



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



YÜKSEK LİSANS TEZİ

**GAMA RADYASYONUN NEDEN OLDUĞU İNCE
BAĞIRSAK HASARINA KARŞI KARNOZİN VE
MELATONİNİN ETKİLERİ**

Hüseyin US

**Biyoloji Anabilim Dalı
Genel Biyoloji Programı**

**Danışman
Doç. Dr. Ömür KARABULUT-BULAN**

Ocak, 2014

İSTANBUL

Bu çalışma 20 / 01 / 2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı Genel Biyoloji programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi:



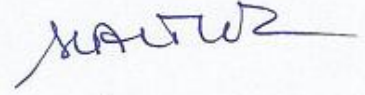
İmza

Doç. Dr. Ömür KARABULUT-BULAN (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



İmza

Prof. Dr. Refiye YANARDAĞ
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi




İmza

Prof. Dr. Seyhan ALTUN
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



İmza

Prof. Dr. Tuncay ORTA
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



İmza

Yard. Doç. Dr. Pelin ARDA-PIRİNÇÇİ
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Bu alışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 18248 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Yüksek lisans öğrenimim ve tez çalışmam boyunca en zor zamanlarımda güler yüzü ve anlayışı ile yanımda olan, tecrübe ve desteğini esirgemeyen çok değerli hocam Sayın Doç.Dr. Ömür KARABULUT-BULAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Biyokimyasal çalışmalarım için “İn Vivo Araştırma ve Radyonüklid Uygulama” laboratuvarının olanaklarından yararlanmamı sağlayan Prof. Dr. Seyhan ALTUN'a, “Moleküler Biyoloji” laboratuvarının olanaklarından yararlanmamı sağlayan Prof. Dr. Şehnaz BOLKENT'e, tez çalışmam sırasında bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım Yard. Doç. Dr. Pelin ARDA-PİRİNÇÇİ'ye teşekkür ederim.

Deney hayvanlarının yetiştirilmesi ve bakımında yardımcı olan İ.Ü. Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Deney Hayvanları Biyolojisi ve Biyomedikal Uygulama Teknikleri Anabilim Dalı çalışanlarına ve biyokimyasal çalışmalarım sırasında teknik destekleri için Farmasina firması çalışanlarına teşekkür ederim.

Tez çalışmamın çeşitli aşamalarında yanımda olan ve benden yardımlarını esirgemeyen değerli arkadaşlarım M. Sait TOPRAK, İpek ADA, Zaven AĞAY'a ve yüksek lisans ve doktora yapan tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Tez çalışmamın her aşamasında yanımda olan sevgili arkadaşım Uzman Biyolog Ayça SEZEN'e teşekkür ederim.

Tezimin her aşamasında maddi manevi her konuda bana destek olan ve hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan canım aileme teşekkür ederim.

Ocak, 2014

Hüseyin US

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİL LİSTESİ.....	iv
TABLO LİSTESİ	viii
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	ix
ÖZET.....	xi
SUMMARY	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL KISIMLAR	4
2.1. İNCE BAĞIRSAK.....	4
2.2. RADYASYON	5
2.3. SERBEST RADİKALLER VE OKSİDATİF STRES	7
2.4. ANTİOKSİDANLAR.....	10
2.4.1 Enzimatik Antioksidanlar	11
2.4.1.1 Katalaz	12
2.4.1.2 Glutasyon peroksidaz (GSH-Px).....	12
2.4.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar.....	13
2.4.2.1. Glutasyon (GSH)	13
2.4.2.2. Melatonin	14
2.4.3 Karnozin.....	17
3. MALZEME VE YÖNTEM	18
3.1. HİSTOLOJİK YÖNTEMLER.....	19
3.2. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL YÖNTEMLER.....	19
3.2.1. PCNA İmmünohistokimyası	19
3.2.2. Aktif Kaspaz-3 İmmünohistokimyası	20
3.2.3. TNF- α İmmünohistokimyası.....	21
3.3 BİYOKİMYASAL YÖNTEMLER.....	22
3.3.1. Total Protein Tayini	23

3.3.2. Katalaz Tayini	24
3.3.3. Total Glutasyon (GSH) Tayini	27
3.4. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME	29
4. BULGULAR	30
4.1. HİSTOLOJİK BULGULAR.....	30
4.1.1. Kontrol Grubuna Ait Histolojik Bulgular	30
4.1.2. Radyasyon Grubuna Ait Histolojik Bulgular.....	33
4.1.3. Radyasyon + Melatonin Grubuna Ait Histolojik Bulgular	36
4.1.4. Radyasyon + Karnozin Grubuna Ait Histolojik Bulgular.....	38
4.1.5. Radyasyon + Karnozin + Melatonin Grubuna Ait Histolojik Bulgular	40
4.1.6. Histolojik Hasar Skoru.....	42
4.2. İMMUNOHİSTOKİMYASAL BULGULAR.....	44
4.2.1. PCNA İmmunohistokimyasına Ait Bulgular	44
4.2.2. Kaspaz-3 İmmunohistokimyasına Ait Bulgular.....	48
4.2.3. TNF- α İmmunohistokimyasına Ait Bulgular.....	52
4.3. BİYOKİMYASAL BULGULAR.....	56
4.3.1. Katalaz Aktivitesine Ait Bulgular.....	56
4.3.2. Glutasyon Değerlerine Ait Bulgular.....	57
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	59
KAYNAKLAR	72
ÖZGEÇMİŞ.....	86

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: İnce bağırsağın genel yapısı.	4
Şekil 2.2: Serbest radikal oluşumuna etkili dış etkenler.	8
Şekil 2.3: Lipid peroksidasyonu oluşum şeması (Tomas-Zapico ve Coto-Montes, 2006).	9
Şekil 2.4: İnce bağırsakta meydana gelen oksidatif stres şeması (Kruidenier ve diğ., 2003).	10
Şekil 2.5: Antioksidanların serbest radikallere etkisi.	11
Şekil 2.6: Glutasyon (GSH) sentezi ve hidrojen peroksitin (H ₂ O ₂) detoksifikasyonu.	13
Şekil 2.7: Melatonin'in genel yapısı.	14
Şekil 2.8: Melatonin'in ritim düzenleyici rolü.	15
Şekil 2.9: Karnozin'in moleküler yapısı.	17
Şekil 3.1: Total protein standart grafiği.	24
Şekil 3.2: Katalaz standart grafiği.	26
Şekil 3.3: Total glutasyon standart grafiği.	28
Şekil 4. 1: Kontrol grubuna ait sıçanların jejunumunun genel görünümü, V: villus, K: kript, Masson, Bar: 200 µm.	31
Şekil 4.2: Kontrol grubuna ait sıçanların jejunumunun genel görünümü, V: villus, K: kript, Masson, Bar: 100 µm.	31
Şekil 4.3: Kontrol grubuna ait villusların genel görünümü, V: villus, HE, Bar: 100 µm.	32
Şekil 4.4: Kontrol grubuna ait jejunumun çizgili kenarında (►) ve goblet hücrelerinde (→) gözlenen şiddetli PAS pozitif reaksiyon, Bar: 100 µm.	32
Şekil 4.5: Radyasyon grubuna ait sıçanların ince bağırsağının jejunum bölgesinde inflamatuvar hücre infiltrasyonu (➡), Ödem (★), Villuslarda kısalma ve genişleme (V), HE, Bar: 200 µm.	33
Şekil 4.6: Radyasyon grubunun jejunumunda hiperemi(→), hiperplazi (↻), koyu dar sitoplazmik reaksiyon veren hücreler (➤), piknotik nükleus (▲), ödem (★), Masson, Bar: 100 µm.	34
Şekil 4.7: Radyasyon grubunun jejunumunda nekrotik alan (✱), bez bütünlüğünde bozulma (✱), ödem (★), Masson, Bar: 100 µm.	34

- Şekil 4.8:** Radyasyon grubunun jejunumunda villus bütünlüğünde bozulma (➡), ödem (★), hiperplazi (↗), vakuolizasyon (v), Masson, Bar: 100 µm.....35
- Şekil 4.9:** Radyasyon grubunun jejunumuna ait goblet hücrelerinde (→) ve çizgili kenarında (▶) PAS pozitif reaksiyon şiddetinde azalma, goblet hücre sayısında azalma ve villuslar arasında ve villusların çizgili kenarlarının hemen üzerinde görülen PAS pozitif reaksiyonda artma (➡), Bar: 100 µm.....35
- Şekil 4.10:** Radyasyon + Melatonin grubuna ait jejunumun genel görünümü, V: villus, K: kript, HE, Bar: 100 µm.37
- Şekil 4.11:** Radyasyon + Melatonin grubuna ait villusların genel görünümü, V: villus, Masson, Bar: 100 µm.....37
- Şekil 4.12:** Radyasyon + Melatonin grubuna ait jejunumun çizgili kenarında (▶), goblet hücrelerinde (→) gözlenen şiddetli PAS pozitif reaksiyon ve villusların arasında ve villusların çizgili kenarlarının hemen üzerinde görülen PAS pozitif reaksiyonda azalma (➡), Bar: 100 µm.38
- Şekil 4.13:** Radyasyon + Karnozin grubuna ait jejunumun genel görünümü, V: villus, K: kript, HE, Bar: 200 µm.39
- Şekil 4.14:** Radyasyon + Karnozin grubuna ait villusların genel görünümü, V: villus, Masson, Bar: 100 µm.....39
- Şekil 4.15:** Radyasyon + Karnozin grubuna ait jejunumun çizgili kenarında (▶), goblet hücrelerinde (→) gözlenen şiddetli PAS pozitif reaksiyon ve villusların arasında ve villusların çizgili kenarlarının hemen üzerinde görülen PAS pozitif reaksiyonda azalma (➡), Bar: 100 µm.40
- Şekil 4.16:** Radyasyon + Karnozin + Melatonin grubuna ait villusların genel görünümü, V: villus, HE, Bar: 100 µm.....41
- Şekil 4.17:** Radyasyon + Karnozin + Melatonin grubuna ait villusların genel görünümü, V: villus, Masson, Bar: 100 µm.....41
- Şekil 4.18:** Radyasyon + Karnozin + Melatonin grubuna ait jejunumun çizgili kenarında (▶), goblet hücrelerinde (→) gözlenen şiddetli PAS pozitif reaksiyon ve villusların arasında ve villusların çizgili kenarlarının hemen üzerinde görülen PAS pozitif reaksiyonda azalma (➡), Bar: 100 µm.....42
- Şekil 4.19:** İnce bağırsağa ait histolojik hasar skoru. Her bir grup için elde edilen değerler “ortalama ± standart hata” olarak gösterilmiştir. Kontrol: 3.85 ± 0.7, Radyasyon: 40.87 ± 0.51, Rad+Mel: 17.12 ± 0.51, Rad+Mel: 18.87 ± 1,39, Rad+Kar+Mel: 18.87 ± 1.02...44
- Şekil 4.20:** Kript epitel hücrelerinde immunohistokimya ile tespit edilen % PCNA pozitif hücre sayısı. Her bir grup için elde edilen değerler ‘ortalama ± standart hata’ olarak gösterilmiştir. Kontrol: 56.65 ± 2.17, Radyasyon: 13.12 ± 0.6, Rad+Mel: 40.92 ± 1.19, Rad+Kar: 31.76 ± 1.48, Rad+Kar+Mel: 27.96 ± 2.03.....45
- Şekil 4.21:** Kontrol grubu kript epitel hücrelerinde PCNA pozitif hücreler (→). Bar: 50 µm....46
- Şekil 4.22:** Radyasyon grubu kript epitel hücrelerinde PCNA pozitif hücreler (→). Bar: 50 µm.....46

Şekil 4.23: Radyasyon + Melatonin grubu kript epitel hücrelerinde PCNA pozitif hücreler (→). Bar: 50 µm.....	47
Şekil 4.24: Radyasyon + Karnozin grubu kript epitel hücrelerinde PCNA pozitif hücreler (→). Bar: 50 µm.....	47
Şekil 4.25: Radyasyon + Karnozin + Melatonin grubu kript epitel hücrelerinde PCNA pozitif hücreler (→). Bar: 50 µm.....	48
Şekil 4.26: Kript epitel hücrelerinde immunohistokimya ile tespit edilen % kaspaz-3 pozitif hücre sayısı. Her bir grup için elde edilen değerler ‘ortalama ± standart hata’ olarak gösterilmiştir. Kontrol: 12.6 ± 1.61, Radyasyon : 48.72 ± 2.58, Rad+Mel : 25.35 ± 2.53, Rad+Kar : 25.57 ± 1.91, Rad+Kar+Mel: 33.4 ± 3.37.....	49
Şekil 4.27: Kontrol grubu kript epitel hücrelerinde kaspaz-3 pozitif hücreler (→). Bar: 50 µm.....	50
Şekil 4.28: Radyasyon grubu kript epitel hücrelerinde kaspaz-3 pozitif hücreler (→). Bar: 50 µm.....	50
Şekil 4.29: Radyasyon + Melatonin grubu kript epitel hücrelerinde kaspaz-3 pozitif hücreler (→). Bar: 50 µm.....	51
Şekil 4.30: Radyasyon + Karnozin grubu kript epitel hücrelerinde kaspaz-3 pozitif hücreler (→). Bar: 50 µm.....	51
Şekil 4.31: Radyasyon + Melatonin + Karnozin grubu kript epitel hücrelerinde kaspaz-3 pozitif hücreler (→). Bar: 50 µm.	52
Şekil 4.32: Kript hücrelerinde immunohistokimya ile tespit edilen % TNF-α pozitif hücre sayısı. Her bir grup için elde edilen değerler ‘ortalama ± standart hata’ olarak gösterilmiştir. Kontrol: 15.6 ± 1.13, Radyasyon: 62.6 ± 3.97, Rad+Mel: 24.75 ± 1.54, Rad+Kar: 37 ± 1.08, Rad+Kar+Mel: 42.4 ± 1.47.....	53
Şekil 4.33: Kontrol grubu kript hücrelerinde TNF-α pozitif hücreler (→). Bar: 50 µm.....	54
Şekil 4.34: Radyasyon grubu kript hücrelerinde TNF-α pozitif hücreler (→). Bar: 50 µm.	54
Şekil 4.35: Radyasyon + Melatonin grubu kript hücrelerinde TNF-α pozitif hücreler (→). Bar: 50 µm.	55
Şekil 4.36: Radyasyon + Karnozin grubu kript hücrelerinde TNF-α pozitif hücreler (→). Bar: 50 µm.....	55
Şekil 4.37: Radyasyon + Karnozin + Melatonin grubu kript hücrelerinde TNF-α pozitif hücreler (→). Bar: 50 µm.....	56
Şekil 4.38: İnce bağırsak homojenatlarının katalaz değerleri. Her bir grup için elde edilen değerler ‘ortalama ± standart hata’ olarak gösterilmiştir. Kontrol: 7.21 ± 0.42, Radyasyon: 2.55 ± 0.2, Rad+Mel: 4.1 ± 0.24, Rad+Kar: 4.3 ± 0.28, Rad+Kar+Mel: 4.28 ± 0.41.....	57

Şekil 4.39: İnce bağırsak homojenatlarının GSH değerleri. Her bir grup için elde edilen değerler ‘ortalama \pm standart hata’ olarak gösterilmiştir. Kontrol: 34.16 ± 0.4 , Radyasyon: 30.18 ± 0.39 , Rad+Mel: 57.6 ± 0.5 , Rad+Kar: 58.93 ± 0.51 , Rad+Kar+Mel: 51.89 ± 0.2458

TABLO LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 3.1: Total protein standart çözeltilerinin hazırlanışı.	23
Tablo 3.2: Katalaz standart çözeltilerinin hazırlanışı.	26
Tablo 3.3: GSH standart çözeltilerinin hazırlanışı.	28
Tablo 4.1: Bağırsak dokusunun yarı-kantitatif olarak histolojik incelenmesi.....	43

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Fe	Demir
H₂O₂	Hidrojen Peroksit
Mn	Mangan
NaOH	Sodyum Hidroksit
NO[·]	Nitrik Oksit
O₂[·]	Süperoksit Radikali
O[·]	Singlet Oksijen
OH[·]	Hidroksil Radikali
ROO[·]	Peroksil Radikali

Kısaltmalar	Açıklama
AEC	3-Amino-9-Etilkarbazol
ADP	Adenozin Difosfat
ATP	Adenozin Trifosfat
BSA	Sığır Serum Albumin
Gy	Gray
GSH	Glutasyon
GSH-Rd	Glutasyon Redüktaz
GSSG	Okside Glutasyon
HE	Hematoksilen-Eosin
KAR	Karnozin
KASPAZ-3	Sistein Aspartat Spesifik Proteaz-3
KAT	Katalaz
LPO	Lipid Peroksidasyonu

MEL	Melatonin
MPO	Miyeloperoksidaz
NADP	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
PAS	Periyodik Asit-Schiff
PBS	Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltilisi
PCNA	Çoğalan Hücrelerin Nükleer Antijeni
GSH-Px	Glutasyon Peroksidaz
RAD	Radyasyon
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
SOD	Süperoksit Dismutaz
TGF-β	Dönüştürücü Büyüme Faktör-Beta
TNF-α	Tümör Nekroz Faktör-Alfa

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GAMA RADYASYONUN NEDEN OLDUĞU İNCE BAĞIRSAK HASARINA KARŞI KARNOZİN VE MELATONİNİN ETKİLERİ

Hüseyin US

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Genel Biyoloji Programı

Danışman: Doç. Dr. Ömür KARABULUT-BULAN

Günümüzde radyoaktif izotopların ve radyasyonun; temel bilim, tıp, tarım, endüstri, enerji ve diğer uygulama alanlarında kullanılışı çok geniş boyutlara ulaşmıştır. Bu kadar geniş bir kullanım alanı olmasına karşın radyasyonun birçok sistem, organ ve doku üzerine olumsuz etkileri mevcuttur. Bu olumsuz etkiler özellikle ince bağırsak gibi bölünme yeteneği fazla olan hücrelerde daha yoğun olarak görülmektedir.

Biyolojik materyallerin radyasyona maruz kalmaları, hızlı bir şekilde reaktif oksijen türlerinin artışına neden olmaktadır. Reaktif oksijen türlerinin organizmadaki olumsuz etkileri çeşitli araştırmalar ile ortaya konmuştur. Bu sebeple de pek çok çalışmada, canlı materyalin radyasyona duyarlılığını etkileyebilecek antioksidanlar kullanılmıştır. Melatonin, epifiz bezinden salgılanan ve serbest radikalleri azaltabilen güçlü bir antioksidandır. Karnozin ise, β -alanin ve L-histidin birleşmesi ile meydana gelen bir nöropeptiddir. Karnozin, aktif oksijen radikallerini temizleyen biyolojik fonksiyonuna bağlı olarak antioksidan özelliğe sahiptir. Antioksidan özelliğine ek olarak karnozinin antiapoptotik ve sitoprotektif özellikleri de bulunmaktadır.

İnce bağırsaktaki radyasyon hasarı üzerinde melatonin ve karnozin kombinasyonunun etkileri hakkında yapılmış herhangi bir çalışma rastlanmamıştır. Bu çalışmanın amacı antioksidan, anti enflamatuvar ve antiapoptotik özellikleri bilinen melatonin ve karnozinin radyasyon ile ortaya çıkan ince bağırsak hasarına karşı koruyucu bir etkisinin olup olmadığını histolojik, immünohistokimyasal ve biyokimyasal parametrelerin ışığı altında değerlendirmektir.

Çalışmamızda, *Wistar albino* cinsi, 40 adet ergin erkek sıçan kullanıldı. Deney hayvanları her birinde 8'er adet sıçan bulunan beş gruba ayrıldı. Birinci grubu oluşturan kontrol sıçanlara ve ikinci grubu oluşturan radyasyon uygulanan sıçanlara serum fizyolojik, üçüncü grup sıçanlara melatonin, dördüncü gruba karnozin, beşinci gruba da karnozin ve melatonin aynı anda enjekte edildi. Bir hafta boyunca 48 saatte bir olmak üzere üç kez enjeksiyon yapıldı. İkinci enjeksiyondan bir saat sonra kontrol grubu dışındaki diğer dört grup 8 Gray total vücut ışınlamasına maruz bırakıldı. Jejunumdan alınan doku örnekleri histolojik incelemeler için Bouin fiksatif ile fikse edildi. Parafin bloklardan alınan doku kesitlerine Hematoksilin & Eosin, Masson'un üçlü boyası ve Periodik Asit Schiff reaksiyonu uygulandı. Formalinde fikse edilmiş doku kesitlerine ise çoğalan hücrelerin nükleer antijeni (PCNA), kaspaz-3 ve tümör nekroz faktör- α (TNF- α) immünohistokimyası uygulandı. Biyokimyasal olarak katalaz ve total glutatyon değerleri ELISA yöntemiyle tayin edildi.

Radyasyon uygulaması ince bağırsak dokularında histolojik olarak dejeneratif değişikliklere yol açtı. İmmünohistokimyasal olarak PCNA pozitif kript hücre sayısında azalış gözlenirken, kaspaz-3 ve TNF- α pozitif kript hücre sayısında artış gözlemlendi. Ayrıca radyasyon uygulanması katalaz ve total glutatyon değerlerinde azalışa sebep oldu. Melatonin, karnozin ve melatonin + karnozin verilen gruplarda bu bulgular kontrol bireylerdeki değerlere yakın sonuçlar gösterdi. Sonuç olarak, eksojen olarak verilen melatonin, karnozin ve melatonin + karnozinin sitoprotektif, antioksidan, antiapoptotik, antiinflamatuvar ve proliferatif bir etki ile radyasyonun neden olduğu ince bağırsak hasarı üzerinde koruyucu bir rolü olabileceğini söyleyebiliriz.

Ocak, 2014, Tezin sayfa sayısı: 103

Anahtar kelimeler: Gama Radyasyonu, Karnozin, Melatonin, İnce Bağırsak.

SUMMARY

M.Sc. THESIS

THE EFFECTS of CARNOSINE and MELATONIN AGAINST GAMMA RADIATION-INDUCED SMALL INTESTINE INJURY

Huseyin US

Istanbul University

Graduate School of Science and Engineering

Department of Biology

General Biology Program

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Omur KARABULUT-BULAN

Today, application areas of radioactive isotopes and radiation such as basic science, medicine, agriculture, industry, energy have reached a very large size. Although such a wide field of radiation, its negative effects on many systems, tissue and organ are available. These negatively effects are seen as more intense in the rapidly dividing cells like small intestine, especially.

Radiation exposure to biological materials cause quickly increasing of the reactive oxygen species (ROS). The negative effects of reactive oxygen species in the organism has been demonstrated in various studies. For this reason, the antioxidants, which may affect the sensitivity of the living material to radiation, were used in many studies. Melatonin is a powerful antioxidant which is secreted from pineal gland and decreased free radicals. Carnosine is a neuropeptid which is combination of the β -alanine and L-histidine. It has antioxidant properties depend on its biological function which cleans active oxygen radicals. In addition to the antioxidant function, carnosine has also the anti-apoptotic and cytoprotective properties.

There is no study about the effects of combination of melatonin and carnosine on radiation damage in the small intestine. The aim of this study is to evaluate whether melatonin and carnosine, which are known as antioxidant, antiinflammatory and antiapoptotic, have protective effect against radiation-induced small intestine injury, as histologically, immunohistochemically and biochemically.

In our study, 40 male adult *Wistar albino* rats were used. Experimental animals were divided into five groups which has 8 rats each. Serum physiologic was given to control rats, which is the first group, and irradiated rats, which is the second group. Melatonin, carnosine and combination of carnosine and melatonin were injected to the thirth, fourth and fifth group, respectively. They were injected for three times every 48 hours during a week. All groups, except control group, were exposed 8 Gray whole body irradiation an hour after second injection. Tissue samples which taken from jejunum were fixed with Bouin solution for histological examinations. Tissue sections which taken from paraffin blocks were stained with Hematoxylin & Eosin (HE), Masson's trichrome and Periodic Acid Schiff (PAS) reaction. Tissue sections, which were fixed in formalin, were prepared for immunohistochemical examinations of proliferating cell nuclear antigen (PCNA), caspase-3 and tumor necrosis factor- α (TNF- α). Catalase and total glutathione levels were determined by ELISA as biochemically.

Radiation treatment caused degenerative changes on small intestine tissues, histologically. Decreasing number of PCNA positive crypt cells and increasing number of caspase-3 and TNF- α positive crypt cells were observed, immunohistochemically. Moreover, the radiation treatment also caused decreasing of catalase and glutathione levels. Findings of the groups which were applied melatonin, carnosine and melatonin + carnosine showed similar results with values of the control groups. Consequently, we can say that applying of exogenous melatonin, carnosine and melatonin + carnosine may have protective effects on radiation-induced small intestine injury.

January, 2014, The number of pages of the thesis: 103

Keywords: Gamma Radiation, Carnosine, Melatonin, Small Intestine.

1. GİRİŞ

Yeryüzündeki bütün canlılar ömürleri boyunca sürekli olarak, doğal ya da yapay radyasyon kaynaklarından yaşadıkları çevreye yayılan iyonlaştırıcı radyasyonların etkisi altındadırlar. Bu sebeple, söz konusu radyasyonlarla canlı sistemler arasındaki etkileşimlerin araştırılması ve anlaşılması büyük önem taşımaktadır. Radyasyonun canlı sistem tarafından absorblanması ile başlayan fizikokimyasal değişikliklerle, biyolojik etkilerin ortaya çıkışı arasındaki süre boyunca gelişen olayların neler olduğunu araştırmak, uygulama ve korunma açısından son derece önemlidir (Özalpan, 2001).

Radyasyonun birçok biyolojik sistem ve organ üzerine etkileri bulunmaktadır (Mazon ve diğ., 1998). Radyasyon hasarına en fazla ince bağırsak gibi hücre yenilenmesi hızlı olan dokularda rastlanır. İnce bağırsakta, ışınlamayı takiben ortaya çıkan değişiklikler öncelikle, “villus” adı verilen yapıların örtü epitelinde görülür. Son derece proliferatif olan Lieberkühn bezi hücreleri sürekli farklılaşan, terminal villusa doğru ilerleyen ve belli bir gelişim sonrası intestinal lümene dökülen hücrelerdir (Guzman-Stein ve diğ., 1989). Radyasyonun temel etki mekanizması, DNA’da yaptığı hasara bağlı olarak hücre ölümüne yol açmasıdır. DNA’daki ölümcül hasar DNA molekülünün fırlatılmış bir elektron ile direkt iyonizasyonu sonucu meydana gelebilir. Radyasyonun bu direkt iyonlaştırıcı etkisi hasarın bir bölümünden sorumludur. Asıl hasar yapan olaylar indirekt mekanizma ile ortaya çıkar. Ortamdaki suyun iyonizasyonuna bağlı olarak gelişen reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumu DNA’daki ölümcül hasarın asıl sorumlusudur (Hall, 2000; Özalpan, 2001).

Günümüzde radyasyona bağlı gastrointestinal sistemdeki olumsuz etkilerin azaltılması, hatta ortadan kaldırılması için çeşitli tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi amacıyla deneysel hayvan modelleri üzerinde yapılan çalışmalar daha da önem kazanmaktadır (Akpolat, 2007). Antioksidan maddelerin, radyasyon hasarına karşı yararlı etkiye sahip olduğu ileri sürülmektedir (Neoman ve diğ., 2002).

Antioksidanlar, serbest radikallerin sebep olduğu peroksidasyon zincir reaksiyonunu engelleyici etki gösterirler. Bu etkiyi enzimatik veya enzimatik olmayan yollarla gerçekleştirirler. Enzimatik olmayan antioksidanlardan biri olan melatonin (N-asetil-5-metoksitriptamin) epifiz bezinden (pineal bez) salgılanan ve serbest radikalleri azaltabilen güçlü bir antioksidandır (Brzezinski, 1997). Ayrıca melatonin antioksidan enzimlerin aktivitesini ve salınımını artırma yeteneğindedir. Lipofilik özelliği nedeniyle hücrenin tüm fraksiyonlarına kolaylıkla girebilir (Hardeland ve Poeggeler, 2008). Çeşitli çalışmalarda doku hasarı üzerinde melatoninin koruyucu bir role sahip olduğu gösterilmiştir (Ianas ve diğ., 1991; Merle ve diğ., 2000; Reiter ve diğ., 2003; Sarıkaya, 2011). Enzimatik olmayan antioksidanlardan bir diğeri olan karnozin, β -alanin ve L-histidinin birleşmesi ile meydana gelir (Fujii ve diğ., 2003). Karnozin, aktif oksijen radikallerini temizleyen biyolojik fonksiyonuna bağlı olarak antioksidan özelliğe sahiptir. Hidroksil ve süperoksit radikallerinin ve çok kuvvetli olarak da singlet oksijen molekülünün temizleyicisidir. Bu özelliği nedeniyle beyin, böbrek ve iskelet kası iskemi reperfüzyon hasarında karnozinin koruyucu etkisi bulunmuştur (Zalesova ve Kuleva, 1998; Boldyrev ve diğ., 1999; Stvolinsky ve diğ., 1999; Stvolinsky ve diğ., 2000; Fujii ve diğ., 2003; Fujii ve diğ., 2005).

Gama radyasyonunun ince bağırsak üzerine etkilerini araştırdığımız bu çalışmada Hematoksilin & Eozin (HE), Masson'un üçlü boyası ve Periodik Asit Schiff (PAS) reaksiyonu uygulanan doku kesitleri histolojik hasarı değerlendirmek üzere incelendi. Ayrıca apoptotik hücre ölümünün belirteci olarak kullanılan aktif kaspaz-3 enzimi (Green, 2000), hücre proliferasyonunun morfolojik özelliklerini iyi şekilde gösteren ve hücre çoğalma indeksinin belirlenmesi için sıklıkla kullanılan çoğalan hücrelerin nükleer antijeni (PCNA) proteini (Sheen-Chen ve diğ., 2003), inflamasyonda temel bir aracı sitokin olan ve inflamasyon belirteci olarak kullanılan TNF- α (Tahan ve diğ., 2011) immünohistokimyasal olarak gösterildi. Antioksidan etkiyi gözlemlemek için total glutatyon (GSH) ve katalaz (KAT) değerleri ELISA yöntemi ile tespit edildi.

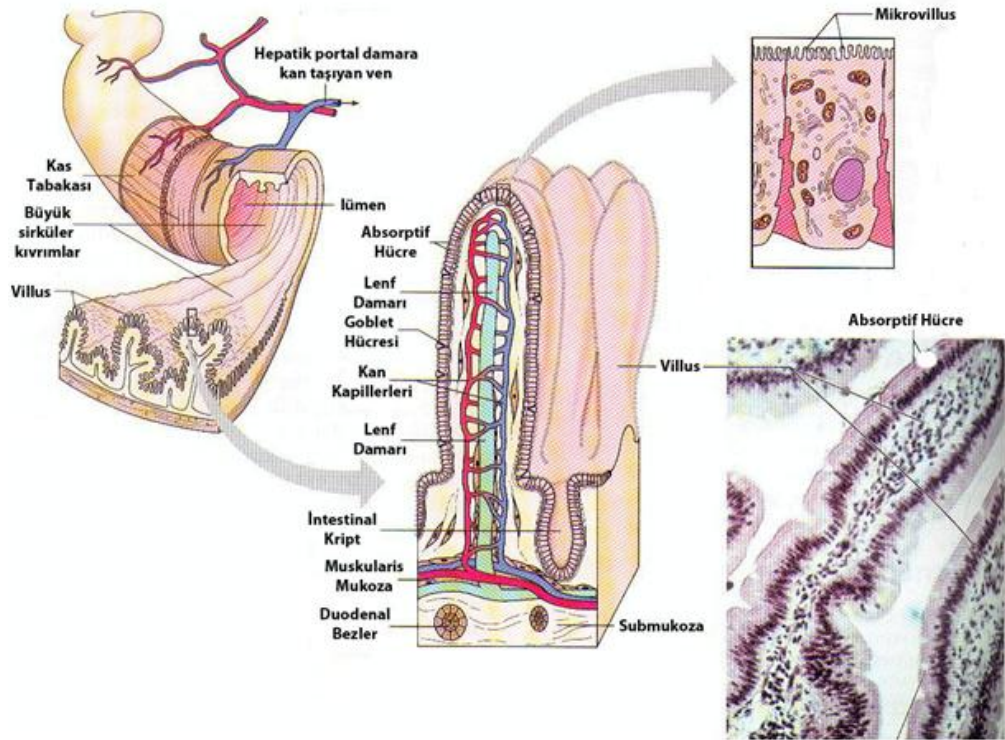
Çalışmamızda, gama radyasyonunun ince bağırsak dokusunda oluşturduğu hasarları ve bu hasarlar üzerinde melatonin ve karnozinin koruyucu etkilerinin olup olmadığını *in vivo* deneysel bir modelle ortaya koymak amaçlanmıştır. Ayrıca çalışmamızın günlük

yaşamda maruz kalınan ve tedavide kullanılan radyasyonun olumsuz yan etkilerini azaltabilme konusunda yapılan çalışmalara ışık tutacağını düşünmekteyiz.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. İNCE BAĞIRSAK

İnce bağırsak son besin sindiriminin, metabolit emiliminin ve endokrin salınımının yapıldığı yerdir. Sindirim olayı sindirim ürünlerinin epitel hücreleri tarafından emildiği ince bağırsakta tamamlanır. İnce bağırsağın apikal kısmında besinlerin emilimi için özelleşmiş emici hücreler (enterositler) ve aralarında mukus üretiminde görevli goblet hücreleri bulunmaktadır. İnce bağırsak mukozası üç tabakadan oluşur; lamina epiteliyalis, lamina propria ve muskularis mukoza. Mukozal yüzeyde villus ve Lieberkühn bezleri (kriptler) olmak üzere iki önemli yapı bulunur. Mukozanın emilim yüzeyini artıran villuslar, kriptleri oluşturmak üzere mukozanın derinliklerine dek uzanır. Kriptler de villusların arasına açılarak çöküntüler oluştururlar (Kierszenbaum, 2006) (Şekil 2. 1).



Şekil 2.1: İnce bağırsağın genel yapısı.

İnce bağırsağın duodenum, jejunum, ve ileum olmak üzere anatomik olarak üç temel kısmı bulunmaktadır. Duodenum, midenin pilor bölgesinden jejunum ile olan birleşme kısmına kadar uzanmaktadır. Submukoza tabakasında Brunner bezleri içermesi ve villuslarının geniş, kısa olması belirgin özelliğidir. Brunner bezlerinin boşaltım kanalları kriptlerin içerisine boşalmaktadır. Jejunumda villuslar daha uzun, kriptler daha derindir. Submukozada bez bulunmamaktadır. Mikrovillusların enzim aktivitesi ve besin absorpsiyon kapasitesi daha fazladır. İleum, jejunuma kıyasla villusların daha kısa olmasıyla ve iri nodüller oluşturan Peyyer plaklarıyla ayırt edilir. Jejunuma oranla besinler, su ve elektrolitlere daha az geçirgindir (Junquera ve Carneiro, 2009).

2.2. RADYASYON

İçinde bulunduğumuz yüzyılda, insanlar teşhis ve tedavi amacıyla meslekleri ya da kaza gibi nedenlerle radyasyona maruz kaldıklarında, karşılaşılabilecekleri biyolojik sonuçların ne olacağı endişesini taşırlar (Türkkanı, 2001). Çağdaş toplumlarda, radyasyonların çeşitli şekillerde giderek artan amaçlarla kullanılışı, insanlığı biyolojik bir risk altına sokmaktadır. Bu riski en aza indirebilmenin ilk şartı, radyasyonun biyolojik etkilerini öğrenmek ve bu bilgilerin ışığında korunmaktır (Özalpan, 2001).

Son zamanlarda radyoaktif izotopların ve radyasyonun temel bilim, tıp, tarım ve endüstri gibi çeşitli uygulama alanlarında kullanılışı çok büyük boyutlara ulaşmıştır. Tıpta radyoaktif izotoplar ve radyasyon çeşitli hastalıkların tanı ve tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Steel, 1997; Özalpan, 2001).

