



TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

**MİRİSETİN'İN İNSAN LENFOSİT DNA'SI ÜZERİNDEKİ
RADYOPROTEKTİF ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Kıymet TABAKÇIOĞLU

**EDİRNE
Ekim-2013**

T.C.

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MİRİSETİN'İN İNSAN LENFOSİT DNA'SI ÜZERİNDEKİ
RADYOPROTEKTİF ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

KIYMET TABAKÇIOĞLU

DOKTORA TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN: PROF. DR. TÜLİN AKTAÇ

EDİRNE - 2013

**MİRİSETİN'İN İNSAN LENFOSİT DNA'SI ÜZERİNDEKİ
RADYOPROTEKTİF ETKİSİNİN İNCELENMESİ**


KIYMET TABAKÇIOĞLU

**DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

2013

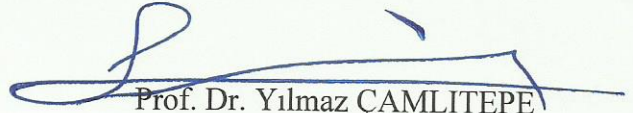
**TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Onayı



Prof. Dr. Mustafa ÖZCAN
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tezin Doktora tezi olarak gerekli şartları sağladığımı onaylarım.



Prof. Dr. Yılmaz ÇAMLITEPE
Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımızca okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Tülin AKTAÇ
Tez Danışmanı

Bu tez, tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından Biyoloji Anabilim Dalında bir Doktora tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri (Ünvan, Ad, Soyad):

Prof. Dr. Tülin AKTAÇ

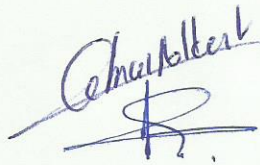
Prof. Dr. Çetin ALGÜNEŞ

Prof. Dr. Şehnaz BOLKENT

Doç. Dr. Figen İNCEOĞLU

Doç. Dr. Hülya YAĞAR

İmza



Tarih: 31 /10 / 2013

TEZ DOĞRULUK BEYANI
T.Ü.FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI
DOĞRULUK BEYANI

İlgili tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin kaynak gösterilerek ilgili tezde yer aldığını beyan ederim.



29 / 11 / 2013

Kıymet TABAKÇIOĞLU

Doktora Tezi

Mirisetin'in İnsan Lenfosit DNA'sı Üzerindeki Radyoprotektif Etkisinin İncelenmesi

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

ÖZET

Bu çalışmada, bir flavonoid olan Mirisetin'in insan lenfosit DNA'sı için radyoprotektif olup olmadığı araştırılmıştır. Bu amaçla, gönüllülerden alınan kan örnekleri ile Mikronukleus, Komet ve ELİSA deneyleri yapılmıştır. Her deney serisi için kontrol, DMSO, 100 µM ve 200 µM Mirisetin, 0.5 Gy ve 2 Gy radyasyon dozları ile Mirisetin ve radyasyonun birlikte uygulamalarının sonuçları analiz edilmiştir.

Mikronukleus deneyleri için kan örnekleri Mirisetin ve radyasyon uygulamalarını takiben 68 saat kültüre alınmış ve sitokinez aşamasında Sitokalazin-B ile durdurulan hücreler ışık mikroskobu ile değerlendirilmiştir. Deney sonuçlarına göre, 100 µM ve 200 µM Mirisetin uygulamasının 0.5 Gy ve 2 Gy dozlarda radyasyonun hasar verici etkisini azalttığı gözlenmiştir.

Komet deneylerinde 2 farklı protokol uygulanmıştır: Alkali ve FPG Komet yöntemleri. pH>13 Alkali Komet DNA'daki tek ve çift zincir kırıklarını tespit etmek için, FPG komet ise radyasyon nedeni ile meydana gelen oksidatif DNA hasarlarını belirlemek amacıyla kullanılmıştır.

Komet deney sonuçlarına göre, 100 µM ve 200 µM dozlarda Mirisetin'in kendisinin de DNA'da ileri düzeyde kırıklara neden olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle, bu çalışmada uygulanan deney koşulları ile Mirisetin'in radyoprotektif etkisinin değerlendirilmesinde sağlıklı bir sonuç elde edilemeyeceği kanısına varılmıştır.

Yıl : 2013

Sayfa Sayısı : 104

Anahtar Kelimeler : Mirisetin, Mikronukleus, Komet Deneyi, Radyoprotektif Etki

Doctorate Thesis
Investigation of the Effects of Myricetin on DNA of the Human Lymphocytes
Trakya University Institute of Natural Sciences
Biology Department

ABSTRACT

In this study, it is investigated that Myricetin which is a flavonoid is whether radioprotective for human lymphocyte DNA or not. For this purpose, Micronucleus, Comet and ELISA assays were carried out with blood samples were taken from volunteers. For each experiment series, results were analyzed as control, DMSO, 100 μM and 200 μM Myricetin, myricetin with doses of 0.5 Gy and 2 Gy irradiation together.

Blood samples were cultured for 68 hours followed by myricetin and radiation applications and cultures were blocked by Cytochalasin-B at cytokinesis stage and cells were evaluated by light microscopy for Micronucleus assays. According to the test results, it was observed that the application of 100 μM and 200 μM Myricetin at 0.5 Gy and 2 Gy doses reduce damaging effect of radiation .

Two different protocols were applied in Comet Assays: Alkaline and FPG Comet methods. pH>13 Alkaline Comet was used to detect single and double strand breaks of DNAs, as for FPG Comet, it was used to determine oxidative DNA damage induced by radiation.

According to Comet Assay results, it was determined that myricetin also itself causes breaks highly on DNA at 100 μM and 200 μM doses. Therefore, it was concluded that no accurate results is able to obtain to evaluate the radioprotective effect of Myricetin in the test conditions applied in these assays.

Year : 2013
Number of Pages : 104
Keywords : Myricetin, Micronucleus, Comet Assay, Radioprotective Effect

TEŞEKKÜR

Tezimin planlanması ve gerçekleştirilmesinde, önerileri, yardımları ve sabrı için değerli tez hocam Prof. Dr. Tülin AKTAÇ' a,

Tez çalışmam sırasında Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nın olanaklarından yararlanmamı sağlayan ve tezim için her türlü desteği veren değerli hocalarım Prof. Dr. Çetin ALGÜNEŞ ve Yrd. Doç. Dr. Funda Sibel PALA'ya,

Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Başkanlığına,

Adnan Menderes Üniversitesi, Biyoistatistik A.D. Öğretim Üyesi Doç. Dr. İmran KURT ÖMÜRLÜ'ye,

T.Ü. Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları A.D. Öğretim Üyesi Prof.Dr. Ülfet VATANSEVER ÖZBEK'e,

T.Ü. Tıp Fakültesi Hastanesi Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Cem UZAL, Uzm. Fizikçi Şule PARLAR ve Radyoterapi Ünitesi çalışanlarına,

Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik A. D. Öğretim Üyeleri Yrd. Doç. Dr. Hakan GÜRKAN ve Yrd. Doç. Dr. Hilmi TOZKIR'a,

T.Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Doç. Dr. Fulya Dilek GÖKALP MURANLI'ya,

Uzm. Biyolog Mehtap TAŞ ve Uzm. Biyolog Damla EKER'e,

T.Ü. Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'ndaki mesai arkadaşlarıma,

Ve canım aileme gösterdikleri destek ve sabırdan dolayı en içten duygularıyla teşekkür ederim.

Bu çalışma Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (TÜBAP) biriminin mali desteği ile gerçekleştirilmiştir (TÜBAP-2010/42).

İÇİNDEKİLER	Sayfa No.
ÖZET	I
ABSTRACT	II
TEŞEKKÜR	III
İÇİNDEKİLER	IV
SİMGELER VE KISALTMALAR	VI
TABLO LİSTESİ	VIII
ŞEKİL LİSTESİ	X
1. GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1. Radyasyon	3
2.1.1. Radyasyon	3
2.1.2. Radyasyon Kaynakları	7
2.1.3. Radyasyon'un Biyolojik Etkileri	8
2.1.4. Radyoprotektörler.....	24
2.2. Flavonoidler	25
2.2.1. Mirisetin.....	25
2.2.2. Mirisetin'in Metabolizması.....	26
2.2.3. Mirisetin'in Biyolojik Etkileri.....	26
2.3. Mikronukleus	31
2.3.1. Mikronukleus Oluşum Mekanizması.....	31
2.3.2. Mikronukleusların Kullanıldığı Alanlar	32
2.3.3. Mikronukleus Analizinin Radyobiyojoloji'de Kullanımı	32
2.4. Komet Deneyi	35
2.4.1. Komet Deneyi nedir ?.....	35
2.4.2. Tarihçe ve Komet Deneyi'nin Radyobiyojoloji'de Kullanımı	39
2.4.3. Komet Deneyi'nin Kullanım Alanları	41
2.5. ELİSA Deneyi	43
2.5.1. ELİSA Deneyi.....	43
2.5.2. ELİSA Yönteminin Oksidatif Hasarın Saptanmasında Kullanımı ...	44

3. MATERYAL METOD	45
3.1. Kan Örnekleri	45
3.2. Işınlama	45
3.3. Mirisetin Uygulama	45
3.4. Deneylerde Kullanılan Kimyasallar	46
3.5. Deney Planı	47
3.6. Mikronukleus	47
3.7. Komet Deneyleri	51
3.8. ELİSA Deneyi	55
4. BULGULAR	56
4.1. Mikronukleus Analiz Sonuçları	56
4.1.1. Doz Cevap Eğrisi	56
4.1.2. Mirisetin'in Absorblanan Radyasyon Dozu Üzerine Etkisi	62
4.2. Komet Analiz Sonuçları	68
4.2. ELİSA Sonuçları	86
5. TARTIŞMA	87
7. KAYNAKLAR	95
8. ÖZGEÇMİŞ	104

SİMGELER VE KISALTMALAR

DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
α	Alfa Parçacığı
β	Beta Parçacığı
γ	Gama Işınları
UV	Mor Ötesi
Co-60	Kobalt 60
Sv	Sievert
PET	Pozitron Emisyon Tomografisi
Gy	Gray
LET	Lineer Enerji Transferi
LD	Letal Doz
NER	Nükleotid Eksizyon (Kesip-Çıkarma) Tamiri
BER	Baz Eksizyon (Kesip-Çıkarma) Tamiri
AP	Apürinik ya da Apirimidinik
keV	kilo elektron Volt
MeV	Mega elektron Volt
RBE	Rölatif Biyolojik Etkinlik
MYH	MutY homolog 1 Geni
OGG1	8-oksoguanin DNA Glikozilaz Geni
ACE	Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim
FeNTA	Ferrik nitrilo triasetat
CuZn SOD	Bakır Çinko Süperoksit Dismutaz
MnSOD	Mangan Süperoksit Dismutaz
GPx	Glutatyon Peroksidaz
CAT	Katalaz
μM	Mikromolar
Caco-2	İnsan Epitelial Kolorektal Adenokarsinom Hücreleri

HepG2	Hepatosellüler Karsinom Hücreleri
PI₃	Fosfatidil İnositol 3 Kinaz
HL-60	İnsan Promyelositik Lösemi Hücreleri
Ha Cat	Malign Olmayan Ölümsüz İnsan Keratinositleri
UVB	Morötesi B Işınları
STZ	Streptozotosin
PC12	Pankreas Adacık Hücreleri
IAPP	Islet Amiloid Polipeptid, Amilin
ThT	Thioflavin T
PVN	Paraventriküler Çekirdek
MN	Mikronukleus
BN	Binukleat Hücre
DAPI	4',6-diamidino-2-fenil indol
FPG	Formamidopirimidin DNA Glikozilaz
SCGE	Tek Hücre Jel Elektroföresi
PFGE	Pulse Field Jel Elektroföresi
ELİSA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
HRP	Horse- Radish Peroksidaz
TMB	3,3',5,5'-Tetrametil Benzidin
SSD	Cilt Kaynak Mesafesi
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
PHA	Fitohemaglütinin
FBS	Fötal Bovin Serum
PBS	Fosfat Tamponlu Salin
LMPA	Düşük Erime Noktalı Agaro
NMPA	Normal Erime Noktalı Agaro
TRITC	Tetrametil rodamin-5-6-izotiyosiyanat
DMSO	Dimetil Sülfoksit

TABLO LİSTESİ

<u>Tablo No.</u>	<u>Tablo Başlığı</u>	<u>Sayfa No.</u>
Tablo 2.1.	Uygulanan Doza Bağlı Olarak Gözlenen Sağlık Etkileri (Akut Radyasyon Sendromu).....	10
Tablo 2.2.	İyonlaştırıcı Radyasyonların LET Değerleri.....	19
Tablo 2.3	Bazı Radyoprotektif Ajanlar ve Etki Mekanizmaları	25
Tablo 2.4.	Tamir Endonükleazları ve Substratları	36
Tablo 2.5.	Komet Deneyi İle Mikronukleus Testi Arasındaki Farklar.....	42
Tablo 4.1.	Gönüllü C.C.'ye ait MN Dağılımı.....	57
Tablo 4.2.	Gönüllü S.K.'ye ait MN Dağılımı.....	58
Tablo 4.3.	Gönüllü S.D.'ye ait MN Dağılımı.....	59
Tablo 4.4.	Birleştirilmiş MN dağılımı.....	60
Tablo 4.5.	MPOL Programı Yardımıyla Elde Edilen Doz Cevap Eğrisi Çıktıları.....	61
Tablo 4.6	Gönüllülerin Kontrol, DMSO, 100 µM ve 200 µM Mirisetin Uygulaması ile Gözlenen MN Sıklıkları.....	62
Tablo 4.7.	0.5 Gy+ 100 µM Mirisetin'e ait MN Dağılımı.....	64
Tablo 4.8.	0.5 Gy+ 200 µM Mirisetin'e ait MN Dağılımı.....	64
Tablo 4.9.	2 Gy+100 µM Mirisetin'e ait MN Dağılımı.....	65
Tablo 4.10.	2 Gy+200 µM Mirisetin'e ait MN Dağılımı.....	65
Tablo 4.11.	Mikronukleus Sıklıklarında Azalma Yüzdeleri.....	66
Tablo 4.12.	Absorblanan Dozda Azalma Yüzdeleri.....	67
Tablo 4.13.	Gönüllü S.D.'ye ait Alkali Komet Sonuçları.....	69
Tablo 4.14.	Gönüllü S.D.'ye ait FPG Komet Sonuçları.....	70
Tablo 4.15.	Gönüllü A.H.'ya ait Alkali Komet Sonuçları.....	71
Tablo 4.16.	Gönüllü A.H.'ya ait FPG Komet Sonuçları.....	72
Tablo 4.17.	Gönüllü O.B.'ye ait Alkali Komet Sonuçları.....	73
Tablo 4.18.	Gönüllü O.B.'ye ait FPG Komet Sonuçları.....	74
Tablo 4.19.	Gönüllü S.D.'ye ait Komet Skorları.....	75
Tablo 4.20.	Gönüllü A.H.'a ait Komet Skorları.....	75
Tablo 4.21.	Gönüllü O.B.'a ait Komet Skorları.....	75

Tablo 4.22.	Alkali Komet Sonuçlarının Karşılaştırılması (Friedman Testi).....	76
Tablo 4.23.	FPG Komet sonuçlarının Karşılaştırılması (Friedman Testi).....	76
Tablo 4.24.	Alkali Komet Post Hoc Değerlendirme Sonuçları.....	79
Tablo 4.25.	FPG Komet Post Hoc Değerlendirme Sonuçları.....	79
Tablo 4.26.	Alkali Komet- FPG Komet Karşılaştırılması.....	80
Tablo 5.1.	0.5 Gy ve 2 Gy Işınlanmış Örneklerde 1'li ve Çoklu MN'ların Dağılımı.....	89
Tablo 5.2.	Taşınan MN Sayılarına Göre Düşme Oranları.....	90

ŞEKİL LİSTESİ

<u>Şekil No.</u>	<u>Şekil Başlığı</u>	<u>Sayfa No.</u>
Şekil 2.1.	Atomun Enerji Absorbladıktan Sonraki Halleri.....	5
Şekil 2.2.	Elektromanyetik Enerji Spektrumu.....	6
Şekil 2.3.	Kobalt 60 Salınımı	6
Şekil 2.4.	Radyasyonun Direkt ve İndirekt Etkisi	10
Şekil 2.5.	Radyasyonun Etki Kademeleri.....	14
Şekil 2.6.	DNA’da Meydana Gelen Hasar Tipleri.....	15
Şekil 2.7.	Guanin’in OH Radikali İle Etkileşimi.....	17
Şekil 2.8.	Kromozom Tipi Aberasyonlar.....	18
Şekil 2.9.	Kromatid Tipi Aberasyonlar.....	18
Şekil 2.10.	Düşük ve Yüksek LET’li Radyasyonların Maddeyi Etkileme Şekli.	19
Şekil 2.11.	RBE –LET İlişkisi.....	20
Şekil 2.12.	Radyasyon Maruziyetini Takiben Meydana Gelen Olaylar	23
Şekil 2.13.	Mirisetin’in Moleküler Yapısı	26
Şekil 2.14.	Mikronukleus Oluşumu.....	31
Şekil 2.15.	Normal Binukleat Hücre (a) Ve Mikronukleuslu Binukleat (b) Hücrenin Mikroskop Görüntüsü	31
Şekil 2.16.	Dozimetri Çeşitleri.....	33
Şekil 2.17.	Komet Şeklindeki Hücreler.....	35
Şekil 2.18.	FPG Enziminin Tanıdığı Fapy Gua Lezyonu.....	37
Şekil 2.19.	FPG Enziminin Tanıdığı 8-Okso-G Lezyonu.....	37
Şekil 2.20.	FPG Komet Protokolü.....	38
Şekil 2.21.	Yaygın Kullanılan ELİSA Deneyleri.....	44
Şekil 3.1.	Değerlendirmeye Uygun Binukleat Hücreler.....	48
Şekil 3.2.	Değerlendirmeye Uygun Binukleat Hücreler v e MN’lar.....	49
Şekil 3.3.	Komet Görsel Skorumaya Diyagramı.....	53
Şekil 4.1.	Co-60 Doz Cevap Eğrisi.....	61
Şekil 4.2.	Gönüllülerin Kontrol, DMSO, 100µM ve 200µM Mirisetin, Uygulaması İle Gözlenen MN Sıklıkları.....	63

Şekil 4.3.	Gönüllü S.D.'ye ait Alkali Komet Sonuçları.....	69
Şekil 4.4.	Gönüllü S.D.'ye ait FPG Komet Sonuçları.....	70
Şekil 4.5.	Gönüllü A.H.'ya ait Alkali Komet Sonuçları.....	71
Şekil 4.6.	Gönüllü A.H.'ya ait FPG Komet Sonuçları.....	72
Şekil 4.7.	Gönüllü O.B'ye ait Alkali Komet Sonuçları.....	73
Şekil 4.8.	Gönüllü O.B'ye ait FPG Komet Sonuçları.....	74
Şekil 4.9.	Komet Hasar Skorları Karşılaştırması.....	77
Şekil 4.10.	Örnek Komet Görüntüleri.....	81-85

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Radyasyon, hayatımızın pek çok alanında karşımıza çıkmasına rağmen genellikle insanlar tarafından tedirginlikle yaklaşılan bir kavramdır. II. Dünya Savaşı'ndaki atom bombası deneyimleri ve çeşitli radyasyon kazaları sonucu ortaya çıkan dramatik görüntüler, insanlar üzerinde radyasyonla ilgili izleri silinemeyecek boyutta tedirginlik yaratmıştır ve yaratmaktadır. Bu sebeple, sonuçları zaman zaman çok büyük insan kitlelerini etkileyebilen radyasyon hasarının engellenmesi ya da hasar meydana geldikten sonra hasarın tamir edilebilmesi tıbbi olarak önemli bir problemdir. Buna ek olarak radyasyonun kontrollü bir biçimde tedavi hizmetlerinde kullanıma girmesi, radyasyondan koruyucu maddelerin araştırılması işini daha da gerekli hale getirmiştir.

Radyasyon, genel olarak enerjinin uzayda dalgalar ya da tanecikler (foton) halinde yayılması olarak tanımlanmaktadır. İyonlaştırıcı ve iyonlaştırıcı olmayan radyasyon olmak üzere ikiye ayrılır. İyonlaştırıcı radyasyon, içinden geçtiği hücrede iyonlaşma ve uyarılma olaylarına neden olarak canlı organizmaya hasar verebilmektedir.

İyonlaştırıcı radyasyonun hücre üzerindeki etkileri direkt ya da indirekt yolla meydana gelebilir. Direkt etkide, radyasyon hücre bileşeninin kendisi tarafından absorblanmakta ve hasar oluşmaktadır. İndirekt etkide ise radyasyon hücredeki diğer moleküller, özellikle su tarafından absorblanmakta ve sonuçta serbest radikaller meydana gelmektedir. Bu etkide hücre bileşenlerine hasar veren serbest radikallerdir [1].

Radyasyonun hücredeki en kritik hedeflerinden biri DNA'dır. DNA'da tek zincir ya da çift zincir kırıkları şeklinde hasarlar oluşturabilmektedir. Bu hasarlar DNA

molekölünün kalıp özelliğini de bozduğundan, sessiz mutasyonlar ile hücre ölümü arasında geniş bir yelpazede etkisini göstermekte, sonunda kansere, ölümle sonuçlanan klinik tablolara sebep olabilmektedir [1,2].

Bu nedenle radyasyona maruz kalınacağı bilindiği hallerde, gerek radyasyonla çalışanlarda gerekse radyoterapi alanlarda, sağlıklı dokuların korunması amacıyla radyasyona yönelik bir takım koruyucu önlemlerin alınması zaman zaman gerekli olmaktadır. Bu amaçla özellikle radyoterapide Amifostin başta olmak üzere sınırlı sayıda bazı ajanlar kullanılmaktadır. Ancak araştırmacılar halen yan etkileri az, daha etkin, uygulaması kolay, uygun aday molekülleri araştırmaya devam etmektedirler.

Radyoprotektif etkileri açısından incelenen en önemli gruplardan birisi de bitkisel kaynaklı flavonoidlerdir ve bu moleküller özellikle serbest radikal temizleyici etkileri sebebiyle oldukça önemsenmektedirler. Kersetin, luteolin, apigenin ve diğer bazı flavonoidlerin radyasyonun hasar verici etkilerini azalttığına dair çalışmalar bulunmaktadır [3,4,5]. Flavonoidlerin radyoprotektif etkilerini de serbest radikalleri ortamdaki uzaklaştırarak gerçekleştirdikleri bu çalışmalarda belirtilmiştir.

Mirisetin (3,3',4',5,5',7-heksa hidroksi flavon) flavonol grubu bir moleküldür. Bu molekülün hücreleri serbest radikallerle oluşan hücre hasarından koruduğu çeşitli araştırmalarda ortaya konmuştur [6,7,8]. Mirisetin'in antioksidan özelliğinin yanı sıra, anti-kanser, anti-diyabetik ve benzeri terapötik olabilecek özellikleri olduğu da bildirilmektedir [9]. Ancak yaptığımız inceleme sonucu hücrede pek çok açıdan etki gösterdiği ileri sürülen mirisetin'in radyoprotektif etkisine dair bir çalışmanın henüz literatürde yer almadığı gözlenmiştir.

Bu nedenle, iyonlaştırıcı radyasyon nedeniyle oluşan serbest radikallerin mirisetin tarafından etkisiz hale getirilebileceği ve böylece radyoprotektif etki gösterebileceği teorisinden yola çıkılarak, Mikronukleus (MN) ve Komet yöntemleri ile mirisetin'in radyoprotektif etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

BÖLÜM 2

GENEL BİLGİLER

2.1. RADYASYON

2.1.1. Radyasyon

19. yüzyılın son çeyreğinde Röntgen'in X ışınlarını keşfi ve hemen ardından birçok araştırmacının radyoaktivite ile ilgili çalışmaları radyasyonu bir daha çıkmamak üzere insan hayatına sokmuştur. Bundan sonra insanlar radyasyonu hem barışçıl amaçlarla hem de askeri amaçlarla çeşitli şekillerde kullanmışlardır.

Tıbbi sağaltımdan, inşaat sektörüne kadar çok geniş bir kullanım alanına sahip olan radyasyonun başlıca kullanım alanları şöylece özetlenebilir:

Tıp alanında;

- Tanısal radyolojide görüntüleme sistemleri,
- Kanser tedavisi,
- Transfüzyon kanlarının ışınlanması,
- Tıbbi aletlerin sterilizasyonu.

Nükleer reaktörlerde;

- Temel nükleer fizik deneyleri,
- Tıpta ve endüstride kullanılan radyonüklidlerin yapımı,
- Elektrik üretimi.

Endüstriyel radyografi;

- Uçak yapımında, petrol ve doğalgaz boru hatlarında kaynak noktalarının kontrolü.

Yerkabuğu incelemelerinde;

- Yer kabuğunun jeolojik yapısının tespiti,
- Yenilenebilir hidrokarbon kaynaklarının durumu hakkında bilgi edinme.

Zararlı böceklerin yok edilmesinde;

- Düşük dozlarda kısırlaştırma, yüksek dozlarda öldürücü etki.

Gümrük ve ulaşım güvenliği servislerinde;

- Kargo ve bagaj görüntüleme,
- Şarbon etkeni için posta temizliği.

Yiyecek üretiminde;

- Hazır et, tavuk, süt, sebze, bakliyat vs. üretiminde her türlü mikroorganizmanın yok edilmesi.

Atık kontrolünde;

- Hastane ve ev atıklarının doğaya salınmadan önce hastalık etmeni olabilecek biyolojik materyalin etkisiz hale getirilmesi.

Kimya endüstrisinde;

- Bazı endüstriyel materyalin (polietilen, lastik yapıştırıcısı) kimyasal modifikasyonu.

Askeri amaçlı;

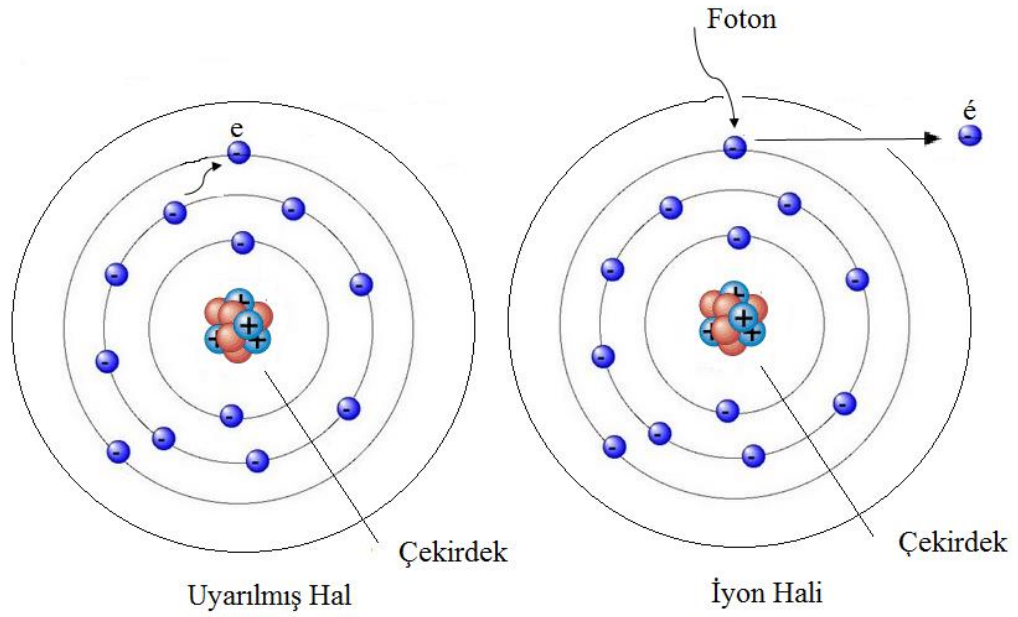
- Fizyon veya füzyon bazlı silah yapımında [10].

İnsan hayatında bu kadar önemli bir rolü olan radyasyon, Türkçe anlamı ile ışınım, genel olarak enerjinin uzayda dalgalar ya da tanecikler (foton) halinde yayılması olarak tanımlanabilir. Enerjisine göre iyonlaştırıcı ve iyonlaştırıcı olmayan olarak ikiye ayrılmakla birlikte pratikte radyasyon denildiğinde “iyonlaştırıcı” radyasyon anlaşılmaktadır. Bu metinde de “radyasyon” iyonlaştırıcı radyasyon anlamında kullanılacaktır.

Radyasyonun iyonlaştırıcı etkisi; radyasyon enerjisinin biyolojik materyal tarafından absorblanması sonucu meydana gelir. Absorbsiyon sonucu atom ya da moleküller gelen radyasyonun enerjisine göre iyonlaşma ve /veya uyarılma olaylarına maruz kalır. Uyarılma, absorblanan radyasyon enerjisinin etkisiyle, atom ya da molekülün enerjiyi absorblayan elektronunun, bulunduğu yörüngeden daha yüksek enerji düzeyindeki (yani daha dıştaki) yörüngeye geçmesine denir.

Atomun stabil halinde çekirdekdeki proton sayısına eşit sayıda elektronlar (1. yörüngede 2, 2. yörüngede 6 vb.) yörüngeler üzerindedir. Elektronun bağ enerjisinden daha yüksek bir değerde enerjiye sahip olan foton bu elektronlardan birini atomdan

koparır. Artık negatif yüklü bir elektronla pozitif yüklü bir yapı vardır. Bu iyonizasyon olayıdır.(Şekil 2.1).



