

Deneysel Araştırma

PET/BT Uygulamasının Sıçan Beyin Dokusunda TRPM2 ve Apoptozis Üzerine Etkileri

Fikri Selçuk ŞİMŞEK^{a1}, Tuncay KULOĞLU²

¹Elazığ Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Nükleer Tıp, Elazığ, Türkiye

²Firat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji, Elazığ, Türkiye

ÖZET

Amaç: Bu çalışma ile PET/BT uygulanan sıçanların beyin dokularında oksidatif hasarla etkileşimi bilinen Transient Reseptör Potansiyel Melastatin 2 (TRPM2) iyon kanallarının immünreaktivitesinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada 20 adet Sprague Dawley cinsi dişi sıçan kullanıldı. Denekler 4 gruba ayrıldı. Grup I' deki sıçanlar kontrol olarak kullanıldı. Grup II' yi oluşturan sıçanlara deneyin ilk günü BT çekildi, grup III' teki sıçanlara deneyin ilk günü tek doz 1 mci-2-floro-2-Deoksi-D-Glukoz (FDG) uygulamasını takiben 1 saat sonra PET/BT çekildi. Grup IV' ü oluşturan sıçanlara ise yine deneyin birinci günü tek doz 1mci dozunda FDG uygulandı. Deney sonunda sıçanlar anestezisi altında dekapite edildi ve beyin dokuları çıkartıldı. Rutin takipler yapılarak dokular parafin bloklara gömüldü. Bloklardan alınan kesitlere apoptozisin değerlendirilmesi için TUNEL boyama, TRPM2 ve *Malondialdehit* (MDA) ekspresyonları için avidin-biotin-peroksidaz yöntemi uygulandı. TUNEL ve immunohistokimyasal boyama sonrası dokular ışık mikroskopunda incelenerek fotoğraflandı ve istatistiksel analizleri yapıldı.

Bulgular: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında diğer tüm gruplarda sıçan beyin dokularında apoptotik indeks ile TRPM2 ve MDA immünreaktivitelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık izlenmedi.

Sonuç: Bu çalışma ile PET/BT uygulanmasının sıçan beyin dokularında apoptozise neden olmadığı, TRPM2 iyon kanalları ve MDA ekspresyonları üzerine önemli bir etkisinin bulunmadığı kanaatine varıldı.

Anahtar Kelimeler: PET/BT, Sıçan, Beyin, TRPM2, MDA

ABSTRACT

The Effects of PET/CT Application on TRPM2 and Apoptosis in Rat Brain Tissue

Objective: In this study it was aimed to examine the immunoreactivity of Transient Receptor Potential Melastatin 2 (TRPM2) ion channels which has a known interaction with oxidative damage in the brain tissues of rats undergoing PET/CT.

Material and Method: In this study 20 adult Sprague Dawley female rats were used. The rats were divided in to 4 groups. Group I was used as control. On 1st day of experimental study computed tomography administered to the second group, to the third group a single dose 1mci FDG was injected and PET/CT was performed after 1 hour. To the fourth group the single dose of 1mci FDG was injected on 1st day of the experimental study. Rats were decapitated and brain tissues were removed. Routine follow up was performed and tissues were embedded in paraffin blocks. Sections taken from the blocks were administrated tunnel staining for apoptosis and avidin-biotin-peroxidase method for TRPM2 and MDA. Tissues were examined in the light microscope and photographed and then statistical analysis was performed.

Results: When compared with the control group, in all other groups no significant differences were determined in brain tissues for apoptotic index, TRPM2 and MDA immunoreactivities.

Conclusion: In this study, we concluded that, PET/CT imagining doesn't cause apoptosis in rat brain tissue, moreover there is no significant effect on TRPM2 ion channels and MDA expressions.

Key Words: PET/CT, Rat, Brain, TRPM2, MDA

Tıp alanında hastalıkların tanı ve tedavisinde radyoaktif ışınların (X ışınları) ve maddelerin kullanımı çok yaygındır (1). PET; bozulan ve pozitron yayan radyonüklidlerin anihilasyon fotonlarının kaydedilmesi sonucu, dokularda bu radyo farmasötüğün dağılımının saptandığı bir görüntüleme yöntemidir.

Diğer nükleer tıp görüntüleme yöntemlerinde olduğu gibi bu yöntem de temel olarak fonksiyonel-metabolik aktivite ile ilgili bilgi verir (2).

