom hasarları meydana getirdiği iyi bilinmektedir (Au and Hsu, 1980).

1.6.1 Doxorubicin'in biyokimyasal etkisi

DXR'nin öne sürülen etki mekanizmaları şunlardır :

a. DNA'ya bağlanma:

İnterkalasyonla çift iplikli DNA içersine sıkı bir şekilde bağlanma

İ.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

b. Serbest radikal oluşturmak:

DXR'nin redüksiyonu sonucu çeşitli serbest radikaller oluşabilir. Bu radikaller, DNA kırıklarına, lipid peroksidasyonuna, proteinlerin ve DNA'nın alkolasyonuna sebep olur.

c. Membranla ilişkisi:

Direkt hücre membranı ile ilişkiye girerek membran fonksiyonunu değiştirir. DXR, kardiyak hücrelerde lipid biyosentezini değiştirebilir. Bu da membran kompozisyonunda ve de fonksiyonunda bozulmalara neden olur. DXR'nin iki muhtemel membran hedefi vardır; bir fosfolipid türevi olan kardiyolipin ve bir protein olan spectrin (Chachoua et al, 1988).

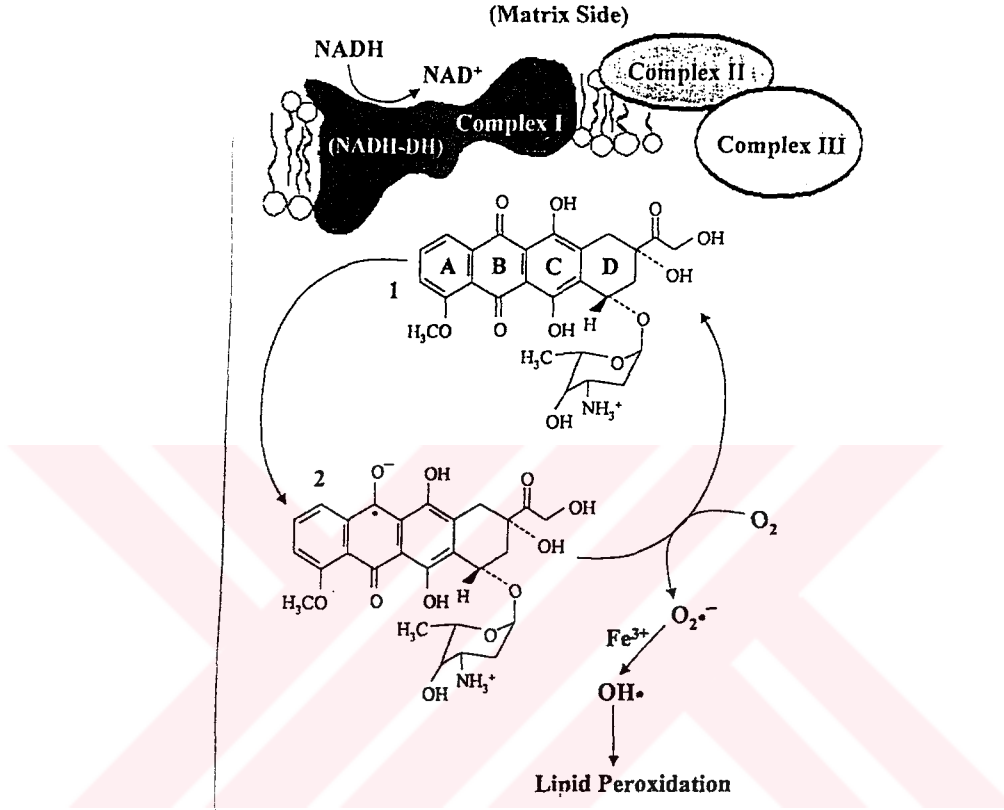
İlacın intrasellüler olarak en yüksek konsantrasyonda olduğu yer çekirdektir. Hücre DXR'ne maruz kaldıktan sonra floresan mikroskopi ile tespit edilebilir. Çekirdek içinde antrasiklinler DNA'ya yüksek afinite ile bağlanır.

Bu bağlanma DNA çift zinciri içine guanin-sitozin baz çifti arasında enine yerleşmek suretiyle (intercalation) olur. Bu mekanizma ile replikasyon ve transkripsiyonu bozarak antineoplastik etkilerini oluştururlar. DXR döneme özgü olmayan bir ilaçtır. Fakat S dönemindeki hücrelerde etkinliği en fazladır. Ayrıca topoizomeraz inhibitörüdür ve topoizomeraz II'ye bağlı DNA yarılması (cleavage) yapar (Bino, 1990). Bunun sonucu olarak çift iplik kırıkları oluşur ([http:// www.medicine. uiowa. edu /pharmacology / Lecturenotes/ 105-125 /2001/ Koland / JGK-antineo-immuno. PDF, 2001](http://www.medicine.uiowa.edu/pharmacology/Lecturenotes/105-125/2001/Koland/JGK-antineo-immuno.PDF)).

Antrasiklinlerin DNA fonksiyonlarını inhibe etmeleri sadece araya girerek değil aynı zamanda tek bağlı kesikler ve DNA'nın bunu izleyen kırılmaları ile de olur. DNA molekülünün yakın civarında süperoksit gibi reaktif serbest radikaller oluşması da bu tür hasardan sorumlu tutulabilir (Tritton, 1991). DXR kromozomal hasarları indükleyen serbest radikal üreticisi olarak bilinmektedir (Antunes, 1999).

Kinon ve hidrokinon gruplarının getirdiği özellikler sayesinde, antrasiklinler hem peroksitleri hem de serbest radikalleri harekete geçirecek potansiyele sahiptir. DXR toksisitesinde serbest radikal oluşumunun rolü konusu, aktif bir araştırma konusudur (Cummings et al, 1991).

Antrasiklinlere bağlı oluşan kardiyotoksiteden serbest radikallerin üretilmesi mekanizması sorumlu tutulan muhtemel bir mekanizmadır. Yapılan çalışmalarda antioksidan alfa-tokoferolün tümör cevabını bozmaksızın kalpte lipid peroksidasyonu azalttığı ve kardiyotoksiteyi düşürdüğü gösterilmiştir (Tesoriere et al, 1994).



Şekil 1.3: Mitokondri seviyesinde, doxorubicin'nin oksidasyonu esnasında süperoksit radikal anyonlarının üretilmesi (Ramos et al, 2001).

Hidrojen peroksit ve lipid peroksitlerin redüksiyonunu katalizleyerek hücreyi benzeri bir zarardan koruyan enzim olan glutatyon peroksidaz, DXR uygulamasından sonra kalp dokusunda korumayı sağladığı gözlenmiştir (Villani, 1991).

Nükleik asit sentezinin inhibisyonu ve DNA yapısının harap edilmesi sitotoksitenin tek sebebi olmayabilir. Hücre kültüründe, hücreler DNA aktivitesine etkili olan ilaç konsantrasyonunun altındaki ilaç konsantrasyonlarında ölçmüşlerdir. İzole edilmiş mitokondride respirasyonun inhibisyonu ve hücre zarı fonksiyonlarında değişikliklerin meydana gelişi düşük antrasiklin seviyelerinde ortaya çıkmaktadır. Spektrin proteini ve kardiyolipin fosfolipidi antrasiklin için

hücre zarındaki bağlantı noktalarıdır. Kardiyolipin tümör hücre zarının ve kardiyak mitokondrinin önemli bir bileşenidir. Antrasiklinlerin kardiyolipine bağlanmalarının kardiyak ve tümör hücreleri için toksisite oluşturduğu düşünülmüştür. Aynı zamanda antrasiklinlerin hücre zarından sodyum ve kalsiyum geçirgenliğini artırması kardiyak toksisite ile ilişkilidir (Aruoma et al, 1989; Berger et al, 1993).

İlaç kandan iki fazda temizlenir. Önce karaciğerde hızla metabolize olur. Metabolize olan DXR extravasküler kompartımana dağılır ve daha sonra tekrar plazmaya döner. Böylece ilacın plazmada kalış süresi uzar ve yarı ömrü 31.7 saattir. İlaç karaciğer, akciğer, kalp ve böbreklere hızla varır ve bu organlarda bazı değişimlere yol açabilir. İdrarın rengini kırmızıya boyar, ilacın idrardan atılımının %23'ü aktif metabolit (adriamycinol şeklinde) olur. Kalanı aglycon şekline dönüşür ve konjuge olur (etki göstermez) (Chamber et al, 2001; <http://www.medsafe.govt.nz/Profs/datasheet/d/doxorubicinhydrochlorideinj.htm>, 2001).

1.6.2 Klinik toksisite

Oldukça geniş spektrumlu ve güçlü etkili olmasının sağladığı üstünlüklerin yanında, toksisitesinin fazlalığı bir sakınca oluşturur.

Doz 60-75 mg/m² veya 0,6 mg/kg olarak uygulanmaktadır. Genellikle kombinasyon içinde kullanılır. Genellikle toplam kümülatif doz vücut yüzeyinin m²'si başına 550 mg ile sınırlıdır; bunun üstüne çıkıldığında giderek artan ölçüde semptomatik ve ölümcül olabilecek kalp yetersizlikleri görülebilmektedir. Daha önce kalp hastalığı olan hastalar, yaşlılar ve miyokarda radyasyon verilmiş olan hastaların tedavisinde özel olarak dikkat edilmesi gerekir. Doksorubisin ayrıca mesaneye doğrudan verilebilir (<http://www.nursespr.com/members/database/ndrhtml/doxorubicinhydrochloride.html>, 2001).

İlacın toksik etkisi olarak olguların %46'sında bulantı ve kusma, %5'inde ateş, %100'ünde alopesi, %75'inde stomatitis (ülserasyon gibi) görülür. Kemik iliği baskılanması genellikle kemoterapiden sonra ikinci haftada hastaların %50-%74'ünde görülür.

Kardiyotoksisite genellikle ciddi ve günümüzde bu ilacın kullanımını kısıtlayan en önemli faktördür.

Son yıllarda kardiyotoksisitenin kalpte, ilaç oksijen kaynaklı serbest radikal oluşumu ve bunun sonucunda lipid biomembranlarının peroksidasyonu, hücresel ve organsal yapı fonksiyonlarının bozulmasından kaynaklandığı konusunda fikir birliği vardır. Yirmi yıllık araştırmadan sonra antitümör aktivite için bir tek izahın yeterli olamayacağı savunulmuş ve bunun için dört ayrı mekanizma ortaya atılmıştır (Teoriere, 1994; Newsome, 1997).

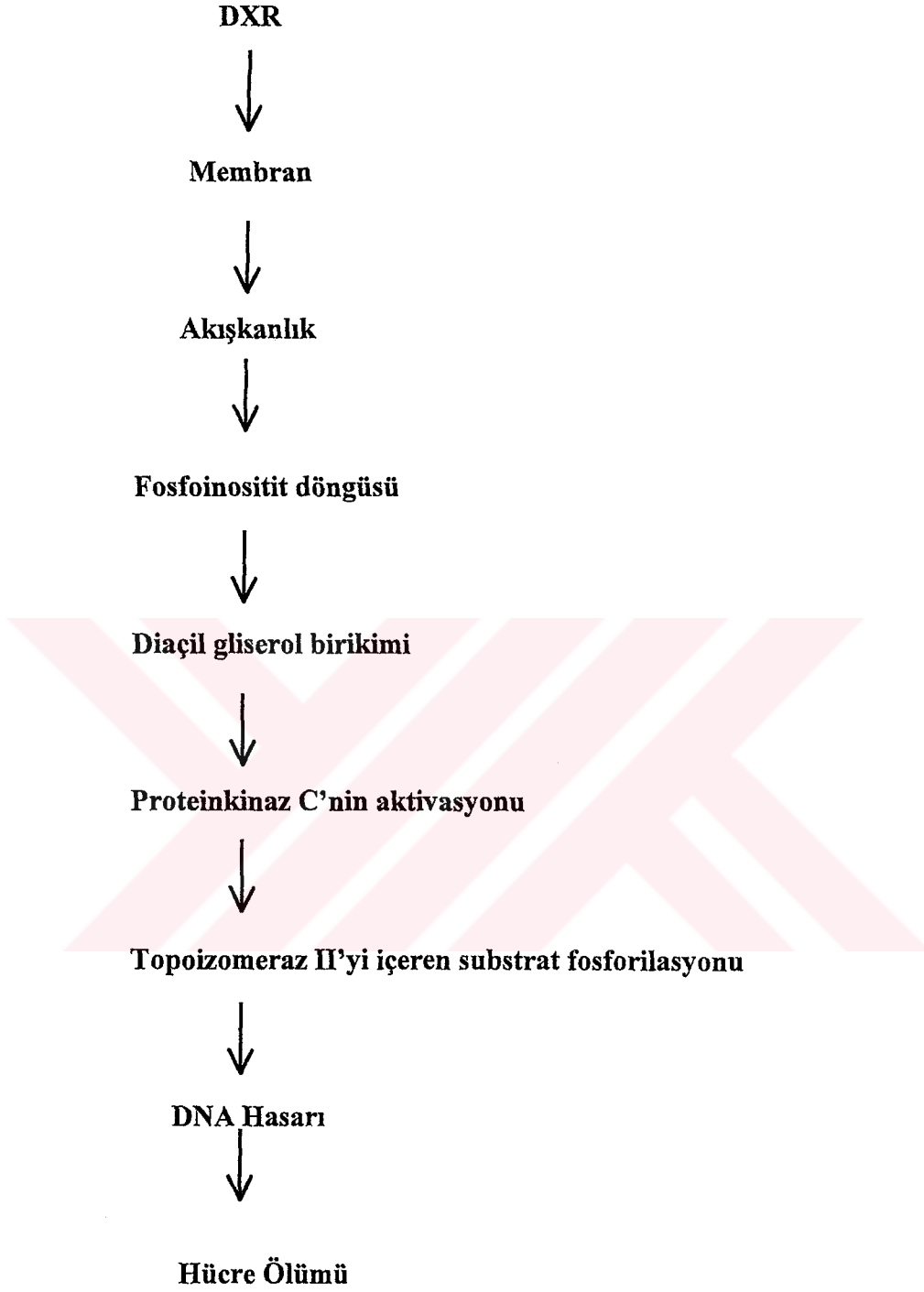
1. DNA interkalasyonu ve topoizomeraz inhibisyonu.
2. Enzimle katalizlenen ve demirle düzenlenen serbest radikal oluşumu.
3. DNA'ya kovalan bağlanma.
4. Hücre zarı yapısında bozulma.

Bu görüşe göre DXR önce hücre yüzeyiyle etkileşime girerek akışkanlığı değiştirip membran yapısında bozulmaya sebep olmakta. Daha sonra fosfotidil inositol döngüsünde bir artışa yol açar ve proteinkinaz C aktive edilir. Bu enzimin fosforilasyon için birçok önemli substratı olabilir ama bu aşamada topoizomeraz II önem taşır. Topoizomeraz II aktivitesi fosforilasyon ile kontrol edilmektedir. DXR topoizomeraz II inhibitörü olduğu için enzimin katalitik etkilerinin tamamını bloke eder. Ancak enzim işlevindeki bozulmalar DNA yıkılmasını tetikler.

Hayvanlar üzerinde yapılan birçok in vitro ve in vivo çalışmalarla, DXR'nin kromozomal aberasyonlara neden olduğu gösterilmiştir (Tapiero et al, 1986). Yine birçok çalışmalarda teratojenik, mutajenik ve klastojenik olduğu kanıtlanmıştır (Teoriere, 1994; Newsome, 1997).