Radyoterapi ile bazı kanser türlerinin tedavisinde olumlu sonuçlar alınmasının yanı sıra, tedavi esnasında ışınlanan çevresel normal dokular üzerindeki radyasyona bağlı riskleri de göz ardı etmemek gerekir (Robbins ve Zhao, 2004; Monobe ve diğ., 2005). Radyasyonun çeşitli dokular üzerindeki etkileri; toplam doza, fraksiyon dozu ve sayısına, tedavi süresine, dokuların radyasyona duyarlılığına, yaşa ve cinsiyete bağlıdır (Özalpan, 2001).

Bergonie ve Tribondeau (1906), radyasyonun biyolojik etkilerine dayanan bir hipotezle “Radyobiyolojinin Temel Kanunu” nu ileri sürmüşlerdir. Buna göre, “ışınlanan canlılarda gözlenen biyolojik etkiler, bu hücrelerin bölünme kapasiteleri ile doğru, farklılaşma dereceleri ile ters orantılıdır”. Radyasyon duyarlılığı açısından çoktan aza doğru sıraladığımızda; hızlı bölünen, ancak henüz farklılaşmamış hücreler olarak eritroblast, bağırsak Lieberkühn bezi hücreleri, spermatogonium ve epidermis bazal hücreleri görülür. Hücreler farklılaştıkça, radyasyon duyarlılıkları azalır (Özalpan, 2001). “Radyasyona duyarlılık yasası”na göre; karaciğer, böbrek, kas, beyin, kemik, kıkırdak ve bağ dokuları, ergin canlıda farklılaşmış olduğundan dirençli doku ve organları oluşturmakta, buna karşın, kemik iliği, ovaryum ve testislerin bölünen hücreleri, mide-bağırsak ve deri epitel hücreleri ise radyasyona karşı duyarlılık göstermektedirler (Steel, 1997). Gastrointestinal sistemde ise radyasyona duyarlılık duodenumdan rektuma doğru giderek azalmaktadır (Cox, 1994).

Yüksek doz radyasyon (letal doz), DNA zinciri üzerinde onarılması mümkün olmayan kırıklar oluşturarak hücre ölümüne yol açar. Letal dozun altındaysa hücre bölünmesini durdurur. Doz düşükse bölünme bir süre sonra yeniden başlar. Doz arttıkça bölünmenin başlama zamanı uzar, mitoz sayısı azalır, anormal mitoz şekilleri, dejenere hücreler ve gen mutasyonları ortaya çıkar (Withers, 1992). Radyasyonun etkisi hücre siklus fazına göre farklıdır. Mitoz (M) ve ikinci dinlenme fazı (G2) radyasyona karşı hassas, birinci dinlenme (G1) ve sentez (S) fazları radyasyona karşı dirençlidir (Marx ve diğ., 1990).

Canlılar %70-90 oranında su içerdiğinden, ışınladıkları zaman radyasyon enerjisi büyük ölçüde su molekülleri tarafından absorbe edilir. Radyasyonun etkisi ile su moleküllerinin iyonlaşması sonucunda pozitif yüklü bir iyon ve serbest bir elektron oluşur. Bu olayı izleyen çeşitli sekonder reaksiyonlar ile değişik tipte serbest radikaller (hidroksil radikali, hidrojen radikali) meydana gelir. Açığa çıkan bu reaktif radikaller, kendi aralarında reaksiyona girerek hidrojen peroksit gibi çok toksik molekülleri oluştururlar. İnce bağırsakta meydana gelen hasarın radyasyon tarafından ortaya çıkan serbest radikallerden kaynaklandığı ileri sürülmüştür (Diamond ve diğ.,1996). Suyun hidrolizi ile açığa çıkan serbest radikaller aracılığı ile oluşan radyasyon etkisi, indirekt etki olarak bilinir. Direkt etkide ise, radyasyon enerjisinin su molekülleri yerine direkt olarak biyolojik moleküllere (örneğin; DNA, enzim) transferi ve biyoradikallerin

oluşumu söz konusudur (Özalpan, 2001; Robbins ve Zhao, 2004; Mansour, 2006; Kocer ve diğ., 2007).

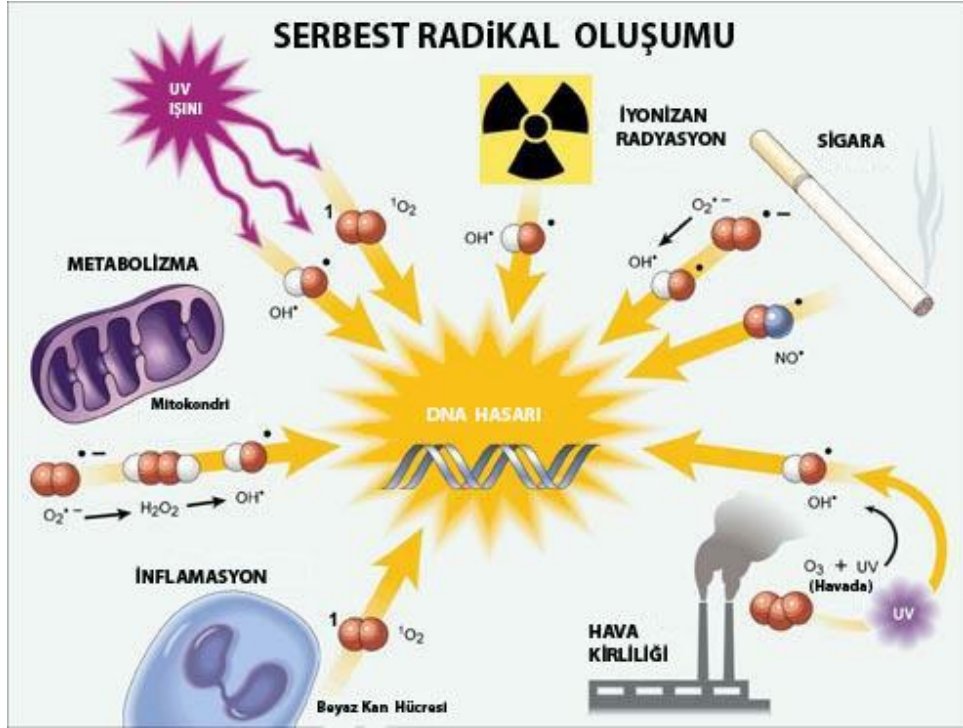
Yüksek seviyedeki reaktif oksijen türleri, mitokondri iç ve dış membranlarını bozar. Bu, kaspazları aktive eden mitokondrilerden sitokrom c'nin salınımına yol açar ve apoptoza neden olur. İyonize radyasyonun apoptozu indüklediği ve hücre siklusunu durdurduğu çeşitli araştırmacılar tarafından gösterilmiştir. (Samanta ve diğ., 2004; Sakashita ve diğ., 2010). Işınlama, aşırı ROS üretimi aracılığı ile testiküler apoptoza neden olan bir uyarandır (Agarwal ve diğ., 2003).

Radyasyona bağlı olarak ortaya çıkan serbest radikallerin stabilitesini ve miktarını endojen ve ekzojen faktörler etkileyebilir. Bu sebeple pek çok çalışmada, canlı materyalin radyasyona duyarlılığını etkileyebilecek moleküler oksijen, tiyoller, vitamin E ve diğer antioksidanlar kullanılmıştır. Kimyasal ajanlar tarafından organizmanın radyasyondan korunması fikrinin temel dayanağının, radikal süpürücü reaksiyonlar olduğu düşünülmektedir (Klimberg ve diğ., 1990; Shaheen ve Hassan, 1991; Threumma, 1996; Somosy, 2000).

2.3. SERBEST RADİKALLER VE OKSİDATİF STRES

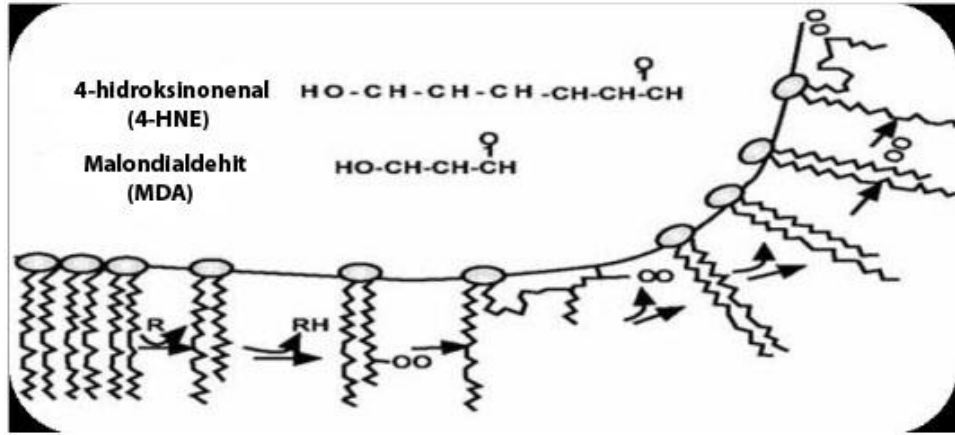
Serbest radikaller, yapılarında bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron içeren, kısa ömürlü, kararsız, molekül ağırlığı düşük ve çok etkin atom veya moleküllerdir (Valko ve diğ., 2007). Bu moleküller ortaklanmamış elektronlarından dolayı diğer moleküllerden elektron aktarımı yaparak aktif duruma gelirler (Davies ve Pryor, 2005). Biyolojik sistemlerde en önemli serbest radikal türleri, oksijenden oluşan süperoksit (O_2^{\cdot}), singlet oksijen (O^{\cdot}), nitrik oksit (NO^{\cdot}), hidroksil radikali (OH^{\cdot}) ve peroksil radikali (ROO^{\cdot})'dir (Wu ve Cederbaum, 2003). Bunların yanında hidrojen peroksit (H_2O_2), serbest radikal olmadığı halde, en reaktif serbest radikal olan OH^{\cdot} 'i oluşturma özelliğinden dolayı reaktif oksijen türevidir olarak kabul edilir (Halliwell ve Whiteman, 2004). Serbest radikaller mitokondriyal solunum zincirinde aerobik enerji metabolizması ile oluşabildikleri gibi, sitoplazmik, peroksizomal, lizozomal hücresel süreçler sonucu da oluşurlar (Kohen ve Nyska, 2002). Radyasyon (Shuryak ve Brenner, 2009), antibiyotikler (Hassett ve Imlay, 2007), ağır egzersiz, alkol, uyuşturucu maddeler (Wu ve Cederbaum, 2003), pestisidler, sigara dumanı, hava kirliliği (Kelly, 2003),

anestezikler ve stres (Kumbul, 2007) gibi dış kaynakların etkisiyle de meydana gelirler (Şekil 2.2). Serbest radikaller hücrelerin lipid, protein, DNA, karbohidrat ve enzim gibi tüm önemli bileşenlerine etki ederler (Darko ve diğ., 2004, Pereira ve diğ., 2010). En önemli etkiyi lipidler üzerinde gösterirler (Kelly ve diğ., 1998, Droge, 2002).



Şekil 2.2: Serbest radikal oluşumuna etkili dış etkenler.

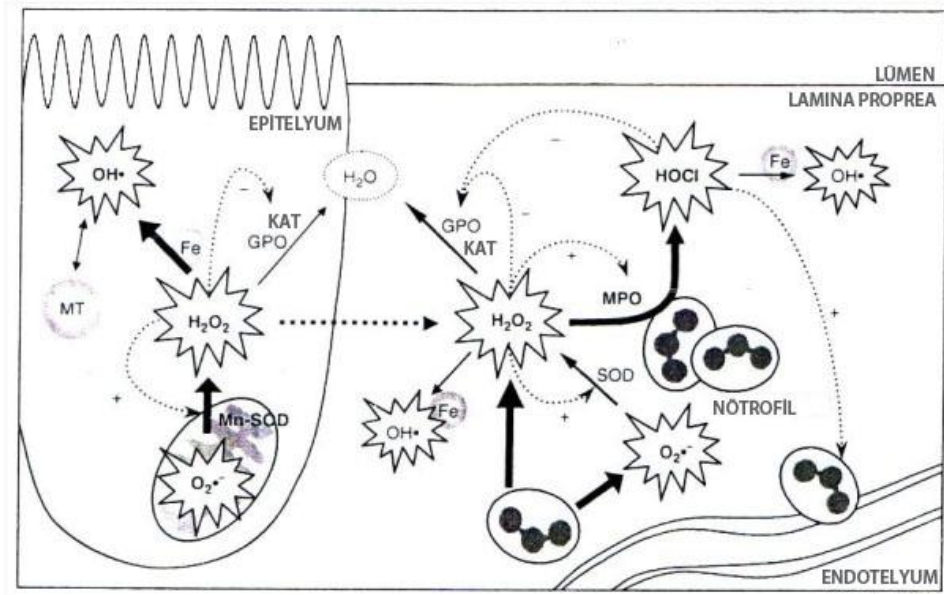
Lipid peroksidasyonu (LPO), oluşan serbest radikallerin etkisi sonucu membran yapısında bulunan doymamış yağ asidi zincirinden bir hidrojen atomu uzaklaştırılması ile başlar. Bunun sonucu yağ asidi zinciri bir lipid radikali niteliği kazanır. Oluşan lipid radikali dayanıksız bir bileşik olduğundan oksijenle reaksiyona girerek lipid peroksil radikali meydana gelir. Bu radikal diğer doymamış yağ asitleriyle reaksiyona girer ve yeni lipid radikallerinin oluşumuna yol açar. Yeni lipid radikalleri de açığa çıkan hidrojen atomlarını bağlayarak lipid hidroperoksidine dönüşürler. Böylece olay kendi kendini katalizleyerek devam eder (Akkuş, 1995; Tomas-Zapico ve Coto-Montes, 2006) (Şekil 2. 3).



Şekil 2.3: Lipid peroksidasyonu oluşum şeması (Tomas-Zapico ve Coto-Montes, 2006).

Oksidatif stres, hücre membranlarındaki lipid tabakasının peroksidasyonu ile sonuçlanan serbest radikallerin fazla üretilmesi ve vücudun antioksidan mekanizmalar ile serbest radikallere karşı kendini savunması arasındaki orantısızlık olarak tanımlanır. Bu dengedeki bozulma lipid peroksidasyonu, DNA hasarı, hücre büyümesinin inhibisyonu (Özden, 2008) gibi etkilerin yanı sıra çok çeşitli hastalıkların ortaya çıkmasında, kanser oluşumunda (Tandon ve diğ., 2005), yaşlanmanın patogeneğinde (Altınışik, 2000), iskemi/reperfüzyon travmalarında (Lai ve diğ., 2000), inflamatuvar hastalıklarda (Chowdhury ve Soulsby, 2008) ve nörodejeneratif hastalıklarda (Andersen, 2004) rol almaktadır.

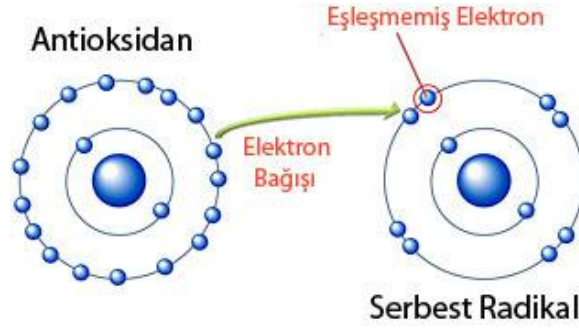
Oksidatif stresin zararlı etkilerinin yanında, vücut için gerekli birçok fonksiyonun gerçekleşmesinde önemli bir rolü vardır (Turna, 2008). Oksijenin biyokimyasal tepkimelerde kullanılabilmesi için reaktif formlara çevrilmesi zorunludur. Mitokondride aerobik solunumda kullanılan oksijen bu tür tepkimelerde kullanılmak üzere serbest oksijen radikallerine dönüştürülmektedir (Jones, 2008). Steroid yapıda çok sayıda bileşiğin üretimi, biyolojik aktif moleküllerin sentezi, ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu, çok sayıda oksidaz ve hidroksilaz enzimlerinin etkileri ve sitotoksik etkilere sahip hücrelerin fonksiyonları için serbest radikal yapımı olmazsa olmaz bir koşuldur (Lesgards ve diğ., 2011). Ancak ortamda serbest oksijen radikalleri sayıca arttığında, ortamdaki başka iyonlarla etkileşime girerek, hasar vermeye başlamaktadırlar (Andreyev ve diğ., 2005) (Şekil 2.4).



Şekil 2.4: İnce bağırsakta meydana gelen oksidatif stres şeması (Kruidenier ve diğ., 2003).

2.4. ANTIÖKSİDANLAR

Reaktif oksijen türlerinin oluşumu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için canlılarda 'antioksidan' olarak adlandırılan çeşitli savunma mekanizmaları gelişmiştir. Antioksidanlar, peroksidasyon zincir reaksiyonunu engelleyici etki göstermektedirler (Cadenas ve Packer, 2002). Antioksidan bileşiklerin etki şekli ve etkinlik düzeyi oldukça farklıdır. Genelde antioksidanlar reaktif oksijen ve nitrojen türevlerinin temizlenmesi, oksidatif stresle hasarlanmış dokuların tamiri, diğer antioksidanların onarımı veya yenilenmesi gibi oldukça farklı etki şekillerinden birini veya birkaçını ortaya koyarlar (Akkuş, 1995). İdeal bir antioksidan bu etki şekillerinden birçoğunu yerine getirebilme özelliğine sahiptir. Biyolojik sistemlerde oksidanların yıkımı ve oluşumu arasındaki denge, hücre ve dokunun biyolojik bütünlüğünün sürdürülmesinde önemlidir (Turna, 2008) (Şekil 2.5).



Şekil 2.5: Antioksidanların serbest radikallere etkisi.

Antioksidanlar, hem doğrudan hem de dolaylı olarak ksenobiyotiklerin, ilaçların, karsinojenlerin ve toksik radikal reaksiyonlarının istenmeyen etkilerine karşı hücreleri koruyan maddelerdir. Antioksidanlar dört farklı mekanizma ile oksidanları etkisizleştirirler. Bu mekanizmalar, oksidanları zayıf bir moleküle çevirme şeklinde olan toplayıcı etki, oksidanlara bir hidrojen aktararak etkisiz hale getiren baskılayıcı etki, oksidanları bağlayarak fonksiyonlarını engelleyen zincir kırıcı ve onarıcı etki mekanizmalarıdır (Altınışık, 2000; Jones, 2008).

Antioksidan mekanizmalar enzimatik ve enzimatik olmayan yollarla oluşurlar. İlk ve temel antioksidan savunma enzimatik olarak yapılmaktadır. En önemli hücre içi enzimlerin katalaz (KAT), süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve glutatyon redüktaz (GSH-Rd) olduğu bilinmektedir (Mates, 2000; Romeu ve diğ., 2002). Sonraki savunma hattı ise ekstrasellüler enzimatik olmayan antioksidanlar tarafından oluşturulur (Cadenas ve Packer, 2002). Bunlar glutatyon (GSH) (Balahoroğlu ve diğ., 2008), melatonin (Aydoğdu ve diğ., 2007a, 2007b), vitamin E, vitamin C, beta-karoten (Taşkın ve diğ., 2008), transferrin, seruloplazmin (Arinola, 2004), albumin, bilirubin ve haptoglobulin gibi bileşiklerdir (Jones ve diğ., 2003).

2.4.1 Enzimatik Antioksidanlar

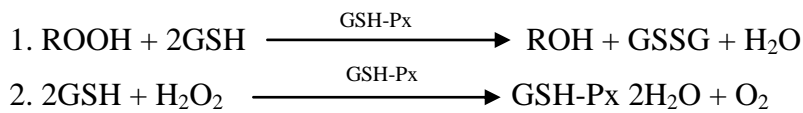
Başlıca antioksidan enzimler; katalaz, süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktazdır (Blokchina ve diğ., 2003).

2.4.1.1 Katalaz

Katalaz, tüm canlı hücre tiplerinde değişik konsantrasyonlarda bulunan, dört tane alt grup içeren ve her bir alt grubu 60,000 dalton molekül ağırlığında olan bir enzimdir. Bu enzimin en önemli görevi hidrojen peroksiti moleküler oksijen ve suya katalizlemektir (Kirkman ve Gaetani, 1984) Katalaz enzimi daha çok peroksizomlarda yerleşmiştir. Kan, kemik iliği, mukoz membranlar, karaciğer ve böbreklerde yüksek miktarda bulunmaktadır (Akkuş, 1995; Kirkman ve diğ., 1999; Ścibior ve Czczot, 2006). Katalaz hidrojen peroksitine karşı göreceli olarak düşük affinite gösterdiğinden katalaz aktivitesi hidrojen peroksitin yüksek konsantrasyonlarında daha önemli hale gelmektedir. Düşük hidrojen peroksiti konsantrasyonlarında, metil veya etil hidroperoksitler, metanol, etanol, fenol gibi küçük moleküllü elektron vericilerini indirger. Enzimin bu iki tür aktiviteden hangisini göstereceği, başta hidrojen peroksit üretim hızı olmak üzere oluşan biyomoleküllerin tür ve miktarına bağlıdır (Jenkins ve Tengi, 1981). Katalaz enzimi, hidrojen peroksit ve metil hidroperoksit gibi küçük moleküllere etki eder, lipit hidroperoksitlere etki etmez (Yalçın, 1998).

2.4.1.2 Glutasyon peroksidaz (GSH-Px)

GSH-Px, glutasyon yolunun ilk enzimidir, hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumludur. Enzim aktivitesi, pentoz fosfat yolunda üretilen NAD(P)H'a bağımlıdır (Wallace, 2002).



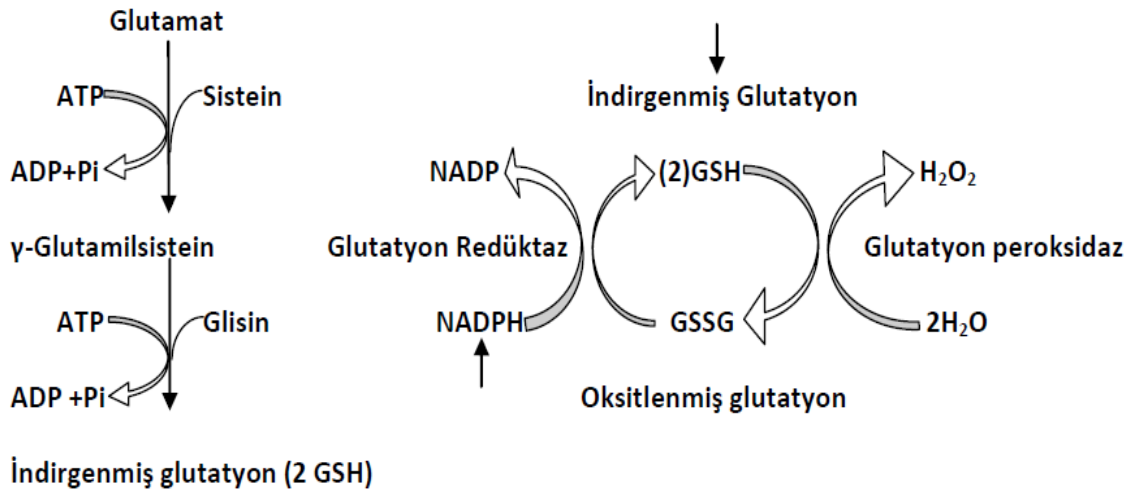
GSH-Px, üç peptidli glutasyonu kendi oksidize formuna (GSSG) oksidize ederken; sitozol ve mitokondrideki SOD tarafından üretilmiş olan H_2O_2 radikalini, yüksek spesifite göstererek ortadan kaldıracak özelliği gösterir (Valko ve diğ., 2006). Fagositik hücrelerde majör peroksit uzaklaştırıcı olarak görev yapan GSH-Px diğer antioksidanlarla birlikte, oksidatif patlama sırasında serbest radikal peroksidasyonu sonucu fagositik hücrelerin zarar görmesini engeller. Endoplazmik retikulumdan salınan H_2O_2 'in dekompozisyonunun primer sorumlusu olan GSH-Px aktivitesindeki azalma, H_2O_2 'in artmasına ve şiddetli hücre hasarına yol açmaktadır (Wallace, 2002).

2.4.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar

Başlıca enzimatik olmayan antioksidanlar; glutatyon (Chavan ve diğ., 2005), melatonin (Millan-Plano ve diğ., 2010), karnozin (Mehmetçik ve diğ., 2007), E ve C vitamini, transferrin, seruloplazmin, albumin, bilirubin, β -karotendir (Gutteridge ve Halliwell, 2000).

2.4.2.1. Glutatyon (GSH)

Glutatyon bir tripeptid olup glutamat, sistein ve glisin amino asitlerinden doğal olarak sentezlenen ama protein olmayan bir tiyol bileşimidir. Tüm hayvan hücrelerinde bulunan GSH, indirgenmiş formda sitozolde sentezlenir, ancak mitokondri ve nükleusta da az miktarda bulunmaktadır. Vücutta GSH sentezinden sorumlu organ ise karaciğerdir. Bu sentez iki basamakta gerçekleşir. Birinci basamakta, γ -glutamilsistein sentetaz isimli enzim GSH'nin amino asitleri olan glutamat ve sisteinden, γ -glutamilsisteinin oluşumunu katalizler. İkinci basamakta ise, glutatyon sentetaz, glisin ve γ -glutamilsisteinden glutatyonu oluşturur. GSH negatif geri bildirim ile glutamilsistein oluşum hızını ve böylelikle kendi sentezini de denetler. Bu sentezde bir molekül GSH için 2 molekül ATP'nin hidrolizi gerekir (Penninckx, 2000) (Şekil 2.6).

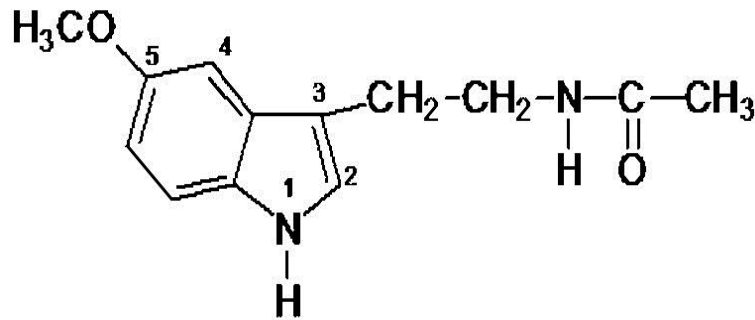


Şekil 2. 6: Glutatyon (GSH) sentezi ve hidrojen peroksinin (H_2O_2) detoksifikasyonu.

GSH, DNA sentezinde ve hasarlı DNA parçalarının onarılmasında, metabolik fonksiyonların yerine getirilmesinde, zehirli maddelerin inaktif hale dönüştürülmesinde ve serbest radikallerin olası hasarlarının önlenmesinde görev yapmaktadır (Chavan ve diğ., 2005). Çok önemli bir antioksidan olan GSH, serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı korur. GSH'ın non-enzimatik olarak veya GSH-Px'in enzimatik olarak oksidasyonu sonucu oluşan okside glutatyon (GSSG) ise oldukça düşük konsantrasyonlarda bulunmaktadır. GSSG'nin glutatyon redüktaz (GSH-Rd) enzimi tarafından GSH formuna indirgenmesi normal durumlar altında dengede olmasına karşı, hücrelerin oksidatif strese maruz kalması sonucu bu denge bozulabilmektedir (Arrick ve Nathan, 1984). Ortamdaki H₂O₂ ile glutatyon peroksidaz (GSH-Px) enziminin kataliziyle reaksiyona giren GSH, okside glutatyona (GSSG) dönüşürken serbest radikal oluşumunu da engellemektedir (Andreyev ve diğ., 2005).

2.4.2.2. Melatonin

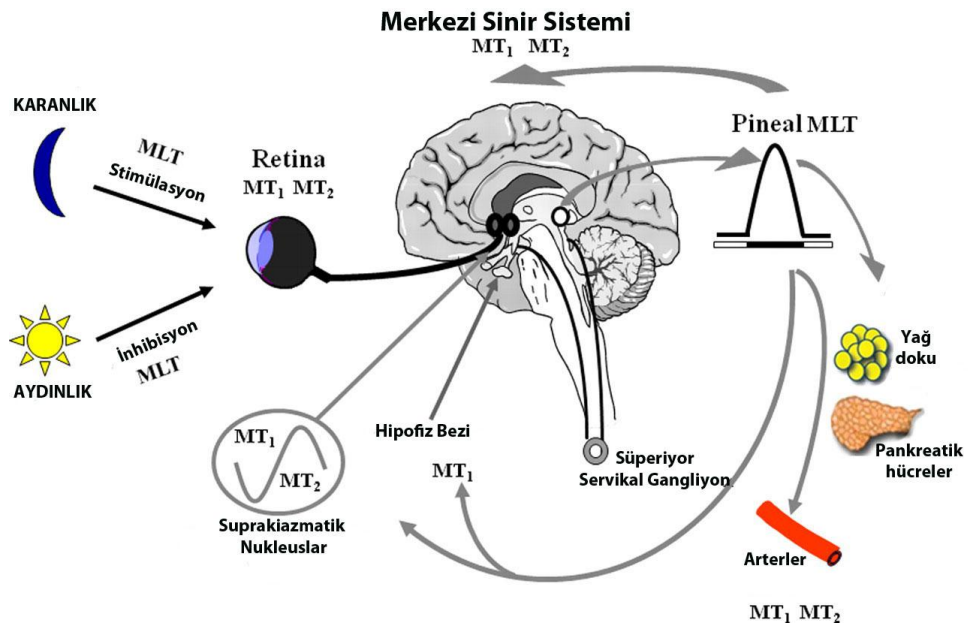
Melatonin (N-asetil-5-metoksitriptamin), memelilerin başlıca beyinde serebral yarım küreler arasındaki epifiz bezinden (pineal bez) ve ayrıca over, göz merceği ve kemik iliği hücreleri ile safra ve gastrointestinal sistemden sentezlenip salgılanan bir hormondur (Reiter ve diğ., 1997) (Şekil 2.7).



Şekil 2.7: Melatonin'in genel yapısı.

Melatonin sentezi sirkadian ritim gösterir. Sirkadian ritim, tüm ökaryotik organizmalarda varolan zamana bağlı devirsel işlemleri düzenleyen biyolojik saattir (Campbell ve Reece, 2006) (Şekil 2. 8). Aydınlıkta hiperpolarize olan retinal hücreler, karanlıkta depolarize olarak, pineal bezde melatonin sentezini başlatırlar. Sentezini

takiben pineal bezden doğrudan dolaşıma verilen melatonin, membran reseptörleri aracılığıyla hedef organlara ulaşır. Melatonin suya göre lipid çözünürlüğünün yüksek olması nedeniyle hücelere rahatça girebilmektedir. Bu nedenle etkileri sadece membrana yönelik değildir. Sulu ortamda kısmen çözünmesi de intrasellüler etkilerinin oluşmasına katkıda bulunmaktadır (Hardeland ve diğ., 1993). Çeşitli çalışmalarda doku hasarı üzerinde melatoninin koruyucu bir role sahip olduğu gösterilmiştir (Karbownik ve Reiter, 2000; Reiter ve diğ., 2003; Yüce ve Aksakal, 2006; Li ve diğ., 2008; Toklu ve diğ., 2009; Morceli ve diğ., 2013).



Şekil 2.8: Melatonin'in ritim düzenleyici rolü.

Aerobik canlılarda serbest oksijen radikallerinin oluşmasıyla birlikte, serbest radikallerin zararlı etkilerini önlemek amacıyla antioksidan savunma sistemleri gelişmiştir. Melatoninin en güçlü serbest radikal tutucu olduğu ileri sürülmektedir. Bu nedenle melatonine olan ilgi giderek artmakta ve antioksidan özelliği gün geçtikçe önem kazanmaktadır (Millan-Plano ve diğ., 2010).

Melatoninin bir antioksidan olduğu ilk kez 1991 yılında Ianas ve diğerleri tarafından öne sürülmüş ve bu görüş daha sonra yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarla desteklenmiştir (Merle ve diğ., 2000; Sarıkaya, 2011). Bu çalışmalar birlikte

değerlendirildiğinde, melatoninin antioksidan özelliği üç ana başlık altında toplanabilir (Brzezinski, 1997; Reiter ve diğ., 2003):

- 1) Direkt antioksidan etki: Oksidatif strese yol açan serbest radikallerle reaksiyona girerek onların zararlı etkilerini önlemesidir.
- 2) Antioksidan enzim aracılı etki: Süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, γ -glutamilsistein sentetaz gibi bazı antioksidan enzimlerin aktivitelerini arttırıcı etki göstermesidir.
- 3) Prooksidan enzim aracılı etki: Hidrojen peroksit, nitrik oksit gibi prooksidan enzimleri inhibe ederek, serbest radikal oluşumunu azaltıcı etki göstermesidir.

1958'de Aaron B Lerner tarafından tanımlanan melatonin, pineal bezden salgılanan, uyku, üreme, sirkadiyen ritim ve immünite gibi pek çok biyolojik fonksiyonun düzenlenmesinde rol oynayan bir hormondur. Ayrıca, *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarla antiproliferatif ve antioksidan etkilere de sahip olduğu gösterilen melatoninin, kanser ve yaşlanmanın önlenmesinde de etkili olabileceği öne sürülmektedir (Hill ve Blask, 1988; Reiter ve diğ., 2003). Sentezini takiben, pineal bezden doğrudan dolaşıma verilen melatonin, lipofilik özelliğine rağmen, membran reseptörleri aracılığıyla hedef hücrelerine ulaşır. Lipofilik özelliği nedeniyle, hücrenin tüm bölümlerine kolaylıkla girebilen melatonin için sitozolik ve nükleer bağlanma yerleri de tanımlanmıştır (Reiter, 1993).

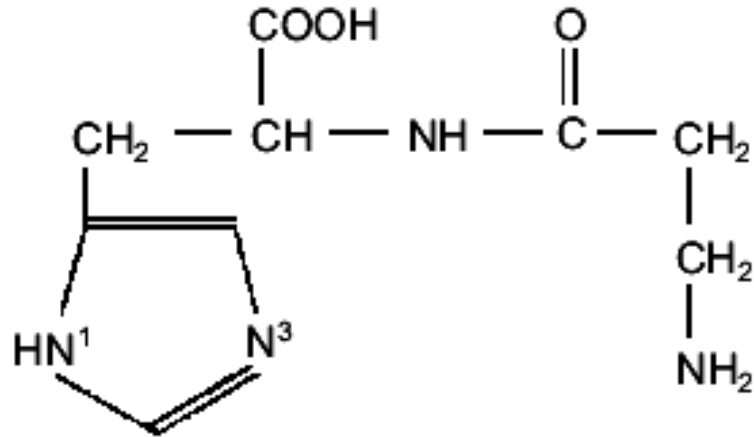
Farmakolojik ve muhtemelen fizyolojik düzeylerdeki melatoninin, SOD, GSH-Px, GSSG Rd, glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) ve γ -glutamilsistein sentetaz gibi bazı antioksidan enzimlerin gen ekspresyonlarını ya da aktivitelerini arttırdığı ve bu yolla oksidatif stresi baskıladığı bildirilmektedir (Beyer ve diğ., 1998; Reiter ve diğ., 2000).

Melatoninin bazı prooksidan enzimleri inhibe ederek, serbest radikal oluşumunu azalttığı ve bu yolla da antioksidan sistemi desteklediği öne sürülmektedir (Reiter ve diğ., 2000; Beyer ve diğ., 1998). Melatoninin antioksidan etkileri genel olarak incelendiğinde, adezyon moleküllerinin ve proinflamatuvar sitokinlerin sentezini

azaltmasını da içeren oldukça geniş spektruma sahip bir antioksidan olduğu görülebilir (Reiter, 2003).

