



**T.C
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**RADYOTERAPİ UYGULANMIŞ RATLARDA
AMİFOSTİN, MELATONİN VE N-ASETİLSİSTEİN'İN
UTERUS ÜZERİNDEKİ KORUYUCU ETKİLERİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI**

**Uğur ŞEKER
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Doç.Dr. Ayfer AKTAŞ**

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**DİYARBAKIR
2013**

**T.C
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**RADYOTERAPİ UYGULANMIŞ RATLARDA
AMİFOSTİN, MELATONİN VE N-ASETİLSİSTEİN'İN
UTERUS ÜZERİNDEKİ KORUYUCU ETKİLERİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI**

**Uğur ŞEKER
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Doç.Dr. Ayfer AKTAŞ**

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**DİYARBAKIR
2013**

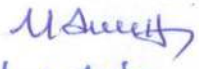
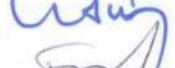
Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (DÜBAP) Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir.
(Proje No:12-TF-99)

T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MÜDÜRLÜĞÜ

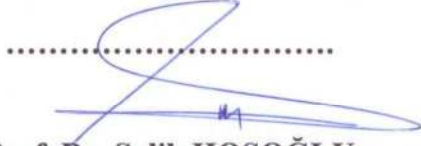
“Radyoterapi Uygulanmış Ratlarda Amifostin, Melatonin ve N-asetilsistein’in Uterus Üzerindeki Koruyucu Etkilerinin Karşılaştırılması” isimli Yüksek Lisans Tezi 21 Haziran 2013 tarihinde tarafımızdan değerlendirilerek başarılı bulunmuştur.

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Ayfer AKTAŞ
Tezi Teslim Eden : Uğur ŞEKER

Jüri Üyesinin;

	Ünvanı	Adı Soyadı	İmza
Başkan	: Prof. Dr.	Yusuf NERGİZ	
Üye	: Prof. Dr.	Murat AKKUŞ	
Üye	: Prof. Dr.	M. Aydın KETANİ	
Üye	: Prof. Dr.	Engin DEVECİ	
Üye	: Doç. Dr.	Ayfer AKTAŞ	

Yukarıdaki imzalar tasdik olunur.


.....
Prof. Dr. Salih HOŞOĞLU
Dicle Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim boyunca bütün birikimlerini paylaşıp tezimin şekillenmesinde katkıda bulunan başta Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Yusuf NERGİZ ve tez danışmanım Doç. Dr. Ayfer AKTAŞ hocalarım olmak üzere bölümümüz saygıdeğer öğretim üyeleri Prof. Dr. Murat AKKUŞ, Prof. Dr. Engin DEVECİ, Doç. Dr. Sevdâ SÖKER ve Uz. Dr. Dilek YAVUZ'a ayrıca teknik personeller Vahdettin ERGÜN ile Süreyya KAÇAR'a

Tez çalışmamız için hazırladığımız 12-TF-99 nolu projeyle bize desteğini sunan DÜBAP'a ve deneysel çalışmamız aşamasında yardımlarından ötürü DÜHADEK kuruluna ve bütün imkanlarını seferber eden Dicle Üniversitesi Prof. Dr. Sabahattin PAYZIN Sağlık Bilimleri Araştırma ve Uygulama Merkezi'ne

Projemizde yer alan, her türlü tecrübe ve bilgisini bana aktaran Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı saygıdeğer hocam Prof. Dr. M. Aydın KETANİ ve Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. S. Burhaneddin ZİNCİRCİOĞLU hocam'a

TUNEL Assay uygulamalarında bana imkan sağlayıp tecrübelerini paylaşan Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. İsmail ÜSTÜNEL, Prof. Dr. Necdet DEMİR hocalarım ve Arş. Gör. Berna SÖZEN'e

Lisansüstü eğitim sürem boyunca her türlü desteği ve motivasyonu sağlayan Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim dalı öğretim üyeleri Doç. Dr. Ümüt CİRİT ve Doç. Dr. Muzaffer TAŞ hocalarım'a

Yaşamımın her alanında şahsıma olan desteğini, güvenini ve sabrını eksiltmeyen pek sevgili babam Osman ŞEKER, annem Gülhan ŞEKER ve abim Yrd. Doç. Dr. Ali ŞEKER'e ayrıca çok değerli arkadaşlarıma ve yakınlarıma teşekkür ederim.

Uğur ŞEKER

2013 / Haziran

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa No
TEZ ONAY SAYFASI	I
TESEKKÜR	II
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	III
ŞEKİLLER DİZİNİ	V
TABLolar DİZİNİ	IX
GRAFİKLER DİZİNİ	IX
KISALTMALAR DİZİNİ	X
ÖZET	XII
ABSTRACT	XIII
1.GİRİŞ ve AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	2
2.1. Radyoterapi	2
2.1.1. İyonize Işınların Etki Mekanizması	3
2.1.2. Cobalt 60 Tedavi Aygıtı	5
2.1.3. Radyoterapiye Bağlı Normal Doku Yaralanmaları	6
2.1.4. Serbest Radikaller	7
2.1.5. Radyoprotektörler	8
2.1.5.1. Amifostin	10
2.1.5.2. Melatonin	11
2.1.5.3. N-asetilsistein	12
2.2. Uterus	14
2.2.1. Rat Uterus Anatomisi	14
2.2.2. Rat Uterus Embriyolojisi	14
2.2.3. Rat Uterus Histolojisi	15
2.2.3.1. Endometriyum	15
2.2.3.2. Miyometriyum	17
2.2.3.3. Perimetriyum	17
2.2.4. Uterus Arteriyel, Venöz, Lenfatik Dolaşım ve Uterusun İnnervasyonu	17
2.2.5. Genital Siklus	18

2.2.5.1. Ratlarda Östrus Siklusu	18
3. MATERYAL VE METOD	21
3.1. Deney Hayvanları ve Temini	21
3.2. Deneyin Düzenlenmesi	21
3.3. Deneyin Sonlandırılması	23
3.4. Histolojik Takip ve Boyama	23
3.5. Hematoksilen-Eozin boyama protokolü	24
3.6. Periyodik asit Schiff boyama protokolü	24
3.7. Masson trikrom boyama protokolü	25
3.8. TUNEL Assay protokolü	25
3.9. İstatistiksel Analiz	26
4. BULGULAR	28
4.1. H&E, Masson Trikrom ve PAS Bulguları	28
4.2. TUNEL Assay Bulguları ve İstatistiksel Analiz	40
5.TARTIŞMA	50
6.SONUÇ	55
7.KAYNAKLAR	56
8. ÖZGEÇMİŞ	69

ŞEKİLLER DİZİNİ

		Sayfa No
Şekil 1	Radyasyonun Direkt ve İndirekt Etkisinin Şematik Görünümü	4
Şekil 2	Suyun Radyolize oluşu	4
Şekil 3	Dicle Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalında yer alan ALCYON II Teleterapi cihazı	6
Şekil 4	Melatonin biyokimyasal sentezi	11
Şekil 5	N-asetilsisteinin yapısı	12
Şekil 6	Rat uterusunun genel görüntüsü	14
Şekil 7	Uterusun Histolojik Görüntüsü	15
Şekil 8	Endometriyumun tabakaları	16
Şekil 9	Endometriyum lümeninin renklendirilmiş taramalı elektron mikroskopi görüntüsü	16
Şekil 10	İnsan ve Ratta uterusun kanlanması şematik gösterimi.	18
Şekil 11	Anestezi altına alınan dişi ratlara ışına yapılması.	23
Şekil 12	Pozitif sinyal veren luminal epitel sayımı.	26
Şekil 13	Pozitif sinyal veren stromal hücrelerin sayımı.	27
Şekil 14	Pozitif sinyal veren uterinal bez hücrelerinin sayımı.	27
Şekil 15	Kontrol grubu rat uterusu kesiti	28

Şekil 16	Kontrol grubu rat endometriyum kesitinde normal yapıda izlenen endometriyum	28
Şekil 17	Kontrol grubu rat endometriyumu	29
Şekil 18	Amifostin grubu rat uterus kesiti.	29
Şekil 19	Amifostin grubu rat uterus endometriyumunda normal görünüm	30
Şekil 20	Amifostin grubu rat endmetriyumu.	30
Şekil 21	Melatonin grubu rat uterusunun total kesiti.	31
Şekil 22	Melatonin grubu rat uterus kesiti.	31
Şekil 23	Melatonin grubu endometriyumu.	32
Şekil 24	N-asetilsistein grubu rat endometriyum görünümü.	32
Şekil 25	N-asetilsistein grubu rat endometriyum görüntüsü.	33
Şekil 26	N-asetilsistein grubu rat endometriyumu.	33
Şekil 27	Radyasyon grubu rat uterus kesiti.	34
Şekil 28	Radyasyon grubu rat uterus kesiti.	34
Şekil 29	Radyasyon grubu rat uterus kesiti.	35
Şekil 30	Radyasyon+Amifostin grubu rat uterus kesiti.	35
Şekil 31	Radyasyon+Amifostin grubu rat uterus kesiti.	36

Şekil 32	Radyasyon+Amifostin grubu rat uterus kesiti.	36
Şekil 33	Radyasyon+Melatonin grubu rat uterus kesiti.	37
Şekil 34	Radyasyon+Melatonin grubu rat uterusunun total kesiti.	37
Şekil 35	Radyasyon+Melatonin grubu rat uterus kesiti.	38
Şekil 36	Radyasyon+N-asetilsistein grubu rat endometriyum kesiti.	38
Şekil 37	Radyasyon+N-asetilsistein grubu rat endometriyum kesiti.	39
Şekil 38	Radyasyon+N-asetilsistein grubu rat uterus kesiti.	39
Şekil 39	Kontrol grubu luminal epitel ve stromal hücrelerde TUNEL Assay.	41
Şekil 40	Kontrol grubu uterinal bez hücrelerinde TUNEL Assay.	41
Şekil 41	Amifostin grubu uterinal bez hücrelerinde ve stromal hücrelerde TUNEL Assay.	42
Şekil 42	Amifostin grubu uterinal bez ve stromal hücrelerde TUNEL Assay.	42
Şekil 43	Melatonin grubu luminal epitel hücrelerinde TUNEL Assay.	43
Şekil 44	Melatonin grubu stromal hücrelerde ve uterinal bezde TUNEL Assay	43
Şekil 45	N-asetilsistein grubu luminal epitel ve stromal hücrelerde TUNEL Assay.	44
Şekil 46	N-asetilsistein grubu uterinal bez hücreleride TUNEL Assay.	44
Şekil 47	R grubu uterus kesitinde luminal epitel ve stromal hücrelerde TUNEL Assay.	45

Şekil 48	Radyasyon grubu uterinal bez ve stromal hücrelerde TUNEL Assay.	46
Şekil 49	Radyasyon+Amifostin grubu luminal epitel, stromal ve uterinal bez hücrelerinde TUNEL Assay.	47
Şekil 50	Radyasyon+Amifostin grubu stromal ve uterinal bez hücrelerinde TUNEL Assay.	47
Şekil 51	Radyasyon+Melatonin grubu luminal epitel ve stromal hücrelerde TUNEL Assay.	48
Şekil 52	Radyasyon+Melatonin grubu uterinal bez ve stromal hücrelerde TUNEL Assay.	48
Şekil 53	Radyasyon+N-asetilsistein grubu luminal epitel ve stromal hücrelerde TUNEL Assay.	49
Şekil 54	Radyasyon+N-asetilsistein grubu uterinal bez ve stromal hücrelerde TUNEL Assay.	49

TABLÖLER DİZİNİ

		Sayfa No
Tablo 1	Serbest Radikallerin Sınıflandırılması.	8
Tablo 2	Deney düzeneğinin şematik görüntüsü.	21
Tablo 3	TUNEL pozitif sinyal yüzdeleri.	40

GRAFİKLER DİZİNİ

		Sayfa No
Grafik 1	TUNEL pozitif sinyal yüzdelerinin grafiksel görünümü.	40

KISALTMALAR DİZİNİ

WHO	Dünya Sağlık Örgütü
RT	Radyoterapi
AI	Apoptotik İndeks
DNA	Deoksiribo nükleik asit
Gy	Gray
cGy	Santi Gray
Co⁶⁰	Kobal60
Cs-137	Sezyum 137
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
SI	Uluslar arası Sistem
OH	Hidroksil Radikali
HOO[•]	Hidroperoksil Radikali
O₂[•]	Süperoksit
K	Kontrol
R	Radyasyon
NAC	N-asetilsistein
M	Melatonin
WR	WR2721 / Amifostin
Amifostin	etanetiyol, 2-(3-aminopropil) amino-, dihidrojen fosfat (ester)
HIOMT	Hidroksindole-O-metil transferaz
KOAH	Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı
MDA	Malondialdehit
GSH	Glutatyon
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling
H&E	Hematoksilen-Eozin
PAS	Periyodik asit Schiff
i.m.	Kas içi enjeksiyon
i.p.	Periton içi enjeksiyon
LH	Luteizan Hormon
FSH	Folikül Stimulan Hormon

dpc	Days post coitum / koitumdan sonraki gün sayısını belirtir
TBI	Tüm vücut ışıması
PCNA	Proliferatif hücre çekirdek antijeni
TS	Theiler Stage
AP	Alkalen fosfataz

ÖZET

Radyoterapi uygulanmış ratlarda amifostin, melatonin ve N-asetilsistein'in uterus üzerindeki koruyucu etkilerinin karşılaştırılması

Gerek radyoterapi uygulamalarının temelini oluşturması bakımından gerekse radyasyona kazara maruz kalma durumunda iyonize radyasyonun hücre üzerinde DNA ve doku yaralanmasına neden olmaktadır. Kanser tedavisinde radyoterapi amaçlı kullanılan gama radyasyonu, tümör dışı alanda normal doku yaralanması olarak adlandırılan hasarlar oluşturmaktadır. Akut ve kronik yönde çeşitli semptomlarla kendini gösteren bu durum için çeşitli radyoprotektif ajanlar geliştirilmiştir. Pelvik bölge gama ışıması uygulamalarında uterus üzerinde mikroskobik düzeyde gerçekleştirilmiş çalışma ve araştırmalar kısıtlıdır.

Çalışmada 56 adet Sprague Dawley cinsi yetişkin dişi rat kullanılmıştır. Ratlar her grupta 7 hayvan olacak şekilde 8 gruba ayrıldı. Kontrol, amifostin, N-asetilsistein ve melatonin dışında kalan 4 denek grubuna (Radyoterapi, Radyoterapi + Amifostin, Radyoterapi + N-asetilsistein, Radyoterapi + Melatonin) abdomino-pelvik bölgeye tek fraksiyonluk 10 Gray (Gy) gama radyasyonu ışıması yapıldı. Tedavi gruplarına ışımadan 15 dk önce ilgili ajanlar i.p. şekilde enjekte edildi. Işımadan 48 saat sonra deney bitiminde tüm gruplardan alınan uterus dokuları rutin parafin takibine alındı. Elde edilen parafin kesitlere H&E, PAS, Masson trikrom ve TUNEL Assay protokolleri uygulanarak ışık mikroskobunda değerlendirme ve sayım işlemleri gerçekleştirildi.

Çalışma sonucu 10 Gy tek fraksiyonluk ışıma yapılan deney hayvanlarında uterus üzerinde akut birçok dejeneratif değişiklik ve apoptotik indekste artış izlenmişken ışımadan 15 dk önce amifostin, melatonin ve N-asetilsistein uygulanan gruplarda iyonize radyasyondan çeşitli oranlarda korunmuşluk tespit edilmiştir.

Çalışmamız kanser tedavisi gören kadınlarda pelvik bölge ışımalarında uterusun korunmasına yönelik deney hayvanı modeli niteliğindedir. Çalışmamız sonucunda pelvik bölge ışımasının uterus üzerinde akut evrede morfolojik hasara ve yoğun DNA fragmantasyonuna neden olabileceğini ayrıca amifostin ve N-asetilsistein ajanlarının bu etkiyi indirgemedi kullanılabiliirliğinin mümkün olduğunu ancak en ideal protektif profilin melatoninle sağlanabildiği sonucuna varıldı.

Anahtar kelimeler: Radyoterapi, Amifostin, Melatonin, N-asetilsistein, Uterus, TUNEL Assay

ABSTRACT

Comparison of the protective effects of amifostine, melatonin and N-acetylcysteine usage on uterus of radiotherapy induced rats

Although it forms the basis of radiotherapy applications on the other hand exposing to radiation accidentally, ionising radiation causes DNA breaks on cells and tissue injuries. Gamma radiation from radiotherapy which used treatment of cancer, generate damages normal tissues out of tumoral region. Some radioprotective agents created for this case that indicating itself with acute and chronic symptoms. Gamma radiation applications in the uterus and pelvic region studies and researches carried out at the microscopic level are limited.

56 adult female Sprague Dawley rats were used in this study. The rats were divided into 8 groups and 7 animals in each group. Control, amifostine, N-acetylcysteine and melatonin group outside the four subjects (radiotherapy, radiotherapy + Amifostine, Radiotherapy + N-acetylcysteine, Radiotherapy + melatonin) single fraction abdominopelvic region 10 Gray (Gy) radiation, gamma radiation was performed. Single fraction 10 Gray (Gy) gamma radiation induced abdominopelvic region of 4 groups (radiotherapy, radiotherapy + Amifostine, Radiotherapy + N-acetylcysteine, Radiotherapy + melatonin) except control, amifostine, N-acetylcysteine and melatonin. Related agents are injected intraperitoneally to the treatment groups 15 minutes previously radiation application. 48 hours after radiation application, routine paraffin monitoring performed at the end of experiment. H&E, PAS, Masson Trichrome and TUNEL Assay protocols applied to the sections taken from paraffin embedded samples. Evaluations and countings are carried on light microscopy.

At the end of research, various degenerative changes and increase of apoptotic index is observed in research animals uterus during the acute phase. Various protective effects are detected in groups which amifostine, melatonin and N-acetylcysteine induced 15 minutes previously radiation application. Our research is an experimental animal model for the protection of uterus in women whom undergoing treatment for cancer of the uterus and pelvic region. Although it is observed amifostine and N-acetylcysteine agents reduces degenerative effects of pelvic radiation applications which can be classified as morphologically damage and dense DNA fragmentation, optimum protective profile is obtained with melatonin.

Key words: Radiotherapy, Amifostine, Melatonin, N-acetylcysteine, Uterus, TUNEL Assay

1.GİRİŞ ve AMAÇ

Dünya Sağlık Örgütü'ne (WHO) bağlı GLOBOCAN kanser araştırma veritabanının bilgilerine göre ülkemiz Türkiyenin de içinde bulunduğu 184 ülkede yapılan araştırmalar sonucunda 2008 yılında 12.7 milyon yeni kanser vakası oluşmuş ve 7.6 milyon insan kanserden hayatını kaybetmiştir. Akciğer, meme, kolorektal ve mide en çok teşhis edilen kanser türleri olup vakaların %40 ını oluşturmaktadır. Akciğer, mide, karaciğer, kolorektal ve meme kanserleri kansere bağlı ölümlerin yarısından fazlasını oluşturmaktadır. Ayrıca vakaların 56% ve ölümlerin 64%'ü ülkemizde içine alan ekonomik olarak gelişmekte olan ülkelerde görülmüştür. (1)

Kanserle mücadelenin en etkili yöntemlerinden biri radyasyon tedavisidir ayrıca tahminen kanser tedavisi gören hastaların yarısı tedavi süresi boyunca radyoterapi görmektedir (2). Radyasyon tedavisinin uygulanmasında tümoral dokunun yanı sıra normal dokuların etkilenmesi kaçınılmaz bir durumdur (3-4). Tedavi gören hastalar normal doku yaralanması olarak bilinen ve kısa bir süre içerisinde normal doku üzerindeki yara iyileşmesindeki aksamalar ve hücre ölümüne bağlı olarak çeşitli semptomlarla kendini gösteren rahatsızlıklar geçirmektedir (5). Radyoterapiye veya kazara radyasyon ışımasına maruz kalan kişilerde hücre ölümünde apoptoz ve nekrozun varlığı, uygulanan doz ile apoptotik indeks (AI) arasında bir bağlantı olduğu ayrıca radyasyonun hücre ölümü mekanizmasında oluşturduğu DNA kırıkları ve mitokondriyona bağlı şekilde etki gösterdiği bilinmektedir. Bu etkilerin indirgenmesinde çeşitli sentetik radyoprotektif ajanlar geliştirilmiştir. Radyasyon ışımasını takiben hücrede serbest radikaller olarak bilinen moleküllerin oluşması ve serbest radikalleri indirgeyen özellikteki antioksidanların kullanımıyla yapılmış deneysel çalışmalarda antioksidanların sentetik radyoprotektiflerle paralel özellikler göstererek DNA üzerinde iyonizan radyasyonun oluşturduğu oksidatif hasarı indirgediği sonucuna varılmıştır (6-8).

Çalışmamızda radyoprotektif bir ajan olan amifostin (WR-2721), bir antioksidan olan melatonin hormonu, sülfidril içeren ve daha önce antioksidan özelliği çeşitli çalışmalarla ıspatlanmış olan N-asetilsistein'in insan uterusu üzerinde radyoterapiye bağlı oluşacak hasar ve DNA fragmentasyon indeksine olan etkilerini deney hayvan modeli aracılığıyla karşılaştırmayı amaçlamaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Radyoterapi

Radyoterapi kanser tedavisinde en çok başvurulan tedavi yöntemlerinden biridir (9). Kanser hastalarının %50-60'ı, cerrahi ve/veya kemoterapi tedavisi yanında ışın tedavisi (Radyoterapi) görmektedir (10). İnvazif kanser tanısı konulan hastaların %70'i loko-rejyonal, %30'u ise metastatik evrededir. Lokorejyonel evrede tanı konulan hastaların yarısından fazlasında kür elde edilirken, diğer hastalarda nüks görülmektedir. Radyoterapi (RT) esas olarak 2 hedefe yöneliktir. Hastalığı tedavi etmek amacıyla küratif olarak, veya hastalığı tümünden yok etmenin mümkün olmadığı durumlarda hastalığın etkilerini indirmek ve yaşam süresini uzatmak amacıyla palyatif olarak kullanılır (11).

Bir atom veya molekülden bir veya daha çok elektronun kopartıldığı işleme iyonizasyon, ortam ile etkileştiğinde direkt veya indirekt olarak (Şekil 1) iyonizasyon meydana getiren yüklü/yüksüz partiküller ve fotonlara iyonize (iyonizasyon yapan) radyasyon denmektedir (12).

İyonize radyasyonlar, partiküllerden veya fotonlardan oluşmasına göre 2 gruba ayrılır ve enerji seviyeleri (frekansları) birbirlerinden farklıdır (13,14). İçinden geçtikleri maddelerde iyon çiftleri oluşturma özellikleri vardır ve bu iyon çiftlerinin özellikle su molekülünün hidroksil (–OH) köklerine ayrışması canlı dokularda tahrip edici özellik teşkil etmektedir (15,16).

Hücre içi ve hücre zarının yanı sıra en önemli etkisini hücrenin canlılık ve bölünebilme yeteneğini sağlayan çekirdek içerisinde yer alan kromozomlarda gösterir. Radyoterpi ve nükleer tıpta kanser tedavisine yönelik kullanılan bu iyonize radyasyonlarla tümör hücreleri tahrip edilirken, normal doku yaralanmaları mümkün olduğunca azaltılmalıdır.

RT'ye yönelik kullanılan iyonize radyasyonlar 50-400keV ile 1,25-25 MeV seviyeleri arasındadır ve 2 şekilde elde edilirler;

- 1- Doğal veya yapay radyoaktif maddelerin atom çekirdeklerinin bozunmasıyla elde edilen alfa (α), beta (β) ışınları, elektronlar ve kobalt 60 (Co^{60}) ve sezyum 137 (Cs^{137}) gibi radyoaktif elementlerden edinilen gama (γ) ışınları.
- 2- Nötron, proton, ağır iyonlar ve sıklıkla kullanılan elektron hızlandırıcıları ile elde edilen yüksek enerjili partikül ışınları ve en önemlisi hızlandırılan elektronların,

tungsten gibi atom ağırlığı yüksek plaklara çarptırılması ile elde edilen yüksek enerjili X ışınları. (11,14)

İyonize ışınların ortam ile etkileşmesi sonucu oluşan olayları ölçümlemek oldukça kompleks bir durumdur. Bu sebeple ortama transfer edilen enerji miktarı hesaplamalarda kullanılmaktadır. Absorbe edilen doz (d), birim kitlede(m) oluşan fazla enerji (e) miktarıdır: $D=e/m$ ve Uluslararası sistemde (SI) absorbe doz birimi gray (Gy) olup, 1 Gy 1 J/kg şeklinde ifade edilir. Daha önceleri ise radyoterapi uygulamalarında Radiation Absorbed Dose (rad) veya cGy (santi gray) birimleri kullanılmakta olup 1 Gy=100 rad, 1 cG=1 rad şeklindedir (17).

2.1.1. İyonize Işınlardan Etki Mekanizması

İyonize ışın belli bir doku üzerine etkiğinde fiziksel ve kimyasal reaksiyonlar bir zincir halinde gerçekleşir. Bir elektronun atomdan kopartılması ile meydana gelen iyonizasyon ilk etaptır. Bir atom veya moleküldeki elektronun atom veya molekülün yapısından atılmadan üst enerji seviyesine yükselmesi olayına eksitasyon (uyarılma) denir. Uyarılmış bu atom ve moleküller kimyasal reaksiyonlara çok kolay girebilecek özelliktedirler. Bu oluşan moleküllere serbest radikaller denir (11,18,19).