Şekil 2. 1. Atomun Enerji Absorladıktan Sonraki Halleri [11]

Radyasyon çoğunlukla:(a) Parçacıklı radyasyon (b) Elektromanyetik ya da dalga radyasyonu olmak üzere iki ayrı sınıfta incelenebilir [12].

a) Parçacıklı Radyasyon

- α (Alfa) Parçacığı (He Çekirdeği)

- β (Beta) Parçacığı (Elektron)

-Protonlar

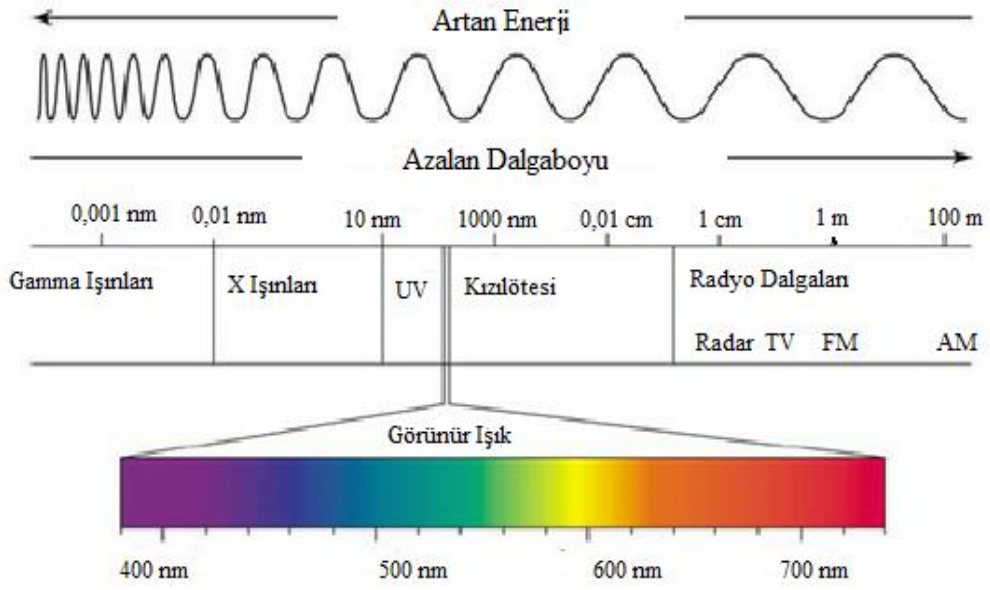
-Nötronlar

-Ağır Yüklü İyonlar

b) Elektromanyetik Radyasyon

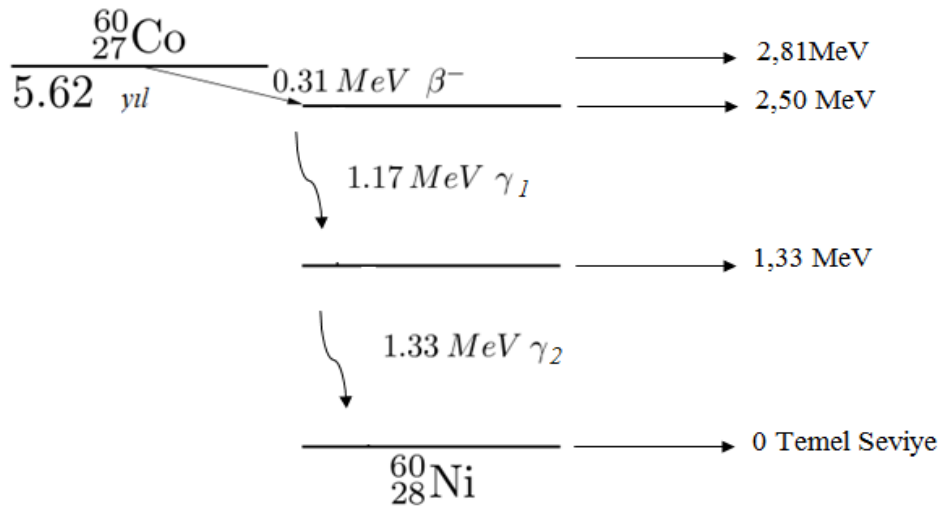
-X Işınları

- γ (Gama) Işınları



Şekil 2.2. Elektromanyetik Enerji Spektrumu [13]

Çalışmamızda kullanılan γ ışınları elektromanyetik radyasyon grubunda yer alır. γ ışınları radyoaktif bir çekirdeğin kararlı hale geçmeye çalışırken parçalanmasıyla açığa çıkan foton karakterli enerjinin çekirdekten dışarı atılmasıyla oluşur. γ ışınlarının dalga boyu 10^{-12} metredir (Şekil 2.2). Elektromanyetik dalgalar daima aynı hızda hareket ederler ve bu hızın değeri $3 \cdot 10^8$ m/sn yani ışık hızıdır [2].



Şekil 2.3. Kobalt 60 Salınımı [1]

Denelerimizde kullandığımız γ ışınları radyoterapide kullanılan Co-60 (Kobalt-60) (Şekil 2.3) kaynağından elde edilmektedir. Radyoaktif Co-60 ticari kullanım için nükleer reaktörlerde, lineer akseleratörlerde aktif olmayan kobalt elementinin nötronlarla ışınlanması sonucu meydana gelir. Co-60 maksimum enerjisi 0.31 MeV olan bir β bozunumu yapar, geri kalan 250 MeV'lik enerjisini 1.33. ve 1.17 MeV'lik iki gama fotonunu atarak stabil Nikel-28'e dönüşür[1]. Radyoaktif olmayan kobalt ise doğada çeşitli minerallerin yapısında bulunan, atom numarası 27, atom ağırlığı 58,9 olan bir elementtir [14].

2.1.2. Radyasyon Kaynakları

a. Doğal Radyasyon Kaynakları

İnsan bedeni pek çok doğal yoldan radyasyona maruz kalmaktadır. Doğal ışınlanma kaynakları; kozmik radyasyon, yeryüzü kaynaklı radyasyon, solunum ve besinlerle alınan radyasyon şeklinde sınıflandırılabilir. Dünya genelinde bu doğal kaynaklardan yıllık absorblanan doz miktarı kişi başına ortalama 2,4 mSv* olarak hesaplanmıştır (Min.1 mSv-Maks. 10 MSv) [15].

b. Yapay Radyasyon Kaynakları

İnsanlar doğal kaynaklar dışında özellikle sağlık hizmeti alırken çeşitli sebeplerle radyasyona maruz kalmaktadırlar. Gerek tanı koyma aşamasında (direkt grafi, tomografi, sintigrafi vb.) gerekse tedavi maksatlı (radyoterapi uygulamaları), radyasyon sağlık hizmetlerinde oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca çeşitli alanlarda yapay kaynaklarla çalışan personelin çalışma şartları nedeniyle veya radyasyon kazalarıyla absorbladıkları dozlar da bu gruba girer. Şüphesiz bu dozların gerek vatandaşlar ve gerekse çalışanlar için kabul edilebilir seviyede olmasına özel bir önem verilir.

Tıpta Radyasyon Kullanımı

Radyasyon tıpta gerek tanısal, gerekse tedavi amaçlı olarak yıllardan beri kullanılmaktadır. Amaca göre, kullanılan radyasyon, parçacık radyasyonu veya

* Sievert (Sv):Biyolojik doz miktarı. Uygulanan radyasyon miktarının canlıda oluşturduğu etkinin ifade biçimidir. Sv= Absorblanmış Doz (Gray) x Rölatif Biyolojik Etkinlik (RBE:Q) şeklinde tanımlanır[1].

elektromanyetik radyasyon olabilir. α parçacığı yayan bir kaynağın hipofiz tümörünün içine doğrudan konularak hipofizektomi için kullanılması [16], beta parçacığı kaynaklarının PET (Pozitron Emisyon Tomografisi) taramasında radyoaktif izci izotop olarak kullanılması bu kullanımlara örnek olarak verilebilir [17].

Elektromanyetik radyasyon olan X ve γ ışınları da tanı ve tedavi amaçlı geniş bir kullanım alanına sahiptirler. Örneğin; X ışınları direkt grafilerde, tomografide, kullanılmaktadır. Uygulamaya göre dozlar değişebilmektedir, ancak tanı amaçlı kullanılan dozlar oldukça düşük dozlardır. Örneğin; Postero-anterior akciğer grafisi 0.4-1.5 mGy (Gray), diş grafisi 5-7 mGy vb. [18]. Gray absorblanmış radyasyon dozu birimidir. Eskiden gram başına 100 erg'lik absorblanma 1 rad olarak kabul edilirdi. Yeni sistemde kullanılan Gray'in 100 rad karşılığı olduğu bilinmektedir[1].

İnsanlar radyoterapi amaçlı uygulamalarda ise çok daha yüksek dozlara maruz kalmaktadırlar. Verilen doz (fraksiyone doz) 1.8-2.0 Gy arasında değişmektedir. Bu doz hastalara hekimin öngördüğü şekilde örneğin; haftanın 5 günü günlük olarak verilmektedir. Ancak hastaların toplamda aldıkları doz ise 75 Gy seviyesine ulaşabilmektedir [1].

(Not: Elektromanyetik radyasyonlar olarak ifade ettiğimiz X ve γ ışınları arasında özellikleri açısından hiçbir fark yoktur. Sadece γ ışınları çekirdek orijinlidir ve bozunan radyoaktif çekirdekten çıkar.)

2.1.3. Radyasyonun Biyolojik Etkileri

Canlılar, organizmanın tamamını oluşturan sistemler, sistemleri oluşturan organlar, organları oluşturan dokular ve dokuları oluşturan hücrelerden meydana gelmektedirler. Radyasyonun canlı organizmada etkilerinin ortaya çıkması için öncelikle enerjisini hücreye aktarması ve organizmanın toplamda zarar görmesi için ise yeterli sayıda hücrenin etkilenmesi gerekir.

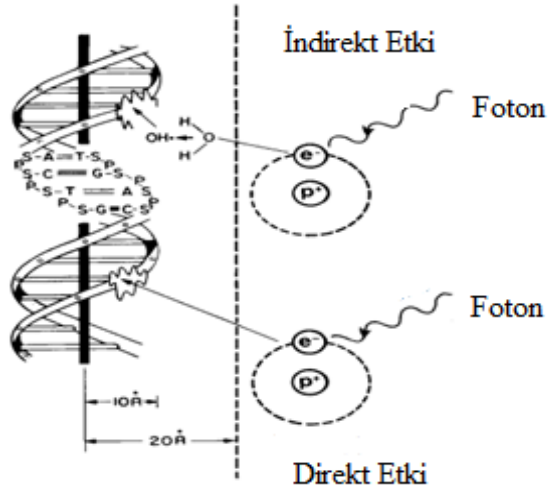
Radyasyon biyolojik sistemlerde tüm moleküller için önemli bir hasar verici etmen olmakla birlikte hücredeki en kritik hedefi DNA'dır. DNA üzerindeki etkisi direkt veya indirekt yoldan meydana gelebilir.

Radyasyon enerjisi DNA gibi çok önemli bir makromolekülde veya RNA ya da özel bir enzimde fiziksel bir olaya neden olmuşsa bu etkiye radyasyonun direkt etkisi denir. Direkt etkide; radyasyon hücredeki önemli biyomoleküllerde iyonizasyon ya da uyarılmaya neden olur. Başlayan fiziksel ve kimyasal süreç sonuçta hücrede hasara

neden olur. Yüksek LET'li (Lineer Enerji Transferi) parçacıkların biyolojik materyal ile etkileşmesinde direkt etki daha baskındır [1,2].

Eğer radyasyon enerjisi, biyolojik molekül tarafından değil, o biyolojik yapının içinde bulunduğu başta su molekülü olmak üzere diğer ortam molekülleri ile etkileşmeye girmişse, biyolojik molekül bu olaydan indirekt olarak etkileneceğinden, bu tip etkilenmeye radyasyonun indirekt etkisi adı verilir[1]. Bu etkide radyasyon, özellikle su ile etkileşip serbest radikal oluşumuna neden olur. Radyasyonun su ile etkileşiminde, çok kısa ömürlü ancak çok reaktif olan H_2O^+ ve $OH\cdot$ gibi radikaller açığa çıkar. Serbest radikaller kararlı yapılar olmadıklarından çevrelerindeki tüm kimyasal bağlara saldırıp kararlı hale geçmeye çalışırlar (Şekil 2.4) [20]. Bu etkileşimde hücre yapılarına zarar veren, serbest radikallerdir. Biyolojik hasarların yaklaşık $2/3$ 'si düşük LET'li radyasyonlar (Örn: X ışınları, γ ışınları) tarafından indirekt yoldan serbest radikal oluşumuyla meydana getirilirler [21].

Radyasyonun meydana getirdiği biyolojik etkilerin tanımlanması bakımından önemli bir kavram olan LET (Lineer Enerji Transferi), radyasyonun yolu boyunca birim mesafede maddeye transfer ettiği enerji miktarıdır ve keV/ μ m şeklinde tanımlanır. Elektromanyetik radyasyonların madde ile etkileşmesinin ihtimaliyet prensibine bağlı olduğu ve parçacık radyasyonlarının madde ile etkileşmesinin ise parçacık büyüklüğü, enerjisi ve yükü ile ilişkili olduğunu göz önüne aldığımızda, LET'in her tip radyasyon için farklı olduğu anlaşılır. Co-60 kaynaklı γ ışınlarının LET değeri kabaca 0.3 keV/ μ m olarak kabul edilir. (Tablo 2.2). Düşük LET'li ışınlar arasında yer alır. Parçacık tipi radyasyonlar ise yüksek LET'li radyasyonlar olarak bilinir ve elektromanyetik radyasyonlara oranla maddeye daha fazla enerji aktarır ve daha fazla iyonlaşmaya neden olurlar. Enerji maddede absorblanmış olarak kalır. Bu nedenle yüksek LET'li radyasyonların hücreye verdiği hasar daha fazladır.



Şekil 2.4. Radyasyonun Direkt ve İndirekt Etkisi [17]

Bir organizmada radyasyonun biyolojik etkilerinin ortaya çıkması birbirini takip eden 3 temel aşamada gerçekleşmektedir (Şekil 2.5).

1. **Fiziksel Aşama:** Hücrenin radyasyona maruz kaldığı ilk andaki etkileri kapsar. Yaklaşık 10^{-16} saniyelik bir zaman dilimidir. Radyasyon enerjisi hücre bileşenlerinde iyonizasyona neden olur. İyonize olan moleküller diğer moleküllerle etkileşerek zincirleme bir iyonlaşma başlatırlar.
2. **Kimyasal Aşama:** Birkaç saniyelik bir zaman dilimini kapsar. İlk aşamada meydana gelen iyonlaşma ürünleri hücrenin organik molekülleri ile etkileşerek yıkıma neden olurlar.
3. **Biyolojik Aşama:** Dakikalar ila yıllar sürebilen bir zaman dilimidir. Biyolojik aşamanın değerlendirilmesinde akut-kronik etkiler, absorblanan doz düzeyi, ölümcül ya da ölümcül olmayan etkiler, somatik ya da kalıtsal etkiler, hücresel boyut ya da organizma boyutu gibi çeşitli sınıflamalar kullanılabilir.

Bu aşamada hücresel boyutta gözlenebilecek etkiler şu şekilde sıralanabilir:

- Herhangi bir etki gözlenmez.
- Bölünmede gecikme meydana gelir.
- Apoptoz gelişir.
- Çoğalma kusurları gözlenir. (Hücre bölünmeye karar verdiği zaman ilk ya da sonraki mitozlardan birinde ölür.)

- Genomik kararsızlık gözlenir.
- Mutasyon meydana gelir. Hücre yaşar ama genomu değişmiştir.
- Transformasyon olur. Hücre yaşar ama mutasyon fenotipte değişikliğe neden olur ve bu genellikle kanserle sonuçlanır.
- Seyirci (Bistander) etkisi meydana gelir. Işınlanmış hücre öbür hücelere sinyal gönderir ve onlarda hasara neden olur.
- Adaptif yanıt gözlenebilir. Işınlanmış hücreler reaksiyona karşı uyarılmıştır ve sonraki ışınlamalara karşı daha dirençli olurlar [22].

Organizma boyutunda ise doza bağlı gözlenebilecek sağlık etkileri Tablo 2.1’de verilmiştir.

Radyasyonun akut ve kronik süreçte biyolojik etkilerinin değerlendirilmesinde farklı biyolojik belirteçlerden faydalanılabilir. Doku enzimleri, metabolitler veya lenfositler, sperm gibi hücre populasyonlarında seviye değişiklikleri, kromozomal aberasyonlar bu belirteçlere örnek verilebilir.

Radyasyon akut etkileri maruziyeti takiben (doza göre, kaza ya da tedaviden sonra) birkaç saatle bir kaç gün içinde görülebildiği gibi, ışınlanmadan haftalar sonra da ortaya çıkabilir. Örneğin serum amilaz seviyesinin artması ilk birkaç saatle birkaç gün arasında görülebilirken, laktat dehidrogenaz seviyesinin veya çinko protopfirin seviyesinin artışı ışınlanmadan birkaç hafta sonra görülebilir. Radyasyon sebebi ile hemogramda meydana gelen değişiklikler de doza bağlı olarak farklılıklar gösterir. 0.5 Gy’lik akut tüm vücut ışınlanmaların altında anlamlı değişiklikler görülmezken, 1-2 Gy’lik akut tüm vücut ışınlanmalarında ilk 48 saat içinde lenfosit sayıları yaklaşık % 50 azalır. İnsan kemik iliğinde, 5 Gy sonrası 3-4. günlerde, 2-4 Gy sonrası 5-7. günlerde total çekirdekli hücre sayısı minimuma iner [23].

3-4 Gy’lik tüm vücut ışınlanmasında Prodromal Radyasyon Sendromu gözlenirken, absorblanan doz 10 Gy’e kadar olan durumlarda hemopoetik sistemin çökmesi, 10-100 Gy’lik ışınlamalarda gastrointestinal sistem harabiyeti, 100 Gy civarı ve üzeri ışınlamalarda nörolojik sistem harabiyeti kişiyi ölüme götürmektedir. Absorblanan doz 100 Gy üzerindeyse ölüm 48 saat içerisinde gerçekleşmektedir (Tablo 2.1).

Radyasyonun kronik etkileri ise, maruziyetten yıllar sonra ortaya çıkan ve bazen sonraki kuşaklara aktarılabilen etkileridir. Genetik değişiklikler, karsinojen etki, ömür

kısalması, aplastik anemi ve katarakt oluşumu kronik etkilere örnek olarak verilebilir [1].

Tablo. 2.1. Uygulanan Doza Bağlı Olarak Gözlenen Sağlık Etkileri (Akut Radyasyon Sendromu) [24,25]

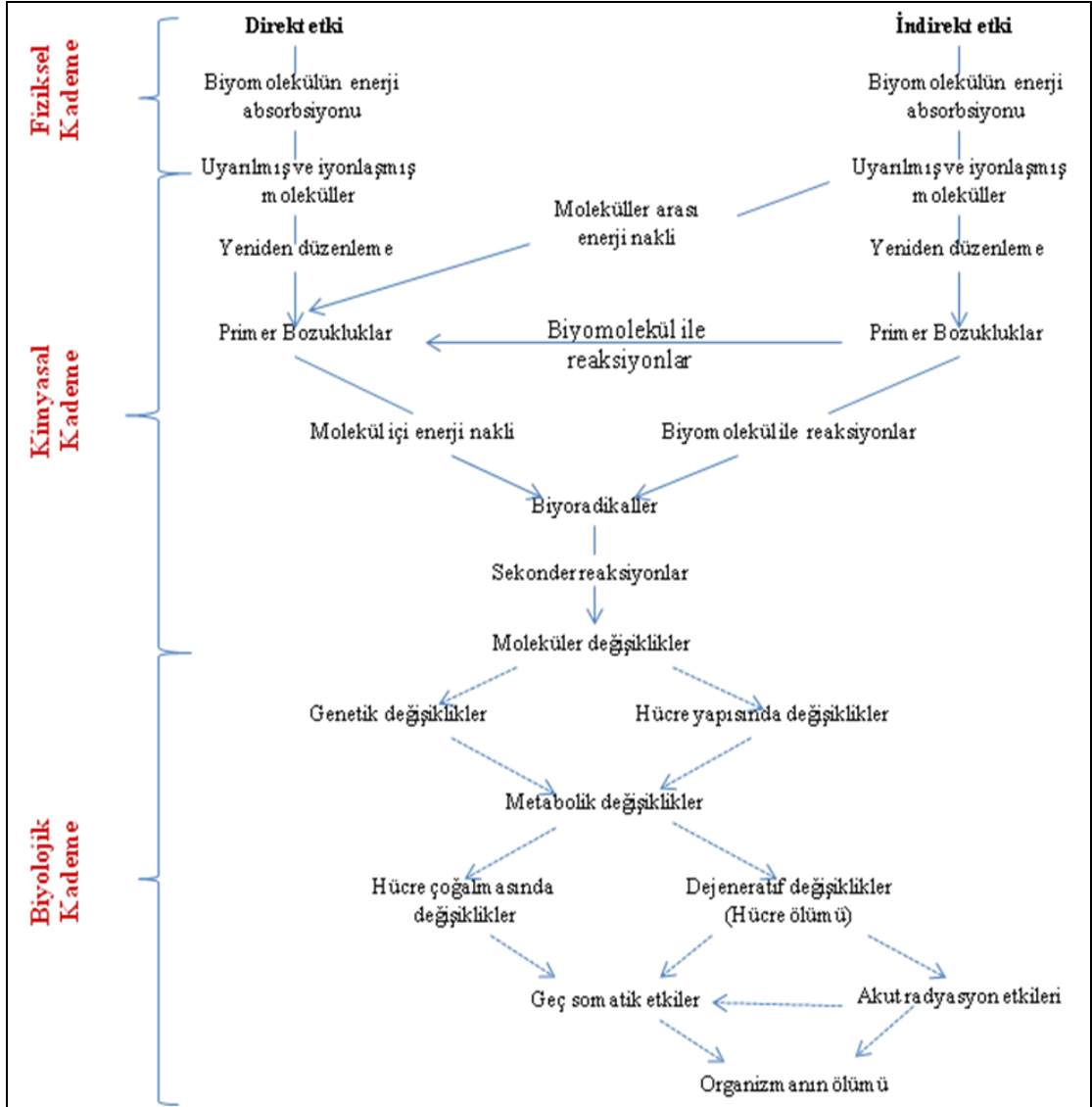
Sendrom	Doz	Prodromal faz	Latent faz	Belirgin Hastalık fazı	İyileşme/Ölüm
Gastrointestinal	<ul style="list-style-type: none"> • 10-100 Gy <p>Bazı semptomlar 6 Gy kadar düşük dozda gelişebilir.</p>	<p>-Anoreksi, ciddi bulantı, kusma, krampolar ve ishal</p> <ul style="list-style-type: none"> • Birkaç saat içinde gelişir. • 2 gün kadar sürer. 	<p>-Sindirim kanalındaki hücreler ölür, ancak hasta iyi görünür ve iyi hisseder.</p> <ul style="list-style-type: none"> • 1 haftadan daha kısa sürer. 	<p>Bitkinlik, anoreksi, ciddi ishal, ateş, dehidratasyon, elektrolit dengesizliği, enfeksiyon ve ölüm.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Maruz kaldıktan 2 hafta içinde ölüm meydana gelir. 	<p>LD100:10 Gy</p>
Hematolojik	<ul style="list-style-type: none"> • 0.7-10 Gy <p>Hafif semptomlar (0.3 Gy'de de gelişebilir).</p>	<p>Anoreksi, bulantı-kusma.</p> <ul style="list-style-type: none"> • 1 saat ile 2 gün içinde başlar. • Dakikalar-günler sürer. 	<p>-Kemik liğindeki kök hücreler ölür, ancak hasta kendisini iyi hisseder ve iyi görünür.</p> <ul style="list-style-type: none"> • 1-6 hafta sürer. 	<p>Birkaç hafta içinde tüm kan hücrelerinde düşme görülür. Anoreksi, ateş, bitkinlik görülür. Ölümün esas nedeni enfeksiyon ve kanamalardır.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Çoğu ölümler maruziyetten sonra birkaç ay içinde meydana gelir. 	<p>- LD50/50: 2.5-5Gy</p> <p>Çoğu vakada, kemik iliği hücreleri ilikte yeniden düzelmeye başlar.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Birkaç hafta- 2 yıla kadar büyük oranda düzeler.
Merkezi Sinir Sistemi	<ul style="list-style-type: none"> • 50 Gy <p>(Bazı semptomlar 20 Gy kadar düşük dozda meydana gelebilir)</p>	<p>Sinirlilik, konfüzyon, ciddi bulantı, kusma ve ishal, bilinç kaybı, ciltte yanma duygusu</p> <ul style="list-style-type: none"> • Dakikalar içinde gelişir. • Dakikalar-saatler sürer. 	<p>Hasta kısmen fonksiyonel olarak döner.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Saatler sürebilir ancak daha kısa da sürebilir. 	<p>İshal, Konvülsiyon, Koma</p> <ul style="list-style-type: none"> • Maruz kaldıktan sonra 5-6 saatte başlar. Maruz kaldıktan sonra 3 gün içinde ölüm meydana gelir. 	<p>İyileşme yok.</p>

LD: Lethal doz (Öldürücü doz); LD50/50: 50 günde % 50 öldürücü doz, LD100: % 100 öldürücü doz

Hücrelerin toplu olarak cevapları doku, organ, sistem ve en son olarak da organizmanın yanıtını yani kişinin sağlık durumunu belirleyen ana faktördür. Radyasyon direkt ya da indirekt yoldan etkilese de hücrede biyolojik etkilerin ortaya çıkması için geçilmesi gereken süreç benzerdir (Şekil 2.5).

Son aşamada hücrenin hayatta kalabilme kabiliyetine göre yapılan sınıflama ise şöyledir:

- Ölümcül hasar: Geri dönüşsüz, düzeltilemez ve hücrenin ya da organizmanın ölümüyle sonlanır.
- Öldürücü düzeyin altında hasar: Ek bir hasar meydana gelmezse saatler içinde tamir edilebilir.
- Potansiyel ölümcül hasar: Hücreler bölünmeye gitmezse tamirle eski normal hallerine döndürülebilirler.
- Somatik ve genetik etki: Somatik etkide bireyler hayatları boyunca kanser, kısırlık, lenste opaklaşma ve hayatın kısalması gibi radyasyon tarafından oluşturulmuş etkilerle uğraşmak zorunda kalır. Genetik ya da kalıtsal etkide ise bireyin sahip olduğu mutasyonlar sonraki kuşakları etkiler [22].



Şekil 2.5. Radyasyonun Etki Kademeleri [2]

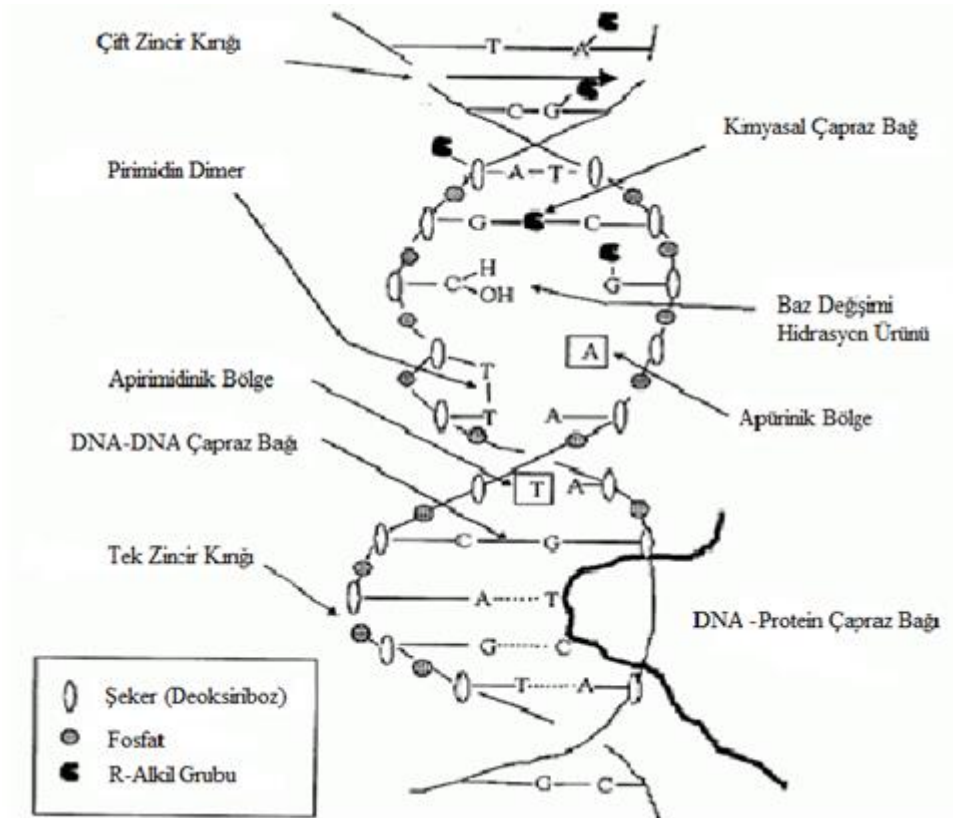
Radyasyonun DNA Üzerine Etkileri

DNA bilindiği gibi hücrenin yaşamsal faaliyetleri yöneten ve kalıtsal bilginin sonraki nesillere aktarılmasını sağlayan bir moleküldür. Bu sebeple DNA'nın yapısına hasar veren herhangi bir etmen hücrenin dolayısıyla organizmanın geleceğini etkileme potansiyeline sahiptir. Radyasyon da dahil olmak üzere pek çok çevresel etmen DNA'ya hasar verebilmektedir. Bu etmenlerin (Fiziksel, kimyasal, biyolojik) meydana getirdiği DNA hasar tipleri şunlardır (Şekil 2.6):

- Alkillenme (genellikle metillenme)
- Oksitlenme (genellikle bazlar)
- Hidroliz (aminsizleşme, depürinasyon, depirimidinasyon)
- Replikasyon hataları (Yanlış eşleşme)
- Büyük yapıların DNA'ya eklenmesi.
- Kırılmalar
- Olağandışı kimyasal bağ oluşumu [26]

İyonlaştırıcı radyasyonun yaptığı hasarlar da şunlardır:

- Tek ya da çift zincir kırıkları
- Oksitlenmiş bazlar ve abazik bölgeler
- DNA-protein çapraz bağları
- DNA-DNA çapraz bağları [27]



Şekil 2.6. DNA'da Meydana Gelen Hasar Tipleri [28]

Radyasyonun DNA üzerindeki etkileri dozla ilişkilendirildiğinde 1 Gy'lik maruziyetin DNA molekülünde 100.000 civarında iyonlaşmaya neden olduğu 1000 kadar baza hasar verdiği, yaklaşık 1000 tek zincir kırığı yaptığı, 20-40 kadar da çift zincir kırığı yaptığı tahmin edilmektedir [29]. Hem direkt etkide hem de indirekt etkide DNA molekülü rastlantısal olarak etkilenmektedir.

