

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
RADYASYON ONKOLOJİSİ
ANABİLİM DALI
Prof. Dr. Arif Bülent Aras

WİSTER-ALBİNO SIÇANLARDA IŞINLAMA SONRASI İNTESTİNAL
MUKOZADA OLUŞAN DEĞİŞİKLİKLER VE ASKORBİK ASİDİN
KORUYUCU ETKİSİ

UZMANLIK TEZİ
Dr. Barbaros AYDIN

TEZ YÖNETİCİSİ
Doç. Dr. Deniz YALMAN

İZMİR, 2010

TEŞEKKÜR

Tezimin yazım aşamasında rutin iş temposunun yoğunluğuna rağmen büyük bir özveriyle bana yardım eden tez danışmanım Doç. Dr. Deniz YALMAN'a,

Tezime konu bulunması ve çalışmanın oluşturulması sırasında benden yardımlarını ve bilgi paylaşımını esirgemeyen Doç. Dr. Serra ARUN KAMER'e,

Deneklerin patolojik incelemelerini büyük bir dikkat ve titizlikle yapan Patoloji Anabilim Dalından Doç. Dr. Başak DOĞANAVŞARGİL'e,

Simulasyon sırasında yoğun iş tempolarına rağmen yardımlarını esirgemeyen simülatör teknisyenlerine,

Fizik planlama sırasında yardımlarını esirgemeyen Fiz.Yüksek mühendisi Hakan EREN'e

Asistanlık hayatım boyunca bana destek olan tüm hocalarım, birlikte çalıştığım tüm uzman ve asistan arkadaşlarıma,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Barbaros Aydın

İÇİNDEKİLER

	Sayfa no
1. GİRİŞ VE AMAÇ	4
2. GENEL BİLGİLER	7
2.1. İyonizan Radyasyonun Etki Mekanizması	7
2.2. Radikaller ve Etkileri	10
2.3. Antioksidanlar	21
2.4. C Vitamini	26
2.5. İntestinal Mukozanın Yapısı ve Radyasyonun Oluşturduğu Hasarlar	31
3. GEREÇ VE YÖNTEM	35
4. BULGULAR	39
5. TARTIŞMA	50
6. SONUÇLAR	55
7. ÖZET	56
8. KAYNAKLAR	58

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser tedavisinde kullanılan iyonizan radyasyon etkilediği bölgelerde serbest radikal oluşumuna sebep olarak istenmeyen sistemik ve lokal hasarlara yol açmaktadır. Bu hasarlar özellikle reaktif oksijen atom ve moleküllerinin aşırı üretimine, dokuların pro-oksidan/anti-oksidan dengesinin değişmesine, protein, lipid ve DNA oksidasyonuna bağlıdır. Bu tepkimeler neticesinde hastalarda ciddi yan etkiler oluşabilmektedir. Oysa tedavideki amaç hastalığı en az yan etki ile tedavi ederek yaşam kalitesini arttırmaktır. Son yıllarda geliştirilen daha etkin tedavilerle kanserli hastalarda yaşam süresinin uzaması yaşam kalitesinin önemini ortaya çıkarmış ve yaşam kalitesini yükseltecek önlemler üzerinde daha fazla durulmasına yol açmıştır. Bu bağlamda araştırılan konulardan bir tanesi de antioksidanlardır. Kanser hastalarında antioksidan savunmanın yetersiz olduğu düşünülerek antioksidan desteğiyle gerek yan etkiler, gerekse hastalığın geriletilebileceği yönünde çok sayıda çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmaların bir kısmı C vitamininin kanserle ilişkisini ve radyasyon hasarını önlemedeki rolünü araştıran çalışmalardır.

Antioksidan olan C vitamini gibi bileşiklerin normal dokuyu radyasyonun ve bazı kemoterapi ajanlarının istenmeyen etkilerinden koruduğu uzun yıllardan beri bilinmektedir. C vitamini normal dokularda bir antioksidandır. Kanser hücresinde ise bir antioksidan enzim olan katalaz miktarı çok düşüktür. C vitamini hücre içindeki bakır ve demir ile reaksiyona girerek pro-oksidan haline geçer. Bu reaksiyonlar sonucunda küçük miktarlarda bir serbest radikal olan hidrojen peroksit oluşur. Bu serbest oksidan radikaller kanserli hücrelerde nötralize edilemez ve tahrip olurlar.¹ Böylece C vitamini kanser hücresindeki farklı metabolizmalar nedeni ile kanserli dokuda oksidan hale geçer. Ayrıca kanser hücreleri kollajenaz salgılamaları nedeniyle bağ dokusuna zarar verirler. C vitamininin kollajen sentezini artırıcı etkisiyle bu olumsuz durumu kısmen engellediği düşünülmektedir. C

vitamini α -interferon düzeyini yükselterek immun sistemi güçlendirici ve enfeksiyonlara karşı direnci arttırıcı özelliğinin yanı sıra kemikte kalsiyum birikimini arttırarak da ağrı eşiğini azaltmaktadır.^{2,3,4} Kanserli hastalara C vitamini verilmesiyle yapılan çalışmaların uzun takip sürelerinde ciddi bir komplikasyon gözlenmemiştir.⁵ Antioksidanların diğeri bir önemli rolü de radyasyonun oluşturduğu hasarlar üzerindeki koruyucu etkileridir. Bir hücrenin iyonizan radyasyona maruz kalması ile hücre içinde oluşan serbest radikaller hücrenin çeşitli bileşenlerinde hasara yol açmaktadır. Antioksidanlar hücre çekirdeğinde DNA hasarının tamirine yardımcı olarak, hücre membranında lipid peroksidasyonunu azaltarak, lipid radikallerini yok ederek, antioksidan kapasitesi olan mitokondrinin bu kapasitesini arttırarak ve apoptozu engelleyerek hücreyi radyasyon hasarına karşı korurlar.⁶

Radyasyon hasarına en fazla hücre yenilenmesi hızlı olan dokularda rastlanır. Gastrointestinal kanal, kemik iliğinden sonra radyasyonun etkilerine karşı en duyarlı sistemdir. Özellikle pelvik bölgeye radyoterapi uygulanan hastaların yaklaşık 1/4'inde ortaya çıkan kısa dönem yan etkilerin en ciddilerinden birinin radyasyon enteriti olduğu bilinmektedir.⁷ İyonizan radyasyonun intestinal mukozadaki akut etkisi kriptlerdeki epitelyal mitozun inhibisyonuna bağlıdır.⁸ Mitotik aktivitesi yüksek olan Lieberkühn bezi hücreleri ölür, villus duvarında düzleşme ve ülserasyonun yanı sıra septik infiltrasyon gelişir. Epitel hasarının sonucunda elektrolit, su ve protein kaybı ortaya çıkar. Yapısı bozulan epitelin geçirgenliği de değiştiğinden bağırsak içindeki bakteri ve antijenler artarak mukozal inflamasyona, hatta bakteriyemiye yol açarlar. Ortaya çıkan hasarların büyük oranda serbest radikal kaynaklı olduğu ve antioksidan maddeler kullanarak olumsuz etkilerin kısmen önlenebileceği ortaya konmuştur.

Bütün bu veriler eşliğinde güçlü bir antioksidan olduğu kanıtlanmış olan C vitamininin radyoterapi sürecinde serbest radikallerin oluşturacağı normal doku hasarına karşı etkili olabileceği düşünülmüş, bu bağlamda bir hayvan deneyi modeli oluşturularak radyoterapinin

oksidatif hasarına karşı C vitamininin koruyucu etkisinin özellikle radyoterapiye erken yanıt veren intestinal mukozada morfolojik incelemelerle ortaya konması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İyonizan Radyasyonun Etki Mekanizması

İyonizan radyasyonun biyolojik etkileri dendiğinde aklımıza daha çok canlı hücrelerdeki etki gelse de, gerçekte iyonizan radyasyonun yol açtığı tüm biyolojik hasarlar atomlarla etkileşme sonucu ortaya çıkar. Atomların dış orbitallerindeki elektronlar kimyasal reaksiyonlarda önemli rol oynarlar. Radyasyonun etkisiyle bu elektronlardaki değişimler maddenin kimyasal özelliğini değiştirir. Atomlar molekülleri, moleküller hücreleri, hücreler dokuları, dokular organları, organlar bütün vücudu etkiler. Hücre içindeki DNA, RNA gibi makromoleküllerde veya su moleküllerindeki bu değişimler radyasyonun doğrudan veya dolaylı etkileri olarak ikiye ayrılır:

1. Doğrudan etki (Direkt etki)

Eğer radyasyon DNA molekülünün atomlarıyla veya hücrenin yaşamı için önemli olan yapıların atomlarıyla doğrudan etkileşirse, buna direkt etki denir. Böyle bir etkileşim hücrenin çoğalma ve yaşama yeteneğini etkiler. Eğer kromozomların uygun replikasyonunu bozacak kadar çok atom etkilenmişse ve DNA molekülünün taşıdığı bilgide belirgin bir değişiklik ortaya çıkmışsa hücrenin yaşamsal sistemi doğrudan hasar görür.

2. Dolaylı etki (İndirekt etki)

İyonizan radyasyon sonucu oluşan bazı ara ürünler başka bir dizi kimyasal reaksiyona girerek diğer moleküllerin değişmesine neden olurlar. Radyasyonun hücrenin çok küçük kısmını oluşturan DNA ile etkileşime girme olasılığı çok düşüktür. Hücre %70-90 oranında su içerdiğinden indirekt etkiler, direkt radyasyon etkilerinden daha önemlidir ve radyasyon hasarlarının büyük ölçüde indirekt yoldan olduğu kabul edilmektedir. Radyasyon suyla etkileştiğinde su molekülünü bir arada tutan kimyasal bağlar kırılarak hidrojen ve hidroksiller

açığa çıkar. Açığa çıkan bu moleküller diğer yapılarla tepkimeye girerek hücreye zarar verebilecek hidrojen peroksit gibi serbest radikallerin oluşumuna neden olur.

Radyasyonun enerjisinin absorblanmasıyla biyolojik etkinin ortaya çıkışı fiziksel, kimyasal ve biyolojik kademe olmak üzere üç kademe gerçekteşir (Şekil 1).

1. Fiziksel kademe

İyonlaştırıcı radyasyon ile canlı dokuları oluşturan atom ve moleküller arasındaki ilk etkileşimleri kapsar. Bu kademe radyasyonun enerjisi maddeye transfer edilir ve bu olay radyasyonu absorblayan maddenin moleküllerinde iyonlaşma ya da uyarılmalara yol açar. Bu iyonlaşmalar sonucunda oluşan serbest elektronlar diğer komşu atomlarda da iyonlaşmalara neden olarak zincirleme bir iyonlaşma olayını başlatır. Bu olaylar 10^{-18} - 10^{-12} sn gibi çok kısa bir zaman sürecinde gerçekteşir (Şekil 1).

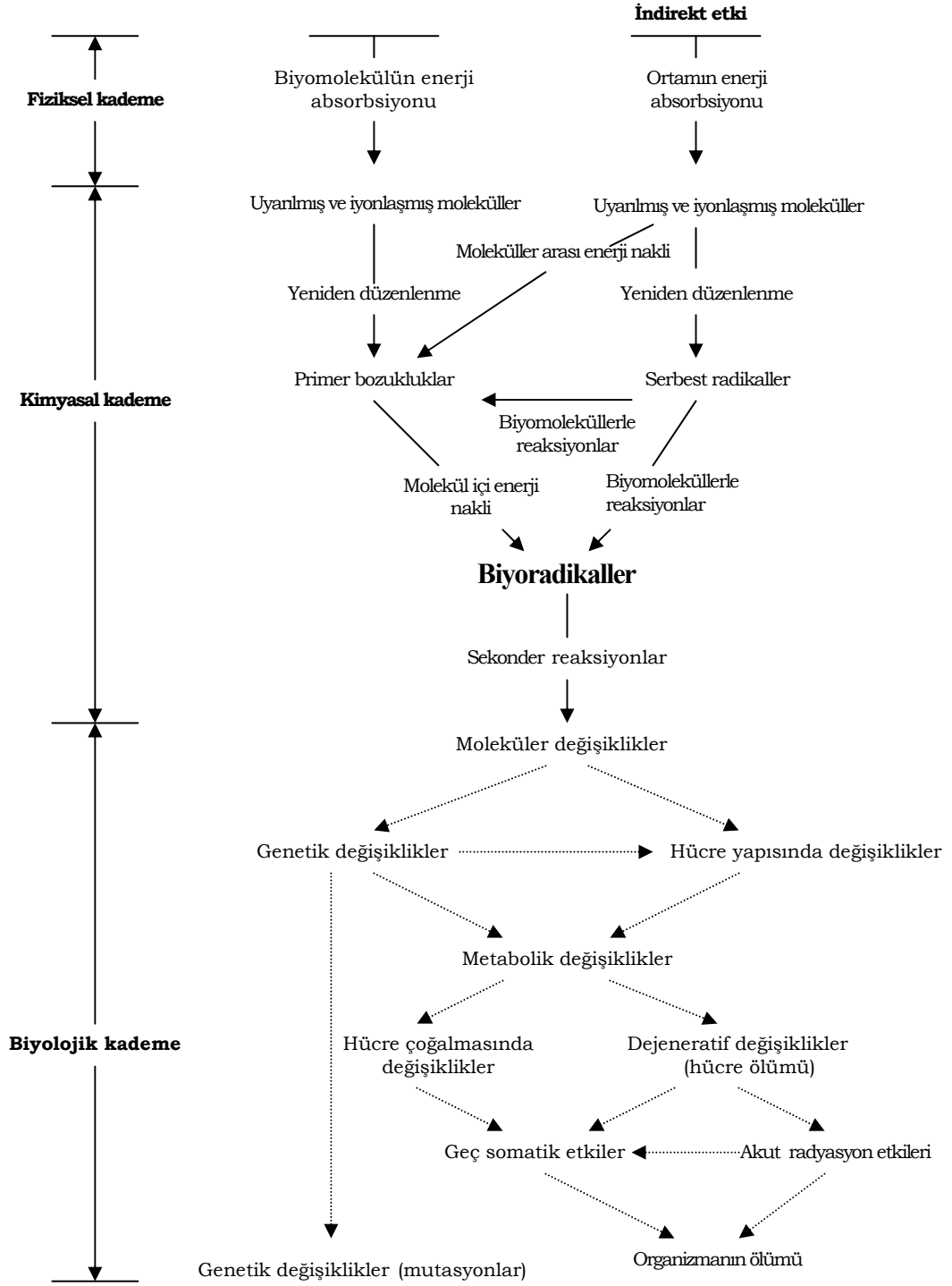
2. Kimyasal kademe

Fiziksel kademe ortaya çıkan yeni ürünler genellikle son derece kararsızdırlar ve çok kısa bir süre içinde sekonder reaksiyonların gerçekteşmesine yol açarlar. Kimyasal kademe hasar görmüş atom ve moleküller diğer hücrese yapılar ile reaksiyona girerler. Bu reaksiyonlar basit ya da karmaşık zincirleme reaksiyonlar şeklinde gelişebilir ve serbest radikallerin oluşmasına yol açar. Çok reaktif olan bu yapılar hem kendileri, hem de ortamdaki diğer moleküllerle tepkimelere girerler. Bu olaylar 10^{-12} sn ile birkaç saat sürebilir.

3. Biyolojik kademe

Radyasyonun etkisi ile oluşan tüm moleküler değişiklikler biyolojik kademeyi başlatırlar. Bu kademe boyunca canlıda meydana gelen olaylar radyasyonun son biyolojik etkisinin ortaya çıkmasına sebep olurlar. Biyolojik kademe çeşitli hasarlara yol açan enzim reaksiyonları ile başlar. DNA molekülünde oluşan hasarların bir kısmı onarılabılır. Onarılamayan hasarlar hücre ölümüne yol açar. Bunun yanında genetik bozukluklar ve kanser

oluşumu gibi geç biyolojik etkiler de ortaya çıkabilir. Biyolojik kademe saatler, hatta yıllar sürebilir.

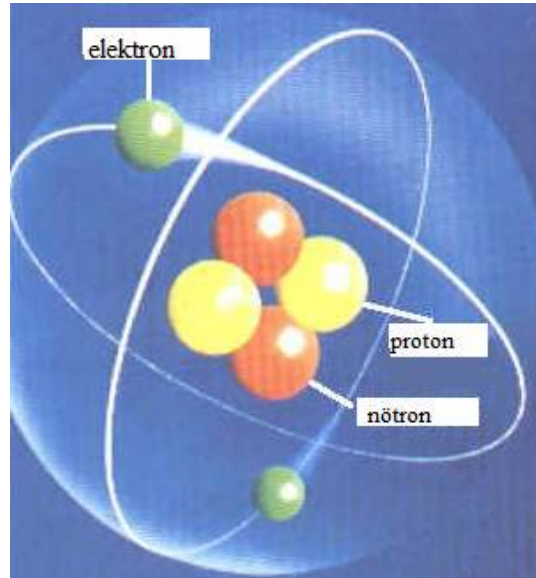


Şekil 1. Radyasyonun canlıdaki etki kademeleri.