2.4.3 Karnozin

Karnozin, β -alanin ve L-histidinin birleşmesi ile meydana gelen, 1900'lerde keşfedilmiş ilk nöropeptiddir. Kas ve sinir dokuda geniş dağılım gösterir (Fujii ve diğ., 2003). Karnozinin antioksidan etkisi 1984'de ilk kez gösterilmiştir. Karnozin, suda erime özelliğine bağlı olarak, suda çözünen oksidasyon mediatörlerinin (metaller ve oksijen radikalleri) yüksek olduğu sitozolde fonksiyon görür. Serbest oksijen radikallerini temizleyen biyolojik fonksiyonundan dolayı antioksidan özelliğe sahiptir. Hidroksil ve süperoksit radikallerinin ve çok kuvvetli olarak da singlet oksijen molekülünün temizleyicisidir. Bu özelliği nedeniyle beyin, böbrek ve iskelet kası iskemi reperfüzyon hasarında karnozinin koruyucu etkisi bulunmuştur (Zalesova ve Kuleva, 1998; Boldyrev ve diğ., 1999; Stvolinsky ve diğ., 1999; Stvolinsky ve diğ., 2000; Fujii ve diğ., 2003; Fujii ve diğ., 2005). Antioksidan özelliğine ek olarak karnozinin antiapoptotik, sitoprotektif özellikleri de bulunmaktadır (Tan ve Candlish, 1998; Baykara ve diğ., 2009).



Şekil 2.9: Karnozin'in moleküler yapısı.

3. MALZEME VE YÖNTEM

Çalışmada, Wistar albino cinsi, 40 adet, 210-310 gram ağırlığında, 12-14 haftalık, ergin erkek sıçanlar kullanıldı. Bu çalışmaya İstanbul Üniversitesi Hayvan Deneyleleri Yerel Etik Kurulu'nun 140 sayılı kararı ile etik kurul onayı verildi. Deney hayvanları İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü'nde (DETAE) yetiştirildi. Deney öncesi ve süresince sıçanlar kontrollü laboratuvar şartlarında, 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık fotoperiyodunda ve 21-23 °C sabit sıcaklıkta, bağıl nemin % 40-60 olduğu odada, yeterli ölçüde standart pellet yem ve şehir suyu ile beslenmişlerdir (Institute for Laboratory Animal Research, 2011).

L-karnozin ve melatonin, Sigma Chemical Co. (St.Louis, MO, USA)'dan temin edildi. L-karnozin % 0,9 serum fizyolojik ile çözüldü. Melatonin ise % 2 etanolde çözüldükten sonra % 0,9 serum fizyolojik ile seyreltilerek hazırlandı.

Rastgele seçilen hayvanlar her birinde 8'er adet sıçan bulunan beş gruba ayrıldı. Birinci grubu oluşturan kontrol grubu sıçanlara % 0,9 serum fizyolojik intraperitoneal yolla, ikinci grubu oluşturan radyasyon uygulanan sıçanlara da sadece % 0,9 serum fizyolojik intraperitoneal yolla enjekte edildi. Üçüncü grup sıçanlara subkutan yolla 10 mg/kg melatonin, dördüncü gruba intraperitoneal yolla 250 mg/kg L-karnozin, beşinci gruba da 250 mg/kg L-karnozin intraperitoneal ve 10 mg/kg melatonin subkutan yolla aynı anda enjekte edildi. Bir hafta boyunca 48 saatte bir olmak üzere üç kez enjeksiyon yapıldı. İkinci enjeksiyondan bir saat sonra kontrol grubu dışındaki diğer dört grup İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi Kan Işınlama Merkezi'nde bulunan, doz hızı 4,3 Gy/dk olan IBL-437 C (Sezyum-137) radyasyon kaynağında 8 Gray (Gy) (1,51 dakika) total vücut ışınlamasına maruz bırakıldı. Her enjeksiyondan önce sıçanlar tartılarak, vücut ağırlıkları saptandı ve her bir kimyasal madde, vücut ağırlığı başına 0,5 ml/kg olacak şekilde verildi.

Deney sonunda, diseksiyondan 24 saat önce, sıçanların oral beslenmesi kesilerek sadece su içmelerine izin verildi. Anestezi sağlamak amacıyla 50 mg/kg ketamin hidroklorür (Ketalar®, Eczacıbaşı) ve 10 mg/kg Xylazine HCl (Alfazyne®, Hollanda) kas içine enjekte edildi. Diseksiyon işlemi sırasında sıçanların ince bağırsaklarının jejunum bölgesi çıkarılarak, dokular Bouin ve % 10 tamponlu formalin fiksatiflerine alındı. Biyokimyasal çalışmalar için alınan dokular çalışmanın yapılacağı güne kadar PBS (fosfat tamponlu tuz çözeltisi, pH 7.4) çözeltisinde -80 °C’de derin dondurucuda saklandı.

3.1. HİSTOLOJİK YÖNTEMLER

Bouin fiksatifinde 22 saat fikse edilen dokular, rutin takip işlemlerinden geçirildikten sonra parafine gömüldüler. 4 mikrometre (µm) kalınlığında alınan doku kesitlerine, Hematoksilen & Eozin (HE), Masson’un üçlü boyası (MASSON) ve Periyodik Asit Schiff (PAS) reaksiyonu uygulandı (Humanson, 1972). Hazırlanan preparatlar Olympus CX 41 model ışık mikroskobu ile incelendi ve Olympus DP71 model dijital kamera ile fotoğrafları çekildi. Histolojik hasar dereceleri Howarth ve diğ. (1996)’nin belirlediği kriterlerdeki bazı modifikasyonlarla saptandı.

3.2. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL YÖNTEMLER

% 10 tamponlu formalinde fikse edilen dokular, rutin takip işlemlerinden geçirildikten sonra parafinde bloklandılar. 4 µm kalınlığında alınan doku kesitleri Poly-L-lizini lamlara alınarak PCNA (Santa Cruz Biotechnology, F-2:sc-25280), aktif kaspaz-3 (Novus Biologicals, NB600-1235) ve TNF-α (Novus Biologicals, NBP1-191532) primer antikorlarıyla ‘streptavidin-biotin peroksidaz’ yöntemi (Javois, 1999) kullanılarak immünohistokimyasal olarak incelendi.

3.2.1. PCNA İmmünohistokimyası

Kesitler deparafinizasyon ve rehidratasyon işlemlerinden sonra distile suya alınarak, antijen iyileştirmesi için sitrat tamponla (pH 6) mikrodalga fırında 700 Watt’ta 10

dakika inkübe edildi. 3 kez 5'er dakika hazırlanmış olan PBS (fosfatla tamponlu tuz çözeltisi, pH 7.4) ile yıkanan kesitler, membran permeabilizasyonu için distile su ile hazırlanan % 0.3'lük Triton X-100 ile 5 dakika inkübe edildi. Endojen peroksidaz aktivitesini kaldırmak için kesitler 15 dakika peroksidaz engelleyici (Invitrogen, 00-2015) çözeltisinde bekletildi. PBS ile yıkamanın ardından Histostain-Plus Broad Spektrum Kit (Invitrogen, 85-9043) kullanılarak kitin önerdiği şekilde işlemlere devam edildi. PBS ve % 3'lük Triton X-100 ile 1:50 oranında sulandırılarak hazırlanan PCNA primer antikoru (Santa Cruz Biotech., sc-25280) ile kesitler + 4 °C'de bir gece boyunca inkübe edildi. Bu aşamada negatif kontrol kesitlere sadece PBS uygulandı. İnkübasyon sonrasında yıkama işlemi 15 dakika, biyotinlenmiş sekonder antikor 30 dakika ve tekrar yıkamadan sonra streptavidin peroksidaz 15 dakika uygulandı. Son yıkama işleminden sonra yaklaşık 15 dakika kromojen olarak AEC (3-Amino-9-Etilkarbazol) (Invitrogen, 00-2007) damlatıldı ve renk oluşumu gözlemlendi. Kesitler distile suya alınarak reaksiyon durduruldu. Zıt boyama amacıyla kesitler 15 saniye Mayer Hematoksilin boyası (Santa Cruz Biotech., CAS 517-28-2) ile muamele edildi. Kapatma işlemi için su bazlı kapatıcı (Abcam, ab64230) kullanıldı. Kesitler inceleninceye kadar +4 °C'de saklandı.

PCNA boyanma derecesi değerlendirilirken lamalar üzerinde 1000 büyük büyütme alanında rastgele seçilen mikroskop alanlarında PCNA ile boyanan ve boyanmayan hücreler sayıldı. Toplam 500 hücrede değerlendirme yapıldı. Boyanma gösteren hücrelerin sayısının, toplam hücre sayısına oranı yüzde olarak hesaplandı.

$$\text{PCNA pozitif hücre indeksi (\%)} = \frac{\text{PCNA pozitif kript hücre sayısı}}{\text{Toplam kript hücre sayısı}} \times 100$$

3.2.2. Aktif Kaspaz-3 İmmünohistokimyası

Deparafinizasyon ve rehidratasyon işlemlerinden sonra distile suya alınan kesitler, antijen iyileştirmesi için sitrat tamponla (pH 6) mikrodalga fırında 700 Watt'ta 10 dakika inkübe edildi. 3 kez 5'er dakika hazırlanmış olan PBS (fosfatla tamponlu tuz çözeltisi, pH 7.4) ile yıkanan kesitler, membran permeabilizasyonu için distile su ile hazırlanan % 0.3'lük Triton X-100 ile 5 dakika inkübe edildi. Endojen peroksidaz

aktivitesini kaldırmak için kesitler 15 dakika peroksidaz engelleyici (Invitrogen, 00-2015) çözeltisinde bekletildi. PBS ile yıkamanın ardından Histostain-Plus Broad Spektrum Kit (Invitrogen, 85-9043) kullanılarak kitin önerdiği şekilde işlemlere devam edildi. PBS ve % 3'lük Triton X-100 ile 1:50 oranında sulandırılarak hazırlanan aktif kaspaz-3 primer antikoru (Novus Biologicals, NB600-1235) ile + 4 °C'de bir gece boyunca inkübe edildi. Bu aşamada negatif kontrol kesitlere sadece PBS uygulandı. İnkübasyon sonrasında yıkama işlemi 15 dakika, biyotinlenmiş sekonder antikor 30 dakika ve tekrar yıkamadan sonra streptavidin peroksidaz 15 dakika uygulandı. Son yıkama işleminden sonra yaklaşık 20 dakika kromojen olarak AEC (3-Amino-9-Etilkarbazol) (Invitrogen, 00-2007) damlatıldı ve renk oluşumu gözlemlendi. Kesitler distile suya alınarak reaksiyon durduruldu. Zıt boyama amacıyla kesitlere 15 saniye Mayer Hematoksilin boyası (Santa Cruz Biotech., CAS 517-28-2) ile muamele edildi. Kapatma işlemi için su bazlı kapatıcı (Abcam, ab64230) kullanıldı. Kesitler inceleninceye kadar +4 °C'de saklandı.

Aktif kaspaz-3 boyanma derecesi değerlendirilirken lamalar üzerinde 1000 büyük büyütme alanında rastgele seçilen mikroskop alanlarında kaspaz-3 ile boyanan ve boyanmayan hücreler sayıldı. Toplam 500 hücrede değerlendirme yapıldı. Kaspaz-3 pozitif hücre sayısının, toplam hücre sayısına oranı yüzde olarak hesaplandı.

$$\text{Kaspaz-3 pozitif hücre indeksi (\%)} = \frac{\text{Kaspaz-3 pozitif kript hücre sayısı}}{\text{Toplam kript hücre sayısı}} \times 100$$

3.2.3. TNF- α İmmünohistokimyası

Kesitler deparafinizasyon ve rehidratasyon işlemlerinden sonra distile suya alındı. Daha sonra antijen iyileştirmesi için sitrat tamponla (pH 6) mikrodalga fırında 700 Watt'ta 10 dakika inkübe edildi. 3 kez 5'er dakika hazırlanmış olan PBS (fosfatla tamponlu tuz çözeltisi, pH 7.4) ile yıkanan kesitler, membran permeabilizasyonu için distile su ile hazırlanan % 0.3'lük Triton X-100 ile 10 dakika inkübe edildi. Endojen peroksidaz aktivitesini kaldırmak için kesitler 10 dakika peroksidaz engelleyici (Invitrogen, 00-2015) çözeltisinde bekletildi. PBS ile yıkamanın ardından Histostain-Plus Broad

Spektrum Kit (Invitrogen, 85-9043) kullanılarak kitin önerdiği şekilde işlemlere devam edildi. PBS ve % 3'lük Triton X-100 ile 1:50 oranında sulandırılarak hazırlanan anti-TNF- α primer antikoru (Novus Biologicals, NBP1-191532) ile kesitler oda ısısında bir saat boyunca inkübe edildi. Bu aşamada negatif kontrol kesitlere sadece PBS uygulandı. İnkübasyon sonrasında yıkama işlemi 15 dakika, biyotinlenmiş sekonder antikor 15 dakika ve tekrar yıkamadan sonra streptavidin peroksidaz 15 dakika uygulandı. Son yıkama işleminden sonra yaklaşık 15 dakika kromojen olarak AEC (3-Amino-9-Etilkarbazol) (Invitrogen, 00-2007) damlatıldı ve renk oluşumu gözlemlendi. Kesitler distile suya alınarak reaksiyon durduruldu. Zıt boyama amacıyla kesitlere 15 saniye Mayer Hematoksilin boyası (Santa Cruz Biotech., CAS 517-28-2) ile muamele edildi. Kapatma işlemi için su bazlı kapatıcı (Abcam, ab64230) kullanıldı. Kesitler inceleninceye kadar +4 °C'de saklandı.

TNF- α boyanma derecesi değerlendirilirken lamalar üzerinde 1000 büyük büyütme alanında rastgele seçilen mikroskop alanlarında TNF- α ile boyanan ve boyanmayan hücreler sayıldı. Toplam 500 hücrede değerlendirme yapıldı. Boyanma gösteren hücrelerin sayısının, toplam hücre sayısına oranı yüzde olarak hesaplandı.

$$\text{TNF-}\alpha \text{ pozitif hücre indeksi (\%)} = \frac{\text{TNF-}\alpha \text{ pozitif hücre sayısı}}{\text{Toplam hücre sayısı}} \times 100$$

3.3 BİYOKİMYASAL YÖNTEMLER

Diseksiyondan sonra biyokimyasal çalışmalar için PBS çözeltilisine alınan ve -80 °C de derin dondurucuda saklanan ince bağırsak dokularının analizlerine başlanmadan önce -20 °C'lik derin dondurucuda, daha sonra da + 4 °C'de bir süre bekletilerek çözümleri sağlandı. Çözünen örneklerden ağırlıkları hesaplanan dokular alınarak, cam homojenizatör içinde her bir kit için önerilen şekilde (Bölüm: 3.3.2 ve 3.3.3) homojenize edildi. Homojenize edilen doku örnekleri Sigma 3K30 cihazı ile santrifüj edildi.

Dokudaki protein miktarları spektrofotometrik olarak tayin edildi ve ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) çalışmaları için Katalaz ELISA kit (Cell Biolabs, STA-341) ve total GSH ELISA kit (Cell Biolabs, STA-312) prosedürleri uygulandı.

3.3.1. Total Protein Tayini

Her bir doku 20 ml/g doku olacak şekilde % 5 metafosforik asit ile homojenize edildi. Homojenatlar +4 °C'de 12.000 g'de 15 dakika santrifüjlendi. Berrak süpernatantlar ölçüm için kullanıldı. Dokuda protein miktar tayini için Lowry metodu kullanıldı (Lowry ve diğ., 1951). Proteinlerin yapısındaki aromatik halka içeren amino asitler, alkali ortamda ve bakır varlığında folin reaktifinde bulunan fosfomolibdotungustik asiti indirgeyerek mavi renkli bir kompleks oluşturur. Oluşan mavi rengin spektrofotometrede 500 nm dalga boyunda verdiği absorbans şiddeti, protein konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.

Tayin İçin Kullanılacak Olan Çözeltilerin Hazırlanışı :

A Reaktifi : % 2 sodyum karbonat (Na_2CO_3), 0,1 N NaOH içerisinde çözüldü.

B Reaktifi : % 0.5 bakır sülfat pentahidrat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), % 1 potasyum tartarat içerisinde çözüldü.

C Reaktifi (Alkali bakır sülfat çözeltisi) : 50 ml A reaktifi ile 1 ml B reaktifinin karıştırılmasıyla hazırlandı.

E Reaktifi : Merck, HC807325 marka Folin reaktifi kullanıldı.

Standart Çözelti : % 100'lük sıgır serum albumin (BSA)'den (Sigma, A7906), % 0.9 serum fizyolojik ile stok çözelti oluşturuldu. Bu stoktan seyreltmeler yapılarak % 5, % 10, % 15 ve % 20'lik çalışma standart çözeltileri hazırlandı.

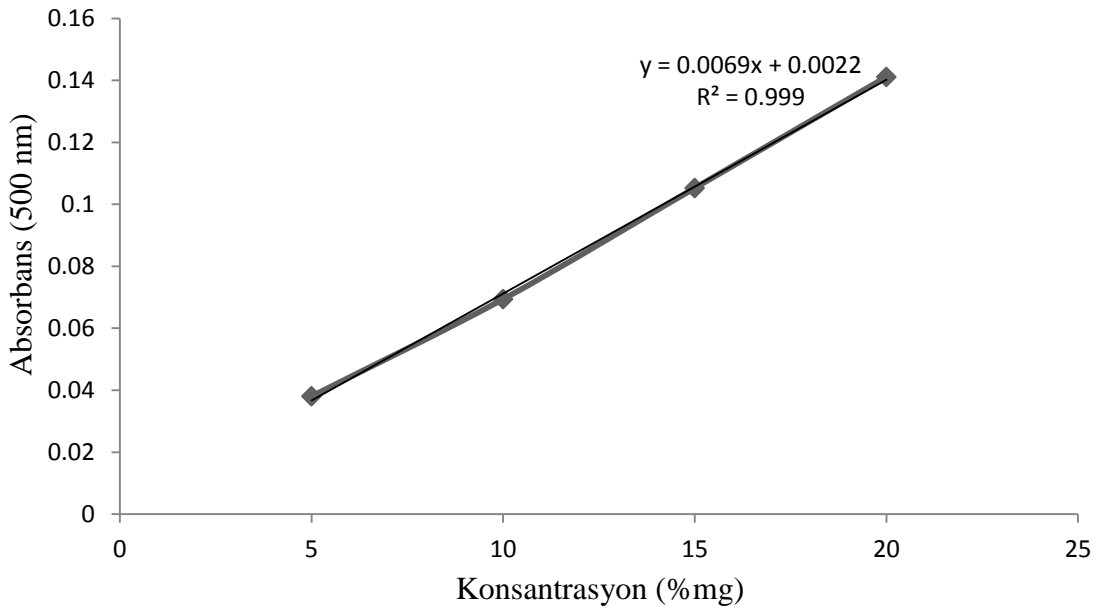
Doku Süpernatantı : % 0.9 serum fizyolojik ile 100 kat seyreltilerek hazırlandı.

Tablo 3.1: Total protein standart çözeltilerinin hazırlanışı.

	Kör	Standart	Örnek
C reaktifi	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml
FTS	0.5 ml	-	-
Standartçözelti	-	0.5 ml	-

Karışımlar hazırlandıktan sonra karıştırılıp, oda ısısında 10 dakika bekletildi. Takiben her bir tüpe 0.25 ml E reaktifi (Folin ayracı) eklenerek karıştırıldı ve oda ısısında 30 dakika bekletildi. Spektrofotometrede (Shimadzu UV-1700) 500 nm dalga boyunda absorbanslar köre karşı okundu.

Hesaplama: Standart çözeltilerin çalışılması sonucu her bir çalışma standardı için elde edilen yaklaşık 30 değer aritmetik ortalamasının hesaplanmasıyla elde edilen grafik yardımı ile total protein tayini yapıldı (Şekil 3.1).



Şekil 3.1: Total protein standart grafiği.

Grafikten elde edilen denklemden yararlanılarak % mg protein miktarı bulundu. Bulunan değer seyreltme katsayısı (100) ile çarpıldı.

3.3.2. Katalaz Tayini

İnce bağırsak dokularından Katalaz ELISA kitinin önerdiği (Cell Biolabs, STA-341) şekilde homojenizasyon yapıldı. Homojenatlardan elde edilen süpernatantlara kitin önerdiği protokole göre kolorimetrik ELISA yöntemi uygulanarak katalaz miktarı tayin edildi.

Çözeltilerin Hazırlanışı:

Tüm çözeltiler kullanılmadan önce oda ısısına getirildi.

Her bir doku 20 ml/g doku olacak şekilde PBS ile homojenize edildi. Homojenatlar +4 °C'de 10.000 g'de 15 dakika santrifüjlendi. Berrak süpernatantlar ölçüm için kullanıldı.

Deney seyrelticisi: Distile su ile 10 kat seyreltildi.

Örnek tampon: Distile su ile 5 kat seyreltildi.

Hidrojen peroksit çalışma çözeltisi: 5 µL stok çözelti 3,67 mL deney seyrelticisi ile seyreltilerek 8,82 M stok çözeltisinden 12 mM çalışma çözeltisi uygulamalardan hemen önce hazırlandı.

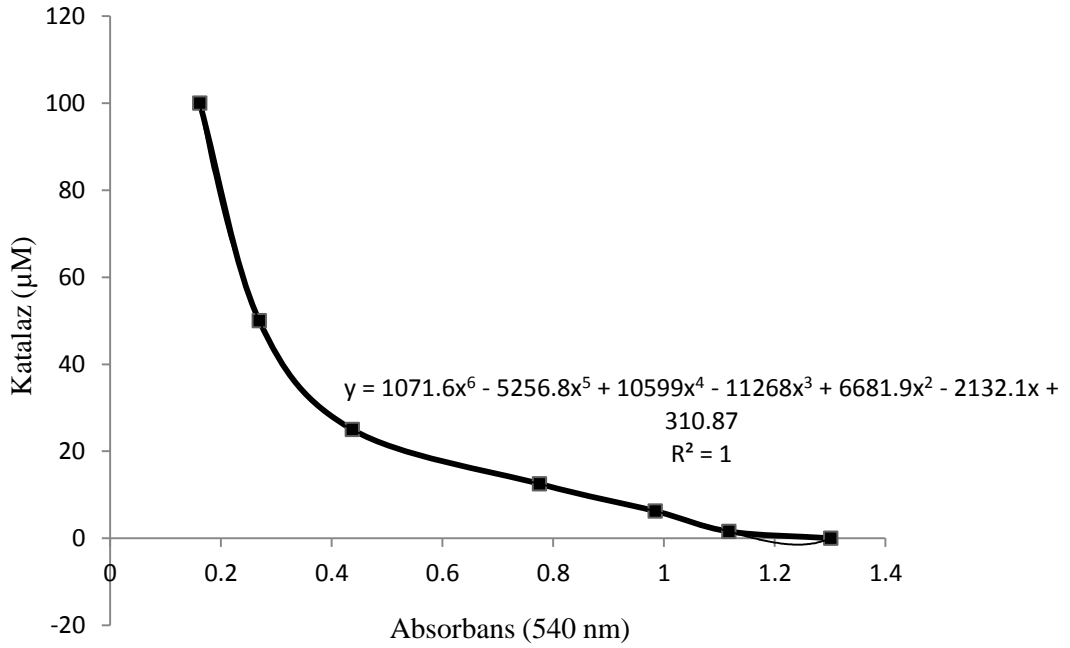
Kromojenik çalışma çözeltisi: Kromojenik A 1:100 oranında Kromojenik B ile dilüe edildi ve iyice karıştırıldı. Daha sonra kromojenik çalışma çözeltisinin her mL'sine 1 µL HRP katalizörü eklendi. Karıştırarak homojenize hale getirildi. Bu çözelti uygulamalardan hemen önce hazırlandı.

Katalaz standart çözeltisi: 600,000 ünite/mL stok çözelti örnek tampon ile 1: 60 oranında seyreltilerek hazırlandı.

Standartların hazırlanışı: 1. tüpe 990 µl, 2'den 8'e kadar numaralandırılan tüplerin hepsine 500 µl dilüsyon tamponu konuldu. 10 µl katalaz standart çözeltisi 1. Tüpe eklendi. 1. tüpteki karışımdan 500 µl mikropipetle çekilerek 2. tüpe aktarıldı. 2. tüpten çekilen 500 µl karışım 3. tüpe konuldu. 3. tüpten çekilen 500 µl karışım 4. tüpe eklendi. 4. tüpten çekilen 500 µl karışım 5. tüpe eklendi. 5. tüpten çekilen 500 µl karışım 6. tüpe eklendi. 6. tüpten çekilen 500 µl karışım 7. tüpe eklendi. En son 8. tüpten 500 µl karışım çekildi ve atıldı. Her bir işlemde 10 kez pipetaj yapıldı. 8 numaralı tüpe sadece 500 µl dilüsyon tamponu konuldu ve kör olarak kabul edildi. Örnekler kolorimetrik olarak ELISA okuyucuda 540 nm'de absorbanslar okundu. Sonuçlar katalaz aktivite kitinde belirtilen hesaplamalara göre yapılarak polinomial altıncı dereceden katalaz standart grafiği çizildi. Bu işlem 3 kez tekrar edildi. (Tablo 3.2).

Tablo 3.2: Katalaz standart çözeltilerinin hazırlanışı.

Tüpler	Standart Katalaz Konsantrasyonu (ünite/ml)	Katalaz Dilüsyon (µl)	Tamponu	Standart Çözelti (10.000 ünite/µl)
1	100	990		10 (standarttan)
2	50	500		500 (1'den)
3	25	500		500 (2'den)
4	12,5	500		500 (3'ten)
5	6,25	500		500 (4'ten)
6	3,125	500		500 (5'den)
7	1,5625	500		500 (6'dan)
8	0	500		Kör

**Şekil 3.2:** Katalaz standart grafiği.

3.3.3. Total Glutasyon (GSH) Tayini

İnce bağırsak dokularından total glutasyon tayin kitinin önerdiği (Cell Biolabs, STA-312) şekilde homojenizasyon yapıldı. Homojenatlardan elde edilen süpernatantlara kitin önerdiği protokole göre kolorimetrik ELISA yöntemi uygulanarak total glutasyon miktarı tayin edildi.

Çözeltilerin Hazırlanışı:

%5 Metafosforik asit: Doku homojenizasyonu için kullanıldı. Her bir doku 20 ml/g doku olacak şekilde % 5 metafosforik asit ile homojenize edildi. Homojenatlar +4 °C'de 12.000 g'de 15 dakika santrifüjlendi. Berrak süpernatantlar ölçüm için kullanıldı.

Deney tamponu: Distile su ile 5 kat seyreltildi.

Glutasyon Redüktaz: Stok çözelti seyreltilmiş deney tamponu ile 1:50 oranında seyreltilerek hazırlandı.

Kromojen: Deney seyrelticisi ile 1:15 oranında seyreltilerek hazırlandı.

NADPH: Stok çözelti seyreltilmiş deney tamponu ile 1:50 oranında seyreltilerek hazırlandı.

%5'lik MPA çözeltisi: 5 gramı 100 mL distile suda çözülerek hazırlandı. Standart çözeltiler için kullanıldı.

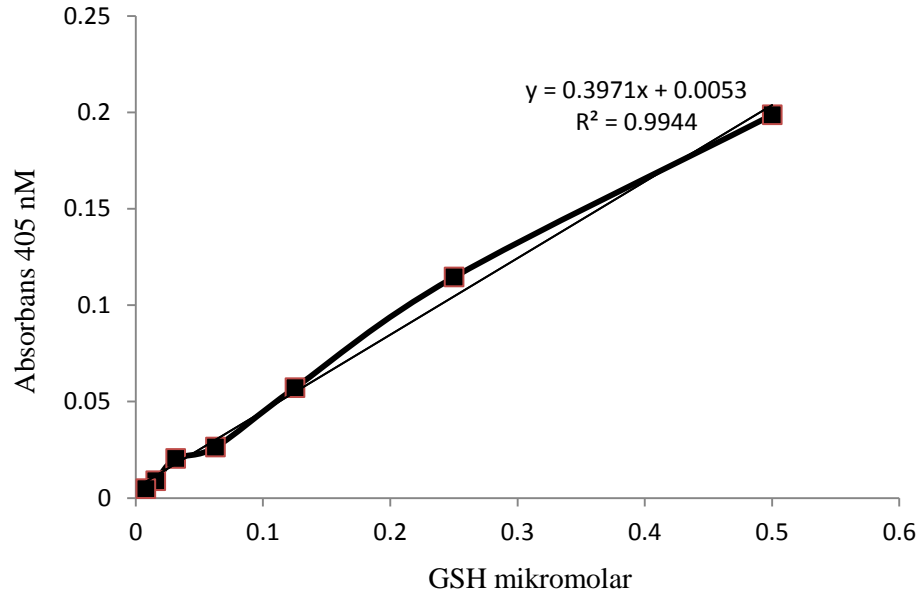
Glutasyon disülfid (GSSG) çözeltisi: GSSG stok çözeltisi %5'lik MPA çözeltisi ile 1:1000 oranında seyreltilerek hazırlandı.

Çözeltilerin tamamı uygulamalardan hemen önce hazırlandı.

Standartların hazırlanışı: 1'den 8'e kadar numaralandırılan tüplerin hepsine 500 µl %5 lik MPA çözeltisi konuldu. 500 µl glutasyon disülfid (GSSG) çözeltisi 1. Tüpe eklendi. 1. tüpteki karışımdan 500 µl mikropipetle çekilerek 2. tüpe aktarıldı. 2. tüpten çekilen 500 µl karışım 3. tüpe konuldu. 3. tüpten çekilen 500 µl karışım 4. tüpe eklendi. 4. tüpten çekilen 500 µl karışım 5. tüpe eklendi. 5. tüpten çekilen 500 µl karışım 6. tüpe eklendi. 6. tüpten çekilen 500 µl karışım 7. tüpe eklendi. En son 8. tüpten 500 µl karışım çekildi ve atıldı. Her bir işlemde 10 kez pipetaj yapıldı. 8 numaralı tüpe sadece 500 µl %5'lik MPA çözeltisi konuldu ve kör olarak kabul edildi. Örnekler kinetik olarak ELISA okuyucuda 405 nm'de absorbanslar okundu. Sonuçlar total glutasyon kitinde belirtilen hesaplamalara göre yapılarak doğrusal total glutasyon standart grafiği çizildi. Bu işlem 3 kez tekrar edildi (Tablo 3.3).

Tablo 3.3: GSH standart çözeltilerinin hazırlanışı.

Tüpler	Standart Glutasyon Konsantrasyonu (ng/ml)	Dilüsyon Tamponu (µl)	Standart Çözelti (µl)
1	0,5	500	500 (standarttan)
2	0,25	500	500 (1'den)
3	0,125	500	500 (2'den)
4	0,0625	500	500 (3'ten)
5	0,03125	500	500 (4'ten)
6	0,0156	500	500 (5'den)
7	0,0078	500	500 (6'dan)
8	0	500	Kör

**Şekil 3.3:** Total glutasyon standart grafiği.

3.4. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

Histolojik, immünohistokimyasal ve biyokimyasal veriler, SPSS (Statistical package for the social sciences, 17. 0) istatistik programı kullanılarak değerlendirildi. Tüm parametreler için varyansların homojenliği testi uygulandı. Histolojik ve immünohistokimyasal parametreler için Kruskal-Wallis testi ile tüm gruplar arasında anlamlılık olup olmadığı belirlendi. Ardından ikili gruplar arasında Mann-Whitney U testi uygulandı. Biyokimyasal parametreler için tek yönlü ANOVA testi ile tüm gruplar arasında anlamlılık olup olmadığı belirlendi. Ardından ikili gruplar arasındaki anlamlılığı belirlemek için bağımsız student-t testi kullanıldı. Sonuçlar 'ortalama \pm standart hata' olarak verildi. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

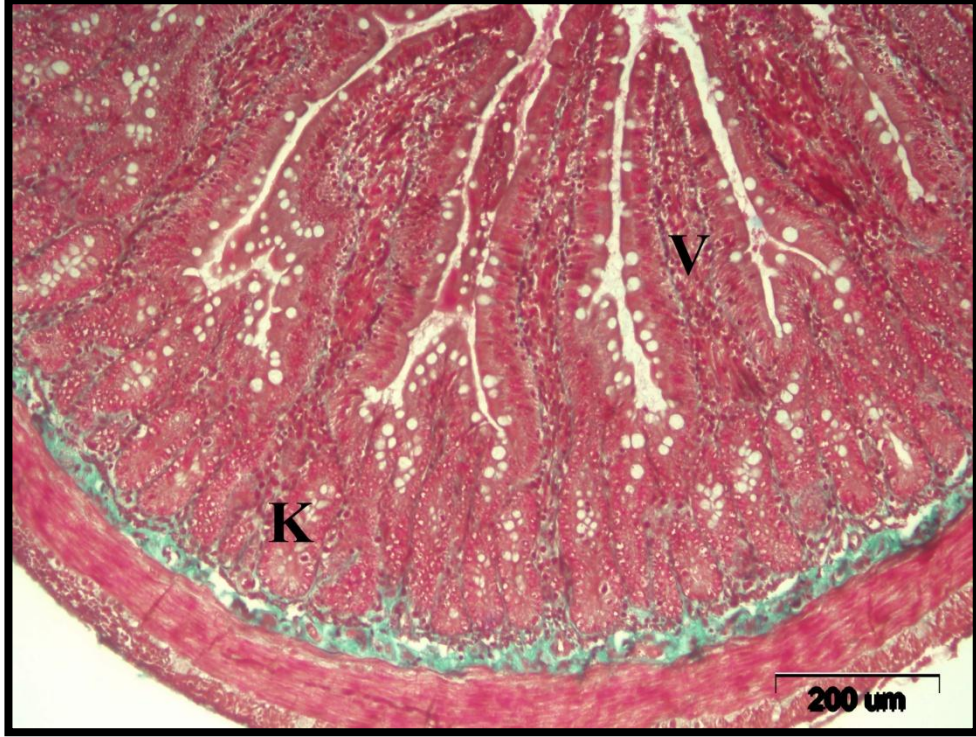
4.1. HİSTOLOJİK BULGULAR

Kontrol ve deney gruplarına ait sıçanların ince bağırsak morfolojileri ışık mikroskopik olarak incelendi ve elde edilen bulgular beş grup altında toplandı.

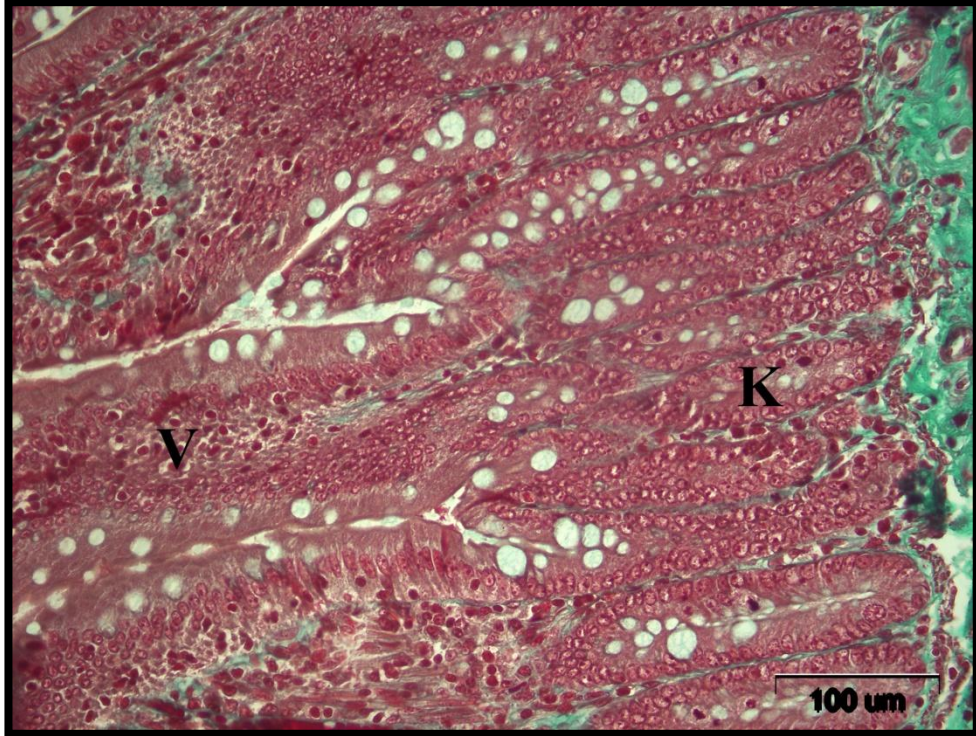
4.1.1. Kontrol Grubuna Ait Histolojik Bulgular

Kontrol grubuna ait histolojik kesitlerde ince bağırsak dokusunun normal histolojik görünümü hakimdi. HE, Masson'un üçlü boyası ve PAS reaksiyonu uygulanan kesitlerde ince bağırsağın jejunum bölgesinde lümeneye doğru epitel ve lamina propria'nın yaptığı çıkıntılar olan ince uzun villuslarda epitel, tek katlı silindirik epiteldir. Villuslar arasında yer alan Lieberkühn bezlerinde de villus epiteli devam etmektedir. Bu epitel uzun, silindirik, absorptif (emici) hücreler ile bu hücreler arasında yer alan goblet hücrelerinden oluşmuştur (Şekil 4.1, 4.2, 4.3).

