T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ

SIÇANLARDA DNA HASARINA NEDEN OLAN İYONİZE RADYASYONA KARŞI PYCNOGENOL®ÜN RADYASYON KORUYUCU VE ANTİOKSİDAN ETKİSİ

Proje No: **TSD-12-3936**

Proje Türü: Tez Projesi, Doktora

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:
Prof. Dr. Yusuf CANER
Temel Tıp Birimleri/Biyofizik

Araştırmacının Adı Soyadı
Fazile CANTÜRK
Temel Tıp Birimleri/Biyofizik

Eylül 2014
KAYSERİ

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

SIÇANLARDA DNA HASARINA NEDEN OLAN İYONİZE RADYASYONA KARŞI PYCNOGENOL®ÜN RADYASYON KORUYUCU VE ANTİOKSİDAN ETKİSİ

Hazırlayan
Fazile CANTÜRK

Danışman
PROF. DR. YUSUF CANER

Doktora Tezi

Bu çalışma; Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TSD-12-3936 kodlu proje ile desteklenmiştir.

Eylül 2014
KAYSERİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

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

Adı-Soyadı: Fazile CANTÜRK
İmza:

YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI

"Sıçanlarda DNA hasarına neden olan iyonize radyasyona karşı pycnogenol®ün radyasyon koruyucu ve antioksidan etkisi" adlı Doktora tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi' ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan	Danışman
Fazile CANTÜRK	Prof. Dr. Yusuf CANER

Biyofizik Ana Bilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. Yusuf CANER

Prof. Dr. Yusuf CANER danışmanlığında **Fazile CANTÜRK** tarafından hazırlanan **"Sıçanlarda DNA hasarına neden olan iyonize radyasyona karşı pycnogenol®ün radyasyon koruyucu ve antioksidan etkisi"** adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü **Biyofizik** Anabilim Dalında **Doktora** tezi olarak kabul edilmiştir.

08 / 09 / 2014

JÜRİ:

Danışman : Prof. Dr. Yusuf CANER

Üye : Prof. Dr. Mustafa Tunaya KALKAN

Üye : Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR

Üye : Prof. Dr. Munis DÜNDAR

Üye : Doç. Dr. Oğuz Galip YILDIZ

ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun ……...… tarih ve ……..…… sayılı kararı ile onaylanmıştır.

……. /……../ ……

Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜRLER

…Prof. Dr. Yusuf CANER'e, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik A.D. Başkanı ve tez danışmanım, eğitim hayatım boyunca ve yaptığım çalışmamda bana vermiş olduğu her türlü destekten dolayı,

…Doç. Dr. Oğuz Galip YILDIZ'a, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyasyon Onkolojisi A.D., sıçanların ışınlanması konusunda desteğinden dolayı,

…Doç. Dr. Servet ÖZCAN'a, Erciyes Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji A.D. ve Ziya-Betül Eren Genom ve Kök Hücre Merkezi Müdür Yardımcısı, her türlü yardımlarından ve desteğinden dolayı,

…Yrd. Doç. Dr. Arzu YAY'a, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji A.D., dokuların histo-patolojilerinin değerlendirilmesi ve sıçanlardan doku alınması aşamasında yardımlarından ve her türlü desteğinden dolayı,

…Yrd. Doç. Dr. Ferhan ELMALI ve Araş. Gör. Gökmen ZARARSIZ'a, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik A.D., sonuçların istatistiksel değerlendirilmesinde yardımlarından dolayı,

…Uzman Güler TOPRAK ve Dilek CEYLAN'a, Bozok Üniversitesi ve Erciyes Üniversitesi, biyokimyasal analizlerin yapılması aşamasında her türlü yardımlarını esirgemedikleri için,

…Araş. Gör. Kalender ÖZDOĞAN'a ve Arş. Gör. Burak TAN'a, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji A.D., dostluklarını ve yardımlarını esirgemedikleri için,

…Osman ÇETİN ve Muhammet CANATAN'a, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyasyon Onkolojisi A.D., sıçanların ışınlanmasında yardımlarından dolayı,

…Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji A.D. yüksek lisans ve doktora öğrencilerine, yardımlarından dolayı,

…Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeler Birimine, tezimi desteklediği için,

…Dr. Frank Schonlau ve Coralie ROTA'ya, Horphag Research Ltd (Geneva, Switzerland) şirketine, çalışmamda kullandığım antioksidanı (Pycnogenol) bağışladıkları için,

…Aileme; sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ve asıl teşekkürüm S'ana…

Fazile CANTÜRK

Eylül 2014

SIÇANLARDA DNA HASARINA NEDEN OLAN İYONİZE RADYASYONA KARŞI PYCNOGENOL®ÜN RADYASYON KORUYUCU VE ANTİOKSİDAN ETKİSİ

Fazile CANTÜRK
Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Biyofizik Anabilim Dalı
Doktora Tezi, Eylül 2014
Danışman: Prof. Dr. Yusuf CANER

KISA ÖZET

Sıçanlarda tüm vücut ışınlamasına bağlı oluşturulacak akciğer, böbrek ve karaciğer hasarına karşı, pycnogenolün radyasyon koruyucu ve antioksidan etkisi olup olmadığını tek hücre düzeyinde, doku düzeyinde ve biyokimyasal parametreler kullanarak araştırmaktır.

Çalışma, on grup ve her grupta sekiz-on haftalık ve ağırlığı 234±20 gr arasında değişen erkek Wistar Albino cinsi on sıçan olacak şekilde planlandı. Kontrol grubu, yalnız radyasyon grubu (γ-ışını), antioksidan gruplar ($P_{37.5,}$ $P_{75,}$ $P_{150,}$ P_{300}) ve radyasyon + antioksidan gruplar (γ-ışını + $P_{37.5}$, γ-ışını + P_{75}, γ-ışını + P_{150}, γ-ışını + P_{300}) olmak üzere on gruba ayrıldı. Radyasyon Cobalt-60 teleterapi cihazıyla uygulandı. Çalışma radyasyon uygulamasından üç gün önce başlatıldı ve dört gün sürdü. Pycnogenol %5'lik DMSO'da çözdürüldü. Kontrol ve radyasyon grubuna %5 DMSO, antioksidan gruplara 24, 48 ve 72. saatlerde pycnogenol verildi. Radyasyon + antioksidan gruplara 900 cGy γ-ışınıyla ışınlanmadan önce 24, 48 ve 72. saatlerde pycnogenol verildi. Radyasyon ve antioksidan uygulamasından 24 saat sonra, ketamin ve ksilazin genel anestezi altında sıçanların akciğerleri, karaciğerleri ve böbrekleri alındıktan sonra tüm sıçanlar sakrifiye edildi. Deney hayvanlarından alınan akciğer, karaciğer ve böbrek dokusunda, comet assay, histo-patolojik değerlendirme, CAT, SOD aktiviteleri ve MDA düzeyleri değerlendirildi.

Akciğer dokusunda, radyasyon grubunda kontrol grubuna göre CAT aktivitesinde azalma, SOD aktivitesinde ve MDA seviyesinde artma; radyasyon + antioksidan gruplarda SOD ve CAT aktivitelerinde artma ve MDA seviyesinde azalma bulundu. Karaciğer dokusunda, radyasyon grubunda CAT aktivitelerinde artma, SOD aktivitelerinde azalma ve MDA seviyesinde artma; buna karşılık radyasyon +

antioksidan grubunda CAT ve SOD aktivitelerinde artma ve MDA seviyesinde azalma tespit edildi. Böbrek dokusunda, radyasyon grubunda CAT aktivitelerinde ve SOD aktivitelerinde azalma ve MDA seviyesinde artma; buna karşılık radyasyon + antioksidan grubunda CAT ve SOD aktivitelerinde artma ve MDA seviyesinde azalma tespit edildi.

Akciğer, karaciğer ve böbrek dokularında kontrole göre diğer gruplarda comet parametreleri artmış, bu parametreler radyasyon + antioksidan gruplarda radyasyon grubuna göre azalmıştı ($p<0.001$).

Akciğer, karaciğer ve böbrek dokularında kontrol grubuna göre diğer gruplarda bozulmuş histo-patoloji, radyasyon + antioksidan gruplarda radyasyon grubuna göre düzelmiş histo-patoloji gözlendi.

Antioksidan etkileri gösterilen bir ajan olan pycnogenolün iyonize radyasyona bağlı akciğer, karaciğer ve böbrek hasarına karşı koruyucu olarak kullanılması, çalışmamızın verilerinden hareketle önerilebilir. Ancak, etki mekanizmasının ve moleküler temelinin daha iyi anlaşılması, doz, toksisite ve tolerabilite konularının daha da açıklığa kavuşması için, preklinik ve klinik çalışmalara da gerek vardır.

Anahtar kelimeler: Gama ışını, pycnogenol, karaciğer, böbrek, akciğer.

ANTIOXIDANT AND RADIOPROTECTIVE EFFECT OF PYCNOGENOL® AGAINST IONIZING RADIATION INDUCING DNA DAMAGE IN RATS.

Fazile CANTÜRK
Erciyes University, Graduate School of Health Sciences
Department of Biophysics
PhD Thesis, September 2014
Supervisor: Prof. Dr. Yusuf CANER

ABSTRACT

Investigation using single cell, tissue and biochemical parameters whithout effect of radiation protect and antioxidant of pycnogenol against liver, kidney and lung damage induced whole body irradiation in rats.

Study, a hundred of male Wistar Albino rats between 8-10 weeks of age and between 234±20 gr of weight were planed for the investigations. The animals were randomly assigned to ten groups, each consisting of 10 rats. Control group, four antioxidant groups ($P_{37.5,}$ $P_{75,}$ $P_{150,}$ P_{300}), only irradiation group (γ-irradiation), and four irradiation and antioxidant groups (γ-irradiation + $P_{37.5,}$ γ-irradiation + $P_{75,}$ γ-irradiation + $P_{150,}$ γ-irradiation + P_{300}). Irradiation was applied by Cobalt 60 teleterapy machine. The study was begined prior to three days from γ-irradiation and lasted four days. Pycnogenol extract was dissolved in 5% dimethyl sulfoxide (DMSO). Controls and γ-irradiation groups were give 5 % DMSO and antioxidant groups were given pycnogenol in 24, 48 and 72h. Irradiation + antioxidant groups were given pycnogenol in 24, 48 and 72h prior to 900 cGy of γ-irradiation. All animals were sacrified and was take kidney, lung and liver under anesthetized by intramuscular injection ketamine and xylazin 24 h post antioxidant and post irradiation. In the kidney, liver and lung tissue were evulated comet assay, histopathology, CAT, SOD activities and MDA level. In lung tissue, there was decrease CAT activites, increase SOD activites and MDA lever in irradiation groups according to control group. There was increase CAT, SOD activities and decrease MDA level in irradiation + antioxidant groups. In liver tissue, there was increase CAT activites, decrease SOD activites and increase MDA lever in irradiation groups according to control group. There was increase CAT, SOD activities and decrease MDA level in irradiation + antioxidant groups. In kidney tissue, there were decrease CAT and SOD activites and increase MDA lever in irradiation groups according to control group. There were increase CAT, SOD activities and decrease MDA level in irradiation + antioxidant groups.

In lung, liver and kidney tissues, there were increase comet parameters in others groups according to control group, there parameters were decrease in irradiation + antioxidant groups according to irradiation group ($p<0.001$).

In lung, liver and kidney tissues, there were destroy histopathology in others groups according to control group, there were improved histopathology in irradiation + antioxidant groups according to irradiation groups.

These findings suggest that pycnogenol an agent which shows the antioxidant effects, may be a useful protective against the ionizing radiation-induced lung, liver and kidney damage. However there is a need for preclinical and clinical research for better understanding of the mechanism of action and molecular bases in addition to further clarification of dosage, toxicity and tolerability issues.

Key words: Gamma radiation, pycnogenol, liver, kidney, lung.

İÇİNDEKİLER

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK....iv
YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI....v
ONAY....vi
TEŞEKKÜRLER....vii
KISA ÖZET....viii
ABSTRACT....x
İÇİNDEKİLER....xii
TABLOLAR LİSTESİ....xvi
ŞEKİLLER LİSTESİ....xvii
KISALTMALAR ve SİMGELER....xx
1.GİRİŞ VE AMAÇ....1
2. GENEL BİLGİLER....5
2.1. Radyasyon....5
2.2. Radyasyon Biyofiziği....6
2.3. İyonize Radyasyon....8
2.4. İyonize Radyasyonun Biyolojik Etkileri....9
2.4.1. İyonize Radyasyonun Hücre Düzeyinde Etkileri....13
2.4.2. İyonize Radyasyonun Doku ve Organ Düzeyinde Etkileri....16
2.4.2.1. İyonize Radyasyonun Akciğer Üzerine Etkileri....17
2.4.2.2. İyonize Radyasyonun Karaciğer Üzerine Etkileri....18
2.4.2.3. İyonize Radyasyonun Böbrek Üzerine Etkileri....19
2.5. Serbest Oksijen Radikalleri....19
2.5.1. Süperoksit Radikali ($O_2^{\bullet}$)....20
2.5.2. Hidroksil Radikali ($OH^{\bullet}$)....20
2.5.3. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)....21
2.5.4. Singlet Oksijen ($^1O_2$)....21
2.5.5. Nitrik Oksit (NO)....21
2.5.6. Serbest Oksijen Radikallerinin Oluşturduğu Oksidatif Hasar....22
2.5.6.2. Serbest Oksijen Radikallerinin Karbonhidratlar Üzerine Etkisi....22
2.5.6.3. Serbest Oksijen Radikallerinin Nükleik Asitler Üzerine Etkisi....23

2.5.6.4. Serbest Oksijen Radikallerinin Lipidler Üzerine Etkisi .24
2.5.6.4.1. Başlangıç Aşaması 24
2.5.6.4.2. Zincir Aşaması 24
2.5.6.4.3. Zincir Uzamasının Durması ve İkincil Ürünlerin Oluşması 25
2.6. Antioksidan Savunma Sistemleri 26
2.6.1. Süperoksit dismutaz (SOD) 27
2.6.2. Katalaz (CAT) 28
2.6.3. Glutatyon peroksidaz (GSH-Px) 28
2.7. Radyoterapi 28
2.7.1. Eksternal Radyoterapi (EBRT) ya da Teleterapi 29
2.7.2. Brakiterapi ya da İç Terapi 29
2.8. Radyasyon Koroyucular (Radyoprotektörler) 29
2.9. Pycnogenol® 30
2.9.1. Pycnogenol®'ün Tarihçesi 31
2.9.2. Pycnogenol® Bileşenleri 32
2.9.3. Pycnogenol Aktivitesinin Başlıca Moleküler Temeli 34
3. GEREÇ VE YÖNTEM 36
3.1. Kimyasallar ve Cihazlar 36
3.2. Hayvanlar 37
3.3. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Antioksidan Uygulaması 37
3.4. Radyasyon Uygulaması 38
3.5. Sıçanlardan Organların Alınması 39
3.6.Akciğer, Karaciğer ve Böbrek Doku Homojenatlarının Hazırlanması 40
3.7. Protein Miktarının Tayini 40
3.8. Enzim Aktivitelerinin Tayini 42
3.8.1. Malondialdehit (MDA) Tayini 42
3.8.2. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi Tayini 43
3.8.3. Katalaz Aktivitesi Tayini 45
3.9. DNA Hasar Tayini 46
3.9.1. DNA Hasarının Değerlendirilmesi 47
3.10. Histo-Patolojik Değerlendirmeler 47
3.10.1. Histolojik Değerlendirme 52

3.11. İstatistiksel Yöntem 52
4. BULGULAR 53
4.1. Akciğer Dokusunda Biyokimyasal Analizler 53
4.1.1. Akciğer Dokusunda MDA Düzeyleri 53
4.1.2. Akciğer Dokusunda CAT Aktivitesi 53
4.1.3. Akciğer Dokusunda SOD Aktivitesi 54
4.2. Karaciğer Dokusunda Biyokimyasal Analizler 55
4.2.1. Karaciğer Dokusunda MDA Düzeyleri 56
4.2.2. Karaciğer Dokusunda CAT Aktivitesi 57
4.2.3. Karaciğer Dokusunda SOD Aktivitesi 57
4.3. Böbrek Dokusunda Biyokimyasal Analizler 59
4.3.1. Böbrek Dokusunda MDA Düzeyleri 59
4.3.2. Böbrek Dokusunda CAT Aktivitesi 60
4.3.3. Böbrek Dokusunda SOD Aktivitesi 61
4.4. DNA Hasar Tayini (Comet Assay) 62
4.4.1. Akciğer Dokusunda DNA Hasar Tayini 62
4.4.1.1. Akciğer Dokusu L Head Değeri 63
4.4.1.2. Akciğer Dokusu L Tail Değeri 64
4.4.1.3. Akciğer Dokusu L Comet Değeri 65
4.4.1.4. Akciğer Dokusu Head DNA Değeri 65
4.4.1.5. Akciğer Dokusu Tail DNA Değeri 66
4.4.1.6. Akciğer Dokusu Tail Moment Değeri 68
4.4.1.7. Akciğer Dokusu Olive Tail Moment Değeri 68
4.4.2. Karaciğer Dokusunda DNA Hasar Tayini 69
4.4.2.1. Karaciğer Dokusu L Head Değeri 69
4.4.2.2. Karaciğer Dokusu L Tail Değeri 71
4.4.2.3. Karaciğer Dokusu L Comet Değeri 71
4.4.2.4. Karaciğer Dokusu Head DNA Değeri 72
4.4.2.5. Karaciğer Dokusu Tail DNA Değeri 73
4.4.2.6. Karaciğer Dokusu Tail Moment Değeri 75
4.4.2.7. Karaciğer Dokusu Olive Tail Moment Değeri 75
4.4.3. Böbrek Dokusunda DNA Hasar Tayini 76
4.4.3.1. Böbrek Dokusu L Head Değeri 76

4.4.3.2. Böbrek Dokusu L Tail Değeri....78
4.4.3.3. Böbrek Dokusu L Comet Değeri....78
4.4.3.4. Böbrek Dokusu Head DNA Değeri....79
4.4.3.5. Böbrek Dokusu Tail DNA Değeri....80
4.4.3.6. Böbrek Dokusu Tail Moment Değeri....82
4.4.3.7. Böbrek Dokusu Olive Tail Moment Değeri....82
4.5. Histo-Patolojik Değerlendirme....83
4.5.1. Akciğer Dokusunda Histo-patolojik Değerlendirme....83
4.5.2. Karaciğer Dokusunda Histo-patolojik Değerlendirme....85
4.5.3. Böbrek Dokusunda Histo-patolojik Değerlendirme....87
5.TARTIŞMA....89
6. SONUÇ....107
7. KAYNAKLAR....109
ÖZGEÇMİŞ

TABLOLAR LİSTESİ

Sayfa No

Tablo2.1. İyonize ve iyonize olmayan radyasyon.....6
Tablo 2.2. Radyo duyarlılığı en fazla olandan en az olana doku ve organların listesi…… 12
Tablo 2.3. Antioksidanlar…… 25
Tablo 2.4. HPLC analizi ile tespit edilmiş çam ağacı kabuğu ekstresinin yüzdeleri ve bileşenleri..... 32
Tablo 3.1. Deney gruplarının listesi…… 36
Tablo 3.2. Bradford standartlarının hazırlanması..... 39
Tablo 3.3. Ohkawa ve ark. geliştirdiği metoda göre MDA tayininde kullanılan kimyasallar..... 41
Tablo 3.4. Sun ve ark. geliştirdiği metoda göre SOD tayininde kullanılan deney karışımı…….....43
Tablo 3.5. Aebi ve ark. geliştirdiği metoda göre CAT tayininde kullanılan deney karışımı.....44
Tablo 3.6. Parafin doku takip yöntemi aşamaları..... 47
Tablo 3.7. Hematoksilen-eozin boyama yöntemi..... 48
Tablo 3.8. Masson trikrom boyama yöntemi..... 49
Tablo 3.9. PAS boyama yöntemi..... 50
Tablo 4.1. Akciğer dokusu gruplarında doku enzim düzeyleri…….....52
Tablo 4.2. Karaciğer dokusu gruplarında doku enzim düzeyleri…….....55
Tablo 4.3. Böbrek dokusu gruplarında doku enzim düzeyleri…….....59
Tablo 4.4. Akciğer dokusu gruplar arası DNA hasar ölçüleri..... 63
Tablo 4.5. Karaciğer dokusu gruplar arası DNA hasar ölçüleri…… 69
Tablo 4.6. Böbrek dokusu gruplar arası DNA hasar ölçüleri..... 76

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1. Elektromanyetik spektrum……..…… 6
Şekil 2.2. İyonize radyasyonun direkt ve indirekt etkisi.....10
Şekil 2.3. Temel monomerik flavonoid yapı..... 30
Şekil 2.4. Pycnogenol ekstresinde (üst) mevcut ana prosiyanidinlerin yapıları ve bunların olası oligomerik montajı (alt).....31
Şekil 3.1. Radyasyon uygulamada kullanılan kutu.....37
Şekil 3.2. Radyasyon uygulaması..... 37
Şekil 3.3. BSA standartlarından elde edilen grafik..... 40
Şekil 3.4. MDA standartlarından elde edilen grafik.....42
Şekil 4.1. Akciğer dokusu grupların doku MDA düzeyleri.....53
Şekil 4.2. Akciğer dokusu grupların doku CAT aktiviteleri.....54
Şekil 4.3. Akciğer dokusu grupların doku SOD aktiviteleri.....55
Şekil 4.4. Karaciğer dokusu grupların doku MDA düzeyleri.....56
Şekil 4.5. Karaciğer dokusu grupların doku CAT aktiviteleri.....57
Şekil 4.6. Karaciğer dokusu grupların doku SOD aktiviteleri.....58
Şekil 4.7. Böbrek dokusu grupların doku MDA düzeyleri.....60
Şekil 4.8. Böbrek dokusu grupların doku CAT aktiviteleri.....61
Şekil 4.9. Böbrek dokusu grupların doku SOD aktiviteleri.....62
Şekil 4.10. Akciğer dokusu gruplar arası length head (baş uzunluğu) değerleri, ortalama ± standart sapma.....64
Şekil 4.11. Akciğer dokusu gruplar arası length tail (kuyruk uzunluğu) değerleri, ortalama ± standart sapma.....64
Şekil 4.12. Akciğer dokusu gruplar arası length comet (comet uzunluğu) değerleri, ortalama ± standart sapma..... 65
Şekil 4.13. Akciğer dokusu gruplar arası head DNA (başta % DNA) değerleri, ortalama ± standart sapma.....66
Şekil 4.14. Akciğer dokusu gruplar arası tail DNA (kuyruk % DNA) değerleri, ortalama ± standart sapma.....67

Şekil 4.15. Akciğer doku hücreleri**,** A) Kontrol grubu tail DNA % 1.5**,** B) γ-ışını grubu tail DNA % 21.6 C) γ-ışını + P_{300} grubu tail DNA % 7.6 (Ethidium bromide boyama x200, Olympus, Japan) 67

Şekil 4.16. Akciğer dokusu gruplar arası tail moment (kuyruk moment) değerleri, ortalama ± standart sapma..... 68

Şekil 4.17. Akciğer dokusu gruplar arası olive tail moment (OTM) değerleri, ortalama ± standart sapma.....69

Şekil 4.18. Karaciğer dokusu gruplar arası length head (baş uzunluğu) değerleri, ortalama ± standart sapma.....70

Şekil 4.19. Karaciğer dokusu gruplar arası length tail (kuyruk uzunluğu) değerleri, ortalama ± standart sapma.....71

Şekil 4.20. Karaciğer dokusu gruplar arası length comet (comet uzunluğu) değerleri, ortalama ± standart sapma..... 72

Şekil 4.21. Karaciğer dokusu gruplar arası head DNA (baş DNA) değerleri, ortalama ± tandart sapma..... 73

Şekil 4.22. Karaciğer dokusu gruplar arası tail DNA (kuyruk DNA) değerleri, ortalama ± standart sapma.....74

Şekil 4.23. Karaciğer hücreleri A) Kontrol grubu tail DNA % 1.7, B) γ-ışını grubu tail DNA % 32.8, C) γ-ışını + P_{300} grubu tail DNA % 16.4 (Ethidium bromide boyama x200, Olympus, Japan) 74

Şekil 4.24. Karaciğer dokusu gruplar arası tail moment (TM) değerleri, ortalama ± standart sapma..... 75

Şekil 4.25. Karaciğer dokusu gruplar arası olive tail moment (OTM) değerleri, ortalama ± standart sapma.....76

Şekil 4.26. Böbrek dokusu gruplar arası length head (baş uzunluğu) değerleri, ortalama ± standart sapma.....77

Şekil 4.27. Böbrek dokusu gruplar arası length tail (kuyruk uzunluğu) değerleri, ortalama ± standart sapma.....78

Şekil 4.28. Böbrek dokusu gruplar arası length comet (comet uzunluğu) değerleri, ortalama ± standart sapma.....79

Şekil 4.29. Böbrek dokusu gruplar arası head DNA (baş DNA) değerleri, ortalama ± standart sapma..... 80

Şekil 4.30. Böbrek dokusu gruplar arası tail DNA (kuyruk DNA) değerleri, ortalama ± standart sapma.....81

Şekil 4.31. Böbrek doku hücreleri **A)** Kontrol grubu tail DNA % 1.5 B) γ-ışını grubu tail DNA % 36.2, γ-ışını + P_{300} grubu tail DNA % 14 (Ethidium bromide boyama x200, Olympus, Japan) 81

Şekil 4.32. Böbrek dokusu gruplar arası tail moment (TM) değerleri, ortalama ± standart sapma.....82

Şekil 4.33. Böbrek dokusu gruplar arası olive tail moment (OTM) değerleri, ortalama ± standart sapma.....83

Şekil 4.34. Kontrol grubu akciğer doku kesiti A) H&E boyama x400, B) Mason trikrom boyama x400 (Olympus, BX51, Japan)..... 84

Şekil 4.35. γ-ışını grubu akciğer doku kesiti A) H&E boyama x400, B) Masson trikrom boyama x400 (Olympus, BX51, Japan)..... 84

Şekil 4.36. γ-ışını + P_{300} grubu akciğer doku kesiti A) H&E boyama x400, B) Masson trikrom boyama x400 (Olympus, BX51, Japan)..... 85

Şekil 4.37. Karaciğer doku kesiti A) Kontrol grubu, B) γ-ışını grubu, C) γ-ışını + P_{300} grubu, H&E boyama x400 (Olympus, BX51, Japan) ...86

Şekil 4.38. Böbrek doku kesiti A) Kontrol grubu, B) γ-ışını grubu, C) γ-ışını + P_{300} grubu, H&E boyama x400 (Olympus, BX51, Japan).. 87

KISALTMALAR ve SİMGELER

α : Alfa

BSA : Sığır serum albümini

Bcl 2 :Apoptozis baskılayıcı genler

β : Beta

Bq : Becquerel

CAT : Katalaz

CASP : Comet assay yazılım projesi

CGy : Santigray

Co60 : Cobalt 60

CoQ_{10} : Co enzim Q on

Ci : Curie

DNA : Deoksiribonükleik asit

DMSO : Dimethil sulfoksit

dH_2O : Distile su

EBRT : Eksternal Radyoterapi (External Beam Radiation Therapy)

EDRF : Endotel kaynaklı gevşeme faktörü

EDTA : Etilen diamin tetraasetik asit

FCS : Fetal dana serumu

γ : Gama

γ-ışını : Radyasyon grubu

γ-ışını+ $P_{37.5}$: Radyasyon + 37.5 mg/kg pycnogenol

γ-ışını+ P_{75} : Radyasyon + 75 mg/kg pycnogenol

γ-ışını+ P_{150} : Radyasyon + 150 mg/kg pycnogenol

γ-ışını+ P_{300} : Radyasyon + 300 mg/kg pycnogenol

GSE : Üzüm çekirdeği ekstresi

GSSG : Okside glutatyon

GST : Glutatyon S-transferaz

GSSG-R : Glutatyon redüktaz

GSH : Glutatyon

GSH–Px : Glutatyon peroksidaz

Gy : Gray

H-E **:** Hematoksilen – eozin

HGPRT **:** Hipoksantin guanin fosforibozil transferaz

H_2O_2 **:** Hidrojen peroksit

$HO_2^{\cdot}$ **:** Hidroperoksit radikali

HPLC **:** Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi

L Comet **:** Comet uzunluğu

LD 50 **:** Lethal doz

L Head **:** Baş uzunluğu

LET **:** Lineer enerji transferi

L Tail **:** Kuyruk uzunluğu

mA **:** Miliamper

MDA **:** Malondialdehit

M **:** Molar

mg **:** Miligram

mL **:** Mililitre

mM **:** Milimolar

µL **:** Mikrolitre

NAG **:** N-acetyl-β-D-glucosaminidase

NBT **:** Nitroblue tetrazolium

ng **:** Nanogram

nm **:** Nanometre

nmol **:** Nanomol

NO **:** Nitrik oksit

NOS **:** Nitrik oksit sentetaz

NO_2 **:** Nitrojen dioksit

NO_3 **:** Nitrat

NOS **:** Nitrik oksit sentetaz

IC50 **:** Yarı-maksimum inhibitör konsantrasyon

IMRT **:** Yoğunluk ayarlı radyoterapi

PAS **:** Periyodik asit schiff

$P_{37.5}$ **:** 37.5 mg/kg pycnogenol

P_{75} **:** 75 mg/kg pycnogenol

P_{150} **:** 150 mg/kg pycnogenol

P_{300} **:** 300 mg/kg pycnogenol

PBS **:** Fosfat tamponu

PGJ **:** Mor üzüm suyu

p21 **:** Siklin bağlı kinaz inhibitörü

p53 **:** Tümör supresör proteini

PLGSH-Px **:** Peroksidaz

P. Pinaster **:** Pinus Pinaster

p Ci **:** Piko Curie

OD **:** Optik Dansite

$^1O_2$ **:** Singlet oksijen

$O_2^{-\bullet}$ **:** Süperoksit anyon radikali

$OH^\bullet$ **:** Hidroksil radikali

$ONOO^-$ **:** Peroksinitrit

OPC **:** Oligomerik proantosiyanidin kompleksleri

OTM **:** Olive Tail Moment

R **:** Röntgen

Rad **:** Absorbe edilen radyasyon dozu

REM **:** Röntgen eşdeğeri insanda

RH **:** Hidrojen radikali

ROH **:** Hidroksil radikali

RNS **:** Nitrojen türleri

$RO^\bullet$: Lipid alkoksi radikali

ROS **:** Reaktif oksijen

$ROO^\bullet$ **:** Lipid peroksit radikali

ROOH **:** Lipid hidroperoksit radikali

RILI **:** Radyasyon-kaynaklı akciğer hasarı

rpm **:** Dakikada devir sayısı

Ü/L **:** Ünite /Litre

Ü/mg **:** Ünite /miligram

SCGE **:** Tek hücre jel elektroforezi

SD **:** Standart sapma

SDS **:** Sodyum dodesil sülfat

SH **:** Sülfidril grupları

SI **:** Uluslararası Birim Sistemi

s **:** Saniye

SOD **:** Süperoksit dismutaz

SOR **:** Serbest oksijen radikalleri

SSD **:** Kaynak cilt mesafesi

TBA **:** Tiyobarbitürik asit

TBE **:** Tris, boric asit ve etilendiamin tetra asetik asit

TM **:** Tail Moment

XO **:** Ksantin oksidaz

1.GİRİŞ VE AMAÇ

İyonize radyasyonun etkisini azaltabilecek, toksik olmayan etkili bir radyasyon koruyucunun tanımlanması ve geliştirilmesinde sürekli bir ilgi bulunmaktadır. İyonize radyasyon birçok tümör çeşidinin tedavisinde etkili olup tüm kanserli hastaların yaklaşık %60'ında tedavinin önemli bir parçasıdır (1). Radyoterapinin amacı, normal dokuyu olabildiğince korumak suretiyle, tümör dokusuna maksimum dozu verirken, normal dokuya minimum zarar vermektir. Radyoterapi dozu artırılırken, lokal tümör kontrolünde de buna paralel bir artış elde etmek mümkündür. Ancak normal dokudaki komplikasyon riski de beraberinde artar. Dolayısıyla tümör kontrolü bir anlamda normal dokunun radyoterapiye toleransına bağlıdır (2, 3).

İyonize radyasyonun temel etki mekanizması, DNA'da yaptığı hasara bağlı olarak hücre ölümüne yol açmasıdır. DNA'daki ölümcül (letal) hasar DNA molekülünün fırlatılmış bir elektron ile direkt iyonizasyonu sonucu meydana gelebilir. Radyasyonun bu direkt iyonlaştırıcı etkisi hasarın bir bölümünden sorumludur. Asıl hasar yapan olaylar indirekt mekanizma ile ortaya çıkar. Ortamdaki suyun iyonizasyonuna bağlı olarak gelişen serbest oksijen radikalleri (SOR)'nin oluşumu DNA'daki ölümcül hasarın asıl sorumlusudur (4, 5).

Normal dokularda radyoterapiye bağlı gelişen yan etkiler akut, subakut ve geç radyasyon komplikasyonlarıdır. Normal akciğer dokusu, verilen iyonize radyasyondan en çok etkilenen dokulardan birisidir. Akciğerde akut/subakut radyasyon hasarı olarak radyasyon pnömonisi, geç radyasyon hasarı olarak da radyasyon fibrozisi, kronik

radyasyon pnömonisi, korpulmonale ve sağ kalp yetmezliği görülebilmektedir (2, 3, 6-8). Radyoterapiye bağlı akciğer toksisitesi yaygın olup, özellikle belli bir dozun üzerine çıkıldığında uygulanacak radyoterapi dozlarını önemli ölçüde sınırlamaktadır. Akciğer kanseri, meme kanseri, lenfoma ve timoma nedeni ile radyoterapi uygulanan hastaların %30'unda radyoterapiye bağlı akciğer şikayetleri meydana gelir (6). İyonize radyasyona bağlı akciğer hasarının mekanizması net olarak bilinmemekle beraber sitokin aktivitesi ve oksidatif strese bağlı olduğuna dair çalışmalar vardır (9, 10).

Karaciğer genellikle üst abdomen, sağ akciğer, distal özofagus tümörlerinde, abdomen radyoterapi sırasında, tüm abdomen ya da tüm vücut ışınlamasında kazara ışınlanır (11). İyonize radyasyon maruziyeti, ciddi sağlık koşullarının geliştirilmesini gerektirir. Akut etkiler çoğunlukla hematopoietik hücre kayıpları, bağışıklık sistemi yetersizliği, mukozal hasar, karaciğer ve diğer dokularda potansiyel hasarlardır. Tüm organın ışınlanması hepatosit yetmezliği ve hepatit gibi radyasyon kaynaklı karaciğer hastalığına yol açabilir (12).

Radyoterapiyi sınırlayan en önemli faktörlerden bir tanesi normal çevre dokularda hasarların oluşmasıdır. Böbrek, radyasyon kaynaklı morbidite geliştirme riskinin normal dokulardan radyo duyarlılığı en fazla olan organlardan biri olarak bilinir (13, 14). Abdominal ya da tüm vücut ışınlamadan sonra radyasyon nefropati oluşacağı tahmin edilir. Radyasyon tedavisinden sonra, büyük ölçüde toplam radyasyon dozuna bağlı böbrek fonksiyonunun geç ve sürekli ilerleyici bozulması bildirilmiştir (15). Böbrekler, gastrointestinal kanserler, jinekolojik kanserler, lenfomalar ve üst abdomen sarkomlar için radyoterapi ve tüm vücut ışınlama sırasında doz sınırlayıcı organlardır. Radyoterapi ilişkili böbrek hasar sıklığı, muhtemelen uzun gecikme nedeniyle rapor edilmemiştir, çünkü disfonksiyon olasılığı genellikle daha yaygın nedenlere bağlanır (16).

Kanser tedavisinde her geçen gün yeni gelişmelere paralel olarak hastaların sağ kalımı uzamaktadır. Bununla beraber yeni kemoterapötik ilaçların ve radyasyon tekniklerinin gelişmesine rağmen tedaviye bağlı komplikasyonlar hala yüksek orandadır. Radyoterapi alan hastalarda, tedavi alanında tümörle birlikte bir kısım sağlıklı dokular da ışınlandığından radyoterapinin çeşitli yan etkileri ortaya çıkmakta ve bu durum kanser hastasının yaşam kalitesinde bozulmaya sebep olabilmektedir (2, 3). SOR'u inhibe eden veya "scavenger" (temizleyici, süpürücü, toplayıcı) etki gösteren antioksidan ilaçlar iyonize radyasyona bağlı normal dokulardaki hasarı azaltabilir (17). İyonize radyasyona

bağlı oluşan oksidatif hasarı en aza indirmek için radyasyon koruyucuları (radyoprotektörler) üzerinde yapılan çalışmalar son yıllarda giderek yaygınlaşmıştır (5). Bunlardan birisi de pycnogenoldür.

Pycnogenol (French Maritime Pine Bark Extract), Pinus pinaster olarak bilinen bir deniz çam ağacının kabuğundan elde edilen biyoflavonoid/polifenol yapısında bir komplekstir. Pycnogenol adıyla satılan çam kabuğu ekstresi, oligomerik proantosiyanidin kompleksleri (OPC) denilen doğal bileşikler içerir ve antioksidan, anti-inflamatuar ve antikanserojen özellikleri de dahil olmak üzere birçok biyolojik etkileri vardır (18). 1940'lı yıllarda, Dr. Jacques Masquelier, çam ağacının kabuğundan çıkan biyoflavonoidi "pycnogenol" olarak adlandırarak bu maddenin vücuttaki serbest radikallere karşı C ve E vitaminlerinden daha etkili olduğunu belirtmiştir. Pycnogenolün başlıca bileşenleri polifenoldür. Özellikle kateşin, epikateşin, taksifolin, monomerik ve oligomerik birimleridir. %65-75 pycnogenol ekstresi, prosiyanidinlerin değişen zincir uzunluklarında kateşin ve epikateşinin alt birimlerinden oluşmaktadır (19). Karşılaştırmalı araştırmalar pycnogenolün lipid peroksidasyonunun önlenmesinde C, E, alfa-lipoik asit ve CoQ_{10} vitaminlerinden ve üzüm çekirdeği ekstresinden daha güçlü olduğunu göstermiştir (20). Laboratuvar testlerinin yanı sıra klinik çalışmalarda da pycnogenolün güçlü bir antioksidan olduğu gösterilmiştir (20, 21). Pycnogenolün oksidatif stresten kaynaklanan glutatyon ve vitamin E'nin deplesyonunu önlediği (22), insanlarda vasküler bütünlüğü, endotel fonksiyonu, antioksidan kapasiteyi artırdığı ve kayda değer bir anti-inflamatuar potense sahip olduğu bulunmuştur (23). Oligomerik prosiyanidinler, özellikle pycnogenolün başlıca biyoflavonoid bileşenleri, membranöz fosfolipidlerin polar baş gruplarına bağlanarak oksidasyonları önler (24). Şöyle ki pycnogenolün bileşenleri vitamin E'ye benzer bir hücre içi lokalizasyona sahip olabilir (25). Pycnogenolün programlanmış nöronal hücre ölümü ve glutamat ile indüklenen nörotoksisiteyi önlediği gösterilmiştir (26, 27).

Pycnogenolü oral yoldan alan hastalarda, platelet agregasyonunun inhibisyonu, antihipertansif etkisi ve mikrosirkülasyon düzenlemesi gibi dolaşım fonksiyonları üzerine etkileri ortaya konmuştur (19, 28). Astım hastalarında deniz çam kabuğu ekstresinin anti-inflamatuar etkileri gözlenmiştir (29, 30). Pycnogenolün, sıçanlarda abdominal bölgenin ışınlamasından sonra, intestinal mukozayı iyonize radyasyondan önemli ölçüde koruduğu sonucuna varılmıştır (31).

Ancak, tüm vücut yüksek doz ışınlamadan (900 cGy) sonra böbrek, karaciğer ve akciğer üzerine pycnogenolün etkisini gösteren bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu çalışmada, "pycnogenolün" radyasyon koruyucu ve antioksidan etkisi, 900 cGy tüm vücut ışınlaması uygulanan sıçanlarda iyonize radyasyona bağlı akciğer, karaciğer ve böbrek hasarını azaltıcı etkisi olup olmadığı araştırıldı.

Çalışmamızda bu amaçla; akciğer, karaciğer ve böbrek dokusunda iyonize radyasyona bağlı, DNA hasarını tek hücre düzeyinde comet assay, doku düzeyinde histo-patolojik değerlendirme ve biyokimyasal açıdan malondialdehit (MDA), SOR'u temizleyici etki gösteren antioksidan enzim olan katalaz (CAT) ve süperoksit dismutaz (SOD) aktiviteleri ölçülerek sonuçları değerlendirildi.

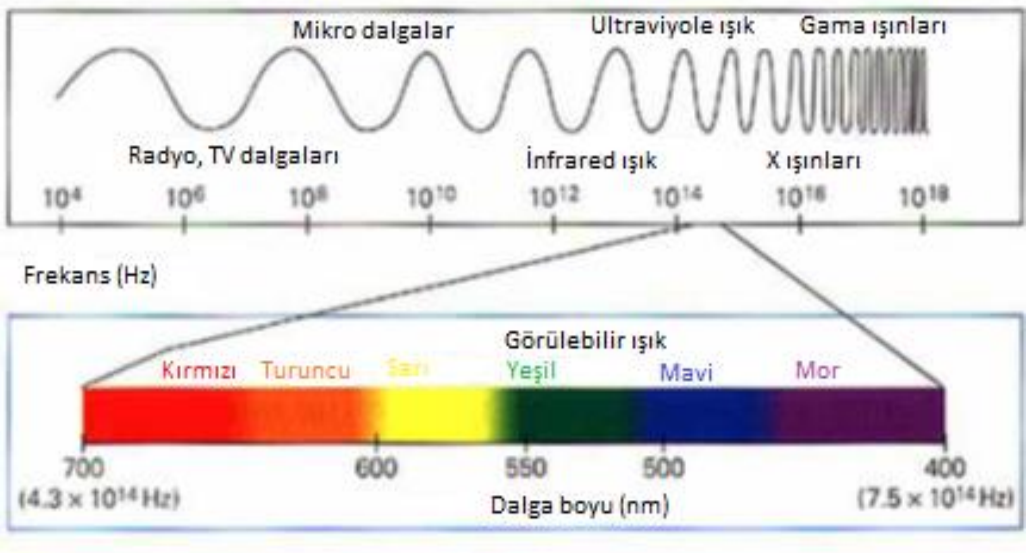
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Radyasyon

Radyasyon, yaşadığımız çevrede tüm canlıları doğrudan ya da dolaylı olarak etkileyen önemli bir faktördür ve madde veya uzayda enerji yayılımı olarak tanımlanabilen, elektromanyetik dalgalar ve/veya enerjitik parçacıklardır.

Keşfedildiği yıllarda (1895 yılında Wilhelm Conrad Roentgen x-ışınını keşfetti (32)) çeşitli alanlarda kullanılmış olan radyoaktif elementler bu dönemlerde bilinmeyen zararlı etkileri nedeniyle birçok insanın kansere yakalanmasına ve hayatlarını kaybetmelerine neden olmuştur. Ancak radyoaktif elementlerden, tıpta tedavi alanında da faydalanılıyor olunması onların doğru şekilde kullanıldıklarında insan sağlığı üzerinde olumlu etkilerinden de yararlanıla bilineceğini kanıtlamaktadır. Bu olumlu ve olumsuz özellikleri nedeniyle radyoaktif elementler ve yaydıkları radyasyon türleri insan hayatında önemli bir yer almaktadır (33).

Yaşadığımız Dünya'da doğal olarak bulunan ve bilimsel destekli teknolojilerin katkısıyla yapay olarak da üretilebilen radyasyonları iki sınıfta değerlendirmek olasıdır. Elektromanyetik spektrum (Şekil 2.1.) incelenecek olursa bu sınıflandırmanın iyonize ve iyonize olmayan radyasyon (Tablo 2.1.) olarak yapılabileceği görülür. Her iki tür radyasyonun da, süre ve doz ilişkisi değerlendirildiğinde, radyasyonun türüne bağlı olmaksızın aşırı etkileşimin, biyolojik veya diğer sistemlerde hasarların oluşmasına neden olacağı açıktır. Olaya etkileşimin veya bir başka deyişle, tahrip gücü açısından bakılması durumunda, iyonize radyasyonların daha tehlikeli olduğu kolaylıkla görülür (34).



Şekil 2.1. Elektromanyetik spektrum

Tablo 2.1. İyonize ve iyonize olmayan radyasyon

İyonize Radyasyon	**İyonize Olmayan Radyasyon**
Alfa (α) parçacıkları	Mikro dalgalar
Beta (β) parçacıkları	Görülebilir ışık
Nötronlar	Radyo dalgaları
Gama (γ)-ışınları	TV dalgaları
X- ışınları	Ultraviyole radyasyon

2.2. Radyasyon Biyofiziği

Radyasyon etkilerini anlamak için radyoaktivitenin, radyasyon maruziyetinin ve radyasyon dozunun miktarını belirlemek önemlidir. Günümüzde radyasyonun miktarını belirlemek için Uluslararası Birim Sistemi (SI) kullanılır ancak literatürlerin çoğu hala eski birim sistemini içermektedir. Bu nedenle her iki sisteminde denkliği tanımlanmıştır (35).

SI sisteminde radyoaktivitenin birimi Becquerel (Bq) dir. Saniyedeki parçalanma sayısını ifade eder. Eski birimlerde Curie (Ci) dir (35, 36).

$$1 \text{ Curie (Ci)} = 3.7 \times 10^{10} \text{ Bq}$$

$$1 \text{ Bq} \approx 27 \text{ pCi}$$

Rad (Radiation Absorbed Dose), absorbe doz birimi ya da enerji dozu olarak tanımlanır. Maddenin gramı başına absorblanan enerji miktarıdır. Bu birim herhangi bir madde ve herhangi bir radyasyon türü için kullanılır. 1 rad, maddenin gramı başına 100 erg emilimi olarak tanımlanır. SI sisteminde absorbe doz birimi, herhangi bir maddenin 1kg da 1 Joule enerji depolamak için gerekli radyasyon miktarı, Gray (Gy) olarak ifade edilir (35-37).

$$100 \text{ Rad} = 1 \text{ Gray}$$

$$1 \text{ Gy} = 1 \text{ j / kg}$$

Birim ayrıca pratikte düşük dozlar için centiGray (cGy) olarak da ifade edilebilir.

$$1 \text{ cGy} = 1 \text{ rad}$$

Röntgen, havada γ ya da x-ışınları şeklinde, enerji miktarını ifade eden bir birimdir (35, 38).

$$1R = 2.58x10^{-4} \text{ As/ kg}$$

REM (Roentgen Equivalent Man), radyasyonun biyolojik hasarını ölçme birimidir. REM belirlemek için, absorbe doz (rad) radyasyonun türüne özgü bir kalite faktörü **R**olative **B**iological **E**ffectiveness (RBE) ile çarpılır (36, 38).

LET (Lineer enerji transferi), belirli bir tip radyasyon tarafından dokuda birim yol başına kaybedilen ortalama enerji miktarıdır. Düşük LET radyasyon, iyonize olaylar arasındaki uzaklığın hücre çekirdeği kadar olduğu β parçacıklarını, γ ve x-ışınlarını içerir. Yüksek LET radyasyon, iyonize olaylar arasındaki uzaklığın çok küçük olduğu α parçacıkları ve nötronları içerir. Doz ve LET gibi faktörler, radyasyon hasar derecesini ve doğasını belirlemek için önemli rol oynar. Bir de radyasyon dozunun dokulara girdiği zaman periyodu önemlidir. Doz oranı, birim zaman başına verilen absorbe doz olarak tanımlanır. Doz uzaması, uzun süre radyasyon verilmesi durumu olarak ifade edilir. Bu, dokularda kalan ve depo edilen, bu yerlerde bozulmaya giden, çeşitli radyonüklitler için ortaktır. Doz fraksiyonu, verilecek radyasyon dozlarının bölünerek belirlenmiş aralıklarda verilmesi metodudur. Bu, doku hasarını azaltma, fraksiyonlar arası

radyasyon hasarının tamiri için olanak sağlar ve terapötik önemli bir prensiptir. Tekrarlayan ve uzun süreli maruziyet sonucu oluşan kümülatif doz, doku ya da organlar için total dozdur. Dozun lokalizasyonu ve dağılması radyasyon hasarında kritik bir faktördür. Hasar yalnızca radyasyona maruz kalmış doku ve hücrelerde mevcut olmalıdır. Maruz kalan ikinci organ için hasarın etkisi, hipofiz yıkımına bağlı hormonal dengesizliklerde olduğu gibi, göz ardı edilir (35).

2.3. İyonize Radyasyon

Atom veya moleküllerden elektron koparabilecek kadar güçlü enerji seviyesine sahip radyasyona iyonize radyasyon denir (39, 40). İyonize radyasyon bir ortama veya biyolojik sisteme girdiğinde ortamdaki atomlara çarparak elektron koparırlar (iyonlaşma) veya çarptıkları atomların elektronlarını koparamasalar bile daha yüksek enerji seviyesine atlatırlar (uyarılma) (5). Elektromanyetik ve radyoaktif radyasyonla dokunun molekül veya atomu etkileşime girer. Radyoaktif radyasyonun kaynaklarından birisi kararsız atom çekirdekleri veya kararlı çekirdeklerin izotoplarıdır (36). Bu radyoaktif atomlar (radyonüklit ya da radyoizotop) daha kararlı hale geçmek için kütle kaybetmek zorundadırlar, yüksek enerjili parçacık yayarlar. Bu işlem radyoaktif bozunma olarak bilinir. Radyoizotopların parçalanması ile oluşan alfa (α) ve beta (β^+, β^-) parçacıkları ve çekirdek parçalanmasında nötronlar, gama (γ) ışınları ve x-ışınıdır (Tablo 2.1.) (36, 41).