Hücrelerin hepsinin radyasyona duyarlılığı aynı değildir. Aktif olarak çoğalan hücreler daha duyarlıdır. Çünkü bölünen hücreler yaşayabilmek için doğru DNA bilgisine ihtiyaç duyarlar. Radyasyonun aktif bir hücreyle doğrudan etkileşimi hücrenin ölümüne veya mutasyona uğramasına yol açar. Aktif olarak bölünmeyen hücrelerde ise radyasyonun etkisi daha azdır. Lenfositler ve kanı oluşturan hücreler sürekli çoğalan hücreler olduğundan radyasyona en duyarlı hücrelerdir. Üreme sistemi ve gastrointestinal sistem hücreleri lenfositlere göre daha yavaş çoğalırlar ancak radyasyona oldukça duyarlıdır. Sinir ve kas hücreleri en yavaş çoğalan hücreler olduğundan radyasyona dirençlidirler. Organların radyoduyarlılığı da organı oluşturan hücrelerin radyoduyarlılığıyla paraleldir.

2.2. Radikaller ve Etkileri

Atomlar, proton ve nötronlardan oluşan pozitif yüklü bir çekirdek ve çekirdeğin etrafında bulunan negatif yüklü elektronlardan oluşur (Şekil 2).



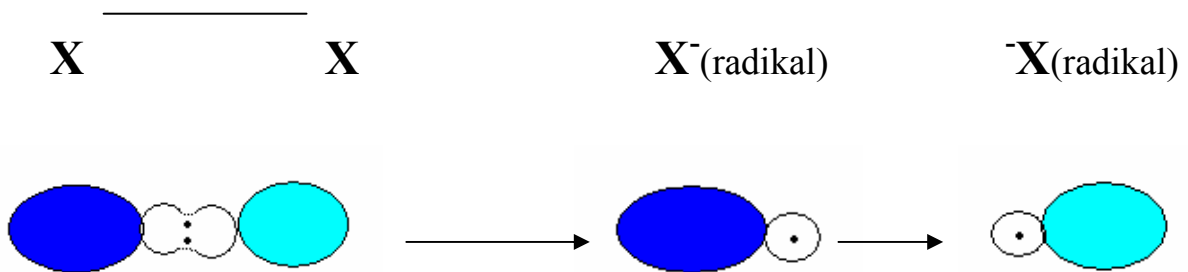
Şekil 2. Atomun yapısı.

Çekirdek etrafında ışık hızı ile hareket eden elektronların bulunduğu yere orbital denir. Atom veya moleküller, yörüngelerindeki elektronlar eşleşmiş ve ters pozisyonda yer aldıklarında kararlı bir yapı gösterirler. Bu kararlı yapı eşleşmemiş elektron bulduklarında bozulur.^{9,10,11} Yörüngesinde bir veya daha fazla sayıda eşleşmemiş elektron bulduran molekül, atom veya iyon **radikal** denir. Başka bir ifadeyle serbest radikaller, negatif yüklü elektron sayısı, pozitif yüklü proton sayısı ile eşit olmayan moleküllerdir.^{9,12}

Tüm kimyasal ve biyokimyasal tepkimeler atomların dış orbitallerindeki elektronlar seviyesinde gerçekleşir. Dış orbitallerde paylaşılmamış elektron bulunması durumunda yapının reaktivitesi olağanüstü arttığı için, radikaller reaktivitesi çok yüksek olan kimyasal türlerdir ve canlı hücrede bulunan tüm moleküllerle reaksiyona girebilirler. Radikaller başlıca üç temel mekanizma ile oluşur:

1. Kovalent bağların homolitik kırılması

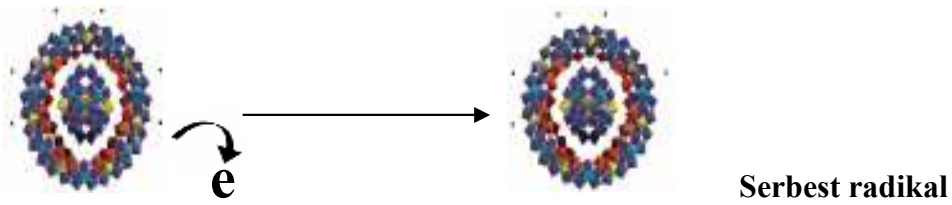
Yüksek enerjili elektromanyetik dalgalar ve yüksek sıcaklık kimyasal bağların kırılmasına neden olur. Kırılma sırasında bağ yapısındaki iki elektronun her biri ayrı ayrı atomlar üzerinde kalıyorsa, bu tür kırılmaya homolitik kırılma denir ve her iki atom üzerinde de paylaşılmamış elektron kalır (Şekil 3).



Şekil 3. Kovalent bağların homolitik kırılması.

2. Normal bir molekülün elektron kaybetmesi

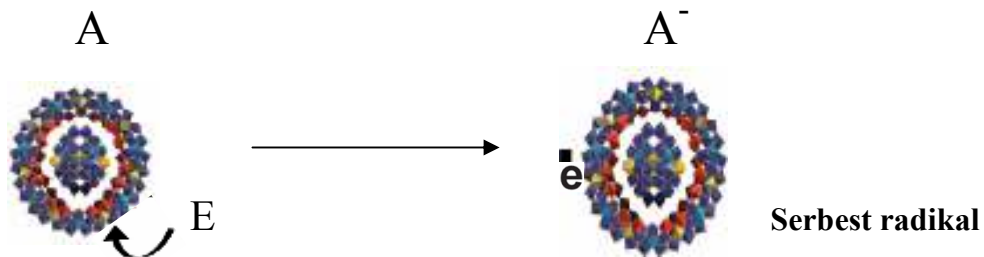
Radikal özelliği bulunmayan bir molekülden elektron kaybı sırasında dış orbitalinde paylaşılmamış elektron kalıyorsa radikal formu oluşur. Örneğin askorbik asit, glutatyon ve tokoferoller gibi hücresele antioksidanlar, radikal türlere tek elektron verip radikalleri indirgerken, kendilerinin radikal formu oluşur (Şekil 4).



Şekil 4. Normal bir molekülün elektron kaybetmesi.

3. Normal bir moleküle elektron transferi

Radikal özelliği taşımayan bir moleküle tek elektron transferi ile dış orbitalinde paylaşılmamış elektron oluşuyorsa bu tür indirgenme radikal oluşumuna neden olabilir (Şekil 5). Örneğin moleküler oksijenin tek elektron ile indirgenmesi, radikal formu olan superoksidin oluşumuna neden olur. Superoksit radikalının yapımındaki artış da, oksijenin diğer radikal türlerinin ve diğer atom merkezli radikallerin oluşumu için tetik fonksiyonu görür.



Şekil 5. Normal bir moleküle elektron transferi.

İnsan vücudunda pekçok serbest radikalın varlığı gösterilmekle birlikte, en yaygın olanları oksijen kaynaklı serbest radikallerdir. Atmosferimizde fotosentetik canlıların faaliyeti sonucu oluşan oksijen molekülü en bol bulunan moleküllerden biridir. Oksijen bütün canlılar için vazgeçilmez bir element olup hidrojen, karbon, nitrojen ve kükürt ile birlikte organik moleküllerin temel yapısal atomlarını oluşturur. Bunun yanında, aerobik canlıların enerji metabolizmasındaki rolü nedeniyle hayati bir öneme sahiptir. Bilinen bütün canlı türleri, organik moleküllerin içindeki şekli ile oksijene gereksinim duysalar da, serbest formdaki moleküler oksijen her canlı türü için aynı anlamı ifade etmez. Aerobik canlılar yaşamları için mutlaka moleküler oksijene gereksinim duyarken, anaerobik canlılar oksijene bağımlı değildirler. Anaerobik canlılarda oksijenin toksik etkisinin nedeni, oksijenden kaynaklanan bazı reaktif yapıların biyolojik molekülleri oksitlemeleri ve bu reaktif yapılara karşı anaerobik canlılarda savunma sisteminin bulunmamasıdır. Oksijen sadece anaerobik canlılarda değil yaşamları için mutlaka moleküler oksijene bağımlı olan aerobik canlılarda da toksik etki gösterebilir. Oksijenin canlılardaki toksik etkileri başlıca iki mekanizma ile gerçekleşir:

1. Enzim inhibisyonu

Aerobik canlılarda gözlenen oksijen toksisitesinin ilk açıklaması, moleküler oksijenin bazı enzimleri inhibe ettiği şeklindedir. Örneğin oksijen, glutamat dekarboksilaz enzimini inhibe ederek beyinde gamma-amino-butirik-asit (GABA) düzeyini düşürmektedir. Ancak oksijenin enzim inhibisyonu etkisi çok sınırlı ve zayıftır.

2. Serbest oksijen radikalleri

İlk kez 1954 yılında, oksijenin biyolojik sistemlerde görülen toksik etkilerinin, oksijenin bazı reaktif bileşiklerinden kaynaklanabileceği ileri sürülmüştür.¹³ Bugün oksijenin canlılardaki toksik etkisinin oksijen radikalleri olarak adlandırılan ve oksijenin vücuttaki metabolizması sırasında oluşan reaktif bileşiklerden kaynaklandığı bilinmektedir. Oksijen metabolizmada en son suya indirgenirken, kısmi olarak indirgenmesi ile de çok sayıda reaktif

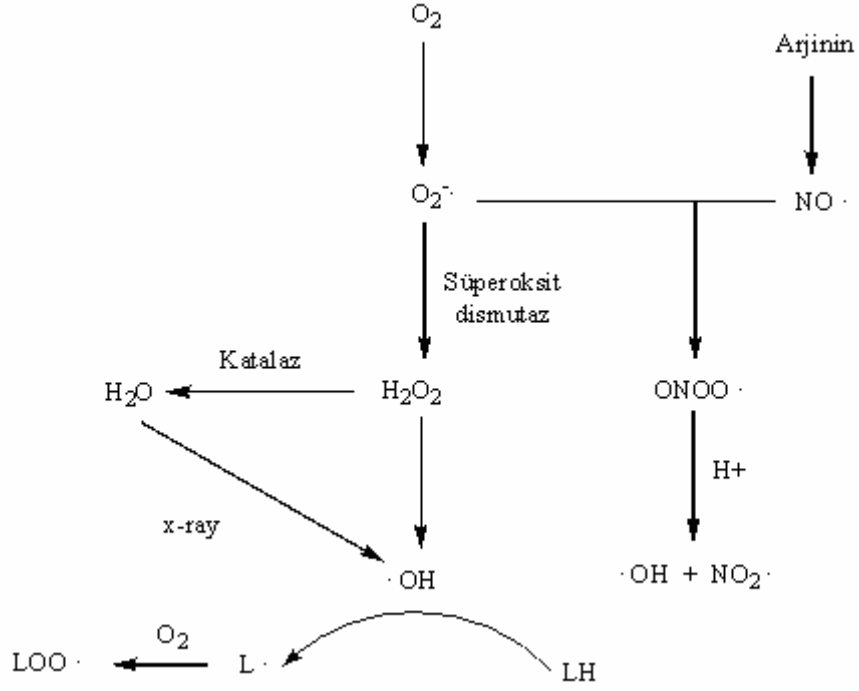
oksijen türleri (reactive oxygen species=ROS) oluşmaktadır.^{9,12,14} Tablo 1'de bazı reaktif oksijen türleri ve tahmini yarı ömürleri gösterilmiştir.

Tablo 1. Reaktif oksijen türleri ve tahmini yarı ömürleri ^{8,14}

	Reaktif oksijen türleri	Yarı ömür (sn)
O_2^-	Süperoksit anyon radikali	Enzimatik
H_2O_2	Hidrojen peroksit	Enzimatik
OH^\cdot	Hidroksil radikali	10^{-9}
1O_2	Singlet oksijen	10^{-6}
RO^-	Alkoksil radikali	10^{-6}
ROO^-	Peroksil radikali	7
Q^-	Semikinon radikali	Günler
NO^-	Nitrik oksit radikali	0,1-10 sn
$ONOO^-$	Peroksinitrit	0.05-1

Kararsız halde olan bu moleküller çevrelerindeki diğer moleküller ile reaksiyona girerek onlardan elektron alıp kararlı hale gelmeye çalışırlar^{15,16} (Şekil 6). Reaktif oksijen bileşikleri, maruz kalınan miktar ve süreye bağlı olarak hücre fonksiyonlarını bozarlar.^{9,17}

Vücutta gerçekleşen ve oksidasyon denen bir grup kimyasal reaksiyon sonucunda ortaya çıkan serbest radikaller, özellikle DNA üzerinde hasara yol açarak birçok hastalığa zemin hazırlamaktadır. Biyolojik ihtiyacın üzerinde üretilen radikaller gözlenen toksik etkilerden sorumludurlar. Düşük miktarlardaki radikal yapımının etkileri çok uzun bir süreç sonunda -örneğin yaşlanma sonunda- görülürken, yüksek miktarda ve yaygın radikal yapımının etkileri daha kısa sürede ve patolojik bir durum olarak karşımıza çıkabilir.



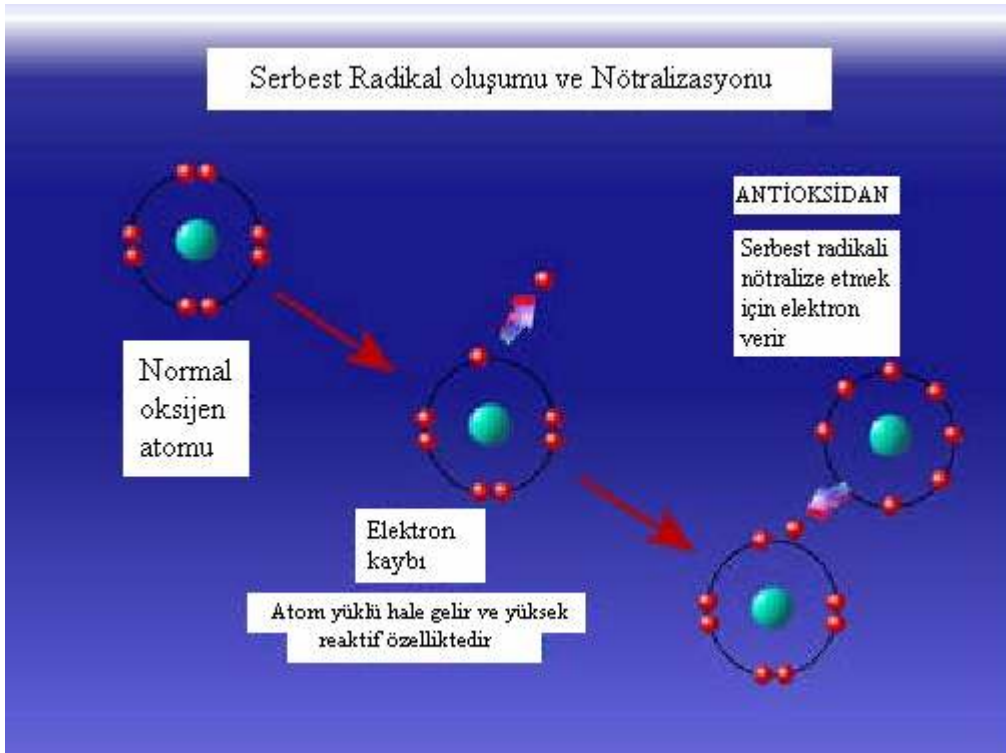
Şekil 6. Reaktif oksijen türlerinin oluşumu. ¹⁷

Bulduğumuz çevrede çeşitli fiziksel etkenler ve kimyasal olaylar nedeniyle devamlı bir radikal yapımı vardır. Normal biyokimyasal tepkimeler sırasında oluşan oksijen radikalleri ile çeşitli biyolojik fonksiyonları yerine getirmek üzere üretilen nitrik oksidin miktarları genellikle çok düşüktür. Düşük yoğunluktaki reaktif türler, hücrelerin antioksidan sistemleri tarafından inaktive edildiklerinden önemli toksik etkilere neden olmazlar. Ancak bu radikallerin yapımları çeşitli patolojik durumlarda artabilir, çoğunlukla da her iki radikal bileşik grubunun oluşumu birbiri ile paralel seyrederek. Örneğin inflamasyon durumlarında aktive olan lökositler aynı anda hem oksijen radikallerini, hem de nitrik oksidi yüksek yoğunlukta sentezlerler. Nitrik oksit, oksijen radikalleri ile tepkimeye girerek veya oksijenli ortamlarda oksitlenerek, kendisinden çok daha reaktif türlerin oluşumuna neden olur. Oksidan stres diye adlandırılan oksijen radikallerinin fazla yapımının neden olduğu etkilerin toplamını nitrik oksidin reaktif türlerinden kaynaklanan toksik etkilerden ayırmak mümkün

olmadığından oksidatif hasar, superoksitten kaynaklanan radikaller ile nitrik oksidin reaktif türlerinin neden olduğu hasarların bir toplamı olarak değerlendirilir.^{9,18,19}

Oksijen radikallerinin etkisiyle ortaya çıkabilecek oksidatif hasarları önlemek amacıyla canlı sistem tarafından gerçekleştirilen pek çok korunma mekanizması vardır. Bunlar intrasellüler ve ekstrasellüler olmak üzere iki gruba ayrılır.^{9,19,20}

İlk ve temel antioksidan savunması enzimatik olarak yapılmaktadır (Şekil 7). En önemli intrasellüler enzimlerin süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon redüktaz (GSSG-R) ve katalaz (KAT) olduğu bilinmektedir. Sonraki savunma hattı ise ekstrasellüler nonenzimatik antioksidanlar tarafından oluşturulur. Bunlar E vitamini, C vitamini, β -karoten, transferrin, seruloplazmin, albumin, haptoglobin gibi bileşiklerdir.^{9,18,21}



Şekil 7. Serbest radikallerin antioksidanlarla nötralizasyonu.

