

**T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SİLİKOZİS HASTALARINDA  
OKSİSTEROL DÜZEYLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Ecz. Neslihan AKSU**

**Farmasötik Toksikoloji Programı**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ANKARA**

**2018**



**T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SİLİKOZİS HASTALARINDA  
OKSİSTEROL DÜZEYLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Ecz. Neslihan AKSU**

**Farmasötik Toksikoloji Programı**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI**

**Doç. Dr. Suna SABUNCUOĞLU**

**ANKARA**

**2018**

## ONAY SAYFASI

### SİLİKOZİS HASTALARINDA OKSİSTEROL DÜZEYLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Ecz. Neslihan AKSU

Danışman: Doç. Dr. Suna SABUNCUOĞLU

Bu çalışma 04.07.2018 tarihinde jürimiz tarafından "Farmasötik Toksikoloji Tezli Yüksek Lisans Programı"nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

**Jüri Başkanı:** Prof. Dr. Nurşen BAŞARAN

Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

**Tez Danışmanı:** Doç. Dr. Suna SABUNCUOĞLU

Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

**Üye:** Prof. Dr. Ülkü ÜNDEĞER BUCURGAT

Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

**Üye:** Doç. Dr. Gözde GİRGİN

Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

**Üye:** Doç. Dr. Aylin ÜSTÜNDAĞ

Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

## ONAY

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

04 Temmuz 2018



Prof. Dr. Diclehan ORHAN

Enstitü Müdürü

## YAYIMLANMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesi'ne verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orjinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

- o **Tezimin/Raporumun tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.**

(Bu seçenekle teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etmeniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirirse bile, teziniz arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir)

- **Tezimin/Raporumun 11/07/2021 tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını (İç kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) istemiyorum.**

(Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir)

- o **Tezimin/Raporumun ..... tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.**
- o **Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi**

11 /07 /2018

Ecz. Neslihan AKSU



## ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Doç. Dr. Suna SABUNCUOĞLU danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığımı beyan ederim.

Ecz. Neslihan AKSU

## TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans Eğitimim boyunca hiçbir zaman desteğini benden esirgemeyen, her konuda paylaşım içinde olabildiğim ve sabırla bu süreci programlayan ve birlikte çalışma fırsatı yakalayabildiğim için kendimi çok şanslı hissettiğim çok değerli danışman hocam Doç. Dr. Suna SABUNCUOĞLU'na,

Bilgisini ve deneyimlerini çekinmeden paylaşan Dr. Afsin SAMADI'ye,

Yüksek Lisans tez çalışmam için numune toplanmasında katkıları olan Uzm. Dr. Türkan Nadir ÖZİŞ'e ve bu çalışmaya gönüllü olarak katılan tüm bireylere ve çalışma imkanı verdikleri için Ankara Keçiören Meslek Hastalıkları Hastanesi'ne,

Yüksek lisans tez çalışmamda yardımlarını ve bilgisini esirgemeyen değerli arkadaşım Ecz. Tuğçe ÇETİN'e,

Ankara GATA Hastanesinde yine çalışmamda yardımlarını esirgemeyen Burcu ESER'e,

Yüksek Lisans eğitimim boyunca gülen yüzleri ile verdikleri destekleri ve emekleri için Hacettepe Üniversitesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı Ailesi'ne,

Tez sürecim boyunca çalışmakta olduğum ve bu süreci yönetebilmem için sağladıkları imkanlar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu ve İDE İlaç Ruhsatlandırma ve Biyofarmasötik Danışmanlık ve Eğitim çalışanlarına,

Akademik olarak ilerlemem için maddi ve manevi desteklerini her zaman yanımda hissettiğim, bana inançları ile başarılarımda çok büyük katkısı olan Nur-Etem Hakkı AKSU, Birsen AKSU, İrem-Tamer BAYRAM ve Merhum Sevim-Mesut BOYACI'ya,

sonsuz teşekkür ederim.

## ÖZET

**Aksu, N. Silikozis Hastalarında Oksisterol Düzeylerinin Değerlendirilmesi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Toksikoloji Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2018.** Silikozis, silika ( $\text{SiO}_2$ ) parçacıklarının uzun süre solunması sonucu akciğerlerde ortaya çıkan, kalıcı ve ilerleyen bir hasara yol açan kronik inflamatuvar bir meslek hastalığıdır. Türkiye'de her yıl önemli sayıda silikozis vakası teşhis edilmektedir. Oksisteroller, kolesterolün oksidasyonu sonucu oluşan moleküllerdir. Enzimatik ve enzimatik olmayan yollarla meydana gelmektedir. Enzimatik olmayan (oto-oksidasyon) yolla oluşan oksisterol türevlerinin patolojik pekçok durum ile ilişkisi gösterilmiştir ve bu nedenle biyobelirteç olarak kullanılabilmesi düşünülmektedir. Bu tez çalışması ile silikozis hastalarında oto-oksidasyon ile oluşan oksisterol düzeylerinin değerlendirilmesi; bir sfingolipit metaboliti olan sfingozin-1-fosfat (S1P) düzeylerinin tespit edilmesi; söz konusu parametrelerin yanısıra indüklenmesi olası lipit peroksidasyonunun da farklı parametrelerle belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, otooksidasyonla oluşan oksisterol türevlerinden 7-ketokolesterol (7-KC),  $3\beta$ ,  $5\alpha$ ,  $6\beta$  trihidroksi kolestan (triol), lipit peroksidasyonunun önemli belirteçleri olan malondialdehit (MDA), F2-izoprostan (F2-iP) ve hidroksinonenal (HNE) ile S1P düzeyleri ölçülmüştür. Kontrol grubunda 7-KC ve triol düzeyleri sırasıyla  $20,26 \pm 1,38$  ng/ml ve  $13,83 \pm 1,75$  ng/ml olarak ölçülürken, hasta grubunda sırasıyla  $40,61 \pm 2,07$  ng/ml ve  $16,15 \pm 2,22$  ng/ml olarak ölçülmüştür ( $p < 0,001$ ). Hasta grubu plazma 4-HNE, F2-iP ve MDA düzeylerinin hem idrar hem de plazmada kontrol grubuna kıyasla anlamlı şekilde daha yüksek olduğu belirlenmiştir ( $p < 0,05$ ). S1P düzeyleri ise kontrol grubu için  $67,57 \pm 16,25$  ng/ml, hasta grubunda  $49,05 \pm 10,87$  ng/ml olarak ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar, kolesterol oksidasyonu ve lipit peroksidasyon parametrelerinin silikozis hastalarında anlamlı bir şekilde yükseldiğini, S1P düzeylerinin ise azaldığını göstermiştir. Yapılan çalışma, silikoziste lipit metabolizmasının etkilendiğini ve oksidatif lipit hasarının tetiklendiğini, kolesterol oksidasyonunun bu maruziyet grubunda da önemli bir belirteç olarak kullanılabilmesini, hastalıkta lipit düzeyindeki patolojik değişimlerin hastalığın ilerlemesinde etkili olabileceğini göstermiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Silikozis, oksisterol, lipit peroksidasyonu, S1P, mesleki hastalık

Bu tez, Hacettepe Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje no: THD-2017-13012



## ABSTRACT

**Aksu, N. Evaluation of oxysterol levels in silicosis patients. Hacettepe University Health Sciences Institute, Thesis of Master of Science in Pharmaceutical Toxicology, Ankara, 2018.** Silicosis is a chronic inflammatory occupational disease that causes permanent and progressive damage to the lungs resulting from prolonged inhalation of silica (SiO<sub>2</sub>) particles. A significant number of silicosis cases are diagnosed each year in Turkey. Oxysterols consist of the oxidation of cholesterol. Oxysterols take place two different routes, enzymatic and non-enzymatic. Oxysterol derivatives that form with non-enzymatic (auto-oxidation) pathway have been shown to be associated with many pathological conditions and for this reason it can be used as a biomarker. The aim of this thesis is to evaluate oxysterol levels which are formed by auto-oxidation pathway in silicosis patients; determination of sphingosine-1-phosphate (S1P) levels which is a sphingolipid metabolite. In addition to these parameters, it is aimed to determine the possible lipid peroxidation by different parameters. For this purpose, oxysterol derivatives (7-ketosterol (7-KC), 3 $\beta$ , 5 $\alpha$ , 6 $\beta$  trihydroxycholesterol (triol), lipid peroxidation parameters (malondialdehyde (MDA), F<sub>2</sub>-isoprostan (F<sub>2</sub>-iP) and hydroxynonenal (HNE) and S1P levels were measured. In the control group, 7-KC and triol levels were measured as 20,26 $\pm$ 1,38 ng/ml and 13,83 $\pm$ 1,75 ng/ml, respectively, while in the patient group, 40,61 $\pm$ 2,07 ng/ml and 16,15 $\pm$ 2.22 ng/ml ( $p < 0,001$ ). The patient group was found to have significantly higher plasma 4-HNE, F<sub>2</sub>-iP and MDA levels in both urine and plasma compared to the control group ( $p < 0,05$ ). S1P levels were 67,57 $\pm$ 16,25 ng/ml in the control group and 49,05 $\pm$ 10,87 ng/ml in the patient group. The results showed that cholesterol oxidation and lipid peroxidation parameters increased significantly in silicosis patients while a decrease in the S1P levels were observed. The study demonstrated that lipid metabolism is affected and oxidative lipid damage is triggered in silicosis. Therefore, cholesterol oxidation can also be used as an important marker in this exposure group, and pathological changes in lipids may be effective in the disease progression.

**Keywords:** Silicosis, oxysterol, lipid peroxidation, S1P, occupational disease

This thesis supported by Hacettepe University Scientific Projects Coordination Unit.

Project no: THD-2017-13012

## İÇİNDEKİLER

	<b>Sayfa</b>
ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN SAYFASI	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xvi
TABLolar	xviii
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	<b>3</b>
2.1. Silikanın Genel Özellikleri ve Silikozis	3
2.1.1. Silikanın Genel Özellikleri	3
2.1.2. Silika Maruziyeti	5
2.2. Silikanın İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri	7
2.2.1. Pnömkonyozlar	7
2.2.2. Silikozis	8
2.2.3. Silika Patogenezinin Olası Mekanizmaları	14
2.2.4. Silikozis Tanısı, Hastalıktan Korunma ve İzleme	18
2.2.5. Silikozis Tedavisi	19
2.2.6. Dünyada ve Türkiye'de Silikozis	19
2.3. Oksisteroller	23
2.3.1. Bazı Oksisterol Türevleri ve Özellikleri	28
2.3.2. Oksisterol Bağlayıcı Proteinler	32
2.3.3. Oksisterollerin Hastalıklarla İlişkisi	33
2.3.4. Oksidatif Stres, Lipit Peroksidasyonu ve Silikozis	37
2.3.5. Sfingozin-1-Fosfat	44
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM</b>	<b>47</b>

3.1. Kullanılan Kimyasallar Maddeler	47
3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler	48
3.3. Hazırlanan Çözeltiler	49
3.3.1. LC-MS/MS ile Oksisterol Analizi Yönteminde Kullanılan Çözeltiler	49
3.3.2. İnsan 4-Hidroksinonenal ELISA Kit'i ile Plazma ve İdrarda Bulunan 4-Hidroksinonenal Analizi Yönteminde Kullanılan Çözeltiler	52
3.3.3. İnsan 8-İsoprostan ELISA Kit'i ile Plazma ve İdrarda Bulunan 8-İsoprostan Analizi Yönteminde Kullanılan Çözeltiler	52
3.3.4. İnsan Malondialdehit ELISA Kit'i ile Plazma ve İdrarda Bulunan Malondialdehit Analizi Yönteminde Kullanılan Çözeltiler	53
3.3.5. Sfingozin-1-Fosfat Analizi Yönteminde Kullanılan Çözeltiler	54
3.4. Çalışma Grubunun Seçimi	54
3.5. Çalışma Grubundan Biyolojik Örneklerin Toplanması	55
3.5.1. Kan ve İdrar Örneklerinin Toplanması	55
3.6. Çalışma Grubunun Klinik Parametrelerinin Değerlendirilmesi	55
3.7. Çalışma Grubunun Akciğer Filmleri	55
3.8. 7-Ketokolesterol ve 3 $\beta$ , 5 $\alpha$ , 6 $\beta$ Trihidroksi Kolesterol Analizi	58
3.8.1. Kromatografik Analiz Koşulları	61
3.8.2. MS/MS Kaynak Ayarlarının Optimizasyonu	62
3.9. İnsan 4-Hidroksinonenal ELISA Kit'i ile Plazma ve İdrarda Bulunan 4-Hidroksinonenal Analizi	65
3.9.1. Miktar Tayini Prosedürü	66
3.10. İnsan F2-İsoprostan ELISA Kit'i ile Plazma ve İdrarda Bulunan F2-İsoprostan Analizi	66
3.11. İnsan Malondialdehit ELISA Kit'i ile Plazma ve İdrarda Bulunan Malondialdehit Analizi	68
3.12. Sfingozin-1-Fosfat Analizi	69
3.12.1. Numunelerin Hazırlanması	69
3.12.2. Miktar Tayini Prosedürü	70
3.13. İstatiksel Analiz	71

<b>4. BULGULAR</b>	72
4.1. Hastalara ait Demografik Bulgular	72
4.2. Spirometrik İnceleme Bulguları	74
4.3. Uluslararası Çalışma Örgütü Sınıflamasına Dayanarak Akciğer Filmlerinin Değerlendirilmesi	79
4.4. Hasta ve Kontrol Grubuna Ait Lipit Profili Bulguları	79
4.5. Plazma 7-Ketokolesterol ve 3 $\beta$ , 5 $\alpha$ , 6 $\beta$ Trihidroksi Kolesterol Düzeyleri	80
4.6. Plazma ve İdrar 4-Hidroksinonenal Düzeylerine İlişkin Bulgular	81
4.7. Plazma ve İdrar F2-İzoprostan Düzeylerine İlişkin Bulgular	82
4.8. Plazma ve İdrar Malondialdehit Düzeylerine İlişkin Bulgular	83
4.9. Sfingozin-1-Fosfat LC-MS/MS Yöntemine İlişkin Bulgular	84
4.10. Ölçülen Parametreler Arasındaki İlişkiye Ait Korelasyon Bulguları	85
<b>5. TARTIŞMA</b>	88
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	101
<b>7. KAYNAKLAR</b>	103
<b>8. EKLER</b>	
Ek-1: Etik Kurul Onayı	
<b>9. ÖZGEÇMİŞ</b>	

## SİMGELER ve KISALTMALAR

<b>22R-OHC</b>	22R-Hidroksikolesterol
<b>24S-OHC</b>	24S-Hidroksikolesterol
<b>25-OHC</b>	25-Hidroksikolesterol
<b>27-OHC</b>	27-Hidroksikolesterol
<b>4-HNE</b>	4-Hidroksinonenal
<b>7-KC</b>	7-Ketokolesterol
<b>7<math>\alpha</math>-OHC</b>	7 $\alpha$ -Hidroksikolesterol
<b>7<math>\beta</math>-OHC</b>	7 $\beta$ -Hidroksi Kolesterol
<b>AA</b>	Araşidonik Asit
<b>ABD</b>	Amerika Birleşik Devletleri
<b>ACN</b>	Asetonitril
<b>Akt/PKB</b>	<i>Protein Kinase B</i> , Protein Kinaz B
<b>ANCA</b>	<i>Antineutrophil Cytoplasmic Antibody</i> , Anti-Nötrofil Sitoplazmik Antikor
<b>COX-2</b>	<i>Cyclooxygenase-2</i> , Siklooksijenaz-2
<b>CT</b>	<i>Computed Tomography</i> , Bilgisayarlı Tomografi
<b>CYP</b>	<i>Cytochrome</i> , Sitokrom
<b>CYP27A1</b>	27-Hidroksilaz
<b>CYP3A4</b>	Sitokrom P450 3A4
<b>CYP46</b>	24S-Hidroksilaz
<b>CYP7A1</b>	Kolesterol-7 $\alpha$ -Hidroksilaz
<b>DF</b>	Desferrioksaminin
<b>DHN</b>	Alkol-1,4-Dihidroksinonen
<b>DKK</b>	Düşük Plazma Kalite Kontrolü
<b>DMAP</b>	4-(Dimetilamino) Piridin
<b>DMG</b>	N,N-Dimetilglisin Hidroklorid
<b>DNA</b>	Deoksiribo Nükleik Asit
<b>EDC</b>	Etil Karbodiimid Hidroklorid
<b>EE</b>	Solucan Ekstraktı
<b>EGF</b>	Epidermal Büyüme Faktörü
<b>ESI</b>	Elektrosprey İyonizasyon

<b>F2-iP</b>	F2-izoprostan
<b>FEV1</b>	Zorlu Soluk Vermenin 1. Saniyesinde Dışarı Atılan Hacim
<b>FVC</b>	Zorlu Vital Kapasite
<b>GTPaz</b>	Guanozin Trifosfataz
<b>HDL</b>	<i>High Density Lipoprotein</i> , Yüksek Dansiteli Lipoprotein
<b>HIV</b>	<i>Human Immunodeficiency Virus</i> , İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü
<b>HMG-KoA</b>	3-Hidroksi-3-Metil Glutaril KoA
<b>HNE-GSH</b>	HNE glutasyon konjugat
<b>HPLC</b>	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> , Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
<b>HRCT</b>	<i>High Resolution Computed Tomography</i> , Yüksek Çözünürlüklü Bilgisayarlı Tomografi
<b>IARC</b>	<i>International Agency for Research on Cancer</i> , Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı
<b>IC<sub>50</sub></b>	İnhibisyon Konsantrasyonu
<b>IL-1</b>	İnterlökin-1
<b>IL-8</b>	İnterlökin-8
<b>ILO</b>	<i>International Labour Organization</i> , Uluslararası Çalışma Ofisi
<b>KK</b>	Kalite kontrol
<b>KoA</b>	Koenzim A
<b>KOAH</b>	Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı
<b>LC-ESI-MS/MS</b>	Sıvı Kromatografisi - Elektrosprey İyonizasyon - Kütle Spektrometresi/Kütle Spektrometresi
<b>LC-MS/MS</b>	Tandem-Kütle Spektrometresi
<b>LDH</b>	Laktat Dehidrogenaz
<b>LDL</b>	<i>Low Density Lipoprotein</i> , Düşük Dansiteli Lipoprotein
<b>LXR</b>	<i>Liver-X-Receptors</i> , Karaciğer X Reseptörleri
<b>m/z</b>	Kütle/Yük
<b>MCP-1</b>	<i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i> , Monosit Kemoatraktan Protein-1
<b>MDA</b>	Malondialdehit
<b>MIP</b>	Makrofaj İnflamatuvar Protein

<b>MRM</b>	<i>The Multiple Reaction Monitoring</i> , Çoklu Reaksiyon İzleme
<b>mRNA</b>	Haberci Ribo Nükleik Asit
<b>MSC</b>	Mezenkimal Kök Hücreler
<b>MSS</b>	Merkezi Sinir Sistemi
<b>NAC</b>	<i>N-Acetyl-cystein</i> , N-Asetil-sistein
<b>NADPH</b>	<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate</i> , Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
<b>NF-κB</b>	Nükleer Faktör Kappa B
<b>-NH<sub>2</sub></b>	Amino
<b>NIOSH</b>	<i>National Institute for Occupational Safety and Health</i> , Mesleki Güvenlik ve Sağlık Enstitüsü
<b>NP-C</b>	Niemann-Pick Tip C
<b>O<sub>2</sub>•</b>	Süperoksit Anyonu
<b>OD</b>	Optik Dansite
<b>OH•</b>	Hidroksil Radikalleri
<b>OSBP</b>	Oksisterol Bağlayıcı Protein
<b>OSHA</b>	<i>Occupational Safety And Health Administration</i> , İş Güvenliği ve Sağlığı İdaresi
<b>PAF</b>	Platelet Akivasyon Faktör
<b>PDGF</b>	<i>Platelet Derived Growth Factor</i> , Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü
<b>PEL</b>	<i>Permissible Exposure Limit</i> , İzin Verilebilir Maruz Kalma Sınırını
<b>PMF</b>	Komplike Silikozis, Konglomere Silikozis, Progresif Masif Fibrozis
<b>PMN</b>	Polimorfonükleer Lökositleri
<b>PUFA</b>	<i>Polyunsaturated Fatty Acids</i> , Çoklu Doymamış Yağ Asitleri
<b>Ras-MAPK</b>	<i>Ras-Mitogen Activated Protein Kinase</i> , Ras-Mitojen Aktivite Protein Kinaz
<b>REL</b>	<i>Recommended Exposure Limit</i> , Önerilen Maruz Kalma Sınırı
<b>RNB</b>	Reaktif azot bileşikleri
<b>ROB</b>	Reaktif oksijen bileşikleri
<b>ROR</b>	<i>The Retinoic Acid Receptor-Related Orphan Receptors</i> , Retinoik Asit Reseptörleri

<b>S1P</b>	Sfingozin-1-Fosfat
<b>S1P1-S1P5</b>	G Proteinine Bağlı S1P Reseptörleri
<b>SGK</b>	Türkiye Sosyal Güvenlik Kurumu
<b>-SH</b>	Tiyol
<b>Si•</b>	Silisyum Radikali
<b>SIM</b>	Seçici İyon İzlemi
<b>SiO•</b>	Silikon Monooksit Radikali
<b>SiO<sub>2</sub></b>	Silika, Silisyum Dioksit
<b>-SiOH</b>	Silanol Grupları
<b>SIRT1</b>	Deasetilaz Sirtuin 1
<b>SLE</b>	Sistemik Lupus Eritematozus, Sistemik Lupus Eritematoz
<b>SM</b>	Sfingomiyelin
<b>SphK</b>	Sfingozin Kinaz
<b>SphK1</b>	Sfingozin Kinaz 1
<b>SphK2</b>	Sfingozin Kinaz 2
<b>SPL</b>	Sfingosin-1-Fosfat Liyaz
<b>SREBP</b>	<i>Sterol Regulatory Element Binding Proteins</i> , Sterol Düzenleyici Element Bağlayıcı Protein
<b>SS</b>	Standar Sapma
<b>TGF-β</b>	<i>Transforming Growth Factor-Beta</i> , Transforme Edici Büyüme Faktörü Beta
<b>TNF-α</b>	<i>Tumor Necrosis Factor Alfa</i> , Tümör Nekroz Faktörü Alfa
<b>Triol</b>	3β, 5α, 6β Trihidroksi Kolestan
<b>YKK</b>	Yüksek Plazma Kalite Kontrolü



## ŞEKİLLER

<b>Şekil</b>	<b>Sayfa</b>
2.1. Silisyum dioksit	3
2.2. Kristalin ve amorf formundaki silisyum dioksit	4
2.3. Alveoler boşluklarda granüler eozinofilik eksüda ve interstisiyel inflamatuvar infiltrasyon gösteren akut silikozis	10
2.4. Kronik silikotik nodül lezyonun karakteristik özelliklerini gösteren silikozis olgusu	12
2.5. Yuvarlak nodüler opasitelerin görüldüğü bir silikozis olgusu	12
2.6. C tip büyük opasiteleri olan komplike bir silikozis olgusu	13
2.7. Silikozis; birçok küçük pulmoner nodülü gösterir ve progresif masif fibrozis ile uyumlu düzensiz konglomera kitlelerinin varlığını doğrular	14
2.8. Kolesterol sentezi	25
2.9. Oksisterol türevleri	26
2.10. Dolaşımdaki major oksisterollerin oluşumu ve eliminasyonu	27
2.11. Oksisterollerin biyolojik fonksiyonları	31
2.12. Oksisterollerin kanser üzerine etkisi	35
2.13. Oksidatif stres biyobelirteçleri	39
2.14. Oksidatif stresin ana hedefleri	40
3.1. 7-KC ve triol için kalibrasyon eğrisi	51
3.2. Standart çözeltilere ait dilüsyonların hazırlanması	52
3.3. Standart çözeltilere ait dilüsyonların hazırlanması	53
3.4. Standart Çözeltilere Ait Dilüsyonların Hazırlanması	53
3.5. Küçük yuvarlak/düzensiz opasiteler	56
3.6. Büyük opasiteler	57
3.7. Yoğunluk Kategorileri	57
3.8. LC-MS/MS cihazının temel bileşenleri	59
3.9. MS/MS'in çalışma prensibinin şematik diyagramı	59
3.10. 7-KC'nin DMG türevinin ürün iyon spektrumu ve parçalanma modeli	64
3.11. Triol'ün DMG türevinin ürün iyon spektrumu ve parçalanma modeli	65
4.1. Silikozis hastaları ve kontrol grubuna ait trigliserit, kolesterol, HDL ve LDL düzeylerinin karşılaştırılması	79

- 4.2. Silikozis hastaları ve kontrol grubunun plazma 7-KC düzeylerinin karşılaştırılması (\*p<0,001) 80
- 4.3. Silikozis hastaları ve kontrol grubunun plazma triol düzeylerinin karşılaştırılması (\*p<0,001) 81
- 4.4. Silikozis ve kontrol gruplarına ait plazma ve idrar 4-HNE düzeylerinin karşılaştırılması, \*p <0,05 82
- 4.5. Silikozis ve kontrol gruplarına ait plazma ve idrar F2-izoprostan düzeylerinin karşılaştırılması, \*p <0,05 83
- 4.6. Silikozis ve kontrol gruplarına ait plazma ve idrar MDA düzeylerinin karşılaştırılması, \*p <0,05 84
- 4.7. Silikozis ve kontrol gruplarına ait plazma S1P düzeylerinin karşılaştırılması, \*p <0,001 85

## TABLOLAR

<b>Tablo</b>	<b>Sayfa</b>
2.1. Mesleki ve Endüstriyel Silika Maruziyeti	6
2.2. Kömür madenciliği dışındaki farklı sektörlerde yapılan silikozis prevalans çalışmaları	22
2.3. Oksisteroller ile ilişkili hastalıklar	33
3.1. Kalibrasyon standart çalışma çözeltilerinin hazırlanması	51
3.2. Küçük opasiteler	56
3.3. Yoğunluk Kategorileri	58
3.4. HPLC Parametreleri	62
3.5. Kütle Spektrometre Parametreleri	63
3.6. 7-KC ve triol'un kütle geçişleri	63
3.7. Sfingozin-1-Fosfat deney yöntemi	71
4.1. Hasta ve kontrol gruplarındaki bireylerin çalışma alanları	73
4.2. Hasta ve kontrol gruplarındaki bireylerin temel demografik özellikleri	74
4.3. Hasta grubundaki bireylere ait sigara kullanımı, yaş, çalışma süresi ve spirometrik inceleme bulguları	75
4.4. Kontrol grubundaki bireylere ait sigara kullanımı, yaş, çalışma süresi ve spirometrik inceleme bulguları	78
4.5. Silikozis hastaları ve kontrol grubuna ait trigliserit, kolesterol, HDL ve LDL düzeyleri	80
4.6. Hasta ve kontrol grubuna ait oksisterol düzeylerinin karşılaştırılması	81
4.7. Silikozis ve kontrol gruplarına ait plazma ve idrar 4-HNE düzeyleri, *p <0,05	82
4.8. Silikozis ve kontrol gruplarına ait plazma ve idrar F2-izoprostan düzeyleri, *p <0,05	83
4.9. Silikozis ve kontrol gruplarına ait plazma ve idrar MDA düzeyleri, *p <0,05	84
4.10. Silikozis ve kontrol gruplarına ait plazma S1P düzeyleri, *p <0,001	85
4.11. Tez kapsamında ölçülen parametrelerin korelasyonları	87

## 1. GİRİŞ

Silika, silisyum dioksit ( $\text{SiO}_2$ ) moleküllerinin bileşiminden oluşan bir mineral olup yer kabuğunun ana bileşenlerinden biridir [1, 2]. Doğada yaygın olarak bulunması ve geniş kullanım alanı nedeniyle silika maruziyeti kaçınılmaz bir şekilde gerçekleşmektedir [3, 4]. Silikanın kristal formları, serbest silika olarak adlandırılmaktadır [5]. Kristal yapıya sahip olmayan ise amorf yapıdaki silika olup kristal olana kıyasla akciğer için toksik olmayan daha az fibrojenik özelliğindedir [2, 6, 7].

Silika içeren tozların uzun süreli ve fazla miktarda solunmasıyla akciğer dokusunda şiddetli ters reaksiyonlar ortaya çıkmakta, bu durum ilerleyici akciğer hastalıklarının oluşmasına neden olmaktadır [1]. Kristalin silika, Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (*International Agency for Research on Cancer, IARC*) tarafından insanda kesin karsinojen olduğu bilinen maddelerin yer aldığı Grup 1'de sınıflandırılmaktadır [3, 8]. Kristalin silikaya maruz kalma, akut silikozis, hızlandırılmış silikozis, kronik silikozis ve konglomera silikozis gibi olumsuz pulmoner yanıtlara neden olduğu gibi sklerodermi, romatoid artrit, sistemik lupus eritematoz, nefropati ve proliferatif glomerülonefrit gibi sistemik ve otoimmün hastalıkların ortaya çıkmasına da yol açabilmektedir [9-11].

Silikozis, kristalin silika tozuna genelde mesleki olarak maruz kalan bireylerin akciğerlerinde küçük, tipik olarak yuvarlak nodüllerin oluşumu olarak tanımlanmaktadır. Kristalin silikanın uzun süreli solunması ve akciğerde birikimi ile oluşan ilerleyici, ölümcül, geri döndürülemez ve tedavi edilemeyen fibrotik akciğer meslek hastalığı olarak da ifade edilmektedir [12, 13].

Silikozis de dahil pekçok akciğer patolojisinde oksidatif stresin rolü olduğu ifade edilmektedir [14]. Kristalin  $\text{SiO}_2$ 'nin yüzeyinde üretilen reaktif oksijen bileşiklerinin (ROB) indüklenmesiyle oksidatif stres tetiklenmektedir [15, 16]. ROB lipitlere, proteinlere ve nükleik asitlere saldırarak hücrel makromoleküllere zarar vermekte, yapısal hasarların oluşmasına neden olmaktadır.  $\text{SiO}_2$ 'ten kaynaklanan bu okside moleküller, hücrel metabolizmayı bozar ve hücrenin normal işlevlerini kaybetmesine yol açar [16, 17].

Hücre zarının önemli bir bileşeni olan kolesterol tüm memeli dokularında bulunur ve yapısı nedeniyle oksidasyona duyarlıdır. Hücre zarında da bulunan kolesterolün oksidasyonu sonucunda oksisteroller olarak bilinen oksidasyon ürünleri oluşmaktadır. Oksisteroller, yapısal olarak kolesterole benzemekle birlikte kolesterolden farklı olarak A veya B halkaları veya yan zincirinde bir veya daha fazla oksijen içeren fonksiyonel grup içermektedir [18, 19]. Enzimatik ve enzimatik olmayan yolla olmak üzere iki farklı yoldan meydana gelebilmektedir. Enzimatik olmayan (oto-oksidadasyon) yolla oluşan oksisterol türevleri, kolesterolün ROB ve reaktif azot bileşikleri (RNB) aracılığı ile oto-oksidadasyona uğraması sonucunda oluşmaktadır. Memeli dokularında çok düşük konsantrasyonlarda bulunan oksisteroller, patolojik durumlarda dokularda yüksek düzeylere ulaşabilmektedir [20, 21].

Oto-oksidadasyon yolu ile oluşan oksisterollerin, ateroskleroz, nörolojik hastalıklar ve kanser gibi hastalıkların patogeneğinde rol oynadıkları yapılan çalışmalarla gösterilmiştir [18, 19, 22].

Oksisterol türevlerinin mesleki hastalıkları da içeren pekçok inflamatuvar hastalıkla ilişkili olması, belli maruziyetler sonucunda oluşabilecek akciğer kanseri, silikozis gibi pnömokonyozlar için biyobelirteç olarak kullanılabilceğini düşündürmektedir. Yapılan literatür taramasında daha önce bu hasta grubunda oksisterol düzeylerinin değerlendirildiği bilimsel bir makaleye rastlanmamıştır. Dolayısıyla, çalışmanın bir ön çalışma olması söz konusudur.

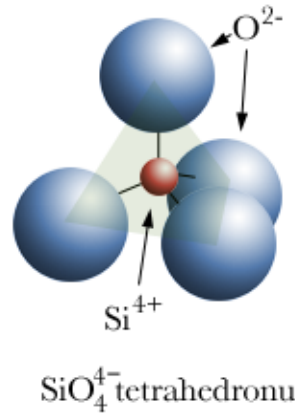
Bu tez çalışması ile silikozis hastalarında kolesterol oksidasyonunun rolünün, oto-oksidadasyon ile oluşan oksisterol düzeylerinin ölçülerek değerlendirilmesi; sfingolipitlerin metabolizması ile oluşan polar bir metabolit olan ve hücre zarının akışkanlığının düzenlenmesinde yapısal olarak önemli rol oynayan sfingozin-1-fosfat (S1P) düzeylerinin tespit edilmesi ve hastalıkla ilişkilendirilmesi; söz konusu parametrelerin yanısıra indüklenmesi olası lipid peroksidasyonunun da 4-hidroksinonenal (4-HNE), F2-izoprostan (F2-iP), malondialdehit (MDA) düzeylerinin ölçülerek belirlenmesi amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Silikanın Genel Özellikleri ve Silikozis

#### 2.1.1. Silikanın Genel Özellikleri

Silika, silisyum dioksit veya silikon dioksit olarak da adlandırılan, yüksek ısı ve basınç altında silikon (silisyum) ve oksijenden oluşan bir moleküldür. Yeryüzünde kristal ve amorf olmak üzere iki formu olan ve en fazla bulunan mineraldir (Şekil 2.2) [6]. Silikanın kristal formları, diğerlerinden ayrılabilmesi amacıyla "serbest silika" olarak adlandırılmaktadır [5]. Amorf yapıdaki silika, kristal yapıya sahip değildir ve kristal formdakine kıyasla akciğer için toksik olmayan daha az fibrojenik özelliktedir [2, 6, 7].

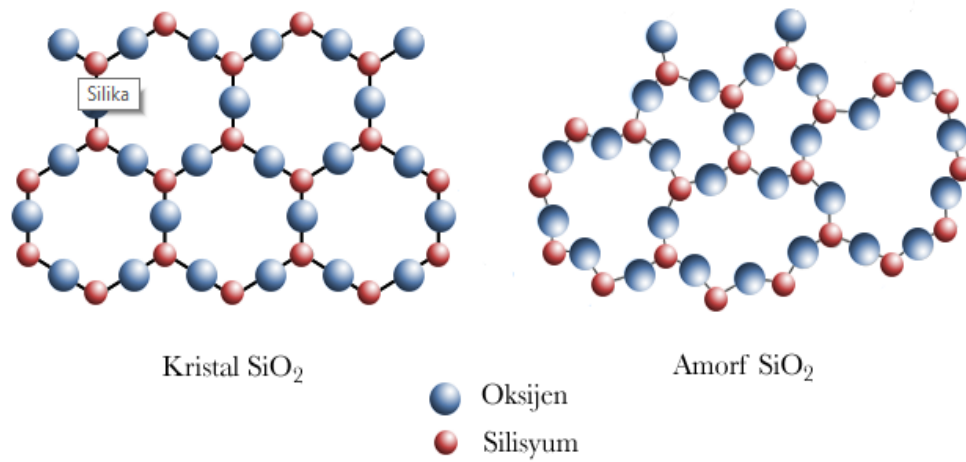


Şekil 2.1. Silisyum dioksit [23].

Kristalin silika; merkez atomunda silisyum ve köşelerinde oksijen barındıran tetrahedral bir yapıya sahiptir (Şekil 2.1). Kristalin silikada bulunan iki komşu tetrahedron iki oksijen atomunu paylaşır [6]. Serbest silikanın beş polimorfu bulunmaktadır: kuvarz, tridimit, kristobalit, koesit ve sistovit'tir [7, 11]. Sistovit, saf kristalin silikanın oktahedral yapısından ayırt edilen başka bir polimorfudur. Volkanik kayalarda ise kristobalit ve tridimit formları bulunmaktadır [6]. Bu polimorflar arasındaki yapısal farklılıklar biyolojik reaktiviteleri için önemli olarak kabul edilmektedir ve aktivite sıralaması; kuvarz> tridimit> kristobalit> koesit> sistovit şeklindedir [11]. Bütün bu polimorflar fibrojeniktir ve sağlık üzerine toksik

etkileri bulunmaktadır. Mesleki maruziyetlerin çoğunda en yaygın olarak görülen kuvartz silikadır [7, 11].

Silika, bir kum taneciğine kıyasla çok daha küçük parçacıklara sahiptir. Solunabilir formdaki silika, 10  $\mu\text{m}$ 'den daha küçük çapa sahip parçacıklardan oluşmaktadır. Oldukça küçük olan bu parçacıklar, burun ve boğazda daha az oranda tutulmaktadır ve doğrudan akciğerlere ulaşma olasılıkları daha yüksektir [2]. Kristalin silika, 1997 yılında, IARC tarafından insanlar için grup 1 karsinojen olarak sınıflandırılmıştır [6, 24].



**Şekil 2.2.** Kristalin ve amorf formundaki silisyum dioksit [23].

Su varlığında, silikanın yüzeyi, silanol gruplarını (-SiOH) oluşturmak üzere hidratlanmaktadır. Kristalin silikanın biyolojik membranlara yüksek reaktivite göstermesinin, bu yüzey silanol gruplarının özelliklerinden kaynaklandığı düşünülmektedir [11]. Söz konusu reaktivite farklı teorilerle açıklanmaktadır. İlk teori, -SiOH gruplarının hidrojen donörleri olarak, çoğu biyolojik makromolekülün sahip olduğu oksijen veya azot üzerindeki hidrojen alıcıları olan yalnız çift elektronları ile etkileşime girmesidir. Silika ve biyolojik membranlar arasında hidrojen bağlarının oluşumu güçlü bir etkileşime ve dolayısıyla olası hasara neden olur [11]. İkinci bir teori, silikanın yüzeyinin negatif yüklü olmasıdır. pH 7.0'de, 30 - SiOH grubundan 1'i negatif yüklüdür (-SiO<sup>-</sup>). Negatif yüklü silika partikülleri alveoler makrofajlar üzerindeki radikal süpürücü reseptörler ile kuvvetle reaksiyona girecek ve ROB ve inflamatuvar sitokinlerin oluşumunu aktive eder [11, 25, 26]. Üçüncü bir teori ise silika öğütme, kaya delme ve kumlama iş alanlarında meydana

gelen silis kristali aracılığı ile silisyum ve silikon monooksit radikalleri (Si• ve SiO•) oluşması ve bunların da oksidatif hasarı tetiklemedir [25, 27, 28].

### 2.1.2. Silika Maruziyeti

SiO<sub>2</sub>, yer kabuğunun temel bileşeni olup, yaklaşık olarak %90'ını oluşturmaktadır ve farklı kayalar (kum taşı, granit, arduvaz taşı gibi) içerisinde %20'den %100'e kadar değişen oranlarda bulunmaktadır [5]. Kristalin silikaya çevresel maruziyet, toprakta fazla miktarda bulunması nedeniyle yaygındır. Silika, kurak, rüzgarlı hava koşullarında veya tarım, şehir ve inşaat faaliyetleri sırasında havaya karışabilmektedir. Çiftlik hayvanlarının ve insanların akciğerlerinde, çevresel silika ve solunan havadaki karışık toz maruziyetine bağlı olarak akciğer fibrozu ve pulmoner değişiklikler gözlenmiştir [11, 29].

İş Güvenliği ve Sağlığı İdaresi (*Occupational Safety and Health Administration*, OSHA)'ya göre, işçilerin beton, duvar, fayans ve kaya gibi silika içeren malzemeleri kesme, zımparalama, ezme veya delme işlemleri sırasında da maruz kalma söz konusu olmaktadır [2]. Madenler, taş ocakları, sondaj çalışmaları, tünel çalışmaları ve kumlama yapılan iş yerlerinde de silika partiküllerine solunum yoluyla maruz kalınmaktadır. İnşaat işçilerinde, çimento ve beton üretiminde, cam imalatında, yol yapımında, çömlek yapımında, döküm işlerinde, dış laboratuvarlarında ve tarımla uğraşanlar da silikaya maruziyet açısından risk grubudur [5]. Tablo 2.1'de, silika maruziyetinin söz konusu olduğu bazı meslek gruplarının ve endüstri alanlarının listesi sunulmaktadır.



**Tablo 2.1.** Mesleki ve Endüstriyel Silika Maruziyeti [2].

MESLEK GRUPLARI	ENDÜSTRİ
Kumlama/Taşlama	Gemi Yapımı, Demircilik, İnşaat / Boyama (Boyalı Yüzeylerin Temizlenmesi)
Madenci	Yeraltı Madenciliği
Değirmenci	Silika Unu Değirmenleri
Seramik İşçisi	Çömlekçilik Ve Seramik
Camcı	Cam Üretimi
Granit Ocağı İşçisi	Ocaklarda Madencilik
Kum Taşlama	Endüstriyel Kum
Taş Taşlama	Granit Endüstrisi (Anıtlar)
Dökme, Silkeleme, Püskürtme	Dökümhane

Dünya genelinde, mesleki yolla silikaya maruz kalan milyonlarca işçinin var olduğu tahmin edilmektedir [2]. Silika içeren kumun birçok işlemde kullanıma uygun olması ve ucuzluğu nedeniyle kristalin silikaya maruziyet tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de oldukça yaygındır [5]. Silika maruziyetinin olduğu birçok meslek grubu ve endüstri alanı bilinmekle birlikte yeni maruz kalma durumları oluşmaya devam etmektedir. Örneğin, petrol ve gaz kuyularının hidrolik kırılmasından (parçalanmasından) oluşan silika maruziyeti son dönemde belirlenen yollardan biridir [2].

Solunan havada bulunan kristalin silika seviyelerinin sınırlandırılması için çeşitli standartlar mevcuttur. İş Güvenliği ve Sağlığı İdaresi, 8 saatlik bir çalışma süresi içinde silika maruziyeti için izin verilebilir maruz kalma sınırını (*permissible exposure limit*, PEL),  $100 \mu\text{g}/\text{m}^3$  olarak belirlemiştir. Haftada 40 saatlik çalışıldığında ise Mesleki Güvenlik ve Sağlık Enstitüsü (*National Institute for Occupational Safety and Health*, NIOSH)'ne göre önerilen maruz kalma sınırı (*recommended exposure limit*, REL) 1 günde 10 saat için  $50 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 'tür. Amerikan Hükümeti Endüstri Hijyenistleri Konferansı (*The American Conference of Governmental Industrial Hygienists*) izin verilen eşik sınırı  $100 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 'tür. Kaya

delme ve taşlama gibi mesleklerde ölçülen solunabilir kristalin silika seviyeleri, genellikle bu standartları aşmaktadır [11].

## 2.2. Silikannın İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri

Silika, pekçok maddenin toksisitesinde olduğu gibi maruz kalınan dozu, sıklığı ve süresi ile ilişkili olarak doku reaksiyonlarına neden olmaktadır [30, 31]. Solunum yoluyla silikaya maruziyet; akciğer fonksiyonunun azalması, kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOA) ve silikozisin de dahil olduğu yerleşmiş pnömokonyozlar gibi farklı hastalıklar ve çeşitli formları ile ilişkilendirilmiştir [6].

