

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

**TÜM VÜCUT RADYOTERAPİSİNİN FARKLI YAŞ
GRUPLARINDAKİ RATLARDA BEYİN DOKUSU LİPİD
PEROKSİDASYONU VE ANTİOKSİDAN SİSTEM
PARAMETRELERİ ÜZERİNE ETKİLERİ.**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Ayşe Burçin UYUMLU
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Kadir BATÇIOĞLU**

**Bu tez, İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2005/68
proje numarası ile desteklenmiştir.**

MALATYA-2007

TEŞEKKÜR

İnönü Üniversitesi Eczacılık Fakültesinde Biyokimya Anabilim Dalında yapmış olduğum tez çalışmam süresince bana destek olan tez danışmanım Doç.Dr.Kadir Batçioğlu'na, tez süresince fikir ve tavsiyelerinden faydalandığım Radyasyon Onkolojisi bölümünden Doç.Dr.Haldun Şükrü Erkal ve Doç.Dr.Meltem Serin'e ve Radyasyon Onkolojisi bölümü çalışanlarına, deney hayvanlarının temini ve yardımlarından dolayı Deneysel Araştırmalar Birimine ve personeline, bilgi ve tecrübelerinden istifade ettiğim sayın Prof.Dr.Metin Genç'e, desteklerinden dolayı değerli arkadaşlarım Uzm.Ecz.M.Fatih Aydoğan ve MSc. Evren Kılınç'a, maddi ve manevi desteğini esirgemeyen Eczacılık Fakültesinin değerli çalışanlarına teşekkürü bir borç bilirim.

Ayrıca akademisyenliğe başlamamda beni teşvik eden ve çalışmalarım boyunca her türlü fedakarlığı gösteren, sürekli manevi desteğini hissettiğim sevgili eşim Ecz. Umut Uyumlu'ya ve çalışmalarım sırasında yeterli ilgiyi gösteremediğim aileme sonsuz sevgi ve şükranlarımı sunarım.

TEŞEKKÜR	Sayfa i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİLLER VE RESİMLER DİZİNİ	iv
TABLOLAR VE GRAFİKLER DİZİNİ	v
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	6
2.1. Serbest Oksijen Radikalleri	6
2.1.1. Süperoksit Radikali ($O_2^{\cdot -}$)	8
2.1.2. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)	10
2.1.3. Hidroksil Radikali ($\cdot OH$)	11
2.1.4. Singlet Oksijen (1O_2)	11
2.1.5. Nitrik Oksit (NO)	12
2.1.6. Hipokloröz Asit (HOCl)	14
2.2. Serbest Radikallerin Biyomoleküllere Etkisi	14
2.2.1. Lipidler Üzerine Etkileri	14
2.2.2. Proteinler Üzerine Etkileri	16
2.2.3. Nükleik Asitler Üzerine Etkileri	17
2.2.4. Karbonhidratlar Üzerine Etkileri	19
2.3. Serbest Radikallere Karşı Antioksidan Savunma Sistemleri	19
2.3.1. Enzimatik Antioksidan Sistemler	20
2.3.1.1. Süperoksit Dismutaz	20
2.3.1.2. Katalaz	20
2.3.1.3. Glutasyon Peroksidaz	21
2.3.1.4. Glutasyon-S-Transferaz	21
2.3.1.5. Glutasyon Redüktaz	22
2.3.1.6. Mitokondriyal Sitokrom Oksidaz	22
2.3.2. Enzimatik Olmayan Antioksidan Sistemler	22
2.4. Yaşlanma ve Oksidatif Stres	25
2.5. Radyasyon	26
2.5.1. Radyoaktivite ve yarı ömür	26
2.5.2. Radyasyon birimleri ve dönüşümleri	28
2.5.3. İyonize Radyasyon	29
2.5.3.1. X Işınları	29

2.5.3.2. Gama Işınları	30
2.5.3.3. Nötronlar	30
2.5.4. İyonize Radyasyonun Biyolojik Etkileri	31
2.6. Radyasyon Onkolojisi	33
2.7. Merkezi Sinir Sistemi	35
2.7.1. Beyin	35
2.7.2. Omurilik (Medulla Spinalis)	37
3. MATERYAL-METOT	39
3.1. Deney Hayvanların Temini ve Radyoterapi Uygulanması	39
3.1.1. Deney Hayvanlarının Temini ve Deneylere Hazırlanması	39
3.1.2. Radyoterapi Uygulaması	39
3.1.3. Ötenazi	41
3.1.4. Beyin Dokularının Çıkarılarak Biyokimyasal Analizlere Hazırlanması	41
3.2. Biyokimyasal Analizlerin Yapılması	42
3.2.1. Protein Miktar Tayini	42
3.2.2. Malondialdehit (MDA) Miktar Tayini	43
3.2.3. Süperoksit Dismutaz Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi	44
3.2.4. Katalaz Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi	47
3.2.5. Glutatyon Peroksidaz Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi	48
3.3. İstatiksel Analizler	50
4. BULGULAR	51
4.1. Beyin Dokusu SOD Aktivitesi	53
4.2. Beyin Dokusu CAT Aktivitesi	54
4.3. Beyin Dokusu GSHPx Aktivitesi	55
4.4. Beyin Dokusundaki MDA Seviyeleri	56
5. TARTIŞMA	57
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	62
7. ÖZET	63
8. İNGİLİZCE ÖZET	64
9. KAYNAKLAR	65
10. ÖZGEÇMİŞ	76

ŞEKİLLER VE RESİMLER DİZİNİ

Şekil 1	: Moleküler oksijenin suya indirgenmesi	7
Şekil 2	: Oksijen radikallerinin orbital şeması	7
Şekil 3	: Singlet oksijenin moleküler orbital şeması	12
Şekil 4	: Nitrik oksit kaynakları ve oluşumu	13
Şekil 5	: Peroksil radikalının oluşumu	15
Şekil 6	: DNA’da hasar oluşturan ajanlar ve tamir mekanizmaları	18
Şekil 7	: α - tokoferol’ün yapısı	22
Şekil 8	: Askorbik asit’in yapısı	23
Şekil 9	: X ışınlarının üretimi	30
Şekil 10	: Radyasyonun DNA’daki direkt ve indirekt etkisi	31
Şekil 11	: Beyin dokusunun bölümleri	37
Fotoğraf 1:	Sıçanın baş ve ekstremitelerinden sabitlenmesi	40
Fotoğraf 2:	Sıçanın Co-60 cihazına yerleştirilmesi	40
Fotoğraf 3:	Sıçana tüm vücut radyoterapisinin uygulanması	40

TABLÖLAR VE GRAFİKLER DİZİNİ

Tablo 1. Reaktif oksijen türleri ve formülleri	6
Tablo 2. Enzimatik ve non-enzimatik antioksidan sistemleri	19
Tablo 3. Radyasyon birimleri ve dönüşümleri	28
Tablo 4. Deney gruplarında beyin dokusu SOD, CAT, GSHPx aktiviteleri ile MDA düzeyleri	52
Grafik 1. Protein standart grafiği	43
Grafik 2. SOD standart çalışması logaritmik grafiği	46
Grafik 3. Radyoterapi uygulanan deney gruplarının kontrol grubu ile SOD aktivitesi yönünden karşılaştırılması.	53
Grafik 4. Radyoterapi uygulanan deney gruplarının kontrol grubu ile CAT aktivitesi yönünden karşılaştırılması.	54
Grafik 5. Radyoterapi uygulanan deney gruplarının kontrol grubu ile GSHPx aktivitesi yönünden karşılaştırılması.	55
Grafik 6. Radyoterapi uygulanan deney gruplarının kontrol grubu ile MDA düzeyleri yönünden karşılaştırılması.	56

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ATP	:	Adenozin tri fosfat
ADP	:	Adenozin di fosfat
BOS	:	Beyin omurilik sıvısı
°C	:	Santigrad derece
CAT	:	Katalaz
cGMP	:	Siklik guanozin monofosfat
cm	:	Santimetre
dL	:	Desilitre
dk	:	Dakika
DNA	:	Deoksiribo nükleik asit
e⁻	:	Elektron
ER	:	Elektromanyetik radyasyon
FAD	:	Flavin adenin dinükleotit
g	:	Gram
Gy	:	Gray
GSH	:	Glutatyon
GSH-Px	:	Glutatyon peroksidaz
GST	:	Glutatyon S-transferaz
GSSG	:	Okside glutatyon
GR	:	Glutatyon redüktaz
H₂O₂	:	Hidrojen Peroksid
HNE	:	4-hidroksinonenal
kg	:	Kilogram
L	:	Litre
LOOH	:	Lipid hidroperoksit
LPO	:	Lipid peroksidasyonu
m	:	Metre
M	:	Molar
MDA	:	Malondialdehit
mg	:	Miligram
mL	:	Mililitre
µL	:	Mikrolitre
µmol	:	Mikromol
mmol	:	Milimol
nmol	:	Nanomol
nm	:	Nanometre
MS	:	Multipl skleroz

NAD	:	Nikotinamid adenin dinükleotid
NAD⁺	:	Yükseltgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid
NADPH	:	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NBT	:	Nitroblue tetrazolium
NO[·]	:	Nitrik oksit radikali
NT	:	Nitro tirozin
O₂^{·-}	:	Süperoksit radikali
¹O₂	:	Singlet oksijen
OH[·]	:	Hidroksil radikali
p⁺	:	Proton
PCO	:	Protein karbonil
PUFA	:	Çoklu doymamış yağ asidi
RNA	:	Ribonükleik asit
ROO[·]	:	Peroksil radikali
ROT	:	Reaktif oksijen türleri
ONOO[·]	:	Peroksinitrit
sn	:	Saniye
SOD	:	Süperoksit dismutaz
UV	:	Ultraviyole ışınlar
U	:	Ünite

GİRİŞ

Radyasyon, daima doğada var olan ve birlikte yaşadığımız bir olgudur. Radyoaktiflik, 1895 yılında Wilhelm Röntgen'in X-ışınlarını bulmasından sonra, 1896 yılında Henry Becquerel'in Uranyumun gözle görülmeyen ışınlar yaydığını belirlemesiyle keşfedilmiştir. Bu buluşların ardından Marie ve Pierre Curie tarafından başka radyoaktif elementler bulunarak izole edilmiştir. Radyoaktif maddeler tarafından yayılan ışınların özellikleri ise, Ernest Rutherford tarafından aydınlatılmıştır (1,2).

Atom çekirdeklerinin, parçalanmaya ve nükleer bozunmaya karşı dayanıklılığı çekirdek kararlılığı olarak tanımlanır. Radyoaktif çekirdekler, kararlı bir nötron/proton oranına ulaşmıyaya kadar radyoaktif çekirdek bozunması olarak adlandırılan bir süreçle "radyasyon" yayarlar (1).

Başlıca radyasyon türleri; iyonlaştırıcı radyasyon ve iyonlaştırıcı olmayan radyasyon olmak üzere iki grupta toplanabilir.

İyonlaştırıcı radyasyon; madde içerisinden geçerken enerjisini ortama aktarmak suretiyle, ortamdaki atomları doğrudan veya dolaylı yollarla iyonlaştıran radyasyon türüdür (3).

İyonize radyasyonun enerjisinin absorpsiyonu direkt ve indirekt etki ile moleküllerde hasar oluşturur. Direkt etkide hasar, biyolojik sistemlerdeki anahtar moleküllerin atomlarının iyonizasyonu sonucu ortaya çıkar. Bu durum, molekülün inaktivasyonuna veya fonksiyonel değişikliğine neden olur. Radyasyonun indirekt etkisi atoma enerji transferi sonucu, serbest radikaller oluşturarak molekülün parçalanmasını kapsar (4).

İyonize edici radyasyonla oluşan serbest radikaller, DNA'yı etkileyerek hücrede mutasyona ve ölüme yol açarlar. Hidroksil radikali, deoksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyona girer ve değişikliklere sebep olur. Aktive olmuş nötrofillerden kaynaklanan H₂O₂ membranlardan kolayca hücre çekirdeğine ulaşarak DNA hasarına, hücre disfonksiyonuna ve hatta hücre ölümüne yol açabilir. Bu yüzden DNA serbest radikallerden kolay zarar görebilen önemli bir hedeftir (5). Hasarlanmış DNA lezyonları, transkripsiyonu ve protein sentezini bozabilmektedir (6).

Serbest radikaller bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip, kısa ömürlü, kararsız, molekül ağırlığı düşük ve çok etkin moleküller olarak tanımlanır (7).

Atomlarda elektronlar orbital adı verilen uzaysal bölgelerde çiftler halinde bulunurlar. Atomlar arasında etkileşim ile bağlar meydana gelmekte ve moleküler yapı oluşmaktadır. Serbest radikal, atomik ya da moleküler yapılarda çiftlenmemiş tek elektron bölümlerine verilen isimdir. Başka moleküller ile çok kolayca elektron alışverişine giren bu moleküllere oksidan moleküller veya serbest radikaller de denilmektedir (8).

Serbest bir radikal, radikal olmayan bir molekülden;

a) Elektron alarak: $X \rightarrow X^{\cdot+} + e^-$

b) Elektron vererek: $X + e^- \rightarrow X^{\cdot-}$

c) Kovalent bağın homolitik parçalanmasıyla: $X - Y \rightarrow X^{\cdot} + Y^{\cdot}$

veya bir hidrojen atomunun çıkarılmasıyla: $CH_4 + Cl^{\cdot} \rightarrow CH_3^{\cdot} + HCl$ oluşabilir (9,10).

Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan serbest radikallerdir. Serbest radikal biyokimyasında anahtar rolü oynayan maddeler oksijenin kendisi, süperoksit radikali, hidrojen peroksit, geçiş metallerinin iyonları ve hidroksil radikalidir (11).

Vücutta doğal metabolik yollarla serbest radikaller oluşur, ancak radikal temizleyen antioksidan sistemlerle, oluşan serbest radikaller ortadan kaldırıldığından,

herhangi bir toksisite ortaya çıkmaz. Ancak bu işleyişin radikaller lehine bozulduğu durumlarda bir dizi patolojik olay ortaya çıkar (12).

Organizmada serbest radikal oluşturan olayların başlıcaları, mitokondriyal elektron transportu, heksoz monofosfat yolu, ksenobiyotiklerin metabolizması, doğal uyarılarla fagositik hücrelerin aktivasyonu, biyosentetik ve biyokimyasal yıkım reaksiyonlarıdır (13). Eksojen kaynaklar ise antineoplastik ajanlar, alışkanlık yapan maddeler, hava kirliliği yapan fotokimyasal maddeler, ilaçlar, stres ve radyasyon (X-ray, gamma radyasyon, parçacık radyasyonu) dur (11).

Serbest radikallerin oluşması ile prooksidan/ antioksidan dengenin prooksidanlar lehine kayması sonucunda gelişen oksidatif stres, çeşitli mekanizmalar ile biyomoleküllere hasar vermektedirler (13,15).

Oksidatif stres DNA, protein ve lipitler gibi önemli biyomoleküllere hasar vererek yapısal ve fonksiyonel modifikasyonlara sebep olmaktadır. Bu yüzden reaktif oksijen türlerinin oluşturduğu oksidatif stresin, ilaç ve toksinle oluşan reaksiyonlar, kurşun zehirlenmesi, aminoglikozid nefrotoksitesi, ağır metal nefrotoksitesi, karbondioksit klorüre bağlı karaciğer hasarı, glomerulonefritis, hepatitis B, iskemi ve reperfüzyon, Vit. E eksikliği, amfizem, hiperoksi, bronkopulmoner displazi, arteroskleroz, pankreatitis, romatoid artrit, kardiyovasküler hastalıklar, artrit, nörodejeneratif prosesler, yaşlanma ve kanser gibi birçok hastalığın etiyopatolojisinde etkili olduğu düşünülmektedir (16,17).

Organizma oksidatif stresi önlemek için antioksidan savunma sistemlerine sahiptir. Bunlar, endojen enzimler (katalaz, glutatyon peroksidaz, süperoksit dismutaz), küçük endojen moleküller (glutatyon, ürat, koenzim Q...vs.) ve çoğu vitamin yapısında olan eksojen moleküllerdir (karotenoidler özellikle de β -karoten, vitamin C, vitamin E, selenyum...vs.) (16).

Reaktif oksijen türleri, hücrenin antioksidan sisteminin yetersiz kaldığı durumda lipid peroksidasyonuna ve mutagenез, karsinogenез ve hücre ölümüne neden olan DNA

hasarını başlatabilir (18). Serbest radikallerin yaptığı uzun süreli zararlar birçok dejeneratif hastalığa neden olur (16).

Oksidatif stres, santral sinir sistemini etkileyen bazı olayların patogenezi ile ilgili önemli bir durumdur. Bunlara örnek olarak, nörodejeneratif bozukluklar, epileptik felçler, demiyelinasyon (MS) ve deliliği verebiliriz. Santral sinir sistemi, oksijen tüketiminin fazla olması, yüksek demir iyonu ve PUFA içerikli lipidleri ihtiva etmesi ve düşük antioksidan savunma aktivitesinin olmasından dolayı oksidatif strese karşı oldukça hassastır (17,19).

Lipid peroksidasyonunun beyinde sinir yapılarına ve fonksiyonlarına Na/K ATPaz aktivitesini azaltarak zarar verebildiği uzun zamandan beri bilinmektedir. Membranın permeabilitesini arttırarak iyonların özellikle Ca^{+2} 'un geçişini kolaylaştırır (20).

Lipid hidroperoksitler doğrudan DNA zincirini kırabilir ve DNA'da oksidasyona sebep olabilir (21). Okzoaldehitler, DNA, RNA ve proteinlere bağlanabilme ve aralarında çapraz bağlar oluşturabilme özelliklerinden dolayı antimitotik etki gösterirler. Böylece kanser ve yaşlanma olaylarında rol oynarlar (22).

Kabul görmüş yaşlanma teorilerinden biri serbest radikal teorisidir. Bu teoriye göre, mitokondri metabolizmasının ürettiği serbest radikaller hücrenin ölümüne ve anormal fonksiyonuna sebep olabilir (23). Radyasyonla sudan hidroksil radikallerinin oluştuğu bilinmektedir. 1954 yılında canlı ortamlarda da bu radikaller saptanmıştır. İnsan bünyesindeki radikalleri ilk araştıranlardan Denham Harman, oksijen radikallerinin enzimatik redoks kimyasının bir yan ürünü olduğunu bildirmiştir. Özellikle eser miktarda demir ve diğer metal iyonlarının canlı bünyedeki oksidatif tepkimeleri katalizlediğini savunarak, 1956 yılında "Yaşlanmanın serbest radikal teorisi" ni tanımlamıştır (24).

Yaşlanma süresince beyin fonksiyonlarındaki değişimlerin mekanizması henüz tümüyle aydınlatılmamıştır. Serbest radikallerin yaşlanma prosesinde rol oynadığı

bilinmektedir. Çünkü beyin en çok oksijen tüketen aerobik organlardan biridir ve yüksek oranda radikallerle reaksiyona girebilecek yağ asidi içermektedir (25, 6).

Radyasyon maruziyetinin canlılarda genetik mutasyonlara, oksidatif hasar yoluyla lipid ve proteinler üzerinde yapısal ve fonksiyonel bozukluklara neden olarak kanser ve yaşlılığın etyopatogenezinde rol oynadığı, bu durumun yüksek oksijen konsantrasyonlarında daha dramatik olduğu öne sürülmektedir.

Birçok hastalığın tedavisinde kullanılmakta olan yöntemler beraberinde ilave sorunlara da neden olabilmektedir. Günümüzde kanser tedavisinde kullanılan kemoterapi ve radyoterapi yöntemleri doğaları gereği kanser hücreleriyle birlikte sağlıklı hücre ve dokulara da önemli ölçüde zarar verebilmektedir.

Radyoterapide kullanılan iyonize ışınlar organizmada doza ve ışınlama süresine bağlı olarak birtakım hasarlar oluşturur. Bu hasarların en önemlisi maruz kalınan radyasyon etkisi ile oluşan oksidatif stres ve neden olduğu oksidatif hasarlardır. Öte yandan bir takım ilave yöntemlerle kullanılan ana yöntemin zararlı yan etkileri de en aza indirilmeye çalışılmaktadır (2).

Bu çalışmanın amacı, kanser tedavisinde yaygın bir şekilde kullanılan radyoterapinin ratların beyin dokusunda oluşturduğu muhtemel oksidatif hasarın düzeyini belirlemek, yaşlanma ile bu hasarların ne ölçüde değiştiğini, organizmanın antioksidan yanıtını ve bu etkilerin farklı yaş gruplarındaki değişimini değerlendirmektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Serbest Oksijen Radikalleri

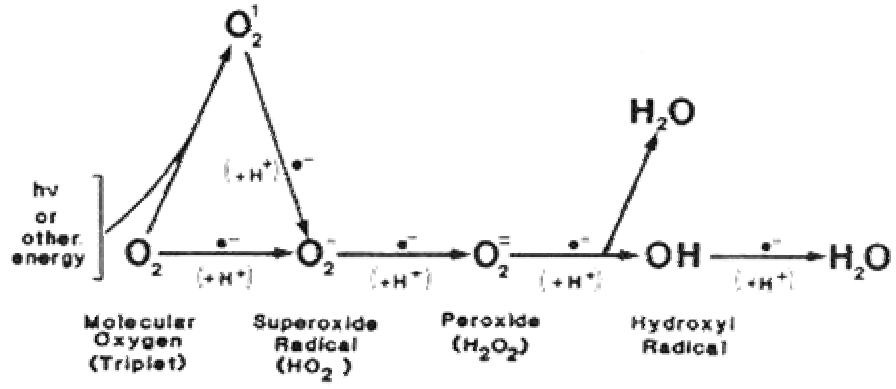
Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller oksijen kaynaklı radikallerdir.

Tablo 1. Reaktif oksijen türleri ve formülleri

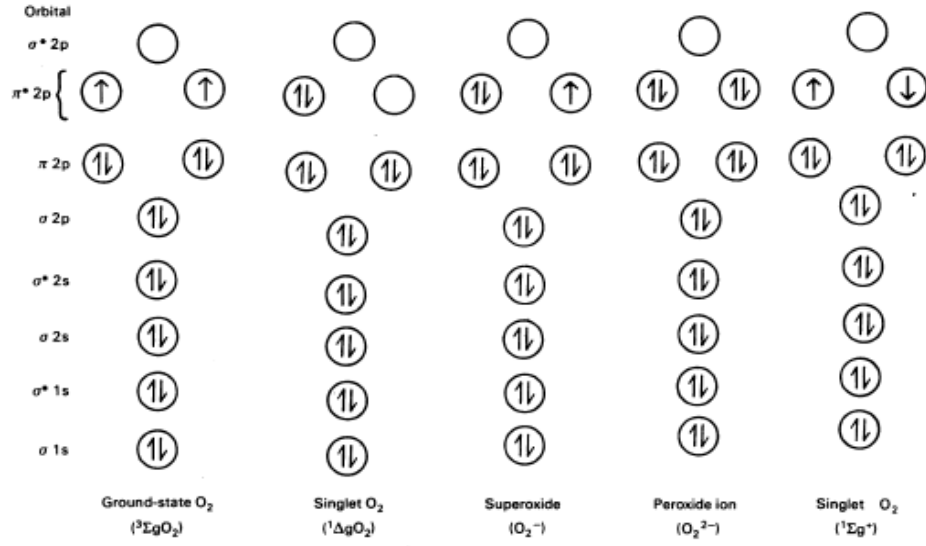
Reaktif oksijen türleri	
Süperoksit radikali	$O_2^{\cdot-}$
Hidroksil radikali	$\cdot OH$
Peroksil radikali	$ROO\cdot$
Hidrojen peroksit	H_2O_2
Singlet oksijen	1O_2
Nitrik oksit	$NO\cdot$
Peroksinitrit	$ONOO^-$
Hipoklorik asit	$HOCl$

Oksijen toksik bir maddedir. Oksijenin zararlı etkilerini bakteri, protozaa, mantar, insan lenfositleri ve tüm hayvanlarda görmek mümkündür (11, 26).