Bazı ilaçlar, ağır metallere maruziyet, çevre kirliliği, ultraviyole ışınları ve iyonize radyasyon gibi

^aYazışma Adresi: Dr. Fikri Selçuk ŞİMŞEK, Elazığ Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Nükleer Tıp, Elazığ, Türkiye

Tel: 0 424 2370000

Geliş Tarihi/Received: 16.07.2014

e-mail: tkuloglu@firat.edu.tr

Kabul Tarihi/Accepted: 11.08.2014

çeşitli faktörler biyolojik sistemlerde serbest radikallerin oluşumuna yol açmaktadırlar (3).

İyonize radyasyon hücrede direkt ve indirekt yollarla hasar oluşturmaktadır. Hücre içerisindeki moleküllerin ve özellikle DNA'nın bir elektron ile direkt iyonizasyonu bu hasarın bir bölümünden sorumlu iken hasarın esas kısmından temelde su molekülünün iyonize radyasyon maruziyeti sonucu parçalanarak serbest oksijen radikallerini meydana getirmesi sorumlu tutulmaktadır (4, 5).

Dış yörüngelerinde paylaşılmamış elektron taşıyan ve bu sebeple kararsız olan moleküller serbest radikal olarak adlandırılmaktadır. Bu moleküller vücuttaki fizyolojik süreçlerde ve patolojik durumlarda sıklıkla ortaya çıkmaktadır (6).

Vücuttaki oksijenin yaklaşık %20'si başta beyin olmak üzere merkezi sinir sisteminde tüketilmektedir. Aynı zamanda merkezi sinir sistemi yüksek metabolik aktiviteye sahiptir. Bu nedenlerle serbest radikal oluşum oranı oldukça yüksektir (7). Çeşitli çalışmalarda oksidatif stres nedeniyle beyin ve arka kök gangliyon hücrelerinde meydana gelen hasarın bazı nörolojik hastalıkların oluşumunda önemli etkenlerden biri olabileceği ortaya konmuştur (6, 7).

Transient Reseptör Potansiyel Melastatin olarak adlandırılan kanalların sekiz farklı tipi bulunmaktadır. İyonların geçişi beşinci ve altıncı segmentlerin arasından meydana gelmektedir.

Transient receptor potential melastatin 2 non-selektif bir katyon kanalıdır ve hücre içine kalsiyum ile sodyum iyonlarının girişini sağlar (8-15). TRPM2 kanalları beyin ve kemik iliğinde tespit edilebildiği gibi, gastrointestinal ve genitouriner sistem organları ile iskelet kası ve lökositlerde de saptanmıştır (14). TRPM2'nin C terminal bölgesinde adenine 5'-diphosphoribose pirofosfat (ADPR) aktivitesi vardır ve burada ADPR yıkılarak AMP ve Ribose 5-fosfat oluşumu sağlanarak kanal aktive edilir (9). Hücrede ADPR artışı, TRPM kanalının aktivasyonunu sağlar (16). TRPM2 ayrıca oksidatif stres, hidrojen peroksit (H_2O_2) ile de uyarılabilir ve hücre içine kalsiyum akışı sağlanabilir. İntrasellüler kalsiyum artışı ise hücrede birçok yapısal ve fonksiyonel değişikliklere yol açar, sonuçta hücre ölümüne kadar varabilen patolojik olaylara sebep olur (12, 13). Yağ asitleri ve kolesterol gibi hücre membranında bol bulunan lipidler serbest radikaller tarafından etkilenmekte ve burada lipid peroksidasyonu sonucu çeşitli maddeler oluşmaktadır. Yağ asidi peroksidasyonu sonucu oluşan son ürünlerden biri olan malondialdehit (MDA), yapısında üç veya üçten fazla çift bağ bulunan yağ asitlerinden meydana gelmektedir. MDA, DNA molekülünde mutasyonlara yol açan bazı etkilerinin olduğu çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur (17-20).

Bu çalışma ile BT, FDG ve PET/BT uygulanan sıçanların beyin dokularında oksidatif hasarla etkileşimi bilinen TRPM2 iyon kanalları ile MDA immünre aktivitesinin incelenmesi, ayrıca bu görüntüleme yöntemlerinin apoptozise neden olup olmadığının saptanması amaçlandı.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma 26.03.2014 tarih ve 82 sayılı Fırat Üniversitesi etik kurul kararı ile onay alındıktan sonra gerçekleştirildi. Çalışmada Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezi'nden (FÜDAM) temin edilen 20 adet erişkin Sprague Dawley cinsi dişi sıçan kullanıldı. Deney hayvanları her grupta 5 hayvan olacak şekilde 4 eşit gruba ayrıldı.

Kontrol grubu: Bu gruba deney süresi olan 24 saat boyunca hiçbir uygulama yapılmadı.

BT grubu: Deneyin 1. gününde 50 mili Amper (mA) ve 110 Kilo elektron (keV) dozda bilgisayarlı tomografi (BT) çekilen grup.

