



T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ

**GAMA RADYASYONLA HASARLANMIŞ
KEMİKLERDE MELATONİN'İN BİYOMEKANİK
PARAMETRELER ÜZERİNE ETKİLERİ**

Zelal ÜNLÜ ÇAKIR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOFİZİK ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Yrd.Doç. Dr. Can DEMİREL

Gaziantep, 2012

T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOFİZİK ANABİLİM DALI

**GAMA RADYASYONLA HASARLANMIŞ KEMİKLERDE
MELATONİN'İN BİYOMEKANİK PARAMETRELER ÜZERİNE
ETKİLERİ**

Zelal ÜNLÜ ÇAKIR

Tez Savunma Tarihi:

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Onayı

Prof.Dr. Mehmet TARAKÇIOĞLU

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez çalışmasının bir “Yüksek Lisans” derecesi için uygun ve yeterli bir çalışma olduğunu onaylıyorum.



Doç. Dr. Hüseyin KAYA

Biyofizik Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir “Yüksek Lisans” tezi olarak kabul edilmiştir.



Yrd. Doç.Dr. Can DEMİREL

Tez Danışmanı

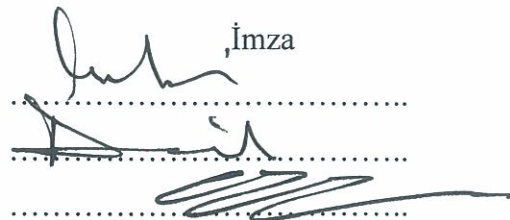
Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir “Yüksek Lisans” tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi İmzası

Prof. Dr. Salih ÇELİK

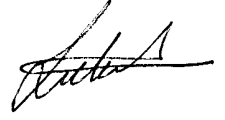
Yrd. Doç.Dr. Can DEMİREL

Yrd. Doç.Dr. Ömer Can DEMİRTAŞ

İmza


BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.



Zelal ÜNLÜ ÇAKIR

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT.....	vi
TEŞEKKÜR	viii
ŞİMGELER ve KISALTMALAR.....	ix
TABLO LİSTESİ.....	xi
ŞEKİL LİSTESİ.....	xii
EKLER.....	xiii
DENKLEMLER LİSTESİ	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Radyasyon	3
2.1.1. İyonize olmayan radyasyon.....	3
2.1.2. İyonize radyasyon	3
2.1.3. İyonize radyasyon tipleri	4
2.1.4. Gamma radyasyon ve etkileri	5
2.2. İonize radyasyonun hücredeki etki mekanizması	5
2.3. Kemiğin Genel Özellikleri	7
2.3.1. Kemiğin yapısı	7
2.3.2. Kemik dokusunun yapısal elemanları.....	9
2.3.3. Kemik oluşumu.....	12
2.3.4. Kemiğin rejenerasyonu	13
2.4. İyonize radyasyonun kemik üzerine etkileri.....	13
2.5. İyonizan Radyasyon ve Serbest Radikallerin Oluşumu.....	16
2.6. Oksidatif Stres ve Serbest Radikaller	17
2.7. Radyasyon Hasarı ve Oksidatif Stres	19
2.8. Antioksidanlar	21
2.9. Amifostin	23
2.9.1. Amifostinin farmokinetiği	24
2.9.2. Amifostinin etki mekanizması	24
2.9.3. Amifostinin yan etkileri	25
2.9.4. Amifostin ve radyoprotektif özelliği.....	25
2.10. Melatonin.....	26

2.10.1. Melatonin biyosentezi ve metabolizması	27
2.10.2. Melatoninin fizyolojik fonksiyonları.....	28
2.10.3. Biyoyararlanım ve yan Etki.....	29
2.10.4. Melatonin antioksidan etkileri.....	30
2.10.5. Melatoninin kemik koruyucu etkisi.....	30
2.12. Üç nokta eğme testi	31
2.12. Biyomekanikte Kullanılan Terminoloji	33
3. MATERYAL VE METOD	35
3.1. Deney Hayvanları	35
3.2. Deney Düzenlenmesi	36
3.3. Kemik Mineral Yoğunluğunun Ölçümü	37
3.4. Kemik Mineral İçeriğinin Ölçümü.....	37
3.5. Kemik Kesit Alanı Ölçümü	37
3.7. Biyomekanik Verilerin Analizi.....	40
3.6.1. Maksimum kuvvet (Ultimate force)	40
3.6.2. Sertlik (Stiffness)	40
3.6.3. Kemikte depolanan enerji (Work to Failure)	41
3.6.4. Elastik modül (Young modulus).....	41
3.6.5. Dayanıklılık (Toughness).....	42
3.7. İstatistiksel Analizler	43
4. BULGULAR	44
4.1. Genel Bulgular	44
4.2. Femur Kemiklerinin Geometrik Parametreleri.....	45
4.2.1 Femur uzunluğu	46
4.2.2. Kemik mineral yoğunluğu (KMY).....	47
4.2.3. Kemik mineral içeriği (KMi)	48
4.2.4. Femur kortikal kemik kesit alanı	49
4.3. Femur Kemiklerinin Biyomekanik Parametreleri	50
4.3.1. Maksimum deformasyon (Ultimate displacement) mm.....	51
4.3.2. Maksimum kuvvet (Ultimate force), N.....	52
4.3.3. Sertlik (Stiffness), N/mm	53
4.3.4. Kemikte depolanan enerji (Energy absorbtion capacity) mj.....	54
4.3.5. Elastik modül (Young modulus), Gpa	55
4.3.6. Dayanıklılık, Mpa (Toughness)	56

4.3.7. Maksimum zor (Ultimate stress), Mpa	57
4.3.8 Maksimum zorlama (Ultimate strain) mm/mm	58
5. TARTIŞMA.....	60
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	68
7. KAYNAKLAR	69
8. ÖZGEÇMİŞ	79
9. EKLER.....	80

ÖZET

Bu çalışmada radyasyonla hasarlanmış kemiklerde Kemik mineral yoğunluğu, kemik mineral içeriği ve kortikal kemik kesit alanı gibi geometrik ve maksimum deformasyon miktarı, maksimum kuvvet, sertlik, kemikte depolanan enerji, elastik modül, dayanıklılık, maksimum zor ve maksimum zorlama gibi biyomekanik parametrelere melatoninin radyoprotektif etkisi amifostinle karşılaştırmalı olarak araştırıldı.

Bu amaçla 40 adet dişi Sprague Dawley sıçan kullanılmıştır. Hayvanlar beş gruba; kontrol grubu (K; n=8; serum fizyolojik, 1 ml i.p), radyasyon (R; n=8; serum fizyolojik, 1 ml i.p), radyasyon+melatonin 25 (R+M25; n=8; 25 mg/kg i.p), radyasyon+melatonin 50 (R+M50; n=8; 50mg/kg i.p) ve radyasyon+amifostin (R+WR; n=8; 200mg/kg i.p) şeklinde ayrılmıştır. R, R+M25, R+M50 ve R+WR gruplarına ait sıçanların sol bacaklarına tek doz 50 Gy gamma radyasyon uygulandı.

Hayvanların haftalık canlı ağırlık artışlarına bakıldığında radyasyon gruplarında (R, R+M25, R+M50 ve R+WR) canlı ağırlık önemli ölçüde azalma göstermiştir. Deney süresince kontrol grubu sıçanlarda femur bölgesinde herhangi bir değişim görülmediği halde, radyasyona maruz kalan sıçanlarda çok fazla kıl dökülmesi ve deri lezyonları tespit edildi.

Dört haftalık deney süresinin sonunda her sıçanın sol femurları alınarak dansitometrik ve biyomekanik yöntemler kullanılarak ölçümler gerçekleştirildi. Kemik mineral yoğunluğu çift enerjili X ışınları absorpsiyometrisi ile kortikal femurun kesit alanı ise bilgisayarlı tomografiyle ölçüldü.

Yapılan ölçümlerde, R grubunun KMY değeri K grubuna göre azalış ($P<0.05$), R+M25 grubunun KMY değerleri ise hem R hem de K grubuna göre artış ($P <0.05$) gösterdi. R+M50 ve R+WR gruplarıyla K grubu arasında KMY değeri bakımından fark saptanmadı. R+M25, R+M50 gruplarının KMI değerlerinin ile K ve R grupları arasında istatistiksel olarak fark saptanmamakla birlikte, R+WR grubunda R grubuna göre artış ($P<0.05$) istatistiksel olarak önemli bulundu.

Biyomekanik analizler sonucunda, R grubunda elastik modülü hariç bütün parametrelerde K grubuna göre azalma saptandı ($P<0.05$). R+M25 ve R+M50 gruplarında maksimum deformasyon, maksimum kuvvet, dayanıklılık, zor ve zorlama parametreleri K grubuna göre istatistiksel olarak önemli azalma, ancak R+M25 grubunun maksimum deformasyon, maksimum kuvvet, sertlik ve depolanan enerji parametreleri R grubuna göre ise artış gösterdi ($P<0.05$). Bütün parametrelerde 50 mg/kg melatonin uygulamasının 25 mg/kg melatonin uygulamasına göre daha az etki gösterdiği saptandı. R+WR grubunda maksimum deformasyon, maksimum kuvvet, enerji ve dayanıklılık parametreleri R grubuna göre artma gösterdi. Ancak, elastik modül ve dayanıklılık parametreleri K grubuna artma, maksimum kuvvet ve sertlikte ise azalma görüldü ($P<0.05$).

Bu sonuçlara göre, radyasyon uygulanmasının sıçanlarda kemik kalitesini düşürdüğü, melatonin ve amifostinin ise kemik kalitesini yükseltilmesinde olumlu katkılarda bulunduğu saptandı.

Anahtar kelimeler: Rat, Melatonin, Gamma radyasyon, femur, kemik yoğunluğu, biyomekanik, morfometrik.

ABSTRACT

In this study, the radio-protective effects of melatonin on the radiation-damaged bones were investigated comparatively with the amifostin. For this purpose some biomechanical parameters of bones such as the ultimate displacement, ultimate force, stiffness, energy absorption capacity, young modulus, toughness, ultimate stress, ultimate strain and some geometric parameters such as bone mineral density, bone mineral content and cortical area of bone were investigated.

For this purpose, 40 female Sprague Dawley rats were used. Animals were divided into 5 groups. These are control group (C; n=8: saline, 1 ml i.p.), radiation (R; n=8; saline, 1 ml i.p.), radiation + melatonin 25 (R+M25; n=8: 25 mg/kg, i.p.), radiation + melatonin 50 (R+M50; n=8; 50 mg/kg i.p.) and radiation + amifostin (R+WR; n=8; 200 mg/kg i.p.). A single dose of 50 Gy gamma radiation was exposed to the left legs of the rat groups of R, R+M25, R+M50 and R+WR.

Looking at a weekly live weight of animals, a significant reduction was observed in body weight of radiation groups (R, R+M25, R+M50 and R+WR). During the experiment, no any changes in the femur area of control group but much hair loss and skin lesions have been seen in rats that radiation treated.

At the end of a four-week of experiment, measurements were done on the left femur of each rat using biomechanical and densitometric methods. Bone mineral density was calculated by dual energy X-ray absorptiometry, while the cortical area of bone was measured by computed tomography.

In the measurements, BMD value of group R showed a decrease according to K group ($P<0.05$), while BMD value of R+M25 showed an increase both according to R and K groups ($P<0.05$). No any differences obtained between R+M50 and R+WR groups with K groups. Although BMC value of R+M25 and R+M50 groups showed no significant differences between K and R groups, R+WR group showed significant differences according to R group ($P<0.05$).

In the result of biomechanical analyzes, all parameters except for the young modulus of the R group, a decreasing were observed ($p < 0.05$). R+M25 and R+M50 groups, the parameters such as ultimate displacement, ultimate force, stiffness, and ultimate stress, ultimate strain were decreased according to K group but the ultimate displacement, ultimate force, toughness and energy absorption capacity parameters for R+M25 according to R group were increased statistically ($p < 0.05$). In the all the parameters, application of 50 mg/kg of melatonin showed less effects compared to those given for 25 mg/kg of melatonin were observed. In the R+WR group, the ultimate displacement, ultimate force and energy absorption capacity increased those compared to R group, while the young modulus and toughness increased, Ultimate force and stiffness showed decreasing according to K group ($p < 0.05$).

According to these results, radiation treated to the rats reduce the bone quality; however application of melatonin showed a protective effect on bone structure same as Amifostin application.

Key Words: Rat, Melatonin, Gamma radiation , femur, bone density, biyomechanic, morphometric.

TEŞEKKÜR

Tezimin tüm aşamalarında, sonsuz desteğini ve engin hoş görüşünü esirgemeyen Tez Danışmanım Sayın Y. Doç. Dr. Can DEMİREL'e Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Doç. Dr. Hüseyin KAYA ve Y. Doç.Dr. Ömer Can DEMİRTAŞ'a teşekkürlerimi sunarım. Hocalarımdan sadece akademik çalışmalar konusunda değil, bir akademisyende bulunması gereken bilgi, görgü, anlayış ve vizyon konusunda da çok şey öğrendim. Bana kazandırdıkları hayata dair bilgiler için de minnettarım. Birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum çalışma arkadaşım Berrin TİRYAKİ'ye tez süresince gösterdikleri yardımlarından dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı Başkanı sayın Prof.Dr. M. Salih ÇELİK ve Doç.Dr. Veysi AKPOLAT'a; Radyasyon Onkolojisi Ana Bilim Dalı Başkanı Y. Doç. Dr. S.Burhaneddin ZİNCİRCİOĞLU, Uzm. Mehmet Hakan Doğan ve Uzm. Mehmet Ali Kaya; Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. M. Aydın KETANİ ve Doç.Dr. Berna G. SARUHAN'a, Hayvan Besleme ve Besleme Hastalıkları Anabilim Dalı'ndan Y.Doç.Dr. Fatih AKDEMİR'e; Sağlık Bilimleri Enstitüsü yüksek lisans öğrencisi Uğur Şeker'e; Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünden Arş.Gör. Dr. Alaatin KAYA ve Arş. Gör. Tarık ÇİÇEK'e tez süresince gösterdikleri anlayış ve tüm yardımlarından dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı Başkanı sayın Prof.Dr. Nurten ERDAL ve Gaziosmanpaşa Üniversitesi Biyofizik Anabilim Dalı öğretim üyesi sayın Yrd. Doç. Dr. Serkan GÜRGÜL'e tüm yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

Hayatımın her döneminde sabır, anlayış ve desteklerini esirgemeyen aileme ve arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim.

SİMGELER ve KISALTMALAR

BAREA	: Cross-sectional area (mm ²)
KMİ	: Kemik Mineral İçeriği (Bone Mineral Content)
KMY	: Kemik Mineral Yoğunluğu (Bone Mineral Density)
B-OVX	: Bilateral Oferektomi (Bilateral Ovariectomy)
BT	: Bilgisayarlı Tomografi
CAT	: Katalaz
cGy	: Santi Gray, 1 Gy = 100 cGy dir
Co-60	: Kobalt-60 (⁶⁰ Co) kobaltın radyoaktif izotopudur, yarılanma ömrü 5,27 yıldır.
DEXA	: Dual Enerji X-Işımı Absorbsiyometre (Dual Energy X ray Absorpsiometry)
DNA	: Deoksiribonükleik asit
F	: Frekans
FDA	: Amerika Birleşik Devletleri gıda ve ilaç dairesi
GAG	: glikozaminoglikanlardan
GR	: Glutasyon Redüktaz
GSH	: Glutasyon
GSH-Px	: Glutasyon peroksidaz
GST	: Glutasyon-S-Transferazlar
Gy	: Gray = 1 Joule/kg
IAEA	: Uluslararası Atom Enerjisi Ajansı (International Atomic Energy Agency)
ICRP	: Uluslararası Radyasyondan Korunma Komisyonu (International Commission on Radiological Protection)
IVP	: intravenöz pyelografi
K	: Kontrol
µm	: Mikrometre
M	: Melatonin
M25	: Melatonin 25 mg/kg
M50	: Melatonin 50 mg/kg
MDA	: Malondialdehit
Mm	: Milimetre
OP	: Osteoporoz
PTH	: Osteoblastlar parathormon
R	: Radyasyon
R+M25	: Radyasyon+ Melatonin 25 mg/kg
R+M50	: Radyasyon+Melatonin 50 mg/kg
ROS	: Reaktif oksijen türleri (Reactive Oxygen Species)
R+WR	: Radyasyon+Amifostin
SNR	: Serbest nitrojen radikalleri
SOD	: Süperoksit dismutaz
SOR	: Serbest oksijen radikalleri
T	: Tesla
TBP-2	: Thioredoxin bağlayıcı protein-2
TPBT	: Üç nokta eğme testi
TD	: Tolerans dozları
Trx-1	: thioredoxin-1

WHO : Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization)
WR : Amifostin (WR2721) (Etanetiyol, 2-[(3-aminopropil)]-
dihidrojen fosfat(ester))

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1. Kemik iyileşmesini hızlandıran ve yavaşlatan unsurlar	14
Tablo 2.2. Kullanılan biyomekanik terimler	35
Tablo 3.1. Deney gruplarında yer alan sıçanların ağırlık değerleri.....	36
Tablo 3.2. Deney grupları ve uygulanan ilaç dozları	37
Tablo 4.1. Deney süresince sıçanlardaki ağırlık değerleri ve değişim oranı.....	45
Tablo 4.2. Kemiğin geometrik parametreleri.....	46
Tablo 4.3 Kemiğin biyomekanik parametreleri.....	51

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1. Radyasyonun sınıflandırılması	3
Şekil 2.2. Bir kemiğin genel yapısı	8
Şekil 2.3. Kemik dokusunun yapısı	9
Şekil 2.4. Kemik hücreleri.....	10
Şekil 2.5. Amifostinin kimyasal yapısı	24
Şekil 2.6. Melatoninin kimyasal yapısı	27
Şekil 2.7. Melatonin sentezi	29
Şekil 2.8 Üç nokta eğme testi.....	33
Şekil 2.9. Kemik kütlelerinin nötral eksene uzaklığı.....	34
Şekil 3.1. Bilgisayarlı tomografi ile kayıtlanan femur kesit alanı görüntüsü	39
Şekil 3.2. MAY03 biyomekanik ölçüm sistemi genel görünüşü.....	41
Şekil 3.3. Üç nokta eğme testi ile kaydedilen yük-deformasyon eğrisi	41
Şekil 3.4. Yük deformasyon eğrisi.....	42
Şekil 3.5. Zor-zorlama eğrisi (elastik modül)	43
Şekil 4.1. Deney süresince sıçanlardaki ağırlık değişimi.....	46
Şekil 4.2. Radyasyon ve kontrol gruplarında femurların ortalama boylar	47
Şekil 4.3. Radyasyon ve kontrol grupları femur kemik mineral Yoğunluğu	48
Şekil 4.4. Radyasyon ve kontrol gruplarında femurların kemik mineral içeriği	49
Şekil 4.5. Radyasyon ve kontrol gruplarında femurların ortalama kesit alanları.....	50
Şekil 4.6. Femurların ortalama Maksimum deformasyon miktarı	52
Şekil 4.7. Femurların ortalama maksimum kuvvet	53
Şekil 4.8. Femurların ortalama sertlik miktarı (N/mm)	54
Şekil 4.9. Femurlarda ortalama depolanan enerji miktarı	55
Şekil 4.10. Femurlarda ortalama elastik modül	56
Şekil 4.11. Deney ve kontrol grupları femur ortalama dayanıklılık miktarı	57
Şekil 4.12. Deney ve kontrol grupları femur ortalama maksimum zor miktarı.....	58
Şekil 4.13. Deney ve kontrol grupları femur maksimum zorlama miktarı	59

EKLER

Ek 1. Gaziantep Üniversitesi Etik Kurul Raporu	80
--	----

DENKLEMLER LİSTESİ

Denklem 3.1. İnstrinsik parametrelerin hesaplanmasında kullanılan denklemler	40
Denklem 3.2. ML yöndeki periostal çap hesaplanmasında kullanılan denklemler.....	40
Denklem 3.3. Medio-lateral (ML) ve anterior-posterior (AP) yönde oluşan kesitsel atalet momenti denklemi	40

1. GİRİŞ

Radyasyon sonrası sistemik hasar, özellikle reaktif oksijen atom ve moleküllerinin aşırı üretimine, dokuların pro-oksidant/anti-oksidant dengesinin değişmesine; protein, lipid ve DNA oksidasyonuna bağlıdır (1). İyonize radyasyona maruz kalan hastaların, iyonize radyasyon sonucu oluşan serbest oksijen radikallerini temizlemede endojen radikal süpürücü sistemlerinin yetersiz kalması sonucu ekzojen antioksidan tedavisiyle organ ve sistemlerinin korunmasını amaçlayan çalışmalar temel alınarak, son zamanlarda kanser tedavisinde antioksidanlar ve türevlerinin kullanılma ihtimali araştırılmaktadır (2).

Bu hasarların etkilerinin azaltılması veya tamamen giderilmesi için melatonin (N-[2-(5-methoxy-1H-indol-3-yl)ethyl]) acetamide, Süperoksit dismutaz (SOD), Katalaz (CAT), Glutatyon peroksidaz (GSH-Px), Glutatyon-S-Transferazlar(GST), Glutatyon Redüktaz (GR) gibi enzimatik ve Glutatyon (GSH) ile vitaminler (A, C, E) gibi enzimatik olmayan antioksidan maddeler kullanılmaktadır (3, 4). Melatoninin en zararlı serbest oksijen radikali olan OH⁻ radikalini ortadan kaldıran çok güçlü bir antioksidandır (5). Kiraz gibi birçok bitki melatoninin önemli kaynaklarıdır (6, 7) ve pineal bezden sirkadiyan bir ritimde ve karanlıkta salgılanan melatonin hormonu vücudun diğer kısımlarına zaman sinyalleri göndererek, günün ve yılın farklı zamanlarına bağlı fizyolojik siklusun düzenlenmesinde görev alır (5, 8).

Son yıllarda melatoninin en etkili antioksidan olduğu ileri sürülmektedir (3, 4, 7, 9). Melatoninin glutatyona ve E vitaminine göre daha etkili bir antioksidan olduğu (10) ve travmatik beyin yaralanmalarının neden olduğu oksidatif hasarlarda koruyucu etki yaptığı belirtilmektedir (11). Melatonin güçlü antioksidan etkisinin yanısıra ayrıca nöral dokuda glutatyon peroksidaz aktivitesini de artırmaktadır. Beyin, glutatyon aktivitesinin gece yüksek olması yüksek melatonin düzeyi ile yakından ilgilidir (12). Melatonin iyonize radyasyon etkisine kalarak organ yaralanmaları ve oksidatif strese karşı radyoprotektif etki göstermektedir (13). Bu nedenle son yıllarda deneysel modeller kullanılarak çeşitli dokularda melatoninin radyasyon hasarına karşı koruyucu etkisini gösteren çalışmalar bulunmaktadır (3, 4, 7, 10, 14, 15, 16, 17, 18). Yüksek dozlardaki serbest radikal koruyucuları, biyomekanik olarak oldukça stabil kemik greftleri oluşumuna katkı

yapmaktadırlar. Bu nedenle radioprotektif koruyucu olarak da yaygın olarak kullanılmaktadırlar (16).

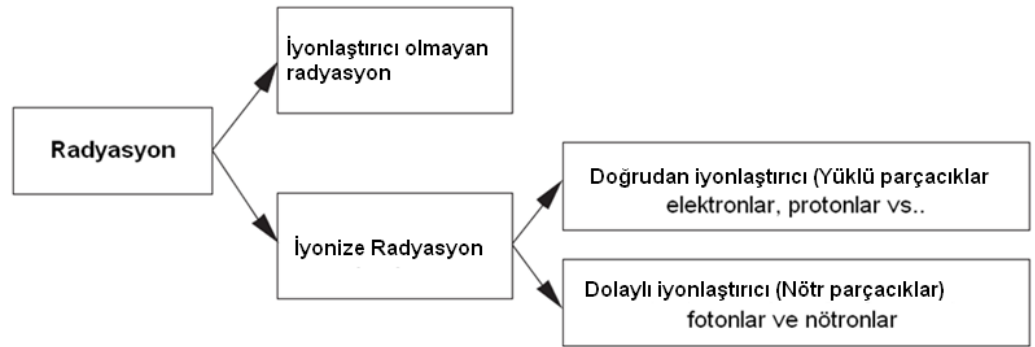
Ancak melatoninin kemik radyasyon hasarı ile oluşan biyomekanik parametreler üzerine koruyucu etkileri üzerine araştırmalar bulunmamaktadır. Amifostin klinikte radyasyon hasarına karşı normal dokular için koruyucu etkisi kanıtlanmış rutinde kullanılan koruyucu tek ilaçtır. Amifostin, radyoprotektif etkisini, radyoterapi ile oluşan serbest radikalleri temizleyerek ve hidrojen vermesi sayesinde serbest radikallerin oluşturduğu DNA hasarını onararak gösterir. Amifostinin dokularda WR-1065 ve diğeri tiyol metabolitlerine dönüşerek dokuları kemoterapiye bağı DNA hasarından koruduğı sanılmaktadır. Yeni radyoprotektiflerin geliştirilmesi amacıyla yapılan araştırmalarda özellikle amifostinin en yüksek koruyucu etkiye sahip olduğı saptanmıştır (19, 20). Klinikte ışın tedavisi öncesi hastalara uzun yıllardır kullanılmaktadır (21).

Bu çalışmada radyasyonla hasarlanmış kemiklerde Kemik mineral yoğunluğu, kemik mineral içeriğı ve kortikal kemik kesit alanı gibi geometrik ve maksimum deformasyon miktarı, maksimum kuvvet, sertlik, kemikte depolanan enerji, elastik modül, dayanıklılık, yield displacement, maksimum zor ve maksimum zorlama gibi biyomekanik parametreler kullanılarak melatoninin koruyucu etkisi araştırılmıştır. Bu koruyucu etkisinin Amifostinle karşılaştırılması klinik kullanım açısından önemli bilgiler içerdiği gibi kemik kalitesi üzerine melatonin ve amifostinin karşılaştırılması melatonin etkinliğinin kanıtlanması açısından da önemlidir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Radyasyon

Radyasyon, doğal ya da yapay radyoaktif nükleusların kararlı yapıya geçebilmek için dışarı saldıkları hızlı parçacıklar ve elektromanyetik dalga biçimindeki enerji yayımı ya da aktarımıdır. Genelde atom numarası 83'ten büyük atomlar radyoaktif olmakla birlikte, daha küçük atom numaralı atomların izotopları da (benzerleri) radyoaktif olabilir. Radyasyon, iyonize ve iyonize olmayan olarak iki gruba ayrılır (22, 23, 24) (Şekil 2.1)



Şekil 2.1. Radyasyonun sınıflandırılması (22)

2.1.1. İyonize olmayan radyasyon

Kütsüz elektromanyetik dalga şeklinde olan radyasyondur. İyonize olmayan radyasyon tipleri radyo dalgaları, mikrodalga, kızıl ötesi ışınlar, görünen ışık (kırmızı, turuncu, sarı, yeşil, mavi, mor) ve mor ötesi ışınlar olarak bilinmektedir (25, 26, 27). İyonize Olmayan Radyasyon güneş veya yıldırım gibi doğal kaynaklardan ya da kablosuz yayınlar, endüstriyel, bilimsel ve medikal uygulamalar gibi insan aktivitesinden yayılmaktadır (27).

2.1.2. İyonize radyasyon

İyonize radyasyon bir ortama veya biyolojik sisteme girdiğinde ortamdaki atomlara çarparak elektron koparırlar (iyonlaşma) veya çarptıkları atomların elektronlarını koparmasalar bile daha yüksek enerji seviyesine atlatırlar (uyarılma). İyonize radyasyon, partikül (alfa ve beta parçacıkları, nötronlar) ya da dalgaların (x ışını, gamma ışını) atom veya moleküllerden elektron koparması ile enerji salınımı ya da

transferidir. Buna bağlı atom ya da molekül pozitif yüklü hale gelir. İyonize radyasyon içeren radyolojik görüntüleme araçları, bilgisayarlı tomografi (BT), anjiyografi, floroskopik tetkikler, mammografi, intravenöz pyelografi İVP ve düz röntgenlerdir. Nükleer tıp çalışmaları da iyonize radyasyon içermektedir. Diğer tanısal araçlar olan ultrasonografi, doppler ultrasonografi ve manyetik rezonans görüntülemede iyonize radyasyon kullanılmaz (22). İyonlaşma ve uyarılma olayı iyonize radyasyon enerjisinin ortam tarafından absorlandığını gösterir.

2.1.3. İyonize radyasyon tipleri

İyonize radyasyonun iki tipi bulunmaktadır. Bunlar;

1. Elektromanyetik Radyasyon: X ışınları ve gamma ışınlarından oluşur.
2. Parçacık Tip Radyasyon: Alfa (α) parçacığı, beta (β) parçacığı, nötron, proton, pimeson, ağır iyonlardan oluşur.

Elektromanyetik radyasyon dalga hareketinin dalga boyu ve bir noktadan geçen dalgaların sayısı (frekansı) ile dalganın hızını bulabiliriz. Bu veriler ile elektromanyetik dalga tiplerini birbirinden ayırabiliriz (22)

X ışınları: Atom çekirdeğinden yayılmaz. Elektromanyetik dalgalardır. X ışınları maddeye giren elektron maddenin atom nükleusları tarafından frenlenerek bir enerji açığa çıkmasıyla oluşur.

Gamma Işınları: Gamma ışınları elektromagnetik dalgalardır. Radyoaktif bir çekirdeğin kararlı hale geçerken açığa çıkan enerji fazlasının nükleustan dışarı atılmasıyla oluşur. Atom çekirdeğindeki fotonlar tarafından yayılmaktadır. Gamma Radyasyon hayli enerjik olup etkileşim olmaksızın insan vücudundan belirli bir kısmı geçebilecek kadar penetrandır. Fotonların yaklaşık %75'i hedef dokunun atomlarıyla etkileşime geçerek enerji kaybederler (22).

