

**T.C.**  
**ERCIYES ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı**

**RADYASYON İLE OLUŞTURULMUŞ DENEYSEL KARACİĞER**  
**HASARI ÜZERİNE MELATONİNİN**  
**ANTIÖKSİDATİF VE ANTI-İNFLAMATUAR ETKİLERİNİN**  
**ARAŞTIRILMASI**

**Hazırlayan**  
**Betül YALÇIN**

**Danışman**  
**Prof. Dr. Arzu Hanım YAY**

**Doktora Tezi**

**Aralık 2021**  
**KAYSERİ**

**T.C.**  
**ERCIYES ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**RADYASYON İLE OLUŞTURULMUŞ DENEYSEL KARACİĞER**  
**HASARI ÜZERİNE MELATONİNİN**  
**ANTIOKSİDATİF VE ANTI-İNFLAMATUAR ETKİLERİNİN**  
**ARAŞTIRILMASI**

**Doktora Tezi**

**Hazırlayan**  
**Betül YALÇIN**

**Danışman**  
**Prof. Dr. Arzu Hanım YAY**

**Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi**  
**Tarafından TDK-2018-8364 nolu proje kodu ile projelendirilmiştir.**

**Aralık 2021**  
**KAYSERİ**

## **BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK**

Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, tüm bilgilerin akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda akademik ve etik kuralların gerektirdiği gibi tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel kurallara uygun olarak atıfta bulunduğumu ve kaynaklar listesinde gösterdiğimi belirtirim.

**Adı ve Soyadı: Betül YALÇIN**

**İmza:**

## **YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI**

**“Radyasyon ile Oluşturulmuş DeneySEL Karaciğer Hasarı Üzerine Melatoninin Antioksidatif ve Anti-İnflamatuvar Etkilerinin Araştırılması” adlı Doktora Tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesine uygun olarak hazırlanmıştır.**

**Tezi Hazırlayan**  
**Betül YALÇIN**

**Danışman**  
**Prof. Dr. Arzu Hanım YAY**

**Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı**  
**Prof. Dr. Birkan YAKAN**

## KABUL VE ONAY

**Prof. Dr. Arzu Hanım YAY** danışmanlığında **Betül YALÇIN** tarafından hazırlanan “**Radyasyon İle Oluşturulmuş Deneysel Karaciğer Hasarı Üzerine Melatoninin Antioksidatif Ve Anti-İnflamatuar Etkilerinin Araştırılması**” konulu bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

24/12/2021

### JÜRİ:

Danışman : Prof. Dr. Arzu Hanım YAY  
(Erciyes Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji AD)

Üye : Prof. Dr. Birkan YAKAN  
(Erciyes Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji AD)

Üye : Prof. Dr. Harun ÜLGER  
(Erciyes Üniversitesi Anatomi AD)

Üye : Dr. Öğr.Üyesi Halime TOZAK YILDIZ  
(Kırşehir Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji AD)

Üye : Dr. Öğr.Üyesi Kübra Tuğçe Kalkan  
(Kırşehir Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji AD)

### ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun .  
kararı ile onaylanmıştır.

## TEŞEKKÜR

Lisansüstü çalışmalarım boyunca ilgi ve desteğini bir an olsun esirgemeyen, engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım yönlendirme ve bilgilendirmeleriyle çalışmalarımı bilimsel temeller ışığında şekillendiren, beraber çalışmaktan ve her zaman öğrencisi olmaktan gurur duyduğum, her konuda destek olan ve hakkını asla ödeyemeyeceğim, bugünlere gelmemde en büyük katkı sahibi çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Arzu YAY'a,

Her zaman yanımda olan bilgi ve desteğini esirgemeyen değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Esra BALCIOğLU'na ve çalışmamda deneyimlerini esirgemeyen labaratuvarını bizimle paylaşan sayın hocam Doç. Dr. Fazile CANTÜRK TAN'a

Eğitimim boyunca bilgilerinden faydalandığım Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Birkan YAKAN'a,

Yüksek lisans ve doktora eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen ve tez projemin oluşturulmasında emeği geçen Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR' a,

Birlikte çalışmaktan mutlu olduğum Histoloji ve Embriyoloji ailesinden çok kıymetli arkadaşlarım Dr. Öğr. Üyesi Gözde Özge ÖNDER, Araş. Gör. Dr. Özge GÖKTEPE, Uzm. Dr. Menekşe ÜLGER, Araş. Gör. Özge CENGİZ MAT' a

Hayatım boyunca yanımda olan ve desteklerini benden esirgemeyen en büyük paya sahip canım annem Tülay YALÇIN'a, canım babam Yahya YALÇIN'a ve canım kardeşlerim Gamze YALÇIN ile Mine YALÇIN' a

Sonsuz Teşekkürlerimi sunarım...

Betül YALÇIN

Aralık 2021, KAYSERİ

# **RADYASYON İLE OLUŞTURULMUŞ DENEYSEL KARACİĞER HASARI ÜZERİNE MELATONİNİN ANTIOKSİDATİF VE ANTI-İNFLAMATUAR ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Betül YALÇIN**

**Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü**

**Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı**

**Doktora Tezi, Aralık 2021**

**Danışman: Prof. Dr. Arzu Yay**

## **ÖZET**

Radyoterapi (RT) günümüzde birçok kanser için önde gelen terapötik yaklaşımlardan biridir; kısa vadeli ve uzun vadeli yan etkilerle normal dokuya zarar verme potansiyeli taşımaktadır. Melatoninin ise radyasyona karşı koruyucu ve duyarlı olması, radyoterapide adjuvan olarak kullanım için ideal bir aday yapmaktadır. Bu çalışmada, radyasyonun karaciğerde oluşturduğu hasara karşı melatoninin koruyucu ve tedavi edici etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Çalışmada, 60 adet yetişkin erkek sıçan kullanıldı. Her grupta 10 adet olacak şekilde K (SF), S (SF+%3'lük etanol), M (10 mg/kg melatonin), R (10 Gy radyasyon), RM (10 Gy radyasyon+10 mg/kg melatonin), MR (10 mg/kg melatonin+10 Gy radyasyon) gruplarına ayrıldı. Histopatolojik değerlendirmeler için Hematoksilin&Eozin (H&E), Masson trikrom (MT) ve Periyodik asit schiff (PAS) ile boyandı. İmmunohistokimyasal metodlar ile kaspaz-3, NF $\kappa$ B-p65, Sirtuin-1 ve  $\alpha$ -SMA immünreaktivite yoğunlukları belirlendi. MDA, CAT, SOD, GSH-Px, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , PDGF ve PGC-1 $\alpha$  düzeyleri ise ELİSA yöntemi ile değerlendirildi. Comet yöntemi ile de DNA hasar miktarı tespit edildi.

Deney sonunda alınan H&E, MT ve PAS boyama metodları radyasyonun karaciğer dokusunda nekroz, vakuolizasyon, sinüzoidlerde dilatasyon, fibrozis ve azalmış

hepatosit glikojen içeriği gibi patolojik değişimlere neden olduğunu gösterdi. İmmunohistokimyasal boyamalarda kaspaz-3, NF $\kappa$ B-p65, Sirtuin-1 ve  $\alpha$ -SMA immunreaktivite yoğunlukları tüm diğer gruplara göre radyasyon grubunda en yüksek iken, MR grubunda kaspaz-3 pozitif hücre sayısı, NF $\kappa$ B-p65, Sirtuin-1 immunreaktivite yoğunluğunda kontrol grubuna yakın anlamlı sonuçlar mevcuttu.  $\alpha$ -SMA ekspresyonu bakımından gruplar arasında anlamlı bir farklılık yoktu. Çalışmada melatonin verilen her iki deney grubunda da biyokimyasal parametrelerden AST, ALT, DB, TB, MDA, SOD, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 'da radyasyon grubuna göre anlamlı düzeyde azalış vardı. Comet bulguları da melatonin uygulanan gruplarda DNA hasarının radyasyon grubuna göre azaldığını gösterdi.

Çalışmada, karaciğer dokusunda radyasyon öncesinde ve sonrasında melatonin kullanımının radyasyonun oluşturduğu hasara karşı olumlu katkıları olmakla birlikte radyasyon öncesinde melatonin kullanımının daha etkili olduğu sonucuna varılmıştır. Bu nedenle klinik radyoterapi öncesi melatonin kullanımının umut verici bir ajan olabileceği düşünölmektedir.

**Anahtar kelimeler:** Comet; DNA Hasarı; İnflamasyon; Melatonin; Oksidatif Stres; Radyasyon.

# **INVESTIGATION OF THE ANTIOXIDATIVE AND ANTI-INFLAMMATORY EFFECTS OF MELATONIN ON EXPERIMENTAL LIVER DAMAGE BY RADIATION**

**Betül YALÇIN**

**Erciyes University, Institute Of Medical Sciences**

**Department Of Histology And Embryology**

**PhD Thesis, December 2021**

**Supervisor: Prof. Dr. Arzu YAY**

## **ABSTRACT**

Currently, radiotherapy (RT) is one of the therapeutic approaches for many cancers and has potential to damage normal tissue with short-term and long-term side effects. Melatonin is a radioprotective and radiosensitive agent, making an ideal candidate for use as an adjuvant in radiotherapy. In this study, it was aimed to determine the protective and therapeutic effect of melatonin against the damage caused by radiation in the liver.

In this study, 60 adult male rats were administered as K (SF), S (SF+3% ethanol), M (10 mg/kg melatonin), R (10 Gy radiation), RM (10 Gy radiation+10 mg/kg melatonin), MR (10 mg/kg melatonin+10 Gy radiation) groups and 10 in each group. Liver tissues of the groups were stained with Hematoxylin&Eosin (H&E), Masson trichrome (MT) and Periodic acid schiff (PAS) for histopathological evaluations. Caspase-3, NF $\kappa$ B-p65, Sirtuin-1 and  $\alpha$ -SMA immunoreactivity intensities were determined by immunohistochemical methods. MDA, CAT, SOD, GSH-Px, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , PDGF and PGC-1 $\alpha$  levels were evaluated by ELISA method. Finally, the amount of DNA damage was determined by the Comet method.

At the end of the experiment, H&E, MT and PAS staining methods showed that radiation caused pathological changes in liver tissue such as necrosis, vacuolization, dilatation of sinusoids, fibrosis and decreased hepatocyte glycogen content. In immunohistochemical staining; caspase-3, NF $\kappa$ B-p65, Sirtuin-1 and  $\alpha$ -SMA

immunoreactivity densities were highest in the radiation group compared to all other groups, while in the MR group the number of caspase-3 positive cells, NF $\kappa$ B-p65 and Sirtuin-1 immunoreactivity density had significant results close to the control group. There was no significant difference between the groups in terms of  $\alpha$ -SMA expression. In the study, there was a significant decrease in biochemical parameters AST, ALT, DB, TB, MDA, SOD, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  in both experimental groups given melatonin compared to the radiation group. Comet findings also showed that DNA damage was reduced in melatonin administered groups compared to radiation.

In this study, it was concluded that in the liver tissue the use of melatonin before and after radiation has positive contributions to the damage caused by radiation, but the use of melatonin before radiation is more effective. For this reason, it is thought that melatonin can be used as a promising agent before clinical radiotherapy.

**Key words:** Comet; DNA damage; Inflammation; Melatonin; Oxidative stress; Radiation.

## İÇİNDEKİLER

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK .....	3
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI.....	4
KABUL VE ONAY .....	5
TEŞEKKÜR.....	6
ÖZET.....	7
ABSTRACT.....	9
İÇİNDEKİLER .....	11
KISALTMALAR VE SİMGELER.....	14
TABLOLAR LİSTESİ.....	16
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	17
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	18
2. GENEL BİLGİLER .....	20
2.1. Karaciğer Embriyolojisi .....	20
2.2. Karaciğer Anatomisi.....	21
2.3. Karaciğer Histolojisi.....	23
2.3.1. Karaciğerin yapısal organizasyonu .....	23
2.4. Radyasyon .....	33
2.4.1. Oksidatif stres .....	35
2.4.2. Serbest radikaller .....	36
2.4.3. Oksidatif stres ve inflamasyon arasındaki ilişki .....	39
2.4.4. DNA Hasarı .....	39
2.5. Melatonin.....	40
2.6. Nükleer Faktör Kappa (NFκB).....	42
2.6.1. NFκB'nin İnhibisyonu .....	43
2.6.2. NFκB ve Sirtuin 1 (SIRT1).....	43
2.6.3. NFκB ve peroksizom proliferatör ile aktive edilmiş reseptör gama koaktivatörü 1-alfa (PGC-1α).....	44
2.7. Sirtuin 1 .....	45
2.7.1. SIRT1'in Antioksidan ve Redoks Sinyalinde Düzenleyici Olarak Rolü .....	47
2.7.2. SIRT1'in İnflamasyondaki Rolü.....	47

2.7.3. SIRT1'in DNA Tamirindeki Rolü .....	48
3. GEREÇ VE YÖNTEM .....	49
3.1. Deney Hayvanları .....	49
3.2. Deney Grupları .....	49
3.3. Radyasyon Uygulaması .....	50
3.4. Histolojik Analizler .....	51
3.5. İmmünohistokimyasal Uygulama .....	54
3.6. Biyokimyasal Analizler .....	55
3.6.1. Karaciğer Doku Homojenatlarının Hazırlanması .....	55
3.6.2. ELİSA Yöntemi .....	56
3.7. Comet Yöntemi .....	57
3.7.1. DNA hasarının değerlendirilmesi .....	58
3.8. İstatistiksel Analiz .....	58
4. BULGULAR .....	59
4.1. Total Vücut Ağırlıkları .....	59
4.2. Işık Mikroskopik Bulgular .....	59
4.3. İmmünohistokimyasal Bulgular .....	62
4.4. Biyokimyasal Bulgular .....	65
4.4.1. Hepatik Enzimler .....	65
4.4.2. MDA Sonuçları .....	66
4.4.3. SOD Sonuçları .....	67
4.4.4. CAT Sonuçları .....	67
4.4.5. TNF- $\alpha$ Sonuçları .....	68
4.4.6. TGF- $\beta$ Sonuçları .....	69
4.4.7. GSH-PX Sonuçları .....	69
4.4.8. PDGF Sonuçları .....	70
4.4.9. PGC1- $\alpha$ Sonuçları .....	71
4.5. DNA Hasar Tayini (Comet Assay) .....	72
5. TARTIŞMA .....	75
6. KAYNAKLAR .....	84
EKLER .....	97

ETİK KURUL KARARI .....	97
İNTİHAL RAPORU .....	99
ÖZGEÇMİŞ .....	100



## KISALTMALAR VE SİMGELER

<b>AFMK</b>	: N-Asetil-N2-Formil-5-Metoksikuramin
<b>ALP</b>	: Alkalin Fosfataz
<b>ALT</b>	: Alanin Amino Transferaz
<b>AMK</b>	: N-Asetil-5-Metoksikuramin
<b>AST</b>	: Aspartat Amino Transferaz
<b>CAT</b>	: Katalaz
<b>cGy</b>	: Santigray
<b>Ci</b>	: Curie
<b>DB</b>	: Direk Bilirubin
<b>GR</b>	: Glutasyon Redüktaz
<b>GSH</b>	: İndirgenmiş Glutasyon
<b>GSHPx</b>	: Glutasyon Peroksidaz
<b>GSSH</b>	: Glutasyon Disülfid
<b>Gy</b>	: Gray
<b>H</b>	: Hidrojen Radikal
<b>HDAC</b>	: Histon Deasetilazlar
<b>HDL</b>	: Yüksek Dansiteli Lipoproteinler
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	: Hidrojen Peroksit
<b>İκB</b>	: İnhibitör Kappa B
<b>LDL</b>	: Düşük Dansiteli Lipoproteinler
<b>MDA</b>	: Malondialdehit
<b>NADPH</b>	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
<b>NFκB-p65</b>	: Nükleer Faktör Kappa beta
<b>OH</b>	: Hidroksil Radikal
<b>PDGF</b>	: Trombosit Kökenli Büyüme Faktörü
<b>PGC-1α</b>	: Peroksizom Proliferatör Aktivatör Reseptör Koaktivatör 1-alfa
<b>R</b>	: Rad
<b>RT</b>	: Radyoterapi

<b>RNS</b>	: Reaktif Nitrojen Türleri
<b>ROS</b>	: Reaktif Oksijen Türleri
<b>SIRT-1</b>	: Sirtuin-1
<b>SOD</b>	: Süperoksit Dismutaz
<b>TB</b>	: Total Bilirubin
<b>TEM</b>	: Transmisyon Elektron Mikroskobu
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	: Dönüştürücü Büyüme Faktörü-Beta
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	: Tümör Nekrozis Faktör-Alfa
<b>VLDL</b>	: Çok Düşük Dansiteli Lipoproteinler



## TABLULAR LİSTESİ

Tablo 3.1. Deney grupları .....	49
Tablo 3.2. Işık Mikroskopu Doku Hazırlama Tekniği.....	51
Tablo 3.3. Hematoksilen&Eozin Boyama Tekniği .....	52
Tablo 3.4. Masson Trikrom Boyama Tekniği.....	53
Tablo 3.5. Periyodik Asit Schiff Boyama Tekniği.....	53
Tablo 3.6. İmmünohistokimya Boyama Metodu .....	55
Tablo 3.7. Çalışmada kullanılan ELİSA kitleri ve katalog numaraları.....	56
Tablo 4.1. Deney gruplarına ait ratların total vücut ağırlıklarının istatistiksel analizi .	59
Tablo 4.2. Tüm deney gruplarına ait kaspaz-3 pozitif apoptotik hücre sayısı, SIRT1 ve $\alpha$ -SMA immünreaktivite yoğunluklarının istatistiksel analizi .....	64
Tablo 4.3. Tüm deney gruplarına ait NF $\kappa$ B-p65 immünreaktivite yoğunluklarının istatistiksel analizi .....	64
Tablo 4.4. Tüm deney gruplarına ait serum ALP, AST, ALT, ALP, DB ve TB değerleri.....	66
Tablo 4.5. Tüm deney gruplarına ait GSH, SOD, CAT, MDA, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , PDGF, PGC-1 $\alpha$ değerlerinin istatistiksel analizi.....	72
Tablo 4.6. Tüm deney gruplarına ait Comet assay parametrelerinin istatistiksel analizi .....	73

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Karaciğerin klasik lobül, portal lobül ve karaciğer asinüsü lobülasyon tiplerinin şematik görünümü (Gartner ve Hiatt, 2016).....	25
Şekil 3.1. A) Sıçanlar radyasyon uygulaması için hazırlanan özel kutu içerisine yerleştirildi. B) Radyasyon uygulaması yapıldı.....	51
Şekil 4.1. Tüm deney gruplarına ait H&E, MT, PAS ile boyanmış karaciğer doku kesitlerinin x40 büyütmedeki görüntüleri.....	61
Şekil 4.2. Tüm deney gruplarına ait karaciğer dokusunda kaspaz 3, NFκB-p65, SIRT-1, α-SMA ifadelerinin x40 büyütmede immünohistokimyasal yöntemle gösterilmiştir.....	63
Şekil 4.3. Malondialdehit (MDA) Tayini Standart Curve Eğrisi.....	66
Şekil 4.4. Süperoksit dismutaz (SOD) Tayini Standart Curve Eğrisi.....	67
Şekil 4.5. Katalaz Tayini (CAT) Tayini Standart Curve Eğrisi.....	68
Şekil 4.6. TNF-α Tayini Standart Curve Eğrisi.....	68
Şekil 4.7. Transforme edici büyüme faktör beta (TGF-β) Tayini Standart Curve Eğrisi.....	69
Şekil 4.8. Glutasyon peroksidaz (GSH-PX) Tayini Standart Curve Eğrisi.....	70
Şekil 4.9. Trombosit kökenli büyüme faktörü (PDGF) Tayini Standart Curve Eğrisi ...	70
Şekil 4.10. Peroksizom Proliferatör Aktivatör Reseptör Koaktivatör 1-alfa (PGC1-α) Tayini Standart Curve Eğrisi.....	71
Şekil 4.11. Comet yöntemi ile tüm deney gruplarına ait karaciğer dokusu hücreleri x20 büyütmede gösterilmiştir.....	74

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Aktif bir metabolik organ olan karaciğer, detoksifikasyon ve bağışıklıktan sorumludur. Bu organ hepatositler ve kolanjiyositler gibi parankimal hücrelerden ve endotel hücreleri, Kupffer hücreleri, hepatik stellat hücreler gibi parankimal olmayan hücrelerden oluşmaktadır (Wang ve ark., 2015, Mederacke ve ark., 2013). Radyosensitif olarak bilinen parankimal olmayan karaciğer hücreleri, radyasyon sırasında karaciğerin yapısında değişikliklere neden olan çeşitli maddeler salgılamaktadırlar (Du ve ark., 2010). Karaciğer, büyük boyutu ve gastrointestinal kanserlerin radyoterapi tedavisi sırasında gastrointestinal yola yakın lokalizasyonu nedeniyle yaygın olarak ışınlanmaktadır (Li ve ark., 2015; Pan ve ark., 2010). Ayrıca karaciğer, hematopoietik kök hücre nakli ve allojenik kemik iliği nakli için hazırlık sırasında da radyasyona maruz kalabilmektedir (Shulman ve ark., 1980; Qiao ve ark., 2015).

İyonize radyasyon, karaciğerde iyonlaşma ile başlayan, moleküler ve hücresel değişikliklerle devam eden DNA kırılmaları, nihayetinde karaciğer hastalıklarına ve organ düzeyinde ve vücut düzeyinde klinik belirtilere yol açan bir reaksiyon zincirini tetikleyebilmektedir. İyonize radyasyon kullanımı kaçınılmazdır ve çok sayıda rapor bunların hayvan ve insan vücudu üzerindeki zararlı etkileriyle ilgilidir (Borzoueisileh ve ark., 2020). Literatürde yapılan incelemeler, iyonize radyasyonun karaciğerde (Cheema ve ark., 2019), kanserde (Nakajima ve ark., 2018), hafif yağlanmada, nekroenflamasyonda ve fibroziste ve diğer birçok patolojik özellikte (Kim ve Jung, 2017) önemli değişikliklere yol açabileceğini göstermiştir. Moleküler seviyedeki

değişiklikler iyon üretimi, oksidatif stres ve sitogenetik değişiklikler olabilir, ancak bunlarla sınırlı değildir. Vücutta bu yan etkileri modüle edebilen onarım mekanizmalarının aktivasyonu ve anti-oksidatif özellikler gibi telafi edici mekanizmalar bulunmaktadır (Nakajima ve ark., 2018).

Melatonin, kemoterapi ve radyoterapi gibi kanser tedavi yöntemlerinin toksik etkilerine karşı koruma için etkileyici özellikler gösteren insan vücudunun doğal bir ürünüdür. (Ghobadi ve ark., 2017; Martínez-Campa C ve ark., 2017; Lissoni, 2007). Çoğunlukla beyindeki epifiz bezi tarafından salgılanırken, birçok çalışmada lenfositler, retina ve gastrointestinal sistem gibi başka kaynaklar da tespit edilmiştir (Yahyapour ve ark., 2018; Chen ve ark., 2011). Melatoninin vücuttaki ana etkisi uyku ve uyanıklık döngüsünün kontrolü olmasına rağmen, birçok çalışma antioksidan, anti-inflamatuar ve yaşlanma karşıtı etkiler gibi başka ilginç özelliklere sahip olduğunu göstermiştir (Yu ve ark., 2017; Favero ve ark., 2017; Volt ve ark., 2016). Son yirmi yılda melatoninin farklı hücre ve organlardaki radyokoruyucu etkilerini araştırmak için çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Melatonin vücuttaki tüm hücre tiplerine kolayca nüfuz etmesi nedeniyle, farklı organları radyasyonun çeşitli yan etkilerine karşı koruyabilmektedir (Yu ve ark., 2016).

Çalışmamızda, radyasyon ile oluşturulan karaciğer hasarına melatoninin hem tedavici edici ve hemde koruyucu etkilerinin histopatolojik, immunohistokimyasal, biyokimyasal ve DNA hasarını belirlemek için Comet yöntemi kullanılarak araştırılması amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Karaciğer Embriyolojisi

3. haftanın ortasında, karaciğer taslağı pre-enteronun distal ucunda endodermal bir epitel çıkıntı olarak ortaya çıkmaktadır (Sadler, 2011). **Karaciğer tomurcuğu** veya **hepatik divertikül** denilen bu çıkıntı, **septum transversum** denilen mezodermal plağı penetre eden, hızla çoğalan hücrelerden oluşmaktadır. Hepatik divertikül oluşumu kalp gelişimi sırasında, kardiyak mezodermden salınan fibroblast büyüme faktörü salgılanması ve bipotent hücreleri etkilemesi ile uyarılmaktadır (Moore ve ark., 2009). Karaciğer ve intrahepatik safra yolları karaciğer divertikülünün ön tarafından gelişirken, safra kesesi ve ekstrahepatik safra yolları karaciğer divertikülünün arka tarafından gelişmektedir (Zorn, 2008). Kalp taslağı ile mesenteron arasında uzanan septum transversum, diaphragmanın centrum tendineumu ve mesenterium ventraleyi oluşturmaktadır. Mesenterium ventralenin iki yaprağı arasında büyüyen hepatik divertikülün kraniyal parçası daha büyük olup **primordium hepaticum** denilmektedir. Endodermal hücreler çoğalarak hepatik hücre kordonları ve intrahepatik safra kanallarını örten epiteli, endotel döşeli boşlukların etrafında hepatik hücre kordonlarının ağ oluşturması ile de karaciğer sinüzoidleri oluşmaktadır. Kupffer hücreleri, hematopoietik hücreler ve bağ dokusu hücreleri septum transversum mezoderminden gelişmektedir (Moore ve ark., 2009).

Beşinci haftadan onuncu haftaya kadar hızla gelişen karaciğer karın boşluğunun büyük bir kısmını kaplamaktadır. Karaciğerin gelişimi ve fonksiyonel segmentasyonu V. umbilicalisten karaciğere akan kanda bulunan oksijen miktarına göre belirlenmektedir. Karaciğer sağ ve sol loblarının büyüklüğü başlangıçta aynı olmasına rağmen, kısa bir süre sonra sağ lop daha fazla büyümektedir (Moore ve ark., 2009).

6. haftada karaciğerde hematopoezin başlamasıyla birlikte 7. - 9. haftalar arasında hematopietik aktivitenin yüksek olmasına bağlı olarak karaciğer hacminin artmasına neden olmaktadır. 10. haftada ise karaciğer ağırlığı toplam vücut ağırlığının %10'unu oluşturmaktadır. Gebeliğin son iki ayında hematopietik aktivitenin azalmasına paralel olarak karaciğer ağırlığı toplam vücut ağırlığının %5' ini oluşturur (Sadler, 2011).

12. haftada karaciğer hücreleri safra üretimine başlamaktadır. Diverticulum hepaticumun kaudal parçası vesica biliarisi, divertikülün sapıda duktus sistikusunu oluşturmaktadır. Duktus sistikus, duktus hepaticus ile birleşerek duktus kolekdoktusunu meydana getirmektedir. Duktus kolekdoktus, başlangıçta duodenumun anterioruna giriş yaparken duodenumun büyümesi ve rotasyonu nedeniyle pozisyon değiştirerek duodenumun posterioruna taşınmaktadır. 13. haftadan sonra ise oluşan safra duodenuma ulaşarak mekonyumun koyu yeşil renk almasına neden olmaktadır (Moore ve ark., 2002).

## 2.2. Karaciğer Anatomisi

Karaciğer, vücudun en büyük bezi olup ağırlığı 1000-2500 gr arasında değişebilmektedir. Karın boşluğunun sağ üst tarafında ve diaphragmanın altında yerleşim göstermektedir. Erişkinlerde vücut ağırlığının %2'sini oluşturmaktadır. Fetusta ise karaciğerin vücut ağırlığına göre oranı daha fazladır. Doku taze iken kırmızımsı kahverenklidir. Karaciğer yırtılması halinde, bol damarlı olması sebebiyle büyük kanamalara neden olabilmektedir.

Karaciğer, diaphragma ve karın organları ile komşu iki yüze sahiptir. **Facies diaphragmatica**, diaphragma ile komşu olan yüzüdür. Bu yüzün büyük bölümü periton ile örtülü iken, geriye kalan **area nuda** denilen bölümü ise diaphragmaya gevşek bağ

dokusu ile örtülüdür. **Facies visceralis** karın organları ile komşu alt yüzüdür. Kolon, sağ böbrek üstü bezi, sağ böbrek, duodenum, mide ile komşuluğu bulunan bu yüzde H harfi şeklinde oluklar mevcuttur. Sağ tarafta daha geniş olan oluğa **sulcus sagittalis dexter**, sol tarafta yarık şeklinde olan oluğa **fissura sagittalis sinister** denilmektedir. **Porta hepatis** denilen enine yarık ise bu iki oluğu birleştirmektedir. **Porta hepatis**'ten vena portae ve arteria hepatica proprianın dalları girer, safra kanalları çıkar.

Karaciğerin margo posterior ve margo inferior olmak üzere iki kenarı vardır. **Margo posterior**, facies diaphragmatica ile facies visceralis arasında arka taraftaki kenar iken, **margo inferior** facies diaphragmatica ile facies visceralis arasında ön tarafta oluşan kenardır (Unur ve ark., 2009).

Karaciğer, dıştan fibröz **Glisson kapsülü** ile çevrelenmiştir. Bu kapsül organın içerisine uzantılar göndererek karaciğeri lobus hepaticus dexter, lobus hepaticus sinister, lobus kuadratus ve lobus kaudatus adı verilen dört loba ayırır (Juza ve Pauli, 2014). Karaciğerin büyük bölümü periton ile örtülüdür; fakat area nuda, porta hepatis, sulcus venae cavae, fissura ligamenti teres, fissura ligamenti venosi, fossa vesica biliaris alanlarında periton bulunmamaktadır (Abdel-Misih ve Bloomston, 2010).

Karaciğerin, karın ön duvarına ve diaphragmanın alt yüzüne uzanan periton yaprakları **lig. falciforme hepatisi** oluşturur. V. umbilicalis, doğumdan önce anneden bebeğe temiz kan getirir ancak doğumdan sonra obliterasyonu ile **lig. teres hepatis** meydana gelir. Lig. teres hepatis, lig. falciforme hepatisin iki yaprağı arasında ve alt kenarı boyunca yerleşim gösterir. **Lig. coronarium hepatis**, diaphragma ile karaciğerin diaphragmatik yüzü arasında oluşur. Area nudanın sağ ve sol ucunda, lig. coronariumun ön ve arka yapraklarının birleşmesi ile **lig. triangulare dextrum ve sinistrum** adı verilen ligamentler oluşur. Porta hepatis ile mide ve duodenum arasında uzanan periton yapıya **omentum minus** denir (Arıncı ve Elhan, 2001).

### 2.3. Karaciğer Histolojisi

İnsan vücudundaki en büyük bez olan karaciğer, kollajen ve elastik liflerden oluşan bir kapsül ile çevrelenmiştir. Glisson kapsülü denilen bu kapsül, peritonla kaplanmıştır (Kierszenbaum, 2006). Karaciğere kan, hepatik portal ven ve hepatik arter aracılığıyla gelmektedir. Organa gelen kan hacminin yaklaşık %75-80'i **portal ven** tarafından sağlanmaktadır. Portal ven bağırsaklar, pankreas ve dalaktan gelen oksijeni tükenmiş olan kanı taşımaktadır. Karaciğerin kan hacminin %25'ini oluşturan oksijenli kan ise trunkus çölyakusun bir dalı olan **hepatik arter** tarafından sağlanmaktadır. Hepatik portal ven ve hepatik arterden gelen kan karaciğer sinüzoidlerinde birbirine karışmaktadır (Ross, 2014; Kierszenbaum, 2006).

