

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**RAT BEYNİNDE YÜKSEK DOZ RADYASYONLA
OLUŞAN AKUT HASARA KARŞI MELATONİN VE
DİKLOFENAK' IN KORUYUCU ETKİSİ**

UZMANLIK TEZİ

**Dr. Ercan ALUÇ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. İsmail TEMEL**

MALATYA-2013

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**RAT BEYNİNDE YÜKSEK DOZ RADYASYONLA
OLUŞAN AKUT HASARA KARŞI MELATONİN VE
DİKLOFENAK' IN KORUYUCU ETKİSİ**

UZMANLIK TEZİ

**Dr. Ercan ALUÇ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. İsmail TEMEL**

**Bu tez, İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi
tarafından 2012/135 proje numarası ile desteklenmiştir.**

TEŞEKKÜR

Eğitim s¼recimde bana ışık tutan ve tez çalışmalarımın her aşamasında destek ve yardımlarını esirgemeyen saygıdeğer hocam Prof. Dr. İsmail TEMEL'e, bölüm hocalarım Prof. Dr. Tayfun G¼LD¼R, Prof. Dr. Yusuf T¼RKÖZ, Prof. Dr. Elif ÖZEROL, Prof. Dr. Aysun BAY KARABULUT, Doç. Dr. M. Çağatay TAŐKAPAN ve Yrd. Doç. Dr. Ahmet IğLI' ya, tezimde değerli zamanlarını ayırarak yardımcı olan sayın Prof. Dr. Nigar VARDI, Yrd. Doç. Dr. İsmet YILMAZ, Yrd. Doç. Dr. Őimay G¼ROCAK, Dr. Őule G¼RSOY, Uzm. Dr. Elif TAŐLIDERE ve Dr. Fatma ÖZYALIN' a teŐekkürlerimi sunarım.

Dr. Ercan ALUÇ

İÇİNDEKİLER	Sayfa
KABUL VE ONAY SAYFASI	ii
TEŞEKKÜR	iii
TABLolar DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
RESİMLER DİZİNİ	viii
KISALTMALAR DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Radyasyon	4
2.1.1. İyonize Radyasyonun Biyolojik Etkileri	5
2.1.2. İyonize Radyasyon ve Serbest Radikallerin Oluşumu	8
2.1.3. Radyasyonun İnflamatuvar Etkisi	10
2.1.4. Radyasyonun Beyindeki Etkisi	10
2.2. Antioksidan savunma mekanizmaları	11
2.2.1. Glutasyon Sistemi	12
2.2.2. Tiyoredoksin Sistemi	14
2.2.3. Diğer Önemli Antioksidanlar	15
2.3. Diklofenak Sodyum	18
3. MATERYAL VE METOD	20
3.1. Gruplar	20
3.2. Metod	21
3.3. Kan ve Beyin Doku Örneklerinin Alınması	21
3.4. Doku Homojenizasyonu	21
3.5. Biyokimyasal Analizler	22
3.5.1. Kullanılan Cihazlar	22
3.5.2. Kullanılan Kimyasallar	22

3.5.3. Glutasyon Ölçümü	23
3.5.4. Glutasyon Redüktaz Ölçümü	24
3.5.5. Glutasyon Peroksidaz Ölçümü	26
3.5.6. Tiyoredoksin Ölçümü	28
3.5.7. Tiyoredoksin Redüktaz Ölçümü	28
3.5.8. Serum C-Reaktif Protein Ölçümü	29
3.5.9. TBARS Ölçümü	29
3.5.10. Protein Ölçümü	32
3.6. Histolojik İnceleme	35
3.7. İstatistiksel Analiz	36
4. BULGULAR	37
4.1. Biyokimyasal Bulgular	37
4.2. Histopatolojik Bulgular	45
5. TARTIŞMA	56
6. ÖZET	60
7. SUMMARY	61
KAYNAKLAR	62

TABLolar DİZİNİ	Sayfa
Tablo 1. Glutatyon redüktaz ölçüm yöntemi	25
Tablo 2. Glutatyon peroksidaz ölçüm yöntemi	27
Tablo 3. TBARS standart eğri çalışması	31
Tablo 4. TBARS ölçüm yöntemi	32
Tablo 5. BSA standardı için dilüsyon tablosu	33
Tablo 6. BSA standart eğri çalışması	34
Tablo 7. Protein ölçüm yöntemi	35
Tablo 8. Tüm parametrelere ait grup ortalama ve standart sapma değerleri	37
Tablo 9. Beyin doku homojenatı GSH düzeyleri grup ortalamaları	38
Tablo 10. Beyin doku homojenatı GSH-Px düzeyleri grup ortalamaları	39
Tablo 11. Beyin doku homojenatı GSH-R düzeyleri grup ortalamaları	40
Tablo 12. Beyin doku homojenatı Trx düzeyleri grup ortalamaları	41
Tablo 13. Beyin doku homojenatı Trx-R düzeyleri grup ortalamaları	42
Tablo 14. Beyin doku homojenatı TBARS düzeyleri grup ortalamaları	43
Tablo 15. Serum CRP düzeyleri grup ortalamaları	44
Tablo 16. Parametreler arası Pearson korelasyon analizleri tablosu	44
Tablo 17. Histolojik skor [med(min-max)]	55
Tablo 18. Toplam nöron ve dejenere nöron sayılarının dağılımı	55

ŞEKİLLER DİZİNİ	Sayfa
Şekil 1. Glutasyon sistemi	12
Şekil 2. TBARS standart eğri grafiği	31
Şekil 3. Protein standart eğri grafiği	34
Şekil 4. Beyin doku homojenatı GSH düzeyleri	38
Şekil 5. Beyin doku homojenatı GSH-Px aktivite düzeyleri	39
Şekil 6. Beyin doku homojenatı GSH-R aktivite düzeyleri	40
Şekil 7. Beyin doku homojenatı Trx düzeyleri	41
Şekil 8. Beyin doku homojenatı Trx-R aktivite düzeyleri	42
Şekil 9. Beyin doku homojenatı TBARS düzeyleri	43
Şekil 10. Serum CRP düzeyleri	44

RESİMLER DİZİNİ	Sayfa
Resim 1. K grubu. Serebral korteksin normal histolojik görünümü	45
Resim 2. K grubu. Piramidal nöronlar	46
Resim 3. K grubu. Mavi-mor renkte boyanmış nöronlar	46
Resim 4. R grubu. Nöron kaybı ve inflamasyon odakları. H-E	47
Resim 5. R grubu. Dejenere nöronların görünümü	48
Resim 6. R grubu. Bazı alanlarda izlenen nöron kaybı. K-Violet	48
Resim 7. M grubu. Nöron kaybı ve inflamasyon odakları. H-E	49
Resim 8. M grubu. Dejenere nöronların görünümü.	50
Resim 9. M grubu. Nöron kaybı. K-Violet	50
Resim 10. D grubu. Nöron kaybı ve küçülmüş inflamasyon odakları. H-E	51
Resim 11. D grubu. Dejenere nöronların görünümü	52
Resim 12. D grubu. Nöronlar. K-Violet	52
Resim 13. MD grubu. Nöron kaybı ve küçülmüş inflamasyon odakları. H-E	53
Resim 14. MD grubu. Dejenere nöronların görünümü	54
Resim 15. MD grubu. Nöronlar. K-Violet	54

KISALTMALAR DİZİNİ

BSA	: Bovin serum albumin
COX-2	: Siklooksijenaz-2
CRP	: C-reaktif protein
Cu	: Bakır
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DTNB	: Ditiyonitrobenzoik asit
e ⁻	: Elektron
EDTA	: Etilen diamintetraasetik asit
ELISA	: Enzyme-linked immunosorbent assay
FAD	: Flavin adenin dinükleotid
Fe ⁺²	: Ferröz demir
Fe ⁺³	: Ferrik demir
GSH	: Redükte glutatyon
GSH-Px	: Glutatyon peroksidaz
GSH-R	: Glutatyon redüktaz
GSSG	: Okside glutatyon
GST	: Glutatyon transferaz
Gy	: Gray
H [•]	: Hidrojen radikali
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
LDL	: Low-density lipoprotein
LET	: Lineer enerji transferi
LOOH	: Lipit hidroperoksit
MDA	: Malondialdehit
Mn	: Mangan
NADP ⁺	: Okside nikotin amid adenin dinükleotid fosfat

NADPH	: Redükte nikotin amid adenin dinükleotid fosfat
NO [•]	: Nitrik oksit
NSAİİ	: Nonsteroid anti inflamatuvar ilaç
O ₂ ^{•-}	: Süperoksit radikali
OD	: Optik dansite
OH [•]	: Hidroksil radikali
PLOOH	: Fosfolipit hidroperoksit
ROOH	: Organik hidroperoksit
ROS	: Reaktif oksijen türevleri
SOD	: Süperoksit dismutaz
SSA	: Sülfosalisilik asit
TBA	: Tiyobarbitürik asit
TNB	: Tiyonitrobenzoik asit
Trx	: Tiyoredoksin
Trx(S) ₂	: Okside tiyoredoksin
Trx(SH) ₂	: Redükte tiyoredoksin
Trx-R	: Tiyoredoksin redüktaz
Zn	: Çinko

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Radyasyon, 19. yüzyılın sonlarına doğru X-ışınları ve radyoaktivitenin keşfiyle birlikte yaşamımıza girmiş, tıbbi ve endüstriyel alanlarda geniş kullanım bulmasıyla yaşantımızın vazgeçilmez bir parçası olmuştur. İnsanlar meslekleri dolayısıyla veya başka nedenlerle, bir şekilde radyasyona maruz kalabilmekte ve alınan doza bağlı olarak ta farklı şekillerde bu radyasyondan etkilenmektedir [1]. İnsanlık, nükleer kazalar sonucu yüksek doz radyasyona maruziyetin sonuçlarını gördüğü gibi tedavi amacıyla hastanelerde kullanılan düşük doz radyasyona maruziyetin zararlı etkilerine de şahit olmuştur. Alınan radyasyonun dozuna bağlı olarak akut, hayatı tehdit eden durumlar ortaya çıkabildiği gibi, düşük dozun moleküler düzeydeki etkisiyle yıllar sonra da hastalıklar ortaya çıkabilmektedir. Son yüzyılda radyasyonun zararlı etkilerinin fark edilmesiyle bu konuda yapılan araştırmalar giderek artmış, hatta bizzat bu konuyla ilgilenen bilim dalları ortaya çıkmıştır. Çünkü hayatımıza birçok alanda girmiş ve bize zarar vermekte olan bir etkenin her yönüyle bilinmesi ihtiyacı doğmuştur [2,3].

Yapılan çalışmalarda radyasyonun canlı dokulardaki etkisi birçok yönden ele alınmakla birlikte bilinen en önemli etkisi hücrelerde oksidatif stres oluşturmaktır. Özellikle su moleküllerini etkileyerek hidroksil radikalinin oluşumuna neden olmaktadır. Oluşan bu radikal daha sonra zincirleme reaksiyonlarla oksidasyon sürecini hızlandırmaktadır. Zincirleme reaksiyonlar başlamadan önce dokuda bulunan antioksidanlar radyasyonun etkisini azaltır [2].

Hücreler radyasyona maruz kaldıklarında oluşan oksidatif stresi mevcut antioksidanların etkisinden sonra kendi antioksidan sistemleriyle ortadan kaldırmaya

çalışır. Bu sistemlerden en önemlileri glutasyon ve tiyoredoksin sistemleridir. Sistemlerin bünyesinde oluşan redükte glutasyon ve redükte tiyoredoksin, oksidasyona uğramış molekülleri indirgeyerek hücreleri korumaktadır. Radyasyon uygulanmasından sonra akut dönemde inflamasyon görülmesi de kaçınılmaz bir durumdur. Radyasyon hedef ve çevre dokularda plazma proteinleri ve lökosit toplanması ile karakterize inflamatuvar süreci uyarılmaktadır [2,4-6].

Günümüzde tedavi amacıyla kullanılmakta olan radyasyonun hastalarda oluşturduğu yan etkileri azaltmak için çareler aranmaktadır. Nitekim radyasyonun hastaları zora sokan ciddi yan etkileri mevcuttur. Bu amaçla antioksidan destek tedavileri aranmakta, antiinflamatuvar ajanların faydaları denenmektedir.

Melatonin, DNA, lipitler ve proteinleri serbest radikallerden koruduğu bilinen bir antioksidandır. Bu özelliğini antioksidan enzimlerin aktivitesini uyararak ve serbest radikalleri direkt veya dolaylı yoldan süpürerek göstermektedir [7]. Bilinen antioksidanlar arasında melatoninin hidroksil radikalini süpürücü etkisi en yüksektir. Hücrenin bütün bölümlerine dağılmış haldedir ve bütün biyolojik membranlardan hızlıca geçebilmektedir. Farklı türde canlılarda yapılan çalışmalarda melatoninin, iyonize radyasyonun neden olduğu oksidatif strese karşı koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir [7]. Bu nedenle düşük toksisiteye de sahip olan melatoninin tedavide kullanılabilmesi düşünülmüştür.

Diklofenak sodyum, analjezik, antiinflamatuvar ve antipiretik etkili bir fenilasetik asit türevidir. Çoğunlukla eklemlerin inflamatuvar hastalıklarında kullanılan bir ilaçtır. Mide-barsak kanalından tam olarak ve çabuk absorbe edilir. Yarılanma ömrü yaklaşık 1,2-1,8 saattir. Non steroid anti-inflamatuvar (NSAİ) ilaçlar bazı patolojik durumlarda ve kanserde upregüle halde bulunan COX-2 enzimini inhibe etmektedir. NSAİ grubundan olan diklofenak sodyum da güçlü bir COX-2 inhibitörüdür. Bu yönüyle diklofenak sodyumun kanserli hastada kullanımı avantajlı görülmektedir. Nitekim son zamanlarda NSAİ ilaçların antikanser etkileri üzerine yapılmış çalışmalar mevcuttur [8-10]. Son yapılan çalışmalarda diklofenak sodyumun radyoprotektif etkisinden de bahsedilmektedir [11].

Biz bu çalışmamızda radyasyonun beyinde oksidatif stres ve inflamasyon yoluyla oluşturduğu zararlı etkileri engellemede melatonin gibi bir antioksidan ve diklofenak sodyum gibi bir antiinflamatuvar ajanın etkilerini araştırmayı amaçladık.

Bakacağımız parametrelerle de melatoninin antioksidan sistemlerle ilişkisini göstermeyi amaçlıyoruz.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Radyasyon

Maddenin temel yapısını atomlar meydana getirir. Bir elementin tüm kimyasal özelliklerine sahip en küçük parçası olan atom, pozitif yüklü bir çekirdek ve etrafında dönen negatif yüklü elektronlardan oluşur. Atomun çekirdeği ise nükleon adı verilen artı yüklü proton ve yüksüz nötronlardan oluşur. Atom çekirdeklerini oluşturan nükleonların (nötron ve proton) oranı hafif elementlerde 1 iken, ağır elementlere doğru gidildikçe nötronlar lehine artmaya başlar. Bir maddenin atom çekirdeğindeki nötronların sayısıyla protonların sayısı arasında bir dengesizlik olduğunda çekirdek kararsız bir yapı göstermekte ve daha kararlı hale geçmek için çeşitli ışınlar yaymaktadır. Çevresine bu şekilde ışın saçan maddelere "radyoaktif madde", çevreye yayılan elektromanyetik dalga ve parçacık şeklindeki ışımsal enerjiye ise "radyasyon" adı verilmektedir. Radyasyonu temel anlamda, boşlukta ve madde içerisinde yol alan enerji olarak tanımlamak mümkündür [1,2,12].

Radyasyon, iyonize ve non-iyonize olmak üzere iki sınıfa ayrılır. Non-iyonize radyasyon kütsüz elektromanyetik dalga şeklinde olan radyasyondur. Radyo dalgaları, mikrodalga, radar, görünür ışık, mor ötesi ışık, enfraruj, ultraviyole ışıklardan oluşur [3,13]. Non-iyonize radyasyonlar, yeterli enerjiye sahip olmadıkları için iyonlaştırıcı radyasyonlar kadar zararlı değildir. Elektrik enerjisi ileten ya da elektrikle çalışan her türlü araç, çalışma durumunda çevresinde bir elektromanyetik alan oluşturabilmektedir. İyonize radyasyonlar ise, madde içerisinde geçerken enerjisini ortama aktarmak suretiyle, ortamdaki atomları doğrudan veya dolaylı yollarla iyonlaştıran radyasyon çeşitleridir. Atom veya moleküllerden elektron koparabilecek kadar güçlü enerji seviyesine sahiptirler [3,13]. İyonize radyasyonlar

bir ortama veya biyolojik sisteme girdiğinde ortamdaki atomlara çarparak elektron koparılır (iyonlaşma) veya çarptıkları atomların elektronlarını koparmasalar bile daha yüksek enerji seviyesine atlatılır (uyarılma) [4]. İyonlaşma ve uyarılma olayı iyonize radyasyon enerjisinin ortam tarafından emildiğini gösterir. İyonize radyasyon çeşitleri aşağıdaki gibidir.

1. Elektromanyetik radyasyon: X ışınları ve gamma ışınları

2. Parçacık tip radyasyon: Alfa parçacığı, beta parçacığı, nötron, proton, elektron, pozitron, ağır iyonlar

Elektromanyetik dalgaları birbirinden ayıran esas faktörler dalga boyları, dolayısıyla frekansları veya enerjileridir. Elektromanyetik radyasyonların enerjileri arttıkça, birer enerji paketi anlamına gelen foton adını alırlar. Fotonlar uzayda ışık hızıyla hareket ederler. Yük ve kütleleri olmadığından parçacık tipi radyasyonlardan farklıdır [14]. X ışınları çekirdek dışında oluşan elektron kaynaklı ışınlardır. Gama ışınları ise, radyoaktif bir çekirdeğin kararlı hale geçmesi esnasında parçalanarak açığa çıkan fazla enerjinin, çekirdekte dışarı atılması sonucunda oluşur. Gamma radyasyon hayli yüksek enerjili olup etkileşim olmaksızın insan vücudundan belirli bir kısmı geçebilecek kadar penetrandır. Fotonların yaklaşık %75'i hedef dokunun atomlarıyla etkileşime girerek enerji kaybeder [3,4].

2.1.1. İyonize Radyasyonun Biyolojik Etkileri

İyonize radyasyonlardan gamma, nötron, beta ve alfa radyasyonları biyolojik sistemlerle etkileşime girer [15]. İyonize radyasyonun biyolojik bir sistemde yol açtığı olumsuz etki direkt ve indirekt etki olmak üzere ikiye ayrılır. Eğer radyasyon enerjisi DNA veya bir enzim molekülü tarafından emiliyorsa, bu moleküllerde oluşturduğu olumsuz etkilere radyasyonun direkt etkisi denir. Biyolojik sistemdeki moleküller tarafından direkt olarak emilmeyip zararlı yan ürünlerin oluşumuna neden oluyor ve bu yolla değişime neden oluyorsa, bu etkiye radyasyonun indirekt etkisi denir [1,15]. İyonize ışınlar geçtikleri dokulara enerji aktarırlar. Bu aktarıma lineer enerji transferi (LET) adı verilir. Nötron, proton, alfa partikülleri ve ağır iyonlar yüksek lineer enerji transferine; fotonlar (gama ışınları dahil), elektronlar ve pozitronlar ise düşük lineer enerji transferine sahip radyasyonlardır. Yüksek LET radyasyonları daha fazla biyolojik hasar meydana getirir [16].

Radyasyon başlıca üç kademedeki etki gösterir [4].

Fiziksel Kademe: İyonize radyasyon ile canlı dokularını oluşturan atom ve moleküller arasındaki ilk etkileşimi kapsar. Radyasyon enerjisi maddeye aktarılır ve bunun sonucunda maddenin moleküllerinde iyonlaşma ya da uyarılma meydana gelir. İyonlaşma sonucunda oluşan serbest elektronlar diğer komşu atomlarda da iyonlaşmaya yol açar ve bu şekilde zincirleme bir reaksiyon meydana gelir. Ancak bu ilk reaksiyonlar sonucu ortaya çıkan ürünler son derece kararsızdırlar ve kısa sürede sekonder reaksiyonların oluşmasına yol açarlar [2-4].

Kimyasal Kademe: Sekonder reaksiyonların meydana geldiği kademedir. Hasar gören atom ve moleküller reaksiyona girer ve sonuçta serbest radikaller oluşur. Bu serbest radikaller çok reaktif yapıdadırlar ve sürekli olarak hem kendi aralarında hem de ortamdaki diğer moleküllerle reaksiyona girerler. Serbest radikal reaksiyonları radyasyonun emiliminden sonra milisaniyeler içinde tamamlanır [2-4].

Biyolojik Kademe: Bu kademedeki canlıda meydana gelen olaylar, radyasyonun son biyolojik etkisinin ortaya çıkmasına yol açar. Bu kademe birtakım hasarlara yol açan enzim reaksiyonlarıyla başlar. Reaksiyonlar sonucunda çekirdek ve sitoplazmada değişim, kromatinlerde hasar, mitozda etkilenme ve hücreler arası iletişim bozukluğu gibi etkiler görülür. DNA'da oluşan hasarların bir kısmı onarılabilir fakat onarılamayan hasarlar da oluşur ve bu hücrenin ölümüne yol açar. Aynı zamanda radyasyon genetik bozukluklar ve kanser gibi etkiler de oluşturur [2-4].

