



**T.C.
AFYONKARAHİSAR SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

**RATLARDA RADYASYONA BAĞLI BEYİN HASARINDA
RAMELTEON'UN OLASI TEDAVİ EDİCİ ETKİSİ**

Sedat AYDIN

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

**Danışman
Dr. Öğr. Üyesi Tülay AKAN**

2023-AFYONKARAHİSAR

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bütün materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Doktora Öğrencisinin

Danışmanın

Adı Soyadı: Sedat Aydın

Ünvanı Adı Soyadı: Dr. Öğr. Üyesi Tülay Akan

İmza:

İmza:

KABUL VE ONAY

Dr. Öğr. Üyesi Tülay Akan danışmanlığında Sedat Aydın tarafından hazırlanan “Ratlarda Radyasyona Bağlı Beyin Hasarında Ramelteon’un Olası Tedavi Edici Etkisi” adlı bu çalışma Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Fizyoloji Anabilim Dalında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

18/ 07/ 2023

JÜRİ:

Başkan : Prof.Dr. Sefa ÇELİK

.....

(Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi)

Üye: Doç.Dr. Ayşe ÖZDEMİR

.....

(Uşak Üniversitesi)

Üye: Doç.Dr. Arzu ŞAHİN BERBEROĞLU

.....

(Uşak Üniversitesi)

Üye: Dr.Öğr.Üyesi Tülay AKAN

.....

(Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi)

Üye: Dr.Öğr.Üyesi Özden KUTLAY

.....

(Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi)

ONAY:

Tezin kabul Enstitü Yönetim Kurulunun tarihli ve.....sayı no ile onaylanması kararlaştırılmıştır.

..... /...../2023

Prof. Dr. Özal ÖZCAN

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Eğitim olanaklarımızı en üst seviyede oluşturan ve yönlendiren teze başlarken ve tez hazırlanım ve bitim safhasına kadar desteğini eksik etmeyen her türlü bilgi ve materyallerle destekleyen ve yönlendiren Anabilim Dalı Başkanımız ve danışman hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Tülay AKAN başta olmak üzere bu süre zarfında bilgisine başvurduğum diğer hocalarıma teşekkürlerimi sunarım.

Sedat AYDIN

Afyonkarahisar, Temmuz, 2023

RATLARDA RADYASYONA BAĞLI BEYİN HASARINDA RAMELTEON'UN OLASI TEDAVİ EDİCİ ETKİSİ

Dr. Sedat AYDIN

Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Fizyoloji Anabilim Dalı Doktora Tezi

Temmuz, 2023

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Tülay AKAN

ÖZET

Kanser tedavisinde, en sık kullanılan tedavi metotlarından birisi radyoterapidir (RT). RT alan hastalarda akut dönemde başağrısıyla başlayıp ve geç dönemde demans, ölüme kadar giden sonuçlar olabilir. Uygulanan iyonlaştırıcı radyasyon, merkezi sinir sisteminde hücre içi reaktif oksijen türlerinin ve proinflamatuvar sitokinlerin üretimini indükleyerek beyin doku ve çevresinde hücrel hasara yol açabilmektedir. Ramelteon (RML), antienflamatuvar ve antioksidan etkileri olan bir melatonin reseptörü agonistidir. Bu çalışmada 10 Gray radyasyon uygulayarak oluşturulan beyin hasarında RML'nin olası tedavi edici etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmada, kontrol grubu, radyasyon grubu, radyasyon ile RML uygulanan grup ve RML uygulanan grup olmak üzere ve her grupta 8 rat olacak şekilde toplamda 32 adet Wistar Albino cinsi dişi rat kullanıldı. Çalışmanın sonunda ratlardan alınan kan örneklerinden hemogram ölçümü gerçekleştirildi. İzole edilen beyin dokularının bir hemisferine ait korteks bölgelerinden beyin hasarını gözlemlemek amacıyla histopatolojik olarak hematoxilen-eozin (H-E) boyaması yapıldı. Oksidatif stresi ölçmek için total oksidan seviye (TOS) ve total antioksidan seviye (TAS) ve oksidatif stres indeksi (OSI) çalışıldı. Ayrıca tümör nekroz faktör- α (TNF- α), kaspaz-3, kaspaz-9 ve interlökin-10 (IL-10) seviyeleri ELISA yöntemiyle ölçülüp değerlendirildi. Histolojik inceleme sonuçlarına göre, radyasyon uygulanan gruplarda ödem, vakuolizasyon ve apoptotik cisimciklere kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha fazla rastlanmıştır. Ancak RML uygulanan grupta bu görünümün anlamlı ölçüde azaldığı hücre bütünlüğünün korunduğu gözlemlenmiştir. RT grubunda, kontrol grubuna göre yükselme gösteren OSI'nin RML tedavisiyle anlamlı olarak düştüğü ($p<0.0001$) gözlemlenmiştir. Kontrol grubuna kıyasla; TNF- α değerinin radyasyon uygulanan gruplarda yükseldiği, RML tedavisiyle anlamlı bir şekilde düştüğü ($p<0.0001$) saptanmıştır. IL-10 seviyesi, radyasyon uygulanan grupta kontrol grubuna göre anlamlı düşme ($p=0.003$) göstermekle beraber RML tedavisi uygulanan grupta anlamlı bir şekilde yükselmiştir ($p<0.0001$). Radyasyon uygulaması sonrası kontrol grubuna göre kaspaz-3 ve kaspaz-9 seviyelerinin yükseldiği ve bu yükselmenin RML tedavisiyle anlamlı olarak düştüğü ($p<0.0001$) görülmüştür. Elde ettiğimiz bu sonuçlar; RML'nin, radyotoksite kaynaklı beyin hasarında antienflamatuvar, antiapoptotik ve antioksidatif etkileri ile koruyucu ve tedavi edici rolünün olabileceğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Radyasyon, Beyin Hasarı, Ramelteon, Oksidatif Stres, İnflamasyon, Apoptozis

POSSIBLE THERAPEUTIC EFFECT OF RAMELTEON IN RATS WITH RADIATION-INDUCED BRAIN INJURY

Dr. Sedat AYDIN

**Afyonkarahisar University of Health Sciences Institute of Graduate Education
Department of Physiology PhD Thesis**

July, 2023

Supervisor: Ass. Prof. Tülay AKAN

ABSTRACT

Radiotherapy (RT) is one of the most commonly used treatment methods in cancer treatment. In patients, receiving RT, there may be results starting with headache in acute period and ending with dementia and death in late period. The ionizing radiation can cause cellular damage in and adjacent brain tissue by inducing the production of intracellular reactive oxygen species and proinflammatory cytokines in the central nervous system. Ramelteon (RML) is a melatonin receptor agonist having anti-inflammatory and antioxidant effects. In this study, it was aimed to investigate the possible therapeutic effect of RML in brain damage, induced by 10 Gray radiation. A total of 32 Wistar Albino female rats were used in the study, including the control group, the radiation group, the radiation plus RML group, and the RML group alone, with 8 rats in each group. At the end of the study, hemogram measurement was performed from blood samples taken from rats. Histopathologically hematoxylin-eosin (H-E) staining was performed to observe brain damage taken from the cortex regions of one hemisphere of the isolated brain tissues. Total oxidant status (TOS) and total antioxidant status (TAS) and oxidative stress index (OSI) were studied to measure oxidative stress levels. In addition, tumor necrosis factor- α (TNF- α), caspase-3, caspase-9 and interleukin-10(IL-10) levels were measured and evaluated by ELISA method. According to the histological examination results, edema, vacuolization and apoptotic bodies were more common in the radiation groups compared to the control group. However, it was observed that this appearance was significantly reduced in the RML group, and cell integrity was preserved. It was observed that OSI, which increased after radiation application compared to the control group, decreased significantly ($p<0.0001$) with RML treatment. Compared to the control group; It was determined that TNF- α value increased in the radiation-treated groups and decreased significantly with RML treatment ($p<0.0001$). Although IL-10 level decreased significantly in the radiation-treated group compared to the control group ($p=0.003$), it increased significantly in the RML-treated group ($p<0.0001$). It was observed that caspase-3 and caspase-9 levels increased after radiation application compared to the control group, and this increase was significantly decreased with RML treatment ($p<0.0001$). These results have been shown that RML may have a protective and therapeutic role in radiotoxicity-induced brain damage with its anti-inflammatory, antiapoptotic and antioxidative effects.

Keywords: Radiation, Brain Injury, Ramelteon, Oxidative Stress, Inflammation, Apoptosis

İÇİNDEKİLER

Sayfa

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK	i
KABUL VE ONAY	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vi
KISALTMALAR VE SİMGELER.....	ix
TABLolar	xi
ŞEKİLLER.....	xii
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	4
2.1. Radyasyon	4
2.1.1. Radyasyonun Tıpta Kullanımı	4
2.2. Radyoterapiye Bağlı Beyin Hasarı.....	5
2.2.1. Vasküler Hipotez.....	6
2.2.2. Parankimal Hipotez	7
2.2.3. Çoklu Hücre Hipotezi	9
2.3. Radyoterapiye Bağlı Değişimler	9
2.3.1. Apoptozis	12
2.3.2. Oksidatif Stres ve İnflamatuvar Cevap	14
2.4. MELATONİNİN ÖZELLİKLERİ	16
2.5. Ramelteon (RML)’nun Özellikleri.....	18
2.5.1. RML’nun Tarihi	18
2.5.2. Ramelteon (RML)’nun Kimyası	18
2.5.3. Farmakodinamik Özellikler ve Etki Düzenekleri	19

2.5.4 Farmakokinetik Özellikler	20
2.5.5. Terapötik Etkinliği ve Oksidatif Stres, İnflamasyon Üzerindeki Etkileri.....	21
2.6. Kaspaz-3 ve Kaspaz-9.....	23
2.7. Tümör Nekrotizan Faktör - α (TNF- α).....	26
2.8. İnterlökin 10 (IL-10)	29
3.GEREÇ VE YÖNTEM	32
3.1. Deney Hayvanları.....	32
3.2. Radyasyon Uygulamaları	33
3.3. Radyasyon Uygulamalarında Hemogram ve Doku analizleri.....	33
3.4. Radyasyon Uygulamasında Kullanılan Ramelteon'nun Özellikleri	34
3.5. Histopatolojik Örneklerin Hazırlanması	34
3.6. Doku Homojenizati Hazırlama	35
3.7. Spektrofotometrik Analizler.....	36
3.8. Kaspaz 3 Seviyesi Ölçümü.....	36
3.9. Kaspaz 9 Seviyesi Ölçümü.....	37
3.10. TNF- α Seviyesi Ölçümü	37
3.11. İnterlökin-10 Seviyesi Ölçümü	38
3.12. Total Antioksidan Seviyesi Ölçümü	38
3.13. Total Oksidan Seviyesi Ölçümü.....	39
3.14. Oksidatif Stres İndeksi	39
3.15. İstatistiksel Analiz Yöntemleri.....	39
4. BULGULAR.....	40
4.1. Histopatolojik Bulgular	40
4.2.Biyokimyasal Analiz Sonuçları	45
4.2.1. Deneysel Uygulamanın Rat Beyin Dokusu Kaspaz-3 Aktivitesi Üzerine Etkisi	45
4.2.2. Deneysel Uygulamanın Rat Beyin Dokusu Kaspaz-9 Aktivitesi Üzerine Etkisi	46

4.2.3. Deneysel Uygulamanın Rat Beyin Dokusu TNF- α Aktivitesi Üzerine Etkisi	47
4.2.4. Deneysel Uygulamanın Rat Beyin Dokusu İnterlökin-10 Aktivitesi Üzerine Etkisi	49
4.2.5. Deneysel Uygulamanın Rat Beyin Dokusu TOS Üzerine Etkisi	50
4.2.6. Deneysel Uygulamanın Rat Beyin Dokusu TAS Üzerine Etkisi	51
4.2.7. Deneysel Uygulamanın Rat Beyin Dokusu OSI Üzerine Etkisi	51
4.2.8. Deneysel Uygulamanın Ratlarda Lökositler Üzerine Etkisi	53
5. TARTIŞMA	54
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	61
KAYNAKLAR	61
EKLER.....	79
ETİK KURUL ONAYI.....	79
ÖZGEÇMİŞ	80
İNTİHAL RAPORU	81

KISALTMALAR VE SİMGELER

6-OHDA	6-Hidroksi Dopamin
APAF1	Apoptotic Protease Activating Factor 1
APC	Antijen Sunan Hücreler
BID	BH3 İnteracting-Domain Death Agonist
CA	Cornu Ammonis
CD4	Yardımcı T Hücresi
CD8	Sitotoksik T Hücresi
C ₁ -FLIP	Cellular İnhibitory Protein
COX2	Siklooksigenaz
CRH	Corticotropin-Releasing Hormone
CYP1A2	Sitokromaz 1A2
DISC	Death-İnducing Signaling Complex
DNA	Deoksiribonükleik Asit
FADD	FAS İle İlişkili Ölüm Alanı Proteinini,
FDA	Food And Drug Administration
GFAP	Glial Fibriler Asidik Protein
Gy	Gray
H-E	Hematoksilen -Eozin
IKK-B	İnhibitör Kappa B Kinaz-Beta
IL	İnterlökin
İR	İyonize Radyasyon
JNK	C-Jun N-Terminal Kinaz
KBB	Kan -Beyin Bariyeri
LPS	Lipopolisakkarit
MCP-1	Monosit Kemoatraktan Protein 1
MHC	Major Histocompatilibity Complex
MLT	Melatonin
MMP1	Matriks Metaloproteinaz 1
MMP2	Matriks Metaloproteinaz 2
MPK	Adenosine Monophosphate-Activated Protein Kinase
MPP	1-Metil-4-Fenilpiridinyum
MT1	Melatonennerjik 1

NO	Nitrik Oksit
Nrf	Nükleer Faktör Eritroid
OSI	Oksidatif Stres İndeksi
PGE2	Prostaglandin E2
PNL	Polimorfonükler Lökositler
RBBH	Radyasyona Bağlı Beyin Hasarı
RBE	Rölatif Biyolojik Etkilenme
RIP	Receptor-İnteracting Protein
RML	Ramelteon
ROS	Reaktif Oksijen Speicmen
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
RT	Radyoterapi
SCN	Suprachiasmatic Nucleus
SDF-1	Stromal Hücre Kaynaklı Faktör 1
SH-SY5Y	Cell Line Human Neuroblast From Neural Tissue,
İnsan Kaynaklı Hücre Dizisi	
SPSS	Statistical Package For The Social Sciences
SR	Serbest Radikal
SSS	Santral Sinir Sistemi
STAT3	Sinyal Dönüştürücü Ve Transkripsiyon 3 Aktivatörü
TAS	Total Antioksidan Kapasitesi
TBH	Travmatize Beyin Hasarı
TNF	Tümör Nekroz Faktörü
TNFR1	Tümör Nekroz Faktörü Reseptörü 1,
TOS	Total Oksidan Miktarı
TRADD	Tümör Nekroz Faktörü Reseptörü Tip 1-İlişkili
DEATH Alanı Proteini,	
TRAIL	TNF-Releated Apoptosis-Inducing Ligand
VILI	Ventilatör Induced Lung Injury

TABLÖLAR

	<u>Sayfa</u>
Tablo 3.1: Çalışmada Kullanılan Kitler ve Özellikleri	33
Tablo 3.2: Skorlama Tablosu	35
Tablo 4.1: RML ve Radyoterapi Uygulanan Deney Hayvanlarının Beyin Dokularının H-E Boyama Sonuçları.....	40
Tablo 4.2: Rat Beyin Dokusunda Ödem ve Subaraknoial Hemoraji Karşılaştırması	43
Tablo 4.3: Rat Beyin Dokusunda Apoptotik Cisim ve Vakuolizasyon Karşılaştırması	44
Tablo 4.4: Gruplara Göre Kaspaz-3 Aktivitesinin Değerleri	45
Tablo 4.5: Gruplara Göre Kaspaz -9 Aktivitesinin Değerleri	46
Tablo 4.6: Gruplara Göre TNF- α Değerleri	48
Tablo 4.7: Gruplara Göre IL-10 Değerleri	49
Tablo 4.8: Gruplara Göre TOS Değerleri	50
Tablo 4.9: Gruplara Göre TAS Değerleri	51
Tablo 4.10: Gruplara Göre OSI Değerleri.....	52
Tablo 4.11: Gruplara Göre Lökosit Değerleri.....	53

ŞEKİLLER

Sayfa

Şekil 2.1: Radyasyonun Beyin Üzerindeki Etkilerin Zamanla Gösterimi	5
Şekil 2.2: İyonize Radyasyonun Etkileri.....	12
Şekil 2.3: Melatonin Sentezi	18
Şekil 2.4: Ramelteon(RML)'nin Yapısal Hali	19
Şekil 2.5: RML Etki Mekanizması.....	22
Şekil 2.6: Dışsal ve İçsel Apoptotik Yolaklarının Bir Özeti	24
Şekil 2.7: Dışsal Apoptozis Yolağı	28
Şekil 4.1: Beyin Dokusunda Ödem ve Subaraknodial Hemoraji Histopatolojik Görüntüleri	42
Şekil 4.2: Beyin Dokusunda Beyin Dokusunda Apoptotik Cisim ve Vakuolizasyon'nun Histopatolojik Görüntüleri	43
Şekil 4.3: Kaspaz-3 Aktivitesinin ELİSA Ölçüm Sonuçları	46
Şekil 4.4: Kaspaz- 9 Aktivitesinin ELİSA Ölçüm Sonuçları	47
Şekil 4.5: TNF- α ELİSA Ölçüm Sonuçları	48
Şekil 4.6: IL-10 ELİSA Ölçüm Sonuçları	49
Şekil 4.7: TOS Sonuçları.....	50
Şekil 4.8: TAS Sonuçları.....	51
Şekil 4.9: OSİ Sonuçları.....	52
Şekil 4.10: Lökosit Sonuçları	53

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Dünyada onlarca yıldır kanser tedavisinin üç önemli ayağının olduğu bilinmektedir; cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi (RT)'dir. Kanser tipi, tuttuğu organ, kişinin genel durumu, benign veya malign olması, metastaz yapıp yapmaması gibi parametreler göz önünde bulundurularak bahsedilen tedavi metodlarından birisi, ikisi veya hepsi birden uygulanabilmektedir.

Beynin radyasyona maruziyeti sonrası beyin parankim hücrelerinin destrüksiyonu ve vasküler sistemde hasar sonucu iskemi ortaya çıkar. Bu vasküler lezyonlarla beraber, nekroz, ödem ve demiyelinizasyon meydana gelir. Beyin radyasyona maruz kaldığında maruz kalınan bölgeye, verilen radyasyonun dozuna, tek veya fraksiyonel doz rejimine bağlı olarak; nöroinflamasyon, epigenetik ve histopatolojik değişiklikler, hücre apoptozisi, bozulmuş hücre profilerasyonu ve differansiyasyon görülür. Temel prensip olarak doza bağlı etki yüksek doz oranı ile düşük doz oranı arasındadır (Yang ve ark., 2017'a). Ayrıca beyine RT uygulamalarında nöral hücrelerde kayıp, inflamasyon, nöroenezis kaybı ve kognitif değişikliklere de sebep olabilir (Betlazar ve ark., 2016).

Radyasyonun bu yan etkileri verilen radyoterapinin fraksiyon dozuna, toplam dozuna, radyasyonun türüne eş zamanlı kemoterapi verilip verilmemesine, radyasyona maruz kalan organ veya dokuya birlikte radyoprotektör kullanılıp kullanılmamasına göre değişir. Örneğin, beyine 2 Gy'nin üzerindeki ışınlamadan sonra ROS birikiminin zararlı etkilerine karşı koyan, süperoksit dismutazlar (SOD), glutatyon ve katalaz gibi tipik olarak hücrelerde azalan antioksidan enzim aktivitesinin bir sonucu olarak beyinde oksidaif stres (OS) aracılı hasar meydana gelebilir (Fishman ve ark., 2009).

Son zamanlardaki çeşitli yayınlarda, ramelteon (RML)'a benzerlik gösteren melatonin (MLT)'nin antienflamatuar ve antioksidatif etkileri gösterilmiştir (Ündeğer ve ark., 2004; Wang ve ark., 2019). Örneğin; rat beynine 1000 Cgray iyonize radyasyon uygulaması sonrası yapılan MLT uygulamasının, DNA hasarına karşı koruyucu olduğu gösterilmiştir (Ündeğer ve ark., 2004). Işınlanmış beyin hücrelerinde MLT'nin nöroprotektif, antioksidan, antiapoptotik ve antienflamatuar etkilerini gösteren yayınlarda mevcuttur (Missiry ve ark., 2021). RML da MLT nin yapısal analogu olup melatonergic reseptörlere affinitesi MLT e göre 3-16 kez daha yüksek, ekonomik olarak oldukça avantajlı olup

FDA'den onaylı güvenli bir ilaçtır. Literatürde RML'nun, MLT'nin reseptör aktivasyonu ile antioksidan ve anti-inflamatuar etkisini gösteren yayınlar da vardır (Wang ve ark., 2019; Liu ve ark., 2021). RML'nun akut ve kronik beyin iskemisini üzerindeki etkisini araştıran 2020 yılındaki bir çalışmada da antioksidan ve anti-inflamatuar etkisi olduğu gösterilmiştir (Wu ve ark., 2020). RML'nun bu etkilerinin yanında immünomodülatör ve immüno-stimulan etkiyle de sahip olduğu bildirilen yayınlarda mevcuttur (Fourman ve Meyer, 2013; Nedkova-Hristova ve ark., 2020). Tüm bu çalışmalar bize, melatoninerjik agonist, antagonist veya parsiyel agonist gibi alt tipleriyle ilgili in vivo çalışma sahasının hastalıklar ve fizyoloji temelinde oynadığı roller gözönünde bulundurulduğu zaman halen melatonin (MLT) ve melatoninerjik reseptörleri için gizemini koruyan ve açıklanmaya muhtaç çok sayıda in vivo çalışmalara ihtiyaç duyulduğunu göstermektedir (Boutin ve ark., 2020).

RML uzun yıllardan beri FDA den onaylı insomnia tanısı alan hastalarda uyku parametrelerinde iyileşmeye katkıda ve aynı zamanda uyku sorunu olan kronik migren hastalarda etkili olduğu gösterilmiştir (Kuriyama ve ark., 2014; Hou ve ark., 2016). Mekanizma olarak hücresel ve hücre altı hedeflere özellikle iyonlaştırıcı radyasyonun neden olduğu hasar, temel olarak yıkıcı serbest radikallerin oluşumuyla ilişkili olduğundan serbest radikal yakalama yeteneğine sahip moleküller pratik olarak radyokoruyuculardır. Radyotoksositeye karşı nöroproteksiyon için birçok ajan kullanılmasına rağmen, bu ilaçlar radyoprotektif dozlarda istenmeyen yan etkilere neden olur ve bu da kullanımlarını sınırlar. Yapılan literatür taramasında, RML'nun radyasyon sonucu oluşan beyin hasarına karşı koruyucu veya tedavi edici etkilerini inceleyen bir çalışmaya rastlanmamıştır.

RT'e bağlı yan etki ve komşu sağlam doku hasarını minimize ederek tedavi protokolunu tamamlama süreci üzerinde yararlı etkiler sağlayacak çeşitli ajanların keşfine ihtiyaç vardır. Buna göre; RML'nun, radyasyonun beyinde oluşturduğu hasarın etkilerini azaltabilecek potansiyelde bir ajan olabileceğini düşündük. Bununla birlikte, teminin kolay ve ekonomik olması da diğer avantajlarıdır. Bu bağlamda bizde çalışmamızda hem melatoninerjik 1 (MT1) hemde melatoninerjik 2 (MT2) reseptörleri üzerinde etkili olan trisiklik yapay melatoninin analogu olan RML'nin tüm beyin bölgesi radyasyona maruz bırakılan ratlarda radyasyona bağlı ortaya çıkan beyin hasarında koruyucu etkisiyle beraber olası tedavi edici etkisi göstermesini hedefledik.

Özet olarak radyasyon uygulaması sonrasında beyin dokusunda hasar oluşturan hücresel düzeyde belirgin etki oksidatif stress, inflamasyon ve apoptozis üçlüsünden biri veya üçünü de kapsayabilmektedir. Hücresel düzeyde görülen bu üçlü etkiler gözönünde bulundurularak çalışmamıza başlanmıştır. Bu sunum rat beyinlerine hem radyasyonun hem de RML'nun literatüre uygun dozunda terapötik ve farmakolojik uygulaması yapılarak, olası antioksidan, antiapoptotik ve antienflamatuar etkilerini göstermek amacıyla tasarlanmıştır. Bu amaçla, oksidatif stres değerlendirmesi için toplam antioksidan seviyesi (TAS), toplam oksidan seviyesi (TOS), oksidatif stress indexi (OSİ), apoptotik etki için kaspaz-3 ve kaspaz-9 ve enflamatuar süreçleri göstermek için ise TNF- α (Tümör Nekrotizan Faktör- α), IL-10 (İnterlökin 10) seviyelerini ölçüp sonuçları detaylıca analiz etmeye çalıştık. Buna ek olarak beyin hasarını gözlemlemek amacıyla histopatolojik olarak hematoksilin-eozin (H-E) boyama yaptık. Ayrıca, heparinize kan örneklerinden hemogram çalışmasıyla kan parametrelerindeki değişiklikleri değerlendirdik.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Radyasyon

Radyasyon, ışık hızına yakın veya ışık hızında olan parçacıklardan ve elektromanyetik dalgalardan çevreye yayılan enerji olarak tanımlanır. Elektromanyetik dalga karekterde yayılan radyasyon ise iyonize olan ve iyonize olmayan olarak iki çeşide ayrılır. İyonlaştırıcı karekterde olan radyasyon foton yapısında olup parçacık veya dalgasal elektromanyetik radyasyon olarak ikiye ayrılır. Parçacık radyasyona Alfa (α) ve beta (β), proton, nötron ve elektronlar, dalgasal karekterde olanlara x ve γ ışınları örnek olarak verilir. Parçacıklardan sadece nötron yüksüz olup diğerlerinin bir kütlesi vardır. İyonlaştırma özelliği olmayan radyasyona dalgasal yapıda olan radyo dalgalar, mikrodalgalar, güneş ışığı, kızılötesi ışık, morötesi ışık örnek olarak verilebilir. Doğada yaşayan canlı türlerinin tümü doğal hayatın kaçınılmaz bir sonucu olarak yaşamlarının mutlak bir bölümünde söz konusu olan bu ışınlardan enaz biriyle etkileşim içinde olurlar.

Doğal olarak adlandırılan radyasyon ise iç ve dış radyasyon olarak adlandırılır. Doğal radyasyonun kaynağı ise güneş ve güneşten gelen yüksek enerjiye sahip kozmik ışınlardır. Bundan dolayı doğal kaynaklardan radyasyona maruz kalma oranı %80 iken tıbbi kullanım başta olmak üzere ulaşım haberleşme gibi insan yapımı radyasyondan kaynaklanan maruz kalma oranı ise geri kalan %20'sini meydana getirir. (UNSCEAR, 2000; UNSCEAR, 2008).

2.1.1.Radyasyonun Tıpta Kullanımı

Radyoterapide ana hedef tümörü tamamen ortadan kaldırmaktır. Fakat bu işlem sırasında normal dokuların etkilenmemesi neredeyse imkânsızdır. Bu etkilenmeye bağlı oluşan yan etkileri minimize etmek için radyasyon dozlarını genel olarak haftada 5 günlük dozlara bölünüp ve hafta sonu ara verilerek uygulanmaktadır. Bundan dolayı RT birçok kanser hastalığında tedavi edici etkisi için hastalığın bazı dönemlerinde palyatif veya kuratif amaçlı kullanılan önemli ve sık başvurulanan bir tedavi şeklidir. Her tedavinin faydası olduğu gibi istenmeyen bazı yan etkileri de olabilmektedir. Bu nedenle RT, tedavi etmesinin yanında sebep olduğu yan etkiler nedeni ile risk de oluşturabilmektedir

(Murshed ve ark, 2019). Özellikle, tümöre komşu olan normal dokuların cinsi ve radyasyona maruziyet kalma süresi RT'den elde edilecek faydayı sınırlamaktadır (Nair ve ark., 2001).

RT'den elde edilecek olası bu faydayı artırmak için günümüzde çok sayıda in vivo ve in vitro çalışmalar yürütülmektedir. Özellikle hayvan çalışmaları bu konuda önemli bir yer tutmaktadır. RT sırasında uygulanan iyonize radyasyon, direkt olarak hücrenin yapısal kısımlarına (membran, hücre iskeleti, DNA ve RNA yapıları, proteinler) fiziksel olarak etki ederek hasarlar oluşturabildiği gibi hücre düzeyinde birçok ROS oluşturarak oksidatif hasarlara da neden olmaktadır (Munoz-Espin ve Serrano, 2014; Santivasi ve Xia, 2014; Marnett, 2000). Bununla birlikte RT'e bağlı beyinde oluşan yanıt zincirinde; astrositler, mikroglialar, oligodendrositler, endotelial hücreler ve nöronlarda inflamatuvar bir kaskat başlar ve progresif bir nörolojik hasarlanma görülür (Moulder ve Cohen, 2007).

2.2. Radyoterapiye Bağlı Beyin Hasarı

Radyasyon tedavisinden sonra beyindeki histopatolojik değişiklikler kişiden kişiye değişir ve tedavi edilen beynin konumu, yaş, tanı ve tedavinin dozu/tekniki dahil olmak üzere birçok faktöre bağlıdır. Şekil 2.1.de gösterildiği gibi bunlar akut, erken dönem ve geç dönem olarak tanımlanmıştır (Giglio ve Gilbert, 2003).



Şekil 2.1: Radyasyonun Beyin Üzerindeki Etkilerin Zamanla Gösterimi (Greene-Schloesser ve ark., 2012).

