



T.C.

ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAZI BİTKİSEL ANTİOKSİDANLARIN MUTAJENİK VE
ANTİMUTAJENİK ETKİLERİNİN KISA SÜRELİ GENOTOKSİSİTE TEST
YÖNTEMLERİ İLE BELİRLENMESİ

Tolga ZORLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BURSA-2010



T.C.

ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAZI BİTKİSEL ANTİOKSİDANLARIN MUTAJENİK VE
ANTİMUTAJENİK ETKİLERİNİN KISA SÜRELİ GENOTOKSİSİTE TEST
YÖNTEMLERİ İLE BELİRLENMESİ

Tolga ZORLU

Doç. Dr. Nilüfer Çinkılıç

(Danışman)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BURSA-2010

T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAZI BİTKİSEL ANTIOKSİDANLARIN MUTAJENİK VE
ANTİMUTAJENİK ETKİLERİNİN KISA SÜRELİ GENOTOKSİSİTE TEST
YÖNTEMLERİ İLE BELİRLENMESİ

Tolga ZORLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu Tez 11/06/2010 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği/oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Nilüfer ÇİNKİLİÇ (Danışman)

Prof. Dr. Rahmi BİLALOĞLU (Asil üye)

Prof. Dr. Lütfi ÖZKAN (Asil üye)

ÖZET

Bu çalışmada fiziksel bir mutajen ajan olan iyonize radyasyonun genotoksik etkisi ve fenolik bir asit olan kinik asidin radyoprotektif etkisi çalışılmıştır. Bu amaçla insan periferel kan lenfositlerinde in vitro COMET testi uygulanmıştır.

Bireylerden heparinize olarak alınan periferel kandan lenfosit izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen lenfositler kültüre edilmiş ve kültür sonunda hücreler 1 ve 2 Gy radyasyona maruz bırakılmıştır. Radyasyon maruziyetinden 30 dakika önce hücreler 0,5, 1, 2, 4 ve 8 µg/ml kinik asit dozları ile inkübe edilmiştir. Bu işlemlerde sonra in vitro COMET testi gerçekleştirilmiştir. COMET testi sonuçlarına göre radyasyon doz grupları kendi aralarında ve kontrol grubu karşılaştırıldığında Genetik Hasar İndeksi ortalama değerleri arasında anlamlı bir farklılık bulunmuştur ($p<0,001$). Yine kinik asit dozları ve kontrol grubu arasında yapılan istatistiksel hesaplamalar sonucunda, bu dozların Genetik Hasar İndeksi bakımından kontrol grubu ve kendi aralarında herhangi bir anlamlı farklılık gözlenmemiştir ($p>0,05$).

Kinik asidin 0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml, 4 µg/ml ve 8 µg/ml dozları, radyasyonun 1 Gy ve 2 Gy radyasyon dozları ile kombine edildiğinde, kombine dozlar ve tek başına radyasyon dozları (1 Gy ve 2 Gy) karşılaştırıldığında aralarında anlamlı farklılık bulunmuştur ($p<0,001$). 1 Gy ve 0,5 µg/ml kombine dozu ile 1 Gy tek radyasyon grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır. ($p>0,05$). Aynı şekilde 2 Gy + 0,5 µg/ml kombine dozu ile 2 Gy tek radyasyon arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktur ($p>0,05$). Kinik asidin 4 µg/ml'lık dozu, 1 ve 2 Gy radyasyon dozlarının indüklediği DNA hasarını en etkili şekilde azaltan doz grubu olduğu belirlenmiştir.

Sonuç olarak radyasyonun 1 ve 2 Gy' lik dozları COMET testine göre genotoksik etki göstermiştir. Fenolik hidroksil gruplar taşıyan kinik asit ise, bu radyasyonun indüklediği genetik hasarı azaltmıştır. COMET testi sonuçlarına göre kinik asitin radyoprotektif etkisinin olduğu ortaya konmuştur.

Anahtar Kelimeler: İyonize Radyasyon, Kinik asit, Comet testi, Antioksidan, Genotoksisite, Radyoprotektörler.

ABSTRACT

In our study, genotoxic effects of ionizing radiation which is a physical mutagen and radioprotective effects of quinic acid are evaluated. For this purpose in vitro COMET assay was carried out in human peripheral blood lymphocytes.

Blood samples are drawn into tubes with heparin as an anticoagulant and lymphocytes are isolated. Isolated lymphocytes were cultured. After 24 hour following culture initiation, the lymphocytes were incubated with 0,5, 1, 2, 4 and 8 $\mu\text{g/ml}$ doses of quinic acid. Thirty minutes after quinic acid treatment, all lymphocyte culture petri dishes excluding control lymphocytes were exposed to ionizing radiation. Once viabilities were ensured, more than 80%, the lymphocytes were subjected to the COMET assay after irradiation. According to COMET assay results, when radiation dose groups were compared among themselves and with control groups, significant differences were detected between Genetic Damage Index average values of dose groups ($p < 0,001$). In quinic acid alone treated lymphocytes, no significant differences were detected when compared to control group. ($p > 0,05$).

When 0,5, 1, 2, 4 and 8 $\mu\text{g/ml}$ doses of quinic acid were combined with radiation doses, significant differences were detected when compared among the quinic acid combined dose groups themselves and radiation dose groups ($p < 0,001$). In 1 Gy + 0,5 $\mu\text{g/ml}$ quinic acid study group, no significant differences were found in the Genetic Damage Index average values when compared to 1 Gy radiation dose group ($p > 0,05$). Also no significant differences detected in 2 Gy + 0,5 $\mu\text{g/ml}$ quinic acid group when compared with 2 Gy study group ($p > 0,05$). From the above-mentioned results, 4 $\mu\text{g/ml}$ of quinic acid was selected as the effective concentration which effectively decreased the DNA damage that induced by 1 and 2 Gy doses of ionizing radiation.

In present study demonstrates that 1 and 2 Gy doses of radiation showed genotoxic effects in human peripheral blood lymphocytes. Ionizing radiation induced genetic damage is decreased by quinic acid which comprehends phenyl hydroxyl groups. The current study demonstrates that quinic acid is effective in protecting lymphocytes against radiation-induced toxicity.

Keywords: Ionizing Radiation, Quinic acid, COMET assay, Antioxidant, Genotoxicity, Radioprotection.

İÇİNDEKİLER	SAYFA
TEZ ONAY SAYFASI	I
ÖZET	II
ABSTRACT	III
İÇİNDEKİLER	IV
KISALTMALAR DİZİNİ	VII
ÇİZELGELER DİZİNİ	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ	X
SİMGELER DİZİNİ	XI
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	3
2.1 Bitkisel Fenolik Bileşikler	3
2.1.1 Kinik Asit	7
2.2 RADYASYON	9
2.2.1 Suyun Hidrolizi	9
2.2.2 Radyasyon Hasarları	12
2.2.3 Radyasyonun DNA molekülüne etkileri	13
2.2.3.1 Yapısal Hasarlar	13
2.2.4 DNA Lezyonlarının Onarımı	16
2.2.5 Majör DNA Tamir Yolları ve Radyasyonun Etkileri	16
2.2.5.1 Mismatch (Hatalı Eşleşme) Tamir Mekanizması (MMT)	16
2.2.5.2 Nükleotid Eksizyon Tamir Mekanizması (NET)	18
2.2.5.3 Baz Eksizyon Tamir Mekanizması (BET)	19
2.2.5.4 Homolog Rekombinasyon (HR)	20
2.2.5.5 Serbest Olmayan Uçların Homolog Olmayan Bağlanması	21
2.2.5.6 Direk Onarım veya Hasarın Geri Döndürülmesi	22
2.2.5.6.1- Hasarın Doğrudan Geri Döndürülmesi (Direkt Reversal)	22

2.2.5.6.2 O-6-Metilguanin Onarımı	23
2.2.5.6.3 Basit Tek Zincir Kırıklarının Ligasyonu	23
2.2.5.7 Oksidatif Hasarın Onarımı	23
2.2.5.8 SOS Tamir Mekanizması	24
2.2.6 Radyasyonun Kromozomlara Etkisi	25
2.2.7 Radyasyonun RNA Molekülüne Etkileri	27
2.2.8 Radyasyonun Protein ve Enzimlere Etkileri	27
2.2.9 Radyasyonun Zar Sistemlerine Etkisi	28
2.2.10 Radyasyonun İnsanlar Üzerine Etkisi	29
2.2.10,1 Radyasyonun Geç Etkileri	29
2.2.10,1.1 Genetik Değişikler	29
2.2.10,1.2 Karsinogen Etki	30
2.2.11 Radyoprotektörler	32
2.2.11.1 Antioksidanların ve Fenolik Bileşiklerin Radyoprotektif Etkileri	33
2.2.11.2 Vitaminler	34
2.2.11.3 Selenyum ve Selenyum/Vitamin E Kombinasyonları	35
2.2.11.4 Fitokimyallar	35
2.2.11.5 Fenolik Bileşikler ve Flavonoidlerin Radyoprotektif Etkileri	35
2.3 Genetoksisite ve Antigenotoksisite Değerlendirmelerinde Kullanılan	
Kısa Süreli Test Yöntemleri	39
2.3.1 Ames Testi	39
2.3.2 SCE Yöntemi	40
2.3.3 CA Yöntemi (Kromozomların homojen boyanması)	40
2.3.4 COMET Testi (Tek Hücre Jel Elektroforezi)	40
2.3.5 Mikronukleus (MN) Testi	43

3. MATERYAL VE METOT	44
3.1. Çalışmada Kullanılan Deney Ekipmanı	44
3.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler	45
3.3 Çalışmada Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması	46
3.4 Yöntem	47
4. BULGULAR	53
4.1 Radyasyon Dozlarının COMET Testi Sonuçları	62
4.2 Kinik asit Dozlarının COMET Testi Sonuçları	64
4.3 Kinik Asit ve Radyasyon Kombine Dozlarının COMET Testi Sonuçları	65
5. FOTOĞRAFLAR	68
6. TARTIŞMA	71
7. KAYNAKLAR	77

KISALTMALAR DİZİNİ

ATP: Adenozin trifosfat

BET: Baz Eksizyon Tamir Mekanizması

BRDU: 5'-bromodeoksiuridin

C: Karbon

CA: Kromozom aberasyonu tekniği

Ca⁺²: Kalsiyum

CH₃: Metil grubu

COTC: 2-crotonyloxymethyl-(4R,5R,6R)-4.5.6-trihydroxycyclohex-2-enone

CPD: Siklobütan pirimidin dimeri

DMSO: Dimetilsülfoksit

DNA: Deoksiribonükleik asit

GHİ: Genetik Hasar İndeksi

H⁺: Hidrojen

H₂O: Su molekülü

H₂O₂: Hidrojen peroksit

HH: Hasarlı hücre

HR: Homolog Rekombinasyon

LMA: Düşük erime noktalı agaroz

MMT: Mismatch (Hatalı Eşleşme) Tamir Mekanizması

mRNA: Mesajcı Ribonükleik asit

NET: Nükleotid Eksizyon Tamir Mekanizması

NMA: Normal erime noktalı agaroz

OH: Hidroksi radikali

oxoG: 8-dihidro-8-oksoguanin

RB: Retinoblastoma

RNA: Ribonükleik asit

RO: alkoksil

ROO: Peroksi

SCE: Kardeş Kromatid Değişimi

SSB: Tek zincir kırıkları

UV: Ultraviyole

ÇİZELGELER DİZİNİ	SAYFA
Çizelge 2.1. Radyasyonun genetik etkileri	30
Çizelge 2.2. Bazı radyoprotektif özelliğe sahip bitkiler ve radyoprotektif özellikleri	38
Çizelge 4.1.: 1 Numaralı Donöre ait kontrol, pozitif kontrol, kinik asit, radyasyon ve radyasyon ile birlikte kinik asit muamelesini içeren COMET testi verileri	54
Çizelge 4.2.: 2 Numaralı Donöre ait kontrol, pozitif kontrol, kinik asit, radyasyon ve radyasyon ile birlikte kinik asit muamelerini içeren COMET testi verileri	56
Çizelge 4.3.: 3 Numaralı Donöre ait kontrol, pozitif kontrol, kinik asit, radyasyon ve radyasyon ile birlikte kinik asit muamelerini içeren Comet testi verileri	58
Çizelge 4.4.: 4 Numaralı Donöre ait kontrol, pozitif kontrol, kinik asit, radyasyon ve radyasyon ile birlikte kinik asit muamelerini içeren Comet testi verileri	60
Çizelge 4.5.: Tüm donörlere ait Genetik Hasar İndeks ortalama değerleri	63
Çizelge 4.6.: Genetik Hasar İndekslerinin İstatistiksel anlamlılıklarının karşılaştırma sonuçları	67

ŞEKİLLER DİZİNİ	SAYFA
Şekil 2.1.: Kinik asitin moleküler yapısı	7
Şekil 2.2.: Su Molekülünün radyasyon ile hidrolizi	10
Şekil 2.3.: Radyasyonun canlıdaki etki kademeleri	11
Şekil 2.4.: 8-oksoguaninin moleküler yapısı	12
Şekil 2.5.a.: Tek zincir kırıkları	13
Şekil 2.5.b.: Çift zincir kırıkları	13
Şekil 2.6.: Radyasyon etkisi ile oluşan çeşitli baz hasarları	15
Şekil 2.7.: Hatalı eşleşme onarımı proteinleri ve homologları	17
Şekil 2.8.: Hatalı eşleşme onarım mekanizması	17
Şekil 2.9.: Nükleotid eksizyon onarım mekanizması	18
Şekil 2.10.: Baz eksizyon onarım mekanizmaları	19
Şekil 2.11.: Homolog rekombinasyon onarımı	20
Şekil 2.12.: Serbest olmayan uçların homolog olmayan bağlanması	21
Şekil 2.13.: Fotoreaktivasyon	22
Şekil 2.14.: Oksidatif hasarın sonucu oluşan bazı hatalı bazlar	23
Şekil 2.15.: SOS onarım mekanizması	24
Şekil 2.16.: Lenfosit, binükleat hücre ve mikronukleuslu binükleat hücre	26
Şekil 2.17.: Radyoprotektörlerin etki mekanizmaları	32
Şekil 2.18.: COMET testi aşamaları	42
Şekil 2.19.: Mikronukleus tekniği görüntüleme çeşitleri	43

SİMGELER DİZİNİ

cm: Santimetre

dk: Dakika

rpm: Dakikada devir sayısı

ml: Mililitre

μ g: Mikrogram

V: Volt

Gy: Gray

μ l: Mikrolitre

gr: Gram

M: Molar

lt: Litre

mM: Milimolar

mA: Miliamper

1. GİRİŞ

Tüm canlılar, yaşamları boyunca doğal radyasyon ortamında bulunurlar. Evrim, günümüz koşullarından çok daha yüksek doğal radyasyon ortamında gerçekleşmiştir. Radyasyon ve radyoaktivite, Roentgen ve Becquerel tarafından yüzyıldan daha uzun zaman önce keşfedildiğinden beri birçok bilim adamı bu konuda çalışmaktadır. 1927'de Herman J. Muller'in, 1946'da kendisine Nobel tıp ödülünü kazandıracak olan, X ışınlarının mutajen olduğunu ve mutasyon frekans oranı ile doz arasında lineer ilişki varlığını keşfinden sonra, iyonize radyasyonun insanlarda mutasyonel risk kaynağı olabileceği konusu bilim dünyasında büyük ilgi uyandırmıştır (Serpil 2006).

Radyasyonun tehlikeli etkilerinin ortaya çıkmasıyla 1928'de Londra'da 1. Uluslararası Radyoloji Kongresi düzenlenmiş, radyasyon dozunu ölçecek standart bir metot ve birimin geliştirilmesi çalışmalarının yapılması için bir komite kurulmuştur. 1928 yılında kurulan komisyon 1950'de yeniden örgütlenerek Uluslararası Radyolojik Korunma Komisyonu (ICRP) adını almıştır. Komisyon 1990 yılında yayınladığı bir bildiriyle sınıflama sistemine son şeklini vermiştir. Bildirge somatik etkileri, stokastik (doz bağımsız) ve deterministik (doz bağımlı) etki şeklinde ayırmıştır ve kalıtsal etkileri de stokastik etki olarak belirlemiştir (Onaran 1997).

1980 yılında in vivo olarak radyasyonun indüklediği kanserin ve in vitro hücrel dönüşümün genel özellikleri ortaya konmuştur. Geçen 20 yıl boyunca radyasyon alanındaki çalışmalar, daha çok memeli hücrelerindeki radyasyon etkilerinin hücrel ve moleküler mekanizmalarının anlaşılması üzerine olmuştur. Bu sayede iyonize radyasyon, DNA hasarına karşı hücrel ve moleküler cevapların araştırılmasında kullanışlı bir araç olmuştur (Little 2000).

Çalışmamızda iyonize radyasyon kullanılmıştır. İyonize radyasyon kaynağı olarak hastanelerin genellikle onkoloji ve radyoloji bölümlerinde kullanılan lineer hızlandırıcı cihazı kullanılmıştır. Bu cihaz radyoterapide yaygın olarak kullanılır ve bu cihaz sayesinde yüksek enerjili ışınlar elde edilir (Kutluk ve Kars 1992).

Geçtiğimiz yıllar içerisinde radyoprotektif amaçlı yapılan çalışmalarda radyoprotektör ajan olarak bitkisel fenolik bileşikler kullanılmıştır. Radyasyon hücrel oksidatif hasara ve indirekt etki olarak serbest oksijen radikallerinin oluşumuna neden olabilir. Fenolik bileşikler antioksidan özellikleri sayesinde bu serbest oksijen radikallerinin uzaklaştırılmasında önemli rol oynarlar (Devipriya ve ark. 2008).

Sağlıklı hücrelerdeki, doku hasarı, onkogenik dönüşümün artmış riski uzun ve kısa süreli hasarlar antioksidanlar tarafından azaltılabilir. Yeni bulgular, antioksidan fenolik bileşiklerin kanser hücrelerindeki apoptozu indüklediğini ve gelecekteki adjuvan terapilerde kullanılabileceklerini göstermektedir. Epidemiyolojik olarak, antioksidanlarca zengin olan besinleri tüketmemiz belli kanserlerin oluşum riskini azaltır. Deneysel sistemlerde de görüldüğü gibi antioksidanlar radyasyonun indüklediği onkogenik transformasyona karşı koruyucu etki gösterir (Borek 2004).

Çalışmamızda fenolik asitlerden olan kinik asidin, radyasyonun indüklediği genotoksik hasara karşı radyokoruyucu etkisi incelenecektir. Kinik asit kına kına bitkisi, kıvılcık, elma, kahve ve kakao tohumlarından ve başka bitkilerden elde edilen kristal halinde bir maddedir ve önemli bir astrenjandır. Kinik asit bileşikleri üzerine yapılan çalışmalarda hiçbir mutajenik etkiye rastlanmamıştır ve antiinflamatuvar özelliği olduğu gözlenmiştir. (Yoshimoto ve ark. 2002, Zeng ve ark 2009). Kinik asidin klorogenik asit, 3,5-dikafeoil-4-succinylkinik asit ve 3,5-dikafeoilkinik asit türevleri önemli antioksidan aktivite gösterirler (Chuda ve ark 1996).

Çalışmamızda insan periferik kan lenfositlerinde genotoksik hasar yaratmak için en önemli fiziksel ajanlardan biri olan iyonize radyasyon kullanılmıştır. İyonize radyasyonun DNA molekülüne zincir kırıkları, kromozom düzensizlikleri, oksidatif hasar gibi birçok etkisi vardır (Özalpan 2001).

Radyasyonun indüklediği hasardan korunmak için, birçok antioksidan fenolik maddenin biyosentezinde ve yapısında bulunan kinik asidin, serbest radikalleri azaltıcı etkisinden dolayı radyasyonun indüklediği hasarı azaltacağı düşünülmüştür. Çalışmamızda in vitro COMET testi kullanılmıştır. Bu test önemli genotoksisite test yöntemleridir ve hızlı güvenilir sonuçlar verir. Bu test sayesinde radyasyonun indüklediği genetik materyal hasarı belirlenebilmektedir (Tice ve ark 2000, Fenech 1993). Bilinçli veya bilinçsiz olarak maruz kalınan radyasyonun insandaki geç etkileri göz ardı edilemeyecek kadar çoktur. Bu etkileri azaltma amacıyla bitki kaynaklı fenoliklerin tüketilmesi önemlidir. Bu zamana kadar birçok fenolik ile çalışma yapılmıştır. Bu çalışmada, radyasyonun genotoksik ve kinik asidin radyokoruyucu etkisi hakkında bilgi verilecektir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1 Bitkisel Fenolik Bileşikler

Fenolik bileşikler bitkilerde doğal olarak oluşan maddelerdir. Bir veya daha fazla aromatik benzen halkaları ile bir veya daha fazla hidroksil gruplarının (-OH) bir araya gelmesiyle oluşur. Fenolik bileşikler asidiktir ve kolayca parçalanabilirler (Frank 2004).

Fenolik bileşikler ikincil metabolitler olarak tanınmaktadırlar. Bitki dokularının normal gelişimi sırasında, enfeksiyon, yaralanma ve UV ışınlarına maruz kalma gibi stres koşulları altında sentezlenmektedir. Meyvelerde ürünlerin keskinlik, sertlik, renk, aroma, koku, ve oksidatif sağlamlığına katkıda bulunmaktadır. Ancak fenolik bileşiklerin dokulardaki ve hücrelerdeki düzeyi daima aynı değildir (Naczki ve Shaidi 2004).

Fenolik bileşikler öjenol, arbutin gibi en basit yapılardan üznik asit, rotenon gibi en kompleks yapılara kadar çeşitlenirler. Fenolik bileşiklerin bir kısmı suda çözünebilen glikozidik formda bulunurlar. Glikozidik fenolik bileşikler hücrede merkezi kofulda bulunur. Diğer fenolik bileşikler lipofildir ve hücrede sitoplazmada bulunurlar. Doğal olarak oluşan 8000 bitkisel fenolik bileşik vardır ve bunların yaklaşık olarak yarısı flavonoidlerdir (Harbourne 1999).

Bütün fenolik bileşikler bir ya da birden fazla benzen ile bir veya daha fazla hidroksil grubuna sahiptir. Metil, metoksil, amino veya glikosil gruplarıyla farklılaşabilirler (Beckman 2000).

Kromotografik teknikler ile bitkilerde yaygın olarak bulunan ve kararlı yapıya sahip olan fenolik bileşiklerin tanımlanabilmesi mümkündür. Bitki fenolik bileşiklerinin farklı kromotografik teknikler ile analizi sayesinde çeşitli türlerde tanımlama ve taksonomik amaçlı araştırmalar gerçekleştirilmiştir (Ulubeldi 1984, Martelock ve ark. 1994) .

Bitki fenolikleri; basit fenoller (benzoik ve sinamik asit türevleri), kumarinleri, flavonoidleri, stilbenleri, tanenleri, lignanları, ligninleri(Naczki ve Shaid 2004) ve kinonları (Harbourne 1994) içermektedirler.

Basit fenoller fenolik asitleri ve fenolik ketonları içerirler. Fenilpropanoidler C₆-C₃ çekirdek yapısına sahiptirler. Koumarinler, fenilpropanoid türevleridirler. Koumarinler bitkisel orjinli yiyeceklerde serbest ya da glikozid formunda bulunan cis-0-hidroksisinamik asit türevlerinin laktonlarıdır. En önemli grupları basit coumarinler, furanokoumarinler ve piranocoumarinlerdir. Bu gruplar bitkisel yiyeceklerde serbest ya da glikozid formlarında bulunur. Coumarinler, Umbelliferae ve Rataceae familyalarında bulunur (Murray et al. 1982)

Lignanlar, merkezi karbonları yan bağlar ile bağlanmış fenilpropanoid dimerleridir. Oksijenlenmelerine göre 2 gruba ayrılırlar. Bunlar lineer ve siklo lignanlardır. Lignanlar bitkilerde savunma maddeleri olarak rol oynarlar (Davin ve James , 1992). Ligninler 3 tane monolignol olan p-koumaril, sinopil ve koniferil alkollerinin polimerizasyonu sonucu oluşur. Lignin bitkilerde hücre duvarında bulunan selüloz maddesine kovalent bağlı olarak bulunur. Bu özelliği sayesinde bitkileri, herbivorlara ve patojenik mikroorganizmalara karşı korur (Lewis ve Yamamoto 1990).

Tanenler yüksek bitkilerde bulunan polifenolik ikincil metabolitlerdir. Tanenler gallik asit türevleridirler. Dört ana gruba ayrılırlar. Bu gruplar gallotanenler, elajitanenler, kompleks tanenler ve kondense tanenlerden oluşurlar (Khanbabae ve Van Ree, 2001).Kinonlar ortak bir kinon çekirdeğine sahip ve benzokinon, naftakinon ve anthokinonlar olarak 3 alt gruba ayrılan pigmentlerdir (Harbourne, 1999). Stilbenoidler, sinamik asit ve molinil koenzim A dan türevlenen C₆-C₂-C₆ iskeletine sahip fenolik bileşiklerdir. Stilbenoidlere, Angiospermae altbölümüne ait bitkilerde rastlanır (Gorham 1996).

Flavonoidler 5 ayrı başlık altında sınıflandırılabilirler. Antosiyanin maviden kırmızı ya kadar olan pigmentlerdir. Antoklorlar ise sarı pigmentlerdir. Antosiyaninler suda çözülebilir pigmentlerdir ve 3. Konumdaki karbonil grupları eksik olduğundan dolayı flavanlar olarak da bilinirler. Minör flavonoidler; dihidriflavonları, dihidrokolkonları, flavanonları, flavonları, flavonolları, Leguminosae familyasında bulunan izoflavonoidleri ve proteinlerle birleşme affinitesi gösteren tanenleri içerirler. Flavonoidler yakın ilişkili yapılara sahiptirler ve flavonun C₁₅ heterosiklik çekirdeğini esas alırlar (Harbourne 1994).

Fenolik bileşikler bitkileri ultraviyole ışıklardan hastalık ve zararlılardan korurlar. Renk ve aromaya katkıda bulunurlar, aynı zamanda büyümeye ve üremeye yardımcı olurlar (Frank, 2004). Fenolik bileşiklerin bitkileri fungal, bakteriyel etmenlere ve abiyotik stres faktörlerine karşı koruyabildikleri belirtilmiştir (Braun ve Tevini 1993).

Gallik, klorojenik, kafeik, elajik ve ferulik asitler gibi meyvelerde bulunan fenolik asitler antimutajenik (Malaveille ve ark. 1998), antikanserojen (Arimoto-Bobayashi ve ark., 1999)ve antitümör (Owen ve ark. 2000) etkilere sahiptirler.

Fenolik bileşikler biyolojik özelliklerinin dışında aynı zamanda gıda, kozmetik ve farmakolojide de kullanılmaktadır. (Moure ve ark. 2001).

Ayrıca yoğunluğu düşük lipoproteinler (LDL) ve trombositlerin toplanması üzerine fenolik bileşiklerin faydalı etkileri vardır. Aynı zamanda fenolik bileşikler kalp damarlarının kan pıhtısı ile tıkanmasında bazı temel risk faktörlerini azaltmaktadırlar (Poyrazoğlu ve ark. 2002).

İpriflavin, ilk olarak Macaristan'da üretilen bir flavonoiddir ve osteoporoz tedavisinde kullanılır. Kemikte total Ca^{+2} oranını artırır ve yapılan klinik çalışmalar sonucu günlük alım dozu 600mg'dır (Dinçer 1997).

Yapılan farmakolojik araştırmalara göre; yüksek fenolik bileşik içeren sebze ve meyvelerin tüketimi kalp, beyin hastalıkları ve kanser ölüm oranını azaltmaktadır. (Hertog ve ark. 1997).

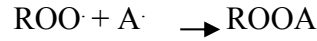
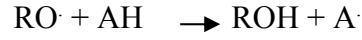
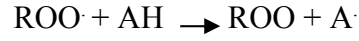
Flavanoidler ve diğer bitki fenoliklerinin süperoksit, peroksit ve nitrik oksit gibi radikalleri temizleme, demir ve bakır şelasyonu, α -tokoferol rejenerasyonu fonksiyonlarına ek olarak; vazodilatatör, immünstimulan, antialerjik, östrojenik, antiviral etkileri de söz konusudur (Çimen ve Burak 1999).

İnsanda bulunan serbest radikaller; yağlar, proteinler ve nükleik asitlerin oksidatif deformasyonuna neden olmaktadır. Antioksidan bileşikler ise bu serbest radikalleri etkisiz hale getirme yeteneğine sahiptir (Clifford 1998).

Yiyeceklerin hazırlanması ve tüketimi sırasında ortaya çıkan ana değişikliklerden birisi oksidasyondur. Özellikle lipid oksidasyonu yiyeceklerin kalitesi ve güvenirliliğini

etkiler. Fenolik bileşikler ve onların bazı türleri otooksidasyonun önlenmesinde çok etkili rol oynarlar. Bazı bitki fenolikleri son zamanlarda antioksidan olarak kabul edilmişlerdir ve ticari olarak üretilmektedirler (Feridoon ve ark. 1992).

Fenolik bileşiklerin antioksidan aktivitesi; serbest radikalleri temizlemesi ve hidrojen atomlarını veya elektronlarını vermesinden kaynaklanmaktadır. Fenolik bileşiklerin yapıları serbest radikallerin belirlenmesinde bir anahtardır. Fenolik bileşiklerin antioksidan etkileri ve faydaları onların emilimine ve metabolizmasına bağlıdır (Balasundram ve ark. 2005). Fenolik antioksidanlar (AH) , lipid radikallere hızlı H^+ vererek lipid oksidasyonu ile etkileşir. Görevleri lipid peroksi (ROO) ve alkoksil (RO) radikalini parçalamak ve böylece lipid peroksidasyon zincir reaksiyonunu sonlandırmaktır.