Işıma sonrası hücre içerisinde kontrol dışı oluşan bu fiziksel olaylar kimyasal ve daha sonra biyolojik etkilerin oluşmasına neden olur. Fiziksel olarak yüklü partiküller (elektron, proton, ağır iyonlar) ortamdan geçerken, geçtikleri ortamda bulunan elektronlarla etkileşirler ve iyonizasyon – eksitasyon sürecini başlatırlar. Nötronlar yüksüz partiküllerdir, γ ve X ışını ise yüksüz olduğu gibi partikül içermezler ancak bunlarda geçtikleri ortamda partiküllerle aynı fiziksel olayları (iyonizasyon-eksitasyon) oluştururlar. Fiziksel etkileşimi takip eden kimyasal etkileşim, ortamda oluşan sekonder elektronlarla ortamda yer alan moleküller arasında gerçekleşir (11).

Işıma yapılmış hücredeki hasarın komşu hücrelere, hücreler arası gap-junctionlar, lipid boşluklarının yanı sıra radyasyona maruz kalmış hücreler tarafından salınan parakrin ve endokrin faktörlerin aracılığıyla geçtiğini ve bu hücreler üzerinde hasara sebep olduğunu açıklayan Bystander etkisine rağmen çok güçlü kanıtlar radyasyonun ana hedefinin DNA olduğunu ıspatlamaktadır (20-22).

İyonize radyasyonun hücre düzeyindeki etkileri direkt veya indirekt yolla olur ayrıca DNA üzerinde radyokimyasal lezyonlar yine direkt veya serbest radikallerin

Serbest radikaller eşlenmemiş elektron taşıyan bir moleküldür, serbest radikallerden en önemlisi hidroksil radikalidir ($\text{OH} \bullet$). Hidroksil radikalleri suyun oksidasyonu sonucu direkt veya ikincil bir ROS oluşturmak üzere iyonize radyasyon tarafından oluşturulur (18). Ayrıca biyolojik materyale radyasyon ışıması süresince serbest radikal indirgeyicilerinin eklendiği deneylerde x-ışını ve gamma ışımlarının oluşturduğu hasarın 3 te 2 sinin serbest radikallerle gerçekleştirildiği görülmüştür. Elektromanyetik radyasyonlar (X ışını, γ ve nötronlar) indirekt iyonizandır. Bu tür radyasyonlar doğrudan biyolojik ve kimyasal hasar oluşturmaz ancak ortam tarafından absorbe edildikleri zaman Compton saçılımı, fotoelektrik olay veya çift oluşumu aşamaları aracılığıyla enerjilerini bırakarak etkirler. X-ışınları ekstranükleer şekilde üretilirler ve elektrik cihazlarıyla oluşturulurlar (14). Gamma (γ) ışınları ise intranükleer üretilirler (ör; radyoaktif izotoplardan yayılan) yani, radyoaktif bir çekirdeğin kararlı hale geçmesi esnasında parçalanarak açığa çıkan fazla enerjinin, çekirdekten dışarı atılması sonucunda oluşur (14,26).

2.1.2. Cobalt ⁶⁰ Tedavi Aygıtı

Doğal kobalt (Co) 27 proton, 32 nötron, 27 elektrondan oluşmuş doğada kararlı halde bulunan, sert, kırılkan, hafif mavimsi renge sahip gri renkli bir metaldir. Özellikleri demir ve nikel benzer. Radyoaktif olmayan Co doğada çeşitli mineraller içinde bulunur ve binlerce yıl boyunca cam ve seramiğin yapımında mavi renk verebilmek amacıyla kullanılmıştır. Co⁶⁰'ın bozunumu β^- türü bozunum ile başlar ve sonrasında 1,17321 MV'lik, 1,33248 MV'lik iki gama ışıması gözlenir. Co⁶⁰'ın yarı ömrü yani radyoaktif çekirdek sayısının yarıya inmesi için geçmesi gereken süre 5,271 yıldır. Genellikle pratik amaçlar için radyoaktif elementin 10 $t_{1/2}$ süre geçtikten sonra tükendiği ve zararsız hale geldiği kabul edilir. Bu nedenle yaklaşık 53 yıl boyunca güvenli bir ortamda saklanması gerekir. Co⁶⁰, doğada doğal halde bulunan radyoaktif olmayan Co⁵⁹ çekirdeğinin nötronla bombardıman edilmesi sonucu elde edilir. Nötron kaynağı olarak ise her fisyon başına ortalama 3,8 nötron yayımlayan Cf²⁵² kullanılır. Üretilen nötronlar fisyon sonucu elde edildiği için hızlıdır fakat Co⁶⁰ sadece yavaş nötronları absorbe eder. Bunu gerçekleştirebilmek için nötron kaynağının da içine daldırılmış olduğu geniş su tankları kullanılır. Burada su nötronları yavaşlatan bir yavaşlatıcı görevi görür. Co⁵⁹ su tankının içinde Cf²⁵²'nin ilerisine konur ve yavaş nötronları soğurması beklenir. Bu işlem istenilen

aktiviteye bağı olarak birkaç yıl sürebilir. Su tankı ayrıca çalışanları Cf^{252} ’den kaynaklanan radyasyondan korumaktadır.

Co^{60} aygıtının 2 cm çapında silindirik bir kaynağı vardır ve aktivitesi genel olarak 5000 ile 15000 Ci arasında değişmektedir. 3000 ci’den daha düşük aktiviteye sahip olan kaynaklar yenileriyle değiştirilir. Bu ise 5 ile 7 yıl arası kullanımdan sonra kaynağın yenilenmesini gerektirir.

Derinliği 10 cm’e kadar olan tümörlerde Co^{60} aygıtı performanslı olarak kullanılabilir. Fakat daha derinde bulunan tümörler için daha iyi odaklama yapabilen ve daha performanslı olan lineer hızlandırıcıların kullanılması tavsiye edilmektedir (11).



Şekil 3. Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalında yer alan Alcyon-II Teleterapi cihazı.

2.1.3. Radyoterapiye Bağlı Normal Doku Yaralanmaları

Normal doku üzerindeki radyasyon yaralanmaları serbest radikallerdeki artış ve buna bağı oksidatif stresle biyokimyasal olarak kısa süre içerisinde kendini göstermektedir. Histolojik değişikliklerin gözlenmesi tedaviyi takip eden günler, haftalar, aylar hatta yıllar içerisinde gözlenmeyebilir. Örnek olarak akciğerde yüksek dozda ısımaya

bağlı hasar 6. haftaya kadar hafif şekilde seyretmesine rağmen bu haftadan itibaren yaygın bir fibrozisle kendini göstermektedir. Buna karşın tek fraksiyon 15 Gy ışıma yapılan deney hayvanlarında çalışmanın 4. gününde sakrifiye edilen hayvanlardan alınan ince bağırsak örneklerindeki jejunum mukozasında, belirgin histolojik değişiklikler gerçekleşmiş, hatta goblet hücrelerinin tamamen ortadan kalkmasına neden olmuştur. Bu anlamda histolojik olarak doku üzerindeki hasarın mikroskobik olarak ortaya çıkış süresi dokudan dokuya ve uygulanan ışınlama protokolüne göre değişiklik göstermektedir (27,28).

Radyasyon yaralanmaları semptomların gelişmesi süresine kadar genellikle akut, dolaylı veya geç etkiler olarak sınıflandırılır. Akut (erken) etkiler tedavi süreci içerisinde veya birkaç hafta içerisinde kendini göstermektedir. Dolaylı (gecikmeli) etkiler akut etkilerden sonraki süreçte gerçekleşmektedir ve kalıcı akut etkilerden kaynaklanmaktadır. Radyasyon uygulamasına bağlı geç etkiler aylar, yıllar sonra ortaya çıkmaktadır. Akut ve geç tanımlamaları radyasyon tedavisinde kolaylık sağlaması amacıyla kullanılmaktadır ancak yaralanmanın hücresel ve moleküler mekanizması çok daha karmaşık bir özellik içermektedir. Böbrek gibi geç etkileri gösteren bazı organlarda radyasyon tedavisine bağlı erken etkiler gözlenmemesine rağmen geç etkiler çeşitli semptomlarla kendini gösterebilmekte ve normal fonksiyonlarına devam edebilmektedir. Radyasyonun hücrenin G1, S ve G2 fazlarında gecikmeye neden olduğu bilinmektedir. İyonize radyasyonun hücresel etkilerinden biride kromozom yapısındaki kırıklardır (27,29-32).

2.1.4. Serbest Radikaller

Yapılarında bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron bulunduran reaktif atom veya moleküllere Serbest Radikaller denir. Serbest Radikaller radikal olmayan maddeler ile reaksiyona girerek yeni radikallerin oluşumunu sağlayan zincirin aktivatörleri olup ömürleri oldukça kısadır (10^{-5} sn). Organizma tarafından metabolik süreç içerisinde üretilmelerine ve ihtiyaç durulmalarına rağmen ısı, radyasyon gibi çevresel etmenlere maruz kalınması durumunda da üretilirler. Organizma tarafından kontrollü bir şekilde üretilen serbest radikaller ve serbest radikal indirgeyicileri olan enzimatik ve non-enzimatik antioksidanlar arasındaki dengenin bozulması durumunda hücreler ve dokular için oksidatif strese neden olmaktadır. Kısa ömürlü olmalarına rağmen oluşan serbest radikaller karşılaştıkları moleküllerle 10^{-15} gibi çok daha kısa bir sürede reaksiyona girerek hücrelerde ve dokulardaki hasarı oluşturabilecek, hücre ölümüne neden olabilecek

yetenektedirler. Organ üzerinde radyasyonun neden olduğu tahribatın %60-70'inin oluşan OH radikalleri tarafından gerçekleştirildiği düşünülmektedir (14,33-36).

Tablo 1: Serbest Radikallerin Sınıflandırılması

Reaktif Oksijen Türleri (ROS)	Reaktif Nitrojen Türleri (RNS)	Reaktif Sülfür Türleri (RSS)
Süperoksit radikali ($O_2^{\bullet-}$)	Nitrik oksit ($NO^{\bullet}$)	Thiyl radikali ($RS^{\bullet}$)
Ozon (O_3)	Nitrik dioksit ($NO_2^{\bullet}$)	
Singlet oksijen (1O_2)	Peroksinitrik ($ONOO^{\bullet-}$)	
Hidrojen peroksit (H_2O_2)		
Hidroksil radikali ($OH^{\bullet}$)		
Hipoklorik asit ($HOCl$)		
Alkoksil radikali ($RO^{\bullet}$)		
Peroksil radikali ($ROO^{\bullet}$)		

2.1.5. Radyoprotektörler

Radyoterapinin amacı normal hücreler üzerinde olabilecek en az hasarı oluşturarak kanserli hücrelerin ortadan kaldırılmasıdır. Radyasyon hücre DNA'sını yaralamaktadır ve radyoterapinin nispi kuralı hücreyi öldürebilecek yeterli yaralamanın gerçekleştirilmesidir. Eğer yaralanmış olan hücre kendi DNA'sını yenileyemezse, yaşamını sürdüremez ve çoğalamaz. Buna karşın radyasyon, normal hücrelerde hasar oluşturur ve bu durum istenmeyen yan etkilere sebep olabilmektedir (37).

Serbest radikal indirgeyicilerinin radyasyon yaralanmalarındaki etkinliği ilk olarak, bilim insanlarının bütün vücut ışımlarında organizmadaki toplam antioksidan kapasindeki düşüş ve askorbik asit ve ürik asit gibi antioksidanların tükenmesini fark etmeleriyle ortaya çıkmıştır (38).

Radyoprotektif ajanlar, iyonize radyasyonun sebep olacağı normal doku hasarını indirgeyen sentetik ve doğal serbest radikal indirgeyicileridir. Radyoprotektif ajanlar başlıca 4 grupta incelenirler: bunlar tiol bileşikleri, diğer sülfür bileşikleri, anestezik ilaçlar, analjezikler ve trankilizanlar gibi farmakolojik ajanlar ve WR-1065, WR-2721, vitamin C ve E ve glutatyon gibi diğer radyoprotektif etkili bileşiklerdir (39).

Serbest radikallerin etkisizleştirilmesi süreci, hidroksil radikali ($OH^{\bullet}$), hidroperoksil

radikali ($\text{HOO}\cdot$) ve süperoksit ($\text{O}_2\cdot$) gibi radyasyon etkisiyle oluşan su metabolitlerinin, eksojen ya da endojen bir takım ajanları okside etmeleri neticesinde diğer hücre içi yapılarla etkileşime girme yeteneğinden yoksun kararlı yapıli bileşiklerin oluşması şeklinde gerçekleşir. Bu mekanizma sayesinde serbest radikallerin yaşamsal öneme sahip hücresel moleküller üzerindeki etkisi büyük ölçüde sınırlandırılmış olur (39,40).

Diğer bir radyoprotektif etki mekanizması, serbest radikale hidrojen atomu bağlanmasıdır. R - H şeklinde sembolize edilen bir molekülün radyasyon etkisiyle $\text{R}\cdot$ (radikal $\text{R}\cdot$) metabolitine dönüşmesi halinde, koruyucu etkili ajan, $\text{R}\cdot$ radikalının yapısına bir hidrojen atomu ekleyerek kararlı yapıdaki R - H formunun yeniden oluşmasını sağlar (39).

Geçtiğimiz 60 yıl boyunca geniş çaplı klinik çalışmalarla daha az toksik ancak daha etkili uygulama yöntemleri geliştirilmeye çalışılmıştır (37).

En iyi bilinen radyoprotektörler sistein ve siteamine gibi sülfidril içeren bileşiklerdir ancak bunlar bulantı, kusma gibi ciddi yan etkilere ve toksik değere sahip olabilmektedirler. Bunun yanı sıra radyoterapiye veya kazara radyasyona maruz kalınmasında karşılaşılan yan etkilerin indirgenmesi kullanılan radyoprotektiflerin kullanım yöntemine ve özelliklerine bağlıdır (41-43).

İdeal bir radyoprotektif ajan belli başlı kriterleri taşımalıdır;

- (a) Radyasyonun sebep olduğu yan etkilere karşı önemli bir koruma sağlamalıdır.
- (b) Organın genel kısmında koruyucu özelliği olmalıdır.
- (c) Kabul edilebilir uygulama yöntemi bulunmalıdır.
- (d) Kabul edilebilir bir toksisite profili ve protektif aralık özelliği bulunmalıdır.
- (e) Hesaplanan fiktar ve aktif ürün bakımından stabil özellik taşımalıdır.
- (f) Hasta veya personel için olası diğer ilaçlarla geniş bir uyumlulukta olması gerekir.

Günümüzde bütün bu kriterleri taşıyan bir radyoprotektör bulunmamaktadır. Sentetik tiyol içerikli radyoprotektif koruyucu özelliği keşfedilmiş olan radyoprotektörlerin üretilmesine rağmen, yan etki profillerinden kaynaklı toksisitesi daha düşük, daha güvenilir, stabil uygulama yöntemi ve metoduna sahip ikinci jenerasyon ilaçların geliştirilmesine gereksinim duyulmaktadır (37).

2.1.5.1. Amifostin

Amifostin (etanetiyol, 2-(3-aminopropil) amino-, dihidrojen fosfat (ester)) 1950 lerde Amerika Birleşik Devletleri'nde yer alan Walter Reed Askeri Araştırma Enstitüsü'nde nükleer savaş tehdidine karşı radyoprotektif etkisi ve toksisitesi göz önünde bulundurulduğunda birçoğu kimyasal madde arasında en uygunu olduğuna karar verilerek üretilmiştir. Amifostin (WR-2721) inaktif formu olan WR-33278'e metabolize edilmeden önce membran bağımlı alkalen fosfataz aracılığıyla defosforilasyon sonrası oluşan ve yapısında yer alan serbest sülfirid grubu sayesinde aktif ve radyoprotektif formu olan WR-1065'e dönüşür. Amifostin'in tümör bulunduran hayvan deneylerinde normal dokularda tümörlü dokuya göre daha hızlı konsantre edildiği gösterilmiştir (44,45). Normal hücre DNA'sında kırıklar ve hasar meydana getiren serbest radikalleri, alkile edici ve platinyum bazlı sitostatik ajanlar tarafından oluşturulan karbon iyonlarını ortadan kaldırarak yaptığı düşünülmektedir. Amifostin'in normal hücreleri seçmesinde, aktif formu olan WR-1065'e dönüşürken membran pH bağımlı alkalen fosfatazı kullanması ve bunun normal hücrelerde, tümoral dokuya oranla daha aktif durumda bulunmasının etkisi olduğu düşünülmektedir. WR-2721 hücre metabolizmasına katılımında aktif transport sistemini kullanmaktadır ve tümoral doku mikroçevre pH değerinin normal dokuya oranla daha düşük olmasında Amifostin'in tümör dışı dokuyu seçmesinde yardımcı bir faktör olduğu bilinmektedir (45,46).

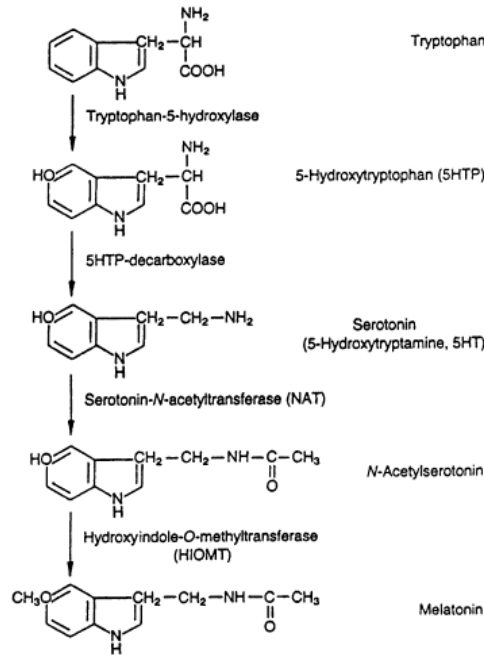
Amifostin, enjekte edildiği andan itibaren plazmada 1 dakikadan az sürede yıkılır. Eliminasyon yarı ömrü 8 dakikadır. Uygulamayı takiben 6. dakikada ilacın %10'undan azı plazmada bulunur. İntravenöz infüzyondan 5–8 dakika sonra aktif metaboliti olan serbest tiyol kemik iliğinde gösterilmiştir (47). Radyoterapi uygulamalarında WR-2721 in tümör dışı dokulardaki koruyucu etkinliği ve standart bir tedavi metodu henüz geliştirilememiştir (3). Toraks ışımasına yönelik yapılmış bir çalışmada konvansiyonel protokol çerçevesinde (55-60 Gy) ışıma yapılmış 146 hastada amifostin koruyucu nitelikte gösterilmiştir ancak 75 mg/m² amifostin injeksiyonu yapılan 83 hastanın dahil edildiği bir çalışmada koruyucu etkisinin olmadığı belirtilmiştir (48,49).

Radyoterapi kaynaklı iyonize radyasyona maruz bırakılan ratların ince bağırsak histolojik kesitlerinde polimorfonükleer hücre infiltrasyonu, hemoraji ve vakuolizasyon gibi patolojik bulgulara ulaşılmıştır ancak ışımadan 30 dk önce 200mg/kg WR-2721 injeksiyonunun bu morfolojik bozunmaları indirgediği bildirilmiştir (50).

2.1.5.2. Melatonin

Melatonin (5-methoxy-N-acetyltryptamine), epifiz bezinde yer alan, büyük çekirdekleriyle diğer hücrelerden histolojik olarak ayırt edilen pinealositlerden salgınır ve 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 düşündüren bir hormondur (51-53).

Kan damarlarından alınan triptofan pinealositler tarafından hidroksile ve dekarboksile edilerek serotoninine dönüştürülür. Serotonin, N-asetil transferaz tarafından N-asetil-serotonine dönüştürülür ve bu formuda hydroxyindole-O-methyl transferase (HIOMT) enzimi tarafından metillenerek mealtonine dönüştürülür (54). Sentezi takiben melatonin pinealositlerden hızlı bir şekilde salgılanır.



Şekil 4. Melatonin biyokimyasal sentezi (55).

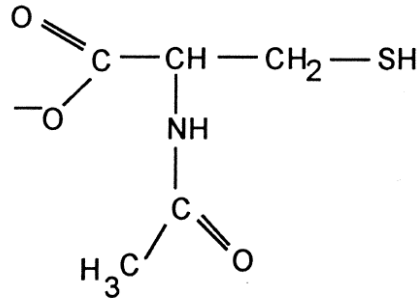
Melatonin siklofosamid, bleomisin, gentamisin, eritropoietin, indometasin, izoniyazid, fenobarbital, karbamazepin, haloperidol, sisplatin, asetaminofendemir ve doksorubisin gibi ilaçların sebep olduğu toksisiteyi azalttığı ve ilacın etkinliğinde artış sağladığı görülmüştür. (56,57). Ayrıca pre-klinik çalışmalarda melatoninin tümör oluşumunu önleyici veya düzenleyici onkostatik özelliği gösterilmiştir (58). Melatonin'in radyoprotektif etkisine yönelik yapılmış bir çalışmada 25 Gy ışına yapılan ratlarda

epifizyal büyüme plağı üzerinde melatoninin koruyucu etkileri belirtilmiştir (59). Radyasyon uygulamasına bağı toksisitenin indirgenmesinde melatoninin etkinliğı ve radyoterapi öncesi uygulanan melatoninin hücrese DNA hasarını indirgemedede ve lipid peroksidasyonunu azaltmadaki rolü gösterilmiştir (60). Dolayısıyla melatonin'in radyoprotektif etkisi ve düşük toksisitesi sayesinde radyoterapi uygulamalarında bir protektif ajan olarak kullanılması mümkündür.

2.1.5.3. N-asetilsistein (NAC)

Çeşitli çevresel faktörlerin sebep olduğı oksidan faaliyetlerini indirgemesinden ötürü tiyol bileşiklerin kullanım alanı her geçen gün artmaktadır. N-asetilsistein (NAC), L-sistein'in N-asetillenmiş formudur. Mukoregülatör özelliğı, doğıal sisteinin en az toksik formu olması, daha çok sülfidril grubu içermesi ve çözünürlüğünün daha iyi olmasından ötürü klinikte sıklıkla kullanılmaktadır (61).

NAC düşük molekül ağırlıklı olup suda ve diğere çözücülerde % 22 oranında çözülebilir ayrıca fizyolojik koşullarda pH'sı stabildir. İlaç alındıktan kısa bir süre sonra kana karışır ve bütün dokulara yayılır.



Şekil 5. N-asetilsistein'in moleküler yapısı (62).

N-asetilsistein'in mukoregülatör özelliğine bağı mukolitik etkisi, balgamdaki sülfidril bağlarını kırmasıyla gerçekleşmektedir. Sistein amino asidinin glutatyona (GSH) dönüşümünde bir ara ürü olan NAC klinikte mukolitik özelliğinin yanı sıra parasetamol (asetaminofen) detoksifikasyonunda, pnömoni, sinüzit tedavisi, amanita phalloides zehirlenmeleri, kronik obstrüktif akciğere hastalığı (KOAH) tedavilerinde kullanılır ayrıca NAC ve GSH değışik dozlarda mutajen ve karsinojenlerin etkilerini inhibe eder (63-66).

NAC serbest oksijen radikallerini doğrudan inhibe ederek (direkt), GSH sentezini artırarak (indirekt) antioksidan etkisini organize eder. N-asetilsistein, serbest radikallerden

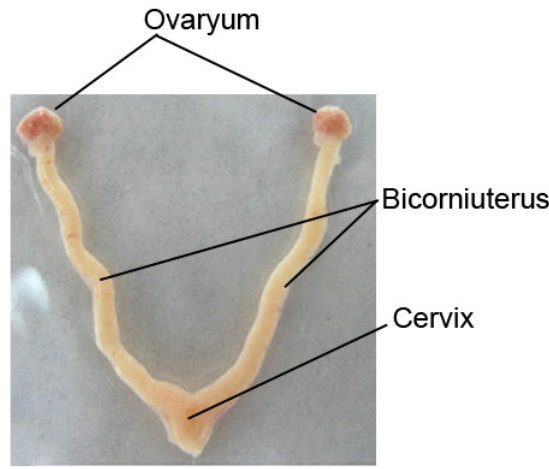
OH^- , O_2^- ve hidrojen peroksit radikallerini indirger (67). Endojen olarak sentezlenen NAC, sisteine benzer şekilde serbest radikalleri sülfidril grubuyla bağlar. Hem oral hemde intraperitoneal NAC uygulaması, GSH düzeylerini artırır ve malondialdehit (MDA) düzeyinde düşüşe sebep olur (68).

Yapısında tiyol bileşiği taşıyan bir antioksidan olmasından dolayı deney hayvanları üzerinde tek doz ışıma yapıldığında lipid peroksidasyonunun en önemli markerı olan MDA ve DNA kırıklarındaki düşüşle radyoprotektif özelliğini göstermektedir (69). Yapılmış bir pre-klinik çalışmada radyasyona bağlı oluşan dermatit, ışıma öncesi 1000 mg/kg NAC yapılan grupta azalmıştır (70). Yapılmış klinik ve deneysel çalışmaların doğrultusunda reaktif elektrophil moleküllerin ve serbest radikalleri indirgemede nonenzimatik aktivite gösteren NAC antioksidan özelliğiyle bir radyoprotektif ajan olarak kullanılabilir (71).