Radyasyona bağlı beyin hasarı genellikle fraksiyonel kısmı (fWBI) veya tüm beyin ışınlama sonrasında gözlenir; bu sendrom hem anatomik hem de fonksiyonel eksiklikleri içerir. Radyasyona bağlı beyin hasarı klinik olarak görülme zamanına göre akut erken gecikmeli ve geç gecikmeli hasar olarak tanımlanır (Tofilon ve Fike, 2000).

Işınlamadan günler ile haftalar sonra ortaya çıkan akut beyin hasarı, mevcut güncel olarak uygulanan radyasyon tedavisi tekniklerinde nadir olarak görülür. Erken gecikmiş beyin hasarı ışınlamadan 1-6 ay sonra ortaya çıkar ve somnolansla birlikte geçici demiyelinizasyon içerebilir. Bu erken hasarların her ikisi de ciddi reaksiyonlarla sonuçlanabilse de aynı zamanda geri dönüşümlü ve kendiliğinden düzelebilen özelliklere de sahiptir. Buna karşılık, histopatolojik olarak vasküler patolojiler, demiyelinizasyon ve beyaz madde nekrozu sonuçlanan geç gecikmiş beyin hasarı (Schultheiss ve Stephens, 1992), genellikle ışınlamadan 6 ay sonra görülen geri döndürülemez ve ilerleyici karaktere sahiptir. Klasik olarak bilinen geç radyasyona bağlı beyin hasarı, yalnızca glial (Maazen ve ark., 1993) veya vasküler endotel hücrelerin (Calvo ve ark., 1988) çoğalma kapasitesindeki azalmaya bağlı olarak ortaya çıkan bir olgu olarak bilinirdi.

Bu hücre tiplerinden herhangi birinin kaybı sonuçta beyaz cevher nekrozuna neden olmasına karşın glial hücrelerin kaybının vasküler endotel hücrelerinin kaybından daha önce nekroza neden olduğu düşünülüyordu. Fakat fraksiyonel kısmı veya tüm beyin ışınlama (fWBI) alan hastaların, tespit edilebilir anatomik anormallikleri olmasa bile ışınlamadan sonraki 6. ayda önemli bilişsel bozulmaya sahip olabileceğine dair artan bir farkındalık vardır (Sundgren ve ark., 2009).

RT'ye bağlı ortaya çıkan beyin hasarını açıklamaya çalışan çeşitli hipotezlerler vardır.

2.2.1. Vasküler Hipotez

Geç radyasyona bağlı beyin hasarına ilişkin vasküler hipotezin savunucuları, vasküler hasarın iskemiye ve ikincil olarak beyaz cevher nekrozuna yol açtığını savunurlar. Bu hipotezi desteklemek için, büyük miktarda verilerden elde edilen datalar göre damar duvarı kalınlaşması, damar genişlemesi ve endotel hücre nükleer genişlemesi dahil olmak üzere radyasyona bağlı vasküler yapısal değişiklikleri tanımlamıştır (Calvo ve ark., 1988; Reinhold ve ark.,1990; Schultheiss ve Stephens, 1992). Işınlanmış rat beyinlerinde

yapılan kantitatif çalışmalar ayrıca endotel hücre çekirdeği sayısında, kan damarı yoğunluğunda ve kan damarı uzunluğunda zamana ve doza bağlı azalmalar göstermiştir (Reinhold ve ark., 1990; Brown ve ark.,2007). Ayrıca, radyasyon hasarının neredeyse tamamının damar sisteminde olduğu Boron Neutron Capture Therapy (BNCT) alışmalarında beyaz cevher nekrozu meydana geldiğni gösteren çalışmalar mevcuttur (Morris ve ark., 1996). Kemirgenlerde yakın zamanda yapılan bir çalışma, fWBI'den 2 ay sonra hipokampusun tüm bölgelerinde kılcal damar seyrelmesinin ve doku hipoksisinin arttığını göstermiştir (Warrington ve ark., 2011a). Paradoksal bir şekilde, bu araştırmacılar aynı zamanda düşük ortam oksijen seviyelerinin beynin mikrovasküler yoğunluğunu dzeltebildiğini (Warrington ve ark., 2011a; Warrington ve ark., 2011b) ve bilişsel bozukluğu tersine çevirdiğini (Warrington ve ark., 2012) gösterdi.

Yapılan bir çalışmada, 5 Gy fraksiyonun her birinden sonra kuyruk damarına enjekte edilen birincil kültürlenmiş fare fetal nöral kök hücreleri hem beyin endotel hücrelerine hem de çeşitli beyin hücrelerine farklılaşmasıyla hem serebral kan akışında hem de bilişsel işlevde radyasyona bağlı düşüşü geri getirdi (Joo ve ark., 2012). Buna karşılık, vasküler değişikliklerin olmaksızın radyasyona bağlı nekroz bildirilmiştir (Schultheiss ve Stephens, 1992).

Endotelde meydana gelen geç hasarın mekanizması, hasarlı endotel hücrelerinin yetersiz onarımı nedenlidir. Buna bağlı olarak kan beyin bariyeri (KBB)'nin bozulması, doku hipoksisi, hipoksiye yanıt veren genlerin ekspresyonunda artış görülebilir. Radyasyondan sonraki haftalarda genetik etkilerin görülmesiyle kalıcı bir değişiklik görülür ve tetiklendiği düşünülen en önemli gen vasküler entotelyal büyüme faktörü (VGEF) indüksiyonu olarak n görülmektedir (Nordal ve ark., 2004).

2.2.2. Parankimal Hipotez

Radyasyona bağlı beyin hasarına ilişkin parankimal hipotez başlangıçta miyelin kılıfların oluşumu için gerekli olan oligodendrositler üzerinde odaklandı. Olgun oligodendrositlerin üretilmesi için anahtar hücre, ratda kranial RT'den sonra progenitör hücre olan üreme kapasitesini kaybeden tip 2 astrosit oligodendrositlerdir (O2A) (Raff ve ark., 1983). Radyasyona bağlı olarak oligodendrosit progenitör hücrelerinin kaybının, sonuçta oligodendrositlerin yerini almada yetersiz kalmıştır. Bunun sonucu olarak

demiyelinizasyon ve beyaz cevher nekrozu geliştiğini rapor eden yayınlar mevcuttur (Bellinzona ve ark., 1996; Kurita ve ark., 2001). Oligodendrositlerdeki radyasyona bağlı hasardan sonra gelişen geç başlangıçlı beyaz cevher nekrozu ile tutarsızlık vardır (Hornsey ve ark., 1981). Bu nedenle, oligodendrositlerdeki radyasyon hasarı ile geç radyasyona bağlı beyin hasarı arasındaki ilişki halen belirsizliğini korumaktadır.

Astrosit hücreleri beyindeki toplam glial hücre popülasyonunun yaklaşık %50'sini oluşturur (Hansson ve ark., 1988). Bir zamanlar yalnızca destekleyici bir rol oynuyor olarak görülen astrositler, artık sinaptik iletimin modülasyonu ile nörotrofik faktör olan birlikte temel fibroblast büyüme faktörü (FGF)'nü salgılanması uyarmak dahil nöroenezesi indükleyerek çeşitli işlevleri gerçekleştiren heterojen bir hücre sınıfı olarak kabul edilmektedir. (Song ve ark., 2002; Seth ve Koul, 2008). Astrositlerin endotel hücrelerini ve nöronları oksidatif hasardan koruduğu gösterilmiştir (Wilson ve ark., 1997). Rat ve fare beyninin ışınlaması, glial fibriller asidik protein (GFAP) seviyelerini hem akut (24 saat) hem de kronik (4-5 ay) olarak artırır (Chiang ve ark., 1993; Hong ve ark., 1995).

Koşullu ortamdan ışınlanmış mikrogial hücrelerin astrogliozisi indükleyerek radyasyona bağlı ödem gelişimine katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Hwang ve ark., 2006). Bununla birlikte, geç radyasyona bağlı beyin hasarının genel patogenezinde astrositlerin kesin rolü hala belirsizdir, ancak muhtemelen beyindeki hem vasküler hem de diğer parankimal öğelerle etkileşerek katkıda bulunduğu varsayılmaktadır (Greene-Schloesser ve ark., 2012).

Hasarlanmadan sonra aktive olan mikrogia hücre gövdesinin yuvarlanması, hücre işlemlerinin ve profilerasyonun geri kalması, artmış reaktif oksijen türleri (ROS) ile birlikte sitokin ve kemokinlerin reaksiyona katılmasıyla nöroinflamasyona neden olurlar. (Stoll ve Jander, 1999; Pocock ve Liddle, 2001; Gebicke-Haerter ve ark., 2001; Kim ve Vellis, 2005).

Mikrogial aktivasyonun ölü hücrelerin fagositozunda önemli bir rol oynamasına rağmen, sürekli aktivasyonun beyindeki kronik bir inflamatuvar duruma katkıda bulunduğu düşünülmektedir (Gebicke-Haerter, 2001; Joo ve ark., 2012). Doku kültürü çalışmalarında aktive edilmiş mikrogliaya ışınlamanın proinflamatuvar genler TNF- α , IL-

1β, IL-6 ve Cox-2'nin ve kemokinler MCP-1 ve ICAM-1'in ekspresyonunda belirgin bir artışa yol açtığını göstermiştir (Chiang ve ark., 1993; Kyrkanides ve ark., 1999; Kyrkanides ve ark., 2002; Hwang ve ark., 2006; Lee ve ark., 2010).

Kemirgen çalışmaları ile birlikte insan beyni dokusunun analizi sonucu aktive olan mikrogliyal hücrelerinin, azalan hipokampal nörogenezis ve bilişsel işlev fonksiyonlarıyla ilişkili olabileceğini düşündürmektedir (Monje ve ark., 2002; Raber ve ark., 2004; Monje ve ark., 2007). Son olarak aktive edilmiş mikrogliya sayısını etkilemeden yeni nöronlar oluşturan fetal nöronal kök hücrelerin (NSC) ortotopik enjeksiyonları, kemirgenlerde radyasyona bağlı bilişsel bozukluğu tersine çevirdiği bildirilmiştir (Acharya ve ark., 2009; Acharya ve ark., 2011).

2.2.3. Çoklu Hücre Hipotezi

Çoklu hücre hipotezinde vasküler veya parankimal hipotezlerde tek bir hücre veya doku bilişsel bozukluk da dahil olmak üzere geç gecikmiş radyasyona bağlı beyin hasarını tam olarak açıklayamadığı için, radyasyona bağlı geç etkilerin artık dinamik beyindeki çoklu hücre tipleri arasındaki etkileşimlerle olabileceğini savunmuştur (Tofilon ve Fike, 2000).

2.3. Radyoterapiye Bağlı Değişimler

Radyasyona bağlı beyin hasarı (RBBH), radyasyonun beynin bir parçasına veya tamamına uygulanması sonrasında gözlenen bir durumdur. Anatomik veya fonksiyonel defisitler ile kendini gösterebilir. RBBH, zaman durumuna bağlı olarak akut, erken dönem veya geç dönem olarak adlandırılmaktadır (Greene-Schloesser ve ark., 2012). Radyasyon, özellikle beynin primer veya metastatik tümörlerinde efektif tedavi sonuçları sunabilir (Patchell ve ark., 1998).

Hücre, doku, organ ve bütün organizma üzerinde iyonize radyasyon tarafından meydana gelebilecek kompleks sonuçlar vardır. Biyolojik dokularda DNA ve kromozom lezyonları, hücre ölümü, hücre döngüsünde bozulma, sistemik etkilenim, embriyolar ve genetik yapı üzerinde etkiler görülmektedir. Günümüzde ise bir yandan radyasyon onkolojisinde tedavi edici etkileri ile kullanılmaktadır (Murshed, 2019). Ayrıca bir diğer önemli bir nokta ise ileride RT uygulaması yapılacak yaşlı hasta populasyonlarında artış

beklenmektedir. Etkili ve sonuç alan bu uygulamalar neticesinde 70 yaş altı RT uygulanan hastaların daha uzun süre yaşayabilecekleride gözönünde bulundurulmalıdır. Genel olarak yaşlı hasta kanser vakalarının %50'si RT kemoterapiye ve cerrahi girişimlere göre oldukça az toksik etkiye sahip olduğundan RT almaktadır (Kurtman ve ark., 2016).

Radyasyonun yan etkileri genel olarak lokal olup RT verilen hedef bölge içerisinde veya yakınında olan organ veya dokular radyasyondan etkilenir. Örneğin Akciğer kanserli bir hastanın RT sahası içerisinde kalan özefagus, kalp, normal akciğer dokusu, medulla spinalis etkilenebilir. Beyin tümörlü bir hastaya RT uygulanırken tümöre yakın normal beyin dokusu, optik sinirler, optik kiazma, beyin sapı etkilenebilir. Jinekolojik tümörü olan bir hastaya RT verildiğinde rektum, mesane etkilenebilir. Mide, pankreas ve batin içi diğer tümörlerde RT verildiğinde ise medulla spinalis, karaciğer ve böbrekler RT'den olumsuz etkilenebilir. Her hücrenin radyasyona verdiği yanıt farklıdır. Bu yanıt farklılığın nedeni olarak iyi diferansiyele olmamış sık bölünen over ve testis hücreleri, kan dolaşımı hücreleri, GİS hücreler radyasyona oldukça duyarlıyken az veya hiç bölünmeyen, iyi diferansiyele olan; K.C, böbrek, kıkırdak, kas, sinir hücreleri gibi hücre grupların radyasyona verdiği yanıt son derece düşüktür (Yaren ve Karayılanoğlu, 2005).

Vücudunun tamamının veya bir kısmının yüksek dozda radyasyona maruz kalmasıyla radyasyonun akut etkisi başlar. Radyasyonun kronik etkisi için belli bir kuluçka süresi gereklidir. İyonize olan radyasyon biyolojik olarak hücresel düzeyde atomlar iyonlaşıp hücre içi yapılara zarar verirler. Radyasyonun hem somatik hem de genetik etkisi söz konusudur (Daşdağ, 2010). Hipokampusunda radyasyondan kaynaklanan zarardan dolayı işlevi olumsuz etkilenmektedir (Deng ve ark., 2009).

Beyin dokusunda radyasyonun oluşturduğu hasarlara bağlı tolerans dozları yaklaşık olarak hesaplanmıştır. Beyinin tümüne 45 Gy ile ışın uygulandığında %5, 60 Gy ile ise %50 oranında beyin dokusu nekroze olmaktadır (Rubin P ve ark., 1978).

Ayrıca beyin değişikliklerinin ve işlev bozukluğunun ışınlamadan sonra erken başladığı bulunmuştur. Bu da erken patolojik durumları indükleyebileceğini göstermektedir (Makale ve ark., 2017b). Genel olarak, mevcut kanıtlar, klinik olarak terapötik dozlarda

lokal radyasyonun her zaman doğal ve adaptif bağışıklık sisteminin bir miktar aktivasyonunu ortaya çıkardığını göstermektedir (McBride ve ark., 2004).

Son 20 yılda yapılan araştırmalarda RBBH, farklı hücre tipleri arasında dinamik etkileşimin olduğu, gecikmiş mitotik aktiviteye bağlı olarak vasküler ve parankimal hücrelerin öldüğü görülmüştür. Beyinde oluşan yanıt zincirinde; astrositler, mikroglialar, oligodendrositler, endotelyal hücreler ve nöronlarda inflamatuvar bir kaskat başlar ve progressif bir nörolojik hasarlanma görülür (Moulder ve Cohen, 2007).

Hayvan modellerinde potansiyel hasarlanma mekanizmaları ve nöroinflamasyon yapısı araştırılmaktadır. Nörovasküler bölge olan KBB'de hasarlanma, nöron progenitör hücrelerin ölümü, hipokampüsteki nörogenezis mekanizmasının inhibisyonu ve gliaların direkt aktivasyonu ile sonuçlanan bir süreç meydana gelmektedir (Turnquist ve ark., 2020).

Özellikle kraniyal RT sonrasında tümör yapısının incelenmesi için yeniden örnekleme yapılarak patolojik olarak radyasyonun ortaya çıkarttığı değişimler gözlenmektedir. Bazı vakalarda sadece nekroz dokusu görülür. Bunun yanı sıra neoplastik dönüşüm olmayan dokularada, astroglisis, vasküler değişimler, doku kaybı, kronik inflamasyon, glial ve nöral atipi görülmektedir. Vasküler dokuda tromboz, hemoraji, hiyalinize olmuş alanlar gözlenir. İmmunolojik takip yapıldığında bazı vakalarda proliferatif tümör hücreleri gözlenmektedir (Belka ve ark., 2001; Perry ve Schmidt, 2006).

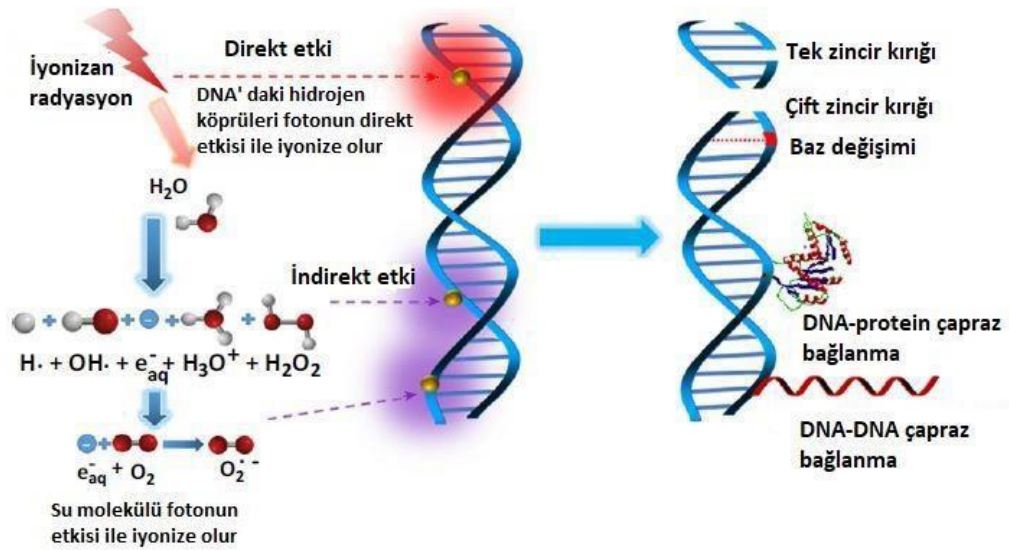
Radyasyona bağlı kromozomal anormalliklerin sayısı ile ölüm arasında doğrudan bir ilişki vardır (Hall ve ark., 1988).

Hipokampal bölgenin RT alması nörogenezis fonksiyonun yavaşlamasına ve sonuçta hafıza kaybı ile sonuçlanır. Glial veya metastatik tümörlerden sonra gelişen nörokognitif bozuklukların RT uygulanması büyük önem arz etmektedir. Bunun için RT uygulanan hastalara fraksiyon başına 3 Gy üstündeki dozlarda ve toplam olarak 45-60 Gy den fazla dozda uygulama yapıldığı zaman oldukça dikkatli davranmak gerekmektedir (Kurtman ve ark., 2016).

2.3.1. Apoptozis

Apoptozis, tüm hücrelerin doğasında bulunan bir hücre intihar sistemidir. Ökaryotik hücreler ve çeşitli moleküller tarafından düzenlenir. Işınlama, hücrelerde p53 aktivasyonu yoluyla veya plazma zarlarında seramid üretimi yoluyla apoptozisi indükleyebilse de, radyasyona bağlı apoptozisin oligodendroglial hücrelerde daha etkili olduğuna dair önemli bir kanıt yoktur. Nöronların büyük olasılıkla X-ışınlarına apoptotik tepkisi, DNA hasarının bir sonucudur (Şekil 2.2). Çünkü radyasyona bağlı hücre ölümünün bu tür bir hasarla ilgili olabileceğine dair önemli kanıtlar var. Örneğin, hücreler, çekirdekte hedeflenen radyasyona, sitoplazma veya plazma zarında hedeflenen radyasyona göre çok daha duyarlıdır (Marin ve Bender, 1963; Munro ve ark., 1970).

Ayrıca, teorik değerlendirmeler, lipid veya proteinlerin X-ışınlarına verilen yanıtın sorumlu olmasının pek olası olmadığını göstermektedir. Çünkü 100 Gy'ye kadar olan dozların bu moleküllerin yalnızca 0,01%'ine zarar verebileceğini göstermektedir (Bump ve Brown, 1990).



Şekil 2.2: İyoneze Radyasyonun Etkileri (Yalçın, 2021)

İyonize radyasyon (İR) sıklıkla içsel (mitokondriyal aracılı), dışsal (ölüm reseptörü aracılı) ve membran (seramid üretimi) apoptotik yolları indükler. İçsel (mitokondriyal aracılı) ve dışsal (ölüm reseptörü aracılı) apoptotik yollar p53 tarafından aktive edilirken, membran stres yolağı ise seramidin ikinci haberci olarak etkisiyle başlamaktadır (Maier ve ark., 2016). Yani p53 ekspresyonu, p53'e bağlı apoptozisi indüklemeye çok önemli bir role sahiptir ve yüksek p53 mRNA ekspresyonu olan hücreler radyasyona bağlı apoptozise karşı daha hassastır (Flores ve ark., 2019).

Kaspaz kaskadı aktivasyonundaki kusurların tümör ilerlemesine ve metastaza yol açtığı iyi bilinmektedir. Tümör hücrelerinin İR'a duyarlı hale getiren bileşikler tarafından aktivasyonun sağlanması ise aynı zamanda apoptozisin indüklenmesine, tümör boyutunun küçülmesine ve kanser gelişiminin kontrolüne sebep olur. Radyasyona maruz kaldıktan sonra kaspaz-3 proteininin ekspresyonundaki artış, apoptotik yolla hücre ölümüne neden olur (Ju ve ark., 2007; Hosokawa ve ark., 2005).

Apoptotik reseptör agonistlerinin, örneğin TNF-ilişkili apoptozisi indükleyen ligand (TRAIL) reseptörlerine spesifik olarak bağlanan monoklonal antikör ligandları İR ile kombinasyon halinde kaspaz yolağını kademeli olarak aktive etmek suretiyle sinerjik bir şekilde apoptotik etki oluşturdıkları gösterilmiştir (Marini ve Budach., 2009; Marini ve ark., 2006; Marini ve ark., 2003; Marini ve ark., 2009).

Fraksiyonel radyoterapi, malign beyin tümörleri için yerleşmiş bir tedavidir. Son zamanlarda iyi huylu intrakranial tümörler ve serebrovasküler malformasyonlara lokalize tek doz veya sınırlı fraksiyone ışınlama endikasyon almasıyla sınırlarını genişletti. Ancak, bu tür bir tedaviler normal beyin için akut beyin ödemi, lökoensefalopati ve gecikmiş radyasyon nekrozu açısından büyük dezavantajlar olabilir. Merkezi sinir sistemindeki (MSS) çeşitli hücre türleri arasında, oligodendrositler ışınlamaya karşı en hassas olanlardır (Kogel ve ark., 1986; Hopewell ve Hubbard, 1978). Bu hücreler, nöronal aksonlar boyunca miyelin kılıfları üretir ve korur. Bu nedenle, oligodendrositlerde radyasyon hasarı beyin atrofisi ile ilişkili progresif lökoensefalopati gibi demiyelinizan süreçleri tetiklediği düşünülmektedir (Asai ve ark., 2001).

Spinal korddaki ve birincil kültürdeki oligodendrositler ışınlamadan sonra apoptozise uğrar ve bu olgu DNA fragmantasyonu ile karakterizedir (Li ve ark., 1996; Li ve ark., 1997).

Radyasyon hasarını izleyen ilk 24 saat içinde karşımıza apoptozis yanıtı çıkabilir (Shinohara ve ark., 1997). Li ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen diğer bir çalışmada, endotelial hücre ölümü sonrasında KBB permabilitesini doğrudan etkilediği gösterilmiştir (Li ve ark., 2003).

Serebral iskemi ve reperfüzyonun gibi diğer oksidatif stres türlerinde beyinde DNA değişikliklerine neden olarak apoptozise neden olabileceğini gösteren çalışmalar mevcuttur (Mac-Manus ve ark., 1993; Hill ve ark., 1995; Islam ve ark., 1995; Li ve ark., 1995; Linnik ve ark., 1995; Du ve ark., 1996; Liu ve ark., 1996).

Radyasyonun neden olduğu beyin yaralanmaları arasında glial atrofi demiyelinizasyon, nekroz, değişen derecelerde vasküler değişiklikler ve diğer histopatolojik değişiklikleri içerir. 20 Gy'den daha yüksek radyasyon dozları kesinlikle serebrovasküler lezyonlara neden olacaktır (Hopewell ve ark., 1989). Birkaç çalışmada, Wistar albino ratları, 10 ila 40 Gy arasında değişen dozlarda tek doz, tüm beyin radyasyonu ile ışınlanmıştır. 10 Gy'de radyasyona maruz bırakılan ratlar, ölüme kadar hiçbir önemli histopatolojik veya klinik değişiklik göstermemekle beraber kısalan bir hayatta kalım süresi de göstermişlerdir. Ancak, 20 Gy ile ışınlanmış ratlarda maruziyetten 15 ay sonra nekrozu olmayan serebrovasküler lezyonlar gözlemlendi. Baskın vasküler lezyonlar arasında hiyalin kalınlaşması ve damar duvarlarında fibrinoid nekroz ile mikroanevrizmalar yer alıyordu. Bununla birlikte 30 ve 40 Gy doz alan ratlarda, esas olarak büyük değişiklikler beyaz cevherde özellikle de hipokampusun iç kapsülü ve fimbriasında meydana gelen nekrotik lezyonlar histopatolojik olarak ön plandaydı (Calvo ve ark., 1988).

2.3.2. Oksidatif Stres ve İnflamatuvar Cevap

Kimyada serbest radikal (SR), bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron içeren ve eşleşmemiş elektronunu başka bir moleküle vererek veya onu alarak diğer moleküllerle reaksiyona girebilen nispeten kararlı bir türdür. Bu kararlılığı artırmak için başka bir molekülden reaksiyona girdiği molekülü diğer bir SR'e dönüştürür. SR reaksiyonlarının

ortak bir özelliği, zincirleme giden reaksiyon tipleridir. Sonuçta bir serbest radikal, başka bir serbest radikalın oluşumuna yol açar. Bu işlem yalnızca iki SR'ler birbiriyle reaksiyona girdiğinde durur. Biyolojik bağlamda, reaktif oksijen türleri (ROS), oksijenli solunum yolunun hücresel düzeydeki metabolizması sonucu doğal olarak ortaya çıkar. Mitokondriyal solunum, reaktif oksijen türlerinin (ROS) (Mailloux ve ark., 2020) önemli bir nedenidir. Mitokondriye ek olarak, ROS, NADPH oksidazlar (NOX), ksantin oksidaz, nitrik oksit sentaz ve peroksizomal bileşenler gibi çeşitli enzimler vardır (Magnani ve ark., 2019). Ayrıca iyonlaştırıcı ve UV radyasyonunun yanı sıra çok çeşitli ilaçların ve ksenobiyotiklerin metabolizması ile üretilirler. Endoplazmik retikulumda, proteinlerin katlanması ve disülfid bağlarının oluşumu sırasında oksidanlar salınır. Bunlar, birçok hücre türü tarafından üretilen O₂ molekülünün elektronları kabul etme yeteneğinden türetilen oldukça reaktif kimyasal moleküllerdir. Bu moleküller çeşitli hücreler tarafından üretilen süperoksit anyonu (O₂⁻), hidrojen peroksit (H₂O₂), hidroksil radikali (OH) ve tekli oksijen gibi ardışık kararsız moleküller üretir (Collin ve ark., 2019). Fizyolojik ROS seviyeleri, hücre sinyalleşmesi ve homeostazis fonksiyonlarını yerine getirmek için hücrelerin normal işleyişine özgüdür (Sies ve ark., 2020). Öte yandan, fazla üretildiklerinde veya hücresel savunmalar bunları metabolize edemediğinde oksidatif stres hasarı meydana gelir (Heid ve ark., 2013). Bazı güçlü ROS temizleyici antioksidanların kullanımı, radyasyona bağlı apoptozis, inflamasyon ve oksidatif stres (OS) üzerindeki koruyucu etkilerini ve normal doku hasarına korumaya yönelik etkiler sağlayabilmektedir.

Genel olarak, iyonlaştırıcı radyasyon, biyolojik etkilerini, doğrudan veya dolaylı olarak, bir hücrenin moleküler veya fonksiyonel fenotipini değiştirebilen ROS üreterek üretir. ROS'ta akut doza bağımlı bir artış sonucu astrositler, mikrogliya ve nöron kültürlerinde ölçülmüştür (Ramanan ve ark., 2008). Kronik oksidatif stresin genellikle ışınlamanın mikrogliya'yı aktive ettiği ve bağışıklık hücrelerinin beyne sızmasına neden olduğu bir inflamatuvar tepkiden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu hücreler daha sonra ROS üreterek daha fazla mikrogliayı aktive edip oksidatif stres seviyesini koruyabilen veya bunu artırabilen pekçok sayıda bağışıklık hücresinin ilgisini çekmesine sebep olur. Kronik oksidatif stres azaltmak için tasarlanan müdahaleler, bilişsel bozukluk da dahil olmak üzere geç radyasyona bağlı beyin hasarını önleme veya iyileştirme fırsatı sunar. Özellikle hayvanlarla yapılan uzun süreli çalışmalarda, OS'in hem ölçülmesi hem de yorumlanması zordur (Robbins ve ark., 2012).