Serbest radikallerin etkisiyle ortaya çıkan bozuklukların başında çeşitli hücre zarlarındaki lipid peroksidasyonu gelmektedir. Lipid peroksidasyonu, serbest radikaller tarafından başlatılan ve zarların yapısındaki doymamış yağ asitlerinin oksidasyonuna neden olan kimyasal bir olay olarak tanımlanmaktadır.^{9,22}

Serbest radikaller ve oksijen türevi serbest radikaller nükleik asitler, serbest amino asitler, proteinler, lipidler, lipoproteinler, karbonhidratlar ve bağ dokusu makromolekülleri de dahil olmak üzere, canlı organizmaların yapısında bulunan hemen hemen bütün bileşiklerle reaksiyona girerek geri dönüşümlü veya geri dönüşümsüz hasar meydana getirebilmektedirler^{9,23} (Tablo 2). Bunların inflamasyon, iskemi ve reperfüzyon, kanserogenez, yaşlanma gibi süreçlerin oluşumunda etkili oldukları yapılan çalışmalarda gösterilmiştir.^{9,23-26}

Tablo 2. Serbest radikallerin hücredeki başlıca zararlı etkileri⁹

Doymamış yağlar	-Kolesterol ve yağ asitlerinde oksidasyon -Lipidlerde çapraz bağlanmalar -Organel ve hücrelerde çapraz bağlanmalar
Karbonhidratlar	-Polisakkaritlerin depolimerizasyonu
Nükleik asit bazları	-Hidroksilasyonlar -Mutasyonlar, kimyasal modifikasyonlar -Şekerlerde benzer reaksiyonlar
Kükürtlü amino asitler	-Protein denatürasyonu ve çaprazlanma -Enzimlerde inhibisyon
Proteinler	-Peptid zincirlerinde kopma -Denatürasyon
Nükleik asitler	-Tek ve çift iplikçik kırılmaları -Proteinlerde çapraz bağlar -Baz içermeyen bölgeler
Hiyaluronik asit	-Sinoviyal sıvı akışkanlığında değişme

Serbest radikallerin lipidler üzerine etkileri

Hidroksil radikali ile oluşan en önemli ve iyi bilinen reaksiyon lipid peroksidasyonu (LPO) olarak bilinen serbest radikal zincir reaksiyonudur.

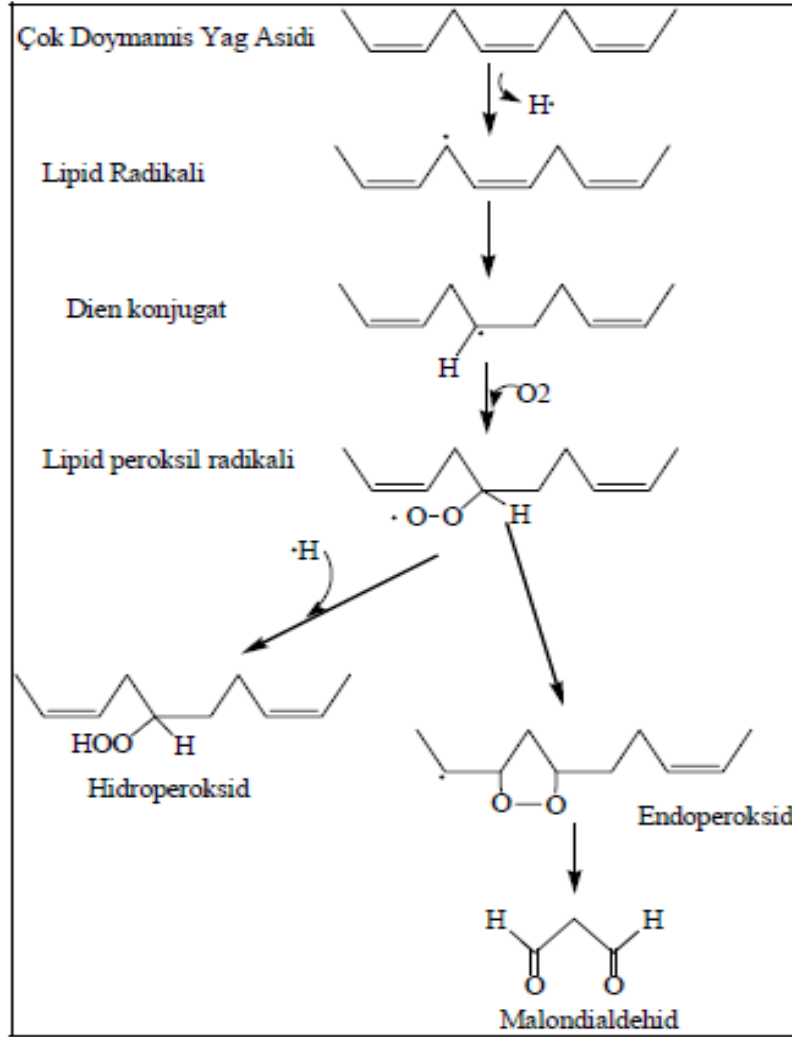
Organizmada yer alan biyolojik zararlar, poliansatüre yağ asitleri ile amfipatik lipidler ve zararlı proteinlerinin birleşmesinden oluşur. LPO, çoklu doymamış yağ asitlerinin radikaller ile oksidasyonu sonucu başlayan ve otokatalitik zincir reaksiyonları şeklinde uzayan, lipid peroksidlerinin aldehit türevleri, hidrokarbon radikalleri ve uçucu bazı ürünlere çevrilmesi şeklinde sonlanan süreçtir.^{9,27,28}

LPO sonucu meydana gelen bu geri dönüşümsüz hasar $\cdot\text{OH}$ radikalinin membranlara yakın bölgelerde ortaya çıkan membran fosfolipidlerinin yağ asidi zincirlerine saldırmasıyla oluşur.^{9,29} Reaksiyon sonrası $\cdot\text{OH}$ radikali ortadan kalkar fakat membranda karbon merkezli lipid radikali oluşur. Oluşan lipid radikali dayanıksızdır ve değişikliğe uğrar. Molekül içi çift bağların pozisyonlarının değişmesiyle konjuge dien yapıları ve daha sonra lipid radikallerinin moleküler oksijenle etkileşmesi sonucu lipid peroksid radikali meydana gelir^{9,30} (Şekil 8). Lipid peroksid radikalleri, membran yapısındaki diğer poliansatüre yağ asitleri ile reaksiyona girerek yeni karbon merkezli radikaller oluştururken, kendileri de açığa çıkan H. parçacığı ile birleşerek lipid hidroperoksidlerine dönüşürler. Böylece olay kendi kendine katalizlenerek devam eder.^{9,27}

Lipid hidroperoksidlerinin membranlarda birikimi sonucu, membran fonksiyonları bozulur ve hücre kollabe olur. Lipid radikallerinin hidrofobik yapıda olması nedeniyle reaksiyonların çoğu membrana bağlı moleküllerde meydana gelir. Peroksid radikalleri ve aldehitler, membran komponentlerinin çapraz bağlanma ve polimerizasyonuna neden olur.⁹ Bu polimerizasyon neticesinde membran enzimleri inaktive olur, buna bağlı membran proteinleri de zarar görerek iyon transportu etkilenebilir. Plazma lipoproteinleri ve özellikle düşük dansiteli lipoproteinler de oksidasyona uğrayabilirler. Okside lipoproteinler hücre

fonksiyonlarının bozulmasına aracılık edebilirler.^{9,31,32}

LPO reaksiyonu ya toplayıcı antioksidan reaksiyonlarla sonlandırılır veya otokatalitik yayılma reaksiyonları ile devam eder.^{9,27}



Şekil 8. Lipid peroksidasyonunun kimyasal yolu.²⁸

Serbest radikallerin karbonhidratlar üzerine etkileri

Serbest radikallerin karbonhidratlar üzerine etkileri sonucu kanser, hipertansiyon, yaşlılık, koroner kalp hastalığı gibi birçok hastalık ortaya çıkabilir. Burada radikal üretiminin

arttığı ve antioksidan savunma mekanizmalarının yetersiz olduğu gösterilmiştir.^{9,19,20} Glukoz, mannoz ve deoksi şekerler fizyolojik şartlarda oto-oksidasyona uğrayarak, süperoksit ve hidrojen peroksiti meydana getirirler. Okzoaldehitler DNA, RNA ve proteinlere bağlanabilme ve aralarında çapraz bağlar oluşturma özelliklerinden dolayı antimitotik etki gösterirler.^{9,12,14,19,23,24}

Serbest radikallerin proteinler üzerine etkileri

Proteinler lipidlere göre daha az etkilenirler. Doymamış bağ ve sülfür içeren amino asitlerden meydana gelmiş proteinler serbest radikallerden daha fazla etkilenir.^{9,30} Serbest radikal ile etkileşim sonrası karbon merkezli radikaller ve sülfür radikalleri oluşur. Proteinler üzerinde oluşan oksidasyonlar yapı değişimine neden olacağından proteinleri proteolitik yıkıma götürür. Serbest radikallerin meydana getirdiği hasar sonucunda çapraz bağlanmalar, proteinlerde fragmantasyon ve proteinlerin agregasyonu meydana gelir. Yapıları bozulan proteinler normal fonksiyonlarını meydana getiremezler. Protein yapısında olan enzimler de bu durumdan etkileneceği için fonksiyonlarını yerine getiremezler.^{12,32}

Serbest radikallerin nükleik asitler üzerine etkileri

İyonizan radyasyon serbest oksijen radikallerinin oluşumuna sebep olarak nükleik asitlerin reaktif oksijen türleri ile reaksiyonu sonucu hücrenin ölümüne yol açar. Reaktif oksijen türlerinin DNA ile etkileşimi çift sarmalın ayrılmasına veya nükleik asit baz değişimlerine neden olabilir. Bu da kromozal mutasyonlar ve sitotoksisite ile sonuçlanır.^{9,16,19,20}

Hidroksil radikali, DNA'da pürin ve pirimidin bazlarıyla etkileşime girerek mutasyonlara neden olabilir. Nükleik asitler de doymuş karbon atomlarından hidrojen çıkarır.³⁰ Baz modifikasyonları, baz delesyonları, zincir kırılmaları gerçekleşebilir. İleri derecedeki DNA hasarları tamir edilemediğinden hücre ölümüne neden olur. Reaktif oksijen

türleri, DNA'nın oksidatif hasarı sonucu karsinogenez, çeşitli hastalıklar ve yaşlanmada önemlidir.^{16,33}

Singlet oksijenin nükleik asitlerle tepkimeye girmesi daha az olasıdır. Süperoksit anyonu güçlü bir oksitleyici olduğundan, guanin gibi yüksek elektron yoğunluklu bölgeler içeren moleküllerle daha kolay tepkimeye girer.^{9,21}

2.3. Antioksidanlar

Serbest radikal oluşumunu engelleyen ya da oluşmuş serbest radikallerin zararlı etkilerini önleyen maddelere genel olarak antioksidanlar denir. Antioksidanlar iki grup altında değerlendirilebilir:

1. Enzimatik antioksidanlar

- Süperoksit dismutaz
- Katalaz
- Glutasyon peroksidaz
- Fosfolipid hidroperoksit glutasyon
- Peroksidaz
- Glutasyon S-transferaz (GST)
- Glutasyon redüktaz

2. Enzimatik olmayan antioksidanlar

- Redükte glutasyon
- Tioller (glutasyon, tioredoksin ve lipoik asid)
- C vitamini
- E vitamini
- β -karoten

Diğer enzimatik olmayan antioksidanlar lutein, likopen, glutamin, asetilsistein, ginkgo biloba, metiyonin, selenyum, B₆ vitamini, B₁₂ vitamini, melatonin, çinko, magnezyum ve folik asittir.

Antioksidan savunmanın ilk basamağı **süperoksit dismutaz** (SOD) enzimi tarafından katalizlenen süperoksitin hidrojen perokside (H₂O₂)'e dismutasyonudur.^{9,18,22,24,34-39}



İlk olarak inek eritrositlerinden saflaştırılan bu enzimin ksantin-ksantin oksidaz deney sistemine eklendiğinde sitokrom c'nin indirgenmesini inhibe ettiği bulunmuştur.^{9,34}



SOD tarafından katalizlenen bu tepkime “dismutasyon tepkimesi” diye adlandırılır. Süperoksit, özellikle hafif asidik koşullarda SOD olmadan kendiliğinden dismutasyonla da H₂O₂'e çevrilebilir.

SOD aerobik hücrelerde oksijen radikalinin zararına karşı intrasellüler savunmada büyük rol oynar. SOD'nin aktivitesinde yaşlanmaya bağlı bir azalma olmaktadır.^{9,22,40} SOD'nin insanda iki tipi bulunmaktadır:

- Sitozolda bulunan, dimerik, Cu ve Zn içeren izomer (Cu-Zn SOD)
- Mitokondride bulunan tetramerik Mn içeren izomer (Mn-SOD)

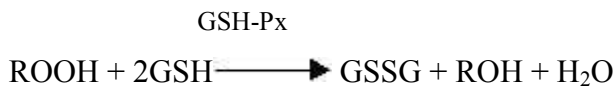
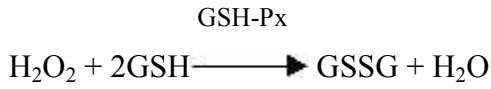
Bu iki tipinden ayrı olarak insanda bulunmayan ve Fe içeren bir izomeri (Fe-SOD) ve ekstrasellüler SOD (EC-SOD) tanımlanmıştır.^{9,41} Aynı tepkimeyi katalizlemeleri dışında Mn-SOD ile Cu-Zn SOD arasında hiçbir ortak yapısal özellik yoktur.²¹

Hücre içinde değişik konsantrasyonlarda bulunabilen ve dört tane hem grubu içeren molekül ağırlığı 248 000 Dalton olan diğer antioksidan **katalaz** (KAT)'dır. Katalaz bir hemoproteindir, H₂O₂'yi moleküler oksijen ve suya katalizler.^{9,12,42}



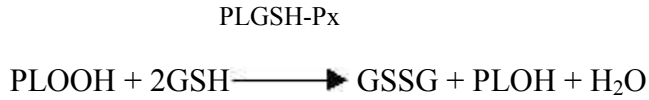
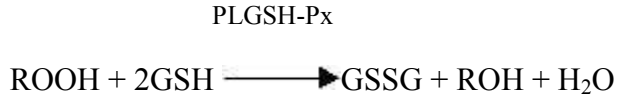
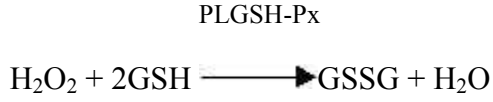
Hücrede peroksizomlarda daha fazla yoğunlukta bulunan H_2O_2 ile metil, etil hidroperoksitleri gibi küçük moleküllere karşı antioksidan aktivite gösteren katalaz enzimi büyük moleküllü lipid hidroperoksitlerine karşı etkili olamamaktadır. Vücutta yoğun olarak buldukları yerler mukoz membranlar, kan, kemik iliği, karaciğer ve böbrekler olarak sıralanabilir.^{12,32,38,42}

Hücrelerde oluşan hidroperoksitlerin uzaklaştırılmasından sorumlu olan diğer bir enzim molekül ağırlığı 85 000 Dalton olan **glutasyon peroksidaz (GSH-Px)**'dir. Dört alt üniteden oluşur. Her alt ünite bir selenyum atomu içerir. Bu nedenle hücreleri çeşitli hasarlara karşı koruyan bir **selenoenzim** ismini almıştır.^{12,43} En yoğun sitoplazmada, daha az oranda ise mitokondride bulunur. İntrasellüler mesafede lipidleri peroksidasyondan koruyarak hücrenin yapısını ve fonksiyonunu koruyan en önemli enzimdir. Enzim aktivitesini en fazla eritrositler, karaciğer ve akciğerlerde gösterir.^{9,12,44} GSH-Px aşağıdaki reaksiyonları katalizler:

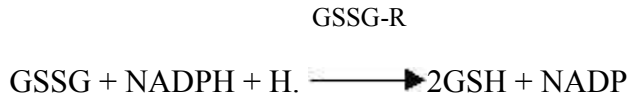


Bir diğer sitozolik enzim, membran fosfolipid hidroperoksitlerini alkole indirgeyen **fosfolipid hidroperoksit glutasyon peroksidaz (PLGSH-Px)**'dir. Membrana bağlı bir antioksidandır. E vitamininin yetersiz olduğu durumlarda membranın peroksidasyonuna karşı koruma sağlar.^{21,38,45,46}

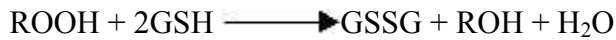
PLGSH-Px aşağıdaki reaksiyonları katalizler:



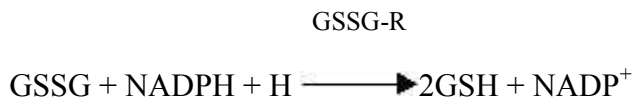
Hidroperoksitlerin redükte olması ile meydana gelen okside glutatyon (GSSG), glutatyon redüktazın (GSSG-R) katalizlediği reaksiyon ile tekrar glutatyon (GSH) dönüşür.