Oksijenin elektronik konfigürasyonunda iki elektronun eşleşmediği görülmektedir. Bu yüzden oksijen bazen bir “diradikal” olarak da değerlendirilir. Oksijenin bu özelliği onun diğer serbest radikallerle kolayca reaksiyona girmesini sağlar. Radikal olmayan maddelerle ise daha yavaş reaksiyona girer. Oksijen en son suya indirgenir (11).



Şekil 1: Moleküler oksijenin suya indirgenmesi (27)

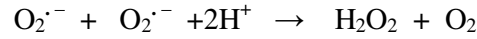


Şekil 2: Oksijen radikallerinin orbital şeması (28)

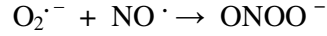
2.1.1. Süperoksit Radikali ($O_2^{\cdot-}$)

Süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$), temel durumdaki oksijen molekülünün bir elektron alarak indirgenmesi sonucu oluşur. En önemli kaynağı mitokondri ve endoplazmik retikulumdaki elektron transport zincir reaksiyonudur (29). Süperoksit radikalının yarı ömrü $\cdot OH$ radikalinden daha uzundur ve moleküllerle daha uzun süre etkileşir.

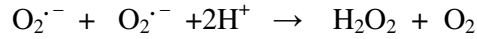
$O_2^{\cdot-}$ radikali tarafından başlatılan reaksiyonlar $OH^{\cdot}$ ve peroksil radikallerini oluşturabilir. Asidik bir ortamda bu süperoksit radikalleri hidrojen peroksit'i oluştururlar.



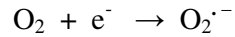
Süperoksit radikali, fizyolojik bir serbest radikal olan nitrik oksit ile reaksiyona girerek reaktif oksijen türevi olan peroksinitriti meydana getirir. Bu türevin doğrudan proteinlere zararlı etkileri olduğu gibi ayrıca bazı nitrat türevi ve hidroksil radikali gibi toksik ürünlere de dönüşebilir (30).



Nötral ve alkali ortamlarda süperoksit dismutasyonu Süperoksit Dismutaz (SOD) enzimi ile katalizlenir (31).



Süperoksit radikali tüm aerobik hücrelerde oluşur. Serbest radikallerin ana biyolojik oluşum yolağı mitokondri membranındaki elektron transferidir. Elektronların mitokondrial elektron transport zincirinden kaçıp moleküler oksijenle direkt olarak reaksiyona girmesi süperoksit radikalini oluşturur (11,32).



Mitokondrideki enerji metabolizması sırasında oksijen kullanılırken, tüketilen oksijenin %1-5 kadarı süperoksit yapımı ile sonlanır. Buradaki radikal yapımının nedeni NADH dehidrogenaz ve koenzim Q gibi elektron taşıyıcılardan oksijene elektron kaçağının olmasıdır (33).

Süperoksit radikalleri, ksantin oksidaz enzimi gibi sitoplazmik kaynaklarla da üretilir. Ksantin oksidaz, ürik asit ve $O_2^{\cdot -}$ radikali üreterek oksijenle hipoksantin reaksiyonunu katalizler (34).

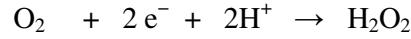
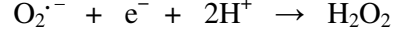
Nötrofiller fagositoz esnasında, membran ve sitoplazmalarında bulundurdıkları NADPH oksidaz ve myeloperoksidaz enzimleri ile hem serbest oksijen radikalleri hem de aşırı okside edici HOCl gibi ajanları üreterek karşılaştıkları virüs, bakteri, mantar gibi ajan patojenleri yok ederler. Solunum patlaması adı verilen bu işlemler esnasında hem ana hem de ara ürün olarak çok fazla ROT oluşur. Antibakteriyel etki için gerekli olan bu radikal yapımı, daha reaktif türlerin oluşumunu da başlatır (35).

Başta çeşitli dehidrogenazlar ve oksidazlar olmak üzere, birçok enzimin katalitik etkisi sırasında süperoksit radikali ürün olarak oluşabilir. Bunlara örnek olarak aldehit oksidaz, flavin dehidrogenaz, siklooksijenaz, NADPH oksidaz ve sitokrom P450 oksidaz sistemlerini verebiliriz.

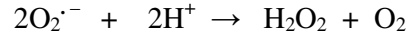
Bunların dışında ayrıca bazı küçük moleküllerin otooksidasyonu (katekolaminler, flavinler ve hidrokinonlar) ve mikrozomal elektronlar ve çekirdek membranı için taşıyıcı sistemler süperoksit oluşumuna katkıda bulunurlar (36).

2.1.2. Hidrojen Peroksit (H₂O₂)

Moleküler oksijenin, iki elektron alması veya süperoksidin bir elektron alması sonucu peroksit oluşur. Peroksit molekülü iki hidrojen atomu ile birleşerek hidrojen peroksit (H₂O₂) meydana getirir. H₂O₂, membranlardan kolayca geçebilen, uzun ömürlü bir oksidandır.

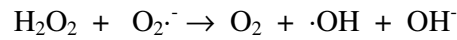


Biyolojik sistemlerde H₂O₂'in asıl üretimi süperoksit'in dismutasyonu ile olur. İki O₂^{·-} molekülü iki proton alarak H₂O₂ ve moleküler oksijeni oluştururlar.

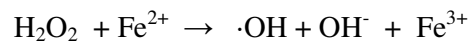


Dismutasyon reaksiyonu ya kendiliğinden ya da SOD enzimi tarafından katalizlenir. Hidrojen peroksit özellikle proteinlerdeki hem grubunda bulunan demir ile tepkimeye girerek yüksek oksidasyon düzeyine sahip reaktif demir formlarını oluşturur. Bu formdaki demir çok güçlü oksitleyici özelliklere sahip olup, hücre zarlarında lipid peroksidasyonu gibi radikal tepkimeleri başlatabilir (11, 37).

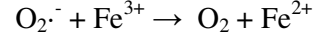
H₂O₂ bir serbest radikal olmadığı halde, reaktif oksijen türleri içine girer. Çünkü süperoksit ile reaksiyona girerek, en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikalini oluşturmak üzere kolaylıkla yıkılabilir. Bu reaksiyona Haber-Weiss reaksiyonu adı verilir (38).



Yüz yıl kadar önce ise Henry Fenton, hidrojen peroksitin ferröz demir (Fe²⁺) ile bazı organik bileşenleri okside edebildiğini bulmuştur. Demirle katalizlenen bu ikinci mekanizma daha hızlıdır.



Bu reaksiyonda önce ferri demir (Fe^{3+}) süperoksit tarafından ferro demire (Fe^{2+}) indirgenir.



Sonra bu ferro demir kullanılarak “Fenton reaksiyonu” ile hidrojen peroksitten $\cdot\text{OH}$ ve OH^- üretilir (39, 40).

2.1.3. Hidroksil Radikali ($\cdot\text{OH}$)

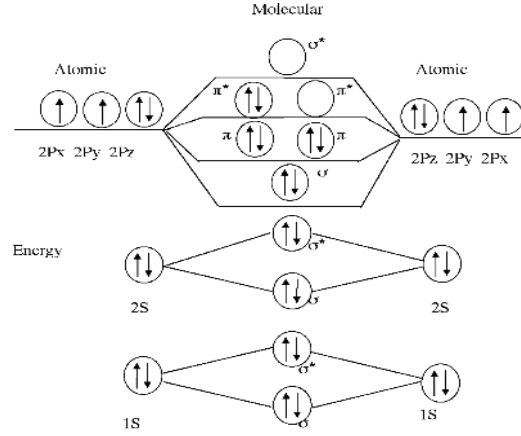
Biyolojik ve kimyasal sistemlerde üretilen hidroksil radikali ($\cdot\text{OH}$) canlılarda iki mekanizma ile oluşabilir. Birincisi suyun yüksek enerjili iyonize edici radyasyonun etkisi sonucu, ikincisi hidrojen peroksidin geçiş metallerinin varlığında indirgenmesiyle (Fenton reaksiyonu) meydana gelir (11).

1. $\text{H}-\text{O}-\text{H} \rightarrow \text{H}^{\cdot} + \text{OH}^{\cdot}$
2. $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \cdot\text{OH} + \text{OH}^- + \text{Fe}^{3+}$

Hidroksil radikali tüm biyomoleküllerle reaksiyona girebilen çok reaktif bir radikaldir. En çok bilinen hasarı lipid peroksidasyonudur. $\cdot\text{OH}$ radikali biyomembranlardaki çoklu doymamış yağ asitlerinin metilen grubundan bir hidrojen atomu kopmasına ve lipid peroksidasyonunun başlamasına neden olur (41,37).

2.1.4. Singlet Oksijen ($^1\text{O}_2$)

Singlet oksijen ($^1\text{O}_2$), radikal olmayan bir reaktif oksijen türüdür. Oksijenin elektronlarından birinin enerji alarak kendi spinine ters yöndeki spinle aynı orbitalde ya da başka bir orbitalde lokalize olmasıyla oluşur. Singlet oksijen kimyasal, enzimatik ve fotokimyasal yollarla üretilebilir (42).



Şekil 3: Singlet oksijenin moleküler orbital şeması (42)

Singlet oksijenin delta ve sigma olmak üzere iki şekli vardır. Delta formu zıt spinli elektronların aynı orbitalde bulunduğu, sigma formu ise ayrı ayrı orbitallerde bulunduğu şekildir. Her iki formun reaktivitesi çok yüksektir.

Singlet oksijen aldığı enerjiyi çevreye dalga enerjisi şeklinde verip oksijene geri dönebildiğinden, oluşumu kemilüminesans ölçümü ile izlenebilir (33).

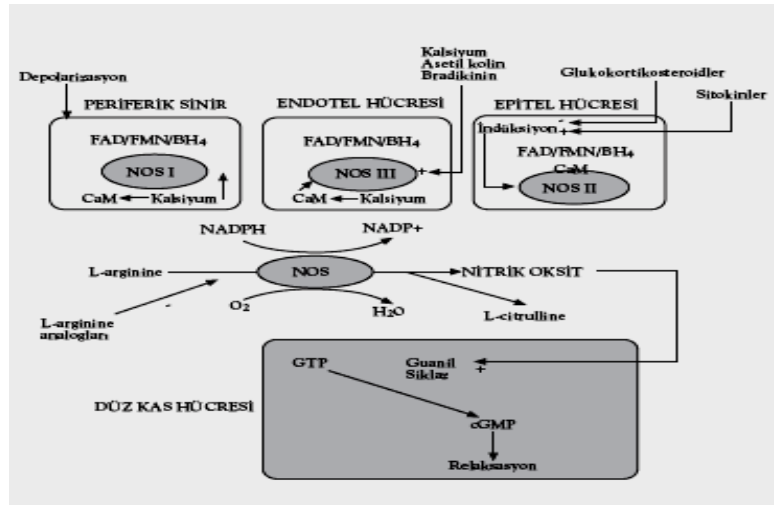
Fotosensitizasyon reaksiyonu ile klorofil, retinal, flavin ve porfirin gibi biyolojik pigmentler yoğun bir şekilde ışığa maruz kaldıklarında singlet oksijen üretebilir (28).

2.1.5. Nitrik Oksit (NO)

Nitrik oksit (NO), gaz yapısında ve radikal özelliğinde bir moleküldür. Çok kısa yarılanma ömrüne sahiptir. Nitrik oksit, lipofilik olduğundan dolayı membranları kolayca geçebilme özelliği vardır (43). Ayrıca NO, immunomodülatör, vazodilatör ve nörotransmitter bir moleküldür (44). Organizmada peroksit anyonu ve hidroksil radikali gibi çok etkin radikallerin üretilmesine neden olur. Bu radikaller dokulara zarar verebilir, kalpte kontraktıl fonksiyonu bozabilir, çeşitli iyon pompalarını etkisiz kılarak iletim bozukluklarına yol açabilir. Öte yandan NO'nin doğrudan doğruya mitokondriyal solunum zincirini inhibe ettiği bilinmektedir (43).

Nitrik oksit, endotel hücreleri, nötrofiller, aktive olmuş makrofajlar ve diğer hücre tiplerinin uyarılmasıyla L-arjininden üretilir (45). Nitrik oksit sentaz enziminin katalizlediği bir dizi reaksiyon sonucunda L-arjinin, oksijen varlığında L-sitrullin ve NO'ya dönüşür (şekil 4). Bu reaksiyon için ortamda oksijenin yanı sıra Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH), Flavin adenin dinükleotid (FAD) gibi bazı kofaktörlerin de bulunması gerekir (46).

Nitrik oksit sentezleyen enzimin 3 izoformu vardır. Bu izoenzimler endotelial NOS (eNOS), nöral NOS (nNOS), indüklenebilen NOS (iNOS) tur. nNOS ve eNOS sürekli, ancak az miktarda ve kalsiyuma bağımlı olarak salınır. Solunum yolu epiteline ve çeşitli diğer hücrelerde NOS II ya da iNOS bulunur, kalsiyuma bağılı değildir. Özgül sitokinlerin indüklemesi sonrasında fazla miktarda salgılanır (47,48).



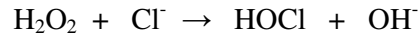
Şekil 4: Nitrik oksit kaynakları ve oluşumu (46)

Nitrik oksit sentezlendikten sonra hızla hedef dokulara yayılarak hücre içinde guanilat siklaz enzimini aktive ederek siklik guanozin monofosfat (cGMP) miktarını artırır ve bu durum, düz kaslarda gevşemeyle sonuçlanır (43).

Nitrik oksit çok kısa yarılanma ömrüne sahip olduğundan hızlı okside olarak nitrit (NO₂) ve nitrata (NO₃) dönüşür. İnsan vücudunda NO, hemoglobine bağlandığında inaktive olur (45).

2.1.6. Hipokloröz Asit (HOCl)

Solunum patlaması sırasında oluşan süperoksit moleküllerinden, spontan dismutasyon reaksiyonu sonucu hidrojen peroksit (H₂O₂) oluşur. Nötrofil lökositlerin primer granüllerinden degranülasyon ile fagozom içine bırakılan myeloperoksidaz (MPO) enzimi, H₂O₂ ve Cl kullanarak hipokloröz asit (HOCl) oluşturur. HOCl, lökositlerde üretilen ve mikrobisid etkiye sahip en önemli oksidandır (35,49). HOCl, nötrofil sitoplazmasında en çok bulunan serbest amino asit olan taurinle reaksiyona girerek HOCl'den daha az reaktif ve daha az toksik olan uzun ömürlü bir bileşik olan taurin monokloramini oluşturur. Taurin monokloramin nötrofillerde üretilen çok sayıda proinflatuar bileşiğin miktarını azaltır (50).



2.2. Serbest Radikallerin Biyomoleküllere Etkisi

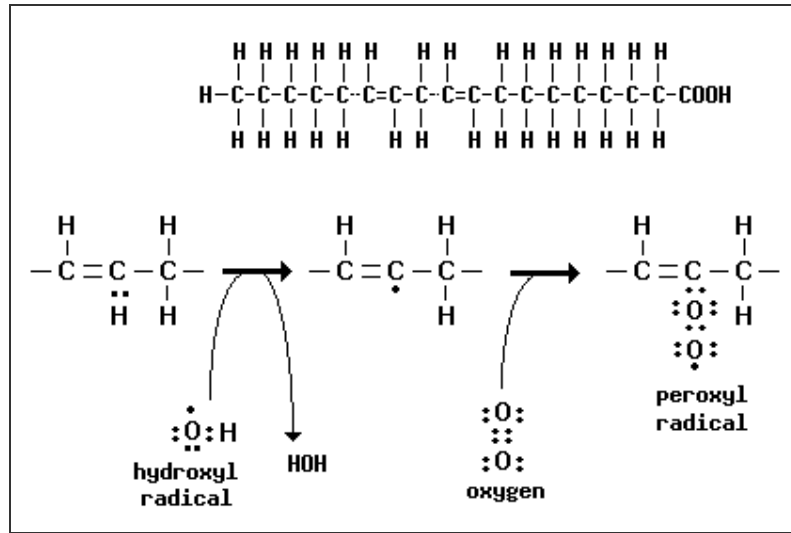
2.2.1. Lipidler Üzerine Etkileri

Lipidler genellikle ya membran lipidleri ve adipositlerde triasilgliserol damlacıkları olarak bulunurlar yada lipoprotein partikülleri olarak proteinlerle birlikte plazmada taşınırlar. Biyolojik membranların yapısını oluşturarak yapının bütünlüğünü korurlar (51).

Lipid peroksidasyonu, serbest radikal kaynaklı doku hasarının en önemli sonuçlarından biridir. Çoğunlukla membran fosfolipidlerinde oluşan yağ açıl gruplarının peroksidasyonu üç fazdan oluşur: Başlangıç, İlerleme ve Sonlanma basamaklarıdır (52,53).

Lipid peroksidasyonunun iki yaygın sonucu vardır. Birincisi membranların yapısal hasarı, ikincisi ise sekonder ürünlerin oluşmasıdır. Membran hasarı, endosiklizasyon, lipid-protein çapraz bağları, lipid-lipid çapraz bağları ve fragmente yağ açil zincirlerinin oluşumu sonucu meydana gelir.

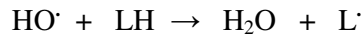
Lipid peroksidasyonunun ikincil ürünleri malondialdehit (MDA), akrolein, 4-hidroksi-2-hekzenal (HHE) ve 4-hidroksi-2-nonenal (HNE) gibi kimyasal olarak reaktif aldehytlerdir (52).



Şekil 5: Peroksil radikalının oluşumu (54)

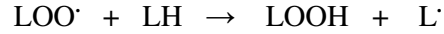
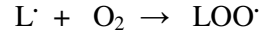
Lipid peroksidasyonu, poliansatüre yağ asitlerinin zincirleme bir radikal reaksiyonudur ve üç aşamada olur:

1) Başlatma: Hidroksil radikali, bir yağ asidinin metilen kısmından bir hidrojen atomu kopararak bir lipid radikali oluşturur.



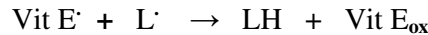
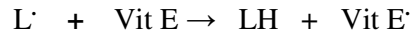
Bu reaksiyon hem membran lipidleri hem besinsel yağlar için geçerlidir. Buna göre, gıdaların korunması için iyonizan radyasyonun kullanılması sakıncalıdır.

2) İlerleme: Zincirleme reaksiyon, oluşan lipid radikaline O₂ ilavesi ile devam eder ve lipid peroksil radikali (LOO[•]) ile lipid peroksit (LOOH) oluşur.



3) Sonlanma: Tek elektron üzerinden yeniden yapılanma lipidin parçalanması ile sonuçlanır (55,28). Burada oluşan ürünlerden birisi, malondialdehit (MDA), çözünürdür ve kan ile idrarda saptanabilir. Üç ya da daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonunda meydana gelir. Oluşan MDA, hücre membranlarından iyon alışverişine etki ederek membrandaki bileşiklerin çapraz bağlanmasına yol açar ve iyon geçirgenliğinin ve enzim aktivitesinin değişimi gibi olumsuz sonuçlara neden olur. MDA bu özelliği nedeniyle, DNA'nın nitrojen bazları ile reaksiyona girebilir ve bundan dolayı mutajenik, hücre kültürleri için genotoksik ve karsinojeniktir. Oluşan diğer ürünler ise, 4-hidroksinonenal, 4-hidroksi-2,3-transnonenaldır (56,57).

Zincir reaksiyonu, zincir kırıcı antioksidanlar (vitamin E vs.) tarafından sonlandırılabilir (58).



2.2.2. Proteinler Üzerine Etkileri

Reaktif türevler tarafından proteinlerin oksidatif modifikasyonu, bir dizi bozukluk ve hastalığın etiolojisi ile ilerlemesinde rol oynar (59,37). Bu hastalıklar arasında başlıcaları; Alzheimer, amiyotrofik lateral skleroz, katarakt oluşumu, kronik böbrek yetmezliği, kistik fibrozis, diyabet, iskemi ve reperfüzyon hasarı, Parkinson, romatoid artrit ve sepsis olarak sayılabilir (60).

Proteinlerde yapısal değişikliğe yol açan başlıca moleküler mekanizmalar protein karbonil (PCO) türevlerinin oluşumu ile karakterize edilen metal iyon katalizli protein oksidasyonu, protein tiyol gruplarının kaybı, nitrotirozin (NT), radyasyon aracılı oksidasyon ve ileri protein oksidasyon ürünlerinin (AOPP) oluşumu olarak sıralanabilir (61).

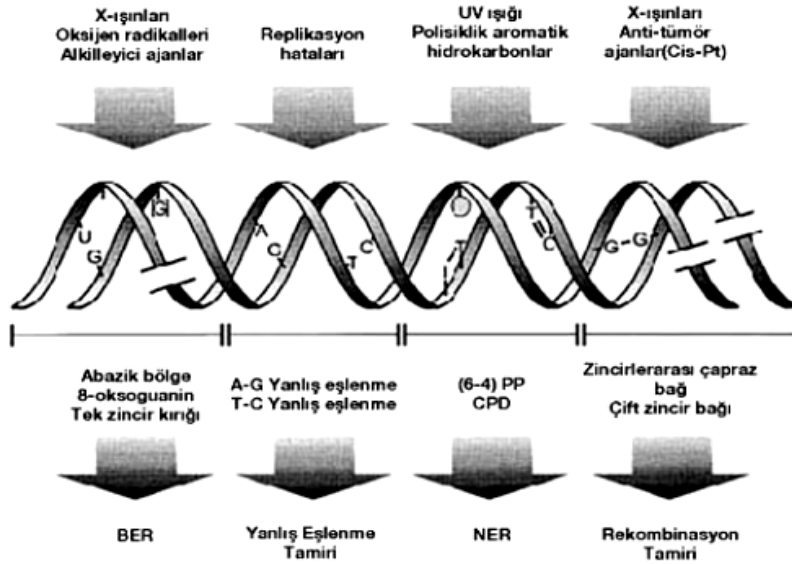
Protein oksidasyonu esas olarak hidroksil radikali (OH) ile başlar. Diğer taraftan oksidasyon sürecinde oksijen (O₂) ile birlikte, süperoksit anyon radikali (O₂⁻) ve hidroperoksil (HO₂⁻) radikali de rol oynar. Bu reaktif oksijen türevleri amino asitlerin yan zincirlerinin oksidasyonuna, protein-protein çapraz bağlarının oluşumuna ve peptit omurgasının oksidasyonu ile protein fragmentasyonuna neden olur (62,63).