2.2. Uterus

2.2.1. Rat Uterus Anatomisi

Rat uterusu boynuz şeklinde, bikornuat yapısıyla abdominal boşluğun her iki kenarında yer alır. Kornular böbreğin alt kutbuna kadar uzanır (72-74). Uterin kornuların lümeni birbirinden tamamen ayrılmış ve vajinal lümene ayrılmış eksternal orifis (portio vaginalis uteri) aracılığıyla açılır. Uterin boynuzlar dorsal abdominal kavitede yer alırken uterin gövde ve vajina rektumun dorsalinde ve mesanenin ventralinde konuşlanmaktadır (75). Anatomik yönden farklılıklar olmasına rağmen insan ve rat uterusundaki mikroskopik yapılanmalar aynıdır.



Şekil 6. Rat uterusunun genel görüntüsü. (76)

2.2.2 Rat Uterus Embriyolojisi

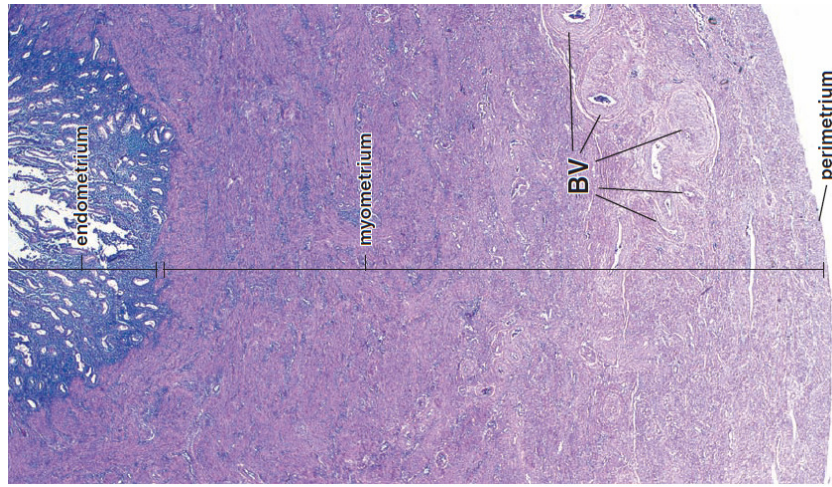
Embriyolojik olarak genital sistem mezoderm kökenlidir. Dişi ve erkek embriyolarında iki çift mezonefrik (Wollfian) ve paramezonefrik (Müllerian) kanallar bulunmaktadır. Mezonefrik kanallar erkek üreme sisteminin gelişiminde önemli iken, paramezonefrik kanallar dişi üreme sisteminde önem taşımaktadır. Testesteron hormonu dişi embriyolarında olmadığından mezonefrik kanallar geriler. Sertoli hücrelerince salgılanan Müller baskılayıcı madde yokluğundan paramezonefrik kanal (Müler kanalı) gelişir. Ratlarda embriyonal gelişim Theiler Stage (Theiler evresi) olarak adlandırılan dönemlere ayrılır. Theiler evre-24 (TS24) yani koitumdan 16 gün sonrasında (16 dpc) paramezonefrik kanaldan uterusun kornuları, tuba uterina, serviks ve vajinanın üst kısmı gelişmeye başlar aynı anda ürogenital sinüs'ün kaudalinden vajinanın alt kısmı gelişir ve vajinanın her iki kısım birbiriyle aynı dönem içerisinde kaynaşır. Uterusta yer alan

miyometriyal kas kütlesi ise TS25 te yani 17-dpc de gelişir. 21-23 gün süren gestasyon sonrası dişi ratın doğumu gerçekleşir dişi ratlarda vajinal kanalın postnatal 33-42 gün sonra açılmasıyla pubertaya girer (74,77,78).

2.2.3 Rat Uterus Histolojisi

Histolojik olarak uterus 3 tabakadan oluşmaktadır, lümeninden dışa doğru;

- Endometriyum
- Miyometriyum
- Perimetriyum'dur.

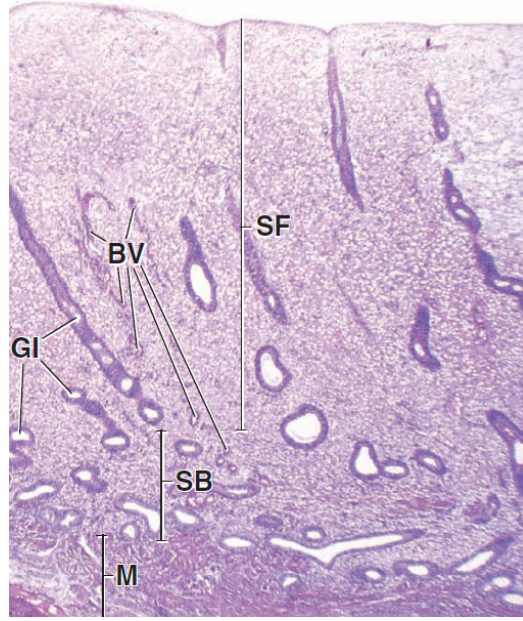


Şekil 7. Uterusun histolojik görüntüsü (72).

2.2.3.1. Endometriyum

Uterusun mukozasını oluşturan endometriyum, epitel ile basit tübüler bezler içeren lamina propriyadan oluşmuştur. Uterin bezler miyometriyuma yakın bölümlerden bazen alt dallanmalar gösterir, epiteli tek katlı silyalı ve salgılayıcı silindirik epiteldir ayrıca basit tübüler yapıdadır. Lamina propriada bağ dokusu fibroblastlardan zengindir ve bol miktarda temel madde içerir. Bağ dokusu lifleri çoğunlukla Tip III kollajendir.

Uterus ratlarda insandakine benzer şekilde mukoza (endometriyum), düz kas tabakası (miyometriyum) ve adventisya (perimetriyum) dan oluşmuştur. Endometriyal propriada yer alan uterin bezler tek sıralı kolumnar epitelden oluşmuştur. Rat uterusunda yaşlanma endometriyumda kollajen artışı, pasif uterin bezler, ayrıca bezlerin çoğunda mitoz görülmeyişi ve dağınık düzenlenme ile karakterize edilir.



Şekil 8. Endometriyumun tabakaları. Kan damarı (BV), endometriyal bezler (GI), miyometriyum (M), bazal tabaka (SB), fonksiyonel tabaka (SF) (72).

Sıklıkla yaşı ilerlemiş ratlarda endometriyal kist ve glandular kistik hiperplazi gözlenir. İnsan ve yüksek primatlar dışında kalan memelilerde menstrual döngüye karşılık gelen östrus siklusu mevcuttur. Östrus siklusu türden türe değişiklik gösterip bazı hayvanlarda mevsime bağımlı olarak gerçekleşmektedir (50,75,79,80).



Şekil 9. Endometriyum lümeninin renklendirilmiş taramalı elektron mikroskopik görüntüsü (81).

2.2.3.2. Miyometriyum

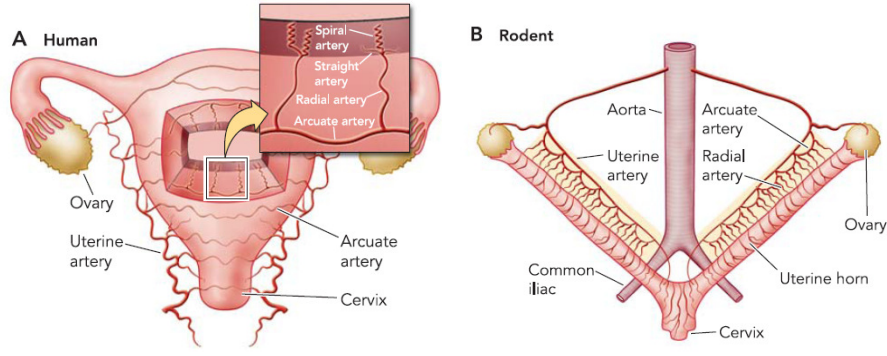
Uterin duvarın en kalın tabakası olan miyometriyum uterusun bağ dokusu ile ayrılmış düz kas demetlerinden oluşmaktadır, ayrıca miyometriyum tuba uterina, vajina ve uterus ligamentlerinde yer alan düz kas demetleriyle ilişki halindedir. Miyometriyum birbirinden ayırt edilemeyen 3 tabakadan oluşmuştur. Orta tabaka birçok geniş kan damarı (venöz pleksuslar) ve lenf damarları bulundurmakta olup, stratum vasculare olarak adlandırılıp miyometriyumun en kalın tabakasını oluşturur. Endometriyumun iç ve dış tabakaları ise longitudinal seyretmektedir. Gebe olmayanların uterus düz kas hücreli ~5µm uzunluğundadır. Gebelik boyunca uterus hacimce büyümektedir. Bu büyüme primer olarak mevcut kas hücrelerinin hipertrofiye olarak 50 µm ye varan uzunluklara ulaşmasıyla, ikincil olarak ise mevcut kas hücrelerinin bölünmesi veya farklılaşmamış mezenşimal hücrelerin düz kas özelliği alması sonucu miyometriyal alandaki yeni ipliklerin oluşumuyla kendini gösterir. (51,72).

2.2.3.3. Perimetriyum

Uterusun dış seröz tabakası veya visseral peritoneal örtüsü olan perimetriyum, pelvik ve abdominal peritona uzanmakta ayrıca mezotel ve ince bir gevşek bağ dokusundan oluşmaktadır. Mezotelin altında elastik doku tabakası genellikle belirgindir. Perimetriyum posteriyor alanda uterusun bütün yüzeyini kaplamasına rağmen anterior bölgede sadece belli bir kısmı örtmektedir. Anterior yüzeyin diğer kısımları bağ dokusu veya adventisyadan oluşmaktadır (72).

2.2.4. Uterus Arteriyel, Venöz, Lenfatik Dolaşım ve Uterusun İnnervasyonu

Ratlarda uterusu kan akışı mezometriyum adı verilen düzlemsel bir bağ dokusundan geçen uteroovarian (prametrial) arterler tarafından sağlanır. Mezometriyuma kanın geliş yönü hem uterin hemde ovarian uç kısımlardan çift yönlü olarak gerçekleşir. Mezometriyumda arkuat arter dalarının uzantıları radyal arter (mezometriyal veya segmental arter) şeklinde uterus duvarında içeri girer. Endometriyuma kadar uzanan bu arterler daha sonra lokalizasyonuna bağlı olarak preplasental veya premyometriyal olmak üzere adlandırılır (82).



Şekil 10. İnsan ve Ratta uterusun kanlanmasının şematik gösterimi. İnsan uterusu (A), rat uterusu (B) (82).

Uterus ayrıca inferior hypogastric plexus'un sempatik ve parasempatik sinir uzantılarıyla innerve olur (83). Lenfatik drenaj renal ve iliyak lenf düğümlerine olur burdanda cisterna chyli ve torasik kanallara geçer. Lenfatik damarların çoğunluğu miyometriyal alanda yer alır endometriyumda ise oldukça dağınık ve küçüktür (84)

2.2.5. Genital Siklus

İnsan ve yüksek primatlarda gerçekleşen menstrual siklustan belli özellikleriyle farklı olarak rat ve farelerde östrus siklusu olarak adlandırılan reproduktif döngü mevcuttur. Menstrual ve östrus siklusu arasındaki başlıca fark, menstrual siklusta uterus kavitesine dökülen ve vajina yoluyla dışarı atılan epitel hücrelerinin aksine östrus siklusunda yıkıma uğrayan epitel hücrelerinin absorbe edilmesidir. Östrus gösteren koyun, köpek gibi hayvanların aksine, ratlar insanlara benzer şekilde mevsimden bağımsız reproduktif siklus gösterirler (84). İnsanlar menstrual döngüsü sonucunda oosit üretip overlerinde korpus luetum gelişmesine rağmen, ratlar spontan ovulasyon gerçekleştirir ancak koital stimülasyon gerçekleşmediği takdirde yoğun salgı yapan gelişmiş bir korpus luteum oluşturmazlar, bu sayede rat ve fare gibi kısa süreli siklusa sahip poliöstrik hayvanlarda gebe olunması dışında gonadotropin baskılanması gerçekleşmez ve yeni bir folikülün gelişimi çok kısa sürede gerçekleşebilir (86).

2.2.5.1. Ratlarda Östrus Siklusu

Ratlar poliöstrik hayvanlardır, östrus siklusu ortalama 4-5 gün sürmektedir. Östrus siklusu laboratuvar koşullarında dahil olmak üzere mevsimden bağımsız olarak yıl

içerisinde düzenli bir şekilde tekrarlamaktadır (87, 88). Siklus 4 döneme ayrılmaktadır; Proöstrus, östrus, metöstrus ve diöstrus. Proöstrus 12 saat sürer. Bu evrenin sonunda dişi erkeği kabul etmeye başlar. Vajinal sitolojide çekirdekli epitel hücreleri görülür. Östrus evresi de 12 (9-15) saat sürer. Dişi erkeği kabul etmeye devam eder ve lordosis (sırtın içbükey yapılıp genital bölgenin açığa çıkarılması) gözlenir. Sitolojiye hakim olan hücre tipi çekirdekli hücrelerdir (%75). Geri kalanını (%25) kornifiye hücreler oluşturur. Metöstrus 21 saat sürer ve artık dişi erkeği kabul etmez. Çekirdekli ve kornifiye hücrelerle beraber çok sayıda akyuvar görülür. Diöstrus 57 saat sürer ve vajinal sitolojide akyuvarlar görülür. Östrus, davranıştaki değişimin gözlenmesi, vajinal sitoloji veya elektriksel empedansın ölçülmesiyle belirlenir (89). Siklusun aşamaları bu sitolojik muayne ile tespit edilebilir. Korpus luteum en büyük olduğu haline erken diöstrus döneminde ulaşır ve östrus siklusunun 2. gününde en yüksek progesteron değerine ulaşılır. Ovaryum ve folliküler değişimlere neden olan ve vajinal sitolojide tespit edebildiğimiz siklik değişiklikler ön hipofizden salınan gonadotropinler tarafından düzenlenir. LH pulsatile şekilde salınır ve en düşük düzey östrusta gözlenirken en yüksek frekansa proöstrusta ulaşılır. LH atımı (pulse) GnRH salınımının miktarına bağlı olarak değişmektedir (90). Proöstrusta 0,9-1,0 mm çapındaki preovulatuvar foliküllerde LH dalgalanması ovulasyonun meydana gelmesine ve corpora lutea'nın şekillenmesine neden olur. Küçük foliküllerin gelişimi iki adet preovulatuvar FSH dalgasının stimülasyonu ile gerçekleşir (91). İlk dalga LH dalgası ile alakalı ve ikinci dalga ovulasyon sonrası inhibindeki azalma ile ilişkilidir (93,94). Rat foliküllerinde yapılan çalışmalar 17- α -Hidroksilaz ve aromataz mRNA düzeyinin preovulatuvar Lh dalgasından önce artış gösterdiğini ortaya koymuştur (94,95). Metöstrus süresinde corpora lutea'dan progesteron salınımı gerçekleşir. Diöstrusta azalan progesteron ve artan östradiol-17 β 'ya bağlı olarak foliküler gelişim tekrar başlar. Proöstrusta gerçekleşen östrojen piklerinin ovulasyona neden olan gonadotropin salınımını indüklemesiyle siklus tamamlanır. Progesteron salınımıyla doğrudan korele olmamasına rağmen prolaktin salınımında luteotropik mekanizmaya katılmaktadır. Vazektomi, erkek rat bulunması veya mekanik etkenler ile servikal uyarıların olması (elektriksel uyarılar) ayrıca düzenli bir şekilde yüksek oranda prolaktin, östrojen, androjen uygulamaları dişi ratlarda pseudopregnancy (yalancı gebelik) oluşmasına neden olur ve bu yalancı gebelik 12-14 gün sürer (96). Serviksin uyarılmasıyla gerçekleşen yalancı gebelikte; diüurnal ve nokturnal serum prolaktin seviyesinde dalgalanmalar oluşur, ayrıca prolaktin dalgalanmaları luteal

LH reseptörlerini arttırarak corpus luteumları uyarır ve progesteron salınımı artar, bu hormonal dalgalanma yalancı gebeliğe neden olmaktadır ve yalancı gebeliği sonlandıran luteolitik mekanizma tam olarak bilinmemektedir (97,98). Barınaklarda hayvanların maruz kaldıkları aydınlık evrenin uzaması östrus siklusunu etkiler. Sürekli ışık uygulaması persistent östrus ve polikistik ovaryum oluşumuna neden olur (99). Proöstrus ve östrus insandaki foliküler faza (proliferatif faz) , metöstrus ve diöstrus ise luteal faza (sekretuvar faz) karşılık gelmektedir (100).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Deney Hayvanları ve Temini

Deneysel çalışmanın yürütülmesi için Dicle Üniversitesi Prof. Dr. Sabahattin Payzın Sağlık Bilimleri Araştırma ve Uygulama Merkezi (DÜSAM) 'nden etik kurul onayı (12.06.2012 tarihli ve 2012/35 nolu izin) alındıktan sonra temin edilen 56 adet Sprague Dawley cinsi yetişkin dişi rat kullanıldı. Hayvanlar her grupta 7 hayvan olacak şekilde 8 gruba ayrıldı. Hayvanlar deneysel aşamadan 1 hafta önce ağırlıkları tartılarak polikarbon kafeslere ayrıldı, hayvanların ortalama ağırlığı 190 ± 10 gr olarak ölçüldü. Deney hayvanlarının standart yem ve suya ad libitum erişimi sağlandı. Deney süresince hayvanların barındırıldığı ünitenin sıcaklığı 21 ± 2 °C ve nem oranı %50-70 olarak ayarlandı. Adaptasyon ve uygulama süreleri boyunca hayvanlara 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık ışık periyodu uygulanmıştır. Deneysel çalışma süresince 9:00-10:00 saatleri arasında hayvanlarda gerekli bakımlar ve kontroller yapılmıştır. Uygulama boyunca anestezie alınması gerektiği durumlarda (ışıma ve enjeksiyon öncesi, sakrifikasyon aşaması) i.m. 10 mg/kg Ksilazin HCL (Ksilazol, Provet) ve 70 mg/kg Ketamin (Ketasol, Richter pharma ag. Avusturya) ile derin genel anestezi sağlandı. Bütün çalışma süresince hayvanlara yapılacak işlemler etik kurallar çerçevesinde gerçekleştirildi.

3.2. Deneyin Düzenlenmesi

Bu araştırma bir randomize kontrollü deneysel çalışmadır. Deneye alınan 56 adet yetişkin Sprague Dawley cinsi dişi rat aşağıda belirtildiği şekilde gruplara ayrılmıştır.

Tablo 2: Deney düzeneğinin şematik görüntüsü

	Grubun Adı	Grubun Kodu	Hayvan Sayısı	Radyasyon Dozu	Ajan	Ajan Dozu
1	Kontrol	K	7	-	-	0
2	Amifostin	WR2721	7	-	Amifostin (WR2721)	200 mg/kg i.p.
3	Melatonin	M	7	-	Melatonin	25 mg/kg i.p.
4	N-Asetilsistein	NAC	7	-	N-Asetilsistein	500 mg/kg i.p.
5	Radyasyon	R	7	10 Gy	-	0
6	Rad.+Amifostin	R + WR2721	7	10 Gy	Amifostin (WR2721)	200 mg/kg i.p.
7	Rad.+Melatonin	R + M	7	10 Gy	Melatonin	25 mg/kg i.p.
8	Rad.+N-asetilsistein	R + NAC	7	10 Gy	N-Asetilsistein	500 mg/kg i.p.

Işıma yapılacak gruplar (R, R+WR, R+M, R+NAC) anesteziye alınarak Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalında yer alan Alcyon-II Co⁶⁰ (General Electric) teleterapi cihazıyla gama ışıması yapıldı. Hayvanlara 30x30 büyüklüğündeki alana 80 cm mesafeden hayvanların cornu şeklindeki uterus ve overleri içine alacak bir şekilde abdominal-pelvik bölgeye tek fraksiyon 10 Gy ışıma gerçekleştirildi. Melatonin injeksiyonu yapılacak gruplara (M ve R+M) 25 mg/kg injeksiyon hedeflendiği için totalde 66,5 mg melatonin (Sigma, M5250) 1 ml etanolde çözüldü ve 14 ml ye steril su ile konsantre edildi. Hazırlanan bu fotosensitif çözeldi ışık geçirmeyen bir kap içerisinde serin ortamda hazırlandı ve her hayvana 1ml olacak şekilde i.p. injeksiyon gerçekleştirildi. NAC injeksiyonu yapılacak gruplara (NAC ve R+NAC) 500 mg/kg dozu hedeflendiği için hayvan başına 90 mg lık NAC injeksiyonuna ihtiyaç duyuldu. Bu amaçla 0,95 ml NAC (Asist ampul, Bilim İlaç, Türkiye 300 mg / 3ml) i.p. olarak hayvanlara enjekte edildi. Amifostin (WR2721) uygulanacak gruplara (WR ve R+WR) hayvan başına 200 mg/kg injeksiyon hedeflendiği için 532 mg lık amifostin (WR2721 / Ethyol, 500 mg flakon, Er-kim ilaç, Türkiye) 14 ml steril su içinde çözülerek hayvan başına 1 ml çözelti hayvanlara enjekte edildi. Hem radyasyon ışıması yapılmayan ancak ajan injeksiyonu gerçekleştirilecek gruplara (WR, M, NAC) hemde ışıma yapılacak gruplara (R+WR, R+M, R+NAC) 10 Gy lik ışımadan 15 dk önce i.p. şekilde ilgili ajanlar uygulandı. Kontrol grubu (K) hiçbir uygulamaya tabi tutulmazken, radyasyon (R) grubuna hiçbir enjeksiyon gerçekleştirilmeden sadece 10 Gy abdomino-pelvik ışıma uygulanmıştır.



Şekil 11. Anestezi altına alınan dişi ratlara ışıma yapılması.

3.3. Deneyin Sonlandırılması

Bütün gruplarda yer alan toplam 56 hayvan deneyin başlamasından 48 saat sonra sakrifiye edilmiştir. 48 saat içerisinde sakrifiye etmemizin amacı; ışın tedavisi veya kazara radyasyona maruz kalımına bağlı normal doku yaralanmalarında, dokuların birbirinden farklı şekilde ve sürede hasarı göstermesi ve akut dönemde iyonize radyasyonun uterus üzerinde oluşturduğu morfolojik değişiklikleri değerlendirmek ayrıca deney hayvanlarında 56 saat süren diöstrus döneminin standart hale getirilmesidir. Bu amaçla intra müsküler (i.m.) Ketamin ve Ksilazin anesteziğiyle derin anestezi altına alınmıştır. Intra kardiyak kan alımıyla hayvanlar sakrifiye edilmiş dokuların kanlanması engellenmiştir. Batın bölgesi açılan hayvanlardan mesaneye komşu durumda yer alan kornular halindeki uterus ve ovaryumlar serviks bölgesi, uterus ve ovaryumları besleyen mesosalphix bölgesinden kesilerek çıkartıldı. Çıkartılan uteruslardan sağ kornudan ovaryan kutup ve servikal kutbun tam orta kısmına gelecek şekilde dokular kesildi ve alınan uterus örneği %10 luk nötral formalin içerisinde fikse edildi.

3.4. Histolojik Takip ve Boyama

Gruplardan alınan doku örnekleri %10'luk tamponlanmış nötral formalin içine alınıp 16 saat bekletilip tespit işlemi gerçekleştirildi. Tespit edilen dokular 12 saat akarsu altında yıkanarak formalin solüsyonundan arındırıldı. Daha sonra sırasıyla, %30, %50,

%70, %80, %90 ve %96'lık alkollerde 8 saat bekletilen dokular absolut alkol (%99.9) içerisinde 2X20 dakika bekletilerek dehidratasyon işlemi tamamlandı. Şeffaflaştırma ve alkolü dokudan uzaklaştırmak için 2X15 dakika ksilolde bekletilen dokular 1/1 hacimde parafin/ksilol içerisinde 1 saat bekletildikten sonra, saf parafin içine alınıp 4 saat kadar daha bekletildi. İnfiltrasyon işleminin ardından parafin bloklara gömme işlemi gerçekleştirildi. Her bir parafin bloktan, tam otomatik rotary mikrotom (Leica RM 2265, Germany) yardımıyla 4-6 µm kalınlığında kesitler alındı. Elde edilen kesitlere Hematoksilen-Eosin (H-E), Masson trikrom ve Periyodik Asit Schiff (PAS) ve TUNEL Assay metodları uygulandı. Hazırlanan preparatların değerlendirmesi Nikon Eclipse 80i mikroskop (Nikon, Japonya) ve NIS Elements V 3.09 programlarıyla gerçekleştirilmiştir.

3.5. Hematoksilen-Eozin boyama protokolü

- 1.Parafin kesitler ksilolde deparafinize edilerek, azalan alkol derecelerinden geçirilip distile suya kadar getirildi.
- 2.Filtre edilmiş Harri's hematoksilen solüsyonunda yaklaşık olarak 8 dakika kadar bekletildi.
- 3.Kesitler 5 dakika akarsuda bekletilerek, hematoksilen artıklarından arındırıldı.
- 4.Differensiyasyonu sağlamak için % 1 lik asit-alkol solusyonuna 1 kez batırılıp çıkarılan dokular tekrar çeşme suyundan geçirilerek yıkanmaları sağlandı.
- 5.Amonyaklı suda çekirdekler parlak mavi oluncaya kadar bekletildi.
- 6.On dakika çeşme suyunda yıkandı ve %80'lik etil alkolde 1-2 dakika bekletildi.
- 7.Zıt boyama için eozin-floksin solusyonunda 2 dakika bekletildi.
- 8.Dehidratasyon ve parlatma için yükselen derecelerde etil alkol serilerinden ve ksilolden geçirilerek, entellan ile kapatıldı.

