

**T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOFİZİK ANABİLİM DALI
DOKTORA PROGRAMI**

Tez Yöneticisi
Doç. Dr. Tefvik GÜLYAŞAR

**RATLARDA İYONLAŞTIRICI RADYASYONUN
NEDEN OLDUĞU OKSİDATİF HASARA KARŞI
MELATONİN VE AMİFOSTİNİN KORUYUCU ETKİSİ**

(Doktora Tezi)

Suat ÇAKINA

EDİRNE-2015

**T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOFİZİK ANABİLİM DALI
DOKTORA PROGRAMI**

Tez Yöneticisi
Doç. Dr. Tefvik GÜLYAŞAR

**RATLARDA İYONLAŞTIRICI RADYASYONUN
NEDEN OLDUĞU OKSİDATİF HASARA KARŞI
MELATONİN VE AMİFOSTİNİN KORUYUCU ETKİSİ**

(Doktora Tezi)

Suat ÇAKINA

**Destekleyen Kurum: Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Birimi (TÜBAP 2012-104)**

Tez No:

EDİRNE – 2015

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğü

ONAY

Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik Anabilim Dalı doktora programı çerçevesinde ve Doç.Dr. Tevfik GÜLYAŞAR danışmanlığında doktora öğrencisi Suat ÇAKINA tarafından tez başlığı "Ratlarda İyonlaştırıcı Radyasyonun Neden Olduğu Oksidatif Hasara Karşı Melatonin ve Amifostinin Koruyucu Etkisi" olarak teslim edilen bu tezin tez savunma sınavı **18/06/2015** tarihinde yapılarak aşağıdaki jüri üyeleri tarafından "**Doktora Tezi**" olarak kabul edilmiştir.

İmza
Unvanı Adı Soyadı
JÜRİ BAŞKANI
Doç.Dr. Tevfik GÜLYAŞAR

İmza
Unvanı Adı Soyadı
ÜYE
Prof.Dr M. Cem Uzun

İmza
Unvanı Adı Soyadı
ÜYE
Doç.Dr. Ali Rıza Kızıler

İmza
Unvanı Adı Soyadı
ÜYE
Doç.Dr. Tammam SİPAHİ

İmza
Unvanı Adı Soyadı
ÜYE
Doç.Dr. Biser Aydemir

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Doç.Dr. Tammam SİPAHİ
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince yetiŐmemde büyük katkı ve emeği geçen, bilgi ve tecrübeleri ile yol gösterici olan değerli hocalarım, tez yöneticim Doç. Dr. Tevfik GÜLYAŞAR anabilim dalı başkanımız Doç. Dr. Tammam SİPAHİ ve Prof. Dr. Seralp ŞENER, tez çalışmam boyunca yardım ve desteklerini esirgemeyen başta Prof. Dr. M. Cem UZAL ve Uzm. Fiz. Şule PARLAR olmak üzere, Uzm. Fiz. Nükhet KÜRKCÜ'ye, Yrd.Doç. Dr. Alaattin ÖZEN'e, Vet. Hek. Ziya Çukur'a maddi olarak tezimi destekleyen TÜBAP'a ve her zaman her koşulda yanımda olan aileme teşekkür eder en içten Őükranlarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	3
RADYASYON	3
İYONİZAN RADYASYONUN HÜCREDEKİ ETKİ MEKANİZMASI	4
RADYASYONUN HÜCRE ÜZERİNDEKİ BİYOLOJİK ETKİLERİ	9
MELATONİN	21
AMİFOSTİN	24
GEREÇ VE YÖNTEMLER	28
BULGULAR	37
TARTIŞMA	46
SONUÇLAR	51
ÖZET	52
SUMMARY	54
KAYNAKLAR	56
ŞEKİLLER LİSTESİ	64
ÖZGEÇMİŞ	66

SİMGE VE KISALTMALAR

BOS	Beyin Omurilik Sıvısı
CAT	Katalaz
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
EM	Elektromanyetik
eV	Elektron Volt
GSH	Glutasyon
G6PD	Glukoz-6-Fosfat Dehidrojenaz
GSH-Px	Glutasyon Peroksidaz
GSH-Rd	Glutasyon Redüktaz
HIOMT	Hidroksiindol-O-metiltransferaz
kDa	Kilo Dalton
MDA	Melondialdehit
ms	Mili-saniye
NAT	N-Asetil Transferaz
NBT	Nitrobluetetrazolium
NE	Norepinefrin
PVN	Paraventriküler Nükleus
RH	Retinohipotalamik
RNA	Ribo Nükleik Asit
RNT	Reaktif Nitrojen Türleri
ROT	Reaktif Oksijen Türleri
SCG	Süperiyor Servikal Ganglion
SCN	Suprakiazmatik Nükleus
SOD	Süperoksit Dismutaz
TAK	Total Antioksidan Kapasite
TBARS	Thibabarbutiric Acid Reactive Substances
TOK	Total Oksidan Kapasite

GİRİŞ VE AMAÇ

Hücrelerde, organizmadaki oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonları sonucu oluşan endojen ve aralarında stres, virüs, iyonizan radyasyon, demir, bakır, kadmiyum vb. metal iyonlarının bulunduğu ekzojen kaynaklı etmenlere bağlı olarak serbest radikaller oluşurlar. Endojen ve ekzojen kaynaklı etmenlere bağlı olarak oluşan serbest radikaller toksikolojik açıdan önemlidir. İyonlaştırıcı (iyonizan) radyasyonun hücrelerdeki etkisini içinden geçtikleri maddelerde iyon çifti oluşturarak gösterir ve böylece iyonizasyon meydana gelir. İyonizan radyasyonun canlıda oluşturduğu hasar genellikle suyun iyonlaşmasıyla oluşan serbest radikallerin etkisiyle olabildiği gibi (indirekt etki), deoksiribo nükleik asidi (DNA) de doğrudan zarar verebilir (direkt etki). Serbest radikaller nükleik asitlerle birleşerek mutasyona neden olur ya da hücre ölümünü indükleyen otokatalitik reaksiyonları başlatır. İyonizan radyasyon DNA, nükleus ve sitoplazmada hasarlar yaratır, mitozu engeller ve hücreler arası iletişim bozukluğuna neden olur (1,2).

Amifostin (ethyol, etanetiyoil, 2-[(3-aminopropil)]- dihidrojen fosfat(ester), WR-2721), organik tiyofosfat yapısına sahiptir. Radyoterapi veya kemoterapi öncesi kullanılan amifostin tümör dokularından daha fazla miktarda normal dokularda bulunan alkalin fosfataz ile defosforile olarak aktif metaboliti olan tiyole dönüşür. Kanser tedavisinde uygulanan radyoterapi ve kemaoterapötik bir ajan olan sisplatinin etkilerine karşı, normal doku hücrelerini kanser hücrelerinden daha fazla koruma yeteneğine sahiptir. Amifostin; radyoprotektif etkisini ortama hidrojen vermesi sayesinde, ışınlama sonucu oluşan serbest radikalleri temizleyerek (dolayısıyla serbest radikallerin oluşturduğu DNA hasarını

azaltarak) gösterir (3-5).Melatonin sentezinde başlangıç madde pineal bez tarafından plazmadan alınan triptofandır. Melatoninin direkt serbest radikal temizleyicisi özelliğine ek olarak, dolaylı yoldan antioksidan özelliği de bulunmaktadır. Dolaylı yoldan serbest radikal biyomoleküllerinin oluşmasından sorumlu olan hidroksil radikalini (OH[•]) etkisiz hale getiren antioksidan bir özeliği de taşımasından, dolaylı bilinen tüm antioksidanlardan daha güçlüdür. Enzimatik olmayan ve güçlü bir antioksidan olan bu hormon, hücrelerdeki biyomoleküllerde oluşan oksidatif hasarın önlenmesinde çok önemli bir rol oynar. Melatonin hem lipofilik hem de hidrofilik özelliğe sahip olmasından dolayı vücudun her hücresine girebilme yeteneğine sahiptir. Bu sayede DNA, mebran lipitlerini ve sitozölü korumaktadır (6,7).

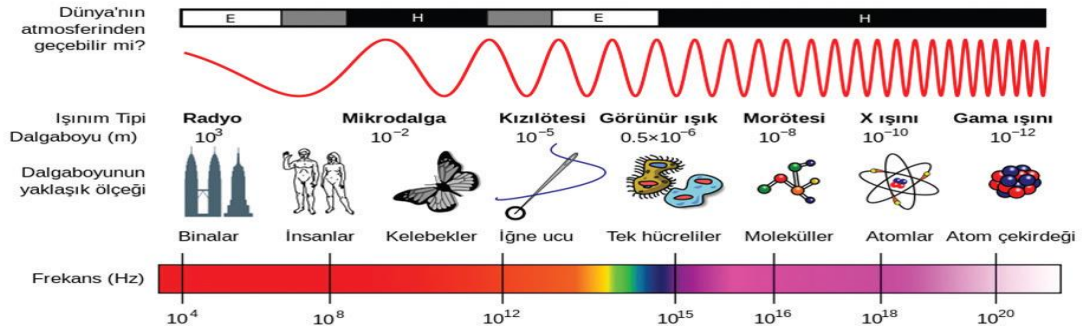
Eser elementler organizmada çeşitli biyolojik olayların regülasyonunda gerekli olan maddelerdir. Bağlanma bölgeleri için metalloprotein ve diğer proteinlerle rekabet eder, onları aktive eder ya da enzim reaksiyonlarını durdurur. Hücre zarı geçirgenliğini modüle eder, gen ekspresyonunu düzenler, elektron taşımaya, hormon ve vitamin sentezine katılır (8-10).

Ratlar üzerinde yaptığımız bu çalışmada iyonizan radyasyonun dokularda oluşturduğu oksidatif hasara karşı bir hormon olan melatonin ile bir radyoprotektör ajan olan amifostinin koruyucu etkisini; total antioksidan kapasite, total oksidan kapasite ve eser element (demir, bakır, çinko, selenyum) düzeylerindeki değişim üzerinden araştırdık. Ayrıca bu çalışmamızda radyoterapi ile birlikte melatonin ve amifostin kullanımının çeşitli organlardaki koruyucu etkisini belirleyerek; melatonin ve amifostin ile yapılacak klinik çalışmalara katkı sağlamayı amaçladık.

GENEL BİLGİLER

RADYASYON

Radyasyon, radyoaktif atom çekirdeklerinin kararlı hale geçebilmek için dışarı yaydıkları hızlı parçacıklara ve elektromanyetik dalgalara (EM) verilen addır. Radyasyon kaynakları doğal ve yapay olmak üzere iki gruba ayrılır. Günümüzde radyoaktif maddeler dışında radyasyonun elde edildiği röntgen tüpleri ve atom altı parçacık (elektron, proton) hızlandırıcıları mevcuttur (11-13).



Şekil 1. Elektromanyetik spektrum (13)

Elektromanyetik radyasyonlar enerjisine göre iyonizan ve iyonizan olmayan (non iyonizan) olarak iki gruba ayrılır.

İyonizan Olmayan Radyasyon

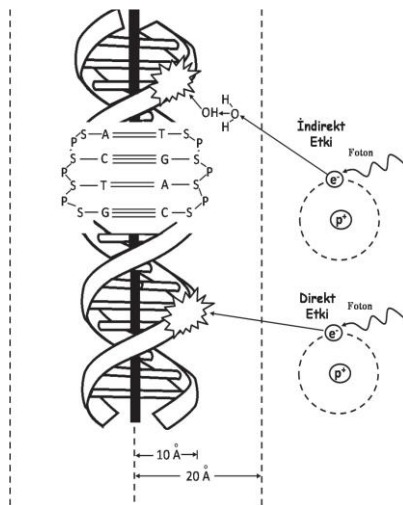
Kütlesiz, EM dalga şeklinde olan radyasyondur. Radyo dalgaları, mikrodalga, radar, kızılötesi ışınlar, görünür ışık, mor ötesi ışık, ve ultraviyole ışınları bu gruba girmektedir (11,14,15).

İyonizan Radyasyon

Atom veya moleküllerden elektron koparabilecek kadar yüksek enerji seviyesine sahip X ve gamma ışınları ile parçacık radyasyonlarına iyonize edici radyasyon denir. 10 eV üzerindeki EM dalgalar kısa dalga boyları ve yüksek frekansları sayesinde iyonizasyon yaparlar. Bunlardan gamma ışınları radyoaktif maddelerden yayınlanırken, X ışınları röntgen tüplerinden ya da diğer elektron hızlandırıcı cihazlardan çeşitli enerji seviyelerinde elde edilebilir. İyonizan radyasyon biyolojik bir sisteme enerjisini aktardığında, ortamdaki atomlarla etkileşerek elektron koparılır (iyonlaşma) veya etkileştikleri atomların elektronlarını daha yüksek enerji seviyesine çıkartırlar (uyarıma) (11-15). Çalışmamızda kullanılan Kobalt-60 cihazı 1.25 MV enerji seviyesinde gamma ışını üretmektedir.

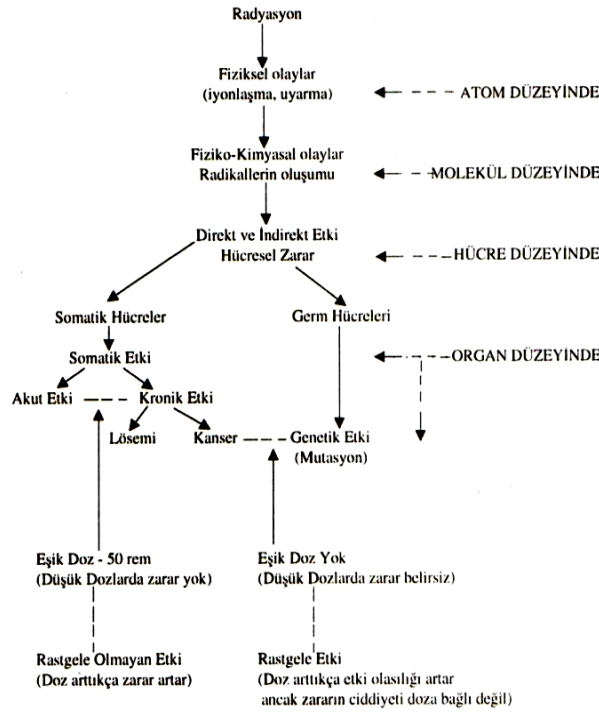
İYONİZAN RADYASYONUN HÜCREDEKİ ETKİ MEKANİZMASI

İyonizan radyasyonların canlıda bir biyolojik etkiye yol açabilmesi için radyasyon enerjisinin canlıyı oluşturan hücreler ve dokular tarafından absorbe edilmesi gerekir (radyokimyasal etki) (11,16). İyonizan radyasyonun canlıda yol açtığı etki direkt ve indirekt (dolaylı) etki olmak üzere ikiye ayrılır. Klinikte uygulanan düşük fraksiyon dozlarındaki radyasyonla (radyoterapi) hedeflenen, sağlam hücrelerde direkt ölüme yol açacak dozlara çıkmadan hücre çoğalmasının (dolayısıyla kanserin) önüne geçecek şekilde (çoğalmayı düzenleyen) DNA'da birikici sublethal hasarlar oluşturmaktır. Eğer radyasyon hedef molekül olan DNA tarafından absorblanıyorsa tek veya çift zincir kırığı meydana gelir ve buna direkt etki denir. Radyasyonun DNA üzerindeki etkisinin üçte biri direkt etki ile oluşur. Eğer radyasyon enerjisi biyolojik sistemdeki diğer ortam molekülleri (özellikle DNA'ya 20 Angström kadar yakın su molekülleri) tarafından absorblanarak oluşan OH moleküllerinin ve türevlerinin (serbest radikal) oluşturdukları olumsuz etkiye indirekt etki denir (11,13,16,17).



Şekil 2. Radyasyonun direkt ve indirekt etkileri (17)

RADYASYONUN BİYOLOJİK ETKİLERİ (Genel Tablo)



Şekil 3. Radyasyonun biyolojik etkileri (18).

Biyolojik bir ortamdan geçen iyonizan radyasyon etkisini dört evrede gösterir:

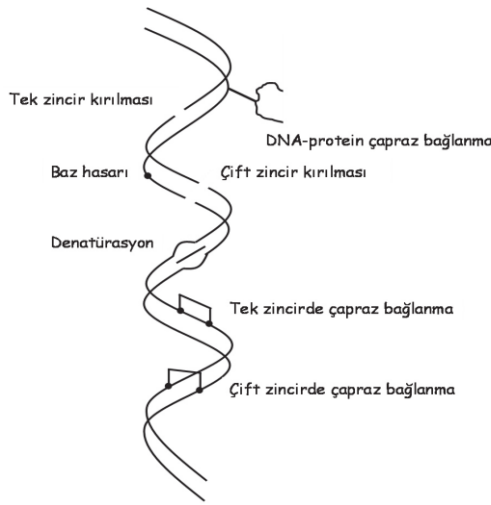
- 1-) Fiziksel evre
- 2-) Fizikokimyasal evre
- 3-) Biyokimyasal evre
- 4-) Biyolojik evre

Fiziksel evre: Bu evre; iyonizan radyasyonun ile hücrenin bir atom ve molekülü arasındaki ilk etkileşim olarak tanımlanır. Maddeye aktarılan radyasyon enerjisi ile maddenin moleküllerinde iyonlaşma ya da uyarılma oluşur. Bu iyonlaşma olayı sonucunda oluşan serbest elektronlar çevredeki atomlarda da iyonlaşmaya yol açar. Bu olay sonucunda zincirleme bir reaksiyon meydana gelir. Reaksiyonların başında oluşan ürünler son derece kararsızdır ve kısa süre içinde sekonder reaksiyonların oluşmasına yol açarlar. Bu evre 10^{12} ile 10^{-2} saniye sürer.

Fizikokimyasal evre: Sekonder reaksiyonların meydana geldiği kademedir. İyonizasyon ve eksitasyon, canlı dokulardaki su ve başka moleküllerle etkileşim sonucu serbest radikaller oluşur. Çok reaktif yapıda olan bu serbest radikaller, hem kendileri hem de ortamdaki diğer moleküllerle etkileşerek reaksiyona girerler. Bu evre radyasyon enerjisinin etkileşmesinden sonraki 1 ms içinde tamamlanırlar.

Biyokimyasal evre: Bu kademedeki serbest radikallerin en dış yörüngelerindeki eşleşmemiş elektronların diğer moleküllerdeki dış yörünge elektronları ile eşleşmesiyle yeni kararlı moleküller meydana gelir. Bu evre ortamda hasarlara yol açan enzim reaksiyonlarıyla başlar. DNA molekülü zarar görebilir. DNA’da oluşan bu hasarların bir kısmı onarılabılırken bir kısmı onarılamaz ve sonuçta bu hasarlardan dolayı hücre ölümü gerçekleşir. Aynı zamanda radyasyon canlıda genetik bozukluklar ve kanser gibi zararlı etkiler de oluşturur.

Biyolojik evre: Hücre ölümü, genetik mutasyonlar, normal dokularda erken ve geç etkilerin oluşumu, radyoterapi ile tümör kontrolü ve sekonder kanser oluşumu gibi, radyasyon etkilerinin ortaya çıktığı evredir. Işınlamadan sonraki saatler içinde görülmeye başlayarak yıllar boyu sürer (11,17,18).



Şekil 4. Radyasyonun etkisi ile DNA’da oluşabilecek hasarlar (17).

Eksojen kaynaklı iyonlaştırıcı radyasyon canlıda hücrelerde serbest radikallerin oluşmasına neden olduğu bilinmektedir. İyonizan radyasyonun bütün şekilleri hücrelerdeki etkilerini etkiledikleri atomda iyonizasyon meydana getirerek gösterir. İyonizan radyasyon doku içinden geçerken önce kimyasal reaksiyonların ve daha sonra fiziksel reaksiyonların başlamasına neden olurlar. İyonizan radyasyon canlı yapıdan geçerken sahip oldukları enerjilerini aktarırlar. Bu enerji, hücre ve doku içerisinde eksitasyon ve iyonizasyona yol açar. Eğer radyasyon enerjisi, o maddeyi oluşturan atomlardan elektron koparacak kadar yüksek değilse, atomun orbitlerinde bulunan elektronların daha yüksek enerji düzeyindeki yörüngelere geçmelerine yol açar. Bu olaya da uyarılma (eksitasyon) adı verilir. Elektronlar ve protonlar gibi elektrik yüklü parçacıklar sahip oldukları enerji yeterli ise direkt olarak iyonizasyona yol açarlar. Bu enerjileri ile maddede de kimyasal bağları koparabilirler. EM ışınlar (X ve gamma) ve nötronlar ise genelde indirekt olarak iyonizasyon yaparlar. Diğer bir

deyişle direkt iyonizasyona neden olan yüksek kinetik enerjili yüklü parçacıkları (elektron ve proton) buldukları atomlardan kopararak indirekt iyonizasyon oluştururlar (11,19,20). X ve gamma ışınları etkileştikleri atomdan elektronlar kopartarak, nötronlar ise emildikleri maddedeki atomların çekirdekleriyle etkileşerek kinetik enerjilerini protonlara aktararak çekirdekten fırlatılmalarına ve dolaylı yoldan iyonizasyona neden olurlar. İyonizan radyasyonlar etkiledikleri madde içinde veya geçtikleri dokularda birçok iyon çifti oluşturur. Oluşan bu iyon çiftleri de hücrede moleküler seviyede DNA ve hücrenin diğer önemli yapıtaşları ile kimyasal reaksiyonlara girerek hasar oluşturabilirler (11,19). İyonizan radyasyonun oluşturduğu hasar genellikle suyun iyonlaşmasıyla oluşan serbest radikallerin etkisiyle olabildiği gibi (indirekt etki), DNA'yı doğrudan da zarar verebilir (direkt etki). Serbest radikaller hücre membranları ve nükleik asitlere zarar vermesi sonucunda mutasyon ya da hücre ölümünün gerçekleşmesine neden olan otokatalitik reaksiyonu başlatırlar (17). İyonizan radyasyon DNA, nükleus ve sitoplazmada önemli değişikliklere yol açar, kromatinlerde hasar oluşturur, mitozu etkiler ve hücreler arası iletişim bozukluğuna neden olur. (11,17-20).

Radyasyon sonrası hücrede oluşabilecek üç tür hasar vardır:

1- Letal hasar; onarılamayacak kadar büyük olup, hücreyi hemen ölüme götürür.

2- Subletal hasar; tek başına ölümcül değildir, uygun koşullarda onarılması mümkündür.

3- Potansiyel letal hasar: Eğer hücre bölünmesi kısa bir sürede meydana gelirse hasar ölümcüldür ancak bölünme gecikirse sonuç tamir edilebilen hasardır. Bu özelliğinden dolayı iyonize edici radyasyon kanser tedavisinde kullanılmaktadır (11,21-23).

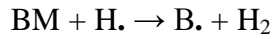
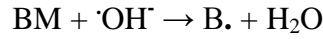
Radyoterapide asıl amaç, hücrenin çoğalma özelliğini dururmaktır; çünkü hücresel çoğalma yeteneği olmayan hücre ölü kabul edilir (reproduktif ölüm). Bu nedenle klinikte kullanılan radyasyon dozları, hücre membranında hasar oluşturacak veya hücre organellerine zarar verecek kadar yüksek değildir. Farksiyonel olarak verilen düşük dozlar DNA üzerinde etkili olmaktadır ve anormal bir şekilde çoğalan kanser hücreleri normal hücrelere göre ışın tedavisinden daha fazla etkilenmektedir. İyonizan radyasyonun etkisi ile hücre çekirdeğinde bulunan DNA'nın hasar görmesi hücrenin çoğalma yeteneğini ortadan kaldırır. İyoniazn radyasyonun DNA üzerine direkt etkisi ile baz değişikliklerine neden olabilir. Ayrıca DNA'nın şeker fosfat iskeletinde bağ kırılmalarına yol açarak birçok hasar meydana gelir. Diğer yandan iyonizan radyasyon tarafından hücre içi sıvıdaki suyun iyonizasyonu ile oluşan serbest radikaller de DNA ile reaksiyona girerek indirekt yoldan hasarlara neden olur (1,11,24,25).