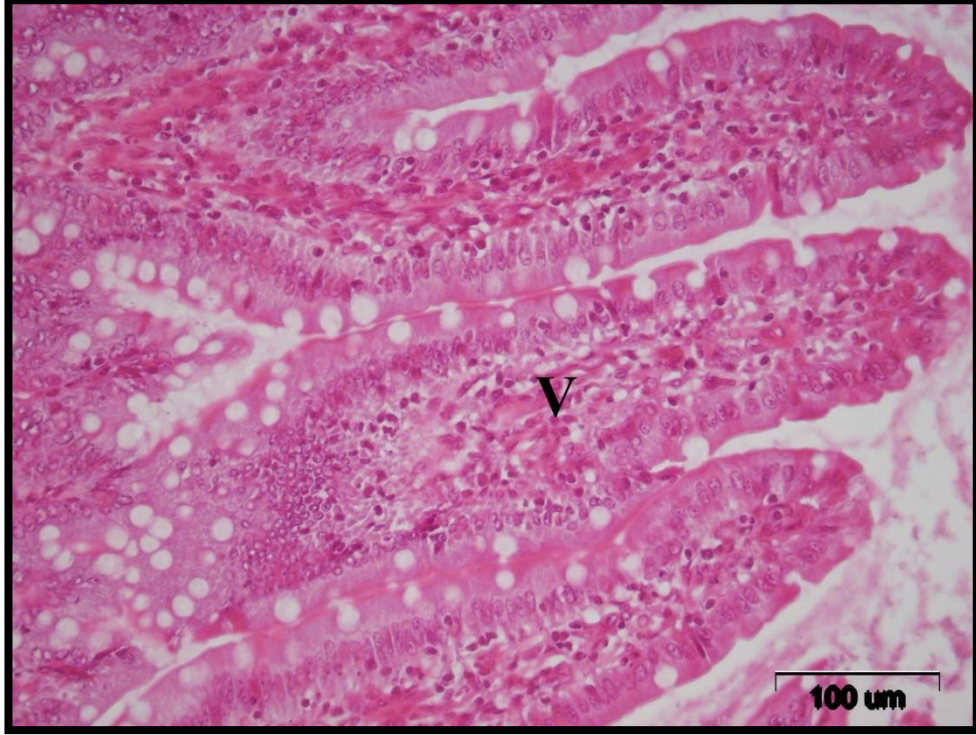
Absorptif hücreler apikal yüzeylerinde çizgili kenarı içerirler. Goblet hücreleri ise absorptif hücreler arasında yer alan, mukus içeren ve salgılayan hücrelerdir. Bu hücrelerin mukus salgısı ve absorptif hücrelerin çizgili kenarı şiddetli PAS pozitif reaksiyon vermektedir (Şekil 4.4).



Şekil 4. 1: Kontrol grubuna ait sıçanların jejunumunun genel görünümü, V: villus, K: kript, Masson, Bar: 200 µm.



Şekil 4.2: Kontrol grubuna ait sıçanların jejunumunun genel görünümü, V: villus, K: kript, Masson, Bar: 100 µm.



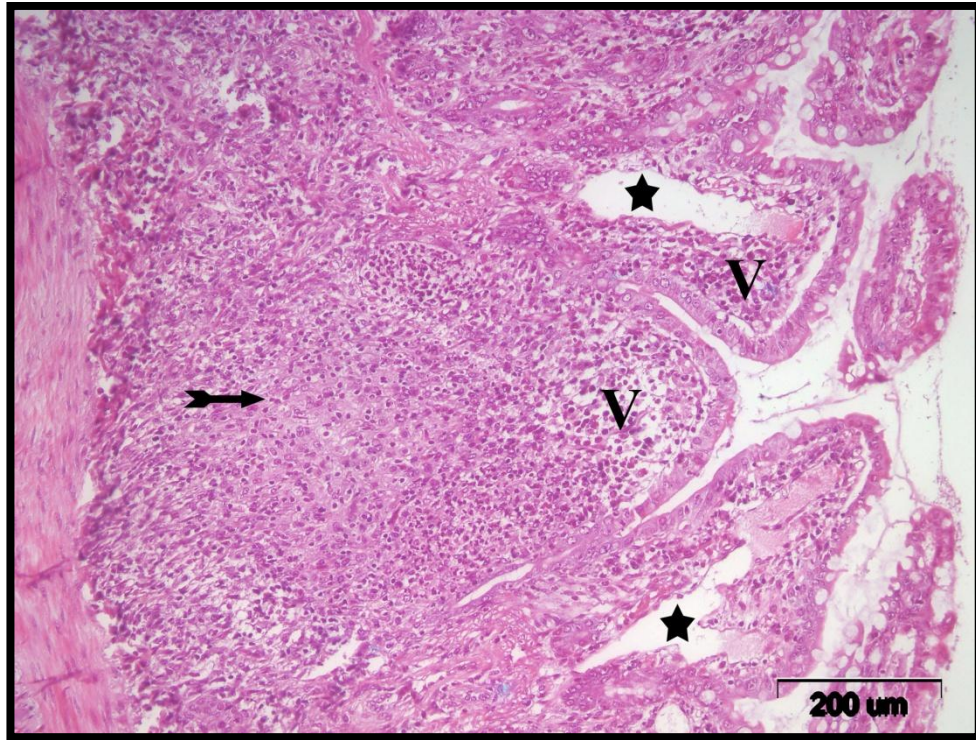
Şekil 4.3: Kontrol grubuna ait villusların genel görünümü, V: villus, HE, Bar: 100 μm.



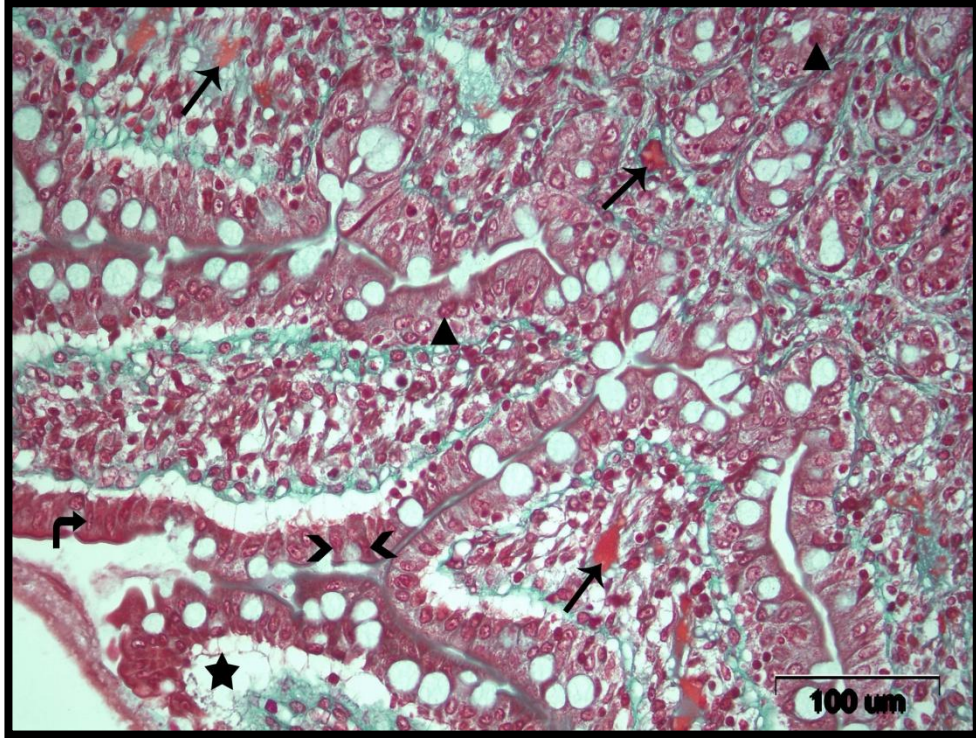
Şekil 4.4: Kontrol grubuna ait jejunumun çizgili kenarında (▴) ve goblet hücrelerinde (→) gözlenen şiddetli PAS pozitif reaksiyon, Bar: 100 μm.

4.1.2. Radyasyon Grubuna Ait Histolojik Bulgular

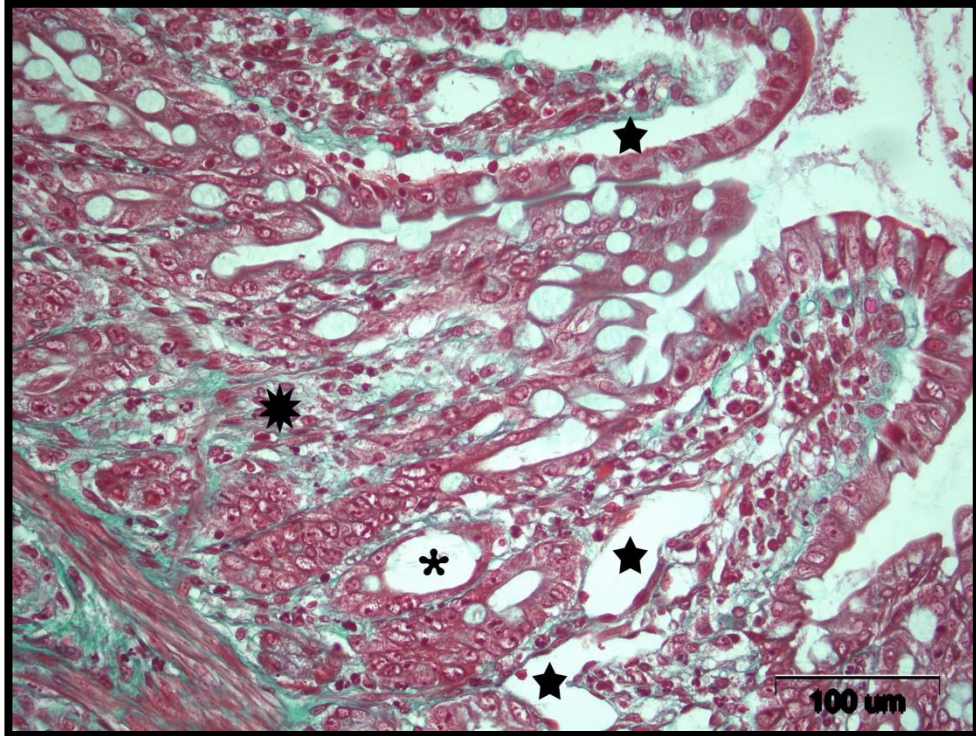
Radyasyon grubuna ait bireyler, kontrol grubu bireylerle karşılaştırıldığında mikroskopik olarak dokuda belirgin bir hasarın meydana geldiği tespit edilmiştir. İnflamatuvar hücre infiltrasyonu, villuslarda kısalma ve genişleme, villus bütünlüğünde bozulma ve kayıp, hiperemi, koyu dar sitoplazmik reaksiyon veren hücre sayısında artış, epitel hücrelerinde hiperplazi ve vakuolizasyon, villusların lamina propriyasında ödem, piknotik nükleus bu grupta belirgin olarak gözlenen bulgulardır. Bu bulguların yanında bez bütünlüğünde bozulma ve kayıp, mukozada nekrotik alanlar gözlenmiştir (Şekil 4.5, 4.6, 4.7, 4.8). PAS pozitif reaksiyon veren goblet hücre sayısında, bu hücrelerdeki ve çizgili kenardaki PAS pozitif reaksiyon şiddetinde kontrol bireyelerine göre belirgin azalma gözlenirken, villuslar arasında ve çizgili kenarların hemen üzerinde görülen PAS pozitif reaksiyonda artış gözlenmiştir (Şekil 4.9).



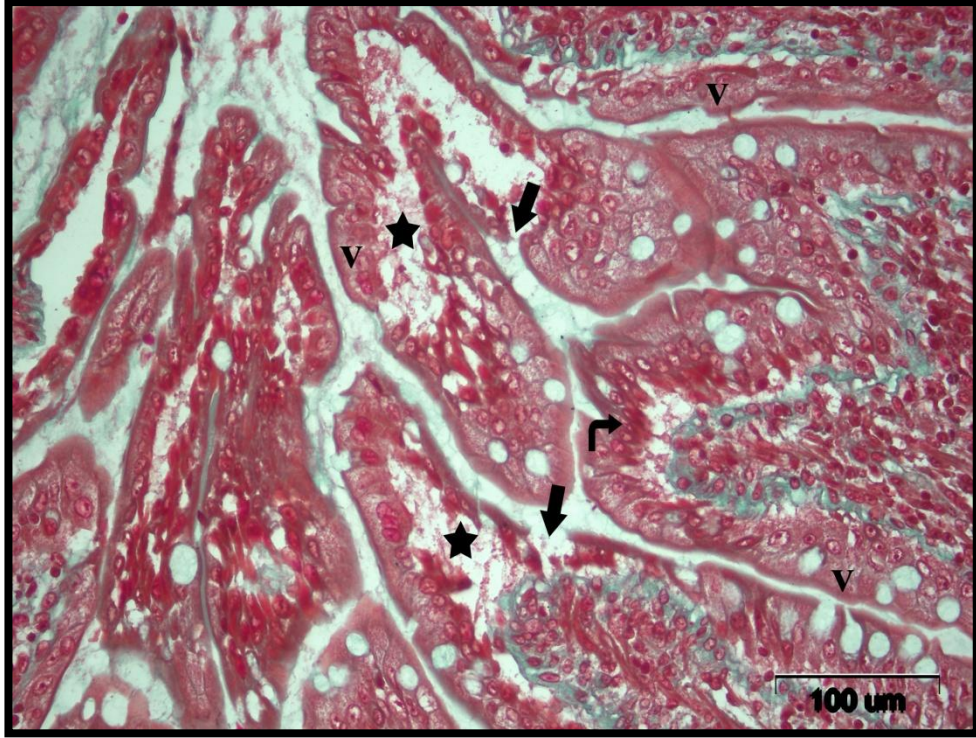
Şekil 4.5: Radyasyon grubuna ait sıçanların ince bağırsağının jejunum bölgesinde inflamatuvar hücre infiltrasyonu (↔), Ödem (★), Villuslarda kısalma ve genişleme (V), HE, Bar: 200 μm.



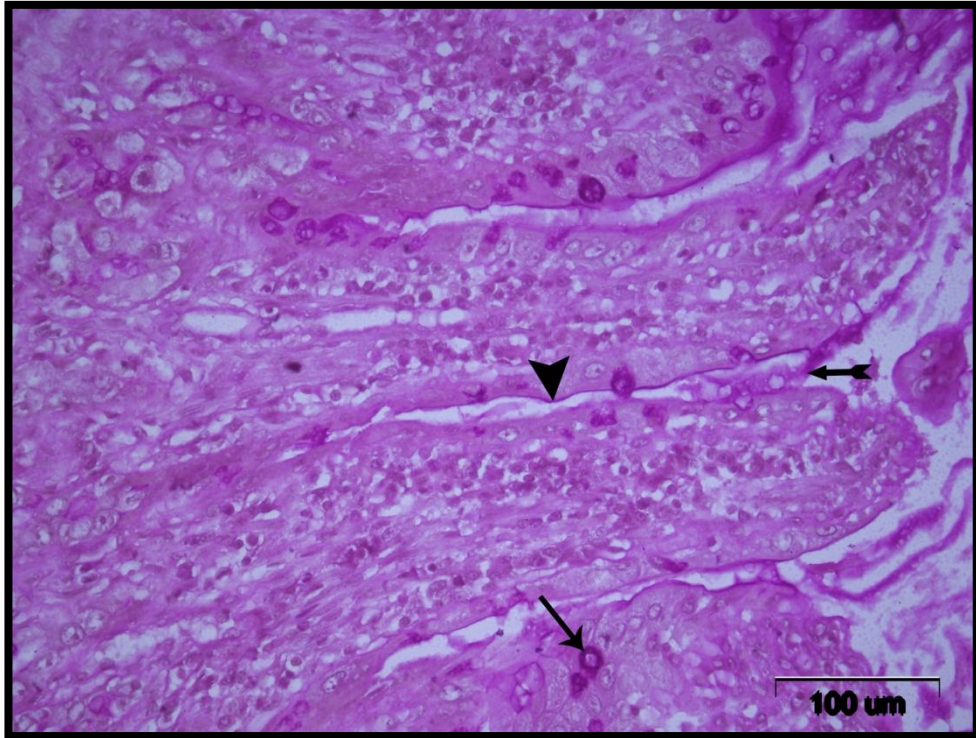
Şekil 4.6: Radyasyon grubunun jejunumunda hiperemi(→), hiperplazi (↷), koyu dar sitoplazmik reaksiyon veren hücreler (➤), piknotik nükleus (▲), ödem (★), Masson, Bar: 100 μm.



Şekil 4.7: Radyasyon grubunun jejunumunda nekrotik alan (✱), bez bütünlüğünde bozulma (✱), ödem (★), Masson, Bar: 100 μm.



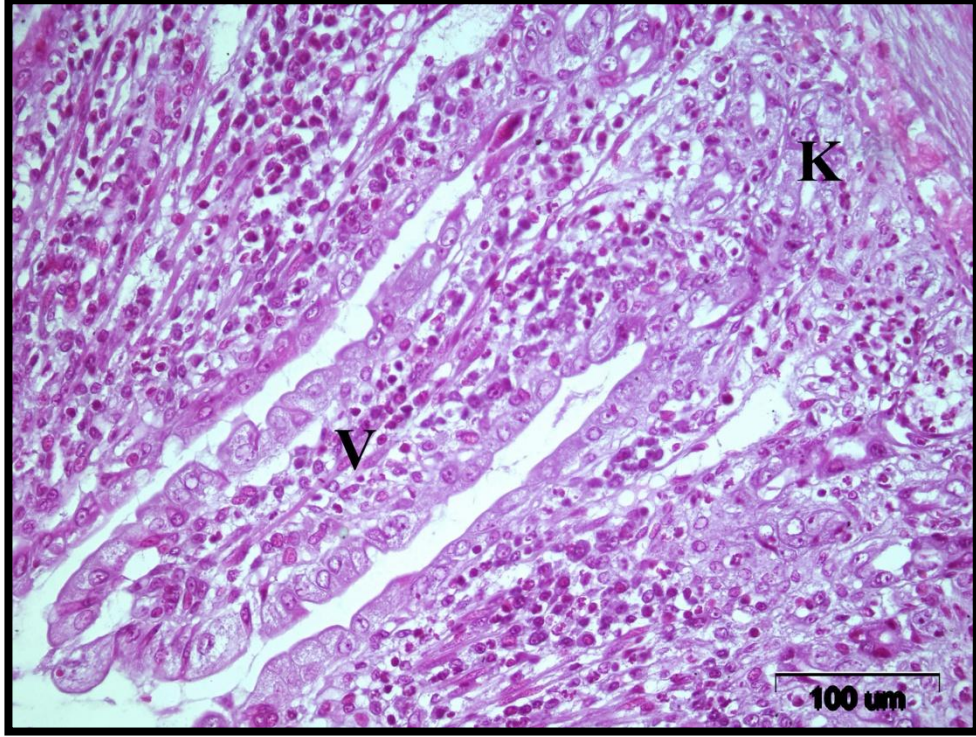
Şekil 4.8: Radyasyon grubunun jejunumunda villus bütünlüğünde bozulma (→), ödem (★), hiperplazi (↗), vakuolizasyon (v), Masson, Bar: 100 µm.



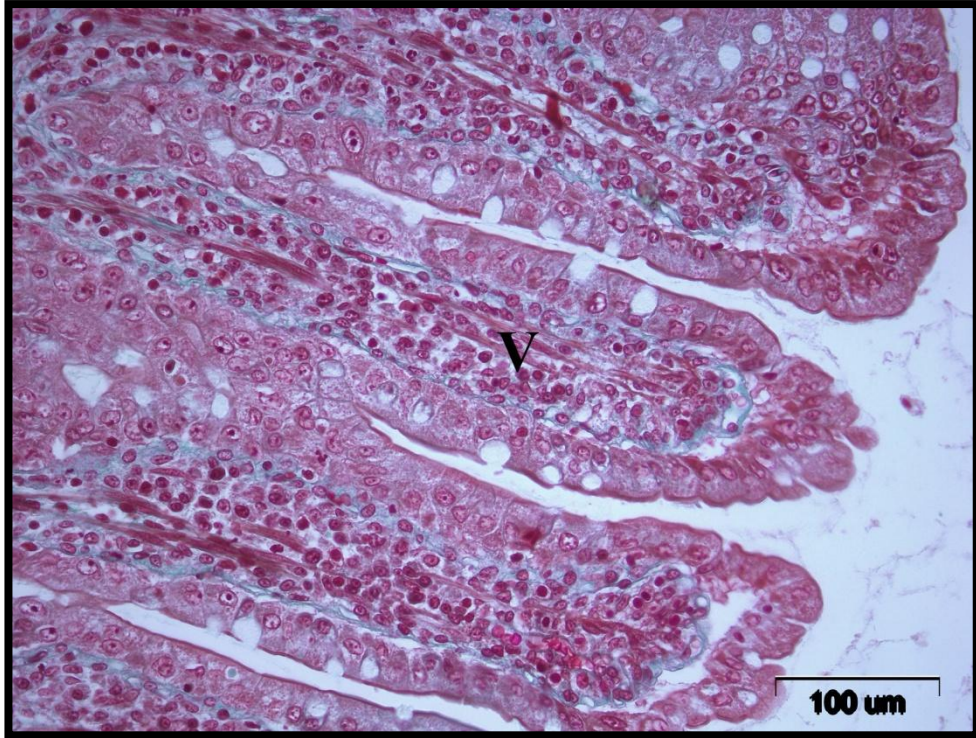
Şekil 4.9: Radyasyon grubunun jejunumuna ait goblet hücrelerinde (→) ve çizgili kenarında (▶) PAS pozitif reaksiyon şiddetinde azalma, goblet hücre sayısında azalma ve villuslar arasında ve villusların çizgili kenarlarının hemen üzerinde görülen PAS pozitif reaksiyonda artma (↗), Bar: 100 µm.

4.1.3. Radyasyon + Melatonin Grubuna Ait Histolojik Bulgular

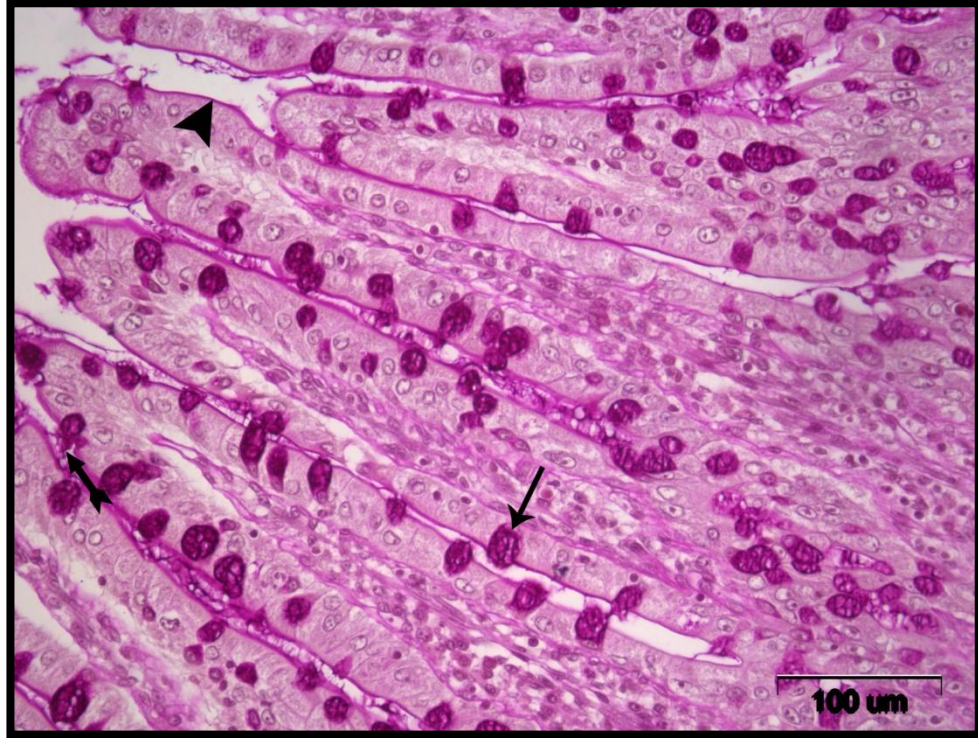
Radyasyon ve melatoninin birlikte verildiği grupta, radyasyon grubunda görülen villus ve bez bütünlüğünde bozulma ve kayıp, inflamatuvar hücre infiltrasyonu, nekrotik alan, hiperemi, villusların lamina propriyasında ödem, villuslarda kısalma ve genişleme, koyu dar sitoplazmik reaksiyon veren hücre sayısı ve epitel hücrelerinde vakuolizasyon bulgularında belirgin bir azalma olduğu tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra villus epitel hücrelerinde gözlenen hiperplazi ve piknotik nükleus sayısı kontrol gruplarının bulgularına yakın bulunmuştur. Ayrıca, piknotik nükleus, nekrotik alan, bez bütünlüğünde bozulma ve kayıp bulguları açısından radyasyon + karnozin ve radyasyon + karnozin + melatonin grupları ile kıyaslandığında azalma gözlenmiştir (Şekil 4.10, 4.11). Bu gruba ait kesitlerin PAS pozitif reaksiyon veren goblet hücre sayısında, bu hücrelerdeki ve çizgili kenardaki PAS pozitif reaksiyon şiddetinde radyasyon grubuna göre belirgin artış gözlenirken, villuslar arasında ve çizgili kenarların hemen üzerinde görülen PAS pozitif reaksiyonda azalma gözlenmiştir (Şekil 4.12).



Şekil 4.10: Radyasyon + Melatonin grubuna ait jejunumun genel görünümü, V: villus, K: kript, HE, Bar: 100 µm.



Şekil 4.11: Radyasyon + Melatonin grubuna ait villusların genel görünümü, V: villus, Masson, Bar: 100 µm.



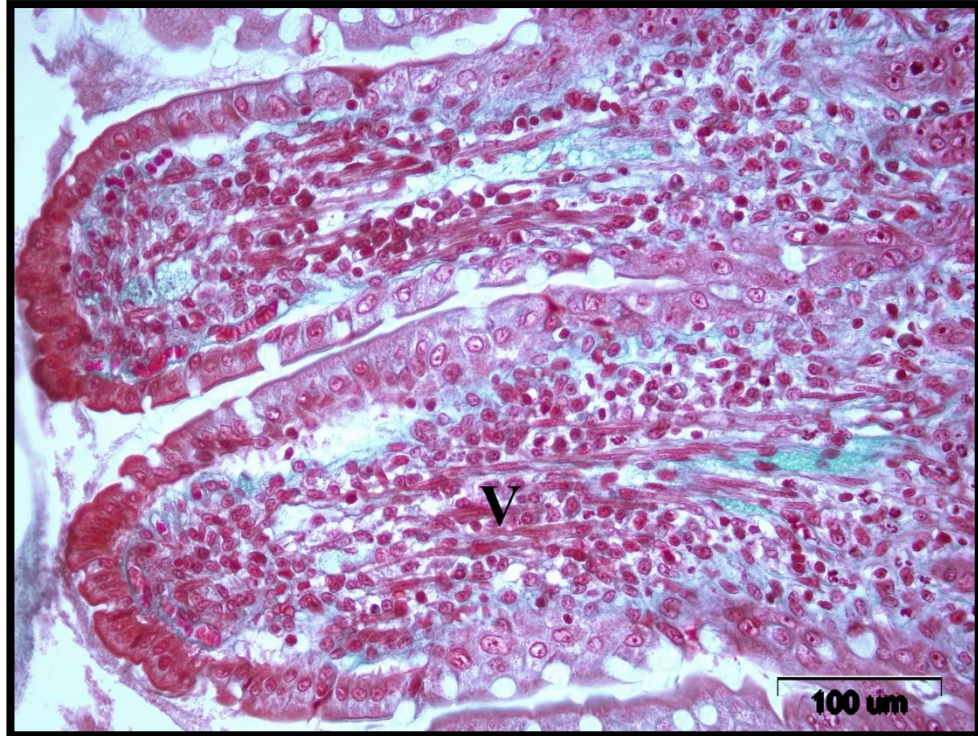
Şekil 4.12: Radyasyon + Melatonin grubuna ait jejunumun çizgili kenarında (►), goblet hücrelerinde (→) gözlenen şiddetli PAS pozitif reaksiyon ve villusların arasında ve villusların çizgili kenarlarının hemen üzerinde görülen PAS pozitif reaksiyonda azalma (↔), Bar: 100 μm.

4.1.4. Radyasyon + Karnozin Grubuna Ait Histolojik Bulgular

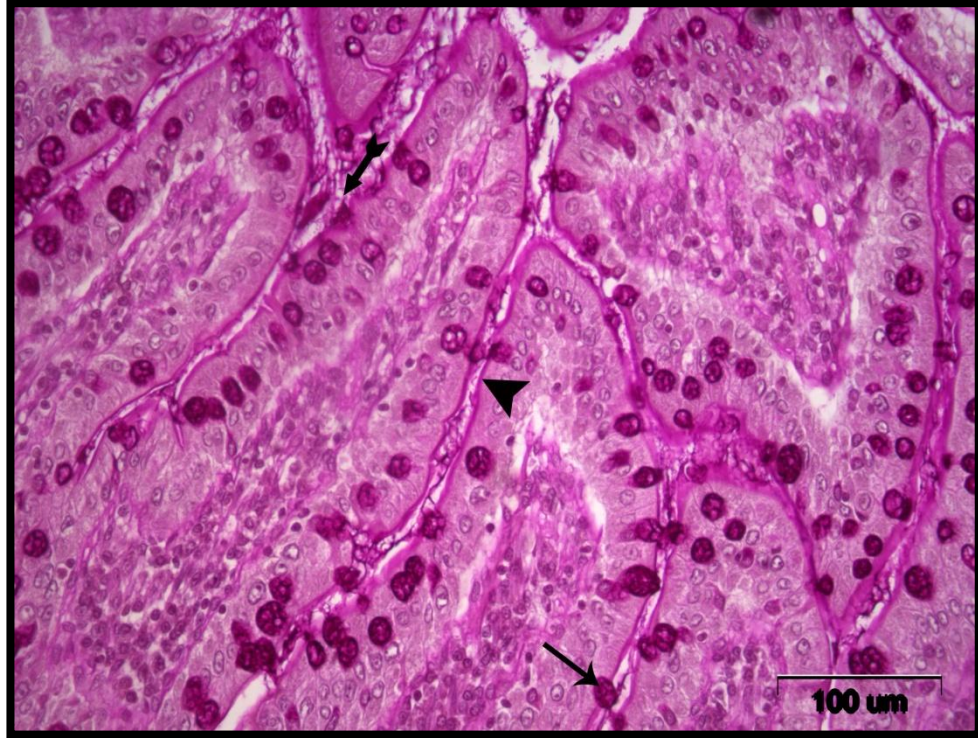
Radyasyon ve karnozinin birlikte verildiği grupta, radyasyon grubunda görülen villus ve bez bütünlüğünde bozulma ve kayıp, inflamatuvar hücre infiltrasyonu, nekrotik alan, villusların lamina propriyasında ödem, piknotik nükleus, villuslarda kısalma ve genişleme, koyu dar sitoplazmik reaksiyon veren hücre sayısı ve epitel hücrelerinde vakuolizasyon bulgularında belirgin bir azalma olduğu tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra villus epitel hücrelerinde gözlenen hiperplazi, hiperemi kontrol gruplarının bulgularına yakındı. Koyu dar sitoplazmik reaksiyon veren hücre sayısı ve villusların lamina propriyasında ödem bulguları bakımından radyasyon + melatonin ve radyasyon + karnozin + melatonin gruplarına göre azalma gözlenmiştir (Şekil 4.13, 4.14). Bu gruba ait kesitlerin PAS pozitif reaksiyon veren goblet hücre sayısında, bu hücrelerdeki ve çizgili kenardaki PAS pozitif reaksiyon şiddetinde radyasyon grubuna göre belirgin artış gözlenirken, villuslar arasında ve çizgili kenarların hemen üzerinde görülen PAS pozitif reaksiyonda azalma gözlenmiştir (Şekil 4.15).



Şekil 4.13: Radyasyon + Karnozin grubuna ait jejunumun genel görünümü, V: villus, K: kript, HE, Bar: 200 µm.



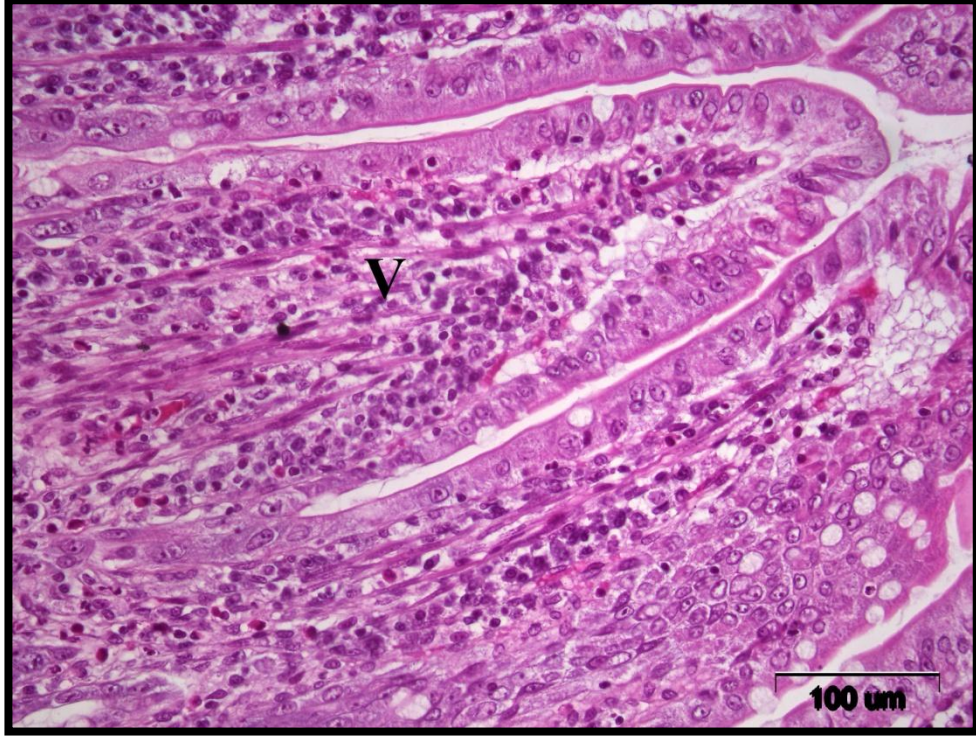
Şekil 4.14: Radyasyon + Karnozin grubuna ait villusların genel görünümü, V: villus, Masson, Bar: 100 µm.



