

Kemoterapi Nedenli Miyelosüpresyon Üzerine Selenyum'un Hematoprotektif Etkisi

Nilhan Heybeli

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

Biyoloji Anabilim Dalı

Aralık 2015

Hematoprotective Effect of Selenium on Chemotherapy Induced Myelosuppression

Nilhan Heybeli

**MASTER OF SCIENCE THESIS**

Department of Biology

December 2015

Kemoterapi Nedenli Miyelosüpresyon Üzerine Selenyum'un Hematoprotektif Etkisi

Nilhan HEYBELİ

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca

Biyoloji Anabilim Dalı

Genel Biyoloji Bilim Dalında

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır.

Danışman: Doç. Dr. Adnan Ayhancı

“(Bu tez BAP tarafından “201130D05” notu proje çerçevesinde desteklenmiştir)”

Aralık 2015

## ONAY

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Nilhan Heybeli'nin YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı “Kemoterapi Nedenli Miyelosüpresyon Üzerine Selenyum’un Hematoprotektif Etkisi” başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek oybirliği ile kabul edilmiştir.

**Danışman** : Doç. Dr. Adnan Ayhancı

**İkinci Danışman** : -

### **Yüksek Lisans Tez Savunma Jürisi:**

**Üye** : Doç. Dr. Adnan Ayhancı

**Üye** : Prof. Dr. Fatma Sultan Kılıç

**Üye** : Prof. Dr. Mehtap Kutlu

**Üye** : Prof. Dr. Varol Şahintürk

**Üye** : Doç. Dr. Figen Çalışkan

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ..... tarih ve  
..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Hürriyet ERŞAHAN  
Enstitü Müdürü

## **ETİK BEYAN**

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre Doç.Dr.Adnan AYHANCI danışmanlığında hazırlamış olduğum “Kemoterapi Nedenli Miyelosüpresyon Üzerine Selenyum’un Hematoprotektif Etkisi” başlıklı YÜKSEK LİSANS tezimin özgün bir çalışma olduğunu; tez çalışmamın tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; tezimde verdiğim bilgileri, verileri akademik ve bilimsel etik ilke ve kurallara uygun olarak elde ettiğime; tez çalışmamda yararlandığım eserlerin tümüne atıf yaptığımı ve kaynak gösterdiğimi ve bilgi, belge ve sonuçları bilimsel etik ilke ve kurallara göre sunduğumu beyan ederim. 01.12.2015

Nilhan HEYBELİ

## ÖZET

Siklofosfamid (CP) klinikte kanser ve non-malignant hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılan alkilleyici sitotoksik bir ilaçtır. CP'nin antitümoral etkinliği yüksek dozda kullanılabilmesine bağlıdır. Ancak yüksek doz CP kan ve kemik iliği toksisitesine neden olmaktadır. CP'ye bağlı hematoksisite, kan dokusunda lipit peroksidasyonunun artışıyla yakın ilişkilidir. Bu çalışmada deneysel olarak oluşturulmuş hematoksisitede, vücudumuzdaki antioksidan enzimlerin ana bileşeni olan ve aynı zamanda antioksidan özellikleri bilinen Selenyum'un (Se) kan ve kemik iliği üzerindeki olası koruyucu etkilerini saptamak amaçlandı. Çalışmamızda, 3 aylık Spraque-Dawley cinsi 42 adet erkek sıçan her grupta 7 hayvan olacak şekilde 6 gruba ayrılmıştır (kontrol; 150 mg/kg CP; 0.5 mg/kg Se; 1 mg/kg Se; 150+0.5 mg/kg CP+Se; 150+1 mg/kg CP+Se). CP ile birlikte Se verilen gruplarda Se uygulamasına CP uygulamasından 5 gün önce başlandı ve deney sonuna kadar devam edildi (6 gün). CP uygulaması ise hayvanlar anestezi edilmeden 24 saat önce tek doz olarak uygulandı. Böylece 7. Günde hayvanlardan anestezi altında intrakardiyak kan alımı yapıldıktan sonra sıçanların femurlarından kemik iliği dikkatlice alındı. Periferik kan hücreleri ve kemik iliği çekirdekli hücreleri kan sayım cihazında sayıldı. İntraperitoneal CP uygulaması kontrole göre lökosit (%317), trombosit (%36) ve kemik iliği çekirdekli hücre sayısını (%481) oldukça azalttı. CP ile birlikte 0.5 ve 1 mg/kg Se verilen deney gruplarındaki lökosit, trombosit ve kemik iliği çekirdekli hücre sayılarının CP verilen gruptakilere göre önemli bir oranda arttığı görüldü ( $p<0.001$ ). CP nedenli miyelosupresyon ve hematoksisitenin önlenmesinde 1 mg/kg Se, 0.5 mg/kg Se'a göre daha koruyucu olmuştur. Verilerimiz Se dozunun belirli oranlarda değiştirilmesiyle artan CP dozuna karşı daha güçlü bir koruyucu etkinliğin sağlanabileceğini düşündürmektedir. CP nedenli hematoksisitenin önlenmesinde Se'un farklı dozlarını içeren çalışmaların yapılması gerektiğini düşünmekteyiz.

**Anahtar kelimeler:** Siklofosfamid, hematoksisite, selenyum, sitoprotektivite, sıçan.

## SUMMARY

Cyclophosphamide (CP) is an alkylating cytotoxic drug that is commonly used in the treatment of cancer and non-malignant diseases. High therapeutic doses of CP have antitumoral activity. On the other hand, high doses of CP cause blood and bone marrow toxicity due to the increase in lipid peroxidation. Aim of this thesis is to find out the protective role of antioxidant Selenium (Se) against blood and bone marrow toxicity in an experimentally induced haematotoxicity model. For this purpose, we used 3 months old, 42 male Spraque-Dawley rats and divided them into 6 groups so that each group contains 7 animals (control; 150 mg/kg CP; 0.5 mg/kg Se; 1 mg/kg Se; 150+0.5 mg/kg CP+Se; 150+1 mg/kg CP+Se). Se injections started 5 days before the CP injections and carried on till the end of the experiment (6th day) for the groups to which CP was administrated together with Se. CP was administered as a single dose before anaesthesia. Therefore on the 7th day, blood was taken with cardiac puncture and bone marrow was taken by flushing the femur. Peripheral blood cells and bone marrow nucleated cells were counted on a cell counter. Intraperitoneal CP injection was found to reduce the number of leukocytes by 317%, thrombocyte by 36% and bone marrow nucleated cells by 481% compared to the control group. In the groups where CP was given after 0.5 and 1 mg/kg Se, numbers of leukocyte, thrombocyte and bone marrow nucleated cells were significantly increased compared to the group to which CP was given alone ( $p < 0.001$ ). Results show that 1 mg/kg Se has a better protection than 0.5 mg/kg against CP related myelosuppression and haematotoxicity. These results also implies that the dose of Se could be adjusted according to an increase in CP dose in order to gain a stronger protective effect. We believe there is a need of further studies in which different doses of Se will be used against CP related haematotoxicity.

**Key words:** Cyclophosphamide, haematotoxicity, selenium, cytoprotectivity, rat.

## TEŞEKKÜR

Bu tezin gerçekleşmesinde bana hem danışmanlık hem de yeri geldiğinde ağabeylik ve babalık ederek gülü yüzünü, anlayışını ve sabrını sonuna kadar göstererek beni yönlendiren ve her türlü olanağı sağlayan danışman Sayın hocam Doç. Dr. Adnan AYHANCI'ya en yürekten dileklerle hakkını ödeyemeyeceğimi bilerek teşekkürlerimi sunarım.

Sayın hocalarım Prof. Dr. Fatma Sultan KILIÇ, Prof. Dr. Mehtap KUTLU, Prof. Dr. Varol ŞAHİNTÜRK ve Doç. Dr. Figen ÇALIŞKAN'a zaman ayırıp teze buldukları katkılardan dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Deneysel aşama ve istatistiksel verilerin toplanmasında desteğini esirgemeyen Sayın Arş. Grv. Dr. Ahmet MUSMUL'a en içten teşekkürlerimi ederim.

Tezimin yazım aşamasında Sayın hocam Doç. Dr. Adnan AYHANCI'nın yanı sıra her türlü desteğini ve gülü yüzünü kendi sıkıntılarını hiçe sayarak gösteren, öz ablamdan ayırmadığım Arş. Grv. Dr. Sibel GÜNEŞ'e de en içten teşekkürlerimi sunarım.

Aynı dönem içerisinde beraber yürüttüğümüz bu tez çalışmasında her an yanımda olan ve desteklerini esirgemeyen dostlarım Özge ACAR ve Pınar KARASATI'ya en içten teşekkürlerimi sunarım.

Hayatım boyunca bana destek olacağına inandığım sevgili eşim Sezgin ERGÜN'e tez aşamasında da gösterdiği destek ve sağladığı katkılardan dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Her daim başarılı olmamdan ve kendimi geliştirmemden yana olup yüksek lisansa başlamama vesile olan, bana olan inancını her zaman göstermiş ve bu yolda benimle beraber maddi manevi tüm sıkıntılara katlanmış olan şu an benimle beraber olamasa da bu başarıyı gördüğüne ve mutlu olduğuna inandığım canım annem Kıymet HEYBELİ'ye, ayrıca bu yolda önüme engel koymadığı ve aynı şekilde başaracağıma inandığı için babam Uğur HEYBELİ'ye ve kardeşim Ceyhun HEYBELİ'ye de sonsuz teşekkürü bir borç bilirim.

Annemin anısına...



## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
<b>ÖZET</b> .....	<b>vi</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>vii</b>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>viii</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>ix</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>xi</b>
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	<b>xii</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	<b>xiii</b>
<b>1. GİRİŞ VE AMAÇ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI</b> .....	<b>1</b>
<b>3. GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>4</b>
3.1. Oksidatif Stres Ve Serbest Radikaller.....	4
3.2. Antioksidanlar.....	5
3.2.1. Enzimatik antioksidanlar.....	6
3.2.1.1. <u>Süperoksit dismutaz</u> .....	6
3.2.1.2. <u>Glutasyon peroksidaz</u> .....	7
3.2.1.3. <u>Katalaz</u> .....	7
3.2.2. Enzimatik olmayan antioksidanlar.....	8
3.2.2.1. <u>Alfa tokoferol</u> .....	8
3.2.2.2. <u>Askorbik asit</u> .....	8
3.3. Kan Dokusu Ve Serbest Radikaller.....	8
3.4. Siklofosfamid.....	9
3.5. Selenyumun Genel Özellikleri.....	12
3.5.1. Selenyumun fizyolojik yapısı ve rolü.....	13
3.5.2. Selenyumun vücuda taşınması.....	14
3.5.3. Selenyumun depolanması ve vücuttaki düzeyi.....	14
3.5.4. Selenyum fazlalığı.....	15
3.5.5. Selenyum eksikliği.....	16
<b>4. MATERYAL VE YÖNTEM</b> .....	<b>17</b>
4.1. Deney Hayvanları.....	17
4.2. Deney Grupları.....	17

**İÇİNDEKİLER (devam)**

4.3. Kimyasal Madde Ve Enjeksiyonları.....	18
4.4. Anestezi Ve Cerrahi Uygulamalar.....	19
4.5. İstatistiksel Değerlendirmeler.....	19
<b>5. BULGULAR VE TARTIŞMA.....</b>	<b>21</b>
5.1. Fizyolojik Bulgular.....	21
<b>6.SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>33</b>
<b>KAYNAKLAR DİZİNİ.....</b>	<b>38</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sekil

### Sayfa

<b>3.2.1.</b> Glutatyon Redoks Döngüsü.....	6
<b>3.4.1.</b> Siklofosfamid; 2-bis (kloroetil) amino tetrahidro-2H-1,2,3- oksazofosforin 2-oksit.....	10
<b>3.4.2.</b> Akrolein üroepitelyal hücreye girmesi, reaktif oksijen türevlerinin üretimi ve iNOS aktivasyonunun artmasıyla başlayan ve DNA hasarıyla sonuçlanan süreç.....	12
<b>5.1.1.</b> 150 mg/kg CP verilen deney grubu, 0,5 mg/kg Se verilen gruplar, 1 mg/kg Se verilen gruplar, 150+0,5 mg/kg CP+Se verilen gruplar, 150+1 mg/kg CP+Se verilen deney grubu ve 0.5 mL sf verilen kontrol gruplarının MDA düzeyleri.....	29
<b>5.1.2.</b> 150 mg/kg CP verilen deney grubu, 0,5 mg/kg Se verilen gruplar, 1 mg/kg Se verilen gruplar, 150+0,5 mg/kg CP+Se verilen gruplar, 150+1 mg/kg CP+Se verilen deney grubu ve 0.5 mL sf verilen kontrol gruplarının GSH düzeyleri.....	30
<b>5.1.3.</b> 150 mg/kg CP verilen deney grubu, 0,5 mg/kg Se verilen gruplar, 1 mg/kg Se verilen gruplar, 150+0,5 mg/kg CP+Se verilen gruplar, 150+1 mg/kg CP+Se verilen deney grubu ve 0.5 mL sf verilen kontrol gruplarının lökosit sayıları.....	30
<b>5.1.4.</b> 150 mg/kg CP verilen deney grubu, 0,5 mg/kg Se verilen gruplar, 1 mg/kg Se verilen gruplar, 150+0,5 mg/kg CP+Se verilen gruplar, 150+1 mg/kg CP+Se verilen deney grubu ve 0.5 mL sf verilen kontrol gruplarının trombosit sayıları.....	31
<b>5.1.5.</b> 150 mg/kg CP verilen deney grubu, 0,5 mg/kg Se verilen gruplar, 1 mg/kg Se verilen gruplar, 150+0,5 mg/kg CP+Se verilen gruplar, 150+1 mg/kg CP+Se verilen deney grubu ve 0.5 mL sf verilen kontrol gruplarının kemik iliği çekirdekli hücre sayıları.....	32

**ÇİZELGELER DİZİNİ**

<b><u>Cizelge</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
<b>4.2.1.</b> Uygulanan siklofosfamid ve selenyumun gruplara göre dağılımı.....	18
<b>4.2.2.</b> Siklofosfamid ve selenyumun gruplara uygulanma biçimi.....	18
<b>5.1.1.</b> 150 mg/kg CP, 150+0.5 ve 150+1 mg/kg CP+Se deney grupları ile kontrol grubu arasındaki MDA ve GSH seviyelerinin karşılaştırılması.....	25
<b>5.1.2.</b> 0.5 ve 1 mg/kg Se deney grupları ile kontrol grubu arasındaki MDA ve GSH seviyelerinin karşılaştırılması.....	26
<b>5.1.3.</b> 150 mg/kg CP, 150+0.5 ve 150+1 mg/kg CP+Se deney grupları ile kontrol grubu arasındaki lökosit, trombosit ve kemik iliği çekirdekli hücre sayılarının karşılaştırılması..	27
<b>5.1.4.</b> 0.5 ve 1 mg/kg Se deney grupları ile kontrol grubu arasındaki lökosit, trombosit ve kemik iliği çekirdekli hücre sayılarının karşılaştırılması.....	28

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

### Simgeler

μ	Mikrometre
kg	Kilogram
LD	Letal Doz
mg	Miligram
mL	Mililitre
n	Denek Sayısı

### Açıklama

### Kısaltmalar

ACR	Akrolein
AO	Antioksidan
Ar	Argon
Cd	Kadmiyum
CP	Siklofosamid
PAM	Fosforamid Mustard
GPx	Glutasyon Peroksidaz
GR	Glutasyon Redüktaz
GSH	Glutasyon
CAT	Katalaz
MDA	Malondialdehit
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
NOS	Nitrikoksit Sentaz
Pb	Kurşun
ROT	Reaktif Oksijen Türleri
Se	Selenyum
SOD	Süperoksit Dismutaz
SOR	Serbest Oksijen Radikali
TBA	Tiyobarbitürik Asit

## 1. GİRİŞ

Kanser, organizmanın savunma mekanizmalarının aksaması ve dengesinin bozulması durumunda, başlangıçta sağlıklı olan hücrelerin vücudun denetiminden çıkarak ölümlü bir büyüme ve yayılmasıyla karakterize olan ölümcül bir hastalıktır (Kearsley, 1986; Murray ve Lopez, 1997).

