

RADYASYONUN SERUM DEMİR, BAKIR VE PROTEİN OKSİDASYON DÜZEYLERİNE ETKİSİ

Özlem GÜLBAHAR¹, Aysel ARICIOĞLU¹, Müge AKMANSU², Zerrin TÜRKÖZER¹

Amaç: Bir çok hastalığın etyopatogeneziinde rol oynadığı düşünülen proteinlerin oksidatif modifikasyonunu analiz etmek amacıyla en sık kullanılan yöntem protein oksidasyon ürünü olan karbonil gruplarının tayinidir. Biz de çalışmamızda, radyasyonun serum üzerindeki etkisini göstermek amacıyla protein oksidasyon ürünü olan karbonil grubu düzeylerini ve "metallerin katalizlediği oksidasyon" (metal-catalyzed oxidation, MCO) sistemleri aracılığıyla protein oksidasyonunu artırdığı bilinen demir (Fe) ve bakır (Cu) düzeylerini araştırmayı amaçladık.

Gereç ve Yöntemler: Kobaylara radyasyon ve antioksidan (N-asetilsistein, NAC) uygulamaları sonrasında serum Fe, Cu ve protein oksidasyon düzeyleri analiz edildi. Protein oksidasyon düzeyi Levine metoduna göre, Fe düzeyi otoanalizörde, Cu düzeyi ise atomik absorpsiyon cihazında ölçüldü.

Bulgular: Radyasyonun, serum protein karbonil grubu, Fe ve Cu düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı artışlara neden olduğu görüldü. Radyasyon öncesinde NAC verilen grupta ise tek başına radyasyon uygulanan gruba oranla oksidatif stresin azaldığı gözlemlendi. Kobaylara yalnızca NAC verilmesi de parametrelerde azalmaya neden oldu.

Sonuç: Sonuç olarak radyasyonun muhtemelen reaktif oksijen türlerinin düzeyini artırarak, ayrıca Fe ve Cu düzeylerini yükseltip metal katalizli oksidasyon yoluyla proteinlerin oksidatif modifikasyonuna yol açtığı, NAC'ın ise radyasyonun oluşturduğu oksidasyona karşı koruyucu bir etkisinin olduğu tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: Radyasyon, protein oksidasyonu, karbonil grubu.

EFFECT OF RADIATION ON THE LEVELS OF IRON, COPPER AND PROTEIN OXIDATION IN SERUM

Purpose: The method used most commonly to analyze oxidative modification of the proteins playing a role in the etiopathogenesis of various diseases is the determination of carbonyl groups, which are the oxidative modification products. To demonstrate the effect of radiation on serum, we determined carbonyl group levels that are protein oxidation products and iron (Fe) and copper (Cu) levels, which are known to increase the protein oxidation, using metal-catalyzed oxidation (MCO) systems.

Materials and Methods: After exposure to radiation and antioxidant (NAC), guinea pigs' serum Fe, Cu and protein oxidation levels were analyzed. Protein oxidation was determined by the Levine method, Fe levels were measured using an autoanalyzer and Cu levels were determined using an atomic absorption apparatus.

Results: Radiation was found to significantly increase the serum carbonyl groups, and Fe and Cu levels. Oxidative stress was observed to decrease in the group given NAC before radiation compared to the group receiving radiation only. Giving only NAC to the guinea pigs led to decreases in parameters.

Conclusion: Radiation causes oxidative modification of the proteins by an increase in the levels of reactive oxygen radicals and Fe and Cu levels by creating metal catalysis, and NAC has a protective effect against oxidation due to radiation.

Key Words: Radiation, protein oxidation, carbonyl groups.