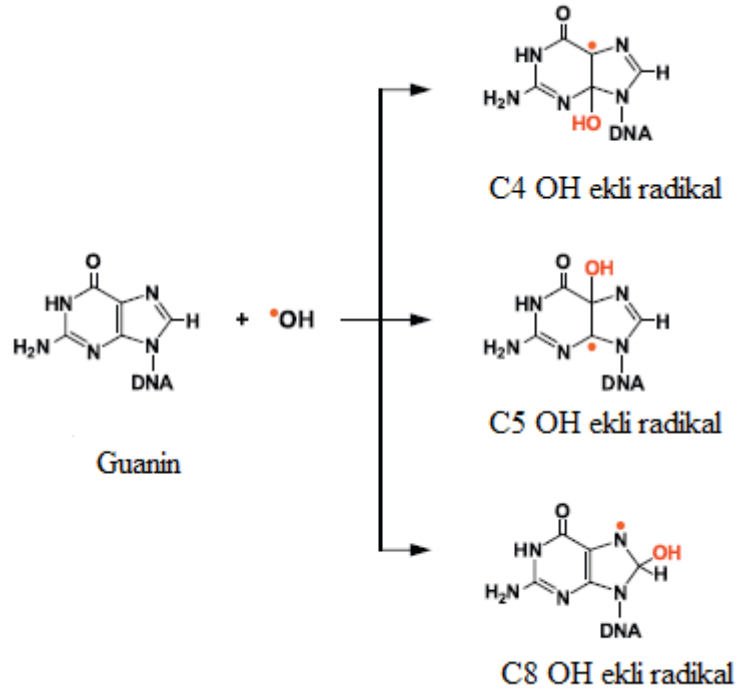
Radyasyona Bağlı Oksidatif DNA Hasarı

DNA hasarına yol açan en önemli yapılardan biri de serbest radikallerdir. Serbest radikaller hem normal hücre metabolizması sırasında meydana gelen, hem de ilaçlar, radyasyon, UV radyasyon, çevresel kirleticiler gibi dışarıdan gelen etmelerle oluşabilen yapılardır.

Bu etmenlerden iyonlaştırıcı radyasyonun indirekt etkisiyle serbest radikal oluşumu hücrede bulunan su moleküllerinin varlığına bağlıdır. Su moleküllerinin radyolizi ile hidroksil (OH \cdot), süperoksit (O $_2^{\cdot-}$), H atomu (H \cdot), hidratlanmış elektron (e $_{aq}^-$) radikalleri ve radikal olmayan H $_2$ O $_2$ meydana gelir [20]. Bunların içinde biyolojik moleküllerin çoğuyla etkileşen OH \cdot radikalidir [30]. OH \cdot radikali DNA üzerinde özellikle heterosiklik yapıdaki DNA bazlarını hasarlar ve şeker yapılarını bozar.

OH \cdot radikali pürinler ve pirimidinlerle etkileşime girerek bu moleküllerin yapısına çift bağlar, OH \cdot iyonu ekler (Şekil 2.7) ya da timinlerin metil grubundan ve deoksiribozun her C-H bağından 1 H koparır. Diğer radikal yapıları da pürinlerde halkalardan birinin bağlarını kırarak ikili halka yapısını bozabilirler. Meydana gelen lezyonlar tekli ya da çoklu olabilir. Oksidatif hasar sonucu en sık meydana gelen lezyon 8-OH dG ve açık halkalı pürinlerdir. 8-OH dG, 8-okso Guanin'in nükleozid formudur. Hem 8-okso Guanin'den NER (Nükleotid Eksizyon Tamiri) işlemleri sırasında hem de sitoplazmadaki diğer oksitlenmiş nükleotidlerden oluşur. Hücre membranını geçebilen bir yapıdadır [20,31,32,33].

OH \cdot radikali DNA'nın şeker yapısına da hasar vermektedir. Çoğunlukla şeker yapısının 5' karbon atomundan da H \cdot kopararak hasar verir. Şeker hasarları genellikle zincir kırıkları ile sonlanır. Ayrıca bazı baz hasarları da glikozidik bağları etkilemektedir ancak zincir kırığı değil, AP (apürinik yada apirimidinik) bölge oluşturmaktadır [20].










Şekil 2.7. Guanin'in $\text{OH}\cdot$ Radikali ile Etkileşimi [20]

Radyasyonun Kromozomlar Üzerine Etkileri












Kromozomların radyasyona çok duyarlı oldukları, 0.1 Gy'den düşük dozlarda bile ökaryotik hücre kromozomlarında kırılmalar olduğu saptanmıştır. Bu kırıklar **kromozom tipi** ya da **kromatid** tipi aberasyonlara yol açarlar.

Mitotik olarak çoğalan hücrelerde interfaz pratik olarak 3'e ayrılır. G_1 , S, G_2 . Hücrelerin çoğunluğu G_1 'in metabolik olarak aktif olmayan fazında, dinlenme halindedir (G_0). G_0 'da dinlenen ve G_1 fazında çoğalan hücrelerin ışınlanması genellikle kromozom tipi aberasyonlara neden olur. G_1 fazının sonunda S fazına geçerken kromatid tipi aberasyonlar meydana gelmeye başlamaktadır. S ve G_2 fazında yapılan ışınlamalarda artık kromatid tipi aberasyonlar oluşur.

Her iki tip aberasyonun oluşumunda da kromozom kollarında kırılmalar, kopmalar ve yeniden birleşmeler gözlenir (Şekil 2.8 ve Şekil 2.9). Kırık ve birleşmeler simetrik (**S**) olabildiği gibi asimetrik (**A**) de olabilir. Kopmalar sonucu asentrik fragmanlar, kırılıp yeniden birleşmeler sonucu translokasyonlar, inversiyonlar, halka kromozomlar, disentrikler gibi yapılar meydana gelmektedir [2,34].

	Ara değişimler	Kollararası İ Değişimler	İ Değişimler	Kopmalar
A	 Disentrik	 Sentrik Halka	 Ara Delesyon	
S	 Resiprokal Translokasyon	 Perisentrik İnverson	 Parasentrik İnverson	

Şekil 2.8. Kromozom Tipi Aberasyonlar [35]

Ara Değişimler	Kollararası İ Değişimler		İ Değişimler		Kopmalar
	Kol İçi	Kollararası	Kol İçi	Kollararası	
 Disentrik	 Sentrik Halka	 Disentrik	 Ara Delesyon	 İzokromatid Delesyon	 Tam Olmayan Kol İçi Değişimler
 Resiprokal Translokasyon	 Perisentrik İnverson	 Duplikasyon/Delesyon	 Parasentrik İnverson	 Duplikasyon/Delesyon	

Şekil 2.9. Kromatid Tipi Aberasyonlar[35]

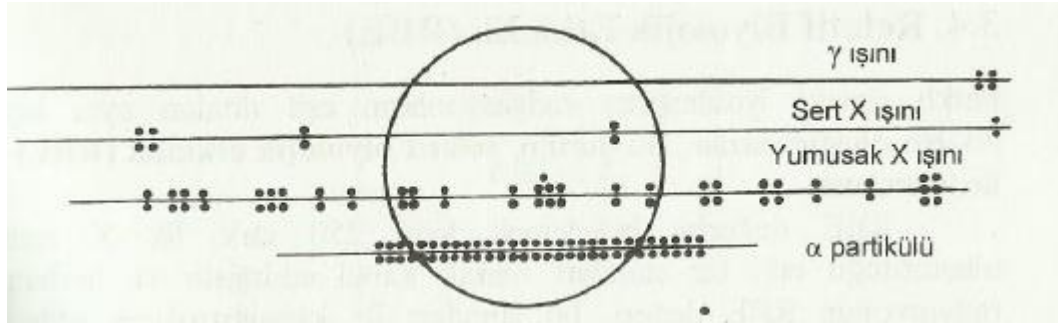
Radyasyonun Biyolojik Etkisini Değiştiren Faktörler

Radyasyonun hasar verici etkisi her hücreyi aynı etkilemediği gibi her organizmayı da aynı oranda etkilememektedir. Bu farklılığa neden olan bazı faktörler vardır.

Bunlar;

• **Hücre Tipi:** Hücrelerin radyasyona gösterdikleri duyarlılık onların bölünme kapasiteleri ve farklılaşma derecelerine göre değişir. İnsan vücudunda iyonlaştırıcı radyasyona en hassas hücreler lenfositler ve kan yapımındaki öncül hücrelerdir. Lenfositleri takiben üreme sistemi hücreleri ile sindirim sistemi hücreleri gelir. Daha az etkilenenler ise kas ve sinir hücreleridir [36].

• **Radyasyonun Tipi:** İyonlaştırıcı radyasyonlar çeşidine göre kat ettikleri yol boyunca temas ettikleri ortamlara farklı düzeylerde enerji transferi yaparlar. Bu sebeple hasar verme kapasiteleri de birbirinden farklılık gösterir [2].



Şekil 2.10. Düşük ve Yüksek LET'li Radyasyonların Maddeyi Etkileme Şekli

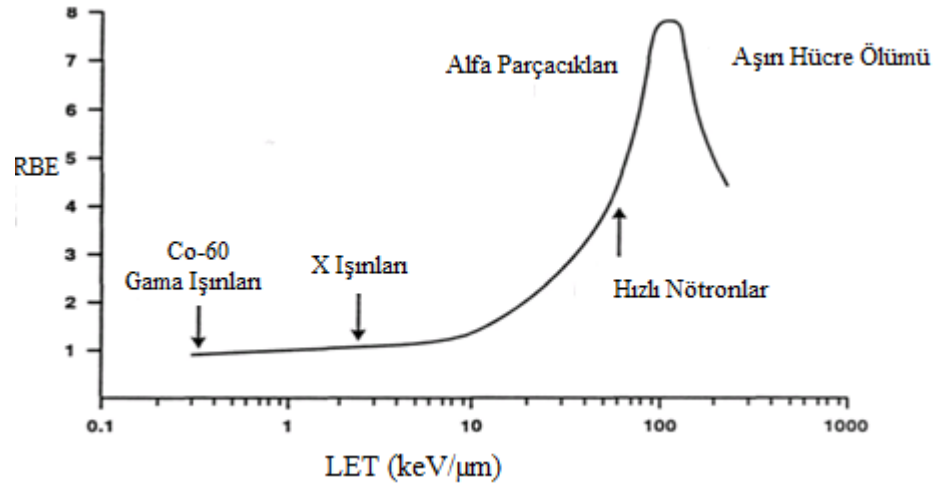
Parçacık tipi yüksek LET'li radyasyonlar maddeye daha çok enerji transferi yapabildiklerinden düşük LET'li radyasyonlara göre daha çok hasar verirler.

Tablo 2.2. İyonlaştırıcı Radyasyonların LET Değerleri[10]

Düşük LET'li Radyasyon	LET (keV/μm)	Yüksek LET'li Radyasyon	LET (keV/μm)
250 kVp X ışınları	2	1 keV Elektronlar	12.3
3 MeV X ışınları	0.3	14 MeV Nötronlar	12
γ ışınları Co-60	0.3	2 MeV Protonlar	17
1 MeV Elektronlar	0.25	100 MeV Karbon İyonları	160
10 keV Elektronlar	2.3	Ağır İyonlar	100-2000

Ayrıca farklı tipteki iyonlaştırıcı radyasyonların eşit dozları aynı biyolojik etkileri oluşturmazlar (Şekil 2.10 ve 2.11). Bu durum, RBE (Rölatif Biyolojik Etkinlik) terimi ile tanımlanır. RBE için 250 keV'lik ışınımın oluşturduğu etki standart değer olarak kabul edilmiştir. Buna göre herhangi bir radyasyonun RBE'si o radyasyon dozunun

oluşturduğu biyolojik etkinin 250 keV'lik X ışını dozu ile karşılaştırılmasından elde edilen değerdir. Q değeri olarak ifade edilir. Örneğin; bir canlı sistemde 250 keV'lik X ışınlarının 100 cGy'lik dozunun yarattığı etkiyi başka bir radyasyon çeşidinin 10 cGy'lik dozu oluşturuyorsa bu radyasyonun RBE'si $RBE_x = D_{250}/D_x$ formülü ile hesaplanır. $RBE_x = 100/10 = 10$ olarak tespit edilir. D_{250} 250 keV'lik X ışınlarının dozunu, D_x RBE'si tayin edilecek radyasyon çeşidinin dozunu ifade etmektedir [1].



Şekil 2.11. RBE –LET İlişkisi [37]

- **Hücre Siklusunun Fazı:** Her hücre tipi radyasyona aynı duyarlılığı göstermediği gibi, duyarlılığı fazla olan hücrelerin de hücre döngüsünün hangi evresinde olduğu duyarlılığı belirleyen faktörlerden biridir. Bölünmekte olan hücreler radyasyona en duyarlı olan hücrelerdir. Özellikle radyasyona en duyarlı oldukları zamanlar döngünün M ve G₂ fazlarıdır. En direçli oldukları zamansa S fazının geç evresidir [38].

- **Kişinin Genel Sağlık Durumu:** Kişinin genel sağlık durumunu etkileyen bir hastalığı varsa bu radyasyona vereceği cevabı da etkileyebilir. Bağışıklık sistemi ve DNA tamir mekanizmalarında daha önceden var olan mutasyon nedenli hastalıklar, radyasyon hasarına yanıtı etkileyebilir. Örn: Baz kesip-çıkarma tamir genlerindeki mutasyonlar çoğunlukla ölümcül olsalar bile, MYH ve OGG1 genleri susturulmuş farelerin cismen küçük bir fenotip göstermeleri ve MYH/OGG1 çifte mutant farelerde tümör oluşumuna yatkınlık görülmesi bu tip mutasyon taşıyan bireylerde radyasyon

hasarının yeterli bir şekilde tamir edilemeyeceğini gösterebilir. Çünkü radyasyon hasarları çoğunlukla baz eksizyon tamir genleri tarafından tamir edilmektedir [39].

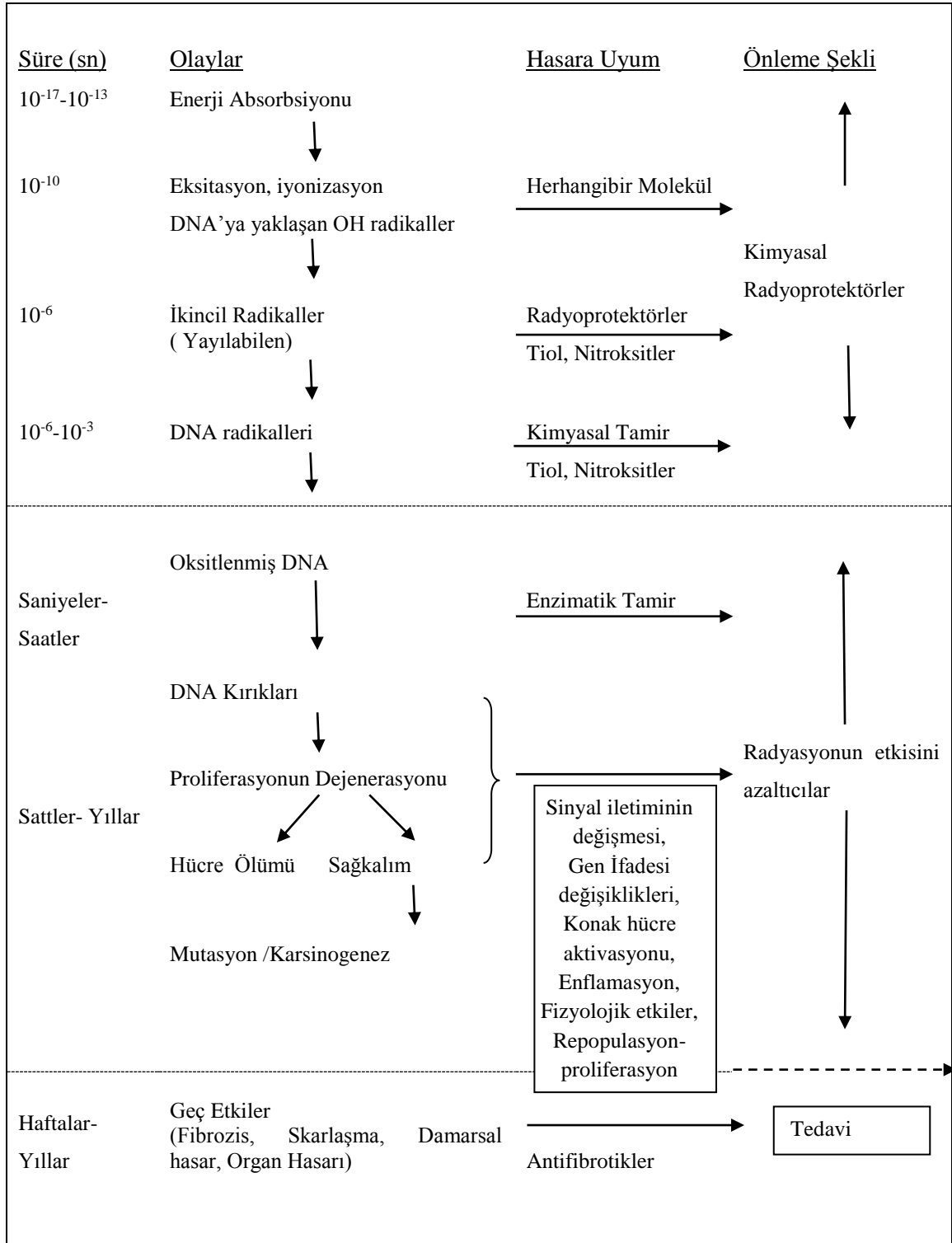
- **Doz Hızı ve Alınan Dozların Zaman Aralığı:** Absorblanan doz birimi Gray'dir (Gy). 1 kg'da 1 joule'lük enerji absorpsiyonuna eşdeğerdir. Doz hızı ise canlı tarafından birim zamanda absorblanan toplam radyasyon miktarıdır. Gy/gün ya da Sv/saat, gün vb. şeklinde ifade edilir. Organizma tarafından absorblanan toplam doz önemlidir. Ancak aynı miktarda düşük doz hızlarında verilen radyasyonun oluşturduğu hasar onarılabılırken yüksek doz hızlarında onarılamadığı görülmüştür. Ayrıca büyük dozların bölünmüş (fraksiyone) bir şekilde verilmesi de DNA tamirine olanak verdiği için, biyolojik hasar düzeyini belirlemede önemlidir. Örneğin; 10 Gy gibi ölümcül bir dozda bile 5+5 (24 saat ara ile) uygulama hücre ölüm yüzdesini % 100'den % 40'a düşürmektedir. Ancak bu durum sadece düşük LET'li radyasyonlar için geçerlidir. Yüksek LET'li radyasyonlarda aynı noktanın birden fazla hasar alma olasılığı yüksek olduğundan tamir etkili olmaz [2].

- **Zaman:** Hasarın tipine bağlı olarak biyolojik etkinin ortaya çıkması saatler ile yıllar içinde olabilir. Sonuç hücrenin ölümü olacaksa, bu saatler ya da günler içinde ortaya çıkar. (Hasarlanmış hücre bölünmeye karar verdiğinde-Radyasyonun erken etkisi) Eğer hasar kanser oluşumuna gidecek bir şekildeyse, ortaya çıkması yıllar alabilir. Örneğin lösemi, kemik, akciğer, deri, tiroid ve meme kanserlerinin iyonize radyasyonla ilişkisi kanıtlanmıştır. Karsinogeneze ek olarak ortaya çıkan geç doku cevabı, fibrosis, vasküler yetmezlik, hayatın kısalması, fetusta etkilenme ve oluşan genetik değişikliklerin sonraki kuşaklara aktarılması şeklinde olabilir (Şekil 2.12) [40].

- **Işınlanma Koşulları:** Ortam sıcaklığı ve Oksijenin varlığı. Ortam sıcaklığına örnek olarak; brakiterapi sırasında doz uygulanan dokunun dışarıdan mikrodalga veya ultrasonik bir cihazla ısısının yükseltilmesinin doz dağılımını en iyi seviyeye çıkardığı dolayısıyla daha iyi klinik sonuçlar verdiği bilinmektedir. Ortamda oksijen varlığı da ısı gibi radyasyonun etkisini arttıran bir etmendir ve bunu serbest oksijen radikallerinin oluşumuna katkıda bulunarak yapmaktadır [1].

- **Radyoprotektörlerin ya da Radyoduyarlaştırıcıların Varlığı:**

Radyoduyarlaştırıcılar düşük doz hızlarında planlanan tedavilerde kişinin absorbladığı toplam dozu arttırarak maruziyet zamanını kısaltmakta yararlıdır. Radyoprotektörler ise sağlıklı dokuların korunmasında, sağlıklı dokuların absorbladığı dozu azaltmada kullanılan ajanlardır. Sağlıklı dokuların korunması, radyasyon sebebiyle oluşabilecek ek doku ve organ hasarlarının engellenmesi, ikincil kanserlerin oluşumunun engellenmesi, hastanın yaşam süresi ve konforu için önemli bir gerekliliktir [16].



Şekil 2.12. Radyasyon Maruziyetini Takiben Meydana Gelen Olaylar [41]

2.1.4. Radyoprotektörler

Radyoprotektörler normal dokularda radyasyonun hasarlayıcı etkisini azaltmak için tasarlanmış ilaçlardır. Koruyucu etkilerini gösterebilmeleri için radyasyon uygulamasından önce ya da uygulama sırasında mutlaka vücuda verilmiş olmalıdırlar. Yakın zamanda pek çok maddenin radyoprotektör özelliği laboratuarda kanıtlanırsa da pek azı ilaç olabilme safhasına geçebilmiştir. Şu an en çok kullanılan ilaç, bazı kontrendikasyonları olsa bile Amifostin'dir.

Radyasyon DNA'ya esas olarak serbest oksijen radikalleri yoluyla hasar verdiği için antioksidan aktivitesi olan pek çok bitkisel kaynaklı molekül de aday radyoprotektör olarak araştırılmıştır. Ancak pek çoğu toksisitesi ya da yan etkileri sebebiyle ilaç olabilme özelliğini kazanamamışlardır. Bitkisel kaynaklı moleküller arasında E vitamini, kafein, klorofil, ferrulik asit, trokserutin ve vanilin gibi moleküllerin radyoprotektör özellikleri olduğu bulunmuştur [42].

Radyoprotektörler uygulanma zamanlarına ve beklenen etkiye göre şöyle sınıflandırılırlar:

1. Profilaktik Ajanlar; uygulamadan önce verilir.
2. Etkiyi Azaltıcı Ajanlar; uygulamadan hemen önce veya hemen sonra semptomlar ortaya çıkmadan verilir.
3. Tedavi Edici Ajanlar; uygulamadan sonra, akut radyasyon sendromunun veya gecikmiş etkilerin ortaya çıkmaması için verilir [29].

Farklı koruyucu ajanlar farklı mekanizmalarla işlevlerini yerine getirirler. Bunlar;

1. Antioksidan mekanizma ile,
2. DNA tamir mekanizmalarını uyararak,
3. Bazı sinyal yollarını modifiye ederek,
4. İmmün sistemi uyararak,
5. Yukarıdaki mekanizmaları kombine kullanarak. [41,43]

Aşağıda Tablo 2.3'te halen kullanılan bazı radyoprotektörler ve özellikleri verilmiştir [29, 44].

Tablo 2.3. Bazı Radyoprotektif Ajanlar ve Etki Mekanizmaları [29]

Radyoprotektif Ajan	Radyoprotektif Etki Mekanizması
Amifostin (WR-2721)	Halen en etkili radyoprotektör ajandır. Etki Mekanizması karmaşıktır. Antioksidan etki, DNA tamir indüksiyonu ve hücrel hipoksi oluşturarak etki göstermektedir.
Melatonin	Farelere ışınlamadan 30 dk önce oral yoldan 20 mg verildiğinde barsak epitelini koruduğu, kromozomal aberasyonları ve mikronukleus oluşumunu azalttığı gösterilmiştir.
ACE inhibitörleri	Akciğer ve böbreklerde radyasyonun gecikmiş etkilerini önlemede etkili olduğu gösterilmiştir. Ayrıca hematopoetik sistemin kendini tamir etmesini kolaylaştırdığı tespit edilmiştir.

2.2.FLAVONOİDLER

Flavonoidler bitkisel kaynaklı besinlerin yapısında bulunan polifenol yapıda bileşiklerdir. Bugüne dek 5000'den fazla flavonoid bileşik tanımlanmıştır. Çeşitli flavonoidlerin sağlık üzerine etkileri ile ilgili pek çok çalışma vardır. Araştırmacılar tarafından yapılan farklı derlemelerde bu bileşiklerin başta antioksidan özellikler olmak üzere pek çok etkisi ile ilgili çalışmalar gözden geçirilmiştir. Sonuç olarak bu bileşiklerin başta kanser ve kalp hastalıkları olmak üzere insan sağlığı için dikkate değer özellikleri olduğu ortaya konmuştur.

Flavonoidler 6 ana gruba ayrılır;

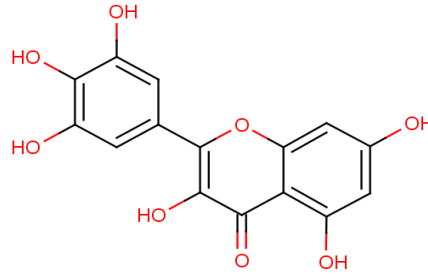
1. Flavonlar (apigenin, luteolin vb.),
2. Flavonoller (kersetin, mirisetin vb.),
3. Flavanonlar (naringenin, hesperidin vb.),
4. Kateşinler ya da flavanoller (epikateşin, gallokateşin vb.),
5. Antosiyanidinler (siyanidin, pelargonidin vb.),
6. İsoflavonlar (genistein, daidzein vb.). [45,46]

2.2.1 Mirisetin

Mirisetin flavonoller alt grubuna ait bir flavonoiddir. Moleküler yapısı şekil 2.13'de gösterilen mirisetin doğada hem besin olarak tüketilen hem de alternatif tıpta kullanılan çeşitli bitkilerin yapısında değişik oranlarda bulunur. Mirisetin ve diğer bazı flavanoidler (Kersetin, kamferol, apigenin vb.) çeşitli bitkilerde farklı konsantrasyonlarda

tespit edilmiştir. Güney Asya kaynaklı, belli başlı bazı tropikal bitkilerin (tıbbi ve besin) flavonoid içeriklerinin incelendiği bir çalışmada semambu bitkisinin yaprakları ve sarımsak, çalışılan bitkiler arasında en yüksek mirisetin oranına (Sırasıyla 853 mg/kg ve 693 mg/kg) sahip bitkiler olarak tespit edilmiştir [47]. Bu çalışmada tespit edilen diğer bir mirisetin kaynağı da 303 mg/kg ile siyah çaydır. Hollanda’da yapılan bir başka çalışmada da, toplumda tüketilen mirisetin gibi bazı flavonoidlerin ana kaynağının çay ve soğan olduğu tespit edilmiştir [48]. Yapılan çalışmaların ortaya çıkardığı sonuca göre besinler yoluyla aldığımız mirisetin’in ana kaynakları; soğan, sarımsak, çay, lahana, elma, kiraz, üzüm, kırmızı şarap gibi besinlerdir.

Mirisetin bitkilerde çoğunlukla glikozid yapısında bulunur, aglikon formu daha nadirdir [49].



Şekil 2.13. Mirisetin’in Moleküler Yapısı [9]

2.2.2. Mirisetin’in Metabolizması

Mirisetin metabolizması ile ilgili olarak literatürde insanlarla yapılmış bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Ancak sıçanlarla oral mirisetin verilerek idrar ve feçeste mirisetin metabolitlerinin araştırıldığı bir çalışmada mirisetin’in ana metabolitinin idrarla atılan 3-5-dihidroksifenil asetik asit olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca neomisin uygulanan sıçanlarda mirisetin metabolitlerinin tamamen kaybolmasıyla mirisetin’in barsak bakterileri tarafında metabolize edildiği sonucuna varılmıştır [50].

2.2.3. Mirisetin’in Biyolojik Etkileri

Mirisetin 1950’lerden beri çeşitli biyolojik özellikleri araştırılan bir moleküldür. İnsan sağlığına değişik açılardan faydalı olabileceği teorisi çeşitli araştırmacılar tarafından ispatlanmaya çalışılmıştır. Sağlıklı ve hastalık taşıyan insan ve hayvan

hücrelerinde Mirisetin'in pek çok etkisi araştırılmıştır ve araştırılmaktadır. Antioksidan, antikarsinojen, antidiyabetik, antiviral ve bazı sağlığa yararlı olabilecek özellikleri bulunduğu savunulan mirisetin'in DNA hasarlayıcı, prooksidan, DNA tamirini engelleyici etkilerinin olduğunu da savunan çalışmalar da vardır ve bu çalışmalardan bazıları aşağıda özetlenmiştir.