Alfa parçacıkları iki proton ve iki nötrondan oluşan, pozitif yüklü enerjitik bir parçacıktır. α parçacıkları, Uranyum-238, Radyum-226 ve Polonyum-210 gibi ağır radyoaktif elementlerin radyoaktif bozunmasıyla yayılırlar (41).

Beta parçacıkları, radyoaktif bozulma sırasında çekirdekten yayılan hızlı elektronlardır. İnsanlar Trityum, Karbon-14 ve Stronsiyum-90 gibi yapay ve doğal β parçacıklarına maruz kalırlar (41).

Gama ışınları, elektromanyetik dalgalardır. Radyoaktif bir çekirdeğin kararlı hale geçerken açığa çıkan enerji fazlasının nükleustan dışarı atılmasıyla oluşur. Atom çekirdeğinden yayılan yüksek enerjili fotonlardır. γ-ışınları MeV enerji mertebesindedir ve etkileşim olmaksızın insan vücudunun belirli bir kısmını geçebilecek kadar penetrandır. Fotonların yaklaşık %75'i hedef dokunun atomlarıyla etkileşime geçerek

enerji kaybederler. γ-ışınlarının yükü ve kütlesi yoktur. Doğal γ-ışını, Potasyum-40, yapay olanı Cobalt-60 ve Sezyum-137 dir (36, 41).

X-ışınları, çekirdeğe yakın yörüngeden koparılan elektronun yerinin doldurulması için diğer yörüngelerden elektron geçişinden kaynaklanan elektromanyetik dalgalar ve keV mertebesinde enerjiye sahip fotonlardır. X-ışınları, maddeye giren elektronun maddenin atom nükleusları tarafından frenlenerek bir enerji açığa çıkarmasıyla oluşur. (5, 36, 39, 41, 42).

Radyoelementlerin organlara karşı olan affinitesi, çeşitli hastalıkların teşhisinde kullanılan yeni metodların gelişmesini sağlamıştır. Günümüz tıbbında ortaya konan, doz-etki ilişkisi gerek teşhis ve gerekse tedavide önemli bir yer tutar (43). Işınlama anındaki fiziksel koşullar (doz aralığı, radyasyon tipi ve kalitesi, akut ya da fraksiyonel oluşu, hormonal durum, oksijen tansiyonu, sıcaklık vb.) hücrenin radyasyona cevabını büyük ölçüde etkiler. Bu yüzden tek başına radyo duyarlı terimi anlamlı bulunmamaktadır. Etkiyi ölçecek biyokimyasal değişiklikler, morfolojik etkiler, üreme kapasitesi ve genetik etkiler gibi kriterler de önem taşımaktadır (44).

2.4. İyonize Radyasyonun Biyolojik Etkileri

İyonize radyasyonlar, canlılarda moleküler ve hücresel düzeylerde fiziksel, kimyasal ve biyolojik çeşitli değişikliklere yol açar. Bu değişiklikler maruz kalınan iyonize radyasyonun cinsine, miktarına ve süresine göre geçici (onarılabilen değişiklikler) veya kalıcı (onarılamayan değişiklikler) olabilirler (45). İyonize radyasyon başlıca üç kademede etki gösterir.

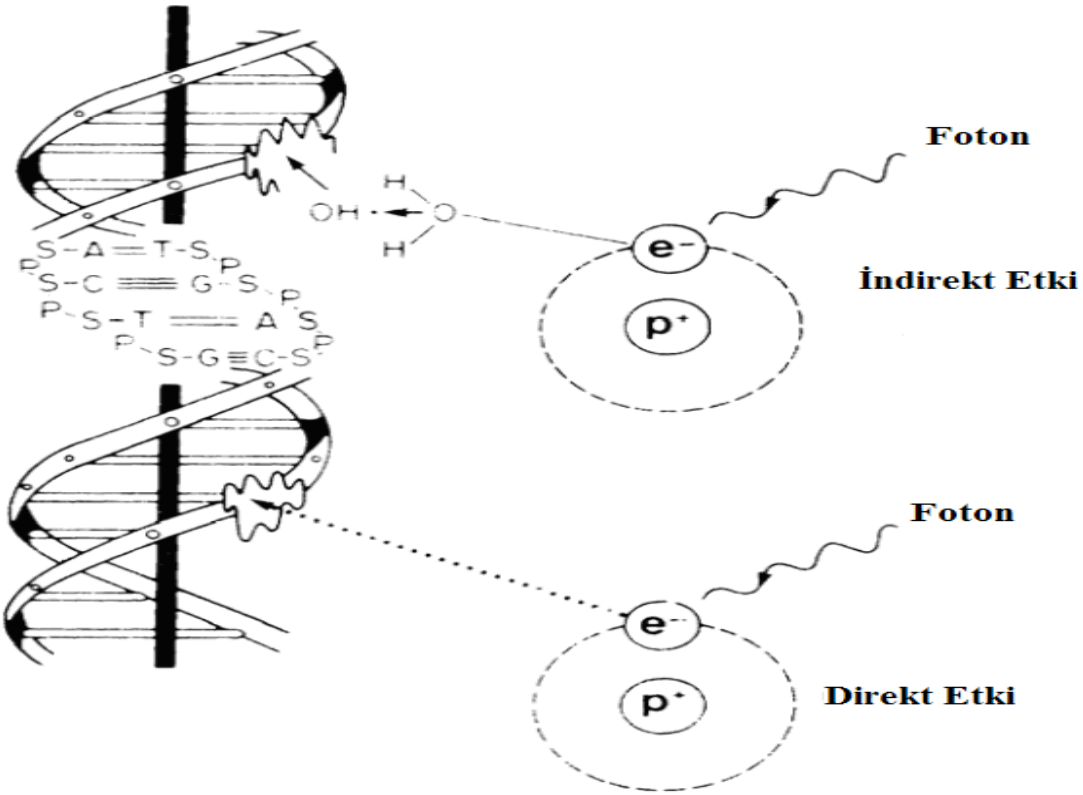
Fiziksel kademe, iyonize radyasyon ile canlı dokularını oluşturan atom ve moleküller arasındaki ilk etkileşimi kapsar. Radyasyon enerjisi maddeye aktarılır ve bunun sonucunda maddenin moleküllerinde iyonlaşma ya da uyarılma meydana gelir. İyonlaşma sonucunda oluşan serbest elektronlar diğer komşu atomlarda da iyonlaşmaya yol açar ve bu şekilde zincirleme bir reaksiyon meydana gelir. Ancak bu ilk reaksiyonlar sonucu ortaya çıkan ürünler son derece kararsızdırlar ve kısa sürede sekonder reaksiyonların oluşmasına yol açarlar (5, 39, 46).

Kimyasal kademe, sekonder reaksiyonların meydana geldiği kademedir. Hasar gören atom ve moleküller reaksiyona girer ve sonuçta serbest radikaller oluşur. Bu serbest

radikaller çok reaktif yapıdadırlar ve sürekli olarak hem kendileri hem de ortamdaki diğer moleküllerle reaksiyona girerler. Serbest radikal reaksiyonları radyasyonun absorbsiyonundan sonraki 1 ms içinde tamamlanırlar (5, 39, 46).

Biyolojik kademe, bu kademede canlıda meydana gelen olaylar, radyasyonun son biyolojik etkisinin ortaya çıkmasına yol açar. Bu kademe birtakım hasarlara yol açan enzim reaksiyonlarıyla başlar. DNA molekülünde hasarlar oluşur. Oluşan bu hasarların bir kısmı onarılabilir fakat onarılamayan hasarlar da oluşur ve bu hücrenin ölümüne yol açar. Aynı zamanda radyasyon genetik bozukluklar ve kanser gibi etkiler de oluşturur (5, 39, 46).

İyonize radyasyonun moleküler düzeydeki etkileri direkt veya indirekt (Şekil 2.2.) yolla olur. Direkt yolda, değişikliğe uğrayan molekül doğrudan doğruya iyonize radyasyona maruz kalır ve uyarılmış duruma geçer. Radyasyonun direkt etkisi biyolojik etkinin bir bölümünden (1/3) sorumludur. İndirekt yolda ise iyonize radyasyon sonucu oluşan bazı ara ürünler başka bir dizi kimyasal reaksiyona girerek diğer moleküllerin değişmesine neden olurlar.



Şekil 2.2. İyonize radyasyonun direkt ve indirekt etkisi

Biyolojik etki asıl bu mekanizma ile ortaya çıkar. γ ve x-ışınları genellikle indirekt yolla etki ederler. İyonize radyasyonun hücrede bol miktarda bulunan su molekülünün ayrışmasına sebep olarak serbest radikallerin oluşmasına yol açtığı düşünülmektedir. Radyasyonun oluşturduğu hücresel hasarların serbest radikal oluşumlar aracılığıyla meydana geldiği kanıtlanmıştır. Oluşan serbest radikal unsurlarının hücrede yeni reaksiyonlar aracılığı ile daha başka serbest radikal oluşumları, lipid peroksidasyon zincir reaksiyonları ve başta intestinal kanamalar olmak üzere miyokardiyal iskemi, karsinogenezis, katarakt oluşumu, solunum düzensizliği, DNA zincir kırılması, mutajenik ve karsinojenik etkiler oluşturduğu saptanmıştır (2-5, 47- 49).

İyonize radyasyon olarak tanımlanan γ ve x-ışınlarının yanı sıra α ve β parçacıkları da geçtikleri ortamda iyonizasyona yol açarlar. γ ve x-ışınları, α ve β parçacıkları ve nötronlar gibi iyonize radyasyonlar, içinden geçtikleri hücrelerde önce moleküler düzeyde değişikliğe neden olurlar. Hücre içerisindeki molekülleri ve atomları iyonize ederek uyarılmış hale geçirirler. Bu şekilde fazla enerjilerini başka moleküllere aktararak molekül temel seviyeye inmeye çalışır (45).

İnsan vücudunun %70- 80'i sudan oluşmaktadır. Canlı organ ışınlandığında radyasyon enerjisinin büyük oranda su molekülleri tarafından soğrulma olasılığı çok yüksektir. Bu durumda su molekülleri iyonlaşırlar ve pozitif yüklü su molekülü ile hızlı bir serbest elektron oluşur.

$$H_2O \xrightarrow{\text{radyasyon}} H_2O^+ + e^-$$

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.

$$e^- + H_2O^+ \longrightarrow H_2O^-$$

Bu reaksiyonlar sonunda oluşan H_2O^+ ve H_2O^- kararlı değildirler ve her biri parçalanarak bir iyon ve bir serbest radikal oluşturur.

$$H_2O^+ \longrightarrow H^+ + OH^\bullet$$

$$H_2O^- \longrightarrow H^\bullet + OH^-$$

Burada noktalar serbest radikalleri göstermektedir. Serbest radikal, dış orbitallerinde eşlenmemiş bir elektrona sahip ve elektriksel açıdan yüksüz atom ya da moleküllerdir. Yukarıdaki bağıntılar irdelenecek olursa ortaya çıkacak başlıca reaksiyon ürünlerinin hidrojen, hidroksil iyonları ve serbest radikaller olacağı görülür. Hidrojen ve hidroksil iyonları, normal olarak canlı hücrelerde mevcutturlar ve radyasyon zararlarına katkıları yoktur. Serbest radikaller eşlenmemiş elektronları içerirler, çok etkindirler ve birçok reaksiyona neden olabilirler. Örneğin iki OH radikali birleşerek hidrojen peroksiti oluştururlar. Benzer reaksiyonlar, hücrenin diğer bileşenleriyle de oluşabilir. Bu tür reaksiyonlar; dokularda uyarılmış iyonlar, uyarılmış moleküller ve diğer tür serbest radikallerin oluşmasına neden olurlar (50).

Vücuttaki tüm dokular eşit radyo duyarlılığa sahip değildir. Genel olarak, bir dokunun radyasyon duyarlılığı, bu hücrelerin proliferasyon oranıyla doğru ve hücre farklılaşma derecesi ile ters orantılıdır (51). Diğer bir deyişle, aktif olarak bölünen hücreler ya da tam olarak olgun olmayan hücreler radyasyon kaynaklı hasarda en hassas hücrelerdir. Tablo 2.2.'de radyo duyarlılığı en fazla ve en az olan doku ve organlar listelenmiştir (51).

Tablo 2.2. Radyo duyarlılığı en fazla olandan en az olana, doku ve organların listesi

En fazla radyo duyarlı ⇕ En az radyo duyarlı	Kan yapan organlar
	Üreme organları
	Deri
	Kemik ve dişler
	Kas
	Sinir sistemi

2.4.1. İyonize Radyasyonun Hücre Düzeyinde Etkileri

Radyasyona tam olarak dirençli hiçbir hücre yoktur. Hücreyi oluşturan yapılardan çekirdek ve özellikle de bölünme halindeki kromozomlar, radyasyona hücre sitoplazmasına göre çok daha duyarlıdırlar. Radyasyonun hücre düzeyindeki en belirgin etkilerinden biri hücre büyümesini baskılamasıdır. Özellikle hücre bölünmesi sırasında

(mitoz) radyasyona maruz kalan hücrelerde büyüme kesintiye uğrar. Radyasyon kromozomların kırılmasına, birbirine yapışmasına, kenetlenmesine ve kıvrılmasına yol açabilir. Kromozom kırıkları yeniden organize olabilir, aynı kalabilir veya bir başka kromozomla birleşebilir. Tüm bu durumlar mutasyonla sonuçlanabilir veya daha da ileri giderek hücrenin ölümüne yol açabilir (52).

Bu radyasyonlar ile iyonizasyon sonucunda hücre içinde ya da çevresinde oluşan primer lezyon pek çok organelin hasarlanması şeklinde gerçekleşir. Radyolezyonlar nükleus ya da sitoplazmada meydana gelir ve belirli bir kısmı tamir edilebilir. Ancak, radyasyon hasarının en önemli sonucu olan kromozom kırılmaları, hücre ölümüne ya da genetik değişikliğe neden olmaktadır (44).

İyonize radyasyon mutasyon frekansında bir artmaya neden olur. Kromozomlarda radyasyonun etkisiyle oluşan değişmeler, kendiliğinden oluşan değişmelere eş değerdir. Kromozomal değişmelerin birçoğu, DNA zincirindeki ani kırılmalardan oluşabilmektedir. İyonize radyasyonlar, DNA zinciri boyunca nükleotidlerin ayrışmasına neden olurlar. Bazen bir iyonize radyasyon, nükleotiddeki azot bazının değişmesiyle, genlerde nokta mutasyonlara neden olabilir. DNA'nın oluşumu esnasında, bir bazın iyonlaşması sonucu, yasak çiftler (guanin-timin veya adenin-sitozin gibi) oluşabilir. Bunun sonucunda, genetik şifrede kalıtsal değişmeler oluşur. Bazen bir baz çiftinde oluşan iyonların miktarı, bazın DNA molekülünden tamamen ayrılmasına neden olur. Böyle bir değişime, baz bozulması denir ve bu süreçte bir genetik şifre hatasının oluşmasına neden olur. Her ne kadar hücre sitoplazmasının radyo duyarlılığı çekirdeğin radyo duyarlılığından az ise de yüksek dozlu radyasyon etkisiyle, hücresel ölüm oluşabilir. Sitoplazmanın radyo duyarlı bölgelerinin mitokondriyonlar (hücrenin enerji kaynakları) olduğu saptanmıştır. Bir organizmanın farklı dokularının, farklı radyo duyarlılık gösterdiği (Tablo 2.2.) deneysel olarak ortaya konmuştur (50). Kan hücrelerini yapan organlar (kemik iliği, dalak, lenf bezleri) radyasyona aşırı duyarlıdırlar. Beyaz kan hücreleri, özellikle lökositler en çok duyarlı olanlardır. Bunları sırasıyla eritrosit ve trombositler izler. Kan hücrelerinden özellikle eritrositlerde, iyonize radyasyona maruz kalınması durumunda, aşırı derecede serbest radikal oluşacak ve hücresel hasar görülecektir. Çünkü eritrositler oksijen taşırlar ve bu durumda serbest oksijen radikali oluşumu daha yüksek olur (53).

Genel olarak orta düzey doz genişliğinde radyasyon kaynaklı ölçüm, kemik iliği hematopoetik fonksiyonun bozulması nedeniyledir. Lökopeni ve trombopeni, çok yönlü olarak enfeksiyon, hemoraji ve ölüm ile sonuçlanırlar. Işınlama sonrası ilk saatler, hatta ilk dakikalar da bile lenfopeni görülebilir (45).

İyonize radyasyon çeşitli hücresel lezyonları artırır. Bunlar genellikle DNA ve membran hasarlarından oluşmaktadır. En önemli hedefi DNA ve membranlar olan gama radyasyonu, sulu hücresel ortamda üretilen serbest radikaller yoluyla hayati hücrelerle bileşir. İyonize radyasyonun neden olduğu major DNA hasarı, tek zincir kırılmaları, çift zincir kırılmaları, DNA-DNA ve DNA-protein çapraz bağları ve nükleotid baz hasarlarıdır (54). DNA hasarı, sinyal iletim yolaklarını koordine edip hücre siklusunu duraksatır. Strese cevap oluşturarak DNA tamir süreçlerini başlatır (55, 56). Radyasyon, DNA çift zincir kırıkları oluşturur ve mitokondriyal apoptotik yolağı başlatıcı rol oynar (57). Ayrıca, diğer yolaklar da (hücresel membranda seramid oluşumu gibi) iyonize radyasyon maruziyeti sonrasında apoptozisi başlatabilir (58, 59). Radyasyon indüksiyonu ile mitokondrilerden sitokrom C salınımı başlar ve intrinsik apoptotik yolak harekete geçirilir. Ardından, kaspaz 3 ve 9 aktive edilir (57). Farklı apoptotik uyaranlara cevap olarak pek çok bileşik mitokondriyal apoptotik yolağı aktive edebilirken, kaspaz 2 mitokondriyal aktivasyon yoluyla DNA hasarıyla indüklenen apoptozisi başlatan esas protein olarak düşünülmektedir (59).

Sitotoksik stres ile indüklenen apoptoziste kaspaz 2'ye gerek duyulmaktadır. İyonize radyasyon gibi uyaranlara maruziyetin hemen ardından aktive olduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte, prokaspaz 2, nükleustaki tek prokaspazdır ve mitokondriyal apoptotik yolağı başlatabilmektedir. Bu görüş ile direkt olarak, DNA çift zincir kırıklarının kaspaz 2'yi aktifleştirdiği düşünülebilir (59).

Tümör supresör proteini p53, iyonize radyasyon gibi DNA hasarı oluşturan çeşitli ajanlara cevap olarak aktifleşen bir nükleer fosfoproteindir. p53 ekspresyonu DNA hasarı uyarımıyla artar ve çeşitli genlerin transkripsiyonunu aktive eder. Böylece, mitokondriyal hasar oluşur ve p53 bağlantılı sinyal mekanizması harekete geçer. Ayrıca p53, hücre siklusu ilerlemesindeki önemli kontrol noktaları kadar apoptozis indüksiyonu için de gerekli görülmektedir. DNA'ya bağlanarak ve siklin bağımlı kinaz inhibitör p21'i transaktive ederek hücre siklusunun kontrolünde önemli rol oynar (60). p53'ün başlıca atretik foliküllerden eksprese olduğu ve apoptozis baskılayıcı genlerin (bcl 2)

ekspresyonunu azalttığı bildirilmiştir (61). Radyasyon ve kemoterapiye cevap olarak p53, apoptozise ve hücre siklusunda duraksamaya aracılık eder. p21, p53'ün direkt transkripsiyonel hedefidir ve DNA hasarıyla güçlü bir şekilde uyarılır. DNA hasarı, p53 ekspresyonunu artırır ve nükleusa taşınmasını hızlandırır. Sonuçta, pek çok genin aktive olmasıyla hücre ya apoptozise uğrar ya da hücre siklusu duraksar. Genellikle iyileşme gözlenmez. p21 ekspresyonu p53 bağımlı ve bağımsız olarak transkripsiyona uğrayabilir. p21'in proapoptotik ve antiapoptotik etkileri spesifik hücresel yapıya bağımlıdır (62).

2.4.2. İyonize Radyasyonun Doku ve Organ Düzeyinde Etkileri

Doku, organ ve tüm organizma seviyesinde radyasyonun etkileri birkaç farklı yolla sınıflandırılmıştır. Geleneksel olarak, somatik etki ve kalıtsal etkiden bahsedilir. Herhangi bir dokuda hem akut hem de geç oluşan hasarı, kritik hedef hücreleri, başlangıç hasarı ve belirli bir patolojik değişiklikleri tanımlayabilmek önemlidir. Akut etkilerin, her zaman daha radyo duyarlı hücrelerde, geç oluşan etkilerle aynı hedef sonucu vereceği beklenmez. Ayrıca, kanser indüksiyonu dahil, spesifik akut etkilerin geç etkiler için tahmin edici olup olmadığı da belli değildir. Doku içinde temel patolojik süreçlerin mikroskobik kanıtları genellikle morfolojik özelliklerden kategorize edilebilir (35).

Atrofi, ışınlamayla ilişkili daha tutarlı bulgulardan biri olarak kabul edilir. Bütün bez dokularının yanı sıra, özel duyular, endokrin, gastrointestinal, solunum, üriner, üreme sistemi, deriye ait çeşitli epitel ya da parenkimal doku geniş bir yelpazede tanımlanmıştır. Atrofi, hücrelerinin apoptotik kaybı ve kayıp hücrelerin yenilenme yetersizliği, fibroplazi nedeniyle besin kaybı ve boşlukta ikincil kayıpların olması ve damarlanmada azalmayla ilişkilendirilebilir. Atrofik değişiklikler genellikle parankimatöz organlar üzerindeki iyonize radyasyonun geç etkileri ile ilişkilidir. Bu etkiler genellikle kronik hipoksi ve anoksi sonucudur ve atrofik değişiklikler genellikle multifokal rastgele olaylarla meydana gelir (35).

Nekrotik değişiklikler genellikle atrofiye göre hastalığın başlangıcında gözlenir ve mikrovasküler hasardan kaynaklı doku iskemisi ile ilişkilidir. Yaygın vasküler etkilerden dolayı, radyo duyarlılığı ne olursa olsun, nekrozis hemen hemen tüm organ sisteminde tanımlanmıştır. Nekrotizan sürecinde yenilenmesiz turnover nedeniyle epitel

yüzey ya da mukoza kaybı gözlenir ve derin bir ülser devam edebilir. Bu gibi durumlarda, bir örnek olarak, beslenme yoluyla, gastrointestinal mukozada hasar oluşmasıyla pH değişir ve sürtünme hasarı oluşur, bakteriyel translokasyondan ışınlanmış spesifik lezyonu ayırmak mümkün değildir ve yanık ve patlamayla ilişkili kombine hasarlar etkilidir (35).

Kroniklik, sürekli veya tekrarlanan travma ve kusurlu onarım, etkilenen dokular metaplastik değişiklikler geçirebilir. Hasarın derecesine ve yenilenme yeteneğine bağlı olarak, dokular hasarlanma ve iyileşme arasındaki karmaşık bir etkileşim içinde daha dirençli hücre tipine geçecektir. Bunun bir örneği, alveoler epitelyal denüdasyonda görülmüştür. Benzer değişiklik atropik bezler ve ışınlanmış ürotelyuda gözlenmiştir. Skuamöz metaplazi genellikle gastrointestinal epitel hücre tiplerinde şişme, besin yollarında gözlenmiştir (35).

Displastik değişiklikler genellikle skuamöz epitel ile kaplı dokularda tarif edilmektedir ve hücresel atipi yanı sıra hücresel polarite kaybı ile normal doku yapısının bozulması, hücrelerin kazınması, yüksek nükleer sitoplazmik oran, zaman zaman anizositozis ve anizokaryozisle karakterize edilir. Displazi geleneksel bir preneoplastik lezyon ve genetik bozukluk olarak kabul edilir (35).

2.4.2.1. İyonize Radyasyonun Akciğer Üzerine Etkileri

Radyasyon tedavisi, radyasyona mesleki maruz kalma ya da maruziyet, normal hücreleri, ışınlama kaynaklı hasardan korumada kritik bir konudur. Bu akciğer için özellikle önemlidir çünkü akciğer geniş bir yüzey alanından dolayı daha yüksek oksijen seviyelerine maruz kalır ve iyonize radyasyona karşı çok hassastır. Radyasyon pnömonisi akut görülür ve bir göğüs duvarı veya intratorasik maligniteler için radyoterapiyi takiben nispeten yaygındır. Akciğer, lösemi tedavisi ve diğer hematolojik maligniteler için tüm vücut ışınlaması sırasında doz sınırlayıcı bir organdır (63, 64). İyonize radyasyona bağlı akciğer hasarının mekanizması net olarak bilinmemekle beraber, sitokin aktivitesi ve oksidatif strese bağlı olduğuna inanılmaktadır (9, 10). Radyasyona bağlı akciğer hasarı, patolojik olarak aktif makrofajlarda artma ile karakterize erken inflamatuar cevapla ilişkilidir (10).

Radyasyon-kaynaklı akciğer hasarı (RILI), çeşitli göğüs kanserlerinin tedavisinde önemli bir engel teşkil eder (65). Akciğerde radyasyona moleküler yanıt sadece dozun fraksiyonuna değil aynı zamanda zamana da bağlıdır (66). İlk olaylardan biri, reaktif oksijen (ROS) ve nitrojen türlerinin (RNS) üretimi olduğu düşünülmüştür ki DNA hasarı, proteinler ve lipidler için gelişebilir (67).

Standart fraksiyon ve dozlarda (1.5/2 Gy/fraksiyon/gün) tüm akciğere 18-20 Gy uygulandığında en az %5 olguda radyasyon pnömonisi gözlenmektedir (2, 3). Radyasyon pnömonisini artıran nedenler ise yüksek total doz, fraksiyon sayısının artması, geniş volüm, ışınlanan normal doku hacminin artması, radyo duyarlaştırıcılar veya kemoterapötik ilaçların beraber kullanılması, hücre ve doku özellikleri gibi faktörlerdir. Özellikle kemoterapi ve radyoterapi birlikte uygulandığında risk daha da artmaktadır (6). Üç boyutlu planlama veya yoğunluk ayarlı radyoterapi (intensity modulated radiation treatment, IMRT) kullanımıyla daha sofistike radyoterapi uygulayarak normal dokunun aldığı hasar minimuma indirilebilmekte ve normal doku korunabilmektedir. Ancak bu ileri radyoterapi teknikleri henüz yaygın olarak kullanılamadığından, radyasyona bağlı akciğer toksisitesi kaçınılmaz olarak karşımıza çıkmaktadır (2, 3).

2.4.2.2. İyonize Radyasyonun Karaciğer Üzerine Etkileri

Karaciğer, detoksifikasyon, protein sentezi ve sindirim için gerekli biyokimyasalların üretimi, safra üretimi, besin metabolitlerin emilmesi, atık ürünlerin ortadan kaldırılması, glikojen depolama, kırmızı kan hücrelerinin yıkılması, plazma protein sentezi, hormon üretimi gibi birçok fonksiyona sahip, önemli bir organdır (11, 68).

Karaciğer genellikle üst abdomen, sağ akciğer, distal özofagus tümörlerinde, abdomen radyoterapi sırasında, tüm abdomen ya da tüm vücut ışınlama sırasında kazara ışınlanır (11). İyonize radyasyon maruziyeti ciddi sağlık koşullarının geliştirilmesini gerektirir. Akut etkiler çoğunlukla hematopoetik hücre kayıpları, bağışıklık sistemi yetersizliği, mukozal hasar, karaciğer ve diğer dokularda potansiyel hasarlardır. Tüm organın ışınlanması hepatosit yetmezliği ve hepatit gibi radyasyon kaynaklı karaciğer hastalığına yol açabilir (12).

2.4.2.3. İyonize Radyasyonun Böbrek Üzerine Etkileri

Böbrekler, kırmızı kan hücresi üretimini teşvik etmek için eritropoietin üretmekten, kandan atık metabolitleri ve elektrolitleri filtrelemekten ve sıvı-elektrolit dengesi ile kan basıncını modüle etmekten sorumlu son derece önemli bir organdır. Böbrekler gastrointestinal kanserler, jinekolojik kanserler, lenfomalar ve üst abdomen sarkomlar için radyoterapi ve tüm vücut uygulama sırasında doz sınırlayıcı organlardır. Radyoterapi ile ilişkili böbrek hasarı insidansı sıklığı muhtemel uzun gecikme nedeniyle rapor edilmemiştir çünkü disfonksiyon olasılığı genellikle daha yaygın nedenlere bağlanır (16).

Böbrek, radyasyon kaynaklı morbidite geliştirme riskinin normal dokulardan daha fazla radyo duyarlı organlardan biri olarak bilinir (13, 14). Abdominal ya da tüm vücut ışınlamadan sonra radyasyon nefropatisi oluşacağı tahmin edilir. Radyasyon tedavisinden sonra, büyük ölçüde toplam radyasyon dozuna bağlı böbrek fonksiyonunun geç ve sürekli ilerleyici bozulması bildirilmiştir (15). Tüm vücut ışınlaması sonrası, radyoterapi kaynaklı böbrek hasarı genellikle hemolitik-üremik sendrom (örneğin, mikroanjiopatik hemolitik anemi ve trombositopeni) özelliklerini içerir (69).

2.5. Serbest Oksijen Radikalleri

Atomlarda elektronlar “orbital” adı verilen uzaysal bölgede ve çift olarak bulunurlar. Moleküllerin çoğu çift elektronlu, az sayıdaki moleküller ise tek yani eksik elektronludur. Eksik elektronlu bu moleküller bulabilecekleri herhangi bir elektron ile iletişime girerek, bu molekülden ya bir elektron alır ya da ona bir elektron verirler. Fizyolojik veya patolojik reaksiyonlar esnasında başka moleküller ile kolayca elektron alışverişine girip onların yapısını bozan bu moleküllere serbest radikaller, oksidant moleküller veya en doğru adlandırma ile reaktif oksijen parçacıkları denmektedir (70-75).

Oksijenden tek elektron indirgenmesi sonucu oluşan serbest radikaller değişik birçok reaksiyonla hücre ve dokularda oluşur. Normal metabolizma olayları sırasında çeşitli basamaklarda serbest oksijen radikalleri oluşabilir, bu radikaller proteinleri, lipidleri, karbonhidratları ve nükleik asitleri yıkıma uğratabilirler. Oluşan bu serbest radikal

yapısına sahip maddelerin organizmaya zarar verme potansiyelleri bulunsa da bazı metabolik olayların devamı için bunların oluşumu kaçınılmazdır (76). Serbest radikal oluşturan başlıca endojen kaynaklar: mitokondriyal elektron taşıma zinciri, mikrozomal membran elektron taşıma zinciri, oksidan enzimlerin reaksiyonu, ksantin oksidaz, lipooksijenaz, triptofan dioksijenaz, D-amino oksidaz, normal simülasyonla fagositik hücrelerin aktivasyonu, nötrofiller, monosit ve makrofajlar, eozinofiller, endotelyal hücreler ve otooksidasyon reaksiyonlarıdır (76-78). Serbest radikal oluşturan başlıca ekzojen kaynaklar arasında redoks-döngüsü maddeleri, ilaç oksidasyonları, iyonize radyasyon, güneş ışığı ve insanlarda sigara içimi sayılabilir (77, 79, 80).

Biyolojik sistemlerde bulunan en önemli serbest oksijen radikalleri, süperoksit anyon radikali ($O_2^{-\bullet}$), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikali ($OH^{\bullet}$) ve singlet oksijen ($^1O_2$) dir. Hidrojen peroksit bir radikal değildir ve bütün elektronları da çiftlenmiştir. Fakat kolayca oksijen serbest radikallerini oluşturması nedeniyle serbest oksijen radikalleri sınıfında incelenmektedir (79).

2.5.1. Süperoksit Radikali ($O_2^{\bullet}$)

Moleküler oksijene fazladan bir elektron bağlanmasıyla onu redükleyerek süperoksit serbest radikal anyonunu meydana getirir. Zayıf bir oksidan olarak $O_2^{\bullet}$ kendi başına önemli bir hücre hasarı oluşturmaz. Milisaniyelik bir yarı ömürle zayıf bir oksidan fakat güçlü bir redüktandır. $O_2^{\bullet}$, oksijen toksisitesinde önemli bir faktördür ve SOD enzimi buna karşı organizmayı korur. Asıl önemi, hidrojen peroksit kaynağı olması, geçiş metal iyonlarını redüklemesi ve NO ile reaksiyona girerek peroksinitrit ($ONOO^-$) oluşturmasıdır (81).

2.5.2. Hidroksil Radikali ($OH^{\bullet}$)

En reaktif ve en fazla toksik SOR olup üretildiği her yerde her biyomolekül ile reaksiyona girebilir ve lipid peroksidasyonunu başlatma, DNA'da kırılma ve hasarlanmalar, enzimlerin aktif merkezlerindeki sülfidril gruplarının (SH) ve benzeri grupların oksitlenmesi ve polisakkaritlerin depolarizasyonu gibi hasarlar yapabilir. Ayrıca tiyoller ve yağ asidi gibi moleküllerden bir proton koparak yeni radikaller oluşturabilir (70).

2.5.3. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

Hücreye doğrudan zarar vermez. Fakat yüksüz olduğundan dolayı tüm biyolojik membranlardan (hücre, mitokondri, nükleer membran gibi) difüzyonla kolayca geçebilir (82). Süperoksit ise negatif yüklü olduğundan bir anyon kanalı olmadıkça membranları geçemez. Bu nedenle süperoksitin giremediği membranlarla korunan bölgelere rahatlıkla geçebilir ve potansiyel bir radikal oluşturucu (özellikle $OH^{\bullet}$) olarak hasarlama yapabilir. H_2O_2 ile oluşturulan hasar katalaz ve glutatyon peroksidaz enzimleri aracılığı ile önlenir (70, 81, 83).

2.5.4. Singlet Oksijen ($^1O_2$)

Oksijen molekülünün daha reaktif türü olan singlet O_2'ler moleküler oksijenin enerji almasıyla meydana gelirler. Bunların delta ve sigma olmak üzere iki tipi mevcuttur. Sigma tipi daha reaktif olduğu için hızla delta tipine dönüşür. Bu yüzden biyolojik sistemlerde delta tipinden bahsedilir (70).

2.5.5. Nitrik Oksit (NO)

15-20 yıl öncesine kadar NO'nun basit bir atmosfer atığı olduğu düşünülmekteydi. Ancak 1987 yılında, damar endotelinden endotel kaynaklı gevşeme faktörü (EDRF) olarak bilinen yapının izole edilmesi sırasında nitrik oksit sentetaz (NOS) keşfedilmiş ve daha sonraki yıllarda EDRF'nin NO olduğu tespit edilmiştir. İnsan ve hayvanların da NO üretebildiklerinin ortaya konması ile 1987 yılına kadar insan vücudunda bulunuş nedeni ve metabolizması hakkında çok az şey bilinen NO'nun fizyolojik ve patolojik olaylardaki rolü anlaşılmış ve 1992'de yılın molekülü seçilmiştir (82, 84).

NO, renksiz bir gazdır. Yüksek konsantrasyondaki NO oksijensiz ortamda oldukça stabil olup suda erime özelliği gösterirken, düşük konsantrasyondaki NO oksijen varlığında dahi stabildir. Havadaki NO, kısa sürede oksijenle oksitlenerek nitrojen dioksite dönüşür. Nitrojen dioksit dokular için oldukça zararlı bir bileşiktir. Nitrik oksitin, üzerinde yük taşımaması ve çiftlenmemiş elektron bulundurması, hücreden hücreye hiçbir bariyerle karşılaşmadan kolaylıkla geçmesini sağlamaktadır. Aynı zamanda NO, taşıdığı çiftlenmemiş elektron nedeni ile bir radikal molekülüdür. Diğer serbest radikaller her konsantrasyonda hücreler için zararlı iken NO düşük konsantrasyonlarda çok önemli fizyolojik işlevlerde rol almaktadır. Ancak aşırı ve

kontrolsüz NO sentezi hücreler için zararlı olmaktadır. NO, bu özellikleri ile çok ideal bir fizyolojik haberci molekülü özelliği kazanmaktadır. NO, diğer serbest radikaller gibi çok kısa yarılanma süresine sahip olup 2-30 saniye içinde daha stabil bir yapı olan nitrata (NO_3) oksitlenir (82, 84).

NO, dokularda NOS tarafından L-argininden sentezlenir. Son görüşlere göre; NOS uyarıldığında, iki oksijen molekülünün aktivasyonu ile bir çift oksijen atomu, L-arginine girerek NO ve strüllin üretilmektedir (85).

2.5.6. Serbest Oksijen Radikallerinin Oluşturduğu Oksidatif Hasar

Serbest radikaller lipid, protein, karbonhidrat, nükleik asit gibi çeşitli biyolojik makromoleküllerin oksidatif hasarına neden olurlar. Oksijen toksisitesi, inflamasyon, yaşlanma, aterosklerozis, hipertansiyon, iskemik hasar, karsinogenezis, mutagenezis, immünoloji, nöroloji, ürolojik hastalıklar ve sindirim sistemi, enfeksiyon, göz, deri, akciğer ve karaciğer hastalıkları serbest radikaller ile ilgili oldukları kanıtlanmış hastalıklardandır (70, 76, 77).

2.5.6.1. Serbest Oksijen Radikallerinin Proteinler Üzerine Etkisi

Serbest radikallerin etkisiyle proteinlerde agregasyon, fragmantasyon, karşı bağ ve floresan oluşumu gözlenir. Floresan oluşumunun nedeni proteinlerin lizin aminoasidinin epsilon amino grubuna malondialdehitin bağlanmasıyla schiff bazı ve protein-protein ya da protein-lipid çapraz bağlarının oluşumudur (86).

Lipid peroksit-protein interaksiyonu üzerine olan çalışmaların çoğu sülfidril gruplarının oksidatif duyarlılığından dolayı sülfür içeren aminoasitlerle in vitro olarak yapılmıştır. Lipid peroksidasyonunun fenil alanin, tirozin, metiyonin, glutamik asit, serin, arginin gibi aminoasitlerde değişik düzeylerde yıkıma neden olabileceği bildirilmektedir (76-78, 87).

2.5.6.2. Serbest Oksijen Radikallerinin Karbonhidratlar Üzerine Etkisi

Fizyolojik pH ve sıcaklıkta glikoz gibi monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucunda hidrojen peroksit, peroksitler ve okzoaldehitler oluşur. Glikoz aminoglikan olan ve sinoviyal sıvının viskozitesinde önemli rol oynayan hyalüronik asit, $O_2^{\bullet}$ tarafından

depolimerize olarak, bağ dokunun stabilitesinin bozulmasına ve sıvının viskozitesinin kaybına neden olmaktadır (80).

2.5.6.3. Serbest Oksijen Radikallerinin Nükleik Asitler Üzerine Etkisi

Serbest radikaller DNA'yı etkileyerek nükleik asit modifikasyonlarından doğan kromozom değişikliklerine bağlı olarak hücrede mutasyona yol açarlar. DNA'ya karşı oksidatif hasar, normal metabolik durumlarda da yüksek oranda meydana gelir. Vücudumuzdaki her bir hücredeki DNA her gün 104 oksidatif hasara maruz kalarak yirmiden fazla farklı oksidatif DNA lezyonlarının oluşumuna yol açar. Bu lezyonların çoğu mutajenik olarak bilinir. Bu lezyonları iyileştirebilen spesifik glikozilaz, endonükleaz ve ekzonükleaz gibi DNA tamir enzimleri vardır. Bununla birlikte bu tamir mekanizmaları mükemmel değildir. Bu mekanizmalar lezyonların %99'unu temizlemesine rağmen %1'i kalır ve bu da zamanla lezyonların birikimine yol açar. Sonuç olarak oksidatif DNA hasarı ve mutasyonları yaşla artar (70, 76, 86).

2.5.6.4. Serbest Oksijen Radikallerinin Lipidler Üzerine Etkisi

Serbest radikallerin en önemli etkisi lipidler üzerine yaptığı etkidir. Bu lipid peroksidasyonu olarak adlandırılır ve üç aşamada incelenebilir (79, 88-90).

2.5.6.4.1. Başlangıç Aşaması

Lipid peroksidasyonu, doymamış yağ asitlerinin serbest radikallerle etkileşmesi sonucu doymamış yağ asidindeki metilen grubundan bir hidrojen atomunun uzaklaştırılması ile başlamaktadır. Biyolojik sistemlerde bu radikalin süperoksit anyon radikali ile hidroksil radikali olduğu kabul edilmektedir. Süperoksit anyon radikali hidroksil radikaline dönüşmektedir. Benzer şekilde hidrojen peroksidin de hidroksil radikaline dönüştüğü bilinmektedir. Bu nedenle lipid peroksidasyonunu başlıca hidroksil radikali başlatmaktadır. Radikal, lipid molekülünden bir hidrojen atomu çıkartarak karbon merkezli lipid radikalinin ($R^{\bullet}$) oluşmasına yol açmaktadır.

$$RH + OH^{\bullet} \longrightarrow R^{\bullet} + H_2O$$

2.5.6.4.2. Zincir Aşaması

Bu aşamada hidrojen atomunun koparılmasıyla oluşan serbest yağ asidi radikali moleküler oksijen ile reaksiyona girerek peroksit radikalini oluşturur. Oluşan peroksit radikali yüksek reaksiyon yeteneğine sahip olup başka bir yağ asidi molekülü ile bir hidroperoksit ve yeni bir yağ asidi radikali oluşturacak şekilde reaksiyona girer. Oluşan bu yağ asidi radikali yeniden oksijen ile birleşir ve RH'dan yeniden bir H^+ ayrılmasını sağlar. Bu başlayan zincir reaksiyonu oluşan yeni radikallerin etkisiyle devamlı olarak artan bir hızda devam eder.

$$R^{\bullet} + O_2 \longrightarrow ROO^{\bullet}$$
$$ROO^{\bullet} + RH \longrightarrow R^{\bullet} + ROOH$$
$$ROOH \longrightarrow ROO^{\bullet} + OH^{\bullet}$$
$$RO^{\bullet} + RH \longrightarrow R^{\bullet} + ROH$$
$$OH^{\bullet} + RH \longrightarrow R^{\bullet} + H_2O$$

Birçok olayda bu şekilde oluşan lipid peroksidi, $RO^{\bullet}$ ve $OH^{\bullet}$ verecek şekilde parçalanır ve bu oluşan radikaller hemen substrat ile reaksiyona girerek yeni zincir reaksiyonlarını başlatacak olan R radikallerini oluşturur. Böylece oluşan bir radikal sürekli olarak yeni radikallerin oluşmasına neden olur (91).

Lipid peroksitleri hücre zarlarının önemli bir kompenentidir ve Fe, Cu gibi geçiş metallerinin varlığında alkoksi ve peroksi radikallerini verirler. Bu nedenle Fe ve Cu tuzları lipid peroksidasyonunun hızını arttırırlar. Sonuçta hücre zarının akışkanlığını ve permeabilitesini arttırarak zar bütünlüğünün bozulmasına yol açarlar. Lizozomal membranların tahribi hidrolitik enzimlerin salınmasına ve intrasellüler sindirime neden olurlar. Biriken hidroperoksitler direkt olarak ya toksiktirler ve duyarlı aminoasit kalıntılarını (metiyonin, histidin, sistein, lizin) okside eder veya zincir polimerizasyon reaksiyonlarıyla enzimleri inaktive edebilirler (91).

Membranda oluşan oksidatif hasar şu şekilde özetlenebilir: Lipid peroksidasyonu, membran yağ asitleri tamamen hidroperoksitlere okside olana kadar devam eder. Bu da normalde Ca^{+2} gibi membranı geçebilen maddelerin geçirgenliğinde artışa neden olur ve böylece hücre içindeki iyon dengesinin korunmasına engel olur. Geçirgenlik membrana bağlı enzimlerin ya da hormonların hücrelere girmelerine yardım eden yüzey reseptör moleküllerinin inaktivasyonuna neden olur. Hücrelerin parçalanması ile sonuçlanabilen hücre membran bozuklukları oluşabilir. Organellerin membranlarında bozulmalar, kopmalar oluşabilir. Örneğin lizozomların membranında oluşan kopma, hidrolitik enzimlerin hücre içine dağılmasına ve hasarın artışına neden olur. Lizozomal membranda kopmaların bazı kanser türlerinin başlangıç safhasında görüldüğü bildirilmektedir. Membran proteinlerin hasarı, kavşaklardaki membranları ya da molekülleri etkileyerek komşu hücreler arasındaki haberleşmeyi inhibe eder. Eritrosit membranların lipid peroksidasyonuna uğraması ve küçük kapillerlere kadar eritrositlerin elastikiyetlerinin kaybına neden olur ve sonuçta hemoliz oluşur (91).

2.5.6.4.3. Zincir Uzamasının Durması ve İkincil Ürünlerin Oluşması

Hidroperoksitler ve bunlara bağlı olarak oluşan serbest radikaller ($ROO^{\bullet}$, $RO^{\bullet}$ ve $R^{\bullet}$) ya birbirleriyle reaksiyona girer, inaktif kondenzasyon ürünlerini verir ve zincir uzaması durur

$$R^{\bullet} + R^{\bullet} \longrightarrow RR$$

$$ROO^{\bullet} + R^{\bullet} \longrightarrow ROOR$$

$$RO^{\bullet} + RO^{\bullet} \longrightarrow ROOR$$

$$RO^{\bullet} + R^{\bullet} \longrightarrow ROR$$

ya da zincir uzamasının durması değişik yapı ve yetenekteki bazı bileşikler tarafından gerçekleştirilir (91).

2.6. Antioksidan Savunma Sistemleri

Reaktif oksijen türlerinin oluşumu ve bunların oluşturduğu hasarı önlemek için vücut antioksidanlar olarak bilinen birçok savunma sistemi geliştirmiştir. Düşük konsantrasyonlarda oksitlenmeye karşı etkili ve duyarlı olan, istenmeyen değişiklikleri önleyen ya da ortadan kaldıran bu bileşikler oksidasyona karşı oldukları için antioksidan olarak isimlendirilmiştir. Antioksidanlar peroksidasyon zincir reaksiyonunu engelleyerek veya reaktif oksijen türlerini toplayarak lipid peroksidasyonunu inhibe ederler. Antioksidanlar etki mekanizmalarını serbest radikalleri tutarak veya daha zayıf yeni bir moleküle çevirerek, serbest radikalle etkileşip aktivitelerini azaltarak, serbest radikalleri kendilerine bağlayıp reaksiyon zincirini kırarak ya da onarım yaparak gösterirler (92-95).

$$R^{\bullet} + AH \longrightarrow A^{\bullet} + RH$$
$$RO^{\bullet} + AH \longrightarrow A^{\bullet} + ROH$$
$$ROO^{\bullet} + AH \longrightarrow A^{\bullet} + ROOH$$

Burada oluşan antioksidan radikalleri yeni bir reaksiyonu başlatmaz. Aksine ikinci bir radikal ile birleşir.

$$ROO^{\bullet} + A^{\bullet} \longrightarrow ROOA$$
$$R^{\bullet} + A^{\bullet} \longrightarrow RA$$
$$RO^{\bullet} + A^{\bullet} \longrightarrow ROA$$
$$H^{\bullet} + A^{\bullet} \longrightarrow HA$$
$$A^{\bullet} + A^{\bullet} \longrightarrow AA$$

Radikallerin birbirleriyle reaksiyona girerek kondanse olmaları veya antioksidanlar tarafından etkisizleştirilmemeleri sonucu ise ikincil ürünler oluşur. Radikallerin oluşumunun önlenmesi ya da bunlar tarafından başlatılan reaksiyonların durdurularak bildirilen olumsuz etkilerinin önlenebilmesi amacıyla organizma moleküler ve enzimatik korunma sistemlerini geliştirmiştir. Antioksidanlar endojen kaynaklı ve ekzojen kaynaklı olmak üzere iki gruba ayrılabildiği gibi serbest radikalin oluşumunu önleyenler ve mevcut olanı etkisiz hale getirenler şeklinde de ikiye ayrılabilirler (92, 93).

Ayrıca enzim ve enzim olmayanlar şeklinde (Tablo 2.3.) de sınıflandırılırlar. Enzimatik antioksidanlar süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve katalaz gibi enzimlerdir. Enzimatik olmayanlar ise tokoferol, β karoten, askorbik asit, ürat, sistein, seruloplasmin, transferrin ve albumindir (94-96).

Organizmanın antioksidatif savunma sisteminde α-tokoferol (89, 97), β-karoten (98, 99), askorbik asit (100, 101) gibi moleküller ve glutatyon peroksidaz (102), superoksit dismutaz (103), katalaz (104), fosfolipaz (105) gibi enzimatik antioksidanlar önemli rol oynamaktadır. Melatonin, üratlar, sistein, metiyonin, glutatyon, seruloplazmin, transferrin, laktoferrin, miyoglobin, hemoglobin, ferritin, albümin, bilirubin de son yıllarda enzimatik olmayan antioksidanlar olarak kabul görmektedir (70).