GİRİŞ

Aktif oksijen türlerinin protein, DNA, lipid gibi makromolekülleri oksidatif olarak modifiye ettiği, birçok fizyolojik ve patolojik süreçte önemli rol oynadığı bilinmektedir (1). Proteinler oksidatif hasarın majör hedefleri olarak tanımlanmaktadır (2). Oksidatif olarak modifiye olan proteinler inflamatuvar hastalıklar, ateroskleroz (AS), nörolojik hastalıklar, iskemi-reperfüzyon (I/R) hasarı ve kanser gibi farklı patolojik durumlarda birikirler (1). İyonize radyasyon, MCO, fotokimyasal süreç ve enzim katalizli redoks reaksiyonlarının oluşturduğu reaktif oksijen türleri protein oksidasyonuna neden olabilmektedir (3). Amino asit yan zincirlerinin karbonil türevlerine modifikasyonu, polipeptit zincirin fragmentasyonu, protein-protein çapraz bağının oluşumu gibi olaylar protein oksidasyonunun muhtemel sonuçlarıdır (1). Oksidatif stresin biyobelirteçleri olarak protein karbonil gruplarının kullanılması, diğer oksidasyon ürünleri ile kıyaslandığı zaman görece olarak daha stabil olması, daha erken oluşması gibi nedenlerle bazı avantajlara sahiptir (4). Protein oksidasyonunun ürünü olan karbonil grupları Alzheimer hastalığı (AD), diyabet, inflamatuvar kemik hastalığı, artrit gibi bazı hastalıklarda bir belirteç olarak görülmektedir (5).

Radyasyonun reaktif oksijen türlerini ürettiği ve bu moleküllerin radyasyon hasarına aracılık ettiği bilinmektedir (6,7). Ayrıca biyolojik açıdan önemli geçiş metal iyonları olan Fe ve Cu'nun aracılık ettiği MCO sistemleri ile amino asit rezidülerinin okside olması sonucu da karbonil türevlerinin düzeyinin arttığı gösterilmiştir (1).

Enzimatik ve nonenzimatik bazı antioksidan savunma sistemleri, hücreleri oksidatif stresin zararlı etkilerinden koruyabilmektedir. Bu antioksidan savunma mekanizmalarından birisi de glutatyon ve tiyoredoksin (TRX) gibi sülfidril içeren tiyollerdir (8). NAC, redükte glutatyonun öncülü olan tiyollerden birisidir (9).

Biz çalışmamızda, radyasyonun serum üzerindeki etkisini göstermek amacıyla protein oksidasyon ürünü olan karbonil grubu düzeylerini ve MCO sistemleri aracılığıyla protein oksidasyonunu artırdığı bilinen Fe ve Cu düzeylerini araştırdık. Ayrıca antioksidan bir özelliğe sahip olan NAC'ın bu sistemler üzerindeki rolünü inceledik.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışmamızda, ağırlıkları 450-500 gr arasında değişen erkek cinsi 32 adet kobay kullanılmıştır. Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulundan bilimsel araştırma için izin alınmıştır.

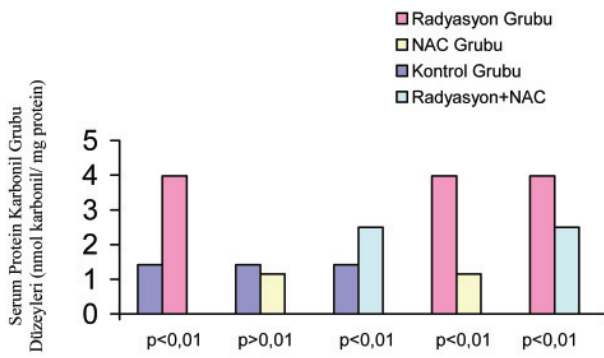
Her grupta 8 adet kobay bulunan dört grup oluşturuldu:

I. Grup : Kontrol grubu,

II. Grup: 612c6y iyonize radyasyon uygulanan grup,

¹Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

²Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı
Tebliğ Yeri ve Tarihi: Klinik Biyokimya Uzmanları Derneği, 2. Ulusal Kongresi, Bodrum; 21-25 Eylül 2004.



Şekil 1: Serum Protein Karbonil Grubu Düzeyleri (nmol karbonil/mg protein) ve Gruplar Arasındaki p Değerleri.

III. Grup: NAC uygulanan grup,

IV. Grup: Radyasyon öncesi NAC uygulanan grup.

Kobaylara anestezi altında Co⁶⁰ Radyoterapi cihazıyla, ön-arka karşılıklı paralel alanlardan 3,5 cm derinlikte, SAD (Source-Axis-Distance)=80 tekniği ile 612cGy dozda γ radyasyon uygulandı.

İntrakardiyak olarak tüm kanları alınan hayvanların serum örnekleri hazırlandı. Numuneler analiz süresine kadar -80 °C'de saklandı.