DNA'da oluşan radyokimyasal hasarlar, tamir enzimleri aracılığıyla geri dönüşümlü olarak giderilebilir. Bu geri dönüşüm ortamdaki O₂ konsantrasyonu ile yakından ilişkilidir.

Oksijen ortamda serbest radikallerin oluşumunu pozitif yönde etkileyerek geri dönüşümü inhibe eder. Oluşan hasarların tamiri süresince meydana gelen delesyon, dublikasyon, translokasyon gibi olaylar da meydana gelen hasarların kalıcı olmasına yol açar.

Uygulanan yüksek dozdaki radyasyona bağlı olarak oluşan lipid peroksidasyonu, tüm biyolojik membranlarda değişime neden olur. Bu süreçte organeller ve tüm hücre için zarar verici ve yıkıcı etki oluşturur. Sonuçta hücrenin yapısal ve biyokimyasal özelliklerinde oluşan kayıp, hücreleri hasara ve ölüme götürür (26). Canlılar % 70-90 oranında H₂O içerdiğinden radyasyon enerjisinin büyük bir kısmı H₂O moleküllerini iyonlaştırır ya da uyarır. İyonlaşma sonucunda pozitif yüklü bir iyon ve hızlı bir serbest elektron oluşur. Bu olayı izleyen çeşitli sekonder reaksiyonlar ile ortamda farklı serbest radikaller oluşur. H₂O'nun iyonizasyonu ile oluşan OH[•] gibi serbest radikaller oluşur oluşan bu serbest radikaller organik biyolojik moleküller (BM) ile reaksiyona girerek, bunları da radikaller haline dönüştürebilirler.

Bu reaksiyonlar sonunda canlıda yeni biyoradikaller (B⁻) oluşur ve bu biyoradikaller DNA ile oluşturdukları bağlar ile hücre çekirdeğinde yer alan DNA'nın bütünlüğünü bozarlar.



Bu reaksiyonların tümü, H₂O' un radyasyon enerjisi ile iyonizasyonu sonucu oluşan serbest radikallerin aracılığı ile gerçekleştiğinden radyasyonun canlılar üzerindeki indirekt etkisi olarak nitelendirilir. Radyoterapide kanser tedavisinde kullanılan düşük lineer enerji transferi yapan X, gamma ve elektron ışınlarının etkisi daha çok indirekt yolla iken, α partikülleri gibi ağır partiküllerin etkisi ise yüksek lineer enerji transferli ışınlar olmaları nedeniyle, daha çok direkt yolla meydana gelir. Bu nedenle ağır parçacıkların etkisi ortamdaki O₂ konsantrasyonundan bağımsızdır. Klinikte kullanılan radyasyonla oluşan hasarların büyük ölçüde indirekt yoldan olduğu bilinmektedir. Subletal hasarlar ile hücrenin reproduktif ölümü, letal DNA hasarının onarılamaması ise apoptozis ile sonuçlanır. Ancak hücre tamir enzimleri DNA'da oluşan subletal hasarları onarabilirse hücre sağ kalabilir. Eğer bu hasarlar onarılamazsa DNA'da oluşan kalıcı mutasyonlar her hücre bölünmesinde gelecek nesillere aktarılır (1,11,18).

Günümüzde birçok kanser türünde tedavi olarak ameliyat, kemoterapi ve radyoterapi kullanılmaktadır. Bu yöntemlerden radyoterapi, anormal çoğalma gösteren kanser hücrelerine etki ederek onların reproduktif ölümlerine neden olur. Ancak radyoterapi uygulanması ile kanser hücreleri yanında çevredeki sağlam hücreler üzerinde de zararlı etkiler oluşturur (1,11,26).

RADYASYONUN HÜCRE ÜZERİNDEKİ BİYOLOJİK ETKİLERİ

Radyasyonun, bir moleküle etkisi, molekülün dış orbitalindeki elektronları kopararak molekülü iyonlaştırmaktır. Yüksek radyasyon dozu (letal doz), DNA zinciri üzerindeki onarılması mümkün olmayan kırıklar oluşturarak hücre ölümüne yol açar. Letal dozun altındaysa hücre bölünmesi duraklar. Doz düşüğe bölünme bir süre sonra yeniden başlar. Doz arttıkça bölünmenin başlama zamanı uzar, mitoz sayısı azalır, anormal mitoz şekilleri ve dejenere hücreler ortaya çıkar (11,27). Radyasyonun hücreye etkisi iki yolla olur. Birinci etki, hücrede su moleküllerinin iyonizasyonu sonucu serbest radikallerin oluşması ve bunların birleşmesiyle oluşan hidrojen peroksidin DNA zincirinde parçalanmaya yol açmasıdır. İkinci etki biçimi ise, iyonize edici partiküllerin direkt DNA molekülüne çarpması ve onda kopmalar meydana getirmesidir. Kopma ciddi bir bölgedense hücre ölür, değilse sakat hücre tipleri ortaya çıkar (11,12,27). Radyasyonun etkisi hücre siklus fazına göre farklıdır. Mitoz (M) ve ikinci dinlenme fazı (G2) radyosensitifken, birinci dinlenme (G1) ve sentez (S) fazları radyorezistandır (11,28).

Oksidatif Stres

Organizmalarda endojen ve ekzojen kaynaklı olarak oluşturulan serbest radikaller ve antioksidan savunma sistemi tarafından yok edilen moleküllerdir. Oksidatif stresin genel bir tanımı, prooksidan-antioksidan dengesinin prooksidan yönüne kayması sonucu potansiyel hücrel hasarlara yol açması durumudur. Organizmada oluşan serbest radikallere karşılık antioksidan sistemin oluşan bu serbest radikalleri ortadan kaldırması ile gerçekleşen oksidatif denge sağlandığı zaman organizma serbest radikallerden dolayı zarar görmez. Oksidatif stres, serbest radikal oluşumunun artması veya antioksidan savunma mekanizmasının serbest radikalleri ortadan kaldıramaması oksidatif dengenin serbest radikaller yönünde artması durumu olarak tanımlanabilir (29). Oksidatif stres ile canlıda hücrede DNA, proteinler, lipitler, karbonhidratlar ve enzimler zarar görür. Biyolojik sistemlerdeki reaktif oksijen türleri (ROT); süperoksit anyonu ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil radikali ($OH^{\cdot-}$), peroksil radikali ($ROO^{\cdot-}$) ve radikal olmayan hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi serbest radikaller oksidatif stresin en önemli nedenlerini oluştururlar (29,30).

Serbest Radikaller

Dış orbitallerinde bir veya daha fazla ortaklanmamış (eşlenmemiş) elektron bulunduran kısa ömürlü reaktif atom veya moleküllere serbest radikal denir. Eşlenmemiş elektronlar serbest radikale ait simgenin üst kısmına konulan nokta ile gösterilirler. Serbest

radikallerin reaktivitesinin göstergesi olarak atomun orbitalinde karşı spin yönünün bir elektron kazanma yeteneği sayesinde gerçekleşir.

Serbest radikallerin girdiği başlıca kimyasal reaksiyonlar:

- Elektron alma ve verme,
- Hidrojen koparma,
- Ekeleme (addition),
- Kendi kendini yok etme (self annihilation),
- Oransızlaştırma (disproportionation) reaksiyonlarıdır. . (29,31-35).

Canlı sistemlerde serbest radikaller daha çok elektron transferi sonucu oluşmaktadır. Serbest radikaller ROT, reaktif nitrojen türleri (RNT) ve diğer reaktifler olmak üzere üç gruba ayrılır (29,36-40). Canlı sistemlerdeki serbest radikaller arasında en önemli olanı yapısında oksijen bulunduran radikallerdir (Şekil 5).

Radikaller	Radikal olmayanlar		
Hidroksil	•OH	Peroksinitrit	ONOO ⁻
Alkoksil	L(R)O•	Hipoklorid	⁻ OCl
Hidroperoksil ^a	HOO•	Hidroperoksit ^b	L(R)OOH
Peroksil	L(R)OO•	Singlet oksijen	¹ ΔO ₂
Nitrik Oksit ^c	NO•	Hidrojen peroksit ^d	H ₂ O ₂
Süperoksit ^d	O ₂ • ⁻		

^a Hidroperoksil radikali süperoksit anyonunun konjuge asididir ve sulu ortamlarda konsantrasyonu pH'a bağlıdır.

^b Geçiş metal iyonları varlığında hidroperoksit, alkoksil ve peroksil radikallerine dönüşür.

^c NO• kendi başına reaktif değildir ve lipit peroksidasyonunda antioksidan gibi davranır. Süperoksit varlığında peroksinitrite dönüşür ki bu formu güçlü bir oksitleyicidir.

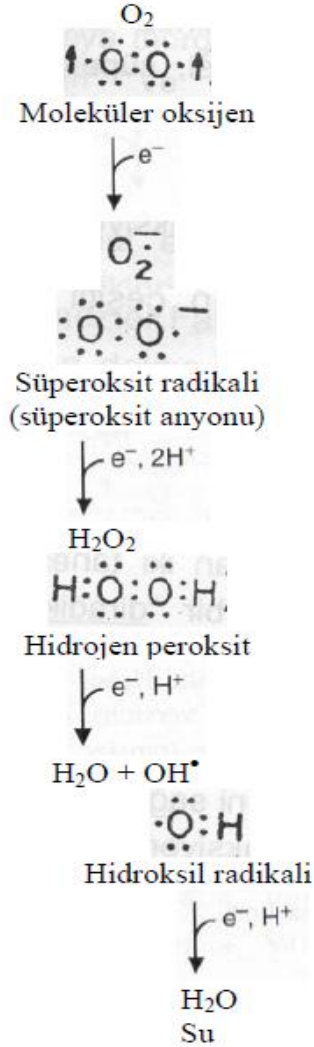
^d Süperoksit iyi bir oksidan olmaktan ziyade redüktandır. Geçiş metal iyonlarını hem okside hem de redükte edebilir ve bu iyonların varlığında H₂O₂'nin •OH'a dönüşmesine sebep olur.

Şekil 5. Reaktif Oksijen Türleri (31)

Reaktif Oksijen Türleri (ROT)

Mitokondri oksijen metabolizmasının gerçekleştiği tek organeldir. Hücrelerde oksijen tüketiminin yaklaşık olarak % 85-90'ı burada gerçekleşir. Mitokondri sürekli olarak oksijen metabolize eder ve bu nedenle yan ürün olarak ROT üretir. İki ortaklanmamış elektron içeren oksijen molekülü bir diradikaldir. Oksijenden oluşan önemli serbest radikaller arasında süperoksit anyonu, hidrojen peroksit, hidroksil radikali ve singlet oksijen yer almaktadır (29,40-42).

Moleküler oksijen elektron alarak en son suya indirgenir. Moleküler oksijene bir elektron eklenmesi sonucu süperoksit anyonu oluşur. Eğer iki elektron eklenirse sonuçta hidrojen peroksit, üç elektron eklenirse hidroksil radikali ve dört elektron eklenirse su molekülü meydana gelir (Şekil 6) (29,31,38).



Şekil 6. Reaktif oksijen Türleri (38).

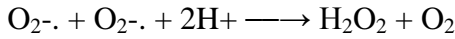
Endojen (nötrofil fagositoz sistemi vb.) ve eksojen (X-ışınları, sigara, pestisitler ve ilaçlar vb.) kaynaklı olarak canlı sistemlerinde oksijen radikalleri oluşabilir. Oluşan serbest oksijen radikalleri canlı yapısını oluşturan hücrelerde bulunan lipit, protein, karbohidrat ve DNA'ya etki ederek bu yapılarda hasar oluştururlar. Serbest oksijen radikallerinin ortamdaki uzaklaştırılması veya etkisiz hale getirilmesi antioksidan savunma sistemi tarafından gerçekleştirilir. Antioksidan savunma sistemi enzimatik (süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz) ve enzimatik olmayan (glutatyon, vitamin A, C, E, melatonin, albumin, bilirubin, ürik asit vb.) biçiminde iki sınıfta toplanabilir (29,31,38,43).

Süperoksit Anyon Radikali (O₂⁻.)

Kimyasal olarak incelendiğinde moleküler oksijenin dış orbitallerinde paylaşılmamış iki elektron bulundurur. Bu orbitallerin tek bir elektron alması sonucu süperoksit radikali oluşmaktadır. Bu olay aerobik hücrelerde hepsinde gerçekleşebilir. İlave edilen bu elektronun en büyük kaynağı elektron transport zinciridir.

Moleküler oksijene bir elektron bağlanmasıyla oluşan süperoksit anyonu çok reaktif değildir. Lipit mebranlarının geçirgenlik yeteneğini azaltır.

Canlılarda, süperoksit radikalleri çeşitli çevresel etkilerle (fiziksel ve kimyasal) veya canlı sistemdeki yükseltgenme-indirgenme tepkimeleri sırasında süperoksit radikali oluşabilir (29,34,44). Süperoksit radikali oksidan ve indirgen özelliğe sahiptir. (45). Süperoksit, bir radikal özelliğe sahip olmasına rağmen hücreler için çok zararlı değildir. Ancak H₂O₂ kaynağı olması ve bazı kimyasal reaksiyonlarda geçiş metallerini indirgeyebilmesinden dolayı oldukça önemlidir. İki molekül süperoksit, proton alarak hidrojen peroksit (H₂O₂) ve moleküler oksijene dönüşür (46).



Hidrojen Peroksit (H₂O₂)

Biyolojik sistemlerde hidrojen peroksitin asıl kaynağı süperoksit radikalının dismutasyonudur. İki süperoksit molekülü iki proton alarak H₂O₂ ve O₂ oluşturur. Reaksiyon sonucu radikal olmayan ürünler meydana geldiğinden bu bir dismutasyon reaksiyonu olarak bilinir.

Bu dismutasyon ya spontandır ya da süperoksit dismutaz enzimi tarafından katalizlenir. Hidrojen peroksit bir serbest radikal olmadığı halde, reaktif oksijen türleri içine girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli rol oynar. Çünkü peroksit ile reaksiyona girerek, en reaktif ve en zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikali oluşturmak üzere kolaylıkla yıkılabilir (29,31,47).



Kendiliğinden gerçekleşen bu dismutasyon reaksiyonu için uygun pH değeri 4.8' dir. Süperoksit dismutaz (SOD) enziminin bulunmasıyla katalizlenen reaksiyonlar daha geniş bir pH aralığında gerçekleşebilir. Hidrojen peroksit sahip olduğu özellik bakımından oksitleyici bir maddedir. Hidrojen peroksit fenton reaksiyon ile proteinlere, tiyol grubu içeren enzimlere, fosfolipidlere, karbohidratlara ve DNA'ya zarar vererek hasar oluşturabilir. H₂O₂ kimyal

yapısında su içermesinden dolayı hücre zarından geçebildiği için çok önemli bir moleküldür. İnsan metabolizmasında bir saat içerisinde yaklaşık olarak 3×10^9 hidrojen peroksit molekülü oluşmaktadır (29,32,47,48)

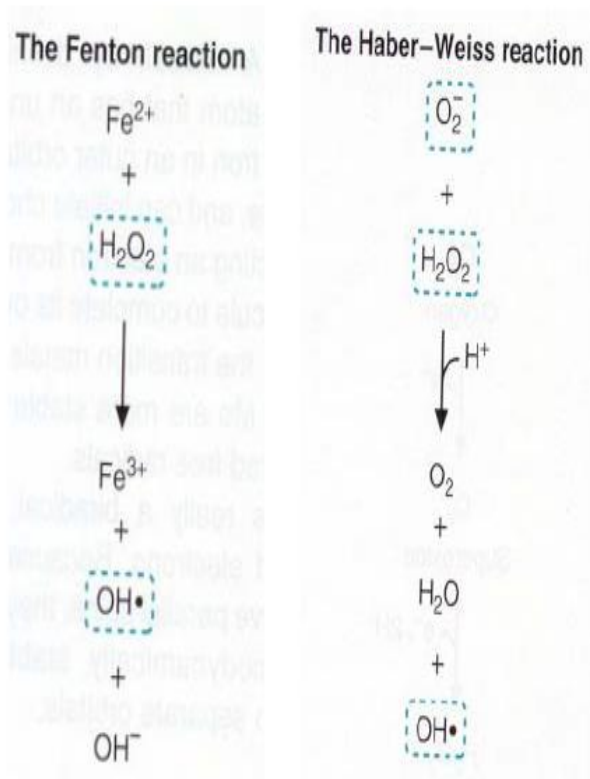
Hidroksil Radikali (OH[•])

Hidroksil radikali biyolojik sistemlerde yaklaşık olarak 10^{-9} saniye yarılanma ömrü olan son derece güçlü bir serbest radikaldir. Bilinen en toksik radikaldir ve hemen hemen bütün biyolojik molekülleri okside edebilir. (49).

Hidroksil radikali, fenton kimyasal reaksiyonu ile hidrojen peroksitin geçiş metalleri varlığında indirgenmesi yoluyla veya hidrojen peroksitin Haber-Weiss kimyasal reaksiyonunda süperoksit radikali ile reaksiyonu veya suyun yüksek enerjili iyonlaştırıcı radyasyonla etkileşimi sonucunda meydana gelir (29,36,38,39).

Fenton ve Haber- Weiss Reaksiyonları:

Hidrojen peroksidin veya süperoksit radikali Fe^{+2} gibi geçiş elementleri (Cu, Zn, Mn, Cr, Co, Ni, Mo) ile reaksiyona girerek ileri derecede reaktif hidroksil radikali oluşur. Bu dönüşümler Fenton ve Haber-Weiss Reaksiyonları olarak tanımlanmaktadır (29,32,44,46).



Şekil 7. Fenton ve Haber-Weiss Reaksiyonu(48).

Singlet Oksijen ($O_2^{\cdot-}$)

Singlet oksijen ortaklanmamış elektronu olmadığı için radikal olmayan reaktif oksijen molekülüdür. Yüksek enerjiye sahiptir. Oksijenin eşleşmemiş elektronlarından birinin verilen enerji sonucu bulunduğu orbitalden başka bir orbitale veya kendi spin yönünün tersine yer değiştirmesi sonucunda oluşur. Singlet oksijen *in vivo* ortamda sitokrom P450, endoperoksit sentetaz ve myeloperoksidaz reaksiyonlarıyla olduğu gibi iyonizan radyasyonla da oluşabilir. Serbest radikal reaksiyonları sonucunda meydana gelebilir veya serbest radikal reaksiyonlarının başlamasına da neden olabilir. Singlet oksijenin delta ve sigma olmak üzere iki formu bulunmaktadır. Biyolojik olarak en önemli formu delta singlet oksijendir (29,38,50,51).

Diğer Reaktif Oksijen Türleri

Reaktif oksijen türlerinin diğer bir grubu, organik peroksitler ($ROOH^{\cdot}$) ve bunların hemolitik yıkım ürünleri olan alkoksi (RO^{\cdot}) ve hidroksiperoksil (ROO^{\cdot}) veya indirekt olarak hidro ve semikinonlar veya nitroaromatlardır. Ayrıca karbon merkezli organik radikaller (R^{\cdot}), tiyil radikalleri (RS) gibi önemli radikaller vardır (29,53,54).

Serbest Radikallerin Yol Açtığı Hasarlar

Serbest radikaller, canlıda başta membran lipidleri olmak üzere, aralarında proteinler, karbonhidratların yer aldığı çeşitli makromoleküllere ve DNA ya önemli zararlar verebilmektedirler. Bu zararlar hücrenin cinsine, maruz kalınan strese ve şiddetine bağlı olarak, toksik, mutajenik veya karsinojenik olabilir (29,54).

Lipitler Üzerine Etkileri

Lipitler serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı en hassas olan biyomoleküllerdir. Hücre membranlarındaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar. Bunun sonucunda membran akışkanlığında bozulma ve permeabilite değişiklikleri meydana gelir (47).

Lipit peroksidasyonu, serbest radikaller tarafından başlatılan, membran fosfolipitlerindeki doymamış yağ asitlerinin oksidasyonuna neden olan ve böylece membran lipit yapısını değiştirerek hücre yapı ve fonksiyonlarını bozan kimyasal bir olaydır.

Lipit peroksidasyonu, organizmada oluşan kuvvetli bir radikal etkisi ile membran yapısında bulunan konjuge olmayan doymamış yağ asidi zincirindeki metilen gruplarından bir hidrojen atomunun uzaklaştırılması ile başlamaktadır.

Lipit hidroperoksitlerden fenton tipi bir reaksiyonla aldehit ve alkanlar oluşur. Üretilen hidroperoksitler daha fazla radikali yıkar ve lipit peroksit, etan ve pentan oluşumu ile sonlanır. Plazma MDA konsantrasyonu non-enzimatik oksidatif lipit peroksit oluşumunun bir sonucudur. MDA hücre membranlarında iyon alışverişini etkileyerek bileşiklerin çapraz bağlanmasına yol açar. İyon geçirgenliğinin ve enzim aktivitelerinin değişimi gibi olumsuz sonuçlar meydana gelir (29,42).

Proteinler Üzerine Etkileri

Doymamış bağ ve kükürt içeren triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metiyonin, sistein gibi amino asitlere sahip proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenirler.

Hemoglobin gibi hem proteinleri de serbest radikallerden önemli oranda zarar görürler. Özellikle oksihemoglobinin süperoksit radikali veya hidrojen peroksitle reaksiyonu methemoglobin oluşumuna neden olur.(29,55).

Serbest radikaller aminoasitlerin modifikasyonu, proteinlerin fragmentasyonu proteinlerin agregasyonu ve çapraz bağlanmalar yaparak proteinin yapısında değişikliklere yol açar (42).

Karbonhidratlar Üzerine Etkileri

Fizyolojik pH ve sıcaklıkta glikoz gibi monosakkaritlerin oksidasyonu sonucunda hidrojen peroksitler, peroksitler ve okzoaldehitler oluşmaktadır. Okzoaldehidler, DNA, ribonükleik asit (RNA) ve proteinlere bağlanabilme ve aralarında çapraz bağ oluşturabilme yeteneğinden dolayı antimitotik etki gösterirler. Bu yüzden kanser ve yaşlanma gibi olaylarda etkili oldukları düşünülmektedir (29,56).

DNA Üzerine Etkileri

İyonlaştırıcı radyasyonla oluşan serbest radikaller DNA'nın içindeki kimyasal bağlara zarar verebilir. Zarar DNA'nın bir şeridi üzerinde bulunursa, bu kısım kontrol mekanizması tarafından bulunur. Arızalı bölgede bozulan bazlar çıkartılıp atılır. Daha sonra karşı şeridindeki zarar görmemiş baz dizisine uygun olarak yeniden sentez edilir.

İyonlaştırıcı radyasyonun zararı DNA'nın karşılıklı zincirlerinde meydana gelirse hücre bunu düzeltemez. Bu durumda hücre ölür veya bir kanser hücresi haline gelebilir. Eğer hidroksil radikali DNA'nın yakınlığında oluşursa purin ve primidin bazlarına etki ederek mutasyona neden olur. Bu durumda çift zincirde meydana gelen değişiklikten dolayı hücre ölmezse ve kendinden meydana gelecek yavru hücrelere yeni bir karakter gibi (mutasyon) iletilir.(1,29,33,36).

Antioksidan Savunma Sistemleri

Hücrelerde endojen ve eksojen kaynaklı olarak oluşan serbest radikal ürünlerinin neden olduğu oksidatif hasarların engellenmesi canlılar için büyük öneme sahiptir. Canlılar enzimatik ve nonenzimatik yapılardan oluşan antioksidan savunma sistemlerine sahiptirler. Aktif oksijen oluşumunu engelleyen ya da oluşan aktif oksijenleri tutarak, oksitlenmenin neden olduğu zararları, hücresel düzeyde engellemekte ve dejeneratif hastalıkların oluşumunu durduran antioksidan sistem mevcuttur (4,47,53).