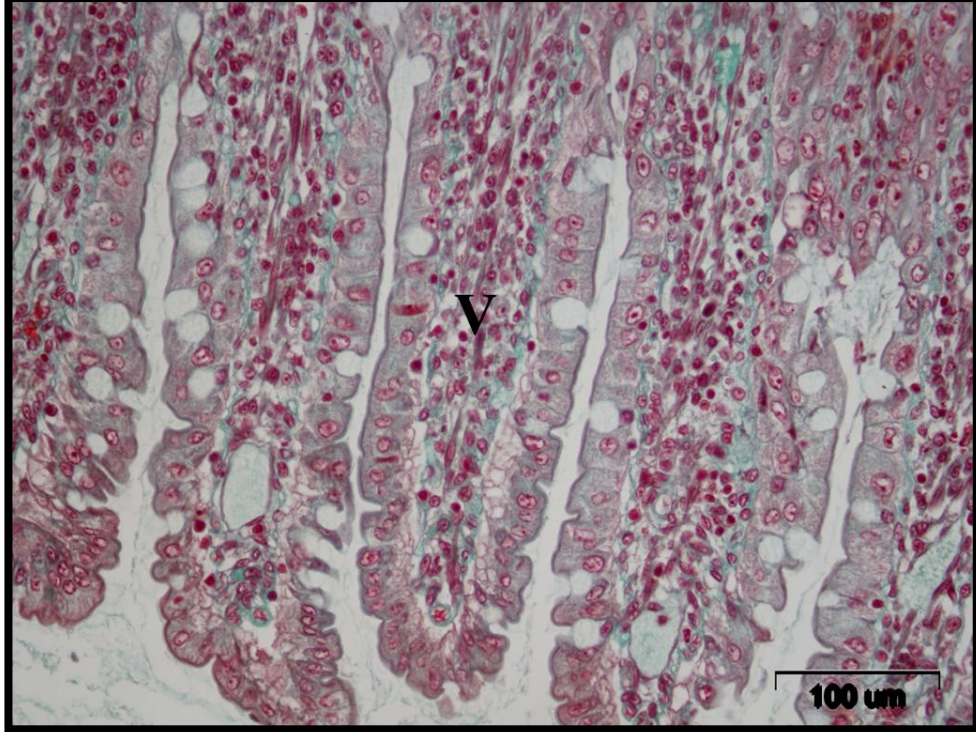
Şekil 4.15: Radyasyon + Karnozin grubuna ait jejunumun çizgili kenarında (▶), goblet hücrelerinde (→) gözlenen şiddetli PAS pozitif reaksiyon ve villusların arasında ve villusların çizgili kenarlarının hemen üzerinde görülen PAS pozitif reaksiyonda azalma (➔), Bar: 100 μm.

4.1.5. Radyasyon + Karnozin + Melatonin Grubuna Ait Histolojik Bulgular

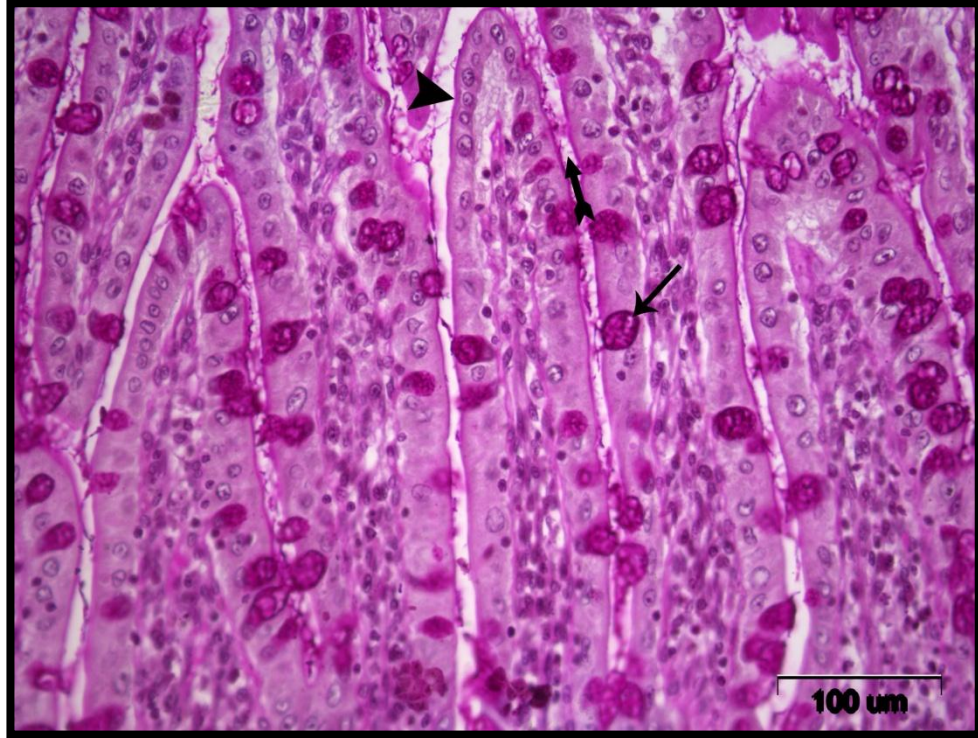
Radyasyon, karnozin ve melatonin birlikte verildiği grupta radyasyon grubunda görülen villus ve bez bütünlüğünde bozulma ve kayıp, inflamatuvar hücre infiltrasyonu, piknotik nükleus, nekrotik alan, villusların lamina propriyasında ödem, mukoza hiperemi, villuslarda kısalma ve genişleme, koyu dar sitoplazmik reaksiyon veren hücre sayısı, epitel hücrelerinde vakuolizasyon bulgularında belirgin bir azalma olduğu tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra villus epitel hücrelerinde gözlenen hiperplazi kontrol gruplarının bulgularına yakındı. Ayrıca vakuolizasyon ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu bulguları bakımından radyasyon + melatonin ve radyasyon + karnozin gruplarına göre azalma gözlenmiştir (Şekil 4.16, 4.17). Bu gruba ait kesitlerin PAS pozitif reaksiyon veren goblet hücre sayısında, bu hücrelerdeki ve çizgili kenardaki PAS pozitif reaksiyon şiddetinde radyasyon grubuna göre belirgin artış gözlenirken, villuslar arasında ve çizgili kenarların hemen üzerinde görülen PAS pozitif reaksiyonda azalma gözlenmiştir (Şekil 4.18).



Şekil 4.16: Radyasyon + Karnozin + Melatonin grubuna ait villusların genel görünümü, V: villus, HE, Bar: 100 µm.



Şekil 4.17: Radyasyon + Karnozin + Melatonin grubuna ait villusların genel görünümü, V: villus, Masson, Bar: 100 µm.



Şekil 4.18: Radyasyon + Karnozin + Melatonin grubuna ait jejunumun çizgili kenarında (►), goblet hücrelerinde (→) gözlenen şiddetli PAS pozitif reaksiyon ve villusların arasında ve villusların çizgili kenarlarının hemen üzerinde görülen PAS pozitif reaksiyonda azalma (►►), Bar: 100 µm.

4.1.6. Histolojik Hasar Skoru

Epitel hücrelerinde hiperplazi, epitel hücrelerinde vakuolizasyon, koyu dar sitoplazmik reaksiyon veren hücre sayısında artış, villusların lamina propriasında ödem, villus bütünlüğünde bozulma ve kayıp, villuslarda kısalma ve genişleme, bez bütünlüğünde bozulma ve kayıp, mukozada inflamatuvar (mononükleer) hücre infiltrasyonu, mukozada hiperemi, mukozada nekrotik alan, piknotik nükleus sayısında artış gibi ışık mikroskobu kriterleri göz önüne alınarak her bir bireye ait jejunum kesitleri değerlendirildi. Her bir histolojik kriter 0 (hasarsız), 1 (az hasar), 2 (orta hasar), 3 (şiddetli hasar) veya 4 (çok şiddetli hasar) şeklinde derecelendirildi.

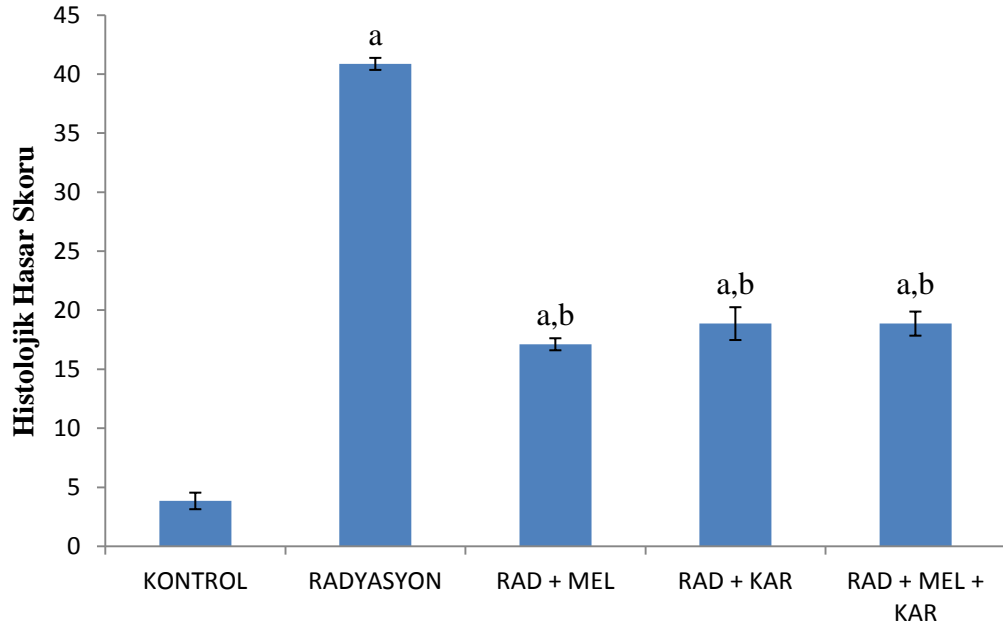
Işık mikroskobu ile tespit edilen yarı-kantitatif değerlendirme sonuçları Tablo 4.1’de ve istatistiksel olarak değerlendirilen bulgular Şekil 4.19’da gösterilmiştir. Bu histolojik kriterlere göre, hasar skoru en yüksek olan radyasyon grubu olmuştur. Kontrol grubu bireyleri ile kıyaslandığında diğer tüm gruplarda histolojik hasar skoru istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermiştir ($p < 0.001$). Radyasyon + melatonin, radyasyon +

karnozin ve radyasyon + melatonin + karnozin gruplarında hasar skoru radyasyon grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalış göstermiştir ($p<0.001$).

Tablo 4.1: Bağırsak dokusunun yarı-kantitatif olarak histolojik incelenmesi.

Histolojik Kriterler	Kontrol (n=7)	Rasyasyon Kontrol (n=8)	Radyasyon Melatonin (n=8)	Radyasyon Karnozin (n=8)	Radyasyon Karnozin Melatonin (n=8)
Epitel hücrelerinde hiperplazi	3	26	4	5	3
Epitel hücrelerinde vakuolizasyon	3	32	18	16	10
Koyu dar sitoplazmik reaksiyon veren hücre sayısı	1	25	11	7	11
Villusların lamina propriyasında ödem	3	29	18	14	18
Villus bütünlüğünde bozulma ve kayıp	5	32	21	21	21
Villuslarda kısalma ve genişleme	5	31	16	20	20
Bez bütünlüğünde bozulma ve kayıp	0	31	11	20	13
İnflamatuvar hücre infiltrasyonu	0	29	12	15	18
Mukozada hiperemi	3	30	10	3	10
Mukozada nekrotik alan	0	31	7	17	15
Piknotik Nükleus	4	31	9	13	12
Ortalama Değer	3,85	40,87	17,12	18,87	18,87

NOT: 0, 1, 2, 3 olarak skorlanan histolojik hasar bulguları bir gruptaki birey sayısı (n) dikkate alınarak verilmiştir.



Şekil 4.19: İnce bağırsağa ait histolojik hasar skoru. Her bir grup için elde edilen değerler “ortalama ± standart hata” olarak gösterilmiştir. Kontrol: 3.85 ± 0.7 , Radyasyon: 40.87 ± 0.51 , Rad+Mel: 17.12 ± 0.51 , Rad+Mel: $18.87 \pm 1,39$, Rad+Kar+Mel: 18.87 ± 1.02 .

^a Kontrol grubundan farklı ($p < 0.001$)

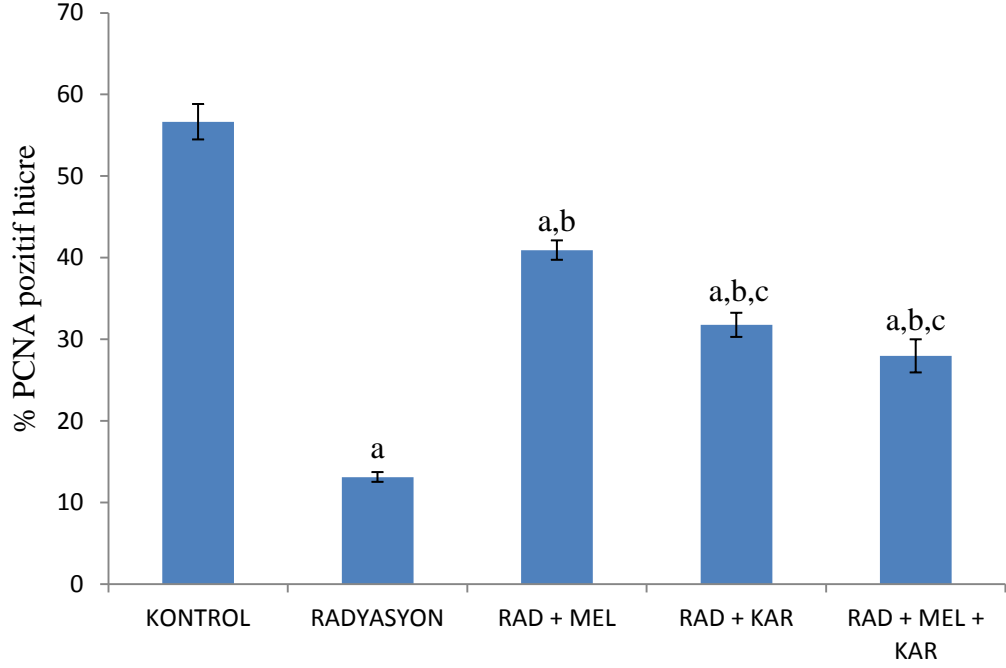
^b Radyasyon grubundan farklı ($p < 0.001$)

4.2. İMMUNOHİSTOKİMYASAL BULGULAR

4.2.1. PCNA İmmunohistokimyasına Ait Bulgular

İnce bağırsak dokularında yapılan immunohistokimyasal incelemeler sonucunda, boyanma derecesinden elde edilen istatistiksel verilere göre tüm gruplarda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenmiştir ($p < 0.05$). Radyasyon + melatonin, radyasyon + karnozin, radyasyon + karnozin + melatonin gruplarında radyasyon grubuna göre anlamlı bir artış gözlenmiştir. Ayrıca radyasyon + melatonin grubu radyasyon + karnozin ve radyasyon + karnozin + melatonin gruplarına göre anlamlı, radyasyon + karnozin grubu da radyasyon + karnozin + melatonin grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir artış göstermiştir (Şekil 4.20). Şekiller

incelendiğinde hücre çoğalma indeksinin belirlenmesinde kullanılan % PCNA pozitif kript hücre indeksi en fazla kontrol grubunda iken, radyasyon grubunda oldukça az olduğu izlenmektedir (Şekil 4.21-4.25).

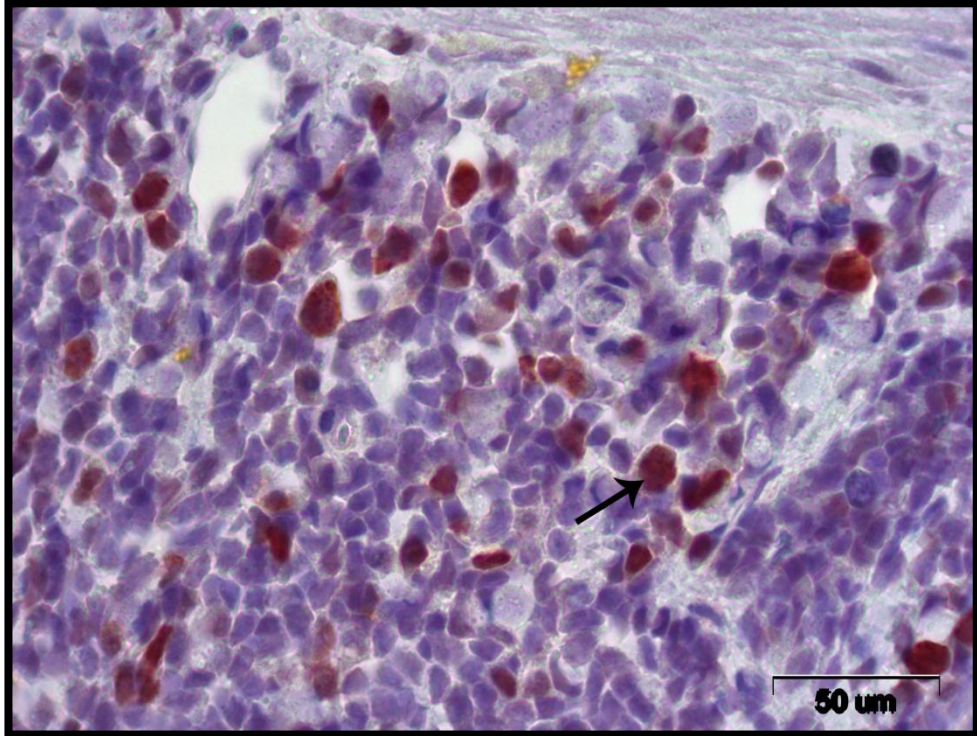


Şekil 4.20: Kript epitel hücrelerinde immunohistokimya ile tespit edilen % PCNA pozitif hücre sayısı. Her bir grup için elde edilen değerler 'ortalama ± standart hata' olarak gösterilmiştir. Kontrol: 56.65 ± 2.17, Radyasyon: 13.12 ± 0.6, Rad+Mel: 40.92 ± 1.19, Rad+Kar: 31.76 ± 1.48, Rad+Kar+Mel: 27.96 ± 2.03.

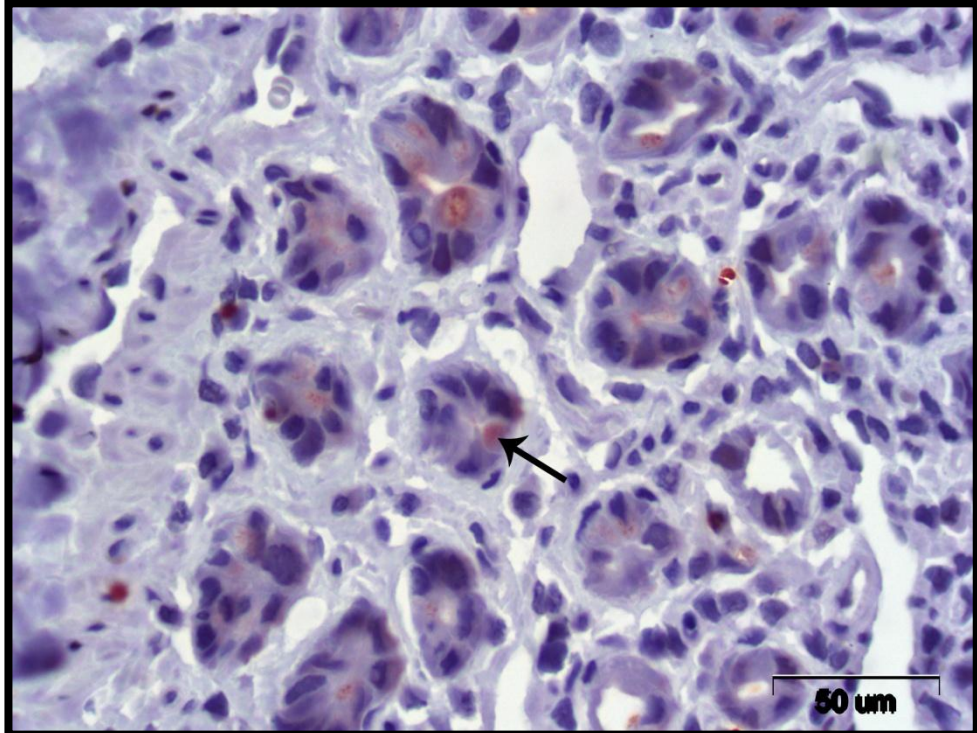
^a Kontrol grubundan farklı ($p < 0.05$)

^b Radyasyon grubundan farklı ($p < 0.01$)

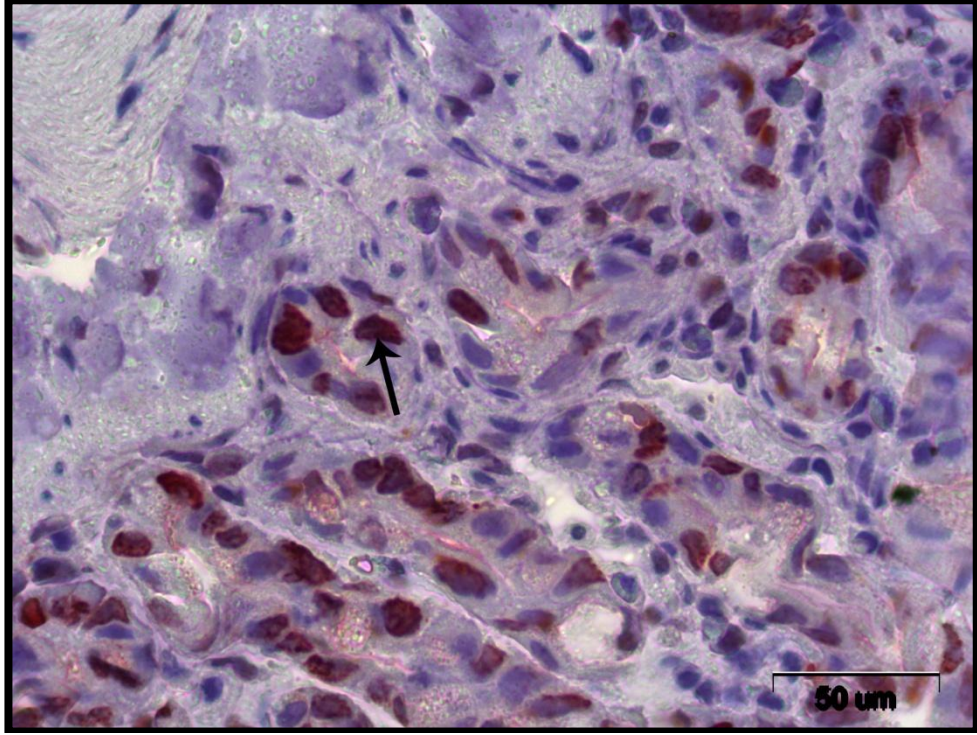
^c Radyasyon + melatonin grubundan farklı ($p < 0.01$)



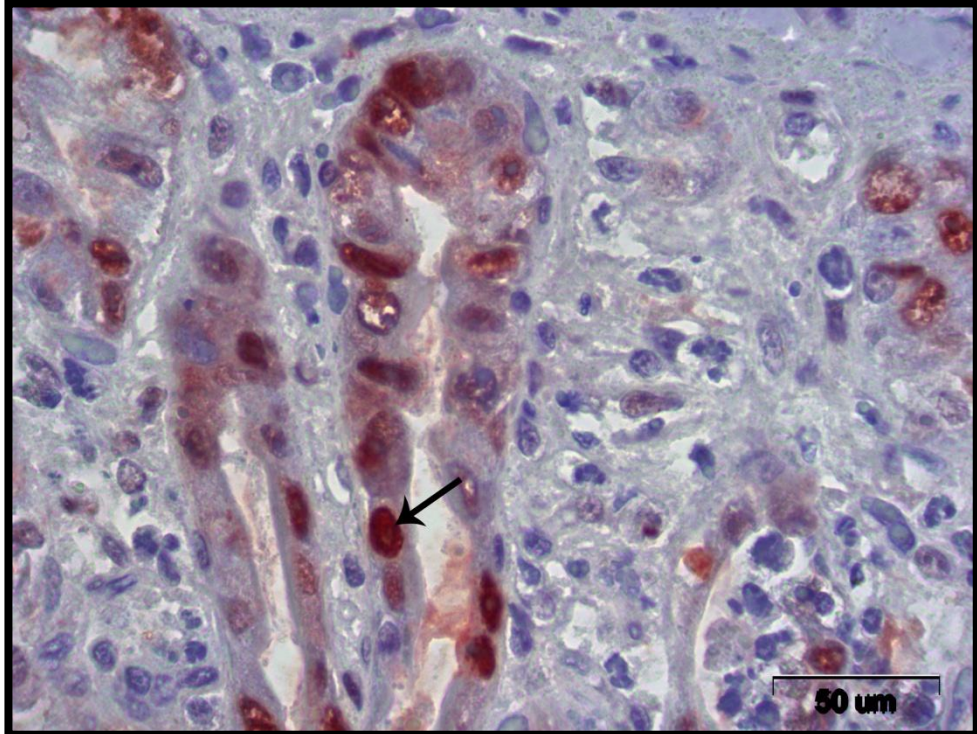
Şekil 4.21: Kontrol grubu kript epitel hücrelerinde PCNA pozitif hücreler (→), Bar: 50 µm.



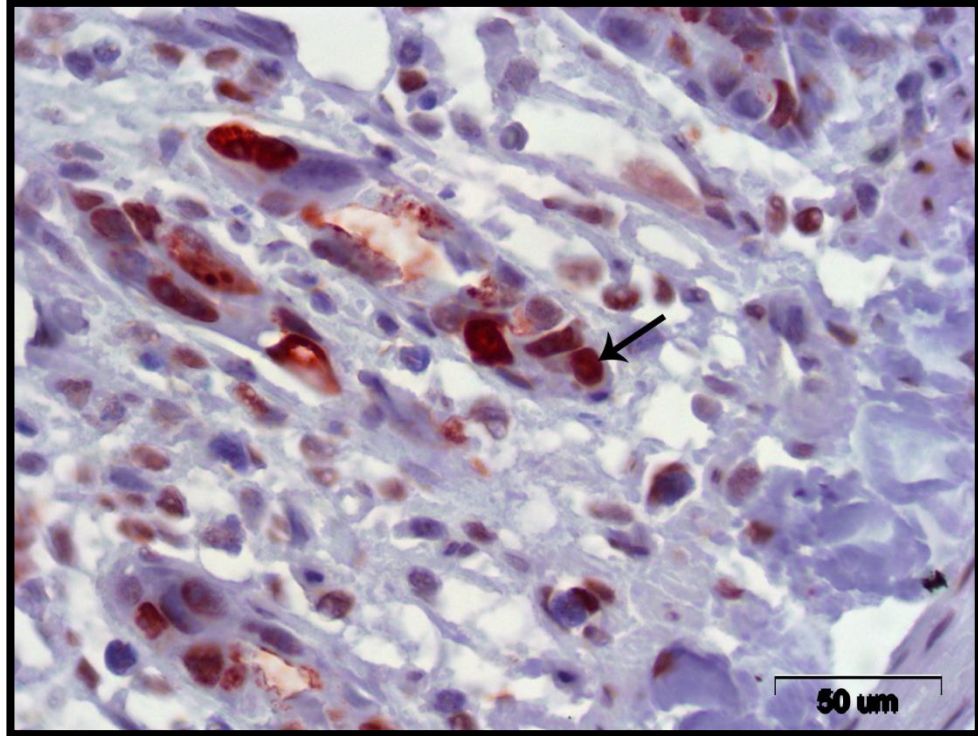
Şekil 4.22: Radyasyon grubu kript epitel hücrelerinde PCNA pozitif hücreler (→), Bar: 50 µm.



Şekil 4.23: Radyasyon + Melatonin grubu kript epitel hücrelerinde PCNA pozitif hücreler (→),
Bar: 50 µm.



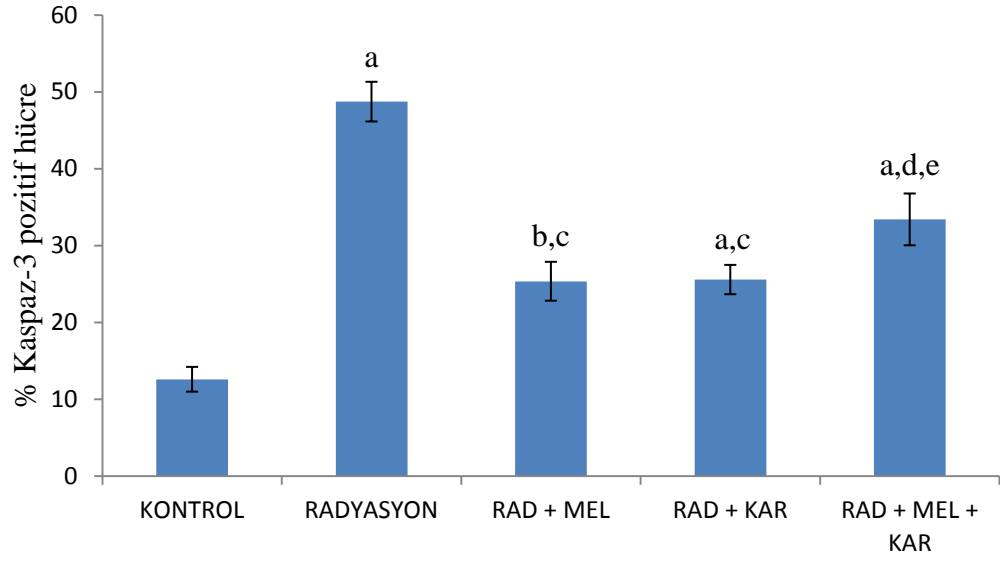
Şekil 4.24: Radyasyon + Karnozin grubu kript epitel hücrelerinde PCNA pozitif hücreler (→),
Bar: 50 µm.



Şekil 4.25: Radyasyon + Karnozin + Melatonin grubu kript epitel hücrelerinde PCNA pozitif hücreler (→), Bar: 50 μ m.

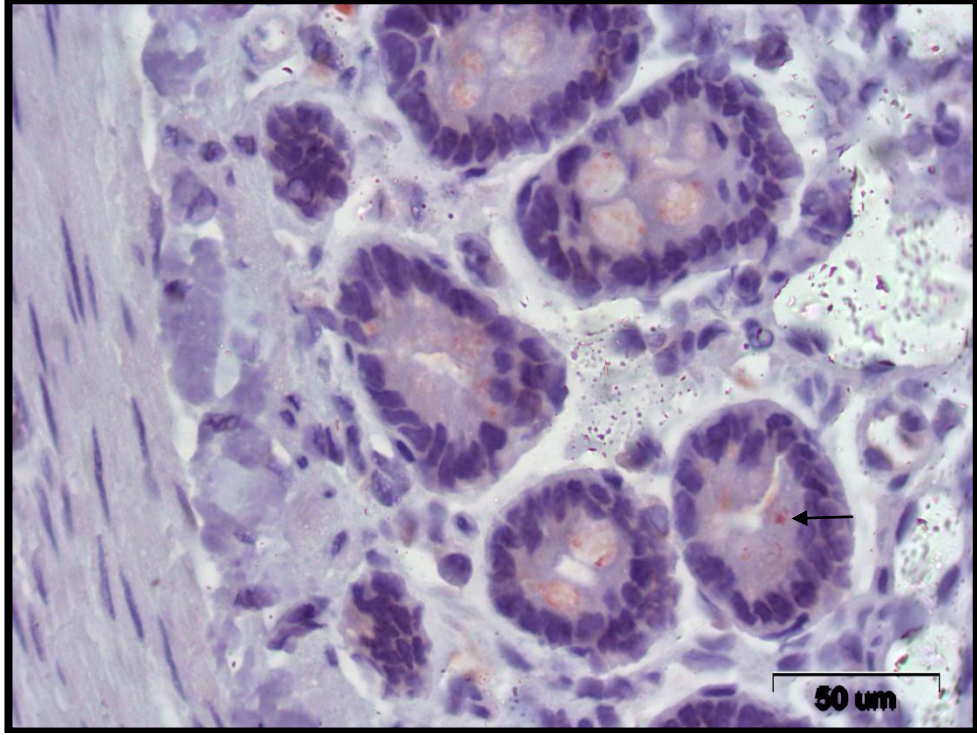
4.2.2. Kaspaz-3 İmmünohistokimyasına Ait Bulgular

İnce bağırsak dokularında yapılan immünohistokimyasal incelemelerde, boyanma derecesinden elde edilen istatistiksel verilere göre kontrol grubu ile kıyaslandıklarında radyasyon, radyasyon + karnozin ve radyasyon + melatonin + karnozin verilen gruplarda ($p < 0.001$) ve radyasyon + melatonin grubunda ($p < 0.01$) istatistiksel olarak anlamlı bir artış belirlenmiştir. Radyasyon + melatonin ve radyasyon + karnozin grupları ($p < 0.001$) ile radyasyon + karnozin + melatonin grubu ($p < 0.01$) radyasyon grubuna göre anlamlı bir azalma göstermiştir. Ayrıca radyasyon + melatonin + karnozin grubu radyasyon + melatonin grubuna göre anlamlı ($p < 0.05$), radyasyon + karnozin grubuna göre anlamlı olmayan bir artış göstermiştir (Şekil 4.26). Apoptotik hücre ölümünün belirteci olan aktif kaspaz-3 immünohistokimyasal değerlendirme sonucunda, farklı gruplardaki kaspaz-3 pozitif hücreler Şekil 4.27-4.31’de görülmektedir.

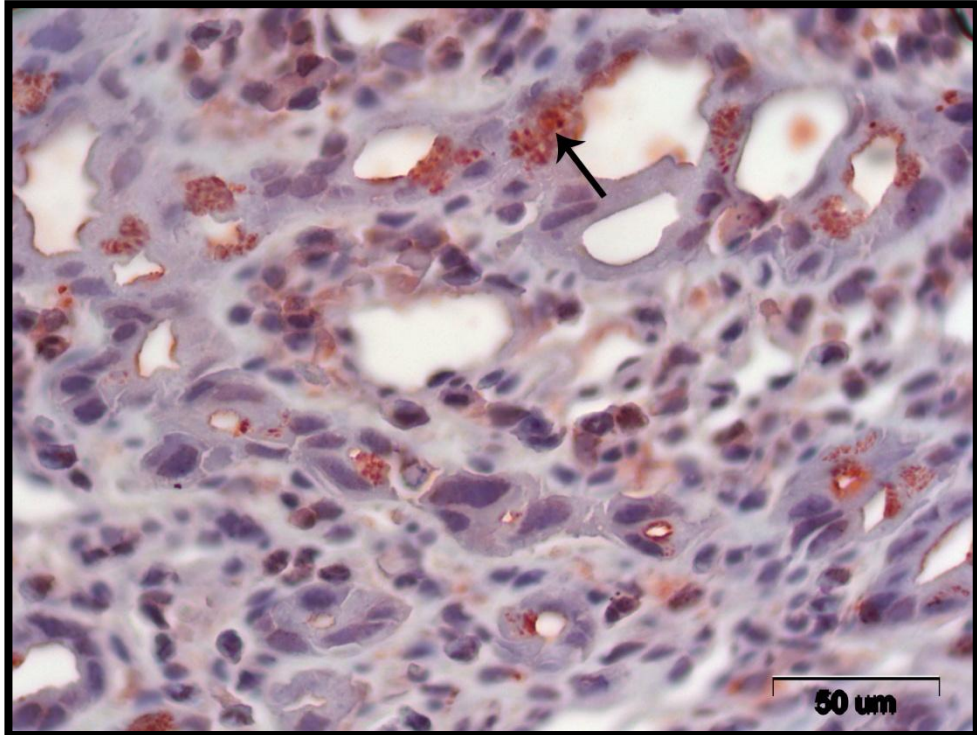


Şekil 4.26: Kript epitel hücrelerinde immunohistokimya ile tespit edilen % kaspaz-3 pozitif hücre sayısı. Her bir grup için elde edilen değerler 'ortalama ± standart hata' olarak gösterilmiştir. Kontrol: 12.6 ± 1.61 , Radyasyon : 48.72 ± 2.58 , Rad+Mel : 25.35 ± 2.53 , Rad+Kar : 25.57 ± 1.91 , Rad+Kar+Mel: 33.4 ± 3.37 .