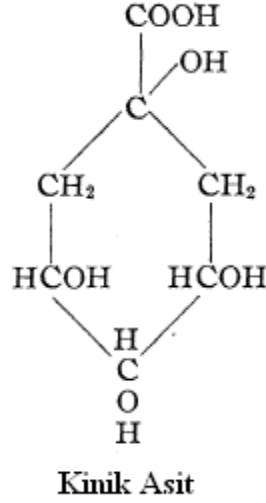
Sonuçta oluşan fenoksi radikali yeni bir serbest radikal oluşumunu başlatmamalı veya zincir reaksiyonu ile hızlı bir oksidasyona maruz kalmalıdır. Bu yönden fenolik antioksidanlar mükemmel H^+ ve e^- donörleridir (Feridoon ve ark. 1992, Tüzün C 1996).

Cai ve ark. (2004), Çin'deki antikanserojen özelliğe sahip geleneksel tıbbi bitkilerin 112 türünde fenolik bileşikler ile antioksidan aktivitesi arasındaki ilişkiyi incelemişlerdir. Sonuç olarak, incelenen tıbbi bitkilerde fenolik bileşiklerin baskın bir antioksidan özelliğe sahip olduğunu bulmuşlardır. Meyve ve sebzelerle yapılan çeşitli çalışmalarda flavonoidler gibi polifenol bileşiklerin antioksidan aktiviteye etki ettikleri bulunmuştur (Bors ve ark. 1990).

Geçtiğimiz 10 yılda yapılan çalışmalara göre; bitkilerdeki fenolik bileşiklerin antioksidan özelliği bakımından, vitamin E ve vitamin C' den daha fazla etkili olduğu bulunmuştur (Rene ve ark. 2001)

2.1.1 Kinik Asit

Kinik asit kına kına bitkisi, kızılçık, elma, kahve ve kakao tohumlarından ve başka bitkilerden elde edilen kristal halinde bir maddedir. Ayrıca sentetik olarak klorojenik asidin hidrolizi ile de elde edilir (Zeiger ve Tice 1998).



Şekil 2.1. Kinik asidin moleküler yapısı

Kinik asit ilk olarak 1950'lerde bakteriyel oksidasyon ve aromatisasyon çalışmalarında karbon kaynağı olarak kullanıldı (Adamson ve ark 1970). Kinik asit birçok doğal olarak oluşan maddelerin asimetrik çok basamaklı sentezlerinde başlangıç materyali olarak görev alır. Kinik asit, karbon halkasındaki tüm karbonlarla yeni bağlar yaratma özelliğine sahiptir ve bu versatil özelliği sayesinde yeni fonksiyonel bileşiklerin öncül maddesi olabilir. Buna örnek olarak anti tümör özelliği bulunan COTC (2-crotonyloxymethyl-(4R,5R,6R)-4.5.6-trihydroxycyclohex-2-enone) verilebilir (Barco ve ark. 1997, Arthurs ve ark. 2008).

Zeng ve arkadaşlarının (2009) yaptığı çalışmalar sonucunda kinik asidin antiinflamatuvar özelliğinin olduğu bulunmuştur. Kinik asidin bu özelliği, nükleer faktör kapp B (NK-κB) isimli proinflamatuvar transkripsiyon faktörünün inhibisyonu mekanizması ile gerçekleştirir.

Kinik asit türevleri ile yapılan antioksidan aktivite çalışmalarında 3,4-di-*O*-kafeoil kinik asit, klorojenik asit, 3,5-dikafeoil-4-succinyl kinik asit, 4,5-di-*O*-kafeoil kinik asit, metil 4,5-di-*O*-kafeoil kinat, metil 3,5-di-*O*-kafeoil kinat ve 3,5-dikafeoil kinik asidin yüksek oranda antioksidan aktivite gösterdikleri bulunmuştur. Antioksidan özelliklerinin ortamdaki serbest radikalleri uzaklaştırma ve lipid peroksidasyonu yeteneğinden geldiği bilinmektedir. Kinik asidin antioksidan kapasitesi henüz araştırılmamıştır (Chuda ve ark. 1996, Chen ve ark. 2001, Moure ve ark. 2001, Hung ve ark. 2006).

Kinik asit ve türevlerinin antimutajenesinin belirlenmesi için yapılan çalışmalarda, patates (*Ipomoea batatas* L.) yaprağından izole edilen kinik asit ve türevlerinin antimutajenik etkilerinin olduğu gözlenmiştir (Yoshimoto ve ark. 2002).

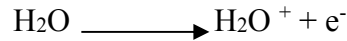
2.2 RADYASYON

Yeryüzündeki bütün canlılar, ömürleri boyunca sürekli olarak doğal ya da yapay radyasyon kaynaklarından yaşadıkları çevreye yayılan iyonlaştırıcı radyasyonların etkisi altındadır. İyonlaştırıcı radyasyon terimi, X ve gamma (γ) ışınları ile, alfa (α) ve beta (β) partikülleri, elektronlar, protonlar ve nötronlar gibi radyasyon tiplerini kapsar. İyonlaştırıcı radyasyonların canlı üzerinde oluşturduğu iyonlaşma ve uyarılma olaylarının yol açtığı fizikokimyasal değişiklikler, bir saniyeden daha kısa bir sürede olup biterler. Buna karşılık, bu fizikokimyasal değişikliklerin sebep olduğu hücre ölümü, genetik mutasyonlar ve kanser oluşumu gibi biyolojik sonuçların ortaya çıkabilmesi için, günler, aylar ve hatta yılların geçmesi gerekebilir. İyonlaştırıcı olmayan radyasyonlar ise optik ve elektromanyetik rezonans nitelikli radyasyondur. Optik radyasyonların en önemlisi güneşten kaynaklanan ultraviyole ışınlarıdır (Özalpan A. 2001). 1985 yılında Alman fizikçi Wilhelm Conrad Roentgen, X ışınlarını keşfetti. 1896 ve 1898 yılları sırasında sırası ile Antoine Becquerel ve Marie Curie uranyum ve radyumun radyoaktif özelliklerini buldular (Nias 1990).

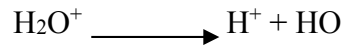
2.2.1 Suyun Hidrolizi

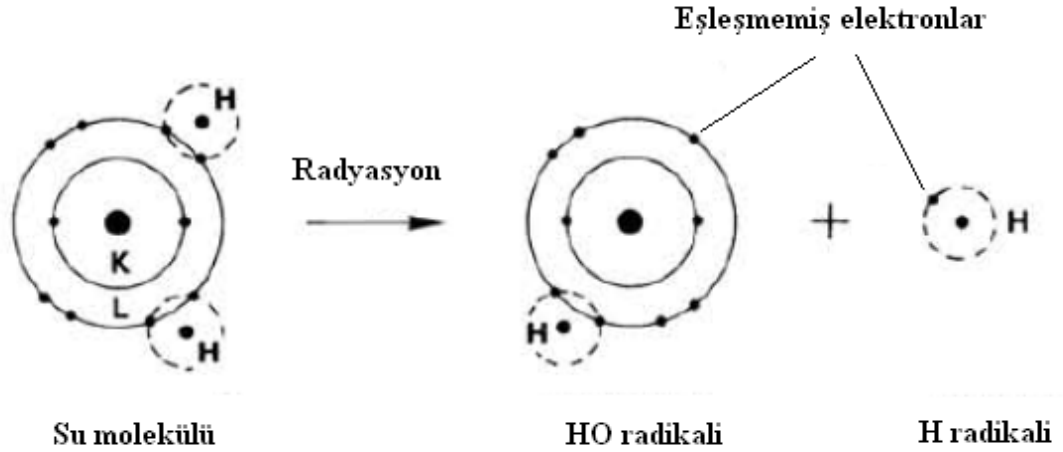
Çoğunlukla önemli biyolojik etkiler, radyasyonun su ile etkileşimi sonucu ortaya çıkar çünkü su insan vücudunun % 80 ini oluşturur. 1901 den beri radyasyonun suyu moleküllerine ayrıştırdığı bilinmektedir.

Radikallerin oluşumu sırasında ilk fenomen su moleküllerinin yaklaşık 13 eV ile iyonlaşması şeklinde olur:



Bu reaksiyon sonucunda radikal iyonlar oluşur. Bu iyonlar çok kararsızdır ve reaktif özellikli nötral radikalleri oluştururlar.

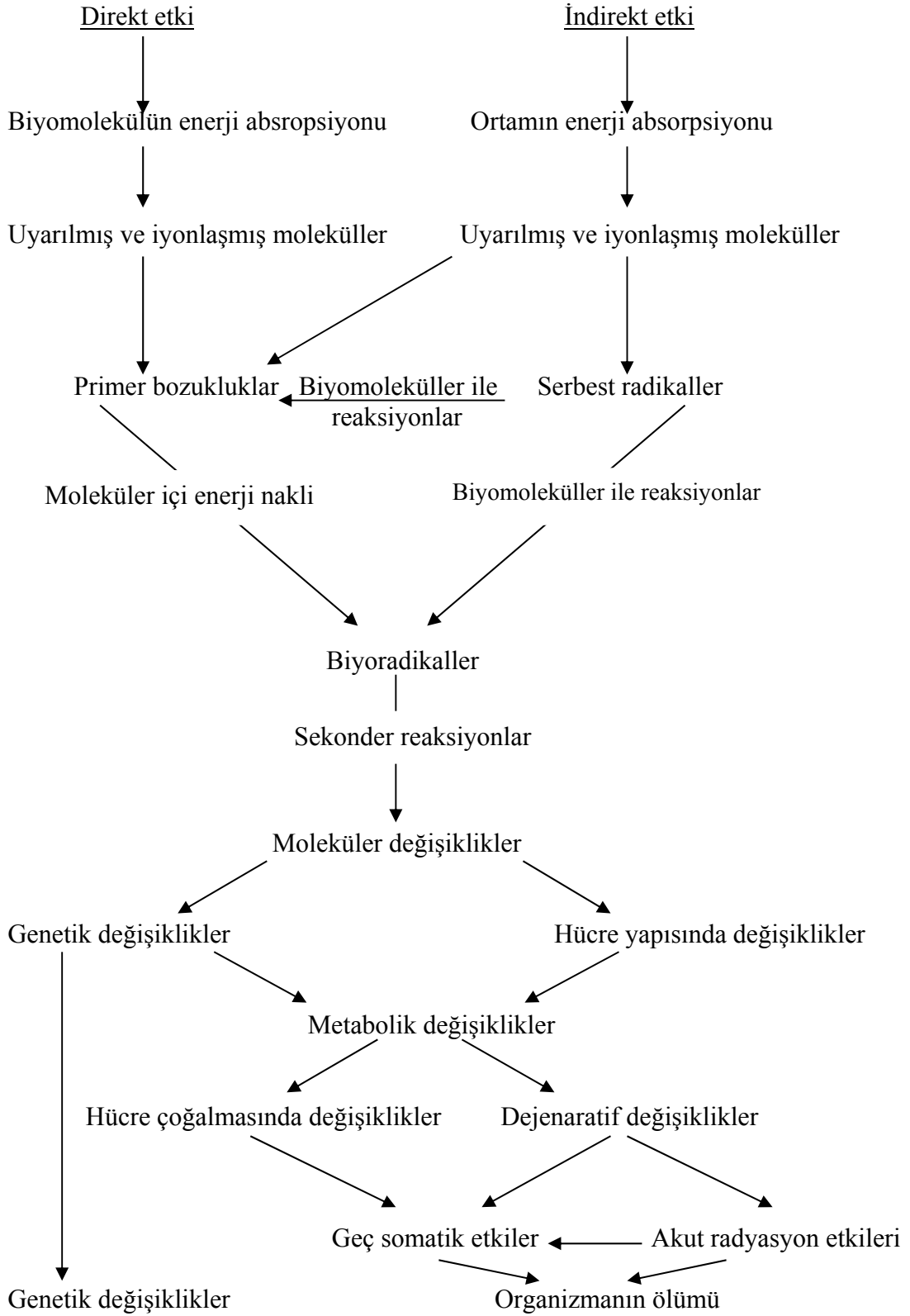




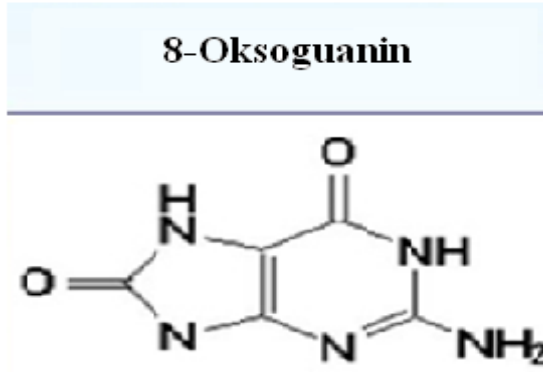
Şekil 2.2. Su Molekülünün radyasyon ile hidrolizi

Radikal terimi, eşleşmemiş elektron içeren ve bu sayede büyük kimyasal reaktivite gösteren atom ve atom gruplarını tanımlamak için kullanılır. Hidroksil (OH) radikali kimyasal reaktivite gösteren çok kuvvetli bir oksitleyici ajandır (Tubiana ve ark. 1990).

Radyasyonun canlıda oluşturduğu etkilerin incelenmesinde, radyasyon enerjisinin absorplanması ile biyolojik etkinin ortaya çıkışı arasındaki sürede birbirini izleyen olaylar zincirini üç etki kademesinde sıralamak mümkündür. Bir biyolojik sistemde radyasyonun etkisi ile oluşan bütün bu olaylar zinciri, eğer radyasyon enerjisinin, örneğin DNA ya da bir enzim molekülü gibi özel bir biyolojik yapı tarafından absorplanması ile başlamışsa, böyle bir etkiye radyasyonun direkt etkisi adı verilir. Radyasyonun indirek etkisi atoma enerji transferi sonucu, serbest radikaller oluşturarak molekülün parçalanmasını kapsar. Serbest radikal, yörüngesinde paylaşılmamış elektron bulunan elektriksel olarak nötral atomlardır. Radikal elektrofilik ve son derece reaktiftir. Bu serbest radikaller, biyolojik moleküllerle reaksiyona girerek onları değişikliğe uğratırlar. Örneğin guaninin oksidasyonu 7,8-dihidro-8-oksoguanin (oxoG) yapısını oluşturur. Bu yapı repliasyon sırasında adeninle baz çifti oluşturur. İnsan kanserlerinde sıkça görülen bir komplikasyondur. OxoG yapısı radyasyonun etkisi ile oluşur (Dertinger ve Jung 1960).



Şekil2.3. Radyasyonun canlıdaki etki kademeleri (Dertinger ve Jung 1970).



Şekil2.4. 8-oksoguaninin moleküler yapısı (Tubiana ve ark. 1990)..

2.2.2 Radyasyon Hasarları

Hücrelerin radyasyona maruz kalmasından dolayı hücrelerde çeşitli hasarlar oluşabilir. Radyasyonun memeli hücrelerinde oluşturduğu hasarları üç gruba ayırmak mümkündür:

1- Letal Hasarlar: Bunlar onarılmayan irreversibl olaylardır ve hücre ölümüne yol açarlar. Bu durum, hücrelerde fonksiyon kaybı ve bölünme yeteneği kaybı şeklinde ortaya çıkar. Bu tip hasar genellikle tek bir radyasyon dozunun etkisiyle DNA zincirlerindeki nükleotidlerin bozulması sonucunda gerçekleşir.

2- Subletal Hasarlar: Letal Hasarlar ikinci bir doz uygulamasında , yeni subletal hasarların eklenmemesi sonucu birkaç saat içerisinde onarırlar. Bu tip hasarlarda tek bir doz radyasyona maruz kalan DNA molekülünde tek zincir kırığı oluşur ve bu kırık tamir edilir. İkinci kere radyasyona maruz kalınması sonucu, yine bir tek zincir kırığı oluşursa, bu kırıklar etkileşir ve hücre ölümünü tetikler.

3- Potansiyel Letal Hasarlar: Bunlar ışınlanmadan sonra hücrenin bulunduğu ortam koşuluna göre değişkenlik gösteren hasarlardır. Normal koşullarda hasar ölümcüldür fakat çevresel etkilerin manipulasyonu ile birlikte hasar tamir edilebilir (Kaya 1997).

Radyasyon moleküllerin ve atomların iyonize duruma gelmesine veya uyarılmasına yol açar. Bu mekanizmalar, serbest radikal üretimi, kimyasal bağların kırılması, makromoleküller arasında yeni kimyasal veya çapraz bağların oluşması ve önemli hücre işlemlerini denetleyen moleküllere hasar vermek şeklinde ortaya çıkarlar (Ward 1988).

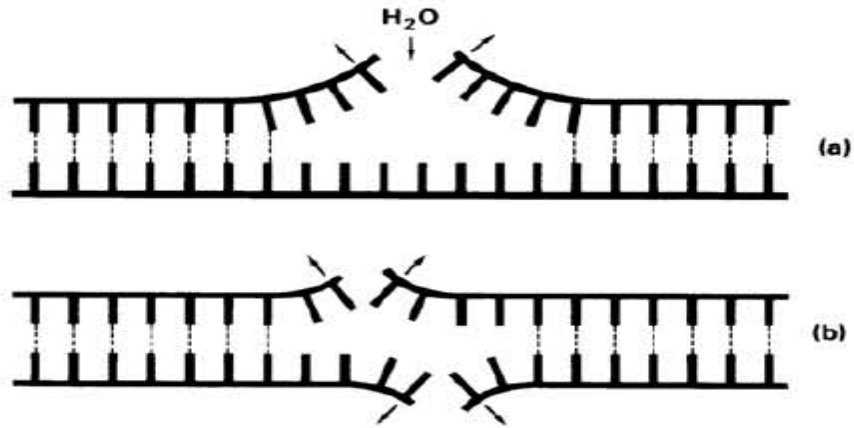
2.2.3 Radyasyonun DNA molekülüne etkileri

Radyasyonun DNA molekülünün yapı, fonksiyon ve sentezine olan etkileri ile ilgili çok sayıda araştırmalar yapılmıştır. Bu araştırmalar genel olarak radyasyonun DNA'ya etkisinin doza, zamana ve hücrenin siklustaki durumuna bağlı olduğunu göstermektedir.

2.2.3.1 Yapısal Hasarlar

İyonize radyasyonun DNA molekülünde oluşturduğu hasarların en önemlileri zincir kırılmaları (Olive, 1998), baz hasarları ve baz kayıpları, denatürasyon bölgelerinin oluşması ve çapraz bağlanmalardır (McMillan ve Steel 1997).

Zincir kırılmalarının DNA molekülünde ortaya çıkan en önemli hasar grubunu oluşturduğu kabul edilmektedir. Bu hasarlar tek zincir kırılmaları ve çift zincir kırılmaları şeklinde 2 gruba ayrılır. Tek zincir kırılmaları, DNA molekülünün çift zincirlerinden bir tanesinde, şeker-fosfat iskeletinde meydana gelen bir kopma şeklinde oluşurlar. Bu tür kırılmalar, düşük iyonizasyon yoğunluklu radyasyonlar tarafından meydana getirilen en yaygın hasarlardır. Çoğunlukla OH radikallerinin aksiyonu sonucu oluşurlar. Çift zincir kırılmaları ise, tek veya bir enerji transferi olayı ile yada iki tek zincir kırılmasının birbirine çok yakın ve karşılıklı bölgelerde oluşması sonucunda ortaya çıkarlar. Bu tip zincir kırılmalarının oluşması için yüksek iyonizasyon yoğunluğuna sahip radyasyonlar gerekmektedir (Friedberg 1995).



Şekil2.5. a .Tek zincir kırıkları (Tubiana ve ark. 1990).

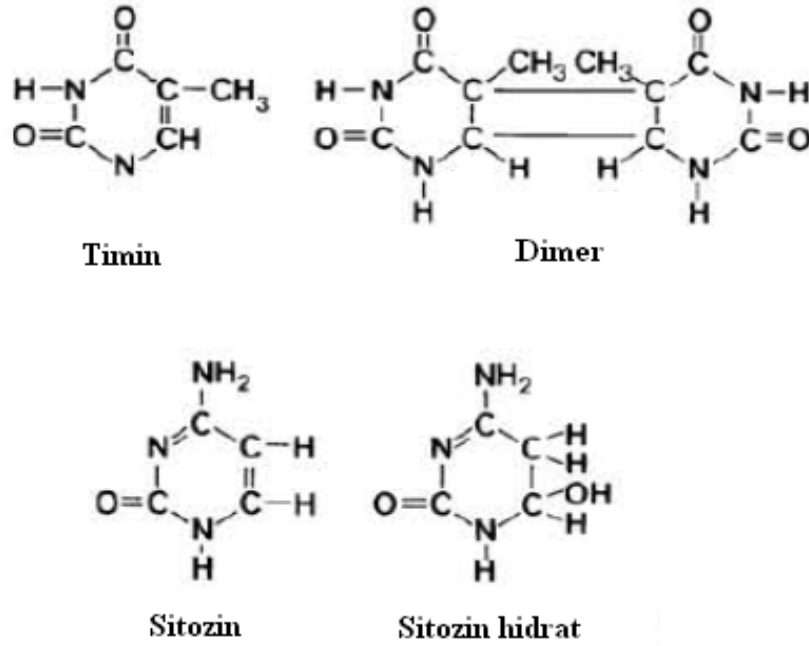
Şekil2.5.b.Çift zincir kırıkları (Tubiana ve ark. 1990).

DNA molekülünün, iyonize radyasyon için ilk hedef olduğu düşünülür ve hücre ölümlerinin ana nedenlerinin başında yanlış onarılan veya onarılamayan DNA lezyonları yer alır. İyonize radyasyon, diploid bir hücrede Gy başına yaklaşık 1000 tek zincir kırıkları (SSB) ve 25-40 tane çift zincir kırıkları oluşturur (Olive 1998)

DNA çift zincir kırıkları, DNA lezyonları içinde en sitotoksik lezyon olarak kabul edilir. İyonize radyasyon tarafından indüklenebilir ve tamir edilmemiş olarak kalırsa hücre ölümüne neden olabilir. Ayrıca yanlış onarılmış bir DNA çift zincir kırığı genomik instabiliteye ve kromozomal translokasyonlara neden olabilir (Mehaney Bl ve ark. 2009).

DNA molekülünde iyonize olmayan (UV) radyasyonun etkisi ile ortaya çıkabilecek diğer bir yapısal değişiklik, baz hasarları ve baz kayıplarıdır. Bu hasarlar açısından pirimidinler pürinlere karşı 2 kat daha fazla duyarlıdır. En duyarlı baz ise Timindir. Baz hasarları ve baz kayıpları genellikle şeker yapısında kimyasal değişikliklere yol açar. Bu değişiklikler N-glikozit bağının hidrolizi sonucu meydana gelirler. Şeker molekülündeki hasarlar genellikle nükleotit zincirinde kırılmalarının oluşmasına sebep olurlar. Bazların radyoduyarlılıklarına artan şekilde sıralanışı şöyledir: Timin > Sitozin > Adenin > Guanin (Mcmillan ve Steel 1997).

UV Radyasyon etkisiyle, tek zincir kırığı olan iki komşu baz, bir kovalent bağ ile bağlanıp aralarında bir siklobütan halka oluşturabilir. Oluşan bu yapılar dimer olarak adlandırılır ve bu dimerler DNA replikasyonunu engeleyebilirler. En stabil dimerler Timin dimerleridir. Bu dimerler, radyasyona maruz kalan bölgelerde cilt kanserlerinin indüksiyonunda rol oynarlar. Timin dimerler UV radyasyonun etkisi ile oluşabilir. Radyasyonun bir başka etkisi de pirimidin bazlarının hidrasyonudur. Örneğin sitozin bazının beş ve altıncı bağlarının açılması ve araya su molekülünün eklenmesi ile oluşan molekül, pirimidin hidratlar genetik kodun değişiminde rol oynarlar (Tubiana ve ark. 1990).



Şekil 2.6. Radyasyon etkisi ile oluşan çeşitli baz hasarları

Radyasyon yine DNA molekülünün fonksiyon kaybına ve inhibisyonuna yol açar. DNA molekülünün transformasyon yeteneğini azaltır ve eğer bu tür etkiler onarılmazsa hücrenin ölümüne yol açarlar (Dertinger ve Jung 1970) .

Radyasyonun DNA sentezine etkisinin genel olarak inhibe edici nitelikte olduğunu söylemek mümkündür. Radyasyonun DNA sentezine etkileri ile ilgili olarak aşağıda sıralanan genellemeleri yapmak mümkündür.

- a. Hızlı ve yavaş bölünen hücrelerde DNA sentezinin başlaması karşı farklı duyarlılıktadır.
- b. S fazında yapılan ışınlamalar DNA sentezini inhibe eder.
- c. G₁ fazında yapılan ışınlamalar DNA sentezini bazı hücrelerde inhibe eder, bazı hücrelerde etkilemez.
- d. DNA sentezi G₁ fazındaki ışınlamalardan etkileniyor ise, bu etkiyi S fazına göre daha düşük dozlarda elde etmek mümkündür.

İyonize radyasyonun DNA sentezinde oluşturduğu diğer bir etki de, düzensiz DNA sentezidir. Bu olay, hücre siklusunun G₁ ve G₂ fazlarında da DNA sentezi yapılması durumudur. Bu sentez S fazındaki senteze göre daha yavaştır ve hasar görmüş hücredeki hasarın onarımı için yapılır (Özalpan 2001).

2.2.4 DNA Lezyonlarının Onarımı

Moleküler tamir mekanizmaları, radyasyonla indüklenen lezyonları elimine eder ve DNA molekülünün orijinal yapısını tekrar oluşturur. Bazı modifikasyonları, zincir kırıklar, çapraz bağ oluşumu gibi bir çok DNA hasarı çeşidi olmasına rağmen, bu hasarlara spesifik olan tamir mekanizmaları vardır. DNA tamir mekanizmalarından çeşitli enzimler ve hücre kontrol noktaları sorumludur (Friedberg ve ark. 1995).

DNA hasarlarının tolerans ve apoptoz gibi sonuçlarına karşı hücrenin verdiği cevaplar DNA tamir mekanizmalarının aktivasyonu ile ilişkilidir. Hatasız olarak sonuçlanan tamir mekanizmaları (foto-restorasyon, transkripsiyon gibi) DNA molekülünü orijinal haline restore ederler ve bu mekanizmalar genel olarak tek basamaklıdır. Hatalı olarak sonuçlanan tamir mekanizmaları (SOS mekanizması) sonucunda mutasyon oranı artar. Hata tamir mekanizmalarından bazıları yapısal özelliktedirler. Eksizyon tamiri gibi yapısal özellikte olan tamir mekanizmaları hücrelerde daimi olarak bulunurlar ve DNA'nın bütünlüğünü kontrol ederler. Diğer tamir mekanizmaları ise indüklenebilir özelliktedir. Bu çeşit tamir mekanizmaları hücrelerde normal olarak bulunmazlar fakat spesifik lezyonlar gelişen hücrede, hücre sel cevap olarak meydana gelirler (Tubiana ve ark. 1990).

2.2.5 Majör DNA Tamir Yolları ve Radyasyonun Etkileri

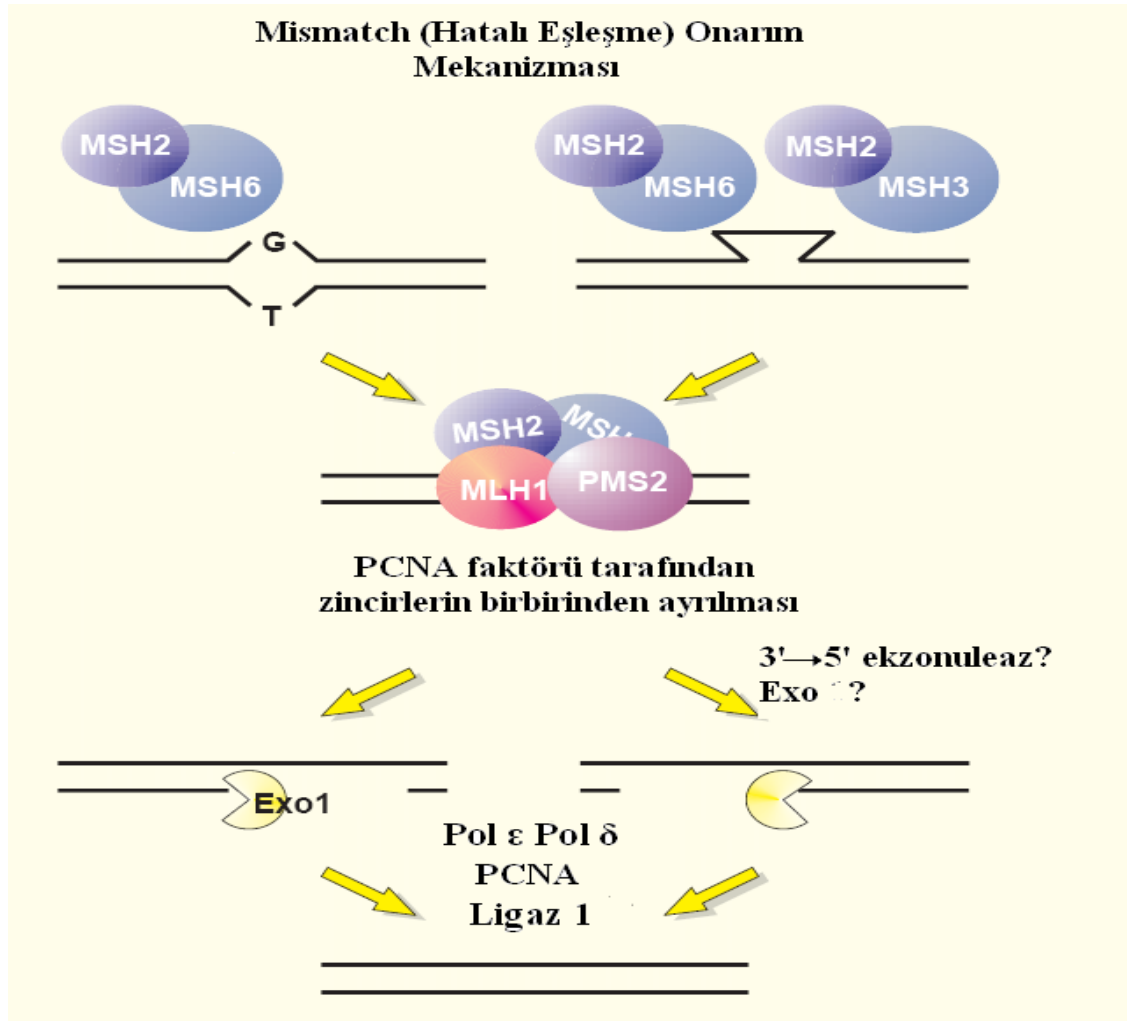
2.2.5.1 Mismatch (Hatalı Eşleşme) Tamir Mekanizması (MMT)

MMT mekanizmasındaki en önemli olay, replikasyon sırasında oluşan yanlış eşleşmiş bazları ve küçük insersiyon/delesyon ilmiklerini çıkarmaktır. *E. coli* bakterisinde MMT mekanizmasında MutS, MutH ve MutL proteinleri görev alır. Ökaryotlarda MMT mekanizmasından sorumlu MutS ve MutL proteinlerinin homologları görev alır. İnsanlarda, MMT mekanizmasının eksikliği sonucunda kalıtsal kolorektal kanserler ve bazı sporadik tümörlerin oluşumu görülür. İnsanlarda MutS homologları olan MSH2-MSH6 heterodimeri yanlış eşleşmiş bazlara bağlanır ve onları birbirine bağlar. MSH2-MSH3 heterodimeri ise küçük insersiyon/delesyon ilmiklerine bağlanır ve onları birbirine bağlar. Buna karşılık MutL homologları olan MLH1-PSM1 heterodimeri mevcuttur.