### 2.2.1. Pnömokonyozlar

Pnömokonyozlar, iş yerlerinde (genellikle) inorganik tozların solunmasından kaynaklanan parankimal akciğer hastalıklarıdır. Biyolojik olarak inert durumda olmalarına rağmen bu tür toz maddeler, göğüs röntgeni veya bilgisayarlı tomografi (*Computed Tomography, CT*) taramasında görülebilmekte ve radyolojik olarak endişe verici durumlara neden olabilmektedir. İntert olmaları nedeniyle hem klinik hastalıklara hem de solunum fonksiyonlarındaki bozukluklara doğrudan yol açmazlar. Özellikle asbest ve kristalin silika başta olmak üzere diğer toz maddeler fibrojeniktir ve bu nedenle sebep oldukları hasar, tozun kendisinden ziyade solunmasıyla indüklenen fibrozdan kaynaklanmaktadır. Klasik olarak bu özellikler, karakteristik radyolojik bulgulara ve akciğer fonksiyonunda kayıplara yol açar; daha da önemlisi, hasara neden olan minerallere maruz kalınma durumu ortadan kalksa da hasarın daha sonra ilerlemesi devam edebilir [32].

Pnömokonyozun tipik olarak çevresel ve mesleki nedenlerinin başlıcaları silika parçacıkları ve asbest lifleri olarak bilinmektedir [32-34]. Pnömokonyozlu hastalar, kronik bronşit, amfizem ve akciğer fibrozu gibi solunum komplikasyonları yanı sıra, silikozis hastalarında genellikle komplike otoimmün hastalıklar ve asbeste maruz kalan hastalarda ise plevral mezotelyoma ve akciğer kanseri gibi malign hastalıklar ortaya çıkabilmektedir [33]. Birleşik Krallık'ta ve benzer ülkelerde asbest, pnömokonyozun en yaygın şeklidir. Bunların dışında, daha nadir görülen pnömokonyoz tipleri arasında kalay (kalay dumanından), siderosis (demir),

berylliosis (berilyum), sert metal hastalığı (kobalt) ve kömür işçisi pnömokonyozu yer almaktadır [32].

### 2.2.2. Silikozis

Mesleki olarak silika maruziyeti, küresel olarak tüm dünyayı ilgilendiren bir sorundur. Çoğu kaya türünde, özellikle granitler, kumtaşları, kum ve topraklarda bulunan silika kuvarz özelliindedir. Kuvarz içeren malzemelerin geniş kullanımından dolayı, işçiler çok çeşitli endüstri alanlarında mesleki olarak silikaya solunum yoluyla maruz kalmaktadır [6].

Silikozis, kristalin silika tozuna maruz kalan insanların akciğerlerinde küçük, tipik olarak yuvarlak nodüllerin oluşumu olarak tanımlanmaktadır. Kristalin silikanın uzun süreli solunması ve akciğerde birikmesinden kaynaklanan potansiyel olarak ilerleyici, ölümcül, geri döndürülemez ve tedavi edilemeyen fibrotik akciğer meslek hastalığı olarak da ifade edilmektedir [12, 13]. Hastalığın şiddeti, solunan materyal ve maruziyetin yoğunluğu ve süresi ile ilgilidir [35].

Kristalin  $\text{SiO}_2$  parçacıklarının boyutu yeterince küçükse ( $<10 \mu\text{m}$ ), akciğerlerin distal kısımlarına ulaşabildiğinden akut silikozis, hızlandırılmış silikozis, kronik silikozis ve konglomera silikozis gibi olumsuz pulmoner yanıtlara neden olabilir [2, 9, 11].

Silikozis, sıklıkla pulmoner ödem, zatürre veya tüberküloz ile karıştırılarak yanlış teşhis edilebilmektedir [35, 36]. Silikozis ile görülebilen tipik otoimmün hastalıklar arasında romatoid artrit (Caplan sendromu olarak da bilinir), sistemik lupus eritematoz (Sistemik Lupus Eritematozus, SLE), sistemik skleroz ve anti-nötrofil sitoplazmik antikor (*Antineutrophil Cytoplasmic Antibody*, ANCA) ile ilişkili vaskülit sayılabilmektedir [33, 37]. Kristal yapıdaki silika tozlarının solunması, akciğerde birikmesi ve akciğerlerde bu tozlara karşı oluşan reaksiyon sonucu fibrozis riski artar [5, 38, 39]. Tüberküloz, sıklıkla silikozisin şiddetlendiği durumlarda görülen bir komplikasyonudur [40]. Silika maruziyeti olan deney hayvanlarında ve maruz kalan insan popülasyonlarında akciğer tümörü oluşumunun arttığı, silikozis ve akciğer kanseri arasında olası bir ilişki olduğu belirlenmiştir [11, 36, 41].

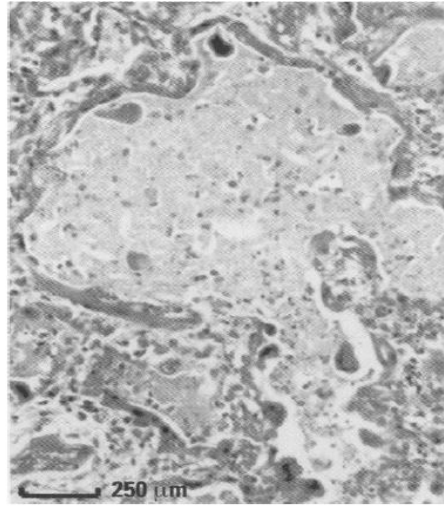
Silikozisin önlenmesinin en iyi yolu, kristalin silika tozu üreten iş yerlerinin belirlenmesi ve tozun elimine edilmesi için gerekli önlemlerin alınması veya düzenli kontrol edilmesidir [35, 36]. Türkiye'de her yıl yeni teşhis edilen çok sayıda vaka bulunmaktadır. Silika tozuna mesleki maruziyet, özellikle gelişmekte olan ülkelerde önemli bir sağlık sorunu olarak kabul edilir [4, 42].

### **I. Akut Silikozis**

Akut silikozis (silicolipoproteinosis), kısa sürede yüksek konsantrasyonda silikaya maruz kalma nedeniyle ortaya çıkmaktadır [11]. Birkaç aydan 5 yıla kadar olan süre içinde yoğun silika maruziyeti sonrasında gelişmektedir [5]. Taşlama, yüzey delme, tünel açma, silis unu öğütme ve seramik yapımı gibi mesleklerde görüldüğü rapor edilmiştir. Morfolojik olarak hastalık, pulmoner ödem, interstisyel inflamasyon ve akciğer alveollerinde sentezlenen surfaktandan zengin proteinli sıvının birikimi ile karakterizedir [10, 11]. Alveolde eozinofilik bir sıvı birikimi vardır ve ince granüler bir görünüme sahiptir (Şekil 2.3). Radyografik olarak, göğüs X ışınları ile orta ve alt loblarda difüze lezyonlar ile buzlu cam şeklinde puslu bir görünüm elde edilir. Hastalar sıklıkla yorgunluk, öksürük, kilo kaybı, azalmış solunum fonksiyonlarından şikayet etmektedir. Sıklıkla mikobakteriyel enfeksiyonların eşlik ettiği siyanoz ve solunum yetmezliği de gelişebilmektedir. Akut silikozisin genelde taze silika tozuna maruz kalan işçilerde ortaya çıktığı ve kırılma sırasında ortaya çıkan Si• ve SiO• radikallerinin bu hastalığın başlamasını hızlandırmada önemli rol oynadıkları öne sürülmüştür [11].

Silikozis ile tüberküloz arasındaki ilişki uzun zamandır bilinmektedir. Tüberküloz tüm silikozis formlarında görülebilmesine karşın, silikozisin gelişmediği olgularda da silika maruziyeti bulunması tüberküloza yatkınlık oluşturabilmektedir. *Mycobacteria tuberculosis* en sık görülen etkidir. Nontüberküloz (atipik) mikobakterilerle de görülebilir [5]. Silikaya maruz kalan bireylerde yüksek mikobakteriyel enfeksiyon riski dikkat çekmektedir [43]. Kristalin silikanın alveoler makrofajların *Mycobacteria tuberculosis*'i öldürme kabiliyeti üzerindeki depresan etkisi deneysel çalışmalarda doğrulanmıştır. Silikozisin, lenfosit alt gruplarında ve serum immünoglobulin seviyelerindeki değişikliklerle hücre aracılı immünitede bir azalmaya yol açtığına inanılmaktadır [11]. *Mycobacterium tuberculosis* ile infekte

kişilerde hastalık gelişmesini etkileyen çeşitli faktörler arasında, insan immün yetmezlik virüsü (*Human Immunodeficiency Virus*, HIV) pozitif olanlar, intravenöz ilaç alışkanlığı, silikozis, diabetes mellitus, kronik renal yetmezlik, gastrektomi, transplantasyon yapılmış kişi, kanser hastaları sayılabilmekte olup bu kişilerde yaşlılık, çocukluk ve adolesan dönemlerinde aktif tüberküloz hastalığı riskinin arttığı gösterilmiştir [44]. Silikaya maruz kalma, Güney Afrika ve dünyanın diğer düşük gelirli bölgelerinde ciddi tüberküloz salgınlarına da katkıda bulunmaktadır. Akciğer ve ekstrapulmoner (akciğer dışı) tüberkülozunun riskindeki artış, silika maruziyet dursa bile ömür boyu sürmektedir. Akut ve hızlandırılmış silikozisli hastalarda risk daha yüksektir [43].



**Şekil 2.3.** Alveoler boşluklarda granüler eozinofilik eksüda ve interstisiyel inflamatuvar infiltrasyon gösteren akut silikozis [11].

## II. Hızlandırılmış (Akselere) Silikozis

Hızlandırılmış silikozis, silika unu eldesinde, taşlama ve diğer ezme işlemlerinde çalışanlarda meydana gelebilecek ağır maruziyet sonucu oluşabilmektedir [10, 11, 45]. Kronik forma göre daha yoğun ve kısa süreli (5-10 yıl) maruziyet sonrası ortaya çıkar [5]. Kronik inflamasyona bağlı olarak alveoller lipoproteinöz bir sıvı ile dolar akut silikozise pek çok açıdan benzerdir. Ek olarak, hızlandırılmış silikozis, kolajen, retikülin ve çok sayıda silika partikülü içeren fibrotik granülom oluşumuyla ilişkilidir. Granülomlar, çok sayıda tek çekirdekli hücre, fibroblast ve kollajen liflerinden oluşmakta ve olgunlaşmamış silikotik nodüllerin özelliğini içeren dairesel yapılar göstermektedir [10, 11]. Alveoler septa,

artan sayıda lamellar gövdeli hipertrofik ve hiperplastik alveoler tip II epitel hücreleri ile kaplıdır [11].

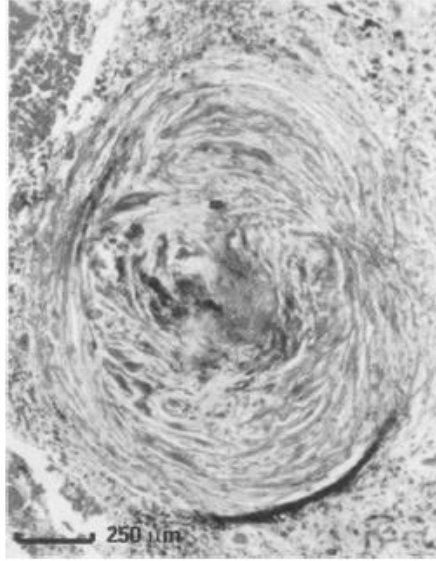
Hızlandırılmış silikoziste, akciğer fonksiyonlarında bozulma daha hızlı gelişmektedir. Hastalıkla birlikte mikobakteriyel enfeksiyon gelişimini tetiklenebilir. Skleroderma, romatoid artrit veya sistemik lupus gibi otoimmün hastalıklarla ilgili bulgular bu tipte daha sık görülmektedir. Otoimmün hastalık tablosu oluştuğunda radyolojik anomaliliklerin ilerlemesi ve fonksiyonel bozulma çok daha hızlı olabilir [5]. Akut ve hızlandırılmış silikozis morbidite ve mortalite riskinde artış görülmektedir [11].

### III. Kronik Silikozis

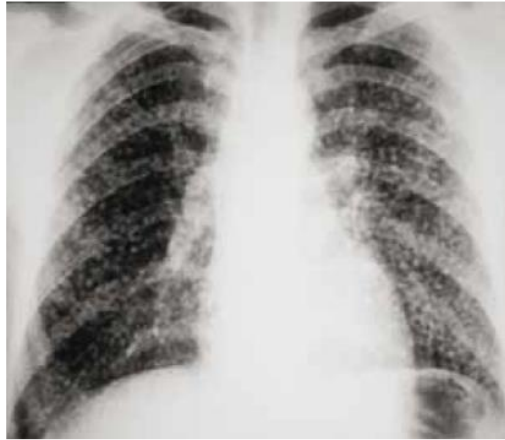
Kronik silikozis, uzun bir süre semptomsuz seyredabilen bir silikozis türüdür [32]. Çoğunlukla belirti vermeksizin ilerleyen bir hastalıktır ve belirtiler oluşmaya başladığında ilk olarak egzersize bağlı dispne veya öksürük görülür. Maruziyet başlangıcından 10 yıl sonra ortaya çıkan silikozis tablosu "kronik (klasik) silikozis" olarak isimlendirilmektedir ve silikozisin en sık görülen tipidir [5, 32].

Kristalin silikanın uzun süre solunması ile tipik histolojik görünüm olan amorf merkez, konsantrik olarak organize edilmiş hiyalinize kolajen lifleri ile çevrili olan klasik fibrotik nodüllerin oluşumunu tetikler. Çevresinde de inflamatuvar hücre örtüsü bulunur (Mason'un trikrom boyaması) (Şekil 2.4). Kolajenin helezonik lifleri ile tipik eş merkezli silikotik lezyonlar, kristalin silikanın inhalasyonu ile insanlarda üretilen silikotik lezyonların özelliğidir ve diğer mesleki inorganik maruziyetlere bağlı olarak oluşan lezyonlardan morfolojik olarak farklıdır [10, 11]. Nodüllerde değişken derecelerde kalsifikasyon ve nekroz gözlenebilir. Toz partiküllerini içeren makrofajlar, fibroblastlar ve lenfositler genellikle nodüllerin çevresiyle sınırlıdır. Mikroskobik olarak, bitişik akciğer parankiminden keskin bir şekilde ayrılan silikozis lezyonları genellikle boyut olarak birkaç milimetre ile birkaç santimetre arasında değişmektedir. Nodüller çoğunlukla, baskın olarak akciğerlerin üst bölgelerinde ve subplevral bölgelerde bulunmaktadır [11]. Radyolojik açıdan genellikle üst akciğer zonlarında yuvarlak, küçük opasiteler (<10 mm) görülür (Şekil 2.5). Bu opasiteler "silikotik nodül" olarak adlandırılır [5]. Kronik silikozis

ilerledikçe, statik akciğer hacimlerindeki azalmalar ile görülen solunum fonksiyon bozuklukları ve gaz değişimi değişiklikleri belirginleşmektedir [11].



**Şekil 2.4.** Kronik silikotik nodül lezyonun karakteristik özelliklerini gösteren silikozis olgusu [11].



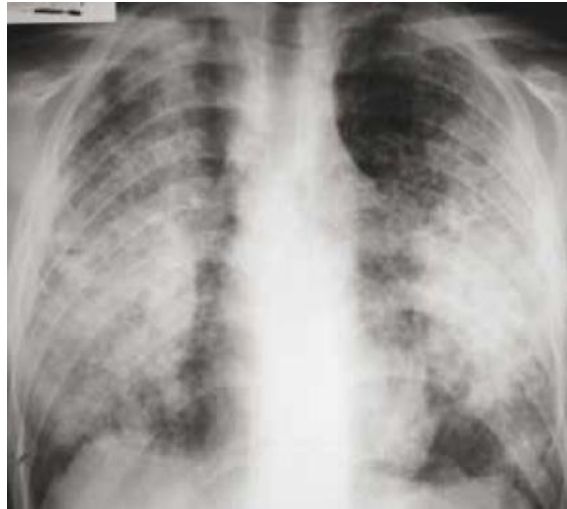
**Şekil 2.5.** Yuvarlak nodüler opasitelerin görüldüğü bir silikozis olgusu [5].

#### **IV. Konglomere Silikozis**

Bu silikozis tipinde, silikotik nodüller birleşerek akciğer grafisinde daha büyük bir opasite (>10 mm) şeklinde görülebilir [5]. Konglomera silikozis, birkaç küçük nodülün birleşmesinden ve aglomerasyonundan kaynaklanmaktadır [11]. Bu şekilde opasitelerin büyümesi ile oluşan "komplike silikozis" veya "konglomere silikozis" olarak da adlandırılan bu tabloya "progresif masif fibrozis (PMF)" de

denilmektedir [5]. Nodüllerin genişlemesine ek olarak, nodüler lezyonların sayısı artmakta ve progresif masif fibrozis ortaya çıkmaktadır. Akciğer boşluğu, bronşiyoller ve kan damarları dahil olmak üzere akciğer parankiminde yaygın hücre ölümü, PMF ile sık görülen bir durumdur. Uluslararası Çalışma Ofisi (*International Labour Organization*, ILO), bir PMF lezyonunu, 1 cm veya daha büyük radyografik boyut olarak tanımlamıştır. Silikozis ve Silikat Hastalıkları Komitesi ise bir PMF lezyonunu 2 cm'den daha büyük bir lezyon olarak ifade etmektedir [11]. Genel olarak, akciğer grafisinde 1 cm ve üzeri opasitelerle karakterize bir durum olarak kabul edilmektedir. Bu opasiteler bazen büyüyerek hemitoraksın tamamını kaplayabilmektedir (Şekil 2.6 ve Şekil 2.7) [5].

Bu hastalarda efor dispnesi belirginleşmektedir ve karbonmonoksit difüzyon kapasitesi düşmektedir. Hem egzersizde hem de istirahatte parsiyel oksijen basıncında azalma ve spirometrede restriktif tipte bozukluk görülebilmektedir. Silikozis gelişimi yanında toz maruziyeti sonucu gelişen bronşit veya bronşiyal ağacın distorsiyonu, prodüktif öksürüğe ve solunumun kısıtlanmasına neden olabilir. Kilo kaybı ile birlikte büyük opasitelerin kaviteleşmesi, tüberküloz veya diğer mikobakteriyel enfeksiyonları akla getirmelidir. Tekrarlayan bakteriyel enfeksiyonlar görülebilir. Pnömotoraks gelişimi yaşamı tehdit edici boyutlara ulaşabilir. Çünkü fibrozis nedeniyle akciğerin yeniden genişlemesi zorlaşmaktadır. Hipoksemik solunum yetmezliği ve konjestif kalp yetmezliği terminal dönemde sıklıkla rastlanan durumlardır [5].



**Şekil 2.6.** C tip büyük opasiteleri olan komplike bir silikozis olgusu [5].





**Şekil 2.7.** Silikozis; birçok küçük pulmoner nodülü gösterir ve progresif masif fibrozis ile uyumlu düzensiz konglomera kitlelerinin varlığını doğrular [32].

### 2.2.3. Silika Patogenezinin Olası Mekanizmaları

İnterstisyel akciğer hastalığı, silikaya maruziyetin yol açtığı fibrotik etkinin aktivasyonu ve akciğerlere verilen hasar ile bağlantılı olarak ortaya çıkan doku hasarıdır. Bu hasar ve hasar oluşum döngüsünün oluşumu aşağıdaki mekanizmalar ile açıklanmaktadır [11, 25, 26]:

**a. Doğrudan sitotoksiste:** Silika sahip olduğu kimyasal özelliği sayesinde akciğer hücreleri ile reaksiyona girerek, hücre membran lipitlerinin peroksidasyonuna neden olur ve hücre bütünlüğü zarar görür. Hasarlı hücrelerden hücre içindeli lizis enzimlerinin salınmasına neden olabilir ve bu durum daha fazla dokunun hasarlanmasıyla alveoler septanın bozulmasına yol açabilir [11].

Nash ve arkadaşları, kristalin silikanın yüzeyindeki SiOH gruplarının membran bileşenleri ile hidrojen bağları oluşturabildiğini ve bunun da membran hasarı ve hücre içeriğinde sızıntıya yol açtığını ileri sürmüştür. [46].

Nolan ve arkadaşları SiO<sup>-</sup> gruplarının negatif yüzey yükünün sitotoksiste için kritik olduğunu öne sürmüşlerdir [47]. Bu negatif yük nedeniyle silika; alveoler makrofajlar üzerinde bulunan tutucu reseptörlerle etkileşime girmektedir [48, 49]. Kuvartz yüzeyinin alüminyum tuzları ile nötrleştirilmesi, sitotoksisteyi önemli ölçüde azaltmıştır [50].

Silikanın öğütülmesi, kırılma düzlemleri üzerinde Si• ve SiO• radikallerinin oluşmasıyla sonuçlanmaktadır [27, 51]. Bu yüzey radikallerinin, sulu çözeltilerinden hidroksil radikalleri (OH•) ürettiği ve bu nedenle lipit peroksidasyonuna, *in vitro*

sitotoksositeye neden olduğu belirtilmektedir [27]. Benzer bir ilişki *in vivo* olarak da gösterilmiştir [28]. Yüzey demirinin de silikanın indüklediği OH• radikal üretimini ve sitotoksitesini hem *in vitro* hem de *in vivo* arttırmada önemli bir rol oynadığı ifade edilmektedir [27, 52]. *In vitro* çalışmalar, silikanın lipit peroksidasyonu, hemoliz, alveoler makrofajlardan laktat dehidrogenaz (LDH) salınımının yanında apoptoz üzerine etkilerini göstermiştir. Aynı şekilde yapılan *in vivo* çalışmalar ile de lipit peroksidasyonu, lavaj enzim seviyeleri, lavaj protein, lavaj kırmızı kan hücresi, lavaj laktat dehidrogenaz ile doğrudan sistotoksik etkisi gösterilmiştir [11].

**b. Alveoler makrofajlar ile oksidan oluşumunun aktivasyonu:** Silika, alveoler makrofajlardan lipid peroksidasyonuna ve hücre hasarına neden olan ROB oluşumunu uyarır ve akciğerlerin antioksidan savunmasını baskılar. Bu tür hasar alveoler septanın hasarlanmasına veya bozulmasına yol açabilir [11].

Alveoler makrofajlardan ROB'nin (süperoksit, hidrojen peroksit, nitrik oksit) üretimi, hücre hasarı ve sonucunda akciğer hastalıkları ile ilişkilidir [53]. Gerçekten de, pulmoner fagositlerin oksidan üretimi ile akciğer hasarı ve pnömokonyozun şiddeti arasında ilişki olduğu bildirilmiştir [11, 54]. Yapılan *in vitro* çalışmalar süperoksit anyonu (O<sub>2</sub>•), hidrojen peroksit'in üretimi görülmüş ve kemilüminesans izlenmiştir; *in vivo* hayvan çalışmalarında hidrojen peroksit ve nitrik oksit'in oluşumu ile silika maruziyeti ile kemilüminesans gözlenmiştir. Silikozis hastalarında yapılan çalışma ile de süperoksit anyonlarının, hidrojen peroksit ve nitrik oksit seviyelerinin yüksek olduğu gösterilmiştir [11].

Alveoler makrofajlardan oksidan türlerin üretimi için beklemiş silikaya göre taze olarak kırılmış silika yüzey radikalleri daha güçlü bir uyarıcıdır. Taze silika tozunun bu etkisi, hem *in vitro* olarak hücre kültüründe hem de *in vivo* sıçanda alveoler makrofajların inhalasyon maruziyetiyle gösterilmiştir [55, 56]. Benzer şekilde, taze silikaya maruz kalan ve akut silikozis tanısı konan bir kaya delme işçisinin akciğerinde radikallere bağlı son derece yüksek seviyede kemilüminesans izlenmiştir [57].

**c. Alveoler makrofajlardan ve/veya alveoler epitel hücrelerinden inflamatuvar sitokin ve kemokinlerin sekresyonunun uyarılması:** Bu inflamatuvar mediatörler polimorfonükleer lökositleri (PMN'ler) ve pulmoner kılcallardan makrofajları hava

boşluklarına almak için kemoatraktanlar olarak hareket etmektedir. Bu sitokinler, ayrıca pulmoner fagositik oksidan türlerini aktive ederek doku hasarına neden olmaktadır [11].

Yapılan çalışmalar, oksidatif stresin nükleer transkripsiyon faktörü olan nükleer faktör kappa B (NF- $\kappa$ B)'yi aktive edebildiğini göstermektedir [58]. Veriler silikanın deoksiribo nükleik asit (DNA)'e NF- $\kappa$ B bağlanmasını stimüle edebileceğini göstermektedir [59]. Çeşitli gen promotörlerine bu tür bir bağlanma, inflamatuvar sitokinler için haberci ribo nükleik asit (mRNA) üretimine neden olabilmektedir. Son araştırmalarda, başka bir transkripsiyon faktörü olan aktivatör protein-1'in silika ile indüklenen aktivasyonunun da inflamatuvar sitokinlerin düzenlenmesinde önemli bir rol oynayabileceğini göstermektedir [60].

Akciğerin yoğun ve uzun süreli inflamasyonu, pulmoner hastalıkların gelişimi ile ilişkilidir. Sıçanların silikaya maruz bırakıldığı çalışmalarda, pulmoner kapillerlerden alveoler hava boşluklarına PMN'lerin alındığı, silika kaynaklı akciğer hastalığının başladığı ve ilerlediği gösterilmiştir [56, 61-63]. Sitotoksik cevaplarda olduğu gibi, pulmoner inflamasyonun derecesi silika partiküllerinin radikal üretme kabiliyeti ile de ilişkilendirilmiştir. Yeni kırılmış silika daha fazla yüzey radikali oluşumunu tetiklemiş ve beklemiş silikadan daha fazla PMN alımına neden olmuştur [28, 56]. PMN alımının ayrıca insanlarda akut silikozisin ayırt edici bir özelliği olduğu da belirlenmiştir [57].

Bu alveoler boşluklara fagositik hücrelerin alınması, alveoler makrofajlar ve alveoler tip II epitelyal hücreler tarafından partikül ile indüklenmiş kemotaktik sitokinlerin ve kemokinlerin üretimine verilen bir yanıtıdır [64]. Silika maruziyetine tepki olarak üretilen inflamatuvar sitokinler ve kemokinlerden platelet aktivasyon faktörü, lökotrien B<sub>4</sub>, tümör nekroz faktörü alfa (*tumor necrosis factor alfa*, TNF- $\alpha$ ) ve interlökin-1 (IL-1) üzerine yapılan *in vitro* çalışmalar ile bulunmaktadır. *In vivo* hayvan çalışmalarında da lökotrien B<sub>4</sub>, TNF- $\alpha$ , IL-1, prostaglandin E2 ve makrofaj inflamatuvar proteinin (MIP) üretildiği gösterilmiştir [11].

Lökotrien B<sub>4</sub>, platelet aktivasyon faktörü (PAF) ve IL-1; PMN'ler ve IL-1 lenfositleri için kimyasal bir yanıtıdır [11]. TNF- $\alpha$ ; MIP-1, MIP-2 ve sitokin kaynaklı nötrofil gibi güçlü kemokinlerin uyarıcısıdır [65]. TNF- $\alpha$ 'nın silikaya karşı inflamatuvar cevabının önemi, a) Silikaya maruz kalan sıçanlarda TNF- $\alpha$  üretimi ile

PMN alımının doğrusal bir ilişki göstermesiyle [66]; ve b) silikaya maruz bırakılan sıçanların anti-TNF- $\alpha$  ile tedavisi, PMN alımını önemli ölçüde hafifletmesiyle vurgulanmıştır [65].

Polimorfonükleer lökositleri alveoler boşluklara geçince, birçok inflamatuvar sitokin, fagositlerin oksidan üretimini uyarmak için harekete geçmektedir. Bu durum, akciğerdeki oksidan yükünü artırmakta, antioksidan savunmasını baskılamakta, akciğer hasarına, ve skarlaşmaya neden olmaktadır. Gerçekten de, PMN'ler tarafından ROB üretiminin aktivasyonunun, PAF, TNF- $\alpha$  ve IL-1'e yanıt olarak ortaya çıktığı gösterilmiştir [11, 66].

**d. Alveoler makrofajlardan ve/veya alveoler epitel hücrelerinden fibrojenik faktörlerin sekresyonunun uyarılması:** Fibrojenik faktörlerin salınımı, fibroblast proliferasyonunun induksiyonu ve/veya fibrozise yol açan kolajen sentezinin uyarılması ile sonuçlanır [11].

Alveoler makrofajlar tarafından üretilen pekçok sitokin, fibroblast büyümesi ve/veya kolajen sentezi üzerinde düzenleyici etkilere sahiptir. Fibrotik ve antifibrotik mediyatörler arasındaki denge değiştiğinde, pulmoner fibrozis gelişebilir. IL-1, TNF- $\alpha$ , trombosit kaynaklı büyüme faktörü (*platelet derived growth factor*, PDGF), fibronektin, alveoler makrofaj büyüme faktörü ve tip 1 insuline benzer büyüme faktörünün fibroblast proliferasyonunu arttırdığı bildirilmiştir. IL-1 de, kolajen üretiminin doğrudan uyarıcısı olarak tanımlanmaktadır. TNF- $\alpha$  sadece fibroblastlar için doğrudan proliferatif bir ajan değildir, aynı zamanda *in vitro* PDGF'nin sekresyonunu uyarır. Pulmoner fibroziste TNF- $\alpha$ 'nın kritik rolü, anti-TNF- $\alpha$ 'nın bir fare modelinde silikanın neden olduğu pulmoner fibrozisi önemli ölçüde azalttığının belirlenmesiyle gösterilmiştir [11].

IL-6 antifibrotik aktivite sergiler. Prostaglandin E<sub>2</sub> ve transforme edici büyüme faktörü beta (*transforming growth factor-beta*, TGF- $\beta$ ), hücre büyümesi üzerine depresif bir etki gösterir. Bununla birlikte, belirli koşullar altında, TGF- $\beta$ , *in vitro* olarak kolajen sentezini uyarabilir. Her ne kadar maruziyetin hem fibrojenik hem de antifibrojenik faktörleri uyardığı bildirilmişse de, bu durum fibrotik uyaranlara doğru kaymaktadır [11].

Silika kaynaklı akciğer hücrelerinden fibrojenik faktör TNF- $\alpha$ , IL-1 sekresyonunun arttığı *in vitro* çalışmalar ile gösterilmiştir. Ayrıca *in vivo* hayvan çalışmaları ile TNF- $\alpha$ , IL-1, fibronektin, TNF- $\beta$ , prostaglandin E<sub>2</sub> sekresyonu artmış olup silikozis hastalarında yapılan çalışmada fibronektin ve alveoler makrofaj kaynaklı büyüme faktörü salınımının attığı gösterilmiştir [11].

#### 2.2.4. Silikozis Tanısı, Hastalıktan Korunma ve İzleme

Silikozis tanısı için, maruz kalan kişinin maruziyet öyküsü ile birlikte akciğerde tipik radyolojik görünüm yeterlidir. Radyolojik özellikler net olmadığında veya maruziyet öyküsü bilinmediğinde tanı koyma ile ilgili problemler yaşanabilmektedir. Öksürük, hemoptizi, ateş veya kilo kaybı gibi komplikasyonlar ile silikozisi düşündüren semptomların varlığında diğer tanı yöntemleri kullanılabilir [5]. Tüberküloz şüphesi olan, ancak balgam incelemesi tanısal olmayan olgularda, PMF ve malignite ayırımında tanının klinik ve radyolojik nedenlerle belirsiz kalması durumunda akciğer biyopsisi yapılabilmektedir [32].

Silikozis tanısı için göğüs röntgen değerlendirmesi veya yüksek çözünürlüklü bilgisayarlı tomografi (*High resolution computed tomography*, HRCT) değerlendirmesi gibi farklı tarama yöntemleri kullanılmaktadır. Standart göğüs röntgeni değerlendirmesine kıyasla tarama için HRCT kullanılan çalışmalarda silikozis prevalansı daha yüksek çıkmaktadır [67-69].

Hastada silikozis belirlendiğinde, o kişinin yeniden silikaya maruz kalmasının önlenmesi büyük önem taşımaktadır. İşyerindeki maruziyetin ve kontrol önlemlerinin izlenmesinin yanında çalışanlar da silikanın sağlık etkileri açısından periyodik olarak izlenmelidir [5]. Silikozis, maruziyetin tamamen sona ermesi durumunda bile ilerleyici bir hastalık olduğu için daha ayrıntılı akciğer fonksiyon testleri ve akciğer grafileri dahil olmak üzere düzenli değerlendirme yapılmalıdır [32]. Bu şekilde izlenen işçilerde silikozis gelişse bile daha hafif seyrettiği görülmüştür. Ayrıca işverenlerin ve işçilerin silika tozuna maruziyetin tehlikeleri ve toz kontrol önlemleri konusunda eğitilmesi de gerekmektedir [5].

Riskli işlerde çalışanların izlenmesi ile birlikte korunma önlemlerinde önemli olduğu kanıtlanmıştır. İşlemlerin kapalı sistemle yapılması, ıslak kumlama, etkili havalandırma ve kişisel korunma tedbirlerinin alınması toz maruziyetini önemli

ölçüde azaltmaktadır. Silika kullanımını gereken işlerde, silika yerine daha az tehlikeli başka maddeler kullanılmalıdır [5, 30].

### **2.2.5. Silikozis Tedavisi**

Silikozis için etkili farmakolojik bir tedavi bulunmamaktadır [32]. Sigarayı bırakmak, silikanın bir karsinojen olması ve silikozis tanısı olan bireylerin akciğer kanseri riskinin artması nedeniyle özellikle önemlidir [32, 70, 71]. Silikozisli hastalarda tedavi doğrudan hastalığın komplikasyonlarına yönelik olmaktadır. Bu durumda, tedavi yaklaşımı diğer olgularda görülen hava akımı kısıtlanması, pnömotoraks, enfeksiyon, hipoksemi ve solunum yetmezliğinden farklı değildir. Hastalık ilerlediğinde semptomatik olarak tedavisi yapılır. Hipoksi oluşunca oksijen tedavisi, enfeksiyon geliştiğinde pnömoni için antibiyotik tedavisi başlanmalıdır. İlerlemesini yavaşlatmak için antioksidan takviyesi düşünülebilir. Bazı genç ve son dönem silikozisli olgularda akciğer veya akciğer/kalp transplantasyonu düşünülebilir [5].

### **2.2.6. Dünyada ve Türkiye'de Silikozis**

Daha önce de belirtildiği gibi silikozis, toprakta çok miktarda yer alması nedeniyle eski fakat hala yaşamı tehdit eden küresel bir meslek hastalığıdır. Ancak, silikozis riski gelişmekte olan ülkelerde daha yaygındır, çünkü mesleki sağlık ve güvenlik konuları genellikle ekonominin türü ve yapısıyla paralel ilerlemektedir. Yüksek işsizlik oranı ve para kazanmak için başka seçeneklerin olmaması, çoğu işçiyi, sağlık ile ilgili riskleri bilmesine rağmen o işte çalışmayı kabul etmeye zorlamaktadır [31, 72].

Silika ile ilişkili hastalıklar, yirmi birinci yüzyılda önemli bir halk sağlığı problemi olmaya devam etmektedir; çünkü kristalin silika, birçok ciddi hastalığa ve artan mortaliteye neden olan toksisite etkenlerinden biridir. Silika maruziyeti, Güney Afrika ve dünyanın diğer düşük gelirli bölgelerinde ciddi hastalıklara neden olmaktadır. Düşük gelirli ülkeler kadar yüksek gelirli ülkelerde de maruziyet yaygındır. Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'de en az 1,7 milyon işçi potansiyel olarak maruz kalmakta ve bazı sektörlerde yaklaşık 119000 kişi aşırı derecede silikaya maruz kalmaktadır. Hindistan (yaklaşık 3 milyon işçi ile birlikte), Çin ve

Brezilya gibi düşük ve orta gelirli ülkelerde milyonlarca işçi maruziyet altındadır. Güney Afrika benzeri madencilikğin önemli olduğu ülkelerdeki işçiler özellikle silika ile ilişkili hastalıklardan etkilenmektedir [43].

Dünyada silikozis ABD'deki Hawk Nest Afeti ve Türkiye'de eski taşlama makinaları ile kot taşlama sonucu ortaya çıkan felaketin ardından kamuoyunun dikkatini çekmiştir [31, 73]. Ülkemizde silikozis farkındalığı ise, bu yüzyılın başında yine aynı şekilde kot taşlama salgınları ile oluşmuş ardından teflon tencere yapımı ve elektrik kablo imalatı gibi daha önce hiç bildirilmemiş iş kollarında silikozis olguları bildirilmiştir [42, 74, 75].

Türkiye'de silikozis veya diğer meslek hastalıkları için özel sörveyans sistemlerinin bulunmaması nedeniyle sorunun tam olarak resmini görmek son derece zordur. İkinci önemli sorun ise Türkiye'de kayıt dışı yüksek çalışma oranının varlığıdır. Türkiye İstatistik Kurumu'nun raporuna göre, 2017'deki işgücü 32 milyon civarında ve kayıt dışı istihdam oranı %33,6'dır [31]. Sistemde sigortasız çalışan işçilerin kayıtlara dahil edilememesi ve sadece ağır vaka verilerinin sunulmasına rağmen Türkiye Sosyal Güvenlik Kurumu (SGK)'dan her yıl, mesleki işgücü kaybının kayıtları yayınlanmaktadır. 2013-2016 yılları arasındaki istatistiklere göre, işgücü kaybına uğramış işçilerin sayısı sıralı olarak 351, 494, 510 ve 594 olmuştur [31, 76]. Bunlar arasında, pnömokonyoz oranı, yukarıda belirtilen yıllar arasında %18, %20, %35 ve %33 oranlarında artış göstermiştir. Asbest ve kömür işçisi pnömokonyozu ile karşılaştırıldığında, silikozis bu artan eğilimin başlıca etkin hastalığıdır [31].

2007 yılında kot taşlamada silikozis prevalansı %53,1 iken aynı popülasyonun 4 yıllık takibinden sonra bugüne kadar bildirilen en yüksek prevalans olan %96'ya yükselmiştir [31, 42, 77]. Dış teknisyenlerinde, yaygınlık 2 ila 5 kat artmaktadır [78, 79]. Diğer sektörler arasında seramik sektörü en düşük prevalansa sahip alan gibi görünmektedir [1, 80].

Kot taşlama yapan silikozis hastalarının ölüm haberinin yayılmasından dolayı silikozis tanısı genellikle işçiler arasında ölüm sebebi olarak kabul edilmekte olup teşhis konan işçiler psikososyal zorluklar yaşamakta ve böylece yaşamları zorlaşmaktadır. Hastalık konusunda ortaya çıkan farkındalık yetkilileri düzenlemeler ve kontrol önlemlerini gözden geçirme konusunda harekete geçirmiştir. Bu

farkındalığın olumlu etkileri şöyle sıralanabilir; silika içeren malzeme kullanılarak kot taşlama yasaklanmıştır, sigortasız çalışanlara ücretsiz sağlık hizmetlerine erişim sağlanmış ve ağır hastalığı olanlara tazminat hakları verilmiştir [81].

İşin türü, maruz kalınan solunabilir tozun miktarı aynı işyerinde farklı silikozis prevalansı oranları oluşmasında etkilidir. Tablo 2.2'de kömür madenciliği dışındaki sektörlerde yapılan silikozis prevalans çalışmaları özetlenmiştir [82].



**Tablo\* 2.2.** Kömür madenciliği dışındaki farklı sektörlerde yapılan silikozis prevalans çalışmaları [31].

Sektör	Çalışma	Yıl	Ortalama Yaş/Yıl	Toplam maruziyet süresi	Silikozis oranı
<b>Seramik</b>	Sakar A. ve ark. [1]	2005	36±6	140±74 ay	24/365 (%6,6)
<b>Kot Taşlama</b>	Akgun M. ve ark. [42]	2008	23±6	36±25 ay	77/145 (%53,1)
	Akgun M. ve ark. [77]	2015	27±6	41±27 ay	80/83 (%96,4)
<b>Diş Teknikeri</b>	Cimrin A. ve ark. [79]	2009	28±8	12±9 yıl	33/140 (%23,6), genel
					22/44 (%50,0), sadece taşlama makinaları
	Özdemir D. ve ark.[83]	2010	29±8	14 yıl	5/36 (%13,8)
	Ergün D. ve ark.[78]	2014	35±9	11±8 yıl	90/888 (%10,1), genel
					79/171 (%46,1), sadece taşlama makinaları
	Kahraman H. ve ark. [69]	2014	32±8	17±9 yıl	35/76 (%46,1), HRCT
	Berk S. ve ark. [84]	2016	31±9	14±9 yıl	10/32 (%31,3), göğüs x-ray
					22/32 (%68,8), HRCT
<b>Dökümhane</b>	Akkurt I. ve ark.[85]	1997	34±4	10±4 yıl	22/32 (%68,8), HRCT
					4/36 (%11), düşük toz maruziyeti
<b>Taş ocağı</b>	Karadağ Ö.K. ve ark. [86]	2001	40±0	10±0 yıl	27/85 (%32,1), yüksek risk
					43/109 (%22,7), düşük risk
	Akkaya A. ve ark. [87]	2001	40±6	12±7 yıl	45/50 (%90,0), yüksek maruziyet
			34±7	3±4 yıl	21/40 (%52,5), düşük maruziyet
<b>Kuvartz değirmen</b>	Polatlı M. ve ark. [88]	2001	36±8	9±3 yıl	8/67 (%11,9)
	Öztürk A. ve ark. [89]	2001	32±8	≤5 yıl (%80,5)	103/448 (%23,0)
<b>Kumlama</b>	Sevinç C. ve ark. [90]	2003	32±11	8±6 yıl	3/11 (%27,2), göğüs x-ray
					4/11 (%36,3), HRCT
<b>Kaynak</b>	Cömert M. ve ark. [82]	2014	39±8	17±9 yıl	8/44 (%18,2)

\*Tam metin olarak sunulan son çalışmalar arasında yaygınlık oranı ve maruz kalma süresini sağlayanlar tabloya dahil edilmiştir [31].

### 2.3. Oksisteroller

Hücre toksik bir maddeye maruz kaldığında transkripsiyon, translasyon, enzim aktivitesi ve lipit kompozisyonunda farklı cevaplar gözlenebilmektedir. Lipit araştırmalarında ilk kilometre taşları 19. yüzyılda ortaya konmuş, 20. yüzyılda çeşitli Nobel ödüllerine konu olan atılımlar gerçekleştirilmiştir. Lipitler, hastalıklarla ilişkisinin anlaşılması ve biyobelirteç olabilmelerinin yanında sinyal iletimindeki görevlerinin keşfedilmesiyle daha fazla ilgi çekmeye başlamıştır. Yapılan çalışmalar, lipit oksidasyon ürünlerinin sinyal iletimi ve transkripsiyondaki değişikliklerle de ortaya çıkabildiklerini, oksidatif stresi ve hücre ölümünü indükleyebildiklerini göstermiştir. Oksisteroller, lipitlerin biyoaktivitesi yüksek önemli bir grubunu oluşturmaktadır [91, 92].