PET/BT grubu: Deneyin 1. gününde intra venöz 1mci dozunda florode oksiglukoz (FDG) injeksiyonun dan 1 saat sonra 50 mili Amper (mA) ve 110 Kilo elektron (keV) dozda PET/ BT çekilen grup.

FDG grubu: Deneyin 1. gününde intravenöz 1mci dozunda FDG injeksiyonu yapılan grup.

Tüm gruplardaki sıçanlar 24 saatlik deney sonunda ketamin (75 mg/kg) + xylazine (10 mg/kg) anestezisi altında dekapite edilerek beyin dokuları hızla çıkartılıp % 10'luk formaldehitte tespit edilerek rutin doku takibi sonrasında parafine gömüldü.

İMMUNOHİSTOKİMYASAL ÇALIŞMA

Parafin bloklardan 4-6 µm kalınlığında alınan kesitler polilizinli lamlara alındı. Deparafinize edilen dokular dereceli alkol serilerinden geçirilip antigen retrieval için sitrat tampon solüsyonunda pH:6'da mikrodalga fırında (750W) 10 dakika kaynatıldı. Ardından PBS (Phosphate Buffered Saline) ile yıkandıktan sonra endojen peroksidaz aktivitesini önlemek için hidrojen peroksit blok solüsyonu ile 5 dakika inkübe edildi (Hydrogen Peroxide Block, TA-125-HP, LabVision Corporation, USA). PBS ile 3x5 dakika yıkanan dokulara zemin boyasını engellemek için 5 dakika Ultra V Block (TA-125-UB, Lab Vision Corporation, USA) solüsyonu uygulandıktan sonra 1/200 oranında dilue edilen primer antikolar (Anti-Malondialdehyde antibody, ab6463, Abcam, Cambridge, UK ve Rabbit Anti-TRPM2 Polyclonal Antibody, Bs-2888R, Bioss, Inc. USA) ile 60 dakika nemli ortamda oda ısısında inkübe edildi. Dokular, primer antikor uygulanmasından sonra PBS ile 3x5 dakika yıkandıktan sonra sekonder antikor (biotiny lated Goat Anti-Poliy valent (anti-mouse/rabbitIgG),

TP-125-BN, LabVision Corporation, USA) ile 30 dakika nemli ortamda oda ısısında inkübe edildi.

Dokular, Sekonder antikor uygulanmasından sonra PBS ile 3x5 dakika yıkayıp StreptavidinPeroxidase (TS-125-HR, LabVision Corporation, USA) ile 30 dakika nemli ortamda oda ısısında inkübe edildikten sonra PBS içerisine alındı. Dokulara 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) Substrate + AEC Chromogen (AEC Substrate, TA-015 ve HAS, AEC Chromogen, TA-002-HAC, LabVision Corporation, USA) solusyonu damlatılıp ışık mikroskopunda görüntü sinyali alındıktan sonra eş zamanlı olarak PBS ile yıkamaya alındı. Mayer's hematoksilen ile zıt boyaması yapılan dokular PBS ve distile sudan geçirilerek uygun kapatma solusyonu (Large Volume Vision Mount, TA-125-UG, LabVision Corporation, USA) ile kapatıldı. Hazırlanan preparatlar Leica DM500 mikroskopunda incelenerek değerlendirildi ve fotoğraflandı. Skala bar: 50µm

İmmünohistokimyasal boyanmanın değerlendirilmesinde boyanmanın yaygınlığı esas alındı. Sitoplazmik immün boyanmanın yaygınlığı 0'dan +3'e kadar sayı ile semi-kantitatif olarak skorlanarak (0:yok, +1:az, +2:orta, +3: şiddetli) istatistiksel analizleri yapıldı.

TUNEL METODU

Parafin bloklardan 4-6 µm kalınlığında alınan kesitler polilizinli lamlara alındı. Üretici firmanın talimatları doğrultusunda ApopTag Plus Peroxidase InSitu Apoptosis Detection Kit (Chemicon, catno: S7101, USA) kullanılarak apoptoza giden hücreler belirlendi.

Hazırlanan preparatlar araştırma mikroskopunda (Leica DM500) incelenerek değerlendirildi ve fotoğraflandı. TUNEL boyamanın değerlendirilmesinde metil green ile yeşile boyanmış çekirdekler normal, kahverengi nükleer boyanma gösteren hücreler apoptotik olarak değerlendirildi. Kesitlerde 10'luk büyütmeye rastgele seçilen alanlarda, normal ve apoptotik en az 500 hücre sayıldı. Apoptotik hücrelerin, toplam (normal + apoptotik) hücrelere oranlanması ile Apoptotik indeks (AI)'i hesaplandı. Skala bar: 20µm.