Daha sonra replikasyon aksesuar faktörü olan PCNA, zincirleri ayırt etmede rol oynar ve DNA zincirlerini birbirlerinden ayırır. Yeni sentezlenen zincir degrade olur ve bu esnada yanlış eşleşme düzeltilir. Exo1 enzimi 5'→3' eksizyonundan sorumludur. DNA Pol δ, Pol ε ve Exo1 enzimlerinin 3'→5' bu eksizyonun sorumlu olabileceği düşünülmektedir. En son MMT, DNA sentezi ve ligasyonu ile sonuçlanır (Schleif 1993, Fleck ve Nielsen 2004,).

<i>E. coli</i>	İnsan
MutS	MSH2 – MSH6
MutS	MSH2 – MSH3
MutS	MSH4 – MSH5
MutL	MLH1 – PMS2, PMS1, MLH3

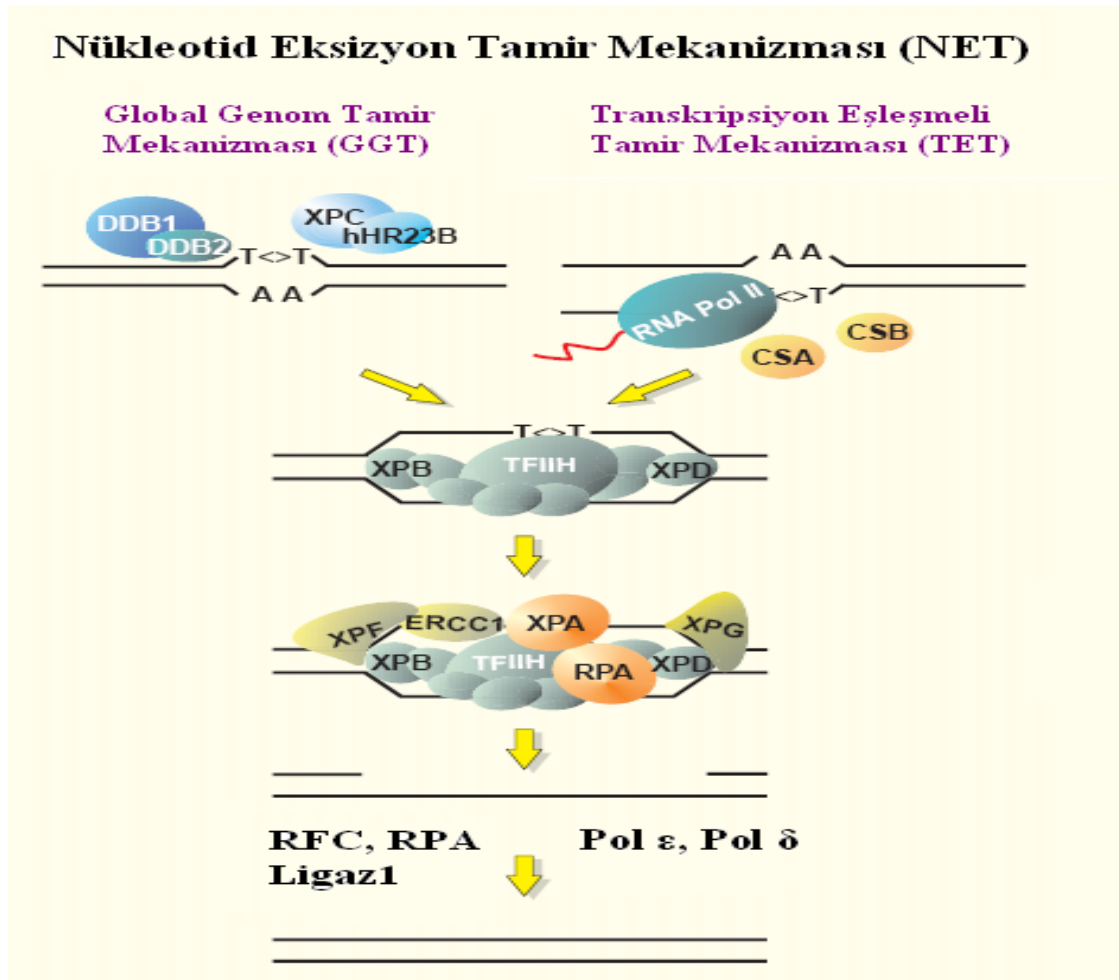
Şekil 2.7. Hatalı eşleşme onarımı proteinleri ve homologları (Schleif, 1993).



Şekil2.8. Hatalı eşleşme onarım mekanizması (Fleck ve Nielsen 2004).

2.2.5.2 Nükleotid Eksizyon Tamir Mekanizması (NET)

DNA bazları üzerinde büyük eklentiler oluşturan birçok çeşit hasarı tanıyabilen bir onarım mekanizmasıdır. Birçok DNA hasarının özellikle de heliks distorsiyonuna neden olanların ve fotoürünler tarafından oluşan lezyonların onarımında etkilidir. NET mekanizması 2 altyoldan oluşur. İlki global genom tamiridir (GGT) ve bu onarım, hasarı genomun bütününden çıkarır. Diğer onarım ise transkripsiyon eşleşmeli tamirdir (TET) ve bu onarım aktif genlerin transkribe zincirini tamir eder. Bu iki onarım arasındaki en önemli fark, hasarı tanıma safhasında kullandıkları farklı faktörlerdir. GGT mekanizmasında DDB1, DDB2 ve XPC-hHR23B proteinleri tanıma safhasından sorumlu olmasına karşın, TET mekanizmasında RNA polimeraz II ve CSA, CSB proteinleri sorumludur. Bundan sonraki aşamalarda kullandıkları proteinler aynıdır. (Fleck ve Nielsen 2004, Debeleç – Bütüner ve Kantarcı 2006).

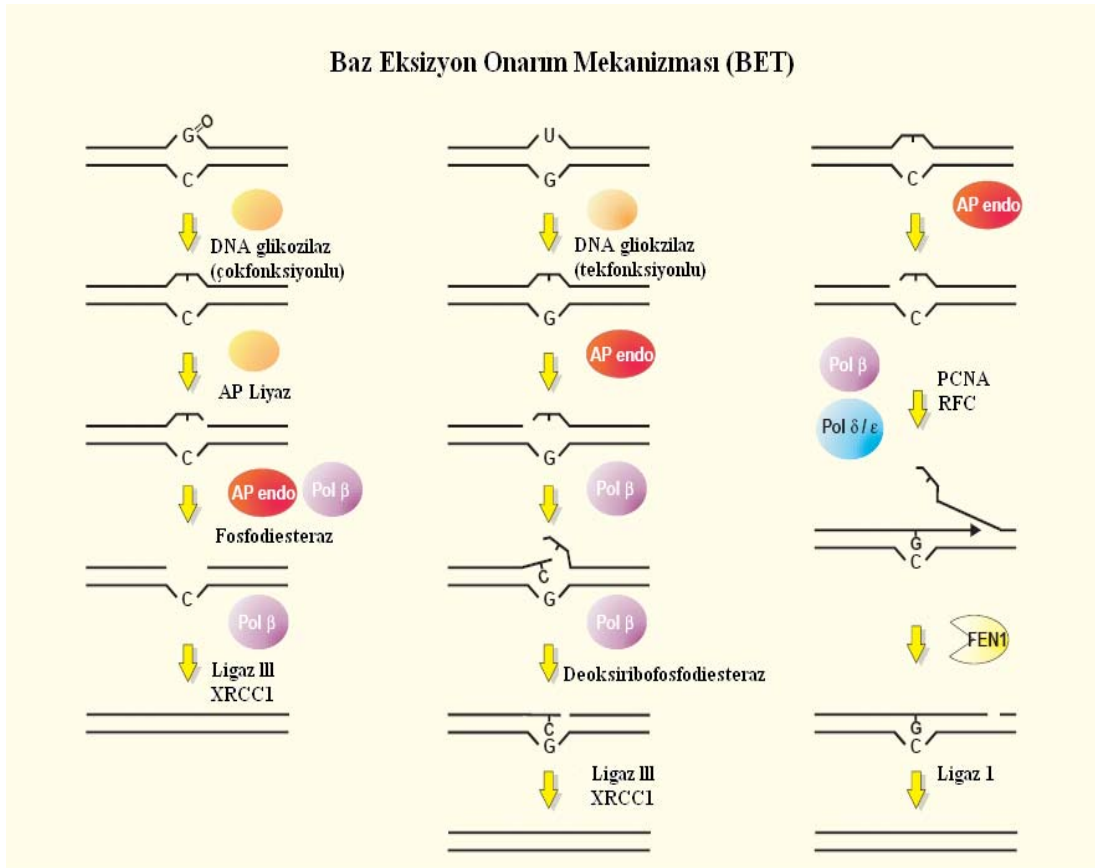


Şekil 2.9. Nükleotid eksizyon onarım mekanizması (Fleck ve Nielsen 2004).

2.2.5.3 Baz Eksizyon Tamir Mekanizması (BET)

BET mekanizması başlıca, bazların alkilasyonu, deaminasyonu ve oksidasyonu ile oluşan lezyonları onarmada önemli rol oynarlar. Hücreler birkaç DNA glikozilaz enzimi içerir ve bu enzimlerin çok geniş substrat spektrumu vardır. DNA glikozilaz enziminin, N-glikosidik bağı kesmesinden sonra bir apürinik veya apirimidinik bir bölge (AP) oluşur. Çift fonksiyonlu DNA glikozilaz enzimlerinin, şeker fosfat iskeletini 3' ucundan AP bölgesine doğru kesmeye yarayan AP liyaz aktivitesi vardır. Kesim sonrası oluşan boşluk DNA polimeraz β enzimi ile doldurulur ve ligasyon gerçekleşir (Memişoğlu ve Samson, 2000).

AP bölgelerinin tek fonksiyonlu DNA glikozilazlarla onarım işlemi, AP endonükleaz (bu enzimin insanlarda en önemli olanı APE1 dir.) enziminin aktivitesine bağlıdır. Diğer bir yöntem ise AP bölgesinin, AP endonükleaz enzimi ile açıldıktan sonra DNA polimeraz β , δ ve ϵ enzimlerinin yeni bir zincir sentezleyip Daha sonrada açılan bu AP bölgesinin FEN1 enzimi ile kesilmesine dayanır (Fleck ve Nielsen 2004).



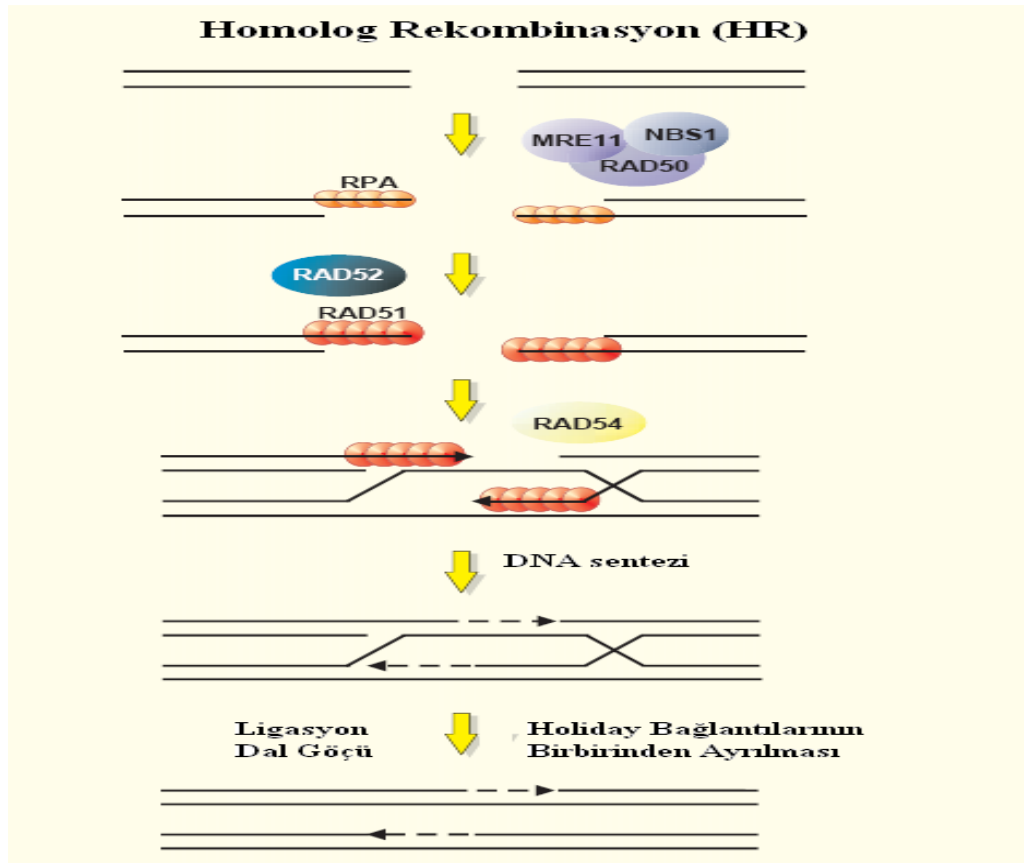
Şekil 2.10, Baz eksizyon onarım mekanizmaları (Fleck ve Nielsen 2004).

2.2.5.4 Homolog Rekombinasyon (HR)

DNA daki çift zincir kırıklarının (ÇZK) tamirinde rol oynayan en önemli onarım mekanizmasıdır. ÇZK'nın HR yoluyla onarımı için, hasarlı bölgeye homoloji gösteren bir DNA molekülü kullanılır. Bu DNA molekülü onarım kalıbı olarak kullanılır (Richardson ve Jasin 2000).

Ökaryotlarda, bu onarım mekanizmasında ÇZK bölgeleri RPA proteini yardımıyla 3' tek zincirli DNA zincirlerine dönüşürler. MRE11-RAD50-NBS1 protein kompleksi bu mekanizma için çok önemlidir. DNA sentezi ve ligasyonu sonucu Holiday Bağlantıları oluşur. Holiday bağlantı noktaları, DNA moleküllerinden birinin diğer moleküle yaptığı çapraz bağlantı noktasıdır. Ligasyon sırasında Dal Göçü olayı gerçekleşebilir. Dal göçü olayı, Holiday Bağlantılarının çift sarmal üzerinde ilerlemesidir (Thomson ve Schild 2002).

Fareler üzerine yapılan çalışmalarda, HR tamir mekanizmasında rol oynayan RAD52 ve RAD54 proteinlerinin hasar görmesi, hücrelerin radyasyona karşı olan direncini azaltabilir (Rijkers et al. 1998).

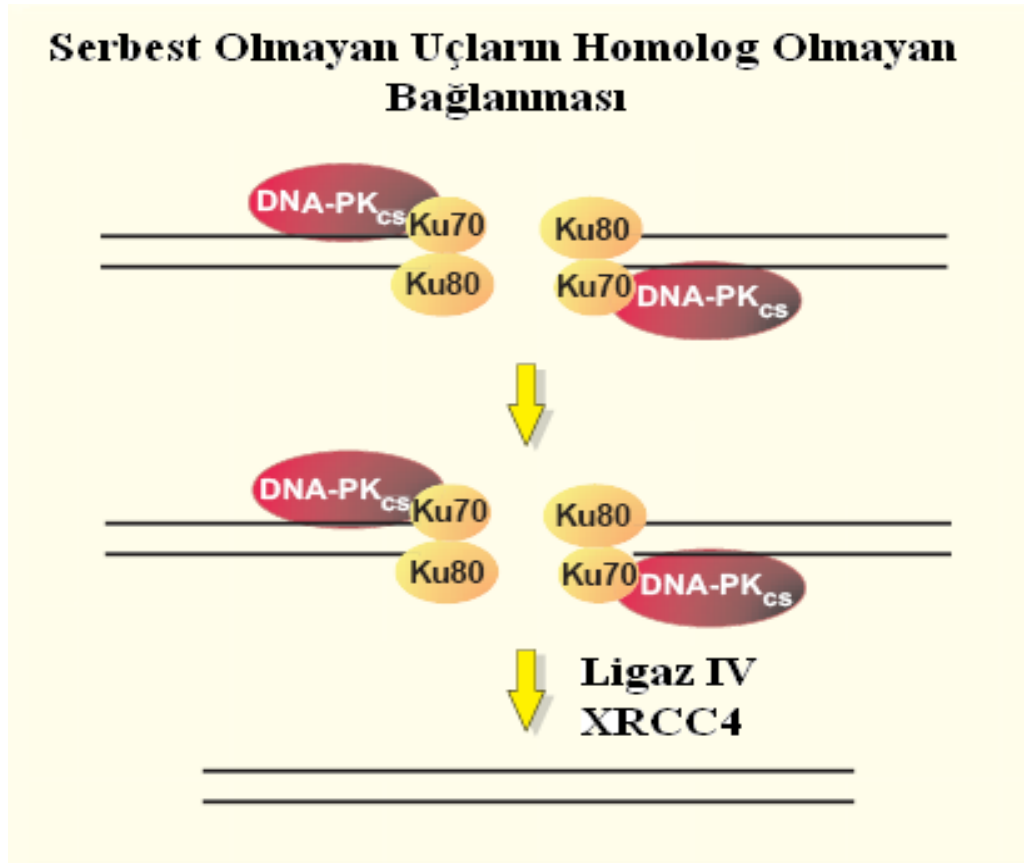


Şekil 2.11. Homolog rekombinasyon onarımı (Fleck ve Nielsen 2004).

2.2.5.5 Serbest Olmayan Uçların Homolog Olmayan Bağlanması

Ku 70-Ku 80 (DNA Bağımlı Protein Kinaz Kataliti Subunit) kompleksleri DNA kırık uçlarına bağlanırlar. DNA Bağımlı Protein Kinaz aktive olarak diğer proteinlerin hasar bölgesine gelmesini sağlar. Bu protein komplekslerinin formasyonu DNA ligaz IV – XRCC4 kompleksinin kırık uçları bağlamasını sağlar.

Bu işlemde herhangi bir homolog kromozomdan faydalanılmaz. Çünkü kırık DNA uçları bağlanabilir durumda olmayabilir ve bu yol bazen genetik bilgide kayıba neden olur. Homolog olmayan uç bağlanmasındaki hatalar iyonize radyasyon duyarlılığına ve immün yetersizliğe neden olur. Ayrıca bu onarım yolundaki hatalar Burkitt lenfoma, Ataxia telangiectasia ve KML (Philedelphia Kromozomu) gibi kanserlere yol açabilir (Onur ve ark. 2009).



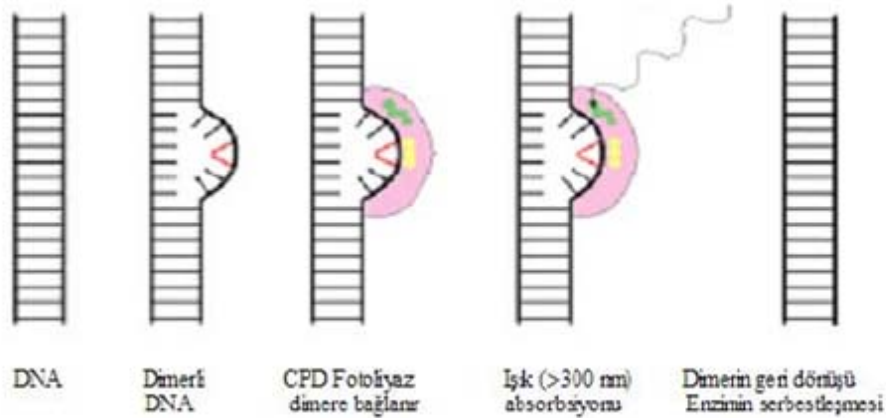
Şekil 2.12. Serbest olmayan uçların homolog olmayan bağlanması (Fleck ve Nielsen 2004).

Radyasyonun, bu onarım mekanizmasındaki Ku 80 proteinin, DNA bağımlı protein kinaz enzimi ve XRCC4 molekülü üzerine önemli etkileri vardır. Yapılan araştırmalarda, Ku 80 proteinin radyasyona maruz kalınması sonucunda, DNA ile birleşme aktivitesinin düştüğü ve bu Ku 70 proteini ile kompleks oluşturamadığı gözlenmiştir. Bunun sonucunda DNA bağımlı protein kinaz enziminin, DNA bağlanma bölgesi üzerindeki amino asit dizisinin yapısının bozulduğu ve böylece bu enzim DNA molekülüne bağlanamayıp, tamir mekanizmasının inhibisyona uğramasına neden olduğu gözlemlenmiştir (Kim ve ark. 2002, Wang ve ark. 2002).

2.2.5.6 Direk Onarım veya Hasarın Geri Döndürülmesi

2.2.5.6.1- Hasarın Doğrudan Geri Döndürülmesi (Direkt Reversal)

Bazı durumlarda ise enzim aracılığı (Fotoliyaz ve O-6-Metil-DNA-alkiltransferaz) ile gerçekleşen tek adımlı reaksiyonlar ile hasar onarılır. Siklobütan pirimidin dimerleri (CPDs), fotoliyaz enzimi tarafından ayrılarak hasar giderilir. Reaksiyona fotoreaktivasyon denir. Bu reaksiyon omurgalı memelilerde gözlemlenen bir olay değildir(Freidberg, 2003).



Şekil 2.13. Fotoreaktivasyon (Friedberg 2003).

2.2.5.6.2 O-6-Metilguanin Onarımı

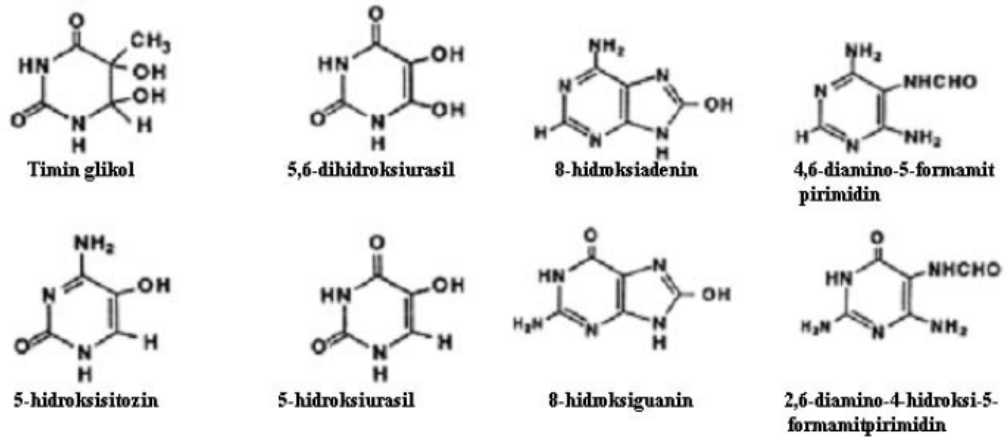
O-6-Metilguanin, alkilleyici ajanlar varlığında oluşur ve yüksek oranda mutajeniktir. O-6-Metilguanin-DNA metil transferaz enzimi, DNA molekülünde yanlış metillenen bazların CH₃ gruplarını kendi sistein rezidülerine transfer ederek normal guanin oluşumunu sağlar. Bu işlem gerçekleşirken kullanılan enzim geri dönüşümsüz baskılanır ve işlev dışı kalır. Bu yüzden bu mekanizmada enzimin özgüllüğü kadar sayısı da önemlidir (Onur ve ark. 2009).

2.2.5.6.3 Basit Tek Zincir Kırıklarının Ligasyonu

İyonize radyasyon ve peroksidler gibi ajanlar DNA zincirinde kırıklara neden olabilirler. Bu zincirde meydana gelen basit kırıklar ligaz enzimi ile giderilir. Enzim enerji gerektiren bir reaksiyon ile 5' fosfat grubu ile 3' OH grubu arasındaki fosfodiester bağımlı oluşturarak onarımı gerçekleştirir (Onur ve ark. 2009).

2.2.5.7 Oksidatif Hasarın Onarımı

Elektron taşıma sisteminin mitokondride yer alması ve mRNA sentezi esnasında RNA polimerazın bir hata okuma (proofreading) mekanizmasına sahip olmaması nedeniyle, oksidatif hasar, mitokondride kromozomal DNA'ya göre daha sıklıkla meydana gelir. Mitokondriyal solunum sonucu oluşan serbest radikaller (-O₂ / Süperoksit, H₂O₂ / Hidrojen peroksit, -OH / Hidroksil), tek zincir kırıklarına ve 8-oksoguanin ve timin glikol gibi hasarlı bazların oluşmasına sebep olur, hücreler bu tip hasarlı bazların onarımı için özel glikozilazlar içerir (Hazra ve ark. 2007).

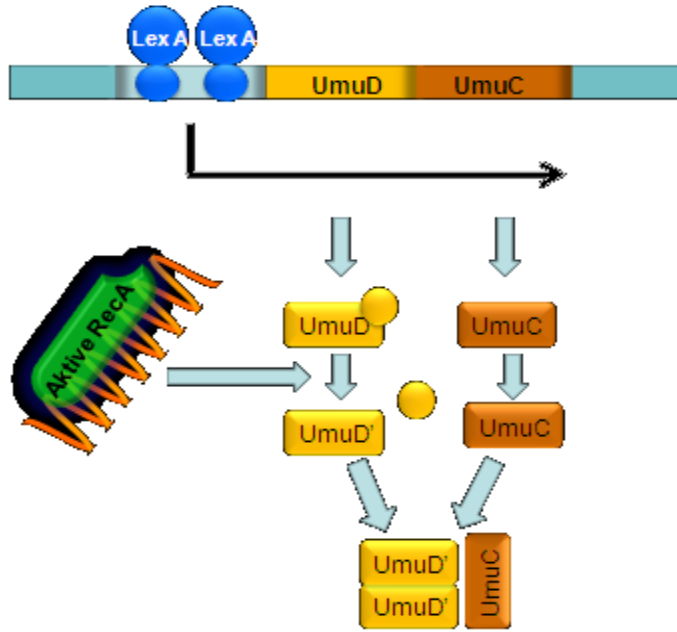


Şekil 2.14. Oksidatif hasarın sonucu oluşan bazı hatalı bazlar (Hazra ve ark 2007).

2.2.5.8 SOS Tamir Mekanizması

DNA hasarının yüksek olduğu ve diğer tamir mekanizmalarının başarılı olmadığı durumlarda devreye giren acil cevap sistemidir. DNA sentezi sırasında, DNA polimerazın lezyona rağmen sentezi devam ettirmesini sağlar. Bu yüzden hataya meyilli bir sistemdir. SOS onarım mekanizmasında, birçok proteini kodlayan genler LexA proteini tarafından baskılanır. DNA hasarı ile karşılaşılınca RecA proteini hasarlı tek zincire bağlanır ve bir kompleks oluşturur. RecA DNA ya bağlandıktan sonra LexA proteininin otoproteolitik yıkımını aktive eder. Daha sonra umuC-umuD kompleksi etkisiyle ve RecA proteininin ekzonükleaz aktivitesini inhibe etmesiyle, replikasyon gerçekleşir (Alberts ve ark. 2002).

SOS Onarım Mekanizması



Şekil 2.15. SOS onarım mekanizması (Alberts ve ark 2002).

2.2.6 Radyasyonun Kromozomlara Etkisi

Kromozomların radyasyon etkisine karşı çok duyarlı oldukları ve 0,1 Gy den daha düşük dozlarda bile bitki, hayvan ve insan kromozomlarında kırılmaların olduğu saptanmıştır. İyonlaştırıcı radyasyonların kromozomlara etkileri ışınlamadan sonraki ilk bölünmenin metafaz veya anafaz evrelerinde izlenebilir. Bu evreler kromozom yapılarının belirgin olduğu evrelerdir (Sparrow ve Moses 1952).

Eğer bir hücreye radyasyon uygulanırsa, kromozomlarda kırılmalar oluşur. Kromozomların kırılan uçları yapışkan özellik taşırlar ve diğer bir kırık uca yapışabilirler. Kırılan parçaların yeniden yapışma olasılıkları, oksijen ve ATP varlığında artar.