Canlı sistemlerin işlevi; canlı organizmaların temel yapı taşı olan hücrelere dayanır. Her hücrede, hücrenin çevreden ayrılmasını sağlayan ve fonksiyonel bir arayüz olan hücre zarı mevcuttur. Ayrıca, çoğu hücre içi organelleri ve yapıları da bir zar ile çevrilidir. Memeli hücre zarları önemli miktarda protein içermektedir [93, 94]. Ancak, ana olarak fosfolipitler ve kolesterolden oluşan çift katlı lipit tabakasından oluşmaktadır. Plazma membranlarının toplam lipit içeriğinin %25 ila 40'ı kolesteroldür [93, 95].

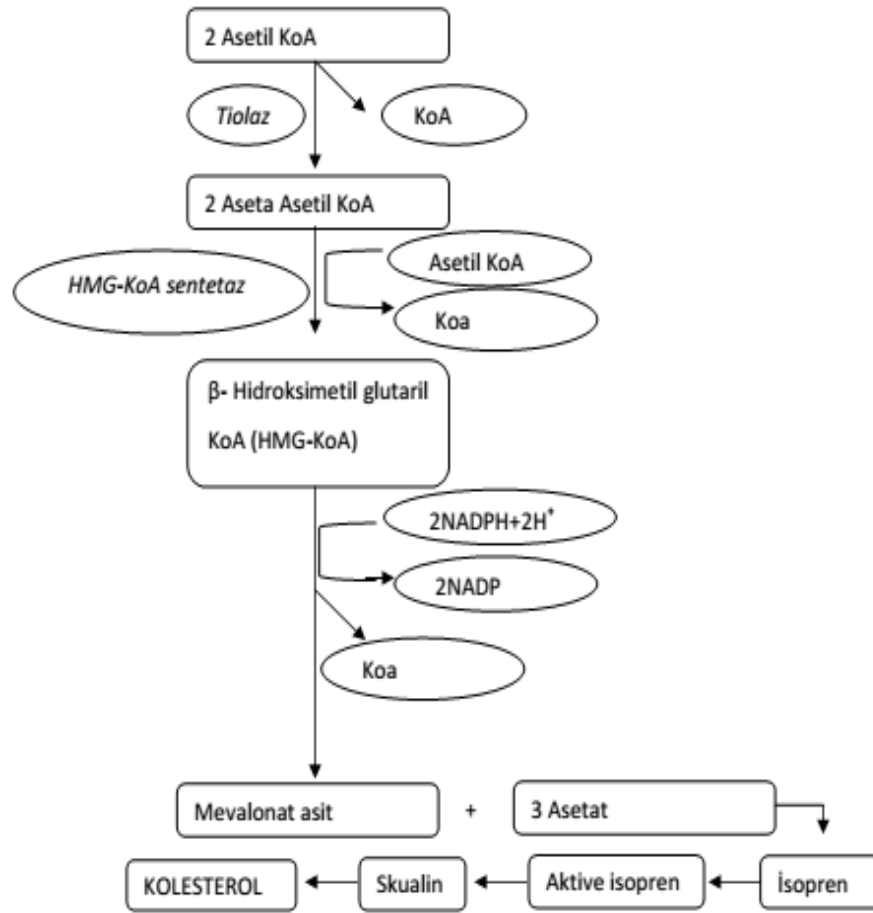
Hücre içi zarlarının kolesterol içeriği plazma membranından daha düşüktür [93, 96]. Kolesterol, membranlarda bulunan proteinlerle doğrudan etkileşime girerek veya dolaylı olarak protein fonksiyonunu modüle ederek, lipit çift katmanlarının biyofiziksel özelliklerini düzenleyerek çok sayıda biyolojik işlemi düzenler. Kolesterol molekülünde bulunan steroid kısım, kolesterol çevresindeki fosfolipitlerin konformasyonel düzeninin oluşmasını sağlar, böylece lipit paketlemesi artar ve membran elastikiyeti azalır bu da suda az çözünür moleküller için zarın daha az erişilebilir hale gelmesini sağlar [93, 97]. Kolesterol safra asitleri ve steroid hormonlarının sentezinde bir öncü moleküldür, lipit nano ölçekli bölgelerinin oluşumuna katılır ve protein fonksiyonlarını düzenler [93, 98-100].

Spesifik halka yapısı (siklopentano-perhidro-fenantren) içeren kolesterol molekülü bir zoosteroldür. Kanda serbest ve ester halde bulunabilmektedir. Vücuttaki kolesterol'ün yarısı dışarıdan diyet ile alınan hayvansal kaynaklı yiyeceklerden sağlanırken, diğer yarısı ise vücutta sentezlenmektedir. Günlük alınan

ve atılan miktarlarına göre kolesterol sentezi düzenlenmektedir. Alınan, kullanılan ve atılan miktarları arasında bir denge bulunmaktadır ve bu dengenin bozulması kolesterol düzeyinin kanda yükselmesi gibi bazı sorunların ortaya çıkmasına neden olur [101].

Kolesterol'ün sentez reaksiyonları, iki molekül asetil koenzim A (KoA)'nın, iki molekül aseto asetil KoA'yı oluşturması ile başlar. Bu moleküle Hidroksimetil Glutaril-Koenzim A sentetaz enzimi aracılığıyla üçüncü bir asetil KoA daha eklenerek 3-hidroksi-3-metil glutaril KoA (HMG KoA) oluşur. 2 molekül nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (*Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*, NADPH) kullanılarak ve "HGM-KoA redüktaz" enzimi katalizörliğünde endoplazmik retikulumda HMG KoA'dan "mevalonik" asit oluşur. Bu kolesterol sentezinin sınırlayıcı basamağıdır ve geri dönüşlü değildir. Bunu takiben sekiz basamaklı tepkime sırasında isopren, skualin gibi ara ürünler oluşur ve son basamakta kolesterol meydana gelir. Skualin, diğer sterol yapısındaki maddelerin sentezi sırasında da sentezlenir. Kolesterol, hücre membranı ve lipoprotein yapılarına katılan önemli bir moleküldür. Safra asitleri, steroid hormonlar ve vitamin D için öncül madde görevi görür. Kolesterol sentezi basamaklarıyla Şekil 2.8'de gösterilmektedir [101].

Çift katlı lipit tabakalarında bulunan kolesterol molekülleri oksidasyona duyarlıdır [102, 103]. Kolesterole benzer yapıda olan ve düşük dansiteli lipoproteinlerde (*low density lipoprotein*, LDL) seviyelerini düşürme kabiliyeti olan fitosteroller, bitkisel kaynaklı sterollerdir [104]. Bilinen kolesterol oksidasyon ürünlerinin yanı sıra, oksisterol türevi olduğu düşünülen fitosterol oksidasyon ürünleri, kolesterolda bulunmayan bir veya daha fazla oksijen içeren grupların varlığıyla kolesterolden farklılık gösterir [102, 103]. Kolesterolün kimyasal yapısında oluşan küçük değişikliklerle oluşan oksisteroller, biyofiziksel özelliklerinde önemli değişikliklere yol açar, bu durum da çift katlı lipit tabakalarının özelliklerini ve dinamiklerini önemli ölçüde değiştirebilir [93].

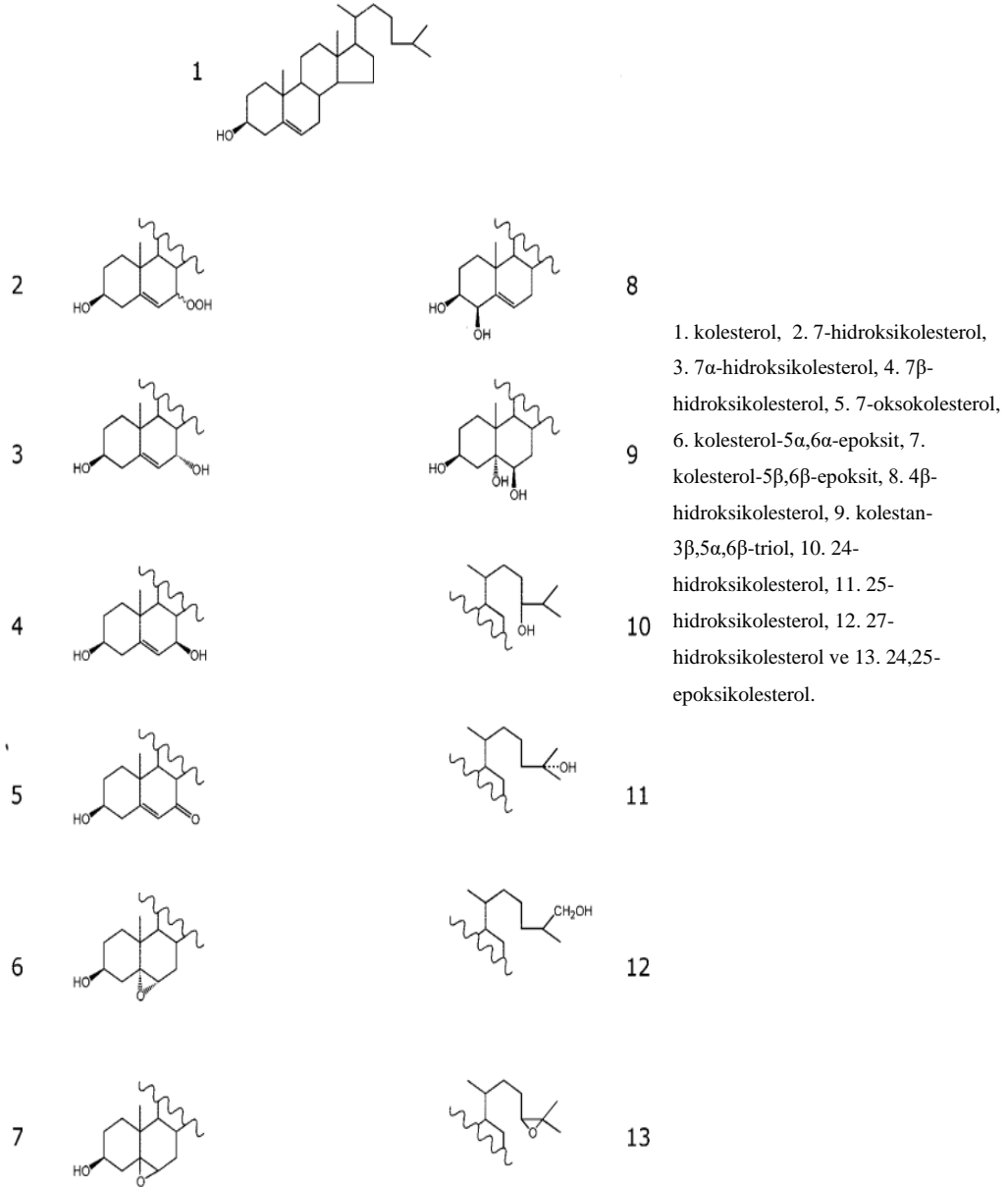


**Şekil 2.8.** Kolesterol sentezi [101].

Oksisteroller, kolesterol'ün 27 karbonlu oksidasyon ürünleridir. Kolesterole bir oksijen fonksiyonunun eklenmesi, kolesterol'ün daha polar bileşiklere dönüşme indirgenme hızını artırır. Oksisteroller, özellikle steroid yan zincirine oksijen eklenmesiyle kolaylıkla hücrelerden dışarı taşınabilir ve böylece ekstrahepatik kaynaklardan kolesterol'ün uzaklaştırılmasını kolaylaştırır [105, 106].

Bir başka ifade ile oksisteroller kolesterol'ün A veya B halkaları veya yan zincirine bir veya iki oksijen atomunun hidroksil, keto, epoksit veya peroksit grupları oluşturacak şekilde eklenmesiyle meydana gelirler [107, 108]. Kolesterol'ün atılım yolundaki son ürünler ya da ara ürünler olarak meydana gelen önemli oksijenli türevleridir. Şekil 2.9'da oksisterol türevleri gösterilmiştir [91]. Oksisteroller; kolesterol yıkımına aracılık etmenin yanı sıra, birçok önemli biyokimyasal aktiviteye

sahip olduğu gösterilmiş olan düzenleyici büyük moleküller sınıfındadır. Ancak, fizyolojik rolleri hala araştırılmaktadır [106, 109-116].

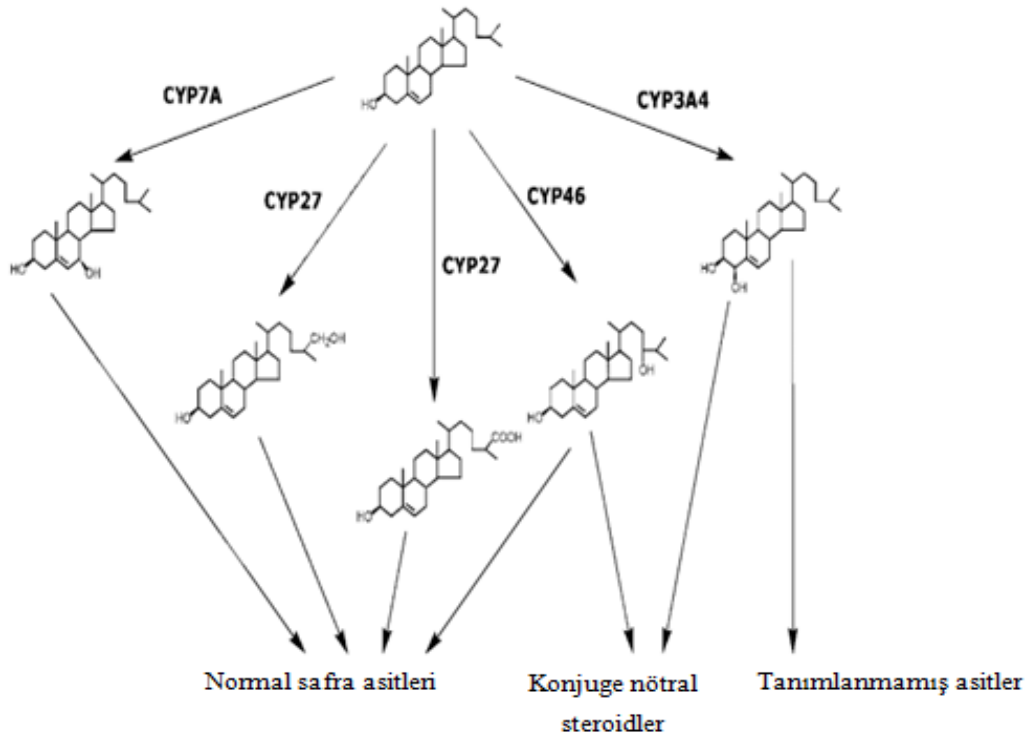


**Şekil 2.9.** Oksisterol türevleri. 1. kolesterol, 2. 7-hidroksikolesterol, 3. 7 $\alpha$  hidroksikolesterol, 4. 7 $\beta$ -hidroksikolesterol, 5. 7-oksokolesterol, 6. kolesterol-5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -epoksit, 7. kolesterol-5 $\beta$ ,6 $\beta$ -epoksit, 8. 4 $\beta$ -hidroksikolesterol, 9. kolestan-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol, 10. 24-hidroksikolesterol, 11. 25-hidroksikolesterol, 12. 27-hidroksikolesterol ve 13. 24,25-epoksikolesterol [91].

Birkaç istisna dışında, kolesterol molekülüne bir oksijenli fonksiyonel grubun eklenmesi ile oluşan oksisteroller kolesterol molekülünün yarı ömrünü büyük ölçüde

azaltmaktadır. Bu moleküller kolesterol'ün atılımını artırır ya da suda çözünen safra asitlerini oksidasyon reaksiyonlarını yönetir. Molekülün, lipofilik membranları geçmesine olanak sağlar [91, 117]. Kolesterol'ün okside hali molekülün hücre içinde dağılımının daha hızlı oranda gerçekleşmesini sağlar. Eser miktarda biyolojik membranlarda ve lipoproteinlerde oksisterol bulunmaktadır. Farklı kimyasal yapılar sahip çok sayıda oksisterol türevi vardır ve vücutta biyolojik olayların düzenlenmesinde önemli görevler üstlenen moleküllerdir [91, 113-115].

Oksisterol türevleri iki şekilde oluşmaktadır: (1) Sitokrom (*cytochrome*, CYP) P-450 ailesine ait enzimler ile enzimatik yolla ve (2) oto-oksidasyon ile enzimatik olmayan yolla meydana gelmektedir [113, 118]. CYP450 enzimi ile oluşan oksijenasyon ürünleri diğerlerine oranla dolaşımda daha fazla bulunmaktadır [91]. Şekil 2.10'da enzimatik yolla oluşan türevler gösterilmiştir. Enzimatik olmayan yolla oluşan oksisterol türevleri ise kolesterol'ün ROB ve RNB aracılığı ile oto-oksidasyona uğramasıyla oluşmaktadır [118].



**Şekil 2.10.** Dolaşımdaki major oksisterollerin oluşumu ve eliminasyonu [91].

### 2.3.1. Bazı Oksisterol Türevleri ve Özellikleri

#### 7 $\alpha$ -Hidroksikolesterol

Oluşan bu türler arasında 7 $\alpha$ -hidroksikolesterol (7 $\alpha$ -OHC), kolesterol 7 $\alpha$ -hidroksilaz (CYP7A1) ile karaciğerden sentezlenmektedir. Klasik safra asit sentez yolu ara maddelerinden biridir. Safra asit sentezi için en önemli yolak kolesterol'ün 7 $\alpha$ -hidroksilasyonu ile başlar ve bu oluşumdaki hız belirleyici basamaktır. Hız belirleyici basamak olan CYP7A1 hormonal ve diyet faktörleri ile etkilenmektedir [91, 119-121].

#### 27-Hidroksikolesterol ve Kolestenoik Asit

27-hidroksikolesterol (27-OHC) ve kolestenoik asit, 27-hidroksilaz enzimi (CYP27A1) ile karaciğerden sentezlenir ve safra asit sentez yolağının ara maddesidir. CYP7A1'in tersine, bu dönüşüme dahil olan CYP27A1 enzimi, sadece karaciğerde değil tüm dokularda bulunur. Reaksiyon, steroid zincirinin terminal metil grubuna (C27 pozisyonu) hidroksil grubunun eklenmesi ile başlar. Enzim, C27-metil grubunu sadece CH<sub>2</sub>OH grubuna dönüştürmez ayrıca karboksilik asit grubuna da dönüştürür (kolestenoik asit) [91, 122]. CYP27A1 enzimi; 27-hidroksilasyon ile başlayan bu yolun başlatılmasına ek olarak, kolesterol'ün C-27 steroid yan zincirinin safra asitlerinin C-24 steroid yan zincirine dönüştürülmesine katkı sağlayan önemli bir enzimdir [91, 123].

#### 24S-Hidroksikolesterol

24S-hidroksikolesterol (24S-OHC) oluşumundan sorumlu, kolesterol 24S-hidroksilaz sitokrom P-450 (CYP46) enzimi insanlarda sadece beyinde bulunur [91, 124, 125]. 24S-hidroksikolesterol, merkezi sinir sistemi (MSS)'ndeki nöronlardan kaynaklanır. Kan-beyin bariyerinden dolaşıma sürekli 24S-OHC akışı vardır. Bu akışın beyin kolesterol'ünün homeostazisi için önemli olduğuna dair kanıtlar sağlanmıştır [91, 126, 127]. Böylece, dolaşımdaki 24S-OHC seviyeleri, beyindeki kolesterol döngüsü için bir belirteç olarak kullanılabilir [91, 125]. İnsanlardaki 24S-OHC'in yarısı safra asitlerine dönüşür ve diğer yarısı da karaciğerden sülfürik ve glukronik asit konjugasyonu ile atılır [91, 128].

### **4 $\beta$ -Hidroksikolesterol**

4 $\beta$ -hidroksikolesterol'ün ise sitokrom P450 3A4 (CYP3A4) enzim aktivitesi ile üretildiği gösterilmiştir [91, 129]. 4 $\beta$ -hidroksikolesterol'ün atılımı dolaşımdaki diğer oksisterollerden daha yavaştır. Düşük dönüşüm hızına rağmen dolaşımdaki yüksek miktarını bu durum açıklayabilir. Kolesterol'ün oksidasyonu ile 4 $\beta$ -hidroksikolesterol oluşumundan sonraki metabolik son ürünleri henüz tanımlanmamıştır [91].

### **Dolaşımda ya da Özel Dokularda Çok Düşük Konsantrasyonda Bulunan Oksisteroller**

25-hidroksikolesterol (25-OHC), 25-hidroksilaz ile oluşur. İlginç şekilde, kolesterol 25-hidroksilaz bir sitokrom P-450 enzimi değildir, hem olmayan demir içeren daha küçük bir protein ailesine aittir. Enzim, çoğu dokuda mRNA lekeleri olarak ifade edilir [91, 130]. Kolesterol bağımlı transkripsiyonel regülasyon için sterol düzenleyici element bağlayıcı protein (Sterol regulatory element binding proteins, SREBP) yolağın düzenleyicisidir [18, 131].

24-25 epoksikolesterol ise kolesterol biyosentezinin mevalonik asit yolunun bir kolundan üretilmiştir [18, 132].

### **Oto-oksidasyon Yoluyla Üretilen Oksisteroller**

Oto-oksidasyon yoluyla üretilen oksisterol türevleri ise; 7-ketokolesterol (7-KC), 7 $\beta$ -hidroksi kolesterol (7 $\beta$ -OHC), 5 $\alpha$ , 6 $\alpha$ - ve 5 $\beta$ , 6 $\beta$ -epoksitlerdir. 7-KC ve 7 $\beta$ -OHC oksitlenmiş düşük dansiteli lipoproteinlerin ana bileşenleridir. *İn vivo* ya da gıda işlenmesi sırasında oluşan serbest radikal, lipit peroksit veya iki değerlikli kanyonlarca yönetilen oksidatif süreçlerin neden olduğu oto-oksidasyon olarak da bilinen non-enzimatik yollarla üretilmektedirler [114, 133]. Oto-oksidasyon yoluyla en çok üretilen oksisteroller, kolesterol'ün B halkasının 7. pozisyonunun değişmesi ile oluşmaktadır. Bu grubun önmlü üyeleri arasında belirgin sitotoksik ve pro-apoptotik özelliklere sahip olan 7-KC ve 7 $\beta$ -OHC yer alır [133, 134].



Epimerik 5, 6 ( $\alpha/\beta$ )-epoksikolesteroller, çift bağ ile bir hidroperoksitin enzimatik olmayan etkileşimi ile radikal olmayan bir reaksiyonla üretilebilmektedir. Bu işlem LDL ve makrofajlarda görülmektedir [18, 135].

### **7-Ketokolesterol**

7-ketokolesterol, insan aterosklerotik plağında bulunan kolesterolün önemli bir oto-oksidasyon ürünüdür. Yapılan bazı hayvan çalışmalarında kolesterolden daha aterojenik olduğu gösterilmiştir. 7-KC, kolesterol biyosentezinde hız kısıtlayıcı enzim olan HMG-KoA redüktazı inhibe edebildiği gibi safra asidi biyosentezinde hız kısıtlayıcı enzim olan 7-alfa-hidroksilazı da inhibe edebilmektedir. 7-KC'nin, kolesterol biyosentezinin endojen bir düzenleyicisi olarak oluştuğu düşünülmüştür. Yapılan çalışmalarla, 7-KC'ün, ateroskleroza katkıda bulunan güçlü etkilere sahip bir oksisterol türevi olduğu belirlenmiştir. 7-KC, sitotoksik etki gösterebilir ve vasküler hücrelerde apoptozisi indükleyebilir [116]. CYP27A1 enzimi, 7-KC'yi 27-hidroksil türevlerine metabolize eder, bu da daha az toksik olan ve hücre tarafından 7-KC'e göre daha kolay elimine edilebilen suda çözünür metabolitlere dönüşmesini sağlayan bir reaksiyondur [18].

7-KC, 25-OHC ve 7 $\beta$ -OHC gibi bazı oksisterollerin pro-inflamatuvar sinyaller oluşturduğu ve makrofajlar ve diğer hücre tipleri tarafından interlökin-8 (IL-8) ve monosit kemoatraktan protein-1 (*Monocyte chemoattractant protein-1*, MCP-1) gibi inflamatuvar mediatörlerin ekspresyonunu artırdığı bildirilmiştir [18].

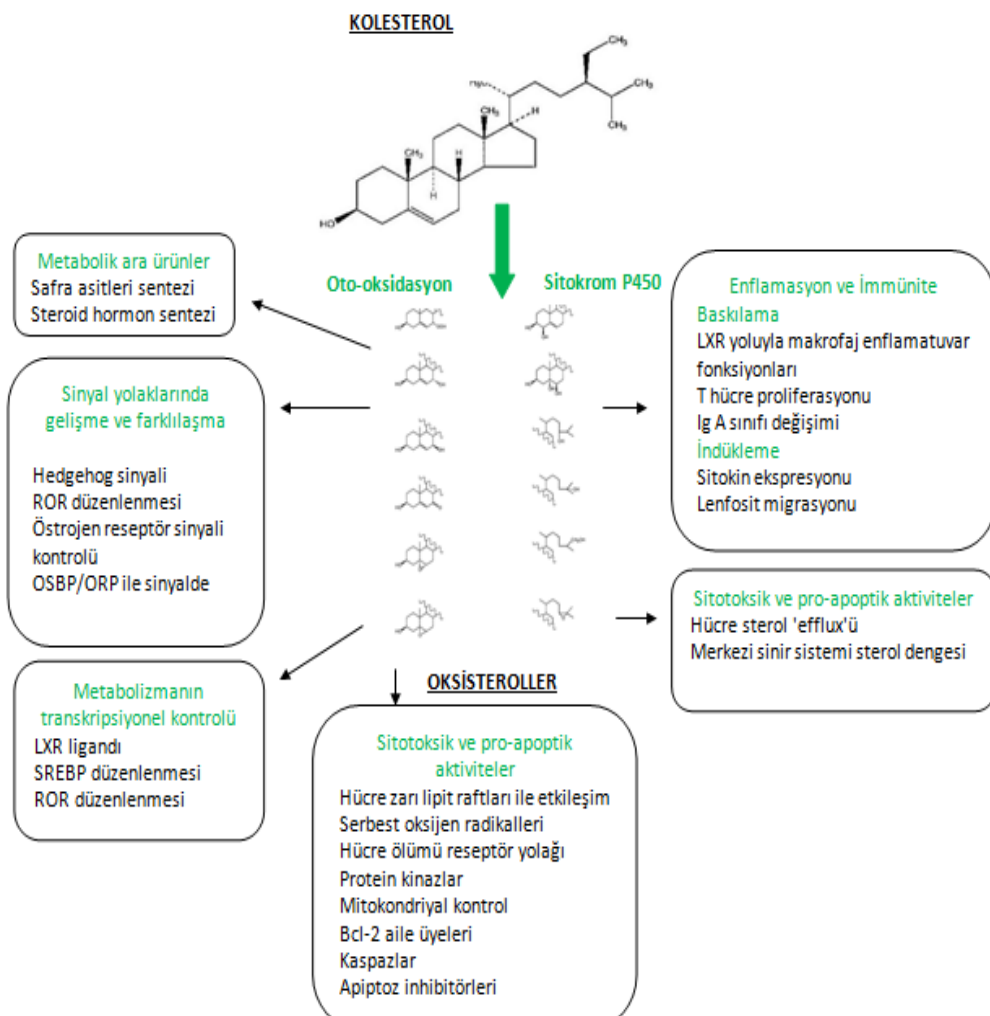
### **3 $\beta$ , 5 $\alpha$ , 6 $\beta$ Trihidroksi Kolestan**

Oksisteroller, CYP450 enzimlerinin aracılık ettiği enzimatik yollardan veya reaktif oksijen ve/veya nitrojen türleri ile enzimatik olmayan mekanizmalardan elde edilen kolesterolün oksijenlenmiş türevleridir. Birçok dokuda, kolesterol hızla kolesterol-5,6-epoksite oksitlenir, ardından kolesterol-5,6-epoksit-hidrolaz ile 3 $\beta$ , 5 $\alpha$ , 6 $\beta$  trihidroksi kolestan (triol)'a hidrasyonu gerçekleşir. Triol en bol bulunan oksisterollerden biridir [136, 137]. Triolün, insanlarda kolesterolün önemli bir metaboliti olduğu kanıtlanmıştır. Hiperkolesterolemik tavşanlarda ve insanlarda triol plazma seviyelerinin yükselmiş olduğu gösterilmiştir [137]. Birçok çalışma ile, kardiyovasküler hastalıklar, nörolojik hastalıklar ve kanser dahil çeşitli hastalıklarda,

7-KC, 24-OHC ve  $3\beta$ ,  $5\alpha$ ,  $6\beta$  trihidroksi kolestan gibi oksisterollerin patolojiye katkıları olduğu gösterilmiştir [138].

Oluşan oksisterollerin biyolojik fonksiyonları Şekil 2.11'de de özetlendiği şekilde aşağıda verildiği gibi sıralanabilir:

1. Lipid metabolizmasının transkripsiyonel kontrolü
2. SREBP düzenlenmesi
3. ROR (*The retinoic acid receptor-related orphan receptors*, retinoik asit reseptörleri) aktivitesinin modüle edilmesi
4. Hücre ölümünde rolü (apoptoz)
5. Enflamasyon sürecini başlatmak ve enflamasyonda rolü [18, 133]



**Şekil 2.11.** Oksisterollerin biyolojik fonksiyonları [18, 133].

### 2.3.2. Oksisterol Bağlayıcı Proteinler

Oksisteroller safra asidi ve steroid hormonunun biyosentez yollarının ara maddeleridir ve aynı zamanda kendi başlarına biyoaktif moleküllerdir. Nükleer reseptörlere ligand olmaları ile ve ayrıca kolesterol ve yağ asidi biyosentezini düzenleyen transkripsiyon faktörleri olarak SREBP'ler aktif formlarına dönüşmesini sağlamaktadır [18, 22].

Oksisteroller; karaciğer X reseptörleri (*Liver-X-receptors*, LXR) membran dinamikleri, protein etkileşimleri ve nükleer reseptörlere bağlanması ile aktivitelerini gerçekleştirir. Oksisteroller, ilgili orphan reseptörleri, farnesoid X reseptörleri, östrojen reseptörleri ve ayrıca LXR gibi farklı nükleer reseptörlere bağlanır ve bu reseptörleri aktive eder [139, 140].

12 üyeli memeli bir gen ailesinin parçası olan oksisterol bağlayıcı protein (OSBP), 1980'lerde kolesterol'ün çeşitli yan zincir ve halka oksitleri için yüksek afiniteli bir reseptör olarak tanımlanmıştır [141]. İlk olarak, kolesterol sentezi ve alımının mediyatörü olarak tanıtılmasına rağmen, son çalışmalar OSBP ailesinin, kolesterol ve lipit homeostazını diğer hücrel aktivitelerle bütünleştirmede rol aldığını, sterol transferi ve/veya sterol algılama gibi aktivitelerinin de olduğunu göstermektedir [142].

LXR, ligand ile aktive edilen transkripsiyon ailesine üye olan bir çekirdek reseptörüdür. Çoğunlukla sitoplazmada bulunan bu reseptörler oksisterol ligandları ile de aktive olmaktadır. 24S-OHC, 22R-hidroksikolesterol (22R-OHC), 24S, 25-epoksikolesterol, 27-OHC ve metaboliti olan kolestenoik asit LXR'ı aktive eden başlıca oksisterollerdir [91].

LXR'lar kolesterol homeostazında önemlidir. Bu reseptörler kolesterol metabolizmasında birçok genin ekspresyonunu düzenler. Kolesterol 7-hidroksilazın transkripsiyonel indüksiyonuna aracılık ettiği gösterilmiştir. Kolesterol taşıyıcı proteinleri ABCA1 ve ABCG1'in düzenlenmesinde görevlidir. Ana olarak  $\alpha$  ve  $\beta$  olmak üzere iki alt türü bulunmaktadır. LXR $\alpha$  ve LXR $\beta$ 'e bağlanan oksisteroller ile aktive olur. LXR $\beta$  reseptörü  $\alpha$  reseptöre göre daha geniş dağılıma sahiptir. Özellikle beyinde yüksek konsantrasyonda bulunmaktadır. 24S-OHC'nin beyindeki yüksek konsantrasyonu, LXR $\beta$ 'nin dahil olduğu beyindeki önemli oksisterol sinyal yolunun

var olabileceğini düşündürmektedir. Fakat, bunu destekleyen kesin kanıt hala bulunamamıştır [91].

### 2.3.3. Oksisterollerin Hastalıklarla İlişkisi

Oksisteroller memeli dokularında çok düşük konsantrasyonlarda bulunurlar. Patolojik durumlarda makrofaj köpük hücreleri, aterosklerotik lezyonlar, katarakt ve safra taşları gibi dokularda düzeylerinin yükseldiği belirtilmektedir. Ateroskleroz, nörolojik hastalıklar ve kanserle olan ilişkisi yapılan çalışmalarda gösterilmiştir [118, 140, 143]. Tablo 2.3'te oksisterol türevleri ile ilişkilendirilmiş hastalıklar gösterilmiştir [118]. Kronik hastalıklarda inflamasyon sürecini başlattıkları savunulmaktadır [143].

**Tablo 2.3.** Oksisteroller ile ilişkili hastalıklar [118].

Oksisteroller	Kanser	Ateroskleroz	Nörolojik hastalıklar
5,6 kolesterolepoksit [118, 144, 145]	√	√	
Kolestan-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol [118, 146, 147]	√	√	
25-hidroksikolesterol [118, 148]			√
24-hidroksikolesterol [118, 149-151]			√
7-hidroperoksi-kolesterol [118, 152]		√	
7-hidroksikolesterol [118, 153]		√	

#### Ateroskleroz:

Ateroskleroz (damar sertliği); arterlerin (atar damarların) iç yüzeyinde kan akışını engelleyen veya yavaşlatan yağ ve kolesterol plakları oluşması durumudur. Endotelial hücre kültürleri ve arteryel düz kas hücreleri üzerinde *in vitro* çalışmalar ile sitotoksik etkilerinin gösterildiği oksisterollerin aterojenik olduğu ileri sürülmüştür. 7 $\beta$ -OHC, plazma seviyesi ve karotid ateroskleroz gelişimi arasında bir ilişki olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Plazmadaki oksisterol düzeylerinin sigara içenlerde içmeyenlere göre daha yüksek olduğu rapor edilmiştir. E vitamini takviyesinin 7 $\beta$ -OHC plazma seviyesini düşürdüğü görülmüştür. Sitotoksik ve stabil

olmayan oksisterol 7-hidroksiperoksikolesterol'ün (LDL'nin oksidatif modifikasyonu ile oluşan) ateroskleroz için patojenik özelliğe sahip olduğu gösterilmiştir [91].

### **Alzheimer:**

Alzheimer hastalarının beyinlerinde kolesterol oksidasyon ürünlerinin anormal düzeyde biriktiği belirlenmiş ve bu durum hastalığın patogenezi ile kolesterol metabolizması arasında bağlantı kurulmasına neden olmuştur. Otopsi örneklerinde hastalığın ciddiyeti ile bağlantılı olarak beyinlerinin frontal korteksindeki 24-OHC, 27-OHC miktarları artar. N-asetil-sistein (N-Acetyl-cystein, NAC) ile hücrenin ön uygulama yapılmasıyla,  $\beta$ -amiloidojenez indüklemesi ile oluşan bu iki oksisterolün oluşumunu engellendiği belirlenmiştir [154].

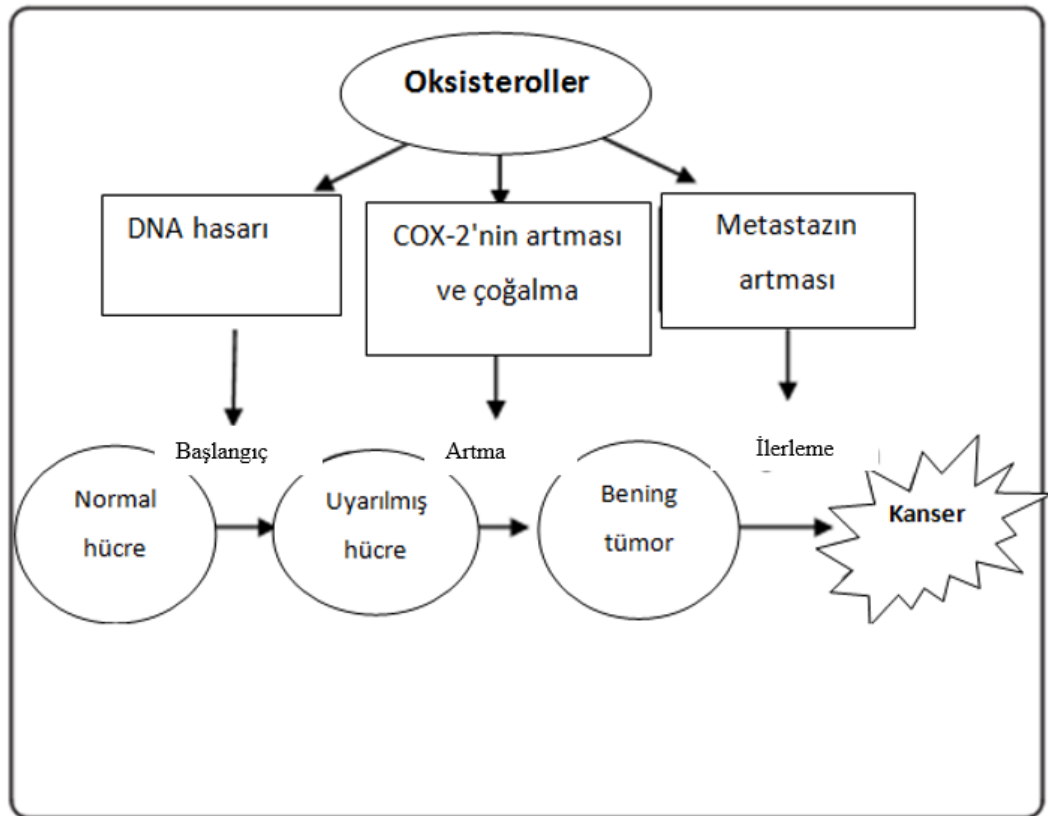
### **Diyabet:**

Diabetes Mellitus oluşumu ve prognozunda oksidatif stresin rolü bilinmektedir [18, 155, 156]. Hiperglisemi, reaktif oksijen radikallerinin oluşumunu hastalık sırasında indüklemektedir. Eritrositlerin yüksek miktarda glukoz ile inkübasyonu ile membran lipid peroksidasyonunu artırdığı gösterilmiştir Ayrıca, hipergliseminin yol açtığı reaktif oksijen radikalleri ile kolesterol gibi endojen moleküllerde de değişikliğe neden olmaktadır. Oksisterollerin diabetes mellitusta sitotoksik ve proinflamatuvar fonksiyonları olduğu ve nörolojik komplikasyonların patofizyolojisinde önemli rol oynadığı düşünülmektedir [18, 156]. Total oksisterol düzeylerinin diyabet hastalarının plazmalarında yükseldiği tespit edilmiştir. Tip 1 diyabet hastalarında otooksidasyonla oluşan  $7\alpha$  ve  $7\beta$  hidroksikolesteroler, tip 2 diyabetlilere göre yüksek bulunmuştur. Tip 2 diyabetli hastaların plazmalarında  $7\beta$ -OHC, kolesterol- $\alpha$ -epoksit, kolesterol- $\beta$ -epoksit miktarlarında artış gözlenmiştir [156]. Oksisterol türleri, diabetes mellitus Tip 1 ve Tip 2'de bozulmuş glukoz toleransında ayrı ayrı oksidatif stresi gösteren duyarlı biyobelirteçler olarak klinik takipte, ilaç etkinliğini izlemede, olası komplikasyonların varlığını öngörmeye ve takibinde kullanılabilir [18].

### Kanser:

Oksisteroller kansere katkıda bulunan pro-oksidatif ve pro-inflamatuvar özelliklere sahiptir. Şekil 2.12'de oksisterollerin kanser üzerine etkisi gösterilmiştir. İlk olarak ROB/RNB üretimini artırarak tümör oluşmasını başlattıkları gösterilmiştir [118]. İkinci olarak hüresel fenotiplerin değişimini tetikleyen siklooksijenaz-2 (*Cyclooxygenase-2*, COX-2) gibi upregüle olan proteinler aracılığı ile oksisteroller tarafından tümör gelişimi tetiklenebileceği bildirilmiştir [118, 157, 158].

Kolesterol oksidasyon ürünlerinin karsinogenez üzerindeki etkileri ilk olarak 1946'da Bischoff ve Rupp tarafından raporlanmıştır [118, 159]. Ovariyektomi yapılmış farelere 10 mg ham progesteron içeren susam yağı verilmiş ve kansere rastlanma oranı saf progesteron verilen farelere göre daha yüksek çıkmıştır. Kolesterol oksidasyon ürünleri ham progesteron ekstraktını alan farelerde görülmüştür. Bu çalışma, karsinojenlerin endojen olarak kolesterolden üretilebileceğine dair kanıtlar sağlamıştır. Sonraki çalışmalar spesifik oksisterollerin kanserojen potansiyelini ortaya koymuştur [118].



Şekil 2.12. Oksisterollerin kanser üzerine etkisi [118].

Farelerle yapılan bir çalışmada, 6 $\beta$ -hidroperoksi-4-kolestan-3-on'ın subkütan olarak enjekte edildiği farelerde lokal sarkomların geliştiği görülmüştür. Kolesterol 5 $\alpha$ , 6 $\alpha$ -epoksit de lokal sarkomlara sebep olabilmektedir [160, 161].

Akciğer kanseri ile oksisterollerin ilişkilendirildiği bir çalışmada 20 tane akciğer kanseri hastasının plazmasında 6 farklı oksisterol türevi ölçülmüştür (7 $\alpha$ -hidroksikolesterol, 7 $\beta$ -OHC, kolesterol- $\alpha$ -epoksit, kolesterol- $\beta$ -epoksit, kolestanetriol, 7-KC, 7-keto-pregnenolon). 7 $\beta$ -hidroksikolesterol seviyesi ile akciğer kanseri arasında pozitif yönde bir ilişki bulunmuştur. Akciğer kanseri riskinde bu oksisterol türevinin biyobelirteç olabileceği belirtilmiştir. Ayrıca, diyet, lipid peroksidasyonu ve bireysel metabolizma farklılıklarından dolayı 7 $\beta$ -OH seviyesi de artmaktadır [118, 162].