Tablo 2.3. Antioksidanlar

Enzimatik	Nonenzimatik	
Süperoksit dismutaz (SOD) Katalaz (CAT) Glutatyon peroksidaz (GSH-Px) Fosfolipid hidroperoksit glutatyon Peroksidaz (PLGSH-Px) Glutatyon S-transferaz (GST) Glutatyon redüktaz (GSSG-R)	Glutatyon (GSH) α-Tokoferol (vit E) Askorbat (vit C) β-Karoten Flavonoidler Ürat Bilirubin	Albümin Seruloplazmin Transferrin Ferritin Laktoferrin Melatonin Sistein

2.6.1. Süperoksit dismutaz (SOD)

Aktif oksijen türleri yüksek reaktif özelliklerinden dolayı herhangi bir koruma mekanizması olmadığı takdirde hücre duvarının yapısına ve fonksiyonlarına zarar verir (106). SOD aerobik hücrelerde oksidatif strese karşı major defans sistemi olarak bilinen bir metalloenzimdir. SOD serbest oksijen radikallerinin en önemli üyesi olan süperoksit anyonunun enzimatik dismutasyonunu gerçekleştirir. Böylece süperoksit anyonu, hidrojen peroksite dönüşür. SOD bu yolla oksijen toksisitesinden koruyucu sistemin en önemli ve ilk basamağında rol oynar (107). Oluşan hidrojen peroksit de toksik bir üründür. Ancak bu da katalaz ve GSH-Px tarafından oksijen ve suya parçalanmaktadır.

2.6.2. Katalaz (CAT)

Katalaz çeşitli streslere karşı geliştirilen cevap mekanizmalarındandır. Ayrıca patojenlerin öldürülmesinde de savunma sistemi hücreleri tarafından üretilir (108). Katalaz, antioksidan sistemin üç önemli enziminden biri olup yapısında demir içeren bir tetramerdir ve hidrojen peroksiti doğrudan parçalayarak etki eder. Katalaz hidrojen peroksite karşı rölatif olarak düşük affinite gösterdiğinden katalaz aktivitesi hidrojen peroksitin yüksek konsantrasyonlarında daha önemli hale gelmektedir. Düşük hidrojen peroksit konsantrasyonlarında, metil veya etil hidroperoksitler, metanol, etanol, fenol gibi küçük moleküllü elektron vericilerini indirger. Enzimin bu iki tür aktiviteden hangisini göstereceği, başta hidrojen peroksit üretim hızı olmak üzere oluşan biyomoleküllerin tür ve miktarına bağımlıdır (109).

2.6.3. Glutatyon peroksidaz (GSH-Px)

Glutatyon redüktaz, okside glutatyonun (GSSG) glutatyona (GSH) indirgenmesini katalizleyen bir enzimdir. Glutatyon redüktaz, redoks döngüsünde önemli bir enzim olup, indirgenmiş hücresel GSH'nın hücrede yeterli seviyede kalmasını sağlar. GSH antioksidan olarak görev yapar ve serbest radikal ve organik peroksitlerle reaksiyona girer, amino asit taşınımında görev alır, organik peroksitlerin detoksifiyesinde ve zenobiyotiklerin metabolizmasında görevli glutatyon peroksidaz ve glutatyon S transferaz enzimlerinin substratıdır (110). GSH-Px, başta karaciğer olmak üzere eritrositler, kalp, akciğer, böbrek, göz ve beyin gibi dokularda bulunmaktadır. GSH-Px'ın en önemli özelliklerinden birisi selenyum bağımlı olmasıdır. GSH-Px, hidrojen peroksitin düşük konsantrasyonlarına daha hassastır (111).

2.7. Radyoterapi

Radyoterapi, malign tümörleri kontrol altında tutmak için iyonize radyasyonun tıbta kullanımıdır (37). Tümörlerin tedavisi için radyasyonun ilk klinik kullanımı 1897'dir. Bugün, bu önemlidir ve bir dizi maligniteler için en yaygın tedavi seçeneğidir (112). Bazen, kanser hastalarının %80'inde, ya küratif ya da palyatif amaçla radyoterapi gerekir (113). Radyoterapide amaç, vücuttaki normal dokulara minimum zarar verirken maksimum tümör öldürmektir (114). Temel olarak iki tip radyasyon tedavisi vardır.

2.7.1. Eksternal Radyoterapi (EBRT) ya da Teleterapi

Eksternal radyoterapi, dış tedavi, makine tarafından üretilen radyasyon kullanılarak radyasyon tedavisinin en sık görülen şeklidir. EBRT'de kullanılan radyasyon kaynağı x-ışınları ya da γ-ışınları olabilir. X-ışınları lineer hızlandırıcılar olarak adlandırılan makineler tarafından oluşturulur. Radyasyonun diğer türleri ile karşılaştırıldığında, x-ışınları, nispeten büyük bir alana radyasyon verebilir. γ-ışınları, parçalanarak radyasyon enerjisi salan belirli elementlerin (İridyum ve Cobalt-60) izotoplarından üretilir. Cobalt-60'ın parçalanmasıyla üretilen γ-ışınları "gama knife" adıyla tedavide kullanılır. EBRT'de, tedavi genellikle fraksiyonlanmış şekildedir. Örneğin, tipik bir tedavi dönemi, dokuya 60 Gy total doz vermek için, 6 haftalık peryodlarla, tedavinin herbiri 2 Gy olacak şekilde 30 tedaviden oluşacaktır (115).

2.7.2. Brakiterapi ya da İç Terapi

Bu tür radyoterapi, doğrudan radyoaktif kaynağın doku içine implantını ya da ulaşılabilir dokuların boşluklarına yerleştirilmesini içerir. Sezyum ve iridyum brakiterapide yaygın kullanılan radyoaktif materyallerdir (115).

2.8. Radyasyon Koroyucular (Radyoprotektörler)

İyonize radyasyonun etkisini azaltabilecek, toksik olmayan etkili bir radyasyon koruyucunun tanımlanması ve geliştirilmesinde sürekli bir ilgi bulunmaktadır. Radyasyonun, tanıda, tedavide, sanayide, enerji sektöründe yaygın kullanımı, uzay yolculuğunda maruz kalma, nükleer kazalar ve nükleer terörizm tehditlerine insanların maruz kalmasına karşı radyasyondan korunmak için bir radyo koruyucu geliştirilmesini gerekli kılmıştır. Farmakolojik müdahale, bir bileşik veya formülasyon serbest radikal süpürücüleri harekete geçirebilen en akılcı strateji olabilir ve antioksidan iyonize radyasyonun kötü sonuçlarını azaltabilir ya da hafifletebilir (116). Vitamin C ya da askorbik asit biyolojik sıvılarda suda çözünebilen güçlü bir antioksidandır (117) ve radyasyon maruziyeti sırasında oluşan serbest radikallerin etkili süpürücü bir radyo koruyucu olarak kullanılabilir (118, 119). Vitamin C hem in vivo hem in vitro biyolojik sistemlerde DNA ve membranların hasarını azaltabilir (120). Askorbik asit ile diyet takviyesi insan lenfositinde DNA hasar seviyesini indükler ve endojenleri azaltır (121). Bu koruyucu etkiler, hücresel makromoleküllere saldırmadan önce reaktif oksijen türlerinin kendi süpürücü

aktivitesi nedeniyle olduğuna inanılmaktadır. Radyasyon ile ilgili çalışmalar, insan hücrelerinde hipoksantin guanin fosforibozil transferazın (HGPRT) lokustaki mutasyonları indüklediği ve fare m5S hücrelerde morfolojik dönüşümler gösterdiği, askorbik asit süpürücüler, uzun ömürlü serbest radikaller kadar kısa ömürlüde de etkili olduğu gösterilmiştir (118).

2.9. Pycnogenol®

Pycnogenol, Pinus pinaster olarak bilinen bir deniz çam ağacının kabuğundan elde edilen biyoflavonoid/polifenol yapısında bir komplekstir. Pycnogenol adıyla satılan çam kabuğu ekstresi, oligomerik proantosiyanidin kompleksleri (OPC) denilen doğal bileşikleri içerir ve antioksidan, anti-inflamatuar ve antikanserojen özellikleri de dahil olmak üzere birçok biyolojik etkileri vardır (18). 1940′lı yıllarda, Dr. Jacques Masquelier, çam ağacının kabuğundan çıkan biyoflavonoidi "pycnogenol" olarak adlandırarak bu maddenin vücuttaki serbest radikallere karşı C ve E vitaminlerinden daha etkili olduğunu belirtmiştir. Pycnogenolün başlıca bileşenleri polifenoldür, özellikle kateşin, epikateşin, taksifolin monomerik ve oligomerik birimleridir. %65-75 pycnogenol ekstresi prosiyanidinlerin değişen zincir uzunlukları, kateşin ve epikateşinin alt biriminden oluşmaktadır (19). Karşılaştırmalı araştırmalar pycnogenolün lipid peroksidasyonunun önlenmesinde C, E, alfa-lipoik asit ve CoQ_{10} vitaminlerinden ve üzüm çekirdeği ekstresinden daha güçlü olduğunu göstermiştir (20). Laboratuvar testlerinin yanı sıra klinik çalışmalarda da pycnogenolün güçlü bir antioksidan olduğu gösterilmiştir (20, 21). Pycnogenol oksidatif stresten kaynaklanan glutatyon ve vitamin E'nin deplesyonunu önlediği (22), insanlarda pycnogenol, vasküler bütünlüğü, endotel fonksiyonu, antioksidan kapasiteyi artırdığı ve kayda değer bir anti-inflamatuar potense sahip (23) olduğu bulunmuştur. Oligomerik prosiyanidinler, özellikle pycnogenolün başlıca biyoflavonoid bileşenleri, membranöz fosfolipidlerin polar baş gruplarına bağlanır ve oksidasyonları önler (24), pycnogenolünün bileşenleri vitamin E'ye benzer bir hücre içi lokalizasyona sahip olabilir (25). Pycnogenolün programlanmış nöronal hücre ölümü ve glutamat ile indüklenen nörotoksisiteyi önlediği gösterilmiştir (26, 27). Pycnogenolü oral yoldan alan hastalarda, platelet agregasyonunun inhibisyonu, antihipertansif etkisi ve mikrosirkülasyon düzenlemesi gibi dolaşım fonksiyonları üzerine etkileri ortaya konmuştur (19, 28). Astım hastalarında deniz çam kabuğu ekstresinin anti-inflamatuar etkileri gözlenmiştir (29, 30). Pycnogenolün, sıçanlarda

abdominal bölgenin ışınlamasından sonra, intestinal mukozayı iyonize radyasyondan önemli ölçüde koruduğu sonucuna varılmıştır (31).

2.9.1. Pycnogenol®'ün Tarihçesi

1535 kışında, Jacques Cartier adlı bir Fransız kaşif, St Lawrence Nehri'nde, şimdi Quebec'de, buzla kaplı gemisinde bulmuştur. Hiçbir meyve ya da sebze yiyeyemeyen mürettebat iskorbüt (C vitamini eksikliği belirtileri) geliştirmeye başlamıştır. Yerli Amerikalılardan biri onlara belirli bir ağaç kabuğundan yapılmış bir çay hazırladığı zaman mürettebatın çoğu zaten ölmüştür. Ağaç, beyaz çam, sedir veya diğer çeşiti bilinmemektedir, ama muhtemelen çaydaki C vitamini birçok mürettebatı iyileştirmiş, iyileşme çayın mucizevi özelliklerine bağlanmıştır. 1951'de Fransız araştırmacı Jacques Masquelier, Cartier'in yazılarındaki bu söylentiyi okumuş ve çaydaki aktif maddeleri aramaya başlamıştır. 1947 yılından daha önce, Jacques Masquelier, Bordeaux Üniversitesi'nde biyoloji ve tıp öğrencisiyken, fıstığın kırmızı iç derisinin zehirli olup olmadığını belirleme görevine atanmıştır. Doktora tezi için, Masquelier bu soruyu cevaplamak için bir dizi deney üstlenmiş, araştırmalarının oldukça başında, Masquelier fıstık derilerinde aslında zehir olmadığını belirleyebilmiştir.

Araştırma tezinde, ayrıca, fıstık derisindeki renksiz bir maddeyi daha ileri incelemeler için çağrılmıştır. 1948'de fıstık derisinden, oligomerik proantosiyanidin (OPC) adlı maddeyi izole etmeyi başarmış ve vazoprotektif (kan damarları koruyucu) potansiyele sahip olduğunu tespit etmiştir. Birçok olası kaynakları topladıktan sonra, Landes çam ağaçlarının kabuğunu araştırırken (genellikle bahçeler için bir malç olarak kullanılan kereste endüstrisinin bir atık ürünü) bulmuş ve Avrupa sahil çam ağacı (P. pinaster) kabuğundan proantosiyanidinleri çıkarabilmiştir.

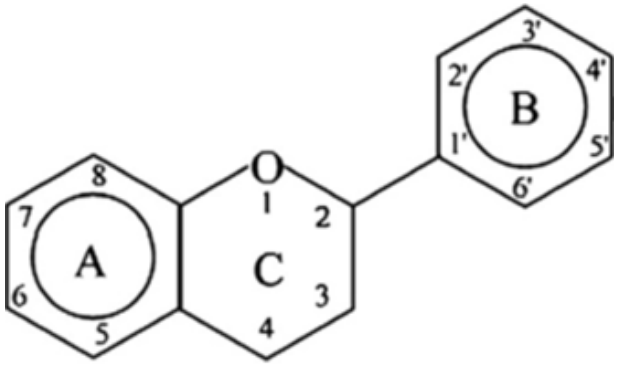
Bu yeni kaynak, yararlı üretim amaçları için yeterli miktarlarda elde edilmiştir. 1970'de, OPC üzüm çekirdeğinden çıkarılmıştır. Üzüm çekirdeğinde bileşim bulunmuş ve bitki proantosiyanidinler ya da pycnogenole ref edilmiştir. Ayrıca Dr. Masquelier tarafından çıkarılmış Pycnogenolden biraz farklıdır. 1979'da Masquelier bu son derece karmaşık kimyada küçük bir düzen oluşturmak için kelime Pycnogenol'ü icat etmiştir. Ancak pycnogenol® ya da üzüm çekirdeği ekstresi (GSE) içeren OPC ürünlerle ilgili ABD pazarında bazı karışıklıklar olmuştur çünkü kimyasal bileşenleri (pycnogenols) için

genel terimlerden biri patentli ticari isimle (Pycnogenol®) aynıdır. Bazı GSE ürünleri "pycnogenols" içeren ABD'de pazarlanmış ve yanlış olarak eskiden etiketlenmiştir.

GSE ve Pycnogenol ® benzer kimyasal bileşenler (özellikle OPC fraksiyonu olarak) içerir, iki üründe kimyasal, farmakolojik ve klinik literatürü farklıdır. Pycnogenol® terimi bu nedenle sadece belirli özel çam ağacı kabuğu özünü ifade etmek için kullanılmalıdır. Bu ürün ile ilgili bilimsel literatür GSE'nin güvenlik veya etkinliği için temel bir referans olmamalıdır (122).

2.9.2. Pycnogenol® Bileşenleri

Birkaç yıl öncesine kadar çam kabuğu sınırlı kullanımı ile ahşap endüstrisi için gereksiz bir kalıntıdır. Günümüzde, bitkisel alt-tabaka ve yanıcı olarak kullanılır. İlginçtir çam kabuğu beslenme, sağlık ve tıp alanlarında artan bir ilgiye sahip, doğal polifenollerin zengin bir kaynağıdır. Bitkilerde, fenolik asitler, stilbenler ve tanninler gibi, flavonoidler (Şekil 2.3.) ve diğer bitki fenolikleri, normal büyüme, gelişme, enfeksiyon ve yaralanmaya karşı savunma önemlidir (123).

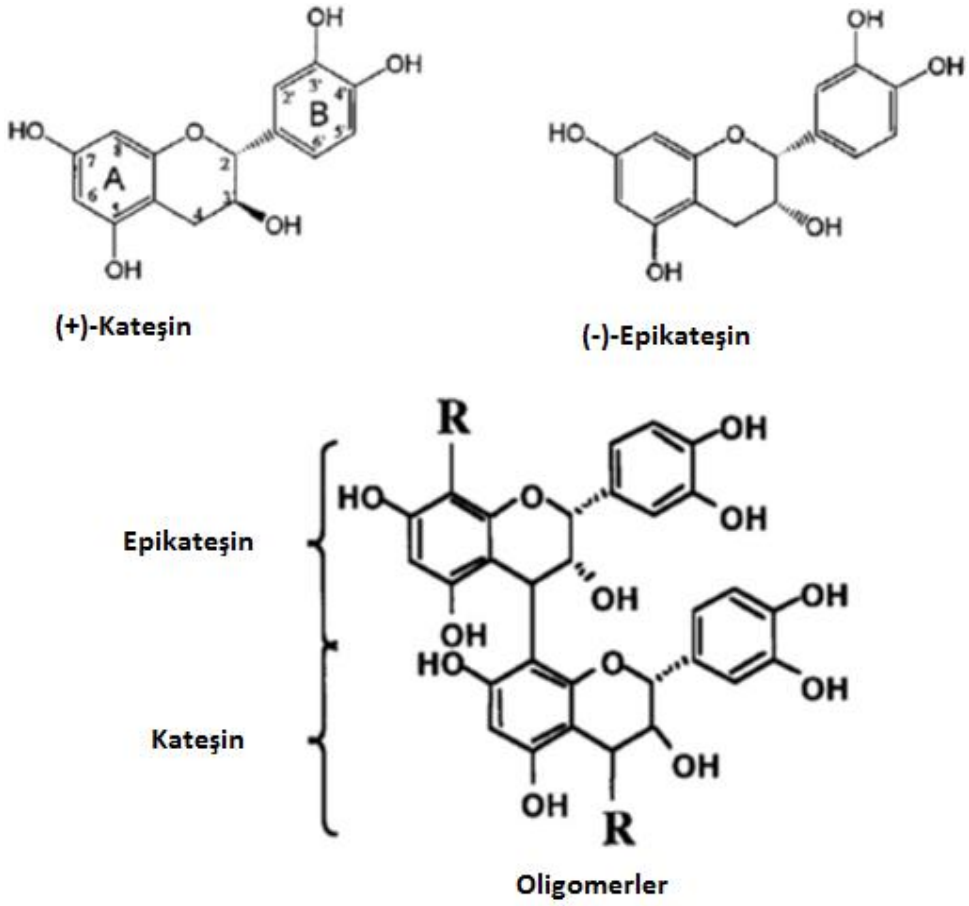


Şekil 2.3. Temel monomerik flavonoid yapı.

Prosiyanidinler, proantosiyanidinlerin bir alt sınıfı, esas olarak C4 → C8 ve/veya C4 → C6 bağları ile bağlanmış (+)- kateşin ve/ya da (–)- epikateşin birimlerinden oluşan (Şekil 2.4.) oligomerler ve polimerlerin karışımlarıdır. Bu flavon-3-ol' lar bir C4 → C8 bağına çift bağlanmış hem de ek olarak O7→ C2 arasına bağlanmış olabilir (124). Ligninler, bitkilerde en yaygın polifenollerdir ve genellikle yüksek konsantrasyonlarda, yaprak, meyve, ağaç kabuklarında veya köklerde bulunabilirler. Son zamanlarda, prosiyanidinler radikal süpürücü yeteneği (125) ve farmakolojik etkileri, büyük ölçüde

kendi yapısına bağlı ve özellikle polimerizasyon derecesi (126, 127) nedeniyle dikkate değer alınmıştır.

Pycnogenol, Birleşik Devletler Farmakopesi (USP 28)'nde belirtilen (eski P. maritima olarak da bilinir) P. Pinaster kabuğunun sulu özüdür (128). Esas olarak prosiyanidin flavonoidlerin (%65-75 arasında Pycnogenol farklı zincir uzunluklarına sahip kateşin ve epikateşin alt birimlerini içeren prosiyanidinlerdir) fenolik asitler, sinamik asitler ve bunların glikositler ve taksifolin (19) karışımından oluşmaktadır. Özellikle, yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) pycnogenol bileşenlerini Tablo 2.4.'deki gibi tanımlamıştır.



Şekil 2.4. Pycnogenol ekstresinde (üst) mevcut ana prosiyanidinlerin yapıları ve bunların olası oligomerik montajı (alt)

Tablo 2.4.'de görüldüğü gibi HPLC analizlerinden dimerik proanthosiyanidinler kateşin monomeri önemli miktarda çam ağacı kabuğu ekstresinde majör bileşendir ve çoğunlukla trimerik ve tetramerik proanthosianidinler olduğu diğer bileşenler arasında belirlenmiştir. İlginç bir şekilde, galik asit, kafeik asit ve ferulik asit gibi pycnogenolün bileşenlerinin bazılarının güçlü in vitro antibakteriyel ve anti-viral özelliklere sahip olduğu bilinmektedir (129).

Tablo 2.4. HPLC analizi ile tespit edilmiş çam ağacı kabuğu ekstresinin yüzdeleri ve bileşenleri (130).

Bileşen	**Yüzde**
Galik asit	3.2
Dimerler (kateşin ve epikateşin)	40.9
Kateşin	18.9
Epikateşin	0.2
Kumarik asit	0.2
Taksifolin	2.1
Ferulik asit	0.5
Diğer trimer ve tetramerler	19.0
Tanımlanmamış bileşen	12.8

2.9.3. Pycnogenol Aktivitesinin Başlıca Moleküler Temeli

Bileşenlerinin temel kimyasal yapısı nedeniyle, pycnogenolün en belirgin özelliği, güçlü antioksidan aktivitesidir. Fenolik asitler, polifenoller ve özellikle de flavonoidler, bir (veya daha fazla) aromatik halkalardan birini taşır ya da daha fazla hidroksil gruplardan oluşmaktadır ve bu nedenle potansiyel olarak rezonans-stabilize fenoksil radikalleri şekillendirerek serbest radikalleri giderebilirler (131).

Süperoksit anyon radikali ($O_2^{-\bullet}$), hidroksil radikali ($HO^{\bullet}$), lipid peroksil radikali ve nitrik oksit radikali ($^{\bullet}NO$) ve peroksinitrit ($ONOO^{-}$) gibi reaktif nitrojen türleri biyolojik çevre, insan sağlığı ve hastalığında en önemli serbest radikaller arasında olduğu, hem in vitro hem de in vivo araştırılmıştır (132-140). Bununla birlikte, oligo-polifenolik bileşikler, monomerik Flavon(ol)' lara kıyasla üstün bir antioksidan kapasitesi göstermektedir. IC50 değerleri kapsamlı bir listede verilmiş (141) ve sabit oran $OH^{\bullet}$ için lineer korelasyon gözlenmiştir (142). Bu kateşin ve prosiyanidinin bir üstünlüğü, radikal bir temizleme için muhtemel bölgelerin katekol/pyrogallol kısımların daha fazla sayıda

değil sadece bulunduğu ileri sürülmektedir. Ek olarak, flavon(ol)'lar mükemmel radikal süpürücüler (143), henüz onların o-kinonları boş redoks çevriminden, reaktif oksijen türlerinin oluşumu nedeniyle potansiyel prooksidanlarıdır (144-146). Bunun aksine, ilk semiquinone radikallerden oluşan proantosiyanidin veya gallate o-kinonlar çeşitli yollarla oligomerik bileşikleri üretme kapasitesine sahiptirler (147-152).

Bütün bu fenolik ya da nükleofilik reaksiyonlar hidroksil gruplarının sayısını korur ve yüksek sayıda radikal hedef bölgeler, öncelikli olarak antioksidanları kuvvetlendirmekten sorumludur. Bazı çalışmalarda ortaya çıkan ilginç bir özellik, pycnogenolün tüm bileşenlerinin saflaştırılmış herhangi bir bileşeninden daha büyük biyolojik etkiler sergilemesidir (22). Bu durum, enzim inhibisyonu (153) ve pycnogenol antioksidan kapasitesi çalışmaları tarafından açıkça önerilmektedir (154, 155). Bu bütün ekstrede, olası çeşitli bileşenler arasındaki karmaşık sinerjistik etkileşim kaynaklı biyolojik etkinin, daha fazla olması anlamına gelir (122). Karsinogeneziste olası bir faktör olarak bilinen, tek ve çift iplik DNA kırıklarında bir azalma, serbest radikal kaynaklı yaralanmalara karşı genetik materyalin korunmasında pycnogenolün potansiyel olarak önemli bir rolü olduğu bildirilmiştir (156).

Ancak bazı çalışmalarda, pycnogenolün az da olsa toksik etkisi olduğu bildirilmiştir. Oral yoldan alan hastaların küçük bir yüzdesinde pycnogenol, istenmeyen akut ve kronik hafif toksik etkiye sahiptir (19). İnkübe edilmiş lensler üzerinde potansiyel toksik etkiye sahip olmasına rağmen, in vivo önemli derecede koruyucu etkiye sahip olduğu ve kayda değer protein glikasyonunu azalttığı görülmüş, Cognis US (Henkel Chemical Co.) ve Horphag Research tarafından desteklenmiştir (157). Pycnogenol sıçanlarda düşük toksisiteye (LD_{50}: 3g/kg os) sahiptir ve teratojenik ya da mutajenik değildir (158).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kimyasallar ve Cihazlar

Pycnogenol, Horphag Research Ltd UK tarafından (Sertifika Numara: CA12-115) patentli olarak bağışlandı. Comassie Brillant Blue G 250 Amresco'dan, BSA (bovine serum albümine) ve Bovine Liver Catalase Sigma'dan, diğer kimyasallar Merck'ten sağlandı. Bütün kimyasalların hazırlanmasında ve biyokimyasal çalışmalarda ultrasaf su (Purelab ELGA, UK) kullanıldı. Tüm reaktif ve kimyasal maddeler analitik ya da daha yüksek saflıkta idi.

Çalışmada kullanılan cihazlar: Cobalt-60 teleterapi cihazı (GWXJ80-Co^{60} Teletherapy Unit), Olympus BX51 ışık mikroskobu (Olympus, Japonya), Olympus BX51 floresan mikroskop (Olympus, Japonya), homojenizatör (Wise Tis HG-15D), spektrofotometre (UV 1800 Shımadzu), santrifüj (BeckmanCoulter), pH metre (Toledo), vorteks (Heidolph), mikrodalga fırın (Vestel), çoklu manyetik karıştırıcı (JepoTech), ısıtıcılı manyetik karıştırıcı (Heidolph), hassas terazi (Ohaus Explorer), analitik terazi (Ohaus Adventurer), -80^0C buz dolabı (Binder), -20^0C buz dolabı (Sanyo), comet elektroforez tankı (Comet 20-Sci Plas), güç kaynağı (Thermo Scientific), kar makinası (Scotsman), ultra saf su cihazı (Purelab ELGA, UK), sıcak su banyosu (Nüve ST-30).

3.2. Hayvanlar

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı uyarınca alınan; Karar No: 11/127 Etik Kurul Kararı esasına uygun olarak yürütüldü. Deneysel çalışma, Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Fonu desteğiyle ve TSD12-3936 proje numarasıyla, Erciyes Üniversitesi Deney Hayvanları Klinik Araştırma Merkezi'nde Kasım 2012-Nisan 2013 tarihleri arasında yapıldı. Sıçanlar, havalandırma şartları sağlanmış, güneş ışığı alan ve her birinde beş sıçanın bulunduğu özel kafeslerde, 12 saatlik sabit aydınlık–karanlık döngüsü altında tutularak içme suyu ve standart sıçan yemi adlibitum verildi. Suları her gün değiştirildi ve kafes temizliği gün aşırı yapıldı.

3.3. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Antioksidan Uygulaması

Çalışma on gruba bölündü ve her bir grup rastgele seçilmiş ancak kendi içlerinde ve gruplar arasında ağırlıkları yakın olacak şekilde, 10 erkek Wistar Albino cinsi sıçandan oluşmak üzere toplam 100 sıçana uygulandı. Antioksidan olarak kullanılan pycnogenol ekstresi (Sertifika Numara: CA12-115) Horphag Research Ltd, Geneva, Switzerland tarafından bağışlandı. Pycnogenol %5'lik dimetil sülfoksit (DMSO) ile çözdürüldü (18) ve gavajla sıçanlara uygulandı. Tablo 3.1.'de verildiği gibi:

1. Kontrol grubu antioksidan ve radyasyon almadı ancak üç gün süreyle %5'lik DMSO
2. $P_{37.5}$ grubu, 24, 48 ve 72. saatlerde tek doz 37.5 mg/kg pycnogenol
3. P_{75} grubu, 24, 48 ve 72. saatlerde tek doz 75 mg/kg pycnogenol
4. P_{150} grubu, 24, 48 ve 72. saatlerde tek doz 150 mg/kg pycnogenol
5. P_{300} grubu 24, 48 ve 72. saatlerde tek doz 300 mg/kg pycnogenol aldı ancak bu gruplar ışınlanmadı
6. γ-ışını grubu, pycnogenol almadı ancak üç gün süreyle %5'lik DMSO gavajla verildi, 24 saat sonra tüm vücut tek doz 900 cGy γ-ışınıyla ışınlandı
7. γ-ışını + $P_{37.5}$ grubu, 24, 48 ve 72. saatlerde tek doz 37.5 mg/kg pycnogenol gavajla verildi ve antioksidan uygulamasından 24 saat sonra tek doz 900 cGy tüm vücut γ-ışınıyla ışınlandı
8. γ-ışını + P_{75} grubu, 24, 48 ve 72. saatlerde tek doz 75 mg/kg pycnogenol gavajla verildi ve antioksidan uygulamasından 24 saat sonra ve tek doz

900 cGy tüm vücut γ-ışınıyla ışınlandı

9. γ-ışını + P_{150} grubu, 24, 48 ve 72. saatlerde tek doz 150 mg/kg pycnogenol gavajla verildi ve antioksidan uygulamasından 24 saat sonra tek doz 900 cGy tüm vücut γ-ışınıyla ışınlandı
10. γ-ışını + P_{300} grubu, 24, 48 ve 72. saatlerde tek doz 300 mg/kg pycnogenol gavajla verildi ve antioksidan uygulamasından 24 saat sonra tek doz 900 cGy tüm vücut γ-ışınıyla ışınlandı

Tablo 3.1. Deney gruplarının listesi

Grup ismi	**Pycnogenol (mg/kg)**	**Radyasyon (cGy)**
Kontrol	—	—
$P_{37.5}$	37.5	—
P_{75}	75	—
P_{150}	150	—
P_{300}	300	—
γ-ışını	—	900
γ-ışını + $P_{37.5}$	37.5	900
γ-ışını + P_{75}	75	900
γ-ışını + P_{150}	150	900
γ-ışını + P_{300}	300	900

Radyasyon uygulaması Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı'nda, DNA hasar tayini ve biyokimyasal değerlendirmeler Erciyes Üniversitesi Genom ve Kök Hücre Merkezi'nde, histo-patolojik değerlendirme Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji- Embriyoloji Anabilim Dalı'nda değerlendirildi.

3.4. Radyasyon Uygulaması

Işınlama Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyasyon Onkoloji Bölümü'nde Cobalt-60 teleterapi (GWXJ80-Co^{60} Teletherapy Unit) cihazı tarafından oluşturulan **γ**-ışını kullanılarak 28x24 boyutunda ve 2.5cm derinlikte tahtadan yapılan özel bir kutu içerisinde (Şekil 3.1.), anestezi yapmadan, 5'er gruplar halinde, total vücut ışınlaması şeklinde ışınlandı (Şekil 3.2). Işınlama sırasında sıçanların nefes almalarına izin vermek

ve sabit SSD (kaynak cilt mesafesi) sağlamak için kutunun üst ve alt kısmına yoğunluğu bilinen delikli tray yerleştirildi. Radyasyon dozunun fizik hesabı 28x24'lik alanda ve 2.5 cm derinlikte ön ve arka karşılıklı iki alandan, total doz 900 cGy olacak şekilde hesaplandı (159). Işınlama süresi hesaplanırken, tray faktörü dikkate alındı.



Şekil 3.1. Radyasyon uygulamada kullanılan kutu.



Şekil 3.2. Radyasyon uygulaması

3.5. Sıçanlardan Organların Alınması

Kontrol, $P_{37.5}$, P_{75}, P_{150}, P_{300} grupları gavajdan 24 saat sonra, γ-ışını, γ-ışını + $P_{37.5}$, γ-ışını + P_{75}, γ-ışını + P_{150} ve γ-ışını + P_{300} ışınlamadan 24 saat sonra, tüm gruplar ketamin (0.1mg/kg) ve ksilazin (0.05 mg/kg) ile intramuskuler genel anestezi altında sıçanların

akciğer, karaciğer ve böbrekleri alındıktan sonra dekapitasyon yöntemi kullanılarak sakrifiye edildi (31). Alınan organ örnekleri çalışmalar için üç gruba ayrıldı. Biyokimyasal analizler için alınan organlar alüminyum folyolara sarıldıktan sonra çalışmalar yapılıncaya kadar -80^{0}C'da saklandı. Histo-patolojik değerlendirmeler için alınan organlar %10'luk formaldehit içinde fikse edildi. DNA hasar tayini için kullanılacak olunan dokular hazırlanan kryoprotektant (%25 FCS, %20 DMSO ve %55 RPMI-1640) içeren ependorf tüpler içinde çalışma yapılıncaya kadar -80^{0}C'da saklandı (160).

3.6.Akciğer, Karaciğer ve Böbrek Doku Homojenatlarının Hazırlanması

Çalışma gününe kadar, -80^{0}C'da dondurularak saklanan akciğer, karaciğer ve böbrekten doku homojenatlarının hazırlanması sırasında yapılan tüm işlemler, buz içerisinde ve 4^{0}C'da yürütüldü. Dokular tartıldıktan sonra ağırlıkları kaydedildi. Homojenizasyon işlemi, soğuk 50 mM KH_2PO_4 buffer solüsyonu (pH 7.0) içinde, teflon uçlu homojenizatör ile gerçekleştirildi. Homejenat 4^{0}C da 12000g de 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatant SOD ve CAT enzim aktiviteleri ve MDA düzeyinin ölçülmesinde kullanıldı (161).

3.7. Protein Miktarının Tayini

Örneklerdeki protein konsantrasyonu Bradford yöntemine (162) göre belirlendi. Protein miktarının belirlenmesinden önce 5X Bradford ayıracı 1:5 oranında distile su (dH_2O) ile seyreltildi ve Whatman #1 numaralı filtre kağıdı ile filtre edildi. Bradford ayıracı hazırlanışı ise kısaca; 500 mg Comassie Brillant Blue G 250 (Amresco), 250 mL %96 etanol içinde iyice çözüldü, daha sonra 500 mL %85 orto-fosforik asit ilave edildi ve son hacim 1 litreye tamamlanıncaya dek dH_2O eklenerek hazırlandı. Protein konsantrasyonunun tespiti için sığır serum albümini (BSA) Fraksiyon V (Sigma) kullanılarak standart serisi oluşturuldu. 1 mg/mL BSA stokundan 5, 10, 15, 20, 25 µL

alınarak hazırlanan cam tüplere aktarıldı ve son hacimleri 500 µL olacak şekilde dH_2O ile tamamlandı. Tüplerin üzerine son hacim 5 mL olacak şekilde 1X Bradford ayıracı eklendi.

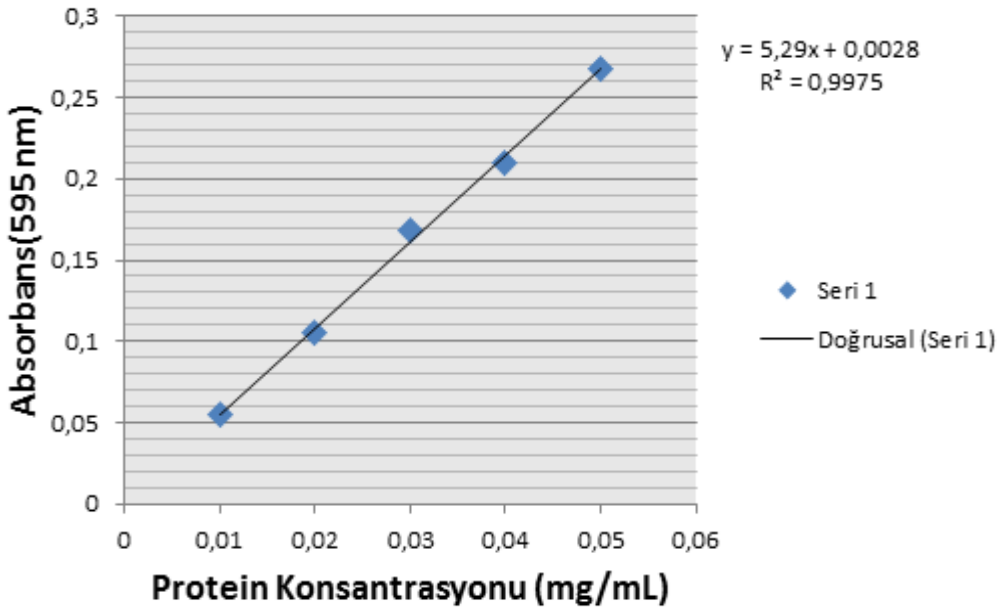
Örneklerin protein konsantrasyonlarının tespiti için 4^{0}C'da buzlu suda tutulan her akciğer ve karaciğer örneğinden 40 µL protein ekstraktı ve her böbrek örneğinden 20 µL protein ekstraktı alınıp cam tüplere aktarıldı ve yine son hacim 1000 µL'ye ultra saf su ile tamamlanarak seyreltildi (seyreltme katsayısı 1000). Bu aşamalardan sonra 1:5

oranında dilüe edilmiş 1X Bradford ayıracından 5 mL karışıma ilave edildi. Oda sıcaklığında yaklaşık 5-10 dakika bekletildikten sonra 595 nm'deki absorbans değerleri belirlendi. Absorbans okumalarında plastik küvet kullanıldı.

Tablo 3.2. Bradford standartlarının hazırlanması

Standartlar	dH_2O (µL)	1 mg/mL stok BSA (µL)	1X Bradford Ayıracı (mL)
Kör	500	0	5
0.01 mg/mL	495	5	5
0.02 mg/mL	490	10	5
0.03 mg/mL	485	15	5
0.04 mg/mL	480	20	5
0.05 mg/mL	475	25	5

Standartlara ait absorbans değerleri kullanılarak bir grafik elde edildi (Şekil 3.3.). Grafikten elde edilen denklem yardımı ile de protein konsantrasyonu bilinmeyen örneklerin konsantrasyonları formülden tespit edildi. Denklemde *x* eğim, *y* ise örneklerin Bradford sonucu ölçülen absorbans değerlerini temsil etmektedir. Hesaplamaya dilüsyon faktörü olarak 1000 katsayısı da dahil edildi.



Şekil 3.3. BSA standartlarından elde edilen grafik.

Kontrol, $P_{37.5}$, P_{75}, P_{150}, P_{300}, γ-ışını, γ-ışını + $P_{37.5}$, γ-ışını + P_{75}, γ-ışını + P_{150} ve γ-ışını + P_{300} örneklerinde protein konsantrasyonları tespit edildikten sonra tüm örneklerin ortak bir konsantrasyon değerinde olması için ultra saf suyla gereken seyreltme yapıldı. Ayarlamaları yapılan örnekler yeterli hacimlerde aliquatlara (küçük hacimlere) ayrılarak enzim çalışmalarında kullanıldı veya sonraki çalışmalar için -80^0C'da saklandı.

3.8. Enzim Aktivitelerinin Tayini

Bütün enzim ekstrakları enzim çalışmaları süresince $0–4^0$C'da buzlu suda tutuldu. Ayrıca ışığın olumsuz etkisi olabileceği ihtimali de göz önünde tutularak örnekler mümkün olduğunca ışıktan korunmaya çalışıldı.

3.8.1. Malondialdehit (MDA) Tayini

Lipid peroksidasyonunun yıkım ürünlerinden olan MDA'nın ölçümünde kullanılan spektrofotometrik metodların büyük bir kısmı, MDA'nın, tiyobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyona girerek, 532 nm dalga boyunda maksimum absorbans veren pembe renkli bir kompleks oluşturması prensibine dayanmaktadır (163). Akciğer, karaciğer ve böbrek dokusu MDA tayininde, Ohkawa ve ark.'nın geliştirdiği metot kullanıldı (164).

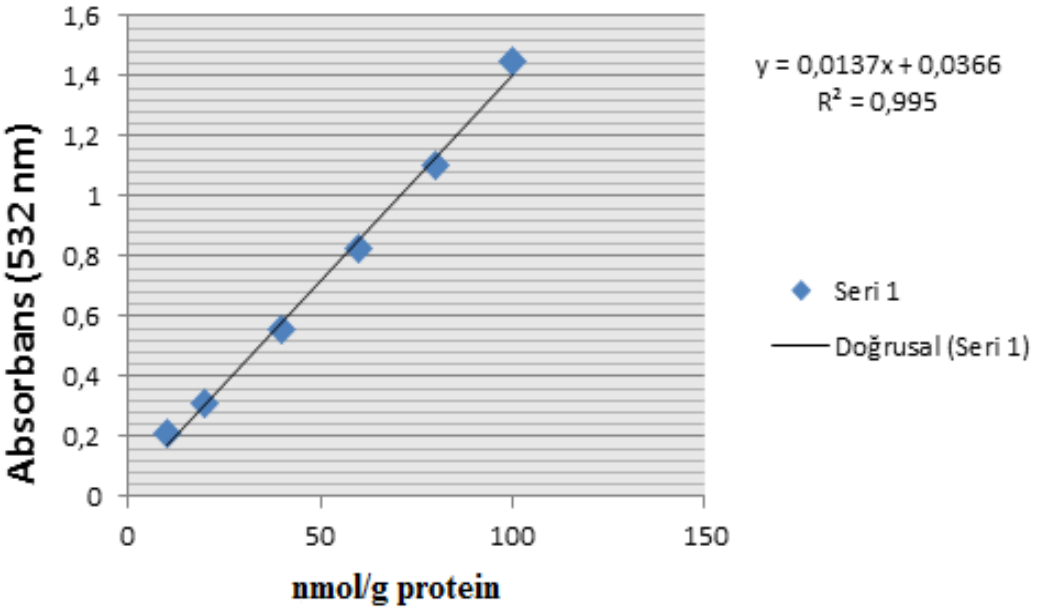
Çalışma: MDA ölçümü yapılacak her numune için kullanılacak olan kimyasallar ve işlem sırası Tablo 3.3.'de verildiği gibi hazırlandı.

Tablo 3.3. Ohkawa ve ark. geliştirdiği metoda göre MDA tayininde kullanılan kimyasallar

Süpernatant	0.1 mL
%8.1 Sodyum dodesil sülfat	0.1 mL
%20 Asetik asit (pH 3.5)	0.75 mL
%0.8 Tiyobarbitürik asit	0.75 mL
dH_2O	0.3 mL
95^0C sıcak su banyosunda 60 dakika kaynatıldı	
dH_2O	0.5 mL
n-butonol/piridin (15:1)	2.5 mL
4^0C'de 4000 rpm'de 15 dakika santrifüje edildi	

Süpernatantlardan 0.1 mL alınıp kapaklı cam tüplere konuldu. Üzerlerine sırasıyla 0.1 mL sodyum dodesil sülfat (%8.1), 0.75 mL asetik asit (%20, pH 3.5), 0.75 mL tiyobarbitürik asit (%0.8) ve 0.3 mL dH_2O eklenerek iyice karıştırıldıktan sonra ağızları

sıkıca kapatılan tüpler, 95^0C sıcak su banyosunda 60 dakika kaynatıldı. Kapakları açılarak soğutulan tüplere, 0.5 mL dH_2O ve 2.5 mL n-butonol/piridin (15:1) karışımı eklenerek vorteksle iyice karıştırıldı. Tüplerin 4^0C'da 4000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmesi ile elde edilen pembe organik fazın absorbansı, 532 nm'de, distile su ile aynı şekilde çalışılan köre karşı ölçüldü. Değerlendirme standart eğri (Şekil 3.4.) üzerinde yapıldı. Standart eğriden elde edilen doku MDA seviyeleri (nmol/mL), aynı süpernatantlarda Bradford yöntemi (162) ile ölçülen miligram protein başına verildi (nmol MDA/ mg protein).

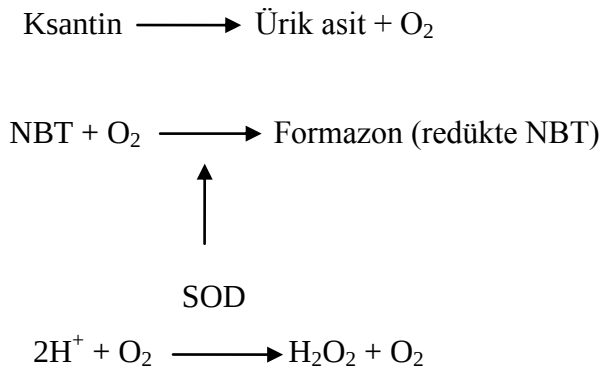


Şekil 3.4. MDA standartlarından elde edilen grafik

3.8.2. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi Tayini

Çalışmaya alınan sıçanların akciğer, karaciğer ve böbrek dokularındaki SOD aktivitesi tayininde Sun ve ark. tarafından geliştirilen metod kullanıldı (165).

Metodun prensibi: Ksantin oksidaz (XO) ile ksantinin oksidasyonu sırasında açığa çıkan $O_2^{\bullet}$, nitro blue tetrazolium (NBT) gibi boyar maddeleri redükleyerek formazonları oluşturmaktadır. Süperoksit anyonunun, H_2O_2'e dismutasyonunu sağlayan SOD varlığında, XO reaksiyonları ile üretilen $O_2^{\bullet}$, sürekli tüketileceğinden, NBT ile reaksiyona giren $O_2^{\bullet}$ miktarı azalacak ve bu yolla formazon oluşumu önlenecektir. SOD aktivitesi, XO'nun katalizlediği tepkimede, NBT redüksiyonunun inhibisyon derecesine bağlı olarak ölçülebilir. SOD aktivitesi yükseldikçe, NBT redüksiyonu ile formazon oluşumu azalacaktır.



Çalışma: SOD aktivitesi tayin edilecek her numune için, toplam hacim 2.45 mL olacak şekilde, Tablo 3.4.'de verilen konsantrasyonlarda bir deney karışımı hazırlandı.

Tablo 3.4. Sun ve ark. geliştirdiği metoda göre SOD tayininde kullanılan deney karışımı

0.3 mM Ksantin	1.0 mL
150 μM NBT	0.5 mL
0.4 M Sodyum karbonat	0.3 mL
0.6 mM EDTA	0.5 mL
1 gr/L BSA	0.15 mL
Deney karışımı	2.45 mL

Deney karışımı pipetlenen numune tüplerinin üzerine akciğer, karaciğer ve böbrek doku homojenatlarından elde edilen, 0.5 mL süpernatant ve deney karışımı içeren kontrol tüpüne, 0.5 mL 0.01 M fosfat tamponu (pH 7.0) ilave edildi. Deney tüpleri 25^0C' da 5 dakika inkübe edildikten sonra, her birinin üzerine, eşit zaman aralıkları ile 0.05 mL 167 Ü/L XO eklenerek reaksiyon başlatıldı. Tüpler, 25^0C'da 20 dakika süreyle tekrar inkübe edildi. Bu sürenin sonunda, yine eşit zaman aralıkları ile tüplere 1 mL 0.8 mM $CuCl_2$ ilavesi ile reaksiyon durduruldu. Numune ve kontrol tüplerinde, formazon oluşumundan kaynaklanan renk şiddeti, 560 nm dalga boyunda, distile su körüne karşı, spektrometrede okundu. SOD içermeyen kontrol tüpünde, maksimum formazon oluşumu (Optik Dansite (OD): 0.250) gözlendi.

Standart serinin hazırlanması: SOD (3300 Ü/mg solid/mg protein), 0.6 mg/mL konsantrasyonda olacak şekilde, dH_2O ile çözüldü. Bu stok standart 0.01 M fosfat tamponu ile dilüe edilerek, deney ortamında sırasıyla 6.25, 12.5, 25, 50, 100 ng

konsantrasyonlarında olacak şekilde, SOD çalışma standartları hazırlandı ve numune gibi çalışıldı.

Hesaplama: Standart seri ve numune tüplerinde % inhibisyon değerleri aşağıdaki formülle hesaplandı:

$$\%\ \textbf{inhibisyon} = \frac{(\textbf{Kontrol OD} - \textbf{Numune OD})}{\textbf{Kontrol OD}}\ X\ \mathbf{10}$$

Standart seri için hesaplanan % inhibisyon değerlerine karşılık gelen SOD konsantrasyonları kullanılarak; SOD tarafından NBT redüksiyon hızının inhibisyon grafiği elde edildi. Grafik yardımı ile numunelere ait % inhibisyon değerlerinde ünite SOD değerleri hesaplandı. Bu değerler metodun uygulanması sırasında kullanılan dilüsyon faktörleri ile çarpılarak numunelerin gerçek SOD ünitelerine ulaşıldı. Bradford yöntemine (162) göre protein miktarları da tayin edilen akciğer, karaciğer ve böbrek doku homojenatlarında SOD aktivitesi, spesifik aktivite cinsinden, Ü/mg protein olarak verildi.

3.8.3. Katalaz Aktivitesi Tayini

Akciğer, karaciğer ve böbrek dokusunda katalaz aktivitesi tayininde Aebi tarafından geliştirilen metod kullanıldı (166). Metodun H_2O_2'in katalaz tarafından O_2 ve H_2O'ya parçalanması esnasında reaksiyon karışımındaki absorbans değişiminin ölçülmesi esasına dayanmaktadır.

$$2H_2O_2 \xrightarrow{CAT} O_2 + 2H_2O$$

Çalışma: CAT aktivitesi tayininde her numune için kullanılacak olan kimyasallar Tablo 3.5.'de verildiği gibi hazırlandı.