Antioksidanlar değişik etki mekanizmalarına sahiptirler. Bu mekanizmalar başlıca şu şekilde sınıflandırılabilir,

1) Onarıcı etki ile serbest radikallerin oluşturdukları hasarın onarılması: Lipid, protein, ve DNA gibi yapılarda olan biyolojik moleküler hasarı onarma

2) Zincir kırıcı etki ile serbest oksijen radikallerini bağlayarak, zincirlerini kırıp işlevlerini engelleme (85); serbest radikal üreten kimyasal reaksiyonları durdurma

3) Baskılayıcı etki ile serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak etkinliklerini azaltma veya inaktif şekle dönüştürme; reaksiyon hızını azaltma

4) Temizleme etkisiyle oksidanları tutma ve zayıf bir moleküle dönüştürme şeklinde gerçekleştirilen bu etki enzimler tarafından yapılmaktadır (29,30,51-57):

Bazı serbest radikallerin zararlı etkisini ortadan kaldırmak için hidrofilik ve lipofilik antioksidanlara ihtiyaç duyulmaktadır. Hidrofilik özellikteki antioksidanlar sitozol ve ekstrasellüler sıvılarda bulunmaktadır. Lipofilik özellikteki antioksidanlar ise membranda ve lipoproteinlerde yer almaktadırlar. Antioksidanlar enzimatik ve nonenzimatik olarak sınıflandırılabilir (29,57,58).

Enzimler

Mitokondrial sitokrom oksidaz sistemi

Superoksit dismutaz

Katalaz

Glutasyon peroksidaz

Glutasyon-S-transferaz

Enzim olmayanlar

Lipid fazda bulunanlar: Alfa-tokoferol, Beta-karoten

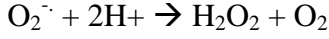
Sıvı fazda (hücre sitozolünde veya kan plazmasında) bulunanlar: Askorbik asit, Ürat, Sistein, Seruloplazmin, Transferin, Laktoferrin, Miyogloblin, Hemogloblin, Ferritin, Albumin, Bilirubin, Glutasyon

Hem sıvı hem de lipid fazda bulunanlar: Melatonin

Enzimatik Antioksidanlar

Süperoksit Dismutaz (SOD)

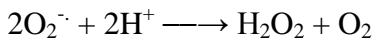
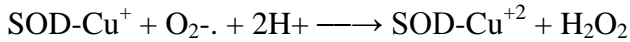
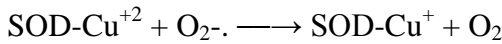
Süperoksit dismutaz, süperoksit radikalının H₂O₂'e ve moleküler oksijene dönüşümünü katalize eder. Oluşan H₂O₂, GPx veya katalaz ile suya indirgenir (57)



Serbest radikallere karşı organizmada ilk savunma bu enzim sayesinde gerçekleşir. Bu reaksiyon spontan gerçekleşebileceği gibi, SOD katalizörlüğünde hızlı bir şekilde gerçekleşebilmektedir. Reaksiyon sonucunda süperoksit radikali (membrandan geçemeyen) hidrojen peroksit (membrandan geçebilen) çevrilir. H₂O₂, geçiş metallerinin bulunduğu durumda Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları sonucunda hidroksil radikallerine dönüşmektedir. SOD üretimindeki artış sonucunda oluşan aşırı H₂O₂, CAT ve GSH-Px enzimlerinin aktivitelerinin artması ile kontrol edilebileceği düşünülmektedir. Süperoksit dismutazlar, yapılarında bulunan geçiş metallerine göre, Cu/Zn-SOD, Mn-SOD ve Fe-SOD olmak üzere üç çeşide ayrılır (29,32,33)

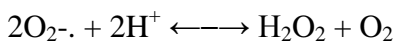
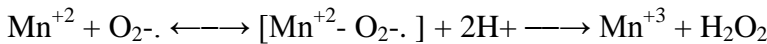
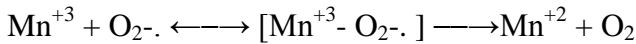
Cu/Zn-SOD

Memeli hücrelerinde SOD'nin üç tipi bulunmaktadır. Bunlardan ilki sitozolde ve mitokondrial membranın iç bölümünde bulunan dimerik yapıdaki sitozolik Cu-Zn SOD enzimidir. Cu/Zn-SOD toplam 33 kDa molekül ağırlığına sahip olup 2 bakır ve 2 çinko atomuna sahiptir. Canlıda hücrelerde en bol bulunan SOD izomeridir. Cu/Zn-SOD enziminde bulunan bakır iyonları oksidasyon ve redüksiyona uğrayarak dismutasyon reaksiyonlarında görev alırken, çinko enzimin stabilizitesinde önemlidir (29,44,58,59).



Mn-SOD

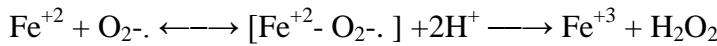
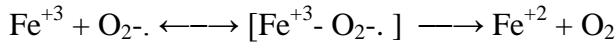
SOD enzimi bir süperoksit molekülünü oksijene yükseltgeyip diğer süperoksit molekülünü H₂O₂'ye indirger. *Mn-SOD* mitokondride bulunur ve kofaktörü mangandır. Mn-SOD lar bakterilerden yüksek yapılı organizmalara kadar pek çok kaynaktan izole edilmiştir. Yüksek yapılı organizmalardan elde edilen tüm Mn-SOD lar tetramerdir ve her alt ünite bir Mn⁺² iyonu içerirler. Mn-SOD 80 kDa molekül ağırlığındadır (29,38,44).



Aktivitesi pH'a duyarlıdır. Ayrıca Mn-SOD'lar ısıya ve kimyasallara karşı dayanıksızdır. (29,35,36).

Fe-SOD

Toplam 41 kDa ağırlığında iki protein alt ünitesi içerir ve her proteinde bir ya da iki demir atomu bulunur. Fe-SOD enzimi normal haldeyken demir iyonu +3 değerlidir, katalitik döngüde ise Fe⁺³ ile Fe⁺² arasında dönüşüm gerçekleşir. Diğer SOD tiplerine göre süperoksidin dismutasyon oranı düşüktür. Yüksek pH larda aktivitesi düşüktür ve siyanürle inhibe edilemez (29,44,55).



SOD'nin vücut sıvısı ve organellerdeki aktivitesini belirlemek için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Bunlardan en sık kullanılanlar, test ortamında enzimatik ve nonenzimatik olarak oluşturulan süperperoksit radikallerinin indikatör bir madde ile reaksiyonuna dayanan yöntemdir. Örnekteki SOD aktivitesi indikatör ile süperperoksit radikalinin reaksiyonunun SOD tarafından inhibisyonuna oranına göre hesaplanmaktadır. Bu amaçla geliştirilen yöntemlerden en sık kullanılan ksantin-ksantin oksidaz sistemidir. Bu sistemde süperoksit indikatörü olarak, nitrobluetetrazolium (NBT), tetranitrommetan, hidroksilamin ve sitokrom C nin redüksiyonundan yararlanılmaktadır.

Ayrıca süperoksit radikali oluşturucu diğer kaynaklar arasında epinefrin, pirogallo, 6-hidroksidopamin de kullanılmaktadır (29,44,57).

Süperoksit radikalinin tayininde pulse radyoliz tekniği, polarografik teknikler ve hızlı dondurma EPR tekniği, daha spesifik immünokimyasal yöntemlerde kullanılmaktadır (44).

Katalaz (CAT)

Katalaz 4 tane hem grubu bulunduran, molekül ağırlığı 240 kDa hemoproteindir. Her alt ünite aynı zamanda enzimi kendi substratı H₂O₂ ye karşı koruyan ve etkinliğini artıran NADPH içerir. Bu molekül enzimin kararlılığında rol oynamaktadır. Enzim sitokrom sistemi içeren tüm oksijenli solunum yapan hücrelerde mevcuttur. Katalaz esas olarak peroksizomlarda olmak üzere endoplazmik retikulum ve sitozolde yoğunudur. Aktivitesi; karaciğer, böbrek, miyokard, çizgili kaslar ve eritrositlerde yüksektir. Görevi, hidrojen peroksiti oksijen Cu ve Fe iyonlarının katalizöründe Fenton reaksiyonu ile suya parçalamaktır. (29,60,61).

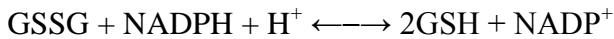
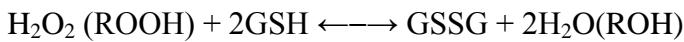
Katalaz aktivitesinin tayininde, H₂O₂'in parçalanmasının ve ortamdan uzaklaştırılmasının spektrofotometrik yöntemle (240 nm) izlendiği yöntemdir. Birim zamanda

absorbsiyondaki azalma katalaz aktivitesinin ile orantılıdır. Diğer yöntemler ise reaksiyon sonucunda oluşan O₂ miktarını ölçmeye dayalıdır.(29,40,57)

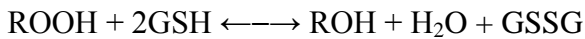
Glutasyon Peroksidaz (glutasyon:hidrojen peroksit oksidoredüktaz) (GSH-Px)

Glutasyon peroksidaz enzimi ilk olarak Mills tarafından 1957 yılında memeli eritrositlerinde tespit edilmiştir. Enzim aktivitesi en fazla ökaryot hücrelerin sitoplazmasında yer almaktadır. Enzim aktivitesinin en fazla olduğu dokular ise eritrositler ve karaciğerdir. Glutasyon peroksidaz enzimatik bir antioksidan olarak, glutasyonu bir elektron kaynağı olarak kullanarak hidrojen peroksit ve organik hiperoksitlerin kimyasal olarak indirgenme işlemini gerçekleştirir. GPx, intrasellüler mesafede lipitleri peroksidasyondan koruyan en önemli enzimdir. Bu nedenle hücrenin özellikle sitozolik kompartmanında yer alan bu enzim hücrenin yapısını ve fonksiyonunu korur. GSH-Px enziminin iki türü bulunmaktadır. Bunlardan birincisi aktif bölgesinde kovalent bağlı olarak selenyum bulunan selenyuma bağımlı GSH-Px (Se-GSH-Px) dir. Se-GSH-Px, organik hidroperoksitler ve H₂O₂ 'e karşı oldukça aktiftir. İkinci türü ise GST olarak adlandırılır ve daha çok organik hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumlu olan türdür (29,32,38,62).

Se-GSH-Px, molekül ağırlığı yaklaşık 85 kDa'dur ve aktif bölgesinde Se atomu içeren dört protein alt ünitesinden oluşmaktadır. Se-GSH-Px ler, H₂O₂ ve çeşitli hidroperoksitlerin yıkımını katalize eder. Okside olan glutasyon (GSSG) ise GSH-Rd enzimi ile reaksiyona girerek yeniden GSH'a indirgenir (38,61).



Selenyum içeren peroksidazların bir diğer çeşidi de fosfolipid hidroperoksit glutasyon peroksidaz (PL-GSH-Px) dir. 20 kDa molekül ağırlığına sahip olan bu enzim bir selenyum atomu içerir. E vitamini eksikliğinde fosfolipid hidroperoksitleri alkollere indirgeyerek membranı peroksidasyona karşı korur (38)



Glutasyon ile konjugasyon reaksiyonlarında selenyum içermeyen GSH-Px'ler glutasyon transferaz olarak aktiflik gösterirler. Glutasyon peroksidaz, hidrojen peroksit (H₂O₂) tarafından redükte edilen GSH'nin okside glutasyon (GSSG)'a yükseltgenmesini katalizler. Ter-butyl hidroperoksit H₂O₂ olarak kullanıldığı ortamda glutasyon peroksidazı oluşturur.

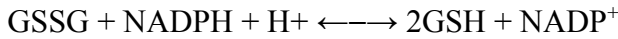
Okside glutatyon, GSH-R ile nikotinamid adenin dinükleotit fosfat hidrogenazın (NADPH) nikotinamid adenin dinükleotit fosfata (NADP) yükseltgenmesi sırasındaki absorbands farkının 340 nm'de okunmasıyla spektrofotometrik olarak ölçülür. (29,63,64).

Glutatyon-S-Transferaz (RX:glutatyon R-transferaz) (GST)

GST, çok substratlı bir enzimdir. GSH'un kosubstratına özgül olan bir G bölgesi ve hidrofobik elektrofilik substratların bağlandığı H bölgesi vardır. GSH'un tiyol grubu, cebin açık olan kısmına dönüktür. Diğer substratlara bağlanan grup, bu tiyol grubudur. Glutatyon S-transferaz enzim sistemleri birçok farklı ksenobiyotik ve endojen bileşiklerin detoksifikasyonu ve biyotransformasyonunda önemli rol oynayan enzimlerindendir (29,65).

Glutatyon redüktaz (GSH-Rd)

GSH-Px aracılığıyla hidroperoksitlerin indirgenmesi sonucu oluşan okside glutatyonun (GSSG) tekrar indirgenmiş glutatyon (GSH) dönüşümünü katalize eder.(30).



Enzimatik Olmayan Antioksidanlar

Glutatyon (GSH)

Glutatyon (GSH); glutamik asid sistein ve glisinden oluşan, intraselüler konsantrasyonu daha fazla olan bir tripeptittir. Önemli bir indirgeyici ajan ve antioksidan olan glutatyon, hücrenin oksido-redüksiyon dengesini sürdürüp hücreleri endojen ve ekzojen kaynaklı oksidanların zararlı etkilerinden korumaktadır. Proteinlerdeki SH gruplarının korunması ve bazı reaksiyonlarda koenzim olarak görev almasının yanı sıra amino asitlerin transportunda, protein ve DNA sentezinde de önemli rol oynar. (38,57).

Oksijen radikalleri reversibl veya irreversibl olarak, protein ve serbest amino asitler, lipidler ve lipoproteinler karbonhidratlar ve bağ dokusu molekülleri üzerinde zararlı etkiler oluştururlar. Süperoksid radikalinin ve hidrojen peroksidin konsantrasyonundan artış doğrudan hücresel harabiyet yapar. Vücutta normal metabolizma sonucu oluşan süperoksid radikali ve H₂O₂, süperoksid dismutaz ve glutatyon peroksidaz enzimleri kullanılarak ortadan

kaldırılırlar. Bu reaksiyonda GSH , glutatyon peroksidaz etkisiyle GSSG'y a dönüşür ve GSSG'd a glutatyon redüktaz tarafından tekrar GSH'ı oluşturur (29,38,57).

MELATONİN

Melatoninin Tarihçesi ve Tanımı

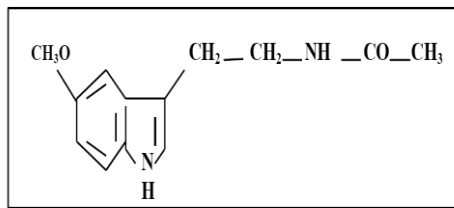
Lerner, 1950'li yılların sonlarında pineal bez ekstratlarının anfibilere verilmesi ile derilerindeki melanin granüllerinin aglutine olması üzerine bu maddeye melatonin adını vermiştir. Melatonin (N-Asetil-5-Metoksitriptamin) pineal bezin en önemli ürünüdür, indol yapısında bir nöro-hormondur (66,67).

Pineal Bezin Yapısı

Pineal bez, embriyolojik olarak proensefalondan gelişmiş olup, tek beyin uzantısıdır ve fotonöroendokrin sisteminin kontrolü altındadır. Ağırlığı 100-180 mg arasında ve genişliği 3-5 mm'dir. Ağırlığında ve boyutlarında puberteye kadar artış, puberteden sonra ise azalma görülür. Posteriyör komissür ve dorsal habenular komissür arasında üçüncü ventrikülün posteriyör duvarına yapışık olarak bulunmaktadır.. Kan akım hızı 4 ml/g/dk'dır . Venöz drenajı internal serebral arter yolu ile olmaktadır. Pineal bez, parankimal ve interstisyel hücreler olmak üzere iki hücre grubundan oluşur. Parankim hücreleri pinealositler olup endokrin hücrelerdir. Pinealositlerin pineal bez içindeki oranı %90 civarındadır (66,68,69).

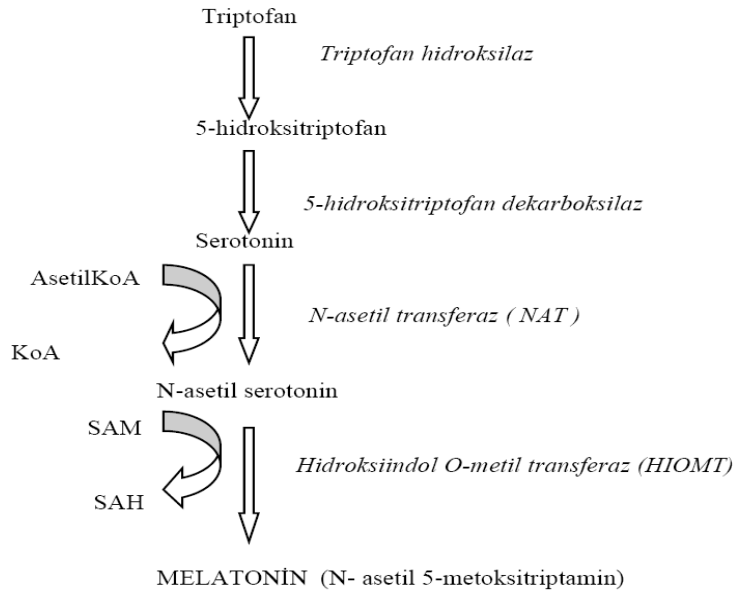
Melatonin Sentez ve Metabolizması

Melatonin sentezinde başlangıç madde pineal bez tarafından plazmadan alınan triptofandır. Triptofan esansiyel bir aminoasit olup, besinlerle dışarıdan alınması gerekmektedir. Triptofan, pinealositlerde triptofan hidroksilaz ile 5- hidroksitriptofan'a hidroksillenir. 5-hidroksitriptofan, L-aminoasid dekarboksilaz enzimi etkisiyle karboksil grubunu kaybeder, 5-hidroksitriptamin'e (serotonin) dönüşür. Serotonin; N-asetil transferaz (NAT) ile N-asetilserotonin'e bu da hidroksiindol-O-metiltransferaz (HIOMT) ile melatonine sentezlenir (69-75). Melatonin molekülü ve sentezinin evreleri şekil 8 ve9'da gösterilmiştir.



Şekil 8. Melatoninin molekül yapısı (75)

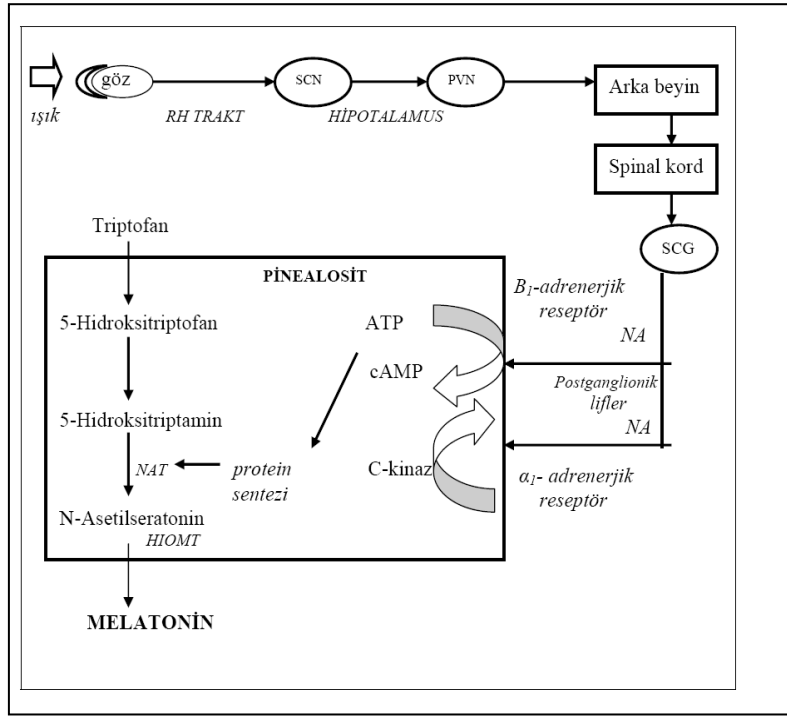
Yapılan deneysel çalışmalarda hayvanlarda NAT enzimi aktivitesinin, dolayısıyla melatoninin kan düzeyinin karanlık fotoperiyotta pik yaptığı gösterilmiştir. Bu fotoperiyod; pineal bezi innerve eden sempatik sinir liflerinin spontan aktivitesinin ve bezde norepinefrinin dönüşümünün en yüksek olduğu saatlere rastlamaktadır. Kısa süreli ışığa maruz kalındığında, sempatik aktivite baskılanır. NAT enzimi aktivitesi ve melatonin miktarı hızla azalır. Melatonin sentezi sadece pineal bez ile sınırlı değildir. Kan dolaşımındaki melatoninin üretimini yaklaşık %80'lik kısmı pineal bez tarafından sağlanır. Enzim sentez aşamasında yer alan HIOMT pineal bez dışında retina ve Harderian bezde de tanımlanmıştır. Bunun dışında diğer bazı organlarda melatonin sentezlenmesine rağmen, kan melatonin düzeyine katkısı yok denecek kadar azdır. Örneğin; retina, lakrimal bez, eritrositler, trombositler, ve gastrointestinal sistem (66,69,70).



Şekil 9. Melatoninin sentez evreleri (71,73)

Melatonin Salınımı

Melatoninin sentez ve salınmasında pek çok faktör etkilidir. Pineal bezden salınımı fotonöroendokrin kontrol altındadır. Bunların arasında en önemli faktör çevrenin aydınlık veya karanlık olmasıdır. Melatonin de diğer hormonlar gibi sirkadiyen ritme sahiptir. Melatonin sentez ve salınımı karanlık ortamda uyarılır, ışık ile baskılanır. Işık, retinal fotoreseptörler ile retinohipotalamik yolla suprakiazmatik nükleusa (SCN) ve paraventricüler çekirdeğe aktarılır. Bu çekirdekten çıkan lifler, medulla spinalisin intermediolateral kolonundan süperiyor servikal gangliona ulaşır (66,70-76).



Şekil 10 Pineal bezde melatonin sentezi (77)

(SCN; Suprakiazmatik nükleus, RH; retinohipotalamik, PVN; Paraventriküler nükleus, SCG; Süperiyor servikal ganglion, NE; Norepinefrin, NAT; 5-Hidroksitriptamin-N-asetil transferaz, HIOMT; Hidroksiindol-O-metiltransferaz)

Sempatik ganglion olan süperiyor servikal gangliyonun çıkan postganglionik lifleri nervi coronarii ile pineal bezde ulaşılarak innervasyonu sağlar. Süperiyor servikal gangliyonun gelen sinyallerin pinealositleri uyarıcı etkisi karanlıkta artarken, aydınlıkta azalmaktadır. Pineal bez içindeki en önemli nörotransmitter noradrenalin'dir. Noradrenalin, pinealosit membranındaki postganglionik reseptörler olan β_1 ve α_1 adrenerjik reseptörlere bağlanır. Melatonin sentezinin %85'inden β_1 reseptörlerinin uyarılması, yaklaşık %15'inden ise α_1 reseptörlerinin uyarılması sorumludur. (Şekil 9) (66,69,75).

Özellikle karanlık ile ilgili impulslar pineal bezde ulaşınca norepinefrinin pinealosit membranında adrenerjik reseptörlere bağlanmasıyla bir seri reaksiyon Nasetiltransferaz artışı olur. Melatonin sentez ve salınımı artar. Melatonin üretildikten sonra depolanmaz, hem lipofilik hem de hidrofilik özelliğinden dolayı kana, beyin omurilik sıvısı da (BOS) dahil olmak üzere tüm vücut sıvılarına hızlı bir şekilde dağılır. Pineal bezde melatonin oluşumu ile bu hormonun plazma seviyeleri arasında güçlü bir ilişki vardır. Plazma melatonin konsantrasyonu gece saatlerinde gündüze göre 3-10 kat fazladır. Melatonin salgılanması akşam saat 21.00-22.00 saatlerinde başlar, 02.00- 04.00 saatleri arasında maksimum seviyelerine ulaşır, sabah 07.00-09.00 saatleri arasında azalmaya başlar. Melatonin plazma konsantrasyonu gündüz 0-20 pg/dl iken gece 50-200 pg/dl düzeyine yükselmektedir. Bir

günde 30 mg melatonin üretilmektedir ve bunun % 80'ni gece sentez edilmektedir. Melatonin seviyesini ışığın yanında birçok çevresel faktörler (ısı, gel-git vb.) ve çeşitli ilaçlar örneğin β -blokörler etkiler. β -blokörlerin, β 1-adrenerjik reseptörler aracılığı ile melatonin salınımını azalttığı gösterilmiştir. β -blokörlerin, nokturnal melatonin seviyelerini azaltması sonucunda uyku düzensizlikleri meydana gelir. Klinik çalışmalarda bu yan etkinin oral melatonin kullanımı ile önlenilebileceği belirtilmektedir (66,69,71,76-78).