Protein karbonil grubu düzeyleri Levine metoduna göre tayin edilmiştir (10).

Serum Fe düzeyleri AEROSSET-Abbott otoanalizöründe hazır kitler kullanılarak analiz edildi (11).

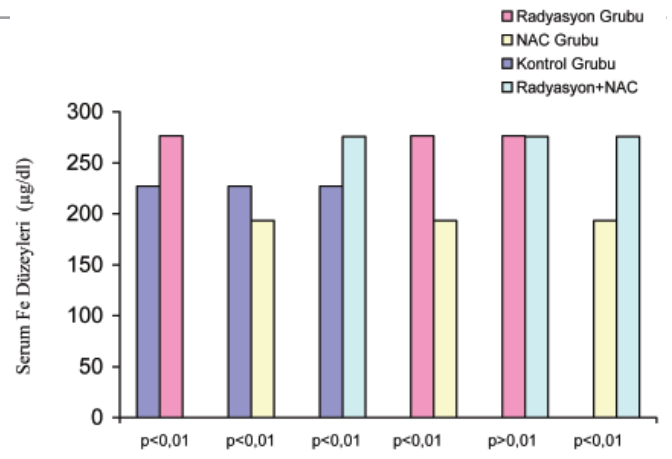
Serum Cu düzeyleri ise UNICAM 939-AAS model atomik absorpsiyon cihazında analiz edildi (12). Sonuçlar $\mu\text{g/dl}$ olarak ifade edildi.

Sonuçların istatistiksel analizi SPSS paket programı aracılığıyla yapılmıştır. Deneysel gruplar arasındaki farklar Kruskal-Wallis analizi ile, ortalamalar arasındaki ikili karşılaştırmalar ise Mann-Whitney U ve Bonferonni testleri uygulanarak değerlendirilmiştir. $p<0,01$ olduğu zaman istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Tablo: Serum Protein Karbonil Grubu, Fe ve Cu Düzeyleri.

	Karbonil Grubu (nmol karbonil/mg protein)	Fe ($\mu\text{g/dl}$)	Cu ($\mu\text{g/dl}$)
Kontrol Grubu	1,42 \pm 0,56	227,12 \pm 19,77	43,87 \pm 7,49
Radyasyon Grubu	3,98 \pm 0,75	276,50 \pm 18,56	56,37 \pm 8,95
NAC Grubu	1,15 \pm 0,32	193,12 \pm 20,96	37,00 \pm 6,92
Radyasyon+NAC Grubu	2,50 \pm 0,78	275,62 \pm 28,31	50,50 \pm 9,84

Değerler ortalama \pm SD olarak verilmiştir.

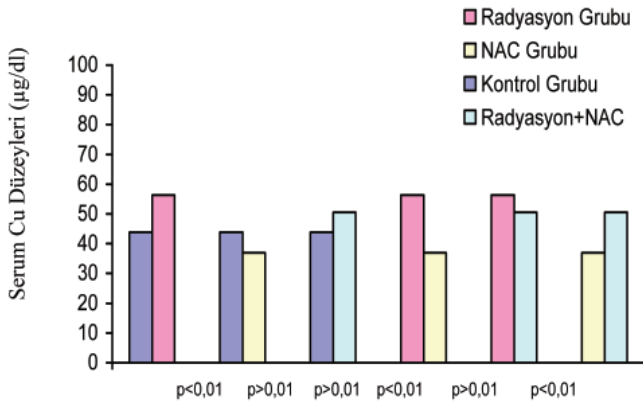


Şekil 2: Grupların Serum Fe Düzeyleri ($\mu\text{g/dl}$) ve Gruplar Arasındaki p Değerleri.

BULGULAR

Çalışmamızda yalnız radyasyon uygulanan grubun serum karbonil grubu düzeylerinin kontrol grubu karbonil düzeylerine oranla anlamlı derecede arttığını tespit ettik. Radyasyon uygulamasından önce NAC verdiğimiz grubun serum karbonil düzeylerinin ise sadece radyasyon uygulanan gruba göre oldukça düşük olduğunu saptadık. Ayrıca sadece NAC verilen grubun serum karbonil grubu düzeyleri ile kontrol grubunun karbonil grubu düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmamasına rağmen bir miktar azalma gözledik (Tablo, şekil 1).