3.6. Periyodik asit Schiff boyama protokolü

- 1.Parafin kesitler ksilolde deparafinize edilerek, azalan alkol derecelerinden geçirilip distile suya kadar getirildi.
- 2.Peryodik asitte 5 dakika bekletildi.
- 3.Distile suda çalkalandı.

- 4.Coleman schiff’de 8 dakika bekletildi.
- 5.Akar suda 5 dakika yıkandı.
- 6.Harris Hematoksilende 3 dakika bekletildi.
- 7.Çeşme suyunda çalkalandı.
- 8.%1’lik Asit alkole batırılıp çıkarıldı.
- 9.Çeşme suyunda yıkandı.
- 10.Dehidratasyon ve parlatma için yükselen derecelerde etil alkol serilerinden ve ksilolden geçirilerek, entellan ile kapatıldı.

3.7. Masson trikrom boyama protokolü

- 1.Parafin kesitler ksilol de deparafinize edilerek, azalan alkol derecelerinden geçirilip distile suya kadar getirildi.
- 2.Bouin solüsyonunda 56 C^o’de etüvde 1 saat bekletildikten sonra çıkarılıp oda sıcaklığının oda ısısına gelmesi beklendi.
- 3.Çeşme suyunun altında bouin çıkıncaya kadar bekletildi.
- 4.Weigert solusyonunda 10 dakika bekletildi.
- 5.Distile suyunda çalkalandı.
- 6.Gomori’de 11 dakika bekletildi.
- 7.%0,5 asetik asit solusyonuna batırılıp çıkarıldı.
- 8.Dehidratasyon ve parlatma için yükselen derecelerde etil alkol serilerinden ve ksilolden geçirilerek, entellan ile kapatıldı.

3.8.TUNEL Assay protokolü

- 1.Parafin kesitler ksilol de deparafinize edilerek, azalan alkol derecelerinden geçirilip distile suya kadar getirildi.
- 2.PBS te 2 seri 5 er dk yıkama işlemi gerçekleştirildi.
- 3.Permeabilizasyon solusyonu içinde (%0.1 Triton X-100, %0.1 Sodyum sitrat) +4 °C de 10 dk süreyle permeabilizasyon gerçekleştirildi.
- 4.PBS te 2 seri 5 er dk yıkama işlemi gerçekleştirildi.
- 5.TUNEL kiti olarak In Situ Cell Death Detection Kit, AP (Roche, Kat. No: 11 684 809 910) kullanıldı. Kit içerisindeki enzim solusyonu (Vial 1) ve işaretleme solusyonu (Vial 2) 1:9 oranında hazırlanıp, 1:1 oranında TUNEL Dilution Buffer (Roche, Kat. No. 11 966 006 001) ile dilue edildi.

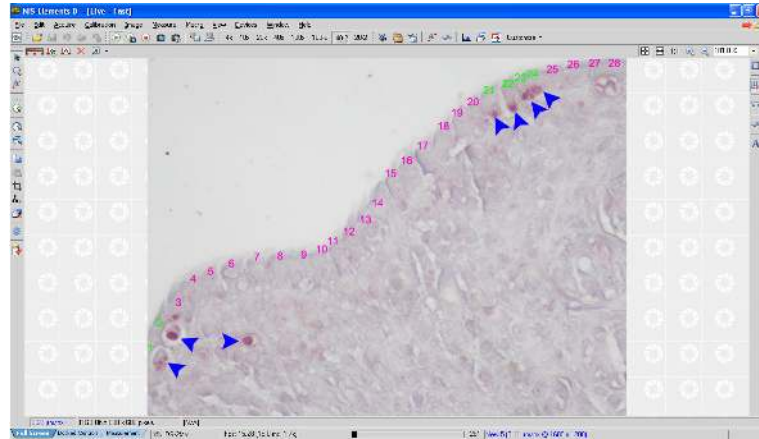
6. Hazırlanan solusyon kesitlere karanlık ortamda 37 °C de 1 saat süreyle uygulandı.
7. PBS te 2 seri 5 er dk yıkama işlemi ve florasana mikroskop altında kontrol edildi.
8. Kesitlerin üzerine kit içeriğinden çıkan Converter-AP (Vial 3) 30 dk uygulandı.
9. PBS te 2 seri 5 er dk yıkama işlemi gerçekleştirildi.
10. Fast Red (Roche) substrat hazırlandı ve kesitlere uygulandı.
11. Pozitif sinyal ışık mikroskopunda kontrol edildi ve görüldüğü gibi reaksiyon PBS ile durduruldu. Akabinde 2 seri 5 er dk PBS te yıkama işlemi gerçekleştirildi.
13. Hematoksilen ile zıt boyama yapıldı, akar sudan geçirilip, 2 seri PBS te 5 er dk yıkandı.
14. Keiser's gliserol jelatin (Merck, Kat. No: 109242) ile kesitler kapatıldı.

3.9. İstatistiksel Analiz

TUNEL Assay uygulanıp ışık mikroskobu altında değerlendirilen kesitlerde;

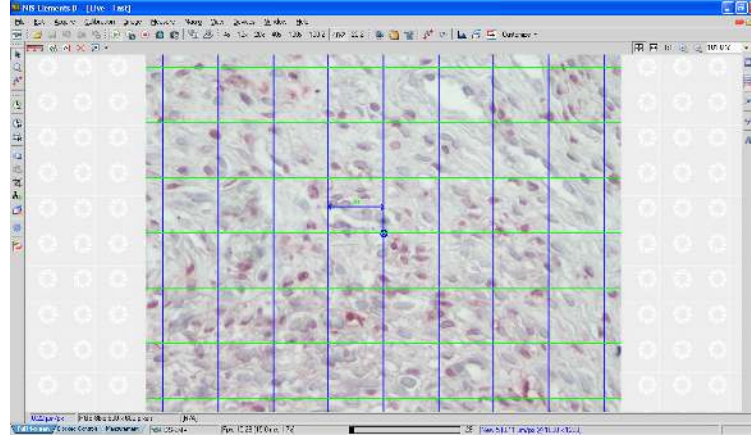
Luminal epitelde her kesit için rastgele bir alandan tek bir yönde hücreler sayıldı.

Sayım esnasında 100 e ulaşıldıktan sonra TUNEL pozitif sinyal hücre yüzdesi hesaplandı.



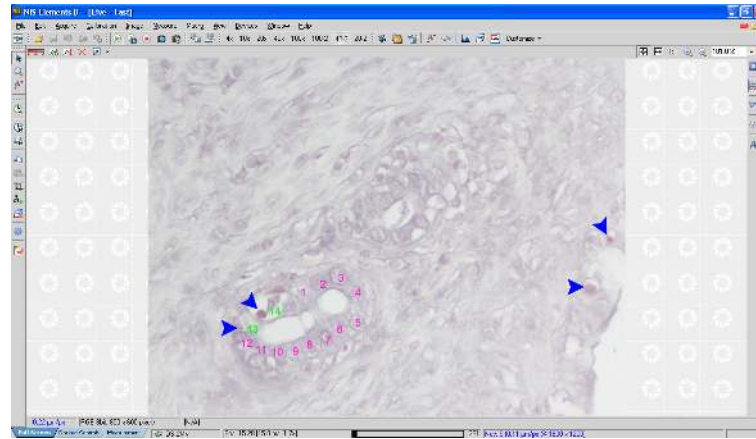
Şekil 12. Pozitif sinyal veren luminal epitel sayımı. Pozitif sinyal; (+), Negatif sinyal; (-).

Stromal pozitif sinyal yüzdesi için stromal alan 48 adet eşit boyutta kareye bölündü. Sayımlar sol üstteki kutudan başlayarak yapıldı. Bölgeleri sınırlayan çizgilerin hizasına gelen hücreler tekrar sayılma ihtimaline karşı sayıma dahil edilmedi ve 100 sayısına ulaşıldığında sayım işlemi sonlandırıldı. Her bir kesit için bu işlem 3 farklı alanda gerçekleştirildi ve elde edilen 300 hücre içerisindeki pozitif sinyal yüzdesi hesaplandı.



Şekil 13. Pozitif sinyal veren stromal hücrelerin sayımı. Pozitif sinyal; (+), Negatif sinyal; (-).

Uterin bez yüzdeleri hesaplanırken uterusun farklı yerlerinden rastgele seçilen 3 adet bezdeki pozitif sinyal veren ve bezdeki bütün hücreler sayıldıktan sonra her bez için teker teker pozitif sinyal veren hücre yüzdeleri hesaplandı



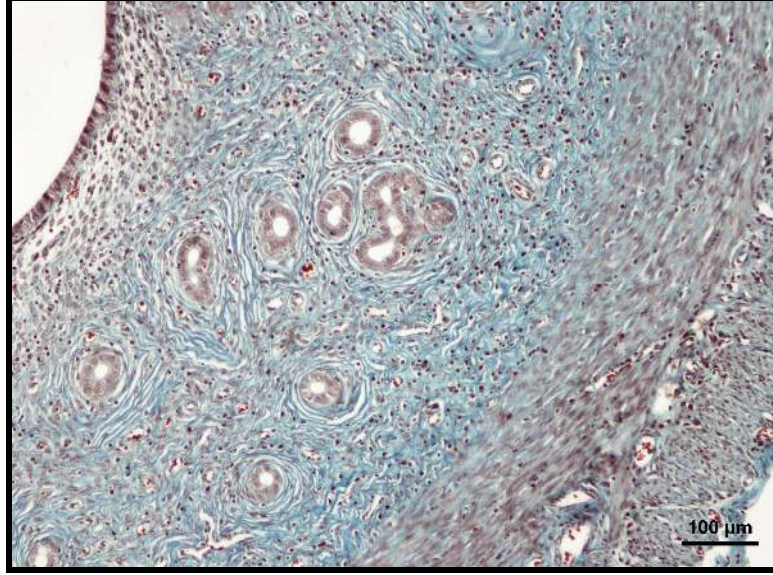
Şekil 14. Pozitif sinyal veren uterinal bez hücrelerinin sayımı. Pozitif sinyal; (+), Negatif sinyal; (-).

Elde edilen pozitif sinyal yüzdeleri non-parametrik Kruskal Wallis testi ile değerlendirildi. Sonuçlar ortalama $\pm$ SE (standart hata) olarak ifade edildi ayrıca Luminal epitel için 0.01'in altındaki ($p < 0.01$), stromal hücreler için 0.001'in altındaki ($p < 0.001$) ve uterinal bezlerde 0.0001'in altındaki ($p < 0.0001$) p değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

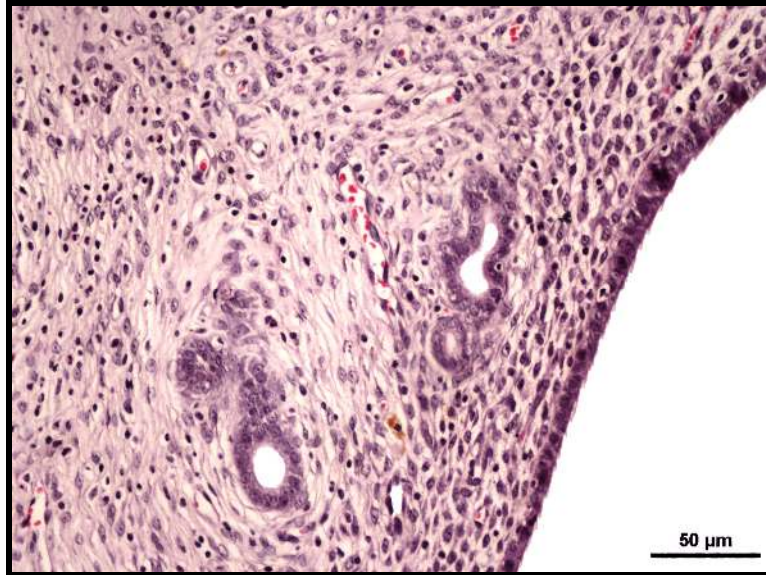
4. BULGULAR

4.1. H&E, Masson Trikrom ve PAS Bulguları:

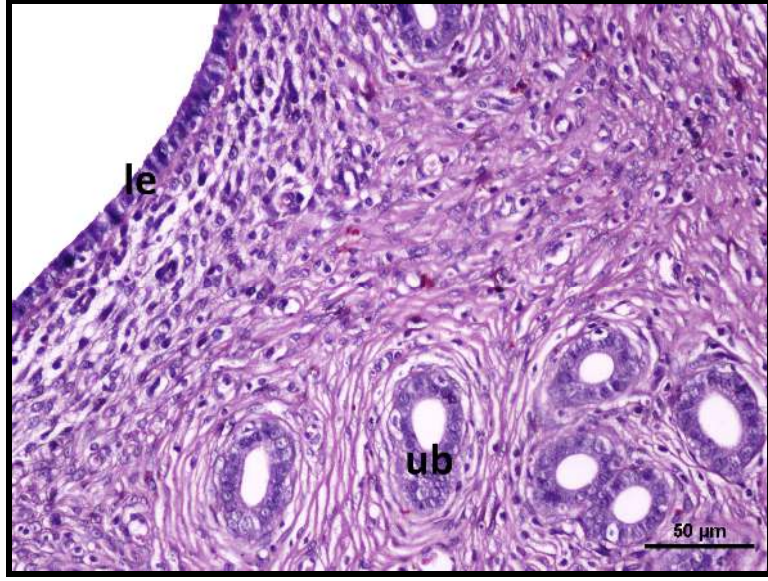
Kontrol grubu: Diöstrus siklusuna özgü normal rat uterusu histolojik yapısı izlendi (şekil 15-17).



Şekil 15. Kontrol grubu rat uterusu kesiti. Luminal epitel, endometriyal bezler ve miyometriyumun normal histolojik yapıda izlenmektedir (Masson Trichrome, Bar: 100 µm).

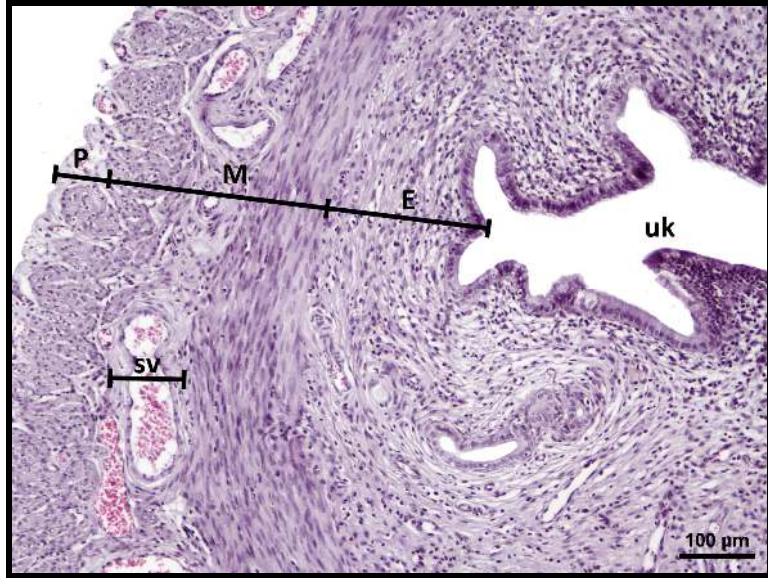


Şekil 16. Kontrol grubu rat endometriyum kesitinde normal yapıda izlenen endometriyum (H&E, Bar: 50µm).

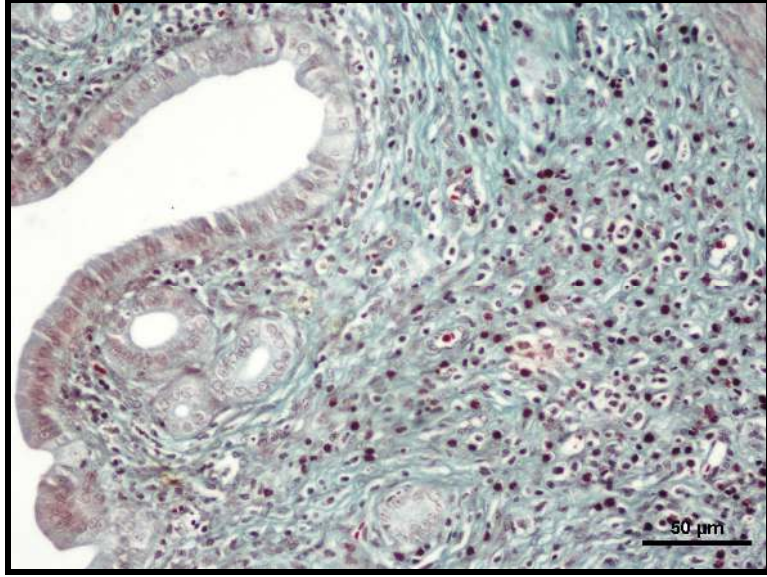


Şekil 17. Kontrol grubu rat endometriyumu. Luminal epitel (ep) ve uterinal bezler (ub) normal yapıda izlenmektedir (PAS, Bar: 50µm).

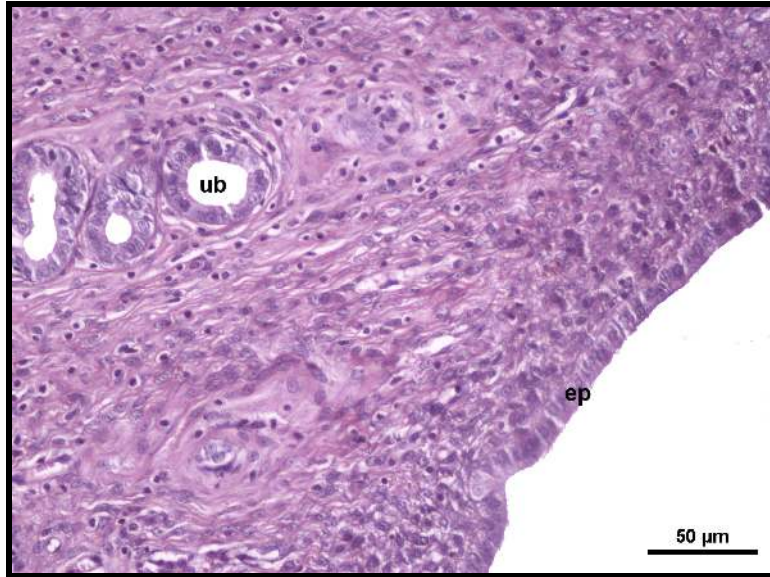
Amifostin grubu: H-E, Masson trikrom ve PAS ile boyanan uterus kesitlerinde, luminal epitel ve uterinal bezler yanı sıra uterusun her 3 tabakası normal histolojik yapıda izlendi (şekil 18-20).



Şekil 18. Amifostin grubu rat uterus kesiti. Total kesitte tüm tabakalar normal olarak izlenmektedir (E:Endometriyum, M:Miyometriyum, P:Perimetriyum, uk: uterus kavitesi, sv: Stratum Vaskülar) (H&E, Bar: 100 µm).

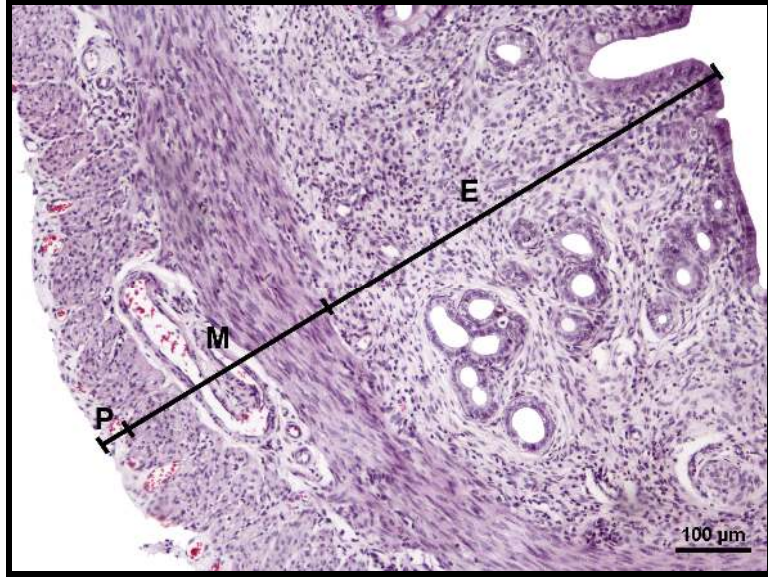


Şekil 19. Amifostin grubu rat uterus endometriyumunda normal görünüm (Masson Trichrome, Bar: 50µm).

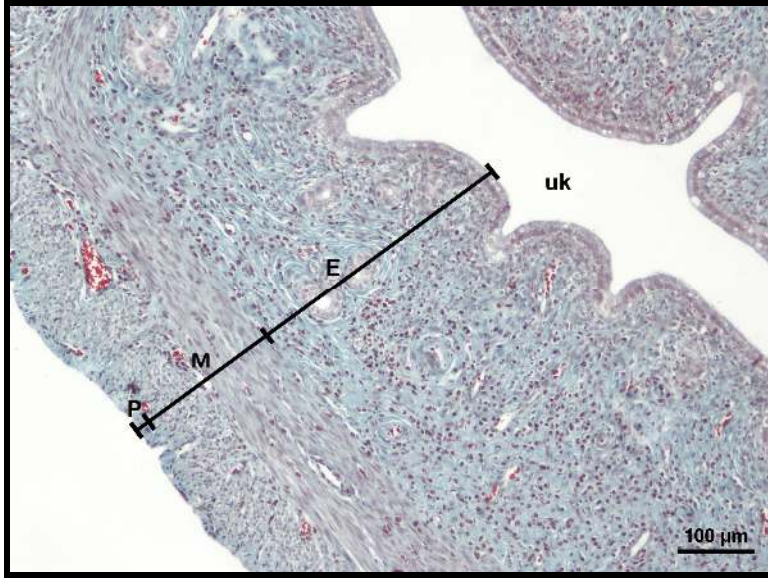


Şekil 20. Amifostin grubu rat endometriyumu. luminal epitel (ep), uterinal bezler (ub) normal yapıda izlenmektedir (PAS, Bar: 50µm).

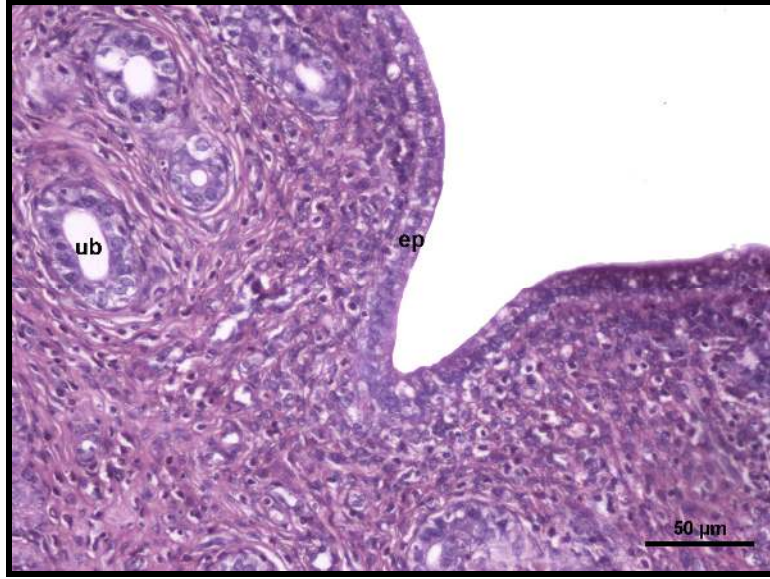
Melatonin grubu: H-E, Masson trikrom ve PAS ile yapılan uterus kesitlerinde, luminal epitel ve uterinal bezler yanı sıra uterusun her 3 tabakası normal histolojik yapıda izlendi (şekil 21-23).



Şekil 21. Melatonin grubu rat uterusunun total kesiti. Uterusun her üç tabakasında normal yapı izlenmektedir E:Endometriyum, M:Miyometriyum, P:Perimetriyum (H&E, Bar: 100 µm).

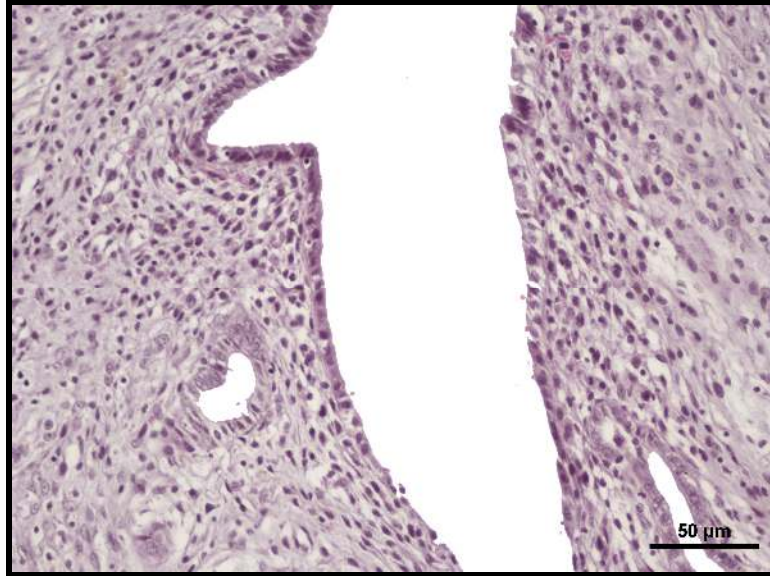


Şekil 22. Melatonin grubu rat uterus kesiti. Normal görünüme sahip total kesit izlenmektedir E:Endometriyum, M:Miyometriyum, P:Perimetriyum, uk: uterus kavitesi (Masson Trikrom, Bar: 100 µm).