Kolon kanseri oluşumunda hayvansal yağlarda meydana gelen oksidasyon ürünlerinin, oksisterollerin, ilişkisinin olduğu gösterilmiştir [163]. İnsan kolon adenokarsinoma hücre hattında; 7 $\alpha$  -hidroksikolesterol (7 $\alpha$ -OHC) (%43), 5 $\alpha$ , 6 $\alpha$ -epoksi kolesterol (%32), 5 $\beta$ , 6 $\beta$ -epoksi kolesterol (%6)'den oluşan oksisterol karışımının apoptozisi indüklediği gösterilmiştir. Bu hücreler oksisteroller tarafından uyarıldıktan sonra mitokondriyal membran potansiyelinde sitokrom c salınımı ve kaspaz-3'ün aktivasyonunda bir azalma görülürken apoptozun mitokondriyal yolu upregüle edilmiştir. Oksisterole bağlı apoptoz upregülasyon mekanizması, hücrelerde NADPH oksidaz aktivasyonu ile ROS üretimini arttırdı. Aşırı ROS ve pro-inflamatuvar sitokin seviyeleri, enterik mukozal fonksiyonun bozulmasına katkıda bulunabilir [164].

### **Niemann-Pick Tip C:**

Niemann-Pick Tip C (NP-C) hastalığı tüm sinir sisteminde tutulum gösteren genetik bir lizozomal depo hastalığıdır. Farklı yaşlarda ortaya çıkıp, farklı ilerleme hızı gösteren hastalığa, özel olmayan pek çok sistemik ve nörolojik bulgu eşlik etmektedir. Bu nedenle nörolojik bulguların ortaya çıkması ve hastaların tanı alması arasındaki süre uzundur [165]. NP-C'de temel mekanizma kolesterolün dokularda birikimi olduğundan oksidatif stres ve ROS'a maruz kalan dokuda okside edilmiş kolesterol ürünleri olan oksisterol düzeylerinde de artış olmaktadır. Hayvan deneylerinde plazma, doku ve makrofajlarda özellikle 7-KC, 7 $\beta$ -hidroksikolesterol

ve triol düzeylerinde artış olduğu gösterilmiştir. 7-KC ve triol türevleri, hastalık için spesifik biyobelirteç olarak değerlendirilmektedir [165-167].

NP-C hastalarının lipit profilindeki bozukluklar, çoğunlukla kolesterol transportundaki bozukluğun derecesiyle korelasyon gösterir. Yüksek dansiteli lipoprotein (*high density lipoprotein*, HDL) seviyesinin düşüklüğü sık olarak görülmektedir. Oksisterol düzeyleri gibi erken tanı biyobelirteçlerinin kullanımının yaygınlaştırılmasına ihtiyaç vardır. Erken tanı ve etkilenmiş bireylerin prenatal dönemde tespit edilmesi açısından oksisterol seviyelerinin ölçülmesinin büyük önemi olduğu düşünülmektedir [165].

#### **2.3.4. Oksidatif Stres, Lipit Peroksidasyonu ve Silikozis**

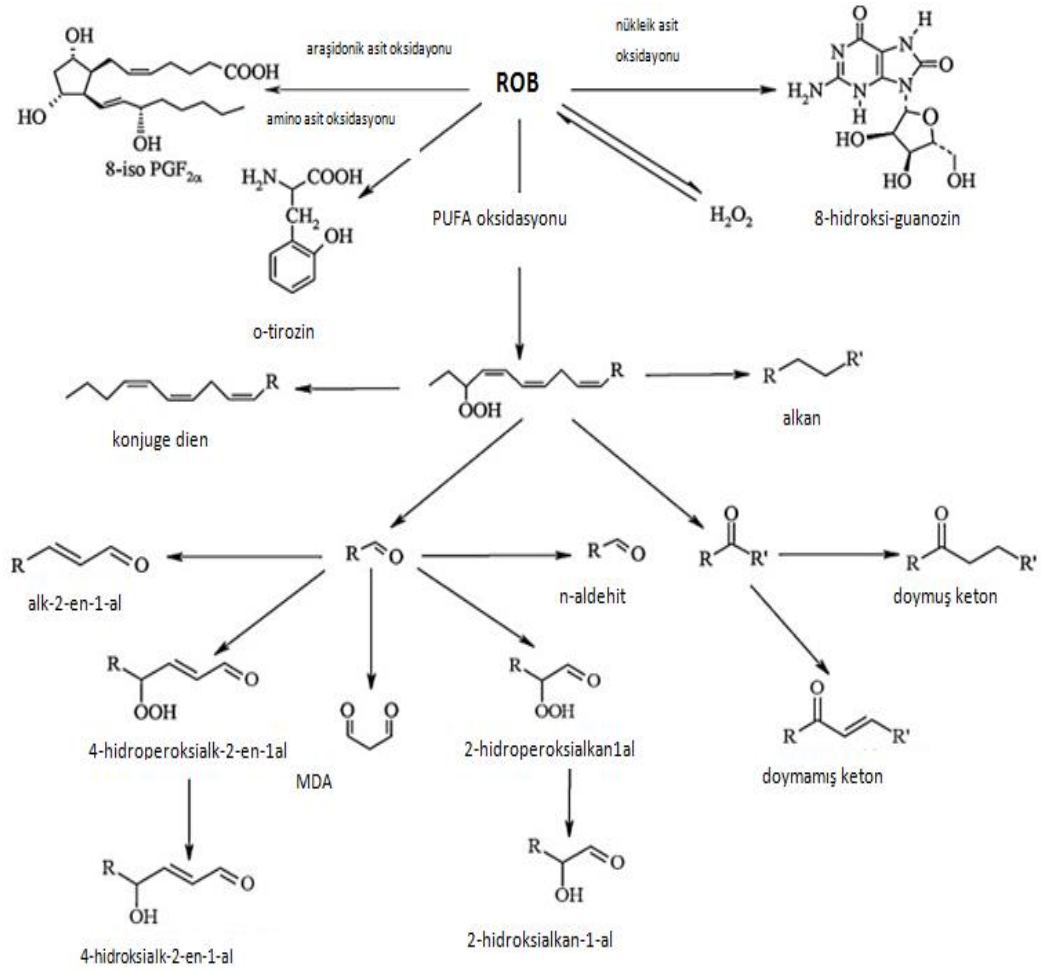
Temel olarak oksidatif stres, çeşitli nedenlerle hücre veya dokularda ROB oluşumunun artması ve biyolojik sistemde prooksidanlarla antioksidanlar arasındaki dengenin ilki lehine bozulması olarak tanımlanmaktadır [168, 169]. ROB da dahil serbest radikaller, lipit, protein ve DNA gibi önemli hücresel makromoleküllere zarar vermektedir. Bu radikaller arasında en önemlileri  $O_2\bullet$  ve  $OH\bullet$  olarak ifade edilmektedir. Vücudumuzda doğal olarak da oluşturulan radikallerin fizyolojik rolleri organizmayı bir mikrobiyal saldırıya karşı savunmaktır [169-171]. Oksidatif stres varlığında ROB aktif granülositler tarafından büyük konsantrasyonlarda üretilmektedir ve herhangi bir hücresel yapıya zarar verebilir. Oksijen miktarının % 2-5'i mitokondrilerde ROB üretmek için kullanılmaktadır [169, 172].

ROB üretimi ve antioksidan sistem normal şartlar altında iyi bir denge içinde çalışmaktadır. Ancak, bu sistem bir hastalık veya çevresel koşullar tarafından bozulabilmektedir. Ateroskleroz ve diyabetin neden olduğu kontrolsüz ROB aktivitesi, organizmada, bir hedef organda (akciğerler gibi) oksidatif stres ile indüklenen hasara veya pekçok organda sistemik hasara yol açabilmektedir [169, 173]. Lipit, protein, enzim, DNA gibi önemli biyo-makromoleküller zarar görebilmektedir ve böylece fizyolojik süreçler etkilenebilmekte ve/veya hücre ölümünün ortaya çıkabilmektedir. Oksidatif strese bazı durumlarda mutasyonlar, karsinogenez, erken yaşlanma veya çoklu organ fonksiyon bozukluğu eşlik edebilmektedir [169].

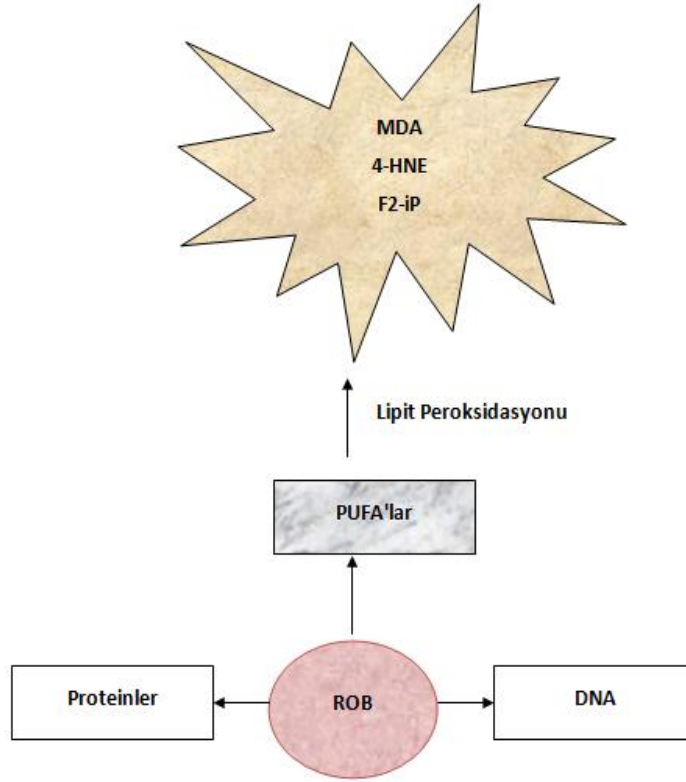


İnsanlarda oksidatif stresin belirlenmesi *in vivo* olarak çeşitli şekillerde gerçekleştirilebilir: (a) ROB'un aşırı üretiminin belirlenmesi, (b) Enzimatik olmayan antioksidanların konsantrasyonunun ölçülmesi, (c) Antioksidan ve detoksifikasyon enzimlerinin aktivitesi/ekspresyonu veya (d) Spesifik biyobelirteçlerin konsantrasyonunun saptanması. ROB'un çok sınırlı kararlılığı analitik yöntemlerle niceliksel olarak ölçümünü zorlaştırmaktadır. Enzim aktivitesi *in vivo* çalışmak için de çok kolay ve uygun değildir. Ancak, oksidatif stresin uygun biyobelirteçleri ve bunların vücut sıvılarında izlenmesi, oksidatif stresi ölçmek için daha kolay bir yöntem olarak değerlendirilmektedir [174].

Tüm hücrel membranlar, lipit çift katmanları oluşturarak içten dışa ve sitoplazmayı hücreler arası bölümlerinden ayıran büyük bir fosfolipit parçasına sahiptir. Bazı fosfolipidlerin hidrofobik kısmında, zar yapısı ve hücre fizyolojisinde önemli bir bileşen olan çoklu doymamış yağ asitleri (*Polyunsaturated Fatty Acids*, PUFA) bulunur [175, 176]. Ayrıca, PUFA içeren fosfolipidler, dokular arasında triaçilgliserol ve kolesterol taşıyan lipoprotein partiküllerinde bulunur. Bununla birlikte, PUFA'lar, yapılarındaki çifte bağlar nedeniyle oksidatif strese özellikle duyarlıdır [177]. Oksidatif stres sırasında artan ROB'lar, özellikle PUFA içeren fosfolipidleri etkileyen lipit peroksidasyonu adı verilen zincir reaksiyonunu başlatır. Nihayetinde MDA veya 4-HNE gibi ikincil ürünlere ayrışabilen lipid peroksitleri oluşur [175, 178]. Şekil 2.13 ve Şekil 2.14'te bazı oksidatif stres biyobelirteçlerinin oluşumu gösterilmiştir [169].



Şekil 2.13. Oksidatif stres biyobelirteçleri [169].



**Şekil 2.14.** Oksidatif stresin ana hedefleri [179].

Serbest radikallerin ana hedefleri lipitler, özellikle de çoklu doymamış yağ asitleridir ve bu ataklar bir zincir reaksiyonu olan lipid peroksidasyonu ile sonuçlanır. Hücre zarı lipitlerinin zarar görmesi, biyolojik fonksiyonları ve/veya hücrelerin stabilitesini büyük ölçüde etkiler. Bu nedenle, oksidasyon ürünleri, oksidatif stresin belirteçleri olarak kullanılabilir. Yağ asitleri ve esterleri üç farklı mekanizma ile ayrıştırılır: (a) enzimatik oksidasyon, (b) serbest radikal oksidasyonu ve (c) enzimatik olmayan ve radikal içermeyen oksidasyonu. Her bir oksidasyon yolu ile farklı tipte maddeler üretilmektedir [169, 174].

Biyolojik olarak izoprostan ailesinin aktif üyesi, 8-izo-prostaglandin  $F_{2\alpha}$ , oksijen radikalleri tarafından hücre yüzeyinde araşidonik asidin (AA) enzimatik olmayan doğrudan oksidasyonu ile üretilmektedir. Genellikle oksidatif stresin en önemli biyobelirteçleri olarak bilinmektedir [174].  $\omega$ -6 ve  $\omega$ -3 doymamış yağ asitleri, konjuge dienler, alkanlar, aldehitler, doymuş ve doymamış ketonlar yağ asitlerinin oksidasyonu ile oluşur. Yağ asidi oksidasyonu sonucu oluşan bazı ürünler yüksek reaktiviteleriyle sitotoksikite ve genotoksikite göstermektedir. Aldehitler, protein ve nükleik asitlerin amino gruplarıyla reaksiyona girerek canlı organizmaların temel

yapı taşlarına zarar verirler. Amino asitlerin ve nükleik asitlerin oksidasyonu ile o-tirozin ve 8-hidroksiguanozin oluşmaktadır ve biyobelirteç olarak kullanılmaktadır [169].

İnhale kristalin SiO<sub>2</sub> partikülleri akciğerde oksidatif strese neden olmaktadır. Bu süreç, kristalin SiO<sub>2</sub>'nin yüzeyinde üretilen ROB indüklenmesiyle başlamaktadır [15, 16]. Oluşan ROB, daha önce açıklandığı gibi lipitleri, proteinleri ve nükleik asitleri oksitler. SiO<sub>2</sub>'nin neden olduğu bu okside moleküller, normal işlevlerini kaybeder ve hücrel metabolizma bozulur [16, 17]. Oluşan oksidatif lipit hasarının ölçülmesi, 8-izo-prostaglandin F<sub>2α</sub>, MDA ve 4-HNE gibi aldehitlerin ölçülmesi ile değerlendirilebilir. Soluk verilen nefes, kan ve idrardaki oksidatif stres biyobelirteçleri düzeylerinin karşılaştırılması, muhtemelen akciğerlerde veya diğer dokularda oluşturulmuş stresin izlenmesini sağlamaktadır [169, 180].

#### a) Malondialdehit

Malondialdehit, hücrelerde çoklu doymamış yağ asitleri peroksidasyonunun son ürünlerinden biridir. Serbest radikallerin etkileri ile makromoleküllerin oksidatif hasarı sonucunda MDA ortaya çıkar. Lipit peroksidasyonu, oksidatif stres sırasında ortaya çıkar ve otolog biyomoleküllere bağlanabilen ve potansiyel olarak istenmeyen biyolojik cevaplar oluşturabilen epitoplara üretebilen MDA gibi son ürünlerin üretilmesine neden olur. Bu nedenle, bağışıklık sistemi, hem hücrel hem de çözünür efektörler yoluyla bu ürünleri bağlayıp nötralize ederek, MDA epitoplarından korunma mekanizmaları geliştirmiştir [175].

MDA, biyolojik materyallerde oksidatif stresin bir ölçüsü olarak yaygın olarak kullanılır. DNA, lipidler veya proteinler gibi diğer biyomoleküllere kovalent olarak bağlanabilen ve böylece MDA epitopları olarak adlandırılan otolog yapılar üzerinde neo-epitoplara oluşturabilen reaktif bir aldehittir [181]. Lipid peroksidasyonunun; kardiyovasküler, pulmoner, hepatik, retinal ve nörodejeneratif hastalıklarda inflamatuvar bir bileşen olan son ürünlerinin saptanmasıyla birçok patolojiye eşlik ettiği kanıtlanmıştır [175].

İnsanlarda özellikle genotoksik, mutajenik ve kanserojenik potansiyeli dahil olmak üzere MDA'nın toksikolojisini belirlemek için çok sayıda *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar yapılmıştır. MDA verileri IARC'da gözden geçirilmiş ve MDA IARC

Monograflarında sınıflandırılmıştır (1987). 1999 yılında MDA'nın Grup 3 olan “İnsanlarda kanserojen olarak sınıflandırılmayanlar” olduğu bildirilmiştir [179]. Devam eden süreçte MDA tarafından indüklenen DNA hasarının kimyası ve biyolojisi, son otuz yılda birçok grup tarafından incelenmiştir. Marnett, incelemesinde “MDA'nın yaşam tarzı ve diyet faktörleriyle bağlantılı olarak kansere önemli ölçüde katkıda bulunabileceğini” belirtmiştir [179, 182]. Marnett ve arkadaşları, 2003 yılında MDA'nın insan hücrelerinde mutajenik olduğunu bildirmiştir [183].

DNA ve proteinlerle etkileşimi mutajenik ve aterojeniktir [184]. *In vitro* MDA; proteinleri, DNA, RNA ve diğer birçok biyomolekülü değiştirebilir. Son dönemde yapılmış bir çalışmada, hiperlipidemik tavşanların aterosklerozunda MDA ile değiştirilmiş proteinin meydana geldiği monoklonal antikolarla gösterilmiştir [185]. Serbest radikallerde artış olması, MDA'nın aşırı üretilmesine neden olmaktadır. MDA düzeyi, kanserli hastalarda da oksidatif stresin bir belirteci olarak değerlendirilmektedir [186]. Bu aldehit yapısındaki ürün oldukça toksik bir moleküldür ve sadece lipit peroksidasyonunun bir belirteci olarak değil daha fazlası olarak düşünülmelidir [184].

#### **b) 4-Hidroksinonenal**

Hidroksinonenal, çoğunlukla linoleik asit, linolenik asit ve AA peroksidasyonu ile oluşan  $\alpha$ ,  $\beta$ -doymamış bir hidroksialkenaldir [187, 188]. HNE üretimi enzimatik olmayan süreçlerle oluşmasına rağmen, NADPH bağımlı mikrozomal enzimlerin varlığında AA'dan meydana gelebildiği çalışmalarla gösterilmiştir [189]. Demir iyonlarının varlığında PUFA'ların HNE'ye indirgenmesi hızlanmaktadır. HNE güçlü bir hidrofobik yapıya sahip olduğu için, çoğunlukla üretildiği zarlarla ilişkilidir; bununla birlikte, farklı hücresel bölmelere de yayılabilir ve birçok farklı alt tabaka ile etkileşime girebilir. HNE, DNA, proteinler ve nükleofilik tiyol (-SH) veya amino (-NH<sub>2</sub>) grupları içeren diğer moleküller gibi çeşitli hücresel bileşenlerle kolaylıkla reaksiyona girebilir. HNE'nin yüksek reaktivitesi, üç fonksiyonel grubun varlığına bağlıdır: bir aldehit, karbon C2 ve C3 arasında bir çift bağ (alken) ve karbon C4'te bir sekonder alkol [187].

4-HNE, PUFA'nın peroksidatif ayrışmasının önemli bir ürünü olarak üretilir ve sitotoksik, hepatotoksik, mutajenik ve genotoksik özelliklere sahiptir. Plazma ve çeşitli organlarda oksidatif stres koşulları altında artmış HNE seviyeleri belirlenmiştir [185]. Memeli hücreleri, HNE metabolizması dahil olmak üzere yüksek derecede aktif aldehit yollarına sahiptir. Çoğu hücre türündeki birincil HNE ürünü olarak, HNE-glutasyon konjugatı (HNE-GSH), hidroksinonenoik asit ve ilgili alkol 1,4-dihidroksinonen (DHN) belirlenmiştir. Oksidatif stres ürünleri nedeniyle proteinleri modifikasyondan korumak için HNE metabolizması çok hızlı gerçekleşir böylece ikincil antioksidatif savunma mekanizmalarının önemli bir parçası olarak HNE degrade edici yolların önemini ortaya koyar. Plazmadan, çeşitli insan dokularından ve diğer memeli türlerinden, HNE seviyelerinin artan yaş ile birlikte yükseldiği gösterilmiştir. Bunun sebebinin HNE oluşumunun hızlanması mı yoksa bu bileşenin azalan metabolizması mı olduğu daha anlaşılmalıdır [190].

4-HNE'nin biyolojik etkileri, esas olarak proteinler, DNA ve amino grubu içeren fosfolipitler dahil olmak üzere önemli biyomoleküller ile kovalent katımına bağlıdır. Proteinler, nükleik asitler ve membran lipidlerindeki nükleofilik fonksiyonel gruplarla kovalent katım oluşturulması yoluyla bir dizi hücre sinyalizasyonu etkilenebilir [191]. Mitokondri, hücreSEL biyoenerji için hayati öneme sahiptir ve ROB üretimi için başlıca hücreSEL bölge olarak kabul edilir [192]. Yapılan çalışmalar mitokondrinin ayrıca 4-HNE oluşumu için önemli bir yer olduğunu ve 4-HNE'den mitokondriyal makromoleküler katım ürünlerinin, kanserin başlatılmasında ve ilerlemesinde rol oynadığını göstermiştir [192]. Lipid peroksidasyonunun önemli bir belirteci olan HNE-protein katım ürünleri, Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, Huntington hastalığı, amiyotrofik lateral skleroz hastaları ve yaşa bağlı nörodejeneratif hastalıkların beyin dokuları ile vücut sıvılarında yükselmiştir [187].

### c) F2-İzoprostan

İzoprostanlar, araşidonik asidin serbest radikal ile başlatılan peroksidasyonunu içeren enzimatik olmayan bir mekanizma yoluyla *in vivo* olarak oluşturulan prostaglandin benzeri bileşiklerdir. Bu bileşikler prostaglandinlerin prostan halkasını içeren bir dizi izomer olduğundan, F2-iP olarak adlandırılır. İzoprostan yolağındaki ara maddeler, F2-iP'leri oluşturmak üzere indirgenmiş ve aynı

zamanda *in vivo* olarak yeniden düzenlenmiş olan E2-, D2-, A2-, J2-izoprostanlar, izotromboksanlar ve yüksek derecede reaktif  $\gamma$ -ketoaldehydler, isoketals olarak adlandırılan prostaglandin H2-benzeri bileşiklerdir [193]. Çeşitli izoprostanların güçlü biyolojik etki gösterdikleri bulunmuştur. Reseptör aracılı eylemleri arasında kimyasal özelliklerine bağlı olarak vazokonstriksiyona sebep olur [194]. Son yapılan çalışmalarda, F2-iP'lerin lipit peroksidasyonunun son derece hassas belirteçleri olduğu ve ateroskleroz, Alzheimer hastalığı ve pulmoner bozukluklar dahil olmak üzere bir dizi insan hastalığında oksidan hasarın rolünü aydınlattığı gösterilmiştir. Alzheimer hastalarının postmortem beyin örneklerinin F2-iP seviyelerinin kontrollere göre anlamlı şekilde yükseldiği gösterilmiştir [195].

Çok sayıda patolojik süreçte serbest radikal aracılığıyla indüklenen oksidatif stres olduğu bilinmektedir. Lipid peroksidasyonu, oksidatif stresle ilişkili en yaygın durumlardan biridir ve lipid peroksidasyon ürünlerinin ölçümü, *in vivo* koşullarda oksidatif stresi değerlendirmek için kullanılmaktadır. Primer son ürünlerin değerlendirilmesi, konjuge dienler ve lipit hidroperoksidin ölçümünü içerirken, ikincil son ürünlerin miktarları tiyo barbitürik reaktif maddeleri, gaz şeklinde alkanları ve F2-iP olarak adlandırılan prostaglandin F2 benzeri ürünleri içermektedir [194].

### 2.3.5. Sfingozin-1-Fosfat

Hücre zarında dört tip fosfolipit bulunmaktadır ve yapılarında taşıdıkları alkol kısmında bulunan moleküllere göre isimlendirilmektedir. Bunlar fosfotidilkolin, fosfotidiletanolamin, fosfotidilserin ve sfingomiyelindir. Hücre zarı fosfolipitlerinden sfingomiyelin oluşumunda gliserol yer almaz. Sfingomiyelin, sfingozin, fosforik asit ve kolinin birleşmesiyle oluşur [196].

Sfingomiyelin (SM), seramid, sfingozin ve S1P hücre zarının akışkanlığının düzenlenmesinde önemli yapısal rol oynayan sfingolipidlerdir ve sfingoid tabanlı lipit ailesinin üyeleridir. [196, 197]. Sfingolipidler tüm ökaryotik plazma zarlarının yapısında bulunmaktadır. Yaygın olarak lipit tabakanın mekanik olarak stabil ve kimyasal olarak dirençli bir dış yapı oluşturmasını sağlayarak hücre yüzeyini koruduğu düşünülür [198]. Sfingolipidler, membran bileşimindeki intraselüler (hücre içi) ikincil haberci ve ekstraselüler (hücre dışı) mediyatör gibi çeşitli fonksiyonlara

sahiptir. Hızlı bir şekilde üretilebilir veya birbirlerine dönüştürülebilirler. Birçoğu inflamasyon ve apoptoz ile büyük oranda ilişkili olan çeşitli hücrel süreçlerde önemli rol oynar. Sayısız sfingolipid arasında seramid ve S1P en çok dikkati çekenlerdir. Seramid, kistik fibroz ve kronik KOAH'ı olan hastaların akciğerlerinde artan bir hidrofobik moleküldür. Seramidin sentezinde yer alan nötr veya asit sfingomiyelinaz enzimleri, amfizematik bulguları olan sigara kullanıcılarında ve şiddetli sepsis hastalarında anormal miktarda bulunmaktadır. Bu nedenle, son dönemde yeni farmakolojik hedef olarak kabul edilmektedirler. S1P, seramidin çeşitli etkilerine karşı G proteinine bağlı S1P reseptörlerine (S1P1-S1P5) bağlanarak etki gösteren bir ekstraselüler mediyatördür. S1P1 reseptörleri vasküler bariyer fonksiyonlarını güçlendiren ve antiapoptotik olan özellikleri ile ilgi çekicidir. Bu nedenle S1P1 reseptör ligandları, KOAH ve akut akciğer hasarı için yeni ilaçlar olarak önerilmektedir. S1P birçok lökosit için güçlü bir kemotaksin olup, lenfosit dolaşımını düzenler ve astımın havayolu aşırı duyarlılığı ve pulmoner eozinofil sekestrasyonu gibi anahtar semptomlarına katılır. Bu bulgulara dayanarak, KOAH, kistik fibrozis, astım ve akut akciğer hasarının tedavisinde spesifik olarak hedef yolaklarında sfingomiyelinazlar, sfingozin kinazlar ve S1P reseptörleri kilit rol oynamaktadır [199].

Sfingolipitlerden biri olan ve sfingozin kinaz (SphK) aracılığıyla oluşan S1P, hücrenin büyümesi, hayatta kalması, hareketinin düzenlenmesi gibi faaliyetlerinin yanında invazyon, anjiyogenez, vasküler olgunlaşma, lenfosit hareketleri ve bağışıklığı da düzenler. Bunun yanında, artan S1P üretimi çoklu skleroz, alerji, ateroskleroz ve otoimmün hastalıkları gibi çeşitli patofizyolojik süreçlerle de ilişkili olduğu ileri sürülmüştür [196, 200]. Son zamanlarda, S1P'nin ayrıca inflamasyon, kanser ve Alzheimer hastalığında önemli hücre içi hedefleri olduğu gösterilmiştir [201]. S1P üretilmesi için sfingozini fosforile eden iki enzim tanımlanmıştır. Bunlar SphK'ın iki izotipi olan sfingozin kinaz 1 (SphK1) ve sfingozin kinaz 2 (SphK2)'dir. SphK1'in tümör ilerlemesinde fonksiyonları tanımlanmıştır ancak SphK2'in fonksiyonları daha az bilinmektedir [196, 200].

S1P, G proteine bağlı beş hücre yüzey reseptörünün ligandlarından biridir. S1P reseptörleri hücre yüzeyinde, sitoplazmada ve çekirdekte bulunur [198]. S1P reseptörlerine bağlanarak büyüme, hücre yaşamının devamı, hücre iskeleti ve



hareketi önemli hücrel fonksiyonları düzenlemektedir ve bu özellikleriyle kanser patogenezinde rolü bulunmaktadır. Epidermal büyüme faktörü (EGF), insan meme kanserinin invazyonu ve tümör gelişimin ilerlemesinde önemli bir rol oynamaktadır. EGF, meme kanseri hücrelerinin plazma membranında SphK1 translokasyonunu ve aktivasyonunu indüklemektedir [202]. S1P'nin hücre içindeki miktarı iki enzim tarafından kontrol edilir, SpHK ve sfingosin-1-fosfat liyaz (SPL). SpHK, S1P oluşturmak üzere sfingozini fosforlarken, SPL ise S1P'den geri dönüşümsüz olarak etanolamin ve heksadesanolünü oluşturur. Bu iki enzim hücre içi S1P miktarını belirleyerek hücrenin yaşamının devamını etkiler. Özellikle hücre streseyken bu iki enzimin ekspresyonun artması hücrenin çoğalmasını ve apoptozunu etkileyebilir. SPL'nin aşırı ekspresyonu hücre içi S1P ve sfingozin seviyelerini azaltır ve apoptoz ile sonuçlanan, seramid düzeylerini yükseltir [203].

S1P, adenilat siklaz, fosfatidilinositol 3-kinaz, Ras-mitojen aktivite protein kinaz (*Ras-Mitogen Activated Protein Kinase*, Ras-MAPK), fosfolipaz C, protein kinaz B (*Protein kinase B*, Akt/PKB), c-Src tirozin kinaz, küçük guanozin trifosfataz (GTPaz)'lar, Rac ve Rho, fosfolipaz D ve fokal adezyon kinaz p125'i içeren sinyal yollarını uyarır. Bu sinyal yolları, normal hücrel fonksiyon için önemli pek çok olayı olduğu gibi tümör invazyonu ve metastazını da kontrol edebilmektedir. S1P, hücrenin yaşam sinyallerini uyarır, endotel hücre hareketini ve tüp oluşumunu uyararak anjiyogenezi teşvik edebilirken bazı tümörleri ve lökosit hücre göçlerini engelleyebilmektedir [196, 204].

Özetle; sfingozin kinaz, biyoaktif sfingolipid sinyal molekülleri seramid, sfingozin ve S1P dengesinin düzenlenmesinde önemli bir oyuncudur. Sfingolipid metabolizmasının yeniden regülasyonundan kaynaklanan patolojik pekçok durum bulunmaktadır ve bu koşulların çoğunun SpHK/S1P yolu aracılığıyla ortaya çıktığı bilinmektedir [205].

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Kullanılan Kimyasallar Maddeler

Kullanılan Kimyasal Maddeler	Firma Adı
3 $\beta$ -hidroksi-5-kolesten-7-on-d7 (7 ketokolesterol-D7)	Avanti, Katalog No T700046P
3 $\beta$ -hidroksi-5-kolesten-7-on (7 ketokolesterol)	Avanti, Katalog No 700015P
3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -Trihidroksikolestan	Toronto, Katalog No T795100
3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -Trihidroksikolestan, D7	Toronto, Katalog No T795102
N-(3-Dimetil Amino Propil)-N' - Etil Karbodiimid Hidroklorid (EDC)	Sigma, E1769
N,N-Dimetilglisin hidroklorid (DMG)	Sigma, D6382
4-(Dimetilamino) piridin, Reaktif Ekli, (DMAP)	Sigma,107700
Kloroform, <i>Chromasolv</i> <sup>®</sup> Ekli, HPLC için, >=%99,9, Stabilizan olarak %0,5- 1,0 Etanol içerir	Merck
Heksan <i>Chromasolv</i> <sup>®</sup> HPLC için, >%97,0	Merck
Metanol <i>Chromasolv</i> <sup>®</sup> , Gradyan Sınıfı, HPLC için, >%99,9	Merck
(Aktif karbon ve dextran ile muamele edilmiş insan plazması antikoagülanı (ACD, EDTA, Heparin)-UNIT, Steril Filtreli	Zenbio, Katalog No SER-PLE-CDS
Formik asit LC-MC Ultra, UHPLC-MS için eluent katkı maddesi	Sigma, Katalog No 56302 Fluka

Amonyum format HPLC için, $\geq 99,0$	Sigma, Katalog No 17843
Asetonitril, LC-MS Ultra <i>Chromasolv</i> <sup>®</sup>	Sigma, Katalog No 34967
Standart (2400 pg/ml)	Eastbiopharm Human 4-Hydroxynonenal (4- HNE) ELISA Kit
Standart (1280 ng/L)	Eastbiopharm Human F2-iP ELISA Kit
Standart (128 nmol/ml)	Eastbiopharm Human MDA ELISA Kit
Mobil Faz Çözücü A - Distile su içinde 10 mM Amonyum Asetat + %0,01 Formik asit çözeltisi	
Mobil Faz Çözücü B - Metanol içinde %0,01 Formik asit çözeltisi	
Distile su	

### 3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

<b>Kullanılan Araç ve Gereçler</b>	<b>Firma Adı, Modeli</b>
LC-MS/MS (Tandem-Kütle Spektrometresi)	Shimadzu model 8040
LC-MS/MS	Agilent 6420
Ependorf santrifüjü	Abott
Su banyosu	Nuve B5
HPLC Cam insert	Sigma, Hettich Universal 30 RF
Santrifüj	Lanofuge 200 Heraeus
Evaporatör	Univapo 150 H
Vakum fırını	Kendro B6420
Cam test tüpleri (10 ml)	Fisher Scientific
Orbital çalkalayıcı	Heidolph tetramax 101

LC-MS/MS Kolon, Simetri C18 (3-5 µm, 21*50 mm)	WAT 200650
LC-MS/MS Kolon, ACE C18 (50 mm x 4,6 mm x 5 µm) kolonu	
Hassas ölçek	Shimadzu ATX 224
37°C inkübatör	Eastbiopharm ELISA Kit
Hassas otomatik pipetler ve pipet uçları	Gilson, Mettler Toledo
Buz kırma makinası	Skotsman
Buzdolabı	Beko BK 3531 T
Deiyonize su cihazı	Baunstead
Derin dondurucu (-20°C)	Arçelik
Derin dondurucu (-80°C)	AS-Polar 530 V
Distile su cihazı	Mes
Etüv	Dedeoğlu
Vorteks	Janke & Kunkel VF 2
Terazi	Schimadzu Libror EB-330D
Ultrasonik Banyo	Transsonic 460/H
Spektrofotometre	Shimadzu UV 1600

### 3.3. Hazırlanan Çözeltiler

#### 3.3.1 LC-MS/MS ile Oksisterol Analizi Yönteminde Kullanılan Çözeltiler

- **7-Ketokolesterol ve 3β, 5α, 6β Trihidroksi Kolesterol Stok Çözeltisinin Hazırlanması:**

7-Ketokolesterol ve triol stok çözeltileri, 1 mg/ml konsantrasyonda olacak şekilde, toz halindeki maddelerin yüksek performanslı sıvı kromatografisi (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) kalitesindeki metanolde çözülmesi ile

hazırlanmıştır. Ayrıca, 5 mg/ml konsantrasyonda bir ara stok hazırlamak için HPLC kalitesindeki metanol ve deiyonize distile su kullanılarak 7-KC ve triolun stok çözeltisi 1:200 oranında seyreltilmiştir. Çözeltiler -20°C'de analize kadar saklanmıştır.

- **7-KC ve Triol Çalışma Standart Çözeltisinin Hazırlanması:**

Çözeltiler döteryum içeren internal standartlar kullanılarak hazırlanmıştır. İnternal standardın çalışma çözeltisi ara stoktan metanol ile seyreltilerek 10 µg/ml triol ve 10 µg/ml 7-KC hazırlanmıştır.

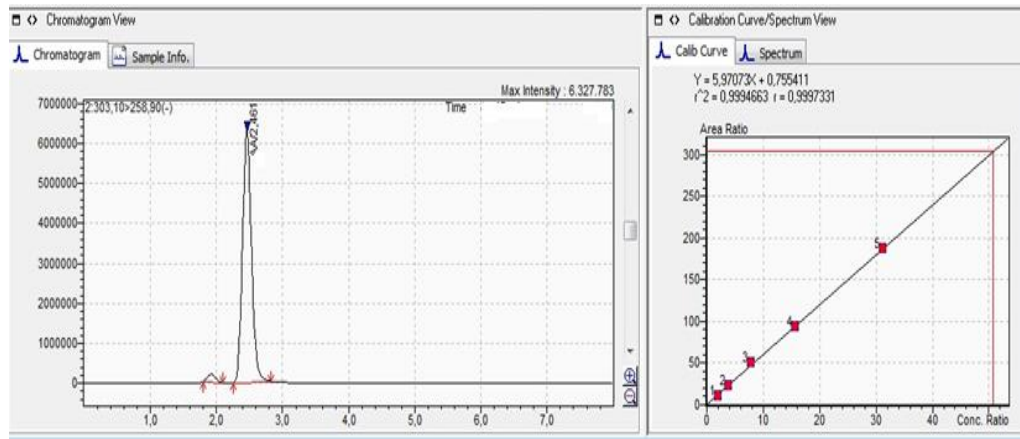
- **Kalibrasyon Standart Çalışma Çözeltisi:**

Ticari insan plazma kalibrasyon standartlarının hazırlanması için fibrin ve lipidden arındırılmış tanı amaçlı plazma kullanılmıştır. 7-KC ve triol için kalibrasyon doğrusu oluşturulmuştur. Kalibrasyon aralığı, normal sağlıklı bir insanda oksisterollerin yaklaşık biyolojik seviyelerine ve oksisterollerin çok yüksek olduğu patolojik seviyelere dayanılarak kararlaştırılmıştır. Sekiz kalibrasyon standardının (8-Karışım kalibratörü) karışımı Tablo 3.1'de gösterilen standartların stok çözeltilerinden hazırlanmıştır (Şekil 3.1). Bu standart kalibratörler, ara stok çözeltilerinin tek tek ilaveleri ile hazırlanmıştır. Standartlar hazırlandıktan sonra küçük parçalara ayrılmış ve -80°C'de saklanmıştır.

Tüm kalibrasyon eğrileri, x eksenini üzerindeki kalibratör analit konsantrasyonuna karşı y-ekseni üzerindeki analit alanı/IS alanı oranının çizilmesiyle oluşturulmuştur. Kalibrasyon noktaları, 8 kalibratör seviyesi (KAL 1 ile KAL 8) kullanılarak elde edilmiştir. ( $r^2 = 0.997$ ) [18].

**Tablo 3.1.** Kalibrasyon standart çalışma çözeltilerinin hazırlanması (1 L'de) [18].

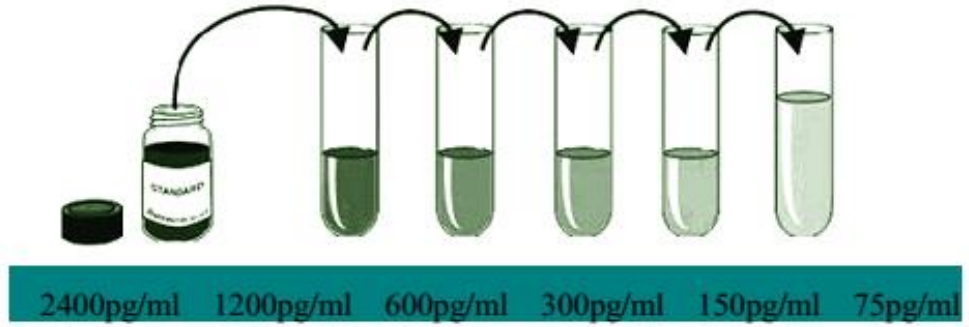
Kalibratörler	7KC ve Triol	7KC ve Triol 5000 ng/ml	7KC ve Triol 500 ng/ml	7KC ve Triol 50 ng/ml
KAL 1	3,125 ng/ml	-	-	62,5 ml
KAL 2	6,25 ng/ml	-	12,5 ml	-
KAL 3	12,5 ng/ml	-	25 ml	-
KAL 4	25 ng/ml	-	50 ml	-
KAL 5	50 ng/ml	-	100 ml	-
KAL 6	100 ng/ml	20 ml	-	-
KAL 7	200 ng/ml	40 ml	-	-
KAL 8	400 ng/ml	80 ml	-	-

**Şekil 3.1.** 7-KC ve triol için kalibrasyon eğrisi.

### 3.3.2. İnsan 4-Hidroksinonenal ELISA Kit'i ile Plazma ve İdrarda Bulunan 4-Hidroksinonenal Analizi Yönteminde Kullanılan Çözeltiler

- **Standart Çözeltilerinin Hazırlanması:**

Standartlar, çalışılan test kitinde sağlanan stok 4-HNE çözeltisinden kullanma talimatına göre dilue edilerek hazırlanmıştır (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Standart çözeltilere ait dilüsyonların hazırlanması.

120 µl stok çözelti (2400 pg/ml) üzerine 120 µl standart çözücüsü eklenerek 1200 pg/ml konsantrasyondaki standart 5 çözeltisi hazırlanmıştır. Daha sonra bu standarttan başlayarak, her bir standart ½ oranda dilue edilmiş sırasıyla 600 pg/ml, 300 pg/ml, 150 pg/ml, 75 pg/ml konsantrasyonlarda 4 adet standart çözelti hazırlanmıştır.

### 3.3.3. İnsan 8-İsoprostan ELISA Kit'i ile Plazma ve İdrarda Bulunan 8-İsoprostan Analizi Yönteminde Kullanılan Çözeltiler

- **Standart Çözeltilerinin Hazırlanması:**

Standartlar, yukarıdakine benzer şekilde çalışılan test kitinde sağlanan stok çözeltiden kullanma talimatına göre dilue edilerek hazırlanmıştır (Şekil 3.3).



**Şekil 3.3.** Standart çözeltilere ait dilüsyonların hazırlanması.

Kitten sağlanan 1280 ng/L stok çözeltinin 120  $\mu$ l'si üzerine 120  $\mu$ l standart çözücü eklenerek 640 ng/L konsantrasyondaki standart 5 çözeltisi hazırlanmıştır. Daha sonra 120  $\mu$ l standart çözelti üzerine 120  $\mu$ l standart çözücü eklenerek ve bu işlem her bir standarttan bir sonraki için tekrar edilerek 320 ng/L - 40 ng/L aralığındaki standart çözeltiler hazırlanmıştır.

### 3.3.4. İnsan Malondialdehit ELISA Kit'i ile Plazma ve İdrarda Bulunan Malondialdehit Analizi Yönteminde Kullanılan Çözeltiler

- **Standart Çözeltilerinin Hazırlanması:**

Standartlar, test kitinde sağlanan ana stok çözeltinin Şekil 3.4'te gösterildiği şekilde dilue edilmesiyle hazırlanmıştır.



**Şekil 3.4.** Standart çözeltilere ait dilüsyonların hazırlanması.

Ana stok MDA çözeltisinin konsantrasyonu 128 nmol/ml olup, üzerine 120  $\mu$ l'si üzerine 120  $\mu$ l standart çözücü eklenerek 64 nmol/ml standart 5 çözeltisi hazırlanmıştır. Daha sonra standart 5 çözeltisinden başlanmak üzere her bir standart



½ oranda dilue edilmiş sırasıyla 32 nmol/ml, 16 nmol/ml, 8 nmol/ml ve 4 nmol/ml konsantrasyonlarda 4 adet daha MDA standart çözeltisi hazırlanmıştır.