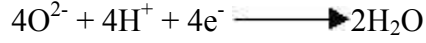
Selenyuma bağlı olmayan glutatyon peroksidaz olarak adlandırılan **glutatyon S-transferaz** enzimi membran lipid peroksidasyonunu fosfolipaz A2'nin varlığında inhibe eden bir antioksidandır. Selenyum araşidonik asit ve lineolat hidroperoksitleri olmak üzere lipid peroksitlerine karşı bağımsız glutatyon peroksidaz gibi aktivite göstererek antioksidan etki oluşturur.^{18,30,47} Aşağıdaki reaksiyonu katalizler:



Diğer bir antioksidan enzim **glutatyon redüktaz**'dır. Okside glutatyonun tekrar redükte hale dönüştürüldüğü tepkimeyi katalizler. Reaksiyonun gerçekleşmesi için NADPH'a ihtiyaç vardır.^{18,30}



Solunum zincirinin son enzimi olan **mitokondriyal sitokrom oksidaz** enzimi süperoksidi detoksifiye eden bir antioksidan enzimdir.³⁰ Bu detoksifikasyon tepkimesi fizyolojik koşullarda sürekli devam eden bir reaksiyon olup enerji üretimi sağlar.^{16,18,19} Aşağıdaki reaksiyonu katalizler:



C vitamini, E vitamini gibi enzimatik olmayan antioksidanlar vücutta çeşitli yükseltme ve indirgenme tepkimelerinde rol alarak buldukları bölgeyi, yapıları ve hücreleri radikallerin başlatacağı istenmeyen oksidatif reaksiyonlara karşı korurlar.

Antioksidanların inflamatuvar sitokinlerin salınımını azalttığı gösterilmiştir.^{48,49} Radyasyona maruziyet sonrası lokal olarak ortaya çıkan serbest radikaller inflamatuvar cevabı başlatarak sitokinlerin ve inflamatuvar medyatörlerin salınımına neden olmakta ve hücre membran permeabilitesi bozularak hücreler apoptoza gidebilmektedir. Antioksidanlar inflamasyona cevap verecek olan sitokinlerin düzeylerini azaltırlar. Mitjans ve arkadaşları antioksidan uygulanmasından sonra inflamasyonda salgılanan IL-1 β , TNF- α ve IL-8 düzeylerinde azalma tespit etmişlerdir.⁵⁰ Haddad ve arkadaşları antioksidanların IL-10 seviyesinde artışa neden olduğunu, bunun da diğer sitokinlerin sentezini azalttığını göstermişlerdir.⁵¹

Antioksidanların radyasyonun akut etkilerini önleme veya azaltmanın yanı sıra oksidatif stresin yol açtığı kronik etkileri önlemede de rolünün olabileceği düşünülmektedir. Kennedy ve arkadaşları pelvik radyoterapiye bağlı kronik radyasyon proktiti gelişen 20 hastaya bir yıl süreyle antioksidan olarak C ve E vitamini uygulamışlar, bir yıl sonunda yaptıkları değerlendirmede vitamin uygulanan hastalarda radyoterapiye bağlı diyare, kanama, defekasyon sıklığı gibi geç yan etkilerde anlamlı derecede azalma ve hayat kalitesinde artma tespit etmişlerdir.⁵²

2.4. C vitamini (Askorbik Asit)

Vitaminler, organizma tarafından üretilmeyen, ancak normal hücrenin yaşamını sürdürebilmesi ve organizmadaki tepkimelerin devamı için gereksinim duyulan küçük moleküllerdir. Yaklaşık 20 değişik vitamin tanımlanmıştır. Her vitaminin metabolizmada belirli fonksiyonları vardır. Organizmanın vitamin gereksinimi yaş, cinsiyet, stresli yaşam, alkol kullanımı, hastalık gibi birçok durumlarda farklılık gösterebilmektedir. Vitaminlerin yetersizliği ya da birikimi metabolizmada önemli sorunlara yol açabileceğinden vitaminlerin gereksinim duyulduğu miktarlarda alınması zorunludur. Vitaminler genel olarak iki grupta incelenebilir:

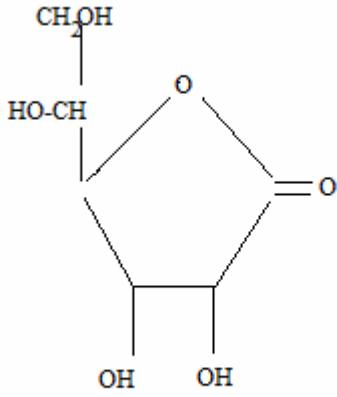
1. Yağda çözünen vitaminler

Bileşimlerinde sadece karbon (C), hidrojen (H) ve oksijen (O) bulunan, bitkisel ve hayvansal kaynaklı olan A, D, E ve K vitaminleridir.

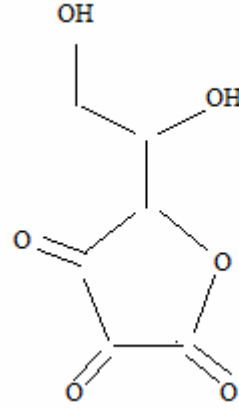
2. Suda çözünen vitaminler

B vitaminleri ve C vitamini suda çözünen vitaminlerdir. Önemli bir kısmı C, H, O, azot (N) ve kükürt (S) elementlerinden oluşurken, bir kısmı da yağda çözünen vitaminlerde olduğu gibi yalnız C, H, ve O'den oluşmuştur.

C vitamini (askorbik asit) bir ketolaktondur. Organizmada askorbik asitin yapılamaması ve fazlasının vücutta depolanmadan atılması nedeniyle ihtiyacı karşılayabilmek için sürekli alınması gerekir. Yetmiş kilogramlık bir insan için önerilen günlük alım ortalama 40-60 mg'dır. Bitkisel kaynaklı yiyecekler zengin C vitamini içerirler. C vitamininin iki aktif formu vardır. Bunlar redüktan maddeler olan L-askorbik asit ve L-dehidroaskorbik asit'tir³⁰ (Şekil 9, 10).

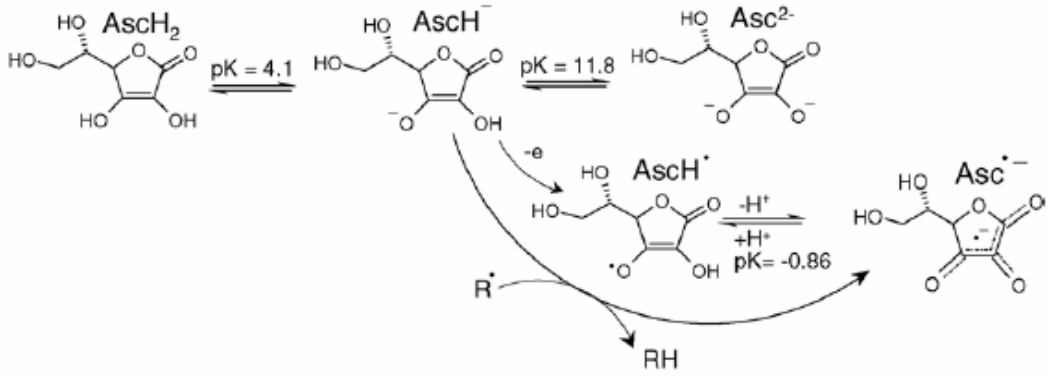


Şekil 9. L-askorbik asit.



Şekil 10. L-dehidro askorbik asit.

C vitamini güçlü indirgeyici aktivitesinden dolayı güçlü bir antioksidandır. Metabolizmada reaktif oksijen türlerine karşı koruyucu etki sağlar, süperoksit, hidroksil radikalleri ve singlet oksijenle reaksiyona girerek onları etkisiz kılar. C vitamini akciğerler, gözün lensi gibi sulu ortamlarda antioksidan etki göstermektedir.³⁰ Askorbik asitin iki hidroksil grubu olduğundan di-asittir. Fizyolojik pH'da C vitamini %99,9 $AscH^-$ formunda bulunur. Antioksidan özelliğini de bu formu gerçekleştirir. $AscH^-$ bir verici (donör) antioksidandır ve serbest radikallerle tepkimeye girerek kararlı trikarbonil askorbat bileşiğini meydana getirir (Şekil 11). Askorbik asitin ROS türevleriyle tepkimeye girmesinden sonra oluşan son ürün semidehidroaskorbatır. Bu molekül son, küçük bir antioksidan moleküldür ve biyolojik sistemlerde oksidatif stresi ölçmede kullanılabilir.^{16,30}



Şekil 11. C vitamininin farklı formlarının serbest oksijen radikalleri ile etkileşimi.

C vitamini sulu fazda olmasına rağmen lipid peroksidasyonunu başlatıcı radikalleri yok ederek membranları oksidan hasara karşı korur. Bazı çalışmalar, radyasyon hasarında ortaya çıkan serbest radikalleri bağlayarak, koruyucu etki yaptığını göstermiştir.^{7,53,54} C vitamini oksijen dışında ferröz demiri (Fe⁺²) ferrik demire (Fe⁺³) indirgeyen hücre içi tek molekül olup, fenton reaksiyonunda (Fe²⁺ + H₂O₂ → Fe³⁺ + OH⁻ + OH[•]) bu özelliği ile hidrojen peroksit üzerinden hidroksil radikalının üretimine neden olur. Yüksek dozlarda pro-oksidan etkisinden dolayı hala antioksidan etkin dozu ile ilgili çalışmalar güncelliğini korumaktadır.^{55,56}

Yapılan bazı çalışmalar serum askorbik asit seviyesi düşük olan kişilerde gastrik metaplazi ve kronik gastrit oranlarının daha yüksek olduğunu göstermiştir.⁵⁷ Bu durum muhtemelen askorbik asitin oluşan N-nitroz bileşiklerinin çevredeki nitrit ve amin bileşikleriyle etkileşimlerini engellemesinden kaynaklanmaktadır. C vitamininin benzer koruyucu etkisi akciğer kanseri ve kolorektal kanserlerde de gösterilmiştir.^{5,58} Knekt ve arkadaşları Finlandiya'da 20-65 yaşları arasında kanser tanısı almamış, sigara içmeyen 4538

erkeği 20 yıl takip ederek karotenoid, C vitamini ve E vitamini alımının akciğer kanseri oluşma riskiyle ilişkisini değerlendirmişlerdir.⁵⁸ Takip sürecinde toplam 117 olguda akciğer kanseri gelişmiş, karotenoid, C vitamini ve E vitamini alan grupta akciğer kanseri için rölatif risk 1,8 ($p=0,01$) iken vitamin almayan grupta 4,0 ($p<0,001$) bulunmuştur. Çalışmada karotenoid, C vitamini ve E vitamini alımının sigara içmeyenlerde akciğer kanserini önleyebileceği sonucuna varılmıştır. Kune ve arkadaşlarının kolorektal kanser gelişimiyle kronik hastalıklar ve ilaç kullanımı (aspirin, vitamin) arasındaki ilişkiyi araştırdıkları çalışmalarında 715 kolorektal kanserli olgu ve 727 kişilik kontrol grubu değerlendirilmiş, aspirin, retinol ve C vitamini alanlarda kolorektal kanser riskinin daha az olduğu belirlenmiştir ($p<0,001$).⁵ Amerika Birleşik Devletleri Ulusal Bilim Akademisi Yiyecek ve Beslenme Heyeti 2000 yılında sadece E ve C vitamini ile selenyumunu diyetle alınabilecek antioksidanlar olarak belirlemiştir.⁵⁹

İn vitro çalışmalar C vitamininin doza bağımlı olarak hücrede lipid peroksidasyonunu engellediğini göstermiştir.¹¹ Bazı in vivo çalışmalarda C vitamini uygulamasının ardından oksidatif DNA, lipid ve protein hasarlarında önemli düzeyde düşüşler görülmüştür.³⁰ Demir varlığında dahi C vitamini in vivo oksidatif hasarı önlemektedir. C vitamininin gen ekspresyonu, apoptoz ve diğer hücresel fonksiyonlar üzerine düzenleyici etkisi bulunmaktadır.^{54,57} Yine birçok çalışmada C vitamininin uyarılmış hücre ölümünü engellediği ortaya konmuştur. C vitamininin bu koruyucu niteliği antioksidan özelliği ile gerçekleşmektedir.⁵⁴

C vitamini radyasyonun indüklediği kromozomal hasarlara karşı koruyucu etki göstermektedir. Sarma ve Kesevan'ın çalışmasında farelere 1 Gy tüm vücut ışınlamasından 2 saat önce, hemen sonra ve 2 saat sonra C ve E vitaminleri per oral verilmiş ve kemik iliğindeki kromozomal değişiklikler incelenmiştir.⁶⁰ Her iki vitaminin de kemik iliği hücrelerinde mikronükleus ve kromozom aberasyonlarının sıklığını belirgin olarak azalttığı,

ayrıca ışınlamadan hemen sonra yapılan uygulamanın ışınlamadan 2 saat önce yapılan kadar etkili olduğu görülmüştür.

Okunieff'in farelerde fibrosarkom oluşturarak yaptığı çalışmasında tüm vücut ışınlamasından 50 dakika önce intraperitoneal askorbik asid (4,5 g/kg) uygulamasının ölümcül radyasyon sendromu ve cilt deskuamasyonu oluşturacak radyasyon dozunu belirgin olarak arttırdığı, tek yüksek doz C vitamini uygulamasının sitotoksik olmadığı ve tümör remisyonu sağlayan radyoterapi dozunu etkilemediği bildirilmiştir.⁶¹ Konopacka ve arkadaşları ışınlamadan hemen önce ve sonra C, E vitaminleri ve β -karoten uyguladıkları farelerin kemik iliğindeki polikromatik eritrositlerde ve dökülen mesane hücrelerinde radyasyonun indüklediği mikronükleus oluşumuna karşı belirgin korumanın olduğunu görmüşlerdir.⁶² Blumenthal ve arkadaşlarının çalışmasında E, C ve A vitamini kombinasyonunun farelerde I^{131} 'le radyoimmun tedavinin toksik etkilerini azalttığı bildirilmektedir.⁶³

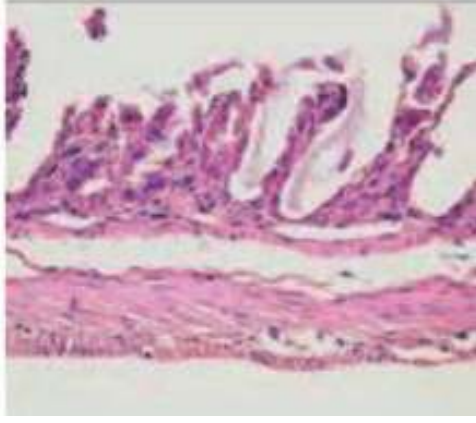
C vitamini transkripsiyon faktörlerinden aktivatör protein-1 (AP-1) kompleksini düzenlemektedir. AP-1 kompleksinin üyeleri farklı gen ekspresyonlarını ve büyüme faktörlerine karşı hücrel yanıtı düzenlerler. Bu komponentler büyüme, çoğalma, farklılaşma, programlanmış hücre ölümü ve onkojenik transformasyon gibi hücrel süreçlerde kilit rolü oynarlar.⁶⁴ Karsinogenezde AP-1 tarafından kontrol edilen hücrel süreçlerdeki bozukluğun etkili olduğu bilinmektedir.⁶⁵ JNK (c-Jun N-terminal kinazlar) sitokinler ve radyasyon gibi stres uyarılarına yanıt oluşturan aktive protein kinazlardır. T hücresi farklılaşması ve apoptozda rol alırlar. Fosforillendiklerinde aktive olurlar. C vitamini uygulanmış hücrelere UV ışını uygulandığında, JNK/AP-1 yolunu aktive ederek gen transkripsiyonunu sağlayan JNK fosforilizasyonunda %50 azalma görülmüştür.³⁰

C vitamini antioksidan özelliğinin yanı sıra immun sistemi güçlendirir, bağ dokusunun temel yapısal proteini olan kollajen sentezini artırır, yara iyileşmesini hızlandırır. Bu nedenle

bağ dokusunun zarar gördüğü herhangi bir durumda tamir mekanizmalarında C vitamini önemli işlev görür. İleri derece eksikliğinde kollajen dokunun zarar gördüğü skorbüt hastalığı gelişir. Demir, fosfat gibi besin maddelerinin kullanımında önemli faktördür. C vitamininin organizmada vasküler endotelial oksidasyonu engellemesiyle anti-aterosklerotik etki yaptığı, kan serotonin seviyelerinde artış yaparak büyüme hormonu sekresyonunu uyarabildiği, uykuyu düzenlediği, mast hücre stabilizasyonu yaparak astım atakları gibi allerjik reaksiyonları önlediği, kortizol seviyelerinde düşmeye neden olarak travma, stres gibi durumlarda metabolizmayı katabolizmaya karşı koruduğu, kemikte kalsiyum birikimini artırarak ağrı eşliğini azalttığı da gösterilmiştir.^{4,48,49,66-70}

2.5. İntestinal Mukozanın Yapısı ve Radyasyonun Oluşturduğu Hasarlar

İntestinal epitelin normal homeostazı epiteldeki diferansiye olmuş hücrelerin dökülmesi ve intestinal kriptik dokuda yer alan epitel hücrelerinin diferansiye olarak, dökülen bu hücrelerin yerine geçmesi ile sağlanır. Radyasyonun neden olduğu intestinal hasarlardan biri bu kriptik klonojenik hücrelerin ölmesi ve buna bağlı olarak intestinal villusların depopulasyonudur⁷¹ (Resim 1). Kriptik epitel hücreleri hızla proliferen olan hücrelerdir ve radyoterapi, kemoterapi gibi sitotoksik ajanlara oldukça duyarlıdırlar. Radyoterapiye bağlı klonojenik hücrelerin kaybı intestinal villusların normal epitelizasyonunun kaybına neden olur. Epitelizasyonun kaybı villus yapısında değişikliklere yol açarak malabsorbsiyon, elektrolit dengesizliği, diyare, kilo kaybı ve ölüme sebep olabilmektedir.