Yapılan bir çalışmada Çin hamster hücrelerinin senkronize kültürlerinde 6 kemoterapötik ajanın uygulanarak memeli siklusu üzerindeki etkileri araştırılmış, bu ajanların içinden DXR uygulanan hücrelerde S fazına girişinde zayıf bir etkiye sahip oldukları gözlenirken, hücrelerin mitozaya ulaşmalarını engellemede ise tam etkiye sahip olduğu görülmüştür.

Tritton ise DXR toksitesini Şu Şekilde Őematize etmiştir (Tritton, 1991).



Şekil 1.4: Doksorubisin toksisitesi

DXR uygulanarak yapılan kemoterapiye karşı klinik cevap hastaların kendi farmokinetiği, tümörün büyüklüğü, damarlanması gibi birçok faktörlere bağlıdır (Kayaalp, 1991).

1.7 Kromozomlar

İnsan kromozomları ilk kez 1857 yılında Virchow tarafından görülmüş, fakat kromozom sözcüğü 1888 yılında Waldeyer tarafından kullanılmıştır. 1917 yılında Wieman tarafından X ve Y kromozomları tanımlanabilmiştir. İnsan kromozomlarının kesin sayısının belirlenmesi 1956 yılında Tjio ve Levan tarafından, insan fetal karaciğer fibroblastlarıyla yaptıkları kültürde kesin rakamın 46 olduğunu ortaya koymalarıyla olmuştur. Bu sayı sıçan ve fareler için 42'dir. Bunlardan cinsiyetin belirlenmesiyle ilişkili olan X ve Y kromozomlarına gonozom geriye kalan kromozomlara ise otozom kromozomları denilmektedir (Passarge,1995 ; Cooper, 1996).

1.7.1 Kromozomun morfolojik kısımları

Kromozomlar ışık mikroskobu altında incelenebilirler, bu incelemede bazı morfolojik özellikleri ayrımsal olarak hemen dikkati çeker. Bunları kısaca şu şekilde sıralayabiliriz.

1.7.1.1 Sentromer (centromere)

Kromozomlar boyandığında en az boyanan bölge olarak dikkati çeken kesim olan sentromer, yapıya katılan özgün proteinlerle beraber "kinetochore" ismini de alır. Kimi zaman da "ilksel darlık" (primer constriction) adı verilir. Fakat kinetokor terimi fonksiyonel olan sentromeri yada metafazdaki sentromeri anlatmak için kullanılır. Sentromer normal olan her kromozomda bir tanedir ve hücre bölünmesi esnasında kromozomların iğ iplikçiklerine tutunmasını sağlar (Passarge,1995 ; Cooper, 1996).

1.7.1.2 Sekonder darlık (secondary construction)

Sekonder darlık, sentromer dışındaki nükleolar (NOR) ya da nükleolar olmayan tüm darlıkları kapsamakta olup sentromerden ayrı özelliklere sahiptir. Sentromer tüm kromozomlarda bulunmasına karşılık bu oluşumlar ancak belli kromozomlarda bulunurlar (örneğin insan 1, 9 ve 16 numaralı kromozomlarında) (Passarge,1995 ; Cooper, 1996).

1.7.1.3 Uydu (satellit)

İnce bir sapla kromozomların kısa kollarına bağlanan, yuvarlak düğme biçimindeki kromatin materyaline satellit ismi verilmektedir. İnsan D ve G grubu ile sıçan kromozomlarında gözlenmektedir (Passarge,1995 ; Cooper, 1996).

1.7.1.4 Kromomer (chromomere)

Işık mikroskobu altında, mayotik ve mitotik profazdaki kromozomların hemen hepsinde yoğunlaşmış kromatid ya da kromozom kesimleri fark edilmektedir ki değişik yoğunlukta boyanan bu kesimler enine bantlar veya tespih tanesi şeklinde görülebilmektedir bu yapılara kromomer ismi verilir. Fakat kromomerik yapı kromozomların daha kondanse olduğu metafaz ve anafaz evrelerinde görülmemektedir (Passarge,1995 ; Cooper, 1996).

1.7.1.5 Kromatin (chromatin)

Genetik maddenin ya da kromozomun interfaz dönemindeki adına kromatid denmektedir. Oysa aynı madde G₁ evresinde kromatin adını almaktadır. Yani genetik materyalin interfaz dönemindeki kümeleşmiş ve yumaklaşmış durumuna denmektedir. Kısaca DNA ve protein karışımına verilen isimdir. İki türlü kromatin bilinmektedir: Heterokromatin (heterochromatin) ve ökromatin (euchromatin) (Passarge,1995 ; Cooper, 1996).

1.7.1.6 Kromonema (chromonema)

Kromozom ve kromatidlerde ışık mikroskobu ile görülebilen en küçük dalları anlatmak için kullanılmıştır. Kromonemanın 2,4 ya da daha çok iplikten oluştuğu ve bunların özel sarmallar yaparak kromatidleri oluşturduğu düşünülmektedir (Passarge,1995 ; Cooper, 1996).

1.7.2 Metefaz ve anafaz kromozomlarının şekli

Metefaz ve anafaz kromozomları, sentromer lokalizasyonu ile total ve kol uzunluklarına göre dört gruba ayrılır (Passarge,1995 ; Cooper, 1996).

1.7.2.1 Metasentrik (median) kromozom

Sentromeri ortada ve iki kolu birbirine eşit olan kromozomlardır (Passarge,1995 ; Cooper, 1996).

1.7.2.2 Submetasentrik (submedian) kromozom

Sentromeri merkezden uzak ve iki kolu birbirine eşit olmayan kromozomlara denir (Passarge,1995 ; Cooper, 1996).

1.7.2.3 Akrosentrik kromozom

Sentromeri kromozomun bir ucuna çok yakın olan kromozomlara denir. Sıçan kromozomlarının tamamı bu grup kromozomlara girmektedir (Passarge,1995 ; Cooper, 1996).

1.7.2.3 Telosentrik kromozom

Bu tip kromozomlarda sentromer en uçta bulunur (Alberts et al, 1994).

1.8 Kromozom anomalileri

Yapısal kromozom anomalileri, kromozomların şekillerinde ve düzenlenişlerinde bozukluk meydana getiren UV, kanserojen ve mutajen ajanlar,

kemoterapotikler gibi kimyasal ve çevresel etkilerle oluşabilirler. Belli başlı yapısal hasarlar şunlardır.

1.8.1 Translokasyon (yer değiştirme)

Bir kromozomdan kopan parçanın bir diğer kromozoma taşınıp yerleştiğini ifade eder. Yani, kırılma gösteren heterolog iki kromozomdan birinin kırılan parçasının, diğer kromozomun kırılan parçasının üzerine yapışmasına translokasyon denir. Translokasyonlar üç grup içerisinde toplanır (Connor and Ferguson-Smith, 1997).

1.8.1.1 Reciprocal translocation (karşılıklı translokasyon)

Bir kırılma sonucu, homolog olan ya da olmayan kromozomlardan kopan parçaların karşılıklı olarak yer değiştirmesine denir (Connor and Ferguson-Smith, 1997).

1.8.1.2 Centric fusion (sentrik kaynaşma tipi translokasyon)

Akrosentrik kromozomlarda görülen özel bir resiprokal translokasyon tipidir. Bu translokasyonda, kromozomlardan birinde sentromere yakın kısa kolunda, diğerinde sentromere yakın uzun kolunda birer kırılma olur. Daha sonra kromozomların uzun ve kısa kolları birleşerek translokasyon kromozomlarını oluşturur. Ancak ortaya çıkan bu anormal kromozomlarda küçük olanı çoğunlukla bir sonraki bölünmede dejenere olarak kaybolur. Bu tip translokasyona Robertsonian translokasyon da denilmektedir (Connor and Ferguson-Smith, 1997).

1.8.1.3 İnsertional translocation (araya girme tipi translokasyon)

Transposition adı da verilir. Homolog olmayan iki kromozomdan birinde çift kırık diğerinde ise tek kırık meydana gelir. İki kırılma olan kromozomdaki parça tek kırılma olan kromozoma gider ve kaynaşır. Bu kromozomlardan birinde eksilme diğerinde ise artma söz konusudur (Connor and Ferguson-Smith, 1997).

1.8.2 Deletion (eksilme, delesyon)

Delesyon, bir kırılma sonucu kromozomun küçük bir parçasının kopması demektir. Kopma iki türlü olabilir; tek kırık sonucu kromozomun parçası kopabilir (terminal delesyon) ya da iki kırık sonucu kopan parça aradan çıkar diğer parçalar yeniden kaynaşır (intertisyel delesyon). Ancak, terminal delesyon pek olası değildir. Çünkü kopan kromozom kolu yapışkan durumda kalır ve yeni bir parçanın buraya eklenmesi beklenebilir. Kopan parça sentromersiz küçük bir parça ise bir sonraki hücre bölünmesinde kaybolur (Connor and Ferguson-Smith, 1997).

1.8.3 Duplication (artma, duplikasyon)

Homolog iki kromozomdan birinde çift kırık sonucu kopan parça, diğerinde tek darbe sonucu kopan aralığa girerek kaynaşacak olursa duplikasyon olgusu ortaya çıkar. Ancak duplikasyon daha çok mayoz bölünmede crossing-over esnasında görülür ve bir kromozom segmentinin iki kopya halinde bulunmasını anlatır. Duplikasyon kendini iki tipte gösterir (Connor and Ferguson-Smith, 1997).

1.8.3.1 Tandem duplikasyon

Kopan parça eklendiği lokustaki gen sıralamasıyla aynı şekilde dizilmiştir (Connor and Ferguson-Smith, 1997).

1.8.3.2 Ters tandem duplikasyon

Artan parça ters dönerek yeni yerine yerleşmiştir (Connor and Ferguson-Smith, 1997).

1.8.4 İnverson (ters dönme)

Bir kromozomda iki kırılma sonucu oluşan parçanın delesyona uğramadan kendi ekseni etrafında 180° dönerek yine eski yerine yapışmasıdır. İki türlü inversiyon vardır (Connor and Ferguson-Smith, 1997).

1.8.4.1 Paracentrik inversiyon

Kırılan ve dönen parça sentromeri içermediği durumlardır. Kromozomun görünüşünün değişmemesine karşın gen sırası değişikliğe uğrar (Connor and Ferguson-Smith, 1997).

1.8.4.2 Perisentrik inversiyon

Kırılan parça sentromeri içerir, dönme sonucu hem kromozomun şekli hem de gen sırası değişir (Connor and Ferguson-Smith, 1997).

1.8.5 Ring kromozom (halka kromozom)

Bir kromozomun uçlarının kaldığı etki sonucu kopması ve bu uçların yapışkan özellik kazanarak birbirleriyle kaynaşmaları sonucu ortaya çıkan yapıya denilir (Connor and Ferguson-Smith, 1997).

1.8.6 Isochromosome (izokromozom)

Normalde anafazda iğ iplikleri tarafından sentromerlerinden boylamasına bölünen kromozomlar oluşan bir hata sonucu sentromerinden enlemesine bölünebilir. Bu durumda yavru hücrelerden birinde yalnız kromozomun kısa kolları bulunurken diğerinde uzun kolları bulunacaktır (Connor and Ferguson-Smith, 1997).

1.8.7 Break (Kromozom kırıkları)

Kromozomlarda oluşan kırıklar ise genel olarak iki ana grupta incelenir:

1.8.7.1 Kromozom tipi kırıklar

Bir kromozomun her iki kromatidinde aynı bölgede oluşan kırıklardır. Bunlara izokromatid tip kırıklar denilir. DNA eşleşmesinin sonunda veya G_1 fazında oluşur.

Kromozomun her iki kromatidinin aynı lokusundaki akromatik lezyon olan boya almayan bölgeler “kromozomal gap” olarak isimlendirilir. Eğer kromozomun her iki kromatidinin aynı lokusunda kırıklar mevcutsa “kromozomal kırık” olarak adlandırılır. İki ya da daha çok kromozom lezyonlarının sonucu olarak “kromozomal exchange” meydana gelir (Savage, 1975).

Tek bir kromatidin genişliğinden daha küçük parçaya “double minute” denir (Connor and Ferguson-Smith, 1997).

1.8.7.2 Kromatid tipi kırıklar

Kromatidlerin birinde oluşur. G_1 fazı sonu ve S ile G_2 fazları arasında olur. Kromatid düzensizliği bir lokustaki bir kromozomun sadece bir kromatidini içerir. Tek bir kromatidin boya almayan bölgesine “kromatid gap” ve tek bir kromatidde gözlenen sıra düzensizliğine ise “kromatid kırık” adı verilir (Savage, 1975).

İki ya da daha çok kromatid lezyonu ve kromatid materyalinin subsequent düzenlenmesi sonucu oluşan “kromatid exchange” kromatid düzensizlikler içinde görülür. İnterchange vakalarında (farklı kromozomların kromatidleri arasındaki exchange) üç kolu bulunduğu “triradial”, dört kolu bulunduğu “quadriradial”, ya da dörtten çok kolu varsa “kompleks” konfigürasyon olarak bilinir (Savage, 1975).

1.9 Gap ve kırıkların karşılaştırılması

Gap ve kırıkların ayırt edilmesi her zaman tartışma konusu olmuş ve bu konuda çeşitli öneriler getirilmiştir. Birçok araştırmacı, yaptıkları gözlemlere dayanarak gap ve kırıkların bazı özelliklerini belirlemişlerdir (Savage, 1975).

Kırık, kromozomun bir parçasının, komple ayrılması olarak izah edilmektedir. Ayrılan parça kolayca görülür, ya da tamamen yok olur.

Gap ise kromatidin bir bölümü incelendiğinde oluşur. Bu da kendisini bir devamsızlık şeklinde gösterir. Işık mikroskobu ile bakıldığında, gaplerin yer değiştirmedeği ve sıklıkla gerçek devamsızlıktan çok sadece hipokromatin bölge olduğu görülür. Bu tip kromozomlarda iki yakın bölge birbirine hala bağlıdır fakat DNA iplikleri çok fazla incelmıştır. Genellikle bu gap bölgesindeki DNA yapısında bazı değişiklikler meydana gelir (Savage, 1975).

Gapler o bölgenin sıkıca kondense olup, kromozomun metafaz formuna geçebilme yeteneğini etkiler (Connor and Ferguson-Smith, 1997; Nussbaum, 2001).

Gapleri kırıklarda ayıran bir başka özellik de anafazda sentrik ve asentrik fragmentlere ayrılmamalarıdır (Connor and Ferguson-Smith, 1997; Nussbaum, 2001).

Kırık ve gap formasyonu klinik olarak önemlidir. Çünkü kromozomun küçük bir parçası ya da asentrik kromozom bu olay sırasında kaybolabilir. Bu kırılmalar sonucunda ışık mikroskobunda gözlenebilen delesyonlar ve kırılan kromozomların kollarının birleşmesi eğilimi sonucunda, halka kromozomlar, duplikasyonlar, inversiyonlar, çeşitli translokasyonlar ve disentrik kromozomlar oluşabilir (Connor and Ferguson-Smith, 1997; Nussbaum, 2001).