## 2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

Kanser, içinde bulunduğumuz 21. yüzyılın temel sağlık sorunlarından birisidir. Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre her yıl 12 milyon yeni kanser vakası teşhis edildiği, bununla birlikte kanserden kaynaklanan ölüm sayısının 7 milyon olduğu ve kanserli 25 milyon kişinin yaşamını sürdürdüğü bildirilmektedir (Bağ, 2013). 2020 yılında dünyada yıllık yeni kanser vaka sayısı 2000 yılına göre %65'lik bir artışla 17 milyon olarak öngörülmektedir. 2030 yılında ise dünya nüfusunun 8,7 milyara yükseleceği, yıllık 27 milyon yeni kanser vakası, kanserden kaynaklanan yıllık 17 milyon ölüm ile birlikte son 5 yıl içinde yeni kanser tanısı konmuş insan sayısının 75 milyona yükseleceği öngörülmektedir (Bağ, 2013; T.C. Sağlık Bakanlığı, 2010).

Günümüzde kanserin doğası anlaşılmış olup, tedavide çok önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Kanser tedavisi yöntemleri genel olarak kemoterapi, radyoterapi, cerrahi ve immünoterapi olup, kanser tanısı konan hastaların bireysel özellik ve hastalık durumuna göre bu yöntemlerden bir veya birkaçı tedavide kullanılmaktadır. Bu tedavi yöntemleri ile hastaların yaşam süresinin uzaması ve daha nitelikli yaşaması amaçlanmaktadır. Ancak kullanılan yöntemlere bağlı olarak tedavi ile ilgili zorluklar ve toksik etkiler de söz konusudur. Özellikle radyoterapi ve kemoterapi normal hücrelere de zarar vermektedir (Kızılcı, 1999).

Kanser kemoterapisinin esası; hastanın normal hücrelerine zarar vermeden tümör hücresinin büyümesini ve çoğalmasını durdurmak veya mümkünse onları yok etmektir. Ancak antineoplastik ilaçların kanser hücresine karşı olan seçicilikleri, antibiyotiklerin

bakteri hücrelerine karşı olan seçiciliklerinden daha azdır. Çünkü malign hücre ile normal insan hücresi arasında kalitatif bakımdan fazla fark yoktur, mevcut fark daha çok kantitatif yöndedir. Antineoplastik ilaçlar vücutta patolojik biçimde çoğalmakta olan kanser hücrelerini yok ettikleri gibi, hızlı biçimde çoğalmakta olan normal hücreleri de yok ederler. Bu yüzden çoğu kanser ilacının normal hücre ve kan dokusu üzerine de yan etkileri vardır (Kintzel, 2001). Örneğin, kemik iliği baskılanması kemoterapinin en önemli yan etkilerinden biridir ve bunun yol açtığı lökopeni, trombositopeni ve anemi hasta için çok rahatsızlık verici durumlardır. Bu durum onların yüksek dozda ve/veya daha sık kullanılmasıyla daha güçlü bir terapötik etkinliğin sağlanmasını engeller (Kalaycıoğlu vd., 1995; Sandberg vd., 1995; Cingi vd., 1996).

Antineoplastik kemoterapötik bir madde olan siklofosfamid (CP) en çok kullanılan antikanser ve bağışıklık baskılayıcı bir ilaçtır (Kumar vd., 2004; Senthilkumar vd., 2006). CP, güçlü bir oksazofosfarin olup, çeşitli solid tümörler ve B hücreli malignant hastalıkların tedavisinde tek başına veya çeşitli ilaçlarla kombine bir biçimde yaygın olarak kullanılan alkilleyici bir ajandır. Ayrıca nefrotik sendrom, romatoid artrit, sistemik lupus eritromatozus gibi non-neoplastik hastalıkların tedavisinde ve kemik iliği transplantasyonu öncesi koşullar için de kullanılır.

CP'nin iki aktif metaboliti fosforamid mustard (phosphoramid mustard= FAM) ve akroleindir (acrolein=ACR) (Kawabata vd., 1990). CP'nin antineoplastik etkileri FAM ile ilişkilidir. FAM'ın DNA ya bağlanarak hücre bölünmesini bloke ettiği, CP'nin bağışıklık baskılayıcı ve antitümör etkilerine aracılık ettiği düşünülmektedir (Kawabata vd., 1990). CP'nin toksik etkisi aktif metaboliti olan ACR ile ilgilidir. ACR doku antioksidan (AO) savunma sistemine müdahale ederek yüksek oranda serbest radikal oluşumuna yol açar ve memeli hücreleri için mutajeniktir. ACR kaynaklı oluşan serbest radikaller; enzim, reseptör, iyon pompaları gibi moleküllerle birleşerek onların fonksiyonlarını bozarlar (Senthilkumar vd., 2006). İnsanlar ACR'ye endüstriyel, çevresel ve terapötik durumlarda maruz kalabilirler. Endüstriyel olarak ACR herbisit olarak yaygın bir biçimde kullanılmaktadır. Çevresel olarak ACR organik materyallerin yanması ile ve yiyeceklerde doğal bir şekilde oluşabilir (Kehrer ve Biswal, 2000).

Serbest radikaller ve bu radikallerin etkisiyle oluşan lipid peroksidlerinin pek çok hastalığın patogenezinde rol oynadığı bilinmektedir. Son zamanlarda yapılan bazı araştırmalarda radyoterapinin, oksidan ve antioksidan aktivite üzerine olan etkileri incelenmiş ve radyoterapinin lipid peroksidasyonunu arttırdığı, antioksidan enzim aktivitesini ise baskıladığı tespit edilmiştir (Sabitha ve Shyamaladevi, 1999).

Diğer yandan antineoplastik ajanlar serbest radikallerin biyolojik kaynaklarındandır. Bu ajanlar sitotoksik etkilerine bağlı olarak lipid peroksidasyonunu artırmaktadırlar (Akkuş, 1995).

Kanser nedenleri arasında lipid peroksidasyonunun düşünölmeye başlaması; çalışmaları çeşitli besinsel antioksidanların kanser oluşumu üzerine etkilerini araştırmaya yönelmiştir (Byers ve Perry, 1992). Antioksidanların karsinojenezin başlama ve gelişme dönemini baskıladıkları, hücre ölümü ve değişmesini önledikleri bulunmuştur (İşcan ve Çoban, 1998).

Selenyum (Se) vücudumuzda birçok enzimin kofaktörüdür ve temel olarak antioksidan fonksiyonuyla bilinen esansiyel bir iz elementtir. Se, insanlarda organizmayı oksidatif hasarlardan koruyan glutatyon peroksidazların (GPx), ve selenoprotein P'nin de dahil olduğu pek çok metabolizmada rol oynamaktadır (Kohrle vd., 2005). GPx hücre sitoplazmasında bir antioksidan enzimdir ve Se deposu olarak görev yapar (Brown ve Arthur 2001). Se, E vitamini ile etkileşerek hücre membranını lipid metabolizmasının bir ürünü olan peroksidlerin oksidatif etkisinden korur (Rayman, 2000 ve Ip, 1998). Se'un lipid peroksidasyonunu baskılayarak hücre zararını koruyucu görevinin yanı sıra (Ilio vd., 1987), antioksidanlarla etkileşimi sayesinde kemoterapötik ajanlarla sinerjistik etkisi olduğu (Dai vd., 1999) ve terapötik etkisini arttırdığı, sisplatinin toksik yan etkilerini azalttığı belirtilmiştir (Yang vd., 2000).

Biz de bu çalışmamızda deneysel olarak oluşturulmuş CP nedenli hematoksisiteye karşı, antioksidan özellikleri bilinen Se'un olası sitoprotektif etkilerini periferik kan ve kemik iliği çekirdekli hücrelerinde araştırmayı planladık.



### 3. GENEL BİLGİLER

#### 3.1. Oksidatif Stres Ve Serbest Radikaller

Serbest radikaller, atomik orbital üzerinde eşlenmemiş elektron taşıyan moleküller olarak tanımlanır (Halliwell, 1994; Young ve Woodside, 2001). Serbest radikallerin oluşturduğu oksidatif stres; normal fonksiyon gösteren hücre ve organizmalardaki moleküllerde enzimatik olmayan oksidatif hasarın birikimi ile karakterize olmuş durumu ifade etmektedir (Baskin ve Salem, 1997). Patolojik bir olayı takiben organizmada meydana gelen fizyopatolojik değişiklikler temelde belirli mekanizmaların harekete geçmesi ile oluşmaktadır. Serbest radikaller, reaktif oksijen türleri veya oksijen metabolitleri olarak da adlandırılabilen bir kısım maddelerin ortaya çıkması ile hücre ölümü, doku hasarı ve nekroz sonucunda, organ veya sistemlerde işlev yetersizliği meydana gelmektedir (Dilek, 2003).

Serbest radikal oluşumunun artması, oksidatif stresi tetiklemektedir. Temel olarak oksidatif stres, biyolojik sistemde prooksidanlarla antioksidanlar arasındaki dengenin, prooksidanlar lehine bozulması olarak tanımlanır (Bhuvaramurthy vd., 1996; Berk vd., 2008). Hücreler hafif oksidatif stresi tek başlarına tolere edebilseler de genellikle antioksidan enzim sistemlerini aktive ederler. Ancak, hücre içi savunma sistemlerinin yeterli olmadığı durumlarda, oksidatif stresin tanımında belirtildiği üzere, reaktif oksijen türleri (ROT) ile antioksidanlar arasındaki denge bozulur, dolayısıyla oksidan hasara duyarlı DNA, protein, karbohidratlar ve lipitler gibi hücrel makromoleküller zarar görür (Gutteridge, 1994; Berger, 2005; Wildburger vd., 2009; Zadák vd., 2009).

Yapılan çalışmalarla, çeşitli kategorideki sitostatik ajanların hem *in vivo* hem de *in vitro* olarak serbest radikal üretimine neden oldukları gösterilmiştir (Weijl vd., 1997). Sitostatik ilaçlarla tedavi edilen hematolojik ve/veya solid malignansili hastaların, polimorfonükleer lökositlerince *in vitro* olarak  $H_2O_2$  ve  $O_2^{\cdot-}$  üretiminin, tedavi öncesine göre belirgin derecede arttığı görülmüştür (Weijl vd., 1997; White vd., 2006). Birçok araştırmacı tarafından, kanser hastalarında kemoterapiye bağlı olarak lipit peroksidasyonu (LPO) ürünlerinin miktarının yükseldiği, tedavi sonrasında da plazma E vitamini düzeyinin azaldığı bildirilmiştir (Weijl vd., 1997).

Kemoterapi alan hastalarda, plazma lipit hidroperoksitleri ve tiyobarbitürikasit (TBA)-reaktif bileşiklerin artması, kemoterapinin oksidatif strese yol açtığına işaret etmektedir (Sangeetha vd., 1990; Clements vd., 1997; Lin, 2002). Oksidatif stresin oluşumunda muhtemel bir neden de demir iyonudur (Weijl vd., 1997; Agarwal, 2008). Doksorubisin'in demir iyonu ile oluşturduğu kompleksin, potansiyel prooksidan etkisi olduğu gösterilmiştir. Bu kompleks, glutatyon (GSH) veya NADPH bağımlı enzimleri azaltabildiği gibi, serbest radikal oluşum reaksiyonlarının bir basamağını başlatabilmektedir. Radyoterapi ve yüksek dozda kemoterapi alan hastalarda, plazma antioksidan kapasitesi ve plazma yağda çözünen antioksidan düzeyi birkaç gün içinde azalmıştır (Weijl vd., 1997).

Kemoterapiye bağlı olarak ROT'un oluşturduğu başlıca hematolojik toksik etkiler, kemik iliğini baskılanması (miyelosupresyon), anemi, nötropeni, trombositopenidir. Miyelosupresyon, kemoterapide doz sınırlayıcı olan yaygın yan etkidir. Anemi yavaş ortaya çıkan bir yan etki olup, kemoterapi için doz sınırlayıcı değildir. Nötrofil ve trombosit sayıları da kemoterapi etkisiyle azalmaktadır (Baquiran ve Gallagher, 2001).

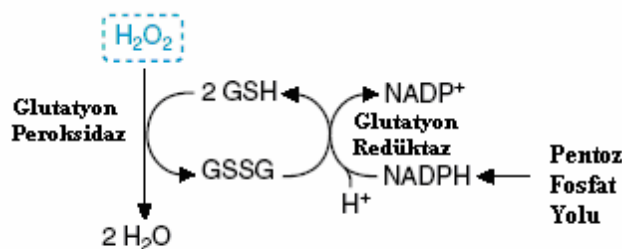
Oksidatif stres sonrası oluşan serbest oksijen radikali (SOR); DNA, lipid ve karbohidrat hasarına yol açar. SOR ile okside olan yağ asileri lipit peroksi radikallerine ve lipit hidroperoksitlerine dönüşürler. Lipid peroksi radikalleri ise malondialdehite (MDA) dönüşür. Lipid radikalleri DNA ile de reaksiyona girerek DNA-MDA ürünlerini oluşturur. SOR endojen ya da eksojen kaynaklı oluşabilir. Endojen SOR normal hücre metabolizması ve oksidatif fosforilasyon sonrası oluşur. İlaçlar, hormonlar ve bazı kimyasallar eksojen SOR'u oluştururlar. Lipit radikalleri hücre zarını rahatlıkla geçerek hücredeki homeostazisi bozar (Knight, 1995).

### **3.2. Antioksidanlar**

Antioksidanlar (AO) düşük konsantrasyonlarda okside edilebilen ve diğer bir substratın oksidasyonunu azaltan veya engelleyen yani oksidasyona karşı mücadele eden maddelerdir.

Antioksidanlar oksidatif strese karşı etkilerini dört farklı şekilde gösterirler. Örneğin  $\alpha$ -tokoferol, lipid faz zincirini kıran bir AO olarak zincirleme bir şekilde ilerleyen lipid peroksidasyonu gibi serbest radikal üreten basamaklara etki ederek reaksiyonları adeta kırar. GSH gibi AO moleküller ise direk olarak ROT konsantrasyonunu azaltırlar (Şekil 3.2.1). Süperoksit dismutaz (SOD) gibi AO enzimler serbest radikal üretimini başlatan ilk radikali etkisiz hale getirirler. Bazı maddeler ise geçiş maddeleri ile şelatlar oluşturarak etkilerini gösterirler. Bu yolla laktoferritin, transferin ile ferritin demir ile; seruloplazmin ve albumin ise bakır ile uyarılan oksidan stresi engellerler (Baskin ve Salem, 1997). Vitamin E, Se, vitamin C ve karotenoidler gibi AO maddeler ilaç ve ksenobiotiklerin oluşturdukları oksidatif hasarlara karşı koruyucu etkilere sahiptirler (Antunes vd., 2000).