Kromozom kırılmaları ve bundan sonra meydana gelen yapışma olayları çeşitli şekillerde gerçekleşebilir. Bunları aşağıdaki şekilde sıralamak mümkündür:

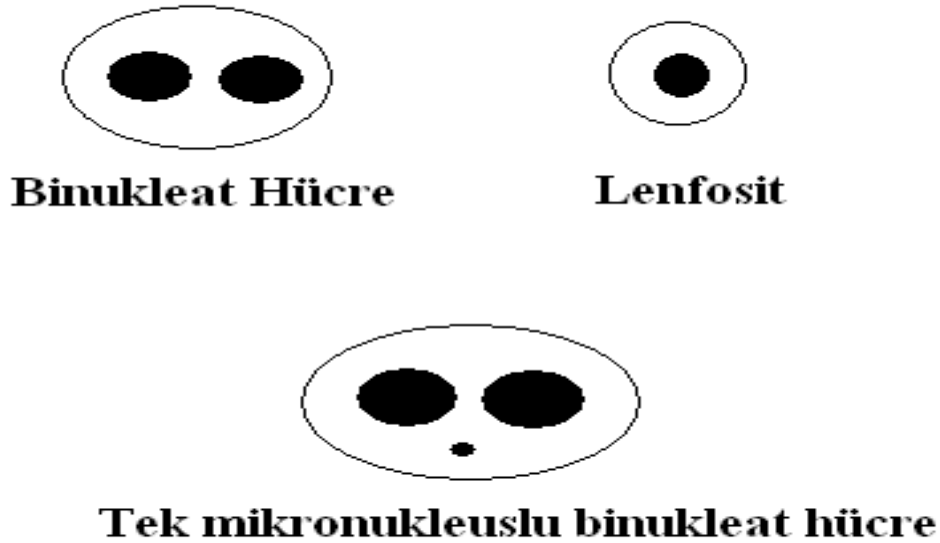
- a. Kırılan parça eski yerine yapışabilir. Bu durumda, sonraki mitozda herhangi bir değişiklik olmaz.
- b. Kırılan parça yapışmaz ve bu durum sonraki mitozda delesyon olarak adlandırılan bir aberasyon şeklinde saptanır.
- c. Kırılan parça bir diğer kırık uca yapışabilir. Bu durumda, sonraki mitozda ileri derecede kromozom aberasyonları gözlenir.

Metafaz ve anafazda izlenen aberasyonları iki gruba ayırmak mümkündür. Bunlar kromozom tip ve kromatit tip aberasyonlar olarak adlandırılır (Ahluwalia, 2009).

Kromozom tip aberasyonlar S fazından önce radyasyona maruz kalınması sonucu oluşur. Eğer replikasyondan önce hasar tamir edilmezse, kardeş kromatitlerin her ikisi de hasarlı olur. G₁ fazında yapılan ışınlamalar sonucu en fazla gözlenen kromozom tipi aberasyonlar: terminal delesyonlar, simetrik parça değişimleri ve asimetrik parça değişimleridir. Kromatit tip aberasyonlar S fazından sonra radyasyona maruz kalınması sonucu oluşur. Eğer hücreler S fazı esnasında radyasyona maruz kalırlarsa her iki tip aberasyon gözlenir. G₂ fazında yapılan ışınlamalar sonucu en fazla görülen gözlenen kromatit tipi aberasyon tipleri; terminal delesyon izoromatit delesyon, simetrik parça değişikliği, asimetrik parça değişikliği ve triradial aberasyondur. Eğer hücreler profaz safhasında radyasyona maruz kalırlarsa kromatitlerin alt ünitelerinde subkromatid aberasyonlar gözlenir (Tubiana ve ark. 1990, Özalpan, 2001).

Yapısal kromozom değişiklikleri proto-onkogenlerin aktivasyonuna ve tümör supressor genlerin eliminasyonuna neden olur ve bunların sonucunda tümör genez olayı başlatılır. Bu yüzden oluşan kromozom aberasyonlarını inceleyerek kanserler hakkında öngörülerde bulunabiliriz (Heim ve Meltman 1996).

Radyasyona maruz alma sonucu oluşan özel bir kromozom aberasyon tipi de mikronukleus oluşumudur. Bu aberasyon bir asentrik fragment veya tam bir kromozomun mitoz esnasında kutuplara çekilmeyip nukleus dışında kalması sonucu oluşur. Mikronukleus oluşumunun analizi, radyasyon hasarları ile ilgili basit duyarlı bir test yöntemidir. Ancak bu durum diploit hücreler için geçerlidir. Mikronukleus analizi için, ışınlanmış hücrelerde sitokalsin-B uygulanarak sitoplazma bölünmesi engellenir ve bu yolla iki yavru nukleusun birlikte bulunduğu binukleat hücreler ve bu hücrelerin sitoplazmaları içinde yer alan mikronukleuslar değerlendirilir (Prosser ve ark. 1988, Vrhovac-Garaj 1999).



Şekil 2.16. Lenfosit, binükleat hücre ve mikronukleuslu binukleat hücre (Özalpan 2002).

2.2.7 Radyasyonun RNA Molekülüne Etkileri

RNA molekülleri, DNA molekülünde taşınan genetik bilgilerin protein sistemine aktarılmasını ve protein sentezinin bu bilgilere uygun şekilde gerçekleşmesini sağlarlar. Radyasyonun etkisi ile bu moleküllerin fonksiyonlarında bazı değişikliklerin meydana geldiği saptanmıştır. Radyasyonun RNA sentezine etkileri ile ilgili çalışmaların sayısı DNA'ya oranla daha azdır ve bunların hemen hepsinde total RNA sentezine olan etkileri incelenmiştir. Bu sebeple farklı RNA tiplerinin ayrı ayrı incelenmesi ve karşılaştırılması bakımından yeterli değildir. Bu çalışmalarda elde edilen sonuçlar, genel olarak total RNA sentezinin DNA sentezine oranla daha dirençli olduğunu göstermektedir (Özalpan 2001)

2.2.8 Radyasyonun Protein ve Enzimlere etkileri

Proteinler hücrenin en önemli yapıtaşlarıdır. Ayrıca hücrede meydana gelen çeşitli biyokimyasal ve metabolik reaksiyonları kataliz eden enzimler de esas olarak protein yapısındadırlar. Yapılan çalışmalarda radyasyon muamelesi sonucunda polipeptit zincirlerindeki kırılmalar ile ortaya çıkan moleküler ağırlık azalmaları, eriyebilirlik oranında meydana gelen değişiklikler, sekonder ve tersiyer yapı bozuklukları ve amino asitlerde ortaya çıkan bozukluklar gibi hasarların meydana geldiği saptanmıştır. Bütün bu hasarların sonucu olarak da enzimin normal fonksiyonunda değişiklikler meydana gelmektedir (Mc Millan ve Steel, 1993).

Radyasyon etkisi ile çeşitli enzimlerde meydana gelen değişikliklerle ilgili birçok çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalarda, X ışınlarının etkisi ile memeli hücrelerindeki bazı enzimlerin aktivitelerinin azaldığı, bazı enzimlerin aktivitelerinin arttığı ve bazı enzimlerde bir değişiklik olmadığı gözlenmiştir (Bollum ve ark. 1960).

Radyasyonun etkisi ile gerçekleşen biyomoleküler hasarların oluşumunda oksijen ve sıcaklığın etkilerini incelemek amacıyla yapılan çalışmalarda, bu iki faktörün söz konusu hasarların oluşum oranlarında önemli ölçüde etkili olduklarını göstermişlerdir (Tubiana ve ark. 1990).

2.2.9 Radyasyonun Zar Sistemlerine Etkisi

Hücrelerin yapı ve işlevleri zarlara sıkıca bağlıdır. Zarlar yalnızca hücrenin içini çevresinden ayırmakla kalmazlar ayrıca ökaryot hücrelerin, nükleus ve sitoplazmik organeller de dahil olmak üzere, iç bölümleri belirler. Biyolojik zarların transport, madde geçişlerini denetlemek, elektron taşınımı, oksidatif fosforilasyona katılmak gibi önemli görevleri vardır. Ayrıca hücre metabolizmasında önemli rol oynarlar. Bu sebeple meydana gelebilecek bir hasarın, söz konusu fonksiyonların bozulmasına yol açması kaçınılmazdır (Cooper 2006).

Bilindiği üzere radyasyon hücrelerde lipid membranının peroksidasyonu, protein oksidasyonu ve DNA molekülüne zarar verme gibi moleküler lezyonlara yol açar. Hücre membranı, radyasyon ile indüklenen radikal kaynaklı oksidatif hasarı sonucu fonksiyonunu kaybeder. Bu hasar reaktif oksijen türleri veya sitosolik serbest radikaller tarafından oluşur. Ayrıca söz konusu radikaller hücrede DNA, proteinler ve lipid yapıları ile birlikte etkileşime girerler. (Pandey ve Mishra 2003).

İyonize radyasyonun biyolojik membranlara etkileri membran proteinlerinin yer değişimi ve doymamış zar lipidlerinin peroksidasyonunu içerir. Bu modifikasyonlar çiftkatlı lipid zar polaritesinde değişikliğe ve membranın akışkanlığına etki eder. Değişen membran parametreleri ve nükleer radyasyon hasarı, hücrenin apoptotik ölümünün tetiklenmesinde önemli bir rol oynar (Berroud 1996).

Son yıllarda radyasyon etkisinden dolayı hücre zarında negatif yük kaybının meydana geldiği saptanmıştır. Yüksek dozda radyasyonun periferik sinirlerde, sinirsel impuls iletimini azalttığı gözlenmiştir. Yapılan araştırmalarda radyasyonun lizozom, mitokondri gibi organellerde negatif etkileri olduğu gözlenmiştir. Radyasyona maruz kalan hücrelerde, lizozom miktarının düştüğü gözlenirken lizozomal zarların aldığı hasardan dolayı lizozomal enzimlerin hücre içinde arttığı belirlenmiştir. Ayrıca orta şiddette radyasyona maruz kalan bir hücrede mitokondrideki oksidatif fosforilasyon olaylarında önemli miktarlarda azalma gözlenmiştir (Coggle 1977).

2.2.10 Radyasyonun İnsanlar Üzerine Etkisi

2.2.10,1 Radyasyonun Geç Etkileri

2.2.10,1.1 Genetik Değişikler

Radyasyonun akut etkileri, vücutta hücre ölümü ve canlının ölümüne yol açar Akut etkiler, stokastik olmayan etkiler olarak da adlandırılırlar. En önemli genetik değişiklikler ve karsinojen etkiler stokastik etkiler olarak adlandırılırlar. Bu etkilerde çok az sayıda hücrenin, hatta bazı durumlarda tek bir hücrenin etkilenmesi söz konusu olabilir. Radyasyon fiziksel bir mutajen ajandır ve tamamen yeni, kendine özgü değişikliklere yol açmaz, sadece canlılarda doğal ve spontan oluşan muasyonların frekansını artırabilir. Genetik değişiklikler, gen mutasyonları ve kromozom mutasyonları olarak ana başlıklar altında toplanabilirler (Coggle 1977).

RADYASYONUN GENETİK ETKİLERİ	
Genetik Etki	Örnek
Gen Mutasyonları	
Dominant	Polidaktili, Retinoblastoma, Huntington koresi
Resesif	Orak hücre anemisi, sistik fibrozis, Tay-Sachs Hastalığı
Eşey Kromozomuna Bağlı	Renk körlüğü, Hemofili
Kromozom Mutasyonları	
Sayısal Değişiklikler	Down sendromu, embriyonik ölüm
Yapısal Değişiklikler	Embriyonik ölüm, fiziksel bozukluklar ve zeka gerilikleri

Çizelge 2.1. Radyasyonun genetik etkileri (Coggle 1977).

Radyasyonun insanlardaki genetik etkileri ile ilgili en geniş çalışma Hiroshima ve Nagasaki' ye atılan atom bombalarından sonra canlı kalabilen ve radyasyona maruz kalmış en büyük popülasyonu oluşturan insanlarla yapılan dikkatli genetik izleme ve saptamalardır. Bu grupta ve bunların çocuklarında 20 yıl boyunca genetik kriterler izlenmiştir. Bu kriterler ölü doğum ve doğum defektleri, 17 yaşından önceki birey ölümleri, eşey kromozomu anormallikleri taşıyan çocuk oranı ve kan proteinlerinde mutasyonlar taşıyan çocuklardan oluşuyordu. Bu kriterlere göre bazı sonuçlar ortaya çıkmıştır. Bu bulgular ışığında, radyasyonun insanda oluşturabileceği etkiler için genelleme yapmak mümkündür:

1. Radyasyon yeni tip mutasyonlara sebep olmaz, sadece spontan mutasyonların frekansını artırır.
2. Radyasyon etkisi ile mutasyon frekansı artışı doğru orantılıdır.
3. Çok küçük dozlarda bile genetik risk mevcuttur (Schull ve ark 1981).

2.2.9.1.2 Karsinogen Etki

Radyasyon ile kanser oluşumu arasındaki ilişki ile ilgili ilk gözlemler, X ışınları ile çalışan radyoloji öncülerinin birçoğunun ellerinde ortaya çıkan deri tümörleridir. Bu konudaki örneklerden biri Marie Curie ve kızı Irene'dir. Her ikisi de lösemiden ölmüşlerdir ve bunun sebebi radyasyon ile ilgili deneyler sırasında maruz kaldıkları radyasyonu olarak kabul edilir. İkinci dünya savaşı ardından yapılan hayvan deneylerinde, radyasyonun spontan olarak oluşan tümörlerin insidansını arttırdığı gözlemlenmiştir. Diğer bir sonuç ise radyasyonun yol açtığı kanser vakalarını doğal olarak oluşan kanserlerden ayırt etmek mümkün değildir. Bunun ardından radyasyon karsinogenezi hakkında birçok epidemiyolojik çalışma yapılmıştır. Radyasyon hemen hemen tüm dokularda tümör oluşumuna yol açabilir. Radyasyon etkisinin tümör oluşumunda uzun bir latent evresi vardır ve birikimli etkisi çok önemlidir. Radyasyona bağlı olarak belli tümör tipleri görülür. Lösemiler en sık görülen tümörlerdir. Tiroid tümörleri genç yaşta radyasyona maruziyet sonrası gelişir. Orta sıklıkta meme, akciğer ve tükrük bezi kanserleri görülür. Deri, kemik ve gastrointestinal trakt radyasyona karşı dirençlidir. (Özalpan 2001).

Radyasyon karsinogenezinin başlamasından sorumlu olan mekanizmaların en önemlileri tümör supresör genler/onkogenler ve hücre döngüsü kontrol noktaları olarak kabul edilir. Radyasyon bilindiği üzere translokasyonlara ve delesyonlara neden olur fakat bunlardan önemli olarak radyasyonla indüklenen kanser başlangıcı heterozigoti kaybı olayı ile olur. Bugüne kadar birçok onkogen tanımlanmıştır. Bunlar arasında en önemlileri ras ve myc onkogenleridir. Radyasyonla ile birlikte onkogenlerin aktivasyonuna örnek olarak çocuklarda oluşan tiroit karsinoması verebilirler (Little 2000).

Bir protoonkogen malignansiye yol açabilmek için mutlaka aktive olmalıdır. Bu şekilde protoonkogen-onkogen dönüşümü meydana gelir ve dönüşen onkogen malignant transformasyona yol açar. Bu dönüşümler çeşitli şekillerde olabilir:

1. Bir nokta mutasyon olayı sonucunda Ras onkogeni protoonkogenen dönüşür ve değişik bir protein kodlamaya başlar.
2. Kromozomlardaki yapısal aberasyon ve parça değişikliklerinden kaynaklanan yeni gen düzenlemeleri de onkogen aktivasyonuna yol açabilir.
3. Gen amplifikasyonu da onkogen aktivasyonuna yol açar (Hall ve Miller 1977).

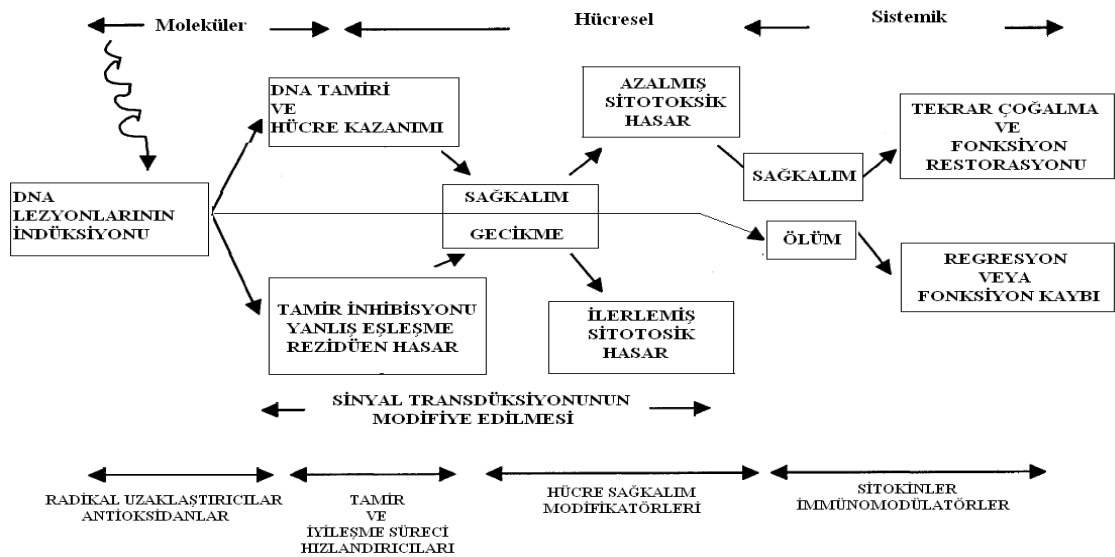
En önemli örneklerden biri retinoblastoma (RB) tümör supressor genidir. Retinablastom hastalarında sekonder kanserlerin oluşmasından sorumlu olay, RB genindeki heterozigoti kaybıdır. Bu olay ret onkogeninin aktivasyonu ile meydana gelir. Fakat radyasyon karsinogenezinin başlama olayının araştırılması için yapılan çalışmalar yetersizdir (Little 2000).

2.2.11 Radyoprotektörler

Radyoprotektörler, canlıyı radyasyona karşı daha dirençli hale getiren, onu koruyan maddelerdir. Toksik olmayan radyoprotektörlerin gelişimi ile nükleer savaş, nükleer endüstriler, radyasyon kazalarından korunmak, uzay gemileri ve tümör ışınlanması sırasında normal dokuların korunması daha kolay olmuştur. Bilindiği gibi radyasyonun makromoleküller üzerine birçok kritik etkisi vardır. Bu etkilerinin üzerine radyasyonla indüklenen hasarı minimuma indirmek için radyoprotektörler geliştirilmeye başlanmıştır (Upadhyay ve ark 2005).

İlk başta bazı geliştirilen radyoprotektif ajanların, protektif etkilerinin yanında toksik etkilerinin de olduğu gözlenmiştir. Bunun en önemli örneği sülfidril grubu içeren bileşiklerdir. Yapılan geniş çalışmalar için bazı ideal radyoprotektör kriterleri aşağıdaki şekilde belirlenmiştir. İdeal bir radyoprotektör aşağıdaki fonksiyonlardan en az birini içermelidir:

1. Serbest radikallerin çıkarılması
2. Oksidatif hasarın indirgenmesi
3. DNA ve hücre tamirini kolaylaştırılması
4. İmmüno-modülasyon
5. Etkilenen veya hasar gören organın tekrar eski haline gelmesi (Upadhyay ve ark 2005).



Şekil 2.17. Radyoprotektörlerin etki mekanizmaları (Upadhyay ve ark 2005).

Antioksidanlar hakkında ilk in vivo radyoprotektif çalışmalar bundan tam 57 yıl önce başlamıştır. İlk olarak sülfidril grubu içeren sistein amino asidi ve sisteaminin koruyucu etkisi olduğu saptanmıştır. Daha sonra yeni radyoprotektörler geliştirilmesi amacıyla bugüne kadar binlerce madde denenmiştir. Bunlardan WR 2721 (Amifostin) maddesinin en yüksek koruyucu etkiye sahip olduğu gözlenmiştir. Fakat yıllar sonra bu ajanların toksik etkilerinin olduğu ortaya çıkmıştır ve çalışmalar antioksidan maddelerin üzerine kaymıştır (Weiss ve Landauer 2000).

2.2.11.1 Antioksidanların ve Fenolik Bileşiklerin Radyoprotektif Etkileri

Fenolik bileşiklerin serbest radikalleri uzaklaştırıcı etkisinin çalışılması, doğal olarak oluşan ve antioksidan olarak adlandırılan fitokimyasal maddelerin karakterizasyonunda önemli rol oynamaktadır. Radyoprotektif etkisi olan en önemli ajanlar antioksidanlar vitaminler, selenyum, çeşitli fitokimyasallar, fenolik bileşikler, flavonoidler, metilksantinler, melatoninler ve bazı bitki ekstraktlarıdır (Weiss ve Landauer 2003).

Antioksidanlar dört ayrı şekilde etki etmektedirler.

1. **Toplayıcı Etki:** Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma veya daha zayıf yeni moleküllere çevirmektedirler. Antioksidan enzimler, trakeobronşiyal mukus ve küçük moleküller bu tip etki göstermektedirler.

2. **Bastırıcı Etki:** Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltma veya inaktif şekle dönüştürmektedirler. Vitaminler, flavanoidler bu tarz bir etkiye sahiptirler.

3. **Zincir Kırıcı Etki:** Serbest oksijen radikallerini bağlayarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engellemektedirler. Hemoglobin, seruloplazmin ve mineraller zincir kırıcı etki göstermektedirler.

4) **Onarıcı Etki:** Serbest radikallerin oluşturdukları hasarı onarmaktadırlar (Baskin ve Salem 1997).

2.2.11.2 Vitaminler

Vitamin E'nin radyasyonun indüklediği hasara karşı etkisi in vitro olarak gösterilmiştir. Vitamin E'nin radyasyonla indüklenen kromozom aberasyonlarına karşı koruyucu etkisi olduğu ve kromozom aberasyonlarını azaltıcı etkisi olduğu bilinmektedir (Satyamitra ve ark 2001). Ayrıca yüksek dozdaki lipid peroksidasyonunun düşük dozdakinden daha etkili olduğu anlaşılmıştır. Bu etki Vitamin E'nin formlarına, radyasyon dozuna ve muamele zamanına göre değişir. Örneğin Vitamin'in α - tokoferol formunun farelerde yaşama oranı seviyesini 3 katına çıkardığı gözlenmiştir. Bunun yanında radyasyon sonrası muamele çalışmalarında α - tokoferol konsantrasyonunun da ki artışın koruma seviyesini daha da yükselttiği gözlenmiştir (Srinivasan ve ark 1983). Kemirgenlerde yapılan radyasyon hasarı çalışmalarında Vitamin E'nin gastrointestinal hücre ölümünü engelleyememesine karşın ince bağırsaktaki koruyucu etkisinin olduğu saptanmıştır (Weiss ve Landauer 2003). Farelerde yapılan tümör gelişiminin yavaşlatılması çalışmasında Vitamin E'nin 50–500 mg/kg dozunun fare sarkomalarında yavaşlamaya neden olduğu gözlenmiştir (Kagerud ve Peterson 1981).

Vitamin C'nin farelerde tüm vücut ışınlamasında, fare lenfositlerinde ve insan lenfositlerinde radyasyonla indüklenen kromozom hasarına karşı koruyucu etkisi bilinmektedir (El-Nahas ve ark 1993).

Farelerde tüm vücut ışınlamasında, Vitamin A'nın diyetinin radyoprotektif etkisi çalışılmıştır ve bulunan sonuçlarda radyasyona maruz kalan farelerdeki ölüm oranını azaltmasına ek olarak radyasyonla indüklenen kandaki lenfosit sayısının azalmasını engellediğini ve adrenal hipertrofi oranını azalttığı gözlenmiştir (Seifter ve ark 1988). Vitamin A'nın insan kan lenfositlerinde radyokoruyucu etkisi olduğu bilinmektedir (Badr ve ark 1998).

2.2.11.3 Selenyum ve Selenyum/Vitamin E Kombinasyonları

Selenyum bileşikleri brokoli, sarımsak gibi birçok besinde bulunur. Selenometionin ise soya tohumlarında ve fasulyede bulunur ve çok az toksiktir. Selenyum ve metionin radyasyona karşı koruma sağlar ve maruz kalmış faredeki yaşama oranını artırır (Whanger 2002).

Selenyum in vitro radyasyonla indüklenen mutageneze karşı koruyucu özellik gösterir ve radyasyonla indüklenen hücre dönüşümünü inhibe eder. Farelerde yapılan çalışmalarda selenyum ve vitamin E'nin tek başına dozları, selenyum ve vitamin E'nin kombine dozlarından daha az radyoprotektif etki göstermiştir. Ayrıca vitamin E ve selenyum kombinasyonu antioksidan enzimlerin aktivitesini radyasyona karşı korur (Noaman ve ark 2002).

Yapılan terapi çalışmasında, günlük 200 µg sodyum selenitin, radyasyon terapisi sonrası baş boyun karsinomalarındaki, immün cevabı hızlandırdığı ortaya çıkmıştır (Kiremidjian-Schumacher ve Roy 2001).

2.2.11.4 Fitokimyasallar

Bitkilerin çoğu çeşitli antioksidan fitokimyasallar içerir ve bu fitokimyasalların çoğu radyoprotektif etki gösterirler. Bu fitokimyasallar arasında, polifenoller, curcumin, elajik asit, klorogenik asit, likopenler, kuersetin, soya ürünleri, ginkgo biloba özütleri, metilksantinler, melatoninler ve daha birçok flavonoid bulunur. Çoğu flavonoidlerin radyoprotektif etkilerinin bilinmesine rağmen, toksik etkileri hala daha bilinmemektedir (Weiss ve Landauer 2003).

2.2.11.5 Fenolik Bileşikler ve Flavonoidlerin Radyoprotektif Etkileri

Orientin ve vicenin, *Ocimum santum* bitkisinden elde edilen flavonlarla yapılan çeşitli radyoprotektif amaçlı çalışmalarda fareleri, öldürücü radyasyon dozuna (11Gy) maruz kalmasına rağmen gastrointestinal ve kemik iliği sendromlarının meydana getirdiği ölümden koruduğu gözlenmiştir. Bu koruyucu etki flavonların, lipid peroksidasyonunu engelleyici ve serbest radikallerin uzaklaştırıcı etkisinden dolayı gerçekleştiği şeklinde açıklanmıştır (Devi ve ark 2000).

Çayda bulunan fenolik bileşiklerle (kuersetin, luteolin ve genistein) yapılan çalışmalarda, bu fenolik bileşiklerin radyasyona maruz kalmış farelerin periferik kanındaki mikronukleuslu retikülositlerin frekansını azalttığı gözlenmiştir (Shimoi ve ark 1994).

Üzüm çekirdeği ekstraktı ve üzüm prosiyanidinleri (üzüm, askorbik asit) ile yapılan çalışmada, bu bileşiklerin, radyasyona maruz kalmış fare kemik iliğindeki mikronukleuslu eritrositlerin frekansında azalmaya neden olduğu gözlenmiştir (Castillo ve ark 2000).

Curcumin ile ilgili yapılan *in vitro* çalışmalarda, bu flavonoidin radyasyonun indüklediği kromozom aberasyonlarına karşı potansiyel bir etkisinin olduğu ve farelerde radyasyonla indüklenen dietilstilbestrol kaynaklı tümörlerin etkisini ve 8-Hidroksi-2'-deoksiguanozin oluşumunu azalttığı gözlenmiştir (Inado ve Onona 2002) . Yine curcumin flavonoidinin insan kan lenfositlerinde radyasyonla indüklenen DNA hasarını ve lipid peroksidasyonunun etkisini azalttığı gözlemlenmiştir (Srinivasan ve ark. 2006).

Propolis, naringin, kafeik asit ve krisin flavonoidleri gamma radyasyonuna maruz kalmış farelerde ölüm oranını azaltmış ve farelerdeki total lökositlerdeki DNA hasarını indirgediği gözlemlenmiştir (Benkovic ve ark. 2008). Yine propolis bileşiğinin yüksek dozları çin hamsteri ovaryum hücrelerinde (CHO-K1) radyasyonla indüklenen kromozom hasarını azalttığı gözlemlenmiştir (Spigoti 2009).

Narenciye ürünlerinde bulunan naringin flavonu ile yapılan radyoprotektif çalışmalarda naringinin fare kemik iliğinde radyasyonla indüklenen kromozom hasarını azalttığı gözlemlenmiştir (Jagetia ve ark 2003).

Yine narenciye ürünlerinde sık olarak rastlanan bir flavon olan hesperidin, fare kemik iliğindeki hücrelerin radyasyonla indüklenen hasarı azalttığı gözlenmiştir (Hosseinimehr ve Nemati 2006).

Kuersetin flavonoidi kullanılarak farelerde yapılan radyoprotektivite çalışmalarında, bu flavonoidin radyasyona maruz kalmayan farelerde toksik olmadığı ve 4Gy radyasyona maruz kalmış farelerde, maruz kalınma öncesi muamele sonucu DNA hasarını indirgediği gözlenmiştir (Benkovic ve ark. 2009). Yine kuersetin flavonoidi ile yapılan çalışmalarda bu flavonoidin radyasyon öncesi muamelesi sonucunda insan periferik kan lenfositlerindeki DNA hasarını indirgediği gözlenmiştir (Devipriya 2008).

Rithidech ve ark. (2005), apigenin flavonoidinin insan kan lenfositleri üzerine radyoprotektif etkisini araştırmıştır. Bu alışma sonucunda apigeninin herhangi bir toksik özelliğinin olmadığını ve apigenin dozuna bağlı olarak radyoprotektif etkinin arttığını gözlemlemiştir.