Karaciğere kan organın hilusundan ya da porta hepatisten giriş yaparken, oluşturulan safrayı taşıyan duktus kommunis ve lenf damarları da organı aynı kısımdan terk etmektedir (Ross, 2014).

#### 2.3.1. Karaciğerin yapısal organizasyonu

Karaciğer; parankima, bağ dokusu yapısındaki **stroma**, **sinüzoidal kapillerler (sinüzoidler)** ve **perisinüzoidal aralıklar (Disse aralıkları)** olmak üzere dört yapısal elemandan oluşmaktadır.

**Parankima**, birbiri ile anastomazlaşan hepatosit plakları ile bu plakların etrafını çevreleyen sinüzoid kapillerlerden oluşmaktadır. Hepatosit plakları, yetişkin bireylerde tek hücre kalınlığında iken, altı yaşına kadar olan genç bireylerde iki hücre kalınlığındadır.

**Bağ dokusu yapısındaki stroma**, glisson kapsülünün devamı halindedir. Kan damarları, sinirler, lenf damarları ve safra kanalları stroma içinde seyretmektedir (Ross, 2014). Yetişkin bireylerde karaciğer dokusunun %80'lik kısmını hepatosit plaklarından meydana gelen parankimaya ait iken geriye kalan %20'lik kısmı organı dıştan sararak Glisson kapsülünü oluşturan bağ dokusu stromaya aittir (Ovalle ve Nahirney, 2009).

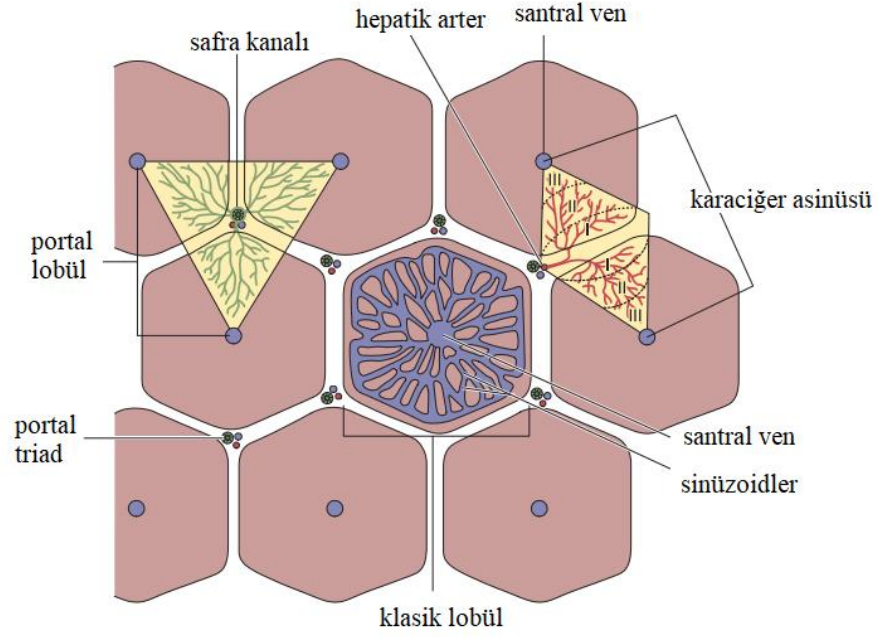
**Sinüzoidler**, hepatosit plakları arasındaki kapillerlerdir. **Perisinüzoidal aralıklar (Disse aralıkları)**, hepatositlerin bazolateral bölgeleri ile sinüzoidlerin endoteli arasında bulunmaktadır.

### 2.3.1.1. Karaciğer lobülleri

Karaciğer yapısı, fonksiyonel birimlerin birbirinden farklı olduğu **klasik lobül**, **portal lobül** ve **karaciğer asinüsü** olmak üzere üç şekilde ifade edilmektedir. **Klasik lobül**, karaciğere kan getiren damarların organ içindeki yerleşimi ve bu damarlardan gelen kanın karaciğer hücrelerine ulaşması sırasında izlediği yolak esas alınarak oluşturulmuştur. Altıgen şeklinde olan bu lobülün merkezinde kan sinüzoidlerinin drene olduğu **terminal hepatik venül (santral ven)** bulunmaktadır. Hepatositler, santral venden lobülün periferine doğru ışınal olacak şekilde yerleşim göstermektedir. Sinüzoidler arteriyal ve portal kanın dolaştığı vasküler kanallar olup kan ile hepatositler arasındaki madde alışverişini sağlamaktadır. Altıgen şeklinin köşelerinde, karaciğer kapsülünün devamı halinde olan gevşek bağ dokusu yapısındaki portal alanlar (portal kanallar) yer almaktadır. Portal alanlarda, portal venin ve hepatik arterin dağıtıcı dalları ile safra kanalının drene edici dallarının oluşturduğu **portal triad** denilen yapılar bulunmaktadır. Portal triadda bu yapılarla birlikte lenfatik drenaj sistemine ait olan damarlar ve sinir lifleri de devam etmektedir. Ayrıca hepatositler ile portal alanı çevreleyen bağ dokusu yapısındaki stroma arasında **periportal aralık (mall aralığı)** denilen aralıktan lenfin kaynaklandığı düşünülmektedir (Ross, 2014; Kierszenbaum, 2006).

**Portal lobülde** karaciğerin ekzokrin fonksiyonu olan safra salgılanması esas alınmıştır. Üçgen şekilli olan portal lobülün merkezinde portal alan, üçgenin köşelerinde portal alana en yakın santral ven yerleşim göstermektedir (Ross, 2014).

**Karaciğer asinüsünde;** karaciğer patofizyolojisi, kan perfüzyonu ve metabolik aktivite arasındaki korelasyonun sağlanması esas alınmıştır. Eşkenar dörtgen şeklinde olan karaciğer asinüsünde, asinüsün kısa eksenini iki klasik lobül arasındaki portal triadın oluşturduğu sınırlar, asinüsün uzun eksenini kısa eksene en yakın iki santral ven oluşturmaktadır. Bir hepatik arterin son dalı ile karaciğer asinüsünün sınırları belirlenmektedir. Karaciğer asinüsü kısa eksenine etrafında arterden gelen kanın venöz sinüzoidler boyunca akışı, oksijenlenme ve beslenmesine göre üç zon halinde incelenmektedir.



**Şekil 2. 1.** Karaciğerin klasik lobül, portal lobül ve karaciğer asinüsü lobülasyon tiplerinin şematik görünümü (Gartner ve Hiatt, 2016).

Her üç zon arasında enzim aktivitesi, organellerin büyüklük ve sayıları, glikojen biriktirme kapasitesi açısından farklılıklar bulunmaktadır (Ross, 2014; Eşrefoğlu, 2009).

**Zon 1**, kısa eksene en yakın zon olup, klasik lobülün periferine denk gelmektedir. Portal ve hepatik arterden gelen oksijen ve besin yönünden zengin kan desteğine sahiptir. Bu zondaki hücreler sinüzoidal kandan gelen toksinlere maruz kalan ve safra kanalının tıkanması durumunda da morfolojik değişime uğrayan ilk hücrelerdir. Dolaşımın bozulması halinde bu hücreler en son ölen, ilk rejenere olan hücrelerdir.

**Zon 2**, Zon 1 ve Zon 3 arasında yerleşim göstermektedir.

**Zon 3**, kısa eksene en uzak, santral vene en yakın zondur. Bu hücreler oksijen yönünden fakir kan desteğine sahip olup, safra kanal tıkanıklıkları ve toksinlerden en az etkilenmektedirler. Perfüzyonda azalma olması halinde iskemik nekroz ve yağ birikimi ilk olarak bu hücrelerde görülmektedir (Ross, 2014).

### 2.3.1.2. Karaciğerin Damar Tipleri ve Kan Akımı

**Portal alanlarda** bulunan kan damarlarına **interlobüler kan damarları** denilmektedir. Portal triadda bulunan interlobüler damarlar en küçük damarlar olup sinüzoidlere kan akımını sağlarken, daha büyük interlobüler damarlar dallanarak lobülün periferinde bulunan dağıtıcı damarları oluştururlar. Dağıtıcı damarlarda sinüzoidlere giriş damarları gönderirler. Kan akımı sinüzoidlerde santral vene doğrudur. Santral venler sublobüler venlere, sublobüler venlerde birleşerek hepatik venlere açılır. Birkaç sublobüler ven de birleşip hepatik venleri oluşturarak vena kava inferiyora boşalırlar (Ross, 2014; Eşrefoğlu, 2009).

**Hepatik arter**, diğer arterlerde olduğu gibi kalın bir müköler tabakaya sahiptir. Bu arterler; sinüsoidlere, büyük portal alanlardaki bağ dokusu ve diğer yapılara arteriyal kan getirmektedir. Bu büyük portal alanlardaki kapillerler, kanı interlobüler venlere, bu venler sinüzoidlere boşalmadan önce geri götürürler. **Portal ven** ve dalları tipik venlerin özelliğine sahiptirler ve çok geniş lümenlerinin olması ile arterlerden kolaylıkla ayırt edilebilmektedirler.

**Santral vene** hepatik venler sisteminin terminal venülü olmasından dolayı **terminal hepatik venül** de denilmektedir. İnce duvarlı bir damardır ve endoteli altında spiral yerleşimli ince bir bağ dokusu bulunmaktadır. Santral ven, **sublobüler venlere** açılmaktadır. **Sublobüler ven** endotelinin altında kollajen ve elastik liflerden oluşan bağ dokusu tabakası bulunmaktadır. Sublobüler venler ve drene oldukları **hepatik venler** tek başlarına ilerler. Histolojik kesitlerde hepatik venler tek damarlar olmaları sebebiyle portal triadda bulunan portal venden ayırt edilebilmektedir. Hepatik venlerde kapakçık (valf) bulunmamaktadır (Ross, 2014).

Tip III kapiller yapısında olan **hepatik sinüzoidler**, kesintili bazal laminaya sahiptir (Junqueira ve Carneiro 2006). Diyaframsız olan endotel hücrelerinde geniş fenestraların bulunması ve komşu endotel hücreleri arasında geniş boşlukların olması endotelin kesintili bir yapıya sahip olduğunu desteklemektedir (Ross, 2014). Hepatik sinüzoid duvarında endotel hücrelerinin beraberinde **stellat sinüzoidal makrofaj** veya **Kupffer**

**hücrelerinin** bulunması ile diğer sinüzoidlerden farklılık göstermektedir (Ross, 2014; Junqueira ve Carneiro, 2006).

Mononükleer fagositik sistemin üyesi olan **Kupffer hücreleri** monositlerden köken almaktadırlar. Kupffer hücreleri komşu endotel hücreleri ile bağlantı oluşturmamaktadır. Bu hücrelerin uzantıları sinüzoid lümenine uzanmakta ve kısmi oklüzyona neden olabilmektedir. Sitoplazmalarında kırmızı kan hücre fragmanları ve ferritin formunda demir bulunmaktadır. Bu yapıların bulunması, dalaktan karaciğere gelen yaşlanmış veya hasarlı kan hücrelerinin son yıkımlarında Kupffer hücrelerinin görevli olduğunu göstermektedir. Kırmızı kan hücrelerinin bu hücrelerde parçalanmasından dolayı bir miktar ferritin demiri hemosiderin granüllerine dönüştürülerek depolanabilmektedir. Özellikle splenektomi sonrasında bu fonksiyon artış göstermektedir (Ross, 2014; Junqueira ve Carneiro, 2006). Kupffer hücreleri antijen sunan hücreler olup portal kanda bulunan bakteri veya atığın yok edilmesinden sorumludurlar (Junqueira ve Carneiro, 2006).

#### **Disse aralığı (perisinüzoidal aralık)**

Hepatositlerin bazal yüzeyleri ile sinüzoid endoteli ve Kupffer hücrelerinin bazal yüzeyleri arasında, hepatositler ve kan arasındaki madde alışverişini sağlayan **Disse aralığı** bulunmaktadır. Hepatositlerin bazal yüzeylerinde, hepatositlerle plazma arasındaki madde alışverişinin yapılması için yüzey alanını arttıran mikrovilluslar vardır. Disse aralığına doğru uzanan küçük, düzensiz mikrovilluslar yüzey alanını yaklaşık 6 kat arttırmaktadır. Endotel hücrelerinde geniş fenestraların bulunması ve komşu endotel hücreleri arasında geniş boşlukların olması nedeniyle sinüzoiddeki plazma ile hepatosit plazma membranı arasında belirgin bir bariyer mevcut değildir. Bu sayede Disse aralığındaki kana hepatosit tarafından oluşturulan protein ve lipoproteinler taşınabilmektedir. Bu yolak safra dışındaki karaciğer salgıları içindir. Ayrıca yetişkinlerde kronik anemi görülmesi halinde Disse aralığında kan yapıcı hücreler oluşabilmektedir. Fetal karaciğerde de Disse aralığında kan yapıcı hücre adaları bulunabilmektedir (Ross, 2014).

**Hepatik stellat hücreler (İto hücreleri)** mezenkimal kökenli olup Disse aralığına yerleşmişlerdir. A vitamini retinil esterleri olarak bu hücrelerin sitoplazmik yağ

damlacıklarında depolanmaktadır. Retinol halindeki A vitamini retinol bağlayıcı proteine bağlanarak retinaya taşınmaktadır. Retinada retinolün stereoizomeri olan 11-cis retinal opsin proteinine bağlanarak, koni ve rod hücrelerin görme pigmenti olan rodopsini oluşturmaktadır.

Hepatik stellat hücreler karaciğer sirozu ve kronik enflamasyon gibi patolojik durumlarda miyofibroblastlara farklılaşarak Tip I ve Tip III kollajen sentezlemeye başlamaktadır. Bu hücrelerin sitoplazmalarında kontraktıl elemanlar olan desmin ve düz kas  $\alpha$  aktin bulunmaktadır. Bu elemanlar sayesinde İto hücrelerinin kasılması sonucunda vasküler kanallarda daralmanın ve sinüzoidlerdeki vasküler dirençte artışın görüldüğü portal hipertansiyona neden olmaktadır. Ayrıca bu hücreler, karaciğer hasarı sonrasında ekstrasellüler matriksin yeniden sentezlenmesinde de görev almaktadırlar (Ross, 2014).

### 2.3.1.3. Karaciğer Lenf Kanalları ve Akımı

Hepatik lenf perisinüzoidal aralıkta oluşmaktadır. Perisinüzoidal aralıkta kalan plazma, periportal bağ dokusuna drene olur. Burada, en dışta bulunan hepatositler ile portal kanalın stroması arasında **periportal alan (Mall aralığı)** denilen lenf sıvısının toplandığı bir alan bulunmaktadır. Periportal alandaki lenf sıvısı daha sonra portal triadın beraberindeki lenfatik kapillerlere açılır. Lenfin akım yönü safra ile aynı olup hepatositlerden portal kanallara doğrudur. Bu yolağı hepatic lenfin %80'i takip ederek duktus torasikusa drene olmaktadır (Ross, 2014; Junqueira ve Carneiro, 2006).

Perisinüzoidal aralıkta kalan plazma hepatic lenfi oluşturmaktadır. Oluşan sıvı, ilk olarak periportal bağ dokusuna sonrasında **Mall aralığına** drene olmaktadır. **Mall aralığı**, klasik lobüle göre en dışta bulunan hepatositler ile portal alanın stroması arasında lenfin toplandığı alandır. Lenfatik sıvı, portal alanda bulunan diğer elemanlarla birlikte yerleşim gösteren lenfatik kapillerlere açılır. Lenf akım yönü safra ile aynı olup hepatositlerden portal alana doğrudur.

Karaciğerde bulunan hücrelerin %80'nini oluşturan hepatositler, anastomozlaşarak karaciğer lobülündeki hücre plaklarını meydana getirmektedirler. 20-30 um çapında olan polihedral hücrelerdir. Merkezi yerleşimli çekirdeği küre şeklinde olup bir veya çoğunlukla iki tanedir. Hücreler genellikle çift çekirdekli olmaları sebebiyle

tetraploididir ve 4d miktarında DNA'ya sahiptir. Her bir çekirdekte iyi gelişmiş bir veya daha fazla çekirdekçiğe sahiptir. Hepatositler, sindirim sisteminde bulunan hücreler arasında uzun ömürlü hücrelerdir ve ortalama yaşam süreleri 5 aydır.

Hepatositler çok yüzeyli hücreler olmasına rağmen kolaylık olması amacıyla altı yüzeyli olarak kabul edilmektedirler. İki yüzeyi perisinüzoidal aralıkla, iki yüzeyi komşu hepatosit ve safra kanalikülüyle, kalan iki yüzeyi ise komşu hücreler ve safra kanalikülü ile temas halindedir. Perisinüzoidal aralıkla temas halinde olan yüzeyler, diğer epitel hücrelerinin bazal yüzeyleri ile komşu hücreler ve safra kanalikülü ile temas halinde olan yüzeyler, diğer epitel hücrelerinin lateral ve apikal yüzeyleri ile komşuluk yapmaktadır (Ross, 2014). Hepatositlerin apikal yüzeyleri safra kanaliküllerini oluştururken, hepatositlerin bazolateral yüzeyleri plazma proteinlerinin salgılanması ve besinlerin ve diğer kan bileşenlerinin hazırlanmasına katkı sağlamaktadır (Junqueira ve Carneiro, 2006). Hepatosit sitoplazmasında çok sayıda mitokondri ve agranüler endoplazmik retikulum bulunması sebebiyle asidofilik boyanma özelliğine sahiptir (Junqueira ve Carneiro, 2006). Hepatositler aktif olarak sentez ve sekresyon yapan hücreler olmaları sebebiyle organel bakımından zengindir (Eşrefoğlu, 2009). Hepatosit sitoplazmasında çapları 0,2-1 µm arasında olan sayıları 200-300 kadar **peroksizom** mevcuttur (Ross, 2014). Peroksizomlar, mitokondriyonlarla oksijen kullanımını açısından benzerlik göstermektedirler. İçerdikleri fazla miktardaki oksidaz toksik olan hidrojen peroksitin açığa çıkmasına neden olmaktadır. Oluşan hidrojen peroksitin katalaz enzimi ile tepkimeye girmesi sonucunda su ve oksijen oluşmaktadır (Ross, 2014; Kierszenbaum, 2006). Peroksizomlarda D-amino asit oksidaz ve alkol dehidrogenaz enzimleri de bulunmaktadır. Ayrıca yağ asitlerinin parçalanması, glukoneogenez ve pürin metabolizmasına da katkı sağlamaktadır (Ross, 2014).

Hepatositler sitoplazmasında bulunan bol miktardaki kaba endoplazmik retikulum plazma proteinlerinin sentezinde görevlidir. Özellikle portal alana yakın hepatositlerin sitoplazmasında kaba endoplazmik retikulum belirgin bazofiliye neden olmaktadır (Junqueira ve Carneiro 2006). Hepatositlerde agranüler endoplazmik retikulum plazma proteinlerin sentezini yapmaktadır. Ayrıca hepatositler glikojen, lipid sentezi ve detoksifikasyon gibi görevlerinin olması ile uyumlu olarak iyi gelişmiş agranüler

endoplazmik retikuluma sahiptirler (Kierszenbaum, 2006). Hepatositlerde hücrenin metabolik aktivitesine göre agranüler endoplazmik retikulum bulunmaktadır. Hücrede ilaçların ve toksinlerin parçalanması ve konjugasyonu için gerekli enzimlerin bulunduğu organeldir. İlaç, toksin veya metabolik uyarılara maruziyet sonucunda agranüler endoplazmik retikulum sayısı artabilmektedir. Bazı ilaçların ve hormonların agranüler endoplazmik retikulum aktivitesini uyarabilmesinin yanı sıra organel membranlarının ve ilişkili enzimlerin sentezlenmelerini indüklemektedirler (Ross, 2014).

Spesifik boyama ile görüntülenebilen **Golgi aygıtı**, Transmisyon elektron mikroskobu (TEM) ile incelediğinde her biri üç-beş sistemadan oluşan yaklaşık 50 golgi birimi ve irili ufaklı veziküller içerdiği belirtilmiştir. Safranın ekzokrin sekresyonuna, safra kanalikülünün etrafında yerleşim gösteren golgi aygıtı elemanlarının katkı sağladığı düşünülmektedir. Çok düşük dansiteli lipoproteinler (VLDL) trigliseridlerin karaciğerden diğer organlara taşınmasını sağlamaktadır. Ayrıca VLDL'lerin büyük çoğunluğu karaciğerde üretilirken geri kalan kısmı ise ince bağırsakta sentezlenmektedir. VLDL ve diğer lipoproteinlerin öncüllerinin de sinüzoidal alanlara yakın Golgi sistemaları ve veziküllerindeki elektron-yoğun granüller olduğu düşünülmektedir. Bu elektron yoğun granüllere granüllü endoplazmik retikulum ve agranüler endoplazmik retikulum sistemalarında da rastlanmaktadır. Ayrıca bu granüller dolaşıma verilerek hepatositlerin endokrin salgısının bir kısmını oluşturmaktadırlar (Ross, 2014). Düşük dansiteli lipoproteinler (LDL) ve yüksek dansiteli lipoproteinler (HDL) esas olarak plazmada oluşturulurken, küçük bir kısmı ise karaciğerde sentezlenmektedir. LDL'ler kolesterol esterlerinin karaciğerden diğer organlara taşınmasını sağlarken, HDL'ler ise kolesterolün periferik organlardan karaciğere taşınmasını sağlamaktadır. Kardiyovasküler açıdan LDL oranının düşük, HDL oranının yüksek olması hastalık riskini azaltmaktadır (Eşrefoğlu, 2009).

Hepatosit sitoplazmasında **lizozomlar** safra kanalikülünün etrafında yerleşim göstermektedirler. Histolojik kesitlerde peribiliyer yoğun cisimciklere karşılık gelen lizozomlar, TEM ile incelendiğinde heterojen yapı sergilemektedirler. TEM görüntülerde lizozomların beraberinde kısmen sindirilmiş sitoplazmik organeller,

pigment granülleri (lipofuskin) ve miyelin figürlere rastlanmaktadır (Ross, 2014). Hepatosit sitoplazmaları ferritinin yıkım ürünü olan eriyebilir ferritin ile eriyemeyen hemosiderin halinde demirin depolandığı yerdir. Ancak demir bazı depo hastalığı durumlarında da hepatosit sitoplazmasında depolanabilmektedir (Ross, 2014; Kierszenbaum, 2006). Yaşlanmış plazma glikoproteinleri, hepatositlerin bazolateral yüzeylerinde bulunan hepatik lektin membran reseptörü ile tanınır. Bu reseptör ile asialoglikoprotein reseptörü içine alınan plazma glikoproteinleri ortadan kaldırılmaktadırlar (Kierszenbaum, 2006).

Hepatositlerde üretilen safranın, safra kesesine ve bağırsağa giderken izlediği kanal sistemine **biliyer ağaç** denilmektedir. Erişkin bir insan karaciğerindeki safra duktülleri ve kanalları farklı boyut ve şekillerde, 2 kilometreden fazla uzunlukta üç boyutlu kanal sistemidir. Bu kanallar nöronal ve hormonal uyarılara yanıt olarak safra içeriğinin değiştirilmesi ve safra akışının düzenlenmesinden sorumludurlar.

Birbirlerine komşu hepatositlerin karşılıklı plazma membranlarının birbirlerine bağlanması ile biliyer ağacın en küçük dalları olan **safra kanalikülleri** oluşmaktadır. Hücreler sıkı bağlantı kompleksleri olan zonula adherens ve desmozom ile birbirlerine bağlanmıştır. 0,5 µm çapında lümenleri olan ışık mikroskobu ile görüntülenemeyen interselüler alanlardır. Kanalikül lümenine komşu iki hepatositin mikrovillusları uzanır ve mikrovilluslar adenozin trifosfataz ve diğer alkalın fosfatazlar gibi enzimleri taşıyan membran alanlarını genişletirler. Safra akımı kan akım yönünün tersi olacak şekilde vena sentralisten portal alana doğrudur. Lobülün periferinde safra kanalikülü Hering kanalları ile devam eder.

**Hering kanalı** hepatositler ve kolanjiyositler olmak üzere iki tip hücre ile döşenmiştir. Kolanjiyositler; belirgin bazal laminaya sahip olmaları, komşu hücreler arasında sıkı bağlantıların bulunması ve sitoplazmalarında az sayıda organel içermeleri gibi özellikleri ile TEM'de ayırt edilebilmektedirler. Bu hücrelerin apikalinde hepatositlere benzer şekilde mikrovillusları bulunmaktadır. Ayrıca her bir kolanjiyosit lümenal akımdaki değişimleri algıyan bir primer silyuma sahiptir.

Hepatositler ise apikal kısımlarında sıkı bağlantıların ve mikrovillusların bulunması ile kolanjiyositlere benzerlik gösterirler. Hepatositlerin bazal yüzeyleri distal biliyer epitel gibi bazal laminaya yerleşmiştir. Hering kanalı portal alana doğru tek yönlü safra akımını destekleyecek şekilde fonksiyonel olarak kontraktıl aktivite göstermektedir. Bu kanal, kolanjiyositleri içeren en küçük ve en proksimal kanal olması sebebiyle küçük safra kanallarını etkileyen hastalıklardan etkilenebilmektedir. Hering kanallarının kontraktıl aktivitesindeki fonksiyonel bozuklukların beraberindeki hasar safra akımında obstrüksiyona neden olabilmektedir.

Karaciğer progenitör hücrelerinin rezervi Hering kanallarında veya kanalların etrafında bulunmaktadır. Bu hücreler göç edebilmekte ve hepatositlere veya safra kanalı hücrelerine farklılaşabilmektedir. Karaciğer nekrozu sonrası kanal reaksiyonlarının yeniden yapımı ile küçük kolanjiyositlerin proliferasyon olarak Hering kanallarını döşediği ve karaciğer parankimmasına göç ettiği belirtilmiştir. Ayrıca bu hücrelerin biliyer antijenlerin ve hepatosit antijenlerin belirteçlerini eksprese ettikleri immunositokimyasal boyamalarla gösterilmiştir. Karaciğer kök hücrelerinin kronik patolojik süreçler sonucunda hasarlanan karaciğer dokusunun tamir edilmesini sağladığı gözlenmiştir. Laboratuvar çalışmalarından elde edilen bu veriler karaciğer hastalıklarının tedavisinde karaciğer kök hücrelerinin umut verici olabileceğini düşündürmektedir. Safra, Hering kanalından sonra intrahepatik safra düktülüne geçer. İntrahepatik safra düktülü kolanjiyositlerden oluşmuştur. İmmünohistokimyasal boyamalara göre lobül sınırından Hering kanalının geçtiğini periportal aralıkta safra düktülü halinde devam ettiği belirlenmiştir. Safra duktili tek hücre tipi olan kolanjiyositlerle döşeli olması ile Hering kanalından farklılık göstermektedir.

İntrahepatik safra düktülleri 1-1,5 µm çapındadır ve safrayı portal triadın bir elemanı olan interlobüler safra kanallarına bırakırlar. 15-40 µm çapında olan interlobüler kanallar lobüllerin yakınında kübik şekilli kolanjiyositler ile döşelidir. Kanalların porta hepatis'e doğru yaklaşmasıyla çap artışına paralel olarak kolanjiyosit epitelini prizmatik epitele dönüştürür. Safra kesesi ve ekstrahepatik safra kanallarındaki hücreler gibi prizmatik şekilli bu hücrelerde mikrovillus iyi gelişmiştir.

Küçük safra duktülleri tek katlı kübik epitel ile döşeliyken kanalın çapının artması ile birlikte epitel tek katlı prizmatik epitele dönüşmektedir. Safra kanallarını çevreleyen sıkı bağ dokusunda kanalın çapının artmasıyla çok sayıda elastik lif görülürken, organın hilusunda bu bağ dokusunda düz kas hücreleri bulunmaktadır. İnterlobüler kanalların birleşmesi ile sağ ve sol hepatik safra kanalları oluştururlar. Bu kanalların hilusta birleşmesi ile ortak hepatik kanal olan duktus hepatikus kommunisi oluştururlar. Safra, ekstrahepatik safra kanalları ile safra kesesi ve duodenuma taşınmaktadır. Ortak hepatik kanal prizmatik epitel ile çevrili olup sindirim kanalı organlarında bulunan tüm tabakaları (muskularis mukoza hariç) içermektedir. Ortak hepatik kanal duktus sistikus ile safra kesesine bağlanır. Duktus sistikus aynı zamanda safranın safra kesesine taşınmasını da sağlamaktadır (Ross, 2014).

#### 2.4. Radyasyon

Yüksek hızlı partiküller ya da dalgalar şeklinde dolaşan enerjiye radyasyon denir (Cotran ve ark., 2010). Elektromanyetik dalgaları yayan enerjilerin geniş bir aralığına sahip olan radyasyon, enerjilerine göre iyonize ve noniyonize radyasyon olmak üzere ikiye ayrılmaktadır (Cotran ve ark., 2010; Dattner, 2003). **Noniyonize radyasyon** tipine mikrodalga ve ses dalgası, ultraviyole ve kızıl ötesi ışık örnek olarak verilebilmektedir. Noniyonize radyasyon enerjisi bir moleküldeki atomların titreşmesine ve hareket ettirebilmesine neden olabilmekte fakat elektronların atomlardan ayrılması için yeterli olmamaktadır (Cotran ve ark., 2010). **İyonize radyasyon**, bir organizmada veya bir ortamda atomlara çarpması sonucu elektron kopmasına veya atomların elektronlarının daha yüksek enerji seviyesine çıkmasına neden olan radyasyon tipidir (Dattner, 2003). Serbest elektronların diğer atomlarla çarpışması sonucunda yeni elektronların açığa çıktığı bu reaksiyona **iyonizasyon** denilmektedir. İyonize radyasyonun ana kaynakları;

1. x ışınları ve gama ışınları (çok yüksek frekanslı elektromanyetik dalgaları)
2. İki proton ve iki nötrondan oluşan alfa partikülleri ve elektronlardan oluşan beta partikülleri yüksek enerjiye sahiptir.

İyonize radyasyon da partiküler radyasyon ve elektromanyetik radyasyon olmak üzere ikiye ayrılır. Partiküler radyasyon belirli bir kütle ve enerjiye sahiptir. Alfa ve beta

parçacıkları, elektron, proton ve nötronlar partiküler iyonize radyasyon tiplerini oluşturur. Elektromanyetik radyasyon foton enerjili dalga özelliğindedir. X ve gama ışınları ise, elektromanyetik radyasyon tiplerini oluşturur (Elgazzar and Kazem., 2014). İyonize radyasyon emilimini, dozunu ve maruziyetini ifade etmek için Curie (Ci) bir radyoizotopun her saniyedeki parçalanmalarını ifade etmektedir. Bir Ci her saniyedeki  $3.7 \times 10^{10}$  parçalanmaya eşittir. Hedef doku tarafından absorbe edilen enerji Gray (Gy) denilen birimle ifade edilir ve bu da dokunun bir gramı başına  $10^4$  erg enerji absorbe etmesidir. 1 santigray (cGy) dokunun her bir gramının 100 erg enerjisiyi absorbe etmesine ve bu da dokunun maruz kaldığı 1 rad (R)'a eşittir (Cotran ve ark., 2010).

Radyasyonun biyolojik etkilerini ifade etmek için kullanılan birim Sievert'dir. Aynı absorbe edilmiş doz için, farklı tipteki radyasyonun oluşturduğu hasarın boyutu da farklıdır. Eşdeğer doz, tek tip bir ölçü birimi sağlayarak çeşitliliği kontrol etmektedir. Radyasyonun göreceli biyolojik etkinliği ile absorbe edilen dozun çarpılması ile eşdeğer doz hesaplanmaktadır.