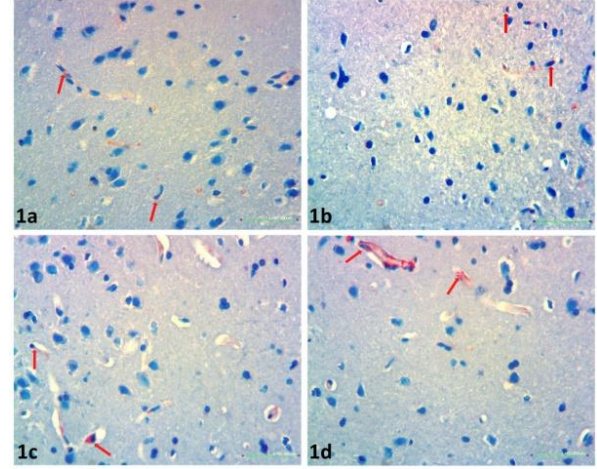
Tüm istatistiksel analizler SPSS version 22 programı kullanılarak yapıldı. Gruplar arası değerlendirme One-way ANOVA ve posthoc tukey testi ile yapıldı.

BULGULAR

İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BULGULAR

Kontrol grubu (Şekil 1a, Şekil 2a) ile karşılaştırıldığında BT (Şekil 1b, Şekil 2b), PET/BT (Şekil 1c, Şekil 2c) ve FDG (Şekil 1d, Şekil 2d) gruplarında MDA (Şekil 1) ve TRPM2 (Şekil 2)

immunreaktivitelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark izlenmedi (Tablo 1).

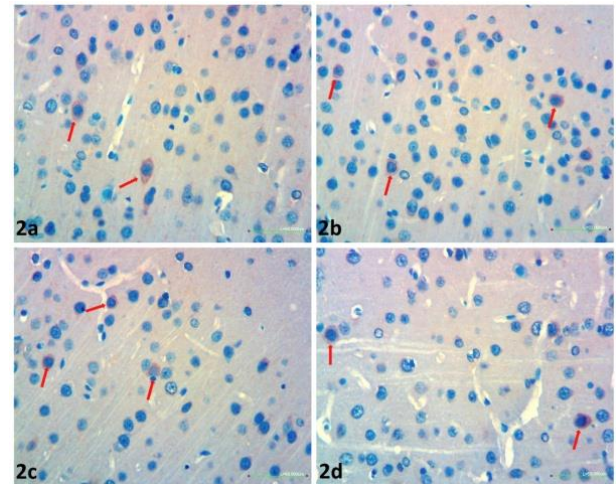


Şekil 1a. Kontrol grubuna ait beyin dokusunda MDA immunreaktivitesi (→) 1b. BT grubuna ait beyin dokusunda MDA immunreaktivitesi (→) 1c. PET/BT grubuna ait beyin dokusunda MDA immunreaktivitesi (→) 1d. FDG grubuna ait beyin dokusunda MDA immunreaktivitesi (→)

Tablo 1. MDA ve TRPM2 immunreaktiviteeleri

	MDA	TRPM2
KONTROL	1.2±0.44	2.2±0.44
BT	1.4±0.54	1.8±0.44
PET/BT	1.2±0.44	2.4±0.54
FDG	1.6±0.54	1.8±0.44

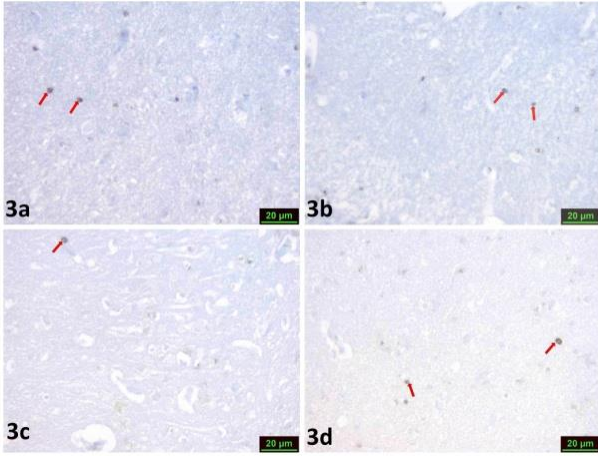
Değerler ortalama ± standart hata olarak verilmiştir.