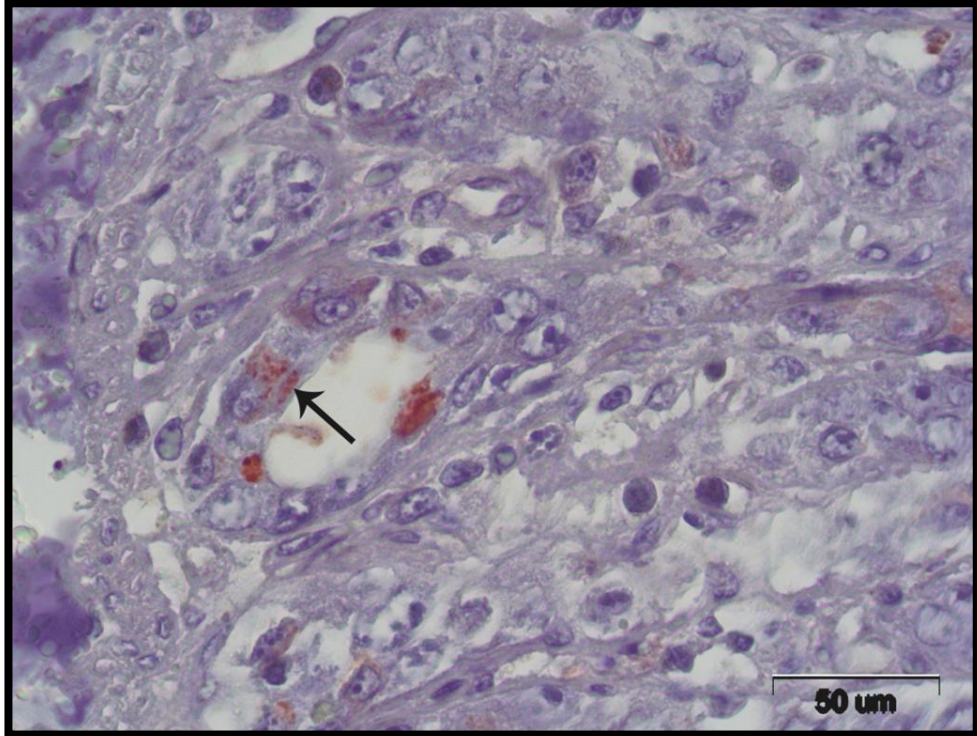
- ^a Kontrol grubundan farklı ($p < 0.001$)
^b Kontrol grubundan farklı ($p < 0.01$)
^c Radyasyon grubundan farklı ($p < 0.001$)
^d Radyasyon grubundan farklı ($p < 0.01$)
^e Rad + Mel grubundan farklı ($p < 0.05$)



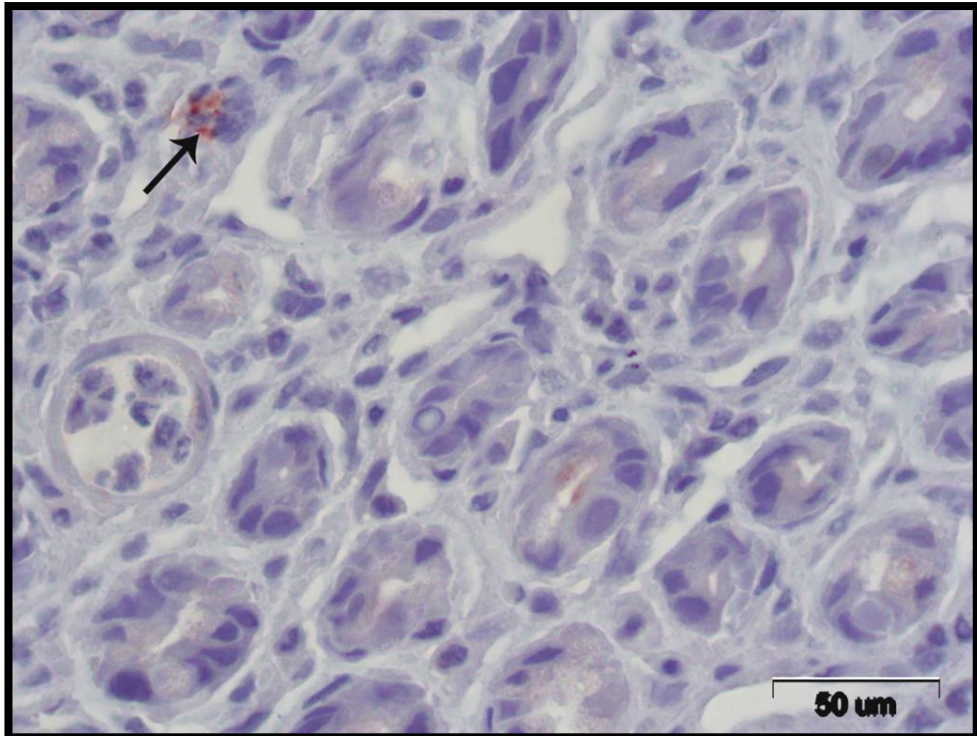
Şekil 4.27: Kontrol grubu kript epitel hücrelerinde kaspaz-3 pozitif hücreler (→), Bar: 50 μm.



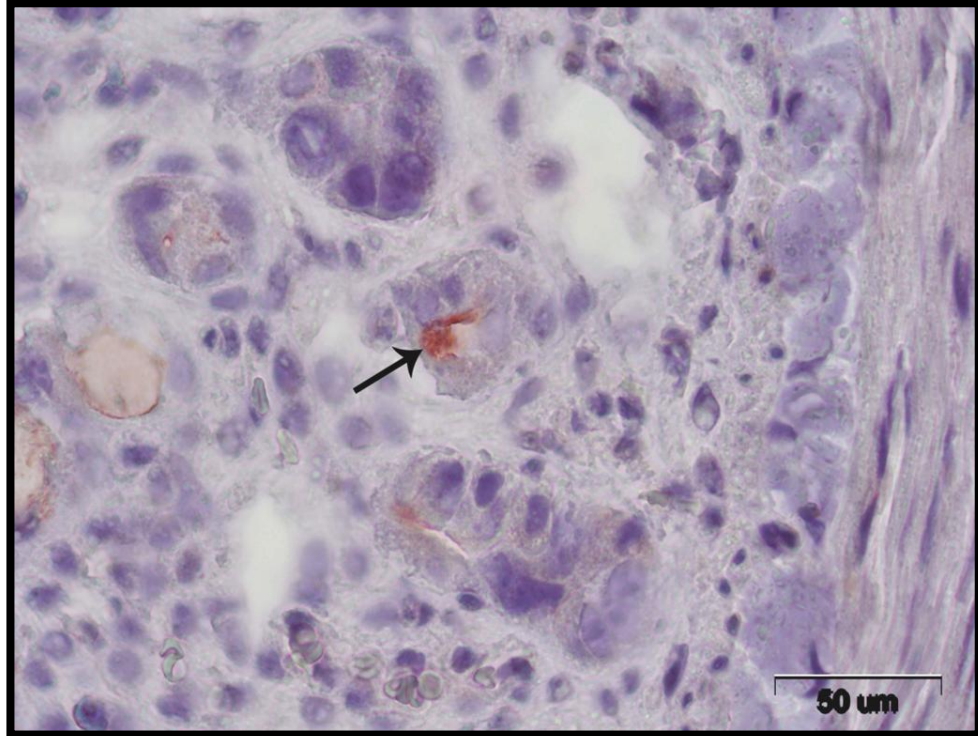
Şekil 4.28: Radyasyon grubu kript epitel hücrelerinde kaspaz-3 pozitif hücreler (→), Bar: 50 μm.



Şekil 4.29: Radyasyon + Melatonin grubu kript epitel hücrelerinde kaspaz-3 pozitif hücreler (→), Bar: 50 μm.



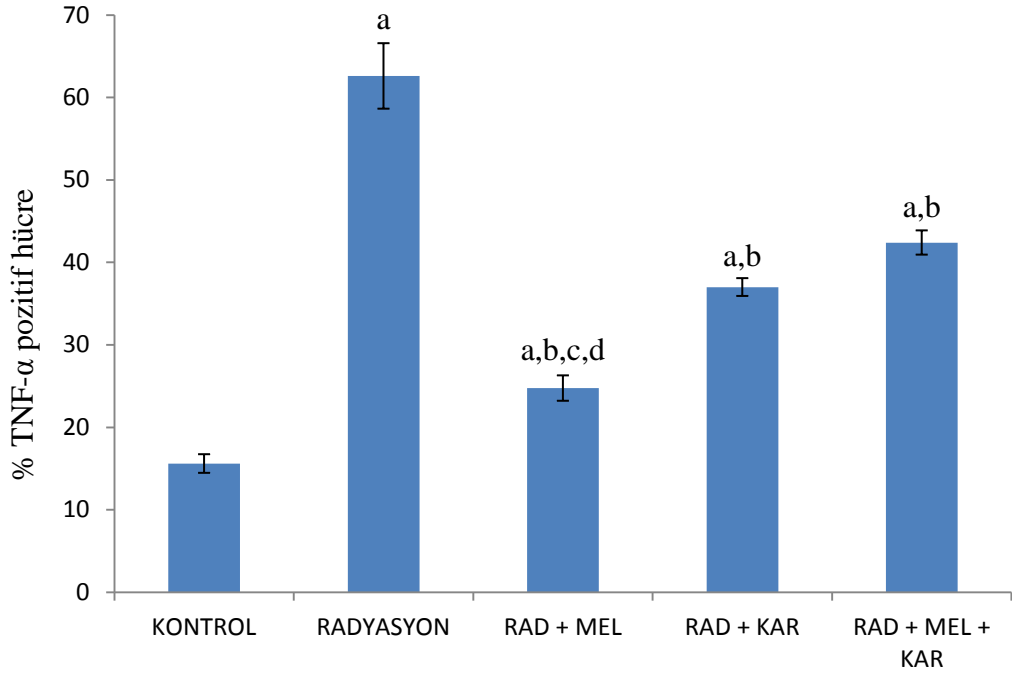
Şekil 4.30: Radyasyon + Karnozin grubu kript epitel hücrelerinde kaspaz-3 pozitif hücreler (→), Bar: 50 μm.



Şekil 4.31: Radyasyon + Melatonin + Karnozin grubu kript epitel hücrelerinde kaspaz-3 pozitif hücreler (→), Bar: 50 μ m.

4.2.3. TNF- α İmmunohistokimyasına Ait Bulgular

İnce bağırsak dokularında yapılan immunohistokimyasal incelemeler sonucu, boyanma derecesinden elde edilen istatistiksel verilere göre kontrol grubu ile kıyaslandıklarında radyasyon, radyasyon + melatonin, radyasyon + karnozin ve radyasyon + melatonin + karnozin gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış belirlenmiştir ($p < 0.05$). Radyasyon + melatonin, radyasyon + karnozin ve radyasyon + karnozin + melatonin gruplarında radyasyon grubuna göre anlamlı bir azalma belirlenmiştir ($p < 0.05$). Ayrıca radyasyon + melatonin grubu radyasyon + karnozin ve radyasyon + karnozin + melatonin gruplarına göre anlamlı bir azalma gösterirken ($p < 0.05$), radyasyon + karnozin grubu radyasyon + karnozin + melatonin grubuna göre anlamlı olmayan bir azalma göstermiştir (Şekil 4. 32). İnflamasyon belirteci olan TNF- α pozitif olan hücreler immünohistokimyasal değerlendirme ile farklı gruplardaki dağılımı Şekil 4.27-4.31’da izlenmektedir.



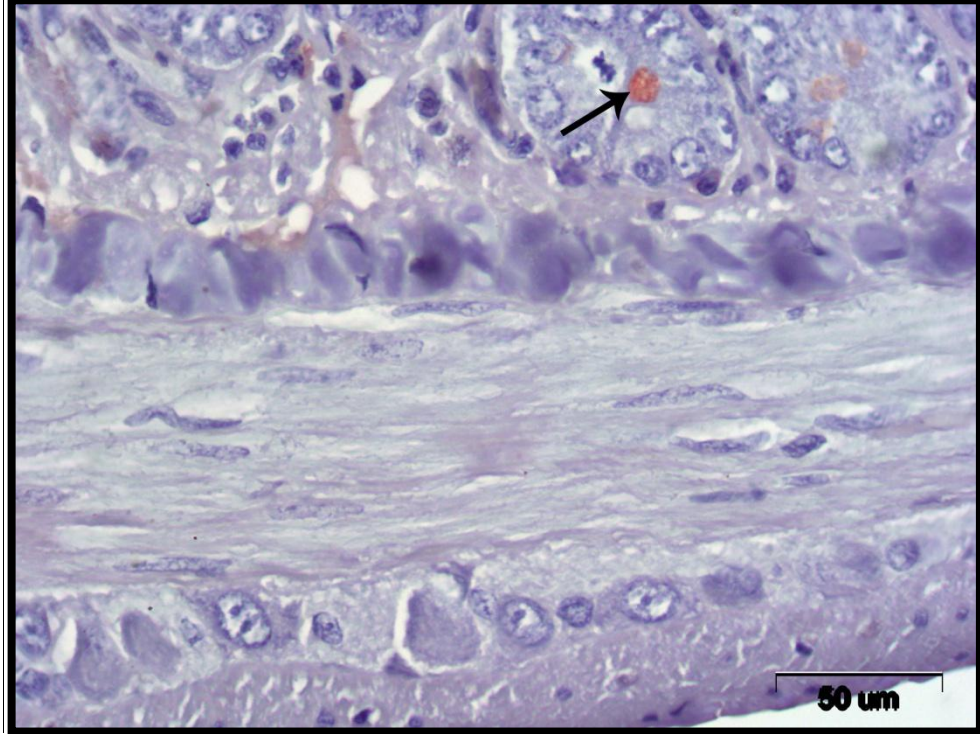
Şekil 4.32: Kript hücrelerinde immunohistokimya ile tespit edilen % TNF- α pozitif hücre sayısı. Her bir grup için elde edilen değerler 'ortalama \pm standart hata' olarak gösterilmiştir. Kontrol: 15.6 ± 1.13 , Radyasyon: 62.6 ± 3.97 , Rad+Mel: 24.75 ± 1.54 , Rad+Kar: 37 ± 1.08 , Rad+Kar+Mel: 42.4 ± 1.47 .

^a Kontrol grubundan farklı ($p < 0.05$)

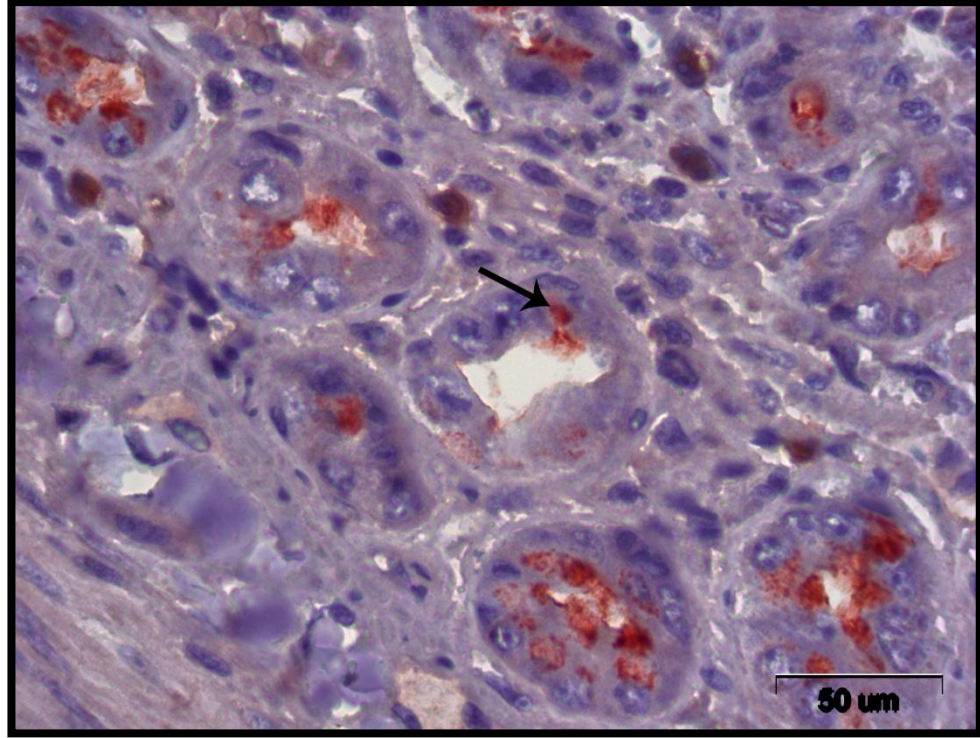
^b Radyasyon grubundan farklı ($p < 0.05$)

^c Rad + Kar grubundan farklı ($p < 0.05$)

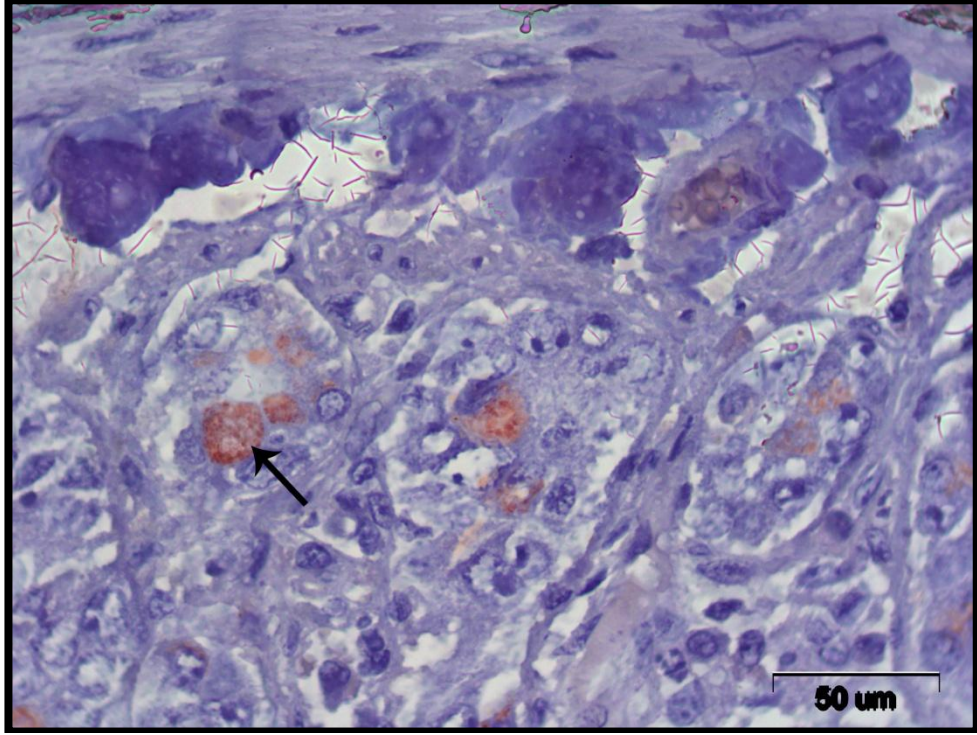
^d Rad + Kar + Mel grubundan farklı ($p < 0.05$)



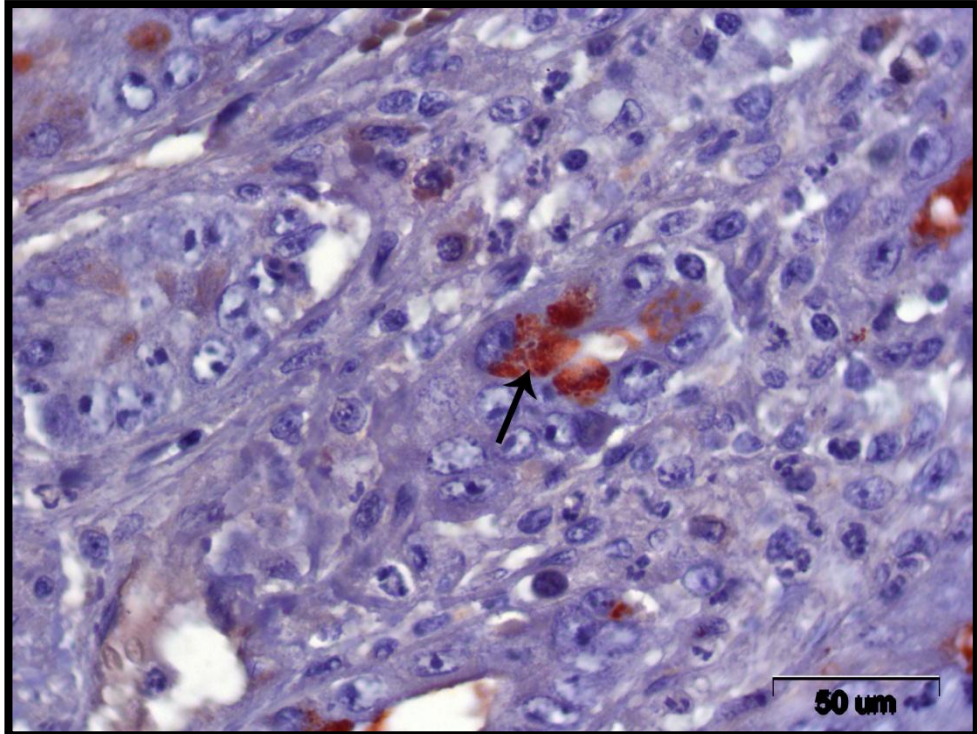
Şekil 4.33: Kontrol grubu kript hücrelerinde TNF- α pozitif hücreler (\rightarrow), Bar: 50 μ m.



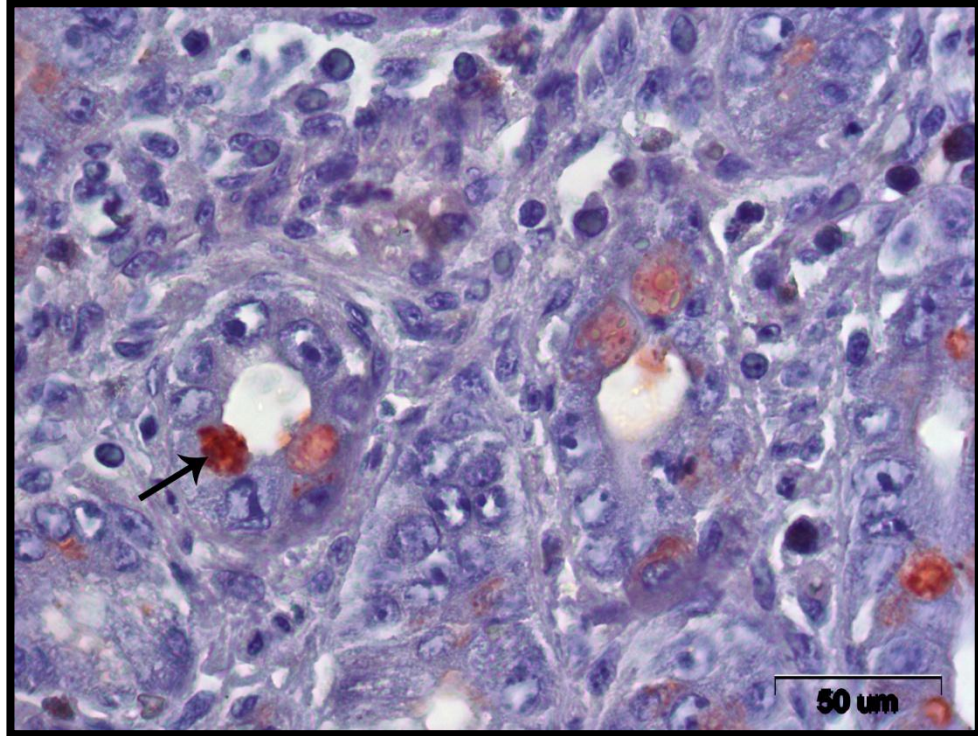
Şekil 4.34: Radyasyon grubu kript hücrelerinde TNF- α pozitif hücreler (\rightarrow), Bar: 50 μ m.



Şekil 4.35: Radyasyon + Melatonin grubu kript hücrelerinde TNF- α pozitif hücreler (\rightarrow), Bar: 50 μ m.



Şekil 4.36: Radyasyon + Karnozin grubu kript hücrelerinde TNF- α pozitif hücreler (\rightarrow), Bar: 50 μ m.

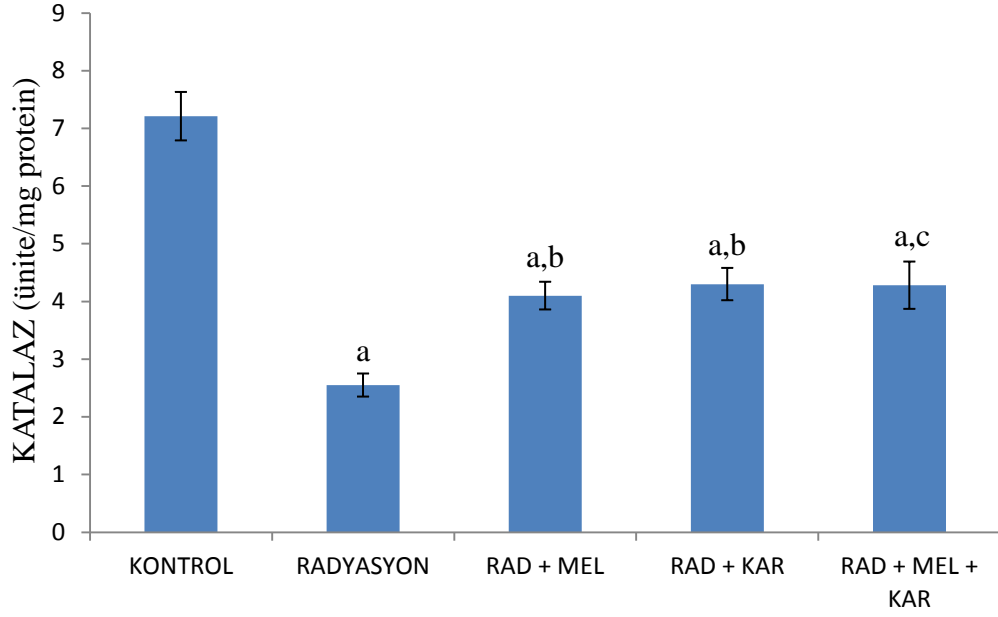


Şekil 4.37: Radyasyon + Karnozin + Melatonin grubu kript hücrelerinde TNF- α pozitif hücreler (\rightarrow). Bar: 50 μ m.

4.3. BİYOKİMYASAL BULGULAR

4.3.1. Katalaz Aktivitesine Ait Bulgular

Antioksidan etkiyi gözlemek üzere doku homojenatlarından elde edilen katalaz verilerine göre kontrol grubu ile radyasyon, radyasyon + melatonin, radyasyon + karnozin ve radyasyon + karnozin + melatonin gruplarının katalaz değerleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalış ($p < 0.001$) belirlenmiştir. Ayrıca radyasyon grubu ile karşılaştırıldığında radyasyon + melatonin ve radyasyon + karnozin grupları ($p < 0.001$) ile radyasyon + karnozin + melatonin grubunun ($p < 0.01$) katalaz değerlerinin anlamlı olarak arttığı gözlenmiştir (Şekil 4.38).



Şekil 4.38: İnce bağırsak homojenatlarının katalaz değerleri. Her bir grup için elde edilen değerler 'ortalama ± standart hata' olarak gösterilmiştir. Kontrol: 7.21 ± 0.42 , Radyasyon: 2.55 ± 0.2 , Rad+Mel: 4.1 ± 0.24 , Rad+Kar: 4.3 ± 0.28 , Rad+Kar+Mel: 4.28 ± 0.41 .

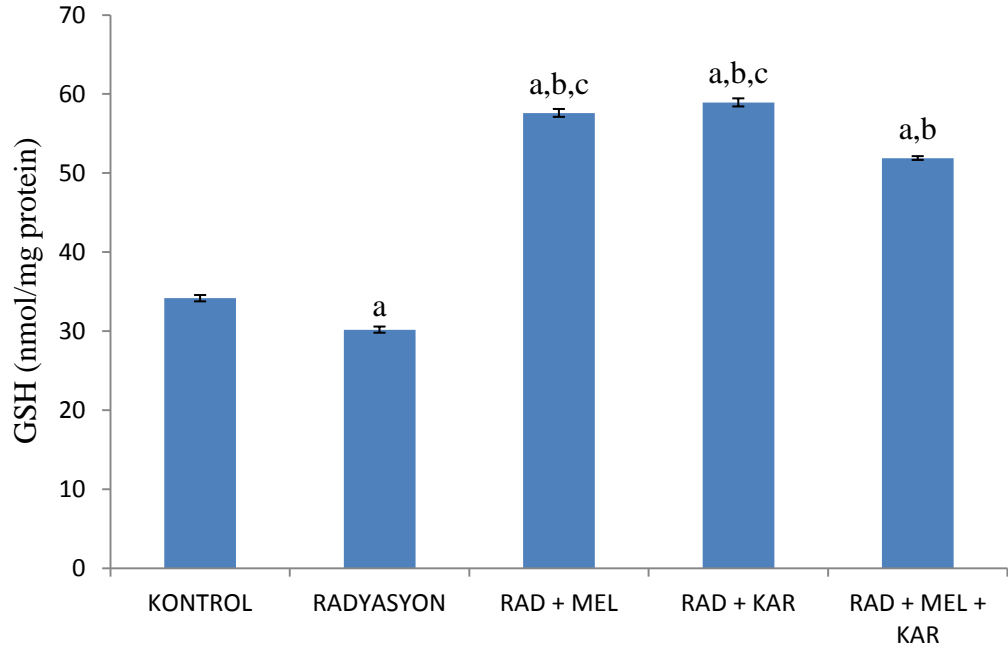
^a Kontrol grubundan farklı ($p < 0.001$)

^b Radyasyon grubundan farklı ($p < 0.001$)

^c Radyasyon grubundan farklı ($p < 0.01$)

4.3.2. Glutasyon Değerlerine Ait Bulgular

Antioksidan etkinin tanımlanması için kullanılan GSH belirtecinden elde edilen verilere göre, kontrol grubu ile radyasyon grubu GSH değerleri istatistiksel olarak anlamlı bir azalış ($p < 0.001$), radyasyon + melatonin, radyasyon + karnozin ve radyasyon + karnozin + melatonin gruplarının GSH değerleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir artış ($p < 0.001$) göstermiştir. Ayrıca radyasyon grubu ile radyasyon + melatonin, radyasyon + karnozin ve radyasyon + karnozin + melatonin grupları karşılaştırıldığında GSH değerlerinin anlamlı olarak arttığı gözlenmiştir ($p < 0.001$). Radyasyon + melatonin ve radyasyon + karnozin gruplarının GSH değerleri radyasyon + karnozin + melatonin grubuna göre de anlamlı bir artış göstermiştir (Şekil 4.39).



Şekil 4.39: İnce bağırsak homojenatlarının GSH değerleri. Her bir grup için elde edilen değerler 'ortalama ± standart hata' olarak gösterilmiştir. Kontrol: 34.16 ± 0.4 , Radyasyon: 30.18 ± 0.39 , Rad+Mel: 57.6 ± 0.5 , Rad+Kar: 58.93 ± 0.51 , Rad+Kar+Mel: 51.89 ± 0.24 .

^a Kontrol grubundan farklı ($p < 0.001$)

^b Radyasyon grubundan farklı ($p < 0.001$)

^c Rad + Kar + Mel grubundan farklı ($p < 0.001$)

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Biyolojik sistemde, radyasyon etkisi ile oluşan olaylar zinciri, radyasyon enerjisinin DNA ya da bir enzim molekülü gibi özel bir biyolojik yapı tarafından absorplanması ile başlamışsa, buna “radyasyonun direkt etkisi” adı verilir. Işınlanmış hücrelerde esas hedefin DNA olduğu görülmüştür (Robbins ve Kumar, 2000). Hücre, özellikle bölünme sırasında radyasyona en duyarlı evrededir. Radyasyon etkisi ile DNA’nın tek veya çift ipliğinde kırık ve baz hasarları oluşabilir (Busch, 1993). DNA’nın radyokimyasal hasarları geri dönüşümlü olabilir. Ancak ortamdaki oksijen konsantrasyonu, serbest radikalleri oluşturabileceğinden, oksijen tarafından geri dönüşüm inhibe edilir (Macmillan ve Steel, 1997).

Ayrıca, radyasyon enerjisi biyolojik moleküllerin (DNA ve enzim gibi) içinde bulunduğu ortamın molekülleri tarafından absorplanmış olabilir. Radyasyon enerjisinin absorplanması ile değişikliğe uğrayan bu ortam molekülleri biyolojik moleküllerle reaksiyona girerek onları değiştirebilirler. Başlangıçta radyasyon enerjisi biyolojik molekül tarafından absorplanmamıştır. Fakat onun da içinde bulunduğu ortamın molekülleri tarafından absorplandığından biyolojik molekül de bu olaydan indirekt olarak etkilenmiştir. Bu etkiye radyasyonun “indirekt etkisi” adı verilir (Özalpan, 2001).

Radyasyondan en fazla canlı organizmanın %70-90’ını oluşturan su moleküllerinin etkilenmesi sonucu, vücut için oldukça zehirli olan hidroksil (OH•) ve hidrojen radikallerinin (H•) ortaya çıktığı görülür. Bunların birbiriyle ve biyolojik moleküllerle etkileşmeleri, yine çok toksik hidrojen peroksit (H₂O₂) moleküllerini oluşturabilir (Tubiana ve Dutreix, 1990; Greenstock, 1993; Macmillan ve Steel, 1997; Hall, 2000). Artan hücre içi H₂O₂ konsantrasyonu, enzim sistemleri tarafından yok edilemeyince hücre içinde birikir ve oksidan etkisiyle hücre hasarına sebep olur (Fang ve diğ., 2002; Neoman ve diğ., 2002; Dokmeci ve diğ., 2006). X ve γ radyasyonları gibi iyonizasyon yoğunluğu düşük olan radyasyonların etkisi, daha çok indirekt yolla meydana gelir. Canlı madde, yüksek oranda su içerdiğinden indirekt etkiler, direkt radyasyon

etkilerinden önemli olup, bunlar daha büyük radyasyon hasarlarına yol açarlar (Özalpan, 2001).

Radyasyon hasarına en fazla hücre yenilenmesi hızlı olan dokularda rastlanır (Schally ve diğ., 1987). İnce bağırsakta, ışınlamayı takiben ortaya çıkan değişiklikler, öncelikle, villusların örtü epitelinde görülür. Bağırsaklarda radyasyona en duyarlı hücreler, Lieberkühn bezlerinin dip kısımlarında hızlı çoğalan, ancak farklılaşmasını villus tepesinde tamamlayan hücrelerdir. Radyasyon, henüz farklılaşmamış bu hücrelerin mitotik safhada ölümüne neden olur (Guzman-Stein ve diğ., 1989; Robbins ve Kumar, 2000).

İyonizan radyasyonun serbest radikaller aracılığıyla ve direkt iyonizasyonla hücrelerde hasara sebep olduğu bilinmektedir. Radyasyona bağlı ortaya çıkan erken ve geç etkileri tedavi etmek her zaman mümkün olamadığı için yan etki oluşumunu önleyebilecek ajanların geliştirilmesi önem kazanmıştır. Antioksidan özellik gösteren maddeler ile yapılan desteğin, radyasyonun hem tümöre yanıtını artırıp, hem de normal hücreler üzerine toksik etkisini azaltarak, tedavi kazancını arttırabileceği düşünülmektedir (Sert ve Çelik, 1996). Antioksidan maddeler kullanarak bu olumsuz etkilerin kısmen önlenebileceği çeşitli deneysel çalışmalar ile ortaya konmuştur (Mutlu-Turkoglu ve diğ., 2000; Dokmeci ve diğ., 2006; Kunwar ve diğ., 2011; Haeri ve diğ., 2013).