Radyasyonun gözlenen hücresel etkileri gerek direkt gerekse indirekt olsun iyonize radyasyonun değişik tip ve dozları için temel olarak benzerdir.

Hedef atoma enerji transferi saniyenin çok küçük bir kısmında oluşmasına rağmen, biyolojik etkiler dakikalar içinde değil, yıllar sonra bile ortaya çıkabilir. Işınsal enerjiye maruz kalındığında, hızlı bölünen hücrelerin bulunduğu dokularda daha fazla, az sayıda bölünen hücrelerin bulunduğu dokularda daha az zedelenme olur. Bunun nedeni hücrelerin mitozdayken radyasyona daha hassas olmasıdır. Dokulardaki zedelenmenin düzeyini alınan doz miktarı, hücrelerin kendini yenileme kapasitesi ve oksijen miktarı belirler [4,17-19].

Yüksek doz radyasyon lipid peroksidasyonu aracılığıyla tüm biyolojik membranlarda değişikliklere neden olur. Bu süreç organeller ve tüm hücre için

belirgin bir yıkıcı etki oluşturur. Sonuçta yapısal ve biyokimyasal özelliklerin kaybı hücreleri hasara ve ölüme götürür.

Birçok memeli canlı için, 100 Gy gibi yüksek bir doz alındığında 24-48 saat içinde görülen ölüm serebrovasküler sendroma bağlıdır. 5-12 Gy aralığında günler içinde gastrointestinal sendroma (kanlı ishal) bağlı ölüm görülürken, 2,5-5 Gy dozlarında hematopoetik sendroma bağlı birkaç hafta içinde ölüm meydana gelir [2].

Düşük dozlar ise daha çok DNA üzerinde etkili olur. İyonize radyasyonun DNA üzerine direkt etkisi ile meydana getirdiği zararlar özet olarak;

- Hidrojen bağlarının kırılması
- Zincir kırılmaları; tek veya çift kolda kırılmalar veya şeker fosfat iskeletinin kırılması
- DNA da baz hasarı; baz değişikliği veya kaybı
- Çapraz bağlanma

Diğer yandan iyonize radyasyon tarafından hücre içi sıvıda oluşturulan serbest radikaller de DNA ile reaksiyona girerek indirekt yoldan hasarlara neden olur. Bu şekilde radyasyonun etkisi ile hücre çekirdeği ve DNA'nın tahrip edilmesi hücrenin üreme yeteneğini ortadan kaldırır [4,20,21].

Radyasyon sonrası DNA'da oluşabilecek üç tür hasar vardır:

- 1- Subletal hasar; tek başına ölümcül değildir, bir sonraki bölünmede ya da olumsuz ortam koşullarının devamı halinde ölüm gelişebilir ve uygun koşullarda onarılması mümkündür.
- 2- Potansiyel letal hasar: Eğer hücre bölünmesi kısa bir sürede meydana gelirse hasar ölümcüldür, ancak bölünme gecikirse sonuç tamir edilebilir hasardır.
- 3- Letal hasar; onarılamayacak kadar büyük olup, hücreyi hemen ölüme götürür. Genellikle çift zincir kırığı mevcuttur [20].

Biyolojik hasarlar açısından, ister direkt ister indirekt yoldan olsun DNA hasarı en önemli olanıdır. Klinikte kullanılan radyasyonla oluşan hasarların büyük ölçüde indirekt yoldan olduğu kabul edilmektedir [4]. Subletal hasarların birikmesi hücrenin reproduktif ölümü ile, letal DNA hasarı ise apoptozis ile sonuçlanır. Ancak hücre tamir enzimleri DNA'daki subletal hasarları belli ölçüde giderebilirse hücre sağ kalabilir ve bu süreç sonunda giderilemeyen kalıcı mutasyonlar her hücre

bölünmesinde diğer nesillere aktarılır. Uzun vadede (5-20 yıl) bu hücrelerde %1-5 oranında kanserleşme görülebilir [22].

Sürekli mitoz gösteren kanser hücreleri normal hücelere göre radyasyondan daha fazla etkilenmektedir [23]. Bu özelliklerinden faydalanılarak iyonize radyasyon kanser tedavisinde kullanılmaktadır. Radyoterapide asıl amaç, hücrenin üreme yeteneğini durdurmaktır. Çünkü hücre üreme yeteneği duran hücre ölü kabul edilir (reproduktif ölüm). Bu nedenle klinikte kullanılan dozlar, hücre membranında lizis yapacak veya hücre organellerini tahrip edecek kadar yüksek değildir.

2.1.2. İyonize Radyasyon ve Serbest Radikallerin Oluşumu

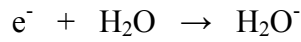
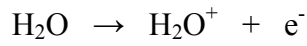
Serbest radikaller bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip, yüklü veya yüksüz, kısa ömürlü, kararsız, molekül ağırlığı çok düşük ve çok etkin moleküller olarak tanımlanabilir. Serbest radikaller organizmada metabolizmanın normal işleyişi sırasında oluşacağı gibi, çeşitli dış etkenlerin etkisiyle de oluşabilmektedir. Yaşam süresi kısa ve yapılarındaki elektrik dengesizliği nedeniyle çok aktif yapıda olan serbest radikaller, çeşitli enzimlerin etkisiyle hücrenin bütün bölümlerinde (mitokondrideki elektron transport zinciri reaksiyonları, endoplazmik retikulumdaki karma fonksiyonlu oksidaz sistemi, sitoplazmada ksantin oksidaz, dopamin beta hidroksilaz, D-aminoasit oksidaz, urat oksidaz gibi enzimlerin etkinliği, prostaglandin sentetaz ve lipooksijenazların faaliyeti, peroksizomlarda ve lizozomlardaki metabolik olaylar) oluşabilmekte ve tüm hücre bileşenleriyle etkileşebilmektedir [24-26]. Tüm aerobik canlıların hücrelerinde belirli düzeylerde radikaller oluşmaktadır. Bunlar O₂ türevi, karbon ve kükürt merkezli serbest radikallerdir [27,28].

Dokularda serbest radikal oluşumu ile antioksidan savunma sistemi denge halindedir. Serbest radikal oluşum hızı savunma sistemi tarafından temizlenme hızını aşarsa serbest radikallere bağlı zararlı etkiler ortaya çıkar. Bunları şöyle sıralayabiliriz.

1. DNA hasarı
2. Nükleotid yapılı koenzimlerin yıkımı
3. Tiyollere bağlı enzimlerin yapı ve fonksiyonlarının bozulması, hücre ortamının tiyol/disülfid oranının değişmesi
4. Protein ve lipitlerde kovalent bağların oluşumu

5. Enzim aktiviteleri ve lipit metabolizmasında değişiklikler
6. Mukopolisakkaritlerin yıkımı
7. Proteinlerin parçalanması ve tekrar yapımının artması; proteinlerdeki sistein sülfhidril grupları ve diğer aminoasit kalıntıları okside olarak yıkılır.
8. Membranlarda lipit peroksidasyonu ile membran geçirgenliğinin artması
9. Kollajen ve elastin gibi proteinlerdeki oksidasyon-redüksiyon olaylarının bozulmasıyla kapiller aterofibrotik değişikliklerin oluşması [29-32].

Organizmada, dış etkenlere bağlı olarak serbest radikal oluşumunun önemli nedenlerinden birisi iyonize radyasyondur. Hücrelerin yaklaşık %80'ini su oluşturduğu için radikal oluşumuna büyük oranda su molekülleri öncülük etmektedir. Radyasyona maruz kalan su iyonize duruma geçer ve aşağıdaki basamakları izleyerek H[•] ve OH[•] radikali oluşumuyla sonuçlanır.

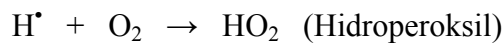
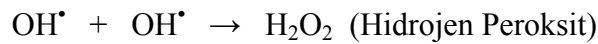


Oluşan H₂O⁺ ve H₂O⁻ molekülleri aşağıdaki gibi OH[•] ve H[•] radikallerinin oluşumuna neden olur.

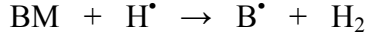
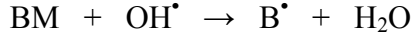


OH[•] ve H[•] radikalleri sadece suyun iyonlaşması ile oluşmaz. Su moleküllerinin uyarılması ve uyarılmış moleküllerin ayrılması ile de meydana gelebilirler.

H[•] ve OH[•] serbest radikalleri, diğer serbest radikaller ve moleküller ile etkileşebilir. Çeşitli sekonder reaksiyonlar ile farklı serbest radikaller oluşur [33].



Suyun radyolizi ile oluşun yüksek kimyasal reaktifliğe sahip radikaller (OH[•] ve H[•]) organik biyolojik moleküller (BM) ile reaksiyona girerek onları da radikal haline dönüştürebilir. Bu reaksiyonlar sonunda canlıya özgü yeni tür biyoradikaller (B[•]) oluşur.



İyonize radyasyonun su molekülünü iyonlaştırması sonucunda oluşan serbest radikaller DNA hasarına neden olur. Etkilerin % 65'i bu dolaylı yol ile oluşmaktadır. Bu reaksiyonların tümü, ilk kademede H₂O ortamında oluşan serbest radikallerin aracılığı nedeniyle radyasyonun indirekt etkisi olarak nitelendirilir [34].

Serbest radikaller ayrıca oksijen molekülleri ile de etkileşime girer ve bu etkileşimler sonucunda gerek hidrojen gerekse bazı organik moleküllerin peroksit radikalleri oluşur ve bunlar biyolojik açıdan son derece tahrip edicidir. Radyasyonun canlı sistemlerde etkinlik derecesi, oksijen varlığı ile artmaktadır. Oksijen varlığı ile sözü geçen peroksit radikallerinin oluşma şansının artışı, bu etkinin mekanizması olarak kabul edilmektedir [2,4,35].

2.1.3. Radyasyonun İnflamatuar Etkisi

Akut radyasyon hasarının bileşenlerinden biri inflamasyondur. Radyasyona maruziyet sonrası ilk saatlerde sitokin kaskadının transkripsiyonel aktivasyonu görülür. Işınlanan hücre tarafından salınan sitokinler aynı dokudaki veya uzak hücrelerdeki reseptörlere bağlanarak hücreleri biyolojik cevap için uyarır [6]. Bu sitokin kaskadının aktivasyonunun maruziyet sonrası hemen başladığı ve uzun süre devam edip geç radyasyon hasarının gelişmesinde de rol oynadığı düşünülmektedir [36].

Radyasyon sonrası proinflamatuvar ve profibrotik sitokinler olan İnterlökin-1 (IL-1), Alfa Tümör Nekroz Faktör (α -TNF) ve Beta Transforme Edici Büyüme Faktörü (β -TGF) salgılanır. Bu sitokinler kollajen I, III, IV ve fibronektin salınımını uyarır [37].

2.1.4. Radyasyonun Beyindeki Etkisi

Sinir hücreleri bölünmeyen ve çoğalmayan hücreler olduğundan vücudun diğer hücrelerine göre radyasyona karşı daha dirençlidir. Çünkü radyasyon özellikle hızlı bölünen hücrelere etkilidir [38]. Bunun yanında sinir hücreleri serbest radikal hasarına oldukça hassastır. Bunun nedenlerini şu şekilde sıralayabiliriz;

1. Oksidatif metabolik aktivitenin hızının çok yüksek olması. Oksijenin yüksek düzeylerine maruz kalması.

2. Membranda bulunan poliansatüre yağ asidi gibi kolayca okside olabilen bazı substratların beyinde oldukça yüksek konsantrasyonda olması.

3. Katalaz ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) gibi antioksidan enzimlerin, spesifik aktivite olarak düşünüldüğünde diğer organ ve dokulara kıyasla daha düşük düzeylerde olması.

4. Dopamin oksidasyonu gibi bazı spesifik nörokimyasal reaksiyonlarla aşırı endojen reaktif oksijen radikali üretilmesi.

5. Nöronların membran alanının sitoplazmik hacime oranının yüksek olması.

6. Aksonların morfolojisinin periferel hasara oldukça yatkın olması.

7. Nöron hücrelerinin doğuştan son bölünmelerini tamamlamış olması ve daha sonraki dönemlerde çoğalamaması nedeni ile hasar gören hücrelerin kendini yenileyememesi.

8. İnsan beyninin bazı bölgelerinin (globus pallidus ve substantia nigra) demir elementinden zengin olması, beyaz ve gri cevherde ise askorbik asit konsantrasyonunun oldukça yüksek olmasıdır [39,40].

2.2. Antioksidan Savunma Mekanizmaları

Antioksidanlar canlı hücrelerde bulunan protein, lipit, karbonhidrat ve DNA gibi okside olabilecek bileşenlerin oksidatif hasarını engelleyen veya geciktiren maddeler olarak tanımlanmaktadır [7]. Aerobik organizmalarda serbest oksijen radikali sürekli oluşmaktadır ve serbest radikallerin zararlı etkilerini önlemek üzere organizmada bulunan antioksidan savunma sistemleri ile denge halindedir. Bu hassas dengenin radikaller lehine bozulması halinde hücre ölümüne kadar gidebilen birçok patolojik değişiklik ortaya çıkmaktadır [5,41].

Antioksidanlar etkilerini iki şekilde gösterirler:

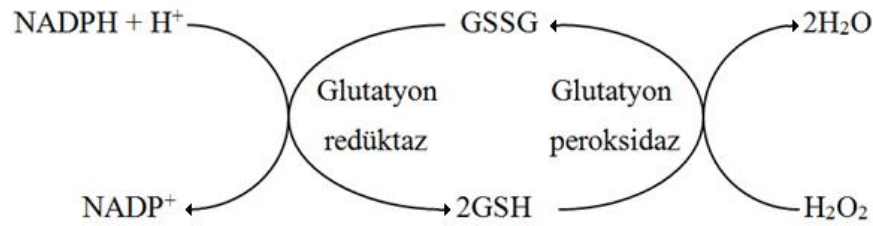
1. Serbest radikal oluşumunun önlenmesi;

- Başlatıcı reaktif türevlerini uzaklaştırıcı etki
- Oksijeni uzaklaştırıcı veya konsantrasyonunu azaltıcı etki
- Katalitik metal iyonlarını uzaklaştırıcı etki

2. Oluşan serbest radikallerin etkisiz hale getirilmesi;

- Zincir kırıcı etki: Reaktif oksijen türlerinin ve zincirleme reaksiyonları başlatacak diğer maddelerin bağlanması
- Süpürücü etki: Reaktif oksijen türlerinin bağlanarak veya daha az reaktif başka moleküllere dönüştürülerek etkisiz hale getirilmesi
- Bastırıcı etki: Reaktif oksijen türlerine bir proton eklenerek etkisiz hale getirilmesi
- Onarıcı etki: Hedef moleküllerin hasar sonrası tamir edilmesi

2.2.1. Glutasyon Sistemi



Şekil 1. Glutasyon sistemi

Glutasyon

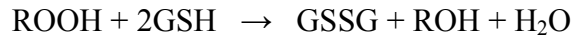
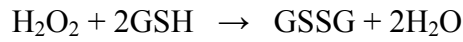
Glutasyon başta karaciğer olmak üzere pek çok dokuda yüksek düzeylerde bulunan, glutamat, sistein ve glisinden oluşan bir tripeptittir [42]. Antioksidan ve indirgeyici bir maddedir. Glutasyona antioksidan özelliğini yapısındaki tiyol grubu kazandırır. GSH-Px ve GST gibi enzimlerin kofaktörüdür. Hücre içinde oksidan maddeleri kendi üzerine çekerek hücrenin fonksiyonel proteinlerinin oksidasyonunu engellemektedir. Hidroksil radikali ve singlet oksijen gibi reaktif oksijen türlerini temizleyen ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı koruyan glutasyon, aynı zamanda aminoasitlerin transportunda da görev almaktadır. E ve C vitamini gibi antioksidanlar ve diğer serbest radikal süpürücülerinin çalışmasını da önemli oranda destekler [43]. Ayrıca, proteinlerdeki sülfhidril (-SH) gruplarını indirgenmiş halde tutarak pek çok protein ve enzimin inaktivasyonunu engeller.

Redükte glutasyon (GSH) çeşitli reaksiyonlarla oksitlenerek, okside glutasyona (GSSG) dönüşür. GSSG'nin tekrar redüksiyonu NADPH'ın kullanıldığı bir reaksiyonla olur. Bu şekilde dokularda GSH/GSSG oranı yüksek tutulur [7]. Genel olarak enzimatik antioksidanlar hücre içinde, enzimatik olmayan

antioksidanlar ise hücre dışında daha fazla etkilidir. Glutasyon bir istisnadır. Çünkü hücre içinde etkili olan güçlü bir antioksidandır.

Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px)

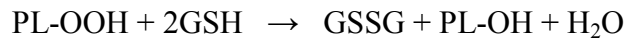
Hidrojen peroksidin ve organik hidroperoksitlerin (ROOH) redüksiyonunu sağlar. Dört selenyum atomu içeren tetramerik yapıda bir enzimdir. GSH-Px enziminin selenyuma bağımlı ve bağımsız olmak üzere iki izomeri bulunmaktadır. Se-bağımlı GSH-Px, H₂O₂'in ve lipit hidroperoksitlerin, Se-bağımsız GSH-Px ise sadece lipit hidroperoksitlerin temizlenmesinden sorumludur [7,44]. Amaç, membran lipitlerinin ve hemoglobinin peroksidler tarafından oksitlenmesine karşı koymaktır.



Reaksiyonda koenzim olarak kullanılan glutasyon ise oksitlendikten sonra glutasyon redüktaz enziminin katalizlediği bir başka reaksiyon ile tekrar redükte glutasyona dönüştürülür [7].



Bir diğer GSH-Px, "fosfolipit-hidroperoksit glutasyon peroksidaz" enzimidir. Bu enzim de selenyum içerir, çoğunlukla monomerik yapıdadır. Membran yapısındaki fosfolipit hidroperoksitlerini alkollere indirgeyerek özellikle E vitamininin yetersiz olduğu durumlarda peroksidasyona karşı koruma sağlar [7].



Glutasyon Redüktaz (GSH-R)

Dimerik yapılu bir enzim olan GSH-R, hücrede okside glutasyonu (GSSG) redükte glutasyona (GSH), NADPH'a bağımlı olarak katalizleyen bir flavoproteindir [45].

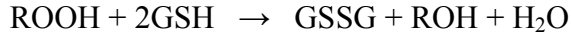


GSH, çevredeki oksidan moleküllerin etkisini kendi üzerine çekerek hücrenin fonksiyonel proteinlerinin oksidasyonunu engellemektedir. Aynı zamanda oksijen radikallerinin biyolojik moleküllere saldırması sonucunda meydana gelen peroksidleri ortadan kaldırmak için bazı peroksidaz enzimler tarafından da kofaktör olarak kullanılmaktadır. Bunun sonucunda oluşan okside glutasyonun redükte glutasyon

haline dönüşümü GSH-R enzimi tarafından katalizlenmektedir. GSH-R, hücre içi NADPH ve GSSG konsantrasyonu ile kontrol edilmektedir.

Glutatyon S-Transferaz (GST)

GST, glutatyonun tiyol grubu ile reaktif bir elektrofilik merkeze sahip organik moleküllerin konjugasyonunu katalizleyen bir enzim grubudur [46]. GST'ler genel olarak üç sitozolik ve bir de mikrozomal olmak üzere dört ana gruba ayrılmaktadır. Organizmaya giren ksenobiyotiklerin biyotransformasyonunda önemli rol oynamaktadırlar [47]. Başta araşidonik asit ve linoleat hidroperoksitler olmak üzere lipid hidroperoksitlere (ROOH) karşı GST'ler Se-bağımsız glutatyon peroksidaz aktivitesi göstermektedirler.



2.2.2. Tiyoredoksin Sistemi

Klasik tiyoredoksin (Trx) sistemi, tiyoredoksin redüktaz ve onun karakteristik substratı olan tiyoredoksinde oluşur. Tiyoredoksin redoks aktif bir proteindir. NADPH aracılığıyla indirgenmektedir. Hedef moleküllere redükte eşlenikler sağlanırken redükte tiyoredoksin yeniden okside olmaktadır [48].

Tiyoredoksin

Tiyoredoksinin fonksiyonlarını sıralayacak olursak;

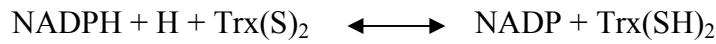
- Trx, oksidasyonla inaktive olmuş proteinlerin rejenerasyonunu sağlar.
- Ribonükleotid redüktaz için elektron donörlüğü yaparak DNA sentezindeki deoksiribonükleotid sentezine katılır.
- Redükte Trx aktive holoenzim T7 DNA polimeraz oluşumu için esansiyeldir.
- Proliferasyon, redoks ve apoptozis kontrolü gibi pleotropik hücresel etkilere sahiptir ve malignitelerde sıklıkla upregüledir.
- Vasküler endotelial büyüme faktör seviyelerini ve dolayısıyla angiogenezi düzenleyebilmektedir.
- Transkripsiyon faktörlerinin düzenlenmesi ve p53 maturasyonunda önemli bir rol oynar. Zıt etki ile NF-kappa B ve AP-1 aktivasyonunu etkilemektedir.

- Trx sistemi birçok yönden hormonal aktiviteye ve sitokin fonksiyonlarına dahil olmuştur [49].