Reaktif oksijen türevlerinin proteinlerle etkileşimi sonucunda histidin, prolin, arjinin ve lizin gibi çok sayıda mevcut amino asitlerde ve/veya peptit omurgasında meydana gelen oksidatif hasar sonucunda protein karbonil ürünleri meydana gelir. PCO düzeylerinin saptanması protein oksidasyonunu belirlemede genel olarak kabul görmüş bir yöntemdir (59,60,63). PCO oluşumuna yol açan sekonder modifikasyon reaksiyonları; proteinlerin karbonhidrat ve lipid oksidasyon ürünleri ile reaksiyonlarını içermektedir (62,63).

2.2.3. Nükleik Asitler Üzerine Etkileri

Oksidatif koşullara maruz kalan DNA molekülleri hasara uğrar. Genomik DNA'nın bütünlüğü, farklı DNA hasarlarına neden olan ultraviyole, X-ışınları, kimyasal bileşikler gibi çevresel ajanlar ile sürekli tehdit altındadır. Hücre metabolizmanın yan ürünü olarak üretilen serbest radikaller gibi endojen ajanlar da DNA hasarına neden olmaktadır (64). Hücre tüm bu DNA hasarlarına farklı metabolik yollar ile cevap verir. Canlı organizmalar genetik materyalin bütünlüğünü korumak için nükleotid eksizyon tamiri (NER) ve baz eksizyon tamiri (BER) gibi çeşitli DNA tamir mekanizmalarına sahiptir (şekil 6). DNA hasarı ve onarımı arasındaki denge nedeniyle, çok düşük düzeylerde hasar sağlıklı bireylerde de saptanmaktadır (65,64).

Ağır DNA hasarları hücrenin apoptozis yolunu aktive ederek hücreyi ölüme götürür. DNA hasarı replikasyon sırasında tamir edilemezse mutasyona ve sonuç olarak genomik kararsızlığa neden olur. DNA’da gerçekleşen genomik kararsızlık, hem kanserin hem de yaşlanmanın önemli nedenlerindendir (66).



Şekil 6: DNA’da hasar oluşturan ajanlar ve tamir mekanizmaları (64)

Oksidatif hasara bağlı olarak DNA’da, tek ve çift dal kırıkları, abazik alanlar, baz modifikasyonları (baz katılımı, bazlarda yeniden düzenlenme), şeker hasarı meydana gelebilir veya DNA ile protein arasında çapraz bağlanma olabilir (67).

DNA’da oluşan oksidatif hasar, mutasyonların, kanserin ve yaşlanmanın göstergesidir (68,69). 8-hydroxy-2’-deoxyguanosine, reaktif oksijen türlerinin, DNA’da yaptığı oksidatif baz hasar ürünlerinden biridir. Modifiye bir baz olan 8-hidroksi-2’-deoxyguanosine, guanin’in 8. karbon atomuna hidroksil radikali atakları sonucu oluşur ve oksidatif DNA hasarının göstergesidir. GC=AT dönüşümüne neden olup premutajenik özellik göstererek mutasyonlara ve kanser gelişimine sebep olabilir (68, 70).

2.2.4. Karbonhidratlar Üzerine Etkileri

Basit monosakkaritler fizyolojik koşullarda hızlı bir şekilde otooksidasyona maruz kalarak dikarbonil ve H_2O_2 oluştururlar. Okside glukoz, glikozidasyon veya glikasyon olarak adlandırılan prosesde proteinlerle reaksiyona girebilir (71).

2.3. Serbest Radikallere Karşı Antioksidan Savunma Sistemleri

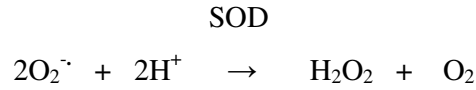
Tablo 2. Enzimatik ve non-enzimatik antioksidan sistemleri

ENZİMATİK ANTİOKSİDANLAR	NON-ENZİMATİK ANTOKSİDANLAR
Süperoksit Dismutaz (SOD)	Vitamin C, Vitamin E, Vitamin A
Katalaz (CAT)	Melatonin
Glutasyon Peroksidaz (GPx) (Selenyum bağımlı)	Glutasyon
Glutasyon-S-Transferaz (GST)	Flavanoidler
Glutasyon Redüktaz (GR)	Ürik asit
Mitokondriyal sitokrom oksidaz	Albumin
	Bilirubin vs.

2.3.1. Enzimatik Antioksidan Sistemler

2.3.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD: EC 1.15.1.1)

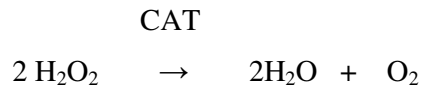
1969 yılında McCord ve Fridovich tarafından eritrositlerden basit bir işlemle elde edilen SOD'un süperoksit radikallerinin dismutasyonunu katalizleyen bir enzim olduğu bildirilmiştir. SOD enzimi süperoksit radikallerini hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüştüren reaksiyonu katalizler. Bu reaksiyon oksidatif strese karşı ilk savunma olarak adlandırılır. Çünkü, süperoksit zincirleme radikal reaksiyonlarının güçlü bir başlatıcısıdır (72,73).



İnsanlarda SOD enzimi Cu/Zn- SOD, Mn-SOD ve EC-SOD (ekstrasellüler SOD) olmak üzere üç şekilde bulunur (74, 75). Cu/Zn- SOD; dimerik yapıya sahiptir. Her bir monomerde bir bakır birde çinko bulunur ve disülfid bağlarıyla bağlanmışlardır. Sitozolde bulunur. Mn-SOD; çoğunlukla mitokondri matriksinde lokalize olmuştur. Mitokondrial SOD' un kofaktörü olan mangan tetramerik bir yapıya sahiptir. Her bir dimerik yapı Mn^{+3} atomu içerir (11,37). EC-SOD, ekstrasellüler sıvıda bulunur, tetramerik ve glikozil yapıdadır (76). Bunların dışında ökaryotlarda bulunmayıp prokaryotlarda bulunan Fe-SOD mevcuttur. Tetramerik ve dimerik yapılarına rastlanmakla birlikte Fe^{+3} atomu içerir (11,37).

2.3.1.2. Katalaz (CAT: EC 1.11.1.6)

Katalaz esas olarak peroksizomlarda lokalize olmuş ve yapısında 4 “hem” grubu bulunan bir hemoproteindir. Karaciğer ve eritrositlerde en yüksek aktiviteye sahiptir. Katalaz, hidrojen peroksiti, su ve moleküler oksijene parçalar.

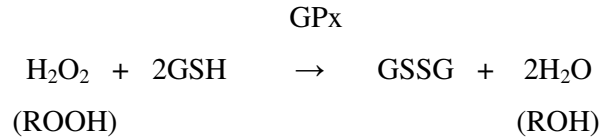


Hidrojen peroksidin yanı sıra metil-, etil-hidroperoksitler gibi küçük moleküllü lipid hidroperoksitlere de etkir (36,11).

2.3.1.3. Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px: EC 1.11.1.9)

GSH-Px, sitozolde ve memeli hücrelerinin mitokondrial matriksinde de bulunan tetramerik (88 000 dalton molekül ağırlığında) bir selenoenzimdir. GSH-Px dokuları oksidatif hasara karşı koruyan enzimlerden biridir. Hidrojen peroksiti indirgeyen tepkimeyi, çok çeşitli organik hidroperoksitleri, su ve uygun alkollere indirgeyen tepkimeleri katalizler (77).

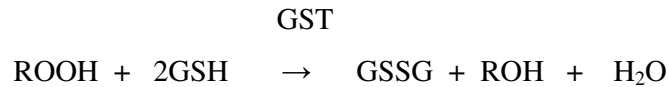
GSH-Px, karaciğer, akciğer, böbrek, testis, dalak, kalp kası, eritrosit, beyin ve timusda saptanmıştır (78).



2.3.1.4. Glutatyon-S-Transferaz (GST; EC, 2.5.1.18)

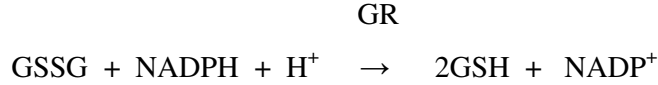
GST, genotoksik ve sitotoksik etki gösteren elektrofiller, karsinojenler ve diğer ksenobiotiklerin indirgenmiş glutatyonla konjugasyonunu katalizleyen faz II savunma enzimidir. Memelilerde sekiz alt sınıfı (alfa, mu, pi, teta, omega, zeta, sigma ve kapa) olan GST dimerik yapıdadır (79).

Başta araşidonik asit ve lineolat hidroperoksitleri olmak üzere lipid hidroperoksitlerine karşı GST'lar Se-bağımsız GSH peroksidaz aktivitesi göstererek bir defans mekanizması oluştururlar (11).



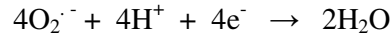
2.3.1.5. Glutasyon Redüktaz (GR; EC, 1.6.4.2)

GR, glutasyon disülfitin redükte glutatyona indirgenmesini katalizleyen bir flavoproteindir. Reaksiyon NADPH'a bağlı olarak yürümektedir (80).



2.3.1.6. Mitokondriyal Sitokrom Oksidaz:

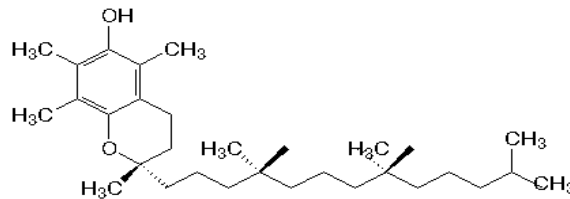
Solunum zincirinin son enzimi olan sitokrom oksidaz, aşağıdaki reaksiyonla süperoksidi detoksifiye eden enzimdir (11).



2.3.2. Enzimatik Olmayan Antioksidan Sistemler

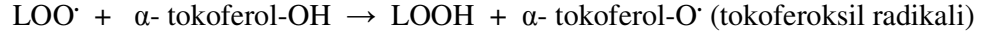
E Vitamini (Tokoferoller): Yağda eriyen vitaminlerden olan vitamin E, biyolojik sistemlerde önemli bir antioksidandır (81). E Vitamini serbest radikal temizleyicisi olarak fonksiyon gösterir ve membranlarda lipid peroksidasyonunu inhibe eder. Bu antioksidan vitamin, prostasiklin oluşumunu artırır ve tromboksan üretimini azaltır (82).

E vitamininin, kromanol halkasına bağlı metil gruplarının sayısı ve konumuna göre biyoaktiviteleri birbirinden değişik olmak üzere α , β , γ ve δ olmak üzere 4 farklı izomeri bulunmaktadır. Antioksidan etkisi en fazla olan α - tokoferoldür. Bu nedenle α - tokoferol terimi Vitamin E ile eş anlamda kullanılmaktadır (83).

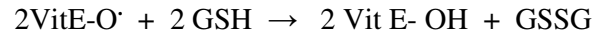
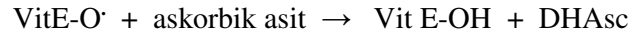


Şekil 7: α -tokoferol'ün yapısı (84)

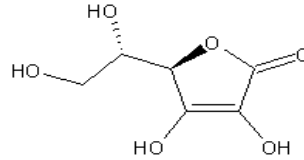
Vit E' nin konsantrasyonu membrandan zengin hücre kısımlarında fazladır. Çok güçlü bir antioksidan olan E vitamini hücre membran fosfolipidlerinde bulunan çoklu doymamış yağ asitlerini serbest radikal etkilerinden koruyucu etki gösteren savunma elemanıdır (81).



Oluşan tokoferoksil radikalleri, ortamdaki askorbik asit ve glutatyon gibi redüktif ajanlar ile tekrar vitamin E molekülüne redüklenir (58).



C Vitamini (Askorbik asit): Askorbik asit, suda çözünen ve antioksidan etkisi yüksek olan insanlar için önemli bir vitamindir. Pek çok hayvan türü askorbik asidi sentez edebiliyor iken insanlar sentez edemezler. Bu yüzden dışardan almaları gerekmektedir. Askorbik asit özellikle meyve ve sebzelerde bulunur.



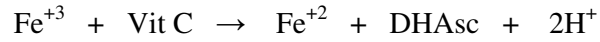
Şekil 8: Askorbik asit'in yapısı (85)

C vitamini eksikliğinde kapiler duvarların geçirgenliği arttığı için deride kanamalar meydana gelir. C vitamini eksikliği devam ederse "Skorbüt" adı verilen bir hastalık meydana gelir (86).

Askorbik asitin kollajen yapısında yer alan prolin ve hidroksi prolinin hidroksilasyonunda ve öteki hidroksilasyon reaksiyonlarında rol oynadığı bilinmektedir (87).

Çok güçlü indirgeyici ajan olan askorbik asit süperoksit ve hidroksil radikalleri ile kolayca reaksiyona girerek onları temizler (88).

Herhangi bir oksidanla karşılaştığında hidrojeni indirgeyerek dehidro askorbata dönüşür (55).



A Vitamini (Karotenoidler): A vitamininin metabolik ön maddesi olan β -karoten son derece güçlü singlet oksijen temizleyicisi olup ayrıca hidroksil, peroksil ve alkoksil radikalleriyle de doğrudan reaksiyon verip lipid peroksidasyonu zincir reaksiyonunu önleyebilir (11,89).

Melatonin: Pineal bezden salgılanan indolamin yapısında bir hormon olan melatonin $\text{OH}^{\cdot}$ radikalini temizleyen çok güçlü bir antioksidandır. $\text{OH}^{\cdot}$ ile reaksiyona girdikten sonra bir indolil katyon radikaline dönüşür. Bu da ortamdaki süperoksit radikalini tutarak antioksidan aktivite gösterir (9).

Glutasyon (GSH): Glutamik asit, sistein ve glisin amino asitlerinden meydana gelmiş bir tripeptittir. GSH'a antioksidan özelliğini sisteinin tiyol grubu kazandırır. Glutasyon, $\text{OH}^{\cdot}$ ve singlet O_2 gibi ROT'lerinin temizleyicisidir. Serbest radikal ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı korur (13).

Flavanoidler: Fenolik yapısında olan flavanoidler, lipid peroksidasyonunu engellerler (11,90).

Ürik Asit: Pürin metabolizmasının son ürünü olan ürik asit normal plazma konsantrasyonlarında lipid radikalleri dışında tüm serbest radikalleri temizler. Tükürükte de bulunuyor olması oral mukozanın korunmasında önemli rol oynadığını düşündürmektedir (11,36).

Albumin: Albumin yapısında bulunan çok sayıdaki sülfidril grubu aracılığıyla bakır iyonlarını sıkı olarak bağlar ve bakır bağımlı lipid peroksidasyonu ile OH⁻ oluşumunu inhibe eder (91).

Bilirubin: “Hem” katabolizmasının sonucunda oluşan safra pigmenti bilirubinin lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği ve OH⁻ ve H₂O₂ radikallerinin temizleyicisi olduğu bilinmektedir (92).

2.4. Yaşlanma ve Oksidatif Stres

Yaşlanma, ölüm riskini arttıran değişimlerin birikimidir. Yaşlanmayla ilgili olarak öne sürülen teorilerden biri serbest radikal teorisidir. Bu teori, 1954 yılında Denham Harman tarafından ortaya atılmıştır. Harman, serbest radikal reaksiyonlarının yaşlanmaya sebep olduğunu ileri sürmüştür. Serbest radikal reaksiyonlarının oluşturduğu ve kümülatif olarak artan oksidatif hasar, memelilerde yaşa bağlı fonksiyonel ve patolojik bozukluklara neden olmaktadır. Serbest radikal reaksiyonları, yaşlanma değişikliklerini oluşturduğu gibi genetik defektlerle, çevresel faktörlerle ve hastalıklarla da ilişkilidir (93,24).

Organizmada prooksidan-antioksidan dengenin oksidanlar lehine bozulmasından dolayı nükleik asitler, lipidler, proteinler ve karbonhidratlar gibi önemli biyomoleküllerde oksidatif hasar oluşmaktadır. Oksidatif hasarı oluşturan serbest radikaller ortaklanmamış elektrona sahip çok reaktif atomlardır. Aerobik organizmalarda, biyolojik sistemlere en çok zararı veren radikaller oksijen radikalleridir. ROT oluşumunun en önemli kaynağı mitokondrideki oksidatif fosforilasyon zincirinde gerçekleşen elektron transportudur. Bu nedenden dolayı mitokondrinin yaşlanma prosesinde çok önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir (94).

Özellikle kalp gibi yoğun enerji metabolizmasına sahip ve büyük oranda yağ asidi oksidasyonunun gerçekleştiği organlarda mitokondriyal oksidatif hasar çok daha dikkat çekici olmaktadır. Yaşa bağlı oksidatif hasar birikimi, hücrenin prolifer olma yeteneğini kaybetmesine ve apoptozise yönelmesine neden olur. Teorik olarak kalp kasının mevcut metabolik aktiviteyle oluşan oksidatif hasarlar sonucu maksimum 129

yıl çalışabileceği hesap edilmiştir. Bu bulgu hücre ve doku düzeyindeki yaşlanmada oksidatif hasarın ne kadar belirleyici olduğunu göstermektedir.

Uzun yaşayan hayvan türleri kısa yaşayan hayvan türlerine göre kıyaslandığında uzun yaşayan hayvanların daha etkili antioksidan sistemlere ve daha yüksek karaciğer Cu, Zn-SOD aktivitesine sahip oldukları görülmüştür (95).

Denham Harman yaşlanma teorisinde, yaşam süresinin uzatılmasının serbest radikal reaksiyonlarının başlama hızının yavaşlatılması veya serbest radikal zincir uzunluklarının azaltılması, kolay okside olabilen bileşiklerin diyetle alınımının azaltılması, kalori kısıtlaması ve vücut yüzey ısının düşürülmesi ile sağlanabileceğini ileri sürmektedir (96).

2.5. Radyasyon

2.5.1. Radyoaktivite ve yarı ömür

Maddenin temel yapısını atomlar meydana getirir. Atom ise, proton ve nötronlardan oluşan bir çekirdek ile bunun çevresinde dönmekte olan elektronlardan oluşmaktadır (97). Atomların özelliklerini, çekirdeklerinin yapısı ve yörünge elektronlarının sayısı ve dizilişleri belirler. Herhangi bir maddenin atom çekirdeğindeki nötronların sayısı, proton sayısına göre oldukça fazla ise bu tür maddeler kararsız bir yapı gösterirler. Bir atom çekirdeğinin kararsız durumdan daha kararlı bir duruma geçerken elektromanyetik dalga veya parçacık şeklinde enerji yaymasına radyasyon (ışınım) denir.

Kararlı hale gelebilmek için parçalanmış bu tür çekirdekler, "**radyoaktif çekirdekler**" olarak adlandırılırlar. Ağır elementlerin çoğu radyoaktif özelliklere sahiptir (98).

Radyoaktif çekirdekler kararlı bir nötron/proton oranına ulaşıncaya kadar, bozunmaya uğrarlar (97). İlk bozunmaya uğrayan radyoaktif çekirdek ana çekirdek, ana

ekirdeğinin radyoaktif bozunmaya uğraması sonucu oluşan çekirdek ise yavru çekirdek adını alır.

Bozunma sürecindeki radyoaktif çekirdekler, alfa (α), beta (β) ve gamma (γ) radyasyonlarından birini veya birkaçını yayınlayarak, rahatlama yolunu seçerler. Bir radyoaktif ana çekirdekten alfa (α), beta (β) ve gamma (γ) bozunmaları sonucu yavru çekirdekler oluşturan seriler, "radyoaktif seriler" olarak tanımlanır. Radyoaktif seriler uranyum, toryum, aktinyum ve neptinyum serisi şeklinde dört gruptan oluşur. Her seri, bozunma zincirini tamamladıktan sonra kararlı bir çekirdek haline dönüşür (98, 1).

Alfa (α) Bozunması: Radyoaktif çekirdeklerin kararlı bir çekirdek yapısına ulaşmak için izlediğı yollardan biri " α -bozunmasıdır." Alfa (α) bozunması, radyoaktif çekirdekten kütle numarası 4 atom numarası 2 olan bir taneciğinin ayrılması sonucu gerçekleşir. Bu yapı bir helyum atomunun çekirdeğinin yapısıdır. Pozitif yüklüdür (4). ekirdeğinin, alfa çıkararak parçalanması olayı atom numarası büyük izotoplarda görülür ve genellikle doğal radyoaktif atomlarda rastlanır (1).

Beta (β) Bozunması: Beta (β) taneciğı aslında çekirdekten yayınlanan yüksek enerjili bir elektrondur. Beta (β) bozunması sürecinde, radyoaktif çekirdekte bulunan bir nötron, bir proton ile bir elektrona dönüşür (4).

Beta (β) tanecikleri, alfa (α) taneciklerinden çok daha küçüktür. Bu nedenle de α taneciğine göre daha etkilidir ve giricilikleri (nüfuz etme özellikleri) de daha fazladır. Beta tanecikleri kağıttan geçerler fakat birkaç metre hava tabakası ve birkaç milimetrelik alüminyum levha bu ışınları durdurur. Beta ışınları, dış derideki ölü seviyeye nüfus eder, derinin iç kısmında durduğu için dış derideki dokulara yakarak zarar verir.

Gamma (γ) Bozunması: Gamma (γ) ışınları tanecik değildir. Bunlar kısa dalga boylu ve yüksek enerjili (x- ışınları benzeri) ışınlardır. Gamma ışıması sürdüren bir çekirdekte atom kütle numarası ve atom numarası değışikliğe uğramaz (1).

Yarı-ömür: Bir radyoaktif maddenin başlangıçtaki çekirdeklerinin yarısının bozunması için geçen süreye fiziksel yarı-ömür (T_f), önceden bir canlıya verilmiş radyoaktif maddenin yarısının dışarı atılması için geçen süreye biyolojik yarı-ömür (T_b), adı verilmektedir. Fiziksel ve biyolojik yarı-ömürler dikkate alınarak bulunan yarı-ömre ise efektif yarı-ömür (T_e) denilmektedir. Bu üç yarı-ömür arasında aşağıdaki bağıntı bulunmaktadır:

$$1 / T_e = 1 / T_f + 1 / T_b$$

Radyoaktif bozunma olayının hızı, birim zamanda bozunan çekirdek sayısı ile ifade edilir ve λ ile gösterilir. Buna göre; $T_f = 0,693 / \lambda$ formülü geçerlidir (98,99).

2.5.2. Radyasyon birimleri ve dönüşümleri

Tablo 3. Radyasyon birimleri ve dönüşümleri (99,100)

Terim	SI Birimi	Özel Birim	Dönüşüm
Aktivite	Becquerel (Bq); 1 parçalanma/1 saniye	Curie (Ci)	1Ci=3.7x10 ¹⁰ Bq 1 Ci=37 GBq 1 Bq= 27.03x10 ⁻² Ci
Işınlanma Dozu	Coulomb/kilogram(C/kg); normal hava şartlarında havanın 1 kg'ında 1 Coulomb'luk elektrik yükü değerinde (+) ve (-) iyonlar oluşturan X veya gama radyasyonu miktarıdır.	Röntgen (R)	1C/kg=3876 R 1R=2.58x10 ⁻⁴ C/kg
Soğurulmuş Doz	Gray (Gy) ; Işınlanan maddenin 1 kg'ında 1 Joule'lük enerji soğurulması meydana getiren radyasyon miktarıdır.	Radiation absorbed Dose (Rad)	1Gy=100rad 1rad=0.01 Gy
Doz eşdeğeri	Sievert (Sv) ; 1 Gy'lik X ve gama ışını ile aynı biyolojik etkiyi meydana getiren herhangi bir radyasyon miktarıdır. Sv= (Gy)x (WR)	Röntgen Equivalent Man (Rem)	1Sv=100 rem 1rem=0.01Sv

Lineer Enerji Transferi (LET): İyonize radyasyonların gittikleri yol boyunca birim uzaklık başına neden oldukları enerji salınımlarına lineer enerji transferi (LET) denilir. LET genellikle iyonize radyasyonun yükü ve hızının fonksiyonu olarak da kabul edilir. İyonize radyasyonun yükü artıp, hızı azaldıkça LET'i artar (99, 4).