Kanser ve Melatonin

Hayvanlardaki deneysel çalışmalarda tümör oluşumunu pinealektominin artırıp, melatoninin azalttığı bildirilmiştir. Melatonin kanser hücrelerinin çoğalmasını, tümör büyümesini ve metastaz sayısını azaltmaktadır. İncelemelerde prostat ve meme kanseri olan hastalarda melatonin seviyeleri düşük bulunmuştur (66,75,76).

Melatoninin Antioksidan Etkileri

Melatoninin radikal temizleyicisi özelliğine ek olarak, dolaylı yoldan antioksidan özelliği bulunmaktadır. Bilinen tüm antioksidanlardan daha güçlüdür, hidrosil radikalini (\cdot OH) ortadan kaldıran endojen bir antioksidandır. Bu hormon hücrelerdeki biyomoleküller üzerine olan oksidatif hasarın önlenmesinde çok önemli rol oynar. Melatonin hem lipofilik hem de hidrofilik olmasından dolayı vücudun her hücresine girebilme özelliği bulunduğundan, DNA, mebran lipitlerini ve sitozölü korumaktadır (66,69,79).

Melatonin ayrıca SOD, GPx ve G6PD gibi enzimleri de aktive ederek dolaylı yoldan antioksidan etki gösterir. Melatonin hidrosil radikalini nötralize etme özelliği glutatyondan 5 kat, mannitolden 15 kat, peroksit radikal tutucu özelliği ise E vitamininden 2 kat daha güçlü olduğu gösterilmiştir. Diyabetik ratlarda yapılan çalışmada melatoninin antioksidan etki ile oksidatif strese bağlı renal tübüler hasarı iyileştirme yönünde etki gösterdiği bildirilmiştir (66,75-79).

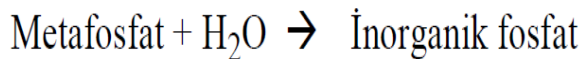
AMİFOSTİN

Radyoprotektörlerin en iyi bilinen grubu SH bileşikleridir ve bu maddelerin koruyucu etkisini bu yapı sağlar. Radyoprotektörlerin arasında kimyasal olarak en basit yapılı olanı sisteindir. Sistein, SH içeren doğal bir aminoasittir. Total vücut ışınlamasından önce yüksek dozda sistein verildiğinde yan etkilerden koruma sağlandığı saptanmıştır. Buna benzer sonuçlar sistein ile çok yakın benzerlik gösteren ve onun dekarboksilasyonu ile oluşan sisteamin ve sisteaminin bir disülfid türevi olan sistamin ile de elde edilmişlerdir Patt ve ark.

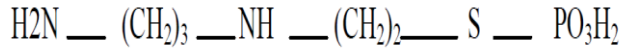
1949 yılında SH içeren aminoasitlerin, sisteinin ve sisteaminin kemiricileri ölümcül radyasyon dozundan koruduğunu göstermişlerdir (1,80).

Amifostin (S-(N-(3-aminopropil)-2-aminoetiylol) sisteamin benzeri bir moleküldür. Soğuk savaş döneminde ABD ordusuna bağlı Walter Reed Ordu Araştırma Enstitüsü tarafından yürütülen ve askerleri cephedeki nükleer silah kaynaklı radyasyondan korumak amacını taşıyan çalışmaların ürünüdür. Bu program tarafından geliştirilen ve tiyol içeren bileşikler Walter Reed'in kısaltılmasıyla "WR" ön eki ile tanımlanmışlardır. Öngörülen amaçla kullanıma uygun olmadığı anlaşıldıktan sonra amifostin tıbbi araştırmalar için kullanılmış, RT ve KT'ye bağlı sağlam doku hasarlarının önlenmesinde etkili olduğu görülmüştür (80-83).

İnaktif bir ön ilaç olan amifostin WR-2721 olarak ta bilinir. Plazma membranında ALP ile defosforile olur ve aktif metaboliti olan WR-1065 formuna dönüşür. Selektif olarak normal dokuları koruma özelliği, WR-1065 akümülyasyonunun tümör hücrelerinden daha fazla normal dokularda görülmesinden kaynaklanmaktadır. Tümörler göreceli olarak hipovaskülerdir ve bunun sonucu olarak hipoksik bir ortama ve düşük interstisyel pH'a sahiptirler. Bunun yanında malign dokularda ALP ekspresyonu da azalmıştır. Bunların kombinasyonu sonucu tümör hücrelerinde aktif ilaç akümülyasyonu düşük olur. Bu nedenle amifostin normal dokuları tümör dokularına nazaran, hücre içi serbest tiyol konsantrasyonu farklılığı sayesinde, 100 kat kadar daha fazla koruyabilmektedir. WR-1065'in oksidasyonu ile en yüksek oranda oluşan metabolit WR-33278 (simetrik disülfid) olup, az miktarda mikst disülfidler de oluşur. Amifostinin fosfor-sülfür bağının sülfür atomuna proton transferi ile parçalanması ile metafosfat ve WR-1065 oluşur. Bundan sonra H₂O'nun devreye girmesi ile metafosfat inorganik fosfata dönüşür (80,84):



Maksimum hidroliz pH 4 ve altında oluşur. Amifostin vücut ısısında ve mide pH'ında hızla hidrolize olur. Yarılanma ömrü 30,5 dakikadır. Nötral pH'da, oda ısısında 4 saat bekletilse dahi hidroliz gerçekleşmez. Amifostinin kimyasal bir özelliği olarak hidrolizi güçlü bir şekilde ısıya bağımlıdır. Bu özellik sayesinde spontan hidroliz ile oluşacak WR-1065 kan, plazma, doku veya doku kültürleri ortamında ölçülebilir. Amifostinin kimyasal yapısı Şekil 11'da gösterilmiştir (80-82).



Şekil 11. Amifostinin kimyasal yapısı (81,82)

Hayvan deneyleri ve insan çalışmaları göstermiştir ki ALP, pH 7 üzerinde aktiftir. ALP çeşitli doku arteriöl endotel hücrelerinde, böbrek proksimal tübölüs hücrelerinde ve ince bağırsak mikrovilluslarında bolca miktarda bulunur. ALP aracılı aktif transport çok hızlı gerçekleşir. Bunun nedeni, amifostinin plazma proteinlerine bağlanmaması ve metabolizmasının büyük oranda ALP aracılı aktif transporta uğramasıdır. Faz II çalışmalar ile amifostinin tolerabl doz aralığı 740-910 mg/m² olarak belirlenmiştir. Amifostin oral kullanıldığında aktif değildir. 15 dakikalık intravenöz (İV) infüzyon sonrası ortalama maksimum plazma konsantrasyonu 0,1-0,235 mmol/L'dir. İlacın dağılım hacmi 6,44 L, plazma klirensi 2,17 dakikadır. Farmokokinetik çalışmalar, hastalarda amifostinin plazma kompartmanından hızla temizlendiğini göstermiştir. İnsanlarda İV verilmesini takiben ilk 6 dakikada amifostinin %90'ı metabolize olur. Yapılan çalışmalarda amifostinin α yarı ömrü (dağılım yarı ömrü) <1 dakika; β yarı ömrü (eliminasyon yarı ömrü) = 8.8 dakika olarak saptanmıştır. WR-1065 metaboliti enjeksiyondan 10-30 dakika sonra pik düzeyine ulaşır. Bu nedenle, normal dokuların sitoproteksiyonunda optimum yarar sağlanabilmesi için RT ya da KT uygulamasından 20-30 dakika önce amifostin uygulanması gerektiği belirlenmiştir (80,81,85,86).

Serbest tiyol olan WR-1065'in normal hücreyi sitotoksik tedavilerin etkilerinden koruması çeşitli mekanizmalar ile açıklanmıştır. Serbest tiyol, intrasellüler ortamda direkt olarak alkilleyici ajanların veya sisplatinin aktif ürününe bağlandığı gibi, hasarlı hedef moleküllere de H⁺ vererek hücresel koruma sağlar. Yapısındaki SH atomu sayesinde, KT ajanları ve RT tarafından oluşturulan SR'ler ortadan kaldırılmadığında meydana gelen ve DNA hasarına yol açan, reaktif nükleofilleri yok eder (80,82,83-87).

Amifostin genel olarak iyi tolere edilir, fakat doz bağımlı kısa süreli geçici yan etkiler olabilir. Bunlar hipotansiyon, bulantı, kusma, hıçkırık, somnolans, infüzyon sırasında metalik tat ve nadiren allerjik reaksiyonlardır (cilt döküntüsü, ateş ve anafilaktik şok) (59). Klinik anlamlı yan etki çoğunlukla hipotansiyondur. Hastaların %60'ında geçici hipotansiyon oluşmaktadır, fakat tedaviye ara verilecek oranda hipotansiyon oluşturması nadirdir (<%5). Bulantı, kusma gibi semptomlar, amifostin öncesi antiemetik ilaçların uygulanması ile önlenabilir. Geçici hipokalsemi paratiroid hormon sekresyonunun inhibisyonuna bağlıdır ve amifostin tedavisinin nadir görülen bir komplikasyonudur. Klinik olarak anlamlı bir hipokalsemi tek doz amifostin uygulamasını takiben yaygın değildir. Ancak günlük RT ile

birlikte birden çok uygulamanın yapıldığı hastalarda periyodik kalsiyum düzeyi izlenmelidir (80,87).

Çalışmalar subkutan uygulamada İV uygulamaya göre bulantı, kusma ve hipotansiyon insidansında azalma olduğunu, ateş ve kutanöz reaksiyonların insidansında ise artış olduğunu göstermiştir. Hem hücre kültürlerinde hem de tümörlü kemiriciler üzerinde yapılan prelinik çalışmalar sonucunda, amifostinin çeşitli mürin ve insan karsinomu, sarkomu ya da lösemi hücrelerinde koruma yapmaksızın seçici olarak normal dokuları koruduğu gösterilmiştir (80,88-92).

Günümüzde bu prelinik verilere dayanarak yürütülmekte olan birçok klinik çalışma mevcuttur. Merkezi sinir sistemi dışında amifostinin birçok organ sistemini ve genetik materyali, RT ve KT'nin yol açtığı hasarlardan koruduğu bildirilmektedir. Amifostin tarafından korunduğu bilinen normal dokular böbrek, akciğer, yemek borusu, periferik sinirler, kemik iliği, ince bağırsak, kalın bağırsak, immün sistem, tükrük bezleri, ağız mukozası, kalp ve testistir (58). Ayrıca uzun ve kraniyofasial kemiklerin büyümesinde RT'ye bağlı meydana gelen gecikmede amifostinin radyoprotektör etkisi gösterilmiştir. Amifostinin intraperitoneal olarak verildiği tek ya da fraksiyone dozlarda RT uygulanan 4-5 haftalık ratlarda, RT sonucu görülen büyüme durmasına karşı koruyucu etkisi gösterilmiştir. Osteoblast, endotel ve fibroblast gibi hücrelerin sayısını korumada da etkinliği gözlenmiştir. Amifostinin genişletilmiş klinik kullanım profilleri ise radyoproteksiyon, kemoproteksiyon, kemik iliği stimülasyonu, radyoprevensiyon ve kemoprevensiyondur (80,93).

GEREÇ VE YÖNTEMLER

ARAÇ VE GEREÇLER

Çalışmamızda; Trakya Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Laboratuvarı'nda yetiştirilen ve standart laboratuvar koşullarında (22 ± 1 °C, 12 saat aydınlık/karanlık siklusunda) tutulan, 180-250 gr ağırlığında Spraque-Dawley sıçanlar kullanıldı. Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda sıçanlara standart sıçan yemi ve musluk suyu verildi. Sıçanlar 2-2.5 aylık iken deneysel çalışmaya başlandı.

Çalışma için Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan (Ek 1) ve Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyasyon Güvenliği Başkanlığı'ndan (Ek 2) onay alındı. Çalışmamız Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (TÜBAP proje no 2012-104) tarafından maddi olarak desteklenmiştir (Ek 3). Ölçümler Trakya Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi Biyofizik ve Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı'nda bulunan aşağıdaki araç ve gereçler ile yapılmıştır.

1. Shimadzu marka AA-6800 model atomik absorpsiyon spektrofotometresi (Japon)
2. Herqueus marka etüv (USA)
3. AVD marka GH-300 model hassas terazi (UK)
4. Beckman-Coulter marka Allegra X-22R model santrifüj (USA)
5. Shimadzu marka UV-1208 model UV-VIS spektrofotometresi (Japon)
6. Boeco marka TS-100 model thermo shaker (Germany)
7. Velp scientific marka Zx³ model vorteks (USA)
8. Hettich marka EBA-21 model santrifuj (USA)
9. Nuve marka OT-012 model sterilizatör (USA)

10. Boch marka buzdolabı (USA)

11. Cis-Bio marka Cirus Kobalt 60 teleterapi cihazı (USA)

12. Daihan marka WiseTis HG-15 D model homojenizatör (Korea)

3.1 Deney Gruplarının Oluşturulması

Çalışmamızda 5 grupta 10'ar adet olmak üzere 50 adet sıçan kullanıldı (Tablo 1).

Grup	Grup Türü	Açıklama
Grup I	Kontrol grubu	
Grup II	Yalnız RT uygulanan grup	Tüm vücut 800 cGy ışımlandı
Grup III	Yalnız melatonin (MEL) uygulanan grup	RT'den 30 dakika önce 10 mg/kg dozunda melatonin (IP) uygulandıktan sonra tüm vücut 800 cGy ışımlandı
Grup IV	Yalnız amifostin (AMF) uygulanan grup	RT'den 30 dakika önce 200 mg/kg dozunda amifostin (IP) uygulandıktan sonra tüm vücut 800 cGy ışımlandı
Grup V	RT (AMF+MEL) uygulanan grup	RT'den 30 dakika önce 200 mg/kg dozunda amifostin ve 10 mg/kg dozunda melatonin (IP) uygulandıktan sonra tüm vücut 800 cGy ışımlandı.

Tablo 1. Çalışma grupları

Tüm (I., II., III, IV. ve V.) gruplardaki deneklerin, ışınlamadan sonraki 4. günde, bütün hayvanlar anestezi altında dekapite edilerek beyin, dalak, karaciğer, böbrek ve bağırsak dokuları (ince ve kalın bağırsak) ölçüm yapılmaya kadar -80 °C'de, kan örnekleri ise -20 °C'de saklanacaktır.

Doku örnekleri homojenize edilerek ve kan örnekleri kullanılarak MDA, TAK , TOK ölçümleri spektrofotometik yöntemle ölçülecektir. Doku ve kan örneklerine ait Fe, Cu, Zn Alevli Atomik Absorbsiyon Spektrofotometresi (AAS) ile ölçülürken; Se ise Grafit Fırınlı Atomik Absorbsiyon Spektrofotometresi (AAS-GFA) cihazıyla ölçülecektir.

Yapılan bu ölçümler istatistiksel olarak değerlendirilecektir.

3.2 Radyasyon Uygulaması

Her bir sıçan, ketamin (50-60 mg/kg, im) ve ksilazin (5-10 mg/kg, im) ile anestezi sağlandıktan sonra yüzüstü pozisyonda sabitlendi. Mecaserto marka Simics model simülör kullanılarak tüm vücudu içerecek bir alan simüle edildi. Simüle edilen ilk hayvanın, alan

görüntülemesi için röntgen filmi çekildi. Elde edilen röntgen filmi ile diğer sıçanların simülasyonu kontrol edildi (Şekil 12). Sıçanların ön-arka kalınlığı cetvelle ölçülerek 1.5 cm yarı kalınlık saptandı. Kaynak-cilt mesafesi 80 cm olmak üzere 1.5 cm yarı kalınlığında uygulanacak doz hesaplanarak belirlenen alana Cis-Bio marka Cirus Kobalt 60 teleterapi cihazı ile tek fraksiyonda 7.32 Gy/dk doz hızında 8 Gy ışın uygulandı (Şekil 13).



Şekil 12. Ratlara RT öncesi simülasyon işlemi



Şekil 13. Ratlara RT uygulaması

3.3 Doku Homojenatların Hazırlanması

3.3.1. MDA, TAK ve TOK ölçümü için:

Doku örneklerinden alınan 1 gr örnek üzerine 9 ml working solution (0,15 M KCl) ilave edilerek, 9500 rpm'de birkaç dakika süreyle buz üstünde homojenize edilir. Homojenatlar eppendorf tüplerine aktarılarak 4000xg'de 10 dk +4 °C'de santrifüj edildi ve süpernatant ayrılır. Ayrılan süpernatantlar spektrofotometrik MDA, TAK ve TOK düzeyi ölçümünde kullanılır.

3.3.2. Fe, Cu, Zn ve Se ölçümü için:

Doku örneklerinden bistüri ile alınan parçalar hassas terzide tartılarak gram cinsinden değerleri belirlendi. Bu örnekler ısıya dayanıklı steril cam tüplere konularak üzerlerine 1 ml HNO₃ (Nitrik asit) ilave edildi. Önceden 100 °C'ye ayarlı etüvde yaklaşık yarım saat kadar bekletildi. Daha sonra etüvden alınarak oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı ve üzerlerine 1 ml HClO₃ (perklorik asit) ilave edildi. 100 °C'ye ayarlı etüvde yaklaşık yarım saat kadar bekletildi. Daha sonra etüvden alınarak oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı ve üzerlerine dH₂O ilave edilerek 10 ml ye tamamlandı.

3.4 Kan örneklerinin alınması:

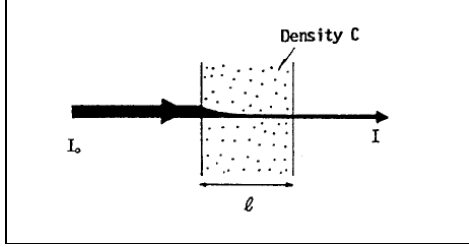
Sıçanlardan alınan enjektörle alınan kanlar düz tüp ve EDTA'lı tüplere alındı. Eser Element, Total Antioksidan Kapasite ve Total Oksidan Kapasite ölçümleri için düz tüpe alınan kan 5000 rpm' de 5 dakika santrifüj edildi, serum kısmı ayrıldı ve çalışma gününe kadar -20 °C'de saklandı. Lipit peroksidasyonu için EDTA'lı tüplere alınan kanlar 4000 rpm' de 5 dakika santrifüj edildi ve plazması ayrılıp -20 °C'de ölçüm yapıncaya kadar saklandı.

3.4.1. Serumda Eser Element (Fe, Cu, Zn ve Se) Düzeyinin Belirlenmesi

Alınan kan örneklerin serumları -20 °C' den alınarak oda sıcaklığına gelmesi beklendi. Daha sonra serum örnekleri üzerine bidistile su ilave edilerek toplam hacim 10ml ye tamamlandı.

Eser element ölçümleri için Titrisol 1000 ±0,002mg (Merck) standart stok solüsyonundan demir, bakır, çinko ve selenyum için 0.5, 1, 2g/mg'lik standart stok çözeltiler hazırlandı. Blank olarak bidistile su kullanıldı. Alette her elemente ait özel dalga boyuna ışık veren HCL (Hollow Cathod Lamp) lambaları ile yine her elemente uygun hava-asetilen gaz karışımı slit aralığı, HCL ve BGC (Back Ground Correction) modları seçildi. Shimadzu AA-6800 Absorbsiyon aletine standart çözeltiler verilmek suretiyle her bir elementin konsantrasyon-kalibrasyon grafikleri çizildi. Her grubun serum örneklerinden Fe, Cu ve Zn düzeyleri Alevli Atomik Absorpsiyon Spektrofotometresinde; Se düzeyleri ise Grafit Atomik Absorpsiyon Spektrofotometresinde belirlendi.

Prensip: Belirli yoğunluktaki ışık temel durumdaki atomlara verildiğinde bu ışığın bir kısmı atomlar tarafından absorbe edilir. Absorbsiyon oranı atomik yoğunluğa göre belirlenir. Işık I_0 yoğunluğunda yollandığında c yoğunluklu ortamda l yolunu geçer (Şekil 14).

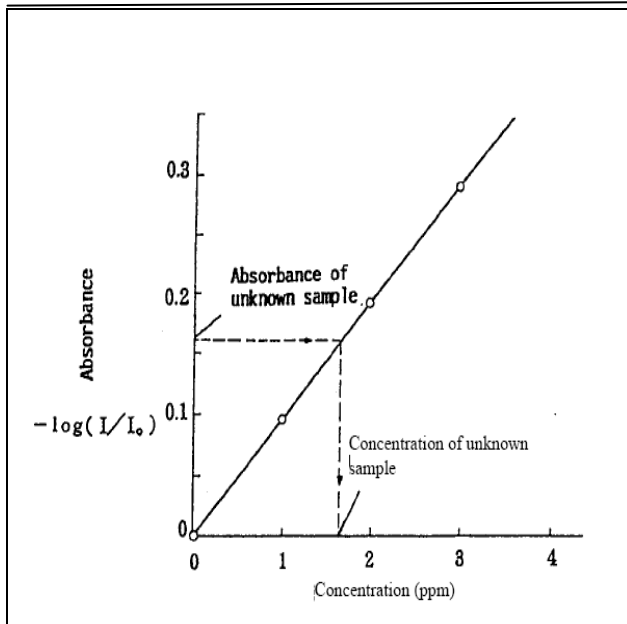


Şekil 14. Atomik absorpsiyon prensipleri

Işık bu yoğunluk tarafından emilir ve yoğunluğu zayıflamış I elde edilir. I ve I_0 arasında aşağıdaki formül uygulanır.

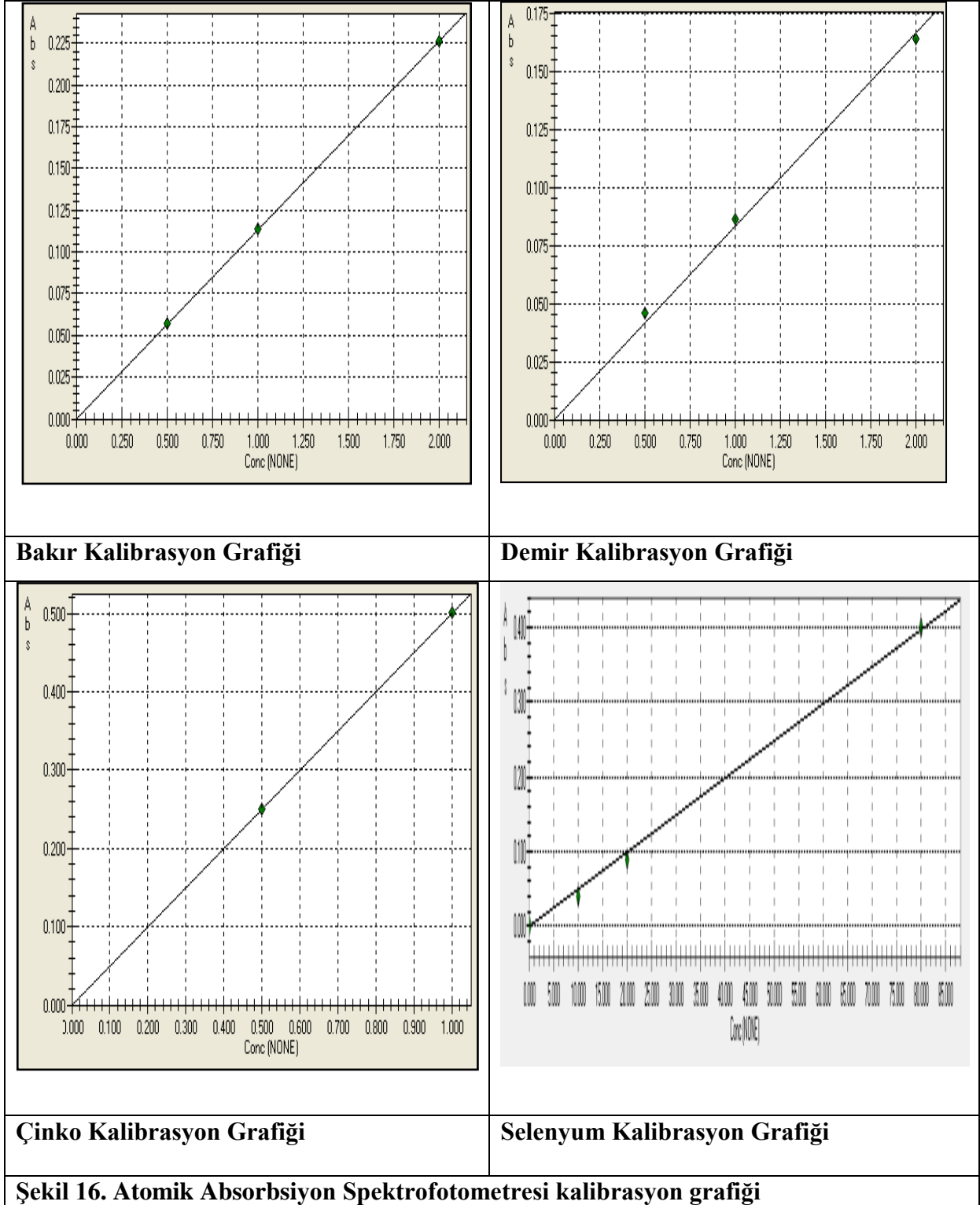
$$I = I_0 \cdot e^{-k/c} \quad (\text{Lambert-Beer's yasasına göre absorbans değeri})$$

Yukarıdaki formül absorbans atom yoğunluğu ile orantılı olduğunu gösterir. Absorbans örneğin; 0.5, 1, 2 konsantrasyonlarda verilen standart çözeltiler üzerinden çizilir ve lineer doğru şeklinde kalibrasyon grafiği elde edilir. Bilinmeyen bir numune absorblandığında konsantrasyonu, bu kalibrasyon grafiğinden belirlenebilir (Şekil 15).