Melatonin, pineal bezden doğrudan dolaşıma verilen, enzimatik olmayan güçlü bir antioksidandır. Çeşitli antioksidanların gücünü belirlemek amacıyla yapılan karşılaştırmalı çalışmalar, melatoninin en güçlü antioksidanlardan biri olduğunu göstermektedir (Karbownik ve Reiter, 2000; Li ve diğ., 2008). Melatoninin kuvvetli antioksidan özelliğinden dolayı gama radyasyon hasarına karşı koruyucu olabileceği çeşitli araştırmalarla gösterilmiştir (Koc ve diğ., 2003; Guney ve diğ., 2007; Hussein ve diğ., 2008). Karnozinin güçlü bir antioksidan olduğu ve bu etkiyi oksidatif stres sonucu ortaya çıkan lipid peroksidasyonunu (Aydin ve diğ., 2010 a, 2010b) ve serbest radikalleri inhibe ederek (Babizhayev ve diğ., 1994) başardığı yapılan araştırmalarla gösterilmiştir. Karnozinin katalaz, glutatyon peroksidaz, süperoksit dismutaz gibi hücrel antioksidan enzimlerin aktivitesini arttırdığı gösterilmiştir (Mehmetçik ve diğ., 2008; Aydin ve diğ., 2010a, 2010b; Ma ve diğ., 2010; Ozdogan ve diğ., 2011).

Günümüze kadar yapılan çalışmalarda radyasyonun ince bağırsak üzerinde oluşturduğu hasar ve çeşitli iyileştirici ajanların bu hasar üzerindeki etkileri araştırılmasına rağmen bu ajanların klinikte kullanılmasına yetecek kadar çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışma kuvvetli antioksidan özellikleri nedeniyle son yıllarda birçok doku hasarında önemli iyileştirici etkileri gösterilen karnozin ve melatoninin ince bağırsakta oluşan radyasyon hasarı üzerindeki etkilerini araştırmak amacıyla yapılmıştır.

İyonizan radyasyon gastrointestinal kanalın çeşitli doku bileşenlerinde bazı morfolojik değişikliklere yol açar. Bu morfolojik değişikliklerin sınıflandırılması, radyasyon hasarının derecesinin tespit edilmesine yardımcı olur. Erken morfolojik parametrelerin değerlendirilmesi için; hücrenin şeklindeki, hücreler arası bağlantılarındaki ve hücre yüzey morfolojisindeki değişikliklerin yanısıra, hücre ölümünün saptanması ve fibrozisin derecesi gibi doku seviyesindeki morfolojik değişiklikler, kriter olarak kullanılmaktadır (Somosy ve diğ., 2002). Çalışmamızda epitel hücrelerinde hiperplazi, vakuolizasyon, dar koyu sitoplazmik reaksiyon veren hücre sayısında artış, villusların lamina propriyasında ödem, villus bütünlüğünde bozulma ve kayıp, villuslarda kısalma ve genişleme, bez bütünlüğünde bozulma ve kayıp, mukozada inflamatuvar (mononuklear) hücre infiltrasyonu, hiperemi, nekrotik alan, piknotik nükleus gibi ışık mikroskobu kriterlerini göz önüne alarak radyasyon, radyasyon + melatonin, radyasyon + karnozin ve radyasyon + melatonin + karnozin verilen bireylerin ince bağırsaklarında meydana gelen histolojik hasar ve iyileşme gözlemlenmiştir.

Kanter ve diğerlerinin (2008) yaptığı bir çalışma ile 15 Gy radyasyon uygulanan *Wistar albino* cinsi sıçanların jejunum mukozalarında histolojik yapının önemli derecede bozulduğu tespit edilmiştir. Hücre kaybına bağlı olarak villuslarda kısalma ve birleşmeler ile birlikte tunika mukozanın ileri düzeyde atrofik bir hal aldığı gözlenirken, villus epitel hücrelerinin dökülmüş, yer yer tamamen kaybolmuş olduğu saptanmış, lamina propriyada mononuklear hücre infiltrasyonunu gözlenmiştir. Lieberkühn bezlerinin sayısında azalma ile birlikte bez hücrelerinde de kayıplar ve çoğunlukla kriptlerde bez hücrelerinin tamamen ortadan kalktığı gözlenmiştir (Kanter ve diğ., 2008). Dalla (1966) tarafından da, iyonize radyasyonun, 24-48 saat içerisinde bağırsaklarda akut morfolojik değişikliklere yol açtığı, villusların boylarında kısalma ile mukoza kalınlığında total bir azalmaya sebep olduğu bildirilmiştir. Başka bir çalışmada,

radoterapi sonrasında saatler içerisinde piknoz ve kromatin parçalanması geliştiği, hücre kaybının meydana geldiği rapor edilmiştir (Berthrong ve Fajardo, 1981). Yine aynı araştırmacılar radyoterapinin ilk haftası içinde Lieberkühn bezlerinde hücre kaybına bağlı olarak atrofi meydana geldiğini, daha sonra villöz atrofi ve mukozada düzleşme oluştuğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda da literatürdekine benzer olarak radyasyon grubuna ait bireylerin ince bağırsak kesitlerinde belirgin miktarlarda inflamatuvar hücre infiltrasyonu, villuslarda kısalma ve genişleme, villus bütünlüğünde bozulma ve kayıp, mukozada hiperemi, dar koyu sitoplazmik reaksiyon veren hücre sayısında artış, epitel hücrelerinde hiperplazi ve vakuolizasyon, villusların lamina propriyasında ödem, piknotik nükleus, bez bütünlüğünde bozulma ve kayıp, mukozada nekrotik alan gözlemledik. Radyasyon + melatonin, radyasyon + karnozin ve radyasyon + melatonin + karnozin gruplarının ince bağırsak dokularında bu histolojik hasar kriterlerinde radyasyon grubuna göre belirgin bir azalma saptanmıştır. Özellikle radyasyon + melatonin grubu bulgularının kontrol grubu bulgularına çok yakın olduğu belirlenmiştir.

Bilindiği gibi PAS reaksiyonu doku karbohidratlarının varlığını gösteren bir indikatördür (Bancroft ve Stevens, 1982). PAS pozitif maddelerin yapılarındaki ve miktarlarındaki değişiklikler rengin şiddetini değiştirebilir (Dahlquist ve diğ., 1965). Hücre örtüsü ve goblet hücrelerindeki mukusu oluşturan materyaldeki yapı taşlarının miktarının azalması veya kimyasal yapısının bozulması PAS (+) reaksiyonunun azalmasının nedeni olabilir. McArdle ve diğ. (1986) iyonizan radyasyonun, ince bağırsak epitel hücrelerinde glikokaliks yapısının azalmasına veya tamamen kaybolmasına sebep olduğunu ve çizgili kenar disakkaritlerinin aktivitesini azalttığını rapor etmişlerdir. Yapılan bir çalışmada 15 Gy radyasyon verilen sıçanların ince bağırsağının ileri düzeyde dejenerasyona uğrayan tunika mukozasında neredeyse hiç goblet hücrelerine rastlanmamış, lamina epitelialisteki hasarın boyutu ile ilişkili olarak çizgili kenar yapısının da tamamen ortadan kalktığı çarpıcı bir biçimde gözlenmiştir (Kanter ve diğ., 2008). Çalışmamızda, radyasyon grubunda PAS pozitif reaksiyon veren goblet hücre sayısı ve bu hücrelerdeki reaksiyon şiddetinde kontrol bireylere göre belirgin azalma gözlerken, villuslar arasında ve çizgili kenarların hemen üzerinde görülen PAS pozitif reaksiyonda artış gözlemledik. Radyasyon + melatonin, radyasyon + karnozin ve radyasyon + melatonin + karnozin gruplarının PAS pozitif reaksiyon

veren goblet hücre sayısı ve bu hücrelerdeki reaksiyon şiddetinde ise radyasyon grubuna göre belirgin bir artış gözlenirken, villuslar arasında ve çizgili kenarların hemen üzerinde görülen PAS pozitif reaksiyonda azalma belirledik. Sonuç olarak, melatonin ve karnozinin oksidatif stres oluşumunu engelleyerek tüm histolojik hasar parametrelerinde düzelmeye yol açtığını söyleyebiliriz.

Beaulieu (1999), ince bağırsak dokusunda hücre proliferasyonunun yüksek oranda olduğunu saptamıştır. İnce bağırsakta mukozal yüzeydeki villusların arasına açılarak çöküntüler oluşturan kriptlerde yüksek proliferasyon kapasitesine sahip olan kök hücreler, her zaman bölünme halindedir. PCNA, proliferasyonu gösteren hücre nükleus antijenidir ve DNA polimeraz gamanın alt birimi olarak hücre döngüsünde rol oynar (Çoğulu ve diğ., 2007). Hücre proliferasyonunun morfolojik özelliklerini iyi şekilde göstermesi sebebiyle hücre çoğalma indeksinin belirlenmesi için PCNA proteininin immünohistokimyasal olarak saptanması sıklıkla kullanılan bir yöntemdir (Sheen-Chen ve diğ., 2003). Çalışmamızda proliferasyondaki değişimler PCNA proteininin varlığına göre belirlenmiştir.

Hücre proliferasyonu yalnızca büyüme faktörlerince değil, aynı zamanda hücre döngüsünü engelleyen sinyallerce de düzenlenir. Hücre döngüsünün durdurulması DNA' nın hasara uğratılması, hücreler arası ilişki ve bazı hücre dışı faktörler yoluyla olabilir. Bu tip baskılayıcı sinyallere verilebilecek en iyi örnek DNA hasarına yanıt olarak p53 proteinince yönlendirilen hücre döngüsünün durdurulmasıdır. P53 proteini, sentez fazındaki hücrelerde DNA eşleşmesini doğrudan engeller ve hücre döngüsünü durdurur (Çoğulu ve diğ., 2007).

Radyasyonun, yüksek dozda veya tekrarlanarak artan dozda uygulandığında, inflamasyon, lamina propriyada plazmosit ve polimorf nükleuslu lökosit infiltrasyonu, farklılaşmamış hücrelerde de mitoz inhibisyonuna neden olduğu bildirilmiştir (Carroll ve diğ., 1995). Dönüştürücü büyüme faktörü beta (TGF- β) ve TNF gibi hücre bölünmesini engelleyen sitokinlerin, büyüme faktörlerinin hücre bölünmesi için aktive ettiği düzenekleri baskıladıkları, büyüme faktörü reseptörlerinin ekspresyonunu azalttıkları, reseptörlerin inaktive edilmesine yol açtıkları ya da hücre bölünmesini sağlayacak sinyallerin iletilmesini engelledikleri bildirilmiştir (Güneş, 1999). Radyasyonun dokular üzerindeki etkileri, belirtilerin ortaya çıkış zamanına göre erken

ve geç dönem olmak üzere iki aşamalıdır. Erken dönem etkileri gastrointestinal mukoza, kemik iliği, testisin germinatif hücreleri gibi hızlı çoğalan dokularda proliferasyon üzerinde olumsuz etki yapması nedeniyledir. Bu etkiler radyoterapiden saatler ya da günler sonra ortaya çıkar ve geçicidir. Geç dönem etkileri, tedaviyi takip eden 6 ay ile 6 yıllık bir dönemde ortaya çıkar ve ilerliyicidir (Withers, 1992). Yaptığımız çalışma ile radyasyon grubu bireylerinin ince bağırsağında kontrol grubu bireyelerine göre proliferasyonda belirgin bir azalma saptadık. Radyasyon + melatonin, radyasyon + karnozin ve radyasyon + melatonin + karnozin gruplarında ise proliferasyonun radyasyon grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olarak arttığını belirledik. Elde ettiğimiz bu bulgular daha önce yapılan çalışmalara paralel olarak radyasyonun ince bağırsak üzerinde oluşturduğu proliferasyonu baskılayıcı etkisini destekler niteliktedir.

Melatoninin proliferasyonu uyarması veya inhibe etmesi hücre tipine ve melatonin konsantrasyonuna bağlıdır (Sainza ve diğ., 2003). Melatoninin kanser hücrelerinde proliferasyonu inhibe ettiği, insan kemik hücresi (Nakade ve diğ., 1999) ve fare splenositleri (Drazen ve diğ., 2001) gibi normal hücrelerde proliferasyonu uyardığı gösterilmiştir. Yapılan *in vitro* bir çalışmada preadiposit hücrelerinde melatoninin doz ve zaman bağımlı olmak üzere proliferasyonu uyardığı gösterilmiştir (Zwirska-Korcza ve diğ., 2005). Tek doz 5 Gylik radyasyon verilen kondrosit hücrelerinde proliferasyonun inhibe olduğu gözlenirken, melatonin uygulamasının bu etkiyi azalttığı yani proliferasyonu uyardığı gösterilmiştir (Kember, 1967). Ayrıca alüminyum tarafından ince bağırsakta proliferasyonun inhibe edildiği gösterilen bir çalışmada melatoninin proliferasyonu arttırdığı gösterilmiştir (Sarıkaya, 2011). Yaptığımız çalışma ile radyasyonun ince bağırsak üzerinde proliferasyonu inhibe edici etkisine karşılık olarak melatoninin proliferasyonu uyardığı tespit edilmiştir.

Tanaka ve diğerlerinin (2005) yaptığı bir çalışmada, yara iyileşmesinde, radyasyonun proliferasyonu azalttığı, karnozin uygulamasının ise, radyasyon grubuna göre proliferasyonu arttırdığı gösterilmiştir. Biz de yaptığımız çalışma ile karnozinin proliferasyonu arttırdığını ortaya koyduk.

Sonuç olarak, radyasyonun DNA, RNA ve protein sentezini engelleyerek hücre proliferasyonunda azalmaya neden olabileceğini, melatonin ve karnozinin ise antioksidan özellikleri nedeniyle proliferasyonu arttırmış olabileceğini düşünmekteyiz.

Apoptoz süresince önemli yapısal proteinlerin parçalanması kaspazlar tarafından gerçekleştirilir (Herren ve diğ., 1998). Apoptozun kaspaz aktivitesi ile gerçekleştiği iki temel sinyal yolu vardır. Bunlar; Fas ligandı gibi bir ölüm reseptörünün aktive olmasıyla gerçekleşen dış yol, mitokondriden sitokrom c salınımının aktive edildiği iç yoldur (Hayashi ve Araki, 2002). Kaspaz ailesinin bir üyesi olan kaspaz-3 bu iki temel apoptotik sinyal yolunda da aktive edilir ve hücre ölümünün geri dönüşümsüz sinyalinin iletilmesinde görevlidir. Bu enzim nükleozomal merdiven oluşumundan sorumlu DNaz'ı aktive eder (Weiske ve diğ., 2001). Bu sebeple aktif kaspaz-3 enzimi sıklıkla apoptotik hücre ölümünün belirteci olarak kullanılır (Green, 2000; Ulukaya, 2003). Bu sebeple yaptığımız çalışmada apoptotik hücre ölümündeki değişimleri sitoplazmik aktif kaspaz-3 enziminin varlığına göre belirledik.

İyonize radyasyonun memelilerde oluşturduğu hasar hücrel bileşiklerin fonksiyonları ve yapısındaki değişikliklere sebep olarak doku yıkım ve ölümleriyle sonuçlanan kompleks bir gerilemeye neden olur (Akpolat ve diğ., 2009). Hücre seviyesinde radyasyona yanıt; mutasyon, anormal hücre şekillerinin gelişimi ve hücrelerin ölümü gibi geri dönüşümsüz, ya da biyolojik sistemlerin geri dönüşümlü değişiklikleri şeklinde gözlenebilir (Somosy, 2000). Araştırmalar, Lieberkühn bezlerinde bulunan kök hücrelerin, ışınlamaya karşı hücre kaybı ve sonrasında hızlı bir çoğalma süreciyle yanıt oluşturduğunu göstermiştir (Potten ve diğ., 1994). Işınlamanın ardından, kök hücrelerin G₂ fazının bloke olmasıyla mitotik inhibisyon gerçekleşir. Apoptozdan dolayı akut hücre ölümü neticesinde direkt olarak kök hücreler kayba uğrar. Mitotik inhibisyon ışınlamadan yaklaşık olarak 30 dakika sonra başlar ve sonraki 8-20 saat süresince gözlenebilir. Apoptotik hücreler ışınlamadan sonra 2-3 saat içinde görülmeye başlar ve tipik ultrastrüktürel özellikler gösterir (Merritt ve diğ., 1995). Yapılan çalışmalardan elde edilen verilere göre, iyonizan radyasyona bağlı apoptozun, gastrointestinal kanalda p53 geninin kontrol ettiği bir mekanizma tarafından düzenlendiği açıklanmıştır (Wilson ve diğ., 1998). Bu çalışmalara paralel olarak yaptığımız çalışma ile radyasyon verilen

bireylerin ince bağırsak dokularında kaspaz-3 pozitif hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir artış belirlenmiştir.

Take ve diğ. (2009) sıçan testisi üzerinde 8 Gy'lik radyasyonun kaspaz-3 enziminin ekspresyonunu, yani apoptozu arttırdığını, melatoninin ise bu hasar üzerindeki etkiyi azaltarak anti-apoptotik bir rol oynadığını göstermişlerdir. Kim ve diğ. (2001)'in yaptıkları *in vitro* bir çalışmada insan derisinin fibroblast hücrelerinde 8 Gy'lik radyasyonun arttırdığı apoptozu, melatoninin azalttığı ortaya konmuştur. Yapılan başka bir *in vitro* çalışmada, radyasyonun sıçanların lenfositlerinde apoptozu uyardığı, melatoninin ise apoptozu inhibe ettiği gösterilmiş, bu etkisinin doz-bağımlı etkisinden kaynaklanabileceği belirtilmiştir (Yurtcu ve diğ., 2007). Dışarıdan verilen melatoninin granüloza hücrelerinde apoptozu inhibe ettiği, proliferasyonu arttırdığı gösterilmiştir (Wang ve diğ., 2012). Başka bir çalışmada, periferel kandaki lenfositlere verilen 8 Gy'lik radyasyonun, apoptozu uyardığı, melatonin ön uygulamasının ise apoptozu azalttığı ortaya konmuştur (Mohseni ve diğ., 2012). Ayrıca UV radyasyonu ile kaspaz-3 ve apoptozun diğer önemli belirteçlerinin arttığı gösterilen keratinosit hücrelerinde de melatoninin bu artışı tersine çevirerek anti-apoptotik bir etki gösterdiği belirtilmiştir (Fischer ve diğ., 2008). Deneysel oluşturulan kolon kolit hasarında TNF- α pozitif hücre sayısında artış saptanmış, melatonin uygulamasının ise, bu hasarın neden olduğu inflamasyon ve apoptozu azaltarak, antiinflamatuvar ve antiapoptotik bir etki gösterdiği belirtilmiştir (Mazzon ve diğ., 2006). Fare beyin dokusuna 4 Gy'lik radyasyon verilen bir çalışmada, oksidatif stres ve apoptozun arttığı, melatonin ön uygulamasının ise oksidatif stres ve apoptozu azalttığı gösterilmiştir. Melatoninin anti-apoptotik etkisinin oksidatif stresi azaltması sebebiyle bu sonuca varılabileceği düşünülmüştür (Liu ve diğ., 2012). Yaptığımız çalışmada, bu çalışmalara paralel olarak, melatoninin radyasyonun ince bağırsakta neden olduğu apoptozu azalttığını belirledik. Melatoninin anti-apoptotik etkisini antioksidan sistem üzerinden gerçekleştirmiş olabileceğini söyleyebiliriz.

Haeri ve diğ. (2013) yaptıkları bir çalışma ile gama radyasyonu verilen farelerin testisinde artan apoptozun karnozin uygulaması ile azaldığını gözlemlemişlerdir. Ayrıca insanlarda yapılan bir çalışmada karnozinin interlökin-1 β üretimini arttırarak ve apoptozu inhibe ederek immün cevabı düzenleyici bir rol aldığı da gösterilmiştir (Tan ve Candlish, 1998). Bu çalışmalara paralel olarak karnozinin, antioksidan etkisi ile,

radyasyonun oluşturduğu ince bağırsak hasarında apoptoza giden hücrelerin sayısında azalmaya sebep olduğunu düşünmekteyiz.

İnflamasyon, canlı dokuların hasara karşı gösterdiği bir reaksiyon, koruyucu bir yanıttır. Temel amacı, organizmayı hem hücre hasarının etkeni olan mikroorganizma ve toksinlerden korumak, hem de hasar sonucu ortaya çıkan nekrotik hücre ve doku artıklarından temizlemektir. İnflamasyon oluşumunda önemli olaylardan birisi de, fagositteki oksijen tüketiminin hızlı ve ani artışını sağlayarak hasara neden olan toksin veya mikroorganizmaya karşı savunma sağlamaktır. Oksijen patlaması denen bu olay, reaktif oksijen ürünlerini ortaya çıkarır (Faith ve diğ., 2008). TNF- α çeşitli inflamatuvar ve immünmodülatör uyarana yanıt olarak çeşitli hücre tipleri tarafından üretilen bir sitokindir (Lentsch ve diğ., 2000). Doğrudan mitokondriye toksisitesi olabilir, apoptozu veya nekrozu indükleyebilir (Baker ve Reddy, 1998). Çalışmamızda radyasyonun meydana getireceği muhtemel oksidatif strese karşı meydana gelecek inflamasyonun varlığını belirlemek amacıyla TNF- α ' yı immünohistokimyasal olarak tespit ettik.

Radyasyonun inflamatuvar hücreleri aktive ederek ince bağırsak inflamasyonuna sebep olabileceği gösterilmiştir (Saclarides, 1997). Yapılan bir çalışmada 6 ve 8 Gy radyasyon verilen sıçanlarda malondialdehit, miyeloperoksidaz, nitrik oksit artışı ve glutatyon seviyelerindeki azalış gibi faktörlerin inflamatuvar süreçte önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Ayrıca, inflamatuvar hücre aktivasyonunun da, kript hücrelerinin ölümü ile karakterize edilen akut ince bağırsak hasarı ile ilişkili olabilecek belli sitokinlerin, inflamatuvar araçların ve reaktif oksijen metabolitlerinin sentezini uyardığı belirlenmiştir (Savarese ve diğ., 2003). Onal ve diğ. (2011)'nin yaptıkları çalışmada ince bağırsakta radyasyonun inflamatuvar süreci uyardığı gösterilmiştir. Biz de yaptığımız çalışma ile önceki çalışmalara paralel olarak radyasyon verilen sıçanların ince bağırsağında inflamasyonun arttığını belirledik.

Radyasyon uygulamasından önce verilen melatoninin, sadece radyasyon verilen bireylere göre inflamasyonu azaltarak koruyucu etki gösterdiği bildirilmiştir (Onal ve diğ., 2011). Ayrıca alüminyum ile oluşturulan sıçan ince bağırsak hasarında inflamasyon varlığı tespit edilmiş ve melatoninin bu hasar sonucu oluşan inflamasyonu önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir (Sarıkaya, 2011).

Yapılan bir çalışmada karnozinin, asetaminofen tarafından arttırılan TNF- α , interlökin-6, interlökin-10 ve monosit kemoatraktan proteinini anlamlı olarak azalttığı saptanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre karnozinin antioksidan ve antiinflamatuvar bir ajan olduğu belirtilmiştir (Yan ve diğ., 2009). Ayrıca diğer araştırmacılar da karnozinin antioksidan özelliğinden dolayı dokuyu hasar ve inflamasyondan koruduğunu bildirmişlerdir (Babizhayev ve diğ., 1994; Chan ve diğ., 1994). Çalışmamızda da radyasyon hasarı oluşan bireylerin ince bağırsağında melatonin ve karnozinin, antioksidan etkileri ile, inflamasyonu azalttıkları belirlenmiştir.

Gama radyasyonun ince bağırsakta oluşturduğu oksidatif stresi araştıran bir çalışmada GSH ve KAT degerlerinin belirgin bir ölçüde azaldığı bildirilmiştir (Saada ve diğ., 2010). Yaptığımız bu çalışma ile, gama radyasyonun ince bağırsakta KAT aktivitesini ve total GSH seviyesini istatistiksel olarak anlamlı bir biçimde azalttığını gözlemledik.

Glutasyon, DNA sentezinde ve hasarlı DNA parçalarının onarılmasında, metabolik fonksiyonların yerine getirilmesinde, zehirli maddelerin inaktif hale dönüştürülmesinde ve serbest radikallerin olası hasarlarının önlenmesinde görev alan çok önemli bir antioksidandır (Chavan ve diğ., 2005). Canlı dokularında oksidatif hasar mekanizmasını anlayabilmek için GSH değerlerinin belirlenmesi önemlidir. Birçok çalışmada antioksidan savunma sistemi belirleyicisi olarak GSH, okside glutasyon (GSSG) ve katalizör enzim glutasyon peroksidaz (GSH-Px) değerlerine bakılmaktadır (Balahoroğlu ve diğ. 2008).

Melatoninin en güçlü antioksidanlardan biri olduğu çeşitli antioksidanların gücünü belirlemek amacıyla yapılan karşılaştırma çalışmaları ile gösterilmiştir (Karbownik ve Reiter, 2000, Li ve diğ., 2008). Melatoninin SOD, GSH-Px, glutasyon redüktaz (GSH-Rd), glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) ve γ -glutamilsistein sentetaz gibi bazı antioksidan enzimlerin gen ekspresyonlarını ya da aktivitelerini arttırdığı ve bu yolla oksidatif stresi baskıladığı bilinmektedir. GSH havuzunu koruyan GSH-Rd aktivitesinin ekzojen melatonin ile yükseldiği bildirilmiştir. Melatonin tarafından γ -glutamilsistein sentetazın uyarılmasıyla, insan endotel hücrelerinde total GSH içeriğinin yükseldiği öne sürülmektedir (Yazıcı ve Köse, 2004).

İyonize radyasyona maruz bırakılan farelerle yapılan bir çalışmada kuvvetli bir antioksidan olan melatoninin KAT ve GSH seviyelerini arttırarak doku hasarına karşı koruyucu etki gösterdiği ve DNA hasarını en aza indirdiği gösterilmiştir (Karbownik ve Reiter, 2000). Liu ve diğ.'nin (2012) radyasyonun uyardığı sıçan beyinde oluşan oksidatif hasara karşı melatoninin etkilerini araştırdıkları bir çalışmada, radyasyonun etkisi ile azalan KAT ve SOD miktarlarının melatonin uygulaması ile arttığı gösterilmiştir. Radyasyon nefropatisine karşı melatoninin etkilerinin incelendiği diğer bir çalışmada ışınlanma öncesi verilen melatoninin total antioksidan enzim, SOD ve GSH-Px miktarında artışa sebep olduğu gösterilmiştir (Özdemir, 2010). Radyasyonun hipotalamus ve serebral korteks üzerinde katalaz seviyelerini azalttığını gösteren bir çalışmada, melatoninin antioksidan özelliği nedeniyle azalan katalaz seviyelerini arttırdığı gösterilmiştir (Yıldırım ve diğ., 2007). Yaptığımız çalışma ile melatonin verilen radyasyon hasarı oluşturulmuş bireylerin ince bağırsağında, total glutatyon ve katalaz değerlerinin, radyasyon bireylerinin değerlerine göre anlamlı ölçüde arttığını gösterdik. Melatoninin, gerek kendisi bir antioksidan olarak gerekse glutatyon ve katalaz gibi önemli antioksidan seviyelerini arttırarak, radyasyonun ince bağırsak üzerinde meydana getirdiği hasarı önemli ölçüde düzelttiğini söyleyebiliriz.

Yan ve diğ. (2009) farelerde asetaminofen ile oluşturulan karaciğer hasarından önce dört hafta boyunca oral verilen karnozinin ve histidinin etkisini araştırmışlardır. Çalışmanın sonucunda karnozinin belirgin olarak GSH'yı arttırdığı, serbest oksijen radikallerini azalttığı, GSH-Px ve KAT aktivitelerini arttırdığı, böylece asetaminofenin neden olduğu oksidatif stresi azalttığı gösterilmiştir. Kadmiyum ile oluşturulan akut karaciğer hasarında karnozinin etkileri araştırılan bir çalışmada hasar sebebiyle azalan GSH, KAT ve SOD seviyelerinin karnozin uygulaması ile arttığı gösterilmiştir (Fouad ve diğ., 2009). Noori ve Mahboob (2010), cisplatinin böbrek üzerinde oluşturduğu oksidatif hasarı araştırdıkları bir çalışmada, dokuda GSH, KAT ve SOD seviyelerinin azaldığını, karnozin uygulamasının ise bu antioksidanların seviyelerini arttırdığını belirtmişlerdir. Baykara ve diğ. (2009) iskemi-reperfüzyon ile sıçanlarda oluşturdukları karaciğer hasarında ise iskemiden 30 dakika önce ve reperfüzyondan hemen sonra uygulanan karnozinin etkisini araştırmışlardır. Bu çalışmanın sonucunda karnozinin, karaciğer hasarında histopatolojik olarak belirgin düzelme sağladığı ve total glutatyon düzeyini anlamlı olarak arttırdığı gösterilmiştir. Ayrıca Artun (2008)

karnozinin sıçanlarda alkole bağı karaciğer hasarı üzerine etkisini incelediği çalışmada, karnozin ön uygulaması yapılan grupta total glutatyon düzeyinin etanol verilen gruba göre arttığını belirlemiştir. Çalışmamız sonucunda karnozinin ince bağırsakta katalaz aktivitesini ve total glutatyon değerlerini anlamlı derecede arttırdığını gözlememiz, karnozinin önemli bir antioksidan olabileceği görüşünü destekler niteliktedir.

Bu çalışmada elde edilen bulgular ve bu bulgulara dayanarak vardığımız sonuçları özetlemek gerekirse;

- Total vücut ışınlanması yapılan sıçan ince bağırsağında radyasyonun doku hasarı meydana getirdiği, ışınlama öncesi ve sonrası verilen melatonin, karnozin ve melatonin + karnozinin bu hasar üzerindeki koruyucu bir etki gösterdiği,
- Radyasyonun ince bağırsaktaki proliferasyonu azaltmasına karşın, melatonin, karnozin ve melatonin + karnozinin iyileştirici bir etki göstererek proliferasyonu arttırdığı,
- Radyasyonun ince bağırsakta inflamasyona sebep olduğu, melatonin, karnozin ve melatonin + karnozinin bu etkiyi azaltarak antiinflamatuvar bir etki gösterdiği,
- Radyasyonun ince bağırsakta apoptozu uyardığı, melatonin, karnozin ve melatonin + karnozinin bu etkiyi azaltarak antiapoptotik bir etki gösterdiği,
- Radyasyon hasarında total glutatyon seviyesinin azaldığı, melatonin, karnozin ve melatonin + karnozinin antioksidan etki ile total glutatyon seviyesini arttırdığı,
- Radyasyon hasarında katalaz aktivitesinin azaldığı, melatonin, karnozin ve melatonin + karnozin uygulanmasının, antioksidan etki göstererek, katalaz seviyesini arttırdığı belirlenmiştir.
- Sonuç olarak, sıçan ince bağırsağında radyasyon ile meydana gelen hasar üzerinde eksojen olarak verilen melatonin, karnozin ve melatonin + karnozinin sitoprotektif, antioksidan, antiapoptotik, antiinflamatuvar ve proliferatif bir etki gösterdikleri ve koruyucu bir rol aldıkları saptanmıştır.

- Çalışmamız klinikte, radyoterapinin sebep olduğu yan etkilerin önlenmesi veya azaltılmasına yönelik ajanların geliştirilmesi için yapılan çalışmalara ışık tutabilecektir.

KAYNAKLAR

- Agarwal, A., Saleh, R.A. and Bedaiwy, M.A., 2003, Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction, *Fertility and Sterility*, 79, 829-43.
- Akkuş, I., 1995, *Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri*, Mimoza Yayınları, İstanbul, ISBN: 975-543-038-5.
- Akpolat, M., 2007, *Gamma Radyasyonun İleum Kadehsi Hücrelerinde Oluşturduğu Hasarlara Karşı Curcumin Ve C Vitamininin Koruyucu Etkilerinin Işık Ve Elektron Mikroskopik Düzeylerde İncelenmesi*, Doktora Tezi, Trakya Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Akpolat, M., Kanter, M., Uzal, M.C., 2009, Protective effects of curcumin against gamma radiation-induced ileal mucosal damage, *Archives of Toxicology*, 83(6), 609–617.
- Altınışik, M., 2000, *Serbest oksijen radikalleri ve antioksidanlar* [online], <http://www.mustafaaltinisik.org.uk/21-adsem-01.pdf>, [Ziyaret Tarihi: 27 Mayıs 2010].
- Andersen, J.K., 2004, Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence, *Nature Reviews Neuroscience*, 5, 18-25.
- Andreyev, A.Y., Kushnareva, Y.E., Starkov, A.A., 2005, Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species, *Biochemistry (Moscow)*, 70(2), 200-214.
- Arinola, O.G., 2004, Metal binding acute phase proteins and trace elements in Nigerian children with urinary schistosomiasis, *Biokemistri*, 16(1), 23.
- Arrick, B.A., Nathan, C.F., 1984, Glutathione metabolism as a determinant of therapeutic efficacy: a review, *Cancer Research*, 44, 4224-4232.
- Artun, B.C., 2008, *Karnozin Uygulamasının Sıçanlarda Alkole Bağlı Karaciğer Hasarı Üzerine Etkisinin İncelenmesi*, Uzmanlık Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Aydin, A.F., Kucukgergin, C., Ozdemirler-Erata, G., Kocak-Toker, N., Uysal, M., 2010a, The effect of carnosine treatment on prooxidant-antioxidant balance in liver, heart and brain tissues of male aged rats, *Biogerontology*, 11, 103–109.
- Aydin, A.F., Kusku-Kiraz, Z., Dogru-Abbasoglu, S., Gulluoglu, M., Uysal, M., Kocak-Toker, N., 2010b, Effect of carnosine against thioacetamide-induced liver cirrhosis in rat, *Peptides*, 31, 67–71.

- Aydoğdu, N., Erbař, H., Kaymak, K., 2007a, Taurin, melatonin ve N-asetilsisteinin kadmiyuma bağlı akciğer hasarındaki antioksidan etkileri, *Trakya Üniversitesi Tıp Fakóltesi Dergisi*, 24(1), 43-48.
- Aydoğdu, N., Kanter, M., Erbaş, H., Kaymak, K., 2007b, Kadmiyuma bağlı karaciğer hasarında taurin, melatonin ve asetilsisteinin nitrik oksit, lipid peroksidasyonu ve bazı antioksidanlar üzerindeki etkileri, *Erciyes Tıp Dergisi*, 29(2), 89-96.
- Babizhayev, M.A., Seguin, M.C., Gueyne, J., Evstigneeva, R.P., Ageyeva, E.A., Zheltukhina, G.A., 1994, L-carnosine (beta-alanyl-L-histidine) and carcinine (beta-alanylhistamine) act as natural antioxidants with hydroxyl-radical-scavenging and lipid-peroxidase activities, *The Biochemical Journal*, 304(2), 509–516.
- Baker, S.J., Reddy, E.P., 1998, Modulation of life and death by the tumor necrosis receptor superfamily, *Oncogene*, 17, 3261–3270.
- Balahoroğlu, R., Dölger, H., Özbek, H., Bayram, I., şekeroğlu, M.R., 2008, Protective effects of antioxidants on the experimental liver and kidney toxicity in mice, *European Journal of General Medicine*, 5(3), 157-164.
- Bancroft, J.D., Stevens, A., 1982, *Theory and practica of histological techniques*, Churchill Livingstone, Edinburg.
- Baykara, B., Tekmen, I., Pekcetin, C., Ulukus, C., Tuncel, P., Sagol, O., Ormen, M., Ozogul, C., 2009, The protective effects of carnosine and melatonin in ischemia-reperfusion injury in the rat liver, *Acta Histochemica*, 111, 42-51.
- Bealieu, J.F., 1999, Integrins and human intestinal cell functions, *Frontiers in Bioscience*, 4, 310-321.
- Bergonie, K., Tribondeau, L., 1906, Actions Des Rayons X Sur Le Testicle, *Archives D'electricite Medical*, 14, 779-911.
- Berthrong, M., Fajardo, L.F., 1981, Radiation injury in surgical pathology. Part II. Alimentary tract, *American Journal of Surgical Pathology*, 5, 153-178.
- Beyer, C.E., Steketee, J.D., Saphier, D., 1998, Antioxidant properties of melatonin-an emerging mystery, *Biochemical Pharmacology*, 56, 1265-1272.
- Blokhina, O., Virolainen, E., Fagerstedt, K.V., 2003, Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review, *Annals of Botany*, 91:179-194.
- Boldyrev, A., Johnson, P., Wei, Y., Tan, Y., Carpenter, D.O., 1999, Carnosine and taurine protect rat cerebellar granular cells from free radical damage, *Neuroscience Letters*, 263, 169-172.
- Brzezinski, A., 1997, Melatonin in humans, *The New England Journal of Medicine*, 336, 186-195.