Antioksidan Etki

Mirisetin'in hem enzimatik hem de enzimatik olmayan sistemler yoluyla antioksidan etki gösterdiği bildirilmiştir. Mirisetin'in A ve B halkalarındaki OH ekleri, çift bağları ve 3-OH değişimlerinden dolayı antioksidan özelliğinin olduğu gösterilmiştir [51].

İnsan lenfositleri ile yapılan bir çalışmada, lenfositler 30 dk. ve 18 saat çeşitli mirisetin konsantrasyonları ve ardından 5 dk H₂O₂ ile muamele edilmiş ve Komet yöntemi ile incelenmiştir. 30 dk mirisetin uygulamasının 100 µM konsantrasyonda H₂O₂'nin oluşturduğu DNA hasarını engellediği tespit edilmiştir [6].

Çin Hamsteri akciğer fibroblastlarında yapılan bir çalışmada da mirisetin'le muamele edilmiş hücreler H₂O₂ ile oksidatif hasara maruz bırakılmış ve 24 saat sonra radikal temizleme aktivitesi, antioksidan enzimlerin ekspresyonu üzerine etkisi, hücresel DNA hasarı, lipid peroksidasyonu ölçülmüştür. Sonuçta mirisetin'in 10 µg/ml konsantrasyonda ortamdaki radikallerin % 73'ünü temizlediği, H₂O₂ ile ekspresyonları azalan CuZn SOD, MnSOD, GPx ve CAT aktivitelerinin mirisetin uygulamasıyla yüksek oranda geri döndüğü tespit edilmiştir. Komet deneyi ile yapılan değerlendirmede ve lipid peroksidasyon değerlendirmesinde de mirisetin'in oksidasyon hasarından koruyucu etkisi ortaya konmuştur [7].

Primer sıçan hepatositleri ile yapılan bir çalışmada DNA oksidasyonu için demir şelatı (Fe-NTA-, ferik nitrilo triasetat) kullanılmıştır. 100 µM konsantrasyonda mirisetin'in lipid peroksidasyonu ve oksitlenmiş DNA ürünlerini anlamlı derecede azalttığı tespit edilmiştir [52].

Caco ve HepG2 hücreleri ile yapılan bir çalışmada;24 saatlik 200 µM mirisetinle inkübasyonu ve ardından H₂O₂ hasarı yapılmış hücreler Komet ile değerlendirildikten sonra mirisetin'in bu hücre serilerinde anlamlı derecede koruyucu olduğu bildirilmiştir [53].

Oksidatif hasarı önleyici etkisini araştıran bu çalışmaların sonuçlarına göre, mirisetin, hücrede farklı etmenlerle ortaya çıkan oksidatif hasarı önlemede etkili bir ajan olarak görünmektedir.

Antikanser Etki

Mirisetin'in kanserli ya da işlevi bozulmuş hücre ve dokulardaki etkilerini inceleyen çalışmalar da bulunmaktadır.

Primer ve metastatik pankreas kanseri hücre serilerinde yapılan bir çalışmada da PI₃ Kinaz (Fosfatidil İnozitol 3 kinaz) inhibisyonu yoluyla her iki hücre serisinde de apoptozu indüklediği saptanmıştır [54].

Mirisetin ve mesane kanseri hücre serisi T24 ile çalışılan bir araştırmada ise, mirisetin'in bu hücrelerin çoğalmasını inhibe ettiği, hücreleri G2/M fazını geciktirerek apoptozu sürüklediği kanısına varılmıştır. Bu çalışmada ayrıca T24 inokülasyonu yapılan çıplak farelerde* mirisetin verilen grupta (5 mg/gün) tümör gelişiminin yavaş olduğu ve yaşam sresinin daha uzun olduğu tespit edilmiştir [55].

Mirisetin'in Lösemi (HL-60) ve hepatoma (Hep G2) hücrelerinde seçici apoptotik etkisinin incelendiği bir çalışmada mirisetin'in bu kanser hücrelerinden HL-60 serisinde apoptozu doza ve zamana bağlı olarak indüklediği, ancak Hep G2 hücrelerinde böyle bir etki göstermediği tespit edilmiştir [56].

Mirisetin'in ölümsüz hücreleri apoptozu sevkettiğine dair bir diğer bulgu da HaCat (Malign olmayan ölümsüz insan keratinositleri) hücreleri ile yapılan bir çalışmada ortaya konmuştur. Düşük doz, tamir edilebilecek düzeyde UVB'ye maruz bırakılan bu hücrelerde, mirisetin'in Akt ve Bad moleküllerinin aktivitesini düşürerek mitokondriyal apoptotik moleküllerin salınımını arttırdığı ve hücreyi p53'ten bağımsız bir yoldan apoptozu sürüklediği gösterilmiştir [57].

Antidiyabetik

Mirisetin diabet tedavisi ya da korunması için de aday bir molekül olarak düşünülmektedir.

Sıçanlarla yapılan bir çalışmada, STZ (Streptozotosin) ile diyabet yapılmış hayvanlarda 10 günlük bir mirisetin (6 mg/gün, ip) uygulamasını takiben yapılan

* Tüysüz, timusu çalışmaz hale getiren bir mutasyon taşıyan, özellikle immünolojik çalışmalarda kullanılan laboratuvar faresi.

tetiklerde Mirisetin'in oksitleyici aynı zamanda nitratlayıcı bir ajan olan peroksinitrin oluşturduğu DNA hasarından hücreyi koruduğu bildirilmektedir [58]. Sıçan astrositleri ve plazmid DNA'sıyla yapılan bu deneylerde mirisetin'in radikal temizleyici etkisi sayesinde bu korumayı gerçekleştirdiği düşünülmektedir.

Zelus ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, mirisetin'in adacık hücrelerini (PC12) öldürerek tip II diabete neden olduğu düşünülen IAPP (Islet Amiloid Polipeptid, Amilin) agregasyonunu engellediği ThT (Tioflavin T) bağlanma testi ile gösterilmiştir [59].

Mirisetin'in anti-diabetik etkisini araştırmak için yapılan bir hayvan çalışmasında, STZ ile diabetik yapılan hayvanlarda 6 mg/gün dozunda verilen mirisetin'in glomeruloskleroza azalttığı, kreatinin klirensini düşürdüğü, üreyi düşürdüğü ve antioksidan enzim aktivitelerini iyileştirdiği tespit edilmiştir [60].

Diğer Çalışmalar

Mirisetin antioksidan olduğu kadar prooksidan özellik de gösterebilen bir moleküldür. Yapılan bir çalışmada mirisetin'in Fe(III)'ü Fe (II)'ye indirgediği, bu indirgenme sonucu oluşan Fe(II)'nin oto-oksidasyon sonucu oksijenden süperoksit (O₂) radikali oluşturduğu tespit edilmiştir. Aynı çalışmada mirisetin'in prooksidan ya da antioksidan aktivitesinin ortam bileşenlerinin konsantrasyonu ve deney şartlarına bağlı olduğu yönünde bulgular elde edilmiştir [61].

Ortam bileşenlerine bağlı prooksidan aktivite gösteren mirisetin'in yine ortamda CuSO₄ varlığında pUC 9.1 plazmid DNA'sında kırıklara neden olarak açık halkasal ve lineer DNA oluşumuna sebep olduğu gösterilmiştir [62].

Mirisetin'in DNA'ya hasar verdiği gibi oluşan hasarın tamir edilmesini gerek DNA polimerazların çalışmasını inhibe ederek [63] gerek topoizomeraz II inhibisyonu yaparak [64] engellediği tespit edilmiştir.

Mirisetin'in merkezi sinir sistemindeki etkilerinden birini araştıran bir çalışmada sıçanlarda hipotalamusta, paraventriküler çekirdekte (PVN) potasyum akımını kolaylaştırarak PVN nöronlarında inhibisyona yol açtığı tespit edilmiştir. Mirisetin'in kardiyovasküler sistemde sempatik aktiviteyi arttıran PVN nöronlarını inhibe etmesi, hipertansiyon, konjestif kalp yetmezliği gibi durumlardan hastayı koruyabileceğini düşündürmektedir [65].

Yine merkezi sinir sisteminde oksijen- glukoz yoksunluğu oluşturulan glial hücrelerde mirisetin uygulamasıyla ödemin engellendiği gösterilmiştir. Bu bulgu iskemik reperfüzyona bağlı beyin hasarı meydana gelebilen tıbbi durumlarda mirisetin'in koruyucu etkisinin olabileceğini gösteren bir bulgu olarak değerlendirilebilir [66].

Mirisetin'le beraber 13 flavonoid'in klastojenik, interkalative ve topoizomeraz II ile etkileşim profilinin araştırıldığı bir çalışmada mirisetin'in klastojenik etkisinin* olmadığı ve zayıf topoizomeraz II inhibisyonu yaptığı gösterilmiştir. Mirisetin'in, kanser tedavisinde kullanılan topoizomeraz II inhibitörleri gibi davranması dikkate değer bir özellik olarak değerlendirilebilir [64].

Burada örnek olarak verilen çalışmaların sonuçlarına göre, Mirisetin sağlıklı hücrelerin korunması yanında kanserli hücrelerin çoğalma, farklılaşma ve hayatta kalma özelliklerini de etkileyebilen bir molekül olarak değerlendirilebilecek bir moleküldür.

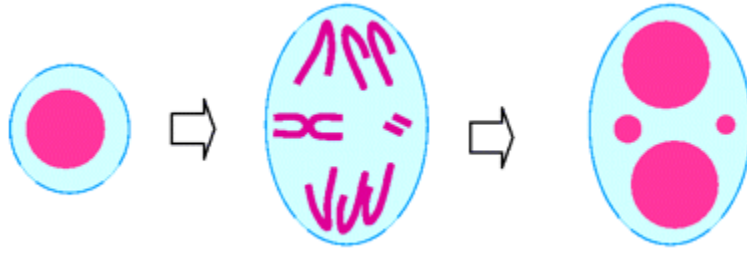
*Memeli hücrelerinde maksimum klastojenik etki için flavonoidlerin C halkasında 2-3 çift bağ içermesi, C halkasının 3' pozisyonunda ve A halkasının 7' pozisyonunda bir OH grubu bulunması, ayrıca B halkasında bir katekol ya da pirogallol yapısı taşıması gerekir [67].

2.3. MİKRONUKLEUS

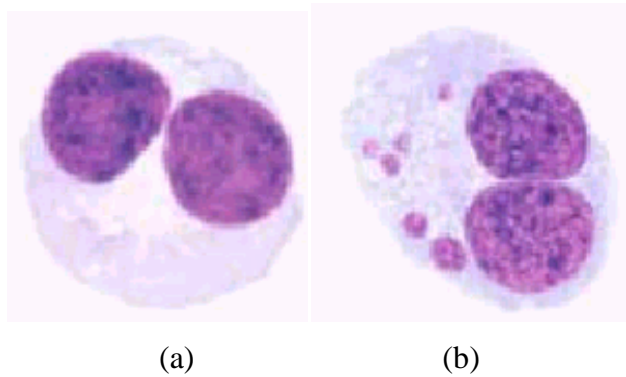
2.3.1. Mikronukleus Oluşum Mekanizması

İyonlaştırıcı radyasyona maruz kalan bireylerde absorblanan radyasyon düzeyini belirlemek için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Örneğin, hücresel düzeyde etkilenmeyi belirlemek için hemogram takibi, kemik iliği incelemesi, spermatogram ve periferik kanda kromozom aberasyonlarının incelenmesi gibi yöntemler kullanılmaktadır. MN analizi de bu yöntemlerden biridir.

Mikronukleuslar, asentrik bir kromozom parçasının ya da tam bir kromozomun hücre bölünmesi sırasında kutuplara çekilememesi ve nükleus dışında kalmasıyla meydana gelirler (Şekil 2.14 ve Şekil 2.15) [2,68] .



Şekil. 2.14. Mikronukleus Oluşumu [69]



Şekil 2.15. Normal Binukleat Hücre (a) ve Mikronukleuslu Binukleat Hücrenin (b) Mikroskop Görüntüsü (Çalışma Görüntüsü)

MN'ların oluşum mekanizması şöyledir:

- Asentrik kromozomların ya da kromatid parçalarının anafazda gecikmesi (DNA kırıklarının hatalı onarılması, DNA kırıklarının onarılamaması sonucu),
- Tüm kromozomların anafazda gecikmesi, (sentromerik ve perisentromerik DNA'daki tekrar dizilerinin hipometilasyonu, kinetokor proteinlerindeki defektler, fonksiyonunu kaybetmiş iğ iplikleri, anafaz kontrol genlerindeki bozukluklar, çözünmeyen replikasyon molekülleri) sonucu meydana gelirler [70].

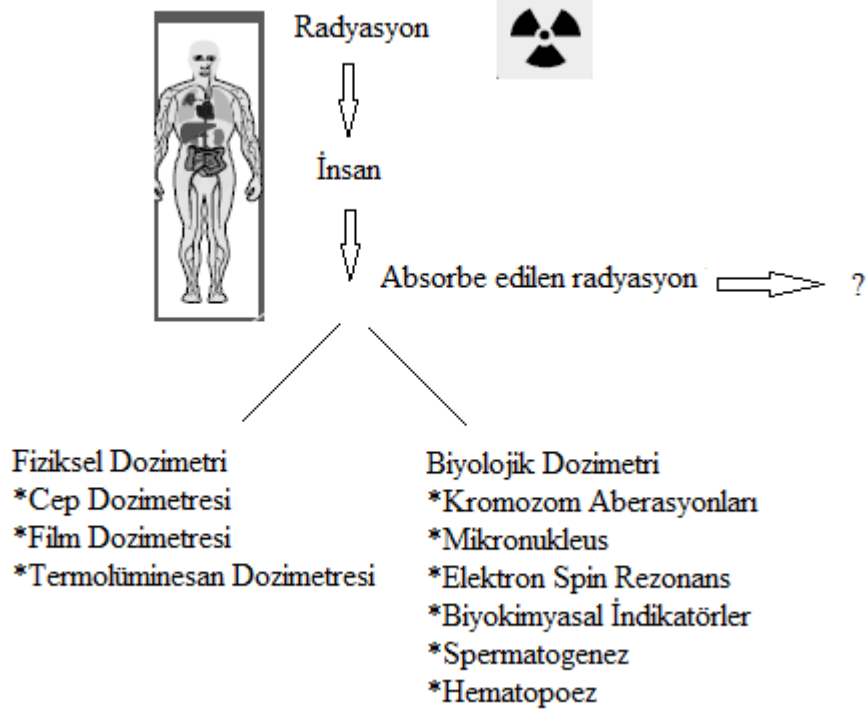
2.3.2. Mikronukleusların Kullanıldığı Alanlar

- Kromozomları etkileyebilecek fiziksel etkenlerin (UV ve γ radyasyon gibi) genotoksik ve karsinojenik potansiyellerinin tespitinde,
- Yeni kimyasalların (Örn; ilaçlar, tarım zehirleri vb.) piyasaya sürülmeden önce olası genotoksik etkilerini ve güvenilirliğini araştırmada,
- Kanserden korunmada ve kanserin izlenmesinde bir biyoizlem testi olarak,
- Radyoprotektör ajanların ve kimyasal hasarına karşı olası koruyucu ajanların araştırılmasında [71] kullanılırlar.

2.3.3. Mikronukleus Analizi'nin Radyobioloji'de Kullanımı

Bir radyasyon kazası sonrasında ışınlanan kişinin absorbladığı dozun doğru belirlenmesi, tedavisinin yönlendirilmesi ve ileride meydana gelebilecek sorunların doğru yorumlanabilmesi açısından çok önemlidir. Bununla birlikte kazaların çoğunda kazanın oluş şekli, ışınlanma süresi, vb. parametrelerin doğru bir şekilde belirlenmesi güç olduğundan absorblanmış dozun fiziksel yöntemlerle doğru bir şekilde hesaplanması genellikle zordur. Fiziksel dozimetrlere, bireylerin absorbladıkları dozların belirlenmesinden çok, ışınlanıp ışınlanmadıkları hakkında fikir sahibi olma konusunda daha etkilidir. Bunun yanı sıra cinsiyet, yaş, kişinin sağlık durumu, genetik altyapısı vb. faktörler absorblanan dozun biyolojik cevabını etkiler. Bu nedenle fiziksel dozimetrlere bulduğu durumlarda doz hesaplamasına yardımcı olmak, bulunmadığı durumlardaysa doz değerlendirilmesinde kullanılmak üzere biyolojik doz tayini önerilir. Önceleri radyasyona maruz kalan kişilerin belirlenmesi ve fiziksel dozimetrlere yardımcı olmak amacıyla geliştirilen biyolojik dozimetri, günümüzde kaza dozimetrisinin yanı sıra, radyasyonla çalışan personelin veya radyoterapi hastalarının

takibinde etkin bir şekilde kullanılmaktadır. Dozimetri çeşitleri Şekil 2.16'da gösterilmiştir.



Şekil 2.16. Dozimetri Çeşitleri [72]

Doz tayininde kullanılan belirteçlerin hepsi az veya çok iyonlaştırıcı radyasyona karşı duyarlıdır. Ancak bir sistemin biyolojik dozimetri olarak kullanılabilmesi için bazı özellikleri sağlaması gerekir.

Bunlar:

1. Radyasyona duyarlılığının yüksek olması ve gözlenen etkinin radyasyona özel olması,
2. Background seviyesinin hemen üzerinde etkisinin tespit edilebilmesi,
3. Radyasyonun kalitesine göre değişken etkinin saptanabilmesi,
4. Kolay örnek alınabilmesi,
5. Tekrarlanabilir olması,
6. Senkron bir hücre popülasyonu olması,
7. Tüm vücudu temsil etmesi,
8. Invitro şartlarda elde edilen doz cevap eğrilerinin in-vivo şartlarla uyumlu olması.

Bütün bu şartları sağlayan tek belirteç dolaşan kan T lenfosit kromozomlarıdır. İnsan periferik kan lenfositleri, hücre siklusunun G_0 fazındadır. G_0 G_1 fazının gelişim olmayan safhasıdır. G_0 da hücre kontrol sistemi bileşenleri ve diğer birçok protein üretimi durdurulmuştur. Her ne kadar bu fazdaki hücreler bölünmüyorsa da organizma içindeki fonksiyonlarını (Salgı üretmeyi, sinir impulslarını kontrol etmeyi, hastalık yapıcı etmenlerle savaşmayı vs.) sürdürmektedir. Periferik lenfositlerin yalnız % 2 si hücre siklusundadır. Bu nedenle iyonizan radyasyon nedeniyle meydana gelen kromozom aberasyonları hücre bölünmesi sırasında ortamdan kaybolmadığından lenfositlerin yarı ömrü süresince bu aberasyonların periferik kanda belirlenebilmesi mümkün olmaktadır.

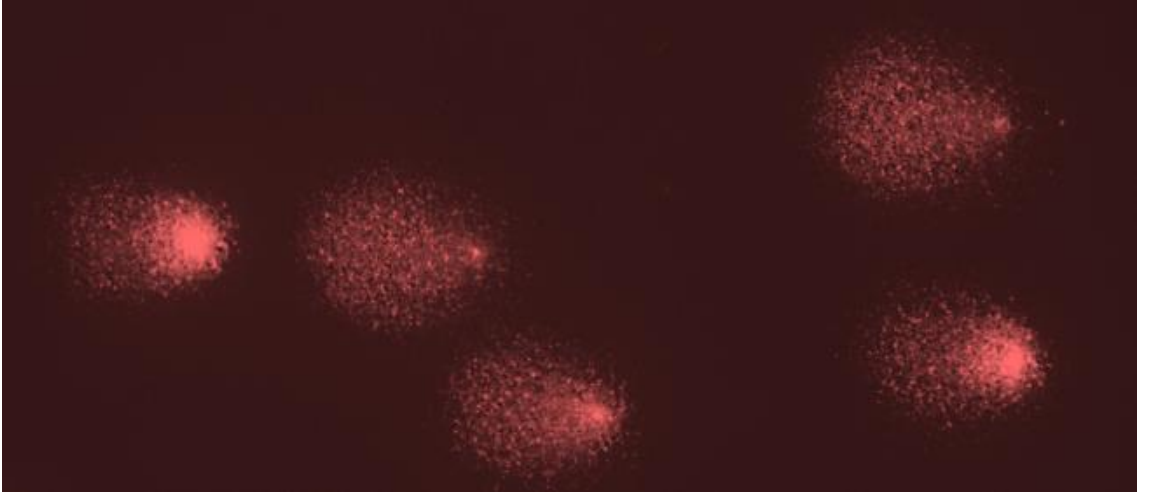
Periferik kandaki lenfositler radyasyona en duyarlı hücre grubunu oluşturmaları nedeniyle vücudumuzda yer alan milyonlarca dozimetri görevini görmektedir. Bu yöntemle; sadece kan tablosunun değişip akut radyasyon semptomlarının görüldüğü yüksek dozlar değil, görünüşte hiçbir fiziksel bulgunun olmadığı, çok düşük dozların bile tespit edilebilmesi mümkündür. Örneğin; lenfositlerde yapılan kromozom aberasyon analizinin duyarlılığı X ve γ ışınları gibi düşük LET' li radyasyonlar için 0.1 Sv, alfa parçacıkları ve nötronlar için 0.01 Sv' tir [73,74].

Maruziyetten 24 saat sonra alınacak 5 ml'lik periferik kan örneği değerlendirme yapmak için yeterlidir. Periferik kanda bulunan T lenfositlerinin % 95'i 3 yıllık bir yarı ömüre sahip olduğundan dolayı, maruziyetten uzun zaman sonra bile absorblanan dozun belirlenebilmesi mümkün olmaktadır. Biyolojik doz tayini için kromozomal aberasyon, disentrik ve mikronukleusların analizleri uzun yıllardır başarıyla uygulanmaktadır. Sadece radyasyon değil çeşitli kimyasallar da mikronukleus oluşturabilir. Bu nedenle kimyasal ve fiziksel ajanların olası biyolojik etkilerinin birlikte değerlendirilmesi bu yöntemler sayesinde yapılabilmektedir. Radyasyon dozu ile mikronukleus sıklığı ilişkisi değerlendirildiğinde grafikte lineer kuadratik bir model sergiledikleri gözlenir [75,76] .

2.4. Komet Deneyi

2.4.1. Komet Deneyi nedir?

Komet deneyi ya da tek hücre jel elektroforezi, prokaryotik ve ökaryotik hücrelerde çeşitli kimyasal ya da fiziksel etmenlerle meydana gelmiş DNA hasarlarını tespit etmek için kullanılan duyarlı ve hızlı bir laboratuvar yöntemidir. Komet deneyinin prensibi, elektriksel olarak negatif (-) yüklü DNA'nın elektrik alanında pozitif (+) kutba doğru hareket etmesi esasına dayanır. Herhangi bir etmenle hasar görüp parçalara ayrılmış olan DNA parçaları elektroforez esnasında büyüklüklerine göre anoda doğru hareket ederler. Bu DNA parçaları floresan ışığa yapan bir boya ile boyandıklarında (Etidium bromür, SyberGreen, DAPI vs.) floresan mikroskopta kuyruklu yıldız (Komet) benzeri bir görüntü ortaya çıkarılır (Şekil 2.17).



Şekil 2.17. Komet Şeklindeki Hücreler (Çalışma Görüntüsü)

Komet deneyi, deney esnasında kullanılan elektroforez tampon sistemlerinin pH'sına göre şöyle sınıflandırılır:

- Nötral Komet (pH: 7-10)
- Alkali Komet (pH: ~12,1)
- pH >13 Komet (pH >13)

Kullanılan farklı pH'daki tampon sistemleri, farklı tipte DNA hasarlarını tanınmasına olanak sağlamaktadır.

Nötral komet ile sadece çift zincir kırıklarının düzeyi tespit edilebilirken alkali komet (Özellikle pH>13) daha sıklıkla meydana gelen tek zincir kırıklarının, alkali labil bölgelerin tespitine de olanak sağlamaktadır. pH>13 alkali komet'le birlikte yapılan endonukleaz ve diğer enzim uygulamaları da yöntemin oksidatif hasar belirleme ve DNA tamirini saptama duyarlılığını arttırmıştır (Tablo 2.4) [77].

2.4.1.1. pH>13 FPG-Alkali Komet

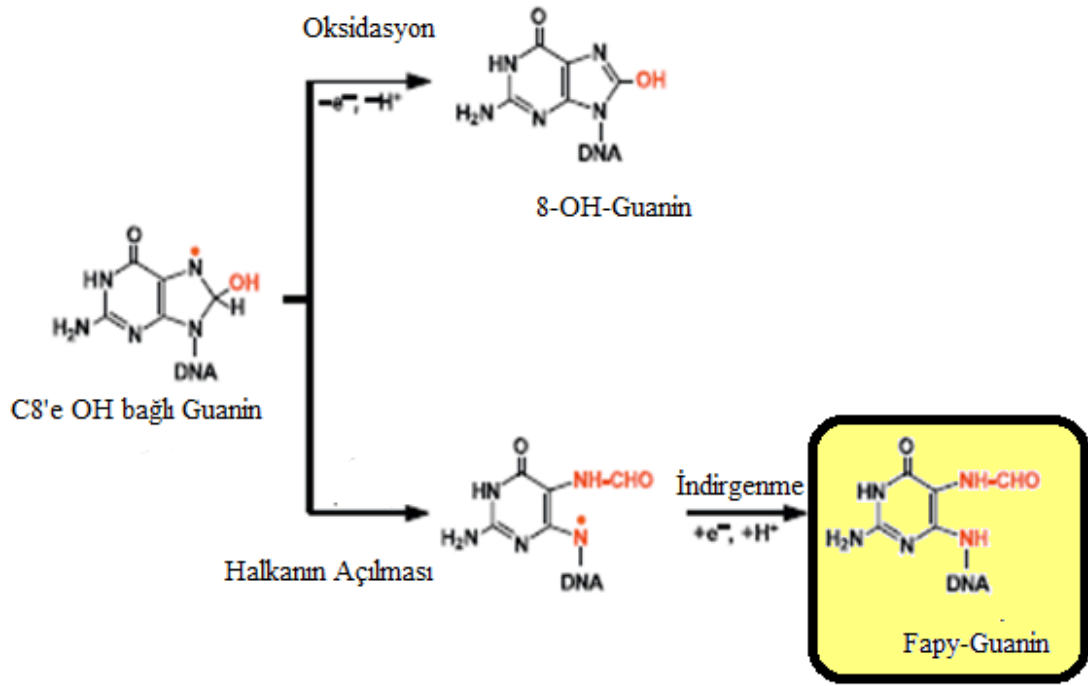
FPG (Formamidopirimidin Glikozilaz, Mut M olarak da adlandırılır) enzimi çift fonksiyonlu (DNA glikozilaz/ AP liyaz) bir baz kesip-çıkarma tamir (BER) enzimidir. *E. coli* tarafından ifade edilen bir enzimidir. Fpg/Nei gen ailesinin üyesidir. Ökaryotlardaki fonksiyonel homoloğu Nth gen ailesine üye olan 8-hidroksiguanin-DNA glikozilaz (OGG1)'dir. Bu enzim çeşitli ökaryotlar tarafından ifade edilmektedir [20]. Oksidatif hasarla meydana gelmiş oksitlenmiş pürinleri (özellikle 8-okso guanin), imidazol halkası açık pürinleri tanıyarak uzaklaştırır (Şekil 2.18 ve Şekil 2.19) [20,78]. Oksitlenmiş pirimidin bazları ile deoksiriboz şekeri arasındaki N-C₁ glikozidik bağının kesilmesini katalizler. Sonuçta DNA iskeletinin 2' ucunda apirimidinik bir bölge meydana gelir [79].

BER oksidatif olarak hasarlanmış DNA için çok önemli bir tamir sistemidir. Örneğin; Fpg, bakteri türlerinde 8-okso- guanozin'in tamirinden sorumludur [80].

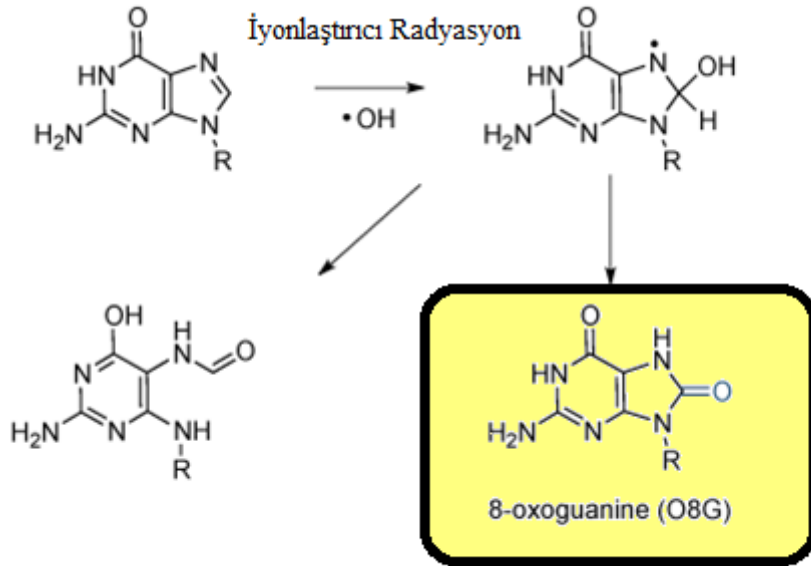
Tamir sürecinde FPG, ilk olarak değişikliğe uğramış bazı DNA zincirinden koparır, daha sonra enzimin Sınıf I Liyaz aktivitesiyle 3' ve 5' ucundaki fosfodiester bağları kesilir ve sonuçta pürinini kaybetmiş bir nükleotid boşluğu meydana gelir [81].