Çalışmamızda aynı zamanda, radyasyon uygulanan grubun serum demir ve bakır düzeylerini kontrol grubunun düzeylerine oranla anlamlı derecede artmış olarak bulduk. Yalnız NAC verilen grubun serum Fe ve Cu düzeyleri kontrol grubuna oranla daha düşük bulundu ancak, sadece Fe düzeylerindeki azalma istatistiksel olarak anlamlı idi. Ayrıca, radyasyon öncesinde NAC uygulanan grubun Fe düzeylerinde yalnız radyasyon uygulanan gruba göre bir değişiklik gözlenmezken, Cu düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte bir azalma mevcuttu. Üstelik bu bulgumuz, radyasyonla artan karbonil gruplarının NAC'ın etkisi sonucu azalması ile uyumlu bulundu (Tablo, Şekil 2 ve 3).



Şekil 3: Grupların Serum Cu Düzeyleri (µg/dl) ve Gruplar Arasındaki p Değerleri.

TARTIŞMA

Tedavi amaçlı veya istenmeden γ radyasyonun zararlı etkilerine maruz kalma oldukça yaygındır. Bu yan etkilerin fazlalığı radyasyonun dozuna, sıklığına, süresine ve maruz kalan alanın büyüklüğüne bağlıdır (13,14). Radyasyon biyokimyasal ve fizyolojik belirteçlerde değişikliğe neden olabilmektedir (15).

İyonize radyasyonun, suyu hidroliz ederek O_2 ., OH ., OH_2 ve H_2O_2 'yi içeren reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimine neden olduğu çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (7,16,17). ROS; protein, DNA, lipid gibi makromoleküllerin oksidasyonuna yol açarak iyonize radyasyonun biyolojik sistemlerdeki hasar oluşturucu etkisine aracılık etmektedir (18-23). Sonuçta karbonil grubu gibi protein oksidasyon ürünleri ve malondialdehit (MDA) gibi lipid peroksidasyon ürünlerinin miktarı artmaktadır. Ayrıca radyasyon dışında Fe ve Cu tarafından katalizlenen MCO sistemleri de protein oksidasyon ürünlerini artırabilmektedir.

ROS'un indüklediği toksisite antioksidanlarla tedavi sonucu ortadan kaldırılabilir (24). Glutasyon (GSH) redoks siklusu canlıların çoğunda majör koruyucu sistem olarak bilinmektedir (25). Bir GSH öncülü olan NAC, total GSH konsantrasyonlarını artırabilmektedir (26). GSH ve NAC, ROS'un sitotoksik aktivitesini bloke eden oldukça etkili antioksidanlar olarak tanımlanmaktadır (27).

Biz de çalışmamızda radyasyonun serumda meydana getirdiği değişiklikleri görmek amacıyla protein oksidasyonunun göstergesi olan protein karbonil grubu ile MCO sistemlerinde önemli olan Fe ve Cu düzeylerini inceledik. Ayrıca, antioksidan bir ajan olan NAC'ın radyasyonun oluşturduğu protein oksidasyonuna karşı koruyucu bir etkisinin olup olmadığını araştırdık.

Çalışmamızın sonucunda serumda radyasyonun oksidatif stresi artırarak karbonil gruplarında artışa yol açtığını ve NAC'ın karbonil düzeylerini azaltarak oksidatif strese karşı koruyucu bir etki gösterdiğini tespit ettik. NAC serumda oksidatif stres olmadığı durumda karbonil düzeylerinde bir azal-

maya neden olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik göstermemiştir.

Traverso ve arkadaşları çalışmalarında, protein modeli olarak BSA üzerinde oksidasyonun etkisini araştırmışlardır. Çalışmalarında, BSA'nin γ radyasyon ile okside edilmesinin sülfhidril gruplarının kaybına ve protein karbonil içeriğinin artmasına yol açtığını gözlemişlerdir. Proteinlerin γ radyasyon ile inkübasyonunun karbonil gruplarındaki artış ile birlikte peroksidlerde azalmaya neden olmuş ve bu ilişki sonucunda, karbonillerin, protein peroksit yıkımının son ürünleri olduğunu düşünmüşlerdir (28).