Beyine radyasyon uygulamasından sonra hücresel düzeyde biyokimyasal parametrelerden ROS, TNF- α , IL-1 β ve IL-6 gibi enflamatuar sitokinler neticede inflamasyon ve doku hasarına neden olarak, doğrudan DNA hasarına yol açar ve mukozal epitelyumun ilk hasarını indükler. Bunun sonucu ortaya çıkan doku hasarı ülserasyona ve ardından Gr(-) bakteriler ile kolonizasyona yol açıp, KBB'nin bozulmasıyla sonuçlanabilir. Bundan dolayı ışınlamadan sonra artan OS enflamasyona yanıt olarak genellikle birçok parametre kullanılır. Bu yanıttan sonra TNF- α , IL-1 β , ICAM-1 ve COX-2 gibi proinflatuar moleküllerin artması ile birlikte (Ramanan ve ark., 2008; Lee ve ark., 2010) nükleer faktör kappa beta (NF κ B) proinflatuar transkripsiyon faktörleri artması eşlik eder (Chiang ve ark.,1997; Raju ve ark.,1999; Kyrkanides ve ark., 1999; Kyrkanides ve ark., 2002; Lee ve ark., 2010).

2.4. MELATONİNİN ÖZELLİKLERİ

Melatonin, diğer adıyla N-asetil-5-metoksitriptamin temel olarak pineal bezde pinealositler tarafından bulunan serotonininin (5-hydroxytryptophan), metoksillenmiş ve N-asetillenmiş bir ara metabotolitidir (Şekil 2.3). Melatonin'nin sentezi ve salınımı karanlıkta hızlanır ve ışıktaki inhibe edilir (Tovito ve ark., 1999). Aydınlik ortam bilgisi Hipotalamusun suprakiazmatik çekirdeği (SCN) yoluyla retinadan epifiz bezine iletilir. İnsanlarda salgısı gün batımından hemen sonra başlar. Gece yarısında (sabah 2 ile 4 arasında) zirveye ulaşır ve gecenin ikinci yarısında kademeli olarak azalır (Brzezinski ve ark., 1997). Melatoninin yaklaşık %80'i gece sentezlenir ve serum konsantrasyonları 80 ile 120 pg/ml arasında değişir. Gündüz saatlerinde serum konsantrasyonları düşüktür (10-20 pg/ml) (Karasek ve ark., 2006) Melatonin sentezlendikten kısa bir süre içinde merkezi ve periferdeki dokulara hızla ulaştırılmak için sistemik dolaşıma hemen verilir.

Melatoninerjik reseptörler santral sinir sistemi (S.S.S) başta olmak üzere periferde çeşitli dokularada görülmektedir. En iyi karakterize edilen yol, yüksek afiniteli MT1 bölgeleri ve düşük afiniteli MT2 bölgeleri olmak üzere iki tür membrana özgü reseptörlerin aktivasyonudur (Dubocovich ve ark., 1995; Morgan ve ark., 1994). G proteinine bağlı reseptörler (Ebisawa ve ark., 1994) olan MT1 reseptörlerinin aktivasyonu ile hedef hücrelerde adenilat siklazın inhibisyonuna yol açar. MT3, Kinon redüktaz 2 enzimidir. Bu enzim, kinonların elektron transfer reaksiyonlarını önleyerek oksidatif stresi önlemede

rol oynayan redüktaz grubuna dahil enzimdir (Pandi-Perumal ve ark., 2008). Bu enzim veya MT3 reseptörü, karaciğer, böbrek, kalp, akciğer, bağırsak, kas ve kahverengi yağ dokusunda bulunur. Kinon redüktaz 2 bir detoksifikasyon enzimidir. Göz içi basıncının düzenlenmesinde yer aldığına dair kanıtlar mevcuttur (Cardinali ve ark., 1997; Ekmekçioğlu ve ark., 2006).

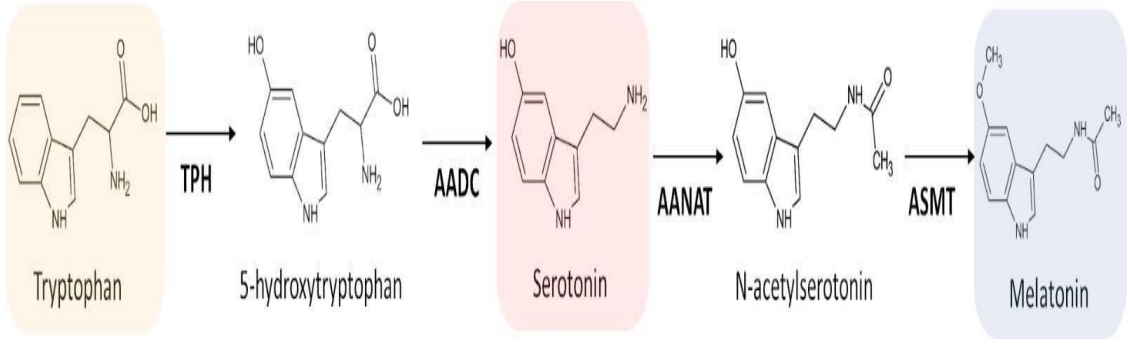
MT'erjik reseptörler, kalp ve atardamarlar, adrenal gland, böbrek, akciğer, karaciğer, safra kesesi, ince bağırsak, adipositler, yumurtalıklar, meme, prostat ve deri uterus dahil olmak üzere birçok merkezi ve periferik dokularda bulunmuştur (Ekmekçioğlu ve ark., 2006). Ayrıca, T ve B lenfositlerinde de tespit edilmişlerdir. Çalışmalar türler arasında MLT reseptörlerinin ekspresyonunun yoğunluğu ve konumunda önemli farklılıklar olduğunu göstermektedir (Morgan ve ark., 1994).

MLT, MT1 ve MT2 reseptörlerini doğrudan etkileyerek uyku-uyanıklık ritmi, nöroendokrin ritim ve vücut sıcaklığı dengesi gibi sirkadiyen ritimler üzerinde düzenleme mekanizmasına sahiptir (Karasek ve ark., 2006; Ekmekçioğlu ve ark., 2006; Zisapel ve ark., 2001). MLT ayrıca erken fetal gelişimi doğrudan etkileyebilir. Plasenta, glial ve nöronal gelişim ile fetusun biyolojik saatinin ayarlanmasında ontojenik fonksiyonları olduğu belirtilmektedir (Iwasaki ve ark., 2005; Niles ve ark., 2004).

2003 yılındaki bir çalışmada 1000 Cgray iyonize radyasyonun induklediği rat beynindeki Melatoninin DNA hasarı üzerindeki koruyucu etkisini olduğu göstermiştir. Işınlamış beyin hücrelerinde 100mg/kg melatonin uygulanan ratlarda DNA zincir kopmasını azaltarak ve lipid peroksidasyonunu önleyerek antioksidatif etki gösterdiğini belirtmişlerdir (Ündeğer ve ark., 2004).

2021 yılında yapılan bir çalışmada gama radyasyonla induklenmiş beyin hasarında melatoninin belirgin bir şekilde ışınlamış rat beyinlerinde antioksidatif etki gösterdiğini ortaya çıkarmıştır (El-Missiry ve ark., 2021).

2019'daki başka bir yayında MLT travmatize beyin hasarında kullanılmış olup çalışma sonucuna göre MLT kullanımının hafif hasarlı dokuda (cAMP-dependent protein kinase (PKA)/ cAMP response element binding (CREB) sinyal yolağıyla enerji açığını kapatıp beyin hasarını önlediği yönünde bilgiye ulaşılmıştır (Yang ve ark., 2017 a).



Şekil 2.3: Melatonin Sentezi (Mannino ve ark., 2021)
(TPH: tryptophan hidroksilaz; AADC: aromatic amino asid dekarboksilaz; AANAT: aralkylamine N-acetiltransferaz; ASMTs: acetylserotonin O-metiltransferaz.)

2.5. Ramelteon (RML)’nun Özellikleri

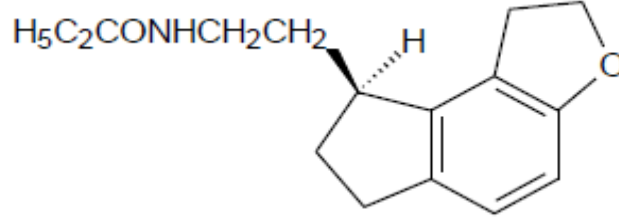
2.5.1.RML’nun Tarihi

1992’de Takeda Pharmaceutical, uykusuzluk tedavisine yönelik alternatif stratejiler araştırmak için bir plan başlattı. Bir MLT reseptör agonisti oluşturmaya odaklandılar. 1996 yılında, şimdi RML olarak bilinen TAK-375 geliştirildi. Bileşiğin klinik denemeleri 1999’da başladı. Bu denemeler, yılda 800’den fazla denekle toplamada 7900’den fazla benzersiz denek kullanım sayısını içeriyordu. RML’nun geliştirilmesinde yürütülen çalışmalar genel etkililik ve güvenlik protokollerinin yanı sıra farmakokinetik ve farmakodinamik özellikleri, toksikolojiyi, kötüye kullanımı ve spesifik özel popülasyonlarda kullanım incelemelerini içermiştir.

RML için yeni ilaç başvurusu Eylül 2004’te FDA’ya sunulmuş olup nihayetinde Temmuz 2005’te onaylanmıştır. RML, ABD’de Eylül 2005’te Rozerem adıyla kullanıma sunulmuştur.

2.5.2. Ramelteon (RML)'nin Kimyası

RML'nun kimyasal yapısı (S)-N-[2-(1,6,7,8-tetrahidro-2H-indeno-[5,4-b)]'dır. RML'un yapısı Şekil 2.4'de gösterilmiştir.



Şekil.2.4: Ramelteon (RML)'nin Yapısal Hali (Takeda Pharmaceutica.,2021)

2.5.3. Farmakodinamik Özellikler ve Etki Düzenekleri

RML'nun in vitro reseptör bağlama deneylerinde MT1 ve MT2 MLT reseptörü alt tiplerinin bir agonisti olduğu gösterilmiştir (Kato ve ark., 2005). MLT ile karşılaştırıldığında, RML'nun bu bağlanma bölgeleri için önemli ölçüde daha fazla afiniteye ve seçiciliğe sahip olduğu gösterildi. İn vitro çalışmalarda RML'un ayrışma sabiti (Ki) MLT'den 3-16 kat daha yüksek çıkmıştır. MLT'in aksine RML memelilerde geniş doku dağılımına sahip olan kinon redüktaz 2 enziminin melatonine duyarlı bir biçimini temsil eden MT3 bağlanma bölgesi için önemli ölçüde daha düşük afiniteye sahiptir. RML'la in vitro yapılan birçok çalışmada benzodiazepin, dopamin ve opiat reseptörleri dahil olmak üzere ligand bağlanma bölgeleri için ölçülebilir bir afinitesi olmadığını göstermiştir. Klinik öncesi uyku ile ilgili etkileri değerlendirmek için hayvan denekleriyle yapılan çalışmalarda serbestçe hareket eden kediler (Miyamoto ve ark., 2004) ve makak maymunları (Yukuhiro ve ark., 2004) kullanılmıştır. RML'nun kedi çalışmasında oral olarak uygulanan eksojen MLT ile karşılaştırılması yapılmıştır. Uyku özellikleri değerlendirmek için elektroensefalogram (EEG) kas gerilimi ve göz hareketlerini içeren gözlemler yapıldı. Sonuçta RML'nun uyanıklığı önemli ölçüde azalttığı gözlemlendi. MLT'nin 2 saate kadar süren eksojen etkilerinin aksine RML'nun geniş bir dozaj aralığı ile birlikte 6 saate kadar süren etkisini ortaya çıkıttığı gösterildi. Ayrıca RML'un uykuyu teşvik etmede MLT'den yaklaşık 10 kat daha güçlü

olduğu bulundu. Makaklarda RML, eksojen MLT ve zolpidem ajanlarıyla yapılan çalışmada RML'nun önemli ölçüde uyku gecikmesini kısalttığı ve bununla birlikte MLT'nin toplam uyku süresini arttırmasına rağmen uyku gecikmesi ve uyku süresi üzerinde daha az etkisi olduğu raporlandı. Ayrıca RML ve MLT ile hiçbir şekilde davranış değişikliğine rastlanmamakla birlikte zolpidemin en yüksek yüksek dozlarında sedasyon ve kas gevşemesi gözlemlendi (Yukuhiro ve ark., 2004).

2.5.4 Farmakokinetik Özellikler

Ramelteon hızla emilir ve 1 saatten daha kısa sürede en yüksek serum konsantrasyonuna ulaşır (Hibberd ve Stevenson, 2004; Karim, 2006a). Kapsamlı ilk geçiş metabolizması vardır ve oral dozu takiben ortalama sistemik yararlanım %2'den azdır (Amakye ve ark., 2004). İnsanlarda protein bağlanması yaklaşık %82'dir (Takeda Pharmaceuticals.,2021). RML'nun geniş bir doz aralığındaki farmakokinetik çalışmaları, tepe konsantrasyon ve toplam sistemik maruziyette büyük ölçüde denekler arası değişkenlik göstermektedir (Karim ve ark.,2006). İlaçların eğri altındaki alan (AUC) değeri ilacın klirensi ile ters orantılıdır. Yani, klirens ne kadar yüksekse, ilaç sistemik dolaşımda o kadar az zaman harcar ve plazma ilaç konsantrasyonunda ki düşüş o kadar hızlı olur. RML'nun gıda ile birlikte verilmesi AUC (eğri altındaki alan)'u arttırır, Tmax'ı geciktirir ve Cmax'ı azaltır (Karim ve ark., 2004a). Etki başlangıcı aç karnına daha hızlı olmasına rağmen klinik olarak anlamlı olmayabilir. RML'nun yüksek yağlı yemeklerle birlikte veya bundan hemen sonra kullanılması absorpsiyonda beklenen gecikmeden dolayı yağlı yemek önerilmez. RML metabolizması birincil olarak CYP1A2 izozimiyle ve ikincil olarak CYP2Calt ailesi ve CYP3A4 izozimleriyle gerçekleşir. RML'nun eliminasyon yarı ömrü yetişkinlerde ve yaşlı deneklerde genellikle 2 saatin altındadır ve cinsiyetten etkilenmez (Karim ve ark., 2006; Greenblatt ve ark., 2007). İnsanlarda RML 'nun serum ölçümleri MI, M-II, M-III ve M-IV olmak üzere dört metaboliti tanımlar. M-II' metaboliti RML ile benzer farmakodinamik özelliklere sahip olan tek aktif metabolit olup yaklaşık olarak RML'nun 1/10'ı kadar etkisine sahiptir. M-II metaboliti en yüksek sistemik maruziyete sahiptir. Ancak yaklaşık 2–4 saatlik bir eliminasyon yarı ömrüne sahiptir (Karim ve ark., 2006).

2.5.5. Terapötik Etkinliği ve Oksidatif Stres, İnflamasyon Üzerindeki Etkileri

RML toksisitesi tam olarak tanımlanamamıştır. Ancak bir klinik çalışmada prolaktin seviyelerinde artış gözlenmiştir. MLT reseptörlerinin, uyku-uyanıklık döngüsünün altında yatan gün içi ritmin sürdürülmesinde rol oynadığına inanılır. S.S.S'deki GABA'erjik nörotransmisyon üzerine ilacın doğrudan etkisi yoktur. RML'nin FDA gebelik kategorisi C'dir (Katzung ve ark., 2004).

Wang ve ark. 2019 yılındaki ratlarda Travmatik Beyin Hasarı (TBH) oluşturarak yapılan bir çalışmada RML tedavisiyle beyin dokusu ve serumda antienflamatuar sitokin salınımını ve antioksidan aktiviteyi arttırdığı, proenflamatuar sitokin salınımı azalttığı gösterilmiştir. Yine aynı şekilde benzer hayvan modellenli çalışmalarda RML'nun tıpkı MLT gibi belirgin bir antioksidatif kapasiteye ve antienflamatuar etkiye sahip olduğunu göstermişlerdir (Li ve ark., 2020). Ayrıca uyku sorunu olan kronik migren hastalarda etkili olduğu gösterilmiştir (Kuriyama ve ark., 2014; Hou ve ark., 2016).

Yaşlı popülasyonda yüksek morbiditeye sahip nörodejeneratif hastalık olan Parkinson hastalarında yapılan başka bir çalışmada RML'nin insan SH-SY5Y (Cell Line human Neuroblast from neural tissue, SH-SY5Y bilimsel araştırmalarda kullanılan insan kaynaklı bir hücre dizisidir) nöronal hücrelerinde 6-OHDA (6-hidroksi dopamin) 'ya bağlı hücresel yaşlanma üzerindeki etkisi için yapılan çalışmanın sonuçlarına göre RML'nin faydalı etkisinin olduğu ve bu etkiyi Nrf2 (Nuclear factor-erythroid 2)'i aktive ederek gösterdiğini belirtmişlerdir (Dan Liu ve ark., 2021).

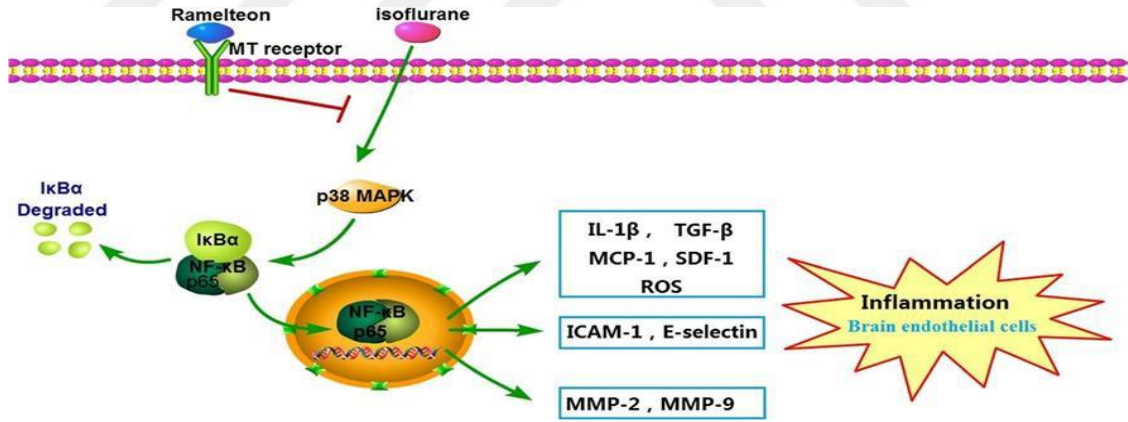
2021 yılındaki bir başka çalışmada RML mitokondriyal yolla nöronal hücrelerde meydana gelen Parkinson hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklarda 1-metil-4-fenilpiridinyum (MPP+)'un yol açtığı nörotoksisiteyi mitokondriyal yolak ile düzelttiği bilgisine ulaşılmıştır (Liu ve ark., 2021a).

Buna benzer başka bir çalışmada RML; Nrf2'i aktive ederek beyin damarlarındaki oksidatif stresi düzelttiği ve ayrıca lipopolisakkarit (LPS)'e bağlı endotelial monolayer geçirgenliğindeki artış ve beyin endotelial hücreleri (bEnd.3)'nde sıkı bağlantı protein ekspresyonundaki azalmayı tersine çevirerek beyni koruduğu gösterilmiştir (Li ve ark., 2021b).

2020'deki bir çalışmanın sonunda hem kronik hem de akut beyin iskemisi sonucu oluşan inme tedavisinde RML'nun potansiyel faydası olduğu kullanımının akılcı bir seçenek olabileceği vurgulanmıştır (Wu ve ark., 2020).

2019 yılındaki bir yayında ise toplam hayatta kalan 16 rat üzerinde beyine ağırlık düşürme modellemesiyle oluşturulan travmatik beyin hasarında RML'nun Nrf2 yolağını uyararak antienflamatuar ve antioksidatif etkisini gösterdiğini ve bunun TBH'nın tedavisinde potansiyel kronoterapotik strateji olabileceğini açıklanmıştır (Wang ve ark., 2019).

Şekil 2.5'de RML'nun postop anestezili hastalarda isofluarana'a bağlı nöronal apoptozis ve nöroinflamasyondaki etkisinin incelendiği bir makalede mikrovasküler endotelial hücrelerindeki ROS'ların oluşumunu baskılayarak antioksidatif etkisini gösterdiği bu etkiyi inflamasyonda anahtar rol oynayan p38'e bağlı kinaz/Nükleer faktör kappa (p38MAPK/NF-κB) yolağını kullanarak gerçekleştirdiği saptanmıştır (Wang ve ark., 2020).



Şekil 2.5: RML Etki Mekanizması (Wang ve ark., 2020)

Günümüzde birçok nörodejeneratif hastalık sürecinde astrositlerin yol açtığı nöroinflamasyon rol alır. Yang ve ark. 2021 yılındaki RML ile yapılan bir çalışmada ise astrositlerde LPS'ler tarafından başlatılan inflamatuvar cevapları düzelttiği gösterilmiştir. Ayrıca bu çalışmada; RML LPS kaynaklı Nitrik oksit sentazı (İNOS), Sıklooksijenaz 2 (COX2), Nitrik oksit (NO) ve Prostaglandin 2 (PGE2) ekspresyon ve Glial fibril asidik protein (GFAP) ekspresyonunu da azalttığını göstermişlerdir. Aynı zamanda Toll-Like Receptor 4 / Nükleer Faktör-kappa B inhibitor alfa/Nükleer Faktör-kappa B p65 (RML,

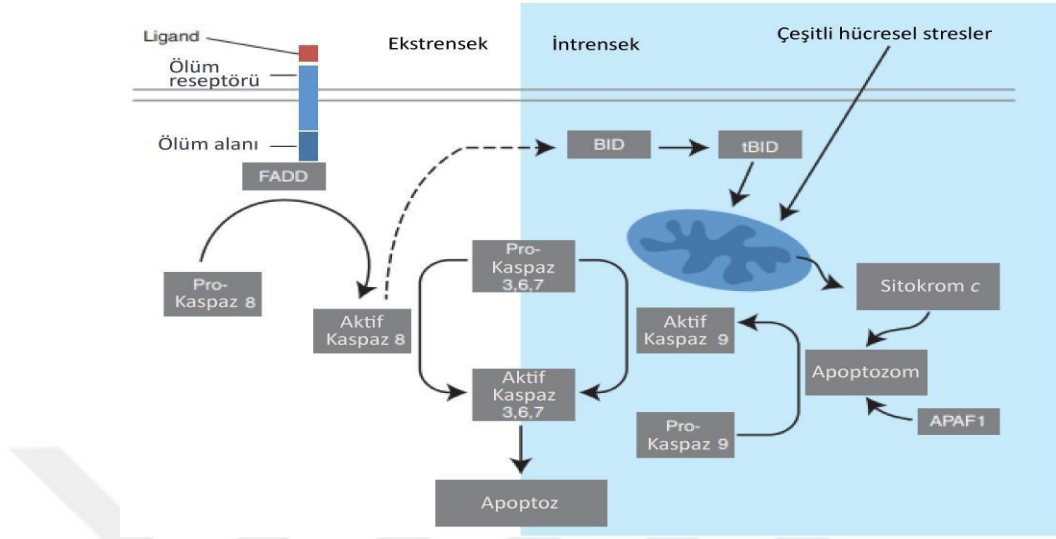
TLR4/IkBalfa/NF-KB p65) eksenini de inhibe etmiştir. Yang 'ın bu çalışmasında asıl dikkate alınması gereken en önemli durum ise RML'nin koruyucu etkileri invivo rodent modelde verifiye edilmiş olmasıdır. Sonuç olarak RML'nin astrositlerde LPS'nin yol açtığı hasarı önleyebileceği kanısına varılmıştır (Yang ve ark., 2021 b).

2.6. Kaspaz-3 ve Kaspaz-9

Etki mekanizmaları temelinde, kaspazlar başlatıcılar (Kaspaz -2, -8, -9 ve -10) ve efektörler (Kaspaz-3, 6 ve 7) olarak kategorize edilmiştir. Kaspazlar (sistein-aspartik proteazlar, sistein aspartazlar), apoptozis ve enflamasyon süreçlerinde homeostazın kontrolünde kritik rollere sahip proteaz enzimlerinin bir ailesidir (Rupnow ve ark., 1999). Apoptozis mekanizmaları kısaca dışsal ve içsel olarak iki kısımda incelenir (Şekil 2.6). Kaspazların tam aktivasyon için dimerize edilmesi gereken inaktif monomerik öncü enzimler olarak bulunduğu inanılmaktadır. Dışsal apoptozis yolu, bir ligandın adaptör proteinlerin (FADD/TRADD) yardımıyla kaspaz-8 dimerizasyonu vasıtasıyla aktif hale gelmesi sonucu ölüm reseptöründen birine bağlanarak fonksiyonel hale geçer. Aktive olmuş kaspaz-8 sonrasında, doğrudan apoptoz yarığına bağlanıp uygulayıcı kaspazları (-3, -6, -7) aktive ederek dışsal apoptozisi başlatabileceği gibi hücre ölümünü indüklemek için BH3 etkileşim alan ölüm agonisti (BID)'ın bölünmesi yoluyla içsel apoptotik yolda aktive edebilir. İçsel veya dışsal apoptoz yolu, mitokondriden sitokrom C salınmasına ve apoptotik proteaz aktivatör faktör-1 (Apaf-1), sitokrom C, ATP ve kaspaz-9'dan oluşan apoptozom oluşumuna yol açan çeşitli hücrel stresler yoluyla aktive edilir. Böylece aktif hale geçen kaspaz-9 daha sonra cellat kaspazlarını parçalamak suretiyle aktive ederek apoptozisi başlatır (Taylor ve ark., 2008; Bruin ve ark., 2008; Shi ve ark., 2004; McIlwain ve ark., 2013).

Kaspaz-3, radyasyona bağlı apoptozisi indükleyen önemli bir yürütücü proteazıdır ve aktif formunun ekspresyon seviyeleri, radyosensitivite ve apoptozisi gösterir. (Santos ve ark., 2017; Silva ve ark., 2022). Son zamanlarda radyasyona maruz bırakılan fare hipokamppal nöronlarının kültürlerinde kaspaz-3 ekspresyonunda önemli bir artış rapor edilmiştir (Puspitasari ve ark., 2019).Yeni yapılan bazı çalışmalarda radyasyona bağlı inflamatuvar yanıtın genlerin aşırı ekspresyonundan kaynaklandığı bildirilmiştir (Hladik ve Tapio, 2016). Radyasyon tedavisinde bir apoptozis aracısı olarak kaspaz kaskadının,

sinyal iletim yollarını ve yaşamsal proteinlerinin ekspresyonunu aktive ettiği tanımlanmıştır (Huang ve ark., 2011).



Şekil 2.6: Dışsal ve İçsel Apoptotik Yolaklarının Bir Özeti (McIlwain ve ark., 2013)

Başlatıcılar kendilerini aktive edebilmek için N-terminalinde pro bölgesi içerirler. Efektörler aktive olmuş başlatıcılar (Kaspaz-8, -9, -10) tarafından aktif hale getirilirler. Kaspaz-2 her iki grubunda dahil kaspazdır. Kaspaz-8 ve kaspaz-10 prodominlerinde ölüm effektör alanı (DED) bulunmaktadır (Boice ve ark., 2020). Bu etkileşim bölgeleri başlatıcı kaspazların büyük multiple protein içeren komplekslere alınmasına olanak sağlar. Aktivasyon bölgeleri her kaspaz için özgüdür (Choo ve ark., 2019). Kaspaz-8 ve kaspaz-10 için ölüme neden olan sinyal kompleksi (DISC), kaspaz-9 için ise Apaf-1 apoptozomu ve p53'ü sahip olan komplekslerin her biri genelde birer reseptör içeren proteinlerden meydana gelir. Söz konusu olan reseptörler ve bunlarda rol oynayan komplekslerin aracılık ettiği sayısız ve çoğunlukla birbiriyle paradoxal etkileşimde gibi görünen bu tablo bize büyük çaptaki mekanizmalar hakkında fikir verir. Bu mekanizmalar içinde olan NF-KB; C1-FLIP, Bcl-2 ve cIAP1/cIAP2, ölüm sinyallenmesinde müdahale eden inhibitör proteinlerin transkripsiyonunu artırır. Diğer tarafta etkin hale gelmiş olan kaspazlar, receptor-interacting protein (RIP), İnhibitör kappa B kinaz-beta (IKK) ve Nükleer faktör eritroid beta (NF-κB)'nin alt birimi olan NF-κB yoluna ait çok sayıda bileşenleri ayırıcı işlem görürler. Hücre tipleri, diğer sitokinlerin beraberinde uyarılma zamanı oluşan ROS'un miktarı gibi çeşitli faktörler mekanizmaları birbirleri lehine veya aleyhine

çevirebilirler. Bu tip karmaşık sinyalleşme mekanizması sistemin sağlam ve düzgün çalışmasını sağlar. Bu yollar gözönünde bulundurulduğu zaman bir sistein-aspartik asit proteazı olan kaspaz-3, doku farklılaşması, yenilenmesi ve nöral gelişimdeki inanılmaz rolleri nedeniyle son zamanlarda çok dikkat çekmiştir. Bu enzim hücre apoptozisinde anahtar bir zimojendir ve apoptotik akış sırasında başlatıcı kaspazlar tarafından parçalanana kadar aktive olmaz. Kaspaz-3, tıbbi araştırma alanında değerli yetenekleri temsil ettiğinden, rekombinant tip üretimi, protein mühendisliği ve dağıtım sistemlerinin tasarımı dahil olmak üzere bu enzimin biyoteknolojik yönleri, apoptozis ile ilgili bozuklukların tedavisinde ortaya çıkan terapötik stratejiler olarak kabul edilmiştir. Bugüne kadarki mevcut çalışmalarda kanserler, kalp yetmezliği ve nörodejeneratif bozukluklar gibi bazı hastalıkların tedavisinde kaspaz-3'ün terapötik kullanımında birkaç ilerleme kaydedilmiştir (Asadi ve ark., 2022).