Tüm hayvansal ve bitkisel organizmalar serbest radikallerin etkilerini önlemek için endojen AO sistemlere sahiptirler. Bu sistemler enzimatik olan ve olmayan olarak ikiye ayrılabilir:



Şekil 3.2.1. Glutasyon redoks döngüsü.

### 3.2.1. Enzimatik antioksidanlar

#### 3.2.1.1. Süperoksit dismutaz

Endojen olarak üretilen ve organizmayı oluşturan her hücre için esansiyel bir enzimdir. Hücresel SOD çeşitli prostetik gruplar taşıyan metalloenzimlerin bir grubudur. SOD beş farklı formdadır: Organizmada en bol olarak bulunan bakır-çinko süperoksit dismutaz (CuZn-SOD) sitoplazmada bulunur. Mangan süperoksit dismutaz (Mn-SOD), mitokondrilerde yer alır. Demir süperoksit dismutaz (Fe-SOD), *E.coli*, *Bacteroides fragilis*

ve *Propionibacterium shermanii* bakterilerinde anaerobik ortamda Fe içeren, aerobik ortamda ise Mn içeren SOD enziminin kullanıldığı özel bir sistem şeklinde bulunmaktadır. Ni-SOD, *Streptomyces griseus* bakterisinde tanımlanan homotetramerik yapıli nikel içeren bir izoenzimdir (Baskin ve Salem, 1997).

Ekstrasellüler SOD (ES-SOD), CuZn-SOD'dan farklı olarak bakır ve çinko taşıyan salgısal SOD'tur. ES-SOD, sadece fibroblast ve endotelial hücreler tarafından sentez edilir ve heparan sülfatlara bağılı olarak hücre yüzeyinde eksprese edilir. Damar endotelinden salgılanan endotelial heparin gevşetici faktör plazmada süperoksit tarafından nötrale edildiğı için ES-SOD damar tonusunun düzenlenmesinde muhtemel rol oynar (Marklund, 1982).

Süperoksit dismutaz, ROT'lardan süperokside bir elektron vererek H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'ye indirgerken; katalaz ve selenyum bağımlı glutatyon peroksidaz (GPx) ise H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'yi suya indirger. SOD'un antioksidan etkisi süperoksit ile Fe<sup>3+</sup>'ün, Fe<sup>2+</sup>'ye indirgenmesi sonucunda hidroksil radikalinin oluşmasının engellenmesi şeklindedir (Baskin ve Salem, 1995).

### **3.2.1.2. Glutatyon peroksidaz**

Glutatyon redoks döngüsü, hücre içi hidroperoksitlerin indirgenmesinde merkezi rol oynamaktadır. GPx, dört atom Se bağıladığından dolayı seleno-sistein bileşigi sınıfına girer ve katalitik aktivitesini bu özelliğı sağlar. Koenzim olarak glutatyon gereksinim duyar. GPx, glutatyonu okside ederek hidrojen peroksiti H<sub>2</sub>O'ya indirgemektedir. Glutatyonun okside formunun (GSSG) tekrar GSH'ya indirgenmesi ise glutatyon redüktaz (GR) tarafından sağlanır. SOD maksimum etkinlik için bakır, çinko ve manganez; GPx selenyum ve katalaz demir gibi geçiş metallerinin kofaktörlüğüne ihtiyaç duyar (Garewal, 1997). Glutatyon peroksidaz eritrosit, trombosit ve plazmada bulunur (Lawrence vd., 2003).

### **3.2.1.3. Katalaz**

Hayvansal organizmaların aerobik hücrelerinde; özellikle karaciğer ve eritrositlerde yoğun olarak bulunur. Beyin, kalp, iskelet kasları ise düşük miktarlarda katalaz (CAT) içermektedir. Katalaz ve GPx, hidrojen peroksidi su ve atomik oksijene indirgemektedirler. Bu enzimlerin aktiviteleri artmadan SOD'un aktivitesinin artması hidrojen peroksitin birikmesine ve böylece hidroksil radikallerinin oluşmasına neden olur (Garewal, 1997).

## **3.2.2. Enzimatik olmayan antioksidanlar**

### **3.2.2.1. Alfa tokoferol**

Hücrelerde bulunan yağda çözünen ana antioksidandır. Plazmada baskın olarak bulunan ve en yüksek AO aktiviteye sahip olanı  $\alpha$ -tokoferoldür (Baskin ve Salem, 1997).

Ana fonksiyonu membran fosfolipitlerinin peroksidasyonunun ve hücre membranlarının hasar görmesinin önlenmesidir (Gey vd., 1991). Tokoferol-OH, bir H atomu ile serbest radikale bir elektron transfer ederek, hücre membranı proteinleri ile reaksiyon girmesini ya da lipit peroksidasyonunu başlatmasını engeller. Tokoferol-OH serbest radikal ile etkileştiğinde tokoferol-O $\cdot$  radikali meydana gelir. Eğer askorbik asit ortamda yeterli miktarda var ise tokoferol-O $\cdot$  ile askorbat reaksiyona girerek tokoferol-OH ve zayıf bir radikal olan semi dehidroaskorbat meydana gelir. Böylece kuvvetli bir radikal etkisiz hale getirilirken, zayıf bir radikal (dehidroaskorbat) oluşur ve tokoferol-OH tekrar kazanılır (Baskin ve Salem, 1997; Carr vd., 2000).

### **3.2.2.2. Askorbik asit**

Askorbik asit (vitamin C) suda çözünebilen zincir kıran bir antioksidan olması nedeniyle özellikle detoksifikasyon metabolizması esnasında meydana gelen serbest radikalleri etkisiz hale getirir (Carr vd., 2000).

### 3.3. Kan Dokusu Ve Serbest Radikaller

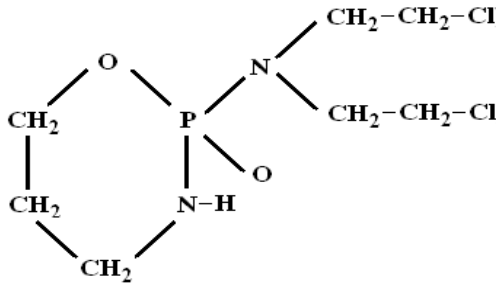
Başta *Staphylococcus aureus* gibi infeksiyöz ajanlar ayrıca lökotrienler ve prostaglandinler gibi aracı maddeler nötrofil, eosinofil ve makrofajları aktive ederler, membrana bağlı nikotinamid adenin dinükleotid fosfat oksidaz (NADPH oksidaz) enzimi yoluyla oksidan moleküller salgılatırlar. Nötrofiller tarafından kullanılan antibakteriyel savunma mekanizması miyeloperoksidaz enzimidir. İnfeksiyöz ajanlarla savaş için gerekli olan oksidan moleküller, kan hücreleri tarafından aşırı salgılanacak olurlarsa bu kez yarar yerine zararlı olmaya başlarlar. Reaktif oksijen türleri endotel hasarı ile mikrosirkülasyonda bozulmaya yol açarlar (Henderson, 1994; Natanson, 1994).

Aktive lökositler NADPH oksidaz adlı spesifik bir membran enzim sistemi üzerinden radikal üretirler. Bu sistemin eksikliğinde kronik granülomatöz hastalığı oluşur. İnflamasyon sırasında açığa çıkan kimyasal araçlar lökosit diapedezine neden olur. Bir fagosit, fagosit edilebilir bir zararlı madde ile karşılaşınca hücre zarında onu kuşatan bir hücre zarı kılıfı (=fagozom) meydana gelir ve membrandaki NADPH oksidaz aktive olarak oksijen tüketimi 10 kattan fazla artar, buna paralel olarak da oksijen radikallerinin üretimi artar. Bir zararlı tarafından uyarılan bu oksijen gereksinimi artışına ‘oksidatif patlama’ ya da ‘solunum patlaması’ denir. Nötrofillerin kullandığı, fakat makrofajların kullanmadığı başka bir öldürme mekanizması miyeloperoksidaz ile olandır. Bu enzim H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>’yi kullanarak klor iyonunu hipokloröz asite (HOCl) oksitler. Bu asit güçlü bir antibakteriyel ajandır, fakat yarı ömrü çok kısadır. Aminoasitler ve biyojen aminlerle etkileşime girerek kloraminleri (R-NHCl) oluşturur, bunlar da oldukça reaktiftir, ancak etkileri daha uzun sürer (Halliwell, 1991).

Akut lösemilerde gerek miyeloid gerekse lenfoid seri kökenli tümör hücrelerinin aşırı miktarda serbest radikal (özellikle de hidroksil radikali) ürettiği bilinmektedir. Yapılan bazı çalışmalarda akut lösemili bireylerin oluşan bu hasara karşı AO sistemlerini yeteri kadar ortaya koydukları, ancak bazı bireylerde ise AO sistemin yeteri kadar devreye girmediği görülmüştür. Antioksidan savunma sisteminin devreye girdiği akut lösemili bireylerde de bazı AO’ların ön plana çıktığı bazılarının ise önemli bir fonksiyon göstermediği bildirilmiştir (Drabko ve Kowalczyk, 2004).

### 3.4. Siklofosfamid

Siklofosfamid (cyclophosphamide=CP), kanser kemoterapisinde yaygın olarak kullanılan, klasik bir alkilleyici ajan olan nitrojen mustardın türevi bir okzasafosforindir. Bu ilaç aynı zamanda önemli ölçüde bağışıklık baskılayıcı etki gösterir ve kemik iliği transplantasyonlarında, renal ve otoimmün bozuklukların tedavisinde kullanılır (Dollery, 1999). CP'nin kimyasal yapısı Şekil 3.4.1'de gösterilmiştir (Budavari, 1987).



Şekil 3.4.1. Siklofosfamid; 2-bis (kloroetil) amino tetrahidro-2H-1,2,3 oksazofosforin 2-oksit.

CP tarafından oluşturulan bağışıklık baskılayıcılık ana ilaçtan ziyade onun metabolitlerinden kaynaklanmaktadır. P-450 monooksijenaz sisteminin etkisi altında CP, 4-hidroksi siklofosfamide metabolize olur. Bu metabolit enzimatik olmayan bir yolla aldofosfamide düzenlenir. Bu da CP'nin esas metabolitleri olan FAM ve ACR'ye ayrılır. FAM'ın DNA'ya bağlanarak hücre bölünmesini baskıladığı, CP'nin antitümör etkilerine aracı olduğu düşünülmektedir. Öte yandan ACR'nin önemli makromoleküllerinin sülfidril gruplarıyla çabucak reaksiyona girdiği böylece bağışıklığın baskılanmasında rol aldığı düşünülmektedir (Kawabata vd., 1990; Kwon vd., 1987; Pool vd., 1988).

CP'nin kullanım alanları şunlardır;

- Hodgkin dışı lenfomalar (Glode vd., 1981; Kreuser vd., 1993),
- Çocukların akut lenfositik lösemisi (Bokser vd., 1990; Morris, 1993),
- Küçük hücreli olan veya olmayan akciğer kanseri (Thatcher vd., 1988),
- Hodgkin hücreleri (Ayhanci vd., 2008),

- Pediatrik solid tümörler (Bramwell vd., 1987).

CP'nin en sık görülen yan etkileri bulantı, kusma ve diğer sindirim sistemi bozuklukları ile kemik iliği baskılanmasıdır (Hansen vd., 1995). CP'nin sınır dozunda gösterdiği toksisitenin kemik iliğini baskılayıcı toksisite olduğu ileri sürülmüştür (Thatcher vd., 1988; Kotlarek-Hause vd., 1995).

Kemik iliği baskılanmasına bağlı olarak lökopeni, trombositopeni ve bazı hastalarda alopesi gelişmektedir (Banham vd., 1985; Akçasu vd., 1992). CP özellikle daha önce kemoterapi görmüş hastalarda lökopeni yapmaktadır (Bramwell vd., 1987). Klinik bir çalışmada ileri derecede melanomalı hastalara düşük dozda (350 mg/kg<sup>2</sup>) CP verildiğinde baskılayıcı T hücresi sayısının oldukça azaldığı gösterilmiştir (Mitchell, 1989).

CP'nin en önemli potansiyel toksisitesi ve doz sınırlayan yan etkisi hemorajik sistittir. CP karaciğerde hidrosillenerek bir metaboliti olan ACR'ye dönüşmektedir ve ACR'nin böbrekten atılmasıyla yan etkiler ortaya çıkmaktadır. ACR sadece siklofosfamidin yıkılmasıyla oluşmamakta ayrıca sigarada, böcek ilaçlarında, bazı yiyeceklerde ve yanmış organik malzemelerde de bulunabilmektedir. ACR'nin ürotelyumla direkt temasıyla ürotelyal hasar başlamaktadır (Masuda vd., 2006). Mesanede vasküler konjesyon, ödem, hemoraji, epitelyal nekroz ve inflamatuvar infiltrasyon ile karakterize ağır bir sistit tablosu görülmektedir. Mesanenin ağırlığı da büyük oranda ödem nedeniyle artmaktadır (Ribeiro vd., 2002). Mesane ağırlığı CP uygulandıktan 2 saat sonra anlamlı derecede artmaya başlamakta ve 4-72 saatte en yüksek seviyelere çıkmaktadır (Matsuoka vd., 2007).

CP'nin antineoplastik etkileri FAM ile ilgilidir; toksik yan etkileri ise (apoptoz, nekroz, çoklu tümör oluşumu) ACR'ye bağlıdır. ACR üroepitelyumu geçerek ve bazı reaktif oksijen türlerini uyararak etkisini gösterdiği gibi nitrik oksit sentaz (NOS) üzerinden nitrik oksit (NO) seviyelerini artırarak da şekil 2.4.2'deki gibi gösterir (Korkmaz vd., 2007). NO birçok önemli fizyolojik ve fizyopatolojik süreci düzenleyen serbest radikal öncülü bir üründür. L-argininden NOS yoluyla sentez edilir ve NOS'un 3 tipi vardır. Endotelial NOS (eNOS) endotelial hücrelerden ve fibroblastlardan sentez edilir ve ana olarak vazodilatasyondan sorumludur. Sinir sisteminde üretilen nöronal NOS (nNOS) sinirsel sinyalizasyonda görev alan bir enzimdir. İndüklenebilir NOS (iNOS), lökosit ve





### 3.5. Selenyumun Genel Özellikleri

Selenyum (Se) adı, eski Yunanda ay tanrıçası Selene'den gelmektedir. 1800'lerin başında modern kimyanın kurucularından olarak nitelendirilen İsveçli Jons Jakob Berzelius tarafından ilk kez keşfedilmiştir. Ancak bir asır sonra eser element olarak fonksiyonları tanımlanmaya başlanmıştır (Kohrle, 1999). Yüksek konsantrasyonları toksik olan bu ametalin eser element olarak düşük konsantrasyonları vücut için esansiyeldir. Deniz ürünleri, yumurta ve karaciğerin yapısında bolca bulunur, vücudumuzda birçok enzimin kofaktörüdür ve temel olarak antioksidan fonksiyonuyla bilinen esansiyel bir iz elementtir.