### 3.3.5. Sfingozin-1-Fosfat Analizi Yönteminde Kullanılan Çözeltiler

- **İnternal standartın hazırlanması:**

Ticari olarak satın alınan 1 µg/ml'lik döteryumlu S1P stok çözeltisi, HPLC kalitesinde metanol ile 7,5 ng/ml'ye dilue edilmiştir. Bu amaçla, 375 µl stok içerisinden alınmış ve yaklaşık 30 ml metanol bulunan mezürün üzerine eklenmiştir. 50 ml'ye yine metanol ile tamamlanarak istenen ara stok hazırlanmıştır. 0,312 - 0,625 - 1,25 - 2,5 - 5 - 10 - 20 - 40 ng/ml konsantrasyonlarındaki standart çözeltileri bu ara stoktan HPLC kalitesinde metanol ile dilue edilerek hazırlanmıştır.

### 3.4. Çalışma Grubunun Seçimi

Bu tez çalışmasının gerçekleştirilebilmesi için çalışma protokolü Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulunca, Helsinki Bildirgesi'ne uygun olarak onaylanmıştır (GO 16/697-18) (Bkz. EK 1).

Ankara Keçiören Mesleki ve Çevresel Hastalıklar Hastanesi Göğüs Hastalıkları ve Tüberküloz bölümüne başvurmuş 47 Silikozis hastası çalışmada yer almıştır. Çalışma grubu içerisinde bulunan hastalar hastanede yatan 18 yaş üzeri yetişkin hasta grubundan seçilmiştir. İlgili hekim tarafından mesleki öyküsü, maruziyetleri ve sigara öyküsü alındıktan sonra klinik parametreleri değerlendirilmiştir.

Kronik hastalığa sahip, kemoterapi/radyoterapi tedavisi almış, viral enfeksiyon geçirmiş ve mesleki olarak toz ve kimyasala maruziyeti olmayan bireyler hasta grubuna dahil edilmemiştir.

Kontrol grubu olarak ise hasta grubunda söz konusu olan kimyasal madde ve toza maruziyeti bulunmayan, cinsiyet, yaş, sigara alışkanlığı ve hayat standartları yönünden hasta grubuna benzer, Ankara Keçiören Mesleki ve Çevresel Hastalıklar Hastanesi'ne başvurmuş periyodik muayeneye gelen sağlıklı 30 kişi seçilmiştir.

### **3.5. Çalışma Grubundan Biyolojik Örneklerin Toplanması**

#### **3.5.1. Kan ve İdrar Örneklerinin Toplanması**

Kan ve idrar örnekleri Silikozis tanısı konan 47 hastadan ve periyodik muayene için gelen 30 sağlıklı kontrolden toplanmıştır. Her bir kişi için 10 ml kadar heparinize kan örneği ve steril idrar kaplarına da idrar örneği hastanede uzman hekim kontrolünde alınmıştır. Alınan numuneler kısa sürede hastaneden Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji Bölümüne soğuk zincir kurallarına uygun şekilde transfer edilmiştir. Kan örnekleri 2500 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonucunda numuneler 2 kısma ayrılmış (plazma ve eritrosit) ve ayrılan kısımlar ependorflara aktarılarak porsiyonlanmış, -80°C'de saklanmak üzere kaldırılmıştır. İdrar örnekleri de homojen bir şekilde karıştırıldıktan sonra ependorf tüplere porsiyonlar halinde ayrılmış ve kan örneklerine benzer şekilde -80°C'de saklanmak üzere kaldırılmıştır.

#### **3.6. Çalışma Grubunun Klinik Parametrelerinin Değerlendirilmesi**

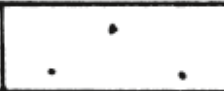
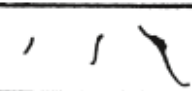




Biyokimyasal olarak klinik parametrelerin analizi Ankara Keçiören Mesleki ve Çevresel Hastalıklar Hastanesi Biyokimya laboratuvarında gerçekleşmiş olup bireylerin klinik verileri Göğüs Hastalıkları ve Tüberküloz bölümünde bulunan uzman hekim tarafından sağlanmıştır.

#### **3.7. Çalışma Grubunun Akciğer Filmleri**

Hasta grubunda bulunan işçilerin silikozis tanısının konması ve hastalıklarının derecesinin belirlenmesi amacıyla Ankara Keçiören Mesleki ve Çevresel Hastalıklar Hastanesi Radyoloji bölümünde Akciğer filmleri çekilmiş olup bu filmler Göğüs Hastalıkları ve Tüberküloz bölümünde bulunan uzman hekim tarafından incelenmiştir. Akciğer filmleri ILO standartlarına uygun olarak opasitelerin yoğunluğu, boyutu, şekli, kapladıkları alan, akciğerde hasar olan bölge ve opasitelerin oluşturduğu riske göre değerlendirilmiştir.

ILO standartlarına göre radyolojik görüntüler küçük veya büyük opasiteler şeklinde olabilir. Küçük opasiteler yuvarlak veya düzensiz opasiteler şeklindedir ve büyüklükleri 1 cm'den daha azdır. Küçük-yuvarlak opasiteler çaplarına göre p, q, r

sembolleri ile gösterilmektedir. 1,5 mm'den küçük yuvarlak opasiteler p, 1,5-3 mm boyutundakiler q, 3-10 mm boyutundakiler r olarak isimlendirilmektedir. Düzensiz opasitelerde ise opasitenin kısa boyutu olan kalınlığa göre s, t, u sembolleri kullanılmaktadır (Şekil 3.5) (Tablo 3.2) [3, 206].

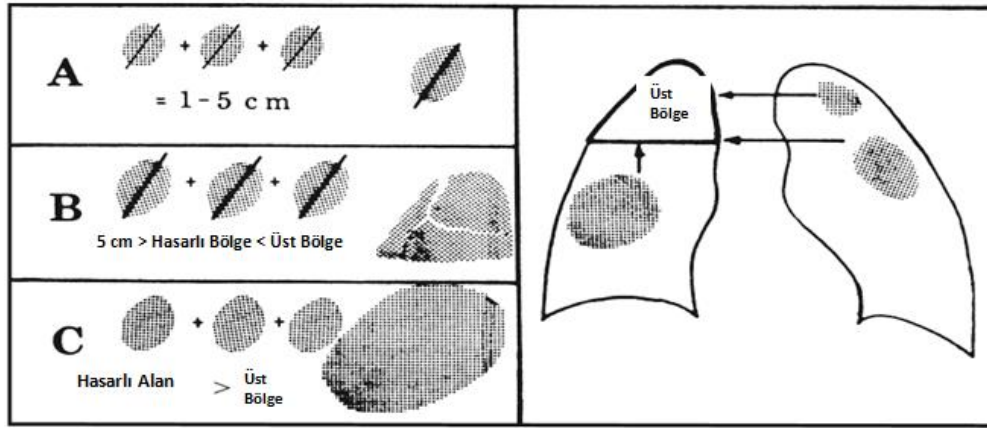
	R	mm	I	
p		- 1.5		s
q		1.5 - 3		t
r		3 - 10		u

Şekil 3.5. Küçük yuvarlak/düzensiz opasiteler [3, 206].

Tablo 3.2. Küçük opasiteler [3, 206].

Büyüklik	Yuvarlak	Düzensiz
0-1,5 mm	p	s
1,5-3 mm	q	t
3-10 mm	r	u

Büyük opasiteler A, B, C sembolleri ile gösterilir ve 1 cm'den büyük boyuttadır. A sembolü, büyüklüğü 1-5 cm arasındaki opasitelerdir. Birden çok olan opasitelerin akciğerde kapladığı toplam alan bir akciğer alanının 1/3'ünden az yer kaplıyorsa B, daha geniş alan kaplayan opasiteler C ile gösterilmektedir (Şekil 3.6) [3, 206].



Şekil 3.6. Büyük opasiteler [3, 206].

Radyolojide belirlenen opasiteler, büyüklüklerinin yanı sıra akciğer alanlarındaki yaygınlığı (profüzyon) yönünden de sınıflandırılır. Bu sınıflandırma 0-3 arasında 4 tane ana ve 3 tane alt olmak üzere toplam 12 sınıf bulunmaktadır (Şekil 3.7) (Tablo 3.3) [3, 206]. Buna göre;

- Sınıf 0; normal görünümü,
- Sınıf 1; her iki akciğer alanının üçte birinden daha az alana yayılmış opasiteler;
- Sınıf 2; her iki akciğer alanında daha yaygın görünümü,
- Sınıf 3; akciğer alanlarının tamamına yayılmış olan görünümü bildirmektedir [3, 206].

0		0/- 0/0
0		0/1
1		1/0 1/1 1/2
2		2/1 2/2 2/3
3		3/2 3/3 3/+

Şekil 3.7. Yoğunluk Kategorileri [3, 206].

**Tablo 3.3.** Yoğunluk Kategorileri [3, 206].

Küçük opasitelerde artan yoğunluk												
Kategori	0			1			2			3		
Alt kategori	0/-	0/0	0/1	1/0	1/1	1/2	2/1	2/2	2/3	3/2	3/3	3/+

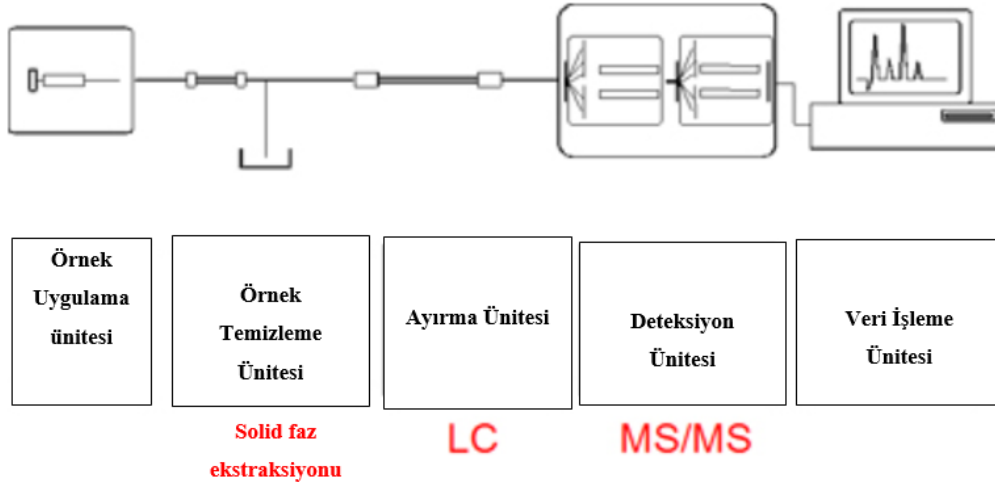
Akciğerin radyolojik değerlendirilmesi sırasında opasitelerin yaygınlığını ve büyüklüğünü ifade eden ikili semboller kullanılır. Radyolojik sembol olarak 1/1 ve s/s kullanılmışsa, yaygınlık düzeyi 1 olan s opasiteleri işaret etmektedir. Örneğin; 0/1 ve s/t; yaygınlık 0 ile 1 arasında ancak 0 yaygınlığın daha baskın olduğu, büyüklük bakımından da s opasiteler daha fazla olmak üzere s ve t opasitelerin bulunduğunu ifade eder. Bir başka örnek olarak 2/1 ve q/r; yaygınlık bakımından sınıf 2 daha baskın olmak üzere 2 ile 1 arası yaygınlık ve q opasiteleri hakim olmak üzere q ve r opasiteleri işaret etmektedir [3, 206].

### 3.8. 7-Ketokolesterol ve 3 $\beta$ , 5 $\alpha$ , 6 $\beta$ Trihidroksi Kolesterol Analizi

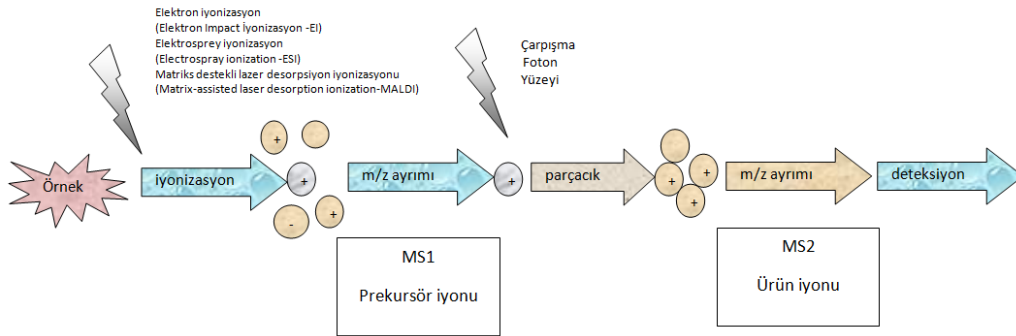
Oto-oksidasyon yoluyla üretilen oksisterollerden olan 7-KC'lerin sitotoksik ve pro-apoptotik özelliklerinin olduğu ve silikozis gibi kronik hastalıklarda enflamasyon sürecini başlattıkları savunulmaktadır [133]. Aynı zamanda 7-KC, oto-oksidasyonun iyi bir göstergesidir [207, 208]. Hem 7-KC hem de triol otooksidasyonla oluşan oksisteroller arasında kullanılan önemli biyobelirteçlerdir ve bu çalışmada da değerlendirilmiştir. Analizler, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Biyokimya Laboratuvarı'nda bulunan LC-MS/MS cihazı ile gerçekleştirilmiştir.

LC-MS/MS, bir numunede farklı bileşiklerin ayrılması, tanınması ve nicelendirilmesi için kullanılan hassas bir analitik tekniktir. Bu teknik, güçlü bir ayırma yöntemi olan HPLC ve güçlü bir tespit yöntemi olan MS/MS'i bir arada içermektedir (Şekil 3.8 ve Şekil 3.9). Yüksek özgüllük ve duyarlılık sağlayan karmaşık yapıları ve karışımların içeriğini tespit edebilme özelliği LC-MS/MS'in, laboratuvarlarda protein, peptid ve oligonükleotid analizi, ilaç keşfi ve klinik ilaç testleri gibi farklı işlemlerde kesin bir sonuç için tercih edilen bir yöntem olmasını

sağlamıştır. LC sistemi sayesinde ayırma gerçekleşmektedir. Kütle spektrometrelerinde ise, bir iyon kaynağı tarafından analit molekülleri iyonlaşmış bir duruma dönüştürülmektedir. İyonlar kütle analizöründeki kütle/yük ( $m/z$ ) oranına göre ayrılırarak analiz edilmektedir ve daha sonra detektör tarafından nicelleştirilir. Veriler,  $m/z$  oranının bir fonksiyonu olarak üretilen iyonların kütle spektrumu şeklinde verilmektedir [18, 209, 210].



Şekil 3.8. LC-MS/MS cihazının temel bileşenleri.



Şekil 3.9. MS/MS'in çalışma prensibinin şematik diyagramı.

Çalışmamızda, oksisterol analizi, LC-MS/MS sistemi ile gerçekleştirilmiştir. Plazmada bulunan triol ve 7-KC düzeyleri ölçülmüştür. LC sistemi, yüksek basınçlı bir karıştırma borusu, bir DGU 14A çözücü gaz giderme birimi, bir SIL 20A otomatik örnekleyicisi, bir CTO kolon firmı ve bir seri SPDM10A fotodiyot dizisi (PDA dedektörü) ile birleştirilmiş iki adet çift kafalı LC10 ADVp yüksek basınçlı

çözücü pompadan oluşmaktadır. Kütle spektrometreleri, değiştirilebilir ESI (elektrosprey iyonizasyon)'a sahip olup, 2010A tek kuadropol (dört kutuplu) dedektör ile seri olarak bağlanmıştır. Sistem kayıtların tutulduğu ve sistem programını içeren bir bilgisayar ile kontrol edilmektedir. MS detektörü için gerekli azot sıvı azot tankından düzenlenen bir havalandırma sistemi ile sağlanmaktadır [18].

- **Kalite Kontrol Örneklerinin Hazırlanması:**

Kalite kontrol (KK) örnekleri, toplanmış plazma örneklerinden, sıvı kromatografisi- elektrosprey iyonizasyon- kütle spektrometresi/kütle spektrometresi (LC-ESI-MS/MS) yöntemi ile endojen triol ve 7-KC'nin ortalama konsantrasyonunun belirlenmesi ile hazırlanmıştır. Düşük ve yüksek plazma kalite kontrolü (DKK, YKK) örnekleri, bilinen standart miktarlarında triol ve 7-KC'e eklenerek sırasıyla 40/40 ng/ml'lik ve 150/150 ng/ml endojen seviyelerinde hazırlanmıştır. Primer 2 KK karışım örnekleri aynı şekilde hazırlanmış olup standartların stok çözeltilerinden ayrı olarak hazırlanmıştır. KK örneklerinin hazırlanmasından sonra, ependorf tüplere bölünmüş ve -80°C'de saklanmıştır.

- **Örneklerin Hazırlanması:**

Örnekler üç aşamada hazırlanmıştır: 1. Aşama, üç adım içermektedir; protein çöktürme, ayırma ve kurutma. 2. aşama, türevlendirme fazı ve 3. aşama, numune temizleme işlemidir. Çalışma örnekleri, KK'ler ve standartlar 2 ml'lik ependorf tüplere ayrılmıştır. LC-MS/MS tayini, sadece serbest veya esterleşmemiş oksisterollerini ölçmek için tasarlanmıştır, toplam oksisterol türlerinin ölçümü için numune hazırlama esnasında gerekli olan plazma örneklerinin esterleştirilmesine gerek kalmamıştır. Bu adımın kaldırılması, yöntemdeki hata olasılığını azaltmıştır. Bu çalışmada Xuntian Jiang ve arkadaşları tarafından geliştirilen protokol kullanılmıştır [18, 167].

1. Aşama: Kalibrasyon standartları, KK numuneleri ve silikozis hasta plazma numuneleri için, 50 µl plazma, 2 ml'lik ependorf tüpüne eklenmiştir. İnternal standart çalışma çözeltisi (300 µl, 20 ng/ml), kör matris haricinde tüm numunelere ilave edilmiştir. Ependorf tüpleri 30 saniye vortekslenmiş ve sonra oda sıcaklığında 13000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatantlar temiz 2 ml'lik ependorf tüplerine

aktarılmış ve daha sonra organik tabaka 35°C'de Çoklu Kuyu Buharlaştırma Sistemleri (Univapo 150) içinde kuruyana kadar buharlaştırılmıştır.

2. Aşama: bu aşamaya türevlendirme fazı denir. Kloroformda 20 µl 0,5 M DMG/2M DMAP ve kloroformda 20 µl 1M EDC, uçurulan örneklere ilave edilmiştir. Karışımların ağzı kapatılmış ve vortekslenmiştir. Daha sonra bir su banyosu içinde 45°C'de 1 saat ısıtılmıştır. İnkübasyon sonunda ependorfların rengi koyu sarı olmalıdır. Bu renk iyi türevlendirilmiş olduğunu göstermektedir. 250 µL H<sub>2</sub>O ve 500 µl heksan, türevlendirilmiş numunelere ilave edilmiş ve bir orbital çalkalayıcı üzerinde 1000 rpm'de 5 dakika çalkalanmaları sağlanmıştır. Numuneler 10 dakika süreyle 13000 rpm'de santrifüjlenmiştir. Süpernatant üzerine 500 µl heksan eklenmiştir. Numuneler bir orbital çalkalayıcı üzerinde 1000 rpm'de 5 dakika çalkalanmıştır. Tekrar 10 dakika süreyle 13000 rpm'de numuneler santrifüje tabi tutulmuştur. Süpernatantlar (heksan) buharlaştırılmıştır. Buharlaştırmadan sonra 300 µl %80 MeOH ilave edilmiştir. Numuneler, 20 saniye vortekslenmiş ve 0,25 ml'lik konik viyal ekleme ile 1,5 ml HPLC otomatik numune alma cihazı viyallerine aktarılmış ve LC-MS/MS ile analize edilmiştir.

3. Aşama: LC ise örnek temizleme fazıdır. Bu adım kaynak koni üzerindeki kirli maddeleri azaltmakta ve MS/MS'de sinyali artırmamaktadır.

### 3.8.1. Kromatografik Analiz Koşulları

Kullanılan oksisterol analiz yönteminde bir ters faz kolonu, *Symmetry C18* (3-5 µm, 21\*50mm) (C/N 5020-01742) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) kullanılmıştır. Kolon fırın sıcaklığı, analiz boyunca 45°C'de tutulmuştur. Örnek enjeksiyon hacmi 7,5 µl ve analiz süresi, her örnek için 7 dakikadır.

Mobil faz çözücü A ve B olmak üzere iki çözeltiden oluşmuştur:

- Çözücü A: (1 mM amonyum format, pH=3)
- Çözücü B: Asetonitril (ACN): 1 mM amonyum format (95:5), pH=3.

Mobil faz A'nın hazırlanması için 1 mM amonyum format hazırlanmıştır. Bu amaçla, 63 mg amonyum format, 1 L su içinde çözülmüş ve pH, formik asit ile 3'e ayarlanmıştır. Mobil faz B'nin hazırlanması için ise, 50 ml mobil faz A, 950 ml ACN ile karıştırılmış ve daha sonra pH, formik asit ile 3'e ayarlanmıştır. Mobil faz,



Çözücü A ve Çözücü B'den oluşmaktadır ve gradient sistemle verilmiştir. Optimize edilmiş HPLC parametreleri Tablo 3.4'de gösterilmektedir.

**Tablo 3.4.** HPLC Parametreleri.

Parametre	Değer	Ayar-Ortam	Birim
Toplam Akış	İkili gradyen	İkili gradiyent	ml/dk
Pompa A basıncı	115	-	Bar
Pompa B basıncı	112	-	Bar
Pompa A Gazdan Arındırma	-94	-	kPa
Fırın Sıcaklığı	45	45	C
Nebülize Gaz Akışı	3,0	3,0	L/dk
Kurutma Gaz Akışı	15,0	15,0	L/dk
DL Sıcaklık	250	250	C
Isı Bloğu Sıcaklığı	450	450	C
CID Gaz	230	230	kPa
Oda Sıcaklığı	29	-	C
IG Vakum	7,4e -	003	Pa
PG Vakum	7,3e +	001	Pa

### 3.8.2. MS/MS Kaynak Ayarlarının Optimizasyonu

Kütle spektrometrisi, pozitif iyon modunda ESI arayüzünü ve seçici iyon izlemine (SIM) içerir. Optimize edilmiş parametre özetleri Tablo 3.5'te verilmiştir.

**Tablo 3.5.** Kütle Spektrometre Parametreleri.

Parametre	Optimize Edilmiş Ayar Değeri
IG vakum	1,4e -
Dedektör voltajı	0,0 kV
Sıcaklık limiti	85°C
DL sıcaklık	250°C
Nebülize gaz akışı	3,0 L/min
Isı bloğu	450°C

Kütle spektrometrisinde triol ve 7-KC'nin saptanmasını kolaylaştırmak için, oksisteroller DMG esterlerine dönüştürülmüştür. Bu şekilde oksisterollerin cevabının artması ve çarpışma hücrelerinde etkin bir şekilde ayrılmaları söz konusu olmuştur. 7-KC ve triolün çoklu reaksiyon izleme (*The multiple reaction monitoring*, MRM) kütle geçişleri Tablo 3.6'da gösterilmiştir.

7-KC için ana iyon 486,0 (m/z)'dir ve 7-KC-D7 için ana iyon 493,0 (m/z)'dir. triol ve triol-D7 için ana iyon sırasıyla 591,5 (m/z) ve 598,5 (m/z)'dir.

Ürün iyonları aşağıdaki gibidir:

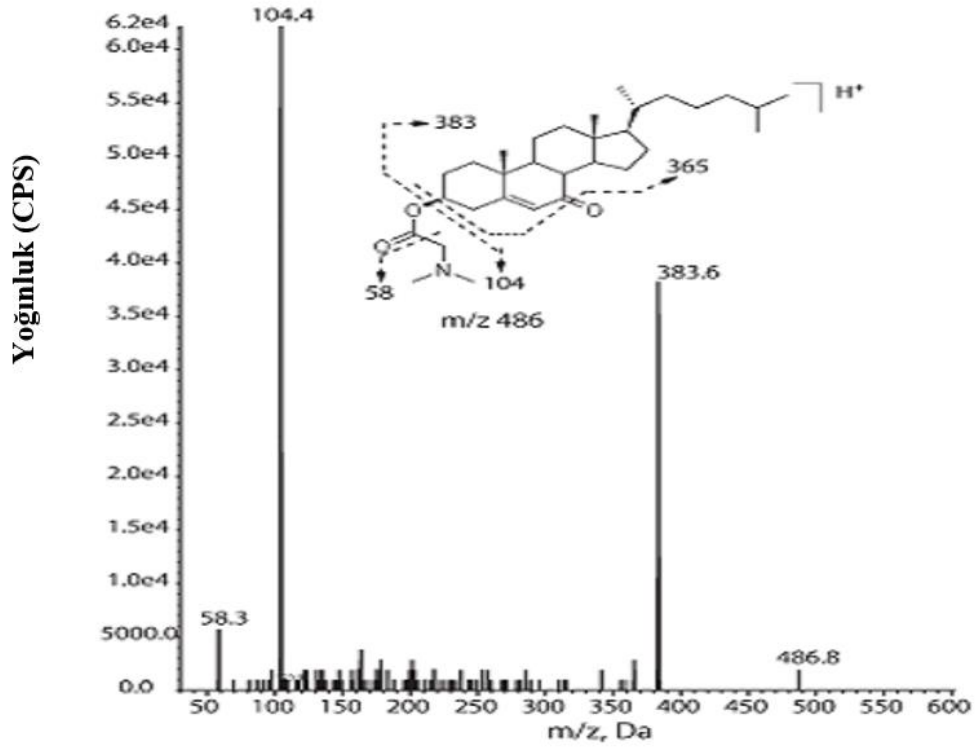
- m/z 104: protonlanmış DMG
- m/z 383: DMG'nin kaybından kaynaklanan oksisterol parçası
- m/z 488,5: DMG'nin kaybından kaynaklanan oksisterol parçası

**Tablo 3.6.** 7-KC ve triol'un kütle geçişleri.

DMG türevlendirmeleri	Ana iyon	Ürün iyon
<b>7-KC</b>	486,0	104
	486,0	383
<b>7-KC D7</b>	493,0	104
<b>Triol</b>	591,5	104
	591,5	488,5
<b>Triol D7</b>	598,5	104

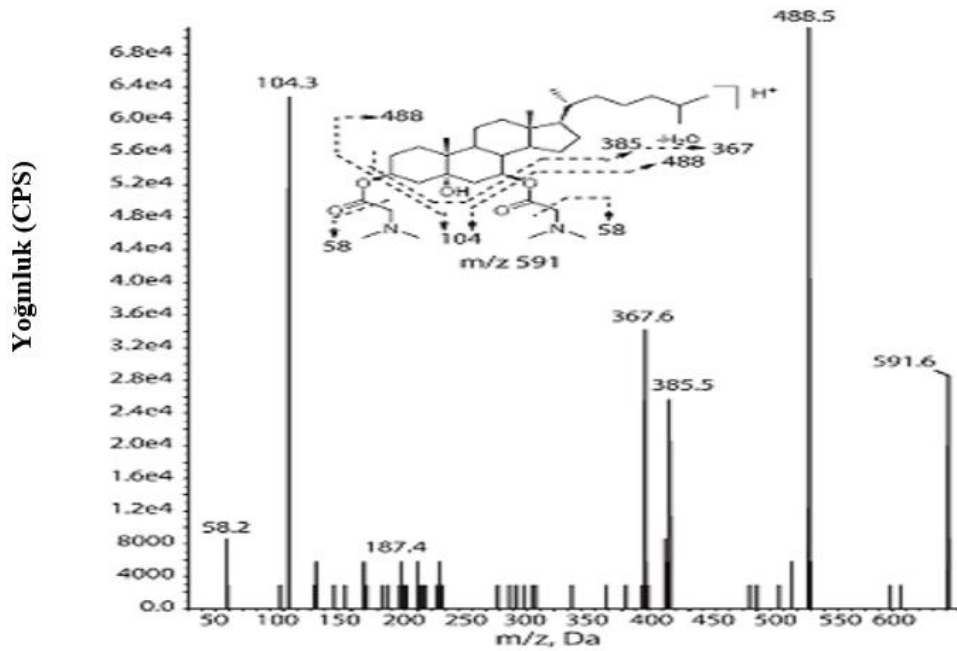
Oksisterol-DMG türevleri için MRM kütle geçişleri m/z 591,5 → 104 (nicelikçi) ve triol için m/z 486 için 591,5 → 488,5 (niteleyici) ve 7-KC için m/z

486→ 383 (nicelikçi) ve 486 → 104 (niteleyici) olarak belirlenmiştir. Şekil 3.10 çarpışmayla oluşan 7-KC'nin DMG türevlerinin ürün iyon spektrumlarını ve parçalanma paternini göstermektedir. Tüm plazma örneklerinin analizleri, standartlarla aynı retansiyon süresinde yapılmış ve 7-KC ile triol piklerini vermiştir.



**Şekil 3.10.** 7-KC'nin DMG türevinin ürün iyon spektrumu ve parçalanma modeli [18, 167].

Şekil 3.11'de triol'ün çarpışma türevleri DMG'nin ürün iyon spektrumları ve parçalanma modeli gösterilmektedir.



Şekil 3.11. Triol'ün DMG türevinin ürün iyon spektrumu ve parçalanma modeli [18, 167].

### 3.9. İnsan 4-Hidroksinonenal ELISA Kit'i ile Plazma ve İdrarda Bulunan 4-Hidroksinonenal Analizi

4-Hidroksinonenal, PUFA peroksidatif ayrışmasının önemli bir ürünü olarak üretilmektedir. Lipid peroksidasyonunun değerlendirilmesinde kullanılan önemli bir biyobelirteç olarak değerlendirilmektedir [185].

Parametrenin idrar ve plazma örneklerinde değerlendirilebilmesi için Eastbiopharm markalı ticari enzim bağlı immunosorban analizi (*double-antikor sandwich enzim linked immunosorbent assay*, ELISA) kiti kullanılmıştır.

Testin prensibi, ELISA'da olduğu gibi antikor-antijen kompleksinden enzim aracılığıyla oluşan ürünün belirlenmesi üzerine kuruludur. Analizde, insan 4-HNE monoklonal antikor ile önceden kuyucuklara 4-HNE eklenmiş ve inkübasyon yapılmıştır. Daha sonra biyotinle işaretlenmiş 4-HNE antikorları eklenmiş ve immün kompleksi oluşturmak için Streptavidin-HRP ile birleştirilmesi sağlanmıştır. Tekrar bir inkübasyonu takiben bağlanmayan enzimler uzaklaştırılmıştır. Kromojen çözelti A, B eklenerek renkli çözeltinin absorbansı belirlenmiştir. Renk şiddeti ile

örneklerde bulunan İnsan 4-HNE madde konsantrasyonu arasında pozitif bir korelasyon bulunmaktadır.

### **Miktar Tayini Prosedürü**

- Her standart, numune ve kör çift olarak çalışılmıştır.
- Örneklerin uygulanması:
  - (1) Kör kuyucuklarına, sadece renk çözeltisi kromojen A, B ve reaksiyon durdurucu çözelti eklenmiştir (Numune, streptavidin-HRP, biyotin ile işaretli 4-HNE-antikor kör kuyucuklarına eklenmemelidir).
  - (2) Standart kuyucuklarına, 50 µl standart ve 50 µl streptavidin-HRP eklenmiştir.
  - (3) Örnek kuyucuklarına ise 40 µl plazma/idrar ve 10 µl 4-HNE-antikor ile 50 µl streptavidin-HRP ilave edilmiştir. Sonra kapatma membranı ile kapatılmış ve nazikçe çalkalanmıştır. 37°C'de 60 dakika inkübe edilmiştir.
- Yıkama: Distile su ile 30 kat daha seyreltilerek yıkama çözeltisi hazırlanmış ve 96 kuyucuklu plağa 300 µl uygulanmış ve daha sonra uzaklaştırılmıştır. Yıkama işlemi 3 kez tekrarlanmıştır.
- 50 µl kromojen A çözeltisi eklenmiş, ardından 50 µl kromojen B çözeltisi aynı kuyucuğa ilave edilmiş ve yavaşça karıştırılmıştır. Işıktan uzak tutularak 37°C'de 10 dakika inkübe edilmiştir.
- Reaksiyonun Durdurulması: Her kuyucuğa reaksiyonu durdurmak için 50 µl durdurma çözeltisi eklenmiştir (Bu sırada kuyucuklardaki mavi renkli çözelti hemen sarı renge dönmüştür).
- Ölçüm: Durdurma çözeltisi eklendikten sonra 15 dakika içinde 450 nm dalga boyunda Optik dansite (OD) okunmuştur.
- Standartların konsantrasyonuna ve okunan absorbans değerlerine göre standart doğrusu çizilmiş ve regresyon denklemi hesaplanmıştır. Denklemden yararlanarak örneklerdeki 4-HNE miktarları belirlenmiştir.

### **3.10. İnsan F2-İsoprostan ELISA Kit'i ile Plazma ve İdrarda Bulunan F2-İsoprostan Analizi**

İzoprostanlar, çoklu doymamış yağ asitlerinin serbest radikal aracılı peroksidasyonuyla üretilen prostaglandin benzeri bileşiklerdir. F2-iP'ların; oluşma

mekanizmalarına (araşidonik asitin nonenzimatik oksidasyonu), kimyasal stabilitesine, duyarlılığına ve invaziv olmayan yöntemlerine bağlı olarak, lipit peroksidasyonunun bir belirteci olarak kullanılabilmesi belirlenmiştir. Son yıllarda, F2-iP'ler, *in vivo* olarak oksidatif stresin en değerli, doğru ve güvenilir belirteci olarak kabul edilmiştir [194].

Eastbiopharm markalı ticari enzim bağlı immunosorban analizi kiti yardımı ile parametrenin değerlendirilebilmesi gerçekleştirilmiştir.

Test prensibi, ELISA'da olduğu gibi antikor-antijen kompleksinden enzim aracılığıyla oluşan ürünün belirlenmesine dayanır. Kuyucuklara F2-iP monoklonal antikor ile F2-iP eklenmiş ve inkübasyon yapılmıştır. Daha sonra biyotinle işaretlenmiş F2-iP antikorları eklenmiş ve immün kompleksi oluşturmak için streptavidin-HRP ile birleştirilmesi sağlanmıştır. Tekrar bir inkübasyonu takiben bağlanmayan enzimler uzaklaştırılmıştır. Renk verici çözelti A ve B eklenerek renkli çözeltinin absorbansı ölçülmüştür. Renk şiddeti ile örneklerde bulunan F2-iP madde konsantrasyonu arasında pozitif bir korelasyon vardır.

### **Miktar Tayini Prosedürü**

- Standart, numune ve kör çift olarak çalışılmıştır.
- Örneklerin uygulanması sırasında kör kuyucuklarına, sadece renk çözeltisi A, B ve durdurma çözeltisi eklenmiştir. Standart kuyucuklarına, 50 µl standart ve 50 µl streptavidin-HRP eklenmiştir. Örnek test kuyucuklarına ise 40 µl numune ile 10 µl F2-iP-antikor ve 50 µl streptavidin-HRP ilave edilmiştir. Sonra kuyucuklar kapatma membranı ile kapatılmış ve yavaşça çalkalandıktan sonra 37°C'de 60 dakika inkübe edilmiştir.
- Distile su ile 30 kat daha dilue edilerek yıkama çözeltisi hazırlanmış ve 96 kuyucuklu plağa 300 µl uygulanmış ve uzaklaştırılmıştır. Yıkama işlemi 3 kez tekrarlanmıştır.
- 50 µl renk çözeltisi A eklenmiş, ardından 50 µl renk çözeltisi B aynı kuyucuğa ilave edilmiş ve nazikçe karıştırılmıştır. Işıktan koruyarak 37°C'de 10 dakika inkübe edilmiştir.

- Durdurma reaksiyonu için her kuyucuğa 50 µl durdurma çözeltisi eklenmiştir (Bu işlem sonucunda kuyucuklardaki mavi renkli çözelti hemen sarı renge dönmüştür).
- Durdurma çözeltisi eklendikten sonra 15 dakika içinde 450 nm dalga boyunda OD ile ölçüm gerçekleştirilmiştir.
- Standartların konsantrasyonu ve örneklerin absorbans değerlerine göre standart doğru oluşturulmuş ve regresyon denklemi hesaplanmıştır. Denklemden yararlanarak örneklerdeki F2-iP miktarları belirlenmiştir.

### **3.11. İnsan Malondialdehit ELISA Kit'i ile Plazma ve İdrarda Bulunan Malondialdehit Analizi**

Birçok biyolojik makromolekül içinde lipidler oksidatif stresin etkilediği en önemli biyomolekül sınıfıdır. MDA, hücrelerde çoklu doymamış yağ asitleri peroksidasyonunun son ürünlerinden biridir. Serbest radikallerde bir artış, MDA'nın aşırı üretilmesine neden olur [184]. DNA ve proteinlerle etkileşimi sıklıkla potansiyel olarak mutajenik ve aterojenik olarak adlandırılmıştır [186].

MDA'nın değerlendirilebilmesi için de Eastbiopharm markalı ticari enzim bağlı immunosorban analiz kiti kullanılmıştır.

ELISA'da olduğu gibi analiz prensibi, antikor-antijen kompleksinden enzim aracılığıyla oluşan ürünün belirlenmesidir. Analizde, kuyucuklara MDA monoklonal antikor ile önceden MDA eklenmiş ve inkübasyon yapılmıştır. Daha sonra biyotinle işaretlenmiş MDA antikorları ilave edilerek immün kompleksi oluşturmak için streptavidin-HRP ile birleştirilmesi sağlanmıştır. Tekrar eden inkübasyonu takiben bağlanmayan enzimlerin uzaklaştırılması sağlanmıştır. Kromojen A ve B çözeltisi ilave edilmiş, renkli çözeltinin absorbansı ölçülmüştür. Örneklerde bulunan MDA konsantrasyonu ile renk şiddeti arasında pozitif bir ilişki vardır.

#### **3.11.1. Miktar Tayini Prosedürü**

- Standart, kör ve numune dublike olarak çalışılmıştır.
- Örneklerin uygulanması sırasında kör kuyucuklarına, sadece renk çözeltisi kromojen A, B ve durdurma çözeltisi eklenmiştir.

- Standart kuyucuklarına, 50 µl standart ve 50 µl streptavidin-HRP eklenmiştir. Test kuyucuklarına ise 40 µl numune ve sonra 10 µl MDA-antikör ve 50 µl streptavidin-HRP ilave edilmiştir. Daha sonra kuyucuklar kapatma membranı ile kapatılmış ve nazikçe çalkaladıktan sonra 37°C'de 60 dakika inkübe edilmiştir.
- Yıkama işlemi için distile su ile 30 kat daha seyreltilmiş yıkama çözeltisinden çalışılan plağa 300 µl uygulanmış ve uzaklaştırılmıştır. Bu işlem 3 kez tekrarlanmıştır.
- 50 µl renk çözeltisi A ve ardından 50 µl renk çözeltisi B aynı kuyucuğa ilave edilmiş ve yavaşça çalkalanmıştır. 37°C'de 10 dakika ışıktan korunarak inkübe edilmiştir.
- Reaksiyonun durdurulması için her kuyucuğa 50 µl durdurma çözeltisi eklenmiştir (Kuyucuklardaki mavi renkli çözelti hemen sarı renge dönmüştür).
- OD ile ölçümü için durdurma çözeltisi eklendikten sonra 15 dakika içinde 450 nm dalga boyunda okuma yapılmıştır.
- Standartların konsantrasyonu ve okunan absorbans değerlerine göre analizin standart doğrusu çizilmiş ve regresyon denklemi hesaplanmıştır. Denklemden yararlanarak örneklerdeki MDA miktarları belirlenmiştir.

### 3.12. Sfingozin-1-Fosfat Analizi

Sfingozin 1-fosfat, sayısız fizyolojik ve hücrel süreçlerde rol oynayan önemli bir biyoaktif sfingolipid metabolitidir. S1P plazma zarının bileşenlerini tanımlayarak hücrelerde yapısal bir rol oynamakla kalmaz, son 20 yılda çeşitli önemli hücrelerde hücre göçü, hayatta kalma ve çoğalma, hücre mimarisi, hücre-hücre teması, adhezyonları, vasküler gelişim, ateroskleroz, akut pulmoner hasar ve solunum sıkıntısı, enflamasyon ve bağışıklık ve tümörögenезis ve metastaz gibi hastalıkların yol açtığı sinyal yolları ve fizyolojik proseslerde rol oynamaktadır [205].

#### 3.12.1. Numunelerin Hazırlanması

Temiz ependorflara 100 µl hasta kontrol plazmalarından alınmış ve üzerlerine 500 µl hazırlanan internal standarttan eklenmiştir. 1 dakika vortekslendikten sonra 5 dakika 5000 rpm'de santrifüjlenmiştir. Santrifüj viallere aktarılarak kullanılmıştır.



### 3.12.2 Miktar Tayini Prosedürü

Ekstraksiyon için 100 µl plazma içerisine 500 µl metanol eklenerek vortekslenmiştir. Ardından 5000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiş ve daha sonra süpernatandan 20 µl cihaza enjekte edilmiştir. S1P ölçümü Agilent 6420 LC-MS/MS cihazı kullanılarak, protein ve peptit karışımlarını iyonlaştırmak için tercih edilen iyonlaştırma sistemi olan ESI metodu ve pozitif iyon modu ile gerçekleştirilmiştir.

- Çalışmada ACE C18 (50 mm x 4.6 mm x 5 µm) kolonu kullanılmıştır. Kolon fırın sıcaklığı 30°C'ye ayarlanmıştır.
- Mobil faz olarak çözücü A distile su içinde 10 mM Amonyum Asetat + %0,01 Formik Asit çözeltisi, çözücü B olarak metanol içinde %0,01 Formik Asit çözeltisi kullanılmıştır.
- Çalışmada gradient metod kullanılmıştır. 0,5 dakika %60, 1, 1-2, 9 dakika arası %90, ve 4-8 dakika arası %60 olacak şekilde düzenlenmiş ve akış 0,5 ml/dk olacak şekilde kullanılmıştır. S1P deney yöntemi özet olarak Tablo 3.7'de gösterilmektedir.
- S1P ana m/z değeri 380,2, bundan elde edilen Q3 m/z değeri ise 264,3 olarak bulunmuştur. Fragmentor voltaj 90 V olarak uygulanmıştır.
- S1P standartı metanol içerisinde seri dilüsyonları ile sekiz seviyeli 0,312 - 0,625 - 1,25- 2,5 - 5 - 10 - 20 - 40 ng/ml kalibrasyonu yapılmıştır. r2 değeri 0,999 olarak saptanmıştır.