Gama ışınlarının dalga boyu ışığın dalga boyundan daha kısa olmasına rağmen ışık gibi fotonlardan oluşur ve ışık hızıyla yayılır. Atom çekirdeğinden bir alfa veya bir beta parçacığı ayrıldıktan sonra çekirdekte fazladan enerji oluşur. Gama ışınları, atomun fazladan sahip olduğu enerjiyi çekirdeğinden ayırmasından oluşur. Yüksek enerji

seviyesine sahip olan atom çekirdeğinin yapısı kararsız olur. Kararlı bir yapıya sahip olmak için çekirdekten enerji ayrılır. Gama ışınları çekirdekten ayrılan elektromanyetik enerjidir. Enerji seviyesi yüksek olan baryum atomu kararsız yapıdır ve bu enerjiyi gama ışınları şeklinde çekirdeğinden ayırır.

2.1.4. Gamma radyasyon ve etkileri

Son yıllarda modern radyoterapi teknikleri yaygın olarak kullanılsa da, radyasyonun normal dokular üzerinde meydana getirdiği hasarları tamamen ortadan kaldıramamıştır. İyonize radyasyon, hücre içi moleküllerde ve daha önemlisi genetik materyal olan kromozomlarda (DNA) kimyasal bağların kopmasına neden olmaktadır (22, 28). Mutasyon olarak adlandırılan bu genetik hasarlar hücre tarafından tamir edilemez ise, hücreyi ölüme götüren süreci başlatan metabolik değişiklikler meydana gelir. Bu etki nedeniyle iyonize radyasyonlar, devamlı hücre çoğalması ile kendini gösteren kanser hastalığının tedavisinde kullanılmaktadır. Ancak, sağlam doku hücrelerindeki genetik hasar hücrenin ölümüyle sonuçlanmazsa yıllar sonra kansere neden olabilmektedir (22).

Radyasyona bağlı ortaya çıkan erken ve geç etkileri tedavi etmek her zaman mümkün olamadığı için yan etki oluşumunu önleyebilecek ajanların geliştirilmesi önem kazanmıştır. Ortaya çıkan hasarların büyük oranda serbest radikal kaynaklı olduğu ve antioksidan maddeler kullanarak olumsuz etkilerin kısmen önlenebileceği çeşitli deneysel çalışmalar ile ortaya konmuştur (29, 30, 31, 32, 33, 34).

2.2. İyonize radyasyonun hücredeki etki mekanizması

İyonize radyasyonlardan gamma, nötron, beta ve alfa iyonize radyasyonları biyolojik sistemlerle etkileşime girer (radyokimyasal etki) (2). Bu etkiler somatik ve genetiksel olup, akut ve kronik şekillerde farklılıklar göstermektedir (22).

Parçacık radyasyonun madde ile etkileşiminde absorblanması sonucu ısı, eksitasyon ve iyonizasyonu oluşur. Bu etkileşimler sonucunda kimyasal ve biyolojik etkiler ortaya çıkar. Elementlerin dış orbitallerindeki elektronlar, kimyasal reaksiyonlarda önemli rol oynar. Radyasyon etkisiyle orbital elektronlarının sökülmesi, maddenin kimyasal özelliğini değiştirir. Bu etkileşim hücre içerisindeki makromoleküllerde (DNA-NA) veya su moleküllerinde de görülebilir (33).

İyonize radyasyonun biyolojik bir sistemde yol açtığı olumsuz etki doğrudan ve dolaylı etki olarak ikiye ayrılır. Eğer radyasyon enerjisi DNA veya bir enzim molekülü tarafından absorblanıyorsa bu moleküllerde oluşturduğu olumsuz etkilere radyasyonun doğrudan etkisi denir. Eğer radyasyon enerjisi biyolojik sistemdeki ortam molekülleri tarafından doğrudan absorblanmayıp, içinde bulunduğu ortamın molekülleri tarafından absorblanarak değişikliğe uğratılıyorsa bu etkiye radyasyonun dolaylı etkisi denir (22).

Dolaylı gerçekleşen etkileşim radyobiyolojik açıdan direkt etkileşimden daha önemlidir ve memeli hücrelerinde radyasyonun olası etkilerinin %70'ini dolaylı yolla gösterdiği düşünülmektedir (33, 35). SOR'ler oksijen molekülleri ile de etkileşime girerler ve bu etkileşimler sonucunda gerek hidrojen gerekse bazı organik moleküllerin peroksit radikalleri oluşur ve bunlar biyolojik açıdan son derece aktiftirler. Oksijen varlığıyla, sözü geçen peroksit radikallerinin oluşum sıklığındaki artış, bu etkinin mekanizması olarak kabul edilir (36). Radyasyon sonrası sistemik hasar özellikle SOR'nin aşırı üretimine bağlı olup; dokuların prooksidant/antioksidan dengesinin değişmesine yol açarak, sonuçta hücrenin temel yapılarının oksidasyonuna neden olur (30).

İyonize radyasyona maruziyet sonucunda canlılarda oluşan iyonizasyonun söz konusu biyolojik reaksiyonları etkileyerek bir takım fizikokimyasal değişikliklere neden olması çok kısa bir süre içinde (<1 sn) gerçekleşir (33). Bu fizikokimyasal değişikliklerin doğurduğu genetik mutasyonlar, kanserleşme ve hücre ölümü gibi biyolojik sonuçlar; saatler, günler, aylar hatta yıllar içinde gözlenebilir (31). İyonize radyasyona bağlı hücre ölümünün başlıca nedeni nükleik asitlerin reaktif oksijen türevleri ile reaksiyonudur. Reaktif oksijen türevleri DNA çift sarmalının ayrılmasına veya nükleik asit baz değişimlerine neden olabilir. Hatalı onarılmış ya da onarılmamış DNA çift kırığı, silinme, yer değiştirme ve asentrik veya disentrik kromozomlar; ayrıca kromozomal kırık ve arça oluşumu, hızlı çoğalan hücrelerde mikronükleus artışı olarak gözlenir (37). Sonuçta bu süreç kromozomal mutasyonlar ve sitotoksosite ile sonuçlanır (3, 38).

Akut Radyasyon Sendromları kısa süre içinde yüksek dozda radyasyona maruz kalan bireylerde gelişen bir durumdur. Bu semptomlar, radyasyona maruz kalınmasından itibaren dakikalar içinde de, günler içinde de gelişebilir. Hayvanlarda iyonize radyasyonun letal etkileri belirli bir organ veya sistemlerin yetmezliğini ortaya çıkarır. 1 Gy üzerindeki doz spesifik bir radyasyon sendromu yaratır. $1 \text{ Gy} < \text{Dose} < 10 \text{ Gy}$:

kemik iliği sendromu, 10 Gy < Dose < 100 Gy: gastro-intestinal sendromlar, daha yüksek dozlar > 100 Gy: merkezi sinir sistemi sendromuna neden olmaktadır (39).

2.3. Kemiğin Genel Özellikleri

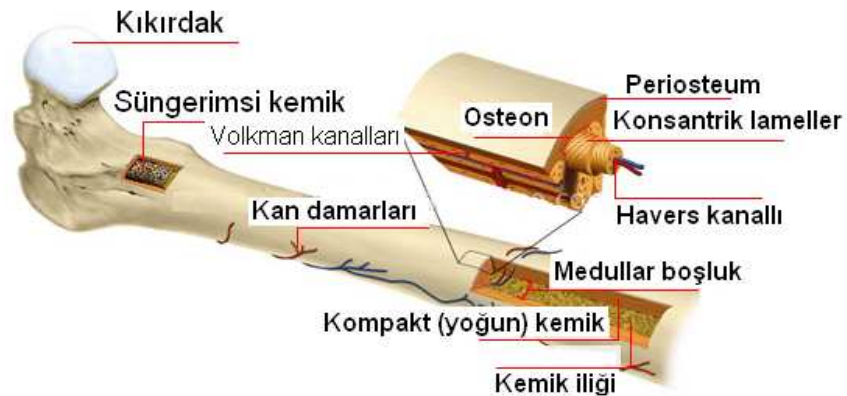
2.3.1. Kemiğin yapısı

Kemik mineralleşme denilen bir işlemle kalsiyum ve fosfat tuzlarıyla doygunlaştırılmış olan sert ve bükülmez bir destek bağ dokusudur. Hücreler ve hücrelerarası maddeden oluşur. Kemikler iskelet sisteminin en önemli yapıtaşdır (40). Bununla birlikte kan hücrelerinin yapıldığı kemik iliğini içermesi ve metabolik önemi olan kalsiyum mineralinin deposu olması, kemiğin destek dokusu olmasının yanında metabolizmada da önemli bir rol oynadığını göstermektedir (41).

Kemiğin dış ve iç yüzeyleri, kemiği oluşturan hücrelerden ve bağ dokusundan oluşan tabakalarla örtülüdür. Dıştakine periosteum, içtekine ise endosteum adı verilir (Şekil 2.2) Temel işlevleri, kemik dokusunun beslenebilmesi, büyüebilmesi ve onarımı için gerekli olan yeni osteoblastları aralıksız olarak üretmektir.

Histolojik inceleme için dekalsifikasyon uygulandığında inorganik tuzların ortadan kalkmasıyla kemik demineralize olur ve yumuşar. Ancak şeklini korur ve mikroskopik yapısı bozulmaz (40). Genel görünüşüne göre kemiğin iki şekli bulunur:

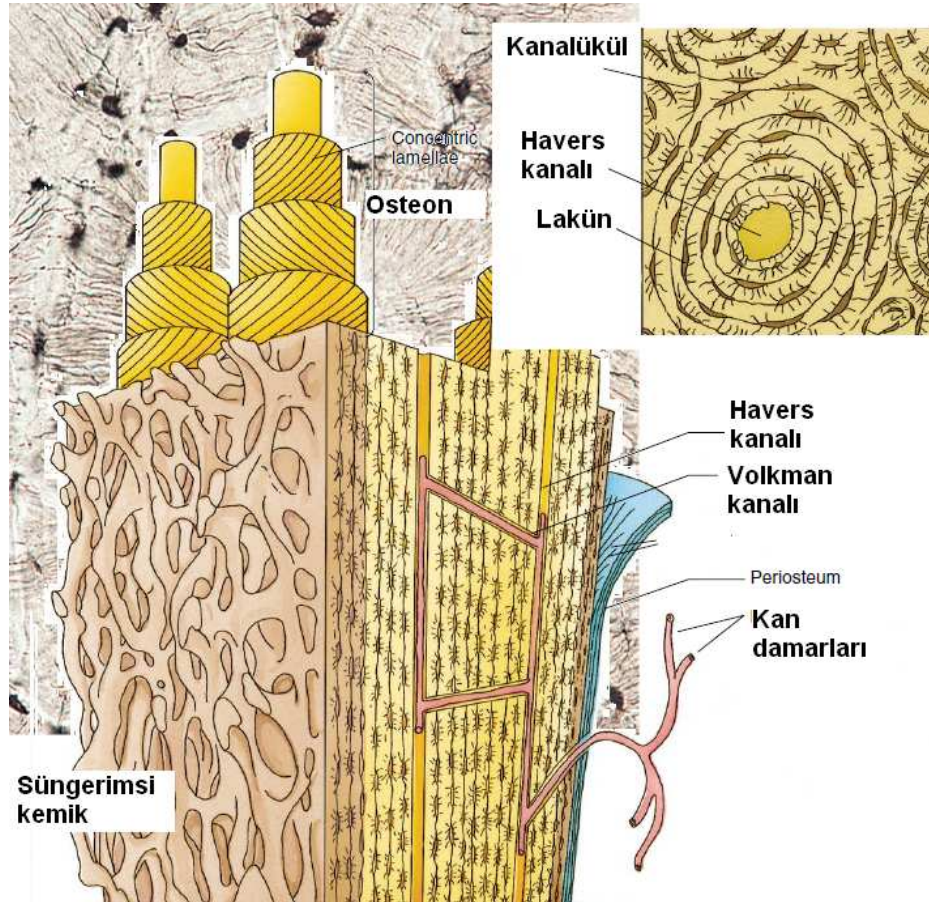
1. Kompakt (yoğun) kemik, 2. Süngerimsi kemik



Şekil 2.2. Bir kemiğin genel yapısı (<http://visual.merriam-webster.com/human-being/anatomy/skeleton/structure-long-bone.php>).

Kompakt kemik sert bir kitle olarak görülür. Süngerimsi kemik, kemik iliği tarafından doldurulan boşluğu sınırlayan spiküllerden ve trabeküllerden oluşan bir ağ örtüsü meydana gelir (40, 42). Yoğun bir kemiğin (örneğin femurun diyafizi) mikroskopik incelemesinde, dokunun Havers kanalları etrafında 3-7 μm kalınlıktaki lamellerden, hücrelerden ve sert bir matriksten oluştuğu görülür. Bir Havers kanalı yan dallarla kemik iliği ve periosteumla bağlantı kurar. Bu yan dallara Volkmann kanalları adı verilir. Haversteeki damarlar uzunlamasına dizilmiş olup, yan dallarıyla da komşu damarlarla temastadırlar (43).

Havers kanalı 20-100 μm çapındadır ve 1-2 adet damarsal yapı içerir. Damarlar genellikle kapiller, postkapiller venül veya seyrek olarak arteriol olabilir. Sert bir matrikse sahip olan kemik dokusunda diffüzyon olanağı olmadığından kanal ve kanaliküllerle kemiğin dışından içine kadar ilişki kurulur ve bu şekilde metabolizma için gerekli maddeler damar ve kanaliküllerle hücrelere kadar ulaşır (41, 42, 44, 45) (Şekil 2.3).



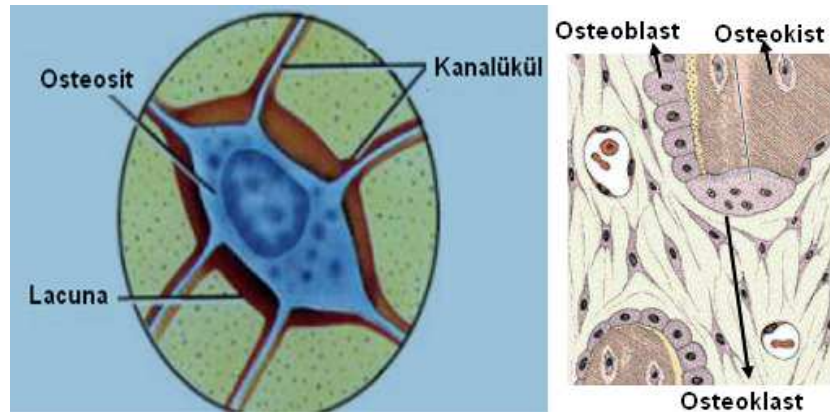
Şekil 2.3. Kemik dokusunun yapısı (W.B. Saunders Company)

Süngerimsi kemik ise, içinde boşluklar barındırır ve yüzeyin hacme oranı yüksektir. Yüksek metabolik etkinliğe sahip süngerimsi kemik plakaları üzerinde çok sayıda osteosit yer alır. Süngerimsi kemikte besin maddeleri kemiğin hücre dışı sıvısından trabekülaya sızar, yoğun kemikte ise besin maddeleri kan damarlarının bulunduğu Havers kanalları ile sağlanır (40, 45, 46). Süngerimsi kemik yoğun kemiğe benzemekle beraber, trabeküller lamelden yoksundur. Dolayısıyla histolojik preparasyonlarda enine kesitte sirküler lamel dizilişi görülmez. Buna karşılık bol boşluklu trabeküllerden oluşan, adeta petek görünümü veren bir dokusu vardır. Bu boşluklar kemik iliği ile doludur. Özellikle uzun kemiklerin epifizindeki süngerimsi doku basıncın veya kuvvetin geldiği yönde düzenlenmiştir. Böylece yapı çok daha sağlam bir hale gelmektedir (40, 41, 43).

2.3.2 Kemik dokusunun yapısal elemanları

Kemikler organik ve inorganik bölümlerden oluşmuştur. Organik kısım kemik dokusunun yaklaşık olarak %30'unu oluşturur. Bu yapının büyük bölümü tip I kollajen lifler ile, protein ve glikozaminoglikanlardan (GAG) oluşan temel amorf maddeden yapılmıştır. Kemiğin organizmadaki gerekli işlevlerini tam olarak yerine getirebilmesi, dokudaki organik/inorganik elemanların ve matriksin uyumlu birlikteliğine bağlıdır. Kollajen ve kollajen dışı proteinler ile kemik iliği hücreleri, kemiğin organik kısmının elemanlarıdır. Organik bölümün %98'ini matriks, %2'sini hücreler oluşturur (40, 41).

Bu hücreler temel olarak Osteoprogenitör hücre, osteoblastlar, osteositler ve osteoklastlardır (40, 46) (Şekil 2.4)



Şekil 2.4. Kemik hücreleri

Osteoprogenitor Hücreler

Diğer destek dokular gibi, kemik dokusu da embriyonik mezenşimden gelişir. Doğum sonrası yapı ve işlev bakımından farklılaşmamış hücre topluluklarına sahip olup, bu hücelere osteoprojenitor veya osteojenik hücreler denir. Bunlar kemik hücresi olma yönünde koşullanmış mezenşim hücrelerdir. Osteoprogenitor hücreler kemiklerin normal büyümesi sırasında aktiftir. Erişkinlerde de yukarıdaki söz konusu bölgelerde hareketsiz dururken; kemikte yaralanma ve kırıkların iyileşme bölgelerinde ve kemiğin içten yeniden düzenlenmesi sırasında aktive edilerek mitozla bölünüp çoğalırlar. Çoğalan bu hücrelerin bir bölümü kemiği oluşturan osteoblastlara dönüşür (40, 41, 45, 46)

Osteoblastlar

Osteoblastlar kemik oluşumundan sorumlu hücrelerdir (45, 46). Kemikleşme bölgelerinde, gelişmekte olan kemiklerin periosteumunun kemiğe temas eden derin bölgelerinde diziler halinde bulunurlar. Sitoplazmaları granüllü endoplazmik retikulumca zengindir. Çok iyi gelişmiş Golgi kompleksi ve uzun mitokondrileri vardır. Osteoblastlar yüksek metabolik aktiviteye sahip hücreler olup, yüksek seviyede alkalen fosfataz aktivitesi gösterirler. Bu da kemik matriksinde kalsiyum depolanmasını osteoblastların düzenlediğini gösterir (40, 41)

Osteoblastlar kemik matriksin esas yapısı olan tip I kollajen ile birlikte, kemik matriksin kollajen dışı proteinlerinin yaklaşık %40-50'sini oluşturan osteokalsin ve osteonektin gibi kemik kalitesinden sorumlu proteinlerini de sentezler. Osteoblastlar parathormon (PTH), D vitamini ve glukokortikoidlere sahiptirler. Osteoblastlar değişim göstererek, lakuna içinde bulunan ve kemik yatağı tarafından çevrelenen osteositlere dönüşürler.

Osteoblastlar kemik yüzeylerinde epitel hücrelerini andıracak şekilde yan yana dizilirler. Matriks sentezini yapmaya başladıklarında şekilleri kübikten prizmatığe kadar değişebilir (47). Komşu osteoblastlar ile temaslarını sağlayan sitoplazmik uzantıları vardır (48).

Osteositler

Kalsiyum tuzlarının birikmesiyle kireçleşmiş kemik matriksi içinde hapsolan osteoblastlara osteosit denir (45). Osteositlerin kemiğin diğer hücre tiplerine

dönüşebilme özelliği vardır. Osteoliz olayı aktif fizyolojik bir olay olup, osteosit etrafındaki kemik matriksinin değişime uğratılması ve kemik tuzlarının geri emilmesidir (40, 41, 45, 46)

Osteositlerin yarı ömrü tahmini 25 yıldır. Kemikte yeniden yapılanma için en önemli uyarı kemiğin haraplanmasıdır. Harabiyet görülen bölgenin tamiri için öncelikle osteoklastların bölgeye gelmesi ve bir rezorbsiyon alanı meydana getirmeleri gerekmektedir (48).

Stres tüm kemikte esas yapılanma ve yeniden yapılanmanın kontrolü için uyarı oluşturur. Bu olayda en çok etkilenen hücre grupları osteositler ile yüzeyde yerleşim gösteren osteoblastlardır.

Osteoklastlar

Kemiğin yeniden biçimlenme süresince çözünüp çevre dokularca emilmesinden sorumlu çok çekirdekli hücreler olan osteoklastlar, monositlerin birleşmesiyle meydana gelir. Kökeni ve işlevi göz önüne alındığında makrofajlara çok benzerler. Kalsiyumun kemik dokusundan kana salınmasında aktif rol oynayarak, vücut sıvılarında kalsiyum derişiminin homeostatik düzenlemesinde çok önemli rol oynar. Kandaki kalsiyum seviyesinin düzenlenmesi, kemikte birbirine zıt çalışan iki hormonla kontrol edilir. Bunlar paratiroid bezinden salgılanan parathormonu ve tiroit bezinden salgılanan kalsitonindir. Parathormonu kemik yıkımını uyarak kalsiyumun kemikten kana geçmesine neden olurken, kalsitonin kalsiyumun kemikten ayrılmasını baskılar (40, 41, 45, 46).

Osteoklastlar, kemik matriksine hücum eden asid, kollajenaz ve diğer proteolitik enzimleri salgırlar. Böylece kalsifiye olmuş temel maddeyi serbest hale getirirler ve kemik rezorbsiyonu sırasında meydana gelen artıkların da ortadan kaldırılmasında aktif olarak rol alırlar (47).

Kemiğin %70'ini ise inorganik kısım oluşturur. İnorganik elementlerin başında kalsiyum, fosfat, sitrat, magnezyum gibi maddeler gelir. İnorganik kısmın çoğunluğunu kalsiyum hidroksiapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) kristalleri oluşturur.

Kemik doku yüksek kalsiyum ve fosfat içeriği nedeniyle, kalsiyum homeostazında çok önemli bir rol oynar. Hidroksiapatit kristallerinin kemikteki önemi, kollajenlerle beraber kemik sertliğini ve dayanıklılığını sağlamasıdır (45).

2.3.3. Kemik oluşumu

Kemikler, iki şekilde gelişirler: Yassı kemikler, mezenkim dokusunun doğrudan kemik dokusuna farklılaşmasıyla gelişir. Bu tür kemikleşmeye, “intramembranöz (zar içi) kemikleşme” denir (45). Kısa ve uzun kemiklerin ise, önce hiyalin kıkırdaktan ufak taslak modelleri meydana gelir. Daha sonra, bu kıkırdakların yerini kemikler alır. Bu tür kemikleşme modelindeki gelişim aşamaları, şu şekilde gerçekleşir (45).

(a) Kıkırdak Modeli: Embriyonik dönemde, ilk aşamada ileride oluşacak kemiği anımsatan küçük bir hiyalin kıkırdak modeli gelişir.

(b) Periostal Kemik Zarfı: Kılcal damarlar perikondriyumu geçerler ve bunun iç yüzünde yer alan mezenkimal hücreler, osteoprogenitör hücrelere dönüşür.

(c) Çoğalmı: Periostal kemik zarfı meydana gelirken, kıkırdak modelinde bazı yapısal ve işlevsel değişiklikler olur. Diyafizin üst ve alt bölgelerinde periost zarfına yakın yerleşimde bulunan kondrositler, hızla çoğalmaya başlar ve kemiğin uzun eksenine paralel izogen gruplar ortaya çıkar.

(d) Hipertrofi: Kondrositler, diyafiz bölgesinde meydana gelen kemik manşetten dolayı yeterince beslenemedikleri için, hızlı bir şekilde geniş ve yuvarlak hücrelere dönüşürler ve bozunurlar.

(e) Kalsifikasyon: Hipertrofi süreci ilerlerken, tüp şeklindeki süper lakünalar arasındaki kıkırdak matriksi kalsifiye olmaya başlar.

(f) Birincil Kemik Boşluğunun Oluşumu: Ölü hücreler ve kalsifiye kıkırdak matriksinin bir bölümü, “kondroklast” denilen büyük ve çok çekirdekli hücreler tarafından ortadan kaldırılır.

(g) Periost tomurcuğu: Periosteumda, birincil kemik iliği boşluğunu delip geçen bir grup kan damarından ve bunların etrafındaki dokudan oluşmuştur.

(h) Kemikleşme: Osteoprogenitör hücreler, bölünüp osteoblastlara farklılaşırlar. Osteoblastlar, kemik matriksini üretip salgılar ve birincil kemik ortaya çıkar. Daha

sonra, birincil kemik ve geriye kalan kalsifiye kıkırdak erir ve bunların yerini ikincil kemik dokusu alır. İkincil kemiğin meydana gelmesi ve daha sonra da yaşam boyu sürdürülmesi olaylarında, osteoblastlarla osteoklaastların arasında bir yapım – yıkım dengesi sürer.

2.3.4. Kemiğin rejenerasyonu

Organizmada herhangi bir nedenle hasar gören dokular belirli bir oranda kendilerini yenileyebilmektedirler. Kemik dokularının hepsinde, olgunlaşma derecelerine bakılmaksızın kemikleşme uyarısı vardır. Kemiğin organik matriksi, canlı hücrelerin yokluğunda bile “Kemik Yapısını Uyarma Proteini” (BMP) denilen bir protein içerir. Kemik yapma uyarımı, substrat – hücre ilişkisine dayanır. Makrofajlar ve histiyositler, yıpranan ölü kemik matriksinin eritilmesi aşamasından sonra, ilkel bağ dokusu hücrelerini osteoprogenitörlere ve ardından da osteoblastlara dönüştürürler. Teşvik olayında, damar etrafında yerleşik bulunan hipertrofik mezenkimal hücreler kemik uyarımına cevap verir. Bu hücreler osteoblastlara, kondroblastlara ve hematositoblastlara farklılaşırlar ve indüksiyon (uyarım) hücrelerine dönüşürler (45). Bir kemikteki yenilenmeyi hızlandıran veya yavaşlatan faktörler mevcuttur (Tablo 2.1)

Tablo 2.1. Kemik iyileşmesini hızlandıran ve yavaşlatan unsurlar

Hızlandıranlar	Yavaşlatanlar
Osteojenik Faktör	Mineraller
Osteojenik Protein – 1	Radyasyon
Tissukol	Enzimatik Parçalanma
TGF – Beta 1	İnterferon – Gamma
Morfogenetik Protein – 2	Kadmiyum
Kollajen ve Bio Oss Maddeler	
Prostaglandinler	
İnsüline Benzer Büyüme Unsuru	
Poliipeptit GF	
Osteojenin	
Osteoindüktif Protein	
Hemostatik Ajanlar	
Isı	

2.4. İyonize radyasyonun kemik üzerine etkileri

Radyasyonun kemik üzerindeki moleküler düzeydeki etkisi çok az bilinmektedir. İn-vitro araştırmalar daha çok kemik iliği hücrelerinin ölüm yüzdeleri ve uygun doz bulma çalışmaları şeklindedir (49).

İyonize radyasyon çeşitli viral ve bakteriyel hastalık bulaşma riskine karşı kemiği sterilize etmek için yoğun olarak kullanılmaktadır (16, 49). Ancak, gama radyasyon sterilizasyonu kemik malzeme özellikleri bozar ve kemik performansını azaltan önemli bir klinik sorundur. Bu nedenle, mikro kırılma eğilimlerinin hesaba katılması mekanikal özelliklerin derecesi ve hasar birikimi arasındaki ilişkilerin anlaşılması açısından önemli bilgiler sağlayacaktır.

İyonize radyasyonun kemik üzerine hasarı mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte, kemik kollojen dokusu üzerine serbest radikaller yoluyla etki yaptığı belirtilmektedir (15). Kemik hasarlarının bir şekli kemik rezorpsiyonu (kemik erimesi) olarak ortaya çıkmaktadır. Araştırmacılar östrojen eksikliği ile ilişkili aşırı kemik rezorpsiyonu, osteoklast yada kemik iliğindeki diğer hücrelerin antioksidanların savunma yeteneklerinin azalması ile yorumlanabilir (50).

Yapılan çalışmalarda Thioredoxin bağlayıcı protein-2 (TBP-2) thioredoxin-1 (Trx-1) olumsuz (negatif) düzenlemeler yaptığı ve bunun osteoklast farklılaşmasında önemli rol oynadığı belirtilmektedir (50).

Kemik iliğinde sürekli kan yapılmasından dolayı radyasyondan en çok etkilenen organlardan birisi kemik iliğidir. Az dozları faydalı iken yüksek dozları (nükleer savasta) kemik iliğinin yok olması gibi sonuçları oluşabilir. Kemik dokusu üzerine radyasyonun etkisi özellikle kemiğin büyüme noktalarındaki gelişimi ile kemik iliğinin kan yapıcı kök hücrelerinin (hematopoietik kök hücreleri) oluşumunu durdurmasıdır.

İyonize radyasyonun terapötik ve tanısal amaçlı kullanımının başta kemik iliği ve gastro-intestinal sistem olmak üzere birçok doku ve sistem üzerinde zararlı etkiler meydana getirdiği bilinmektedir (2). İyonize radyasyon toplam doz, fraksiyon şeması (günlük doz ve toplam tedavi süresi) ve tedavi edilen volüm gibi birbiriyle yakından ilişkili parametrelere bağlı olarak, dokularda farklı etkiler oluşturur (49). Bir organın normal dokusunda belirli bir hasar meydana getirebilmek için gereken ışın dozu, organın ışınlanan hacmi küçüldükçe artmaktadır (51). 8-10 Gray gibi yüksek dozlardaki radyasyon kemik iliği hücrelerinde bozukluklar oluşturduğunu saptanmıştır. Elde edilen veriler ışığında X-ray ve MR'ın gerek tek tek gerekse kombine uygulanmasının rat

kemik iliği retikülosit hücreleri üzerinde genotoksik ve sitotoksik bir etkiye sahip oldukları, genomik instabiliteye neden oldukları saptanmıştır (52). Araştırmalar iyonize radyasyonun tek dose 5 gray uygulaması serbest radikaller vasıtasıyla osteoblastlarda c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase (JNK/SAPK) ile transcription factor, AP-1 aktivasyonunu etkilemektedir (53).

Serviks kanseri kadınlarda radyoterapi sonrası oluşan pelvik ağrı, kemik erimesi ve kırıklar, kemik dokusunun metastaz olmasından daha çok radyasyonun yol açtığı sorunlardır (54).

Radyasyon etkisini azaltmak üzere çeşitli koruyucu maddeler kullanılmaktadır. Radyasyonun neden olduğu serbest radikal oluşumunu engellemek üzere yapılan çalışmada, N-asetil-sistein glutathione sentezi ve RhoA activationun inhibasyonu ile osteogenik aktiviteyi uyarmaktadır (55). Tek doz 17.5 Gy radyasyon uygulanmış sıçanlarda kontrole göre % 71,9 oranında osteoklast ve chondroblast sayılarında azalma görülmüştür. Amifostin uygulaması yapılan gruplarda ise bu sayılarda kontrole yakın değerler belirtilmiştir (56, 57).