Radyasyonun biyolojik etkileri aşağıdaki faktörlere bağlıdır:

Radyasyon alanının boyutu radyasyonun biyolojik etkilerini büyük oranda etkilemektedir. Küçük ve çevresi korunmuş bir alana yüksek dozlar uygulandığında vücut kendini koruyabilmekte iken, büyük alanlara verilen küçük dozlar ölümle sonuçlanabilmektedir.

Işınsal enerjinin etkisi birikici olmasına rağmen, bölünmüş dozlarda alınması oluşan hasara karşı bazı hücrelerin onarımına imkan sağlamaktadır. Fakat hücrelere tanınan bu onarım süresinin yeterli olmaması halinde ışınsal enerji birikici etki yapabilmektedir.

Endotel hücreleri radyasyona orta derecede duyarlılık göstermektedir. Radyasyon kan damarlarının daralmasına veya tıkanmasına sebep olabilmekte bu da iyileşme sürecini aksatabilmektedir. Radyasyonun neden olduğu vasküler hasar aylar veya yıllar sonra görülebilmektedir (Cotran ve ark., 2010).

İyonize radyasyon biyolojik etkilerini direkt etki ve indirekt etki olarak iki ana mekanizma ile göstermektedir. Direkt etkide, iyonize radyasyon direkt olarak hedef atomlara çarpılmaktadır. Enzimatik ve yapısal preoteinler ve RNA gibi hücredeki bütün

atom ve moleküller radyasyon hasarına maruz kalmaktadır. Fakat DNA, iyonize radyasyonun tek veya çift sarmallı kromozomal kırılmalar ürettiği temel hedefdir. Direkt etki mekanizması hücrel radyasyon hasarını açıklamak için yetersiz olmuştur. İndirekt etki mekanizmasında, iyonize radyasyon hücrel suyun radyolizi ile serbest radikal oluşturmaktadır. Bu serbest radikaller hücrede özellikle DNA, atomlar ve moleküller ile reaksiyona girerek kimyasal modifikasyonlar oluşturur (Elgazzar AH and Kazem., 2014). Suyun radyolizi sonucunda sulu elektron, hidrojen radikal (H) ve hidroksil radikalleri (OH) reaktif türleri oluşmaktadır. Hücrelerdeki en zarar verici serbest radikal OH'dir. Hücre zarı lipidlerinin yüksek miktarda oluşu, lipid peroksidasyonu, hücre zarı yıkımı ve serbest oksijen radikalleri doku hasarına neden olan ana faktörlerdir. Lipid peroksidasyonunun son ürünü olan malondialdehit (MDA), güçlü sitotoksositeye sahip olmasının yanısıra antioksidan enzimlerinin hareketini engellemektedir (Tahamtan ve ark., 2015).

İyonize radyasyonun oluşturduğu DNA hasarı hücre proliferasyonunu da etkilemektedir. Aktif olarak bölünen hücreler radyasyon kaynaklı hasara daha duyarlıdır. DNA yapısını etkilemeyen dozlar, kas hücreleri ve nöronlar gibi bölünmeyen hücreler için önemli değildir. Fakat aktif olarak bölünen hücrelerde hücre döngüsündeki kontrol mekanizmaları tarafından mutasyon tipleri ve kromozom anomalileri tanınmakta ve bu da proliferasyonu inhibe etmekte ve apoptoza neden olmaktadır. Aktif olarak bölünen dokular radyasyona çok duyarlı olup kemik iliği, gonadlar, lenfoid doku ve gastrointestinal sistem mukozası bu dokulara örnektir (Cotran ve ark., 2010).

#### **2.4.1. Oksidatif stres**

Biyolojik sistemlerde, reaktif oksijen türleri (ROS) ve reaktif nitrojen türlerinin (RNS) miktarının, homeostazı sağlamak için fizyolojik yeterliliği aşması durumu oksidatif stres olarak adlandırılmaktadır (Sies, 2015; Breitenbach ve Eckl., 2015). Antioksidanlar, serbest radikallere elektron transfer ederek hücrel olarak meydana gelen oksidatif hasarı önlemiş olurlar (Valko ve ark., 2007).

Oksijen molekülünün bir, iki ve üç elektron indirgemesi ve eksitasyon (uyarılma) sonucunda oluşan ROS, temel haldeki oksijenden çok daha fazla reaktif olması ile karakterizedir. ROS iyonlar, atomlar ve moleküller ve hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), singlet

oksijen ( $^1O_2$ ), süperoksit anyon radikali ( $O_2^-$ ) ve OH gibi radikalleri içermektedir (Pospisil ve ark., 2019). OH radikali yüksek reaktivitesi ve lipidler, proteinler, karbonhidratlar ve deoksiribonükleik asitler gibi birçok hücre bileşenini oksitleme yeteneği nedeniyle dokular için tehlikelidir (Leser ve ark., 2019). Lipid peroksidasyonu sonucu, diğer biyomoleküllere oksidatif hasar verebilen reaktif lipid türevleri oluşur (Ahotupa, 2016). Oksidasyona uğrayan yağ asidine bağlı olarak, trans-4-hidroksi-2-nonenal ve/veya MDA lipid peroksidasyon seviyesinin belirteçleri olarak kullanılan son ürünler oluşturulur (Breitenbach ve Eckl., 2015). Protein yapısının oksidatif modifikasyonları yaşlanma süreci ve apoptozun dahil olduğu birçok patofizyolojik koşullarda gözlenmiştir (Gebicki, 2016; Hauck ve ark., 2019).

Oksijen metabolizması ve ROS prevalansı, canlı organizmaları oksidatif stresin olumsuz etkilerini yok etmek için uygun karşı etki mekanizmaları geliştirmeye zorlamıştır (Torres-Cuevas ve ark., 2019). Antioksidan savunma sistemi endojen ve ekzojen unsurlardan oluşur. Süperoksit dismutazlar (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidazlar (GSH.Px) ve GSH.Px 'in çalışması için gerekli enzim olan glutatyon redüktaz (GR)'ın dahil olduğu antioksidan enzimler endojenöz primer enzimatik savunmanın bir parçasıdır (Wang ve ark., 2017; Veal ve ark., 2018). Antioksidan enzimlere ek olarak, GSH.Px için bir kofaktör olan indirgenmiş glutatyon (GSH), proteinler (ferritin, transferin, seruloplazmin, albumin), ürik asit, melatonin ve vitamin D aşırı oksidatif stresin önlenmesinde rol oynar (Reiter ve ark., 2016).

#### 2.4.2. Serbest radikaller

Serbest radikaller hücrede protein, DNA ve lipidlerin oksidasyonuna neden olmaktadır. Oksidasyon sonucu oluşan oksidatif stresi ortadan kaldıran maddelere antioksidan, bu mekanizmalara da antioksidan savunma sistemleri denilmektedir. Serbest radikallere elektron transferi yapan antioksidanlar, hücresel hasarın oluşmasını **Temizleme etkisi**, **Baskılama etkisi**, **Onarma etkisi** ve **Zincir koparma etkisi** olmak üzere dört farklı etki mekanizması ile önlemektedir. **Temizleme etkisi** serbest oksijen radikallerini tutarak veya oksidanların daha zayıf bir moleküle dönüştürerek etkisizleştirmektedir. Bu etkiye örnek olarak antioksidan enzimler verilebilir. **Baskılama etkisi**, bir hidrojeni

oksidanlara aktararak onların etkisiz hale getirilmelerine veya aktivitelerinin azalmasına neden olmaktadır. Vitaminler ve flavonoidler etkilerini bu mekanizma ile göstermektedirler. **Onarma etkisi**; protein, DNA ve lipitlerde serbest radikallerin neden olduğu biyolojik hasarın onarılmasını sağlamaktadır. Nükleazlar ve glikozidazlar bu etki mekanizmasının örnekleridir. **Zincir koparma etkisi**; serbest oksijen radikallerini bağlayarak, serbest oksijen radikallerin reaksiyon zincirlerinin kırılmasına ve işlevlerinin engellenmesini sağlayarak etki göstermektedirler (Valko ve ark; 2007).

#### 2.4.2.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)

SOD enzimi, süperoksit radikalının O<sub>2</sub> molekülüne yükseltgenmesini ve diğer bir süperoksit radikalının ise daha az reaktif bir molekül olan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'e indirgenmesini katalize etmektedir. Reaksiyon sonucunda oluşan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> radikali ise CAT veya GSH-Px enzimleri ile suya dönüştürülmektedir (Aslankoç ve ark., 2019).



SOD, hücrenin farklı kısımlarında O<sub>2</sub> seviyelerinin kontrolünü sağlamaktadır. Zincirleme radikal reaksiyonlarının güçlü bir başlatıcısı olması sebebiyle oksidatif strese karşı ilk savunma olarak da isimlendirilmektedir (Panglossi, 2007).

#### 2.4.2.2. Katalaz (CAT)

Katalaz, her bir polipeptit alt birimi hem ve nikotinamid adenin dinükleotid fosfat molekülü içeren dört protein alt birimden oluşmaktadır (Limon-Pacheco ve Gonsebatt, 2009). Mitokondride oksijenin suya indirgenmesi sonucunda süperoksit ve hidrojen peroksit oluşmaktadır. Oluşan süperoksit radikallerinin yol açtığı hasara karşı savunmadan sorumlu SOD ve GSH-Px enzimleri tarafından yok edilmesine rağmen bir miktar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sitoplazmaya geçmektedir. Mitokondriden ayrılarak sitoplazmaya geçen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ise peroksizomlarda sentezlenen CAT enzimi ile detoksifiye edilmektedir. GSH-Px enziminin Michaelis-Menten sabitinin CAT enzime, göre daha düşük olması sebebiyle glutatyon peroksidaz daha düşük konsantrasyonlarda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'i parçalamaktadır (Radi ve ark., 1991).

### 2.4.2.3. Glutasyon Peroksidaz (GSH.Px)

Birçok hücrede sentezlenen GSH; glisin, L-glutamat ve L-sistein aminoasitlerinden oluşan bir tripeptiddir. GSH molekülü ilk aşamada glutamin ve sistein aminoasitlerinin glutamin-sistein ligaz enzimi ile tepkimeye girmesi ile  $\gamma$ -glutamilsisteini oluşturmaktadır. İkinci aşamada  $\gamma$ -glutamilsistein ve glisin glutasyon sentetaz ile reaksiyonu sonucunda GSH molekülü meydana gelmektedir (Lagman ve ark., 2015; Pei ve ark., 2013)

GSH.Px, her biri selenyum içeren dört protein alt birimden oluşan tetramerik yapıda bir enzimdir. Hücrelerin sitoplazmasında bulunan bu enzim, elektron kaynağı olarak glutasyonu kullanarak hidrojen peroksit ve organik hidroperoksitlerin (lipit hidroperoksitler, DNA hidroperoksitler) indirgenmesini sağlamaktadır.  $H_2O_2$ 'den OH oluşmasını engelleyerek oksidatif hasara karşı hücreleri korumaktadır (Rani ve ark., 2014).

$H_2O_2$ 'in sebep olabileceği oksidatif hasara karşı koruyucudur. Dolaylı yoldan  $H_2O_2$ 'den çok tehlikeli bir radikal olan OH radikalinin oluşumuna engel olmuş olur. Dört alt birimden oluşur. Her bir alt birimi bir selenyum içerir (Sen ve Chakraborty., 2011).

Elektron kaynağı GSH'dur.  $H_2O_2$ 'i ve organik  $H_2O_2$ 'leri detoksifiye eden reaksiyonları katalizler. GSH.Px enzimi, biri selenyum içeren selenyuma bağımlı glutasyon peroksidaz ve selenyum içermeyen yani selenyuma bağımlı olmayan glutasyon peroksidaz olmak üzere iki tipten oluşur. Selenyum bağı glutasyon peroksidaz hidrojen peroksit ve organik hidroperoksitlere karşı etkilidir. Selenyum bağımsız glutasyon peroksidaz ise organik hidroperoksitler üzerinde etkilidir. Bu detoksifikasyon reaksiyonları sırasında GSH'ın elektron verici olarak görev alması  $H_2O_2$  ve organik hidroperoksitleri indirgerken kendisinin yükseltgenmesine neden olur (Sen ve ark., 2010). GSH'un oksitlenmesi ile glutasyon disülfid oluşur. Okside glutasyonun indirgenmesi için GR enzimi gereklidir. Bu indirgenme reaksiyonu sırasında elektron vericisi olma görevini NADPH üstlenir (Sen ve Chakraborty., 2011; Reiter ve ark., 1995).

### **2.4.3. Oksidatif stres ve inflamasyon arasındaki ilişki**

İnflamatuar yanıt redoks aktivasyonunda önemli rol oynamaktadır. Radyasyona veya ROS'a maruz kalan hücreler mitotik ölüm, apoptozis ve nekrozis gibi yollarla hücre ölümüne yol açan nükleer ve mitokondrial DNA hasarına neden olmaktadır (Pugin, 2012). Apoptozis TGF- $\beta$  and IL-10'un dahil olduğu anti-inflamatuar sitokinlerin salınımını başlatırken; nekrozis IL-1, IL-4, IL-13 gibi inflammatuar sitokinlerin ve diğer inflammatuar mediyatörlerin salınımını başlatabilmektedir (Frey ve ark., 2017; Shen ve ark., 2018). ROS, radyasyon ile indüklenen doku hasarı oluşumunun asıl nedenidir. IR sonrası sürekli ROS oluşumu T lenfositlerin ve diğer hücrelerin radyosensivitesinin kaynağı olabilir (Ogawa ve ark., 2003). Ayrıca ROS pro-inflamatuar sitokinlerle birlikte NF $\kappa$ B sinyal yolağını aktif hale getirebilir. NF $\kappa$ B, RT sonrası kronik inflammatuar hastalıklarda önemli rol oynamaktadır (Mortezaee ve ark., 2019).

İnflamatuar sitokinler ve büyüme faktörleri NADPH oksidaz, COX-2 ve iNOS gibi çeşitli sinyal yollarının aktifleşmesine neden olmaktadır (Bours ve ark., 2000). Mitokondrinin bir enerji ve serbest radikal rezervi olduğu düşünülmektedir. Normal şartlarda antioksidan savunma sistemleri süperoksiti nötralize eder, serbest radikal oluşturur ve mitokondriyal aktiviteden kaynaklanan oksidatif hasardan hücreleri korur (Packer ve Murphy, 1995). Fakat, mitokondriyal disfonksiyon ve apoptozis ROS, pro-IL-1 $\beta$ , iNOS ve inflammatuar yanıtlarla indüklenebilmektedir. Aynı zamanda çalışmalar ROS türevli NOX sisteminin mitokondriyal disfonksiyona ve sonrasında bu organelde ROS oluşmasına katkı yaptığını göstermiştir (Kowluru ve Mishra, 2015)

### **2.4.4. DNA Hasarı**

İyonize radyasyonun esas hücrel hedefi DNA'dır. Radyasyonun sebep olduğu DNA hasarı, onarılmadığı takdirde yıllar sonra kansere neden olabilecek mutasyonlara yol açmaktadır. Radyasyon DNA baz dizilerinde ve DNA ve proteinler arasındaki çapraz bağlarda hasarlanma, DNA tek ve çift zincir kırıkları gibi çeşitli tipte hasarlara neden olabilmektedir. Hasar görmeyen hücrelerde oluşan basit defektler enzim onarım sistemleri tarafından tamir edilmektedir. Onarım sisteminde bulunan Ataxia-Telangiectasia Mutated hasar sonrası sinyal iletimini başlatmakta iken, p53 ise DNA

tamiri için hücre döngüsünü geçici olarak yavaşlatmaktan veya onarılamayan hücrelerin apoptozisini tetiklemekten sorumludur. Çift zincir kırıkları onarılmadan kalıcı olabilmekte veya onarım sonrası mutasyon görülebilmektedir. Örneğin p53 mutasyonu durumunda, hücre döngüsü kontrol mekanizması işlev görmediğinde anormal hücreler ve kararsız genomların ortaya çıkmasına ve sonunda tümör oluşmasına neden olan anormal kopyalar olarak büyümesine neden olmaktadır (Cotran ve ark., 2010).

## **2.5. Melatonin**

Melatonin (N-asetil-5-metoksitriptamin) serotoninin asetilasyon ve metilasyonu ile sentezlenen modifiye bir triptofandır. Melatonin primer olarak epifiz bezinden salgılanmaktadır fakat kemik iliği, immün hücreler, beyin ve bağırsaklardan da sentezlenmektedir. Melatonin iki önemli metaboliti vardır. N-asetil-N2-formil-5-metoksikuramin (AFMK) ve N-asetil-5-metoksikuramin (AMK). Bunlardan AFMK en bol bulunanıdır (Reiter ve ark., 2016). Melatoninin yarılanma ömrü 30 ila 57 dakika arasında değiştiği tahmin edilmektedir (Vijayalaxmi ve ark., 2004). Melatonin, küçük boyutu ve yüksek lipofilik özelliğinden dolayı biyolojik membranları geçebilmektedir ve hücrenin bütün bölümlerine girebilmektedir (Reiter ve ark., 1999).

Melatonin amfifilik yapısından dolayı pinealositlerde depo edilememektedir. Damardan zengin olan ve 3. ventrikül duvarının dorsal ve posteriorunda bulunan pineal bez, melatoninin gece boyunca merkezi sinir sistemi serebrospinal sıvısına ve aynı zamanda kan dolaşımına salınmasını sağlamaktadır. Kanda genellikle albümine bağlanan melatonin, karaciğerde sitokrom P450 izoformu (çoğunlukla CYP1A2) ile 6-hidroksimelatonine metabolize olmakta ve sonrasında üriner salgılama için 6-sülfatoksimeleatonine konjuge olmaktadır. 6-sülfatoksimeleatonin üretimi plazma melatonin seviyesini iyi bir şekilde yansıtmaması sebebiyle 6-sülfatoksimeleatoninin ölçümü pineal fonksiyon ve melatonin üretimini değerlendirmek için kullanılabilir. Merkezi sinir sisteminde melatonin N-asetil-5-metoksikuramin (AMK) olarak formüle edilen N-asetil-N2-formil-5-metoksikuramine (AFMK) indirgenmektedir (Hardeland, 2017).

Melatonin sentezi triptofanın, triptofan hidroksilaz enzimi ile 5-hidroksitriptofana dönüşmesi ile başlamaktadır. 5-hidroksitriptofan seratonine dönüşür. Seratonin, aralkilamin N-asetiltransferaz ile asetillenerek N-asetil seratonine dönüştürülür. N-asetil seratonin, asetil seratonin-O-metiltransferaz veya hidroksi indol-O-metiltransferaz ile melatonine dönüştürülür. Yukarıdaki 3 enzimde zaman, süre ve üretilen melatonin miktarını regüle eden nöral ve endokrin sistemlerin kontrolü altındadır (Afeche ve ark., 2008).

Melatonin enerji metabolizmasını etkileyen anti-inflamatuar ve antioksidan özelliklere sahiptir ve onkostatik ve antiaging bir molekül olarak da kullanılmaktadır (Agabiti-Rosei, 2017). Bu nedenle melatonin temel klinik uygulamalarda çoklu göreve sahip önemli bir molekül olarak düşünülmektedir (Reiter ve ark., 2014). Melatonin spesifik membran reseptörleri ile interaksiyonu (Erren ve Reiter, 2015) veya direkt radikal süpürücü fonksiyonu ile ilgili reseptör bağımsız etki gösterebilmektedir (Mauriz ve ark., 2013).

Melatonin reseptörleri membran ve nükleer bağlanma bölgeleri içermektedir (Acuña-Castroviejo ve ark., 2014). 2011'den itibaren 2 membran melatonin reseptörü tanımlanmıştır ve G protein bağlı yedi transmembran reseptörü olan MT1 ve MT2 karakterize edilmiştir (Slominski ve ark., 2012). MT1 reseptörleri retina, ovaryum, testis, meme bezleri, safra kesesi, karaciğer, böbrek, immün hücreler, ekzokrin pankreas ve kardiyovasküler sistemde eksprese olurken, MT2 reseptörleri duodenal enterositlerde, immün sistemde, hipotalamus, suprachiasmatic nükleus, retina, hipofiz bezi, kan damarları, testisler, böbrek, gastrointestinal sistem, meme bezleri, yağ dokusu ve deride eksprese olmaktadır (Singh ve Jadhav, 2014).

Melatonin ideal antioksidan ve anti-inflamatuar özelliklerinin yanı sıra mitokondri üzerinde önemli bir etkiye sahip çok fonksiyonlu bir moleküldür. Bu indoleamin; uyku düzenlenmesi, kan basıncı kontrolü, mitokondriyal fizyolojinin korunması ve insülin, leptin ve lipid sekresyonu gibi metabolik süreçlerin modülasyonu dahil olmak üzere bir dizi biyolojik işleve katkı sağlamaktadır ve önemli anti-inflamatuar ve antioksidan koruyucu etkilere sahiptir (Reiter ve ark., 2018).

Melatoninin, antioksidan olarak yüksek etkinliği, amfifilik olması ve bütün morfofizyolojik bariyerlerden geçebilmesi ile ilişkilidir (Reiter ve ark., 2013). Sitoprotektif etkileri direkt ve indirekt antioksidan özellikleri ile ilişkilidir (Reiter ve ark., 2016). Araştırmalarda melatoninin indirekt bir antioksidan olarak bu görevi birkaç mekanizma yoluyla yaptığı doğrulanmıştır:

- (i) Antioksidan enzimlerin aktive edilmesi
- (ii) Oksidatif hasardan antioksidatif enzimlerin korunması
- (iii) Glutasyon sentezinin uyarılması,
- (iv) Diğer antioksidanların aktivitelerinin artırılması,
- (v) Geçiş metallerine bağlanması,
- (vi) Epigenetik mekanizmalar aracılığıyla pro-oksidatif enzimlerin inhibe edilmesi
- (vii) Mitokondriyal elektron taşıma zincirinin etkinliğinin artırılması böylece elektron kaçağının azalması ve serbest radikal oluşumunun azalması (Reiter ve ark., 2016).

Melatonin bu çoklu etkilerinin bir sonucu olarak oksidatif strese yanıtta DNA hasarı ve çoğunlukla moleküler hasarı kolaylıkla kontrol edebilmektedir. Melatoninin antioksidan potansiyeli yaşa bağlı nörodejenerasyon, sol ventrikül hipertrofisi ve ilaçla indüklenmiş nefrotoksisite ve hepatotoksisite gibi şartlar altında çok sayıda hayvan ve insan modelleri kullanılarak araştırılmıştır (Maarman ve ark., 2015). Ayrıca, bu çok yönlü ajan DNA'yı fiziksel ajanların, iyonize radyasyon, toksinler ve lipopolisakkaritlerin zararlı etkilerinden de korumaktadır (Mathes, 2010). Bu maruziyetlerin sonucunda toksik serbest radikal üretiminden kaynaklanan DNA hasarı oluşmaktadır. Çünkü DNA hasarının en büyük nedeni artmış ROS seviyeleri olduğu için, melatoninin koruyucu etkisi antioksidan potansiyeline dayandırılmaktadır.

## **2.6. Nükleer Faktör Kappa (NFκB)**

İnsanlarda NFκB p50, p52, cRel, RelA (p65) ve RelB olmak üzere beş alt birimden oluşmaktadır. NFκB normal şartlar altında inaktif halde bulunmaktadır ve bu alt birimlerin homodimer ya da heterodimer yapılarını oluşturmaları ile aktifleşmektedir (Calzado ve ark., 2007). NFκB protein ailesinin tüm alt birimleri immünglobulin

benzeri tekrar bölgeleri ve Rel domain bölgeleri içermektedir. Rel domain NFκB'nın çekirdeğe taşınmasını, DNA'ya bağlanmasını ve alt birimlerle dimerizasyonunu sağlamaktadır (Calzado ve ark., 2007).

NFκB ailesinin p50 ve p52 alt birimleri ise öncüller halinde sentezlenip işlenmeler sonrasında aktifleşmektedirler. P105 öncülü proteolitik işlemler sonrasında p50 alt birimini oluşturmakta iken, p100 öncülünün fosforilasyon ve ubiquitinasyon işlemleri sonrasında p52 alt birimi oluşmaktadır. P50 ve p52 alt birimlerinin yapısında TA bölgesi bulunmaması sebebiyle transkripsiyonel olarak inaktiftir. RelA, RelB ve cRel yapısında TA bölgesi bulunduğu için hedef genlerin transkripsiyonunu başlatabilmektedir (Calzado ve ark., 2007).

### **2.6.1. NFκB'nin İnhibisyonu**

NFκB kompleksi aktifleştikleri yer olan sitoplazmada (Israel, 2010) inaktif halde bulunmaktadır (Aggarwal ve ark., 2004). TNFα veya diğer hücre stresleri gibi moleküller ile uyarıldığında TNFα reseptörüne bağlanır. Bu bağlanma birkaç ara basamak yoluyla inhibitör kappa B (IκB) fosforilasyonuna ve sonrasında IκB ubiquitasyon ve degradasyona neden olan IκB kinaz ile etkileşime yol açmaktadır. NFκB dimeri degradasyon olur olmaz çekirdekte çeşitli hedef genlerin DNA konsensus sekansının olduğu bölgeye transloke olmaktadır (Qin ve ark., 2007). Sitozolde dinlenim durumundayken NFκB ile etkileşen ve onun inhibe hale gelmesini sağlayan IκB proteinleridir. IκB proteinlerinin NFκB ile protein-protein etkileşimleri, IκB'nin yapısında bulunan ankrin tekrarları sayesinde olur. IκB'nin ankrin tekrarları, NFκB'nin yapısında bulunan RHD'ye bağlanarak NFκB'nin çekirdek lokalizasyon sinyalini tanıyan bölgenin maskelenmesini sağlar (Calzado ve ark., 2007)

### **2.6.2. NFκB ve Sirtuin 1 (SIRT1)**

SIRT1 ve NFκB sistemi memelilerde karşılıklı zıt kontrol mekanizması aracılığıyla metabolik ve inflamatuvar ağrı düzenleyen eski sinyal yolağıdır. SIRT1, NFκB sinyalini direkt veya indirekt olarak inhibe edebilmektedir, NFκB sistemi ise SIRT1'in downstream hedeflerini inhibe ederek SIRT1 aracılı fonksiyonlarını baskılamaktadır. SIRT1, NFκB kompleksinin RelA/p65 bileşeni ile direkt reaksiyona girer ve deasetile

eder. Lys310'un asetilasyonu RelA/p65 alt ünitesinin transaktivasyon kapasitesini inhibe eder ve sonuç olarak NFκB bağımlı gen ekspresyonunun transkripsiyonunu baskılamaktadır. RelA/p65 proteininde Lys310'un deasetilasyonu Lys314 ve Lys315' de metilasyona neden olur, bu da proteinin ubiquitinasyon ve degradasyonunu artırır (Yang ve ark., 2010). Son çalışmalar SIRT1'in NFκB sinyalini inhibe ettiğini ve SIRT1 aktivasyonunun NFκB kaynaklı inflamatuvar ve metabolik bozuklukları azaltabileceğini doğrulamıştır (Yao ve Rahman, 2012). Sonraki çalışmalar SIRT1, NFκB kaynaklı inflamatuvar yanıtın sonlandırılmasında ve inflamasyon rezolüsyonuna katkı sağlamada önemli rol oynamaktadır (Yeung ve ark., 2004). Liu ve arkadaşları insan THP1 makrofajlarda kronik LPS uygulamasının SIRT1 ekspresyonunu artırdığı ve eş zamanlı olarak TNF-α ve IL-1β transkripsiyonunu baskıladığı rapor edilmiştir. Ayrıca uzun süreli LPS uygulaması SIRT1'in bu sitokin genlerin promotor bölgesine birikmesini uyardığı ve orada NFκB kompleksinin RelA/p65 alt ünitesinde ve histon H4K16'de deasetilasyonu indüklediği gözlemlenmiştir. Ardından SIRT1 deasetile RelA/p65 proteini yerine inhibitör RelB proteini alır ve böylece TNF-α promotoruna olgun bir baskılayıcı kompleks oluşturur (Liu ve ark., 2011). SIRT1 ve NFκB kompleksi inflamasyon rezolüsyonuna ve hatta kromatin düzeyinde epigenetik değişikliğe neden olan endotoksin toleransının oluşmasına katkı yapmaktadır (McCall ve ark., 2011).

### **2.6.3. NFκB ve peroksizom proliferatör ile aktive edilmiş reseptör gama koaktivatörü 1-alfa (PGC-1α)**

PGC-1α mitokondriyal biyogenezi indükleyen ve böylece oksidatif metabolizmayı artıran en önemli downstream hedefi SIRT/AMPK sinyal yolağıdır (Fernandez-Marcos., 2011). LPS ve TNF-α ile indüklenen inflamatuvar sinyal PGC-1α'nın fonksiyonu baskılanabilmektedir (Schilling ve ark., 2011). Palomer ve arkadaşları insan kardiak miyositlerinde NFκB aktivasyonu yoluyla TNF-α'nın PGC-1α ekspresyonunu inhibe ettiğini açıklamışlardır. PGC-1α'nın baskılanması glukoz oksidasyonunu artırdığını gözlemlenmiştir. İskelet kasında palmitat uygulaması NFκB sinyal aktivasyonu ile PGC-1α ekspresyonunu baskılamaktadır (Coll ve ark., 2006). Alvarez Guardia ve arkadaşları (2010) kardiak hücrelerde NFκB kompleksi RelA/p65 alt ünitesinin PGC-1α proteinine bağlandığını belirtmişlerdir. TNF-α maruziyeti sonrası NFκB aktivasyonu

RelA/p65 ve PGC-1 $\alpha$  proteini arasındaki etkileşimin anlamlı olarak artmasına ve bunun sonucunda glikoz oksidasyonunun artmasına neden olmaktadır. Bu çalışmalar PGC-1 $\alpha$  deasetilasyonunun mitokondrial oksidatif solunumu artırırken, NF $\kappa$ B sinyal aktivasyonu SIRT1/PGC-1 $\alpha$  sinyalini baskılayabilmekte ve aerobik glikozisi başlatmaktadır. PGC-1 $\alpha$ 'nın aşırı ekspresyonu RelA/p65 bileşeninin fosforilasyonunun ve NF $\kappa$ B transkripsiyonel aktivitesinin azalmasına neden olmuştur (Eisele ve ark., 2013). Kas hücrelerinde artan PGC-1 $\alpha$  ekspresyonu TNF- $\alpha$ , TLR (Toll benzeri reseptör) agonistleri ve yağ asitleri tarafından indüklenen proinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu ve sekresyonunu baskılamaktadır. Vasküler hücrelerde aşırı PGC-1 $\alpha$  ekspresyonu ROS üretimini azaltmakta ve TNF- $\alpha$  ile indüklenmiş NF $\kappa$ B aktivasyonunu baskıladığını gözlemlemiştir. Ayrıca proinflamatuvar genlerin ekspresyonu iskelet kası spesifik PGC-1 $\alpha$  nakavt farelerde artmıştır. PGC-1 $\alpha$  inflamasyon ve enerji metabolizması arasındaki ilişkinin regülasyonunda önemlidir (Kim ve ark., 2007).

## 2.7. Sirtuin 1

Önemli epigenetik regülatörlerden olan histon deasetilazlar (HDAC) spesifik histon ve non-histon proteinleri üzerinde bulunan lizin kalıntılarını deasetilate etmektedirler. Lizin kalıntılarının  $\epsilon$ -amino grubunda olan lizin asetilasyonu oldukça düzenlenmiş bir posttranslasyonel modifikasyon olup geri dönüşümlüdür. Asetilasyonun gerçekleşmesi protein stabilitesi, transkripsiyonel aktivite, protein-protein etkileşimi, DNA-protein etkileşimleri ve enzimatik aktivitenin düzenlenmesi açısından önem taşımaktadır (Glozak, 2005).