**Tablo 3.7.** Sfingozin-1-Fosfat deney yöntemi

<b>Cihaz</b>	Agilent 6420 LCMS/MS		
<b>Kolon</b>	ACE C18 (50 mm x 4,6 mm x 5µm)		
<b>Kolon Sıcaklığı</b>	30°C		
<b>Mobil Faz</b>	Çözücü A (distile su içinde 10 mM Amonyum Asetat + %0,01 Formik Asit çözeltisi) Çözücü B (metanol içinde %0,01 Formik Asit çözeltisi)		
<b>Gradyent Tablosu</b>	<b>Zaman</b>	<b>Çözücü A</b>	<b>Çözücü B</b>
	0	% 40	% 60
	0,5	% 40	% 60
	1,1	% 10	% 90
	2,9	% 10	% 90
	4	% 40	% 60
	8 dk	% 40	% 60
<b>Akış Hızı</b>	0,5 ml/dk		
<b>Enjeksiyon Hacmi</b>	20 µl		
<b>Süre</b>	8 dk		

### 3.13. İstatiksel Analiz

İstatistiksel analizler Windows Sürüm 22.0 için paket program IBM SPSS'de gerçekleştirilmiştir. Kolmogorov Smirnov testi: nümerik değişkenlerin normal dağılıma sahip olup olmadığını incelemek için kullanılmıştır. Gruplar arasında sayısal değişkenler arasında fark olup olmadığı belirlemek için Mann-Whitney U testi kullanılmıştır.

Sayısal değişkenler arasındaki ilişki Pearson veya Spearman korelasyon katsayısı tarafından gösterilmiştir. Tüm veriler ortalama  $\pm$  standar sapma (SS) olarak ifade edilmiştir. Bütün karşılaştırmalarda, p değerlerinin 0,05'ten küçük olması anlamlı kabul edilmiştir.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Hastalara ait Demografik Bulgular

Çalışmamızda yer alan silikozisli hastaların ve kontrol grubunun tamamı benzer coğrafi bölgede yaşayan ve benzer yaşam şartlarına sahip kişiler arasından seçilmiştir. Çalışma grubumuzun tamamı erkeklerden oluşmaktadır. Çalışmamızda yer alan tüm bireyler erkek olduğundan bireylerin tamamı aynı bölgede ve benzer koşullarda yaşaması nedeniyle ise bu özelliklerinin ölçülen parametrelere etkisi değerlendirilmemiştir.

Çalışmada yer alan hasta grubu seramik, porselen, kaynak, inşaat işçisi, maden, döküm, çimento fabrikası, tuğla fabrikası, termik santral ve kalıp şekillendirme alanları gibi risk taşıyan sektörlerde çalışan bireylerdir. Hasta ve kontrol grubu bireylerinin yaş ortalaması  $42,5 \pm 8,6$  yıldır. Hasta grubunun yaş ortalaması ise  $41,8 \pm 7,6$  yıl olarak belirlenmiştir. Hasta grubunun %78,7'si sigara kullanmakta ve %21,3'ü sigara içmemektedir. Bu grupta bulunan bireyler çalışma süresine göre sınıflandırıldığında %48,9'u 16 yıl veya daha fazla, %23,4'ü 11-15 yıl, %12,8'i 6-10 yıl ve %14,9'u 1-5 yıl boyunca çalıştığı görülmektedir.

Kontrol grubu sağlıklı ofis çalışanlarından seçilmiş olup yaş ortalaması  $43,6 \pm 9,6$ 'dır ve hasta grubu ile karşılaştırıldığındaki fark yaş ortalamasına göre istatistiksel olarak anlamlı değildir ( $p = 0,5044$ ). Kontrol grubunda bulunan kişilerin % 43,3'ü sigara kullanmakta ve %56,7'si sigara içmemektedir.

Çalışmamızda yer alan bireylerin çalışma alanları ve demografik özelliklerine ait bulgular Tablo 4.1 ve Tablo 4.2'de yer almaktadır.

**Tablo 4.1.** Hasta ve kontrol gruplarındaki bireylerin çalışma alanları.

<b>Çalışma Alanları</b>			
<b>Kontrol Grubu (n=30)</b>		<b>Hasta Grubu (n=47)</b>	
Büro memuru/işçisi	3 (%10)	Seramik işçisi	20 (%42,6)
Elektrikçi	1 (%3,3)	Porselen işçisi	5 (%10,6)
Laboratuvar teknisyeni	3 (%10)	Kaynak işçisi*	7 (%14,9)
Matbaacı - Ambalajcı	5 (%16,6)	İnşaat işçisi	2 (%4,25)
Ziraat mühendisi	2 (%6,7)	Maden işçisi	2 (%4,25)
Çamaşırcı - Bulaşıkçı	2 (%6,7)	Döküm işçisi	3 (%6,4)
Tamirci - Sıhhi Tesisatçı	2 (%6,7)	Çimento fabrikası çalışanı	2 (%4,25)
Bekçi	2 (%6,7)	Tuğla fabrikası çalışanı	2 (%4,25)
Aşçı - garson	6 (%20)	Termik santral çalışanı	2 (%4,25)
Çiftlik işçisi	4 (%13,3)	Kalıp-şekillendirme	2 (%4,25)

\*Kaynak işçilerinde ana maruziyet metaller yoluyla olurken, silika ikincil maruziyet etkeni olarak değerlendirilmektedir.

**Tablo 4.2.** Hasta ve kontrol gruplarındaki bireylerin temel demografik özellikleri.

<b>Değişkenler</b>	<b>Kontrol Grubu (n=30)</b>	<b>Hasta Grubu (n=47)</b>
<b>Yaş (yıl*)</b>	43,6	41,8
<b>Yaş Grupları</b>		
18-29	3 (%10)	2 (%4,3)
30-42	11 (%36,7)	23 (%48,9)
> 42	16 (%53,3)	22 (%46,8)
<b>Sigara Öyküsü</b>		
Yok	17 (%56,7)	10 (%21,3)
Var	13 (%43,3)	37 (%78,7)
<b>Çalışma Süresi</b>		
1-5 yıl	7 (%23,3)	7 (%14,9)
6-10 yıl	3 (%10)	6 (%12,8)
11-15 yıl	3 (%10)	11 (%23,4)
≥ 16	17 (%56,7)	23 (%48,9)

#### 4.2. Spirometrik İnceleme Bulguları

Toz maruziyeti olan iş kollarında çalışan bireylerin bulunduğu hasta grubu ve toz maruziyeti olmayan sağlıklı ofis çalışanlarından seçilmiş kontrol grubu bireylerinin akciğer fonksiyonları spirometrik inceleme ile değerlendirilmiştir. Zorlu soluk vermenin 1. Saniyesinde dışarı atılan hacim (FEV1) ve zorlu vital kapasite (FVC) ölçülerek FEV1/FVC değerleri hesaplanmıştır. Çeşitli hastalıklarda FEV1 değeri düşük bulunabileceğinden, akciğer hastalığı tanısı için en uygun gösterge FEV1/FVC oranıdır. Bu oranın %75 ve daha düşük olması hava yolu tıkanıklığını göstermektedir [3, 211].

Hasta ve kontrol grubuna ait spirometrik inceleme sonuçları Tablo 4.3 ve Tablo 4.4'de verilmiştir. Hastaların FEV1/FVC oranlarının ortalama değeri %82,26 iken kontrol grubunun FEV1/FVC oranlarının ortalama değeri %84,27 olarak bulunmuştur.

Hasta grubunun FEV1/FVC oranları değerlendirildiğinde yaklaşık %10,64'ünün FEV1/FVC oranlarının %75 ve %75'ten daha düşük olduğu bulunmuştur.

**Tablo 4.3.** Hasta grubundaki bireylere ait sigara kullanımı, yaş, çalışma süresi ve spirometrik inceleme bulguları.

Sıra No	FEV1/FVC Değeri (%)	Tanı	Silikozis Kategori	Yaş	Sigara	Çalışma Süresi (yıl)
1	91	Silikozis p/s 1/0	1	38	Kullanmıyor	11
2	73	Silikozis p/q 1/1	1	56	Kullanmıyor	39
3	80	Silikozis p/p 1/0	1	48	Kullanıyor	24
4	79	Silikozis p/q 1/1	1	30	Kullanıyor	5
5	87	Silikozis p/q 1/1	1	39	Kullanıyor	12
6	82	Silikozis p/p 1/2	1	35	Kullanıyor	5
7	79	Silikozis p/p 1/0	1	42	Kullanıyor	22
8	80	Silikozis p/q 1/1	1	38	Kullanıyor	9
9	82	Silikozis s/p 1/1	1	47	Kullanıyor	23
10	83	Silikozis p/q 2/1	2	44	Kullanıyor	24
11	84	Silikozis p/q 1/0	1	43	Kullanıyor	5
12	79	Silikozis p/s 1/1	1	47	Kullanıyor	22

**Tablo 4.3.** Hasta grubundaki bireylere ait sigara kullanımı, yaş, çalışma süresi ve spirometrik inceleme bulguları (devam).

Sıra No	FEV1/FVC Değeri (%)	Tanı	Silikozis Kategori	Yaş	Sigara	Çalışma Süresi (yıl)
13	64	Silikozis p/s 1/1	1	48	Kullanıyor	5
14	80	Silikozis q/p 1/1	1	40	Kullanıyor	14
15	80	Silikozis p/s 1/1	1	45	Kullanıyor	9
16	76	Silikozis p/s 1/1	1	51	Kullanıyor	20
17	78	Silikozis p/p 1/0	1	35	Kullanıyor	11
18	90	Silikozis p/p 1/0	1	41	Kullanmıyor	20
19	83	Silikozis p/p 1/0	1	46	Kullanıyor	20
20	77	Silikozis q/r 3/2	3	58	Kullanıyor	15
21	79	Silikozis p/q 1/2	1	37	Kullanıyor	15
22	79	Silikozis p/p 1/0	1	31	Kullanıyor	11
23	90	Silikozis p/p 1/1	1	31	Kullanıyor	2
24	90	Silikozis p/p 1/0	1	47	Kullanmıyor	19
25	78	Silikozis p/q 1/2	1	59	Kullanıyor	23
26	90	Silikozis p/p 1/0	1	47	Kullanıyor	23
27	88	Silikozis q/q 2/2	2	43	Kullanıyor	18
28	83	Silikozis p/p 1/0	1	30	Kullanıyor	10
29	78	Silikozis p/p 1/0	1	31	Kullanıyor	7
30	87	Silikozis p/q 1/0	1	37	Kullanıyor	17
31	81	Silikozis p/p 1/0	1	29	Kullanmıyor	3

**Tablo 4.3.** Hasta grubundaki bireylere ait sigara kullanımı, yaş, çalışma süresi ve spirometrik inceleme bulguları (devam).

Sıra No	FEV1/FVC Değeri (%)	Tanı	Silikozis Kategori	Yaş	Sigara	Çalışma Süresi (yıl)
32	82	Silikozis q/r 3/2	3	51	Kullanıyor	26
33	87	Silikozis p/p 1/0	1	39	Kullanmıyor	19
34	86	Silikozis p/p 1/1	1	35	Kullanıyor	11
35	57	Silikozis p/p 1/0	1	44	Kullanmıyor	22
36	86	Silikozis p/p 1/0	1	34	Kullanıyor	10
37	91	Silikozis p/p 1/0	1	40	Kullanıyor	14
38	88	Silikozis p/p 1/1	1	48	Kullanıyor	32
39	83	Silikozis p/p 1/0	1	39	Kullanmıyor	3
40	83	Silikozis p/s 1/1	1	40	Kullanıyor	24
41	88	Silikozis p/p 1/0	1	46	Kullanıyor	12
42	84	Silikozis p/q 1/2	1	40	Kullanıyor	19
43	90	Silikozis p/q 1/0	1	47	Kullanıyor	17
44	87	Silikozis p/q 1/2	1	42	Kullanıyor	14
45	83	Silikozis p/s 1/1	1	49	Kullanıyor	25
46	73	Silikozis p/p 1/1	1	52	Kullanmıyor	32
47	88	Silikozis p/p 1/0	1	29	Kullanmıyor	6



**Tablo 4.4.** Kontrol grubundaki bireylere ait sigara kullanımı, yaş, çalışma süresi ve spirometrik inceleme bulguları.

Sıra No	FEV1/FVC Değeri (%)	Solunum Fonksiyon Testi Yorumu	Yaş	Sigara	Çalışma Süresi (yıl)
1	87,65	Normal	30	Kullanmıyor	1
2	99,5	Normal	39	Kullanıyor	12
3	92,7	Normal	28	Kullanmıyor	3
4	87,0	Normal	33	Kullanıyor	5
5	80,7	Restriktif	39	Kullanmıyor	16
6	84,3	Normal	36	Kullanıyor	13
7	83,2	Normal	45	Kullanmıyor	16
8	68,1	Obstrüktif	41	Kullanmıyor	13
9	84,6	Normal	47	Kullanmıyor	19
10	81,2	Normal	41	Kullanmıyor	17
11	84,8	Normal	44	Kullanmıyor	16
12	83,0	Normal	45	Kullanmıyor	19
13	100	Normal	24	Kullanmıyor	1
14	87,9	Normal	45	Kullanmıyor	16
15	81,7	Mix tip solunum fonksiyon kaybı	39	Kullanıyor	1
16	93,5	Normal	41	Kullanmıyor	17
17	82,9	Normal	54	Kullanmıyor	26
18	80,6	Normal	44	Kullanıyor	16
19	88,3	Normal	38	Kullanıyor	16
20	80,6	Normal	53	Kullanıyor	25
21	73,3	Normal	59	Kullanıyor	5
22	92,9	Nonkopere	50	Kullanmıyor	21
23	77,6	Normal	51	Kullanmıyor	28
24	86,7	Normal	49	Kullanıyor	26
25	84,0	Normal	41	Kullanmıyor	10
26	82,4	Normal	47	Kullanmıyor	7
27	82,9	Normal	25	Kullanmıyor	3
28	80,1	Normal	55	Kullanıyor	10
29	71,4	Obstrüktif	67	Kullanıyor	18
30	84,6	Normal	46	Kullanıyor	17

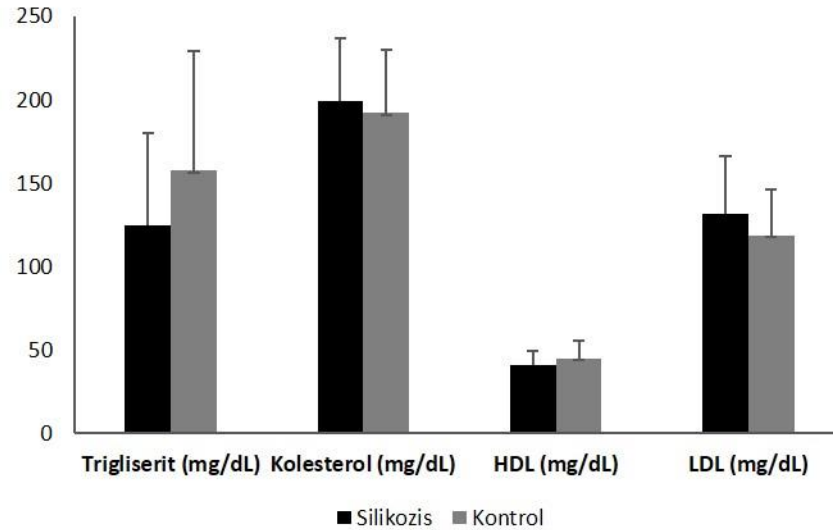
### 4.3. Uluslararası Çalışma Örgütü Sınıflamasına Dayanarak Akciğer Filmlerinin Değerlendirilmesi

Uluslararası Çalışma Örgütü sınıflandırmasına göre hasta grubunun akciğer filmleri değerlendirilmiştir. Silikozis hastalarından 43'ü kategori 1'de, 2'si kategori 2 ve diğer 2 kişide kategori 3'te olduğu Tablo 4.3'te görülmektedir.

Tozla Mücadele Yönetmeliği'ne bağlı olarak kategori 0 olarak değerlendirilen işçilerin aralıklı muayenelerle takiplerinin yapılması, kategori 1 ve üzeri olarak değerlendirilenlerin SGK tarafından yetkilendirilen sağlık hizmet sunucularına sevkinin sağlanması gerekmektedir [3, 212].

### 4.4. Hasta ve Kontrol Grubuna Ait Lipit Profili Bulguları

Tez çalışmasında oksidatif lipid ve kolesterol hasarının değerlendirilmesi amaçlandığından hastaların klinikte ölçülen lipit profilleri de değerlendirilmiştir. Hasta ve kontrol grubunun trigliserit, kolesterol, HDL ve LDL ilişkin bulgular Şekil 4.1 ve Tablo 4.5'te verilmiştir. Elde edilen sonuçlarda kontrol ve hasta grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir değişim gözlenmemiştir.



**Şekil 4.1.** Silikozis hastaları ve kontrol grubuna ait trigliserit, kolesterol, HDL ve LDL düzeylerinin karşılaştırılması.

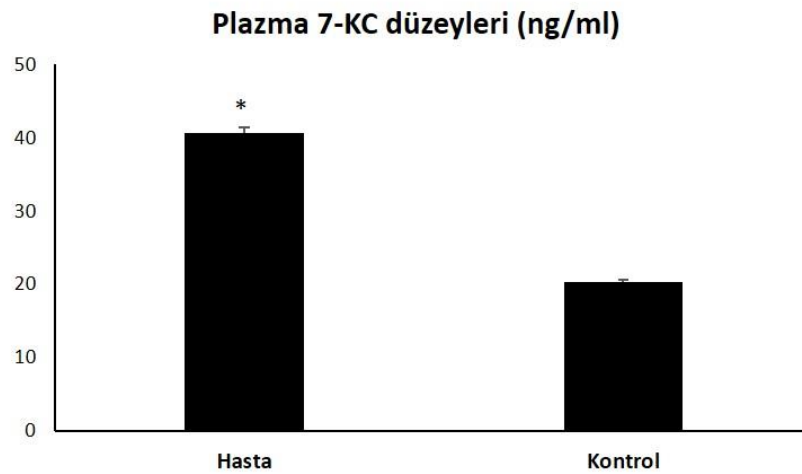
**Tablo 4.5** Silikozis hastaları ve kontrol grubuna ait trigliserit, kolesterol, HDL ve LDL düzeyleri.

	<b>Trigliserit (mg/dl)</b>	<b>Kolesterol (mg/dl)</b>	<b>HDL (mg/dl)</b>	<b>LDL (mg/dl)</b>
<b>Silikozis</b>	124,8 ± 55,4	199,1 ± 37,5	40,5 ± 8,6	131,6 ± 34,7
<b>Kontrol</b>	157,4 ± 72	192,1 ± 37,7	45,0 ± 10,4	118,6 ± 27,7

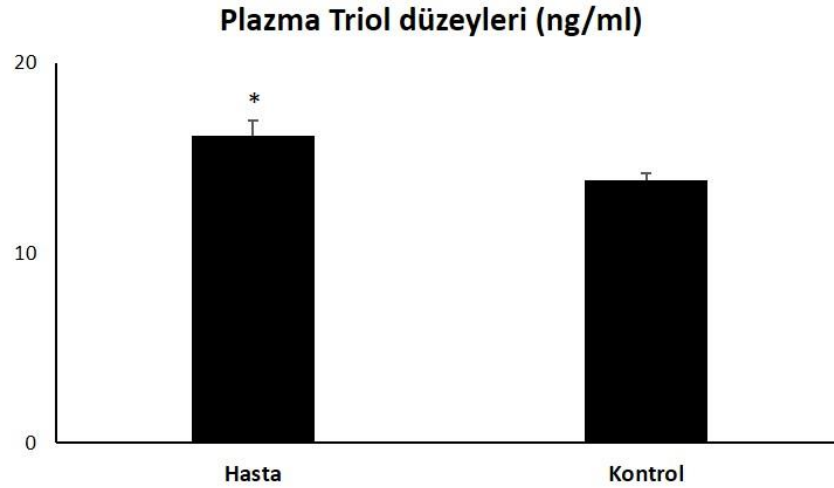
Değişkenler, Ortalama ± SS ile belirtilmiştir.

#### 4.5. Plazma 7-Ketokolesterol ve 3β, 5α, 6β Trihidroksi Kolesterol Düzeyleri

Hasta ve kontrol gruplarına ait plazma 7-KC ve Triol düzeyleri ölçülmüş ve istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar, oto-oksidasyonla oluşan her iki oksisterol türevinin de düzeylerinin silikozisli hastalarda kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksek olduğunu göstermektedir ( $p < 0,001$ ). Sonuçlar Şekil 4.2, Şekil 4.3 ve Tablo 4.6'da özetlenmiştir.



**Şekil 4.2.** Silikozis hastaları ve kontrol grubunun plazma 7-KC düzeylerinin karşılaştırılması ( $*p < 0,001$ ).



**Şekil 4.3.** Silikozis hastaları ve kontrol grubunun plazma triol düzeylerinin karşılaştırılması (\* $p < 0,001$ ).

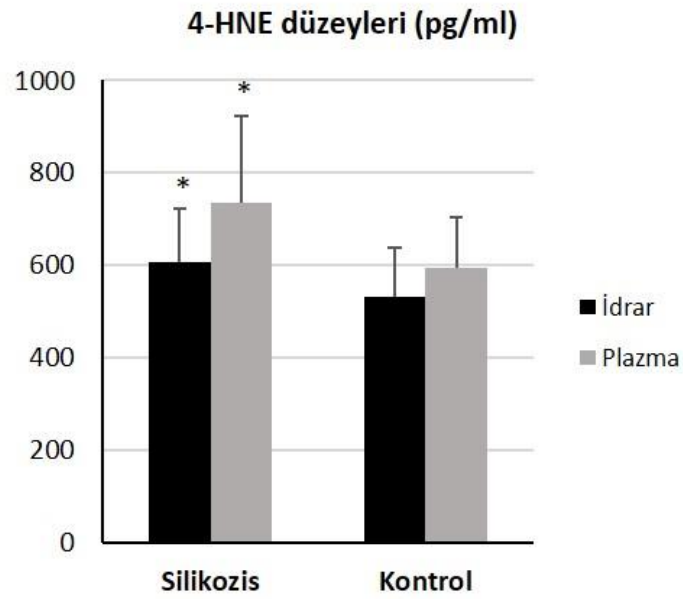
**Tablo 4.6.** Hasta ve kontrol grubuna ait oksisterol düzeylerinin karşılaştırılması.

	<b>Kontrol</b>	<b>Silikozis</b>
<b>7-KC (ng/ml)</b>	20,26 ± 1,38	*40,61 ± 2,07
<b>Triol (ng/ml)</b>	13,83 ± 1,75	*16,15 ± 2,22

\*  $p < 0,001$  (Değişkenler, Ortalama ± SS ile belirtilmiştir).

#### 4.6. Plazma ve İdrar 4-Hidroksinonenal Düzeylerine İlişkin Bulgular

İnflamatuvar hastalıkların da dahil olduğu pekçok patolojik durumda lipit peroksidasyonunun önemli bir parametresi olarak değerlendirilen 4-HNE düzeyleri hem hasta hem de kontrol grubu idrar ve plazmasında ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlarda, hasta grubuna ait idrar ve plazma 4-HNE düzeylerinin kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek olduğu bulunmuştur ( $p < 0,05$ ). Sonuçlar Şekil 4.4 ve Tablo 4.7'de özetlenmiştir.



**Şekil 4.4.** Silikozis ve kontrol gruplarına ait plazma ve idrar 4-HNE düzeylerinin karşılaştırılması, \* $p < 0,05$ .

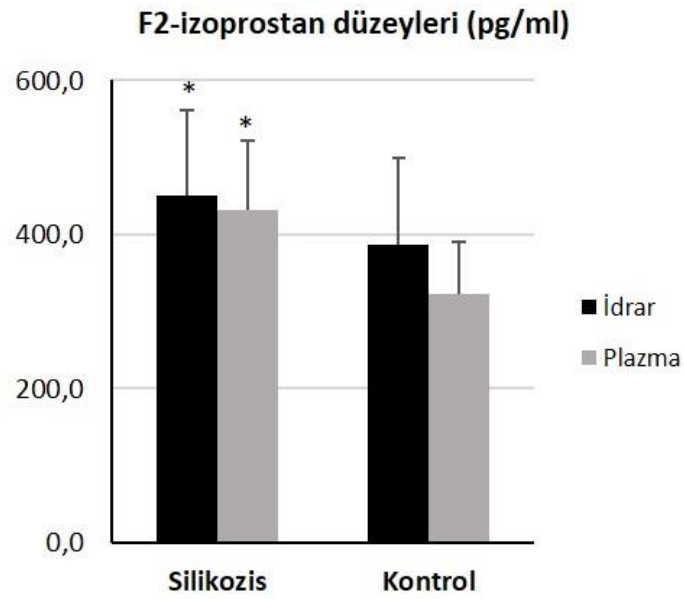
**Tablo 4.7.** Silikozis ve kontrol gruplarına ait plazma ve idrar 4-HNE düzeyleri, \* $p < 0,05$ .

	<b>Kontrol</b>	<b>Silikozis</b>
<b>İdrar (pg/ml)</b>	531,8 ± 107,2	*606,0 ± 118,2
<b>Plazma (pg/ml)</b>	595,7 ± 108,6	*735,1 ± 128,8

\*  $p < 0,05$  (Değişkenler, Ortalama ± SS ile belirtilmiştir).

#### 4.7. Plazma ve İdrar F2-İzoprostan Düzeylerine İlişkin Bulgular

Oksijen radikalleri tarafından hücre yüzeyindeki araşidonik asidin enzimatik olmayan doğrudan oksidasyonu ile oluşan F2-izoprostan düzeyleri silikozisli hastalara ve kontrol grubuna ait idrar ve plazma örneklerinde ölçülmüştür. Çalışma sonucunda, idrar ve plazma F2-izoprostan düzeylerinin hasta grubunda kontrole göre anlamlı şekilde yüksek olduğu bulunmuştur ( $p < 0,05$ ). Sonuçlar Şekil 4.5 ve Tablo 4.8'de özetlenmiştir.



**Şekil 4.5.** Silikozis ve kontrol gruplarına ait plazma ve idrar F2-izoprostan düzeylerinin karşılaştırılması, \*p<0,05.

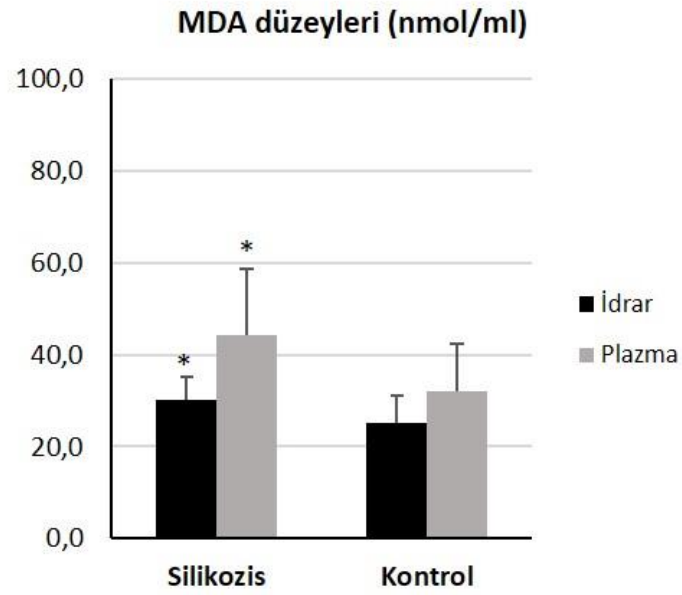
**Tablo 4.8.** Silikozis ve kontrol gruplarına ait plazma ve idrar F2-izoprostan düzeyleri, \*p<0,05.

	<b>Kontrol</b>	<b>Silikozis</b>
<b>İdrar (pg/ml)</b>	386,9 ± 112,7	*450,0 ± 101,4
<b>Plazma (pg/ml)</b>	321,9 ± 69,4	*432,7 ± 88,8

\* p<0,05 (Değişkenler, Ortalama ± SS ile belirtilmiştir).

#### 4.8. Plazma ve İdrar Malondialdehit Düzeylerine İlişkin Bulgular

Artan oksidatif stres nedeniyle indüklenen lipid peroksidasyonunun en önemli ve sıklıkla değerlendirilen parametrelerinden biri olan MDA düzeyleri hem hasta hem de kontrol grubu idrar ve plazmalarında ölçülmüştür. Elde edilen bulgular, gruplar arasında, idrar ve plazma MDA düzeylerinin istatistiksel olarak farklı olduğu ve hasta grubunda kontrole göre daha yüksek olduğu bulunmuştur (p<0,05). Sonuçlar Şekil 4.6 ve Tablo 4.9'da özetlenmiştir.



**Şekil 4.6.** Silikozis ve kontrol gruplarına ait plazma ve idrar MDA düzeylerinin karşılaştırılması, \* $p < 0,05$ .

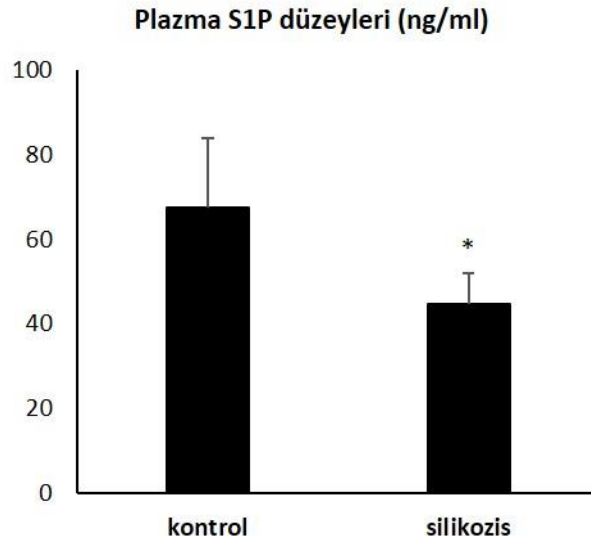
**Tablo 4.9.** Silikozis ve kontrol gruplarına ait plazma ve idrar MDA düzeyleri, \* $p < 0,05$ .

	<b>Kontrol</b>	<b>Silikozis</b>
<b>İdrar (nmol/ml)</b>	25,2 ± 6,1	*30,2 ± 5,1
<b>Plazma (nmol/ml)</b>	31,9 ± 10,5	*44,1 ± 14,6

\*  $p < 0,05$  (Değişkenler, Ortalama ± SS ile belirtilmiştir).

#### 4.9. Sfingozin-1-Fosfat LC-MS/MS Yöntemine İlişkin Bulgular

Hücre zarının akışkanlığının düzenlenmesinde önemli yapısal rol oynayan sfingolipidlerden biri olan S1P parametresi de bu tez kapsamında değerlendirilmiştir. Silikozisli hastaların plazma S1P düzeyleri  $49,05 \pm 10,87$  ng/ml, kontrol grubunda bu düzey  $67,57 \pm 16,25$  ng/ml olarak ölçülmüştür. Söz konusu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir. Sonuçlar Şekil 4.7 ve Tablo 4.10'da özetlenmiştir.



**Şekil 4.7.** Silikozi ve kontrol gruplarına ait plazma S1P düzeylerinin karşılaştırılması, \*p<0,001.

**Tablo 4.10.** Silikozi ve kontrol gruplarına ait plazma S1P düzeyleri, \*p<0,001.

	<b>Kontrol</b>	<b>Silikozi</b>
<b>S1P (ng/ml)</b>	67,57 ± 16,25	*49,05 ± 10,87

\*p<0,001 (Değişkenler, Ortalama ± SS ile belirtilmiştir)

#### 4.10. Ölçülen Parametreler Arasındaki İlişkiye Ait Korelasyon Bulguları

Tez kapsamında ölçülen parametrelerin korelasyonları yapılarak ilişkileri incelenmiştir. Elde edilen bulgular Tablo 4.11'de verilmiştir.

Tabloda da görüldüğü gibi Plazma HNE ile MDA ve F2-iP arasında güçlü pozitif bir korelasyona rastlanmıştır. (sırasıyla  $r=0,85$ ;  $r=0,85$ ;  $p<0,05$ ). Ayrıca, plazma HNE düzeyleri ile 7-KC ( $r=0,25$ ;  $p<0,05$ ), kolesterol ( $r=0,34$ ;  $p<0,05$ ) ve LDL ( $r=0,39$ ;  $p<0,05$ ) düzeyleri arasında zayıf pozitif bir ilişki bulunmuştur. İdrar HNE düzeyleri ile 7-KC arasında zayıf pozitif bir korelasyon bulunurken, HDL düzeyleri ile bu ilişkinin zayıf negatif yönde olduğu görülmüştür (sırasıyla  $r=0,33$ ;  $r=-0,28$ ;  $p<0,05$ ).

Plazma MDA düzeyleri ile kolesterol ( $r=0,26$ ;  $p<0,05$ ) ve LDL ( $r=0,32$ ;  $p<0,05$ ) düzeyleri arasında da zayıf pozitif bir ilişki bulunmuştur. Bununla birlikte,



idrar MDA düzeylerinin de 7-KC ve triol düzeyleri ile ilişkisinin anlamlı olduğu belirlenmiştir. (sırasıyla  $r=0,44$ ;  $r=-0,30$ ;  $p<0,05$ ).

Plazma F2-iP düzeyleri ile HNE'ye benzer şekilde 7-KC ( $r=0,31$ ;  $p<0,05$ ), kolesterol ( $r=0,42$ ;  $p<0,05$ ) ve LDL ( $r=0,47$ ;  $p<0,05$ ) düzeyleri arasında da zayıf pozitif korelasyon olduğu belirlenmiştir. İdrar F2-iP düzeyleri ile S1P ve trigliserit düzeyleri arasında ise negatif bir anlamlı korelasyona rastlanırken kolesterol ile pozitif yönde anlamlı bir ilişkisi olduğu görülmüştür. (sırasıyla  $r=-0,31$ ;  $r=-0,26$ ;  $r=0,33$ ;  $p<0,05$ ).

Oksisterol türevleri olan 7-KC ve triol arasında anlamlı pozitif bir korelasyon görülürken ( $r=0,49$ ,  $p<0,05$ ) S1P ve HDL ile tersi yönde bir ilişkisi olduğu saptanmıştır (sırasıyla  $r=-0,54$ ;  $r=-0,29$ ;  $p<0,05$ ). Triolün de yine S1P ile anlamlı negatif bir ilişkisi olduğu ( $r=-0,31$ ;  $p<0,05$ ), LDL ile ise pozitif korele olduğu ( $r=0,25$ ;  $p<0,05$ ) belirlenmiştir.

Grupların lipit profilinde yer alan trigliserit ile HDL arasında anlamlı negatif bir korelasyon ( $r=-0,51$ ;  $p<0,05$ ) görülürken kolesterol ile LDL düzeyleri arasında da pozitif bir ilişki ( $r=0,94$ ;  $p<0,05$ ) tespit edilmiştir.

**Tablo 4.11.** Tez kapsamında ölçülen parametrelerin korelasyonları.

	Plazma MDA	Plazma F2	İdrar HNE	İdrar MDA	İdrar F2	7-KC	Triol	S1P	Trigliserid	Kolesterol	HDL	LDL
Plazma HNE	<b>0,85</b>	<b>0,85</b>	0,03	0,16	-0,02	<b>0,25</b>	0,16	-0,10	0,02	<b>0,34</b>	-0,09	<b>0,39</b>
Plazma MDA		0,16	-0,01	0,07	-0,02	0,24	-0,03	-0,01	-0,01	<b>0,26</b>	-0,13	<b>0,32</b>
Plazma F2			-0,10	0,16	0,01	<b>0,31</b>	0,15	-0,16	0,10	<b>0,42</b>	-0,19	<b>0,47</b>
İdrar HNE				0,19	-0,10	<b>0,33</b>	0,17	-0,16	0,06	-0,12	<b>-0,28</b>	-0,09
İdrar MDA					0,19	<b>0,44</b>	<b>0,30</b>	-0,12	0,02	0,09	-0,16	0,15
İdrar F2						0,23	0,06	<b>-0,31</b>	<b>-0,26</b>	<b>0,33</b>	0,24	0,06
7-KC							<b>0,49</b>	<b>-0,54</b>	-0,05	0,07	<b>-0,29</b>	0,15
Triol								<b>-0,31</b>	0,07	0,19	-0,14	<b>0,25</b>
S1P									0,01	-0,16	0,03	-0,13
Trigliserid										0,41	<b>-0,51</b>	0,22
Kolesterol											0,02	<b>0,94</b>
HDL												-0,04

<b>Güçlü</b>	<b>Orta</b>	<b>Zayıf</b>
--------------	-------------	--------------

## 5. TARTIŞMA

Silis, SiO<sub>2</sub>'den oluşan kimyasal bir bileşik olup kristal veya amorf olmak üzere iki farklı yapıya sahiptir [5]. Amorf yapıdaki silika, kristal yapıya sahip değildir ve kristal formdakine kıyasla akciğer için toksik olmayan daha az fibrojenik özelliktedir [2, 6, 7].

Silikaya maruz kalınan doz, maruz kalma sıklığı ve süresine bağlı olarak özellikle akciğerlerde istenmeyen doku reaksiyonları ortaya çıkmaktadır [30, 31]. Solunum yoluyla silikaya maruziyet, akciğerde solunum fonksiyonunun azalması, KOAH ve silikozis gibi yerleşmiş pnömokonyozların oluşumuna yol açabilmektedir [6]. Pnömokonyozlar, iş yerlerinde inorganik tozların solunmasından kaynaklanan parankimal akciğer hastalıklarıdır [32]. Çevresel ve mesleki yollarla silika parçacıkları ve asbest liflerine maruziyet pnömokonyozlara neden olmaktadır [32-34].

Silikozis, akciğerlerde kristalin silika maruziyetine bağlı olarak küçük, tipik olarak yuvarlak veya çizgisel nodüllerin oluşumu ile karakterize ilerleyici, ölümcül, geri döndürülemez ve tedavi edilemeyen fibrotik bir meslek hastalığıdır [12, 13].

Kristalin SiO<sub>2</sub> parçacıklarının boyutu <10 µm'den küçük olduğunda, akciğerlerin distal kısımlarına ulaşabilmektedir. Bu durum, akut silikozis, hızlandırılmış silikozis, kronik silikozis ve konglomera silikozis gibi olumsuz pulmoner patolojilerinin oluşumunu tetikleyebilmektedir [2, 9, 11].

Özellikle gelişmekte olan ülkelerde, mesleki olarak silika maruziyeti, yaygın olarak görülebilmektedir. Pekçok kaya türünde, özellikle de granitler, kumtaşları, kum ve topraklarda bulunan silika kuvarz yapı taşımaktadır. Kuvarz içeren malzemelerin geniş kullanımından dolayı, işçiler çok çeşitli endüstri alanında mesleki olarak silikaya solunum yoluyla maruz kalmaktadır [6]. İnşaat, kumlama, kaya delme, kesme, yontma veya cilalama, tuğla veya fayans kesme, beton delme, taşlama, tünel açma, yıkım, madencilik, seramik üretimi ve dökümcülük gibi pekçok farklı sektörlerinde çalışan işçiler, silikozis gelişimi açısından risk altında bulunmaktadır [42, 74, 75].

Silikozis, dünyada öncelikle ABD'de ve Türkiye'de eski taşlama makinaları ile kot taşlama sonucu ortaya çıkan felaketlerin ardından kamuoyunun dikkatini çekmiştir [31, 73]. Ülkemizde silikozis farkındalığı ise, bu yüzyılın başında yine aynı

şekilde kot taşlama salgınları ile oluşmuştur. Bu duruma, teflon tencere yapımı ve elektrik kablo imalatı gibi yeni iş kollarında ortaya çıkan silikozis olguları eşlik etmiştir [42, 74, 75].

Hücre zarı, hücrenin bütünlüğünün korunmasını, dış çevreden ayrılmasını sağlayan ve pekçok fonksiyonu bulunan yapıdır. Benzer şekilde, hücre içindeki organeller de bir zar ile çevrilidir [93, 94]. Hücre membranının ana bileşeni, fosfolipitler ve kolesterolden oluşan çift katlı lipit tabakasıdır. Plazma membranlarının toplam lipit içeriğinin % 25 ila 40'ını kolesterol oluşturmaktadır [93, 95]. Kolesterol, membranlarda protein fonksiyonunu modüle eder ve lipit çift katmanlarının biyofiziksel özelliklerini düzenleyerek çok sayıda biyolojik işlemi düzenler [93, 97]. Kolesterol safra asitleri ve steroid hormonlarının sentezinde bir öncü bir moleküldür [93, 98-100].

Çift katlı lipit tabakalarında bulunan kolesterol moleküllerinin metabolizmaları oksidasyon reaksiyonlarına duyarlıdır [102, 103]. Oksisteroller, kolesterol'ün 27 karbonlu oksidasyon ürünleri olup, bir oksijen eklenmesi, kolesterol'ün daha polar bileşiklere indirgenme hızını arttırmaktadır. Oksisteroller, özellikle steroid yan zincirine oksijen eklenmesiyle kolaylıkla hücrelerden dışarı taşınabilir ve böylece ekstrahepatik kaynaklardan kolesterol'ün uzaklaştırılmasını kolaylaştırır [105, 106]. Kolesterolün kimyasal yapısında oluşan bu tür küçük bir değişiklikle oluşan oksisterollerin biyofiziksel özelliklerinde önemli değişikliklere yol açar, bu da çift katlı lipit tabakalarının özelliklerini ve dinamiklerini önemli ölçüde değiştirebilir [93].

Oksisteroller enzimatik ve enzimatik olmayan (oto-oksidasyon) yollarla oluşabilmektedir. Enzimatik olarak oluşan oksisteroller CYP450 enzim sistemi ile oluşmaktadır ve çeşitli biyolojik yollarda önemli görevleri bulunmaktadır. Oto-oksidasyon yoluyla üretilen oksisterol türevleri ise *in vivo* ya da gıda işlenmesi sırasında ROB gibi serbest radikallerin aracılık ettiği non-enzimatik (oto-oksidasyon) yollarla üretilirler ve pekçok patolojik durum ile ilişkilendirilmektedir. Enzimatik olmayan bu oksisteroller arasında 7-KC, 7 $\beta$ -OHC, 5 $\alpha$ , 6 $\alpha$ - ve 5 $\beta$ , 6 $\beta$ -epoksitler başlıcalarıdır [114, 133]. Bu oksisteroller kolesterol'ün B halkasının 7. pozisyonunun değişmesi ile oluşan, belirgin sitotoksik ve pro-apoptotik özelliklere sahip olan 7-KC ve 7 $\beta$ -OHC'ı de içeren bir gruptur [133, 134].

Hücre toksik bir maddeye maruz kaldığında veya patolojik bir durum oluştuğunda enzim aktivitesi ve lipit kompozisyonunda farklı cevaplar gözlenebilmektedir. Yapılan çalışmalar, lipit oksidasyon ürünlerinin sinyal iletimi ve transkripsiyondaki değişikliklerle de ortaya çıkabildiklerini, oksidatif stresi ve hücre ölümünü indükleyebildiklerini göstermiştir. Lipitlerin biyoaktivitesi yüksek önemli bir grubunu da oksisteroller oluşturmaktadır [91, 92]. Normal şartlarda, oksisteroller memeli dokularında çok düşük konsantrasyonlarda bulunmakla birlikte, patolojik durumlarda makrofaj köpük hücreleri, aterosklerotik lezyonlar, katarakt ve safra taşları gibi dokularda düzeyleri yükselmektedir. Ateroskleroz, nörolojik hastalıklar ve kanserle olan ilişkileri üzerine yapılan farklı çalışmalar bulunmaktadır [118, 140, 143]. Kronik hastalıklarda inflamasyon sürecini başlattıkları savunulmaktadır [143].