Keller ve arkadaşları, in vitro olarak BSA'yı, radyolizis veya Fenton benzeri bir mekanizma sonucu ortaya çıkan hidroksil radikaline maruz bırakmışlardır. Sonuç olarak, konsantrasyona bağımlı bir şekilde karbonil grubunun arttığını ve albuminin fragmanlara ayrıldığını saptamışlardır. Radyasyon uygulamasındaki artış ile karbonil gruplarındaki artış arasında lineer bir ilişki olduğunu tespit etmişlerdir (29).

Radyasyonun serum protein karbonil grubu üzerine olan etkisini açıklayan yeterli çalışmaların bulunmaması, konuyla ilgili daha ileri araştırmalara gerek duyulduğunu düşündürmektedir.

Çalışmamızda aynı zamanda, radyasyon uygulanan grubun serum Fe ve Cu düzeylerini kontrol grubunun düzeylerine oranla anlamlı derecede artmış olarak bulduk. Serum Cu düzeylerinin, radyasyon uygulamasından sonra artması ile ilgili yayınlar olmasına rağmen bu artışın bir sonuç mu yoksa bir neden mi olduğu ve nasıl arttığı konusu açık değildir (30). Serum Fe düzeyleri ile ilgili olarak ise çeşitli yayınlarda farklı sonuçlar bulunmuştur (31-33).

Protasova ve arkadaşları, Çernobil felaketinin kötü etkilerinin giderilmesi için o bölgede çalışan insanların serumlarında Cu konsantrasyonlarının arttığını ama Fe konsantrasyonlarının değişmediğini göstermişlerdir (32). Fe düzeyinde herhangi bir değişiklik olmamasını, demir transportu sonrasında bir depolanma olmasına ve bu nedenle serum seviyelerinin normal kalmasına bağlamışlardır.

Levina ve arkadaşları ise, Çernobil kazasının sınırlanmasında çalışan kişilerin serumlarında, transferrinden bağımsız bir Fe havuzunun olduğunu gözlemişler, Fe metabolizmasındaki değişikliklerin plazmanın antioksidan aktivitesindeki azalma ve mononükleer fagositlerin disfonksiyonu ile açıklanabileceğini ifade etmişlerdir (31).

Ward ve arkadaşları, hemitorasik radyasyon aracılığı ile pnömotoksiste oluşturulan ratlarda serum Cu düzeylerinin doz ve zaman bağımlı olarak arttığını görmüşlerdir. Ancak serum Cu'nun orijininin ve moleküler oluşumunun bilinmediğini açıklamışlardır. Serum Fe konsantrasyonu ise, Cu konsantrasyonuna zıt olarak radyasyon ile değişiklik göstermemiştir (33). Yine Ward ve arkadaşları, yaptıkları başka bir çalışmada, rat hemitorakslarına artan dozlarda ^{60}Co γ radyasyon uygulamışlar ve doz bağımlı bir şekilde serum Cu düzeylerinde artış gözlemişlerdir (30). Serum Fe konsantrasyonlarının ise radyasyon dozu ve zamanından etkilenmediğini belirtmişlerdir.

Silverman ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, oral veya orofaringeal kanserli hastalarda ve sağlıklı kontrol grubunda serum Cu düzeylerinde radyoterapi sonrasında önemli bir değişiklik olmadığını belirtmişlerdir (34).

Birdi ve arkadaşları, kanserli hastaların serum Cu düzeylerinin kontrole göre anlamlı derecede arttığını ancak radyoterapi sonrasında normal sınırlara düştüğünü gözlemişlerdir. Radyoterapi sonrasında serum Cu düzeylerindeki azalmayla birlikte klinik olarak da iyileşme olduğunu fark etmişlerdir (35).

Biz de çalışmamızda serum Fe ve Cu düzeylerini radyasyon uygulaması sonrasında mekanizmasını açıklayamamakla birlikte anlamlı derecede artmış olarak bulduk. Bu artışın nedenini açıklayabilecek herhangi bir bilgiye rastlayamadık ancak radyasyonun hasar verici etkisinde Fe ve Cu'nun katkısının büyük olduğunu düşünmekteyiz. Çünkü bu iki element, MCO sistemi aracılığıyla radikal oluşumunu artırıp protein oksidasyon ürünü olan protein karbonil grubu düzeylerini artırarak hücre ve doku hasarına yol açabilmektedir.