Antioksidan zellik gösteren ve susam yağında bulunan sesamol fenoliğinin, insan kan lenfositlerindeki DNA hasarını ve lipit peroksidasyon düzeyini azalttığı gözlenmiştir (Prasad ve ark 2005).

Birçok meyve ve sebze, zeytinyağında, ayda ve şarapta bulunan kafeik asit, antioksidan özelliğinden dolayı insan kan lenfositlerinde radyasyonla indüklenen DNA hasarına karşı radyokoruyucu etki gösterir (Devipriya ve ark. 2008).

Doğal olarak oluşan ve yiyeceklere tat veren vanilin ile yapılan çalışmada, vanilinin plasmid pBR322, insan ve fare periferel kan lökositlerinde ve dalak lenfositlerinde oluşan γ -radyasyonu ile indüklenen DNA hasarı üzerine koruyucu bir etkisi belirlenmiştir (Maurya ve ark. 2007).

Zeytin yaprağından ekstrakte edilen rutin, verbaskosit, oleuropein, luteolin ve diosmin flavonoidleri ile yapılan çalışmada bu flavonoidlerin in vivo olarak radyoprotektif etkileri çalışılmıştır. Tüm flavonoidlerin kombinasyonu ile oluşan grup, diğer tek flavonoidlerden olşan gruplara göre daha fazla radyoprotektif etki göstermiştir (Benavente ve ark. 2002).

Fenolik bileşikler kadar, fenolik bileşikleri taşıyan bitkilerle ve onların ztleriyle de yapılmış birçok radyoprotektif çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Aşağıdaki tabloda bu bitkilerin bazıları verilmiştir (Arora ve ark. 2005).

BİTKİ	RADYOPROTEKTİF ETKİLERİ
<i>Aegle marmelos</i>	İnsan periferal kan lenfositlerinde radyasyonun indüklediği genomik instabiliteyi ve DNA hasarını azalttığı bulunmuştur. Radyasyona maruz kalmış farelerde ise ölüm oranını azaltmıştır.
<i>Acanthopanax senticosus</i>	Farelerde radyasyon muamele öncesi ve sonrası verildiğinde yaşam oranını artırmıştır.
<i>Allium cepa</i>	X ışınına karşı radyoprotektif etkisi vardır.
<i>Pilea microphylla</i>	Özütü ile yapılan fare çalışmalarında, gastrointestinal sistemi, hematopoetik sistemi yüksek dozda radyasyona karşı koruduğu gözlenmiştir.
<i>Mentha arvensis</i>	Radyasyon önce muamele sonucu farelerin radyasyonlar indüklenen kemik iliği ve gastrointestinal ölümünü azalttığı gözlenmiştir.
<i>Tephrosia purpurea</i>	Özütü, İsviçre albino farelerinin hematopoetik sistemini koruduğu gözlenmiştir.
<i>Moringa oleifera</i>	Radyasyona maruz kalma öncesi, özütü ile muamele sonucu fare metafaz kromozomlarındaki aberasyonları azalttığı gözlenmiştir.
<i>Glycyrrhiza glabra L.</i>	Antioksidan olan bu bitkini özütü farelerin mikrozomal membranlarını γ - radyasyonuna karşı koruduğu ve plasmidlerle yapılan çalışmalarda ise DNA çift zincir kırıklarını minimum düzeye indirmediği gözlenmiştir.
<i>Hypericum perforatum</i>	Farelerde yapılan radyoprotektif çalışmalarda, intestinal mukozayı ve kemik iliğini X ışını dozlarına karşı korumuştur.
<i>Amaranthus paniculatus</i>	Yaprak özütü 5Gy radyasyona maruz kalan farelerde beyindeki kolesterol, lipid peroksidasyon ve glikojen düzeylerini radyasyona karşı korumuştur.

Çizelge 2.2. Bazı radyoprotektif özelliğe sahip bitkiler ve radyoprotektif özellikleri (Arora ve ark. 2005).

2.3 GENOTOKSİSİTE VE ANTİGENOTOKSİSİTE DEĞERLENDİRMEDE KULLANILAN KISA SÜRELİ TEST YÖNTEMLERİ

Bir maddenin mutajenik veya genotoksik etkili olup olmadığını saptamak amacıyla çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemler; *Salmonella typhimurium* mutant suşlarının kullanıldığı, bakteriyel Ames testi, CA, SCE ve MN frekanslarının araştırıldığı sitogenetik yöntemler ve alkali ortamda DNA elektroforezinin yapıldığı COMET yöntemidir (Single Cell Gel Electrophoresis, SCGE). Bu yöntemler laboratuvar çalışmalarında olduğu kadar populasyon taramalarında ve çevre kirliliği araştırmalarında da kullanılmaktadır. Ayrıca bu yöntemler ile doğal ürünlerin anti-karsinojenik ve anti-mutajenik özellikleri de incelenebilmektedir.

2.3.1 Ames Testi

İlk defa 1973 yılında Dr. Bruce N. Ames tarafından geliştirilmiş bir yöntemdir. Ames testi olarak da adlandırılan *Salmonella*/mikrozom test sistemi, kimyasal maddelerin mutajenik etkilerinin araştırılmasında en yaygın olarak kullanılan, mutajen karsinojen etkisi en iyi bilinen kimyasallar ile geçerliliği en fazla kabul edilmiş kısa süreli bakteriyel test sistemlerinden birisidir. Tanımlandığı yıldan bu yana 5000'den fazla kimyasal maddenin mutajenik ve karsinojenik etkileri bu test ile araştırılmıştır. Ayrıca bu test sisteminde karaciğer mikrozom enzimleri (S9) kullanılarak, kimyasal maddenin metabolitlerinin de mutajenik olup olmadığı araştırılabilmektedir. S9 kullanıldığında pozitif sonuç alınması, bu kimyasal maddenin kendisinin zararsız olduğunu, fakat canlı vücuduna alındığında ortaya çıkacak metabolitlerin zararlı etkiye sahip olduğunu gösterir. Ames yönteminde genellikle *Salmonella typhimurium* mutant suşları (TA98 ve TA100) kullanılmaktadır. Her test suşu histidin operonunun değişik bölgelerinde çeşitli mutasyonlar içermektedir.

Bunlar ya DNA'daki tek bir bazın değişmesi ile ortaya çıkan baz değişimleri ya da bir bazın eklenmesi veya çıkarılması ile kendini gösteren çerçeve kayması mutasyonlarıdır (Ames ve ark. 1973, Mortelmans ve Zeiger 2000).

2.3.2 In vitro SCE Yöntemi

Perry ve Evans tarafından 1975 yılında tanımlanan SCE analizi, günümüzde genotoksisite analizlerinde kullanılan geleneksel yöntemlerden birisi haline gelmiştir. SCE, bir kromozomun kardeş kromatidleri arasında meydana gelen resiprokal parça değişimi olayıdır. Karsinojenik ve mutajenik maddelerin, SCE düzeyini artırdığı gözlenmiştir. Bu nedenle, bu yöntemde kardeş kromatidler farklı boyanmakta ve aralarındaki SCE frekansı saptanmaktadır. SCE ilk defa Taylor tarafından bitki hücrelerinde tritium ve otoradyografi kullanılarak gözlemlenmiştir. Daha sonra DNA baz analogu olan 5'-bromodeoksiuridin (BRDU)'in Hoechst 33258 boyası ile kombine edilmesiyle kardeş kromatitlerin ayırt edilebileceği ve SCE'ler gözlenebileceği keşfedilmiştir (Latt 1974).

2.3.3 In vitro CA Yöntemi (Kromozomların homojen boyanması)

Bu yöntemle kromozomların sayısal ve yapısal anormallikleri incelenebilir. Mutajen ve karsinojenlerin kromozom aberasyonlarını indüklediği saptanmış ve aberasyon frekansının kanser riski taşıyan grupların tanımlanmasında önemli olduğu görülmüştür. Yöntemde genellikle kolsemid ve kolşisin gibi tubulin polimerizasyon inhibitörleri kullanılmakta böylece hücre bölünmesinde metafaz safhasında kalmış kromozomlar sayı ve aberasyon yönünden değerlendirilmektedir. Morfolojik kriterlere göre yapısal kromozom hasarı iki ana sınıfa ayrılmaktadır: Kromozom tipi hasar, bir veya çok sayıda kromozomun her iki kromatitini içermektedir ve kromatit tipi hasar bir veya birkaç kromozomun bir veya iki kromatitini farklı konumlarda içermektedir (Hagmar ve ark. 1994, Bonassi ve ark., 2000).

2.3.4 In vitro COMET Testi (Tek Hücre Jel Elektroforezi)

Biyolojik ve fiziksel etmenlerin oluşturduğu DNA hasarını kontrol etmek için çeşitli teknikler geliştirilmiştir. Bu teknikler arasında COMET testi ya da Tek Hücre Jel Elektroforezi tekniği çok güvenilir ve kullanışlı bir metottur. COMET kelimesinin anlamı, bu teknikte hasarlı DNA ların göçü ile oluşan görüntüdür. Bu yöntem hem in vivo hem de in vitro şekilde uygulanabilir. Hasarlı DNA molekülleri kuyruklu yıldız görüntüsü oluşturur (Tice ve ark 2000). İlk olarak Östling ve Johanson (1984) , DNA hasarını belirlemek için tek hücre düzeyinde bir mikrojel elektroforezi geliştirmiştir. Bu

teknikte hücreler bir jel içine gömülüp deterjanlar ve yüksek tuz konsantrasyonları ile lizis işlemi gerçekleştirilip daha sonra nötral koşullarda DNA molekülünün elektroforezine dayanır. Nötral koşullardan dolayı bu yöntemin potansiyelinde bazı sınırlamalar ortaya çıkmıştır (Singh ve ark 1988).

Bunun üzerine Singh ve arkadaşları (1988) tek hücrelerde oluşan DNA hasarlarını belirlemek için alkali ($pH > 13$) ortamlarda gerçekleştirilen bir mikrojel tekniği geliştirmiştir. Bu Alkali ortamda, DNA göçü tek zincir kırıklarının frekansına bağlıdır. Bu tekniğin diğer genotoksisite testlerine göre avantajları:

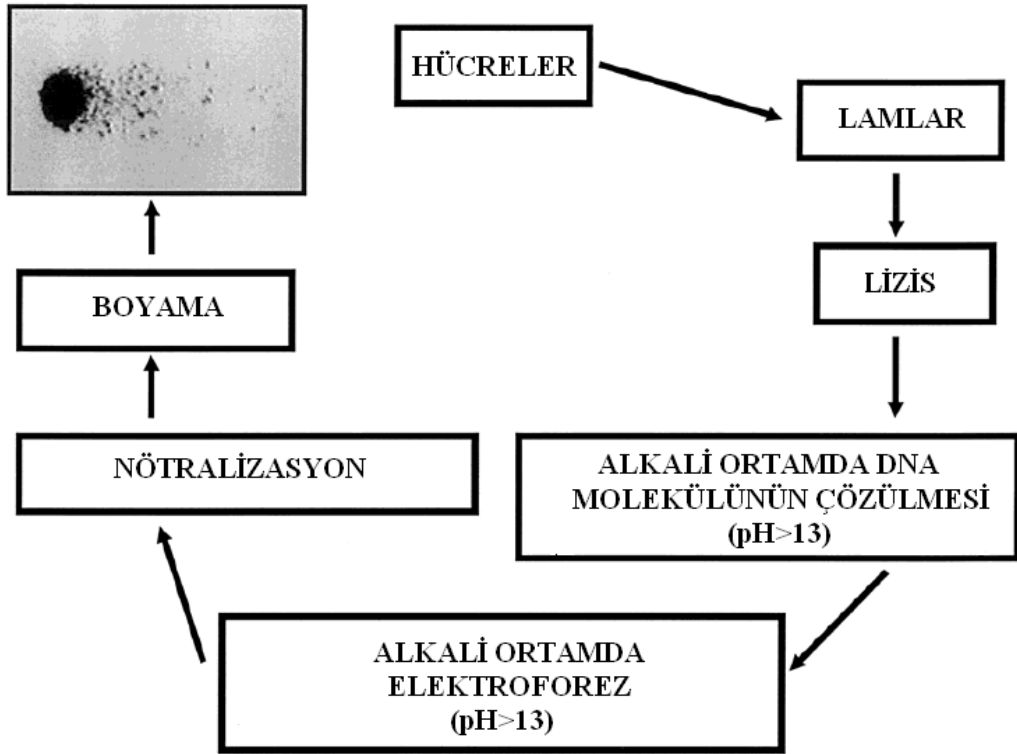
1. Küçük düzeylerdeki DNA hasarlarını belirlemek için hassas bir yöntemdir.
2. Her örnek için az miktarda hücreye ihtiyaç vardır.
3. Düşük maliyetlidir.
4. Esnek bir yöntemdir, kolay modifiye edilir.
5. Uygulaması kolaydır.
6. Tamamen sonuç almak için sadece 1-2 gün yeterlidir.
7. Çalışmalar yapmak için nispeten küçük miktarlarda test maddeleri kullanılır.

Son yıllarda bu test insanlardan çevresel değerlendirme çalışmalarına kadar tüm genetik toksikoloji çalışmalarında kullanılmıştır. COMET testinin genetik toksikoloji de kullanım alanları şunlardır:

1. Potansiyel yüksek oranda sonuç içeren tarama çalışmaları
2. Genotoksisite ile indüklenen kromozom hasarını, sitotoksisite ile indüklenen kromozom hasarından ayırt etmek
3. İn vivo çalışmalarda genotoksik ve genotoksik olmayan karsinojenleri ayırt etmek
4. İnsan mutajenlerini ve karsinojenlerini tayin etmek

COMET testinin yöntemine baktığımızda bu test şu basamaklardan oluşur:

1. Üzerine agaroz içinde hücrelerin yayıldığı mikroskop lamalarının hazırlanması
2. DNA molekülünü hücrelerden ayırmak için lizis
3. Tek zincirli DNA molekülünü ve tek zincir kırıklarını gözlemlemek için alkali ($pH > 13$) ortam
4. Alkali koşullarda ($pH > 13$) elektroforez
5. Nötralizasyon
6. Boyama, Görüntüleme ve Sayım



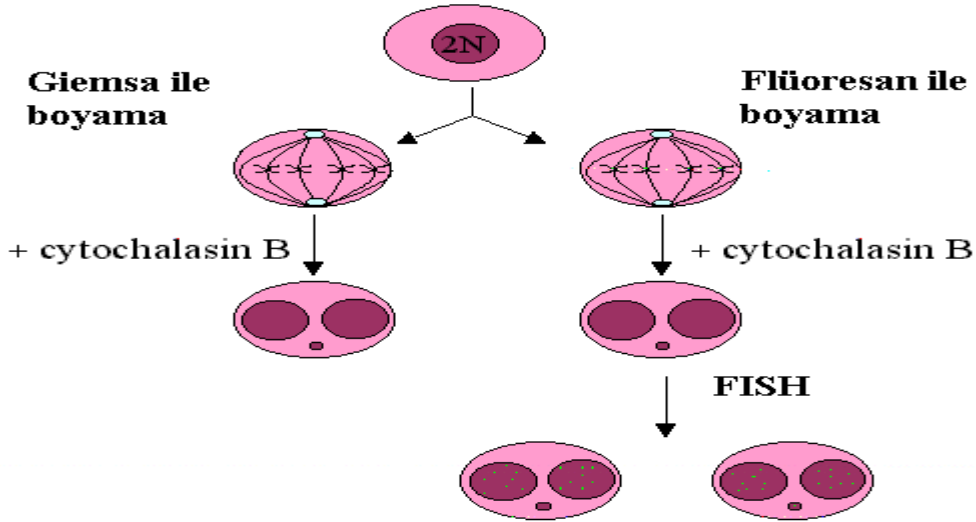
Şekil 2.18. COMET testi aşamaları (Tice ve ark. 2000).

Lamların hazırlaması sırasında her lam üzerine 1–3 bağımsız jel yayılır. En alt tabaka ya tam buzlu mikroskop lamından veya yüksek konsantrasyonda normal erime noktası bulunan agaroz jelinden oluşur. Bunların üzerine hücrelerin düşük erime noktalı agaroz ile oluşan süspansiyonu yayılır. Bundan sonra lizis işlemi gerçekleştirilir. Bu işlemde deterjanlar ve yüksek konsantrasyonlu tuz çözeltilerinden yararlanır. Üzerinde hücreler bulunan lamlar en az 1 saat en çok 1 gece olmak üzere, lizis solüsyonlarında bekletilir. Elektroforez öncesi alkali yürütme tamponu içinde lamlar 20–25 dk arası bekletilir. Bu işlem DNA molekülünün çözülmesi için gereklidir.

Bu işlemden sonra elektroforez işlemi uygulanır, bu işlemde Standard voltaj 0,7-1 V/cm' dir. Elektroforez sonrası alkali lamlar nötralizasyon bufferi ile yıkanır. Yıkama işleminden sonra lamlar etidyum bromit, DAPI (diamidino–2-fenilindol), propiyum iyot veya SYBR Green1 gibi floresan özellikli boyalarla veya gümüş nitrat gibi floresan olmayan boyalarla boyanırlar. COMET sayımı için metrik ve metrik olmayan teknikler vardır. Ayrıca COMET sayımı için bilgisayar sistemli programlarda geliştirilmiştir. En basit yöntemlerden biri COMET'leri büyüklüklerine göre kategorilere göre bölüp değerlendirmektir (Olive ve ark. 1991, Cotelle ve Ferard 1999, Tice ve ark. 2000).

2.3.5 In vitro Mikronukleus (MN) Testi

Mikronükleuslar (MN) hücrenin mitoz bölünmesi sırasında ortaya çıkan, esas çekirdeğe dahil olmayan, tam kromozom veya asentrik kromozom fragmanlarından köken alan oluşumlardır. Geleneksel sitogenetik yöntemlerden birisi de Fenech ve Marleyn tarafından 1985 yılında tanımlanan MN yöntemidir (Fenech 2000). MN sayısındaki artış, çeşitli ajanların hücrelerde oluşturduğu sayısal ve yapısal kromozom düzensizliklerinin indirekt göstergesi olarak değerlendirilmektedir. MN testi sitogenetik hasarın tespitinde, kromozom analizine göre kolay uygulanabilmesi, daha fazla sayıda hücre sayılması ve istatistiksel yönden daha anlamlı sonuçlar elde edilmesi avantajı sağlamasıyla yaygın kullanım alanı bulan bir teknik olmuştur (Demirel ve Zamani 2002).



Şekil 2.19. Mikronukleus tekniği görüntüleme çeşitleri (Fenech 2000).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Çalışmada Kullanılan Deney Ekipmanı

Ekipman	Marka-Model
Hassas Terazi	Shimadzu AUW220D
Güç Kaynağı	EC 250-90
Elektroforez Tankı	Cleaver Scientific CSL COM-40
Su Banyosu	Nüve BM-302
Santrifüj	Nüve CN-180
İnkübatör	Leec
Işık Mikroskobu	Olympus
Flüoresan Mikroskop	BAB
Buzdolabı	VESTEL
Derin Dondurucu	VESTEL
Mikropipet	EPPENDORF
Petri Kapları	TPP
pH metre	
Vortex	VELP
Lineer Akselatör	SIEMENS MD2 (6 MV FOTON)
Besiyeri tüpleri	BD Falcon
Cam malzemeler	
Isıtıcı Karıştırıcı	CHILTERN
Flowkabin	
Enjektör	
Eppendorf tüpleri	
Hemasitometre	Webber S.I.

3.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler

Kimyasal Madde	Firma	Katalog No:
NaCl	MERCK	106404
NaOH	MERCK	106482
AGARUZ	MERCK	101236
HCL	MERCK	100314
TRİSMA BASE	SİGMA	T1503
TRİTON X-100	SİGMA	T8787
DMSO	SİGMA	D5879
AGARUZ, LOW MELTING	SİGMA	A9414
D-(-)-QUİNİC ACİD	SİGMA	138622
HİSTOPAQUE 1077	SİGMA	H8889
TYRPAN BLUE	SİGMA	T8154
EtBr	SİGMA	E8751
NEVPARİN	MUSTAFA NEVZAT	
RPMI MEDİUM	SİGMA	R8758
PENİCİLİN-STREPTOMYCİN	SİGMA	P0781
FETAL CALF SERUM	SİGMA	F9665
PHYTOHEMAGGLUTİNİN-A	SİGMA	L8754
L-GLUTAMİNE	SİGMA	G7513
DULBECCO'S PBS	SİGMA	D5652
Na ₂ EDTA	SİGMA	E5134
MUTLAK ETANOL	GURUP DELTALAR	

3.3 Çalışmada Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması

Besiyerinin Hazırlanışı:

15 ml Fetal calf serum

2 ml L-Glutamin

0,5 ml Penicilin, streptomycin

2,5 ml Phytohemagglutinin

Karışım, RPMI-1640 ile 100 ml'ye tamamlanır. Karışım steril Flow'da hazırlanır ve steril besiyeri tüplerine 5 ml dağıtılır.

Fizyolojik serum hazırlanışı:

0,9 gr NaCl tartılır ve 100ml distile su da çözülür.

PBS çözeltisi hazırlanışı:

0,48 gr Dulbecco Phosphate Buffer Saline tartılır, 50 ml distile suda çözülür.

Lizis Tamponu hazırlanışı:

2.5 M NaCl: 29.22gr NaCl tartılır.

100 mM Na₂EDTA: 7.4448 gr Na₂EDTA tartılır.

10 mM Tris: 0,2422gr Trisma Base tartılır.

Tartılan kimyasallar ısıtmadan 178 ml distile su da çözülür. pH NaOH veya HCL kullanılarak 10' a ayarlanır. Lizis işleminden yarım saat önce bu çözeltiliye 2 ml Triton X-100 ve 20 ml DMSO eklenir.

Yürütme tamponu hazırlanışı:

0,747 Na₂EDTA ve 24gr NaOH tartılır ve 2 lt distile su ile çözülür. pH>13 olacak şekilde tampon hazırlanır. Buzdolabında +4°C de saklanır.

Nötralizasyon tamponu hazırlanışı:

4.8456 gr Trisma Base tartılır ve 100 ml distile suda çözülür. Çözeltinin pH=7.5 olacak şekilde HCL veya NaOH kullanılarak pH ayarlanır. Bu çözelti yürütme işlemi sonrası taze hazırlanır.

Fiksasyon tamponu hazırlanışı:

100 ml absolü etanol kullanılır.

Boyama solüsyonu:

20gr/ml EtBr ile hazırlanır.

Lamlar için Agaroz jel hazırlanışı:

0,65 gr agaroz tartılır ve 100ml distile suda ısıtılarak çözülür.

Hücreler için Low Melting Agaroz jel hazırlanışı:

0,065gr Agaroz Low Melting (LMA) tartılır ve ısıtılarak 10 ml distile suda çözülür.

%5 DMSO çözeltisinin hazırlanışı:

0,5 ml DMSO ile 10 ml distile su karıştırılır.

Kinik Asit çözeltisinin hazırlanışı:

0,0006 gr kinik asit tartılır ve 10 ml %5 DMSO çözeltisinde çözülerek stok hazırlanır.

Değişik konsantrasyonlardaki kinik asit dozları şöyle belirlenir:

0,5 µg/ml kinik asit dozu için, 12.5 µl kinik asit ile 1.5 ml lenfosit solüsyonu karıştırılır.

1 µg/ml kinik asit dozu için, 25 µl kinik asit ile 1.5ml lenfosit solüsyonu karıştırılır.

2 µg/ml kinik asit dozu için, 50µl kinik asit ile 1.5ml lenfosit solüsyonu karıştırılır.

4 µg/ml kinik asit dozu için, 100 µl kinik asit ile 1.5ml lenfosit solüsyonu karıştırılır.

8 µg/ml kinik asit dozu için, 200 µl kinik asit ile 1.5ml lenfosit solüsyonu karıştırılır.

3.4 Yöntem

Çalışmamızda in vitro COMET testi kullanılmıştır.

Çalışma Gruplarının Belirlenmesi:

Her donör için 21 tane çalışma grubu belirlenmiştir. Deneyler duplike yapılmıştır.

Gruplar şu şekildedir:

Kontrol grupları:

Sadece Kan Kontrol

DMSO Kontrol

1 Gy ışınlama

2 Gy ışınlama

Tek başına Kinik asit Dozları:

0,5 µg/ml kinik asit

1 µg/ml kinik asit

2 µg/ml kinik asit

4 µg/ml kinik asit

8 µg/ml kinik asit

Radyasyon ve Kinik asit Kombine Dozları:

1 Gy + 0,5 µg/ml kinik asit	2 Gy + 0,5 µg/ml kinik asit
1 Gy + 1 µg/ml kinik asit	2 Gy + 1 µg/ml kinik asit
1 Gy + 2 µg/ml kinik asit	2 Gy + 2 µg/ml kinik asit
1 Gy + 4 µg/ml kinik asit	2 Gy + 4 µg/ml kinik asit
1 Gy + 8 µg/ml kinik asit	2 Gy + 8 µg/ml kinik asit

Radyasyon ve DMSO Kombine Dozları:

1 Gy + DMSO

2 Gy + DMSO

Bireylerin Seçimi:

Araştırma grubu donörleri, 22-31 yaş arasında değişen, hiç sigara kullanmayan, son 1 ay içinde antibiyotik kullanmamış ve kalıtsal hastalığı bulunmayan 2 erkek 2 de bayan bireyden oluşmaktadır. Deney grubunun yaş ortalaması 25.75 ± 4.5 'tir. Donörlerden kan alımı gerçekleştirilirken Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Etik Kurulunun onamı alınmıştır.

Kan Örneklerinin Alınması:

Kan örnekleri bireylerden heparinize olarak, vakumlu kuru tüplere alınmıştır. Her bireyden 22 ml kan alınmıştır.

Lamların Agaroz Jel ile Kaplanması:

Mikroskop lamları, kendileri için hazırlanan agaroz jel içine daldırılıp 30 sn bekletilir. Daha sonra da çıkarılıp altları temizlenip kurumaya bırakılır. Kuruduktan sonra hangi bireye ait oldukları ve hangi çalışma grubuna dâhil oldukları üzerlerine yazılır.

Lenfosit İzolasyonu

1. Heparinize olarak alınan kan, 5 er ml olarak steril tüplere bölüştürülür.
2. Kan, taze hazırlanan serum fizyolojik tamponu ile 1:1 oranına sulandırılır ve karıştırılır.
3. Ayrı steril tüplere 2 ml Histopaque 1077 alınır. Daha sonra kan ve serum fizyolojik tamponu içinde Histopaque 1077 bulunan tüplere yavaşça aktarılır.
4. Aktarımdan sonra tüpler hemen 15 dakika 1500 rpm de santrifüj edilir.
5. Santrifüj ardından tüplerde oluşan tabakalardan, lenfosit içeren tabaka pipet yardımıyla boş tüplere aktarılır.
6. Aktarılan lenfosit süspansiyonu serum fizyolojik tamponu ile 5 ml ye tamamlanır ve 1500 rpm de 10 dakika çevrilir. Bu yıkama işlemidir, bu işlemle ortamdaki lenfosit dışındaki maddeler uzaklaştırılır. Bu işlem ortamda sadece lenfositler kalana kadar tekrarlanır.
7. En sonuncu yıkama işleminden sonra serum fizyolojik tamponu ortamdan uzaklaştırılır.
8. Lenfositler besiyerlerine ekilmek için RPMI-1640 ile sulandırılır. Her tüpe 5 er ml RPMI-1640 eklenir. Daha sonra karıştırma işlemi yapılır ve daha önceden lenfositler hazırlanan besiyerlerine ekilir. Ayrı bir eppendorf tüpüne 100µl lenfosit alınır ve Tyrpan Blue testi yapılır. Tyrpan Blue testi sonucunda lenfositlerde % 80 canlılık oranı aranır.
9. Bu testte süspansiyon 1:1 oranında tyrpan blue boyası ile seyreltilir ve bu seyreltilen sıvıdan 100 µl alınıp hemasitometreye yayılır ve ışık mikroskobu altında yaşayan hücreler sayılır.
10. Bu aşamaya kadar ki tüm işlemler (Tyrpan Blue ve santrifüj işlemi hariç) steril flow kabin içerisinde yapılır. Tüpler daha sonra 37°C de 24 saat inkübe edilir.

Işınlama işlemi

1. 24 saat sonra lenfosit ekilmiş besiyerleri çıkartılır ve 2000 rpm de 10 dakika santrifüj edilir.
2. Supernatant tüpte 1.5 ml kalacak şekilde atılır. Pellet iyice karıştırılıp, steril flow kabinde petrilere aktarılır.
3. Petriler çalışma gruplarına göre işaretlenir ve ilgili kimyasallarla muamele edilirler.
4. Muamele işleminden sonra petriler 30 dakika inkübasyon için 37°C ye bırakılırlar.
5. 30 dakika sonra petriler çıkarılır ve radyasyona maruz kalacak çalışma grupları ışınlamaya götürülür.
6. Işınlama yaparken petrilerin kaynaktan 80 cm uzakta ve üzerine 2 cm bolus olmasına dikkat edilir. Işın kaynağı olarak Siemens Lineer Hızlandırıcı (6MV Foton) kullanılmıştır.
7. Işınlama işlemi lineer akseleratörde gerçekleşir ve bu işlemden sonra petriler tekrar 1 saat boyunca 37°C de inkübasyona bırakılırlar.
8. Işınlama işleminden sonra hücrelerin viabilitesini kontrol etmek amacıyla her çalışma grubu petrisinden 100 µl süspansiyon alınır ve eppendorf tüplerine konup Tyrpan Blue testi yapılır.
9. Süspansiyon 1:1 oranında tyrpan blue boyası ile seyreltilir ve bu seyreltilen sıvıdan 100 µl alınıp hemasitometreye yayılır ve ışık mikroskopu altında yaşayan hücreler sayılır.
10. 1 saat sonunda petriler açılır ve içindeki lenfosit süspansiyonu steril tüplere aktarılır.
11. Aktarılan süspansiyonlar 2000 rpmde 10 dakika santrifüj edilir. Bu işlemden sonra süpernatant atılır. Böylece pellet kısmında sadece lenfositler kalır ve lenfositler muamele edildikleri kimyasallardan uzaklaştırılır.