Yapılan tez çalışması ile ülkemizde de her yıl yeni vakaların da eklendiği, mesleki silika maruziyeti ile meydana gelen inflamatuvar bir hastalık olan silikozis hastalarında, oto-oksidasyon ile oluşan oksisterol düzeylerinin ölçülerek kolesterol oksidasyonunun rolünün değerlendirilmesi; sfingolipitlerin metabolizmasının önemli bir bileşeni olan S1P düzeylerinin tespit edilmesi ve hastalıkla ilişkilendirilmesi; söz konusu parametrelerin yanısıra 4-HNE, F2-iP, MDA düzeylerinin ölçülerek indüklenmesi olası lipit peroksidasyonunun da belirlenmesi amaçlanmıştır. İnflamatuvar bir hastalık olan silikozisin oksidatif stres ve ROS oluşumu üzerine pek çok çalışma bulunmakla birlikte, kolesterol oksidasyonunun değerlendirildiği bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ayrıca oksidatif lipit ve kolesterol hasarı ile lipit modifikasyonlarının bir arada değerlendirilmiş olması nedeniyle bu tez çalışması bir ön çalışma niteliği taşımaktadır.

Farklı türevlere sahip oksisteroller, hücre ölümü, inflamasyon, immün sistemi baskılama, hücre proliferasyonu, sitokin üretimi ve trombosit aktivasyonu gibi biyolojik olaylarda rol almaktadır ve son zamanlarda biyoaktif lipidler olarak kabul edilmektedir [133]. Oksisteroller, lipit peroksidasyonu için değerli belirteçler olarak önerilmektedir ve yaşlılarda, artmış lipit peroksidasyonu, kardiyovasküler hastalıkların gelişmesini destekleyen ve tip 2 diabetes mellitusun tetiklenmesini sağlayan artan oksisterol oluşumuna katkıda bulunmaktadır [213]. Bu tez çalışmasında da silika maruziyetinde kolesterol oksidasyonunun bir belirteç olarak

değerlendirilebilmesi amaçlanmış ve ölçülen oksisterol düzeyleri anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur.

Son bir kaç yılda, gelişen LC-MS/MS teknolojisi ile oksisterol türlerinin ölçülebilir hale gelmesi, oksisterollerin oksidatif stres biyobelirteçleri olarak kullanılabilmesi konusunu öne çıkarmıştır. Bu nedenle biyobelirteç olarak hastalıkların teşhisinde, tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesinde ve hastalıkların prognozunun takibinde oksisterol türevlerinin değerlendirilmesinin önemli olduğu düşünülmektedir [140]. Kansere üzerine yapılan çalışmalarda, oksisterollerin kanser patofizyolojisine farklı aşamalarda katkıda bulunan pro-oksidatif ve pro-inflamatuvar özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir. Oksisterollerin, ilk olarak ROB/RNB üretimini artırarak tümör oluşmasını başlatabilmektedir. İkinci olarak ise hücrede fenotipik değişikliği tetikleyen proteinler aracılığı ile tümör gelişimi tetikleyebilmektedir. Yapılan bir çalışmada, 20 akciğer kanseri hastasının plazmasında oksisteroller ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar 7 $\beta$ -hidroksikolesterol seviyesi ile akciğer kanseri arasında bir ilişki olduğunu göstermiştir. Akciğer kanseri riskinde bu molekül biyobelirteç olarak değerlendirilmektedir [118, 162].

Son yapılan çalışmalarda, oksisterollerin tümör büyümesini modüle ettiği gösterilmiştir. Bu etkilerin, oksisterol bağlayıcı LXR'lerin aktivasyonuna bağlı olabileceği bildirilmiştir. LXR izoformlarının yaygın şekilde aktivasyonu, bazı inflamatuvar hastalıklar, ateroskleroz ve otoimmünite gibi patolojik süreçlerde hücre, doku veya hastalığa özgü olarak oluşmaktadır. Oksisteroller, LXR sinyalizasyonunun, tümör hücresi büyümesine katkıda bulunurken, antitümöral immün yanıtlarını inhibe ettiği gösterilmiştir [214].

Alzheimer hastalığı patogenezinin altında yatan çeşitli olaylarda kolesterol oksidasyon ürünlerinin yer aldığı belirlenmiştir. Belirli oksisteroller nöronlarda fonksiyon kaybına ve nöron dejenerasyonuna neden olmaktadır, ancak son zamanlarda bazı türevlerinin nöroprotektif etkilere de sahip olduğu gösterilmiştir. 24-OHC'nin hiperfosforile tau proteininin intranöronal birikimine karşı potansiyel etkileri, 2018 yılında yapılan bir çalışmada değerlendirilmiştir. SK-N-BE nöroblastoma hücrelerinde 24-OHC'nin yararlı bir etkisi gösterilmiştir ve bu etki hiperfosforile tau proteininin nörotoksik birikimini önlemeye yardımcı olan deasetilaz sirtuin 1'i (SIRT1) modüle etme yeteneği ile gösterilmiştir. 24-OHC'dan

farklı olarak, 7-KC, SIRT1'e bağılı nöroprotektif yolağı modüle etmemiştir. 24-OHC'nin nöroprotektif rolünü doğrulamak için *in vivo* deneyler, 24-OHC'nin intraserebroventriküler enjeksiyonu vasıtasıyla, tau patolojisini (hTau fareleri) geliştirmeden, insan tau'yu eksprese eden fareler üzerinde gerçekleştirilmiştir. 7-KC'den farklı olarak 24-OHC'nin, amiloid monomerleri tarafından indüklenen tau hiperfosforilasyonunu tamamen önlediği bulunmuştur. Bu veriler beyinde 24-OHC kaybının önlenmesinin ve nörodejenerasyona karşı koymak için SIRT1 enziminin yüksek seviyelerini korumanın önemini vurgulamaktadır [215].

Oksisteroller'in seviyeleri ve tipleri plak oluşumu, gelişmesi ve stabilitesinde ilişkili olabilir. Oksisteroller, köpük hücrelerinin oluşumunu uyarır, aterosklerotik plak ilerlemesine neden olur. Sitotoksitesi ve hücre apoptozunu indükleme yetenekleri nedeniyle plak hassaslığına ve instabilitesine katkıda bulunur. Çalışmalar, plazma 7 $\beta$ -OHC seviyesinin karotis ve koroner arter hastalığını saptamak için bir biyobelirteç olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Plak zedelenmesi ve kararsızlık için biyobelirteçler olarak kullanım için oksisterollerin potansiyelini değerlendirmek için daha fazla klinik çalışmaya ihtiyaç vardır. Semptomatik ve asemptomatik plakları ayırt edebilen kandaki biyobelirteçlerin tanımlanması çözümlenmemiş bir konudur [216].

7-KC'nin sitotoksikite ve apoptozis indüksiyonu dahil olmak üzere hücre ölüm süreçlerinde güçlü etkileri vardır. Kolesterol oksidasyon ürünleri ve sitotoksik maddelerdir. Mezenkimal kök hücreler (MSC'ler) kendini yenileme ve hücrel farklılaşma yetenekleri ile karakterize edilen çok yetili hücrelerdir. MSC'lerde oksisterollerin etkileri hakkında çok az şey bilinmektedir. 2014'de Levy D. ve arkadaşlarının çalışmasında, insan adipoz dokusundan türetilen MSC'ler üzerinde 7-KC'nin kısa süreli sitotoksik etkisi gösterilmiştir. MSC'ler, iki genç sağlıklı kadından elde edilen yağ dokusundan izole edilmiştir. 7-KC ile 24 saat inkübasyondan sonra mitokondriyal hiperpolarizasyon gözlenmiş, ardından apoptoz seviyesinde hafif bir artış ve aktin organizasyonundaki değişiklikler izlenmiştir. Son olarak, 7-KC'nin inhibisyon konsantrasyonu (IC<sub>50</sub>)'si, bu hücrelerde diğer normal veya kanser hücre hatlarında gözlemlenmiş veya belirlenmiş olandan daha yüksek çıkmıştır [216, 217].

Oksisterollerin biyolojik materyallerdeki laboratuvar analizi, kolesterol ile yakından ilişkili yapılara sahip olan çeşitli bileşiklerin varlığı nedeniyle ve bunların

konsantrasyonları ile kolesterol konsantrasyonu arasında büyük farklılıklar olmasından kolay değildir [18, 218]. Lipit metabolizmasında genetik bir bozukluk olan Niemann-Pick tip C-1 hastalık patogenezinde oksidatif stresi gösteren önceki çalışmaların, kolesterol oksidasyon ürünlerinin enzimatik olmayan oluşumunun hastalık biyobelirteçleri olarak kullanılabilmesi olasılığı ile Forbes D. Porter ve ark.'nın yaptığı çalışmada nonenzimatik olarak oluşan kolesterol oksidasyon ürünlerinin tüm hastaların plazmasında benzer şekilde artmış olduğu gösterilmiştir [167]. Sara Boenzi ve arkadaşları ise Triol ve 7-KC'i Niemann-Pick tip C'nin teşhisi için spesifik biyobelirteçler olabileceğini ortaya koymuştur. Elde edilen sonuçlara göre oksisteroller Niemann-Pick tip-C'nin güvenilir ve duyarlı biyobelirteçleridir [219].

Bu tez çalışmasında da, literatürde verilen çeşitli hastalıklarda olduğu gibi triol ve 7-KC düzeylerinin, inflamatuvar bir hastalık olan silikoziste kontrole kıyasla anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ( $p < 0,001$ ). Dolayısıyla, kolesterol oksidasyonunun da bu hastalık için ayırıcı bir belirteç olarak kullanılabilmesini düşündürmektedir.

Biyoaktif sfingolipid metaboliti S1P kanser, ateroskleroz, diyabet ve osteoporoz gibi birçok fizyolojik ve patofizyolojik süreçlerin kritik düzenleyici moleküllerden birisi olarak bilinmektedir. Son zamanlarda, S1P'nin ayrıca inflamasyon, kanser ve Alzheimer hastalığında önemli hücre içi hedefleri olduğu gösterilmiştir [201]. Kanser oluşumunda, SphK1 aktivasyonu ile S1P'nin artması kanser hücrelerinin apoptozunu engeller böylece hayatta kalmasını, gelişmesini, anjiyogenez ve metastazını kolaylaştırır. Meme, kolon, akciğer, yumurtalık, mide, uterus, böbrek ve rektum kanserinde SphK1'in aşırı üretildiği rapor edilmiştir [196].

Alzheimer hastalarında sfingolipid metabolizmasının da değişime uğradığı bildirilmiştir ve beyin S1P seviyelerindeki düşüş sfingolipid sinyalini hücre ölümü yönünde değiştirmektedir. Alzheimer hastalarında SPL ekspresyonu artmış ve artmış SPL ekspresyonu klinik demans progresyonu ile korelasyon göstermiştir. Ek olarak, SPL genindeki iki tek nükleotid polimorfizmi geç başlangıçlı Alzheimer hastalığına karşı duyarlılık kazandırmıştır. Bu bulgular, SPL'nin Alzheimer hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıkların ilerlemesinde potansiyel bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir [220]. Bizim tez çalışmamızda da, S1P'nin düzeylerinin azalmış



olduğu gösterilmiştir. Bu durumun, S1P metabolizmasının hızlanması ve oluşumunun baskılanmasına bağlı olarak ortaya çıkabileceği ve bir savunma olarak hasarlı hücreyi apoptozize yönlendirmek için SPL'nin artarak S1P'nin azalmış olabileceği düşünülmektedir.

Hücrel oksidan/antioksidan dengesi bir hastalık veya çevresel koşullar nedeniyle bozulabilmekte ve oksidatif stres indüklenebilmektedir. ROB üretimi ve antioksidan sistem dengesi bozulduğunda, kontrolsüz ROB artışı hedef organda (akciğer gibi) veya sistemik bir hasara yol açabilmektedir [169, 173]. Bu durum, lipid, protein, enzim, DNA gibi önemli biyo-makromoleküllere zarar verebilmektedir ve böylece fizyolojik süreçler etkilenebilmektedir ve/veya hücre ölümü ortaya çıkabilmektedir. Oksidatif strese bazı durumlarda mutasyonlar, karsinojenez, erken yaşlanma veya çoklu organ fonksiyon bozukluğu eşlik edebilmektedir [169].

Oksidatif stres ve silikozis ilişkisi üzerine Zsoldos T. ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, sıçanlara 0,5 ml salin içinde 50 mg silika süspansiyonu intratrakeal yoldan verilmiş ve 3., 6., 12., 21. gün sonlarında hayvanlar öldürülmüştür. Hayvanların akciğer dokularında lipid peroksidasyonunun zamana bağlı olarak arttığı, süperoksit dismutaz ve katalaz aktivitelerinin de yükseldiği belirlenmiştir. Aynı zamanda akciğer dokularının redoks durum potansiyeli de bu dönemde belirlenmiştir. Silikanın etkisiyle akciğerde lipid peroksidasyonunun kademeli olarak arttığı ve bu durumu süperoksit dismutaz ve katalaz aktivitesinin de artmasının eşlik ettiği görülmüştür. Redoks potansiyelinin oksidasyona kaydığı da tespit edilmiştir. Silikanın, lipid peroksidasyonu yoluyla dolaylı olarak membran hasarına yol açtığı ve serbest radikal üretimini indüklediği belirtilmiştir [221].

Bezrukavnikova LM. ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada akciğerlerde toza bağlı hastalıklara sahip olgularda kan plazmasında lipid peroksidatlarının arttığını ve muhtemelen bu durumu kompanse etmek üzere de tokoferol düzeylerinin yükseldiğini göstermişlerdir. Buna karşın antioksidan savunma sisteminde bir azalma tespit edilmiştir [222].

Bir başka çalışmada, yaklaşık 2 haftalık süre boyunca taze kırılmış kuartz veya yaşlandırılmış kuvartz (2 ay önce öğütülmüş) tozuna maruz bırakılan sıçanların akciğer lavaj sıvıları ve akciğerlerindeki biyokimyasal ve patolojik değişiklikler değerlendirilmiştir. Odalardaki kristalin kuvartz konsantrasyonu ortalaması

20 mg/m<sup>3</sup> olarak belirlenmiştir. Taze öğütülmüş kuvarz örnekleri ile ilişkili serbest radikal konsantrasyonları, yaşlı kuvarzinkilere kıyasla anlamlı derecede yüksek çıkmıştır. Akciğer hasarını gösteren biyokimyasal belirteçler yükselmiş, lipid peroksidasyonu artmıştır ve pulmoner fagositlerin daha fazla oksijen radikali ürettiği belirlenmiştir. Genel olarak, tüm bu pulmoner yanıtlar kıyaslandığında, yaşlı kuvarz ile karşılaştırıldığında taze kırık kuvarzın solunmasının sonra daha belirgin hasara neden olduğu görülmüştür [28]. Bir başka çalışmada Castranova V. ve ark. kuvarz parçacıklarının öğütülmesinin veya kırılmasının Si-O bağlarını kırdığını ve Si ve Si-O oluşturduğunu göstermiştir. Bölünme düzlemlerinin yüzeyindeki radikaller su ile temas ettiğinde, hidroksil radikalleri üretebildiğini ve kırık silika tozu yaşlandıkça bu yüzey radikalleri bozulduğu görülmüştür. Taze kırılmış kuvarz, doğrudan lipid peroksidasyonuna, membran hasarına ve hücre ölümüne neden olan yaşlı silikadan çok daha güçlü etki gösterdiği ifade edilmiştir. Ayrıca, taze öğütülmüş silika, yaşlı silikadan daha güçlü bir alveoler makrofaj uyarıcısı olduğu da belirlenmiştir. Bu silika kaynaklı aktivasyon, süperoksit, hidrojen peroksit, nitrik oksit ve akciğer hücrelerine zarar verebilen diğer oksidan moleküllerin üretilmesi ile sonuçlandığı da belirtilmiştir [223]. Liu Bl. ve ark. kuvarz etkisi altında alveoler makrofajın oksidan ve antioksidan sistemindeki değişikliklerini hücre kültürü, silikozis indüklenmiş deney hayvanları ve silikozisli hastalar gibi farklı gruplarda incelemiştir. Sonuçlar, kuvarz tozunun, hücre zarında lipid peroksidasyonuna yol açabilen, alveoler makrofajlardan türetilmiş serbest radikallerin üretimini indükleyebileceğini göstermiştir. Bu değişikliklerin özellikle deneysel sıçan silikozisin erken döneminde ve silikozisli hastalarda belirgin olduğu gösterilmiştir [224].

Odinaev FI. ve ark. kuvarza maruziyetinin etkilerini farklı irtifalarda çalışan madencilerde incelemiştir. MDA düzeyleri ve antioksidan savunma (süperoksit dismutaz ve katalaz aktiviteleri) sistemi aktiviteleri ölçülmüştür. İşçilerde sağlıklı gönüllülere kıyasla lipid peroksidasyonunun arttığı ve antioksidan savunmanın azaldığı belirlenmiş, sonuçların çalışılan maden irtifası, hipobarik hipoksiyle kombine edilen kuvarz içeren toz maruziyeti ile korele olduğu gösterilmiştir. Artan lipid peroksidasyonunun, hücrelerin ölümüne ve parçalanmasına neden olduğu, pnömokonyoz oluşumunun başlıca patojenetik bileşenleri arasında MDA'nın yer aldığı ifade edilmiştir. Araştırmacılar, madencilerdeki yüksek ve orta irtifalarda

hastalığın erken gelişimini, nispeten hızlı ilerlemeyi ve nodüler formların sıklığını bu durumla ilişkilendirmiştir. Ayrıca, hipobarik hipoksinin silikozisi tetiklediği de ifade edilmiştir [225].

Nardi JI. ve ark. tarafından 2018 yılında madencilik sırasında mesleki maruziyeti olan işçilerde, silikozis için potansiyel erken biyobelirteçler olarak inflamatuvar cevap ve oksidatif stres parametreleri incelenmiştir. Çalışmanın kristalize silikaya maruz kalan 38 işçi (maruz grup), silikozis teşhis edilen 24 işçi (hasta grubu) ve 30 mesleki olarak maruz kalmamış çalışan (kontrol grubu) olmak üzere toplam 92 katılımcısı bulunmaktadır. Hasta grubu, maruz kalma zamanına göre 2 gruba ayrılmıştır: 1-15 yıl mesleki maruziyete sahip 19 işçi (Hasta I) ve 16 yıldan fazla mesleki maruziyete sahip 19 işçi (Hasta II). MDA ve serum C vitamini düzeylerinin plazma seviyeleri belirlenmiştir. L-selektin yüzey proteini ekspresyonu, Hasta II grubunda önemli ölçüde azalmıştır ( $p < 0,05$ ), bu bağışıklık sistemi bileşeninin kristalin silika kaynaklı toksisitenin potansiyel bir göstergesi olarak önemini göstermektedir. MDA düzeyleri Hasta I, Hasta II ve maruz grupta kontrol grubuna göre anlamlı olarak artmıştır ( $p < 0,05$ ). İnflamatuvar yanıt ve oksidatif stres biyobelirteçleri arasında önemli ilişkiler gözlemlenmiştir. Bu nedenle, çalışma sonuçları, silikozis gelişmeden önce, kronik maruziyet sonrası madencilerde kristal silikanın neden olduğu toksisiteyi izlemek için potansiyel bir çevresel biyobelirteç olarak L-selektinin kullanabileceğini göstermiştir [226].

Yaptığımız çalışmada da, literatüre benzer şekilde kontrole kıyasla hem idrar hem de plazma lipit peroksidasyon parametreleri (MDA, F2-iP ve 4-HNE) anlamlı şekilde yükselmiştir ( $p < 0,05$ ). Bu durum, silikozis hastalarında ROB artışına bağlı oksidatif stresin oluştuğunu ve buna bağlı olarak da lipit peroksidasyonunun tetiklendiğini desteklemektedir.

Silikozis hastalarında yapılan son çalışmalar incelendiğinde, hastalığın tedavi yöntemi üzerine yapılmış çalışmalar da göze çarpmaktadır. Zhang H. ve arkadaşları 2017 yılında; Infliximab tedavisi ile silika kaynaklı akciğer patolojik değişikliklerini (enflamatuvar hücreler, kolajen birikimi) önemli ölçüde iyileştirdiğini göstermişlerdir. Infliximab, TNF- $\alpha$ 'yı azaltarak, NF- $\kappa$ B sinyalini ve artmış oksidan aktiviteyi inhibe ederek silika kaynaklı pulmoner inflamasyonu azaltabilmektedir ve bu da Infliximab'ın tedavide potansiyel bir ilaç olabileceğini göstermiştir [227].

Peng HB ve ark. 2017 yılında oleanolik asitin silikozisli sıçanlarda, oksidatif stres ve Akt/NF- $\kappa$ B yolağı üzerinden sitokin ve kolajen ekspresyonu üzerine koruyucu etkilerini göstermişlerdir. Etki mekanizması araştırıldığında, oleanolik asitin fosforile edilmiş Akt1 seviyesini azalttığı ve bunun sonucunda silikozisin gelişimi ve ilerlemesinde NF- $\kappa$ B'nin transkripsiyonunu inhibe ettiği bulunmuştur. Oleanolik asitin koruyucu etkilerinin kısmen antioksidan aktivitesine ve Akt/NF- $\kappa$ B yolunu modüle ederek sitokin ve kolajen ekspresyonunu azaltma yeteneğine bağlı olduğunu göstermiştir [228].

Doğal bir besin olan solucan ekstraktı (EE) ile yapılan bir çalışmada, ekstrenin anti-enflamatuvar, antioksidan ve anti-apoptotik etkileri olduğu bildirilmiştir. *In vivo* hem de *in vitro* modeller kullanarak yapılan çalışmalar, sonucunda EE'nin silikozis için potansiyel bir anti-oksidatif, anti-enflamatuvar ve anti-fibrotik ilaç olduğunu belirtmişlerdir [229]. Abdelaziz RR. ve ark. 2016'da bir silikozis sıçan modelinde Tadalafil'in, hava yolu hiperaktivitesini azalttığını ve akciğer ve solunum yollarının disfonksiyonuna karşı koruyucu olduğunu göstermiştir. Tadalafil'in gözlenen koruyucu etkisinde inflamatuvar ve fibrojenik sitokin ekspresyonunun azaltılması, oksidanların/antioksidan hemostazın düzenlenmesi, antioksidan destek ve anjiyogenezin desteklenmesi rol oynamaktadır [230].

Desferrioksamının (DF) silikaya bağlı pulmoner reaksiyon üzerine etkisi incelenmiştir. Demir bir şelatör olan DF, silika kaynaklı pulmoner reaksiyon sürecini inhibe edebileceği belirtilmiştir. Silika'nın, demir aracılı Fenton aktivitesi DF inkübasyonu ile azaltılmıştır. Arttığı tespit edilen MDA düzeylerinde, DF ile tedavi edilen silika grubunda, tedavi edilmeyen gruba kıyasla belirgin düşüşler görülmüştür. DF, sadece silikanın neden olduğu tümör nekroz faktörü- $\alpha$  ve A549'dan IL-8 salınmasını değil, aynı zamanda fibroblast proliferasyonunu da inhibe etmiştir. DF, tedavi edilmeyen kontrol ile karşılaştırıldığında inflamasyonu ve fibrozu önemli ölçüde azaltmıştır. Bu sonuçlardan, DF'nin silika kaynaklı pulmoner reaksiyonun inhibisyonunda rol oynayabileceği sonucuna varmışlardır [231].

Silikozisli hastalarda yapılan bir başka çalışmada, besin takviyeli bir beslenmenin lipid peroksidasyonunda azalmada önemli bir rol oynayabileceği, serbest radikal reaksiyonlarını azaltabileceği, hücre zarını stabilize edebileceği ve

dolayısıyla akciğer fibrozunu geciktirebileceği ve vücudun bağışıklık fonksiyonlarını artırabileceği sonucuna varmışlardır [232].

Silikozis tedavisinin olmaması nedeniyle yeni yaklaşımların geliştirilmesine ihtiyaç bulunmaktadır. Özellikle hastalıkla indüklenen inflamatuvar cevabın altında yatan mekanizmalar aydınlatıldığında, tedavi yaklaşımlarına ilişkin çalışmalar hız kazanacaktır. Yapılan çalışma, hastalık ile lipit modifikasyonları arasındaki ilişkinin ortaya konulmasına katkıda bulunmaktadır. Elde edilen bulgular, oksidatif lipit hasarının hastalıkla indüklendiğini göstermiştir. Bu yolak üzerinden de yeni tedavi yaklaşımlarının belirlenebilmesinin söz konusu olabileceği düşünülebilir.

Çalışma sırasında ölçülen parametreler arasında önemli korelasyonların olduğu da tespit edilmiştir. Özellikle triol ve 7-KC arasında önemli bir ilişkinin bulunması ( $r=0,49$ ,  $p<0,05$ ) biyobelirteç olma ihtimalini güçlendirmektedir. Ayrıca, indüklenen oksidatif strese bağlı olarak artan lipit peroksidasyonu parametrelerinden plazma HNE ile MDA ve F2-iP arasında güçlü pozitif bir korelasyon olduğu görülmektedir (sırasıyla  $r=0,85$ ;  $r=0,85$ ;  $p<0,05$ ). Bu da hücre zarının önemli bileşenlerinden olan fosfolipitlerde lipit peroksidasyonu reaksiyonlarının gerçekleştiğini göstermiştir. Bununla birlikte, idrar MDA düzeylerinin de 7-KC ve triol düzeyleri ile ilişkilerinin anlamlı olduğunun belirlenmesi (sırasıyla  $r=0,44$ ;  $r=-0,30$ ;  $p<0,05$ ), artan ROB ile birlikte lipit peroksidasyonu sırasında oluşan hidroperoksitlerin de kolesterol oksidasyonuna da neden olabileceğini düşündürmektedir. Çalışma bulguları, triol ile S1P düzeyleri arasında anlamlı negatif bir ilişki olduğunu ( $r=-0,31$ ;  $p<0,05$ ) göstermiştir. Kolesterol oksidasyonu artarken, S1P metabolizmasının da indüklenerek S1P düzeylerinin azaldığı ve literatürde de belirtildiği şekilde apoptozun tetiklendiğini akla getirmektedir. Ayrıca, grupların lipit profilinde yer alan trigliserit ile HDL arasında anlamlı negatif bir korelasyon ( $r=-0,51$ ;  $p<0,05$ ) görülürken kolesterol ile LDL düzeyleri arasında da pozitif bir ilişki ( $r=0,94$ ;  $p<0,05$ ) tespit edilmiştir. Bununla birlikte, çalışmada ölçülen parametrelerle trigliserit ve kolesterol düzeyleri arasında bir korelasyona rastlanmamıştır. Bu durumun, çalışmada kullanılan hasta sayıları ile ilişkili olabileceği, sayının artırılması ile daha kesin bir sonuca ulaşılabileceği düşünülmektedir.

Çalışma sonuçları özetlendiğinde; silikozis hastalarında daha önce kolesterol oksidasyon ürünü olan oksisteroller üzerine yapılmış bir çalışmaya rastlanmamış

olup, bu yönüyle bir ön çalışma niteliğindedir. Elde edilen bulgular, inflamatuvar bir hastalık olan silikoziste lipid peroksidasyonunun indüklendiğini ve okside kolesterol düzeylerinin yükseldiğini göstermiştir. Sonuçlarımız kurduğumuz hipoteze de uygun olarak silikoziste lipit metabolizmasının etkilendiğini ve oksidatif lipit hasarının tetiklendiğini, kolesterol oksidasyonunun bu maruziyet grubunda da önemli bir belirteç olarak kullanılabileceğini göstermiştir. Gelecekte hasta sayısının da artırılarak geniş çaplı lipidomik çalışmaların yapılması planlanmaktadır. Böylece hastalığa bağlı lipit modifikasyonları ile ilgili kesin bilgilerin elde edilmesi ve hastalık patogenezi ile ilişkilendirilmesi söz konusu olabilir.

Elde edilen bulgular, hastalardaki oksidatif stres ve oksidatif lipit hasarının tetiklendiğini işaret ettiğinden hastalara antioksidan takviyesinin yararının önemli olup, bu hastaların beslenmelerine de dikkat etmeleri gerekmektedir.

Günümüzde silikozisin etkili bir tedavisinin hala olmaması nedeni ile işçilerin sağlığını korumanın tek yolu silika içeren tozlara maruz kalmanın kontrol edilmesidir. Hastalığın başarılı şekilde önlenmesi için tedbirlerin alınması gerekmektedir. Avustralya, Belçika, Kanada, Finlandiya, Fransa, Almanya, İsviçre, İsveç, Birleşik Krallık ve Amerika Birleşik Devletleri gibi ülkelerde, iyi organize edilmiş önleme programları ile silikozis insidansının önemli ölçüde azaltılmasının mümkün olduğunu gösterilmiştir. Kurumsal düzeyde, silika içeren toz oluşumunu önlemek için uygun teknolojilerin uygulanması, toz kontrolü için mühendislik yöntemlerinin kullanımı, belirlenen maruz kalma limitleri ve teknik standartlara uygunluk, önleyici tedbirlerin etkinliğini değerlendirmek için çalışma ortamının gözetimi, işçilerin sağlıklarının izlenmesi, silikozisin erken evrelerini tespit etmek için kişisel sağlık koruyucu ekipmanların kullanımı (geçici önlem olarak), ayrıca sağlık eğitimi zorunludur [233].

Silikozisi önlemek için gerekli olan ulusal düzeyde, yasalar ve yönetmelikler, mesleki maruziyet sınırlarının ve teknik standartların uygulanması, teknik danışmanlık hizmetleri, etkili bir denetim sistemi, iyi organize edilmiş bir raporlama sistemi ile devlet kurumlarını, sanayi ve sendikaları içeren bir ulusal eylem programı, gelişmiş ülkelerin politikalarında yer almaktadır [233].

Türkiye'de pnömokonyozun önlenmesi için oluşturulan ulusal eylem planı; ülkenin sosyo-ekonomik durumu göz önünde bulundurularak risk altındaki

çalışanların belirlenmesi, riski önleme stratejilerinin kurumsal çerçeve ile işbirliği yapılarak oluşturulmasını içermektedir. Ayrıca Uluslararası standartların rehberliğinde pilot çalışma, uygulama, izlem ve değerlendirme kriterleri ile kısa ve uzun dönemde beklenen sonuçlar ile Türkiye'de gerçek pnömokonyoz veritabanı temelinin oluşturulması, eğitimin artırılması ve çalışma standartlarının uluslararası seviyeye yükseltilmesiyle pnömokonyoz olgularının en aza indirilmesi üzerinde durulmaktadır [233].

Türkiye'de silikozis veya diğer meslek hastalıkları için denetim sistemlerinde ciddi eksiklikler bulunmaktadır. Dolayısıyla, pekçok alanda olduğu gibi sorunun boyutuna ilişkin istatistiksel bir çıkarım yapılamamaktadır. Türkiye'de sigortasız çalışma oranının yüksek olması nedeniyle doğru çıkarımların yapılması mümkün olamamaktadır. Türkiye İstatistik Kurumu'nun raporunda, 2017'deki işgücü 32 milyon ve kayıt dışı istihdam oranı %33,6 olarak verilmiştir [31]. Türkiye Sosyal Güvenlik Kurumu'nun 2013-2016 yılları arasında elde edilen verilerle oluşturduğu istatistiklerine göre, meslek hastalıklarına bağlı işgücü kaybına uğramış işçilerin sayısı sıralı olarak 351, 494, 510 ve 594 olmuştur [31, 76]. Bunlar arasında, pnömokonyozların oranı, yukarıda belirtilen yıllar arasında %18, %20, %35 ve %33 oranlarında artış göstermiştir. Asbest ve kömür işçisi pnömokonyozu ile karşılaştırıldığında, silikozis eğiliminin daha yüksek olduğu görülmüştür [31].

Silikozisin önlenmesinin en iyi yolu, kristalin silika tozu üreten iş yerlerinin belirlenmesi ve daha sonra tozun elimine edilmesi veya kontrol edilmesidir [35, 36]. Türkiye'de her yıl yeni teşhis edilen çok sayıda vaka bulunmaktadır. Silika tozuna mesleki maruziyet, özellikle ülkemizin de dahil olduğu gelişmekte olan ülkelerde önemli bir sağlık sorunu olarak kabul edilmektedir [42].

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışması ile silikozis hastalarında oto-oksidasyon ile oluşan oksisterol düzeylerinin değerlendirilmesi; bir sfingolipit metaboliti olan S1P düzeylerinin tespit edilmesi; söz konusu parametrelerin yanısıra indüklenmesi olası lipit peroksidasyonunun da farklı parametrelerle belirlenmesi amaçlanmıştır. Ulaşılan sonuçlar aşağıda özetlenmiştir:

- Kolesterol oksidasyonunun belirlenebilmesi amacıyla, kolesterol oto-oksidasyonunun belirteçlerinden olan 7-KC ve triol düzeyleri ölçülmüş, silikozis ile düzeylerinin yükseldiği ve bunların hastalıkta biyobelirteç olabileceği öngörülmüştür. Dolayısıyla bu hasta grubunda kolesterol oksidasyonunun da hastalığın patogenezinde rol alabileceği düşünülmektedir.
- Özellikle, kolesterol oksidasyon türevleri olan triol ve 7-KC arasında önemli bir korelasyonun bulunması ( $r=0,49$ ;  $p<0,05$ ) biyobelirteç olma ihtimallerini güçlendirmiştir.
- Bu hastalarda, ayrıca S1P düzeyleri de ölçülmüş ve kontrole kıyasla anlamlı şekilde azaldığı belirlenmiştir.
- Silikozis hastalarında daha önce kolesterol oksidasyon ürünü olan oksisteroller ve S1P düzeylerinin değerlendirmesi üzerine yapılmış bir çalışmaya rastlanmamış olup, bu yönüyle tez çalışması bir ön çalışma niteliğindedir.
- İnflamatuvar bir hastalık olan silikozis hastalarında, lipid peroksidasyonunun belirlenmesi için toplanan idrar ve plazma örneklerinde MDA, F2-iP ve 4-HNE düzeyleri ölçülmüştür. Elde edilen bulgular, bu hastalarda lipit peroksidasyonunun indüklendiğini göstermiştir.
- Sonuçlarımız kurduğumuz hipoteze de uygun olarak silikoziste lipit metabolizmasının etkilendiğini ve oksidatif lipit hasarının tetiklendiğini, kolesterol oksidasyonunun bu maruziyet grubunda da önemli bir belirteç olarak kullanılabileceğini göstermiştir. Dolayısıyla,



gelecekte hasta sayısının da artırılarak geniş çaplı lipidomik çalışmaların yapılmasının anlamlı olduğu sonucuna varılmıştır.

- Ayrıca, örneklerin toplandığı Ankara Keçiören Mesleki ve Çevresel Hastalıklar Hastanesi Göğüs Hastalıkları ve Tüberküloz bölümünden, yeni gelen vakaların geçmişteki başvurulara kıyasla daha hafif prognozda olduğu bilgisi alınmış, ancak, hastalığın bu evrelerinde de oksidatif hasara bağlı olarak yapısal değişikliklerin söz konusu olduğu belirlenmiştir.
- Elde edilen bulguların, hastalarda oksidatif stres ve oksidatif lipit hasarının tetiklendiğini işaret etmesi, hastalara antioksidan takviyesi yapılmasının ve bu hastaların beslenmelerine dikkat etmelerinin de önemli olduğunu düşündürmektedir. Düzenli olarak kullanılacak antioksidan takviyelerinin serbest radikal reaksiyonlarını ve oksidatif lipit hasarını azaltabileceği, dolayısıyla da akciğer fibrozunun gelişimini geciktirebileceği sonucuna varılabilir.

## KAYNAKLAR

1. Sakar, A., et al., *Evaluation of silicosis in ceramic workers*. Tuberkuloz ve toraks, 2005. **53**(2): p. 148-155.
2. Steenland, K. and E. Ward, *Silica: a lung carcinogen*. CA: a cancer journal for clinicians, 2014. **64**(1): p. 63-69.
3. Anlar, H.G., *Seramik İşçilerinde Mesleki Maruziyete Bağlı Olası Genotoksik Hasarın Değerlendirilmesi*. 2017.
4. Anlar, H.G., et al., *Effects of occupational silica exposure on oxidative stress and immune system parameters in ceramic workers in Turkey*. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A, 2017. **80**(13-15): p. 688-696.
5. Akgün, M., *Silikozis*. İlk Söz: p. 34.
6. Peretz, A., et al., *Silica, silicosis, and lung cancer*. The Israel Medical Association journal: IMAJ, 2006. **8**(2): p. 114-118.
7. Castranova, V., W.E. Walker, and V. Vallyathan, *Silica and silica-induced lung diseases*. 1995: CRC Press.
8. Anlar, H.G., et al., *Assessment of DNA damage in ceramic workers*. Mutagenesis, 2017. **33**(1): p. 97-104.
9. Craighead, J., *Diseases associated with exposure to silica and nonfibrous silicate minerals*. Archives of Pathology and Laboratory Medicine, 1988. **112**(7): p. 673-720.
10. Green, F.H. and V. Vallyathan, *Pathologic responses to inhaled silica*. Silica and silica-induced lung diseases, 1996: p. 39-59.
11. Castranova, V. and V. Vallyathan, *Silicosis and coal workers' pneumoconiosis*. Environmental health perspectives, 2000. **108**(Suppl 4): p. 675.
12. Pandey, J.K. and D. Agarwal, *Biomarkers: A potential prognostic tool for silicosis*. Indian journal of occupational and environmental medicine, 2012. **16**(3): p. 101.
13. Prasad, B. and J. Pandey, *Serum copper and zinc level as biomarker for dust exposed lung diseases among coal miners*. Journal of Biodiversity and Environmental Sciences, 2016. **8**(1): p. 65-74.
14. Bargagli, E., et al., *Oxidative stress in the pathogenesis of diffuse lung diseases: a review*. Respiratory medicine, 2009. **103**(9): p. 1245-1256.
15. Fubini, B. and A. Hubbard, *Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) generation by silica in inflammation and fibrosis*. Free Radical Biology and Medicine, 2003. **34**(12): p. 1507-1516.
16. Fukui, H., et al., *The induction of lipid peroxidation during the acute oxidative stress response induced by intratracheal instillation of fine crystalline silica particles in rats*. Toxicology and industrial health, 2016. **32**(8): p. 1430-1437.

17. Yamano, Y., et al., *Oxidative DNA damage induced by silica in vivo*. Environmental research, 1995. **69**(2): p. 102-107.
18. Samadi, A., *Analysis Of Oxysterol Species In Type 1 And Type 2 Diabetes Mellitus By Lc-ms/ms Method*. 2018.
19. Brown, A.J. and W. Jessup, *Oxysterols: sources, cellular storage and metabolism, and new insights into their roles in cholesterol homeostasis*. Molecular aspects of medicine, 2009. **30**(3): p. 111-122.
20. Bjorkhem, I., *Are side-chain oxidized oxysterols regulators also in vivo?* Journal of Lipid Research, 2009. **50**: p. S213-S218.
21. Bjorkhem, I., *Five decades with oxysterols*. Biochimie, 2013. **95**(3): p. 448-454.
22. Griffiths, W.J., et al., *New methods for analysis of oxysterols and related compounds by LC-MS*. The Journal of steroid biochemistry and molecular biology, 2016. **162**: p. 4-26.
23. *Amorf yapıdaki seramikler*. [cited 2018 16.06.2018]; Available from: <https://muhendishane.org/kutuphane/temel-malzeme-bilgisi/amorf-yapidaki-seramikler/>.
24. Humans, I.W.G.o.t.E.o.C.R.t., I.A.f.R.o. Cancer, and W.H. Organization, *Silica, some silicates, coal dust and para-aramid fibrils*. 1997: World Health Organization.
25. Castranova, V., *Particulates and the airways: basic biological mechanisms of pulmonary pathogenicity*. Applied occupational and environmental hygiene, 1998. **13**(8): p. 613-616.
26. Lapp, N.L. and V. Castranova, *How silicosis and coal workers' pneumoconiosis develop--a cellular assessment*. Occupational medicine (Philadelphia, Pa.), 1993. **8**(1): p. 35-56.
27. Vallyathan, V., et al., *Generation of free radicals from freshly fractured silica dust*. Am Rev Respir Dis, 1988. **138**(5): p. 1213-19.
28. Vallyathan, V., et al., *Freshly fractured quartz inhalation leads to enhanced lung injury and inflammation. Potential role of free radicals*. American journal of respiratory and critical care medicine, 1995. **152**(3): p. 1003-1009.
29. Sherwin, R., M. Barman, and J. Abraham, *Silicate pneumoconiosis of farm workers*. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology, 1979. **40**(5): p. 576-582.
30. Henneberger, P.K. and D.N. Weissman, *Old adversaries in new places*. 2017, BMJ Publishing Group Ltd.
31. Akgün, M. and B. Ergan, *Silicosis in Turkey: Is it an Endless Nightmare or is There Still Hope?* Turkish thoracic journal, 2018. **19**(2): p. 89.
32. Cullinan, P. and P. Reid, *Pneumoconiosis*. Primary Care Respiratory Journal, 2013. **22**(2): p. 249.

33. Lee, S., et al., *Silica exposure and altered regulation of autoimmunity*. Environmental health and preventive medicine, 2014. **19**(5): p. 322.
34. Laney, A.S. and D.N. Weissman, *The classic pneumoconioses: new epidemiological and laboratory observations*. Clinics in chest medicine, 2012. **33**(4): p. 745-758.
35. Karkhanis, V.S. and J. Joshi, *Combined pulmonary fibrosis and emphysema in a tyre industry worker*. Lung India: official organ of Indian Chest Society, 2012. **29**(3): p. 273.
36. Leung, C.C., I.T.S. Yu, and W. Chen, *Silicosis*. The Lancet, 2012. **379**(9830): p. 2008-2018.
37. Archontogeorgis, K., et al., *Lung cancer and interstitial lung diseases: a systematic review*. Pulmonary medicine, 2012. **2012**.
38. BASARAN, N., et al., *EFFECTS OF EXPOSURE TO HAZARDOUS SUBSTANCES IN POTTERY AND CERAMIC WORKERS*. The Turkish Journal Of Occupational/Environmental Medicine and Safety. **2**(1 (1)): p. 70-70.
39. Altindag, Z.Z., et al., *Neopterin as a new biomarker for the evaluation of occupational exposure to silica*. International archives of occupational and environmental health, 2003. **76**(4): p. 318-322.
40. Barboza, C.E.G., et al., *Tuberculosis and silicosis: epidemiology, diagnosis and chemoprophylaxis*. Jornal brasileiro de pneumologia, 2008. **34**(11): p. 959-966.
41. McDonald, J.C., et al., *Silica and lung cancer*. Silica and Silica-Induced Lung Diseases. CRC Press, Boca Raton, 1996: p. 383-396.
42. Akgun, M., et al., *An epidemic of silicosis among former denim sandblasters*. European Respiratory Journal, 2008. **32**(5): p. 1295-1303.
43. Rees, D. and J. Murray, *Silica, silicosis and tuberculosis [State of the Art Series. Occupational lung disease in high-and low-income countries, Edited by M. Chan-Yeung. Number 4 in the series]*. The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease, 2007. **11**(5): p. 474-484.
44. Kolsuz, M., et al., *Eskişehir Deliklitaş Verem Savaş Dispanseri'nde kayıtlı akciğer tüberkülozu olgularının değerlendirilmesi*. Tüberküloz ve Toraks Dergisi, 2003. **51**: p. 163-170.
45. Banks, D.E., *Clinical features of silicosis*. Silica and silica-induced lung diseases. Boca Raton, FL: CRC Press Inc, 1996: p. 23-37.
46. Nash, T., A. Allison, and J. Harington, *Physico-chemical properties of silica in relation to its toxicity*. Nature, 1966. **210**(5033): p. 259.
47. Nolan, R., et al., *Quartz hemolysis as related to its surface functionalities*. Environmental research, 1981. **26**(2): p. 503-520.
48. Kobzik, L., *Lung macrophage uptake of unopsonized environmental particulates. Role of scavenger-type receptors*. The Journal of Immunology, 1995. **155**(1): p. 367-376.

