



**T. C.**  
**ERCIYES ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**  
**RADYASYON ONKOLOJİSİ ANABİLİM DALI**

**TÜM VÜCUT İŞINLAMASI YAPILAN RATLARDA**  
**RADYASYONA BAĞLI AKCİĞER HASARINA**  
**KARŞI AMİNOGUANİDİNİN ETKİSİ**

**TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**Dr. CELALETTİN EROĞLU**

**KAYSERİ 2006**



**T. C.**  
**ERCIYES ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**  
**RADYASYON ONKOLOJİSİ ANABİLİM DALI**

**TÜM VÜCUT IŞINLAMASI YAPILAN RATLARDA**  
**RADYASYONA BAĞLI AKCİĞER HASARINA**  
**KARŞI AMİNOGUANİDİNİN ETKİSİ**

**TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**Dr. CELALETTİN EROĞLU**

**Danışman**

**Doç. Dr. SERDAR SOYUER**

**KAYSERİ 2006**

## TEŞEKKÜR

Yaptığım çalışmada bana vermiş olduğu her türlü destekten dolayı tez danışmanım E.Ü.T.F. Radyasyon Onkolojisi A.D. Başkanı Doç. Dr. Serdar Soyuer'e, öğretim üyeleri Doç. Dr. Bünyamin Kaplan'a, Yard. Doç. Dr. Oğuz Galip Yıldız'a, Uzm. Dr. Okan Orhan'a ve Tıbbi Radyofizik Uzm. Dr. Kadir Yaray'a; bilgilerinden yararlandığım ve çalışmama yaptığı katkılardan dolayı Biyokimya A.D.'ndan Uzm. Dr. Recep Saraymen'e; Biyoistatistik A.D.'ndan Dr. Ahmet Öztürk'e ve Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi çalışanlarına teşekkürlerimi sunarım.

Her türlü yakın ilgi ve yardımlarını gördüğüm Radyasyon Onkolojisi A.D. araştırma görevlilerine, personeline ve tez çalışmamda bana her türlü manevi desteği sağlayan, sıkıntılara katlanan eşime ve iki kızıma sevgi ve şükranlarımı sunarım.

## İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	I
KISALTMALAR.....	IV
TABLO LİSTESİ.....	VI
ŞEKİL LİSTESİ.....	VII
ÖZET.....	VIII
ABSTRACT.....	X
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. RADYASYONUN CANLIDAKİ ETKİ KADEMELERİ.....	4
2.2. RADYASYON VE SERBEST RADİKALLER.....	8
2.3. SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİ.....	10
2.4. LİPİD PEROKSİDASYONU.....	16
2.5. ANTİOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLER.....	17
2.6. RADYOTERAPİNİN AKCİĞERDE OLUŞTURDUĞU HASARLAR ..	19
2.7. RADYOPROTEKTÖRLER.....	19
2.8. AMİNOGUANİDİN.....	20
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	22
3.1. DENEY GRUPLARININ OLUŞTURULMASI.....	22
3.2. RADYASYON UYGULAMASI.....	23
3.3. İLAÇ UYGULAMASI VE ÖRNEKLERİN ALINIŞ ŞEKLİ.....	23
3.4. AKCİĞER DOKU HOMOJENATLARININ HAZIRLANMASI.....	25
3.5. MALONDİALDEHİT TAYİNİ.....	26

3.6. SÜPEROKSİT DİSMUTAZ AKTİVİTESİ TAYİNİ .....	26
3.7. GLUTATYON PEROKSİDAZ AKTİVİTESİ TAYİNİ.....	28
3.8. KATALAZ AKTİVİTESİ TAYİNİ .....	29
3.9. NİTRİK OKSİT AKTİVİTESİNİN TAYİNİ.....	30
3.10. İSTATİSTİKSEL YÖNTEM .....	32
4. BULGULAR.....	33
5. TARTIŞMA .....	39
6. SONUÇLAR .....	46
7. KAYNAKLAR .....	48
8. TEZ ONAY SAYFASI.....	54

## KISALTMALAR

<b>AG</b>	: Aminoguanidine
<b>AGE</b>	: İleri glikozilasyon son ürünleri
<b>ARDS</b>	: Akut respiratuar distres sendromu
<b>BLM</b>	: Bleomisine
<b>CAT</b>	: Katalaz
<b>cGy</b>	: Santigray
<b>cNOS</b>	: Yapısal nitrik oksit sentaz
<b>Co60</b>	: Cobalt 60
<b>DAO</b>	: Diamin oksidaz
<b>DRF</b>	: Doz redüksiyon faktörü
<b>EDRF</b>	: Endotel kaynaklı gevşeme faktörü
<b>eNOS</b>	: Endotelyal nitrik oksit sentaz
<b>GSH</b>	: Glutasyon
<b>GSH-Px</b>	: Glutasyon peroksidaz
<b>Gy</b>	: Gray
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	: Hidrojen peroksit
<b>HO<sub>2</sub>'</b>	: Hidroperoksit radikali
<b>IMRT</b>	: Yoğunluk ayarlı radyoterapi
<b>iNOS</b>	: İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
<b>K</b>	: Kontrol
<b>L-NAME</b>	: N-nitro L-arginin metil ester
<b>L-NIO</b>	: N-iminoetil L-ornitin
<b>L-NMMA</b>	: N-monometil L-Arginin
<b>L-NNA</b>	: N-nitro L-Arginin

<b>MDA</b>	: Malondialdehit
<b>mg</b>	: Miligram
<b>nmol</b>	: Nanomol
<b>NNMU</b>	: N–nitroso–N–methyllurethane
<b>nNOS</b>	: Nöral nitrik oksit sentaz
<b>NO</b>	: Nitrik oksit
<b>NO<sub>2</sub></b>	: Nitrojen dioksit
<b>NO<sub>3</sub></b>	: Nitrat
<b>NOS</b>	: Nitrik oksit sentetaz
<b>1O<sub>2</sub></b>	: Singlet oksijen
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	: Süperoksit radikali
<b>OH.</b>	: Hidroksil radikali
<b>ONOO<sup>-</sup></b>	: Peroksinitrit
<b>ppb</b>	: Milyarda bir birim
<b>RNM</b>	: Reaktif nitrojen metabolitleri
<b>RO<sup>•</sup></b>	: Lipid alkoksi radikali
<b>ROO<sup>•</sup></b>	: Lipid peroksit radikali
<b>ROOH</b>	: Lipid hidroperoksit
<b>RT</b>	: Radyoterapi
<b>SAMDC</b>	: S–adenozilmetiyonin dekarboksilaz
<b>SD</b>	: Standart sapma
<b>SH</b>	: Sülfidril grupları
<b>sn</b>	: Saniye
<b>SOD</b>	: Süperoksit dismutaz
<b>SOR</b>	: Serbest oksijen radikalleri
<b>SSD</b>	: Kaynak cilt mesafesi
<b>XO</b>	: Ksantin oksidaz

## TABLO LİSTESİ

### Sayfa No

<b>Tablo 1:</b> Canlıda radyasyon bozukluklarına yol açan olaylar .....	7
<b>Tablo 2:</b> Memeli hayvanlarda görülen radyobiyojik bozukluklar.....	8
<b>Tablo 3:</b> Nitrik oksit sentezleyen enzimler .....	13
<b>Tablo 4:</b> Nitrik oksitin akciğerdeki fonksiyonları.....	14
<b>Tablo 5:</b> Serbest oksijen radikallerinin kaynakları.....	16
<b>Tablo 6:</b> Antioksidanlar.....	18
<b>Tablo 7:</b> Deney hayvanlarının gruplara göre dağılımı .....	23
<b>Tablo 8:</b> Gruplarda doku enzim düzeyleri ve standart deviasyonları.....	33
<b>Tablo 9:</b> Gruplar arası doku enzim düzeyleri p değerleri.....	34



## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa No

Şekil 1: İyonlaştırıcı radyasyonun direkt ve indirekt etkileri .....	5
Şekil 2: Radyasyonun canlıdaki etki kademeleri.....	6
Şekil 3: Serbest radikal aracılı oksidatif DNA hasarı .....	9
Şekil 4: L-arginin'den NO sentezi.....	12
Şekil 5: Nitrik oksitin yıkılımı.....	13
Şekil 6: Aminoguanidinin yapısı .....	21
Şekil 7: Radyasyon uygulamasında kullanılan kutu.....	24
Şekil 8: Radyasyon uygulaması.....	24
Şekil 9: Grupların doku CAT aktiviteleri .....	34
Şekil 10: Grupların doku GSH-Px aktiviteleri.....	35
Şekil 11: Grupların doku SOD aktiviteleri .....	36
Şekil 12: Grupların doku MDA düzeyleri .....	37
Şekil 13: Grupların doku NO düzeyleri.....	38

## ÖZET

**Amaç:** Ratlarda tüm vücut ışınlamasına bağlı oluşturulacak akciğer hasarına karşı, indüklenbilir nitrik oksit sentaz'ın (inducible nitric oxide synthase, iNOS) selektif inhibitörü ve antioksidan ajan olan aminoguanidine (AG)'in koruyucu etkisi olup olmadığını biyokimyasal parametreler kullanarak araştırmaktır.

**Gereç ve Yöntem:** Çalışma, üç grup ve her grupta erkek Wistar Albino cinsi on rat olacak şekilde planlandı. Kontrol grubu, yalnız radyasyon grubu (RT) ve radyasyon+aminoguanidin (RT+AG) şeklinde üç gruba ayrıldı. Çalışma radyasyon uygulamasından bir gün önce başlatıldı ve dört gün sürdü. AG, radyasyon uygulamasından bir saat önce, diğer günler ise buna uygun olarak her gün aynı saatte 200 mg/kg/gün olarak intraperitoneal yapıldı. Radyasyon, Co 60 teleterapi cihazı ile sabit kaynak-cilt mesafesi (SSD) tekniği ile (SSD 80 cm'de) ve 2,5 cm derinlikte, ön ve arka karşılıklı iki alandan tüm vücut dozu 800 cGy olacak şekilde uygulandı. Ratlar radyasyon uygulamasından 72 saat sonra, ketamin (50-60 mg/kg intraperitoneal) ile genel anestezi altında ratların akciğerleri alındıktan sonra sakrifiye edildi.

Deney hayvanlarının alınan akciğer dokusunda katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve süperoksit dismutaz (SOD) aktiviteleri ile malondialdehit (MDA) ve nitrik oksit (NO) düzeyleri değerlendirildi.

**Bulgular:** CAT, GSH-Px ve SOD aktiviteleri RT grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düşük bulunurken (sırası ile;  $p < 0.042$ ,  $p < 0.001$  ve  $p < 0.001$ ) RT + AG grubunda ise RT ve kontrol grubuna göre artma saptandı (sırası ile;  $p < 0,001$  ve  $p < 0,027$ ;  $p < 0,001$  ve  $p < 0,001$ ;  $p < 0,001$  ve  $p < 0,002$ ). MDA düzeylerinde RT grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış bulunurken ( $p < 0.001$ ) RT+AG grubunda ise RT grubuna göre düşüş saptandı ( $p < 0,001$ ) ve bu düşüş kontrol grubuna göre de anlamlı idi ( $p < 0,032$ ). NO düzeyleri RT grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış bulundu ( $p < 0,001$ ). RT+AG grubunda ise

RT grubuna göre NO düzeylerinde anlamlı şekilde düşüş görülürken ( $p < 0,001$ ) bu düşme kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde saptanmadı ( $p < 0,707$ ).

**Sonuç:** Radyoterapi'ye bağlı akciğer hasarının patogeneğinde antioksidan enzimlerde azalma, serbest radikaller ve lipid peroksidasyon ürünlerinde artmanın rol oynayabileceğini; iNOS'un selektif inhibitörü olan AG'in antioksidan etki göstererek RT'ye bağlı akciğer hasarını önleyebileceği sonucuna varıldı.

**Anahtar kelimeler:** İyonlaştırıcı radyasyon, Antioksidan enzimler, Lipid peroksidasyonu, Aminoguanidine, Nitrik oksit.

# THE EFFECT OF AMINOGUANIDINE AGAINST RADIATION-INDUCED LUNG DAMAGE IN WHOLE-BODY IRRADIATED RATS

## ABSTRACT

**Aim:** The aim of this experimental study was to investigate the possible productive effects of aminoguanidine (AG), an antioxidant agent and selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase (iNOS), on lung damage in whole body irradiated rats. To evaluate the biological damage of radiation on rat lung tissue it was used lipid peroxidation products by using biochemical parameters.

**Material and method:** In this study, we used 30 wistar albino rats which were divided three subgroups contains: control group, irradiation alone group (RT), and irradiation + aminoguanidine (RT+AG) group. The study was started one day before irradiation and lasted four days. AG was administered 200 mg/kg/day intraperitoneally one hour before irradiation and, irradiation was applied by Co 60 teleteapy machine, with fixed SSD technique at 80 cm to the 2,5 cm depth. All rats were sacrificed 72 hours later, after irradiation and CAT, GSH-Px, SOD activities and MDA, NO levels were evaluated on lung tissue of rats.

**Results:** CAT, GSH-Px and SOD activities statistically lower in RT group according to the control group ( $p < 0.042$ ,  $p < 0.001$  ve  $p < 0.001$ ); in RT+AG group, there was a rise according to the RT and control groups ( $p < 0,001$  and  $p < 0,027$ ;  $p < 0,001$  and  $p < 0,001$ ;  $p < 0,001$  and  $p < 0,002$ ). While there was statistically significant increase in MDA levels in RT groups according to control groups ( $p < 0.001$ ); a decrease was detected in RT+AG group according to RT and control groups ( $p < 0,001$  and  $p < 0,032$ ). There was a statistically significant rise at NO levels in RT group according to

control group ( $p < 0,001$ ). Although there was a significantly decrease at NO levels in RT+AG group according to control group, this was not statistically significant.

**Conclusion:** We reached that decrease in antioxidant enzymes and increase in free radicals and lipid peroxidation products may have a role at etyopatpgenesis on ionizing radiation-induced lung damage. AG, which is a selective inhibitor of iNOS, may protect against ionizing radiation-induced lung damage, by its antioxidant effect.

**Keywords:** Ionizing radiation, Antioxidant enzymes, Lipid peroxidation, Aminoguanidine, Nitric oxide.

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

İyonlaştırıcı radyasyon birçok tümör çeşidinin tedavisinde etkili olup kanserli hastaların %50-60'ında tedavinin önemli bir parçasıdır (1,2). Radyoterapinin amacı, normal dokuyu olabildiğince korumak suretiyle, tümör dokusuna maksimum dozu vermektir. Radyoterapi dozu artırılırken, lokal tümör kontrolünde de buna paralel bir artış elde etmek mümkündür. Ancak, normal dokudaki komplikasyon riski de beraberinde artar. Dolayısıyla tümör kontrolü, bir anlamda normal dokunun radyoterapiye toleransına bağlıdır (2,3).

Kanser tedavisinde, her geçen gün yeni gelişmelere paralel olarak hastaların sağkalımı uzamaktadır. Bununla beraber, yeni kemoterapotik ilaçlara ve radyasyon tekniklerinin gelişmesine rağmen, tedaviye bağlı komplikasyonlar hala yüksek orandadır. Radyoterapi alan hastalarda, tedavi alanında tümörle birlikte, bir kısım sağlıklı dokular da ışınlandığından, radyoterapinin çeşitli yan etkileri ortaya çıkmakta ve bu durum kanser hastasının yaşam kalitesinde bozulmaya sebep olabilmektedir (2,3).

Normal akciğer dokusu, verilen iyonlaştırıcı radyasyondan en çok etkilenen dokulardan birisidir. Radyoterapiye bağlı akciğer toksisitesi, yaygın olup, özellikle belli bir dozun üzerine çıktığında uygulanacak radyoterapi dozlarını önemli ölçüde sınırlamaktadır. Akciğer kanseri, meme kanseri, lenfoma ve timoma nedeni ile radyoterapi uygulanan hastaların %30'unda radyoterapiye bağlı akciğer şikayetleri meydana gelir (4). Standart fraksiyon ve dozlarda (1.5/2 Gy/fraksiyon/gün) tüm akciğere 18-20 Gy uygulandığında en az % 5 olguda radyasyon pnömönisi

gözlenmektedir (2,3). Radyasyon pnömonisini artıran nedenler ise yüksek total doz, fraksiyon sayısının artması, geniş volüm, ışınlanan normal doku hacminin artması, radyoduyarlaştırıcılar veya kemoterapik ilaçların beraber kullanılması, hücre ve doku özellikleri gibi faktörlerdir. Özellikle kemoterapi ve radyoterapi birlikte uygulandığında risk daha da artmaktadır (4). Üç boyutlu planlama veya yoğunluk ayarlı radyoterapi (intensity modulated radiation treatment, IMRT) kullanımıyla daha sofistike radyoterapi uygulayarak normal dokunun aldığı hasar, minimuma indirilebilmekte ve normal doku korunabilmektedir. Ancak bu ileri radyoterapi teknikleri henüz yaygın olarak kullanılmadığından, radyasyona bağlı akciğer toksisitesi kaçınılmaz olarak karşımıza çıkmaktadır (2,3).