Şekil 2a. Kontrol grubuna ait beyin dokusunda TRPM2 immunreaktivitesi (→) 2b. BT grubuna ait beyin dokusunda TRPM2 immunreaktivitesi (→) 2c. PET/BT grubuna ait beyin dokusunda TRPM2 immunreaktivitesi (→) 2d. FDG grubuna ait beyin dokusunda TRPM2 immunreaktivitesi (→)

TUNEL BULGULARI

Kontrol grubu (Şekil 3a) ile karşılaştırıldığında BT (Şekil 3b), PET/BT (Şekil 3c) ve FDG (Şekil 3d) gruplarında apoptotik indekste istatistiksel olarak anlamlı bir fark izlenmedi (Tablo 2).



Şekil 3a. Kontrol grubuna ait beyin dokusunda TUNEL pozitif hücreler (→) **3b.** BT grubuna ait beyin dokusunda TUNEL pozitif hücreler (→) **3c.** PET/BT grubuna ait beyin dokusunda TUNEL pozitif hücreler (→) **3d.** FDG grubuna ait beyin dokusunda TUNEL pozitif hücreler (→)

Tablo 2. Apoptotik İndeks (%)

	Apoptotik indeks %
Kontrol	3.50±1.87
BT	3.33±0.51
PET/BT	3.83±0.40
FDG	3.17±1.16

Değerler ortalama ± standart hata olarak verilmiştir.

TARTIŞMA

İnsan dokuları, teknolojinin ilerlemesi ile birlikte giderek artan oranda radyasyona maruz kalmaktadır. Özellikle tanısal amaçlı kullanılan çeşitli görüntüleme yöntemleriyle bu durum daha belirgin hale gelmektedir. Sonuçta radyasyona maruz kalan kişilerde bu maruziyetin oluşturduğu hasarın ortaya konması gerekmektedir. Radyasyon uygulamasından sonra serbest oksijen radikallerinin meydana geldiği ve apoptozis başta olmak üzere hücreyi ölüme götüren çok sayıda olayın oluştuğu bilinmektedir (21, 22).

İyonize radyasyon nedeniyle meydana gelen beyin hasarının mekanizması bilinmemekle birlikte sitokin aktivitesi ve oksidatif stres ile ilişkili olabileceğine dair çalışmalar vardır (22, 23). İyonize radyasyona maruziyet, reaktif oksijen radikalleri meydana getirir ve bu moleküller DNA hasarına, çeşitli hücre içi sinyal yollarında olumsuz etkiye, hücre proliferasyonunun inhibisyonuna, sonuçta apoptozis, nekroz, mitotik katastrofiye bağlı olarak hücre yaşam ve ölüm dengesinin bozulmasına yol açarlar (23, 24).

Başta merkezi ve periferik sinir sistemi olmak üzere, vücuttaki hemen hemen bütün organ ve sistemler oksidatif strese duyarlı yapılardır. Beynin oksidatif strese karşı oldukça duyarlı olması, yağ asitleri bakımından zengin olması, yüksek oranda oksijen kullanması ve içeriğinde askorbik asit gibi bazı antioksidanların düşük olması ile ilişkilidir (23-25).

Kranial radyasyon maruziyeti erişkinlerde kognitif fonksiyon kaybı gibi çeşitli yan etkilerle yol açabilmektedir. Bazı deneysel hayvan çalışmalarında, akut radyasyon maruziyetinin hafıza ve öğrenme fonksiyonlarında zayıflamaya yol açtığı ortaya konmuştur. Genç erişkin rodentlerde beyin dokusunun tek doz 5 veya 10 Gy radyasyona maruziyeti, maruziyetten üç ay sonra kognitif kayıpla ilişkili hipokampal nöroeneziste azalmayla sonuçlandığı gösterilmiştir. Ayrıca kranial radyoterapi gibi bazı radyasyon içeren yöntemlerin insan ve rodent beyin beyaz cevherinde kayba yol açtığı saptanmıştır (26-29).

Radyasyon sonrası TRPM2 iyon kanallarının aktivasyonu ile oksidatif stresin ve DNA hasarının ilişkili olduğu bilinmektedir (30-32).

TRPM2 kanallarını kodlayan gen insan genomunda 21q22.3 bölgesinde lokalize olup bipolar affektif bozukluk gibi genetik rahatsızlıklarla ilişkilidir (33). Bu kanallar oksidan strese karşı bir cevap niteliğine sahiptir (34, 35). Beyin dokusunda da diğer birçok dokuda olduğu gibi çeşitli TRP kanalları eksprese edilmekle birlikte H₂O₂ gibi oksidan stres elemanlarına karşı TRP melastatin 2 (TRPM2) kanalının sensitif olduğu saptanmıştır (13, 16). Bu kanalların aktivasyonunda ayrıca intrasellüler kalsiyum seviyesinin artışı ve ADPR'nin de rolü bulunmaktadır (12).