COMET Testi Prosedürü

1. Bu aşamada kullanılmayan bütün solüsyonlar soğuktur. Bu prosedür loş ışıkta gerçekleştirilmiştir. Pellet olarak kalan lenfositler 1 ml PBS ile seyreltilir ve iyice karıştırılır..
2. Hücreleri jel içine gömmek için, düşük erime noktası olan agaroz (LMA) kullanılarak jel hazırlanır. 0,065 gr LMA tartılır ve 10 ml distile su içinde ısıtarak jel haline getirilir.
3. Daha sonra 10 ml lik jelden, eppendorf tüplerine 250 şer µl aktarılır. Bu eppendorf tüpleri 37°C de bekleyen sıcak su banyosuna yerleştirilir.
4. Seyreltilen lenfosit pelletlerinden 80 µl çekilir, su banyosunda bekleyen ve içinde 250µl LMA jeli bulunan eppendorf tüplerine aktarılır. Jel ve lenfosit süspansiyonu iyice pipet yoluyla karıştırılır.
5. Karıştırılan jel ve lenfosit karışımından 100 µl çekilir ve lam üzerine yayılır. Her çalışma grubu kendi lamının üzerine yayılır.
6. Üzerine karışım koyulan lamlar hemen lamelle kapatılır ve buz üzerine kaldırılır.
7. Yayma işlemi bittikten sonra lamlar 15 dakika +4°C de bekletilir.
8. 15 dakika sonra lamlar alınır ve lameller çıkarılır.
9. Lizis işlemi başlatılır. Lamelleri çıkmış olan lamlar şalelere dizilir ve lizis solüsyonuna daldırılır. Lamlar şaleler içinde 1 gece boyunca karanlıkta ve +4°C de bekletilir.
10. Ertesi gün lamlar lizis solüsyonundan çıkarılır ve COMET tankına dizilir.
11. Tanklar yürütme tamponu ile doldurulur ve lamlar 20 dk yürütme tamponu içinde bekletilir. Bu aşamada DNA sarmalları açılır.
12. 20 dakika sonunda yürütme işlemi başlar. Yürütme işlemi buz üzerinde gerçekleştirilir. Yürütme işlemi 300 mA, 25V, yarım saat boyunca yürütülür.
13. Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra lamlar tanklardan çıkarılıp nötralizasyon tamponuna daldırılır ve 5 dakika lamlar tampon içerisinde bekletilir. Nötralizasyon işlemi karanlıkta gerçekleşir.
14. Nötralizasyon işlemi sonrasında lamlar tampondan çıkarılıp distile suya daldırılıp yıkanır ve kuruması beklenir.
15. Kuruduktan sonra lamlar absolü etanol içinde 5 dakika fikse edilir.

Boyama İşlemi

EtBr ile hazırlanan boya solüsyonundan enjektör ile 0,2 ml çekilir ve lamlara damlatılır. Boya damlatıldıktan sonra lamalar lamellerle kapatılıp, mikroskopik inceleme için hazırlanır.

Mikroskopik İnceleme

Sayım ve değerlendirme safhalarında flüoresan mikroskop kullanılır. Boyanılan lamlara mikroskopta bakılır ve her lamdan 100 tane hücre sayılır. Değerlendirme yöntemi olarak görsel sayım yöntemi uygulanır. Hücreler hasarlarına göre COMET tiplerine ayrılır. Tip 0, Tip 1, Tip 2, Tip 3, Tip 4 olarak COMET'ler, DNA göçü oranlarına göre ayrılırlar. Tip 0 hasarsız hücre olarak kabul edilirken, Tip 4 ise en fazla hasar görmüş ve en büyük kuyruklu yıldız oluşturan hücrelerdir. Ayrılan gruplardan Genetik Hasar İndeksi (GHİ) ve % hasarlı hücre oranı hesaplanır.

$$GHİ=(1*\sum Tip1)+(2*\sum Tip2)+(3*\sum Tip3)+(4*\sum Tip4)/(\sum Tip0+\sum Tip1+\sum Tip2+\sum Tip3+\sum Tip4)$$

$$\% \text{ Hasarlı Hücre} = \sum Tip2 + \sum Tip3 + \sum Tip4$$

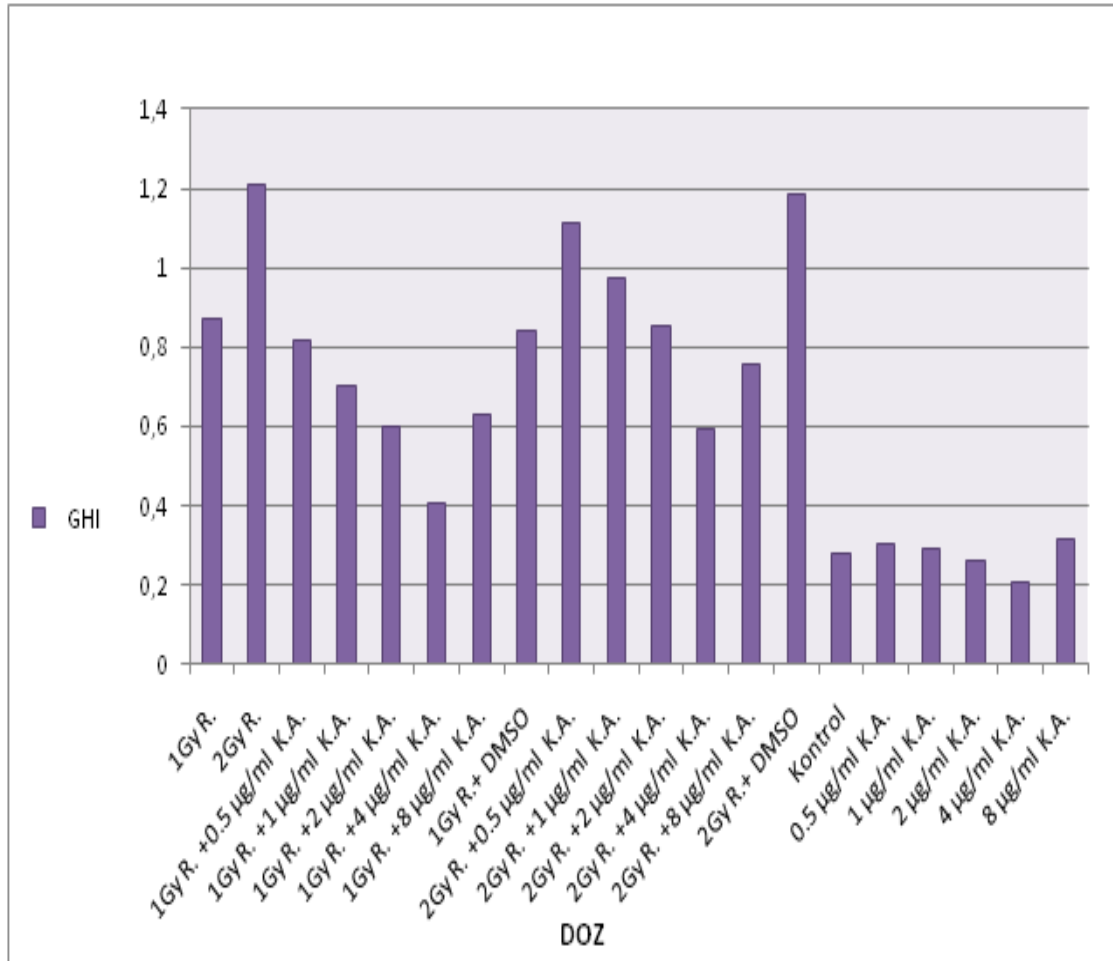
(* işareti çarpma işlemi anlamına gelmektedir)

İstatistiksel Hesaplamalar

Tüm donörlerden elde edilen verilerin karşılaştırılmaları nonparametrik tek yönlü Kruskal- Wallis analizi ile değerlendirilmiştir. Ayrıca çalışma gruplarının aralarındaki farklar Mann-Whitney U testi ile değerlendirilmiştir. Radyasyon hasarının kinik asidin çeşitli dozları tarafından doza bağımlı bir şekilde azaltılıp azaltılmadığını belirlemek için lineer regresyon analizi yapılmıştır. Tüm istatistiksel analizler SPSS 11.5 bilgisayar programı ile yapıldı.

4. BULGULAR

Bu çalışmada fiziksel bir mutajen olan radyasyonun insan kan lenfositlerindeki genotoksik etkisi ve kinik asidin, radyasyonun yarattığı genotoksik hasara karşı göstermiş olduğu antijenotoksik etki in vitro COMET testi ile ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar her donör için çizelgeler 4.1, 4.2, 4.3, 4.4' de gösterilmiştir. Tüm donörlere ait Genetik Hasar İndeksi ortalama değerleri Şekil 4.1 de grafiksel olarak gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Tüm donörlere ait Genotoksik Hasar İndeksi ortalama değerlerinin grafiksel olarak dağılımı. KA; Kinik asit, DMSO; Dimetil sülfoksit R; İyonize Radyasyon

Çizelge 4.1. 1 Numaralı Donöre ait kontrol, pozitif kontrol, kinik asit, radyasyon ve radyasyon ile birlikte kinik asit muamelesini içeren COMET testi verileri

Donör	Çalışma Grubu	Tekrar	Değerlendirilen Hücre Sayısı	Hasarsız (Normal) Hücre Sayısı	Tip 1	Tip 2	Tip 3	Tip 4	GHI	% HH
1	Kontrol	A	100	92	2	3	1	2	0,14	4
		B	100	94	2	1	2	1	0,19	6
	DMSO	A	100	94	2	0	3	1	0,14	4
		B	100	93	3	2	1	1	0,15	5
	0,5 µg/ml K.A.	A	100	94	1	3	1	1	0,14	5
		B	100	91	3	1	1	4	0,24	6
	1 µg/ml K.A.	A	100	91	1	0	4	1	0,17	5
		B	100	90	3	2	3	2	0,24	7
	2 µg/ml K.A.	A	100	91	4	2	3	0	0,17	5
		B	100	92	2	2	3	1	0,19	6
	4 µg/ml K.A.	A	100	94	2	2	1	1	0,13	4
		B	100	93	2	2	2	1	0,16	5
	8 µg/ml K.A.	A	100	89	1	5	2	3	0,27	10
		B	100	87	6	2	2	3	0,28	7
	1 Gy R.	A	100	76	3	4	5	12	0,74	21
		B	100	74	3	5	4	14	0,82	23
	2 Gy R.	A	100	65	2	5	3	25	1,21	33
		B	100	60	6	4	6	24	1,33	34
	1 Gy R + 0,5 µg/ml K.A.	A	100	78	1	4	7	10	0,7	21
		B	100	76	3	4	4	13	0,75	21
	1 Gy R + 1 µg/ml K.A.	A	100	80	6	4	3	7	0,51	14
		B	100	80	5	4	4	7	0,53	15
	1 Gy R + 2 µg/ml K.A.	A	100	86	3	3	3	5	0,38	11
		B	100	85	3	2	5	5	0,43	12
	1 Gy R + 4 µg/ml K.A.	A	100	84	3	7	4	1	0,33	12
		B	100	87	1	6	4	2	0,33	12
	1 Gy R + 8 µg/ml K.A.	A	100	82	3	3	7	5	0,5	15
		B	100	78	3	5	8	6	0,61	19
	1 Gy R + DMSO	A	100	78	5	3	4	10	0,63	17
		B	100	75	7	2	4	12	0,71	18

KA; Kinik asit, DMSO;Dimetil sülfoksit R; İyonize Radyasyon

Çizelge 4.1'in devamı.

Donör	Çalışma Grubu	Tekrar	Değerlendirilen Hücre Sayısı	Hasarsız (Normal) Hücre Sayısı	Tip 1	Tip 2	Tip 3	Tip 4	GHİ	% HH
1	2 Gy R + 0,5 µg/ml K.A	A	100	66	0	7	8	19	1,14	34
		B	100	66	4	5	4	21	1,1	30
	2 Gy R + 1 µg/ml K.A	A	100	74	1	4	7	14	0,86	25
		B	100	72	4	5	4	15	0,86	24
	2 Gy R + 2 µg/ml K.A	A	100	79	3	4	4	10	0,63	18
		B	100	78	3	3	5	11	0,68	19
	2 Gy R + 4 µg/ml K.A	A	100	84	1	5	3	7	0,48	15
		B	100	83	3	3	4	7	0,49	14
	2 Gy R + 8 µg/ml K.A	A	100	81	5	2	5	7	0,52	14
		B	100	80	2	4	4	10	0,62	18
	2 Gy R + DMSO	A	100	65	4	3	6	22	1.16	31
		B	100	67	2	5	6	20	1.1	31

KA; Kinik asit, DMSO;Dimetil sülfoksit R; İyonize Radyasyon

Çizelge 4.2. 2 Numaralı Donöre ait kontrol, pozitif kontrol, kinik asit, radyasyon ve radyasyon ile birlikte kinik asit muamelerini içeren COMET testi verileri

Donör	Çalışma Grubu	Tekrar	Değerlendirilen Hücre Sayısı	Hasarsız (Normal) Hücre Sayısı	Tip 1	Tip 2	Tip 3	Tip 4	GHİ	% HH
2	Kontrol	A	100	90	3	4	1	2	0,22	7
		B	100	89	2	3	2	4	0,3	9
	DMSO	A	100	92	3	2	2	1	0,17	5
		B	100	91	3	2	2	2	0,21	6
	0,5 µg/ml K.A.	A	100	89	2	3	3	3	0,29	9
		B	100	89	1	4	3	3	0,30	10
	1 µg/ml K.A	A	100	87	5	2	3	3	0,30	8
		B	100	90	3	4	2	1	0,18	8
	2 µg/ml K.A	A	100	88	3	3	2	4	0,31	9
		B	100	89	4	4	1	2	0,28	7
	4 µg/ml K.A	A	100	93	3	0	2	2	0,17	4
		B	100	92	3	1	1	3	0,20	5
	8 µg/ml K.A	A	100	86	4	5	2	3	0,32	10
		B	100	87	3	3	3	4	0,34	10
	1 Gy R.	A	100	70	3	4	6	17	0,97	27
		B	100	70	3	3	6	18	0,99	27
	2 Gy R.	A	100	63	2	2	9	24	1,29	35
		B	100	67	2	3	5	23	1,15	31
	1 Gy R + 0,5 µg/ml K.A	A	100	70	5	3	7	15	0,92	25
		B	100	73	3	1	8	15	0,89	24
	1 Gy R + 1 µg/ml K.A	A	100	75	3	5	4	13	0,85	22
		B	100	74	3	4	6	14	0,77	24
	1 Gy R + 2 µg/ml K.A	A	100	76	4	4	6	10	0,73	20
		B	100	78	2	2	5	13	0,7	20
	1 Gy R + 4 µg/ml K.A	A	100	82	2	4	5	7	0,53	16
		B	100	83	1	3	7	6	0,52	16
	1 Gy R + 8 µg/ml K.A	A	100	79	3	4	7	7	0,6	18
		B	100	80	0	4	6	10	0,66	20
	1 Gy R + DMSO	A	100	70	3	3	6	18	0,99	27
		B	100	70	4	4	6	16	0,97	26

Çizelge 4.2'nin devamı

Donör	Çalışma Grubu	Tekrar	Değerlendirilen Hücre Sayısı	Hasarsız (Normal) Hücre Sayısı	Tip 1	Tip 2	Tip 3	Tip 4	GHI	% HH
2	2 Gy R + 0,5 µg/ml K.A	A	100	62	6	6	5	21	1,17	32
		B	100	63	7	5	6	19	1,11	30
	2 Gy R + 1 µg/ml K.A	A	100	70	2	2	8	18	1,02	28
		B	100	65	5	4	6	19	1,08	29
	2 Gy R + 2 µg/ml K.A	A	100	70	3	5	9	13	0,92	27
		B	100	68	4	5	8	15	0,98	28
	2 Gy R + 4 µg/ml K.A	A	100	80	2	1	9	8	0,63	18
		B	100	78	2	4	7	9	0,67	20
	2 Gy R + 8 µg/ml K.A	A	100	75	3	6	3	13	0,76	22
		B	100	77	4	0	8	11	0,72	19
	2 Gy R + DMSO	A	100	61	5	4	7	23	1,26	34
		B	100	62	4	4	8	22	1,24	34

Çizelge 4.3. 3 Numaralı Donöre ait kontrol, pozitif kontrol, kinik asit, radyasyon ve radyasyon ile birlikte kinik asit muamelerini içeren COMET testi verileri

Donör	Çalışma Grubu	Tekrar	Değerlendirilen Hücre Sayısı	Hasarsız (Normal) Hücre Sayısı	Tip 1	Tip 2	Tip 3	Tip 4	GHI	% HH
3	Kontrol	A	100	88	3	4	1	4	0,3	9
		B	100	89	2	2	3	4	0,31	9
	DMSO	A	100	89	3	2	3	3	0,28	8
		B	100	88	2	3	4	3	0,31	10
	0,5 µg/ml K.A.	A	100	88	4	4	0	4	0,28	8
		B	100	86	1	6	3	4	0,32	13
	1 µg/ml K.A.	A	100	90	2	5	1	2	0,23	8
		B	100	90	3	3	1	3	0,24	7
	2 µg/ml K.A.	A	100	92	2	4	0	2	0,18	6
		B	100	91	0	6	0	3	0,24	9
	4 µg/ml K.A.	A	100	91	2	3	2	2	0,22	7
		B	100	87	5	4	2	2	0,27	8
	8 µg/ml K.A.	A	100	89	1	4	3	3	0,3	10
		B	100	87	2	2	4	5	0,38	11
	1 Gy R.	A	100	75	3	3	4	15	0,81	22
		B	100	73	3	7	4	13	0,81	24
	2 Gy R.	A	100	63	2	6	8	21	1,22	35
		B	100	62	6	5	5	22	1,19	32
	1 Gy R + 0,5 µg/ml K.A.	A	100	77	2	3	6	14	0,82	23
		B	100	75	1	6	2	14	0,75	22
	1 Gy R + 1 µg/ml K.A.	A	100	76	4	5	5	10	0,69	20
		B	100	77	0	4	6	11	0,70	21
	1 Gy R + 2 µg/ml K.A.	A	100	83	2	3	5	7	0,51	15
		B	100	82	3	3	4	8	0,53	15
	1 Gy R + 4 µg/ml K.A.	A	100	87	2	2	4	5	0,38	11
		B	100	89	1	2	2	6	0,35	10
	1 Gy R + 8 µg/ml K.A.	A	100	80	4	5	3	8	0,55	16
		B	100	81	1	4	5	9	0,59	18
1 Gy R + DMSO	A	100	73	4	4	5	14	0,83	23	
	B	100	72	4	4	7	13	0,85	24	

Çizelge 4.3'ün devamı

Donör	Çalışma Grubu	Tekrar	Değerlendirilen Hücre Sayısı	Hasarsız (Normal) Hücre Sayısı	Tip 1	Tip 2	Tip 3	Tip 4	GHI	% HH
3	2 Gy R + 0,5 µg/ml K.A	A	100	65	4	7	5	17	1,03	29
		B	100	68	3	5	6	18	1,09	31
	2 Gy R + 1 µg/ml K.A	A	100	69	4	4	6	17	0,98	27
		B	100	69	4	5	6	16	0,96	27
	2 Gy R + 2 µg/ml K.A	A	100	73	0	7	4	16	0,93	27
		B	100	72	1	5	4	18	0,96	27
	2 Gy R + 4 µg/ml K.A	A	100	81	2	3	5	9	0,59	17
		B	100	80	2	4	4	10	0,62	18
	2 Gy R + 8 µg/ml K.A	A	100	77	3	4	4	12	0,71	20
		B	100	74	4	2	6	14	0,82	22
	2 Gy R + DMSO	A	100	62	4	4	8	22	1,26	34
		B	100	60	6	5	6	23	1,27	35

Çizelge 4.4. 4 Numaralı Donöre ait kontrol, pozitif kontrol, kinik asit, radyasyon ve radyasyon ile birlikte kinik asit muamelerini içeren COMET testi verileri

Donör	Çalışma Grubu	Tekrar	Değerlendirilen Hücre Sayısı	Hasarsız (Normal) Hücre Sayısı	Tip 1	Tip 2	Tip 3	Tip 4	GHI	% HH
4	Kontrol	A	100	84	3	4	3	6	0,44	13
		B	100	87	3	3	3	4	0,34	10
	DMSO	A	100	82	8	4	3	3	0,37	10
		B	100	87	6	1	3	3	0,29	7
	0,5 µg/ml K.A.	A	100	86	3	4	3	4	0,36	11
		B	100	84	3	4	4	5	0,43	13
	1 µg/ml K.A.	A	100	82	4	5	3	6	0,47	14
		B	100	85	3	5	3	4	0,38	12
	2 µg/ml K.A.	A	100	83	4	4	3	6	0,45	13
		B	100	88	4	1	4	3	0,30	8
	4 µg/ml K.A.	A	100	88	4	3	2	3	0,28	8
		B	100	88	4	5	2	1	0,24	8
	8 µg/ml K.A.	A	100	86	3	3	5	3	0,36	11
		B	100	89	4	3	1	3	0,25	7
	1 Gy R.	A	100	74	1	4	5	16	0,88	25
		B	100	70	4	5	5	16	0,93	26
	2 Gy R.	A	100	65	2	6	6	21	1,16	33
		B	100	67	3	2	6	22	1,13	30
	1 Gy R + 0,5 µg/ml K.A.	A	100	75	2	4	6	13	0,80	23
		B	100	72	4	1	8	15	0,90	24
	1 Gy R + 1 µg/ml K.A.	A	100	72	3	3	5	17	0,92	25
		B	100	77	3	3	3	14	0,74	20
	1 Gy R + 2 µg/ml K.A.	A	100	77	2	3	6	12	0,74	21
		B	100	78	1	2	5	14	0,76	21
	1 Gy R + 4 µg/ml K.A.	A	100	85	3	3	4	5	0,41	12
		B	100	88	1	2	3	6	0,38	11
	1 Gy R + 8 µg/ml K.A.	A	100	75	3	3	6	13	0,79	22
		B	100	76	3	4	4	13	0,75	21
1 Gy R + DMSO	A	100	72	4	4	6	14	0,86	24	
	B	100	73	2	3	5	17	0,90	24	

Çizelge 4.4'ün devamı

Donör	Çalışma Grubu	Tekrar	Değerlendirilen Hücre Sayısı	Hasarsız (Normal) Hücre Sayısı	Tip 1	Tip 2	Tip 3	Tip 4	GHI	% HH
4	2 Gy R + 0,5 µg/ml K.A	A	100	66	4	5	5	20	1,09	30
		B	100	65	3	5	6	21	1,15	32
	2 Gy R + 1 µg/ml K.A	A	100	70	2	2	9	17	1,01	28
		B	100	69	1	4	7	19	1,06	30
	2 Gy R + 2 µg/ml K.A	A	100	73	4	1	9	13	0,85	23
		B	100	74	1	2	8	15	0,89	25
	2 Gy R + 4 µg/ml K.A	A	100	79	3	3	5	10	0,64	18
		B	100	79	3	2	7	9	0,64	18
	2 Gy R + 8 µg/ml K.A	A	100	71	2	4	4	19	0,98	27
		B	100	71	4	4	6	15	0,90	25
	2 Gy R + DMSO	A	100	67	3	4	5	21	1,10	30
		B	100	68	2	3	5	22	1,11	30

4.1 Radyasyon Dozlarının COMET Testi Sonuçları

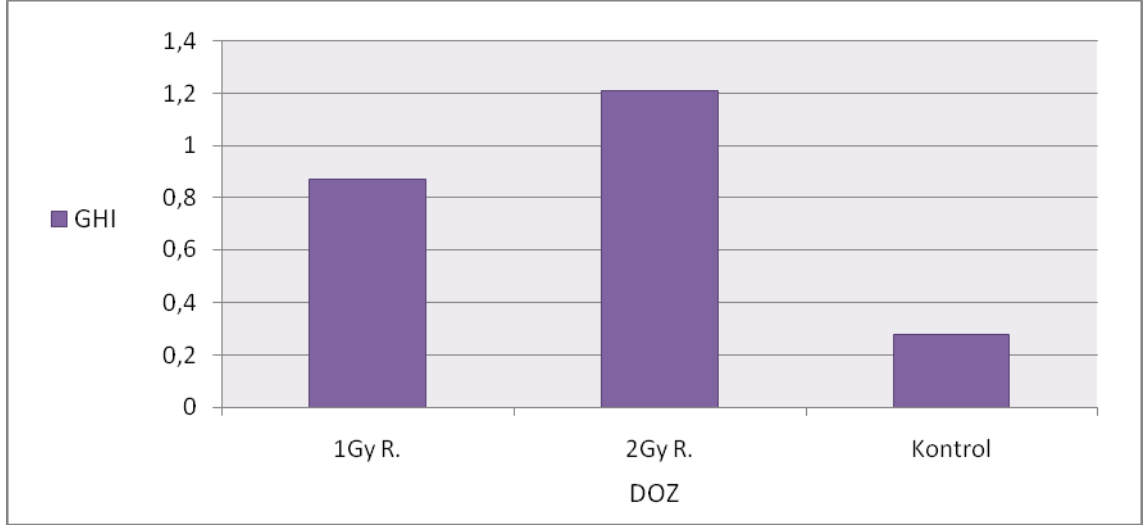
Çalışmamızın başlangıcında radyasyonun 6 farklı dozu ile doz deneme çalışması gerçekleştirildi. Bu dozlar sırasıyla 0,05 Gy, 0,1 Gy, 0,5 Gy, 1 Gy, 2 Gy, 4 Gy şeklindeydi. Bu denemelerin sonucunda 1 Gy altındaki dozlarda istediğimiz hasar oranına ulaşamadık. 4 Gy lik dozda ise çok yüksek oranda hasar ve hücre ölümü gerçekleştiği için incelenecek yeterli hücre sayısı elde edilemedi. Bu sebeplerle 1 ve 2 Gy dozlar radyasyon çalışmasında kullanılmak üzere uygun dozlar olarak belirlenmiştir.

Bu dozların neden olduğu Genetik Hasar İndeksi (GHI) ve hasarlı hücre (%HH) değerleri her donör için ayrı ayrı olmak üzere çizelge 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, de gösterilmiştir. Kontrol gruplarının hasar değerleri ile kıyaslandığında, radyasyonun her iki dozu yüksek değerlerde hasarlara neden olmuştur. Radyasyon dozları kendi arasında kıyaslandığında, GHI ve %HH değerlerinin doza bağımlı olarak arttığı görülmektedir. Tüm donörlere ait genotoksik hasar indeksi ortalama değerleri çizelge 4.5 de gösterilmiştir. Non parametrik Kruskal-Wallis testine göre radyasyon doz grupları kendi aralarında ve kontrol grubu karşılaştırıldığında Genetik Hasar İndeksi ortalama değerleri arasında anlamlı bir farklılık bulunmuştur ($p<0,001$). Bunun üzerine Mann Whitney U testi kullanılarak ikili karşılaştırmalar yapılmıştır. Radyasyon dozları ve kontrol grubu arasında yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda, 1 Gy radyasyon ve kontrol grubu arasında Genetik Hasar İndeksi bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0,001$). Aynı şekilde 2 Gy radyasyon ve kontrol grubu arasında Genetik Hasar İndeksi bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmiştir ($p<0,001$). Radyasyon dozlarının kendi aralarındaki fark Genetik Hasar İndeksi bakımından anlamlıdır ($p<0,001$). Genetik Hasar İndekslerinin istatistiksel anlamlılıklarının karşılaştırma sonuçları çizelge 4.6 da ve şekil 4.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.5. Tüm donörlere ait Genetik Hasar İndeks ortalama değerleri.

Doz	GHI
1Gy R.	0,8688±0,8839
2Gy R.	1,2100±0,6949
1Gy R. +0,5 µg/ml K.A.	0,8163±0,8088
1Gy R. +1 µg/ml K.A.	0,7025±0,1625
1Gy R. +2 µg/ml K.A.	0,5975±0,1523
1Gy R. +4 µg/ml K.A.	0,4038±0,0796
1Gy R. +8 µg/ml K.A.	0,6313±0,9790
1Gy R.+ DMSO	0,8388±0,1181
2Gy R. +0,5 µg/ml K.A.	1,1100±0,4375
2Gy R. +1 µg/ml K.A.	0,9737±0,9180
2Gy R. +2 µg/ml K.A.	0,8550±0,1304
2Gy R. +4 µg/ml K.A.	0,5950±0,7151
2Gy R. +8 µg/ml K.A.	0,7537±0,1476
2Gy R.+ DMSO	1,1875±0,0776
Kontrol	0,2800±0,0943
DMSO Kontrol	0,2413±0,0856
0,5 µg/ml K.A.	0,3025±0,0899
1 µg/ml K.A.	0,2912±0,0953
2 µg/ml K.A.	0,2588±0,0933
4 µg/ml K.A.	0,2088±0,0456
8 µg/ml K.A.	0,3125±0,9790

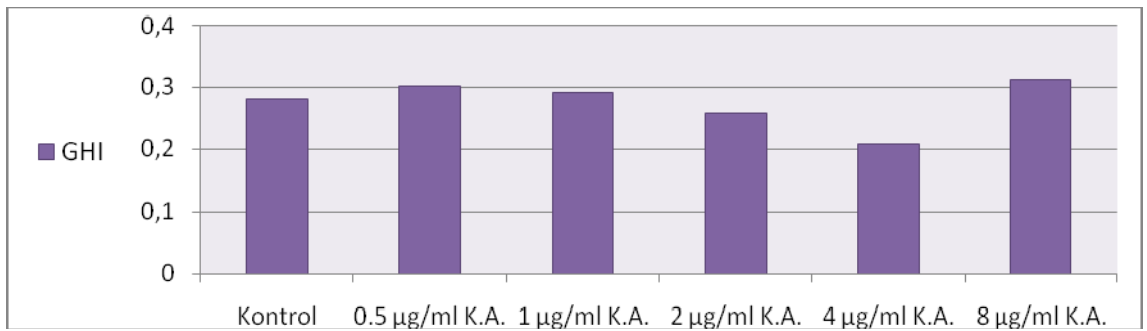
Tüm değerler Ortalama±Standart Sapma (SS) şeklinde verilmiştir. Her donöre ait 2 tekrardan toplam 8 tekrarin ortalamaları verilmiştir. KA; Kinik asit, DMSO;Dimetil sülfoksit R; İyonize Radyasyon



Şekil 4.2. Tek başına radyasyon çalışma gruplarının ve kontrol grubunun Genetik Hasar İndeksi ortalama değerlerinin grafiksel dağılımı (GHI; Genetik Hasar İndeksi).