Yüksek radyasyon dozlarında kemiğin büyüme özelliği olmayan kısımları oransal olarak daha dayanıklı olmasına karşın, büyüme alanlarındaki kırık plaklarında hasar oluşur. Yapılan çalışmalarda, diz bölgesine radyasyon verilen 30 günlük sıçanlarda mitoz bölünme iki ya da üç gün içinde sona erer ve birçok kırık plak hücreleri kaybolur ya da bazılarında şişme ve dejenerasyon görülmektedir. Bir hafta içinde, geri kalan hücrelerde dejenerasyon ve ölüm artmaktadır. Kemik, kırık plak, yağ ve kemik iliğinin kılcal damarlarında değişiklikler gözlenir. Rejenerasyon radyasyon uygulanmasından iki ile altı hafta içinde gerçekleşir. Kemik onarımı radyasyon uygulanmasından birkaç ay sonrasına kadar tamamlanmasına karşın, genellikle kırık plak hücrelerinin dejenerasyonu ve osteoblastların tahrip olmasından dolayı kemiklerde bir kısılma ve kırıklar görülür. Işınlanmış kemiklerdeki kırıklar, kemik matriksindeki mineralizasyonun hatası veya kemik yapısındaki hasar nedeniyle oluşmaktadır (58). Radyasyonun kemik üzerindeki etkisi (1) yüksek dozda plutonium, radium ve strontium gibi elementlerin radyoaktif izotopları ile kemiğin etkileşimi veya (2) radyoterapi esnasında kemiğin yüksek dozda radyasyon almasıyla ilişkilidir.

Uluslararası Radyolojik Koruma Komisyonu (59) raporuna göre olgun kemik ve kırıkdağların nispeten nonradioresponsive olduğu; ancak proliferatif (artan) durumda, özellikle büyüme çağındaki çocuklarda veya kırık iyileşme sürecinde radyasyonun kemik üzerindeki etkisi ve etileşimi büyük ölçüde artmaktadır (59). Örneğin çocuklarda, büyümedeki gerileme radyasyon uygulama koşullarına ve yaşa bağılı olarak bazen 1 Gy daha düşük dozlarda da görülebilir. Çocukluk çağında ışın tedavi sonrası diğerk iskelet değışiklikleri 20 Gy aşan dozlarda, gözlenmiştir. Erişkinlerde, olgun kırıkdağ 40 Gy dört haftadan daha fazla dayanmaktadır.

Radyasyonun etkileri kronolojik olarak 3 safhaya ayrılır:

1. Akut etkiler: RT sırasında ya da 6-8 hafta içinde görülür. Kemik iliğı, gastrointestinal, orofaringeal ve özofageal mukoza ve cildin bazal tabakası gibi hücreleri hızlı proliferen olan dokularda görülür. Tolerans dozları (TD) aşılmadığı sürece geri dönüşümlü etkilerdir.

2. Subakut etkiler: RT'den 2-3 ay sonra görülür. Omurilik ışınlanması sonrası demiyelinizasyon sonucu görülen Lhermitt sendromu, beyin ışınlanması sonrası görülen somnolans gibi geçici etkilerdir.

3. Geç etkiler: Bir kaç ay ile birkaç yıl içinde görülen, yavaş gelişen, ağır seyreden ve iyileşmeyen kalıcı yan etkilerdir. Kemik, yumuşak doku, sinir sistemi gibi hücreleri yavaş proliferen olan dokularda görülür. Fibrozis, ülserasyon ve nekroz tipik bulgularıdır.

Akut ya da geç yan etkilerin ortaya çıkış süresini ve şiddetini, hücrelerin kinetik özellikleri (proliferasyon hızları), ışınlanan sağlam doku hacmi, verilen toplam doz ve fraksiyon şeması belirler.

2.5. İyonizan Radyasyon ve Serbest Radikallerin Oluşumu

Atomdaki proton sayısı elektron sayısına eşit olduğunda atom elektriksel olarak yüksüzdür. Elektron ve proton sayıları eşit değilse bu parçacık iyon olarak adlandırılır. İyonlar oldukça kararsız yapılardır ve yüksek enerjilerinden kurtulmak için ortamdaki

başka iyon ve/veya atomlarla etkileşime girerler. Serbest radikal, eşlenmemiş elektron içeren atom veya moleküldür.

Genelde elektronlar atom veya molekülde eşlenik olarak bulunmaları nedeniyle molekül stabildir ve reaktif değildir (60). Ancak moleküle bir elektron ilavesi ya da bir elektron kaybı onu reaktif hale getirir. Serbest radikaller kimyasal bağların kırılmasına ve kimyasal değişimlere yol açarak biyolojik hasara neden olan son derece reaktif moleküllerdir (22, 61). Organizmada çok çeşitli serbest radikaller oluşmakta ve yaygın hasara yol açmaktadır. Eşleşmemiş elektron bu molekülleri oldukça reaktif hale getirir ve protein, lipid ve nükleik asitler gibi önemli molekülleri tahrip edecek reaksiyonları başlatabilirler.

Diğer yönden hücresel düzeyde tümör için sitogenotoksiste oluşturan tedavi edici radyasyona bağlı oluşan oksidatif stres, korunması gereken normal doku hücreleri için de geçerlidir. Bu sonuç, tedavide tümöre koruma sağlamadan, normal dokuları koruyabilecek radyoprotektif arayışlarını arttırmıştır. Dokular serbest radikal ataklarından korunmak ve oluşabilecek hasarı azaltmak için oldukça kompleks bir defans mekanizması ile donatılmıştır. Radyasyon sonrası hücre içi birçok düzenleyici değişiklik serbest oksijen radikalleri, DNA ve DNA çift kırığı (DSB) arasındaki klasik sinyal uyumlulaştırıcı etkileşimi aracılığıyla gerçekleşir (33).

2.6. Oksidatif Stres ve Serbest Radikaller

Serbest oksijen radikalleri (SOR) ve serbest nitrojen radikalleri (SNR) biyolojik sistemde, sisteme yarar ve zarar anlamında ikili role sahiptirler. Yüksek konsantrasyonda bulunduğu SOR, protein, lipid ve DNA'yı içeren hücresel yapıların oksidasyonunun (kısacası oksidatif stresin) mediatörüdür. SOR'nin zararlı etkileri enzimatik ve non-enzimatik antioksidanlar ile dengelenir. Oksidatif reaksiyonu düzenleyen oldukça etkili, koruyucu ajanlar ve savunma mekanizmaları "antioksidan savunma sistemi" olarak adlandırılırlar.

Oksidatif hasarı onarmak için enzimler ve hasarlı moleküllerin değiştirilmesi ya da ortadan kaldırılması için çeşitli mekanizmalar vardır. Antioksidanlar eksojen veya endojen kaynaklı olup süpürücü (*scavenger*) ya da koruyucu (*preventive*) olarak sınıflanabilir. Süpürücü gruptakiler C vitamini, glutatyon (GSH) gibi suda çözünen veya

E vitamini, lipoik asit gibi lipitte çözülebilen küçük moleküllü antioksidanlardır. Enzim antioksidanlar büyük moleküllü olup; süperoksit iyonunu detoksifiye eden süperoksit dismutaz (SOD), hidrojen peroksit (H_2O_2) ile ilgili katalaz ve hücre peroksitlerini detoksifiye eden glutatyon peroksidaz'ı (GPx) içerirler. Koruyucu antioksidanlar yeni SOR oluşumunu engelleyen esansiyal proteinlerdir. Bu grup, albümin, metalloprotein, transferrin, seruloplazmin, miyogloblin ve ferritini içerir (31, 33).

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 tüm fraksiyonlarında oluşabilmekte ve tüm hücre bileşenleriyle etkileşebilme özelliği göstermektedir (48, 62). Organizmada serbest radikallere özellikle süperoksit, hidrojenperoksit ve hidroksil radikallerine karşı enzimatik savunma sistemi gelişmiştir Antioksidan olarak bilinen maddeler serbest radikal temizleme özelliğine sahiptir (63).

Serbest radikaller bütün hücresel makromoleküllerle reaksiyona girebilirler. Serbest radikallerin hücre membranındaki Ca^{++} , Mg^{++} ATPaz üzerine ve hücre içi kalsiyum depolarına etkisi sonucu hücre içi kalsiyum düzeylerini artırdığı gösterilmiştir. Kalsiyum düzeylerindeki artış ise fosfolipaz aktivitesini stimüle ederek serbest araşidonik asit düzeylerini yükseltmektedir. Bunu takiben siklooksijenaz, lipoksijenaz yolları ve araşidonat metabolizması üzerinden, prostaglandin ve lökotrienlerin yanısıra, O_2^* ve toksik lipid peroksidleri oluşmaktadır. Oluşan bu peroksitler, siklooksijenaz aktivitesi aracılığı ile vazokonstriktör tromboksan oluşumunu artırmaktadır. Lipoksijenaz yoluyla üzerinden oluşan lökotrienler ve PAF'da yine vazokonstriksiyona, kemotaksise ve lökosit adherensine neden olmaktadır. Bütün bu başlangıç olayların endotel hasarına ve graft fonksiyonlarında azalmaya neden olduğu gösterilmiştir

Hücresel hasar oluşumunda özellikle üç tip reaksiyon önemlidir;

1. Lipid Peroksidasyonu: Serbest oksijen radikalleri, plazma ve organel membranlarında lipid peroksidasyonuna neden olurlar. Hidroksil radikali membran lipidleri ile çift bağ yapar ve böylece lipid-radikal etkileşimi ile zincirleme reaksiyon

sonucu pek çok lipid peroksidasyon ürünü (malondialdehit (MDA), dien konjugatları gibi) oluşur. Eritrosit membranlarının, lipozomal membranların (özellikle hücre ve mitokondri) okside olması ile bu yapıların fiziksel ve kimyasal özellikleri değişir. Membranın iyon geçirgenliği bozulur. Eritrositlerde hemoliz olur. Böylece yaygın membran, organel ve hücre hasarı ortaya çıkar.

MDA: Lipid peroksidasyonu, lipid moleküllerindeki iki ansatüre bağ arasında yerleşmiş metilen grubundan bir hidrojen atomunun çıkması ile başlatılan kompleks bir fenomendir. Sonuçta yeni bir karbon merkezli lipid serbest radikali oluşur. Oksijen varlığında bu yeni lipid serbest radikalinden lipid peroksitler veya hidroperoksitler oluşmaktadır. Bu son ürünler nispeten daha stabil bir son ürün olan ve lipid peroksidasyonunun markeri olarak kullanılabilen MDA'ya dönüşür.

2. Proteinlerin oksidatif modifikasyonu: Serbest oksijen radikalleri, aminoasit yan zincirleri oksidasyonuna neden olarak protein-protein bağlarının oluşmasına yol açarlar. Ayrıca protein yapısında, ana zinciri okside ederek proteinlerin parçalanmasına neden olurlar. Böylece hücrede fonksiyonel önemi olan enzimlerde bozulmalar ortaya çıkar.

3. DNA hasarı: Serbest oksijen radikalleri, nükleer ve mitokondrial DNA'da timin ile reaksiyona girerek tek zincir kırılmaları oluşturur. Sonuçta hücrelerin enerji kaybetmeleriyle nekrotik tipte hücre ölümü olur. Reoksidasyon sırasında allopurinol (ksantin oksidaz inhibitörü), SOD veya CAT uygulamasının endotel hücre hasarını önlediği gösterilmiştir (45,49). Organizmada oluşan serbest radikaller yukarıda adı geçen SOD, CAT, ve GPx gibi enzimlerin yanı sıra non-enzimatik bir şekilde de süpürülürler (28).

2.7. Radyasyon Hasarı ve Oksidatif Stres

Organizmada, eksojen olarak serbest radikallerin oluşmasına neden olan önemli kaynaklardan birisi de iyonize radyasyondur. İyonize radyasyona maruziyet sonucunda canlılarda oluşan iyonizasyonun sözkonusu biyolojik reaksiyonları etkileyerek bir takım fiziko-kimyasal değişikliklere neden olması çok kısa bir süre içinde (<1 sn) gerçekleşir. İyonize radyasyonun bütün şekilleri hücrelerdeki etkilerini çarpıştıkları atom ve moleküllerde elektronların yerini değiştirerek gösterir ve böylece iyonizasyon meydana gelir. Işınlardan doku içinden geçerken bir zincir şeklinde önce kimyasal reaksiyonların ve bunu izleyen süreçte fiziksel reaksiyonların başlamasına neden olurlar. İyonize

radasyonlar ister elektromanyetik, isterse parçacıklar olsun içinden geçtiği maddede enerjilerini aktarırlar. Bu enerji, hücre ve doku içerisinde absorbe edildiğinde eksitasyon ve iyonizasyona neden olurlar (31, 33). Eğer bir maddeye giren radyasyon enerjisi, o maddeyi oluşturan atomlardan elektron koparacak kadar yüksek değilse, o zaman elektronların daha yüksek enerji düzeyindeki yörüngelere geçmelerine yol açar. Bu olaya da uyarılma (eksitasyon) adı verilir (64). Elektronlar ve protonlar gibi yüklü parçacıklar doğrudan iyonizasyona yol açarlar. Bunlar yeterli kinetik enerjileri sayesinde kimyasal bağları koparabilirler. Elektromagnetik ışınlar (X ve gamma) ve nötronlar ise dolaylı olarak iyonizasyon yaparlar. Yani kendileri kimyasal bağları kırmamakla birlikte bu içi yapan yüksek kinetik enerjili, yüklü parçacıklar oluşturarak iyonizasyon yaparlar. Nötronlar ise emildikleri maddedeki atomların nkleuslarıyla etkileşerek kinetik enerjilerini protonlara aktararak iyonizasyona neden olurlar.

İyonize radyasyonlar içinden geçtikleri dokularda birçok iyon çifti oluşturur. Bu iyon çiftleri de moleküler seviyede DNA ve diğer önemli yapıtaşları ile kimyasal reaksiyonlara girerek canlı dokular için hasar verici özellik gösterir.

Hedeflenen atoma enerji transferi veya herhangi bir kaynaktan gelen ışınsal enerji saniyenin çok küçük bir kısmında oluşmasına rağmen, biyolojik etkiler dakikalar içinde değil, yıllar sonra bile ortaya çıkabilir. İyonize radyasyonun oluşturduğu hasar genellikle suyun radyolizisiyle oluşan serbest radikallerin indüksiyonuyla olabildiği gibi, DNA'yı doğrudan da zedeleyebilir. Serbest radikaller hücre membranları ve nükleik asitlerle birleşerek mutasyon ya da hücre ölümünü indükleyen otokatalitik reaksiyonu başlatırlar. Işınsal enerji DNA, nükleus ve sitoplazmada değişim yaratır, kromatinlerde hasar oluşturur, mitozu etkiler ve hücreler arası iletişim bozukluğuna neden olur. Ayrıca İyonize radyasyon kemik hasarına yol açtığı iyi bilinmektedir (18, 65).

Birkaç gün süreyle, ışınsal enerjiye maruz kalındığında, hızlı bölünen hücrelerin bulunduğu dokularda daha fazla, az sayıda bölünen hücrenin bulunduğu dokularda daha az zedelenme olur. Dokulardaki zedelenmenin düzeyini alınan doz miktarı, hücrelerin kendini yenileme kapasitesi ve oksijen etkisi belirler (28).

Radyasyon sonrası oluşabilecek  tür hasar vardır:

Letal hasar oluşumunda onarılamayacak kadar büyük olup, hücreyi hemen ölüme götürür. Subletal hasar ise tek başına ölümcül değildir, bir sonraki bölünmede ya da olumsuz ortam koşullarının devamı halinde gelişebilir ve uygun koşullarda onarılması mümkündür. Potansiyel letal hasar oluşumunda eğer hücre bölünmesi kısa bir sürede meydana gelirse hasar ölümcüldür ancak bölünme gecikirse sonuç tamir edilebilen hasardır.

İyonize radyasyon kanser tedavisinde kullanılmaktadır. Radyoterapide asıl amaç, hücrenin üreme ve klonlaşma yeteneğini durdurmaktır. Radyasyonun etkisi ile hücre çekirdeği ve DNA 'nın tahrip edilmesi hücre üreme yeteneğini ortadan kaldırır. İyonize radyasyonun DNA üzerine doğrudan etkisi ile baz değişiklerine neden olan lezyonlar oluşur. Aynı zamanda şeker fosfat iskeletinde bağ kırıkları oluşarak birçok hasar meydana gelir. Diğer yandan iyonize radyasyon tarafından hücre içi sıvıda oluşturulan serbest radikaller de DNA ile reaksiyona girerek dolaylı yoldan hasarlara neden olur (28, 66).

Daha yüksek dozdaki radyasyona bağlı olarak gelişen lipid peroksidasyonu, tüm biyolojik membranlarda değişikliklere neden olur. Bu süreç organeller ve tüm hücre için belirgin bir yıkıcı etki oluşturur (67).

Biyolojik hasarlar açısından, ister doğrudan ister dolaylı yoldan olsun DNA hasarı en önemli olanıdır. Klinikte kullanılan radyasyonla oluşan hasarların büyük ölçüde dolaylı yoldan olduğu kabul edilmektedir (28). Subletal hasarların birikmesi hücrenin reproduktif ölümü ile letal DNA hasarının giderilememesi 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.

2.8. Antioksidanlar

SOR ve SNR biyolojik sistemde, sisteme yarar ve zarar anlamında ikili role sahiptirler. Yüksek konsantrasyonda bulunduğunda SOR, protein, lipit ve DNA'yı içeren hücre yapılarının oksidasyonunun mediatörüdür. SOR'nin zararlı etkileri enzimatik ve non-enzimatik antioksidanlar ile dengelenir (31, 33).

Antioksidan etki mekanizmalarını; SOR oluşumunun baskılanma yoluyla engellenmesi, enzimsel reaksiyonlar aracılığıyla veya doğrudan serbest radikallerin temizlemesi, metal iyonlarının bağlanarak radikal oluşumunun önlenmesi, hedef moleküllerin hasar sonrası tamiri ve temizlenmesi gibi çeşitli şekilleri bulunmaktadır (31).

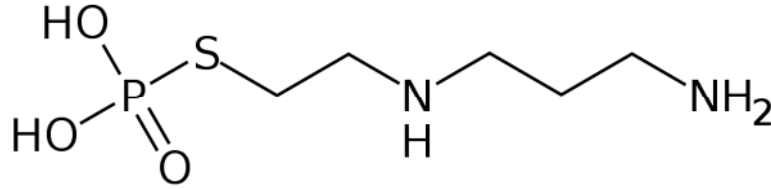
Antioksidanlar normal koşullarda hücresel düzeyde bir denge oluştururlar. Bu denge organizmanın yaşamı ve sağlığı için gereklidir. (31). Antioksidanlar; enzimatik Süperoksit dismutaz (SOD), Katalaz (CAT) Glutatyon peroksidaz (GSH-Px), Glutatyon-S-Transferazlar (GST), Glutatyon Redüktaz (GR), enzimatik olmayan antioksidanlar ise, Glutatyon (GSH), Vitaminler (A, C, E) ve Melatonininden oluşmaktadır.

Süpürücü gruptakiler C vitamini, glutatyon (GSH) gibi suda çözünen veya E vitamini, lipoik asit gibi lipitte çözülebilen küçük moleküllü antioksidanlardır. Enzim antioksidanlar büyük moleküllü olup; süperoksit iyonunu detoksifiye eden süperoksit dismutaz (SOD), hidrojen peroksit (H_2O_2) ile ilgili katalaz ve hücre peroksitlerini detoksifiye eden glutatyon peroksidaz'ı (GPx) içerirler. Koruyucu antioksidanlar yeni SOR oluşumunu engelleyen esansiyel proteinlerdir. Bu grup, albümin, metalloprotein, transferrin, seruloplazmin, miyogloblin ve ferritini içerir (31, 33).

Günümüzde Kanser tedavisinde sağlıklı hücreleri kemoterapi ve radyoterapiye bağlı yan etkilerden korumak önemlidir. Koruyucu tekniklere seçenek oluşturacak bir yaklaşım biçimi de antioksidanların sitoprotektif ajanlar olarak tedavide kullanılmasıdır. İdeal bir sitoprotektif ajan; tedavinin antitümöral etkinliğini azaltmaksızın seçici bir biçimde normal hücreyi korumalı, yan etkileri tolere edilebilir sınırlarda olmalı, kolay uygulanabilmeli, geniş bir etki spektrumu olmalı ve aynı zamanda birden fazla dokuyu korumalıdır. Sitoprotektif ajan hastanın sitotoksik tedaviye direncini artırmanın yanı sıra hastanın yaşam kalitesini artırır, doz yoğunluğunun artırılmasına olanak vererek tedaviye yanıtı artırır ve tedaviye bağlı gelişen komplikasyonlarının tedavisi için gereken maliyeti düşürür. Günümüzde klinikte kullanıma girmiş en önemli serbest radikal temizleyici ajan amifostindir.

2.9. Amifostin

Amifostin (etanetiyol, 2-[(3-aminopropil)]- dihidrojen fosfat(ester), bir organik tiyofosfattır. Bir ön ilaç olan amifostin normal dokularda alkalen fosfataz ile defosforile olarak aktif metaboliti olan tiyole dönüşür (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Amifostinin kimyasal yapısı (<http://en.wikipedia.org/wiki/Amifostine>)

Radyasyon ve sisplatinin etkilerine karşı normal dokuları koruma yeteneğine sahiptir. Amifostinin bu etkisi normal dokularda kapiller fosfataz aktivitesinin yüksek olmasına, pH değerinin yüksekliğine ve tümör dokularından daha iyi damarlanmasına bağlanmaktadır. Bu sebeple serbest tiyol metaboliti normal dokularda tümör dokularına göre daha hızlı oluşur ve normal hücreler tarafından hızla alınır. Amifostin hücre koruyucu olarak kullanılan ajanlar içerisinde organa özgül olmayan organik bir tiyol birleşimidir. Son zamanlarda amifostinin radyoprotektif ajan olarak üzerinde sıkça hayvan çalışmaları ve klinik çalışmalar yapılmaktadır. Tüm bu çalışmalar amifostinin, radyoterapinin etkinliğini azaltmaksızın, normal dokuları radyasyonun zararlı etkilerine karşı koruduğunu göstermiştir (20, 21, 68, 69).

Amifostin ilk defa 1950 yıllarının sonlarında Amerika Ordusuna bağlı Walter Reed Ordu Araştırma Enstitüsü tarafından geliştirilmiş ve bu enstitü tarafından tanımlanan ve tiyol içeren bileşikler Walter Reed'in kısaltmasıyla "WR" ön eki ile adlandırılmıştır (21). Bu bileşiklerin iyonize radyasyon ve kemoterapik ajanlar tarafından oluşturulan serbest radikalleri yok etme potansiyeli vardır (68).

Amifostin, ilk kez sisplatin uygulanan ileri evre over kanserli ve küçük hücreli dışı akciğer kanserli hastalarda sisplatinin oluşturduğu kümülatif renal toksisiteyi azalttığı için, 1996 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde gıda ve ilaç dairesi (FDA) tarafından onaylanmıştır (21). Klinik öncesi ve klinik çalışmalar; kanser tedavisine bağlı olarak ortaya çıkan nötrojeni, nefrotoksite, ototoksite, nörotoksite, mukosit ve

kserostomi'yi önlemede amifostinin etkisini desteklemektedir. Günümüzde amifostin onkolojik tedavilerde güvenli ve etkin bir şekilde kullanılmaktadır (69).

2.9.1. Amifostinin farmokinetiği

WR-2721 olarak da bilinen amifostin, organik tiofosfat olan sisteamin analogu bir ön ilaçtır. Açık kimyasal formülü; $H^2N-(CH_2)_3-NH-(CH_2)_2-S-PO_3H_2$ şeklindedir.

Yapısındaki fosfor amifostini inaktif formda tutarken, sülfür ise bileşiğe serbest radikal temizleme özelliği kazandırır. Amifostin, böbreğin proksimal tübül epitelyumu, plazma membranları ve diğer dokuların arterioller endotel plazma membranlarında bulunan alkalen fosfataz sayesinde hızla normal dokulara giren ve aktif şekli olan WR-1065'e defosforile olur ve bu şekliyle normal doku içine girer. WR-1065 normal hücre içine girdikten sonra yine serbest radikal temizleme özelliği olan metabolitlerine dönüşür. En fazla oluşan metaboliti WR-33278'dir. WR-1065 hasarlı dokuyu kurtarmaktan çok normal dokuya koruma sağladığından radyasyondan veya sitotoksik ilaçtan günler, haftalar önce değil 30-60 dk. önce uygulanmalıdır. Yapılan çalışmalarda 3 hafta boyunca amifostin uygulandığında WR-1065'in hem tümör dokusunda hem de normal dokularda birikmediği gözlenmiştir (19).

2.9.2. Amifostinin etki mekanizması

Amifostin; radyoprotektif etkisini radyoterapi ile oluşan serbest radikalleri temizleyerek ve hidrojen vermesi sayesinde serbest radikallerin oluşturduğu DNA hasarına onararak gösterir. Amifostinin dokularda WR-1065 ve diğer tiyol metabolitlerine dönüşürken dokuları kemoterapiye bağlı DNA hasarından koruduğu düşünülmektedir. Amifostin kemoterapinin zararlı etkilerini normal dokuda tümör dokusunda olduğundan daha fazla azaltır. Çünkü WR-1065 tümör hücrelerine oranla normal hücrelerde çok daha fazla konsantrasyonda toplanır ve böylelikle tümör hücrelerine göre normal hücrelerde çok daha etkindir (2). Normal dokuda kanlanma tümörden daha iyidir ve pH da daha yüksektir. Bundan dolayı alkalen fosfataz aktivitesi normal hücrede kanser hücresinden daha yüksektir. WR-1065, yapısındaki sülfidril atomu sayesinde iyonize radyasyon ve kemoterapi ajanları tarafından meydana getirilen serbest radikallerin oluşturduğu DNA hasarına yol açan reaktif nükleofilleri yok eder (9, 20, 21, 68, 69).

Serbest radikal temizleme özelliği WR-1065'in iki metaboliti olan sisteamin ve simetrik disülfid WR-133278 üzerinde yoğunlaşmıştır. WR-33278'in radyoterapinin indüklediği sitotoksitesinin yanı sıra mutajenik etkisine karşı da koruyucu olduğu kanıtlanmıştır. Amifostin tarafından korunduğu bilinen normal dokular: böbrek, akciğer, yemek borusu, periferik sinirler, kemik iliği, ince bağırsak, kalın bağırsak, immün sistem, tükürük bezleri, ağız mukozası, kalp ve testisdir (20, 21, 68, 69).

2.9.3. Amifostinin yan etkileri

Yaklaşık %3 hastada tedaviyi kesmeyi gerektirecek kadar şiddetli sistolik hipotansiyon görülür. Hipotansiyonun mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte WR-1065'in doğrudan vazodilatasyon oluşturma özelliğine bağlı olabileceği düşünülmektedir. Amifostin uygulanmasını takiben, değişik derecelerde bulantı ve kusma ilk 30 dakika içinde oluşabilir. Bu durum amifostin uygulamadan önce ve uygulama esnasında antiemetik kullanımını gerektirebilir. Tübüler emilimde azalma ve paratiroid hormon sekresyonunun inhibe olmasından dolayı oluştuğu düşünülmektedir. Bu amifostin tedavisinin nadir görülen bir komplikasyonudur. Amifostine bağlı görülen diğer yan etkiler yüzde kızarıklık, sıcaklık hissi, üşüme, titreme, baş dönmesi, uyku hali, hapsirme ve hıçkırıktır. Çok nadir vakalarda kısa süreli ve çabucak düzelen şuur kaybı bildirilmiştir. Amifostin tiyol bileşiklerine ya da mannitole karşı hipersensitivite olduğu bilinen kişilerde kontrendikedir (2).

2.9.4. Amifostin ve radyoprotektif özelliği

Radyoprotektifler, canlıyı radyasyona karşı olduğundan daha dirençli hale getiren ve onu koruyan maddelerdir. Bazı maddeler hücrelerin radyasyon duyarlılıklarını etkilemedikleri halde canlıyı bütün olarak korurlar. Çünkü bunlar vazokonstriksiyona yol açarak ya da normal metabolik süreçleri etkileyerek kritik organların oksijen konsantrasyonlarını düşürürler. Hücreler hipoksik koşullarda X ışınlarına karşı direnç kazanacakları için, bu olay bir koruma sağlayabilir. Sodyum siyanür, karbon monoksit, epinefrin, histamin ve serotonin bu tür maddelere örnektir. Ancak bu maddeleri gerçek koruyucular olarak kabul etmek mümkün değildir. Radyoprotektiflerin en iyi bilinen grubu sülfhidril (-SH) bileşikleridir ve bu maddelerin koruyucu etkisini SH yapısı sağlar. Radyoprotektifler içinde kimyasal olarak en basit yapılı olanı sistein (SH-CH₂-

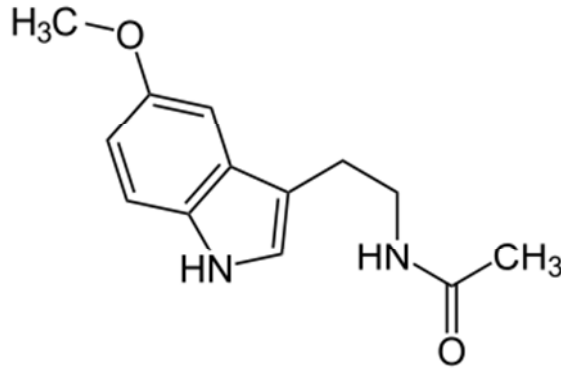
CH(NH₂)-COOH) aminoasitidir. Sistein ile çok yakın benzerlik gösterip sisteinin dekarboksilasyonu ile oluşan sisteamin (SH-CH₂-CH₂-NH₂) ve sisteaminin bir disülfüt türevi olan sistamin de Radyoprotektif özelliktedir. Bu maddelerin koruyucu etkilerinin yanında toksik etkilerinin de olması, yeni Radyoprotektiflerin geliştirilmesi çabalarını hızlandırmıştır. Bu çerçevede yapılan çalışmalarda, SH grubunun bir fosfat grubu ile kaplanması durumunda, toksisitesinin büyük ölçüde azaldığı saptanmıştır. İlaç hücreye girdikten sonra fosfat grubu ayrılmakta ve SH grubu serbest radikalleri yakalamaktadır. Yeni Radyoprotektiflerin geliştirilmesi amacıyla yapılan araştırmalarda özellikle amifostinin en yüksek koruyucu etkiye sahip olduğu saptanmıştır. Amifostin, antitümöral etkinliği düşürmeksizin normal dokularda oluşan toksisitenin azaltılmasını, dolayısıyla tümöre verilen dozun arttırılabilmesini ve daha iyi tümör kontrol oranlarının elde edilmesini sağlayabilecek radyoprotektif bir ajandır (20, 21, 68, 69).