Tablo 2.4. Tamir Endonukleazları ve Substratları [77]

Endonukleaz III	Oksitlenmiş Pirimidinler, AP bölgeleri
Formamidopirimidin Glikozilaz	Açık Halkalı pürinler(Fapy –adenin, Fapy Guanin) 8-okso-guanin, AP Bölgeleri
3-Metiladenin Glikozilaz	3- Metiladenin(alkA), 7-Metilguanin
Endonukleaz V (UV Endonukleaz)	Siklobütan pirimidin dimerleri, AP bölgeleri
Urasil DNA Glikozilaz	DNA'daki Urasil

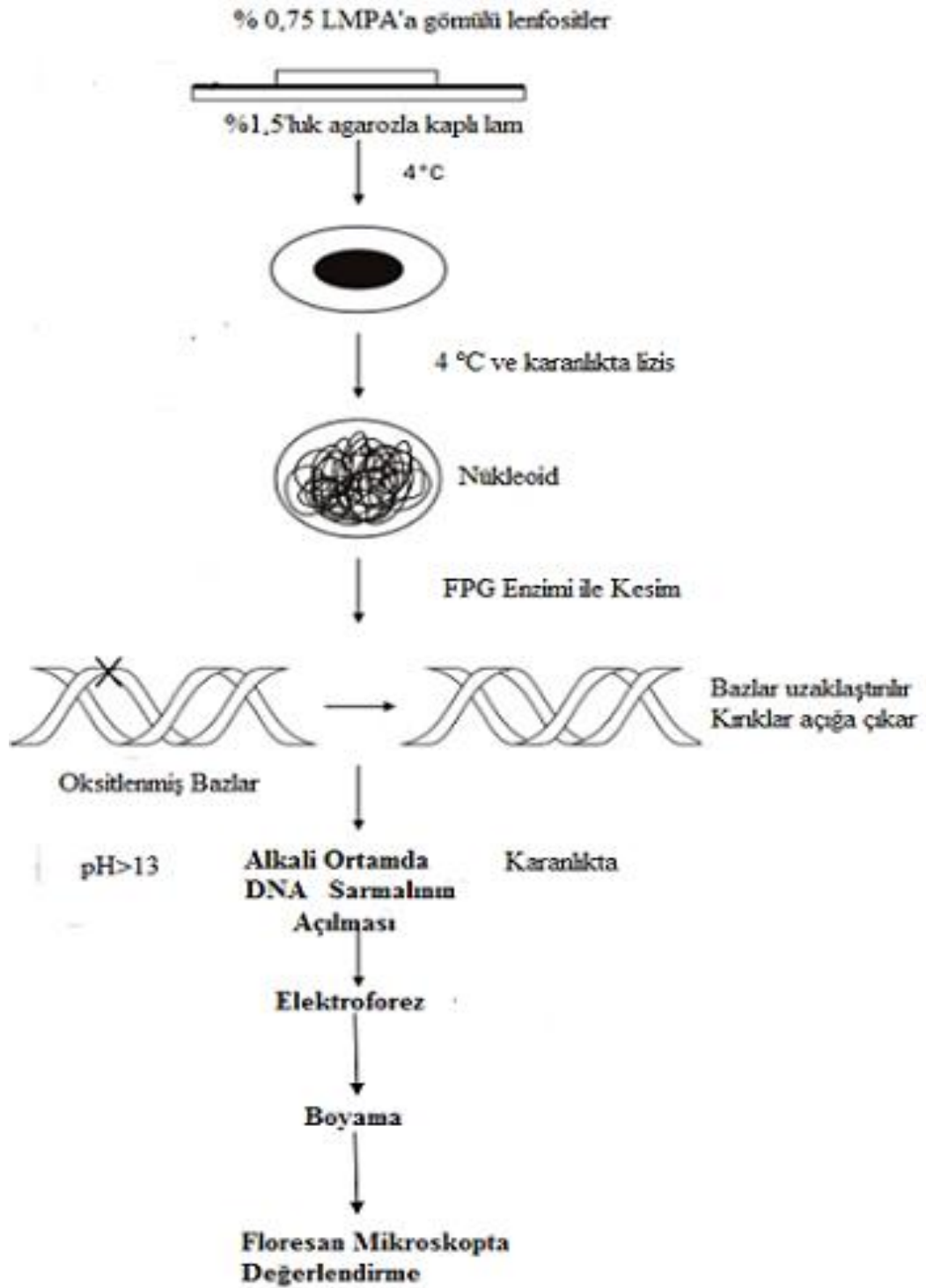


Şekil 2.18. FPG Enziminin Tanıdığı Fapy Gua Lezyonu [20]



Şekil 2.19. FPG Enziminin Tanıdığı 8-okso-G Lezyonu [20]

2.4.1.2. FPG Komet Protokolu



Şekil 2.20. FPG Komet Protokolu [82]

2.4.2. Tarihçe ve Komet'in Radyobiyolojide Kullanımı

DNA'nın yapısal hasarlarının insan üzerindeki hastalık yapıcı etkilerini tahmin edebilmek adına, mikronukleuslar, yapısal kromozom aberasyonları gibi günümüze dek pek çok yöntem geliştirilmiştir.

1960'ların ortasında ilk defa Mc Grath ve Williams *E.coli'de* radyasyonla oluşan DNA zincir kırıkları ve bunların tamirini göstermişlerdir. Sonraki yıllarda sukroz gradient sedimantasyon tekniği ve çözme tekniği ışınlanmış memeli hücreleri için başarıyla uygulanmaya başlanmıştır. Daha sonra Roti ve ark. tarafından nükleoid sedimantasyon prensibine dayanan Halo tekniği geliştirilmiştir. Halo tekniğinde çekirdek materyalinde sadece tek zincir kırıkları tespit edilebilmesine rağmen, sonuçları tartışmaya açık daha önceki fiziksel metodlardan daha çok kabul görmüştür.

DNA'nın floresan boyalarla işaretlenebilmesi pratikte 5 cGy kadar düşük bir dozun yaptığı tek zincir kırıklarını tespit edilebilir hale getirmiştir. Bu yöntemlerin hepsi hücre popülasyonlarında çalışılabilen yöntemlerdir ve heterojen hücre topluluklarında değerlendirme yapılmasına izin vermektedir. DNA hasarının tek hücre düzeyinde gösterilebilmesi ihtiyacı sonucu, ilk defa 1978 yılında Rydberg ve Johansson tarafından Komet deneyi DNA zincir kırıklarını, yani DNA'nın yapısal hasarlarını tespit etmeye yönelik bir yöntem olarak tanımlanmıştır. Rydberg ve Johansson'un tanımladığı yöntemde hücreler mikroskop slaydı üzerindeki agaroz jele gömülüyor ve ardından yüksek tuz ve deterjan içerikli bir tampon içerisinde hücreler lizise uğrattılıyordu. 1984 yılında Oestling ve Johansson ilk çalışmayı ilerleterek Komet deneyini (SCGE-Tek Hücre Jel Elektroforezi) tanımlamışlardır [83]. Daha sonra bu teknik Ostling, Johansson ve Singh tarafından modifiye edilerek daha basitleştirilmiş ve pratikleştirilmiştir. Yeni yöntemde ışınlanmış hücreler agaroz gömülme ve elektroforeze tabi tutulmaktadır. Hasarlı, kırık DNA parçaları büyüklüklerine göre elektrik alanda hareket ederek bir kuyruklu yıldız görüntüsü meydana getirmektedir. Floresan boyalarla boyanan DNA materyali floresan mikroskopta kolayca görüntülenebilmektedir. Bu deneyde nötral ortamda elektroforez yapılmakta ve çift zincir kırığı olan DNA'lar yoğun bir şekilde anoda doğru hareket etmekteydi. Nötral şartlarda yapılan Komet deneyi sadece çift zincir kırığı olan DNA'ları tanımlayabildiği için araştırmacılar diğer hasar tiplerini de tanımlayabilecekleri modifikasyonlar üzerinde çalışmaya başladılar. Bu konuda çalışan iki grup vardı. Bunlardan birincisi hali hazırda araştırmacılar tarafından en çok

kullanılan alkali Komet deneyini tasarlayan Singh ve ark., ikincisi de Olive ve ark. dir. Modifikasyonlarını sırasıyla 1988 ve 1990 yıllarında yayınlamışlardır. Singh tarafından geliştirilen $pH > 13$ alkali Komet deneyi tek zincir veya çift zincir DNA kırıklarının yanı sıra, alkali-labil bölgeleri ve gecikmiş onarım bölgelerini de tanımlayabilmemize olanak sağladığı için zamanla araştırmacılar tarafından daha tercih edilen bir yöntem olmuştur [84].

Komet yöntemi de radyasyonun DNA üzerinde yarattığı hasarları tespit edebilmemize olanak sağlayan bir yöntemdir. Radyasyon, ışınlanmış hücrelerde rastgele bir şekilde, doza ve hücrenin radyasyon duyarlılığına göre çeşitli hasarlar meydana getirebilir. Hücreler ancak oksijenin yokluğunda veya dış kaynaklı koruyucuların varlığında bu hasarlardan korunabilir [85].

Normal gelişim koşullarında olan her memeli hücrenin gün boyunca baz kaybı, baz değişimleri, zincir kırıkları gibi binlerce DNA hasarına uğradığı tahmin edilmektedir. Ancak bu tip hasarlar genellikle hücre tarafından hızla tamir edilebilmektedir. Asıl mesele nadiren meydana gelen ve tamiri diğerlerinden daha güç olan çift zincir kırıkları ve komplike lezyonların varlığıdır. Özellikle tamir edilemeyen çift zincir kırıkları kromozom aberasyonları ve hücre ölümüne sebep olabilmektedir. Bu sebeple araştırmacıların ilgisi 1980'lerde tek zincir kırıklarının incelenmesinden ışınlanmış hücrelerde ölümcül sonuçları olabilen DNA hasarlarına doğru kaymıştır.

Daha önce de belirtildiği üzere, 1 Gy'lik maruziyetin DNA molekülünde 1000 kadar baza hasar verdiği, yaklaşık 1000 tek zincir kırığı yaptığı, 20-40 kadar da çift zincir kırığı yaptığı tahmin edilmektedir [29].

Işınlanmış hücrelerde tek zincir kırıklarının oluşumu çift zincir kırıklarına göre Gy başına 20-40 kat daha azdır. Nötral Komet uygulamalarında bu yüzden 4 Gy gibi yüksek bir doz kullanılması gerekir. 0.5 Gy'in altındaki uygulamalarda PFGE kullanılması daha uygun görülmüştür.

Hücrenin siklusun hangi evresinde olduğu da hücrenin radyasyona cevabını etkileyen bir faktördür. Hücre popülasyonu yüksek oranda replike olan hücre içeriyorsa bu popülasyonda, replikasyon çatalları migrasyonu yavaşlatıp çift zincir kırıkları için Komet'in duyarlılığı düşmektedir. Ayrıca onarım kabiliyeti yüksek hücrelerde de 20 Gy gibi ölümcül bir dozdan sonra bile çift zincir kırığı tespit edilememektedir.

Alkali Komet uygulaması bu tarz problemlerin pek çoğuna çözüm getirmiştir. S fazındaki hücrelerde replikasyon çatalı artık tek zincir kırığı gibi davranmakta ve bu da migrasyon hızını etkilememektedir.

Collins ve ark. tarafından hasara özgün endonukleazların kullanımı Komet'in çalışma alanını genişletmiştir. Bu yöntem oksitlenmiş pürin ve pirimidinlerin varlığını ve tamirlerinin tespitini olanaklı hale getirmiştir. İyonizan radyasyonun aynı zamanda oksitleyici bir ajan olması, yüzlerce farklı baz hasarı yapabilmesi endonukleazlarla yapılan çalışmalar için onu iyi bir aday haline getirmiştir. Collins tarafından geliştirilen yeni Komet yönteminde kullanılan enzimlerden FPG oksitlenmiş pürinleri ve formamidopirimidin lezyonlarını tanır ve bunları enzimatik olarak keser. Bunlara FPG-Duyarlı bölgeler denir. Çeşitli baz hasarları farklı enzim uygulamaları ile ortaya konabilmektedir [85,86].

Pouqet ve ark.'nın [87] yaptığı çalışma sonucu bu yeni yöntemin gaz kromatografisinden daha duyarlı olduğu ortaya çıkmıştır.

2.4.3. Komet Deneyi'nin Kullanım Alanları

Komet deneyi pekçok alanda hücre bazında DNA kırıklarını tespit etmek için kullanılan bir tekniktir. Bu alanlar;

- İnsan Çalışmaları: Çeşitli insan hücrelerinin radyasyon ya da genotoksik kimyasallara çevresel maruziyetinin biomonitorizasyonunda, beslenme ve diet araştırmalarında, Kseroderma pigmentozum ve Nijmegen kırık sendromunun tanısında, birikmiş DNA hasarının belirlenmesinde,
- Ekolojik Monitorizasyon: Çevresel kaynakların genotoksik kirliliğini tespit etmek için uygun organizmaların (midyeler, yer kurtları, küçük kemirgen) hücrelerinin incelenmesinde,
- Genotoksik Testler: Yeni ilaç ve kimyasalların biyolojik güvenilirliğini tespit etmek için standart test olarak ,
- DNA Tamirinin Tahmin Edilmesinde: Hüresel düzeyde tamir kapasitesini tespit etmek için de elverişli bir tekniktir [83,88,89].

Komet deneyleri bakterilerden insan gibi yüksek organizmalara dek çok geniş bir yelpazede pek çok canlının hücrelerinde çeşitli kimyasal ve fiziksel hasarlayıcıların etkisini ortaya çıkarmak için kullanılmaktadır.

2.4.3.1. Komet Deneyinin Verimlilik Özellikleri

1. Komet Deneyi bütün hücre serilerine uygundur.
2. Prokaryot ya da bitkiler de dahil olmak üzere çeşitli ökaryot hücre tiplerine başarı ile uygulanmıştır.
3. Hasarı tek hücre düzeyinde tespit eder.
4. Yüksek bir duyarlılığa sahiptir. (50-15.000 kırık /hücre)
5. Sonuçlar aynı gün içinde alınır.
6. Hasar, döngüde olan ya da olmayan her hücre tipinde tespit edilebilir.
7. Hızlı basit ve ucuzdur.
8. Taze ya da donmuş örnekler kullanılabilir.
9. Non-invazif bir tekniktir.
10. Örnek hacmi çok küçüktür (10.000-50.000 hücre) [88].

Tablo 2.5. Komet Deneyi ile Mikronukleus Testi Arasındaki Farklar [88]

	Mikronukleus Testi	Komet Deneyi
Hasar Tipi	Kromozomal mutasyon	DNA Hasarı
Tamir	Edilemez	Edilebilir
Hücre Bölünmesi	Gerekli	Gerek değil
Maruziyet Süresi	Orta/ Uzun(Günler/Aylar)	Kısa/Orta (Dakikalar/saatler)
Anöploidi Tespiti	Evet	Hayır

2.5. ELİSA Deneyi

ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) yöntemi ilk kez İsveçli araştırmacılar Peter Perlmann ve Eva Engvall tarafından 1971 yılında yayınlanmıştır [90]. Yöntemin prensibi biyolojik bir çözeltide bulunan ve antijenik özellik gösteren bir hücrenel yapının varlığını ve miktarını saptamak için o yapıyı tanıyan bir antikörle muamele etmek ve bağlanma gerçekleşen madde miktarını renk veren bir substrat yardımıyla saptamaktır.

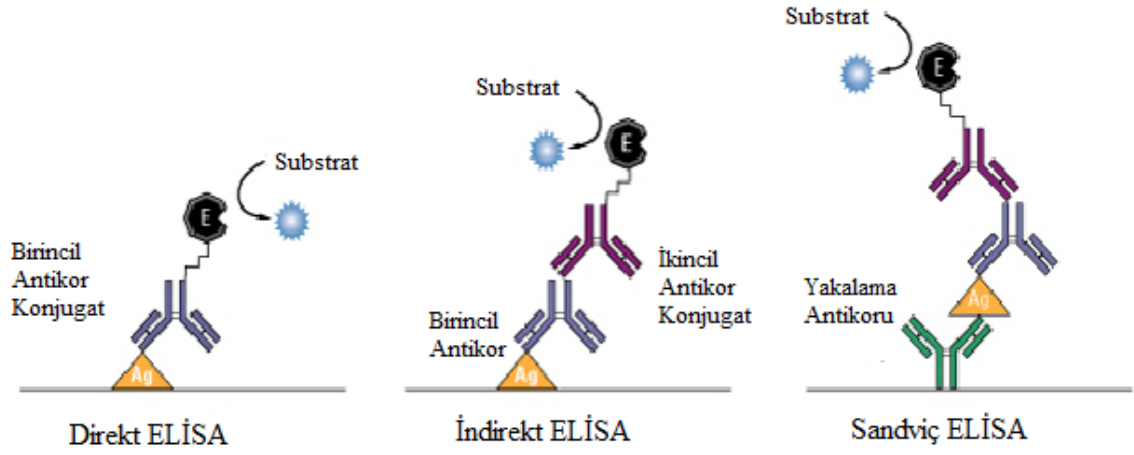
ELİSA Deneyinin en basit uygulaması olan direkt ELİSA'nın basamakları şöyledir:

1. İncelenecek maddenin bulunduğu çözelti plastik, ışık geçirgen, düz zeminli kuyucukların bulunduğu plakaya etiketlenerek konur.
2. Ortamdaki protein bağlanma noktalarını bloklamak için bloklama tamponu kuyucuğa eklenir.
3. Aranılan antijenik yapıdaki maddeye özgün antikör ortama eklenir.
4. Birinci antikörü tanıyan ikincil antikör-HRP (Horse-radish peroksidaz) konjugatı ortama eklenir.
5. Son olarak HRP ile reaksiyona girerek onu görünür hale getiren TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidin) eklenir.
6. Hızlıca spektrofotometrik ölçüm yapan ELİSA okuyucu ile kuyucuklar okunur (Şekil 2.23).

ELİSA deneyinin;

- Direkt,
- İndirekt
- Sandviç
- Yarışmalı, gibi farklı şekilleri olmasına rağmen en sık kullanılanı sandviç ELISA yöntemidir.

ELİSA deneyinin en sık kullanıldığı alan mikrobiyoloji (Viral etkenlerin, toksinlerin tanımlanması vb.) olmakla birlikte antijenik yapılarla çalışılan diğer dallarda da kullanılmaktadır (HLA tiplendirmesi vb.) [91].



Şekil 2. 21. Yaygın Kullanılan ELİSA Deneyleri [92]

ELİSA Yönteminin Oksidatif Hasarın Saptanmasında Kullanımı

Oksidatif olarak hasar görmüş DNA miktarını saptanmasında da ELİSA yöntemi kullanılmaktadır. Yöntem esas itibariyle kanda, plazmada ve idrarda en sık gözlenen oksitlenme ürünü olan 8-OH dG' nin miktar olarak ölçümü prensibine dayanmaktadır. Ancak deney şartları DNA oksitlenme düzeyini etkileyebildiği için yaygın olarak kullanılamamaktadır.

BÖLÜM 3

MATERYAL VE METOD

3.1. Kan Örnekleri

Çalışmada 20-30 yaş arası, sigara ve alkol kullanmayan, radyasyonla çalışmayan gönüllü, sağlıklı erkek bireylerden alınan kan örnekleri kullanıldı. Gönüllülere Bilgilendirilmiş Onam Formları imzalatıldı. Venöz kan örnekleri hem MN hem de Komet deneyleri için Li-Heparinli tüplere alındı. MN yönteminin radyasyon doz-cevap eğrisi deneyleri için 3 gönüllünün, MN-Mirisetin çalışması için 5 gönüllü, Komet deneyleri içinse 3 gönüllüye ait kan örnekleri kullanıldı. Çalışma kapsamında gönüllülerden optimizasyon, mikronukleus doz-cevap eğrisi deneyi ve çalışma deneyleri için farklı zamanlarda kan örnekleri alındı. ELİSA deneyleri için de 5 gönüllünün kan örnekleri kullanıldı. Kan örnekleri EDTA'lı tüplere alındı.

3.2. Işınlama

MN doz-cevap eğrisi için kan örnekleri 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 3, 4 ve 5 Gy dozlarda Co-60 ile ışınladı. Diğer deney protokolları için ışınlama değerleri olarak düşük doz için 0.5 Gy (Kan tablosunun değişmeye başladığı eşik değer), yüksek doz için de 2 Gy (Radyoterapide kullanılan tek seferlik doz) [19] seçildi.

3.3. Mirisetin Uygulama

Deneylerde mirisetin'in DMSO içinde hazırlanmış 100 μ M ve 200 μ M konsantrasyonları kullanıldı (Mirisetin'in molekül ağırlığı 318,24 g/mol'dur.

DeneYlerde 1 molarlık stok çöZelti hazırlanıp kullanıldı). Mirisetin uygulaması ışınlamalardan 30 dk. önce yapıldı.

3.4. DeneYlerde Kullanılan Kimyasallar

MN DeneYi

- RPMI-1640 (Sigma)
- FBS (Fötal Sığır Serumu) (Biological Industries)
- Penisilin Streptomisin (Sigma)
- PHA-Fitohemaglutinin (Biochrome)
- Sitokalazin B (Sigma)
- Metanol (Merck)
- Asetik Asit (Merck)
- 0.075 M KCl ÇöZeltisi
- Formaldehit (Riedel de Haen)
- Fosfat tamponu
- Giemsa (Merck)

Komet DeneYi

- NMPA (Normal Melting Point Agarose)
- LMPA (Low Melting Point Agarose)
- Tris-Baz (Sigma)
- Tris-HCl (Sigma)
- NaCl
- EDTA
- PBS
- NaOH
- KOH
- FPG Enzimi (1/500 dilüsyonda) (Trevigen)

- FPG Tampon Çözeltisi (40 mM Hepes, 0.1 M KCl, 0.5 mM EDTA, 0.2 mg/ml Sığır Serum Albumini)

ELİSA Deneyi

- DNA İzolasyon Kiti (Qiagen)
- 8-OH- dG ELİSA (Trevigen)
- DNaz I (Trevigen)
- Alkalen Fosfataz (Trevigen)

3.5. Deney Planı

Hem Mikronukleus hem de Komet deneyleri için aşağıda belirtilen protokol uygulandı.

1. Kör
2. DMSO
3. 100 µM Mirisetin
4. 200 µM Mirisetin
5. 0.5 Gy radyasyon
6. 2 Gy radyasyon
7. 0.5 Gy radyasyon +100 µM Mirisetin
8. 0.5 Gy radyasyon +200 µM Mirisetin
9. 2 Gy radyasyon +100 µM Mirisetin
10. 2 Gy radyasyon +200 µM Mirisetin

3.6. Mikronukleus

3.6.1. Mikronukleus Kültürü

Venöz kan örnekleri Li-Heparinli tüplere alındıktan sonra dengeye gelebilmeleri için 1 saat oda ısısında bekletildi. Daha sonra steril kabin içinde, steril eppendorf tüplere, her tüpte 1 ml olacak şekilde bölündüler. Radyasyon uygulamasından önce Mirisetin uygulanacak tüplere (7.-10. Gruplar) Mirisetin eklendikten sonra, tüpler 30 dk. oda ısısında bekletildi. Daha sonra bu tüpler sadece radyasyon uygulanacak tüpler (5. ve 6. Grup) ile birlikte Trakya Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Radyasyon Onkoloji

Radyoterapi ünitesinde Co-60 kaynağı (Cirus Teleterapi Cihazı) ile bolus içinde 10x10 cm alanda 80 cm (SSD) mesafeden belirlenen dozlarda ışınlandı. Işınlanan tüpler 1 saat oda ısısında dinlendirildi. Sadece Mirisetin uygulanacak örneklere de (3. ve 4. Grup) 30 dk Mirisetin ve 2. gruba DMSO uygulaması yapıldı ve tüm örnekler eş zamanlı olarak kültüre alındı.

Kültür kaplarının içine herbir örnek için 7.9 ml RPMI 1640, 1 ml fetal sığır serumu, 0.1 ml penisilin-streptomisin karışımı, 0.5 ml (1.2 mg/ml) PHA (Fitohemaglutinin) konuldu. 0.5 ml kan örneği eklendi. Kaplar 37°C'deki CO₂'li inkübatöre konuldu. Kültürün 44. saatinde kültür kaplarının içine 360 µL (Final konsantrasyon 6 µg/ml) Sitokalsin -B eklendi. 68. saatte kültürler sonlandırıldı.

Hücrelerin Elde Edilmesi.

1. Örnekler 15 ml'lik falkon tüplere konulduktan sonra tüpler 8 dk. 800 rpm'de santrifüj edildi.
2. Süpernatantları atıldıktan sonra altta kalan pelletin üzerine 4° C'ye kadar soğutulmuş 0.075M KCl (heparinli) vorteks üzerinde (800-1000 rpm) eklendi.
3. Tüpler 8 dk. 800 rpm'de santrifüj edildi.
4. Süpernatantları atıldıktan sonra altta kalan pelletin üzerine, hücreleri yıkamak amacıyla vorteks üzerinde fiksatif (3 kısım metanol+1 kısım asetik asit) damla damla eklendi.
5. Tüpler 5 dk. 1000 rpm'de santrifüj edildi.
6. Süpernatantları atıldıktan sonra altta kalan pelletin üzerine vorteks üzerinde fiksatif damla damla eklendi.
7. Tüpler 5 dk. 1000 rpm'de santrifüj edildi.
8. Süpernatantları atıldıktan sonra altta kalan pelletin üzerine vorteks üzerinde % 1 formaldehitli fiksatif damla damla eklendi.
9. Tüpler 5 dk. 1000 rpm'de santrifüj edildi.
10. Süpernatantları atıldıktan sonra altta kalan pelletin üzerine fiksatif (formaldehitsiz) eklenerek hücreler -20 °C'ye kaldırıldı.

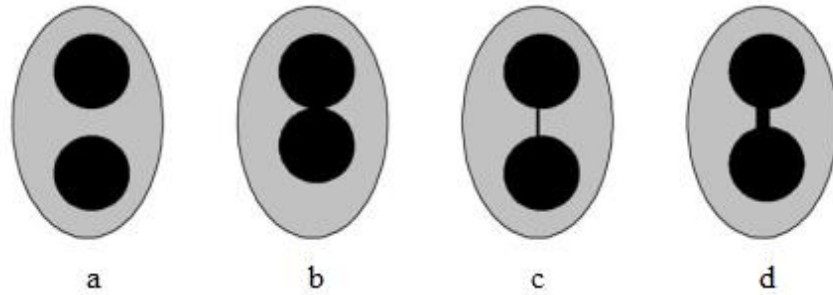
3.6.2. Hücrelerin Boyanması

Standart lamalar alkole batırılıp yakıldıktan sonra yıkanıp temizlendi ve etiketlendi. Lamların üzerine 6-8 damla hücre çözeltisi damlatıldı ve havada kurumaya bırakıldı. Kuruyan lamlarda hücre kalitesi ve sıklığı faz kontrast mikroskopta kontrol edildi. Uygunluğuna karar verilen lamlar boyaya alındı. Fosfat tampon çözeltisi ile % 10'luk Giemsa boyası hazırlandı ve filtre kağıdından geçirildi. Yatay olarak dizilen lamların üzerine 2-3 ml kadar Giemsa boyası konuldu ve lamlar 40 dk. oda ısısında bekletildi. Süre sonunda boyası süzdürülen lamlar şale içinde distile suyla 2 kez yıkandı ve havada kurumaya bırakıldı. Havada kuruyan lamlar ışık mikroskopunda (40x) kalite açısından kontrol edildikten sonra uygunluğuna karar verilen lamlar entellan ile kapatılıp sayıma hazır hale getirildi.

3.6.3. Mikroskopik Değerlendirme

Her bir örnek için 1000-2500 Binokleat (BN) hücre sayıldı. Mikronukleus sayıları kaydedildi ve mikronukleusların binde oranları saptandı. BN değerlendirmesi yapılırken aşağıdaki kriterler kullanıldı.

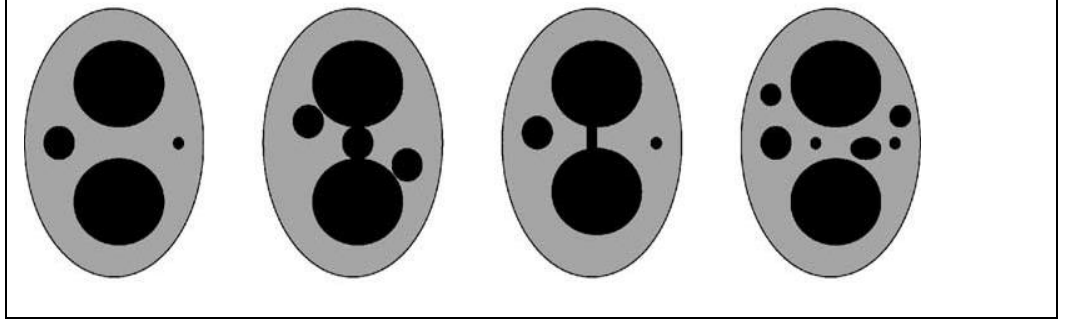
- BN hücrelerde iki nukleus aynı sitoplazmik alan içinde bulunmalıdır (a-d).
- İki çekirdeğin boyutları, boyanma paternleri ve boyanma yoğunlukları aynı olmalıdır (a-d).
- BN hücre içindeki nukleuslar arasında bulunan nukleoplazmik köprü çekirdek çapının 1/4'ünden fazla olmamalıdır (c,d).
- BN içindeki iki nukleus birbirine temas edebilirler ancak ideal olarak birbirlerinin üzerine binmemiş olmalıdır (b).
- BN hücrenin sitoplazmik sınırları komşu hücrelerden açıkça ayırdedilebilmelidir [68].