HDAC'lar insanlarda dört sınıfa ayrılmış olup sirtuinler, nikotinamid adenin dinükleotid (NAD<sup>+</sup>) bağımlı sınıf III HDAC'lara dahildir (Gray ve Ekstrom, 2001). Sessiz bilgi düzenleyici 2 (Sir2), sirtuin (SIRT) ailesinde keşfedilen ilk gen olup ilk kez mayada ömrü uzattığı belirtilmiştir (Haigis ve Sinclair, 2010).

Memelilerde farklı moleküler ağırlığa ve farklı biyokimyasal aktiviteye sahip yedi sirtuin bulunmaktadır (Baur, 2012). Sirtuinler; N-terminal bölge, C-terminal bölge, katalitik çekirdek ve allosterik bölge olmak üzere 4 farklı bölgeden oluşmaktadır (Kozako, 2014). Yapılarında bulunan N ve C terminallerinin farklılık göstermesi, farklı hücresel lokalizasyon, farklı biyolojik aktiviteleri ve farklı ekspresyon kalıpları

nedeniyle farklı biyolojik fonksiyonlara sahiptirler (Haigis, 2010). SIRT1 nükleer ve sitoplazmik, SIRT2 sitoplazmik, SIRT3, -4, -5 mitokondride ve SIRT6 ve -7 ağırlıklı olarak nükleer lokalizasyona sahiptir (Kozako, 2014). Memeli sirtuinleri, başlıca histon deasetilaz aktivitesine (SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT5 ve SIRT7) ya da monoriboziltransferaz aktivitesine sahiptir (SIRT4 ve SIRT6) (Baur, 2012).

Sirtuinler; transkripsiyon, hücre yaşamı, genom stabilitesi, DNA hasarı ve onarımı, inflamasyon ve uzun ömürlülük gibi çeşitli biyolojik işlemlerde yer alan enzimlerdir. Bu enzimler, ortak kosubstrat olarak NAD<sup>+</sup> kullanılarak, histonlar, transkripsiyon faktörleri ve enzimler gibi spesifik protein substratları üzerindeki spesifik lizin kalıntılarının ε- amino grubundan asetil grubunun deasetilasyonunu katalize eder (Graziadio ve ark., 2016).

SIRT1 en iyi karakterize edilmiş sirtuinlerdendir. Karaciğer, beyin, kas, pankreas, testis, over ve adipoz dokuda varlığı gösterilmiştir. Güçlü deasetilasyon aktivitesine sahiptir. Aynı zamanda inflamatuvar cevap, apoptoz, mitokondriyal biyogenez ve oksidatif stresle ilişkili olduğu da bilinmektedir (Morris ve ark., 2011). SIRT1'in özellikle p53, Foxo, Ku70, P300, Rb, E2F1, NFκB, p73, PGC-1α ve PPARγ gibi hücre yaşlanma, hücre döngüsü progresyonu ve apoptoz süreçlerinde yer alan proteinleri deasetile ettiği bildirilmiştir (Kozako ve ark., 2014).

SIRT1, p53 dışında Ku70, E2F1 ve TGF-β sinyal yolağı gibi hücre ölümü ilişkili diğer hedefleri de regüle etmektedir (Michan ve Sinclair, 2007). SIRT1, NFκB kompleksinin komponentlerini deasetile ederek apoptozise neden olmaktadır (Yeung ve ark., 2004). SIRT1'in gen susturulması çalışmalarında, hücre döngüsü, DNA hasar onarımı ve yaşam süresi ile ilgili olabileceği bildirilmiştir. SIRT1; p53'ü lizin amino asid kalıntılarında deasetilize ederek transkripsiyonel sinyal etkinliğini azaltır. Oksidatif strese ve DNA hasarlanmalarına karşı programlı hücre ölümünü baskılar (Vaziri ve ark., 2001). SIRT1'in inflamatuvar süreçlerde, anti-inflamatuvar ve pro-inflamatuvar mediatörleri modüle ederek inflamasyonun düzenlenmesinde, hücre büyümesi ve metabolizmasının modülasyonu gibi çeşitli patofizyolojik süreçlerde rolü olduğu gösterilmiştir (Sharma, 2014).

NAD kofaktörü stres, direnç ve yaşam süresi ile ilgili metabolizmalarda anahtar düzenleyici olarak bulunur. Oksidatif stres, NAD<sup>+</sup> ve sirtuin metabolizması arasındaki ilişki Braidy ve ark. tarafından gösterilmiştir. Yaşa bağlı olarak kalp, karaciğer, akciğer ve böbrek mitokondrilerinde oksidatif strese ve DNA hasarında artma, total antioksidan, NAD<sup>+</sup> ve SIRT1 düzeylerinde azalma saptamışlardır. SIRT1 aktivitesini NAD<sup>+</sup> üzerinden yürütür (Braidı ve ark., 2011). SIRT1'in, oksidatif strese bağı apoptozu inhibe etmek için önemli bir rolü olduğı ortaya konulmuştur (He ve ark., 2015).

### **2.7.1. SIRT1'in Antioksidan ve Redoks Sinyalinde Düzenleyici Olarak Rolü**

Süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon ve glutatyon peroksidaz gibi geleneksel endojen antioksidanların yanı sıra SIRT1'in çeşitli mekanizmalar yoluyla oksidatif streste önemli bir sitoprotektif rol oynadığı gösterilmiştir. Örneğin, forkhead box transkripsiyon faktörlerini (FOXO1, FOXO3a ve FOXO4) (Hori ve ark., 2013) ve peroksizom proliferatör ile aktive edilmiş reseptör gama koaktivatörü 1-alfa (PGC-1 $\alpha$ ) (Shuang ve ark., 2016, Khader ve ark., 2014) deasetilasyonunu yapabilmekte ve çok sayıda antioksidan enzim ekspresyonunu indükleyebilmektedir (Li and Wu., 2018). FOXO'lar ayrıca genomik stabiliteyi ve DNA tamirini başlatmak için büyüme arresti ve DNA hasarını indükleyebilen protein GADD45'i aktive edebilir (Kobayashi ve ark., 2005). Ayrıca, SIRT1 NF $\kappa$ B kompleksinin RelA/p65 alt birimini deasetile etmekte (Yeung ve ark., 2004) ve ardından NAD(P)H aracılı ROS üretimini engellemektedir (Kang ve ark., 2004). SIRT1, p53'ün oksidatif stres kaynaklı apoptotik aktivitesini (Han ve ark., 2008) ve FOXO3a'nın proapoptotik etkilerini doğrudan inhibe edebilir (Wang ve ark., 2015). Tüm bu olaylar birlikte oksidatif stres toleransını ve hücre sağ kalımını desteklemektedir. Bu özellikler SIRT1 aktivatörleri için yoğun bir araştırma yapılmasını sağlamıştır.

### **2.7.2. SIRT1'in İnflamasyondaki Rolü**

Bağıışıklık sisteminin regülasyonunda Sirtuinlerin önemli görevleri bulunmaktadır. Birçok doku ve makrofajlarda SIRT1'in inflamasyonu baskıladığı belirtilmektedir (Yoshizaki ve ark., 2009). SIRT1, anahtar düzenleyici olan NF $\kappa$ B'yi düzenlemek

suretiyle yangıda da rol oynamaktadır. SIRT1, NFκB faaliyetini muhtemelen çoklu mekanizmalarla baskılamaktadır. SIRT1'in, NFκB'nin alt ünitesi olan RelA/p65'ı onun transkripsiyonel potansiyelini durdurmak suretiyle deasetilize ettiği kanıtlanmıştır (Yeung ve ark., 2004). Kronik inflamasyon halinde koruma sağlayan SIRT1, delesyonu lokal inflamasyona, SIRT1'in aşırı eksprese edilmesi ise inflamatuvar yanıtın baskılanmasına neden olmaktadır (Schug ve ark., 2010). Endotelial hücrelerde SIRT1, NFκB'nin inhibisyonunu sağlayarak inflamasyonun azalmasına ve apoptozun inhibe olmasına neden olmaktadır (Zhao ve ark., 2016).

### **2.7.3. SIRT1'in DNA Tamirindeki Rolü**

SIRT1'in genomik stabilitenin sağlanmasında etkili olduğu model organizmalarda yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Maya Sir2'nin DNA kırıklarının olduğu alanlarda relokasyonu sağladığı ve ribozomal DNA rekombinasyonunu inhibe ettiği belirtilmiştir (Denu, 2003). DNA hasar tamirinde görevli Werner helikaz ve NBS1'in dahil olduğu faktörleri deasetile etmektedir (Yuan ve ark., 2007). SIRT1'in oksidatif stres sonrası DNA'da oluşan kırıkların düzeltilmesini sağladığı belirtilmiştir (Oberdoerffer, 2008).

Son yapılan çalışmalarda SIRT1 geninin birçok metabolik aktivitesine, DNA onarım mekanizmasındaki faaliyeti de eklenmiştir. Radyasyona maruz kalınması üzerine SIRT1, DNA onarım kapasitesini ve onarım proteini olan Ku70'in deasetilasyonunu geliştirmektedir. Aşırı SIRT1 ifadesi ise, DNA zincirinde, radyasyondan kaynaklanan zincir kırılmalarında artışa sebebiyet vermektedir (Mostoslavsky ve ark., 2006). Öte yandan, SIRT1 siRNA tarafından gerçekleştirilen endojenik SIRT1 ifadesi, SIRT1'in hücrelerin, DNA onarım kapasitelerini DNA zincir kırılmaları ile düzenleyebildiğini göstermektedir (Jeong ve ark., 2007).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Erciyes Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanlığı 14/02/2018 tarihli ve 18/043 nolu Etik Kurul onayı alınan çalışmanın deney aşaması Erciyes Üniversitesi Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezinde (DEKAM) gerçekleştirildi. Çalışmanın diğer aşamaları Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda tamamlandı. TDK-2018-8364 numaralı bu proje Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAP) tarafından desteklenmiştir.

#### 3.1. Deney Hayvanları

Bu çalışmada Erciyes Üniversitesi DEKAM'da yetiştirilen 60 adet 8-12 haftalık, 250-300 gr ağırlığında yetişkin Wistar albino türü erkek sıçanlar kullanılmıştır. Sıçanlara günün normal düzeninde 21°C ve 12 saatlik aydınlık/karanlık ortamında su ve besin ihtiyaçları sağlanmıştır. Denekler tartılıp, ağırlıkları birbirine yakın olanlar bir araya getirilerek deney grupları oluşturulmuştur.

#### 3.2. Deney Grupları

Deney grupları Tablo 3.1' de belirtildiği şekilde oluşturuldu.

**Tablo 3. 1.** Deney grupları

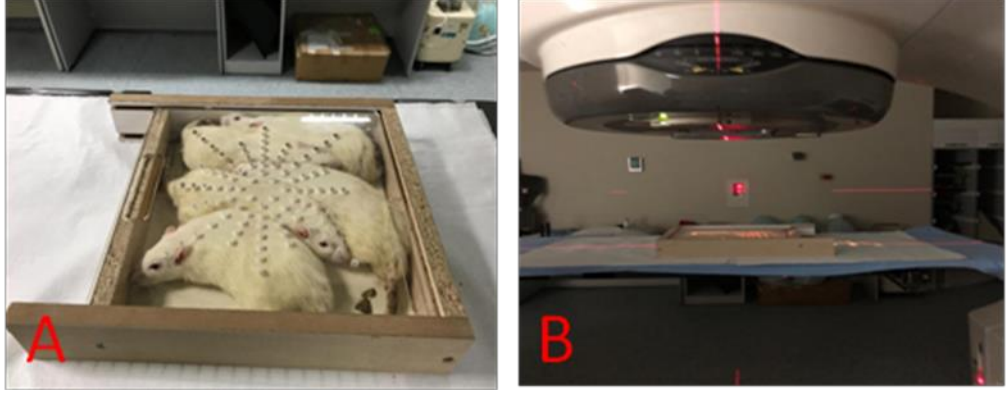
Gruplar	Uygulama
Kontrol grubu (K)	% 0,9'luk serum fizyolojik intraperitoneal (i.p) olarak 10 gün boyunca hergün bir defa

<b>Sham grubu (S)</b>	Serum fizyolojik içinde %3'lük etanol i.p olarak 10 gün boyunca hergün bir defa
<b>Radyasyon grubu (R)</b>	Akut radyasyon (tek doz 10 Gy)
<b>Melatonin grubu (M)</b>	10 gün boyunca 10 mg/kg/gün melatonin i.p
<b>Radyasyon + Melatonin grubu (RM)</b>	Akut radyasyon (tek doz 10 Gy) uygulamasından 24 saat sonra 10 gün boyunca 10 mg/kg/gün melatonin i.p
<b>Melatonin +Radyasyon grubu (MR)</b>	10 gün boyunca 10 mg/kg/gün melatonin i.p uygulamasından 24 saat sonra Akut radyasyon (tek doz 10 Gy)

### 3.3. Radyasyon Uygulaması

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyasyon Onkolojisi Bölümünde Cobalt-60 teleterapi (GWXJ80-Co60 Teletherapy Unit) cihazı ile oluşturulan  $\gamma$ -ışını kullanılarak ışınlanma yapıldı. Sıçanlara ışınlanma yapmak için 28x24 boyutunda ve 2.5 cm derinlikte olan tahtadan yapılmış özel bir kutu kullanıldı. Radyasyon dozunun fiziki hesabı 28x24x2.5 cm ölçülerindeki kutu ön ve arka karşılıklı iki alandan, total tek doz 10Gy olacak şekilde hesaplama yapıldı. Tray faktörü de dikkate alınarak ışınlanma süresi hesaplandı. Sıçanlara herhangi bir anestezi madde verilmeden, 5'erli gruplar halinde total vücut ışınlanma yapıldı (Şekil 3.1). Işınlanma sırasında sıçanların nefes almalarına izin vermek ve sabit SSD (kaynak cilt mesafesi), sağlamak için kutunun üst ve alt kısmına yoğunluğu bilinen delikli tray yerleştirildi.

Melatonin hayvan başına 10 mg/kg olacak şekilde uygulandı. Hayvanların ağırlıkları tartılarak her bir hayvan için verilecek melatonin miktarı hesaplandı. Melatonin %3 etanol içerisinde çözdürülerek son hacim serum fizyolojik ile tamamlandı. Son uygulamadan 24 saat sonra sıçanların ağırlıkları tartıldı ve ketamine hydrochloride (60 mg/kg i.p) ve %2 xylazine hydrochloride (10 mg/kg i.p) ile anestezi altında sakrifiye edilerek kan ve doku örnekleri alındı. Karaciğer dokularının bir kısmı %10'luk formaldehite alınırken, bir kısmı da biyokimyasal analizler ve comet assay için alüminyum folyo içerisine paketlenerek -80°C'ye kaldırıldı. Alınan kan numunelerinden ise serumlar elde edilerek Aspartat Amino Transferaz (AST), Alanin Amino Transferaz (ALT), Alkalın fosfataz (ALP) ve Direk bilirubin (DB) ve Total bilirubin (TB) çalışıldı.



**Şekil 3. 1.** A) Sıçanlar radyasyon uygulaması için hazırlanan özel kutu içerisine yerleştirildi. B) Radyasyon uygulaması yapıldı.

### 3.4. Histolojik Analizler

Histolojik incelemeler için %10'luk formaldehit solüsyonuna alınan karaciğer doku örnekleri 48 saat tespit edildi. Tespit edilen karaciğer doku örnekleri akan musluk suyunda yıkandıktan sonra artan dereceli alkol serilerinden geçirildi ve ksilen ile şeffaflandırdıktan sonra parafine gömülerek bloklandı. Yapılan işlemler Tablo 3.2' de ayrıntılı olarak verilmiştir.

Parafin bloklardan alınan 5-6  $\mu\text{m}$ 'lik kesitler polilizin kaplı lamlara yayıldı. Hazırlanan lamlar standart histolojik yöntemler kullanılarak ksilen ile parafini uzaklaştırıldı ve dereceli alkol serilerinden geçirilip dehidrate edildi. Genel histolojik yapıyı görmek amacıyla kesitler Hematoksilen&Eozin (H&E) (Tablo 3.3) ile bağ dokusu bileşenlerini göstermek için Masson Trikrom (MT) (Tablo 3.4) ve hepatositlerdeki glikoprotein içeriğini değerlendirebilmek için ise Periyodik Asit Schiff (PAS) (Tablo 3.5) boyamaları yapıldı. H&E, MT ve PAS ile boyanan kesitler Olympus BX51ışık mikroskopunda incelendi.

**Tablo 3.2. Işık Mikroskobu Doku Hazırlama Tekniği**

Sıra	Yapılan işlem	Süre	Sıra	Yapılan işlem	Süre
1	Musluk suyu	2 saat	7	Absolü Alkol	3-5 dk
2	%50 Alkol	10 dk	8	Absolü Alkol	1 dk
3	%70 Alkol	10 dk	9	Ksilen	1 dk
4	%80 Alkol	10 dk	10	Ksilen	1 dk
5	%96 Alkol	5 dk	11	Ksilen	1 dk
6	Absolü Alkol	5 dk	12	Eriyik parafin (60 °C)	1 dk

**Tablo 3.3. Hematoksilen&Eozin Boyama Tekniği**

Sıra	Yapılan işlem	Süre	Sıra	Yapılan işlem	Süre
1	Etiv (60 °C)	2 saat	14	Eozin	3-5 dk
2	Ksilen I	10 dk	15	Akarsu	1 dk
3	Ksilen II	10 dk	16	%50 Alkol	1 dk
4	Ksilen III	10 dk	17	%70 Alkol	1 dk
5	Absolu Alkol I	5 dk	18	%80 Alkol	1 dk
6	Absolu Alkol II	5 dk	19	%96 Alkol	1 dk
7	%96 Alkol	5 dk	20	Absolu Alkol I	1 dk
8	%80 Alkol	5 dk	21	Absolu Alkol II	2 dk
9	%70 Alkol	5 dk	22	Absolu Alkol III	2 dk
10	%50 Alkol	5 dk	23	Ksilen I	20 dk
11	Akarsu	2 dk	24	Ksilen II	20 dk
12	Hematoksilen	5-8 dk	25	Ksilen III	20 dk
13	Akarsu	5 dk	26	Kapatma	

**Tablo 3.4.** Masson Trikrom Boyama Tekniği

Sıra	Yapılan işlem	Süre	Sıra	Yapılan işlem	Süre
1	Etüv (60 °C)	2 saat	15	Distile su	2 dk
2	Ksilen I	10 dk	16	Fosfomolibdik Asit	5 dk
3	Ksilen II	10 dk	17	Kurutma	1 dk
4	Ksilen III	10 dk	16	Anilin Blue	5 dk
5	Absolu Alkol I	5 dk	17	Distile su	1 dk
6	Absolu Alkol II	5 dk	18	%1'lik Asetik Asit	1 dk
7	%96 Alkol	5 dk	19	%96 Alkol	2 dk
8	%80 Alkol	5 dk	20	Absolu Alkol I	3 dk
9	%70 Alkol	5 dk	21	Absolu Alkol II	3 dk
10	%50 Alkol	5 dk	22	Absolu Alkol III	3 dk
11	Akarsu	2 dk	23	Ksilen I	20 dk
12	Hematoksilen	5-8 dk	24	Ksilen II	20 dk
13	Akarsu	5 dk	25	Ksilen III	20 dk
14	Asit Fuksin	20 saniye	26	Kapatma	

**Tablo 3.5.** Periyodik Asit Schiff Boyama Tekniği

Sıra	Yapılan işlem	Süre	Sıra	Yapılan işlem	Süre
1	Etüv (60 °C)	2 saat	14	Schiff solüsyonu	25 dk
2	Ksilen I	10 dk	15	Akarsu	10 dk
3	Ksilen II	10 dk	16	Hematoksilen	5-8 dk
4	Ksilen III	10 dk	17	Akarsu	5 dk
5	Absolu Alkol I	5 dk	18	Asit Alkol	1-2 saniye
6	Absolu Alkol II	5 dk	19	Akarsu	1 dk
7	%96 Alkol	5 dk	20	Absolu Alkol I	2 dk
8	%80 Alkol	5 dk	21	Absolu Alkol II	3 dk
9	%70 Alkol	5 dk	22	Absolu Alkol III	3 dk
10	%50 Alkol	5 dk	23	Ksilen I	20 dk
11	Distile su	2 dk	24	Ksilen II	20 dk
12	Periyodik asit	7 dk	25	Ksilen III	20 dk
13	Distile su	2 dk	26	Kapatma	

### 3.5. İmmünohistokimyasal Uygulama

$\alpha$ -SMA (1:640; 19245 Cell Signalling), NF $\kappa$ B (1:800; 8242 Cell Signalling), cleaved kaspaz 3 (1:100; 9661 Cell Signaling) ve Sirtuin1 (1:200; NBP1-51641 Novus) primer antikörlerinin immünreaktivitelerini belirlemek amacıyla avidin-biotin-peroksidaz yöntemi ile immunohistokimya boyama metodu uygulandı (Tablo 3.6).

Parafin bloklardan polilizin kaplı lamlara alınan kesitler 60°C etüvde 1 gece bekletildikten sonra ksilen ve azalan dereceli alkol serilerinden (%100, %96, %80, %70) geçirilerek rehidrate edildi. Distile su ile 2 dakika 2 defa yıkanan kesitler antijen geri kazanımı için %10'luk sitrat tamponu ile mikrodalga fırında 600W'de 5 dakika sıcak uygulaması sonrası kesitler oda sıcaklığında aynı tampon solüsyonu içerisinde 10 dk soğumaya bırakıldı. Daha sonra fosfat tamponu (PBS) ile yıkanan kesitlere endojen peroksidaz aktivitesi engellemek için %3 hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ile 12 dakika muamele edildi. Bu aşamadan sonraki tüm basamaklarda Large Volume Detection System (Thermo Sscientific, TP-125-HL) immunohistokimya boyama kiti kullanıldı. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sonrası PBS ile 2 defa 5 dakika yıkanmış kesitlere 10 dakika Ultra V block uygulanarak antijenik alanların dışında kalan bölgelerin kapatılması sağlandı. Hemen ardından kesitlere  $\alpha$ -SMA, NF $\kappa$ B, kaspaz 3 ve Sirtuin-1 antikörleri uygulanarak 1 gece +4°C'de bekletildikten sonra 30 dakika oda ısısında inkübe edildi. Negatif kontrol olarak, primer antikor yerine PBS kullanıldı. Yıkama işleminden sonra kesitler biotinli-sekonder antikor ile 10 dakika inkübe edildi ve ardından yıkama işlemi tekrarlandı. Daha sonra streptavidin peroksidaz ile 10 dakika muamele edilen kesitler yıkanarak immünreaktiviteyi görünür hale getirmek için 3,3'-diaminobenzidine (DAB) özelliği gösteren kitteki peroksidaz substrat ile 1-5 dakika muamele edildikten sonra 5 dakika distile su ile yıkandı. Gill hematoksilen ile zıt boyanan kesitler birkaç kez distile su ile yıkandı. Son olarak artan alkol serileri (%70, %80, %96, %100) ile suyu uzaklaştırılarak ksilenden geçirilen kesitler kapatma solüsyonu (Entellan®, Merck) ile kapatılarak Olympus BX51 mikroskobu altında incelendi. Tüm deney gruplarına ait karaciğer dokulardan alınan kesitlerde  $\alpha$ -SMA, NF $\kappa$ B ve Sirtuin-1 immünreaktivite yoğunluklarını hesaplamak için her denekten x40' de 10 farklı alan kullanıldı. Image J software programı kullanılarak değerlendirilen bu antikörlerin immunoreaktivite

yoğunluğu hesaplanarak sonuçlar kaydedildi. Kaspaz-3 uygulanan preparatlarda ise Kaspaz-3 pozitif hücre sayıları X40 büyütmede rastgele seçilen 10 farklı alandan olacak şekilde sayıldı. Elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirildi.

**Tablo 3. 6. İmmünohistokimya Boyama Metodu**

Sıra	Yapılan işlem	Süre	Sıra	Yapılan işlem	Süre
1	Etüv (60 °C)	2 saat	18	Sekonder Antikor	10 dk
2	Ksilen I	10 dk	19	PBS	3x5 dk
3	Ksilen II	10 dk	20	Streptavidin Horse Radish Peroksidaz	10 dk
4	Ksilen III	10 dk	21	PBS	3x5 dk
5	Absolu Alkol I	5 dk	22	DAB kromojen	5 dk
6	Absolu Alkol II	5 dk	23	Distile su	2x3 dk
7	%96 Alkol	5 dk	24	Hematoksilen	1 dk
8	%80 Alkol	5 dk	25	Musluk Suyu	2 dk
9	%70 Alkol	5 dk	26	Distile su	5 dk
10	Distile su	2x3 dk	27	%70 Alkol	2 dk
11	%10 Sitrat Buffer	10 dk	28	%80 Alkol	2 dk
12	PBS	3x5 dk	29	%96 Alkol	2 dk
13	%3 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	12 dk	30	Absolu Alkol I	2 dk
14	PBS	3x5 dk	31	Absolu Alkol II	2 dk
15	Ultra V block	5 dk	32	Ksilen I	5 dk
16	Primer Antikor	Bir gece	33	Ksilen II	5 dk
17	PBS	3x5 dk	34	Kapatma	

### 3.6. Biyokimyasal Analizler

Deney sonunda sıçanlardan alınan kan örnekleri 5000 devirde 10 dakika santrifüj edilerek AST, ALT, ALP, DB ve TB değerleri çalışılmak üzere Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez laboratuvarına teslim edildi.

#### 3.6.1. Karaciğer Doku Homojenatlarının Hazırlanması

Biyokimyasal analizler için alınan biyopsi materyallerinden, her bir hayvandan 1 g ağırlığında karaciğer doku örneği tartılarak idrar kaplarına konuldu. Karaciğerin kanlı

bir doku olması sebebiyle soğuk serum fizyolojik ile yıkandı ve dokunun etrafındaki fazla su kurutma kağıdı ile uzaklaştırıldı. Bu aşamadan itibaren yapılan tüm işlemler buz izolasyonu altında gerçekleştirildi. Falkon tüplere alınan karaciğer dokuları fosfat tamponu (pH 7.4) eklenerek homojenizatör ile homojenize edildi. Doku homojenatları +4°C’de 15000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildikten sonra elde edilen süpernatantlar ependorf tüplere aktarılarak -80 °C’de saklandı.

### 3.6.2. ELİSA Yöntemi

ELİSA yöntemi ile Tablo 3.7’ de belirtilen kitler firmanın önerdiği protokollere uygun olarak çalışıldı. -80 °C’ den çıkarılan süpernatantların buz üzerinde erimeleri sağlandı. Standartlar kit protokolüne göre hazırlanarak standart kuyucuklarına 50 µl standart, örnek kuyucuklarının her birine 40 µl örnek yüklendi. Standart kuyucukların dışındaki tüm kuyucuklara 10 µl antibody eklendi. Ardından tüm kuyucuklara 50 µl HRP pipetlenerek 1 saat 37 °C’de inkübe edildi. İnkübasyon bitiminde plate yıkama solüsyonu ile otomatik yıkama cihazında 5 kez yıkandı. Bütün kuyucuklara 50 µl kromojen A ve 50 µl kromojen B eklenerek karanlıkta 10 dakika 37 °C’de bekletildi. 10 dakika sonra tüm kuyucuklara 50 µl stop solüsyonu eklendi ve mikroplate okuyucu ile 450 nm’de okutuldu.

**Tablo 3. 7.** Çalışmada kullanılan ELİSA kitleri ve katalog numaraları

	Marka	Katalog numarası
<b>GSH</b>	Sunredbio marka	201-11-5104
<b>SOD</b>	Sunredbio marka	201-11-0169
<b>CAT</b>	Sunredbio marka	201-11-5106
<b>MDA</b>	Sunredbio marka	201-11-0157
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Sunredbio marka	201-11-0765
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Sunredbio marka	201-11-0779
<b>PDGF</b>	Sunredbio marka	201-11-0692
<b>PGC-1<math>\alpha</math></b>	Sunredbio marka	201-11-1449

### 3.7. Comet Yöntemi

Hücre seviyesinde DNA hasarı tespitinde kullanılan Tek Hücre Jel Elektroforezi veya DNA comet assay basit, hızlı ve hassas bir floresan mikroskobik yöntemdir. Bu çalışmada dokudaki DNA hasarı nötral şartlarda Tek Hücre Jel Elektroforez yöntemi ile değerlendirildi.

Lamlar distile su ile hazırlanmış %0,5'lik normal erime noktalı agarozla kaplandı ve oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. -80 °C' den çıkarılan karaciğer doku örneklerinin her birinden yaklaşık 2 g olacak şekilde parçalar cam petri içerisine alındı ve bistüri yardımıyla parçalanmaya çalışıldı. Parçalanmış dokuların üzerine 10 ml soğuk PBS (Ca<sup>+2</sup> ve Mg<sup>+2</sup> free) eklendi ve 10 dakika 500 rpm'de manyetik karıştırıcıda karıştırılarak homojenat elde edildi. Homojenatlar deney tüplerine aktararak 10 dakika bekletildi ve süpernatant elde edildi. Bu arada PBS ile %0,8'lik düşük erime noktalı agar kaynatıldı ve sıcaklığı 37 °C'ye kadar soğutuldu. Daha sonra 1000 µl düşük erime noktalı agar ile 100 µl süpernatant ependorf içerisinde karıştırıldı ve daha önce agar ile kaplanmış lamların üzerine lamel yardımıyla yayılarak 4 °C' deki buz aküleri üzerinde donması sağlandı. Lamların üzerindeki lameller kaldırıldı ve 4 °C' deki taze hazırlanmış lysis çözeltisinde (TBE, 25 g SDS) 7 dakika bekletildi. Yatay elektroforez tankı taze hazırlanmış elektroforez tamponu (TBE: 54 g Tris, 27.5 g borik asit, 20 ml EDTA, pH 8.4) ile doldurularak lamlar tanka dizildi ve DNA sarmalının açılması için 20 dakika tamponda bekletildi. Daha sonra 64V-250 mA'de 2 dakika elektroforez yapıldı. Elektroforez aşamasından sonra lamlar 5 dakika distile su ile yıkanarak iyonların ve deterjanların uzaklaştırılması sağlandı. Lamlar etidium bromide (1µg/ml) ile boyanarak lamel ile kapatıldı.

### **3.7.1. DNA hasarının değerlendirilmesi**

Karaciğer dokusundaki DNA hasarını belirlemek için Olympus BX51 floresan mikroskobu ile her bir lamdan x40 büyütmede alınan fotoğraflar kullanıldı. Comet Assay Software Project programı (CASP 1.2.2, Windows 2010) ile alınan fotoğraflardan her bir hayvan başına rastgele 100 hücre olacak şekilde ölçümler yapılarak kaydedildi. CASP programı ile 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 analiz edildi.

### **3.8. İstatistiksel Analiz**

Verilerin analizi için Prism™ yazılım sürümü 8.0'ı (GraphPad Inc., San Diego, CA) kullanıldı. Image J yazılımı kullanılarak elde edilen immünohistokimya sonuçları, biyokimya sonuçları, ELİSA sonuçları ve CASP programı kullanılarak elde edilen Comet assay verileri için değerlendirilmeler yapıldı. Ham veriler, gruplara göre ortalamaları  $\pm$  SEM (ortalamanın standart hatası) ve Median (quarter 1-quarter 3) olarak sunulmuştur. İki grubun birden çok grupta karşılaştırılması, Bonferroni analizi ile tek yönlü ANOVA kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İki den fazla grup arasında karşılaştırmalar için Kruskal wallis testleri kullanıldı. Çoklu karşılaştırmalar için Dunn testi uygulandı. İstatistiksel analiz,  $p < 0.05$  ise anlamlı kabul edildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Total Vücut Ağırlıkları

Çalışma başında ve bitiminde sıçanların ağırlıklarının değerlendirilmesi sonucunda, radyasyon verilen gruplardaki sıçanların ilk ağırlıkları ile son ağırlıkları arasında fark olmasına rağmen görülen bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı Tablo 4.1’de gösterilmiştir.