Amici ve arkadaşları, beyin proteozomunun özellikleri üzerinde nörotoksik metal iyonları tarafından indüklenen oksidatif stresin etkisini çalışmışlardır. Enzimin katalitik aktivite gibi fonksiyonel etkilerinin oksidasyonun indüklediği modifikasyonlar ile bağlantılı görüldüğünü belirtmişlerdir. Bu ilişki, Fe ve Cu gibi metal iyonlarına maruziyeti takiben enzimdeki karbonil gruplarının artışı ile açıklanmıştır (36).

Kim ve arkadaşları, Fe^{+3} , O_2 ve elektron verici olarak sistemden oluşan Cys-MCO sistemi ile seruloplazminin inkübasyonunun karbonil gruplarının içeriğinde bir artışa neden olduğunu ve proteolitik duyarlılık kadar ferooksidaz aktivitesinde de önemli değişikliğe yol açtığını saptamışlardır. Oksidatif stres sırasında seruloplazminden Cu'nun salınımındaki artışın, ROS'un oluşumunu ve hücre hasarı artırabileceğini belirtmişlerdir (37).

Kwon ve arkadaşları; süperoksit dismutaz'ın (SOD), Fe^{+3} , O_2 ve elektron donörü olarak tiyolden oluşan MCO sistemi ile oksidatif modifikasyona ve hasara duyarlı olduğunu, karbonil gruplarının oluşumundaki artış, aktivite kaybı, peptidin fragmentasyonu ve agregasyonu aracılığı ile göstermişlerdir. Cu/Zn-SOD'un oksidatif hasarının, dietilen triaminpentasetik asit, serbest radikal yakalayıcıları ve "spin-trapping" ajanları ile inhibe edildiğini saptamışlardır. Cu/Zn-SOD'un MCO sistemleri ile inkübasyonunun bu enzimden Cu'nun salınımına neden olduğunu da ifade etmişlerdir (38). Troncoso ve arkadaşları, sığır nöroflamentlerinin askorbat/ Fe^{+3}/O_2 'den oluşan MCO sistemi aracılığıyla oksidasyonunun zaman ve konsantrasyon bağımlı olarak karbonil içeriğini artırdığını göstermişlerdir (39).

Yukarıda belirtildiği gibi, radyasyonun serum Fe ve Cu düzeylerine etkisi ile ilgili bizim çalışmamızın sonuçları ile uyumlu veya farklı araştırma sonuçları bulunmaktadır. Ancak bulgularımız, radyasyon sonrası serum protein karbonil grubu düzeylerinin kontrole göre yüksek bulunmasının, serumdaki radyasyon sonrası artan Fe ve Cu düzeyleri ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir.

NAC'ın Fe ve Cu düzeyleri üzerindeki etkisini araştırmak amacıyla, Podesta ve arkadaşları, topoizomera I aktivitesinin, Fenton sistemi (H_2O_2/Fe^{+2} veya H_2O_2/Cu^{+2}) ile inhibe olduğunu ve NAC'ın bu inhibisyonu %100 azalttığını göstermişlerdir (40). Ayrıca, NAC'ın terapötik dozları ile oral olarak tedavi gören hastaların plazma ve idrarlarındaki Fe, Cu gibi geçiş metallere konsantrasyonlarının değişmediği ancak yüksek intravenöz dozlarda NAC'ın metal şelatlayıcı etkisinin gerçekleştiğini gösteren çalışmalar mevcuttur (41).

Bizim çalışmamızda da, yalnız NAC verilen grubun serum Fe ve Cu düzeyleri kontrol grubuna oranla daha düşük bulundu, ancak sadece Fe düzeylerindeki azalma istatistiksel olarak anlamlı idi. Aynı zamanda, radyasyon uygulanan grupta Cu düzeyleri kontrole oranla anlamlı derecede yüksek bulunurken, radyasyondan önce NAC verilen grubun Cu değerlerindeki artışın anlamlı olmadığını saptadık. Bu bulgularımız, NAC'ın ağır metalleri şelatlayıcı etkisinin olduğu görüşünü desteklemektedir.