Normal dokularda radyoterapiye bağlı gelişen yan etkiler akut, subakut ve geç radyasyon komplikasyonlarıdır. Akciğerde akut/subakut radyasyon hasarı olarak radyasyon pnömonisi; geç radyasyon hasarı olarak da radyasyon fibrozisi, kronik radyasyon pnömonisi, korpulmonale ve sağ kalp yetmezliği görülebilmektedir (2,3,5,6).

İyonlaştırıcı radyasyonun temel etki mekanizması, DNA’da yaptığı hasara bağlı olarak hücre ölümüne yol açmasıdır. DNA’daki ölümcül (letal) hasar DNA molekülünün fırlatılmış bir elektron ile direkt iyonizasyonu sonucu meydana gelebilir. Radyasyonun bu direkt iyonlaştırıcı etkisi hasarın bir bölümünden sorumludur. Asıl hasar yapan olaylar indirekt mekanizma ile ortaya çıkar. Ortamdaki suyun iyonizasyonuna bağlı olarak gelişen serbest oksijen radikalleri (SOR)’nin oluşumu DNA’daki ölümcül hasarın asıl sorumlusudur (7,8).

İyonlaştırıcı radyasyona bağlı akciğer hasarının mekanizması net olarak bilinmemekle beraber sitokin aktivitesi ve oksidatif strese bağlı olduğuna dair çalışmalar vardır (9,10). SOR’ni inhibe eden veya “scavenger” (temizleyici, süpürücü, toplayıcı) etki gösteren antioksidan ilaçlar iyonlaştırıcı radyasyona bağlı normal dokulardaki hasarı azaltabilir (11). İyonlaştırıcı radyasyona bağlı oluşan oksidatif hasarı en aza indirmek için radyasyon koruyucuları (radyoprotektörler) üzerinde yapılan çalışmalar son yıllarda giderek yaygınlaşmıştır (8).

Aminoguanidin (AG), serbest radikallerden olan nitrik oksit (NO)’in substratı olan L-arginine yapısal olarak benzeyen ve indüklenebilir nitrik oksit sentazın

(inducible nitric oxide synthase, iNOS) selektif bir inhibitördür (12-14). AG, oksidatif stres ve lipid peroksidasyonunu azaltarak belirgin olarak doku hasarını azaltıcı antioksidan etki gösterir (15,16). AG'nin deneysel çalışmalarla antineoplastik ve toksik ilaçların neden olduğu organ hasarına karşı antioksidan etki ile koruyucu olduğu gösterilmesine rağmen iyonlaştırıcı radyasyona bağlı organ hasarını önleyici rolü olup olmadığı ile ilgili literatüre rastlanılmadı.

Bu çalışmada selektif iNOS inhibitörü olan AG'in, tüm vücut ışınlaması uygulanan ratlarda iyonlaştırıcı radyasyona bağlı akciğer hasarını azaltıcı etkisi olup olmadığı araştırıldı. Bu amaçla, akciğer dokusunda iyonlaştırıcı radyasyona bağlı akciğer hasarını göstermek için malondialdehit (MDA) ve nitrik oksit (NO) düzeyleri ve SOR'nin akciğer hasarı gelişimindeki rolünü göstererek SOR'ni temizleyici etki gösteren antioksidan enzim olan katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve süperoksit dismutaz (SOD) aktiviteleri ölçülerek sonuçları değerlendirildi.



## 2. GENEL BİLGİLER

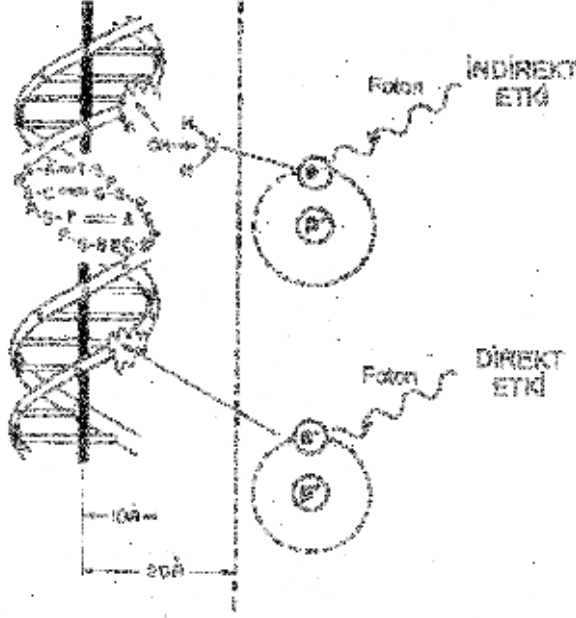
### 2.1. RADYASYONUN CANLIDAKİ ETKİ KADEMELERİ

Tıpta radyoaktif izotoplar ve radyasyon çeşitli hastalıkların tanı ve tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Radyoterapide, derindeki dokulara girebilen ve hasta hücrelerin ölümüne yol açan yüksek enerjili X ışını kaynakları, partikül akseleratörleri ve Co 60 kaynaklarından elde edilen iyonlaştırıcı radyasyonlar kullanılmaktadır. Bir atom veya molekülden bir elektronun kopmasına neden olan radyasyon tipine iyonlaştırıcı radyasyon adı verilir. İyonlaştırıcı radyasyonlar, X ve gama ( $\gamma$ ) gibi elektromagnetik radyasyonlar ve alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ) partikülleri, elektronlar, protonlar ve nötronlar gibi partiküler radyasyonlar olmak üzere iki gruba ayrılır (7,8).

İyonlaştırıcı radyasyonların canlıda biyolojik bir etkiye yol açabilmeleri için radyasyon enerjisinin canlıyı oluşturan hücreler ve dokular tarafından absorplanması ve bu enerjinin dokularda dağılması gerekir (7,8).

Bir biyolojik sistemde radyasyon etkisi ile oluşan bütün bu olaylar zinciri, eğer radyasyon enerjisinin, örneğin DNA ya da bir enzim molekülü gibi özel bir biyolojik yapı tarafından absorplanması ile başlamışsa, böyle bir etkiye radyasyonun “direkt etkisi” denir (Şekil 1). Radyasyonun direkt etkisi biyolojik etkinin bir bölümünden (1/3) sorumludur. Yüklü atom parçacıkları, genellikle direkt yolla etki gösterirler. Bu biyolojik moleküller içinde bulunduğu ortamın molekülleri tarafından radyasyon enerjisinin absorplanması ile değişikliğe uğrayarak bu olaydan indirekt olarak

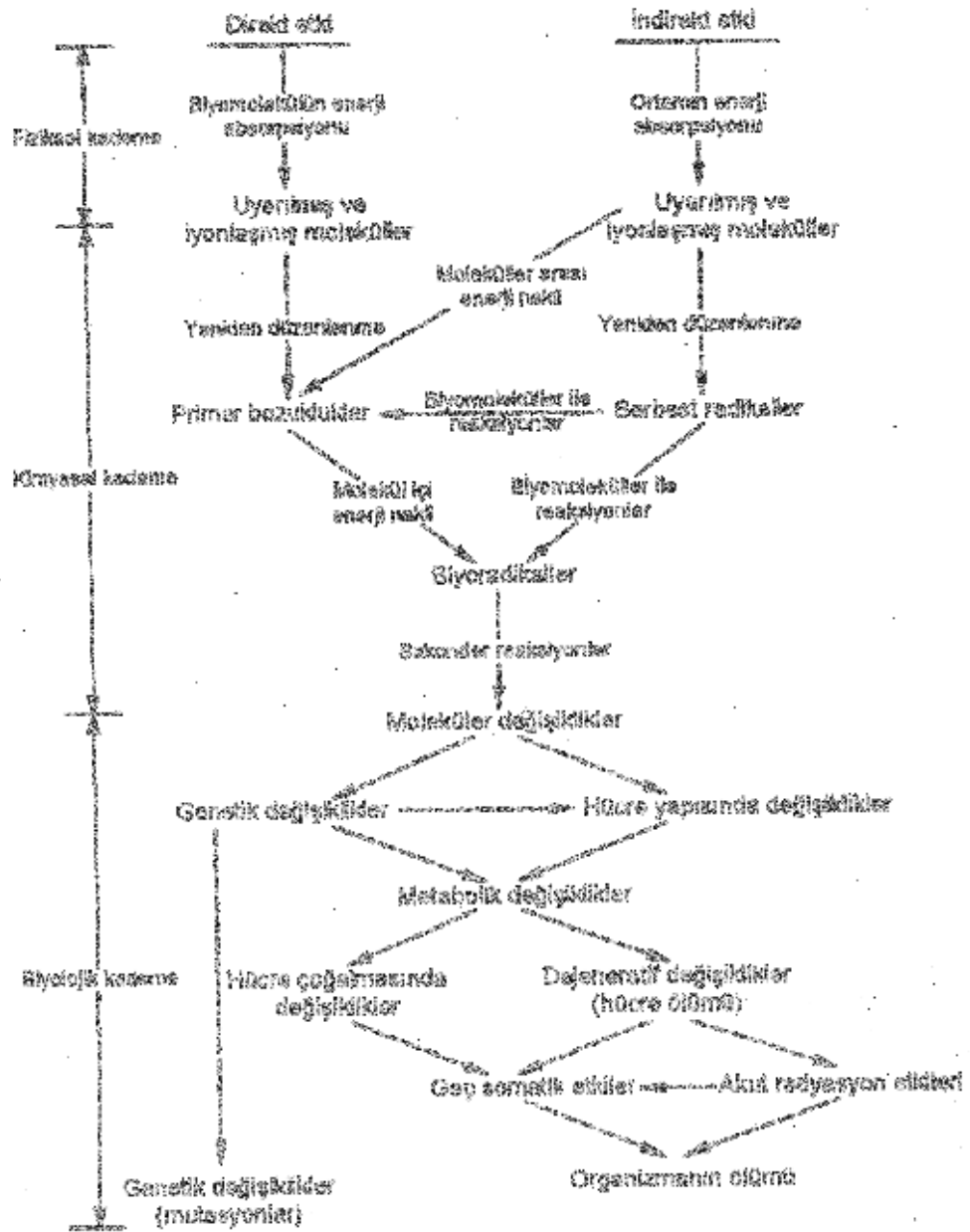
etkilenirler. Bu etkiye ise radyasyonun “indirekt etkisi” denir (Şekil 1). Biyolojik etki asıl bu mekanizma ile ortaya çıkar. X ve  $\gamma$  ışınları genellikle indirekt yolla etki ederler (2,3,7,8).



**Şekil 1.** İyonlaştırıcı radyasyonun direkt ve indirekt etkileri

Radyasyonun canlıda oluşturduğu etkilerin ayrıntılı bir şekilde incelenmesinde, radyasyon enerjisinin absorblanması ile biyolojik etkinin ortaya çıkışı arasındaki sürede birbirini izleyen olaylar zinciri fiziksel, kimyasal ve biyolojik kademeler olarak bilinen üç aşamada gerçekleşir (Şekil 2).

Radyasyon etkisinin ilk kademesi olan fiziksel kademe, iyonlaştırıcı radyasyonlar ile canlı dokuları oluşturan atom ve moleküller arasındaki ilk etkileşimleri kapsar. Radyasyon enerjisi maddeye transfer edilir. Çok hızlı bir elektron,  $10^{-18}$  saniyede DNA molekülünden,  $10^{-14}$  saniyede de bir hücreden geçebilir. Bu esnada DNA molekülü ya da hücredeki diğer moleküllerde iyonlaşma ve uyarılma olayları meydana gelir. Bu iyonlaşmalar sonucunda oluşan serbest elektronlar, diğer komşu atomlarda da iyonlaşmalara yol açarlar ve böylece zincirleme bir iyonlaşma olayı meydana gelir. Bu kademe de oluşan yeni ürünler, genellikle son derece kararsızdırlar ve çok kısa bir süre içinde sekonder reaksiyonların oluşmasına yol açarlar (7,8).



**Şekil 2.** Radyasyonun canlıdaki etki kademeleri

İkinci kademe olan kimyasal kademede, radyasyon tarafından hasar görmüş atom ve moleküller diğer hüresel yapılar ile zincirleme reaksiyonlara girerek serbest radikallerin oluşmasına yol açarlar. Serbest radikaller çok reaktif yapılar olduğundan hem kendileri ile hem de ortamdaki diğer moleküllerle reaksiyona girmeye devam ederler. Bu kademede ki önemli kimyasal olaylardan biri de serbest radikalleri, inaktif hale getiren sülfidril yapıları gibi yakalayıcı reaksiyonlar ile önemli biyolojik

moleküllerdeki kimyasal değişiklikleri, kalıcı hale getiren fiksasyon reaksiyonları arasında bir yarış olmasıdır (7,8).

Üçüncü kademe, biyolojik kademedir. Bu kademe boyunca canlıda meydana gelen olaylar, radyasyonun son biyolojik etkisinin ortaya çıkmasına sebep olurlar. Çeşitli hasarlara yol açan enzim reaksiyonları ile başlar. Bu arada DNA moleküllerinde hasarlar oluşur. Ancak bunların bir kısmı onarılabilir. Onarılamayan hasarlar ise hücrenin ölümüne yol açarlar. Eğer ölüm kök hücreleri popülasyonunda meydana gelirse, ışınlanmadan birkaç hafta ya da birkaç ay sonra ortaya çıkan erken doku ölümleri meydana gelir. İnce bağırsak ve kemik iliğinde oluşan hasarlar, bu tür olaylara örnektir. Bunun yanında radyasyon, genetik bozukluklar ve kanser oluşumu gibi geç biyolojik etkilere de yol açabilir (7,8).

İyonlaştırıcı radyasyonların canlıda oluşturduğu etki kademeleri ile bu kademelerde oluşan bozuklukların ana hatları ve bütün bu olayların kapsadıkları süreler Tablo 1’de gösterilmiştir. Bu tablonun incelenmesi ile, başlatıcı reaksiyonların tamamen fiziksel nitelikli oldukları görülmektedir. Bu canlı bir sistem olabileceği gibi, cansız bir sistem de olabilir. Her iki durumda da olayların seyri aynı olmasına rağmen, biyomoleküller ve biyolojik bozuklukların ortaya çıkmasına yol açan kimyasal ve biyolojik olayların oluşabilmesi sadece canlı sistemde mümkün olabilir. Tablo 2’de memeli hayvanlarda bu kademelerde hangi önemli radyasyon etkilerinin hangi biyolojik organizasyon düzeyinde meydana geldiği gösterilmiştir (7,8).