**Tablo 4.1.** Deney gruplarına ait ratların total vücut ağırlıklarının istatistiksel analizi

	<b>K Median (Q1-Q3)</b>	<b>S Median (Q1-Q3)</b>	<b>M Median (Q1-Q3)</b>	<b>R Median (Q1-Q3)</b>	<b>RM Median (Q1-Q3)</b>	<b>MR Median (Q1-Q3)</b>
<b>ilk ağırlık</b>	270 (266- 276.3)	270.5 (261.8- 279)	277 (246.8- 280.3)	282 (275.5- 288.5)	298.5 (261.3- 306.3)	292.5 (288- 297.8)
<b>son ağırlık</b>	275.5 (270- 281)	274 (259- 281)	269.5 (219.5- 280.5)	262 (227.5- 279)	213 (204.5- 237.3)	268.5 (257- 276)

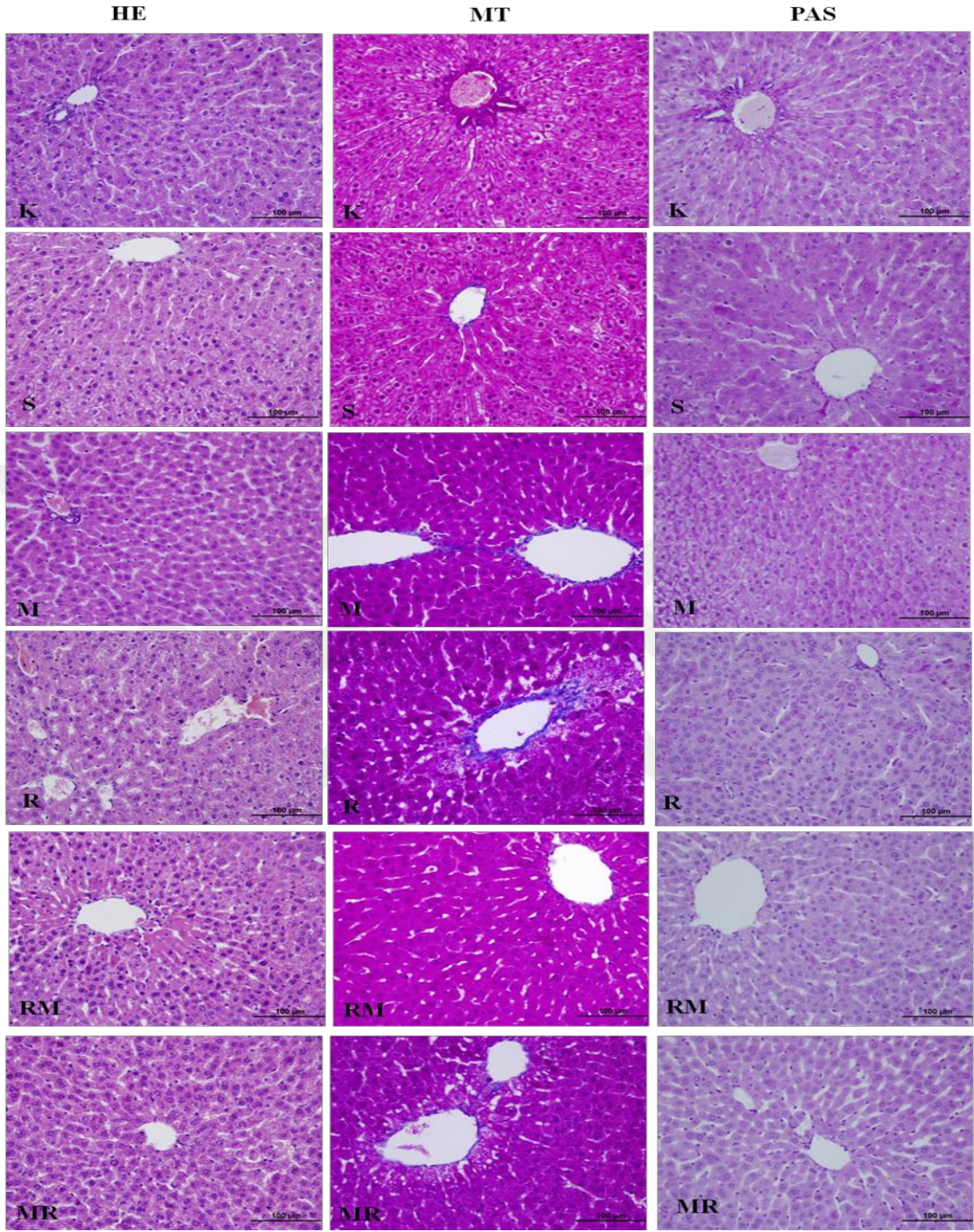
### 4.2. Işık Mikroskopik Bulgular

Kontrol grubuna ait karaciğer parankimasının fonksiyonel hücreleri olan hepatositler, vena sentralis etrafında hücre sınırları düzgün, belirgin koyu nükleusları olan hücreler olarak belirgindi. Bu hücreler kordonları oluşturacak şekilde düzenlenmiş olup, hücre kordonları arasında karaciğer sinüzoidleri düzenli bir şekilde yerleşmişti. S grubu ve M grubu karaciğer dokuları da histolojik açıdan kontrol grubu ile benzerlik göstermekteydi. Radyasyon uygulanan deney gruplarına ait karaciğer kesitleri, kontrol ve sadece melatonin uygulanan deney grupları ile karşılaştırıldığında, karaciğer normal

histolojik yapısının bozulduğu, vasküler sinüzoidal hemoraji ve sinüzoidal hemoraji görüldü. Ayrıca, radyasyon uygulanan sıçanlara ait R grubu karaciğer dokularında hepatoselüler nekroz, hepatositlerde vakuolizasyon ve vena centralisten ışınal tarzda uzanan sinüzoidlerde dilatasyonun belirgin olduğu dikkati çekti. R ile M'nin birlikte uygulandığı gruplara ait sıçan karaciğer örneklerinde ise, R grubuna göre RM grubuna ait karaciğer histolojik yapısının korunduğu gözlemlendi. Benzer şekilde, MR grubunda da azalmış patolojik değişimler dikkati çekerken, bu değişimin R ve RM gruplarına göre daha iyi olduğu hatta kontrole yakın olduğu tespit edildi (Şekil 4.1).

Bağ dokusunun genel görünümünü ve kollajen liflerinin birikimini belirlemek için MT boyama metodu kullanıldı. MT boyama yapılmış kontrol grubuna ait karaciğer kesitlerinde vena centralis ve komşuluğundaki damarların duvarında yerleşim gösteren tek sıra, ince kollajen lifler normal dağılım göstermekteydi. Sadece radyasyon uygulanan hasar grubuna ait karaciğer örnekleri diğer tüm deney grupları ile karşılaştırıldığında stromada artmış kollajen lif dağılımı dikkati çekti. Bu bağ dokusu artışı özellikle vena sentralislerin etrafında ve çoğunlukla portal alanların bulunduğu bölgelerde görüldü. R ile M'in birlikte uygulandığı gruplarda, portal alan etrafındaki kollajen lifler yalnız R uygulanan gruba göre belirgin düzeyde azalmıştı (Şekil 4.1).

Hepatositlerin glikojen içeriklerini belirlemek için PAS boyama metodu kullanıldı. PAS boyama yapılmış K, S ve M gruplarına ait hepatositlerin kuvvetli PAS+ reaksiyon gösterdiği görüldü. K grubuna ait karaciğer kesitlerin lobülün hem merkezinde, hem de periferinde yer alan hepatositler yoğun glikojen depoları içermekteydi. R grubu ise K grubuna ait preparatlarla karşılaştırıldığında hepatositlerdeki PAS+ boyanma yoğunluğunun azaldığı dikkati çekti. Bu gruptaki hepatositlerin glikojen içeriğindeki bu azalmanın santral vende daha az iken, periferde daha yoğun olduğu gözlemlendi. R ile M'in birlikte uygulandığı tedavi gruplarında, hepatositlerdeki glikojen içeriği K grubundaki kadar olmasa da, yalnız R uygulanan gruba göre bir artış olduğu belirlendi (Şekil 4.1).

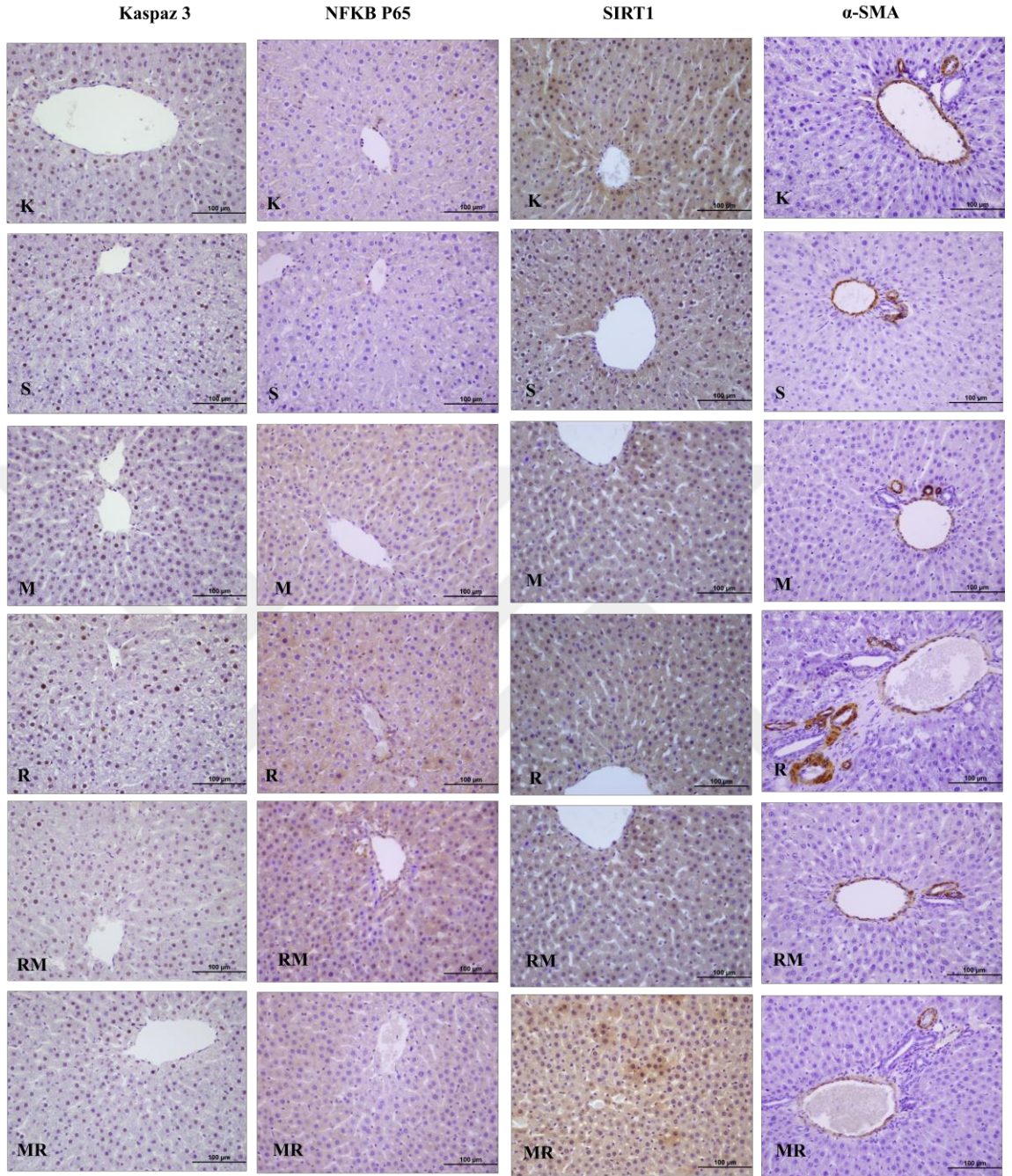


**Şekil 4.1.** Tüm deney gruplarına ait H&E, MT, PAS ile boyanmış karaciğer doku kesitlerinin x40 büyütmedeki görüntüleri.

### 4.3. İmmünohistokimyasal Bulgular

Tüm deney gruplarına ait karaciğer dokusunda apoptotik hücre ölümü için önemli bir molekül olarak görev yapan kaspaz-3 ile apoptotik hücre sayısının belirlenmesi amaçlandı. Bu doğrultuda kaspaz-3 primer antikoru ile boyanan apoptotik hücreler görüntülenerek kaspaz-3 pozitif apoptotik hücreler sayıldı. Elde edilen verilerin değerlendirilmesi sonucunda R grubunda diğer tüm gruplara göre kaspaz-3 pozitif apoptotik hücre sayısının istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterdiği belirlendi ( $p<0.001$ ). Ayrıca, tüm deney gruplarında kaspaz-3 pozitif apoptotik hücrelerin özellikle vena centralis etrafında yerleşim göstermesi dikkat çekmekteydi (Şekil 4.2) (Tablo 4.2). SIRT1 güçlü bir antioksidan ve anti-inflamatuar olmasının yanı sıra inflamatuvar yanıtları inhibe etmek için NF $\kappa$ B aktivasyonunun baskılamasından da sorumludur. SIRT1 primer antikoruyla boyanan karaciğer kesitlerinde, SIRT1 immünreaktivitesi hepatositlerin hem nükleus hem de sitoplazmasında görülmekteydi. Şekil 4.2'de gösterildiği gibi, SIRT1 immünreaktivite yoğunluğu M, R ve RM gruplarında kontrol grubuna göre artmıştı, ancak bu artışın sadece R ve MR grubu ile anlamlı olduğu belirlendi ( $p<0.05$ ). Ayrıca, MR grubu SIRT1 immünreaktivite yoğunluğunun K grubu dışındaki tüm gruplarla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bir azalış gösterdiği tespit edildi ( $p<0.05$ ) (Şekil 4.2) (Tablo 4.2).

$\alpha$ -SMA immünreaktivite yoğunluğu, R grubunda diğer tüm diğer deney gruplarına göre artmasına rağmen bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi. İmmünreaktivite yoğunluğu bakımından kontrol grubuna en yakın ekspresyon gösteren grup M grubu idi ( $p<0.05$ ) (Şekil 4.2) (Tablo 4.2).



**Şekil 4.2.** Tüm deney gruplarına ait karaciğer dokusunda kaspaz 3, NF $\kappa$ B-p65, SIRT-1,  $\alpha$ -SMA ifadelerinin x40 büyütmede immünohistokimyasal yöntemle gösterilmiştir.

**Tablo 4.2.** Tüm deney gruplarına ait kaspaz-3 pozitif apoptotik hücre sayısı, SIRT1 ve  $\alpha$ -SMA immünreaktivite yoğunluklarının istatistiksel analizi

	<b>K</b> Median (Q1-Q3)	<b>S</b> Median (Q1-Q3)	<b>M</b> Median (Q1-Q3)	<b>R</b> Median (Q1-Q3)	<b>RM</b> Median (Q1-Q3)	<b>MR</b> Median (Q1-Q3)
<b>kaspaz-3</b>	0 (0-1.75) <sup>a</sup>	1 (0-2) <sup>a</sup>	0 (0-2) <sup>a</sup>	4 (3-6) <sup>b</sup>	1 (0-3) <sup>a</sup>	0 (0-2) <sup>a</sup>
<b>SIRT1</b>	88.07 (83.06- 92.51) <sup>ac</sup>	89.52 (83.66- 95.7) <sup>ad</sup>	92.18 (85.49- 97.84) <sup>ab</sup>	93.81 (88.56- 99.34) <sup>b</sup>	92.18 (88.29- 94.51) <sup>bd</sup>	85.32 (82.82- 88.10) <sup>c</sup>
<b><math>\alpha</math>-SMA</b>	112.1 (101.1- 119.9)	111.2 (101- 123.7)	112.4 (102.7- 121.8)	116.4 (107.9- 134.6)	112.2 (96.81- 124.4)	114.9 (103.3-123.8)

Veriler ortalama±standart sapma olarak ifade edilmiştir. Aynı satırda yer alan aynı harfler gruplar arası benzerliği, farklı harfler gruplar arası farklılığı ifade etmektedir.

NF $\kappa$ B immün, inflamatuvar ve anti-apoptotik yanıtlara göre sitokinlerin ekspresyonunu düzenleyebilen nükleer bir transkripsiyon faktörüdür (Gilmore, 2006). NF $\kappa$ B alt ünitesi olan p65 aktivitesi pro-inflamatuvar sitokinler tarafından indüklenebilmekte ve aktivasyonu halinde hepatik hücre rejenerasyonunda bozulmaya neden olmaktadır. NF $\kappa$ B-p65 primer antikoruyla boyanan karaciğer kesitlerinde, immün boyanması esas olarak hepatosit sitoplazmasında gözlemlendi (Şekil 4.2). Sonuçlarımıza göre, NF $\kappa$ B-p65 immünreaktivite yoğunluğu, K grubuna göre radyasyon uygulanan tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artmıştı ( $p<0.001$ ). Ayrıca R grubu ile RM grubu dışındaki tüm deney grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardı ( $p<0.001$ ) (Tablo 4.3).

**Tablo 4.3.** Tüm deney gruplarına ait NFκB-p65 immünreaktivite yoğunluklarının istatistiksel analizi

	<b>K</b> <b>Median</b> <b>(Q1-Q3)</b>	<b>S</b> <b>Median</b> <b>(Q1-Q3)</b>	<b>M</b> <b>Median</b> <b>(Q1-Q3)</b>	<b>R</b> <b>Median</b> <b>(Q1-Q3)</b>	<b>RM</b> <b>Median</b> <b>(Q1-Q3)</b>	<b>MR</b> <b>Median</b> <b>(Q1-Q3)</b>
<b>NFκB</b> <b>p65</b>	80.46± 5.464 <sup>a</sup>	80.34± 4.876 <sup>ad</sup>	87.82± 6.09 <sup>b</sup>	91.29± 6.731 <sup>c</sup>	92.54± 7.855 <sup>c</sup>	79.46± 5.941 <sup>d</sup>

Veriler ortalama±standart sapma olarak ifade edilmiştir. Aynı satırda yer alan aynı harfler gruplar arası benzerliği, farklı harfler gruplar arası farklılığı ifade etmektedir.

#### 4.4. Biyokimyasal Bulgular

##### 4.4.1. Hepatik Enzimler

Kan serumu biyokimyasal parametreleri değerlendirildiğinde, AF miktarı radyasyon uygulanan gruplarda önemli ölçüde azaldı, ancak bu azalma melatonin ile tedavi edilen gruplarda artma eğilimindeydi. Elde edilen verilerden radyasyon uygulanan gruplar ile diğer gruplar arasında anlamlı bir fark olduğu sonucuna varıldı. ALT seviyeleri R grubunda tüm deney gruplarına göre anlamlı bir artış gösterdi ( $p<0.05$ ). Bu verilere paralel olacak şekilde AST düzeyinin de R grubunda artmış olduğu ve bu artışın RM grubu dışındaki diğer gruplarla istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterdiği belirlendi ( $p<0.01$ ) (Tablo 4.4). DB ve TB seviyeleri R grubunda diğer gruplara göre daha yüksekti, fakat sadece R ve M grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardı ( $p<0.05$ ).

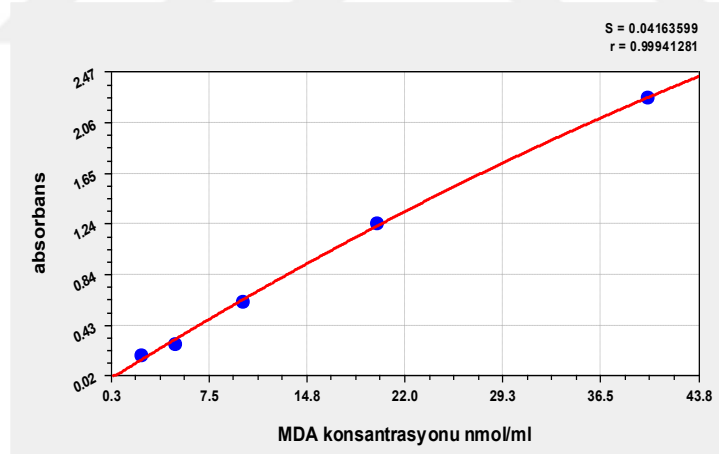
**Tablo 4. 4.** Tüm deney gruplarına ait serum ALP, AST, ALT, DB ve TB değerleri

	<b>K</b> Median (Q1-Q3)	<b>S</b> Median (Q1-Q3)	<b>M</b> Median (Q1-Q3)	<b>R</b> Median (Q1-Q3)	<b>RM</b> Median (Q1-Q3)	<b>MR</b> Median (Q1-Q3)
<b>ALP</b>	227.5± 39 <sup>a</sup>	230.8± 26.11 <sup>a</sup>	177± 21.07 <sup>a</sup>	75.44± 33.22 <sup>b</sup>	94.29± 11.15 <sup>bc</sup>	138.3± 37.86 <sup>c</sup>
<b>ALT</b>	66.17± 18.95 <sup>a</sup>	70.17± 18.71 <sup>a</sup>	63.33± 9.91 <sup>a</sup>	141± 28.12 <sup>b</sup>	100.5± 22.86 <sup>a</sup>	88.67± 21.44 <sup>a</sup>
<b>AST</b>	119.5± 29.74 <sup>a</sup>	110.5± 30.85 <sup>a</sup>	118.7± 32.85 <sup>a</sup>	222.6± 54.78 <sup>b</sup>	167.9± 51.96 <sup>ab</sup>	129.7± 26.86 <sup>a</sup>
<b>DB</b>	0.018± 0.0098 <sup>ab</sup>	0.028± 0.007 <sup>ab</sup>	0.015± 0.0054 <sup>a</sup>	0.034± 0.015 <sup>b</sup>	0.035± 0.0137 <sup>ab</sup>	0.028± 0.0121 <sup>ab</sup>
<b>TB</b>	0.045± 0.015 <sup>ab</sup>	0.046± 0.0233 <sup>ab</sup>	0.035± 0.008 <sup>a</sup>	0.064± 0.016 <sup>b</sup>	0.040± 0.0209 <sup>ab</sup>	0.048± 0.016 <sup>ab</sup>

Veriler ortalama±standart sapma olarak ifade edilmiştir. Aynı satırda yer alan aynı harfler gruplar arası benzerliği, farklı harfler gruplar arası farklılığı ifade etmektedir.

#### 4.4.2. MDA Sonuçları

ELİSA metodu kullanılarak deney hayvanlarından alınan karaciğer dokularında MDA değerleri belirlendi ve örneklerin konsantrasyonları MDA standart eğrisi kullanılarak hesaplandı (Şekil 4.3).



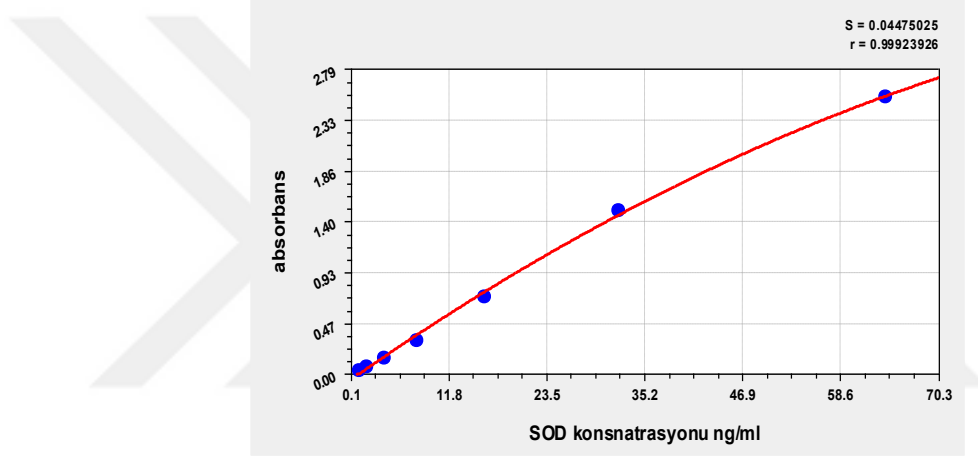
**Şekil 4.3.** Malondialdehit (MDA) Tayini Standart Curve Eğrisi

Tüm deney gruplarına ait hepatik MDA düzeyleri değerlendirildiğinde, K ve S grupları en düşük MDA düzeyine sahip iken R ve RM grupları en yüksek MDA düzeyine sahipti. Sadece R verilen grubun K ( $p < 0.01$ ) ve S ( $p < 0.05$ ) gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterdiği tespit edildi ( $p < 0.05$ ). Ayrıca MR grubundaki MDA düzeyi, R ( $p < 0.05$ ) grubuna göre anlamlı olarak daha düşüktü ( $p < 0.05$ ) (Tablo 4.5).

#### 4.4.3. SOD Sonuçları

ELİSA metodu kullanılarak, deney hayvanlarından alınan karaciğer dokularında SOD değerleri belirlendi ve örneklerin konsantrasyonları SOD standart eğrisi kullanılarak hesaplandı (Şekil 4.4).

Karaciğer dokularında ELİSA metodu ile elde edilen verilere göre SOD düzeyleri, R grubunda diğer gruplara göre artış göstermekteydi, ancak bu artış sadece K ( $p<0.01$ ) grubu ile istatistiksel olarak anlamlı bir farka sahipti. MR grubu SOD düzeyleri ise S ( $p<0.05$ ), M ( $p<0.01$ ), R ( $p<0.01$ ) ve RM ( $p<0.01$ ) grupları ile istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterdi (Tablo 4.5).

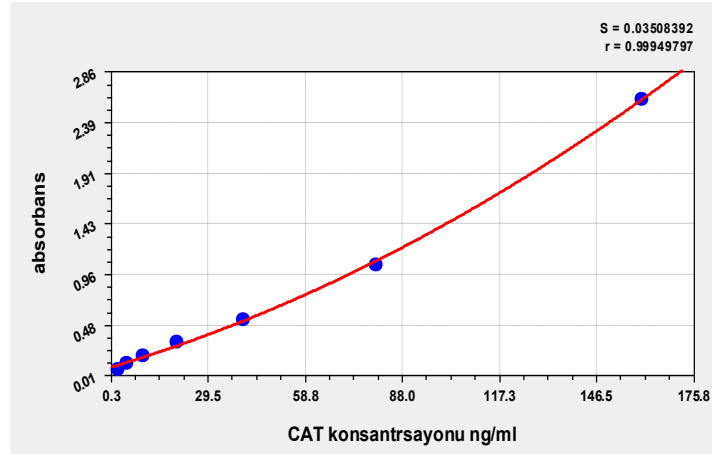


Şekil 4.4. Süperoksit dismutaz (SOD) Tayini Standart Curve Eğrisi

#### 4.4.4. CAT Sonuçları

ELİSA metodu ile deney hayvanlarından alınan karaciğer dokularında CAT değerleri belirlendi ve örneklerin konsantrasyonları CAT standart eğrisi kullanılarak hesaplandı (Şekil 4.5).

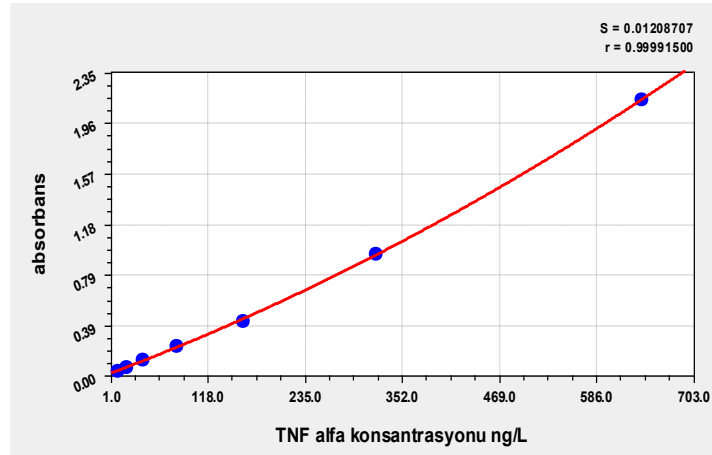
CAT düzeyleri değerlendirildiğinde, radyasyon uygulanan gruplarda CAT düzeylerinin azaldığı, ancak bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi. MR grubu K ( $p<0.05$ ), S ( $p<0.01$ ) ve M ( $p<0.01$ ) grupları ile istatistiksel olarak anlamlı farklılığa sahipti (Tablo 4.5).



Şekil 4.5. Katalaz Tayini (CAT) Tayini Standart Curve Eğrisi

#### 4.4.5. TNF- $\alpha$ Sonuçları

Deney hayvanlarından alınan karaciğer dokularında TNF- $\alpha$  değerleri belirlendi ve örneklerin konsantrasyonları TNF- $\alpha$  standart eğrisi kullanılarak hesaplandı (Şekil 4.6). Deney gruplarından alınan örnekler TNF- $\alpha$  düzeyleri açısından değerlendirildiğinde, R grubunun en yüksek TNF- $\alpha$  düzeyine sahip olduğu K ( $p < 0.01$ ), S ( $p < 0.01$ ), M ( $p < 0.01$ ) ve radyasyon verilen deney grupları olan RM ( $p < 0.01$ ) ve MR ( $p < 0.01$ ) ile istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterdiği tespit edildi ( $p < 0.05$ ) (Tablo 4.5).

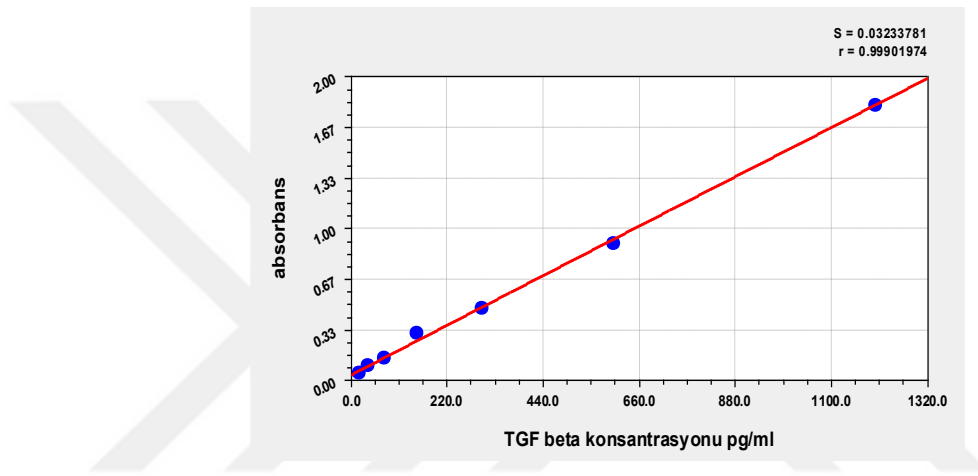


Şekil 4.6. TNF- $\alpha$  Tayini Standart Curve Eğrisi

#### 4.4.6. TGF- $\beta$ Sonuçları

ELİSA metodu kullanılarak, deney hayvanlarından alınan karaciğer dokularında TGF- $\beta$  değerleri belirlendi ve örneklerin konsantrasyonları TGF- $\beta$  standart eğrisi kullanılarak hesaplandı (Şekil 4.7).

Karaciğer dokularında ELİSA metodu ile elde edilen verilere göre TGF- $\beta$  düzeyleri, R ( $p < 0.01$ ) ve RM ( $p < 0.05$ ) grupları en yüksek TGF- $\beta$  düzeyine sahip olup, kontrol grubu ile kıyaslandığında her iki grupta istatistiksel olarak anlamlı artış gösterdiği görülmektedir. (Tablo 4.5).