TRPM2 kanallarının oksidatif strese duyarlılığından dolayı serebral iskemi gibi bazı durumlarda rol oynadığı bilinmektedir. Oksidatif stresin indüklediği hücre ölümünde, hem erkeklerde hem de bayanlarda, TRPM2 kanal inhibisyonunun koruyucu rolünün olduğu ortaya konmuştur (36, 37).

Son zamanlara kadar beynin yüksek doz radyasyon maruziyetinden negatif yönde etkilendiği düşünülürken, 1989 yılında Koropatnick ve ark. (38) yaptığı bir çalışmada düşük doz radyasyon uygulamasının da beyinde bazı değişikliklere yol açabildiği gösterilmiştir. Aynı çalışmada 5 Gy'den az radyasyon uygulanan farelerin öğrenme kapasitelerinin gerilediği bildirilmiştir. İnsan beynine uygulanan 1 Gy'lik radyasyonun yorgunluk ve güç kaybına, 5 Gy'lik radyasyonun ise oryantasyon eksikliğine yol açtığı bazı çalışmalarda ortaya konmuştur (39, 40). Bunların yanı sıra radyasyona maruz bırakılan farelerde davranış bozuklukları ve öğrenme geriliği meydana geldiği dolayısıyla düşük doz radyasyon maruziyetinin nöronlarda bazı fonksiyonel kayıplara neden olabileceği ortaya konmuştur (41).

Normal beyin dokusunda radyasyon nedeniyle meydana gelen doku hasarında çalışmalar genellikle tek doz radyasyon uygulaması üzerine odaklanmıştır. Radyasyonun indüklediği beyin hasarı beyin nöronal, glial ve vasküler komponentlerine zarar verebilir ve sonuçta anatomik ve fonksiyonel bozukluklara yol açabilir. Aktif proliferatif kök/progenitor hücreler

radyasyon hasarına nöronlar gibi matür hücelere kıyasla daha duyarlıdır. Beynin tek doz radyasyon maruziyeti subventriküler alandaki nöral kök ve progenitor hücrelerde doz bağımlı olarak azalmaya yol açtığı ancak bu durumun geriye dönüşümlü olduğu bazı çalışmalarda ortaya konmuştur (42-45).

Çalışmamızda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında BT, PET/BT ve FDG gruplarında MDA ve TRPM2 immunreaktiviterinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark izlenmemekteydi. Ayrıca gruplar arasında apoptotik hücre sayılarında da farklılık gözlenmedi. Bu sonuçlar görüntüleme yöntemlerinin uygulanması sırasında verilen radyasyon dozlarının beyin dokusunda ilk 24. saatte anlamlı bir oksidatif stres oluşturmadığı şeklinde yorumlanabilir. Bellin zona ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada genç erişkin ratlara tek doz radyasyon uygulayarak 0- 48 saatlik süre içerisinde çalışmamıza benzer şekilde TUNEL yöntemi ile beyin dokusunda apoptozise giden hücreleri belirlemişlerdir. Çalışmalarında apoptotik hücrelerin ilk 6. saatte en yüksek seviyede olduğunu,

24. Saatte ise 0.saate göre bir farklılık olmadığını belirtmişlerdir (46). Çalışmamızda sadece radyasyon

uygulanmasının 24.saatine bakıldığından gruplar arası farklılık görünmemesi Bellinzona ve arkadaşlarının çalışmaları ile paralellik göstermektedir.

Çalışmamızda gruplar arası farklılıkların olmaması sirkadien ritim ile ilişkili olabilir. Zira memelilerde hücre bölünmesinin sirkadien bir ritmizlediği, dolayısıyla hücrelerin radyo sensitivite lerinin gün içerisinde farklılaşabildiği, fare ve sıçanlarda radyo terapiye bağlı mortalite veya toksik etkilerin en çok akşam saatlerinde meydana geldiği bildirilmiştir (47, 48). Çalışmamızda ise ratlar sabah saatlerinde radyasyona maruz bırakılmıştır.

Sonuç olarak, bu çalışmada kontrol ile karşılaştırıldığında, radyasyon içeren görüntüleme yöntemlerinden BT, PET ve PET/BT'nin beyin dokusunda lipidperoksidasyon ürünü olan MDA seviyelerini, apoptotik hücre sayısını ve oksidatif stresle indüklenen TRPM2 iyon kanallarının immünreaktivitesini değiştirmedeği ancak gelecekte farklı radyasyon doz ve süreleri ile yapılacak çalışmalara ihtiyaç olduğu kanaatine varıldı.