**Tablo 1.** Canlıda radyasyon bozukluklarına yol açan olaylar

Başlatıcı reaksiyonlar (fiziksel kademe)	Biyomoleküller bozuklukları (kimyasal kademe)	Biyolojik bozukluklar (biyolojik kademe)
İyonlaşmalar, uyarılmalar  ( $10^{-18}$ – $10^{-12}$ sn)	Serbest radikaller, nükleik asitlerde ve proteinlerde hasarlar  ( $10^{-12}$ sn – birkaç saat)	Hücre ölümü, organizma ölümü, mutasyonlar ve kanser oluşumu  (saatler – yıllar)

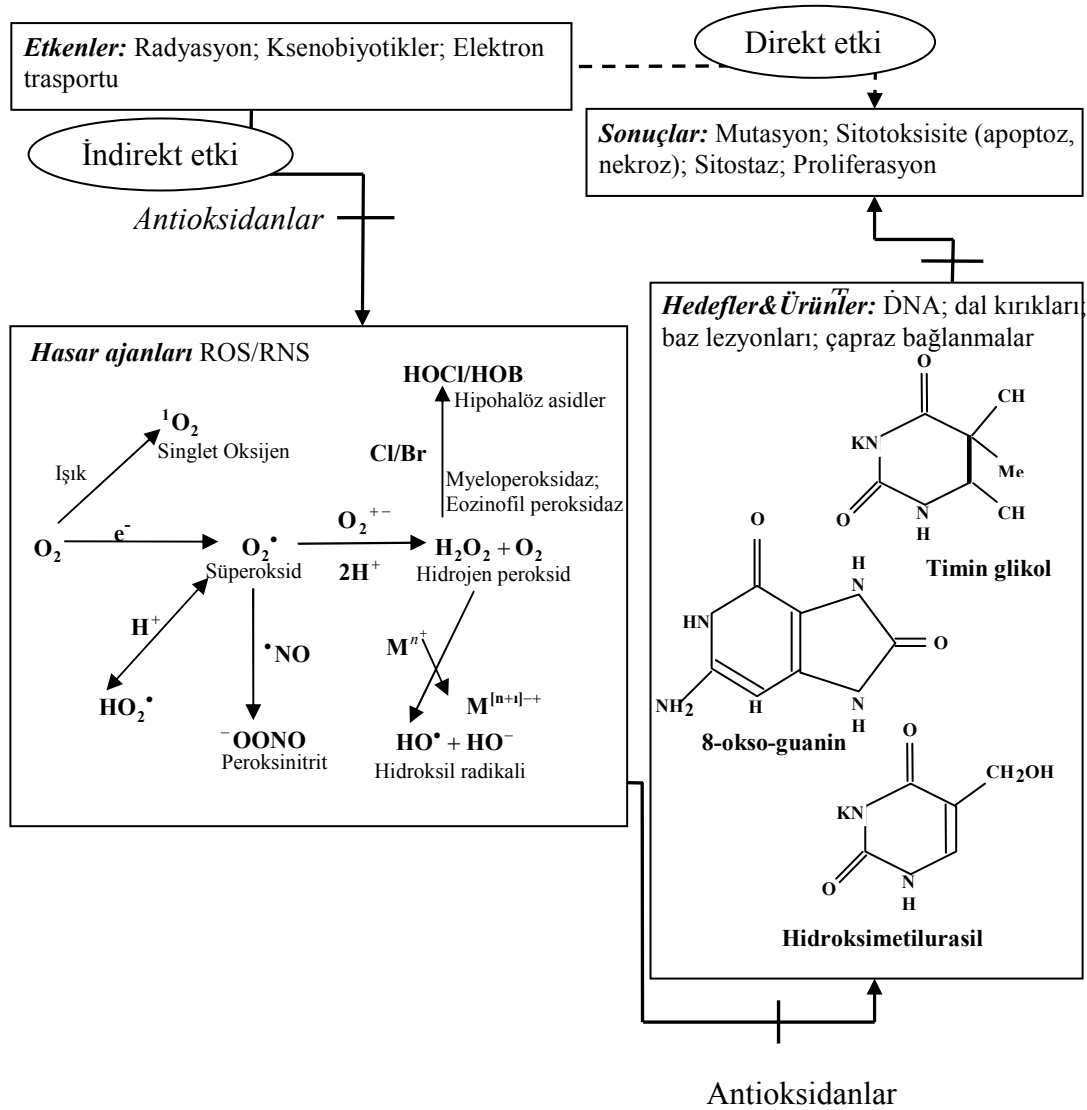
**Tablo 2.** İyonlaştırıcı radyasyona bağlı görülen bazı radyobiyojik bozukluklar

<b>Biyolojik organizasyon düzeyi</b>	<b>Önemli radyasyon etkileri</b>
Molekül	Enzim, RNA ve DNA gibi bazı makromoleküllerde hasarlar ve metabolik reaksiyon kademelerinde karışıklıklar
Hücre organelleri	Hücre zarı, nükleus, kromozomlar, mitokandri ve lizozomlar gibi hücre organellerinde bozukluklar
Hücre	Hücre bölünmesinin inhibisyonu, hücre ölümü, hücrenin anormal karakterler kazanacak şekilde transformasyonu
Doku, organ	Merkezi sinir sistemi, kemik iliği ve gastrointestinal sistemde ortaya çıkan bozukluklar, kanser oluşumu
Organizma	Ölüm, ömür kısalması
Populasyon	Populasyonda ortaya çıkan gen ve kromozom bozukluklarına bağlı olarak, topluluğun genetik özelliklerinde meydana gelen değişimler

## **2. 2. RADYASYON VE SERBEST RADİKALLER**

Serbest radikaller radyasyon etkisi ile iyonlaşma ve eksitasyon sonucunda dış yörüngelerinde eşleşmemiş bir veya daha fazla elektron bulunduran ve genellikle elektriksel açıdan yüksüz atom veya moleküllerden meydana gelir. Serbest radikaller hemen her zaman iyon çiftlerinin oluşumu ile radyasyon etkisi sonucu ortaya çıkan son kimyasal ürünler arasındaki ara kademeyi oluştururlar. Serbest radikaller son derece reaktif olduklarından diğer atom veya moleküllerle kolayca reaksiyona girerler. Çünkü eşleşmemiş elektronların bir başka radikalın aynı durumdaki elektronu ile eşleşmek veya bir elektron transferi reaksiyonu ile eşleşerek kararlı hale gelme eğilimleri vardır. Bu nedenle serbest radikaller elektron alıcı (oksitleyici) veya verici (redükleyici) özelliğe sahiptir (7,8).

Canlılar yaklaşık %70-90 oranında su içerdiği için, ışınlandıklarında radyasyonun etkisi ile su molekülleri iyonlaşırlar veya uyarılırlar. İyonlaşma ile pozitif yüklü bir iyon ve hızlı bir serbest elektron oluşur. Bu olayı izleyen çeşitli sekonder reaksiyonlar ile değişik tipte serbest radikaller meydana gelir. Serbest radikaller aynı zamanda diğer su molekülleri ile de reaksiyona girebilecekleri gibi, kendi aralarındaki reaksiyonlar sonunda ortaya çıkan ürünlerle de tekrar reaksiyona girebilirler. Sonuçta iyonlaştırıcı radyasyonların indirekt etkisi ile oluşan serbest radikaller hedef olan DNA molekülünde oksidatif hasara yol açarlar (Şekil 3) (7,8,21).



**Şekil 3:** Serbest radikal aracılı oksidatif DNA hasarı.

**Serbest Radikaller ve Oksijenin Etkisi:** Radyasyonun canlıdaki etkinlik derecesi ışınlama sırasında oksijenin varlığı ile artmaktadır. Çünkü serbest radikallerin

oksijen molekülleri ile reaksiyona girmeleri sonucu çok hasar verici hidrojen ve önemli bazı organik moleküllerin peroksit radikalleri oluşur (7,8,21).

### 2.3. SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİ

Serbest radikaller hidroksil, süperoksit, nitrik oksit ve lipid peroksit radikalleri gibi değişik kimyasal yapılara sahiptir. Serbest radikal aracılı doku hasarından sorumlu olan hidroksil radikalleri (OH<sup>-</sup>) iki ana yolla oluşur. Bunlar reaktif oksijen metabolitleri (ROM) ve reaktif nitrojen metabolitleri (RNM) üzerinden oluşan radikallerdir. Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir (21,21).

SOR içinde en önemlileri; süperoksit radikali (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), hidroperoksit radikali (HO<sub>2</sub><sup>·</sup>), hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), hidroksil radikali (OH<sup>·</sup>), singlet oksijen (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>)'dir (8,21). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve <sup>1</sup>O<sub>2</sub> tanımlamada bir serbest radikal olarak sayılmazlar, fakat serbest radikal özelliği gösterirler. Biyolojik açıdan diğer önemli serbest radikaller veya onların denklemleri ise lipid hidroperoksit (ROOH), lipid peroksit radikali (ROO<sup>·</sup>), lipid alkoksi radikali (RO<sup>·</sup>), nitrik oksit (NO<sup>·</sup>) ve nitrojen dioksit (NO<sub>2</sub>) gibi radikal türleridir (21,22). RNM; NO<sub>2</sub>, peroksinitrit (ONOOH), diazot trioksit (N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) ve hidrojen nitrit (HNO<sub>2</sub>) dir. Bu radikallerin hepsi oksidatif stresin bir parçasıdır.

**2.3.1. Süperoksit radikali (O<sub>2</sub><sup>-</sup>):** Moleküler oksijene fazladan bir elektron bağlanmasıyla onu redükleyerek süperoksit serbest radikal anyonunu meydana getirir. Zayıf bir oksidan olarak O<sub>2</sub><sup>-</sup> kendi başına önemli bir hücre hasarı oluşturmaz. Milisaniyelik bir yarı ömürle zayıf bir oksidan fakat güçlü bir redüktandır. O<sub>2</sub><sup>-</sup>, oksijen toksisitesinde önemli bir faktördür ve SOD enzimi buna karşı organizmayı korur. Asıl önemi hidrojen peroksit kaynağı olması, geçiş metal iyonlarını redüklemesi ve NO ile reaksiyona girerek peroksinitrit (ONOO<sup>·</sup>) oluşturmasıdır (23).

**2.3.2. Hidroksil radikali (OH<sup>·</sup>):** En reaktif ve en fazla toksik SOR olup üretildiği her yerde her biyomolekül ile reaksiyona girebilir ve ilgili hasarlanmayı (örneğin; lipid peroksidasyonunu başlatma, DNA'da kırılma ve hasarlanmalar, enzimlerin aktif merkezlerindeki SH ve benzeri grupların oksitlenmesi ve

polisakkaritlerin depolarizasyonu gibi) yapabilir. Ayrıca tiyoller ve yağ asidi gibi moleküllerden bir proton kopararak yeni radikaller oluşturabilir (24).

**2.3.3. Hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ):** Hücreye doğrudan zarar vermez. Fakat yüksüz olduğundan dolayı tüm biyolojik membranlardan (hücre, mitokondri, nükleer membran gibi) diffüzyonla kolayca geçebilir (25). Süperoksit ise (-) yüklü olduğundan bir anyon kanalı olmadıkça membranları geçemez. Bu nedenle süperoksitin giremediği membranlarla korunan bölgelere rahatlıkla geçebilir ve potansiyel bir radikal oluşturucu (özellikle  $OH^{\cdot}$ ) olarak hasarlanma yapabilir.  $H_2O_2$  ile oluşturulan hasar katalaz ve glutasyon peroksidaz enzimleri aracılığı ile önlenir (22-24).

**2.3.4. Singlet oksijen ( $^1O_2$ ):** Oksijen molekülünün daha reaktif türü olan singlet  $O_2$ 'ler moleküler oksijenin enerji almasıyla meydana gelirler. Bunların delta ve sigma olmak üzere iki tipi mevcuttur. Sigma tipi daha reaktif olduğu için hızla delta tipine dönüşür. Bu yüzden biyolojik sistemlerde delta tipinden bahsedilir (24).

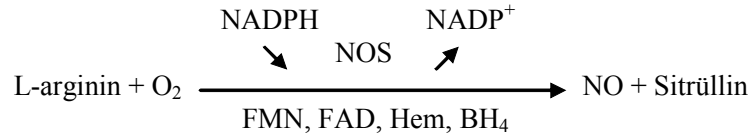
**2.3.5. Nitrik oksit (NO):** 15-20 yıl öncesine kadar NO'nin basit bir atmosfer atığı olduğu düşünülmekteydi. Ancak 1987 yılında, damar endotelinden endotel kaynaklı gevşeme faktörü (EDRF) olarak bilinen yapının izole edilmesi sırasında nitrik oksit sentetaz (NOS) keşfedilmiş ve daha sonraki yıllarda EDRF'nin NO olduğu tespit edilmiştir. İnsan ve hayvanların da NO üretebildiklerinin ortaya konması ile 1987 yılına kadar insan vücudunda bulunuş nedeni ve metabolizması hakkında çok az şey bilinen NO'nin fizyolojik ve patolojik olaylardaki rolü anlaşılmış ve 1992'de yılın molekülü seçilmiştir (25,26).

NO, renksiz bir gazdır. Yüksek konsantrasyondaki NO oksijensiz ortamda oldukça stabil olup suda erime özelliği gösterirken, düşük konsantrasyondaki NO oksijen varlığında dahi stabildir. Havadaki NO, kısa sürede oksijenle oksitlenerek nitrojen dioksit'e dönüşür. Nitrojen dioksit dokular için oldukça zararlı bir bileşiktir. Nitrik oksit'in, üzerinde yük taşımaması ve çiftlenmemiş elektron bulundurması, hücreden hücreye hiçbir bariyerle karşılaşmadan kolaylıkla geçmesini sağlamaktadır. Aynı zamanda NO, taşıdığı çiftlenmemiş elektron nedeni ile bir radikal moleküldür. Diğer serbest radikaller her konsantrasyonda hücreler için zararlı iken NO düşük konsantrasyonlarda çok önemli fizyolojik işlevlerde rol almaktadır. Ancak aşırı ve



kontROLSÜZ NO sentezi hücreler için zararlı olmaktadır. NO, bu özellikleri ile çok ideal bir fizyolojik haberci molekülü özelliği kazanmaktadır. NO, diğer serbest radikaller gibi çok kısa yarılanma süresine sahip olup 2-30 saniye içinde daha stabil bir yapı olan nitrata (NO<sub>3</sub>) oksitlenir (25,26).

NO, dokularda NOS tarafından L-arginin'den sentezlenir. Son görüşlere göre; NOS uyarıldığında, iki oksijen molekülünün aktivasyonu ile bir çift oksijen atomu, Larginin'e girerek NO ve strüllin üretilmektedir (Şekil 4) (27).



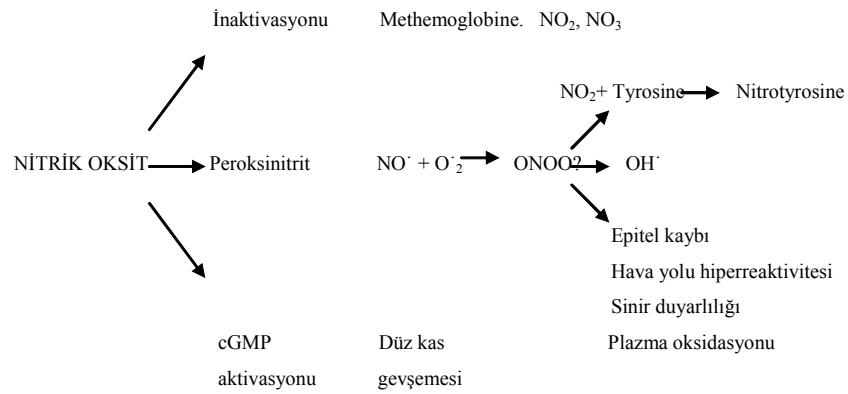
**Şekil 4.** L-arginin'den NO sentezi

**2.3.5.1. Nitrik oksit sentaz (NOS):** Nitrik oksit sentezleyen NOS enziminin 3 farklı izoformu vardır (Tablo 3). Bu izoenzimlere özgü genler kromozom 7 (endotelial NOS-eNOS), 12 (nöral NOS-nNOS) ve 17 (indüklenbilir NOS-iNOS) üzerinde bulunmuştur. Nitrik oksit sentezleyen enzim nNOS ve eNOS sürekli, ancak az miktarda ve kalsiyuma bağımlı olarak salınır. Nöral dokularda nNOS ve vasküler endotelde ise eNOS bulunur. Solunum yolu epitelinde ve çeşitli diğer hücrelerde iNOS bulunur (kalsiyuma bağımlı değildir). iNOS sitokinler, endotoksin ve reaktif oksijen radikalleri tarafından indüklenbilir (28).

**Tablo 3:** Nitrik oksit sentezleyen enzimler

NOS İzoform	Diğer Adı	Salınım	Kaynak	Regülasyon	NO Miktarı	Kromozom
Tip I	nNOS	Devamlı	Sinir hücreleri	Kalsiyuma bağımlı	Düşük (picomol)	12
Tip II	iNOS	İndüklendiğinde	Makrofaj, damar düz kası, damar endoteli, miyokard, endokart, hepatosit, immun hücreler, hava yolu epiteli	Sitokinler, endotoksin ve oksidanlarla indüklenme	Yüksek (nanomol)	17
Tip III	eNOS	Devamlı	Vasküler endotel hücreleri, trombositler, miyokard ve endokard, mast hücreleri, nötrofiller	Kalsiyuma bağımlı	Düşük (picomol)	7

NO'nun yarılanma süresi çok kısadır ve solüsyonlarda hızlı okside olarak nitrit ( $\text{NO}_2$ ) ve nitrata ( $\text{NO}_3$ ) dönüşür. İnsan vücudunda NO, hemoglobine bağlandığında inaktive olur (Şekil 5). Bu bağlanma, oksijene göre 3000 kat daha hızlı olmaktadır (28,29). Bu kadar hızlı inaktive olması belki de NO'nun etkilerini lokalize kılan en önemli faktördür. NO aynı zamanda serbest radikal süperoksit tarafından da inaktive edilmektedir. Böylece SOD gibi süperoksidi ortadan kaldıran enzimler NO'nun ömrünü uzatabilir. NO'nun süperoksitle reaksiyonu sonunda oldukça güçlü doku hasarına yol açan bir madde olan peroksinitrit ( $\text{ONOO}^-$ ) oluşur (Şekil 5).



**Şekil 5.** Nitrik oksitin yıkılımı

**2.3.5.2. Nitrik oksit ve akciğerler:** Solunum havasında NO (sağlıklı bireylerde 5-10 ppb) ve bronkoskopik lavaj ve indüklenmiş balgam örneklerinde NO metabolitlerinin saptanması, NO'nun hava yollarında sentezlendiğini gösteren bulgulardır (30,31). Akciğer fizyopatolojisinde major rol oynamaktadır. Tablo 4'de NO'nun akciğerlerdeki etkileri gösterilmiştir.