Ayrıca, radyasyon öncesinde NAC uygulanan grubun Fe düzeylerinde yalnız radyasyon uygulanan gruba göre bir değişiklik gözlenmezken, Cu düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte bir azalma mevcuttu. Üstelik bu bulgumuz, radyasyonla artan karbonil gruplarının NAC'ın etkisi sonucu azalması ile uyumlu bulundu. Sonuçta NAC'ın, radyasyonla yükselen Cu düzeylerini kontrol grubuna yaklaştırarak MCO'dan organizmayı koruyucu rol oynayabileceğini düşünmekteyiz.

Yazışma Adresi

Dr. Özlem GÜLBAHAR

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı,

Merkez laboratuvarı

Tel: 0312 2024167

mdzengin@yahoo.com

KAYNAKLAR

1. Fagan JM, Slecza BG, Sohar I. Quantitation of oxidative damage to tissue proteins. *Int J Biochem Cell Biol* 1999; 31: 751-757.
2. Shringarpure R, Davies KJA. Protein turnover by the proteasome in aging and disease. *Free Radic Biol Med* 2002; 32: 1084-1089.
3. Stadtman ER. Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: Biochemical mechanism and biological consequences. *Free Radic Biol Med* 1990; 9: 315-325.
4. Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D ve ark. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta* 2003; 329: 23-38.
5. Chevon M, Berenshtein E, Stadtman ER. Human studies related to protein oxidation: protein carbonyl content as a marker of damage. *Free Radic Res* 2000; 33: 99-108.
6. Dal-Pizzol F, Ritter C, Klamt F ve ark. Modulation of oxidative stress in response to gamma-radiation in human glioma cell lines. *J Neurooncol* 2003; 61: 89-94.
7. Halliwell B, Gutteridge JMC. An introduction to oxygen toxicity and free radicals. *Free Radic Biol Med* (Clarendon Press, Oxford) 1999; 18-24.
8. Davis WJr, Ronai Z, Tew KD. Cellular thiols and reactive oxygen species in drug-induced apoptosis. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 296: 1-6.