2. AMAÇ VE KAPSAM

1989 yılında, ABD'deki ölümlerin %43'ü kardiyovasküler hastalıklardan, %23 ise kanser sebebiyle meydana gelmiştir. Her iki rahatsızlık üzerine yapılan epidemiyolojik bulgular ve çalışmalar sonucu araştırmacılar serbest radikallerin bu rahatsızlıkların gelişiminde önemli bir rolü olduğunu ortaya çıkarmışlardır (Barber, and Harris, 1994)

Serbest radikaller, metabolizmanın değişmez bir parçasıdır, sürekli olarak canlı dokularda normal metabolik reaksiyonlar ve hücrenin enerji üretimi esnasında yan ürün olarak açığa çıkmaktadırlar (Basaga, 1990; Davies, 2000). Isı stresi, radyasyon, hiperoksi, inflamasyon, yaralanma ve egzersizden dolayı metabolizmanın hızlanması, hatta tamir mekanizmaları serbest radikal ve buna bağlı reaktif oksijen, nitrojen türevlerinin seviyelerinin artmasına neden olur. Serbest radikaller DNA'da hasarlarını, oksitlenmiş nükleositleri oluşumunu, zincir kırıklarını ve DNA-protein kross-linklerini indüklemektedir. Oluşan bu bozukluklar ya tamir edilmekte ya da apoptozis, nekrozis gibi mekanizmaları devreye sokmaktadır. DNA bozukluklarının hatalı tamiri ise DNA dizisinde değişikliklere sebebiyet vermekte bu da kanserleşmeye kadar gidebilen sonuçlar doğurmaktadır. Ayrıca oksidanlar mitokondriyel DNA'da da hasarlara ve metabolik fonksiyon bozukluklarına yol açmaktadırlar (Fehrenbach and Nortoff, 2001).

Serbest radikaller ve antioksidanlar, klinik ve beslenme literatürlerinde geniş olarak tartışılmaktadır. Antioksidanlara, aktif oksijen ve nitrojen türevlerinin oluşumlarının önlenmesinde ve zararlı etkilerinin ortadan kaldırılmasında ihtiyaç duyulmaktadır. Endojen antioksidanlar (superoksit dismutaz, H₂O₂- uzaklaştırıcı enzimler, metal bağlayıcı proteinler) zararlı etkinin giderilmesinde yeterli olmamaktadır, böylelikle diyetle birlikte dışarıdan alınan antioksidanlar büyük önem kazanmaktadır (Hallivell, 1996; Ames, 1993).

Kanser tedavisinde yaygın ve etkili olarak kullanılan DXR'in bir serbest radikal üreticisi olduğu ve kromozomal anomalilere yol açtığı bilinmektedir. Özellikle lipid peroksidasyonu sonucu oluşturduğu serbest radikaller, hem

kromozomal hem de hücrel metabolik hasarlara yol açmaktadır (Antunes et al, 1999; Kusyk and Hsu, 1976)

Doğal antioksidanlardan biri olarak bilinen vit A üzerine yapılan çalışma ve tartışmalar devam etmektedir. Vit A'nın doza bağlı olarak bir antioksidan etki gösterdiği düşünülmektedir. Vit A ile yapılmış olan in vitro testlerde bu görüşü desteklemektedir (Tesoriere et al, 1994; Badr et al, 1998).

Bu çalışmada, DXR'in hücreler üzerindeki bilinen klastojenik etkisine bağlı olarak ortaya çıkan kromozomal hasarları önlenmesinde vit A'nın in vivo etkisinin sitogenetik olarak gözlenmesi amaçlanmıştır. Bunun için Wistar cinsi albino sıçanlardan oluşan deney ve kontrol gruplarından elde edilen sonuçlar sayısal ve istatistiki olarak kıyaslanmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Gereçler

3.1.1 Kimyasal maddeler

- Doxorubicin (Carlo Erba)
- Vitamin A (Sigma)
- Kolşisin (Sigma)
- Potasyum klorür (Sigma)
- Metanol (Merck)
- Asetik asit (Sigma)
- KH_2PO_4 (Merck)
- Na_2HPO_4 (Merck)
- Giemsa (Sigma)
- Eter (Merck)
- Ksilol (Merck)
- Hidroklorik asit (Sigma)
- Sodyum hidroksit (Sigma)
- Entellan (Merck)
- İmmersiyon yağı (Olympus)
- Zeytinyağı
- Distile su

3.1.2 Kullanılan tampon ve çözeltiler

Çizelge 3.1: Carnoy's fiksatif solüsyonu

Methanol (3 kısım)	75 ml
Glacial asetik asit (1 kısım)	25 ml
(Her kullanımda taze olarak hazırlanır.)	

Çizelge 3.2: Hipotonik solüsyon

Potasyum klorür	5.6 g
Distile su	1000 ml

(KCl solüsyonu 0.075 M olarak hazırlanır ve oda sıcaklığında 2-3 hafta saklanabilir.)

Çizelge 3.3: Kolşisin solüsyonu

Kolşisin (liyofilize)	0.1 g
Distile su	100 ml

(Steril olarak hazırlanır. Stok solüsyon 2-5°C' de birkaç ay kalabilir.)

Çizelge 3.4: Fosfat AB tampon solüsyonu

Sol A: KH_2PO_4	9.08 g	1000 ml' de çözülür
Sol B: Na_2HPO_4	9.47 g	1000 ml' de çözülür

AB buffer \Rightarrow 200 ml Sol A + 800 ml Sol B karıştırılarak elde edilir.

(pH 6.8'e HCl ve NaOH kullanılarak ayarlanır)

Çizelge 3.5: Giemsa boya solüsyonu

Giemsa boyası	2.5 ml
AB tampon solüsyonu	5 ml
Distile su	42.5 ml

(Her boyama için taze olarak hazırlanır.)

3.1.3 Deneyde kullanılan araçlar

- Diseksiyon seti
- Lam
- Lamel
- 50 ve 100 ml mezur
- Cam şale
- Pastör pipetleri
- Cam santrifüj tüpü
- Santrifüj
- Vorteks mikser
- Etüv
- pH metre
- Buzdolabı
- Hassas terazi
- Enjektör (1, 3, 5 ml)
- Pediatrik idrar sondası
- Olympus araştırma mikroskobu
- Meta Görüntüleme Sistemi (IKAROS)

3.1.4 Kolşisin (colchicine) hazırlanışı

0.1 gr kolşisin steril olarak tartılarak 100 ml distile suda sulandırılır. Stok solüsyon +4°C'de saklanılabılır. Deneye başlamadan 2 saat önce sıçana gram başına bu stok solüsyondan 0.1 ml olacak şekilde intraperitoneal olarak verilir (Macgregor and Varley, 1983).

3.1.5 DXR dozu ve uygulanişı

Antunes ve ark. (1998) yaptıkları çalışmada DXR'nin kromozomal hasarları indükleyen etkili dozu olarak 90 mg/kg b.w.'lik miktarı almışlardır. Biz çalışmalarımıza bu dozu referans olarak alıp başladığımızda deneye aldığımız 3 hayvandan elde ettiğimiz preparatlarda bu dozun kemik iliğinde aşırı baskılanmaya yol açtığını ve metafaz plağı bulunamayışından dolayı inceleme yapılamadığını gördük.

Kromozom hasarı yapan minimum dozu belirlemek amacıyla 40, 50, 60 ve 70 mg/kg b.w.'lik dozları denediğimizde 50 mg/kg b.w. dozunun akut kromozomal anomaliye yol açan ve inceleme yapmaya elverişli, mitotik indeks ile uyumlu metafaz plağı sağlayan doz olduğuna karar verdik.

DXR'in damar dışına taşmalarda nekroza sebep olmasına karşın yaptığımız araştırmada ve literatür taraması sonucunda DXR'nin intraperitonel olarak uygulanmasına karar verdik (Ciaccio et al, 1993 ; Antunes and Takahashi, 1998)

3.1.6 Vitamin a'nın dozu ve uygulanişı

25 IU/kg b.w. olarak seçilen ilk doz; hücre membranlarında membran lipidlerinin doxorubicin ve benzeri lipit peroksidasyonu yapan ajanlara karşı fizyolojik antioksidan olarak etkili, literatürde verilmiş olan doz seçilmiştir (Antunes et al,1998; Tesoriere et al, 1994).

70 IU/kg b.w. seçilen doz ise insan için vitamin A'nın RDA (Recommended Dietary Allowwance) dozu referans olarak alınarak uygulanmıştır (<http://www.nfpt.com/Library/Articles/vitamins.html>; Baysal et al, 1991).

Vitamin A'nın deney hayvanlarına uygulanişı; pediatrik idrar sondası yardımıyla gavajla verildi. Uygulama esnasında sıçanlar boyun bölgesinden sıkıca tutularak ağızları ortası delik bir çubuk yardımıyla açılarak sondayı ısırmasını engellendi. Sonda esnasında yanlışlıkla soluk borusuna girilmemesine özellikle

dikkat edildi. Sonda mideye ulaştıktan sonra enjektör yardımıyla sonda payı da hesaba katılmış olan uygun dozdaki vitamin A hayvanlara verildi.

3.1.7 Deneyleerde kullanılan hayvanlar

Tek doz uygulanan DXR'nin kemik iliği mitotik kromozomları üzerindeki zararlı etkisine karşı Vit A'nın koruyucu etkisini in vivo olarak araştırmak amacıyla yaptığımız bu çalışmada seksüel olgunluğa erişmiş 100-120 gr ağırlığında 6 haftalık Wistar cinsi albino sıçanlar kullanılmıştır. Sıçanların 6 haftalık olarak seçilmesinin nedeni, bu dönemin hayvanların olgunluk devresinin ilk basamağını oluşturması ve yaşlılık sebebiyle meydana gelebilecek olan kromozom hasarlarının yol açabileceği değerlendirme hatalarını ortadan kaldırmasıdır (Antunes and Takahashi, 1998). Deney ve kontrol grubu hayvanları bu özellikler göz önünde bulundurularak seçilmiştir.

Deneydeki hayvanlar, deney gruplarına göre dişi ve erkek olmak üzere eşit olarak dağıtılmasına önem verilmiştir.

Deneyleerde kullanılan hayvanlar Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu onayı ile Kocaeli Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Birimi'nden sağlanmıştır.

Deney hayvanlarının genel bakımları bu birim tarafından yapılırken deneye alınan hayvanların gözetim ve bakımı bizzat araştırmacı tarafından üstlenilmiştir. Çalışma süresince deney ve kontrol grupları aynı ortam şartlarına maruz bırakılmıştır. Deney hayvanlarının beslenmeleri için standart laboratuvar yemi ve su kullanılmıştır.

Kontrol grubu ve her deney gurubunda 3 erkek 3 dişi olmak üzere 6'şar hayvan bulunmaktadır (Antunes and Takahashi, 1998).

3.1.8 Kontrol ve deney grupları

3.1.8.1 Kontrol Grubu

6 sıçandan oluşan kontrol grubuna hiçbir kimyasal müdahalede bulunulmadan doğruca deneye alındılar. Sadece deney öncesi tüm hayvanlara uygulanan intraperitonel olarak kolşisin uygun miktarda verildi.

3.1.8.2 DXR Grubu

DXR ile muamele gören hayvanlara, kilogram başına 50 mg DXR uygulandı. Her bir hayvanın vücut ağırlığına uygun dozda total 0.5 ml steril suda çözülmüş DXR intraperitoneal olarak verildi.

3.1.8.3 Vitamin A Grupları

Deneylerde vit A'nın Sigma firmasından sağlanan all-trans retinol formu kullanılmıştır. Vit A'nın bu formunun 1 ml'si 12.500 IU eşittir. Uygun dozların ayarlanması için doğal zeytinyağı kullanılarak vit A uygun dozlara ayarlanmıştır. 25 IU ve 70 IU'lik dozlar hayvanların ağırlıkları dikkate alınarak kilogram başına uygun dozlarda gavaj ile verilmiştir.

3.2 Yöntem

Altı haftalık Wistar albino sıçanlara DXR grubu için ayarlanan dozlardaki DXR insülin enjektörü ile intraperitoneal olarak uygulandı (Nakagawa et al, 1985). İlaç enjeksiyonundan sonra 22. saate insülin enjektörü ile ağırlıklarına uygun miktarda kolsişin verildi. Kolsişin verildikten 2 saat sonra yani ilaç verilmesinden 24 saat sonra hayvanlar servikal dislokasyon ile sakrifiye edildi.

Vitamin A gruplarında ise öncelikle ilk iki gün 24 saat ara ile vitamin A verildi. Bu işlem esnasında vitamin A zeytin yağında uygun dozda seyreltilmiş olarak pediatrik idrar sondası ile hassas bir şekilde ağız yoluyla gavaj yöntemiyle hayvanlara verildi. 46. saatte uygun miktarda kolsişin verilerek hayvanlar aynı yöntemle deneye alındı.

DXR + vitamin A gruplarında ise ilk iki gün vitamin A uygulaması, üçüncü gün DXR sonunda 70. saatte kolşisin verilerek deneye alındılar (Ciaccio et al, 1993).

3.2.1 Materyalin alınışı ve hipotonik şok

- 1- Sakrifiye edilen sıçanların femurları hızlı bir şekilde çıkarıldı.
- 2- Gazlı bez ve makas yardımıyla yumuşak dokudan temizlendi.
- 3- Sonra kemik makasıyla kemiklerin her iki ucu kesildi.
- 4- Etüvde 37°C ısıtılmış olan 0,075 M KCl solüsyonu içeren enjektör ile kemiğin kesik bir ucundan girilerek kemik iliği saat camı üzerine çıkarıldı. Bu yıkama işlemi birkaç defa tekrarlandı.
- 5- Saat camı içindeki materyal steril gazlı bezle süzülerek cam santrifüj tüpüne aktarıldı.
- 6- Materyal etüvde 37°C'de 25 dakika inkübe edildi.
- 7- Etüvden çıkarılıp 1000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.
- 8- Tüpün üst kısmında kalan süpernatant pastör pipeti kullanılarak atıldı.

3.2.2 Fiksasyon işlemi

- 1- Etüvden çıkarılıp süpernatantı atılmış dipte çöken hücrelere (pellet) o anda taze olarak hazırlanmış olan metanol/asetik asit (3/1 oranında) karışımından oluşan fiksatifden damla damla ilave edildi.
- 2- Bu esnada hücrelerin birbirinden ayrılmaları ve tekrar yapışmalarını önlemek için vorteks mikser yardımıyla karışım çevrildi.
- 3- Damla damla fiksatif eklenmesine 10 ml'ye kadar devam edildi.
- 4- Bu işlem sonrası ağzı kapatılan tüp oda sıcaklığında 25 dakika bekletildi.
- 5- Daha sonra 1000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.
- 6- Süpernatantı atıldı.
- 7- Dipte kalan hücrelere aynı işlem (madde 1-3) uygulanır ve 1000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi (Bu işlem 3 kez tekrarlanır).
- 8- En son santrifüjden sonra üst sıvı atılır ve tüpün dibindeki pellete 2-3 ml fiksatif ilave edildikten sonra hücre süspansiyonu hazırlanmış oldu.

3.2.3 Preparatların hazırlanışı

Daha önceden numaralandırılmış ve adlandırılmış lamalar %10'luk alkolde temizlenirler. Fiksatifle yıkama sonucu elde ettiğimiz süspansiyon halindeki pellet pipete alınarak yaklaşık yirmi santim yüksekten lamlara damlatılarak preparatlar hazırlanır.

3.2.4 Preparatların boyanması

Preparatlar oda sıcaklığında kuruduktan sonra tamponda hazırlanan giemsa boyası ile 10 dakika boyandı. Boyamadan sonra distile su ile preparatların fazla boyası yıkandı. Oda sıcaklığında kurutulan preparatlar mikroskopta incelenmeye hazır hale geldi.

3.2.5 Preparatların incelenmesi

Preparatlar öncelikle Olympus araştırma mikroskobunda incelenerek metafaz plakları belirlendi. Plaklarda tespit edilen anomaliler not edildi. Her hayvandan yüz plak olacak şekilde her gurubun incelenmesi tamamlandıktan sonra. bilgisayar görüntülemeli kromozom analiz sistemi (Meta sistem, IKAROS) kullanılarak, istenilen plakların görüntüsü bilgisayara aktarılıp üzerlerinde gerekli işaretlemeler yapılarak tezde kullanılacak şekle getirildiler.