Resim 1. Radyoterapi uygulanmış olan sıçan villus intestinalisleri (villus intestinalislerde düzensizlik, parçalanma, subepitelyal ayrılma, konjesyon, lümeninde epitel hücrelerinin varlığı, bazal mitoz ve apoptotik hücreler görülebilmekte).⁵⁴

İntestinal multipotent kök hücreler (stem cell) kriptik tabakanın bazalinde yer almaktadır. Normal koşullarda bu hücreler nadiren proliferer olurlar. Ancak uyarı geldiğinde ya enterositlere, goblet hücrelerine ve enteroendokrin hücrelerine farklılaşmak üzere villuslara doğru, ya da Paneth hücrelerini oluşturmak üzere kript bazaline doğru hareket ederler. Bu multipotent hücreler bağırsak hasarından sonra epitelin ihtiyacına göre farklılaşarak hücre popülasyonu tekrar sağlarlar. İyonizan radyasyon sonrası kript bazalinde yer alan hücreler ya hızla apoptoza giderler ya da geçici veya kalıcı olarak bölünmeleri durur.⁷¹⁻⁷³ Bu durum doza bağlıdır.⁷³ Bu nedenle kriptin akibeti bağırsak kök hücresinin klonojenik proliferer kriptik hücrelerin yerini almasına bağlıdır. Eğer bütün kript hücreleri ölürse, kript sterilize olmuştur ve 48 saat içinde yok olur. Ancak bir veya daha fazla klonojenik hücre yaşamayı başarırsa hızla proliferer olur ve 72-96 saatte kripti rejenere ederek villusu yeniden yapılandırır. Organın sağkalımı ise kriptleri rejenere eden ve yaşayabilen klonojenik hücre sayısı ve etkisiyle kript depopülasyonu arasındaki dengeye bağlıdır.

Bağırsak savunmasının ilk basamağını düşük epitelyal permeabilite, kript epitelyal hücreleri tarafından su ve klorid iyonlarının sekresyonu ve artmış motilite oluşturmaktadır. Bu işleyen mekanizmaların kombinasyonu yabancı ve zararlı ajanların mukozadan uzak tutulmasını ve gastrointestinal sistemden hızlıca uzaklaştırılmasını sağlar. Mekanizmanın çalışması enterik sinir sisteminin miyenterik pleksus, mukoza ve submukozal lokal aferent

duyusal sinir sonlanmaları ile epitelyal enterokromafin benzeri hücrelerin birbirleriyle iletişimi ile gerçekleşen kompleks bir süreçtir. Savunma mekanizmalarından bir veya birkaçında meydana gelebilecek değişiklik bağırsakta inflamasyon ve hasarlanmaya neden olur.

Röntgen ışınlarının keşfinden kısa süre sonra Walsh radyasyonun bağırsaklar üzerine etkisinden ilk kez bahsetmiş ve radyasyonun barsak mukozasında doğrudan inflamasyona neden olduğunu bildirmiştir.⁷⁴ Ancak radyoterapinin bağırsak dokusu ve fonksiyonu üzerine olan etkileri ile ilgili ilk sistematik çalışmalar Warren ve Whipple tarafından 25 yıl sonra yapılmıştır.^{75,76} Radyasyonun akut etkisinin sitotoksik etkiye bağlı olduğu ve bu etkinin uzun dönemde progresif okluzif vaskülit, ülserasyonlar, kollajen birikimi, nekroz ve fibroz ile sonuçlanabileceği tespit edilmiştir.⁷⁷ Geç dönemde şiddetli reaksiyonların görülme sıklığının erken evrede geçirilen şiddetli akut reaksiyonlar ile ilişkili olduğu ve bağırsağın fizyolojisinde bazı değişiklikler oluşturarak inflamasyona daha yatkın hale getirdiği sanılmaktadır.⁷⁸ Ülseratif kolit ve Crohn hastalığı gibi inflamatuvar barsak hastalıklarında yapılan çalışmalardan elde edilen veriler epitelyal savunma mekanizmaları ve hastalık relapsı arasında bir ilişki olduğunu işaret etmektedir. Crohn hastalığında tespit edilen permeabilite değişikliklerinin inflamatuvar süreçte rol oynadığı düşünülmektedir.^{79,80} İnflamasyon durumunda bağırsağın sekresyon mekanizması etkilenmekte, buna bağlı lümende bakteri translokasyonu engellenmekte, sonuç olarak bakteri sayısında ve bakteri ürünlerinde artış olmakta ve lamina propria antijenlere maruz kalmaktadır. Bu durum bağırsaktaki inflamasyonun alevlenmesine ve sebat etmesine yol açar.⁸¹ Enterik bakterilerin inflamasyonda rol oynadığı bilinmektedir. Kuhn ve arkadaşlarının sıçanlarla yapmış oldukları çalışmada interlökin 10 eksikliği olan sıçanların ağır kolit atakları geçirdikleri, ancak interlökin 10 fazlalığında kolit ataklarının olmadığı gösterilmiştir.⁸² Dieleman ve arkadaşları da sıçanlar üzerinde yaptıkları çalışmalarda bağırsak florası ile inflamatuvar hastalıklar arasındaki ilişkiyi

tanımlamışlardır.⁸³ En yeni çalışmalar radyasyonun bağırsak üzerine olan etkisinin epitelin bariyer fonksiyonunu bozması, buna bağlı sekretuar kapasite ve permeabilitede meydana gelen değişiklikler olduğuna işaret etmektedir.⁸⁴

Radyoterapinin epitel hücresinde oluşturduğu hasarın büyük kısmı serbest radikaller üzerinden gerçekleşmektedir. Oluşan serbest radikallerin ya vücudun lokal, bölgesel savunma mekanizmaları tarafından ya da dışarıdan müdahale ile etkisizleştirilmesi söz konusu olursa radyoterapiye bağlı bağırsakta oluşan yan etkilerin de azaltılması söz konusu olabilir. Bhanja ve arkadaşlarının bir mitojenik ajan olan R-spondin1 ile fareler üzerinde yapmış oldukları çalışmada 10,4 Gy tüm vücut radyoterapisi ile birlikte uygulanan R-spondin1'in bağırsakta radyasyona bağlı oluşan yan etkileri anlamlı derecede azalttığı tespit edilmiştir ($p<0,003$).⁷¹ Bu çalışmaya göre radyoterapinin bağırsak epitel hücrelerinde mitozu inhibe edici etkisini ortadan kaldıracak bir ajanın bağırsakta akut ve kronik yan etkileri önleyebileceği bulunmuştur. Yamamoto ve arkadaşlarının fareler üzerinde yaptıkları benzer bir çalışmada C vitamini (150 mg/kg/gün) ve 14 Gy radyoterapi uygulanan grupta radyoterapi uygulanmayan gruba göre radyasyona bağlı gastrointestinal hasarda anlamlı derecede azalma ve DNA microarray çalışmalarda C vitamini uygulanmayan grupta apoptozda etkili olan kaspaz-9 bağımlı intrinsek yol ve kaspaz-8 bağımlı ekstrinsek yolla ilgili genlerde artış saptanırken, C vitamini uygulanan grupta bu genlerin ekspresyonunda azalma tespit edilmiştir ($p<0,01$).⁵⁴

3. GEREÇ VE YÖNTEM

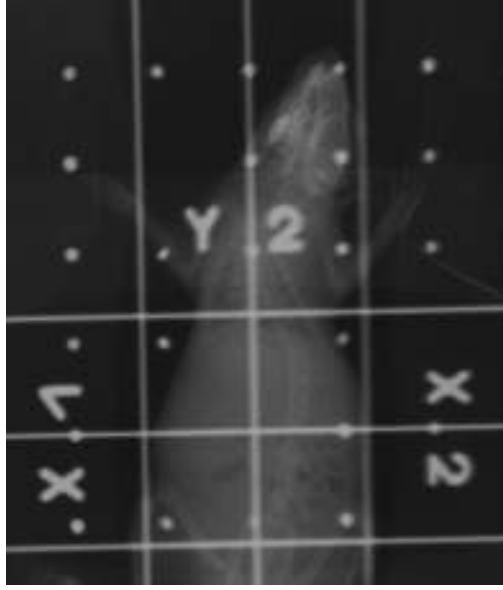
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi hayvan deneyleri yerel etik kurulundan onay alınarak Ağustos 2009-Kasım 2009 tarihleri arasında Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Birimi'nde üretilen, genç erişkin, ortalama 4 aylık, ağırlıkları 180-220 gr arasında değişen 32 adet Wistar albino erkek (n=16) ve dişi (n=16) sıçan çalışmaya dahil edilmiştir.

Sıçanlar biri kontrol, üçü deney grubu ve her grupta 4 adet erkek, 4 adet dişi denek olacak şekilde 4 gruba randomize edilmiştir:

1. Kontrol grubu
2. C vitamini grubu
3. Radyoterapi grubu
4. Radyoterapi + C vitamini grubu

Deneklerin hazırlanması

Deney süresince tüm denekler, optimum laboratuvar koşulları altında ($22\pm 1^{\circ}\text{C}$, 12 saat aydınlık/karanlık siklusunda, havalandırılmalı, nem ve ışık kontrollü), günlük içme suyu ad libitum ve %21 ham protein içeren pelet yemlerle (Purina) beslenmiştir. Uygulamaya başlamadan önce ve deney boyunca her gün sıçanlar tartılarak ağırlıkları kaydedilmiştir. C vitamini ve Radyoterapi + C vitamini gruplarının içme suyuna 10 gün boyunca 250 mg/kg dozunda C vitamini eklenmiştir. Radyoterapi uygulanacak gruplara ait sıçanlar intraperitoneal yoldan 90 mg/kg ketamin (Ketalar-Eczacıbaşı), 10 mg/kg xylazine (Rompun-Bayer İstanbul/Türkiye) uygulanarak uyutulmuş, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalında simüle edilerek (Mecaserto, Simscan 2) batın bölgeleri işaretlenmiştir (Resim 2).



Resim 2. Simulasyon filmi

Sıçanların daha sonra toraks ve ekstremiteleri korunarak batin bölgesine Co⁶⁰ teleterapi cihazı (Theratron 780 C) ile 80 cm SSD'den 89,22 cGy/dk hızında tek fraksiyonda 8 Gy radyoterapi uygulanmış, radyoterapiden 72 saat sonra tüm sıçanlar anestezi altında sakrifiye edilmiştir. Median insizyonla özofagus distal uçtan anüse kadar tüm gastrointestinal traktus "en-bloc" çıkarılmış, çalışma alanı olarak ileo-çekal valvin 5 cm proksimali ileumdan ve 5 cm distali kolon segmentinden 1 cm'lik segment seçilmiştir. Seçilen segmentin her iki ucundan lümeneye dik kesilerle iki dilim çıkarılmış, kalan segment ucu topuzlu pediatrik bağırsak makasıyla antimezenterik hat boyunca açılarak lümeneye paralel, barsak pililerine dik olacak şekilde iki kesit daha alınmıştır. Luminal içerik serum fizyolojik içerisinde, abraze etmeden yıkanmıştır.

Histopatolojik değerlendirme

Alınan örnekler zaman geçirilmeden %10'luk fosfat tamponlu nötral formalin içerisinde tespit edilmiş, doku takibi sonrası 3-4 µm kalınlığında seri kesitler alınarak Hematoksilen-eozin (H&E) ile boyanmıştır. İnceleme, uzman bir patolog tarafından standart ışık

mikroskopunda (Olympus BX50; x4 büyütme: 4,32 mm çap, x40 büyütme: 0,54 mm çap, Oküler: x10 büyütme), deneklerin ait olduğu grup bilinmeksizin yapılarak fotoğrafları (Olympus C-5060) çekilmiştir.

Histopatolojik değerlendirilmede:

- Bir cm'lik alandaki kript sayısı
- Anormal epitelyum hücresi varlığı
- Mukozal konjesyon, ödem
- Kriptik doku değişiklikleri
- Villus boyu (muskularis mukozaya komşu kriptin boyuna oranlanarak değerlendirilmiştir)
- Villus yapı değişiklikleri (küntleşme, kısalma)
- Villus birleşmesi
- Villus parçalanması
- Subepitelyal ayrılma
- Lümente epitelyum hücre varlığı
- Bazal tabakada (Lieberkühn bezlerinde) mitotik figür sayısı (bir büyük büyütmede sayılan kript sayısına göre)
- Bazal tabakada (Lieberkühn bezlerinde) apoptotik figür sayısı (bir büyük büyütmede sayılan kript sayısına göre) dikkate alınmıştır.

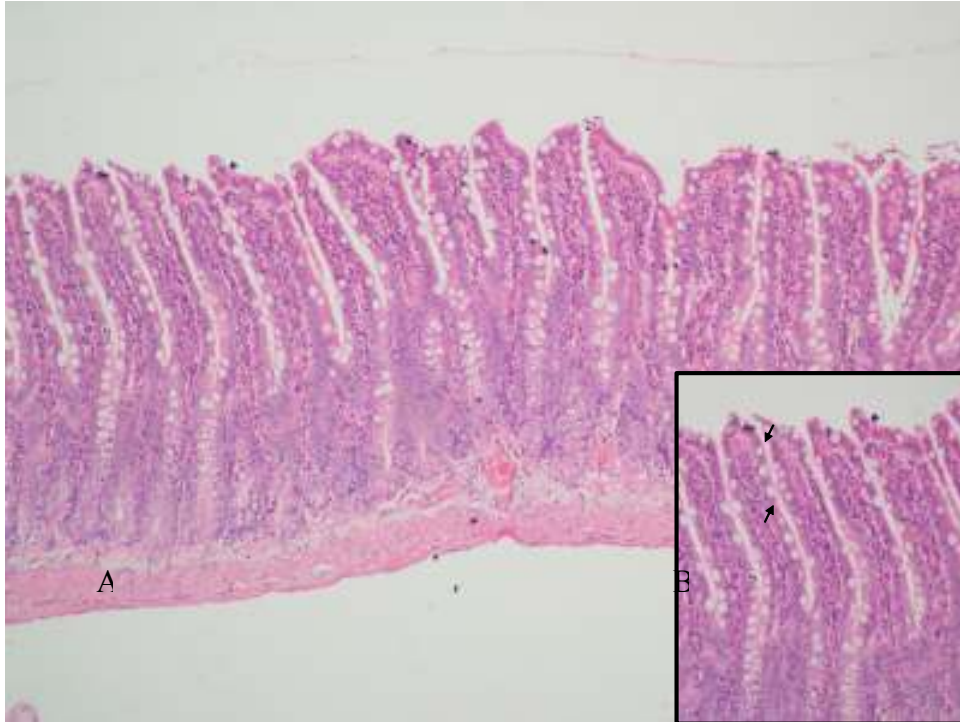
İstatistiksel değerlendirilme

İstatistiksel değerlendirilmede SPSS 13.0 paket programı (Statistical Package for the Social Sciences, Chicago, İll, USA) kullanılmıştır. Gruplar arasındaki farkın istatistiksel anlamlılığı ANOVA (tek yönlü varyans analizi, one-way ANOVA) testi, histopatolojik değerlendirilme sonuçları Kruskal-Wallis testi ile değerlendirilmiş, çoklu karşılaştırmalarda

Post-Hoc testlerden Bonferroni-Dunn testi yapılmıştır. Anlamlılık sınırı olarak $p < 0,05$ kabul edilmiştir.