Tablo 3.5. Aebi'nin geliştirdiği metoda göre CAT tayininde kullanılan deney karışımı

Fosfat buffer (50 mM; pH 7.0)	a)6.81 g KH_2P0_4 1000 mL dH_2O tamamlandı.
	b)8.90 g $Na_2HP0_4.2H_20$ 1000mL dH_2O tamamlandı.
	a) ve b) çözeltileri 1:1.55 oranında karıştırıldı.
Hidrojen peroksit (%30)	1 µL
Homejenat	20 µL

Deney tüpüne 979 µL 0.05 M, pH 7.0 Fosfat tamponu, 1 µL %30 H_2O_2 pipetlendi. Ortama daha sonra 20 µL homejenat pipetlenerek, 25^0C'da 240 nm dalga boyunda dH_2O

körüne karşı spektrofotometrik olarak 5 dakika absorbans değişimi izlendi. Katalaz aktivitesinde, böbrek ve karaciğerde 120 saniyeden ve akciğerde 180 saniyeden sonra bir değişim gözlenmediğinden, çalışmada katalaz aktivitesinin karaciğer ve böbrek için 120 saniye, akciğer için 180 saniye boyunca izlenmesi uygun bulundu.

Standart serinin hazırlanması: Standart olarak saf katalaz (Bovine Liver Catalase, Sigma) kullanıldı. 2.5, 5.0, 7.5 ve 10.0 µg/mL konsantrasyonlarda katalaz standart solüsyonu hazırlandı. Deney tüpüne 2 mL fosfat tamponu (0.05 M, pH 7.0) ve 1 µL %30 H_2O_2 pipetlendikten sonra ortama en son 100 µL standart eklendi. 25^0C'da 240 nm dalga boyunda 180 saniye süreyle spektrofotometrik olarak absorbans değişimi izlendi. ΔOD/dk hesaplanarak bu değerlerle standart eğri çizildi. ΔOD/dk hesaplanarak, katalaz miktarları standart eğriden elde edildi. Akciğer dokusunda Bradford yöntemi (162) ile protein tayini yapılarak sonuçlar µg/g protein cinsinden verildi.

Hesaplar:

x = A µg Katalaz/mL (Numunedeki katalaz miktarı)

Numune µg protein — A µg Katalaz

1000 µg protein — y µg Katalaz

$$y = \frac{A \times 1000}{\text{Numune µg protein}}$$

y = B µg katalaz / mg protein x 2,8 (faktör) = Ü / mg protein

3.9. DNA Hasar Tayini

DNA comet assay ya da tek hücre jel elektroforezi (SCGE) canlı popülasyonlarında, hücre düzeyinde DNA hasar tespitinde kullanılan, hızlı, basit ve çok hassas floresan mikroskobik yöntemdir.

Dokuda DNA hasarı nötral şartlarda tek hücre jel elektroforez (comet) yöntemi kullanılarak araştırıldı. Hücre süspansiyonunun hazırlanması için, dokulardan yaklaşık 2 g gelecek şekilde parçalar alındı, temiz bir bisturi yardımıyla buz üzerinde parçalandı, parçalanan dokulara 10 mL soğuk PBS (Ca^{2+} ve Mg^{2+}free) eklenerek yaklaşık 10 dakika 500 rpm manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Homojenat 10 dakika deney tüpünde bekletildi. Süpernatant analizler için kullanıldı (167). Kısaca, her bir mikroskop lamı

distile suda hazırlanmış %0.5'lik normal erime noktalı agarozla kaplandı ve oda sıcaklığında kurutuldu. Daha sonra, ilk katın üstüne PBS'de hazırlanmış, 37^0C'da %0.8'lik düşük erime noktalı agarozun 1000µL ile 100µL hücre süspansiyonu karıştırıldı ve birinci katın üzerine yayıldı. Lamlar 4^0C'da buz aküsünün üzerinde 5 dakika katılaşmaya bırakıldı. Lameller lamlardan kaldırıldı, taze hazırlanmış soğuk lyzis çözeltisinde (TBE, 25 g SDS) 7 dakika 4^0C'da lize edildi. Lamlar lyzis çözeltisinden alındı, yatay elektroforez tankı taze hazırlanmış elektroforez tamponu (TBE: 54 g Tris, 27.5 g borik asit, 20 mL EDTA, pH 8.4) ile doldurulduu ve lamlar yerleştirildi, DNA sarmalının çözülmesi için 20 dakika bekletildi. Oda sıcaklığında 64 V-250 mA'de 2 dakika elektoroforez uygulandı. Daha sonra lamlar iyon ve deterjanların uzaklaştırılması için 5 dakika dH_2O ile yıkandı. Nötralizasyondan sonra 50 µL ethidium bromide (1 µg/mL) ile boyandı ve lamelle kapatıldı. Bütün işlemler DNA hasarını önlemek için karanlıkta uygulandı (168, 169).

3.9.1. DNA Hasarının Değerlendirilmesi

Görüntüler floresan mikroskop (Olympus, Japan) kullanılarak x200 büyütmeyle çekildi. Her bir lamdan rastgele seçilmiş 100 hücre görüntüsü Comet Assay Software Project (CASP 1.2.2, Windows 2010)'le analiz edildi. Baş uzunluğu (length head), kuyruk uzunluğu (length tail), comet uzunluğu (length comet), başda %DNA (head DNA), kuyrukta %DNA (tail DNA), kuyruk momenti (tail moment) ve olive tail moment (OTM) parametreleri CASP kullanılarak analiz edildi. Hasar hücre başından göç etmiş, comete neden olan kırılmış DNA kuyruğundan belirlendi, kuyruklu hasarlı, kuyruksuz hasar görmemiş olarak düşünüldü (170, 171).

3.10. Histo-Patolojik Değerlendirmeler

%10'luk formalin fiksasyonu sonrası rutin histolojik takip aşamalarından sonra hazırlanan ve parafin bloklara gömülen dokulardan 5µm'lik kesitler dökülmemesi için poli-L lizinle kaplı lamlara alındı. Histolojik doku takibi aşamaları Tablo 3.6.'da

gösterildi. Elde edilen ve deney gruplarına ait olan karaciğer ve akciğer dokularına hematoksilen-eozin ve Masson trikrom boyama metodları uygulanırken, böbrek dokularında bazal membran yapılarının ve tübüllerin daha net görülebilmesi için ek olarak periyodik asit Schiff (PAS) boyama metodları uygulandı. Bu boyama metodları için uygulanan prosedürler Tablo 3.7., Tablo 3.8. ve Tablo 3.9.'da gösterildi.

Tablo 3.6. Parafin doku takip yöntemi aşamaları

Sıra	**Yapılan işlem**	**Süre**
1	%10'luk formalin	Bir gece
2	Akarsu	Bir saat
3	%50'lik etil alkol	Bir saat
4	%70'lik etil alkol	Bir saat
5	%90'lık etil alkol	Bir saat
6	%96'lık etil alkol-I	Bir saat
7	%96'lık etil alkol-II	Bir saat
8	Absolu alkol-I	Bir saat
9	Absolu alkol-II	Bir saat
10	Ksilen	Bir saat
11	57^0C'da etüvde eriyik parafin	Bir gece
12	Gömme	

Tablo 3.7. Hematoksilen-eozin boyama yöntemi

Sıra	**Yapılan işlem**	**Süre**
1	Ksilen-I	15 dakika
2	Ksilen-II	15 dakika
3	Absolu alkol-I	10 dakika
4	Absolu alkol-II	10 dakika
5	%96 Alkol	10 dakika
6	%80 Alkol	10 dakika
7	%70 Alkol	10 dakika
8	%50 Alkol	10 dakika
9	Akarsu	5 dakika
10	Hematoksilen	7-8 dakika
11	Akarsu	5 dakika
12	Eozin	4-5 dakika
13	Akarsu	5 dakika
14	%50 Alkol	10 dakika
15	%70 Alkol	10 dakika
16	%80 Alkol	10 dakika
17	%96 Alkol	10 dakika
18	Absolu alkol-I	10 dakika
19	Absolu alkol-II	10 dakika
20	Ksilen-I	15 dakika
21	Ksilen-II	15 dakika
22	Kapatma	

Tablo 3.8. Masson trikrom boyama yöntemi

Sıra	**Yapılan işlem**	**Süre**
1	Ksilen-I	15 dakika
2	Ksilen-II	15 dakika
3	Absolu alkol-I	10 dakika
4	Absolu alkol-II	10 dakika
5	%96 Alkol	10 dakika
6	%80 Alkol	10 dakika
7	%70 Alkol	10 dakika
8	%50 Alkol	10 dakika
9	Akarsu	5 dakika
10	Hematoksilen	7-8 dakika
11	Akansu	5 dakika
12	Asit fuksin	5 dakika
13	Distile su	5 dakika
14	Fosfomolibdik asit	5 dakika
15	Preparatlar kurutulur	10-15 dakika
16	Anilin blue	2-5 dakika
17	Distile su	5 dakika
18	%1'lik asetik asit	2 dakika
19	%50 Alkol	10 dakika
20	%70 Alkol	10 dakika
21	%80 Alkol	10 dakika
22	%96 Alkol	10 dakika
23	Absolu alkol-I	10 dakika
24	Absolu alkol-II	10 dakika
25	Ksilen-I	15 dakika
26	Ksilen-II	15 dakika
27	Kapatma	

Tablo 3.9. PAS boyama yöntemi

Sıra	**Yapılan işlem**	**Süre**
1	Ksilen-I	15 dakika
2	Ksilen-II	15 dakika
3	Absolu alkol-I	10 dakika
4	Absolu alkol-II	10 dakika
5	%96 Alkol	10 dakika
6	%80 Alkol	10 dakika
7	%70 Alkol	10 dakika
8	%50 Alkol	10 dakika
9	Distile su	5 dakika
10	Periodik asit	5 dakika
11	Distile su	5 dakika
12	Schiff çözeltisi	15 dakika
13	Akarsu	5 dakika
14	Hematoksilen	7-8 dakika
15	Akarsu	5 dakika
16	%50 Alkol	10 dakika
17	%70 Alkol	10 dakika
18	%80 Alkol	10 dakika
19	%96 Alkol	10 dakika
20	Absolu alkol-I	10 dakika
21	Absolu alkol-II	10 dakika
22	Ksilen-I	15 dakika
23	Ksilen-II	15 dakika
24	Kapatma	

3.10.1. Histolojik Değerlendirme

H-E, PAS ve Masson trikrom ile boyanan preparatların histolojik değerlendirmesi için DP 70 dijital kamera ile donatılmış Olympus BX51 ışık mikroskobu (Olympus, Tokyo, Japonya) kullanıldı. Hazırlanan preparatlarda, akciğer, karaciğer ve böbrek dokularına ait parankima yapıları incelenerek görüntüler elde edildi.

3.11. İstatistiksel Yöntem

MDA, SOD ve CAT verilerin analizi IBM SPSS Statistics 20.0 (IBM Inc., ILL, USA) ile değerlendirildi. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testi ile, varyans homojenliği Levene testi ile değerlendirildi. Gruplar arası karşılaştırmalar tek yönlü varyans analizi ve Kruskal-Wallis H testleri ile değerlendirildi. Çoklu karşılaştırmalar Tamhan T2 ve Siegel-Castellan testleri ile değerlendirildi. Veriler ortanca ile 25. ve 75. yüzdelikler olarak ifade edildi. $p<0.05$ anlamlılık düzeyi kabul edildi.

Comet verilerin analizi, IBM SPSS Statistics 22 (IBM Inc., ILL, USA) paket programında değerlendirildi. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testi ile incelendi. Gruplar arası karşılaştırmalar Tek Yönlü Varyans Analizi ile yapıldı. Çoklu karşılaştırma testi olarak Student-Newman-Keuls yöntemi kullanıldı. Veriler ortalama ile standart sapma olarak ifade edildi. $p<0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Bu çalışmada, kontrol grubu hariç radyasyon (γ-ışını) ve radyasyon + antioksidan (γ-ışını + $P_{37.5}$, γ-ışını + P_{75}, γ-ışını + P_{150}, γ-ışını + P_{300}) gruplarında olan sıçanlara total vücut ışınlaması şeklinde Cobalt-60 teleterapi cihazıyla total doz 900 cGy olacak şekilde tek doz radyasyon uygulandı.

4.1. Akciğer Dokusunda Biyokimyasal Analizler

Akciğerin oksidan/antioksidan durumunun göstergesi olarak CAT ve SOD aktiviteleri, lipid peroksidasyonunun göstergesi olarak MDA düzeyleri ölçüldü. Bulgular Tablo 4.1.'de verildi. $p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

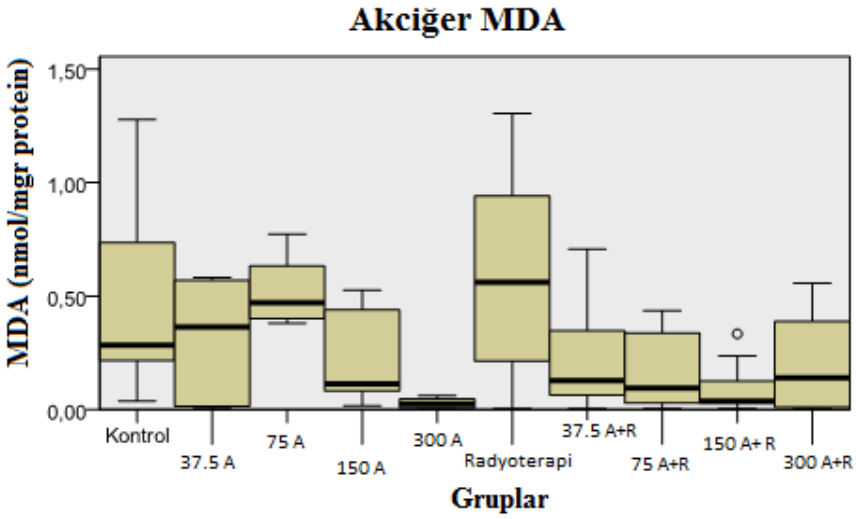
Tablo 4.1. Akciğer dokusu gruplarında doku enzim düzeyleri

Gruplar	**MDA nmol/mg protein Ortanca (%25-%75)**	**CAT Ü/mg protein Ortanca (%25-%75)**	**SOD Ü/mg protein Ortanca (%25-%75)**
Kontrol	0.28 (0.22-0.67)	34.29 (28-43)	0.15 (0.07-0.26)
$P_{37.5}$	0.36 (0.01-0.56)	30.67 (29-37)	0.27 (0.18-0.33)
P_{75}	0.47 (0.40-0.59)	30 (20-35)	0.22 (0.02-0.30)
P_{150}	0.11 (0.08-0.39)	33 (31-40)	0.23 (0.14-0.32)
P_{300}	0.02 (0.008-0.04)	31.57 (24-40)	0.22 (0.13-0.33)
γ-ışını	0.56 (0.26-0.86)	27 (24-31)	0.17 (0.09-0.22)
γ-ışını + $P_{37.5}$	0.12 (0.07-0.24)	30.5 (24.9-37.9)	0.20 (0.18-0.26)
γ-ışını + P_{75}	0.09 (0.03-0.3)	34.3 (31-37.9)	0.08 (0.06-0.2)
γ-ışını + P_{150}	0.03 (0.02-0.08)	32.3 (26.4-38.9)	0.33 (0.27-0.35)
γ-ışını + P_{300}	0.13 (0.01-0.31)	28.7 (23.2-31.6)	0.24 (0.12-0.30)
P	<0.001	0.239	< 0.08

(MDA: Malondialdehit, CAT: Catalaz, SOD: Süperoksit dismutaz, %25-%75 persentil)

4.1.1. Akciğer Dokusunda MDA Düzeyleri

Akciğer dokusunun lipid peroksidasyonunun göstergesi olarak MDA düzeyleri ölçüldü. MDA düzeyleri Tablo 4.1. ve Şekil 4.1.'de gösterildi. MDA düzeyi kontrol grubu, antioksidan gruplar ve radyasyon + antioksidan gruplar arasında sayısal fark olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (p=0.067). Sadece kontrol grubu ve P_{300} grubu karşılaştırıldığında kontrol grubunda kayda değer daha yüksekti (p<0.030). P_{300} grubu diğer antioksidan gruplarla karşılaştırıldığında P_{300} grubu kayda değer daha düşüktü (p<0.001). Radyasyon grubu kontrol grubuna göre sayısal daha yüksek olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu (p=0.519). Radyasyon grubu, P_{150} grubu ve P_{300} grubu karşılaştırıldığında radyasyon grubu diğer gruplardan kayda değer daha yüksekti (p<0.001). P_{75} grubu, γ-ışını + P_{75} grubu ve γ-ışını + P_{150} grubu karşılaştırıldığında P_{75} grubu kayda değer daha yüksekti (p<0.001). Radyasyon grubu, γ-ışını + P_{150} grubu ve γ-ışını + P_{300} grubu karşılaştırıldığında radyasyon grubu diğer gruplardan kayda değer daha yüksekti (p<0.005).

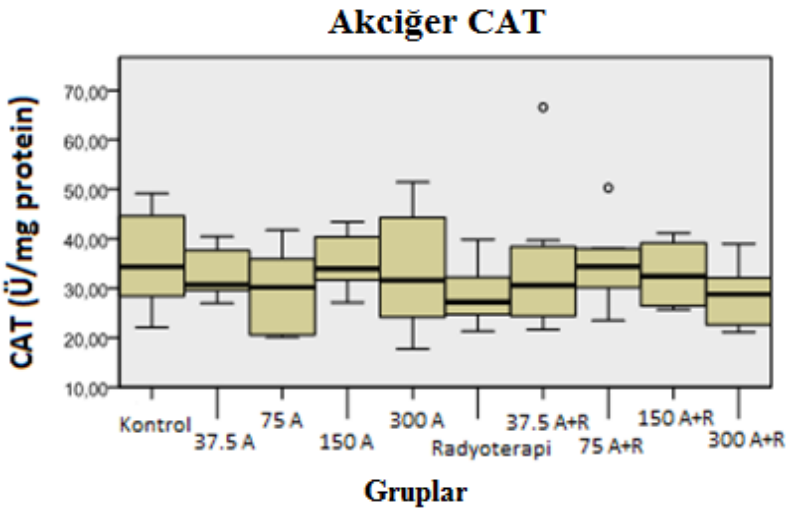


Şekil 4.1. Akciğer dokusu grupların doku MDA düzeyleri

4.1.2. Akciğer Dokusunda CAT Aktivitesi

Akciğerin oksidan/antioksidan durumunun göstergesi olarak CAT aktiviteleri ölçüldü. CAT aktiviteleri Tablo 4.1. ve Şekil 4.2.'de gösterildi. Kontrol grubu, antioksidan gruplar, radyasyon grubu ve radyasyon + antioksidan gruplarla karşılaştırıldığında kontrol grubu diğer gruplardan sayısal olarak yüksek olmasına rağmen istatistiksel kayda değer bir fark bulunmadı (p=0.289). Radyasyon grubu, antioksidan ve radyasyon

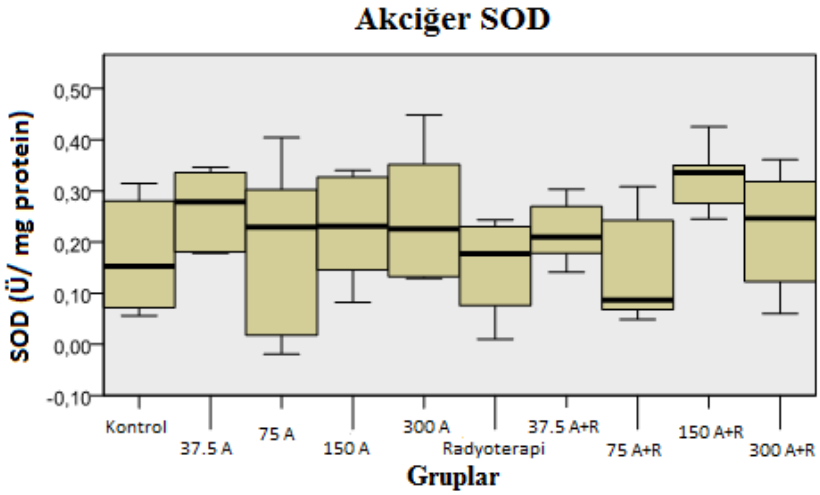
+ antioksidan gruplarla karşılaştırıldığında radyasyon grubu diğer gruplara göre sayısal düşük olmasına rağmen istatistiksel olarak kayda değer bir fark yoktu (p=0.960). Antioksidan ve radyasyon + antioksidan gruplar arasında kayda değer bir fark bulunmadı (p=1.000).



Şekil 4.2. Akciğer dokusu grupların doku CAT aktiviteleri

4.1.3. Akciğer Dokusunda SOD Aktivitesi

Akciğerin oksidan/antioksidan durumunun göstergesi olarak SOD aktiviteleri ölçüldü. SOD aktiviteleri Tablo 4.1. ve Şekil 4.3.'de gösterildi. Kontrol grubu, antioksidan gruplar, radyasyon ve radyasyon + antioksidan gruplarla karşılaştırıldığında kontrol grubu diğer gruplara göre daha sayısal olarak düşük olmasına rağmen kayda değer bir fark yoktu (p=1.000). Sadece kontrol grubu ve γ-ışını + P_{75} grubu karşılaştırıldığında kontrol grubunda kayda değer daha yüksekti (p<0.047). Radyasyon grubu ve antioksidan gruplar karşılaştırıldığında radyasyon grubu diğer gruplara göre sayısal daha düşük olmasına rağmen istatistiksel kayda değer bir fark bulunmadı (p=1.000). Radyasyon ve radyasyon + antioksidan gruplardan γ-ışını + P_{150} grubu kayda değer daha yüksek ve γ-ışını + P_{75} grubu kayda değer daha düşüktü (p=0.019). Radyasyon grubu ve diğer radyasyon + antioksidan gruplar karşılaştırıldığında radyasyon grubu diğer gruplara göre daha sayısal düşük olmasına rağmen kayda değer bir fark yoktu (p=1.000). $P_{37.5}$ grubu ve γ-ışını + P_{75} grubu karşılaştırıldığında $P_{37.5}$ grubu kayda değer daha yüksekti (p<0.044). γ-ışını + P_{75} ve γ-ışını +P_{150} grubu karşılaştırıldığında γ-ışını + P_{75} grubu kayda değer daha düşüktü (p<0.002).



Şekil 4.3. Akciğer dokusu grupların doku SOD aktiviteleri

4.2. Karaciğer Dokusunda Biyokimyasal Analizler

Karaciğerin oksidan/antioksidan durumunun göstergesi olarak CAT ve SOD aktiviteleri, lipid peroksidasyonunun göstergesi olarak MDA düzeyleri ölçüldü. Bulgular Tablo 4.2.'de verildi. $p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

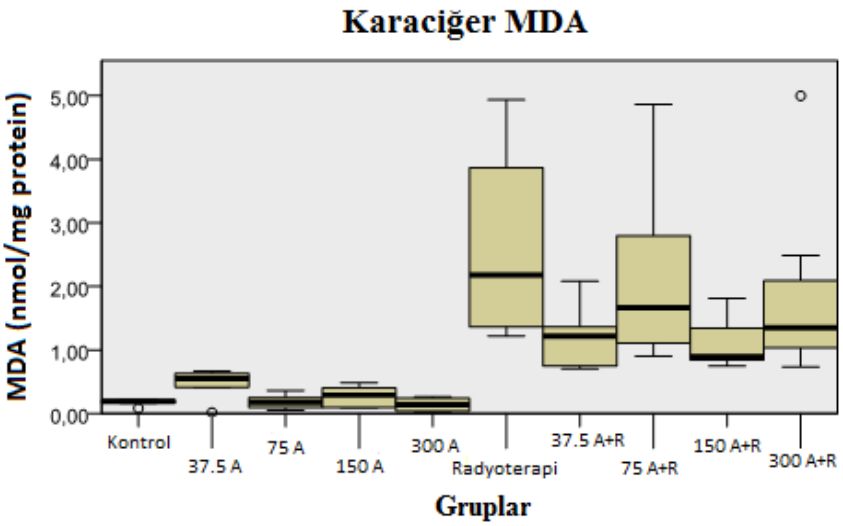
Tablo 4.2. Karaciğer dokusu gruplarında doku enzim düzeyleri

Gruplar	**MDA nmol/mg protein Ortanca (%25-%75)**	**CAT Ü/mg protein Ortanca (%25-%75)**	**SOD Ü/mg protein Ortanca (%25-%75)**
Kontrol	0.19 (0.17-0.21)	84.35 (77-101)	0.20 (0.16-0.24)
$P_{37.5}$	0.54 (0.41-0.63)	105 (102-117)	0.25 (0.19-0.31)
P_{75}	0.17 (0.09-0.22)	81 (66-109)	0.19 (0.16-0.28)
P_{150}	0.28 (0.09-0.4)	57 (39-79)	0.26 (0.17-0.30)
P_{300}	0.13 (0.04-0.23)	92.4 (67-103)	0.24 (0.19-0.30)
γ-ışını	2.17 (1.4-3.3)	85.8 (67-100)	0.18 (0.15-0.26)
γ-ışını + $P_{37.5}$	1.21 (0.7-1.3)	66.5 (58-78)	0.16 (0.12-0.19)
γ-ışını + P_{75}	1.66 (1.25-2.5)	80 (72-134.6)	0.21 (0.19-0.24)
γ-ışını + P_{150}	0.89 (0.84-1.24)	77.17 (67.9-100.7)	0.22 (0.18-0.28)
γ-ışını + P_{300}	1.3 (1.2-1.6)	93.7 (69.5-115.5)	0.24 (0.18-0.26)
p	<0.001	<0.041	0.213

(MDA: Malondialdehit, CAT: Katalaz, SOD: Süperoksit dismutaz, %25-%75: persentil)

4.2.1. Karaciğer Dokusunda MDA Düzeyleri

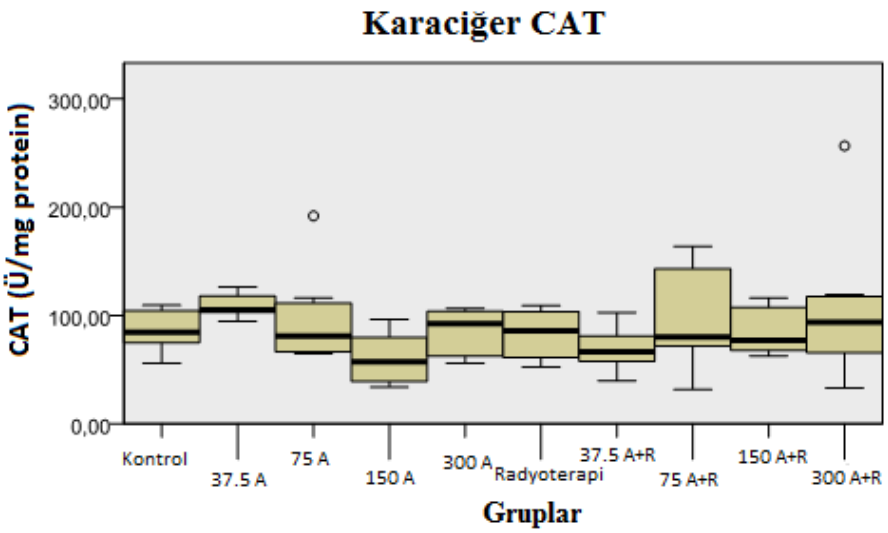
Karaciğer dokusunun lipid peroksidasyonunun göstergesi olarak MDA düzeyleri ölçüldü. MDA düzeyleri Tablo 4.2. ve Şekil 4.4.'de gösterildi. Kontrol grubu, $P_{37.5}$ ve P_{150} gruplarla karşılaştırıldığında daha düşük ve P_{75} ve P_{300} gruplarla karşılaştırıldığında sayısal daha yüksek olmasına rağmen istatistiksel kayda değer bir fark bulunmadı (p=1.000). Kontrol grubu ve radyasyon + antioksidan grupları karşılaştırıldığında kontrol grubunda kayda değer daha düşüktü (p<0.003). Kontrol grubu ve radyasyon grubu karşılaştırıldığında kontrol grubunda kayda değer daha düşüktü (p=0.000). Radyasyon ve antioksidan gruplar karşılaştırıldığında antioksidan grubunda kayda değer daha düşüktü (p=0.006). Radyasyon ve radyasyon + antioksidan gruplar karşılaştırıldığında radyasyon grubunda diğer gruplara göre sayısal daha yüksek olmasına rağmen kayda değer bir fark yoktu (p=1.000). Radyasyon ve γ-ışını + P_{150} karşılaştırıldığında radyasyon grubunda kayda değer daha yüksekti (p<0.035). Antioksidan gruplar arasında kayda değer bir fark yoktu (p=1.000). γ-ışını + $P_{37.5}$ grubu, P_{75} grubu ve P_{300} grubu karşılaştırıldığında MDA değeri γ-ışını + $P_{37.5}$ grubunda kayda değer daha yüksekti (p=0.014). γ-ışını + P_{75} grubu, P_{150} grubu ve P_{300} grubu ile karşılaştırıldığında γ-ışını + P_{75} grubunda kayda değer daha yüksekti (p=0.029). P_{300} grubu ve γ-ışını + P_{300} grubu karşılaştırıldığında MDA değeri γ-ışını + P_{300} grubunda kayda değer daha yüksekti (p=0.002).



Şekil 4.4. Karaciğer dokusu grupların doku MDA düzeyleri

4.2.2. Karaciğer Dokusunda CAT Aktivitesi

Karaciğerin oksidan/antioksidan durumunun göstergesi olarak CAT aktiviteleri ölçüldü. CAT aktiviteleri Tablo 4.2. ve Şekil 4.5.'de gösterildi. Kontrol grubu, $P_{37.5}$ grubu ve P_{300} grubu karşılaştırıldığında kontrol grubu sayısal daha düşük; kontrol grubu, P_{75} grubu ve P_{150} grubu karşılaştırıldığında kontrol grubu sayısal daha yüksek olmasına rağmen istatistiksel kayda değer bir fark yoktu (p=1.000). Kontrol grubu ve radyasyon grubu karşılaştırıldığında kontrol grubu radyasyon grubuna göre sayısal daha düşük olmasına rağmen istatistiksel olarak kayda değer fark bulunmadı (p=1.000). $P_{37.5}$ grubu, γ-ışını + $P_{37.5}$ grubu ve P_{150} grubu karşılaştırıldığında $P_{37.5}$ grubunda kayda değer daha yüksekti (p=0.000). P_{150} grubu ve radyasyon grubu karşılaştırıldığında radyasyon grubunda kayda değer daha yüksekti (p<0.040). Diğer antioksidan ve radyasyon + antioksidan gruplar arasında kayda değer bir fark yoktu (p=1.000).

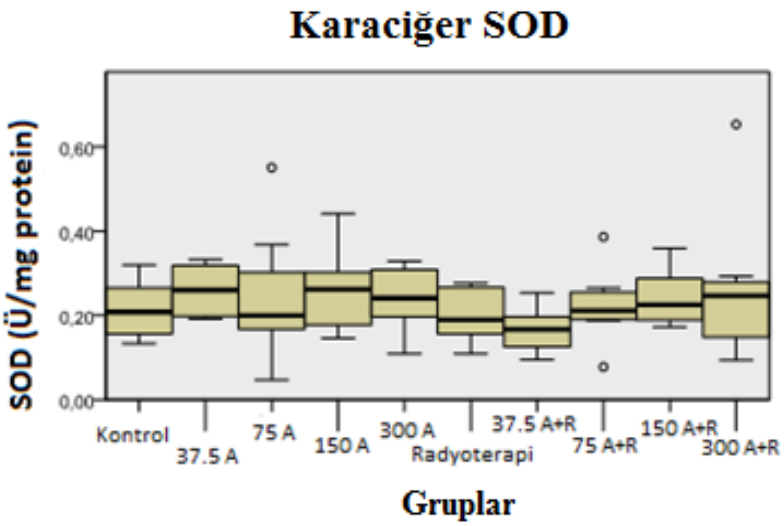


Şekil 4.5. Karaciğer dokusu grupların doku CAT aktiviteleri

4.2.3. Karaciğer Dokusunda SOD Aktivitesi

Karaciğerin oksidan/antioksidan durumunun göstergesi olarak SOD aktiviteleri ölçüldü. SOD aktiviteleri Tablo 4.2. ve Şekil 4.6.'da gösterildi. Kontrol grubu, $P_{37.5}$ grubu, P_{150} grubu ve P_{300} grubu karşılaştırıldığında kontrol grubu diğer gruplara göre sayısal daha düşük, kontrol grubu ve P_{75} grubu karşılaştırıldığında kontrol grubu sayısal daha yüksek olmasına rağmen istatistiksel kayda değer fark bulunmadı (p=0.213). Kontrol grubu ve radyasyon grubu karşılaştırıldığında kontrol grubu sayısal daha yüksek olmasına rağmen istatistiksel kayda değer fark yoktu (p=0.075). Radyasyon grubu ve antioksidan gruplar

karşılaştırıldığında radyasyon grubu sayısal daha düşük olmasına rağmen istatistiksel kayda değer fark bulunmadı (p=0.045). Radyasyon ve radyasyon + antioksidan gruplar karşılaştırıldığında radyasyon grubu sayısal daha düşük olmasına rağmen istatistiksel kayda değer fark yoktu (p=0.059). Radyasyon ve γ-ışını + $P_{37.5}$ grubu karşılaştırıldığında radyasyon grubu sayısal daha yüksek olmasına rağmen istatistiksel kayda değer fark yoktu (p=0.125). Diğer antioksidan ve radyasyon + antioksidan gruplar arasında kayda değer fark bulunmadı (p=0.213).



Şekil 4.6. Karaciğer dokusu grupların doku SOD aktiviteleri

4.3. Böbrek Dokusunda Biyokimyasal Analizler

Böbreğin oksidan/antioksidan durumunun göstergesi olarak CAT ve SOD aktiviteleri, lipid peroksidasyonunun göstergesi olarak MDA düzeyleri ölçüldü. Bulgular Tablo 4.3.'de verildi. $p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Tablo 4.3. Böbrek dokusu gruplarında doku enzim düzeyleri

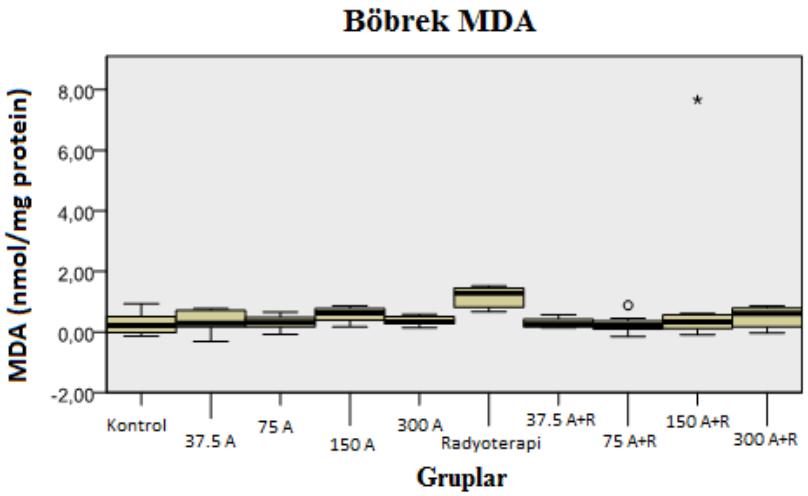
Gruplar	**MDA nmol/mg protein Ortanca (%25-%75)**	**CAT Ü/mg protein Ortanca (%25-%75)**	**SOD Ü/mg protein Ortanca (%25-%75)**
Kontrol	0.21 (0.02-0.4)	72.63 (62-86)	0.22 (0.20-0.35)
$P_{37.5}$	0.28 (0.16-0.7)	34.4 (23-52)	0.13 (0.10-0.14)
P_{75}	0.31 (0.18-0.43)	46.32 (37-57)	0.19 (0.16-0.20)
P_{150}	0.63 (0.4-0.7)	49 (42-77)	0.26 (0.19-0.30)
P_{300}	0.33 (0.27-0.43)	32.6 (29-40)	0.27 (0.17-0.33)
γ-ışını	1.27 (0.95-1.38)	39.5 (38.9-45)	0.20 (0.20-0.26)
γ-ışını + $P_{37.5}$	0.26 (0.17-0.38)	38.3 (25.9-44.2)	0.17 (0.17-0.20)
γ-ışını + P_{75}	0.20 (0.13-0.33)	58.5 (45.8-68.9)	0.23 (0.16-0.27)
γ-ışını + P_{150}	0.33 (0.11-0.5)	40.39 (32.8-43.8)	0.20 (0.15-0.22)
γ-ışını + P_{300}	0.6 (0.35-0.78)	58.1 (42.8-72)	0.14 (0.13-0.20)
p	<0.008	<0.001	<0.010

(MDA: Malondialdehit, CAT: Katalaz, SOD: Süperoksit dismutaz, %25-%75: persentil)

4.3.1. Böbrek Dokusunda MDA Düzeyleri

Böbrek dokusunun lipid peroksidasyonunun göstergesi olarak MDA düzeyleri ölçüldü. MDA düzeyleri Tablo 4.3. ve Şekil 4.7.'de gösterildi. Kontrol grubu ve P_{150} grubu karşılaştırıldığında P_{150} grubu kontrol grubuna göre kayda değer daha yüksekti ($p<0.015$). Kontrol grubu ve diğer antioksidanlar karşılaştırıldığında kontrol grubu diğer gruplara göre sayısal daha düşük olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0.092$). Kontrol grubu ve γ-ışını + P_{300} grubu karşılaştırıldığında γ-ışını + P_{300} grubu kontrol grubuna göre kayda değer daha yüksekti ($p<0.006$). Kontrol grubu ve diğer radyasyon + antioksidan grubu karşılaştırıldığında kontrol grubu diğer gruplara göre

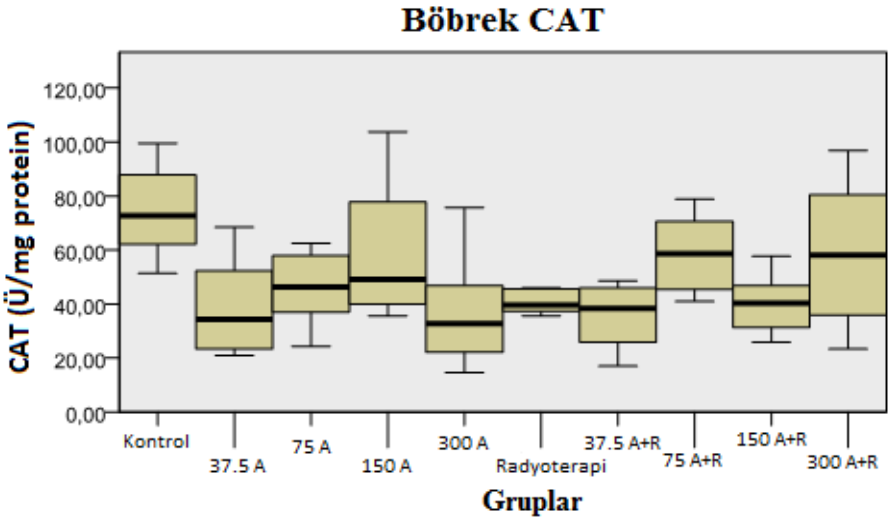
sayısal daha düşük olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu (p=1.000). Radyasyon grubu, kontrol grubu, antioksidan gruplar ve radyasyon + antioksidan gruplarla karşılaştırıldığında bu gruplara göre radyasyon grubu kayda değer daha yüksekti (p<0.000). P_{150} grubu, γ-ışını + $P_{37.5}$ grubu, γ-ışını + P_{75} grubu ve γ-ışını + P_{150} grubu karşılaştırıldığında P_{150} grubu diğer gruplara göre kayda değer daha yüksekti (p<0.009). γ-ışını + P_{300} grubu, γ-ışını + $P_{37.5}$ grubu ve γ-ışını + P_{150} grubu ile karşılaştırıldığında γ-ışını + P_{300} grubu diğer gruplara göre kayda değer daha yüksekti (p<0.016).



Şekil 4.7. Böbrek dokusu grupların doku MDA düzeyleri

4.3.2. Böbrek Dokusunda CAT Aktivitesi

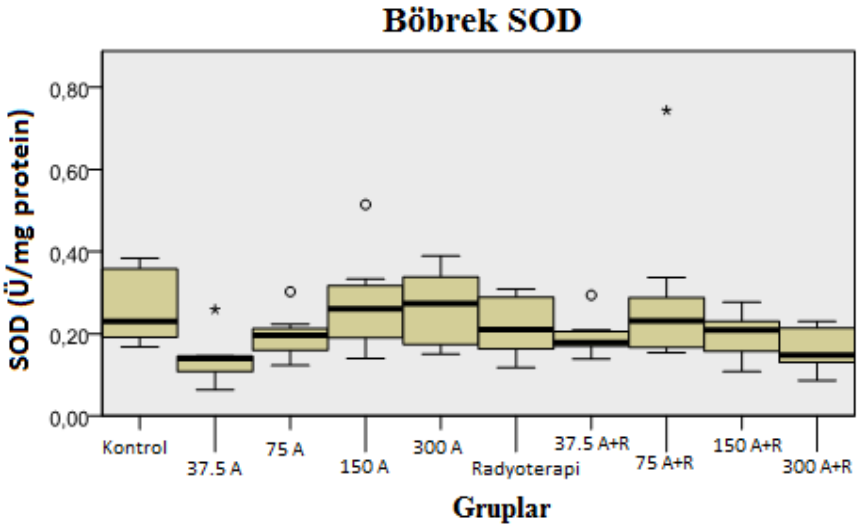
Böbreğin oksidan/antioksidan durumunun göstergesi olarak CAT aktiviteleri ölçüldü. CAT aktiviteleri Tablo 4.3. ve Şekil 4.8.'de gösterildi. Kontrol grubu, antioksidan gruplar, radyasyon grubu ve radyasyon + antioksidan gruplar karşılaştırıldığında kontrol grubunda kayda değer daha yüksekti (p=0.014). $P_{37.5}$ grubu, γ-ışını + P_{75} grubu ve γ-ışını + P_{300} grubu karşılaştırıldığında $P_{37.5}$ grubu diğer gruplara göre kayda değer daha düşüktü (p<0.009). γ-ışını + P_{75} grubu, $P_{37.5}$ grubu, P_{300} grubu, radyasyon grubu, γ-ışını + $P_{37.5}$ grubu ve γ-ışını + P_{150} gruplarıyla karşılaştırıldığında γ-ışını + P_{75} grubu diğer gruplardan kayda değer daha yüksekti (p<0.024). γ-ışını + P_{150} ve γ-ışını + P_{300} grubu karşılaştırıldığında γ-ışını + P_{300} grubu kayda değer daha yüksekti (p<0.032). Antioksidan gruplar ve radyasyon + antioksidan gruplar arasında kayda değer bir fark yoktu (p=0.168).



Şekil 4.8. Böbrek dokusu grupların doku CAT aktiviteleri

4.3.3. Böbrek Dokusunda SOD Aktivitesi

Böbreğin oksidan/antioksidan durumunun göstergesi olarak SOD aktiviteleri ölçüldü. SOD aktiviteleri Tablo 4.3. ve Şekil 4.9.'da gösterildi. Kontrol grubu ve $P_{37.5}$ grubu karşılaştırıldığında $P_{37.5}$ grubu kontrol grubuna göre kayda değer daha düşüktü ($p=0.029$). Kontrol grubu ve P_{75} grubu karşılaştırıldığında P_{75} grubu kontrol grubuna göre daha düşük, P_{150} grubu ve P_{300} grubu kontrole göre sayısal daha yüksek olmasına rağmen istatistiksel kayda değer bir fark yoktu ($p=0.316$). Kontrol, γ-ışını + $P_{37.5}$ grubu ve γ-ışını + P_{300} grubu karşılaştırıldığında kontrol grubu diğer gruplara göre kayda değer daha yüksekti ($p<0.007$). Kontrol ve γ-ışını + P_{75} grubu karşılaştırıldığında kontrol grubu daha düşük, γ-ışını + P_{150} grubu karşılaştırıldığında kontrol grubu sayısal daha yüksek olmasına rağmen istatistiksel kayda değer bir fark yoktu ($p=0.192$). Kontrol grubu ve radyasyon grubu karşılaştırıldığında radyasyon grubu kontrol grubuna göre sayısal daha düşük olmasına rağmen istatistiksel kayda değer bir fark yoktu ($p=0.446$). P_{300} grubu, $P_{37.5}$ ve γ-ışını + $P_{37.5}$ gruplarıyla karşılaştırıldığında P_{300} grubu diğer gruplara göre kayda değer daha yüksekti ($p<0.004$). Diğer antioksidan gruplar, radyasyon ve radyasyon + antioksidan gruplar arasında da kayda değer bir fark yoktu ($p=1.000$).



Şekil 4.9. Böbrek dokusu grupların doku SOD aktiviteleri

4.4. DNA Hasar Tayini (Comet Assay)

Yapılan çalışmada akciğer, karaciğer ve böbrek doku DNA'sında meydana gelen tek ve çift iplik kırılmalarını belirlemek için nötral comet tekniği kullanıldı. Baş uzunluğu (length head), kuyruk uzunluğu (length tail), comet uzunluğu (length comet), başta % DNA (head DNA), kuyrukta % DNA (tail DNA), kuyruk momenti (tail moment) ve olive tail moment (OTM) parametreleri CASP (Comet Assay Software Project-1.2.2) kullanılarak analiz edildi. Hasar hücre başından göç etmiş, comete neden olan kırılmış DNA kuyruğundan belirlendi, kuyruklu hasarlı, kuyruksuz hasar görmemiş olarak düşünüldü (170, 171).

Sıçanların tüm vücut gama radyasyonuna maruz kalması akciğer, karaciğer ve böbrek dokularında comet parametrelerinde (L head, L tail, L comet, tail DNA, TM ve OTM paremetrelerinde) artma gözlendi ve hücresel DNA hasarıyla sonuçlandı.

4.4.1. Akciğer Dokusunda DNA Hasar Tayini

Akciğer dokusu gruplar arası hücresel DNA hasar değerleri Tablo 4.4.'de verildi. Sıçanların tüm vücut gama radyasyonuna maruz kalması akciğer dokularında hücresel DNA hasarıyla sonuçlandı ve kontrol grubuna göre diğer grupların comet parametrelerinde artma gözlendi. $p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

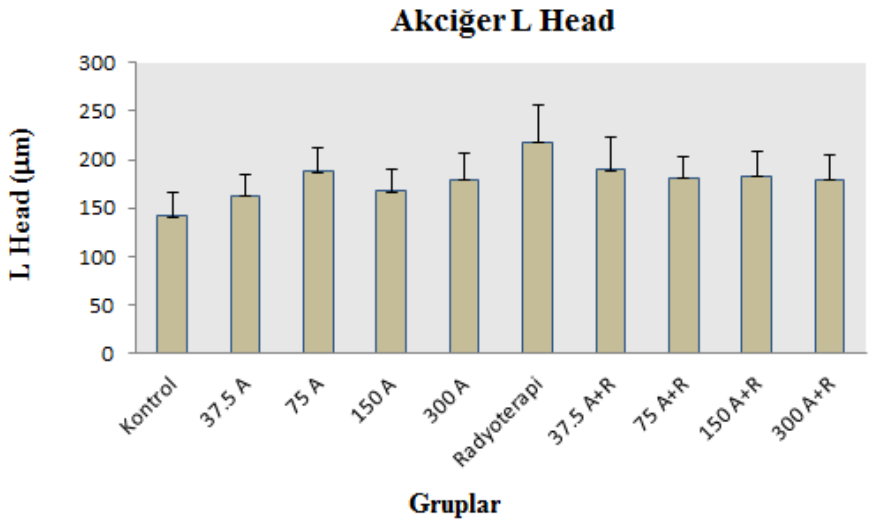
Tablo 4.4. Akciğer dokusu gruplar arası DNA hasar ölçüleri

Gruplar	**L Head ±SD**	**L Tail ±SD**	**L Comet ±SD**	**HeadDNA ±SD**	**TailDNA ±SD**	**TM ±SD**	**OTM ±SD**
Kontrol	141.5 ± 24	12.8 ±10	154.9 ± 29	98.4 ± 1	1.5 ± 1	0.2 ± 1	0.6 ± 1
$P_{37.5}$	162.6 ± 21	32.4 ± 16	195 ± 32	95.2 ± 2	4.7 ± 2	1.8 ± 2	3.3 ± 2
P_{75}	187.7 ± 23	74.2 ± 26	261.9 ± 37	87.9 ± 5	12 ± 5	9.8 ± 7	11.5 ± 6
P_{150}	167.5 ± 22	95 ± 30	262.6 ± 44	83.9 ± 5	16 ± 5	16.4± 9	15.4 ± 7
P_{300}	179.4 ± 27	103.8±33	284 ± 49	81.7 ± 5	18 ± 5	20 ± 11	18 ± 7
γ-ışını	217.5 ± 38	142.5±63	360.4 ± 83	78.2 ± 10	21.6 ± 9	36 ± 28	27.7± 16
γ-ışını + $P_{37.5}$	189.9 ± 33	119 ± 43	309 ± 66	81.6 ± 6	18.2 ± 6	23 ± 14	19.9 ± 9
γ-ışını + P_{75}	180.8 ± 22	96.8 ± 26	277.6 ± 43	84.7 ± 3	15 ± 3	15 ± 7	15 ± 5
γ-ışını + P_{150}	183.2 ± 24	56.8 ± 25	238 ± 45	91.7 ± 4	8.2 ± 4	5.5 ± 4	7.5 ± 4
γ-ışını + P_{300}	179.7 ± 25	50.5 ± 20	230 ± 38	92.5 ± 3	7.6 ± 3	4.2 ± 3	6.4 ± 3
p	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

(L Head: Baş uzunluğu, L Tail: Kuyruk uzunluğu, L Comet: Comet uzunluğu, Head DNA: Başta %DNA, Tail DNA: Kuyrukta %DNA, TM: Kuyruk momenti, OTM: Olive tail moment, SD: Standart sapma)

4.4.1.1. Akciğer Dokusu L Head Değeri

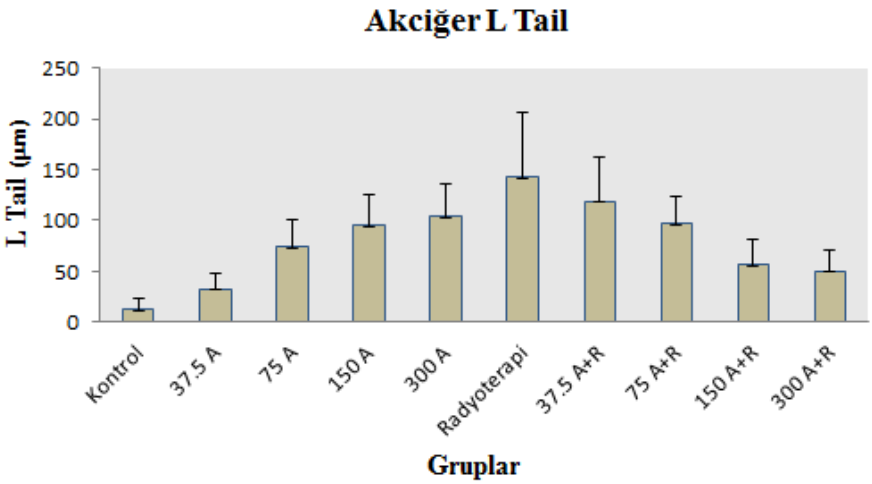
Akciğer dokusu L head değerleri Tablo 4.4. ve Şekil 4.10.'da gösterildi. Akciğer L head değerlerinde gruplar arasında kayda değer bir fark gözlendi ($p<0.001$). Kontrol grubu, antioksidan gruplar, radyasyon grubu ve radyasyon + antioksidan gruplarla karşılaştırıldığında kontrol grubu kayda değer daha düşüktü ($p<0.001$). Radyasyon grubu, antioksidan gruplar ve radyasyon + antioksidan gruplarla karşılaştırıldığında radyasyon grubu kayda değer daha yüksekti ($p<0.001$). Antioksidanlar ve radyasyon + antioksidanlar arasında anlamlı fark bulundu ($p<0.001$).