Amifostin optimal radyoprotektif etkisini radyoterapidenden 15 dakika önce uygulandığında göstermektedir (1,2,49). Hücre hasarından sorumlu kimyasal reaksiyonlar, radyasyona maruziyetten hemen sonra milisaniyeler içerisinde gerçekleşmektedir. Amifostinin aktif formu olan WR-1065'in herhangi bir koruyucu etki gösterebilmesi için radyasyon uygulaması esnasında hücre içinde bulunması zorunludur (20, 21, 68, 69, 70).

2.10. Melatonin

Kimyasal adı N-[2-(5-methoxy-1H-indol-3-yl)ethyl] olan Melatoninin açık formülü Şekil 2.6'verilmiştir. Bu madde hayvan, bitki (6) ve mikroorganizmalarda bulunmaktadır. Biyoavabilirliği %30-50 olup, yarılanma ömrü 35-50 dakikadır. İdrar ile birlikte dışarı atılır (34).

İlk defa Aaron Lerner tarafından 1958'de pineal bezden salgılanan melatoninin yapısının ortaya konulmasıyla, bu bezin fonksiyonlarının anlaşılmasında önemli bir adım atılmıştır. Pineal bezin, son 50 yıldaki çalışmalar sonucunda yapı ve fonksiyonları daha iyi anlaşılmaya başlanmıştır (71).



Şekil 2.6. Melatoninin kimyasal yapısı (<http://en.wikipedia.org/wiki/Melatonin>).

Melatoninin birçok biyolojik etkileri yanında güçlü bir antioksidan olduğu belirtilmektedir. Özellikle çekirdek ve mitokondri DNA sının korunmasında rol oynar (7). Amerika Birleşik Devletlerinde 1990 lardan itibaren birçok diet ürününde melatonin kullanılmaktadır.

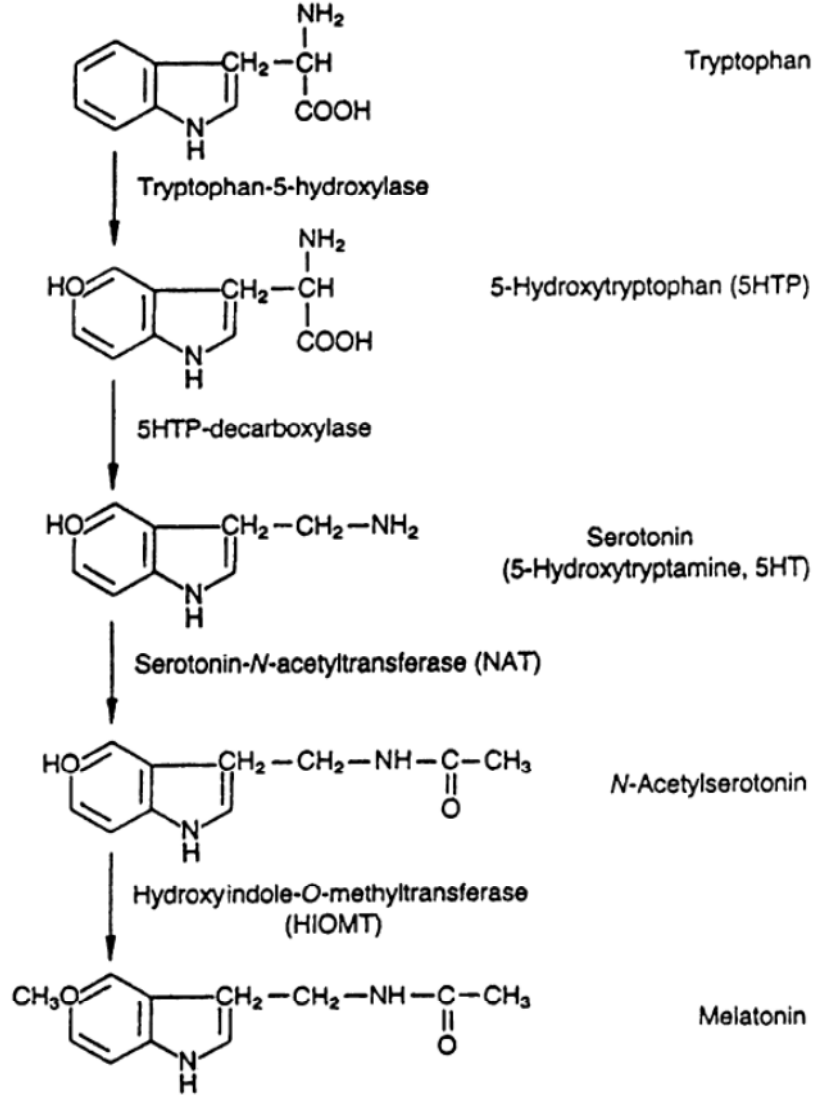
2.10.1. Melatonin biyosentezi ve metabolizması

Pineal bezden salgılanan başlıca hormon olan melatonin bir indol türevidir. İndolamin sentezi pinealositlerde meydana gelmektedir. Melatonin sentezi için öncelikle triptofan aminoasidinin dolaşımdan hücre içine alınması gerekmektedir. Triptofan, triptofan 5-hidroksilaz enzimi tarafından 5-hidroksitriptofana (5HTP), 5HTP ise aromatik amino asid dekarboksilaz (Dopa dekarboksilaz) aracılığıyla serotonine (5-hidroksitriptamin, 5HT) dönüştürülür. Serotonin, serotonin N-asetiltransferaz (NAT) ile N-asetilserotonine ve son olarak N-asetilserotonin hidroksiindol-0-metiltransferaz (HIOMT) enzimi tarafından melatonine dönüştürülür (Şekil 2.7) (5).

Melatonin yapımı, adrenerjik kontrol altındadır. Karanlıkta, pineal bezde melatonin sentezinin artması bez içindedeki postgangliyonik sinir uçlarından norepinefrin (NE) salgılanması ile mümkün olmaktadır. NE, pinealosit membranında başlıca pi reseptörleri üzerine etki ederek cAMP yapımını artırmak suretiyle NAT ve dolayısıyla melatonin sentezini hızlandırmaktadır.

Pinealositlerde α -1 reseptörleri mevcut olup, pineal fonksiyonun düzenlenmesinde uyarımı artırıcı bir rol üstlenir. Serotoninin melatonine dönüştürülmesinde rol oynayan NAT ve HIOMT enzim aktivitelerinin insan pineal bezinde gece daha yüksek olduğu belirlenmiştir. NATın ritmik aktivitesini düzenleyen ritmik transkripsiyon

mekanizmasının da varlığı ortaya konulmuştur. Melatonin başlıca karaciğerde ve ikinci derecede de böbreklerde metaboliize olur. İdrardaki başlıca metaboliti 6-sülfatoksimeatonin'dir. Melatonin prekürsörü olan N-asetilserotonin de aynı zamanda bir melatonin metabolitidir (5).



Şekil 2.7 Melatonin sentezi (5).

2.10.2. Melatoninin fizyolojik fonksiyonları

Melatonin fotoperiyod ile ilgili bilgiyi vücudun fizyolojisine aktararak sirkadyen ritmin ve organizmanın fonksiyonlarının düzenlenmesinde rol oynar. Melatonin sekresyonunun aydınlık/karanlık siklusu ile ilişkisi bu hormonu endojen bir senkronizör olarak düşündürmektedir (34). İnsanda pekçok biyokimyasal, fizyolojik ve davranışsal

değişkenlerde olduğu gibi plazmadaki melatonin düzeyleri de 24 saatlik periyod içinde düzenli iniş çıkışlar gösterir.

Melatonin vücutta birçok fizyolojik görev yapmaktadırlar. Sirkadiyen periyosite ve organizasyonun sağlanması, Amfibalarda, sürüngenlerde ve memelilerde üreme siklusunun, fotoperiyodik regülasyonu, uyku-uyanıklık siklusunun sağlanması, uyku siklusunun kayması, kış uykusu ve senkronizasyon, mevsimsel affektif bozukluklar, hipotalamik-pituiter aksın modülasyonu, pituiter-adrenal aksın modülasyon, pituiter-tiroid aksın modülasyonu, puberte-antigonadal aktivite, fertilité, hamilelik, menapoz, yaşlanma-antiaging hormon, juvenil hormon, hipereksitabilite durumu ve epilepsiler, platelet agregasyonu, strese cevap ve genel adaptasyon-antistres hormonu, analjezik etki, otonom fonksiyonların düzenlenmesi, susama ve elektrolit dengesi, vücut ağırlığının regülasyonu, normal kan basıncının sağlanması-antihipertansif, termoregülasyon-hipertermik, immün mekanizmaların modülasyonu, antimitotik aktivite ve maligniteye etkisi, hücre çoğalması, antioksidan etkisi (34, 72).

Melatoninin sentezlenmesi ve salgılanması karanlık ile başlar, aydınlık ile sona erer. Salgılanması genellikle 21.00-22.00 saatleri arasında başlar, maksimum konsantrasyonu 02.00-04.00 arasında gözlenir ve saat 07.00-09.00 arasında ise giderek azalır. Yetişkinlerde plazmadaki ortalama maksimum düzeyleri 50-70 pg/ml'dir. İnsanda 1000-2500 lüks'lük ışık melatoninin salgılanmasında azalmaya yol açmaktadır (12, 34).

2.10.3. Biyoyararlanım ve yan Etki

Oral uygulanan melatoninin biyoyararlanımı değişkenlik gösterir. 1-5 mg oral dozlar alındıktan 1 saat sonra serum melatoninini gece ulaşılan plasma düzeyinin 10-100 katına çıkarır ve 4-8 saat içinde düşer (10). Düşük dozlar (0.1-0.3 mg) gündüz alındığında gece ulaşılan melatonin pik konsantrasyonunu verebilir. Amerikada çeşitli “ilaç marketleri”nde melatoninin 0.2 mg, 0.3 mg, 0.5 mg, 1 mg, 2.5 mg, 3 mg, 5 mg’ lık preperatları mevcuttur. Ayrıca likid formda (1 mg/mL, 1 mg/4 ml) preperatları da mevcut olup melatonin preperatları için herhangi ciddi bir yan etki bildirilmemiştir. Endokrin sistemdeki belirgin etkilerine rağmen yüksek farmakolojik dozlar serum LH artırabilir ve prolaktinde düşme yapabilir (34).

2.10.4. Melatonin antioksidan etkileri

Bazı çalışmalarda ise melatoninin antioksidan ve serbest radikal süpürücü etkisinin reseptör aracılı olmadığı ve bu etkilerin fizyolojik konsantrasyonların üzerinde olduğu bildirilmektedir (73). Melatonin hidroksil ve peroksil radikallerinin güçlü bir süpürücüsüdür. $\cdot\text{OH}$ radikalini nötralize edici etkisi glutatyondan 5 kat ve $\text{ROO}\cdot$ inaktivasyonunda ise E vitamininden 2 kat fazla etkilidir. Ancak melatoninin peroksil radikali üzerine olan etkisi tartışmalıdır. Bazı araştırmacılar melatoninin, peroksil radikale karşı süpürücü etkisinin E vitamininden daha düşük olduğunu dolayısı ile lipoperoksil radikale karşı daha az nötralize edici etkisinin bulunduğunu belirtmişlerdir (74). Melatonin ayrıca inflamasyon reaksiyonları sırasında makrofajların aktivasyonu ile oluşan ve toksik bir oksijen türevi olan $(\text{HOCl})\cdot$ 'e karşı da süpürücü etki göstermektedir. Ancak melatoninin H_2O_2 ve $\text{O}_2^{\cdot-}$ radikalleri üzerine doğrudan süpürücü etkisi zayıftır. Melatoninin H_2O_2 ile reaksiyonu sonucu N^1 -asetil- N^2 -formil-5-metoksi knüramin (AFMK) olduğu, AFMK'nın ise katalazla N^1 -asetil-5-metoksi knüramine dönüştürüldüğü ve antioksidan etkiye sahip bu metabolitlerin melatoninin süpürücü etkisini artırdığı bildirilmiştir (71).

Melatoninin serbest radikaller üzerinde dolaylı etkileri de vardır. Melatonin, hidroperoksitleri metabolize eden GSH-Px enzimini aktive ederek, $\text{O}_2^{\cdot-}$ radikalini H_2O_2 'ye kataliz eden SOD aktivitesini artırarak, oksidatif stres esnasında katalaz aktivitesindeki azalmayı önleyerek ve NO oluşumundan sorumlu nitrik oksit sentaz (NOS) enzimini inhibe ederek, antioksidan etki göstermektedir (34).

Melatoninin serbest radikaller üzerindeki süpürücü etkisi onun aynı zamanda güçlü bir antiinflamatuvar ajan olduğunu da açıklamaktadır. İnflamasyonun uyarılmasıyla doku hasarına giden yolak üzerinde çeşitli kademelerde melatonin ile blokaj bu ajana antiinflamatuvar ve doku koruyucu etki sağlamaktadır. Çeşitli inflamasyon modellerinde (yanık hasarı, sepsis, iskemi/reperfüzyon gibi) nötrofil aktivasyonunun dokularda neden olduğu oksidan hasarları melatonin anlamlı olarak geri çevirmiştir (34, 75).

2.10.5. Melatoninin kemik koruyucu etkisi

Melatoninin kemik üzerine etkisi doğrudandır (34). Melatonin sekresyonunun baskılanması serum kalsiyum konsantrasyonunu düşürürken, melatonin uygulaması ise

artırır. Fraksiyonel radyoterapi uygulanan ratlarda melatoninin kemik büyümesi üzerine koruyucu etki yaptığı rapor edilmiştir (76). Ovariectomili sıçanlara melatonin uygulaması kemik kaybını azaltmıştır (77). Melatonin kemik iliğinde bol miktarda bulunması melatonin kemik hücrelerindeki etkilerinin muhtemelen otokoid etkiler aracılığı ile olduğunu düşündürmektedir. Melatonin ayrıca doz bağımlı olarak kemik matrix proteinlerini artırır. Osteoblastik bir protein olan osteoprotegerin melatonin ile artmıştır (78). Günümüzde yaygın olarak postmenapozal dönemde osteoporoza karşı kullanılan bifosfonatlara ilave olarak melatonin uygulamasının gerek doğrudan kemik üzerine olumlu etkileri ve gerekse bu ilaçlara bağlı yan etkileri azalatarak kemik koruyucu etkiyi güçlendirebileceği düşünülmektedir. Nitekim sıçanlarda alendronatın neden olduğu gastrik hasara karşı melatoninin koruyucu etkisi gösterilmiştir (34).

İnsanlarda da melatonin salgısının azalmasının meme kanserinin gelişmesi için eğilim yaratan bir faktör olabileceği ileri sürülmüştür. Ayrıca göğüs ve prostat kanserine de koruyucu ve tedavi amaçlı kullanılabileceğini bildiren çalışmalar vardır. Melatonin, kanserin hem başlamsını hem de gelişmesini önleyen güçlü bir ajandır (79).

Melatoninin yaşlanmayı geciktirici bir homnon olduğu ileri sürülmektedir. Melatoninin yaşla üretimi azalmaktadır. Diyet kısıtlaması yapılan ratlarda yaşam süreleri uzamış (çünkü reaktif oksijen üretimi azalmakta ve antioksidan savunma cevabı korunmaktadır), aynı zamanda bunlarda melatonin salınımında buna paralel olarak artmıştır. İçme sularına melatonin katılan farelerin yaşam süreleri %20 uzamıştır fakat, pinealektomi yapılan ratlarda yaşam sürelerinde kısalma izlenmemiştir. Melatoninin yaşlanmayı geciktirici etkisinin immün sistem üzerindeki olumlu etkilerine bağlanabilir (8).

2.12. Üç nokta eğme testi

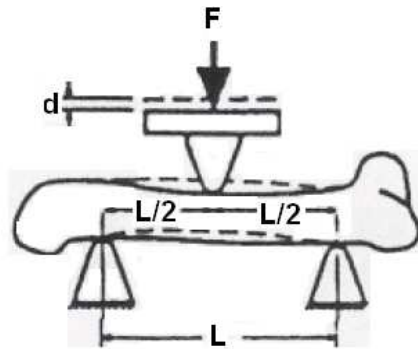
Kemiğe uygulanan kuvvet, uygulama yönüne bağlı olarak; germe, sıkıştırma, makaslama veya anılan kuvvetlerin belirli derecede kombinasyonları şeklinde olabilir. Birbirinden farklı mekanik özelliklere sahip çeşitli test metotları geliştirilerek kemiğin uygulanan kuvvete karşı verdiği cevaplar saptanabilir. Germe, sıkıştırma, burma ve eğme testleri kemik biyomekaniğinde konvansiyonel olarak kullanılan test yöntemleridir (80).

Germe testi ile hem kortikal hem de trabeküler kemik test edilebilir. Germe testinde kullanılacak kemik örnekleri, genellikle 15- 25 mm uzunluğunda ve en az 4-8 mm genişliğinde hazırlanmalıdır. Yöntemde uygulanan germe kuvveti kemiğin uzun eksenı boyunca uzamasına neden olur (17, 81, 82).

Sıkıştırma testi, göreceli olarak daha küçük kemik örneklerinin çalışmasına izin veren bir testtir ancak doğruluğu germe testine göre düşüktür. Trabeküler kemiğin mekanik özelliklerinin saptanmasında tercih edilen bir yöntemdir. Hazırlanan örnekler germe testine göre daha küçük ve hazırlama prosedürü germe testi kadar kompleks değildir. (17, 81).

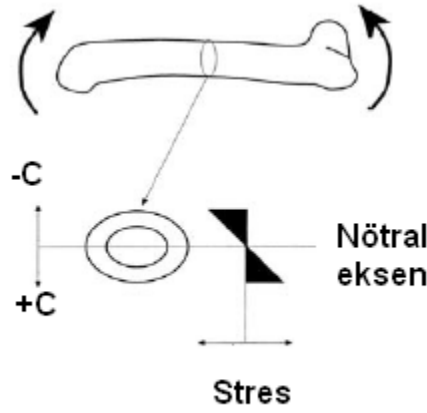
Burma testi, kemiğin bir bütün olarak kullanıldığı bir test yöntemidir. Daha çok büyük kemiklerin mekanik özelliklerinin belirlenmesinde kullanılır. Kırık iyileşmesi, kemik defektleri veya kemik doku nakillerinin (bone graft) mekanik özelliklerinin değerlendirilmesinde tercih edilir. Burma testinde kemik paralel kuvvetlerin etkisi altında kalır. (17, 81).

Eğme testi; Eğme testi, fare, sıçan ve kobay gibi deney hayvanlarına ait uzun kemiklerin mekanik özelliklerinin belirlenmesinde kullanılan önemli bir testtir. Eğme testinde kemik bir bütün olarak kullanılır. Doku iki mesnet (destek) noktası üzerine sabitlenir ve yük, doku yüzeyine dik gelecek şekilde uygulanır (Şekil 2.8). Yükün bu pozisyonu nedeniyle kemik eğilir ve belirli bir süre sonunda kırılır. Eğme nedeni ile kemiğin bir yüzünde germe, diğer yüzünde sıkıştırma zoru gözlenir. Kemik sıkıştırma zoruna germeye nazaran daha dayanıklıdır. Bu nedenle, eğme testinde kırık genellikle germe zorunun olduğu yüzeyde gözlenir (81).



Şekil 2.8. Üç nokta eğme testi (81).

Eğme testinde zorun oluşmadığı tek bölge nötral eksenidir ve eksen boyunca zor sıfırdır. Nötral eksen den kemik yüzeyine çıkıldıkça zor artar ve yüzeyde maksimum değerine ulaşır (Şekil 2.9). Üç nokta eğme testi (TPBT) kemiğin orta kısmında yüksek makaslama zoru oluşturabilir. Bu durum gözlenen eğilmenin makaslama ve eğme zorlarının belirli oranlarda katılımıyla oluştuğunu gösterir. İdeal koşullarda böyle bir etkileşim istenmez. Makaslama zorunu ihmal edilebilecek seviyelere çekmek için materyalin uzunluk/kalınlık oranının en az 20:1 olması gerekir. Ancak kemirgenlerde bu değer, istenen oranın yarısı (10:1) kadardır. Bu nedenle, TPBT ile kemirgenlerden elde edilen zorlama gerçek değerinden yüksek, esneklik katsayısı ise düşüktür (81, 91).



Şekil 2.9. Kemik kütesinin nötral eksene uzaklığı (83).

Şekil 2.8 de verildiği gibi üç eğme testlerine maruz bırakılan bir kemiğe ait zor (σ) ve zorlama (ϵ) sırasıyla denklem 3.1 de verildiği gibi hesaplanabilir. (81)

Başarılı ve doğruluğu yüksek bir TPBT uygulaması için, mesnet noktaları arasındaki mesafe önemli bir değişkendir. Kemirgenlerden alınan TPBT kayıtlarında L mesafesi yaklaşık 15 mm alındığında gözlenen bükülmenin büyük oranda (%85-90) eğme zoru nedeniyle oluştuğu gösterilmiştir (81).

2.12. Biyomekanikte Kullanılan Terminoloji

Kemik dokunun biyomekanik özelliklerine ilişkin kullanılan terminoloji Tablo 2.2’de verilmiştir.

Tablo 2.2. Tez çalışmasında kullanılan biyomekanik terimler*

Terim	Mühendislik Terminolojisi	Simge	Birim
Maksimum deformasyon	Ultimate displacement	δ_u	Mm
Maksimum kuvvet	Ultimate force	F_u	N
Sertlik	Stiffness	S	N/mm
Enerji	Work to failure	U	N-mm ² -mJ
Elastik modül	Young's modulus	E	Mpa N/mm ²
Maksimum zor	Ultimate stress	σ_u	Mpa N/mm ²
Maksimum zorlama	Ultimate strain	ϵ_u	

*Turner (84) ve Sevil (82)'den alınmıştır.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Deney Hayvanları

Çalışmaya başlamadan önce Gaziantep Üniversitesi Yerel Etik Kurulundan izin (03/02/2011 tarih ve 03 nolu karar, EK-1). Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun izniyle Dicle Üniversitesi Deneysel Araştırma laboratuvarından (DÜSAM) temin edilen sıçanlar kullanıldı ve bütün prosedürler, National Institutes of Health, Gaziantep Üniversitesi ile Dicle Üniversitesi Hayvan bakımı ve kullanımı hakkındaki yönetmelik ve kurallarına uyularak yürütülmüştür. Çalışmada 40 sağlıklı dişi Sprague Dawley sıçan kullanılmıştır. Deney başlamadan önce bütün sıçanlar laboratuvar koşullarına uyumunu sağlamak üzere 1 haftalık bakıma alınmışlardır. Hayvanlar Dicle Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Araştırma ve Uygulama Merkezinde (DÜSAM) 50x80x50cm boyutlarındaki paslanmaz çelik sıçan kafeslerine her bir kafeste sekiz hayvan olacak şekilde yerleştirilmiştir.

Uyum döneminden sonar sıçanlar rastgele alınarak 8 gruba ayrılmış (her grupta 8 sıçan) ve ağırlık değerleri ± 0.1 gram hassasiyetli bir terazi ile alınmıştır. Her gruptaki sıçanların ağırlıkları Tablo 3.1'de verilmiştir.

Tablo 3.1. Deney başlangıcında gruplarda yer alan sıçanların ağırlık değerleri (g) (Min. en düşük ağırlık, Maks. en fazla ağırlık, SD. standard sapma).

Gruplar	Min-Maks (g)	Ortalama $\pm$ SD
K	198-164	179.7-12.31
R	202-161	182.9-17.01
RM+25	194-167	181.8-10.10
R+M50	184-163	179.6-6.89
R+WR	206-172	182.1-10.68

Deney süresince Laboratuvarın sıcaklığı $21 \pm 2^\circ\text{C}$ ve nem oranı %50-70 olarak ölçülmüştür. 4 haftalık deney süresince 12 saat aydınlık (7:00-19:00) ve 12 saat karanlık uygulaması yapılmıştır. Dicle Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarında normal sıçan yemi ile beslenerek yaşatılmıştır. Su ihtiyacı, kafeslerde otomatik suluk sistemi

kurularak sağlanmıştır. Günlük bakım ve besleme işlemleri her sabah saat 9.00-10.00 arasında yapılmıştır.

3.2. Deney Düzenlenmesi

Bu araştırma bir randomize kontrollü deneysel çalışma olup, Deneye alınan sıçanlar Tablo 3.2'deki şekilde gruplara ayrılmıştır.

Tablo 3.2. Deney grupları ve uygulanan ilaç dozları

Deney ve kontrol grupları			Grup başına hayvan adedi
1	K	Kontrol (sadece serum fizyolojik, 1 ml) i.p	8
2	R	Radyasyon (serum fizyolojik, 1 ml) i.p	8
3	R+M25	Radyasyon+Melatonin (25 mg/kg) i.p	8
4	R+M50	Radyasyon+Melatonin (50 mg/kg) i.p	8
5	R+WR	Radyasyon+WR2721 (200mg/kg Amifostin) i.p	8
Toplam			40

Radyasyon gruplarına (R, R+M25, R+M50, R+WR) Kobalt-60 cihazı kullanılarak tek doz 50 Gy sol bacak ışınlanmıştır. Doz oranı 50 gy/dak. 80 cm mesafede verilmiştir. Dicle Üniversitesi Onkoloji Hastahanesi, Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalında, radyasyon grubundaki sıçanlara çalışmanın ilk günü yüzeye 50 Gy gelecek şekilde Dicle Üniversitesi Onkoloji Hastahanesi, Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalındaki ALCYON-II Co-60 teleterapi cihazında 30x30 cm büyüklüğündeki alana 42 dakika Gamma radyasyon ışınlanmıştır.

Radyasyon uygulamasından 15 dk. önce R+M25 gurubuna 25 mg/kg, R+M50 grubuna ise 25 mg/kg melatonin serum fizyolojik ile 1/10 oranında sulandırılarak i.p olarak tek doz olarak verilmiştir (M5250 250 mg Sigma-Aldrich Chemical Co.). Melatonin etanol içinde çözündürülmüş ve 1 ml olacak şekilde serum fizyolojik (izotonik NaCl) ile tamamlanmıştır.

Radyasyon uygulamasından 15 dk. önce R+WR grubuna 200mg/kg intraperitoneal Amifostin uygulaması yapılmıştır (9, 38, 85, 86). (Amifostin WR2721, 500 mg, Ethyol flacon, Er-Kim İlaç, İstanbul).

Sıçanlar radyasyon uygulamasından 4 hafta sonra, intramusküler 10 mg/kg ksilazin (Roma pun, Bayer, Türkiye) ve 70 mg/kg ketamin (Ketalar, Eczacıbaşı, Türkiye) anestezisi ile uyutularak sakrifiye edilmiştir.

Bu işlemin ardından, her sıçanın sol femuru kemikleri periosteuma zarar vermeden dikkatlice bistüri ve makas yardımıyla diseksiyon işlemi yapılmıştır. Femurlar ayrı ayrı fazla kasları temizlenerek serum fizyolojik ile ıslatılmış spanç ile sarılarak numaralandırılmış kapaklı tüplere alınmış ve -20°C deepfreezde analiz edilinceye kadar bekletilmiştir (84, 86, 87).

3.3. Kemik Mineral Yoğunluğunun Ölçümü

Deneyin 4. hafta sonunda Mersin Üniversitesi Radyodiagnostik Anabilim dalında mevcut Dual energy X ray absorpsiyometre (DEXA) (Norland XR-46) ile kontrol ve deney grubundaki sıçanların tüm vücut kemik mineral yoğunluğu g/cm² olarak ölçüldü (Şekil 3.1).

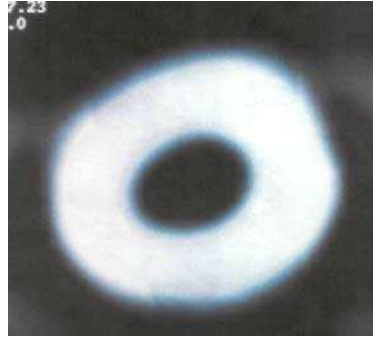
3.4. Kemik Mineral İçeriğinin Ölçümü

Kemik mineral yoğunluğunun ölçümünde olduğu gibi deney sonunda DEXA yardımıyla kontrol ve deney gruplarındaki sıçanların sol femurları üç bölge (Boyuni, Kortikal ve Tüm femur) baz alınarak femur kemik mineral içeriği gram (g) olarak ölçüldü. Ölçümler, Dual Enerji X-ışını Absorpsiyometri cihazı (DXA; Norland XR-46) ile yapıldı. Tüm ölçümler, küçük hayvanlar için düzenlenmiş deneysel ölçüm protokolü (Tarama hızı: 10 mm/s, Rezolüsyon: 0,5x0,5mm, Anot voltajı: 100 kV, Akım: 1,3 mA) uygulanarak gerçekleştirildi (88, 89, 90).

3.5. Kemik Kesit Alanı Ölçümü

Her femur için radyoloji anabilim dalında bulunan bilgisayarlı tomografi cihazı (Toshiba Aquilion 64 Slice Tomografi Cihazı) ile femurların orta hatdan transvers kesit filmleri büyütme yapılarak çekildi. Tarama şeklinde çekimlerle alınan kesitler, ölçüm

yapılması için değişik oranlarda büyütülmüş ve kesit filmler elde edildikten sonra stereolojik yöntemlerden nokta sayma yöntemi kullanılarak (2mm duyarlılığında) ve sıçan sağ femurlarının kesit alanı hesaplanmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Bilgisayarlı tomografi ile kayıtlanan femur kesit alanı görüntüsü (8).