Hem kaspaz-3 hem de kaspaz-9, mitokondri aracılı apoptozisin yürütülmesinde kritik roller oynar. Kaspaz-9, sitokrom C ve dATP/ATP varlığında Apaf-1'e bağlanır ve kendi kendini parçalayarak aktive olur. Kaspaz-3, kaspaz-8 ve kaspaz-9'un bölünmesiyle aktive edilir (Wong ve ark., 2007).

Son zamanlarda yeni geliştirilen terapötik uygulamalar (örneğin genterapisi gibi) hücrede hali hazırda bulunan kaspazların doğal inhibitörlerini baskılayan molekülleri kullanmak suretiyle kaspazların tek tek özgül bir şekilde aktif hale getirilmesine dayanır. Cellat kaspazlar (Kaspaz-3, -6 ve-7) aktif hale geldiğinde endonükleazı aktive edip DNA'yı fragmente ederler. Ayrıca nükleer proteinleri ortadan kaldırır, fagositoz yapan hücrelere ligand eksprese edip sonuçta apoptotik cisimler oluşumuna katkıda bulunurlar.

Apoptozis, nükleer DNA, Golgi, endoplazmik retikulum (ER) gibi hücresel bileşenin bozunmasını ve kaspaz adı verilen bir grup sistein proteazıyla mitokondriyal ağların hidrolizini içeren programlanmış bir hücre ölümüdür. İyonize radyasyon (İR), kemoterapötik ilaçlar, TNF- α gibi ölüm reseptörlerinin aracılık ettiği süreçler, büyüme faktörü geri çekilmesi, hücre yapışma kaybı (anoikis) ve hücre iskeleti hasarı gibi çeşitli uyaranlar, kaspaz kaskadının aktivasyonu yoluyla apoptozis yolunu destekleyebilir (Rahmanian ve ark., 2016).

Bununla birlikte ekternsek apoptotik yolda, CD95 (APO-1/Fas) , TRAIL-R1 gibi ölüm reseptörleri ile hücre dışı ligandlar CD95 (CD95L), lymphotoxin- α , TRAIL-1 arasında bir kompleks oluşturulur. p53 ün radyasyonla aktivasyonu hem ölüm reseptörlerinin hem de ligandların aşağı akış işlemine neden olduğu gözden çıkarılamamalıdır (Maier ve ark., 2016; Sheard ve ark., 2001)

2015 yılındaki bir yayında TBH hastalarında serum kaspaz-3 seviyeleri > 0.20 ng/mL ile mortalite arasında yayında oldukça korrele bir bağ bulunmuştur (Leonardo ve ark., 2015)

Kaspaz-9, cellat kaspazlarının aktivasyonunda yer alan yukarı akışlı bir kaspazdır. Mitokondriden sitokrom C'nin salınmasından sonra kaspaz-9 aktivasyonuna yol açan sözde apoptozomu oluşturan dATP varlığında Apaf-1'e bağlanır. Aktif kaspaz-9, kaspaz-3 ve kaspaz-7 gibi aşağı akış yürütücü kaspazları uyarır (Slee ve ark., 2001; Slee ve ark., 1999).

Kaspaz-9, sitoplazmik kompleks apoptozomdaki mitokondriyal hasara yanıt olarak aktive olan bir apoptozis başlatıcı proteazdır. Proteinlerin floresan etiketlenmesi, konfokal mikroskopi ve hücrealtı fraksiyonları ile kaspaz-9'un apoptotik olmayan hipofiz hücrelerinin sitoplazmasında olduğunu gösterilmiştir (Potokar ve ark., 2003).

Son zamanlardaki çalışmalarda kaspaz-9 aktivasyonuna yol açan mitokondriyal yolun kaspaz kaskadını başlatmaktan ziyade büyütme olasılığını artırdığını yayınlamışlardır (Lassus ve ark., 2002; Marsden ve ark., 2002; Robertson ve ark., 2002; Bitzer ve ark., 2002; Christian ve ark., 2007).

2.7. Tümör Nekrotizan Faktör - α (TNF- α)

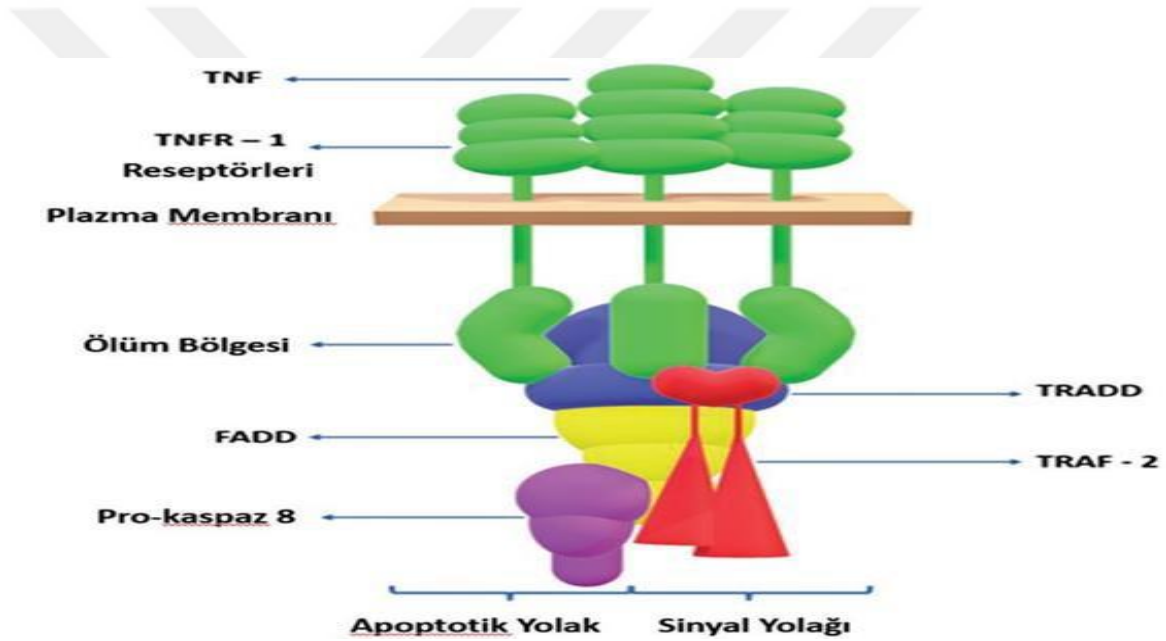
TNF ifadesi günümüz bilim dünyasına ilk olarak 1975 yılında literatüre giriş yaptı. O yıllarda endotoksinlerin sebep olduğu düşünülen bu tümör nekrotize edici aktiviteye sonraları makrofajlar tarafından salgılandığı anlaşılmış olup bu salınım TNF ismi verilmiştir (Carswell ve ark., 1975). 1985 yılında ise makrofajlardan salınan tümör nekrotizan faktör - α (TNF- α) ve lenfositlerden salınan lenfotoksinler olmak üzere yapısal olarak iki çeşit sitokin tanımlanmıştır (Kelker ve ark., 1985). Daha sonraları bu isimler TNF- β ve TNF- α olarak değiştirilmiş olup bu sitokin ailesi ile bağlantılı olarak 17 çeşit

ligand aileye eklenmiş ve toplamda 19 çeşit ligand ve 29 çeşit reseptörlerden meydana gelen TNF süper ailesi olarak anılmaya başlamıştır. TNF- α 'nın içinde bulunduğu bu süper aile fizyolojik olarak son derece önemli fonksiyonlar üstlenmektedir. Belirgin proinflamatuvar etkisi ile birlikte bu süper aile sırasıyla morfogenetik değişimler, apoptozis, proliferatif ve differansiyon etki gibi fonksiyonlar üstlenir. TNF- α , NF- κ B, apoptozis yolağı, ekstrasellüler sinyal düzenleyici kinaz (ERK), p38 mitogen-activated protein kinaz (p38MAPK), c-Jun N-terminal kinaz (JNK) enzim ve yolları olmak üzere en az 5 farklı şekilde sinyal göndererek etkisini gösterir (Aggarwal ve ark., 2012).

TNF- α temelde monosit ve makrofajlar aracılığıyla sentezlenip toplam 212 adet a.a den oluşan 3 monomer yapısına sahip sitokin gruplarından. Otoimmün hastalıklar başta olmak üzere özellikle inflamatuvar olayların tetiklenmesinde ve bunun süregelen hale gelmesinde kritik rol oynar. Bu sitokinin sentez ve salınımında LPS' ler major faktördür. Membran ve çözelti halindeki her iki formda reseptör düzeyinde etkin rol oynar. TNF- α ilk zamanlarda sadece makrofaj hücrelerince sentezlendiği düşünülmekteydi. Fakat geçen zamanla buna lenfoid, mast ve endotelial hücreler başta olmak üzere kardiyak miyositler, yağ doku hücreleri, fibroblastlar ve nöronlarda da sentezlendiği ortaya çıkarıldı. Etkisini hücre yüzeyinde bulunan TNFR-1'e bağlanarak göstermektedir. Hücresel düzeyde etki gösteren reseptörlerin yapısında 4 adet sistein a.a'den oluşan tekrarlı trimetrik bir lokasyon mevcuttur. Reseptör düzeyine gelen uyarıdan sonra oluşan sinyal kaskadından ilk iki sırada olanlar protein-1 ile beraber inflamatuvar yolda işlev görürken 3. yoldaki ise apoptotik yolda işlev yapmaktadır. Sonuç itibarıyla pleiotropik etkileri söz konusudur. Yani enflamasyonun çeşitli evrelerinde ve farklı hücrelerde değişik etkileri söz konusudur. TNF- α geni MHC içindeki 6. kromozoma bağlı gende bulunmaktadır. Genin ekspresyonu edilmesi hem transkripsiyonel hem de posttranskripsiyonel olarak iki şekilde gerçekleşmektedir. TNF- α 'nın bağlandığı reseptörünün yerleştiği yer 12. kromozomun kısa koludur. Çoğunlukla IL-1 ve IL-6 ile beraber birçok organ üzerinde etkileri vardır. Hipotalamusta ise CRH (Corticotropin-Releasing Hormone) uyararak ateşe neden olur. Karaciğerde akut faz reaktanlarını uyararak C reaktif protein (C-RP) oluşumunu sağlar. Kemoatraktant özelliğiyle endotelial hücrelerde nötröfiller'in göç etmesine yardımcı olur. Makrofaj hücrelerinde ise fagositozu kolaylaştırmakla beraber IL-1 ve PGE 2 sentezini uyarır. TNF- α , insülin reseptörü serin kalıntıları fosforiller, sinyal iletimini engelleyerek insülin direncine

neden olur. İştahı azaltır ve aynı zamanda acı tat algısını düzenler. TNF- α değeri lokal olarak artan bölgede sıcaklık artışı, ödem, kızarıklık, ağrı ortaya çıkar. Yüksek TNF- α değerlerinde şok benzeri tablo ortaya çıkarken düşük uzun süreli TNF- α değerlerinde ise karsinomalı hastalarda daha sık görülmek üzere kaşeksiye sebep olabilir (Çayakar, 2018).

TNF aktivitesinin düzeyi, salgı zamanı ve süresi gibi faktörler immün sistem mekanizmalar açısından oldukça önemlidir. Bu sözkonusu etkenlerden herhangi birindeki bir kusur herhangi birinin bozulması TNF-reseptör kaynaklı aktiviteler proinflatuar, bağışıklığı aktive eden veya bağışıklığı baskılayan gibi paradoksal olarak ortaya çıkacak farklı immün sistem yanıtlarına yol açabilir (Kollias ve ark., 2002).



Şekil 2.7: Dışsal Apoptozis Yolağı (Glowacki ve ark. 2013)

TNF, şekil 2.7’ de gösterildiği gibi TNFR1 ve TNFR2 olmak üzere iki reseptöre sahip olup bu ikisinin de bağlayabilir: TNF sinyalleri genelde TNFR1’den elde edildiğinden, TNFR2’nin etkisi çoğu kez göz ardı edilmektedir. TNF- α , hipoksi ile ilişkilidir, radyasyonun neden olduğu reaktif astroglisose ve kan beyin bariyeri (KBB)’ de vasküler hasara katkıda bulunur. TNF- α aynı zamanda hücre içi yapışma molekülü 1’in (ICAM-1) ifadesini de düzenler (Yang ve ark.,2015). ICAM-1 daha sonra beyin hasarını takiben aktif lökositin S.S.S’ ne girişine izin verir (Kyrkanides ve ark.,1999; Yuan ve ark., 2006; Wilson ve ark., 2009; Zhou ve ark., 2011). TNF ailesine dahil TRAIL’ın membrana bağlı ve çözünebilir her iki formu da çeşitli karsinoma türlerinde ve otoimmünite

seyreden hastalıklarda ölüm reseptörleri yoluyla apoptozisi başlattığı bildirilmiştir. TRAIL apoptozisde belirteç gibi kullanılmaktadır (Choo Z ve ark., 2019).

Fare beyinlerinde ışınlamadan 6 ay kadar sonra kronik enflamatuvar yanıtın ölçümlerinde TNF- α yükselmesi görülmüştür (Hong ve ark., 1995).

TNF'nin inflamatuvar yanıtta oldukça önemli bir anahtar konuma sahip olan sınıf I MHC'yi direkt, sınıf II MHC'yi ise IFN- γ vasıtasıyla artırdığı bilinmektedir. TNF'nin immün hücreler üzerindeki etkileri de önemli ve çeşitlidir. Monosit-makrofajların olgunlaşmasını (muhtemelen CSF-1 aracılığıyla prekürsörleri etkileyerek) sağlar. Makrofajlar TNF salgısını artırırken, anti-TNF ekspresyonunu azaltır. Tam olarak olgunlaşan makrofajlardaki sınıf II MHC ekspresyonunu azaltarak negatif feedback yapar. TNF'nin monositleri aktive edebilmesi için önceden IFN- γ ile uyarıya hazırlanmış olmaları şarttır. TNF, PNL (polinükleer lökositler)'nin fagositoz yeteneğini, antikora bağımlı hücrel sitotoksitesini ve respiratuvar burst (solunumsal patlama) kapasitesini artırmaktadır. Degranülasyon, adezyon ve kemotaksis üzerinde de artırıcı etkileri vardır (Açıkgöz, 1997).

2.8. Interlökin 10 (IL-10)

Bağışıklık sistemi, enfeksiyonla savaşırken konakçı hücre hasarını en aza indirmek için çalışan bir sistemdir. Etkin ve güçlü bir bağışıklık sistemde yanıt oluşurken beraberinde ortaya çıkacak olası doku patolojileri arasındaki ölçülü dengeyi korumak amacıyla birçok düzenleyici sistemlere ait olan mekanizmalar aracı olmaktadır. IL-10'un paradigmasında olduğu gibi ortaya çıkan antienflamatuvar yanıt, bu tip düzenleyici sistem mekanizmasına ait belirgin örneklerden bir tanesidir (Sarai ve ark., 2019).

İlk olarak hücrelerinde sitokin sentezini inhibe eden ve hücrelerinin bir ürünü olarak tanımlanan IL-10'un artık makrofajlar, dendritik hücreler, B hücreleri ve çeşitli CD4 + ve CD8 + alt kümeleri tarafından üretildiği bilinmektedir. IL-10, insan sitokin sentezi inhibitör faktörü (CSIF) olarak da bilinir. Başlangıçta T hücresi yanıtlarını düzenlediği gösterilen IL-10'un T hücresi ve NK (katil hücre) hücresi işlevi üzerindeki etkilerinin birçoğunun dolaylı olduğu, bugün ise monosit makrofajlar üzerindeki doğrudan etkisi aracılığıyla aracılık ettiği bilinmektedir. Bağışıklık sisteminde rol oynayan

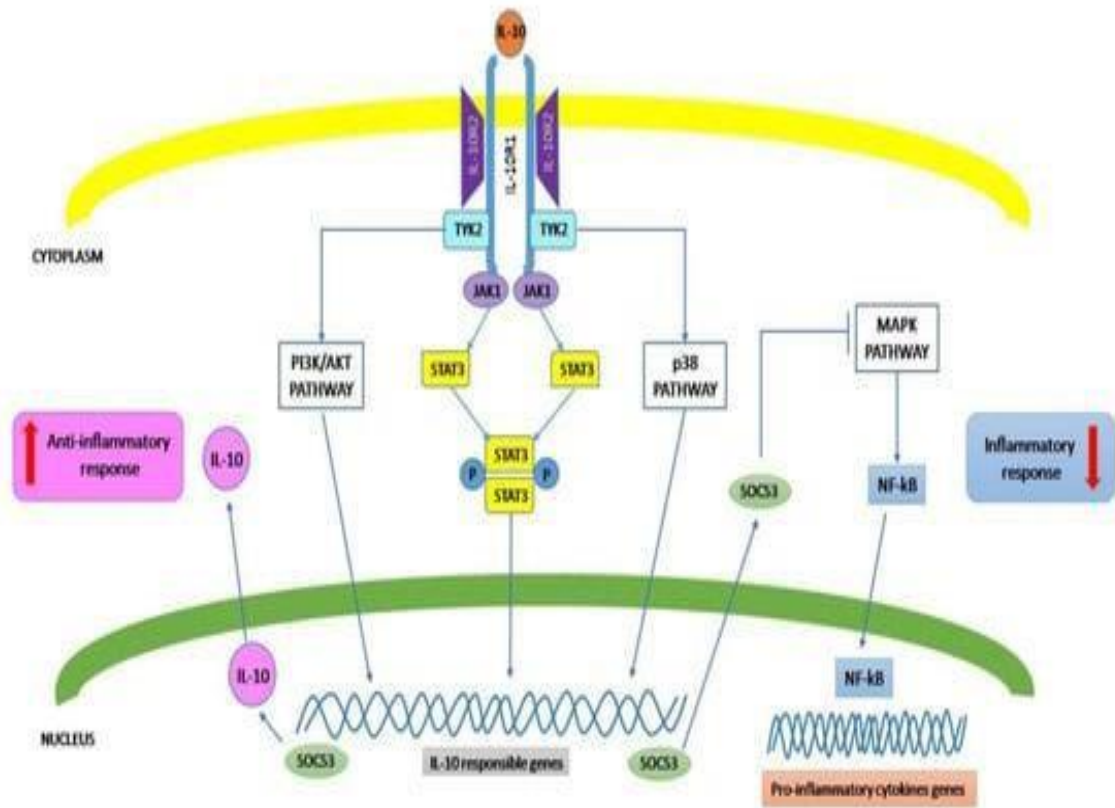
antienflamatuar sitokindir. IL-10, makrofajlar, monositler, T hücreleri, B hücreleri ve keratinositler gibi çok çeşitli memeli hücre tipleri tarafından üretilen immünosupresif bir sitokindir. Bu etkisini lökositler, makrofaj hücreleri ve NK (doğal katil), Th1 ve Th2 hücre grupları gibi birçok immün sistem hücre çeşitlerini azaltmak kaydıyla gösterir. Birçok enfeksiyon sırasında IL-10, monositler ve makrofajlar üzerindeki MHC sınıf II'yi ve kostimülatör molekül B7-1/B7-2 ekspresyonunu inhibe ederek etkisini gösterir. Ayrıca makrofajlar ve düzenleyici T hücreleri gibi hücreler tarafından yapılan proinflamatuar sitokinlerin (IL-1 α ve β , IL-6, IL-12, IL-18 ve TNF- α , GM-CSF) ve kemokinlerin (MCP1, MCP5, RANTES, IL-8, IP-10 ve MIP-2) sentezini inhibe etme yeteneğine sahiptir. IL-10, doğrudan CD4⁺ T hücreleri üzerinde etki ederek IL-2, IFN- γ , IL-4, IL-5 ve TNF- α 'nın çoğalmasını ve üretimini engelleyebilir. Böylece IL-10, lenf düğümlerinde T hücresi aktivasyonunu ve farklılaşmasını sınırlamakla birlikte dokulardaki proinflamatuar yanıtları baskıladığından dolayı, bozulan patojen kontrolü veya azalmış immünopatoloji sonucunda, doğuştan ve adaptif Th1 ve Th2 yanıtlarını düzenler. IL-10'un mast hücreleri ve B hücreleri üzerindeki uyarıcı aktiviteleri de iyi bir şekilde belgelenmiştir (Kevin ve ark., 2008). Birçok farklı hücre tipi, farklı dokularda veya aynı enfeksiyonun akut veya kronik aşamalarında değişen ana IL-10 kaynağı ile IL-10 üretebilir. IL-10, CD8 T hücre proliferasyonunu, sitotoksik aktiviteyi ve IFN- γ üretimini artırır (Groux ve ark., 1998; Mumm ve ark., 2011; Naing ve ark., 2018). IL-10, Foxp3 düzenleyici T hücrelerinin hayatta kalmasını ve faaliyetini teşvik eder (Murai ve ark., 2009; Chaudhry ve ark., 2011).

Güçlü bir antienflamatuar sitokin olan IL-10, kronik inflammatuar hastalıkları önlemek için immün yanıtların dengelenmesinde kritik bir rol oynar (Mosser ve ark., 2008). IL-10, dendritik hücreler, Langerhans hücreleri, makrofajlar dahil olmak üzere antijen sunan hücreler (APC'ler) gibi birçok hücre tipinde immünosupresif ve immünostimülatör yanıtları düzenleyerek hem doğuştan gelen hem de adaptif bağışıklıkta rol oynar (Roncarolo ve ark., 2006). S.S.S patolojisi sırasında, sinir dokusunun hayatta kalmasını sağlamak ve inflammatuar yanıtları azaltmak için pleiotropik yolu tetikleyen birkaç sinyal beyinde IL-10 seviyeleri önemli ölçüde artar (Strle ve ark., 2002).

Klasik olarak, IL-10'un APC'ler yoluyla T hücresi tepkilerini inhibe ettiği bilinmektedir (Macatonia ve ark., 1993). Bununla birlikte, IL-10, tepkisizliği veya anerjiyi indüklemek için doğrudan CD4⁺ T hücreleri üzerinde hareket ederek T hücresi tepkilerini de

sınırlayabilir (Groux ve ark., 1996). Son zamanlarda, IL-10'un deneysel kolitte bellek/efektör T hücreleri üzerinde doğrudan etki gösterdiği gösterilmiştir (Kamanaka ve ark., 2011). Şaşırtıcı bir şekilde, IL-10'un T hücreleri üzerindeki uyarıcı etkileri de tarif edilmiştir (Thompson ve Snipes ve ark., 1991; Rousset ve ark., 1992; Itoh ve Hirohata.,1995). Th17 hücrelerinde bağırsak iltihabı sırasında (Huber ve ark., 2011) ve bir ev tozu akarı allerjisi fare modelinde Th2 hücrelerinde de etkisi gösterilmiştir (Coomes ve ark., 2017).

Klasik etkisinin yanı sıra IL-10, enfeksiyon veya diğer inflammatuar süreçler sırasında (Şekil 2.8) nöronal hasarın sınırlandırılmasında ve ayrıca homeostatik süreçlerin düzenlenmesinde (Zhou ve ark., 2009 a,b) ve yetişkin nörojenезinin düzenlenmesinde (Perez-Asensio ve ark., 2013; Pereira ve ark., 2015) önemli roller oynar. IL-10 ile ilgili yapılan farklı çalışmalarda ise STAT3'ü ve NF-κB sinyalinin düzenlenmesini içeren mekanizmalar aracılığıyla akson rejenerasyonu için faydalı olduğu kanıtlanmıştır (Vidal ve ark., 2013). Son olarak, IL-10'nun nöronların S.S.S iskemisine ve travmaya karşı hassasiyeti azalttığı gösterildi (Knobloch ve Faden., 1998; Grilli ve ark., 2000).



Şekil.2.8.İnterlökin-10 Şeması (Porro ve ark., 2020)

3.GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda toplam 32 adet, 300-350 g ağırlığında, Wistar albino cinsi dişi ratlar kullanılmıştır. Çalışma öncesinde gerekli olan etik kurul onayı, Süleyman Demirel Üniversitesi (SDÜ) Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 21.10.2021 tarihinde 10 no'lu toplantı ve 02 karar numarası ile alınmış olup deney hayvanları SDÜ Deney Hayvanları Üretimi ve Deneysel Araştırma Laboratuvarı'ndan temin edilmiştir.

3.1. Deney Hayvanları

SDÜ Deney Hayvanları Laboratuvarında bakımı gerçekleştirilen hayvanlar, 7 gün boyunca izlendi. Bu süre içerisinde 22-24 °C sıcaklıkta ve %55 nemde tutulan oda şartlarında 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık olacak şekilde kafeslerde barındırıldı. Bir haftalık barındırma süresi sonrasında deney prosedürü uygulandı.

Grup 1 (kontrol): 8 hayvandan oluşan bu gruba her gün intraperitoneal (İP) olarak 90 mg/kg ketamin ve 10 mg/kg xylazin anestezisi yapıldı. 7 gün boyunca her sabah 11:00'da 1 ml salin oral gavaj yöntemi ile uygulandı.

Grup 2 (RT): 8 hayvandan oluşan bu gruba her gün İP olarak 90 mg/kg ketamin ve 10 mg/kg xylazin anestezisi yapıldı. Anestezi altında tek doz 0,62 Gy/min oranında 10 Gy X ışını beyine (600C lineer accelator, Varian, USA) uygulandı ve 7 gün boyunca sabah 11:00'da bir ml salin oral gavaj yolu ile verildi.

Grup 3 (RT+ RML): 8 hayvandan oluşan bu gruba her uygulama öncesinde 90 mg/kg ketamin ve 10 mg/kg xylazin anestezisine alınarak tek doz 0,62 Gy/min oranında 10 Gy X ışını beyine (600C lineer accelator, Varian, USA) uygulandı ve 1 ml 10 mg/kg RML (Ramelda, Türkiye) 7 gün boyunca her sabah 11:00'da oral gavaj yöntemi ile uygulandı.

Grup 4 (RML): 8 hayvandan oluşan bu gruba her uygulama öncesinde deney hayvanları ip olarak 90 mg/kg ketamin ve 10 mg/kg xylazin anestezisi altına alınan ratlara anestezi sonrası 1 ml 10 mg/kg RML 7 gün boyunca her gün sabah 11.00 de oral gavaj yöntemi ile uygulandı.

Gruplara uygulanan son ilaçtan 4 saat sonra bütün ratlar 80-100 mg/kg ketamin (Alfamin, Alfasan IBV) ve 8-10 mg/kg xylazin (Alfazin, Alfasan IBV) anestezisi altında sakrifiye edildi ve abdominal insizyon ile vena cava inferiordan lökosit ölçümü için kan alındı. Ölçümlerde kullanılan kitlere ait bilgiler Tablo 3.1’de yer almaktadır.

Tablo 3.1: Çalışmada Kullanılan Kitler ve Özellikleri

KİT ADI	TÜR	MARKA	CAT. NO	Yöntem	Kullanılan Cihaz
Tümör Nekroz Faktör-alfa	Rat	BT	E076 4Ra	ELİSA	Microplate reader: BIO-TEK EL X 800-Aotu strip washer: BIO TEK EL X 50
İnterlökin 10	Rat	BT	E010 8Ra	ELİSA	Microplate reader: BIO-TEK EL X 800-Aotu strip washer: BIO TEK EL X 50
Kaspaz-3	Rat	BT	E164 8Ra	ELİSA	Microplate reader: BIO-TEK EL X 800-Aotu strip washer: BIO TEK EL X 50
Kaspaz-9	Rat	BT	E189 8Ra	ELİSA	Microplate reader: BIO-TEK EL X 800-Aotu strip washer: BIO TEK EL X 50
TAS(Total Antioksidan Seviye)	Universal	REL ASSAY	RL00 17	Kolorime trik	MINDRAY-BS400
TOS(Total Oksidan Seviye)	Universal	REL ASSAY	RL00 24	Kolorime trik	MINDRAY-BS400
NOT: Dokular 1/9 oranında (0,1 gr doku: 0,9ml 140 mmol. lık KCl) Potasyum Klorür tamponu ile homojenize edildikten sonra 7000 rpm + 4’ de 5 dk santrifüj edildi.					

3.2. Radyasyon Uygulamaları

Radyasyona maruz bırakılan ratlar için Isparta Özel Meddem Hastanesi Radyasyon Onkolojisi kliniği bünyesindeki Varian marka Clinac DMX model lineer acceleratör cihazı kullanıldı.

3.3. Radyasyon Uygulamalarında Hemogram ve Doku analizleri

Araştırmamızda deneysel prosedür sonrası sakrifiye edilen ratlardan abdominal insizyon ile vena cava inferiordan alınan kan örneklerinden hemogram ölçümü yapıldı. Çıkarılan

beyin dokunun bir hemisferine ait serebral kortex doku örneklerinden beyin hasarını gözlemlemek amacıyla histopatolojik olarak H-E boyama, diğer hemisfere ait serebral kortex doku örneklerinden ise oksidatif stresi spektrofotometrik değerlendirmek için TOS ve TAS ve OSI parametreleri ile birlikte ELISA yöntemiyle apoptotik ve inflamatuvar süreçleri göstermek amacıyla TNF- α , kaspaz-3, kaspaz -9 ve IL-10 seviyeleri ise dokuda ölçülüp değerlendirildi

3.4. Radyasyon Uygulamasında Kullanılan Ramelteon'nun Özellikleri

Deneyde kullandığımız farmakolojik ajan olan RML Abdi İbrahim ilaç firması (TÜRKİYE) tarafından üretilen ramelda 8mgr (ATC:N05CH02)10 film tabletten temin edilmiştir. ramelda 8 mgr serum fizyolojik (SF) ile dilue edilerek her rat için 10 mg/kg olacak şekilde ayarlanarak 1ml salin çözeltisi içinde uygulanmıştır.