Tiyoredoksin Redüktaz (Trx-R)

Tiyoredoksin redüktaz tiyoredoksinin indirgenmesini katalizleyen homodimerik bir flavoenzimdir. Enzim birçok organizmada karakterize edilmiş ve bakteri ve memeli olmak üzere iki sınıfta toplanmıştır. Memeli Trx-R C-ucu aminoasit dizisinde selenosistein içerir. Sitozolda, mitokondride ve testiste olmak üzere memeli Trx-R'nin üç izoformu bulunur. Trx-R'nin DNA sentezi, redoks sinyali, antioksidatif savunma, selenyum metabolizması ve apoptozun düzenlenmesinde önemli fonksiyonları vardır. Bu nedenle birçok araştırmaya konu olmaktadır [49].

Tiyoredoksin redüktazın en önemli fonksiyonu tiyoredoksinlerin NADPH bağımlı redüksiyonunu katalize etmektir.

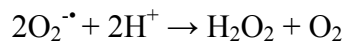


Tiyoredoksinin sülfhidril grupları biyokimyasal mekanizmalarda ve oksidatif stresle inaktive olmuş proteinlerin rejenerasyonunu sağlayan hücrel regülasyonda çeşitli fonksiyonlara sahiptir. Memeli tiyoredoksinleri ayıca dehidroaskorbati askorbata, ubikinonu ubikinole NADPH bağımlı mekanizmayla dönüştürebilmektedir [49].

2.2.3. Diğer Önemli Antioksidanlar

Süperoksit Dismutaz (SOD)

Süperoksit radikalinin hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü sağlamaktadır.



SOD antioksidan sistemin en önemli ve ilk basamağında rol oynar. Bir radikal üzerine direkt olarak etki eden tek enzimdir. Oluşan hidrojen peroksit daha sonra katalaz ve glutatyon peroksidaz tarafından oksijen ve suya parçalanmaktadır [50].

SOD'un iki izoenzimi vardır. Bunlar, sitoplazmada bulunan bakır ve çinko içeren dimerik yapıdaki Cu/Zn-SOD ile mitokondride bulunan mangan içeren

tetramerik yapıdaki Mn-SOD'dur [51]. SOD'un fizyolojik görevi hücreyi süperoksit radikalinin zararlı etkilerine karşı korumaktır. Oksijen kullanımı fazla olan dokularda SOD aktivitesi yüksektir. Buna karşılık hücre dışı sıvılarda SOD aktivitesi çok düşüktür [7].

Katalaz (CAT)

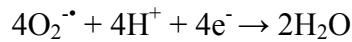
Katalaz, hidrojen peroksidi oksijen ve suya parçalayan $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ reaksiyonunu katalizler [51]. Enzim esas olarak peroksizomlarda bulunur. Yapısında dört tane hem grubu taşıyan bir hemoproteindir. Reaksiyon hidrojen peroksit yoğunluğu yüksek olduğunda önemlidir. Hidrojen peroksit, düşük yoğunluklarda peroksidazlar tarafından daha az reaktif olan alkollere ve suya parçalanmaktadır [44].

Katalaz, hidrojen peroksit varlığında bir takım küçük moleküllere karşı peroksidatif aktivite göstermektedir [52]. Enzimin indirgen özelliği ve peroksidatif aktivitesi hidrojen peroksit ve metil, etil hidroperoksit gibi küçük moleküllere özgüdür. Büyük molekülü lipid hidroperoksitlere etki etmemektedir [7].

Granülomatöz hücrelerde katalaz, solunumsal patlama reaksiyonlarına karşı koruma işlevi de görmektedir.

Sitokrom Oksidaz

Mitokondrilerde solunum zincirinin son basamağında yer alan ve bakır içeren bir enzimdir. Solunum zincirindeki görevini sürdürürken süperoksit radikalinin suya dönüşümünü de sağlamaktadır [53].



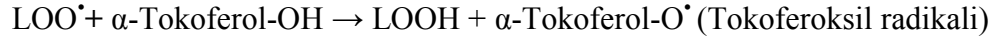
Süperoksit radikalinin oluşumu çoğu defa enzimin kapasitesini aşar ve bu aşamada diğer enzimler de devreye girer.

E Vitamini

E vitamini, tokoferol ve tokotrienol türevlerini kapsayan bir vitamindir. Doğal olarak alfa, beta, gama, delta, eta ve zeta gibi çeşitli şekilleri bulunmaktadır. Antioksidan aktivitesi en yüksek olan tokoferol, alfa-tokoferoldür. Yapısındaki aromatik halka, aktif kısmını oluşturur ve molekülün antioksidan özelliği bu gruptan kaynaklanır [54]. Dokularda mitokondri ve mikrozoim gibi hücresel yapılarda bulunur. [55].

Çok kuvvetli bir antioksidan olarak, membranlardaki fosfolipidleri serbest radikallerin etkisinden koruyan ilk savunma hattını oluşturur. E vitamini, süperoksit ve hidroksil radikallerini, singlet oksijeni, lipit peroksitlerini ve diğer radikalleri indirger, nitrik oksit (NO[•]) ile de reaksiyona girebilir. Tokoferolün antioksidan etkisi, yüksek oksijen düzeylerinde fazladır.

E vitamini ile GSH-Px, serbest radikallere karşı birbirlerini tamamlayıcı etki gösterirler. GSH-Px, oluşan peroksitleri ortadan kaldırır, E vitamini ise peroksitlerin oluşumunu engeller. E vitamini selenyum metabolizmasında da önemli rol oynar. Selenyum kaybını önleyerek organizmanın selenyum ihtiyacını azaltır. Ayrıca lipit peroksitlerini etkisiz hale getirerek peroksidasyon zincir reaksiyonunu sonlandırmaktadır. Bu sırada oluşan tokoferoksil radikali kararlı bir molekül olup safra ile vücuttan uzaklaştırılmaktadır [7].



C Vitamini (Askorbik Asit)

Suda çözünen vitaminlerdendir. Dokularda ve plazmada askorbat iyonu şeklinde bulunur. Hidroksilasyon reaksiyonlarında indirgeyici bileşik olarak görev yapar. Askorbik asit aynı zamanda kuvvetli bir antioksidandır. Altı karbonlu C vitamininin 2. ve 3. karbonlarının meydana getirdiği enediol yapısı antioksidan özelliğinden sorumludur [56]. Süperoksit radikali, hidroksil radikali ve singlet oksijen ile kolayca reaksiyona girerek onları etkisizleştirir. Sulu fazda bulunmasına karşın lipit peroksidasyonunu başlatan radikalleri temizleyerek lipitleri ve membranları oksidatif hasara karşı korur. E vitamininin rejenerasyonunda görev alır. E vitamini ile birlikte etkin bir şekilde LDL'yi oksidasyondan korur [54]. Askorbik asit, Fe⁺³'ü, Fe⁺²'ye indirgeyen, süperoksit radikali dışında tek hücre içi moleküldür. Bu etkisiyle fenton reaksiyonu aracılığıyla hidroksil radikali oluşumuna öncülük eder. Bu özelliği, C vitamininin prooksidan etki göstermesine sebep olmaktadır [54].

Melatonin

En zararlı radikallerden hidroksil radikalini etkisiz hale getiren çok kuvvetli bir antioksidandır. Melatonin, hidroksil radikalini, NO[•] ve peroksinitritleri temizler [57]. Melatoninin hidroksil radikali ile reaksiyona girdikten sonra bir indolil katyon radikaline dönüştüğü ve bu radikalini de süperoksit radikalini tutarak antioksidan aktivite gösterdiği bilinmektedir [7]. Melatoninin bir diğer önemli özelliği lipofilik

olmasıdır. Böylece hücrenin bütün organellerine ve hücre çekirdeğine ulaşabildiği gibi kan-beyin engelini de kolayca geçer. Bu sebeple çok geniş bir alanda antioksidan aktivite gösterir. Melatoninin çok yüksek dozlarda ve uzun süre kullanımında bile sağlığa zararlı etkisi gözlenmemiştir [7]. Ayrıca, bazı antioksidanlar gibi prooksidan aktivitesi de yoktur. DNA hasarının melatonin tarafından çok etkili bir şekilde önlendiği gösterilmiştir [7]. Yaşlanma ile birlikte melatonin biyosentezi azalır.

İnsan vücudunda antioksidan özelliğe sahip diğer biyomolekülleri de sıralayacak olursak: Primer fonksiyonları birbirinden farklı birçok molekülün bu listeye dahil olduğunu görürüz. Söz konusu moleküllerin tümünün vücudumuzda mevcut doğal antioksidan savunma sistemine katkıları bulunmaktadır.

- Ürat
- Bilirubin
- Albümin
- Seruloplazmin
- Transferrin ve Laktoferrin
- Ferritin
- Sistein
- Ebselen
- Sitokinler
- Demir şelatörleri
- Desferroksamin
- Oksipurinol
- Mannitol
- Probukol

2.3. Diklofenak Sodyum

Fenilasetik asit türevi olan diklofenak sodyum analjezik, antiinflamatuvar ve antipiretik etkili bir ilaçtır. Romatoid artrit karşı aspirin ve indometazin kadar ve osteoartrit karşı da indometazin derecesinde etkilidir. Bu gruptaki diğer ilaçlar gibi, mide ve duodenum mukozasını bozucu etkisi diğer NSAİ ilaçların çoğuna göre daha azdır. Maksimum plazma değerine 1,5-2 saatte ulaşır. % 99'undan fazlası geri dönüşümlü olarak plazma albüminine bağlanır. Karaciğerde esas olarak

hidroksillenmek ve konjugasyon suretiyle inaktive edilir. Böbreklerden ve kısmen karaciğerden elimine edilir. Eliminasyon yarılanma ömrü yaklaşık 1,2-1,8 saat kadardır [8]. Bir prostaglandin sentetaz inhibitörü olan diklofenak sodyum özellikle romatizmal olgularda uygulanır. Plazma konsantrasyonu, verilen dozla doğru orantılıdır. Çoğunluğu hidroksilasyonla oluşan metabolitleri ve %1'den az miktarı değişmeyen molekül biçiminde idrarla atılır. Geri kalan kısmı ise feçesle atılır. Böbrek ve karaciğer fonksiyon bozukluklarında, ilacın farmakokinetiği değişmemektedir. Aynı şekilde değişik yaşlardaki hastalarda; absorpsiyon, metabolizma ve eliminasyonda farklılık gözlenmemiştir [8].

Epidemiyolojik çalışmalarda NSAİ kullananlarda meme kanseri görülme insidansında azalma olduğu gösterilmiştir. NSAİ ilaçlar siklooksijenaz enzim sistemi üzerinden (COX-1 ve COX-2 enzimleri aracılığı ile) etkisini gösterir. COX-2'un birçok kanser dokusunda upregüle olduğu gösterilmiştir [9,10,58]. Düzenli olarak aspirin ya da NSAİ kullanan insanlarda kolorektal kanser gibi bazı kanser tiplerinin sıklığında azalma gösterilmiştir [59]. Son yapılan çalışmalarda diklofenak sodyumun radyoprotektif etkisinden bahsedilmektedir [11].

3. MATERYAL VE METOD

Bu çalışma 2012-2013 yıllarında İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya AD, Histoloji ve Embriyoloji AD, Radyasyon Onkolojisi AD ve Eczacılık Fakültesi Farmakoloji AD tarafından gerçekleştirilmiştir. Çalışmamız İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 25.09.2012 tarihinde 2012/135 nolu protokol ile desteklenmiş olup, 20.11.2012 tarihinde 2012/A-113 protokolü ile İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır.

İnönü Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarında oda sıcaklığında barındırılan, standart laboratuvar yemi ve su ile beslenen 40 adet Wistar Albino cinsi erkek rat çalışmaya dahil edildi. Deneklerin ortalama ağırlığı 180-220 gr olup 12 saatlik periyotlarla karanlık ve ışıkta, bölmeli kafeslerde barındırıldı.

3.1. Gruplar

Araştırmada, her grupta 8 rat olmak üzere 5 grupta toplam 40 adet rat kullanıldı. Ratlar aşağıdaki gibi gruplandırıldı;

Grup 1 (n:8): Kontrol grubu (K)

Grup 2 (n:8): Radyasyon grubu (R)

Grup 3 (n:8): Melatonin ve radyasyon grubu (M)

Grup 4 (n:8): Diklofenak ve radyasyon grubu (D)

Grup 5 (n:8): Melatonin, diklofenak ve radyasyon grubu (MD)

3.2. Metod

Kontrol (K) grubunda; deneklere herhangi bir uygulama yapılmadı.

Radyasyon (R) grubunda; deneklere tüm vücutlarını ışınlamak amacıyla 70 Gy gama radyasyon verildi. Radyasyon uygulaması için İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyasyon Onkolojisi AD bünyesinde bulunan LINAC cihazı kullanıldı. Uygulama 50 mg/kg ketamin kullanılarak anestezi altında yapıldı.

Melatonin ve radyasyon (M) grubunda; deneklere 5 gün süreyle 100 mg/kg melatonin [SF/Etanol (5/1) içerisinde taze hazırlanmış homojen melatonin süspansiyonu] ip. yoldan uygulandı. Son uygulamadan 1 saat sonra 70 Gy tüm vücut gama radyasyon verildi [60].

Diklofenak ve radyasyon (D) grubunda; deneklere 5 gün süreyle 8 mg/kg [SF içerisinde çözerek (1.6 mg/ml)] Diklofenak sodyum (Novartis) oral yoldan verildi. Burada diklofenak sodyumun ratlar için antiinflamatuvar dozu tercih edildi [61]. Son dozdan 1 saat sonra 70 Gy tüm vücut gama radyasyon uygulandı.

Melatonin, diklofenak ve radyasyon (MD) grubunda; deneklere 5 gün süreyle 100 mg/kg melatonin ip., diklofenak 8 mg/kg oral ve bu uygulamaların sonuncusundan 1 saat sonra 70 Gy tüm vücut gama radyasyon verildi.

3.3. Kan ve Beyin Doku Örneklerinin Alınması

Radyasyon uygulamasından 48 saat sonra kan örnekleri anestezi (50 mg/kg ketamin ip.) altındaki ratların kalbinden enjektörle yeteri kadar (5 ml) alındı. Beyin dokuları ratların kafatası açılarak alındı ve buz soğukluğundaki salin ile yıkandıktan sonra bir lobu biyokimyasal analizler için alüminyum folyoya sarılarak analiz edilinceye kadar -70°C'de saklandı. Diğer lobu histolojik incelemeler için %40 formaldehit içine konularak muhafaza edildi. Kan örnekleri santrifüj edilerek (3500 rpm, 10 dk) serumları ayrıldı ve analiz edilinceye kadar -70°C'de saklandı.

3.4. Doku Homojenizasyonu

Dondurulmuş doku örnekleri 0,5 g olacak şekilde tartıldı ve içerisinde proteaz inhibitör kokteyli (Sigma) bulunan (100 ml tampon için 1 ml) buz soğukluğundaki fosfat tamponu (25 mM potasyum fosfat, 0,25 mM EDTA, pH 7,0) kullanılarak (1:10, w/v) homojenizatör ile buz içerisinde homojenize edildi. MDA analizi için farklı bir tampon (50 mM KH₂PO₄-K₂HPO₄, pH 7,0) kullanılarak yeni bir

homojenat hazırlandı. Homojenatlar 15000 rpm'de 20 dk santrifüj edilerek katı partiküller çöktürüldü. Ayrılan süpernatant, yapılacak biyokimyasal analizlerde kullanılmak üzere alındı. Süpernatantların protein düzeyleri, standart olarak sığır serum albumini kullanan Lowry metodu ile ölçüldü ve biyokimyasal analizler için -70°C'de donduruldu.

3.5. Biyokimyasal Analizler

3.5.1. Kullanılan Cihazlar

Spektrofotometre
Otomatik pipet
Sıcak su banyosu
Manyetik karıştırıcı
Buz makinesi
Vorteks
Derin Dondurucu
Dijital pH metre
Soğutmalı Santrifüj
Elektrikli Terazi
Santrifüj
Distile su cihazı

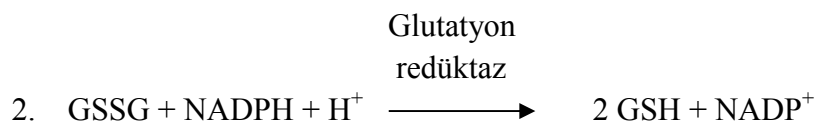
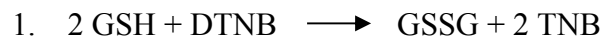
3.5.2. Kullanılan Kimyasallar

Thioredoxin Reductase Assay Kit (Sigma®)
Thioredoxin Rat, Trx ELISA Kit (Eastbiopharm®)
Glutathion Assay Kit (Sigma®)
Rat C-Reaktive Protein ELISA Kit (Eastbiopharm®)
Melatonin
L-Glutathion oxidized disodium salt
NADPH
tert-Butyl hydroperoxide solution
L-Glutathion reduced
Glutathion reductase
Tris base
Tris hydrochloride

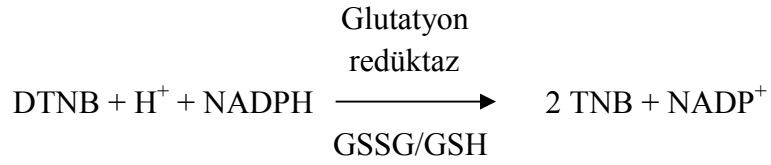
Ethylene diamine tetraacetic acid
FAD disodium salt hydrate
Sodium carbonate
Sodium hydroxide
Copper sulphate
Potassium sodium tartrate solution
Folin&ciocalteu's phenol reagent
Albumin from bovine serum
2,4-Dinitrophenylhydrazine (DNPH)
Trichloro acetic acid (TCA)
Guanidine hydrochloride
Ethyl acetate
Ethanol
Sodium dodecyl sulfate
Acetic acid
2-Thiobarbituric acid
1,1,3,3-Tetramethoxypropane
n-Butanol
Pyridine solution

3.5.3. Glutasyon Ölçümü

Sigma marka analiz kiti kullanılarak ölçüm yapılmıştır. Kullanılan yöntemde biyolojik örnek ilk olarak %5 SSA solüsyonu ile deproteinize edilmekte, çökmüş proteini uzaklaştırmak üzere santrifüj edilmekte ve daha sonra glutasyon için analiz edilmektedir. GSH ölçümü kinetik bir analiz ile kullanılmaktadır. Bu analizde DTNB sürekli olarak TNB'ye indirgenmekte ve oluşan GSSG'nin geri dönüşümü glutasyon redüktaz ve NADPH tarafından sağlanmaktadır. Mevcut GSSG ayrıca bu reaksiyonda pozitif bir değer vermek üzere reaksiyona girmektedir.



Birleşik reaksiyon:

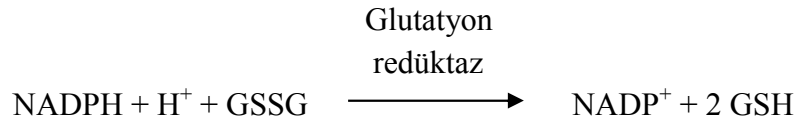


Sarı ürün, 5-tiyo-2-nitrobenzoik asid (TNB) 412 nm’de spektrofotometrik olarak ölçülmektedir. Analizde biyolojik örnekteki glutatyon miktarını ölçmek için standart bir redükte glutatyon eğrisi kullanılmaktadır [62].

3.5.4. Glutatyon Redüktaz Ölçümü

3.5.4.1. Prensip

Glutatyon Redüktaz, GSSG’nin NADPH tarafından GSH’a indirgenmesini katalize eder. Enzim aktivitesi, tepkime sırasında yükseltgenen NADPH’ın 37 °C’de, 340 nm dalga boyunda absorbans farkı ölçülerek belirlenir [63].



3.5.4.2. Reaktifler

1. 1 M Tris Tamponu (pH: 8,0)

Tris asit (anhidröz) 8,8 g

Tris baz (anhidröz) 5,4 g

EDTA (anhidröz) 0,14g

Saf su ile 100 ml’ye tamamlanır.

2. 10 µM FAD

Stok (1 mM FAD) için; FAD (anhidröz) 80 mg

Saf su ile 100 ml’ye tamamlanır.

1:100 seyreltilerek 10 µM FAD hazırlanır.

3. 0,033 M GSSG

GSSG 210 mg

Saf su ile 10 ml’ye tamamlanır.

Kullanılacak olan miktar günlük olarak hazırlanır.

4. 2 mM NADPH

NADPH 17 mg

Saf su ile 10 ml'ye tamamlanır.

Kullanılacak olan miktar günlük olarak hazırlanır.

3.5.4.3. Yöntem

Ayrıraçlar 1 ml'lik küvetlere tablo 1' de belirtilen oranlarda ilave edilir.

Tablo 1. Glutatyon redüktaz ölçüm yöntemi

	Kör (µl)	Örnek (µl)
1M Tris Tamponu	50	50
Süpernatant	10	10
Saf Su	790	690
10 µM FAD	100	100
<i>37 °C'de 10 dakika inkübasyon</i>		
0,033 M GSSG	-	100
<i>37 °C'de 10 dakika inkübasyon</i>		
2 mM NADPH	50	50

Glutatyon Redüktaz bir flavin enzimdir. Normal süpernatantlarda FAD tarafından tam olarak aktive edilmediği bulunmakla birlikte apoenzimin tam aktivasyonu için enzimin FAD ile preinkübasyonu gereklidir.