3.3 İstatistiki değerlendirme

İncelenen preparatlardan elde edilen gruplara ait sayısal anomali değerleri SPSS ver. 9.1 istatistik programında bilgisayarda değerlendirildi. Gruplar arası anlamlılık One Way-ANOVA ile değerlendirilirken, her bir anomali türünün gruplar arasındaki anlamlılığı ise Tukey çoklu karşılaştırma yöntemi ile gerçekleştirildi.

4. BULGULAR

DXR'nin oluşturduğu yapısal anomalileri önlemede vit A'nın rolünü araştırırken altı araştırma grubu oluşturulmuştur.

Çizelge 4.1 : Deney grupları.

Uygulama	Gruplar*	Doz
Kontrol	1	Steril su (i.p.)
Vit A ₂₅	2	25 IU/kg b.w. Vitamin A
Vit A ₇₀	3	70 IU/kg b.w. Vitamin A
DXR ₅₀	4	50 mg/kg b.w. DXR
Vit A ₂₅ +DXR ₅₀	5	25 IU/kg b.w. + 50 mg/kg b.w. (vit A+DXR)
Vit A ₇₀ +DXR ₅₀	6	70 IU/kg b.w. + 50 mg/kg b.w. (vit A+DXR)

* Her grubun hayvan sayısı 6'dır. (DXR i.p. olarak, vit A gavaj ile verilmiştir.)

Vit A'nın koruyucu etkisinin araştırıldığı bu deneyler Wistar albino sıçanlar üzerinde in vivo olarak gerçekleştirildi. Vit A ve DXR uygulamaları sonucu deneye alınan hayvanlardan direkt kemik iliğinden kromozomlar elde edildi. Hazırlanan preparatlar mikroskop altında incelenmiş, yapısal anomaliler sayılıp istatistiksel değerlendirmeleri yapılmıştır.

İncelenen tüm deney hayvanlarının preparatlarında gruplara göre değişiklik gösteren yedi yapısal (gap, exchange figür, kromatid tip kırık, izokromatid tip kırık, triradial figür, asentrik fragment ve translokasyon kromozomu) anomali saptanmıştır. Bu yapısal anomalilere ait tüm değerler gruplara ait çizelgelerde verilmiştir. Anomalilerin sınıflandırılması ve değerlendirilmesi için Savage'nin yapısal kromozomal anomalileri sınıflandırdığı çalışması dikkate alınmıştır (Savage, 1975).

Gaplerin gözden kaçabileceği ve değerlendirmelerde hatalara yol açabileceği düşüncesiyle, gaplere ilişkin bulgular toplam anomalilere ve istatistiksel değerlendirmeye katılmamış çizelgelerde aydınlatıcı bilgi olarak verilmiştir (Antunes et al, 1998).

4.1 Kontrol grubuna ait bulgular

Bu gruptaki 6 hayvanda gapler hariç, 8 kromatid tipi kırık (K) ve 2 asentrik fragment (AF) gözlenmiştir. Toplam 10 yapısal anomaliye rastlanılmıştır. Bu gruptaki yapısal anomalilerin kontrol grubu olmalarından dolayı çok az olduğu dikkati çekmektedir. Bu gruba ait bulgular ayrıntılı olarak Çizelge 4.2’de verilmiştir.

Çizelge 4.2 : Kontrol grubunda gözlenen yapısal anomalilerin sayısı ve çeşitleri.

KONTROL		YAPISAL ANOMALİLER							
Birey No	Sayılan Metafaz	Gap	Kırık		E	T	AF	TK	Toplam
			K	İK					
K ₁ /♀	100	1	1	-	-	-	-	-	1
K ₂ /♀	100	1	2	-	-	-	1	-	3
K ₃ /♀	100	-	1	-	-	-	-	-	1
K ₄ /♂	100	-	1	-	-	-	-	-	1
K ₅ /♂	100	-	1	-	-	-	-	-	1
K ₆ /♂	100	2	2	-	-	-	1	-	3
Toplam	600		8				2		10

4.2 Vit A₂₅ grubuna ait bulgular

Vit A₂₅ grubunda, yapısal anomaliler anlamlı bir artış göstermemişlerdir. Değerler kontrol grubuna çok yakındır. 10 K ve 6 AF gözlenen bu grupta toplam 16 yapısal anomali sayılmıştır. Gruba ait ayrıntılı değerler Çizelge 4.3’de verilmiştir.

Çizelge 4.3 : 25 IU/Kg b.w.'lik vit A doz grubunda gözlenen yapısal anomalilerin sayı ve çeşitleri.

Vit A ₂₅		YAPISAL ANOMALİLER							
Birey No	Sayılan Metafaz	Gap	Kırık		E	T	AF	TK	Toplam
			K	İK					
VA ₂₅ /♀ ₁	100	1	1	-	-	-	2	-	3
VA ₂₅ /♀ ₂	100	-	3	-	-	-	1	-	4
VA ₂₅ /♀ ₃	100	1	1	-	-	-	-	-	1
VA ₂₅ /♂ ₄	100	-	2	-	-	-	1	-	3
VA ₂₅ /♂ ₅	100	-	1	-	-	-	1	-	2
VA ₂₅ /♂ ₆	100	1	2	-	-	-	1	-	3
Toplam	600		10				6		16

4.3 Vit A₇₀ grubuna ait bulgular

Bu gruptaki yapısal anomalilerin kontrol grubuna oranla arttığı gözlenmiştir. Gapler hariç, 20 K ve (AF gözlenmiş, toplam 28 yapısal anomali sayılmıştır.

Çizelge 4.4 : 70 IU/Kg b.w.'lik vit A doz grubunda gözlenen yapısal anomalilerin sayı ve çeşitleri.

Vit A ₇₀		YAPISAL ANOMALİLER							
Birey No	Sayılan Metafaz	Gap	Kırık		E	T	AF	TK	Toplam
			K	İK					
VA ₇₀ /♀ ₁	100	1	4	-	-	-	-	-	4
VA ₇₀ /♀ ₂	100	1	3	-	-	-	1	-	4
VA ₇₀ /♀ ₃	100	-	3	-	-	-	2	-	5
VA ₇₀ /♂ ₄	100	1	5	-	-	-	3	-	8
VA ₇₀ /♂ ₅	100	-	1	-	-	-	1	-	2
VA ₇₀ /♂ ₆	100	1	4	-	-	-	1	-	5
Toplam	600		20				8		28

4.4 DXR grubuna ait bulgular

Bu gruptaki yapısal anomali miktarı ve çeşitleri beklenenle uyumlu bulunmuş ve kontrollere göre anlamlı derecede artış göstermiştir. Gapler hariç, 140 K, 13 izokromatid tip kırık (İK), 30 exchange figür (E), 5 triradial figür (T), 20 AF ve 2 translokasyon kromozomu (TK) gözlenmiştir. Toplam yapısal anomali sayısı 210 sayılmış bu değer gruplar arasındaki en yüksek değerdir. Bu grupta, kontrol ve vit A kontrol gruplarında görülmeyen kompleks yapısal anomaliler gözlenmiştir.

Çizelge 4.5 : DXR 50 mg/kg b.w. doz grubunda gözlenen yapısal anomalilerin sayısı ve çeşitleri.

DXR ₅₀		YAPISAL ANOMALİLER							
Birey No	Sayılan Metafaz	Gap	Kırık		E	T	AF	TK	Toplam
			K	İK					
DXR/♀ ₁	100	2	28	2	7	-	4	-	41
DXR/♀ ₂	100	1	20	3	3	1	2	-	29
DXR/♀ ₃	100	2	21	2	5	-	2	-	30
DXR/♂ ₄	100	4	31	4	8	3	5	1	52
DXR/♂ ₅	100	1	17	1	4	1	3	-	26
DXR/♂ ₆	100	1	23	1	3	-	4	1	32
Toplam	600		140	13	30	5	20	2	210

4.5 Vit A₂₅+DXR₅₀ grubuna ait bulgular

Bu gruptaki yapısal anomalilerin DXR grubuna göre sayısal olarak azaldığı gözlenmiştir. Bu grupta 81 K, 13 E, 9 AF ve 1 TK sayılmıştır. Toplam Anomali DXR grubundan anlamlı derecede düşük 104 dür. Anomalilerin grup içerisindeki dağılımı Çizelge 4.6'da ayrıntılı olarak verilmiştir. Çizelge içerisindeki G₁, Vit A₂₅+DXR₅₀ kombine dozun kısaltmasıdır.

4.4 DXR grubuna ait bulgular

Bu gruptaki yapısal anomali miktarı ve çeşitleri beklenenle uyumlu bulunmuş ve kontrollere göre anlamlı derecede artış göstermiştir. Gapler hariç, 140 K, 13 izokromatid tip kırık (İK), 30 exchange figür (E), 5 triradial figür (T), 20 AF ve 2 translokasyon kromozomu (TK) gözlenmiştir. Toplam yapısal anomali sayısı 210 sayılmış bu değer gruplar arasındaki en yüksek değerdir. Bu grupta, kontrol ve vit A kontrol gruplarında görülmeyen kompleks yapısal anomaliler gözlenmiştir.

Çizelge 4.5 : DXR 50 mg/kg b.w. doz grubunda gözlenen yapısal anomalilerin sayısı ve çeşitleri.

DXR ₅₀		YAPISAL ANOMALİLER							
Birey No	Sayılan Metafaz	Gap	Kırık		E	T	AF	TK	Toplam
			K	İK					
DXR/♀ ₁	100	2	28	2	7	-	4	-	41
DXR/♀ ₂	100	1	20	3	3	1	2	-	29
DXR/♀ ₃	100	2	21	2	5	-	2	-	30
DXR/♂ ₄	100	4	31	4	8	3	5	1	52
DXR/♂ ₅	100	1	17	1	4	1	3	-	26
DXR/♂ ₆	100	1	23	1	3	-	4	1	32
Toplam	600		140	13	30	5	20	2	210

4.5 Vit A₂₅+DXR₅₀ grubuna ait bulgular

Bu gruptaki yapısal anomalilerin DXR grubuna göre sayısal olarak azaldığı gözlenmiştir. Bu grupta 81 K, 13 E, 9 AF ve 1 TK sayılmıştır. Toplam Anomali DXR grubundan anlamlı derecede düşük 104 dür. Anomalilerin grup içerisindeki dağılımı Çizelge 4.6'da ayrıntılı olarak verilmiştir. Çizelge içerisindeki G₁, Vit A₂₅+DXR₅₀ kombine dozun kısaltmasıdır.

Çizelge 4.6 : VA₂₅ + DXR₅₀'lik kombine doz grubunda gözlenen yapısal anomalilerin sayısı ve çeşitleri.

VA ₂₅ + DXR ₅₀		YAPISAL ANOMALİLER							
Birey No	Sayılan Metafaz	Gap	Kırık		E	T	AF	TK	Toplam
			K	İK					
G ₁ /♀ ₁	100	2	12	-	-	-	1	-	13
G ₁ /♀ ₂	100	1	14	-	3	-	1	-	18
G ₁ /♀ ₃	100	2	11	-	1	-	2	-	14
G ₁ /♂ ₄	100	1	9	-	4	-	1	-	14
G ₁ /♂ ₅	100	1	14	-	1	-	1	-	16
G ₁ /♂ ₆	100	4	21	-	4	-	3	1	29
Toplam	600		81		13		9	1	104

4.6 Vit A₇₀+DXR₅₀ grubuna ait bulgular

Bu grupta 101 K, 3 İK, 21 E, 1 T, 10 AF sayılmış, toplam olarak 136 yapısal anomali gözlenmiştir. Bu gruptaki anomalilerde DXR grubuna oranla düşük gözlenmiştir.

Çizelge 4.7 : VA₇₀ + DXR₅₀'lik kombine doz grubunda gözlenen yapısal anomalilerin sayısı ve çeşitleri.

VA ₇₀ + DXR ₅₀		YAPISAL ANOMALİLER							
Birey No	Sayılan Metafaz	Gap	Kırık		E	T	AF	TK	Toplam
			K	İK					
G ₂ /♀ ₁	100	1	15	-	2	-	1	-	18
G ₂ /♀ ₂	100	1	18	-	4	-	-	-	22
G ₂ /♀ ₃	100	3	19	-	5	-	4	-	28
G ₂ /♂ ₄	100	-	12	1	3	-	2	-	18
G ₂ /♂ ₅	100	1	16	-	3	-	1	-	20
G ₂ /♂ ₆	100	2	21	2	4	1	2	-	30
Toplam	600		101	3	21	1	10		136

4.7 Tüm deney gruplarına ait toplam bulgular

Tüm gruplardaki yapısal anomaliler ve bunların toplamları Çizelge 4.8’de verilmiştir. Ayrıca bu çizelgede gruplara ait % Mİ değerleri de belirtilmiştir. Mİ’in DXR uygulanan gruplarda düştüğü ve bu düşüğe kombine vit A gruplarında da engel olunamadığı gözlenmiştir.

Çizelge 4.8 : Tüm grupların, Mİ ve toplam anomalileri.

Grup Kodu	Mİ (%)	Gap	Kırık		E	T	AF	TK	Toplam
			K	İK					
Kontrol	3,6	4	8	-	-	-	2	-	10
Vit A ₂₅	3,4	3	10	-	-	-	6	-	16
Vit A ₇₀	3,1	5	20	-	-	-	8	-	28
DXR ₅₀	1,3	16	140	13	30	5	20	2	210
Vit A ₂₅ + DXR ₅₀	1,7	11	81	-	13	-	9	1	104
Vit A ₇₀ + DXR ₅₀	1,4	8	101	3	21	1	10	-	136
Toplam	-	47	360	16	64	6	55	3	504

Ayrıca bütün gruplara ait yapısal anomalilerin ortalamaları ve standart sapmaları (SD) Çizelge 4.9’da verilmiştir. DXR grubu ile kombine dozlar arasındaki farklar burada da açıkça gözlenebilmektedir.