4.2 Kinik asit Dozlarının COMET Testi Sonuçları

Kinik asidin 0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml, 4 µg/ml ve 8 µg/ml dozları denenmiştir. Bu doz gruplarında anlamlı oranda DNA hasarı oluşmadığı için denenen tüm dozlar çalışmada kullanılmıştır. Kinik asit değerlerinin COMET testi sonuçları her donör için çizelge 4.1, 4.2, 4.3, 4.4 de gösterilmiştir. Çizelge 4.5 ve Şekil 4.2’de kinik asidin genetik hasar indeks ortalama değerleri verilmiştir. Non parametrik Kruskal-Wallis testi kullanılarak kinik asit dozları ve kontrol grubu arasında yapılan istatistiksel hesaplamalar sonucunda, bu dozların Genetik Hasar İndeksi bakımından kontrol grubu ve kendi aralarında herhangi bir anlamlı farklılık gözlenmemiştir ($p>0,05$).



Şekil 4.3. Kinik asit dozlarının ve kontrol grubunun Genetik Hasar İndeksi ortalama değerlerinin grafiksel dağılımı (GHI; Genetik Hasar İndeksi).

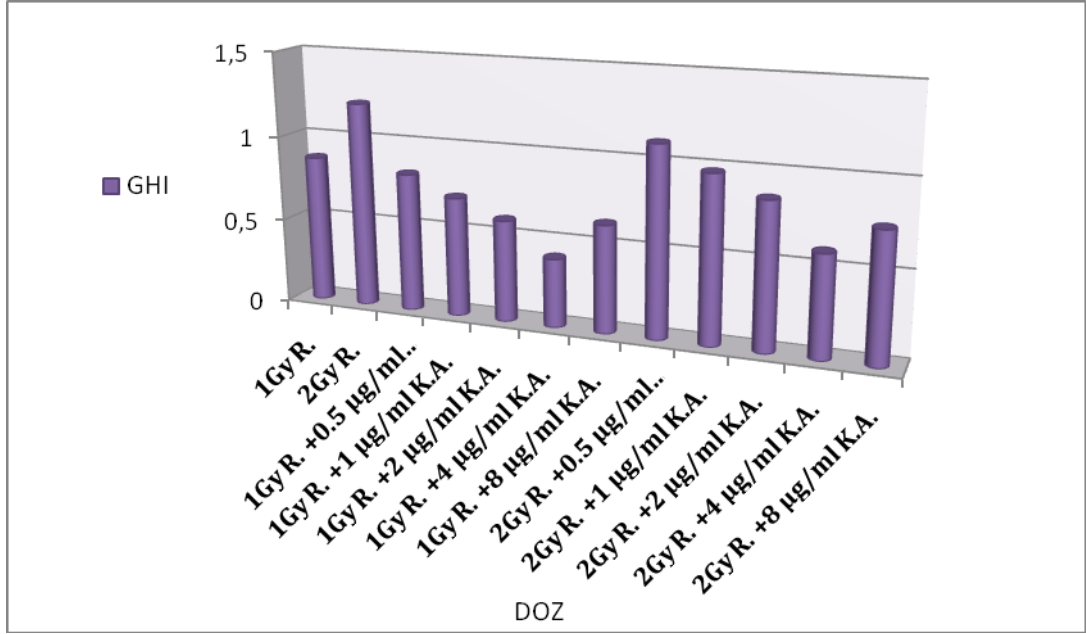
4.3 Kinik Asit ve Radyasyon Kombine Dozlarının COMET Testi Sonuçları

Kinik asidin 0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml, 4 µg/ml ve 8 µg/ml dozları, radyasyonun 1 Gy ve 2 Gy radyasyon dozları ile kombine edilmiştir. Bu kombine dozların COMET testi sonuçları her donör için çizelge 4.1,4.2,4.3,4.4 de verilmektedir.

Genetik Hasar İndeksi ortalama verileri çizelge 4.5 de gösterilmiştir. Kombine dozlar ve tek başına radyasyon dozları arasında (1 Gy ve 2 Gy) Nonparametrik Kruskal-Wallis testine göre karşılaştırıldığında aralarında anlamlı farklılık bulunmuştur ($p<0,001$). Bunun üzerine ikili karşılaştırmalar Mann Whitney U testi kullanılarak yapılmıştır.

İkili karşılaştırmalar ilk olarak 1 Gy radyasyon ile 1 Gy radyasyon artı kinik asit dozlarının oluşturduğu kombine dozlar arasında yapılmıştır. İkili karşılaştırmalar çizelge 4.10' da gösterilmiştir. 1 Gy + 0,5 µg/ml kombine dozu ile 1 Gy radyasyon dozu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur ($p>0,05$). Geriye kalan tüm kombine dozlar ile 1 Gy radyasyon dozu arasında istatistiksel açıdan anlamlı farklılık bulunmuştur. Anlamlılık değerleri de yine Çizelge 4.6'da belirtilmiştir. Tek başına 1 Gy radyasyon dozunun oluşturduğu Genetik Hasar İndeksini, kinik asidin sırasıyla 0.5, 1, 2, 4, 8 µg/ml dozlarının doza bağımlı olarak azaltıp azaltmadığı lineer regresyon analizi ile belirlenmiştir. Buna göre kinik asit 1 Gy radyasyonun oluşturduğu hasar oranını doza bağımlı olarak azaltmıştır ($R^2 = 0,409$, $p< 0,001$)

2 Gy ile 2 Gy radyasyon ve kinik asit dozlarının oluşturduğu kombine dozlar arasında karşılaştırma yapılmıştır. İkili karşılaştırmalar çizelge 4.6'da ve şekil 4.3'te gösterilmiştir. 2 Gy + 0,5 µg/ml kombine dozu ile 2 Gy tek radyasyon arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktur ($p>0,05$). Geriye tüm kombine dozlar ile tek başına 2 Gy radyasyon dozu arasında istatistiksel açıdan anlamlı farklılık bulunmuştur ($p<0,001$). Lineer regresyon analizine göre 2 Gy radyasyon dozu ile oluşan genetik hasar indeks oranını kinik asit doza bağımlı bir şekilde azaltmıştır ($R^2 = 0,712$, $p<0,001$)



Şekil 4.4. Kontrol grupları dahil edilmeksizin tek başına radyasyon dozları ile radyasyon artı kinik asit kombine dozlarının Genetik Hasar İndeksi ortalama değerlerinin grafiksel dağılımı (GHI; Genetik Hasar İndeksi, KA; Kinik asit, DMSO;Dimetil sülfoksit R; İyonize Radyasyon).

Çizelge 4.6. Genetik Hasar İndekslerinin İstatistiksel anlamlılıklarının karşılaştırma sonuçları.

Karşılaştırılan Gruplar	Farkların İstatistiksel Anlamlılığı	p Değeri
Kontrol - 1Gy R.	Anlamlı	$p < 0,001$
Kontrol - 2Gy R.	Anlamlı	$p < 0,001$
1Gy R. - 2Gy R.	Anlamlı	$p < 0,001$
1Gy R. - 1Gy R.+ 0,5µg/ml K.A.	Anlamsız	$p > 0,05$
1Gy R. - 1Gy R.+ 1µg/ml K.A.	Anlamlı	$p < 0,005$
1Gy R. - 1Gy R.+ 2µg/ml K.A.	Anlamlı	$p < 0,001$
1Gy R. - 1Gy R.+ 4µg/ml K.A.	Anlamlı	$p < 0,001$
1Gy R. - 1Gy R.+ 8µg/ml K.A.	Anlamlı	$p < 0,005$
2Gy R. - 2Gy R.+ 0,5µg/ml K.A.	Anlamsız	$p > 0,05$
2Gy R. - 2Gy R.+ 1µg/ml K.A.	Anlamlı	$p < 0,001$
2Gy R. - 2Gy R.+ 2µg/ml K.A.	Anlamlı	$p < 0,001$
2Gy R. - 2Gy R.+ 4µg/ml K.A.	Anlamlı	$p < 0,001$
2Gy R. - 2Gy R.+ 8µg/ml K.A.	Anlamlı	$p < 0,001$

Non parametrik Kruskal-Wallis testine göre aralarında anlamlı farklılık olan gruplar arasında ikili karşılaştırmalar yapılmıştır. İkili arştırmalar Mann-Whitney U testi ile yapılmıştır. KA; Kinik asit, DMSO;Dimetil sülfoksit R; İyonize Radyasyon

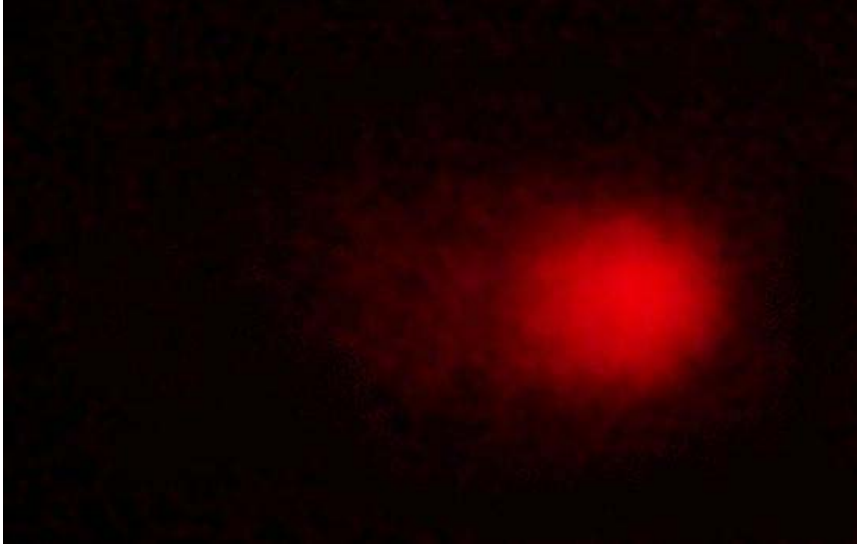
5. FOTOĞRAFLAR



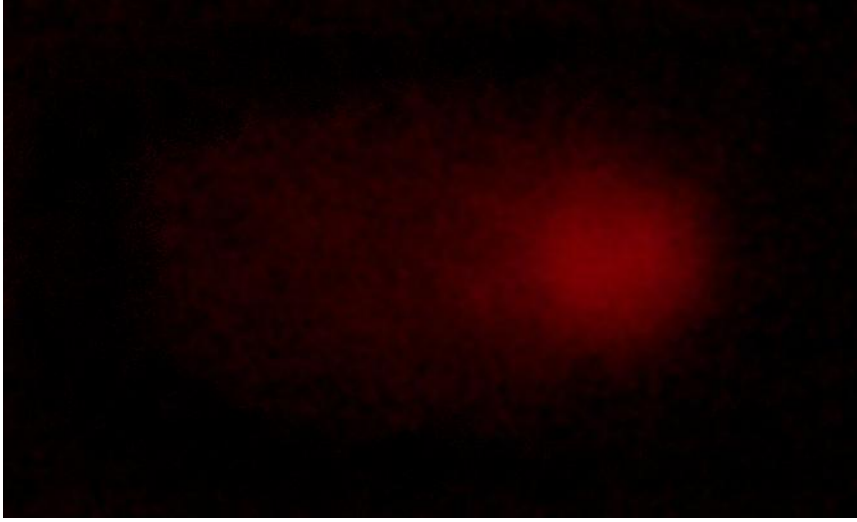
Şekil 5.1. COMET testine göre Tip 0 olarak değerlendirilen hücre.



Şekil 5.2. COMET testine göre Tip 1 olarak değerlendirilen hücre.



Şekil 5.3. COMET testine göre Tip 2 olarak değerlendirilen hücre.



Şekil 5.4. COMET testine göre Tip 3 olarak değerlendirilen hücre.



Şekil 5.5. COMET testine göre Tip 4 olarak değerlendirilen hücre.

6. TARTIŞMA

İyonize radyasyonun, DNA molekülünde tek zincir kırıklarına, çift zincir kırıklarına, alkali labil bölgelere ve okside pürin ve pirimidinlere neden olduğu bilinmektedir. İyonize radyasyon ile DNA molekülünde oluşan hasarlar ya tamamen tamir edilir veya eksik, hatalı tamir edilir ya da hücreyi apoptosise götürür (Frankenberg-Schwager 1990).

İyonize radyasyon, suyun radyolizi sonucu oluşan serbest radikaller sayesinde DNA molekülünün şeker-fosfat iskeletinde deformasyonlara yol açar ve bu sayede zincir kırıkları oluşur. Oluşan bu serbest radikaller, hücrelerde oksidatif hasarlara yol açar ve bu hasarlar hücre ölümünü tetikler. İyonize radyasyonun moleküler düzeydeki etkileri direkt veya dolaylı yolla olur. Direkt yolda, değişikliğe uğrayan molekül doğrudan doğruya iyonize radyasyona maruz kalır ve uyarılmış duruma geçer. Dolaylı yolda ise iyonize radyasyon sonucu oluşan bazı ara ürünler başka bir dizi kimyasal reaksiyona girerek diğer moleküllerin değişmesine neden olurlar (Kaya 2002).

Radyoterapi günümüzde kanser olgularının bir çoğunda tek başına veya cerrahi ve kemoterapi kombinasyonları ile küratif olarak kullanılan bir tedavi modelidir. Radyoterapi, 1895 yılında Wilhelm Conrad Roentgen'in X ışınlarını bulması ile başlayan süreçte ilk olarak 1896'da Fransa'da uygulanmıştır. Radyoterapinin amacı tanımlanmış tümör hacmine, tümörü çevreleyen sağlıklı dokuya en az zarar verecek şekilde, yüksek doğrulukla ölçülmüş radyasyon dozunu vermek bu sayede tümör içindeki hastalıklı hücrelerin ileri hücre bölünmelerini veya çoğalmalarını devamlı olarak durdurmak, tümörün yok olmasını sağlamak, hayat kalitesini artırmak ve kanserli hasta sağ kalımını uzatmaktır (Perez ve ark. 1998).

Genotoksisite, fiziksel veya kimyasal ajanlarla genetik materyalde oluşan hasardır. Genotoksisite testleri esas olarak kanserden korunmada, çevresel etkenlerin (UV, iyonize radyasyon), endüstriyel kimyasalların etkisini araştırmada, ilaçların piyasaya sürülmeden önce toksik etkilerini ve güvenilirliğini araştırmada kullanılır. Bu test yöntemleri arasında en önemli test yöntemlerinden biri COMET testidir (Kramer 1998).

In vitro olarak insan periferik kan hücrelerinde radyasyonla oluşturulan DNA hasarının tayininde ve tamir yeteneğinin değerlendirilmesinde COMET yönteminin uygunluğu birçok çalışmada belirtilmiştir (Cerda ve ark 1997, Kizilian ve ark 1999, Garcia ve ark 2004). COMET yönteminin avantajlarından dolayı, genotoksisite çalışmalarında kullanımı giderek artmıştır. COMET testi düşük dozlardaki radyasyona maruziyetin tayini için yeterli duyarlılığa sahiptir (Bedir ve ark 2004). COMET mekanizması, radyasyonun etkisiyle DNA molekülünde oluşan zincir kırıklarının, DNA'nın süper sarmal yapısını gevşetmesi ve çekirdekten göç etmesine dayanır. Bu göç elektriksel alanda gerçekleştirilir ve mikroskop altında incelenir. Mikroskopta radyasyon ile indüklenen DNA hasarları kuyruklu yıldız şeklinde görülmektedir. Bu kuyruklu yıldızların şekli ve boyutu DNA hasarının büyüklüğü ile doğru orantılıdır (Fairbairn ve ark 1995).

Radyasyon tedavisi büyük oranda kanser hastalarının tedavi seçeneği olduğundan, hedeflenen kanser hücrelerinde geri dönüşsüz hasar oluşturmak için radyasyon kullanıldığında normal dokuları korumak amacıyla etkili radyokoruyucular araştırmak gerekli hale gelmiştir (Kalpana ve ark. 2009). Son yıllarda iyonize radyasyonun özellikle de radyoterapideki istenmeyen etkilerini önlemede bitkisel ürünler ve ekstraktlar ile bunların sentetik bileşiklerinin önemini araştırmaya özel bir ilgi olduğu görülmektedir. Bu sebeple bizim çalışmamızda daha önce antigenotoksik etkisi yönünden çalışılmamış bir bileşik olan kinik asidin iyonize radyasyonun oluşturduğu DNA hasarını önleme etkisi COMET testi kullanılarak araştırılmıştır. Bu çalışma ile elde edilecek sonuçların ileride radyoterapi ile sağlıklı dokularda oluşabilecek hasarı önleme çalışmalarına ışık tutması beklenmektedir.

Kinik asit kına kına bitkisi, yerelması, elma, kahve ve kakao tohumlarından ve başka bitkilerden elde edilen kristal halinde bir maddedir. Ayrıca sentetik olarak klorogenik asidin hidrolizi ile de elde edilir. Kahvenin aktif maddeleri içinde de yer alır. Kinik asit bileşikleri üzerine yapılan çalışmalarda hiçbir mutajenik etkiye rastlanmamıştır (Zeiger ve Tice 1998).

Kinik asit ve türevleri ile yapılan antioksidan aktivite çalışmalarında, bu bileşiklerin yüksek oranda antioksidan aktivite gösterdikleri bulunmuştur. Antioksidan

özelliklerinin ortamdaki serbest radikalleri uzaklaştırma ve lipit peroksidasyonu yeteneğinden geldiği bilinmektedir (Moure ve ark. 2001).

Çalışmamızda kinik asidin radyasyon hasarını önleme etkisini belirlemek üzere öncelikle kinik asidin 5 farklı dozu ile radyasyonun 6 farklı dozu tek başlarına ve kombine edilerek denenmiştir. Radyasyon dozlarından optimum düzeyde hasar oluşturanlar seçilip kinik asit dozları ile kombine edilerek radyasyonun indüklediği genetik hasarı kinik asidin azaltıp azaltmadığı araştırılmıştır.

Çalışmada elde edilen COMET testi sonuçlarına göre 1 Gy ve 2 Gy radyasyon dozları, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında genetik hasar indeksi bakımından anlamlı bir farklılık bulunmuştur. 2 Gy radyasyon dozunun oluşturduğu genetik hasar indeksi 1 Gy radyasyona göre anlamlı olarak artış göstermiştir. COMET testinde genetik hasar indeksi DNA hasarlı hücrelerin normal hücrelere oranını göstermektedir. Genel olarak literatürde iyonize radyasyonla yapılan in vitro çalışmalarda kullanılan doz aralığı 1 Gy ile 4 Gy arasında değişmektedir (Devipriya ve ark 2005, Prasad ve ark 2005, Sudprasert ve ark 2006, Srinivasan ve ark 2006, Devipriya ve ark 2008, Tiwari ve ark 2009). Bu dozlar daha önceki çalışmalarda sıklıkla denenmiş ve maksimum genetik hasar gösteren ancak minimum toksik etki yapan dozlar olmaları yüzünden kullanılan dozlardır.

Radyasyon hasarını önleme alanında yapılan çalışmalarda çeşitli bitkisel kökenli bileşiklerinin yanı sıra vitaminler, tioller, pigmentler gibi farklı grup bileşiklerin kullanıldığı görülmektedir. Bitkisel kökenli bileşikler içerisinde bizim kullandığımız kinik asit ile aynı grupta bulunan birçok fenolik bileşik radyasyon hasarını önleme yönünden farklı test yöntemleriyle test edilmiştir.

Bu bileşiklerden apigenin ile insan kan lenfositlerinde yapılan in vitro çalışmada apigeninin 2 Gy iyonize radyasyon dozunda oluşan mikronukleus oranını 2.5 ile 10 µg/ml dozlar arasında doza bağımlı olarak azalttığı belirlenmiştir (Rithidech ve ark. 2005). Buna karşın beklendiği üzere apigenin tek başına mikronukleus oluşturmamıştır. Bizim çalışmamızda da kinik asit özellikle 2 Gy radyasyonun oluşturduğu DNA hasarını oldukça anlamlı oranda azaltmıştır. Ayrıca kinik asit tek başına anlamlı oranda DNA hasarı oluşturmamıştır.

Susam yağında bulunan bir fenolik bileşik olan sesamol ile yapılan ve periferal insan kan lenfositlerindeki radyasyonun indüklediği hasarı önlemeyi amaçlayan çalışmada 1, 2 ve 4 Gy radyasyon dozları kullanılmıştır. Radyasyon dozlarına maruz kalan kan lenfositlerindeki DNA hasarını azaltmak için radyoprotektif bir ajan olduğu düşünülen sesamolün 1, 5 ve 10 µg/ml lik dozları kullanılmıştır ve mikronukleus ile disentrik kromozom aberasyonu testleri uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlarda radyasyonun indüklediği mikronukleus ve disentrik aberasyon frekanslarında doza bağımlı bir azalma gözlenmiştir (Prasad ve ark. 2005). Yapılan bu çalışmada sesamolün vitamin E benzeri bir fenolik bileşik olduğu ve metilendioksi gruplarına sahip olduğu belirtilmektedir. Sesamolün bu yapısından dolayı radyasyonun indüklediği DNA hasarını azalttığı düşünülmektedir. Çalışmamızda kullanılan kinik asit dozları 1 ve 2 Gy radyasyon dozlarının oluşturduğu DNA hasarını doza bağımlı bir şekilde azaltmıştır. Kinik asit, karboksil ve hidroksil grupları taşıyan kristal halinde bir moleküldür. Özellikle hidroksil grupları sayesinde oksidatif hasarı önlediği düşünülmektedir.

Bitkilerde doğal olarak oluşan fenolik bir bileşik olan curcumin ile yapılan radyoprotektif etki belirleme çalışmasında 1, 2 ve 4 Gy radyasyon dozları ile muamele edilen insan kan lenfositlerinde artmış mikronukleus ve disentrik kromozom aberasyon oranlarını curcumin 1, 5 ve 10 µg/ml lik dozlarda kullanıldığında doza bağımlı olarak azaltmıştır (Srinivasan ve ark. 2006). Çalışmamızda yaptığımız doz denemelerinde 4 Gy radyasyon dozu uygulandığında Trypan Blue canlılık testi sonuçlarına göre yüksek toksisite ve hücre ölümü sebebiyle değerlendirmeye yetecek canlı hücre elde edilememiştir. Bu sebeple bu doz çalışmada kullanılmamıştır. Curcuminle yapılan çalışmada bu bileşiğin fenolik hidroksil gruplarına sahip olması sebebiyle serbest radikal yakalama ve lipit peroksidasyonunu inhibe etme etkisine sahip olduğu vurgulanmaktadır. Çalışmamızda kullanılan kinik asit 1 ve 2 Gy radyasyonun oluşturduğu DNA hasarını anlamlı oranda azaltmıştır. Ancak kinik asidin en yüksek dozu olan 8 µg/ml ile radyasyon dozları kombine edildiğinde her iki radyasyon dozu ile de DNA hasar oranının bir miktar yükseldiği gözlenmiştir. Bu durum kinik asidin denenmeyen daha yüksek dozlarının toksik etkilerinin olabileceğini bize düşündürmektedir.

Devipriya ve arkadaşlarının (2008) yaptığı radyokoruyucu etki araştırma çalışmasında, doğal olarak oluşan bir flavonoid olan kuersetin kullanılmıştır. Kuersetinin 1, 2, 4, 8 ve 16 µg/ml lik dozları kullanılmıştır. Kuersetinin radyokoruyucu etkisini araştırmak amacıyla 1, 2, 3 ve 4 Gy gamma radyasyon dozları, kuersetinin farklı dozları ile kombine edilip DNA hasarı oranındaki değişim genotoksisite testleri kullanılarak araştırılmıştır. Bunun sonucunda DNA hasarının radyasyon dozuna göre arttığı ve radyasyon dozlarının oluşturduğu DNA hasarının, kuersetin dozlarına bağımlı olarak azaldığı bulunmuştur. En iyi koruyucu doz olarak kuersetinin 8 µg/ml lik dozu seçilmiştir. Kuersetinin 8 µg/ml'lik dozunun radyasyonun oluşturduğu DNA hasarını en iyi şekilde azalttığı bulunmuştur. Yapılan bu çalışmada kuersetinin radikal uzaklaştırma potansiyelinin diğer flavonoidlere göre daha yüksek olduğuna değinilmiştir (Devipriya ve ark. 2008). Kinik asidin türevleri ile yapılan çalışmalarda bu türevlerin radikal uzaklaştırma potansiyeline sahip olduğu görülmüştür. Bizim çalışmamızda kinik asidin 4 µg/ml'lik dozunun en iyi radyoprotektif etki gösterdiği bulunmuştur. Kinik asidin 4 µg/ml'lik dozu, radyasyon dozlarının oluşturduğu DNA hasarını en etkili şekilde azaltmıştır.

Bitkilerde doğal olarak oluşan fenolik bir asit olan kafeik asit ile yapılan in vitro çalışmada, kafeik asidin 1, 2, 4, 8, 10 ve 12 µg/ml'lik dozlarından, 10 µg/ml'lik dozunun radyasyonun indüklediği DNA hasarını en etkili şekilde azalttığı bulunmuştur (Devipriya ve ark. 2008). Bu çalışmada en yüksek DNA hasarını oluşturan radyasyon dozu olarak 4 Gy radyasyon dozu seçilmiştir. 10 µg/ml'lik kafeik asit dozu mikronukleus, disentrik kromozom aberasyonu ve COMET testindeki genetik hasar indeksi oranını 4 Gy radyasyon ile kombine edildiğinde yüksek oranda azaltmıştır. Daha sonra seçilen 10 µg/ml'lik kafeik asit dozu, 1, 2, 3 ve 4 Gy radyasyon dozları ile kombine edilerek, etkili dozun radyoprotektif etkisi araştırılmıştır. Kafeik asidin radikal uzaklaştırma etkisinden dolayı radyoprotektif bir ajan olduğu düşünülmektedir ve kafeik asidin radikal uzaklaştırma etkisinin sebebinin yapısında bulunan fenilhidroksi gruplarından kaynaklandığı düşünülmektedir (Devipriya ve ark. 2008).

Kinik asidin moleküler yapısı olarak kafeik asidinkine benzemektedir. Taşıdıkları fenilhidroksi gruplarından dolayı radikal uzaklaştırıcı etki gösterdikleri düşünülmüştür. Kinik asidin tam olarak antioksidan potansiyeli araştırılmamıştır, fakat yaptığımız çalışmada radyasyonun indüklediği DNA hasarını en iyi azaltan kinik asit dozu olarak 4 µg/ml kinik asit dozu belirlenmiştir. Yapısında kinik asit ve kafeik asit bulunan fenolik bileşiklerin, radikal uzaklaştırma etkisine sahip oldukları yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Chuda ve ark. 1996, Yoshimoto ve ark. 2002).

Günümüzde canlı varlıklar yapay veya doğal olarak radyasyona maruz kalmaktadırlar. Ayrıca insanların kanser veya diğer bazı hastalıkların tedavisinde bilinçli olarak kullandıkları iyonize radyasyonun sağlıklı dokulara verdiği zararın önlenmesi günümüzde oldukça önem verilen bir çalışma alanı haline gelmiştir. Radyasyonun zararlı etkilerinin en aza indirgenmesi için kullanılan maddelerin yanı sıra radyasyonun sebep olduğu serbest radikalleri uzaklaştırıcı etkisi olan ancak toksik yan etkileri az olan kinik asit gibi bitkisel etken maddeler alternatif olarak kullanılabilir. Bu fenolik bileşiklerin birçoğunun antioksidan kapasiteleri, genotoksik etkileri ve yan etkileri bilinmediğinden, bu etkilerin ilerideki çalışmalarda detaylı bir şekilde araştırılması gerekmektedir. Ayrıca insanlarda iyonize radyasyon ve kinik asidin koruyucu etkilerinin daha net anlaşılabilmesi için in vitro çalışmanın kemirgen deney hayvanlarında genotoksisite test sistemleri ile in vivo olarak tekrarlanması yararlı olacaktır.