- Busch, D.B., 1993, Radiation and Chemotherapy Injury: Pathophysiology, Diagnosis, and Treatment, *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 15, 49-89.
- Cadenas, E. and Packer, L., 2002, *Handbook of Antioxidants*, Marcel Dekker Inc., New York, ISBN: 0-8247-0547-5.
- Campbell, N.A. and Reece, J.B., 2006, *Biyoloji*, Palme Yayıncılık, ISBN: 975-8982-85-0.
- Carroll, M.P., Zera, R.T., Roberts, J.C., Schlafmann, S.E., Feeney, D.A., Johnston, G.R., West, M.A., Bubrick, M.P., 1995, Efficacy of radioprotective agents in preventing small and large bowel radiation injury, *Disease of Colon Rectum*, 38(7), 716-22.
- Chan, W.K.M., Decker, E.A., Lee, J.B., Butterfield, L.D., 1994, EPR spin-trapping studies of the hydroxy radical scavenging activity of carnosine and related dipeptides, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 42, 1407–1410.
- Chavan, S., Sava, L., Saxena, V., Pillai, S., Sontakke, A., Ingole, D., 2005, Reduced glutathione: importance of specimen collection, *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 20(1), 150-152.
- Chowdhury, P., Soulsby, M., 2008, Oxidant- antioxidant status in rats exposed to simulated weightlessness by hind-limb unloading and reloading, *The Open Clinical Chemistry Journal*, 1, 47-56.
- Cox, J.D., 1994, Gastrointestinal Tract, *Moos' Radiation Oncology*, 7, 428-440.
- Çoğulu, Ö., Alpman, A., Durmaz, B., Özkinay, F., 2007, Mitoz ve mayozun moleküler temelleri, Türkiye Klinikleri, *Journal of Medical Sciences*, 27, 725- 737.
- Dahlquist, A., Olsson, I., Norden, A., 1965, The periodate schiff reaction: specificity, kinetics and reaction products with pure substrate, *Journal of Histochemical Cytochemical*, 13(6), 423-430.
- Dalla, P., 1966, *Intestinal malabsorption in patients undergoing abdominal radiation therapy*, In: Sullivan ME (ed). *Gastrointestinal Radiation Injury*, Richland: Washington.
- Darko, E., Ambrus, H., Stefanovits-Banyai, E., Fodor, J., Bakos, F., Barnabas, B., 2004, Aluminium toxicity, Al tolerance and oxidative stress in an Al-sensitive wheat genotype and in Al-tolerant lines developed by in vitro microspore selection, *Plant Science*, 166(3), 583-591.
- Davies, K.J.A., Pryor, W.A., 2005, The evolution of free radical biology and medicine: a 20-year history, *Free Radical Biology and Medicine*, 39, 1263–1290.
- Diamond, A.M., Dale, M.P., Murray, J.L., Grdina, D.J., 1996, The inhibition of radiation induced mutagenesis by the combined effects of selenium and the aminothiol WR-1065, *Mutation Research*, 356, 147-154.

- Dokmeci, D., Akpolat, M., Aydogdu, N., Uzal, M.C., Turan, F.N., 2006, The protective effect of L-carnitine on ionizing radiation-induced free oxygen radicals, *Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science*, 33(2), 75-83.
- Drazen, D.L., Bilu, D., Bilbo, S.D., Nelson, R.J., 2001, Melatonin enhancement of splenocyte proliferation is attenuated by luzindole, a melatonin receptor antagonist, *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 280 (5), 1476-1482.
- Droge, W., 2002, Free radicals in the physiological control of cell function, *Physiological Reviews*, 82, 47-95.
- Faith, M., Sukumaran, A., Pulimood, A.B., Jacob, M., 2008, How reliable an indicator of inflammation is myeloperoxidase activity, *Clinica Chimica Acta*, 396(1-2), 23-25.
- Fang, Y.Z., Yang, S., Wu, G., 2002, Free Radicals, Antioxidants, and Nutrition, *Nutrition*, 18, 872-9.
- Fischer, T.W., Zmijewski, M.A., Wortsman, J., Slominski, A., 2008, Melatonin maintains mitochondrial membrane potential and attenuates activation of initiator (casp-9) and effectorcaspases (casp-3/casp-7) and PARP in UVR-exposed HaCaT keratinocytes, *Journal of Pineal Research*, 44 (4), 397-407.
- Fouad, A.A., Qureshi, H.A., Yacoubi, M.T., Al-Melhim, W.N., 2009, Protective role of carnosine in mice with cadmium-induced acute hepatotoxicity, *Food and Chemical Toxicology*, 47(11), 2863-2870.
- Fujii, T., Takaoka, M., Muraoka, T., Kurata, H., Tsuruoka, N., Ono, H., Kiso, Y., Tanaka, T., Matsumura, Y., 2003, Preventive effect of L-carnosine on ischemia/reperfusion-induced acute renal failure in rats, *European Journal of Pharmacology*, 474, 261-267.
- Fujii, T., Takaoka, M., Muraoka, T., Kurata, H., Tsuruoka, N., Ono, H., Kiso, Y., Tanaka, T., Matsumura, Y., 2005, Dietary supplementation of L-carnosine prevents ischemia/reperfusion induced renal injury in rats, *Biological and Pharmaceutical Bulltein*, 28(2), 361-363.
- Green, D.R., 2000, Apoptotic pathways: paper wraps stone blunts scissors, *Cell*, 102, 1-4.
- Greenstock, C.L., 1993, Radiation and Aging: FreeRadical Damage, Biological Response and Possible Antioxidant Intervention, *Medical Hypotheses*, 41, 473-82.
- Guney, Y., Hicsonmez, A., Uluoglu, C., Guney, H.Z., Ozel Turkcu, U., Take, G., Yucel, B., Caglar, G., Bilgihan, A., Erdogan, D., Nalca-Andrieu, M., Kurtman C., Zengil H., 2007, Melatonin prevents inflammation and oxidative stress caused by abdominopelvic and total body irradiation of rat small intestine, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 40, 1305-14.

- Gutteridge, J.M., Halliwell, B., 2000, Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 899, 136-47.
- Guzman-Stein, G., Bonsack, M., Lieberly, J., 1989, Abdominal radiation causes bacterial translocation, *The Journal of Surgical Research*, 46, 104-107.
- Güneş, H., 1999, Sitokinlerin hücre döngüsü üzerindeki etkileri, *Turkish Journal of Biology*, 23, 283- 292.
- Haeri S. A., Rajabi H., Fazelipour S., Hosseinimehr S. J., 2013, Carnosine mitigates apoptosis and protects testicular seminiferous tubules from gamma-radiation-induced injury in mice, *Andrologia*, 12, 1-6.
- Hall, J.E., 2000, *Radiobiology for the Radiologist*, 5th ed. J.B. Lippincott Company, USA, ISBN: 978-975-420-579-4.
- Halliwell, B., Whiteman, M., 2004, Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean, *British Journal of Pharmacology*, 142, 231–255.
- Hardeland, R., Poeggeler, B., 2008, Melatonin beyond its classical functions, *The Open Physiology Journal*, 1, 1-22.
- Hardeland, R., Reiter, R.J., Poeggeler, B., Tan, D.X., 1993, The significance of the metabolism of the neurohormone melatonin: antioxidative protection and formation of bioactive substances, *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 17(3), 347-357.
- Hassett, D.J., Imlay, J.A., 2007, Bactericidal antibiotics and oxidative stress: a radical proposal, *ACS Chemical Biology*, 2(11), 708-710.
- Hayashi, M., Araki, T., 2002, Caspase in renal development, *Nephrology Dialysis Transplantation*, 17 (9), 8-10.
- Herren, B., Levkau, B., Raines, E.W., Ross, R., 1998, Cleavage of beta-catenin and plakoglobin and shedding of VE-cadherin during endothelial apoptosis: evidence for a role for caspases and met alloproteinases, *Molecular Biology of the Cell*, 9 (6), 1589-601.
- Hill, S. M., Blask, D.E., 1988, Effects of the Pineal Hormone Melatonin on the Proliferation and Morphological Characteristics of Human Breast Cancer Cells (MCF-7) in Culture, *Cancer Research*, 48, 6121.
- Howart, G.S., Francis, G.L., Cool, J.C., Xu, X., Byard, R.W., Read, L.C., 1996, Milk growth factors enriched from cheese whey ameliorate intestinal damage by methotrexate when administered orally to rats, *The Journal of Nutrition*, 129, 2519-2530.

- Humanson, G.L., 1972, *Animal tissue techniques*, H.W. Freeman and Company, San Francisco, ISBN: 61-17383.
- Hussein, M.R., Abu-Dief, E.E., Kamel, E., El-Ghait, A.T.A., Abdulwahed, S.R., Ahmad, M.H., 2008, Melatonin and roentgen irradiation-induced acute radiation enteritis in Albino rats: An animal model, *Cell Biology International*, 32, 1353-1361.
- Ianas, O., Olivescu, R., Badescu, I., 1991, Melatonin involvement in oxidative processes, *Romanian Journal of Endocrinology*, 29, 117-123.
- Javois, L.C., 1999, *Immunocytochemical Methods and Protocols*, Humana press, New Jersey, ISBN: 0-89603-570-0.
- Jenkins, R.R., Tengji, J., 1981, Catalase activity in skeletal muscle of varying fibre types, *Experientia*, 37, 67-8.
- Jones, D.P., 2008, Radical-free biology of oxidative stress, *American Journal of Physiology Cell Physiology*, 295, 849-868.
- Jones, S.P., Hoffmeyer, M.R., Sharp, B.R., Ho, Y.S., Lefer, D.J., 2003, Role of intracellular antioxidant enzymes after in vivo myocardial ischemia and reperfusion, *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*, 284, 277-282.
- Junqueira, B., Carneiro, D., 2009, *Temel Histoloji*, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, ISBN: 97897542006999.
- Kanter, M., Tarladaçalışır, Y.T., Akpolat M., Mercantepe T., 2008, Gamma radyasyona bağlı oluşan jejunum mukoza hasarına karşı curcumin ve amifostinin koruyucu etkilerinin incelenmesi, *Tıp Araştırmaları Dergisi*, 2008, 6 (3), 128-135.
- Karbownik, M., Reiter, R.J., 2000, Antioxidative effects of melatonin in protection against cellular damage caused by ionizing radiation, *Experimental Biological Medicine*, 225, 9-22.
- Kember, N.F., 1967, Cell survival and radiation damage in growth cartilage, *British Journal of Radiology*, 40, 496-505.
- Kelly, F.J., 2003, Oxidative stress: its role in air pollution and adverse health effects, *Occupation of Environmental Medicine*, 60, 612-616.
- Kelly, S.A., Havrilla, C.M., Brady, T.C., Abramo, K.H., Levin, E.D., 1998, Oxidative stress in toxicology: established mammalian and emerging piscine model systems, *Environmental Health Perspectives*, 106(7), 375-384.
- Kierszenbaum, A.L., 2006, *Histoloji ve Hücre Biyolojisi Patolojiye Giriş*, Palme Yayıncılık, İstanbul, ISBN: 994-4341-0-29.

- Kim, B.C., Shon, B.S., Ryoo, Y.W., Kim, S.P., Lee, K.S., 2001, Melatonin reduces X-ray irradiation-induced oxidative damages in cultured human skin fibroblasts, *Journal of Dermatology Science*, 26, 194-200.
- Kirkman, H.N., Gaetani, G.F., 1984, Catalase: a tetrameric enzyme with four tightly bound molecules of NADPH, *National Academy of Sciences of the United States of America*, 81(14), 4343-4347.
- Kirkman, H.N., Rolfo, M., Ferraris, A.M., Gaetani, G.F., 1999, Mechanisms of protection of catalase by NADPH. Kinetics and stoichiometry, *The Journal of Biological Chemistry*, 274(20), 13908-13914.
- Klimberg, V.S., Souba, W.W., Dolson, D.J., 1990, Prophylactic glutamine protects the intestinal mucosa from radiation injury, *Cancer*, 66, 62.
- Koc, M., Taysi, S., Buyukokuroglu, M.E., Bakan N., 2003, Melatonin protects rat liver against irradiation-induced oxidative injury, *Journal of Radiation Research*, 44, 211-215.
- Kocer, I., Taysi, S., Ertekin, M.V., Karslioglu, I., Gepdiremen, A., Sezen, O. Serifoglu, K., 2007, The effect of L-carnitine in the prevention of ionizing radiation-induced cataracts: a rat model, *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 245, 588-594.
- Kohen, R., Nyska, A., 2002, Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants redox reactions and methods for their quantification, *Toxicologic Pathology*, 30(6), 620-650.
- Kruidenier, L., Kuiper, I., Dujin, W., Mieremet-Ooms, M.A.C., Hogezaand, R.A., Lamers, C.B.H.W., Verspaget, H.W., 2003, Imbalanced secondary mucosal antioxidant response in inflammatory bowel disease, *Journal of Pathology*, 201, 17-27.
- Kumbul, K., 2007, *Deneyisel intestinal iskemi ve reperfüzyon modelinde caffeic acid phenethyl esterin akciğer hasarını önlemedeki etkinliği*, Uzmanlık Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Kunwar, A., Bag, P.P., Chattopadhyay, S., Jain, V.K., Priyadarsini, K.I., 2011, Anti-apoptotic, anti-inflammatory, and immunomodulatory activities of 3,3-diselenodipropionic acid in mice exposed to whole body γ -radiation, *Archives of Toxicology*, 85, (11), 1395-1405.
- Lai, H.S., Chen, W.J., Chiang, L.Y., 2000, Free radical scavenging activity of fullereneol on the ischemia-reperfusion intestine in dogs, *World Journal Surgery*, 24, 450-454.
- Lentsch, A.B., Atsushi, K., Yoshidome, H., 2000, Inflammatory mechanisms and therapeutic strategies for warm hepatic ischemia/reperfusion injury, *Hepatology*, 32, 169-173.

- Lerner, A., 2007, Aluminum is a potential environmental factor for Crohn's disease induction, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1107, 329-345.
- Lesgards, J.F., Gauthier, C., Iovanna, J., Vidal, N., Dolla, A., Stocker, P., 2011, Effect of reactive oxygen and carbonyl species on crucial cellular antioxidant enzymes, *Chemico-Biological Interactions*, 190(1), 28-34.
- Li, J.Y., Yin, H.Z., Gu, X., Zhou, Y., Zhang, W.H., Qin, Y.M., 2008, Melatonin protects liver from intestine ischemia reperfusion injury in rats, *World Journal of Gastroenterology*, 14(48), 7392-7396.
- Liu, Y., Zhang, L., Zhang, H., Liu, B., Wu, Z., Zhao, W., Wang, Z., 2012, Exogenous melatonin modulates apoptosis in the mouse brain induced by high-LET carbon ion irradiation, *Journal of Pineal Research*, 52(1), 47-56.
- Lowry, O.H., Rosebrough, W.I., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951, Protein measurement with the folin phenol reagent, *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.
- Ma, X.Y., Jiang, Z.Y., Lin, Y.C., Zheng, C.T., Zhou, G.L., 2010, Dietary supplementation with carnosine improves antioxidant capacity and meat quality of finishing pigs, *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition (Berl)*, 94, e286-e295.
- Macmillan, T.J. and Steel, G.G., 1997, *DNA damage and cell killing*, In; Steel GG (Ed.). *Basic Clinical Radiobiology*. New York: Co-published in the USA by Oxford University Press.
- Mansour, H.H., 2006, Protective role of carnitine ester against radiation-induced oxidative stress in rats, *Pharmacology Research*, 54, 165-171.
- Marx, E.R., Ehler, J.W., Tayapongsk, P., 1990, Relationship of oxygen dose to angiogenesis induction in irradiated tissue, *American Journal of Surgery*, 160(5), 519-524.
- Mates, J.M., 2000, Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species, *Toxicology*, 153, 83-104.
- Mazeron, J., Locoche, T., Maugis, A., 1998, (Çeviri: Uzal C). *Kanserde ışınlama teknikleri*, Ankara: Öncü Limited, 7-60.
- Mazzon, E., Esposito, E., Crisafulli, C., Riccardi, L., Muià, C., Di Bella, P., Meli, R., Cuzzocrea, S., 2006, Melatonin modulates signal transduction pathways and apoptosis in experimental colitis, *Journal of Pineal Research*, 41 (4), 363-373.
- McArdle, A.H., Reid, E.C., Laplante, M.P., Freeman, C.R., 1986, Prophylaxis against radiation injury: the use of elemental diet prior and during radiotherapy for invasive bladder cancer and early postoperative feeding following radical cystectomy and ileal conduit, *Archives of Surgery*, 121, 879-885.

- Mehmetçik, G., Ozdemirler, G., Kocak-Toker, N., Cevikbas, U., Uysal, M., 2008, Role of carnosine in preventing thioacetamide-induced liver injury in the rat, *Peptides*, 29, 425–429.
- Merle, A., Delagrangé, P.H., Renard, P., Lesieur, D., Cuber, J.C., Roche, M., Pellissier, S., 2000, Effect of melatonin on motility pattern of small intestine in rats and its inhibition by melatonin receptor antagonist S 22153, *Journal of Pineal Research*, 29(2), 116-124.
- Merritt, A.J., Potten, C.S., Watson, A.J., Loh, D.Y., Nakayama, K., Nakayama, K., Hickman, J.A., 1995, Differential expression of bcl-2 in intestinal epithelia. Correlation with attenuation of apoptosis in colonic crypts and the incidence of colonic neoplasia, *Journal of Cell Sciences*, 108, 2261-2271.
- Millan-Plano, S., Piedrafita, E., Miana-Mena, F.J., Fuentes-Broto, L., Martínez-Ballarín, E., López-Pingarrón, L., Saenz, M.A., García, J.J., 2010, Melatonin and structurally-related compounds protect synaptosomal membranes from free radical damage, *International Journal of Molecular Sciences*, 11, 312-328.
- Mohseni, M., Mihandoost, E., Shirazi, A., Sepehrizadeh, Z., Bazzaz, J.T., Ghazikhansari, M., 2012, Melatonin may play a role in modulation of bax and bcl-2 expression levels to protect rat peripheral blood lymphocytes from gamma irradiation-induced apoptosis, *Mutation Research*, 738-739, 19-27.
- Morceli, G., Honorio-França, A.C., Fagundes, D.L., Calderon, I.M., França, E.L., 2013, Antioxidant effect of melatonin on the functional activity of colostrum phagocytes in diabetic women, *PLoS One*, 8 (2), e56915.
- Monobe, M., Hino, M., Sumi, M., Uzawa, A., Hirayama, R., Ando, K., 2005, Protective effect of melatonin on γ -ray induced intestinal damage, *International Journal of Radiational Biology*, 81(11), 855-860.
- Mutlu-Turkoglu, U., Erbil, Y., Oztezcan, S., Olgaç, V., Toker, G., Uysal, M., 2000, The effect of selenium and/or vitamin E treatments on radiation-induced intestinal injury in rats, *Life Sciences*, 66(20), 1905-1913.
- Nakade, O., Koyama, H., Arijji, H., Yajima, A., Kaku, T., 1999, Melatonin stimulates proliferation and type I collagen synthesis in human bone cells in vitro, *Journal of Pineal Research*, 27, 106–110.
- Institute For Laboratory Animal Research, 2011, *Guide for the care and use of laboratory animals*, The National Academies Press, Washington D.C., ISBN: 0-309-15401-4.
- Neoman, E., Zahran, A.M., Kamal, A.M., 2002, Vitamin E and selenium administration as a modulator of antioxidant defence system: Biochem Assesment and Modification, *Biological Trace Element Research*, 86, 55-64.

- Noori, S., Mahboob, T., 2010, Antioxidant effect of carnosine pretreatment on cisplatin-induced renal oxidative stress in rats, *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 25 (1), 86-91.
- Onal, C., Kayaselcuk, F., Topkan, E., Yavuz, M., Bacanlı, D., Yavuz, A., 2011, Protective Effects of Melatonin and Octreotide Against Radiation-Induced Intestinal Injury, *Digestive Diseases and Sciences*, 56, 359–367.
- Ozdogan, K., Taskin, E., Dursun, N., 2011, Protective effect of carnosine on adriamycin-induced oxidative heart damage in rats, *Anadolu Kardiyoloji Dergisi*, 11, 3–10.
- Özalpan, A., 2001, *Temel Radyobioloji*, 1. Basım, Haliç Üniversitesi Yayınları, İstanbul, ISBN:975-8574-00-0.
- Özdemir, Ö., 2010, *Melatonin Ve L Karnitinin Radyasyon Nefropatisine Karşı Etkileri*, Uzmanlık Tezi, On Dokuz Mayıs Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Özden, A., 2008, *Ratlarda deneysel olarak oluşturulan iyonik kontrast madde kaynaklı böbrek hasarında oksidatif stresin fonksiyonu ve olası oksidatif stres üzerine kafeik asit fenetil esterinin etkisinin araştırılması*, Uzmanlık Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi.
- Penninckx, M., 2000, A short review on the role of glutathione in the response of yeasts to nutritional, environmental, and oxidative stresses, *Enzyme and Microbial Technology*, 26(9-10), 737-742.
- Pereira, L.B., Mazzant^o, C.M., Goncalves, J.F., Cargnelutti, D., Tabaldi, L.A., Becker, A.G., Calgaroto, N.S., Farias, J.G., Battisti, V., Bohrer, D., Nicoloso, F.T., Morsch, V.M., Schetinger, M.R., 2010, Aluminum-induced oxidative stress in cucumber, *Plant Physiology and Biochemical*, 48(8), 683-689.
- Potten, C.S., Merritt, A., Hickman, J., Hall, P., Faranda, A., 1994, Characterization of radiation-induced apoptosis in the small intestine and its biological implications, *International Journal of Radiational Biology*, 65, 71-78.
- Reiter, R.J., 1993, Interactions of the pineal hormone melatonin with oxygen-centered free radicals: a brief review, *Brazilian Journal Medicine Biology Research*, 26, 1141-1155.
- Reiter, R., Tang, L., Garcia, J.J., Munoz-Hoyos, A., 1997, Pharmacological actions of melatonin in oxygen radical pathophysiology, *Life Sciences*, 60(25), 2255-2271.
- Reiter, R.J., 2003, Melatonin: clinical relevance, *Best Practical Research of Clinical Endocrinology Metabolism*, 17, 273-285.
- Reiter, R.J., Tan, D.X., Mayo, J.C., Sainz, R.M., Leon, J., Czarnocki, Z., 2003, Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans, *Acta Biochimica Polonica*, 50(4), 1129-1146.

- Reiter, R.J., Tan, D.X., Osuna, C., Gitto, E., 2000, Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress, *Journal of Biomedical Science*, 7, 444-458.
- Robbins, M.E.C., Zhao, W., 2004, Chronic oxidative stress and radiation late normal tissue injury: a review, *International Journal of Radiational Biology*, 80(4), 251-259.
- Robbins, S. and Kumar, V., 2000, *Temel Patoloji: Çevresel Hastalıklar; Fiziksel ajanlarla zedelenme*, (Çeviri Ed.: U Çevikbaş), 6. Basım, Nobel Tıp Kitapevleri Ltd. Şti., İstanbul.
- Romeu, M., Mulero, M., Giralt, M., Folch, J., Nogues, M.R., Torres, A., Fortuno, A., Sureda, F.X., Cabre, M., Paternain, J.L., Mallol, J., 2002, Parameters related to oxygen free radicals in erythrocytes, plasma and epidermis of the hairless rat, *Life Sciences*, 71, 1739-1749.
- Saada, H.N., Rezk, R.G., Eltahawy, N.A., 2010, Lycopene protects the structure of the small intestine against gamma-radiation-induced oxidative stress, *Phytotherapy Research*, 24 (2), 204-208.
- Saclarides, T.J., 1997, Radiation injuries of the gastrointestinal tract, *The Surgical Clinics of North America*, 77, 261-268.
- Sainza, R. M., Mayo, J.C., Rodriguez, C., Tan, D.X., Lopez-Burilloa, S. and Reiter, R. J., 2003, Melatonin and cell death: differential actions on apoptosis in normal and cancer cells, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 60, 1407-1426.
- Sakashita, T., Takanami, T., Yanase, S., Hamada, N., Suzuki, M., Kimura, T., Kobayashi, Y., Ishii, N., Higashitani, A., 2010, Radiation biology of caenorhabditis elegans: germ cell response, aging and behavior, *Journal of Radiational Research*, 51, 107-121.
- Samanta, N., Kannan, K., Bala, M., Goel, H.C., 2004, Radioprotective mechanism of podophyllum hexandrum during spermatogenesis, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 267, 167-176.
- Sarikaya, G., 2011, *Alüminyum ile oluşturulan sıçan ince bağırsak toksisitesi üzerinde melatoninin rolü*, Uzmanlık Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Savarese, D.M., Savy, G., Vahdat, L., Wischmeyer, P.E., Corey, B., 2003, Prevention of chemotherapy and radiation toxicity with glutamine, *Cancer Treatment Reviews*, 29, 501-513.
- Schally, A.V., Paz-Bouza, J.I., Schlosser, J.V., Karashima, T., Debeljuk, L., Gandle, B., 1987, Protective effects of analogs of luteinizing hormone-releasing hormone against x-irradiationinduced testicular damage in rats, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84, 851-855.
- Scibor, D., Czczot, H., 2006, Catalase: structure, properties, function, *Postepy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 60, 170-180.

- Sert, C., Çelik, M.S., 1996, Radyasyondan koruyucu ajanlar, *Türkiye Klinikler Journal of Medical Sciences*, 16, 292-298.
- Shaheen, A.A., Hassan, S.M., 1991, Radioprotection of whole-body gamma-irradiation-induced alteration in some hematological parameters by cysteine, vitamin E and their combination in rats, *Strahlenther und Onkologie*, 167(8), 498-501.
- Sheen-Chen, S., Ho, H., Chen, W., Eng, H., 2003, Obstructive Jaundice Alters Proliferating Cell Nuclear Antigen Expression in Rat Small Intestine, *World Journal of Surgery*, 27, 1161-1164.
- Shuryak, I., Brenner, D.J., 2009, A model of interactions between radiation-induced oxidative stress, protein and DNA damage in deinococcus radiodurans, *Journal of Theoretical Biology*, 261, 305–317.
- Somosy, Z., 2000, Radiation response of cell organelles, *Micron*, 31, 165-181.
- Somosy, Z., Horvath, M., Telbisz, A., Rez, G., Palfia, Z., 2002, Morphological aspects of ionizing radiation response of small intestine, *Micron*, 33, 167-178.
- Steel G.G., 1997, *The Significance of Radiobiology for Radiotherapy*, In; Steel GG (Ed.). Basic Clinical Radiobiology. New York: Co-published in the USA by Oxford University Press.
- Stvolinsky, S.L., Kukley, M.L., Dobrota, D., Vachova, M.M., Tkac, I., Boldyrev, A., 1999, Carnosine: an endogenous neuroprotector in the ischemic brain, *Cellular and Molecular Neurobiology*, 19(1), 45-56.
- Stvolinsky, S.L., Kukley, M.L., Dobrota, D., Mezesova, V., Boldyrev, A., 2000, Carnosine protects rats under global ischemia, *Brain Research Bulletin*, 53(4), 445-448.
- Tahan, G., Gramignoli, R., Marongiu, F., Aktolga, S., Cetinkaya, A., Tahan, V., Dorko, K., 2011, Melatonin expresses powerful anti-inflammatory and antioxidant activities resulting in complete improvement of acetic-acid-induced colitis in rats, *Digestive Diseases and Sciences*, 56 (3), 715-720.
- Take, G., Erdogan, D., Helvacioğlu, F., Göktas, G., Ozbey, G., Uluoğlu, C., Yücel, B., Guney, Y., Hicsonmez, A., Ozkan, S., 2009, Effect of melatonin and time of administration on irradiation-induced damage to rat testes, Effects of melatonin on irradiated testes, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 42, 621-628.
- Tan, K.M., Candlish, J.K., 1998, Carnosine and anserine as modulators of neutrophil function, *Clinical and Laboratory Haematology*, 20, 239-244.
- Tanaka, R.A., Ramos, F.M.M., Almeida, S.M., Vizioli, M.R., Bòscolo, F.N., 2005, Evaluation of Radioprotective Effect of Carnosine (β -Alanyl-1-Histidine) on the Wound Healing in Rats, *Journal of Applications Oral Sciences*, 13 (3), 253-258.

- Tandon, V.R., Sharma, S., Mahajan, A., Bardi, G.H., 2005, Oxidative stress: a novel strategy in cancer treatment, *JK Science*, 7(1), 1-3.
- Taşkın, E.İ., Akgün-Dar, K., Kapucu, A., Altunbaş, K., Fırat, İ., Doğruman, H., 2008, Sıçan kolon epiteli proliferasyonuna orlistat ve yeşil çayın etkisi, beta katenin ile olan ilişkisi, *Nobel Medicine*, 4(3), 15-19.
- Threumamma, K.E., 1996, Protective effects of curcumin, ellagic acid and bixin on radiation induced toxicity, *Indian Journal of Experimental Biology*, 34, 840-847.
- Toklu, H., Deniz, M., Yuksel, M., Keyr-Uysal, M., Sener, G., 2009, The protective effect of melatonin and amlodipine against cerebral ischemia/reperfusion induced oxidative brain injury in rats, *Marmara Medical Journal*, 22(1), 34-44.
- Tomas-Zapico, C., Coto-Montes, A., 2006, Melatonin as antioxidant under pathological processes, *Recent Patents on Endocrine, Metabolic and Immune Drug Discovery*, 1, 63-82.
- Tubiana, M. and Dutreix, J., 1990, *Introduction to Radiobiology*, Taylor&Francis, Paris.
- Turna, G., 2008, *Ehrlich asid solid tümör model oluşturulmuş farelerde thymus sipyleus ve taurinin karaciğer MDA, glutatyon, AOPP düzeylerine ve SOD aktivitesine etkileri*, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Türkkanı, A., 2001, *Gamma ışınlamasının testis seminifer tübülüsleri üzerindeki etkisinin ışık mikroskopu düzeyinde incelenmesi*, Uzmanlık Tezi, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi.
- Ulukaya, E., 2003, *Apoptozis Ders Notları*, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı.
- Valko, M., Neibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., Telser, J., 2007, Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39, 44-84.
- Valko, M., Rhode,s C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M., 2006, Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer, *Chemical Biology Interaction*, 160(1), 1-40.
- Wallace, S.S., 2002, Biological consequences of free radical-damaged DNA bases Free *Radical Biology and Medicine*, 33(1), 1-14.
- Wang, S.J., Liu, W.J., Wu, C.J., Ma, F.H., Ahmad, S., Liu, B.R., Han, L., Jiang, X.P., Zhang, S.J., Yang, L.G., 2012, Melatonin suppresses apoptosis and stimulates progesterone production by bovine granulosa cells via its receptors (MT1 and MT2), *Theriogenology*, 78 (7), 1517-1526.
- Weiske, J., Schoneberg, T., Schroder, W., Hatzfeld, M., Tauber, R., Huber, O., 2001, The fate of desmosomal proteins in apoptotic cells, *The Journal of Biological Chemistry*, 276 (44), 41175-41181.

- Wilson, J.W., Pritchard, D.M., Hickman, J.A., Potten, C.S., 1998, Radiation-induced p53 and p21WAF-1/CIP1 expression in the murine intestinal epithelium: apoptosis and cell cycle arrest, *American Journal of Pathology*, 153, 899-909.
- Withers, R.H., 1992, *Biologic basis of radiation therapy, Principles and practice of radiation oncology*, Perez, C, Brady, L, ed. LippincottCo. Philadelphia.
- Wu, D., Cederbaum., A.I., 2003, Alcohol, oxidative stress and free radical damage, *Alcohol Research and Health*, 27(4), 277-284.
- Yalçın, S., 1998, Antioksidanlar, *Klinik Gelişim*, 11, 342-346.
- Yan, S.L., Wu S.T., Yin, M.C., Chen, H.T., Chen, H.C., 2009, Protective effects from carnosine and histidine on acetaminophen-induced liver injury, *Journal of Food Sciences*, 74, 259-265.
- Yazıcı, C., Köse, K., 2004, Melatonin: karanlığın antioksidan gücü, *Erciyes University Journal of Health Sciences*, 13(2), 56-65.
- Yildirim, O., Comoğlu, S., Yardimci, S., Akmansu, M., Bozkurt, G., Avunduk, M.C., 2007, Melatonin treatment for prevention of oxidative stress: involving histopathological changes, *General Physiology and Biophysics*, 26(2), 126-132.
- Yurtcu, E., Guney, Y., Ergun, M.A., Guney, H.Z., Uluoglu, C., Hicsonmez, A., Yucel, B., Ozbey, G., Zengil, H., 2007, Lack of a time-dependent effect of melatonin on radiation-induced apoptosis in cultured rat lymphocytes, *Cell Biology International*, 31 (10), 1144-1149.
- Yüce, A., Aksakal, M., 2006, Ratlarda homosisteinin oksidan-antioksidan sistem ve koroner damarlarda oluşturduğu değişiklikler üzerine melatoninin etkisi, 2006, *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 20(1), 51-59.
- Zalesova, Z.S., Kuleva, N.V., 1998, The influence of carnosine on oxidation of skeletal muscle actin in vivo and in vitro, *Pathophysiology*, 3(1), 119.
- Zwirska-Korczała, K., Jochem, J., Adamczyk-Sowa, M., Sowa, P., Polaniak, R., Birkner, E., Latocha, M., Pilc, K., Suchanek, R., 2005, Influence of melatonin on cell proliferation, antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in 3T3-L1 preadipocytes - an in vitro study, *Journal of Physiology Pharmacology*, 56 (6), 91-99.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı	HÜSEYİN US
Uyruğu	T.C.
Doğum tarihi, Yeri	13.03.1983, ÇİÇEKDAĞI/KIRŞEHİR
Telefon	0536 702 58 75
E-mail	ushuseyin@gmail.com
Web adres	

Eğitim

Derece	Kurum/Anabilim Dalı/Programı	Yılı
Yüksek Lisans	İ.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü/ Biyoloji Anabilim Dalı / Genel Biyoloji Programı	
Lisans	İstanbul Üniveristesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	2009
Lise	Çorlu Lisesi, TEKİRDAĞ	2004

Makaleler / Bildiriler

<p>Karabulut-Bulan, O., Bayrak, B., Arda – Pirinçci, P., Sarikaya-Ünal, G., Us, H., Yanardağ, R., Melatonin Prevents Rat Kidney Injury Caused By Exposure To Aluminium, <i>Federation of European Biochemical Societies CONGRESS 2013</i>, 06-11 Temmuz 2013, RUSYA, Mechanisms in Biology.</p> <p>Sancar-Baş, S., Kaptan, E., İnceli, M., Sezen, A., Us, H., 2009, Glycoconjugate Histochemistry In The Fundic Stomach And Small Intestine Of The Frog (<i>Rana ridibunda</i>), <i>IUFS Journal of Biology</i>, 2, 93-104.</p>