Şekil 3. 1. Değerlendirmeye Uygun Binukleat Hücreler [68]

MN'ları değerlendirirken de aşağıdaki kriterlere uymalarına dikkat edildi.

- MN'lar yapısal olarak esas nukleusa benzeseler de daha küçüktürler.
- MN'un çapı (Binukleat insan lenfositleri için) esas nukleusun çapının 1/16 ila 1/3'ü arasında değişir.
- MN'lar yuvarlak ya da oval şekillidir.
- MN'lar mikroskopta parlama yapmazlar.
- MN'lar esas çekirdeğe bağlı değildir ya da temas etmezler.
- MN'lar çekirdek ile üst üste gelmez.
- MN'lar çoğunlukla esas çekirdekle aynı yoğunlukta, nadiren daha yoğun boyanırlar [93].



Şekil 3.2. Değerlendirmeye Uygun BN Hücreler ve MN'lar.

Toplam MN sayısını tespit etmek için aşağıdaki formül kullanıldı.

$$(1 \text{ MN'lu Hücre Sayısı} \times 1) + (2 \text{ MN'lu Hücre Sayısı} \times 2) + (3 \text{ MN'lu Hücre Sayısı} \times 3) + (4 \text{ MN'lu Hücre Sayısı} \times 4) + \dots = \text{Toplam MN Sayısı}$$

Binde oranlarını tespit amacıyla da $\frac{\text{Toplam MN Sayısı}}{\text{Sayılan BN Sayısı}} = \frac{x}{1000}$ eşitliği kullanıldı ve binde MN sayıları (x) tespit edildi.

3.6.4. İstatistik Değerlendirme

Doz-Cevap eğrisinde kullanılacak mikronukleus sonuçlarının Poisson dağılımı bir bilgisayar programı aracılığı ile değerlendirildi (Alan Edwards'ın hazırladığı Curve Fitting Program T.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji A.D'dan Yrd. Doç. Dr. Funda S. Pala'dan temin edilmiştir) ve uygunluğu saptanan değerler kullanılarak doz cevap

grafiği oluşturuldu. Diğer değerlendirmeler SPSS programı ile Fisher's Exact Test kullanılarak yapıldı.

3.7. Komet Deneyleri

Radyasyonun yarattığı hasarın DNA boyutunda değerlendirilebilmesi için Komet deneyleri 2 farklı biçimde gerçekleştirildi.

- Alkali Komet deneyi mirisetin ve radyasyonun etkisiyle DNA'da meydana gelen çift ve tek zincir kırıklarının beraber değerlendirilmesi (pH>13) için kullanıldı.
- FPG Komet deneyi, DNA'daki oksidatif hasar düzeyini belirlemek için kullanıldı.

3.7.1.Hücrelerin Hazırlanması

- 10 ml kan heparinli tüplere alındı ve hiç bekletmeden işlemlere başlandı.
- 15 ml'lik falkon tüpe ilk önce Ficoll-Histopaque (5 ml) konuldu. Üzerine kan örnekleri yavaşça 1:1 (5 ml:5 ml-2 tüp) oranında olacak şekilde karıştırmadan konuldu.
- Örnekler 1500 rpm, 8 °C'de 20 dakika santrifüj edildi.
- Buffy coat tabakası steril bir pastör pipet yardımıyla RPMI 1640, % 10 FBS ve % 1 penislin- streptomisinden oluşan medyum içine alındı.
- Hücreler medyum ile 1500 rpm'de 15'er dakika 2 kez yıkandı. (Son hacim 10 ml olacak şekilde).
- 2. yıkama sonunda hücreler medyum içine tek tüpe alındı. +4 °C buzdolabına kaldırıldı.

3.7.2.Hücrelerin Kontrolü

Komet deneyine alınan hücrelerin canlı olması gerektiğinden hücrelerin ne kadarının canlı olduğunu tespit etmek için Tripan Mavisi yöntemi kullanıldı. 10 µl hücre süspansiyonu 2 µl Tripan mavisi (% 0.4) ile karıştırılıp 5 dk. oda ısısında beklendi. Hemasitometreye damlatılıp üzerine lamel kapatıldı ve ışık mikroskopunda (10x) hücreler sayıldı. Hücrelerin yüzde olarak ne kadarının maviye döndüğü saptandı.

3.7.3. Komet Deney Süreci

Komet Deneyleleri planlanırken temel olarak Tice ve Dusinska [84, 94] tarafından önerilen protokol kullanıldı. FPG Komet deneylelerinin uygulamaları da Miklos ve ark.'nın [95] yaptığı, lenfosit ve radyasyon kullanılan protokola göre gerçekleştirildi. Mirisetin uygulama süreleri içinse Duthie ve ark.'nın [96] çalışması örnek alındı.

Deneyin başında hücre izolasyonu devam ederken hücrelerin içine gömüleceği % 0.75'lik LMPA (Low Melting Point Agarose) PBS ile hazırlandı ve 2 ml'lik eppendorf tüpler içinde 40 °C'deki (önceden ısıtılmış) su banyosuna konuldu ve ısılarının 40 °C'ye inmesi için 20-30 dk. beklendi.

- Hücrelerin inkübasyonundan önceki zaman aralığında lamalar su ile yıkandı ve alkolden geçirilip kurulandı. Deneylelerde özel Komet lamaları (Trevigen) kullanıldı. Lamaların her bir kuyucuğuna PBS ile hazırlanmış eriyik haldeki % 1.5'luk normal agarozdan 100'er µl eklendi ve üzerine hızlıca lamel kapatıldı. Agarozun katılması için lamalar en az 15 dk. 4 °C'ye kaldırıldı.
- Mirisetin uygulanan hücreler 30 dk. 37 °C'de inkübe edildikten sonra oda ısısında ışlandı ve ışlanmayı takiben metabolik tüm faaliyetleri özellikle DNA tamirini durdurmak üzere hemen buz üzerine alındı.
- Hücrelerin muamelelerden sonra hasar görüp görmediğini tespit etmek için her örnek Tripan Mavisini ile thoma lamında tekrar incelendi.
- Agaroz kaplı lamalar buzdolabından çıkartılarak üzerlerindeki lameller dikkatlice çıkarıldı ve her deney serisi için 2 lam etiketlendi (Alkali Komet, FPG Komet)
- Hazırlanmış hücre süspansiyonlarından 60 µl aynı etiketli tüplere konulup üzerine 390 µl LMPA eklendi ve pipetaj yapılarak karıştırıldı. Bu karışımdan 150'şer µl, pipetle hızlıca aynı etiketli agaroz kaplı lamaların üzerine konuldu ve üzeri parafilmle kapatıldı. Lamalar 2. katman agarozun katılması için en az 15 dk. 4 °C'ye kaldırıldı.
- Lamalar buzdolabından çıkarıldıktan sonra üzerlerindeki parafilmleler dikkatlice kaldırıldı.
- Lamalar dikkatlice yatay olarak bir tepsiye dizildi ve üzerlerine, nükleus materyali dışındaki hücrelerin hücre bileşenlerinin uzaklaştırılması için 4 °C'de soğutulmuş lizis çözeltisi eklendi. Lam tepsi 4 °C'ye karanlık bir ortama kaldırıldı (Lizis solusyonunda bekletme süresi 1 saat ile 4 saat arasında değişmektedir. 24 saate kadar DNA hasarı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemiştir [97]).

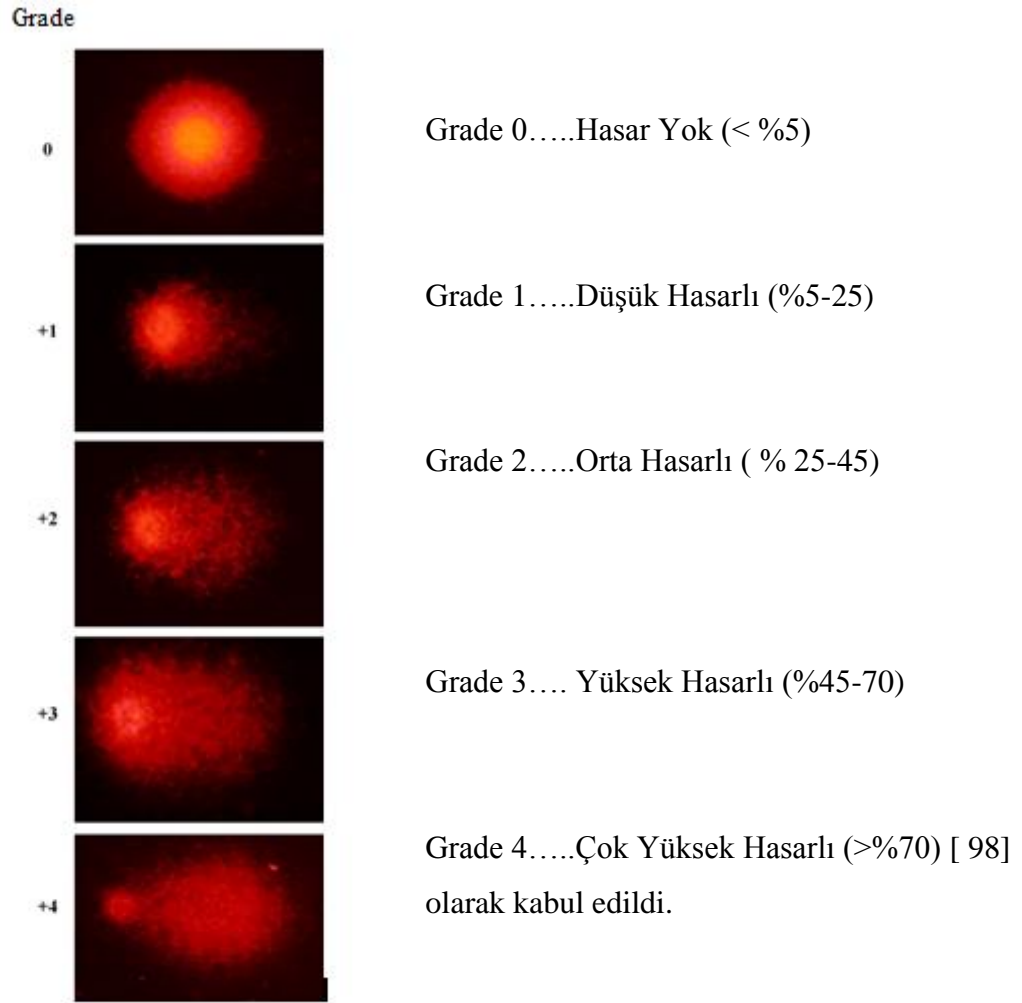
Lizis basamağından sonra Alkali Komet için uygulanan süreç ile FPG süreci bazı farklılıklar göstermektedir.

- Alkali Komete; Lizis kabından lamalar dikkatlice çıkarıldıktan sonra dikkatlice süzdürüldü ve 3 kez 5'er dk. nötralizasyon tamponu ile yıkandı.
- Son yıkamadan sonra iyice süzdürülen lamalar elektroforez tankına yan yana anoda yakın olacak şekilde dizildi ve sabitlendi. Tankta pH'ı ayarlanmış elektroforez tamponu lamaların üzerini en az 0.2 cm örtecek şekilde yavaşça konuldu ve tankın kapağı kapatıldı.
- DNA'nın çözünmesi için lamalar tankın içinde 4 °C'ye (karanlık) kaldırıldı. Lamalar elektroforez yapmadan elektroforez tamponunun içinde 1 saat bekletildi.
- 1 saatin sonunda sonunda güç kaynağı açıldı ve akım 300 mA, Voltaj 24 V (1 V/cm), süre 25 dk.'ya ayarlandı. Elektroforez başlatıldı. Süresi sonunda lamalar tankın içinden dikkatlice alınarak tekrar nötralizasyon tamponu ile 3 kez 5'er dk. yıkandı ve süzdürüldü. Son olarak üzerlerine Etidium bromür boyası konarak üzerleri lam ile kapatıldı. Daha sonra görüntülenmek üzere 4 °C'ye kaldırıldı.
- FPG Komete ise lizis basamağından sonra lamalar FPG tampon çözeltisi ile 3 kez 10'ar dk. yıkandı.
- Yıkamayı takiben FPG serisindeki her lamanın üzerine 1/500 oranında FPG buffer ile sulandırılmış FPG enzimi konuldu ve üzerleri parafilmle kapatılarak 37 °C'de 30 dk. inkübe edildiler. İnkübasyonun ardından iyice süzdürülen lamalar elektroforez tankına yerleştirilerek Alkali Komet'teki gibi süreç devam ettirildi.

3.7.4. Görüntüleme

- Floresan mikroskopta 10x objektif ve TRITC filtre ile görüntüler kontrol edildikten sonra SPOT RT programı ile bilgisayara kaydedildi.
- Her preparatta, bilgisayara kaydedilen görüntülerde, 100 hücre görsel olarak skorlandı ve kaydedildi. Görsel skorlama için Şekil 3.3'de gösterilen skorlama diyagramı kullanıldı.

- Bu diyagrama göre;



Şekil. 3.3. Komet Görsel Skorlama Diyagramı [99]

Toplam skorun belirlenmesi için de Collins tarafından önerilen hesaplama yöntemi kullanıldı.

- Grade 0.....Sayılan Hücre x 0
- Grade 1.....Sayılan Hücre x 1
- Grade 2.....Sayılan Hücre x 2
- Grade 3.....Sayılan Hücre x 3
- Grade 4.....Sayılan Hücre x 4

Toplam

Derecelendirmede Grade 4, bir hücreyi baz alarak toplam 100 hücre için 400 hasar ünitesi üzerinden toplam skor elde edildi [99].

3.7.5. İstatistik Değerlendirme

Komet Deneyinin istatistik değerlendirmeleri SPSS programı ile yapılmıştır. Friedman Testi, Post Hoc Analizi ve Eşleştirilmiş t Testi kullanılmıştır.

3.8. ELİSA Deneyi

Radyasyon etkisiyle oluşan oksitlenmiş DNA ürünlerini tespit etmek amacıyla da 8-OH-dG ELİSA yöntemi kullanılmıştır.

MN ve Komet deneylerinde kullanılan protokol takip edilmiştir. Mirisetin ve radyasyon uygulamalarını takiben kan örneklerinden DNA izolasyonları yapılmıştır. İzolasyonları takiben tüm DNA örneklerinin miktar tayinleri Nanodrop cihazı ile gerçekleştirilmiştir. ELİSA kit protokoluna göre her kuyucuğa konacak DNA miktarı hesaplandıktan sonra, DNA örneklerinin enzim muameleleri (DNAz 1 ve Alkalen Fosfataz) yapılmış ve ELİSA protokoluna geçilmiştir. ELİSA işlemleri sonunda örnekler 450 nm'de ELİSA okuyucu cihaz ile değerlendirilmiştir.

BÖLÜM 4

BULGULAR

4.1. MİKRONUKLEUS ANALİZİ SONUÇLARI

4.1.1. Doz Cevap Eğrisi

Mirisetin'in radyoprotektif etkisini ve olası klastojenik etkisini belirlemek amacıyla MN analizi yöntemi kullanıldı. Bu amaçla önce absorblanan dozlarda olası düşüşü değerlendirebilmek için doz cevap eğrisi oluşturuldu. 3 ayrı gönüllüden alınan kan örnekleri 0'la 5 Gy arasında 10 farklı dozda Co-60 kaynağı ile ışımlandı. 3 gönüllüye ait mikronukleus dağılımları Tablo 4.1, 4.2, 4.3.'de verildi.

Gönüllülere ait kan örneklerinde MN sıklıkları ve dağılımları istatistiksel olarak uyumlu bulunduğundan 3 veri birleştirildi (Tablo 4.4).

Birleştirilmiş veri kullanılarak laboratuvarımıza ait Co-60 doz cevap eğrisi elde edildi.

Tablo 4.1. Gönüllü C.C.'ye ait MN Dağılımı

	Toplam BN	Toplam MN	MN/BN oranı *	MN Sayıları*						
				0	1	2	3	4	5	6+
0 Gy	2258	28	12	2230	24	2	0	0	0	0
0.1 Gy	2591	57	22	2541	44	5	1	0	0	0
0.25 Gy	2500	75	30	2438	53	5	4	0	0	0
0.5 Gy	2554	42	16	2514	38	2	0	0	0	0
0.75 Gy	2524	169	67	2377	125	22	0	0	0	0
1 Gy	2550	294	115	2293	224	29	4	0	0	0
2 Gy	2585	806	311	1911	523	108	36	5	1	1
3 Gy	1795	692	385	1289	369	101	27	7	0	2
4 Gy	2523	1770	701.5	922	945	466	135	38	12	34(T) 2(6) 2(7),1(8)
5 Gy	2517	2928	1163	919	757	506	219	89	19	51(T) 6(6),1(7)1(8)

*1000 BN hücrede.

Tablo 4.2. Gönüllü S.K.'ye ait MN Dağılımı

	Toplam BN	Toplam MN	MN/BN oranı *	MN Sayıları*						
				0	1	2	3	4	5	6+
0 Gy	2500	21	8.4	2479	21	0	0	0	0	0
0.1 Gy	2460	34	13.82	2427	32	1	0	0	0	0
0.25 Gy	2500	50	20	2454	42	4	0	0	0	0
0.5 Gy	2500	85	34	2420	75	5	0	0	0	0
0.75 Gy	2500	155	62	2356	135	7	2	0	0	0
1 Gy	2227	221	99.23	2034	167	24	2	0	0	0
2 Gy	2500	611	244.4	2007	392	84	17	0	0	0
3 Gy	2500	1097	438.8	1684	585	187	39	4	1	0
4 Gy	1600	1203	751	1310	173	84	28	5	0	0
Gy	2135	2599	1217	696	744	462	189	69	12	19 2(6)+1(7)

*1000 BN hücrede.

Tablo 4.3. Gönüllü S.D.'ye ait MN Dağılımı

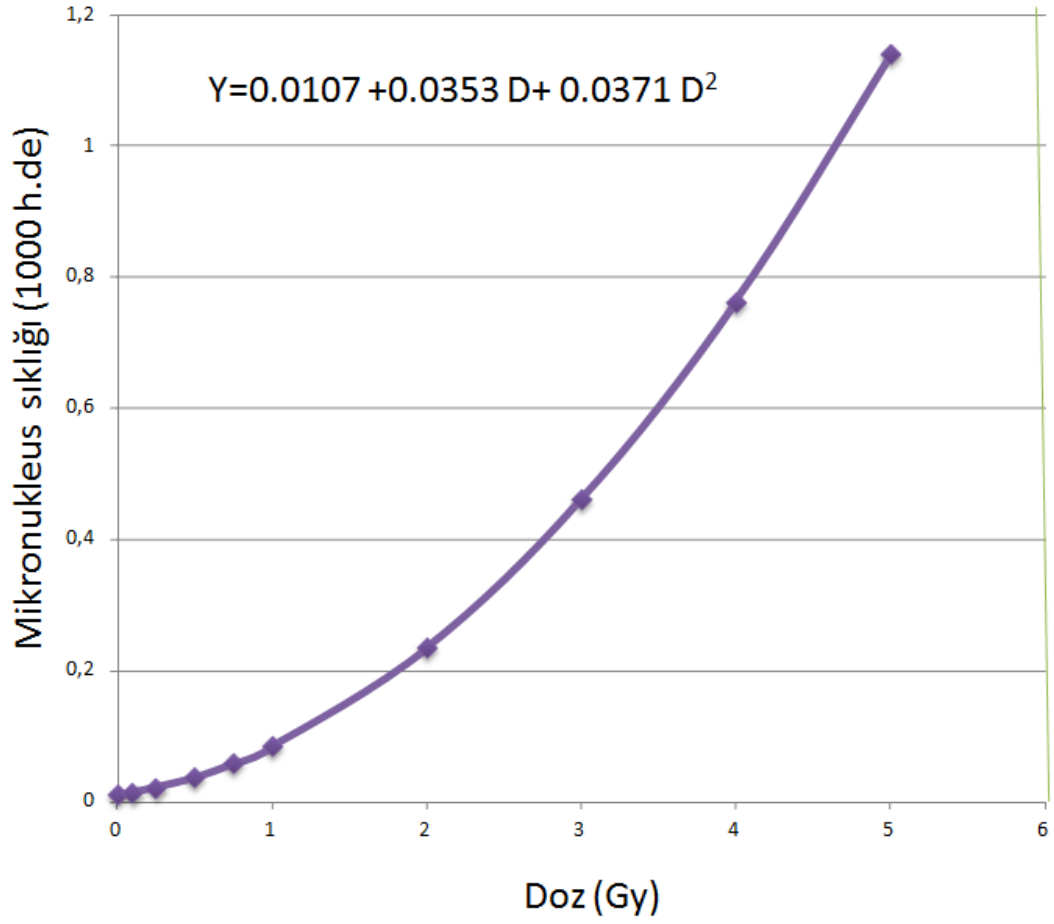
	Toplam BN	Toplam MN	MN/BN oranı *	MN Sayıları*						
				0	1	2	3	4	5	6+
0 Gy	2500	17	6.8	2483	17	0	0	0	0	0
0.1 Gy	2000	22	11	1978	22	0	0	0	0	0
0.25 Gy	1500	29	19	1473	25	2	0	0	0	0
0.5 Gy	2000	63	32	1941	57	3	0	0	0	0
0.75 Gy	2000	127	64	1882	110	7	1	0	0	0
1 Gy	952	95	100	881	55	9	6	1	0	0
2 Gy	1561	310	198	1355	135	44	21	5	1	0
3 Gy	2500	1100	440	1681	590	190	30	6	2	1
4 Gy	1000	676	676	570	273	100	37	12	5	19(T) 2(6), 1(7),
5 Gy	1005	995	991	411	360	142	46	29	11	42(T) 3(6), 1(7),1(8), 1(9)

*1000 BN hücrede.

Tablo 4.4. Birleştirilmiş MN dağılımı

	Toplam BN	Toplam MN	MN/BN oranı*	MN Sayıları*									
				0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0 Gy	7258	66	9.1	7194	62	2	0	0	0	0	0	0	0
0.1 Gy	7051	113	15.6	6946	98	6	1	0	0	0	0	0	0
0.25 Gy	6500	154	24	6365	120	11	4	0	0	0	0	0	0
0.5 Gy	5974	194	32.5	5796	166	11	2	0	0	0	0	0	0
0.75 Gy	7033	448	63.8	6615	370	36	2	0	0	0	0	0	0
1 Gy	5729	610	106.5	5208	446	62	12	1	0	0	0	0	0
2 Gy	5108	1128	220.8	4234	674	153	41	5	1	0	0	0	0
3 Gy	6795	2889	425.2	4654	1544	478	96	17	3	3	0	0	0
4 Gy	5123	3649	712.2	2802	1391	650	200	55	17	4	3	1	0
5 Gy	5897	7133	1206.2	2026	1861	1110	454	187	42	11	3	2	1

*1000 BN hücrede.



Şekil 4.1. Co-60 Doz Cevap Eğrisi

Tablo 4.5. MPOL programı yardımıyla elde edilen doz cevap eğrisi çıktıları

INPUT DATA	DOSE	CELLS	ABERRATIONS	VAR/MEAN
	.000	7258	66	1.050
	.100	7051	113	1.140
	.250	6500	154	1.280
	.500	5974	194	1.140
	.750	7033	448	1.120
	1.000	5729	610	1.240
	2.000	5108	1128	1.340
	3.000	6795	2889	1.230
	4.000	5123	3649	1.330
	5.000	5897	7133	1.180

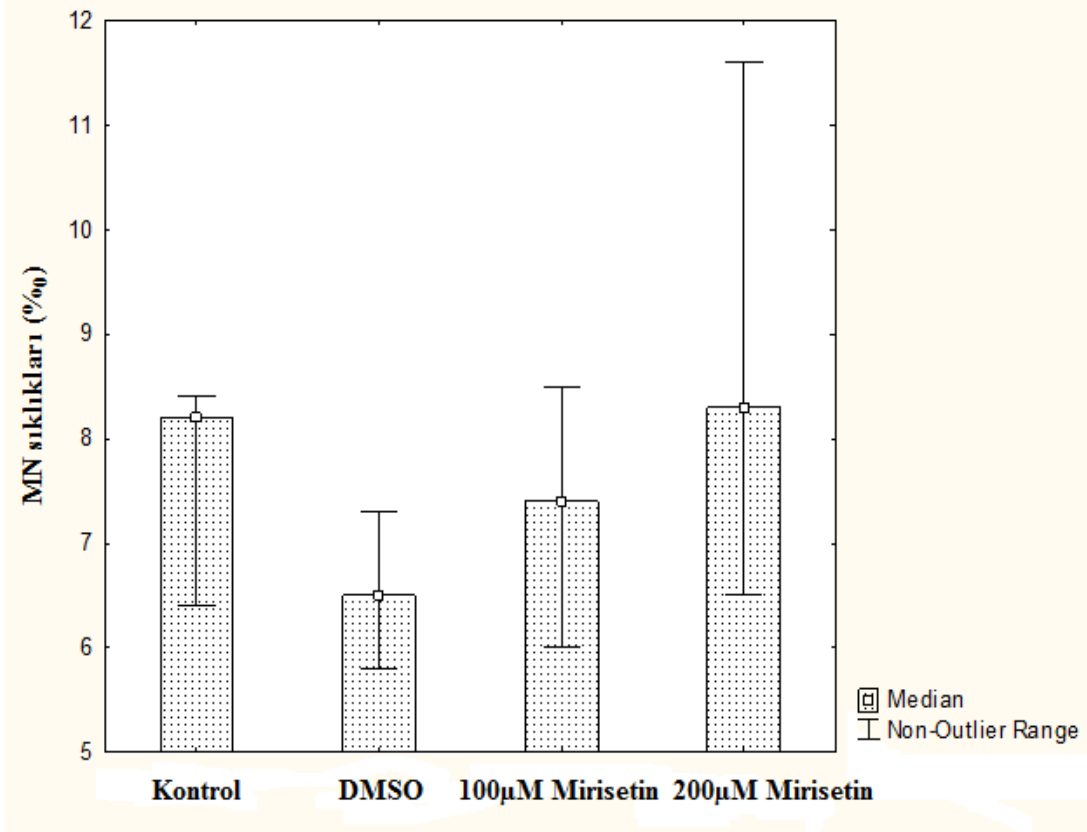
4.1.2. Mirisetin'in Absorplanan Radyasyon Dozu Üzerine Etkisi

Mirisetin'in absorplanan doz üzerine etkisi 5 ayrı gönüllüye ait kan örneğinde araştırıldı. Kontrol değerlerini belirlemek amacıyla, gönüllülerin doğal MN sıklıkları tespit edildi. Mirisetin'in 2 konsantrasyonu ve çözücü olarak kullanılan DMSO (Dimetil Sülfoksit) uygulanmış kan örneklerine ait MN sıklıkları, doğal sıklıkları ile karşılaştırıldı. Sonuçlar Tablo 4.6 ve Şekil 4.2'de verildi. Friedman testine göre 5 gönüllüye ait doğal MN, DMSO, 100 µM ve 200 µM Mirisetin sonuçları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmedi (p=0.077).

Tablo 4.6. Gönüllülerin Kontrol, DMSO, 100 µM ve 200 µM Mirisetin Uygulaması ile Gözlenen MN Sıklıkları

Uygulama Gönüllü	KONTROL*	DMSO*	100 µM Mirisetin*	200 µM Mirisetin*
C.C	12	10.3	12.3	11.6
S.D.	6.8	6.3	7.4	6.5
O.K.	6.4	5.8	6.8	8.3
B.A	8.4	6.5	6.0	7.2
Y.T	8.2	7.3	8.5	9.5
Ortalama±SD Medyan (25-75 persantil)	8.4±2.2 8.2 (6.6-10.2)	7.2±1.8 6.5 (6.1-8.8)	8.2±2.5 7.4 (6.4-10.4)	8.6±2.0 8.3 (6.9-10.6)
p	0.077			

*1000 Binukleat Hücrede MN sayısı



Şekil 4.2. Gönüllülerin Kontrol, DMSO, 100 µM ve 200 µM Mirisetin, Uygulaması ile Gözlenen MN Sıklıkları

Mirisetin'in radyoprotektif etkisi 2 ayrı dozda ve 2 konsantrasyonda araştırıldı. Sonuçlar Tablo 4.7, Tablo 4.8, Tablo 4.9 ve Tablo 4.10'da verildi. 0.5 Gy'lik radyasyon dozunda MN sıklığı 1000 Binukleat hücrede 32.5 iken bu değer 100 µM Mirisetin varlığında ortalama 25.4 ± 1.6 , 200 µM Mirisetin varlığında ise 18.5 ± 1.3 olarak gözlemlendi. 2 Gy de ise MN sıklığı 1000 hücrede 220.8 iken 100 µM Mirisetin varlığında 167 ± 3.8 'e, 200 µM Mirisetin varlığında ise 133.9 ± 3.4 'e düştü.