3.5.4.4.Hesaplama

$$\text{GSH-R Aktivitesi (Ü/ml)} = \frac{\Delta\text{OD/dak}}{6,22} \times \frac{V_{\text{Toplam}}}{V_{\text{Örnek}}}$$

$\Delta\text{OD/dak}$ = Dakikadaki Optik Dansite Değişimi

6,22 = 1 mM NADPH'nin 1 cm'lik ışık yolunda verdiği OD değeri

$V_{\text{Toplam}} = \text{Toplam hacim}$

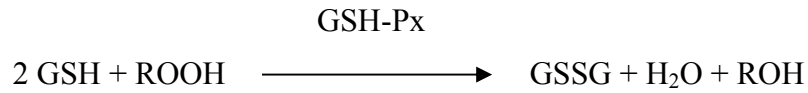
$V_{\text{Örnekleme}} = \text{Süpernatant hacmi}$

$\text{GSH-R Spesifik Aktivitesi} = \text{GSH-R Aktivitesi} / \text{Doku Protein miktarı}$

3.5.5. Glutasyon Peroksidaz Ölçümü

3.5.5.1. Prensip

Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) ile t-bütül hidroperoksit varlığında GSH'nin GSSG'ye oksidasyonu gerçekleşir. Yöntem, bu oksidasyon sonucu oluşan GSSG'nin glutasyon redüktaz (GSH-R) enzimi ile tekrar GSH'ye indirgenmesi tepkimesinde NADP'ye oksitlenen NADPH'nin 340 nm dalga boyundaki absorbans değeri farkının zamana karşı okunması prensibine dayanır [63].



3.5.5.2. Reaktifler

1. 1 M Tris Tamponu (pH: 8,0)

Tris asit (anhidröz) 8,8 g

Tris baz (anhidröz) 5,4 g

EDTA (anhidröz) 0,14 g

Saf su ile 100 ml'ye tamamlanır.

2. 0,1 M GSH

GSH 31 mg

Saf su ile 1 ml'ye tamamlanır.

Gerekli miktarda günlük olarak hazırlanır.

3. 10 U/ml Glutasyon Redüktaz

100U/0,22 ml GR 0,11 ml

Saf su ile 5 ml'ye tamamlanır.

4. 7 mM t-butil hidroperoksit

%70'lik t-butilhidroperoksit saf su ile 1:1000 sulandırılır.

5. 2 mM NADPH

NADPH 17 mg

Saf su ile 10 ml'ye tamamlanır.

Gerekli miktar günlük olarak hazırlanır.

3.5.5.3. Yöntem

Ayıracılar 1 ml'lik küvetlere tablo 2'de belirtilen oranlarda ilave edilir.

Tablo 2. Glutasyon peroksidaz ölçüm yöntemi

	Kör (µl)	Örnek (µl)
1 M Tris Tamponu	100	100
0,1 M GSH	20	20
10 Ü/ml Glutasyon Redüktaz	100	100
2 mM NADPH	100	100
Süpernatant	10	10
Saf Su	670	660
<i>37 °C'de 10 dakika inkübasyon</i>		
t-Bütil hidroperoksit	–	10

3.5.5.4. Hesaplama

1 cm ışık yollu kuvarz küvetlerde, 37 °C'de, 340 nm dalga boyunda oluşan tepkimenin absorbans değişikliği farklı zaman aralıklarında izlenir.

$$\text{GSH-Px Aktivitesi (Ü/ml)} = \frac{\Delta\text{OD/dak}}{6,22} \times \frac{V_{\text{Toplam}}}{V_{\text{Örnek}}}$$

$\Delta OD/dak = \text{Dakikadaki Optik Dansite Değişimi}$

$6,22 = 1 \text{ mM NADPH'nin } 1 \text{ cm'lik ışık yolunda verdiği OD değeri}$

$V_{\text{Toplam}} = \text{Toplam hacim}$

$V_{\text{Ömek}} = \text{Süpernatant hacmi}$

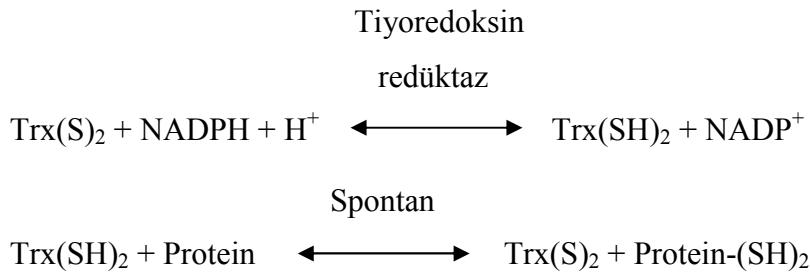
$\text{GSH-Px Spesifik Aktivitesi} = \text{GSH-Px Aktivitesi} / \text{Doku protein miktarı}$

3.5.6. Tiyoredoksin Ölçümü

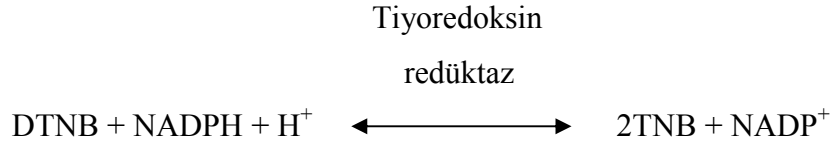
Eastbiopharm[®] marka ELISA kiti kullanılarak ölçüm yapılmıştır. Bu kit numunelerdeki tiyoredoksin düzeyini ölçmek için duble-antikor sandviç tekniğini kullanmaktadır. Bu teknikte numune, Rat-Trx antikorlarıyla kaplı kuyucuklara konulmakta, inkübasyondan sonra üzerine immün kompleks oluşturmak üzere Streptavidin-HRP ile bağlanabilen, biotin işaretli Rat-Trx antikorları eklenmektedir. Tekrar bir inkübasyonun ardından bağlanmamış enzimleri uzaklaştırmak amacıyla yıkama işlemi uygulanmaktadır. Bu şekilde Rat-Trx'ler kuyucuklardaki antikorlarla tutulup biotinli antikorlarla işaretlenmektedir. Bu aşamadan sonra kromojen solüsyonlar eklenerek, biotine bağlanmış bulunan Streptavidin-HRP'nin etkisiyle mavi renk elde edilmektedir. Son aşamada stop solüsyon eklenerek ani bir sarı renk oluşturulmakta ve 450 nm'de optik dansite ölçülmektedir. Hesaplama hazırlanan standartlar baz alınarak yapılmakta ve sonuçlara ulaşılmaktadır.

3.5.7. Tiyoredoksin Redüktaz Ölçümü

Sigma marka analiz kiti kullanılarak ölçüm yapılmıştır. Tiyoredoksin redüktazın substrat olarak tiyoredoksin kullandığı in vivo redüksiyon reaksiyonu aşağıdaki gibidir:



Memeli tiyoredoksin redüktaz aktivitesi substrat olarak DTNB kullanan kit ile değerlendirilmiştir.



Okside olan her 1 mol NADPH'a karşılık 2 mol 5-tiyo-2-nitrobenzoik asit (TNB) oluşmaktadır. Analiz oda sıcaklığında (25°C) gerçekleştirilmekte ve TNB 412nm'de maksimum absorpsiyon göstermektedir (molar absorpsiyon katsayısı [ϵ M] 14,150 M⁻¹cm⁻¹). Ham biyolojik örneklerde, glutatyon redüktaz ve glutatyon peroksidaz gibi diğer enzimler de DTNB'yi indirgeyerek DTNB redüksiyonunu hızlandıracaktır. Bu aktivitelerin toplam DTNB redüksiyonuna katkısı spesifik bir tiyoredoksin redüktaz inhibitörü kullanılarak tespit edilebilir. Sadece tiyoredoksin redüktaz aktivitesine bağlı DTNB redüksiyonunu değerlendirmek için iki analize ihtiyaç duyulacaktır: ilk ölçüm toplam DTNB redüksiyonu, ikincisi ise tiyoredoksin redüktaz inhibitörü varlığında yapılan ölçümdür. İki ölçüm arasındaki fark tiyoredoksin redüktaz aktivitesine bağlı DTNB redüksiyonudur [64,65].

3.5.8. Serum High Sensitive C-Reaktif Protein (HS-CRP) Ölçümü

Eastbiopharm[®] marka ELISA kiti kullanılarak ölçüm yapılmıştır. Bu kit serumdaki CRP düzeyini ölçmek için duble-antikör sandviç tekniğini kullanmaktadır. Bu teknikte numune, Rat-HS-CRP antikörleriyle kaplı kuyucuklara konulmakta, inkübasyondan sonra üzerine immün kompleks oluşturmak üzere Streptavidin-HRP ile bağlanabilen, biotin işaretli Rat-HS-CRP antikörleri eklenmektedir. Tekrar bir inkübasyonun ardından bağlanmamış enzimleri uzaklaştırmak amacıyla yıkama işlemi uygulanmaktadır. Bu şekilde Rat-HS-CRP'ler kuyucuklardaki antikörlerle tutulup biotinli antikörlerle işaretlenmektedir. Bu aşamadan sonra kromojen solüsyonlar eklenerek, biotine bağlanmış bulunan Streptavidin-HRP'nin etkisiyle mavi renk elde edilmektedir. Son aşamada stop solüsyon eklenerek ani bir sarı renk oluşturulmakta ve 450 nm'de optik dansite ölçülmektedir. Hesaplama hazırlanan standartlar baz alınarak yapılmakta ve sonuçlara ulaşılmaktadır.

3.5.9. TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances) Ölçümü

Hücre membranının lipoprotein yapısındaki poliansatüre yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu yan ürün olarak TBARS oluşur. Aerobik ortam şartlarında TBARS pH 3,4'te TBA ile 95 °C'de 30 dakika inkübasyon edildiğinde pembe renkli

bir kompleks oluşturur. Bu kompleks spektrofotometrede 532 nm dalga boyunda ölçülür [66,67].

3.5.9.1.Reaktifler

1. % 8,1 Sodyum dodesil sülfat (SDS)

Sodyum dodesil sülfat (SDS) 8,1 g

Saf suyla 100 ml'ye tamamlanır.

2. % 20 Asetik asit (HAc) (pH 3,5)

Asetik asit 20 ml

Saf su ile 100 ml'ye tamamlanır.

pH: 3,5'e NaOH ilavesiyle ayarlanır.

3. % 0,8 Tiyobarbitürik asit (TBA) (pH 3,5)

Tiyobarbitürik asit 0,8 g

Saf su ile 100 ml'ye tamamlanır.

pH: 3,5'e NaOH ilavesiyle ayarlanır.

4. n-Butanol-Piridin (nBu-Piri) çözeltisi (15/1)

n-Butanol 15 ml

Piridin 1 ml

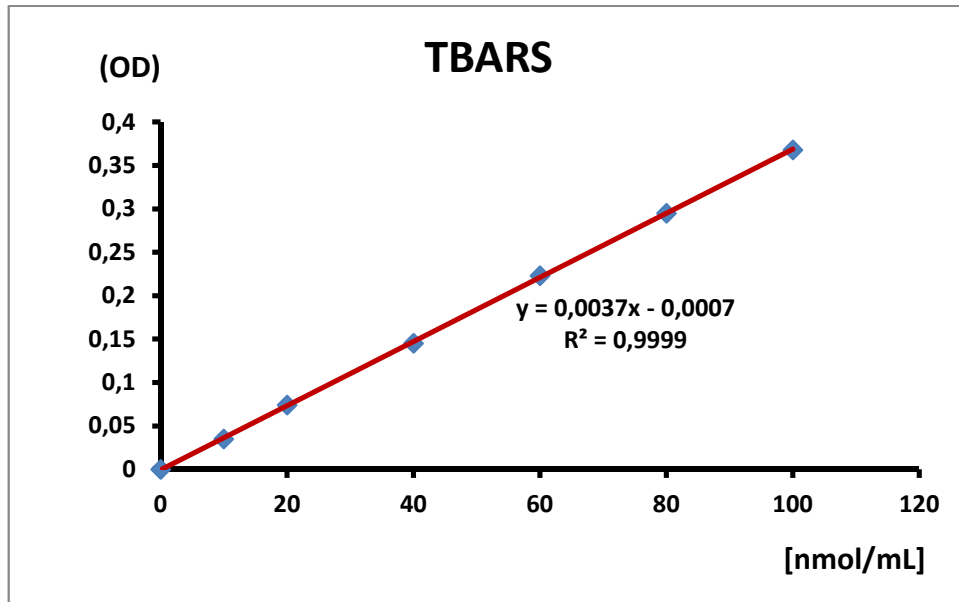
5. Stok standart: 1,1,3,3-tetrametoksipropan (yoğunluk: 0,99 g/ml)

3.5.9.2. Standart Eğri Çalışması

Günlük standart: Stok standarttan 6,6 µl alınarak 100 ml'ye saf su ile tamamlanır. 400 nmol/ml'lik günlük standart elde edilmiş olur. Daha sonra 10, 20, 40, 60, 80 ve 100 nmol/ml'lik çalışma standartları hazırlanır. Standart eğri çizimi için aşağıdaki tabloda gösterilen işlemler uygulanır. Kuvvetli şekilde çalkalanır ve 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir. Üstteki organik kısım alınır 532 nm'de absorbansı okunur.

Tablo 3. TBARS standart eğri çalışması

Çözeltiler (ml)	Kör	10	20	40	60	80	100
		nmol	nmol	nmol	nmol	nmol	nmol
Standart	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
% 8,1 SDS	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
% 20 HAc	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
% 0,8 TBA	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Saf su	0,8	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7
<i>95 °C’de benmaride 30 dakika inkübe edildikten sonra soğutulur.</i>							
Saf su	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
nBu/Piri	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0



Şekil 2. TBARS standart eğri grafiği

3.5.9.3. Yöntem

TBARS miktarını tespit etmek için tablo 4’ de gösterilen işlemler uygulanır.

Tablo 4. TBARS ölçüm yöntemi

Çözeltiler (ml)	Kör	Standart	Örnek
Standart (10 nmol/ml)	-	0,1	-
Örnek	-	-	0,1
% 8,1 SDS	0,2	0,2	0,2
% 20 HAc	1,5	1,5	1,5
% 0,8 TBA	1,5	1,5	1,5
Saf su	0,8	0,7	0,7
<i>95 °C'de benmaride 30 dakika inkübe edildikten sonra soğutulur.</i>			
Saf su	1,0	1,0	1,0
nBu/Piri	5,0	5,0	5,0

Kuvvetli şekilde çalkalama işleminden sonra 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir. Üstteki organik kısım alınarak 532 nm dalga boyundaki absorbanlar kaydedilir. Elde edilen sonuçlar standart egriden değerlendirilir.

3.5.10. Protein Ölçümü

Protein miktarı Lowry ve arkadaşlarının metoduna göre tayin edilmiştir. Proteinlerin çoğu tirozin, triptofan ya da her iki aminoasidi içerirler. Bu aminoasitler serbest veya katlanmamış polipeptid zincirinde mavi renk oluşturmak üzere fosfotungstik asit-molibdik asit ayıracını (Folin-Ciocalteu) indirgerler. Bu yöntemde proteinler ilk olarak bakır-peptid bağı-protein kompleksini oluşturmak üzere alkali çözeltide Cu^{+2} ile reaksiyona girer. Ortama Folin-Ciocalteu ayıracı eklendiği zaman indirgeme süreci esnasında bakır-protein kompleksleri ile tirozin, triptofan kalıntıları birleşirler. Renklendirilmiş çözeltinin absorbanı 660 nm dalga boyunda ölçülür [68].

3.5.10.1. Reaktifler

1. Bovin serum albumin (BSA) stok solüsyon (1 mg/ml)
2. Alkali Sodyum Karbonat çözeltisi (50 ml %2 Na₂CO₃ + 50 ml 0,1 N NaOH)
3. Bakır Sülfat - Sodyum Potasyum Tartarat çözeltisi
 - a) %1,56 CuSO₄ 10 ml
 - b) %2,37 Na-K tartarat 10 ml
4. Alkali çözelti (günlük olarak hazırlanır): 100 ml alkali Sodyum Karbonat ile 2 ml Bakır Sülfat - Sodyum Potasyum Tartarat çözeltisi karıştırılır.
5. Folin-Ciocalteu Ayırıcı: 1 ml Folin-Ciocalteu reaktif solüsyonu 1 ml saf su ile dilüe edilecek şekilde istenilen hacimde hazırlanır.

3.5.10.2. Standart Eğri Çalışması

BSA stok solüsyon ile tablo 5'e göre dilüsyon yaparak standartlar oluşturulur.

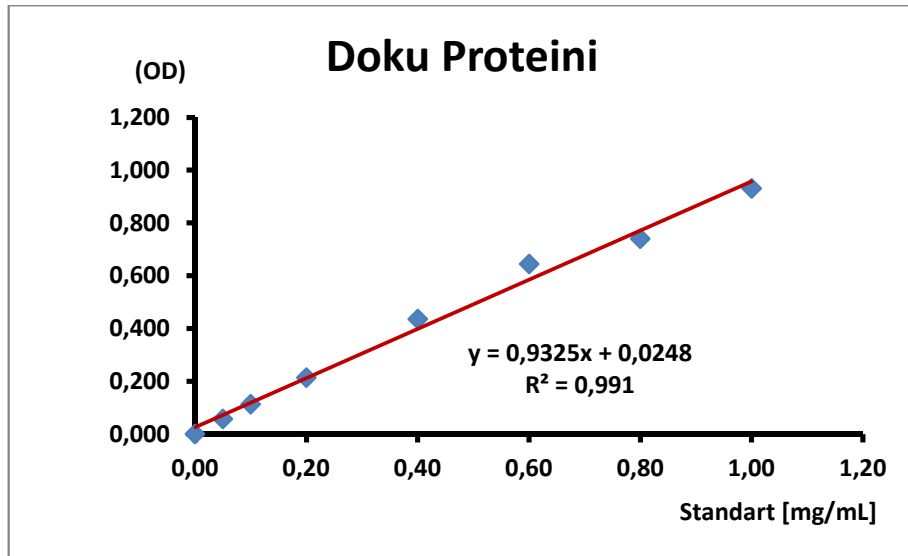
Tablo 5. BSA standardı için dilüsyon tablosu

Çözeltiler (ml)	0,05 mg/ml	0,1 mg/ml	0,2 mg/ml	0,4 mg/ml	0,6 mg/ml	0,8 mg/ml	1,0 mg/ml
BSA	0,25	0,5	1	2	3	4	5
Saf su	4,75	4,5	4	3	2	1	0

Tablo 6. BSA standart eğri çalışması

Çözeltiler (ml)	0,05	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
	mg/ml	mg/ml	mg/ml	mg/ml	mg/ml	mg/ml	mg/ml
BSA	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Alkali çözelti	2	2	2	2	2	2	2
<i>Oda sıcaklığında 10 dakika bekletilir.</i>							
Folin-Ciocalteu	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
<i>30 dakika inkübe edilir.</i>							

30 dakika inkübasyondan sonra 660 nm dalga boyundaki absorbanslar kaydedilir. Elde edilen sonuçlarla standart eğri oluşturulur.



Şekil 3. Protein standart eğri grafiği

3.5.10.3. Yöntem

Tablo 7. Protein ölçüm yöntemi

Çözeltiler (ml)	Numune	Kör
Örnek	0,2	-
Saf su	-	0,2
Alkali çözelti	2	2
<i>Oda sıcaklığında 10 dakika bekletilir.</i>		
Folin-Ciocalteu reaktifi	0,2	0,2
<i>30 dakika inkübe edilir.</i>		

Oda ısısında 30 dakika bekletildikten sonra 660 nm dalga boyundaki absorbands değerleri kaydedilir. Elde edilen değerler standart eğriden değerlendirilir.

3.6. Histolojik İnceleme

Ratların beyin dokuları 3 mm eninde dilimlere ayrıldı. Daha sonra plastik doku takip kasetlerine konularak %10'luk formaldehit içerisinde 48 saat süre ile fikse edildi. Fiksasyon işleminin ardından dokular 24 saat boyunca akan çeşme suyunda yıkandılar. Dereceli alkollerde dehidrate edilerek, ksilende şeffaflaştırılıp parafine gömüldüler. Parafin bloklardan Leica RM2145 marka mikrotom yardımıyla 5'er mikron'luk kesitler alındı. Kesitlere genel histolojik yapıyı gözlemlemek amacıyla hematoksilin ve eozin, nöron gövdelerini ayırt etmek amacıyla da krezil viyolet boyama yöntemleri uygulandı. Histolojik değerlendirme için; serebral korteksde infiltrasyon ve nöron yerleşim düzeninde bozulma değerlendirildi ve 0-3 arası skorlama yapıldı. Skor 0: normal (hasar yok), skor 1: hafif (<%0-20 serebral korteks hasarı), skor 2: orta (%21-50 serebral korteks hasarı), skor 3: şiddetli (%50-100 serebral korteks hasarı) olarak gruplandırıldı. Ayrıca serebral korteksde 10 farklı alanda X40 objektif kullanılarak dejenere nöron (sitoplazması asidofil, nükleusu heterokromatik ve büzüşmüş nöronlar) ve toplam nöron sayısı hesaplandı. Preparatlar Leica DFC280 ışık mikroskobu ve Leica Q (Leica Micros Imaging

solution Ltd, Cambrige, UK) görüntü analiz sistemi ile incelenerek skorlandı, fotoğrafları çekildi.