Biyomekanik testlerden önce oda ısında 30 dakika bekletilerek çözdürülen kemiklerin femur uzunlukları dijital kumpas ile ölçülmüştür. Kemikler, mesnet noktaları arasındaki mesafe (L: mm) dijital kumpas ile belirlenerek, test cihazına medio-lateral doğrultuda yerleştirilip femoral orta hat basma noktası olarak belirlendi (140). Kemiklere MAY TPBM 2113 test cihazı (Commat Ltd.) ile üç nokta eğme testi uygulandı (Şekil 3.2). Eğme yükü 1 mm/s hızla verildi (141). Uygulanan eğme kuvveti sonucunda oluşan sinyaller 12 bit'lik A/D çevireç kullanılarak 1000 örnek/s duyarlılıkla kayıt edildi. Diğer tüm mekanik testlerde olduğu gibi, üç nokta eğme testinin yapıldığı ortam sıcaklığı ölçülen ve hesaplanan parametreleri etkilediğinden, ortam sıcaklığı 22-24°C'ye sabitlendi. Üç nokta eğme sisteminde yük 0,064 s' hızla (zorlama rate) uygulandı (17, 81).

Çalışmada, kemiğin mekanik özelliklerini belirlemek amacıyla femoral diyafize üç nokta bükme testi uygulandı. Test sonunda yük-deformasyon eğrisi çizdirilerek; maksimum kuvvet (F_u ; N), maksimum deformasyon (d_u ; mm), kırılıncaya kadar depolanan enerji (U; mJ) ve sertlik (S; N/mm) direkt olarak elde edildi (Şekil 3.2). Bu parametreler LoggerPro yazılımı (V 3.8.3, Vermer Software & Technology, Orlando. FL USA) kullanılarak değerlendirildi. Ayrıca maksimum eğme dayanımı (σ_u ; MPa), maksimum zorlama (ϵ_u ; mm/mm), esneklik katsayısı (E; GPa) ve dayanıklılık (u ; MPa) değerleri denklem 3.1 de verilen eşitlikler kullanılarak hesaplandı (91). Bu değerler hesaplanırken ML yöndeki periostal çap kullanıldı; ayrıca, AP yönündeki atalet momenti (I_{AP} ; mm⁴) denklem 3.3 de verilen eşitlikler kullanılarak hesaplandı.

Denklemlerde 3.1, 3.2, 3.3' te kullanılan, F uygulanan kuvveti, L mesnet noktaları arasındaki mesafeyi (Şekil 2.8), a yük kolunun destek noktasına uzaklığını, c kemik kütlelerinin nötral eksenenden uzaklığını (Şekil 2.9), I nötral eksen etrafındaki atalet momentini ve d deformasyonu ifade etmektedir.(81)

Denklem 3.1. İnstrinsik parametrelerin hesaplanmasında kullanılan denklemler (80, 91)

$$\sigma = F \left(\frac{Lc}{4I} \right), \epsilon = d \left(\frac{12c}{L^2} \right), E = S \left(\frac{L^3}{48I} \right), u = U \left(\frac{3c^2}{IL} \right)$$

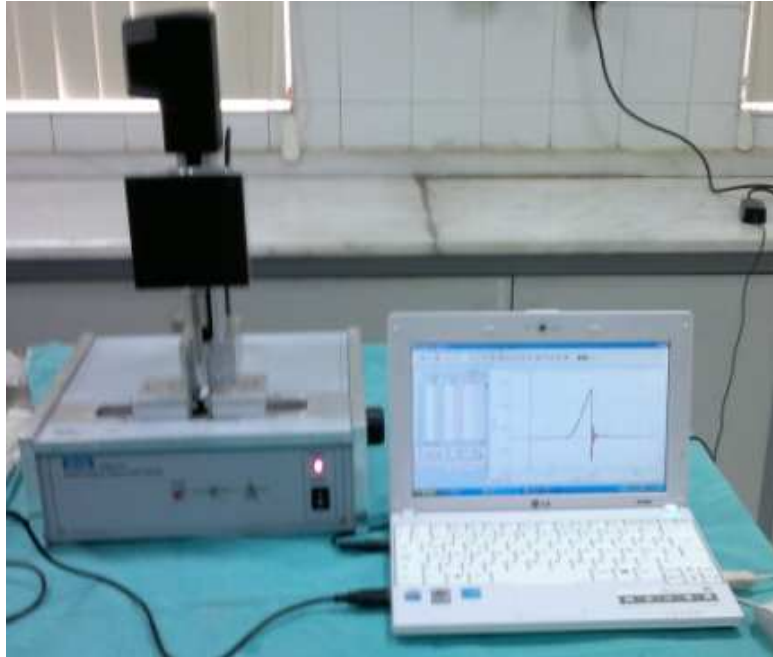
Denklem 3.2. ML yöndeki periostal çap hesaplanmasında kullanılan denklemler (91)

$$c = PER_{ML} / 2 ; mm$$

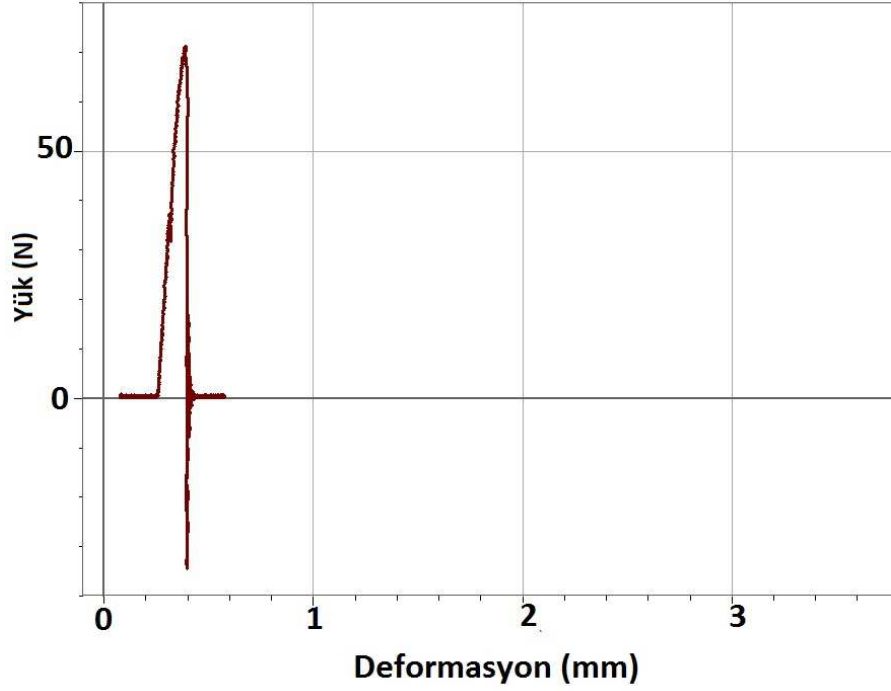
Denklem 3.3. Medio-lateral (ML) ve anterior-posterior (AP) yönde oluşan kesitsel atalet momenti denklemi (80, 92)

$$I_{AP} = \frac{\pi}{64} \cdot [(PER_{AP}^3 \cdot PER_{ML}) - (END_{AP}^3 \cdot END_{ML})]$$

$$I_{ML} = \frac{\pi}{64} \cdot [(PER_{ML}^3 \cdot PER_{AP}) - (END_{ML}^3 \cdot END_{AP})]$$



Şekil 3.2. MAY TPBM 2113 üç nokta eğme testi biyomekanik ölçüm sistemi genel görünüşü



Şekil 3.3. Üç nokta eğme testi ile kaydedilen yük-deformasyon eğrisi

3.7. Biyomekanik Verilerin Analizi

Yukarıda bahsedilen sistem kullanılarak maksimum deformasyon miktarı, maksimum kuvvet, sertlik, kemikte depolanan enerji, elastik modül, dayanıklılık, yield displacement, maksimum stres ve maksimum zorlama gibi biyomekanik parametreler hesaplanmıştır (17, 84, 93).

3.6.1. Maksimum kuvvet (Ultimate force)

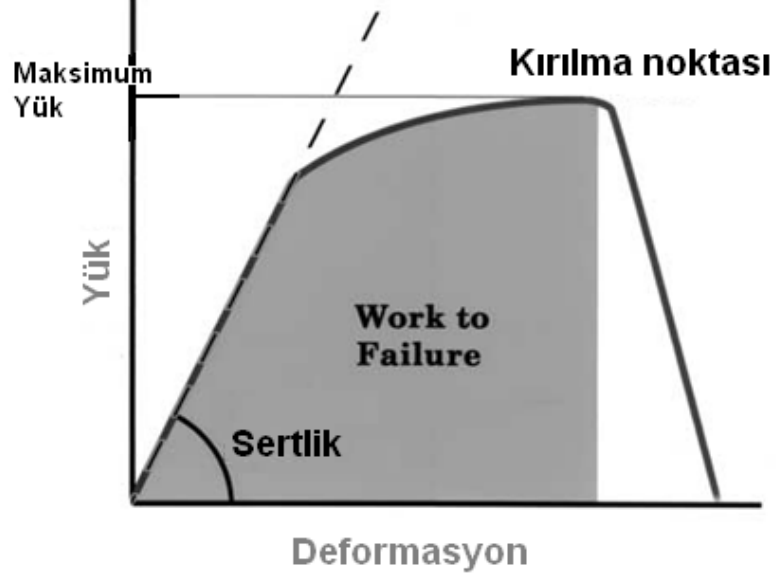
Maksimum kuvvet ya da kırılma kuvveti, kemikte kırılma oluşana kadar uygulanan kuvvettir. Her bir kemik için yükün zamana göre değişimini veren eğriler elde edilerek analizi yapılarak maksimum kuvvet (N) olarak ölçülmüştür. Elde edilen eğri Kuvvet (N)- Deformasyon(mm) eğrisidir.

3.6.2. Sertlik (Stiffness)

Yük-zaman eğrisinden yararlanarak test cihazıyla uygulanan eğme kuvveti ile bu kuvvet sonucunda oluşan deformasyon verileri kullanılarak yük-deformasyon eğrisi elde edildi (Şekil 3.4). Sertlik bu eğrinin eğiminden başka bir ifade ile;

$$Sertlik = \frac{\Delta F}{\Delta L} \left(\frac{N}{mm} \right)$$

Bağıntısından hesaplandı.



Şekil 3.4. Yük deformasyon eğrisi (17).

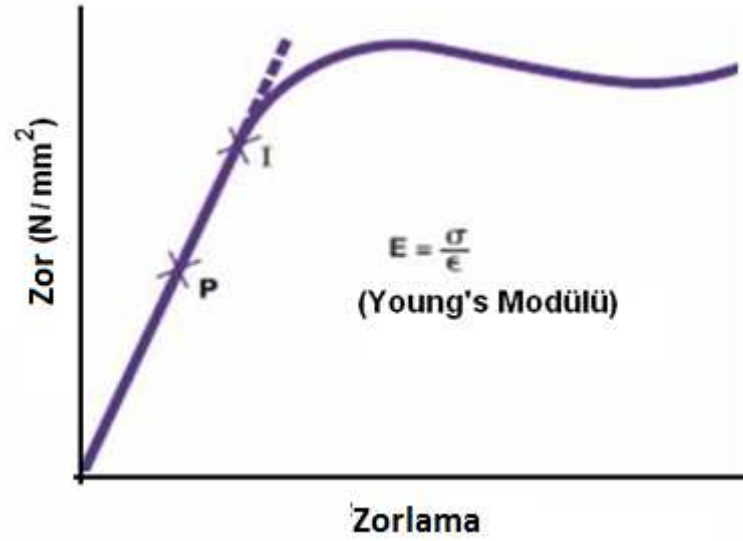
Sertlik yük-deformasyon eğrisininin doğrusal bölümünün eğiminden hesaplandı. Yük-deformasyon eğrisinin eğimi $Sertlik = \Delta F / \Delta L$ N/mm bağıntısıyla verilmektedir (86).

3.6.3. Kemikte depolanan enerji (Work to Failure)

Yük-deformasyon eğrisinin doğrusal bölümünün altında kalan alan kemiğin kırılıncaya kadar depoladığı enerjiye karşılık gelmektedir. Bu alan hesaplanarak kemiğin kırılıncaya kadar depoladığı enerji değerine ulaşıldı.(81)

3.6.4. Elastik modül (Young modulus)

Yük-deformasyon eğrisi zor-zorlama (zor-zorlanma) eğrisine dönüştürülebilir. Zor-zorlama eğrisinin doğrusal bölümünün eğimi Elastik modüle eşittir (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Zor - zorlama eğrisi (elastik modül)

bu eğim;

$$\text{Elastik modül} = \text{zor/zorlama } \text{N/mm}^2$$

$$\text{Zor} = F/A \quad \text{N/mm}^2$$

$$\text{Zorlama} = (L-L_0)/L$$

$$\text{Yong Modül (Elastik Modül)} = \frac{\text{Zor}}{\text{Zorlama}} = \frac{F.L}{A.L} \left(\frac{\text{N}}{\text{mm}^2} \right)$$

bağıntısıyla hesaplanır.

Bağıntılardaki F kemiğe uygulanan kuvvet, A kortikal kesit alanı, L_0 kemiğin yüklenmeden önceki boyu, L ise yüklendikten sonraki boyudur. ΔL ise deformasyon miktarıdır (86).

3.6.5. Dayanıklılık (Toughness)

Kollagen, kemiğin mineral yoğunluğundan ve içeriğinden bağımsız olarak kemiğin kırılmaya karşı dayanıklılığını belirler. Zor-zorlama eğrisinde maksimum dayanım noktasına kadar eğri altında kalan alan dayanıklılık (toughness) veya zorlama enerjisi olarak tanımlanır ve kemiği kırmak için gereken enerji miktarını ifade eder (81). Bu çalışmada da zor-zorlama eğrisinin altında kalan alan kullanılarak dayanıklılık hesaplandı.

3.7. İstatistiksel Analizler

Biyomekanik olarak ölçülen dataların tümü, gruplar arasında istatistiksel olarak değerlendirilerek, femurlarda oluşan radyasyon hasarına karşı melatoninin koruyucu etkisi araştırılmıştır. Elde edilen verilerin tanımsal istatistikleri ortalamalar $\pm$ standard sapma (SD.) alınmıştır. Guruplararası karşılaştırmalarda non-parametrik testlerden Kruskal-Wallis testi kullanılmıştır. İstatistiksel değerlendirmelerde $P<0.05$ anlamlı sonuç olarak alınmıştır. Hesaplamalarda ve grafik düzenlenmesinde SPSS (v 11.5; Lead Technologies, Inc., IL USA) ve MedCalc (v 10.1.6.0; MedCalc Software Co., Maiakerke, Belgium) istatistik bilgisayar programları kullanılmıştır.

4. BULGULAR

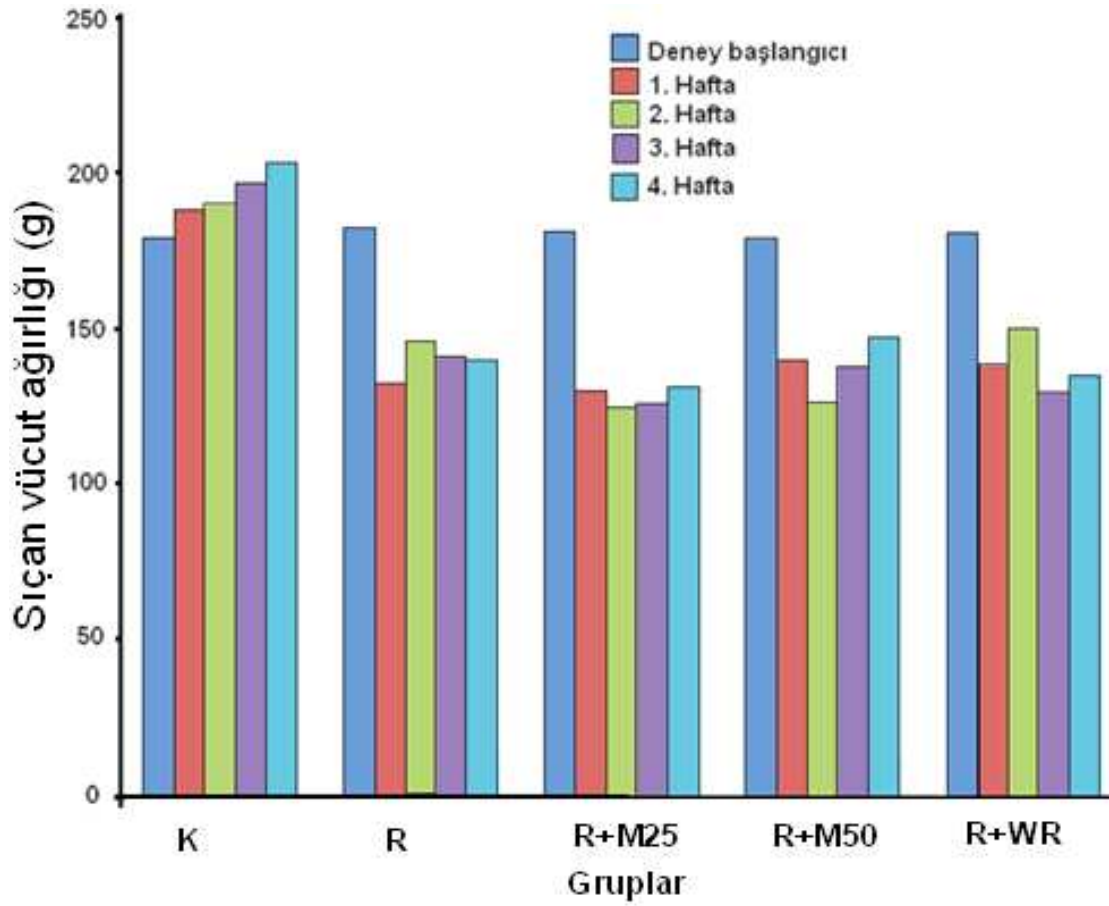
4.1. Genel Bulgular

Çalışma başlangıcında gruplar oluşturulurken radyasyon ve kontrol grupları hayvanlarının canlı ağırlıkları arasında istatistiksel farklılık olmayacak ve grupları homojen dağılım gösterecek şekilde seçilmiştir. Hayvanların haftalık canlı ağırlık artışlarına bakıldığında radyasyon gruplarında (R, R+M25, R+M50 ve R+WR) canlı ağırlık önemli ölçüde azalma göstermiştir (Tablo 4.1 ve Şekil 4.1).

Tablo 4.1. Deney süresince sıçanlardaki ağırlık değerleri ve yüzde olarak değişim oranları. K: Kontrol grubu, R: Radyasyon grubu, R+M25: Radyasyon + Melatonin 25 grubu, R+M50: Radyasyon+Melatonin 50 grubu, R+WR: Radyasyon+Amifostin grubu.

		K	R	R+M25	R+M50	R+WR
Deney Başlangıcı	Ortalama	179.7	182.9	181.8	179.6	182.1
	S.D.	12.307	17.0079	10.096	6.88554	10.68293
1.Hafta	Ortalama	188.8	132.8	130.9	141.0	138.7
	S.D.	15.20	24.48	16.39	10.41	20.43
	Değişim %	5.10	-27.41	-28.00	-21.50	-23.84
2.Hafta	Ortalama	190.0	146.7	125.7	127.0	151.0
	S.D.	14.56	15.31	32.93	24.06	27.18
	Değişim %	5.75	-19.80	-30.86	-29.30	-17.09
3.Hafta	Ortalama	198.0	142.0		139.0	130.0
	S.D.	14.10	7.55		14.53	19.16
	Değişim %	10.20	-22.35		-22.62	-28.62
4.Hafta	Ortalama	204.0	140.0		148.7	136.0
	S.D.	17.44	7.07		16.29	23.58
	Değişim %	13.54	-23.44		-17.23	-25.33

Deney süresince kontrol grubu sıçanlarda femur bölgesinde herhangi değişim görülmediği halde, radyasyona maruz kalan sıçanlarda çok fazla kıl dökülmesi ve deri lezyonları tespit edilmiştir.



Şekil 4.1. Deney süresince sıçanlardaki ağırlık değişimi. K: Kontrol grubu, R: Radyasyon grubu, R+M25: Radyasyon + Melatonin 25 grubu, R+M50: Radyasyon+Melatonin 50 grubu, R+WR: Radyasyon+Amifostin grubu.

4.2. Femur Kemiklerinin Geometrik Parametreleri

Deney sonucu deney ve kontrol gruplarına ait hesaplanan geometrik parametreler (Femur uzunluğu, Kemik mineral yoğunluğu, kemik mineral içeriği ve kortikal kemik kesit alanı) Tablo 4.2’de verilmiştir.

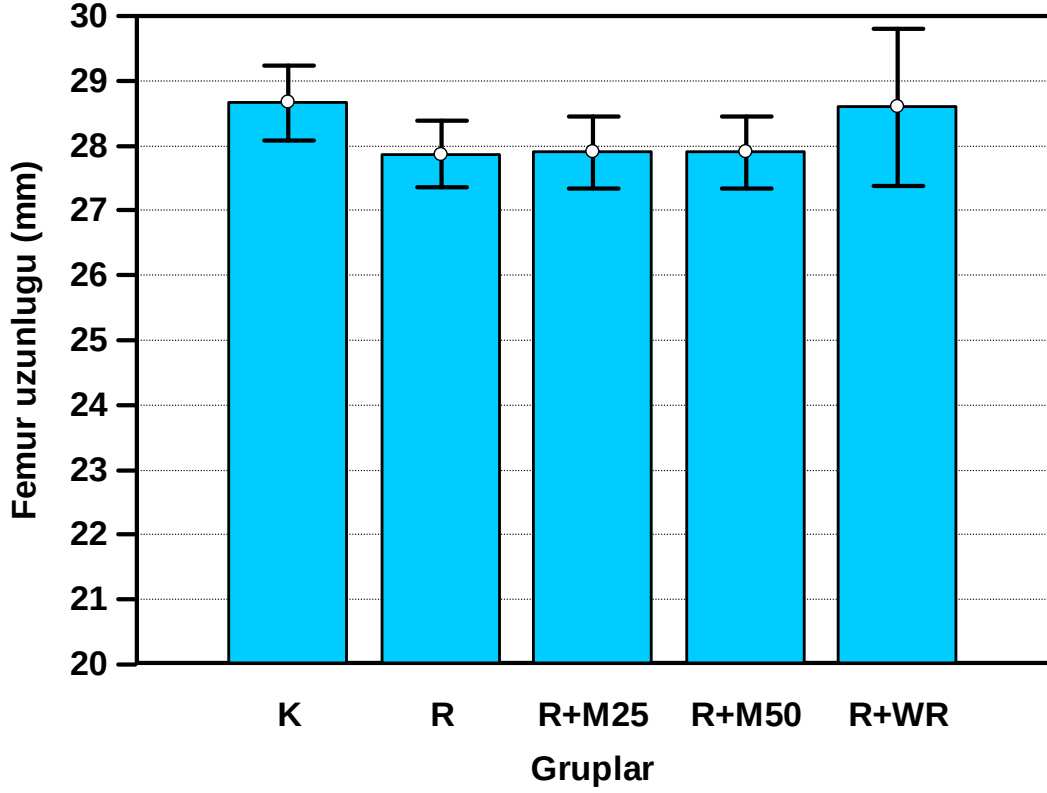
Tablo 4.2. Kemiğin geometrik parametreleri. K: Kontrol grubu, R: Radyasyon grubu, R+M25: Radyasyon + Melatonin 25 grubu, R+M50: Radyasyon+Melatonin 50 grubu, R+WR: Radyasyon+Amifostin grubu.

	K	R	R+M25	R+M50	R+WR
Femur Uzunluğu (mm)	28.625± 0.691	27.85 ± 0.478	27.808±0.576	27.93±0.553	28.62± 1.205
Kemik mineral yoğunluğu (g/cm ²)	0.104± 0.003	0.092 ± 0.001 ^a	0.111±0.002 _{a,f}	0.093±0.003	0.104 ± 0.002
Kemik mineral içeriği (g/cm ²)	0.150±0.123	0.145±0.004	0.169±0.009	0.126±0.008	0.175±0.007 ^e
Kesit alanı (mm ²)	1.436±0.074	1.582± 0.046	1.529±0.051	1.355±0.054 ^b	1.686 ± 0.058

^a $P < 0.05$ **K** ile karşılaştırıldığında, ^b $P < 0.01$ **K** ile karşılaştırıldığında, ^c $P < 0.001$ **K** ile karşılaştırıldığında, ^d $P < 0.05$ **R** ile karşılaştırıldığında, ^e $P < 0.01$ **R** ile karşılaştırıldığında, ^f $P < 0.001$ **R** ile karşılaştırıldığında,

4.2.1 Femur uzunluğu

Deney grubundaki sıçanların ortalama femur boyları Tablo 4.2 ile Şekil 4.2’de verilmiştir. Tabloda görüldüğü gibi femur uzunlukları, K grubunda 28.625± 0.691 mm, R grubunda 27.85 ± 0.478 mm, R+M25 grubunda 27.808±0.576 mm, R+M50 grubunda 27.93±0.553 mm ve R+WR grubunda ise 28.62± 1.205 mm olarak ölçülmüştür. R, R+M25 ile R+M50 gruplarındaki femur uzunlukları yaklaşık 1 mm daha kısa bulunmakla birlikte kontrol grubu ile istatistiksel fark göstermemiştir. R+WR grubu ile kontrol grupları arasında ise bu değer farklılık göstermemiştir.

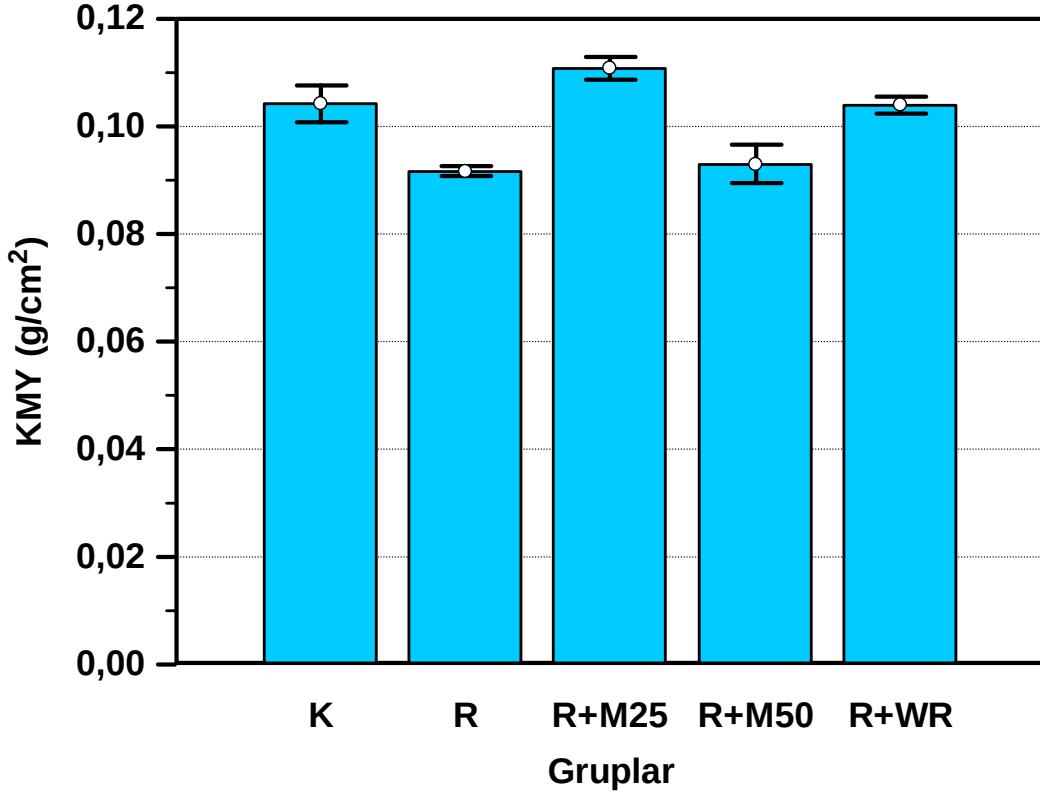


Şekil 4.2. Radyasyon ve kontrol gruplarında femurların ortalama boyları (Ortalama±SD). K: Kontrol grubu, R: Radyasyon grubu, R+M25: Radyasyon + Melatonin 25 grubu, R+M50: Radyasyon+Melatonin 50 grubu, R+WR: Radyasyon+Amifostin grubu.

4.2.2. Kemik mineral yoğunluğu (KMY)

Radyasyona maruz bırakılan deney ve kontrol grubu sıçanların kemik mineral yoğunluğu ortalamaları ve standart sapmaları Tablo 4.2 ve Şekil 4.3’de verilmiştir. Kemik mineral yoğunluğu, K grubunda $0.104 \pm 0.003 \text{ g/cm}^2$, R grubunda $0.092 \pm 0.001 \text{ g/cm}^2$, R+M25 grubunda $0.111 \pm 0.002 \text{ g/cm}^2$, R+M50 grubunda $0.093 \pm 0.003 \text{ g/cm}^2$ ve R+WR grubunda ise $0.104 \pm 0.002 \text{ g/cm}^2$ olarak ölçülmüştür. R grubu sıçanların KMY değerleri kontrol grubuna göre azalma göstermiş olup, istatistiksel olarak da bu azalış önemli bulunmuştur ($P < 0.05$). R+M25 ve R+WR gruplarındaki KMY değerleri R grubuna göre yüksek ancak K grubu ile farklılık göstermediği belirlenmiştir. R+M50 grubunun KMY değeri ise kontrole göre daha düşük olup R grubuna yakın bir değerde ölçülmüştür. 25 mg/kg melatonin uygulanan R+M25 deney grubu sıçanların KMY değerlerindeki artış R grubuna göre istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($P < 0.001$).

Melatonin 25 mg/kg ile Amifostinin 200 mg/kg uygulaması kemik mineral yoğunluğunu olumlu yönden etkilediği saptanmıştır.