Şekil 4.10. Akciğer dokusu gruplar arası length head (baş uzunluğu) değerleri, ortalama ± standart sapma

4.4.1.2. Akciğer Dokusu L Tail Değeri

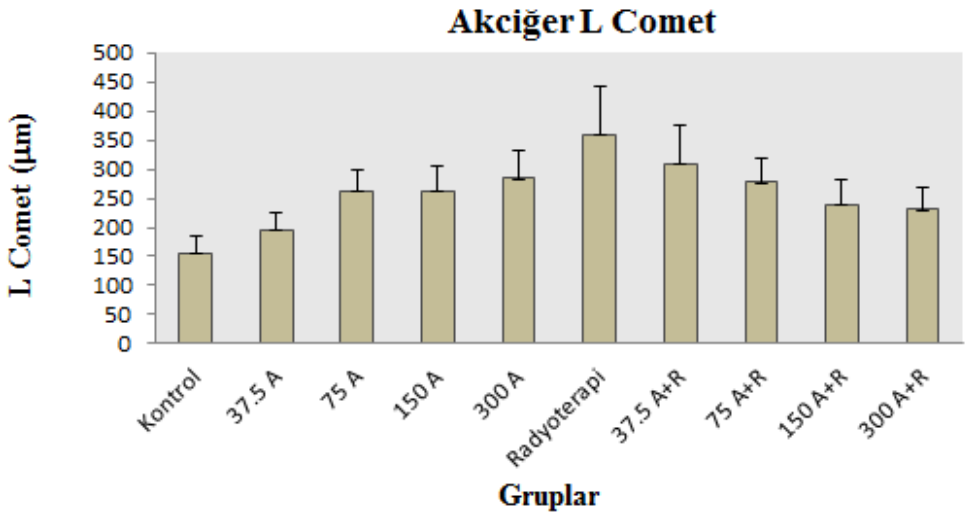
Akciğer L tail değerleri Tablo 4.4. ve Şekil 4.11.'de gösterildi. Akciğer dokusu L tail değerlerinde gruplar arasında kayda değer bir fark gözlendi ($p<0.001$). Kontrol grubu, antioksidan gruplar, radyasyon grubu ve radyasyon + antioksidan gruplarla karşılaştırıldığında kontrol grubunda kayda değer daha düşüktü ($p<0.001$). Radyasyon grubu, antioksidan gruplar ve radyasyon + antioksidan gruplarla karşılaştırıldığında radyasyon grubunda kayda değer daha yüksekti ($p<0.001$). Antioksidan gruplar ve radyasyon + antioksidan gruplar arasında anlamlı fark vardı ($p<0.001$).



Şekil 4.11. Akciğer dokusu gruplar arası length tail (kuyruk uzunluğu) değerleri, ortalama ± standart sapma

4.4.1.3. Akciğer Dokusu L Comet Değeri

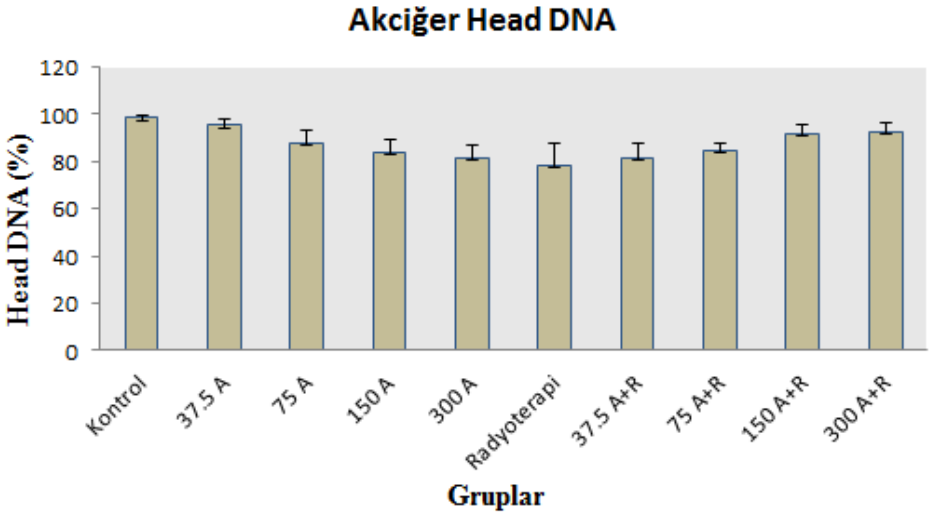
Akciğer L comet değerleri Tablo 4.4. ve Şekil 4.12.'de gösterildi. Akciğer dokusu L comet değerlerinde gruplar arasında kayda değer bir fark gözlendi ($p<0.001$). Kontrol grubu, antioksidan gruplar, radyasyon grubu ve radyasyon + antioksidan gruplarla karşılaştırıldığında kayda değer daha düşüktü ($p<0.001$). Radyasyon grubu, antioksidan gruplar ve radyasyon + antioksidan gruplarla karşılaştırıldığında kayda değer daha yüksekti ($p<0.001$). Antioksidan gruplar ve radyasyon + antioksidan grupla karşılaştırıldığında kayda değer fark vardı ($p<0.001$).



Şekil 4.12. Akciğer dokusu gruplar arası length comet (comet uzunluğu) değerleri, ortalama ± standart sapma

4.4.1.4. Akciğer Dokusu Head DNA Değeri

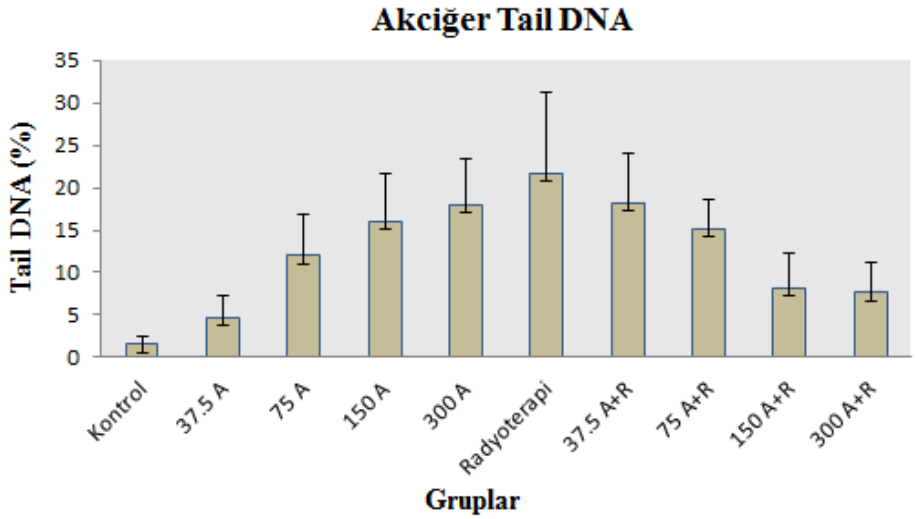
Akciğer Head DNA değerleri Tablo 4.4. ve Şekil 4.13.'de gösterildi. Akciğer dokusu head DNA değerlerinde gruplar arasında kayda değer bir fark gözlendi ($p<0.001$). Kontrol grubu, antioksidan gruplar, radyasyon grubu ve radyasyon + antioksidan gruplarla karşılaştırıldığında kayda değer daha yüksekti ($p<0.001$). Radyasyon grubu, antioksidan gruplar ve radyasyon + antioksidan gruplarla karşılaştırıldığında kayda değer daha düşüktü ($p<0.001$). γ-ışını + $P_{37.5}$ grubu ve P_{300} grubu karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark yoktu ($p=0.610$). Diğer antioksidan ve radyasyon + antioksidan gruplar karşılaştırıldığında kayda değer fark vardı ($p<0.001$).



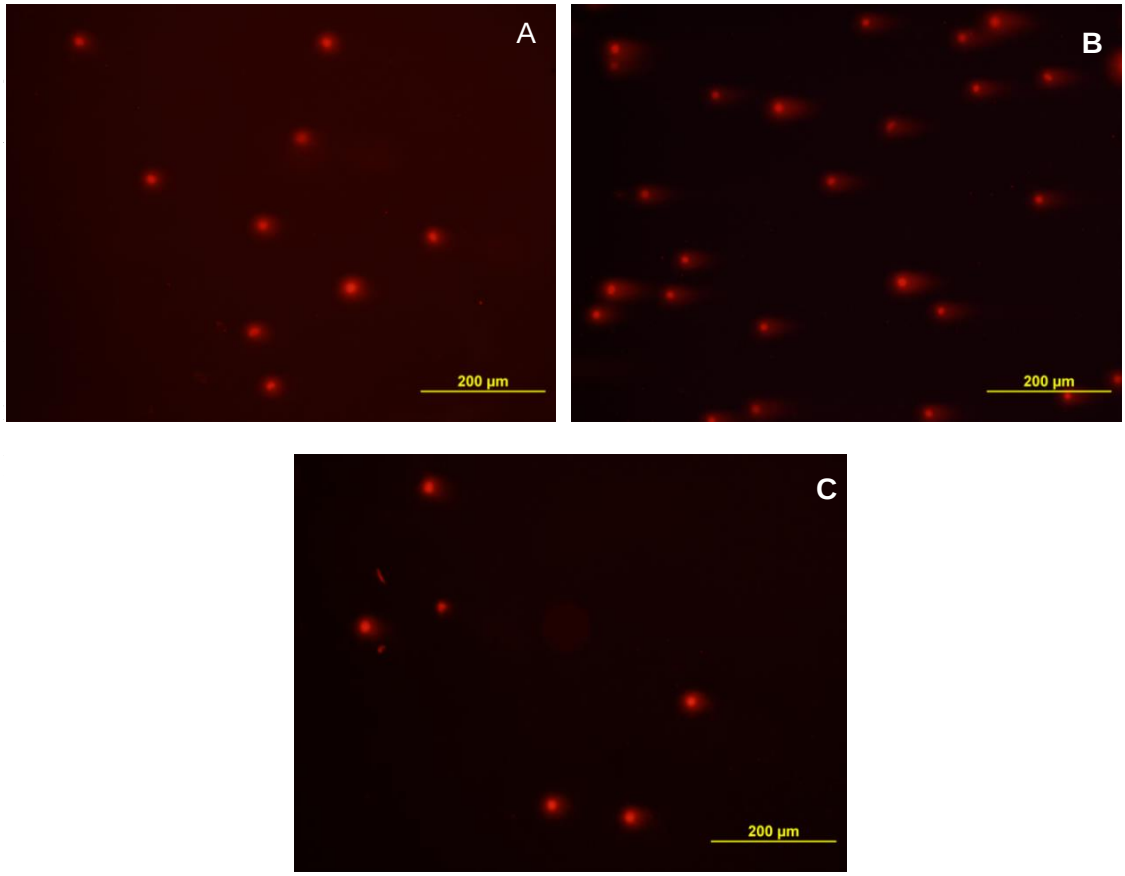
Şekil 4.13. Akciğer dokusu gruplar arası head DNA (başta %DNA) değerleri, ortalama ± standart sapma

4.4.1.5. Akciğer Dokusu Tail DNA Değeri

Akciğer tail DNA değerleri Tablo 4.4. ve Şekil 4.14.'de gösterildi. Akciğer dokusu tail DNA değerlerinde gruplar arasında (Şekil 4.15.) kayda değer bir fark gözlendi ($p<0.001$). Kontrol grubu, antioksidan gruplar, radyasyon grubu ve radyasyon + antioksidan gruplar karşılaştırıldığında kontrol grubu kayda değer daha düşüktü ($p<0.001$). Radyasyon grubu, antioksidan gruplar ve radyasyon + antioksidan gruplar karşılaştırıldığında radyasyon grubu kayda değer daha yüksekti ($p<0.001$). γ-ışını + $P_{37.5}$ grubu ve P_{300} grubu karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark yoktu ($p=0.396$). Diğer antioksidan ve radyasyon + antioksidan gruplar arasında kayda değer fark vardı ($p<0.001$).



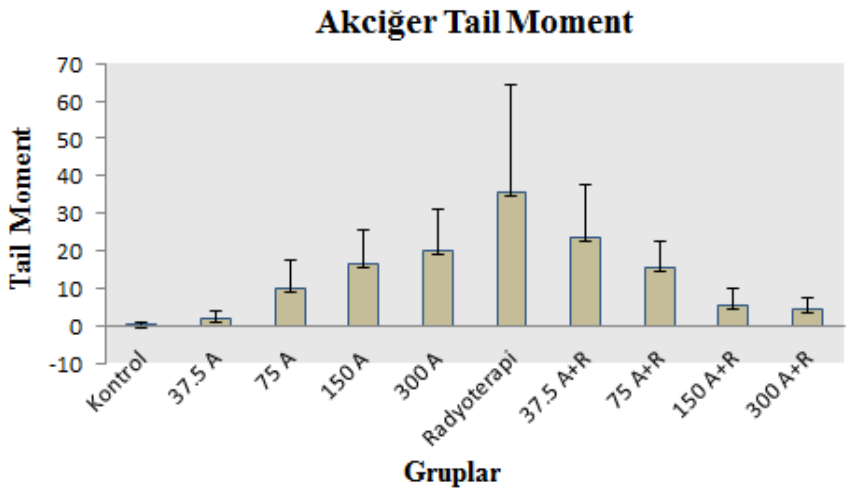
Şekil 4.14. Akciğer dokusu gruplar arası tail DNA (kuyruk %DNA) değerleri, ortalama ± standart sapma



Şekil 4.15. Akciğer doku hücreleri**,** A) Kontrol grubu tail DNA %1.5**,** B) γ-ışını grubu tail DNA %21.6 C) γ-ışını + P_{300} grubu tail DNA %7.6 (Ethidium bromide boyama x200, Olympus, Japan)

4.4.1.6. Akciğer Dokusu Tail Moment Değeri

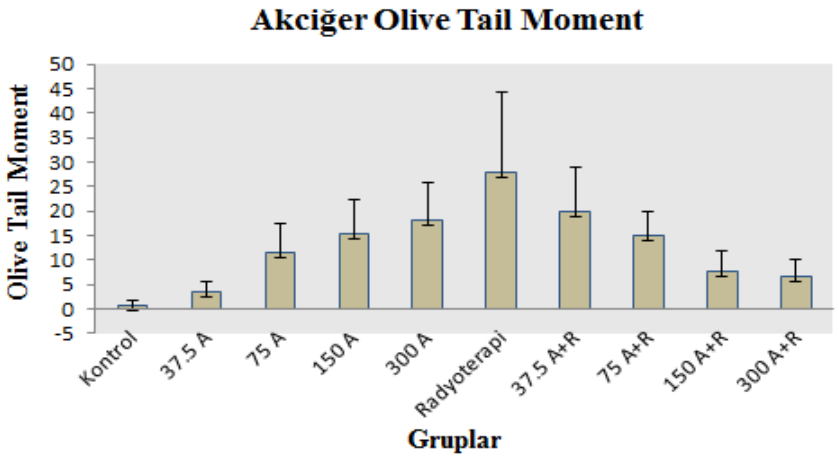
Akciğer tail moment değerleri Tablo 4.4. ve Şekil 4.16.'da gösterildi. Akciğer dokusu tail moment değerlerinde gruplar arasında (Şekil 4.16.) kayda değer bir fark gözlendi ($p<0.001$). Kontrol grubu, antioksidan gruplar, radyasyon grubu ve radyasyon + antioksidan grubu karşılaştırıldığında kontrol grubu kayda değer daha düşüktü ($p<0.001$). Radyasyon grubu, antioksidan gruplar ve radyasyon + antioksidan grubu karşılaştırıldığında radyasyon grubu kayda değer daha yüksekti ($p<0.001$). γ-ışını + P_{75} grubu ve P_{150} grubu karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark yoktu ($p=0.120$). γ-ışını + P_{150} grubu ve γ-ışını + P_{300} grubu karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark yoktu ($p=0.083$). Diğer antioksidan ve radyasyon + antioksidan gruplar arasında kayda değer fark vardı ($p<0.001$).



Şekil 4.16. Akciğer dokusu gruplar arası tail moment (kuyruk moment) değerleri, ortalama ± standart sapma

4.4.1.7. Akciğer Dokusu Olive Tail Moment Değeri

Akciğer olive tail moment değerleri Tablo 4.4. ve Şekil 4.17.'de gösterildi. Akciğer dokusu olive tail moment değerlerinde gruplar arasında kayda değer bir fark gözlendi ($p<0.001$). Kontrol grubu, antioksidan gruplar, radyasyon grubu ve radyasyon + antioksidan gruplar karşılaştırıldığında kontrol grubu kayda değer daha düşüktü ($p<0.001$). Radyasyon grubu, antioksidan gruplar ve radyasyon + antioksidan gruplar karşılaştırıldığında radyasyon grubu kayda değer daha yüksekti ($p<0.001$). Antioksidan gruplar ve radyasyon + antioksidan gruplar karşılaştırıldığında gruplar arasında kayda değer fark vardı ($p<0.001$).



Şekil 4.17. Akciğer dokusu gruplar arası olive tail moment (OTM) değerleri, ortalama ± standart sapma

4.4.2. Karaciğer Dokusunda DNA Hasar Tayini

Karaciğer dokusu gruplar arası DNA hasar değerleri Tablo 4.5.'de verildi. Sıçanların tüm vücut gama radyasyonuna maruz kalması karaciğer dokularında hücresel DNA hasarıyla sonuçlandı ve kontrol grubuna göre diğer grupların comet parametrelerinde artma gözlendi. $p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

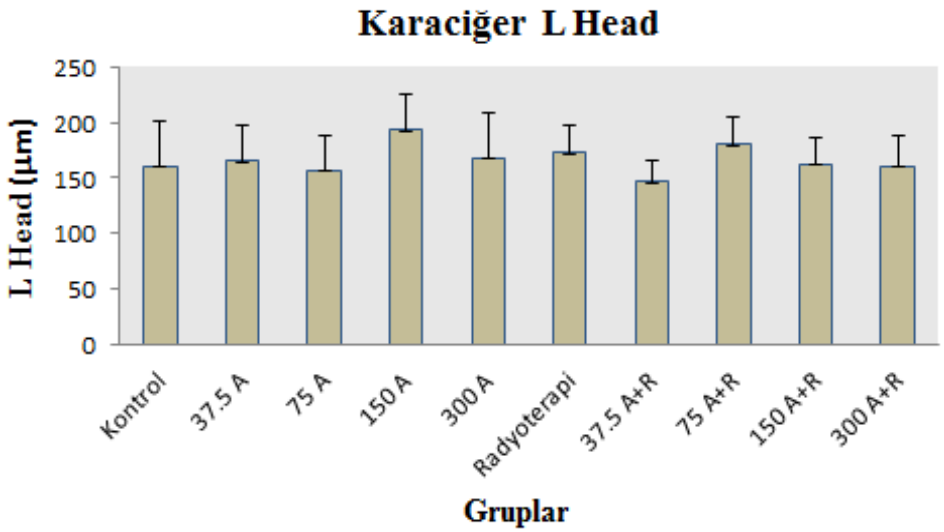
Tablo 4.5. Karaciğer dokusu gruplar arası DNA hasar ölçüleri

Gruplar	L Head ±SD	L Tail ±SD	L Comet ±SD	HeadDNA ±SD	TailDNA ±SD	TM ±SD	OTM ±SD
Kontrol	160.6±40	17.6 ± 13	178.3± 48	98.3 ± 1	1.7 ± 1	0.3 ± 1	0.9 ± 1
$P_{37.5}$	165.2±32	50.4 ± 16	215.7± 43	92 ± 2	7.8 ± 2	4 ± 2	5.8 ± 2
P_{75}	156.4±32	71.3 ± 24	227.8± 47	88.3 ± 4	11.6 ± 4	8.9 ± 5	9.6 ± 5
P_{150}	192.8±33	99.5 ± 26	292.3± 51	85.2 ± 4	14.7 ± 3	15 ± 7	14.9 ± 5
P_{300}	167.9±41	108.5±35	276.5± 65	80.3 ± 6	19.6 ± 6	22.2 ± 11	18 ± 8
γ-ışını	172 ± 25	193 ± 56	365.4± 57	67.1 ± 10	32.8 ± 10	67.9 ± 38	41.9 ± 17
γ-ışını + $P_{37.5}$	146 ± 18	202 ± 47	393.8± 56	71.9 ± 6	28.3 ± 7	58.4 ± 23	37.9 ± 11
γ-ışını + P_{75}	179.8±24	148.4±43	328.5± 52	77 ± 6	22.9 ± 5	35.9 ± 18	26.6 ± 10
γ-ışını + P_{150}	162.7±24	105.6±31	268.4± 46	81.8 ± 4	18 ± 4	19.9 ± 9	16.8 ± 5
γ-ışını + P_{300}	160.9±28	81.8 ± 26	242.7± 50	83.6 ± 4	16.4 ± 4	13.9 ± 7	12 ± 5
p	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

(L Head: Baş uzunluğu, L Tail: Kuyruk uzunluğu, L Comet: Comet uzunluğu, Head DNA: Başta %DNA, Tail DNA: Kuyrukta %DNA, TM: Kuyruk momenti, OTM: Olive tail moment, SD: Standart sapma)

4.4.2.1. Karaciğer Dokusu L Head Değeri

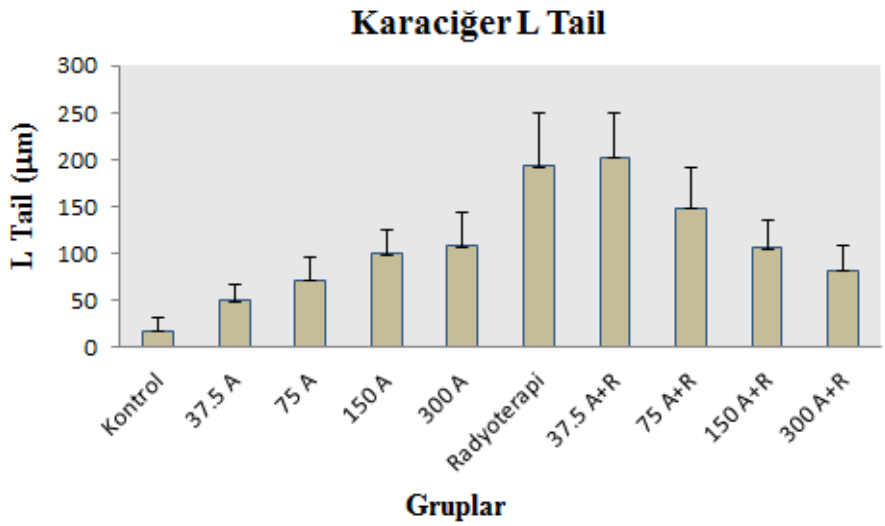
Karaciğer L head değerleri Tablo 4.5. ve Şekil 4.18.'de gösterildi. Karaciğer dokusu L head değerlerinde gruplar arasında kayda değer bir fark gözlendi ($p<0.001$). Kontrol grubu ve antioksidan gruplar karşılaştırıldığında kontrol grubu kayda değer daha düşüktü ($p<0.001$). Kontrol grubu ve γ-ışını + $P_{37.5}$ grubu karşılaştırıldığında L head değeri γ-ışını + $P_{37.5}$ grubunda kontrole göre kayda değer daha düşüktü ($p<0.001$). Kontrol grubu, γ-ışını + P_{75} grubu, γ-ışını + P_{150} grubu ve γ-ışını + P_{300} grubu ile karşılaştırıldığında kontrol kayda değer daha düşüktü ($p<0.001$). Kontrol grubu ve radyasyon grubu karşılaştırıldığında radyasyon grubu kontrol grubuna göre kayda değer artmıştı ($p<0.001$). Radyasyon grubu, $P_{37.5}$ grubu, P_{75} grubu ve P_{300} grubu ile karşılaştırıldığında γ-ışını grubunda kayda değer daha yüksekti ($p<0.001$). Radyasyon grubu ve P_{150} grubu karşılaştırıldığında L head değeri radyasyon grubunda kayda değer daha düşüktü ($p<0.001$). Radyasyon grubu, γ-ışını + $P_{37.5}$ grubu, γ-ışını + P_{150} grubu ve γ-ışını + P_{300} grubu ile karşılaştırıldığında L head değeri radyasyon grubunda kayda değer daha yüksekti ($p<0.001$). Radyasyon grubu ve γ-ışını + P_{75} grubu karşılaştırıldığında L head değeri radyasyon grubunda kayda değer azalmıştı ($p<0.001$). Antioksidan ve radyasyon + antioksidan gruplar arasında anlamlı fark vardı ($p<0.001$).



Şekil 4.18. Karaciğer dokusu gruplar arası length head (baş uzunluğu) değerleri, ortalama ± standart sapma

4.4.2.2. Karaciğer Dokusu L Tail Değeri

Karaciğer L tail değeri Tablo 4.5. ve Şekil 4.19.'da gösterildi. Karaciğer dokusu L tail değerlerinde gruplar arasında kayda değer bir fark gözlendi ($p<0.001$). Kontrol grubu, antioksidan gruplar, radyasyon grubu ve radyasyon + antioksidan gruplarla karşılaştırıldığında kontrol grubu kayda değer daha düşüktü ($p<0.001$). Radyasyon grubu, antioksidan gruplarla karşılaştırıldığında radyasyon grubu kayda değer daha yüksekti ($p<0.001$). Radyasyon grubu ve γ-ışını + $P_{37.5}$ grubu karşılaştırıldığında L tail değeri radyasyon grubunda kayda değer daha düşüktü ($p<0.001$). Radyasyon grubu, γ-ışını + P_{75} grubu, γ-ışını + P_{150} grubu ve γ-ışını + P_{300} grubu (81.8 ± 26) ile karşılaştırıldığında L tail değeri radyasyon grubunda kayda değer daha yüksekti ($p<0.001$). γ-ışını + P_{150} grubu ve P_{300} grubu karşılaştırıldığında gruplar arasında kayda değer bir fark yoktu ($p=0.179$). Diğer antioksidan ve radyasyon + antioksidan gruplar arasında kayda değer bir fark vardı ($p<0.001$).

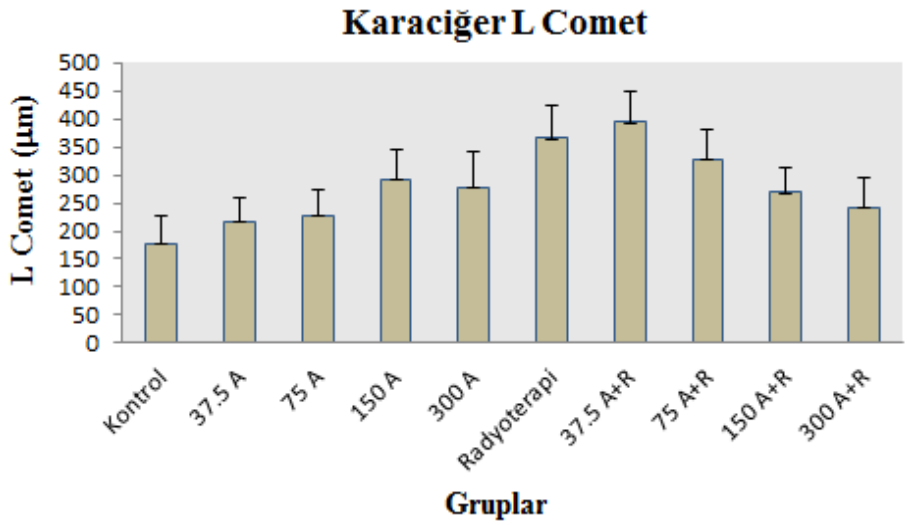


Şekil 4.19. Karaciğer dokusu gruplar arası length tail (kuyruk uzunluğu) değerleri, ortalama ± standart sapma

4.4.2.3. Karaciğer Dokusu L Comet Değeri

Karaciğer L comet değeri Tablo 4.5. ve Şekil 4.20.'de gösterildi. Karaciğer dokusu L comet değerlerinde (Şekil 4.25.) gruplar arasında kayda değer bir fark gözlendi ($p<0.001$). Kontrol grubu, antioksidan gruplar, radyasyon grubu ve radyasyon + antioksidan gruplarla karşılaştırıldığında kontrol grubu kayda değer daha düşüktü ($p<0.001$). Radyasyon grubu ve antioksidan gruplar karşılaştırıldığında radyasyon grubu

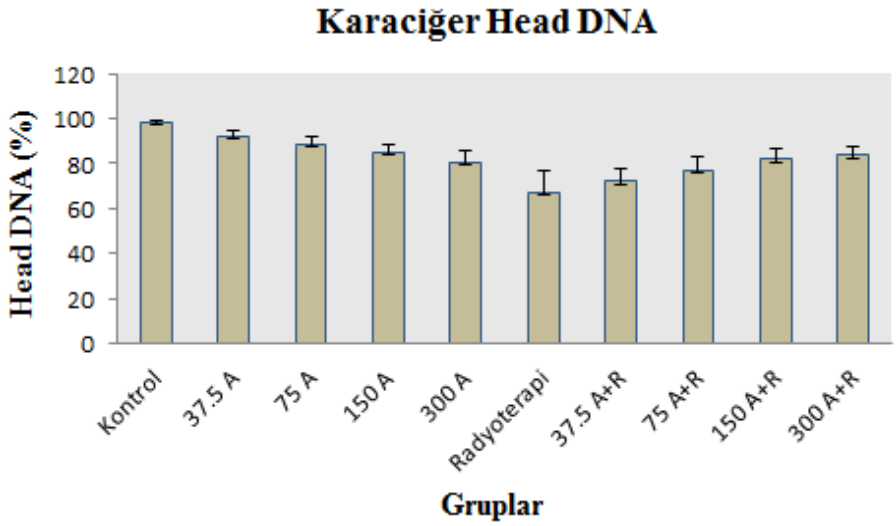
kayda değer daha yüksekti ($p<0.001$). Radyasyon grubu ve γ-ışını + $P_{37.5}$ grubu karşılaştırıldığında L comet değeri radyasyon grubunda kayda değer daha düşüktü ($p<0.001$). Radyasyon grubu ve γ-ışını + $P_{37.5}$ grubu karşılaştırıldığında radyasyon grubunda kayda değer daha düşüktü ($p<0.001$). Radyasyon grubu, γ-ışını + P_{75} grubu, γ-ışını + P_{150} grubu, ve γ-ışını + P_{300} grubu ile karşılaştırıldığında radyasyon grubunda kayda değer daha yüksekti ($p<0.001$). Antioksidan ve radyasyon + antioksidan gruplar karşılaştırıldığında gruplar arasında kayda değer fark vardı ($p<0.001$).



Şekil 4.20. Karaciğer dokusu gruplar arası Length Comet (comet uzunluğu) değerleri, ortalama ± standart sapma

4.4.2.4. Karaciğer Dokusu Head DNA Değeri

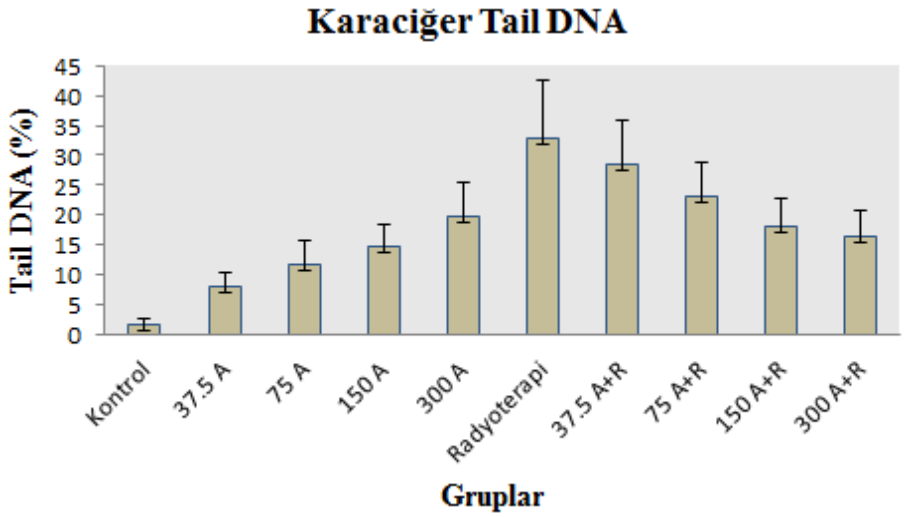
Karaciğer head DNA Tablo 4.5. de ve Şekil 4.21.'de gösterildi. Karaciğer dokusu head DNA değerlerinde gruplar arasında kayda değer bir fark gözlendi ($p<0.001$). Kontrol grubu, antioksidan gruplar, radyasyon grubu ve radyasyon + antioksidan gruplarla karşılaştırıldığında kontrol grubu kayda değer daha yüksekti ($p<0.001$). Radyasyon grubu, antioksidan gruplar ve radyasyon + antioksidan gruplarla karşılaştırıldığında radyasyon grubu kayda değer daha düşüktü ($p<0.001$). Antioksidan gruplar ve radyasyon + antioksidan gruplar arasında kayda değer bir fark vardı ($p<0.001$).



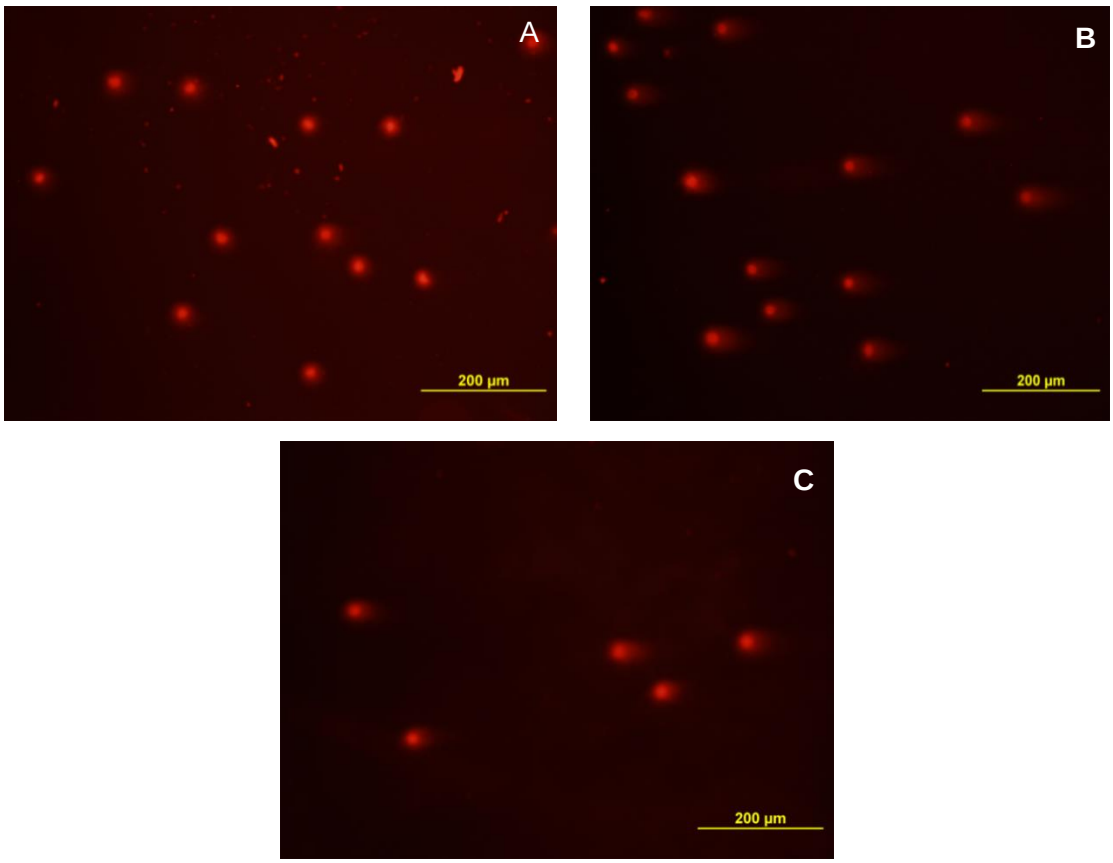
Şekil 4.21. Karaciğer dokusu gruplar arası head DNA (baş DNA) değerleri, ortalama ± standart sapma

4.4.2.5. Karaciğer Dokusu Tail DNA Değeri

Karaciğer dokusu tail DNA değeri Tablo 4.5. ve Şekil 4.22.'de gösterildi. Karaciğer dokusu tail DNA değerlerinde gruplar arasında (Şekil 4.23.) kayda değer bir fark gözlendi ($p<0.001$). Kontrol grubu, antioksidan gruplar, radyasyon grubu ve radyasyon + antioksidan gruplarla karşılaştırıldığında kontrol grubu kayda değer daha düşüktü ($p<0.001$). Radyasyon grubu, antioksidan gruplar ve radyasyon + antioksidan gruplarla karşılaştırıldığında radyasyon grubu kayda değer daha yüksekti ($p<0.001$). Antioksidan gruplar ve radyasyon + antioksidan gruplar arasında kayda değer bir fark vardı ($p<0.001$).



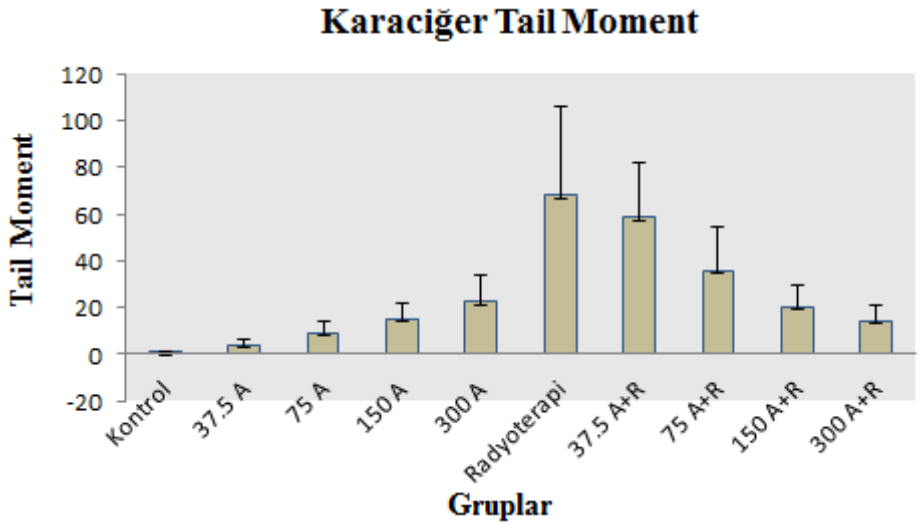
Şekil 4.22. Karaciğer dokusu gruplar arası tail DNA (kuyruk DNA) değerleri, ortalama ± standart sapma



Şekil 4.23. Karaciğer hücreleri A) Kontrol grubu tail DNA %1.7, B) γ-ışını grubu tail DNA %32.8, C) γ-ışını + P_{300} grubu tail DNA %16.4 (Ethidium bromide boyama x200, Olympus, Japan)

4.4.2.6. Karaciğer Dokusu Tail Moment Değeri

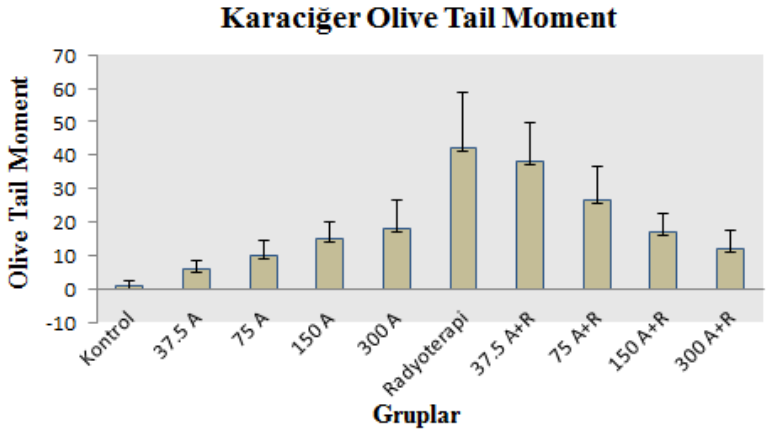
Karaciğer tail moment değeri Tablo 4.5. ve Şekil 4.24.'de gösterildi. Karaciğer dokusu tail moment değerlerinde gruplar arasında kayda değer bir fark gözlendi ($p<0.001$). Kontrol grubu, antioksidan gruplar, radyasyon grubu ve radyasyon + antioksidan gruplarla karşılaştırıldığında kontrol grubu kayda değer daha düşüktü ($p<0.001$). Radyasyon grubu, antioksidan gruplar ve radyasyon + antioksidan gruplarla karşılaştırıldığında radyasyon grubu kayda değer daha yüksekti ($p<0.001$). P_{150} grubu ve γ-ışını + P_{300} grubu ile karşılaştırıldığında tail moment değerinde kayda değer bir fark yoktu ($p=0.258$). Diğer antioksidan ve radyasyon + antioksidan gruplar arasında kayda değer bir fark vardı ($p<0.001$).



Şekil 4.24. Karaciğer dokusu gruplar arası tail moment (TM) değerleri, ortalama ± standart sapma

4.4.2.7. Karaciğer Dokusu Olive Tail Moment Değeri

Karaciğer olive tail moment değerleri Tablo 4.5. ve Şekil 4.25.'de gösterildi. Karaciğer dokusu olive tail moment değerlerinde gruplar arasında kayda değer bir fark gözlendi ($p<0.001$). Kontrol grubu, antioksidan gruplar, radyasyon grubu ve radyasyon + antioksidan gruplarla karşılaştırıldığında kontrol grubu kayda değer daha düşüktü ($p<0.001$). Radyasyon grubu, antioksidan gruplar ve radyasyon + antioksidan gruplarla karşılaştırıldığında radyasyon grubu kayda değer daha yüksekti ($p<0.001$). Antioksidan gruplar ve radyasyon + antioksidan gruplar arasında kayda değer bir fark vardı ($p<0.001$).



Şekil 4.25. Karaciğer dokusu gruplar arası olive tail moment (OTM) değerleri, ortalama ± standart sapma

4.4.3. Böbrek Dokusunda DNA Hasar Tayini

Böbrek dokusu gruplar arası hücresel DNA hasar değerleri Tablo 4.6.'da verildi. Sıçanların tüm vücut gama radyasyonuna maruz kalması böbrek dokularında hücresel DNA hasarıyla sonuçlandı ve kontrol grubuna göre diğer grupların comet parametrelerinde artma gözlendi. $p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

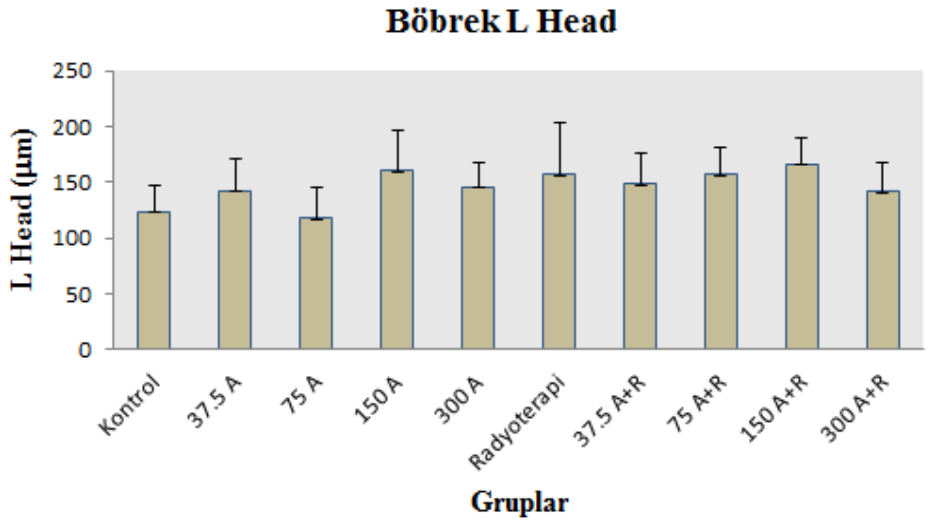
Tablo 4.6. Böbrek dokusu gruplar arası DNA hasar ölçüleri

Gruplar	**L Head ±SD**	**L Tail ±SD**	**L Comet ±SD**	**HeadDNA ±SD**	**Tail DNA ±SD**	**TM ±SD**	**OTM ±SD**
Kontrol	123.6± 23	12.5 ± 13	136.4 ± 32	98.4 ± 4	1.5 ± 1	0.3 ± 1	0.7 ± 1
$P_{37.5}$	142.3± 29	50.8 ± 41	193 ± 58	91.5 ± 8	8.4 ± 8	7.1 ± 10	6.5 ± 8
P_{75}	117.9± 29	52.2 ± 38	169 ± 60	90.4 ± 7	9.5 ± 7	7.1 ± 10	6 ± 7
P_{150}	160.8± 35	90.8 ± 27	251.6 ± 54	83.8 ± 5	16 ± 5	15 ± 8	13.7 ± 6
P_{300}	146 ± 21	112.3± 94	258.5 ± 42	79.2 ± 5	20.7 ± 5	24.4 ± 12	17 ± 6
γ-ışını	157.6± 46	205.9± 93	363±125	63.8 ± 11	36.2 ± 10	81 ± 52	46 ± 24
γ-ışını+ $P_{37.5}$	148.5± 27	115 ± 43	263.6 ± 58	78.6 ± 8	21.2 ± 8	26.6 ± 20	19.2 ± 10
γ-ışını +P_{75}	157.4± 25	111.2± 45	268.6 ± 56	80.8 ± 6	19 ± 6	23.4 ± 15	17.9 ± 9
γ-ışını + P_{150}	166 ± 23	96.9 ± 35	263 ± 45	82.9 ± 5	16.9 ± 5	17.7 ± 11	16 ± 8
γ-ışını +P_{300}	141.3± 26	68.6 ± 29	209.9 ± 46	85.9 ± 5	14 ± 5	10 ± 6	10.5 ± 5
p	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

(L Head: Baş uzunluğu, L Tail: Kuyruk uzunluğu, L Comet: Comet uzunluğu, Head DNA: Başta %DNA, Tail DNA: Kuyrukta %DNA, TM: Kuyruk momenti, OTM: Olive tail moment, SD: Standart sapma)

4.4.3.1. Böbrek Dokusu L Head Değeri

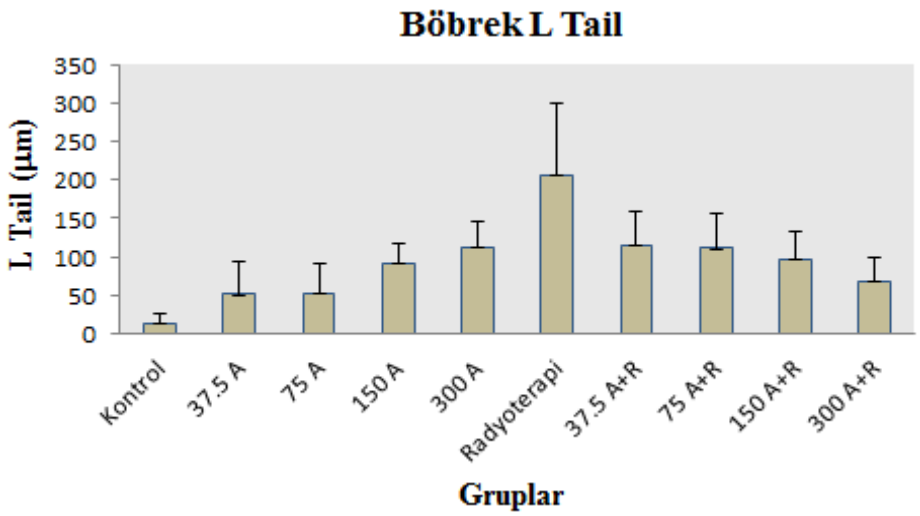
Böbrek dokusu L head değerleri Tablo 4.6. ve Şekil 4.26.'da gösterildi. Böbrek dokusu L head değerlerinde gruplar arasında kayda değer bir fark gözlendi ($p<0.001$). Kontrol grubu, $P_{37.5}$ grubu, P_{150} grubu ve P_{300} grubu ile karşılaştırıldığında kontrol grubunda kayda değer daha düşüktü ($p<0.001$). Kontrol grubu ve P_{75} grubu karşılaştırıldığında değeri kontrol grubunda kayda değer daha düşüktü ($p=0.002$). Kontrol grubu, radyasyon grubu ve radyasyon + antioksidan gruplarla karşılaştırıldığında kontrol grubu kayda değer daha düşüktü ($p<0.001$). Radyasyon grubu, $P_{37.5}$ grubu, P_{75} grubu ve P_{300} grubu ile karşılaştırıldığında L head değeri γ-ışını grubunda kayda değer daha yüksekti ($p<0.001$). γ-ışını grubu ve P_{150} grubu karşılaştırıldığında gruplar arasında kayda değer bir fark yoktu ($p=0.090$). Radyasyon grubu ve γ-ışını + $P_{37.5}$ grubu karşılaştırıldığında L head değeri radyasyon grubunda kayda değer daha yüksekti ($p<0.001$). Radyasyon grubu ve γ-ışını + P_{75} grubu karşılaştırıldığında gruplar arasında kayda değer bir fark yoktu ($p=0.888$). Radyasyon grubu ve γ-ışını + P_{150} grubu karşılaştırıldığında L head değeri γ-ışını grubunda kayda değer daha düşüktü ($p<0.001$). Radyasyon grubu ve γ-ışını + P_{300} grubu ile karşılaştırıldığında L head değeri γ-ışını grubunda kayda değer daha yüksekti ($p<0.001$). Antioksidan ve radyasyon + antioksidan gruplar arasında kayda değer bir fark vardı ($p<0.001$).