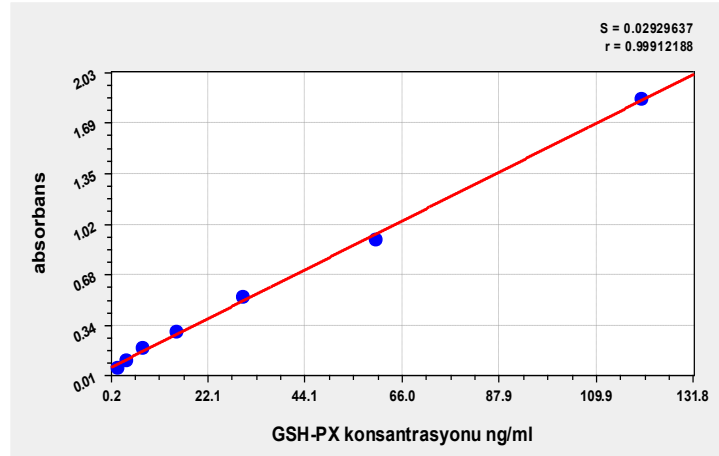


Şekil 4.7. Transforme edici büyüme faktör beta (TGF- $\beta$ ) Tayini Standart Curve Eğrisi

#### 4.4.7. GSH-PX Sonuçları

ELİSA metodu ile deney hayvanlarından alınan karaciğer dokularında GSH-PX değerleri belirlendi. Örneklerin konsantrasyonları GSH-PX standart eğrisi kullanılarak hesaplandı (Şekil 4.8).

Hepatik GSH-PX düzeyleri değerlendirildiğinde, R grubu GSH-PX değeri diğer tüm deney gruplarına göre daha düşük olmasına rağmen gruplar arasında istatistiksel anlamlılık bulunmamaktaydı (Tablo 4.5).

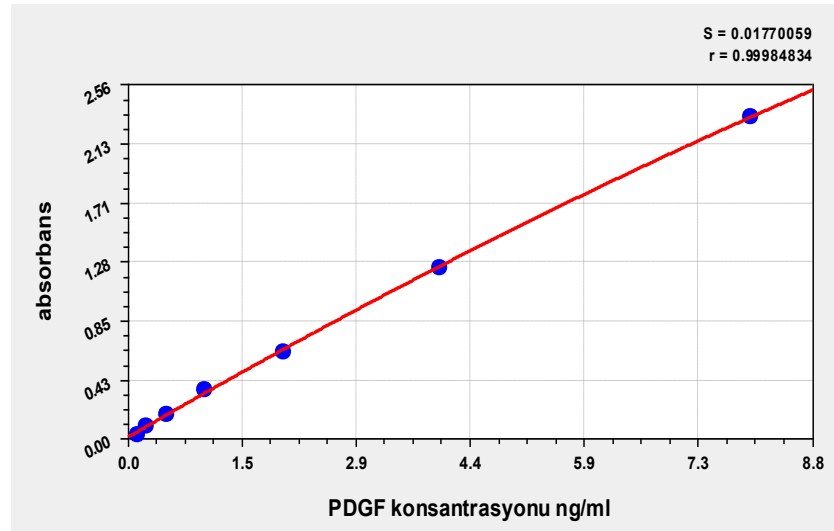


Şekil 4.8. Glutatyon peroksidaz (GSH-PX) Tayini Standart Curve Eğrisi

#### 4.4.8. PDGF Sonuçları

PDGF değerleri, deney hayvanlarından alınan karaciğer dokularında ELİSA metodu ile belirlendi ve PDGF standart eğrisi kullanılarak örneklerin konsantrasyonları hesaplandı (Şekil 4.9).

ELİSA metodu ile karaciğer dokularında PDGF düzeylerine göre, R grubu diğer deney grupları ile karşılaştırıldığında en düşük PDGF değerine sahip olduğu fakat bu düşüşün istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi (Tablo 4.5).

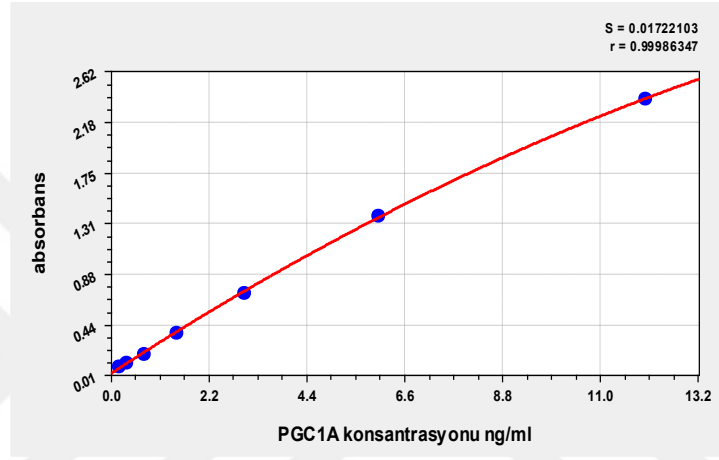


Şekil 4.9. Trombosit kökenli büyüme faktörü (PDGF) Tayini Standart Curve Eğrisi

#### 4.4.9. PGC1- $\alpha$ Sonuçları

Deney hayvanlarından alınan karaciğer dokularında PGC1- $\alpha$  değerleri ELİSA metodu kullanılarak belirlendi. PGC1- $\alpha$  standart eğrisi kullanılarak örneklerin konsantrasyonları hesaplandı (Şekil 4.10).

Hepatik PGC1- $\alpha$  düzeyleri değerlendirildiğinde, tüm deney grupları içinde R grubu en düşük PGC1- $\alpha$  seviyesine sahip olmasına rağmen gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu (Tablo 4.5).



Şekil 4.10. Peroksizom Proliferatör Aktivatör Reseptör Koaktivatör 1-alfa (PGC1- $\alpha$ ) Tayini Standart Curve Eğrisi

**Tablo 4.5.** Tüm deney gruplarına ait GSH, SOD, CAT, MDA, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , PDGF, PGC-1 $\alpha$  değerlerinin istatistiksel analizi

	<b>K</b> <b>Median</b> <b>(Q1-Q3)</b>	<b>S</b> <b>Median</b> <b>(Q1-Q3)</b>	<b>M</b> <b>Median</b> <b>(Q1-Q3)</b>	<b>R</b> <b>Median</b> <b>(Q1-Q3)</b>	<b>RM</b> <b>Median</b> <b>(Q1-Q3)</b>	<b>MR</b> <b>Median</b> <b>(Q1-Q3)</b>
<b>MDA</b>	7.14 $\pm$ 0.46 <sup>a</sup>	7.36 $\pm$ 0.78 <sup>a</sup>	7.87 $\pm$ 0.55 <sup>ab</sup>	8.67 $\pm$ 0.72 <sup>b</sup>	8.26 $\pm$ 0.97 <sup>ab</sup>	7.2 $\pm$ 0.83 <sup>a</sup>
<b>SOD</b>	6.74 $\pm$ 1.01 <sup>a</sup>	7.52 $\pm$ 0.68 <sup>ac</sup>	7.74 $\pm$ 0.64 <sup>ac</sup>	8.51 $\pm$ 0.75 <sup>b</sup>	7.48 $\pm$ 1.14 <sup>ac</sup>	5.95 $\pm$ 0.65 <sup>ad</sup>
<b>CAT</b>	26.57 $\pm$ 3.15 <sup>ac</sup>	30.44 $\pm$ 2.69 <sup>ac</sup>	27.71 $\pm$ 5.334 <sup>ac</sup>	24.11 $\pm$ 5.49 <sup>ac</sup>	22.4 $\pm$ 3.46 <sup>acd</sup>	17.98 $\pm$ 3.2 <sup>b</sup>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	88.47 $\pm$ 6.12 <sup>a</sup>	87.84 $\pm$ 3.63 <sup>a</sup>	87.14 $\pm$ 11.71 <sup>a</sup>	107.3 $\pm$ 7.468 <sup>b</sup>	87.13 $\pm$ 11.10 <sup>a</sup>	88.42 $\pm$ 7.73 <sup>a</sup>
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	151 $\pm$ 31.28 <sup>a</sup>	168.8 $\pm$ 21.64 <sup>ab</sup>	168.6 $\pm$ 22.62 <sup>ab</sup>	204 $\pm$ 12.73 <sup>b</sup>	191.1 $\pm$ 22.69 <sup>bc</sup>	172.1 $\pm$ 17.93 <sup>ab</sup>
<b>GSH-PX</b>	16.05 $\pm$ 4.12	14.44 $\pm$ 2.78	15.32 $\pm$ 3.061	11.99 $\pm$ 3.253	13.42 $\pm$ 4.29	14.93 $\pm$ 3.87
<b>PDGF</b>	0.97 $\pm$ 0.12	1.061 $\pm$ 0.068	0.95 $\pm$ 0.069	0.86 $\pm$ 0.14	0.88 $\pm$ 0.16	0.9 $\pm$ 0.15
<b>PGC-1<math>\alpha</math></b>	1.37 $\pm$ 0.19	1.30 $\pm$ 0.16	1.302 $\pm$ 0.19	1.28 $\pm$ 0.19	1.281 $\pm$ 0.20	1.318 $\pm$ 0.18

Veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edilmiştir. Aynı satırda yer alan aynı harfler gruplar arası benzerliği, farklı harfler gruplar arası farklılığı ifade etmektedir

#### 4.5. DNA Hasar Tayini (Comet Assay)

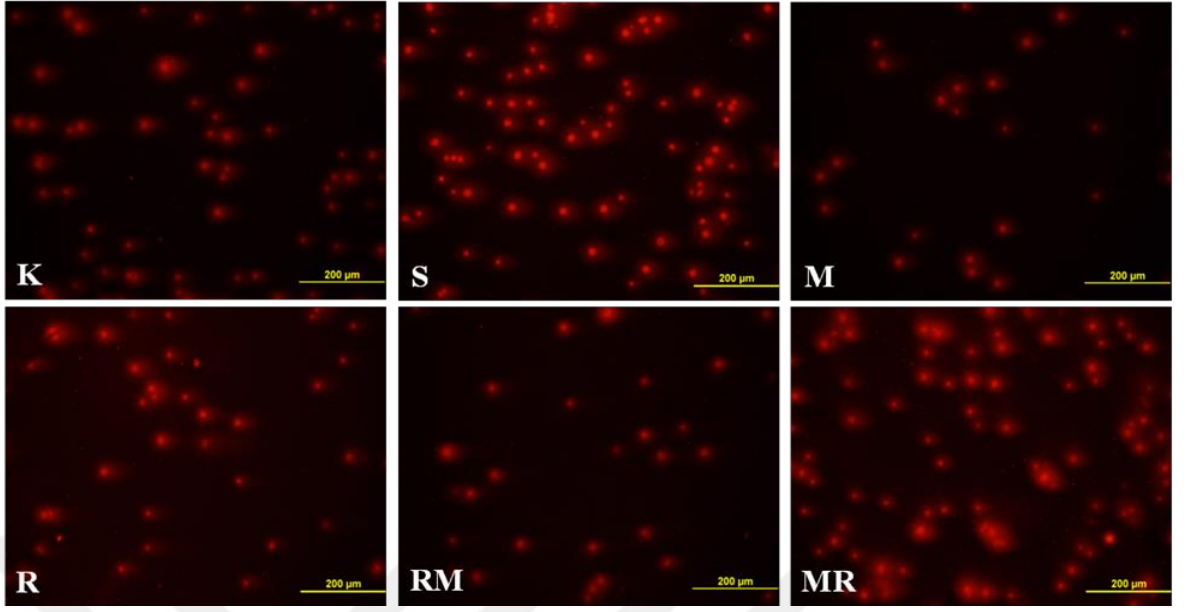
Çalışmamızda radyasyonun neden olduğu hasara melatoninin DNA düzeyinde katkısı belirlendi. Comet Assay, tek hücreli jel elektroforez yöntemi kullanılarak yüksek alkali koşullar altında gerçekleştirildi. Tüm deney gruplarının Comet assay parametreleri Tablo 1'de gösterilmiştir. Comet Assay parametreleri değerlendirildiğinde, özellikle R grubunda Head DNA dışındaki bu parametreler artış göstermiştir. Head DNA değerleri, R ( $p<0.001$ ) ve MR ( $p<0.001$ ) gruplarında tüm deney gruplarına göre önemli ölçüde azaldı (Tablo 4.5). Head DNA değerlerinin aksine, Tail DNA değerleri, K ve S gruplarına göre R ( $p<0.001$ ) ve MR ( $p<0.001$ ) gruplarında önemli ölçüde artmıştır. RM grubu Head DNA ve Tail DNA değerleri, M ( $p<0.01$ ) ve R ( $p<0.001$ ) grupları ile anlamlı farklılık gösterdi. Radyasyona maruz kalan gruplarda L comet değerleri K ( $p<0.001$ ), S ( $p<0.001$ ) ve M ( $p<0.001$ ) gruplarına göre önemli bir artış gösterdi. MR grubunda L comet değeri de M ( $p<0.01$ ) grubuna göre anlamlı olarak arttı. L Head değerlerinin radyasyona maruz kalan gruplar olan R, RM ve MR gruplarında K

( $p<0.01$ ) grubuna göre anlamlı artış gösterdiği belirlendi. M grubu L Head değerleri de K grubuna benzer şekilde artış göstermiş olup istatistiksel olarak R ( $p<0.05$ ), RM ( $p<0.001$ ) ve MR ( $p<0.01$ ) grupları ile anlamlılığı mevcuttu (Tablo 4.5). OTM ve L Tail değerleri birbirleriyle benzerlik göstermekteydi. Her iki parametre için de R ve RM gruplarındaki artışın K ( $p<0.001$ ), S ( $p<0.001$ ) ve M ( $p<0.001$ ) grupları ile istatistiksel olarak anlamlı tespit edildi. Ayrıca bu parametrelerin, pre and post melatonin tedavisi alan gruplarda R ( $p<0.001$ ) grubu ile kıyaslandığında anlamlı derecede azalış sergilediği tespit edildi. Radyasyona maruz kalan gruplarda TM değerlerinin K ( $p<0.001$ ) ve S ( $p<0.001$ ) gruplarına göre anlamlı artış gösterdiği anlaşıldı. Özellikle R ( $p<0.001$ ) grubu TM değerleri diğer deney gruplarından anlamlı derecede yüksekti.

**Tablo 4. 6.** Tüm deney gruplarına ait Comet assay parametrelerinin istatistiksel analizi

	<b>K Median (Q1-Q3)</b>	<b>S Median (Q1-Q3)</b>	<b>M Median (Q1-Q3)</b>	<b>R Median (Q1-Q3)</b>	<b>RM Median (Q1-Q3)</b>	<b>MR Median (Q1-Q3)</b>
<b>head DNA</b>	92.97 (90.48-94.86) <sup>a</sup>	92.22 (88.48-95.2) <sup>a</sup>	89.53 (87.65-91.77) <sup>b</sup>	84.02 (79.95-87.62) <sup>c</sup>	91.96 (88.98-94.48) <sup>a</sup>	88.93 (86.75-91.16) <sup>b</sup>
<b>L-comet</b>	238 (210.3-263.5) <sup>a</sup>	254 (217.5-282.8) <sup>a</sup>	254 (224.3-285.8) <sup>a</sup>	314 (283.3-350.8) <sup>b</sup>	291.5 (263.3-333) <sup>bc</sup>	286.5 (260-315.8) <sup>c</sup>
<b>L-head</b>	170 (153- 199) <sup>a</sup>	193 (167.5-233) <sup>bc</sup>	186 (167.5-207) <sup>ab</sup>	198 (179-219) <sup>c</sup>	216 (189-231) <sup>c</sup>	199 (185- 225) <sup>c</sup>
<b>L-tail</b>	54 (42-71) <sup>a</sup>	72 (50.25-91) <sup>b</sup>	76.5 (59.25-98.75) <sup>b</sup>	121.5 (110-142.5) <sup>c</sup>	97 (79.25-117.5) <sup>d</sup>	75.5 (52.5-95.75) <sup>b</sup>
<b>OTM</b>	6.03 (4.19-8.064) <sup>a</sup>	7.97 (5.68-10.85) <sup>ab</sup>	9.68 (5.87-12.19) <sup>b</sup>	17.2 (15.03-20.26) <sup>c</sup>	12.78 (8.75-15.72) <sup>d</sup>	10.13 (7.038-12.5) <sup>b</sup>
<b>Tail DNA</b>	7.034 (5.141-9.518) <sup>a</sup>	7.782 (4.8-11.52) <sup>a</sup>	10.47 (8.234-12.35) <sup>b</sup>	15.43 (12.14-17.87) <sup>c</sup>	8.03 (5.508-1.01) <sup>a</sup>	11.04 (8.844-13.05) <sup>b</sup>
<b>TM</b>	3.86 (2.26-5.74) <sup>a</sup>	5.53 (2.88-9.50) <sup>a</sup>	8.76 (7.2-11) <sup>b</sup>	16.74 (13.13-18.94) <sup>c</sup>	10.8 (7.69-4.27) <sup>b</sup>	10.82 (7.46-12.68) <sup>b</sup>

Veriler ortalama±standart sapma olarak ifade edilmiştir. Aynı satırda yer alan aynı harfler gruplar arası benzerliği, farklı harfler gruplar arası farklılığı ifade etmektedir



**Şekil 4.11.** Comet yöntemi ile tüm deney gruplarına ait karaciğer dokusu hücreleri x20 büyütmede gösterilmiştir.

## 5. TARTIŞMA

Radyoterapi, ameliyattan sonra en etkili kanser tedavisi olarak kabul edilir, ancak normal doku ve organlarda, özellikle sindirim sistemi epitelinde ve hematopoietik dokuda hasara neden olabilir (Schau ve McBride, 2015). Bilim adamları son birkaç yıldır, radyoterapinin erken ve geç etkilerini azaltmak ve ayrıca tümörün radyasyon tedavisine yanıtını artırmak için stratejiler geliştirmeye çalışmaktadırlar. Bu amaçlardan herhangi biri, yan etkilerin azalmasına ve kanser hastalarının hayatta kalma oranının artmasına neden olarak, terapötik oranı iyileştirmeye yardımcı olabilmektedir (Liau ve ark., 2013). Radyokoruyucuların ve radyosensitizörlerin kullanımı, normal dokulardaki yan etkileri hafifletmek ve tümör direncini azaltmak için iki ilginç stratejidir (Allison ve Dicker, 2014). Literatürde yapılan deneysel çalışmalarda çeşitli tipte radyoprotektörler ve radyosensitizörlerin test edilmiş ve halen test edilmektedir (Narmani ve ark., 2018; Bagheri, ve ark., 2018). Mevcut çalışmada, radyasyonun yol açtığı hasara karşı endojen olarak üretilen bir molekül olan melatoninin radyasyon öncesinde ve sonrasında uygulanması durumundaki olası koruyucu etkilerini araştırdık.

Radyasyon, enerjinin dalgalar veya parçacıklar şeklinde iletimi veya emisyonu olarak tanımlanmaktadır. Radyasyon yüksek oranda reaktif serbest radikalleri oluşturarak protein modifikasyonlarına, DNA, RNA ve hücre zarlarının hasarına neden olmaktadır (Citrin ve Mitchell, 2017). Radyasyondan sonraki moleküler olaylar karmaşık olup yaşlanma (Panganiban ve ark., 2013), oksidatif stres (Wei ve ark., 2019), inflamasyon, hasarlı hücrelerin tükenmesi ve fibrozis (Wang ve ark., 2020) dahil olmak üzere çeşitli biyolojik süreçleri (Citrin ve Mitchell, 2017) kapsamaktadır. Radyoterapinin karaciğer,

kemik iliği gibi hayati organlarda oluşturduğu bu zararlı etkiler tümörleri baskılamak için uygulanan radyasyon dozunu kısıtlamaktadır (Sossey-Alaoui ve ark., 2018). Karaciğerin homeostazı korumak için sayısız işlevi vardır. Radyasyondan sonra, karaciğer yağlanması gibi karaciğer hastalıkları indüklenir (Rim ve Yoon, 2018).

Yapılan bir çalışmada sadece radyasyon verilen hayvanların, vücut ağırlığındaki azalma radyasyon dozuna bağlı olarak ilk iki hafta arasında gözlemlendiğini belirmiştir. Kilo kaybı, diyare ile sıvı ve elektrolit kaybına ve gastrointestinal sistemdeki absorpsiyon kapasitesinin azalmasına dayandırılabilir (Krishna ve Kumar, 2005). Diğer bazı çalışmalarda da radyasyon gruplarına ait deney hayvanlarında kontrol grubuna göre belirgin kilo kaybı meydana geldiği gösterilmiştir (Mihandoost ve ark., 2014; Li ve ark., 2021). Mevcut çalışmada, ilk olarak çalışmaya başlamadan önce ve deneyin bitiminde sıçanların ağırlıkları hesaplanarak kaydedildi ve gruplar arasında karşılaştırmalar yapıldı. Buna göre, literatürle uyumlu şekilde radyasyon verilen gruplarda sıçan ağırlıklarının diğer gruplara göre azaldığını, ancak bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığını gösterdik.

Araştırmalarda kullanılan tedavi metodlarının, radyasyon dozunun tek veya fraksiyonlu ışınlama halinde uygulanması, başka kimyasallarla birlikte verilen radyasyon, kullanılan fare/sıçan türü ve cinsiyetlerinin farklılık göstermesi sebebiyle radyasyonla indüklenen karaciğer hasarı hayvan modelleri henüz oluşturulmamıştır. Çalışmalardaki bu tanımlanmamış tedavi yöntemleri, değişken sonuçlara neden olmakta ve mekanizmanın anlaşılmasını zorlaştırmaktadır. Yapılan bir çalışmada, 8 Gy tek doz abdominal radyasyona maruziyetten 36 saat sonra ışınlanmış karaciğer dokularında şiddetli sinüzoidal hemoraji, santral ven dilatasyonu, hepatositlerde vakuolizasyon ve Kupffer hücrelerinde artış gözlenmiştir (Özyurt ve ark., 2014). Başka bir çalışmada, 25 Gy'lik tek doz radyasyon uygulanan karaciğer dokusunda, ışınlamadan 24 ve 48 saat sonra hepatoselüler hasar ve steatohepatitis izlenmiştir (Christiansen ve ark., 2006). 30 Gy hepatik ışınlamaya maruziyetinin ışınlamadan 6 ay sonra radyasyona bağlı karaciğer fibrozu tespit edilmiştir (Du ve ark., 2010). Çalışmalar radyasyon dozunun karaciğerin etkilenme derecesini göstermektedir. Kümülatif doz 10Gy ile ışınlanan sıçanlarda,

sağlam lobüler karaciğer mimarisi ve ince plaka halinde düzenlenmiş hepatositler, genişlemiş sinüzoidler, artmış çift çekirdekli hepatositler görülmekteydi. Yine aynı çalışmada tek doz 8 Gy ile ışınlanan sıçanlarda hafif bozulmuş lobüler hepatic mimari, orta derecede hepatosit dejenerasyonu, çift çekirdekli hepatositler, portal kanalda hemoraji ve fibrözis gösterdi (Mahgoub ve ark., 2020). Toplamda 12 Gy radyasyona maruz kalan sıçanlarda, maruziyetten 36 saat sonra hepatic hücre ödemi ve inflamasyon yanı sıra, hepatositlerde belirgin vakuoler dejenerasyon görülmüştür (Li ve ark., 2021). Başka bir çalışmada 6 Gy radyasyona maruz kalan farelere radyasyon uygulamasından önce tek doz 30 mg/kg melatonin verilmiştir. Çalışmanın histopatolojik bulgularına göre Radyasyon ve melatoninin birlikte kullanımının radyasyonun hepatotoksitesini azaltarak radyasyonun zararlı etkilerine karşı koruma sağladığını belirtilmiştir (Uslu ve ark., 2019). Bizde çalışmamızda K grubu karaciğer dokularının normal histolojik yapısını koruduğunu, R grubunda ise bu normal karaciğer mimarisinin bozulduğunu, vasküler sinüzoidal hemoraji ve sinüzoidal dilatasyon bulgularını gösterdik. Radyasyon uygulanan bütün R grubuna ait karaciğer dokularında hepatoselüler nekroz, hepatositlerde vakuolizasyon ve sinüzoidlerde dilatasyonun diğer tüm deney gruplarına göre fazla olduğu belirlendi. R ile M'nin birlikte uygulandığı gruplara ait sıçan karaciğer örneklerinde ise, R grubuna göre RM grubunun histolojik yapısının korunduğu gözlemlendi. Benzer şekilde, MR grubu histopatolojik değişikliklerindeki azalmanın RM grubuna göre daha belirgin olduğu görüldü. Çalışmamızdan elde edilen histopatolojik bulgulara göre, melatoninin radyasyon hasarı oluşmadan önce uygulanmasının hasar sonrası uygulanmasına göre, daha belirgin bir koruyucu etki gösterdiğini söyleyebiliriz. Benzer sonuçlar MT ve PAS ile boyanmış preparatlarda da mevcuttu. Radyasyonun neden olduğu fibrozis ve hepatositlerdeki glikojen depolarındaki kayıp RM grubuna göre, MR grubunda daha belirgin şekilde düzelmişti.

Melatonin, güçlü antioksidan yeteneği nedeniyle güçlü bir radyasyon koruyucu etkiye sahiptir (Farhood ve ark., 2019). Farklı deneysel çalışmalarda çeşitli fizyolojik ve farmakolojik konsantrasyonlarda ve geniş bir doz aralığına sahip olan melatoninin çok düşük toksisiteye sahip olduğunu göstermiştir (Vijayalaxmi ve ark., 2004). Melatoninin serbest radikalleri temizleme mekanizması, diğer antioksidanların çoğundan farklı

görülmektedir çünkü melatonin, redoks sistemini uyarmadan ROS ile etkileşir; ayrıca melatonin, serbest radikalleri, temelde diğer moleküllerle reaksiyona girmeyen kararlı ürünlere dönüştürür (Najafi ve ark., 2019). Melatoninin viral hepatit, obstrüktif kolestaz, hepatektomi, septik şok, iskemi reperfüzyon, ilaca bağlı karaciğer hasarı ve radyasyonun da dahil olduğu ve çeşitli karaciğer hasarı modellerinde gösterilmiştir. Bizim çalışmamızdan da elde edilen histopatolojik verilere göre, radyasyonun neden olduğu karaciğer hasarına karşı melatoninin koruyucu etkilerini desteklemektedir.

Radyasyon karaciğerde akut veya kronik hasara neden olabilir. Radyasyonun erken etkileri arasında DNA hasarı, oksidatif stres ve hepatoselüler apoptoza yol açan reaktif oksijen türlerinin üretimi ve ışınlanmış bölgelerde akut inflamatuvar yanıtlar yer alır (Robbins ve Zhao, 2004). İnflamasyonla ilgili yollardaki değişiklikler, ışınlamadan sonra çeşitli karaciğer hastalıklarına yol açabilmesine sebep olabileceğinden dolayı kesinlikle önemlidir. NF $\kappa$ B dahil olmak üzere inflamasyonla ilişkili yollar, steatoz ve karaciğer karsinogenezi arasında görünmektedir. Ek olarak, inflamasyonun, obezite veya alkol alımının neden olduğu yağ metabolizmasındaki değişikliklerle modüle edilen karaciğerdeki radyasyon etkileriyle de ilişkili olması muhtemeldir. Örneğin, NF $\kappa$ B tıbbi tedavi için bir hedef olabilir. Bununla birlikte, karaciğerdeki NF $\kappa$ B işlevleri diğer organlardaki işlevlerden farklı olabilir (Muriel, 2009). Ancak NF $\kappa$ B'nin baskılanması radyasyonla kombinasyon halinde hepatoselüler karsinom hücrelerine karşı etkili olmasına rağmen, karaciğerdeki NF $\kappa$ B yollarının modülasyonu çok dikkatli bir şekilde ele alınmalıdır (Hsu ve ark., 2015). NF $\kappa$ B inflamasyon yanıtlarında anahtar rol oynayan inflamatuvar sitokinlerin ana regülatörüdür (Shih ve ark., 2015). p65, hepatositlerdeki ana sitoprotektif NF $\kappa$ B alt birimidir (Grossmann, 1999). NF $\kappa$ B-p65 immünoreaktivite yoğunluğu K grubuna göre radyasyon uygulanan tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artmıştı. R grubu ile RM grubu arasında ve S grubu ile MR grubu arasında benzerlik olduğu belirlenmiştir.

Radyasyon; apoptoz, mitotik katostrof, nekroz, otofaji ve yaşlanma gibi farklı mekanizmalar yoluyla hücre ölümünü tetiklemektedir (Manda ve ark., 2012). Hepatositler, radyasyonun neden olduğu oksidatif stres, ROS üretimi ve DNA hasarı

gibi erken etkilerine yanıt olarak apoptoza uğrayabilmektedirler (Guicciardi ve ark., 2013). Radyasyon gibi sitotoksik strese maruziyet sonrasında hasarlı hücrelerin kendi hücresel bileşenlerini yok ettiği apoptozisde rol alan anahtar enzimler kaspazlardır (Taylor ve ark., 2008). Kaspaz-3, hücrenin apoptotik yolağa girişi için önemli bir belirteç olup kromatin yoğunlaşmasından ve DNA fragmentasyonundan sorumludur (Nicholson ve ark., 1995). Radyasyona maruziyet sonrası kaspaz-3'ün aktivasyonu, apoptotik yol ile hücre ölümünü indükler (Marini ve ark., 2009). Çalışmamızda immünohistokimyasal olarak değerlendirdiğimiz kaspaz-3 pozitif apoptotik hücre sayısı R grubunda diğer tüm gruplara göre anlamlı olarak artmıştı ve diğer gruplar arasında farklılık yoktu. Radyasyon öncesinde ve sonrasında melatonin uygulamasının etkili olduğu ancak RM ve MR grupları arasında farklılık olmadığı sonucuna varılmıştır.