NO'nun akciğerdeki hücresel kaynakları epitel hücreleri, pulmoner arter ve venlerin endotel hücreleri, inhibitör nonadrenerjik nonkolinerjik nöronlar, düz kas hücreleri, mast hücreleri, mezotel hücreleri, fibroblastlar, nötrofiller, lenfositler ve makrofajlardır (29). iNOS normal hava yolu epitelinde yer alır ve sitokinler, endotoksin ve SOR tarafından indüklenebilir. Nitrik oksidin birçok zararlı etkisi süperoksit anyonu ile reaksiyonu sonucu oluşan peroksinitrite bağlı olarak ortaya çıkar (Şekil 5). İnflamatuar süreçte NO ve süperoksit radikallerinin oluşumu epitel hasarına, medyatör salınımına ve hava yolu duyarlılığının artmasına neden olmaktadır (28).

**Tablo 4:** Nitrik oksitin akciğerdeki fonksiyonları

YARARLI	ZARARLI
1. Bronkodilatasyon	1. Semptomlarda ve hava yolu tıkanmalarında artışa neden olan inflamatuvar yanıt
2. Arteriyel vazodilatasyon	2. Bronşial vazodilatasyon, astımlı hastalarda görülen hava yolu hiperemisi
3. Mukosilyer klirensin düzenlenmesi	3. Postkapiller venüllerdeki kan akımını arttırmak suretiyle hava yollarında ödem
4. Savunma sistemleri; bakteri, virüs ve parazitler üzerine toksik etki	4. Pulmoner damarlardaki vazodilatasyona bağlı ventilasyon perfüzyon dengesizliği
	5. Doğrudan veya submukozal bezlerdeki kan akışı artışına bağlı mukus sekresyonunda artış
	6. T-helper 2 aktivasyonundan dolayı artışa bağlı olarak astmatik inflamasyonda artış
	7. Hava yollarında inflamatuvar hücrelerce oluşturulan süperoksit anyonları ile birleşerek peroksinitrit iyonları oluşturması

### **2.3.5.3. Nitrik oksitin etkisinin inhibisyonu:**

NO üretiminin inhibisyonu için çok farklı maddeler kullanılabilir. Bunların bir kısmı NOS'ı inhibe ederken bir kısmı da doğrudan NO'ı inhibe edebilir.

#### **A. NOS inhibitörleri:**

**1. Arginin analogları:** Bugün en yaygın kullanılan NOS inhibitörleri olup nNOS için seçicilik gösterirler. Bu maddeler; N-monometil L-Arginin (L-NMMA), N-nitro L-Arginin (L-NNA), N-nitro L-arginin metil ester (L-NAME) ve N-iminoetil L-ornitin (L-NIO) dir (32).

**2. Nitrojen içeren bileşikler:** Bunlar nNOS ve iNOS'u inhibe ederler. Bu grupta 7-nitroindazol, NADPH bağımlı FAD/FMN inhibitörleri ve difeniliodinium klorid gibi flavoprotein inhibitörleri yer alır (32).

**3. Aminoguanidin:** Selektif iNOS inhibitörüdür (12-14).

#### **B. NO inhibitörleri:**

Sentezi yapılan NO çok hızlı bir şekilde hedef hücrelere diffüze olur. Serbest NO, bazı moleküller tarafından işlev görmeden bloke edilebilir. Bu grupta en çok kullanılan maddelere örnek olarak; metilen mavisi, hemoglobın, fusidik asit ve karboksi-2-fenil-4,4,5,5-tetrametilimidazolin-1-oksil (karboksi-PTIO) sayılabilir (33).

#### **C. NO Vericileri (Donörleri):**

NO endojen sentezinin yanı sıra vücuda bazı ilaçların metabolitleri olarak alınır. Nitrogliserin ve sodyum nitroprussid gibi vazodilatör ajanların aktif bir metaboliti olan NO'e dönüşerek etki yaptığı gösterilmiştir (34).

### **2.3.6. SERBEST RADİKAL ÜRETİM KAYNAKLARI**

Biyolojik sistemlerde serbest radikal oluşumu, normal metabolik olayların seyri sırasında meydana gelebildiği gibi, organizmanın, radyasyon gibi dış etkenlere maruz kalması ve organizmada bazı yabancı maddelerin (örneğin; ksenobiyotikler) metabolize

olması sırasında da meydana gelebilir. Bu nedenle serbest oksijen radikalleri endojen ve eksojen kaynaklı oluşabilir (35). Tablo 5’de SOR’nin kaynakları verilmiştir.

Tablo 5. SOR’un kaynakları

Endojen Kaynaklar	Eksojen Kaynaklar
Mitokondriyal elektron transport zinciri	İlaç oksidasyonları (Ör. Parasetamol, $CCl_4$ )
Kloroplast elektron transport zinciri	İyonize radyasyon
Oksidan enzimler: Ksantin oksidaz	Güneş ışığı
İndolamin dioksijenaz	X- ışınları
Triptofan dioksijenaz	UV- ışınları
Galaktoz oksidaz	Isı şoku
Siklooksijenaz	Glutasyonu okside eden maddeler
Lipooksijenaz	Ortam havası
Mono aminooksidaz	Sigara dumanı
Fagositik hücreler:	Ozon
Nötrofiller	Kükürtdioksit
Monosit ve makrofajlar	Egzos gazları
Eozinofiller	
Endotelyal hücreler	
Oto-oksidasyon reaksiyonları ( $Fe^{+2}$ , epinefrin)	

## 2.4. LİPİD PEROKSİDASYONU

Lipid peroksidasyonu, serbest oksijen radikallerinin, hücre membranındaki doymamış yağ asitleri, fosfolipidler ve glukolipidlerin peroksidasyonuna neden olma süreci olup, bu süreç sonunda ciddi biçimde membran hasarı ve fonksiyon kaybı oluşur (36).

İnsanlarda birçok hastalığın etyopatogenezinde, lipid peroksidasyonunun uyarılması ile organ ve dokularda açığa çıkan hücre membranı hasarı suçlanmaktadır (36). Lipid peroksidasyonuna neden olan serbest oksijen radikalleri, eksojen yada endojen kaynaklı olabilir.

Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan son ürünler aldehitler, hidrokarbon gazları ve malondialdehit (MDA)’dir. Mutajenik, genotoksik ve karsinogenik bir bileşik olan

MDA, laboratuarda doku, kan komponentleri ve vücut sıvılarında ölçülerek lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olarak kullanılmaktadır (36).

Radyasyon, iskemi ve bazı ilaçlarla ortaya çıkan SOR'nin, lipid peroksidasyonuna neden olduğu ve MDA düzeylerinde yükselmeye neden olduğu bilinmektedir. Malondialdehit düzeyleri ölçülerek indüklenen peroksidasyon derecesi belirlenebilmektedir (37,38).

MDA, üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin SOR ile peroksidasyonu sonucunda oluşmaktadır. Diğer lipid peroksidasyon ürünleri ile uzak bölgelere diffüze olabilmektedir (37). Oluşan bu MDA ve diğer ürünler hücrede geçirgenlik ve inflamasyon artışına ve araşidonik salınımına neden olmaktadır. Bunun sonucu olarak organellerde şişme ve membran rüptürü oluşmaktadır. DNA'da da bazlar ile reaksiyona girerek zincir kopmalarına yol açmaktadır.

## **2.5. ANTIOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLER**

Canlı hücrelerde bulunan protein, lipid, karbonhidrat ve DNA gibi okside olabilecek maddelerin oksidasyonunu önleyen veya geciktirebilen maddelere antioksidanlar; bu olaya da antioksidan savunma sistemleri denmektedir. Antioksidan sistemler tür, organ, yaş, cinsiyet ve çevresel faktörlerden etkilenmektedir (35). Antioksidan sistemler hücre içi ve hücre dışı ortamda farklıdır (35).

Normal şartlar altında serbest oksijen radikali (SOR) üretimi ve yıkımı arasında bir denge vardır. Organizmada oluşan oksijen radikallerine karşı koruyucu sistem olan antioksidan savunma sistemi arasındaki dengenin radikaller lehine kayması oksidatif stres olarak anılır. Hücreleri oksidatif streslere karşı koruyan antioksidan sistem enzimatik ve nonenzimatik olarak ikiye ayrılır (24). Tablo 6'da antioksidanlar gösterilmiştir.

**Tablo 6: Antioksidanlar**

Enzimatik	Nonenzimatik	
Süperoksit dismutaz (SOD)	Glutasyon (GSH)	Albümin
Katalaz (CAT)	$\alpha$ -Tokoferol (vit E)	Seruloplazmin
Glutasyon peroksidaz (GSH-Px)	Askorbat (vit C)	Transferrin
Fosfolipid hidroperoksit glutasyon	$\beta$ -Karoten	Ferritin
Peroksidaz (PLGSH-Px)	Flavonoidler	Laktoferrin
Glutasyon S-transferaz (GST)	Ürat	Melatonin
Glutasyon redüktaz (GSSG-R)	Bilirubin	Sistein

### 2.5.1. Süperoksit dismutaz (SOD):

SOD, aerobik hücrelerde oksidatif strese karşı major defans sistemi olarak bilinen bir metalloenzimdir (37).

SOD, serbest oksijen radikallerinin en önemli üyesi olan süperoksit anyonunun enzimatik dismutasyonunu gerçekleştirir. Böylece süperoksit anyonu, hidrojen peroksite dönüşür. SOD bu yolla oksijen toksisitesinden koruyucu sistemin en önemli ve ilk basamağında rol oynar (37). Oluşan hidrojen peroksit de toksik bir üründür. Ancak bu da katalaz ve GSH-Px tarafından oksijen ve suya parçalanmaktadır.

**2.5.2. Katalaz (CAT):** Katalaz, antioksidan sistemin üç önemli enziminden biri olup yapısında demir içeren bir tetramerdir (39).

Katalaz, hidrojen peroksiti doğrudan parçalayarak etki eder. Katalaz hidrojen peroksite karşı rölatif olarak düşük affinite gösterdiğinden katalaz aktivitesi hidrojen peroksinin yüksek konsantrasyonlarında daha önemli hale gelmektedir. Düşük hidrojen peroksiti konsantrasyonlarında, metil veya etil hidroperoksitler, metanol, etanol, fenol gibi küçük molekülü elektron vericilerini indirger. Enzimin bu iki tür aktiviteden hangisini göstereceği, başta hidrojen peroksit üretim hızı olmak üzere oluşan biyomoleküllerin tür ve miktarına bağlıdır (39).

**2.5.3. Glutasyon peroksidaz (GSH-Px):** Glutasyon peroksidaz, süperoksit anyonunun SOD tarafından giderilmesi sonucu ortaya çıkan toksik ürün hidrojen

peroksit ve lipid hidroperoksitlerinin, redükte glutasyon varlığında redüklenmesi reaksiyonunu katalizleyen enzimdir (36).

GSH-Px, başta karaciğer olmak üzere eritrositler, kalp, akciğer, böbrek, göz ve beyin gibi dokularda bulunmaktadır. GSH-Px'ın en önemli özelliklerinden birisi selenyum bağımlı olmasıdır. GSH-Px, hidrojen peroksitin düşük konsantrasyonlarına daha hassastır (40).

## **2.6. RADYOTERAPİNİN AKCİĞERDE OLUŞTURDUĞU HASARLAR**

Solunum sisteminde damarlar ve alveol epiteli radyasyona karşı duyarlı iken kıkırdak dokusu ve plevra dirençlidir (8).

İnsan akciğerinde RT'nin yaptığı hasar dört evrede (klinik faz olarak da bilinmektedir) incelenmektedir. Bunlar, akut faz (radyasyon pnömonisi), subakut faz, kronik faz (akciğer fibrozisi ile karakterizedir) ve geç faz olarak adlandırılır. Akut faz ve subakut faz tedavi zamanıyla ilişkilidir. Radyasyon pnömonisi bu iki fazda ve genellikle de tedavi başlangıcından 3-6 ay sonra; kronik faz ise bir yıl sonra görülmektedir (8). Bu dört evre, kliniğe, radyasyon pnömonisi ve radyasyon fibrozisi olarak yansımaktadır (2,10). Radyasyon pnömonisi ve fibrozisini ilk olarak Evans 1925 yılında tanımlamıştır (6).

## **2.7. RADYOPROTEKTÖRLER (RADYASYON KORUYUCULARI)**

Radyoprotektörler, canlıyı radyasyona karşı, olduğundan daha dirençli hale getiren ve onu koruyan maddelerdir. Bazı maddeler hücrelerin radyasyona duyarlılıklarını etkilemedikleri halde canlıyı bütün olarak korur. Bunlar damarlarda vazokonstriksiyona yol açarak dokuda oksijen konsantrasyonunu azaltır ve radyasyona daha dirençli hale getirir. Epinefrin, histamin, karbon monoksit, siyanür, serotonin bu yolla etki gösterir. Bununla birlikte sayılan bu maddeleri, gerçek koruyucular olarak kabul etmek mümkün görünmemektedir (3,7,8).

Radyoterapi ve/veya kemoterapi normal hücrelerde serbest radikal meydana getirir. Serbest oksijen radikallerinin dokuda oluşturacağı tahribat, radikal temizleyici ajanlar kullanarak önlenir. Bunlardan en iyi bilinen grup, sülfidril (SH) bileşikleridir



olup, Sistein kimyasal olarak en basit yapıya sahip olanıdır. Sistein aynı zamanda toksik bir bileşik olup, radyoprotektör olarak kullanılma dozunda bulantı ve kusmaya neden olur. Radyoprotektörlerin ortak özelliği, iki ya da üç karbonlu bir düz zincir ile bu zincirin bir ucunda serbest bir SH grubu, diğer ucunda da amin yada guanidin gibi kuvvetli bazik bir grubun bulunmasıdır. Ayrıca koruyucu etkisi, hücre siklusunun çeşitli fazlarına bağlı olarak değişir (2,8).

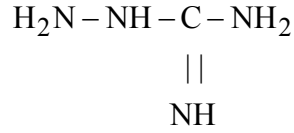
İyi bir radyoprotektörde şu özellikler aranır: Kullanılan ajanların normal dokuları seçici olarak koruması, tümör hücrelerini koruyucu potansiyelinin olmaması, stabil olması, kalıcı toksiteye neden olmaması, kolay uygulanabilir olması ve hidrofilik olmasıdır (3,7).

Radyoprotektörler, etkilerini gösterebilmeleri için radyasyon uygulaması esnasında canlıda bulunmaları gerekir. Işınlamadan sonra uygulanan radyoprotektörlerin hiçbir koruyucu etkisi gösterilememiştir. Bir radyoprotektörün etkinliği doz redüksiyon faktörü (DRF) terimi ile tanımlanır. DRF= protektör varlığındaki doz/ protektör yokluğundaki doz formülü ile gösterilir. Bugüne kadar saptanan çeşitli radyoprotektörlerin DRF değerleri, 1.5-2.5 arasında değişir (8).

Radyoprotektörlerin geliştirilmesi amacı ile bugüne kadar binlerce (4000 üzerinde) madde incelenmiştir. WR 2721 (amifostin) adı verilen bir maddenin, özellikle kan yapıcı organlarda iyi koruma sağladığı tespit edilmiştir (43).

## **2.8. AMİNOGUANİDİN (AG)**

Biguanid grubu bir nükleofilik hidralazin derivesi ve antidiyabetik olan AG (Şekil 5), (CH<sub>6</sub>N<sub>4</sub> ; mol wt=74,09) ilk kez 1892'de nitroguanidinin redüksiyonu ile hazırlanmıştır (44). AG, yüz yıldan fazla zamandır bilinen bir preparat olup ileri glikozilasyon son ürünlerinin (Advanced glycation end products, AGE) inhibitörlerinin prototipidir. 1986'da glukozun dokularda neden olduğu çapraz bağ oluşumunu ve doku hasarını engellediği gösterilmiştir (44,45).



**Şekil 6 : Aminoguanidinin yapısı**

AG, AGE inhibitörü olmasının yanısıra, 1990'ların başında uyarılabilen nitrik oksit sentazı (iNOS) inhibe ettiği de gösterilmiştir (12-14).

AG'nin, histamin ve putresin gibi biyolojik aktif diamminlerin degradasyonunu katalizleyen, diammin oksidaz (DAO) enziminin potent inhibitörü olduğu bildirilmiştir (45). DAO böbrek, adrenal gland, barsak, plasenta ve timusta yüksek aktiviteye sahiptir.

AG, spermidin ve spermin gibi kompleks poliaminlerin sentezinde anahtar bir enzim olan S-adenozilmetiyonin dekarboksilaz (SAMDC) enzimi üzerine de etkileri mevcuttur. AG'nin SAMDC enzimini stabilize ederek seviyesini artırdığı fare lösemi hücrelerinin kültüründe gösterilmiştir (46,47).