Şekil 4.26. Böbrek dokusu gruplar arası length Head (baş uzunluğu) değerleri, ortalama ± standart sapma

4.4.3.2. Böbrek Dokusu L Tail Değeri

Böbrek L tail değerleri Tablo 4.6. ve Şekil 4.27.'de gösterildi. Böbrek dokusu L tail değerlerinde gruplar arasında kayda değer bir fark gözlendi ($p<0.001$). Kontrol grubu, antioksidan gruplar, radyasyon grubu ve radyasyon + antioksidan gruplarla karşılaştırıldığında kayda değer daha düşüktü ($p<0.001$). Radyasyon grubu, antioksidan gruplar ve radyasyon + antioksidan gruplarla karşılaştırıldığında kayda değer daha yüksekti ($p<0.001$). $P_{37.5}$ grubu ve P_{75} grubu karşılaştırıldığında gruplar arasında kayda değer bir fark yoktu ($p=0.607$). γ-ışını + $P_{37.5}$ grubu ve P_{300} grubu karşılaştırıldığında gruplar arasında kayda değer bir fark yoktu ($p=0.342$). Diğer antioksidan ve radyasyon + antioksidan gruplar karşılaştırıldığında gruplar arasında kayda değer bir fark vardı ($p<0.001$).

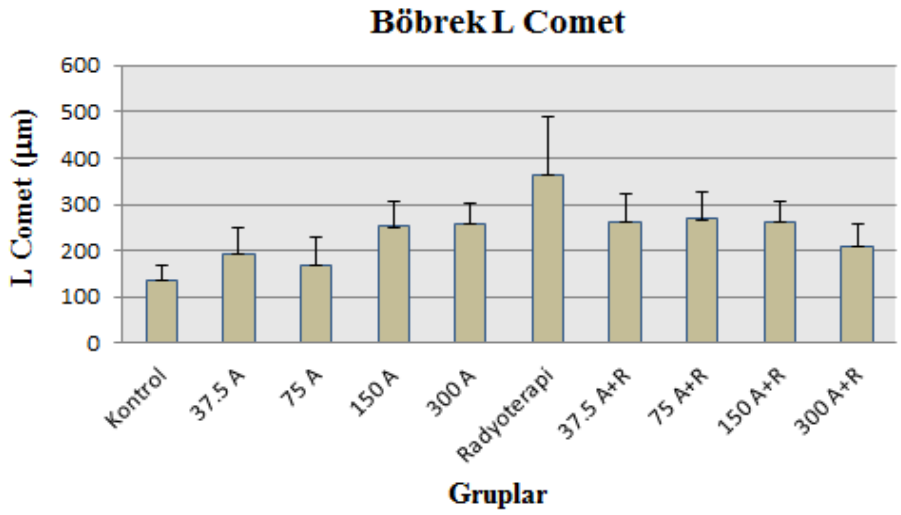


Şekil 4.27. Böbrek dokusu gruplar arası length tail (kuyruk uzunluğu) değerleri, ortalama ± standart sapma

4.4.3.3. Böbrek Dokusu L Comet Değeri

Böbrek dokusu L comet değeri Tablo 4.6. ve Şekil 4.28.'de gösterildi. Böbrek dokusu L comet değerlerinde gruplar arasında kayda değer bir fark gözlendi ($p<0.001$). Kontrol grubu, antioksidan gruplar, radyasyon grubu ve radyasyon + antioksidan gruplarla karşılaştırıldığında kayda değer daha düşüktü ($p<0.001$). Radyasyon grubu, antioksidan gruplar ve radyasyon + antioksidan gruplarla karşılaştırıldığında kayda değer daha yüksekti ($p<0.001$). γ-ışını + $P_{37.5}$ grubu ve P_{300} grubu karşılaştırıldığında gruplar arasında kayda değer bir fark yoktu ($p=0.404$). γ-ışını + $P_{37.5}$ grubu ve γ-ışını + P_{75} grubu karşılaştırıldığında gruplar arasında kayda değer bir fark yoktu ($p=0.202$). γ-ışını + $P_{37.5}$

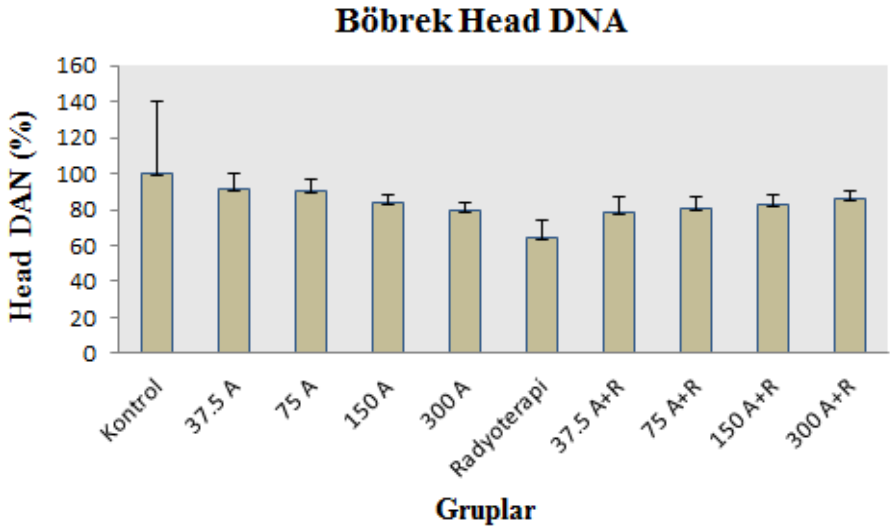
grubu ve γ-ışını + P_{150} grubu karşılaştırıldığında gruplar arasında kayda değer bir fark yoktu (p=0.918). γ-ışını + P_{75} grubu ve P_{300} grubu karşılaştırıldığında gruplar arasında kayda değer bir fark yoktu (p=0.051). Diğer antioksidan ve radyasyon + antioksidan gruplar arasında kayda değer fark vardı (p<0.001).



Şekil 4.28. Böbrek dokusu gruplar arası length comet (comet uzunluğu) değerleri, ortalama ± standart sapma

4.4.3.4. Böbrek Dokusu Head DNA Değeri

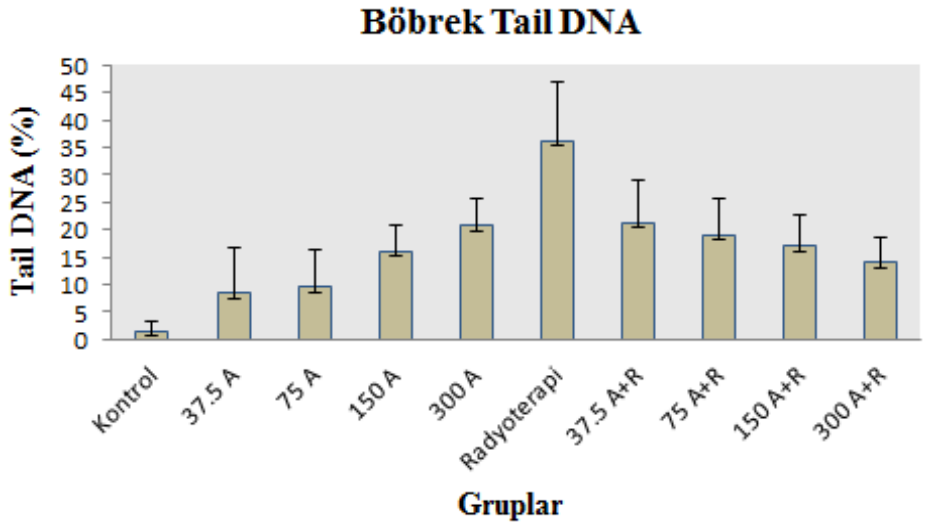
Böbrek head DNA değeri Tablo 4.6. ve Şekil 4.29.'da gösterildi. Böbrek dokusu head DNA değerlerinde gruplar arasında kayda değer bir fark gözlendi (p<0.001). Kontrol grubu, antioksidan gruplar, radyasyon grubu ve radyasyon + antioksidan gruplarla karşılaştırıldığında kayda değer daha yüksekti (p<0.001). Radyasyon grubu, antioksidan gruplar ve radyasyon + antioksidan gruplarla karşılaştırıldığında kayda değer daha düşüktü (p<0.001). γ-ışını + $P_{37.5}$ grubu ve P_{300} grubu karşılaştırıldığında gruplar arasında kayda değer bir fark yoktu (p=0.963). γ-ışını + $P_{37.5}$ grubu **ve** γ-ışını + P_{150} grubu karşılaştırıldığında gruplar arasında kayda değer bir fark yoktu (p=0.938). γ-ışını + P_{150} grubu ve γ-ışını + P_{300} grubu karşılaştırıldığında gruplar arasında kayda değer bir fark yoktu (p = 0.970). Diğer antioksidan gruplar ve radyasyon + antioksidan gruplar arasında kayda değer bir fark vardı (p<0.001).



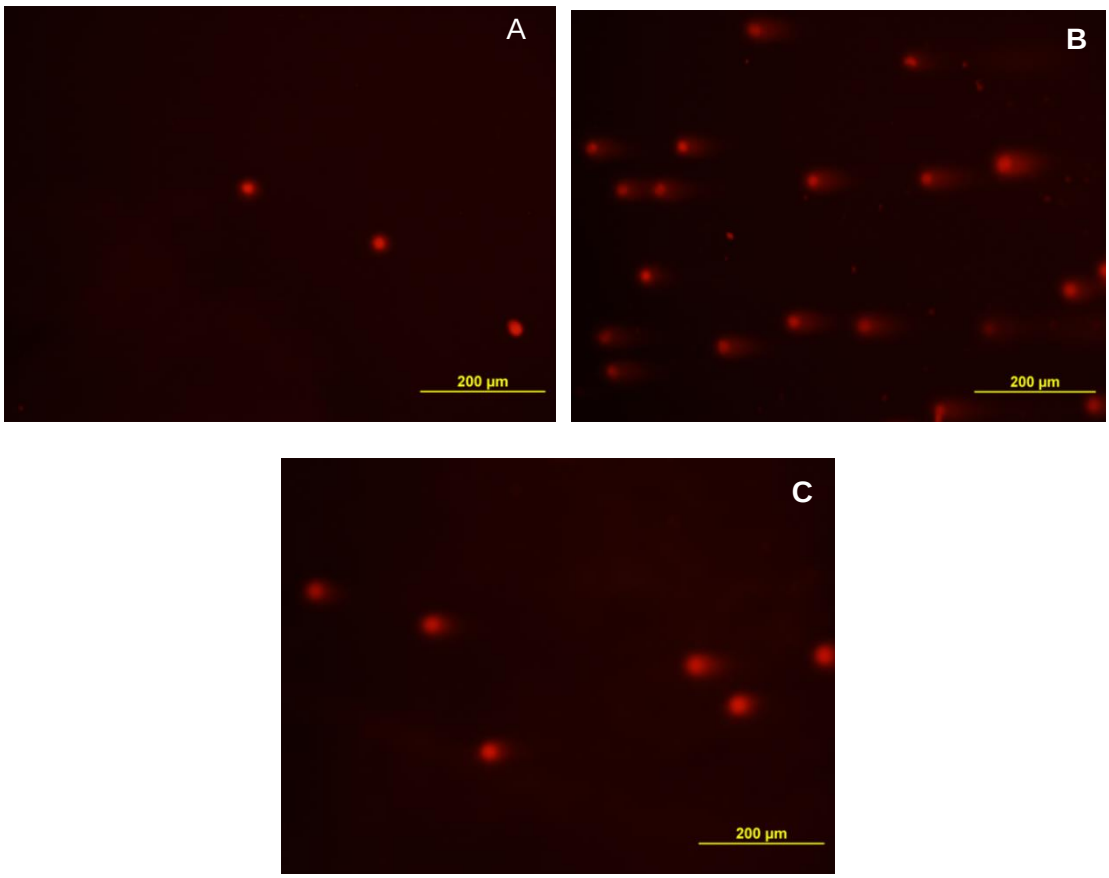
Şekil 4.29. Böbrek dokusu gruplar arası head DNA (baş DNA) değerleri, ortalama ± standart sapma

4.4.3.5. Böbrek Dokusu Tail DNA Değeri

Böbrek tail DNA değeri Tablo 4.6. ve Şekil 4.30.'da gösterildi. Böbrek dokusu tail DNA değerlerinde gruplar arasında (Şekil 4.31.) kayda değer bir fark gözlendi ($p<0.001$). Kontrol grubu, antioksidan gruplar, radyasyon grubu ve radyasyon + antioksidan gruplarla karşılaştırıldığında kayda değer daha düşüktü ($p<0.001$). Radyasyon grubu, antioksidan gruplar ve radyasyon + antioksidan gruplarla karşılaştırıldığında kayda değer daha yüksekti ($p<0.001$). γ-ışını + $P_{37.5}$ grubu ve P_{300} grubu karşılaştırıldığında gruplar arasında kayda değer bir fark yoktu ($p=0.238$). P_{150} grubu ve γ-ışını + P_{150} grubu karşılaştırıldığında gruplar arasında kayda değer bir fark yoktu ($p=0.058$). Diğer antioksidan gruplar ve radyasyon + antioksidan gruplarla karşılaştırıldığında kayda değer fark vardı ($p<0.001$).



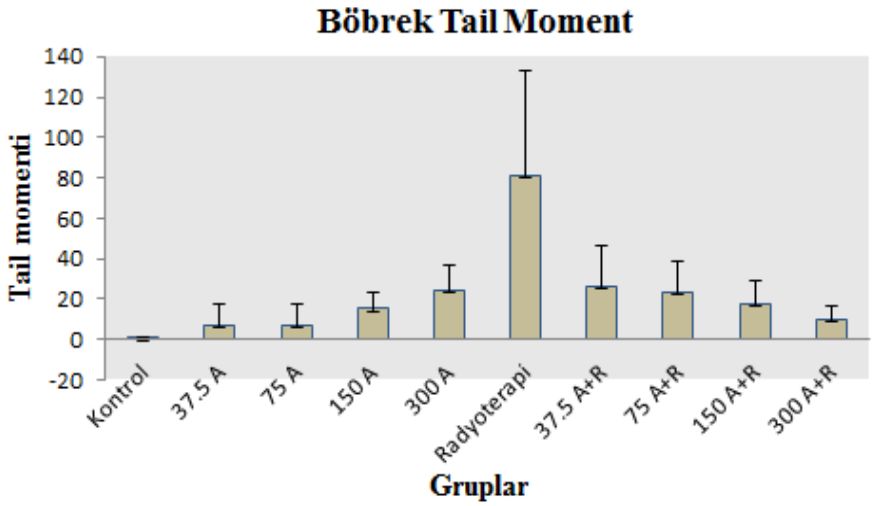
Şekil 4.30. Böbrek dokusu gruplar arası tail DNA (kuyruk DNA) değerleri, ortalama ± standart sapma



Şekil 4.31. Böbrek doku hücreleri **A)** Kontrol grubu tail DNA %1.5 B) γ-ışını grubu tail DNA %36.2, γ-ışını + P_{300} grubu tail DNA %14 (Ethidium bromide boyama x200, Olympus, Japan)

4.4.3.6. Böbrek Dokusu Tail Moment Değeri

Böbrek tail moment değeri Tablo 4.6. ve Şekil 4.32.'de gösterildi. Böbrek dokusu tail moment değerlerinde gruplar arasında kayda değer bir fark gözlendi ($p<0.001$). Kontrol grubu, antioksidan gruplar, radyasyon grubu ve radyasyon + antioksidan gruplarla karşılaştırıldığında kayda değer daha düşüktü ($p<0.001$). Radyasyon grubu, antioksidan gruplar ve radyasyon + antioksidan gruplarla karşılaştırıldığında kayda değer daha yüksekti ($p<0.001$). γ-ışını + $P_{37.5}$ grubu ve P_{300} grubu karşılaştırıldığında gruplar arasında kayda değer bir fark yoktu ($p=0.085$). γ-ışını + P_{75} grubu ve P_{300} grubu karşılaştırıldığında gruplar arasında kayda değer bir fark yoktu ($p=0.423$). Diğer antioksidan gruplar ve radyasyon + antioksidan gruplar karşılaştırıldığında gruplar arasında kayda değer fark vardı ($p<0.001$).

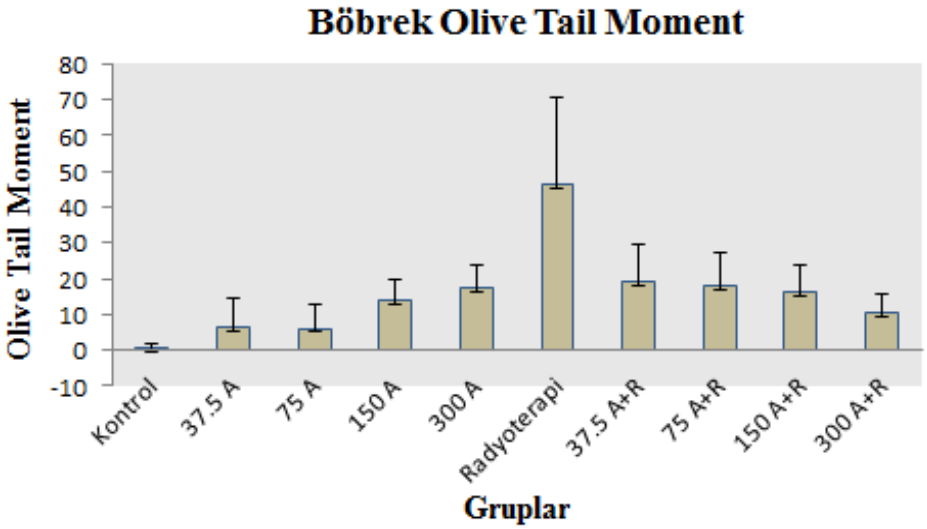


Şekil 4.32. Böbrek dokusu gruplar arası tail moment (TM) değerleri, ortalama ± standart sapma

4.4.3.7. Böbrek Dokusu Olive Tail Moment Değeri

Böbrek olive tail moment değeri Tablo 4.6. ve Şekil 4.33.'de gösterildi. Böbrek dokusu olive tail moment değerlerinde gruplar arasında kayda değer bir fark gözlendi ($p<0.001$). Kontrol grubu, antioksidan gruplar, radyasyon grubu ve radyasyon + antioksidan gruplarla karşılaştırıldığında kayda değer daha düşüktü ($p<0.001$). Radyasyon grubu, antioksidan gruplar ve radyasyon + antioksidan gruplarla karşılaştırıldığında kayda değer daha yüksekti ($p<0.001$). γ-ışını + P_{75} grubu ve P_{300} grubu karşılaştırıldığında kayda değer bir fark yoktu ($p=0.247$). γ-ışını + P_{150} grubu ve P_{300} grubu

karşılaştırıldığında olive tail moment değerinde kayda değer bir fark yoktu (p=0.105). Diğer antioksidan gruplar ve radyasyon + antioksidan gruplar karşılaştırıldığında gruplar arasında kayda değer fark vardı (p<0.001).



Şekil 4.33. Böbrek dokusu gruplar arası olive tail moment (OTM) değerleri, ortalama ± standart sapma

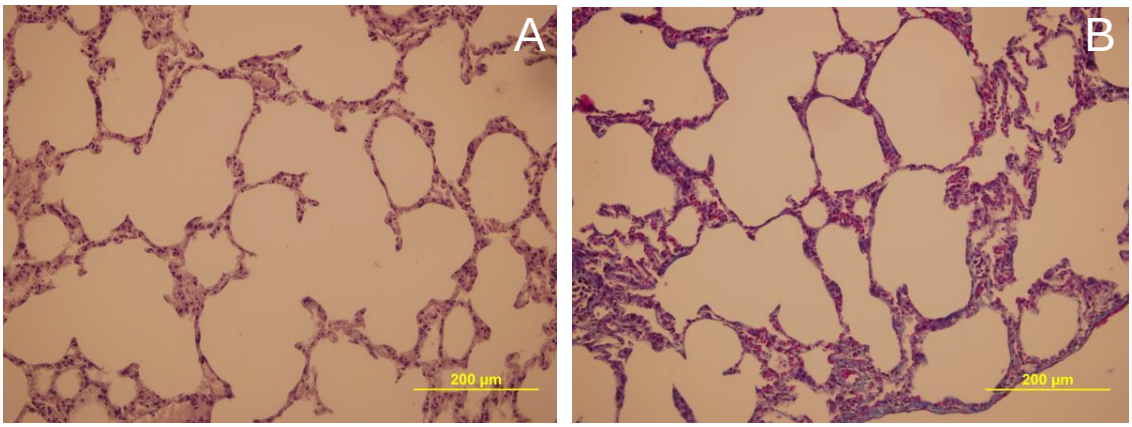
4.5. Histo-Patolojik Değerlendirme

Yapılan deney sonucunda, sıçanlardan alınan karaciğer ve akciğer dokularına hematoksilen-eozin ve Masson trikrom, böbrek dokularına ise ek olarak periodik asit Schiff boyama metodları uygulandı. Histo-patolojik değerlendirmeler sonucunda radyasyon ve antioksidan uygulanmayan kontrol gruplarına ait dokular kendi normal histolojik doku özelliklerini gösterirken, radyasyon uygulanan dokularda başta vasküler ve interstisyel hemoraji alanları olmak üzere çeşitli hücresel hasarlar gözlendi.

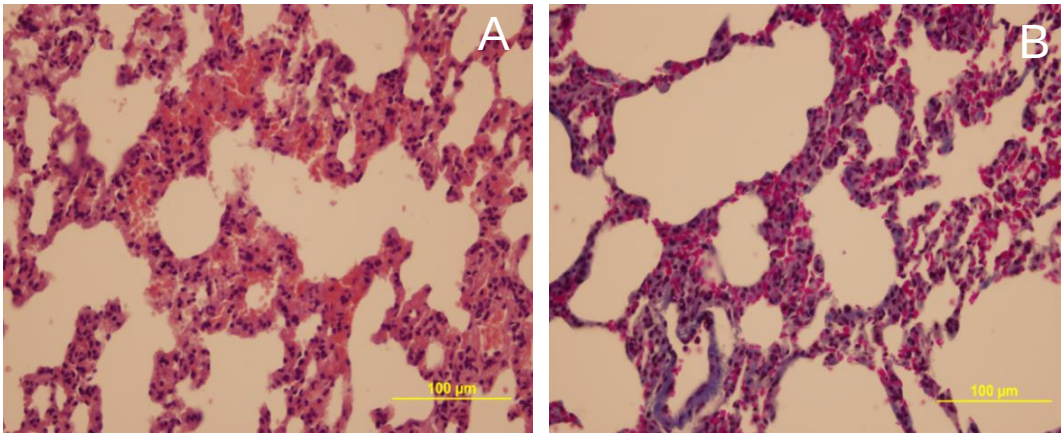
4.5.1. Akciğer Dokusunda Histo-patolojik Değerlendirme

Kontrol grubuna ait sıçanların akciğerleri normal histolojik görünüme sahipti (Şekil 4.34.) Akciğer alveolar epiteli hava ile direkt temasta olan bölgedir. Bu gruba ait akciğer parankimasında düzgün görünümlü tek katlı yassı epiteli ile alveoler keseler ile birlikte terminal ve respiratuvar bronşioller ile kan damarları da belirgin olarak seçilebilmekteydi.

Sadece radyasyon uygulanan gruba (γ-ışını) ait akciğer dokuları histolojik olarak incelendiğinde, akciğer parankimasında artan ödem, alveoler duvarların kalınlaşması, vasküler ve interstisyel hemoraji gözlendi (Şekil 4.35.). Hemoraji hem alveoler yüzey üzerinde hem de interstisyel bağ dokusunda belirgindi. Mevcut çalışmada, akciğerlerin radyasyona duyarlı olduğu ve 900 cGy radyasyon uygulaması sonucunda akciğerlerde ödem ve hemoraji gözlendi.



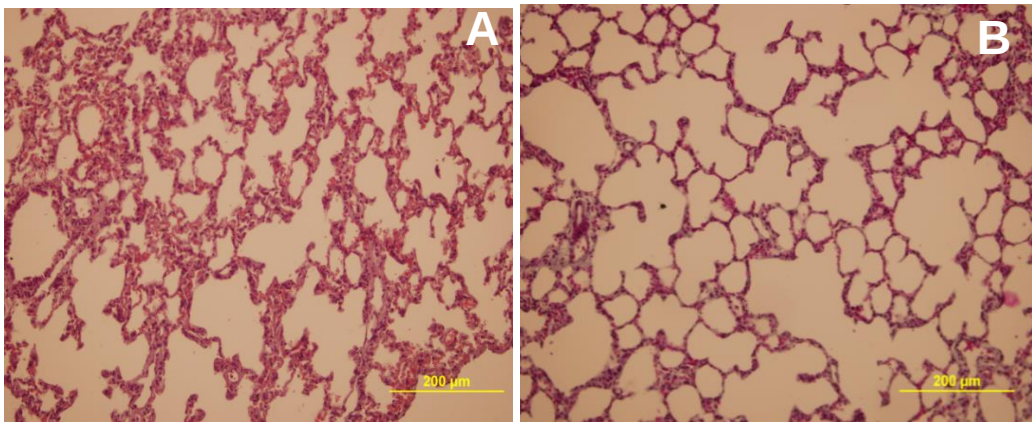
Şekil 4.34. Kontrol grubu akciğer doku kesiti A) H&E boyama x400, B) Masson trikrom boyama x400 (Olympus, BX51, Japan)



Şekil 4.35. γ-ışını grubu akciğer doku kesiti A) H&E boyama x400, B) Masson trikrom boyama x400 (Olympus, BX51, Japan)

Farklı dozlarda sadece pycnogenol uygulanan gruplarda ($P_{37.5}$, P_{75}, P_{150}, P_{300}) kontrol grubundan farklı olarak alveoler keselerde ve bağ dokusu alanlarında radyasyon grubuna benzer hemoraji alanları gözlendi. Bu kanama bölgeleri antioksidanın dozuna bağlı olarak artmıştı. Yalnız hücresel hasar ya da ödem antioksidan gruplarında görülmedi.

Radyasyon öncesi 37,5 mg/kg, 75 mg/kg ve 150 mg/kg pycnogenol uygulanan gruplarda (γ-ışını + $P_{37.5}$, γ-ışını + P_{75}, γ-ışını + P_{150}) akciğer dokusu üzerinde radyasyonun oluşturduğu hasara karşı antioksidanın koruyucu özelliği gözlenmedi. Radyasyon öncesi 300 mg/kg pycnogenol uygulanan grupta (γ-ışını + P_{300}) hemoraji ve ödemin bölgelerinde azalma görüldü (Şekil 4.36.).

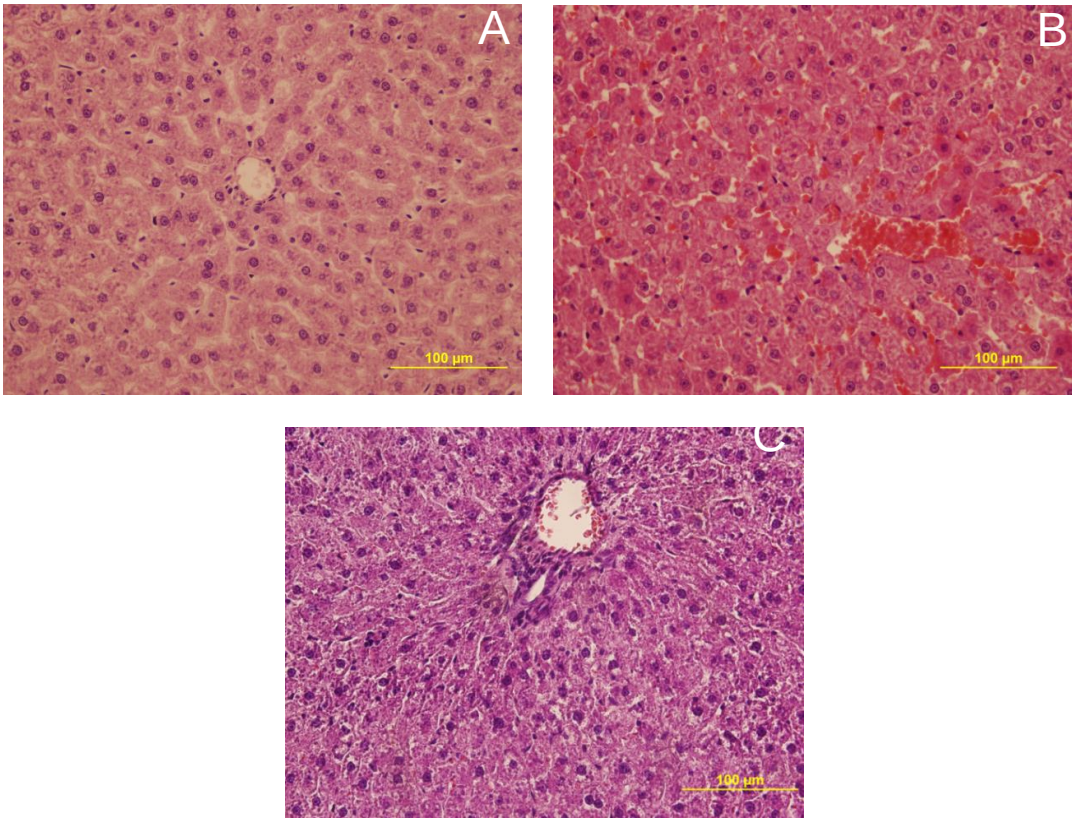


Şekil 4.36. γ-ışını + P_{300} grubu akciğer doku kesiti A) H&E boyama x400, B) Masson trikrom boyama x400 (Olympus, BX51, Japan)

4.5.2. Karaciğer Dokusunda Histo-patolojik Değerlendirme

Değerlendirmeler sonucunda kontrol grubuna ait karaciğer dokuları normal parankimal yapı özellikleri sergiledi (Şekil 4.37. A). Lobüller içerisinde vena centralis etrafında ışınsal tarzda dizilmiş karaciğer hücreleri (hepatositler) yer almaktadır. Hepatositler etrafında karaciğer sinüzoidleri gözlenmektedir. Portal alanlarda ise, bağ dokusu içinde yer alan hepatik arter, portal ven ve safra kanalı üçlüsü yer almaktadır.

Sadece radyasyon uygulanan gruplara (γ-ışını) ait karaciğer kesitleri incelendiğinde kontrol grubundan farklı olarak, yoğun vasküler sinuzoidal hemoraji ile birlikte, eritrositlerin sıkışarak sinuzoidleri doldurmuş olduğu gözlendi. Radyasyon uygulanan bütün deney gruplarında, nekrotik hepatositlerin bulunduğu alanlar ve şişmiş hepatositler gözlendi (Şekil 4.37. B). Ayrıca vena centralisten ışınsal tarzda uzanan sinüslerde belirgin genişleme vardı.



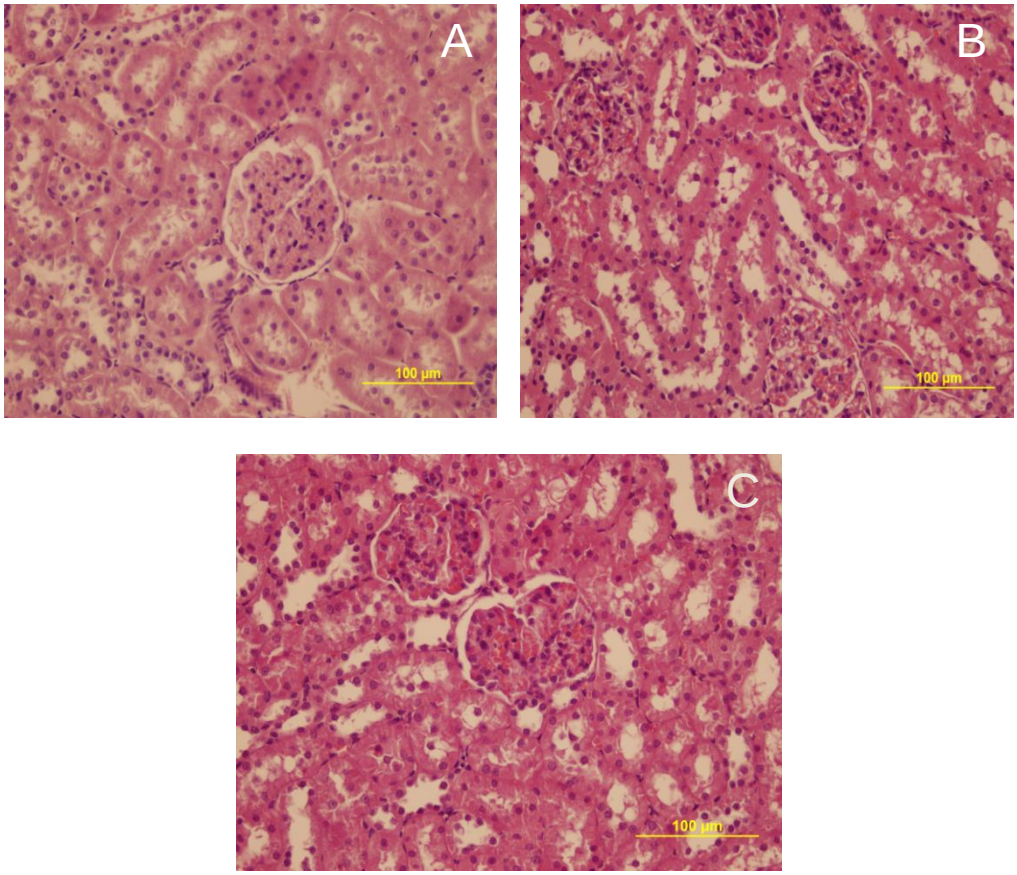
Şekil 4.37. Karaciğer doku kesiti A) Kontrol grubu, B) γ-ışını grubu, C) γ-ışını + P_{300} grubu, H&E boyama x400 (Olympus, BX51, Japan

Farklı dozlarda sadece pycnogenol uygulanan gruplarda ($P_{37.5}$, P_{75}, P_{150}, P_{300}) kontrol grubuna ait karaciğer dokusunun histolojik özelliklerine benzer özellik gösterdikleri bulundu. Pycnogenol, karaciğer parankiması üzerinde herhangi bir olumsuz etki göstermedi.

Radyasyon öncesi farklı dozlarda antioksidan uygulanan gruplarda (γ-ışını + $P_{37.5}$, γ-ışını + P_{75}, γ-ışını + P_{150}, γ-ışını + P_{300}) radyasyonun karaciğer dokusu üzerinde oluşturduğu olumsuz etkilere karşı düşük doz (37.5 mg /kg, 75 mg/ kg) pycnogenolün herhangi bir koruyucu etkisi görülmedi. Radyasyon öncesi 150 mg/kg pycnogenol uygulanan deney grubuna (γ-ışını + P_{150}) ait karaciğer dokusunda, pycnogenolün radyasyonun zararlı etkilerine karşı olumlu bir etkiye sahip olduğu görülürken, en iyi koruyucu etkinin radyasyon öncesi 300 mg/kg pycnogenol verilen grupta (γ-ışını + P_{300}) olduğu gözlendi. Radyasyonun karaciğer dokusu üzerine oluşturduğu olumsuz histo-patolojik etkinin, radyasyon öncesi 300 mg/kg pycnogenol verilen deney grubunda (γ-ışını + P_{300}) azaldığı ve karaciğer parankimasının normal karaciğer dokusu görünümüne yakın olduğu gözlendi (Şekil 4.37. C).

4.5.3. Böbrek Dokusunda Histo-patolojik Değerlendirme

Kontrol grubuna ait böbrek dokuları parankimasında böbrek cisimcikleri (renal korpusküller), proksimal ve distal kıvrıntılı tübüller, peritübüler kapillerler ve medullar ışınlar düzgün yerleşimliydi (Şekil 4.38.A). Radyasyon uygulanmayan bu grupta, glomerüller ve tübüller normal histolojik özellik gösterdiler.



Şekil 4.38. Böbrek doku kesiti A) Kontrol grubu, B) γ-ışını grubu, C) γ-ışını + P_{300} grubu, H&E boyama x400 (Olympus, BX51, Japan)

Radyasyon uygulaması yapılan grubun (γ-ışını) böbrek dokusu histolojik olarak incelendiğinde, kontrol grubuna göre son derece önemli ve anlamlı dejereneratif değişiklikler gösterdiği gözlendi. Radyasyon grubuna ait böbrek dokularının histo-patolojik incelenmesinde, hem interstisyel bağ dokusu alanlarında hem de renal korpusküllerin glomerüllerinde belirgin hemoraji incelendi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, tübül hücrelerinde de belirgin hasar mevcuttu. Böbreğin histo-patolojik incelenmesinde tübüllerde ve glomerüllerde belirgin değişikliklerin olduğu

gözlendi. Tübüllerde ve interstisyel dokuda erken değişiklikler dikkati çekti. Hücresel hasara neden olduğu gözlendi (Şekil 4.38. B).

Farklı dozlarda sadece pycnogenol uygulanan gruplarda ($P_{37.5}$, P_{75}, P_{150}, P_{300}) kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, tübül hücrelerinde belirgin hasar mevcuttu. Böbreğin histo-patolojik incelenmesinde radyasyon grubuna benzer, tübüllerde ve glomerüllerde belirgin değişikliklerin olduğu gözlendi, bu hasar verilen antioksidan miktarıyla artmaktaydı.

Farklı dozlarda pycnogenol ve radyasyon (γ-ışını + $P_{37.5}$, γ-ışını + P_{75}, γ-ışını + P_{150}, γ-ışını + P_{300}) uygulanan gruplardan 37.5 mg/kg ve 75mg/kg pycnogenolün radyasyon üzerine herhangi bir koruyucu etkisi görülmedi. Radyasyon öncesi 150 mg/kg pycnogenol uygulanan deney grubuna (γ-ışını + P_{150}) ait böbrek dokusunda, pycnogenolün radyasyonun zararlı etkilerine karşı olumlu bir etkiye sahip olduğu görülürken, en iyi koruyucu etkinin radyasyon öncesi 300 mg/kg pycnogenol verilen grupta (γ-ışını + P_{300}) olduğu gözlendi. Radyasyonun böbrek dokusu üzerine oluşturduğu olumsuz histo-patolojik etkinin, radyasyon öncesi 300 mg/kg pycnogenol verilen deney grubunda azaldığı ve böbrek parankimasının normal böbrek dokusu görünümüne yakın olduğu gözlendi (Şekil 4.38. C).

5.TARTIŞMA

İyonize radyasyonun saldırısından canlı sistemleri koruma radyasyon biyolojisinde en büyük önemi taşımaktadır. Nükleer savaşlarda, nükleer kazlarda ve nükleer saldırılarda bunun özel bir önemi vardır. Radyasyondan korunma, kanser radyoterapisinde de kanserli hücreleri yüksek doz radyasyona maruz bırakırken normal hücrelerin korunmasında önemlidir (113, 172).

Radyoterapide amaç normal çevre dokulara minimum hasar verirken tümöre sitotoksik dozu vermektir. Hedef hücre ya da dokularda hasar oluşturmak için iyonize radyasyon kullanılır. İyonize radyasyon, çoğu tümörün tedavisinde etkili olup tüm kanserli hastaların yaklaşık %60'ında tedavinin bir parçasıdır (1). Bununla beraber iyonize radyasyon, normal dokularda da yan etkilere neden olabilir. Radyoterapi dozu arttıkça, lokal tümör kontrolü artarken, normal dokunun zarar görmesi ihtimali de artar. Elde edilen en iyi tümör kontrolü, normal dokunun radyoterapiye toleransına bağlıdır (2, 3).

İyonize radyasyonun moleküler düzeydeki etkileri direkt veya indirekt yolla olur. Direkt yolda, değişikliğe uğrayan molekül doğrudan doğruya iyonize radyasyona maruz kalır ve uyarılmış duruma geçer. Radyasyonun direkt etkisi biyolojik etkinin bir bölümünden (1/3) sorumludur. Yüklü atom parçacıkları, genellikle direkt yolla etki gösterirler. İndirekt yolda ise iyonize radyasyon sonucu oluşan bazı ara ürünler başka bir dizi kimyasal reaksiyona girerek diğer moleküllerin değişmesine neden olurlar (2-5, 47-49).

İyonize radyasyonun biyolojik ve ölümcül etkileri için primer hedefin hücresel DNA olduğu bilinmektedir. İyonize radyasyona bağlı hücresel DNA hasarının yaklaşık %60-70'i SOR ile meydana gelir. SOR, iyonize radyasyonun etkisi ile su moleküllerinin

radyolizi neticesinde hızlı bir şekilde oluşur. Sekonder reaksiyonlar da oluşan SOR'un düzeyinin artmasına yol açar. DNA'nın yanı sıra lipid ve proteinler de iyonize radyasyona bağlı serbest radikallerden etkilenir. Lipid peroksidasyonunun, hücre membranlarındaki hasarın önemli nedenlerinden ve SOR'a bağlı doku hasarının gelişmesine katkıda bulunan faktör olduğu gösterilmiştir (5, 17).

Oksidatif stres, aşırı serbest radikal üretimi ve/veya zayıf antioksidan savunmanın olduğu durumlarda meydana gelir ve yapısal ve fonksiyonel değişikliklere neden olan biyomoleküllerin kimyasal değişimleri ile sonuçlanır. SOR üretimi radyasyona bağlı doku hasarının patogenezinde önemli bir rol oynar. Bu nedenle SOR'u inhibe eden veya temizleyici ilaçlar iyonize radyasyon uygulanan normal dokulardaki hasarı azaltmada yararlı olabilirler (17).

SOR'un artışına bağlı oluşan oksidatif hasara karşı hücreleri, bazı enzimatik veya non-enzimatik savunma sistemleri korur. Oksidatif stresden hücreleri koruyan SOR temizleyicisi SOD, GSH-Px ve CAT gibi antioksidanlar, enzimatik savunma sistemde yer alırlar. Vitamin E, melatonin ve glutatyon gibi bazı antioksidanlar ise nonenzimatik savunma sistemde yer alırlar. Hücrenin serbest radikallere karşı oluşturduğu savunma mekanizması kendi içerisinde hem sinerjistik hem de antagonistik etkili olabilmektedir. Örneğin, CAT ve GSH-Px, hücrenin farklı kısımlarında üretilen H_2O_2 üzerinde aynı katalitik aktiviteye sahiptir. Diğer taraftan SOD, CAT ve GSH-Px birbirlerini karşılıklı desteklemekte; CAT ve GSH-Px'in oksidasyonuna neden olan $O_2^{\bullet}$, SOD tarafından H_2O_2'ye çevrilirken; SOD'un inaktivasyonuna yol açan H_2O_2, CAT ve GSH-Px tarafından yıkılmaktadır (66, 77).

İyonize radyasyon, $OH^{\bullet}$, $H^{\bullet}$, $O^{\bullet}$ ve $O_2^{-\bullet}$ şeklinde serbest oksijen türlerine neden olur, tek ya da çift iplik kırılmaları, baz hasarı ve DNA-DNA ya da DNA-protein çapraz bağları gibi DNA hasarına yol açan olaylar zincirini takip eder (113, 172). İyonize radyasyon birçok farklı tipte DNA lezyonu üretir, radyasyon kaynaklı hücresel DNA hasarlarına karşı korunmak için, potansiyel öldürücü hücreler biyolojik öneme sahiptir (173).

Hücre ölümüne neden olan iyonize radyasyon kaynaklı lezyonların en önemlisinin DNA çift iplik kırıkları olduğu düşünülür. Radyasyon kaynaklı major DNA hasarı; iç ya da ara iplik çapraz bağı, tek ve çift DNA iplik kırıkları, bazların değişimi ve ayrılması, şeker hasarlarıdır. Hücresel yanıtlar; hücre döngüsünün durması, hücre döngüsü kontrol noktalarında ilerleme ve DNA onarım indüksiyonunu içerir. Çok hücreli memeli

organizmalarının çeşitli dokularında, radyasyon kaynaklı hücresel DNA hasarının yanı sıra membran oksidatif hasarı, radyasyonun neden olduğu kötü etkiler eninde sonunda gerçekleşir ve iyonize radyasyona maruziyetten günler ve aylar sonra gelişen radyasyon kaynaklı patolojik durumlar, bakteri duyarlı enfeksiyonlar, radyasyon hastalığı, kemik iliği yetmezliğinden karakterize durumlar, gastrointestinal problemler ve diğer semptomlar ortaya çıkar. Serbest radikalleri süpürme ve reaktif oksijen türlerini azaltma yeteneğine sahip birkaç antioksidan bileşikler radyasyondan korunmak için araştırılmıştır (113, 173-177).

Daha önceki çalışmalarda fare kemik iliğinde GSE ve resveratrolün radyo koruyucu etkisi gösterilmiştir (178). İntragastrik GSE (179, 180) ve BGJ (181) ve ya CCl4 intraperitional enjeksiyonunda (181) sıçanlarda in vivo çalışmalar karaciğer (179) ve diğer dokularda (180) akut iyonize radyasyon maruziyeti kaynaklı oksidatif stres değişikliklerinin düzeldiğini gözlemişlerdir.

Bu amaçla çalışmada, antioksidan, anti-inflamatuar ve antikanserojen özellikleri de dahil olmak üzere birçok biyolojik etkileri olan (18) pycnogenol® kullanıldı.

5.1. Akciğer

Işınlama kaynaklı hasardan normal hücreleri koruma, radyasyon tedavisinde ve mesleki ya da radyasyona maruz kalmada kritik bir konudur. Bu akciğer için özellikle önemlidir, çünkü akciğer geniş bir yüzey alanından dolayı daha yüksek oksijen seviyelerine maruz kalır ve iyonize radyasyona karşı çok hassastır. Radyasyon pnömonisi akut görülür ve bir göğüs duvarı veya intratorasik maligniteler için radyoterapiyi takiben nispeten yaygındır. Akciğer lösemi tedavisi ve diğer hematolojik maligniteler için tüm vücut ışınlaması sırasında doz sınırlayıcı bir organdır (63, 64).

İyonize radyasyona bağlı akciğer hasarının mekanizması net olarak bilinmemekle beraber, sitokin aktivitesi ve oksidatif strese bağlı olduğuna inanılmaktadır (9, 10). Radyoterapiye bağlı akciğer toksisitesi, yaygın olup, özellikle belli bir dozun üzerine çıkıldığında uygulanacak radyoterapi dozlarını önemli ölçüde sınırlamaktadır. Radyoterapi, birçok torasik malignitede çok önemli bir tedavi modalitesidir. Radyoterapiye bağlı pulmoner toksisiteyle sıkça karşılaşılmakta olup, bu durum radyoterapi dozunu sınırlayan ciddi bir problemdir. Akciğer kanseri, meme kanseri, lenfoma ve timoma nedeni ile radyoterapi uygulanan hastaların %30'unda radyoterapi ile ilişkili pulmoner semptomlar meydana gelir. Hodgkin lenfoma, özofagus kanseri ve

total vücut ışınlaması sonrası kemik iliği transplantasyonu gibi kombine tedavi modalitelerinin uygulandığı durumlarda da radyoterapiye bağlı pulmoner toksisite sıklıkla görülür (3-8, 10).