Çizelge 4.9 : Yapısal anomaliler ortalaması \pm SD değerleri

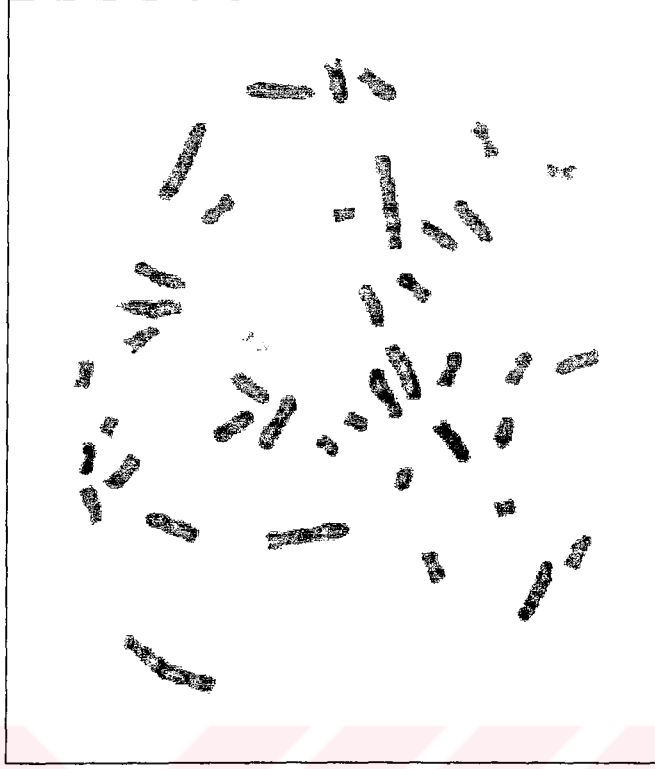
Grup	K	İK	E	T	AF	TK	TAO
Kontrol	1,33 \pm 0,52	0,00	0,00	0,00	0,33 \pm 0,52	0,00	1,67 \pm 1,03
VA ₂₅	1,67 \pm 0,82	0,00	0,00	0,00	1,00 \pm 0,63	0,00	2,67 \pm 1,03
VA ₇₀	3,33 \pm 1,37	0,00	0,00	0,00	1,33 \pm 1,03	0,00	4,67 \pm 1,97
DXR	23,33 \pm 5,24	2,17 \pm 1,17	5,00 \pm 2,10	0,67 \pm 1,21	3,33 \pm 1,21	0,33 \pm 0,52	35,00 \pm 9,76
VA ₂₅ +DXR	13,50 \pm 4,14	0,00	2,17 \pm 1,72	0,00	1,50 \pm 0,84	0,17 \pm 0,41	17,33 \pm 5,99
VA ₇₀ +DXR	16,83 \pm 3,19	0,50 \pm 0,84	3,50 \pm 1,05	0,17 \pm 0,41	1,67 \pm 1,37	0,00	22,67 \pm 5,16

4.8 Mikroskop görüntüleri

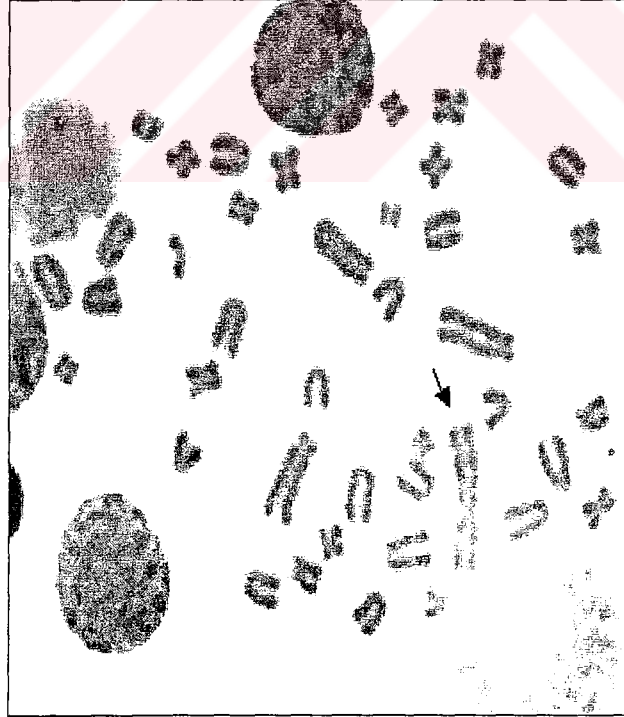
Gözlenen yapısal anomalilere ait mikroskop görüntülerinden örnekler aşağıdaki şekillerde verilmiştir. Şekil 4.1 ve Şekil 4.2’de herhangi bir yapısal anomali bulunmamaktadır ve bu görüntüler kontrol gruplarından elde edilmiş tam figürlerdir. Diğer figürlerle ilgili açıklama şekillerin altlarında belirtilmiştir.



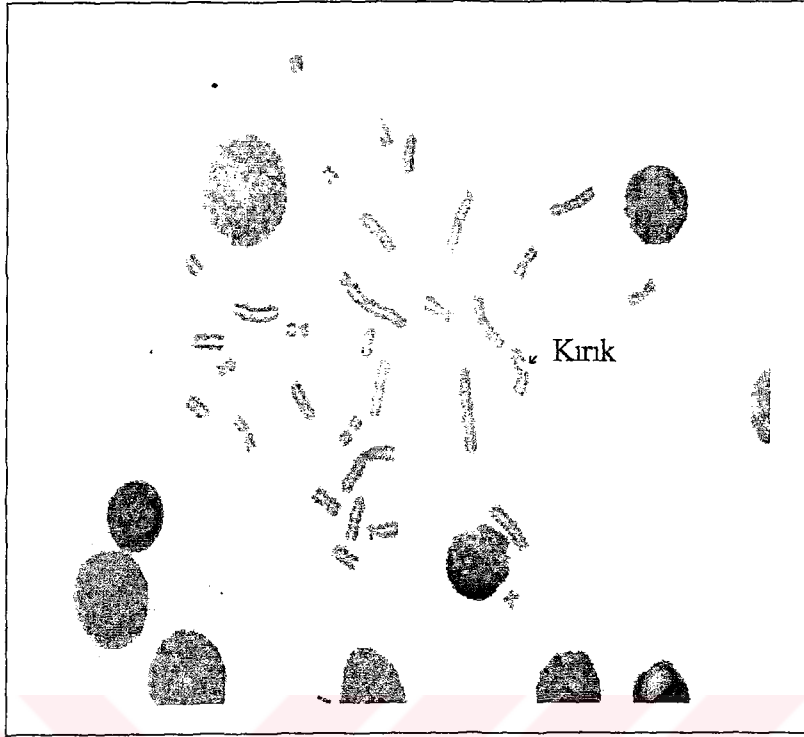
Şekil 4.1 : Herhangi bir anomali bulunmayan tam bir kromozom plağı.



Şekil 4.2 : Tam kromozom plağı (Metefaz başlangıcı).



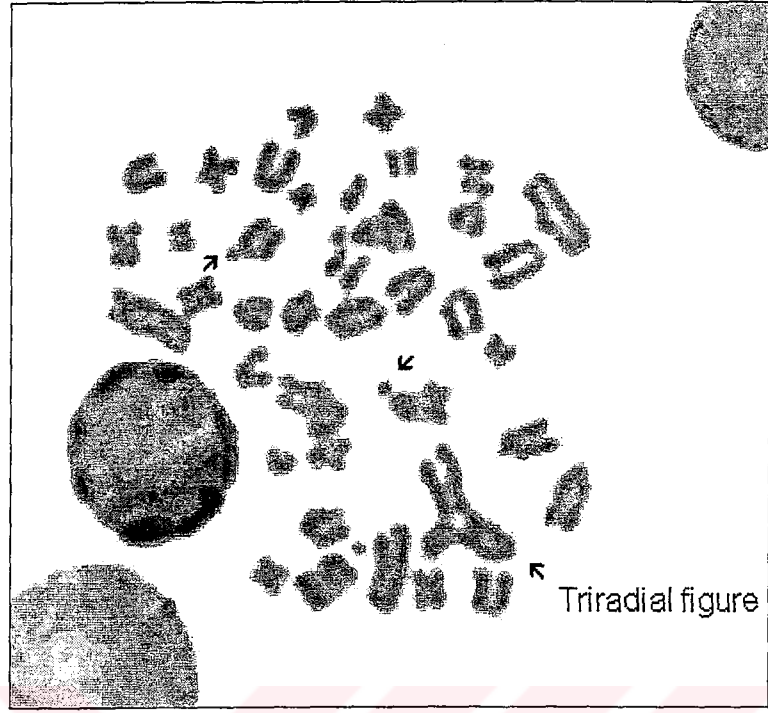
Şekil 4.3 : Translokasyon kromozomu.



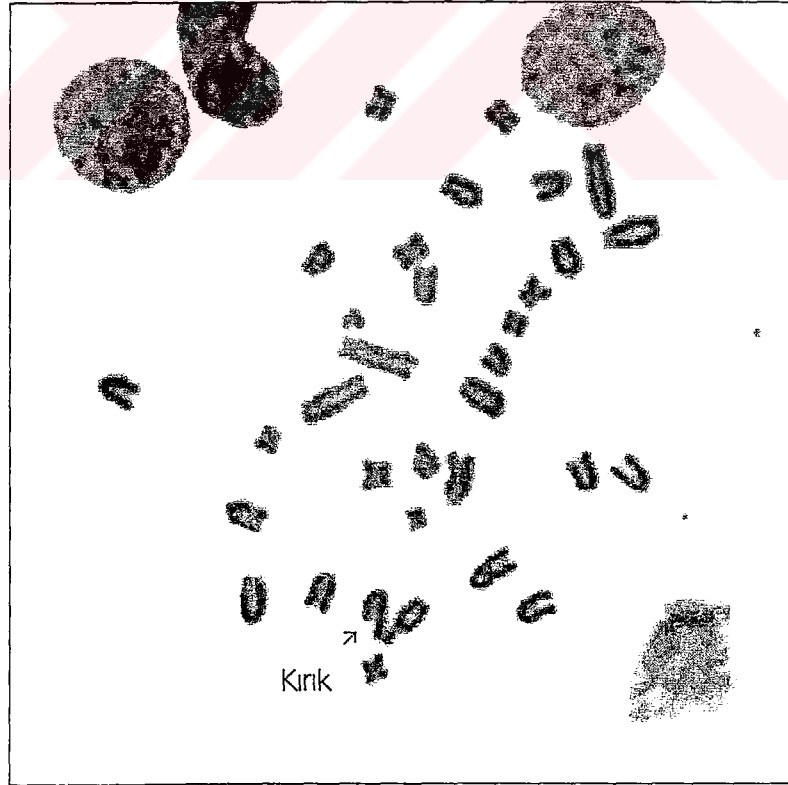
Şekil 4.4 : Kromozomal kırık.



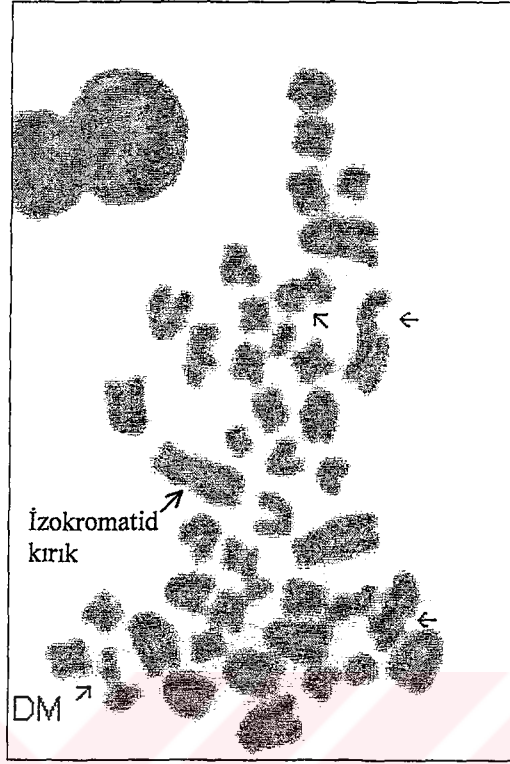
Şekil 4.5 : Triradial figür.



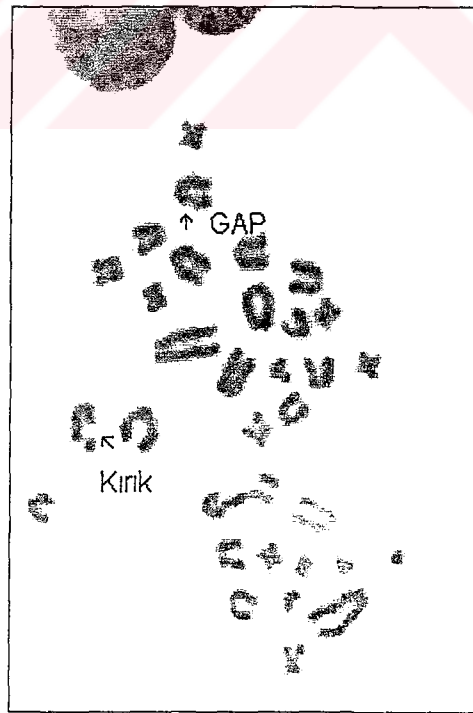
Şekil 4.6 : Asentrik fragment ve triradial figür.



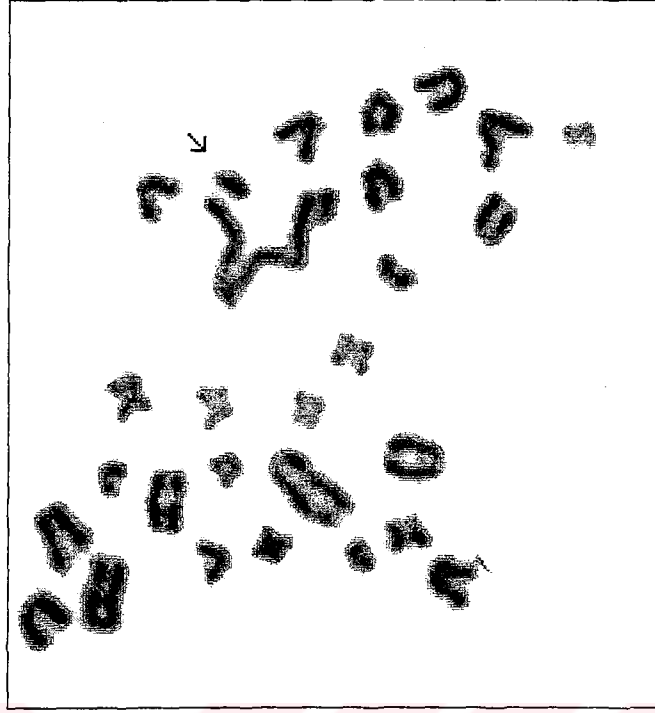
Şekil 4.7 : Kırık ve delesyon.



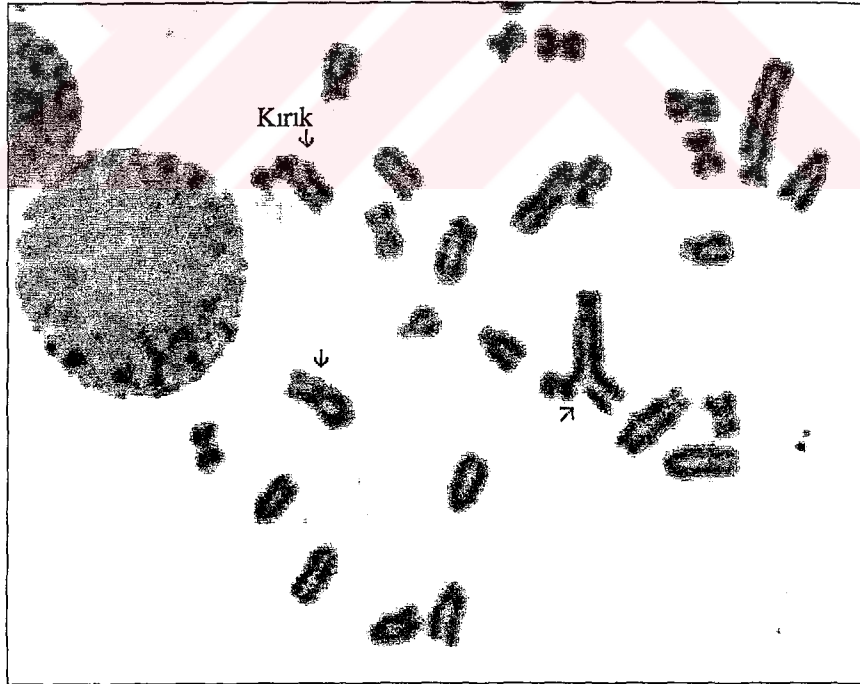
Şekil 4.8 : İzokromatit, kromatid kırıklar ve DM.