Daha önceki çalışmalarda AG'nin antioksidan etkileri (15,16) ve peroksinitriti temizleyici etkileri (48) gösterilmiştir. Ayrıca AG'nin serbest radikal temizleyici etkileri (süperoksit ve OH radikallerine karşı) de gösterilmiştir (15,16).

Fujisawa ve ark. (49) tarafından, AG'nin yaşlanmayı önleyici etkileri de gösterilmiştir.

Tüm bu etkilerine rağmen AG'nin diyabetik hastalarda kullanımında tereddütler de vardır. Çünkü AG'nin pridoksini bağlaması nedeniyle hayvanlarda uzun süre uygulamalarında vitamin B<sub>6</sub> eksikliği ve nörotoksisite geliştiği gösterilmiştir (50). Ayrıca klinik tedavide AG'nin, gastrointestinal rahatsızlık, KC fonksiyon testi anormallikleri, grip benzeri semptomlar ve nadiren vaskülit yaptığına dair yan etkileri rapor edilmiştir (51).

### **3. GEREÇ VE YÖNTEM**

Bu deneysel çalışma, Erciyes Üniversitesi Araştırma Fonu desteğiyle ve TT-04-41 proje numarasıyla Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi (DEKAM) 'nde Eylül 2005 – Haziran 2006 tarihleri arasında yapıldı. Çalışmada deney hayvanı olarak bu merkez tarafından yetiştirilen sağlıklı, 250 ± 15 gram ağırlığında, on iki haftalık, erişkin erkek Wistar Albino ratları kullanıldı. Ratlar, havalandırma şartları sağlanmış, güneş ışığı alan odalarda ve her birinde beş ratın bulunduğu özel kafeslerde tutuldu. Düzenli olarak standart pellet yemle beslendi ve çeşme suyu verildi. Suları her gün değiştirildi ve kafes temizliği gün aşırı yapıldı. Radyasyon uygulaması Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı'nda, biyokimyasal değerlendirmeler Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda yapıldı.

#### **3.1. DENEY GRUPLARININ OLUŞTURULMASI**

Çalışma, üç grup ve her grupta on rat olacak şekilde planlandı. Kontrol grubu (K), yalnız radyasyon grubu (RT) ve radyasyon+aminoguanidin (RT+AG) şeklinde üç gruba ayrıldı (Tablo 7). Çalışmaya, radyasyon uygulamasından bir gün önce başlandı ve dört gün sürdü. İlaç uygulamaları radyasyon uygulamasından bir saat önce, diğer günler ise buna uygun olarak her gün aynı saatte yapıldı. Ratlar radyasyon uygulamasından 72 saat sonra sakrifiye edildi.

**1. Grup (Kontrol grubu) (n=10):** Dört gün süre ile her rata 1 ml % 0,9 NaCl intraperitoneal olarak uygulandı.

**2. Grup (Radyasyon grubu) (n=10):** Yalnız radyasyon ve radyasyon uygulamasından bir gün önce ve takip eden üç gün 1 ml %0,9 NaCl ip olarak uygulandı.

**3. Grup (Radyasyon+Aminoguanidin grubu) (n=10):** Radyasyonla birlikte aminoguanidin'in radyasyon uygulamasından bir gün önce ve takip eden üç gün süre ile 200 mg/kg/gün intraperitoneal olarak uygulandı.

**Tablo 7.** Deney Hayvanlarının Gruplara Göre Dağılımı

Grup adı	n
Kontrol (K)	10
Radyasyon (RT)	10
Radyasyon+Aminoguanidin (RT+AG)	10

### **3.2. RADYASYON UYGULAMASI**

Ratlar, 31,5x30,5x5 cm boyutlarında tahtadan yapılan özel bir kutu içerisinde, anestezi yapmadan, beşerli gruplar halinde, total vücut ışınlanması şeklinde ışınlandı (Şekil 7). Işınlama sırasında ratların nefes almalarına izin vermek ve sabit SSD (kaynak-cilt mesafesi) sağlamak için kutunun üst ve alt kısmına yoğunluğu bilinen delikli tray yerleştirildi (Şekil 8). Radyasyon dozunun fizik hesabı 31,5x30,5 cm'lik alanda, sabit SSD tekniği ile (SSD 80 cm'de) ve 2,5 cm derinlikte, ön ve arka karşılıklı iki alandan total doz 800 cGy olacak şekilde hesaplandı (1,11,52). Işınlama süresi hesaplanırken, tray faktörü dikkate alındı. Işınlama işlemi gama ışın kaynağı olan Cobalt-60 teleterapi cihazı (Theratron 780C) ile 3,13 cGy/Monitor Unite (MU) doz hızında yapıldı.

### **3.3. İLAÇ UYGULAMASI VE ÖRNEKLERİN ALINIŞ ŞEKLİ**

Aminoguanidin'i (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany) (CH<sub>6</sub>N<sub>4</sub>-1/2H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> FW.123,1, MW123,1) enjeksiyona hazırlamak için % 0,9 NaCl

solusyonu ile dilue edildi. İlacın radyoprotektör etkisini temin edebilmek maksadıyla radyasyondan bir saat önce, steril şartlarda tek kullanımlık enjektörle



**Şekil 7.** Radyasyon uygulamasında kullanılan kutu



**Şekil 8.** Radyasyon uygulaması

İntraperitoneal olarak uygulandı (17-20). İlaçların dozu ve uygulama şekilleri daha önceki deneysel çalışmalar esas alınarak belirlendi.

Işınlamadan 72 saat sonra, ketamin (50-60 mg/kg intraperitoneal) ile genel anestezi altında ratların akciğerleri alındıktan sonra sakrifiye edildi. Özel kaplar içine konularak -80°C'de çalışma gününe kadar bekletildi.

### **3.4. AKCİĞER DOKU HOMOJENATLARININ HAZIRLANMASI**

Çalışma gününe kadar, -80°C'de dondurularak saklanan akciğerden doku homojenatlarının hazırlanması sırasında yapılan tüm işlemler, buz içerisinde ve 4°C'de yürütüldü. Homojenizasyon işlemi, teflon uçlu homojenizatör ile gerçekleştirildi.

Doku homojenatlarıyla ilgili diğer metodolojik özellikler ise şu şekilde idi:

1. Akciğer dokusu çözdürüldükten sonra, 3 kez soğuk su ile yıkandı. Hassas terazi ile 1,0 g ağırlığında tartılan yaş doku örnekleri, 0,01 N HCl ile hazırlanan 5,0 ml %5'lik TCA çözeltisi ile homojenize (Jankee Kunkel IKA-Laboortechnik Ultra-Turrax T25) edildi. Doku homojenatı (1/5 w/v), 13,000 rpm'de 15 dakika santrifüje edilerek (Sigma 3K30 Laborzentrifugen GmbH, West Germany), elde edilen proteinsiz-asit süpernatant, aynı gün total ve okside glutatyon tayininde kullanıldı (53,54).

2. Buzu çözdürülen başka bir akciğer dokusu hassas terazi ile 1,5 g ağırlığında tartıldıktan sonra, 0,25 g yaş doku/ml homojenat olacak şekilde, 0,015 M PBS (pH 7,4) ile homojenize edildi (55).

3. Aynı homojenatın (1/4 w/v) geri kalan kısmı, 0,015 M PBS (pH 7,4) ile 1/10 (w/v) oranında dilüe edildi. Bu şekilde hazırlanan homojenat, 3000 rpm'de 30 dakika santrifüje edildi ve elde edilen süpernatantın bir kısmı, aynı gün MDA ölçümünde kullanıldı (56).

4. Süpernatantın diğer kısmı, 13,2000 rpm'de 30 dakika süre ile santrifüje edildi. Elde edilen süpernatant, SOD, GSH-Px, CAT aktivitelerinin ölçümünde kullanılmak üzere alikotlar halinde -80°C'de dondurularak saklandı (56).

### 3.5. MALONDİALDEHİT TAYİNİ

Lipid peroksidasyonunun yıkım ürünlerinden olan MDA'nın ölçümünde kullanılan spektrofotometrik metodların büyük bir kısmı, MDA'nın, tiyobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyona girerek, 532 nm dalga boyunda maksimum absorbanı veren pembe renkli bir kompleks oluşturması prensibine dayanmaktadır (57).

Akciğer dokusu MDA tayininde, Ohkawa ve ark.'nın geliştirdiği metod kullanıldı (58). Süpernatantlardan 0,1 ml alınıp kapaklı cam tüplere konuldu. Üzerlerine sırasıyla 0.1 ml sodyum dodesil sulfat (% 8.1), 0.75 ml asitik asit (% 20: pH=5), tiyobarbitürik asit(% 0.8) ve 0.3 ml distile su eklenerek iyice karıştırıldıktan sonra ağızları sıkıca kapatılan tüpler, kaynar su banyosunda 60 dk kaynatıldı. Musluk suyu ile soğutulan tüplere, 0.5 ml distile su ve 2.5 ml n-butanol/piridin (15:1) karışımı eklenerek vorteksle iyice karıştırıldı. Tüplerin 4°C'de 4000 rpm'de 15 dk santrifüje edilmesi ile elde edilen pembe organik fazın absorbanı, 532 nm'de, distile su ile aynı şekilde çalışılan köre karşı ölçüldü. Değerlendirme standart eğri üzerinde yapıldı. Standart eğriden elde edilen doku MDA seviyeleri (nmol/ml), aynı süpernatantlarda Lowry yöntemi (59) ile ölçülen miligram protein başına verildi (nmol MDA/ mg protein).

### 3.6. SÜPEROKSİT DİSMUTAZ AKTİVİTESİ TAYİNİ

Çalışmaya alınan ratların akciğer dokularındaki SOD aktivitesi tayininde Sun ve ark. tarafından geliştirilen metod kullanıldı (60).

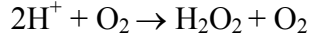
Metodun prensibi: ksantin oksidaz (XO) ile ksantin oksidasyonu sırasında açığa çıkan  $O_2^{\cdot -}$ , nitroblue tetrazolium (NBT) gibi boyar maddeleri redükleyerek formazonları oluşturmaktadır. Süperoksit anyonunun,  $H_2O_2$ 'e dismutasyonunu sağlayan SOD varlığında, XO reaksiyonları ile üretilen  $O_2^{\cdot -}$ , sürekli tüketileceğinden, NBT ile reaksiyona giren  $O_2^{\cdot -}$  miktarı azalacak ve bu yolla formazon oluşumu önlenecektir.

SOD aktivitesi, XO'nun katalizlediği tepkimede, NBT redüksiyonunun inhibisyon derecesine bağlı olarak ölçülebilir. SOD aktivitesi yükseldikçe, NBT redüksiyonu ile formazon oluşumu azalacaktır.



↑

SOD



**Çalışma:** SOD aktivitesi tayin edilecek her numune için, toplam hacim 2,45 ml olacak şekilde, aşağıdaki konsantrasyonlarda bir deney karışımı hazırlandı:

0,3 mM Ksantin	1,0 ml
150 µM NBT	0,5 ml
0,4 M Sodyum karbonat	0,3 ml
0,6 mM EDTA	0,5 ml
1 gr/L BSA	0,15 ml
<hr/>	
Deney karışımı	2,45 ml

Deney karışımı pipetlenen numune tüplerinin üzerine akciğer doku homojenatlarından elde edilen, 0,5 ml dilüe süpernatant ve deney karışımı içeren kontrol tüpüne, 0,5 ml 0,01 M fosfat tamponu (pH 7,0) ilave edildi. Deney tüpleri 25°C’de 5 dakika inkübe edildikten sonra, her birinin üzerine, eşit zaman aralıkları ile, 0,05 ml 167 U/L XO eklenerek reaksiyon başlatıldı. Tüpler, 25°C’de 20 dakika süreyle tekrar inkübe edildi. Bu sürenin sonunda, yine eşit zaman aralıkları ile tüplere 1 ml 0,8 mM CuCl<sub>2</sub> ilavesi ile reaksiyon durduruldu. Numune ve kontrol tüplerinde, formazon oluşumundan kaynaklanan renk şiddeti, 560 nm dalga boyunda, distile su körüne karşı, spektrometere okundu. SOD içermeyen kontrol tüpünde, maksimum formazon oluşumu (Optik Dansite (OD): 0,250) gözlemlendi.



**Standart serinin hazırlanması:** SOD (3300 Ü/mg solid/mg protein), 0,6 mg/ml konsantrasyonda olacak şekilde, distile su ile çözüldü. Bu stok standart 0,01 M fosfat tamponu ile dilüe edilerek, deney ortamında sırasıyla 6,25; 12,5; 25; 50; 100 ng konsantrasyonlarında olacak şekilde, SOD çalışma standartları hazırlandı ve numune gibi çalışıldı.

**Hesaplama:** Standart seri ve numune tüplerinde % inhibisyon değerleri aşağıdaki formülle hesaplandı:

$$\% \text{ inhibisyon} = \frac{(\text{Kontrol OD} - \text{Numune OD})}{\text{Kontrol OD}} \times 10$$

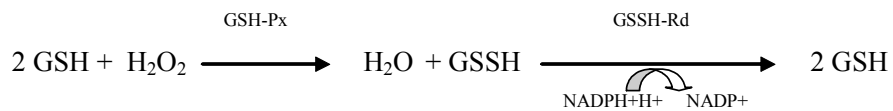
Standart seri için hesaplanan % inhibisyon değerlerine karşılık gelen SOD konsantrasyonları kullanılarak; SOD tarafından NBT redüksiyon hızının inhibisyon grafiği elde edildi. Grafik yardımı ile numunelere ait % inhibisyon değerlerinde ünite SOD değerleri hesaplandı. Bu değerler metodun uygulanması sırasında kullanılan dilüsyon faktörleri ile çarpılarak numunelerin gerçek SOD ünitelerine ulaşıldı.

Protein miktarları da tayin edilen akciğer doku homojenatlarında (59), SOD aktivitesi, spesifik aktivite cinsinden, Ü/mg protein olarak verildi.

### 3.7. GLUTATYON PEROKSİDAZ AKTİVİTESİ TAYİNİ

Akciğer dokusunda glutatyon peroksidaz (GSH-Px) aktivitesi, Paglia ve Valentine'nin birleşik enzimatik yöntemi kullanılarak tayin edildi (61).

Metodun prensibi; GSH'ın H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile oksitlenmesini katalizleyen GSH-Px reaksiyon hızının, GSSG-Rd reaksiyonu sırasında tüketilen NADPH konsantrasyonu üzerinden ölçülmesi esasına dayanmaktadır:



Birleşik enzimatik reaksiyonlarla, GSH konsantrasyonu sabit tutulduğundan; GSH-Px aktivitesi, UV-spektrofotometrede 340 nm dalga boyunda, NADPH'ın NADP'a dönüşümü sırasında gözlenen (OD) düşüşü üzerinden doğrudan tayin edilebilir.

Hazırlanan deney karışımını içeren tüplerin üzerine, 0,05 ml numune doku süpernatanı ilave edildi ve tüpler, 25°C'de 10 dakika inkübe edildi. Quartz küvetlere aktarılan inkübasyon karışımları üzerine 0,1 ml 2,2 M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pipetlenerek reaksiyon başlatıldı ve UV-spektrofotometrede 340 nm dalga boyunda, distile su körüne karşı, OD'deki düşüş 4 dakika süre ile izlendi. Ayrıca GSH'ın nonenzimatik oksidasyonunu tayin etmek için, numune yerine distile su kullanılarak (kontrol), çalışma tekrarlandı.

**Hesaplama:** Her numune ve kontrol tüpü için, 2. ve 4. dakika değerleri kullanılarak, ΔOD/dk değerleri hesaplandı. Daha sonra numune ΔOD/dk değerlerinden kontrol değerleri çıkarılarak net ΔOD/dk değerleri bulundu.

GSH-Px ünite (Ü/ml) değerleri, metodun uygulanması sırasında yapılan işlemlere karşılık gelen dilüsyon faktörleri ile çarpılarak, gerçek doku GSH-Px aktiviteleri bulundu. Akciğer dokusu GSH-Px aktivitesi, gram protein başına (Ü/g protein) hesaplanarak, spesifik aktivite cinsinden verildi.

### 3.8. KATALAZ AKTİVİTESİ TAYİNİ

Akciğer dokusunda katalaz aktivitesi tayininde Torii ve arkadaşları tarafından geliştirilen metod kullanıldı (62). Metodun H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in katalaz tarafından O<sub>2</sub> ve H<sub>2</sub>O'ya parçalanması esnasında reaksiyon karışımındaki absorbans değişiminin ölçülmesi esasına dayanmaktadır.