Şekil 15. Kalibrasyon grafiği

Demir, bakır, çinko ve selenyum elementleri için Atomik absorpsiyon cihazından elde edilen kalibrasyon grafikleri şekil 16'da verildi.



3.4.2 Serumda Total Oksidan Kapasite (TOK) Düzeyinin Belirlenmesi

Serumda TOK Erel tarafından geliştirilen kolorimetrik yönteme göre ölçülecektir. Ölçümler ticari kit (Rel-Assay-Dragrastics-Total Oxidant Status) kullanılarak yapılmıştır.

Analizde standart 1'in hazırlanması için küvete 500 μ L reagent 1 eklenmiş ve üzerine 75 μ L standart 1 eklenmiştir. Standart 2'nin hazırlanması için küvete 500 μ L reagent 1 eklenmiş

ve üzerine 75µL standart 2 eklenmiştir. Örnek için küvete 500µL reagent 1 eklenmiş ve üzerine 75µL örnek eklenmiştir. Elde edilen karışımlar 530nm 'de ilk absorbans okunmuştur. Aynı küvetlere 25µL reagent 2 konularak 37 °C' lik su banyosunda 5 dakika inkübe edilmiştir. İkinci kez 530nm'de absaorbansı alınmıştır.

Hesaplama

Standart 1'in absorbansı (A)	Standart 1'in ikinci absorbansı – Standart 1'in ilk absorbansı
Standart 2'nin absorbansı (B)	Standart 2'in ikinci absorbansı – Standart 2'in ilk absorbansı
Örneğin absorbansı (C)	Örneğin ikinci absorbansı – Örneğin ilk absorbansı
SONUÇ (S, µmol H ₂ O ₂ Ekivalent/L)	(Standart 1'in absorbansı – Örneğin absorbansı) / (standart 1'in absorbansı– Standart 2'nin absorbansı) * Standart 2'nin değeri S (µmol H ₂ O ₂ Ekivalent/L)= $\frac{(A-C)}{(A-B)}$ xD
Standart 2'nin değeri (D)	20 µmol H ₂ O ₂ µmol H ₂ O ₂ Ekivalent/L

Prensip

Örnekte bulunan oksidanlar, Fe⁺² –O⁻ dianisidine kompleksini Fe⁺³ iyonuna okside eder. Oksidasyon reaksiyonu, reaksiyon ortamında bol miktarda bulunan gliserol molekülleri ile arttırılır. Fe⁺³ iyonu asidik ortamda ksilenol oranj ile renkli bir kompleks yapar. Renk şiddeti, örnekte bulunan oksidan moleküllerinin miktarı ile orantılıdır ve spektrofotometrik olarak ölçülebilir. Ölçüm hidrojen peroksit ile kalibre edilir ve sonuçlar µmol H₂O₂ Ekivalent/L olarak ifade edilir.

3.4.3. Serum Total Antioksidan Kapasite (TAK) Düzeyinin Belirlenmesi

Erel tarafından geliştirilen bir yöntem olup güçlü serbest radikallere karşı vücudun total antioksidan kapasitesini ölçen bir metottur. Serumda total antioksidan düzeyleri ticari kit (Rel-Assay-Dragrastics-Total Antioxidant Status) kullanılarak yapılmıştır. Analizde standart 1'in hazırlanması için küvete 500µL reagent 1 eklenmiş ve üzerine 30µL standart 1 eklenmiştir. Standart 2'nin hazırlanması için küvete 500µL reagent 1 eklenmiş ve üzerine 30µL standart 2 eklenmiştir. Örnek için küvete 500µL reagent 1 eklenmiş ve üzerine 30µL örnek eklenmiştir. Elde edilen karışımlar 660nm 'de ilk absorbans okunmuştur. Aynı küvetlere 75µL reagent 2 konularak 37 °C' lik su banyosunda 5 dakika inkübe edilmiştir. İkinci kez 660nm'de absorbansı alınmıştır.

Hesaplama

Standart 1'in absorbanası (A)	Standart 1'in ikinci absorbanası – Standart 1'in ilk absorbanası
Standart 2'nin absorbanası (B)	Standart 2'in ikinci absorbanası – Standart 2'in ilk absorbanası
Örneğin absorbanası (C)	Örneğin ikinci absorbanası – Örneğin ilk absorbanası B
SONUÇ (S, mmol Trolox ekivalent/L)	(Standart 1'in absorbanası – Örneğin absorbanası) / (standart 1'in absorbanası– Standart 2'nin absorbanası) $S \text{ (mmol H}_2\text{O}_2 \text{ Ekivalent/L)} = \frac{(A-C)}{(A-B)} \times D$
Standart 2'nin değeri (D)	20 mol H ₂ O ₂ Ekivalent/L

Prensip

İndirgenmiş ABTS molekülü asit ortamda (asetat tamponu, 30 mmol/L, pH:3,6) H₂O₂ kullanılarak ABTS^{•+} molekülüne okside edilir. Asetat tampon solüsyonunda, konsantre (koyu yeşil) ABTS^{•+} molekülü uzun süre dayanıklılığını korur. Yüksek pH' daki daha konsantre bir asetat tampon solüsyonu (asetat tamponu, 0,4 mol/L, pH:5,8) ile dilüe edildiğinde, renk kendiliğinden yavaşça açılır. Örnekte bulunan antioksidanlar konsantrasyonları ile orantılı olarak renkteki açılmayı hızlandırır. Bu reaksiyon spektrofotometrik olarak izlenebilir ve renkteki açılma total antioksidan kapasite ile ters orantılıdır. Reaksiyon hızı, total antioksidan kapasite ölçüm yöntemleri için geleneksel standart olarak kullanılan Trolox ile kalibre edilir. Ölçüm sonuçları mmol Trolox ekivalent/L olarak ifade edilir.

3.5.Oksidatif Stres İndeksinin (OSİ) Hesaplanması

$$\text{Oksidatif Stres İndeksi} = \frac{\text{TOS } (\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Ekivalent/L})}{\text{TAS}(\mu\text{mol Trolox Ekivalent/L})} \times 100$$

Hesaplama yapılmadan önce Total antioksidan kapasitenin birimi mmol Trolox Ekivalent/L den $\mu\text{mol Trolox Ekivalent/L}$ ' ye dönüştürülmüştür.

3.6.Plazmada Lipit Peroksidasyonu (MDA) Tayini

Plazma MDA düzeyleri Yagi ve ark tarafından tanımlanan spektrofotometrik metodun modifikasyonu ile ölçülecektir.

Analizde ölçümler için;

- %75'lik TBA (Tiyobarbitürik Asit)
- %30'luk TCA (Triklorasetik Asit)
- 5 Molarlık HCL (Hidroklorik Asit) hazırlandı.

Kimyasllardan 1.5 ml TBA, 1ml TCA ve 0.1ml HCL cam tüplere konuldu ve 37 °C'lik su banyosunda 15 dakika inkübasyona bırakıldı. Aynı tüplerin içine 0.2ml plazma eklendi. Tüpler 100°C'lik su banyosunda 15 dakika tutuldu. Tüpler soğuduktan sonra 5000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Elde edilen karışım küvetlere konularak 535nm de absorbansı okundu.

Hesaplama:

$$\text{SONUÇ} = [(\text{absorbans}) / (1,56 \times 10^5)]$$

Prensip

Plazma MDA düzeyleri Yağı ve ark tarafından tanımlanan spektrofotometrik metodun modifikasyonu ile ölçüldü. Bu yöntem, Lipid peroksidasyonun bir ürünü olan MDA'nın tiyobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyonu sonucu oluşan pembe rengin 535 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçülmesi prensibine dayanmaktadır (nmol/mL veya nmol/gr).

İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

İstatistiksel değerlendirme için Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalı'na kayıtlı SPSS 17.0 istatistik programı kullanılarak yapıldı. Sonuçlar ortalama±standart sapma olarak verildi. Gruplar arasındaki karşılaştırmalar Kruskal Wallis testi post-hoc Mann Whitney U test kullanılarak yapıldı. P<0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Sıçan Beyin Dokusu Verileri

Beyin dokularında yapılan ölçümlerden elde edilen TAK, TOK, OSİ; MDA, Zn, Fe, Cu ve Se ölçümleri tablo 2' de verilmektedir.

Tablo 2A. Beyin dokusu sonuçları

Grup No	TAK (mmol H ₂ O ₂ Ekivalent/L)	TOK (µmol Trolox Ekivalent/L)	OSİ	MDA (nmol/g)	Fe (µg/g)	Se (ng/g)
1	4,56±0,31	1,16±0,17	0,03±0,00	2,45±0,77	11,42±5,11	2,88±1,71
2	3,62±0,26 §	1,10±0,21	0,03±0,00	1,99±0,67	13,64±4,35	2,32±1,90
3	5,38±0,25 ¶	3,60±0,52 ¶	0,07±0,01¶	3,90±0,72 ¶	10,93±4,04	1,96±1,02
4	5,55±0,26 ‡	3,70±0,20 ‡	0,07±0,04‡	4,86±0,25 ‡	9,94±3,37	1,57±0,39
5	5,30±0,31 #	1,59±0,34 #	0,03±0,06	3,72±0,23 #	11,25±5,14	2,12±1,41

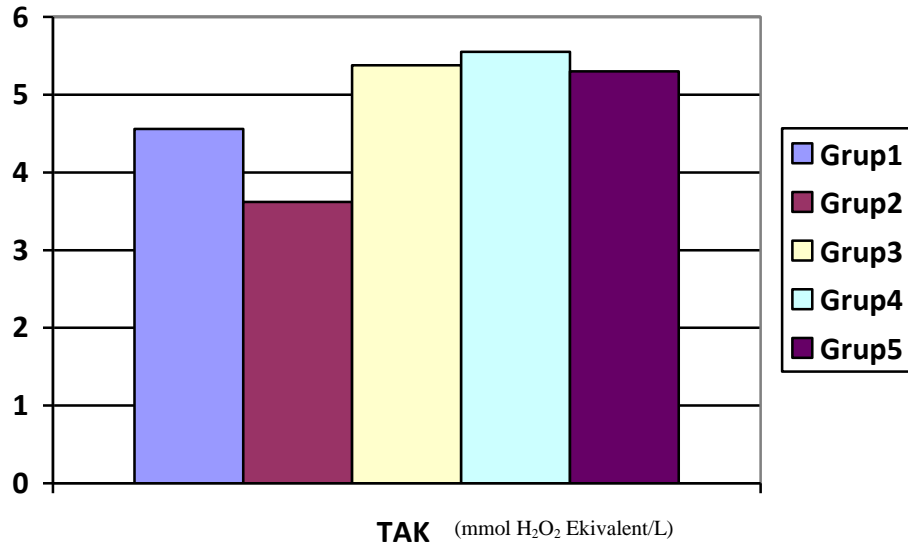
Grup 1 : kontrol grubu; Grup 2 : RT grubu , Grup 3 : RT+ melatonin (MEL) uygulanan grup, Grup 4 : RT+amifostin (AMF) uygulanan grup, Grup 5 : RT +AMF+MEL uygulanan grup
§p= grup1 ile grup 2; ¶p= grup2 ile grup 3; ‡p= grup2 ile grup 4; #p= grup2 ile grup 5 karşılaştırılmıştır. (p<0.05).

Tablo 2B. Beyin dokusu sonuçları

Grup No	Cu (µg/g)	Zn (µg/g)	Cu/Zn oranı
1	32,69±4,93	6,65±3,54	5,83±3,23
2	20,40±6,54	9,04±3,13	2,60±1,34
3	47,44±4,01 ¶	12,75±2,36	3,60±2,93
4	25,47±6,07	9,76±2,39	2,92±1,60
5	30,74±8,16	9,34±3,91	4,42±3,25

Grup 1 : kontrol grubu; Grup 2 : RT grubu , Grup 3 : RT+ melatonin (MEL) uygulanan grup, Grup 4 : RT+amifostin (AMF) uygulanan grup, Grup 5 : RT +AMF+MEL uygulanan grup
§p= grup1 ile grup 2; ¶p= grup2 ile grup 3; ‡p= grup2 ile grup 4; #p= grup2 ile grup 5 karşılaştırılmıştır. (p<0.05).

RT grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında TAK düzeyinin RT grubunda azaldığı ($p<0,05$), TOK, MDA, Zn, Fe, Cu ve Se düzeyelerindeki azalma istatistiksel olarak anlamlı değildir. Grup 2 ile grup 3 karşılaştırıldığında grup 3'te TAK, TOK, MDA ve OSI düzeyinin artarken Cu düzeyi azaldı ($p<0,05$) Grup2 ile grup 4 karşılaştırıldığında grup 4'te; grup 2 ile grup5 karşılaştırıldığında grup 5'te TAK, TOK, MDA düzeyinin arttığı belirlendi ($p<0,05$). Ayrıca grup 2 ile grup 4 karşılaştırıldığında grup 4'te OSI düzeyinin arttığı görüldü (Şekil 17) Cu/Zn oranında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı.



Şekil 17: Beyin dokusu TAK sonucu

Sıçan Böbrek Dokusu Verileri

Böbrek dokularında yapılan ölçümlerden elde edilen TAK, TOK, OSİ, MDA, Zn, Fe, Cu ve Se ölçümleri tablo 3'de verilmektedir.

Tablo 3A. Böbrek dokusu sonuçları

Grup No	TAK (mmol H ₂ O ₂ Ekvivalent/L)	TOK (µmol Trolox Ekvivalent/L)	OSİ	MDA (nmol/g)	Fe (µg/g)	Se (ng/g)
1	3,58±0,45	0,99±0,34	0,03±0,09	11,44±1,41	40,83±3,61	2,37±1,04
2	2,98±0,67	2,12±0,91	0,07±0,03§	10,25±1,31	27,73±2,56	1,31±1,11
3	4,50±0,62¶	3,02±1,27	0,07±0,03	7,68±0,69¶	9,80±2,75	1,19±0,55
4	4,16±0,21‡	6,70±1,53‡	0,16±0,03‡	7,34±1,30‡	10,76±1,90	1,86±0,53
5	2,89±0,48	2,92±0,71	0,10±0,03	10,06±1,5	11,97±2,89	1,41±0,90

Grup 1 : kontrol grubu; Grup 2 : RT grubu , Grup 3 : RT+ melatonin (MEL) uygulanan grup, Grup 4 : RT+amifostin (AMF) uygulanan grup, Grup 5 : RT +AMF+MEL uygulanan grup

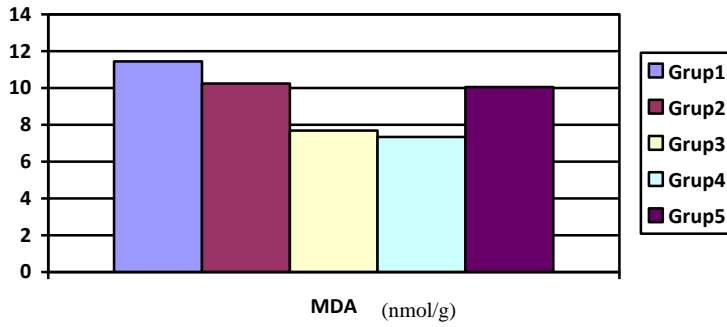
§p= grup1 ile grup 2; ¶p= grup2 ile grup 3; ‡p= grup2 ile grup 4; #p= grup2 ile grup 5 karşılaştırılmıştır. ($p<0,05$).

Tablo 3B. Böbrek dokusu sonuçları

Grup No	Cu (µg/g)	Zn (µg/g)	Cu/Zn oranı
1	70,05±5,16	12,26±3,16	6,30±5,70
2	153,15±8,57 §	13,97±5,59	10,62±2,99
3	31,90±2,34	21,23±1,10	1,82±1,73 ¶p
4	79,98±4,03	12,99±4,57	6,61±2,75
5	91,37±4,26	15,93±1,03	7,82±5,26

Grup 1 : kontrol grubu; Grup 2 : RT grubu , Grup 3 : RT+ melatonin (MEL) uygulanan grup, Grup 4 : RT+amifostin (AMF) uygulanan grup, Grup 5 : RT +AMF+MEL uygulanan grup
§p= grup1 ile grup 2; ¶p= grup2 ile grup 3; ‡p= grup2 ile grup 4; #p= grup2 ile grup 5 karşılaştırılmıştır. (p<0.05).

RT grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında OSI ve Cu düzeyinin RT grubunda arttığı belirlendi (p<0,05). Grup 2 ile grup 3 karşılaştırıldığında grup 3'te TAK düzeyinin artarken, MDA düzeyi azaldı (p<0.05). Ayrıca Cu/Zn oranının grup 3'te azaldı (p<0.05). Grup 2 ile grup 4 karşılaştırıldığında grup 4'te TAK, TOK ve OSİ düzeyinin arttığı, MDA düzeyinin azaldığı belirlendi (p<0.05) (Şekil 18).

**Şekil 18: Böbrek dokusu MDA sonucu****Sıçan Dalak Dokusu Verileri**

Dalak dokularında yapılan ölçümlerden elde edilen TAK, TOK, OSİ, MDA, Zn, Fe, Cu ve Se ölçümleri tablo 4' de verilmektedir.

Tablo 4A. Dalak dokusu sonuçları

Grup No	TAK (mmol H ₂ O ₂ Ekvivalent/L)	TOK (µmol Trolox Ekvivalent/L)	OSİ	MDA (nmol/g)	Fe (µg/g)	Se (ng/g)
1	3,78±0,83	3,08±1,46	0,09±0,06	10,10±2,16	38,12±0,82	5,09±1,55
2	1,89±0,43 §	4,11±0,41	0,40±0,03 §	12,62±1,40	73,88±5,70 §	2,15±0,59 §
3	3,37±0,57 ¶	3,91±0,70	0,12±0,05 ¶	15,79±1,43 ¶	37,78±1,54 ¶	1,05±0,50
4	3,50±0,64	2,81±0,95	0,08±0,03 ‡	11,55±3,30	34,17±1,90	1,95±0,53
5	4,03±0,44 #	3,27±0,91	0,08±0,02 #	10,64±1,50	54,79±1,79 #	1,63±0,45

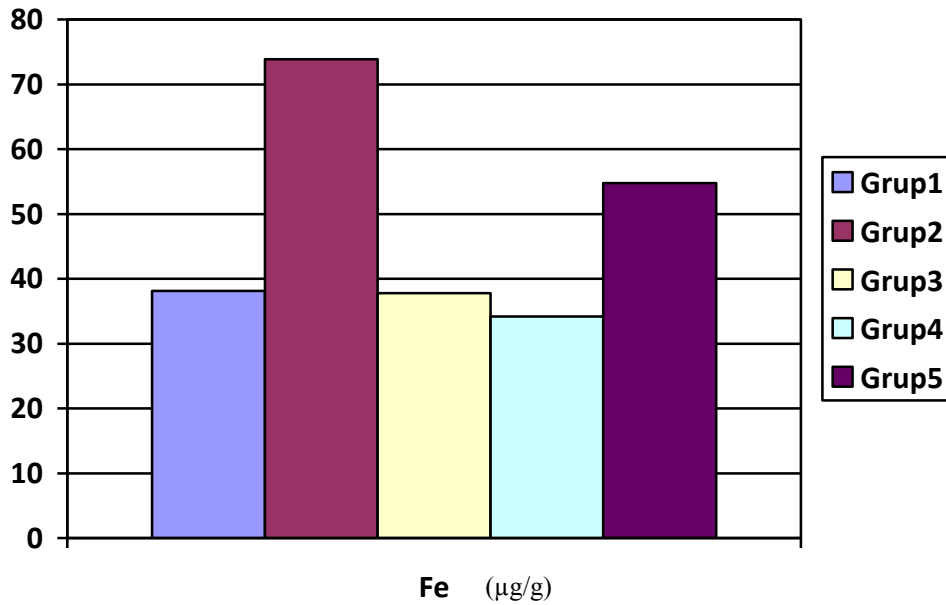
Grup 1 : kontrol grubu; Grup 2 : RT grubu , Grup 3 : RT+ melatonin (MEL) uygulanan grup, Grup 4 : RT+amifostin (AMF) uygulanan grup, Grup 5 : RT +AMF+MEL uygulanan grup
§p= grup1 ile grup 2; ¶p= grup2 ile grup 3; ‡p= grup2 ile grup 4; #p= grup2 ile grup 5 karşılaştırılmıştır. (p<0.05).

Tablo 4A. Dalak dokusu sonuçları

Grup No	Cu (µg/g)	Zn (µg/g)	Cu/Zn oranı
1	27,77±1,24	18,22±0,80	1,37±0,55
2	9,60±2,53§	17,84±1,47	1,55±0,34
3	34,03±6,83¶	12,27±3,86	2,92±1,709
4	35,32±1,11	18,49±3,57	1,98±0,74
5	44,33±5,90‡	21,57±3,21	2,09±0,43

Grup 1 : kontrol grubu; Grup 2 : RT grubu , Grup 3 : RT+ melatonin (MEL) uygulanan grup, Grup 4 : RT+amifostin (AMF) uygulanan grup, Grup 5 : RT +AMF+MEL uygulanan grup
§p= grup1 ile grup 2; ¶p= grup2 ile grup 3; ‡p= grup2 ile grup 4; #p= grup2 ile grup 5 karşılaştırılmıştır. (p<0.05).

RT grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında RT grubunda TAK, Cu ve Se düzeyinin azaldığı, OSI ve Fe düzeyinin arttığı belirlendi (p<0,05). Grup 2 ile grup 3 karşılaştırıldığında grup 3'te TAK, MDA, Cu düzeyinin artarken OSI ve Fe düzeyi azaldı (p<0.05). Grup 2 ile grup 4 karşılaştırıldığında grup 4'te; grup2 ile grup5 karşılaştırıldığında grup 5'te TAK, Fe ve Cu düzeyinin arttığı OSI düzeyinin azaldığı belirlendi (p<0.05) (Şekil 19). Cu/Zn oranında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı.



Şekil 19: Dalak dokusu Fe sonucu

Sıçan İnce Bağırsak Dokusu Verileri

İnce bağırsak dokularında yapılan ölçümlerden elde edilen TAK, TOK, OSI; MDA, Zn, Fe, Cu ve Se ölçümleri tablo 5' de verilmektedir.