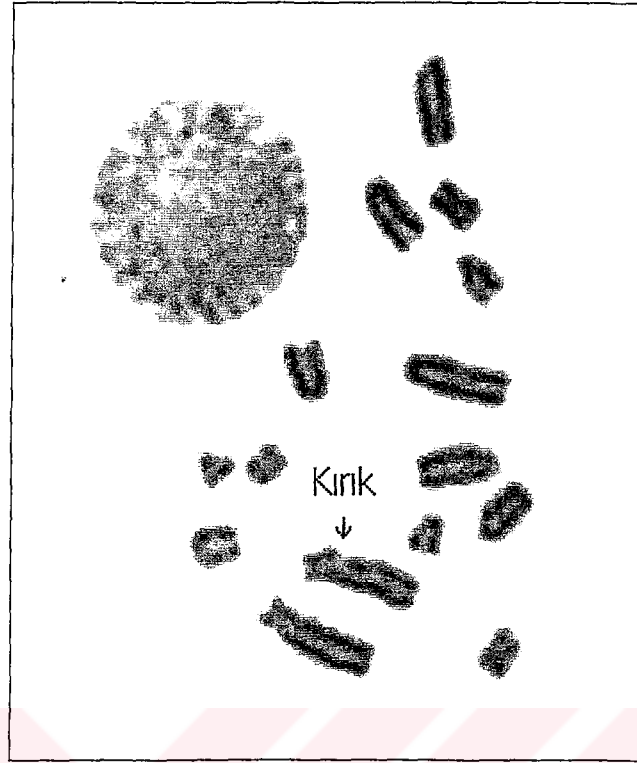
Şekil 4.9 : Kırık ve gap anomalileri.



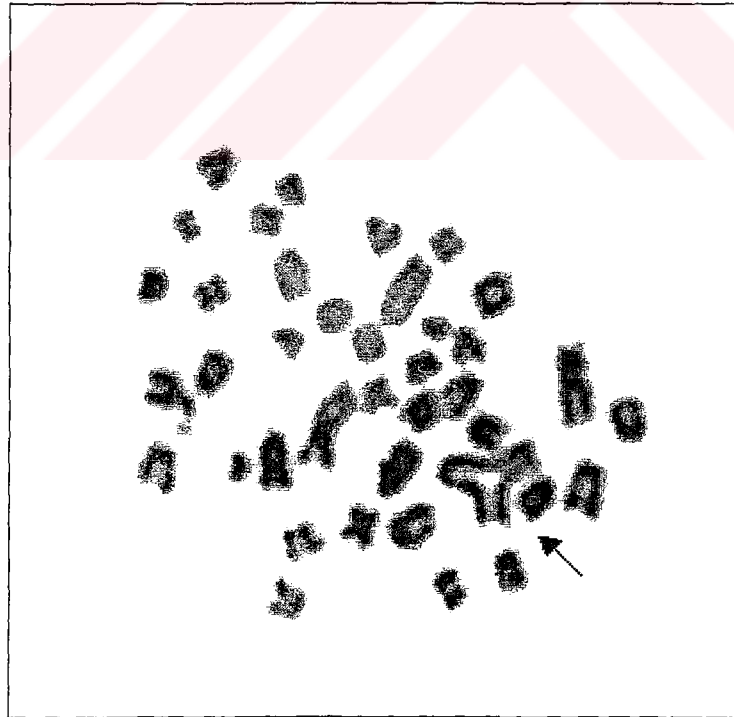
Şekil 4.10 : Exchange figür.



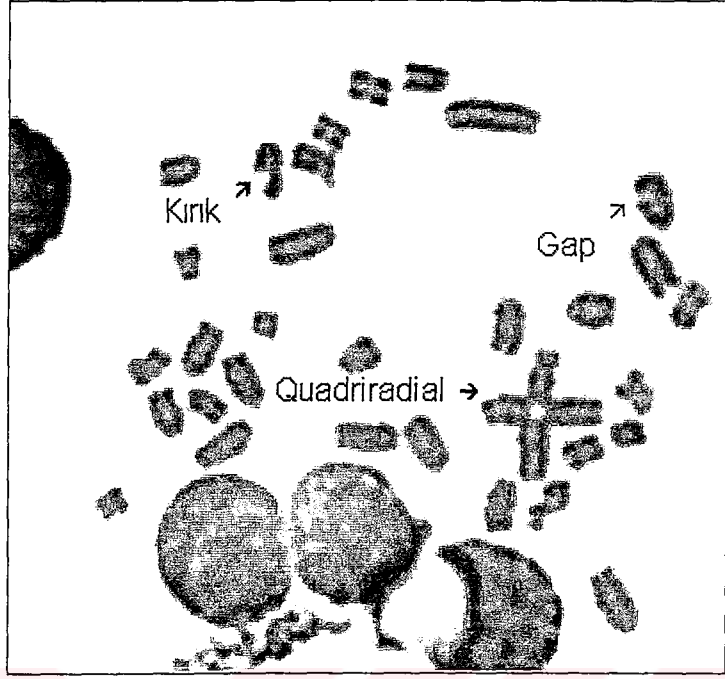
Şekil 4.11 : Kırık ve exchange figür.



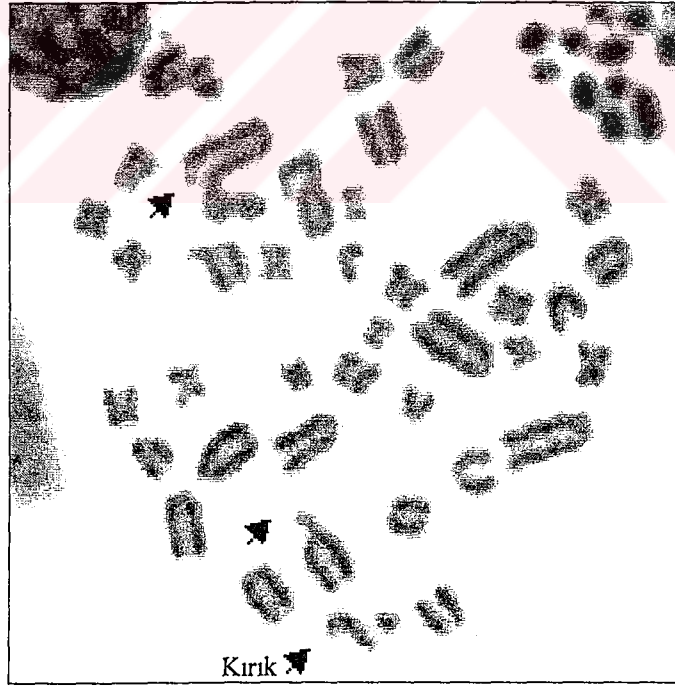
Şekil 4.12 : Kromatid tip kırık.



Şekil 4.13 : Triradial figür.



Şekil 4.14 : Kırık, gap ve quadriradial figür.



Şekil 4.15 : Kırık ve asentrik fragment.



Şekil 4.16 : Exchange figür ve kırık.

5. TARTIŞMA

Kanser kemoterapisinde geniş bir kullanımı olan ve serbest radikal üreticisi olduğu bilinen DXR, lipit peroksidasyonunu artırmakta ve kromozomal hasarlara yol açmaktadır. Lipit peroksidasyon ürünleri makromoleküllere özellikle DNA'ya büyük hasar vermektedir. Ayrıca kromozomal düzeyde de yapısal anomalilere yol açtığı pek çok araştırmada gösterilmiştir (Au and Hsu, 1980; Larramendy, 1980; Antunes and Takahashi, 1998, Antunes et al, 1999).

Antioksidanların, oksidatif ürün veren antineoplastiklere karşı koruyucu etkisinin olduğu ise özellikle son on yıl içinde yapılan pek çok çalışma ile gösterilmiştir (Pascoe and Reed, 1987; Amara-Mokrane et al, 1996; Antunes and Takahashi, 1998; Giri et al, 1998; Antunes et al, 1999; Antunes et al, 2000; Nefic, 2001).

Vitamin C ve E gibi vit A'nın da antioksidan özelliğe sahip olduğu, peroksidasyon ürünlerini azalttığı (Ciaccio et al, 1993) veya antineoplastik ilaçlara adjuvant etki gösterdiği (Ciaccio et al, 1994) üzerine pek çok tartışma ve çalışma devam etmektedir.

Özellikle in vitro yapılan çalışmalar vit A'nın peroksidasyon ürünlerinin zarar verici etkisini azaltıcı yönde etki yaptığını göstermiştir (Ciaccio et al, 1993). Yine vit A ile yapılan bir in vivo çalışmada, vit A'nın DXR'nin indüklediği kardiyotoksisiteyi anlamlı derecede azalttığı belirtilmiştir (Tesariore et al, 1994).

Doğal metabolizmanın yan ürünleri olan serbest radikaller hücrede yoğun olarak üretilmekte olup (Fehrenbach and Northoff, 2001), enzimler ve doğal antioksidanlar tarafından etkisiz hale getirilmektedir.

Vit A'nın ise bir antioksidan olarak serbest radikallerin ortadan kaldırılmasında rol oynadığı, antineoplastik, radyasyon ve lipit peroksidasyonuna dayalı pek çok çalışma ile gösterilmiştir (Ciaccio et al, 1993; Ciaccio et al, 1994; Tesoriere et al, 1994; Badr et al, 1998).

DXR'in oluşturduğu kromozomal hasarlara karşı vit A'nın in vivo koruyucu etkisi ilk kez bu araştırmada çalışılmıştır. Çalışmamız da elde edilen bulgular One Way-ANOVA ve Tukey çoklu karşılaştırma yöntemleri ile istatistiksel olarak yorumlanmıştır. Buna göre;

1. One Way-ANOVA testi ile yapısal kromozom anomalilerinin gruplar arasındaki istatistiksel anlamlılığına bakılmış ve kromatid tipi kırık, izokromatid tipi kırık, exchange figür, asentrik fragment ve toplam yapısal anomali ortalamalarında gruplar arasında hem %5'lik hem de %0.1'lik seviyede anlamlılık bulunmuştur ($p < 0,05$ ve $p < 0,001$). Bu sonuçlar sık rastlanan kırık, exchange ve asentrik fragment gibi anomalilerin kontrol, vit A ve deney grupları arasında önemli derecede farklı olduğunu göstermektedir. ANOVA testinin değerleri Çizelge 5.1'de verilmiştir.

Çizelge 5.1 : İncelenen her anomali cinsinin One Way-ANOVA testine göre gruplar arası anlamlılıkları (Tablo içindeki kısaltmalar, kısaltmalar dizininde verilmiştir).

		Kareler Toplamı	df	Ortalama Kare	F	P
K	Gruplar arası	2554,333	5	510,867	53,277	0,000(#)
	Gruplar içi	287,667	30	9,589		
	Toplam	2842,000	35			
IK	Gruplar arası	22,556	5	4,511	13,097	0,000(#)
	Gruplar içi	10,333	30	0,344		
	Toplam	32,889	35			
E	Gruplar arası	137,889	5	27,578	19,543	0,000(#)
	Gruplar içi	42,333	30	1,411		
	Toplam	180,222	35			
T	Gruplar arası	2,139	5	0,428	1,571	0,198
	Gruplar içi	8,167	30	0,272		
	Toplam	10,306	35			
AF	Gruplar arası	30,139	5	6,028	6,272	0,000(#)
	Gruplar içi	28,833	30	0,961		
	Toplam	58,972	35			
TK	Gruplar arası	,583	5	0,117	1,615	0,186
	Gruplar içi	2,167	30	0,0722		
	Toplam	2,750	35			
TAO	Gruplar arası	5369,333	5	1073,867	39,352	0,000(#)
	Gruplar içi	818,667	30	27,289		
	Toplam	6188,000	35			

$p < 0,001$

2. Tukey çoklu karşılaştırma testine göre kromatid tipi kırıklar kontrol grubu ile DXR, VA₂₅+DXR ve VA₇₀+DXR grupları arasında %0,1 seviyesinde anlamlı iken VA₂₅ ve VA₇₀ grupları arasında herhangi bir farklılık göstermemektedir. Aynı şekilde VA₂₅ grubu ile DXR, VA₂₅+DXR ve VA₇₀+DXR grupları arasında %0,1'lik seviyede önemli iken VA₇₀ grubu ile herhangi bir fark göstermemektedir. VA₇₀ grubu da VA₂₅ grubu gibi DXR, VA₂₅+DXR ve VA₇₀+DXR grupları ile %0,1 seviyesinde anlamlıdır. DXR grubu ise VA₂₅+DXR grubu ile %0,1'lik seviyede, VA₇₀+DXR grubu ile %5'lik seviyede anlamlı bulunmuştur. Bu durum vit A'nın DXR'nin oluşturduğu kromatid tipi yapısal anomalileri azalttığını göstermektedir. VA₂₅+DXR grubu ile VA₇₀+DXR grubu arasında bir anlamlılık gözlenmemiştir. Tukey çoklu karşılaştırma testinin sonuçları Çizelge 5.2'de verilmiştir.

Çizelge 5.2 : Tukey çoklu karşılaştırma yöntemine göre kromatid tipi kırıkların gruplara göre anlamlılıkları.

Bağımlı Değişken	(I) Grup	(J) Grup	Ortalama Farkı (I-J)	P
Kromatid Tipi Kırık	Kontrol	VA ₂₅	-0,3333	1,000
		VA ₇₀	-2,0000	0,870
		DXR	-22,0000	0,000(#)
		VA ₂₅ +DXR	-12,1667	0,000(#)
		VA ₇₀ +DXR	-15,5000	0,000(#)
	VA ₂₅	VA ₇₀	-1,6667	0,935
		DXR	-21,6667	0,000(#)
		VA ₂₅ +DXR	-11,8333	0,000(#)
		VA ₇₀ +DXR	-15,1667	0,000(#)
	VA ₇₀	DXR	-20,0000	0,000(#)
		VA ₂₅ +DXR	-10,1667	0,000(#)
		VA ₇₀ +DXR	-13,5000	0,000(#)
	DXR	VA ₂₅ +DXR	9,8333	0,000(#)
		VA ₇₀ +DXR	6,5000	0,012(*)
	VA ₂₅ +DXR	VA ₇₀ +DXR	-3,3333	0,442

p<0,001 ve * p<0,05

3. Tukey çoklu karşılaştırma testine göre izokromatid tipi kırıklar, DXR grubu hariç diğer tüm gruplar arasında hiçbir anlamlılık göstermez iken; DXR grubu tüm gruplarla $p < 0,001$ seviyesinde anlamlılık göstermektedir. Bu sonuçlar DXR'nin oluşturduğu izokromatid tipi kırık için vit A'nın her iki dozunda koruyucu etki yaptığını göstermektedir. Tukey çoklu karşılaştırma testinin sonuçları Çizelge 5.3'de verilmiştir.

Çizelge 5.3 : Tukey çoklu karşılaştırma yöntemine göre izokromatid tipi kırıkların gruplara göre anlamlılıkları.

Bağımlı Değişken	(I) Grup	(J) Grup	Ortalama Farkı (I-J)	P
İzokromatid Tipi Kırık	Kontrol	VA ₂₅	0,0000	1,000
		VA ₇₀	0,0000	1,000
		DXR	-2,1667	0,000(#)
		VA ₂₅ +DXR	0,0000	1,000
		VA ₇₀ +DXR	-0,5000	0,682
	VA ₂₅	VA ₇₀	0,0000	1,000
		DXR	-2,1667	0,000(#)
		VA ₂₅ +DXR	0,0000	1,000
		VA ₇₀ +DXR	-0,5000	0,682
	VA ₇₀	DXR	-2,1667	0,000(#)
		VA ₂₅ +DXR	0,0000	1,000
		VA ₇₀ +DXR	-0,5000	0,682
	DXR	VA ₂₅ +DXR	2,1667	0,000(#)
		VA ₇₀ +DXR	1,6667	0,000(#)
VA ₂₅ +DXR	VA ₇₀ +DXR	-0,5000	0,682	

$p < 0,001$

4. Exchange figür için elde edilen değerler Tukey çoklu karşılaştırma testine göre karşılaştırıldığında kontrol grubu ile VA₂₅ ve VA₇₀ grupları dışındaki tüm gruplar arasında anlamlılık bulunmuştur. VA₂₅ ve VA₇₀ gruplarının her birisi ile DXR, VA₂₅+DXR ve VA₇₀+DXR grupları arasında exchange figür bakımından farklılık gözlenmiştir. DXR grubu ile VA₂₅ grubu arasında anlamlılık var iken VA₇₀ grubu ile arasında bir anlamlı azalma gözlenmemiştir. Vit A ile DXR'nin kombine verildiği dozlar arasında da bir anlamlılık yoktur. Bu anomali bakımından Tukey çoklu karşılaştırma testinin sonuçları Çizelge 5.4'de verilmiştir.