2.5.3. İyonize Radyasyon

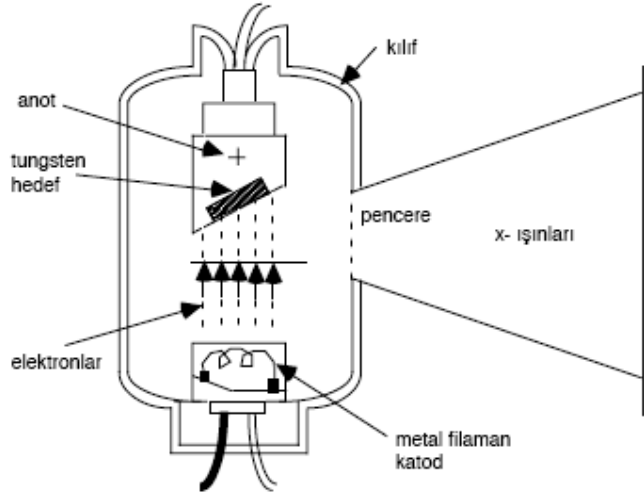
İyonlaştırıcı radyasyon; madde içerisinde geçerken enerjisini ortama aktarmak suretiyle, bir atom veya molekülden bir elektron kopmasını gerçekleştiren radyasyon türüdür (4).

İyonize radyasyon, iki grupta toplanmaktadır. Birinci grup; elektromanyetik radyasyon spektrumunda yer alan, kısa dalga boylu ve yüksek enerjili γ (gama) ve X (röntgen) ışınlarıdır (foton). İkinci grup ise; atom alt parçacıklarından elektron veya β ışını, pozitron, proton, nötron, α ışını ve ağır iyonların, doğal veya yapay radyoaktif elementlerin atom çekirdeğinden fırlatılması veya cihazlarda hızlandırılması ile meydana gelen partiküler radyasyonlardır (101,4).

2.5.3.1. X Işınları

X ışınları 1895 yılında W. Conrad Röntgen (1845-1923) tarafından keşfedilmiştir. Bir dizi çalışmadan sonra Röntgen, X ışınlarının elektriksel yüke sahip olmadığını, fotoğraf kağıdını kararttığını, ince metal levhalardan geçebildiğini ve geçerken yapılarda iyonizasyona sebep olduğunu açıklamıştır. Daha sonra yapılan bilimsel çalışmalar, X ışınlarının foton karakterli ER olduğunu, γ ışınları ile aynı özellikte olduğunu, fakat oluşumlarında bir fark bulunduğunu göstermiştir (102).

X ışınları, röntgen tüpü adı verilen yüksek voltajlı bir katot- ışını tüplerinde elde edilir. Tüp içerisinde ısıtılmış katottan yayılan elektronlar, yüksek voltaj gerilimle hızlandırılarak karşıdaki hedef anoda çarptırılır. Bu çarpışma sonucu elektronlar durdurulurken elektronların kaybettiği enerji X ışınları olarak yayınlanır. Bu olaya Bremsstrahlung (frenleme ışını) olayı, X ışınlarının oluşturduğu sürekli spektruma da Bremsstrahlung adı verilir.



Şekil 9: X ışınlarının üretimi (103)

X ışınları, kısa dalga boylu ve yüksek enerjili ER lar olduğundan geçtikleri dokularda , doku yoğunluğuna bağlı olarak absorblandıklarından ve ekran veya film üzerinde farklı yoğunluklu görüntüler oluşturdıklarından dolayı tıpta tanı amacıyla kullanılmaktadır (102,104).

2.5.3.2. Gama Işınları

Gama ışınları atomun çekirdeğinde oluşur. Çekirdek, alfa veya beta parçacığı çıkarttıktan sonra genellikle kararlı bir durumda olmaz. Kararsızlığa neden olan çekirdek enerjisi bir elektromanyetik radyasyon olarak yayınlanır. Bu sırada çekirdeğin kütlesi ve elektrik yükü değişmez. Gama ışınları, beta ışınlarından daha yüksek enerjili ve dolayısıyla daha girici (nüfuz edici) ışınlardır.

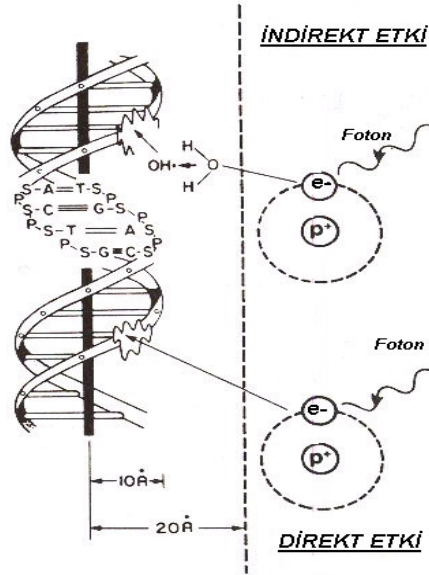
2.5.3.3. Nötronlar

Nötronların yüksüz parçacıklar olmalarından dolayı herhangi bir madde içerisine kolaylıkla nüfuz edebilirler. Doğrudan bir iyonlaşmaya sebep olmayan nötronların, atomlarla etkileşimleri, iyonlaşmaya neden olan alfa, beta, gama veya X ışınlarının ortaya çıkmasına neden olabilir (100).

2.5.4. İyonize Radyasyonun Biyolojik Etkileri

Radyasyon enerjisinin biyolojik materyal tarafından absorpsiyonu doku elektronlarının eksitasyonuna ve bu dokuları oluşturan molekül veya atomların iyonizasyonuna neden olur. Bir atom veya molekülden bir elektronun daha yüksek enerji seviyesine elektron fırlatma olayı olmaksızın geçebilmesi eksitasyon olarak adlandırılır. Bir atom veya molekülden bir veya daha fazla orbital elektronunu fırlatacak kadar enerjiye sahip radyasyon enerjisi iyonize radyasyon, bu prosese de iyonizasyon adı verilir (105).

İyonize radyasyonun enerjisinin absorpsiyonu direkt ve indirekt etki ile moleküllerde zarar meydana getirir. Direkt etkide hasar, biyolojik sistemlerdeki önemli biyomoleküllerin atomlarının iyonizasyonu sonucu ortaya çıkar. Bu molekülün inaktivasyonuna veya fonksiyonel değişikliğine sebep olur. İndirekt etkide ise anahtar moleküllerde toksik hasar oluşturan reaktif serbest radikallerin oluşması biyolojik etkilerin ortaya çıkmasına neden olur (106).

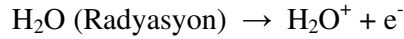


Şekil 10: Radyasyonun direkt ve indirekt etkisi (105)

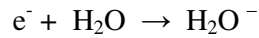
Radyasyon enerjisi, DNA gibi çok önemli bir makromolekülde yapısal değişikliğe neden olmuşsa, bu etkiye radyasyonun direkt etkisi denir (102). Canlılar için hayati önem taşıyan bu molekül bütünüyle harap olursa, bölünme yapamaz ve hücre ölür. Birden fazla hücrede bu durum gerçekleştiğinde, doku ölür (1).

Radyasyonun indirekt etkisi atoma enerji transferi sonucu, serbest radikallerin oluşmasını kapsar. Radikaller elektrofilik ve son derece reaktiftir (2). Radyasyon aracılı oluşan serbest radikaller hücrede yeni reaksiyonlar aracılığı ile daha başka serbest radikal oluşumları, lipid peroksidasyon zincir reaksiyonları ve başta intestinal kanamalar olmak üzere miyokardial iskemi, karsinogenezis, katarakt oluşumu, solunum düzensizliği, DNA zincir kırılması, mutajenik ve karsinojenik etkiler oluşturduğu saptanmıştır (99).

Biyolojik sistemlerdeki temel molekül olan su molekülü, serbest radikallerin oluşması ve çoğalması için bir ortam oluşturur. Işınlamadan sonra radyasyon enerjisinin büyük oranda su molekülleri tarafından soğurulma olasılığı çok yüksektir. Bu durumda su molekülleri iyonlaşırlar ve pozitif yüklü su molekülü ile hızlı bir serbest elektron oluşur.



Bu serbest elektron, su içinde bir başka su molekülü tarafından yakalanıncaya kadar yol alır ve bu su molekülü ile birleşerek onu negatif bir su molekülü haline getirir.



Bu reaksiyonlar sonunda oluşan H_2O^+ ve H_2O^- kararlı değildir ve her biri parçalanarak bir iyon ve bir serbest radikal oluşturur (99,107).



Basit serbest radikallerin ($\text{H}^\cdot$ veya $\text{OH}^\cdot$) yaşam süreleri 10^{-10} saniye gibi çok kısa olduğundan dolayı genel olarak çok reaktif olmalarına rağmen oluştukları yerlerden hücre nükleusuna ulaşacak kadar ortamda bulunmazlar. Hidroperoksi radikalleri gibi serbest radikaller nötral formlara kolayca rekombine olmazlar. Bu stabil formlar hücre

nükleusuna gidecek kadar yeterli süre ortamda kaldıklarından biyolojik moleküllerle etkileşerek bağ kırığına veya anahtar fonksiyonun inaktivasyonuna neden olabilecek düzeyde hasar verici olabilirler (106,102).

İyonize radyasyonunun en çok zarar verdiği biyomolekül DNA'dır (2,108). İyonizan radyasyon ya direkt olarak DNA zincirinde kırılmalar oluşturur ya da hücre içindeki moleküllerle etkileşerek oksijen radikalleri oluşumunu sağlar ve bu oksijen radikalleri DNA bileşenleri ile etkileşerek zincirde kırılmalar (baz hasarı, tek ve çift zincir kırılmaları) ve diğer tip bozulmalara yol açarlar (100,108).

Her hücre tipinin radyasyona duyarlılığı farklıdır. Sık bölünen ve andiferansiye olan hücrelerin (over ve testisin germinal hücreleri, hematopoetik sistem hücreleri, gastrointestinal sistem epitel hücreleri) duyarlılığı fazla iken, bölünmeyen ve üst diferansiasyon gösteren hücrelerin (karaciğer, böbrek, kartilaj, kas, sinir hücreleri) duyarlılığı daha azdır (109).

2.6. Radyasyon Onkolojisi

Klinik radyasyon tedavisinin tıbbi bir bilim dalı olarak anılması, 1922 yılında Paris'te düzenlenen uluslararası Onkoloji Kongresinde, Coutard ve Hautant'ın gelişmiş gırtlak kanserinin radyasyon ile tedavi edilebilir olduğunu göstermeleri ile başlamıştır. 1934 yılında, Coutard günümüzde geçerli olan radyasyon tedavisinin ilkelerini geliştirdi. 1936'da ise Paterson X ışınlarıyla uyguladığı kanser tedavisinin sonuçlarını yayınladı. İlk olarak 1910 yılında Radyum (Ra) iğne ve tüpleriyle başlanan brakiterapinin pek çok anatomik yerleşimli malign tümörlerin tedavisinde kullanımı giderek artmıştır. Zamanla, iyonize radyasyonun yüksek enerjili foton ve elektronları içermesi ve tedavi planının iyi tanımlanabilmesinden dolayı iyonize radyasyonun kanser tedavisinde kullanımı yaygınlaşmıştır.

Son yirmi yıldır, radyasyon fiziği, radyasyon biyolojisi, klinik tedavi planı hakkındaki bilgilerin çoğalması ve radyoterapide bilgisayar kullanımının artmasından dolayı kanser tedavisinde büyük gelişmeler olmuştur (110).

Radyoterapi, malign hastalıkların tedavisinde iyonize radyasyonun kullanıldığı klinik bir uygulamadır. Radyasyon tedavisinin amacı, tümörün yok edilmesi, tümörün çevresindeki sağlıklı dokunun en az şekilde zarar görmesi, hastanın yaşam kalitesi ve hayatta kalma süresinin arttırılmasıdır.

Küratif tedavi, hastalığın tedavisine yönelik olan bir tedavidir. Kompleks ve uzun bir tedavi planı gerektirir. Örneğin baş ve boyun tümörleri veya akciğer karsinomaları küratif amaçlı tedavi edilir.

Küratif tedavinin yanı sıra, radyoterapi, kanser tedavisinde hastalığın semptomlarını önlemede, örneğin kemik metastazlarının kontrolü ve ağrının giderilmesi gibi etkili palyatif tedavide de major bir rol oynar (110).

İyonizan radyasyon klinik olarak üç şekilde uygulanabilir:

1. Teleterapi: Genelde vücuttan 80-100 cm uzaklıktaki kaynaklarla uygulanan eksternal ışınlama yöntemidir. Bu tip, Co-60 teleterapi ünitelerini ve lineer akseleratörleri içerir.

2. Brakiterapi: Hedef dokuyla doğrudan ilişkili veya hedef dokunun yakınında interstisyel, intrakaviter veya yüzeysel yerleştirilmiş kapalı konteynırlar içindeki Co-60, Cs-137, Ir-192, I-125 gibi radyoaktif izotopların ve kısa mesafeli konlar aracılığı ile uygulanan doğrudan X ışınının kullanıldığı lokal radyasyondur.

3. Sistemik selektif tedavi: Enteral, intrakaviter veya intravenöz olarak uygulanan ¹³¹I, ³²P, ⁸⁹St gibi radyoaktif kaynaklardan elde edilen internal veya sistemik radyasyondur (111).

2.7. Merkezi Sinir Sistemi

Merkezi sinir sistemi, beyin (cerebrum) ve omurilikten (medulla spinalis) oluşmaktadır (112).

Beyin ve omurilik, sinir hücreleri aracılığıyla oluşturulan bilgilerin kontrolünü sağlayan ana merkezlerdir. Örneğin yürüme, okuma, konuşma gibi istemli yaptığımız hareketlerle nefes almak, kan basıncı, sindirim gibi istemsiz yaptığımız reaksiyonların düzenlenmesini sağlar (113). Bundan dolayı çok iyi korunmaktadır. Beynin ventriküllerini ve tüm subaraknoid boşluğu dolduran beyin omurilik sıvısı (BOS) bir su yastığı halinde M.S.S.'nin fiziksel bir koruyucusudur. Ayrıca ekstrasellüler aralıklarla da bağlantısının olmasından dolayı beyin metabolizmasında önemli bir rol oynar (114).

2.7.1. Beyin (Cerebrum)

Merkezi sinir sisteminin ön bölümünü oluşturan beyin, kafatası boşluğunda yer alır. Beyin, bu boşluğu tamamıyla doldurur ve bundan dolayı beyin şekli de kafatası boşluğunun şekline uyar (115).

Yetişkin bir insan beyni vücut ağırlığının % 2.5'u kadardır. Ortalama olarak erkek beyni kadın beyninden daha büyüktür. Fakat bu, zeka kapasitesinin daha yüksek olduğunu göstermemektedir. Beyin ölçüsü ile zeka arasında bir bağlantı yoktur (114).

Çok yumuşak beyin dokusu kafatası içinde üç tabaka zarla çevrilmiştir. En dışta bulunan dura mater, kollajen bağ dokusundan oluşmuş çok kalın ve sağlam bir zardır. Ortada bulunan araknoid mater, örümcek ağı şeklinde, ince, şeffaf bir zardır. Beyni torba gibi sarar. En içte yer alan piamater, çok damarlı ince bir bağ dokusu zarıdır. Beynin yüzeyine sıkı bir şekilde yapışıktır.

Merkezi sinir sistemi fonksiyonlarını normal bir şekilde sürdürebilmesi için çok kararlı bir fizyolojik ortama gereksinim duymaktadır. Bu sebeple, sinir sistemi ile kan ve kan ile BOS arasında seçici engel mekanizmaları vardır (116).

Kan-beyin engeli, albumini geçirmemektedir. Fakat gazlar, su, glikoz, elektrolitler ve amino asitler kandan beyne serbest olarak geçerler (117, 116).

Embriyolojik bakımdan ele alındığında beyin üç önemli bölüme ayrılarak incelenir:

- 1) Prosencephalon (önbeyin)
- 2) Mesencephalon (orta beyin)
- 3) Rhombencephalon (arka beyin)

Prosencephalondan (ön beyin) telencephalon (beyin yarım küreleri) ile diencephalon (arabeyin) adı verilen önemli kısımlar meydana gelir. Beyin yarım kürelerinde önemli beyin lobları oluşur. Bu yarımküreler, beyaz ve gri cevherden meydana gelmişlerdir. Beyaz cevher, yapının içinde yer alır ve sinir hücresi içermez, Sadece sinirsel yollardan meydana gelmiştir. Kabuk şeklinde beyaz bölümü dışarıdan kuşatan gri cevhere "Cortex cerebri" adı verilir. Cortex cerebri'nin belirli yerlerinde önemli fonksiyonel merkezler bulunur (112,118).

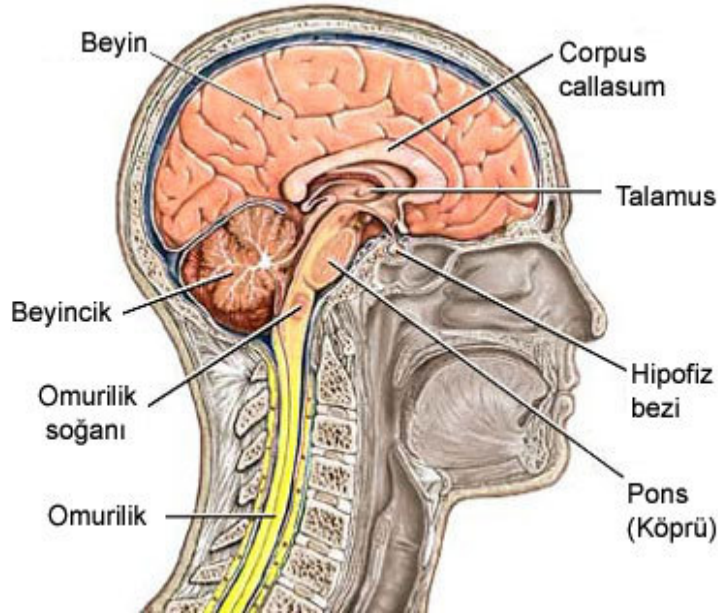
Mesencephalon (orta beyin), ön beyin ile arka beyin arasında bağlantıyı sağlayan önemli sinir uzantılarının geçtiği beynin en dar kısmıdır (118).

Rhombencephalon (arka beyin) Pons, Bulbus ve Cerebellum olmak üzere kendi içinde üç önemli bölümden meydana gelir. Pons ve bulbusta (medulla oblongata) kafa sinirlerine ait önemli başlangıç ve sonlanma çekirdekleri yerleşmiştir. Cerebellum (beyincik) ise ortada bir ara parça ile birleşmiş iki yarım küreden oluşmuştur. Her iki parçanın dış yüzleri, daha sık olmak üzere, beynin dış yüzüne benzer şekilde girinti ve çıkıntılı bir yapı gösterir. Vücudun dengesi, kas tonusunun regülasyonu ve hareketlerin koordinasyonu cerebellum'un ana fonksiyonlarını oluşturur (112,114,118).

Beyin yüksek miktarda doymamış yağ asitleri içermesinden dolayı lipid peroksidasyonuna oldukça açıktır. Diğer organlarla karşılaştırıldığında beyin, enerji elde etmek için en yüksek miktarda oksijen tüketen organdır. Ayrıca beynin bazı

bölgelerinin demir gibi geçiş metallerince zengin olması ve GSHPx, CAT gibi antioksidan enzim aktivitelerinin düşük olması da oksidatif hasara karşı hassas olmasının nedenlerindendir (94,19).

Serbest radikal hasarının sonucu olarak, özellikle santral sinir sisteminde biriken yaşlanma pigmenti adı da verilen lipofuskin pigmenti sinir sisteminin hücresel yaşlanma göstergesidir (119). Lipofuskinin nöron kaybı başta olmak üzere bir çok ters etkiye yol açtığı ve birikim hızının da antioksidanlarla yavaşlatılabildiği gösterilmiştir (120).



Şekil 11: Beyin dokusunun bölümleri (121)

2.7.2. Omurilik (Medulla Spinalis)

Medulla spinalis, vertebra kanalının içerisinde bulunur ve üst ucu belli bir sınır göstermeden medulla oblangata ile birleşir. Alt ucu ise, gittikçe inceler, daralır ve conus medullaris adını alır.

Şekil bakımından medulla spinalis biraz önden arkaya basık bir silindire benzer. Uzunluğu kişiye göre değişmekle beraber, ortalama olarak 40-50 cm arasındadır.

Medulla spinalis, gri ve beyaz cevher olmak üzere, hem renk hem yapı bakımından ayrı iki cevherden yapılmıştır. Gri cevher medulla spinalis'in orta kısmını işgal eder. Miyelinli sinir liflerinden ve glia hücrelerinden yapılmış olan beyaz cevher ise, dış kısımda bulunur ve gri cevheri her taraftan sarmıştır.

Omurilikte ventral kök, dorsal kök ve yan boynuz bulunur. Ventral kök motor nöronlarının çıktığı, dorsal kök duyu nöronlarının omuriliğe girdiği yerdir. Yan boynuzdan otonom sinir sistemine ait sinirler çıkar. Omurilik refleks merkezidir. Beyne gelen ve çıkan impulsları iletir (115).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Deney Hayvanların Temini ve Radyoterapi Uygulanması

3.1.1. Deney Hayvanlarının Temini ve Deneylere Hazırlanması

Bu çalışma, İnönü Üniversitesi, Turgut Özal Tıp Merkezi, Deneysel Araştırmalar Birimi'nde, Avrupa hayvan bakımı anlaşması ve İnönü Üniversitesi hayvan etiği komitesi tarafından öngörülen kurallara uygun olarak yapıldı. Çalışmamızda kullandığımız otuz beş adet erkek Wistar albino ratı, İnönü Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Birimi'nden temin edildi. Deney hayvanları, ilk üç grupta on adet 4. grupta ise beş adet olmak üzere bir haftalık (15-20 gr), dört haftalık (45-50), on iki haftalık (200-250 gr) ve bir yaş (300-350 gr) olarak dört gruba ayrıldı. Her grubun beşer adet kendi kontrol grubu oluşturuldu. Her gruptaki ratlar ayrı olarak özel kafeslere konuldu. Tüm hayvanlar ad libitum standart yem ve su ile beslendi. Uygun ışık ve ısıda muhafaza edildi.