IV. BULGULAR

Kontrol grubuna ait ince bağırsak segmentinden alınan kesitler histolojik olarak normal yapı özellikleri sergilediği görülmüştür (Resim 3). Villus intestinalisler düzenli ve birbirinden ayrı durmakta, mukozal kayıp bulunmamakta, lamina propriada apoptotik hücre izlenmemekte ve Lieberkühn bezlerinde az sayıda mitotik figür izlenmektedir. Konjesyon ve subepitelyal ayrılma tespit edilmiştir. Lümeninde hücrel infiltrasyon görülmemiş ve kriptik tabaka korunmuştur. Kontrol grubuna ait histopatolojik değerlendirme bulguları Tablo 3'te gösterilmiştir.



Resim 3. Kontrol grubuna ait normal morfolojiye sahip villus intestinalisler. A: Normal mukoza, villöz yapı ve kriptik tabaka korunmuş (H&E, x10). B: Goblet hücreleri (okla işaretli) (H&E, x20).

Tablo 3. Kontrol grubunun histopatolojik değerlendirme bulguları

Denek no.	Kript sayısı	Anormal epitelyum hücreleri	Mukozal konjesyon-ödem	Kriptik doku değişiklikleri	Villus boyu	Villus yapı değişiklikleri	Villus birleşmesi	Villustarda parçalanma	Subepitelyal ayrılma	Lüminde epitelyum hücrelerinin varlığı	Bazal tabaka mitoz sayısı	Bazal tabaka apoptoz sayısı
1	69	Yok	Yok	Yok	4	Yok	Yok	Yok	Yok	Var	11/10	Yok
2	56	Yok	Yok	Yok	3-3,5	Yok	Yok	Var	Yok	Var	4/8	Yok
3	52	Yok	Yok	Yok	3-3,5	Yok	Var	Yok	Yok	Yok	6/8	Yok
4	46	Var	Yok	Yok	4	Yok	Var	Yok	Yok	Yok	10/8	Yok
5	55	Yok	Yok	Yok	4	Yok	Var	Yok	Yok	Yok	6/8	Yok
6	52	Var	Yok	Yok	3-3,5	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	5/7	Yok
7	71	Yok	Yok	Yok	4-4,5	Yok	Var	Yok	Yok	Yok	10/10	Yok
8	60	Yok	Var	Var	3	Var	Var	Yok	Var	Var	4/11	Yok

Yalnız C vitamini uygulanan grupta morfolojik değişiklikler göstermeyen villus intestinalisler izlenmekteydi. Normal mukoza, villöz yapı ve kriptik tabakanın korunmuş olması nedeniyle morfolojik bulgular kontrol grubuyla benzerlik göstermekteydi (Resim 4). Bu gruba ait histopatolojik değerlendirme bulguları Tablo 4'te görölmektedir.

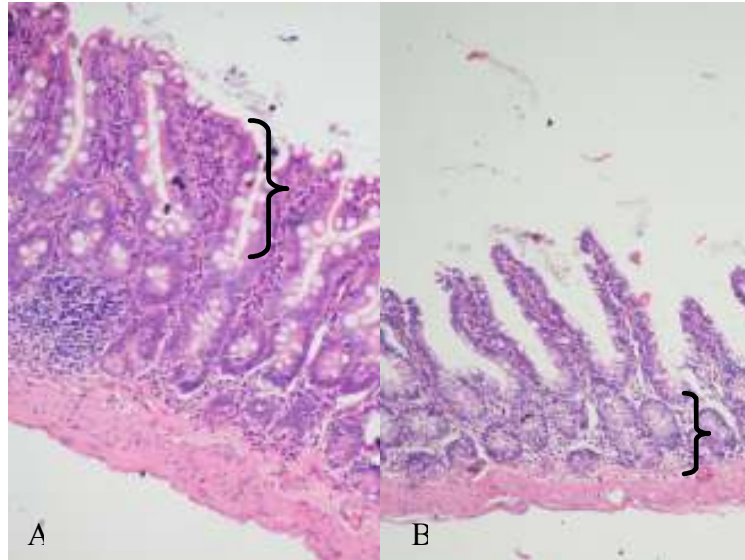


Resim 4. Yalnız C vitamini uygulanan grupta morfolojik değişiklikler göstermeyen villus intestinalisler. Normal mukoza, villöz yapı ve kriptik tabaka korunmuş (H&E, x10).

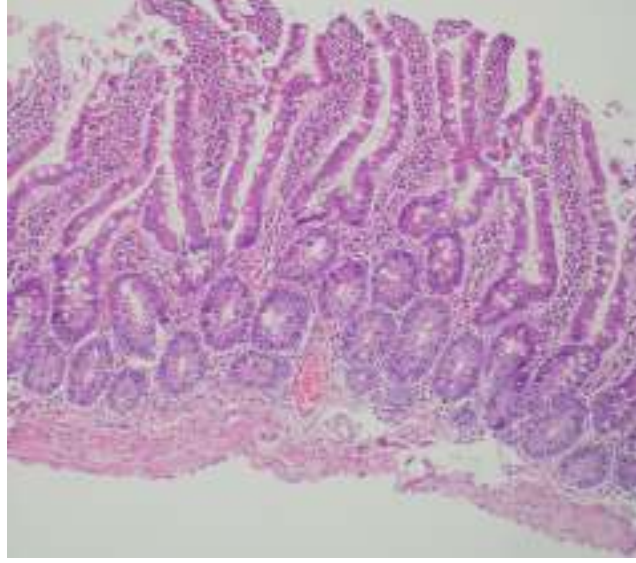
Tablo 4. C vitamini grubunun histopatolojik değerlendirme bulguları

Denek no.	Kript sayısı	Anormal epitelyum hücreleri	Mukozaal konjesyon -ödem	Kriptik doku değişiklikleri	Villus boyu	Villus yapı değişiklikleri	Villus birleşmesi	Villuslarda parçalanma	Subepitelyal ayrılma	Lümen de epitelyum hücrelerinin varlığı	Bazal tabaka mitoz sayısı	Bazal tabaka apoptoz sayısı
9	84	Yok	Yok	Yok	4	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	3/10	Yok
10	94	Yok	Yok	Yok	4,5-5	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	2/9	Yok
11	87	Yok	Yok	Yok	4,5	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	2/8	Yok
12	80	Yok	Yok	Yok	4-4,5	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	5/9	Yok
13	78	Var	Yok	Yok	4-4,5	Yok	Var	Yok	Yok	Var	3/12	Yok
14	84	Yok	Yok	Yok	4-4,5	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	5/8	Yok
15	86	Yok	Yok	Yok	4-4,5	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	6/10	Yok
16	80	Yok	Yok	Yok	3,5-4	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	4/10	Yok

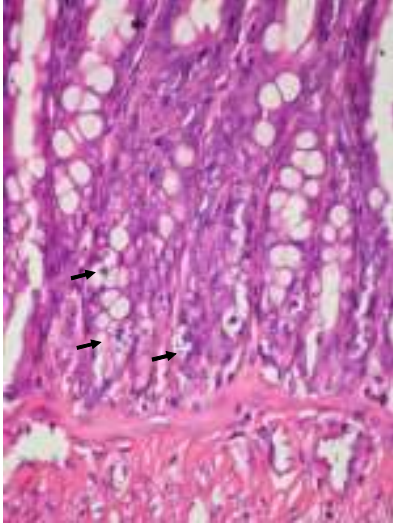
Radyoterapi uygulanan grupta ileri düzeyde dejenere villuslar, villuslarda birleşme, villus boylarında kısalma, villuslarda şekil bozuklukları (çatallanma, dallanma), kriptik tabaka sayısında azalma, mukozal düzensizlikler ve apoptoz gözlenmiştir (Resim 5, 6, 7, 8). Ayrıca bazı kesitlerde lümende epitelyum hücresi, lenfosit infiltrasyonuna da rastlanmıştır. Bu gruba ait histopatolojik değerlendirme bulguları Tablo 5’te görülmektedir.



Resim 5. Radyoterapi (8 Gy) uygulanan ve morfolojik değişiklikler gösteren villus intestinalisler. A: Villus boylarında kısalma (villöz atrofi) (H&E, x10); B: Kriptik tabaka kalınlığında azalma (mukozal atrofi) (H&E,x10).



Resim 6. Kriptlerde çatallanma-dallanma (H&E, x10).



Resim 7. Apoptoz (okla işaretli) (H&E, x40).

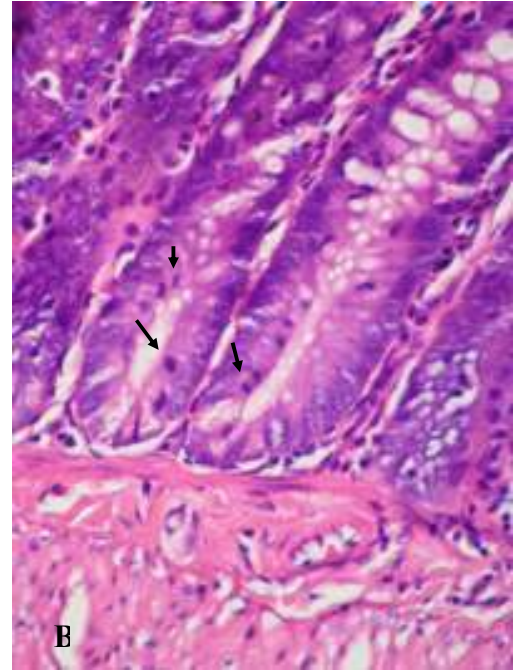
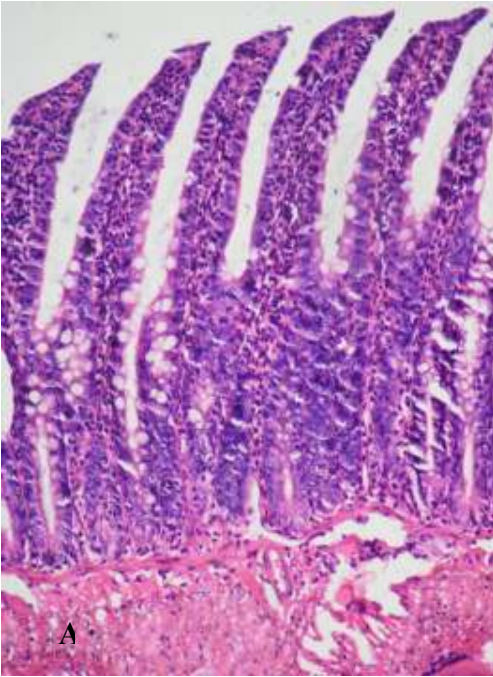


Resim 8. Mukus kaybı olan alan (çift ok) ve goblet hücresi içeren alan geçişi gözleniyor (tek ok) (H&E, x40)

Tablo 5. Radyoterapi grubunun histopatolojik değerlendirme bulguları

Denek no.	Kript sayısı	Anormal epitelyum hücreleri	Mukozaal konjesyon -ödem	Kriptik doku değişiklikleri	Villus boyu	Villus yapı değişiklikleri	Villus birleşmesi	Villuslarda parçalanma	Subepitelyal ayrılma	Lümen epitelyum hücrelerinin varlığı	Bazal tabaka mitoz sayısı	Bazal tabaka apoptoz sayısı
17	63	Var	Yok	Yok	3-3.5	Var	Yok	Yok	Yok	Var	7/13	Yok
18	60	Yok	Yok	Yok	2-3.5	Yok	Yok	Var	Yok	Var	10/8	5/11
19	54	Yok	Yok	Yok	2-2.5	Yok	Var	Yok	Yok	Yok	5/7	6/5
20	81	Yok	Yok	Yok	3-3.5	Var	Var	Yok	Yok	Yok	9/10	Yok
21	47	Yok	Yok	Yok	3-3.5	Var	Var	Var	Yok	Yok	5/8	12/8
22	75	Var	Var	Yok	3-3.5	Var	Yok	Yok	Yok	Var	11/8	3/8
23	66	Yok	Yok	Yok	1,5-2	Yok	Var	Yok	Yok	Yok	10/10	7/9
24	70	Var	Var	Yok	2,5-3	Var	Yok	Yok	Yok	Yok	6/8	4/7

Radyoterapi + C vitamini grubundan bir denek “ex” olmuştur. Bu grup değerlendirildiğinde ince bağırsak mukozasının kontrol grubuna göre daha düzensiz olduğu, ancak sadece radyoterapi alan gruba göre villus yapılarının, kriptik tabakanın, mukozal yapının kısmen korunduğu görülmüş ve çok az apoptotik figüre rastlanmıştır (Resim 9). Histopatolojik değerlendirme bulguları Tablo 6’da görülmektedir.



Resim 9. Radyoterapi + C vitamini uygulanan grup. A: Villus yapıları korunmuş, kısmen mukoza kaybı mevcut; B: Mitotik figürler (okla işaretli) (H&E, x40), goblet hücre sayısında azalma ve nükleer kalabalıklaşma (H&E, x10).

Tablo 6. Radyoterapi + C vitamini grubunun histopatolojik değerlendirme bulguları

Denek no.	Kript sayısı	Anormal epitelyum hücreleri	Mukozal konjesyon-ödem	Kriptik doku değişiklikleri	Villus boyu	Villus yapı değişiklikleri	Villus birleşmesi	Villuslarda parçalanma	Subepitelyal ayrılma	Lümen de epitelyum hücrelerinin varlığı	Bazal tabaka mitoz sayısı	Bazal tabaka apoptoz sayısı
25	60	Yok	Yok	Yok	4-4,5	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	8/11	Yok
26	71	Yok	Yok	Yok	4	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	12/8	Yok
27	58	Yok	Yok	Yok	4-4,5	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	7/6	1/10
28	64	Var	Yok	Yok	3-3,5	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	6/7	2/14
29	55	Var	Yok	Yok	3-3,5	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	5/8	Yok
30	62	Yok	Yok	Yok	3-3,5	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	3/6	1/8
31	72	Yok	Yok	Yok	4-4,5	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	2/7	Yok

Tüm bulgular eşliğinde yapılan istatistiksel değerlendirmede yalnız radyoterapi uygulanan grupta apoptotik hücre sayısında radyoterapi + C vitamini grubu ($p=0,003$), C vitamini grubu ($p=0,001$) ve kontrol grubuna ($p=0,001$) göre istatistiksel anlamlı artış tespit edilmiştir

Villus boyutunun karşılaştırılmasında yalnız radyoterapi uygulanan gruptaki villus boylarında radyoterapi + C vitamini ($p=0,008$) ve yalnız C vitamini alan gruba göre ($p<0,001$) istatistiksel anlamlı kısalma olduğu belirlenmiştir.

Tüm gruplar arasında radyoterapi uygulananlarda genel olarak mitoz sayısı daha yüksek bulunmasına rağmen istatistiksel anlamlı farklılık yalnız radyoterapi grubu ile yalnız C vitamini alan grup arasında tespit edilmiştir ($p=0,021$).

Kript sayısında ise yalnız radyoterapi ile yalnız C vitamini uygulanan gruplar arasında anlamlı fark tespit edilmiştir ($p<0,001$). C vitamini uygulanan grupta kript sayısı lehine artış mevcuttur. Radyoterapi + C vitamini grubunda kript sayısında artış olmasına rağmen yalnız radyoterapi uygulanan grupla karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı fark bulunamamıştır ($p=1,00$). Çalışma gruplarına ait apoptoz, mitoz, kript sayısı ve villus boyunun karşılaştırılmasına ait istatistiksel değerlendirme sonuçları ve yalnız radyoterapi grubuyla diğer grupların karşılaştırılması sırasıyla Tablo 7 ve 8'de gösterilmiştir.

Tablo 7. Çalışma gruplarına ait değerlendirme sonuçları (*Kruskal Wallis testi*)

	Radyoterapi grubu	C vitamini grubu	Radyoterapi + C vitamini grubu	Kontrol grubu	p değeri
Ortalama apoptoz*	61,00	0,00	5,29	0,00	p=0,001
Ortalama mitoz*	89,38	40,13	80,86	66,25	p=0,018
Ortalama kript sayısı	64,50	84,13	63,14	57,63	p<0,001
Ortalama villus boyu	3,13	4,44	4,00	3,75	p=0,001

*Apoptoz ve mitoz sayısı yüz kript sayılarak değerlendirilmiştir.