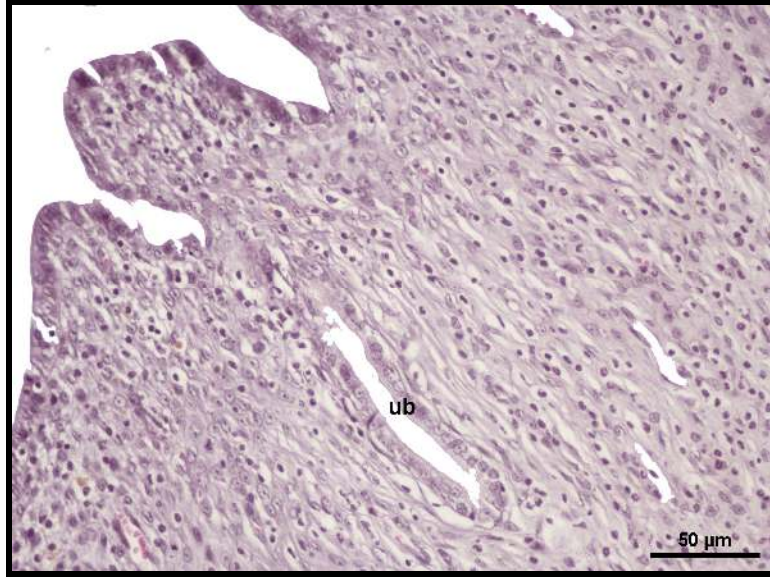


Şekil 23. Melatonin grubu endometriyumu. Luminal epitel (ep) ve endometriyal bezler (ub) normal görünümde izlenmektedir (PAS, Bar: 50 µm).

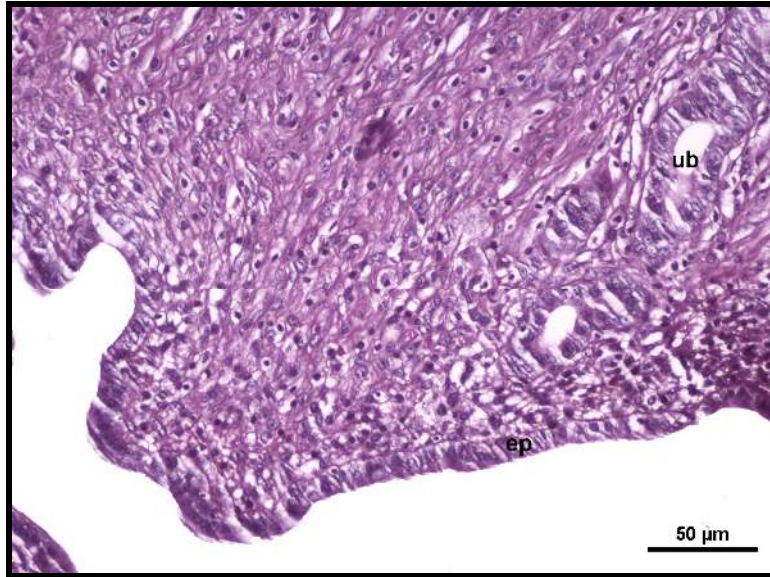
N-asetilsistein grubu: H-E, Masson trikrom ve PAS ile yapılan uterus kesitlerinde endometriyum, miyometriyum ve perimetriyum tabakaları normal histolojik yapıda izlendi (şekil 24-26).



Şekil 24. N-asetilsistein grubu rat endometriyum görünümü. Endometriyuma ait yapılanmalar normal görünümde (H&E Bar: 50 µm).



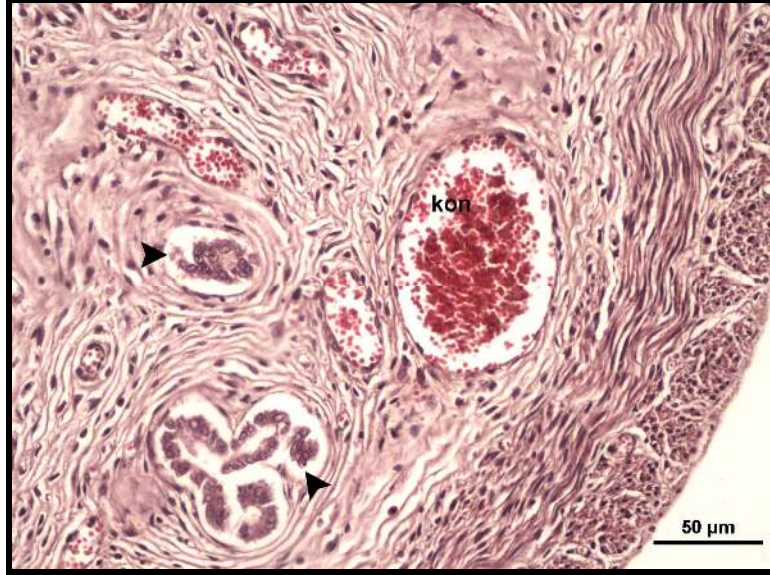
Şekil 25. N-asetilsistein grubu rat endometriyum görüntüsü. Longitudinal kesilmiş normal uterinal bez (ub) izlenmektedir (H&E, Bar: 50 µm).



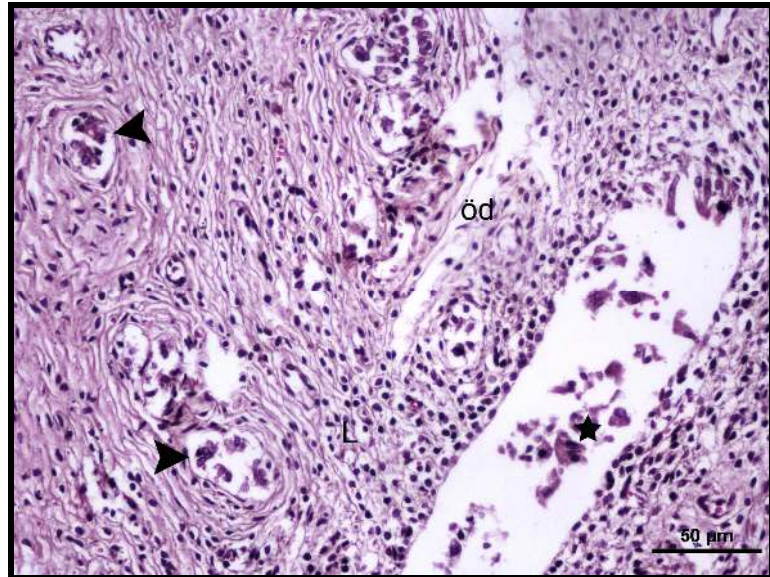
Şekil 26. N-asetilsistein grubu rat endometriyumu. Normal histolojik görünüm izlendi ep: Luminal epitel, ub: uterinal bez (PAS, Bar: 50µm).

Radyasyon grubu: Uterus yüzey epitelinin tamamen desquame olduğu, endometriyal stromada mononükleer hücre infiltrasyonu tespit edildi. Dilate kapiller ve yer yer fokal hemoraji izlendi. Uterinal bez lümeninde düzensizlikler ve yer yer bez epitel hücrelerinde proliferasyon gözlemlendi. Miyometriyumda histopatolojik bir bulguya rastlanmamakla birlikte, stratum vaskülare de konjesyon ve vazodilatasyon belirgin olarak

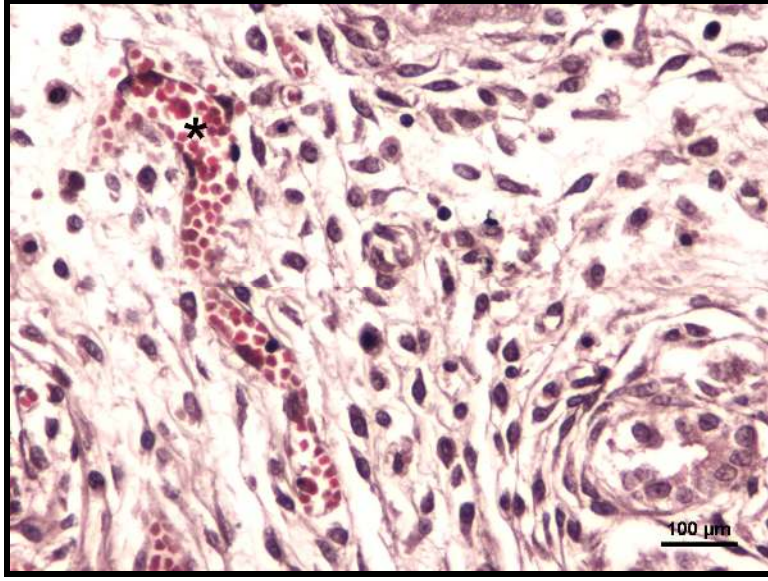
izlendi. Bu gruba ait bazı uterus kesitlerinde luminal epitelde dökülme yanısıra, bezlerde distorsiyon ,perforasyon ve uterus kavitesinde çok sayıda desquame hücreler izlendi (şekil 27-29).



Şekil 27. Radyasyon grubu rat uterus kesiti. Stratum vaskülardeki damarlarda konjesyon (kon), uterinal bezlerde distorsiyon ve perforasyon (ok başı) izlenmektedir (H&E, Bar: 50 µm).

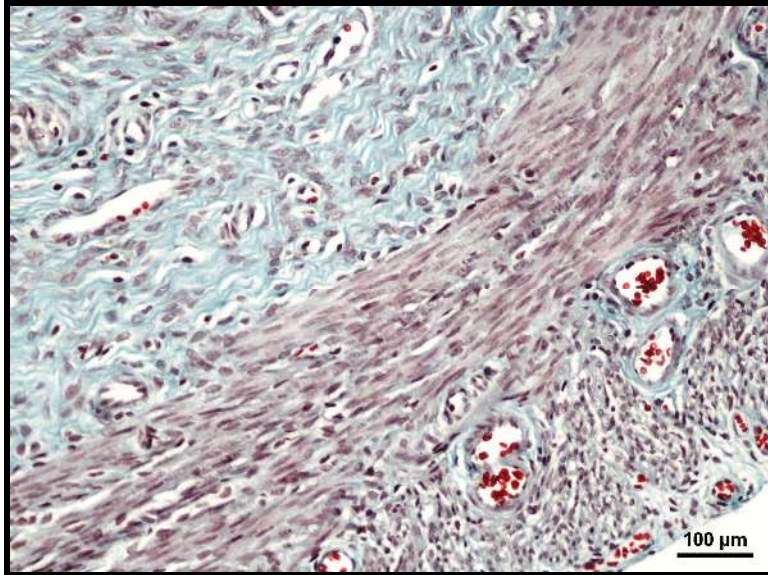


Şekil 28. Radyasyon grubu rat uterus kesiti. Luminal epitelde desquamasyon ve uterus kavitesinde desquame hücreler (★). Uterinal bezlerde distorsiyon ve perforasyon (ok başı) ve stromal bağ dokuda ödem (öd) ayrıca Subepteliyal alanda lenfosit infiltrasyonu (L) izlenmektedir (H&E, Bar: 50 µm)

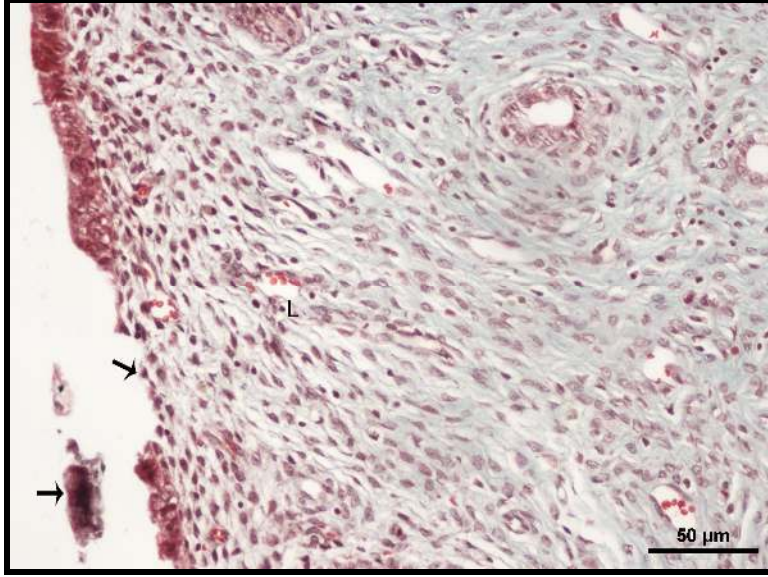


Şekil 29. Radyasyon grubu rat uterus kesiti. Kesitte dilate kapillerler (*) izlenmektedir (H&E, Bar: 20 µm).

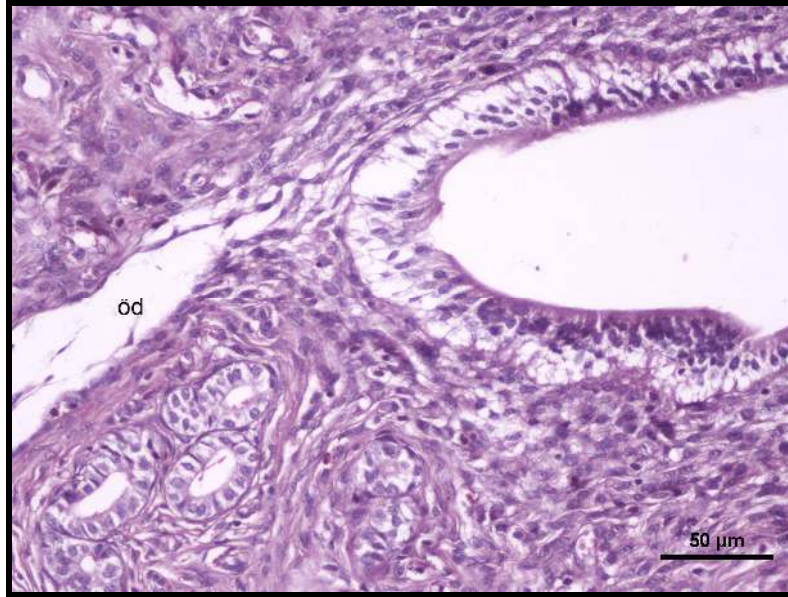
Radyasyon+Amifostin grubu: Uterus luminal epitelinde yer yer deskuamasyon, stromada lenfosit infiltrasyonunda radyasyon grubuna oranla azaldığı tespit edildi ayrıca uterinal bezlerde harabiyet sınırlı bulundu. Endometriyum kapillerleri ve uterinal bezler ile stratum vaskülarede yer alan damarsal yapılar normal izlendi (şekil 30-32).



Şekil 30. Radyasyon+Amifostin grubu rat uterus kesiti. Stratum vaskülarede damarsal yapılar normal izlenmektedir (Masson Trichrome, Bar: 100 µm).

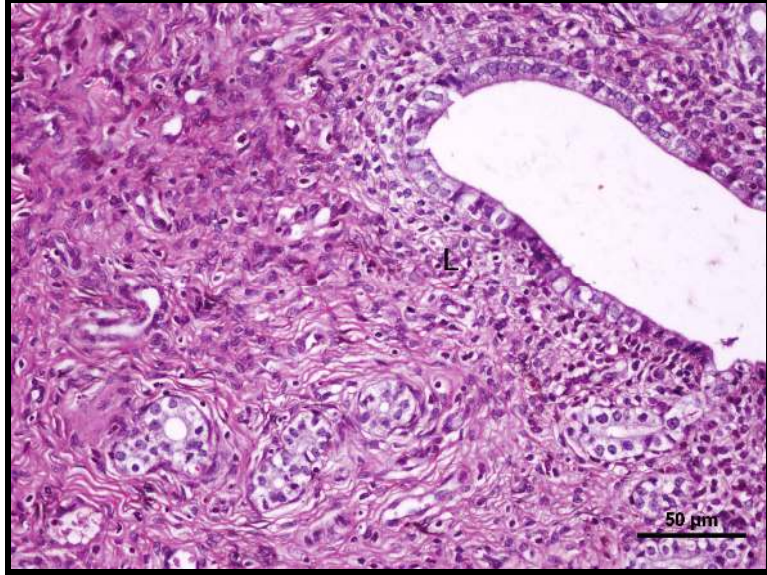


Şekil 31. Radyasyon+Amifostin grubu rat uterus kesiti. Luminal epitelde yer yer doku kaybının (ok) yanı sıra subepiteliyal bölgede lenfosit infiltrasyonu (L) izlenmektedir. (Masson Trikrom, Bar: 50µm).

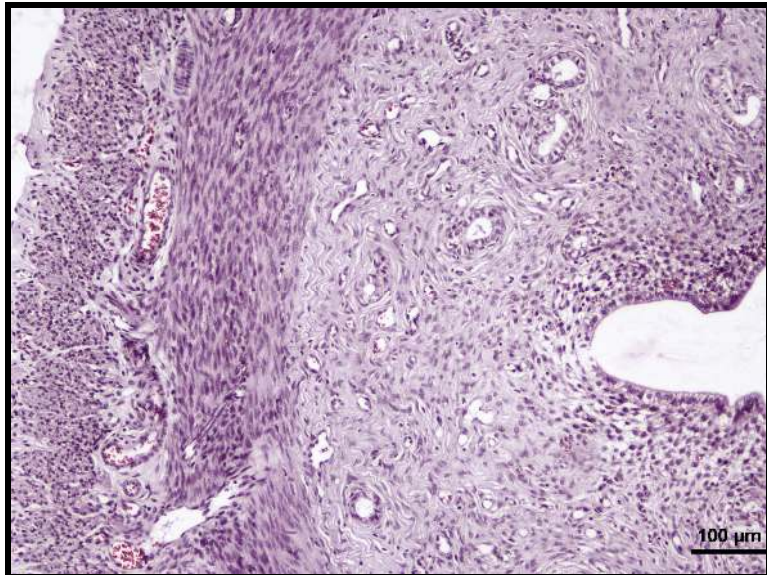


Şekil 32. Radyasyon+Amifostin grubu rat uterus kesiti. Luminal epitelde yer yer dejenerasyon ve stromal bağ dokuda ödem (öd) izlenmektedir (PAS, Bar: 50 µm).

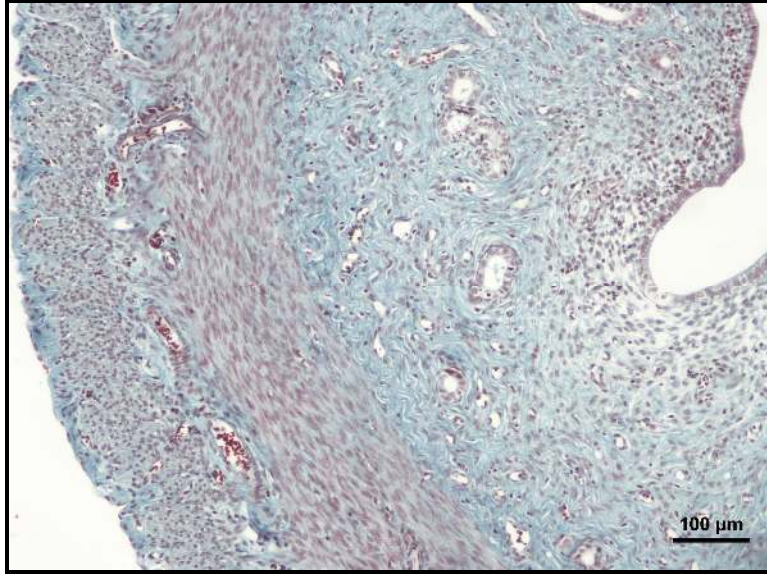
Radyasyon+Melatonin grubu: Uterus yüzey epitel bütünlüğü korunmuş, endometriyal bezler düzgün ve stromal bağ dokusunda lenfosit infiltrasyonu dışında herhangi bir patolojiye rastlanmadı. Endometriyum ve vasküladeki damarsal yapılar kontrol grubuna benzer görünümde izlendi (şekil 33-35).



Şekil 33. Radyasyon+Melatonin grubu rat uterus kesiti. Uterus yüzey epitelinin bütünlüğünü koruduğu bunun yanı sıra stromal bağ dokusunda lenfosit infiltrasyonu (L) izlenmektedir. (PAS, Bar: 50 µm)

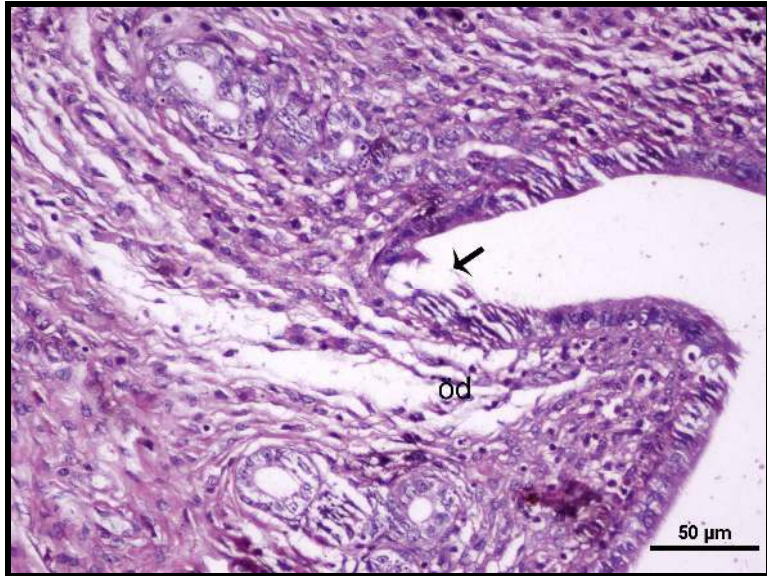


Şekil 34. Radyasyon+Melatonin grubu rat uterusunun total kesiti. Stromal bağ dokusu lenfosit infiltrasyonunun haricinde kontrol grubuna benzer görünüm. (H&E, Bar: 100 µm)

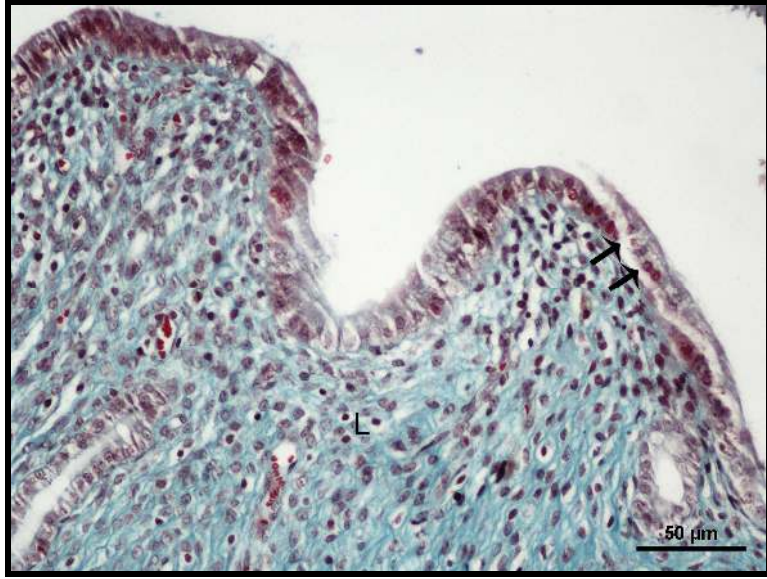


Şekil 35. Radyasyon+Melatonin grubu rat uterus kesiti. Endometriyal bezler ve stromadaki damarsal yapılar kontrol grubuna benzer görünümde izlenmektedir. (Masson Trikrom, Bar: 100 µm)

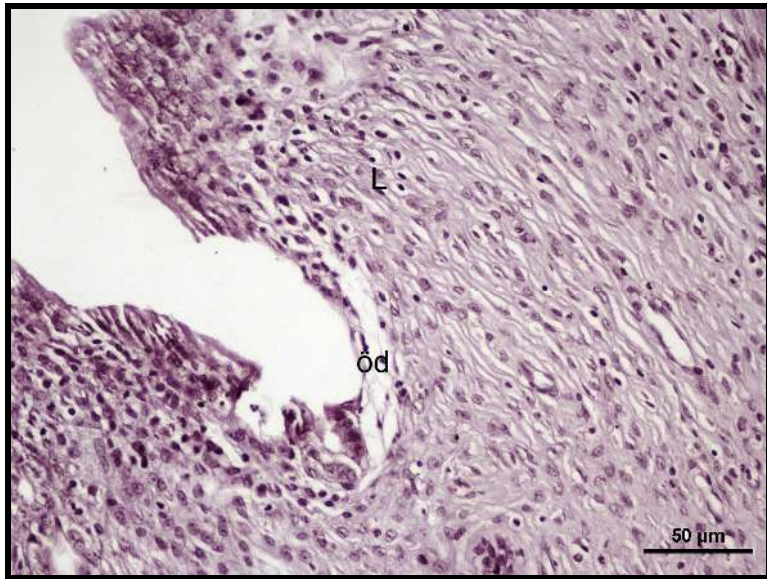
Radyasyon+N-asetilsistein grubu: Uterus yüzey epitelinde yer yer dökülme ve epitel boyunda artış ayrıca çekirdekler bazal kısımda yerleşik bulundu. Stromal bağdokuda ödem ve doku kaybı yanı sıra subepitelyal lenfosit infiltrasyonu seçildi (şekil 36-38).