KAYNAKLAR

1. Fahey FH. PET instrumentation. RadiolClin North Am 2001; 39: 919-929.
2. Aizhi Z, Daniel L, Hyunsuk S. Metabolic PET Imaging in Cancer Detection and Therapy Response Semin Oncol 2011; 38: 55-69.
3. Cheeseman KH, Slater TF. An intro ducti onto freeradical biochemistry. BrMed Bull1993; 49: 481-493.
4. Taysi S, Memisogullari R, Koc M et al. Melatonin reduces oxidative stress in therat lens due to radiation-induced oxidative injury. Int J RadiatBiol 2008; 84: 803-808.
5. Karslioğlu I, Ertekin MV, Taysi S et al. Radioprotective effects of melatonin on radiation-induced cataract. J Radiat Re 2005; 46: 277-282.
6. Özgül C. Arka Kök Gangliyon Hücrelerinde Oksidatif Stresle Aktive Edilen TRPM2 Katyon Kanallarının İnhibisyonunda N-Asetil Sisteinin Etkisinin Patch-Clamp Sistemi ile Araştırılması T.C. Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik Anabilim Dalı Yüksek lisans Tezi 2013
7. Butterfield DA, Castegna A. Proteomics for the identification of specifically oxidized proteins in brain: technology and applicationto the study of neurod egenerative disorders. Amino Acids 2003; 25: 419-425.
8. Nazıroğlu M. Molecular Mechanisms of vitamin E on intra cellular signaling pathways in brain. In Reactive Oxygen Species and Diseases. Ed; Laszlo Goth, Research Signpost Press: Kerala, India, 2007: 239-256.
9. Nazıroglu M. New molecularmechanisms on the activation of TRPM2 channels by oxidative stress and ADP-ribose. Neurochem Res 2007; 32: 1990-2001.
10. Pan Z, Yang H, Reinach PS. Transientreceptorpotential (TRP) gene super familyen coding cation channels. Hum Genomics 2011; 5: 108-16.
11. Nilius B, Owsianik G, Voets T et al. Transient Receptor Potential cation channels in disease. Physiol Rev 2007; 87: 165-217.
12. Kühn FJ, Heiner I, Lückhoff A. TRPM2: a calcium flux path way regulated by oxidative stress and the novel second messenger ADP-ribose. Pflugers Arch 2005; 451: 212-219.
13. Hecquet CM, Malik AB. Role of H (2) O (2)-activated TRPM2 calcium channel in oxidant-induced endothe lial injury. Thromb Haemost 2009; 101: 619-25.
14. Clapham, DE. Snapshot: mammalian TRP channels. Cell 2007; 129: 220.
15. Atalay Ç, Mesane Kanserlerinde TRPM2 Gen Ekspresyonu T.C Gaziantep Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi 2011.
16. Wehage E, Eisfeld J, Heiner I et al. Activation of the cation channel long transient receptor potential channel 2 (LTRPC2) by hydrogen peroxide. A splice variant reveals a mode of activation independent of ADP-ribose. J. Biol. Chem 2002; 277: 23150-23156.
17. Ecevit H, Orak Hücre Anemili Hastalarda Oksidatif Stres Belirteci Olarak 8-Hidroksi DeoksiGuanozinMalondialdehit ve Protein Karbonil Düzeylerinin Araştırılması. T.C. Mustafa Kemal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi. 2013
18. Niki E, Antioxidant in relation to lipid peroxidation. Chem. Phy. Lipids 1987; 44: 227-253.
19. Placer CA, Cushman LL, Johnson BC. Estimation of product of lipid peroxidation (Malondyaldehyde) in biochemical systems. Anal. Biochem1990; 16: 259-264.
20. Fenech M, Chang WP, KrischVolders M et al. HUMN Project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures, Mutat. Res 2003; 534: 65-75.