3.1.2. Radyoterapi Uygulaması

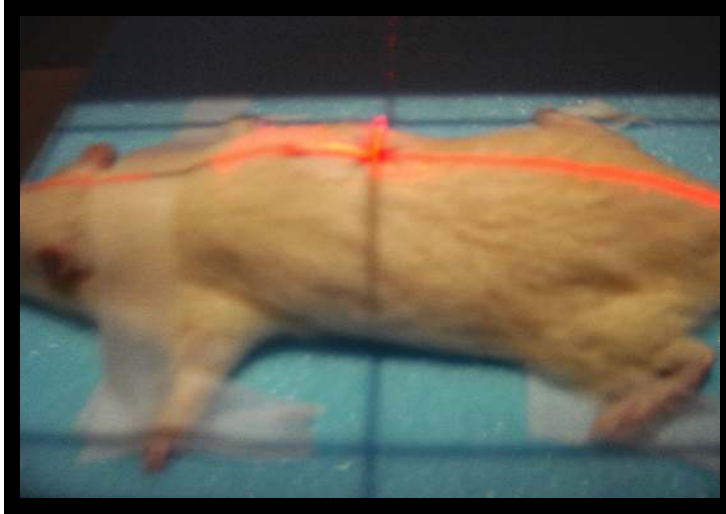
Radyoterapiden önce ratlara 80 mg/kg dozda ketamin (Ketalar, Pfizer İlaçları Limited Şirketi, İstanbul, Türkiye) ve 5 mg/kg dozda ksilazin (Rompun, Bayer Türk Kimya Sanayi Limited Şirketi, İstanbul, Türkiye) tek enjektöre çekilerek intraperitoneal uygulama ile genel anestezi uygulandı. Anestezi uygulanan ratlar, sert bir yüzeye yüzüstü yatırılarak baş ve ekstremitelerinden sabitlendi (fotoğraf 1). Tüm gruptaki ratlara, Kobalt-60 (Theratron 1000E, MDS Nordion, Kânâtâ, Ontanro, Kanada) cihazının radyasyon demetinin çıktığı ön girişine 2,5 cm uzaklıkta olacak şekilde yerleştirilen rat vücuduna, 8 Gy dozda tek bir fraksiyon radyasyon uygulandı (fotoğraf 1,2). Tüm kontrol grupları da radyoterapi uygulanıyor gibi aynı işlemlere tabi tutuldu. Radyoterapinin ardından ratların anesteziden çıkmaları beklendi. Fotoğraflar dijital fotoğraf makinesi (SONY, DSC-P93, San Diego, CA, USA) ile çekildi.



Fotoğraf 1: Ratın baş ve ekstremitelerinden sabitlenmesi



Fotoğraf 2: Ratın Co-60 cihazına yerleştirilmesi



Fotoğraf 3: Rata tüm vücut radyoterapisinin uygulanması

3.1.3. Ötenazi

Ratlar radyoterapiden 12 saat sonra sakrifiye edildi. Ötenaziden önce ratlara 50 mg/kg doz propofol (Propofol, Abbott Laboratuvarı Anonim Şirketi, İstanbul, Türkiye) kullanılarak intraperitoneal uygulama ile anestezi yapıldı. Ötenazi, % 0.9'luk sodyum klorür ile transkardiyak perfüzyon uygulanarak yapıldı.

3.1.4. Beyin Dokularının Çıkarılarak Biyokimyasal Analizlere Hazırlanması

Biyokimyasal analizlerde kullanılacak olan beyin dokuları derhal alüminyum folyoya sarıldı. Grup numaraları not edilen numuneler, içinde kuru buz bulunan bir kapta korunarak laboratuara getirildi ve derhal dokuların hazırlanmasına geçildi.

Beyin dokuları cam tüplere aktarıldı. Dokuların üzerine soğuk 1mL fosfat tamponu (50mM, pH 7.4) eklendi. Daha sonra dokuların soğukluğu muhafaza edilerek Ultra-Turrax T25 (IKA Werke GmbH, Staufen, Almanya) homojenizatöründe 6000 dev/dak hızla 5 dakika süreyle homojenize edildi. Elde edilen homojenatlar vortekslendikten sonra eppendorf tüplerine aktarıldı.

Homojenatların yarısı MDA düzeyinin ölçümü için ayrıldı. Homojenatların diğer yarısı ise, 15 dakika süreyle 13500 g'de 15 C° de soğutmalı santrifüjde (Centrifuge 5415R, Eppendorf AG, Hamburg, Almanya) santrifüj edilerek süpernatant elde edildi. Ayrılan süpernatantlar, protein miktar tayini, SOD, CAT, GSHPx aktivite tayinleri için – 40 C° de derin dondurucuda (SANYO Biomedical Co., Ltd., MDF-U537, Osaka, Japonya) saklandı.

3.2. Biyokimyasal Analizlerin Yapılması

3.2.1. Protein Miktar Tayini

Protein miktar tayininde Lowry metodu, protein standartı olarak da BSA (sığır serum albumini) kullanıldı. Bu metod, proteinin yapısında bulunan tirozin ve triptofan aminoasitlerinin fosfotungustat kompleksini molibden mavisine indirgemesi esasına dayanır (122).

Kullanılan reaktifler:

1. A Çözeltisi karışımı:

%2'lik Na_2CO_3 'ın 0.1 N NaOH'teki çözeltisi (98 hacim)

%1'lik CuSO_4 çözeltisi (1 hacim)

%2'lik Sodyum Potasyum tartarat çözeltisi (1 hacim)

Bu üç çözelti yukarda belirtilen hacimlerde karıştırıldı.

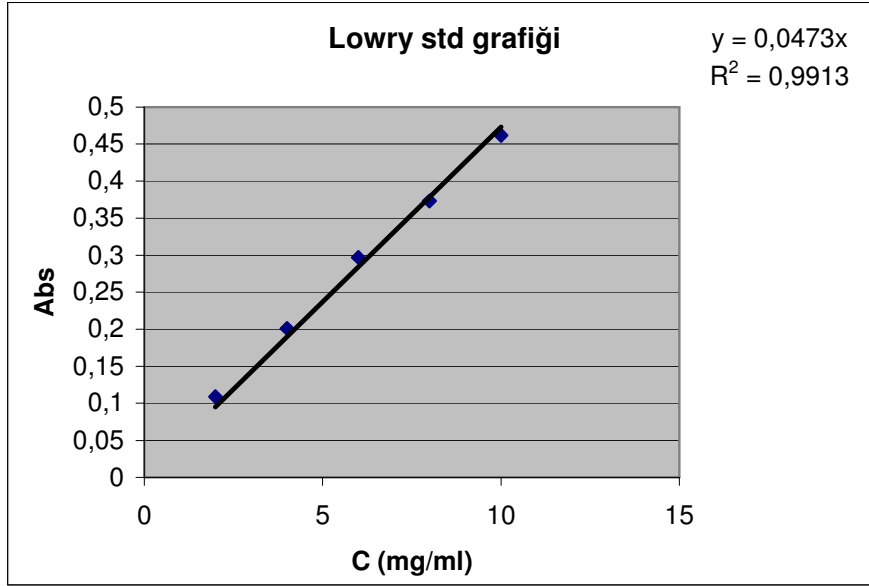
2. B Çözeltisi:

1 hacim Folin Fenol belirteci + 1 hacim distile su.

3. Bovin Serum Albumin (BSA) Standardı: 10 mg/ml konsantrasyondaki stok BSA çözeltisinden 2, 4, 6, 8, 10 mg/ml'lik çözeltiler hazırlandı.

Deneyin Yapılışı:

Test ve standart tüplerine 240 µl, kör tüpüne 250 µl distile su kondu. 2,5 ml A çözeltisi tüm tüplere ilave edildikten sonra, test tüplerine 10 µl süpernatant; standart tüplerine de 10 µl her bir standarttan ilave edildi ve tüpler vorteks ile iyice karıştırıldı. Oda ısısında karanlıkta 10 dk bekledikten sonra, tüm tüplere 250 µl B çözeltisi eklendi. 25 °C'de 30 dk bekledikten sonra, spektrofotometrede (Shimadzu,UV-1200, Kyoto, Japan) 650 nm'de köre karşı sıfırlanarak okuma yapıldı. Hesaplamalar standart grafiğinden faydalanılarak gerçekleştirildi.



Grafik 1 : Protein standart grafiği

3.2.2. Malondialdehit (MDA) Miktar Tayini

MDA ölçümü Mihara ve Uchiyama metodu uyarınca gerçekleştirildi. Bu metotta, asidik ortamdaki TBA 95 °C'de reaksiyona giren MDA ile pembe renkli kompleks oluşturur. Oluşan renkli kompleks n-bütanol fazına ekstrakte edilerek 532 nm'deki absorbansı ölçüldü. Oluşan rengin şiddeti ortamdaki MDA konsantrasyonuyla orantılı olmaktadır (123).

Kullanılan reaktifler:

1. % 1.5'lik KCl
2. % 1'lik H₃PO₄
3. %0.6'lik tiyobarbitürik asit (TBA)
4. n-Butanol

Deneyin Yapılışı:

50 µl doku homojenatına 50 µl %1.5'lik KCl ilave edildikten sonra vortekslendi ve üzerine 1.9 ml %1'lik H₃PO₄ çözeltisi ilave edildi. Daha sonra 1 ml %0.6'lık TBA çözeltisinden eklendi ve vortekslenerek 95 °C'deki su banyosunda 1 saat bekletildi. Su banyosundan çıkarılan örnekler musluk suyu altında soğutulduktan sonra üzerine 2 ml

n-bütanol eklendi ve vorteksle 1 dak. karıştırıldı. Organik faz 4000 g'de 5 dakika santrifüj edilerek ayrıldı ve spektrofotometrede (Shimadzu,UV-1200, Kyoto, Japan) 532 nm'de absorpsiyonları okundu. Elde edilen absorpsiyon değerleri aşağıdaki formül yardımıyla nmol/ml cinsinden MDA konsantrasyonlarına dönüştürüldü ve bu sonuçlar protein konsantrasyonuna oranlanarak MDA sonuçları nmol/mg protein cinsinden ifade edildi.

Sonuçların Hesaplanması:

$$C \text{ (nmol/ml)} = \frac{\text{Abs} \times V_t \times 10^9}{E \times V_s \times L \times 10^3}$$

A = Absorpsiyon

E = Molar absorpsiyon katsayısı ($1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

V_t = Total reaksiyon hacmi

V_s = Total reaksiyon içindeki numune hacmi

L = Küvet çapı

10^9 = Molün nanomole çevrilmesi

10^3 = Litrenin mililitreye çevrilmesi

Sonuçlar nmol MDA/mg protein olarak ifade edildi.

3.2.3. Süperoksit Dismutaz Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi

Hücrel oksidatif savunma mekanizmasının en önemli enzimi olan SOD, süperoksit radikallerinin dismutasyonunda görev almaktadır. Ksantin-ksantin oksidaz sisteminde üretilen süperoksit radikallerinin NBT'yi indirgeyerek mavi renkli formazon oluşturmasının SOD tarafından inhibisyonu temeline dayanan enzim aktivite deneyidir (124).

Kullanılan reaktifler:**1) Ölçüm Reaktifi:**

Aşağıdaki bileşenleri belirtilen konsantrasyonlarda içerecek şekilde 1 L çözelti hazırlandı. Çözücü olarak distile su kullanıldı. Hazırlanan ölçüm reaktifi 4 °C 'de 3 gün kararlıdır. Başlangıçta açık saman sarısı olan çözelti rengi maviye kayarsa ölçüm reaktifi bozulmuş demektir ve kullanılamaz.

1. 0.3 mmol/L Ksantin
2. 0.6 mmol/L Na₂EDTA
3. 150 µmol/L NBT
4. 400 mmol/L Na₂CO₃
5. 1 g/L BSA

2) Enzim Çözeltisi (Ksantin Oksidaz):

Enzimatik aktivitesi 167 U/L olacak şekilde stok Ksantin Oksidaz'dan çözücü olarak 2 M soğuk (NH₄)₂SO₄ kullanılarak hazırlandı.

3) Bakır II Klorür Çözeltisi:

Derişimi 0.08 mmol/L olacak şekilde katı stoktan, çözücü olarak distile su kullanılarak hazırlandı.

Deneyin Yapılışı:

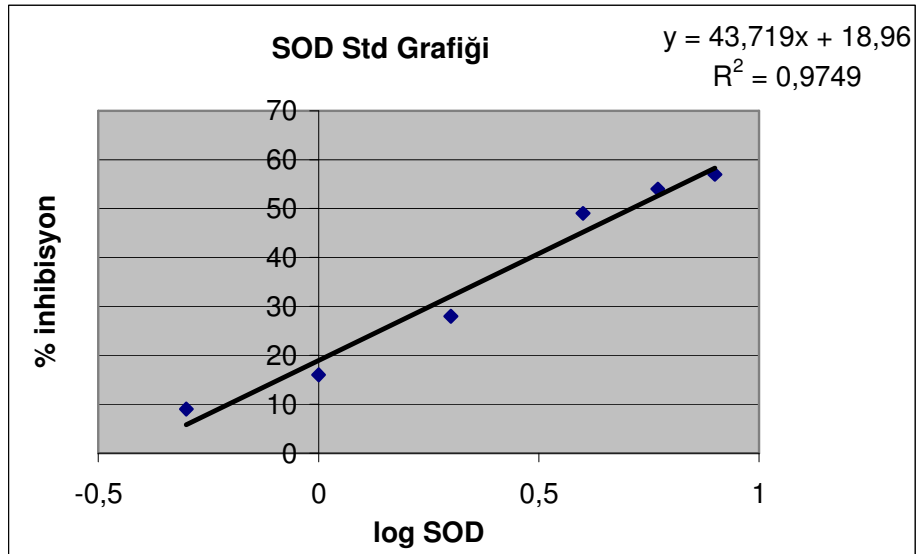
Cam deney tüplerine 2.85 ml ölçüm çözeltisi ve 50 µl 10 kat dilüe edilmiş süpernatant eklendi ve vortekslendi. Kör tüpüne bu aşamada numune yerine distile su eklendi. Daha sonra 100 µl enzim çözeltisi eklenerek tüpler 25 °C'de karanlıkta 20 dakika inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda kör ve numune tüplerine 1 ml CuCl₂ çözeltisi eklenerek reaksiyon sonlandırıldı. Oluşan formazonun spektrofotometrede (Shimadzu, UV-1200, Kyoto, Japan) 560 nm'deki absorbans değerleri okundu. Saf SOD enzimi kullanılarak hazırlanan aktivitesi belli standart enzim çözeltileri kullanılarak hazırlanan % inhibisyon-log SOD grafiği yardımıyla numunelerin SOD aktivite düzeyleri hesaplandı.

Sonuçların Hesaplanması:

Önce aşağıdaki formülden % inhibisyonlar hesaplandı.

$$\% \text{ İnhibisyon} = \frac{A(\text{kör}) - A(\text{numune/standart})}{A(\text{kör})} \times \%100$$

Standart çalışmalardan elde edilen SOD aktivitesine karşı % inhibisyon değerleri grafiğe geçirildi. Çizilen hiperbolik SOD çalışma grafiği lineer olmadığından logaritmik transformasyon uygulanarak grafik yeniden çizildi (grafik 2). Bu grafikte x eksenine standart SOD değerlerinin (U/ml) logaritmik dönüşüm değerleri, y eksenine standartlara ait % inhibisyon değerleri konuldu. Grafikten yararlanarak numunelere ait % inhibisyona karşılık gelen SOD değerleri hesap edildi. Sonuçlar U/mg protein cinsinden ifade edildi.



Grafik 2: SOD standart çalışması logaritmik grafiği

3.2.4. Katalaz Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi

Katalaz, katalitik aktivitesiyle hidrojen peroksiti, dekompoze ederek su ve moleküler oksijene dönüştürmektedir.



Hidrojen peroksit (H_2O_2) 240 nm’de maksimal absorbands veren bir moleküldür. Deney ortamına ilave edilen H_2O_2 ’nin katalaz tarafından su ve oksijene parçalanması 240 nm’de absorbands azalması ile izlenebilmektedir. Absorbanda gözlenen bu azalma üzerinden ortamdaki katalaz enzim aktivitesi hesap edilebilmektedir (125).

Kullanılan reaktifler:

1. 50 mM pH 7.0 olan fosfat tamponu hazırlanır.
2. Hidrojen peroksit çözeltisi: pH 7.0 fosfat tamponuna, spektrofotometrede 0.500 absorbands değeri verecek kadar H_2O_2 ilave edilerek hazırlandı.

Deneyin Yapılışı:

Spektrofotometre (Shimadzu,UV-1200, Kyoto, Japan) 240 nm’ye ayarlandı ve fosfat tamponu ile sıfır absorbandsa ayarlandı. 1ml’lik küvete 1000 μL hidrojen peroksitli fosfat tamponu ve 50 μL numune ilave edilerek hızla karıştırıp absorbandsı okundu, bu başlangıç absorbands değeridir. Daha sonra 60 saniye süreyle absorbands azalması takip edildi. Sürenin sonunda okunan absorbands değeri kaydedildi. Sonuçlar U/mg protein cinsinden ifade edildi.

Sonuçların Hesaplanması:

1 U Katalaz Aktivitesi: 1 dakikada katalaz tarafından dekompoze edilen H_2O_2 ’in μmol cinsinden miktarıdır.

$$U/L = \frac{\Delta \text{ Abs} / t \times V_t \times 10^6}{E \times L \times V_s}$$

$\Delta \text{ Abs}$: Okunan absorbans değışimi

t : Ölçüm süresi (1 dak)

V_t : Total hacim (1 ml)

V_s : Kullanılan numune hacmi (0.05 ml)

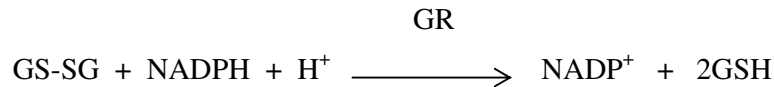
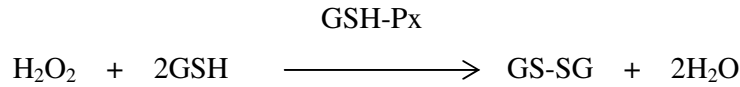
E : Molar absorpsiyon katsayısı (39.4 M⁻¹ cm⁻¹)

L : Işık yolu (1 cm)

10⁶ : Molü mikromole dönüştürme çarpanı.

3.2.5. Glutatyon Peroksidaz Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi

GPx, redükte glutatyonu kullanarak hidrojen peroksitin suya dönüşümünü katalizleyen bir enzimdir. Reaksiyon sonunda redükte glutatyon (GSH) okside forma dönüşürken, hidrojen peroksit ise suya katalizlenir. Oluşan okside glutatyonun (GSSG) tekrar kullanılabilmesi için okside glutatyonun redükte glutatyona dönüşmesi gerekir. Bu dönüşüm, ortamda NADPH ve glutatyon redüktaz (GR) enzimi varlığında gerçekleştirilir. Bu durumda NADPH okside formu olan NADP⁺ye çevrilirken okside glutatyon redükte forma dönüşür.



NADPH 340 nm’de maksimal absorbans gösteren bir maddedir. Glutasyon redüktaz katalizi devam ettikçe, ortamdaki NADPH miktarı giderek azalacak ve buna paralel olarak 340 nm’de absorbans azalması meydana gelecektir. Birim zamanda absorbanstaki azalma hızı ortamdaki glutasyon peroksidaz aktivitesi ile doğru orantılı olacaktır (126).

Kullanılan reaktifler:

1. 5 mM EDTA içeren 50 mM pH 7’lik fosfat tamponu
2. 150 mM GSH EDTA’lı fosfat tamponunda çözüldü.
3. 1 M NaN_3 EDTA’lı fosfat tamponunda çözüldü.
4. 3 mM NADPH EDTA’lı fosfat tamponunda çözüldü.
5. 50 mM H_2O_2 EDTA’lı fosfat tamponunda çözüldü.
6. 100 U/ml GSH-Redüktaz olacak şekilde enzim çözeltisi hazırlandı.

Deneyin Yapılışı:

Kör tüpüne 2.680 ml, test tüplerine 2.670 ml EDTA’lı fosfat tamponu, 0.1 ml redükte glutasyon, 0.1 ml NADPH, 0.01 ml glutasyon redüktaz, 0.01 ml NaN_3 ve 0.01 ml 10 kat dilüe edilmiş numune ilave edildikten sonra 30 dk oda ısısında inkübe edildi. Spektrofotometre 340 nm’de fosfat tamponu ile sıfırlandı. Sürenin sonunda her tüpe 100 μl H_2O_2 ilave edilip reaksiyon başlatıldı ve hemen küvetler spektrofotometreye konarak 3 dk süreyle absorbans azalması takip edildi. Absorbans azalmasının bu süre içerisinde tam olarak lineer olduğu görüldü.

Sonuçların Hesaplanması:

1 U GPx Aktivitesi: 1 dakikada okside olan NADPH’ın μmol cinsinden miktarıdır.

$$\text{U/L } (\mu\text{mol/dk/L}) = \frac{\Delta A/t \times V_t \times 10^6}{E \times V_s \times L}$$

$E = \text{NADPH}'\text{in tüketim katsayısı (} 6.22 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}\text{)}$

$V_t = \text{Total reaksiyon hacmi}$

$V_s = \text{Total reaksiyon içindeki numune hacmi}$

$L = \text{Küvet çapı}$

$\Delta A/t = \text{Dakikadaki absorbens değişimi}$

$10^6 = \text{Molün mikromole çevrilmesi}$

Spesifik aktivite için bulunan sonuçlar U/mg protein olarak ifade edildi.

3.3. İstatistiksel Analiz

Bu çalışmanın istatistiksel analizleri SPSS 10.0 paket programı kullanılarak yapıldı. İstatistiksel anlamlılık sınırı $p < 0,05$ olarak alındı. n sayıları küçük olduğu için (genel olarak < 20) ve yapılan normal dağılıma uygunluk testlerinde veriler normal dağılıma uygunluk göstermediğinden non-parametrik testler kullanılmıştır.

Grupların bütün olarak karşılaştırılmasında grup sayısı 2'den fazla olduğunda Kruskal Wallis Varyans analizi, 2 grubun karşılaştırılmasında Mann Whitney U testi kullanılmıştır. Dolayısıyla, Kruskal Wallis Varyans analizi sonucunda gruplar arasında fark bulunduğu zaman bu farkın hangi ikili karşılaştırmalardan kaynaklandığını ortaya koymak için Mann Whitney U testi yapılmıştır.

4. BULGULAR

Bu çalışmada, radyoterapi uygulanan farklı yaş gruplarındaki ratların beyin dokusunda oluşan lipid peroksidasyon düzeyleri ve antioksidan enzim aktiviteleri araştırıldı. Bu amaçla 1, 4, 12 haftalık ve 1 yaşında olan 35 adet Wistar albino türü erkek ratların total beyin homojenatlarında SOD, CAT, GSHPx enzim aktiviteleri ve MDA düzeyleri ölçüldü. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar tablo 4’de ve ayrıca grafikler halinde şekil 11-14’de gösterilmiştir.

Tablo 4. Deney gruplarında beyin dokusu SOD, CAT, GSHPx aktiviteleri ile MDA düzeyleri.