Tablo 5A. İnce bağırsak dokusu sonuçları

Grup No	TAK (mmol H ₂ O ₂ Ekivalent/L)	TOK (µmol Trolox Ekivalent/L)	OSİ	MDA (nmol/g)	Fe (µg/g)	Se (ng/g)
1	1,69±0,16	3,42±0,85	0,20±0,05	7,06±1,59	5,93±0,59	2,93±0,57
2	0,42±0,21§	4,36±0,29§	1,25±0,5§	9,55±1,91§	11,67±4,37	4,46±2,27
3	3,90±0,65¶	4,29±0,49	0,11±0,02	10,46±2,02	9,34±0,41	4,83±0,35
4	3,00±0,64‡	3,85±0,95	0,13±0,02	9,44±0,64	10,57±0,90	5,04±0,24
5	1,65±0,44#	4,28±0,91	0,26±0,07	5,10±1,50	9,04±5,66	2,83±0,45

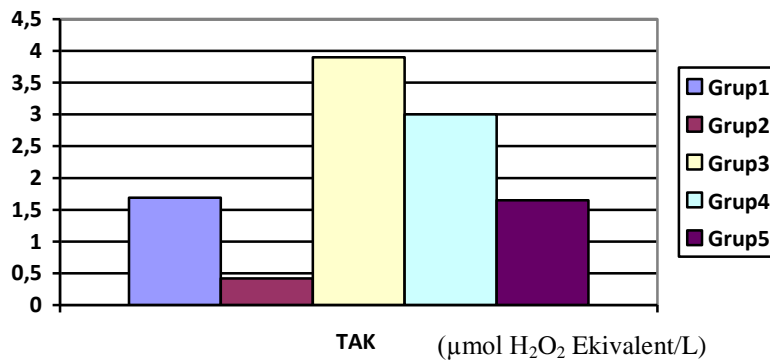
Grup 1 : kontrol grubu; Grup 2 : RT grubu , Grup 3 : RT+ melatonin (MEL) uygulanan grup, Grup 4 : RT+amifostin (AMF) uygulanan grup, Grup 5 : RT +AMF+MEL uygulanan grup
§p= grup1 ile grup 2; ¶p= grup2 ile grup 3; ‡p= grup2 ile grup 4; #p= grup2 ile grup 5 karşılaştırılmıştır. (p<0.05).

Tablo 5B. İnce bağırsak dokusu sonuçları

Grup No	Cu (µg/g)	Zn (µg/g)	Cu/Zn oranı
1	71,61±4,66	28,74±1,61	2,42±0,34
2	52,02±2,84	26,97±1,69	2,15±0,65
3	10,85±0,83¶	14,96±1,20¶	0,83±0,52¶
4	14,30±0,99‡	14,22±1,88‡	1,10±0,32‡
5	13,19±5,10#	9,84±3,21#	1,45±0,70#

Grup 1 : kontrol grubu; Grup 2 : RT grubu , Grup 3 : RT+ melatonin (MEL) uygulanan grup, Grup 4 : RT+amifostin (AMF) uygulanan grup, Grup 5 : RT +AMF+MEL uygulanan grup
§p= grup1 ile grup 2; ¶p= grup2 ile grup 3; ‡p= grup2 ile grup 4; #p= grup2 ile grup 5 karşılaştırılmıştır. (p<0.05).

RT grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında TAK düzeyinin RT grubunda azaldığı, OSI, TOK ve MDA düzeyinin arttığı belirlendi (p<0,05). Grup 2 ile grup 3 karşılaştırıldığında grup 3'te TAK, düzeyinin artarken OSI, Cu ve Zn düzeyi ve Cu/Zn oranı azaldı (p<0.05). Grup 2 ile grup 4 karşılaştırıldığında grup 4'te TAK düzeyinin arttığı, OSI, Cu ve Zn düzeyinin ve Cu/Zn oranının azaldığı belirlendi (p<0.05). Grup 2 ile grup 5 karşılaştırıldığında grup 5'te TAK, düzeyinin arttığı, OSI, MDA, Cu ve Zn ve Cu/Zn oranının azaldığı düzeyinin azaldığı belirlendi (p<0.05) (Şekil 20).

**Şekil 20: İnce bağırsak dokusu TAK sonucu**

Siçan Kalın Bağırsak Dokusu Verileri

Kalın bağırsak dokularında yapılan ölçümlerden elde edilen TAK, TOK, OSİ; MDA, Zn, Fe, Cu ve Se ölçümleri tablo 6 de verilmektedir.

Tablo 6A. Kalın bağırsak dokusu sonuçları

Grup No	TAK (mmol H ₂ O ₂ Ekivalent/L)	TOK (µmol Trolox Ekivalent/L)	OSİ	MDA (nmol/g)	Fe (µg/g)	Se (ng/g)
1	3,79±0,41	4,23±0,47	0,11±0,02	3,82±0,59	6,20±3,80	6,88±2,59
2	1,60±0,70§	5,26±0,69§	0,40±0,04§	1,71±0,24§	14,67±1,41	4,31±2,50
3	1,57±0,58	4,10±0,83¶	0,29±0,04	0,60±0,37¶	18,30±3,87¶	4,28±2,69
4	1,88±0,55	5,61±0,75	0,32±0,02	4,47±0,44‡	6,26±2,87‡	4,46±2,50
5	1,61±0,64	2,69±0,93#	0,28±0,03	1,24±0,22	4,80±2,60#	4,29±2,50

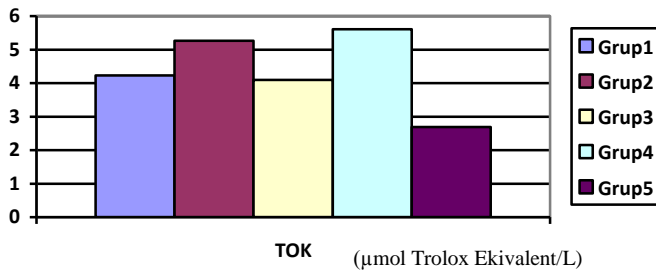
Grup 1 : kontrol grubu; Grup 2 : RT grubu , Grup 3 : RT+ melatonin (MEL) uygulanan grup, Grup 4 : RT+amifostin (AMF) uygulanan grup, Grup 5 : RT +AMF+MEL uygulanan grup
§p= grup1 ile grup 2; ¶p= grup2 ile grup 3; ‡p= grup2 ile grup 4; #p= grup2 ile grup 5 karşılaştırılmıştır. (p<0.05).

Tablo 6B. Kalın bağırsak dokusu sonuçları

Grup No	Cu (µg/g)	Zn (µg/g)	Cu/Zn oranı
1	8,82±3,05	31,12±1,88	0,34±0,15
2	33,24±1,84§	22,97±1,45	1,97±1,28§
3	2,11±1,10§	18,30±1,76	0,13±0,07¶
4	9,24±6,23‡	29,57±1,90	0,33±0,17‡
5	3,27±1,37#	15,21±0,73	0,39±0,21#

Grup 1 : kontrol grubu; Grup 2 : RT grubu , Grup 3 : RT+ melatonin (MEL) uygulanan grup, Grup 4 : RT+amifostin (AMF) uygulanan grup, Grup 5 : RT +AMF+MEL uygulanan grup
§p= grup1 ile grup 2; ¶p= grup2 ile grup 3; ‡p= grup2 ile grup 4; #p= grup2 ile grup 5 karşılaştırılmıştır. (p<0.05).

RT grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında TAK, MDA düzeyinin RT grubunda azaldığı, OSİ, TOK ve Cu düzeyinin ve Cu/Zn oranının arttığı belirlendi (p<0,05). Grup 2 ile grup 3 karşılaştırıldığında grup 3'te Fe, düzeyinin artarken TOK, MDA, Cu düzeyi ve Cu/Zn oranı azaldı azaldı (p<0.05) Grup 2 ile grup 4 karşılaştırıldığında grup 4'te MDA düzeyinin arttığı, Cu, Fe ve Cu/Zn oranının azaldığı belirlendi (p<0.05). Grup 2 ile grup 5 karşılaştırıldığında grup 5'te, TOK, Fe, Cu ve ve Cu/Zn oranının azaldığı belirlendi (p<0.05) (Şekil 21).



Şekil 21: Kalın bağırsak dokusu TOK sonucu

Şıçan Karaciğer Dokusu Verileri

Karaciğer dokularında yapılan ölçümlerden elde edilen TAK, TOK, MDA, Zn, Fe, Cu ve Se ölçümleri tablo 7’de verilmektedir.

Tablo 7A. Karaciğer dokusu sonuçları

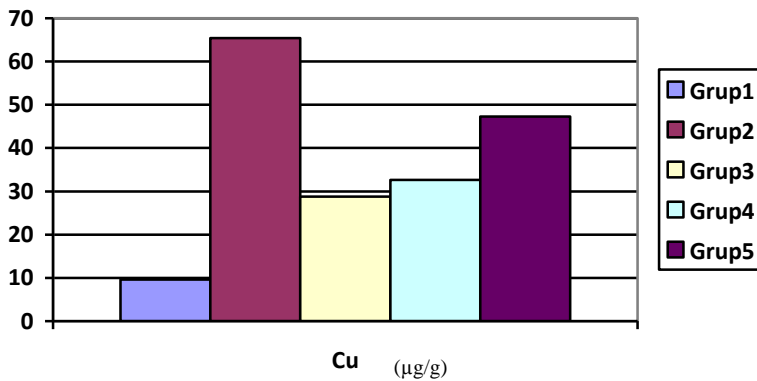
Grup No	TAK (mmol H ₂ O ₂ Ekvivalent/L)	TOK (µmol Trolox Ekvivalent/L)	OSİ	MDA (nmol/g)	Fe (µg/g)	Se (ng/g)
1	3,60±0,17	0,78±0,38	0,02±0,01	4,50±0,75	6,46±0,65	0,98±0,41
2	3,98±0,24§	1,91±0,52§	0,04±0,01§	4,22±0,70	6,63±1,38	1,19±0,57
3	3,67±0,25¶	1,35±0,45	0,03±0,01	5,41±0,72¶	9,43±0,60¶	0,95±0,25
4	3,68±0,15‡	0,97±0,42‡	0,02±0,01	5,15±0,35‡	7,64±1,87	0,88±0,17
5	3,90±0,26	0,81±0,51#	0,02±0,01	3,37±0,33#	7,51±3,86	1,04±0,31

Grup 1 : kontrol grubu; Grup 2 : RT grubu , Grup 3 : RT+ melatonin (MEL) uygulanan grup, Grup 4 : RT+amifostin (AMF) uygulanan grup, Grup 5 : RT +AMF+MEL uygulanan grup
§p= grup1 ile grup 2; ¶p= grup2 ile grup 3; ‡p= grup2 ile grup 4; #p= grup2 ile grup 5 karşılaştırılmıştır. (p<0.05).

Tablo 7B. Karaciğer dokusu sonuçları

Grup No	Cu (µg/g)	Zn (µg/g)	Cu/Zn oranı
1	9,64±4,12	21,68±4,55	0,46±0,21
2	65,43±1,27§	23,33±2,33	2,82±0,59§
3	28,75±2,87¶	24,31±1,05	1,18±0,14¶
4	32,62±1,78‡	22,61±3,94	1,51±0,86‡
5	47,31±1,87#	24,53±5,41	2,10±0,51

Grup 1 : kontrol grubu; Grup 2 : RT grubu , Grup 3 : RT+ melatonin (MEL) uygulanan grup, Grup 4 : RT+amifostin (AMF) uygulanan grup, Grup 5 : RT +AMF+MEL uygulanan grup
§p= grup1 ile grup 2; ¶p= grup2 ile grup 3; ‡p= grup2 ile grup 4; #p= grup2 ile grup 5 karşılaştırılmıştır. (p<0.05).



Şekil 22: Karaciğer dokusu Cu sonucu

RT grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında, RT grubunda OSİ, TAK, TOK, Cu düzeyinin ve Cu/Zn oranının arttığı belirlendi(p<0,05). Grup 2 ile grup 3 karşılaştırıldığında

grup 3'te MDA, Fe düzeyinin artarken, TAK, Cu düzeyi ve Cu/Zn oranı azaldı ($p<0.05$) Grup 2 ile grup 4 karşılaştırıldığında grup 4'te, MDA düzeyinin arttığı, TAK, TOK, Cu düzeyinin ve Cu/Zn oranının azaldığı belirlendi ($p<0.05$). Grup 2 ile grup 5 karşılaştırıldığında grup 5'te, MDA, TOK, Cu düzeyinin azaldığı belirlendi ($p<0.05$). Grup 2 ile grup 5 karşılaştırıldığında grup 5'te Cu/Zn oranında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (Şekil 22) .

Sıçan Serum Örnekleri Verileri

Serum örneklerinden yapılan ölçümlerden elde edilen TAK, TOK, OSİ, MDA, Zn, Fe, Cu ve Se ölçümleri tablo 8' de verilmektedir.

Tablo 8A. Serum sonuçları

Grup No	TAK (mmol H ₂ O ₂ Ekivalent/L)	TOK (µmol Trolox Ekivalent/L)	OSİ	MDA (nmol/mL)	Fe (µg/dl)	Se (ng/dl)
1	5,52±0,23	10,19±2,16	0,19±0,04	4,96±1,54	299,95±10,38	30,71±5,91
2	4,79±0,46§	9,38±0,69	0,19±0,02	4,74±1,97	396,52±16,33	31,25±2,81
3	5,24±0,15¶	10,89±1,47	0,20±0,02	3,21±0,85	299,95±10,38	30,11±2,53
4	5,27±0,16‡	7,99±0,96	0,15±0,02‡	5,43±2,14	259,88±7,24	34,34±1,14
5	5,33±0,29‡	12,03±0,93‡	0,22±0,01	6,69±2,33	290,58±12,91	26,92±8,52

Grup 1 : kontrol grubu; Grup 2 : RT grubu , Grup 3 : RT+ melatonin (MEL) uygulanan grup, Grup 4 : RT+amifostin (AMF) uygulanan grup, Grup 5 : RT +AMF+MEL uygulanan grup
§p= grup1 ile grup 2; ¶p= grup2 ile grup 3; ‡p= grup2 ile grup 4; ‡p= grup2 ile grup 5 karşılaştırılmıştır. ($p<0.05$).

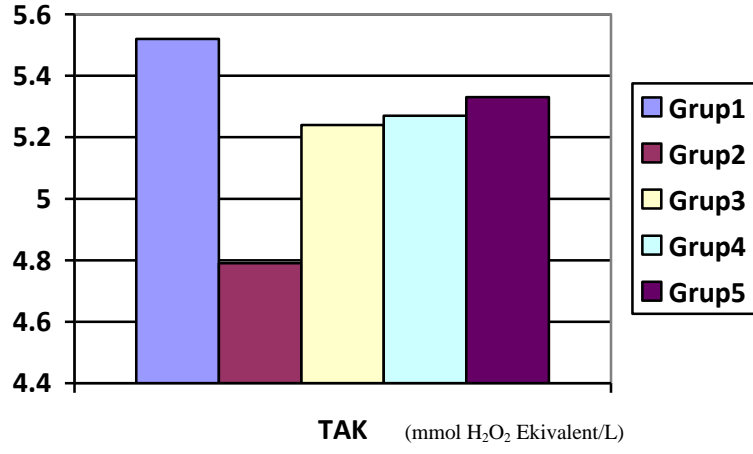
Tablo 8A. Serum sonuçları

Grup No	Cu (µg/dl)	Zn (µg/dl)	Cu/Zn oranı
1	59,12±1,40	158,34±19,25	1,88±0,61
2	143,66±20,02§	120,93±10,73§	3,36±1,64§
3	125,58±7,55¶	163,65±11,04¶	2,50±1,31
4	121,62±18,85‡	151,81±5,80‡	1,70±0,44‡
5	137,95±4,69	146,83±8,80	1,96±0,41‡

Grup 1 : kontrol grubu; Grup 2 : RT grubu , Grup 3 : RT+ melatonin (MEL) uygulanan grup, Grup 4 : RT+amifostin (AMF) uygulanan grup, Grup 5 : RT +AMF+MEL uygulanan grup
§p= grup1 ile grup 2; ¶p= grup2 ile grup 3; ‡p= grup2 ile grup 4; ‡p= grup2 ile grup 5 karşılaştırılmıştır. ($p<0.05$).

RT grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında, RT grubunda, Cu düzeyinin ve Cu/Zn oranının arttığı; TAK, Zn düzeyinin azaldığı belirlendi ($p<0,05$). Grup2 ile grup 3 karşılaştırıldığında grup 3'te TAK, Zn düzeyinin artarken, Cu düzeyi ve Cu/Zn oranı azaldı ($p<0.05$). Grup2 ile grup 4 karşılaştırıldığında grup 4'te, TAK, Zn düzeyinin arttığı, OSI ve Cu düzeyinin ve Cu/Zn oranının azaldığı belirlendi ($p<0.05$). Grup2 ile grup5

karşılaştırıldığında grup 5'te, TAK, TOK düzeyinin arttığı, Cu/Zn oranının azaldığı belirlendi ($p<0.05$) (Şekil 23).



Şekil 23: Serum TAK sonucu

TARTIŞMA

Günümüzde iyonizan radyasyona neden olduğu hücrel hasarların patogeneğinde oksidatif stresin önemi kanıtlandıktan sonra, antioksidanların bu alanda koruyucu amaçlı kullanımının araştırıldığı çok sayıda çalışma yapılmıştır. Bu çalışmaların çoğunda, serbest radikalleri süpürücü kapasiteyi artırmaya yönelik antioksidan desteği yapılmış ve birçok sistem üzerine faydalı etkileri olduğu gösterilmiştir. Bu sonuçlara rağmen, iyonizan radyasyon tedavisinde antioksidanların klinik kullanımı, yapılan çalışmalarda çok fazla değişkenlik gösterdiğinden tartışmalı bir konu olarak kalmıştır (1,2,8,12).

İyonizan radyasyon organizmalar için toksiktir çünkü temel makromoleküllerin yapısında zararlı değişikliklere neden olur. İyonizan radyasyon, oksidatif hasara neden olduğu bilinen bir karsinojendir ve DNA molekülüne hasar verdiği önceki çalışmalarda rapor edilmiştir. İyonizan radyasyon ile meydana gelen, DNA hasarının yaklaşık % 60-70'i suyun radyolizi ile oluşan, hidroksil (OH) moleküllerinden kaynaklanır. DNA'nın yanı sıra, lipit ve protein molekülleri de iyonizan radyasyonla oluşan serbest radikaller tarafından zarar görürler. Hücre ve nükleus zarlarında parçalanmaya kadar giden zararların önemli bir kısmının da lipit peroksidasyonu ile oluştuğuna inanılmaktadır. Oksijen radikali kaynaklı doku hasarının gelişmesinde de katkıda bulunan bir faktör olduğu öne sürülmüştür. Hücre dışında üretilen serbest radikaller, hücre bileşenleriyle etkileşmeden önce hücre zarını geçmek zorundadırlar. Oksijen molekülünün membran lipitlerine karşı yüksek affinitesi olduğundan hücre zarı, serbest radikal reaksiyonları için önemli bir hedeftir. Serbest oksijen radikalleri, membranlarda bulunan doymamış yağ asitlerine bağlanarak lipit peroksidasyonuna neden olur. Lipit peroksidasyonu, oksidatif stresin en önemli sonuçlarından biridir. Hücre yapı ve bütünlüğünün bozulmasına ve kanser gibi birçok hastalığın oluşumuna katkı sağladığı

bilinmektedir (1,2,12). Son yıllarda yapılan çalışmalarda ratlarda radyasyon öncesi melatonin kullanımının MDA düzeyini azalttığı bildirilmiştir. Tüm vücut ışınlanan ratlarda artan lipid peroksidasyonuna bağlı olarak karaciğer, beyin, dalak, bağırsak ve böbrek dokularında hasar oluşmaktadır. Melatonin uygulaması lipid peroksidasyonunu bastırır ve oksidatif hasara karşı koruyucu etki gösterir. Melatonin, etkili bir anti-oksidan ve serbest radikal süpürücüdür. Melatonin küçük boyutu ve yüksek düzeyde lipofil olması nedeniyle, kolayca biyolojik membranlardan geçer ve hücrenin tüm bölmelerine ulaşır. Endojen ve eksojen serbest radikallere maruz kalan DNA, lipid ve protein moleküllerindeki hasarlara karşı melatoninin koruyucu etkisi vardır (2,42,62).

Tüm vücut ışınlanması uygulanan hastalarda plazma toplam antioksidan kapasitesinin azaldığı bulunmuştur. Bağışıklık sisteminin oksidatif strese karşı olan savunma mekanizmasına katkısı muhtemelen doğrudan değildir. Canlı organizmadaki bağışıklık sistemi dışındaki sistemler de savunma mekanizmasının verimi yanında bağışıklık sisteminin de işlevini artırmaktadır. Bu mekanizmalardan biri olan insan serum total antioksidan kapasitesi serum melatonin düzeyi ile direkt bir ilişki göstermektedir. Glioblastom hastalarında uygulanan beyin radyoterapisi ile birlikte melatonin uygulandığında (tek başına radyoterapi ile karşılaştırıldığında), radyasyona bağlı toksisitede bir azalma ve buna bağlı olarak sağ kalım oranının da bir artma bildirilmiştir.(40-42).

Çalışmamızda, kullandığımız amifostin maddesi ilk kez 1950 yıllarında Amerikan ordusu tarafından askeri personeli radyasyon maruzundan korumak için geliştirilmiştir. Amifostinin, ABD’de ilerlemiş over kanserlerinde ve küçük hücreli olmayan akciğer kanserlerinde sisplatin tedavisinin nefrotoksisitesini önlemek ve baş-boyun kanserlerinde postoperatif radyoterapiden sonra oluşan kserostomiye önlemek için kullanımı onaylanmıştır. Amifostin, çeşitli hücre tiplerini radyasyona bağlı hasardan koruduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Radyasyon ve kemoterapiye bağlı hücresel hasarını, serbest oksijen radikallerini ortadan kaldırarak ve sitotoksik ajanların reaktif metabolitlerini detoksifiye ederek önler. Amifostin ayrıca endotel hücre proliferasyonunu ve müteakip neovaskülarizasyonu indükler. Neovaskülarizasyonunda yara iyileşmesinde önemli aşamalardan birisi olduğu kanıtlanmıştır. Amifostin, normal dokuların efektif bir radioprotektanıdır ve radyasyon terapisinin anti-tümör aktivitesine negatif bir etki yapmaz. Amifostin, kanser tedavisi için kullanılan radyoterapi sonucu normal dokuda oluşan hasarı önlemeye yönelik olarak kullanılan (FDA onaylı) tek radyoprotektör ajandır. Bir organik tiyofosfat olan amifostin normal dokularda alkalin fosfataz ile defosforile olarak aktif metaboliti olan tiyole dönüşür. Radyasyon ve sisplatinin etkilerine karşın normal dokuları koruma yeteneğine sahiptir. Amifostinin bu etkisi normal dokularda kapiller fosfataz

aktivitesinin yüksek olmasına, pH değerinin yüksekliğine ve tümör dokularının daha iyi damarlanmasına bağlıdır. Bu sebeple serbest tiyol metaboliti normal dokularda tümör dokularına göre daha hızlı oluşur ve normal hücreler tarafından hızla alınır. Son zamanlarda amifostinin radyoprotektör ajan olarak üzerinde sıkça hayvan deneyleri ve klinik çalışmalar yapılmaktadır. Tüm bu çalışmalar amifostinin, radyoterapinin etkinliğini azaltmadan, normal dokuları radyasyonun zararlı etkilerine karşı koruduğunu göstermiştir (4,83,85).