3.5. Histopatolojik Örneklerin Hazırlanması

Rutin parafin takibi gerçekleştirilen beyin dokularının parafin bloklarından alınan kesitler, (H-E) boyama için kullanıldı. Rutin parafin takibi aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi:

1. Ratlardan alınan beyin dokuları, formaldehit fiksatifisi içerisinde +4 °C 'de 24 saat boyunca fikse edildi.
2. Fikse olan beyin dokuları süre sonunda dehidratasyon için artan alkol serilerinden (%70, %80, %90 ve %100'lük etanolden) geçirildi. Alkol serilerindeki bekletme süreleri %70, %80 ve %90'lık etanollerde birer gün; %100'lük etanolde ise 3 saat olarak gerçekleştirildi.
3. Dehidratasyondan sonra, alkol+ksilol karışımında 15 dakika ve sonrasında beyin dokuları şeffaflaştırılmaları için saf ksilolde 15 dakika bekletildi.
4. Şeffaflaştırmadan sonra parafinizasyon işlemi için beyin dokuları, sıvı parafinde üç saat 60 °C'lık etüvde tutulduktan sonra temiz parafin içine uygun oryantasyonda gömülüp, parafin bloklar oluşturuldu.
5. Parafin takibinden sonra 5 μ m kalınlığında kesitler alınıp, H-E boyama ile rat beyin dokularının histolojik yapılarının genel olarak değerlendirmesini yapıldı.

Rat beyin dokusu kesitlerinin, hematoksilen-eozin boyaması aşağıda anlatılan basamaklar uygulanarak gerçekleştirildi:

1. Parafin bloklardan alınan kesitleri içeren preparatlar, 60 C'lik etüvde 3 saat bekletilerek; dokuların lam yüzeyine iyi bir şekilde yapışması sağlandı.
2. Daha sonra, preparatlar ksilol I ve ksilol II'de 10'ar dakika bekletildi.
3. Suyu indirme (rehidratasyon) için preparatlar azalan etanol serilerinde (%100, %90, %80 ve %70'lik etanol) 10'ar dakika tutuldu.
4. Süre sonunda preparatlar distile suda beş dakika yıkandı.
5. Süzölmüş hematoksilen boyasında 3 dakika bekletildikten sonra preparatlar çeşme suyunda yıkandı ve devamında, eozin boyasında 2 dakika tutulduktan sonra tekrar çeşme suyunda yıkandı.
6. H-E boyamasından sonra, preparatlar %70, %80, %90 ve %100'lük artan etanol serilerine batır-çıkar yapılarak, dehidratasyonları sağlandı.
7. Son olarak ksilol I ve II'de 10'ar dakika tutulan preparatlar, entellan ile kapatılıp; ışık mikroskobunda (Zeiss) X20 büyütme ile beyin dokularının genel histolojik yapıları değerlendirildi.

Deney ve kontrol gruplarına ait beyin doku kesitlerinde incelenen yapısal değişiklikler Abdel-Wahhab ve ark.'nın yapmış oldukları skorlamaya göre değerlendirildi (Abdel-Wahhab ve ark., 1999).

Tablo 3.2: Skorlama Tablosu

(-) skor	Negatif skor	Hiçbir yapısal değişikliğin olmamasını ifade etmektedir.
(+) skor	1 pozitif skor	Hafif derecede yapısal değişikliği ifade etmektedir.
(++) skor	2 pozitif skor	Orta derecede yapısal değişikliği ifade etmektedir.
(+++)	3 pozitif skor	Yüksek derecede yapısal değişikliği ifade etmektedir.

3.6. Doku Homojenizatu Hazırlama

- 1.1gram taze doku alındı,
- 2.9 ml Working Solüsyon eklendi,
- 3.Mekanik homojenizatör ile ezildi,
- 4.7000 ile 5 dakika santrifüj edildi,

5.Süpernatant serum şeklinde kullanıldı.

Working solüsyonu olarak 140 mmol KCL (deiyonize su içinde) veya 50 mmol fosfat tamponu (pH: 7,4) kullanıldı.

3.7. Spektrofotometrik Analizler

Tüm ELİSA ve kolorimetrik çalışmaları için kullanılan kit ve cihazlar Mega Tıp LAB (Türkiye)'den temin edildi. Aynı zamanda dokuda protein ölçümü yapıldı. Bunun için Bradford Protein Ölçümü metodu kullanıldı. Bradford protein ölçümünün temeli ise 595 nm' den 450 nm'a kadar olan absorbans değerlerini ölçülmesini doğrusallaştırma esasına dayanır. Bu ileri değerlendirme, geleneksel olarak yapılan ölçümlerden hemen hemen 10 kat daha duyarlı sonuç vermektedir (Zor ve Selinger, 1995). Bu ölçümde dokular 1:9 oranında (örnek 0.1 gr doku, 0.9 ml tampon) fosfat tamponunda (50 mmol. lık pH:7.40 Fosfat Tamponu) homojenize edildi, 7000 rpm +4°C'de 5 dk. santrifüj edildi. Santrifüj'den sonra alınan süpernatant kit reaktifleri ile işleme tabi tutulup, spektrofotometrede 595 nm'de okunarak işlem sonlandırıldı ve protein konsantrasyonu hesaplandı. Aşağıda detayı verilen ELISA ölçümleri sonucunda elde edilen değerler, ilgili numunelerin protein konsantrasyonlarına bölünerek ilgili parametrelerin değerleri hesaplandı.

3.8. Kaspaz 3 Seviyesi Ölçümü

ELISA yöntemi ile çalışan kit kullanıldı. Kitin yapısında kaspaz-3 Antikoru emdirilmiş plate bulunmaktadır. Örneklerdeki kaspaz-3 proteinler bu kuyucuklardaki antikora bağlandı. Çalışma protokolü aşağıdaki gibi uygulandı

- 1.Numuneler kuyucuklara eklendi.
- 2.Daha sonra biotinlenmiş Rat kaspaz-3 Antikoru eklenir ve örnekteki kaspaz-3'e bağlandı.
- 3.Daha sonra Streptavidin-HRP eklenir ve Biotinylated kaspaz-3 antikoru bağlandı.
- 4.Daha sonra Streptavidin-HRP eklenir ve Biotinylated Kaspaz-3 antikoru bağlandı.
- 5.Daha sonra substrat solüsyonu eklenir ve Rat kaspaz-3 miktarıyla orantılı olarak renk gelişti.

6.Reaksiyon, asidik durdurma solüsyonunun eklenmesiyle sonlandırıldı ve 450 nm’de absorbans ölçüldü. Hesaplamalar sonrası elde edilen ham değerler protein konsantrasyonuna bölünerek veriler elde edildi.

3.9. Kaspaz 9 Seviyesi Ölçümü

Kit, ELISA yöntemi ile çalışmaktadır. Rat kaspaz 9 antikorları ile kaplanmış plate kullanılarak ölçüm yapıldı. Çalışma protokolü aşağıdaki gibi uygulandı

- 1.Numuneler eklenir. Örnekte bulunan kaspaz-9 eklendi ve kuyucuklara kaplanmış antikorlara bağlandı.
- 2.Daha sonra biotinlenmiş Rat kaspaz-9 Antikoru eklendi ve örnekteki kaspaz-9’a bağlandı.
- 3.Daha sonra Streptavidin-HRP eklenir ve biotinlenmiş kaspaz-9 antikoruna bağlandı.
- 4.İnkübasyondan sonra bağlanmamış Streptavidin-HRP bir yıkama adımı sırasında yıkanarak uzaklaştırıldı.
- 5.Daha sonra substrat solüsyonu eklendi ve rat kaspaz-9 orantılı olarak renk gelişti.
- 6.Reaksiyon, asidik durdurma solüsyonunun eklenmesiyle sonlandırıldı ve 450 nm’de absorbans ölçüldü. Hesaplamalar sonrası elde edilen ham değerler protein konsantrasyonuna bölünerek veriler elde edildi.

3.10. TNF- α Seviyesi Ölçümü

ELISA yöntemi ile çalışan bir kit kullanıldı. Kitin plakası daha önceden rat türüne ait TNF-alfa antikorları ile kaplanmıştır. Kitin kullanım kılavuzuna göre aşağıdaki işlemler gerçekleştirildi.

- 1.Numune örnekler, antikorların bulunduğu çukurlara eklendi.
- 2.Daha sonra biyotinlenmiş rat TNF- α Antikoru eklenir ve numunedeki TNF- α ’ya bağlandı.
- 3.Daha sonra Streptavidin-HRP eklenir ve Biotinlenmiş TNF- α antikorlarına bağlandı.

- 4.İnkübasyondan sonra bağlanmamış Streptavidin-HRP bir yıkama adımı sırasında yıkanarak uzaklaştırıldı.
- 5.Daha sonra substrat çözeltisi eklenir ve rat TNF- α miktarıyla orantılı olarak renk gelişti.
- 6.Reaksiyon, asidik durdurma solüsyonunun eklenmesiyle sonlandırıldı ve 450 nm'de absorbans ölçüldü. Hesaplamalar sonrası elde edilen ham değerler protein konsantrasyonuna bölünerek veriler elde edildi.

3.11. İnterlökin-10 Seviyesi Ölçümü

ELISA yöntemi ile çalışan kit kullanıldı. Kitin plate yapısı daha önceden IL-10 antikorları tarafından kaplanmış. Kitin kullanım kılavuzuna göre aşağıdaki işlemler gerçekleştirildi.

- 1.Numunede bulunan IL-10 eklendi ve kuyucuklara kaplanmış antikorlara bağlandı.
- 2.Daha sonra biyotinlenmiş rat IL-10 Antikoru eklendi ve numunedeki IL-10'a bağlandı.
- 3.Daha sonra Streptavidin-HRP eklendi ve Biotinylated IL-10 antikoruna bağlandı.
- 4.İnkübasyondan sonra bağlanmamış Streptavidin-HRP bir yıkama adımı sırasında yıkanarak uzaklaştırıldı.
- 5.Daha sonra substrat solüsyonu eklendi ve rat IL-10 miktarı ile orantılı olarak renk gelişti.
- 6.Reaksiyon, asidik durdurma solüsyonunun eklenmesiyle sonlandırıldı ve 450 nm'de absorbans ölçüldü. Hesaplamalar sonrası elde edilen ham değerler protein konsantrasyonuna bölünerek veriler elde edildi.

3.12. Total Antioksidan Seviyesi Ölçümü

Total antioksidan seviyesi (TAS) ölçümü için piyasada bulunan kitler kullanıldı. Yeni otomatik metotlar tarafından daha kararlı bir ABTS (2,2'-Azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) katyonu ölçümü saplamak için fotokromatik yaklaşım kullanıldı. Bu yöntemin hassasiyeti oldukça yüksek olup %3'ün altındaki değerleri ölçebilir. Sonuçlar

litrede mmol Trolox eşdeğeri olarak ifade edildi (Erel, 2004). Daha sonra elde edilen bu sonuçlar Bradford protein tayini ile ölçülen protein değerleri ile orantılanarak mmol trolox eşdeğeri/mg protein olacak şekilde verildi.

3.13. Total Oksidan Seviyesi Ölçümü

Total oksidan seviyesi (TOS), ticari olarak temin edilebilen kitler kullanılarak ölçüldü. Bu yöntemde, numunede bulunan oksidanlar, demir iyon-o-dianisidin kompleksini demir iyonuna oksitler. Oksidasyon reaksiyonu, reaksiyon ortamında bol miktarda bulunan gliserol molekülleri tarafından artırılır. Ferrik iyon asidik bir ortamda ksilenol turuncu ile renkli bir kompleks üretir. Spektrofotometrik olarak ölçülebilen renk yoğunluğu, numunede bulunan toplam oksidan molekül miktarı ile ilgilidir. Test, hidrojen peroksit ile kalibre edilip ve sonuçlar litre başına mikromolar hidrojen peroksit eşdeğeri ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ eşdeğeri/L) cinsinden ifade edildi (Erel, 2004). Daha sonra elde edilen bu sonuçlar Bradford protein tayini ile ölçülen protein değerleri ile orantılanarak $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ eşdeğeri/mg protein olarak verildi.

3.14. Oksidatif Stres İndeksi

Oksidatif stres indeksi (OSI), TOS değerinin TAS değerine oranı ile hesaplanır (Harma ve ark., 2003; Kosecik ve ark., 2005; Yumru ve ark., 2009).

$$\text{OSI (seçili birim)} = \frac{[(\text{TOS } ((\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ eşleniği}))/\text{L})]}{[(\text{TAS } (\mu\text{mol Trolox eşleniği}))/\text{L}]}$$

3.15. İstatistiksel Analiz Yöntemleri

Çalışma verileri SPSS 26.0 paket programı kullanılarak analiz edildi. Verilerin normal dağılıma uyup uymadıklarını test etmek için Shapiro-Wilk testi uygulandı. Gruplar arası karşılaştırmalarda normal dağılıma sahip olan gruplarda One way ANOVA, normal dağılıma sahip olmayan gruplarda Kruskal-Wallis H testi kullanıldı. Buna göre Histopatolojik veriler, One way ANOVA ile biyokimyasal veriler Kruskal-Wallis H testi ile değerlendirildi. Farkları yaratan grupları belirlemede çoklu karşılaştırmada LSD veya DUNN testi kullanıldı. Sonuçlar; ortalama $\pm$ standart sapma ya da median (max-min) olarak verildi. $p < 0,05$ anlamlık düzeyi olarak belirlendi.

4. BULGULAR

Çalışmamızda her grupta 8'er rat kullanılarak kontrol grubu, radyasyon grubu (RT), hem radyasyon hem de tedavi uygulanan grup (RT+RML) ve tedavi ramelteon (RML) uygulanan grup olmak üzere 4 grup oluşturuldu. Deney prosedürleri tamamlandıktan sonra sakrifiye edilen ratlar üzerinde histolojik ve biyokimyasal ölçümler yapıldı.

4.1. Histopatolojik Bulgular

Deney ve kontrol gruplarına ait beyin doku kesitlerinde incelenen yapısal değişiklikler Abdel-Wahhab ve ark.'nın yapmış oldukları skorlamaya göre H-E boyaması yapılarak değerlendirildi (Abdel-Wahhab MA, Nada SA, Arbid MS. Ochratoxicosis: prevention of developmental toxicity by L-methionine in rats. J Appl Toxicol. 1999;19(1):7–12.). Bu skorlamaya göre oluşturulan gruplara ait beyin doku kesitlerindeki yapısal değişiklikler Tablo 4.1 de gösterilmiştir.

Tablo 4.1: RML ve Radyoterapi Uygulanan Deney Hayvanlarının Beyin Dokularının H-E Boyama Sonuçları

Gruplar	Parametreler			
	Ödem	Subaraknoid hemoraj	Apoptotik cisim	Vakualizasyon
KONTROL-1	-	-	-	-
KONTROL-2	-	-	-	-
KONTROL-3	+	-	-	+
KONTROL-4	-	-	-	-
KONTROL-5	-	-	-	-
KONTROL-6	+		+	
KONTROL-7	-	+	-	+
KONTROL-8	-	+	+	-
RT-1	+	+	++	++
RT-2	++	++	++	++
RT-3	+	++	+	+
RT-4	++	++	++	++
RT-5	+	+	++	++

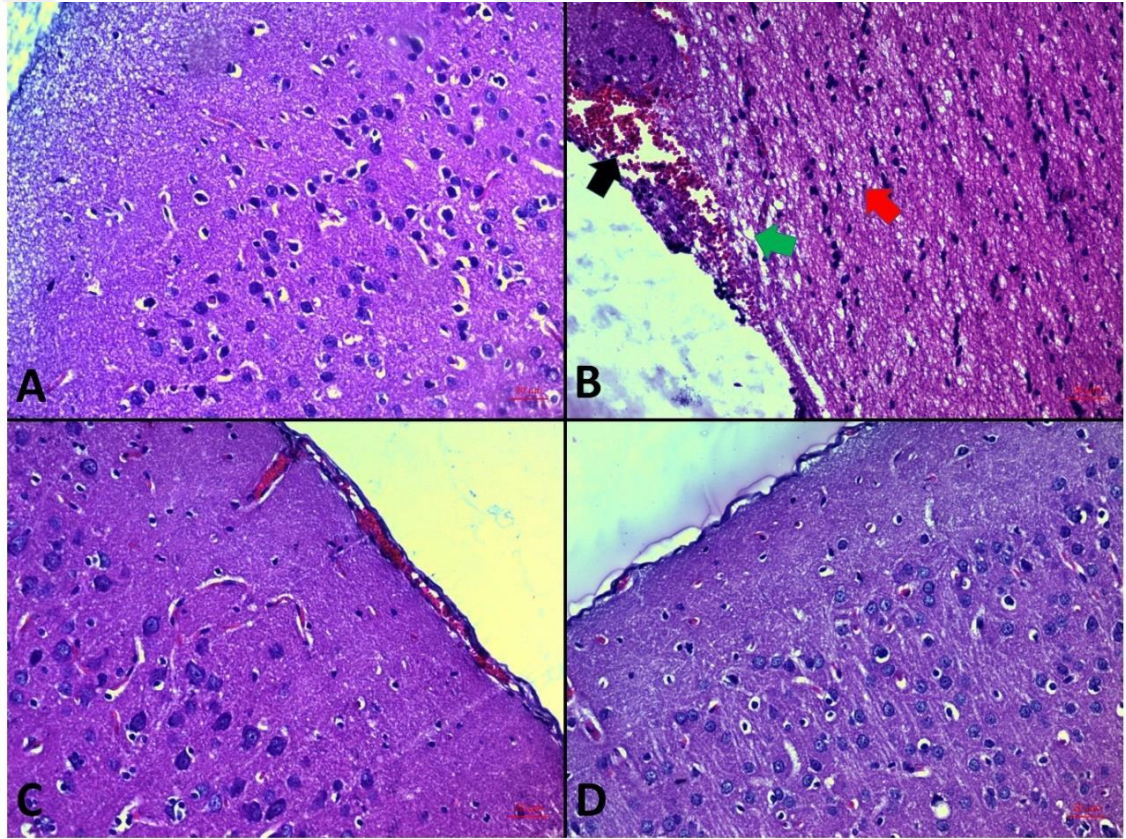
RT-6	++	+++	+	++
RT-7	++	+	++	++
RT-8	++	+++	+++	+++
RML+RT-1	+	+	+	+
RML+RT-2	-	+	+	+
RML+RT-3	-	+	++	++
RML+RT-4	+	++	++	++
RML+RT-5	+	+	+	+
RML+RT-6	+	++	+	+
RML+RT-7	+	+	++	++
RML+RT-8	++	+	+	+
RML- 1	-	+	-	+
RML -2	-	-	-	-
RML -3	-	++	-	-
RML -4	+	-	-	-
RML -5	-	-	-	-
RML -6	-	-	-	-
RML -7	+	-	+	+
RML -8	+	-	+	+

Kontrol Grubu: Kontrol grubuna ait beyin dokularının H-E boyamaları incelenmiştir. Işık mikroskopunda yapılan incelemeler neticesinde herhangi bir histopatolojik bulguya rastlanmamıştır (Tablo 4.1).

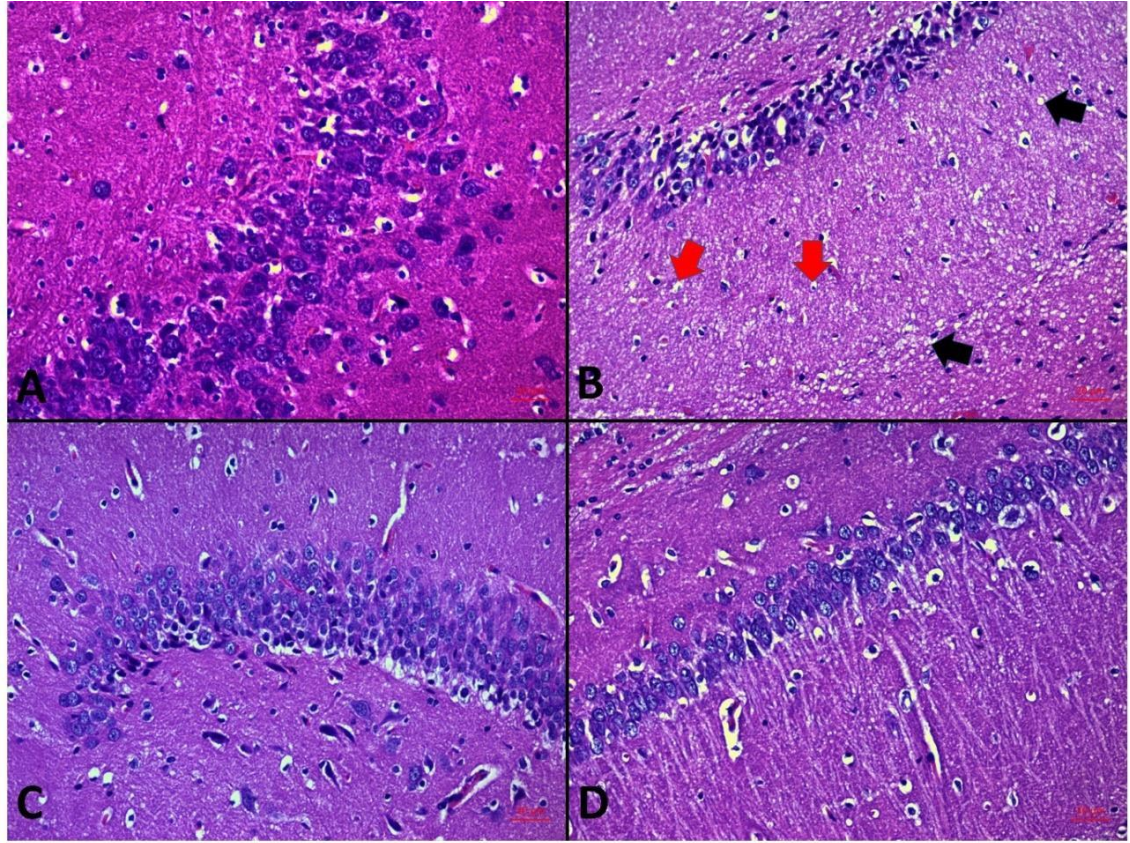
RT Grubu: RT uygulanan hayvanların beyin dokuları incelenmiş ve kontrol grubuyla karşılaştırmalar yapılmıştır. Yapılan inceleme ve gözlemler neticesinde bu grubun hayvanlarının beyin dokusunun subaraknoid bölgesinde hemoraji, subaraknoid bölgenin hemen altındaki moleküler tabakanın olduğu bölgede ödem (Şekil 4.1) tespit edilmiştir. Beyin dokusunun beyaz cevherinin hipokampal bölgesinde ise apoptotik (Şekil 4.2) cisimler ve vakuol (Şekil 4.1) yapıları gözlemlenmiştir. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında ise bu histopatolojik bulguların anlamlı olduğu bir kez daha doğrulanmıştır (Tablo 4.1).

RT+RML Grubu: RT ve RML uygulanan grubun beyin dokuları incelendiğinde ise subaraknoid bölgede hemoraji ve moleküler tabakanın olduğu bölgede ödem gözlemlenmiş ancak RT grubunda olduğu kadar şiddetli olmadığı tespit edilmiştir. Aynı şekilde hipokampal bölgede de apoptotik cisimler ve vakuol görülmüş ancak bunların da şiddetinin RT grubuna göre daha az olduğu gözlemlenmiştir (Tablo 4.1).

RML Grubu: RML uygulanan hayvanların beyin dokusu incelendiğinde subaraknoid bölgede hemoraji tespit edilmiş ancak RT grubundaki kadar şiddetli olmadığı görülmüştür. Moleküler tabakada ise ödem gözlemlenmiş ama yine RT grubundaki kadar yoğun olmadığı gözlemlenmiştir. Hipokampal bölgede ise kontrol grubundakine benzer şekilde bulgular tespit edilmiştir (Tablo 4.1).



Şekil 4.1: Beyin Dokusunda Ödem ve Subaraknodial Hemoraji Histopatolojik Görüntüleri. Yeşil okla gösterilen bölgede ödem ve vakuoller tespit edilmiştir. B resminde siyah okla gösterilen subaraknoid bölgede ise hemoraji gözlemlenmiştir. Bu bölgedeki apoptotik cisimler ise kırmızı okla gösterilmiştir (A, B, C ve D X20) (A=Kontrol, B=RT, C= RML ve D=RT+RML gruplarını göstermektedir).



Şekil 4.2: Beyin Dokusunda Beyin Dokusunda Apoptotik Cisim ve Vakuolizasyon'un Histopatolojik Görüntüleri. Kırmızı okla gösterilen hipokamppal bölgede apoptotik cisimler tespit edilmiştir. B resminde siyah okla gösterilen hipokamppal bölgede vakuoller gözlemlenmiştir. (A, B, C ve D X20) (A=Kontrol, B=RT, C= RML ve D=RT+RML gruplarını göstermektedir.)

Tablo 4.2: Rat Beyin Dokusunda Ödem ve Subaraknodial Hemoraji Karşılaştırması

	ÖDEM		SUBARAKNOİDAL HEMORAJİ	
GRUPLAR	ORTALAMA $\pm$ SD	P DEĞERİ	ORTALAMA $\pm$ SD	P DEĞERİ
KONTROL	0,25 $\pm$ 0,46		0,25 $\pm$ 0,46	
RT	1,62 $\pm$ 0,51 ^a	a: ≤ 0.001	1,87 $\pm$ 0,83 ^a	a: ≤ 0.001
RT+RML	0,87 $\pm$ 0,64 ^{a,b}	a: 0.028 b: 0.010	1,25 $\pm$ 0,46 ^b	a: 0.005
RML	0,37 $\pm$ 0,51 ^b	b: ≤ 0.001	0,37 $\pm$ 0,74 ^{a,b,c}	b: ≤ 0.001 c: 0.012

“a” kontrol grubu ile karşılaştırmayı, “b” RT grubu ile karşılaştırmayı, “c” RT+RML grubu ile karşılaştırmayı temsil eder (RT – Radyoterapi; RML-Ramelteon; SD – Standart Sapma).

Ödem açısından yapılan değerlendirmeye göre RT ve RT+RML gruplarında kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir şekilde artış gözlenmiştir ($p \leq 0.001$, $p=0.028$; sırasıyla). RT grubundaki gözlenen bu ödem artışı RT+RML ve RML gruplarıyla kıyaslandığında anlamlı bir şekilde tersine çevrilmiştir ($p=0.010$, $p \leq 0.001$; sırasıyla). Subaraknoidal hemorajinin incelenmesine göre kontrol grubuna kıyasla RT ve RT+RML gruplarında anlamlı bir şekilde artış vardır ($p \leq 0.001$, $p=0.005$; sırasıyla). RML grubunda ise RT ve RT+RML gruplarına göre anlamlı bir şekilde azalma gözlenmiştir ($p \leq 0.001$, $p=0.012$; sırasıyla).

Tablo 4.3: Rat Beyin Dokusunda Apoptotik Cisim ve Vakuolizasyon Karşılaştırması

GRUPLAR	APOPTOTİK CİSİM		VAKUOLİZASYON	
	ORTALAMA $\pm$ SD	P DEĞERİ	ORTALAMA $\pm$ SD	P DEĞERİ
KONTROL	0,25 $\pm$ 0,46		0,25 $\pm$ 0,46	
RT	1,87 $\pm$ 0,64 ^a	a: ≤ 0.001	2,00 $\pm$ 0,53 ^{ab}	a: ≤ 0.001
RT+RML	1,37 $\pm$ 0,51 ^b	b: ≤ 0.001	1,37 $\pm$ 0,51 ^b	a: ≤ 0.001 b: 0.020
RML	0,25 $\pm$ 0,46 ^b	b: $P \leq 0.001$ c: $P \leq 0.001$	0,37 $\pm$ 0,51 ^{b,c}	b: $P \leq 0.001$ c: 0.001

Apoptotik cisim incelemesine göre kontrol grubuna kıyasla RT grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artış gözlenmiştir ($p \leq 0.001$). RT grubuyla yapılan kıyaslamaya göre RT+RML ve RML gruplarında apoptotik cisim açısından anlamlı bir şekilde azalma görülmüştür ($p \leq 0.001$; her iki grup için de). RML grubunda da RT+RML grubuna kıyasla anlamlı bir şekilde azalma gözlenmiştir ($p \leq 0.001$). Vakuolizasyon açısından yapılan değerlendirmeye göre kontrol grubuna kıyasla diğer tüm gruplarda bir artış gözlenirken sadece RT ve RT+RML gruplarında bu artış anlamlı olmuştur ($p \leq 0.001$; her iki grup için de). Ancak RT grubundaki artış RT+RML ve RML gruplarıyla kıyaslandığında anlamlı bir şekilde tersine döndürülmüştür ($p=0.020$, $p \leq 0.001$; sırasıyla). RML grubunda da RT+RML grubuyla kıyaslandığında anlamlı bir şekilde azalma gözlenmiştir ($p=0.001$).