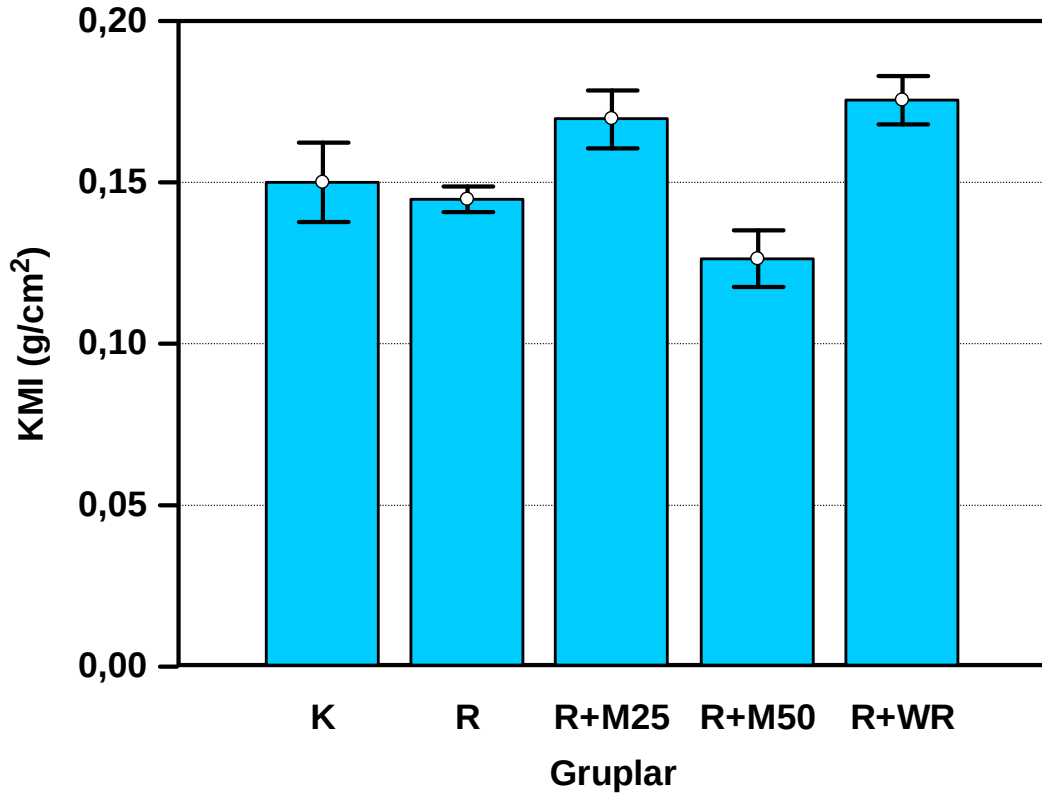


Şekil 4.3. Radyasyona maruz bırakılan deney ve kontrol grubu sıçanların kemik mineral yoğunluğu (KMY) (Ortalama±SD). K: Kontrol grubu, R: Radyasyon grubu, R+M25: Radyasyon + Melatonin 25 grubu, R+M50: Radyasyon+Melatonin 50 grubu, R+WR: Radyasyon+Amifostin grubu.

4.2.3. Kemik mineral içeriği (KMİ)

Radyasyona maruz bırakılan deney ve kontrol grubu sıçanların kemik mineral içeriği (KMİ) ortalamaları ve standart sapmaları Şekil 4.4’da verilmiştir.

Kemik mineral içeriği, K grubunda 0.150 ± 0.123 g/cm², R grubunda 0.1448 ± 0.004 g/cm², R+M25 grubunda 0.169 ± 0.009 g/cm², R+M50 grubunda 0.126 ± 0.008 g/cm² ve R+WR grubunda ise 0.175 ± 0.007 g/cm² olarak ölçülmüştür.



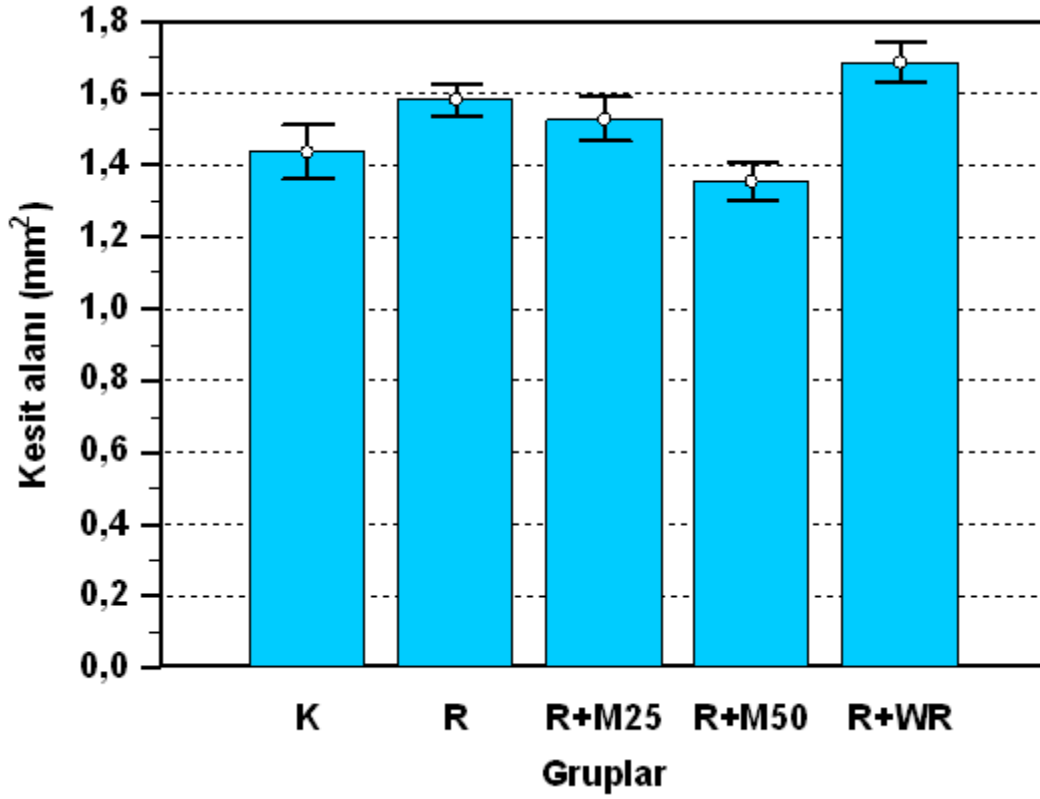
Şekil 4.4. Radyasyon ve kontrol gruplarında femurların kemik mineral içeriği (KMİ) (Ortalama±SD). K: Kontrol grubu, R: Radyasyon grubu, R+M25: Radyasyon + Melatonin 25 grubu, R+M50: Radyasyon+Melatonin 50 grubu, R+WR: Radyasyon+Amifostin grubu.

Şekil’de görüldüğü gibi KMİ miktarı R grubunda azalma göstermiştir. Ancak bu azalma istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır ($P>0.05$). R+M25 ve R+WR gruplarının KMİ değerleri R grubuna göre yüksek bulunmuş olup, bu farklılık istatistiksel olarak da önemli bulunmuştur ($P<0.05$). Ancak R+M50 grubundaki KMİ değeri hem K hem de R gruplarından daha düşük bulunmuştur. Melatonin 25 mg/kg ile Amifostinin 200 mg/kg uygulaması kemik mineral içeriğini olumlu yönden etkilediği saptanmıştır.

4.2.4. Femur kortikal kemik kesit alanı

Radyasyon ve kontrol gruplarındaki sıçanlarda kortikal kemik kesit alanı ölçümleri Şekil 4.5’de verilmiştir. Femur kortikal kemik kesit alanı, K grubunda $1.436 \pm 0.074 \text{ mm}^2$, R grubunda $1.582 \pm 0.046 \text{ mm}^2$, R+M25 grubunda $1.529 \pm 0.051 \text{ mm}^2$, R+M50 grubunda $1.355 \pm 0.054 \text{ mm}^2$ ve R+WR grubunda ise $1.686 \pm 0.058 \text{ mm}^2$ olarak ölçülmüştür. Grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($P>0.05$).

Ancak R+M50 grubu sıçanlardaki kortikal kemik kesit alanı kontrole göre önemli derecede azalma göstermiştir ($P<0.05$).



Şekil 4.5. Radyasyon ve kontrol gruplarında femurların ortalama kesit alanları (BAREA, mm²) (Ortalama±SD). K: Kontrol grubu, R: Radyasyon grubu, R+M25: Radyasyon + Melatonin 25 grubu, R+M50: Radyasyon+Melatonin 50 grubu, R+WR: Radyasyon+Amifostin grubu.

4.3. Femur Kemiklerinin Biyomekanik Parametreleri

Uygulama sonunda hem deney grubu hem de kontrol grubundaki sıçanların femurlarına mekanik değerler saptanmış ve elde edilen veriler Tablo 4.3.'te verilmiştir.

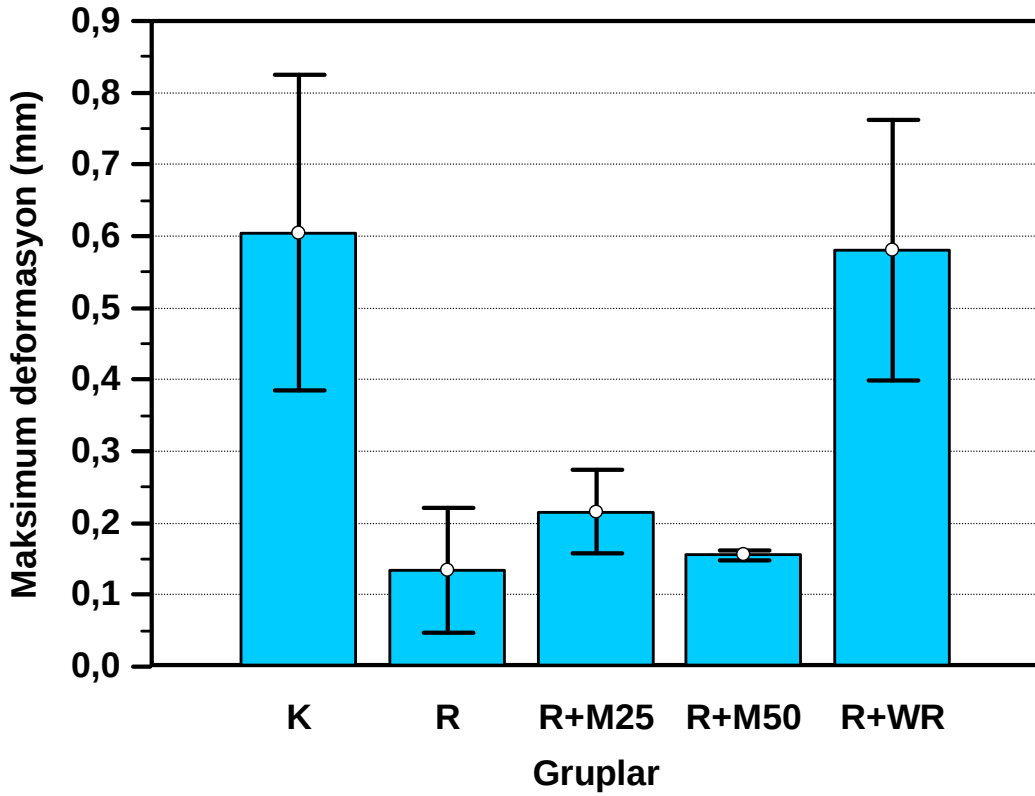
Tablo 4.3. Kemiğin biyomekanik parametreleri. K: Kontrol grubu, R: Radyasyon grubu, R+M25: Radyasyon + Melatonin 25 grubu, R+M50: Radyasyon+Melatonin 50 grubu, R+WR: Radyasyon+Amifostin grubu.

Mekanik Parametreler	K	R	R+M25	R+M50	R+WR
Maksimum deformasyon, mm	0.605± 0.221	0.134±0.088 ^c	0.216±0.059 ^{c, d}	0.155± 0.008 ^c	0.580±0.181 ^f
Maksimum kuvvet, N	60.781±0.794	40.313±4.310 ^c	51.058±2.119 ^{c, e}	46.217±3.501 ^c	49.335±1.374 ^{c, e}
Sertlik, N/mm	586.37±34.107	424.733±29.682 ^c	524.680±62.762 ^d	415.700±38.964 ^c	455.467±57.057 ^a
Enerji, mJ	19.871± 8.518	10.851± 0.516 ^b	14.407± 3.161 ^d	13.011± 2.592	15.822± 2.188 ^e
Elastik modül, Gpa	0.758± 0.156	2.101 ± 0.637	2.192± 0.951 ^a	3.169± 0.090 ^{c, d}	2.120 ± 0.819 ^a
Dayanıklılık, Mpa	3.253± 1.629	2.307± 0.482 ^a	2.322± 0.520 ^a	2.282± 0.476 ^a	3.305± 0.400 ^d
Maksimum zor, Mpa	60.259±5.521	67.784±23.542 ^b	58.034±11.428 ^a	61.359±4.045 ^a	94.873±5.539 ^b
Maksimum zorlama, mm/mm	0.083±0.016	0.031± 0.002 ^b	0.032±0.011 ^b	0.020±0.001 ^c	0.0613±0.018

^a $P < 0.05$ kontrol ile karşılaştırıldığında, ^b $P < 0.01$ kontrol ile karşılaştırıldığında, ^c $P < 0.001$ kontrol ile karşılaştırıldığında, ^d $P < 0.05$ R ile karşılaştırıldığında, ^e $P < 0.01$ R ile karşılaştırıldığında, ^f $P < 0.05$ R ile karşılaştırıldığında,

4.3.1. Maksimum deformasyon (Ultimate displacement) mm

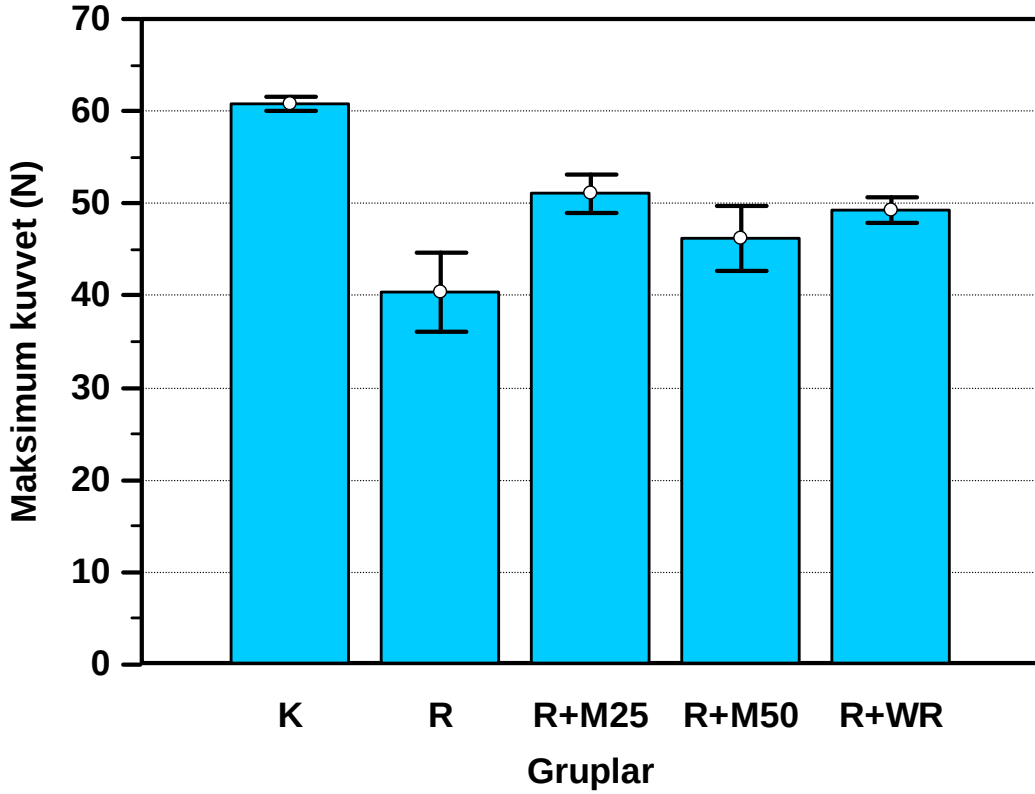
Radyasyon ve kontrol gruplarındaki sıçanlarda Maksimum deformasyon miktarı ölçümleri Şekil 4.6'de verilmiştir. Radyasyon grubunda Maksimum deformasyon miktarı 0.134±0.088 mm, kontrollerde ise 0.605± 0.221 mm olarak bulunmuştur. R ve R+M25 ile R+M50 gruplarının maksimum deformasyon miktarı K grubuna göre önemli ölçüde azaldığı ($P < 0.001$), ancak R+WR grubundaki sıçanlarda bu değer kontrol ile benzerlik gösterdiği saptanmıştır ve bunlar arasında istatistiksel fark görülmemiştir ($P > 0.05$). R+WR ($P < 0.001$) grubu R grubuna göre önemli farklılık gösterirken ($P < 0.001$), R+M25 ile R+M50 grubu R grubuna benzerlik göstermiştir. Bu durum melatonin uygulanan sıçanlarda melatoninin maksimum deformasyon değeri üzerine olumlu bir etkisinin olmadığını göstermektedir.



Şekil 4.6. Dişi sıçanlarda deney ve kontrol gruplarında femurların ortalama maksimum deformasyon miktarı (Ortalama±SD). K: Kontrol grubu, R: Radyasyon grubu, R+M25: Radyasyon + Melatonin 25 grubu, R+M50: Radyasyon+Melatonin 50 grubu, R+WR: Radyasyon+Amifostin grubu.

4.3.2. Maksimum kuvvet (Ultimate force), N

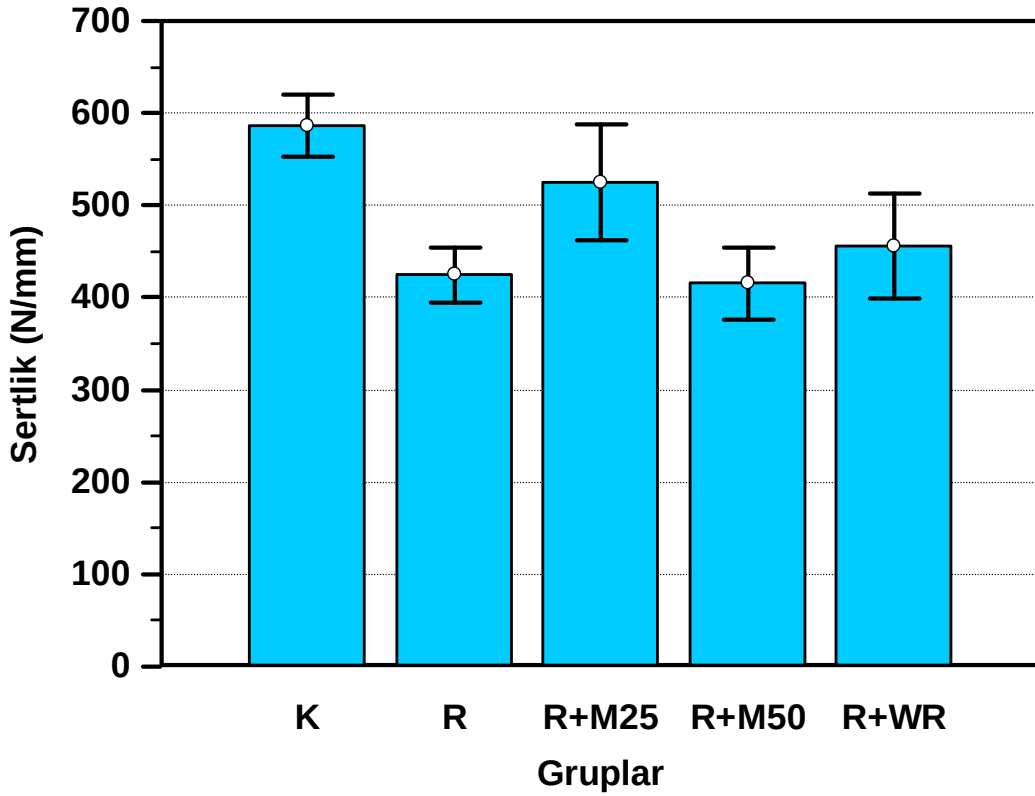
Radyasyon ve kontrol gruplarındaki sıçanlarda maksimum kuvvet miktarı ölçümleri Şekil 4.7’de verilmiştir. R grubunda ortalama maksimum kuvvet 40.313 ± 4.310 N olarak, K grubunda ise bu değer 60.781 ± 0.794 N olarak ölçülmüştür. R, R+M25, R+M50 ve R+WR grupların maksimum kuvvet değerleri K grubuna göre azaldığı ve bunun istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır ($P < 0.001$ ve $P < 0.05$). Ancak R+M25 ve R+WR gruplarının maksimum kuvveti R grubuna göre artış göstermekte olup, bunun istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır ($P < 0.01$). R+M50 grubunun R grubuna göre artışı ise istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır ($P > 0.05$). Melatonin ve amifostin uygulanan radyasyon gruplarındaki maksimum kuvvet değerleri üzerine az da olsa etkili olduğu görülmüştür.



Şekil 4.7. Dişi sıçanlarda deney ve kontrol gruplarında femurların ortalama maksimum kuvvet (Ortalama $\pm$ SD). K: Kontrol grubu, R: Radyasyon grubu, R+M25: Radyasyon + Melatonin 25 grubu, R+M50: Radyasyon+Melatonin 50 grubu, R+WR: Radyasyon+Amifostin grubu.

4.3.3. Sertlik (Stiffness), N/mm

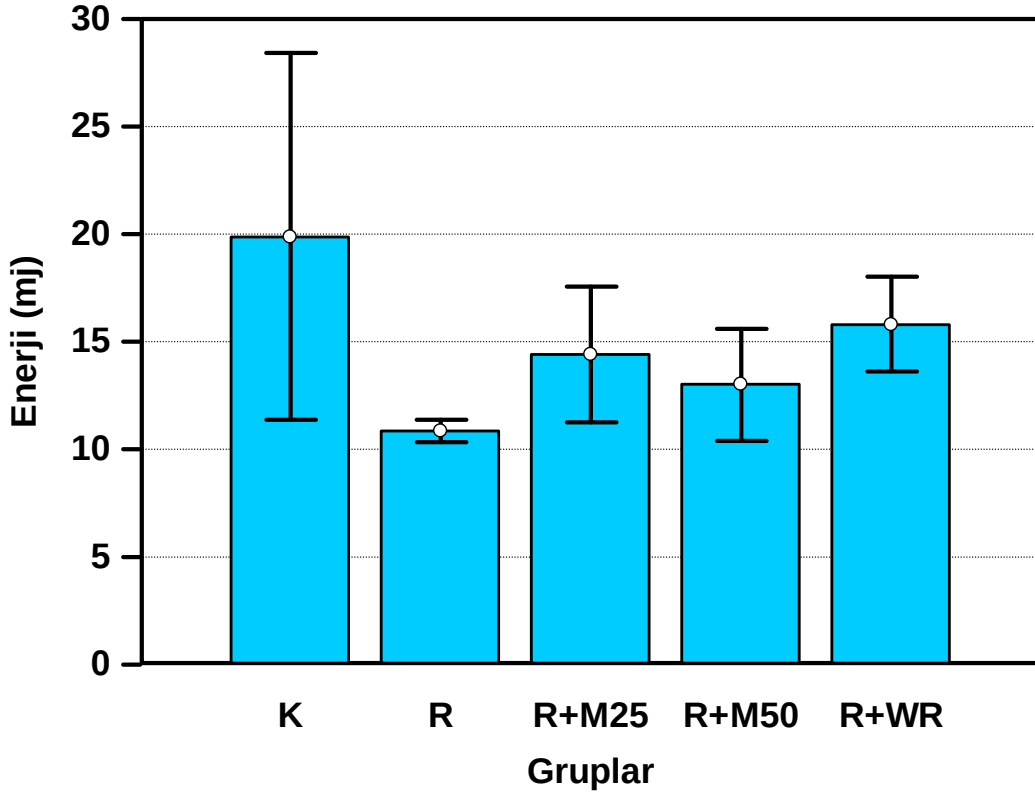
Radyasyon ve kontrol gruplarındaki sıçanlarda sertlik miktarı ölçümleri Şekil 4.8’de verilmiştir. Radyasyon grubundaki sıçanlarda ortalama sertlik (stiffness) 424.733 $\pm$ 29.682 N/mm, iken, kontrollerde bu değer 586.37 $\pm$ 34.107 N/mm olarak bulundu. R, R+M50 ve R+WR gruplarının ortalama sertlik değerinin K grubuna göre önemli miktarda azaldığı saptanmıştır ($P<0.001$ ve $P<0.05$). Ancak R+M25 grubunun sertlik değeri K grubuna göre biraz düşük olmasına karşın R grubuna göre yüksek olup, bu fark istatistiksel olarak da önemli bulunmuştur ($P<0.05$). Bu durum 25 mg/kg melatonin uygulanan deney grubunun sertlik parametresi bakımından önemli derecede etkili olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.8. Dişi sıçanlarda deney ve kontrol gruplarında femurların ortalama sertlik miktarı (N/mm) (Ortalama $\pm$ SD). K: Kontrol grubu, R: Radyasyon grubu, R+M25: Radyasyon + Melatonin 25 grubu, R+M50: Radyasyon+Melatonin 50 grubu, R+WR: Radyasyon+Amifostin grubu.

4.3.4. Kemikte depolanan enerji (Energy absorbtion capacity) mj

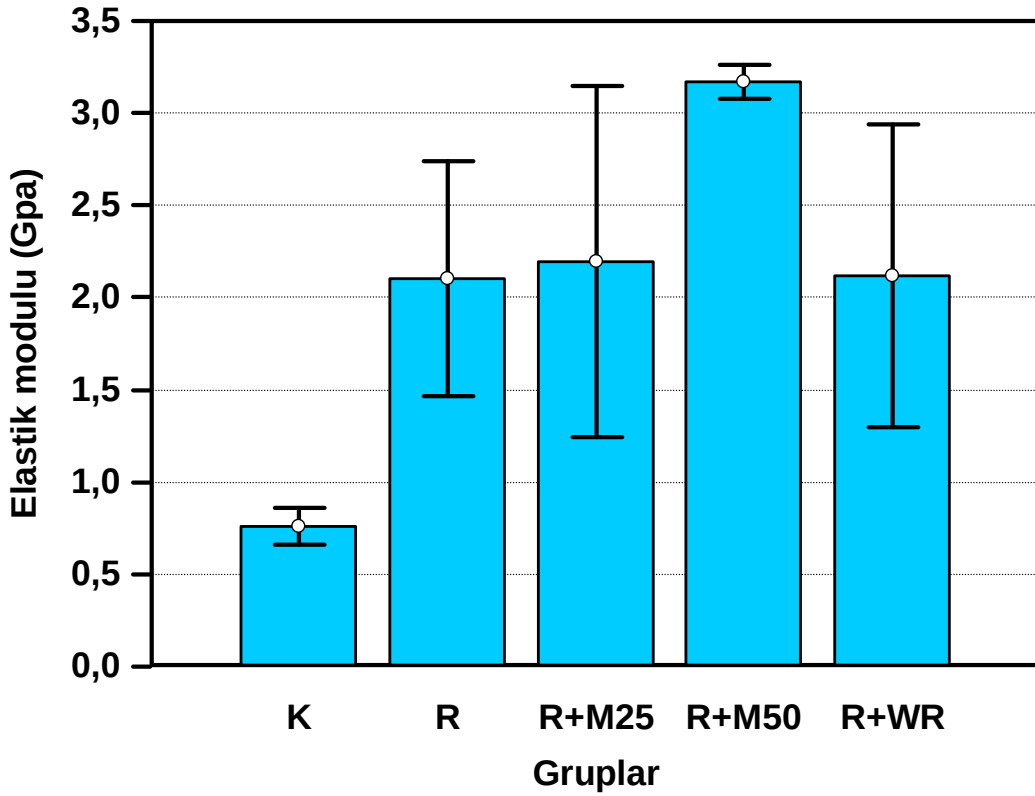
Radyasyon grubundaki sıçanlarda kırılmaya karşı kemikte depolanan ortalama enerji 10.851 $\pm$ 0.516 mJ olarak hesaplandı. Kontrollerde ise bu değer 19.871 $\pm$ 8.518 mJ olarak bulundu. R+M25, R+M50 ve R+WR deney gruplarında kemikte depolanan enerji K grubuna göre azalma, R grubuna göre ise artma göstermiştir. Ancak enerji artışı sadece R+WR grubunda R grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermiştir ($P>0.001$, Şekil 4.9). Melatoninin kemikte depolanan enerji miktarına çok az olumlu katkısı bulunduğ u saptanmıştır.



Şekil 4.9. Dişi sıçanlarda deney ve kontrol gruplarında femurlarda ortalama depolanan enerji miktarı (Ortalama $\pm$ SD). K: Kontrol grubu, R: Radyasyon grubu, R+M25: Radyasyon + Melatonin 25 grubu, R+M50: Radyasyon+Melatonin 50 grubu, R+WR: Radyasyon+Amifostin grubu.