9. Dringen R, Hamprecht B. N-acetylcystein, but not methionine or 2-oxothiazolidine-4-carboxylate, serves as cysteine donor for the synthesis of glutathione in cultured neurons derived from embryonal rat brain. *Neurosci Lett* 1999; 259: 79-82.
10. Levine BL, Garland D, Oliver CN ve ark. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 1990; 186: 464-478.
11. Artiss JD, Vinogradov S, Zak B. Spectrophotometric Study of Several Sensitive Reagents for Serum Iron. *Clin Biochem* 1981; 14: 311-315.
12. Unicam Atomic Absorption Spectrophotometry Method, Manual; Unicam Limited, United Kingdom, 1994.
13. Kamiryo T, Kassell NF, Thai QA ve ark. Histological changes in the normal rat brain after gamma irradiation. *Acta Neurochir (Wien)* 1996; 138: 451-459.
14. Leibel SA, Sheline GE. Radiation therapy for neoplasms of the brain. *J Neurosurg* 1987; 66: 1-22.
15. Hoshino K, Kamayama Y. Effects of low-dose X-irradiation in utero on the development of cortical architecture of the brain in mice. *Environ Med* 1983; 27: 29-34.
16. Gajdusek CM, Tian H, London S ve ark. Gamma radiation effect vascular smooth muscle cells in culture. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1996; 36: 821-828.
17. Rousselot DB, Albert MG, Delattre J ve ark. Oxidation of low-density lipoproteins by OH and OH/O-2 free radicals produced by gamma radiolysis. *Radiat Res* 1993; 134: 271-282.
18. Berlett BS, Stadtman ER. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem* 1997; 272: 20313-20316.
19. Cooper CE, Vollaard NBJ, Choueiri T ve ark. Exercise, free radicals and oxidative stress. *Biochem Soc Trans* 2001; 30: 280-285.
20. Evans P, Lyras L, Halliwell B. Measurement of protein carbonyls in human brain tissue. *Methods Enzymol* 1999; 300: 145-156.
21. Kojima M, Matsuki O, Nomura T ve ark. Elevation of antioxidant potency in the brain of mice by low-dose γ -ray irradiation and its effect on 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine(MPTP)-induced brain damage. *Free Radic Biol Med* 1999; 26: 388-395.
22. Liu J, Wang X, Shigenaga MK ve ark. Immobilization stress causes oxidative damage to lipid, protein, and DNA in the brain of the rats. *FASEB J* 1996; 10: 1532-1538.
23. Wolff SP. Ferrous ion oxidation in presence of ferric ion indicator xylenol orange for measurement of hydroperoxides. *Methods Enzymol* 1994; 233: 182-189.
24. Shimizu E, Hashimoto K, Komatsu N ve ark. Roles of endogenous glutathione levels on 6-hydroxydopamine-induced apoptotic neuronal cell death in human neuroblastoma SK-N-SH cells. *Neuropharmacology* 2002; 43: 434-443.
25. Dringen R. Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog Neurobiol* 2000; 62: 649-671.
26. Pileblad E, Magnusson T, Fornstedt B. Increase in rat brain glutathione following intracerebroventricular administration of gamma-glutamylcysteine. *Biochem Pharmacol* 1992; 44: 895-903.
27. Froissard P, Monroq H, Duval D. Role of glutathione metabolism in the glutamate-induced programmed cell death of neuronal-like PC12 cells. *Eur J Pharmacol* 1997; 326: 93-99.
28. Traverso N, Menini S, Cottalasso D ve ark. Mutual interaction between glycation and oxidation during non-enzymatic protein modification. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1336: 409-418.
29. Keller HJ, Halmes NC, Hinson JA ve ark. Immunochemical detection of oxidized proteins. *Chem Res Toxicol* 1993; 6: 430-433.
30. Ward WF, Molteni A, Fitzsimons EJ ve ark. Serum copper concentration as an index of lung injury in rats exposure to hemithorax irradiation. *Radiat Res* 1988; 114: 613-620.
31. Levina AA, Tsibul'skaia MM, Lukina EA ve ark. Change in iron metabolism as affected by ionizing radiation. *Gematol Transfuziol* 1993; 38: 5-8.
32. Protasova OV, Maksimova IA, Klimenko LL ve ark. The late sequelae of the action of irradiation during the cleanup of the aftermath of the Chernobyl catastrophe on the concentration of macro- and microelements in human blood serum. *Izv Akad Nauk Ser Biol* 1997; 5: 592-595.
33. Ward WF, Molteni A, Ts'ao C ve ark. Serum copper concentration as an index of experimental lung injury. *Adv Exp Med Biol* 1989; 258: 287-302.
34. Silverman S Jr, Thompson JS. Serum zinc and copper in oral/oropharyngeal carcinoma. A study of seventy-five patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1984; 57: 34-36.
35. Birdi A, Gupta S, Gambhir SS. Serum copper in carcinoma of cervix uteri as an indicator of successful radiotherapy. *J Surg Oncol* 1983; 22: 193-196.
36. Amici M, Forti K, Nobili C ve ark. Effect of neurotoxic metal ions on the proteolytic activities of the 20S proteasome from bovine brain. *J Biol Inorg Chem* 2002; 7: 750-756.
37. Kim RH, Kwon OJ, Park JW. Ceruloplasmin enhances DNA damage induced by cysteine/iron in vitro. *Biochimie* 2001; 83: 487-495.
38. Kwon OJ, Lee SM, Floyd RA ve ark. Thiol-dependent metal-catalyzed oxidation of copper, zinc superoxide dismutase. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1387(1-2): 249-256.
39. Troncoso JC, Costello AC, Kim JH ve ark. Metal-catalyzed oxidation of bovine neurofilaments in vitro. *Free Radic Biol Med* 1995; 18: 891-899.
40. Podesta D, Stoppani A, Villamil SF. Inactivation of Trypanosoma cruzi and Crithidia fasciculata topoisomerase I by Fenton systems. *Redox Rep* 2003; 8: 357-363.
41. Hjortso E, Fomsgaard JS, Fogh-Andersen N. Does N-acetylcysteine increase the excretion of trace metals (calcium, magnesium, iron, zinc and copper) when given orally? *Eur J Clin Pharmacol* 1990; 39: 29-31.