Selenyum, insanlarda organizmayı oksidatif hasarlardan koruyan GPx'in, iyodo tirozin deiyodinazın ve selenoprotein P'nin de dahil olduğu pek çok metabolik süreçte rol oynar (Kohrle vd., 2005). Se aynı zamanda tiyoredoksin redüktazın bir bileşenidir ki bu enzim DNA sentezinde, oksidatif strese karşı savunmada rol oynayan ve protein onarımında gerekli olan önemli bir enzimdir (Miller vd., 2007).

Biriktirici özelliği nedeniyle killi topraklarda yetişen bitkilerde Se miktarı daha fazladır (Akkuş vd., 1991). Et, deniz ürünleri ve balık da çok iyi birer Se kaynağıdır. Öte yandan meyve ve sebzeler (mantar ve sarımsak hariç), süt ve süt ürünleri (yumurta, bazı peynirler ve tereyağı hariç), yağlar, içecekler ve pek çok bebek maması Se açısından fakir gıdalardır. Hayvanlarda en çok böbrek korteksinde birikir. Kalp kası dışında diğer kaslarda Se düşük, karaciğerde ise orta düzeydedir. Sütte toksik seviyede Se bulunmaz. Az miktarda içme suyunda da bulunur (Neve vd., 1985; Akkuş vd., 1991; Yanardağ ve Orak, 1999).

Oral kullanılan antioksidanlar arasında bulunan Se iz elementi antimitojenik ajan olarak bilinir. Normal hücrelerin malin transformasyonunu engeller ve p53'ü düzenler. Genel olarak selenoenzimlerin hücre bölünme kontrolünde, oksijen metabolizmasında, detoksifikasyon sürecinde, kanser hücrelerinde apoptozun indüklenmesinde, onkogen inaktivasyonunda, immün sistem fonksiyonlarında görevi vardır. Günde 200 µg Se kullanımının akciğer, kolon ve prostat kanseri riskini azalttığı gösterilmiş olmakla beraber, deri kanseri riskinde değişme görülmemiştir (Valko vd., 2006).

### 3.5.1. Selenyumun fizyolojik yapısı ve rolü

Selenyum biyolojik etkilerini, yapısında başlıca selenosistein aminoasidi bulunan selenoproteinler yoluyla göstermektedir. Bazı enzimlerin yapısında yer alan selenosistein, aslında sistein amino asidinde bulunan sülfür atomlarından birinin yerine selenyum atomu geçmesiyle ortaya çıkmaktadır. Selenosisteinler, biyolojik pH'de anyonik halde bulunur ve bu sayede elektron alışverişi yoluyla biyolojik redoks reaksiyonlarının gerçekleşmesini sağlarlar (Rayman, 2000). Selenoproteinler ise, selenosistein rezidüleri içeren protein yapılarıdır. Se eksikliğinin aslen selenoproteinlerin oluşmasında aksama sonucu klinik bulgulara neden olduğu düşünülmektedir.

Dört Se atomu, hayvanlarda vitamin E ile sinerjik etki gösteren, güçlü bir AO görevi olan GPx enziminde sistein rezidüsüne kovalent bağlı olarak yer alır. Dokuların sitoplazma ve mitokondrilerinde yer alan GPx, hücre içinde organik peroksit ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> birikimine karşı başlıca koruyucu AO enzimdir. Özellikle membran lipidlerini, peroksidasyona karşı korur ve bu sayede hücre membranlarının bütünlüğünün korunmasını sağlar (Lawrance vd., 2003).

Selenyum iz element olarak inflamatuvar, immün düzenleyici ve endokrin fonksiyonların düzenlenmesi için hem yapısal ve hem de kofaktör olarak rol alır. GPx'lerin en az yedi izoenzimi tanımlanmıştır (Stawicki vd., 2007; Utomo vd., 2004). GPx1, en sık rastlanan formdur ve neredeyse tüm memeli dokularında bulunmaktadır. Güçlü bir serbest radikal olduğu bilinen hidrojen peroksidi suya dönüştürme reaksiyonunu katalize eder. Böylece organizmayı oksidatif hasarlanmadan korur. GPx1 hücre sitoplazmasında bir antioksidandır ve Se deposu olarak görev yapar. Glutasyon peroksidazın yapısı incelendiğinde selenosistein rezidüsü içeren tetramerik bir selenoproteinden oluştuğu anlaşılmıştır. Yapıda asıl fonksiyon gören kısım selenosistein ucudur, selenosistein içermeyen formları işlevsizdir. Her bir GPx farklı bir selenoprotein olmasına rağmen hepsi AO enzimler olup hidrojen peroksit veya hidroperoksitler gibi potansiyel zarar verici ROT'ların su ve alkol gibi zararsız ürünlere indirgenmelerini GSH'nin oksidasyonu ile sağlarlar (Brown ve Arthur, 2001).

### 3.5.2. Selenyumun vücuda taşınması

Atmosferdeki Se, toprak ve bitkiler tarafından alınarak gıda zinciri ile insanlara ve hayvanlara geçer. Hayvanların başlıca Se alımları yemle birlikte gerçekleşir (Shamberger, 1984). Bitkisel Se kendini daha çok selenometiyonin olarak gösterirken, hayvanlarda öncelikli formu selenosisteindir (Lawrence vd., 2003).

### 3.5.3. Selenyumun depolanması ve vücuttaki düzeyi

Selenyum, başta böbrekler olmak üzere karaciğer, dalak, hipofiz ve pankreas gibi glandüler dokularda birikmektedir (Arthur, 1997). Duodenum ve proksimal jejunumdan etkili olarak emilir, karaciğer ve eritrositler tarafından hızla alındıktan sonra metabolize olmuş formda plazmaya döner. Eritrositler tarafından indirgenerek plazma proteinlerine bağlanabilecek hale gelir. Alınan Se'un %55-60'ı idrarla atılır. Toksik seviyelerdeki Se'un ter ve solunumla atılımı önem kazanır (Neve vd., 1985). Selenyum vitamin E ile yakın ilişkili olup bu vitaminle birlikte biyolojik membranları oksidatif dejenerasyondan koruyarak doku yıkımını önlemektedir (Arthur, 1997).

Selenoprotein P, plazmadaki Se yaklaşık %60'ını oluşturur ve taşıyıcı protein olarak rol alır. Plazmada bulunmasının yanısıra vasküler endotelial hücreler ile de bağlantı halindedir. Selenoprotein P'nin fonksiyonu tam belirlenememiş olmasına rağmen, peroksinitrit denen serbest radikaller tarafından zarar görmüş endotelial hücrelerinin antioksidanı olduğu düşünülmektedir. Se'un bazı kanser tiplerine karşı koruyucu olabileceği, erkek fertilitasını artırdığı, kardiyovasküler mortalitede azalma sağladığı ve astımda inflamatuvar araçların yapımını baskıladığı gösterilmiştir (Arthur ve Brown, 2001).

Selenyumun vücuttaki düzeyi, serum, plazma ve idrarda Se konsantrasyonu ve eritrositlerde GPx'in aktivitesi olarak tayin edilmektedir. En sık kullanılan parametre plazma (veya tam kan) Se konsantrasyonudur. Sağlıklı insanda normal değerler ileri derecede değişkenlik göstermekte olup coğrafi duruma, toprak ve gıdalardaki Se miktarına bağlıdır. Alınan Se miktarının ani azalması plazma konsantrasyonuna ve idrarla atılan Se miktarına hemen yansımaktadır. Keza Se konsantrasyonu yüksek olan trombositler kısa

ömürleri nedeniyle kısa süreli değişimlere duyarlıdır. GPx aktivitesi ve saç ve tırnaktaki Se konsantrasyonları ise uzun süreli Se miktarı hakkında bilgi verir, kısa süreli Se değişimlerine ise duyarlı değildir (Neve vd., 1985).

#### **3.5.4. Selenyum fazlalığı**

En belirgin bulgu saç ve tırnakların dökülmesidir. Deri ve sinir sistemi lezyonları ve diş bozuklukları oluşur. Düşüklere yol açabilir ancak teratojenik etkiye ait delil yoktur. Kronik Se temasına tipik bir hastalık belirlenmemişse de akut intoksikasyonu tespit edilmiştir. İlk belirtiler bulantı, kusma ve diyaredir. Birkaç hafta sonra saçlar dökülmeye başlar ve tırnaklarda patolojik değişiklikler oluşur. Geçici EKG değişikliği, karaciğer fonksiyon bozukluğu ve sarımsak kokulu solunum da bildirilmiştir. Retikülo endotelial neoplazi de serum Se seviyesi yüksek bulunmuştur (Akkuş vd., 1991; Neve vd., 1985).

#### **3.5.5. Selenyum eksikliği**

Eksiklik organizmanın besinsel ihtiyacı ile diyetteki biyolojik olarak kullanılabilir element arasındaki dengesizlikten kaynaklanmaktadır. Ya selenyum arzı azalmış ya da talebi artmıştır. Jeokimyasal etmenler endemik yetersizlik sahalarının ve buna bağlı hastalıkların oluşmasına sebep olurlar. Yeme alışkanlıkları da Se eksikliğine neden olabilir. Mide salgısını etkileyen patolojiler eser elementlerin emilimini etkileyebilir. Keza pürifiye parental veya enteral beslenme vejetaryen rejimler, bazı mamalarla beslenme ve total parenteral beslenme Se eksikliği oluşturabilir (Akkuş vd., 1991; Mertz vd., 1989; Neve vd., 1985). Buna ilişkin ilk kanıtlar 1979 yılında Çin'de bilim adamlarının Se eksikliği ile karakterize olan Keshan ve Kashin-Beck's hastalığını bulmaları ile elde edildi. Keshan hastalığı kardiyojenik şoka ve bazı durumlarda konjestif (kan göllenmesine sebep olan) kan yetmezliğine neden olabilen bir kardiyomiyopatidir. Kronik durumlarda hasta çeşitli derecelerde kalp yetmezliği ve kalp büyümesi ile karşı karşıya kalır (Burk ve Levander, 1999; Groff vd., 1995). Keshan hastalığı genellikle çocukları ve genç bayanları etkilerken, Kashin-Beck's hastalığı erken gençlik döneminde etkisini gösterir. Bu hastalık çeşitli tiplerde kireçlenme ile sonuçlanır. Hastalık genellikle sinirlerin ve kıkırdak doku hücrelerinin bozulması ile karakterizedir. Kıkırdak doku hücrelerinin harabiyeti, cücelik ve eklem bozulmalarına neden olur (Burk ve Levander, 1999).

## 4. MATERYAL VE YÖNTEM

### 4.1. Deney Hayvanları

Deneysel çalışmamızda sağlıklı, erkek,  $220\pm 20$  gram ağırlıkta, 3 aylık Sprague-Dawley cinsi albino sıçanlar kullanılmıştır. Deney hayvanları Eskişehir Osmangazi Üniversitesi (ESOGÜ) Tıbbi ve Cerrahi Araştırma Merkezi'nden temin edilmiştir. Bütün deney hayvanları enjeksiyondan önce bir haftalık karantinaya alındı ve deney süresince 12:12 aydınlık/karanlık ışıklandırması olan, ısı ( $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) ve nemi (%45-50) otomatik olarak ayarlanmış odalarda, polikarbonat şeffaf kafeslerde barındırıldı ve gerektiği kadar pellet yem ve çeşme suyu verildi. Bu çalışma ESOĞÜ Deney Hayvanları Etik Kurulu'nun 27.02.2013 tarihli ve 320/2014 nolu kararı ile kabul edilmiştir. Karar örneği ektedir.

### 4.2. Deney Grupları

Deney hayvanları arasından rastgele seçimle her birinde 7'şer sıçan olmak üzere kontrol grubu dahil toplam 6 grup oluşturuldu. Bunlar:

**Grup 1 (Kontrol Grubu):** Her hayvana 0,5 mL serum fizyolojik enjekte edildi.

**Grup 2:** Her hayvana 150 mg/kg tek doz CP enjeksiyonu yapıldı.

**Grup 3:** Her hayvana 0.5 mg/kg Se enjeksiyonu yapıldı.

**Grup 4:** Her hayvana 1 mg/kg Se enjeksiyonu yapıldı.

**Grup 5:** 150+0.5 mg/kg CP+Se enjeksiyonu yapıldı.

**Grup 6:** 150+1 mg/kg CP+Se enjeksiyonu yapıldı.

**Çizelge 4.2.1.** Uygulanan siklofosfamid ve selenyumun gruplara göre dağılımı.

Dozlar/ Gruplar	150 mg/kg CP	0.5 mg/kg Se	1 mg/kg Se	SF
1. Grup (Kontrol)				+
2. Grup	+			
3. Grup		+		
4. Grup			+	
5. Grup	+	+		
6. Grup	+		+	

**Çizelge 4.2.2.** Siklofosfamid ve selenyumun gruplara uygulanma biçimi.

Gün/ Verilen madde	1	2	3	4	5	6	7
Kontrol	SF	SF	SF	SF	SF	SF	x
CP	SF	SF	SF	SF	SF	CP+SF	x
Se	Se	Se	Se	Se	Se	Se	x
CP+Se	Se	Se	Se	Se	Se	CP+Se	x

### 4.3. Kimyasal Maddeler Ve Enjeksiyonları

Deneyde 2, 5, 6. gruplara tek doz intraperitoneal (i.p) olarak uygulanan CP (Sigma C0768-10G, Amerika) ve 3, 4, 5, 6. gruplara i.p olarak kullanılan Se (Sigma 209643-50G, Amerika) ticari olarak temin edildi. CP'nin 150 mg/kg'lık tek dozu kullanıldı (Çizelge 4.2.1.). Deneylerimizde Se'un iki farklı dozu (0.5 ve 1 mg/kg) kullanıldı (Çizelge 4.2.1.). Sıçanlarda Se'un i.p letal dozu (LD50) 4.25 mg/kg olarak belirlenmiştir (Reid vd., 2004).

CP'nin 500 mg'ı 25 mL bidistile suda eritilerek 25 mL/500 mg CP içeren çözelti hazırlanmıştır. Se'un ise 0.5 ve 1 mg/kg'ı 0.5 mL serum fizyolojikte (SF) eritilerek çözelti hazırlanmıştır. Bu kimyasal maddeler ve kontrol gruplarına uygulanan gerekli dozlardaki serum fizyolojik i.p olarak verilmiştir. Bütün hayvanlar ilk enjeksiyondan ve sakrifikasyondan önce tartılarak ağırlıkları saptanmıştır. Sadece CP verilen 1. gruptaki hayvanlar CP enjeksiyonundan 24 saat sonra anestezi edilmiştir (7.gün).

Se ile birlikte CP verilen gruplarda, Se uygulamasına CP uygulamasından beş gün önce başlanmış ve deney sonuna kadar devam edilmiştir. Altıncı günde hayvanlar tekrar tartılarak uygulanacak CP dozu belirlenmiş böylece altıncı gün CP+Se verilmiştir. Se'un CP ile birlikte 0.5 ve 1 mg/kg'lık dozlarından başka, 0.5 ve 1 mg/kg'lık dozları da tek başına kullanılmıştır (Çizelge 4.2.2.). Yedinci gün hayvanlar anestezi edilerek kan ve kemik iliği alınmıştır (Ayhanci vd., 2008).

#### **4.4. Anestezi ve Cerrahi Uygulamalar**

Tüm deneysel çalışmalar steril ortamda ve steril cerrahi aletler kullanılarak gerçekleştirildi.