Undeger ve ark yaptıkları çalışmada 10 Gy iyonizn radyasyona maruz kalan ratlarda DNA zincir kırıklarının ve MDA göstergesi olan TBARS konsantrasyonunun arttığını belirtmişlerdir. Ayrıca radyoterapi öncesi melatonin uygulanan grupta DNA zincir kırıklarının ve lipit peroksidasyonun istatistiksel olarak azaldığını rapor etmişlerdir (94). Gülyaşar ve ark. ratlarda kadmiyum toksitesi üzerine yaptıkları çalışmada kontrol grubu ile karşılaştırıldığında kadmiyumun beyin ve kalpte anlamlı düzeyde birikim gösterdiğini ve melatonin uygulanan ratlarda beyin dokusunda kadmiyum birikimine karşı en etkili maddenin melatonin olduğunu bulmuşlardır (95). Erol ve ark. yaptıkları radyasyon uygulanan ratların beyin dokularında melatonin ve vitamin E'nin koruyucu etkisini araştırdıkları karşılaştırmalı deneysel çalışmada, melatoninin radyasyonun indüklediği serbest oksijen radikalleri nedeniyle oluşan beyin hasarını azalttığını patolojik olarak göstermişlerdir (96). Cakmak ve ark. 8 Gy tüm vucut radyoterapi uyguladıkları ratların beyin dokularında amifostinin etkisini inceledikleri çalışmada, iyonizan radyasyona karşı amifostinin lipit peroksidasyonu inhibe ederek beyin dokusunda koruyucu etki gösterdiğini bulmuşlardır (97). Bizim çalışmamızda beyin dokusu incelendiğinde, sadece radyoterapi verilen grupla karşılaştırıldığında, yalnız melatonin+RT, yalnız amifostin+RT ve amifostin+melatonin+RT verildiği grupta TAS, TOS ve MDA düzeyinin arttığı ($p<0.05$) eser element düzeylerinin değişmediği görüldü. Ancak TAS, TOS ve MDA' daki bu artış miktarı amifostin+melatoninin+RT verildiği grupta, amifostin+RT ve melatonin+RT uygulandığı gruptakilere göre daha düşüktür. Amifostin+melatonin+RT'nin birlikte uygulandığı durumda TAS'ın, amifostin+RT ve melatonin+RT'nin uygulandığı gruptakilere göre daha çok arttığı görüldü. Buradan amifostinin melatonininle birlikte kullanılmasının beyin dokusunda radyasyon hasarına karşı daha etkili olduğu söylenebilir.

Kucuktulu'nun 2012 yılında ratlar üzerinde yaptığı deneysel çalışmada, yalnız radyoterapi ve melatonin+radyoterapi uygulayarak böbrek dokularını histopatolojik olarak incelemişlerdir(98). Radyoterapi+melatonin uygulanan grupta oluşan doku hasarının, radyoterapi uygulanan gruba göre daha az olduğu görülmüştür ($p<0.05$). Bu deneysel model sonucunda, melatonin iyonizan radyasyona karşı ratların böbrek dokularında koruyucu etki gösterdiğini rapor etmişlerdir. Uguzalp-Kaldır ve ark. 6 Gy tek doz radyoterapi uyguladıkları ratların böbrek dokuları üzerinde sintigrafik değerlendirme yapmışlardır. Çalışma sonucunda

amifostinin böbrek üzerinde radyoprotektif etkisini sintigrafik olarak kanıtlanmışlardır. Aynı zamanda, böbrek dokusunda radyasyona bağlı olarak gelişen histopatolojik değişikliklerin azaldığını rapor etmişlerdir (99). Bizim çalışmamızda böbrek dokusunda incelendiğinde RT uygulanan grup ile kontrol grubu karşılaştırıldığında, kontrol grubunda Cu düzeyininin arttığı görüldü ($p<0.05$). Ayrıca yalnız amifostin+RT ve yalnız melatonin+RT verilen grupta TAS ve TOS'un arttığı MDA'nın da azaldığı görüldü ($p<0.05$). Amifostin+melatonin+RT uygulanan grupta incelediğimiz parametrelerde istatistiksel bir değişiklik gözlenmedi. Bunun sonucunda böbrekte amifostinin ve melatoninin ayrı ayrı kullanılarak böbrek dokusunu RT'ye karşı koruduğu görüldü.

Ratların dalak dokusunda da melatoninin iyonizan radyasyon hasarına karşı koruyucu etkisi çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Trajkovic ve ark 8 Gy tek doz tüm vucut radyasyon uygulanan ratlarda çeşitli dokular üzerinde histopatolojik incelemelerde bulunmuşlardır. Çalışma sonucunda amifostin uygulanan grupta dalak dokusu üzerine radyoprotektif etkisini olduğunu belirtmişlerdir (100). Bizim çalışmamızda dalak dokusu incelendiğinde yalnız melatonin+RT verilen grupta MDA ve TAS'ın arttığı görüldü ($p<0.05$). Yalnız Amifostin+RT ve amifostin+melatonin+RT verilen grupta TAS, Fe ve Cu'nun arttığı görüldü ($p<0,05$). Ayrıca MDA konsantrasyonunda azalma gözlendi ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0.05$). Buradan amifostinin dalak dokusunda RT'ye karşı koruyucu olduğu, melatoninin bu korumayı tek başına gerçekleştiremediği, ancak amifostin ile birlikte verildiğinde RT'ye karşı amifostinin radyoprotektif etkisini artırarak koruyucu antioksidan özellik gösterdiği görüldü.

Cassat ve ark. iyonize radyasyon uygulanan ratlar üzerinde yaptıkları çalışmada ince ve kalın bağırsak dokusu üzerine amifostinin koruyucu etkisi olduğunu göstermişlerdir (101). Güney ve ark 8 Gy iyonizan radyasyon uygulan ratlarda ince ve kalın bağırsak dokuları üzerinde yaptıkları çalışmada melatonin uygulanan grupta TBARS konsantrasyonunun önemli derecede azaldığını bulmuşlardır. Çalışma sonucu olarak melatoninin ince ve kalın bağırsak dokuları üzerine radyoprotektif etkisini belirtmişlerdir (102). Bizim çalışmamızda ince bağırsak dokusu incelendiğinde yalnız melatonin+RT ve yalnız amifostin+RT verildiğinde, RT grubuna göre MDA düzeyinin değişmediği, melatonin+amifostin+RT'nin uygulandığı grupta MDA düzeyininin azaldığı gözlendi ($p<0.05$). Ayrıca Zn ve Cu düzeylerinin azaldığı gözlendi ($p<0.05$). Melatonin ve amifostin birlikte verildiğinde RT'ye karşı koruyucu antioksidan özelliklerinde artış görüldü. Kalın bağırsak dokusu incelendiğinde yalnız melatonin+RT verilen grupta MDA düzeyinin azaldığı görüldü ($p<0.05$). Genel olarak Cu düzeyi, yalnız melatonin+RT, yalnız amifostin+RT ve melatonin+amifostin+RT verilen grupta düştüğü gözlendi ($p<0.05$).

Gülyaşar ve ark. ratlarda kadmiyum toksitesi üzerine yaptıkları çalışmada melatonin uygulandığında karaciğer dokusu üzerine koruyucu etkisini göstermişlerdir (95). Shirazi ve ark. yaptıkları çalışmada tüm vucut radyasyon uygulanan ratların karaciğer dokusunda MDA düzeyinin arttığını ve melatonin uygulanan grupta MDA düzeyinin azaldığını rapor etmişlerdir. Ayrıca iyonize radyasyona karşı melatoninin karaciğer dokusu üzerinde koruyucu etkisini belirtmişlerdir (103). Çakmak ve ark. yaptığı çalışmada tüm vucut radyasyon uygulanan ratların karaciğer dokularında mikrozomal membranlarda önemli değişimlere neden olduğunu, buna karşı amifostinin radyoprotektif etkisini rapor etmişlerdir (104). Bizim çalışmamızda karaciğer dokusu incelendiğinde melatonin+amifostin+RT'nin birlikte verildiği grupta MDA ve Cu düzeyinin azaldığı görüldü ($p<0.05$). Yalnız melatonin+RT ve yalnız amifostin+RT verilen grupta MDA düzeyi artmaktadır ($p<0.05$).

Shirazi ve ark. tüm vucut iyonizan radyasyon uygulanan ratlarda melatonin+RT uygulanan grupta antioksidan enzim aktivitesinin; kontrol grubuna ve sadece RT uygulanan gruba göre arttığını rapor etmişlerdir (104). Bizim yaptığımız çalışma sonucunda RT uygulanan ratlarda serum örnekleri incelendiğinde yalnız melatonin+RT, yalnız amifostin+RT ve melatonin+amifostin+RT verilen grupta TAS'ın arttığı görüldü ($p<0.05$).

SONUÇLAR

Ratlarda iyonizan radyasyon nedeniyle dokularda oluşan oksidatif hasara karşı enzimatik olmayan ve güçlü bir antioksidan olan melatonin ile bir radyoprotektör ajan olan amifostinin koruyucu etkisini karşılaştırmak ve eser element (demir, bakır, çinko, selenyum) düzeylerindeki değişimi belirlemeyi amaçladığımız çalışmamızdan elde edilen sonuçlar aşağıdaki gibidir:

1. 8 Gy tüm vücut ışınlaması uygulanan (melatonin veya amifostin uygulanmayan gruptaki) ratların karaciğer, beyin, böbrek ve kalın bağırsak dokularının, ince bağırsak ve dalak dokularına göre daha az etkilendiğini (MDA bakımından) belirledik.
2. Beyin dokusunda amifostin ile melatoninin birlikte kullanılmasının RT'ye karşı korumada daha etkili olduğunu belirledik.
3. Böbrek dokusunda ise amifostinin ve melatoninin ayrı ayrı kullanılarak RT'ye karşı etkili olduklarını belirledik.
4. Dalak dokusunda Amifostinin tek başına RT'ye karşı koruyucu olduğunu belirledik.
5. İnce bağırsak, kalın bağırsak ve karaciğer dokusunda melatonin ve amifostininin birlikte kullanıldığında RT'ye karşı etkili antioksidan özellik gösterdiğini belirledik.
6. Bu çalışmamızda melatonin ve amifostinin tek başına veya birlikte uygulanmasının çeşitli organlardaki farklı radyoprotektif etkilerini belirleyerek; bu ajanlarla yapılacak klinik radyoproteksiyon çalışmalarında ışınlanan organa göre yapılacak ajan seçimine katkı sağladığımızı düşünmekteyiz.

RATLARDA İYONLAŞTIRICI RADYASYONUN NEDEN OLDUĞU OKSİDATİF HASARA KARŞI MELATONİN VE AMİFOSTİNİN KORUYUCU ETKİSİ

ÖZET

Amifostin sağlıklı dokuları, sitotoksik tedavilerin (alkilleyici ve platin bazlı kemoterapötikler yanında, özellikle iyonizan radyasyonun) neden olduğu hasara karşı tümör hücrelerinden daha fazla korur. Melatonin de aynı şekilde hücre çekirdeğindeki DNA'yı, iyonizan radyasyonun neden olduğu serbest radikallere karşı korur. Bu çalışma melatonin ve amifostinin ratlarda tüm vucut ışınlanması sonucu oluşan organ hasarlarına karşı koruyucu etkisini belirlemek için tasarlandı.

50 albino sıçan 5 gruba ayrıldı ve ışınlanmayan kontrol grubu (grup 1) dışındaki her bir hayvana ketamin anestezisi altında 800 cGy tek doz tüm vucut ışınlanması uygulandı. Işınlamadan 30 dk önce grup 2'ye 0.9% izotonik solüsyonu ip, grup 3'e melatonin (10 mg/kg, ip), grup 4'e amifostin (200 mg/kg, ip) ve grup 5'e melatonin + amifostin (sırasıyla 10 mg/kg, 200 mg/kg, ip) verildi. Denekler ışınlamadan 72 saat sonra dekapite edildi. Total antioksidan kapasite ve total oksidan kapasite düzeyeleri serum ve doku örneklerinde spektrofotometrik yöntemle kit kullanılarak ölçüldü. Oksidatif stres indeksi total oksidan kapasitesinin total antioksidan kapasitesine oranı olarak belirlendi. Doku ve serum örneklerindeki eser element düzeyleri atomik absorpsiyon spektrofotometresi ile, lipit peroksidasyonu ise ultraviyole spektrofotometrik yöntemle ölçüldü. Serumda ve beyin, böbrek, karaciğer, dalak ve bağırsak dokularında malondialdehit, total antioksidan kapasite, total oksidan kapasite ve eser elementler (Fe, Cu, Zn ve Se) düzeyleri belirlendi.

Bu çalışmada radyoprotektan etkili melatonin ve amifostinin tek veya birlikte kullanımlarının çeşitli organlardaki iyonizan radyasyona karşı olan koruyucu etkileri istatistiksel olarak karşılaştırıldı ve birbirlerine olan üstünlükleri gösterildi.

AnahtarKelimeler: amifostin, melatonin, iyonizan radyasyon, rat, eser element

MELATONIN AND AMIFOSTINE PROTECTIVE EFFECTS AGAINST IONIZING RADIATION-INDUCED OXIDATIVE DAMAGE IN RATS

SUMMARY

Amifostine protects healthy tissues but not tumor cells from the damage induced by cytotoxic treatments, particularly ionizing radiations, alkylating and platinating chemotherapeutic agents. Similarly melatonin protects DNA in the cell nucleus from free radical damage induced by ionizing radiation. This study was designed to compare the effects of melatonin and amifostine against organ damage induced by whole-body irradiation in rats.

Fifty albino rats were divided into 5 groups, and out of the control group (Group 1), each rat received a single whole-body dose of 800 cGy under ketamine and xylazine anaesthesia. 30 minutes before irradiation, Group 2 received 0.9% saline solution ip, Group 3 received melatonin (10 mg/kg, ip), Group 4 received amifostine (200 mg/kg, ip) and Group 5 received melatonin +amifostine (respectively 10 mg/kg, 200 mg/kg, ip). 72 hour after exposure to irradiation the animals were decapitated. Total antioxidant and total oxidant capacity levels were determined in the serum by spectrophotometric method using a commercial kit. Oxidative stress index was found with the ratio of total oxidant capacity to total antioxidant capacity. Trace elements levels in serum and tissue samples were measured by using atomic absorption spectrometry and lipid peroxidation was measured by ultraviolet spectrophotometric method. Levels of malondialdehyde, total antioxidant status, total oxidant status, trace elements (Fe, Cu, Zn and Se) were determined in brain, kidney, liver, spleen and intestinal tissues as well as in serum samples.

The radioprotective agents melatonin and amifostine, and their combined administration effects against ionizing radiation were compared statistically in various organs and serum, and the advantage against each other was determined by the results of this study.

Key Words: amifostine, melatonin, ionizing radiation, rats, trace elements

KAYNAKLAR

1. Özalpan A. Temel Radyobioloji. 1. Basım. İstanbul: Haliç Üniversitesi Yayınları 2001:1-218.
2. Hall JE. Radiobiology for the radiologist. Third edition. J.B. Lippincott Company 1988.
3. Cassat, DR., Fazenbaker, CA. Effects of dose and schedule on the efficacy of ethylol:Preclinical studies. Semin.Oncol 2003;30(6):31-39.
4. Uzal C, Altun G, Caloglu M, Ergulen A, Altaner S, Yigitbasi O. The protective effect of amifostine on radiation-induced acute pulmonary toxicity: Detection by Tc-99m DTPA transalveolar clearances. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2004;60(2):564-9.
5. Tokatlı F, Uzal C, Doganay L, Kocak Z, Kaya M, Ture M. The potential cardioprotective effects of amifostine in irradiated rats. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2004;58(4):1228-34.
6. Maksimovich AA. Structure and Function of the Vertebrate Pineal Gland. Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology 2002;38:1-15.
7. Shirazi A, Mihandoost E, Mohseni M, Ghazi-Khansari M, Mahdavi SR. Radio-protective effects of melatonin against irradiation-induced oxidative damage in rat peripheral blood, Physica Medica 2012; 1-10.
8. Seven A, Erbil Y, Seren R, İnci F, Gülyavaş T, Barutçu Ü.B, Candan G. Breast cancer and benign disease patients evaluated in relation of oxidative stress. Cancer Biochem. Biophys Vol 1998; 16:333-345.
9. Moore AB, Shannon J, Chen C. Dietary and stored iron as predictors of breast cancer risk: a nested case-control study in Shanghai. Int J Cancer 2009;125:1110-1117.
10. Hughes S, Samman S. The effect of zinc supplementation in humans on plasma lipids, antioxidant status and thrombogenesis. J Am Coll Nutr 2006; 25:285-291.

11. Mercantepe T. Gamma Radyasyonunu Neden Olduğu Mide Mukozası hasarına Karşı Curcumin ve Amifostinin Koruyucu Etkilerinin Işık ve Elektron Mikroskopik Düzeyde İncelenmesi (tez). Edirne: Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi, 2008.
12. Aydın G. Klinik ve temel radyoterapi. Bilge H, Gökçe ŞÇ, Özyiğit G, Yıldız OG (Editörler). Türk Radyasyon Onkolojisi Derneđi 2013;43-50.
13. Goksel EO. Klinik ve temel radyoterapi. Bilge H, Gökçe ŞÇ, Özyiğit G, Yıldız OG (Editörler). Türk Radyasyon Onkolojisi Derneđi 2013;39-42.
14. Tubiana M, Dutreix J. Intoduction to radiobiology. Taylor&Francis, 1990.
15. Stell GG, Adams GE, Peckham MJ. The Biological Basis of Radiotherapy. Elsevier, 1983.
16. Uzal C, Çaloglu M. The role of ionizing radiation in the etiology of cancer. Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 2002; 19(3-4):177-182.
17. Erođlu C. Klinik ve temel radyoterapi. Bilge H, Gökçe ŞÇ, Özyiğit G, Yıldız OG (Editörler). Türk Radyasyon Onkolojisi Derneđi 2013;.13-17.
18. Önen S. Radyasyon Biyofiziđi Ders Kitabı.istanbul Üniversitesi 1997; s:43-80
19. Nair CK, Parida DK, Nomura T. Radioprotectors in radiotherapy. J Radiat Res 2001;42:21-37.
20. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidantants in normal physiological function and human disease. Int J Biochem Cell Biol 2007; 39: 44-84.
21. Dubois A, Walker RI. Prospects for management of gastrointestinal injury associated with the acute radiation syndrome. Gastroenterology 1988; 95(2):500-7.
22. Breiter N, Trott KR, Sassy T. Effect of X-irradiation on the stomach of the rat. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1989; 17(4): 779-84.
23. Dubois A, Danquechin Dorval E, Wood LR, Rogers JE, O'Connell L, Durakovic A, Conklin JJ. Effect of gamma-irradiation on the healing of gastric biopsy sites in monkeys. An experimental model for peptic ulcer disease and gastric protection. Gastroenterology 1985; 88(1 Pt 2):375-81.
24. Koksall IT, Usta M, Orhan I, Abbasoglu S, Kadioglu A. Potential role of reactive oxygen species on testicular pathology associated with infertility. Asian J Androl 2003; 5:95-9.
25. Kaya A. The biological effects of ionizing radiation. Dicle Tıp Dergisi 2002; 29-32.
26. Busch DB. Radiation and chemotherapy injury: pathophysiology, diagnosis, and treatment. Crit Rev Oncol Hematol 1993; 15(1): 49-89.
27. Withers, RH. Biologic basis of radiation therapy. Principles and practice of radiation oncology. Perez, C, Brady, L, ed. Lippincott Co.Philadelphia1992;64-98.

28. Marx, ER., Ehler, JW, Tayapongask, P. Relationship of oxygen dose to angiogenesis induction in irradiated tissue. Am.J.Surg 1990;160:519-524.
29. Kayış T. Diazinon'un Subletal Kkonsantrasyonlarının *Pimpla turionellae* L.'nin Eşey Oranı ve Bazı Biyokimyasal Parametreleri Üzerine Etkileri (tez). Adan: Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2010.
30. Hermes-Lima, M., Storey, J.M., and Storey, K.B. Antioxidant Defenses and Animal Adaptation to Oxygen Availability During Environmental Stress. In: Storey K.B., Storey J.M. (Eds), Cell and Molecular Responses to Stress,. Elsevier Press, Amsterdam 2001; 263-287.
31. Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. Oxygen Toxicity, Oxygen Radicals Transition Metals and Disease. Biochem. J 1984;219: 1-14.
32. Deaton C.M. and Marlin D.J. Exercise-Associated Oxidative Stress, Clin. Tech. Equine Pract 2003; 2(3):278-291.
33. Akkus, I., Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. Mimoza Yayınları, 38, Kuzucular Ofset, Konya-Türkiye 1995.
34. Yurdakul, Z. Oksijen ve Canlılar. <http://www.biyokimya.8m.net/oksijen.html>; 2004.
35. Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. Free Radicals in Biology and Medicine, 3.ed. Oxford New York 2000.
36. Cheesman, K.H. and Slater, T.F. An Introduction to Free Radical Biochemistry. Br. Med. Bull 1993; 49(3):481-93.
37. Wu, D. and Cederbaum, A.I., Alcohol. Oksidative Stres and Free Radical Damage. Alcohol Res. Health 2003;27(4): 277–284.
38. Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. Free Radicals in Biology and Medicine. Third Edition, Oxford University Pres. Inc., New York 1999;936.
39. Song, O. Oxidative Stress: A Theoretical Model or Biological Reality?. C.R. Biologies 2004;327:649-662.
40. Mates, J.M. Effects of Antioxidant Enzymes in the Molecular Control of Reactive Oxygen Species Toxicology. Toxicology 2000; 153: 83-104.
41. Thurnham, D.I. Antioxidants and Prooxidants in Malnourished Populations. Proceedings Nutr. Society 1990; 49:247–259.
42. Erenel, G, Erbaş, D. ve Arıcıoğlu A. Serbest Radikaller ve Antioksidan Sistemler. Gazi Tıp Derg 1992; 3:243-250.
43. Wickens, A.P. Ageing and Free Radical Theory. Respiration Physiology 2001;128:379–391.

44. Fridovich, I. Superoxide Dismutase. *Ann. Rev. Biochem* 1975;44: 147-159.
45. Bast, A, Haenen, G.R.M.M. and Doelman, C.J.A. Oxidants and Antioxidants: State of the Art. *Am. J. Med* 1991; 91(3): 2-13.
46. Nordberg, J. and Arner, E.S.J. Reactive Oxygen Species, Antioxidants, and the Mammalian Thioredoxin System. *Free Radical Biol. Med* 2000; 31:1287– 1312
47. Cheesman, K.H. and Slater, T.F. An Introduction to Free Radical Biochemistry. *Br. Med. Bull* 1993;49(3):481-93.
48. Winterbourn, C.C. Toxicity of Iron and Hydrogen Peroxide: The Fenton Reaction. *Toxicol. Lett* 1995;82–83, 969–974.
49. Betteridge, D.J. What is Oxidative Stress? *Metabolism* 2000; 49: 3–8
50. Cross, C. E, Halliwell, B, Borish, E, Pryor, W, Ames, B N, Saul, R, Cord J.M. and Hardman, D. Oxygen Radicals and Human Disease. *Ann. Intern. Med* 1987; 107: 526- 545.
51. Ames, B.N, Shingenaga, M.K. and Hagen, T.M. Oxidants, Antioxidants, and the Degenerative Diseases of Aging. *Proc. Natl. Acad. Sci* 1993; 90(17): 7915-7922.
52. Mruk, D.D, Silvestrini, B, Meng-Yun, M.O. and Cheng, C.Y. Antioxidant Superoxide Dismutase -a Review: Its Function, Regulation in the Testis, and Role in Male Fertility. *Contraception* 2002;65:305-311.
53. Valavanidis, A, Vlahogianni, T, Dassenakis, M. and Scollous, M. Molecular Biomarkers of Oxidative Stress in Aquatic Organisms in Relation to Toxic Environmental Pollutants, *Ecotoxicol. Environ. Saf* 2006; 64:178–179.
54. Freeman, B.A. and Crapo, J.D. Free Radicals and Tissue Injury. *Lab. Invest* 1982;47: 412-426.
55. Van-Der-Meulen JH, McArdle A, Jackson MJ, Faulkner JA. Contraction-induced injury to the extensor digitorum longus muscles of rats: The role of vitamin E. *J. Appl. Physiol.* 1997; 83: 817-823.
56. Evelson P, Ordonez CP, Llesuy S, Boveris A. Oxidative stress and in vivo chemiluminescence in mouse skin exposed to UVA radiation. *J. Photochem. Photobiol. B* 1997; 38: 215-219.
57. Konukoğlu D, Akçay T. Glutasyon Metabolizması ve Klinik Önemi, *Temel Klinik Bilimleri.* 1995;15:214-217.
58. Blokhina, O., Virolainen, E. and Fagerstedt, K.V. Antioxidants, Oxidative Damage and Oxygen Deprivation Stress: A Review. *Ann. Bot.*, 2003; 91:179–194.
59. Hikkila, R.E. and Cabbat, F.S.. A Sensitive Assay for Superoxide Dismutase Based on the Autoxidation of 6-Hydroxydopamine, *Anal. Biochem.*, 1976; 75:356-362.