Tablo 4.7. 0.5 Gy+ 100 µM Mirisetin'e ait MN Dağılımı

	Toplam BN	Toplam MN	MN/BN oranı *	MN Dağılımı				
				0	1	2	3	4
0.5 Gy	5974	194	32.5	5796	166	11	2	0
C.C	1530	38	24.5	1497	28	5	0	0
S.D.	2000	52	26.0	1949	50	1	0	0
O.K.	2000	47	23.5	1957	39	4	0	0
B.A	2000	52	26.0	1953	45	3	1	0
Y.T	3067	80	26.1	2998	61	6	1	1

*1000 hücrede

Tablo 4.8. 0.5 Gy+ 200 µM Mirisetin'e ait MN Dağılımı

	Toplam BN	Toplam MN	MN/BN oranı *	MN Dağılımı			
				0	1	2	3
0.5 Gy	5974	194	32.5	5796	166	11	2
C.C	1901	38	19.9	1866	32	3	0
S.D.	2197	39	17.8	2160	35	2	0
O.K.	2500	45	8.0	2456	43	1	0
B.A	2500	46	18.4	2458	38	4	0
Y.T	2193	42	19.2	2152	40	1	0

*1000 hücrede

Tablo 4.9. 2 Gy+100 µM Mirisetin'e ait MN Dağılımı

	Toplam BN	Toplam MN	MN/BN oranı*	MN Dağılımı					
				0	1	2	3	4	5
2 Gy	5108	1128	220.8	4234	674	153	41	5	1
C.C	2029	333	164.1	1755	229	34	8	3	0
S.D.	1748	284	162.5	1508	184	44	12	0	0
O.K.	2500	426	170.4	2142	300	50	6	2	0
B.A	2759	493	178.7	2350	335	132	18	8	0
Y.T	2500	391	156.4	2177	267	45	10	1	0

* 1000 BN hücrede

Tablo 4.10. 2 Gy+200 µM Mirisetin'e ait MN Dağılımı

	Toplam BN	Toplam MN	MN/BN oranı*	MN Dağılımı					
				0	1	2	3	4	5
2 Gy	5108	1128	220.8	4234	674	153	41	5	1
C.C	1112	143	128.6	969	107	15	2	0	0
S.D.	2000	261	130.1	1786	177	27	10	0	0
O.K.	2500	340	136	2214	239	41	5	1	0
B.A	2839	397	139.8	2503	281	50	4	1	0
Y.T	2000	258	129	1782	186	25	6	1	0

*1000 BN hücrede

Her doz ve konsantrasyon için MN sıklıklarındaki azalma yüzdeleri hesaplandı. Sonuçlar Tablo 4.11’de verildi. 0.5 Gy’de 100 µM Mirisetin için %22.8, 200 µM Mirisetin için ise % 43.1 azalma görüldü. Bu değerler 2 Gy’de 100 µM Mirisetin için % 24.4, 200 µM Mirisetin için ise % 40.1 olarak bulundu.

0,5 Gy radyasyon uygulanan örneklerde 100 µM ve 200 µM Mirisetin uygulamasının MN sıklığı üzerine etkileri Fisher’s Exact test ile karşılaştırıldığında her iki dozun da MN sıklıklarını istatistiksel olarak anlamlı bir biçimde düşürdüğü gözlemlendi (p=0,001).

2 Gy radyasyon uygulanan örneklerde de 100µM ve 200 µM Mirisetin uygulamasında her iki dozun da MN sıklıklarını istatistiksel olarak anlamlı bir biçimde düşürdüğü gözlemlendi (p<0,001).

Tablo 4.11. Mikronukleus Sıklıklarında Azalma Yüzdeleri

	Sayılan Hücre	Mikronukleus	MN/BNMN*	Azalma (%)
0.5 Gy	5974	194	32.5±2.3	
100µM Mirisetin	10597	269	25.4±1.6	22.8
200µM Mirisetin	11291	210	18.5 ±1.3	43.1
2 Gy	5108	1128	220.8±6.6	
100µM Mirisetin	11536	1927	167.0±3.8	24.4
200µM Mirisetin	10451	1399	133.9±3.4	40.1

* 1000 BN hücrede

Elde edilen doz cevap eğrisi kullanılarak, Mirisetin varlığında absorblanan doz değerleri hesaplandı. Sonuçlar Tablo 4.12’de verildi. 0.5 Gy için 100 ve 200 µM Mirisetin varlığında % 38 ve % 64 azalma görülürken bu değerler 2 Gy’de % 26.2 ve % 36.1 oldu. 200 µM Mirisetin uygulanması düşük dozda % 52 daha etkili olurken 2 Gy’de konsantrasyonlar arasındaki fark % 13.5’de kaldı.

Tablo 4.12. Absorblanan Dozda Azalma Yüzdeleri

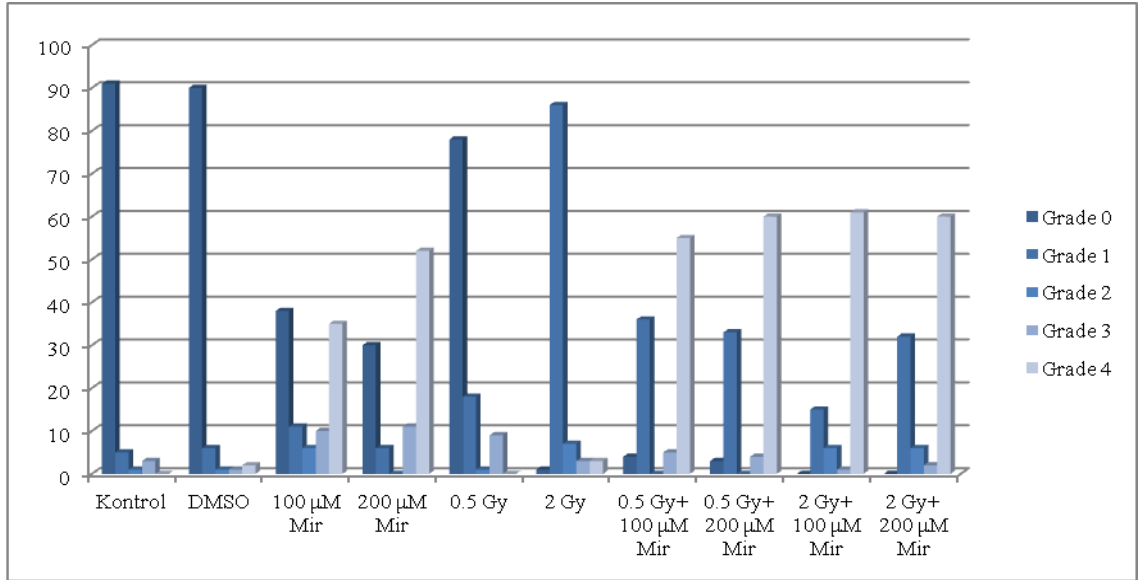
		Absorplanan Doz(Gy)	Fark (%)
0.5 Gy	100 µM Mirisetin	0.31	38
	200 µM Mirisetin	0.18	64
	Fark(%)	52.0	
2 Gy	100 µM Mirisetin	1.63	26.2
	200 µM Mirisetin	1.40	36.1
	Fark(%)	13.5	

4.2. KOMET ANALİZİ SONUÇLARI

Mirisetin'in olası antioksidan dolayısıyla radyoprotektif etkisini değerlendirmek için ayrıca 3 gönüllüye ait kan örnekleri ile Komet ve FPG Komet deneyleri yapıldı. 3 gönüllüye ait Komet sayım sonuçları Tablo 4.13 - Tablo 4.18'de ve Şekil 4.3- Şekil 4.8'de verildi

Tablo 4.13. Gönüllü S.D.'ye ait Alkali Komet Sonuçları

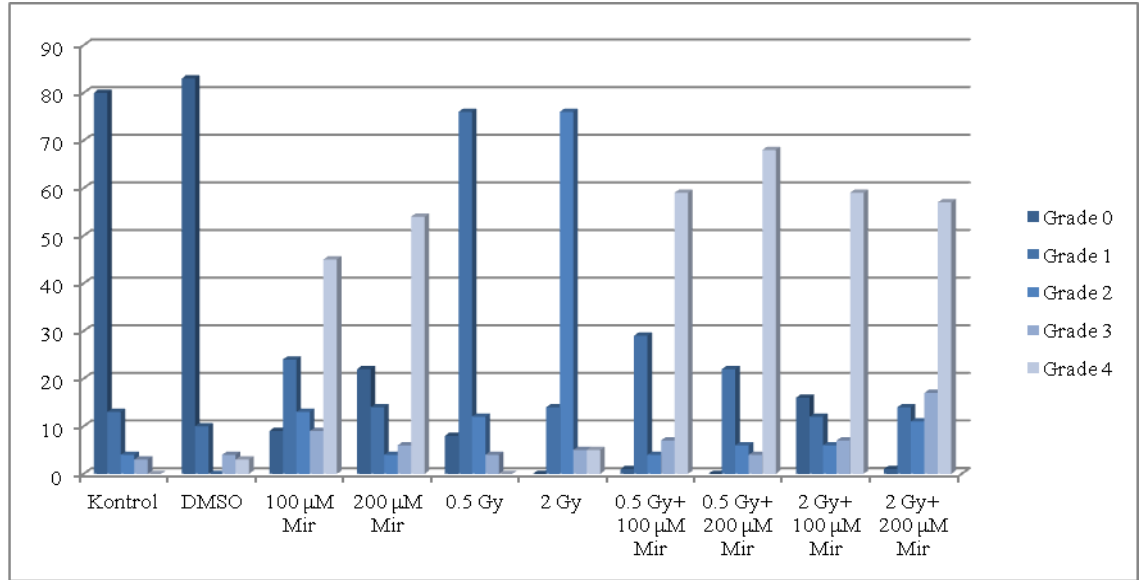
Sayılan Doz	Toplam Sayılan Hücre	Grade 0	Grade 1	Grade 2	Grade 3	Grade 4	Hasar Skoru
Kontrol	100	91	5	1	3	0	16
DMSO	100	90	6	1	1	2	19
100 µM	100	38	11	6	10	35	193
200 µM	100	30	6	0	11	52	247
0.5 Gy	100	78	18	1	9	0	47
2 Gy	100	1	86	7	3	3	121
0.5 Gy +100 µM	100	4	36	0	5	55	271
0.5 Gy +200 µM	100	3	33	0	4	60	285
2 Gy +100 µM	100	0	15	6	1	61	274
2 Gy +200 µM	100	0	32	6	2	60	290



Şekil 4. 3. Gönüllü S.D.'ye ait Alkali Komet Sonuçları

Tablo 4.14. Gönüllü S.D.'ye ait FPG Komet Sonuçları

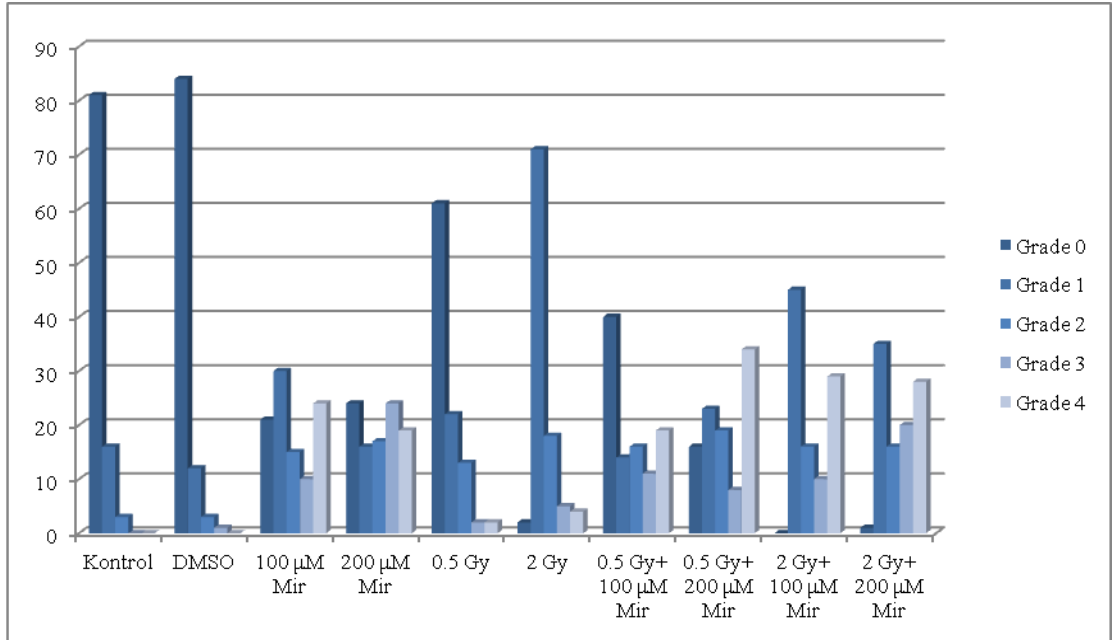
Sayılan Doz	Toplam Sayılan Hücre	Grade 0	Grade 1	Grade 2	Grade 3	Grade 4	Hasar Skoru
Kontrol	100	80	13	4	3	0	30
DMSO	100	83	10	0	4	3	34
100 µM	100	9	24	13	9	45	257
200 µM	100	22	14	4	6	54	256
0.5 Gy	100	8	76	12	4	0	112
2 Gy	100	0	14	76	5	5	201
0.5 Gy +100 µM	100	1	29	4	7	59	294
0.5 Gy +200 µM	100	0	22	6	4	68	298
2 Gy +100 µM	100	16	12	6	7	59	281
2 Gy +200 µM	100	1	14	11	17	57	315



Şekil 4.4. Gönüllü S.D.'ye ait FPG Komet Sonuçları

Tablo 4.15. Gönüllü A.H.'ya ait Alkali Komet Sonuçları

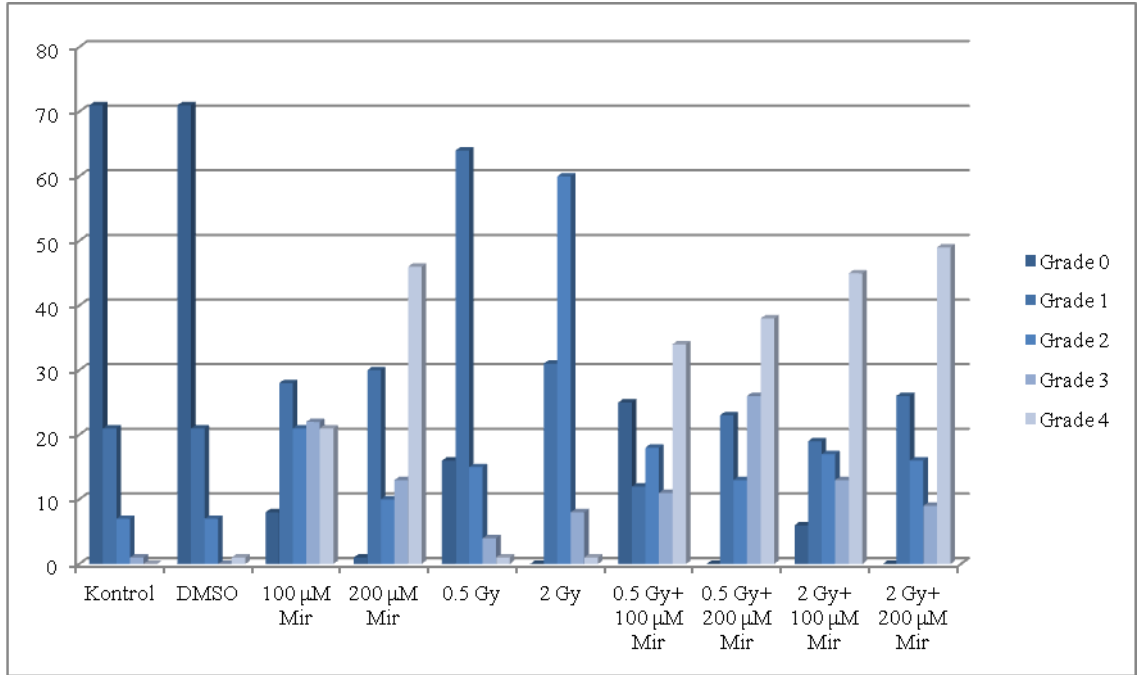
Sayılan Doz	Toplam Sayılan Hücre	Grade 0	Grade 1	Grade 2	Grade 3	Grade 4	Hasar Skoru
Kontrol	100	81	16	3	0	0	22
DMSO	100	84	12	3	1	0	21
100 µM	100	21	30	15	10	24	186
200 µM	100	24	16	17	24	19	198
0.5 Gy	100	61	22	13	2	2	62
2 Gy	100	2	71	18	5	4	130
0.5 Gy +100 µM	100	40	14	16	11	19	155
0.5 Gy +200 µM	100	16	23	19	8	34	221
2 Gy +100 µM	100	0	45	16	10	29	225
2 Gy +200 µM	100	1	35	16	20	28	239



Şekil 4.5. Gönüllü A.H.'ya ait Alkali Komet Sonuçları

Tablo 4.16. Gönüllü A.H.'ya ait FPG Komet Sonuçları

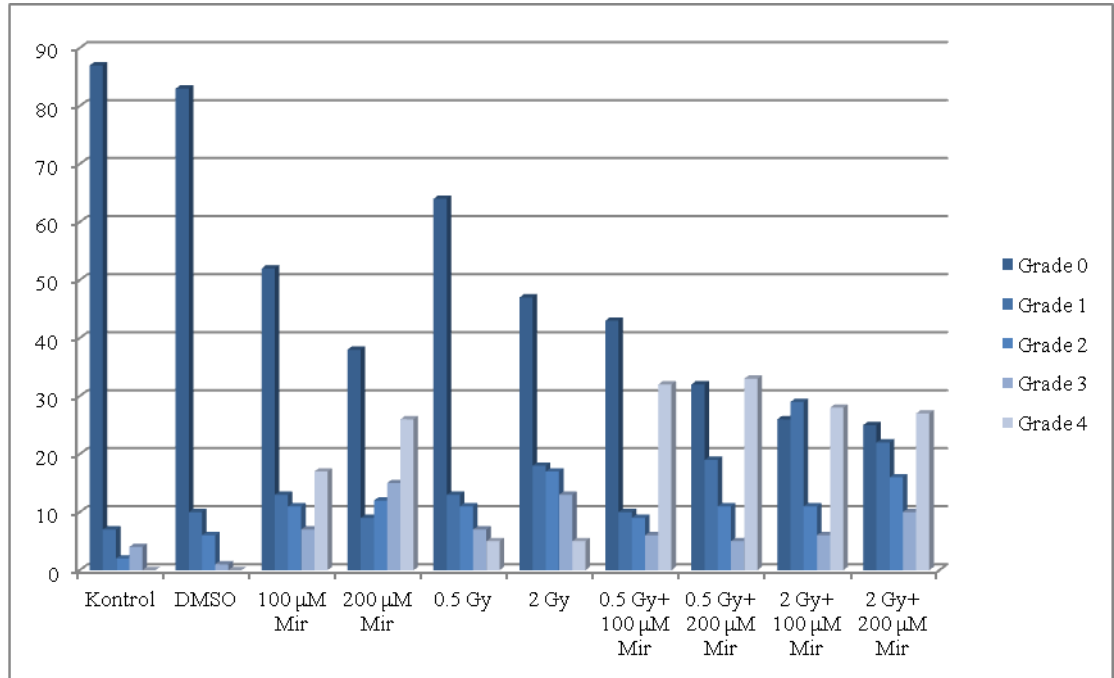
Sayılan Doz	Toplam Sayılan Hücre	Grade 0	Grade 1	Grade 2	Grade 3	Grade 4	Hasar Skoru
Kontrol	100	71	21	7	1	0	38
DMSO	100	71	21	7	0	1	39
100 µM	100	8	28	21	22	21	220
200 µM	100	1	30	10	13	46	253
0.5 Gy	100	16	64	15	4	1	110
2 Gy	100	0	31	60	8	1	199
0.5 Gy +100 µM	100	25	12	18	11	34	217
0.5 Gy +200 µM	100	0	23	13	26	38	279
2 Gy +100 µM	100	6	19	17	13	45	272
2 Gy +200 µM	100	0	26	16	9	49	281



Şekil 4.6. Gönüllü A.H.'ya ait FPG Komet Sonuçları

Tablo 4.17. Gönüllü O.B.'ye ait Alkali Komet Sonuçları

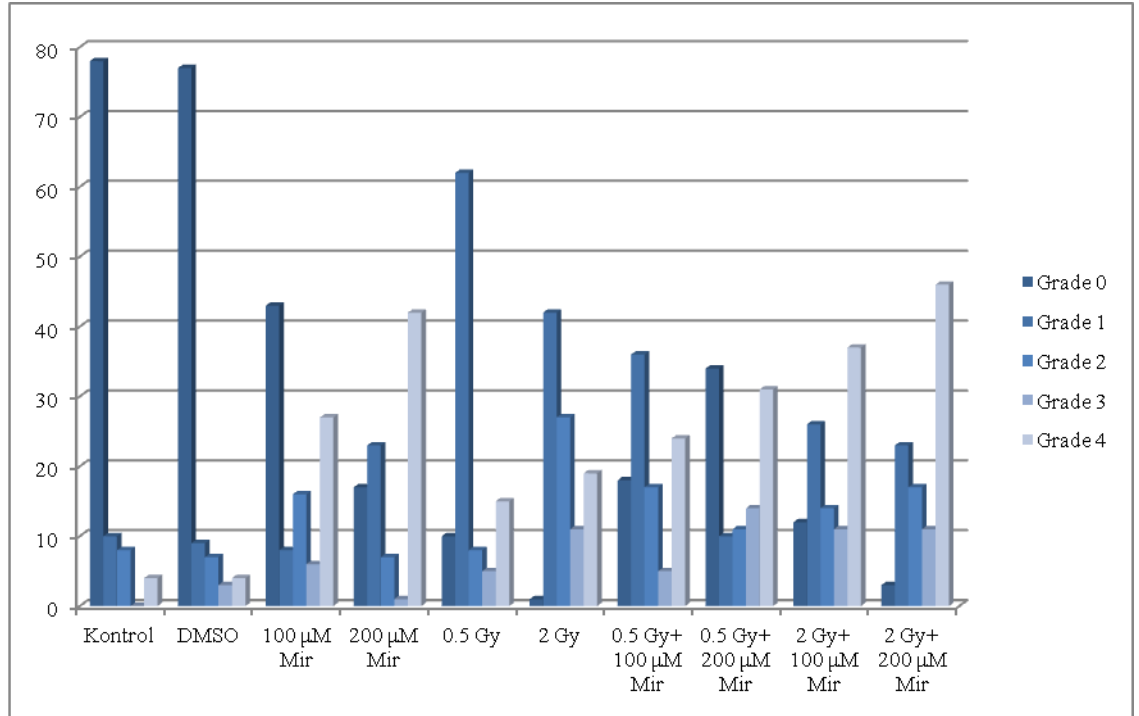
Sayılan Doz	Toplam Sayılan Hücre	Grade 0	Grade 1	Grade 2	Grade 3	Grade 4	Hasar Skoru
Kontrol	100	87	7	2	4	0	23
DMSO	100	83	10	6	1	0	25
100 µM	100	52	13	11	7	17	124
200 µM	100	38	9	12	15	26	182
0.5 Gy	100	64	13	11	7	5	76
2 Gy	100	47	18	17	13	5	111
0.5 Gy +100 µM	100	43	10	9	6	32	174
0.5 Gy +200 µM	100	32	19	11	5	33	188
2 Gy +100 µM	100	26	29	11	6	28	175
2 Gy +200 µM	100	25	22	16	10	27	192



Şekil 4.7. Gönüllü O.B.'ye Ait Alkali Komet Sonuçları

Tablo 4.18. Gönüllü O.B.'ye ait FPG Komet Sonuçları

Sayılan Doz	Toplam Sayılan Hücre	Grade 0	Grade 1	Grade 2	Grade 3	Grade 4	Hasar Skoru
Kontrol	100	78	10	8	0	4	42
DMSO	100	77	9	7	3	4	48
100 µM	100	43	8	16	6	27	166
200 µM	100	17	23	7	1	42	238
0.5 Gy	100	10	62	8	5	15	153
2 Gy	100	1	42	27	11	19	205
0.5 Gy +100 µM	100	18	36	17	5	24	181
0.5 Gy +200 µM	100	34	10	11	14	31	198
2 Gy +100 µM	100	12	26	14	11	37	235
2 Gy +200 µM	100	3	23	17	11	46	274



Şekil. 4.8. Gönüllü O.B.'ye ait FPG Komet Sonuçları

Tablo 4.19. Gönüllü S.D.'ye ait Komet Skorları

	Kontrol	DMSO	100 µM	200 µM	0.5 Gy	2 Gy	0.5 Gy+ 100 µM	0.5 Gy+ 200 µM	2 Gy+ 100 µM	2 Gy+ 200 µM
Alkali	16	19	193	247	47	121	271	285	274	290
FPG	30	34	257	256	112	201	294	298	281	315

Tablo 4.20. Gönüllü A.H.'ya ait Komet Skorları

	Kontrol	DMSO	100 µM	200 µM	0.5 Gy	2 Gy	0.5 Gy+ 100 µM	0.5 Gy+ 200 µM	2 Gy+ 100 µM	2 Gy+ 200 µM
Alkali	22	21	186	198	62	130	155	221	225	239
FPG	38	39	220	253	110	199	217	279	272	281

Tablo 4.21. Gönüllü O.B.'a ait Komet Skorları

	Kontrol	DMSO	100 µM	200 µM	0.5 Gy	2 Gy	0.5 Gy+ 100 µM	0.5 Gy+ 200 µM	2 Gy+ 100 µM	2 Gy+ 200 µM
Alkali	23	25	124	182	76	111	174	188	175	192
FPG	42	48	166	238	153	205	181	198	235	274

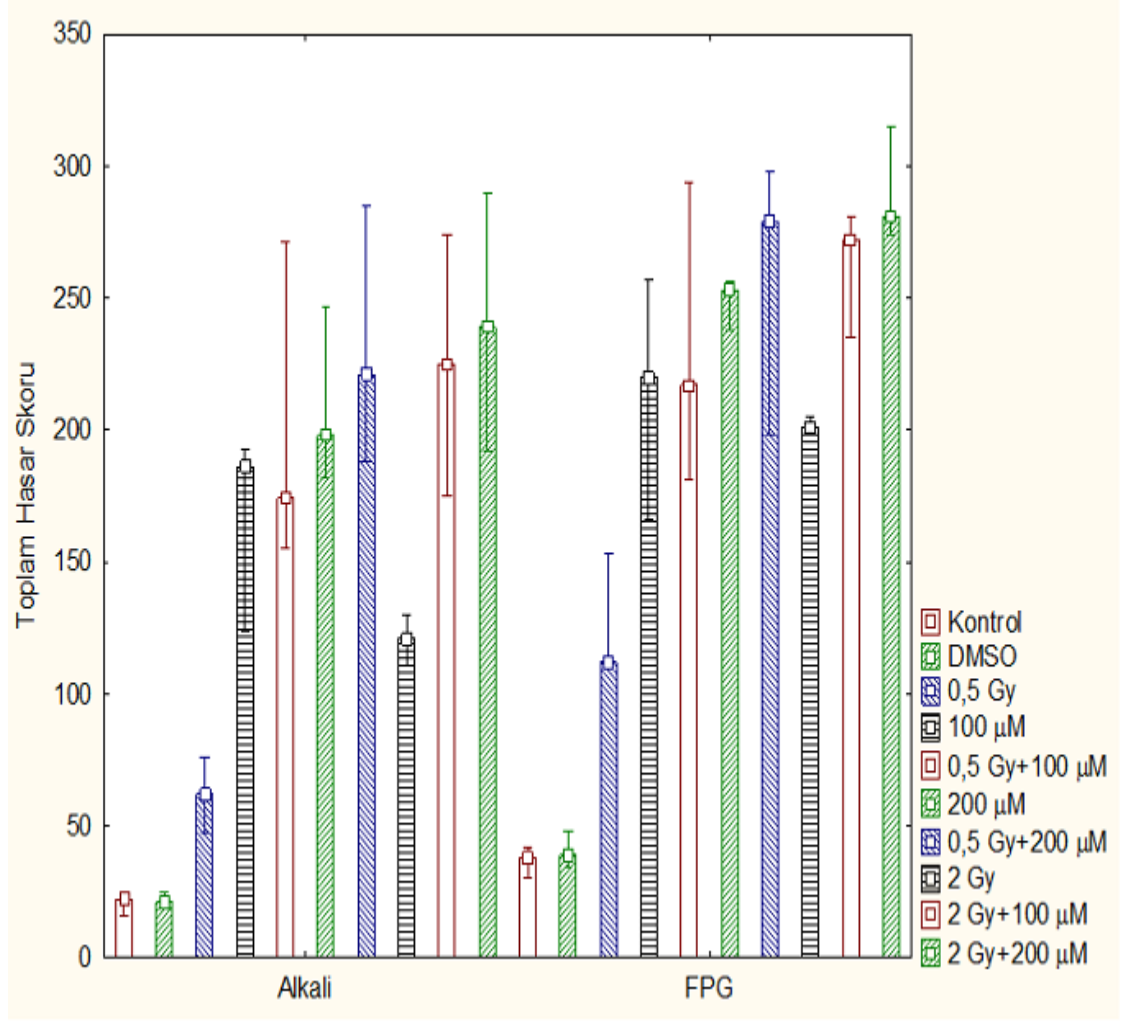
Tablo 4.22 Alkali Komet Sonuçlarının Karşılaştırılması (Friedman Testi)

	Kontrol	DMSO	100 µM	200 µM	0.5 Gy	2 Gy	0.5 Gy+ 100 µM	0.5 Gy+ 200 µM	2 Gy+ 100 µM	2 Gy+ 200 µM	P
S.D.	16	19	193	247	47	121	271	285	274	290	P
O.B.	23	25	124	182	76	111	174	188	175	192	
A.H.	22	21	186	198	62	130	155	221	225	239	
Ortalama±SD	20.3±3.8	21.7±3.1	167.7±37.9	209±33.9	61.7±14.5	120.7±9.5	200±62.2	231.3±49.3	224.7±49.5	240.3±49.0	0.002
Medyan (25-75 persantil)	22 (16-23)	21 (19-25)	186 (124-193)	198 (182- 247)	62 (47-76)	121 (111-130)	174 (155-271)	221 (188-285)	225 (175-274)	239 (192-290)	

Tablo 4.23. FPG Komet Sonuçlarının Karşılaştırılması (Friedman Testi)

	Kontrol	DMSO	100 µM	200 µM	0.5 Gy	0.5 Gy+ 100 µM	0.5 Gy+ 200 µM	2 Gy	2 Gy+ 100 µM	2 Gy+ 200 µM	P
S.D.	30	34	257	256	112	294	298	201	281	315	P
O.B.	42	48	166	238	153	181	198	205	235	274	
A.H.	38	39	220	253	110	217	279	199	272	281	
Ortalama±SD	36.7±6.1	40.3±7.1	214.3±45.8	249±9.6	125±24.3	230.7±57.7	258.3±53.1	201.7±3.1	262.7±24.4	290±21.9	0.005
Medyan (25-75 persatil)	38 (30-42)	39 (34-48)	220 (166-257)	253 (238- 256)	112 (110-153)	217 (181-294)	279 (198-298)	201 (199-205)	272 (235-281)	281 (274-315)	

Verilerin gruplararası karşılaştırılmasında Friedman testi kullanıldı. Tanımlayıcı istatistikler ortalama±standart sapma ve medyan (25-75 persantil) biçiminde gösterildi. $p < 0.05$ olduğu durumda istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



Şekil 4.9. Komet Hasar Skorları Karşılaştırması

10 farklı Alkali Komet grubu kendi aralarında Friedman testi ile karşılaştırıldıklarında, istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu bulundu ($p=0.002$). FPG Komet sonuçları karşılaştırıldığında da gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı fark bulunduğu tespit edildi ($p=0.005$) (Tablo 4.22, Tablo 4.23) (Şekil 4.9).