Şekil 36. Radyasyon+N-asetilsistein grubu rat endometriyum kesiti. Luminal epitelde yer yer dökülme (ok) ve stromal bağ dokusunda doku kaybı ve ödem (öd) (PAS, Bar: 50 µm).



Şekil 37. Radyasyon+N-asetilsistein grubu rat endometriyum kesiti. Yüzey epiteldinde ayrışma (çift ok) ve subepitelyal lenfosit infiltrasyonu (L) (Masson Trikrom Bar: 50 µm).



Şekil 38. Radyasyon+N-asetilsistein grubu rat uterus kesiti. Luminal epitelde silinme ve subepitelyal dokuda lenfosit infiltrasyonun (L) yanısıra ödem (öd) izlenmektedir (H&E, Bar: 50µm).

4.2. TUNEL Assay Bulguları ve İstatistiksel Analiz

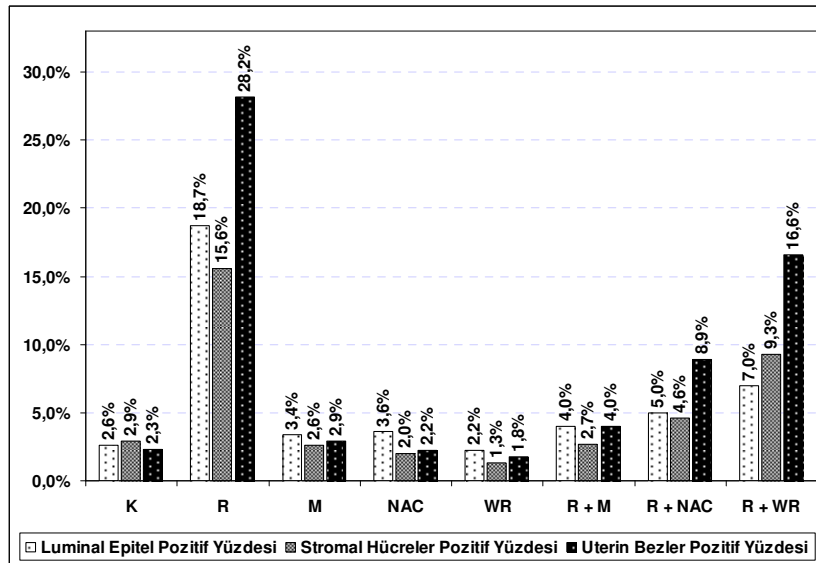
Gruplardan alınan kesitlerden Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL Assay) metoduyla fragmentasyona ulaşan DNA işaretlemeleri yapılarak apoptotik indeks (AI) değerlendirmesi yapıldı ve gruplar arasındaki fark değerlendirildi. Bütün grupların luminal epitel, stromal hücreler, uterin bez hücrelerinden elde edilen veriler Kruskal Wallis testine göre değerlendirildiğinde Tablo 3. ve Grafik 1 deki sonuçlar elde edilmiştir.

Tablo 3: TUNEL Pozitif Sinyal yüzdeleri

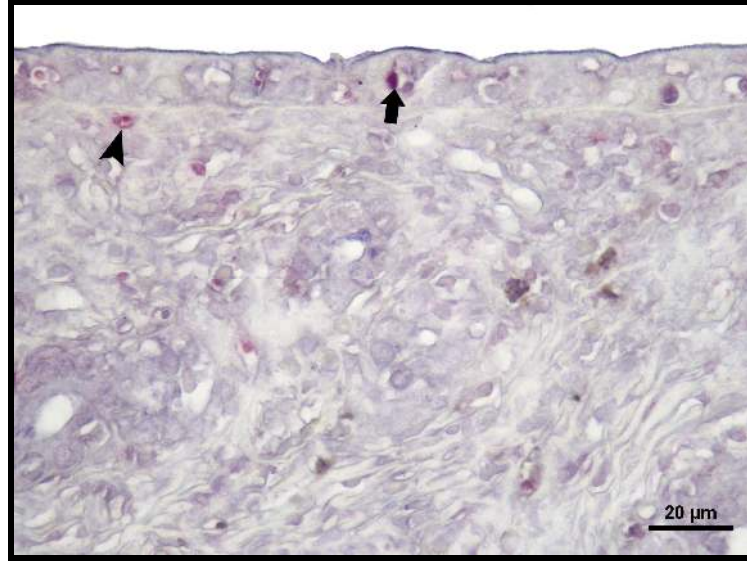
Grup	Grup Adı	Lum Ep Pozitif %	Stromal H Pozitif %	Uterin Bez Pozitif %
1	Kontrol	2.6±0.68 ^a	2.9±0.39 ^c	2.3±0.56 ^f
2	Radyasyon	18.7±3.61 ^b	15.6±2.71 ^e	28.2±5.37 ^h
3	Melatonin	3.4±1.03 ^a	2.6±0.79 ^c	2.9±0.91 ^f
4	NAS	3.6±0.68 ^a	2.0±0.26 ^c	2.2±0.87 ^f
5	WR	2.2±0.86 ^a	1.3±0.55 ^c	1.8±0.57 ^f
6	R + M	4.0±1.32 ^a	2.7±0.79 ^c	4.0±0.79 ^f
7	R + NAS	5.0±1.92 ^a	4.6±0.93 ^c	8.9±1.13 ^{fg}
8	R + WR	7.0±1.02 ^a	9.3±1.93 ^d	16.6±3.77 ^g

Farklı üstsimgeler aynı kolonda gruplar arasında istatistiksel anlamı göstermektedir (ab:P<0.01; cde:P<0.001; fgh:P<0.0001).

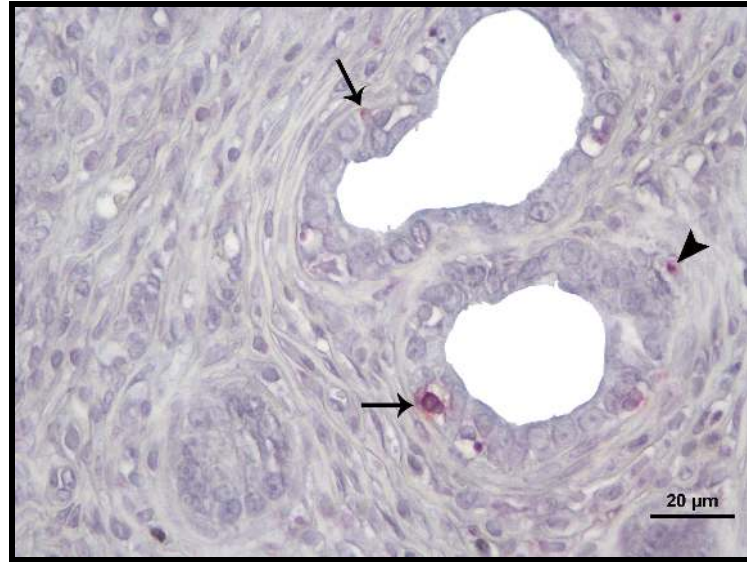
Grafik 1: TUNEL pozitif sinyal yüzdelерinin grafiksel görünümü.



Kontrol grubu TUNEL pozitif hücre yüzdesi: Luminal epitel pozitif sinyal veren hücre yüzdesi istatistiksel olarak Kruskal Wallis testine göre 2.6 ± 0.68 sonucunu gösterdi. Kontrol grubunda stromal hücrelerin toplam pozitif sinyal veren hücre yüzdesi $2,9 \pm 0.39$ ve uterin bezlerin $2,3 \pm 0.56$ olduğu tespit edildi (şekil 39-40).

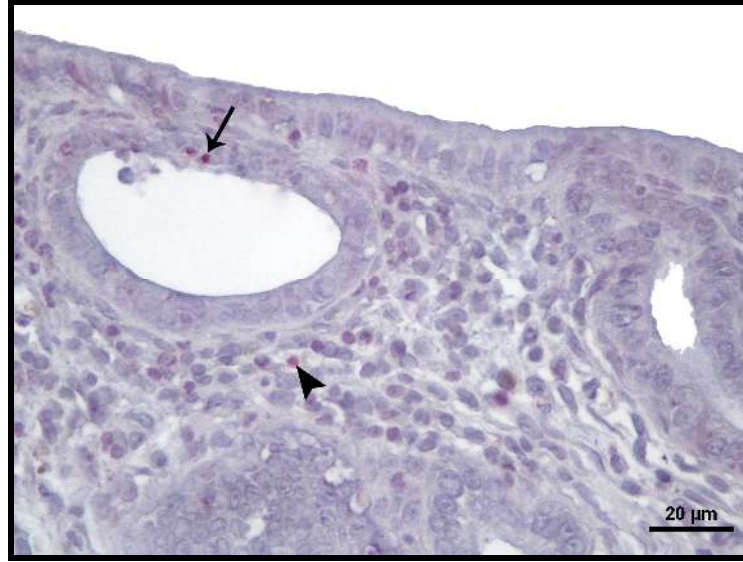


Şekil 39. Kontrol grubu luminal epitel ve stromal hücrelerde TUNEL Assay. Epitel hücrelerinde (kalın ok) ve stromal hücrelerde (ok başı) düşük pozitif sinyal veren hücre sayısı olduğu gözlemlendi (TUNEL Assay, Bar:20 µm).

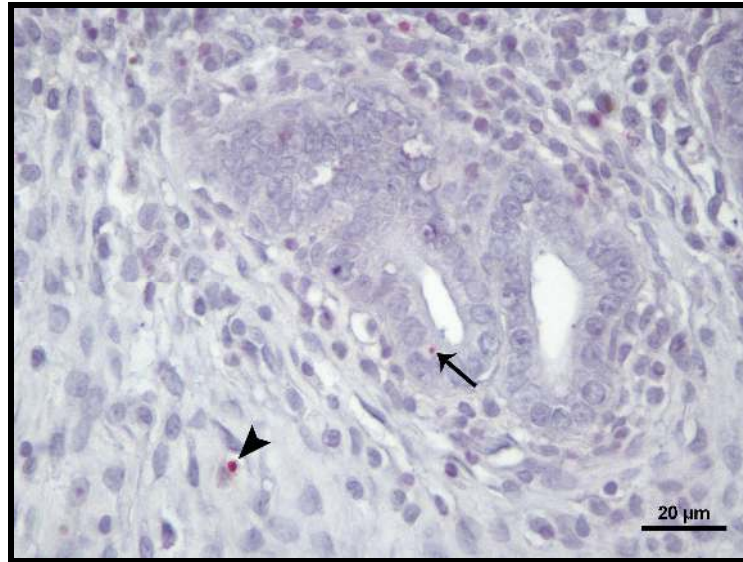


Şekil 40. Kontrol grubu uterin bez hücrelerinde TUNEL Assay. Bez hücreleri fragmentasyon bölgeleri (ok) ve stromal hücrelerde (ok başı) düşük pozitif sinyal veren hücre sayısı (TUNEL Assay, Bar:20 µm).

Amifostin grubu TUNEL pozitif hücre yüzdesi: Luminal epitelde $2,2 \pm 0,86$ değer gösterdi ve kontrol grubuyla benzer görüldü. Bu grubun stromal hücrelerde $1,3 \pm 0,55$ ve uterinal bezlerde $1,8 \pm 0,57$ pozitif sinyal veren hücre yüzdesine sahip olduğu ve her ikisinin de kontrol grubuyla paralel olduğu tespit edildi (şekil 41-42).

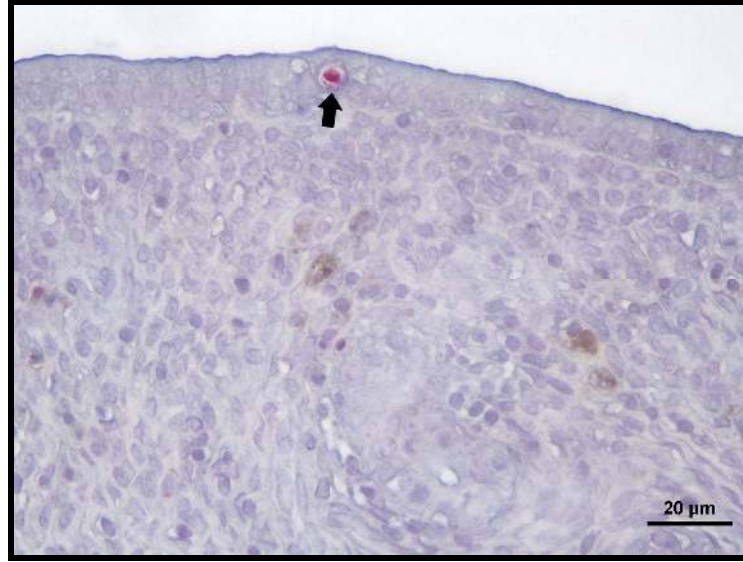


Şekil 41. Amifostin grubu uterinal bez hücrelerinde ve stromal hücrelerde TUNEL Assay. Luminal epitel, stromal hücreler (ok başı) ve uterinal bez hücrelerinde (ok) düşük pozitif sinyal gözlenmektedir (TUNEL Assay, Bar:20 µm).

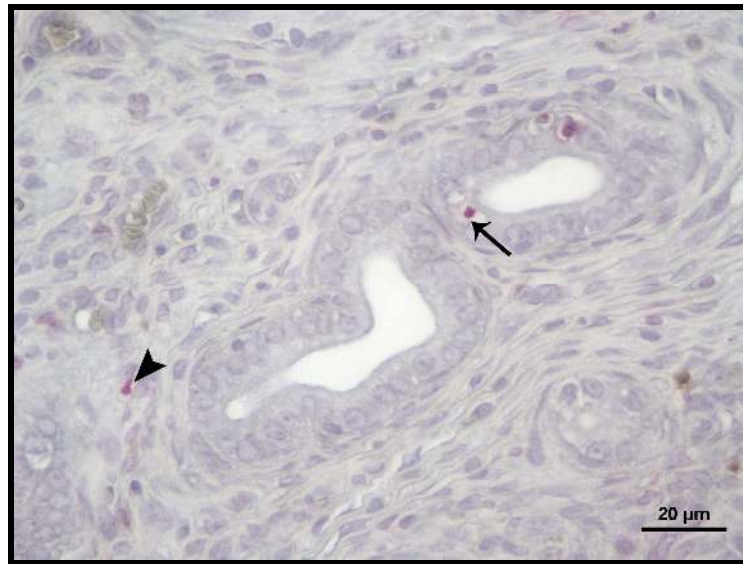


Şekil 42. Amifostin grubu uterinal bez ve stromal hücrelerde TUNEL Assay. Stromal hücrelerde (ok başı) ve uterinal bez hücrelerinde (ok) kontrol grubuyla paralel pozitif sinyal olduğu görülmektedir (TUNEL Assay, Bar:20 µm).

Melatonin grubu TUNEL pozitif hücre yüzdesi: Luminal epitel pozitif sinyal veren hücre yüzdesinin $3,4 \pm 1.03$ olduğu ve kontrol grubuna benzer olduğu tespit edildi. Stromal hücrelerde $2,6 \pm 0.79$ ve uterinal bezlerdeki $2,9 \pm 0.91$ yüzdelерinin kontrol grubuyla benzer olduğu sonucuna ulaşıldı (şekil 43-44).

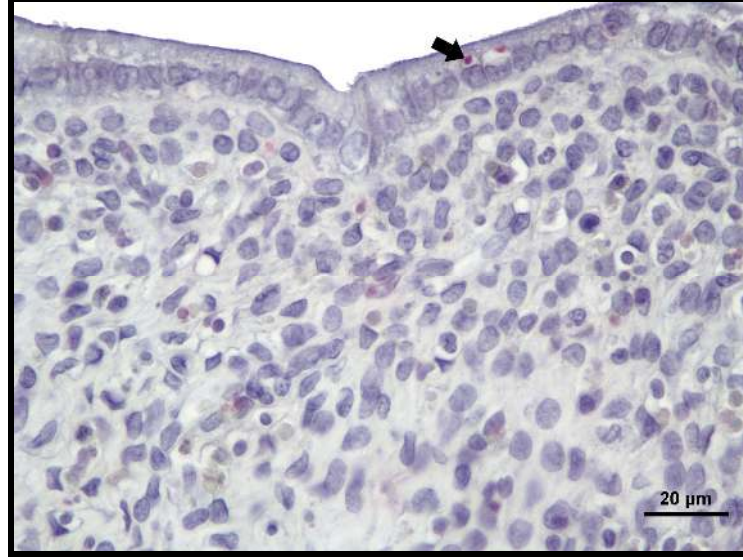


Şekil 43. Melatonin grubu luminal epitel hücrelerinde TUNEL Assay. Luminal epitelde (kalın ok) düşük pozitif sinyal veren hücre sayısı (TUNEL Assay, Bar:20 µm).



Şekil 44. Melatonin grubu stromal hücrelerde ve uterinal bezde TUNEL Assay. Stromal hücrelerde (ok başı) ve uterinal bez hücreleride (ok) pozitif sinyal veren alanlar gözlenmektedir (TUNEL Assay, Bar:20 µm).

N-asetilsistein grubu TUNEL pozitif hücre yüzdesi: luminal epitel yüzdesi $3,6\pm0,68$ bulundu ayrıca stromal hücreler için $2,0\pm0,26$ ve uterinal bezlerde $2,2\pm0,87$ yüzde vererek kontrol grubuyla benzer sonuç elde edildi (şekil 45-46).

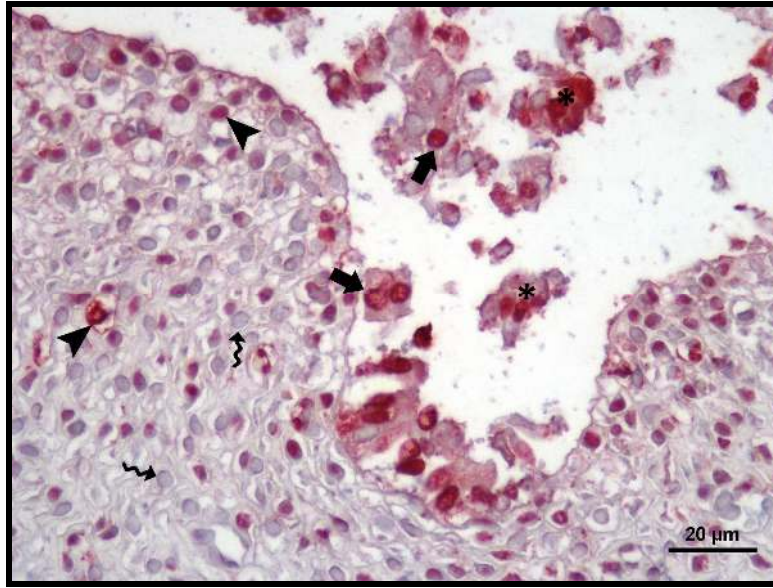


Şekil 45. N-asetilsistein grubu luminal epitel ve stromal hücrelerde TUNEL Assay. Luminal epitelde (kalın ok) düşük pozitif sinyal veren hücre sayısı olduğu gözlemlendi (TUNEL Assay, Bar:20 µm).

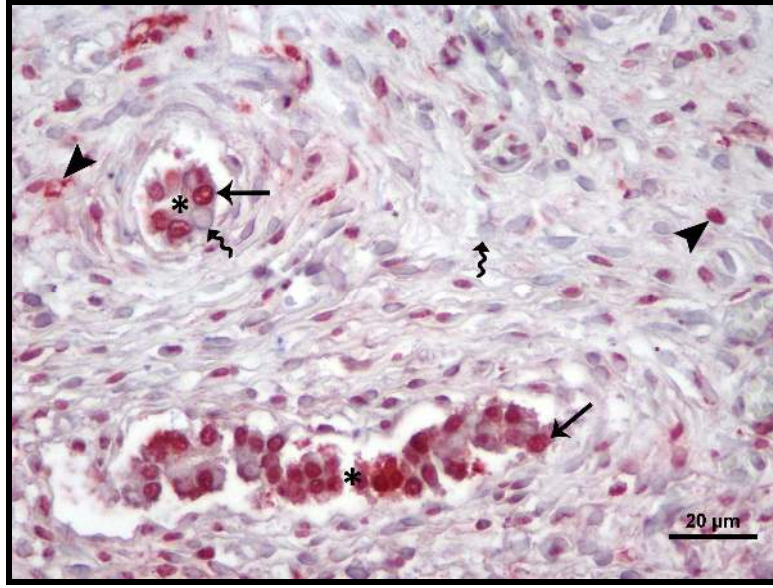


Şekil 46. N-asetilsistein grubu uterinal bez hücrelerinde TUNEL Assay. Uterinal bez hücrelerinde pozitif sinyal veren alanlar (ok) gözlenmektedir. (TUNEL Assay, Bar:20 µm).

Radyasyon grubu TUNEL pozitif hücre yüzdesi: Luminal Epitel 18.7 ± 3.61 yüzdesine sahip olduğu ve kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.01$). Stromal hücrelerde Kontrol grubuna kıyasla Radyasyon grubu pozitif sinyal veren hücre sayısında 15.6 ± 2.71 yüzdeyle artış olduğu tespit edildi ($p < 0.001$). Uterinal bezlerin pozitiflik yüzdesinin luminal epitel ve uterinal bezlere benzer şekilde Radyasyon grubunda 28.2 ± 5.37 yüzdeye sahip olduğu ve artış gösterdiği gözlemlendi ($p < 0.0001$) (Tablo 3, Grafik 1) (şekil 47-48).

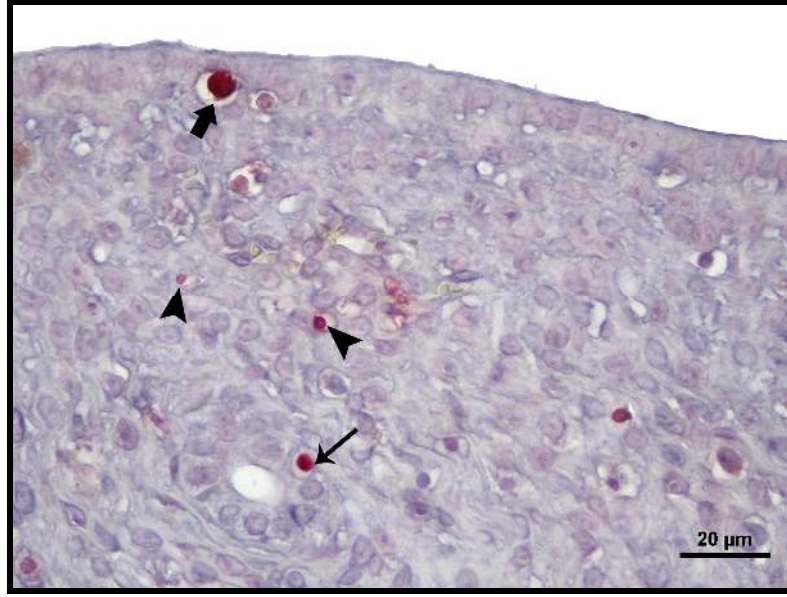


Şekil 47. Radyasyon grubu uterus kesitinde luminal epitel ve stromal hücrelerde TUNEL Assay. Luminal epitelde (kalın ok), stromal hücrelerde (ok başı) yoğun pozitif sinyal ayrıca uterinal kaviteye dökülmüş luminal epitel kümelerinde yoğun pozitif sinyalin (*) yanı sıra negatif sinyal veren hücreler (kıvrımlı ok) gözlenmektedir (TUNEL Assay, Bar:20 μ m).

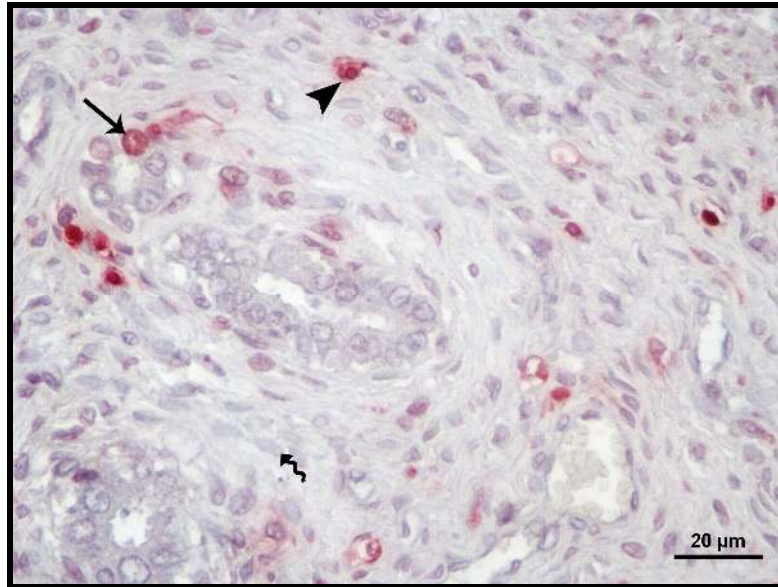


Şekil 48. Radyasyon grubu uterinal bez ve stromal hücrelerde TUNEL Assay. uterus kesitinde yoğun pozitif elde edilmiş uterinal bez hücreleri alanları (*) içerisinde yer alan bez hücreleri (ok) gösterilmiştir. Stromal hücrede pozitif sinyal veren hücre (ok başı) sayısında artış yanı sıra negatif sinyal veren hücreler (kırımlı ok) gösterilmiştir (TUNEL Assay, Bar:20 μ m).