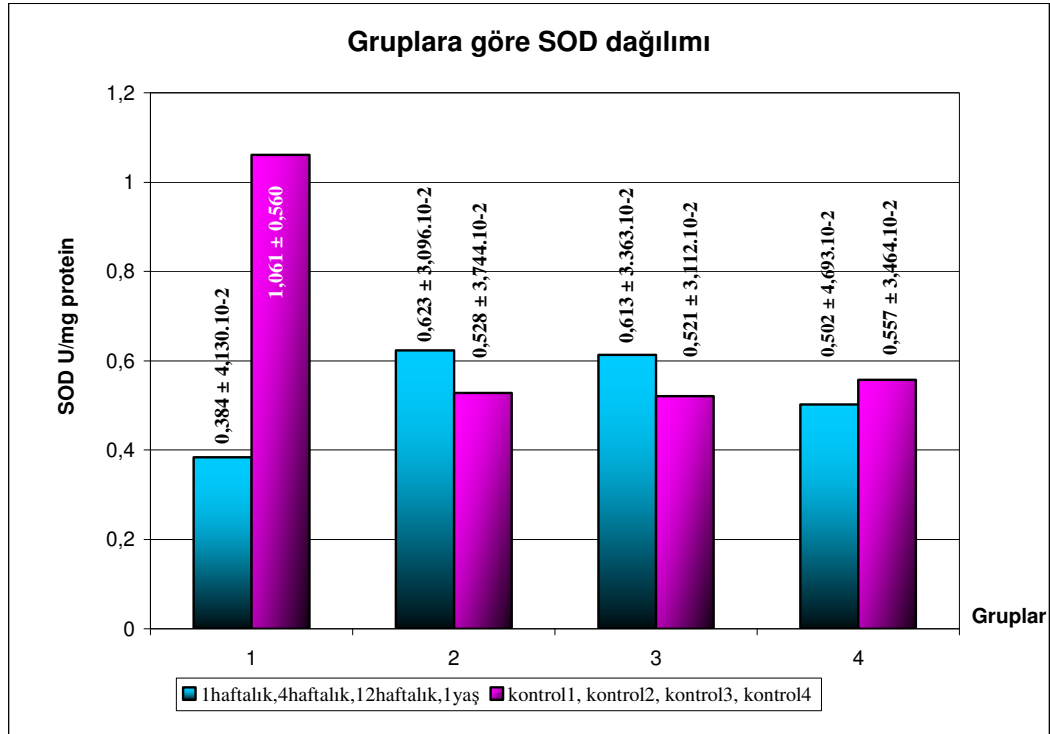
YAŞ	SOD (U/mg protein)	GSHPx (U/mg protein)	CAT (U/mg protein)	MDA (nmol/mg protein)	AĞIRLIK
Grup I (1 Haftalık, n=10)	0,384 ± 4,130.10 ⁻² ^{a,b,c}	0,222 ± 2,589.10 ⁻² ^{a,b}	1158,74 ± 53,05 ^{b,c,d}	2,651 ± 0,424	15-20 gr
Grup II (4 Haftalık, n=10)	0,623 ± 3,096.10 ⁻² ^d	0,165 ± 5,517.10 ⁻³ ^{a,c}	459,52 ± 39,3 ^c	2,659 ± 0,438 ^a	45-50 gr
Grup III (12 Haftalık, n=10)	0,613 ± 3.363.10 ⁻²	0,188 ± 5,349.10 ⁻³	354,017 ± 37,52 ^d	2,498 ± 0,359	200-250 gr
Grup IV (1 yaş, n=5)	0,502 ± 4,693.10 ⁻²	0,206 ± 2,878.10 ⁻²	688,8 ± 145,56	3,560 ± 0,823 ^a	300-350 gr
Kontrol I (n=5)	1,061 ± 0,560	0,844 ± 0,564	1640,18 ± 575,56	1,783 ± 0,436	15-20 gr
Kontrol II (n=5)	0,528 ± 3,744.10 ⁻²	0,330 ± 8,860.10 ⁻²	406,49 ± 46,62	1,371 ± 0,184	45-50 gr
Kontrol III (n=5)	0,521 ± 3,112.10 ⁻²	0,176 ± 7,153.10 ⁻³	437,06 ± 58,96	2,35 ± 0,384	200-250 gr
Kontrol IV (n=5)	0,557 ± 3,464.10 ⁻²	0,245 ± 5,846.10 ⁻²	450,71 ± 31,20	0,869 ± 4,726.10 ⁻²	300-350 gr

Bulgular X ± SE olarak verilmiştir. n= numune sayısı

a: Kontrolü ile karşılaştırıldığında (p<0,05), **b:** Grup II ile karşılaştırıldığında (p<0,05), **c:** Grup III ile karşılaştırıldığında (p<0,05)

d: Grup IV ile karşılaştırıldığında (p<0,05)

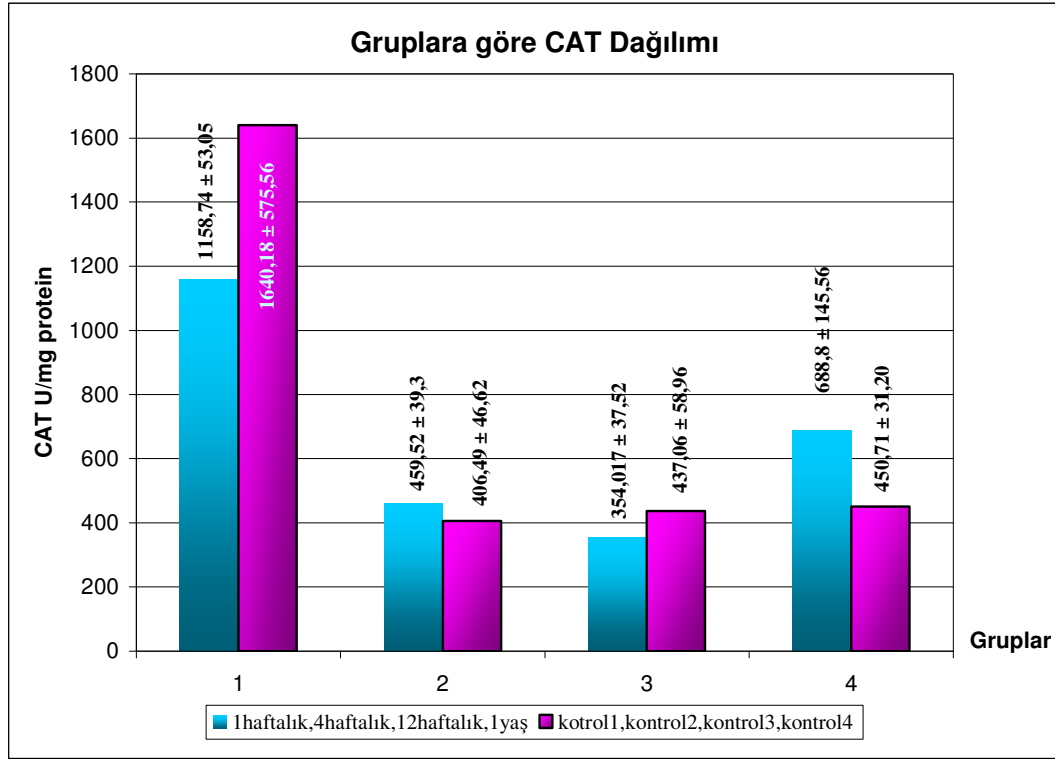
4.1. Beyin Dokusu SOD Aktiviteleri



Grafik 3: Kontrol grubu ve radyoterapi uygulanan deney gruplarının SOD aktivitesi yönünden karşılaştırılması.

Tablo 4 ve grafik 3’de gösterildiği gibi 1 haftalık ratların kontrollerine göre SOD aktivite farkı anlamlı olarak düşük bulundu ($p<0,05$). 4 haftalık ratların 1 haftalık ve 1 yaşındaki ratlar ile arasındaki fark anlamlı olarak yüksek bulundu, 12 haftalık ratlar ile arasında fark bulunmadı ($p<0,05$). 12 haftalık ratlar kontrolleri ile karşılaştırıldığında arasındaki fark anlamlı değildi, öte yandan 12 haftalık ratların 1 haftalık ratlar ile arasındaki fark anlamlı olarak bulundu ($p<0,05$). 4 haftalık ratların kontrolleri ile karşılaştırılması sonucunda bulunan fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p<0,05$). 1 yaşındaki ratların SOD aktivitesi 1 haftalık ratlara göre yüksek olmasına karşın bu farkın istatistiksel olarak anlamı yoktur ($p<0,05$). 1 yaşındaki ratların kontrolleri ile karşılaştırılması sonucunda ise farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulundu ($p<0,05$).

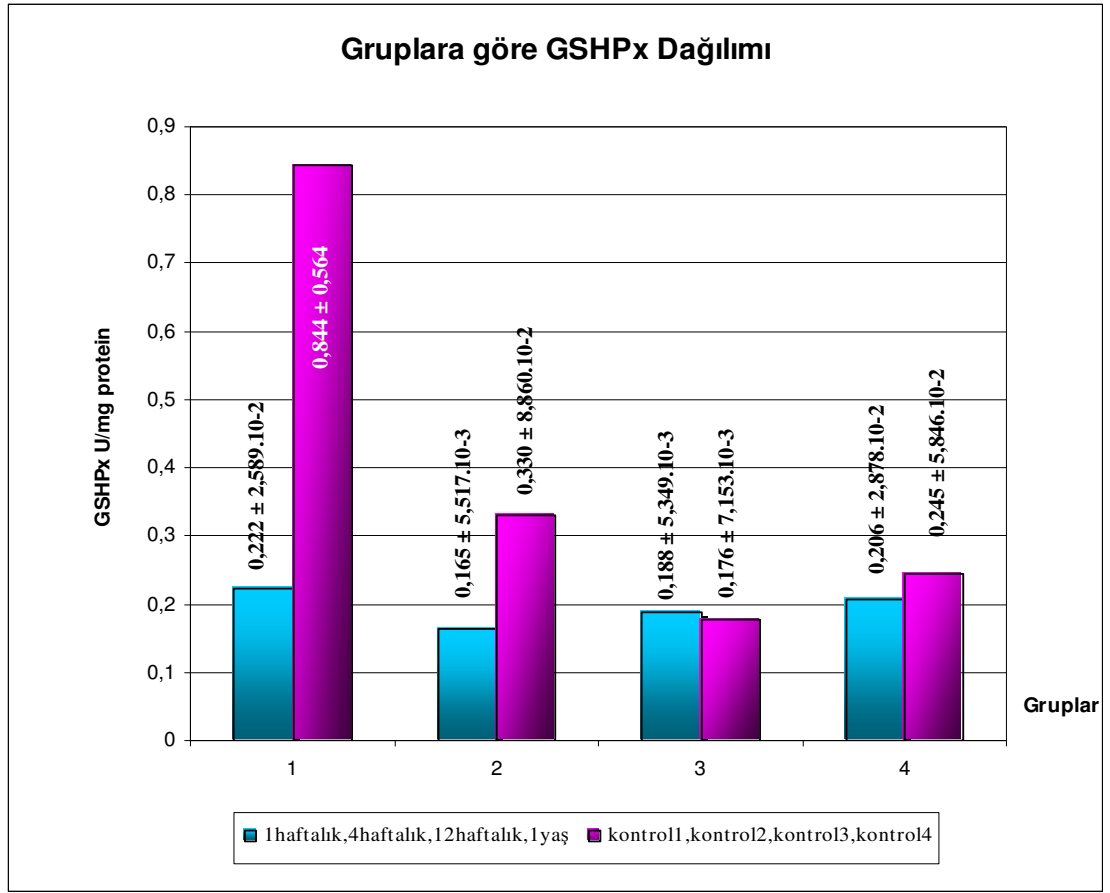
4.2. Beyin Dokusu CAT Aktivitesi



Grafik 4: Kontrol grubu ve radyoterapi uygulanan deney gruplarının CAT aktivitesi yönünden karşılaştırılması.

Tablo 4 ve grafik 4’de gösterildiği gibi deney gruplarının hepsinin kontrolleri ile karşılaştırıldığında aralarındaki CAT aktivite farkı istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p < 0,05$). 4 haftalık ratların, 12 haftalıklarla arasındaki CAT aktivite farkı anlamlı olarak yüksek bulundu ($p < 0,05$). 1 haftalık ratların da 4 haftalık ratlara göre arasındaki fark anlamlı olarak yüksek bulundu. 4 haftalık ratlar ile 1 yaşındaki ratlar arasındaki CAT aktiviteleri farklı değildi ($p < 0,05$). 12 haftalık ratların, 1 haftalık ve 1 yaşındaki ratlar arasındaki CAT aktivite farkı anlamlı olarak düşük bulundu ($p < 0,05$). 1 haftalık ratların CAT aktivitesi 1 yaşındaki ratlarınki ile karşılaştırıldığında aralarındaki farkın anlamlı olarak yüksek olduğu bulundu ($p < 0,05$).

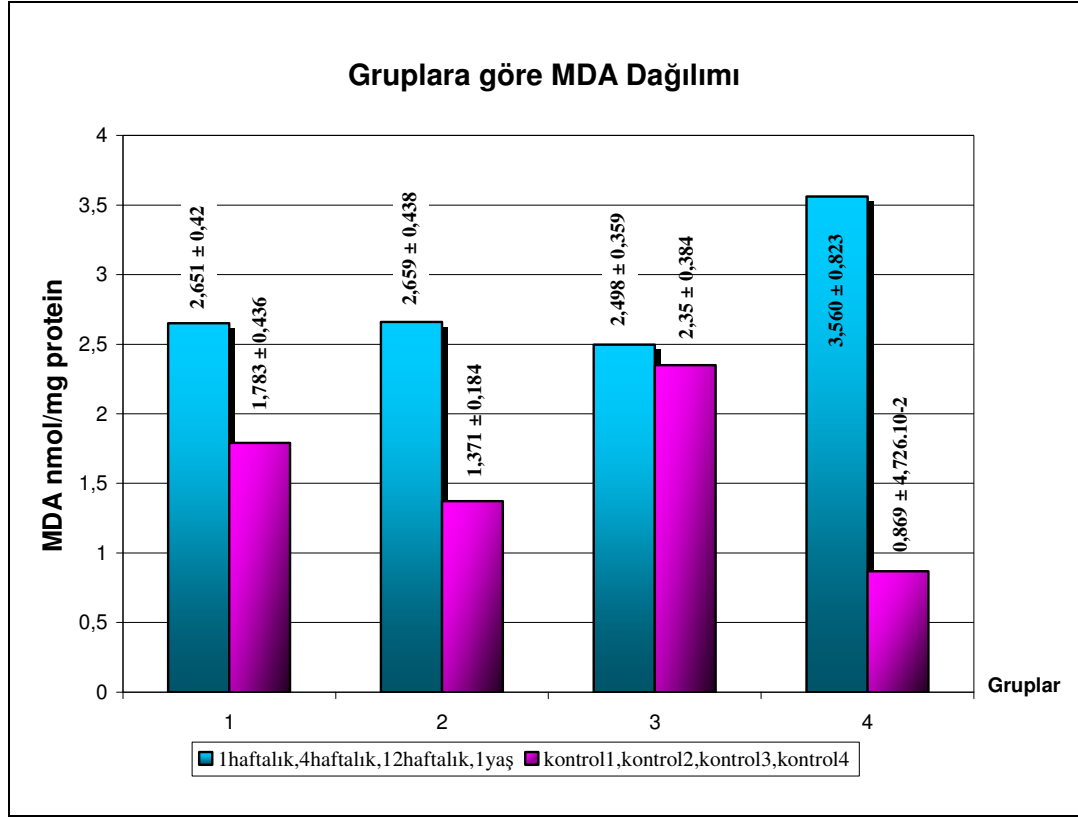
4.3. Beyin Dokusu GSHPx Aktivitesi



Grafik 5: Kontrol grubu ve radyoterapi uygulanan deney gruplarının GSHPx aktivitesi yönünden karşılaştırılması.

Tablo 4 ve grafik 5'te gösterildiği gibi 4 haftalık ratların kontrolleri ile karşılaştırıldığında GSHPx aktivite farkının anlamlı olarak düşük olduğu bulundu ($p<0,05$). 4 haftalık ratların GSHPx aktivitesi, 12 haftalıklarınkine göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p<0,05$). 4 haftalık ratların 1 haftalık ratlarla karşılaştırıldığında GSHPx aktivitesinin anlamlı olarak düşük olduğu bulundu, 1 yaşındaki ratların GSHPx aktivitesine göre ise farklı olmadığı bulundu ($p<0,05$). 12 haftalık ratlar ile kontrolleri arasındaki GSHPx aktivite farkı anlamlı değildi ($p<0,05$). 1 haftalık ratlar ile kontrolleri arasındaki GSHPx aktivite farkı anlamlı olarak düşük bulundu ($p<0,05$). 1 yaşındaki ratlar ile kontrolleri arasındaki GSHPx aktivite farkı ise anlamlı değildi.

4.4. Beyin Dokusundaki MDA Düzeyleri



Grafik 6: Kontrol grubu ve radyoterapi uygulanan deney gruplarının MDA düzeyleri yönünden karşılaştırılması.

Tablo 4 ve grafik 6’da gösterildiği gibi 1 haftalıkların MDA düzeyi kontrollerine göre yüksek olmasına karşın bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p < 0,05$). 4 haftalık ratlar ile kontrolleri karşılaştırıldığında MDA düzeylerinin anlamlı olarak yüksek olduğu bulundu ($p < 0,05$). 1 haftalık ve 4 haftalıkların MDA düzeyleri ise farklı değildi ($p < 0,05$). 12 haftalıkların MDA düzeyleri kontrollerine göre farklı değildi ($p < 0,05$). 1 yaşındaki grubun MDA düzeyleri kontrollerine göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p < 0,05$). 1 yaşındaki ratların MDA düzeyleri diğer yaştaki grupların hepsine göre yüksek bulunmasına karşın bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulundu ($p < 0,05$).

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada, kanser tedavisinde son yıllarda yaygın olarak kullanılan tedavi stratejilerinden biri olan radyoterapinin tedavi edici etkisinin yanı sıra yarattığı oksidatif stres nedeniyle organizmada oksidatif hasar oluşturup oluşturmadığı ve varsa, bu hasarın yaşla ne ölçüde değiştiği araştırıldı.

Hemen hemen tüm tedavi yaklaşımlarının birtakım olumsuz etkileri bulunmaktadır. Kemoterapi ve radyoterapi de beraberinde birçok komplikasyon riski taşımaktadır ve hala bu riskleri ortadan kaldırmaya yönelik çalışmalar büyük bir hızla devam etmektedir. Radyoterapi uygulamalarında ışın yolu üzerindeki hücrelerde ve uygulamanın yapıldığı dokunun yakın çevresinde oksidatif hasar oluşumu kaçınılmazdır. Biliyoruz ki, iyonize radyasyon canlı dokularda moleküler ve hücresel düzeylerde, fiziksel, kimyasal ve biyolojik çeşitli değişikliklere yol açar. Bu değişiklikler, maruz kalınan iyonize radyasyonun cinsine, miktarına ve süresine bağlı olarak geçici (onarılabilen) veya kalıcı (onarılamayan) değişiklikler olabilir (99). Bu noktada, oluşabilecek oksidatif hasarın şiddetinin ve türünün ortaya konması özellikle önemlidir. Aksi takdirde bir yandan mevcut tümör tedavi edilmeye çalışılırken yeni bir kanserleşme sürecinin başlangıç safhasının temeli atılmış olabilir. Çalışmamızda kullanılan ratlar “teleterapi” adı verilen teknikle belli bir uzaklıktan Co-60 radyoaktif elementinden yayımlanan iyonize radyoaktif ışınlarla maruz bırakılmıştır (111). Oluşması muhtemel olan oksidatif hasarın kaynağı bu teknikte kullanılan iyonize radyasyonun oluşturduğu ROT’lardır (107). Öte yandan kullanılan ratların yaşları 1 haftalık, 4 haftalık, 12 haftalık ve 1 yaşında gruplar oluşturacak şekilde seçildi. Bu yaklaşım, 1 haftalık ratların, insanlarda yeni doğana, 4 haftalık ratların ergene, 12 haftalık ratların erişkine ve 1 yaşındaki ratların yaşlıya tekabül edebileceği varsayımına dayanmaktadır. Literatürde ratlar üzerinde yapılan çalışmaların insanlara uyarlanarak yorumlanmasında benzer gruplandırımların kullanıldığı araştırmalar mevcuttur (127,128). Bu sayede elde edilen bulguların yaşa bağlı değişimini de değerlendirme imkanı bulabileceğimizi planladık. Oksidatif hasarın değerlendirilmesinde ise lipid peroksidasyonunun göstergelerinden biri olan MDA düzeyleri ile antioksidan enzim sisteminin bileşenlerinden SOD, CAT ve GSHPx aktivitelerini seçtik. Son yıllarda yapılan çalışmalarda oksidatif hasarın değerlendirilmesinde kullanılan parametre sayısında önemli gelişmeler dikkati çekmektedir. Protein oksidasyon ürünleri, 8-

oxoguanin düzeyi ya da ilgili enzimlerin mRNA düzeylerinin yeni geliştirilen tekniklerle ölçülmesi gibi (129,130,131,132). Bu konudaki bundan sonraki çalışmalarda moleküler düzeydeki analizlerle benzer parametrelerin ölçülmesi ve oksidatif hasarın moleküler düzeyde değerlendirilmesi faydalı olabilir.

Sonuçları değerlendirirken grupları hem kendi kontrol grupları ile hem de diğer yaş grupları ile karşılaştırdık. İstatistiksel analiz verileri göstermektedir ki yeni doğan ve yaşlı rat gruplarında antioksidan parametreler açısından istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenirken ($p<0,05$), ergen ve erişkin gruplarında ise gözlenen farklar genelde anlam içermemektedir ($p<0,05$).