**Çözeltiler:** 1. 0.05 M Fosfat Tamponu (pH = 7,0)

2. %0.18 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.05 M, pH=7.0, Fosfat tamponu içinde hazırlandı)

**Çalışma:** Deney tüpüne 2 ml 0,05 M, pH = 7,0 Fosfat tamponu, 1 ml % 0,18 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pipetlendi. Ortama daha sonra 100 µl/ml katalaz standart solüsyonu pipetlenerek, 25°C’de 240 nm dalga boyunda deiyonize su körüne karşı spektrofotometrik olarak 10 dakika absorbans değişimi izlendi. Katalaz aktivitesinde, 4 dakikadan sonra bir değişim gözlenmediğinden, çalışmada katalaz aktivitesinin 4 dakika boyunca izlenmesi uygun bulundu.

**Standart serinin hazırlanması:** Standart olarak saf katalaz (Bovine Liver Catalase, Sigma) kullanıldı. 2,5, 5,0, 7,5 ve 10,0 µg/ml konsantrasyonlarda katalaz standart solüsyonu hazırlandı. Deney tüpüne 2 ml fosfat tamponu (0,05 M, pH = 7,0) ve 1 ml % 0,18 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pipetlendikten sonra ortama en son 100 µl standart eklendi. 25°C’de 240 nm dalga boyunda 4 dakika süreyle spektrofotometrik olarak absorbans değişimi izlendi. ΔOD/dk hesaplanarak bu değerlerle standart eğri çizildi. ΔOD/dk hesaplanarak, katalaz miktarları standart eğriden elde edildi. Akciğer dokusunda Lowry yöntemi (59) ile protein tayini yapılarak sonuçlar µg/g protein cinsinden verildi.

### Hesaplar:

$$x = \frac{(N \text{ OD/dk}) \times (\text{Standart konsantrasyonu})}{\text{Standart OD}} \times \text{Dilüsyon Faktörü}$$

$$x = A \text{ µg Katalaz/ml (Numunedeki katalaz miktarı)}$$

$$y = \frac{\begin{array}{l} \text{Numune µg protein} \\ 1000 \text{ µg protein} \end{array} \begin{array}{l} \nearrow A \text{ µg Katalaz} \\ \searrow y \text{ µg Katalaz} \end{array}}{A \times 1000}$$

$$y = B \text{ µg katalaz / mg protein} \times 2,8 \text{ (faktör)} = \text{Ü / mg protein}$$

### 3.9. NİTRİK OKSİT AKTİVİTESİNİN TAYİNİ

NO radikalinin çok kısa ömürlü olması, kantitatif olarak miktarının belirlenmesini güçleştirmektedir. NO, organizmada sentezlendikten hemen sonra çok

hızlı bir şekilde nitrit (NO<sub>2</sub>) ve nitrat (NO<sub>3</sub>) iyonlarına dönüşmekte ve mevcut nitrit iyonlarının %95'den fazlası da nitrat iyonlarına oksitlenmektedir. Biyolojik örneklerde NO tayini, bu stabil metabolitler (NO<sub>2</sub> ve NO<sub>3</sub>)'in ölçülmesi ile indirekt olarak yapılabilmektedir (63).

**Nitrat tayini:** Griess reaksiyonu (sülfanilamid ve N-1-naftiletilediamin maddelerinden oluşan çözelti) nitrat iyonlarına spesifik olmadığı için, biyolojik materyalde bulunan nitrat, önce nitrite redüklenir; sonra nitrit üzerinden miktarı tayin edilebilir (63,64).

Deproteinize örneklerde nitrat seviyelerinin tayini sırasında, Griess reaksiyonu ile birleştirilen nitrat redüktaz (NR) reaksiyonu kullanıldı (63,64).

İki aşamada gerçekleştirilen metodun prensibine gelince:

1. Nitrat iyonlarının, NADPH ve FAD kofaktörleri varlığında, NR tarafından nitrit iyonlarına redüklenmesi
2. Total nitrit (endojen nitrit ve NR redüksiyonu ile oluşan nitrit)'in Griess reaksiyonu ile azo türevi oluşturması esasına dayanmaktadır.

**Çözeltiler:** 1. 0.1 M fosfat tamponu, pH 7.5

2. 1 Ü/ml NR (sigma N-7265)

3. 2.0 mM NADPH

4. 0.1 mM FAD

5. Griess reaktifi

6. 100 mM KNO<sub>3</sub> (stok standart)

Taze hazırlanan NR, NADPH ve FAD çözeltileri çalışma sırasında buz üzerinde bekletilir.

**Çalışma:** Deney ortamında 0.1 ml deproteinize plazma ya da doku süpernatantı, 55 mM fosfat tamponu, 100 mÜ/ml NR, 0.2 mM NADPH ve 5µM FAD olacak şekilde gerekli pipetlemeler yapıldı. Reaksiyon karışımları 37 °C’de bir saat inkübe edildi.

İnkübasyon sonunda ortamda bulunan total nitrit miktarı, Griess reaksiyonu ile tayin edildi. Değerlendirme nitrat standart eğrisi üzerinde yapıldı.

**Standart serinin hazırlanması:** Stok KNO<sub>3</sub> (100 mM) çözeltisinden, 1.0 µmol/ml konsantrasyonda ara stok standart çözeltisi hazırlandı. Ara stok standart, deney ortamında 3.0; 6.0; 10.0; 25.0; 50.0; 100.0 nmol NO<sub>3</sub>/ml konsantrasyonlarına karşılık gelecek şekilde; distile su ile dilüe edilerek, sırasıyla 15; 30; 50; 125; 250; ve 500 nmol NO<sub>3</sub>/ ml konsantrasyonlarında standart seri hazırlandı ve deproteinize örneklerde olduğu gibi, NR ve Griess reaksiyonları gerçekleştirildi. Nitrat iyonlarının redüksiyonu ile oluşan nitrit konsantrasyonlarına karşılık gelen OD değerleri ile standart eğri çizildi.

Standart eğriden elde edilen total nitrit değerleri, metodun uygulanması sırasında yapılan işlemlere karşılık gelen dilüsyon faktörleri ile çarpılarak, gerçek doku total nitrit (NO<sub>2</sub> ve NO<sub>3</sub>) seviyeleri bulundu ve nmol/g protein olarak verildi.

### 3.10. İSTATİSTİKSEL YÖNTEM

Bu çalışmada, gruplardan elde edilen verilerin değerlendirilmesinde, SPSS For Windows’un 13.0 paket bilgisayar programı kullanıldı. Gruplardan elde edilen veriler normal dağılım gösterdiğinden parametrik testlerden one-way ANOVA testi; çoklu karşılaştırma için post-hoc testlerden Tukey HSD (Honestly Significant Difference) testi; kontrol grubuna göre karşılaştırmalar için de Dunnett testi kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık için p< 0.05 olan değerler anlamlı olarak kabul edildi. Değerler, ortalama ± standart hata olarak verildi.

## 4. BULGULAR

Bu çalışmada kontrol grubu hariç radyasyon ve radyasyon+aminoguanidin gruplarına alınan ratlara total vücut ışınlanması şeklinde Cobalt-60 teleterapi cihazı ile total doz 800 cGy olacak şekilde radyasyon uygulandı. Akciğerin oksidan/antioksidan durumunun göstergesi olarak CAT, GSH-PX ve SOD aktiviteleri, lipid peroksidasyonunun göstergesi olarak MDA ve NO düzeyleri ölçüldü. Bulgular Tablo 8'de verildi.

**Tablo 8: Gruplarda doku enzim düzeyleri**

Gruplar	CAT Ü/mgprotein ±SD	GSH-PX Ü/g protein ±SD	SOD Ü/mgprotein ±SD	MDA nmol/mg protein ±SD	NO nmol/g protein ±SD
<b>Kontrol (I)</b>	8,492 ± 0,516	80,00 ± 2,35	0,781 ± 0,021	2,433 ± 0,517	1,409 ± 0,631
<b>RT (II)</b>	7,260 ± 0,268	31,92 ± 2,16	0,415 ± 0,066	4,111 ± 0,590	2,567 ± 0,379
<b>RT+AG (III)</b>	9,816 ± 1,771	48,09 ± 2,09	0,872 ± 0,057	3,022 ± 0,322	1,571 ± 0,504

(CAT: Katalaz, GSH-Px: Glutasyon peroksidaz, MDA: Malondialdehit, NO: nitrik oksit, SD: Standart sapma)

Bulguların istatistik yöntemle elde edilen p değerleri Tablo 9’da verildi.

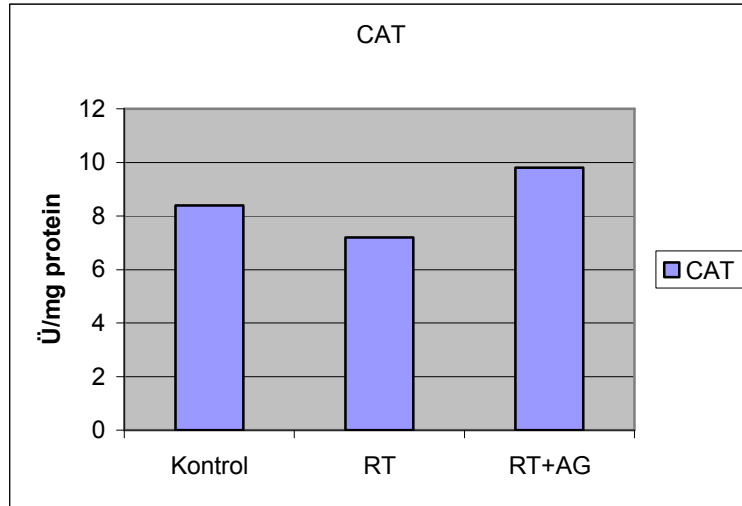
**Tablo 9:** Gruplar arası doku enzim düzeylerinin p değerleri

Gruplar	CAT	GSH-PX	SOD	MDA	NO
I-II	0,042	0,001	0,001	0,001	0,001
I-III	0,027	0,001	0,002	0,032	0,763 (AD)
II-III	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001

(CAT: Katalaz, GSH-Px: Glutasyon peroksidaz, MDA: Malondialdehit, NO: nitrik oksit, AD: Anlamli değil)

#### 4.1. Akciğer dokusunda CAT aktivitesi

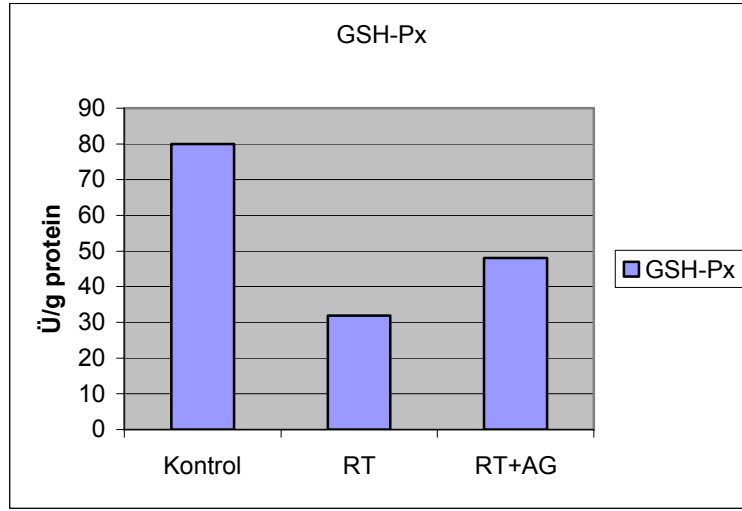
CAT aktiviteleri şekil 8’de gösterildi. CAT aktivitesi RT grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düşük bulundu ( $p < 0,042$ ). RT+AG grubunda ise RT ve kontrol grubuna göre anlamlı şekilde artma saptandı (sırası ile  $p < 0,001$  ve  $p < 0,027$ ).



**Şekil 9:** Grupların doku CAT aktiviteleri

#### 4.2. Akciğer dokusunda GSH-Px aktivitesi

GSH-Px aktiviteleri şekil 9’da gösterildi. GSH-Px aktivitesi RT grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düşük bulundu ( $p < 0,001$ ). RT+AG grubunda ise RT ve kontrol grubuna göre anlamlı şekilde artma saptandı (sırası ile  $p < 0,001$  ve  $p < 0,001$ ).

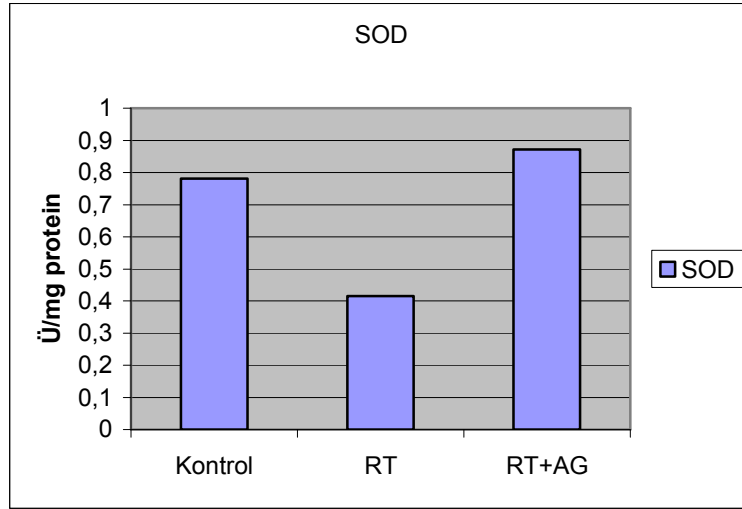


**Şekil 10:** Grupların doku GSH-Px aktiviteleri



### 4. 3. Akciğer dokusunda SOD aktivitesi

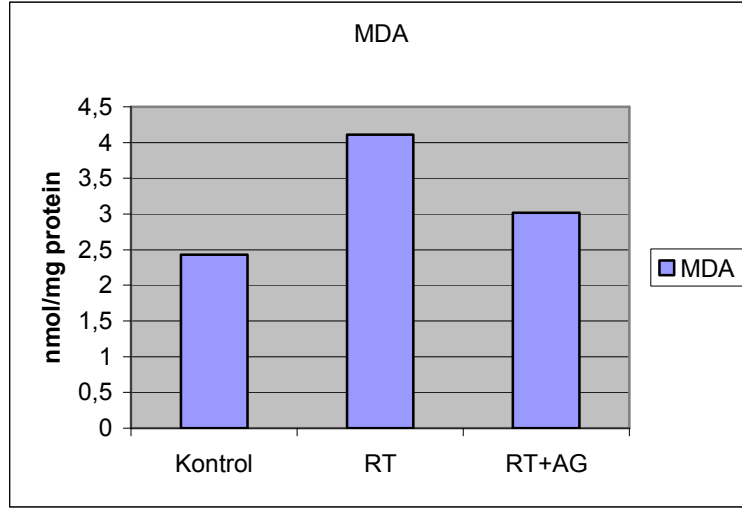
SOD aktiviteleri şekil 10'da gösterildi. SOD aktivitesi RT grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düşük bulundu ( $p < 0,001$ ). RT+AG grubunda ise RT ve kontrol grubuna göre anlamlı şekilde artma saptandı (sırası ile  $p < 0,001$  ve  $p < 0,002$ ).



Şekil 11: Grupların doku SOD aktiviteleri

#### 4.4. Akciğer dokusunda MDA düzeyleri

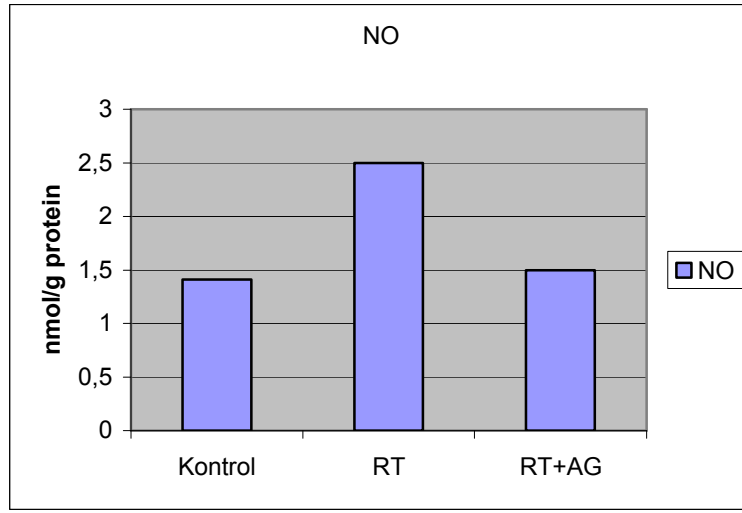
MDA düzeyleri şekil 11’de gösterildi. MDA düzeyi RT grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış bulundu ( $p < 0,001$ ). RT+AG grubunda ise RT grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük saptandı ( $p < 0,001$ ).



Şekil 12: Grupların doku MDA düzeyleri

#### 4.5. Akciğer dokusunda NO düzeyleri

NO düzeyleri şekil 12’de gösterildi. NO düzeyleri RT grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu ( $p < 0,001$ ). RT+AG grubunda ise RT grubuna göre anlamlı şekilde düşük saptandı ( $p < 0,001$ ). RT+AG grubunda, RT grubuna göre gözlenen bu düşüş, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p < 0,707$ ).