Radyasyon+Amifostin grubu TUNEL pozitif hücre yüzdesi: Luminal epitelde 7.0 ± 1.02 ortalamayla kontrol grubuna benzer bulundu, stromal hücrelerde ise 9.3 ± 1.93 ortalamayla kontrol ve radyasyon grupları arasında bir değer gösterdi ($p < 0.001$). Radyasyon+Amifostin grubu uterinal bez pozitif hücre yüzdesi 16.6 ± 3.77 olarak hesaplandı. Uterinal bez yüzdesinin stromal hücrelere benzer şekilde kontrol ve radyasyon grubu arasında bir değere sahip olduğu istatistiksel olarak tespit edildi ($p < 0.0001$) (şekil 49-50).

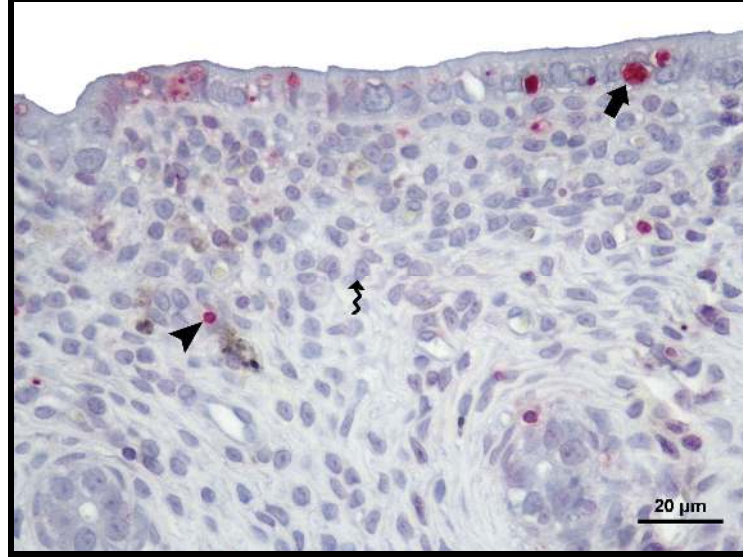


Şekil 49. Radyasyon+Amifostin grubu luminal epitel, stromal ve uterinal bez hücrelerinde TUNEL Assay. Luminal epitelde (kalın ok), stromal hücrelerde (ok başı) ve uterinal bez hücrelerinde (ok) pozitif sinyal veren fragmente DNA'lar görülmektedir (TUNEL Assay, Bar:20 μ m).

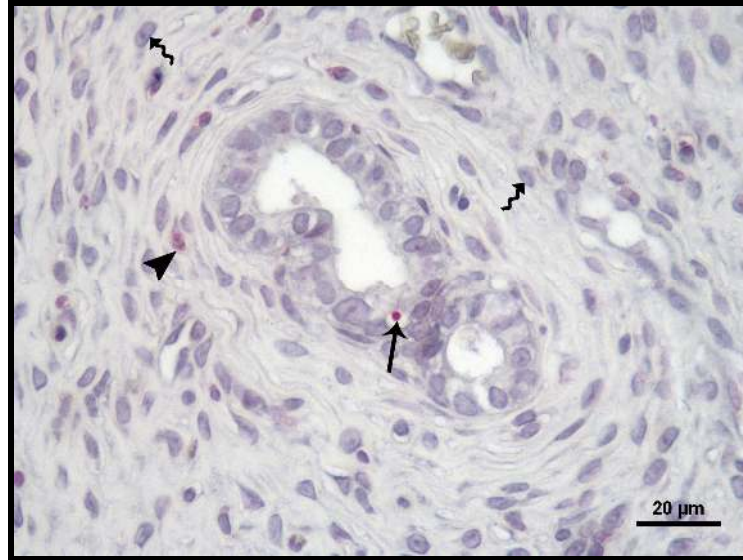


Şekil 50. Radyasyon+Amifostin grubu stromal ve uterinal bez hücrelerinde TUNEL Assay. Stromal hücrelerde kontrol ve radyasyon grupları arasında yüzdeye sahip pozitif yüzdesi veren stromal hücreler (ok başı) ayrıca uterinal bez hücrelerinde (ok) artmış pozitif sinyalin yanı sıra negatif sinyal oluşan (kıvrımlı ok) hücreler görülmektedir (TUNEL Assay, Bar:20 μ m).

Radyasyon+Melatonin grubu TUNEL pozitif hücre yüzdesi: Luminal epitelde 4.0 ± 1.32 , stromal hücrelerde 2.7 ± 0.79 ve uterinal bezlerde 4.0 ± 0.79 pozitif sinyal yüzde sonucuna ulaşıldı ve kontrol grubuyla benzer olduğu tespit edildi (şekil 51-52).

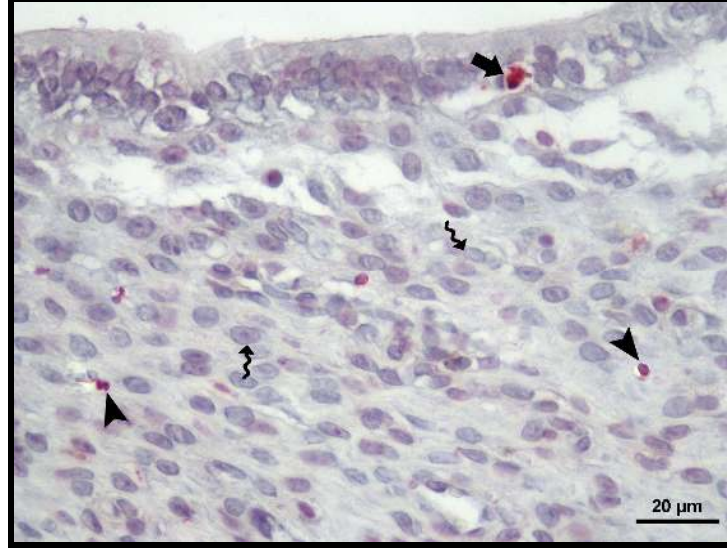


Şekil 51. Radyasyon+Melatonin grubu luminal epitel ve stromal hücrelerde TUNEL Assay. Luminal epitel hücrelerinde (Kalın ok), stromal hücrelerde (ok başı) düşük pozitif sinyal görülmektedir. Stromal hücreleri büyük kısmında negatif sinyal (kıvrımlı ok) gösterilmektedir (TUNEL Assay, Bar:20 µm).

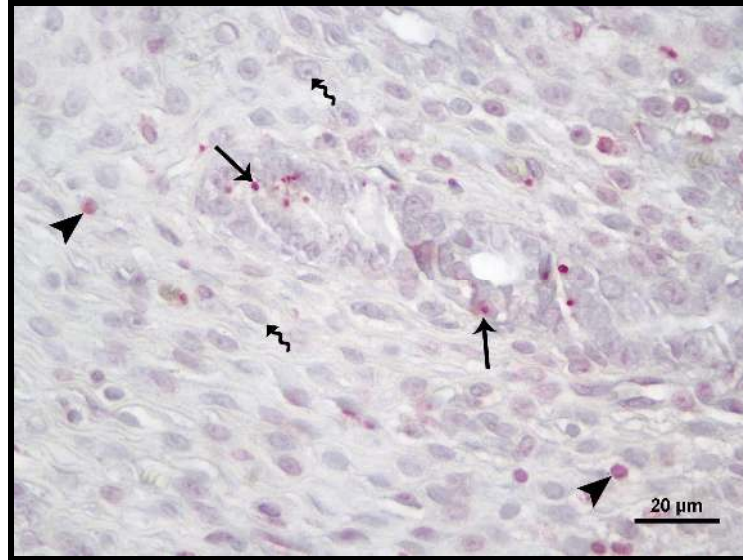


Şekil 52. Radyasyon+Melatonin grubu uterinal bez ve stromal hücrelerde TUNEL Assay. Uterinal bez hücrelerinde (ok) ve stromal alanda (ok başı) zayıf pozitif sinyal görülmektedir, negatif sinyal alınan hücreler görülmektedir (kıvrımlı ok) (TUNEL Assay, Bar:20µm).

Radyasyon+N-asetilsistein grubu TUNEL pozitif hücre yüzdesi: Luminal epitel pozitif yüzdesinin 5.0 ± 1.92 olduğu, stromal hücrelerde 4.6 ± 0.93 ve uterin bezlerde 8.9 ± 1.3 yüzdeye sahip olarak kontrol grubuna benzer olduğu tespit edilmiştir (şekil 53-54).



Şekil 53. Radyasyon+N-asetilsistein grubu luminal epitel ve stromal hücrelerde TUNEL Assay. Luminal epitel (kalın ok) ve stromal alanda (ok başı) kontrol grubuna benzer pozitif sinyal yüzdesi izlenmektedir. Negatif sinyal veren hücreler (kıvrımlı ok) görülmektedir (TUNEL Assay, Bar:20 µm).



Şekil 54. Radyasyon+N-asetilsistein grubu uterin bez ve stromal hücrelerde TUNEL Assay. Stromal hücrelerde (ok başı) ve uterin bez hücrelerinde (ok) pozitif sinyal odakları görülmektedir. Negatif sinyal veren hücreler (kıvrımlı ok) görülmektedir (TUNEL Assay, Bar:20 µm).

5. TARTIŞMA

Kanser tedavisinde en sık başvuru yöntemlerinden biri olan radyoterapide esas hedef tümörlü dokuyu ortadan kaldırırken normal dokularda minimum hasar oluşturulmasıdır ancak iyonize radyasyon tümörlü dokuyu tahrip ederken normal doku yaralanması olarak adlandırılan uzun süreli veya kalıcı yan etkilere neden olabilmektedir. Abdomino-pelvik ışımalarda iyonize radyasyon uterus gibi pelvik ve abdominal bölgedeki organları olumsuz yönde etkilemektedir. Casarett'in doku radyosensitivite (hassasiyet) sınıflandırmasına göre hücre ölümü ve doku hasarı baz alındığında hassasiyet derecesine göre radyosensitivite 4 gruba ayrılmaktadır. I. grup dokular en radyosensitif olup gonadları içermektedir. Casarett'in sınıflandırmasına göre uterus II. grup radyosensitif kategorisinde yer almaktadır (24). Ayrıca kanser tedavisi gören kadınlarda ışıma yapılan bölgeye göre infertilite gelişmesi ve gebelikte sorunlara neden olması mümkündür.

Radyasyon tedavisinin hipotalamus-hipofiz-gonad eksenini aracılığıyla (101) ayrıca doğrudan overler üzerinde hasara sebep olabileceği gibi (102-104) uterus üzerinde doğuma kadar fetüsü barındıracak uygun bir ortam oluşmasını engelleyecek etkiler ortaya çıkartabileceği daha önce bildirilmiştir. Klinik çalışmalarda ulaşılan bir diğer sonuç 14-30 Gy ışımanın uterin disfonksiyona neden olmasının yanı sıra pre-pubertal uterusun yetişkin uterusundan daha radyosensitif olduğu yönündedir (105,106).

Pelvik bölge ışımalarının spontane düşükler, erken doğum, düşük doğum ağırlığı ve plasental anomaliler yönünden gebelik ile ilişkili olduğu (106-108) ayrıca düşük uterus volümünün yanında miyometriyal fibroz, uterin damarlanmada hasar ve endometriyal yaralanmayla kendini gösterdiği bildirilmiştir (109-113). Uterusun ışımaya bağlı hasarı, uygulanan radyasyon dozuna, ışıma bölgesine ve tedavi gören hastanın yaşına bağlı olarak farklı şiddette gerçekleştiği belirtilmiştir (104,105,109).

Tüm vücut ışımalarında (TBI) radyoterapinin uterin damarlarda hasara neden olduğu ve dolayısıyla zayıf vaskülarizasyonun fetoplasental kan akışını düşürdüğü öne sürülmüştür (110). Ayrıca pelvik bölge ışımasının endometriyum hasarına ve normal desidualizasyonu engellediği öne sürülmüştür. Bu durum gebelikte plasenta akreta veya plasenta perkreta gibi plasantasyon anomalilerine neden olmasının yanı sıra radyoterapinin miyometriyum incelmeye neden olduğu ve uterin rüptüre neden olabileceği belirtilmiştir (108,112).

Çalışmamızda 10 Gy iyonize radyasyonu kullanmış olmamızın nedeni, Kokawa ve

ark. radyoterapiye bağlı DNA fragmentasyon değerlendirmesi yaptıkları bir çalışmada 9 Gy ışıma sonrası fragmentasyon oranının pik yaptığını 2 farklı metotla tespit etmiş, 36.9 Gy ışıma yapılan deneklerde ise fragmentasyonun azaldığını nekrozun artış gösterdiğini belirtmişlerdir (114). Ayrıca yüksek dozda radyasyonun apoptotik indeks (AI) yerine nekroza neden olduğu bu nedenle DNA fragmentasyonu değerlendirmesinde TUNEL Assay kullanımında hataya sebep olabileceği öne sürülmektedir (115). Yapılmış 2 ayrı çalışmalarda yine 9-10 Gy'lik ışımaya bağlı AI değerlendirmesi belirtilmiştir (116,117).

Pelvik ışıma için deney hayvan modeli oluşturduğumuz bu çalışmamızda hayvanları ışımayı takiben 48 saat sonra sakrifiye ederek uterus dokularını dissekiye ettik. Bunu yapmamızdaki amaç, hem genital siklus için ~57 saat süren distrusu standart bir duruma getirmek hemde Dery ve ark. yaptıkları çalışma sonucunda siklus boyunca diöstrus döneminde düşük AI görüldüğünü ne sürmüş olmalarıdır (118). Dolayısıyla deneysel çalışmamızda gözlemleyeceğimiz TUNEL pozitif sinyallerinin radyasyon kaynaklı fragmentasyonlara bağlı oluştuğunu söylememiz mümkündür.

Radyoterapi kaynaklı iyonize radyasyonun uterus üzerindeki etkisi ve bu etkilere karşı protektif ajanları değerlendiren klinik ve deneysel çalışmalar kısıtlı olmasına rağmen başka dokula üzerinde çeşitli fraksiyon ve dozda iyonize radyasyonun yanında protektif ajanları değerlendiren birçok çalışma yapılmıştır. Carabajal ve ark. yaptıkları bir deney hayvanı çalışmasında 5 Gy ışıma yapılmış deney hayvanlarından 72 saat sonra elde edilen uterus dokularında uterinal bezlerde dejenerasyon, uterinal kavite kıvrımlarının ortadakı kalktığı ayrıca mitotik figrdeki düşüşü proliferatif hücre çekirdek antijeni (PCNA) ekspresyonundaki azalma ile göstermiştir. Aynı çalışmada ince bağırsak kriptalarında 5 Gy ışımanın kripta hücrelerinde DNA fragmentasyonuna bağlı AI artışına neden olduğu TUNEL Assay metoduyla gösterilmiştir (119). Çalışmamızda 10 Gy radyoterapi uygulaması sonrası uterus luminal epitel desquamasyonu, uterinal bezlerde distorsiyon ve perforasyon, yoğun ödem artışı ve stratum vaskülarede konjesyon gözlenmiştir.

aloğlu ve ark. ince bağırsakta 20 Gy lik ışıma sonrası dokularda diffüz hemorajik infiltrasyon, vakuolize ve piknotik çekirdekli hücrelerde artış, fokal nekroz, plazmaliz ve karyoliz gözlemiştir. Ayrıca aynı çalışmada amifostin (200 mg/kg) n tedavi uygulanan grupta kan damarlarında orta dereceli dilatasyon ve sitoplazmik granüller olduğu, radyasyon grubuna göre morfolojik hasarın azaldığı belirtilmiştir (50). Amifostin'in radyoprotektif etkisine yönelik Segreto ve ark. yaptıkları çalışma sonucu 7 Gy'lik

radasyon ışıması yapılan deney hayvanı kemik iliğinde radyoterapiye bağı parenkimal dejenerasyonlar belirtilmiş amifostin (400 mg/kg) tedavisi uygulanan grupta bu dejenerasyonların azaldığı bildirilmiştir (120).

DNA fragmentasyonu değerlendirmesinin yapıldığı bir çalışmada Karakoyun-elik ve ark. deney hayvanı testisine 2 Gy ışıma uyguladıktan sonra AI artışı olduğunu, ışımanın yanı sıra 200 mg/m² amifostin tedavisi uygulanan grupta AI'in radyasyon uygulanan grupla benzer olduğu belirtilmiştir. Bu alışmadan Casarett'in sınıflandırmasına göre grup-I'de yer alan yüksek radyosensitif testisteki germ hücrelerinde 2 Gy ışımaya karşın 200 mg/m² amifostin uygulanmasının koruyucu olmadığı sonucuna ulaşılmaktadır (121). Uterus üzerinde bizim yaptığımız deneysel çalışma sonucu amifostin ön tedavisi uyguladığımız grupta, radyoterapi grubundaki yoğun histolojik dejenerasyonun nispeten azaldığı, desquame hücre miktarı ve uterinal bez dejenerasyonun sınırlı olduğu gözlendi. Ayrıca radyasyon grubuyla kıyaslandığında TUNEL pozitif sinyal yüzdesinin stromal hücreler ve uterinal bez hücrelerinde düşüşe geçtiği, luminal epitelin ise AI bakımından kontrol grubuyla benzer olduğu sonucuna ulaştık.

Aghazadeh ve ark. yaptığı bir çalışmada 10 Gy gama ışımayı takiben 72 saat sonra spinal kord da mono-nükleer infiltrasyon, konjesyon, nekroz, hücrel vezikülasyon ve demyelinizasyon gibi histopatolojik bulgular gözlenmiştir. Aynı çalışmada 30 mg/kg melatonin injeksiyonu yapılan grupta konjesyon ve nekrozun azaldığı bildirilmiştir (122). 18 Gy gama ışıması uygulayan Serin ve ark. deney hayvanları akciğerinde intra alveolar ödem, makrofaj aktivitesinde artış, hyalin arteroskleroz ve alveol duvarında kalınlaşma bildirilmiş buna karşın 100 mg/kg i.p. melatonin injeksiyonu yapılan grupta bu histopatolojik bulguların azaldığı bildirilmiştir (123).

Topkan ve ark. deney hayvanlarında bacak ışıması gerçekleştirdikleri bir çalışmada 3 fraksiyon halinde toplam 25 Gy ışıma yapılan hayvanların radyasyona bağı epifizyal büyüme plak dejenerasyonu geliştirdiği, amifostin (200 mg/kg) uygulanan grupta koruyucu etkisini göstermesine rağmen melatonin (15 mg/kg) uygulamasının daha koruyucu olduğu belirtilmiştir (59). Bizim yaptığımız deney sonucunda uterusu radyasyona bağı histolojik konjesyon ve dejenerasyon hem amifostin hemde melatonin uygulanan gruplarda azaltmıştır ancak melatonin uygulanan grupta morfolojik yapının daha iyi olduğu gözlenmiştir. Ayrıca amifostin uygulanan grupta DNA fragmentasyonunda düşüş olmasına rağmen melatonin grubunun kontrol grubuyla benzer olduğu, dolayısıyla uterus üzerinde

daha protektif bir profile sahip olduğunu düşünmekteyiz.

N-asetilsistein'e yönelik Demirel ve ark. yaptığı çalışmada radyoterapi uygulamasına bağlı deride oluşan hasarı indirgemedi N-asetilsistein ve amifostin'in protektif etkinliği bildirilmiştir (70). Bir başka çalışmada 6 Gy γ -ışınması yapılan deney hayvanlarının karaciğer hücrelerinde hepatoksisite ve DNA fragmentasyonunda artış agaroz jel elektroforezi yöntemiyle gösterilmiştir ayrıca histolojik olarak bu hayvanların karaciğer hücrelerinde yoğun piknotik çekirdek ve hücresel dejeneratif yapılanmalar izlenmiştir. 6 Gy ışınma öncesi 7 gün boyunca 1g/kg NAC injeksiyonu yapılan grupta ise bu dejeneratif özelliklerin ve DNA fragmentasyon miktarının kontrol grubuyla benzer olduğu bildirilmiştir (124). Bizim çalışmamızda 10 Gy abdomino-pelvik ışınma yanısıra 500 mg/kg NAC injeksiyonu yapılan grupta morfolojik ve hücresel dejenerasyonun radyoterapi uygulanan gruba oranla azaldığı ve DNA fragmentasyonu bakımından kontrol grubuna benzer olduğu TUNEL Assay yöntemi ile tespit edilmiştir.

Randomize kontrollü yürüttüğümüz deneysel çalışmamızda Co⁶⁰ kaynaklı teleterapi cihazı kullanılarak radyoterapi amaçlı iyonize gama radyasyonu diğer dokularda olduğu gibi uterus üzerinde dejeneratif profilde değişimlere ve DNA fragmentasyonunda artışa neden olmaktadır. Işınma öncesi amifostin uygulamasının bu bozunmayı azalttığı ancak n-asetilsistein uygulamasının ve özellikle melatonin'in normal doku üzerinde bu etkileri azaltmada daha etkili olduğu kanısındayız.

Genel anlamda yapılmış çalışmalar ve bizim bulgularımız doğrultusunda amifostin'in koruyucu etkisi dokudan dokuya, uygulanan doz ve fraksiyon sayısına bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Arteriyolar endotel ve böbrek proksimal tübül hücre membranına bağımlı alkalen fosfatazin amifostini defosforile ederek aktif tiyol metaboliti olan WR-1065'e dönüştürdüğü bilinmektedir (125). Deneysel çalışmamız sonucunda melatonin ve n-asetilsistein'in TUNEL pozitif ve genel morfolojide protektif etkisini açık bir şekilde göstermesine rağmen amifostin'in düşük protektif profil göstermesinde iki nedenin etkili olabileceğini düşünmekteyiz. Bu nedenlerden ilki, genital siklusun diöstrus döneminde rat uterusunu besleyen arteriollerde membran bağımlı alkalen fosfataz (AP) etkinliğinin azalmış olabileceğidir. Bunu düşünmemizdeki neden, Prahlad ve ark. östrojenin AP'ın uterus epitelinde konsantrasyonunu arttırdığı ve progesteronun düşürdüğünü öne sürmesidir (126). Buradan uterin arteriyollerdeki AP etkinliğinin rat genital siklus safhasına bağlı olarak değişebileceğini düşünmekteyiz. Amifostin'in düşük

protektif etki göstermesinin nedeni olarak bir diğ er d    ncemiz ise Casarett'e g  re uterusun grup-II sensitivite g  stermesi ve buna bağlı olarak pelvik ı ımalarda 200 mg/kg amifostin'in yeterli protektif   zellik g  sterememi   olmasıdır.

Bu   alı manın kliniğe uyarlaması sonucunda pelvik b  lge ı ıması uygulanan insanlarda uygulanan protektif ajanların menstrual siklus fazıyla ne derecede ili kili olduğu sorusunun netle tirilmesi gerektiği ayrıca yapmı  olduğumuz deneysel   alı manın protektif etkinliği   ne s  r  len 3 farklı ajanın 10 Gy abdomino-pelvik ı ımada erken evrede uterus   zerinde protektif etkinliklerini kar ıla tırmı  olmasına rağmen bu konuda daha detaylı ve geni  kapsamlı ara tırmalar yapılması gerektiğini d    nmekteyiz.

6. SONUÇ

- ✓ Yaptığımız çalışma sonucu düşük apoptotik indeks gösterdiği bilinen diöstrus dönemindeki rat uterusunda iyonize gama radyasyonuna bağlı fragmente hücre sayısında artış ve genel morfolojide değişimler olduğu tespit edildi.
- ✓ Kontrol amacıyla kullandığımız melatonin, N-asetilsistein ve amifostin (WR2721) gruplarında injeksiyon sonrası genel uterinal yapının korunduğu ve apoptotik indeksin değişmediği sonucuna ulaşıldı. 10 Gy abdomino-pelvik ışıma yapılan grupta dejeneratif nitelikte birçok değişikliğin yanı sıra her üç parametrede (luminal epitel, stromal hücreler ve uterinal bez hücreleri) DNA fragmentasyonuna bağlı apoptotik indeks artışı TUNEL Assay ile tespit edilmiştir. Radyasyon uygulaması öncesi melatonin uygulanan grupta genel morfolojinin ve TUNEL pozitivitesinin kontrol grubuyla paralellik gösterdiği, N-asetilsistein uygulanan grubun ise düşük miktarda morfolojik bozukluk gösterdiği ayrıca TUNEL pozitifliğinin bütün parametrelerde kontrol grubuyla eşdeğer olduğu görüldü. Radyoterapi uygulaması öncesi Amifostin (WR2721) tedavisi uygulanan grupta yoğun dejeneratif özellik tespit edildi. Bu grupta TUNEL pozitif hücre yüzdesinde kontrol ve radyasyon grupları arasında yer aldı.
- ✓ Deneysel çalışmamız sonucunda İyonize radyasyonun kanserli olmayan uterus üzerinde 48 saat içerisinde çeşitli morfolojik dejenerasyonlara ve DNA fragmentasyonlarına neden olabileceğini, normal doku yaralanması olarak adlandırılan bu olgunun indirgenmesinde amifostin ve N-asetilsistein kısmen başarılı olmasına rağmen melatonin uygulamalarının koruyucu etkisinin daha iyi olduğunu saptadık.
- ✓ Radyoterapi kaynaklı iyonize gama radyasyonu etkisiyle normal doku yaralanmasını indirmede farklı nitelikli 3 protektif ajanı kıyasladığımız bu çalışmanın vermiş olduğu sonuçlara rağmen daha fazla klinik ve deneysel çalışma yapılması gerektiği düşüncesindeyiz.