Çizelge 5.4 : Tukey çoklu karşılaştırma yöntemine göre exchange tipi anomalilerin gruplara göre anlamlılıkları.

Bağımlı Değişken	(I) Grup	(J) Grup	Ortalama Farkı (I-J)	P
Exchange	Kontrol	VA ₂₅	0,0000	1,000
		VA ₇₀	0,0000	1,000
		DXR	-5,0000	0,000(#)
		VA ₂₅ +DXR	-2,1667	0,038(*)
		VA ₇₀ +DXR	-3,5000	0,000(#)
	VA ₂₅	VA ₇₀	0,0000	1,000
		DXR	-5,0000	0,000(#)
		VA ₂₅ +DXR	-2,1667	0,038(*)
		VA ₇₀ +DXR	-3,5000	0,000(#)
	VA ₇₀	DXR	-5,0000	0,000(#)
		VA ₂₅ +DXR	-2,1667	0,038(*)
		VA ₇₀ +DXR	-3,5000	0,000(#)
	DXR	VA ₂₅ +DXR	2,8333	0,003(*)
		VA ₇₀ +DXR	1,5000	0,273
	VA ₂₅ +DXR	VA ₇₀ +DXR	-1,3333	0,397

* p<0,05 ve # p<0,001

5. Triradial figür bakımından gruplar arasında anlamlılığa rastlanılmamıştır. Bu anomali açısından istatistiksel sonuçlar Çizelge 5.4'de verilmiştir

Çizelge 5.5 : Tukey çoklu karşılaştırma yöntemine göre triradial figürlerin gruplara göre anlamlılıkları.

Bağımlı Değişken	(I) Grup	(J) Grup	Ortalama Farkı (I-J)	P
Triradial Figür	Kontrol	VA ₂₅	0,0000	1,000
		VA ₇₀	0,0000	1,000
		DXR	-0,6667	0,262
		VA ₂₅ +DXR	0,0000	1,000
		VA ₇₀ +DXR	-0,1667	0,993
	VA ₂₅	VA ₇₀	0,0000	1,000
		DXR	-0,6667	0,262
		VA ₂₅ +DXR	0,0000	1,000
		VA ₇₀ +DXR	-0,1667	0,993
	VA ₇₀	DXR	-0,6667	0,262
		VA ₂₅ +DXR	0,0000	1,000
		VA ₇₀ +DXR	-0,1667	0,993
	DXR	VA ₂₅ +DXR	0,6667	0,262
		VA ₇₀ +DXR	0,5000	0,567
	VA ₂₅ +DXR	VA ₇₀ +DXR	-0,1667	0,993

6. Asentrik fragmentler Tukey çoklu karşılaştırma testi ile gruplar arasında değerlendirildiğinde ise VA70+DXR grubu hariç diğer tüm gruplar ile DXR grubu arasında anlamlı farklar bulunmuştur. Bu durum asentrik fragment açısından vit A'nın 25 IU'lık dozunun DXR'nin etkisini azaltıcı yönde etki yaptığının göstergesidir. Bu gruba ait sonuçlar Çizelge 5.6'da verilmiştir.

Çizelge 5.6 : Tukey çoklu karşılaştırma yöntemine göre asentrik fragmentlerin gruplara göre anlamlılıkları.

Bağımlı Değişken	(I) Grup	(J) Grup	Ortalama Farkı (I-J)	P
Asentrik Fragment	Kontrol	VA ₂₅	-0,6667	0,844
		VA ₇₀	-1,0000	0,501
		DXR	-3,0000	0,000(#)
		VA ₂₅ +DXR	-1,1667	0,334
		VA ₇₀ +DXR	-1,3333	0,204
	VA ₂₅	VA ₇₀	-0,3333	0,991
		DXR	-2,3333	0,003(*)
		VA ₂₅ +DXR	-0,5000	0,948
		VA ₇₀ +DXR	-0,6667	0,844
	VA ₇₀	DXR	-2,0000	0,015(*)
		VA ₂₅ +DXR	-0,1667	1,000
		VA ₇₀ +DXR	-0,3333	0,991
	DXR	VA ₂₅ +DXR	1,8333	0,032(*)
		VA ₇₀ +DXR	1,6667	0,062
	VA ₂₅ +DXR	VA ₇₀ +DXR	-0,1667	1,000

* p<0,05 ve # p<0,001

7. Translokasyon kromozomu açısından elde edilen gruplara ait değerler Tukey çoklu karşılaştırma testi ile irdelendiğinde, tüm grupların birbiri ile anlamlı bir ilişki göstermediği gözlenmiş olup; bunun nedeni gruplarda bu anomali sayısının oldukça düşük olmasıdır. Bu anomaliye ait istatistiksel değerlendirme Çizelge 5.7'de verilmiştir.

Çizelge 5.7 : Tukey çoklu karşılaştırma yöntemine göre translokasyon kromozomu tipi anomalilerin gruplara göre anlamlılıkları.

Bağımlı Değişken	(I) Grup	(J) Grup	Ortalama Farkı (I-J)	P
Translokasyon Kromozomu	Kontrol	VA ₂₅	0,0000	1,000
		VA ₇₀	0,0000	1,000
		DXR	-0,3333	0,291
		VA ₂₅ +DXR	-0,1667	0,888
		VA ₇₀ +DXR	0,0000	1,000
	VA ₂₅	VA ₇₀	0,0000	1,000
		DXR	-0,3333	0,291
		VA ₂₅ +DXR	-0,1667	0,888
		VA ₇₀ +DXR	0,0000	1,000
	VA ₇₀	DXR	-0,3333	0,291
		VA ₂₅ +DXR	-0,1667	0,888
		VA ₇₀ +DXR	0,0000	1,000
	DXR	VA ₂₅ +DXR	0,1667	0,888
		VA ₇₀ +DXR	0,3333	0,291
	VA ₂₅ +DXR	VA ₇₀ +DXR	0,1667	0,888

8. Gruplardan elde edilen tüm yapısal anomalilere ait toplam değerler (gapler hariç) istatistiksel olarak test edildiğinde, kontrol grubu pek çok anomalide görüldüğü gibi VA₂₅ ve VA₇₀ hariç diğer gruplarla %0,1'lik seviyede anlamlılık göstermiştir. Hem VA₂₅ hem de VA₇₀ grupları DXR, VA₂₅+DXR ve VA₇₀+DXR grupları ile istatistiksel olarak anlamlılık göstermiştir. DXR grubu ise VA₇₀+DXR grubu ile %0,1'lik seviyede anlamlı iken, VA₇₀+DXR grubu ile %5'lik seviyede istatistiksel anlama sahiptir. Bu sonuçta göstermektedir ki 25 IU'lik vit A dozu tüm anomaliler göz önüne alındığında DXR'in oluşturduğu yapısal kromozomal hasarlara karşı 70 IU'lik dozdan daha fazla koruyucu bir etki göstermiştir. Toplam anomalilere ait istatistiksel değerlendirme Çizelge 5.8'de verilmiştir.

Çizelge 5.8 : Tukey çoklu karşılaştırma yöntemine göre toplam anomali ortalamalarının gruplara göre anlamlılıkları

Bağımlı Değişken	(I) Grup	(J) Grup	Ortalama Farkı (I-J)	P
Toplam Anomali Ortalaması	Kontrol	VA ₂₅	-1,0000	0,999
		VA ₇₀	-3,0000	0,916
		DXR	-33,3333	0,000(#)
		VA ₂₅ +DXR	-15,6667	0,000(#)
		VA ₇₀ +DXR	-21,0000	0,000(#)
	VA ₂₅	VA ₇₀	-2,0000	0,985
		DXR	-32,3333	0,000(#)
		VA ₂₅ +DXR	-14,6667	0,000(#)
	VA ₇₀	VA ₇₀ +DXR	-20,0000	0,000(#)
		DXR	-30,3333	0,000(#)
		VA ₂₅ +DXR	-12,6667	0,003(*)
	DXR	VA ₇₀ +DXR	-18,0000	0,000(#)
		VA ₂₅ +DXR	17,6667	0,000(#)
	VA ₂₅ +DXR	VA ₇₀ +DXR	12,3333	0,004(*)
		VA ₇₀ +DXR	-5,3333	0,500

* p<0,05 ve # p<0,001

Bu çalışmada DXR uygulaması için intraperitoneal yol tercih edilmiştir. Çünkü bu yol, test edilecek ajana kemik iliği hücrelerinin maruz kalmasını sağlayan literatürce önerilen uygulamadır (Antunes et al, 1998). Bu yolla vücuttaki hemen hemen tüm organ sistemleri kemoteropatikten etkilenmesine rağmen, özellikle kemik iliği ve gastrointestinal mukoza çok daha duyarlıdır (Morelli et al, 1996).

Akut tek doz DXR uygulamasından 12 ile 24 saat sonra rodentlerde kromozom hasarlarının frekansının maksimum seviyeye yükseldiği daha önce yapılan pek çok çalışmada ortaya konmuştur (Au and Hsu, 1980; Larramendy et al, 1980, Antunes et al, 1998). Ayrıca sıçan periferik kan lenfosit kültürlerinde tek doz DXR uygulamasından 24 saat sonra kromozomal aberasyon frekansının yükseldiği Roselli ve ark. tarafından gösterilmiştir (Roselli et al, 1990). Bizim çalışmamızda da literatüre uygun olarak, akut tek doz DXR uygulamasından 24 saat sonra yapısal kromozom hasarlarının maksimum noktaya ulaştığı gözlenmiştir.

DXR uygulanan gruplarda mitotik indeksin (Mİ) ise baskılandığı çalışmamızda gözlenmiştir (Çizelge 4.8). Bu baskılanma vit A+DXR kombine dozlarında çok az yükseliş göstermekle beraber hiçbir zaman kontrol ve vitamin gruplarındaki Mİ değerlerine ulaşmamıştır. Bu baskılanma kemik iliği hücreleri üzerine DXR'nin sitotoksik etkisi ile ilişkili olup, benzer sonuçlar farklı antioksidanlarla organize edilen bir çok araştırmada ortaya konmuştur (Au and Hsu, 1980, Antunes et al, 1998).

İstatistiksel değerlendirmesi yukarıda yapılan çalışmamızda, vit A'nın düşük olan dozunda (25 IU/kg b.w.) DXR'nin indüklediği yapısal hasarları anlamlı derecede düşürdüğü bulunmuştur. Klastojenik ajan olarak gamma radyasyonunun kullanıldığı Badr ve ark. tarafından insan lenfosit kültürlerinde gerçekleştirilen in vitro çalışmada vit A'nın farklı dozları koruyucu ajan olarak denenmiştir (Badr et al, 1998). Adı geçen çalışmada 2 µg olarak verilen en düşük vit A dozu, 8 ve 24 µg'lık dozlara göre çok daha anlamlı koruyucu etki yaptığı gözlenmiştir. Kombine gruplarda, vit A dozu arttıkça yapısal anomalileri artırıcı etki gösterdiği, hatta en yüksek vit A dozunun (24 µg) yalnız radyasyon uygulanan gruptan daha yüksek sayıda kromozomal hasar oluşturduğu tespit edilmiştir. Vit A'nın yüksek dozlarının teratojenik etki yaptığı Rothman ve ark. tarafından belirtilmiştir (Rothman et al, 1995). Bunun yanı sıra yüksek dozlarda verilen vit A'nın toksisiteyi artırmasının yanı sıra koruyucu rolünde de yavaşlama olabileceği bildirilmiştir (Badr et al, 1998). Bunun sonucunda, yüksek vit A dozlarının hücre yapı ve fonksiyonunun oksidatif bozulmasını artırdığı literatürde bildirilmiştir (Kazuo et al, 1984; Gloriay et al, 1985, Badr et al, 1998).

Karsinogenesis üzerine retinolün inhibitör etkisinin doku spesifik olduğu ve embriyonik kökeniyle ilişkili olduğu savunulmaktadır. Hücre farklılaşmasında vit A düzenleyici rolü, ektodermal ve endodermal orijinli epitel üzerine olup; böylece mezenşimal hücrelerin fenotipik farklılaşmasının başlamasına yol açmaktadır (Badr et al, 1998).

Bu araştırma ve Badr ve ark. tarafından yapılan benzer çalışma, vit A'nın bir antikarsinojen gibi DNA'nın korunmasındaki rolü ve mutajenesise neden olan mekanizmasının altında yatan birçok soruyu gündeme getirmektedir. Çünkü vit A hücresel seviyede konsantrasyona bağlı olarak bifazik bir rol oynamaktadır ve bu

rol zamana bağlı olabilir. İleride organize edilecek çalışmalarla vit A'nın hem koruyucu rolü hem de mutajenik etkiyi indükleyen mekanizmasının tartışılması gerekmektedir.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Antikanser ilaçlarının büyük bir çoğunluğu son derece sitotoksik olup çoğu mutajeniktir. DXR, insan neoplazmalarına karşı etkili bir şekilde geniş olarak kullanılan bir antikanser ilacıdır. Bununla birlikte mutajenik ve kanserojenik olup, şiddetli kromozom hasarları meydana getirdiği iyi bilinmektedir.

Özellikle A, C ve E vitamini gibi pek çok ajanın antineoplastiklerin oluşturduğu kromozom hasarlarına karşı hücreleri koruduğu pek çok çalışma ile gösterilmiştir.

Bu çalışmada DXR'nin oluşturduğu yapısal kromozom hasarlarına karşı vitamin A'nın koruyucu etkisinin araştırılması planlanmıştır. Yapılan in vivo deneyler sonucunda vitamin A'nın 25 IU'lık dozunun diğer doz olan 70 IU'lık doza göre hücreleri DXR'nin oluşturduğu kromozom aberasyonlarına karşı daha iyi koruduğu gösterilmiştir.