İnsanlarda yeni doğana karşılık geleceğini düşünerek çalışmaya dahil ettiğimiz 1 haftalık ratlarda SOD aktivitesi, kontrole göre önemli ölçüde azalmıştır. SOD enzimi, süperoksit radikallerinin dismutasyonundan sorumludur (72). İyonize radyasyon nedeniyle konsantrasyonu artan serbest oksijen radikalleri, bir yandan SOD tarafından dismute edilirken bir yandan da SOD enziminin protein yapısı üzerinde birtakım hasarlar oluşturmaktadır. Bu hasarlar zamanla enzimin üç boyutlu konformasyonunda değişimlere neden olarak enzimi aktivite kaybına uğratabilir. Turnover'ı azalan SOD enziminin aktivite kaybı organizma tarafından gen düzeyinde üst düzenleme (up regulation) mekanizma ile kompanse edilebilir (131,132). Yani enzimin mRNA ekspresyonu gen düzeyinde artabilir ve bu da enzim sentezinin artmasını sağlar, ancak bu yolun yeni doğanda henüz tümüyle işlerlik kazanmış bir mekanizma olmayışı nedeniyle aktivite kaybının tolere edilememiş olması muhtemeldir. Bulgularımızda bu yöndedir. Ancak bu hipotetik yaklaşımın, beyin dokusundaki SOD mRNA düzeyinin ölçülmesi ile ya da immünohistokimyasal tekniklerle enzimin doku kesitlerinde boyanması ile desteklenmesi gerekmektedir. 1 haftalık ratların SOD aktivite düzeyleri diğer yaş gruplarıyla da kıyaslandığında anlamlı bir şekilde düşük olduğu göze çarpmaktadır. SOD aktivitesi ergen, erişkin ve yaşlılarda daha yüksek bulunmuştur. Tulunoğlu ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir çalışmada ergenlik ve erişkinliğe doğru artan yaş ile antioksidan kapasite arasında pozitif bir korelasyon olduğu rapor edilmiştir (133). Buna karşın birçok literatür bulgusu, olgunlaşma sonrası yaşlanmayla birlikte antioksidan kapasite ile artan yaş arasında negatif bir korelasyon bulunduğuna işaret etmektedir (128,129,131). Literatür bulgularına bakıldığında antioksidan sistemin

farklı yaş gruplarındaki dağılımına ilişkin bulgular çok tutarlı görünmese de yaşamın ilk evrelerinde ve yaşlılıkta genel olarak ergenlik ve erişkinlik dönemlerine kıyasla daha düşük bir antioksidan kapasite varlığı dikkat çekmektedir. Guemouri L. ve arkadaşları insanlar üzerinde yapmış oldukları bir çalışmada 4-97 yaş aralığında değişen grupların plazma ve eritrosit içi antioksidan enzim düzeylerini ölçmüşler ve 14-65 yaş arası erişkin gruplarda antioksidan sistemin daha stabil olduğunu, 14 yaş altındaki ve 65 yaş üstündeki yaş gruplarında ise anlamlı bir azalmanın var olduğunu rapor etmişlerdir (134). Yaşamın bu dönemlerinde sistemin yetersizliğinin yanı sıra zaman zaman maruz kalınan oksidatif stres kaynağı etkenlere karşı organizmanın yanıtının da yeterli olamadığı bilinmektedir. Bunun muhtemel nedeni yeni doğanda sistemin henüz tümüyle oturmamış olması, yaşlılarda ise yaşlılıkla ilgili cereyan eden birçok mekanizma nedeniyle pek çok fizyolojik yanıt yolağının küntleşmesi gösterilebilir. Bu durum bulgularımıza yansımıştır. 1 haftalık ratlarda radyoterapiye bağlı oluşan oksidatif hasar nedeniyle meydana gelen aktivite kaybı diğer gruplardan daha dramatiktir ve tolere edilememiş görünmektedir. 1 haftalık grup dışında, SOD aktivitesinde kontrolüne göre ikinci azalma 1 yaşındaki ratlarda görülmektedir. Bu grupta SOD aktivitesinde dikkat çekici bir azalma görülmesine rağmen fark kullanılan istatistiksel testlere göre anlamlı bulunamamıştır. Yeni doğan ve yaşlı grubunun aksine sırasıyla ergen ve erişkin olarak nitelendirebileceğimiz 4 ve 12 haftalık rat gruplarının her ikisinde de radyoterapi sonrası SOD aktivitelerinde azda olsa artış göze çarpmaktadır. Organizmada antioksidan sistemin ihtiyaç halinde tetiklenebildiği, oluşan radikallerin başlangıçta antioksidan enzimlerin sentezinden sorumlu genlerin ekspresyonunu arttırdığı bilinmektedir. Kinoshita A. ve arkadaşları hücre kültür ortamında yapmış oldukları bir çalışmada oluşturulan oksidatif stresin SOD enzimi mRNA ekspresyonunu indüklediğini rapor etmişlerdir (135). Niwa Y. ve arkadaşları da lökosit hücreleri üzerinde gerçekleştirdikleri çalışmalarında benzer şekilde SOD, GSHPx ve CAT enzim sentezinin indüklendiği yönünde bulgular elde etmişlerdir (136). Bu mekanizmanın bu iki grubun SOD düzeylerindeki artışta etkili olabileceğini, bu yanıtın yeni doğan ve yaşlı rat gruplarında yeterince oluşmadığını düşünüyoruz.

Glutasyon peroksidaz ve katalaz enzimleri peroksidatif ajanların (hidrojen peroksit ya da lipid peroksitleri gibi) detoksifikasyonundan sorumlu iki enzimdir. Oksidatif stres varlığında ilk antioksidan savunmanın GSHPx tarafından verildiği,

oksidatif stresin arttığı durumlarda ise CAT'ında GSHPx aktivitesine katkı sağladığı ileri sürülmektedir (137). Çalışma gruplarımız içerisinde GSHPx'da en dramatik azalma SOD aktivitesinde olduğu gibi 1 haftalık rat grubunda gerçekleşmiştir. Işımanın tek doz olması oluşan peroksitlerin sadece GSHPx aktivitesiyle tolere edilebildiğini düşündürmektedir, ancak her ne kadar istatistiksel olarak anlamlı bulunmasa da 1 haftalık rat grubunun CAT aktivitesinde de dikkat çeken bir azalma göze çarpmaktadır. Her iki enzim bir yandan iyonize radyasyon sonucu oluşan serbest radikallerin oluşturduğu peroksitleri detoksifiye ederken, bir yandan da SOD aktivitesi süresince oluşan hidrojen peroksitin de ortamdan temizlenmesinde rol oynamışlardır. Çünkü SOD enzimi bir yandan süperoksiti dismute ederken bir yandan da H_2O_2 oluşturmaktadır. Bu nedenle bu iki enzimin aktiviteleri, SOD aktivitesi aracılığıyla devamlı olarak hidrojen peroksit oluştuğundan, bir süreklilik göstermek durumunda olup aktivite boyunca turnoverlarının azalması kaçınılmaz olacaktır. Çünkü sentezlenen bir enzimin organizmadaki yaşam süresi boyunca etki edebileceği substrat miktarı sınırlıdır. Yoğun aktivite doğal olarak enzimin yaşam süresini kısaltacaktır. Özellikle bu tip redoks reaksiyonlarını kataliz eden enzimlerde, substrat moleküller çoğunlukla oksidan türler olduğundan, yoğun aktivite, protein yapısındaki enzim molekülünü oluşturan aminoasitlerin yan gruplarında oksidasyonlara ve konformasyon değişikliklerine neden olacaktır. Özellikle oksidasyona uğrayan aminoasitlerin enzimin aktif merkezinde yer alması enzim aktivitesinde ciddi azalmalar oluşturur. Literatürde oksidatif hasara bağlı olarak protein yapı hasarı ve enzim turnoverlarının azalması yönünde bulgular içeren çok sayıda araştırmaya rastlamak mümkündür (138,139,140,141). Bu noktada oluşan hasarlar önemli düzeye ulaşmamışsa tamir sistemleri tarafından (örneğin; protein karboksimetil transferaz: spontan olarak gelişen atipik proteinlerin tamirinde rol oynar) ortadan kaldırılabilir (142,143), ancak oluşan hasarın yoğun olması enzimatik aktiviteyi önemli ölçüde inhibe eder ya da enzimin tümüyle inaktif olmasına neden olur. GSHPx ve CAT için de ergen ve erişkin rat gruplarında önemli değişimler olmadığını görmekteyiz. Aktivite kayıpları 1 haftalık ve 1 yaşındaki ratlarda daha belirgindir. Bu durumda yeni doğan ve yaşlı ratlarda GSHPx ve CAT için ya hasarlanan proteinler yeterince tamir edilememektedir ya da aktivite kaybı enzim sentezinin arttırılması yoluyla yerine konulamamıştır diyebiliriz.

Lipid peroksidasyonunun son ürünü olan malondialdehit oksidatif stresin değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılan önemli markırlardandır. Genel kanı, oluşan oksidatif stresin neden olduğu lipid peroksidasyonu sonucu MDA düzeylerinin artacağı yönündedir ve literatürde bu yaklaşımı destekleyen çok sayıda çalışmaya rastlamak mümkündür (144,145,146,147). Bizim bulgularımızda genel olarak bu yönde olup bütün gruplarda artış saptanmıştır, ancak en ciddi fark yine 1 yaşındaki rat grubunda gözlenmektedir. Bu durum 1 yaşındaki rat grubunda antioksidan enzim sistemlerindeki aktivite kaybının diğer gruplara oranla daha fazla olması ile uyumlu bir sonuçtur. Doğal olarak antioksidan kapasitenin azalması sonucu ortamdan yeterince temizlenemeyen radikal moleküller daha fazla lipid peroksidasyonuna neden olacaktır. Bir diğer nokta ise, oluşan aldehit yapıları moleküllerin aldehit dehidrogenaz enzim sistemi tarafından metabolize edilebilme yeteneğinin kısıtlı olma ihtimalidir (148,149). Yaşlılıkla birlikte bazal metabolizma hızı ve bir çok metabolik prosesin yavaşladığı ve fizyolojik kapasite kaybı bilinen bir gerçektir. Bu bağlamda, yaşlı gruptaki MDA yüksekliğinin daha dramatik olması hem radikallerin hem de oluşan aldehit yapıları moleküllerin yeterli hızda temizlenememiş olmasına işaret etmektedir. Öte yandan iyonize radyasyonun tüm gruplarda MDA düzeylerinin artmasına neden olması radyoterapi kullanımında göz ardı edilmemesi gereken bir noktadır.

Sonuç olarak radyoterapi tekniği, kullanılan iyonize radyasyon nedeniyle antioksidan sistemleri etkilemekte ve doku MDA düzeylerini artırmaktadır. Antioksidan sistemdeki ve MDA düzeylerindeki değişikliklerin 1 haftalık ve 1 yaşındaki ratlarda daha dramatik olduğunu ve bu durumun yeni doğan ratlarda henüz birçok sistemin tam olarak yerleşmiş olmayışından ve 1 yaşındaki (yaşlı) ratlarda ise yaşlanmaya bağlı olarak ortaya çıkan fizyolojik kapasitedeki kayıplardan kaynaklandığını söyleyebiliriz. Kullanılan ışın 8 Gray ve tek doz olup çok yüksek olmamakla birlikte yine de canlı sistem üzerinde enzimatik aktivite kaybı ve lipid peroksidasyonu gibi birtakım olumsuz etkilere neden olmuştur. Buna rağmen bu etkiler, kanser tedavisinde önemli ve etkili bir silah olan radyoterapi tekniğini yarar/zarar ilişkisi açısından şüphe altında bırakacak bir düzeyde değildir. Özellikle ergen ve erişkin popülasyonda kümülatif dozun 8 Gray'e eşdeğer dozlarda olduğu radyoterapi uygulamalarının güvenli olduğunu, ancak özellikle yaşlı hastalarda yüksek oranda lipid peroksidasyonuna neden olduğundan tedavi boyunca ekzojen bir antioksidanla (E vitamini, melatonin, likopen gibi) sistemin

desteklenmesinin yararlı olabileceğini düşünmekteyiz (150,151,152). Çalışmamızın bundan sonraki adımını hem oksidatif stresin moleküler düzeyde ortaya konması hem de uygulama yapılan ratlarda organizmanın antioksidan bir ajanla desteklenmesiyle elde edilecek bulguların değerlendirilmesi oluşturacaktır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

8 Gray dozda tüm vücut radyoterapisi uygulanan ratların beyin dokusunda iyonize radyasyona bağlı olarak antioksidan sistemler etkilendi ve doku MDA düzeyleri arttı. Antioksidan sistemlerdeki ve MDA düzeylerindeki değişikliklerin 1 haftalık ve 1 yaşındaki ratlarda daha fazla olduğu bulundu. Ergen ve erişkin popülasyonda bu dozda radyoterapi kullanımının güvenli olduğunu, fakat yaşlı bireylerde yüksek düzeydeki lipid peroksidasyonundan dolayı tedaviye destek olarak ekzojen bir antioksidanın kullanılmasının yararlı olabileceğini düşünüyoruz.

TÜM VÜCUT RADYOTERAPİSİNİN FARKLI YAŞ GRUPLARINDAKİ RATLARDA BEYİN DOKUSU LİPİD PEROKSİDAYONU VE ANTİOKSİDAN SİSTEM PARAMETRELERİ ÜZERİNE ETKİLERİ

7. ÖZET

Radyoterapide kullanılan iyonize ışınlar organizmada doza ve ışınlama süresine bağlı olarak serbest radikallerin oluşmasına ve oksidatif strese neden olurlar. Reaktif oksijen türlerinin oluşturduğu oksidatif stres, kardiyovasküler hastalıklar, nörodejeneratif bozukluklar, yaşlanma ve kanser gibi birçok hastalığın etiyolojisinde etkili olduğu düşünülmektedir. Bu çalışmada, kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılan radyoterapinin ratların beyin dokusunda oluşturduğu lipid peroksidasyonunun ve antioksidan sistem parametrelerinin düzeylerinin yaşa bağlı değişiminin ve bu parametrelerin birbirleri ile ilişkilerinin araştırılması amaçlandı.

Bu çalışmada 35 adet Wistar albino tipi erkek ratlar, 1 haftalık (n=10), 4 haftalık (n=10), 12 haftalık (n=10) ve 1 yaş (n=5) olmak üzere dört gruba ayrıldı. Tüm gruptaki ratlara Co-60 cihazı ile 8 Gy tek fraksiyon radyasyon uygulandı. Sakrifiye edilen ratların beyin dokuları fosfat tamponu ile homojenize edildi. Homojenatların yarısı ile MDA ölçümü yapıldı. Diğer yarısından elde edilen süpernatant ile protein miktar tayini, SOD, CAT, GSHPx aktivite tayinleri yapıldı. SOD aktivitesinin, 1 haftalık ratlarda anlamlı derecede azaldığı, diğer gruplarda anlamlı olmasa da azalmanın olduğu bulundu ($p<0,05$). GSHPx ve CAT aktivitesindeki azalma 1 haftalık ve 1 yaşındaki ratlarda daha belirgindir. Ergen ve erişkin ratlarda önemli değişimler olmadı ($p<0,05$). MDA düzeyinde tüm yaş gruplarında artma gözlemlendi. En yüksek MDA düzeyinin yaşlı ratlarda olduğu bulundu ($p<0,05$).

Sonuç olarak radyoterapi tekniğinde kullanılan iyonize radyasyon antioksidan sistemleri etkilemekte ve doku MDA düzeylerini arttırmaktadır. Bu değişiklikler 1 haftalık ve 1 yaşındaki ratlarda daha fazladır. Bu durumun yeni doğan ratlarda henüz birçok sistemin tam olarak yerleşmiş olmayışından ve yaşlı ratlarda ise yaşlanmaya bağlı olarak ortaya çıkan fizyolojik kapasitedeki kayıplardan kaynaklandığını söyleyebiliriz.

Anahtar kelimeler: Radyoterapi, Serbest radikal, Yaşlanma, Antioksidan sistemler, Lipid peroksidasyonu.

EFFECTS OF WHOLE BODY RADIOTHERAPY ON LIPID PEROXIDATION AND ANTIOXIDANT SYSTEM PARAMETERS OF BRAIN TISSUES IN DIFFERENT AGED GROUPS OF RATS

8. SUMMARY

Exposure of ionizing radiation that is used in radiotherapy caused the production of free radicals and oxidative stress depending on dose and the time of irradiation in organism. Oxidative stress produced by reactive oxygen species have been thought to be effective on the pathogenesis of cardiovascular diseases, neurodegenerative disorders, aging and cancer. This study aims to find out the age-related changes of lipid peroxidation and antioxidant system parameters levels produced by radiotherapy that is widely used on cancer treatment and their connection between each other.

In this study, thirty-five male Wistar albino rats (ages between 1, 4, 12 weeks (n=10) and 1 year (n=5)) were divided into four groups. For the rats in all groups irradiation were performed on a Cobalt-60 unit using a single fraction of 8 Gy. The brain tissues of the rats were homogenized in PBS solution. The homogenate was divided into two portions. One portion of the homogenate was used for the measurement of the MDA. The other portion of homogenate was centrifuged. The supernatant was separated and used for the measurement of the SOD, CAT, GSHPx and Lowry protein analyze. The SOD activity decreased significantly in 1 week old rats. Decreased activities were also seen in the other groups, but it was insignificant ($p<0,05$). The decrease in GSHPx and CAT activities was more obvious in 1 week and 1 year old rats than others. No change in enzyme activities of 4 and 12 weeks old rats was found to be significant ($p<0,05$). The MDA levels of all groups increased. The highest MDA levels were seen in 1 year old rats ($p<0,05$).

Finally, ionizing radiation used radiotherapy have effected antioxidant systems and increased MDA levels of the tissue. These changes were more in the 1 week and 1 year old rats than others. According to the results of the present study, many systems of newborn rats don't run properly and the 1 year old age rats have the loss of physiological capacities.

Key Words: Radiotherapy, Free radicals, Aging, Antioxidant systems, Lipid peroxidation.

9. KAYNAKLAR

- 1) Kanışkan, N., Açıklalp, E., Caner, N., Güven, A.: Radyoaktivite. Editör: Zor, L.: Temel Kimya. Eskişehir: Anadolu Üniversitesi Yayınları No: 672, 234-250, 1996
- 2) Little, J.B.: Ionizing radiation. Edited by: Weichselbaum, R.R.: Cancer Medicine Section 3/Cancer etiology. London: BC Decker Inc, 207-218, 2003
- 3) <http://www.cevreorman.gov.tr/belgeler/e-radyasyon.pdf> 20.08.06
- 4) Ozalpan, A. : Temel Radyobioloji, 1. basım. İstanbul: Haliç Üniversitesi yayınları, ss.353, 2001
- 5) Portakal, O., Özkaya, Ö., Inal, M.E., Bozan, B., Koşan, M., Sayek, I.: Coenzyme Q10 concentrations and antioxidant status in tissues of breast cancer patients. *Clinical Biochemistry* 33, (4), 279-284, 2000
- 6) Pelaez, F.C., Brooks, P.J., Stedeford, T., Song, S., Ramos, JS.: DNA damage, repair and antioxidant systems in brain regions: a correlative study. *Free Radical Biology&Medicine*, 28, (5), 779-785, 2000
- 7) Abdollahi, M., Ranjbar, A., Shadnia, S., Nikfar, S., Rezaie, A.: Pesticides and oxidative stres: a review. *Med Sci Monit* 10(6), 141-147, 2004
- 8) Halliwell, B.: Oxygen radicals: A commonsense look at their nature and medical importance. *Medical Biology* 62, 71-77, 1984
- 9) Pierrefiche, G., Laborit, H.: Oxygen free radicals, melatonin and aging. *Experimental Gerontology* 30, 213-227, 1995
- 10) Halliwell, B.: Free radical reactions in human disease. Edited by. Fuchs J., Packer L.: Environmental Stressors in Health and Disease. New York: Marcel Dekker Inc., 1-16, 2001
- 11) Akkuş, İ.: Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri, Konya: Mimoza yayınları, Kuzucular ofset, 1995
- 12) Evelson, P., Travacio, M., Repetto, M., Escobar, J., Llesuy, S., Lissi, EA.: Evaluation of total reactive antioxidant potential (TRAP) of tissue homogenates and their cytosols. *Archives of biochemistry and biophysics*, 388, (2), 261-266, 2001
- 13) Oztürk, M., Güzelhan, Y., Sayar, K., Tüzün, U.: Yaygın gelişimsel bozukluğu olan çocuklarda plazma malondialdehit ve glutatyon düzeylerinin araştırılması. *Klinik Psikofarmakoloji Bülteni* 11, (3), 155-159, 2001
- 14) Burçak, G., Andican, G.: Oksidatif DNA hasarı ve yaşlanma. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi* 35, (4), 159-169, 2004

- 15) Malekiran, A.A., Ranjbar, A., Rahzani, K., Pilehvarian, A.A., Rezaie, A., Zamani, M.J., Abdollahi, M.: Oxidative stress in radiology staff. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 20, 215-218, 2005
- 16) Temple, N.J.: Antioxidants and disease: more questions than answers. *Nutrition Research*, 20(3), 449-459, 2000
- 17) Marques, F.O.: Hagen, M.E.K., Pederzoli, C.D., Sgaravatti, A.M., Durigon, K., Testa, C.G., Wannmacher, C.M.D., et al.: Glutaric acid induces oxidative stress in brain of young rats. *Brain Research* 964, (1), 153-158, 2003
- 18) Devi, G.S., Prasad, M.H., Saraswathi, I., Raghu, D., Rao, D.N., Reddy, P.P.: Free radicals antioxidant enzymes and lipid peroxidation in different types of leukemias. *Clinica Chimica* 293, 53-62, 2000
- 19) Chakraborty, H., Ray, S.N., Chakrabarti, S.: Lipid peroxidation associated protein damage in rat brain crude synaptosomal fraction mediated by iron and ascorbate. *Neurochemistry* 39, 311-317, 2001
- 20) Rokyta, R., Holecek, V., Pekarkova, I., Racek, J., Trefil, L., Yamamoto, A.: Free radicals after painful stimulation are influenced by antioxidants and analgesics. *Neuroendocrinol Lett* 24, (5), 304-309, 2003
- 21) Yılmaz, S., Ozan, S.T.: Meme kanserli hastalarda lipid peroksidasyonu ve bazı enzim aktiviteleri arasındaki ilişki. *Turk J Biochem* 28, (4), 252-256, 2003
- 22) Oakley, G.G., Devanaboyina, U., Robertson, L.W., Gupta, R.C.: Oxidative DNA damage induced by activation of polychlorinated biphenyls (PCBs): implications for PCB-induced oxidative stress in breast cancer. *Chem Res Toxicol* 9, 1285-1292, 1996
- 23) McCann, S.M.: The nitric oxide hypothesis of brain aging. *Experimental Gerontology* 32, 431-440, 1997
- 24) Harman, D.: Free radical theory of ageing: applications. *Asia Pacific Heart J* 7, (3), 169-177, 1998
- 25) Picot, I.C., Nicole, A., Clement, M., Bourre, J.M., Sinet, P.M.: Age-related changes in antioxidant enzymes and lipid peroxidation in brains of control and transgenic mice overexpressing copper-zinc superoxide dismutase. *Mutation Research*, 275, 281-293, 1992
- 26) Gregory, E.M., Fridovich, I.: Induction of superoxide dismutase by molecular oxygen. *Journal of Bacteriology* 114, (2), 543-548, 1973
- 27) Proctor, P.H., Reynolds, E.S.: Free radicals and disease in man. *Physiological and Physics and Medical NMR* 16, 175-195, 1984
- 28) Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C.: Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* 219, 1-14, 1984

- 29) Halliwell, B.: Oxidants and the central nervous system: some fundamental questions. *Acta Neurol Scand* 126, 23-33, 1989
- 30) Andrade Junior, D.R., Souza, R.B., Santos, S. A., Andrade, D.R.: Oxygen free radicals and pulmonary disease. *J Bras Pneumol* 31, (1), 60-68, 2005
- 31) Gregory, E.M., Fridovich, I.: Oxygen toxicity and the superoxide dismutase. *Journal of Bacteriology* 114, (3), 1193-1197, 1973
- 32) Tyler, D.D.: Polarographic assay and intracellular distribution of superoxide dismutase in rat liver. *Biochem J* 147, 493-504, 1975
- 33) Kılınç, K., Kılınç, A.: Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri. *Hacettepe Tıp Dergisi* 33, (2), 110-116, 2002
- 34) McCord, J.M.: Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* 312, 159-163, 1985
- 35) Halliwell, B.: Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *American Journal of Medicine* 91, (3C), 14-22, 1991
- 36) Yu, B.P.: Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological Reviews* 74, (1), 139-162, 1994
- 37) Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C.: Free Radicals in Biology and Medicine, 3ed: New York: Oxford University Press, pp. 936, 1999
- 38) Koppenol, W.H.: The Haber- Weiss cycle-70 years later. *Redox Report* 6, (4), 229-234, 2001
- 39) Waddell, J.P., Mayer, G.C.: Effects of Fenton's reagent and potassium permanganate applications on indigenous subsurface microbiota: a literature review. in Hatcher, K.J., ed., Proceedings of the 2003 Georgia Water Resources Conference, April 23-24, University of Georgia, Athens, GA, 2003
- 40) Chen, S., Schopfer, P.: Hydroxyl-radical production in physiological reactions: a novel function of peroxidase. *Eur J Biochem* 260, 726-735, 1999
- 41) Boşgelmez, I., Güvendik, G., Söylemezoğlu, T.: Hekzavalan Kromun fare beyin dokusunda indüklediği oksidatif stres üzerinde taurinin koruyucu ve antidotal etkisi. *Kocatepe Tıp Dergisi* 5, 63-67, 2004
- 42) Min, D.B., Boff, J.M.: Chemistry and reaction of singlet oxygen in foods. *Comprehensive reviews in food science and food safety* 1, 58-72, 2002
- 43) Lowenstein, C.J., Dinerman, J.L., Synder, S.H.: Nitric oxide: A physiologic Messenger. *Annals of Internal Medicine* 120, (3), 227-237, 1994