4.2. Biyokimyasal Analiz Sonuçları

4.2.1. Deneysel Uygulamanın Rat Beyin Dokusu Kaspaz-3 Aktivitesi Üzerine Etkisi

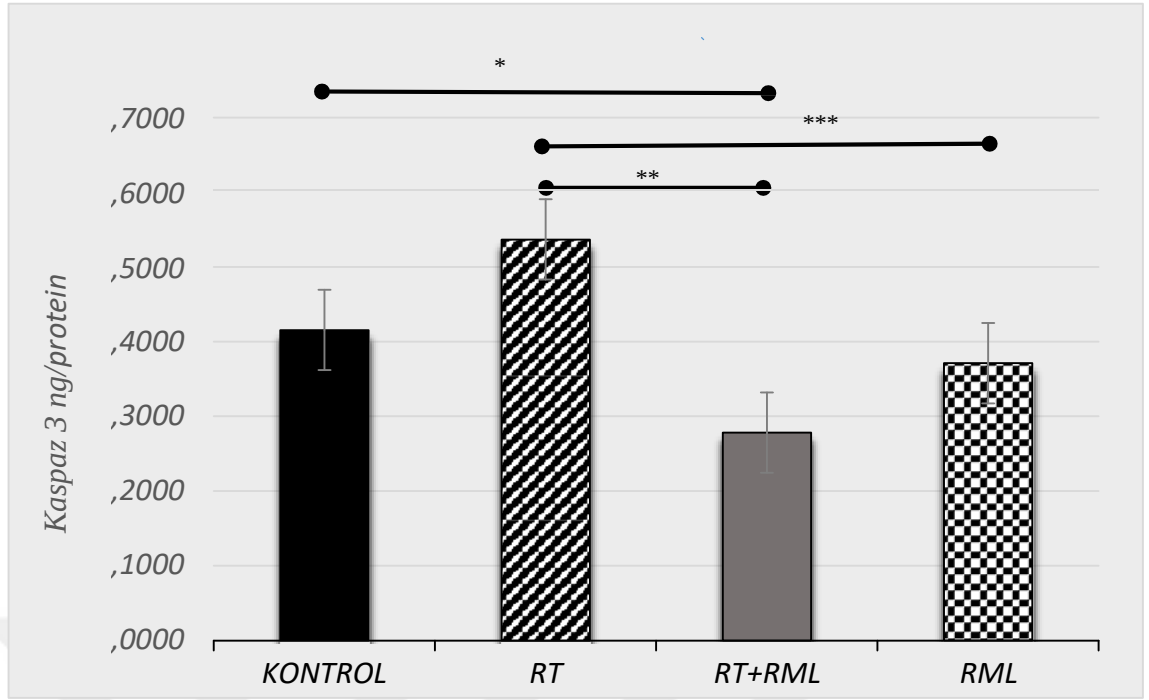
Kaspaz-3 ölçümlerinin gruplara göre karşılaştırılması yapılmış ve Tablo 4.4’de Kaspaz-3 değerleri verilmiştir.

Tablo 4.4: Gruplara Göre Kaspaz-3 Aktivitesinin Değerleri

Grup	Median (Min; Max)
Kontrol	,4555(,30;,60) ^{b,c,d}
RT	,5060(,45;,67) ^d
RT+RML	,2505(,16;,56) ^a
RML	,3920(,28;,63) ^{a,c}
p	,003

Aynı sütünda farklı harfler gruplar arasında fark olduğunu gösterir.

Kaspaz-3 için yapılan istatistiksel analiz; kontrol ile RT+RML grubu ($p=0.023$), RT ile RT+RML grubu arasında ($p<0.0001$) ve RT ile RML grubu arasında ($p=0,040$) istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu ancak kontrol grubu ile RML grubu arasında ($p=0,488$) fark olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edildi. (Şekil 4.3).



Şekil 4.3: Kaspaz-3 Aktivitesinin ELİSA Ölçüm Sonuçları

(*) $p=0.023<0,05$ Kontrol ile RT+RML gruplarına göre

(**) $p<0.0001<0,05$ RT ile RT+RML gruplarına göre

(***) $p=0,040<0,05$ RT ile RML gruplarına göre

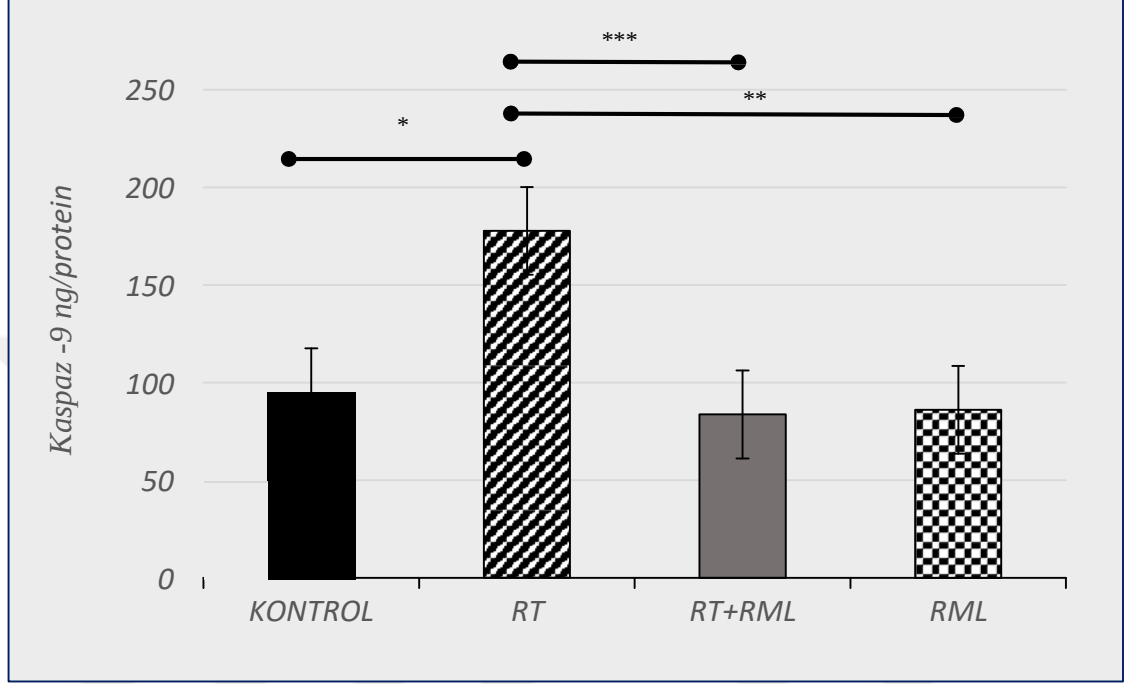
4.2.2. Deneysel Uygulamanın Rat Beyin Dokusu Kaspaz-9 Aktivitesi Üzerine Etkisi

Kaspaz-9 ölçümlerinin gruplara göre karşılaştırılması yapılmış ve Tablo 4.5’de Kaspaz-9 değerleri verilmiştir.

Tablo 4.5: Gruplara Göre Kaspaz -9 Aktivitesinin Değerleri

Grup	Median (Min;Max)
Kontrol	94,9550(69,92;180,70) ^a
RT	177,6750(144.96;255,87) ^{b,d}
RT+RML	83,6800(58,99;94,60) ^a
RML	86,0300(64,81;107,44) ^{a,c}
p	,000

Kaspaz-9 için yapılan istatistiksel analiz; kontrol ile RT grubu ($p=0.024$) arasında, RT ile RML grubu arasında ($p=0.001$), RT+RML ile RT grubu arasında ($p<0.0001$) istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu ancak diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığını gösterdi (Şekil 4.4).



Şekil 4.4: Kaspaz-9 Aktivitesinin ELİSA Ölçüm Sonuçları

(*) $p=0.024<0,05$ Kontrol ile RT gruplarına göre

(**) $p=0.001<0,05$ RT ile RML gruplarına göre

(***) $p<0.0001<0,05$ RT+RML ile RT gruplarına göre

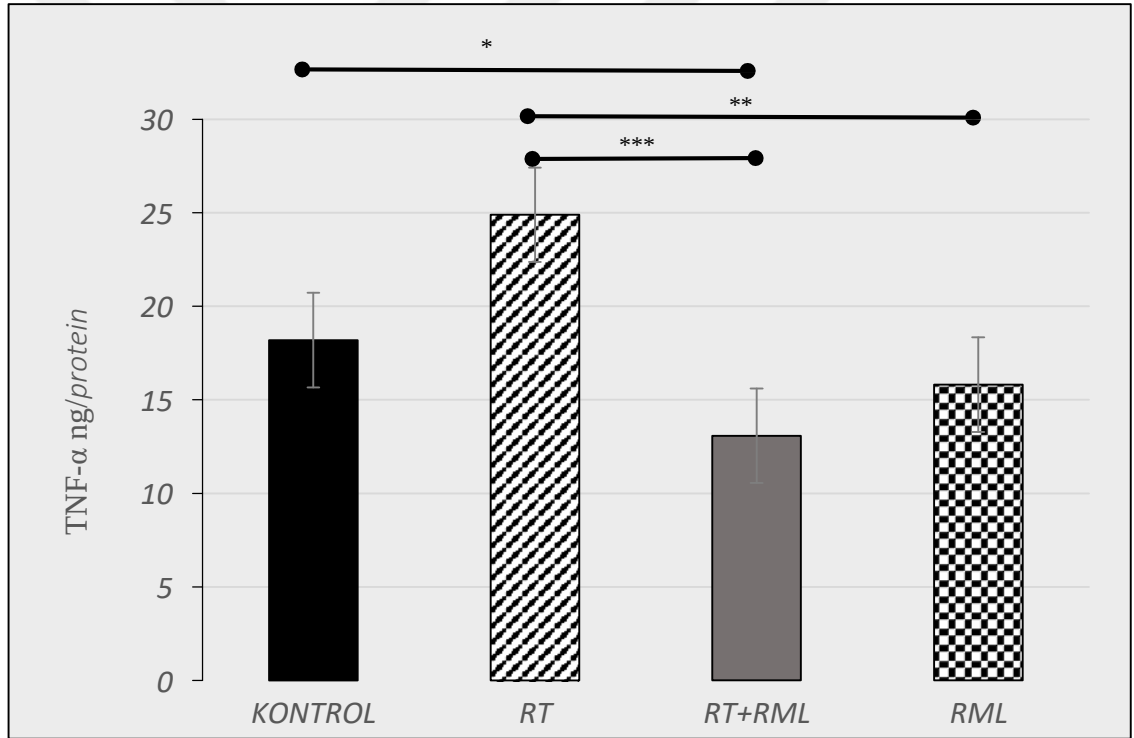
4.2.3. Deneysel Uygulamanın Rat Beyin Dokusu TNF- α Düzeyleri Üzerine Etkisi

TNF- α ölçümlerinin gruplara göre karşılaştırılması yapılmış ve Tablo 4.6'de TNF- α değerleri verilmiştir.

Tablo 4.6: Gruplara Göre TNF- α Değerleri

Grup	Median(Min;Max)
Kontrol	18,1900(14,43;26,25) ^{b,d,e}
RT	24,8900(18,87;27,36) ^{c,e}
RT+RML	13,0750(10,94;15,93) ^a
RML	15,8100(12,73;21;79) ^{a,d}
p	,000

TNF- α için yapılan istatistiksel analiz; kontrol ile RT+RML grubu ($p=0.003$) arasında, RT ile RML grubu arasında ($p=0.008$), RT+RML ile RT grubu arasında ($p<0.0001$) istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu ancak diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığını gösterdi (Şekil 4.5).



Şekil 4.5: TNF- α ELİSA Ölçüm Sonuçları

(*) $p=0.003<0,05$ Kontrol ile RT+RML gruplarına göre

(**) $p=0.008<0,05$ RT ile RML gruplarına göre

(***) $p<0.0001<0,05$ RT+RML ile RT gruplarına göre

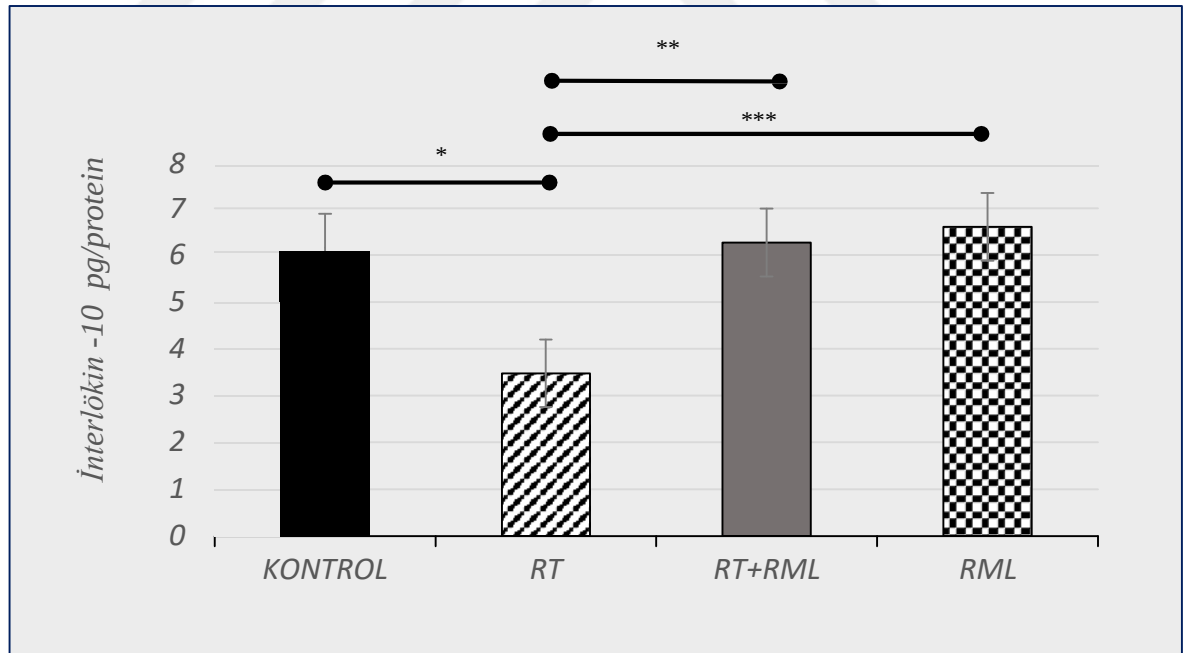
4.2.4. Deneysel Uygulamanın Rat Beyin Dokusu İnterlökin-10 Üzerine Etkisi

IL-10 ölçümlerinin gruplara göre karşılaştırılması yapılmış ve Tablo 4.7’de IL-10 değerleri verilmiştir.

Tablo 4.7: Gruplara Göre IL-10 Değerleri

Grup	Median(Min;Max)
Kontrol	6,1600(3,82; 8,31) ^{d,b}
RT	3,4750(1,66;6,45) ^c
RT+RML	6,2700(3,22;10,07) ^b
RML	6,6050(5,50;9,57) ^{a,b}
p	,007

IL-10 için yapılan istatistiksel analiz; kontrol ile RT grubu arasında ($p=0.019$) ve RT ile RT+RML grubu arasında ($p=0.012$), RT ile RML grubu arasında ($p=0.001$) istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu gösterildi (Şekil 4.6).



Şekil 4.6: IL-10 ELİSA Ölçüm Sonuçları

(*) $p=0.019 < 0,05$ Kontrol ile RT gruplarına göre

(**) $p=0.012 < 0,05$ RT ile RT+RML gruplarına göre

(***) $p=0.001 < 0,05$ RT ile RML gruplarına göre

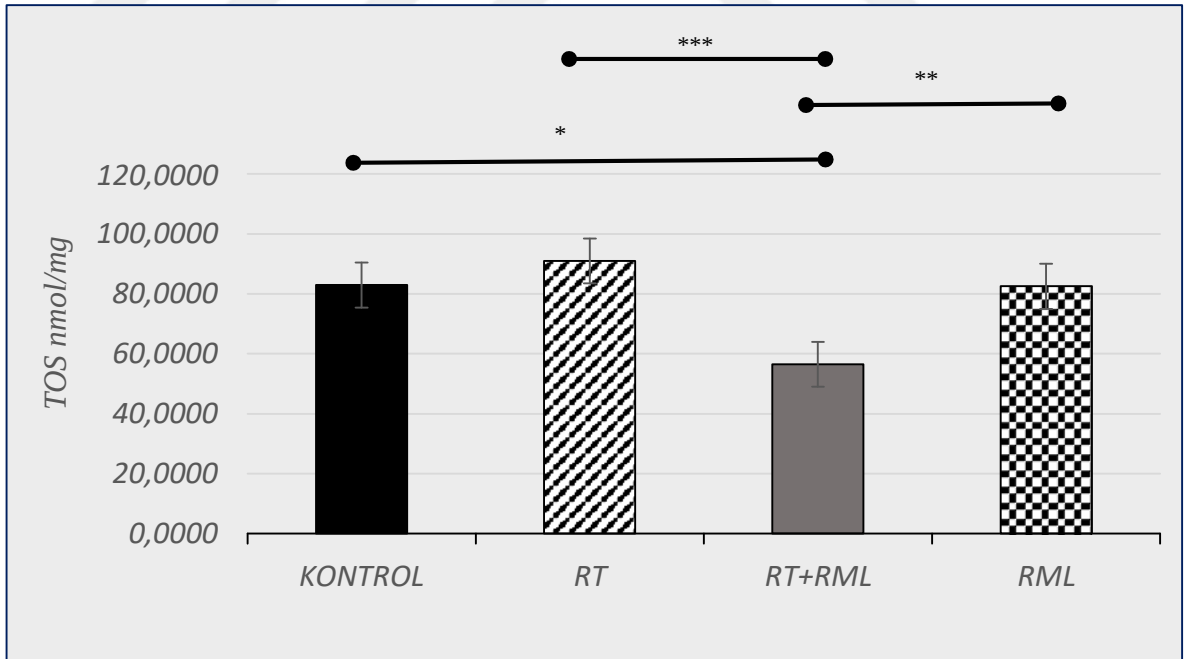
4.2.5. Deneysel Uygulamanın Rat Beyin Dokusu TOS Üzerine Etkisi

TOS değerlerinin gruplara göre karşılaştırılması yapılmış ve Tablo 4.8’de TOS değerleri verilmiştir.

Tablo 4.8: Gruplara Göre TOS Değerleri

Grup	Median(Min;Max)
Kontrol	82,9550(73,84; 109,87) ^{b,c}
RT	91,0200(62,99;111,27) ^{b,c,d}
RT+RML	56,5400(35,64; 83,01) ^a
RML	82,5300(58,71; 99,12) ^{b,c}
p	,021

TOS için yapılan istatistiksel analiz; kontrol ile RT+RML grubu ($p=0.008$) arasında, RML ile RT+RML grubu arasında ($p=0.031$), RT+RML ile RT grubu arasında ($p=0.006$) istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu ancak diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığını gösterdi (Şekil 4.7).



Şekil 4.7: TOS Sonuçları

- (*) $p=0.008<0,05$ Kontrol ile RT+RML gruplarına göre
- (**) $p=0.031<0,05$ RML ile RT+RML gruplarına göre
- (***) $p=0.006<0,05$ RT+RML ile RT gruplarına göre

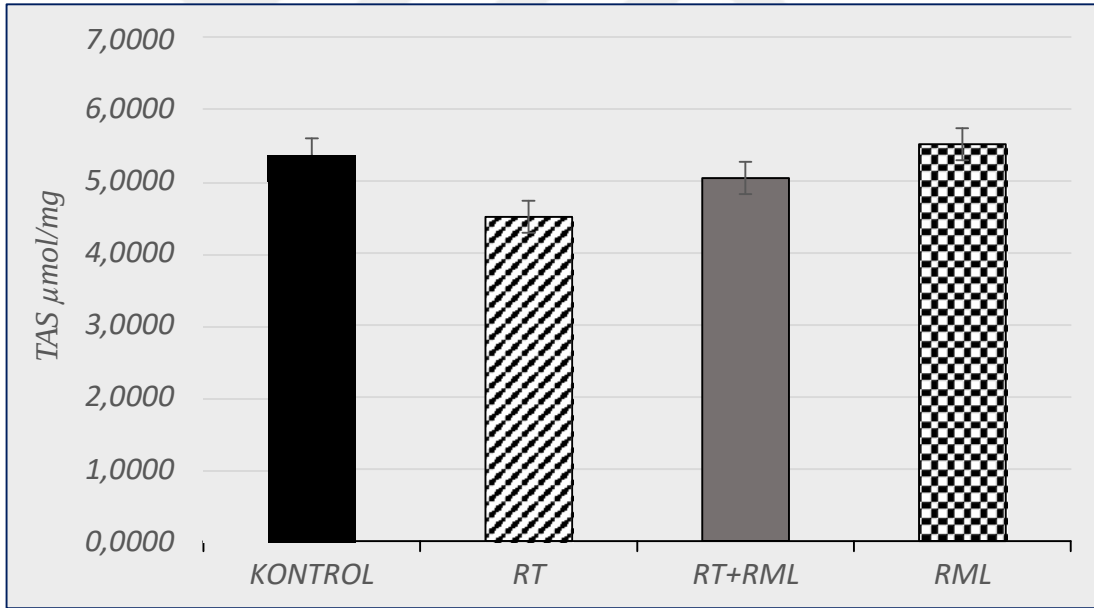
4.2.6. Deneysel Uygulamanın Rat Beyin Dokusu TAS Üzerine Etkisi

TAS değerlerinin gruplara göre karşılaştırılması yapılmış ve Tablo 4.9’de TAS değerleri verilmiştir.

Tablo 4.9: Gruplara Göre TAS Değerleri

Grup	Median(Min;Max)
Kontrol	5,3800(3,84; 7,31)
RT	4,4350(3,89; 5,32)
RT+RML	5,1000(4,09; 6,41)
RML	5,2000(3,83; 6,62)
p	,135

TAS grupları arasında yapılan istatistiksel analizde istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı görüldü (Şekil 4.8).



Şekil 4.8: TAS Sonuçları

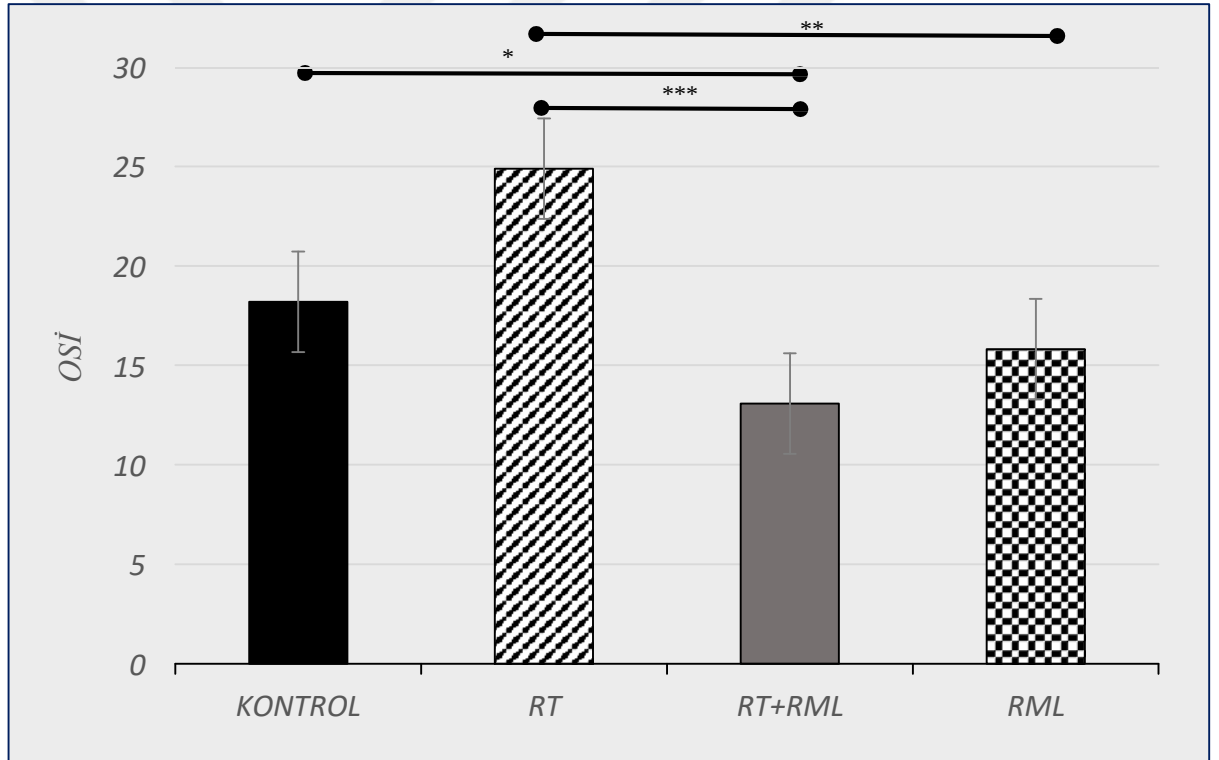
4.2.7. Deneysel Uygulamanın Rat Beyin Dokusu OSİ Üzerine Etkisi

OSİ değerlerinin gruplara göre karşılaştırılması yapılmış ve Tablo 4.10’de OSİ değerleri verilmiştir.

Tablo 4.10: Gruplara Göre OSİ Değerleri

Grup	Median(Min;Max)
Kontrol	17,2550(13,07; 21,84) ^{b,d}
RT	18,5900(14,40; 26,55) ^d
RT+RML	10,8700(7,53; 15,93) ^a
RML	14,9720(12,82; 17,32) ^{a,b}
p	,001

OSİ için yapılan istatistiksel analiz; kontrol grubu ile RT+RML grubu ($p=0.011$) arasında RT ile RML grubu arasında ($p=0.026$), RT+RML ile RT grubu arasında ($p<0.0001$) istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu ancak diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığını gösterdi (Şekil 4.9).



Şekil 4.9: OSİ Sonuçları

- (*) $p=0.011<0,05$ Kontrol ile RT+RML gruplarına göre
(**) $p=0.026<0,05$ RT ile RML gruplarına göre
(***) $p<0.0001<0,05$ RT+RML ile RT gruplarına göre

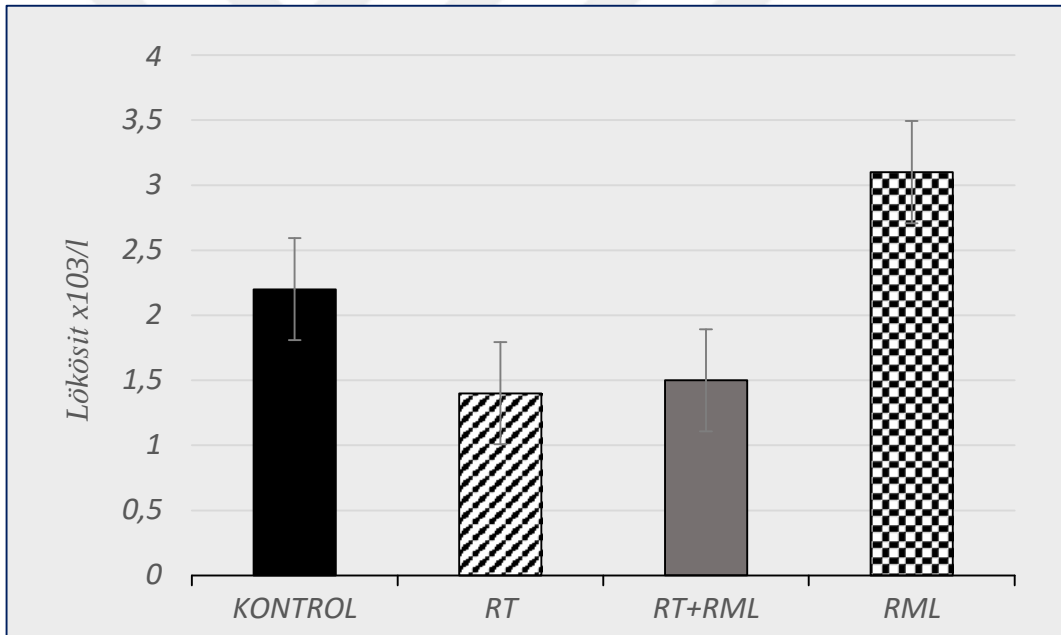
4.2.8. Deneysel Uygulamanın Ratlarda Lökositler Üzerine Etkisi

Lökosit ölçümlerinin gruplara göre karşılaştırmak amacıyla 32 adet dişi fare ile deney yapılmış ve Tablo 4.11’de lökosit değerlerinin istatistik sonuçları verilmiştir.

Tablo 4.11: Gruplara Göre Lökosit Değerleri

Grup	Median(Min;Max)
Kontrol	2,2000(1,20;3,00)
RT	1,4000(,80;4,20)
RT+RML	1,5000(1,20;6,50)
RML	3,1000(1,10;3,60)
p	,142

Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmadığı görüldü (Şekil 4.10).



Şekil 4.10: Lökosit Sonuçları

5. TARTIŞMA

Beyin tümörlerinde uygulanan RT tedavisinde, radyasyona bağlı bazı yan etkiler görülmektedir. Bu yan etkileri azaltmak için farklı ajanlar ve tedavi yöntemleri denenmektedir. Bu amaçla kullanılan ajanlardan birisi de; RML ile benzer farmakolojik özelliklere sahip ve aynı zamanda RML'nin yapısal analogu olan MLT'nindir. MLT, FDA tarafından onaylı değildir ve ABD'de reçetesiz satılan düzensiz bileşikler kategorisine dahil edilmektedir. Bu nedenle, son yıllarda gerçekleştirilen çeşitli çalışmalar MLT'nin kendisinden daha çok, MLT'erjik reseptör agonistleri üzerinde odaklanmıştır (Boutin.,2020).

Çalışmamızda MLT'erjik reseptör agonisti olan RML'nun RT sonrası dokuda hasara sebep olan inflamasyon, OS ve apoptozis üçlüsü üzerindeki etkisini göstermek amacıyla radyasyona bağlı beyin hasarı oluşturduğumuz ratların beyin doku örneklerinden; TAS, TOS, OSİ, Kaspaz-3 ve -9, TNF- α , IL-10 düzeyleri araştırılmıştır. Ayrıca, tam kan örneklerinden lökosit ölçümü yaptık ve korteks bölgesi doku örneklerinden H-E boyaması gerçekleştirilerek hücrel değişiklikleri inceledik. Buna göre; radyasyona bağlı beyin hasarında RML'nun histolojik olarak hücrel bütünlüğün korunmasına katkı sağladığını, OSİ'nin azalmasına neden olduğunu, kaspaz-3 ve -9, TNF- α değerlerini azalttığını, IL-10 değerlerinde artışa neden olduğunu tespit ettik.