4.3.5. Elastik modül (Young modulus), Gpa

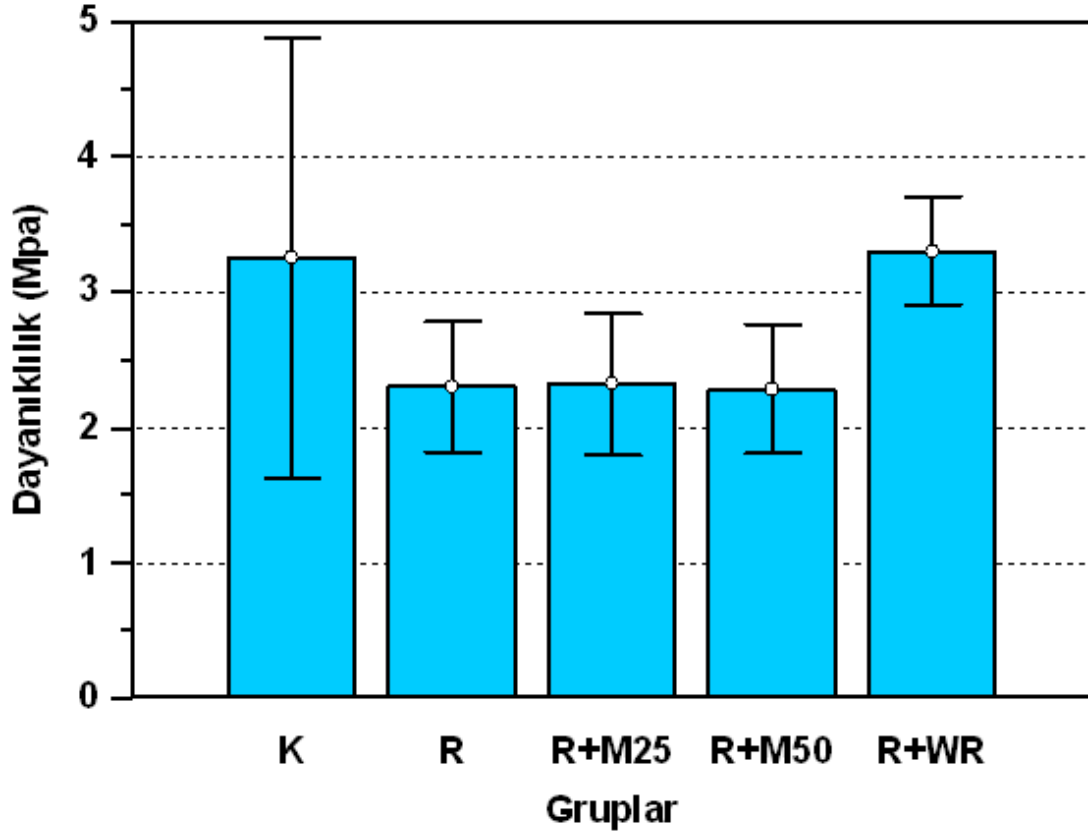
Dişi sıçanlarda Radyasyon grubunda ortalama Young modülü 2.101 ± 0.637 GPa olarak ölçüldü. K grubunda ise bu değer 0.758 ± 0.156 GPa, olarak bulunmuştur. R ve diğer deney gruplarındaki Elastik modül K grubuna göre artmış ve bu artış istatistiksel olarak da anlamlı bulunmuştur ($P < 0.05$, Şekil 4.10). Ayrıca R+M50 grubu R ile de anlamlı artış göstermiştir ($P < 0.05$). Melatonin ve amifostinin elastik modül değerinin artışı üzerine etkili olduğu saptanmıştır.



Şekil 4.10. Dişi sıçanlarda deney ve kontrol gruplarında femurlarda ortalama elastik modül (Ortalama $\pm$ SD). K: Kontrol grubu, R: Radyasyon grubu, R+M25: Radyasyon + Melatonin 25 grubu, R+M50: Radyasyon+Melatonin 50 grubu, R+WR: Radyasyon+Amifostin grubu.

4.3.6. Dayanıklılık, Mpa (Toughness)

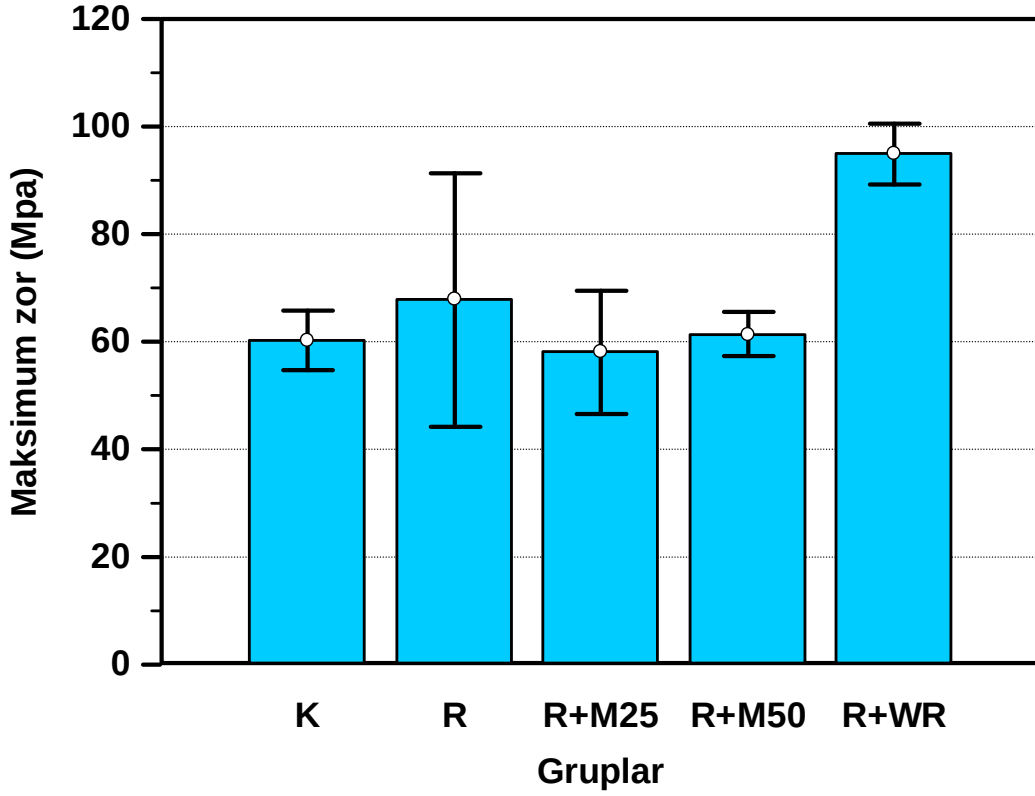
Radyasyon ve kontrol gruplarındaki sıçanlarda dayanıklılık miktarı ölçümleri Şekil 4.11’de verilmiştir. Radyasyon grubundaki sıçanlarda ortalama dayanıklılık 2.307 ± 0.482 Mpa, iken, kontrollerde bu değer 3.253 ± 1.629 Mpa olarak bulundu. Şekilde görüldüğü gibi R+WR grubundaki dayanıklılık miktarı K grubuna çok yakın olmakla birlikte, RW25 ve RW50 grupları ile K grubu, R+WR ile R grubu istatistiksel olarak farklılık göstermiştir ($P < 0.05$). Melatonin uygulanan sıçanlarda melatoninin dayanıklılık miktarının etkisi olmadığı saptanmıştır.



Şekil 4.11. Deney ve kontrol gruplarında femurların ortalama dayanıklılık miktarı (Ortalama±SD). K: Kontrol grubu, R: Radyasyon grubu, R+M25: Radyasyon + Melatonin 25 grubu, R+M50: Radyasyon+Melatonin 50 grubu, R+WR: Radyasyon+Amifostin grubu.

4.3.7. Maksimum zor (Ultimate stress), Mpa

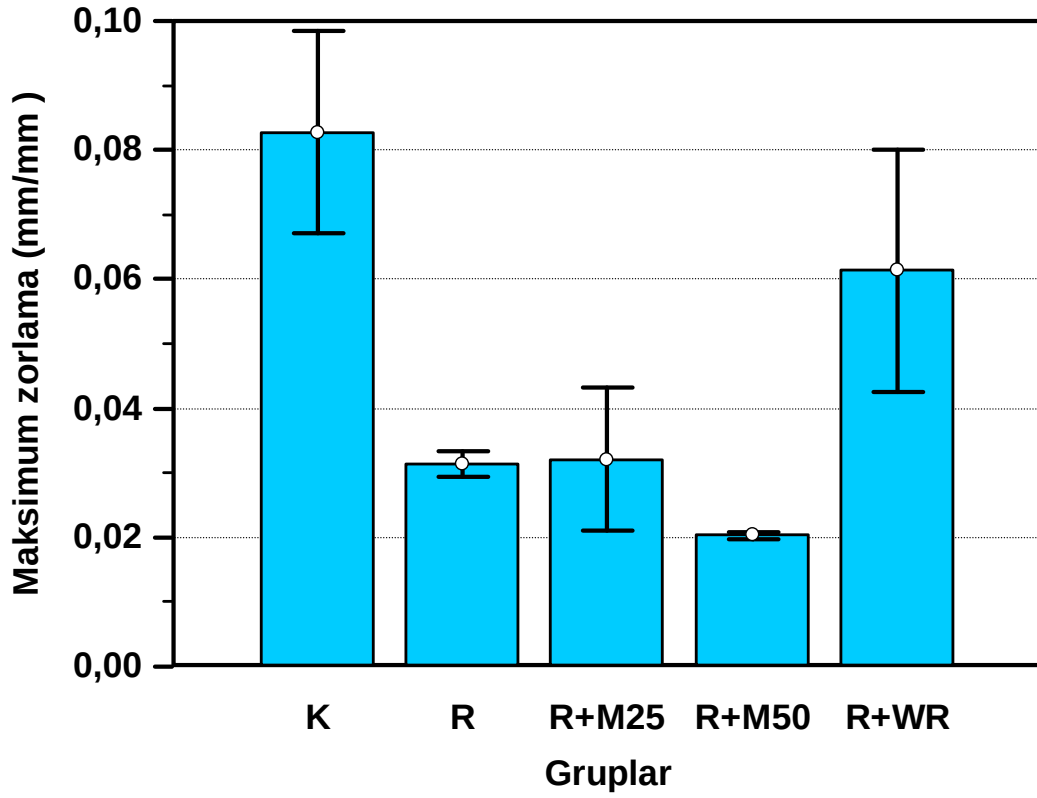
Radyasyon ve kontrol gruplarındaki sıçanlarda maksimum zor miktarı Şekil 4.12’de verilmiştir. Radyasyon grubundaki sıçanlarda ortalama maksimum zor 67.784 ± 23.542 Mpa, iken, kontrollerde bu değer 60.259 ± 5.521 Mpa olarak bulundu. R grubu ile R+WR grubundaki sıçanlarda ortalama maksimum zor değerinin kontrol grubuna göre anlamlı artış gösterdiği belirlenmiştir ($P < 0.01$). Ancak R+M25 ile R+M50 grupları K ile farklılık göstermemiştir. Ayrıca R+M25, R+50 ve R+WR gruplarının R grubu ile farkı istatistiksel olarak önemli görülmemiştir ($P > 0.05$). Ancak radyasyon grubu ve melatonin uygulanan radyasyon gruplarında maksimum zor miktarı anlamlı bir artış göstermemiştir ($P > 0.05$).



Şekil 4.12. Deney ve kontrol gruplarında femurların ortalama maksimum zor miktarı (Ortalama $\pm$ SD). K: Kontrol grubu, R: Radyasyon grubu, R+M25: Radyasyon + Melatonin 25 grubu, R+M50: Radyasyon+Melatonin 50 grubu, R+WR: Radyasyon+Amifostin grubu.

4.3.8 Maksimum zorlama (Ultimate strain) mm/mm

Radyasyon ve kontrol grubundaki sıçanlarda maksimum zorlama miktarı Şekil 4.13’da verilmiştir. Radyasyon grubundaki sıçanlarda ortalama maksimum zorlama 0.031 ± 0.002 mm/mm, iken, kontrollerde bu değer 0.083 ± 0.016 mm/mm olarak bulundu. R, R+M25 ile R+M50 gruplarının maksimum zorlama değeri K grubuna göre önemli ölçüde azalma göstermiştir ($P < 0.01$ ve $P < 0.001$). R+M25 R grubu ile aynı, R+M50 R grubundan daha görülmüştür. R+WR grubunda maksimum zorlama değeri K grubuna göre düşük ancak R grubuna göre ise daha yüksek bulunmuştur.



Şekil 4.13. Deney ve kontrol gruplarında femurların ortalama maksimum zorlama miktarı (Ortalama $\pm$ SD). K: Kontrol grubu, R: Radyasyon grubu, R+M25: Radyasyon + Melatonin 25 grubu, R+M50: Radyasyon+Melatonin 50 grubu, R+WR: Radyasyon+Amifostin grubu.

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada Kobalt-60 cihazı ile tek doz 50 Gy sol bacak ışınlanarak hasar oluşturulmuş dişi sıçanlarda 4 hafta sonunda kemik mineral yoğunluğu, kemik mineral içeriği ve kortikal kemik kesit alanı gibi geometrik ve maksimum deformasyon miktarı, maksimum kuvvet, sertlik, kemikte depolanan enerji, elastik modül, dayanıklılık, maksimum zor ve maksimum zorlama gibi biyomekanik parametrelere melatoninin radyoprotektif etkisi araştırılmıştır. Bu koruyucu etkisinin Amifostinle karşılaştırılması klinik kullanım açısından önemli bilgiler içerdiği gibi kemik kalitesi üzerine melatonin ve amifostinin karşılaştırılması melatonin etkinliğinin kanıtlanması açısından da önemlidir. İyonize radyasyonun terapötik ve tanısal amaçlı kullanımının başta kemik olmak üzere birçok doku ve sistem üzerinde zararlı etkiler meydana getirdiği bilinmektedir (2, 15, 16, 49, 50).

Son yıllarda, özellikle hücresel düzeyde gösterdiği etkiler nedeniyle radyasyonun organizmada yarattığı hasarların önlenmesi çalışmaları hız kazanmıştır. Radyasyona bağlı değişiklikler daha çok osteoradionekrosis in patogenesisinde potansiyel bir rol oynayan kemiğin onarılması ve yeniden şekillenmesi ile ilişkilidir (49).

Hayvanlarda iyonize radyasyonun letal etkileri belirli bir organ veya sistemlerin yetmezliğini ortaya çıkarır. 1 Gy üzerindeki doz spesifik bir radyasyon sendromu yaratır. 1 Gy < Dose < 10 Gy: kemik iliği sendromu, 10 Gy < Dose < 100 Gy: gastro-intestinal sendromlar, daha yüksek dozlar > 100 Gy: merkezi sinir sistemi sendromuna neden olmaktadır (39). Serviks kanseri kadınlarda radyoterapi sonrası oluşan pelvik ağrı, kemik erimesi ve kırıklar, kemik dokusunun metastaz olmasından daha çok radyasyonun yol açtığı sorunlardır (54). Radyasyonun kemik kaybı üzerindeki etkileri çeşitli deneysel çalışmalarla incelenmiş ve bu çalışmalarda farklı uygulama prosedürleri gözlenmiştir. 8-10 Gray yüksek dozlardaki radyasyon kemik iliği hücrelerinde bozukluklar oluşturduğunu saptanmış olmakla birlikte (51). Sıçanlarda tek doz 20 Gy üstü radyasyon uygulanmasından 30 gün sonra kemik mineral içeriğini değiştirdiği belirtilmiştir (95). Bu çalışmada da biyomekanik etkilerin daha yüksek dozlarda oluşacağı göz önüne alınarak daha önce yapılan 30-50 Gy yüksek doz radyasyon uygulanmaları temel alınarak 50 Gy doz kullanılmıştır (65, 95, 96, 97, 98, 101, 102).

Bir organın normal dokusunda belirli bir hasar meydana getirebilmek için gereken ışın dozu, organın ışınlanan hacmi küçüldükçe artmaktadır (51).

Radyasyona bağlı oluşan hasarların patogeneğinde oksidatif stresin önemi kanıtlandıktan sonra, antioksidanların bu alanda koruyucu amaçlı kullanımını cesaretlendirici çok sayıda çalışma yapılmıştır (11, 13, 18, 29, 31, 33). Bu çalışmaların çoğunda, serbest radikal süpürücü kapasiteyi arttırmaya yönelik antioksidan desteği yapılmış ve birçok sistem üzerine faydalı etkileri olduğu gösterilmiştir. Bu sonuçlara rağmen, iyonize radyasyonun tedavisinde antioksidanların klinik kullanımı, çalışmalarda çok fazla değişkenlik gösterdiğinden tartışmalı bir konu olarak kalmıştır (33, 63).

Günümüze dek yapılan çalışmalarda; iyonize radyasyonun canlı doku ve sistemlerde oluşturduğu olumsuz etkilerin ışınlama süresi ve maruz kalınan doza bağlı olarak değişiklik gösterdiği bilinmektedir (51, 67, 103, 104).

Radyasyon grubundaki deneklerin ışınlamayı takiben beslenmeleri azalmış ve ışınlamanın birinci gününden itibaren Melatonin ve Amifostin grubuna ait deneklerin beslenmeleri kısmen bozulmakla ve ara diyetleri ve kontrol ile karşılaştırıldığında önemli kilo kaybı belirlenmiştir. Bu durum daha önceki çalışmalarla uyumlu bulunmuştur (105). 4. Hafta sonunda femur uzunluğunda deney ve kontrol grupları arasında önemli bir fark bulunmamıştır. Buradan yola çıkarak, verilen radyasyonun deney gruplarında gözlenen femur uzunluğu üzerine her hangi bir etkisinin olmadığı sonucuna varılmıştır.

Melatoninin radyasyon hasarını koruyucu etkisi birçok çalışmada değişik doku ve organlarda araştırılmıştır. Ancak radyasyon ile hasar oluşturulmuş kemikteki etkileri ve özellikle de kemiğin biyomekanik özellikleri üzerine etkileri ile ilgili çalışmalar sınırlı sayıdadır (18). Bu çalışmada radyasyonla hasarlanmış kemiklerde maksimum kuvvet, dayanıklılık, maksimum kırılma, zor, zorlama, maksimum gerim gibi biyomekanik parametrelere melatoninin koruyucu etkisi araştırılmıştır. Araştırma kemik gelişimini ve kemik biyomekaniğini etkileyen faktörlerin cinsiyete göre farklılık gösterme olasılığı nedeniyle deney boyunca sadece dişi sıçanlarda yürütülmüştür. Çeşitli kimyasal ve toksik maddelerin *in vivo* etkilerinin belirlenmesinde sıçanlar en çok kullanılan memeli

türüdür. Sıçanların üreme ve bakımlarının kolay olması ve kimyasalların hangi yolla olursa olsun kolayca uygulanabilmeleri tercih edilme nedenlerinin başında gelmektedir. Yine sıçanlar, elde edilen sonuçların insanlara uygulanabilirliği açısından iyi bir model oluşturmaktadırlar (106).

Amerikada çeşitli “ilaç marketleri”nde melatoninin 0.2 mg, 0.3 mg, 0.5 mg, 1 mg, 2.5 mg, 3 mg, 5 mg’ lık preperatları mevcuttur (34). Deneysel çalışmalarda radyasyon hasarına karşı melatonin çok farklı farmakolojik dozları (2,5-250 mg/kg) kullanılmıştır. Farmakolojik çalışmalarda 250 mg/kg melatonin kulanımlarında hiçbir yan etki olmadığı kaydedilmiştir (76). Melatonin dozla bağlantılı olarak immunodepresan etki de göstermektedir. Yüksek farmakolojik dozlarda (> 100mg/kg BW) melatonin antikor oluşumunu baskılamaktadır. Bu yüksek dozlarda melatoninin uzun süre reseptöre bağlı kalması down-regülasyona yol açarak immun supresyona neden olmaktadır (34). Kromozomların korunması üzerine yapılan çalışmada 5 gün boyunca i.p. olarak 2.5 mg/kg (3), doku yaralanmaları ve oksidatif strese ile ilgili olarak 10 mg/kg 4 günlük (13), kemik mineral yoğunluğu çalışmasında 10 gün süreyle 5 mg/kg/gün (18), beyin oksidatif hasarı çalışmasında 5 mg/kg (11) doz kullanılmıştır. Yapılan çalışmalarda melatonin 10 ve 30 mg/kg dozları femurun trabecular alanını ve kalınlığını artırmaktadır. Ayrıca kemiklerde osteoklast aktivitesini inhibe etmektedir (78). Yüksek doz melatoninin (100 mg/kg) DNA hasarını ve lipid peroksidasyonu azalttığı, beyin hücrelerini azaltığı belirtilmektedir (14).

Amifostin, kanser tedavisi sonucu oluşan hasarı önlemeye yönelik radyoterapide kullanılan tek Radyoprotektif ajandır. Bir organik tiyofosfat olan amifostin normal dokularda alkalen fosfataz ile defosforile olarak aktif metaboliti olan tiyole dönüşür. Radyasyon ve sisplatinin etkilerine karşın normal dokuları koruma yeteneğine sahiptir. Amifostinin bu etkisi normal dokularda kapiller fosfataz aktivitesinin yüksek olmasına, pH değerinin yüksekliğine ve tümör dokularının daha iyi damarlanmasına bağlıdır. Bu sebeple serbest tiyol metaboliti normal dokularda tümör dokularına göre daha hızlı oluşur ve normal hücreler tarafından hızla alınır. Son zamanlarda amifostinin radyoprotektif ajan olarak üzerinde sıkça hayvan deneyleri ve klinik çalışmalar yapılmaktadır. Tüm bu çalışmalar amifostinin, radyoterapinin etkinliğini azaltmadan,

normal dokuları radyasyonun zararlı etkilerine karşı koruduğunu göstermiştir (20, 21, 68, 69)

Maksimum zor, maksimum zorlama, elastik modül (Young modül) ve dayanıklılık (toughness) gibi biyomekanik özellikler kemiğin kırılabilirliğini değerlendirmek üzere kullanılan en temel parametrelerdir ve bunlar aynı zamanda kemiğin mukavemeti ile ilgili önemli faktörlerdir. Bu parametreler kemik yapısının biyomekanik bütünlüğünü gösterir ve bunların birlikte değişimi kristalleşme, mineralleşme bozuklukları ve kollojen deformasyonu dahil birçok farklı durumun göstergeleridir (17, 84, 88, 101, 107). Femur kemiklerine ait yapısal parametreler olan maksimum deformasyon, maksimum kuvvet, sertlik ve enerji parametrelerinde radyasyona bağlı olarak sırasıyla %77.85, %33.67, %27,56, %45,39 şeklinde gözlenen azalışların istatistiksel olarak farklı bulunması radyasyonun yapısal parametreleri bozduğuna dair güçlü bir kanıttır. Dayanıklılık, zor ve zorlamada ortaya çıkan farklılık materyal parametrelerin de hasara uğradığının bir göstergesidir.

Sıçanlarda femur ve tibia gibi uzun kemiklerin mekanik özelliklerinin belirlenmesinde en çok tercih edilen yöntemler germe, sıkıştırma ve TPBT'dir. Germe, uzun kemiklere uygun ve uniaksial bir yöntemdir. Sıkıştırma ise vertebra gibi küçük kemiklere uygun, uniaksial (vertikal veya horizontal) ve doğruluğu germe testine göre daha düşük bir yöntemdir. Biyomekanik testlerde dokunun fizyolojik doğasına ve farklı bedensel hareketlerde uzun kemiklerin doğal yaşam sürecinde karşılaştığı yüklemeye en uygun yöntem olması nedeniyle, bu çalışmada TPBT yöntemi tercih edilmiştir (81, 82, 91). Kemiğe ait biyomekanik değişkenler, femur kemiklerine eğme testi uygulanarak ölçülmüştür. Eğme nedeni ile kemiğin bir yüzünde germe, öteki yüzünde ise sıkıştırma stresi gözlemlenir, eğme testinde kırık genellikle germe stresinin olduğu yüzeyde gözlenir. (17). Kemiğin germe stresine karşı kırılmadan gösterdiği direnç dayanıklılığını belirlemektedir (17, 87).

Nyaruba ve ark. (98) sıçanlarda tek doz 40 veya 60 Gy radyasyon uygulanmasında tibianın maksimum yüklenmesi %16 ile %19 arası bir zayıflamaya neden olduğunu belirtmiştir. Literatürdeki bu sonuçlar, çalışmada verilen yüksek doz radyasyona bağlı sonuçlarla uyum göstermektedir.

Bu çalışmada farmakolojik doza uygun olarak bir defa uygulanan iki farklı yüksek doz doz 25 mg/kg ve 50 mg/kg kullanılmıştır. Bu çalışmada uygulanan radyasyon dozunun 4 haftalık uygulamanın, kemikteki longitudinal değişikliklerin izlenmesi açısından yeterli olacağı düşünülmüştür. Dokunun yapısal bütünlüğünü en iyi yansıtan maksimum kırılma kuvveti ile dokunun yapısal özelliklerinin belirlenmesinde kullanılan maksimum deformasyon miktarı, sertlik ve depolanan enerji biyomekanik analizlerde sıklıkla kullanılan önemli parametrelerdir (17, 84). Yapısal parametreler kemiğin kalitesi ve dayanıklılığı (kemik gücü) ile yakından ilişkilidir (99). Melatonin 25 mg/kg uygulanmasıyla birlikte yapısal parametrelerde gözlenen artışlar, radyoprotektif etkinin bu parametreler üzerine olumlu katkı yaptığının bir kanıtı şeklinde değerlendirilmektedir.

Kemik mineral yoğunluğu (KMY) kemikteki santimetre kare başına mineral madde miktarını gösteren bir terimdir. KMY osteoporoz ve kemik hasarının indirekt bir göstergesi olarak, klinik tıpta kullanılmaktadır (100). R grubu sıçanların KMY değerleri kontrol grubuna göre azalma göstermiş olup, istatistiksel olarak da bu azalış önemli bulunmuştur ($P<0.05$). R+M25 ve R+WR gruplarındaki KMY değerleri kontrol ile farklılık göstermediği, ancak R grubuna göre daha yüksek olarak belirlenmiştir. Radyasyonla oluşturulan kemik kaybı modellerinde, KMY düzeylerinin azaldığı bilinen bir sonuçtur (17, 84, 88, 101). Melatonin 25 mg/kg ile Amifostinin 200 mg/kg uygulaması radyasyon kontrol (R) grubu ile karşılaştırıldığında kemik mineral yoğunluğunu olumlu yönden etkilediği saptanmıştır. Bu sonuçlar, Melatonin ve Amifostinin protektif etkisinin göstergeleri olarak düşünülmektedir. Radyasyon hasarının bir göstergesi olarak KMI R grubunda K grubuna göre %3.46 azalmıştır. Melatonin uygulamasıyla KMY R grubuna göre %20.65 artmış. Benzer olarak amifostin uygulamasıyla birlikte KMI ise R grubuna göre %20.85 artmıştır. Bu olumlu etkinin radyasyon öncesi melatonin ve amifostin uygulamasının kemik mineralizasyonu üzerine radyoprotektif etkisinin olduğunu göstermektedir.

Melatonin uygulanan grupların KMI değeri artış gösterirken, 50 mg/kg Melatonin uygulanan grupta KMI değerinde azalma saptanmıştır. Melatonin 25 mg/kg ile Amifostinin 200 mg/kg uygulaması kemik mineral içeriğini olumlu yönden etkilediği saptanmıştır. Ayrıca Radyasyon uygulamasından itibaren 30 günlük sürede R grubu

sıçanların KMI değeri kontrol grubuna göre yeterli düzeyde etkilemediğinden kaynaklandığını düşündürmektedir.

Radyasyonla kemik hasarı oluşturulmuş (R) grubuna ait birçok biyomekanik parametreler (Deformasyon miktarı, maksimum kuvvet, sertlik, kemikte depolanan enerji, Elastik modül ve dayanıklılık) kontrol değerlerinden farklı bulunmuştur. Bu durum radyasyonun kemik kalitesini önemli ölçüde bozduğu görüşünü kuvvetlendirmektedir. Radyasyona bağlı gözlemlenen dejenerasyon kırılmalıkta ki artışı, bozulan kemik bütünlüğünün ve azalan kemik direncini ortaya koymaktadır. Biyomekanik sonuçlara göre radyasyon hasarına bağlı kemik kırılmalığının arttığını, kırılmaya karşı gösterdiği direncin azaldığını ve bu etkilerin kemik kütle kaybını ve kollajen dejenerasyonu önleyen osteoblastlar yüzünden oluştuğu söylenebilir. Maksimum zor, maksimum zorlama, Elastik modül ve dayanıklılık kemik kuvvetinin değerlendirilmesinde ve kemiğin kologen elemanlarıyla çok yakından ilişkili parametrelerdir (17, 84, 88, 101). Biyokimyasal değerlendirmelerde, bu parametreler arasındaki kombine değişimler kemik minerilazyonundaki azalma ve artma dahil çeşitli problemler olduğunun göstergeleridir (17, 101).

Elastik modülün belirlenmesinde, uygulanan yüke karşı kemikte oluşan kuvvet, deformasyon miktarı ve femurun kortikal kesit alanı önemli parametrelerdir (84). Bu nedenle, tüm deney ve kontrol gruplarına ait femurların kortikal kesit alanları, bilgisayarlı tomografi ile görüntülenmiş ve stereolojik yöntemlerden nokta sayma yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır. Bu çalışmada ortalama kortikal kemik kesit alanı açısından deney grupları ile radyasyon ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($P>0.05$). Ancak R+M50 grubu sıçanlardaki kortikal kemik kesit alanı kontrole göre önemli derecede azalma göstermiştir ($P<0.05$).

Dayanıklılık (toughness) kemiğin uygulanan yüke karşı oluşturduğu kuvvet ile deformasyon miktarının bir fonksiyonudur ve yük deformasyon eğrisinin elastik bölgesinin eğiminden hesaplanır (17, 84). Kemiğin kollajen bütünlüğü, kemiğin mineral yoğunluğundan ve içeriğinden bağımsız olarak kemiğin kırılmaya karşı dayanıklılığını belirler (87). Kemiğin materyal özelliklerinin belirlenmesinde kollajen etkisi zor - zorlama eğrisinin altında kalan belirleyicidir. Bu çalışmada zor-zorlama eğrisinin altında kalan alan ölçülmüş ve melatonin gruplarında elde ettiğimiz

dayanıklılık parametresinin kontrol grubuna göre azaldığı ancak bunun istatistiksel bakımından farklı olmadığı saptanmıştır. Amifostinin melatonin gruplarına göre dayanıklılık miktarına olan etkisi daha çok olduğu görülmektedir. Dayanıklılık ve maksimum zor kemiğin kollogen bütünlüğünün bir belirteci olup (17, 101, 107) melatonin ve amifostin uygulanan deney gruplarındaki dayanıklılık değerinin kontrolden istatistiksel olarak farklı olmaması, bu bütünlüğü koruduğunu göstermektedir. Bu da melatoninin az da olsa kemik mineral yoğunluğunu arttırarak etkisini gösterdiğini düşündürmektedir.