49. Iyer, R., et al., *Silica-induced apoptosis mediated via scavenger receptor in human alveolar macrophages*. Toxicology and applied pharmacology, 1996. **141**(1): p. 84-92.
50. Brown, G.M., K. Donaldson, and D.M. Brown, *Bronchoalveolar leukocyte response in experimental silicosis: modulation by a soluble aluminum compound*. Toxicology and applied pharmacology, 1989. **101**(1): p. 95-105.
51. Fubini, B., V. Bolis, and E. Giamello, *The surface chemistry of crushed quartz dust in relation to its pathogenicity*. Inorganica chimica acta, 1987. **138**(3): p. 193-197.
52. Castranova, V., et al., *Augmentation of pulmonary reactions to quartz inhalation by trace amounts of iron-containing particles*. Environmental Health Perspectives, 1997. **105**(Suppl 5): p. 1319.
53. Weiss, S. and A. LoBuglio, *Phagocyte-generated oxygen metabolites and cellular injury*. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology, 1982. **47**(1): p. 5-18.
54. Wallaert, B., et al., *Superoxide Anion Generation by Alveolar Inflammatory Cells in Simple Pneumoconiosis and in Progressive Massive Fibrosis of Nonsmoking Coal Workers*. American Review of Respiratory Disease, 1990. **141**(1): p. 129-133.
55. Castranova, V., N. Dalal, and V. Vallyathan, *Role of surface free radicals in the pathogenicity of silica*. Silica and silica-induced diseases, 1996: p. 91-105.
56. Castranova, V., et al., *Enhanced pulmonary response to the inhalation of freshly fractured silica as compared with aged dust exposure*. Applied occupational and environmental hygiene, 1996. **11**(7): p. 937-941.
57. Goodman, G.B., et al., *Acute silicosis responding to corticosteroid therapy*. Chest, 1992. **101**(2): p. 366-370.
58. Shi, X., et al., *The role of hydroxyl radical as a messenger in the activation of nuclear transcription factor NF- $\kappa$ B*. Molecular and cellular biochemistry, 1999. **194**(1-2): p. 63-70.
59. Chen, F., et al., *Role of hydroxyl radical in silica-induced NF-kappa B activation in macrophages*. Annals of Clinical & Laboratory Science, 1998. **28**(1): p. 1-13.
60. Ding, M., et al., *Freshly fractured crystalline silica induces activator protein-1 activation through ERKs and p38 MAPK*. Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(43): p. 30611-30616.
61. Bowden, D. and I. Adamson, *The role of cell injury and the continuing inflammatory response in the generation of silicotic pulmonary fibrosis*. The Journal of pathology, 1984. **144**(3): p. 149-161.
62. Warheit, D.B., et al., *Development of a short-term inhalation bioassay to assess pulmonary toxicity of inhaled particles: Comparisons of pulmonary responses to carbonyl iron and silica*. Toxicology and applied pharmacology, 1991. **107**(2): p. 350-368.

63. Driscoll, K.E., et al., *Pulmonary response to inhaled silica or titanium dioxide*. Toxicology and applied pharmacology, 1991. **111**(2): p. 201-210.
64. Driscoll, K.E., et al., *Macrophage inflammatory proteins 1 and 2: expression by rat alveolar macrophages, fibroblasts, and epithelial cells and in rat lung after mineral dust exposure*. American journal of respiratory cell and molecular biology, 1993. **8**: p. 311-311.
65. Driscoll, K.E., et al., *TNF $\alpha$  and increased chemokine expression in rat lung after particle exposure*. Toxicology letters, 1995. **82**: p. 483-489.
66. Driscoll, K.E., *The role of interleukin-1 and tumor necrosis factor  $\alpha$  in the lung's response to silica*. Silica and silica-induced lung disease, 1996: p. 163-184.
67. ERGÜN, R., et al., *Evaluation of dental technician's pneumoconiosis using chest X-ray and HRCT: correlation between radiological and functional findings*. Turkish journal of medical sciences, 2017. **47**(1): p. 252-259.
68. Yurdasal, B., et al., *The evaluation of the dust-related occupational respiratory disorders of dental laboratory technicians working in Denizli Province*. Annals of thoracic medicine, 2015. **10**(4): p. 249.
69. Kahraman, H., et al., *Pneumoconiosis in dental technicians: HRCT and pulmonary function findings*. Occupational medicine, 2014. **64**(6): p. 442-447.
70. Başaran, N., et al., *Monitoring of DNA damage in foundry and pottery workers exposed to silica by the alkaline comet assay*. American journal of industrial medicine, 2003. **43**(6): p. 602-610.
71. Başaran, N., et al., *Alterations in immune parameters in foundry and pottery workers*. Toxicology, 2002. **178**(2): p. 81-88.
72. Cullinan, P., et al., *Occupational lung diseases: from old and novel exposures to effective preventive strategies*. The Lancet Respiratory Medicine, 2017. **5**(5): p. 445-455.
73. Thomas, C.R. and T.R. Kelley, *A brief review of silicosis in the United States*. Environmental health insights, 2010. **4**: p. EHI. S4628.
74. Sari, G., et al., *Accelerated Silicosis In Teflon-Coated Pan Manufacturing: Case Report*, in *C59. SILICOSIS*. 2017, American Thoracic Society. p. A5963-A5963.
75. Köksal, N. and H. Kahraman, *Acute silicosis in teflon-coated pan manufacturing due to metal sandblasting*. International journal of occupational and environmental health, 2011. **17**(3): p. 210-213.
76. Davoodi, S., et al., *Occupational Disease Registries—Characteristics and Experiences*. Acta informatica medica, 2017. **25**(2): p. 136.
77. Akgun, M., et al., *Silicosis appears inevitable among former denim sandblasters: a 4-year follow-up study*. Chest, 2015. **148**(3): p. 647-654.
78. Ergün, D., et al., *Pneumoconiosis and respiratory problems in dental laboratory technicians: Analysis of 893 dental technicians*. International

- journal of occupational medicine and environmental health, 2014. **27**(5): p. 785-796.
79. Cimrin, A., et al., *Pneumoconiosis and work-related health complaints in Turkish dental laboratory workers*. Tuberk Toraks, 2009. **57**(3): p. 282-8.
  80. Cimrin, A. and Z. Erdut, *General aspect of pneumoconiosis in Turkey*. Indian journal of occupational and environmental medicine, 2007. **11**(2): p. 50.
  81. Yildiz, T., et al., *Quality of life, depression and anxiety in young male patients with silicosis due to denim sandblasting*. Tuberk Toraks, 2011. **59**(2): p. 120-125.
  82. Cömert, M.A., et al., *Evaluation of Risk Factors in Pneumoconiosis Development Among Welders*. Ankara Medical Journal, 2014. **14**(1).
  83. Doğan, D.Ö., et al., *Prevalence of respiratory abnormalities and pneumoconiosis in dental laboratory technicians*. Tuberk Toraks, 2010. **58**(135): p. 41.
  84. Berk, S., et al., *Relationship between radiological (X-ray/HRCT), spirometric and clinical findings in dental technicians' pneumoconiosis*. The clinical respiratory journal, 2016. **10**(1): p. 67-73.
  85. AKKURT, İ., et al., *Pulmonary Findings in Foundry Workers*. Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences, 1997. **17**(1): p. 28.
  86. Karadağ, Ö., et al., *Silicosis and respiratory findings among quarry workers*. Tuberculosis Thorax, 2001. **49**: p. 73-80.
  87. Akkaya, A., *Research of respiratory symptoms, respiratory function tests, radiological findings and free radicals in stone quarry workers*. Tuberkulozve Toraks Dergisi, 2001. **49**: p. 64-72.
  88. Polatlı, M., et al., *Silicosis risk in quartz workers*. Respir. Dis, 2001. **12**: p. 90-95.
  89. Öztürk, A., et al., *Prevalence of silicosis among employees in feldspat and quartz mills and associated factors with silicosis*. Tuberkuloz ve toraks, 2012. **60**(3): p. 224-229.
  90. Sevinc, C., et al., *Sandblasting under uncontrolled and primitive conditions in Turkey*. Journal of occupational health, 2003. **45**(1): p. 66-69.
  91. Björkhem, I. and U. Diczfalusy, *Oxysterols: friends, foes, or just fellow passengers? Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 2002. **22**(5): p. 734-742.
  92. Boaz, M., et al., *Baseline oxysterols and other markers of oxidative stress, inflammation and malnutrition in the vitamin E and intima media thickness progression in end-stage renal disease (VIPER) cohort*. Nephron Clinical Practice, 2005. **100**(4): p. C111-C119.
  93. Kulig, W., et al., *Cholesterol oxidation products and their biological importance*. Chemistry and physics of lipids, 2016. **199**: p. 144-160.

94. Niemelä, P.S., et al., *Bioinformatics and computational methods for lipidomics*. Journal of Chromatography B, 2009. **877**(26): p. 2855-2862.
95. Ikonen, E., *Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization*. Nature reviews Molecular cell biology, 2008. **9**(2): p. 125.
96. Coskun, Ü. and K. Simons, *Cell membranes: the lipid perspective*. Structure, 2011. **19**(11): p. 1543-1548.
97. Berkowitz, M.L., *Detailed molecular dynamics simulations of model biological membranes containing cholesterol*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 2009. **1788**(1): p. 86-96.
98. Chiang, J.Y., *Regulation of bile acid synthesis: pathways, nuclear receptors, and mechanisms*. Journal of hepatology, 2004. **40**(3): p. 539-551.
99. Edidin, M., *The state of lipid rafts: from model membranes to cells*. Annual review of biophysics and biomolecular structure, 2003. **32**(1): p. 257-283.
100. Epand, R.M., *Cholesterol and the interaction of proteins with membrane domains*. Progress in lipid research, 2006. **45**(4): p. 279-294.
101. AKSOY, M., *Beslenme Biyokimyası, Hatipoğlu Yayınevi, Ankara, 2. 2008, Baskı*.
102. Guardiola, F., *Cholesterol and phytosterol oxidation products: analysis, occurrence, and biological effects*. 2002: The American Oil Chemists Society.
103. Kulig, W., et al., *Cholesterol under oxidative stress—how lipid membranes sense oxidation as cholesterol is being replaced by oxysterols*. Free Radical Biology and Medicine, 2015. **84**: p. 30-41.
104. Fakih, O., et al., *Exploring the biophysical properties of phytosterols in the plasma membrane for novel cancer prevention strategies*. Biochimie, 2018.
105. Björkhem, I., U. Diczfalussy, and D. Lütjohann, *Removal of cholesterol from extrahepatic sources by oxidative mechanisms*. Current opinion in lipidology, 1999. **10**(2): p. 161-165.
106. Leonarduzzi, G., B. Sottero, and G. Poli, *Oxidized products of cholesterol: dietary and metabolic origin, and proatherosclerotic effects*. The Journal of nutritional biochemistry, 2002. **13**(12): p. 700-710.
107. Miyoshi, N., et al., *Implications of cholesterol autoxidation products in the pathogenesis of inflammatory diseases*. Biochemical and biophysical research communications, 2014. **446**(3): p. 702-708.
108. Pikuleva, I.A., *Cholesterol-metabolizing cytochromes P450: implications for cholesterol lowering*. Expert opinion on drug metabolism & toxicology, 2008. **4**(11): p. 1403-1414.
109. Smith, L.L., *Cholesterol autoxidation 1981–1986*. Chemistry and Physics of Lipids, 1987. **44**(2-4): p. 87-125.
110. Smith, L.L. and B.H. Johnson, *Biological activities of oxysterols*. Free Radical Biology and Medicine, 1989. **7**(3): p. 285-332.



111. Luu, B. and C. Moog, *Oxysterols: biological activities and physicochemical studies*. *Biochimie*, 1991. **73**(10): p. 1317-1320.
112. Smith, L.L., *Review of progress in sterol oxidations: 1987–1995*. *Lipids*, 1996. **31**(5): p. 453-487.
113. Guardiola, F., et al., *Biological effects of oxysterols: current status*. *Food and Chemical Toxicology*, 1996. **34**(2): p. 193-211.
114. Brown, A.J. and W. Jessup, *Oxysterols and atherosclerosis*. *Atherosclerosis*, 1999. **142**(1): p. 1-28.
115. Schroeffer Jr, G.J., *Oxysterols: modulators of cholesterol metabolism and other processes*. *Physiological reviews*, 2000. **80**(1): p. 361-554.
116. Lyons, M.A. and A.J. Brown, *7-Ketocholesterol*. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 1999. **31**(3-4): p. 369-375.
117. Lange, Y., J. Ye, and F. Strebel, *Movement of 25-hydroxycholesterol from the plasma membrane to the rough endoplasmic reticulum in cultured hepatoma cells*. *Journal of lipid research*, 1995. **36**(5): p. 1092-1097.
118. Jusakul, A., et al., *Mechanisms of oxysterol-induced carcinogenesis*. *Lipids in health and disease*, 2011. **10**(1): p. 44.
119. Russell, D.W., *Nuclear orphan receptors control cholesterol catabolism*. *Cell*, 1999. **97**(5): p. 539-542.
120. Repa, J.J. and D.J. Mangelsdorf, *The role of orphan nuclear receptors in the regulation of cholesterol homeostasis*. *Annual review of cell and developmental biology*, 2000. **16**(1): p. 459-481.
121. Chiang, J.Y., R. Kimmel, and D. Stroup, *Regulation of cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase gene (CYP7A1) transcription by the liver orphan receptor (LXR $\alpha$ )*. *Gene*, 2001. **262**(1): p. 257-265.
122. Princen, H.M., S.M. Post, and J. Twisk, *Regulation of bile acid biosynthesis*. *Current Pharmaceutical Design*, 1997. **3**: p. 59-84.
123. Björkhem, I., *Mechanism of degradation of the steroid side chain in the formation of bile acids*. *Journal of lipid research*, 1992. **33**(4): p. 455-471.
124. Lund, E.G., J.M. Guileyardo, and D.W. Russell, *cDNA cloning of cholesterol 24-hydroxylase, a mediator of cholesterol homeostasis in the brain*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1999. **96**(13): p. 7238-7243.
125. Björkhem, I., et al., *Cholesterol homeostasis in human brain: turnover of 24S-hydroxycholesterol and evidence for a cerebral origin of most of this oxysterol in the circulation*. *Journal of lipid research*, 1998. **39**(8): p. 1594-1600.
126. Lütjohann, D., et al., *Cholesterol homeostasis in human brain: evidence for an age-dependent flux of 24S-hydroxycholesterol from the brain into the circulation*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1996. **93**(18): p. 9799-9804.

127. Björkhem, I., et al., *Importance of a Novel Oxidative Mechanism for Elimination of Brain Cholesterol* **TURNOVER OF CHOLESTEROL AND 24 (S)-HYDROXYCHOLESTEROL IN RAT BRAIN AS MEASURED WITH 18O2 TECHNIQUES IN VIVO AND IN VITRO**. *Journal of Biological Chemistry*, 1997. **272**(48): p. 30178-30184.
128. Björkhem, I., et al., *From Brain to Bile* **EVIDENCE THAT CONJUGATION AND  $\omega$ -HYDROXYLATION ARE IMPORTANT FOR ELIMINATION OF 24S-HYDROXYCHOLESTEROL (CEREBROSTEROL) IN HUMANS**. *Journal of Biological Chemistry*, 2001. **276**(40): p. 37004-37010.
129. Bodin, K., et al., *Antiepileptic Drugs Increase Plasma Levels of 4 $\beta$ -Hydroxycholesterol in Humans* **EVIDENCE FOR INVOLVEMENT OF CYTOCHROME P450 3A4**. *Journal of Biological Chemistry*, 2001. **276**(42): p. 38685-38689.
130. Lund, E.G., et al., *cDNA cloning of mouse and human cholesterol 25-hydroxylases, polytopic membrane proteins that synthesize a potent oxysterol regulator of lipid metabolism*. *Journal of Biological Chemistry*, 1998. **273**(51): p. 34316-34327.
131. Russell, D.W., *Oxysterol biosynthetic enzymes*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2000. **1529**(1): p. 126-135.
132. Nelson, J., S. Steckbeck, and T. Spencer, *Biosynthesis of 24, 25-epoxycholesterol from squalene 2, 3; 22, 23-dioxide*. *Journal of Biological Chemistry*, 1981. **256**(3): p. 1067-1068.
133. Olkkonen, V.M., O. Béaslas, and E. Nissilä, *Oxysterols and their cellular effectors*. *Biomolecules*, 2012. **2**(1): p. 76-103.
134. Lordan, S., J.J. Mackrill, and N.M. O'Brien, *Oxysterols and mechanisms of apoptotic signaling: implications in the pathology of degenerative diseases*. *The Journal of nutritional biochemistry*, 2009. **20**(5): p. 321-336.
135. Zhang, H., H. Basra, and U.P. Steinbrecher, *Effects of oxidatively modified LDL on cholesterol esterification in cultured macrophages*. *Journal of lipid research*, 1990. **31**(8): p. 1361-1369.
136. Lin, C.-Y., et al., *Cholestane-3 $\beta$ , 5 $\alpha$ , 6 $\beta$ -triol suppresses proliferation, migration, and invasion of human prostate cancer cells*. *PLoS One*, 2013. **8**(6): p. e65734.
137. Hu, H., et al., *The major cholesterol metabolite cholestane-3 $\beta$ , 5 $\alpha$ , 6 $\beta$ -triol functions as an endogenous neuroprotectant*. *Journal of Neuroscience*, 2014. **34**(34): p. 11426-11438.
138. Jusakul, A., et al., *Anti-apoptotic phenotypes of cholestan-3 $\beta$ , 5 $\alpha$ , 6 $\beta$ -triol-resistant human cholangiocytes: Characteristics contributing to the genesis of cholangiocarcinoma*. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 2013. **138**: p. 368-375.

139. De Boussac, H., et al., *Oxysterol receptors and their therapeutic applications in cancer conditions*. Expert opinion on therapeutic targets, 2013. **17**(9): p. 1029-1038.
140. Sabuncuoğlu, S. and Y. Öztaş, *Oxysterols and Their Metabolic Roles Beyond Cholesterol: A Reappraisal*. Acta Medica, 2014. **45**(1): p. 75-79.
141. Kandutsch, A. and E. Shown, *Assay of oxysterol-binding protein in a mouse fibroblast, cell-free system. Dissociation constant and other properties of the system*. Journal of Biological Chemistry, 1981. **256**(24): p. 13068-13073.
142. Jaworski, C.J., et al., *A family of 12 human genes containing oxysterol-binding domains*. Genomics, 2001. **78**(3): p. 185-196.
143. Poli, G., F. Biasi, and G. Leonarduzzi, *Oxysterols in the pathogenesis of major chronic diseases*. Redox biology, 2013. **1**(1): p. 125-130.
144. Sevanian, A. and A. Peterson, *Cholesterol epoxide is a direct-acting mutagen*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1984. **81**(13): p. 4198-4202.
145. Garcia-Cruset, S., et al., *Oxysterol profiles of normal human arteries, fatty streaks and advanced lesions*. Free radical research, 2001. **35**(1): p. 31-41.
146. Lo, F.W.-B. and H.S. Black, *Formation of cholesterol-derived photoproducts in human skin*. Journal of Investigative Dermatology, 1972. **58**(5): p. 278-283.
147. Liao, P.-L., et al., *Cholesterol-3-beta, 5-alpha, 6-beta-triol induced PI3K-Akt-eNOS-dependent cyclooxygenase-2 expression in endothelial cells*. Toxicology letters, 2009. **190**(2): p. 172-178.
148. Gueguen, Y., et al., *Control of apolipoprotein E secretion by 25-hydroxycholesterol and proinflammatory cytokines in the human astrocytoma cell line CCF-STTG1*. Cell biology and toxicology, 2001. **17**(3): p. 191-199.
149. Kölsch, H., et al., *The neurotoxic effect of 24-hydroxycholesterol on SH-SY5Y human neuroblastoma cells*. Brain research, 1999. **818**(1): p. 171-175.
150. Bretillon, L., et al., *Plasma levels of 24S-hydroxycholesterol in patients with neurological diseases*. Neuroscience letters, 2000. **293**(2): p. 87-90.
151. Lütjohann, D., et al., *Plasma 24S-hydroxycholesterol (cerebrosterol) is increased in Alzheimer and vascular demented patients*. Journal of lipid research, 2000. **41**(2): p. 195-198.
152. Brown, A.J., et al., *7-Hydroperoxycholesterol and its products in oxidized low density lipoprotein and human atherosclerotic plaque*. Journal of lipid research, 1997. **38**(9): p. 1730-1745.
153. Liu, Y., L.M. Hultén, and O. Wiklund, *Macrophages isolated from human atherosclerotic plaques produce IL-8, and oxysterols may have a regulatory function for IL-8 production*. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 1997. **17**(2): p. 317-323.

154. Gamba, P., et al., *Up-regulation of  $\beta$ -amyloidogenesis in neuron-like human cells by both 24-and 27-hydroxycholesterol: protective effect of N-acetyl-cysteine*. *Aging cell*, 2014. **13**(3): p. 561-572.
155. Lazo-de-la-Vega, M.-L. and C. Fernández-Mejía, *Oxidative stress in diabetes mellitus and the role of vitamins with antioxidant actions*, in *Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases-A Role for Antioxidants*. 2013, InTech.
156. Ferderbar, S., et al., *Cholesterol oxides as biomarkers of oxidative stress in type 1 and type 2 diabetes mellitus*. *Diabetes/metabolism research and reviews*, 2007. **23**(1): p. 35-42.
157. Yoon, J.H., et al., *Oxysterols induce cyclooxygenase-2 expression in cholangiocytes: Implications for biliary tract carcinogenesis*. *Hepatology*, 2004. **39**(3): p. 732-738.
158. Cao, Y. and S.M. Prescott, *Many actions of cyclooxygenase-2 in cellular dynamics and in cancer*. *Journal of cellular physiology*, 2002. **190**(3): p. 279-286.
159. Bischoff, F. and J.J. Rupp, *The production of a carcinogenic agent in the degradation of cholesterol to progesterone*. *Cancer research*, 1946. **6**(8): p. 403-409.
160. Bischoff, F., *Cocarcinogenic activity of cholesterol oxidation products and sesame oil*. *Journal of the national Cancer Institute*, 1957. **19**: p. 977-987.
161. BISCHOFF, F., *Carcinogenic effects of steroids*, in *Advances in lipid research*. 1969, Elsevier. p. 165-244.
162. Linseisen, J., G. Wolfram, and A.B. Miller, *Plasma 7 $\beta$ -hydroxycholesterol as a possible predictor of lung cancer risk*. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 2002. **11**(12): p. 1630-1637.
163. Leonarduzzi, G., et al., *The lipid peroxidation end product 4-hydroxy-2, 3-nonenal up-regulates transforming growth factor beta1 expression in the macrophage lineage: a link between oxidative injury and fibrosclerosis*. *The FASEB Journal*, 1997. **11**(11): p. 851-857.
164. Biasi, F., et al., *Pro-oxidant and proapoptotic effects of cholesterol oxidation products on human colonic epithelial cells: a potential mechanism of inflammatory bowel disease progression*. *Free Radical Biology and Medicine*, 2009. **47**(12): p. 1731-1741.
165. Öztoprak, M., *Niemann-Pick Tip C Hastalarında Nörolojik Bulgular ve Tanı Yaşı Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesi*. 2014.
166. Porter, F.D., et al., *Cholesterol oxidation products are sensitive and specific blood-based biomarkers for Niemann-Pick C1 disease*. *Science translational medicine*, 2010. **2**(56): p. 56ra81-56ra81.
167. Jiang, X., et al., *A sensitive and specific LC-MS/MS method for rapid diagnosis of Niemann-Pick C1 disease from human plasma*. *Journal of lipid research*, 2011. **52**(7): p. 1435-1445.

168. Halliwell, B., *Lipid peroxidation, antioxidants and cardiovascular disease: how should we move forward?* Cardiovascular Research, 2000. **47**(3): p. 410-418.
169. Syslová, K., et al., *Rapid and easy method for monitoring oxidative stress markers in body fluids of patients with asbestos or silica-induced lung diseases.* Journal of Chromatography B, 2009. **877**(24): p. 2477-2486.
170. Schubert, J.K., et al., *Breath analysis in critically ill patients: potential and limitations.* Expert review of molecular diagnostics, 2004. **4**(5): p. 619-629.
171. Seguchi, H. and T. Kobayashi, *Novel insight into current models of NADPH oxidase regulation, assembly and localization in human polymorphonuclear leukocytes.* Histology and histopathology, 1999. **14**(4): p. 1295-1308.
172. Gredilla, R., et al., *Short-Term Caloric Restriction and Sites of Oxygen Radical Generation in Kidney and Skeletal Muscle Mitochondria.* Annals of the New York Academy of Sciences, 2004. **1019**(1): p. 333-342.
173. Metodiewa, D. and C. Koška, *Reactive oxygen species and reactive nitrogen species: relevance to cyto (neuro) toxic events and neurologic disorders. An overview.* Neurotoxicity Research, 1999. **1**(3): p. 197-233.
174. Morrow, J.D. and L.J. Roberts II, *The isoprostanes: current knowledge and directions for future research.* Biochemical pharmacology, 1996. **51**(1): p. 1-9.
175. Busch, C.J. and C.J. Binder, *Malondialdehyde epitopes as mediators of sterile inflammation.* Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids, 2017. **1862**(4): p. 398-406.
176. Jump, D.B., *The biochemistry of n-3 polyunsaturated fatty acids.* Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**(11): p. 8755-8758.
177. Cosgrove, J.P., D.F. Church, and W.A. Pryor, *The kinetics of the autoxidation of polyunsaturated fatty acids.* Lipids, 1987. **22**(5): p. 299-304.
178. Gutteridge, J., *Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage.* Clinical chemistry, 1995. **41**(12): p. 1819-1828.
179. Tsikas, D., *Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges.* Analytical biochemistry, 2017. **524**: p. 13-30.
180. Pelclova, D., et al., *Increased 8-isoprostane, a marker of oxidative stress in exhaled breath condensate in subjects with asbestos exposure.* Industrial health, 2008. **46**(5): p. 484-489.
181. Weismann, D. and C.J. Binder, *The innate immune response to products of phospholipid peroxidation.* Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 2012. **1818**(10): p. 2465-2475.
182. Marnett, L., *Chemistry and biology of DNA damage by malondialdehyde.* IARC scientific publications, 1999(150): p. 17-27.

183. Niedernhofer, L.J., et al., *Malondialdehyde, a product of lipid peroxidation, is mutagenic in human cells*. Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(33): p. 31426-31433.
184. Del Rio, D., A.J. Stewart, and N. Pellegrini, *A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress*. Nutrition, metabolism and cardiovascular diseases, 2005. **15**(4): p. 316-328.
185. Esterbauer, H. and K.H. Cheeseman, [42] *Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal*, in *Methods in enzymology*. 1990, Elsevier. p. 407-421.
186. Gaweł, S., et al., *Malondialdehyde (MDA) as a lipid peroxidation marker*. Wiadomosci lekarskie (Warsaw, Poland: 1960), 2004. **57**(9-10): p. 453-455.
187. Di Domenico, F., A. Tramutola, and D.A. Butterfield, *Role of 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) in the pathogenesis of alzheimer disease and other selected age-related neurodegenerative disorders*. Free Radical Biology and Medicine, 2017. **111**: p. 253-261.
188. Spickett, C.M., *The lipid peroxidation product 4-hydroxy-2-nonenal: advances in chemistry and analysis*. Redox biology, 2013. **1**(1): p. 145-152.
189. Esterbauer, H., et al., *Studies on the mechanism of formation of 4-hydroxynonenal during microsomal lipid peroxidation*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism, 1986. **876**(1): p. 154-166.
190. SIEMS, W., et al., *HNE (4-hidroksinonenal) Metabolizması ve Yaşlanmayla İlişkisi*. Turkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences, 2009. **29**(5): p. 7-10.
191. Zhong, H. and H. Yin, *Role of lipid peroxidation derived 4-hydroxynonenal (4-HNE) in cancer: focusing on mitochondria*. Redox biology, 2015. **4**: p. 193-199.
192. Levonen, A.-L., et al., *Redox regulation of antioxidants, autophagy, and the response to stress: implications for electrophile therapeutics*. Free Radical Biology and Medicine, 2014. **71**: p. 196-207.
193. Montuschi, P., P.J. Barnes, and L.J. Roberts, *Isoprostanes: markers and mediators of oxidative stress*. The FASEB Journal, 2004. **18**(15): p. 1791-1800.
194. Pilacik, B., T. Wronska-Nofer, and W. Waswoicz, *F~ 2-isoprostanes biomarkers of lipid peroxidation: their utility in evaluation of oxidative stress induced by toxic agents*. International journal of occupational medicine and environmental health, 2002. **15**(1): p. 19-28.
195. Milne, G.L., E.S. Musiek, and J.D. Morrow, *F2-isoprostanes as markers of oxidative stress in vivo: an overview*. Biomarkers, 2005. **10**(sup1): p. 10-23.
196. Çalış, İ.U., *Meme kanserinin metastazında sfingozin 1-fosfat ve reseptörlerinin rolü*. 2016, ESOĞÜ, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
197. Furuya, H., Y. Shimizu, and T. Kawamori, *Sphingolipids in cancer*. Cancer and Metastasis Reviews, 2011. **30**(3-4): p. 567-576.

198. Hla, T., *Sphingosine 1-phosphate receptors*. Prostaglandins & other lipid mediators, 2001. **64**(1-4): p. 135-142.
199. Yang, Y. and S. Uhlig, *The role of sphingolipids in respiratory disease*. Therapeutic advances in respiratory disease, 2011. **5**(5): p. 325-344.
200. Kim, R.H., et al., *Export and functions of sphingosine-1-phosphate*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids, 2009. **1791**(7): p. 692-696.
201. Maceyka, M., et al., *Sphingosine-1-phosphate signaling and its role in disease*. Trends in cell biology, 2012. **22**(1): p. 50-60.
202. Sarkar, S., et al., *Sphingosine kinase 1 is required for migration, proliferation and survival of MCF-7 human breast cancer cells*. FEBS letters, 2005. **579**(24): p. 5313-5317.
203. Ling, B., et al., *Sphingosine-1-phosphate: a potential therapeutic agent against human breast cancer*. Investigational new drugs, 2011. **29**(2): p. 396-399.
204. Geho, D.H., et al., *Physiological mechanisms of tumor-cell invasion and migration*. Physiology, 2005. **20**(3): p. 194-200.
205. Gandy, K.A.O. and L.M. Obeid, *Targeting the sphingosine kinase/sphingosine 1-phosphate pathway in disease: review of sphingosine kinase inhibitors*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids, 2013. **1831**(1): p. 157-166.
206. PNEUMOCONIOSES, O., *GUIDELINES FOR THE USE OF THE ILO INTERNATIONAL CLASSIFICATION OF RADIOGRAPHS*. 2002.
207. Dyer, R.G., et al., *7-ketocholesterol, a specific indicator of lipoprotein oxidation, and malondialdehyde in non-insulin dependent diabetes and peripheral vascular disease*. Clinica chimica acta, 1997. **260**(1): p. 1-13.
208. Vejux, A. and G. Lizard, *Cytotoxic effects of oxysterols associated with human diseases: Induction of cell death (apoptosis and/or oncosis), oxidative and inflammatory activities, and phospholipidosis*. Molecular aspects of medicine, 2009. **30**(3): p. 153-170.
209. Woldegebriel, M. and G. Vivó-Truyols, *Probabilistic model for untargeted peak detection in LC-MS using bayesian statistics*. Analytical chemistry, 2015. **87**(14): p. 7345-7355.
210. Xiao, J.F., B. Zhou, and H.W. Resson, *Metabolite identification and quantitation in LC-MS/MS-based metabolomics*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2012. **32**: p. 1-14.
211. Bateman, E.D., et al., *Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary*. European Respiratory Journal, 2008. **31**(1): p. 143-178.
212. Yönetmeliği, T.M. and R.G. Sayısı, 28812, *TC Resmi Gazete, Ankara*. 2013.


213. Uzel, N., et al., *Erythrocyte lipid peroxidation and glutathione peroxidase activities in patients with diabetes mellitus*. Hormone and metabolic research, 1987. **19**(02): p. 89-90.
214. Traversari, C., et al., *LXR-dependent and-independent effects of oxysterols on immunity and tumor growth*. European journal of immunology, 2014. **44**(7): p. 1896-1903.
215. Testa, G., et al., *A silver lining for 24-hydroxycholesterol in Alzheimer's disease: the involvement of the neuroprotective enzyme sirtuin 1*. Redox biology, 2018.
216. Khatib, S. and J. Vaya, *Oxysterols and symptomatic versus asymptomatic human atherosclerotic plaque*. Biochemical and biophysical research communications, 2014. **446**(3): p. 709-713.
217. Levy, D., et al., *Short-term effects of 7-ketocholesterol on human adipose tissue mesenchymal stem cells in vitro*. Biochemical and biophysical research communications, 2014. **446**(3): p. 720-725.
218. Murakami, H., et al., *Plasma oxysterols and tocopherol in patients with diabetes mellitus and hyperlipidemia*. Lipids, 2000. **35**(3): p. 333-338.
219. Boenzi, S., et al., *Evaluation of plasma cholestane-3 $\beta$ , 5 $\alpha$ , 6 $\beta$ -triol and 7-ketocholesterol in inherited disorders related to cholesterol metabolism*. Journal of lipid research, 2016. **57**(3): p. 361-367.
220. Leong, W.I. and J.D. Saba, *SIP metabolism in cancer and other pathological conditions*. Biochimie, 2010. **92**(6): p. 716-723.
221. Zsoldos, T., et al., *Lipid peroxidation in the membrane damaging effect of silica-containing dust on rat lungs*. Experimental pathology, 1983. **23**(2): p. 73-77.
222. Bezrukavnikova, L., et al., *Impairment of lipid peroxidation control in patients with dust-induced lung diseases*. Voprosy meditsinskoi khimii, 1988. **34**(3): p. 18-21.
223. Castranova, V., *Generation of oxygen radicals and mechanisms of injury prevention*. Environmental health perspectives, 1994. **102**(Suppl 10): p. 65.
224. Liu, B., *The study of oxidative injury of alveolar macrophage in the development of silicosis*. Zhonghua yu fang yi xue za zhi [Chinese journal of preventive medicine], 1993. **27**(1): p. 10-12.
225. Odinaev, F., *The mechanisms of the formation of pneumoconiosis under high-altitude conditions*. Gigiena truda i professional'nye zabolevaniia, 1992(5): p. 11-13.
226. Nardi, J., et al., *Inflammatory and oxidative stress parameters as potential early biomarkers for silicosis*. Clinica Chimica Acta, 2018.
227. Zhang, H., et al., *Subcutaneous administration of infliximab-attenuated silica-induced lung fibrosis*. International journal of occupational medicine and environmental health, 2017.



228. Peng, H.B., et al., *Protective effects of oleanolic acid on oxidative stress and the expression of cytokines and collagen by the AKT/NF- $\kappa$ B pathway in silicotic rats*. *Molecular medicine reports*, 2017. **15**(5): p. 3121-3128.
229. Yang, J., et al., *Earthworm extract attenuates silica-induced pulmonary fibrosis through Nrf2-dependent mechanisms*. *Laboratory Investigation*, 2016. **96**(12): p. 1279.
230. Abdelaziz, R.R., W.F. Elkashef, and E. Said, *Tadalafil reduces airway hyperactivity and protects against lung and respiratory airways dysfunction in a rat model of silicosis*. *International immunopharmacology*, 2016. **40**: p. 530-541.
231. Kim, K.-A., et al., *Effect of desferrioxamine on silica-induced pulmonary reaction*. *Inhalation toxicology*, 2000. **12**(sup3): p. 117-123.
232. Wang, Z., et al., *Effects of dietary supplementation on the function of alveolar macrophages of silicosis rats, on the blastogenic response of lymphocytes and on the peroxidase activity in blood of silicosis patients*. *Journal of environmental pathology, toxicology and oncology: official organ of the International Society for Environmental Toxicology and Cancer*, 1994. **13**(3): p. 209-212.
233. *Occupational health: Silicosis*. [cited 2018 19.06.2018]; Available from: [http://www.ilo.org/safework/areasofwork/occupational-health/WCMS\\_108566/lang--en/index.htm](http://www.ilo.org/safework/areasofwork/occupational-health/WCMS_108566/lang--en/index.htm).

## 8. EKLER

## Ek-1: Etik Kurul Onayı

  
T.C.  
**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ**  
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : 16969557 - 1114  
Konu : ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

**Toplantı Tarihi** : 08 KASIM 2016 SALI  
**Toplantı No** : 2016/22  
**Proje No** : GO 16/697 (Değerlendirme Tarihi: 08.11.2016)  
**Karar No** : GO 16/697- 18

Üniversitemiz Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç. Dr. Suna SABUNCUOĞLU' nun sorumlu araştırmacı olduğu, Doç. Dr. İncilay LAY, Uzm. Dr. Türkan Nadir ÖZİŞ, Vet. Afshin SAMADI ile birlikte çalışacakları ve Ecz. Neslihan AKSU' nun yüksek lisans tezi olan, GO 16/697 kayıt numaralı ve "**Silikozis Hastalarında Oksisterol Düzeylerinin Değerlendirilmesi**" başlıklı proje önerisi araştırmannın gerekeçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup, etik açıdan uygun bulunmuştur.

1. Prof. Dr. Sevda F. MÜFTÜOĞLU (Başkan)	10 Prof. Dr. Oya Nuran EMİROĞLU (Üye)
2. Prof. Dr. Nurten AKARSU (Üye)	11 Yrd. Doç. Dr. Özay GÖKÖZ (Üye)
3. Prof. Dr. M. Yıldırım SARA (Üye)	12. Doç. Dr. Gözde GİRGİN (Üye)
4. Prof. Dr. Necdet SAĞLAM (Üye)	13. Doç. Dr. Fatma Visal OKUR (Üye)
5. Prof. Dr. Hatice Doğan BUZOĞLU (Üye)	14. Yrd. Doç. Dr. Can Ebru KURT (Üye)
6. Prof. Dr. R. Köksal ÖZGÜL (Üye)	15. Yrd. Doç. Dr. H. Hüsrev TURNAGÖL (Üye)
7. Prof. Dr. Ayşe Lale DOĞAN (Üye)	16. Öğr. Gör. Dr. Müge DEMİR (Üye)
8. Prof. Dr. Elmas Ebru YALÇIN (Üye)	17. Öğr. Gör. Meltem ŞENGELEN (Üye)
9. Prof. Dr. Mintaze Kerem GÜNEL (Üye)	18. Av. Meltem ONURLU (Üye)

Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu  
06100 Sıhhiye-Ankara  
Telefon: 0 (312) 305 1082 • Faks: 0 (312) 310 0580 • E-posta: goetik@hacettepe.edu.tr

Ayrıntılı Bilgi için:

## 9. ÖZGEÇMİŞ

### KİŞİSEL BİLGİLER



Adı Soyadı: Neslihan AKSU

Doğum Yeri: Isparta

Doğum Tarihi: 10/08/1990

Medeni Durumu: Bekar

Adresi: Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu - Söğütözü Mh, 2176. Sk. No:5, 06520  
Çankaya/Ankara

Telefon: 0505 514 58 42

e-mail: neslihany.aksu@gmail.com

Görevi: Eczacı

Ünvanı: Eczacı

Yabancı Dil: İngilizce (YÖK DİL: 80)

### 1. EĞİTİM

Derece	Bölüm / Program	Üniversite	Yıl
Lisans	Eczacılık	Hacettepe Üniversitesi	2010-2015

### 2. MESLEKİ DENEYİM

Görev Ünvanı	Görev Yeri	Yıl
Ruhsatlandırma Uzmanı	İDE İlaç Ruhsatlandırma ve Biyofarmasötik Danışmanlık ve Eğitim	11.2015/11.2017
Eczacı	Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu	04.2018 / ...

### **3. ARAŞTIRMA KONULARI**

Oksisteroller

Silikozis

Lipit Peroksidasyonu

### **4. YAYINLAR**

Poster Bildirileri:

1) Aksu N., Samadi A., Lay İ., Öziş T.N., Sabuncuoğlu S., *Evaluation of Oxysterol Levels in Silicosis, 7. European Network for Oxysterol Research Symposium, 21-22/09/2017 Brussels/BELGIUM*

2) Aksu N., Samadi A., Lay İ., Öziş T.N., Sabuncuoğlu S., Silikozis Hastalarında Oksisterol Düzeylerinin Değerlendirilmesi, II. Lipit Araştırmaları Çalıştayı, 07/10/2017 Ankara/TÜRKİYE

3) Aksu N., Çetin T., Samadi A., Lay İ., Öziş T.N., Sabuncuoğlu S., *Evaluation of Oxidative Lipid And Cholesterol Damages in Silicosis, 12th International Symposium on Pharmaceutical Sciences, 26-29/06/2018 Ankara/TURKEY*

### **5. GÖREV ALDIĞI PROJELER**

Hacettepe Üniversitesi tarafından desteklenen projeler:

1) Proje Başlığı: Silikozis Hastalarında Oksisterol Düzeylerinin Değerlendirilmesi, Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projesi, Proje ID:13012.

### **6. KATILDIĞI KURSLAR VE EĞİTİMLER**

1) Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu, Farmakovijilans Yetkilileri Eğitimi, 11-12 Nisan 2016, Ankara /Türkiye.

2) ICP-MS Teknolojisi ve Uygulamaları, 09 Mart 2018, Ankara/Türkiye.

**7. KATILDIĞI KONGRE, SEMPOZYUM, KONFERANS ve ÇALIŐTAYLAR**

- 1) Geleceđin E Hali, 23-24-25 Mart 2012, İstanbul/Türkiye
- 2) Uluslararası İlaç Ve Eczacılık Kongresi, 28-30 Kasım 2014, İstanbul/Türkiye
- 3) II. Lipit Araştırmaları Çalıştayı, 07/10/2017 Ankara/TÜRKİYE
- 4) *12th International Symposium on Pharmaceutical Sciences*, 26-29/06/2018  
Ankara/*TURKEY*