Tablo 8. Yalnız radyoterapi grubuyla diğer grupların karşılaştırılması

Bazal apoptoz		
Radyoterapi grubu	C vitamini grubu	p=0,001
	Radyoterapi+C vitamini grubu	p=0,003
	Kontrol grubu	p=0,001
Bazal mitoz		
Radyoterapi grubu	C vitamini grubu	p=0,021
	Radyoterapi+C vitamini grubu	p=1.00
	Kontrol grubu	p=0,865
Kript sayısı		
Radyoterapi grubu	C vitamini grubu	p<0.001
	Radyoterapi+C vitamini grubu	p=1.00
	Kontrol grubu	p=0,623
Villus boyu		
Radyoterapi grubu	C vitamini grubu	p<0,001
	Radyoterapi+C vitamini grubu	p=0,008
	Kontrol grubu	p=0,083

Bonferroni-Dunn testi

5. TARTIŞMA

Radyoterapinin neden olduğu akut yan etkiler radyoterapi sırasında ya da radyoterapinin tamamlanmasından hemen sonra ortaya çıkar. Özellikle hızlı bölünen ve çoğalan hücrelerin bulunduğu doku ve organlarda akut yan etkiler daha sık ve şiddetli olarak görülmektedir. Gastrointestinal kanal, kemik iliğinden sonra radyasyonun etkilerine karşı en duyarlı sistemdir.

Yapılan çalışmalarda radyoterapi sonrası bağırsak mukozasında oluşan biyokimyasal değişikliklere ek olarak fonksiyonu akut olarak etkileyen morfolojik değişiklikler de gözlenmiş olup bu değişiklikler villus-kript yapısındaki değişiklikler ve radyasyonun indüklediği apoptozla ilişkili epitelial değişiklikler olarak iki grupta toplanabilir.^{5,54,61,85,86}

Radyoterapinin epitel hücresinde oluşturduğu hasarın büyük kısmı serbest radikaller ve metabolitleri üzerinden gerçekleşmektedir. Oluşan serbest radikallerin ya vücudun lokal, bölgesel savunma mekanizmaları tarafından ya da dışarıdan müdahale ile etkisizleştirilmesi söz konusu olursa radyoterapiye bağlı yan etkilerin de azaltılması söz konusu olabilir. Antioksidanlar hücre çekirdeğinde DNA hasarının tamirine yardımcı olarak, hücre membranında lipid peroksidasyonunu azaltarak, lipid radikallerini yok ederek, antioksidan kapasitesi olan mitokondrinin bu kapasitesini arttırarak ve apoptozu engelleyerek hücreyi radyasyon hasarına karşı korurlar.⁶ Antioksidanlar içinde en çok araştırılanlardan biri de C vitamini dir.

Yamamoto ve arkadaşları farelerde C vitamininin radyasyonun indüklediği gastrointestinal sendrom üzerine etkisini araştırdıkları çalışmalarında farelere radyoterapiden önce veya sonra üç gün süreyle peroral askorbik asid (150 mg/kg) vermişler ve 6-14 Gy tüm vücut radyoterapisi (WBI) uygulamışlardır.⁵⁴ Sağkalan farelere radyoterapiden 24 saat sonra kemik iliği transplantasyonu yapılmıştır. Farelerin plazma ve ince barsak dokusunda askorbik

asid düzeyleri, plazmadaki serbest radikal metabolitleri ölçülmüş ve DNA “microarray”le gen ekspresyon analizi yapılmıştır. Ondört Gy WBI öncesi askorbik asid verilen farelerde sağkalımın daha iyi olduğu, ancak radyoterapiden sonra askorbik asid uygulananların hiçbirinin kemik iliği transplantasyonuna rağmen yaşamadığı görülmüştür. Farelerin intestinal mukozasında yapılan incelemede WBI öncesi askorbik asid verilenlerde dejeneratif değişikliklerin daha az olduğu, askorbik asidin villus boylarında kısalmayı ve kript sayısında azalmayı önlediği belirlenmiştir. WBI öncesi askorbik asid verilen farelerin ince bağırsaklarındaki askorbik asid seviyesinin daha yüksek olduğu, ilginç olarak da hem askorbik asid verilen hem de verilmeyenlerde radyoterapi uygulamasından bir saat sonra ince bağırsak dokusunda askorbik asid seviyesinin anlamlı olarak düştüğü gözlenmiştir. Bu bulgu radyasyonun dokuda askorbik asid tüketimini arttırdığını göstermektedir. WBI öncesi askorbik asid uygulaması plazmada serbest radikal metabolitlerini azaltmış, kript epitelyum hücrelerinde radyasyonun indüklediği DNA hasarını önlemiştir. Gen ekspresyon analizinde de WBI öncesi askorbik asid verilen farelerde apoptoz indüksiyonunda rol alan enzimlerin regülasyonunda azalma tespit edilmiş, incelenen gen gruplarından yola çıkılarak bu azalmanın ince bağırsakta hem mitokondri aracılı intrensek, hem de reseptör aracılı ekstrensek yolların baskılanmasıyla ortaya çıktığı belirlenmiştir. Bu çalışmaya göre radyoterapi sonrası oluşan serbest radikallerin askorbik asit tarafından etkisizleştirilmiş olması gerekir. Aynı çalışmada bu sorunun cevabına yönelik yapılan araştırmada askorbik asidin okside formu olan dehidroasetik asit düzeyinde de artış saptanmıştır ki, bu da C vitamininin radikal oluştuktan sonra radikali etkisizleştirmek için hidrojen donörü olarak reaksiyona girdiğini göstermektedir.⁵⁴ Tüm bu etkilerin radyoterapi öncesi askorbik asid verilen farelerde görülmesi hem radyasyona maruziyet öncesi hem de maruziyet sırasında askorbik asidin doku konsantrasyonunun yüksek olmasının önemini vurgulamaktadır.

C vitamininin apopitoza yol açan kaspaz 3 ve kaspaz 9 yolaklarını aktive eden genlerin ekspresyonunda azalmaya sebep olduğu ve bu yolakların aktive olamamasından dolayı apopitozu engellediği öne sürülmektedir.⁵⁴ Paris ve arkadaşları gastrointestinal sendromun radyasyonun mikrovasküler endotelial hücrelerin apopitozunu indüklemesi nedeniyle ortaya çıktığını öne sürmüşlerdir.⁶⁶ Ancak başka çalışmalarda apopitoza kript epiteli hücrelerinde rastlanıldığı, vasküler endotelial hücrelerde rastlanılmadığı belirtilmektedir.^{22,23,24,54} Bu durumda radyoterapi öncesi verilen C vitamini doğrudan kript hücrelerindeki hasarı önleyerek veya vasküler endotelial hasara karşı koruyucu etkiyle dolaylı yoldan etki göstermektedir. Bizim çalışmamızda da ışınlanan deneklerde apopitotik hücrelerin yoğun bir şekilde görülmesi, buna karşın radyoterapi ve C vitamini alan deneklerde apopitotik hücre sayısının anlamlı derecede düşük bulunması ve radyoterapi almayan grupta hemen hiç apopitotik hücreye rastlanılmamış olması C vitamininin hücreleri radyoterapiye bağlı apopitoza karşı koruduğunu desteklemektedir.

Akpolat ve arkadaşlarının iyonizan radyasyonun neden olduğu ince bağırsak hasarına karşı curcumin (Çin ve Hindistan'da yetiştirilen bir tür bitkisel antioksidan) ve C vitamininin koruyucu etkisini inceledikleri çalışmalarında yalnız radyasyon uygulanan sıçanlarda hücre kaybına bağlı olarak villus boylarında kısalma ile birlikte şekil bozuklukları, ileri seviyede subepitelyal boşluk, lamina propriada kapiller konjesyon ve dilatasyon, Lieberkühn bezlerinde çok sayıda mitotik figür, dejenerasyona uğrayan villuslarda goblet hücre hakimiyeti görülmüş, buna karşın C vitamini verilen sıçanlarda yer yer korunmuş olan villus intestinalislerin yanı sıra şekilleri bozulmuş villus yapıları, çok hafif subepitelyal ayrılma ve Lieberkühn bezlerinde az sayıda mitotik figürlere rastlanmıştır.⁵⁵ Histopatolojik değerlendirmede mukozal hasar şiddetini yansıtan histopatolojik skorun radyasyon grubunda anlamlı düzeyde yüksek bulunduğu ($p<0,001$), buna karşın C vitamini alan grupta anlamlı düzeyde düşük olduğu ($p<0,001$) tespit edilmiştir.

Carr ve arkadaşları ışınlamadan birkaç saat sonra Lieberkühn bezlerinin boyun bölgesinde epitelin düzensizleştiğini, villus yüzeyinde bakterilerin sayısında ve mukus üretiminde artma meydana geldiğini, gözlenen morfolojik değişikliklerin ışınlamanın dozuna ve özelliklerine bağlı olduğunu, hasarların çoğunun ışınlamadan sonraki 3-7 gün içinde görüldüğünü bildirmişlerdir.⁸⁶ Çalışmamızda da radyasyonun ince bağırsak epitelinde değişikliklere yol açtığını gösteren diğer çalışmalarla benzer şekilde radyoterapi uygulanan grupta 72 saat sonra yapılan değerlendirmede mukozal epitel yapısında morfolojik değişiklikler tespit edilmiştir.^{5,54,61,84,85} Radyoterapi grubu ile radyoterapi ve C vitamini alan grup arasında villus boyları açısından anlamlı düzeyde fark bulunmuştur (p=0,008). Lieberkühn bezlerinin çevresinde hücre kaybına bağlı villus boyları kısalmış, yalnız radyoterapi uygulanan grupta lamina epitelialisteki bozulma nedeniyle lümende epitel hücreleri tespit edilmiş, yer yer anormal epitelyum hücrelerine de rastlanılmıştır. Radyoterapiyle birlikte C vitamini uygulanan grupta morfolojik değişikliklerin daha az gözlenmesi C vitaminin oksidatif hasara karşı mukozal yapıyı kısmen koruduğunun bir göstergesi olabilir. Radyasyon uygulanan grupta 72 saat sonra mitozun görülmesi ve radyoterapi grubu ile C vitamini alan grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmesi (p=0,021) diğer gruplarla istatistiksel olarak fark bulunmaması bu süre içinde mitotik inhibisyonunun ortadan kalktığının bir göstergesi olarak değerlendirilmiştir.

Radyoterapinin mast hücresi degranülasyonu ve histamin salınımına neden olduğu bilinmektedir.^{55,84,87,88} Abdominal radyoterapi sonrası meydana gelebilecek olan inflamasyon ve medyatörlerin salınımı bağırsakta yan etkilerin gelişmesine katkıda bulunur. C vitamininin mast hücresi stabilatörü olarak etki edebileceği ve degranülasyona engel olarak medyatörlerin salınımını engellediği, astım hastalığı gibi alerjik hastalarda semptomlarda düzelme sağladığı birçok çalışmada gösterilmiştir.^{87,88,89,90,91} Radyoterapi ile birlikte C vitamini uygulaması

bağırsaktaki mast hücre degranülasyonunu ve buna bağlı inflamasyonu önleyebileceğinden radyoterapiye bağlı yan etkilerin gelişmesine engel olabilir.

C vitamininin antioksidan özelliği nedeniyle radyasyonun oluşturduğu oksidatif hasarı engellediği birçok çalışmada tespit edilmesine rağmen klinik kullanıma henüz girmemiştir. Çalışmamızda da sıçanlara 250 mg/kg dozunda uygulanan C vitamininin intestinal mukozayı radyasyon hasarından koruduğu ve antiapoptotik etkisi olduğu gösterilmiştir. C vitamininin pelvik ışınlamalarda profilaktik kullanımı sıklıkla karşılaşılan intestinal yan etkilerin gelişimini önleyebilir. C vitamini gerek uygulama kolaylığı gerekse maliyet açısından uygun bir radyoprotektif ajan olarak düşünülebilir. Ancak oksidatif strese karşı antioksidan özelliği doz bağımlı olduğundan ve yüksek dozlarda pro-oksidan olabileceğinden doz kontrollü ve tümörlü dokularda yapılan çalışmalara ihtiyaç vardır.

6. SONUÇLAR

Wister-Albino sıçanlarda intestinal mukozada radyoterapinin oksidatif hasarına karşı C vitamininin koruyucu etkisinin araştırıldığı bu çalışmada intestinal mukozanın histopatolojik incelemesinde aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir:

- Radyoterapi uygulanan grupta dejenere villuslar, villuslarda birleşme, villuslarda şekil bozuklukları (çatallanma, dallanma), mukozal düzensizlikler görülmüştür. Ayrıca bazı kesitlerde lümeninde epitelyum hücresi ve lenfosit infiltrasyonuna da rastlanmıştır.
- Radyoterapi uygulanan grupta apoptotik hücre sayısında radyoterapi + C vitamini grubu, C vitamini grubu ve kontrol grubuna göre artış tespit edilmiştir.
- Radyoterapi uygulanan gruptaki villus boylarında radyoterapi + C vitamini ve yalnız C vitamini alan gruba göre anlamlı kısalma olduğu belirlenmiştir.
- Radyoterapi uygulananlarda genel olarak mitoz sayısı daha yüksek bulunmasına rağmen istatistiksel anlamlı farklılık yalnız radyoterapi grubu ile yalnız C vitamini alan grup arasında saptanmıştır.
- C vitamini uygulanan grupta kript sayısı lehine artış mevcuttur. Radyoterapi + C vitamini grubunda kript sayısında artış olmasına rağmen yalnız radyoterapi uygulanan grupla karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı fark bulunamamıştır.

ÖZET

Bir antioksidan olan C vitamininin radyoterapi sürecinde serbest radikallerin oluşturacağı normal doku hasarına karşı özellikle radyoterapiye erken yanıt veren intestinal mukozada etkili olabileceği düşünülmüş ve bir hayvan deneyi modeli oluşturulmuştur.

Ağustos 2009 - Kasım 2009 tarihleri arasında Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Hayvanları Araştırma Birimi'nde üretilen, genç erişkin, ortalama 4 aylık, ağırlıkları 180-220 gr arasında değişen 32 adet Wistar albino erkek (n=16) ve dişi (n=16) sıçan kontrol grubu, C vitamini grubu, radyoterapi grubu ve radyoterapi + C vitamini grubu olmak üzere 4 gruba randomize edilmiştir. C vitamini ve Radyoterapi + C vitamini gruplarının içme suyuna 10 gün boyunca 250 mg/kg dozunda C vitamini eklenmiştir. Radyoterapi uygulanacak gruplara ait sıçanlar anestezisi altında simüle edilerek batin bölgeleri işaretlenmiş ve Co⁶⁰ teleterapi cihazı ile tek fraksiyonda 8 Gy uygulanmıştır. Radyoterapiden 72 saat sonra tüm sıçanlar anestezisi altında sakrifiye edilerek özofagus distal uçtan anüse kadar tüm gastrointestinal traktus "en-bloc" çıkarılmış, ileo-çekal valvin 5 cm proksimali ileumdan ve 5 cm distali kolon segmentinden 1 cm'lik segmentte histopatolojik değerlendirme yapılmıştır.

Radyoterapi uygulanan grupta apoptotik hücre sayısında radyoterapi + C vitamini grubu (p=0,003), C vitamini grubu (p=0,001) ve kontrol grubuna (p=0,001) göre anlamlı artış tespit edilmiştir. Villus boyutunun karşılaştırılmasında yalnız radyoterapi uygulanan gruptaki villus boylarında radyoterapi + C vitamini (p=0,008) ve yalnız C vitamini alan gruba göre (p<0,001) kısalma olduğu belirlenmiştir. Tüm gruplar arasında radyoterapi uygulananlarda genel olarak mitoz sayısı daha yüksek bulunmasına rağmen istatistiksel anlamlı farklılık yalnız radyoterapi grubu ile yalnız C vitamini alan grup arasında tespit edilmiştir (p=0,021). Kript sayısında ise yalnız radyoterapi ile yalnız C vitamini uygulanan gruplar arasında anlamlı

fark tespit edilmiştir ($p<0,001$). C vitamini uygulanan grupta kript sayısı lehine artış mevcuttur. Radyoterapi + C vitamini grubunda kript sayısında artış olmasına rağmen yalnız radyoterapi uygulanan grupla karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı fark bulunamamıştır ($p=1,00$).