Lipid peroksidasyon ürünlerinden olan MDA, radyasyona bağlı oksidatif hasarın göstergesidir. Bu çalışmada da radyasyona bağlı akciğer hasarını göstermek için doku MDA düzeyleri ölçüldü. Radyasyon grubunda, kontrol, antioksidan gruplar ve radyasyon + antioksidan gruplara göre MDA düzeyinde artma saptandı. MDA düzeylerinde artış radyasyonun akciğerde oksidatif hasara yol açtığını göstermektedir. Antioksidan gruplar arasında ve radyasyon + antioksidan gruplarda sayısal değerleri yakın olup istatistiksel olarak anlamlı düzeyde saptanmadı. γ-ışını + P_{300} grubunun kontrol ve radyasyon grubundan daha düşük olması radyasyonun oksidatif hasarına karşı pycnogenolün membran lipidini koruduğunu göstermektedir.

Bizim çalışmamıza benzer olarak, tüm vücut ışınlaması veya lokal ışınlama yapılan çalışmalarda sıçanların akciğer, karaciğer, kolon, kalp ve ileum gibi organlarında radyasyona bağlı hasarın göstergesi olarak doku MDA düzeylerinde artma olduğu gösterilmiştir (17, 182-184).

Çalışmada radyasyon grubunda kontrol grubuna göre CAT aktivitesinde azalma saptandı. Bu durum, aşırı SOR üretimine karşı antioksidan sistemin yetersiz kaldığını göstermektedir. Radyasyon + antioksidan gruplarda radyasyon grubuna göre artma saptanması pycnogenolün SOR üretimine karşı yeterli olduğunu göstermektedir.

Çalışmada radyasyon grubunda kontrol grubuna göre SOD aktivitesinde artma saptandı. Bu durum, aşırı SOR üretimine karşı antioksidan sistemin yeterli olduğunu göstermektedir. Radyasyon + antioksidan gruplarda radyasyon grubuna göre artma saptanması pycnogenolün SOR üretimine karşı yeterli olduğunu göstermektedir.

Radyasyon + antioksidan gruplarda SOD ve CAT aktivitelerinde artış olduğu (γ-ışını + P_{75} grubu hariç) gözlendi. Bu iki antioksidan enzimin de birbirlerinin etkilerini potansiyelize ettiğini göstermektedir.

Bizim sonuçlarımız, Shin ve ark.nın verileriyle uyumluluk göstermektedir. Işınlanmadan bir hafta önce Se-methilselenosistein alan sıçanlarda, MDA düzeyi ve CAT aktivitesinde radyasyonun indüklediği değişim, ışınlamadan 24 saat sonra kontrol grubuna göre Se-methilselenosistein tedavi edilmiş grupta kayda değer azalmıştır (185).

Çalışmamızda akciğer dokusunda, radyasyon grubunda CAT aktivitelerinde azalma, SOD aktivitelerinde ve MDA seviyesinde artma; buna karşılık radyasyon + antioksidan grubunda CAT ve SOD aktivitelerinde artma ve MDA seviyesinde azalma tespit edilmesi, pycnogenolün koruyucu etkisinin antioksidan aktivitesine bağlı olduğunu gösterebilir. Bu veriler daha önce oksidan ajanlarla yapılan çalışmalarda gösterildiği gibi, bu çalışmada iyonize radyasyona bağlı gelişen akciğer hasarının SOR'a bağlı olarak radyasyonun indirekt etkisinden gelişebildiği gibi radyasyon grubunda CAT aktivitesinin azalması, oysa SOD aktivitesi ve MDA düzeylerinin artması iyonize radyasyonun direkt etkisinden kaynaklı olabileceğini de göstermektedir. Ayrıca gruplar arasında sayısal fark olmasına rağmen istatistiksel anlamlı değildi. Buna rağmen, antioksidan savunma sistemi pycnogenolün etkisinin antioksidan yolla olabileceğini desteklemektedir.

Comet assay, DNA hasarı ve onarımının değerlendirilmesi için, duyarlı, hızlı ve basit bir teknik olarak kullanılır (186). Bu yöntemle hemen hemen tüm dokularda DNA hasarını değerlendirmek mümkündür (187). Kültüre edilmiş hücrelerin kullanılmasıyla yapılan in vitro deneyde, 1-3 Gy iyonize radyasyonun neden olduğu DNA hasarını belirlemişler (188) bir de in vitro 0.25-2 Gy radyasyon doz aralığı ve DNA hasar derecesi, doz-cevap ilişkisini gözlemlemişlerdir (189).

Bu yöntemde, DNA hasarını değerlendirmek için az sayıda hücre gerekir ve % baş DNA (head DNA), % kuyruk DNA (tail DNA), kuyruk uzunluğu, kuyruk momenti, olive tail moment (OTM) gibi çeşitli comet parametreleri yardımıyla tek hücre düzeyinde DNA hasarı ölçmek mümkündür.

Bu çalışmada da akciğer doku DNA'sında, radyasyona bağlı meydana gelen tek ve çift iplik kırılmalarını belirlemek için nötral comet tekniği kullanıldı. Sıçanların tüm vücut gama radyasyonuna maruz kalması akciğer dokularında hücresel DNA hasarıyla sonuçlandı ve comet parametrelerinde (L head, L tail, L comet, tail DNA, TM ve OTM paremetrelerinde) artma gözlendi. Radyasyon grubunda, kontrol grubu, antioksidan gruplar ve radyasyon + antioksidan gruplara göre L head, L tail ve L comet değerlerinde artma gözlendi. L head, L tail ve L comet değerlerinde artış radyasyonun akciğerde hücresel hasara yol açtığını göstermektedir. Kontrol grubunda, antioksidan gruplar, radyasyon grubu ve radyasyon + antioksidan gruplara göre L head, L tail ve L comet değerlerinde azalma bulundu. Antioksidan gruplarda L head, L tail ve L comet

değerlerinde artma sapandı. Bu artma bize antioksidanın toksik etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Radyasyon + antioksidan gruplarda L head, L tail ve L comet değerlerinde azalma kaydedildi, bu azalmış değerler antioksidanın radyo koruyucu etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Radyasyon + antioksidan grupların kontrol grubundan yüksek ve radyasyon grubundan daha düşük olması radyasyonun hücresel hasarına karşı pycnogenolün hücreyi koruduğunu göstermektedir. L head, L tail ve L comet değerleri tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde değerlendirildi.

Radyasyon grubunda, kontrol grubu, antioksidan gruplar ve radyasyon + antioksidan gruplara göre head DNA değerlerinde azalma saptandı. Bu azalma bize radyasyonun akciğerde hücresel hasara yol açtığını ve baştaki DNA miktarının kuyruğa göç ettiğini göstermektedir. Kontrol grubunda, antioksidan gruplar, radyasyon grubu ve radyasyon + antioksidan gruplara göre head DNA değerinde artma bulundu. Antioksidan gruplarda head DNA değerinde azalma gösterildi. Bu azalma bize antioksidanın toksik etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Radyasyon + antioksidan gruplarda head DNA değerlerinde artma saptandı, bu artmış değerler antioksidanın radyo koruyucu etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Bu sonuç, radyasyonun hücresel hasarına karşı pycnogenolün hücreyi koruduğunu göstermektedir. Head DNA değerleri tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde değerlendirildi.

Radyasyon grubunda, kontrol grubu, antioksidan gruplar ve radyasyon + antioksidan gruplara göre tail DNA, TM ve OTM değerlerinde artma saptandı. Tail DNA, TM ve OTM değerlerinde artış radyasyonun akciğerde hücresel hasara yol açtığını ve DNA'nın kuyruğa göç ettiğini göstermektedir. Kontrol grubunda, antioksidan gruplar, radyasyon grubu ve radyasyon + antioksidan gruplara göre tail DNA, TM ve OTM değerlerinde azalma değerlendirildi. Antioksidan gruplarda tail DNA, TM ve OTM değerlerinde artma bulundu. Bu artma bize antioksidanın toksik etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Radyasyon + antioksidan gruplarda tail DNA, TM ve OTM değerlerinde azalma saptandı, bu azalmış değerler antioksidanın radyo koruyucu etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Tail DNA, TM ve OTM değerleri tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde değerlendirildi.

Çalışmamızın comet assay sonuçlarına dayanarak, en iyi korumanın γ-ışını + P_{300} grubunda olduğunu ve radyasyonun hücresel hasarına karşı pycnogenolün hücreyi koruduğunu söyleyebiliriz. Ancak çalışmamızda Rohdewald, Trevithick et al. ve

Masquelier'in yaptığı çalışmalara benzer olarak, sağlıklı gruplarda hücre hasarının doz miktarıyla artması pycnogenolün toksik etkisi olduğunu göstermiştir (19, 157, 158).

Yapılan çalışma sonucunda, sıçanlardan alınan akciğer dokularına Hematoksilen-eozin ve Masson trikrom boyama metodları uygulandı. Histo-patolojik değerlendirmeler sonucunda, kontrol gruplarına ait dokular kendi normal histolojik doku özelliklerini gösterirken, radyasyon uygulanan dokularda başta vasküler ve interstisyel hemoraji alanları olmak üzere çeşitli hücresel hasarlar gözlendi. Kontrol grubuna ait akciğer parankimasında düzgün görünümlü tek katlı yassı epiteli ile alveoler keseler ile birlikte terminal ve respiratuvar bronşioller ile kan damarları da belirgin olarak seçilebilmekteydi. Radyasyon grubuna ait akciğer dokuları histolojik olarak incelendiğinde, akciğer parankimasında artan ödem, alveoler duvarların kalınlaşması, vasküler ve interstisyel hemoraji ve ödem gözlendi. Bu sonuçlar bize, akciğer dokusunda radyasyonun doku düzeyinde hasar oluşturduğunu göstermektedir. Antioksidan gruplarda, alveoler keselerde ve bağ dokusu alanlarında radyasyon grubuna benzer hemoraji alanları gözlendi, bu kanama bölgeleri antioksidanın dozuna bağlı olarak artmıştı. Bu artmadan antioksidanın toksik etkisi olduğunu söyleyebiliriz. Radyasyon + antioksidan gruplarında, akciğer dokusu üzerinde radyasyonun oluşturduğu hasara karşı antioksidanın koruyucu özelliği gözlenmedi, sadece γ-ışını + P_{300} grubunda hemoraji ve ödemin bölgelerinde azalma görüldü.

Sonuç olarak, radyasyon uygulamasından önce verilen 300 mg/kg pycnogenol, enzim, hücre ve doku düzeyinde akciğer dokusunu iyonize radyasyon hasarına karşı en iyi korumuştur.

5.2. Karaciğer

Karaciğer genellikle üst abdomen, sağ akciğer, distal özofagus tümörlerinde abdomen radyoterapi sırasında, tüm abdomen ya da tüm vücut ışınlama sırasında kazara ışınlanır (11). İyonize radyasyon maruziyeti ciddi sağlık koşullarının geliştirilmesini gerektirir. Akut etkiler çoğunlukla hematopoetik hücre kayıpları, bağışıklık sistemi yetersizliği, mukozal hasar, karaciğer ve diğer dokularda potansiyel hasarlardır. Tüm organın ışınlanması hepatosit yetmezliği ve hepatit gibi radyasyon kaynaklı karaciğer hastalığına yol açabilir (12).

Lipid peroksidasyon ürünlerinden olan MDA, radyasyona bağlı oksidatif hasarın göstergesidir. Bu çalışmada da radyasyona bağlı karaciğer hasarını göstermek için doku MDA düzeyleri ölçüldü. Radyasyon grubunda, kontrol grubu, antioksidan gruplar ve radyasyon + antioksidan gruplara göre MDA düzeyinde artma saptandı. MDA düzeylerinde artış radyasyonun karaciğerde oksidatif hasara yol açtığını göstermektedir. Antioksidan gruplar arasında en yüksek $P_{37.5}$ grubu ve en düşük P_{300} grubunda saptandı. Radyasyon + antioksidan gruplarda; en yüksek γ-ışını + P_{75} grubu ve en düşük γ-ışını + $P_{37.5}$ grubunda saptandı. γ-ışını + P_{300} grubu, kontrol grubundan daha yüksek ve radyasyon grubundan daha düşük olması radyasyonun oksidatif hasarına karşı pycnogenolün membran lipidini koruduğunu göstermektedir.

Tüm vücut ışınlaması veya lokal ışınlama yapılan çalışmalarda sıçanların akciğer, karaciğer, kolon, kalp ve ileum gibi organlarında radyasyona bağlı hasarın göstergesi olarak doku MDA düzeylerinde artma olduğu gösterilmiştir (17, 182-184).

Çalışmada radyasyon grubunda kontrol grubuna göre CAT aktivitesinde artma saptandı. Bu durum, aşırı SOR üretimine karşı antioksidan sistemin yeterli olduğunu göstermektedir. γ-ışını + P_{300} gruplarda radyasyon grubuna göre artma saptanması pycnogenolün SOR üretimine karşı yeterli olduğunu göstermektedir.

Çalışmada radyasyon grubunda kontrol grubuna göre SOD aktivitesinde azalma bulundu. Bu durum, aşırı SOR üretimine karşı antioksidan sistemin yetersiz olduğunu göstermektedir. Radyasyon + antioksidan gruplarda (γ-ışını + $P_{37.5}$ hariç) radyasyon grubuna göre artma saptanması pycnogenolün SOR üretimine karşı yeterli olduğunu göstermektedir.

Radyasyon + antioksidan gruplarda SOD ve CAT aktivitelerinde artış olduğu gözlendi. Bu iki antioksidan enzimin de birbirlerinin etkilerini potansiyelize ettiğini göstermektedir.

Bizim çalışmamıza benzer olarak, 6 Gy gama ışını uygulanmış sıçan karaciğer dokusunda, kontrol grubuyla radyasyon grubu karşılaştırıldığı zaman SOD, GSH-Px aktivitesinde ve GSH seviyesinde kayda değer azalma ve lipid peroksidasyon seviyesinde kayda değer artma gözlenmiştir (190).

Benzer sonuçlar, GSE tedavisinde, 8 Gy tüm vücut ışınlamasını takiben karaciğer homejenatlarında total SOD aktivitesinde kayda değer bir azalma bulunmuştur (179).

Bizim sonuçlarımızla uyumlu olarak, Jagetia (191) ve Mansour ve ark. (192) tüm vücut γ-ışını sonrası lipid peroksitlerin arttırılması ile birlikte, antioksidan sistem içinde kayda değer bir azalma kaydetmiştir. Yine bizim çalışmamızla uyumlu olarak, tek doz 6 Gy x-ışını almış sıçan karaciğerlerinde lipid peroksidasyonunu ışınlanmış grupta daha yüksek bulmuşlardır (193).

Bu veriler daha önce oksidan ajanlarla yapılan çalışmalarda gösterildiği gibi, iyonize radyasyona bağlı gelişen karaciğer hasarının SOR'a bağlı olarak radyasyonun indirekt etkisinden gelişebildiği gibi iyonize radyasyonun direkt etkisinden kaynaklı olabileceğini de göstermektedir. Çünkü radyasyon grubunda SOD aktivitesi azalmış, oysa CAT aktivitesi ve MDA düzeyleri artmıştır. Ayrıca gruplar arasında sayısal fark olmasına rağmen istatistiksel anlamlı değildi.

Sonuçta, karaciğer dokusunda, radyasyon grubunda CAT aktivitelerinde artma, SOD aktivitelerinde azalma ve MDA seviyesinde artma; buna karşılık radyasyon + antioksidan grubunda CAT ve SOD aktivitelerinde artma ve MDA seviyesinde azalma tespit edilmesi, pycnogenolün koruyucu etkisinin antioksidan aktivitesine bağlı olduğunu gösterebilir.

Comet assay, DNA hasarı ve onarımının değerlendirilmesi için, duyarlı, hızlı ve basit bir teknik olarak kullanılır (186). Ueno ve ark.'nın yaptığı in vivo çalışmada, tüm vücut x-ışınıyla (3, 6, 12 ve 24 Gy) ışınlanmış farelerin karaciğer, böbrek, akciğer, dalak, timus ve beyin dokularıyla çalışmışlar, artan x-ışını dozuyla artmış DNA hasarı oranını, ışınlama periyodlarında DNA hasar tamirini değerlendirmişlerdir. Bir de aynı çalışmada in vivo DNA hasar değerlendirmesinde OTM, % tail DNA ve kuyruk uzunluğunun duyarlılığını göstermişlerdir (194).

Bu çalışmada da karaciğer doku DNA'sında, radyasyona bağlı oluşan tek ve çift iplik kırılmalarını belirlemek için nötral comet tekniği kullanıldı. Sıçanların tüm vücut gama radyasyonuna maruz kalması karaciğer dokularında hücresel DNA hasarıyla sonuçlandı ve comet parametrelerinde (L head, L tail, L comet, tail DNA, TM ve OTM paremetrelerinde) artma gözlendi.

Radyasyon grubunda, kontrol grubu, antioksidan gruplar ve radyasyon + antioksidan (γ-ışını + P_{300} grubu hariç) gruplara göre L head, L tail ve L comet değerlerinde artma gözlendi. L head, L tail ve L comet değerlerinde artış radyasyonun karaciğerde hücresel hasara yol açtığını göstermektedir. Kontrol grubunda, antioksidan gruplar, radyasyon grubu ve radyasyon + antioksidan gruplara göre L head, L tail ve L comet değerlerinde azalma bulundu. Antioksidan gruplarda L head, L tail ve L comet değerlerinde artma saptandı. Bu artma bize antioksidanın toksik etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Radyasyon + antioksidan gruplarda L head, L tail ve L comet değerlerinde azalma kaydedildi, bu azalmış değerler antioksidanın radyo koruyucu etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Radyasyon + antioksidan gruplarda iyonize radyasyonun hücresel hasarına karşı pycnogenolün hücreyi koruduğu gösterilmiştir. L head, L tail ve L comet değerleri tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde değerlendirildi.

Radyasyon grubunda, kontrol grubu, antioksidan gruplar ve radyasyon + antioksidan gruplara göre head DNA değerlerinde azalma gözlendi. Bu azalma bize radyasyonun karaciğerde hücresel hasara yol açtığını ve baştaki DNA miktarının kuyruğa göç ettiğini göstermektedir. Kontrol grubunda, antioksidan gruplar, radyasyon grubu ve radyasyon + antioksidan gruplara göre head DNA değerinde artma bulundu. Antioksidan gruplarda head DNA değerinde azalma saptandı. Bu azalma bize antioksidanın toksik etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Radyasyon + antioksidan gruplarda head DNA değerlerinde artma saptandı, bu artmış değerler antioksidanın radyo koruyucu etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Radyasyon + antioksidan gruplarda kontrol grubundan düşük ve radyasyon grubundan daha yüksek olması radyasyonun hücresel hasarına karşı pycnogenolün hücreyi koruduğunu göstermektedir. Head DNA değerleri tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde değerlendirildi.

Radyasyon grubunda, kontrol grubu, antioksidan gruplar ve radyasyon + antioksidan gruplara göre tail DNA, TM ve OTM değerlerinde artma bulundu. Tail DNA, TM ve OTM değerlerinde artış radyasyonun karaciğerde hücresel hasara yol açtığını ve DNA'nın kuyruğa göç ettiğini göstermektedir. Kontrol grubunda, antioksidan gruplar, radyasyon grubu ve radyasyon + antioksidan gruplara göre tail DNA, TM ve OTM değerlerinde azalma gözlendi. Antioksidan gruplarda tail DNA, TM ve OTM değerlerinde artma saptandı. Bu artma bize antioksidanın toksik etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Radyasyon + antioksidan gruplarda tail DNA, TM ve OTM değerlerinde azalma bulundu, bu azalmış değerler antioksidanın radyo koruyucu etkiye sahip

olduğunu göstermektedir. Radyasyon + antioksidan gruplarda kontrol grubundan yüksek ve radyasyon grubundan daha düşük olması radyasyonun hücresel hasarına karşı pycnogenolün hücreyi koruduğunu göstermektedir. Tail DNA, TM ve OTM değerleri tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde değerlendirildi.

Çalışmamızda comet sonuçlarına dayanarak, 300 mg/ kg pycnogenolün iyonize radyasyon hasarına karşı hücreyi koruduğunu ancak sağlıklı gruplarda artan dozla birlikte hücre hasarını arttığını ve pycnogenolün toksik etkisi olduğunu söyleyebiliriz. Bu sonuçlar, Rohdewald, Trevithick et al. ve Masquelier'in yaptığı çalışmalar tarafından da desteklenmektedir (19, 157, 158).

Yapılan çalışmada, sıçanlardan alınan karaciğer dokularına Hematoksilen-eozin ve Masson trikrom boyama metodları uygulandı. Histo-patolojik değerlendirmeler sonucunda, kontrol gruplarına ait dokular kendi normal histolojik doku özelliklerini gösterirken, radyasyon uygulanan dokularda başta vasküler ve interstisyel hemoraji alanları olmak üzere çeşitli hücresel hasarlar gözlendi.

Değerlendirmeler sonucunda kontrol grubuna ait karaciğer dokuları normal parankimal yapı özellikleri sergiledi. Radyasyon grubuna ait karaciğer kesitleri incelendiğinde kontrol grubundan farklı olarak, yoğun vasküler sinuzoidal hemoraji ile birlikte, eritrositlerin sıkışarak sinuzoidleri doldurmuş olduğu gözlendi. Radyasyon uygulanan bütün deney gruplarında, nekrotik hepatositlerin bulunduğu alanlar ve şişmiş hepatositler gözlendi. Ayrıca vena centralisten ışınsal tarzda uzanan sinüslerde belirgin genişleme vardı. Antioksidan gruplarda, kontrol grubuna ait karaciğer dokusunun histolojik özelliklerine benzer özellik gösterdikleri bulundu. Pycnogenol, karaciğer parankiması üzerinde herhangi bir olumsuz etki göstermedi.

Radyasyon + antioksidan gruplarda radyasyonun karaciğer dokusu üzerinde oluşturduğu olumsuz etkilere karşı düşük doz (37.5 mg /kg, 75 mg/ kg) pycnogenolün herhangi bir koruyucu etkisi görülmedi. γ-ışını + P_{150} grubuna ait karaciğer dokusunda, pycnogenolün radyasyonun zararlı etkilerine karşı olumlu bir etkiye sahip olduğu görülürken, en iyi koruyucu etkinin γ-ışını + P_{300} grubu olduğu gözlendi.

Sonuç olarak, radyasyonun karaciğer dokusu üzerine oluşturduğu olumsuz histo-patolojik etkinin, radyasyon öncesi 300 mg/kg pycnogenol verilen grupta azaldığı, karaciğer parankimasının normal karaciğer dokusu görünümüne yakın olduğu gözlendi

ve 300 mg/kg pycnogenol enzim, hücre ve doku düzeyinde karaciğer dokusunu iyonize radyasyon hasarına karşı en iyi korumuştur.

5.3. Böbrek

Terapötik abdominal ışınlama, glomerüler mesanjiyal skleroz ve tübüler dejenerasyon ile ilişkili ilerleyici böbrek hastalığının geç oluşumuna eşlik edebilir (195). Mevcut bulgulara göre, ışınlamadan sonra birkaç hafta içinde sıçan böbreğinde belirgin histolojik değişiklikler ortaya çıkar. Lezyonlar çoğunlukla glomerüler ve tübüler hücrelerde görülür. Işınlamadan 4 hafta sonra, minimal glomerüler değişiklikler gözlenir. 10. haftada, glomerular lezyonlar endotel hücre hasarı, mesanjiyal hücrelerin proliferasyon ve hipertrofi, epitel hücre şişme ve bazal membran kalınlaşması oluşur. Bu glomerüler değişim, domuzda 1989-1991 yıllarında Robbins ve arkadaşları ve farede 1990 yılında Down arkadaşları tarafından rapor edilmiştir. Benzer glomerüler değişim tüm vücut ışınlamayı takiben klinikte söz edilmiştir (196). Mesanjiyal hücrelerin sayısının arttığı ve artmış mesanjiyal matris miktarı rapor edilmiştir. Jaenke ve arkadaşları (197) ve Robbins (198), endotel hücrelerin hasarı renal radyasyon hasarında önemli birincil etkinlik gösterdiğini önermişlerdir.

Önceki literatürlerde, birkaç ilaç radyasyonun indüklediği hasarı normal dokudan azaltmak ya da önlemek için kullanılmıştır, bunlar sülfidril radikali (199) içeren pentoxifyline (200) ve glukokortikosteriod (201) bileşiklerdir. Bu ilaçların deneysel çalışmaları umut vericidir, ancak klinik kullanımda, bu ilaçlar toksik etkiler göstermiştir.

Lipid peroksidasyon ürünlerinden olan MDA, radyasyona bağlı oksidatif hasarın göstergesidir. Bu çalışmada da radyasyona bağlı böbrek hasarını göstermek için doku MDA düzeyleri ölçüldü. Radyasyon grubunda kontrol grubu, antioksidan gruplar ve radyasyon + antioksidan gruplara göre MDA düzeyinde artma gözlendi. MDA düzeylerinde artış radyasyonun böbrekte oksidatif hasara yol açtığını göstermektedir. Kontrol grubuna göre antioksidan ve radyasyon + antioksidan gruplar da MDA artmıştır. Radyasyon grubuna göre radyasyon + antioksidan gruplar da MDA düzeyinin azalması radyasyonun oksidatif hasarına karşı pycnogenolün membran lipidini koruduğunu göstermektedir.

Çalışmada radyasyon grubunda kontrol grubuna göre CAT aktivitesinde azalma bulundu. Bu durum, aşırı SOR üretimine karşı antioksidan sistemin yetersiz olduğunu göstermektedir. γ-ışını + P_{300} gruplarda radyasyon grubuna göre artma bulunması pycnogenolün SOR üretimine karşı yeterli olduğunu göstermektedir.

Çalışmada radyasyon grubunda kontrol grubuna göre SOD aktivitesinde azalma saptandı. Bu durum, aşırı SOR üretimine karşı antioksidan sistemin yetersiz olduğunu göstermektedir. γ-ışını + P_{300} grubunda radyasyon grubuna göre azalma saptanması pycnogenolün SOR üretimine karşı yetersiz olduğunu göstermektedir.

Mansour tarafından yapılan çalışmada, tek doz 6 Gy verilen sıçan böbreklerinde MDA ve NO seviyesinin arttığını, SOD ve GSH-Px aktivitelerinin azaldığını gözlediler. Işınlamadan önce 7 gün ginseng verilmiş grupta SOD ve GSH-Px aktivitelerinin kayda değer arttığını ve MDA ve NO seviyesinin kayda değer azaldığını gözledi (202).

Çalışmamıza benzer olarak, Oktem ve ark.'nın yaptığı çalışmada 900-MHz elektomanyetik radyasyon uyguladıkları sıçan böbrek dokularında MDA ve NAG seviyesinin arttığını, SOD, CAT ve GSH-Px aktivitelerinin azaldığını, melatonin uygulanan grupta MDA ve NAG seviyelerinin azaldığını, SOD, CAT ve GSH-Px aktivitelerinin arttığını gözlediler (203).

Böbrek dokusunda, radyasyon grubunda CAT ve SOD aktivitelerinde azalma, MDA seviyesinde artma; buna karşılık radyasyon + antioksidan grubunda CAT ve SOD aktivitelerinde artma ve MDA seviyesinde azalma tespit edilmesi, pycnogenolün koruyucu etkisinin antioksidan aktivitesine bağlı olduğunu gösterebilir. Bu veriler daha önce oksidan ajanlarla yapılan çalışmalarda gösterildiği gibi, iyonize radyasyona bağlı gelişen böbrek hasarının SOR'a bağlı olarak geliştiğini ve pycnogenolün etkisinin antioksidan yolla olabileceğini desteklemektedir.

Tek hücre jel elektroforez (comet assay) hücresel DNA'da iplik kırıkları, alkali bölgeleri ve çapraz bağları belirlemek için yaygın olarak kullanılır (194). Colins ve ark.'nın yaptığı çalışmada, 0-8 Gy radyasyonun indüklediği DNA hasarıyla ilişkili olarak, kuyrukta yüzde DNA'nın lineer arttığını göstermişlerdir (204).

Bu çalışmada da böbrek doku DNA'sında, radyasyona bağlı oluşan tek ve çift iplik kırılmalarını belirlemek için nötral comet tekniği kullanıldı. Sıçanların tüm vücut gama radyasyonuna maruz kalması böbrek dokularında hücresel DNA hasarıyla sonuçlandı ve

comet parametrelerinde (L head, L tail, L comet, Tail DNA, TM ve OTM) artma gözlendi.

Radyasyon grubunda, kontrol grubu, antioksidan gruplar ve radyasyon + antioksidan gruplara göre L head, L tail ve L comet değerlerinde artma bulundu. L head, L tail ve L comet değerlerinde artış radyasyonun böbrekte hücresel hasara yol açtığını göstermektedir. Kontrol grubunda, antioksidan gruplar, radyasyon grubu ve radyasyon + antioksidan gruplara göre L head, L tail ve L comet değerlerinde azalma saptandı. Antioksidan gruplarda L head, L tail ve L comet değerlerinde artma gözlendi. Bu artma bize antioksidanın toksik etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Radyasyon + antioksidan gruplarda L head, L tail ve L comet değerlerinde azalma saptandı, bu azalmış değerler antioksidanın radyo koruyucu etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Radyasyon + antioksidan grubunun kontrol grubundan yüksek ve radyasyon grubundan daha düşük olması iyonize radyasyonun hücresel hasarına karşı pycnogenolün hücreyi koruduğunu göstermektedir. L head, L tail ve L comet değerleri tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde değerlendirildi.

Radyasyon grubunda, kontrol grubu, antioksidan gruplar ve radyasyon + antioksidan gruplara göre head DNA değerlerinde azalma saptandı. Bu azalma bize radyasyonun böbrekte hücresel hasara yol açtığını ve baştaki DNA miktarının kuyruğa göç ettiğini göstermektedir. Kontrol grubunda, antioksidan gruplar, radyasyon grubu ve radyasyon + antioksidan gruplara göre head DNA değerinde artma gözlendi. Antioksidan gruplarda head DNA değerinde azalma saptandı. Bu azalma bize antioksidanın toksik etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Radyasyon + antioksidan gruplarda head DNA değerlerinde artma saptandı, bu artmış değerler antioksidanın radyo koruyucu etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Radyasyon + antioksidan grubunun kontrol grubundan düşük ve radyasyon grubundan daha yüksek olması radyasyonun hücresel hasarına karşı pycnogenolün hücreyi koruduğunu göstermektedir. Head DNA değerleri tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde değerlendirildi.

Radyasyon grubunda, kontrol grubu, antioksidan gruplar ve radyasyon + antioksidan gruplara göre tail DNA, TM ve OTM değerlerinde artma kaydedildi. Tail DNA, TM ve OTM değerlerinde artış radyasyonun böbrekte hücresel hasara yol açtığını ve DNA' nın kuyruğa göç ettiğini göstermektedir. Kontrol grubunda, antioksidan gruplar, radyasyon grubu ve radyasyon + antioksidan gruplara göre tail DNA, TM ve OTM değerlerinde

azalma saptandı. Antioksidan gruplarda tail DNA, TM ve OTM değerlerinde artma bulundu. Bu artma bize antioksidanın toksik etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Radyasyon + antioksidan gruplarda tail DNA, TM ve OTM değerlerinde azalma saptandı, bu azalmış değerler antioksidanın radyo koruyucu etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Radyasyon + antioksidan grubunun kontrol grubundan yüksek ve radyasyon grubundan daha düşük olması radyasyonun hücresel hasarına karşı pycnogenolün hücreyi koruduğunu göstermektedir. Tail DNA, TM ve OTM değerleri tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde değerlendirildi.

Bizim çalışmamıza benzer olarak, Trosic ve ark.' nın yaptıkları çalışmada, comet yöntemini kullanarak elektromanyetik radyo frekansın etkisini sıçan beyin, karaciğer ve böbrek hücrelerinde, DNA hasar parametrelerinden kuyruk uzunluğunu kullanarak ışınlanmış sıçanların karaciğer ve böbreklerinde kayda değer DNA hasarı bulmuşlardır (205).

Çalışmamızdaki comet sonuçlarına dayanarak pycnogenolün iyonize radyasyon hasarına karşı böbrek hücrelerini koruduğunu ancak sağlıklı hücre gruplarında da toksik etki gösterdiğini söyleyebiliriz. Benzer sonuçlar, Rohdewald, Trevithick ve ark. ve Masquelier' in yaptığı çalışmalarda da gözlenmiştir (19, 157, 158).

Yapılan çalışmada, sıçanlardan alınan böbrek dokularına Hematoksilen-eozin, Masson trikrom ve periodik asit Schiff boyama metodları uygulandı. Histo-patolojik değerlendirmeler sonucunda, kontrol gruplarına ait dokular kendi normal histolojik doku özelliklerini gösterirken, radyasyon uygulanan dokularda başta vasküler ve interstisyel hemoraji alanları olmak üzere çeşitli hücresel hasarlar gözlendi. Kontrol grubuna ait böbrek dokuları parankimasında böbrek cisimcikleri (renal korpuskülleri), proksimal ve distal kıvrıntılı tübüller, peritübüler kapillerler ve medullar ışınlar düzgün yerleşimliydi ve glomerüller ve tübüller normal histolojik özellik gösterdiler. Radyasyon grubun böbrek dokusu histolojik olarak incelendiğinde, kontrol grubuna göre son derece önemli ve anlamlı dejereneratif değişiklikler gösterdiği gözlendi, hem interstisyel bağ dokusu alanlarında hem de renal korpusküllerin glomerüllerinde belirgin hemoraji incelendi. Böbreğin histo-patolojik incelenmesinde tübüllerde ve glomerüllerde belirgin değişikliklerin olduğu gözlendi. Tübüllerde ve interstisyel dokuda erken değişiklikler dikkat çekti. Böbrek dokusunda radyasyonun hücresel hasara neden olduğu gözlendi. Antioksidan gruplarda, tübül hücrelerinde belirgin hasar mevcuttu. Böbreğin histo-

patolojik incelenmesinde radyasyon grubuna benzer, tübüllerde ve glomerüllerde belirgin değişikliklerin olduğu gözlendi, bu hasar verilen antioksidan miktarıyla artmaktaydı. Bu sonuç bize, antioksidanın böbrek dokusunda toksik etkisinin olduğunu göstermektedir.

Radyasyon + antioksidan gruplardan 37.5 mg/kg ve 75 mg/kg pycnogenolün radyasyon üzerine herhangi bir koruyucu etkisi görülmedi. γ-ışını + P_{150} ait böbrek dokusunda, pycnogenolün radyasyonun zararlı etkilerine karşı olumlu bir etkiye sahip olduğu görülürken, en iyi γ-ışını + P_{300} grubunda olduğu gözlendi. Radyasyonun böbrek dokusu üzerine oluşturduğu olumsuz histo-patolojik etkinin, radyasyon öncesi 300 mg/kg pycnogenol verilen deney grubunda azaldığı ve böbrek parankimasının normal böbrek dokusu görünümüne yakın olduğu gözlendi.

Sonuç olarak, radyasyonun böbrek dokusu üzerine oluşturduğu olumsuz histo-patolojik etkinin, radyasyon öncesi 300 mg/kg pycnogenol verilen grupta azaldığı, böbrek parankimasının normal böbrek dokusu görünümüne yakın olduğu gözlendi ve 300 mg/kg pycnogenol enzim, hücre ve doku düzeyinde böbrek dokusunu iyonize radyasyon hasarına karşı en iyi koruduğu görüldü.

5.4. Pycnogenol

Fransız deniz çam kabuğu ekstresi olan pycnogenol, iskorbüt hastalığı, cilt yaraları ve yaraların tedavisi için geçmişte bir tıbbi malzeme olarak kullanılmıştır (206). Pycnogenol fenol, polifenol, flavonoid ve taksifolin karışımı yoğunlaştırılmış flavonoitdir (207) ve güçlü bir antioksidan etkiye sahip olduğu bilinir (22). Günümüzde, pycnogenolün moleküler temeli hakkında yeterli bilgi olmamasına rağmen, çeşitli durumlar için yararlı bir besin takviyesi olarak genel nüfusta yaygın olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte, bugüne kadar çeşitli çalışmalar pycnogenolün bazı biyolojik aktivitelerini tanımlamışlardır. İnsan umbilikal damar endotelyal hücreleri (HUVEC)' de, pycnogenol TNF-α kaynaklı VCAM-1 ve ICAM-1 ifadesini bastırmış, ateroskleroz, iltihaplanma, iskemik vasküler bozukluklar ve kanser metastazında önemli bir rol oynamaktadır (207). Keratinositlerde, pycnogenol UV radyasyon kaynaklı NF-kB-bağımlı gen ekspresyonunu inhibe etmiştir (208). İlk çalışmalar pycnogenolün 3T3 L-1 hücrelerinde tanımlanmış mekanizmalar olmadan lipogenezi inhibe ettiği ve lipolizi uyardığını göstermiştir (209).

Pycnogenol, Avrupa ülkelerinde besin takviyesi olarak kullanılmaktadır. Hipertansiyon ve astım semptomlarını iyileştirmesi, endotel fonksiyonunu modüle etmesi ve sperm aktivitesini artırma ve nöro-koruma ile ilişkili olduğu belgelenmiştir (19, 27, 210-212). Bu etkiler, pycnogenolü temsil eden bileşik sınıflarının serbest radikal süpürücü aktivitesi ve anti-inflamasyon gibi pleiotropik aktivitelerine bağlanmıştır (19, 213).

Pycnogenol, serbest radikallerin güçlü süpürücülerini aktive ederek ve anti-oksidatif enzimleri intrasellüler sentezi ikiye katlayarak çeşitli hücre sistemlerini oksidatif strese karşı korur. Diğer antioksidan etkileri C ve E vitamini yenilenmesi ve korunmasında rol alır. UV-radyasyona bağlı eritem pycnogenolün oral yolla alınmasını takiben klinik bir çalışmada bulunmuştur (19).

Pycnogenolde en az 40 farklı molekül tanımlanmış, monomerik (kateşin, epikateşin, taxifolin) ve polimerik flavonoidler (prosiyanidinler) ve organik asitler en önemli bileşenleridir (19, 22). Önceki çalışmalar flavonoidlerin zengin anti-proliferasyon ve anti-kanser ajanlar olduğunu göstermiştir (158, 214-216). Pycnogenol bir de antioksidan aktiviteye (154), antiinflamator özelliklere (217) ve MCF-7 hücrelerde anti kanser etkiye (218) sahip olduğu ortaya çıkmıştır.

Pycnogenol, miyeloid löseminin belirli bir farklılaşma indükleyicisi olduğunu göstermiş, HL-60, U937 ve K562 hücrelerinin farklılaşmasının indüklenmesinde belirgin özelliklerin farklı hücre tiplerinde gen ekspresyonunun diferansiyel nedeniyle olabileceği, bununla birlikte, pycnogenolde kateşin, prosiyanidinler ya da diğer bileşenlerin anti-kanser aktivitesinde önemli rol oynayıp oynamadığının takip edilmesi gerektiği bildirilmiştir (217).

Ancak bazı çalışmalarda, pycnogenolün az da olsa toksik etkisi olduğu bildirilmiştir. Oral yoldan alan hastaların küçük bir yüzdesinde pycnogenol, istenmeyen akut ve kronik hafif toksik etkiye sahiptir (19). İnkübe edilmiş lensler üzerinde potansiyel toksik etkiye sahip olmasına rağmen, in vivo önemli derecede koruyucu etkiye sahip olduğu ve kayda değer protein glikasyonunu azalttığı görülmüş, Cognis US (Henkel Chemical Co.) ve Horphag Research tarafından desteklenmiştir (149). Pycnogenol sıçanlarda düşük toksisiteye (LD50: 3 g/kg os) sahiptir ve teratojenik ya da mutajeniktir değildir (158).

Bizim çalışmamızda da pycnogenolün antioksidan ve radyo koruyucu özelliği olup olmadığı enzim, hücre ve doku düzeyinde araştırıldı. Kontrole göre antioksidan

gruplarda da MDA düzeyinin artması, CAT ve SOD aktivitelerinin azalması, comet parametrelerinin artması, doku histo-patolojilerinin bozulması, antioksidan savunma sisteminin yetersiz kaldığını ve pycnogenolün potansiyel toksik etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Bu veriler daha önce oksidan ajanlarla yapılan çalışmalarda gösterildiği gibi, iyonize radyasyona bağlı gelişen akciğer hasarının SOR'a bağlı olarak radyasyonun indirekt etkisinden gelişebildiği gibi iyonize radyasyonun direkt etkisinden kaynaklı olabileceğini de göstermektedir. Ancak radyasyon + antioksidan gruplarda azalan MDA düzeyi, artan CAT ve SOD aktiviteleri, comet parametrelerinin azalması, doku histo-patolojisinin düzelmesi radyasyon hasarına karşı akciğer, karaciğer ve böbrek dokusunu kayda değer koruduğunu göstermektedir.

Verstraeten ve ark. yaptığı çalışmada pycnogenolün başlıca biyoflavonoid bileşenlerinin membranöz fosfolipidlerin polar baş gruplarına bağlanarak oksidasyonları önlediği gösterilmiştir. Çalışmamızda, radyasyon + antioksidan gruplarda azalan MDA düzeyi, artan CAT ve SOD aktiviteleri bu çalışmayı desteklemektedir (24).

Çalışmamıza benzer olarak, Ramus ve ark.'nın yaptığı çalışmada sıçanlarda abdominal bölgenin x-ışınıyla ışınlanmasından sonra yapılan histo-patolojik çalışmada 300 mg/kg pycnogenolün intestinal mukozayı iyonize radyasyondan önemli ölçüde koruduğu sonucuna varılmış, bu çalışma bizim çalışmamızı desteklemektedir (31).

Sonuç olarak, SOR'u inhibe eden ve/veya temizleyici antioksidan ilaçlar iyonize radyasyona maruz kalan dokulardaki hasarı azaltarak kanserli hastalarda yararlı olabilirler. Ancak, çalışmamızda kullandığımız antioksidanın moleküler temeli hakkında yeterli bilgi olmamasından dolayı gerek preklinik ve gerekse klinik daha fazla çalışma yapılması ve özellikle etki mekanizması, toksisite ve yan etki profilinin daha net ortaya çıkarılması gerekmektedir.

6. SONUÇ

Sıçanlarda 900 cGy tüm vücut ışınlaması yapılarak iyonize radyasyona bağlı akciğer, karaciğer ve böbrek hasarı oluşturuldu, bunun göstergesi olan lipid peroksidasyon ürünlerinden MDA düzeyi, radyasyon grubunda kontrol grubuna göre yüksek bulundu. İyonize radyasyon uygulanması ile CAT ve SOD gibi antioksidan enzimlerin etkilendiği artma ve azalma meydana geldiği görüldü. Bu da iyonize radyasyonun oluşturduğu hasarın, serbest radikallerin aşırı üretilmesi; buna karşın antioksidan sistemin yeterince çalışmaması neticesinde meydana gelebileceği gibi iyonize radyasyonun direkt etkisinden kaynaklı olabileceğini göstermektedir.

Radyoterapi grubunda doku MDA düzeyinde artma olması, akciğer, karaciğer ve böbrek hasarı sırasında özellikle de membran yapılarında lipid peroksidasyonunun arttığını göstermektedir. Pycnogenol uygulaması ile MDA düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı azalma görüldü. Radyasyon + antioksidan grubunda her iki antioksidan enzim aktivitesinde de artış görülmesi, pycnogenolün antioksidan etkiye sahip bir ajan olduğu söylenebilir.

Sıçanların tüm vücut gama radyasyonuna maruz kalması akciğer, karaciğer ve böbrek dokularında comet parametrelerinde (L head, L tail, L comet, tail DNA, TM ve OTM parametrelerinde) artma gözlendi ve hücresel DNA hasarıyla sonuçlandı. DNA hasarının göstergesi olan artmış comet parametreleri akciğer, karaciğer ve böbrek dokusunda radyoterapi grubunda kontrol grubuna göre kayda değer daha yüksek saptandı. Aynı zamanda, antioksidanın verilen dozun artmasıyla comet parametrelerinde de artma gözlendi. Bu da bize antioksidanın toksik etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Ancak radyasyon + antioksidan gruplarda comet parametrelerinin azalmış olması radyasyonun

zararlı etkilerine karşı pycnogenolün radyo koruyucu bir özelliğe sahip olduğunu gösterebilir.

Akciğer, karaciğer ve böbrek dokusunda yapılan histo-patolojik değerlendirmeler sonucunda da kontrol grubuna göre radyasyon ve antioksidan gruplarda bozulmuş histo-patoloji gözlenirken, radyasyon + antioksidan gruplarda radyasyon grubuna göre düzelmiş histo-patoloji gözlendi.

Çalışmamız enzim, hücre ve doku düzeyinde değerlendirildiğinde pycnogenol; sağlıklı dokular üzerinde potansiyel toksik etkiye sahip olmasına rağmen aynı zamanda iyonize radyasyon hasarına karşı radyo koruyucu etkisi de vardır. Bu koruyucu etki en iyi γ-ışını + P_{300} grubunda gözlendi. En iyi radyo koruyucu etkiyi 300 mg/kg pycnogenol gösterdi.

Antioksidan etkileri gösterilen bir ajan olan pycnogenolün iyonize radyasyona bağlı akciğer, karaciğer ve böbrek hasarına karşı koruyucu olarak kullanılması, çalışmamızın verilerinden hareketle önerilebilir. Ancak, etki mekanizmasının ve moleküler temelinin daha iyi anlaşılması, doz, toksisite ve tolerabilite konularının daha da açıklığa kavuşması için, preklinik ve klinik çalışmalara da gerek vardır. Ayrıca daha moleküler boyutta ve çeşitli enzim çalışmaları yapılarak iyonize radyasyonu neden olduğu hasarın indirekt yolla mı yoksa bilinenin aksine direkt yolla mı olduğunun aydınlatılması gerekmektedir. Çalışmamızın gelecekte yapmayı planladığımız bu çalışmalara ışık tutacağı kanaatindeyiz.

7. KAYNAKLAR

1. Halperin EC, Perez CA, Brady LW. Perez and Brady's Principles and Practice of Radiation Oncology. Lippincott Williams&Wilkins, 438.
2. Perez CA, Brady LW. Principles and practice of radiation oncology (4nd ed). Lippincott Company, Philadelphia, 2004.
3. Cox JD, Ang KK. Radiation Oncology Rational, Technique, Results (8th ed). Mosby, 2003.
4. Hall EJ. Radiobiology for the radiologist (5th ed). Lippincott Company, Philadelphia, 2000.
5. Özalpan A. Temel radyobiyoloji (1. Basım). Haliç Üniversitesi Yayınları, 2001
6. Vujaskovic Z, Marks LB, Anscher MS. The physical parameters and molecular events associated with radiation-induced lung toxicity. Semin Radiat Oncol 2000; 10: 296–307.
7. Topuz E. Klinik Onkoloji. İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü yayınları, 2000.
8. Engin K, Özyardımcı N. Akciger Kanserleri Tanı ve Tedavide Temel İlkeler ve Uygulamalar (1. Basım). Avrupa Tıp Kitapçılık Ltd. Sti., İstanbul, 2001.
9. Rubin P, Johnston CJ, Williams JP, et al. A perpetual cascade of cytokines postirradiation leads to pulmonary fibrosis. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1995; 33: 99–109.
10. Liguang C, David MB, Zahid NR, et al. The protective effect of recombinant human keratinocyte growth factor on radiation-induced pulmonary toxicity in rats. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2004; 60: 1520–9.

11. Pan CC, Kavanagh BD, Dawson LA, et al. Radıatıon-assocıated liver ınjury. Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys 2010; 76: 94–100.
12. Khozouz RF, Huq SZ, Perry MC. Radiation-induced liver disease. J Clin Oncol 2008; 26: 4844– 4845.
13. Bergstein J, Andreoli SP, Provisor AJ, et al. Radiation nephritis following total body irradiation and cyclophosphamide in preparation for bone marrow transplantation. Transplantation 1986; 4: 63– 66.
14. Stewart FA. Radiation nephropathy after abdominal irradiation or total body irradiation. Radial Res 1995; 143: 235–237.
15. Willett CG, Tepper JE, Orlow EL, et al. Renal complications secondary to radiation treatment of upper abdominal malignances. Int. J Radiat Oneal BioI Phys 1986; 12: 1601–1604.
16. Dawson LA, Kavanagh BD, Paulıno AC, et al. Radiation-associated kidney injury. Int J Radiation Oncology Biol Phys 2010; 76: 108–115.
17. Şener G, Jahovic N, Tosun O, et al. Melatonin ameliorates ionizing radiation induced oxidative organ damage in rats. Life Sciences 2003; 74: 563–72.
18. Sime S, Reeve EV. Protection from inflammation, immunosuppression and carcinogenesis induced by UV radiation in mice by topical pycnogenol. Photochemistry and Photobiology 2004; 79: 193–198.
19. Rohdewald P. A review of the French maritime pine bark extract (Pycnogenol), a herbal medication with a diverse clinical pharmacology. Int J Clin Pharmacol Ther 2002; 40: 158–168.
20. Chida M, Suzuki K, Nakanishi-Ueda T, et al. 1999. In vitro testing of antioxidants and biochemical end-point in bovine retinal tissue. Ophthalmic Res 1999; 31: 407– 415.
21. Devaraj S, Vega-López S, Kaul N, et al. Supplementation with a pine bark extract rich in polyphenols increases plasma antioxidant capacity and alters the plasma lipoprotein profile. Lipids 2002; 37: 931–934.
22. Packer L, Rimbach G, Virgili F. Antioxidant activity and biologic properties of a procyanidin-rich extract from pine (Pinus maritima) bark, pycnogenol. Free Radic Biol Med 1999; 27: 704–24.