Rehman ve ark. (2019), travmatik beyin hasarı (TBH) oluşturdukları ratlarda, MLT uygulamasının, beyin hasarına bağlı OS, nöroinflamasyon ve nörodejenerasyona karşı nörolojik iyileştirme etkisini araştırmışlardır. Elde ettikleri analiz sonuçlarına göre, tekrarlayan hafif travmatik beyin hasarı (rmTBI) grubunda yükselmiş ROS düzeyleri ve artmış MDA miktarının MLT tedavisiyle tam tersine döndüğünü göstermişlerdir. Ayrıca bu çalışmada fare beyinlerinde TBH ile indüklenen nöroinflamasyon derecesini saptamak için TNF- α ölçümü yapılmış ve TBH'nin TNF- α düzeyinde neden olduğu artışın, MLT'le tedavi edilen gruplarda önemli ölçüde azaldığını saptamışlardır. Apoptotik süreci değerlendirmek için Western Blot yöntemi ile ölçtükleri kaspaz-3 seviyelerinin hafif travmatize hasarlı beyin dokulu gruplarda(rmTBI) arttığını bulmuşlardır (Rehman ve ark., 2019). Bulguları, bizim çalışmamızdaki OSİ sonuçlarımızda benzer şekilde RML'un antioksidatif etkisini desteklemektedir. TNF- α ile kaspaz-3 düzeyleri RML tedavisiyle azalmıştır. Rehman ve ark. (2019) gerçekleştirdikleri bu çalışmanın sonuçları MLT'nin,

çalışmamızdaki RML'a benzer şekilde antienflamatuar, antioksidatif ve antiapoptotik etkiler sağladığını ve TBH'na karşı koruyucu olduğunu göstermiştir.

El-Missiry ve ark. (2021), γ -radyasyon uygulanmasının neden olduğu beyin hasarında MLT'nin inflammatuar, OS ve apoptozis üzerine etkisini araştırmışlardır. Histopatoloji sonuçlarına göre; ratlarda hippocampal bölge dokusunda RT'la oluşturulan lezyonlara 1. ve 7. günlerde MLT eklenip kontrol grubu (sadece 1.ve 7.günlerde MLT) ile karşılaştırıldığında, gruplar arasında anlamlı bir fark bulamamışlardır. Bununla beraber 4-Gy γ -radyasyon uygulaması yapılan ratlarda piknosisle beraber sitoplazmanın yoğunluğunun artmış, granüler tabakada belirgin iskemik nöronal dejenerasyon gözlenmiştir. Sadece 7. gün RT uygulanan grubun histopatolojisinde nöronöfaji birlikte granüler tabakada şiddetli iskemik nöronal dejenerasyon gözlenmiştir. Ayrıca bu çalışmada RT+MLT uygulanan gruplarda ise hafif derecede vakuoler dejenerasyon ile birlikte granüler tabakada hafif iskemik hasar gözlenmiş olup MLT'nin iskemik nöronal dejenerasyonu hafiflettiğini belirtmişlerdir. Bizim çalışmamızın vakuolizasyon açısından yapılan değerlendirilmesine göre kontrol grubuna kıyasla diğer tüm gruplarda bir artış gözlenirken sadece RT ve RT+RML gruplarında bu artış anlamlı olmuştur (her iki grup için de). Ancak RT grubundaki artış RT+RML ve RML gruplarıyla kıyaslandığında El-Missiry ve ark. (2021) çalışma sonuçlarına benzer olarak anlamlı bir şekilde tersine dönmüştür. RML grubunda da RT+RML grubuyla kıyaslandığında anlamlı bir şekilde azalma gözlenmiştir. Bununla birlikte araştırmacı çalışmasında apoptotik etkiyi değerlendirmek için radyasyon uygulanan grupta immünohistokimyasal boyama ile kaspaz-3'un granüler hücrelerde belirgin bir şekilde artış gösterdiğini ve bu artışın 1. ve 7. günlerde MLT eklenmesiyle granüler hücre içi ve sitoplazmik nükleer kaspaz-3 seviyelerinin tersine dönmesiyle MLT'nin antiapoptotik mekanizmadaki nöroprotektif rolünün önemli olduğunu belirtmiştir. Bizim çalışmadaki histopatolojik olarak apoptotik cisim incelemesinde ise kontrol grubuna kıyasla RT grubunda anlamlı bir şekilde artış gözlenmiştir. RT grubuyla yapılan kıyaslamaya göre RT+RML ve RML gruplarında apoptotik cisim açısından anlamlı bir şekilde azalma görülmüştür (her iki grup için de). RML grubunda da RT+RML grubuna kıyasla anlamlı bir şekilde azalma gözlenmiş olup histopatolojik sonuçların RML'nun antiapoptotik rolünü göstermesi bakımından olumlu bir veri olarak değerlendirmek mümkün olacaktır. Çalışmamızda RML'nun antiapoptotik etkisini histopatolojik inceleme ile beraber ELISA yöntemiyle gerçekleştirdiğimiz kaspaz-9 ve kaspaz-3 analizleri ile değerlendirdik. Sonuçlarımıza göre hem kaspaz-9'un

hem de kaspaz-3'un grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı ve El-Missiry ve ark. (2021) MLT ile elde ettiği verilerle son derece uyumlu olarak RML'nun da antiapoptotik role sahip olduğunu gösterdik. Aynı çalışmada, OS değerlendirmek için radyasyon uygulanan gruplarda ölçülen; SOD, CAT, GPx, GSH değerlerinin anlamlı bir şekilde düşme gösterdiğini ve buna ek olarak MDA seviyesinin yükseldiğini, MLT tedavisi ile bu değerlerin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde tersine çevrildiği gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda ise OS'i belirlemek için kullandığımız OSI sonuçları istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde OS açısından El-Missiry ve ark. (2021) çalışmasını destekler şekildeydi. El-Missiry ve ark. (2021) çalışmasındaki enflamatuar etki için inflammatuar sitokinlerden TNF- α , IL-1 β , IL-6 ve antienflamatuar etkiyi göstermek için ise IL-10 ölçülmüştür. MLT tedavisi alan gruplarla kontrol grupları arasında anlamlı bir fark çıkmamıştır. Ancak 1. ve 7. günde radyasyon uygulanan grupta pro-inflamatuar sitokinlerin (TNF- α , IL-1 β , IL-6) artış gösterdiği ve aynı zamanda IL-10 seviyesinde düştüğü belirlenmiştir (El-Missiry ve ark., 2021). Çalışmada MLT tedavisiyle pro-inflamatuar sitokinlerin belirgin bir şekilde düşmesiyle beraber aynı zamanda IL-10 seviyesinin yükselmesi bizim RML'la elde ettiğimiz TNF- α ve IL-10 analiz ölçümleriyle paralellik göstermiştir. Özetle El-Missiry ve ark. (2021) çalışmasında MLT'nin radyasyona bağlı beyin hasarında, çalışmamızda kullandığımız RML ile benzer şekilde antioksidan, antienflamatuar ve antiapoptotik etki gösterdiğini söylemek mümkündür.

Wang ve ark. tarafından 2019 yılında TBH'ından sonra RML'nun Nrf2 sinyal yolak üzerinden OS ve inflamasyonu hafifletmesini konu alan bir çalışmada beyin dokusunda TBH'dan sonraki 3 ve 28. günlerde lezyon hacimlerinin RML grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde küçüldüğü gözlenmiştir. Bununla birlikte ipsilateral hemisferlerdeki beyin ödeminde TBH'dan sonraki 3. günde RML grubunda kontrol grubuna göre yine istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı saptanmıştır. Bizim çalışmamızda bulduğumuz histopatolojik sonuçlarda ise RT grubundaki ödem artışı RT+RML ve RML gruplarıyla kıyaslandığında anlamlı bir şekilde azalma göstermiş olup Wang'ın çalışmasıyla uyumlu çıkmıştır. Ayrıca Wang'ın bu çalışmasındaki biyokimyasal analizlerde ise RML'nun TBH'dan 1,3,7 gün sonra inflammatuar sitokinleri (IL-4, IL-1 β , ve TNF- α) kontrol grubuna göre azaltmasının yanısıra 1, 3, ve 7 günlerde ise antienflamatuar sitokinleri (IL-10 ve IL-4) aynı şekilde kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde artırdığı bulunmuştur. Bu sonuçlar bizim çalışmamızın gerek TNF- α gerekse

IL-10 sonuçlarıyla benzerlik göstererek RML'nun antienflamatuvar etkisi olabileceği varsayımını desteklemiştir. Ayrıca bu çalışmada OS değerlendirmesi için doku ve serumda SOD, MDA, GSH ve GSH-Px ve MDA ölçümleri kullanılmıştır. TBH'dan sonraki 1. 3. ve 7. günlerde kontrol grubuyla kıyas yapıldığında beyin doku ve serumda SOD, MDA, GSH, ve GSH-Px düzeylerinin düşük olduğu, MDA'nın yükseldiği RML'nun 1,3,7 günlerde yükselmiş MDA'yı kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde tersine çevirdiği gözlenmiştir. Genel olarak da RML tedavisi ile test edilen her üç zaman noktasının çoğunda beyin ve serum SOD, GSH ve GSH-Px düzeylerini artırdığı ve serum MDA düzeylerini düşürerek (Wang ve ark., 2019) bizim çalışmamızda RML'la elde ettiğimiz OSİ sonuçlarına benzer şekilde olası antioksidatif etki kapasitesini ortaya çıkarmıştır. Sonuç olarak çalışmamız hem histopatolojik hem de biyokimyasal olarak Wang ve ark.'nın çalışmasındaki gibi RML'nun antienflamatuvar, antioksidatif etkilere sahip olduğunu göstermektedir.

Wu, X. L ve ark. (2020) yılında RML'nun iskemik beyin hasarı üzerindeki etkinliğini konu alan bir çalışma yapmışlardır. Bu çalışmada RML 3 mg/kg olarak uygulanmıştır. Çalışmada ratlarda orta serebral arter oklüzyonu yapılmış olup bu şekilde akut fokal serebral iskemide (lezyonlar 0.,4.,6. saatlerde değerlendirilmiş) ve kronik beyin hasarı için fototrombosis (PT) uygulanmış olup lezyonlar 15'inci günde değerlendirilmiştir. Çalışmada oluşturulan iskemik hasardan 4 saat sonra RML grubuyla kontrol grubu arasında RML'nun anlamlı bir şekilde beyin infarkt hacmini azalttığı görülmüştür. Bu modellemelerde kronik beyin hasarında RML uygulanmış grupla PT grubu kıyaslandığında beyin lezyon bölümleri hacimleri ölçümlerine göre yine anlamlı bir şekilde hasarı azalttığı gösterilmiştir. Bu çalışmanın histopatolojik sonuçları, RML tedavisinin hem akut hemde kronik iskemik hasar üzerinde bizim çalışmamızdaki histopatolojik değerlendirmelerle benzer şekilde (ödem, vakuolizasyon ve apoptotik cisim etkisi açısından) olumlu etkiler göstermektedir. Wu, X. L., ve ark. (2020) çalışmalarında ayrıca, serebral iskemide inflamasyonu değerlendirmek için IL-1 β ve TNF- α ölçümlerini kullanmıştır. Sonuçta iskemiden sonra anlamlı bir şekilde artan bu parametrelerin bizim çalışmadakine benzer bir şekilde RML tedavisiyle baskılanıp RML'un antienflamatuvar etki gösterdiği gözlenmiştir (Wu, X. L., ve ark., 2020).

Wu, G.C ve ark. (2020), RML ve MLT ile ventilatörün neden olduğu akut akciğer hasarına karşı IL-10 üretiminin yukarı regülasyon yoluyla koruma sağladığını göstermek

amacıyla gerçekleştirdikleri çalışmada, kontrol grubuna göre VILI (Ventilatör Induced Lung Injury) grubunda ventilatöre bağlı gelişen geniş interstisyel ödem ve lökosit infiltrasyonununundan sonra düşen IL-10 ve yükselen TNF- α eşlik etmiştir. MLT veya RML tedavisi ile IL-10'nun önemli ölçüde yükseldiği, TNF- α seviyesinin anlamlı bir şekilde düşme göstermişlerdir (Wu, G.C ve ark.,2020). Çalışmanın sonuçları bizim IL-10 ve TNF- α sonuçlarıyla uyumlu çıkmıştır. Ayrıca çalışmamızın histopatolojik sonuçlarının ödem açısından yapılan değerlendirmesine göre RT ve RT+RML gruplarında kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir şekilde artış gözlenip, RT grubundaki gözlenen bu ödem artışı RT+RML ve RML gruplarıyla kıyaslandığında anlamlı bir şekilde tersine çevrilip, Wu, G.C ve ark. (2020) çalışmasında ventilasyona bağlı oluşan ödemin, RML ve MLT tedavisiyle tam iyileşme göstermesi açısından benzerlik içermektedir. Aynı çalışmada, OS değerlendirmek için serumda MDA düzeyleri ve protein karbonil düzeyleri ölçüp, kontrol grubuna göre kıyasla VILI grubunda anlamlı bir şekilde yükselmiş MDA ve protein karbonil değerlerinin, MLT veya RML tedavisi anlamlı bir şekilde düştüğünü saptamıştır. Bizim çalışmamızda antioksidatif kapasiteyi göstermek için kullandığımız OSI sonuçlarıyla benzer olarak RML'nin antioksidatif etkisini belirtmiştir. Wu ve ark. apoptozis değerlendirmesi için immunohistokimyasal olarak kaspaz-3 boyaması yaparak, kaspaz-3 seviyesinin VILI grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde yükseldiğini ve bu yüksekliğin RML veya MLT tedavisi ile düşme eğilimi gösterdiğini gözlemleyip bizim çalışmamızda RML'le elde ettiğimiz kaspaz-3 çalışma sonuçlarını destekleyecek şekilde RML'nun olası antiapoptotik etkisini ortaya çıkarmışlardır. Ayrıca Melatoninerjik reseptör antagonisti eklendiğinde bu düşme eğiliminin ortadan kalktığı görülmüştür (Wu,G.C ve ark.,2020). Özetle bu çalışmanın gerek histopatolojik sonuçları gerekse biyokimyasal (TNF- α ve IL-10, Kaspaz 3, MDA, Protein karbonil) analiz sonuçları çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlarla benzer olarak RML'nun antienflamatuar, antiapoptotik ve antioksidan etkilerini göstermiştir.

Li, C. ve ark. (2021) tarafından gerçekleştirilen, RML'nin mitokondriyal bağımlı bir yolda nöronal hücrelerde 1-metil-4-fenilpiridinyum (MPP+) ile indüklenen nörotoksisitesinin iyileştirilmesini konu alan bir çalışmada nöronal apoptozis yollarında RML'nin rolü incelenmiştir. Çalışmada nöronlarda meydana gelen MPP+ ile oluşturulan apoptozisda sitozolik sitokrom C salımının ve Bax/Bcl-2 oranının artmasının yanısıra kaspaz-3 seviyesinin yükselmesinin eşlik ettiği ve RML uygulanmasıyla bizim çalışmamızdaki kaspaz-3 sonuçları ile uyumlu olarak bütün tablonun tersine dönerek

RML'nun antiapoptotik olarak etki gösterdiği sonucuna varmışlardır. Yine bu çalışmada yayıнымızda OS için kullandığımız OSİ yerine mitokondrial ROS ve protein karbonil değerleri baz alınmıştır. Bu değerlendirmelere göre MPP+ kaynaklı grupta anlamlı şekilde artış gösteren mitokondrial ROS ve protein karbonil değerleri RML uygulanmasıyla bu artışın anlamlı şekilde düştüğü gözlemlenmiş olup (Li, C. ve ark. 2021), çalışmamızda OSİ ile ölçtüğümüz değerlerle uyumlu olarak RML'nun potansiyel antioksidatif etkisi bir kez daha vurgulanmıştır.

2020 yılında Tao Wang ve ark. tarafından RML'nin isoflorana aracılı beyin mikrovasküler endotel hücrelerinde oluşturduğu inflamatuvar yanıtla ilgili yapılan çalışmada isofloranın tek başına yaklaşık olarak mitokondroyal ROS'u 3.6 kat arttırmasına karşılık 2 ayrı doz şeklinde uygulanan RML tedavisi ile anlamlı bir şekilde bu oranın sırasıyla 2.6 ve 1.7 kata kadar düştüğü gözlemlenmiştir (Tao Wang ve ark. 2020). Bu veriler, bizim çalışmamızda OS parametresi olarak kullandığımız OSİ sonuçlarıyla paralellik göstermiş olup RML'nun olası antioksidatif etkisini teyid etmiştir. Yine bu çalışmanın hücre kültürüyle yapılan inflamatuvar değerlendirmesinde bizim çalışmamızda kullandığımız inflamatuvar parametre olan TNF- α 'ya karşılık olarak IL-1 β ve TGF- β ölçümleri yapılmış olup isofloran sonucu anlamlı bir şekilde artış gösteren bu parametrelerin RML etkisi ile düştüğü ve bu düşmenin bizim çalışmadaki TNF- α sonuçlarıyla uyumlu olarak RML'nun antienflamatuvar kapasitesine dikkat çekmiştir (Tao Wang ve ark. 2020). Sonuç olarak bu çalışmada çıkan bulgular, RML'nun isoflorana bağlı oluşan beyin endotel hasarında antienflamatuvar ve antioksidatif etkisine dikkat çekip çalışmamızın sonuçlarını destekler niteliktedir.

Liu, Y ve ark. (2021) RML'nin Nrf2 aktivasyonu yoluyla, LPS kaynaklı kan beyin bariyerini geçirgenliğini bozan hasarda iyileştirici etkisini araştırdıkları çalışmada, RML'nin beyin damarlarındaki inflamasyon düzeyini gözlemlemek için IL-1 β ve MCP-1 değerlerini ölçmüşlerdir. Çalışmadan elde edilen veriler, LPS grubundaki sonuçların kontrol grubundan anlamlı bir şekilde yüksek olduğu ve bu yüksekliğin RML tedavisi ile bizim çalışmamızdaki TNF- α sonuçlarına benzer şekilde RML'nun antienflamatuvar etki gösterdiği, LPS kaynaklı beyindeki bu şiddetli inflamasyonun RML ile hafifletebileceğini gözlemlemişlerdir. Aynı çalışmada OS değerlendirilmesi için MDA ölçümü yapılmış olup LPS grubunda MDA'nın anlamlı bir yükseklik göstermesine karşın bu yüksekliğin hem RML grubunda hem de RML+LPS grubunda büyük oranda baskılanarak bizim

çalışmamızdaki OSİ sonuçlarıyla uyumlu şekilde düştüğünü göstermiştir (Liu, Y ve ark., 2021). Ortaya çıkan bu veriler, çalışmamızda elde ettiğimiz RML'nun antioksidatif ve antienflamatorik etkisini desteklemektedir.

Liu, D. Gu ve ark. (2021), insan SH-SY5Y nöronal hücre hattında, 6-OHDA kaynaklı hücresel yaşlanmaya karşı RML'nin 30 nM ve 60 nM dozlarıyla koruyucu etkisini araştıran bir çalışma yapmıştır. Bu çalışmada, RML'nin OS üzerindeki etkisini belirlemek için bizim kullandığımız OSİ'ne karşılık olarak nöronal hücrelerdeki H₂O₂ üretimi ölçülerek tespit edilmiştir. 6-OHDA ile uyarılan bu hücrelerde anlamlı bir şekilde H₂O₂ üretimi yükselmiş olup RML verilmesiyle çalışmamızdaki OSİ ile uyumlu bir şekilde OS'in baskılanarak nöronal hücrelerde 6-OHDA kaynaklı OS'in belirgin bir şekilde düzeltilebileceği gösterilmiştir. Ayrıca bu çalışmada apoptozis göstergesi olarak bizim çalışmamızda analiz ettiğimiz kaspaz-3 ve kaspaz-9 ölçümüne karşılık olarak p53 gen ekspresyonu ölçülmüştür. Bu çalışma sonucuna göre p53 gen ekspresyonunun belirgin bir şekilde arttığı ve bu artışın bizim çalışmamızın kaspaz-3 ve kaspaz-9 analiz sonuçlarıyla uyumlu olarak Liu ve ark. (2021) çalışmasında da RML tedavisi ile baskılanarak olası antiapoptotik etkisi gösterilmiştir (Liu, D. Gu ve ark., 2021). Çıkan sonuçların hepsi birlikte ele alındığında RML bizim çalışmadaki sonuçlarla benzer şekilde hem antiapoptotik hem de antioksidatif etki göstererek çalışmamız sonucu elde ettiğimiz verilerimizi desteklemektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Radyasyon sonrasında beyin dokusunda meydana gelen etkilenmelerin temelinde OS, enflamasyon ve apoptozis yer almaktadır. Çalışmamızdan yaptığımız çıkarımlara göre RML tedavisi, radyasyon sonrasında OS ve inflamasyon sonucu oluşan hücresel ödemi istatistiksel olarak da anlamlı ölçüde azaltabileceği olgusu verilerle sunuldu. Ayrıca çalışmamızda enflamatuar sitokin olan TNF- α düzeyleri, RML tedavisi ile istatistiksel olarak anlamlı ölçüde düşerken, antienflamatuar sitokin olan IL-10 konsantrasyonunda yine istatistiksel olarak artış gözlemlendi. Böylece istatistiksel olarak anlamlı çıkan sonuçlara dayanarak RML'nun radyasyona maruz kaldıktan sonra dokularda apoptozis programlamasında rol oynayan kaspaz-3 ve kaspaz-9 aktivasyonunu etkileyerek ve pro-apoptotik gen başlangıcını kısıtlayarak kaspaz-3 ve kaspaz-9 yolunun inhibisyonu yoluyla radyoprotektif bir etki gösterdiğini söyleyebiliriz. Çalışmamızda, RML'nin fizyolojik ve farmakolojik dozunda antioksidan, antiapoptotik ve antienflamatuar etkilerini göstermeye çalıştık. Bununla birlikte bu çalışma, RML'nun ısıtılmış sıçanlara kıyasla hipokampusun histolojik yapısını önemli ölçüde koruduğunu göstermiştir. Çalışmamızdaki histopatolojik sonuçlar ile biyokimyasal analiz sonuçları birbirini desteklemekteydi. Bu verilerin ışığında RML tedavisi ile radyasyonun meydana getirdiği beyin hasarında kullanılabilecek ve gelecek çalışmalar yönünden bilim dünyasında heyecan verici sonuçları meydana getirebilecek bir molekül olabileceğini kanıtladık. Diğer yandan RML'nun etki mekanizmasının daha net incelenmesi için, etkili olabileceği yollarla ilgili daha ileri moleküler analizlere ihtiyaç vardır. Sonuç olarak, RML'nun gerçek klinik faydasını görmek ve değerlendirmek için FDA onaylı olması, kötü kullanım, toksik doz gibi kullanımını kısıtlayan herhangi kontrendike durum söz konusu olmadığından, klinikte RT alan hastalar üzerinde kullanılıp etkilerin ileri moleküler ve histolojik analizlerle desteklenip uzun süreli hasta izlemlerinin olduğu çalışmaların artırılması faydalı olacaktır. Sonuç olarak çalışmamız radyasyona bağlı beyin hasarında RML'un olası yararlı etkilerini gösteren ilk çalışmadır. Bu yönüyle, yapılacak daha ileri çalışmalara ışık tutarak, literatüre yeni bilgiler kazandırmaya adanmıştır.

KAYNAKLAR

Abdel- Wahhab, M. A., Nada, S. A., Arbid, M. S. (1999) ‘Ochratoxicosis: Prevention of developmental toxicity by L- methionine in rats.’ *Journal of Applied Toxicology: An International Forum Devoted to Research and Methods Emphasizing Direct Clinical, Industrial and Environmental Applications*, pp.7-12.

Acharya MM, Christie LA, Lan ML, Donovan PJ, Cotman CW et al. (2009) ‘Rescue of radiation induced cognitive impairment through cranial transplantation of human embryonic stem cells.’ *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 106(45), pp. 19150–19155.

Açıkgöz, H. (1997) ‘Hacettepe Üniversitesi Tıp fakültesi. Mikrobiyoloji Bülteni’.

Aggarwal, B. B., Gupta, S. C., Kim, J. H. (2012) ‘Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey.’ *Prepublished Online*,

A.J. van der Kogel, (1986) ‘Radiation-induced damage in the central nervous system: An interpretation of target cell responses’ *Br J Cancer Suppl.*, 7, pp. 207–217.

Amakye, D. D. Hibberd, M. Stevenson, S. J. A. (2004) ‘Phase I study to investigate the absolute bioavailability of a single oral dose of ramelteon (TAK-375) in healthy male subjects.’ *Clinical Pharmacology & Therapeutics In: Sleep*, pp.54.

Asadi, M. Taghizadeh, S. Kaviani, E. Vakili, O. Taheri- Anganeh, M. Tahamtan, M. Savardashtaki, A. (2022) ‘Caspase- 3: structure, function, and biotechnological aspects.’ *Biotechnol*, 69(4), pp.1633-1645.

Aydoğan Y. (2021) ‘WR-1065 ve asetil salisilik asitin radyoprotektif etkinliğinin mikronukleus yöntemi ile araştırılması’..Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Radyasyon Biyolojisi Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı.

Axelrod, J. (1974) 'The pineal gland: a neurochemical transducer.' *Science*, , 184, pp. 1341-1348.

Balik, A.; Kretschmannova, K.; Mazna, P.; Svobodova, I.; Zemkova, H. (2004) 'Melatonin action in neonatal gonadotrophs.' *Physiol.Res*, 53(1), pp.153-166.

Bellinzona, M., Gobbel, G.T., Shinohara, C., and Fike, J.R., (1996) 'Apoptosis is induced in the subependyma of young adult rats by ionizing irradiation.', *Neurosci Lett.*, 208(3), pp. 163-166.

Belka, C. Budach, W. Kortmann, R. D. Bamberg, M. (2001) 'Radiation induced CNS toxicity—molecular and cellular mechanisms.' *British Journal of Cancer*, 85(9), pp.1233-1239.

Benedict B. ve Albensi S. (2019) 'Front.Cell Dev.Biol.', *Sec.Mitochondrial Research*, 7.

Betlazar, C. Middleton, R. J. Banati, R. B. Liu, G. J. (2016) 'The impact of high and low dose ionising radiation on the central nervous system.' *Redox Biology*, 9, pp.144-156.

Boice, A. Bouchier-Hayes, L. (2020) 'Targeting apoptotic caspases in cancer.' *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1867(6), pp.118688.

Borja, N. L. Daniel, K. L. (2006) 'Ramelteon for the treatment of insomnia.' *Clinical Therapeutics*, 28(10), pp.1540-1555.

Brzezinski, A. (1997) 'Melatonin in humans.', 336(3), pp.186-195.

Boutin, JA., Paula A. Witt-Enderby., Christoph Sotriffer., Darius P. Zlotos .(2020) 'Melatonin receptor ligands: A pharmaco-chemical perspective.' *J Pineal Res*, 69:e12672.

Cardinali, D.P.; Golombek, D.A.; Rosenstein, R.E.; Cutrera, R.A.; Esquifino, A.I. (1997) 'Melatonin site and mechanism of action: Single or multiple?' *J. Pineal Res*, 23(1), pp.32-9.

Carswell, E. A., Old, L. J., Kassel, R. L., Green, S, Fiore, N. (1975) 'Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors.' *Natl Acad Sci U S A*, 72(9), pp.3666-70.

Chiang, C.S., McBride, W.H., and Withers, H.R., (1993) 'Radiation-induced astrocytic and microglial responses in mouse brain.' *Radiother Oncol*, 29(1).

Chipuk, J., Bouchier-Hayes, L., Green, D. (2006) 'Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: The innocent bystander scenario.' *Cell Death Differ*, 13(8), pp.136-402.

Choo, Z. E. Loh, A. H. P. Chen, Z. X. (2019) 'Destined to die: Apoptosis and pediatric cancers.' *Cancers (Basel)*, 11(11), pp.1623.

Collin, F. (2019) 'Chemical basis of reactive oxygen species reactivity and involvement in neurodegenerative diseases.' *Int J Mol Sci*, 20(10), pp.2407

Couper, K. N. Blount, D. G. Riley, E. M. (2008) 'IL-10: the master regulator of immunity to infection.' *The Journal of Immunology*, 180(9), pp.5771-7.

Dahlitz, M.; Alavarez, B.; Vignau, J.; English, J.; Arendt, J.; Parkes, J.D. (1991) 'Delayed sleep phase syndrome.' *Lancet*, , 337, pp.1121-1124.

Çayakar. A, (2018) 'Türkiye Klinikleri J Intern Med.' 3(2), pp.67-76

Daşdağ, S. (2010) 'İyonlaştırıcı radyasyonlar ve kanser.' *Dicle Tıp Dergisi*, 237(2), pp.177–185.

Deng, W. Saxe, M. D. Gallina, I. S. Gage, F. H. (2009) 'Adult-born hippocampal dentate granule cells undergoing maturation modulate learning and memory in the brain.' 29(43), pp.13532-42.

Dubocovich, M.L. (1995), 'Melatonin receptors: are there multiple subtypes?' *Trends Pharmacol. Sci.*, 16(2), pp. 50-56.

Ebisawa, T.; Karne, S.; Lerner, M.R.; Reppert, S.M. (1994), 'Expression cloning of a high-affinity melatonin receptor from *Xenopus* dermal melanophores.' *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 91(13), pp. 6133-6137.

Ekmekcioglu, C. (2006), 'Melatonin receptors in humans: biological role and clinical relevance.' *Biomed. Pharmacother.*, 60, pp. 97-108.

El-Missiry, M. A. Shabana, S. Ghazala, S. J. Othman, A. I. Amer, M. E. (2021) 'Melatonin exerts a neuroprotective effect against γ -radiation-induced brain injury in the rat through the modulation of neurotransmitters, inflammatory cytokines, oxidative stress, and apoptosis.' *Environ Sci Pollut Res Int*, 28(24), pp.31108-31121.