Çalışmanın sonucunda 250 mg/kg dozunda uygulanan C vitamininin sıçanlarda intestinal mukozayı radyasyon hasarından koruduğu ve antiapoptotik etkisi olduğu gösterilmiştir. Ancak C vitamininin oksidatif strese karşı antioksidan özelliği doz bağımlı olduğundan ve yüksek dozlarda pro-oksidan olabileceğinden doz kontrollü ve tümörlü dokularda yapılan çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

1. Riordan HD ve ark. Intravenous vitamin C as a chemotherapy agent. A report on clinical cases. *PRHSJ* 2004;23(2):115-8.
2. Cameron E, Pauling L. Vitamin C and the immune system. In: *Cancer and vitamin C*. 2nd ed. Philadelphia, Camino Book 1990;108-11.
3. Jensen NH. Reduced pain from osteoarthritis in hip joint or knee joint during treatment with calcium ascorbate. *Ugeskr Laeger* 2003;165:2563-6.
4. Lewin S. Maintenance of physiological actions by c-AMP and c-GMP. In: *Vitamin C: Its molecular biology and medical potential*. London: Academic Press 1976;92-93.
5. Gonzalez MJ ve ark. Orthomolecular oncology review: ascorbic acid and cancer 25 years later. *Integr Cancer Ther* 2005;4(1):32-44.
6. Okunieff P, Swarts S, Keng P, ve ark. Antioxidants reduce consequences of radiation exposure. *Adv Exp Med Biol* 2008;614:165-78.
7. Chandra JG, Rajanikant GK, Rao SK, Shrinath Baliga M. Alteration in the glutathione, glutathione peroxidase, superoxide dismutase and lipid peroxidation by ascorbic acid in the skin of mice exposed to fractionated gamma radiation. *Clin Chim Acta* 2003;332:111-21.
8. Horwhat D, HJ, Dubois A. Radiation Enteritis. Current Treatment Options in Gastroenterology Current Medicine Group LLC 1999;2:371-381.
9. Tekkes Y, Streptozotosin ile diabet oluşturulmuş farelerde aspirin ve E vitaminin dokularda lipid peroksidasyonu ve antioksidan sisteme etkisinin araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Kahramanmaraş 2006;1-52.
10. Mascio Dİ, Murphy ME, Sies H. Antioxidant defense systems: the role of carotenoids, tocopherols, and thiols. *Am J Clin Nutr* 1991;53(1 Suppl):194-200.
11. Smith MA, Harris PLR, Sayre LM, Beckman JS, Perry G. Widespread peroxynitrite-mediated damage in Alzheimer's disease, *J. Neurosci* 1997;17:2653-7.
12. Akkuş İ. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Mimoza yayınları, Kuzucular ofset, Konya. 1995;1-124.
13. Potten CS, Merritt A, Hickman J, Hall P, Faranda A. Characterization of radiationinduced apoptosis in the small intestine and its biological 1994;65:71-8.
14. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull* 1993;49(3):481-93.
15. Rachmilewitz D, Karmeli F, Okan E, Samuni A. A novel antiulserogenic stable radical prevents gastric mucosal lesions in rats. *Gut* 1994;35:1181-8.

16. Frei B. Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: Mechanisms of Action.,The American Journal of Medicine 1994;97(Suppl 3A),26,3A-5S-3A-12S.
17. Battal A ve ark. Serbest radikal temizleyici süperoksit dismutaz enziminin ve serum, bakır, çinko, selenyum düzeylerinin diabetes mellitus'un kronik komplikasyonları ile ilişkisi. GATA Bülteni 1995;37:218-2.
18. Bast A, Haenen GRMM, Cees JAD. Oxidants and antioxidants:State of the art. The American Journal of Medicine 1997;91,(Suppl 3C),30,3C-2S_3C-13S.
19. Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence. Lancet 1994;10;344(8924):721-4.
20. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. Proc Natl Acad Sci USA 1993;1;90(17):7915-22.
21. Halliwell B, Gutteridge JM. The antioxidants of human extracellular fluids. Arch Biochem Biophys 1990;280(1):1-8.
22. Çakır M. Aspirin ve vitamin E (α -Tokoferol)'nin farelerde (*Mus musculus*) karaciğer total süperoksit dismutaz ve katalaz aktivitelerine etkileri. Ondokuz Mayıs Üni. Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Samsun, 1997;1-50.
23. Cross CE ve ark. Oxygen radicals and human disease. Ann Intern Med 1987;107(4):526-45.
24. Cerutti AP, Mc Cord JM, Fridovich I. Oxy-radicals in molecular biology and pathology. New York.Alan R. Liss. Inc. 1988;183-93.
25. Merry P, Winyard PG, Morris CJ, Grootveld M, Blake DR. Oxygen free radicals, inflammation, and synovitis: the current status. Ann Rheum Dis 1989;48(10):864-70.
26. Pascifi RE, Davies KJ. Protein, lipid and DNA repair systems in oxidative stress: the free radical theory of aging revisited. Gerontology 1991;37(1-3):166-80.
27. Gutteridge JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. Clin Chem 1995;41(12 Pt 2):1819-28.
28. Murray RK, Graner DK, Mayes RA, Rodwell VW. Fizyolojik öneme sahip lipidler. Çeviri editörleri Dikmen N, Özgünen T. Harper'ın Biyokimyası, Yirmidördüncü baskı, Barış Kitabevi, 1996 İstanbul.
29. Craig ET, Aust SD. Free radicals and environmental toxins. Annals of Emergency Medicine 1986;9-15.
30. Valko M, Rhodes CJ, Moncola J, Izakovic M, Mazura M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer Chemico-Biological Interactions 2006;160:1-40.

31. Nair V, Cooper CS, Vietti DE, Turner GA. The chemistry of lipid peroxidation metabolites: crosslinking reactions of malondialdehyde. *Lipids* 1986;21(1):6-10.
32. Rice-evans CA, Diplock AT, Smons MCR. *Techniques in free radicals research*. Elsevier, Amsterdam, 1991;22:699-704.
33. Winrow VR, Winyard PG, Morris CJ, Blake DR. Free radicals in inflammation. Second messengers and mediators of tissue destruction. *British Medical Bulletin* 1993;49(3):506-522.
34. Cord MC, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem* 1969;244(22):6049-55.
35. Fridovich I. Superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* 1975;44:147-59.
36. Henry LEA, Halliwell B, Hall DO. The superoxide dismutase activity of various photosynthetic organisms measured by a new and rapid assay technique. *Febs Letters* 1976;66:2.
37. Flohe L, Otting F. Superoxide dismutase assays. *Methods Enzymol* 1984;105:93-104.
38. Gonzales R, Auclair C, Voisin E, Gautero H, Dhermy D, Boivin P. Superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in red blood cells from patients with malignant diseases. *Cancer Res* 1984;44(9):4137-9.
39. Wheeler CR, Salzman JA. Automated assays for superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and glutathione reductase activity. *Analytical Biochemistry* 1990;184:193-9.
40. Ciriolo MR, Fiskin K, De Martino AD, Corasaniti MT, Nistico G, Rotilio G. Age related changes Cu-ZnSOD. Se-dependent and-independent glutathione peroxidase and catalase activities in specific areas of rat brain. *Mechanism of Ageing And Development* 1991;61:287-97.
41. Marklund SL. Properties of extracellular superoxide dismutase from human lung. *Biochem J* 1984;220(1):269-72.
42. Tudhope GR. Red cell catalase in health and in disease , with reference to the enzyme activity in anaemia. *Clin Sci* 1967;33:165-82.
43. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967;70(1):158-69.
44. Fırat S. Kobaylarda radyasyonla oluşan akciğer hasarında doku glutatyon, glutatyon peroksidaz, glutatyon- S-transferaz düzeyleri ve N-asetil sistein'in bu sistem üzerindeki etkisi. Gazi Üni. Tıp Fak. Biyokimya A.B.Dalı, Uzm.Tezi, Ankara 1997.
45. Necheles TF, Boles TA, Allen DM. Erythrocyte glutathione peroxidase deficiency and hemolytic disease of the newborn infant. *The Journal of Pediatrics* 1968;72(3):319-24.

46. Takahashi K, Cohen HJ.. Selenium-dependent glutathione peroxidase protein and activity: Immunological investigations on cellular and plasma enzymes. *Blood* 1986;68(3):640-5.
47. Mannervik B. Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 1985;113:490-5.
48. Cameron E, Pauling L. Vitamin C and the immune system. In: *Cancer and Vitamin C*. Editor Andrew W. Saul, 2nd ed. Philadelphia, Camino Book;1990;108-11.
49. Jensen NH. Reduced pain from osteoarthritis in hip joint or knee joint during treatment with calcium ascorbate *Ugeskr Laeger* 2003;165:2563–6.
50. Mitjans M, Martínez V, del Campo J ve ark. Novel epicatechin derivatives with antioxidant activity modulate interleukin-1 β release in lipopolysaccharide-stimulated human blood. *Bioorg Med Chem Lett* 2004;14:5031–34.
51. Haddad JJ, Fahlman CS. Redox- and oxidant-mediated regulation of interleukin-10: an antiinflammatory, antioxidant cytokine? *Biochem Biophys Res Commun* 2002;297:163–76.
52. Kennedy M, Bruninga K, Mutlu EA, Losurdo J, Choudhary S, Keshavarzian A. Successful and sustained treatment of chronic radiation proctitis with antioxidant vitamins E and C. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 1080–84.
53. Nam SY, Cho CK, Kim SG. Correlation of increased mortality with the suppression of radiation-inducible microsomal epoxide hydrolase and glutathione S-transferase gene expression by dexamethasone: effects on vitamin C and E-induced radioprotection. *Biochem Pharmacol* 1998;56:1295-304.
54. Yamamoto T, Kinoshita M, Shinomiya N ve ark. Pretreatment with Ascorbic Acid Prevents Lethal Gastrointestinal Syndrome in Mice Receiving a Massive Amount of Radiation. *J Radiat Res (Tokyo)* 2009;1-12.
55. Akpolat M, Tarladaçalışır YT, Kantar M. İyonizan radyasyonun neden olduğu ince bağırsak hasarına karşı curcumin ve C vitamininin koruyucu etkilerinin incelenmesi, *Tıp Araştırmaları Dergisi* 2008;6(2):77-85.
56. Seven A, Candan G. Antioksidan savunma sistemleri. *Cerrahpaşa Tıp Derg* 1996;27:41-50.
57. You WC, Zhang L, Gail MH ve ark. Gastric cancer: Helicobacter pylori, serum Vitamin C, and other risk factors, *J Natl Cancer Inst* 2000;92:1607–12.
58. Knekt P, Jarvinen R, Seppanen R ve ark. Dietary antioxidants and the risk of lung-cancer, *Am J Epidemiol* 1991;134:471–79.
59. Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, National Academy of Sciences. Dietary reference intakes for vitamin C, vitamin E, selenium and carotenoids. National Academy Press, Washington, DC 2000;1-529.

60. Sarma L, Kesavan PC. Protective effects of vitamins C and E against gamma-ray induced chromosomal damage in mouse. *Int J Radiat Biol* 1993;63:759-64.
61. Okunieff P. Interactions between ascorbic acid and the radiation of bone marrow, skin, and tumor. *Am J Clin Nutr* 1991;54:1281-83.
62. Konopacka M, Widel M, Rzeszowska-Wolny J. Modifying effect of vitamin C, E, and beta-carotene against gamma-ray-induced DNA damage in Mouse cells. *Mutat Res* 1998;417:85-94.
63. Blumenthal RD, Lew W, Reising A ve ark. Anti-oxidant vitamins reduce normal tissue toxicity induced by radio-immunotherapy. *Int J Cancer* 2000;86:276-80.
64. Valko M, Rhodes CJ, Moncola J, Izakovic M, Mazura M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer *Chemico-Biological Interactions* 2006;160:1–40.
65. Murray AR, Kisin ER, Kommineni C, Vallyathan V , Castranova V, Shvedova AA. Pro/antioxidant status and AP-1 transcription factor in murine skin following topical exposure to cumene hydroperoxide. *Carcinogenesis* 2007;28(7):1582-88.
66. Paris F, Fuks Z, Kang A ve ark. Endothelial apoptosis as the primary lesion initiating intestinal radiation damage in mice. *Science* 293:2001;293–97.
67. Johnston CS, Martin LJ, Cai X. Antihistamine effect of supplemental ascorbic acid and neutrophil chemotaxis. Department of Family Resources and Human Development, Arizona State University *Journal of the American College of Nutrition* 1992;11(2):172-76.
68. Bucca C, Rolla G, Oliva A, Farina JC. Effect of vitamin C on histamine bronchial responsiveness of patients with allergic rhinitis. *Dpt. di Scienze Biomediche e Oncologia Umana, Università di Torino, Italy* 1990;65(4):311-4.
69. Kodama M, Kodama T, Murakami M. Vitamin C infusion treatment enhances cortisol production of the adrenal via the pituitary ACTH route. *In Vivo* 1994;8(6):1079-85.
70. Selvaraju T, Ramaraj R. Simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine and serotonin at poly(phenosafranine) modified electrode. School of Chemistry, Madurai Kamaraj University, Madurai India. *Electrochemistry Communications* 2003;5(8):667-72.
71. Bhanja P, Saha S, Kabarriti R ve ark. Protective role of R-spondin1, an intestinal stem cell growth factor, against radiation-induced gastrointestinal syndrome in mice *PLoS One*. 2009;4(11):e8014, 1-10.
72. Francois S, Bensidhoum M, Mouiseddine M, Mazurier C, Allenet B. Local irradiation not only induces homing of human mesenchymal stem cells at exposed sites but promotes their widespread engraftment to multiple organs: a study of their quantitative distribution after irradiation damage. *Stem Cells* 2006;24:1020–29.

73. Monti P, Wysocki J, van der Meeren A, Griffiths NM. The contribution of radiation induced injury to the gastrointestinal tract in the development of multiorgan dysfunction syndrome or failure. *BJR Suppl* 2005;27:89–94.
74. Walsh D. Deep tissue traumatism from roentgen ray exposure. *Br Med J* 1897;2:272-3.
75. Warren SL, Whipple GH. Roentgen ray intoxication. I. Unit dose over thorax negative-over abdomen lethal. Epithelium of small intestine sensitive to X-rays. *J Exp Med* 1922;35:187-202.
76. Warren SL, Whipple GH. Roentgen-Ray intoxication:Roentgentherapy in man in the light of experiments showing sensitivity of intestinal epithelium. *JAMA* 1923;81:1673-75.
77. Sher ME, Bauer J. Radiation-induced enteropathy. *Am J Gastroenterol* 1990;85(2):121-28.
78. Galland RB, Spencer J. The natural history of clinically established radiation enteritis. *Lancet* 1985;1:1257-58.
79. Hubel KA, Renquist KS. Ion transport in normal and inflamed human jejunum in vitro. Changes with electrical field stimulation and theophylline. *Dig Dis Sci* 1990;35:815-20.
80. Hawker PC, McKay JS, Turnberg LA. Electrolyte transport across colonic mucosa from patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1980;79:508-11.
81. Wood JD. Neuro-immunophysiology of colon function. *Pharmacol* 1993;47(1):7-13.
82. Berg DJ, Davidson N, Kühn R, et al. Enterocolitis and colon cancer in interleukin-10-deficient mice are associated with aberrant cytokine production and CD4+ TH1-like responses. *J Clin Invest* 1996;98:1010–20.
83. Dieleman LA, Goerres MS, Arends A ve ark. Lactobacillus GG prevents recurrence of colitis in HLA-B27 transgenic rats after antibiotic treatment. *Gut* 2003;52:370–6.
84. Helen BS, Coleman CN, Anscher MS, McBride WH. Effects of radiation on normal tissue: consequences and mechanisms. *The Lancet Oncology* 2003;4:529-36.
85. Rubio CA, Jalnas M. Dose-time-dependent histological changes following irradiation of the small intestine of rats. *Dig Dis Sci* 1996;41:392-401.
86. Carr KE, Hamlet R, Nias AH, Watt C. Multinucleate giant enterocytes in small intestinal villi after irradiation. *J Microsc* 1981;123:169-76.
87. Johnston CS, Martin LJ, Cai X ve ark. Antihistamine effect of supplemental ascorbic acid and neutrophil chemotaxis *J Am Coll Nutr* 1992;2:172-76.

88. Doyle TF, Strike TA. Radiation-released histamine in the rhesus monkey as modified by mast-cell depletion and antihistamine. *J Cellular and Molecular Life Sciences* 1977;33(8):1047-49.
89. Harik-Khan RI, Muller DC, Wise RA. Serum vitamin levels and the risk of asthma in children. Low vitamin C and alpha-carotene intakes are associated with asthma risk in children. *Am J Epidemiol* 2004;159(4):351-7.
90. Chang HH, Chen CS, Lin JY. High dose vitamin C supplementation increases the Th1/Th2 cytokine secretion ratio, but decreases eosinophilic infiltration in bronchoalveolar lavage fluid of ovalbumin-sensitized and challenged mice. *J Agric Food Chem* 2009;57(21):10471-6.
91. Allen S, Britton JR, Leonardi-Bee JA. Association between antioxidant vitamins and asthma outcome measures: systematic review and meta-analysis. *Thorax* 2009;64(7):610-9.