Maksimum kuvvet ya da kırılma kuvveti, kemikte kırılma oluşana kadar uygulanan kuvvettir (17). Radyasyon uygulanan grupların (R, R+M25, R+M50, R+WR) ortalama maksimum kuvvet parametreleri K grubuna göre azalmış olup, bu azalış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($P<0.001$). Radyasyon uygulaması sonucu maksimum kuvvet K grubuna göre %33,6 azalmış ancak melatonin uygulamasıyla birlikte %26,65 R grubuna göre artmıştır. Benzer şekilde maksimum kuvvet amifostin uygulamasıyla birlikte %22,37 R grubuna göre artmıştır. Melatonin uygulaması ile gözlenen bu artış amifostin uygulamasıyla da benzer olduğu görülmüştür. R grubunda maksimum kuvvette gözlenen azalma, uygulanan radyasyonun şiddetinin sıçanlarda femurların gücünü azalttığı şeklinde yorumlanabilir. Femurların sertlik özelliklerinin ortaya çıkışında maksimum kuvvetin ve deformasyon miktarının önemi büyüktür (17, 84). Kırılma enerjisi çekilmeye zorlanan malzemelerin kırılanlığı ve esnekliğinin çok önemli bir göstergesidir. Femurlar için kırılmaya kadar absorbe edilen toplam enerji değerleri, maksimum kırılma yükünün ve maksimum deformasyon miktarının bir fonksiyonudur. Maksimum kırılma yükü ve maksimum deformasyon değerleri femurlarca absorbe edilen toplam enerji büyüklüklerini doğrudan değiştirebilirler (17, 84).

Zor-zorlama eğrisinin doğrusal bölümünün eğimi elastik modüle eşittir. Yük-deformasyon eğrisi zor-zorlanma eğrisine dönüştürülebilir ve bu eğrinin eğiminden de elastik modül hesaplanabilir (17, 84). Uygulanan yüke karşı kemikte oluşan kuvvet, deformasyon miktarı ve femurun kortikal kesit alanı elastik modülü belirleyen parametrelerdir (87). Çalışmamızda sıçanlarda radyasyon grubundaki ortalama elastik modül kontrol grubuna göre artmış olarak bulunmuş olup, Melatonin 50 mg/kg elastik

modül üzerine olumlu artış gösterdiği saptanmıştır. Elastik modülü belirleyen temel etkenler kuvvet, kortikal kesit alanı ve deformasyon miktarıdır (84, 88, 107).

Tüm sıçanlarda kemiğin maksimum kırılma kuvveti, sertlik, depoladığı enerji miktarını ve Elastik modülün artması melatoninin kemiğin biyomekanik kalitesini arttırdığını düşündürmektedir. Bu parametrelerin azalması ise kemik dokusundaki kristalleşmenin bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (17, 107). Biyomekanik ve densiometrik parametrelerden elde edilen tüm sonuçlar incelendiğinde, radyasyonun hem yapısal hem de materyal parametreleri üzerine hasarlayıcı etkisinin bulunduğu ve melatonin uygulamasıyla yapısal parametrelerin amifostin ile benzer olarak düzeldiği gösterilmiştir. Melatonin gösterdiği bu koruyucu etkinin kemik yapım-yıkım döngüsünü regüle eden osteoblast ve osteoklasitlerin fonksyonları üzerine oluşan antioksidan etkinin bir sonucu olduğu düşünülmektedir. Elde ettiğimiz bulgularla birlikte melatoninin kemik üzerine etkisi hormonal ve yapısal faktörlerin tümü tarafından belirlenen oldukça karmaşık bir etkiye sahip olduğunu ve bu etkinin uygulanan doza ve süreye sıkı sıkıya bağlı olduğunu düşündürmektedir (84, 88, 101, 107).

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Önemli bir antioksidan olan Melatoninin radyoprotektif etkisinin amifostinle biyomekanik ve dansitometrik yöntemler kullanılarak karşılaştırılması klinik açıdan önemli bilgiler içermektedir ve melatonin etkinliğinin kanıtlanması açısından da önemlidir.

Radyoterapi esnasında normal hücreleri radyasyon hasarından koruyabilmeyi düşünerek planlanan bu çalışmada, ışınlamadan hemen önce melatonin ve amifostin uygulamalarının denekleri radyasyonun olumsuz etkilerinden genel anlamda koruduğu gözlenmiştir.

Bu sonuçlara göre, radyasyon ratlarda biyomekanik parametrelerden; deformasyon miktarında artışa, sertlik, depolanan enerji, dayanıklılık ve Elastik modülde azalmaya neden olarak kemiğin biyomekanik kalitesini azalttığı gözlenmiştir. Kemik yapım-yıkım döngüsü birçok hormon, sitokin ve mineralin görev aldığı oldukça karmaşık bir süreçtir. Ancak, mekanizmanın tam olarak açıklanabilmesi için kemik yapım-yıkım döngüsünde yer alan PTH, kalsitonin veya osteokalsin gibi hormonların biyokimyasal değişimleri incelenmelidir. Bunun yanında, kollojen olgunlaşması sırasında oluşan ve sadece kemik yıkımı sonucu, kollojenin parçalanmasıyla ortaya çıkan, kemiğe spesifik, serum Deoksipiridinolin seviyeleri de biyokimyasal olarak değerlendirilmelidir.

Bu çalışma ile radyasyon hasarına karşı melatoninin kemik biyomekanik parametreleri ile kemik yoğunluğu üzerine radyoprotektif özellik gösterdiği saptanmıştır. Radyasyon hasarına karşı melatonin uygulamasının klinikte güvenle kullanılan amifostin gibi radyoprotektif etki sağladığı ve bu etkinin tedavi kazancını arttırabileceği, kliniğe fayda sağlayabileceği kanısına varılmıştır.

7. KAYNAKLAR

1. Shirazi A, Ghobadi G, Ghazi-Khansari M. A Radiobiological Review On Melatonin: A Novel Radioprotector. J Radiat Res (Tokyo). 2007; 48:263-72.
2. Mercantepe T. Gamma Radyasyonun Neden Olduğu Mide Mokokası Hasarına Karşı Curcumin ve Amifostinin Koruyucu Etkilerinin Işık ve Elektron Mikroskopik Düzeyde İncelenmesi. 2008, Trakya Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksekisans Tezi, 66 sayfa, Edirne (Prof.Dr.Mehmet KANTER).
3. Assayed ME, Abd El- Aty AM. Protection of Rat chromosomes by melatonin against gamma radiation- induced damage. Mutat Res 2009; 677:14-20.
4. Weiss JF and Landauer MR. Protection Against İonizing Radiation By Antioxidant Nutrients And Phytochemicals. Toxicology 2003; 189:1-20.
5. Macchi MM, Bruce JN. Human pineal physiology and functional significance of melatonin. Front. Neuroendocrinol 2004; 25:177-195.
6. Reiter RJ, Tan DX, Burkhardt S and Manchester LC. Melatonin in plants. Nut Rev 2001; 59:286-290.
7. Reiter RJ, Tan DX. Melatonin: an antioxidant in edible plants. Ann. New York Acad Sci 2002; 957:341-344.
8. Palaoğlu S, Beşkonaklı E. Pineal bez ve yaşlanma. Tr J Geriatric 1998; 1:13-18.
9. Koç M., Taysi S, Buyukokuroglu M.E, Bakan N, Melatonin protects rat liver against irradiation-induced oxidative injury. J Radiat Res 2003; 44: 211-215.
10. Vijayalaxmi, Meltz ML, Reiter RJ and Herman TS. Melatonin and protection froin genetic damage in blood and bone marrow: Whole-body irradiation studies in mice. J Pineal Res 1999; 27:221-225.
11. Özdemir D, Uysal, N, Gonen S, Acikgoz O, Sonmez A, Topçu A, Ozdemir N, Duman M, Semin I, Ozkan H. Effect of Melatonin on Brain Oxidative Damage Induced by Traumatic Brain Injury in Immature Rats. Physiol Res 2005; 54:631-637.
12. Roberts JE. Update on the positive effects of light in humans. Photochem Photobiol 2005; 81:490-492.

13. El-Missiry MA, Fayed TA, El-Sawy MR and El-Sayed AA. Ameliorative effect of melatonin against gamma-irradiation-induced oxidative stress and tissue injury. *Ecotox Environ Safety*. 2007; 66:278-286.
14. Ündeğer U, Giray B, Zorlu A.F, Oge K, Bacaran N. Protective effects of melatonin on the ionizing radiation induced DNA damage in the rat brain. *Exp Toxicol Pathol* 2004; 55:379–384.
15. Akkus O, Knott DF, Jepsen KJ, Davy DT, Rimnac CM. Relationship between damage accumulation and mechanical property degradation in cortical bone: Microcrack orientation is important. *J Biomed Mater Res A*. 2003; 65:482-488.
16. Akkus O, Belaney RM, Das, P. Free radical scavenging alleviates the biomechanical impairment of gamma radiation sterilized bone tissue. *J Orthop Res*. 2005; 23:838-845.
17. Burr, DB. The Contribution of the organic matrix to bone's material propertion. *Bone* 2002; 31:8-12
18. Orbak Z, Ertekin V, Yildirim M, Ertekin V, Seven B, Karshoğlu İ. Effect of melatonin on bone mineral density of irradiated rats. *Cell Journal (Yakhteh)* 2011; 12:459-462.
19. Trajkovic S, Dobric S, Jacevic V, Dragojevic-Simic V, Milovanovic Z, Djordjevic A Tissue-protective effects of fulleranol C60(OH)24 and amifostine in irradiated rats. *Coll Surf B* 2007; 58:39-43.
20. Kouvaris JR, Kouloulis VE and Vlahos LJ. Amifostine: the first selective-target and broad-spectrum radioprotector. *Oncologist* 2007; 12:738-47.
21. Guelman LR, Zorrilla Zubilete MA, Rios H and Zieher LM. WR-2721 (Amifostine, Ethylol) prevents motor and morphological changes induced by neonatal X-irradiation. *Neurochem Int* 2003; 42:385-391.
22. Podgorsak EB. Basic Radiation Physics. In: *adiation Oncology Physics: A Handbook for Teachers and Students* (Ed. E.B. Podgorsak). International Atomic Energy Association, Vienna, Austria: 2005; p.1-36.
23. Saha GB. *Physics and radiobiology of nuclear medicine*. 3th Springer- Verlag, New York; 2006.

24. Khan FM The physics of radiation therapy. 4th Edition. Baltimore: Williams and Wilkins. Philadelphia, Pennsylvania. 2010: p.299-306.
25. Belcher PC, Wildsmith JD. Ionizing radiation, In: Belcher PC (Ed.). Clay's Handbook of Enviromental Health. 18th ed. London: E & FN Spon: 1999: p.549-553.
26. Tanwar VS. Recent advances in microwave theory and applications. MICROWAVE International Conference. 21-24 Nov. 2008; p557.
27. Ng KH. Non-Ionizing Radiations–Sources, Biological Effects, Emissions and Exposures. Proceedings of the International Conference on Non-Ionizing Radiation at Uniten ICNIR2003 Electromagnetic Fields and Our Health. 20–22 2003.
28. Moller P, Loft S. Oxidative DNA damage in human white blood cells in dietary antioxidant intervention studies. Am J Clinic Nut 2002; 76:303-310.
29. Guerin P, El Mouatassim S, Menezo Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. Hum Reprod Update 2001; 7:175-89.
30. Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. FASEB J 2003; 17:1195–1214.
31. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int J Biochem Cell Biol 2007; 39:44-84.
32. Demirel C. Kılçksız S. İzci Ay Ö. Gürgül S. Ay ME. Erdal N. N-asetil-sistein'in sıçan kemik iliği hücrelerinde radyasyona bağlı DNA hasarından koruyucu etkisi ve WR-2721 ile karşılaştırılması. Türk Onkoloji Dergisi 2008; 23:120-125.
33. Kılçksız S. Demirel C. Oksidatif stres, radyasyona bağlı hasar ve radyokoruyucu olarak N-asetil-sistein'in potansiyel rolü. Türk Onkol Der 2008; 23:200-207.
34. Şener G. Karanlığın hormonu: Melatonin. Marmara Eczacılık Der 2010; 14:112-120.
35. Neal R, Matthews RH, Lutz P, Ercal N. Antioxidant role of N-acetyl cysteine isomers following high dose irradiation. Free Radic Biol Med 2003; 34:689-95.

36. Weiss JF. Pharmacologic Approaches to Protection against Radiation-induced Lethality and Other Damage. *Environ. Health Perspect.* 1997; 105: 1473-1480.
37. Barker S, Weinfeld M, Zheng J, Li L, Murray D. Identification of mammalian proteins cross-linked to DNA by ionizing radiation. *J Biol Chem* 2005; 280:33826-33838.
38. Demirel C. Kılıksız S. İzci Ay Ö. Gürgöl S. Ay ME. Erdal N. Effect of N-acetylcysteine on Radiation-induced Genotoxicity and Cytotoxicity in Rat Bone Marrow. *J Radiat Res* 2009; 50:43–50.
39. Suntharalingam N, Podgorsak EB, Hendry JH. Basic radiobiology. In *Review of Radiation Oncology Physics: A Handbook for Teachers and Students*. Podgorsak EB (Ed.). Vienna: International Atomic Energy Agency, 2003: p.399-401.
40. Abraham KL. *Histoloji ve hücre biyolojisi patolojiye giriş*. İstanbul: Palme Yayıncılık; 2006: p.533-564.
41. Verma GP. *Fundamentals of Histology*. New Dehli: New Age International Ltd. Pub. 2001: 464 p.
42. Gartner LP Hiatt JL. *Color atlas of histology*. 5nd Ed. Philadelphia: Wolters Kluwer, Lippincott Williams & Wilkins, 2009: p.7-94.
43. Kuehnel W. *Color Atlas of Cytology, Histology, and Microscopic Anatomy*. 4th Ed. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag; 2005: p.100-157.
44. Eşrefoğlu M. *Genel ve özel histoloji*. İstanbul: Pelikan Yayınları; 2004: p.356.
45. Gökçimen A. *Genel Tıbbi Histoloji*, Isparta, SDÜ Basımevi 2006; 250pp.
46. Akay T. *Genel histoloji*. İstanbul: Palme Yayıncılık; 2008: p.126–149
47. Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO. *Basic Histology*. 9th ed. Appleton and Lange, U.S.A. 1998.
48. Angın G. Radyoterapinin Gelişimini Tamamlamış Kemik Dokusunda Meydana Getirdiği Hasarların Sitoprotektif Ajanlar Oldukları Bilinen Amifostin ve Karnitin ile Önlenmesinin Sintigrafik ve Histopatolojik Parametreler ile Değerlendirilmesi. 2008, Trakya Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı, Uzmanlık tezi, 63 sayfa, Edirne, (Doç. Dr. Cem Uzal).

49. Gal TJ, Munoz-Antonia T, Muro-Cacho CA, et al: Radiation effects on osteoblasts in vitro: a potential role in osteoradionecrosis. Arch Otolaryngol 2000; 126:1124–1128.
50. Aitken CJ, Hodge JM, Nishinaka Y, Vaughan T, Yodoi J, Day CJ, Morrison NA, Nicholson GC. Regulation of human osteoclast differentiation by thioredoxin binding protein-2 and redox-sensitive signaling. J Bone Min Res 2004; 19: 2057-2064.
51. Dritschilo A, Shermant DS, Radiation and chemical injury in the bone marrow. Environ Health Perspect 1981; 39:59-64.
52. Gül E. İyonize radyasyon ve güçlü manyetik alan etkisinde kalan rat kemik iliği stem hücrelerinde mikroçekirdek sıklığı. 2005, Cumhuriyet Üniversitesi, Sağlık Bilimler Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 89 sayfa, Sivas, (Doç.Dr. Öztürk Özdemir).
53. Chae HJ, Chae SW, Kang JS, Bang BG, Han JI, Moon SR, Park RK, So HS, Jee KS, Kim HM, Kim HR. Effect of ionizing radiation on the differentiation of ROS 17/2.8 osteoblasts through free radicals. J Radiat Res 1999; 40:323–335.
54. Huh SJ, Kim B, Kang MK, Lee JE, Lim DH, Park W, Shin SS, Ahn YC. Pelvic insufficiency fracture after pelvic irradiation in uterine cervix cancer. Gynecol Oncol 2002; 86:264–268.
55. Jun JH, Lee SH, Kwak HB, Lee ZH, Seo SB, Woo KM, Ryoo HM, Kim GS, Baek JH. N-acetylcysteine stimulates osteoblastic differentiation of mouse calvarial cells. J Cell Biochem 2008; 103:1246-1255.
56. Margulies B, Morgan H, Allen M, Strauss J, Spadaro J, Damron T. Transiently increased bone density after irradiation and the radioprotectant drug amifostine in a rat model. Am J Clinical Oncol 2003; 26:106-114.
57. Margulies BS, Damron TA, Allen MJ. The differential effects of the radioprotectant drugs amifostine and sodium selenite treatment in combination with radiation therapy on constituent bone cells, Ewing's sarcoma of bone tumor cells, and rhabdomyosarcoma tumor cells in vitro. J Orthop Res 2008; 26:1509-1512.
58. Casarett AP. Radiation biology. Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall, Inc; 1968: p.191-195.

59. ICRP. Nonstochastic effects of ionizing radiation. ICRP Publication 41. Ann. ICRP 1984; 14.
60. Cuzzocrea S, Riley DP, Caputi AP, Salvemini D. Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. Pharmacol Rev 2001; 53:135-159.
61. Mercan U. Toksikolojide Serbest Radikallerin Önemi. YYU Vet Fak Derg 2004; 15:91-96.
62. Delibaş N. Özçankaya R. Serbest radikaller. S.D.Ü Tıp Fak Der. 1995; 2:11-17.
63. Sert C, Çelik MS. Radyasyondan koruyucu ajanlar. Türkiye Klin J Med Sci. 1996; 16:292-298.
64. Özalpan A. Temel Radyobioloji. 1. Basım. İstanbul: Haliç Üniversitesi Yayınları, 2001: 218 sayfa.
65. Ohrnell L O, Brånemark R, Nyman J, Nilsson P., Thomsen P. Effects of irradiation on the biomechanics of osseointegration. An experimental in vivo study in rats. Scand J Plast Recons 1997; 31:281-293.
66. Özbey E. Radyasyona dirençli *Deinococcus radiodurans* ve *Escherichia coli*'de Radyasyonun antioksidan sistem üzerine etkisinin araştırılması. İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Yüksek Lisans Tez. 2009, (Doç. Dr. Dilek ASMA).
67. Yaren H, Karayılanoğlu T, Radyasyon ve insan sağlığı üzerine etkileri. TSK Koruyucu Hek Bült 2005; 4:199-208.
68. Santini V, Giles FJ. The potential of amifostine: from cytoprotectant to therapeutic agent. Haematologica 1999; 84:1035–1042.
69. Süzen S, Radioprotective agents in the treatment of cancer and the role of amifostine, J Fac Pharm Ankara Univ 1999; 28:117-128.
70. Shaker JL, Fallon M D, Goldfarb S, Farber J, Attie MF. WR-2721 reduces bone loss after hindlimb tenotomy in rats. J Bone Miner Res 1989; 4:885-90.
71. Reiter RJ, Tan DX, Terron MP, Flores LJ, Czarnocki Z. Melatonin and its metabolites: new findings regarding their production and their radical scavenging actions. Acta Biochim Pol 2007; 54:1-9.

72. am A, Erdoğan MF. Melatonin. AÜ Tıp Fak Derg 2003; 56:103-112.
73. Reiter RJ. Oxidative processes and antioxidant defense mechanisms in the aging brain. FASEB J 1995; 9:526-533.
74. Escames G, Guerrero JM, Reiter RJ, Garcia JJ, Munoz-Hoyos A, Ortiz GG, et al. Melatonin and vitamin E limit nitric oxide-induced lipid peroxidation in rat brain homo-genates. Neurosci Lett 1997; 230:147-150.
75. Şener G, Şehirli AO, Keyer-Uysal M, Arbak S, Ersoy Y, Yeğen BC. The protective effect of melatonin on renal ischemia-reperfusion injury in the rat. J Pineal Res 2002; 32:120-126.
76. Yavuz MN, Yavuz AA, Ulku C, Sener M, Yaris E, Kosucu P, Karslioglu I. Protective effect of melatonin against fractionated irradiation-induced epiphyseal injury. J Pineal Res 2003; 35:288–294.
77. Ostrowska Z, Kos-Kudla B, Marek B, Kajdaniuk D, Stas-zewicz P, Szapska B, Strzelczyk J. The influence of pine-alectomy and melatonin administration on the dynamic pattern of biochemical markers of bone metabolism in experimental osteoporosis in the rat. Neuro Endocrinol Lett 2002; 23 Suppl 1:104-109.
78. Suzuki N, Somei M, Seki A, Reiter RJ, Hattori A. Novel bromomelatonin derivatives as potentially effective drugs to treat bone diseases. J Pineal Res 2008; 45:229-234.
79. Dilek M. Deneysel rat menapoz modelinde melatoninin ROS ve NMDA reseptörleri üzerindeki etkilerinin araştırılması. S.D.Ü. Tıp Fakóltesi, Uzmanlık tezi, Isparta, 2009 (Prof. Dr. H. Baha ORAL).
80. Gürgöl S. Pulsu elektromanyetik alanın deneysel osteoporoz modeli oluşturulmuş sıçanlarda kemik doku üzerindeki etkilerinin biyomekanik, biyokimyasal, dansiyometrik ve histomorfolojik özellikleri yönünden incelenmesi. Mersin Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 2012; Mersin, (Prof. Dr. Nurten ERDAL).
81. Turner CH, Burr DB. Basic biomechanical measurements of bone: a tutorial. Bone 1993;14:595-608.

82. Sevil F. Tavşan femur'unun morfometrik ve biyomekanik özellikleri üzerine ovariyektominin etkileri. Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2006; Mersin, 112 sayfa (Doç. Dr. M. Erkut KARA).
83. Turner CH, Burr DB. Experimental techniques for bone mechanics, in Bone Mechanics Handbook (Cowin, sc, ed.), CRC Press, Boca Raton, FL, 2001; pp. 7/1 - 7/35
84. Turner CH. Biomechanics of bone: determinants of skeletal fragility and bone quality. Osteoporosis Int 2002; 13:97-104.
85. Şener G, Jahovic N, Tosun O, Atasoy BM, Yeğen BC. Melatonin Ameliorates Ionizing Radiation-Induced Oxidative Organ Damage In Rats. Life Sci 2003; 74:563-572.
86. Ögenler O. Kurşun zehirlenmesinin kemiğin elastik özellikleri üzerine etkileri. Mersin Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2004; Mersin, 66 sayfa (Doç. Dr. Ülkü ÇÖMELEKOĞLU).
86. Yılmaz S, Yılmaz E. Effects of melatonin and vitamin E on oxidative-antioxidative status in rats exposed to irradiation. Toxicology 2006; 222: 1-7.
87. Gürgül S. Manyetik alanın kemik formasyonu üzerindeki etkilerinin biyomekanik özellikleri yönünden incelenmesi. Mersin Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2005; Mersin, (Prof. Dr. Nurten ERDAL).
88. Gürgül S, Erdal N, Yılmaz ŞN., Yıldız A, Ankaralı H. Deterioration of bone quality by long-term magnetic field with extremely low frequency in rats. Bone 2008; 42:74–80.
89. Jarvinen TLN, Kannus P, Sievanen H, Jozsa L, Heinonen OJ, Vieno T, Jarvinen M. Effects of remobilization on rat femur are dose-dependent. Scand J Med Sci Sports, 2001;11: 292-298.
90. Tamaki H, Akamine T, Goshi N, Kurata H, Sakou T. Effects of exercise training and etidronate treatment on bone mineral density and trabecular bone in ovariectomized rats. Bone, 1998; 23:147-153.
91. Corwin SC. Bone Mechanics Handbook. 2nd Ed., New York: CRC Press LLC, 2001; 7-1-7-26.

92. Brzoska MM, Majevska K, Moniuszko-Jakoniuk J. Mechanical properties of femoral diaphysis and femoral neck of female rats chronically exposed to various levels of cadmium. *Calcif Tissue Int*, 2005; 76:287-298.
93. Cengiz A. Aydın A. Özkan A. Kişioğlu Y. Müezzinoğlu ÜS. Mekanik testlerin biyomekanikuygulamalar için değerlendirilmesi. 2. Ulusal Tasarım İmalat ve Analiz Kongresi 11-12 Kasım 2010: Balıkesir. 454-461.
95. Hopewell W. Radiation-therapy effects on bone density. *Med Pediatr Oncol* 2003; 41:208 -211.
96. Jacobsson M, Kdlebo P, Tjellstrom A, et al. Bone cell viability after irradiation: an enzyme histochemical study. *Acta Oncol* 1987; 26:463-465.
97. Sugimoto M, Takahashi S, Toguchida et al. Changes in bone after high-dose irradiation: biomechanics and histomorphology. *Bone joint Surg Br* 1991; 73:492-497.
98. Nyaruba MM, Yamamoto I, Kimura H, et al. Bone fragility induced by X-ray irradiation in relation to cortical bone-mineral content. *Acta Radiol* 1998; 39:43-46.
99. Ritchie RO, Koester KJ, Ionova S, Yao W, Lane NE, Ager, JW. Measurement of the toughness of bone: a tutorial with special reference to small animal studies. *Bone* 2008; 43:798–812.
100. Akpolat, V. Osteoporoz tanısında kullanılan kemik mineral yoğunluğu ölçüm yöntemleri. *Dicle Tıp Der* 2008; 35:216-220.
101. Demirel C, Kilciksiz S. Gurgul S. Erdal N, Yildiz A. N-Acetylcysteine Ameliorates gamma-Radiation-induced Deterioration of Bone Quality in the Rat Femur. *J Int Med Rese* 2011; 39:2393-2401.
102. Guha C, Sharma A, Gupta S, Alfieri A, Gorla GR, Gagandeep S, Sokhi R, Roy-Chowdhury N, Tanaka KE, Vikram B, and Roy-Chowdhury J. Amelioration of radiation-induced liver damage in partially hepatectomized rats by hepatocyte transplantation; *Cancer Res* 1999; 59:5871-5874.
103. Mansour HH, Hafez HF, Fahmy NM, Hanafi N. Protective effect of N-acetylcysteine against radiation induced DNA damage and hepatic toxicity in rats. *Bioch Phar* 2008; 75:773-780.

104. Kaya A., İyonize radyasyonun biyolojik etkileri. Dicle Tıp Der 2002; 29:65-75.
105. Erikoğlu M, Radyasyon enteritinde lifli besinlerin koruyucu etkisi. Gen Tıp Deri 2001; 11:93-97.
106. SOT. Animals in Research. The Importance of Animals in the Science of Toxicology The Society of Toxicology, Reston, VA, 2006. 12 p. (www.toxicology.org).
107. Erdal N, Gurgul S, Kavak S, Yıldız A, Emre M. Deterioration of bone quality by streptozotocin (STZ) induced type 2 diabetes mellitus in rats. Biol Trace Element Res 2011; 140:342-353.

8. ÖZGEÇMİŞ

02.06.1982 yılında Diyarbakır ilinde doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini bu ilde tamamladıktan sonra Gaziantep Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Fizik Mühendisliği Bölümünü 2001-2008 öğretim yılında bitirdi. 2010 yılında Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalında yüksek lisans öğrenimine başladı. Yüksek lisans eğitimini halen burada sürdürmektedir.

Zelal Ünlü Çakır

9. EKLER

EK-1

GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU UNIVERSITY OF GAZİANTEP, ANIMAL EXPERIMENTS LOCAL ETHICS COMMITTEE GAZİANTEP-TÜRKİYE						
ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYI						
BAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL NO ARAŞTIRMA ADI	Gama Radyasyonla Hasarlanmış Kemiklerde Melatonin'in Biyomekanik Parametreler Üzerine Etkileri				
	SORUMLU ARAŞTIRICI UNVANI/ADI/BİRİMİ	Yrd.Doç.Dr.Can DEMİREL G.Ü.Tıp Fak.Biyofizik A.D.				
	DİĞER ARAŞTIRICILARIN UNVANI/ADI/BİRİMİ	Zelal ÇAKIR Sağ. Bil. Ens. Biyofizik A.D.				
	KOORDİNATOR MERKEZ DESTEKLEYİCİ					
DEĞERLENDİRİLEN İLGİLİ BELGELER	Belge Adı	Tarih				
	DENEY HAYVANLARI KULLANIM SERTİFİKASI	Var/ 02-03 Mayıs 2002				
	BAŞVURU TAAHHÜTNAMESİ	Var/ 12.01.2011				
ÇALIŞMA ESASI	İYİ LABORATUVAR UYGULAMALARI KLAVUZU					
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 02.2011-03		Tarih: 23.02.2011			
	Üniversitemiz Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı öğretim üyesi Yrd.Doç.Dr.Can DEMİREL'in sorumluluğunda yapılması tasarlanan ve yukarıda bilgileri verilen hayvan deneyleri araştırma amaçlı başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak 23.02.2011 tarihli Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul toplantısında incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üyelerinin oy birliği ile karar verilmiştir.					
ETİK KURUL ÜYELERİ						
Unvanı /Adı/ Soyadı Etik Kurul Üyeliği	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki (*)	Katılım (**)	İmza
Prof.Dr.Celalettin CAMCI Başkan	Tıbbi Onkoloji	Tıp Fakültesi Tıbbi Onkoloji A.D.	E	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Prof.Dr.A.Tuncay DEMİRYUREK Başkan Yardımcısı	Tıbbi Farmakoloji	Tıp Fakültesi Farmakoloji A.D.	E	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Prof. Dr.Şükran YAGCI YUCEL Üye	Biyoloji	Fen-Ed.Fak. Biyoloji Bölümü	K	☐ E ☒ H	☐ E ☒ H	Katılmadı
Prof. Dr.Ahmet ERBAĞCI Üye	Üroloji	Tıp Fakültesi Üroloji A.D.	E	☐ E ☒ H	☐ E ☒ H	Katılmadı
Yrd.Doç.Dr.Neşe KIZILKAN Üye/Eğitim Sorumlusu	Anatomi	Tıp Fakültesi Anatomi A.D.	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Yrd.Doç.Dr.Ayhan ERALP Üye	Histoloji ve Embriyoloji	Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji A.D.	E	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Doç.Dr.Oral SÖKÜCÜ Üye/Raportör	Diş Hekimliği	Diş Hekimliği Fakültesi	E	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Avukat Muret GÜNERİ Üye	Avukat	Serbest Avukat	E	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
M.Celal ÖZSÖYLER Üye	Veteriner Hekim	Sivil Üye	E	☐ E ☒ H	☐ E ☒ H	Katılmadı
* Araştırma ile İlişki ** Toplantıda Bulunma						