Şekil 13: Grupların doku NO düzeyleri

## 5. TARTIŞMA

Radyoterapi (RT)'de, hedef hücre ya da dokularda hasar oluşturmak için iyonlaştırıcı radyasyon kullanılır. Bununla beraber iyonlaştırıcı radyasyon, normal dokularda da yan etkilere neden olabilir. Radyoterapinin amacı, tümör dokusuna maksimum dozu verirken, normal dokuya minimum zarar vermektir. Radyoterapi dozu arttıkça, lokal tümör kontrolü artarken, normal dokunun zarar görmesi ihtimali de artar. Elde edilen en iyi tümör kontrolü, normal dokunun radyoterapiye toleransına bağlıdır (2,3).

İyonlaştırıcı radyasyon, çoğu tümörün tedavisinde etkili olup kanserli hastaların yaklaşık %50-60'ında tedavinin bir parçasıdır (1). Radyoterapi, birçok torasik malignitede çok önemli bir tedavi modalitesidir. Radyoterapiye bağlı pulmoner toksisiteyle sıkça karşılaşılmakta olup, bu durum RT dozunu sınırlayan ciddi bir problemdir. Akciğer kanseri, meme kanseri, lenfoma ve timoma nedeni ile RT uygulanan hastaların %30'unda radyoterapi ile ilişkili pulmoner semptomlar meydana gelir. Hodgkin lenfoma, özefagus kanseri ve total vücut ışınlanması sonrası kemik iliği transplantasyonu gibi kombine tedavi modalitelerinin uygulandığı durumlarda da RT'ye bağlı pulmoner toksisite sıklıkla görülür (3,10).

Oksidatif stres, aşırı serbest radikal üretimi ve/veya zayıf antioksidan savunmanın olduğu durumlarda meydana gelir ve yapısal ve fonksiyonel değişikliklere neden olan biomoleküllerin kimyasal değişimleri ile sonuçlanır. SOR üretimi radyasyona bağlı doku hasarının patogenezinde önemli bir rol oynar. Bu nedenle

SOR'ni inhibe eden veya temizleyici ilaçlar iyonlaştırıcı radyasyon uygulanan normal dokulardaki hasarı azaltmada yararlı olabilirler (11). Bu amaçla çalışmada, antineoplastik ve toksik ilaçlarla yapılan deneysel çalışmalarda SOR üzerine inhibe edici veya temizleyici etkisi gösterilmiş olan AG kullanıldı.

İyonlaştırıcı radyasyonun biyolojik ve ölümcül etkileri için primer hedefin hücrel DNA olduğu bilinmektedir. İyonlaştırıcı radyasyona bağlı hücrel DNA hasarının yaklaşık %60-70'i SOR ile meydana gelir. SOR, iyonlaştırıcı radyasyonun etkisi ile su moleküllerinin radyolizi neticesinde hızlı bir şekilde oluşur. Sekonder reaksiyonlar da oluşan SOR'nin düzeyinin artmasına yol açar. DNA'nın yanı sıra lipid ve proteinler de iyonlaştırıcı radyasyona bağlı serbest radikallerden etkilenir. Lipid peroksidasyonunun, hücre membranlarındaki hasarın önemli nedenlerinden ve SOR'ne bağlı doku hasarının gelişmesine katkıda bulunan faktör olduğu gösterilmiştir (8,11). Lipid peroksidasyon ürünlerinden olan MDA, radyasyona bağlı oksidatif hasarın göstergesidir. Çalışmalarda tüm vücut ışınlanması veya lokal ışınlama yapılan ratların akciğer, karaciğer, kolon, kalp ve ileum gibi organlarında radyasyona bağlı hasarın göstergesi olarak doku MDA düzeylerinde artma olduğu gösterilmiştir (1,11,52,65). Bu çalışmada da radyasyona bağlı akciğer hasarını göstermek için doku MDA düzeyleri ölçüldü. Radyasyon grubunda kontrol grubuna göre MDA düzeyinde artma saptandı. Ayrıca oksidatif stresin aşırı SOR üretimine bağlı olduğunu göstermek amacı ile doku NO düzeyleri ölçüldü. Yine radyasyon grubunda kontrol grubuna göre NO düzeyinde artma saptandı. MDA ve NO düzeylerinde artış radyasyonun akciğerde oksidatif hasara yol açtığını göstermektedir.

SOR'nin artışına bağlı oluşan oksidatif hasara karşı hücreleri, bazı enzimatik veya non-enzimatik savunma sistemleri korur. Oksidatif streden hücreleri koruyan SOR temizleyicisi SOD, GSH-Px ve CAT gibi antioksidanlar, enzimatik savunma sistemde yer alırlar. Vit E, melatonin ve glutatyon gibi bazı antioksidanlar ise non-enzimatik savunma sistemde yer alırlar.

Hücrenin serbest radikallere karşı oluşturduğu savunma mekanizması kendi içerisinde hem sinerjistik hem de antagonistik etkili olabilmektedir. Örneğin, CAT ve GSH-Px, hücrenin farklı kısımlarında üretilen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> üzerinde aynı katalitik aktiviteye

sahiptir. Diğer taraftan SOD, CAT ve GSH-Px birbirlerini karşılıklı desteklemekte; CAT ve GSH-Px'in oksidasyonuna neden olan  $O_2^{\cdot-}$ , SOD tarafından  $H_2O_2$ 'e çevrilirken; SOD'ın inaktivasyonuna yol açan  $H_2O_2$ , CAT ve GSH-Px tarafından yıkılmaktadır (23,24). Bu reaksiyonlar, serbest radikalleri metabolize eden enzimler arasında düzenleyici etkileşimlerin olduğunu göstermektedir.

Çalışmada radyasyon grubunda kontrol grubuna göre SOD, GSH-Px ve CAT aktivitelerinde azalma saptandı. Bu durum, aşırı SOR üretimine karşı antioksidan sistemin yetersiz kaldığını göstermektedir. RT+AG verilen grupta SOD, GSH-Px ve CAT aktivitelerinde artış olduğu gözlemlendi. Bu üç antioksidan enzimin de birbirlerinin etkilerini potansiyelize ettiğini göstermektedir. Bunun nedeni AG, dokuda iNOS'u inhibe ederek ortamdaki NO düzeyini azaltırken, cNOS'a bağlı olarak sentezlenen NO, SOD ile süperoksit için yarışır. Sonuçta reaksiyon hızı yüksek olan NO ile süperoksit birleşerek ortamda peroksinitrit oluşumuna neden olur. SOD daha yavaş reaksiyon verdiği için ortamda yüksek miktarda bulunabilir. Dolayısı ile SOD tarafından süperoksitten oluşturulan  $H_2O_2$  miktarı az olacağından ortamdaki CAT ve GSH-Px miktarı da fazla olacaktır.

Ayrıca çalışmada, MDA düzeyi RT grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artmış bulunurken, RT+AG grubunda ise RT grubuna göre anlamlı şekilde düşük saptandı. CAT, GSH-Px ve SOD aktiviteleri RT grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düşük bulunurken, RT+AG grubunda ise bu aktivitelerde RT ve kontrol grubuna göre anlamlı şekilde artma saptandı. MDA düzeyinde RT+AG grubunda, RT grubuna göre anlamlı düşüş saptandı. RT+AG grubunda RT grubuna göre antioksidan enzim (CAT, GSH-Px ve SOD) düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı olan artış kontrol grubuna göre de anlamlı saptandı.

NO, fizyolojik ve patolojik olaylarda rol alır. Düşük konsantrasyonlarda güvenli olup fizyolojik olaylarda rol alırken, yüksek konsantrasyonlarda infeksiyon ve inflamasyonlarda rol oynar (19). Akut akciğer hasarı ve kolonun inflamatuvar lezyonlarında NOS ekspresyonunun, süperoksit ve peroksinitrit üretimi ile sonuçlanan NO'nin aşırı üretimine neden olduğu gösterilmiştir. Akciğer fibrozisinde hücrel hasara infiltratif hücreler tarafından üretilen SOR aracılık eder. Aktive makrofajların hem NO

hem de peroksinitrit ürettiği gösterilmiştir. Peroksinitrit en potent oksidan olup süperoksit radikalleri ile NO'in reaksiyonunda hızlı bir şekilde üretilir (66). Nötrofil ve makrofajdan üretilen serbest nitrojen radikalleri, sitotoksisitede ve akciğer hastalığının patogenezinde önemli rol oynar. Örneğin solunan havada NO düzeylerindeki artışın alveolitis, astım ve bronşektazi ile ilgili olduğu gösterilmiştir (17-19).

AG, geri dönüşümsüz (irreversibil) iNOS inhibitörüdür (12-14). AG ve derivelerinin antikanser ve antiviral etkiye sahip olduğu; in vitro civciv fibroblastlarının Rous sarkom virus transformasyonunun, farede P388 lösemisinde ve kültürde Ehrlich asitlerinin hücre büyüme proliferasyonunu inhibe etmesi ile gösterilmiştir (67). Diğer çalışmalar AG'in 8 derivesinin ribonükleik asit redüktaz aktivitesini inhibe ederek in vitro insan lösemi hücrelerine karşı etkili olduğunu göstermiştir (67). AG'in diyabetik rat modellerinde, yara iyileşme sürecinin bir kısmında glikoza bağlı angiogenezin inhibisyonunu durdurduğu gösterilmiştir (18).

Sitokinler, lipopolisakkaritler ve ortam pH'da düşme iNOS salınımını artırır. Akciğerde NO'in hücreyel kaynağı, interstisyel makrofajlar, alveolar tip II epitelyal hücreler, alveolar makrofajlar ve endotelyumdur (69). İyonlaştırıcı radyasyona bağlı akciğer hasarının mekanizması net olarak bilinmemekle beraber, sitokin aktivitesi ve oksidatif strese bağlı olduğuna inanılmaktadır (9,10). Radyasyona bağlı akciğer hasarı, patolojik olarak aktif makrofajlarda artma ile karakterize erken inflamatuvar cevapla ilişkilidir (10).

Akciğer hasarına yol açan NO'in etkisinin; mitokondrial Fe-sülfür içeren enzimlerin inaktivasyonu, DNA hasarının indüksiyonu, siklooksijenazın aktivasyonu ile inflamatuvar cevabın uyarılması ve prostaglandin sentezinin arttırılmasına bağlı olduğu bilinmektedir. Ayrıca NO'in, nötrofil aracılı hücre ölümü ve süperoksit aracılı toksisite ile alveolar epitelyal hücreleri koruduğu ve NO inhalasyonunun IL-1'in stimüle ettiği alveolar yüzeye nötrofil göçünü azalttığı da bildirilmiştir (68). Klinik olarak NO inhalasyonu, ödemi önleyerek akut respiratuvar distres sendrom (ARDS)'lu hastalarda kapiller basıncı azaltmaktadır (25,28).

NO ve peroksinitrite bağlı doku hasarını azaltmanın yollarından birisi de, AG gibi iNOS'un spesifik inhibitörü ile NO'in aşırı üretimini inhibe etmektir. AG'in

kullanımı ile diyabet, ensefalomiyelit ve doksorubisine bağlı kardiotoksisite gibi NO'in aşırı üretimine bağlanan patofizyolojik değişikliklerin şiddetinde azalma bildirilmiştir (17).

Diyabet, serbest radikallerin hücrel hasara yol açtığı hastalıklar içerisinde en iyi bilinen örneklerden biridir. AG'in, diyabette aşırı NO üretiminin neden olduğu oksidatif stres ve lipid peroksidasyonunu azaltarak patofizyolojik değişikliklerin şiddetini azalttığı gösterilmiştir.

iNOS izoformu tarafından oluşturulan NO sentezi çeşitli sitokinler ile oluşan inflamatuvar hava yolları hastalıklarının patofizyolojisinde rol oynar. NO'in tümörenezisine etkisi kompleks olup metaztazda olduğu gibi tümör progresyonu ile ilgili olan artmış NOS ekspresyonu ile ilişkilidir. Yüksek konsantrasyonlarda iNOS ile üretilen NO hem sitotoksik hem de sitostatik özellikleri ile karsinogenezin ilk adımı olan DNA hasarına yol açar. Düşük konsantrasyonlarda cNOS tarafından oluşturulur ve anjiogenetik etkiye sahip NO'in antiapoptotik etkisi ile artar. Bu nedenle kanserden korunma ve kanseri tedavi etme çalışmalarında iNOS için spesifik NOS inhibitörlerinin seçimi önemlidir. Bu veri akciğer kanserinden korunmada in vivo akciğer kanseri modelinde iNOS inhibitörleri ile ilgili prelinik çalışmaların temelini oluşturmuştur (67).

Bleomisine (BLM) bağlı akciğer fibrozisi, başlangıçta kısmen nötrofiller ve makrofajlar tarafından üretilen hidroksi radikalleri, süperoksit iyonları ve hidrojen peroksit gibi SOR'nin akciğerde yol açtığı inflamatuvar reaksiyona bağlıdır. SOR'nin akciğer parenkimini hasara uğratarak akciğer fibrozisine yol açtığına inanılır. Son zamanlarda yayınlanan bazı çalışmalarda, ratlarda BLM bağlı idyopatik pulmoner fibrozis gelişmesi sırasında bronkoalveolar lavaj sıvısında NO düzeyinde artma ve mRNA, iNOS ve NOS proteinlerinin overekspresyonu gösterilmiştir (19).

Yıldırım ve ark. bir çalışmada, BLM'e bağlı akciğer fibrozisinin patogenezisinde NO'in rol oynadığını ve antioksidan etkili iNOS inhibitörü AG'nin, oluşturulan bu hasara karşı koruyucu etki gösterdiğini bildirmişlerdir (19).



Giri ve ark. yaptıkları bir çalışmalarında ratlarda oral yolla AG uygulamasının, yüksek dozlarda sistemik bir toksisiteye yol açmadan bleomisin'e bağlı akciğer fibrozisini, hem biyokimyasal hem de morfolojik olarak azalttığını ve nitrik oksitin bleomisine bağlı akciğer fibrozisinde önemli rol oynadığını göstermişlerdir (17).

Wilhelm ve ark., N-nitroso-N-methylurethane (NNMU)'a bağlı akut akciğer hasarının, NO ile ilişkili olduğunu ve NOS inhibitörlerinin NNMU'ya bağlı alveolar hasarı azalttığını göstermişlerdir (68,69).

Paraquat, oksidatif strese neden olan bir maddedir. Serbest radikaller oluşturarak, akciğer, karaciğer, miyokard ve böbrekte nekrotik hasara neden olan oldukça toksik bir herbisid (bitki öldürücü) dir. Paraquat, paraquat radikalleri ile oksijene ekstra elektron taşıyarak süperoksit radikallerine çevrilir. Süperoksit radikalleri de SOD enzimi ile hidrojen peroksit ve hidroksil radikallerine dönüşür. Oluşan bu toksik radikaller CAT veya glutatyon varlığında GSH-Px ile detoksifiye edilir. Bu SOR özellikle de hidroksil radikalleri doymamış yağ asitleri ile tepkimeye girerek lipid-hidroperoksit ürünlerine dönüşür ve erken dönemde akciğer epitelyumunu yıkarak akciğer fibrozisine yol açar (18).

Adel ve ark., ratlarda paraquata bağlı oluşan akciğer toksisitesinde NO'in rol oynadığını ve bu hasara karşı AG'nin sitoprotektif etki gösterdiğini bildirmişlerdir (18).

Nozaki ve ark., ratlarda iyonlaştırıcı radyasyon maruziyeti sonrası iNOS aracılı oluşan NO'in, pulmoner inflamasyonda önemli bir mediyatör olarak rol oynadığını ve oluşturulan akciğer pnömonisi modelinde, iNOS ekspresyonunun ışınlanan akciğer dokusunda gözlenirken, ışınlanmayan akciğerde tespit edilemediğini göstermişlerdir. Bu ekspresyonun radyasyondan sonraki 3 ila 7 günler arasında olduğunu bildirmişlerdir (70). Ayrıca kolon ve ileumda da irradyasyon sonrası iNOS ekspresyonu olduğu tespit edilmiştir (71).

Bu çalışmada tüm vücut ışınlanması yapılan ratların akciğer dokusunda radyasyon uygulamasını takiben 72 saatte NO düzeylerinde kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı artış olduğu saptandı. Bu sonuçlarımız Nozaki ve ark.'nın verileriyle uygunluk göstermektedir. RT+AG grubunda ise RT grubuna göre anlamlı şekilde düşüş

görüldü. Ancak RT+AG ile RT grubu arasındaki bu düşme, kontrol grubu ile sayısal değer olarak çok yakın olup istatistiksel olarak anlamlı düzeyde saptanmadı. Bu veriler, iyonlaştırıcı radyasyona bağlı akciğer hasarının NO artışı sonucu meydana geldiğini desteklemektedir. Ayrıca selektif iNOS inhibitörü AG uygulamasının, hem radyasyona bağlı oksidatif stres sonucu oluşan SOR'ne antioksidan etki göstererek hem de NO ve NO radikallerinin oluşumunu azaltarak akciğer hasarını azaltıcı etki yaptığını göstermektedir.