3.7. İstatistiksel Analiz

Bulguların değerlendirilmesinde MedCalc® istatistiksel analiz programı kullanıldı. Grup ortalamaları arasında fark olup, olmadığının tespiti için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) uygulandı. ANOVA testi anlamlı bulunan parametrelerde farkın, hangi grup ya da gruplardan kaynaklandığını test etmek üzere *Student-Newman-Keuls* ikili karşılaştırma analizi kullanıldı. Ayrıca test parametreleri arasında ilişki olup, olmadığını belirlemek üzere *Pearson* korelasyon analizi yapıldı. Sonuçların ifadesinde ortalama \pm SD gösterimi kullanıldı ve istatistiksel anlamlılık düzeyi olarak $p < 0,05$ değeri kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Biyokimyasal Bulgular

Çalışmamızda beş günlük ilaç uygulamalarından sonra radyasyon alan ratların beyin dokularında GSH, GSH-Px, GSH-R, Trx, Trx-R ve TBARS, serumlarında ise CRP düzeylerine bakıldı. Tablo 8’ de tüm parametrelere ait grup ortalama ve standart sapma değerleri verilmiştir.

Tablo 8. Tüm parametrelere ait grup ortalama ve standart sapma değerleri

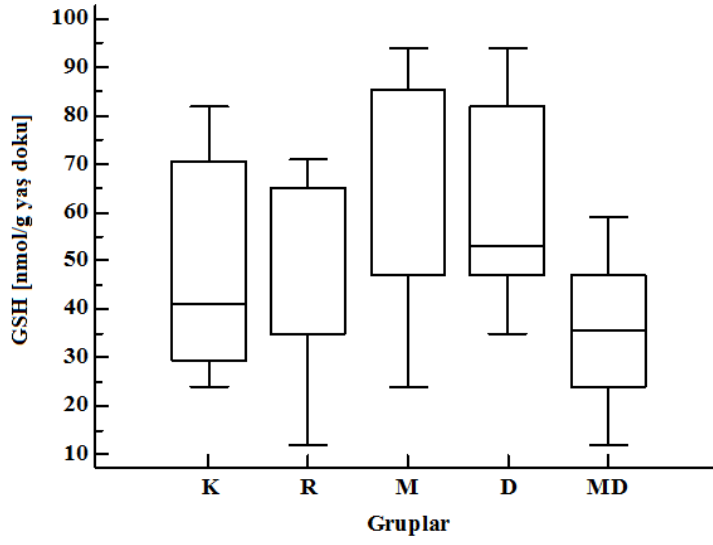
	Grup									
	K		R		M		D		MD	
	n	Ort±SD	n	Ort±SD	n	Ort±SD	n	Ort±SD	n	Ort±SD
GSH	8	48.5±23.7	7	43.7±21.3	7	58.9±26.2	6	60.7±22.8	6	35.5±18.1
GSH-Px	8	158.8±32.0	7	134.4±35.4	8	200.4±32.1 ^a	5	156.2±9.6	8	169.3±14.7
GSH-R	7	55.7±9.0	8	53.5±20.7	7	75.7±10.5 ^b	6	60.3±5.7	8	66.0±4.6
Trx	8	104.4±15.5	8	102.4±15.5	8	104.8±17.9	6	94.0±18.7	8	102.0±16.3
Trx-R	7	18.4±10.1	8	20.9±11.9	8	22.1±9.7	6	22.2±2.9	7	20.3±4.8
TBARS	8	22.3±3.3	8	44.1±14.4 ^c	8	29.0±9.4	7	29.4±4.2	6	27.0±7.3
CRP	8	85.4±3.7	8	83.1±11.8	7	85.1±5.8	6	81.8±6.3	8	85.3±4.6

^ap=0.05 istatistiksel anlamlılık düzeyine göre M grup ortalaması diğer grup ortalamalarından farklı bulundu.

^bp=0.05 istatistiksel anlamlılık düzeyine göre M grup ortalaması K ve R grup ortalamalarından farklı bulundu.

^cp=0.05 istatistiksel anlamlılık düzeyine göre R grup ortalaması diğer grup ortalamalarından farklı bulundu.

Beyin doku homojenatı GSH düzeyleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (Şekil 4).

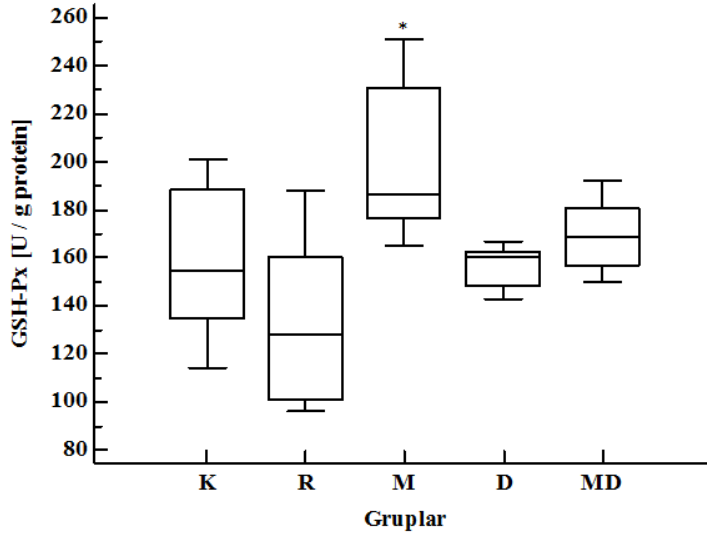


Şekil 4. Beyin doku homojenatı GSH düzeyleri. (K:kontrol; R:radyasyon; M:melatonin; D:diklofenak MD:melatonin+diklofenak). p=0.05 istatistiksel anlamlılık düzeyine göre gruplar arasında fark yoktur.

Tablo 9. Beyin doku homojenatı GSH düzeyleri grup ortalamaları

	Grup									
	K		R		M		D		MD	
	n	Ort±SD	n	Ort±SD	n	Ort±SD	n	Ort±SD	n	Ort±SD
GSH	8	48.5±23.7	7	43.7±21.3	7	58.9±26.2	6	60.7±22.8	6	35.5±18.1

Beyin doku homojenatı GSH-Px aktivite düzeyleri melatonin grubunda diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu ($p<0,05$). Grupların sahip oldukları GSH-Px aktivite düzeyleri kıyaslandığında, gruplar arasında: [M] > [MD] > [D] > [K] > [R] şeklinde bir sıralamanın mevcut olduğu görülmektedir (Şekil 5).



Şekil 5. Beyin doku homojenatı GSH-Px aktivite düzeyleri. (K:kontrol; R:radyasyon; M:melatonin; D:diklofenak MD:melatonin+diklofenak).

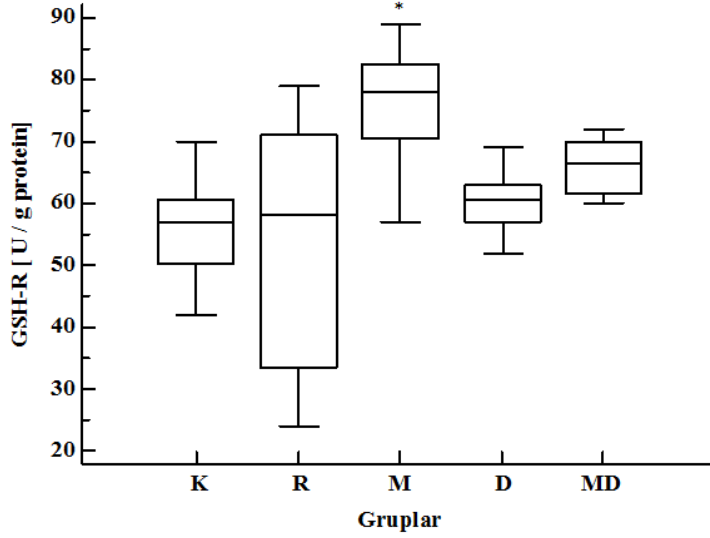
* $p=0.05$ istatistiksel anlamlılık düzeyine göre M grup ortalaması diğer grup ortalamalarından farklı bulundu.

Tablo 10. Beyin doku homojenatı GSH-Px aktivite düzeyleri grup ortalamaları

	Grup									
	K		R		M		D		MD	
	n	Ort±SD	n	Ort±SD	n	Ort±SD	n	Ort±SD	n	Ort±SD
GSH-Px	8	158.8±32.0	7	134.4±35.4	8	200.4±32.1 ^a	5	156.2±9.6	8	169.3±14.7

^a $p=0.05$ istatistiksel anlamlılık düzeyine göre M grup ortalaması diğer grup ortalamalarından farklı bulundu.

Beyin doku homojenatı GSH-R aktivite düzeyleri melatonin grubunda kontrol ve radyasyon grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu ($p<0,05$). Grupların sahip oldukları GSH-R aktivite düzeyleri kıyaslandığında, gruplar arasında: $[M] > [MD] > [D] > [K] > [R]$ şeklinde bir sıralamanın mevcut olduğu görülmektedir (Şekil 6).



Şekil 6. Beyin doku homojenatı GSH-R aktivite düzeyleri. (K:kontrol; R:radyasyon; M:melatonin; D:diklofenak MD:melatonin+diklofenak).

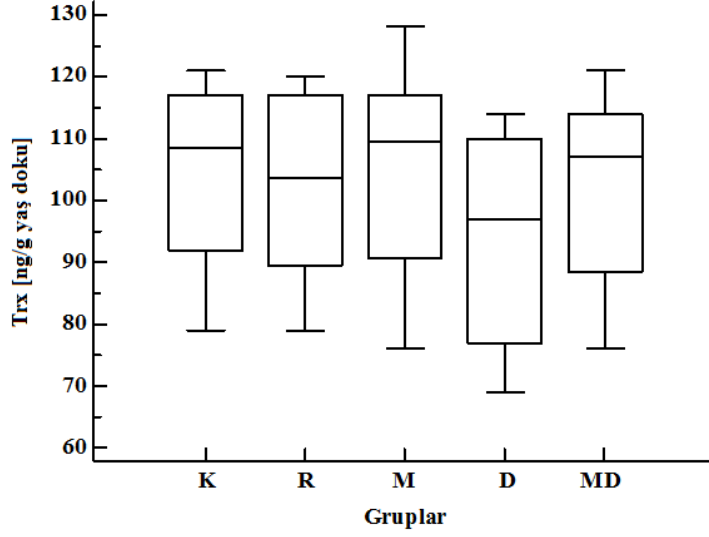
* $p=0.05$ istatistiksel anlamlılık düzeyine göre M grup ortalaması K ve R grup ortalamalarından farklı bulundu.

Tablo 11. Beyin doku homojenatı GSH-R aktivite düzeyleri grup ortalamaları

	Grup									
	K		R		M		D		MD	
	n	Ort±SD	n	Ort±SD	n	Ort±SD	n	Ort±SD	n	Ort±SD
GSH-R	7	55.7±9.0	8	53.5±20.7	7	75.7±10.5 ^b	6	60.3±5.7	8	66.0±4.6

^b $p=0.05$ istatistiksel anlamlılık düzeyine göre M grup ortalaması K ve R grup ortalamalarından farklı bulundu.

Beyin doku homojenatı Trx düzeyleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (Şekil 7).

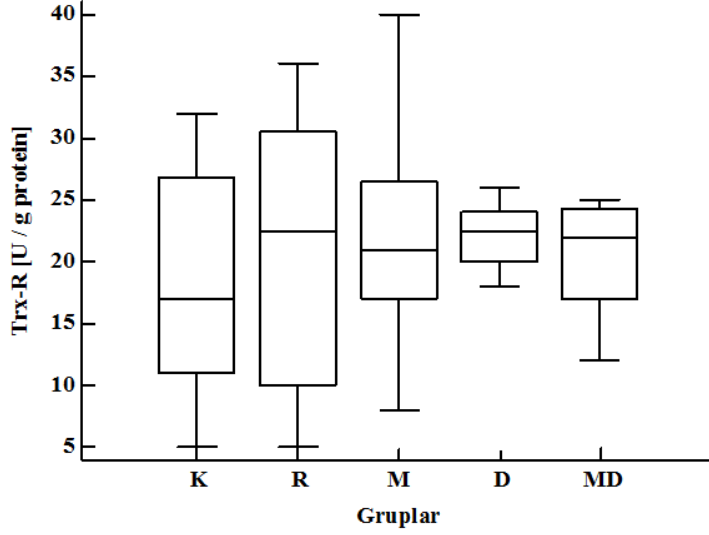


Şekil 7. Beyin doku homojenatı Trx düzeyleri. (K:kontrol; R: radyasyon; M: melatonin; D: diklofenak MD: melatonin+diklofenak). $p=0.05$ istatistiksel anlamlılık düzeyine göre gruplar arasında fark yoktur.

Tablo 12. Beyin doku homojenatı Trx düzeyleri grup ortalamaları

	Grup									
	K		R		M		D		MD	
	n	Ort±SD	n	Ort±SD	n	Ort±SD	n	Ort±SD	n	Ort±SD
Trx	8	104.4±15.5	8	102.4±15.5	8	104.8±17.9	6	94.0±18.7	8	102.0±16.3

Beyin doku homojenatı Trx-R aktivite düzeyleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı.

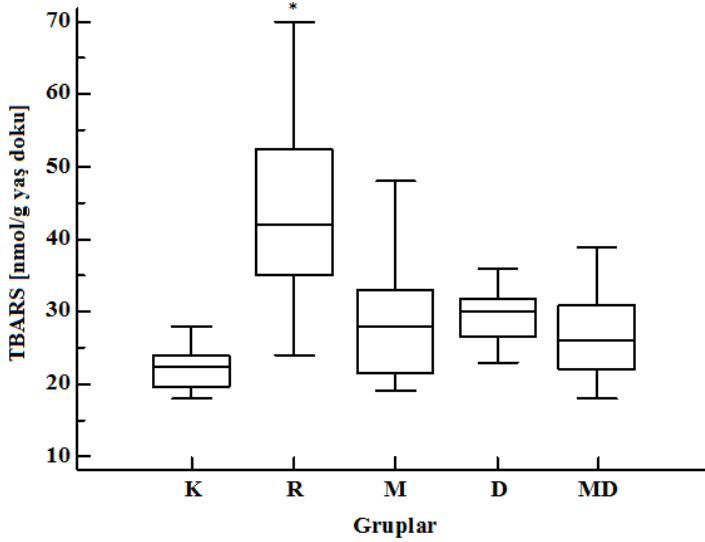


Şekil 8. Beyin doku homojenatı Trx-R aktivite düzeyleri. (K:kontrol; R: radyasyon; M: melatonin; D: diklofenak MD: melatonin+diklofenak). $p=0.05$ istatistiksel anlamlılık düzeyine göre gruplar arasında fark yoktur.

Tablo 13. Beyin doku homojenatı Trx-R aktivite düzeyleri grup ortalamaları

	Grup									
	K		R		M		D		MD	
	n	Ort±SD	n	Ort±SD	n	Ort±SD	n	Ort±SD	n	Ort±SD
Trx-R	7	18.4±10.1	8	20.9±11.9	8	22.1±9.7	6	22.2±2.9	7	20.3±4.8

Beyin doku homojenatı TBARS düzeyleri radyasyon grubunda diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu ($p < 0,05$). Grupların sahip oldukları TBARS düzeyleri kıyaslandığında, gruplar arasında: $[R] > [D] > [M] > [MD] > [K]$ şeklinde bir sıralamanın mevcut olduğu görülmektedir (Şekil 9).



Şekil 9. Beyin doku homojenatı TBARS düzeyleri. (K:kontrol; R:radyasyon; M:melatonin; D:diklofenak MD:melatonin+diklofenak).

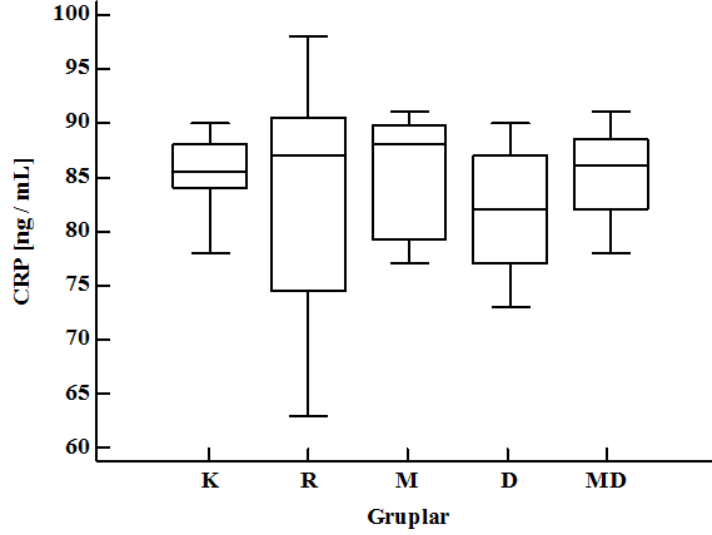
* $p=0.05$ istatistiksel anlamlılık düzeyine göre R grup ortalaması diğer grup ortalamalarından farklı.

Tablo 14. Beyin doku homojenatı TBARS düzeyleri grup ortalamaları

	Grup									
	K		R		M		D		MD	
	n	Ort±SD	n	Ort±SD	n	Ort±SD	n	Ort±SD	n	Ort±SD
TBARS	8	22.3±3.3	8	44.1±14.4 ^c	8	29.0±9.4	7	29.4±4.2	6	27.0±7.3

^c $p=0.05$ istatistiksel anlamlılık düzeyine göre R grup ortalaması diğer grup ortalamalarından farklı.

Serum CRP düzeyleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (Şekil 10).



Şekil 10. Serum CRP düzeyleri. (K:kontrol; R: radyasyon; M: melatonin; D: diklofenak MD: melatonin+diklofenak). $p=0.05$ istatistiksel anlamlılık düzeyine göre gruplar arasında fark yoktur.

Tablo 15. Serum CRP düzeyleri grup ortalamaları

	Grup									
	K		R		M		D		MD	
	n	Ort±SD	n	Ort±SD	n	Ort±SD	n	Ort±SD	n	Ort±SD
CRP	8	85.4±3.7	8	83.1±11.8	7	85.1±5.8	6	81.8±6.3	8	85.3±4.6

Tablo 16. Parametreler arası *Pearson* korelasyon analizleri tablosu

CRP	1,000						
GSH	-0,184	1,000					
GSH-Px	0,036	0,074	1,000				
GSH-R	-0,105	0,192	0,501	1,000			
TBARS	-0,050	0,129	-0,041	-0,034	1,000		
Trx	0,092	-0,273	-0,289	0,019	-0,145	1,000	
Trx-R	0,101	-0,054	0,452	0,388	0,287	-0,081	1,000
	CRP	GSH	GSH-Px	GSH-R	TBARS	Trx	Trx-R

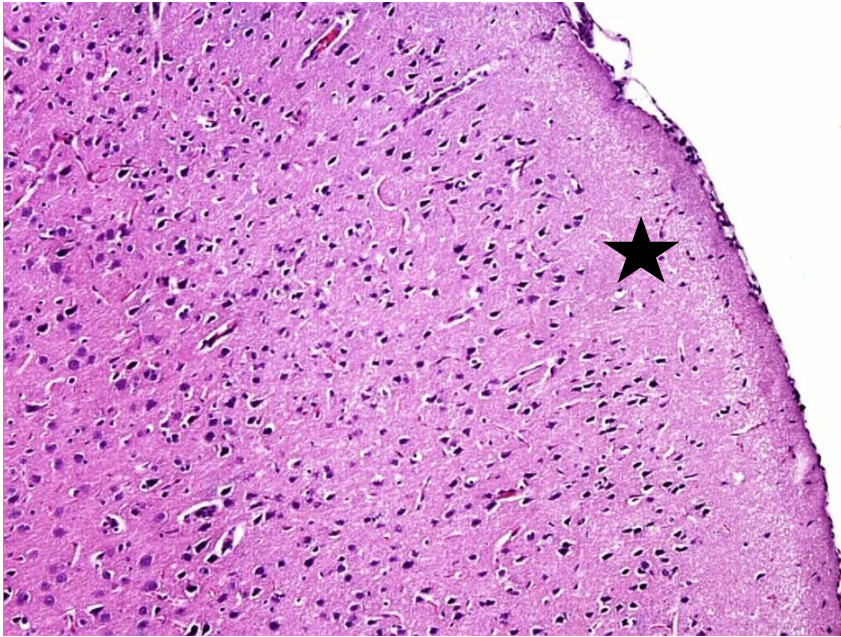
$p<0.05$ istatistiksel anlamlılık düzeyine göre; anlamlı bulunan korelasyon katsayıları koyu ve altı çizili olarak gösterilmiştir. Buna göre: GSH-Px, GSH-R ve Trx-R arasında her parametrenin diğer ikisi ile arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon tespit edilmiştir.