Ketamin/ksilazin (50/10 mg/kg) ile anestezi edilmiş hayvanlardan intrakardiyak kan alımı yapıldı. Kan örneklerinin 1/5' lik kısmı EDTA'lı tüplere konularak MS 4S model kan sayım cihazının sıçan kalibrasyonunda sayımı yapıldı.

Kan alımının ardından hafif ketamin/ksilazin anestezisi ile öldürülecek hayvanların bir femuru kaslarından iyice temizlenerek ortaya çıkarıldı. Kemik iki ucundan kesilerek bir pens yardımı ile tutularak, enjektördeki serum fizyolojik femurun bir ucundan basınçla fişkırtılarak iliğin tamamının tüpe geçmesi sağlandı. Toplam 5mL serum fizyolojik ve kemik iliği içerikli dereceli tüpteki hücrelerin dağılımının homojen olabilmesi için aynı enjektör ile tüpteki sıvı birkaç defa çekilip boşaltıldı. Bu işlemler yapılırken (hücrelerin zarar görmemesi için) sıvının köpürmemesine dikkat edildi. Kemik iliği içeren tüpler 3000 devirde 5 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant enjektör ile alındı. Dereceli tüpte 1 mL serum fizyolojik ile hücreleri içeren bu karışım tekrar enjektör yardımıyla birkaç kez çekilip boşaltılarak homojen hale getirildi. Daha sonra kan parametreleri sayımında olduğu gibi kemik iliği hücreleri de kan sayım cihazında sayılarak elde edilen veriler kaydedildi.

#### **4.5. İstatistiksel Değerlendirmeler**

Çalışmalarımız sonucunda elde edilen verilerin değerlendirilmesinde 'SPSS 18.0 for windows' versiyonu bilgisayar paket programı kullanılmıştır. ESOGÜ' nün bilgi işlem merkezinin lisanslı programıdır.



Kan serumlarında analizi yapılacak olan periferik kan hücreleri (lökosit ve trombosit) ve kemik iliği hücre sayımından elde edilen veriler; gruplar arasındaki farklılık durumları Kruskal Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks ile değerlendirilmiştir.

Tüm istatistiksel uygulamalar sonucunda sayısal değerler ( $p$ ) olarak ortaya çıkan deney grupları arasındaki farklar  $p < 0.05$  olduğunda anlamlı olarak kabul edilmiştir.

## 5. BULGULAR VE TARTIŞMA

### 5.1. Fizyolojik Bulgular

Çizelge 4.1.1.'de 150 mg/kg CP, 150+0.5 mg/kg CP+Se ve 150+1 mg/kg CP+Se uygulanan deney gruplarının ve serum fizyolojik verilen kontrol gruplarının MDA ve GSH ortalama değerlerinin istatistiksel karşılaştırması gösterilmiştir.

Çizelge 4.1.1.'de görüldüğü gibi 150 mg/kg CP verilen deney grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, MDA değeri kontrol grubuna göre ileri derecede önemli bir artış (%64) göstermiştir ( $p<0.001$ ). Bu deney grubunun GSH değeri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ise ileri derecede önemli bir azalış (%105) göstermiştir ( $p<0.001$ ).

150+0.5 mg/kg CP+Se verilen deney grubu kontrol grubu ile kıyaslandığında, 150+0.5 mg/kg CP+Se uygulanan grubun MDA değerinde kontrol grubuna göre %1'lik bir azalma görülmüş ancak bu azalma istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır ( $p>0.05$ ). Bu deney grubunun GSH değeri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ise ileri derecede önemli bir azalma (%31) göstermiştir ( $p<0.001$ ).

150+1 mg/kg CP+Se verilen deney grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, MDA değerinde kontrol grubuna göre %1'lik bir artış olmasına rağmen, bu artış istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır ( $p>0.05$ ). Bu deney grubunun GSH değeri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ise ileri derecede önemli bir artış (%31) göstermiştir ( $p<0.001$ ).

0.5 mg/kg Se ve 1 mg/kg Se uygulanan deney gruplarının ve serum fizyolojik verilen kontrol gruplarının MDA ve GSH ortalama değerlerinin istatistiksel karşılaştırması Tablo 4.1.2.'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1.2.'de de görüldüğü gibi 0.5 mg/kg Se verilen deney grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, MDA değerinde %17'lik bir düşüş görülmesine rağmen bu azalış istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır ( $p>0.05$ ). Bu deney grubunun GSH değeri

kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ise, GSH değerindeki %4'lük bir azalma istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır ( $p>0.05$ ). 1 mg/kg Se verilen deney grubu MDA ve GSH değerleri bakımından kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, 1 mg/kg Se verilen deney grubunun kontrol grubuna göre MDA ve GSH değerlerindeki sırasıyla %8 ve %9'lük azalışlar istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır ( $p>0.05$ ).

150 mg/kg CP, 150+0.5 mg/kg CP+Se ve 150+1 mg/kg CP+Se uygulanan deney gruplarının ve serum fizyolojik verilen kontrol gruplarının lökosit, trombosit ve kemik iliği çekirdekli hücrelerinin ortalama değerlerinin istatistiksel karşılaştırması Tablo 4.1.3.'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1.3.'de görüldüğü gibi 150 mg/kg CP verilen deney grubu kontrol grubu ile lökosit sayısı bakımından karşılaştırıldığında, 150 mg/kg CP verilen deney grubundaki lökosit sayısı kontrole göre ileri derecede önemli bir azalış (%317) göstermiştir ( $p<0.001$ ). Bu deney grubunda trombosit sayısı da kontrole göre ileri derece önemli bir azalma (%36) göstermiştir ( $p<0.001$ ). 150 mg/kg CP verilen deney grubunun kemik iliği çekirdekli hücre sayısı kontrole göre ileri derecede önemli bir azalma (%481) göstermiştir ( $p<0.001$ ).

150+0.5 mg/kg CP+Se verilen deney grubu kontrol grubu ile lökosit sayısı bakımından karşılaştırıldığında, 150+0.5 mg/kg CP+Se verilen deney grubundaki lökosit sayısı kontrole göre ileri derece önemli bir azalma (%104) göstermiştir ( $p<0.001$ ). Bu grupta trombosit sayısında kontrole göre %15'lik bir azalma olmasına rağmen bu azalış istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır ( $p>0.05$ ). 150+0.5 mg/kg CP+Se uygulanan gruptaki kemik iliği çekirdekli hücre sayısı kontrole göre ileri derecede önemli bir azalma (%173) göstermiştir ( $p<0.001$ ).

150+1 mg/kg CP+Se verilen deney grubu lökosit sayısı bakımından kontrol ile karşılaştırıldığında, lökosit sayısı kontrol grubuna göre ileri derecede önemli bir azalma (%30) göstermiştir ( $p<0.001$ ). Bu deney grubunda trombosit sayısında %0.3 lük bir azalma olmasına rağmen bu azalış istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır ( $p>0.05$ ). Ayrıca kemik iliği çekirdekli hücre sayısı kontrolle karşılaştırıldığında ileri derecede önemli bir azalma (%23) göstermiştir ( $p<0.001$ ).

0.5 mg/kg Se ve 1 mg/kg Se uygulanan deney gruplarının ve serum fizyolojik verilen kontrol gruplarının lökosit, trombosit ve kemik iliği çekirdekli hücrelerinin ortalama değerlerinin istatistiksel karşılaştırması Çizelge 4.1.4.'de gösterilmiştir.

0.5 mg/kg Se verilen deney grubu kontrol grubu ile lökosit sayısı bakımından karşılaştırıldığında, 0.5 mg/kg Se verilen deney grubundaki lökosit sayısı kontrole göre %0.7'lik bir artış göstermiş ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $p>0.05$ ). Bu deney grubunda trombosit sayısında kontrole göre %12'lik bir azalma olmasına rağmen bu azalış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $p>0.05$ ). 0.5 mg/kg Se verilen deney grubundaki kemik iliği çekirdekli hücre sayısı kontrole göre % 3 oranında artmıştır ( $p>0.05$ ).

1 mg/kg Se verilen deney grubu kontrol grubu ile lökosit sayısı bakımından kıyaslandığında, 1 mg/kg Se verilen deney grubundaki lökosit sayısı kontrole göre %4 oranında artmıştır ( $p>0.05$ ). Bu deney grubunda trombosit sayısı kontrole göre %0.1'lik bir artış göstermiştir ( $p>0.05$ ). 1 mg/kg Se verilen deney grubundaki kemik iliği çekirdekli hücre sayısı kontrole göre ileri derecede önemli bir artış (%9) göstermiştir ( $p<0.001$ ).

0.5 mg/kg Se uygulanan deney grubu ile 1 mg/kg Se uygulanan deney grubu MDA ve GSH seviyeleri bakımından karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p>0.05$ ). Bu gruplar arasında lökosit ve trombosit sayıları arasında da anlamlı bir fark saptanmamıştır ( $p>0.05$ ). 1 mg/kg Se verilen deney grubunun kemik iliği çekirdekli hücre sayısı 0.5 mg/kg Se verilen deney grubuna göre ileri derecede önemli bir artış (%5) göstermiştir ( $p<0.001$ ).

150+0.5 mg/kg CP+Se uygulanan deney grubu ile 150+1 mg/kg CP+Se uygulanan deney grubu MDA ve GSH seviyeleri bakımından kıyaslandığında, 150+0,5 mg/kg CP+Se ve 150+1 mg/kg CP+Se grupları arasında MDA miktarı bakımından anlamlı bir fark bulunmazken ( $p>0.05$ ); 150+1 mg/kg CP+Se verilen deney grubundaki GSH miktarı 150+0,5 mg/kg CP+Se verilen deney grubunun GSH miktarına göre, Se'un doz artışına paralel olarak ileri derecede önemli bir artış (%73) göstermiştir ( $p<0.001$ ). 150+0.5 mg/kg CP+Se uygulanan deney grubu ile 150+1 mg/kg CP+Se uygulanan deney grubu lökosit, trombosit ve kemik iliği çekirdekli hücre sayısı bakımından kıyaslandığında, 150+1 mg/kg

CP+Se uygulanan deney grubunun lökosit sayısı 150+0.5 mg/kg CP+Se uygulanan deney grubunun lökosit sayısına göre ileri derecede önemli bir artış (%57) göstermiştir. 150+1 mg/kg CP+Se verilen deney grubunun trombosit sayısında, 150+0.5 mg/kg CP+Se verilen deney grubunun trombosit sayısına göre %14'lük bir artış olmasına rağmen bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $p>0.05$ ). Kemik iliği çekirdekli hücre sayısı 150+1 mg/kg CP+Se verilen deney grubunda 150+0.5 mg/kg CP+Se verilen deney grubuna göre, ileri derecede önemli bir artış (%121) göstermiştir ( $p<0.001$ ).

**Çizelge 5.1.1.** 150 mg/kg CP, 150+0.5 ve 150+1 mg/kg CP+Se deney grupları ile kontrol grubu arasındaki MDA ve GSH seviyelerinin karşılaştırılması

Gruplar (n=7)	MDA (nmol/mL)	<i>p</i>	GSH (µM GSSG)	<i>p</i>
1 .Grup (Kontrol)	0,485±0,0795	***	5,809±1,107	***
2. Grup (150 mg/kg CP)	0,798±0,0890		2,820±0,526	
1 .Grup (Kontrol)	0,485±0,0795	0	5,809±1,107	***
5. Grup (150+0.5 mg/kg CP+Se)	0,476±0,0895		4,414±0,688	
1 .Grup (Kontrol)	0,485±0,0795	0	5,809±1,107	***
6. Grup (150+1 mg/kg CP+Se)	0,490±0,102		7,659±1,146	

0 :  $p > 0.05$ , fark yok

\*\* :  $p < 0.01$ , önemli fark var

\* :  $p < 0.05$ , fark var

\*\*\* :  $p < 0.001$ , ileri derecede önemli fark var

**Çizelge 5.1.2.** 0.5 ve 1 mg/kg Se deney grupları ile kontrol grubu arasındaki MDA ve GSH seviyelerinin karşılaştırılması

Gruplar (n=7)	MDA (nmol/mL)	<i>p</i>	GSH (µM GSSG)	<i>p</i>
1. Grup (Kontrol)	0,485±0,0795	0	5,809±1,107	0
3. Grup (0.5 mg/kg Se)	0,412±0,0948		5,580±1,105	
1. Grup (Kontrol)	0,485±0,0795	0	5,809±1,107	0
4. Grup (1 mg/kg Se)	0,445±0,0855		6,336±1,451	

0 :  $p > 0.05$ , fark yok

\* :  $p < 0.05$ , fark var

\*\* :  $p < 0.01$ , önemli fark var

\*\*\* :  $p < 0.001$ , ileri derecede önemli fark var

**Çizelge 5.1.3.** 150 mg/kg CP, 150+0.5 ve 150+1 mg/kg CP+Se deney grupları ile kontrol grubu arasındaki lökosit, trombosit ve kemik iliği çekirdekli hücre sayılarının karşılaştırılması

Gruplar (n=7)	Lökosit (X 10 <sup>3</sup> / $\mu$ L)	<i>p</i>	Trombosit (X 10 <sup>3</sup> / $\mu$ L)	<i>p</i>	Kemik İliği (X 10 <sup>3</sup> / $\mu$ L)	<i>p</i>
1. Grup (Kontrol)	9,361±0,818	***	689,429±42,945	***	33,551±2,008	***
2. Grup 150 mg/kg CP	2,243±0,239		506,714±33,084		5,766±0,596	
1. Grup (Kontrol)	9,361±0,818	***	689,429±42,945	0	33,551±2,008	***
5. Grup 150+0.5 mg/kg CP+Se	4,573±0,336		598,000±64,846		12,259±1,279	
1. Grup (Kontrol)	9,361±0,818	***	689,429±42,945	0	33,551±2,008	***
6. Grup 150+1 mg/kg CP+Se	7,191±0,951		686,714±69,344		27,164±1,384	

0 :  $p > 0.05$ , fark yok  
\* :  $p < 0.05$ , fark var

\*\* :  $p < 0.01$ , önemli fark var  
\*\*\* :  $p < 0.001$ , ileri derecede önemli fark var



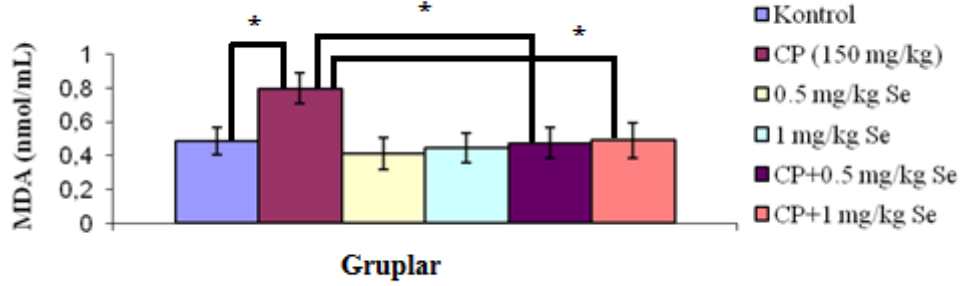
**Çizelge 5.1.4.** 0.5 ve 1 mg/kg Se deney grupları ile kontrol grubu arasındaki lökosit, trombosit ve kemik iliği çekirdekli hücre sayılarının karşılaştırılması

Gruplar (n=7)	Lökosit (X 10 <sup>3</sup> /µL)	<i>p</i>	Trombosit (X 10 <sup>3</sup> /µL)	<i>p</i>	Kemik İliği (X 10 <sup>3</sup> /µL)	<i>p</i>
1. Grup (Kontrol)	9,361±0,818	0	689,429±42,945	0	33,551±2,008	0
3. grup 0.5 mg/kg Se	9,427±1,068		611,143±90,346		34,669±1,474	
1. Grup (Kontrol)	9,361±0,818	0	689,429±42,945	0	33,551±2,008	***
4. Grup 1 mg/kg Se	9,787±1,013		690,714±57,893		36,709±1,122	

0 :  $p > 0.05$ , fark yok  
\* :  $p < 0.05$ , fark var

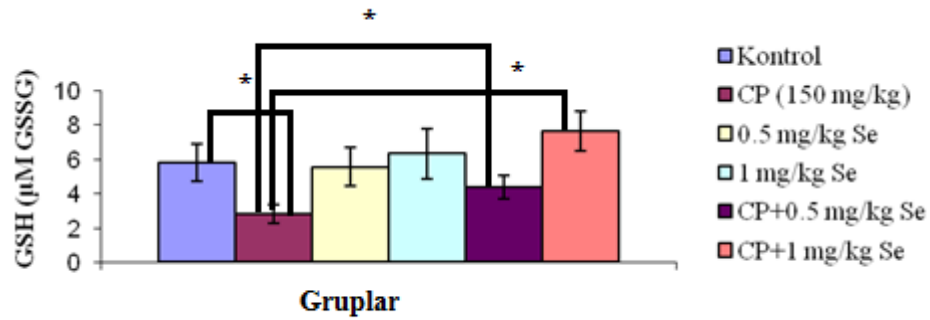
\*\* :  $p < 0.01$ , önemli fark var  
\*\*\* :  $p < 0.001$ , ileri derecede önemli fark var

Bütün deney grupları MDA, GSH, lökosit, trombosit ve kemik iliği değerleri bakımından ayrı ayrı karşılaştırılmış; MDA, GSH, lökosit, trombosit ve kemik iliği değerleri ayrıca grafiksel olarak da gösterilmiştir.