60. Cheung C.C.C, Zheng, G.J, Li, A.M.Y, Richardson, B.J. and Lam, P.K.S. Relationship Between Tissue Concentrations of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Antioxidative Responses of Marine Mussels, *Perna viridis*. *Aquatic Toxicol* 2001;52:189-203.
61. Aydın, A, Sayal, A. ve Işimer, A. Serbest Radikaller ve Antioksidan Savunma Sistemi, Gülhane Askeri Tıp Akademisi Ayn Kitabı, 2001.
62. Mills, G.C. Hemoglobin Catabolism. I. Glutathione Peoxidase, an Erythrocyte Enzyme which Protects Hemoglobin from Oxidative Breakdown. *J. Biol. Chem* 1957; 229,189.
63. Lawrance R.A. and Burk R.F. Glutathion Peroxidase Activity in Selenium Defficient Rat Liver, *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 1976;71(4): 952– 958.
64. Paglia, D.E. and Valentine, W.N. Studies on the Quantitative and Qualitative Characterization of Erythrocyte Glutathione Peroxidase. *J. Lab. Clin. Med* 1967; 70(1):158-69.
65. Arı F, Dere E. Benzen'in Karaciğer Glutatyon S-transferaz Enzim Aktivitesine. *In Vitro Etkisi*. *C.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi Fen Bilimleri Dergisi* 2003; 24(1):76-81.
66. Öztürk S. Jinekolojik Ameliyat Geçiren Olgularda Ameliyat Sonrası Titreme Sıklığı ile Melatonin Düzeyleri Arasındaki Bağlantının Değerlendirilmesi (tez). Isparta: Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, 2006.
67. Russel R. Melatonin: Clinical relevance. *Best Practice and research Clinical Endocrinology and Metabolim* 2003;17:273-285.
68. Maksimovich AA. Structure and Function of the Vertebrate Pineal Gland. *Jornal of Evotionary Biochemistyr and physilogy* 2002;38:1-15.
69. Palaoğlu S, Beşkonaklı E. Pineal bez ve yaşlanma. *Turkish Journal of Geriatrics* 1998;1:13- 18.
70. Cardinalli DP, Pevet P. Basic aspects of melatonin action. *Sleep Medicine Reviws* 1998;2:175-190.
71. Touitou Y. Human aging and melatonin. Clinical relevance. *Experimental Gerontology* 2001,1083-1100.
72. Rohr UD, Herold J. Melatonin deficiencies in women. *Maturitas* 2002;41:85-S104.
73. Nowak JZ, Zawilska JB. Melatonin and its physiological and therapeutic properties. *Pharmacy World and science* 1998,20:18-27.
74. Bountin JA, Aedinot V, Ferry G. Delagrance P. Molecular tools to study melatonin pathways and actions. *TRENDS in Pharmacolocial Sciences* 2005;26:;412-419.
75. Macchi MM, Bruce JN. Human pineal physiology and functional significance of melatonin. *Frontiers in Neuroendocrinology* 2004;25:177-195.

76. Özgüner F, Özçankaya R, Delibaş N, Koyu A, Çalışkan S. Melatonin ve klinik önemi. S.D.Ü. Tıp Fakültesi.. Dergisi 1995; 2:1-6.
77. Çam A, Erdoğan MF. Melatonin. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası 2003;56:103-112.
78. Claustrat B, Brun J, Chazot G. The basic physiology and pathophysiology of melatonin. Sleep Medicine Reviews 2005;9:11-24.
79. Karkela J, Vakkuri O, Kaukinen S, Haung WQ, Pasanen M. The influence of anaesthesia and surgery on the circadian rhythm of melatonin. Acta Anaesthesiol Scand 2002;46:30-36.
80. Angın G. Radyoterapinin Gelişimini Tamamlamış Kemik Dokusunda Meydana Getirdiği Hasarların Sitoprotektif Ajanlar Oldukları Bilinen Amifostin ve Karnitin ile Önlenmesinin Sintigrafik ve Histopatolojik Parametreler ile değerlendirilmesi (tez). Edirne: Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi; 2008.
81. Caroline M. Spencer and Karen L. Goa. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential as a radioprotector and cytotoxic chemoprotector. Drugs 1995;50(6):1001-31.
82. Capizzi RL. Clinical status and optimal use of amifostine. Oncology (Williston Park) 1999;13(1):47-59.
83. Karadayı B, Akmansu M, Dirier A, Akdemir Ö. Amifostinin sitoprotektif etkinliğinin kantitatif tükürük bezi sintigrafisi ile değerlendirilmesi. Dicle Tıp Dergisi 2005;32(4):183-9.
84. Yuhás JM. Active versus passive absorption kinetics as the basis for selective protection of normal tissues by S-2-(3-aminopropylamino)-ethylphosphorothioic acid. Cancer Res 1980;40:1519 –24.
85. Blumberg AL, Nelson DF, Gramkowski Met al. Clinical trials of WR-2721 with radiation therapy. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1982;8:561–3.
86. Kouvaris JR, Kouloulías VE, Vlahos LJ. Amifostine: The First Selective-Target and Broad-Spectrum Radioprotector. Oncologist 2007;12:738-47.
87. Vijgh WJF, Peters GJ. Protection of normal tissues from the cytotoxic effects of chemotherapy and radiation by amifostine: Preclinical aspects. Seminars in Oncology 1994;21(5):2-7.
88. Glover D, Riley L, Carmichael K, Spar B, Glick J, Kligerman MM, et al. Hypocalcemia and inhibition of parathyroid hormone secretion after administration of WR-2721 (a radioprotective and chemoprotective agent). N Engl J Med 1983;309:1137–41.
89. Sasse AD, Clark LG, Sasse EC, Clark OA. Amifostine reduces side effects and improves complete response rate during radiotherapy: Results of a metaanalysis. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2006;64:784 –91.

90. Koukourakis MI, Kyrias G, Kakolyris S, Kouroussis C, Frangiadaki C, Giatromanolaki A, et al. Subcutaneous administration of amifostine during fractionated radiotherapy: A randomized phase II study. *J Clin Oncol* 2000;18:2226–33.
91. Anne PR, Curran WJ Jr. A phase II trial of subcutaneous amifostine and radiation therapy in patients with head and neck cancer. *Semin Radiat Oncol* 2002;12(suppl 1):18–9.
92. Anne PR, Machtay M, Rosenthal DI, Brizel DM, Morrison WH, Irwin DH, et al. A Phase II trial of subcutaneous amifostine and radiation therapy in patients with head-and-neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2007;67:445– 52.
93. Gevorgyan A, La Scala GC, Neligan PC, Pang CY, Forrest CR. Radioprotection of craniofacial bone growth. *The J of Craniofacial Surgery* 2007;18(5):995-1000.
94. Undeger, U., Giray, B., Zorlu, A.F., Oge, K., Bacaran, N., 2004. Protective effects of melatonin on the ionizing radiation induced DNA damage in the rat brain. *Exp. Toxicol. Pathol.* 55 (5), 379–384.
95. Gulyaşar T, Aydoğdu N, Çakına S, Sipahi T, Kaymak K, Şener S. Trace elements in a rat model of cadmium toxicity: the effects of taurine, melatonin and N-acetylcysteine, *Trakya Univ Tıp Fak Dergi* 2010;27(1):23-27.
96. Erol FS, Topsakal C, Ozveren MF, Kaplan M, İlhan N, Ozercan IH, Yıldız OG. Protective effects of melatonin and vitamin E in brain damage due to gamma radiation: an experimental study. *Neurosurg Rev* 2004;27(1):65-9.
97. Cakmak G, Miller LM, Zorlu F, Severcan F. Amifostine, a radioprotectant agent, protects rat brain tissue lipids against ionizing radiation induced damage: an FTIR microspectroscopic imaging study. *Arch Biochem Biophys* 2012, 520(2):67-73.
98. Kucuktulu E. Protective effects of melatonin against radiation induced nephrotoxicity in rats. *APJCP* 2012, 13(8):4101-5.
99. Uguzalp-Kaldır M, Yürüt-Çaloğlu V, Çoşar R, Çermik TF, Altaner Ş, Eskiocak S, saynak M, İbiş K, Çaloğlu K, Tokatlı F, Koçak Z, Uzal C. Radyasyona bağlı oluşan karaciğer ve böbrek toksitesini önlemede amifostinin rolü. *Türk onkoloji dergisi* 2007, 22(2):105-117.
100. Trajkovic S, Dobric S, Jacevic V, Dragojevic SV, Milovanovic Z, Dordevic A. Tissue-protective effects of fullereneol C60(OH)24 and amifostine in irradiated rats. *Colloids surf b Biointerfaces* 2007; 58(1):39-43.
101. Cassat DR, Fazanbaker CA, Bachy CM, Hanson MS. Preclinical modelling of improved amifostine (Ethyol) use in radiation therapy. *Semin Radiat Oncol* 2002; 12(1):97-102.
102. Guney Y, Hicsonmez A, Uluogu C, Guney HZ, Ozel Turkcu U, Take G, Yucel B, Caglar G, Bilgihan a, Erddoğan D, Nalca Andreu M, Kurtman C, Zengil H. *Braz j Med Bio Res* 2007; 40(10):1305-14.

103. Shirazi AR, Fardid R, Mihandoost E. Protective effect of low dose melatonin on radiation –induced damage to rat liver. *Jour of Bio Phys and Eng* 2012, 2(2):66-71.
104. Cakmak G, Zorlu F, Severcan M, Severcan F. Scening of protective effect of amifostine on radiation-induced structural and functional variations in rat liver microsomal membranes by FT-IR spectroscopy. *Anal Chem* 2011; 83(7):2438-44.

ŞEKİLLER LİSTESİ

Tablolar;

Tablo 1. Çalışma grupları.....	29
Tablo 2A. Beyin dokusu sonuçları.....	37
Tablo 2B. Beyin dokusu sonuçları.....	37
Tablo 3A. Böbrek dokusu sonuçları.....	38
Tablo 3B. Böbrek dokusu sonuçları.....	39
Tablo 4A. Dalak dokusu sonuçları.....	39
Tablo 4B. Dalak dokusu sonuçları.....	40
Tablo 5A. İnce bağırsak dokusu sonuçları.....	41
Tablo 5B. İnce bağırsak dokusu sonuçları.....	41
Tablo 6A Kalın bağırsak dokusu sonuçları.....	42
Tablo 6B Kalın bağırsak dokusu sonuçları.....	42
Tablo 7A. Karaciğer dokusu sonuçları.....	43
Tablo 7B. Karaciğer dokusu sonuçları.....	43
Tablo 8A. Serum sonuçları.....	44
Tablo 8B. Serum sonuçları.....	44

Şekiller;

Şekil 1. Elektromanyetik spektrum (7).....	3
---	---

Şekil 2. Radyasyonun direkt ve indirekt etkileri(17).....	4
Şekil 3. Radyasyonun biyolojik etkileri(18).....	5
Şekil 4. Radyasyonun etkisi ile DNA’da oluşabilecek hasarlar(17).....	6
Şekil 5. Reaktif Oksijen Türleri (31).....	10
Şekil 6. Reaktif Oksijen Türleri (38).....	11
Şekil 7. Fenton ve Haber-Weiss Reaksiyonu(48).....	13
Şekil 8. Melatoninin molekül yapısı(75).....	21
Şekil 9. Melatoninin sentez evreleri(71,73).....	22
Şekil 10. Pineal bezde melatonin sentezi(77).....	23
Şekil 11. Amifostinin kimyasal yapısı (81,82).....	26
Şekil 12. Ratlara RT öncesi simülasyon işlemi	30
Şekil 13. Ratlara RT uygulaması	30
Şekil 14. Atomik absorpsiyon prensipleri	32
Şekil 15. Kalibrasyon grafiği.....	32
Şekil 16. Atomik Absorpsiyon Spektrofotometresi kalibrasyon grafiği	33
Şekil 17. Beyin dokusu TAK sonucu	38
Şekil 18. Böbrek dokusu MDA sonucu.....	39
Şekil 19. Dalak dokusu Fe sonucu.....	40
Şekil 20. İnce bağırsak dokusu TAK sonucu	41
Şekil 21. Kalın bağırsak dokusu TOK sonucu	42
Şekil 22. Karaciğer dokusu Cu sonucu.....	43
Şekil 23. Serum TAK sonucu.....	45

ÖZGEÇMİŞ

Adım soyadım Suat ÇAKINA. 20.07.1980 tarihinde Karabük'te doğdum. İlköğretimimi Atatürk Merkez İlköğretim okulunda (Karabük), ortaokulu I. Murat Lisesi (Edirne), liseyi İlhami Ertem Lisesi (Edirne)' de tamamladım. Ön lisans eğitimimi Ege Üniversitesi Atatürk SHMYO Diş Protez bölümünde 2000 yılında bitirdim. 2006 yılında Trakya Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Fizik Lisans programından mezun oldum. 2009 yılında Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik yüksek lisans programından ve 2014 yılında T.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Sağlık Fiziği Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans programından mezun oldum. Halen Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik doktora programında öğrenciyim.

EKLER:



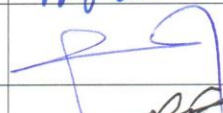

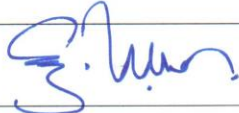
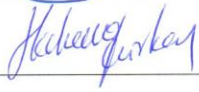
T.C.

**TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARLARI**

EDİRNE

**Oturum Sayısı: 02
KARAR NO: 2012.02.03****Karar Tarihi: 30.03.2012**

Yürütücülüğünü Tıp Fakültesi öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Tefik GÜLYAŞAR'ın Suat ÇAKINA'ın doktora tezi olarak planlanan TÜHDYEK-2012/18 protokol nolu "Ratlarda İyonlaştırıcı Radyasyonun Neden Olduğu Oksidatif Hasara Karşı Melatonin ve Amifostinin Koruyucu Etkisi" başlıklı çalışma hakkında görüşüldü; araştırmanın amaç, yaklaşım, gereç ve yöntemler dikkate alınarak incelenmesi sonucunda: Hayvan Hakları Evrensel Bildirgesi ve etik kurallara uygun olarak hazırlandığına ve çalışmanın ve Radyasyon Güvenlik Komitesi olurundan sonra yapılabileceğine mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.

Ünvanı/Adı/Soyadı	Araştırma ile İlişki	Toplantı Katılımı	İmza
Yrd.Doç.Dr. Burhan AKSU Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Yrd.Doç. Dr. Hayati ARDA Fen-Edebiyat Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Vet.Hek. Ziya ÇUKUR Veteriner Hekim	<input type="checkbox"/> var <input type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Hüseyin KOÇ Sivil Toplum Örgütü Üyesi Sivi Üye	<input type="checkbox"/> var <input type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Yrd.Doç.Dr. Beytullah ÖZKAN Fen-Edebiyat Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Yrd.Doç.Dr. Y. Atakan SEZER Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Doç. Dr. Enis ULUÇAM Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Yrd.Doç.Dr.Hakan GÜRKAN Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Osman GÜLTEKİN Sivil Üye	<input type="checkbox"/> var <input type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	



T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
RADYASYON GÜVENLİĞİ KOMİTE BAŞKANLIĞI



Sayı: 21

13.04.2012

BİYOFİZİK ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞINA

İlgi: 06.04.2012 tarih ve B.30.2.TRK.0.20.12.02/59 sayılı yazınız.

Yürütücülüğünü Yrd.Doç.Dr.Tevfik GÜLYAŞAR'ın yaptığı Biyofizik doktora öğrencisi Suat ÇAKINA'nın doktora tezi olarak planlanan "Ratlarda İyonlaştırıcı Radyasyonun Neden Olduğu Oksidatif Hasara Karşı Melatonin ve Amifostinin Etkisi" adlı TÜHDYEK- 2012/18 protokol no'lu çalışma komitemiz tarafından incelenmiştir.

Bunun sonucunda çalışma radyasyon güvenliği açısından bir sakınca içermemekte olup çalışmanın yapılması uygun görülmüştür.

Gereğini bilgilerinize arz ederim.

Doç.Dr.Ercüment ÜNLÜ
Radyasyon Güvenliği Komite Başkan Vekili

Uzm.Fiz.Şule PARLAR
Radyasyon Güvenlik Komitesi Üyesi

Uzm.Eiz.Alev ERGÜLEN
Radyasyon Güvenlik Komitesi Üyesi

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ SÖZLEŞMESİ

PROJE NO : 2012/104
PRJ NİTELİĞİ : Doktora

1- PROJE BAŞLIĞI

Ratlarda İyonlaştırıcı Radyasyonun Neden Olduğu Oksidatif Hasara Karşı Melatonin ve Amifostinin Koruyucu

2- PROJE PERSONELİ

Adı ve Soyadı	Unvanı	Telefon (İş)
Proje Yöneticisi : Tevfik GÜLYAŞAR	Yrd. Doç. Dr.	Tel: 2360909-1553
Araştırmacılar : Suat ÇAKINA	Dokt. Öğr.	Fax:
Alaattin ÖZEN	Uzm. Dr.	Cep:
Ziya ÇUKUR	Vet. Hekim	
Şule PARLAR	Öğr. Gör.	
Nüket KÜRKÇÜ	Fiz.	
M. Cem UZAL	Prof. Dr.	
Seralp ŞENER	Prof. Dr.	

3- PROJE BÜTÇESİ

Teçhizatın Tanımı : Detay listesi ektedir.	Fiyatı (TL)

Ekonomik Kod		
05.3.1.11	03.2 Tüketime Yönelik Mal ve Malzeme Alımları	15.150
	03.3 Yolluklar	
	03.5 Hizmet Alımları	
	03.7 Menkul Mal, Gayrimaddi Hak Alım,Bakım ve Onarım Giderleri	4.824
07.1.9.99	06.1 Mamul Mal Alımları	
TOPLAM ÖDENEK		19.974

4- PROJENİN GELİŞİMİ :

1. Projenin Kabul Tarihi: 11.05.2012	4. I. Rapor Tarihi : 28.11.2012	Sonuç : (+/-)
2. Projenin Başlama Tarihi : 28.05.2012	5. II. Rapor Tarihi :	Sonuç : (+/-)
3. Projenin Bitiş Tarihi: 28.05.2013	6. III. Rapor Tarihi :	Sonuç : (+/-)
4. Projenin Süresi: 12 ay	7. IV. Rapor Tarihi :	Sonuç : (+/-)
	8. Sonuç Raporu Tarihi: 28.05.2013	Sonuç : (+/-)

5- İLGİLİ BÖLÜM VE FAKÜLTE : Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı

6- PROJENİN UYGULANMASI :

1. Bu proje 2547 sayılı YÖK Kanununun 4684 sayılı Kanunla değişik 58.maddesi gereğince, Yükseköğretim Kurumları Bilimsel Araştırma Projeleri Hakkında Yönetmelik ve Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Uygulama Yönergesi çerçevesinde yürütülür.		
2. Proje süresinde ve harcama fasıllarında Rektörlük onayı alınmadan değişiklik yapılamaz.		
3. Proje Yöneticisi her 6 ayın sonunda gelişme raporunu, Bölüm Başkanlığı ve ilgili Dekanlık veya Enstitü Müdürlüğü aracılığı ile Rektörlüğe iletmekle yükümlüdür.		
4. Projelerden alınan teçhizat tüm öğretim üyelerinin kullanımına açıktır.		
5. Bir ay geçtiği halde gelişme raporu verilmemiş veya süresi bitmiş olup süre uzatımı talebinde bulunulmamış projeler iptal edilir. Bakiye ödenek, BAP Komisyonu tarafından kabul edilecek yeni projelere tahsis edilir veya diğer projelere aktarılır.		
Adı ve Soyadı	İmza	Tarih
Proje Yöneticisi : Yrd. Doç. Dr. Tevfik GÜLYAŞAR		

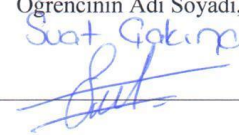
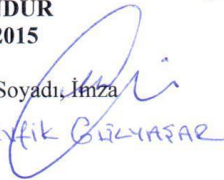
Komisyon Başkanı

...../.../2012

Prof.Dr. Beyhan KARAMANLIOĞLU

Rektör Yardımcısı

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI
ORJİNALLİK RAPORU

Öğrencinin Adı Soyadı: SUAT ÇAKINA												
Numarası:1098303201												
Anabilim Dalı:BİYOFİZİK AD												
Programı:	Yüksek Lisans	Doktora										
Tez başlığı/Konusu: RATLARDA İYONLAŞTIRICI RADYASYONUN NEDEN OLDUĞU OKSİDATİF HASARA KARŞI MELATONİN VE AMİFOSTİNİN KORUYUCU ETKİSİ												
Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne												
<p>Yukarıda açık adı bulunan tezinin "Kapak Sayfası, Giriş ve Amaç, Genel Bilgiler, Bulgular, Tartışma, Sonuçlar, Özet ve Summary" bölümlerinden oluşan toplam 75 sayfalık kısmına ilişkin 19/06/2015. Tarihinde tez danışmanım tarafından <i>Turnitin</i> adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanmış olan orijinallik raporuna göre tezinin benzerlik oranı % 24 olarak belirlenmiştir.</p> <p><u>Uygulanan filtrelemeler:</u></p> <table><tr><td>1-Kabul ve Onay Sayfası hariç</td><td>6-Kaynaklar hariç</td></tr><tr><td>2-Teşekkür hariç</td><td>7-Şekiller Listesi hariç</td></tr><tr><td>3-İçindekiler hariç</td><td>8-Özgeçmiş hariç</td></tr><tr><td>4-Simge ve Kısaltmalar hariç</td><td>9-Ekler hariç</td></tr><tr><td>5-Gereç ve Yöntemler Hariç</td><td></td></tr></table> <p>Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez çalışması Orijinallik Raporu Uygulama Esaslarını inceledim ve bu uygulama esaslarında belirtilen maksimum benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini, aksinin ispat edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğruluğunu beyan ederim. 19/06/2015</p>			1-Kabul ve Onay Sayfası hariç	6-Kaynaklar hariç	2-Teşekkür hariç	7-Şekiller Listesi hariç	3-İçindekiler hariç	8-Özgeçmiş hariç	4-Simge ve Kısaltmalar hariç	9-Ekler hariç	5-Gereç ve Yöntemler Hariç	
1-Kabul ve Onay Sayfası hariç	6-Kaynaklar hariç											
2-Teşekkür hariç	7-Şekiller Listesi hariç											
3-İçindekiler hariç	8-Özgeçmiş hariç											
4-Simge ve Kısaltmalar hariç	9-Ekler hariç											
5-Gereç ve Yöntemler Hariç												
		Öğrencinin Adı Soyadı, İmza Suat Çakina 										
Ek:Orijinallik Raporu (1 Sayfa)												
UYGUNDUR 19/06/2015												
Danışman Adı Soyadı, İmza Doç. Dr. Teyfik BİLİR 												

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOFİZİK ANABİLİM DALI
DOKTORA PROGRAMI

Tez Yöneticisi
Doç. Dr. Tefvik GÖLYAŞAR

RATLARDA İYONLAŞTIRICI RADYASYONUN NEDEN OLDUĞU OKSİDATİF HASARA KARŞI MELATONİN VE AMİFOSTİNİN KORUYUCU ETKİSİ

(Doktora Tezi)

Suat ÇAKINA

EDİRNE-2015

dspace.trakya.edu.tr:8080
İnternet kaynağı

%7

1in37 Eşleşmesi

%7

dspace.trakya.edu.tr:8080
İnternet kaynağı

%2

share.pdfonline.com
İnternet kaynağı

%<1

caniliblmi.com
İnternet kaynağı

%<1

www.radyobiyojji.netfir...
İnternet kaynağı

%<1

www.bilimvesaglik.com
İnternet kaynağı

%<1

www.toraks.org.tr
İnternet kaynağı

%<1

dspace.trakya.edu.tr
İnternet kaynağı

%<1