4.2. Histopatolojik Bulgular

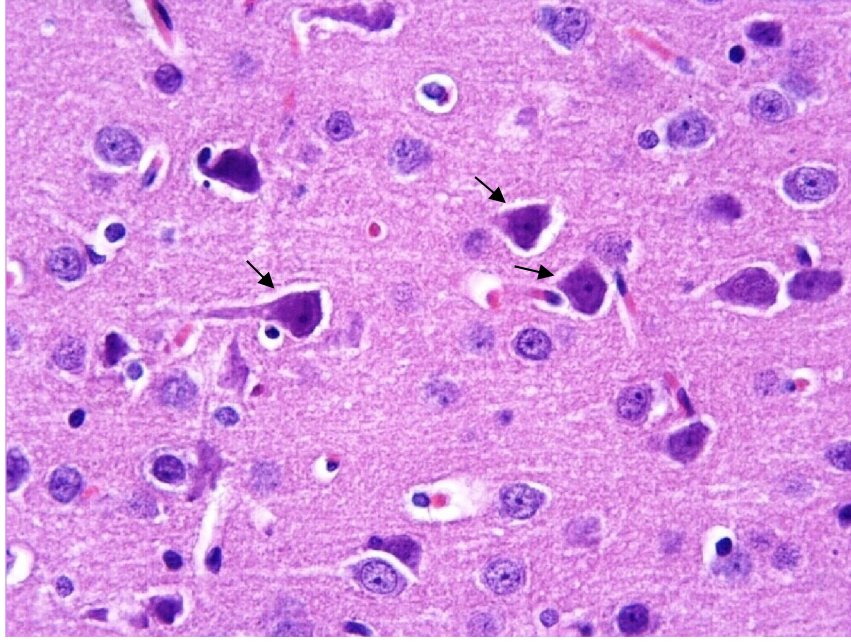
4.2.1. Kontrol (K) Grubu

Hematoksilen-eozin boyama metodu uygulanmış kesitlerde, beyin korteksinin normal histolojik yapıda olduğu gözlemlendi. Nöronlar lamina molekular tabakasında seyrek olarak izlendi. Bu tabakanın dışındaki serebral korteks tabakalarında ise nöronlar daha yoğun ve homojen olarak dağılmıştı (Resim 1). Nöronların arasında üçgen şeklindeki büyük gövdeleriyle tanınan piramidal nöronlara rastlandı (Resim 2).

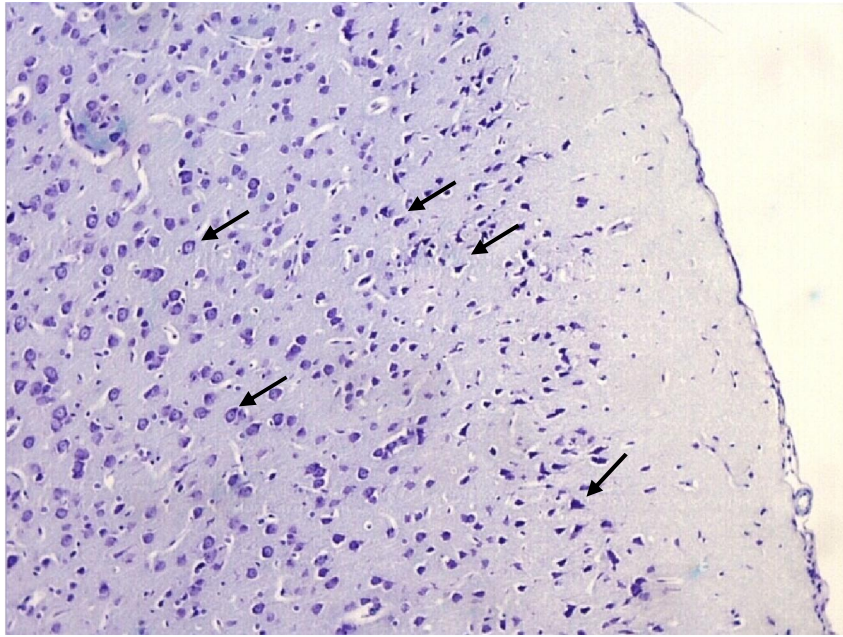
Krezil viyolet boyama metodu uygulanan kesitlerde nöron gövdeleri mavimor renkte boyanmış olarak görüldü (Resim 3). Bu grupta ortalama nöron sayısı $36,34 \pm 0,46$ olarak tespit edildi.



Resim 1. K grubu. Serebral korteksin normal histolojik görünümü ve lamina molekular tabakası (yıldız) H-E; X10.



Resim 2. K grubu. Nöronların arasında üçgen şeklindeki büyük gövdeleriyle tanınan piramidal nöronlar (oklar). H-E; X40.



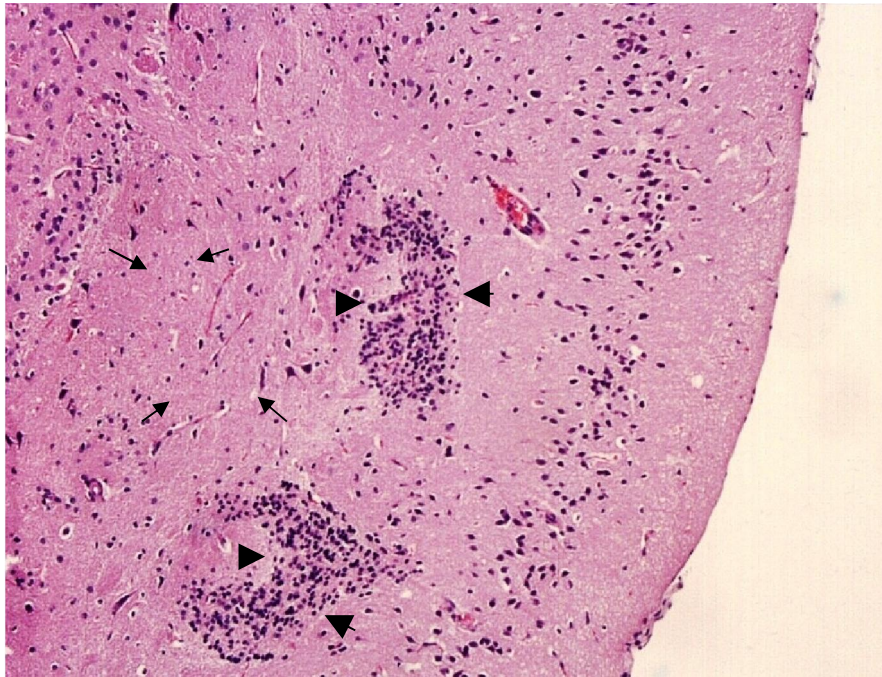
Resim 3. K grubu. Mavi-mor renkte boyanmış nöronların genel görünümü. Kresil-viyolet; X10.

4.2.2. Radyasyon (R) Grubu

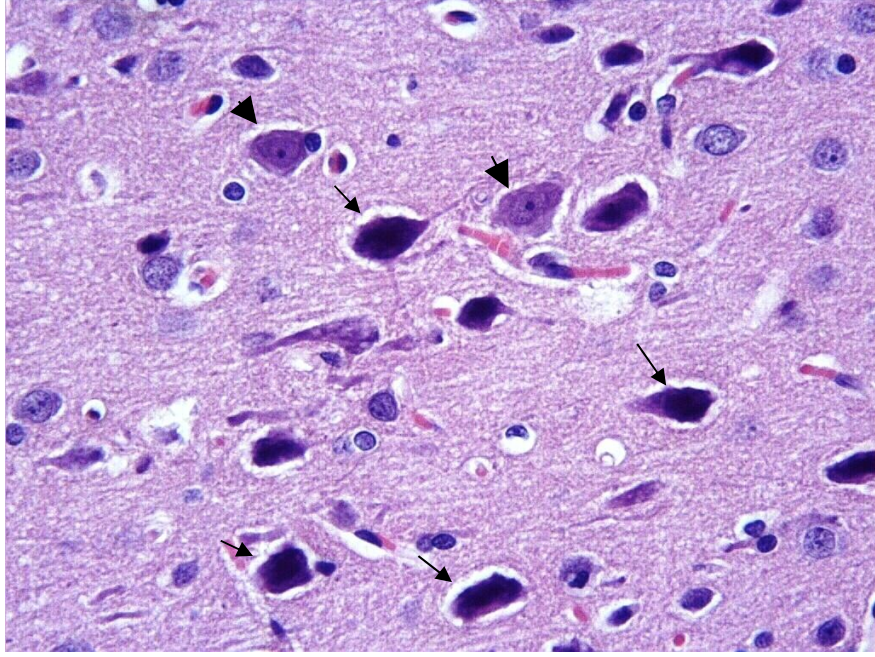
Hematoksilen-eozin boyama metodu uygulanmış kesitlerde, serebral korteksin nöron yerleşim düzeninin bozulduğu ve bazı alanlarda nöron gövdelerinin izlenmediği tespit edildi. Ayrıca bazı alanlarda inflamatuvar hücrelerin bir araya gelerek sınırları düzensiz inflamasyon odakları oluşturduğu izlendi (Resim 4).

Normal nöronların arasında yer yer düzensiz sınırlı ve nukleus yoğunluğu artmış dejenere nöronlar görüldü (Resim 5). Dejenere nöronların sayısı bu grupta $7,64 \pm 0,27$ olarak tespit edildi. K ($0,77 \pm 0,12$) grubu ile karşılaştırıldığında bu grupta dejenere nöron sayısının istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı görüldü ($p < 0,01$).

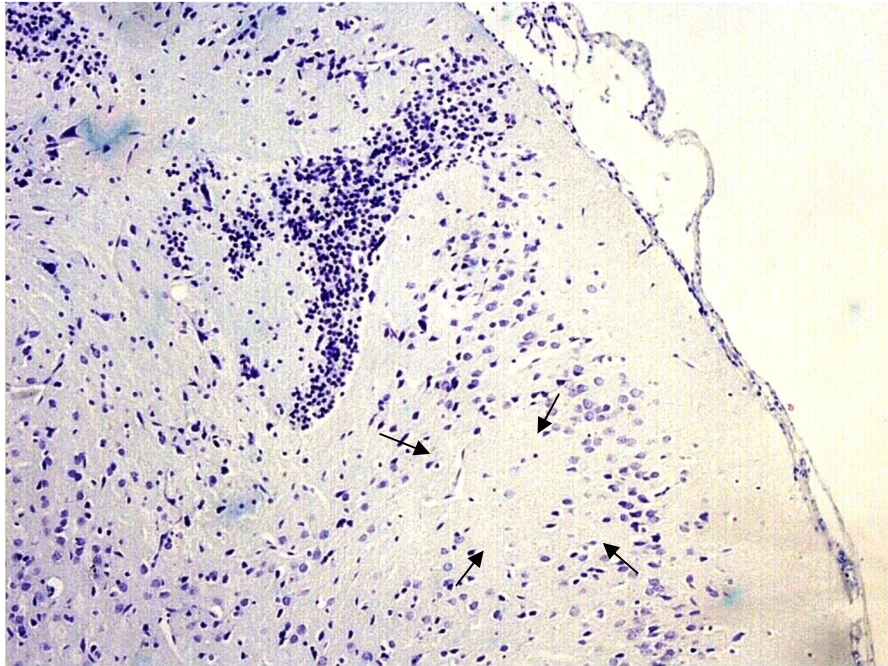
Krezil viyoleet boyama metodu uygulanan kesitlerde ise toplam nöron sayısı $28,25 \pm 0,70$ olarak tespit edildi. K ($36,34 \pm 0,46$) grubu ile karşılaştırıldığında bu grupta nöron sayısının istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı gözlemlendi ($p < 0,01$) (Resim 6).



Resim 4. R grubu. Nöron gövdelerinin izlenmediği alanlar (oklar) ve inflamasyon odakları (ok başları). H-E; X10.



Resim 5. R grubu. Sağlam nöronların arasında (ok başları) sınırları düzensiz, sitoplazması asidofil, nükleusu heterokromatik ve büzüşmüş dejenere nöronların görünümü (oklar). H-E; X40.



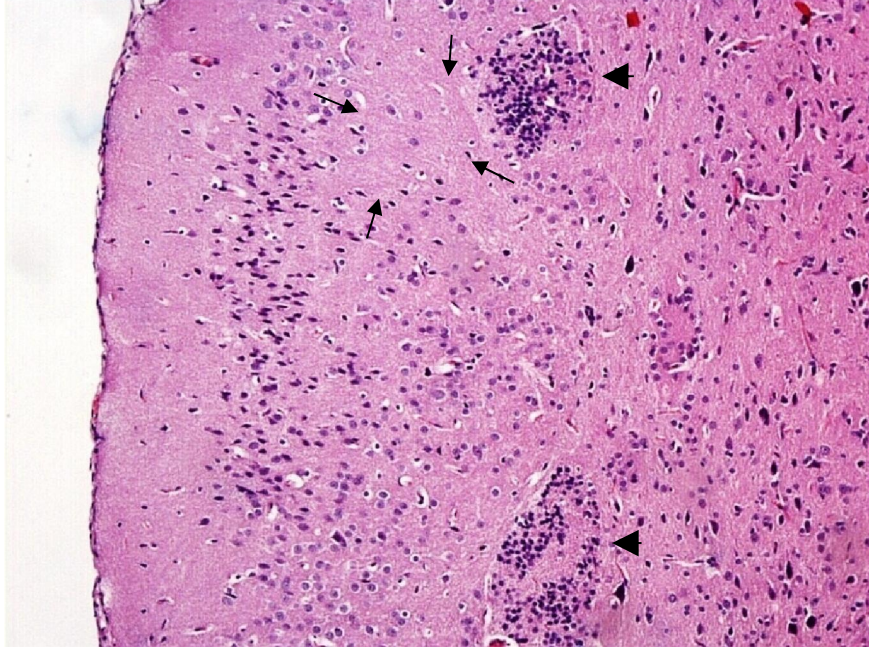
Resim 6. R grubu. Mavi-mor renkte boyanmış nöronların görünümü, bazı alanlarda izlenen nöron kaybı (oklar). Kresil-viyolet; X10.

4.2.3. Melatonin (M) Grubu

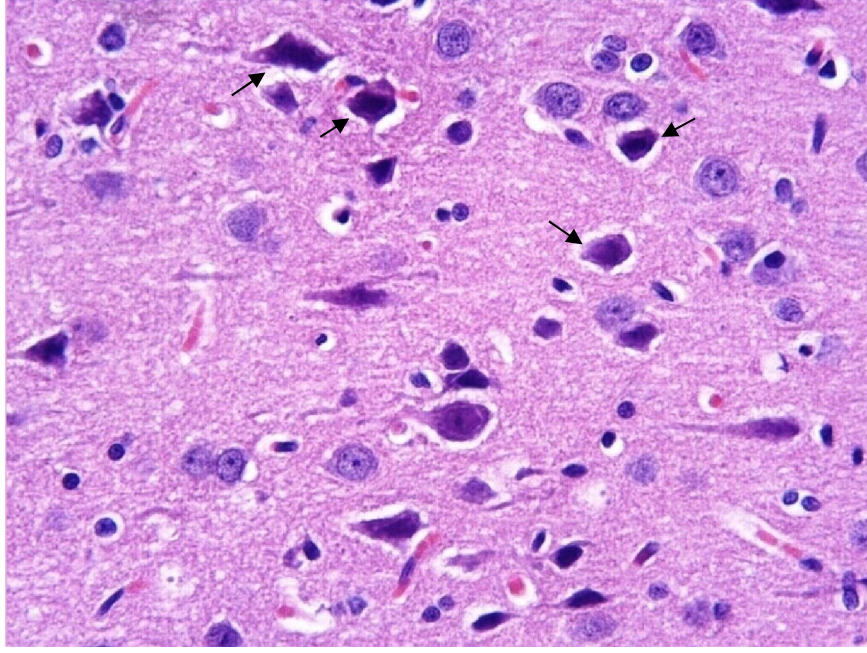
Hematoksilen-eozin boyama metodu uygulanmış kesitlerde serebral korteks içerisinde yer alan nöronların dağılımı ve inflamasyon odaklarının görünümü R grubuna benzer şekildeydi (Resim 7). Ancak bu grupta dejenere hücrelerin sayısının

($3,47 \pm 0,28$), R grubu ($7,64 \pm 0,27$) ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı gözlemlendi ($p < 0,01$) (Resim 8).

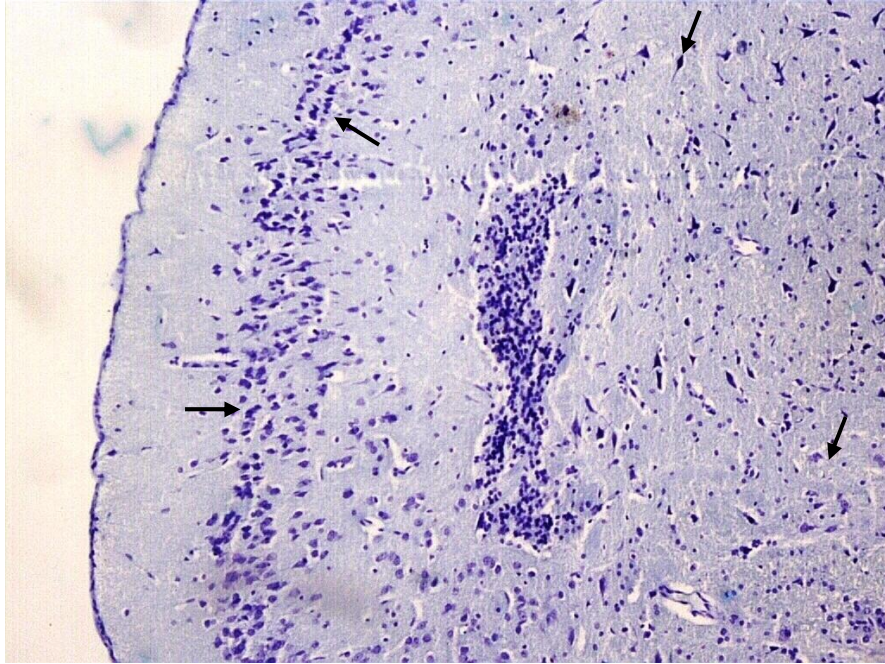
Krezil viyoletole boyama yöntemi uygulanan kesitlerde ortalama nöron sayısı $29,71 \pm 0,85$ olarak tespit edildi (Resim 9). R ($28,25 \pm 0,70$) grubu ile karşılaştırıldığında bu grupta nöron sayısı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p > 0,05$).



Resim 7. M grubu. Nöron gövdelerinin izlenmediği alanlar (oklar) ve inflamasyon odakları (ok başları). H-E; X10.



Resim 8. M grubu. Dejenere nöronların görünümü (oklar). H-E; X40.



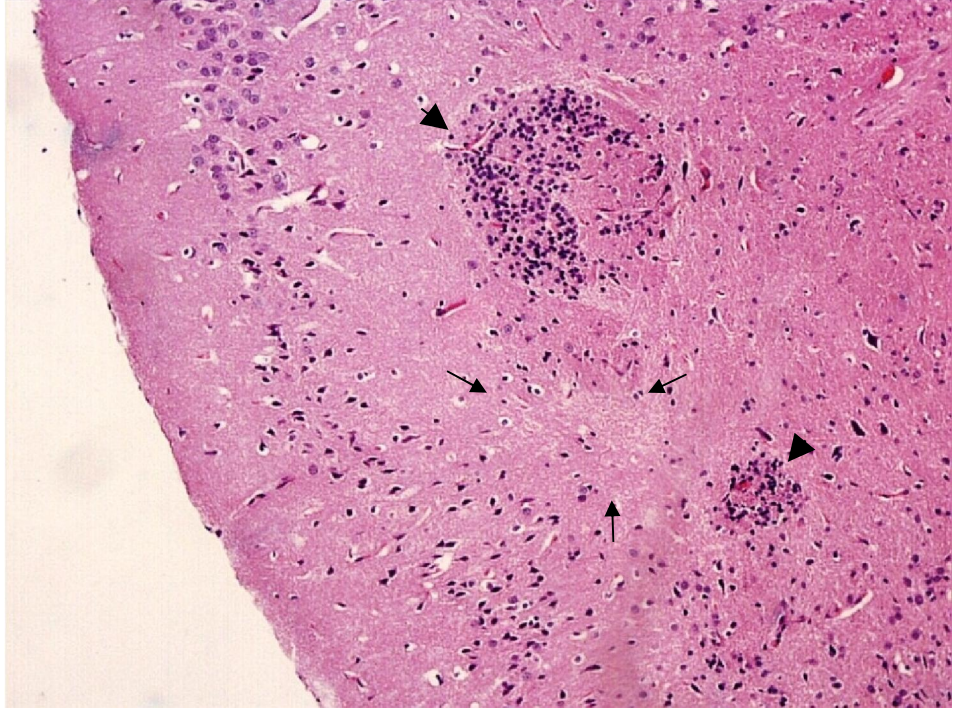
Resim 9. M grubu. Mavi-mor renkte boyanmış nöronlar (oklar). Kresil-viyolet; X10.