Erel, Ö. A. (2004) 'Novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation.' *Clin Biochem*, (4), pp.277-85.

Flores, E. R. Tsai, K. Y. Crowley, D. Sengupta, S. Yang, A. McKeon, F. Jacks, T. (2002) 'p63 and p73 are required for p53-dependent apoptosis in response to DNA damage.' *Nature*, 416(6880), pp.560-4.

Fourman, L. T, Meyer, B. R. (2013) 'Autoimmune hepatitis in association with ramelteon.' *Clin Gastroenterol*, 47(7), pp.6514.

Gebicke, H. (2001) 'Microglia in neurodegeneration: molecular aspects.' *Microsc Res Tech*, 54(1), pp.47-58.

Giglio, P. Gilbert, M. R. (2003) 'Cerebral radiation necrosis.' *Neurologist Jul*, 9(4), pp. 180-8.

Glass, J.D.; Knotts, L.K. (1987) 'A brain site for the antigonadal action of melatonin in the white-footed mouse (*Peromyscus leucopus*): Involvement of the immunoreactive GnRH neuronal system.' *Neuroendocrinology*, 46, pp.48-55.

Greene-Schloesser, D. Robbins, M. E. Peiffer, A. M. Shaw, E. G. Wheeler, K. T. Chan, M. D. (2012) 'Radiation-induced brain injury: A review.' *Front Oncol*, 2, pp.73.

Giuseppe Mannino, Carlo Pernici, Graziella Serio, Carla Gentile and, Cinzia M. Berteà (2021) 'Melatonin and Phytomelatonin: Chemistry, Biosynthesis, Metabolism, Distribution and Bioactivity in Plants and Animals.' *An Overview. Int. J. Mol. Sci.*, 22(18), pp. 9996.

Harma, M. Erel, O. (2003) 'Increased oxidative stress in patients with hydatidiform mole.' *Swiss Med Wkly*, 133(41-42), pp.563-6.

Hansson, E., (1988), 'Astroglia from defined brain regions as studied with primary cultures.', *Prog Neurobiol.* 30(5), pp.369-97.

Heid, M.E.; Keyel, P.A.; Kamga, C.; Shiva, S.; Watkins, S.C.; Salter, R.D. (2003) 'Mitochondrial reactive oxygen species induces NLRP3-dependent lysosomal damage and inflammasome activation.' *J Immunol*, 191(10), pp.5230-8.

Hladik, D, Tapio, S. (2016) 'Effects of ionizing radiation on the mammalian brain.' *Mutat Res*, pp.219–230.

Hong, J.H., Chiang, C.S., Campbell, I.L., Sun, J.R., Withers, H.R., and McBride, W.H., (1995) 'Induction of acute phase gene expression by brain irradiation.' *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 33(3), pp.619-26.

Hornsey, S., Myers, R., Coultas, P.G., Rogers, M.A., and White, A. (1981) 'Turnover of proliferative cells in the spinal cord after X irradiation and its relation to time-dependent repair of radiation damage.' *Br J Radiol*, 54(648), pp.1081-5.

Hosokawa, Y. Sakakura, Y. Tanaka, L. Okumura, K. Yajima, T. Kaneko, M. (2005) 'Radiation-induced apoptosis is independent of caspase-8 but dependent on cytochrome c and the caspase-9 cascade in human leukemia HL60 cells.' *Radiat Res*, 46(3), pp.293-303.

Hou, Y. C. Lai, C. H. (2016) 'The relief effects of ramelteon on refractory chronic migraine: a case report.' *Clinical Psychopharmacology and Neuroscience*, 14(4), pp.405-406.

Hubbard, B.M. & Hopewell, J.W. (1978). 'The dose-latent period relationship in the irradiated cervical spinal cord in the rat.' *Radiology*, 128(3), pp.779-81.

Hwang SY, Jung JS, Kim TH, Lim SJ, Oh ES. (2006) 'Ionizing radiation induces astrocyte gliosis through microglia activation'. *Dis.*, 21(3), pp.457-67.

Iwasaki, S.; Nakazawa, K.; Sakai, J.; Kometani, K.; Iwashita, M.; Yoshimura, Y.; Maruyama, T. (2005) 'Melatonin as a local regulator of human placental function.' *J. Pineal Res.*, 39, pp. 261-265.

Jin, X.; Von Gall, C.; Pieschl, R.L.; Gribkoff, V.K.; Stehle, J.H.; Reppert, S.M.; Weaver, D.R. (2003) 'Targeted Disruption of the Mouse Mel1b Melatonin Receptor.' *Mol. Cell Biol*, 23(3), pp.1054- 1060.

J. W. Hopewell, W. Calvo, D. Campling, H. S. Reinhold, M. Rezvani and T. K. Yeung. (1989) 'Effects of radiation on the microvasculature. Implications for normal-tissue damage.' *Front Radiat Ther Onc.*, 23, pp.85-95.

Joo KM, Jin J, Kang BG, Lee SJ, Kim KH. (2012) 'Trans-differentiation of neural stemcells: a therapeutic mechanism against the radiation induced brain damage.' *PLoS One*, 7(2), pp.25936.

Ju, G. Z., Shen, B., Sun, S. L., Yan, F. Q., Fu, S. B. (2007) 'Effect of X-rays on expression of caspase-3 and p53 in EL-4 cells and its biological implications.' *Biomed Environ Sci*, 20(6), pp.456-9.

Karasek, K.; Winczyk, K. (2006) 'Melatonin in humans'. *J. Physiol.Pharmacol.*, 57(5), pp. 19-39.

Karim, A., Tolbert, D., Cao, C. (2006) 'Disposition kinetics and tolerance of escalating single doses of ramelteon, a high- affinity MT1 and MT2 melatonin receptor agonist indicated for treatment of insomnia.' *J Clin Pharmacol*, 46(2), pp.140-8.

Katzung, B. G. Masters, S. B. Trevor, A. J (2004) 'Basic & clinical pharmacology'.

Kelker, H. C. Oppenheim, J. D. Stone- Wolff, D. Henriksen- DeStefano, D. Aggarwal, B. B. Stevenson, H. C. Vilček, J. (1985) 'Characterization of human tumor necrosis factor produced by peripheral blood monocytes and its separation from lymphotoxin.' *Int J Cancer*, 36(1), pp.69-73.

Kennaway, D.J. (2004) 'Melatonin and development: physiology and pharmacology.' *Sem. Perinatol*, 24, pp. 258-266.

Kim & de Vellis, 2005 Kim SU, de Vellis J. (2005) 'Microglia in health and disease.' *Neurosci Res*, 81(3), pp.302-13.

Kollias, G., Kontoyiannis, D. (2002) 'Role of TNF/TNFR in autoimmunity: Specific TNF receptor blockade may be advantageous to anti-TNF treatments.' *Cytokine Growth Factor Rev*, 13(4-5), pp.315-21.

Kuriyama, A. Honda, M. Hayashino, Y. (2014) 'Ramelteon for the treatment of insomnia in adults: a systematic review and meta-analysis.' *Sleep Med*, 15(4), pp.385-92.

Kurita, H., Kawahara, N., Asai, A., Ueki, K., Shin, M., and Kirino, T. (2001) 'Radiation-induced apoptosis of oligodendrocytes in the adult rat brain.' *Neurol. Res.* 23(8), pp. 869-874.

Kurtman, C., Gümüštepe, E. (2016) 'Geriatride radyoterapi.' *Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıp Dergisi*, 49(2), pp.122-127.

Kyrkanides S, Olschowka JA, Williams JP, Hansen JT, O'Banion MK. (1999) 'TNF alpha and IL-1beta mediate intercellular adhesion molecule1 induction via microglia-astrocyte interaction in CNS radiation injury.' *J Neuroimmun*, 95(1-2), pp.95-106.

Kyrkanides S, Moore AH, Olschowka JA, Daeschner JC, Williams JP et al. (2002) 'Cyclooxygenase-2 modulates brain inflammation-related gene expression in central nervous system radiation-injury.' *Brain Res Mol Brain Res*, 104(2), pp.159-69.

Lassus, P. Opitz-Araya, X., Lazebnik, Y. (2002) 'Requirement for caspase-2 in stress-induced apoptosis before mitochondrial permeabilization.' *Science*, 97(5585), pp.1352-4.

Lee WH, Sonntag WE, Mitschelen M, Yan H, Lee YW. (2010) 'Irradiation induces regionally specific alterations in pro-inflammatory environments in rat brain.' *Int J Radiat Biol*, 86(2), pp.132-44.

Leonardo, Lorente, María M. Martín, Mónica Argueso, Luis Ramos (2015) 'Serum caspase-3 levels and mortality are associated in patients with severe traumatic brain injury' *BMC Neurol.*, 15, pp.228.

Li, C. Zhang, Y. Liu, R. Mai, Y. (2021) 'Ramelteon ameliorated 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+)-induced neurotoxicity in neuronal cells in a mitochondrial-dependent pathway.' *Bioengineered*, 12(1), pp.4868-4877.

Li, Y. Q. Chen, P. Haimovitz-Friedman, A. Reilly, R. M. Wong, C. S. (2003) 'Endothelial apoptosis initiates acute blood-brain barrier disruption after ionizing radiation.' *Cancer Research*, 63(18), pp. 5950-5956.

Liu, D. Gu, X. Han, F. Cai, M., Liu, W., Han, L., Ma, Q. (2021) 'The protective effects of Ramelteon against 6- OHDA- induced cellular senescence in human SH- SY5Y neuronal cells.' *Brain Behav*, 11(8), pp. 2278.

Liu, Y., Wang, L., Du, N., Yin, X., Shao, H., Yang, L. (2021) 'Ramelteon ameliorates LPS-induced hyperpermeability of the blood-brain barrier (BBB) by activating Nrf2.' *Inflammation*, 44(5), pp.1750-1761.

Liu, J.; Clough, S.J.; Hutchinson, A.J.; Adamah-Biassi, E.B.; Popovska-Gorevski, M.; Dubocovich, (2016) 'M.L. MT1 and MT2 melatonin receptors: a therapeutic perspective.' *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol* 56, pp.361-383.

Lorente, L., Martín, M. M., Argueso, M., Ramos, L., Solé-Violán, J., Riaño-Ruiz, M., Borreguero -León, J. M. (2015) 'Serum caspase-3 levels and mortality are associated in patients with severe traumatic brain injury.' *BMC Neurol*, 15, pp.228.

Lysiak, J. J., Zheng, S., Woodson, R., Turner, T. T. (2007) 'Caspase-9-dependent pathway to murine germ cell apoptosis: Mediation by oxidative stress, BAX, and caspase 2.' *Cell Tissue Res*, 328(2), pp.411-9.

Magnani, F.; Mattevi, A. (2019) 'Structure and mechanisms of ROS generation by NADPH oxidases.' *Curr. Opin. Struct. Biol. Struct Biol*, 59, pp.91-97.

Maier, P., Hartmann, L., Wenz, F., Herskind, C. (2016) 'Cellular pathways in response to ionizing radiation and their targetability for tumor radiosensitization.' *Int J Mol*, 17(1), pp.102.

Mailloux, R.J. (2007) 'An update on mitochondrial reactive oxygen species production.' *Antioxidants (Basel)*, 9(6), pp.472.

Makale, M. T. McDonald, C. R. Hattangadi-Gluth, J. Kesari, S. (2017a) 'Brain irradiation and long-term cognitive disability: Current concepts.' *Nat Rev Neurol*, 13(1), pp.52–64.

Marini, P. Budach, W. Niyazi, M. Junginger, D. Stickl, S. Jendrossek, V. Belka, C. (2009) 'Combination of the pro-apoptotic TRAIL-receptor antibody mapatumumab with ionizing radiation strongly increases long-term tumor control under ambient and hypoxic conditions.' . *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 75(1), pp.198-202.

Marini, P. Denzinger, S. Schiller, D. Kauder, S. Welz, S. Humphreys, R. Belka, C. (2006) 'Combined treatment of colorectal tumours with agonistic TRAIL receptor antibodies HGS-ETR1 and HGS-ETR2 and radiotherapy: Enhanced effects in vitro and dose-dependent growth delay in vivo.' *Oncogene*, 25(37), pp.5145-5154.

Marini, P. Jendrossek, V. Durand, E. Gruber, C. Budach, W. Belka, C. (2003) 'Molecular requirements for the combined effects of TRAIL and ionising radiation.' *Radiother Oncol*, 68(2), pp.189-98.

Marini, P., Junginger, D., Stickl, S., Budach, W., Niyazi, M., Belka, C. (2009) 'Combined treatment with lexatumumab and irradiation leads to strongly increased long term tumour control under normoxic and hypoxic conditions.' *Radiat Oncol*, 27, pp.44-49.

Marnett, L. J. (2000) 'Oxyradicals and DNA damage.' *Carcinogenesis*, 3, pp.361-70.

Marsden, V. S., O'Connor, L., O'Reilly, L. A., Silke, J., Metcalf, D., Ekert, P. G., Strasser, A. (2002) 'Apoptosis initiated by Bcl-2-regulated caspase activation independently of the cytochrome c/Apaf-1/caspase-9 apoptosome.' 419(6907), pp.634-7.

Marsh, J. C., Gielda, B. T., Herskovic, A. M., Wendt, J. A., Turian, J. V. (2010) 'Sparing of the hippocampus and limbic circuit during whole brain radiation therapy: A dosimetric study using helical tomotherapy.' *J Med Imaging Radiat Oncol*, 54(4), pp.375-82.

McBride, W. H., Chiang, C.-S., Olson, J. L., Wang, C.-C., Hong, J.-H., Pajonk, F., et al. (2004). A sense of danger from radiation. *Radiat Res*, 162(1), pp.1-19.

McIlwain, D. R., Berger, T., & Mak, T. W. (2013). *Caspase Functions in Cell Death and Disease*. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 5(4), a008656–a008656. doi:10.1101/cshperspect.a008656

Monje ML, Mizumatsu S, Fike JR, Palmer TD. (2002) ‘Irradiation induces neural precursor-cell dysfunction.’ *Nat Med*, (9), pp.55-62.

Monje ve diğerleri, 2007 Monje ML, Vogel H, Masek M, Ligon KL, Fisher PG, Palmer TD. (2007) ‘Impaired human hippocampal neurogenesis after treatment for central nervous system malignancies.’ *Ann Neurol*, 62(5), pp.515-20.

Morgan, P.J.; Barrett, P.; Howell, H.E.; Helliwell, R. (1994) ‘Melatonin receptors: localization, molecular pharmacology and physiological significance.’ *Neurochem. Int*, 24(2), pp.101-146.

Mosser, D.M.; Zhang, X. (2008) ‘Interleukin-10: New perspectives on an old cytokine.’ *Immunol. Rev*, 226, pp.205-18.

Moulder, J. E., Cohen, E. P. (2007) ‘Future strategies for mitigation and treatment of chronic radiation-induced normal tissue injury.’ *Semin Radiat Oncol*, 17(2), pp.141-8.

Murshed, H. (2019) ‘Fundamentals of radiation oncology : Physical, biological, and clinical aspects.’ *Imprint of Elsevier*.

Niles, L.P.; Armstrong, K.J.; Rincón Castro, L.M.; Dao, C.V.; Sharma, R.; McMillan, C.R.; Doering, L.C.; Kirkham, D.L. (2004) Neural stem cells express melatonin receptors and neurotrophic factors: colocalization of the MT1 receptor with neuronal and glial markers.

Neubauer, D. N. A. (2008) ‘Review of ramelteon in the treatment of sleep disorders.’ *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 4(1), pp.69-79.

Nordal, R. A., Nagy, A., Pintilie, M., Wong, C. S. (2004) 'Hypoxia and hypoxia-inducible factor-1 target genes in central nervous system radiation injury: A role for vascular endothelial growth factor.' *Clin Cancer Res*, 10(10), pp.3342-53.

Pandi-Perumal SR, Trakht I, Srinivasan V, et al. (2008) 'Physiological effects of melatonin: role of melatonin receptors and signal transduction pathways.' *Prog Neurobiol*; 85, pp. 335 -53.

Pajonk, F., Chiang, C. S., Sun, J. R., McBride, W. H. (2002) 'NF- κ B, cytokines, proteasomes, and low-dose radiation exposure.' *Military Medicine*, 167(1), pp. 66-67.

Patchell, R. A., Tibbs, P. A., Regine, W. F., Dempsey, R. J., Mohiuddin, M., Kryscio, R. J., Young, B. (1998) 'Postoperative radiotherapy in the treatment of single metastases to the brain: A randomized trial.' *JAMA*, 280(17), pp.1485-9.

Perry, A., Schmidt, R. E. (2006) 'Cancer therapy-associated CNS neuropathology: An update and review of the literature.' *Acta Neuropathol*, 111(3), pp.197 212.

Pevet, P.; Challet, E. (2011), 'Melatonin: both master clock output and internal time-giver in the circadian clock network.' *J. Physiology-Paris*, 105, pp.170-182.

Pocock & Liddle, 2001 Pocock JM, Liddle AC. (2001) Microglial signalling cascades in neurodegenerative disease..*Prog Brain Res.*;132, pp.555-65.

Porro B. (2020). 'The Regulatory Role of IL-10 in Neurodegenerative Diseases.' *Biomolecules*, 10(7), pp.1017.

Potokar, M., Milisav, I., Kreft, M., Stenovec, M., Zorec, R. (2003) 'Apoptosis triggered redistribution of caspase-9 from cytoplasm to mitochondria.' *FEBS Lett*, 544(1-3), pp.153-9.

Puspitasari A., Yamazaki, H., Kawamura, H., Nakano, T., Takahashi, A., Shirao, T., Held, K. D. (2019) 'X-irradiation of developing hippocampal neurons causes changes in

neuron population phenotypes, dendritic morphology and synaptic protein expression in surviving neurons at maturity.' *Neurosci Res*, 160, pp. 11–24.

Raber J, Rola R, LeFevour A, Morhardt D, Curley J et al. (2004) 'Radiation-induced cognitive impairments are associated with changes in indicators of hippocampal neurogenesis.' *Radiat Res*, 162(1), pp.39-47.

Raff, M.C., Miller, R.H., and Noble, M., (1983), 'A glial progenitor cell that develops in vitro into an astrocyte or an oligodendrocyte depending on culture medium.' *Nature*, 303(5916), pp.390-6.

Rahmanian A. (2016); 'The paradox role of caspase cascade in ionizing radiation therapy.' *Journal of Biomedical Science* 23:88.

Rehman, S. U., Ikram, M., Ullah, N., Alam, S. I., Park, H. Y., Badshah, H., Ok Kim, M. (2019) 'Neurological enhancement effects of melatonin against brain injury-induced oxidative stress, neuroinflammation, and neurodegeneration via AMPK/CREB signaling.' *Cells*, 8(7), pp. 760.

Robbins M, Greene-schloesser D, Peiffer AM, Shaw EG, Chan MD and Wheeler KT (2012) 'Radiation-induced brain injury' *A review*, 2, pp. 73.

Roncarolo, M.G.; Gregori, S.; Battaglia, M.; Bacchetta, R.; Fleischhauer, K.; Levings, M.K. (2006), 'Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans.' *Immunol Rev*, 212, pp.28-50.

Roy, D.; Belsham, D.D., (2002) 'Melatonin receptor activation regulates GnRH gene expression and secretion in GT1-7 GnRH neurons. Signal transduction mechanisms.' *Biol Chem*, 277(1), pp.251-8.

Rubin, P., Cooper, R. A., Philips, T. L. (1978) 'Radiation biology and radiation therapy pathology syllabus.' *American College of Radiology*.

Santos, N. F. D., Silva, R. F., Pinto, M. M., Silva, E. B., Tasat, D. R., Amaral, A. (2017) 'Active caspase-3 expression levels as bioindicator of individual radiosensitivity.' *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 89, pp. 649-659.

Seth, P. and Koul, N. (2008) 'Astrocyte, the star avatar: redefined.' *J BiosciSep*; 33(3), pp.405-21.

Sheard, M. A. (2001) 'Ionizing radiation as a response-enhancing agent for CD95-mediated apoptosis.' *Int J Cancer*, 96(4), pp. 213–20.

Shinohara, C., Gobbel, G. T., Lamborn, K. R., Tada, E., Fike, J. R. (1997) 'Apoptosis in the subependyma of young adult rats after single and fractionated doses of X-rays.' *Cancer Research*, 57(13), pp. 2694-2702.

Sies, H.; Jones, D.P. (2020), 'Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents.' *Nat Rev Mol Cell Biol*, 21(7), pp.363-383.

Silva, F. F. V. E., Padín-Iruegas, M. E., Caponio, V. C. A., Lorenzo-Pouso, A. I., Saavedra-Nieves, P., Chamorro-Petronacci, C. M., Pérez-Sayáns, M. (2022) 'Caspase 3 and cleaved caspase 3 expression in tumorigenesis and its correlations with prognosis in head and neck cancer: A systematic review and meta-analysis.' *International Journal of Molecular Sciences*, 23(19), pp.11937.

Slee, E. A., Adrain, C., Martin, S. J. (2001) 'Executioner caspase-3,-6, and-7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis.' *J Biol Chem.*, 276(10), pp.73206.

Slee, E. A., Harte, M. T., Kluck, R. M., Wolf, B. B., Casiano, C. A., Newmeyer, D. D., Martin, S. J. (1999) 'Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2,-3,-6,-7,-8, and-10 in a caspase-9-dependent manner.' *The. J Cell Biol*, 144(2), pp.281-92.

Strle, K.; Zhou, J.H.; Broussard, S.R.; Venters, H.D.; Johnson, R.W.; Freund, G.G.; Dantzer, R.; Kelley, K.W. (2002), 'IL-10 promotes survival of microglia without activating., *Neuroimmunol*, 122(1-2), pp.9-19.

Stevenson, S., Bryson, S., Amakye, D., Hibberd, M. (2004) 'Study to investigate the absolute bioavailability of a single oral dose of ramelteon (TAK- 375) in healthy male subjects.' *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 75(2), pp.22.

Stewart, C. A., Metheny, H., Iida, N., Smith, L., Hanson, M., Steinhagen, F., Trinchieri, G. (2013), 'Interferon-dependent IL-10 production by Tregs limits tumor Th17 inflammation.' *J Clin Invest*. 123(11), pp.4859–4874.

St-Louis, M. C., Archambault, D. (2007) 'The equine arteritis virus induces apoptosis via caspase-8 and mitochondria-dependent caspase-9 activation.' *Virology*, 367(1), pp.147-155.

Stoll G, Jander S. (1999) 'The role of microglia and macrophages in the pathophysiology of the CNS.' *Prog Neurobiol*, 58(3), pp. 233-47.

Takeda Pharmaceutical (2021)

<https://content.takeda.com/?contenttype=PI&product=ROZ&language=ENG&country=GBL&documentnumber=>

Touitou, Y. (2011), 'Melatonin: hormone and medication'. *C R Seances Soc Biol Fil*, 192(4), pp. 643-57.

Turnquist, C., Harris, B. T., Harris, C. C. (2020) 'Radiation-induced brain injury: current concepts and therapeutic strategies targeting neuroinflammation.' *Neurooncol Adv*, 2(1), pp.057.

United Nations Scientific Committee (2008) 'The effects of atomic radiation, sources and effects of ionizing radiation annex d.' *Health Effects Due To Radiation From The Chernobyl Accident*. <http://www.unscear.org/unscear/en/publications.html>.

Unsear. (2009) 'United nations scientific committee on the effects of atomic radiation (unscear).' *UNSCEAR Report. Annex E. Sources-to-Effects Assessment for Radon in Homes and Workplaces.*

Ündeğer, Ü., Giray, B., Zorlu, A. F., Öge, K., Baçaran, N. (2004) 'Protective effects of melatonin on the ionizing radiation induced DNA damage in the rat brain.' *Experimental and Toxicologic Pathology*, 55(5), pp.379-384.

Wang, J., Jiang, C., Zhang, K., Lan, X., Chen, X., Zang, W., Wang, J. (2019) 'Melatonin receptor activation provides cerebral protection after traumatic brain injury by mitigating oxidative stress and inflammation via the Nrf2 signaling pathway' *Free Radic Biol Med*, 131, pp.345-355.

Wang, T., Li, Z., Xia, S., Xu, Z., Chen, X., Sun, H. (2021) 'The protective effects of ramelteon against isoflurane-induced insults and inflammatory response in brain microvascular endothelial cells.' *Neurotox Res*, 39(3), pp.677-686.

Wilson, J.X., (1997) 'Antioxidant defense of the brain: a role for astrocytes.' *Can J Physiol Pharmacol*, 75(10-11), pp.1149-63.

Wong, C. K., Chen, Z., So, K. L., Li, P. (2007) 'Polycomb group protein RING1B is a direct substrate of Caspases-3 and-9.' *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1773(6), pp. 844-852.

Wu, G. C., Peng, C. K., Liao, W. I., Pao, H. P., Huang, K. L., Chu, S. J. (2020) 'Melatonin receptor agonist protects against acute lung injury induced by ventilator through up-regulation of IL-10 production.' *Respiratory Research*, 21(1), pp. 1-17.

Wu, X. L., Lu, S. S., Liu, M. R., Tang, W. D., Chen, J. Z., Zheng, Y. R., Zhang, X. N. (2020) 'Melatonin receptor agonist ramelteon attenuates mouse acute and chronic ischemic brain injury.' *Acta Pharmacol Sin*, 41(8), pp.1016-1024.

Von Gall, C.; Stehle, J.H.; Weaver, D.R. (2002) 'Mammalian melatonin receptors: molecular biology and signal transduction' *Cell Tissue Res*, 309, pp.151-162.

Yang L, Froio RM, Sciuto TE, Dvorak AM, Alon R, Luscinskas FW; Froio; Sciuto; Dvorak; Alon; Luscinskas (2005). 'ICAM-1 regulates neutrophil adhesion and transcellular migration of TNF- α -activated vascular endothelium under flow'. *Blood*, 106(2), pp. 584-92.

Yang, L., Yang, J., Li, G., Li, Y., Wu, R., Cheng, J., Tang, Y. (2017) 'Pathophysiological responses in rat and mouse models of radiation-induced brain injury.' *Neurobiol Mar*; 54(2), pp.1022-1032.

Yang, S., Wang, J., Wang, D., Guo, L., Yu, D. (2021) 'Melatonin receptor agonist ramelteon suppresses lps-induced neuroinflammation in astrocytes.' *ACS Chemical Neuroscience*, 12(9), pp. 1498-1505.

Yaren, H., Karayılanoğlu, T. (2005) 'Radyasyon ve insan sağlığı üzerine etkileri.' *TSK Koruyucu Hekimlik Bülteni*, 4(4), pp. 199-208.

Zhang, L., Li, K., Sun, R., Zhang, Y., Ji, J., Huang, P., Tian, Y. (2014) 'Minocycline ameliorates cognitive impairment induced by whole-brain irradiation: An animal study.' *Radiat Oncol*, 12(9), pp.281.

Zisapel, N, (2001), 'Circadian rhythm sleep disorders: pathophysiology and potential approaches to management.' *CNS Drugs*.

EKLER

ETİK KURUL ONAYI

		
T.C. SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL BAŞKANLIĞI		
Toplantı Tarihi	Toplantı Sayısı	Karar Sayısı
21.10.2021	10	02
SDÜ Rektörlüğü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 21.10.2021 tarihinde saat-10.00'da ZOOM programı üzerinden uzaktan toplanarak aşağıdaki kararlar alınmıştır;		
Karar: 02-Proje Yürütücüsü: Proje Yürütücüsü: Dr. Öğr.Üyesi Talay KOCA (Afyon Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Yürütücülüğünde, Yardımcı Araştırmacılar: Doç.Dr. Halil AŞCI, Doç.Dr. Elif ÖZKAN ve Doktor Öğrencisi Sedat AYDIN'ın yardımcı araştırmacı olarak yer aldığı "Ratlarda Radyasyona Bağlı Beyin Hasarında Ramelteon'un Olası Tedavi Edici Etkisi" başlıklı SDÜ Bilimsel Araştırma Projesi etik kurulumuzca oybirliği ile UYGUNLUĞUNA karar verilmiştir.		

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı : Sedat Aydın

Uyruğu : T.C

Yazışma Adresi :

EĞİTİM

Lisans : Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi (1998)

Doktora: Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Fizyoloji Anabilim Dalı (2023)

YABANCI DİL

İngilizce : YDS: 75, 2014-Eylül

İS DENEYİMİ

Yıl	Kurum	Görev
1998-1999	Karaman	Prt.hekim
1999-2001	Ankara	Prt.hekim.
2001-2014	Uşak	Prt.hekim
2014-Halen	Uşak	İşyeri hekim

YAYINLAR/BİLİMSEL ETKİNLİK

Yalçinkaya ve ark.2014. Do male and female patients with chronic neck pain really have different health-related physical fitness, depression, anxiety and quality of life parameters?(<https://doi.org/10.1111/1756-185X.12389>)

İNTİHAL RAPORU

RATLARDA RADYASYONA BAĞLI BEYİN HASARINDA RAMELTEON'UN OLASI TEDAVİ EDİCİ ETKİSİ

ORJİNALLIK RAPORU

%**4**

BENZERLİK ENDEKSİ

%**4**

İNTERNET KAYNAKLARI

%**1**

YAYINLAR

%**2**

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1

tez.sdu.edu.tr

İnternet Kaynağı

%**2**

2

Submitted to Aksaray Aniversitesi

Öğrenci Ödevi

%**1**

3

acikbilim.yok.gov.tr

İnternet Kaynağı

%**1**

4

abakus.inonu.edu.tr

İnternet Kaynağı

%**1**

Alıntıları çıkart

Kapat

Eşleşmeleri çıkar

< %1

Bibliyografyayı Çıkart

üzerinde