7. KAYNAKLAR

- ADAMSON, R. H., J. W. BRIDGES, M. E. EVANS, R. T. WILLIAMS, 1970, Species Differences in the Aromatization of Quinic Acid In Vivo and Role of Gut Bacteria. *Biochem. J.* 116:437-443.
- ALBERTS, B., A. JOHNSON, J. LEWIS, M. RAFF, K. ROBERTS, P. WALTER, 2002. *Molecular Biology of The Cell 4th Edition*. Garland Science, New York. p.235-299
- AMES, B., F. LEE, W. DURSTON, 1973. An Improved Bacterial Test System for the Detection and Classification of Mutagens and Carcinogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 70: 782-786.
- ARORA, R., D. GUPTA, R. CHAWLA, R. SAGAR, A. SAHARMA, R. KUMAR, J. PRASAD, S. SINGH, N. SAMANTA, R. K. SHARMA, 2005. Radioprotection by Plant Products: Present Status and Future Prospects. *Phytother. Res.* 19:1-22.
- ARTHURS, C. L., K. F. LINGLEY, M. PIACENTI, I. J. STRATFORD, T. TATIC, R. C. WHITEHEAD, N. S. WIND. (-)-Quinic acid: A Versatile Precursor For the Synthesis of Analogues of 2-crotonyloxymethyl-(4R,5R,6R)-4,5,6-trihydroxycyclohex-2-enone (COTC) Which Possess Anti-tumour Properties. *Tetrahedron Letters* 49: 2410-2413.
- BADR, F. M., O. H. M. EL-HABIT, M. HAMDY, G. A. R. HASSAN, 1998. The Mutagenic Versus Protective Role of Vitamin A on the Induction of Chromosomal Aberration in Human Lymphocyte Cultures. *Mutat. Res./Gen. Toxi. And Environ. Mutagenesis.* 414(1):157-163.
- BALASUNDRAM, N., SUNDRAM, K., SAMMAN S., 2005. Phenolic Compounds in Plants and Agri-Industrial By-Products: Antioxidant Activity, Occurrence and Potential Uses, *Food Chemistry*, 99: 191-203
- BARCO, A., S. BENETTI, C. DE RISI, P. MARCHETTI, G. P. POLLINI, V. ZANIRATO, 1997. D-(-)-Quinic acid: a Chiron Store for Natural Product Synthesis. *Tetrahedron Asymmetry.* 8(21):3515-3545.
- BASKIN, I. S. VE H. SALEM. 1997. *Oxidants, Antioxidants, and Free Radicals*. CRC Press. p.1-20,
- BECKMAN, C. H., 2000, Phenolic-Storing Cells: Keys to Programmed Cell Death and Periderm Formation in Wilt Disease and in General Defence Responses in Plants, *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 57: 101-110
- BEDİR, A., B. BİLGİCİ, Z. YURDAKUL, B. Ş. GÜRSEL, M. ALVUR, 2004. The Comparison of μ -FADU and COMET Methods in DNA Damage Analysis. *Türk Klinik Biyokimya Derg.* 2(3): 97-103.
- BENAVENTE-GARCIA, O., J. CASTILLO, J. LORENTE, M. ALCARAZ, 2007. Radioprotective Effects In Vivo of Phenolics Extracted from *Olea europaea* L. Leaves Against X-Ray-Induced Chromosomal Damage: Comparative Study Versus Several Flavonoids and Sulfur-Containing Compounds. *Journal of Medicinal Food.* 5(3):125-135.
- BENKOVIC, V., A. H. KNEZEVIC, D. DIKIC, D. LISISIC, N. ORSOLIC, I. BASIC, N. KOPJAR, 2009. Radioprotective Effects of Quercetin and Ethanolic Extract of Propolis in Gamma-Irradiated Mice. *Arh Hig Rada Toksikol.* 60:129-138.

BENKOVIC, V., N. ORSOLIC, A. H. KNEZEVIC, S. RAMIC, D. DIKIC, I. BASIC, N. KOPIJAR, 2008. Evaluation of the Radioprotective Effects of Propolis and Flavonoids in Gamma-Irradiated Mice: The Alkaline Comet Assay Study. *Biol. Pharm. Bull.* 31(1):167-172.

BERROUD, A., A. LE ROY, P. VOISIN, 1996. Membrane Oxidative Damage Induced by Ionizing Radiation Detected by Fluorescence Polarization. *Radiat. Environ. Biophysics*, 35:289-295.

BJÖRN, H., H. VAGHEF, L.FRIIS, C. EDLİNG, 1997 , Alkaline Single Gel Electrophoresis of DNA Fragments in Biomonitoring for Genotoxicity : An Introductory Study on Healthy Human Volunteers, *Int. Arch. Occup. Health.* , 69:185-192

BOLLUM, F. J., J. W. ANDREGG, A. B. McELLYA, V. R. POTTER, 1960, Nucleic Acid Metabolism in Regenerating Rat Liver VII. Effect of X-Radiation on Enzymes of DNA Synthesis. *Cancer Research.* 20:138-143.

BONASSI, L. HAGMAR, U. STRÖMBERG, A. H. MONTAGUD, H. TINNERBERG, A. FORNI, P. HEIKKILÄ, S. WANDERS, P. WILHARDT, I. L.HANSTEEN, L. E. KNUDSEN, H. NORPPA, 2000, Chromosomal Aberrations in Lymphocytes Predict Human Cancer Independently of Exposure to Carcinogens. *Cancer Research.* 60:1619–1625.

BOREK, C., 2004. Antioxidants and Radiation Therapy. *J. Nutr.* 134:3207–3209.

BORS, W. , HELLER, W. MICHAEL C., 1990, Flavonoids as Antioxidants: Determination of Radical Scavenging Efficiencies, *Methods in Enzymology*, 186: 343-355

BRAUN, J. , TEVINI M., 1993. Regulation of UV Protective Pigment Synthesis in Epidermal Layer of Rye Seedlings, *Photochem. Photobio.* , 57: 518-523

CAI, Y., Q. LUO, M. SUN ve H. CORKE, 2004. Antioxidant Activity and Phenolic Compounds of 112 Traditional Cheese Medicinal Plants Associated with Anticancer, *Life Sciences*, 77(17): 2157-2184

CASTILLO, J., O. BENAVENTE GARCIA, J. LORENTE, M. ALCARAZ, A. REDONDO, A. ORTUNO, J. A. DELRIO, 2000, Antioxidant activity and Radioprotective Effects Against Chromosomal Damage Induced in vivo by X-rays of Flavan-3-ols (Procyanidins) from Grape Seeds (*Vitis vinifera*): Comparative Study Versus Other Phenolic and Organic Compounds. *J. Agric. Food Chem.* 48:1738-1745.

CERDA, H., H. DELINC'EE, H. HAİNE, H. RUPP, 1997. The DNA "comet assay" as a Rapid Screening Technique to Control Irradiated Food. *Mutat. Res.* 375:167–181.

CHEN, C. C., B. L. WEI, S. H. LOKE, W. F. CHIOU. 3,4-DI-O-Caffeoyl Quinic Acid Protects Endothelial Cells Against Oxidative Stress and Restores Endothelium Dependent Vasodilatation. *J Chin Med* 18(1,2): 89-100,

CHUDA, Y., H. ONO, M. OMISHI-KAMEYAMA, T. NAGATA, T. TSUSHIDA, 1996. Structural Identification of Two Antioxidant Quinic Acid Derivatives from Garland (*Chrysanthemum coronarium* L.). *J. Agric. Food Chem.* 44:2037-2039.

CLIFFORD, M.N., 1998. Understanding The Biological Effects of Dietary Complex Phenols and Tannins and Their Implications for The Consumers Health and Well Being, VTT Symposium (Valtion Teknillinen Tutkimuskeskus), 187: 47-49

- COGGLE, J.E. 1977. Biological Effects of Radiation. Wykeham Pubs. Ltd. London. p. 29-100,
- COOPER, M.G., R. E. HAUSMANN. 2006. The Cell: A Molecular Approach. ASM Press, Washington. p. 80-85.
- COTELLE, S., J. F. FERARD, 1999. Comet Assay in Genetic Ecotoxicology: A Review. Environmental and Molecular Mutagenesis. 34:246-255.
- DEBELEÇ-BÜTÜNER, B., G. KANTARCI, 2006. Mutasyon, DNA Hasarı, Onarım Mekanizmaları ve Kanslerle İlişkisi. Ankara Ecz. Fak. Derg. 35(2):149-170
- DEMİR, S., A. G. ZAMANI, 2002. Mikronükleus tekniği ve kullanım alanları. Genel Tıp Derg 2002. 12(3):123-127.
- DEMİREL, S., A. G. ZAMANI, 2002. Mikronükleus tekniği ve kullanım alanları, Genel Tıp Dergisi, 12(3):123-127
- DEVIPRIYA, N., A. R. SUDHEER, M. SRINIVASAN, V. P. MENON, 2008. Quercetin Ameliorates Gamma Radiation-Induced DNA Damage and Biochemical Changes in Human Peripheral Blood Lymphocytes. Mutation Research 654:1-7.
- DEVIPRIYA, N., A. R. SUDHEER, V. P. MENON, 2008. Caffeic Acid Protects Human Peripheral Blood Lymphocytes against Gamma Radiation-Induced Cellular Damage. J Biochem Mol Toxicol 22:175-186.
- DEVİPRİYA N., A. R. SUDHEER, V. P. MENON , 2008 , Caffeic Acid Protects Human Peripheral Blood Lymphocytes Against γ -radiation Induced Cellular Damage , J. Biochem. Molecular Toxicology. 22(3):175-186
- EL-NAHAS, S. M., F. E. MATTAR, A. A. MOHAMED, 1993. Radioprotective Effect of Vitamins C and E. Mutat. Res. Letters. 301(2):143-147.
- ERDOĞAN, S., 2006. İyonizan Radyasyon İnsan Sağlığına Yararlı mı?. J Med Sci. 26:555-558
- FAIRBAIM, D.W., P. L. OLİVE ,K.L. ONEILL. 1995. The Comet Assay: a Comprehensive Review. Mutat Res. 339: 37-59.
- FENECH, M., 1993. The Cytokinesis-Block Micronucleus Technique and Its Application to Genotoxicity Studies in Human Populations. Environmental Health Perspectives Supplements. 101: 101-107.
- FENECH, M., 2000, The In Vitro Micronucleus Test. Mutat. Res. 455:81-95.
- FİEDBERG, E. C., 2003. DNA damage and Repair. Nature. 23(421):436-440,
- FLECK, O., O. NİELSEN, 2004. DNA Repair. Journal of Cell Science. 117:515-517.
- FRANK, J., 2004. Dietary Phenolic Compounds and Vitamin E Bioavailability- Model Studies in Human and Rats, Doctoral Thesis (unpublished), Swedish University of Agricultural Sciences, p.1-55
- FRANKENBERG-SCHWAGER, M., 1990, Induction, Repair and Biological Relevance of Radiation-induced DNA Lesions in Eucaryotic Cells. . Radiat. Environ. Biophys. 29: 273-292.
- FRIEDBERG, E. C., G. C. WALKER, W. SİEDE, 1995. DNA Repair and Mutagenesis. ASM Press, Washington. p.91-453.

GARAJ-VRHOVAC, V., 1999. Micronucleus Assay and Lymphocyte Mitotic Activity In Risk Assesment of Occupational Exposure of Microwave Radiation. *Chemosphere*. 39(13):2301-2312.

GARCÍA, O., T. MANDINA, A. I. LAMADRÍD, A. DÍAZ, A. REMÍGIO, Y. GONZALEZ, J. PILOTO, J. E. GONZALEZ, A. ALVAREZ, 2004. Sensitivity and Variability of Visual Scoring in the Comet Assay Results of an Inter-laboratory Scoring Exercise With the Use of Silver Staining. *Mutation Research*. 556: 25–34.

GHORBANM. Í, H. MOZDARANÍ, 2003, In Vitro Radioprotective Effect of Histamine H₂ Receptor Antagonists Against gamma-rays Induced Chromosomal Abberations in Human Lymphocytes, *Iran. J. Radiat. Res.* , 1(2);99-104

GORHAM, J. , 1995, *The Biochemistry of Stilbenoids*, Chapman & Hall Press, London, p.2-6

HAGMAR, L., A. BROGGER, I. L. HANSTEEN, S. HEIM, B. HÖGSTEDT, L. E. KNUDSEN , B. LAMBERT, K. LINNAINMAA, F. MITELMAN, I. NORDERSON C. REUTERWALL, S. SALOMAA, , S. SKERFVING, S. SORSA, 1994. Cancer Risk in Humans Predicted by Increased Levels of Chorosomal Aberrations in Lymphocytes: Nordic Study Group on the Health Risk of Chorosomal Damage. *Cancer Research*, 54:2919-2922.

HALL, E. J., A. J. GIACCA, 2006. *Radiobiology for Radiologist 6th Edition*. Lippincott Co, Philedelphia, p. 303-327.

HALL, E. J., R. C. MILLER, 1977. The How and Why of In Vitro Oncogenic Transformation. *Radiat Res*. 87:208-224.

HARBOURNE, J. B. , H. Baxter, G. P. Moss, 1999, *Phytochemical Dictionary: A Handbook of Bioactive Compounds from Plants*, Taylor&Francis Ltd. , Padstowe, 359 p. 359-360

HAZRA, T.K., A. DAS, S. DAS, S. CHOUDHURY, Y. W. KOW, R. ROY, 2007. Oxidative DNA damage repair in mammalian cells:A New Perspective. *DNA Repair* . 6:470-480,

HEDDLE, J. A., R. I. COUNTRYMAN, 1976. The production of micronuclei from chromosome aberration in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutat Res*. 41:321-32.

HERTOG, M.G.L, P.W. SWEETNAM, A.M. FEHILLY, P.C ELWOOD, D. KROMHOUT, 1997. Antioxidant Flavonols and Ischemic Heart Disease in Welsh Population of Men. The Caerphilly Study. *Am. J. Clin. Nutr.*, 65: 1489-1494

HOSSEINIMEHR, S. J., A. NEMATI, 2006. Radioprotective Effects of Hesperidin Against Gamma Irradiation in Mouse Bone Marrow Cells. *The British Journal of Radiology*, 79:415–418.

HUNG, T. M., M. K. NA, P. T. THUONG, N. D. SU, D. SOK, K. S. SONG, Y. H. SEONG, K. BAE,2006. Antioxidant Activity of Caffeoyle Quinic Acid Derivatives from the Roots of *Dipsacus asper* Wall. *Journal of Ethnopharmacology*. 108(2):186-192.

JAGETIA, G. C., V. A. VENKATESHA, T. K. REDDY, 2003. Naringin, A Citrus Flavonone, Protects Against Radiation-Induced Chromosome Damage in Mouse Bone Marrow. *Mutagenesis*. 18(4): p.337–343.

KAGERUD, A., H. I. PETERSON, 1981. Tocopherol in Irradiation of Experimental Neoplasms. Influence of Dose and Administration. *Acta Radiol Oncol*. 20:97-100,

- KAYA, T., 1997. Temel Radyoloji Tekniği. Güneş & Nobel Kitabevi, Bursa. s.118-137.
- KHANBABAEE K., T. VAN REE, 2001, Tannins: Classification and definition, Nat. Prod. Rep., 18: 641-649
- KIZILIAN, N., R.C. WILKINS, P. REINHARDT, C. FERRAROTTO, J.R.N. MCLEAN, J.P. McNAMEE, 1999. Silver-stained Comet Cessay For Detection of Apoptosis, Biotechniques. 27: 926-930,
- KİREMİDJİAN-SCHUMACHER, L., M. ROY, 2001. Effect of Selenium on the İmmunocompetence of Patients With Head and Neck Cancer and on Adoptive Immunotherapy of Early and eEstablished Lesions. Biofactors 14:161-168.
- KRAMER, P. J., 1998. Genetic Toxicology. J Pharm Pharmacol. 50: 395-405.
- KUTLUK, T., A. KARS, 1992. Kanser Konusunda Genel Bilgiler. Türk Kanser Araştırma ve Savaş Kurumu Yayınlan. Ankara. s. 97.
- LATT, S.A. 1974. Sister Chromatid Exchanges, Indices of Human Chromosome Damage and Repair: Detection by Fluorescence and Induction by Mitomycin C. Proc. Nat. Acad. Sci. 71:3162-3166
- LEWİS, N. G., E. YAMAMOTO, 1990, Lignin: Occurence , biogenesis and degradation, Ann. Rev. Plant Phy. Plant Mol. Bio. 41: 455-496
- LITTLE, J. B., 2000, Radiation Carcinogenesis. Carcinogenesis. 21(3):397-404.
- LIU, S. Z., 2003. Non-linear Dose Response Relationship in the Immune System Following Exposure to Ionizing Radiation:Mechanisms and Implications. Non Linearity in Biology, Toxicology and Medicine. 1:72-92.
- MARTELOCK, G., H. BAUER ve D. TREUTTER, 1994. Characterization of P. Avium L. Varieties with Phenolic Compounds. Fruit Varietes Journal, 48(2): 81-88
- MAURYA D. K., S. ADHİKARİ, C. KRİSHNAN K. NAİR, T. P. A. DEVASAGAYAM, 2007, DNA Protective Properties of Vanillin Against γ -induced Radiation Under Different Conditions: Possible Mechanisms, Mutation Research, 634: 69-80
- MAURYA, D. K., S. ADHIKARI, C. K. K. NAIR, T. P. A. DEVASAGAYAM, 2007. DNA Protective Properties of Vanillin Against γ -Radiation Under Different Conditions: Possible Mechanisms. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. 634(2):69-80,
- McCARTHY P.J., S.F. SWEETMAN, P.G. McKENNA , 1997 , Evaluation of Manual and Image Analysis Quantification of DNA Damage in Alkalne Comet Assay, Mutagenesis , 12(4):209-214
- MEMİŞOĞLU, A., L. SAMSON, 2000, Base Excision Repair in Yeast and Mammals. Mutat. Res. 451: 39-51
- MENDEZ, J., T. BROWN, 1982. The natural coumarins : Occurence , chemistry and biochemistry, John Wiley-İnterscience, Chicester U.K. edition, Philedelphia, p. 26-106.
- MORTELMANS, K., E. ZEIGER, 2000, The Ames Salmonella/Microsome Mutagenicity Assay. Mutation Research, 455: 29-60,
- MOURE, A., M.J. CRUZ, D. FRANCO, J.M. DOMİNGUEZ, J. SINEIRO, M.J. MURRAY, R.D.H., NUNEZ, J.C. PARAJO, 2001. Natural Antioxidants from Residual Sources, Food Chemistry, 72: 145-171

NIAS, A. H.W., 1990, An Introduction to Radiobiology. John Wiley and Sons Ltd. Chicester, 400p.

NOAMAN, E., ZAHRAN, A.M., KAMAN, A.M., OMRAN, M.F., 2002. Vitamin E and Selenium Administration as a Modulator of Antioxidant Defense System: Biochemical Assessment and Modification. *Biol. Trace Elem. Res.* 86:55- 64.

OLIVE, P. L., D. WLODEK, J. P. BANÁTH, 1991. DNA Double-Strand Breaks Measured in Individual Cells Subjected to Gel Electrophoresis. *Cancer Research.* 51: 4671-4676.

OLIVE, P. L., 1998. The Role of DNA Single and Double Strand Breaks in Cell Killing by Ionizing Radiation. *Radiation Research.* 150:42-51.

ONARAN, L., 1997. RADYASYON. Biyoetik Derneği 3. Tıbbi Etik Sempozyumu. Ankara. 23-25

ONUR, E., B. TUĞRUL, F. BOZYİĞİT, 2009. DNA Damage and Repair Mechanisms. *Türk Klinik Biyokimya Dergisi.* 7(2):61-70,

OWEN, R.W., A. GIACOSA, W.E. HULL, R. HAUBNER, B. SPIGELHALDER ve H. BARTSCH, 2000, The Antioxidant/Anticancer Potential of Phenolic Compounds Isolated from Olive Oil, *European Journal of Cancer,* 36(10): 1235-1247

ÖZALPAN, A. 2001. Temel Radyobiyojoloji. Haliç Üniversitesi Yayınları, İstanbul. 353 s.

ÖSTLING, O., K. J. JOHANSON, 1984. Microelectrophoretic study of radiation Induced DNA Damages in Individual Mammalian Cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 123:291-298.

PANDEY, B.N., K.P. MISHRA, 2003. Oxidative Membrane Damage and Its Involvement in Gamma Radiation- induced Apoptotic Cell Death. *Iran. J. Radiat. Res,* 1(1):17-22.

PEREZ, A.C., L.W. BRADY, 1998. Principles and Practice of Radiation Oncology. 3 rd PERRY, P., H. J. EVANS, 1975. Cytological Detection of Mutagen-Carcinogen Exposure by Sister Chromatid Exchange. *Nature,* 258:121-135.

POYRAZOĞLU, E., V. GÖKMEN ve N. ARTIK, 2002. Organic Acids and Phenolic Compounds in Pomangrates (*Punica Granatum L.*) Grown in Turkey. *Journal of Food Composition and Analysis,* 15: 567-575.

PRASAD N. R. , V. P. MENON, V. VASUDEV, K.V. PUGALENDİ, 2005. Radioprotective Effect of Sesamol on γ -radiation Induced DNA Damage, Lipid Peroxidation and Antioxidants Level in Cultured Human Lymphocytes. *Toxicology.* 209 : 225-235

PRASAD, K. N., Handbook of Radiobiology 2nd Edition. CRC Press Inc., Florida. 334 p.

PRASAD, N. R., V. P. MENON, V. VASUDEV, K.V. PUGALENDİ, 2005. Radioprotective Effect of Sesamol on γ -Radiation Induced DNA Damage, Lipid Peroxidation and Antioxidants Levels in Cultured Human Lymphocytes. *Toxicology* 209:225-235.

- PROSSER, J.S., J. E. MOQUET, D. C. LLOYD, A. A. EDWARDS, 1988. Radiation Induction of micronuclei in human lymphocytes. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 199(1):37-45
- RENE, D.T., V. YOLANDA, A. ZENO, 2001. Comparison of the Antioxidant Content of Fruits, Vegetables and Tea Measured as Vitamin C Equivalents, *Toxicology*, 166: 63-69
- RICHARDSON, C., M. JASIN, 2000, Coupled Homologous and Nonhomologous Repair of a Double-Strand Break Preserves Genomic Integrity in Mammalian Cells. *Mol. and Cell. Bio.* 20:9068-9075.
- RITHIDECH, K. N., M. TUNGJAI, E. B. WHORTON, 2005. Protective Effect of Apigenin on Radiation-Induced Chromosomal Damage in Human Lymphocytes. *Mutation Research* 585:96–104.
- RODEMANN, H. P., M. BAMBERG, 1995. Cellular Basis of Radiation-Induced Fibrosis. *Radiotherapy and Oncology*. 35(2):83-90,
- SATYAMITRA, M., P. U. DEVI, H. MURASE, V. T. KAGIYA, 2001. In Vivo Protection by Alpha-TMG: Preliminary Studies. *Mutat. Res.* 479:53-61.
- SCHLEIF, R., 1993. *Genetics and Molecular Biology*. John Hopkins University Press Baltimore. p.62-66.
- SCHMID, W., 1975. The Micronucleus Test. *Mutat Res.* 31:9-15.
- SCHULL, W. L., M. OTAKE, J. V. NEAL, 1981. Genetic Effects of the Atomic Bomb: A Reappraisal. *Science*. 213:1220-1227
- SEIFTER, E., J. MENDENCKI, S. HOLTZMAN, J. D. KANOFSKY, E. FREIDENTHAL, L. DAVIS, J. WEINZWEIG, 1988. Role of Vitamin A and Beta Carotene in Radiation Protection: Relation to Antioxidant Properties. *Pharmacol. Ther.* 39:357- 365.
- SHAHIDI, F. , M. NACZK, 2003, *Food Phenolics: Sources, Chemistry, Effects, Applications*, CRC Press, USA, p.1-15
- SHIMOI, K., S. MASUDA, M. FUROGORI, S. ESAKI, N. KINAE, 1994. Radioprotective Effect of Antioxidative Flavonoids in Gamma-ray Irradiated Mice. *Carcinogenesis* 15: 2669- 2672.
- SINGH N.P. , 2000, A Simple Method for Accurate Estimation of Apoptotic Cells. *Experimental Cell Research*. 256:328-337
- SINGH, N.P., M. T. McCOY, R. R. TICE, E. L. SCHNEIDER, 1988. A Simple Technique for Quantitation for Low Levels of DNA Damage in Individual Cell. *Experimental Cell Research*, 175:184-191.
- SPIGOTI, G., S. TSUTSUMI, P. BARTOLINI, K OKAZAKI, 2009. Protective Effect of Propolis on Radiation Induced Chromosomal Damage on Chinese Hamster Ovary Cells (CHO-K1). *International Nuclear Atlantic Conference*. Rio de Janeiro. 27 Ekim-2 Kasım, p.1-10 .
- SRINIVASAN, M. N. R. PRASAD, V. P. MENON, 2006. Protective effect of curcumin on γ -radiation induced DNA damage and lipid peroxidation in cultured human lymphocytes. *Mutation Research*. 611:96–103.

- SRINIVASAN, V., A. J. JACOBS, S. A. SIMPSON, J. F. WEISS, 1983. Radioprotection by Vitamin E: Effects on Hepatic Enzymes, Delayed Type Hypersensitivity and Postirradiation Survival of Mice. "in, Modulation and Mediation of Cancer by Vitamins, Eds F. L. Myekens and N. L. Prasad. Karger, Basel. p.119-131.
- SUDPRASERT, W., P. NAVASUMRIT, M. RUCHIRAWAT, 2006. Effects of Low-Dose Gamma Radiation on DNA damage, Chromosomal Aberration and Expression of Repair Genes in Human Blood Cells. *Int J Hyg Environ Health*. 209:503–511.
- THOMPSON, L. H., D. SCHILD, 2002. Recombinational DNA Repair and Human Disease. *Mutat. Res*. 509: 49-78.
- TICE, R. R., E. AGURREL, D. ANDERSON, B. BURLINSON, A. HARTMANN, H. KOBAYASHI, Y. MIYAMAE, E. ROJAS, J. C. RYU, Y. F. SASAKI, 2000, Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 35:206-221.
- TIWARI, P., A. KUMAR, S. BALARISHNAN, H. S. KUSHWAHA, K. P. MISHRA, 2009. Radiation Induced Micronucleus Formation and DNA Damage in Human Lymphocytes and Their Prevention by Antioxidant Thiols. *Mutat Res*. 676: 62-68.
- TUBIANA, M., J. DUTREIX, A. WAMBERSIE, 1990, An Introduction to Radiobiology. Taylor & Francis Ltd, London. 270 p.
- ULUBELDE, M., 1984. Citrus ve Prunus Cinsindeki Bazı Meyve Türlerinin Yaprak Fenolik Bileşik Yardımıyla Tamamlamaları Üzerine Araştırmalar. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Bornova İzmir, 100 s.
- UMA DEVİ, P., A. GANASOUNDARİ, B. VRİNDA, K. K. SRİNIVASAN, M. K. UNNIKRISHNAN, 2000, Radiation protection by the ocimum flavonoids orientin and vicenin: Mechanisms of action. *Radiation Research*. 154: 455-60,
- UPADHYAY, S. N., B. S. DWARAKANATH, T. RAVINDRANATH, T. L. MATHEW, 2005. Chemical Radioprotectors. *Defence Science Journal*. 55(4):403-425.
- ÜNDEĞER, Ü., N. BAŞARAN, A. KARS, D. GÜÇ, 1999 , Assessment of DNA Damage in Nurses Handling Antineoplastic Drugs by the Alkaline Comet Assay , *Mutation Research/Genetic Toxicology and Enviromental Mutagenesis*, 439(2):277-285
- VAN DER KOGEL, A. J., 1993. Cell Proliferation in Normal Tissues. "in, Basic Clinical Radiobiology First Edition, Eds G. G. Steel", Hodder Arnold Pub., London . p.23-100,
- WARD, J. F., 1988. DNA Damage Produced by Ionizing Radiation in Mammalian Cells: Identities, Mechanisms of Formations and Reparability. " in, *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, Vol 35, Eds W. E. Cohn and K. Moldave", Academic Press, California. p. 103-121.
- WARREN, S., 1980, Effects of Radiation on Normal Tissues. *CA Cancer J. Clin*. 30:350-355.
- WEISS, J. F., M. R. LANDAUER, 2000, Ptection by Antioxidants. *Ann New York Acad. Sci*. 899:44-60,
- WEISS, J. F., M. R. LANDAUER, 2003. Protection Against Ionizing Radiation by Antioxidants Nutrients and Phytochemicals. *Toxicology*. 189:1-20,
- WHANGER, P.D., 2002. Selenocompounds in Plants and Animals and Their Biological Significance. *J. Am. Coll. Nutr*. 21: 223-232.

- YOSHIMOTO, M., S. YAHARA, S. OKUNO, M. D. ISLAM, K. ISHIGURO, O. YAMAKAWA, 2002. Antimutagenicity of Mono-, Di- and Tricaffeoylquinic Acid Derivatives from Sweet Potato (*Ipomoea batatas* L.) Leaf. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66(11):2336-2341.
- ZEIGER, E., R. TICE, 1998. Chlorogenic Acid and Caffeic Acid. ILS. North Carolina. s. 120,
- ZENG, K., K. R. THOMPSON, C. R. YATES, D. D. MILLER, 2009. Synthesis and Biological Evaluation of Quinic Acid Derivatives as Anti-inflammatory Agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* . 19(18):5458-5460,

TEŐEKKÜR

Bana bu konuda çalışma olanağı veren ve tezimin her aŐamasında yardımına baŐvurduđum danıŐmanım Doç. Dr. Nilüfer INKILI'a, deney ve yazım aŐamasında tezle ilgili birçok konuda yardımına baŐvurduđum, deneylerimde emeği geçen ve deneyiminden faydalandığım Prof. Dr. Rahmi BİLALOĞLU, Doç Dr. Tolga ÇAVAŐ, AraÇ. Gör. Özgür VATAN, AraÇ. Gör. Dilek YILMAZ, Ece TÜZÜN ve Sebla EVİKÖZ' e, çalıŐmalarımnda radyasyon kaynaklarını kullandığım U. Ü. Tıp Fakültesi Radyasyon Onkolojisi ABD Öğretim Üyeleri ve çalıŐanlarına, beni destekleyen aileme teŐekkürlerimi sunarım.

ÖZGEÇMİŞ

TOLGA ZORLU 1986 yılında K.K.T.C.'de doğdu. İlk ve lise öğrenimini K.K.T.C.'de tamamladı. 2007 yılında Uludağ Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji bölümünden mezun oldu. 2008 yılında Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Genel Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisansa başladı.