Radyasyon ile indüklenen çift zincir kırılmalarından dolayı iyonize radyasyonun primer hedefi olarak kabul edilen DNA, mutasyon ve hücre ölümüne neden olabilecek en önemli hasar türüdür (Srinivasan ve ark., 2008). Comet yöntemi özellikle zincir kırılmalarını ve hücre düzeyinde onarımını ölçmek için kullanılmaktadır (Collins, 2004). Tüm vücut ışınlanmış farelerin kemik iliği ve dalak gibi dokularında tek ve çift zincir kırılmalarının oluşumu gibi radyasyonla indüklenen hasarların olduğu comet parametrelerinin arttığı gösterilmiştir (Nair ve Nair, 2013). Çalışmamızda uyguladığımız yöntemlerden biri olan bu yöntem sonuçlarına göre, R grubunda head DNA dışındaki tüm Comet parametrelerinin artış gösterdiği, RM ve MR gruplarında ise bu artışın görülmediği dikkat çekmekteydi. M grubu ile MR grubu arasında head DNA, L-Tail, Tail DNA, OTM ve TM parametreleri açısından benzerlik olduğu sonucuna varılmıştır. Bu sonuçlar, tüm vücut ışınlamanın R grubunda Comet parametrelerini değiştirerek DNA hasarı oluşmasına neden olurken, melatoninin DNA'nın oksidatif hasara duyarlılığını azalttığını ve DNA'yı iyonize radyasyonun zararlı etkilerinden koruduğunu ve dolayısıyla radyasyona bağlı genomik hasar hakaretlerini önlemek için yararlı olabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda ayrıca, NAD<sup>+</sup> bağımlı bir protein deasetilaz olan sessiz bilgi düzenleyici 1 SIRT1 ve  $\alpha$ -SMA moleküllerinin immünreaktiviteleri de değerlendirilmiştir. SIRT1 deasetilasyon yoluyla anahtar hedefleri modüle ederek inflamasyon, apoptoz ve metabolizma dahil olmak üzere çeşitli biyolojik süreçlerde yer almıştır (Imai ve ark., 2000). SIRT1, histonların ve peroksizom proliferatörü ile aktive olan reseptör gama, koaktivatör 1 alfa (PGC-1 $\alpha$ ) gibi transkripsiyon aktivitelerinde yer alan birçok histon olmayan proteini deasetilate eder (Lagouge ve ark., 2006). SIRT1, antioksidan ve anti-inflamatuar etkilerini ise FOXO ve NF $\kappa$ B ile reaksiyonu sonucu göstermektedir (Zhu ve ark., 2019). Bu molekül Wnt ve Notch gibi sinyal yollarında bulunan protein substratları ile etkileşime girmektedir. Bunun sonucunda hücre çoğalması, farklılaşması, yaşlanması, apoptoz ve metabolizmada önemli bir düzenleyici rol oynamakta ve vücutun fizyolojik fonksiyonlarının çoğunun düzenlenmesine katılmaktadır (Chang ve Guarente, 2014). Daha da önemlisi SIRT1, PGC-1 $\alpha$  ile fiziksel olarak etkileşimi sonucu olarak PGC-1 $\alpha$  aktivitesini artırır, mitokondriyal genlerin transkripsiyonunu düzenleyerek ve mitokondriyal biyogenezi tetiklemekte ve mitokondriyal fonksiyonları düzenlemektedir (Sanz ve ark., 2019). Son zamanlarda, SIRT1 ekspresyonu ve aktivitesindeki değişiklikler, hepatik iskemi/reperfüzyon hasarı ve hepatik lipid homeostazı dahil olmak üzere çeşitli insan karaciğer hastalıklarıyla ilişkilendirilmiştir (Wang ve ark., 2010; Rickenbacher ve ark., 2014). Çalışmamızda, SIRT1 immünoreaktivite yoğunlukları M, R ve RM grubunda artış göstermiştir. Ayrıca, bu artışın görüldüğü gruplar ile MR grubu arasında anlamlı farklılık olduğu belirlenmiştir.

Hipoksik koşullar altında SIRT1 ekspresyonu artar ve buna mitokondriyal uzama eşlik eder, bu da SIRT1'in bu morfolojik değişikliği düzenlediğini düşündürmektedir (Oanh ve ark., 2017). Oksidatif stres ve mitokondriyal dinamikler, kas hücrelerinde SIRT1 aktivasyonu ile ilişkili olabilir ve oksidatif stresi sınırlayabilir (Chang, 2019). SIRT1, inflammatuar yanıtları ve oksidatif stresi sınırlayarak asetaminofen hepatotoksisitesine karşı koruma sağlar (Rada ve ark., 2017). Benzer şekilde, SIRT1 mRNA ve protein seviyelerinin alkolik yağlı karaciğerinde normal farelere göre önemli ölçüde düşük olduğunu ve yaban mersini suyu ve probiyotiklerin SIRT1 eksikliğini mitokondriyal koruma ve anti-oksidatif stres üzerindeki etkinliğini önemli ölçüde sınırladığını

belirtmişlerdir, bu da yaban mersini suyunun ve probiyotiklerin SIRT1 yoluyla mitokondriyal fonksiyonu ve oksidatif stresi azalttığı sonucuna varmışlardır (Fan ve ark., 2021).

Transkripsiyonel koaktivatör PGC-1 $\alpha$ , SIRT1 için deasetillenmiş bir substrattır ve mitokondriyal biyosentez ve bakımda kritik bir rol oynar (Qian ve ark., 2019; Lee ve ark., 2019). Mitokondriden zengin dokularda bol miktarda bulunan PGC-1 $\alpha$  proteini, moleküler ağırlığı yaklaşık 92 kDa olan 795 amino asitten oluşur (Benton ve ark., 2008). PGC-1 $\alpha$ , çoklu moleküler yolların modifiye edilmesinde rol oynar ve çeşitli koşullar altında mitokondriyal fonksiyonun ve enerji metabolizmasının stabilitesini korur. SIRT1, PGC-1 $\alpha$  mitokondriyal biyosentezin aktive edilmesi, alkolün neden olduğu karaciğer hasarını sınırlayabilir (Wang ve ark., 2018) ve PGC-1 $\alpha$ 'nın bozulması, kronik aşırı alkol tüketiminin neden olduğu hepatosteatozdan sorumludur (Varatharajalu ve ark., 2014). Alkolik yağlı karaciğer hastalığında hepatosit mitokondrisinin regülasyonu için PGC-1 $\alpha$ 'nın SIRT1 aktivasyonunun gerekli olduğunu göstermiştir (Fan ve ark., 2021).

Literatürde radyasyonun biyokimyasal parametreler üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada tüm vücut 6 Gy radyasyona maruz kalan farelerin AST ve ALT düzeylerinin artmış olduğu belirtilmiştir (Wang ve ark., 2013). Başka bir çalışmada ise tek doz 8 Gy radyasyon uygulanmasından 30 gün sonra serum AST ve ALT düzeylerinde anlamlı bir artış olduğu gösterilmiştir (Mahgoub ve ark., 2020). Çalışmamızdaki kan serumu biyokimyasal parametrelerinden olan ALP radyasyon uygulanan gruplarda önemli ölçüde azalırken, melatonin ile tedavi edilen gruplarda artma eğilimi göstermiştir. ALP düzeyi R grubu ile RM ve MR grupları arasında anlamlı farklılık bulunurken, RM ve MR grupları arasında fark bulunamamıştır. R grubu ALT düzeyleri diğer tüm deney gruplarına göre anlamlı bir artış göstermiştir. AST düzeyi, ALT seviyelerindeki sonuçlara benzer şekilde R grubunda artarken, bu artışın RM grubu dışındaki diğer gruplarla anlamlı farklılığa sahip olduğu belirlenmiştir. R grubu direkt bilirubin ve toplam bilirubin seviyeleri diğer gruplara göre daha yüksek olup sadece R ve M grupları

arasında anlamlılık tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalardaki sonuçlarla elde edilen sonuçlar uyumluluk içersindeydi. Biyokimyasal sonuçlarımıza göre R grubu ile radyasyon öncesinde ve sonrasında melatonin uygulanan gruplar arasında anlamlı farklılık varken, RM ve MR grubu arasında farklılık bulunamadığı tespit edilmiştir. Radyasyon ile birlikte melatonin uygulanmasının karaciğer serum hasarı biyobelirteçlerinde iyileşmeye neden olduğu anlaşılmıştır.

Melatoninin dolaylı etkisi, GSH, GPX, SOD, GR ve CAT dahil olmak üzere antioksidan savunmayı uyarmasıdır. Çeşitli çalışmalar melatoninin glutatyon peroksidazın aktivitesini artırabildiğini ve glutatyon sentezini artırabildiğini göstermiştir (Mihandoost ve ark., 2014). Melatonin ayrıca NF $\kappa$ B'nin çekirdeğe translokasyonunu engelleyebilir, böylece NF $\kappa$ B'nin aracılık ettiği sinyal yolunu inhibe edebilir ve radyasyondan sonra ROS tarafından indüklenen oksidatif stresi azaltmak için bütünlüğünü korur (Najafi ve ark., 2017). Taysi ve ark (2003) yapmış oldukları çalışmada sıçanlara tek doz 6 Gy radyasyon uygulamasından 30 dakika önce 5 ve 10 mg/kg melatonin uygulanmıştır. Çalışma sonucunda melatonin süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz ve katalaz gibi endojen antioksidan savunma kapasitesini geliştiren enzimlerin aktivitelerinin değişmesine neden olduğu ve iyonize radyasyon hasarına karşı korumada veya oksidatif strese karşı bir antioksidan olarak kullanılabileceğini belirtmektedirler. Shirazi ve ark (2013) tüm vücut tek doz 10 Gy radyasyon uygulamasından önce tek doz ve radyasyon uygulamasından sonra 3 gün olacak şekilde melatonin enjeksiyonu yapılmıştır. Bu çalışmada melatonin MDA, SOD, CAT ve GSH-PX düzeylerini değiştirerek karaciğer fonksiyonlarını koruduğu ve sıçanların radyasyon hasarından oksidatif stresini azalttığı bulunmuştur. ELISA metodu ile elde edilen verilere göre, karaciğer dokularında MDA düzeyi, R grubunda K ve S grubuna göre anlamlı olarak artmakta iken, MR grubunda R grubuna göre anlamlı olarak azalmakta olduğu belirlendi. SOD düzeyleri, R grubunda diğer gruplara göre artmakta olup bu artış sadece K grubu ile anlamlı bir farka sahipti. MR grubu SOD düzeyleri K grubu dışındaki tüm gruplarla istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterdi. CAT düzeylerinin radyasyon uygulanan gruplarda azaldığı ve MR grubunun K, S ve M grupları ile anlamlı farklılığa sahip olduğu belirlendi. TNF- $\alpha$  düzeyi en yüksek olan R

grubunun tüm deney grupları ile anlamlı farklılık gösterdiği tespit edildi. R ve RM grubu TGF- $\beta$  düzeyleri, K grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış gösterdi. Hepatik GSH-PX, PDGF ve PGC1- $\alpha$  değerlerinin ise R grubunda diğer deney gruplarına göre, en düşük değerlere sahip olduğu fakat bu düşüşün istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi.

Biz çalışmamızda radyasyon kaynaklı karaciğer hasarına karşı melatoninin koruyucu mu yoksa tedavi edici mi etkiye sahip olduğunu belirlemek için histokimyasal, immunohistokimyasal, biyokimyasal ve comet metodlarını kullandık. Çalışmadan elde edilen veriler, radyasyonun neden olduğu karaciğer hasarına karşı melatoninin hem koruyucu hem de tedavi edici etkilere sahip olduğunu desteklemektedir. Ancak özellikle histokimyasal ve comet bulguları melatoninin hasar öncesinde uygulanmasının, hasar oluşuktan sonra verilmesine nazaran daha etkili olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlar melatoninin radyasyona bağlı doku hasarı oluşmadan önce kullanımının radyoterapi öncesinde umut verici bir ajan olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

## 6. KAYNAKLAR

- Abdel-Misih SR, Bloomston M. Liver anatomy. *Surgical Clinics*. 2010; 1; 90(4): 643-53.
- Acuña-Castroviejo D, Escames G, Venegas C, et al. Extrapineal melatonin: sources, regulation, and potential functions. *Cell Mol Life Sci*, 2014; 71: 2997-3025.
- Afeche SC, do Amaral FG, Villela DCM, Abrahão MV, Peres R, Cipolla-Neto J. Melatonin and the Pineal Gland. In: Romano E, De Luca S, editors. *New Research on Neurosecretory Systems*. New York: Nova Biomedical Books; 2008: 151-77.
- Agabiti-Rosei C, Favero G, De Ciuceis C et al. Effect of long-term treatment with melatonin on vascular markers of oxidative stress/inflammation and on the anticontractile activity of perivascular fat in aging mice, *Hypertens Res*, 2017; 40: 41-50.
- Aggarwal BB, Takada Y, Shishodia S, Gutierrez AM, Oommen OV, Ichikawa H, et al. Nuclear transcription factor NF-kappa B: role in biology and medicine. *Indian J Exp Biol*, 2004; 42: 341-353.
- Ahotupa M. Oxidized lipoprotein lipids and atherosclerosis. *Free Radic. Res*. 2017, 51, 439-447. 51.
- Allison R, Dicker A. Minimizing morbidity in radiation oncology: a special issue from future oncology. *Future Oncol*. 2014; 10(15): 2303-5.
- Alvarez-Guardia D, Palomer X, Coll, Davidson, Chan TO, Feldman AM, Laguna JC, Vazquez-Carrera M. The p65 subunit of NF-kappaB binds to PGC-1alpha, linking inflammation and metabolic disturbances in cardiac cells. *Cardiovasc Res*, 2010; 87: 449-458.
- Arıncı K, Elhan A. *Anatomi*. 3. Baskı. Ankara: Ankara Güneş Kitabevi; 2001. 1. Cilt 265-273, 299-305, 311-316. 2. Cilt 2-14
- Aslankoç R, Demirci D, İnan Ü ve ark. Oksidatif stres durumunda antioksidan enzimlerin rolü- Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPX). *SDÜ Tıp Fakültesi Derg* 2019; 26: 362-369.

Bagheri H, Rezapour S, Najafi M, Motevaseli E, Shekarchi B, Cheki M et al. Protection against radiation-induced micronuclei in rat bone marrow erythrocytes by Curcumin and selenium L-methionine. *Iran J Med Sci.* 2018; 43(6): 645-652.

Baur JA, Ungvari Z, Minor RK, Le Couteur DG, de Cabo R. Are sirtuins viable targets for improving healthspan and lifespan? *Nat Rev Drug Discov*, 2012; 11(6): 443-61.

Benton CR, Wright DC, Bonen A. PGC-1 $\alpha$ -mediated regulation of gene expression and metabolism: implications for nutrition and exercise prescriptions. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2008;33(5):843-62.

Borzoueisileh S, Monfared AS, Ghorbani H, Mortazavi SMJ, Zabihi E, Pouramir M, Doustimotlagh AH, Shafiee M, Niksirat F. Assessment of function, histopathological changes, and oxidative stress in liver tissue due to ionizing and non-ionizing radiations. *Caspian J Intern Med*, 2020; 11(3): 315-323.

Bours G, Bonizzi M, Bentires-Alj et al. NF- $\kappa$ B activation in response to toxic and therapeutic agents: role in inflammation and cancer treatment. *Toxicology*, 2000; 153, (1-3): 27-38.

Braidy N, Guillemin GJ, Mansour H, Chan-Ling T, Poljak A, Grant R. Age related changes in NAD<sup>+</sup> metabolism oxidative stress and Sirt1 activity in wistar rats. *PLoS One*, 2011; 6(4): 190-194.

Breitenbach M, Eckl P. Introduction to Oxidative Stress in Biomedical and Biological Research. *Biomolecules* 2015, 5, 1169-177.

Calzado MA, Bacher S, Schmitz ML. NF- $\kappa$ B inhibitors for the treatment of inflammatory diseases and cancer. *Curr Med Chem* 2007; 14: 367-376.

Chang E. 1,25-Dihydroxyvitamin D decreases tertiary butyl-hydrogen peroxide-induced oxidative stress and increases AMPK/SIRT1 activation in C2C12 muscle cells. *Molecules.* 2019; 24(21): 1-14.

Chang HC, Guarente L. SIRT1 and other sirtuins in metabolism. *Trends Endocrinol Metab.* 2014;25(3):138-45.

Cheema AK, Mehta KY, Rajagopal MU, et al. Metabolomic studies of tissue injury in nonhuman primates exposed to gamma-radiation. *Int J Mol Sci.* 2019;20: E3360.

Chen CQ, Fichna J, Bashashati M, Li YY, Storr M. Distribution, function and physiological role of melatonin in the lower gut. *World J Gastroenterol WJG.* 2011;17(34): 3888-98.

Chen YR, Lai YL, Lin SD, Li XT, Fu YC, Xu WC. SIRT1 interacts with metabolic transcriptional factors in the pancreas of insulin-resistant and calorie-restricted rats. *Mol Biol Rep.* 2013; 40(4): 3373-80.

Christiansen H, Batusic D, Saile B, Hermann RM, Dudas J, Rave-Frank M et al. Identification of genes responsive to gamma radiation in rat hepatocytes and rat liver by cDNA array gene expression analysis. *Radiat Res* 2006; 165: 318-325.

Citrin DE, Mitchell JB. Mechanisms of normal tissue injury from irradiation. *Semin Radiat. Oncol.* 2017; 27: 316-24.

Coll T, Jove M, Rodriguez-Calvo R, Eyre E, Palomer X, Sanchez RM, Merlos M, Laguna JC, Vazquez-Carrera M. Palmitate-mediated downregulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1alpha in skeletal muscle cells involves MEK1/2 and nuclear factor-kappaB activation. *Diabetes*, 2006; 55: 2779-2787.

Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol. Biotechnol.* 2004; 26: 249-261.

Cotran RS, Kumar V, Collins T. Robbins pathologic basis of disease, 8th edn. W.B. Saunders, Philadelphia (2010)

Dattner AM. From medical herbalism to phytotherapy in dermatology; back to the future. *Dermatol Ther.* 2003; 16: 106-113.

Denu JM. Linking chromatin function with metabolic networks: Sir2 family of NAD (+)-dependent deacetylases. *Trends Biochem Sci* 2003; 28: 41-48.

Du SS, Qiang M, Zeng ZC, Ke AW, Ji Y, Zhang ZY et al. Inactivation of Kupffer cells by gadolinium chloride protects murine liver from radiation-induced apoptosis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2010; 76: 1225-1234.

Du SS, Qiang M, Zeng ZC, Zhou J, Tan YS, Zhang ZY et al. Radiation-induced liver fibrosis is mitigated by gene therapy inhibiting transforming growth factor-beta signaling in the rat. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2010; 78: 1513-1523.

Eisele PS, Salatino S, Sobek J, Hottiger MO, Handschin C. The peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator 1 $\alpha/\beta$  (PGC-1) coactivators repress the transcriptional activity of NF- $\kappa$ B in skeletal muscle cells. *J Biol Chem*, 2013; 288: 2246-2260.

Elgazzar AH and Kazem N. Biological Effects of Ionizing Radiation. *The Pathophysiologic Basis of Nuclear Medicine*, 2014; 715-726.

Erren TC and Reiter RJ. Melatonin: a universal time Messenger. *Neuro Endocrinology Letters* 2015; 36: 187-192.

Fan H, Shen Y, Ren Y, Mou Q, Lin T, Zhu L, Ren T. Combined intake of blueberry juice and probiotics ameliorate mitochondrial dysfunction by activating SIRT1 in alcoholic fatty liver disease. *Nutrition & Metabolism*, 2021; 18(50): 1-11.

- Farhood B, Aliasgharzadeh A, Amini P, et al. Radiation induced dual oxidase upregulation in rat heart tissues: protective effect of melatonin. *Medicina*, 2019; 55(7): 317.
- Favero G, Franceschetti L, Bonomini F, Rodella LF, Rezzani R. Melatonin as an anti-inflammatory agent modulating inflammasome activation. *Int J Endocrinol*. 2017; 2017: 1835195.
- Fernandez-Marcos PJ, Auwerx J. Regulation of PGC-1 $\alpha$ , a nodal regulator of mitochondrial biogenesis. *Am J Clin Nutr*, 2011; 93: 884-890.
- Frey B, Rückert M, Deloch L, Rühle PF, Derer A, Fietkau R, Gaipl US. Immunomodulation by ionizing radiation-impact for design of radio-immunotherapies and for treatment of inflammatory diseases. *Immunol Rev*, 2017; 280 (1): 231-248.
- Gartner LP, Hiatt JL. (2016) *Hücre Biyolojisi ve Histoloji*. (Canan Hürdağ Çev. Ed.). İstanbul: İstanbul Kitabevi.
- Gebicki JM. Oxidative stress, free radicals and protein peroxides. *Arch Biochem Biophys*, 2016; 595: 33-39.
- Ghobadi A, Shirazi A, Najafi M, Kahkesh MH, Rezapoor S. Melatonin ameliorates radiation-induced oxidative stress at targeted and nontargeted lung tissue. *J Med Phys*, 2017; 42(4): 241.
- Glozak MA, Sengupta N, Zhang X, Seto E. Acetylation and deacetylation of non-histone proteins. *Gene*, 2005; 363: 15-23.
- Gray SG, Ekstrom TJ. The human histone deacetylase family. *Exp Cell Res*. 2001; 262(2): 75-83.
- Graziadio A, Locatelli A, Morigi R, Rambald M. Small-Molecules Targeting Sirtuin 1: A Patent Review *Med chem*, 2016; 6: 6, 411-421.
- Guicciardi ME, Malhi H, Mott JL, Gores GJ. Apoptosis and necrosis in the liver. *Comp. Physiol*, 2013; 3: 977-1010.
- Haigis MC, Sinclair DA. Mammalian Sirtuins: Biological Insights and Disease Relevance. *Annu Rev Pathol Mech Dis*, 2010; 5(1): 253-95.
- Han MK, Song EK, Guo Y, Ou X, Mantel C, Broxmeyer HE. SIRT1 regulates apoptosis and Nanog expression in mouse embryonic stem cells by controlling p53 subcellular localization. *Cell Stem Cell*, 2008; 2(3): 241-251.
- Hardeland R. Taxon- and Site-Specific Melatonin Catabolism. *Molecules*. 2017; 22(11): 2015.

Hauck AK, Huang Y, Hertzell AV, Bernlohr DA. Adipose oxidative stress and protein carbonylation. *J Biol Chem*, 2019; 294: 1083-1088.

He N, Zhu X, He W, Zhao S, Zhao W, Zhu C. Resveratrol inhibits the hydrogen dioxide-induced apoptosis via SIRT1 activation in osteoblast cells. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2015; 79(11): 1779-1786.

Hori YS, Kuno A, Hosoda R and Horio Y. Regulation of FOXOs and p53 by SIRT1 modulators under oxidative stress. *PLoS One*, 2013; 8(9): e73875.

Hsu FT, Liu YC, Liu TT, Hwang JJ. Curcumin Sensitizes Hepatocellular Carcinoma Cells to Radiation via Suppression of Radiation-Induced NF- $\kappa$ B Activity. *BioMed Res. Int.* 2015; 2015: 363671.

Imai S, Armstrong CM, Kaeberlein M, Guarente L. Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature* 2000; 403: 795-800.

Israel A. The IKK complex, a central regulator of NF-kappaB activation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2(3): a000158.

Jeong J, Juhn K, Lee H, et al. SIRT1 promotes DNA repair activity and deacetylation of Ku70. *Exp Mol Med* 2007; 39: 8-13.

Junqueira LC, Carneiro J. (2006). *Temel Histoloji*. (Yener AYTEKİN, Seyhun Solakoğlu Çev. Ed.). İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri.

Juza RM, Pauli EM. Clinical and surgical anatomy of the liver: a review for clinicians. *Clinical Anatomy*. 2014; 27(5): 764-9.

Khader A, Yang WL, Kuncewitch M, et al. Sirtuin 1 activation stimulates mitochondrial biogenesis and attenuates renal injury after ischemia-reperfusion. *Transplantation*, 2014; 98(2): 148-156.

Kierszenbaum AL. (2006). *Histoloji ve Hücre Biyolojisi, Patolojiye Giriş*. (Ramazan Demir, Çev. Ed.). Ankara: Palme Yayıncılık

Kim HJ, Park KG, Yoo EK, Kim YH, Kim YN, Kim HS, Kim HT, Park JY, Lee KU, Jang WG, Kim JG, Kim BW, Lee IK. Effects of PGC-1 $\alpha$  on TNF- $\alpha$ -induced MCP-1 and VCAM-1 expression and NF-kappaB activation in human aortic smooth muscle and endothelial cells. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2007, 9(3): 301-307.

Kim J, Jung Y. Radiation-induced liver disease: current understanding and future perspectives. *Exp Mol Med*, 2017; 49: e359.

Kobayashi Y, Furukawa-Hibi Y, Chen C, et al. SIRT1 is critical regulator of FOXO-mediated transcription in response to oxidative stress. *International Journal of Molecular Medicine*, 2005; 16(2): 237-243.

- Kowluru RA and Mishra M. Oxidative stress, mitochondrial damage and diabetic retinopathy. *Biochim Biophys Acta*, 1, 11, 2474-2483.
- Kozako T, Suzuki T, Yoshimitsu M, Arima N, et al. Anticancer agents targeted to sirtuins. *Molecules*, 2014; 19(12): 20295-313.
- Krishna A, Kumar A. Evaluation of Radioprotective Effects of Rajgira (*Amaranthus paniculatus*) Extract in Swiss Albino Mice. *J. Radiat. Res*, 2005; 46: 233-239.
- Lagman M, Ly J, Saing T, Kaur Singh M, Vera Tudela E, Morris D. Investigating the causes for decreased levels of glutathione in individuals with type II diabetes. *PLOS ONE* 2015, 10(3): 1-19.
- Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, Meziane H, Lerin C, Daussin F, et al. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. *Cell*, 2006; 127(6):1109-22.
- Lee G, Uddin MJ, Kim Y, Ko M, Yu I, Ha H. PGC-1alpha, a potential therapeutic target against kidney aging. *Aging Cell*. 2019; 18(5): e12994.
- Leser M, Chapman JR, Khine M, Pegan J, Law M, Makkaoui ME, Ueberheide BM, Brenowitz M. Chemical generation of hydroxyl radical for oxidative 'footprinting'. *Protein Pept Lett*, 2019; 26: 61-69.
- Li G, Wang J, Hu W, Zhang Z. Radiation-induced liver injury in three-dimensional conformal radiation therapy (3D-CRT) for postoperative or locoregional recurrent gastric cancer: risk factors and dose limitations. *PLoS ONE* 2015; 10: e0136288.
- Li W, Jiang L, Lu X, Liu X, Ling M. Curcumin protects radiation-induced liver damage in rats through the NF- $\kappa$ B signaling pathway. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 2021; 21:1-10.
- Li Y and Wu S. Epigallocatechin gallate suppresses hepatic cholesterol synthesis by targeting SREBP-2 through SIRT1/FOXO1 signaling pathway. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2018; 448(1-2): 175-185
- Liau SL, Connell PP, Weichselbaum RR. New paradigms and future challenges in radiation oncology: an update of biological targets and technology. *Sci Transl Med*, 2013; 5(173): 173.
- Limon-Pacheco J, Gonsebatt ME. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutation Research*, 2009, 674, (1-2), 137-147.
- Lissoni P. Biochemotherapy with immunomodulating pineal hormones other than melatonin: 5-methoxytryptamine as a new oncostatic pineal agent. *Pathol Biol*, 2007; 55(3-4): 198-200.

Maarman G, Blackhurst D, Thienemann F, et al. Melatonin as a preventive and curative therapy against pulmonary hypertension. *J Pineal Res*, 2015; 59: 343-353.

Mahgoub S, Sallam AO, Sarhan HKA, Ammar AAA, Soror SH. Role of Diosmin in protection against the oxidative stress induced damage by gamma-radiation in Wistar albino rats. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2020; 113: 104622.

Manda K, Glasow A, Paape D, Hildebrandt G. Effects of ionizing radiation on the immune system with special emphasis on the interaction of dendritic and T cells. *Front Oncol*, 2012; 2: 102.

Marini P, Wilfried B, Maximilian N, Dorothea J, Stefan S, Verena J, Claus Belka. Combination of the pro-apoptotic TRAIL-receptor antibody mapatumumab with ionizing radiation strongly increases long-term tumor control under ambient and hypoxic conditions *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys*, 2009; 75: 198-202.

Martínez-Campa C, Menéndez-Menéndez J, Alonso-González C, González A, Álvarez-García V, Cos S. What is known about melatonin, chemotherapy and altered gene expression in breast cancer. *Oncol Lett*, 2017; 13(4): 2003-14.

Mathes AM. Hepatoprotective actions of melatonin: possible mediation by melatonin receptors. *World J Gastroenterol*, 2010; 16(48): 6087-6097.

Mauriz JL, Collado PS, Veneroso C, et al. A review of the molecular aspects of melatonin's anti-inflammatory actions: recent insights and new perspectives. *J Pineal Res*, 2013; 54: 1-14.

McCall CE, El Gazzar M, Liu T, Vachharajani V, Yoza B. Epigenetics, bioenergetics, and microRNA coordinate gene-specific reprogramming during acute systemic inflammation. *J Leukoc Biol*, 2011; 90: 439-446.

Mederacke I, Hsu CC, Troeger JS, et al. Fate tracing reveals hepatic stellate cells as dominant contributors to liver fibrosis independent of its aetiology. *Nat Commun*, 2013; 4: 2823.

Michan S, Sinclair D. Sirtuins in mammals: insights into their biological function. *Biochem J*, 2007; 404: 1-13.

Mihandoost E, Alireza S, Mahdavi SR, Aliasgharzadeh A. Consequences of Lethal-Whole-Body Gamma Radiation and Possible Ameliorative Role of Melatonin. *The Scientific World Journal*, 2014; 621570.

Moore KM, Persaud TVN. (2002). *İnsan Embriyolojisi*. (Yıldırım M, Okar İ, Dalçık H, Çev. Ed.). İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi.

Moore KM, Persaud TVN. *Embriyoloji ve doğum defektlerinin temelleri*. (Müftüoğlu S, Atilla P, Kaymaz F Çev. Ed.). 2009; 7.

Morris KC, Lin HW, Thompson JW, Perez-Pinzon MA. Pathways for ischemic cytoprotection: Role of sirtuins in caloric restriction, resveratrol, and ischemic preconditioning. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2011; 31, 1003-1019.

Mortezaee K, Najafi M, Farhood B, Ahmadi A, D. Shabeeb, and A. E. Musa, NF- $\kappa$ B targeting for overcoming tumor resistance and normal tissues toxicity. *Journal of Cellular Physiology*, 2019; 234(10): 17187–17204.

Mostoslavsky R, Chua KF, Lombard DB, et al. Genomic instability and aging-like phenotype in the absence of mammalian SIRT6. *Cell* 2006; 124: 315-29.

Muriel P. NF-kappaB in liver diseases: A target for drug therapy. *J. Appl. Toxicol.* 2009; 29: 91-100.

Nair GG, Nair CK. Radioprotective effects of gallic acid in mice. *BioMed Res. Int.* 2013; 2013: 953079.

Najafi M, Shirazi A, Motevaseli E, et al. The melatonin immunomodulatory actions in radiotherapy. *Biophysical Reviews*, 2017; 9(2): 139-148.

Nakajima T, Ninomiya Y, Neno M. Radiation-induced reactions in the liver: modulation of radiation effects by lifestyle-related factors. *Int J Mol Sci.* 2018; 19: E3855.

Narmani A, Farhood B, Haghi-Aminjan H, Mortezaazadeh T, Aliasgharzadeh A, Mohseni M, et al. Gadolinium nanoparticles as diagnostic and therapeutic agents: their delivery systems in magnetic resonance imaging and neutron capture therapy. *J Drug Deliv Sci Technol.* 2018; 44: 457-66.

Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Ding CK, Gallant M et al. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature*, 1995; 376: 37-43.

Oanh NTK, Park YY, Cho H. Mitochondria elongation is mediated through SIRT1-mediated MFN1 stabilization. *Cell Signal.* 2017; 38: 67-75.

Oberdoerffer P, Michan S, McVay M, Mostoslavsky R, Vann J, Park SK, et al. SIRT1 redistribution on chromatin promotes genomic stability but alters gene expression during aging. *Cell* 2008; 135: 907-18.

Ogawa Y, Kobayashi T, Nishioka A. et al., Radiation-induced reactive oxygen species formation prior to oxidative DNA damage in human peripheral T cells. *International Journal of Molecular Medicine*, 2003; 11 (2): 149-152.

Ovalle WK, Nahirney PC. *Netter's Essential Histology*, Müftüoğlu S, Kaymaz F, Atilla P (Eds), Günes Tıp Kitabevleri, Ankara, 2009: 400-425.

Ozyurt H, Ozden AS, Cevik O, Ozgen Z, Cadirci S, Elmas MA et al. Investigation into the role of the cholinergic system in radiation-induced damage in the rat liver and ileum. *J Radiat Res* 2014; 55: 866-875.

Packer MA and Murphy MP. Peroxynitrite formed by simultaneous nitric oxide and superoxide generation causes cyclosporin-A-sensitive mitochondrial calcium efflux and depolarisation. *Eur J Biochem*, 1995; 234(1): 231-239.