Terapide oldukça dikkatli davranılması gereken antineoplastiklerin uygulaması sırasında sıkça kullanılan vitamin desteği, doz ve zaman ayarlanarak uygun şekilde verilmediği takdirde, antineoplastiklerin yan etkilerine benzer istenmeyen durumlara neden olabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmada da ortaya çıktığı gibi bifazik bir etki mekanizması olan vitamin A'nın bir antikarsinojen gibi DNA'nın korunmasındaki rolü ve mutajenesise neden olan mekanizmasının altında yatan birçok soru ileride yapılacak çalışmalarla aydınlatılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- AĞABEYOĞLU, İ., AKÇASU, A., AYHAN, İH., ESKİOĞLU, E., FIRAT, D., HINCAL, A., İZGÜ, E., KANZIK, İ., ÖZMEN, F., SAYEK, İ., TEZİÇ, T., (1999). Habis hastalıklar ve bağışıklığın baskılanması. *British National Formulary / Türkiye İlaç Kılavuzu 1999 Formülleri*. Ed.: O. Kayaalp. Turgut Yayıncılık ve Ticaret A.Ş. İstanbul pp.: 345-369
- ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WATSON, JD., (1994). Basic genetic mechanisms. In: *Molecular Biology of The Cell Third Edition*, Ed: M. Robertson. New York, London: Garland Publishing Inc. pp: 259-262
- AMARA-MOKRANE, YA., LEBUCHER-MICHEL, MP., BALANSARD, G., DUMENIL, G., BOTTA, B., (1996). Protective effects of α -hederin, chlorophilin and ascorbic acid towards the induction of micronuclei by doxorubicin in cultured human lymphocytes. *Mutagenesis*. 11: 161-167
- AMES, BN., SHİGENAGA, MK., HAGEN, TM., (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99: 7915-7922
- ANTUNES, LMG., ARAJUO, MC., DARIN, JDC., BIANCHI, MLP., (2000). Effects of the antioxidants curcumin and vitamin C on cisplatin-induced clastogenesis in wistar rat bone marrow cells. *Mutation Res.* 464: 131-137
- ANTUNES, LMG., ARAJUO, MC., DIAS, FL., TAKAHASHI, CS., (1999). Modulatory effects of curcumin on the chromosomal damage induced by doxorubicin in Chinese hamster ovary cells. *Teratog. Carcinog. Mutagen.* 19(1): 1-8

- ANTUNES, LMG. and TAKAHASHI, CS., (1998). Effects of high doses of vitamins C and E against doxorubicin-induced chromosomal damage in wistar rat bone marrow cells. *Mutation Res.* 419: 137-143
- ARUOMA, OI., HALLIWELL, B., GAJEWSKI, E., DIZDAROĞLU, M., (1989). Damage to the bases in DNA induced by hydrogen peroxide and ferric ion chelates. *The Journal of Biological Chem.* 264: 20509-20512
- AU, WW. and HSU, TC., (1980). The genotoxic effects of adriamycin in somatic and germinal cells of the mouse. *Mutation Res.* 79(4): 351-361
- BADR, FM., EL-HABİT, OHM., HAMDY, M., HASSAN, GAR., (1998). The mutagenic versus protective role of vitamin A on the induction of chromosomal aberration in human lymphocyte cultures. *Mutation Res.* 414: 157-163
- BARBER, BA. and HARRIS, SR., (1994). Oxygen free radicals and antioxidants. *American Pharmacy* 534: 412-425
- BASAGA, HS., (1990). Biochemical aspects of radicals. *Cell Biol.* 68: 989-998
- BAYSAL, A., (1990). Vitaminler. *Beslenme*. 5. Baskı. Ed.: A. Baysal. Hacettepe Üniversitesi Yayınlar. Ankara. s.: 137-223
- BAYSAL, A., KEÇECİOĞLU, S., ARSLAN, P., YÜCECAN, S., PEKCAN, G., GÜNEYLİ, U., BİRER, S., SAĞLAM, F., YURTTAGÜL, M., (1991). Besinlerin bileşimi. *Türkiye Diyetisyenler Derneği Yayını*:1. 3. Baskı. Ankara. s.: 1-7
- BERGER, Y., HAZEN, M., NEJARI, A., FOURNIER, J., GUIGNAR, DJ., PEZERAT, H., CADET, J., (1993). Radical oxidation reactions of the

purine moiety of 2'-deoxyribonucleosides and DNA by iron containing minerals. *Carcinogenesis* 14: 41-46

BÍNO, DG., (1990). Diverse effects of camptothecin, an inhibitor of topoisomerase I, on the cell cycle of lymphocytic and myelogenous leucemic cells. *Cancer Res.* 50: 5746-5750

BROOM, J., (1999). Vitamins, minerals and nutrition. In: *Medical Biochemistry*. Ed.: J. Baynes and MH. Dominiczak. Harcourt Brace and Company Ltd. London. pp.: 109-121

CHAMBER, BA., RYAN, DP., PAZ-ANES, L., GARCIA-CARBONERO, R., CALABRESI, P., (2001). Antineoplastic agents. In: *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 10th edition. Ed.: JG. Hardman, LE. Limbird, AG. Gilman. The McGraw-Hill Companies. New York pp.: 1425-1431

CHACHOUA, A., HOCHSTER, H., MUGGIA, FM., (1988). Doxorubicin. In: *Handbook of Chemotherapy in Clinical Oncology*. Ed.: JP. Groz, E. Cvitkovic, JP. Armand, S. Khoury. Rhône-Poulenc. Houston, USA. pp.: 125-127

CIACCIO, M., VALENZA, M., TESORIERE, L., BONGIORNO, A., ALBIERO, R., LIVREA, MA., (1993). Vitamin A inhibits doxorubicin-induced membrane lipid peroxidation in rat tissues in vivo. *Arch. Biochem. Biophys.* 302(1):103-108

CIACCIO, M., TESORIERE, L., PINTAUDI, AM., RE, R., VALLESICARDILLO, S., BONGIORNO, A., LIVREA, MA., (1994). Vitamin A preserves the cytotoxic activity of adriamycin while counteracting its peroxidative effects in human leukemic cells in vitro. *Biochem. Mol. Biol. International.* 34(2): 329-35

- CONNOR, JM., FERGUSON-SMITH, MA., (1997). Chromosome aberrations. In: *Essential Medical Genetics*. 5th ed. Ed.: JM. Connor and MA. Ferguson-Smith. Blackwell Science, Inc. USA. pp.: 55-68
- COOPER, GM., (1996). Replication, Maintenance, and Rearrangements of Genomic DNA. *The Cell: A Molecular Approach*. Ed: GM. Cooper. USA: ASM Press. pp: 181-182
- CUMMINGS, J., ANDERSON, L., WILLMOTT, N., SMYTH, JF., (1991). The molecular pharmacology of doxorubicin in vivo. *Eur J Cancer*. 27(5):532-5
- DAVIES, KJ., (2000). Oxidative stress, antioxidant defense, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB Life*. 50(4-5):279-289
- DRAGNEV, KH., RIGAS, JR., DMITROVSKY, E., (2000). The retinoids and cancer prevention mechanisms. *The Oncologist*. 5: 361-368
- FEHRENBACH, E. and NORTOFF, H., (2001). Free radicals, exercise, apoptosis, and heat shock proteins. *Exerc. Immunol Rev*. 7: 66-89
- GIRI, A., KHYNRIAM, D., PRASAD, SB., (1998). Vitamin C mediated protection on cisplatin induced mutagenicity in mice. *Mutation Res*. 421: 139-149
- GLORIAIY, K., DELUMEN, B., ALEXANDRE, TO., (1985). Rat liver nuclei are more sensitive to lipid peroxidation than microsomes: role of vitamin A. *Nutr. Rep. Int*. 32: 179-186
- GREGUS, Z. and KLAASSEN, CD., (2001). Mechanisms of Toxicity. In: *Casarett and Doull's Toxicology the Basic Science of Poisons*. 6th ed. Ed.:

CD. Klaassen. McGraw-Hill Medical publishing Division, New York. pp.:
35-83

GUTTERIDGE, JM., (1995). Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers
of tissue damage. *Clin Chem.* 41:1819-28

GUTTERIDGE, JM. and HALLIWELL, B., (2000). Free radicals and
antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann N Y Acad
Sci.* 899:136-47

HALLIVELL, B., (1996). Antioxidants in human health and disease. *Annu. Rev.
Nutr.* 16:33-50

HRUSZKEWYCZ, AM. and BERGTOLD, DS., (1988). Oxygen radicals, lipid
peroxidation and DNA damage in mitochondria. *Basic. Life. Sci.* 49: 449-
456

HRUSZKEWYCZ, AM. and BERGTOLD, DS., (1990). The 8-hydroxy guanine
content of isolated mitochondria increases with lipid peroxidation. *Mutation
Res.* 244(2): 123-128

http://dtp.nci.nih.gov/docs/static_pages/compounds/123127.html, 2001

<http://www.artemis.unmc.edu:82>, 2000

<http://www.cancerhelp.org.uk/help/default.asp?page=4025>, 2001

[http://www.medicine.uiowa.edu/pharmacology/Lecturenotes/105-125/2001
/Koland/JGK-antineo-immuno.PDF](http://www.medicine.uiowa.edu/pharmacology/Lecturenotes/105-125/2001/Koland/JGK-antineo-immuno.PDF), 2001

[http://www.nursespr.com/members/database/ndrhtml/doxorubicinhydrochloride.
html](http://www.nursespr.com/members/database/ndrhtml/doxorubicinhydrochloride.html)

<http://www.rxlist.com/cgi/generic2/doxor.htm>, 2001

KAYAALP, OS., (1991). Kanser kemoterapisinin esasları ve antineoplastik ilaçlar. *Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji*. Cilt I. 6. Baskı. Feryal Matbacılık. Ankara. s.: 978-1044

KAZUO, O., TAKAMURA, T., NAZAWA, Y., (1984). Effect of α -tocopherol on lipid peroxidation and acyl chain modality of liver microsomes from vitamin E. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 30: 221-234

KIRKWOOD, JM., LOTZE, MT., YASKO, JM., (1996). Antibiotic agents, Doxorubicin. In: *Current Cancer Therapeutics*. Ed.: LJ. Boinbridge, J. Slade. Current Medicine. Philadelphia, USA. pp.: 40-46

KUSYK, CJ. and HSU, TC., (1976). Adriamycin-induced chromosome damage: elevated frequencies of isochromatid aberrations in G₂ and S phases. *Experienta.* 32(12): 1313-4

LARRAMENDY, ML., DULUOT, FN., BIANCHI, NO., OLIVERO, OA., (1980). In vivo dose-response relationship in bone-marrow cells of mice treated with adriamycin. *Mutation Res.* 79 : 133-140

MACGREGOR, HC. and VARLEY, JM., (1983). Mitotic Chromosomes. In: *Working with Animal Chromosomes*. Ed.: HC Macgregor. JW&Sons Ltd. New York. pp.: 13-39

MARCUS, R. and COULSTON, RM., (2001). Fat-Soluble Vitamins. In: *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 10th edition. Ed.: JG. Hardman, LE. Limbird, AG. Gilman. The McGraw-Hill Companies. New York pp.: 1773-1795

- MORELLI, D., MENARD, S., COLNAGHI, MI., BASARI, A., (1996). Oral administration of anti-doxorubicin monoclonal antibody prevents chemotherapy-induced gastrointestinal toxicity in mice. *Cancer Res.* 56: 2082-2085
- MURRAY, RK., GRANNER, DK., MAYES, PA., RODWELL, VW., (2000). Structure and function of the lipid-soluble vitamins. In: *Harper's Biochemistry*. 25th ed. Ed.: DA. Barnes, J. Ransom, J. Roche. Appelton & Lange. Stamford, Connecticut. pp.: 642-653
- MURRAY, RK., GRANNER, DK., MAYES, PA., RODWELL, VW., (2000). Nutrition. In: *Harper's Biochemistry*. 25th ed. Ed.: DA. Barnes, J. Ransom, J. Roche. Appelton & Lange. Stamford, Connecticut. pp.: 653-661
- NAKAGAWA, M., YAMAGUCHI, T., UEDA, H., KOMIYAMA, S., AKIYAMA, S., OGATA, J., KUWANO, M., (1985). Potentiation by vitamin A of the action of anticancer agents against murine tumors. *Jpn. J. Cancer Res.* 76(9): 887-94
- NAQUI, A. and CHANCE, B., (1986). Reactive oxygen intermediates in biochemistry. *Ann. Rev. Biochem.* 55: 137-166
- NEFIC, H., (2001). Anticlastogenic effect of Vitamin C on cisplatin induced chromosome aberrations in human lymphocyte cultures. *Mutation Res.* 498:89-98
- NEWSOME, YL. and SINGH, DN., (1977). Cytologic effects of adriamycin on human peripheral lymphocytes. *Acta Cytologica.* 21(1): 137-140
- NUSSBAUM, RL., McINNES, RR., WILLARD, HF., BOERKOEL III, CF., (2001). Principles of clinical cytogenetics. In: *Thompson & Thompson*

Genetics in Medicine. 6th ed. Ed.: W. Schmitt, WB. Saunders Company. USA. pp.: 135-154

PASCOE, GA., REED, DJ., (1987). Vitamin E protection against chemical-induced cell injury: II. Evidence for a threshold effect of cellular α -tocopherol in prevention of adriamycin-toxicity. *Arch. Biochem. Biophys.* 256: 159-166

PASSARGE, E., (1995). Structural chromosomal Aberrations. *Color Atlas of Genetics*, Ed: GT. Verlag. Stuttgart, New York: Thieme Medical Publisher Inc. pp: 182-185

RAMOS, KS., MELCHERT, RB., CHACON, E., ACOSTA, D., (2001). Toxic responses of the hearth and vascular systems. In: *Casarett and Doull's Toxicology the Basic Science of Poisons*. 6th ed. Ed.: CD. Klaassen. McGraw-Hill Medical publishing Division, New York. pp.: 597-653

RISBERG, B., SMITH, L., ORTENWALL, P., (1991). Oxygen radicals and lung injury. *Acta Anaesthesiol Scand Suppl.* 95:106-16

ROSELLI, F., ZACCARO, L., VENTURI, M., ROSSI, AM., (1990). Persistence of drug-induced chromosome aberrations in peripheral blood lymphocytes of the rat. *Mutation Res.* 232: 107-114

ROYHMAN, KJ., MOORE, LL., NGUYEN, US., MANNIO, S., MILUNSKY, A., (1995). Teratogenicity of high vitamin A intake. *N. Engl. J. Med.* 333: 1369-73

SAVAGE, JRK., (1975). Classification and relationship of induced chromosomal structural changes. *J. Med. Genet.* 12: 103-122

- SEVANIAN, A. and HOCHSTEIN, P., (1985). Mechanisms and consequences of lipid peroxidation in biological systems. *Ann. Rev. Nutr.* 5: 365-390
- TAPIERO, H., PATET, J., FOURCADE, A., HUPPERT, J., (1986). Chromosomal changes associated with resistance to doxorubicin: correlation with tumorigenicity. *Anticancer Res.* 6(2): 203-8
- TESORIERE, L., CIACCIO, M., VALENZA, M., BONGIORNO, A., MARESI, E., ALBIERO, R., LIVREA, MA., (1994). Effects of vitamin A administration on resistance of rat heart against doxorubicin-induced cardiotoxicity and lethality. *J. Pharmacol Exp. Ther.* 269 (1): 430-436
- TRITTON, TR., (1991). Cell surface actions of adriamycin. *Pharmac. Ther.* 49: 293-309
- VACA, CE., WILHELM, J., HARMS-RINGDAHL, M., (1988). Interaction of lipid peroxidation products with DNA. *Mutation Res.* 195: 137-149
- VILLANI, F., GALIMBERTI, M., ZUNINO, F., MONTI, E., ROZZA, A., LANZA, E., FAVALLI, L., POGGI, P., (1991). Prevention of doxorubicin-induced cardiomyopathy by reduced glutathione. *Cancer Chemother Pharmacol* 28(5):365-9
- WEISS, SJ., (1986). Oxygen, ischemia and inflammation. *Acta Physiol. Scand.* 548: 9-37
- WINROW, VR., WINYARD, PG., MORRIS, CJ., BLAKE, DR., (1993). Free radicals in inflammation: second messengers and mediators of tissue destruction. *British Medical Bulletin* 43: 506-522

ÖZGEÇMİŞ

1974 yılında Ünye’de doğdum. İlk ve orta öğrenimimi Ünye’de tamamladım. 1991 yılında Uludağ Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümü’nü kazandım. 1997 yılında Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsünde Yüksek Lisans öğrenimime başladım. 1998 yılında Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı’na Araştırma Görevlisi olarak atandım. Halen Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı’nda Araştırma Görevlisi olarak görev yapmaktayım.



**TC. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**