4.2.4. Diklofenak (D) Grubu

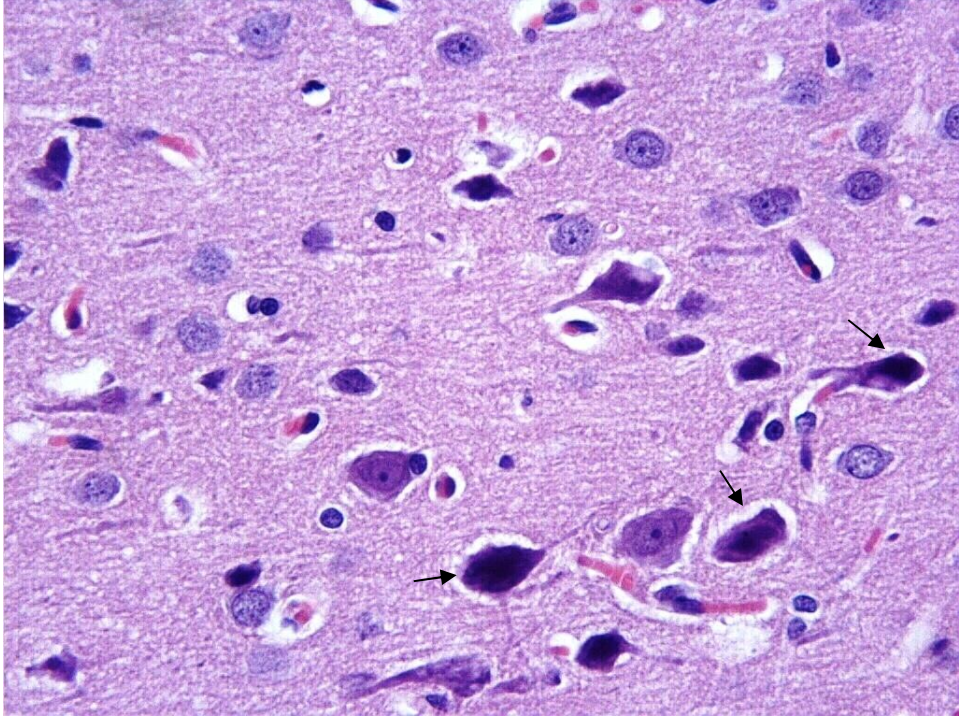
Hematoksilin-eozin boyama metodu uygulanmış kesitlerde, serebral korteks içerisinde yer alan nöronların dağılımı, M grubuna benzer şekildeydi. İnflamasyon odakları küçülmüş ve sınırları düzenli olarak gözlemlendi (Resim 10). Bu grupta

dejenere hücrelerin sayısı $2,85 \pm 0,24$ olarak tespit edildi (Resim 11). R ($7,64 \pm 0,27$) grubu ile karşılaştırıldığında bu grupta dejenere nöron sayısının istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı görüldü ($p < 0,01$). M grubu ile karşılaştırıldığında ise dejenere nöron sayısı bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p > 0,05$).

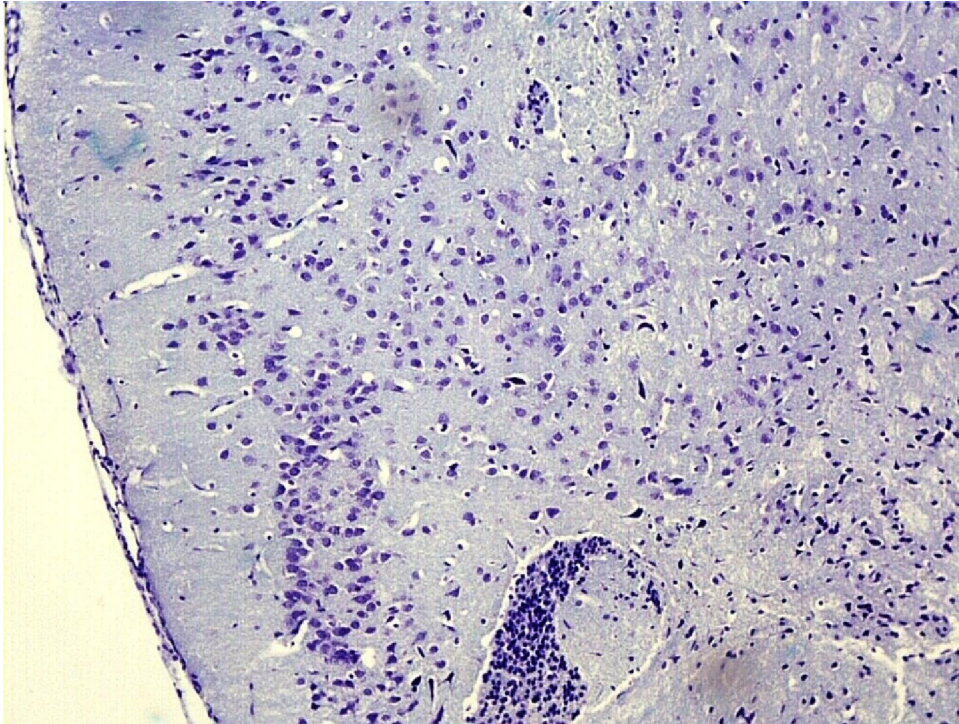
Krezil viyole boyama metodu uygulanan kesitlerde ortalama nöron sayısı $31,87 \pm 0,74$ olarak tespit edildi (Resim 12). R ($28,25 \pm 0,70$) grubu ile karşılaştırıldığında bu grupta nöron sayısının istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı gözlenirken ($p < 0,01$), M grubu ile aralarında bir fark bulunmadı ($p > 0,05$).



Resim 10. D grubu. Nöron gövdelerinin izlenmediği alanlar (oklar) ve küçülmüş inflamasyon odakları (ok başları). H-E; X10.



Resim 11. D grubu. Dejenere nöronların görünümü (oklar). H-E; X40.

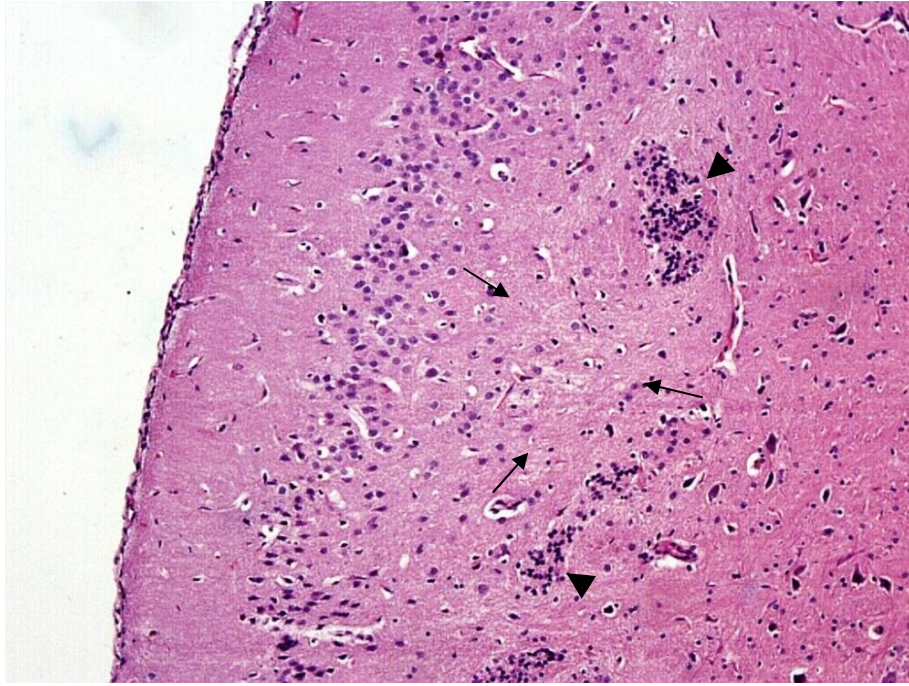


Resim 12. D grubu. Mavi-mor renkte boyanmış nöronların genel görünümü. Kresil-viyolet; X10.

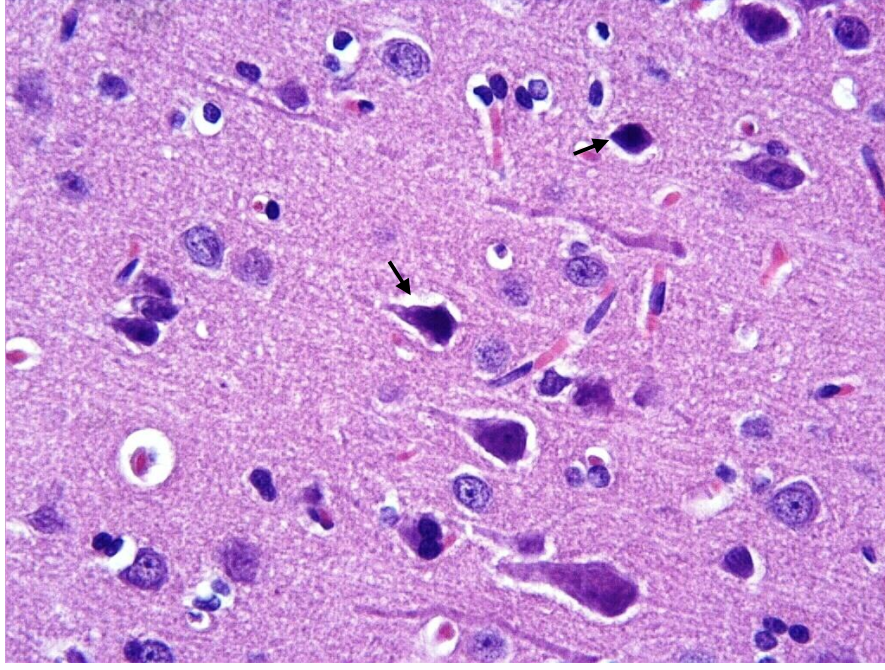
4.2.5. Melatonin+Diklofenak (MD) Grubu

Hematoksilin-eozin boyama metodu uygulanmış kesitlerde, serebral korteks içerisinde yer alan nöronların dağılımı, R grubuna göre daha düzenli olarak izlendi. İnflamasyon odaklarının sınırları düzenli ve küçük olarak gözlemlendi (Resim 13). Bu grupta dejenere hücrelerin sayısı $3,07 \pm 0,24$ olarak tespit edildi (Resim 14). R ($7,64 \pm 0,27$) grubu ile karşılaştırıldığında bu grupta dejenere nöron sayısının istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı izlenirken ($p < 0,01$), M ve D grupları ile karşılaştırıldığında ise anlamlı bir fark bulunmadı ($p > 0,05$).

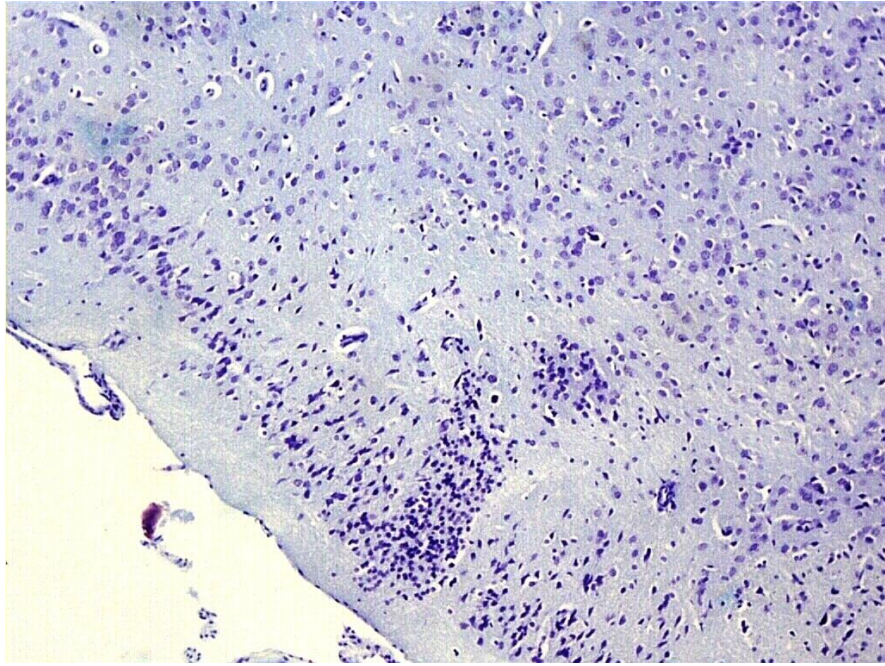
Krezil viyoleto boyama metodu uygulanan kesitlerde ortalama nöron sayısı $32,64 \pm 0,57$ olarak tespit edildi (Resim 15). R ($28,25 \pm 0,70$) grubu ile karşılaştırıldığında bu grupta nöron sayısının istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı gözlemlenirken ($p < 0,01$), M ve D grupları arasında bir fark bulunmadı ($p > 0,05$).



Resim 13. MD grubu. Nöron gövdelerinin izlenmediği alanlar (oklar) ve küçülmüş inflamasyon odakları (ok başları). H-E; X10.



Resim 14. MD grubu. Dejenere nöronların görünümü (oklar). H-E; X40.



Resim 15. MD grubu. Mavi-mor renkte boyanmış nöronların genel görünümü. Kresil-viyolet; X10.

Tablo 17. Histolojik skor [med(min-max)]

Parametre	K	R	M	D	MD
İnflamatuar hücre infiltrasyonu	0(0-0)	2(0-3) ^a	2(0-3) ^a	1(0-2) ^{a,b,c}	1(0-2) ^{a,b,c,d}
Nöron yerleşim düzeninin bozulması	0(0-0)	1(0-3) ^a	1(0-2) ^{a,b}	1(0-2) ^{a,b,c}	1(0-2) ^{a,b,c,d}

Skor 0: normal (hasar yok), Skor 1: hafif (<%0-20 serebral korteks hasarı), Skor 2: orta (%21-50 serebral korteks hasarı), Skor 3: şiddetli (%50-100 serebral korteks hasarı)

^aK ile istatistiksel olarak anlamlı fark (p<0.01)

^bR ile istatistiksel olarak anlamlı fark (p<0.01)

^cM ile istatistiksel olarak anlamlı fark (p<0.01)

^dD ile istatistiksel olarak anlamlı fark yok (p>0.05)

Tablo 18. Toplam nöron ve dejenere nöron sayılarının gruplara göre dağılımı

Parametre	K	R	M	D	MD
Nöron sayısı	36.34±0.46	28.25±0.70 ^a	29.71±0.85 ^a	31.87±0.74 ^{a,b,c}	32.64±0.57 ^{a,b,c,d}
Dejenere nöron sayısı	0.77±0.12	7.64±0.27 ^a	3.47±0.28 ^{a,b}	2.85±0.24 ^{a,b,c}	3.07±0.24 ^{a,b,c,d}

^aK ile istatistiksel olarak anlamlı fark (p<0.01)

^bR ile istatistiksel olarak anlamlı fark (p<0.01)

^cM ile istatistiksel olarak anlamlı fark yok (p>0.05)

^dD ile istatistiksel olarak anlamlı fark yok (p>0.05)

5. TARTIŞMA

Yaşam boyunca, canlı vücudu sürekli bir dinamik denge durumundadır. Canlılığın gereği olarak süreklilik arz eden metabolik faaliyetler çerçevesinde bir taraftan yapım, diğer taraftan yıkım fonksiyonları birlikte devam etmektedir. Olağan koşullarda, metabolik faaliyetler sonucu oksidatif stres-antioksidan kapasite arasında belirli bir denge mevcuttur. Ancak, ani olarak ortaya çıkan ekstra koşullar bu dengenin bozulmasına neden olabilir. Çalışmamıza konu olan yüksek doz radyasyona maruz kalma durumu da ekstra ROS artışına sebep olarak dengenin bozulmasına yol açabilir [2].

Canlı sistemlerde akut ROS artışına karşı koyma görevi ilk etapta hücrede mevcut kimyasal antioksidanların kullanımı ile başarılmaya çalışılır. Ancak canlı dokusu sahip olduğu sınırlı antioksidan kapasite nedeniyle her zaman bu artışa karşı koyamaz. Bu durumda bozulan dengenin korunması için ikinci aşamada enzimlerden oluşan antioksidan savunma sistemi faaliyete geçerek ortaya çıkan yeni durumla baş etmeye çalışır [2,4].

Manda ve ark. yaptığı çalışmada radyasyon uygulanan sıçanların beyin dokusunda TBARS artışı ve GSH azalması tespit edilmiştir. Uyguladıkları melatonin ile birlikte gözlenen bu değişimlerin normale döndüğü gözlenmiştir. Bu sonuçlar melatoninin antioksidan etkisi lehine yorumlanmıştır [69]. Yine Erol ve arkadaşlarının melatonin ve E vitamininin beyinde radyasyon hasarını engellemedeki etkisini kıyasladığı çalışmada radyasyon uygulanmasıyla doku MDA düzeyi yükselmiş ve uygulanan melatonin bu yükselişe engel olmuştur [70]. Ündeğer ve ark. çalışmasında da melatoninin beyin dokusunda radyasyonla oluşan lipid peroksidasyonuna engel olduğu tespit edilmiştir [71]. Çalışmamızda kontrol (K)

grubu ile radyasyon uygulanan gruplar arasında hem TBARS hem de antioksidan enzim aktivite düzeyleri yönünden önemli farkların oluştuğu görülmektedir. Benzer şekilde, antioksidan destek verilmeyen, radyasyon (R) grubu ile antioksidan destek alan [melatonin (M), diklofenak (D) ve melatonin+diklofenak (MD)] radyasyon grupları arasında da önemli farklar bulunmaktadır. TBARS düzeyleri yönünden R grubunun hem K hem de antioksidan destek alan gruplara kıyasla önemli oranda yüksek değerlere sahip olduğu görülmüştür. Öncelikle bu durum araştırmamızda kullanılan melatonin ve diklofenanın radyasyona bağlı olarak artan ROS'un nötralizasyonunda önemli koruyucu etki sağladığı şeklinde yorumlanmıştır. İkinci olarak, antioksidan uygulanan gruplarda GSH-Px ve GSH-R aktivitelerinin anlamlı düzeyde artmış olması ve bu artışın TBARS düşüşüyle paralellik göstermesi enzimatik antioksidan savunma sisteminin melatonin tarafından tetiklendiğinin kanıtı olarak kabul edilebilir. Çalışmamıza ait GSH sonuçlarının Manda ve arkadaşlarının yaptığı çalışmayla benzerlik göstermemesini ise kullandığımız analiz yöntemine bağlayabiliriz. Nitekim sonuçlarımıza göre de GSH düzeyleri melatonin uygulanmasıyla R grubuna göre yükselmiştir fakat istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Farklı organ ve dokularda radyasyondan başka yöntemlerle oluşturulan oksidatif stresin melatonin tarafından tamponlandığı ve melatoninin GSH-Px ve GSH-R düzeylerini artırdığı ve bu şekilde oksidatif strese karşı koyduğu sonucuna varılmıştır [72-74]. Nitekim melatoninin hem direkt antioksidan etkiye sahip olduğu hem de antioksidan enzimlerin (SOD, GSH-Px, GSH-R, CAT) aktivasyonu ile dolaylı yoldan antioksidan savunmayı desteklediği bilinmektedir [75-77]. Elde ettiğimiz sonuçlara göre de GSH-Px ve GSH-R artışını melatoninin bu aktivasyonuna bağlayabiliriz.

Çalışmamızdan çıkan ilginç bir sonuç, melatoninin GSH, GSH-Px ve GSH-R düzeylerini radyasyon grubuna kıyasla yükseltmesi, diklofenak ile kombine edildiğinde ise bu etkisinin azalmasıdır. Bu sonuç diklofenanın melatoninin antioksidan etkisini azalttığı şeklinde yorumlanabilir, fakat istatistiksel olarak anlamlı olmadığı için net bir şey ifade edemiyoruz.

Taradığımız literatürde diklofenanın melatoninle kombinasyonuna rastlamadık. Melatonin gibi bilinen bir antioksidanla diklofenak gibi bir antiinflamatuvar ajanın kombinasyonu araştırmamızın orijinal yönüdür. Biz diklofenanın antiinflamatuvar etkisi için kullanmayı planlamıştık, fakat etkili şekilde

antioksidan etkisinin olduğunu gördük. Çalışmamızın sonucuna göre diklofenak uygulanan radyasyon grubunda TBARS düzeyleri R grubuna kıyasla anlamlı oranda düşük çıkmıştır. Alok ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da diklofenagin zayıf bir antioksidan etkisi olduğu söylenmiştir [11]. Ancak, çalışmadaki diğer enzim düzeyleriyle ilişkisi ise anlamlı bulunmamıştır. Bunu da diklofenagin bizatihi antioksidan özelliğine bağlayabiliriz. Melatonin gibi enzim sistemlerini etkilememektedir.

Primatlarda radyasyon sonrası akut faz reaktanlarını inceleyen bir araştırmada CRP'nin ilk 24 saatte pik yaptıktan sonra 2-3 gün içinde normale döndüğü bulunmuş [78]. Başka bir çalışmada da CRP'nin sıçanlarda radyasyona cevap veren bir protein olmadığı sonucuna varılmış [79]. Çalışmamızda da benzer şekilde bir sonuç alınmıştır. Yine sonuçlarımıza göre diklofenak CRP düzeyleri üzerine istatistiksel olarak anlamlı olmayan azaltıcı bir etki göstermiştir. Aldığımız bu sonucu da aynı nedene bağlayabiliriz.

Birçok yönden GSH'a benzerlik arz etmesi nedeniyle hem GSH hem de Trx düzeylerinin radyasyondan olumsuz etkilenmesini beklememize rağmen; her iki parametrede de gruplar arasında anlamlı fark bulunamamıştır. Bu durumu deneyde kullanılan antioksidan ve antioksidan enzim aktivitelerinin bileşik etkisinin, beyin dokusu GSH ve Trx düzeylerini koruyacak kapasiteye sahip olmasıyla açıklayabiliriz. Nitekim GSH düzeyleri melatonin uygulanması sonucu yükselmiş fakat istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Ayrıca Trx' in çok düşük düzeylere sahip olması ve primer fonksiyonunun lipidlerden ziyade proteinleri oksidasyonuna karşı koruma mekanizmasıyla ilişkili olması nedeniyle, sonucunun GSH'dan farklı olması beklenebilir [80].