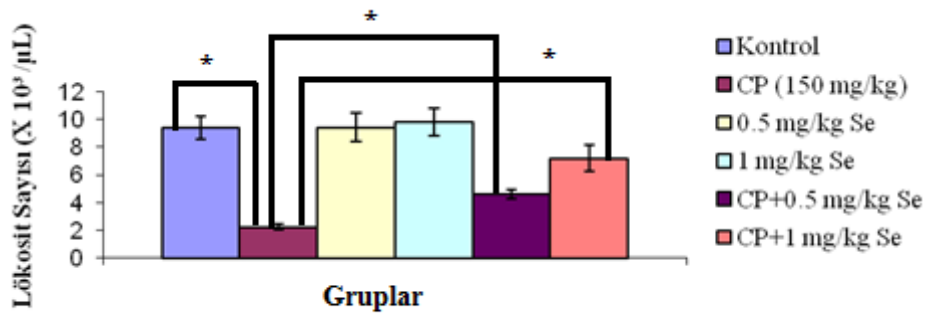
**Şekil 5.1.1.** 150 mg/kg CP verilen deney grubu, 0,5 mg/kg Se verilen gruplar, 1 mg/kg Se verilen gruplar, 150+0,5 mg/kg CP+Se verilen gruplar, 150+1 mg/kg CP+Se verilen deney grubu ve 0.5 mL sf verilen kontrol gruplarının MDA düzeyleri.

Şekil 5.1.1.'de görüldüğü gibi 150 mg/kg CP verilen deney grubu, 0.5 mg/kg Se verilen gruplar, 1 mg/kg Se verilen gruplar, 150+0.5 mg/kg CP+Se verilen gruplar, 150+1 mg/kg CP+Se verilen gruplar ve 0.5 mL sf verilen kontrol grupları MDA seviyeleri bakımından karşılaştırıldıklarında istatistiksel açıdan ileri derecede önemli bir fark göstermiştir ( $p<0.001$ ). 150 mg/kg CP ile birlikte verilen Se'un 0.5 ve 1 mg/kg'lık dozları MDA seviyesini kontrol düzeyine yaklaştırmıştır. Ayrıca Se'un tek başına uygulanan 0.5 ve 1 mg/kg'lık dozlarında da MDA düzeyi kontrol seviyesindedir.



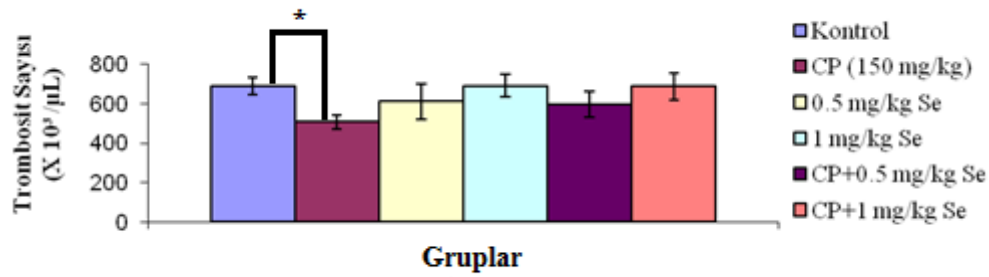
**Şekil 5.1.2.** 150 mg/kg CP verilen deney grubu, 0,5 mg/kg Se verilen gruplar, 1 mg/kg Se verilen gruplar, 150+0,5 mg/kg CP+Se verilen gruplar, 150+1 mg/kg CP+Se verilen deney grubu ve 0.5 mL sf verilen kontrol gruplarının GSH düzeyleri.

Şekil 5.1.2.'de görüldüğü gibi 150 mg/kg CP verilen deney grubu, 0.5 mg/kg Se verilen gruplar, 1 mg/kg Se verilen gruplar, 150+0.5 mg/kg CP+Se verilen gruplar, 150+1 mg/kg CP+Se verilen gruplar ve 0.5 mL sf verilen kontrol grupları GSH seviyeleri bakımından karşılaştırıldıklarında istatistiksel açıdan ileri derecede önemli bir fark göstermiştir ( $p<0.001$ ). 150 mg/kg CP ile birlikte verilen Se'un 0.5 ve 1 mg/kg'lık dozları GSH seviyesini kontrol düzeyine yaklaştırmıştır. Ayrıca Se'un tek başına uygulanan 0.5 ve 1 mg/kg'lık dozlarında da GSH seviyesi kontrol düzeyindedir.



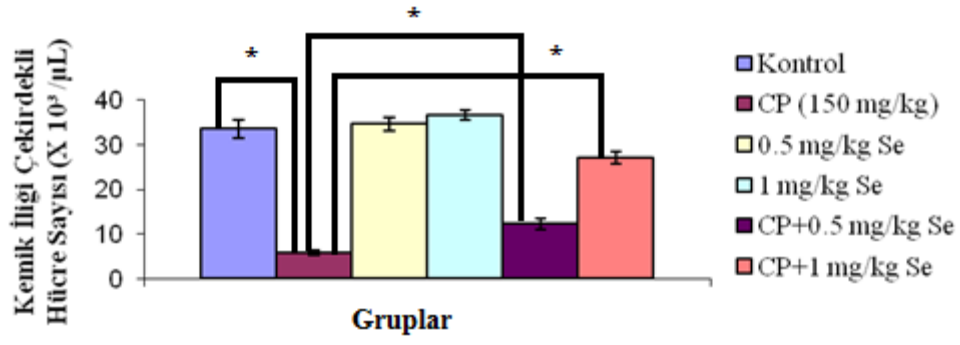
**Şekil 5.1.3.** 150 mg/kg CP verilen deney grubu, 0,5 mg/kg Se verilen gruplar, 1 mg/kg Se verilen gruplar, 150+0,5 mg/kg CP+Se verilen gruplar, 150+1 mg/kg CP+Se verilen deney grubu ve 0.5 mL sf verilen kontrol gruplarının lökosit sayıları.

Şekil 5.1.3.'te görüldüğü gibi 150 mg/kg CP verilen deney grubu, 0.5 mg/kg Se verilen gruplar, 1 mg/kg Se verilen gruplar, 150+0.5 mg/kg CP+Se verilen gruplar, 150+1 mg/kg CP+Se verilen gruplar ve 0.5 mL sf verilen kontrol grupları lökosit sayıları bakımından karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan ileri derecede önemli bir fark göstermiştir ( $p<0.001$ ). 150 mg/kg CP ile birlikte verilen Se'un 0.5 ve 1 mg/kg'lık dozları lökosit sayısını kontrol düzeyine yaklaştırmıştır. Se'un ayrı ayrı uygulanan 0.5 ve 1 mg/kg'lık dozları da lökosit sayısını kontrol düzeyine yakın tutmuştur.



**Şekil 5.1.4.** 150 mg/kg CP verilen deney grubu, 0,5 mg/kg Se verilen gruplar, 1 mg/kg Se verilen gruplar, 150+0,5 mg/kg CP+Se verilen gruplar, 150+1 mg/kg CP+Se verilen deney grubu ve 0.5 mL sf verilen gruplarının trombosit sayıları.

Şekil 5.1.4.'te görüldüğü gibi 150 mg/kg CP verilen deney grubu, 0.5 mg/kg Se verilen gruplar, 1 mg/kg Se verilen gruplar, 150+0.5 mg/kg CP+Se verilen gruplar, 150+1 mg/kg CP+Se verilen gruplar ve 0.5 mL sf verilen kontrol grupları trombosit sayıları bakımından karşılaştırıldıklarında istatistiksel açıdan ileri derecede önemli bir fark göstermiştir ( $p<0.001$ ). 150 mg/kg CP ile birlikte verilen Se'un 0.5 ve 1 mg/kg'lık dozları trombosit sayısını kontrol düzeyine yaklaştırmıştır. Se'un tek başına uygulanan 0.5 ve 1 mg/kg'lık dozlarında da trombosit sayısı kontrol düzeyine yaklaşmıştır.



**Şekil 5.1.5.** 150 mg/kg CP verilen deney grubu, 0,5 mg/kg Se verilen gruplar, 1 mg/kg Se verilen gruplar, 150+0,5 mg/kg CP+Se verilen gruplar, 150+1 mg/kg CP+Se verilen deney grubu ve 0.5 mL sf verilen kontrol gruplarının kemik iliği çekirdekli hücre sayıları.

Şekil 5.1.5.'te de görüldüğü gibi 150 mg/kg CP verilen deney grubu, 0.5 mg/kg Se verilen gruplar, 1 mg/kg Se verilen gruplar, 150+0.5 mg/kg CP+Se verilen gruplar, 150+1 mg/kg CP+Se verilen gruplar ve 0.5 mL sf verilen kontrol grupları trombosit sayıları bakımından karşılaştırıldıklarında istatistiksel açıdan ileri derecede önemli bir fark göstermiştir ( $p < 0.001$ ). 150 mg/kg CP ile birlikte verilen Se'un 0.5 ve 1 mg/kg'lık dozları kemik iliği çekirdekli hücre sayısını kontrol düzeyine yaklaştırmıştır. 1 mg/kg Se uygulanan gruptaki kemik iliği çekirdekli hücre sayısı kontrol seviyesinin de üzerine çıkmıştır.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Normal dokuları kemoterapi nedenli toksisitelerden korumak için toksik olmayan seçici, hücre koruyucu ajanların geliştirilmesi kanser kemoterapisi araştırmalarında büyük bir ıgır açmaya adaydır.

Siklofosamid, kanser ve malignant olmayan hastalıkların tedavisinde etkili olduğu kanıtlanmış geniş klinik kullanımlı alkilleyici bir ilaçtır. CP'nin antitümoral etkinliği, yüksek dozda kullanılabilmesine bağlıdır. Ancak yüksek doz CP'nin klinik yararlanımı immünosupresyon ve ürotoksisite nedeniyle sınırlıdır (Moore vd., 1995; Perini vd., 2007; Sugumar vd., 2007; Abraham ve Isaac, 2011). Bir deneysel çalışmada da 20 ve 40 mg/kg CP'nin sıçanlarda dalak ve kemik iliğinde mutajen olduğu gösterilmiştir (Moore vd., 1995). İdeal olarak, kanser kemoterapisinde kullanılan ilaçlar kanser hücrelerini yok ederken, normal dokuları olumsuz biçimde etkilememelidir. Ancak bugün de kullanılan CP gibi yüksek doz alkilleyici (DNA'yı etkileyen) ajanlar bu koşulu tam olarak yerine getirmemektedir (Katzung, 2001).

CP'nin iki aktif metaboliti FAM ve ACR'dir. CP'nin antineoplastik etkileri FAM ile ilişkilidir. FAM'ın DNA'ya bağlanarak hücre bölünmesini baskıladığı, CP'nin bağışıklık baskılayıcı ve antitümör etkilerine aracı olduğu düşünölmektedir (Kawabata vd., 1990). CP'nin toksik etkisi aktif metaboliti olan ACR ile ilgilidir. ACR doku AO savunma sistemine müdahale ederek yüksek oranda SOR oluşumuna yol açar ve memeli hücreleri için mutajeniktir. ACR kaynaklı oluşan SOR'lar; enzim, reseptör, iyon pompaları gibi moleküllerle birleşerek onların işlevlerini bozarlar (Senthilkumar vd., 2006). Neoplastik hastalıklarda, CP kemoterapisi boyunca, ACR'nin toksik yan etkilerinden kaçınmak için bazı AO ajanlar kullanılarak bu toksik etkilerin detoksifiye edilmesi gerekir.

CP'nin toksik etkilerini önleyerek daha yüksek dozlarda kullanılmasına olanak sağlayan yöntemler geliştirilmiş ise de halen ilaç uygulama sistemleri daha duyarlı olabilecek yöntemlerin arayışı içindedir (Ayhanci vd., 2008).

Gerek kemik iliğinde gerekse periferik kanda yaptığımız incelemelerden elde ettiğimiz bulgular araştırmacılar tarafından ileri sürülen bulgulara benzemektedir. Nitekim sadece 150 mg/kg CP uyguladığımız hayvanların lökosit, trombosit ve kemik iliği çekirdekli hücre sayılarında kontrole göre belirgin azalmalar kaydedilmiştir ( $p<0.001$ ). Ayrıca bu deney grubunun SOR kaynaklı oluşan MDA düzeyleri kontrol grubuna göre belirgin derecede artmış ( $p>0.001$ ), antioksidan özellikli GSH seviyeleri de kontrol grubuna göre belirgin derecede azalmıştır ( $p<0.001$ ).

Oksijenli solunum yapan canlılarda, SOR'lar kaçınılmaz bir şekilde oluşmaktadır. Bu radikaller süperoksit, hidrojen peroksit, serbest hidroksil radikali ve bunların etkisiyle oluşan lipid peroksidleri ve diğer benzer türevleri hücrenin farklı kısımlarında bulunan protein, karbohidrat, lipid ve DNA gibi molekülleri etkileyerek önemli değişikliklere neden olurlar. Özellikle hücrelerde bulunan doymamış yağ asitleri bunlar için çok iyi birer hedeftirler (Karataş vd., 2006).

Serbest radikaller; ortaklanmamış elektron içeren, reaktif ve kısa ömürlü moleküllerdir. Bu moleküller hem normal metabolizmanın yan ürünü olarak hem de ilaçların ve diğer zararlı kimyasal maddelerin etkisiyle oluşabilmektedir. Birçok hastalık, doku yıkımı, serbest radikaller ve lipid peroksidasyonu sonucu oluşur. Organizmada serbest radikal reaksiyonları birçok AO sistemi ile kontrol edilir.