23. Grimm T, Chovanová Z, Muchová J, et al. Inhibition of NF-kB activation and MMP-9 secretion by plasma of human volunteers after ingestion of maritime pine bark extract (Pycnogenol®). J Inflamm 2006; 3: 1–15.
24. Verstraeten SV, Keen CL, Schmitz HH, et al. Flavan-3-ols and procyanidins protect liposomes against lipid oxidation and disruption of the bilayer structure. Free Radic Biol Med 2003; 34: 84–92.
25. Kendra I, Marsiglio S, Shaw G, et al. Pycnogenol® and vitamin E inhibit ethanol-induced apoptosis in rat cerebellar granule cells. Inc J Neurobiol 2004; 59: 261–271.
26. Kobayashi MS, Han D, Packer L. Antioxidants and herbal extracts protect HT-4 neuronal cells against glutamate-induced cytotoxicity. Free Radical Research 2000; 32: 115–124.
27. Peng QL, Buz'Zard AR, Lau BH. Pycnogenol protects neurons from amyloid-beta peptide-induced apoptosis. Mol Brain Res 2002; 104: 55–65.
28. Belcaro G, Cesarone MR, Errichi BM, et al. Venous ulcers: microcirculatory improvement and faster healing with local use of pycnogenol((r)). Angiology 2005; 56: 699–705.
29. Hosseini S, Pishnamazi S, Sadrzadeh SM, et al. Pycnogenol in the management of asthma. J Med Food 2001; 4: 201–209.
30. Lau BH, Riesen SK, Truong KP, et al. Pycnogenol as an adjunct in the management of childhood asthma. J Asthma 2004; 41: 825–832.
31. Ramos FMM, Schönlau F, Novaes PD, et al. Pycnogenol® protects against ıonizing radiation as shown in the ıntestinal mucosa of rats exposed to x-rays. Phytother Res 2006; 20: 676– 679.
32. Tubiana M. Wilhelm Conrad Röntgen and the discovery of x-rays. Bull Acad Natl Med 1996; 180: 97–108.
33. Peştreli D. Deniz Salyangozunda (Rapana Venosa) Radyosezyum Kinetiğinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul 2011: 77.
34. Kaya A. İyonize radyasyonun biyolojik etkileri. Dicle Tıp Dergisi (Journal of Medıcal school) 2002; 29: 3.

35. Lombardini ED, Pacheco-Thompson ME, Melanson MA. Radiation and other physical agents. Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology, (3rd ed) Chapter 44, 2013: 1427–1436.
36. Caner Y. Biyofiziğin Temelleri, Kardeşler Matbaası, Kayseri, 2010.
37. Dunne-Daly CF. Principles of radiotherapy and radiobiology. Seminars in Oncology Nursing 1999; 15: 250-259.
38. Casarett AP. Radiation biology. NY: American Institute of Biological Sciences and US Atomic Energy Commission 1968.
39. Tubiana M, Dutreix J. Intoduction to radiobiology. Taylor&Francis, 1990.
40. Stell GG, Adams GE, Peckham MJ. The Biogical basis of radiotherapy. Elsevier, 1983.
41. Ionizing Radiation Fact Book. Environmental Protection Agency EPA-402-F-06-061 United States, 2007; 1–5.
42. Dubois A, Danquechin DE, Wood LR, et al. Effect of gamma-irradiation on the healing of gastric biopsy sites in monkeys. An experimental model for peptic ulcer disease and gastric protection. Gastroenterology 985; 88: 375-81.
43. Daşdağ S, Çelik S. Lenfomalılarda total kan-eritrosit-plazma volümü tayini. D.O.Tıp Fakültesi Dergisi 1987; 14: 119.
44. Baker TG. Effects of ionizing radiations on mammalian oogenesis: a model for chemical effects. Environ Health Perspect 1978; 24: 31–7.
45. Floersheim G L. Differantial radioprotection of bone marrow and tumor cells by zinc aspartat. Br J Radiology 1988; 61: 501–508.
46. Hall JE. Radiobiology for the radiologist. Third edition. J.B. Lippincott Company, 1988.
47. Machlin LJ, Pendich A. Free radical tissue damage. Protective role of antioxidant nutrients. Faseb J 1987; 1: 441– 445.
48. Weiss J F, Kumor KS, Walden TL. Advences in radioprotection through the use of combined agent regimens. 1nl J Radiat BioI 1990; 57: 709–722.
49. Athar M, Abdula M, Sultana S, et al. Free radicals and trace elements. The Journal of Trace Elements in Experimental Medicine 1993; 6: 65–73.
50. Yıldırım H. Biyofizik. Anadolu Üniversitesi Basımevi, Eskişehir, 1985: 321–324.
51. Rubin P, Casarett GW. Clinical radiation pathology. Philadelphia: W. B. Saunders, 1698.

52. Görpe A, Cantez S. Pratik Nükleer Tıp. İstanbul Tıp Fakültesi Vakfı, Nobel Tıp Kitabevi, 1992: 14–17.
53. Brown M A. Resistance of human erythrocytes containing elevated levels of vitamin E to radiation- induced hemolysis. Radiat Research 1993; 95: 303–316.
54. Chandrasekharan DK, Kagıya TV, Krishnan CKN. Radiation protection by 6-palmitoyl ascorbic acid-2-glucoside: Studies on DNA damage in vitro, ex vivo, in vivoand oxidative stress in vivo. J Radiat Res 2009; 50: 203–212.
55. Watters D. Molecular mechanisms of ionizing radiation-induced apoptosis. Immunol Cell Biol 1999; 77: 263–71.
56. Manabe N, Goto Y, Matsuda-Minehata F, et al. Regulation mechanism of selective atresia in porcine follicles: regulation of granulosa cell apoptosis during atresia. J Reprod Dev 2004; 50: 493–514.
57. Morita Y, Perez GI, Paris F, et al. Oocyte apoptosis is suppressed by disruption of the acid sphingomyelinase gene or by sphingosine-1- phosphate therapy. Nat Med 2000; 6: 1109–14.
58. Kaya H, Desdicioğlu R, Sezik M, et al. Does sphingosine-1-phosphate have a protective effect on cyclophosphamide- and irradiationinduced ovarian damage in the rat model? Fertil Steril 2008; 89: 732–5.
59. Hanoux V, Pairault C, Bakalska M, et al. Caspase-2 involvement during ionizing radiation-induced oocyte death in the mouse ovary. Cell Death Differ 2007; 14: 671–681.
60. Tilly JL, Tilly KI, Kenton ML, et al. Expression of members of the bcl-2 gene family in the immature rat ovary: equine chorionic gonadotropin-mediated inhibition of granulosa cell apoptosis is associated with decreased bax and constitutive bcl-2 and bcl-x long messenger ribonucleic acid levels. Endocrinology 1995; 136: 232–41.
61. Lee CJ, Kim HT, Song KW, et al. Ovarian expression of p53 and p21 apoptosis regulators in gamma-irradiated mice. Mol Reprod Dev 2008; 75: 383–91
62. Hsueh AJW, Billig H, Tsafriri A. Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. Endocrine 1994; 15: 707–24.
63. Barrett A, Depledge MH, Powles RL. Interstitial pneumonitis following bone marrow transplantation after low dose rate total body irradiation. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1983; 9: 1029–33.

64. Cosset JM, Baume D, Pico JL, et al. Single dose versus hyperfractionated total body irradiation before allogeneic bone marrow transplantation: a non-randomized comparative study of 54 patients at the Institut Gustave-Roussy. Radiother Oncol 1989; 15: 151– 60.
65. Abratt RP, Morgan GW. Lung toxicity following chest irradiation in patients with lung cancer. Lung Cancer 2002; 35: 103–109.
66. Fleckenstein K, Zgonjanin L, Chen L, et al. Temporal onset of hypoxia and oxidative stress after pulmonary irradiation. Int JRadiat Oncol Biol Phys 2007; 68: 196–204.
67. Zhao W, Robbins ME. Inflammation and chronic oxidative stress in radiation-induced late normal tissue injury: therapeutic implications. Curr Med Chem 2009; 16: 130–143.
68. Anthea M, Hopkins J, McLaughlin CW, et al. Human Biology and Health. Englewood Cliffs, New Jersey, USA: Prentice Hall 1993.
69. Cruz DN, Perazella MA, Mahnensmith RL. Bone marrow transplant nephropathy: A case report and review of the literature. J Am Soc Nephrol 1997; 8: 166–173.
70. Akkuş İ. Serbest Radikaller ve Fizyo-patolojik Etkileri. Mimoza Yayınları, Konya 1995.
71. Bulkley GB. The role of oxygen free radicals in human disease processes. Surgery 1983; 94: 407– 411.
72. Defraigne JO, Pincemail J, Franssen C, et al. In vivo free radical production after cross-clamping and reperfusion of the renal artery in the rabbit. Cardiovasc Surg 1993; 1: 343–349.
73. Delibaş N, Özcankaya R. Serbest radikaller. SDÜ Tıp Fak Derg 1995; 2: 11–17.
74. Kehrer JP. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. Critical Reviews in Toxicology 1993; 23: 21– 48.
75. Padberg FT, Franco CD, Kerr JC, et al. Acute ischemia-reperfusion injury in the canine hindlimb. J Cardiovasc Surg 1989; 30: 925– 931.
76. Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease. Free radicals and tissue injury. Lab Invest 1982, 47: 412–27.
77. Cross CE, Halliwell B, Borish ET, et al. Oxygen radicals and human disease. Ann Inj Md 1987; 107: 526–545 .

78. Giardini O, Taccone-Gallucci M, Lubrano R, et al. Evidence of red blood cell membrane lipid peroxidation in haemodialysis patients. Nephron 1984; 36: 235–37.
79. Frei B. Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: Mechanisms of actio. Am J Med 1994; 97: 5–12.
80. Lee Y, Shacter E. Role of carbohydrates in oxidative modification of fibrinogen and other plasma proteins. Arch Biochem Biophys 1995; 321: 175–81.
81. Fridovich L. Superoxide radical and superoxide dismutases. Annu Rev Biochem 1995; 64: 97–112.
82. Türköz Y, Özerol E. Nitrik oksit'in etkileri ve patolojik rolleri. Turgut Özal Tıp Dergisi 1997; 4: 453–61.
83. Mercan U. Toksikolojide serbest radikallerin önemi. YYU Vet Fak Derg 2004; 15: 91–6.
84. Atalık KE, Dogan N. Nitirk oksit ve fizyolojik etkileri. Genel Tıp Dergisi 1997; 7: 167–9.
85. Marletta MA. Nitric oxide synthase structure and mechanism. J Biol Chem 1993; 268: 1231–5.
86. Hennekens CH. Health promotion and disease prevention: the role of antioxidant vitamins: proceedings of a symposium. Am J Med 1994; 97: 139–141.
87. Southard JH, Marsh DC, McAnulty JF, et al. Oxygen-derived free radical damage in organ preservation: activity of superoxide dismutase and xanthine oxidase. Surgery. 1987; 101: 566–70.
88. Niki E. Antioxidants in relation to lipid peroxidation. Chemistry and Physics of Lipids 1987; 44: 227–253.
89. Tappel AL. Vitamin E as the biological lipid antioxidant. *Vitamins Hormones 1962;* 20*:* 493–510.
90. Tappel AL. Lipid peroxidation damage to cell components. Fed Proc 1973; 32: 1870– 4.
91. Mead JF. Free radical mechanisms in lipid peroxidation and prostaglandins, in: Free Radicals in Molecular Biology**.** Aging and Disease (D. Armstrong, R. S. Sohal, R.G.Cutler and T.F. Slater eds.) Raven Press, New York, 1984: 53–66.
92. Burton GW, Foster DO, Perly B, et al. Biological antioxidants. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 1985; 17: 565–578.

93. Durak K, Bilgen ÖF, Kaleli T, et al. Antioxidant effect of alfa-tocopherol on fracture haematoma in rabbit. J Int Med Res 1996; 24: 419–424.
94. Takenaka Y, Miki M, Yasuda H, et al. The effect of alpha-tocopherol as an antioxidant on the oxidation of membrane protein thiols induced by free radicals generated in different sites. Arch Biochem Biophys 1991; 285: 344–350.
95. Traber MG, Packer L. Vitamin E. Beyond antioxidant function. Am J Clin Nutr 1995; 62: 1501–1509.
96. Liebler DC. The role of metabolism in the antioxidant function of vitamin E. Crit Rev Toxicol 1993; 23: 147–169.
97. Burton GW, Ingold KU. Vitamin E as an in **vitro** and in vivo antioxidant**.** Annals of the New York. Acad Sci 1989; 570: 7–23.
98. Burton GW. Antioxidant action of carotenoids. J Nutr 1989; 119: 109**–**111.
99. Kunsky NI. Antioxidant functions of carotenoids. Free Radical Biol Med 1989; 7: 617–635.
100. Chan AC. Partners in defense**,** vitamin E and vitamin C. Can J Physisl Pharmacol 1993; 71: 725–731.
101. Sies H, Stahl W, Sundquist AR. Antioxidant functions of vitamins. Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids. Ann N Y Acad Sci 1992; 669:7–20
102. Wendel A. Glutathione peroxidase. Methods Enzymol 1981; 77: 325–33.
103. Fridovich I. Superoxide Dismutases. Annual Review of Biochemistry 1975; 44: 147–159.
104. Percy ME**.** Catalase: an old enzyme with a new role? Can J Biochem Cell Biol 1984; 62: 1006–1014.
105. Sevanian A, Kim E**.** Phospholipase A2 dependent release of fatty acids from peroxidized membranes**.** J Free Radic Biol Med 1985; 1: 263–271.
106. Bennicelli RP, Stepniewski W, Zakrzhevsky DA, et al. The effect of soil aeration on superoxide dismutase activity, malondialdehyde level, pigment content and stomatal diffusive resistance in maize seedlings. Environ Exp Bot 1998; 39: 203–211.
107. Halliwell B. Free radicals and antioxidants: a personel view. Nutr Rev 1994; 52: 253– 65.

108. Northwest Life Science Specialties NWLSS TM catalase activity assay, http://www.jaica.com/pdf/cat_act_kit_instruction. Product NWK-CAT 01 data sheet.
109. Jenkins RR, Tengi J. Catalase activity in sceletal muscle of varying fiber types. Experimentia 1981; 37: 67–8.
110. OxisResearch™A Division of OXIS health products, ınc. Spectrophotometric assay glutathione reductase for research, http.// www.oxfordbiomed.com, Catalog Number 21018D data sheete.
111. Tanırgan G, Koldas M, Uras F. Serbest radikaller: An introduction to free radical biochemistry. Haseki Tıp Bülteni 1994; 32: 304–8.
112. Prise K.M, Schettino G, Folkard M, et al. New insights on cell death from radiation exposure. http://oncology.thelancet.com, 2005.
113. Nair CKK, Parinda DK, Nomura T. Radioprotectors in radiotherapy. J Radiat Res 2001; 42: 21–37.
114. Mccumber LM. The potential influence of cell protectors for dose escalation in cancer therapy: An analysis of amifostine. Med Dosim 2004; 29: 139-43.
115. Little MP. Cancer after exposure to radiation in the course of treatment for benign and malignant disease. Lancet Oncol 2001; 2: 212–20.
116. Ganesh CJ. Radioprotective Potential of Plants and Herbs Against the Effects of Ionizing Radiation. J Clin Biochem Nutr 2007; 40: 74–81.
117. Getoff N, Platzer I, Winkelbauer C. Transients and cooperative action of β-carotene, vitamin E & C in biological systems in vitro under irradiation. Rad Phys Chem 1999; 55: 699–704.
118. Koyama S, Kodama S, Suzuki K, et al. Radiation-induced long-lived radicals which cause mutation and transformation. Mutat Res 1998; 421: 45─54.
119. Lund KA. Mega Doses of L-ascorbic Acid Affect Antineoplastic Effects of Ionizing Radiation in EMT6 Cells in Vitro, A Thesis for Doctor of Medicine, Yale University School of Medicine, New Haven 2006: 49.
120. Wilson RL. Free Radical Repair Mechanisms and the Interaction of Glutathione and Vitamin C and E, In Radioprotectors and Anticarcinogens, Eds. Nygard, O. F. and Simic, M. G. Academic press, NewYork 1983: 1–23.
121. Cozzi R, Ricordy R, Aglitti T, et al. Ascorbic acid and beta carotene as modulators of oxidative damage. Carcinogenesis 1997; 18: 223–228.

122. D'Andrea G. Pycnogenol: A blend of procyanidins with multifaceted therapeutic applications? Fitoterapia 2010; 81: 724–736.
123. Kähkönen MP, Hopia AI, Vuorela HJ, et al. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. J Agric Food Chem 1999; 47: 3954–62.
124. Gu L, Kelm M, Hammerstone JF, et al. Fractionation of polymeric procyanidins from lowbush blueberry and quantification of procyanidins in selected foods with an optimized normal-phase HPLC-MS fluorescent detection method. J Agric Food Chem 2002; 50: 4852– 60.
125. Escribano-Bailón T, Gutiérrez-Fernández Y, Rivas-Gonzalo JC, et al. Characterization of procyanidins of Vitis vinifera variety tinta del pais grape seeds. J Agric Food Chem 1992; 40: 1794–9.
126. Gaulejac N, Vivas N, Freitas V, et al. The influence of various phenolic compounds on scavenging activity assessed by an enzymatic method. J Sci Food Agric 1999; 79: 1081–90.
127. Touriño S, Selga A, Jiménez A, et al. Procyanidin fractions from Pinus pinaster bark: radical scavenging power in solution, antioxidant activity in emulsion and antiproliferative effect in melanoma cells. J Agric Food Chem 2005; 53: 4728–35
128. Maritime Pine Extract. United States Pharmacopeia. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, Inc 2005: 2115–6.
129. Carper J. The food pharmacy. New York: Bantam Books; 1988: 84–90.
130. http://www.integratedhealth.com/infoabstract/pycdes.html.
131. Rice-Evans CA, Miller NJ, Pananga G. Structure–antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids. Free Radic Biol Med 1996; 20: 933–56.
132. Van Jaarsveld H, Kuyl JM, Schulemburg DH, et al. Effect of flavonoids in the outcome of myocardial mitochondrial ischemia/reperfusion injury. Res Comm Mol Pathol Pharmacol 1996; 91: 65–75.
133. Blazso G, Gabor M, Sibbel R, et al. Antiinflammatory and superoxide radical scavenging activities of procyanidins containing extract from the bark of Pinus pinaster Sol. and its fractions. Pharm Pharmacol 1994; 3: 217–20.
134. Virgili F, Kobuchi H, Packer L. Procyanidins extracted from Pinus maritima (Pycnogenol): scavengers of free radical species and modulators of nitrogen

monoxide metabolism in activated murine RAW 264.7 macrophages. Free Radic Biol Med 1998; 24: 1120–9.

135. Nelson AB, Lau BH, Ide N, et al. Pycnogenol inhibits macrophage oxidative burst, lipoprotein oxidation and hydroxyl radical induced DNA damage. Drug Dev Ind Med 1998; 24: 1–6.
136. Uchida S, Edamatsu R, Hiramatsu M, et al. Condensed tannins scavenge active oxygen radicals. Med Sci Res 1987; 15: 831–2.
137. Macrides TA, Shihata A, Kalafatis N, et al. A comparison of the hydroxyl radical scavenging properties of the shark bile steroid 5-β-scymnol and plant pycnogenols. Biochem Mol Biol Int 1997; 42: 1249–60.
138. Van Acker SABE, Tromp MNJL, Haenen GRMM, et al. Flavonoids as scavenger of nitric oxide radical. Biochem Biophys Res Commun 1995; 214: 755–9.
139. Haenen GRMM, Paquay JBG, Kothouwer REM, et al. Peroxynitrite scavenging of flavonoids. Biochem Biophys Res Commun 1997; 236: 591–3.
140. Pannala AS, Rice-Evans CA, Halliwell B, et al. Inhibition of peroxynitritemediated tyrosine nitration by catechin polyphenols. Biochem Biophys Res Commun 1997; 232: 164–8.
141. Yokozawa T, Chen CP, Dong E, et al. Study on the inhibitory effect of tannins and flavonoids against the 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. Biochem Pharmacol 1998; 56: 213–22.
142. Bors W, Michel C. Antioxidant capacity of flavanols and gallate esters: pulse radiolysis studies. Free Radic Biol Med 1999; 27: 1413–26.
143. Bors W, Heller W, Michel C, et al. Flavonoids and polyphenols: chemistry and biology. In: Cadenas E, Packer L, editors. Handbook of Antioxidants. Marcel Dekker: New York 1996: 409–66.
144. Cao GH, Sofic E, Prior RL. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure–activity relationships. Free Rad Biol Med 1997; 22: 749–60.
145. Miura YH, Tomita I, Watanabe T, et al. Active oxygens generation by flavonoids. Biol Pharm Bull 1998; 21: 93–6.
146. Metodiewa D, Jaiswal AK, Cenas N, et al. Quercetin may act as a cytotoxic prooxidant after its metabolic activation to semiquinone and quinoidal product. Free Rad Biol Med 1999; 26: 107–16.

147. Jensen ON, Pedersen JA. The oxidative transformations of (+)-catechin and (−)-epicatechin as studied by ESR: formation of hydroxycatechinic acids. Tetrahedron 1983; 39: 1609–15.
148. Guyot S, Vercauteren J, Cheynier V. Structural determination of colourless and yellow dimers resulting from (+)-catechin coupling catalysed by grape polyphenoloxidase. Phytochemistry 1996; 42: 1279–88.
149. Escribano-Bailón T, Dangles O, Brouillard R. Coupling reactions between flavylium ions and catechin. Phytochemistry 1996; 41: 1583–92.
150. Singleton VL, Cilliers JJL. In: Lee CY, Whitaker JS, editors. Enzymatic browning and its prevention, 600. ACS Symp Ser 1995: 23–48.
151. Steynberg PJ, Nel RJJ, Van Rensburg H, et al. Oligomeric flavanoids. Part 27. Interflavanyl bond formation in procyanidins under neutral conditions. Tetrahedron 1998; 54: 8153–8.
152. Hemingway RW, Laks PE. Condensed tannins: a proposed route to 2R,3R-(2.3 cis)-proanthocyanidins. J Chem Soc Chem Commun 1985: 746–7.
153. Kobuchi H, Virgili F, Packer L. Assay of the inducible form of nitric oxide synthase activity: effect of flavonoids and plant extracts. Meth Enzymol 1999; 301: 503–13.
154. Noda Y, Anzai K, Mori A, et al. Hydroxyl and superoxide anion radical scavenging activities of natural source of antioxidants using the computerized JESFR30 ESR spectrometer system. Biochem Mol Biol Internat 1997; 42: 35–44.
155. Cossins E, Lee R, Packer L. ESR studies of vitamin C regeneration, order of reactivity of natural source phytochemical preparations. Biochem Mol Biol Int 1998; 45: 583–98.
156. Emerit I. Reactive oxygen species, chromosome mutation, and cancer: possible role of clastogenic factors in carcinogenesis. Free Radic Biol Med 1994; 16**:** 99–109.
157. Trevithick JR, Bantseev V, Hirst M, et al. Is pycnogenol a double-edged sword? Cataractogenic in vitro, but reduces cataract risk in diabetic rats. Curr Eye Res 2013; 38: 751–60.
158. Masquelier J. Plant extract with a proanthocyanidins content as therapeutic agent having radical scavenging effect and use thereof. (US Patent 4, 698, 360),1987.

159. Neal R, Matthew H R, Lutz P, et al. Antioxidant role of n-acetyl cysteine isomers following high dose irradiation. Free Radical Biology & Medicine 2003; 34: 689–695.
160. Belpaeme K, Cooreman K, Kirsch-Volders M. Development and validation of the in vivo alkaline comet assay for detecting genomic damage in marine flatfish. Mutation Research 1998; 415:167–184.
161. Çelik İ, Türker M, Tülüce Y. Abcisic acid and gibberellic acid cause increased lipid peroxidation and fluctuated antioxidant defense systems of various tissues in rats. Journal of Hazardous Materials 2007; 148: 623–629.
162. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the priniple of protein–dye binding. Anal Biochem 1976; 72: 248–254.
163. Yagi K. Assay for blood plasma or serum. In: Colowick SP, Kaplan NO (eds), Methods Enzymol Volume 105. Academic Press, Inc. New York, San Fransisico, London 1984: 328–31.
164. Ohkawa W, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal Biochem 1979; 95: 351–58.
165. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of süperoxide dismutase. Clin Chem 1988; 34: 497–500.
166. Aebi H. Methods of enzymatic analysis. In: Bergmeyer HV, editor. Catalase Estimation. New York: Verlag Chemic 1974; 673–84.
167. Cerda H. Detection of irradiated fresh chicken, pork and fish using the DNA comet assay. Lebensm.-Wiss. u.-Technol 1998; 31: 89–92.
168. Türk Standardı. Gıda maddeleri-ışınlanmış gıda maddelerinin belirlenmesi için DNA comet deneyi-eleme yöntemi. TS EN 13784 Aralık 2004.
169. Haines G, Marples B, Daniel P, Morris I. DNA damage in human and mouse spermatozoa after in vitro-irradiation assessed by the comet assay. Adv Exp Med Biol 1998; 444: 789–791.
170. Singh NP, Stephens RE. X-ray induced DNA double-strand breaks in human sperm. Mutagenesis 1998; 13: 75–79.
171. S. Sarıozkan, F. Canturk, A. Yay, et al. The effect of different storage temperature on sperm parameters and DNA damage in liquid stored new zealand rabbit spermatozoa. Kafkas Univ Vet Fak Derg 2012; 18: 475–480.

172. Willers H, Dahm-Daphi J, Powell SN. Repair of radiation damage to DNA. Br J Cancer 2004; 90: 1297–301.
173. Olive PL. The role of DNA single- and double-strand breaks in cell killing by ionizing radiation. Radiat Res 1998; 150: 42–51.
174. Wan XS, Ware JH, Zhou Z, et al. Protection against radiation-induced oxidative stress in cultured human epithelial cells by treatment with antioxidant agents Int J Radiat Oncol Biol Phys 2006; 64: 1475–1481.
175. Weiss JF, Landauer MR. Radioprotection by antioxidants. Ann NY Acad Sci 2000; 899: 44–60.
176. Weiss JF, Landauer MR. Protection against ionizing radiation by antioxidant nutrients and phytochemicals. Toxicology 2003; 189: 1–20.
177. Bustamante J, Lodge JK, Marcocci L, et al. Alphalipoic acid in liver metabolism and disease. Free Radic Biol Med 1998; 24: 1023–1039.
178. Castillo J, Benavente-Garcia O, Lorente J, et al. Antioxidant activity and radioprotective effects against chromosomal damage induced in vivo by X-rays of flavan-3-ols (Procyanidins) from grape seeds (Vitis vinifera): comparative study versus other phenolic and organic compounds. J Agric Food Chem 2000; 48: 1738–1745.
179. Cetin A, Kaynar L, Kocyigit I, et al. The effect of grape seed extract on radiation-induced oxidative stress in the rat liver. Turk J Gastroenterology 2008; 19: 92–98.
180. Saada HN, Said UZ, Meky NH, et al. Grape seed extract Vitis vinifera protects against radiation-induced oxidative damage and metabolic disorders in rats. Phytother Res 2009; 23: 434–438.
181. Dani C, Oliboni LS, Pasquali MAB, et al. Intake of purple grape juice as a hepatoprotective agent in Wistar rats. J Med Food 2008; 11: 127–132.
182. Şener G, Atasoy BM, Ersoy Y, et al. Melatonin protects against ionizing radiation induced oxidative damage in corpus cavernosum and urinary bladder in rats. J Pineal Res 2004; 37: 241–6.
183. Orhan O. Ratlarda Tüm Vücut Işınlaması Sonrası Vitamin E ve Amifostinin Karaciğerde Radyoprotektif Etkilerinin Lipid Peroksidasyonu Yönünden Değerlendirilmesi. Tıpta Uzmanlık Tezi, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kayseri 2002: 58.

184. Karahacıoglu E, Yıldız OG, Saraymen R. Ratlarda torakal radyoterapi ile simültane paklitaksel (Taxol) uygulamasının kardiak doku üzerine etkilerinin lipid peoksidasyonu ve histopatoloji yönünden degerlendirilmesi. Türk Onkoloji Dergisi 1999;14: 128–33.
185. Shin HS, Yang WJ, Choi EM. The preventive effect of Se-methylselenocysteine on γ-radiation-induced oxidative stress in rat lungs. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology 2013; 27: 154–159.
186. Singh NP, Stephens RE. Microgel electrophoresis: sensitivity, mechanisms, and DNA electrostretching. Mutat Res DNA Repair 1997; 383: 167–175.
187. Sasaki YF, Sekihashi K, Izumiyama F, et al. The comet assay with multiple mouse organs: comparison of comet assay results and carcinogenicity with 208 chemicals selected from the IARC monographs and U.S.NTP Carcinogenicity Database, Crit Rev Toxicol 2000; 30: 629–799.
188. Östling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. Biochem Biophys Res Commun 1984; 123: 291–298.
189. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Exp Cell Res 1988; 175: 184–191
190. Mansour HH, Hafez HF. Protective effect of Withania somnifera against radiation-induced hepatotoxicity in rats. Ecotoxicology and Environmental Safety 2012; 80: 14–19.
191. Jagetia GC. Radioprotective potential of plants and herbs against the effect of ionizing radiation. J Clin Biochem Nutr 2007; 40: 74–81.
192. Mansour HH, Hafez HF, Fahmy NM, et al. Protective effect of N-acetylcysteine against radiation induced DNA damage and hepatic toxicity in rat. Biochem Pharmacol 2008; 75: 773–780.
193. Andrade ER, Cruz IBM, Andrade VVR, et al. Evaluation of the potential protective effects of ad libitum black grape juice against liver oxidative damage in whole-body acute X-irradiated rats. Food and Chemical Toxicology 2011; 49: 1026–1032.
194. Ueno S, Kashimoto T, Susa N, et al. Assessment of DNA damage in multiple organs of mice after whole body x-irradiation using the comet assay. Mutation Research 2007; 634: 135–145.

195. Krochak RJ, Baker DG. Radiation nephritis. Clinical manifestation and pathophysiologic mecha-nism. Urology 1986; 27: 389–39.
196. Bergstein J, Andreoli SP, Provisor AJ, et al. Radiation nephritis following total body irradiation and cyclophosphamide in preparation for bone marrow transplantation. Transplantation 1986; 4: 63–66.
197. Jaenke RS, Robbins MEC, Bywaters T, et al. Capillary endothelium target site of renal radiation injury. Lab Invest 1993; 68: 396–405.
198. Robbins MEC, Jaenke RS, Bywaters T, et al. Sequential evaluation of radiation induced glomerular ultrastructural changes in the pig kidney. Radiat Res 1993; 135: 351–364.
199. Ward WF, Molteni A, Ts'ao CD, et al. Functional responses of the pulmonary endothelium to thoracic irradiation in rats; Differential modification by D. penicillamine. Int J Radiation Oncol BioI Phys 1987; 13: 1505–1509.
200. Dion MW, Hassey DH, Osborme JW. The effect of pentoxifylin on early and late radiation injury following fractinonated irradiation in C34mice. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1989; 17: 101–107.
201. Geraci JP, Mariano NS, Jackson KL. Amelioration of radiation nephropathy in rats by dexamethasone treatment after irradiation. Radiat Res 1993; 134: 86–93.
202. Mansour HH. Protective effect of ginseng against gamma-irradiation-induced oxidative stress and endothelial dysfunction in rats. EXCLI Journal 2013; 12: 766–777.
203. Oktem F, Ozguner F, Mollaoglu H, et al. Oxidative damage in the kidney ınduced by 900-mhz-emitted mobile phone: Protection by melatonin. Archives of Medical Research 2005; 36: 350–355.
204. Collins AR, Dusinsk´a M, Gedik CM, et al. Oxidative damage to DNA: do we have a reliable biomarker? Environ Health Perspect 1996; 104: 465–469.
205. Trosic I, Pavicic I, Milkovic-Kraus S, et al. Effect of electromagnetic radiofrequency radiation on the rats' brain, liver and kidney cells measured by comet assay. Coll Antropol 2011; 35: 1259–1264.
206. Chandler FR, Freeman L, Hooper SN. Herbal remedies of the Maritime Indians. J Ethnopharmacol 1979; 1: 49–68.

207. Peng Q, Wei Z, Lau BH. Pycnogenol inhibits tumor necrosis factor-α-induced nuclear factor kappa B activation and adhesion molecule expression in human vascular endothelial cells. Cell Mol Life Sci 2000; 57: 834–841.
208. Saliou C, Rimbach G, Moini H, et al. Solar ultraviolet-induced erythema in human skin and nuclear factor kappa-B-dependent gene expression in keratinocytes are modulated by a French maritime pine bark extract. Free Radic Biol Med 2001; 30: 154–160.
209. Mochizuki M, Hasegawa N. PYC stimulates lipolysis in 3t3-L1 cells via stimulation of beta-receptor mediated activity. Phytother RES 2004; 18: 1029–1030.
210. Horakova L, Licht A, Sandig G, et al. Standardized extracts of flavonoids increase the viability of PC12 cells treated with hydrogen peroxide: effects on oxidative injury. Arch Toxicol 2003; 77: 22–9.
211. Roseff SJ. Improvement in sperm quality and function with French maritime pine tree bark extract. J Reprod Med 2002; 47: 821–4.
212. Passwater RA. Pycnogenol: the powerful antioxidant. In: The new superantioxidant-plus. New Canaan, CT: Keats Publishing Inc 1992; 15–21.
213. Hollman PC, Van-Trijp JM, Buysman MN, et al. Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid Quercetin from various foods in man. FEBS Lett 1997; 418: 152–6.
214. Csokay B, Prajda N, Weber G, et al. Molecular mechanisms in the anti-proliferative action of Quercetin. Life Sci 1997; 60: 2157–63.
215. Lepley DM, Pelling JC. Induction of p21/WAF1 and G1 cell cycle arrest by the chemopreventive agent apigenin. Mol Carcinogen 1997; 19: 74–82.
216. Erben Bayeta MS, Benjamin HS. Pycnogenol inhibits generation of inflammatory mediator in macrophages. Nutr Res 2000; 20: 249–59.
217. Huang WW, Yang JS, Lin CF, et al. Pycnogenol induces differentiation and apoptosis in human promyeloid leukemia HL-60 cells. Leukemia Research 2005; 29: 685–692.
218. Huynh HT, Teel RW. Selective induction of apoptosis in human mammary cancer cells (MCF-7) by Pycnogenol. Anticancer Res 2000; 20: 2417–20.

ÖZGEÇMİŞ

ADI : Fazile

SOYADI : CANTÜRK

DOĞUM TARİHİ : 10.10.1982

DOĞUM YERİ : Kayseri

UYRUK : T. C.

E – MAIL ADRESİ : fcanturk@erciyes.edu.tr

AKADEMİK DERECELERİ

2009–2014: Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyofizik Anabilim Dalı, Doktora, Kayseri.

2005–2009: Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyofizik Anabilim Dalı, Yüksek Lisans, Kayseri.

1999–2004: Erciyes Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Fizik Bölümü, Lisans, Kayseri.

BİLDİĞİ YABANCI DİLLER

İngilizce (ÜDS: 66.250)

MESLEKİ DENEYİM

2006–2014: Araştırma Görevlisi, Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kayseri- Türkiye

TEZLER

2009–2014: Sıçanlarda DNA hasarına neden olan iyonize radyasyona karşı pycnogenolün radyasyon koruyucu ve antioksidan etkisi (Doktora Tezi).

2004–2009: Glial tümörlerin komşu yolaklarda meydana getirdiği hasarların difüzyon ağırlıklı görüntüleme ile tespiti ve değişik b-değerlerine karşılık gelen difüzyon katsayısının hesaplanması (Yüksek Lisans Tezi).

1. AKADEMİK ÇALIŞMALAR

1.1. SSCI ve AHCI indekslerine giren dergilerde yayımlanan makaleler (INDM)

1. Sariözkan S, Tuncer PB, Büyükleblebici S, Bucak MN, **Cantürk F**, Eken A. Antioxidative Effects Of Cysteamine, Hyaluronan And Fetuin On Post-Thaw Semen Quality, Dna Integrity And Oxidative Stress Parameters In The Brown Swiss Bull. Andrologia, 2014
2. Sarıözkan S, Bucak MN, Tuncer PB, Büyükleblebici S, **Cantürk F**.
   Influence of various antioxidants added to TCM-199 on post-thaw bovine sperm parameters, DNA integrity and fertilizing ability. Cryobiology 2014; 68: 129-133
3. Sarıözkan S, Türk G, **Cantürk F**, Yay A, Eken A, Akçay A.
   The effect of bovine serum albumin and fetal calf serum on sperm quality, DNA fragmentation and lipid peroxidation of the liquid stored rabbit semen. Original Research Article Cryobiology 2013; 67 (1): 1-6
4. Sariözkan S, **Cantürk F**, Yay A, Akçay A.
   The effect of different storage temperature on sperm parameters and DNA damage in liquid stored New Zealand rabbit spermatozoa. Kafkas Univ Vet Fak Derg 2012; 18: 475-480
5. Sariözkan S, Bucak M, **Cantürk F**, Özdamar S, Yay A, Tuncer P, Özcan S, Sorgucu N, Caner Y.
   The Effects of different sugars on motility, morphology and DNA damage during the liquid storage of rat epididymal sperm at 4^0C. Cryobiology 2012; 65: 93-97
6. Tuncer P, Sariözkan S, Bucak MN, Ulutaş PA, Akalın PP, Büyükleblebici S, **Cantürk F**.
   Effects of glutamine and sugars after bull spermatozoa crypreservation. Theriogenology 2011; 5: 1459–1465

1.2. Hakemli kongre/sempozyum bildiri kitaplarında yer alan yayınlar (BILD)

1. Yakan B, Özçoban Ö, **Cantürk F,** Ġrez T, Ekmekçioğlu O, Yıldırım D Cansu P. Varikosel Olgularında Sperm Morfolojisi ve DNA Hasarlarının İncelenmesi. XII. National Histology And Embryology Congress 27-30 May 2014, Ankara University / Ankara
2. **Cantürk F**, Caner Y, Yay A, Özçoban Ö, Yıldız OG, Ceylan D. Ratlarda Tüm Vücut Işınlamasına Bağlı Karaciğer Hasarına Karşı Pycnogenolün Farklı Dozlarının Enzim, Hücre ve Doku Düzeyinde Araştırılması. Deneysel Hematoloji Kongresi & EBMT Highlight 18- 20 Nisan 2014 Kapadokya
3. **Cantürk F**, Caner Y, Özçoban Ö, Yay A, Yıldız OG. Pycnogenolün Antioksidan ve Radyokoruyucu Özelliğinin 18Gy Gama Işınına Maruz Kalmış Rat Böbreklerinde Enzim, Hücre ve Doku Düzeyinde Araştırılması. Deneysel Hematoloji Kongresi & EBMT Highlight 18- 20 Nisan 2014 Kapadokya
4. **Cantürk F**, Caner Y, Özçoban Ö, Akkuş D, Yıldız OG. Tüm Vücut Işınlamasına Maruz Kalmış Rat Böbreklerinde Pycnogenolün Radyokoruyucu Etkisinin Araştırılması. Elektromanyetik Alanlar ve Etkileri, İstanbul/ Türkiye, 8-9 Kasım 2013
5. **Cantürk F**, Caner Y, Akkuş D, Özdoğan K, Sönmez MF. Different Cryopreservation Protocols For Comet Assay In Tissues. 1st Cell Death Research Congress with International Participation, pp.120, Çeşme - İzmir / Turkey, 30th October - 3rd November 2013
6. **Cantürk F**, Caner Y, Yay A, Korkmaz GÖ, Yıldız OG. The Protective Role Of Pycnogenol Against Whole-Body Gamma Radiation-Induced Lungs Toxicity In Rats. 1st Cell Death Research Congress with International Participation, pp.112, Cesme - Izmir / Turkey, 30th October - 3rd November 2013
7. **Cantürk F**, Caner Y, Yay A, Yıldız OG, Korkmaz GÖ. Radioprotective Effect Of Different Doses Of Pycnogenol Against Liver Damage Induced By Whole-Body Irradiation In Rats. 1st Cell Death Research Congress

with International Participation, pp.113, Çeşme - İzmir / Turkey, 30th October - 3rd November 2013

8. **Cantürk F**, Caner Y, Yay A, Yıldız OG, Korkmaz GÖ.
Radioprotective Effect Of Pycnogenol In Rat Kidneys Exposed To 18 Gy Gamma Irradiation. 1st Cell Death Research Congress with International Participation, pp.114, Çeşme - İzmir / Turkey, 30th October - 3rd November 2013
9. Sariözkan S, **Cantürk F**, Yay A, Özdamar S, Akçay A.
Yeni Zelanda Irkı Tavşanlarda Yaşın Spermatolojik Parametreler Ve Dna Hasarı Üzerine Etkileri. Laboratuvar Hayvanları Bilimi 3. Ulusal Kongresi, ss.1, Kayseri /Türkiye, 26-28 Eylül 2013
10. Sariözkan S, **Cantürk F**, Yay A, Akçay A, Caner Y.
The effect of different storage temperature on sperm parameters and DNA aamage in liquid stored New Zealand rabbit spermatozoa. 4th International Congress on Cell Membranes and Oxidative Stress: Focus on Calcium Signaling and TRP Channels, Isparta / Turkey, 26-29 June 2012
11. Sorgucu N, Caner Y, **Cantürk F,** Sorgucu U, Özcan S.
İnfrared ısıtıcıların yenidoğan fare derisindeki etkilerinin Comet Assay ile araştırılması. 23.Ulusal Biyofizik Kongresi, Oral Presentation, Edirne / Türkiye,13-16 Eylül 2011
12. Sarıözkan S, Bucak MN, Tuncer PB, **Cantürk F.**
Farklı Şekerlerin 4^0C'de depolanmış epididimal rat spermatozoasının spermatolojik parametreleri ve DNA hasarı üzerine etkileri. 6. Ulusal Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Bilim Kongresi. (Uluslararası Katılımlı), 18-22 Mayıs 2011
13. **Cantürk F**, Caner Y, Sorgucu N,Sarıözkan S, Özcan S, Yay A.
Investigate Comet Assay of effects in the testis of newborn mice of infrared heaters. 9th International Comet Assay Workshop, Kuşadası-Aydın / Türkiye,13-16 September 2011

14. Sarıözkan S, **Cantürk F**, Yay A, Özdamar S, Caner Y, Akçay A.
The effect of carnitine on DNA damage in rabbit semen during liquid storage at 4^0C. 9th International Comet Assay Workshop, Kuşadası-Aydın / Türkiye, 13-16 September 2011

15. **Cantürk F**, Caner Y, Sorgucu N, Yay A, Sarıözkan S.
    Hayvan hücrelerinde DNA Comet Assay. 22. Ulusal Biyofizik Kongresi, Aydın / Türkiye, 28 Eylül-1 Ekim 2010.
16. Sorgucu N, Caner Y, **Cantürk F**, Özcan S.
    Radyasyona maruz kalmış farklı tip bitki hücrelerindeki DNA hasarının Comet Yöntemi ile tespiti. 22. Ulusal Biyofizik Kongresi, Oral Presentation, Aydın / Türkiye, 28 Eylül-1 Ekim 2010
17. Caner Y, **Cantürk F**, Tucer B, Gökoğlu AK, Öztürk M.
    Apparent diffusion coefficient in the glial tumors. The 2nd International Biophysics Congress and Biotechnology at GAP & 21st National Biophysics, Diyarbakır / Turkey 5-9 October 2009
18. Caner Y, **Cantürk F**, Tucer B, Gökoğlu AK, Öztürk M.
    Determined of glial tumors with diffusion weighted ımaging. The 2nd International Biophysics Congress and Biotechnology at GAP & 21st National Biophysics, Diyarbakır / Turkey, 5-9 October 2009

1.3. Sertifika, kurs ve eğitimler

1. Stem Cell Applications: From Bench Side To Bed Side, LLP / Erasmus Intensive Program, Hungary-Gyor 2014
2. Enerji Alanlarını Keşfetmek, Lösemi ve Lenfoma Derneği, Kayseri 2014
3. Intermediate Level English Course, Deulcom International, Kayseri 2013
4. Stem Cell Applications: From Bench Side To Bed Side, LLP / Erasmus Intensive Program, Kayseri 2013
5. Araştırmalarda Farkındalık ve Odaklanma, TÜBİTAK EKUAL ve Taylor & Francis Group, Kayseri 2012
6. 2nd Embryonic Stem Cell, Training course I-III Management and Business of Stem Cell Technologies and Basics of Mammalian Cell Culture, Erciyes Stem Cell & Genocell Company, Kayseri 2010
7. DNA Comet Analiz Yöntemi, Türkiye Atom Enerjisi Kurumu -Ankara, Türkiye Atom Enerjisi Kurumu, 2009
8. International Symposium on Current Topics in Diagnostic Medical Physics, AAPM International Scientific Exchange Programs (ISEP), Ankara 2009

9. Araştırıcılar İçin Deney Hayvanları Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası, Erciyes Üniversitesi, 2009

10. Hücresel Tedavi Kursu, Erciyes Üniversitesi, 2009

11. Manyetik Rezonans Görüntüleme, Difüzyon Ağırlıklı Görüntüleme, Görevbaşı Eğitimi, GATA-Ankara, 2008

12. Konfokal Görüntüleme Teknikleri ve Uygulamaları Semineri, Leica Microsystems Gantenbein, Türkiye, 2007

1.4. Ulusal ve uluslararası kongreler

1. Deneysel Hematoloji Kongresi & EBMT Highlight 18- 20 Nisan 2014 Kapadokya

2. Elektromanyetik Alanlar ve Etkileri, İstanbul, Kasım 2013

3. 1st Cell Death Research Congress with International Participation, İzmir Ekim 2013

4. Laboratuvar Hayvanları Bilimi 3.Ulusal Kogresi, Kayseri Eylül 2013

5. 4th International Congress on Cell Membranes and Oxidative Stress: Focus on Calcium Signaling and TRP Channels, Isparta, Haziran 2012

6. 9th International Comet Assay Workshop, Kuşadası-Aydın, Eylül 2011

7. 1st International Conference on Stem Cell Research and Aplications, Kayseri, Ekim 2011

8. Embryonic Stem Cells Seminar, Erciyes Üniversitesi Biyoteknoloji ve Araştırma Merkez, Kayseri, Mayıs 2010

9. XXII. Ulusal Biyofizik Kongresi, Aydın, Eylül 2010

10. XII.Ulusal Medikal Fizik Kongresi, Ankara, Ekim 2009

11. 2nd International Biophysics Congress and Biotechnology at GAP &21st National Biophysics Congress, Diyarbakır, Ekim 2009

12. 1.Ulusal Hücresel Tedavi ve Rejeneratif Tıp Kongresi, Nevşehir, Mart 2009

13. XX. Ulusal Biyofizik Kongresi, Mersin, Ekim 2008

14. Sinir Bilimleri Araştırmalarında Elektrofizyolojik Yöntemlerin Kullanımı, Workshop, Kayseri, Mayıs 2008

15. Genç Bilim İnsanları İle Beyin Biyofiziği II:Beyin Asimetresi ve Kognitif Ölçümlerde Multidisipliner Yaklaşım, Çalıştay , İzmir, Şubat 2008

2. BİLİMSEL ÜYELİKLER

1. Türk Biyofizik Derneği

2. Hücre Ölümü Araştırma Derneği

3. ETKİNLİK ORGANİZASYONU

1.Deneysel Hematoloji Kongresi & EBMT Highlight 2014, Deneysel Araştırma Kurulu Üyesi, Nevşehir, Türkiye, 2014

4. ARAŞTIRMA ALANLARI

1. Biyofizik

2. DNA hasarı

3. Antioksidanlar

5. ALINAN ÖDÜLLER

1.Translasyonel Hematoloji Ödülü,2014

6. PROJELER

6.1. Tamamlanmış araştırma projeleri

1. TSA-08-334 - Y.Lisans Tezi, Araştırmacı 30.06.2008- 30.06.2010

Gial tümörlerin difüzyon ayrılığı görüntüleme ile tesbit edilmesi.

2.TSY-10-3121- Y.Lisans Tezi, Araştırmacı 06.05.2010 - 28.10.2011

Elektromanyetik radyasyonun yeni doğan fare derisindeki etkilerinin Comet assay ile Araştırılması

3.TSA-11-3538 – Normal Araştırma, Araştırmacı 39.04.2011- 03.04.2013

Kök Hücre Proteini Piwil2 nin Prostat Epitel Hücrelerinin Kanser Kök Hücrelerine Geçişindeki Rolünün LNCaP Hücre Hattında Araştırılması

6.2. Devam eden araştırma projeleri

1. TCD-2013-4127 Çok Disiplinli A., Araştırmacı 25.01.2013

Karayemiş (Laurocerasus officinalis Roem.) Meyve Ekstresinin Rat Dokularında Dimetoatın İndüklediği Toksisiteye Karşı Koruyucu Etkilerinin Araştırılması.

2. TYL-2013-4598 Y.Lisans Tezi, Araştırmacı 12.06.2013-

Varikosel olgularında sperm morfolojisi ve DNA hasarlarının incelenmesi.

3. TYL-2013-4388 Y.Lisans Tezi, Araştırmacı 26.02.2013-

Ratlarda iskemi/reperfüzyon esnasında insulin ve metformin verilmesinin kalbi koruyucu etkisi.

4. TSD-2012-3936-Doktora Tezi, Araştırmacı 14.03.2012-

Ratlarda DNA hasarına neden olan iyonize radyasyona karşı pycnogenolün- radyasyon koruyucu ve ntioksidan etkisi.