Pan CC, Kavanagh BD, Dawson LA, Li XA, Das SK, Miften M et al. Radiation-associated liver injury. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2010; 76: 94-100.

Panganiban RA, Mungunsukh O, Day RM. X-irradiation induces ER stress, apoptosis, and senescence in pulmonary artery endothelial cells. *Int J Radiat Biol*, 2013; 89: 656-67.

Panglossi HV. *Leading Edge Antioxidants Research*: Nova Science Publishers; 2007.

Pei S, Minhajuddin M, Callahan KP, Balys M, Ashton JM, et al. Targeting aberrant glutathione metabolism to eradicate human acute myelogenous leukemia cells. *Journal of Biological Chemistry* 2013; 288(47): 33542–33558.

Pospisil P, Prasad A, Rac M. Mechanism of the Formation of Electronically Excited Species by Oxidative Metabolic Processes: Role of Reactive Oxygen Species. *Biomolecules*, 2019; 9(7): 258.

Pugin J. How tissue injury alarms the immune system and causes a systemic inflammatory response syndrome. *Annals of Intensive Care*, 2012; 2(1): 27.

Qian X, Li X, Shi Z, Bai X, Xia Y, Zheng Y, Xu D, Chen F, You Y, Fang J, Hu Z, Zhou Q, Lu Z. KDM3A senses oxygen availability to regulate PGC-1 $\alpha$ -mediated mitochondrial biogenesis. *Mol Cell*, 2019; 76(6): 885-895.

Qiao J, Fu J, Fang T, Huang Y, Mi H, Yang N et al. Evaluation of the effects of preconditioning regimens on hepatic veno-occlusive disease in mice after hematopoietic stem cell transplantation. *Exp Mol Pathol*, 2015; 98: 73-78.

Qin ZH, Tao LY and Chen X. Dual roles of NF-kappaB in cell survival and implications of NF-kappaB inhibitors in neuroprotective therapy. *Acta Pharmacol Sin*, 2007; 28: 1859-1872.

Rada P, Pardo V, Mobasher M, Garcia I, Ruiz L, Gonzalez Rodriguez A, Sánchez Ramos C, Muntané J, Alemany S, James LP, Simpson KJ, Monsalve M, Valdecantos MP, Valverde A. SIRT1 controls acetaminophen hepatotoxicity by modulating inflammation and oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*, 2017; 28(13): 1187-1207.

Reiter R. Interactions of the pineal hormone melatonin with oxygen-centered free radicals: a brief review. *Braz J Med Res*, 1993; 26: 1141-1155.

Reiter RJ, Melchiorri D, Sewerynek E, Poeggeler B, Barlow-Walden L, Chuang J, Ortiz, GG, Acuna-Castroviejo DA. Review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. *Journal of Pineal Research*, 1995; 18(1): 1-11.

Reiter RJ, Mayo JC, Tan DX, Sainz RM, Alatorre-Jimenez M, Qin L. Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers. *J Pineal Res*, 2016; 61(3): 253-278

Reiter RJ, Tan DX and Galano A. Melatonin: exceeding expectations. *Physiology (Bethesda, Md.)* 2014; 29: 325–333.

Reiter RJ, Tan DX, Cabrera J, et al. The Oxidant/Antioxidant network: role of melatonin. *Biological Signals and Receptors* 1999; 8: 56-63.

Reiter RJ, Tan DX, Rosales-Corral S, Galano A, Zhou XJ, and Xu B. Mitochondria: central organelles for melatonin's antioxidant and anti-aging actions. *Molecules*, 2018; 23(2): 509.

Reiter RJ, Tan DX, Rosales-Corral SC, Manchester L. The universal nature, unequal distribution and antioxidant functions of melatonin and its derivatives. *Mini Rev Med Chem*, 2013; 13: 373-384.

Rickenbacher A, Jang JH, Limani P, Ungethum U, Lehmann K, Oberkofler CE, et al. Fasting protects liver from ischemic injury through Sirt1-mediated downregulation of circulating HMGB1 in mice. *J Hepatol*, 2014; 61: 301-308.

Rim C, Yoon W. Leaflet manual of external beam radiation therapy for hepatocellular carcinoma: A review of the indications, evidences, and clinical trials. *Onco Targets Ther*, 2018; 11: 2865-2874.

Robbins ME, Zhao W. Chronic oxidative stress and radiation-induced late normal tissue injury: A review. *Int J Radiat Biol*, 2004; 80: 251-259.

Ross MH, Pawlina W. *Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas, İlişkili Hücre Biyolojisi ve Moleküler Biyoloji ile*. 6 ed. Ankara: Palme Yayıncılık; 2014.

Sadler TW. *Langman Medikal Embriyoloji*, 11. Baskı, Palme Yayıncılık, Ankara, 2011.

Sanz MN, Grimbert L, Moulin M, Gressette M, Rucker-Martin C, Lemaire C, Mericskay M, Veksler V, Ventura-Clapier R, Garnier A, Piquereau J. Inducible cardiac-specific deletion of sirt1 in male mice reveals progressive cardiac dysfunction and sensitization of the heart to pressure overload. *Int J Mol Sci*, 2019; 20(20): 1-22.

Schaue D and McBride WH. Opportunities and Challenges of Radiotherapy for Treating Cancer. *Nat Rev Clin Oncol*, 2015; 12 (9), 527-540.

Schilling J, Lai L, Sambandam N, Dey CE, Leone TC, Kelly DP. Toll-like receptor-mediated inflammatory signaling reprograms cardiac energy metabolism by repressing

peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator-1 signaling. *Circ Heart Fail*, 2011; 4: 474-482.

Schug TT, Xu Q, Gao H, Peres-da-Silva A, Draper DW, Fessler MB, et al. Myeloid deletion of SIRT1 induces inflammatory signaling in response to environmental stress. *Mol Cell Biol*, 2010; 30(19): 4712-21.

Sen S, Chakraborty R, Sridhar C, Reddy YSR, De B. Free radicals, antioxidants, diseases and phytomedicines: Current status and future prospect. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 2010; 3(1): 91-100.

Sen S, Chakraborty R. The Role of Antioxidants in Human Health. *Oxidative Stress: Diagnostics, Prevention and Therapy*, American Chemical Society, Washington DC, 2011, Chapter 1: 1-37.

Sharma M, Mohapatra J, Wagh A, Patel HM, Pandey D, Kadam S, Argade A, Deshpande SS, Shah GB, Chatterjee A, Jain MR. Involvement of TACE in colon inflammation: a novel mechanism of regulation via SIRT-1 activation. *Cytokine*, 2014; 66(1): 30-39.

Sharma S, Haldar C. Melatonin prevents X-ray irradiation induced oxidative damage in peripheral blood and spleen of the seasonally breeding rodent, *Funambulus pennanti* during reproductively active phase. *Int J Radiat Biol*, 2006; 82(6): 411-419.

Shen Y, Jiang X, Meng L, Xia C, Zhang L, and Xin Y. Transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells prevents radiation- induced artery injury by suppressing oxidative stress and inflammation. *Oxid Med Cell Longev*, 2018; 2018: 5942916.

Shih RH, Wang CY, Yang CM. NF-kappaB signaling pathways in neurological inflammation: a mini review. *Front. Mol. Neurosci*, 2015; 8: 77.

Shuang R, Rui X, Wenfang L. Phytosterols and dementia. *Plant Foods for Human Nutrition*, 2016; 71(4): 347-354.

Shulman HM, McDonald GB, Matthews D, Doney KC, Kopecky KJ, Gauvreau JM et al. An analysis of hepatic venoocclusive disease and centrilobular hepatic degeneration following bone marrow transplantation. *Gastroenterology*, 1980; 79: 1178-1191.

Sies H. Oxidative stress: A concept in redox biology and medicine. *Redox Biol*, 2015, 4, 180-183.

Singh M and Jadhav HR. Melatonin: functions and ligands. *Drug Discov Today*, 2014; 19: 1410-1418.

Slominski RM, Reiter RJ, Schlabritz-Loutsevitch N, et al. Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: distribution and functions. *Mol Cell Endocrinol*, 2012; 351:152-166.

Sossey-Alaoui K, Pluskota E, Szpak D, Schiemann WP, Plow EF. The Kindlin-2 regulation of epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer metastasis is mediated through miR-200b. *Sci Rep*, 2018; 8(1): 7360.

Srinivasan M, Devipriya N, Kalpana KB, Menon VP. Effect of curcumin analog on gamma-radiation-induced cellular changes in primary culture of isolated rat hepatocytes in vitro *Chem. Biol. Interact*, 2008; 176: 1-8.

Tahamtan R, Monfared AS, Tahamtani Y, Tavassoli A. Radioprotective effect of melatonin on radiation-induced lung injury and lipid peroxidation in rats. *Cell J*, 2015; 17(1): 111-20.

Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*, 2008; 9: 231-241.

Taysi S, Koc M, Büyükokuroğlu ME, Altinkaynak K, Sahin YN. Melatonin reduces lipid peroxidation and nitric oxide during irradiation-induced oxidative injury in the rat liver. *J Pineal Res*. 2003; 34(3): 173-7.

Torres-Cuevas I, Parra-Llorca A, Sanchez-Illana A, Nunez-Ramiro A, Kuligowski J, Chafer-Pericas C, Cernada M, Escobar J, Vento M. Oxygen and oxidative stress in the perinatal period. *Redox Biol*, 2017; 12: 674-681.

Unur E, Ülger H, Ekinçi N. *Anatomi. Kıvılcım Kitabevi, Kayseri, 2009.*

Uslu GH, Canyılmaz E, Serdar L, Ersöz Ş. Protective effects of genistein and melatonin on mouse liver injury induced by whole body ionising radiation. *Molecular and Clinical Oncology*, 2019; 10: 261-266.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007; 39: 44-84.

Varatharajulu R, Garige M, Leckey LC, Arellanes-Robledo J, Reyes-Gordillo K, Shah R, Lakshman MR. Adverse signaling of scavenger receptor class B1 and PGC1s in alcoholic hepatosteatosis and steatohepatitis and protection by betaine in rat. *Am J Pathol*, 2014; 184(7): 2035-44.

Vaziri H, Dessain SK, Ng Eaton E, et al. hSIR2 (SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell*, 2001; 107: 149-59.

Veal E, Jackson T, Latimer H. Role/s of 'Antioxidant' Enzymes in Ageing. *Subcell Biochem*, 2018; 90: 425-450.

Vijayalaxmi V, Reiter RJ, Tan DX, et al. Melatonin as a radioprotective agent: a review. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 2004; 59(3): 639-653.

Volt H, Garcia JA, Doerrier C, Diaz-Casado ME, Guerra-Librero A, Lopez LC, et al. Same molecule but different expression: aging and sepsis trigger NLRP3 inflammasome activation, a target of melatonin. *J Pineal Res.* 2016; 60(2): 193-205.

Wang B, Wei J, Meng L, Wang H, Qu C, Chen X, et al. Advances in pathogenic mechanisms and management of radiation-induced fibrosis. *Biomed Pharmacother.* 2020; 121: 109560.

Wang C, Xia Y, Zheng Y, Dai W, Wang F, Chen K, Li J, Li S, Zhu R, Yang J, Yin Q, Zhang H, Wang J, Lu J, Zhou Y, Guo C. Protective effects of N-acetylcysteine in concanavalin A induced hepatitis in mice. *Mediators Inflamm.* 2015; 2015: 1-17.

Wang S, Lee Y, Kim J, Hyun J, Lee K, Kim Y et al. Potential role of Hedgehog pathway in liver response to radiation. *PLoS ONE*, 2013; 8: e74141.

Wang RH, Li C, Deng CX. Liver steatosis and increased ChREBP expression in mice carrying a liver specific SIRT1 null mutation under a normal feeding condition. *Int J Biol Sci.* 2010; 6: 682-690.

Wang S, Wan T, Ye M, Qiu Y, Pei L, Jiang R, Pang N, Huang Y, Liang B, Ling W, Lin X, Zhang Z, Yang L. Nicotinamide riboside attenuates alcohol induced liver injuries via activation of Sirt1/PGC-1 $\alpha$ /mitochondrial biosynthesis pathway. *Redox Biol.* 2018; 17: 89-98.

Wang YQ, Cao Q, Wang F, et al. SIRT1 protects against oxidative stress-induced endothelial progenitor cells apoptosis by inhibiting FOXO3a via FOXO3a ubiquitination and degradation. *J Cell Physiol.* 2015; 230(9): 2098-2107.

Wang S, He G, Chen, M, Zuo T, Xu W, Liu, X. The Role of Antioxidant Enzymes in the Ovaries. *Oxidative Med Cell Longev.* 2017; 2017: 1-14.

Wei J, Wang B, Wang H, Meng L, Zhao Q, Li X, et al. Radiation-induced normal tissue damage: oxidative stress and epigenetic mechanisms. *Oxid Med Cell Longev.* 2019; 12: 1-11.

Yahyapour R, Shabeeb D, Cheki M, Musa AE, Farhood B, Rezaeyan A et al. Radiation protection and mitigation by natural antioxidants and flavonoids; implications to radiotherapy and radiation disasters. *Curr Mol Pharmacol.* 2018; 11(4): 285-304.

Yang XD, Tajkhorshid E, Chen LF. Functional interplay between acetylation and methylation of the RelA subunit of NF-kappaB. *Mol Cell Biol.* 2010; 30(9): 2170-80.

Yao H, Rahman I. Perspectives on translational and therapeutic aspects of SIRT1 in inflammaging and senescence. *Biochem Pharmacol.* 2012; 84: 1332-1339.

Yeung F, Hoberg JE, Ramsey CS, Keller MD, Jones DR, Frye RA, Mayo MW. Modulation of NF- $\kappa$ B-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *The EMBO Journal*, 2004; 23(12), 2369-2380.

Yu GM, Kubota H, Okita M, Maeda T. The anti-inflammatory and antioxidant effects of melatonin on LPS-stimulated bovine mammary epithelial cells. *PLoS One*, 2017;12(5): e0178525.

Yu H, Dickson EJ, Jung S-R, Koh D-S, Hille B. High membrane permeability for melatonin. *J Gen Physiol*, 2016;147(1): 63-76.

Yuan Z, Zhang X, Sengupta N, Lane WS, Seto E. SIRT1 regulates the function of the Nijmegen breakage syndrome protein. *Mol Cell*, 2007; 27: 149-162.

Zhao S, Li T, Li J, Lu Q, Han C, Wang N, et al. miR-23b-3p induces the cellular metabolic memory of high glucose in diabetic retinopathy through a SIRT1-dependent signalling pathway. *Diabetologia*, 2016; 59(3): 644-54.

Zhu Y, Wang K, Ma Z, Liu D, Yang Y, Sun M, Wen A, Hao Y, Ma S, Ren F, Xin Z, Li Y, Di S, Liu J. SIRT1 activation by butein attenuates sepsis-induced brain injury in mice subjected to cecal ligation and puncture via alleviating inflammatory and oxidative stress, *Toxicol. Appl. Pharmacol*, 2019; 363: 34-46.

Zorn A. Liver development (October 31, 2008), *StemBook*, ed. The Stem Cell

**EKLER**

**ETİK KURUL KARARI**



T.C.  
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ  
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU  
(EÜHADYEK)



Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 14.02.2018 tarihinde Prof. Dr. Fahri OĞUZKAYA'nın başkanlığında toplanmıştır.

Üye Adı/Soyadı	Ünvanı	Bölümü
Fahri OĞUZKAYA	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi
Coşkun TEZ	Prof. Dr.	Fen Fakültesi
Gültekin ATALAN	Prof. Dr.	Veteriner Fakültesi
Füsun Ferda ERDOĞAN	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi
Serpil SARIÖZKAN	Prof. Dr.	Veteriner Fakültesi
Ahmet ÖZTÜRK	Doç. Dr.	Tıp Fakültesi
Zühal HAMURCU	Doç. Dr.	Tıp Fakültesi
M. Betül AYCAN	Doç. Dr.	Eczacılık Fakültesi
Sezer DEMİRBUĞA	Doç. Dr.	Diş Hekimliği Fakültesi
Nalan Hakime NOĞAY	Doç. Dr.	Sağlık Bilimleri Fakültesi
Çağrı Çağlar SİNMEZ	Yard.Doç. Dr.	Veteriner Fakültesi
Burcu ÜNLÜ ENDİRLİK	Yard.Doç. Dr.	Eczacılık Fakültesi
Osman İBİŞ	Yard.Doç. Dr.	Ziraat Fakültesi
Zeynep SOYER SARICA	Dr.	Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Arş.Mrkz.
Serap ALTUNTAŞ EROĞLU	Avukat	Kurumla İlişkisi Olmayan Üye
Asiye GÖKBELEN	Yardım Sevenler Derneği Başkanı	Sivil Toplum Kuruluşu Temsilcisi

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji A.D.'dan Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR tarafından sunulan "Radyasyon ile Oluşturulmuş Deneysel Karaciğer Hasarı Üzerine Melatoninin Antioksidatif ve Anti-inflamatuar Etkilerinin Araştırılması" başlıklı proje incelenerek çalışmanın yapılmasının uygun olacağına ve Rektörlük makamına sunulmasına oybirliğiyle karar verildi.

Tarih

Etik kurul Başkanı

İmza

## İNTİHAL RAPORU

### RADYASYON İLE OLUŞTURULMUŞ DENEYSEL KARACİĞER HASARI ÜZERİNE MELATONİNİN ANTİOKSİDATİF VE ANTİ-İNFLAMATUAR ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

ORJİNALLİK RAPORU

% **12**  
BENZERLİK ENDEKSİ

% **10**  
İNTERNET KAYNAKLARI

% **5**  
YAYINLAR

% **7**  
ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

<b>1</b>	<b>Submitted to Erciyes Üniversitesi</b> Öğrenci Ödevi	% <b>4</b>
<b>2</b>	<b>www.firattipdergisi.com</b> İnternet Kaynağı	% <b>1</b>
<b>3</b>	<b>www.emo.org.tr</b> İnternet Kaynağı	% <b>1</b>
<b>4</b>	<b>acikbilim.yok.gov.tr</b> İnternet Kaynağı	% <b>1</b>
<b>5</b>	<b>Submitted to Istanbul University</b> Öğrenci Ödevi	% <b>1</b>
<b>6</b>	<b>dspace.gazi.edu.tr</b> İnternet Kaynağı	<% <b>1</b>
<b>7</b>	<b>2793ed39-269b-4a6e-bfbb-1dd53eb9ddcb.filesusr.com</b> İnternet Kaynağı	<% <b>1</b>
<b>8</b>	<b>www.hindawi.com</b> İnternet Kaynağı	<% <b>1</b>

## ÖZGEÇMİŞ

**Adı Soyadı** : Betül YALÇIN

**İletişim Bilgileri**  
**Adres**

**Telefon**  
**Mail**

**Doğum Tarihi /Yeri**

**Unvanı**

**Öğrenim Durumu** :

<b>Derece</b>	<b>Alan</b>	<b>Üniversite</b>	<b>Yıl</b>
<b>Lisans</b>	Biyoloji	Erciyes Üniversitesi	2005-2009
<b>Yüksek Lisans</b>	Histoloji-Embriyoloji	Erciyes Üniversitesi	2011-2015
<b>Doktora</b>	Histoloji-Embriyoloji	Erciyes Üniversitesi	2016-Halen

**Yüksek Lisans Tezi;** Doğum Sonrası Gelişim Dönemlerindeki Sıçan Uterus Dokusunda Kök Hücre Varlığının Araştırılması

**Doktora Tezi;** Radyasyon ile Oluşturulmuş Deneysel Karaciğer Hasarı Üzerine Melatoninin Antioksidatif ve Antiinflamatuvar Etkilerinin Araştırılması

**Yabancı Dil;** 87,50 (Yökdil)

### A. Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

- A1. Sarioğlu N, Sunay FB, Yay AH, Korkut O, Erel F, Hişmioğullari AA, Kōse M, Yalçın B. Anti-inflammatory effects of adalimumab, tocilizumab, and steroid on lipopolysaccharide-induced lung injury. *Turk J Med Sci*, 2021; 51: 1-11.
- A2. Ūlger M, Sezer G, Őzyazgan İ, Őzocak H, Yay A, Balcıođlu E, Yalçın B, Gōç R, Ūlger B, Őzyazgan TM, Yakan B. The Effect of Erythropoietin and Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells on Nerve Regeneration in Rats with Sciatic Nerve İnjury. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 2021; 114: 1-14.
- A3. Karabulut D, Kaymak E, Yalçın B, Ulger H, Ketı D. A different perspective on the filtration barrier after kidney stone formation: An immunohistochemical and biochemical study. *Urolithiasis*, 2020; 49 (3): 201-210.
- A4. Yılmaz S, Gōçmen AY, Arıkan ES, Akyüz E, Tokpınar A, Nisari M, Unur E, Yay AH, Yalçın B, et al. The protective role of melatonin against the effects of different doses of caffeine on the fetus. *Cellular And Molecular Biology*, 2020; 66: 169-178.
- A5. Yılmaz S, Alpa S, Gocmen AY, Ulger H, Arslan E, Yay AH, Ertekin T, Nisari M, Yalcin B. The investigation of the antitumoral effect of *Cornus mas* L in mice with ehrlich solid tumor. *Bratislava Medical Journal-Bratislavske Lekarske Listy*, 2020; 121, 22-30.
- A6. Yildirim AB, Karabulut D, Ozturk E, Kaymak E, Yalçın B, Kuloğlu N, Akkus E. Alterations in the immunoreactivity of laminin, type IV collagen and  $\alpha3\beta1$  integrin in diabetic rat ovarian follicles. *Bratislavske lekarske listy*, 2020; 121: 340-347.
- A7. Yildirim AB, Ozdamar S, Yalcın B, Karabulut D. Changes in MAP-2 and GFAP immunoreactivity in pup hippocampus during prepubertal and pubertal periods caused by maternal subclinical hypothyroidism. *Eur. J. Anat.* 2019; 23 (1): 27-40.
- A8. Akbulut S, Yağci A, Yay AH, Yalçın B. Experimental investigation of effects of platelet-rich plasma on early phases of orthodontic tooth movement. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, 2019; 155: 71-79.
- A9. Korkut S, Őzdemir A, Yay AH, Yalçın B, Ceylan M, Korkmaz L, et al. Obestatin Reduces Intestinal Damage in Experimental Necrotizing Enterocolitis in Newborn Rats. *American Journal Of Perinatology*, 2018; 1: 1-10.
- A10. Sarı ES, Yazıcı A, Akşit H, Yay AH, şahin G, Yıldız O, Ermiş SS, Seyrek K, Yalçın B. İnhibitory Effect of Sub-conjunctival Tocilizumab on Alkali Burn Induced Corneal Neovascularization in Rats. *Current Eye Research*, 2015; 40: 48-55.
- A11. Bahadır A, Ceyhan A, Gergin OO, Yalçın B, Ūlger M, Őzyazgan TM, et al. Protective effects of curcumin and beta-carotene on cisplatin induced cardiotoxicity: An experimental rat model. *Anatolian Journal of Cardiology*, 2018; 19: 213-221.

**B. Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (Proceeding) basılan bildiriler.**

- B1. Yay AH, Gölgele A, Yalçın B, Yazgan K, Keklik E, et al. Brain Tissue Plasticity in High Fat Diet Fed and Fasting Rats. XXIV. International Symposium on Morphological Sciences, İstanbul, Türkiye, 2-6 Eylül 2015, 167-168. (Poster Bildiri)
- B2. Yazgan K, Yıldırım RT, İnce Z, Gölgele A, Yalçın B. Effect of Shortly the Ethyl Alcohol Consumption Certain Blood Levels in Female Rats. XXIV. International symposium on morphological sciences, İstanbul, Türkiye, 2-6 Eylül 2015, 226-227. (Poster Bildiri)
- B3. Yazgan K, Gölgele A, Yalçın B. Effects of monosodium l-glutamate BMI and visceral organs in male and female rats. XXIV. International Symposium on Morphological Sciences, İstanbul, Türkiye, 2-6 Eylül 2015, 168-169. (Poster Bildiri).
- B4. Yıldırım AB, Özdamar S, Kaymak E, Sakalar C, Yalçın B, Sezen S. The Immunoreactivity of Cytochrome P450 Aromatase in Testes of Rats Whose Mothers Had Hypothyroidism. 2nd International Conference on Recent Advances in Medical and Health Sciences (ICRAMHS), Paris, Fransa, 11 Ekim 2015. (Sözlü Bildiri).
- B5. Gölgele A, Yazgan K, Yalçın B. Effects of Emotional Behavior Investigation E621's in Male and Female Rats. Acta Physiologica, 2015; 215: 64-65
- B6. Yıldırım AB, Özdamar S, Yalçın B. Histopathological Evaluation of Hippocampal Astrocytes in Pre-pubertal and Pubertal Pups of Mothers with Hypothyroidism. International Congress of Histochemistry and Cytochemistry, Antalya, Turkey, 18-21 Mayıs 2017. (Poster Bildiri).
- B7. Ceylan T, Kaymak E, Yalçın B, Cantürk F, Yakan B. Investigation of Protective Effect of Caffeic Acid Phenethyl Ester on Testicular Damage Which Was Caused by Cisplatin. 15th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry, Antalya, Turkey, 18-21 Mayıs 2017, 366-366.
- B8. Yıldırım AB, Özdamar S, Yalçın B, Yay A. Hypothyroidism Changes the Immunoreactivity of MAP-2 in the Adult Rat Cerebral Cortex. International Congress of Histochemistry and Cytochemistry, Antalya, Turkey, 18-21 Mayıs 2017. (Poster Bildiri).
- B9. Ceylan T, Kaymak E, Yalçın B, Yakan B. Protective Effect of Caffeic Acid Phenethyl Ester Against Cisplatin-Induced Nephrotoxicity in Rats. 15th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry, Antalya, Turkey, 18-21 Mayıs 2017. 456-456.
- B10. Cantürk Tan F, Karamazı Y, Uçar S, Daşdağ S, Yalçın B, Tan B. The prenatale effect to ossification of exposure to radiofrequency-electromagnetic field. Acta Physiologica, 2018; 225: 66.
- B11. Cantürk Tan F, Önder GÖ, Tan B, Karamazı Y, Yay AH, Daşdağ S, Yalçın B et al. Teratogenic effects of exposure to radiofrequency electromagnetic field on histopathological and on hippocampal levels of MAPKs on rats brain. Acta Physiologica, 2018; 225: 30.
- B12. Bakkaloğlu U, Babur E, Tan B, Yalçın B, Yay AH, Gölgele A. The effect of agomelatine on

neurogenesis in depressive rats. *Acta Physiologica*, 2018; 225: 35.

B13. Karamazi Y, Cantürk Tan F, Uçar S, Daşdağ S, Yalçın B, Tan B. 2450 MHz elektromanyetik alan sıçan fetüsünde kemikleşmeyi artırır. *International Congress on Sports, Anthropology, Nutrition, Anatomy and Radiology (SANAR2018)*, Nevşehir, Türkiye, 3-5 Mayıs 2018, 13-14.

B14. Karamazi Y, Cantürk Tan F, Önder GÖ, Yalçın B, Yay AH, Tan B, et al. Sıçanların fetüsünde elektromanyetik alanın neden olduğu karaciğer hasarında histopatolojik değişiklikler. *International Congress on Sports, Anthropology, Nutrition, Anatomy and Radiology (SANAR2018)*, Nevşehir, Türkiye, 3-5 Mayıs 2018, 10-11.

B15. Uçar I, Degermenci M, Yılmaz S, Yay AH, Yalçın B, Unur E. Possible teratogenic effect of paracetamol on the development of rat's lower extremity bone. *19th National Anatomy Congress & 1st International Mediterranean Anatomy Congress*, Konya, Turkey, 6-9 Eylül 2018, 12: 2; 163-164.

B16. Göktepe Ö, Balcıoğlu E, Özkul T, Yay AH, Yalçın B, Aydoğan S. Deneysel diyabet oluşturulan sıçanlarda HNGF6A ve antihiperglisemik ilaçların böbrek dokusu üzerine etkisi. *Çukurova I. Uluslararası Multidisipliner Çalışmalar Kongresi*, Adana, Turkey, 13-16 December 2018, 1223-1231.

B17. Göktepe Ö, Baran MB, Cantürk Tan F, Yalçın B, Balcıoğlu E, Özyazgan TM, Yay AH, Yıldız OG. Radyasyona Bağlı İnce Bağırsak Hasarına Karşı Quersetinin Koruyucu ve İyileştirici Etkisi. *Middle East International Conference on Contemporary Scientific Studies-V*, Ankara, Turkey, 27-28 March 2021, 507-516.

B18. Yalçın B, Göktepe Ö, Baran MB, Ülger M, Cantürk Tan F, Yay AH. Radyasyonun Neden Olduğu Kolon Hasarına Karşı Quersetinin Etkisi. *Middle East International Conference on Contemporary Scientific Studies-VI*, Beirut, Lebanon, 20-22 September 2021, 507-516.

### **C. Ulusal hakemli dergilerde yayınlanan makaleler**

C1. Balcıoğlu E, Bilgici P, Yalçın B, Yay AH, Bolat D, Ceyhan A, Somdaş MA. Histological examination of structural changes in the cochlear canal. *KBB Uygulamaları*, 2021; 9(1):12-17.

C2. Yalçın B, Balcıoğlu E, Yay AH, Önder GÖ, Bilgici P, Somdaş MA. Investigation of the Histological Structure of Cochlea and Corti under Light and Electron Microscope. *KBB Uygulamaları*, 2020; 8(3):160-164.

C3. Karabulut D, Kaymak E, Yalçın B, Ülger H, Akın AT, Öztürk E. Etilen Glikolün Mide Üzerine Etkisi: Histolojik Çalışma. *Bozok Tıp Dergisi*, 2020; 10: 111-116.

C4. Balcıoğlu E, Yalçın B, Önder GÖ. Metoksiklorun böbrek ve karaciğer dokusu üzerine etkisi. *Sağlık Bilimleri Dergisi*, 2019; 28(2): 57-61.

**Katıldığı ve devam etmekte olan projeler;**

Farelerde oluşturulan Encephalitozoon intestinalis enfeksiyonunda albendazolün mikrosporisidal etkinliğinin vinposetin ile artırılması (BAP- THD-2021-10888)

Karbamazepin'in Embriyonal Kemik Gelişimi Üzerine Teratojenik Etkilerinin Araştırılması (BAP- TKB-2020-9988)

Sisplatin ile Hepatotoksisite Oluşturulan Ratlarda N-Asetilsistein'in Bazı Oksidatif Stres Parametrelerine Etkisi (BAP- TDK-2015-5881)

Metotreksatın Neden Olduğu Hepatotoksisitede Luteolinin Etkisinin Değerlendirilmesi (BAP- TYL-2017-7577)

Fruktozun in vitro embriyo kültürü ve vitellus kesesi damarlanması üzerine olası etkisi (BAP- TYL-2020-10011)

Serbest dişeti grefti uygulamalarında trehaloz solüsyonunun sıçanlarda doku iyileşmesi üzerine etkisinin incelenmesi (BAP- TDK-2020-9984)

**Katıldığı Bilimsel Kongre / Sempozyum ve Bilimsel Toplantılar**

Işık (Optik) Mikroskopisi Kursu, Antalya, Mayıs 2018

14.Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, Mayıs 2018

13.Ulusal Histoloji ve Embriyoloji kongresi, İzmir, Mayıs 2016

2.Hematogenetik Sempozyumu, Gaziantep, Kasım 2015

3.Ulusal Deney Hayvanları Bilim Kongresi, Eylül 2013

3.Uluslararası katılımlı deneysel hematoloji kongresi, Mayıs 2016

XXIV International Symposium on Morphological Sciences, İstanbul, Eylül 2015