AO'lar serbest radikal oluşumunu önleyen veya zincir kıran yapılar olarak iş görürler. Serbest radikallerin oluşum hızı, bunları etkisiz hale getiren veya azaltan katalaz (KAT), glutatyon peroksidaz (GPx) ve süperoksit dismutaz (SOD) gibi endojen AO enzimlerden oluşan savunma sistemlerinin hızı ile dengede olduğu sürece, organizma etkilenmez. Ancak bu denge bozulursa, serbest radikaller zararlı olmaya başlar ve oksidatif stres şeklinde etkilerini gösterirler (Kurt vd., 2005). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda da AO'ların karsinogenezin başlama ve gelişme dönemini baskıladıkları, hücre ölümü ve değişimini önlediklerini göstermiştir (İşcan ve Çoban 1998).

Bazı in vivo ve in vitro bulgular sitotoksik ajanların neden olduğu hücrel toksisitelerin bu AO'lardan biri olan Se'un kullanılmasıyla önemli ölçüde önlenebileceğini

göstermektedir. Se'un, lipit peroksidasyonunu inhibe ederek hücre zarını koruyucu rolünün yanı sıra (Ilio vd., 1987), antioksidanlarla etkileşimi sayesinde kemoterapötik ajanlarla sinerjistik etkili olduğu (Dai vd., 1999) ve antineoplastik ilaçların terapötik etkinliğini arttırdığı, sisplatin gibi sitotoksik ajanların toksik yan etkilerini azalttığı bildirilmiştir (Yang vd., 2000).

Se bileşiklerinin yoğun bir şekilde kimyasal önleyici ajanlar olarak değerlendirilmesine rağmen, bu ajanın potansiyeli ile ilgili bazı yayınlarda antikanser ilaçların organizmayı koruyucu etkilerinde ve toksisitelerinin modifikasyonlarında etkili olduğu değerlendirilmektedir (Cao vd., 2004).

Se, organizmalar için esansiyel bir iz mineral olup organizmada doymamış yağ asitlerinin oto-oksidasyonunu engeller. Bunun nedeninin, selenyumun serbest radikalleri inaktive eden ve böylece lipit peroksidasyonunun oluşmasını engelleyen 'glutasyon peroksidaz' enziminin merkez katalitik yapısını oluşturmasından kaynaklandığı belirtilmektedir (Tos-Luty vd., 2003).

Araştırmacılar Se'un, glutasyon peroksidaz enzim sisteminin esansiyel bir parçası olduğunu buldular (Burk vd., 1999). Bizim çalışmamızda da güçlü antioksidan etkisi bilinen Se'un 0.5 ve 1 mg/kg'lık dozlarının 150 mg/kg CP nedenli hematoksisiteyi önemli ölçüde düzelttiği gözlenmiştir.

Se normal büyüme ve hücre fonksiyonları için gerekli olan bir iz elementtir. Hem eksikliği hem de fazlalığı hastalık ya da toksisiteye neden olur ve eksikliği ile toksisitesi arasındaki sınır çok dardır. Se'un besinsel gerekliliği hücrel redoks süreçlerine katılan tiyoredoksin redüktaz, glutasyon peroksidaz ve diğer birçok kritik enzim ile ilişkilidir. Bu selenoproteinler, memelilerde tümör gelişiminin baskılanmasında rol alır. Bu etkiyi hücre döngüsünün redokslarını, büyümeyi teşvik eden transkripsiyon faktörlerini ve apoptozisini kontrol ederek yaparlar (Ramos vd., 2004).

Se'un verilmesi ile klinik bulguların normale dönmesi selenyumun sitoprotektif etkileri olduğu yönündeki düşünceleri güçlendirmektedir. Se'un antikanser rolüne ek olarak, çeşitli ağır metallerin (Cd, Pb, Ar gibi) belirgin toksik etkilerine karşı dayanıklılık



sağlama yeteneği tespit edilmiştir. Se'un kadmiyum ile birlikte uygulandığı deneysel bir çalışmada, kadmiyum tarafından karaciğer ve böbrekte oluşturulan hasar Se tarafından anlamlı bir şekilde azaltılmıştır (Khattab, 2007). İnsan baş, boyun ve kolon karsinomu taşıyan genç farelere uygulanan antikanser ilaçlarla birlikte verilen 0.2 mg/kg Se'un oldukça yüksek bir koruyucu etki gösterdiği saptanmıştır (Cao vd., 2004).

Bu çalışmada 150 mg/kg CP verilen deney grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, MDA değeri kontrol grubuna göre ileri derecede önemli bir artış (%64) göstermiştir. Bu deney grubunun GSH değeri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ise ileri derecede önemli bir azalış (%105) göstermiştir.

150+0.5 mg/kg CP+Se verilen deney grubundaki GSH seviyesi, kontrole göre %31 artarken MDA seviyesi %1 oranında azalmış, 150+0.5 mg/kg CP+Se verilen deney grubundaki GSH seviyesi, 150 mg/kg CP alan gruba göre ise %56 oranında artmış MDA seviyesi %67 oranında azalmıştır. GSH seviyesindeki bu artış ve MDA düzeylerindeki bu azalmalar, muhtemelen ACR'nin neden olduğu serbest radikal artışının ve buna bağlı olarak gelişen sitotoksitenin, Se varlığında GPx enzim aktivitesinin ve redükte glutatyon düzeyinin artırılarak serbest radikallerin önemli ölçüde bertaraf edilmesiyle açıklanabilir. Diğer yandan 150+1 mg/kg CP+Se verilen deney grubunun, GSH seviyesi kontrole göre %31, MDA düzeyi ise %1 oranında artmıştır. 150+1 mg/kg CP+Se verilen deney grubunun GSH seviyesi 150 mg/kg CP alan gruba göre ise, %171 oranlarında artarken, MDA düzeyi %38 oranında azalmıştır. Sadece 0.5 ve 1 mg/kg Se verilen gruplarda GSH ve MDA düzeyleri kontrole göre anlamlı bir farklılık göstermemesine rağmen, 150+0.5 mg/kg CP+Se ve 150+1 mg/kg CP+Se dozlarının, GSH düzeylerini kontrole göre önemli oranda artırması ve MDA düzeylerini önemli oranlarda azaltması, Se'un antioksidan etkinliğinin oksidatif stres anında arttığı ve oksidatif streste daha etkin olduğu anlamına gelebilir.

Deneysel bulgularımıza göre, düşük dozda (0.5 mg/kg) Se uygulandığında da hematopoyetik sistemde bir iyileşme sağlandığı ancak, 1 mg/kg Se kadar etkili olmadığı görülmüştür. Bu sonuç, yüksek doz CP ile birlikte nispeten yüksek doz Se (1mg/kg)'un daha koruyucu olduğu anlamına gelebilir. Deneysel verilerimize göre Se, CP nedenli toksisitelerin önlenmesinde etkili bir ajan olup kemoterapötik ilaç protokollerinde yer

alabilir ancak, Se'un farklı dozlarının denenmesi daha yararlı olan dozunu ortaya koyabilir. Buna bağlı olarak yeni ve kapsamlı çalışmalara ihtiyaç olabileceğini düşünmekteyiz.

Bulgularımız CP uygulamasının toksik metabolitlerinden dolayı periferik kan ve kemik iliğinde oksidatif strese neden olduğunu göstermektedir. Se ön uygulaması CP nedenli miyelosupresyonu önlemede oldukça etkili olmuştur. Bu durum Se'un antioksidan kapasiteyi artırarak CP'nin toksik metabolitlerinin etkilerini önemli oranda azalttığı şeklinde yorumlanabilir.

## KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abraham, P., Indirani, K., Sugumar, E., (2007). Effect of cyclophosphamide treatment on selected lysosomal enzymes in the kidney of rats. *Experimental and Toxicologic Pathology* 59 143-149.
- Abraham, P, Isaac B (2011) Ultrastructural Changes in the Rat Kidney After Single Dose of Cyclophosphamide-Possible Roles for Peroxisome Proliferation and Lysosomal Dysfunction in Cyclophosphamide-Induced Renal Damage. *Hum. Exp. Toxicol.*, 30:1924.
- Agarwal, R., (2008). Iron, oxidative stress, and clinical outcomes. *Pediatric Nephrology*, 23(8), 1195-1199.
- Akçasu, A., Banoğlu, N., Berkada, Ş., (1992). Farmakoloji, İlaç Uygulamalarında Temel Kavramlar, Nobel Tıp Kitabevi, S:822.
- Akkuş, İ., (1995). Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Mimoza yayınevi. Konya, s:106-111.
- Akkuş, İ., Şekeroğlu, M.R., Üner, A., Aköz, M., Kurt, E., (1991). Selenyum dağılışı, metabolizması ve fizyopatolojisi. *S.Ü. Tıp Fak Dergisi* 4:547-51
- Arthur, J.R., (1997). Non-glutathione peroxidase functions? In, Lyons TP, Jacques KA (Eds): *Biotechnology in the Feed Industry. Proceedings of Alltech's 13th Annual Symposium*, pp. 142154, Nottingham University Press, England.
- Ayhanci, A., Uyar, R., Aral, E., Kabadere, S., Apak, S., (2008). Protective Effect of Zinc on Cyclophosphamide-Induced Hematotoxicity and Urotoxicity, *Biol Trace Elem Research* DOI 10.1007/s 12011-008-8189-5.
- Antunes, L.M., Darin, J.D., Bianchi, M.P., (2000). Protective effects of vitamin C against cisplatin-induced nephrotoxicity and lipid peroxidation in adult rats. *Pharmacol Res*; 41 (4): 405-11.
- Bag, B., (2013). Kanser Hastalarında Uzun Dönemde Görülen Psikososyal Sorunlar Long-Term Psychosocial Problems in Cancer Patients, *Psikiyatride Güncel Yaklaşımlar-Current Approaches in Psychiatry*, 5(1):109-126 doi:10.5455/cap.20130508.
- Banham, S., Dorward, A., Hutcheon, A., Ahmedzai, S., (1985). The Role of VP-16 in the Treatment of Small-Cell Lung Cancer Group. *Seminars in Oncology*, Vol: No: 1 Suppl: 2 (March), pp: 2-6.
- Baskin, S.I., Salem, H., (1997). *Oxidants, antioxidants, and free radicals*. Washington DC: Taylor and Francis, pp 26-35.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Baskin, S.I., Salem, H., (1997). Oxidants, antioxidants, and free radicals. Washington DC: Taylor and Francis, pp 79-120.
- Baquiran, D.C., Gallagher, J., (2001). *Lippincott's Cancer Chemotherapy Handbook*. Philadelphia, PA: W. B. Saunders Company.
- Berger, M.M., (2005). Can oxidative damage be treated nutritionally? *Clinical Nutrition*, 24(2), 172-183.
- Berk, M., Ng, F., Dean, O., Dodd, S., Bush, A.I., (2008). Glutathione: a novel treatment target in psychiatry. *Trends in Pharmacological Science*, 29(7), 346-351.
- Bhuvarahamurthy, V., Balasubramanian, N., Govindasamy, S. (1996). Effect of radiotherapy and chemoradiotherapy on circulating antioxidant system of human uterine cervical carcinoma. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 158(1), 17-23.
- Bokser, I., Szende, B., Shally, A. V., (1990). Protective Effects of D-Trp-Luteinising Hormone- Releasing in Female Microcapsules Against Cyclophosphamide-Induced Gonadotoxicity in Female Rats., *Br. J. Cancer*, 61:861-865.
- Bramwell, V.C.H., Mouristen, H.I., Santora, A., (1987). Cyclophosphamide Versus Ifosfamide: Final Report of a Randomized Phase 2 Trial in Adult Soft Tissue Sarcomas, *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, 23(3):311-321p.
- Brown, K.M., Arthur, JR., (2001). Selenium, selenoproteins and human health: a review. *Public Health Nutr* 4:593-9.
- Budavari, S., (1987), *An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals*, The Merck Index. Eleventh Edition Centennial Edition, USA., p: 429-430, 1563.
- Burk, R.F., Levander, O.A., (1999). In: *Modern Nutrition in Health and Disease*, Ninth Edition, Edited by M. Shils, Jolson, M. Shike and A. C. Ross. Baltimore: Williams & Wilkins, p. 265-276.
- Byers, T., Perry, G., (1992). Dietary carotenes, vitamin C, and vitamin E as protective antioxidants in human cancers. *Annu Rev Nutr*. 12:139-159.
- Cao, S., Durrani, F.A., Rustum, Y.M., (2004) Selective Modulation of the Therapeutic Efficacy of Anticancer Drugs by Selenium Containing Compounds against Human Tumor Xenografts, *Clinical Cancer Research*, Vol. 10: 2561-2569.
- Carr, A.C., Zhu, B.Z., Frei, B., (2000). Potential antiatherogenic mechanisms of ascorbate (vitamin C) and alpha-tocopherol (vitamin E). *Circ Res* 87:349-354.
- Cingi, M.İ., Erol, K., Özdemir, M., (1996). *Farmakoloji Ders Notları II*, Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı, Eskişehir.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Clemens, M.R., Waladkhani, A.R., Bublitz, K., Ehninger, G., Gey, K.F., (1997). Supplementation with antioxidants prior to bone marrow transplantation. *Wiener Klinische Wochenschrift*, 109(19), 771-776.
- Dai, J., Weinberg, R. S., Waxman, S., Jing, Y., (1999). Malignant Cells Can Be Sensitized to Undergo Growth Inhibition and Apoptosis by Arsenic Trioxide Through Modulation of the Glutathione Redox System, The American Society of Hematology, 0006-4971/99/9301-0016.
- Dilek, O.N., (2003). Serbest Radikaller ve Cerrahi. Serbest Radikaller ve Antioksidanlar Araştırma Derneği III. Ulusal Kongresi. Afyon 23-30 Mart:6
- Dollery, C., (1999). *Therapeutic Drugs*, Churchill Livingstone, Edinburgh, UK.
- Drabko, K., Kowalczyk, J., (2004). Imbalance between prooxidative and anti-oxidative processes in children with neoplastic disease. *Med Wieku Rozwoj* 8: 217-223
- Garewal, H.S., (1997). Antioxidants and disease prevention. Florida: CRC Press LLC, pp 3-19.
- Gey, K.F., Puska, P., Jordan, P., Moser, U.K., (1991). Inverse correlation between plasma vitamin E and mortality from ischemic heart disease in cross-cultural epidemiology. *Am J Clin Nutr* 53:326-334.
- Glode, M., Robinson, J., Gould, F.S., (1981). Protection from Cyclophosphamide-Induced Testicular Damage with an Analogue of Gonadotropin-Releasing Hormone, *The Lancet*, May 23, 1132-1136.
- Groff, J.L., Gropper, S.S., Hunt, S.M., (1995). *Microminerals in Advanced Nutrition and Human Metabolism*, Minneapolis: West Publishing Company, Minneapolis, p. 381-384.
- Gutteridge, J.M.C., (1994). Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. *Chemico-Biological Interactions*, 91, 133-140, 1994.
- Halliwell, B., (1991). Reaktif oxygen species in living systems:source, biochemistry, and role in human disease. *Am J Med*; 91(suppl 3C):14-22.
- Halliwell, B., (1994). Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutrition Reviews*, 52(8-1), 253-265.
- Hansen, F., Stenbygaard, L., Skovsgaard, T., (1995). Effect of Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF), on Hematologic Toxicity Induced by High-Dose Chemotherapy in Patients with Metastatic Breast Cancer. *Acta. Oncol.*, 34 (7):919-924.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Henderson, W., (1994). The role of leukotriens in inflammation. *Ann Intern Med*; 121:684 – 697.
- İlbey, Y.O., Ozbek, E., Simsek, A., Otunctemur, A., Cekmen, M., Somay, A., (2009). potential chemoprotective effect of melatonin in cyclophosphamide-and cisplatin-induced testicular damage in rats. *Fertil Steril* 92:1124-1132.
- Ilio, C.D., Boccio, G.D., Casaccia, R., Aceto A., Giacomo, F., Federici, G., (1987). Selenium Level and Glutathione-Depent Enzyme Activities in Normal and Neoplastic Human Lung Tissues, *Carcinogenesis* vol. 8 no. 2 pp. 281-284.
- Ip, C., (1998). Lessons from basic research in selenium and cancer prevention. *J nutr*;128(11):1845-54.
- İşcan, M., Çoban, T., (1998). Normal ve neoplastik meme dokusunda antioksidan enzimler. *Klinik Gelişim.*; 11:392-395.
- Kalaycıoğlu, M.E., Lichtin, A.E., Andrese, S.W., Tuason, L., Bolwell, B.J., (1995). High-Dose Busulfan and Cylophosphamide Followed by Autologous Bone Marrow Transplantationand/or Peripheral Blood Progenitor Cell Rescue for Metastatic Breast Cancer., *Am. J. Clin. Oncol.* 18(6):491-494 p.
- Karataş, F., Aşkın, U., Halifeoğlu İ., Dönder, E., (2006). Guatr'lı Hastalarda Antioksidan Vitaminler (A, E ve C), Selenyum ve Glutatyon Peroksidaz(GSH-Px) Düzeylerinin Araştırılması, *F.Ü. Sağ. Bil. Der.*, 20 (4): 277 – 280
- Katzung, B.G., (2001) *Basic & Clinical Pharmacology*. 8th Ed. Appleton & Lange, Stamford.
- Kawabata, T.T., Chapman, M.Y., Kim, D.H., Stevens, W.D., Holsapple, M.P., (1990). Mechanism of in vitro Immunosuppression by Hepatocyte Generated Cyclophosphamide Metabolites and 4-Hydroxycyclophosphamide, *Biochemical Pharmacology*, Vol.40: No. 5, pp. 927-935 p.
- Kearsley, J.H., (1986). Cytotoxic Chemotherapy for Common Adult Malignancies: 'The Emperor's New Clothes' Revisited., *Brit. Med. S.* 293:871.
- Kehrer J.P., Biswal, S.S., (2000). *Toxicol Sci.* Sep;57(1):6-15.
- Khattab, F.K.I., (2007). Effects of Sodium Selenite on the Ultrastructure of the Kidney Cortex in Normal Rats, *Journal of Applied Sciences Research*, 3 (9) : 803-810.
- Kızılcı, S., (1999). Kemoterapi Alan Kanserli Hastalar ve Yakınlarının Yaşam Kalitesini Etkileyen Faktörler, *C. Ü. Hemşirelik Yüksekokulu Dergisi*, 3 (2).