Akciğer dokusunda, RT alan grubunda CAT, SOD ve GSH-Px aktivitelerinde azalma ve MDA seviyesinde artma; buna karşılık RT+AG grubunda CAT, SOD ve GSH-Px aktivitelerinde artma ve MDA seviyesinde azalma tespit edilmesi, AG'in koruyucu etkisinin antioksidan aktivitesine bağlı olduğunu gösterebilir. Bu veriler daha önce oksidan ajanlarla yapılan çalışmalarda gösterildiği gibi, iyonlaştırıcı radyasyona bağlı gelişen akciğer hasarının SOR'ne bağlı olarak geliştiğini ve AG'in etkisinin antioksidan yolla olabileceğini desteklemektedir.

AG yüzyılı aşkın bir süreden beri bilinmesine rağmen genel olarak biguanid grubu antidiyabetikler, bir takım yan etkilerinin olması ve daha etkili antidiyabetiklerin üretilmesi nedeni ile diyabet tedavisinde pek tercih edilmemektedir (50,51).

Böylece SOR'ni inhibe eden ve/veya temizleyici antioksidan ilaçlar iyonlaştırıcı radyasyona maruz kalan normal dokulardaki hasarı azaltarak kanserli hastalarda yararlı olabilirler. Ancak, gerek prelinik ve gerekse klinik daha fazla çalışma yapılması ve özellikle etki mekanizması ve yan etki profilinin daha net ortaya çıkarılması gerekmektedir.

## 6. SONUÇLAR

Ratlarda 8 Gy tüm vücut ışınlaması yapılarak iyonlaştırıcı radyasyona bağlı akciğer hasarı oluşturuldu, bunun göstergesi olan lipid peroksidasyon ürünlerinden MDA düzeyi, RT grubunda kontrol grubuna göre yüksek bulundu.

İyonlaştırıcı radyasyon uygulamasına bağlı akciğer hasarı oluşumunda NO'nin katkısının olabileceği; bunun göstergesinin de RT grubunda kontrol grubuna göre NO düzeylerinin daha yüksek saptanışı söylenebilir.

İyonlaştırıcı radyasyon uygulanması ile CAT, GSH-PX ve SOD gibi antioksidan enzimlerin etkilendiği ve anlamlı azalma meydana geldiği görüldü. Bu da iyonlaştırıcı radyasyonun oluşturduğu hasarın, serbest radikallerin aşırı üretilmesi; buna karşın antioksidan sistemin yeterince çalışmaması neticesinde meydana gelebileceğini göstermektedir.

RT grubunda doku MDA düzeyinde artma olması, akciğer hasarı sırasında özellikle de membran yapılarında lipid peroksidasyonunun arttığını göstermektedir. AG uygulaması ile MDA düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı azalma görüldü.

RT+AG grubunda her üç antioksidan enzim aktivitesinde de artış görülmesi, AG'nin antioksidan etkiye sahip bir ajan olduğunu kanıtladı.

AG uygulamasına baēlı olarak doku NO düzeylerinde azalmaya neden olması, iNOS inhibitörü olan AG'nin NO oluşumunu önleyerek doku hasarı geliŐimine karşı koruyucu etki yaptığını göstermektedir.

Selektif iNOS inhibitörü ve antioksidan etkileri gösterilen bir ajan olan AG'in, iyonlaştırıcı radyasyona baēlı akciēer hasarına karşı koruyucu olarak kullanılması, çalıŐmamızın verilerinden hareketle önerilebilir. Ancak, etki mekanizmalarının daha iyi anlaŐılması, doz ve tolerabilite konularının daha da aıklıēa kavuŐması için, preklinik ve klinik çalıŐmalara gerek vardır. ÇalıŐmamızın gelecekte yapılacak olan bu çalıŐmalara ıŐık tutacaēı kanaatindeyiz.

## KAYNAKLAR

1. Şener G, Atasoy BM, Ersoy Y, et al. Melatonin protects against ionizing radiation-induced oxidative damage in corpus cavernosum and urinary bladder in rats. *J Pineal Res* 2004;37:241-6.
2. Perez CA, Brady LW. Principles and practice of radiation oncology (4nd ed). Lippincott Company, Philadelphia, 2004.
3. Cox JD, Ang KK. Radiation Oncology Rational, Technique, Results (8th ed). Mosby, 2003.
4. Vujaskovic Z, Marks LB, Anscher MS. The physical parameters and molecular events associated with radiation-induced lung toxicity. *Semin Radiat Oncol* 2000; 10:296-307.
5. Erkan Topuz, Klinik Onkoloji. İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü yayınları, 2000.
6. Kayıhan Engin, Nihat Özyardımcı. Akciğer Kanseri Tanı ve Tedavide Temel İlkeler ve Uygulamalar (1. Basım). Avrupa Tıp Kitapçılık Ltd. Şti., İstanbul, 2001.
7. Hall EJ. Radiobiology for the radiologist (5th ed). Lippincott Company, Philadelphia, 2000.
8. Özalpan A. Temel radyobiyoloji (1. Basım). Haliç Üniversitesi Yayınları, 2001.
9. Rubin P, Johnston CJ, Williams JP, et al. A perpetual cascade of cytokines postirradiation leads to pulmonary fibrosis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995;33:99-109.
10. Liguang C, David MB, Zahid NR, et al. The protective effect of recombinant human keratinocyte growth factor on radiation-induced pulmonary toxicity in rats. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004;60:1520-9.
11. Şener G, Jahovic N, Tosun O, et al. Melatonin ameliorates ionizing radiation-induced oxidative organ damage in rats. *Life Sciences* 2003;74:563-72.

12. Misko TP, Moore WM, Kasten TP, et al. Selective inhibition of the inducible nitric oxide synthase by aminoguanidine. *Eur J Pharmacol* 1993;233:119-25.
13. Cross AH, Misko TP, Lin RF, et al. Aminoguanidine an inhibitor of inducible nitric oxide synthase ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis in SJL mice. *J Clin Invest* 1996;93:2684-90.
14. Suzuki N, Sakamoto A, Ogawa R. Effect of L-canavanine, an inhibitor of nitric oxide synthase, on myocardial dysfunction during septic shock. *J Nippon Med Sch* 2002;69:13-8.
15. Ihm SH, Yoo HJ, Park SW, et al. Effect of aminoguanidine on lipid peroxidation in streptozotocin-induced diabetic rats. *Metabolism* 1999;48:1141-5.
16. Courderot-Masuyer C, Dalloz F, Maupoil V, et al. Antioxidant properties of aminoguanidine. *Fund Clin Pharmacol* 1999;13:535-40.
17. Giri SN, Biring I, Nguyen T, et al. Abrogation of bleomycin-induced lung fibrosis by nitric oxide synthase inhibitor, aminoguanidine in mice. *Nitric Oxide* 2002;7(2):109-18.
18. Adel M, Gado AM, Al-Shabanah OA, et al. Protective effect of aminoguanidine against paraquat-induced oxidative stress in the lung of mice. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2002;132:391-7.
19. Yıldırım Z, Türkoz Y, Kotuk M, et al. Effect of aminoguanidine and antioxidant erdosteine on bleomycin-induced lung fibrosis in rats. *Nitric Oxide* 2004;11:156-65.
20. Sahna E, Parlakpınar H, Cihan OF, et al. Effect of aminoguanidine against renal ischaemia-reperfusion injury in rats. *Cell Biochem Funct* 2006;24:137-41.
21. Burçak G, Gülnur A. Oksidatif DNA hasarı ve yaşlanma. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi* 2004;35:159-69.
22. Mercan U. Toksikolojide serbest radikallerin önemi. *YYU Vet Fak Derg* 2004;15:91-6
23. Fridovich L. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* 1995;64: 97-112.

24. Akkuş İ. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Mimoza Basın Yayın Dağıtım, Konya 1995, s:32-42
25. Türköz Y, Özerol E. Nitrik oksit'in etkileri ve patolojik rolleri. Turgut Özal Tıp Dergisi 1997;4(4):453-61.
26. Atalık KE, Doğan N. Nitrik oksit ve fizyolojik etkileri. Genel Tıp Dergisi 1997;7(3):167-9.
27. Marletta MA. Nitric oxide synthase structure and mechanism. J Biol Chem 1993;268:1231-5.
28. Özkan M. Nitrik oksit ve akciğerler. Toraks Dergisi 2003;4(1):88-94.
29. Dweik R. The promise and reality of nitric oxide in the diagnosis and treatment of lung disease. Clev Clin J Med 2001;68:486-93.
30. Al-Ali MK, Howarth PH. Nitric oxide and the respiratory system in health and disease. Respir Med 1998;92:701-15
31. Jang AS, Choi IS, Lee S, et al. Nitric oxide metabolites in induced sputum; a marker of airway inflammation in asthmatic subjects. Clin Exp Allergy 1999;29:1139-42.
32. Vargas HM, Cuevas JM, Chaudhuri G. Comparison of the inhibitory potencies of N(G)-methyl-, N(G)-nitro- and N(G)-amino-L-arginine on EDRF function in the rat: evidence for continuous basal EDRF release. J Pharmacol Exp Ther 1991;257:1208-11.
33. Fukuto JM, Chaudhuri G. Inhibition of constitutive and inducible nitric oxide synthase: potential selective inhibition. Ann Rev Pharmacol Toxicol 1995;35:165-9.
34. Synder SH. Nitric oxide as a neuronal Messenger. TIPS 1991;12:125-8.
35. Kurutaş EB, Güler Fİ, Kılınç M. Serbest Radikaller Arşiv 2004;13:120-32.
36. Köse K, Doğan P. Lipid peroksidasyonu. Erciyes Tıp Dergisi 1992;Prof. Dr. Ahmet Bilge Ek Sayısı:340-50.
37. Halliwell B. Free radicals and antioxidants: a personal view. Nutr Rev. 1994;52: 253-65.

38. Cross CE, Halliwell B, Borish A, et al. Oxygen radicals and human disease. *Ann Intern Med* 1987;107:526-45.
39. Jenkins RR, Teng J. Catalase activity in skeletal muscle of varying fiber types. *Experientia* 1981;37:67-8.
40. Tanırgan G, Koldaş M, Uras F. Serbest radikaller: An introduction to free radical biochemistry. *Haseki Tıp Bülteni* 1994;32(4):304-8.
41. Mason KA, Komaki R, Cox JD, et al. "Biology-based combined-modalite radioterapy : Workshop report" *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001;50:1079-89.
42. Emami B, Lyman J, Brown A, et al. Tolerance of normal tissue to therapeutic irradiation. *Int J Radiation Oncol Biol Phys* 1991;21:109-22.
43. Sasaki R, Soejima T, Matsumoto A, et al: Clinical Significance of pulmonary surfactant proteins. A for the early detection of radiation pneumonitis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001;50 (2), 301-7.
44. Nilsson BO. Biological effects of aminoguanidine: An update. *Inflamm Res.*1999;48:509-15.
45. Nilsson BO. Biological effects of aminoguanidine: An update. *Inflamm Res.*1999;48:509-15.
46. Stjernborg L, Persson L. Stabilization of S-adenosylmethionine decarboxylase by aminoguanidine. *Biochem Pharmacol* 1993;45:1174-6.
47. Svensson F, Mett H, Persson L. CGP 48664, a potent and specific S-adenosylmethionine decarboxylase inhibitor: effects on regulation and stability of enzyme. *Biochem J* 1997;322: 297-302.
48. Szabo C, Ferrer-Sueta G, Zingarelli B, et al. Mercaptoethylguanidine and guanidine inhibitors of nitric oxide synthase react with peroxynitrite and protect against peroxynitrite-induced oxidative damage. *J Biol Chem* 1997;272:9030-6
49. Fujisawa H, Nishikawa T, Zhu BH, et al. Aminoguanidine supplementation delays the onset of senescence in vitro in dermal fibroblast-like cells from senescence-accelerated mice. *J Geront* 1999;54:276-82.



50. Jakus V, Rietbrock N. Advanced glycation end-products and the progress of diabetic vascular complications. *Physiol Res* 2004;53:131-42.
51. Thornalley PJ. Use of aminoguanidine (Pimagedine) to prevent the formation of advanced glycation endproducts. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2003;419:31-40.
52. Orhan O. Ratlarda tüm vücut ışınlaması sonrası Vitamin E ve amifostinin karaciğerde radyoprotektif etkilerinin lipid peroksidasyonu yönünden değerlendirilmesi. *Tıpta Uzmanlık Tezi, Kayseri* 2002.
53. Anderson ME. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. In: Colowick SP, Kaplan NO (eds), *Methods Enzymol Volume 77*. Academic Press, Inc. New York, San Fransisco, London, 1981, pp. 548-55.
54. Tietze F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione. *Anal Biochem* 1969;27:502-22.
55. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. In: Colowick SP, Kaplan NO (eds), *Methods Enzymol Volume 52*. Academic Press, Inc. New York, San Fransisco, London, 1978, pp. 302-10.
56. Sewerynek E, Reiter RJ, Melchiorri D, et al. Oxidative damage in the liver induced by ischemia reperfusion: Protection by melatonin. *Hepatogastroenterology* 1996;43:898-905.
57. Yagi K. Assay for blood plasma or serum. In: Colowick SP, Kaplan NO (eds), *Methods Enzymol Volume 105*. Academic Press, Inc. New York, San Fransisco, London, 1984, pp. 328-31.
58. Ohkawa W, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979;95:351-58.
59. Lowry OH, Roserbrough NJ, Farr AL, et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-75.
60. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of süperoxide dismutase. *Clin Chem* 1988;34/3:497-500.

61. Paglia DE, Valentina WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967;70:158-69.
62. Torii KK, Hayashi S, Nakamoto H, et al. Properties of *Aspergillus niger* catalase. *J Biochem* 1982;92:1449-56.
63. Moshage H, Kok B, Huizenga JR, et al. Nitrite and nitrate determinations in plasma: A critical evaluation. *Clin Chem* 1995;41(6):892-6.
64. Bories PN, Bories C. Nitrate determination in biological fluids by an enzymatic one-step assay with nitrate reductase. *Clin Chem* 1995;41(6):904-7.
65. Karahacıoğlu E, Yıldız OG, Saraymen R. Ratlarda torakal radyoterapi ile simültane paklitaksel (Taxol®) uygulamasının kardiyak doku üzerine etkilerinin lipid peroksidasyonu ve histopatoloji yönünden değerlendirilmesi. *Türk onkoloji Dergisi* 1999;14(3):128-33.
66. Szabo C, Ferrer-Sueta G, Zingarelli B, et al. Mercaptoethylguanidine and guanidine inhibitors of nitric-oxide synthase react with peroxynitrite and protect against peroxynitrite-induced oxidative damage. *J Biol Chem* 1997;272(14):9030-6.
67. Sharma S, Wilkinson BP, Gao P, et al. Differential activity of NO synthase inhibitors as chemopreventive agents in a primary rat tracheal epithelial cell transformation system. *Neoplasia* 2002;4(4):332-3.
68. Cruz WSC, Moxley MA, Corbett JA, et al. Inhibition of nitric oxide synthase attenuates NNMU-induced alveolar injury in vivo. *Am J Physiol* 1997;273:1167-3.
69. Cruz WSC, Corbett JA, Longmore WJ, et al. Nitric oxide participates in early events associated with NNMU-induced acute lung injury in rats. *Am J Physiol* 1999;276:263-8.
70. Nozaki Y, Hasegawa Y, Takeuchi A, et al. Nitric oxide as an inflammatory mediator of radiation pneumonitis in rats. *Am J Physiol* 1997;272:651-8.
71. Macnaughton WK, Aurora AR, Bhamra J, et al. Expression, activity and cellular localization of inducible nitric oxide synthase in rat ileum and colon post-irradiation. *Int J Radiat Biol* 1998;74(2):255-64.

TC.  
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI'NA

**Dr. Celalettin EROĞLU'na ait Tüm Vücut Işınlaması Yapılan Ratlarda Radyasyona Bağlı Akciğer Hasarına Karşı Aminoguanidinin Etkisi** adlı çalışma, jürimiz tarafından **Radyasyon Onkolojisi** Anabilim Dalı'nda Tıpta Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarih : 28.12.2006

Başkan Prof. Dr. Mustafa GÜLEÇ



Üye Doç. Dr. Serdar SOYUER



Üye Doç. Dr. Bünyamin KAPLAN



Üye Doç. Dr. Metin ÖZKAN

Üye Yrd. Doç. Dr. Oğuz Galip YILDIZ