- 44) Joshi, M.S., Ponthier, J.L., Lancaster, J.R.: Cellular antioxidant and pro-oxidant actions of nitric oxide. *Free Radical Biology & Medicine* 27, 1357-1366, 1999
- 45) Mulligan, M.S., Hevel, J.M., Marletta, M.A., Ward, P.A.: Tissue injury caused by deposition of immune complexes is L-arginine dependent. *Proc Natl Acad Sci* 88, 6388-6342, 1991
- 46) Ozkan, M., Yüksekol, I.: Nitrik oksit ve akciğerler. *Toraks Dergisi* 4, (1), 88-94, 2003
- 47) Marsden, P.A., Heng, H.H.Q., Scherer, S.W., Stewart, R.J., Hall, Anne V.A., Shi, X., Tsui, L.C., Schappert, K.T.: Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *The Journal of Biological Chemistry* 268, (23), 17478-17488, 1993
- 48) Chartrain, N.A., Geller D.A., Koty P.P., Sitrin N.F., Nussler A.K., Hoffman E.P., Billiar T.R., Hutchinson N.I., Mudgett J.S.: Molecular cloning, structure and chromosomal localization of the human inducible nitric oxide synthase gen. *The Journal of Biological Chemistry* 269, (9), 6765-6772, 1994
- 49) Ward, P.A.: Mechanisms of endothelial cell killing by H₂O₂ or products of activated. *The American Journal of Medicine* 91, (3C), 89-94, 1991
- 50) Marquez, L.A., Dunford, H.B.: Chlorination of Taurine by myeloperoxidase. *The Journal of Biological Chemistry* 269, (11), 7950-7956, 1994
- 51) Champe, P.C., Harvey, R.A.: Biyokimya. Çev.Ed.: Tokullugil, A., Dirican, M., Ulukaya, E. 2. basım, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, 1997
- 52) Montine, T.J., Neely, M.D., Quinn, J.F., Markesbery, W.R., Roberts, L.J., Morrow, J.D.: Lipid peroxidation in aging brain and Alzheimer's disease. *Free Radical Biology & Medicine* 33, (5), 620-626, 2002
- 53) Girotti, A.W.: Mechanism of lipid peroxidation. *Journal of Free Radicals in Biology and Medicine* 1, (2), 87-95, 1985
- 54) http://arbl.cvmbs.colostate.edu/hbooks/pathphys/misc_topics/radicals.html
15.02.2006
- 55) Burton, G.W., Foster, D.O., Perly, B., Slater, T.F., Smith, I.C.P., Ingold, K.U.: Biological antioxidants. *Phil Trans R Soc Lond* 311, 565-578, 1985
- 56) Marnett, L.J.: Oxy radicals, lipid peroxidation and DNA damage. *Toxicology* 181-182, 219-222, 2002
- 57) Sabitha, K.E., Shyamaladevi, C.S.: Oxidant and antioxidant activity changes in patients with oral cancer and treated with radiotherapy. *Oral Oncology* 35, 273-277, 1999

- 58) Wefers, H., Sies, H.: The protection by ascorbate and glutathione against microsomal lipid peroxidation is dependent on vitamin E. *European Journal of Biochemistry* 174, 353-357, 1988
- 59) Dalle-Donne, I., ROTsi, R., Giustarini, D., Milzani, A., Colombo, R.: Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica Chimica Acta* 329, 23-38, 2003
- 60) Dalle-Donne, I., Giustarini, D., Milzani, Colombo, R., Rossi, R., Milzani, A.: Protein carbonylation in human disease. *Trends in Molecular Medicine* 9, (4), 169-176, 2003
- 61) Dean, R.T., Fu, S., Stocker, R., Davies, M.J.: Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J* 324, 1-18, 1997
- 62) Berlett, B.S., Stadtman, E.R.: Protein oxidation in aging, disease and oxidative stress. *The Journal of Biological Chemistry* 272, (33), 20313-20316, 1997
- 63) Stadtman, E.R., Levine, R.L.: Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids* 25, 207-218, 2003
- 64) Boer, J., Hoeijmakers, J.H.J.: Nucleotide excision repair and human syndromes. *Carcinogenesis* 21, (3), 453-460, 2000
- 65) Hansen, W.K., Kelley, M.R.: Review of mammalian DNA repair and translational implications. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 295, (1), 1-9, 2000
- 66) Cooke, M.S., Evans, M.D., Dizdaroğlu, M., Lunec, J.: Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J* 17, 1195-1214, 2003
- 67) Evans, M.D., Cooke, M.S.: Factors contributing to the outcome of oxidative damage to nucleic acids. *BioEssays* 26, 533-542, 2004
- 68) Hazra, T.K., Izumi, T., Maitt, L., Floyd, R.A., Mitra, S.: The presence of two distinct 8-oxoguanine repair enzymes in human cells: their potential complementary roles in preventing mutation. *Nucleic Acids Research* 26, (22), 5116-5122, 1998
- 69) Pelaez, F.C., Song, S., Parthasarathy, A., Epstein, C.J., Ramos, J.S.: Attenuation of age-dependent oxidative damage to DNA and protein in brainstem of Tg Cu/Zn SOD mice. *Neurobiology of Aging* 19, (4), 311-316, 1998
- 70) Halliwell, B.: Effect of diet on cancer development: is oxidative DNA damage a biomarker. *Free Radical Biology & Medicine* 32, (10), 968-974, 2002
- 71) Thornalley, P.J., Wolff, S.P., Crabbe, J.C., Stern, A.: The oxidation of oxyhaemoglobin by glyseraldehyde and other simple monosaccharides. *Biochem J* 217, 615-622, 1984

- 72) McCord, J.M., Fridovich, I.: An enzymic function for erythrocuprein (Hemocuprein). *The Journal of Biological Chemistry* 244, (22), 6049-6055, 1969
- 73) McCord, J.M., Edeas, M.A.: SOD, oxidative stress and human pathologies: a brief history and a future vision. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 59, 139-142, 2005
- 74) Janssen, A.M.L., Bosman, C.B., Duijin, W., Kubben, F.J.G.M., Griffioen, G., Lamers, C.B.H.W., Krieken, J.H.J.M., Velde, C.J.H., Verspaget, H.W.: Superoxide dismutases in gastric and esophageal cancer and the prognostic impact in gastric cancer. *Clinical Cancer Research* 6, 3183-3192, 2000
- 75) Yoshii, Y., Saito, A., Zhao, D.W., Nose, T.: Copper/zinc superoxide dismutase, nuclear DNA content, and progression in human gliomas. *Journal of Neuro-Oncology* 42, 103-108, 1999
- 76) Fridovich, I.: Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* 64, 97-112, 1995
- 77) Burk R.F., Nishiki K., Lawrence R.A., Chance, B.: Peroxide removal by selenium-dependent and selenium-independent glutathione peroxidases in hemoglobin-free perfused rat liver. *The Journal of Biological Chemistry* 253, (1), 43-46, 1978
- 78) Harapin, I., Bauer, M., Bedrica, L., Potočnjak, D.: Correlation between glutathione peroxidase activity and the quantity of selenium in the whole blood of beef calves. *Acta Vet Brno* 69, 87-92, 2000
- 79) Thyagaraju, K., Hemavathi, B., Vasundhara, K., Rao, A.D., Devi, K.N.: Comparative study on glutathione transferases of rat brain and testis under the stress of phenobarbital and β -methylcholanthrene. *Journal of Zhejiang University Science* 6B, (8), 759-769, 2005
- 80) Carlberg, I., Mannervik, B.: Glutathione reductase. *Methods in Enzymology* 113, 484-490, 1985
- 81) Kostner, G.M., Oettl, K., Jauhiainen, M., Ehnholm, C., Esterbauer, H., Dieplinger, H.: Human plasma phospholipid transfer protein accelerates exchange / transfer of α -tocopherol between lipoproteins and cells. *Biochem J* 305, 659-667, 1995
- 82) Halifeoğlu, I., Karataş, F., Ustündağ, B., Canatan, H., İlhan, N.: Tiner ile çalışan kişilerde tiner solumanın antioksidan vitaminler üzerine etkisi. *Biyokimya Dergisi* 2, (24), 29-32, 1999
- 83) Papas, A.M.: Vitamin E: Tocopherols and tocotrienols. Edited by: Papas, A.M.: Antioxidant Status, Diet, Nutrition, and Health. USA: CRC Press LLC, 189-210, 1999
- 84) <http://www.uic.edu/.../vitamin%20E/vit-E.gif> 15.11.2006
- 85) http://ro.wikipedia.org/wiki/Acid_ascorbic 15.11.2006

- 86) Rumsey, S.C., Wang, Y., Levine, M.: Vitamin C. Edited by: Papas, A.M.: Antioxidant Status, Diet, Nutrition, and Health. USA: CRC Press LLC, 159-187, 1999
- 87) Peterkofsky, B., Udenfriend, S.: Enzymatic hydroxylation of proline in microsomal polypeptide leading to formation of collagen. *Proc N.A.S.* 53, 335-342, 1965
- 88) Erdem, G., Onal, A.M., Kısakürek, D., Ogüs, A.: Free radical mediated interaction of ascorbic acid and ascorbate / Cu (II) with viral and plasmid DNAs. *J Biosci* 19, (1), 9-17, 1994
- 89) Boileau, T.W.M., Moore, A.C., Erdman, J.W.: Carotenoids and vitamin A. Edited by: Papas, A.M.: Antioxidant Status, Diet, Nutrition, and Health. USA: CRC Press LLC, 133-158, 1999
- 90) <http://lpi.oregonstate.edu/f-w00/flavonoid.html> 15.11.2006
- 91) Halliwell, B., Gutteridge, J.M.: The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys* 280, (1), 1-8, 1990
- 92) Gutteridge, J.M.: Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem* 41, (12Pt2), 1819-1828, 1995
- 93) Harman, D.: Extending functional life span. *Experimental Gerontology* 33, 95-112, 1998
- 94) Mariani, E., Polidori, M.C., Cherubini, A., Mecocci, P.: Oxidative stress in brain aging, neurodegenerative and vascular diseases: An overview. *Journal of Chromatography B* 827, (1), 65-75, 2005
- 95) Junqueira, V.B.C., BarROT, S.B.M., Chan, S.S., Rodrigues, L., Giavarotti, L., Abud, R.L., Deucher, G.P.: Aging and oxidative stress. *Molecular Aspects of Medicine* 25, 5-16, 2004
- 96) Harman, D.: The aging process: major risk factor for disease and death. *Proc Natl Acad Sci* 88, 5360-5363, 1991
- 97) Akın, A.: Temel Nükleer Tıp. Ankara: Ankara Üniversitesi Basımevi no:417, ss.519, 1981
- 98) Engizek, T., Soytürk, B.: Radyobioloji ve Sağlık Fiziği Laboratuvar Kılavuzu. İstanbul: İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Basımevi no.218, ss.88, 1991
- 99) Kaya, A.: İyonize radyasyonun biyolojik etkileri. *Dicle Tıp Dergisi* 29, (3), 65-75, 2002
- 100) Yaren, H., Karayılanoğlu, T.: Radyasyon ve insan sağlığı üzerine etkileri. *TSK Koruyucu Hekimlik Bülteni* 4, (4), 199-208, 2005

- 101) Uzal, C., Caloğlu, M.: Kanser etyolojisinde iyonizan radyasyonun yeri. *Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 19, (3-4), 177-182, 2002
- 102) Algüneş, Ç.: Radyasyon Biyofiziği, Edirne: Trakya Üniversitesi yayınları no:51, ss.135, 2002
- 103) Kılıçkaya, S.: Dalgalar. Editör: Cemalcılar, A.: Temel Fizik. Eskişehir: Anadolu Üniversitesi Yayınları No: 674, 75-85, 1996
- 104) http://www.taek.gov.tr/bilgi/elkitabi_bROTur/tanisal_radyoloji/tanisal_radyoloji.htm 20.06.2006
- 105) Hall, E.J.: Radiobiology for the Radiologist, 3ed. Pennsylvania: Lippincott Company, pp.535, 1988
- 106) <http://web.inonu.edu.tr/~ekekili/pdf/radbiyoletki.pdf> 20.10.2006
- 107) Riley, P.A.: Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. *Int J Radiat Biol* 65, (1), 27-33, 1994
- 108) Undeğer, U., Giray, B., Zorlu, F., Oge, K., Baçaran, N.: Protective effects of melatonin on the ionizing radiation induced DNA damage in the rat brain. *Exp Toxic Pathol* 55, 379-384, 2004
- 109) <http://web.inonu.edu.tr/~ekekili/document/nukleertipkitap.doc> 15.10.2006
- 110) Perez, C.A., Brady, L.W., RotiRoti, J.L.: Chapter 1/Overview. Edited by: Perez, C.A., Brady, L.W.: Principles and Practice of Radiation Oncology. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1-78, 1997
- 111) <http://www.ato.org.tr/konuk/radonk/doktor.htm> 18.10.2006
- 112) Gürsel, O.: Ünite:9 Sinir Sistemi. Editör: Kesim, M.: Anatomi. Eskişehir: Anadolu Üniversitesi Yayınları No: 492, 159-170, 1991
- 113) <http://www.minddisorders.com/A-Br/Brain.html> 04.11.2006
- 114) Rogers, A.W.: Textbook of Anatomy. New York: Churchill Livingstone, pp.779, 1992
- 115) Odar, I.V.: Anatomi Ders Kitabı 1.cilt. Ankara: Salmanlar Ofset Tesisleri, ss.565, 1986
- 116) Dere, F.: Nöroanatomi ve Fonksiyonel Nöroloji. Adana: Okullar Pazarı Kitabevi, ss.356, 1990
- 117) Emerit, J., Edeas, M., Bricaire, F.: Neurodegenerative disease and oxidative stress. *Biomedicine&Pharmacotherapy* 58, 39-46, 2004

- 118) Snell, R.S.: Clinical Neuroanatomy for Medical Students, 2ed. Boston: Little, Brown and Company Inc, pp. 613, 1987
- 119) Mohsen, M.M.A., Iravani, M.M., Spencer, J.P.E., Rose, S., Fahim, A.T., Motawi, T.M.K., Ismail, N.A.F., Jenner, P.: Age-associated changes in protein oxidation and proteasome activities in rat brain: Modulation by antioxidants. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 336, 386–391, 2005
- 120) Harman, D.: The aging process. *Proc Natl Acad Sci* 78, (11), 7124-7128, 1981
- 121) Sinir Sistemi <http://www.medibul.com/files.php?p=pp&cid=31> 20.10.2006
- 122) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Ronndall, R.J.: Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193, 265-271, 1951
- 123) Mihara, M., Uchiyama, M.: Determination of Malondialdehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem.*, 86, 271-278, 1978
- 124) Podezasy, J.J., Wei, R.: Reduction of iodonitrotetrazolium violet by superoxide radicals. *Biochem Biophys Res Com* 150, 1294-1350, 1988
- 125) Luck, H.: Catalase. Edited by: Bergmeyer HU: Methods of enzymatic analysis. New York: Academic Press, pp.885-888, 1963
- 126) Lawrence, R.A., Burk, R.F.: GSHPx activity in rat liver *Biochem. Biophys Res Comm*, 71, 952-958, 1976
- 127) Weir, C.P., Robaire, B.: Spermatozoa have decreased antioxidant enzymatic capacity and increased reactive oxygen species production during aging in the Brown Norway rat. *J Androl*, Oct 4, 2006 (In Press)
- 128) Sivonova, M., Tatarova, Z., Durackova, Z., Dobrota, Z., Lehotsky, J., Matakova, T., Kaplan, P.: Relationship between antioxidant potential and oxidative damage to lipids, proteins and dna in aged rats. *Physiol Res*, Nov 6, 2006 (In Press)
- 129) Andziak, B., O'Connor, T.P., Qi, W., DeWaal, E.M., Pierce, A., Chaudhuri, A.R., Van Remmen, H., Buffenstein, R.: High oxidative damage levels in the longest-living rodent, the naked mole-rat. *Aging Cell*, 5, (6), 463-71, 2006
- 130) Zhou, F.L., Zhang, W.G., Su, Z.X., Meng, X., Tian, W.: Relationship between Oxidative Stress and Depression in Patients with Acute Leukemia. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*, 14, (5), 872-5, 2006
- 131) Pahlavani, M.A., Haris, M.D.: Effect of in vitro generation of oxygen free radicals on T cell function in young and old rats. *Free Radic Biol Med*, 25, 903–13, 1998
- 132) Dalton TP, Shertzer HG, Puga A. Regulation of gene expression by reactive oxygen. *Annu Rev Toxicol*, 39, 67–101, 1999

- 133) Tulunoğlu, O., Demirtaş, S., Tulunoğlu, I.: Total antioxidant levels of saliva in children related to caries, age and gender. *International Journal Paediatric Dentistry*, 16, 186-191, 2006
- 134) Guemouri, L., Artur, Y., Herbeth, B., Jeandel, C., Cuny, G., Siest, G.: Biological variability of superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and catalase in blood. *Clin Chem*, 37, (11), 1932-7, 1991
- 135) Kinoshita, A., Kobayashi, D., Saitoh, Y., Tanabe, N., Uchino, K., Nishiguchi, K., Okumura, K., Komada, F.: Regulation of exogenous gene expression by superoxide. *Pharm Res*, 23, (11), 2536-41, 2006
- 136) Niwa, Y., Iizawa, O., Ishimoto, K., Akamatsu, H., Kanoh, T.: Age-dependent basal level and induction capacity of copper-zinc and manganese superoxide dismutase and other scavenging enzyme activities in leukocytes from young and elderly adults. *Am J Pathol*, 143, (1), 312-20, 1993
- 137) Remacle, J., Michiels, C., Raes, M.: The importance of antioxidant enzymes in cellular aging and degeneration. *EXS*, 62, 99-108, 1992
- 138) Pchejetski, D., Kunduzova, O., Dayon, A., Calise, D., Seguelas, M.H., Leducq, N., Seif, I., Parini, A., Cuvillier, O.: Oxidative Stress-Dependent Sphingosine Kinase-1 Inhibition Mediates Monoamine Oxidase A-Associated Cardiac Cell Apoptosis. *Circ Res*, Dec 7, 2006 (In Press)
- 139) Altindag, O., Erel, O., Aksoy, N., Selek, S., Celik, H., Karaoglanoglu, M.: Increased oxidative stress and its relation with collagen metabolism in knee osteoarthritis. *Rheumatol Int*, Nov 10, 2006 (In Press)
- 140) Gibbons, N.C., Wood, J.M., Rokos, H., Schallreuter, K.U.: Computer simulation of native epidermal enzyme structures in the presence and absence of hydrogen peroxide (H₂O₂): potential and pitfalls. *J Invest Dermatol*, 126, (12), 2576-82, 2006
- 141) Keeney, P.M., Xie, J., Capaldi, R.A., Bennett, J.P.Jr.: Parkinson's disease brain mitochondrial complex I has oxidatively damaged subunits and is functionally impaired and misassembled. *J Neurosci*, 26, (19), 5256-64, 2006
- 142) IngROTso, D., Cimmino, A., D'Angelo, S., Alfinito, F., Zappia, V., Galletti, P.: Protein methylation as a marker of aspartate damage in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient erythrocytes: Role of oxidative stress. *Eur J Biochem*, 269, 2032-2039, 2002
- 143) Ingrosso, D., D'Angelo, S., Carlo, E., Perna, A.F., Zappia, V., Galetti, P.: Increased methyl esterification of altered aspartyl residues in erythrocyte membrane proteins in response to oxidative stress. *Eur J Biochem*, 267, 4397-4405, 2000

- 144) Claeson, K., Aberg, F., Karlberg, B.: Free malondialdehyde determination in rat brain tissue by capillary zone electrophoresis: evaluation of two protein removal procedures. *Journal of Chromatography B*, 740, 87-92, 2000
- 145) Ray, G., Batra, S., Shukla, N.K., Deo, S., Raina, V., Ashok, S., Husain, S.A.: Lipid peroxidation, free radical production and antioxidant status in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 59, 163-170, 2000
- 146) Doganay, S., Borozan, M.: The Effect of Resveratrol in Experimental Cataract Model Formed by Sodium Selenite. *Current Eye Research*, 31, 147-153, 2006
- 147) Ilhan, N., Halifeoglu, I., Ozercan, H.I., Ilhan, N.: Tissue malondialdehyde and adenosine triphosphatase level after experimental liver ischaemia-reperfusion damage. *Cell Biochem Funct*, 19, 207-212, 2001
- 148) Wenzel, P., Hink, U., Oelze, M., Schuppan, S., Schaeuble, K., Schildknecht, S., Ho, K.K., Weiner, H., Bachschmid, M., Münzel, T., Daiber, A.: Role of reduced lipoic acid in the redox regulation of mitochondrial aldehyde dehydrogenase (aldh-2) activity: Implications for mitochondrial oxidative stress and nitrate tolerance. *J. Biol. Chem*, Nov 13, 2006 (In Press)
- 149) Lassen, N., Pappa, A., Black, W.J., Jester, J.V., Day, B.J., Min, E., Vasiliou, V.: Antioxidant function of corneal ALDH3A1 in cultured stromal fibroblasts. *Free Radical Biology&Medicine*, 41, 1459-1469, 2006
- 150) Munoz-Castaneda, J.R., Montilla, P., Padillo, F.J., Bujalance, I., Munoz, M.C., Muntane, J., Tunez, I.: Role of serotonin in cerebral oxidative stress in rats. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 66, (1), 1-6, 2006
- 151) Montilla, P.L., Tunez, I.F., Munoz de Agueda, C., Gascon, F.L., Soria, J.V.: Protective role of melatonin and retinol palmitate in oxidative stress and hyperlipidemic nephropathy induced by adriamycin in rats. *J Pineal Res*, 25, (2), 85-93, 1998
- 152) Ahmed, R.S., Suke, S.G., Seth, V., Jain, A., Bhattacharya, S.N., Banerjee, B.D.: Impact of oral vitamin E supplementation on oxidative stress & lipid peroxidation in patients with polymorphous light eruption. *Indian J Med Res*, 123, (6), 781-7, 2006

10. ÖZGEÇMİŞ

13 Aralık 1979'da Osmaniye ilinde doğdum. İlköğretimimi Kırıkkale'de, lise eğitimimin ilk yıllarını Kırıkkale'de, son yılını ise Osmaniye'de tamamladım. 1998 yılında Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesini kazandım. 2002 yılında lisans eğitimimi tamamlayarak mezun oldum. 2003 yılında altı ay kadar eczane mesul müdürlüğü yaptım. 2004 yılında İnönü Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalında yüksek lisansa başladım. Aynı yıl İnönü Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalına Araştırma Görevlisi olarak atandım. Halen burada çalışmaktayım. Evliyim.