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kintzel, P.E., (2001). Anticancer drug-induced kidney disorders. Incidence, prevention and management. *Drug Safety* 24:19-38.
- Kiuchi, H., Takao, T., Yamamoto, K., (2009). Sesquiterpene Lactone Parthenolide Ameliorates Bladder Inflammation and Bladder Overactivity in Cyclophosphamide Induced Rat Cystitis Model by Inhibiting Nuclear Factor-kappa B Phosphorylation. *The Journal of Urology*. May Vol. 181, 2339-2348.
- Knight, J.A., (1995). Disease related to oxygen-derived free radicals. *Ann.Clin.Lab.Sci.*; 25(2):111-21.
- Kohrle, J., Jakob, F., Contempre, B., Dumont, J.E., (2005). Selenium, the thyroid, and the endocrine system. *Endocr Rev*;26:944-84.
- Kohrle, J., (1999). The trace element selenium and the thyroid gland. *Biochimie*;81:527-33.
- Korkmaz, A., Oter, S., Sadir, S., Coskun, O., Topal, T., Ozler, M., Bilgic, H., (2005). Peroxynitrite may be involved in bladder damage caused by cyclophosphamide in rats. *J Urol* 173:1793–1796.
- Korkmaz, A., Topal, T., Oter, S., (2007). Pathophysiological aspects of cyclophosphamide and ifosfamide induced hemorrhagic cystitis; implication of reactive oxygen and nitrogen species as well as PARP activation. *Cell Biol Toxicol Sep* 23(5):303- 12.
- Kotlarek-Hause, S., Gabrys, K., Potoczek, S., (1995). Evaluation of Early Treatment Results in Hodgkin's Disease During the Cytostatic Protocol Containing Methotrexate., *Pol. Arc. Med. Wewn.*, 93 (3):228-233.
- Kreuser, E.D., Klingmuller, D., Thiel, E., (1993). The Role of LHRH-Analogues in Protecting Gonadal Functions During Chemotherapy and Irridation., *Eur. Urol.*, 23:157-164.
- Kumar, K.B.H., Kuttan, R., (2004). Chemoprotective Activity of an Extract of *Phyllanthus Amarus* Against Cyclophosphamide Induced Toxicity in Mice, *Phytomedicine* 12:494-500
- Kumari, J., Shaoo, P.K., (2005). Effects of cyclophosphamide on the immun system and disease resistance of Asian catfish *Clarias batrachus*. *Fish Shellfish Immunol* 19:307-316.
- Kurt, H., Başaran, A., Aral, E., (2005). Sıçanlarda Karbon Tetrakloritin (CCl<sub>4</sub>) Oluşturduğu Oksidatif Stresin Kateşin ve Likopen ile Önlenmesi, Doktora Tezi, Osmangazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kwon, H.C., Borch, R.F., Engel J., Niemeyer, U., (1987). Activation Mechanism of Mafosfamide and The Role of Thiols in Cyclophosphamide Metabolism, *J. Medchem.*, 30: 395-399.
- Lawrence, A.K., Amadeo, J.P., Steven, C.K., (2003). *Clinical Chemistry*. 4th Edition.;714.
- Lin, J.Q., (2002). Effect of nutrition intervention on antioxidant capacity and lipid peroxide in patients with bone marrow transplantation. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*, 22(6), 530-532.
- Marklund, S., (1982). Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. *Proc Natl Acad Sci USA*;79:7634-8.
- Masuda, H., Chancellor, M.B., Kihara, K., Yoshimura, N, (2006). 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 attenuates development of cyclophosphamide-induced cystitis in rats. *Urology*; 67:435.
- Matsuoka, Y., Masuda, H., Yokoyama, M., Kihara, K., (2007). Protective effects of heme oxy-genase-1 against cyclophosphamide-induced haemorrhagic cystitis in rats. *BJU Int*; 100: 1402–8.
- Mertz, W., Morris, E.R., Smith, J.C., (1989). Trace elements in the elderly . Metabolism, requirements, and recommendations for intakes. HN Munro et al (eds). *Nutrition, aging, and the elderly*. Plenum Publishing Corp., p. 195-222.
- Miller, L.L., Wang, F., Palace, V.P., and Hontela, A., (2007). Effects of Acute and Subchronic Exposure to Waterborne Selenite on the Physiological Stress Response and Oxidative Stress Indicators in Juvenile Rainbow trout. *Aquatic Toxicology*, 83:263-271.
- Mitchell, M.S., (1989). Low-Dose Cyclophosphamide and IL-2 in the Treatment of Advanced Melanoma Division of Medical Oncology, Compr. Cancer Center, University of Southern California, 85-89.
- Moore, F. R., Urda, G. A., Krishna, G. And Theiss, J.C., 1995, An invivo/invitro Method for Assesing Micronucleus and Chromosome Aberration Induction in Rat Bone Morrow and Spleen. 1. Studies with Cyclophosphamide. *Mutat. Res.* 335 (2): 191-199.
- Morris, I.D., (1993). Protection Against Cytotoxic-Induced Testis Damage Experimental Approaches, *Eur. Urol.*, 23:143-147.
- Murray, C.J.L., Lopez, A.D., (1997). Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global burden of disease study. *Lancet*; 349:1498-504.
- Natanson, C., (1994). Selected treatment strategies for septic shock based on proposed mechanisms of pathogenesis. *Ann Intern Med*; 120 (9 ):771 - 778.



### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Neve, J., Vertongen, F., Molle, L., (1985). Selenium Deficiency. *Clin Endocrinol Metabol*;14:629-56.
- Perini P, Calabrese M, Rinaldi L, and Gallo P (2007) The safety profile of cyclophosphamide in multiple sclerosis therapy. *Expert Opin Drug Saf.*, 6:183-190.
- Pool, B.L., Bos, R.P., Niemeyer, U., Theuws, J. L.G., Schmalhl, D., (1988). In vitro/in vivo Effect of Mesna on the Genotoxicity and Toxicity of Cyclophosphamide A Study Aimed at Clarifying the Mechanism of Mesna's Anticarcinogenic Activity, *Toxicology Letters*, 41:49-56 p.
- Ramos, A., Lame, A.N., Hollingworth, D., Fan, T.W.M., (2004). Secondary structure and stability of the selenocysteine insertion sequences (SECIS) for human thioredoxin
- Rayman, M.P., (2000). The importance of selenium to human health. *Lancet*; 356(9225):233-41
- Reid, M.E., Marshall, J.R., Duffield-Lillico, A.J., Stratton, S., Natarajan, N., Fakih, M. A., (2004). Report of High Dose Selenium Supplementation Response and Toxicities. *Journal of Trace Elements in Medicine & Biology* 18, 69–74.
- Ribeiro, R.A., Freitas, H.C., Campos, M.C., Santos, C.C., Figueiredo, F.C., Brito, G.A., (2002). Tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-1 $\beta$  mediate the production of nitric oxide involved in the pathogenesis of ifosfamide induced hemorrhagic cystitis in mice. *J Urol*; 167:229.
- Sabitha, K.E., Shyamaladevi, C.S., (1999). Oxidant and antioxidant activity changes in patients with oral cancer and treated with radiotherapy. *Oral Oncol.*, 35(3):273-7.
- Sandberg, J.O., Olsson, N., Johnson, R.C., Hellerstrom, C., Andersson, A., (1995). Immunosuppression, Macroencapsulation and Ultraviolet-B Irradiation as Immunoprotection in Porcine Pancreatic Islet Xenotransplantation, *Pharmacol. Toxicol.* 76(6):400-405 p.
- Sangeetha, P., Das, U.N., Koratkar, R., Suryaprabha, P., (1990). Increase in free radical generation and lipid peroxidation following chemotherapy in patients with cancer. *Free Radical Biology and Medicine*, 8(1), 15-19.
- Selvakumar, E., Prahalathan, C., Sudharsan, P.T., Varalakshmi, P., (2006). Chemoprotective effect of lipoic acid against.
- Senthilkumar, S., Yogeeta, S.K., Subashini, R., Devaki, T., (2006). Attenuation of Cyclophosphamide induced Toxicity by Squalene in Experimental Rats, *Chemico-Biological Interactions*, 160: 252-260 p.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Shamberger, R.J., (1984). Selenium In; Friend, E, Editor. Biochemistry of the essential ultratrace elements. Plenum Pres. NewYork: 201-237.
- Souza-Filho, M.V., Lima, M.V., Pompeu, M.M., Ballejo, G., Cunha, F.Q., Ribeiro, Rde, A., (1997). Involvement of nitric oxide in the pathogenesis of cyclophosphamide-induced he-morrhagic cystitis. *Am J Pathol*, 150:247.
- Stawicki, S.P., Lyons, M., Aloupis, M., Sarani, B., (2007). Current evidence from phase III clinical trials of selenium supplementation in critically ill patients: why should we bother? *Mini Rev Med Chem*;7:693-99.
- Sugumar E, Kanakasabapathy I, Abraham P (2007) Normal plasma creatinine level despite histological evidence of damage and increased oxidative stres in the kidneys of cyclophosphamide treated rats. *Clin Chim Acta.*, 376: 244-5.
- Szabo, C., (1996). The pathophysiological role of peroxynitrite in shock, inflammation, and ischemia-reperfusion injury. *Shock*, 6:79.
- T.C. Sağlık Bakanlığı Tedavi Hizmetleri Genel Müdürlüğü (2010). Türkiye Onkoloji hizmetleri Yeniden Yapılanma Programı 2010-2023. Ankara, T.C. Sağlık Bakanlığı.
- Thatcher, N., Smith, D.B., Lind, M.J., Anderson, H., Barclay, J., Chopra, M.P., Fitzgerald, M., D., (1988). Double Alkylating Agent Therapy with Ifosfamide and Cyclophosphamide for Advanced Non-Small Cell Lung Cancer from the Manchester Lung.
- Tos-Luty, S., Obuchowska-Przabdrowska, Latuszynska, J., Musdk, I., Tokarska Rodak (2003). Comporison of Histological and Ultrastructural Changes in Mice Organs After Supplementation with Inorganic and Organic Selenium, *Ann Agric Environ Med.*, 10:87-91.
- Utomo, A., Jiang, X., Furuta, S., Yun, J., Levin, D.S., Wang, Y.C., Desai, K.V., Green, J.E., Chen, P.L., Lee, W.H., (2004). Identification of a novel putative non-selenocysteine containing phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (NPGPx) essential for alleviating oxidative stress generated from polyunsaturated fatty acids in breast cancer cells. *J Biol Chem* 279:43522-9.
- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M., (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress- induced cancer. *Chemico\_Biological Interactions* 160:1-40.
- Weijl, N.I., Cleton, F.J., Osanto, S., (1997). Free radicals and antioxidants in chemotherapy induced toxicity. *Cancer Treatment Reviews* 23(4), 209-240.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- White, A.C., Sousa, A.M., Blumberg, J., Ryan, H.F., Fanburg, B.L., Kayyali, U.S., (2006). Plasma antioxidants in subjects before hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation* 38(7), 513-520.
- Wildburger, R., Mrakovcic, L., Stroser, M., Andrisic, L., Borovic Sunjic, S., Zarkovic, K., Zarkovic, N. (2009). Lipid peroxidation and age-associated diseases-cause or consequence?: Review Citation. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi* 29(1), 189-193.
- Yanardağ, R., Orak, H., (1999). Selenium content of milk and milk products of Turkey – Part II. *Biol Trace Elem Res* 68:79-95
- Yang, Z., Faustino, P.J., Andrews, P.A., Monastra, R., Rasmussen, A.A., Ellison, C.D., Cullen, K.J., (2000). Decreased Cisplatin/DNA Adduct Formation is Associated with Cisplatin Resistance in Human and Neck Cancer Cells Lines, *Cancer Chemother Pharmacol* 46:255-262.
- Young, I.S., Woodside, J.V., (2001). Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinical Pathology* 54:176-186.
- Zadák, Z., Hyspler, R., Tichá, A., Hronek, M., Fikrová, P., Rathouská, J., Hrnčiariková, D., Stetina, R., (2009). Antioxidants and vitamins in clinical conditions. *Physiological Research*, 58 (Suppl 1), 13-17.