21. Luchetti F, Canonico B, Curci R et al. Melatonin prevents apoptosis induced by UV-B treatment in U937 cell line. *J Pineal Res* 2006; 40: 158-167.
22. Gorman AM, Mc Gowan A, O'Neill CO et al. Oxidative stress and apoptosis in neurodegeneration. *J. Neurol. Sci* 1996; 139: 45-52.
23. Peuchen S, Bolanos JP, Heales SJ et al. Interrelationships between astrocyte function, oxidative stress and antioxidant status with in the central nervous system. *Prog. Neurobiol* 1997; 52: 261.
24. Abayomi OK, Pathogenesis of irradiation-induced cognitive dysfunction. *Acta Oncol* 1996; 35: 659-663.
25. Hall EJ. Acute effect of total body irradiation. In: *Radiobiology for the Radiologist*. Lippincott Williams and Wilkins, New York, 2000; 130-131.
26. Lazarini F, Mouthon MA, Gheusi G et al. Cellular and behavioral effects of cranial irradiation of the subventricular zone in adult mice. *PLoS ONE* 2009; 4:e7017.
27. Kim JS, Lee HJ, Kim JC et al. Transient impairment of hippocampus-dependent learning and memory in relatively low-dose of acute radiation syndrome is associated with inhibition of hippocampus. *J. Radiat. Res* 2008; 49: 517-526.
28. Raber J, Rola R, Le Feuvre A et al. Radiation-induced cognitive impairments are associated with changes in indicators of hippocampal neurogenesis. *Radiat. Res* 2004; 162: 39-47.
29. Reddick WE, Russell JM, Glass JO et al. Subtle white matter volume differences in children treated for medulloblastoma with conventional or reduced dose cranial irradiation. *Magn Reson Imaging* 2000; 18: 787-793.
30. Okada H, Mak TW. Pathways of apoptotic and non apoptotic death in tumour cells. *Nat Rev Cancer* 2004; 4: 592-603.
31. Özgül C, Nazıroğlu M. Role of TRPM2 cation channels on molecular pathways in neurological cells. *Journal of Experimental and Clinical Medicine* 2010; 27: 144-151.
32. Forfria E, Marshall ICB, Benham CD et al. TRPM2 channel opening in response to oxidative stress is dependent on activation of poly (ADP-ribose) polymerase. *Br. J. Pharmacol* 2004; 143 : 186-192.
33. Straub RE, Lehner T, Luo Y et al. A possible vulnerability locus for bipolar affective disorder on chromosome 21q22.3. *Nat. Genet* 1994; 8: 291-296.
34. Hara Y, Wakamori M, Ishii M et al. LTRPC2 Ca²⁺ -permeable channel activated by changes in redox status confers susceptibility to cell death. *Mol. Cell* 2002; 9: 163-173.
35. Fleig A, Penner R. The TRPM ion channel subfamily: molecular, biophysical and functional features. *Trends Pharmacol Sci Cross Ref Medline* 2004; 25: 633-639.
36. Mac Donald JF, Jackson MF. Transient receptor potential channels of the melastatin family and ischemic responses of central neurons. *Stroke* 2007; 38: 665-669.
37. Verma S, Quillinan N, Yang YF et al. TRPM2 channel activation following in vitro ischemia contributes to male hippocampal cell death. *Neuroscience Letters* 2012; 530: 41-46.
38. Koropatnick J, Leibbrandt M, Cherian G. Organ-specific metallothionein induction in mice by X irradiation. *Radiat Res* 1989; 119: 356-365.
39. Amano T, Inamura T, Wu CM et al. Effects of single low dose irradiation on subventricular zone cells in juvenile brain. *Neurol Res* 2002; 24: 809-16.
40. Mizumatsu S, Monje LM, Morhardt DR et al. Extreme sensitivity of adult neurogenesis to low doses of X-irradiation. *Cancer Res* 2003; 63: 4021-7.
41. Balentova S, Hajtmanova E, Mellova Y et al. Alterations in the rat forebrain apoptosis following exposure to ionizing radiation. *Biologia (Bratisl)* 2011; 66: 701-5.
42. Lee CR, Tepper JM. A calcium-activated nonselective cation conductance underlies the plateau potential in rat substantia nigra GABAergic neurons. *J Neurosci Cross Ref Medline* 2007; 27: 6531-6541.
43. Perraud AL, Takanishi CL, Shen B et al. Accumulation of free ADP-ribose from mitochondria mediates oxidative stress-induced gating of TRPM2 cation channels. *J. Biol. Chem* 2005; 280: 6138-6148.
44. Peissner W, Kocher M, Treuer H et al. Ionizing radiation-induced apoptosis of proliferating stem cells in the dentate gyrus of the adult rat hippocampus. *Mol Brain Res* 1999; 71: 61-8.
45. Tada E, Yang C, Gobbel GT et al. Long-term impairment of subependymal repopulation following damage by ionizing irradiation. *Exp Neurol* 1999; 160: 66-77.
46. Bellinzona M, Gobbel GT, Shinohara C et al. Apoptosis is induced in the subependyma of young adult rats by ionizing irradiation. *Neurosci Lett* 1996; 208: 163-6.
47. Haus E, Touitou Y. Principles of clinical chronobiology. In: Touitou Y, Haus E (Eds): *Biologic Rhythms in Clinical and Laboratory Medicine*. 2nd ed. Springer-Verlag: Berlin, 1994: 6-34.
48. Scheving LE. Circadian rhythms in cell proliferation: their importance when investigating the basic mechanism of normal versus abnormal growth. *Prog Clin Biol Res* 1981; 59: 39.