Beyin dokusu Trx-R aktivitesi grup ortalamaları arasında fark bulunmamasını, beyin dokusunun fosfolipid ağırlıklı bir yapıya sahip olması ve bu dokuda Trx düzeylerinin GSH'a kıyasla çok daha az miktarlarda bulunmasına bağlayabiliriz [81]. Hernekadar, gruplar arasında Trx-R düzeyleri yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmasa da Trx-R, GSH-Px ve GSH-R arasında anlamlı pozitif korelasyonların bulunması, artan ROS karşısında Trx-R'nin de antioksidan savunma mekanizmasına katkıda bulunduğunun işareti olarak değerlendirilebilir.

Sonuç olarak şunu söyleyebiliriz: Çeşitli nedenlerle ortaya çıkan akut radyasyon maruziyetleri ilk etapta beyin dokusunda ROS üretimini artırarak oksidan-

antioksidan dengesinin bozulmasına yol açabilir. Henüz inflamatuvar yanıtın ortaya çıkmadığı bu basamakta melatonin vb. antioksidan desteğin oksidatif stress düzeyini azaltarak kalıcı doku hasarlarını azaltabildiğini ve hatta önleyici olduğunu da söyleyebiliriz. Ancak radyasyondan etkilenen doku özellikleri dikkate alınarak, dokuya özgü doğru antioksidan desteği seçmek gerekir. Dilofenak'ın tek başına koruyucu etkisi olmakla birlikte, melatoninle kombinasyonunda melatoninin antioksidan etkisini azaltması ilginç bir bulgudur. Diklofenak'ın radyasyona bağlı inflamasyon süreciyle ilişkisini ve melatoninle kombinasyonundaki özelliğini açıklığa kavuşturmak için daha ileri çalışmalar yapılabilir. Önerilerimiz;

- 1- Diğer enzim aktivite tayin metodları ile daha ileri çalışmalar yapılabilir.
- 2- Kontrol grubu yanında sham grubu da oluşturabilir.
- 3- Antioksidanların radyasyon olmadan tek başına verildiği bir grup oluşturulabilir.
- 4- Ayrıca çalışmamızın daha geniş gruplarla ve daha ileri moleküler markerlarla desteklendiği daha ileri çalışmalara da ihtiyaç vardır.

6. ÖZET

RAT BEYNİNDE YÜKSEK DOZ RADYASYONLA OLUŞAN AKUT HASARA KARŞI MELATONİN VE DİKLOFENAK' IN KORUYUCU ETKİSİ

Bu çalışmayla yüksek doz radyasyonun beyinde oluşturduğu oksidatif stres ve akut inflamasyonu melatonin ve diklofenak ile engellemeyi amaçladık.

Çalışmaya 40 adet Wistar-Albino cinsi erişkin (180-220 gr) erkek rat dahil edildi. Kontrol (K) grubuna herhangi bir uygulama yapılmadı. Radyasyon (R) grubuna 70 Gy tüm vücut radyasyon verildi. Melatonin+Radyasyon (M) grubuna radyasyon uygulamasından önce 5 gün boyunca 100 mg/kg ip. Melatonin uygulandı. Diklofenak+Radyasyon (D) grubuna radyasyon öncesi 8 mg/kg Diklofenak oral verildi. Melatonin+Diklofenak+Radyasyon (MD) grubuna radyasyon öncesi 100 mg/kg ip. Melatonin ve 8 mg/kg Diklofenak oral verildi. Radyasyon uygulamasından 48 saat sonra doku ve kan örnekleri alınarak analizlerde kullanıldı. Alınan beyin dokularından hazırlanan homojenatlarda GSH, GSH-Px, GSH-R, Trx, Trx-R ve TBARS analizleri çalışıldı. Serumlarda ise CRP çalışıldı. Ayrıca beyin dokuları histopatolojik olarak ta incelendi.

GSH, Trx, Trx-R ve CRP sonuçları istatistiksel olarak anlamlı değildi. TBARS, radyasyon grubunda diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$) yüksek bulundu. Melatoninin radyasyona bağlı TBARS yüksekliğini düzelttiği görüldü. GSH-Px ve GSH-R düzeyleri melatonin grubunda istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$) yüksek bulundu.

Sonuç olarak; melatonin akut yüksek doz radyasyonun beyinde oluşturduğu oksidatif hasarı azaltmaktadır. Diklofenak ta melatonin gibi antioksidan aktivite göstermiştir. Histopatolojik sonuçlara göre diklofenağın beyinde radyasyonla oluşan inflamasyonu baskıladığı ancak bunun biyokimyasal parametrelerden CRP ile korele olmadığı tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Melatonin, Diklofenak, Radyasyon, Oksidatif stres

7. SUMMARY

PROTECTIVE EFFECTS OF MELATONIN AND DICLOFENAC AGAINST HIGH DOSE RADIATION-INDUCED ACUTE BRAIN INJURY IN RATS

The aim of this study was to determine the preventive effects of melatonin and diclofenac against oxidative stress and acute inflammation induced by high-dose radiation in rat brain.

Adult male (180-220 g) albino Wistar rats were randomly divided into five groups. Control group did not receive any administration. In radiation group, rats were subjected to dose of 70 Gy from LINAC. In melatonin group, five days prior to irradiation, animals received melatonin daily (100 mg/kg body weight i.p.). Diclofenac group received diclofenac daily (8 mg/kg body weight orally), five days prior to irradiation. Melatonin+diclofenac group received melatonin along with diclofenac, five days prior to irradiation. Tissue and blood samples were collected 48 hours after irradiation. Oxidative stress was assessed by determining reduced glutathione (GSH), thioredoxin (Trx) and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) levels, and alteration in antioxidant enzymes such as glutathione peroxidase (GSH-Px), glutathion reductase (GSH-R) and thioredoxin reductase (Trx-R) in brain tissues of all groups. Serum C-reactive protein levels were determined to assessment of acute inflammation. Also, brain tissues were investigated histopathologically.

A significant increase in the TBARS levels was observed in the irradiated animals ($p < 0,05$). Melatonin treatment significantly prevented the increasing of TBARS content in rat brain tissue. GSH-Px and GSH-R levels had been significantly increased in melatonin group ($p < 0,05$). Statistically significant alterations in the levels of GSH, Trx, CRP and the activity of Trx-R were not observed.

In conclusion; melatonin showed a protective role against oxidative damage induced by high-dose radiation in rat brain. Diclofenac showed an antioxidative effect too. According to histopathological evaluation, diclofenac suppressed acute inflammation induced by radiation. But there is not correlation between CRP results and histopathological findings.

Keywords: Melatonin, Diclofenac, Radiation, Oxidative stress

KAYNAKLAR

- 1- Yaren, H., ve Karayılanoğlu, T. Radiation and effects on human health. TSK Koruyucu Hekimlik Bülteni (2005) 4(4).
- 2- Hall, J.E. Radiobiology for the radiologist. Sixth edition. J.B. Lippincott Company (2006) 45-50, 124-126.
- 3- Tubiana, M., Dutreix, J., Warmbersie, A. Introduction to Radiobiology. London: Taylor & Francis (1990) 87-94.
- 4- Özalpan, A. Temel Radyobioloji. 1. Basım. İstanbul: Haliç Üniversitesi Yayınları (2001) 1-218.
- 5- Durak, I., Kacmaz, M., Cimen, M.Y., Buyukkocak, U., and Ozturk, H.S. Blood Oxidant/Antioxidant Status of Atherosclerotic Patients. Int. J. Cardiol. (2001) 77:293-297.
- 6- Hallahan, D.E. Radiation-mediated gene expression in the pathogenesis of the clinical radiation response. Semin. Radiat. Oncol. (1996) 6: 250-267.
- 7- Yalçın, A.S. Antioksidanlar. Klinik Gelişim (1998) 11: 342-346.
- 8- Kayaalp, O. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, 12. Baskı (2009)
- 9- Schonthal, H., and Axel. Exploiting Cyclooxygenase-(in)Dependent Properties of COX-2 Inhibitors for Malignant Glioma Therapy. Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (2010) Vol.10, No.6, 450-461.
- 10- Poonam, Thakur, and Sanyal S.N. Chemopreventive Role of Preferential COX-2 Inhibitor Diclofenac in 9,10-Dimethylbenz(a)anthracene Induced Experimental Lung Carcinogenesis. Am. J. Biomed. Sci. (2010) 2(3), 275-288.
- 11- Alok, A., Adhikari, J.S., Chaudhury, N.K. Radioprotective role of clinical drug diclofenac sodium. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis (2013) Volume 755, Issue 2, 15, Pages 156–162.
- 12- Togay, Y.E. Radyasyon ve Biz. Türkiye Atom Enerjisi Kurumu Yayınları Ankara (2002) 37.
- 13- Stell, G.G., Adams, G.E., and Peckham, M.J. The Biological Basis of Radiotherapy. Elsevier (1983)
- 14- Early, P.J. Nature of radiation. In: Early PJ, Sodee D.B, eds. Principles and practice of nuclear medicine. St. Luis: Mosby (1995) 17-22.
- 15- Uzal, C., and Caloglu, M. The role of ionizing radiation in the etiology of cancer. Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi (2002) 19 Suppl 3-4:177-182.
- 16- Tuncel, E. Klinik Radyoloji. Genişletilmiş 2. Baskı. Nobel&Güneş Tıp Kitabevleri (2008) 3-105.
- 17- Dubois, A., Danquechin Dorval, E., Wood, L.R., Rogers, J.E., O'Connell, L., Durakovic, A., and Conklin, J.J. Effect of gamma-irradiation on the healing of gastric biopsies in monkeys. An experimental model for peptic ulcer disease and gastric protection. Gastroenterology (1985) 88(1 Pt 2):375-81.
- 18- Abdel Salam, O.M., Hadajat, I., Bayomy, A.R., El-Shinawy, S., and Arbid, M.S. Acute effect of gamma irradiation on gastric acid secretion and gastric mucosal integrity in the rat. Scientific World Journal (2005) 5:195-204.

- 19- Dubois, A., and Walker, R.I. Prospects for management of gastrointestinal injury associated with the acute radiation syndrome. *Gastroenterology* (1988) 95 Suppl. 2:500-7.
- 20- Kaya, A. The biological effects of ionizing radiation. *Dicle Tıp Dergisi* (2002) 29:3.
- 21- Koksall, I.T., Usta, M., Orhan, I., Abbasoglu, S., and Kadioglu, A. Potential role of reactive oxygen species on testicular pathology associated with infertility. *Asian J. Androl.* (2003) 5: 95-9.
- 22- Mercantepe, T. Gamma radyasyonun neden olduğu mide mukozası hasarına karşı curcumin ve amifostinin koruyucu etkilerinin ışık ve elektron mikroskopik düzeyde incelenmesi (tez). Edirne: Trakya Üniversitesi (2008)
- 23- Busch, D.B. Radiation and chemotherapy injury: pathophysiology, diagnosis, and treatment. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* (1993) 15(1): 49-89.
- 24- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., and Telser, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* (2007) 39: 44-84.
- 25- Sert, C., and Çelik, M.S. Radioprotective agents. *Türkiye Klinikleri J. Med. Sci.* (1996);16(4):292-8
- 26- Kaldır, M. Ratlarda karaciğer ve böbrek dokusu üzerine aminofostinin radyoprotektif etkisinin sintigrafik, biyokimyasal ve histopatolojik olarak gösterilmesi (tez). Edirne:Trakya Üniversitesi Tıp Fak. (2006)
- 27- De Zwart, L.L., Meerman, J.H.N., Commander, J.N.M., and Vermeulen, N.P.E. Biomarkers of free radical damage applications in experimentals and in humans. *Free. Radic. Biol. Med.* (1999) 26(2): 202-226.
- 28- McCord, J.M. The evaluation of free radicals an oxidative stres. *Am. J. Med.* (2000) 108: 652-659.
- 29- Halliwell, B. Oxygen radicals, nitric oxide and human inflammatory joint disease. *Ann. Rheum. Dis.* (1995) 54(6): 505-510.
- 30- Wiseman, H., and Halliwell, B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflamatory disease and progression to cancer. *Biochem. J.* (1996) 313: 17-29.
- 31- Dröge, W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* (2002) 82(1): 47-95.
- 32- Machlin, L.J, and Bendich, A. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *Faseb J.* (1987) 6: 441-445.
- 33- Athar, M., Abdula, M., Sultana, S., and Favier, A. Free radicals and trace elements. *The journal of trace elements in experimental medicine* (1993) 6: 65-73.
- 34- Halperin, E.C., Perez, C.A., and Brady, L.W. Perez and Brady's principles and practice of radiation oncology. Lippincott Williams&Wilkins (2008)
- 35- Alper, T., and Howard-Flanders, P. Role of oxygen in modifying the radiosensitivity of E. Coli. *B. Nature* (1956) 178: 978-979.

- 36- Rubin, P., Johnston, C.J., Williams, J.P., McDonald, S., and Finkelstein, J.N. A perpetual cascade of cytokines postirradiation leads to pulmonary fibrosis. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* (1995) 33: 99-109.
- 37- Rubin, P., Constine, L.S., and Williams, J.P. Late effect of cancer treatment on normal tissues. In: *Principles and Practice of Radiation Oncology* (4th ed). Perez CA, Brady LW (eds). Philadelphia: Lippincott-Raven (2003) 357-390.
- 38- Beyzadeoğlu, M.M., ve Ebruli, C.C. Temel Radyasyon Onkolojisi. *Klinik Radyasyon Onkolojisi: Gülhane Askeri Tıp Akademisi Basımevi* (2008) 135-157.
- 39- Halliwell, B. Oxidants and the central nervous system: some fundamental questions. *Acta. Neurol. Scand.* (1989) 126: 23-33.
- 40- Evans, P.H. Free radicals in brain metabolism and pathology. *Br. Med. Bull.* (1993) 49(3):577-587.
- 41- Maxwell, S.R.J. Prospects For The Use of Antioxidants Therapies. *Drugs.* (1995) 49(3): 345-361.
- 42- Packer, L., Traber, M.G., and Xin, W. Proceeding of The International Symposium on Natural Antioxidant: Molecular Mechanisms and Health Effects, AOCS Press, Illinois. (1996) 224-226, 569-574.
- 43- Scott, M.D., Lubin, B.H., Zuo, L., and Kuypers, F.A. Erythrocyte Defense Against Hydrogen Peroxide Preeminent Importance of Catalase, *J. Lab. Clin. Med.* (1991) 118(1):7-16.
- 44- Girgin, F., Onat, T., Emerk, K., ve Sözmen, E.Y. Biyolojik Yükseltgenme-İndigenme Tepkimeleri, Elektron Taşıyıcılar ve Redoks Enzimleri. *İnsan Biyokimyası. Palme yayıncılık, Ankara* (2002):73-78.
- 45- Sözmen, E.Y., Onat, T., Emerk, K. Yaşlanma Biyokimyası. *Palme yayıncılık, Ankara* (2002) 665-674.
- 46- Moser, R., Oberley, T.D., Daggett, D.A., Friedman, A.L., Johnson, J., and Siegel, F.L. Effect of Lead Administration on Developing Rat Kidney. *Toxicol. Appl. Pharm.* (1995) 131:85-93.
- 47- Jakoby, W.B., and Ziegler, D.M. The Enzymes Detoxification. *J. Biol. Chem.* (1990) 265:34; 20715-20718.
- 48- Stephan, G., Sabine, U., and Katja, B. *Medicinal Research Reviews* (2004) Vol. 24, No. 1, 40-89.
- 49- Tandogan, B., and Ulusu, N.N. Thioredoxin reductase. *Hacettepe J.Biol.&Chem.* (2011) 39 (1); 87-92
- 50- Halliwell, B. Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutr. Rev.* (1994) 52:253-65.
- 51- Bertini, I., Gray, H.B., Lippard, S.J., and Valentine, J.S. *Bioinorganic Chemistry. University Science Books, California* (1994) 295-310.
- 52- Paller, M.S., and Patent, M.T. Hydrogen Peroxide and İschemic Renal İnjury: Effect of Catalase İnhibition, *Free Radical Biol. Med.* (1991) 10: 29-34.
- 53- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., and Stryer, L. *Biochemistry* 5th ed. W. H. Freeman and Company, New York (2002) 503-507.

- 54- Combs, G.F. *The Vitamins: Fundamental Aspects in Nutrition and Health* 2nd ed. Academic Pres, New York (1998) 190-223, 252-257.
- 55- Champe, P.C., and Harvey, A. *Lippincott's Illustrated Reviews* serisinden: *Biyokimya* 2. baskı. Tokullugil, A., Dirican, M., Ulukaya, E. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul (1997) 339-340.
- 56- Özer, N.K., Onat, T., Emerk, K., ve Sözmen, E.Y. *Vitaminler ve Mineraller. İnsan Biyokimyası*. Palme yayıncılık, Ankara (2002) 518-519.
- 57- Denisov, E.T., and Afanas'ev, I.B. *Oxidation and Antioxidation in Organic Chemistry and Biology*. Taylor&Francis Group, London (2005) 876-877.
- 58- Dişel, U. *Meme Kanserinde Siklooksijenaz-2 ve Klinik-Patolojik Parametreler ile İlişkisi (tez)*. Ankara; Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi (2005)
- 59- Morgan, G. *Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs and The Chemoprevention of Colorectal and Nonaspirin Oesophageal Cancers*. *Gut*. (1996) 38: 646-648.
- 60- Vijayalaxmi, Meltz, M.L., Reiter, R.J., Herman, T.S., Kumar, S. *Melatonin and protection from whole-body irradiation: survival studies in mice*. *Mutat. Res.* (1999) 425, 21–27.
- 61- Kaur Saini, M., Kaur, J., Sharma, P., and Nath Sanyal, S. *Chemopreventive response of diclofenac, a non-steroidal anti-inflammatory drug in experimental carcinogenesis*. *Nutr Hosp.* (2009) 24(6):717-723.
- 62- Akerboom, T.P., and Sies, H. *Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples*. *Methods Enzymology* (1981) 77: 373-382.
- 63- Beutler, E. *Red Cell Metabolism. A manual of biochemical methods*. 3th Ed. Grune & Stratton. Orlando (1984) 72-73,74-75,105-106.
- 64- Arner, E.S.J. et al. *Preparation and assay of mammalian thioredoxin and thioredoxin reductase*. *Meth. Enzymol.* (1999) 300: 226-239.
- 65- Holmgren, A., and Bjornstedt, M. *Thioredoxin and thioredoxin reductase*. *Meth. Enzymol.* (1995) 252: 199-208.
- 66- Ohkawa, H., Ohishi, N., and Tagi, K. *Assay for Lipid Peroxides in Animal Tissues by Thiobarbituric Acid Reaction*. *Analytical Chemistry* (1979) 95: 351-358.
- 67- Oropesa, A.L., Garcia-Camero, J.P., and Soler, F. *Glutathione and Malondialdehyde Levels in Common Carp after Exposure to Simazine*. *Environmental Toxicology and Pharmacology* (2009) 27: 30-38.
- 68- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. *J. Biol. Chem.* (1951)193: 265.
- 69- Manda, K., Anzai, K., Kumari, S., Bhatia, A.L. *Melatonin attenuates radiation-induced learning deficit and brain oxidative stress in mice*. *Acta neurobiol. exp.* (2007) 67: 63-70.
- 70- Erol, F.S., Topsakal, C., Ozveren, M.F., Kaplan, M., Ilhan, N., Ozercan, I.H., Yildiz, O.G. *Protective effects of melatonin and vitamin E in brain damage due to gamma radiation*. *Neurosurg Rev.* (2004) 27:65–69.

- 71- Undeger, U., Giray, B., Zorlu, F., Oge, K., Bacaran, N. Protective effects of melatonin on the ionizing radiation induced DNA damage in the rat brain. *Exp Toxic Pathol.* (2004) 55: 379–384.
- 72- Baydas, G.,1, Ercel, E., Canatan, H., Donder, E., and Akyol, A. Effect of melatonin on oxidative status of rat brain, liver and kidney tissues under constant light exposure. *Cell. Biochem. Funct.* (2001) 19: 37-41.
- 73- Koc, M., Taysı, S., Buyukokuroglu, M.E., Bakan, N. Melatonin Protects Rat Liver against Irradiation-induced Oxidative Injury. *J. Radiat. Res.* (2003) 44: 211–215.
- 74- Sewerynek, E., Reiter, R.J., Melchiorri, D., Ortiz, G.G., Lewinski, A. Oxidative damage in the liver induced by ischemia-reperfusion: protection by melatonin. *Hepatology* (1996) 43: 898–903.
- 75- Bonnefont-Rousselota, D., Collin, F. Melatonin: Action as antioxidant and potential applications in human disease and aging. *Toxicology* (2010) 278: 55–67.
- 76- Reiter, R.J. Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin. *Progress in Neurobiology* (1998) Vol. 56: 359-384.
- 77- Shirazi, A., Mihandoost, E., Mahdavi, S.R., Mohseni, M. Radio-protective role of antioxidant agents. *Oncology Reviews* (2012) vol. 6:e16.
- 78- Ossetrova, N.I., Sandgren, D.J., Blakely, W.F. C-reactive protein and serum amyloid A as early-phase and prognostic indicators of acute radiation exposure in nonhuman primate total-body irradiation model. *Radiation Measurements* (2011) 46: 1019-1024.
- 79- Ossetrova, N.I., Blakely, W.F. Multiple blood-proteins approach for early-response exposure assessment using an in vivo murine radiation model. *International Journal of Radiation. Biology.* (2009) 85 (10): 837-850.
- 80- Gromer S., Urig S., Becker K. The Thioredoxin System-From Science to Clinic. *Medicinal Research Reviews* (2004) Vol. 24, No. 1, 40-89.
- 81- Reiter, R.J. Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. *FASEB J.* (1995) 9: 526-533.