7. KAYNAKLAR

- 1) Ferlay J., et al. Globocan 2008, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, <http://globocan.iarc.fr>. 2010, Son erişim: 4.12.2012.
- 2) Ringborg U., et al. The Swedish Council on Technology Assessment in Health Care (SBU) systematic overview of radiotherapy for cancer including a prospective survey of radiotherapy practice in Sweden 2001—summary and conclusions. *Acta Oncol.* 2003; 42: 357– 365.
- 3) Bentzen S. M., et al. Patient-to-patient variability in the expression of radiation-induced normal tissue injury. *Semin Radiat Oncol.* 1994; 4: 68-80.
- 4) Delanian S., et al. Current Management for Late Normal Tissue Injury: Radiation-Induced Fibrosis and Necrosis, *Semin Radiat Oncol.* 2007; 17: 99-107.
- 5) Stone H.B., et al. Effects of radiation on normal tissue: consequences and mechanisms. *Lancet Oncol* 2003; 4: 529–36.
- 6) Rainaldi G., Ferrante A., Indovina P.L., Santini M.T., Induction of apoptosis or necrosis by ionizing radiation is dose-dependent in MG-63 osteosarcoma multicellular spheroids.
- 7) Hosseinimehr S.J., Foundation review: Trends in the development of radioprotective agents. *Drug Discovery Today* 2007; 12: 794-805.
- 8) Kelle I., Radyoprotektif Etkili Ajanlar, *Dicle Tıp Dergisi*, 2008; 35(1): 69-76
- 9) Steel, G. G.: *Basic Clinical Radiobiology*, Third edition, Londra, Edward Arnold Publishers.
- 10) Kızılcı S., Kemoterapi alan kanserli hastalar ve yakınlarının yaşam kalitesini etkileyen faktörler. *Cumhuriyet Üniversitesi Hemşirelik Yüksekokulu Dergisi*, 1999; 3(2): 18-26.

- 11) Uzal C., Kanserde Işınlama Teknikleri, 1995 Ankara. Sopa développement.
- 12) Yaren H., Karayılanoğlu T., Radyasyon ve İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri, TSK Koruyucu Hekimlik Bülteni, 2005; 4(4): 199-208.
- 13) Coşkun Ö. İyonize Radyasyonun Biyolojik Etkileri, S.D.U. Teknik Bilimler Dergisi. 2011; 1(2): 13-17.
- 14) Cox, J. D., Ang, K. K., Radiation Oncology: Rationale, Technique, Results, Amerika, 2009 Mosby; 9. Basım.
- 15) Sonntag C.V., The Chemical Basis of Radiation Biology, London, 1989, Taylor & Francis.
- 16) Citrin D., et. all, Radioprotectors and Mitigators of Radiation-Induced Normal Tissue Injury, Oncologist. 2010; 15(4): 360–371.
- 17) Aydın Y., Akut Radyasyon Yaralanmaları. Cilt Hastalıkları ve Yara Bakımı Sempozyumu, İstanbul, 2001, 173-187.
- 18) Riley PA., Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. Int. J. Radiat Biol. 1994; 65(1): 27-33.
- 19) Freeman B.A., Crapo J.D., Biology of disease: free radicals and tissue injury, Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology, 1982; 47(5): 412-426.
- 20) Hei T.K., et al., Mechanism of radiation-induced bystander effects: a unifying model, JPP 2008, 60: 943–950.
- 21) Nagasawa H, Little JB. Induction of sister chromatid exchanges by extremely low doses of alpha-particles. Cancer Res. 1992; 52: 6394-6396.
- 22) Topkan E. Et al., Radyoterapiye bağlı “bystander” etki: Oluşum mekanizmaları ve potansiyel klinik yansımalar. Türk Onkoloji Dergisi 2007; 22(3): 146-152

- 23) Önen S. Radyasyon Biyofiziği Ders Kitabı, İstanbul, 1993, İstanbul Üniversitesi Basımevi.
- 24) Hall EJ., Giaccia AJ., Physics and chemistry of radiation absorption. In: Radiobiology for the Radiologist. 6th ed. Philadelphia, 2006, Lippincott Williams & Wilkins, 5-15.
- 25) Joshi Y.M., et al. Radioprotective-A pharmacological intervention for protection against ionizing radiations: A review. J. of Int. Med. 2010; 8(2): 5.
- 26) Özalpan, A.: Temel Radyobioloji 1. Basım. İstanbul, 2001 Haliç Üniversitesi Yayınları.
- 27) Stone H.B., Effects of radiation on normal tissue: consequences and mechanisms. Lancet Oncol. 2003; 4(9): 529-536.
- 28) Kanter M., et al. Gamma radyasyona bağlı oluşan jejunum mukoza hasarına karşı curcumin ve amifostinin koruyucu etkilerinin incelenmesi. Tıp Araştırmaları Dergisi: 2008; 6 (3): 128-135 .
- 29) Dörr W., Hendry J.H., Consequential late effects in normal tissues. Radiother Oncol 2001; 61: 223–31.
- 30) Denham J.W., Hauer-Jensen M., Peters L.J., Is it time for a new formalism to categorize normal tissue radiation injury? Int. J. Radiat. Oncol., Biol Phys 2001; 50: 1105–06.
- 31) Bernhard E.J., Maity A., Muschel R.J., McKenna W.G., Effects of ionizing radiation on cell cycle progression. Radiation and Environmental Biophysics 1995; 34(2): 79-83
- 32) İsi H., Türkyılmaz A.B., Budak T., Kronik Olarak Radyasyona (X Işını) Maruz Kalmış Bireylerde Bleomycin'nin Kromozomlar Üzerine Etkisi, Dicle Tıp Dergisi 2004; 31(2): 50-55.

- 33) Revan S., Farklı Dayanıklılık Antrenmanlarının Oksidatif Stres Oluşumu ve Antioksidan Düzeyleri Üzerine Etkisi, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2007.
- 34) Kılçksız S., Demirel C., Oksidatif stres, radyasyona bağlı hasar ve radyokoruyucu olarak N-asetil-sistein'in potansiyel rolü. Türk Onkoloji Dergisi 2008; 23(4): 200-207.
- 35) Shirazi A., Ghobadi G., A Radiobiological Review on Melatonin: A Novel Radioprotector. J. Radiation Res., 2007; 48: 263-272.
- 36) Vijayalaxmi, Reiter, R.J., Tan, D. X., Herman, T S., Thoma, J.R.C.R. Melatonin as a Radioprotective Agent: A Review. Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys. 2004; 59: 639-653.
- 37) Sancar A., et al., Molecular Mechanisms of Mammalian DNA Repair and the DNA damage checkpoint. Annual Review of Biochemistry, 2004; 73: 39-85 .
- 38) Karbownik, M., Reiter, R.J., Antioxidative Effects of Melatonin in Protection Against Cellular Damage Caused by Ionizing Radiation. Proceedings of the society for Experimental Biology and Medicine. 2000; 225: 9-22.
- 39) Varanda EA, Tavares DC. Radioprotection: mechanisms and radioprotective agents including honeybee venom. J. Venom. Anim. Toxins, 1998; 4: 5-21.
- 40) Muscatello A.C., Nutritional supplements as radioprotectors: a review and proposal. <http://www.fas.org/sgp/othergov/doe/lanl/osti/334244.pdf> erişim tarihi: 07.Mart.2013.
- 41) Patt, H.M., Tyree, E. B., Straube, R. L. And Smith, D. E., Cysteine protection against X irradiation. Science. 1949; 110: 213-214.
- 42) Bump, E. A., Malakar, K. Radioprotectors: Chemical, biological and clinical perspectives, 1997, CDC Pres.
- 43) Uzal C., The Protective Effect of Amifostine on Radiation-Induced Proctitis: Systemic Versus Topical Application. Balkan Med J 2012; 29: 32-8.

- 44) Yuhas J.M., Active versus passive absorption kinetics as the basis for selective protection of normal tissues by S-2-(3-aminopropylamino)-ethylphosphorothioic acid. *Cancer Res.* 1980; 40: 1519–1524.
- 45) Peters G.J., van der Vijgh WJF., Protection of Normal Tissues from the Cytotoxic Effects of Chemotherapy and Radiation by Amifostine (WR-2721): Preclinical Aspects. *Eur. J. Cancer* 1995; 31(A): 1-7.
- 46) Wasserman T., Radioprotective Effects of Amifostine, *Sem. Oncol.* 1999; 26(2): 89-94.
- 47) Ethiol R (amifostin) ilaç prospektüsü, 1998.
- 48) Antonadou D., Coliarakis N., Synodinou M., Randomized phase III trial of radiation treatment amifostine in patients with advanced-stage lung cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001; 51: 915-922.
- 49) Mitsuhashi N., Takahashi I., M Takahashi M., Clinical study of radioprotective effects of amifostine (YM-08310, WR-2721) on long-term outcome for patients with cervical cancer *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1993; 26: 407–411.
- 50) Caloglu M., Caloglu V.Y., Yalta T., Yalcin O., Uzal C., The histopathological comparison of L-carnitine with amifostine for protective efficacy on radiation-induced acute small intestinal toxicity. *J Can Res Ther* 2012; 8: 260-265.
- 51) Junqueira L.C., Carneiro J., Kelly R.O., *Temel Histoloji – Tekst ve atlas*, Aytekin Y., 7. Baskı, İstanbul Barış Kitapçılık, 1993
- 52) Macchi M.M., Bruce J.N., Human pineal physiology and functional significance of melatonin. *Frontiers in Neuroendocrinology* 2004; 25(3-4): 177-195.
- 53) Şener G., Karanlığın hormonu Melatonin. *Marmara Eczacılık Dergisi*, 2010; 14: 112-120.
- 54) Reiter R.J., Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions, *Endocr. Rev.* 1991; 12: 151-180.

- 55) Arendt J., Melatonin and the Mammalian Pineal Gland, London, 1995 Chapman & Hall.
- 56) Jahovic N., Cevik H., Sehirli A.O., Yeğen B.C., Sener G., Melatonin prevents methotrexate induced hepatorenal oxidative injury in rats. J Pineal Res., 2003; 34: 282-287.
- 57) Reiter R.J., Tan D.X., Sainz R.M., Mayo J.C., Lopez-Burillo S., Melatonin: reducing the toxicity and increasing the efficacy of drugs. J Pharm Pharmacol, 2002; 54: 1299-1321.
- 58) Karasek M., Pawlikowski M., Antiproliferative effects of melatonin and CGP 52608, Biol. Signals Recept. 1999; 8: 75–78.
- 59) Topkan E., Tufan H., Yavuz A.A., Bacanlı D., Onal C., Kodsak S., Yavuz M.N., Comparison of the protective effects of melatonin on amifostine on radiation induced epiphyseal injury, Int. J. Radiat. Biol. 2008; 84: 796-802.
- 60) Undeğer U., Giray B., Zorlu A.F., Oge K., Baçaran N.. Protective effects of melatonin on the ionizing radiation induced DNA damage in the rat brain. Exp Toxic Pathol 2004; 55: 379-384.
- 61) Tola H.T., Doksorubisin ile oluşturulan deneysel kadiyotoksisite üzerine N-asetilsisteinin biyokimyasal ve histopatolojik düzeylerdeki koruyucu etkilerinin araştırılması, Tıpta Uzmanlık Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, 2008
- 62) Gurer H., Ercal N., Can antioxidants be beneficial in the treatment of lead poisoning? Free Rad and Biol 200; 29: 927-945
- 63) Kayaalp O., Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji 10ncu Baskı. Ankara, 2002, Pelikan Yayınları.

- 64) Rodenstein D., DeCoster A., Gazzaniga A., Pharmacokinetics of oral acetylcysteine: absorbtion, binding and metabolism in patients with respiratory disorders. Clin Pharmacokinet. 1978; 3: 247-254.
- 65) Atmaca G., Antioxidant effects of sulfur-containing amino acids. Yonsei Med J. 2004; 45: 776-788
- 66) Sodjin K., Nilsson E., Hallberg A., Tunek A.,: Metabolism of N-acetyl-L-cysteine. Biochem Pharmacol 1989; 38: 3981-3985.
- 67) Fırat S. Kobaylarda radyasyonla oluşan akciğer hasarında doku glutatyon, glutatyon peroksidaz, glutatyon S transferaz, düzeyleri ve N-asetilsisteinin bu sistem üzerindeki etkisi, Uzmanlık tezi, Gazi Üniversitesi Biyokimya AD, 1997
- 68) Demir E.O., Çakmak G.K., Bakkal H., Türkcü U.O., Kandemir N., Demir A.S., Taşçılar O., N-Acetyl-Cysteine Improves Anastomotic Wound Healing after Radiotherapy in Rats. Journal of Investigative Surgery, 2011; 24: 151–158
- 69) Mansour H.H., Hafez H.F., Fahmy N.M., Protective effect of N-acetylcysteine against radiation induced DNA damage and hepatic toxicity in rats. Biochemical Pharmacology 2008; 75(3): 773-780
- 70) Demirel C., Kilciksiz S., Evirgen-Ayhan S., Gurgul S., Erdal N., The preventive effect of N-acetylcysteine on radiation-induced dermatitis in a rat model. J Buon. 2010; 15(3): 577-82
- 71) Moldéus P., Cotgreave I.A., Berggren M., Lung protection by a thiol-containing antioxidant: N-acetylcysteine. Respiration. 1986; 50(1): 31-42.
- 72) Ross M.H., Pawlina W., Histology: a text and atlas: with correlated cell and molecular biology 6th ed. Philadelphia, 2011, Lippincott Williams & Wilkins.
- 73) Pannu H.K., Uterus Dynamic MR Imaging of Pelvic Organ Prolapse: Spectrum of Abnormalities. RadioGraphics 2000; 20: 1567–1582
- 74) Krinke G.J., The Laboratory Rat, Amerika, 2000, Academic Pres - 315

- 75) Hebel R., Stromberg M.W., Anatomy and Embryology of the Laboratory Rat, 1986, Woerthsee: BioMed Verlag.
- 76) Zhang X., et al. Evaluation of the efficacy of a danazol-loaded intrauterine contraceptive device on adenomyosis in an ICR mouse model. Human Reproduction 2008; 23(9) 2024–2030.
- 77) Sadler T.W., Langman' s Medical Embryology, Başaklar A.C., 9.Baskı, Ankara Palme Yayıncılık, 1996.
- 78) McMahon A.P., Aronow B.J., Davidson D.R., Davies J.A., Gaido K.W., Grimmond S., Lessard J.L., Little M.H., Potter S.S., Wilder E.L., Zhang P.,GUDMAP: the genitourinary developmental molecular anatomy project. J Am Soc Nephrol. 2008; 19: 667-671.
- 79) Sarıözkan S., Laboratuvar Hayvanlarında Reprodüksiyon, Lalahan Hay. Araş. Enst. Derg. 2005; 45(1): 33–39.
- 80) Mohr, U., Pathobiology of the Aging Rat, Washington 1993, Intl Life Sciences Inst pp.377-388.
- 81) Aplin J.D., The Endometrium: Molecular, Cellular, and Clinical Perspectives (Reproductive Medicine & Assisted Reproductive Techniques.) Second edition. London, 2008, Informa Healthcare - 879
- 82) Osol G., Mandala M., Maternal Uterine Vascular Remodeling During Pregnancy, Physiology (Bethesda), 2009; 24: 58-71.
- 83) Snell R.S., Clinical Anatomy by Regions 9th ed., Philadelphia, 2008 Lippincott Williams & Wilkins.
- 84) Head J.R., Lande I.J.M., Uterine Lymphatics: Passage of Ink and Lymphoid Cells from the Rat' s Uterine Wall and Lumen, Biology of Reproduction, 1983; 28: 941-955.
- 85) Jones R.E., Lopez K.H., Human reproductive biology, Amerika, 2006, Academic Press.

- 86) McCracken J.A., Custer E.E., Lamsa J.C., Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event". *Physiol. Rev.* 1999; 79(2): 263–323
- 87) Bennett J.P., Vickery B.H., *Reproduction and Breeding Techniques for Laboratory Animals*, Philadelphia, 1970, Lea and Febiger, p. 299–315.
- 88) Anderson L.C., Leow F.M., Quimby F.W., *Laboratory Animal Medicine*, San Diego, 2002, Academic Press; p. 121–165.
- 89) Suckow M.A., Weisbroth S.H., Franklin C.L., *The laboratory rat*. San Diego, 2002, Academic Press; p. 121–165.
- 90) Gallo R.V., Pulsatile LH release during the ovulatory LH surge on proestrus in the rat. *Biol. Reprod.* 1981; 24: 100–104 & 771-777.
- 91) Fortune J.E., Ovarian Follicular Growth and Development in Mammals. *Biology of Reproduction.* 1994; 50: 225-232
- 92) Ackland J.F., D'Agostino J., Ringstrom S.J., Hostetler J.P., Mann B.G., Schwartz N.B., Circulating radioimmunoassayable inhibin during periods of transient follicle-stimulating hormone rise: secondary surge and unilateral ovariectomy. *Biol. Reprod.* 1990; 43: 347-352
- 93) Haisenleder D.J., Ortolano G.A., Jolly D., Dalkin A.C., Landefeld T.D., Vale W.W., Marshall J.C., Inhibin secretion during the rat estrous cycle: Relationships to FSH secretion and FSH beta subunit mRNA concentrations. *Life Sci.* 1990; 47: 1769–1773.
- 94) Richards J.S., Jahnsen T., Hedin L., Lifka J., Ratoosh S., Durica J.M., Goldring N.B., Ovarian follicular development: from physiology to molecular biology. *Recent Prog Horm Res.* 1987; 43: 231-276.
- 95) Findlay J.K., An update on the roles of inhibin, activin, and follistatin as local regulators of folliculogenesis. *Biol Reprod* 1993; 48: 15-23.

- 96) Knobil E., Neill J.D., *The Physiology of Reproduction*, New York, 1998, Raven Press; p. 1983.
- 97) Smith M.S., Freeman M.E., Neill J.D., The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: Prolactin, gonadotropin, and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. *Endocrin.* 1975; 96: 219–226.
- 98) Matsuyama S., Takahashi M., Immunoreactive (ir) transforming growth factor (TGF)-beta in rat corpus luteum: ir-TGF beta is expressed by luteal macrophages. *Endocrin. J.* 1995; 42: 203–217
- 99) Singh K.B., Persistent estrus models of polycystic ovary disease: an update. *Fertil Steril* 2005; 84(2); 1228-1234.
- 100) Roche R.E., Characterisation of antigen-presenting cells in the murine female reproductive tract and its draining lymph nodes, Master Tezi, The University of York, 2011.
- 101) Bath LE, et al. Hypothalamic-pituitary-ovarian dysfunction after prepubertal chemotherapy and cranial irradiation for acute leukaemia. *Hum Reprod* 2001; 16(9): 1838–1844.
- 102) Bath LE, et al. Depletion of ovarian reserve in young women after treatment for cancer in childhood: detection by anti-Mullerian hormone, inhibin B and ovarian ultrasound. *Hum Reprod* 2003; 18(11): 2368–2374.
- 103) Wallace WH, et al. Ovarian failure following abdominal irradiation in childhood: natural history and prognosis. *Clin Oncol (R Coll --Radiol)* 1989; 1(2): 75–79.
- 104) Wallace WH, Thomson AB, Kelsey TW. The radiosensitivity of the human oocyte. *Hum Reprod* 2003; 18(1): 117–121.
- 105) Critchley HO, et al. Abdominal irradiation in childhood; the potential for pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol* 1992; 99(5): 392–394.

- 106) Bath LE, et al. Ovarian and uterine characteristics after total body irradiation in childhood and adolescence: response to sex steroid replacement. *Br J Obstet Gynaecol* 1999;106(12):1265–72.
- 107) Chiarelli AM, Marrett LD, Darlington GA. Pregnancy outcomes in females after treatment for childhood cancer. *Epidemiology* 2000; 11(2): 161–166.
- 108) Norwitz ER, et al. Placenta percreta and uterine rupture associated with prior whole body radiation therapy. *Obstet Gynecol* 2001; 98(5 Pt 2): 929–931.
- 109) Larsen EC, et al. Radiotherapy at a young age reduces uterine volume of childhood cancer survivors. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2004; 83(1): 96–102.
- 110) Holm K, et al. Ultrasound B-mode changes in the uterus and ovaries and Doppler changes in the uterus after total body irradiation and allogeneic bone marrow transplantation in childhood. *Bone Marrow Transplant* 1999; 23(3): 259–63.
- 111) Laursen EM, et al. Doppler assessment of flow velocity in the uterine artery during pubertal maturation. *Ultrasound Obstet Gynecol* 1996; 8(5): 341–345.
- 112) Pridjian G, Rich NE, Montag AG. Pregnancy hemoperitoneum and placenta percreta in a patient with previous pelvic irradiation and ovarian failure. *Am J Obstet Gynecol* 1990; 162(5): 1205–1206.
- 113) Li F.P., et al. Outcome of pregnancy in survivors of Wilms' tumor. *JAMA* 1987; 257(2): 216–9.
- 114) Kokawa K, Shikone T, Otani T, et al. Transient increase of apoptosis and Bax expression occurring during radiotherapy in patients with invasive cervical carcinoma. *Cancer* 1999; 86: 79-87.
- 115) Adhya A.K., et al. Radiation Therapy Induced Changes in Apoptosis and Its Major Regulatory Proteins, Bcl-2, Bcl-XL, and Bax, in Locally Advanced Invasive Squamous Cell Carcinoma of the Cervix. *Int J Gynecol Pathol.* 2006; 25(3): 281-287

- 116) Yuki H, Fujimura M, Yamakawa Y, et al. Detection of apoptosis and expression of apoptosis associated proteins as early predictors of prognosis after irradiation in stage IIIb uterine cervical cancer. *Jpn J Cancer Res* 2000; 91: 127-134.
- 117) Harima Y, Harima K, Shikata N, et al. Bax and Bcl-2 protein expression predict response to radiotherapy in human cervical cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 1998; 124: 503-510.
- 118) Dery M.C, Leblanc V., Shooner C., Asselin E., Regulation of Akt expression and phosphorylation by 17 β -estradiol in the rat uterus during estrous cycle, *Reproductive Biology and Endocrinology* 2003; 1: 47-60
- 119) Carabajal E, Massari N, Croci M, Martinel Lamas DJ, Prestifilippo JP, Bergoc RM, Rivera ES, Medina VA., Radioprotective potential of histamine on rat small intestine and uterus. *European Journal of Histochemistry*, 2012; 56(48): 302-310
- 120) Segreto H.R.C., Segreto R.A., Silva M.R.R., Egami M.I., Ghiraldini M., Novo N.F., WR2721 Bone marrow radioprotection: Light and electron microscope study, *Interciencia*, 1995; 20(4): 215-221.
- 121) Karakoyun-Çelik Ö., ARAS A., Tuğan D., Hekimgil M., Yalman D., Esassolak M., Haydaroğlu A., Sıçan Germ Hücrelerinde Radyasyona Bağlı Apoptoz Ve Amifostin İle İlişkisi. *T Klin Tıp Bilimleri* 2004; 24: 142-146.
- 122) Aghazadeh S., Azarnia M., Shirazi A., Mahdavi S.R., Zangii B.M., Protective effect of melatonin on spinal cord damage after gamma irradiation, *Japanese Society for Alternatives to Animal Experiments*, 2007; 14: 535-538
- 123) Serin M, Gülbaş H, Gürses I, Erkal HS, Yücel N. The histopathological evaluation of the effectiveness of melatonin as a protectant against acute lung injury induced by radiation therapy in a rat model, *Int J Radiat Biol.* 2007; 83(3): 187-93.
- 124) Mansoura H.M., Hafez H.F., Fahmya N.M., Hanafi N., Protective effect of N-acetylcysteine against radiation induced DNA damage and hepatic toxicity in rats, *Biochemical Pharmacology*, 2008; 75(3): 773–780

125) Shaw LM, Bonner H, Lieberman R., Pharmacokinetic profile of amifostine. Semin Oncol. 1996; 23(4 Suppl 8): 18-22.

126) Prahlad K.V., Conaway C.H., Alkaline Phosphatase Activity in the Rat Uterus, J. Embryol. exp. Morph. 1961; 9(4): 599-608.

8.ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında Diyarbakırda doğdum.2002 yılında Diyarbakır Anadolu Lisesindek mezun oldum. 2008 yılında Dicle Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünden lisans eğitimimi tamamladıktan sonra askerlik görevimi gerçekleştirdim. 2011 yılı bahar döneminde Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıp Histoloji ve Embriyoloji programında Yüksek Lisans programında eğitime başladım. 2012 yılında 11. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, 2013 te 21. Ulusal Elektron Mikroskopi kongresine katıldım. Lisansüstü eğitimim tez çalışması amacıyla danışman hocam Doç. Dr. Ayfer AKTAŞ'ın yürütücülüğünde ve Prof. Dr. Yusuf NERGİZ, Prof. Dr. M. Aydın KETANİ ve Yrd. Doç. Dr. S. Burhaneddin ZİNİZİRCİOĞLU hocalarımla araştırmacı olarak bulunduğ, DÜBAP tarafından desteklenen, 12-TF-99 nolu projede araştırmacı olarak yer aldım.Medeni durumun bekardır.