Alkali grupların Post-Hoc analiz tabloları aşağıda verilmiştir (Tablo 4.24). Buna göre Alkali grubunda Kontrol ile DMSO istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p= 0.893$). Kontrol ve DMSO ile 200 μM Mirisetin, 0.5Gy+200 μM Mirisetin, 2 Gy +100 μM Mirisetin, 2Gy+200 μM Mirisetin uygulaması arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu. Her iki doz radyasyon uygulamasının alkali Komet deneyinde istatistiksel olarak anlamlı bir hasar oluşturmadıkları gözlemlendi. Radyasyon ve Mirisetin'in birlikte uygulandığı deneylerde ise 0.5 Gy ile 0.5 Gy +200 μM Mirisetin uygulaması arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p= 0.022$). 2 Gy için de, 2 Gy ile 2Gy+200 μM Mirisetin uygulaması arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p= 0.015$).

FPG Komet grupların Post-Hoc analiz tabloları da aşağıda verilmiştir (Tablo 4.25). Buna göre FPG Komet grubunda Kontrol ile DMSO arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p= 0.686$). Kontrol ve DMSO ile 200 μM Mirisetin, 0.5 Gy+100 μM Mirisetin, 0.5 Gy+200 μM Mirisetin, 2 Gy +100 μM Mirisetin, 2Gy+200 μM Mirisetin, uygulaması arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu. Ayrıca her iki doz radyasyon uygulamasının FPG Komet deneyinde kontrol grubu ile istatistiksel olarak anlamlı bir fark taşımadığı gözlemlendi. Radyasyon ve Mirisetin'in birlikte uygulandığı deneylerde ise 0.5 Gy ile 0.5 Gy +200 μM Mirisetin ve 2 Gy +200 μM Mirisetin uygulaması arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu. 2 Gy için de 2 Gy ile 2Gy+200 μM Mirisetin uygulaması arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p=0.043$). Tablolarda sadece istatistiksel olarak anlamlı olan sonuçlar verilmiştir.

Tablo 4.24. Alkali Komet Post Hoc Değerlendirme Sonuçları

1.grup	2.grup	p
Kontrol	200 µM Mir	0.022
Kontrol	0.5 Gy+200 µM Mir	0.003
Kontrol	2 Gy+100 µM Mir	0.007
Kontrol	2 Gy+200 µM Mir	0.000
DMSO	200 µM Mir	0.031
DMSO	0.5 Gy+200 µM Mir	0.005
DMSO	2 Gy+100 µM Mir	0.010
DMSO	2 Gy+200 µM Mir	0.001
0.5 Gy	0.5 Gy+200 µM Mir	0.022
0.5 Gy	2 Gy+100 µM Mir	0.043
0.5 Gy	2 Gy+200 µM Mir	0.005
2 Gy	2 Gy+200 µM Mir	0.015

.p<0.05 olduğu durumda istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Tablo 4.25. FPG Komet Post Hoc Değerlendirme Sonuçları

1.grup	2.grup	p
Kontrol	200 µM Mir	0.015
Kontrol	0.5 Gy+100 µM Mir	0.043
Kontrol	0.5 Gy+200 µM Mir	0.005
Kontrol	2 Gy+100 µM Mir	0.007
Kontrol	2 Gy+200 µM Mir	0.000
DMSO	200 µM Mir	0.043
DMSO	0.5 Gy+200 µM Mir	0.015
DMSO	2 Gy+100 µM Mir	0.022
DMSO	2 Gy+200 µM Mir	0.001
0.5 Gy	0.5 Gy+200 µM Mir	0.043
0.5 Gy	2 Gy+200 µM Mir	0.005
2 Gy	2 Gy+200 µM Mir	0.043

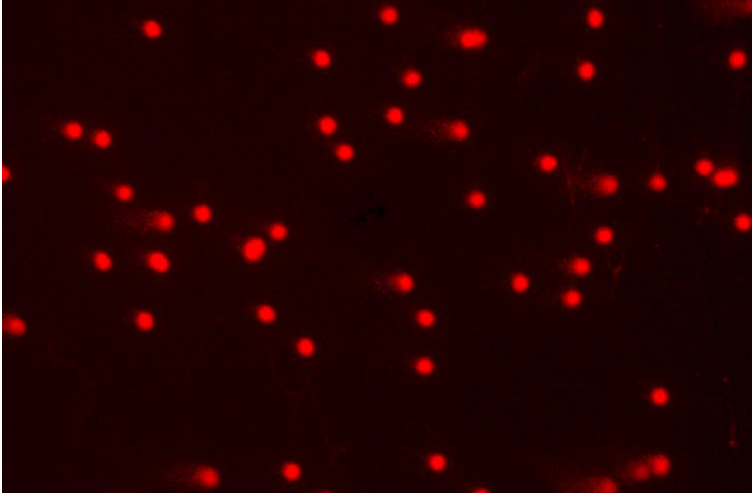
p<0.05 olduğu durumda istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Tablo 4.26. Alkali Komet- FPG Komet Karşılaştırılması

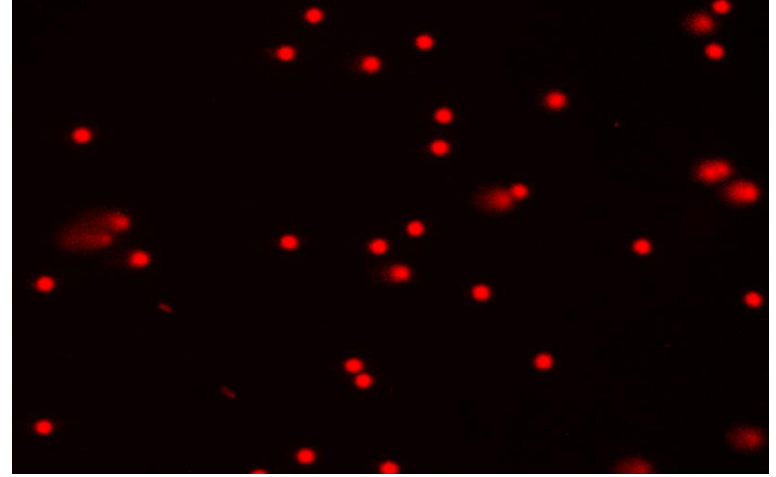
	ALKALİ	FPG	p*
Kontrol	20.3±3.8 22 (16-23)	36.7±6.1 38 (30-42)	0.008
DMSO	21.7±3.1 21 (19-25)	40.3±7.1 39 (34-48)	0.015
100 µM	167.7±38 186 (124-193)	214.3±45.8 220 (166-257)	0.035
200 µM	209±33.9 198 (182-247)	249±9.6 253 (238-256)	0.123
0.5 Gy	61.7±14.5 62 (47-76)	125±24.3 112 (110-153)	0.017
2 Gy	120.7±9.5 121 (111-130)	201.7±3.1 201 (199-205)	0.008
0.5 Gy+100 µM	200±62.2 174 (155-271)	230.7±57.7 217 (181-294)	0.201
0.5 Gy+200 µM	231.3±49.3 221 (188-285)	258.3±53.1 279 (198-298)	0.224
2 Gy+100 µM	224.7±49.5 225 (175-274)	262.7±24.4 272 (235-281)	0.140
2 Gy+200 µM	240.3±49.0 239 (192-290)	290±21.9 281 (274-315)	0.099

*Analizler Eşleştirilmiş t testi ile gerçekleştirildi.

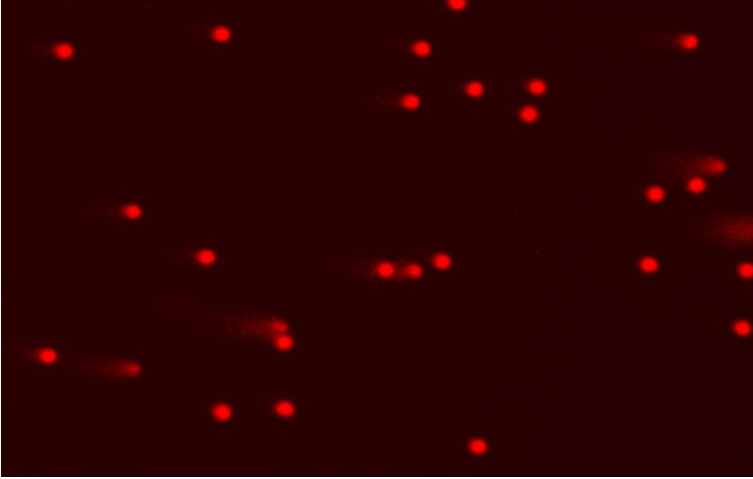
Oksidatif hasarın belirlenmesi için alkali komet sonuçları FPG komet sonuçları ile karşılaştırıldığında ise Kontrol, DMSO, 100 µM Mirisetin, 0.5 Gy ve 2 Gy uygulamalarında sonuçlar arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde fark olduğu gözlemlendi. Bu sonuç, bu deney serilerinde ölçülebilir düzeyde oksidatif hasarın meydana geldiği yönünde değerlendirildi (Tablo 4.26).



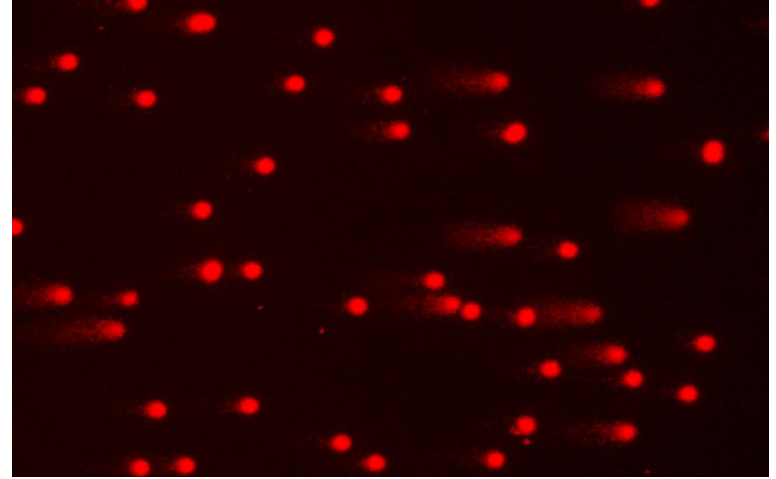
a



b

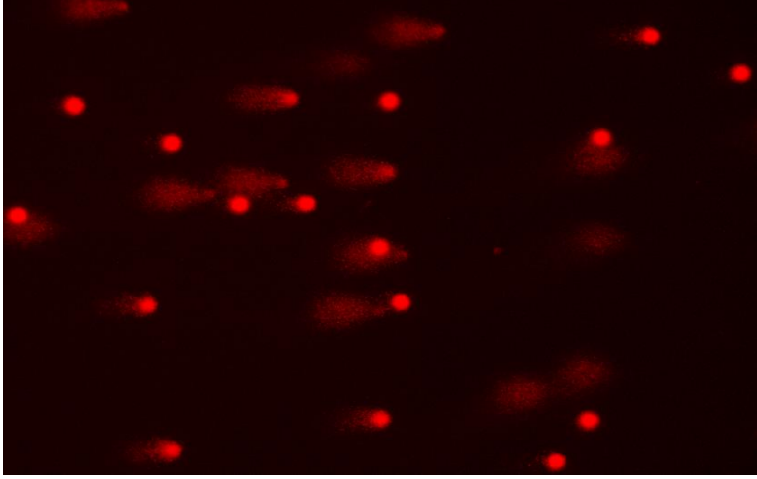


c

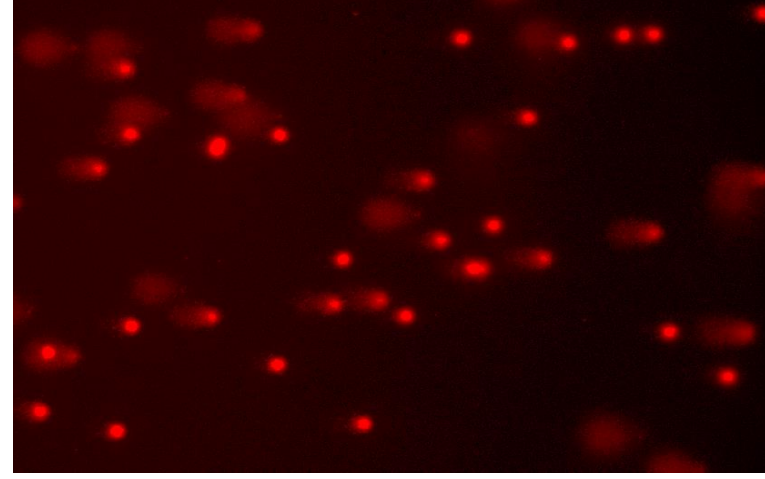


d

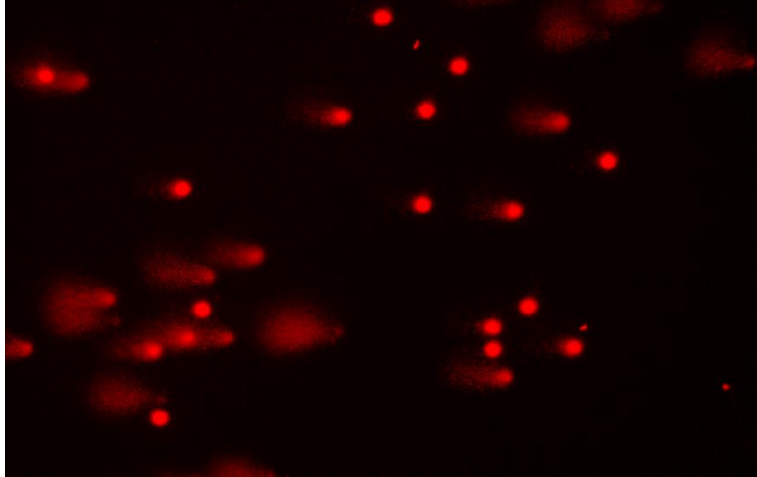
Şekil 4. 10. Örnek Komet Görüntüleri :a. Alkali Kontrol , b. FPG Kontrol, c. Alkali DMSO, d. FPG DMSO



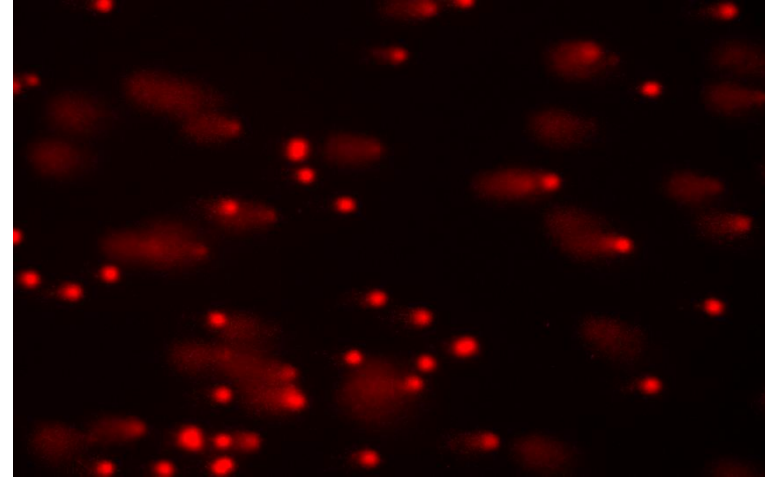
a



b

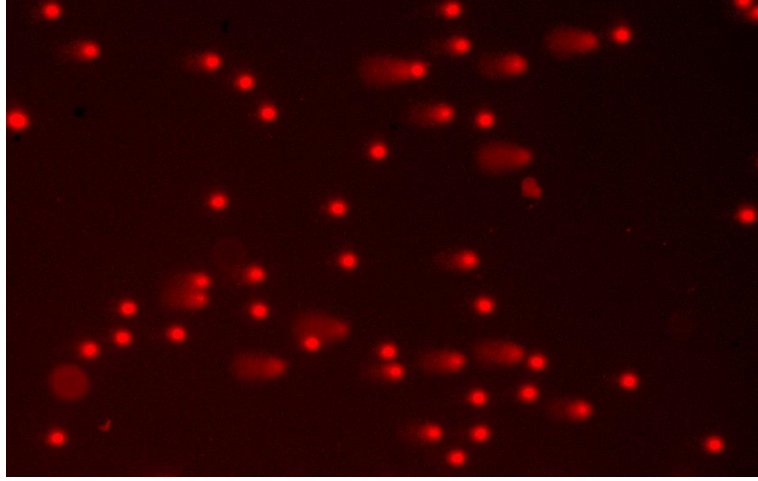


c

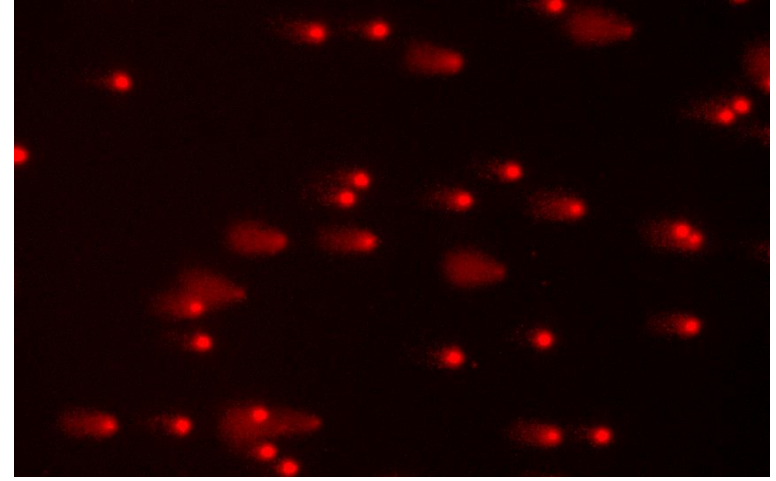


d

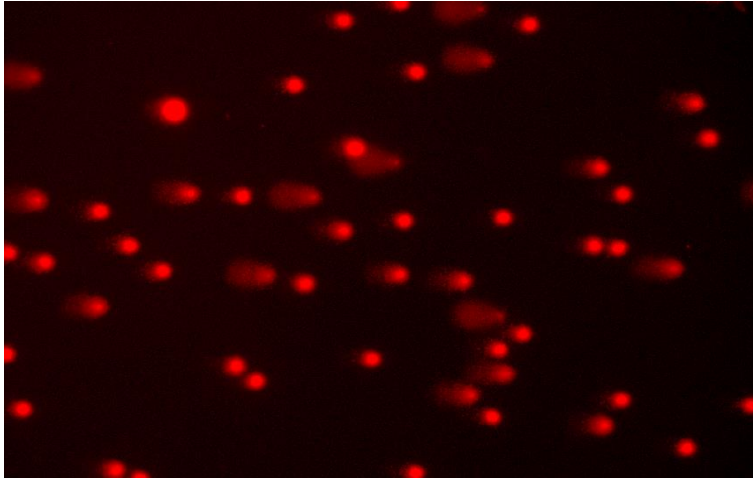
Şekil 4. 10. Örnek Komet Görüntüleri Devam. : a.Alkali 100 μ M Mir , b. FPG 100 μ M Mir, c. Alkali 200 μ M Mir, d. FPG 200 μ M Mir.



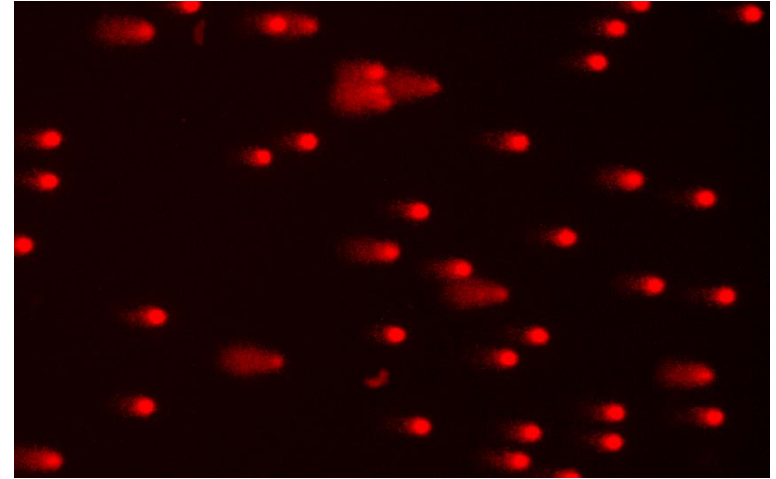
a



b

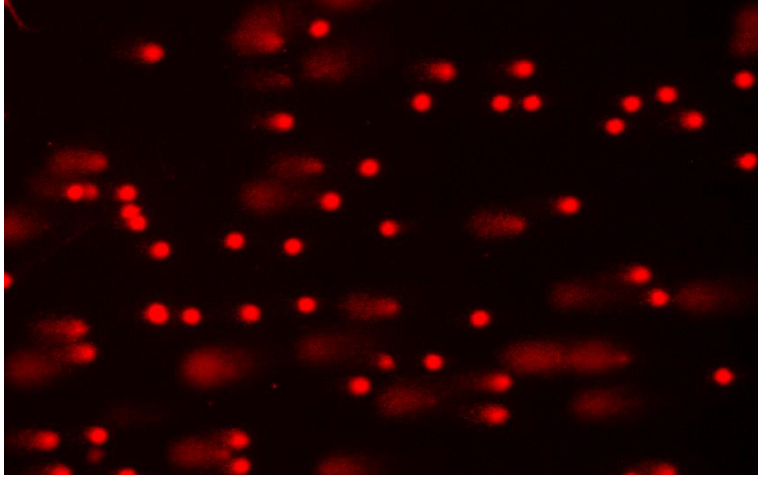


c

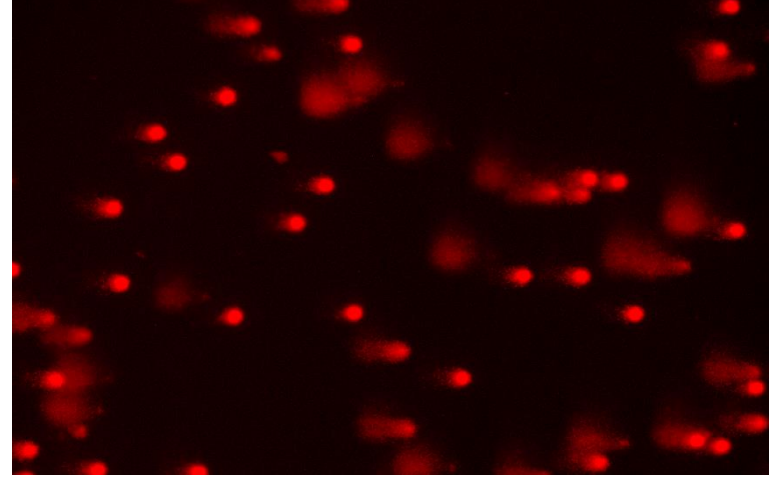


d

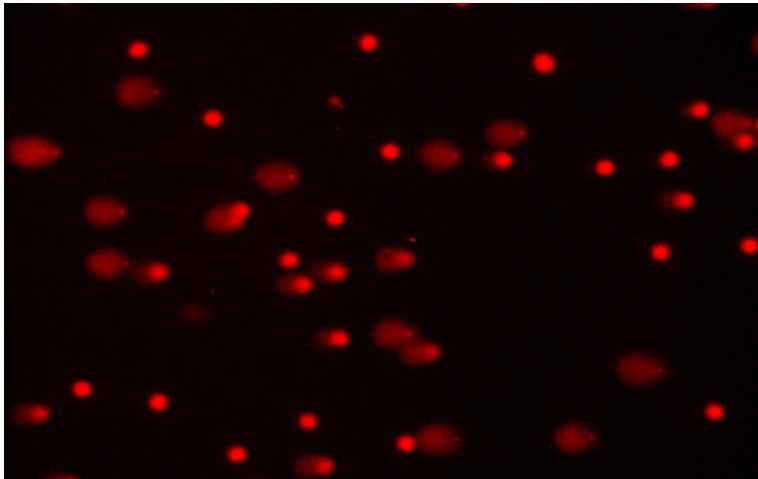
Şekil 4. 10. Örnek Komet Görüntüleri Devam. : a.Alkali 0.5 Gy, b. FPG 0.5 Gy, c. Alkali 2 Gy, d. FPG 2 Gy



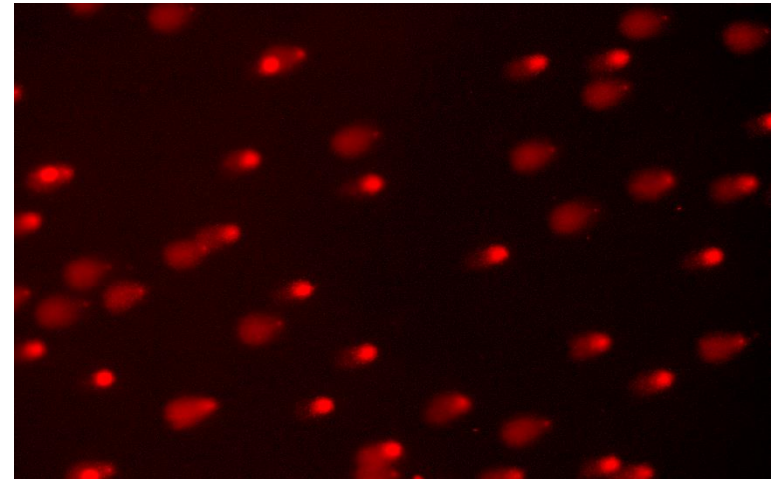
a



b

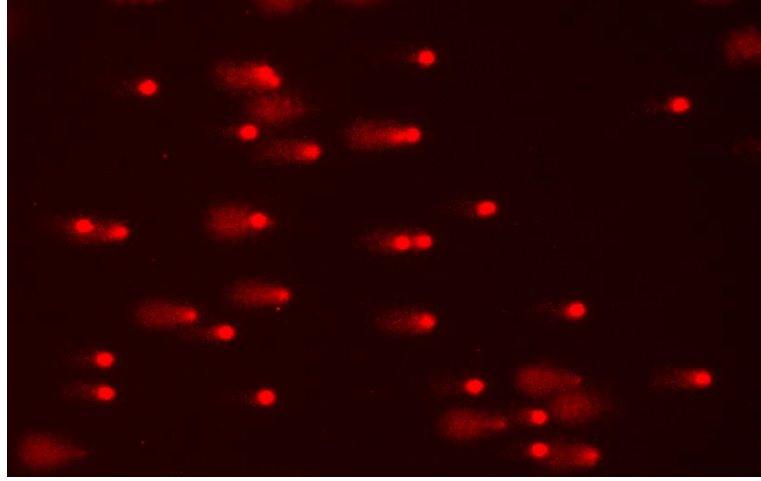


c

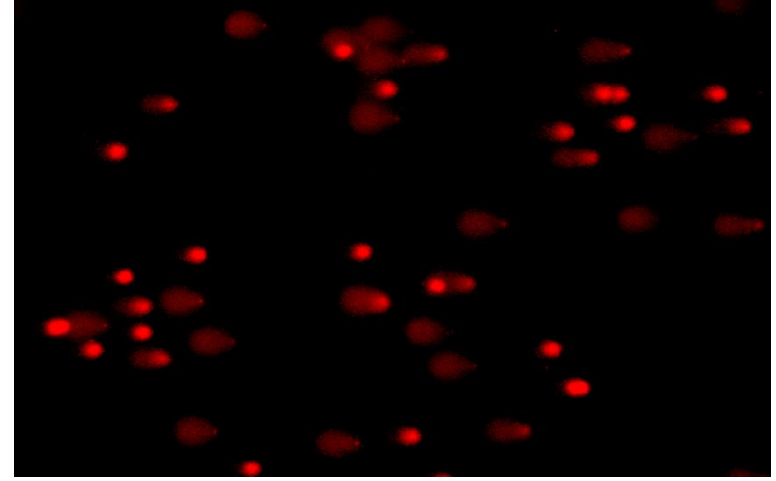


d

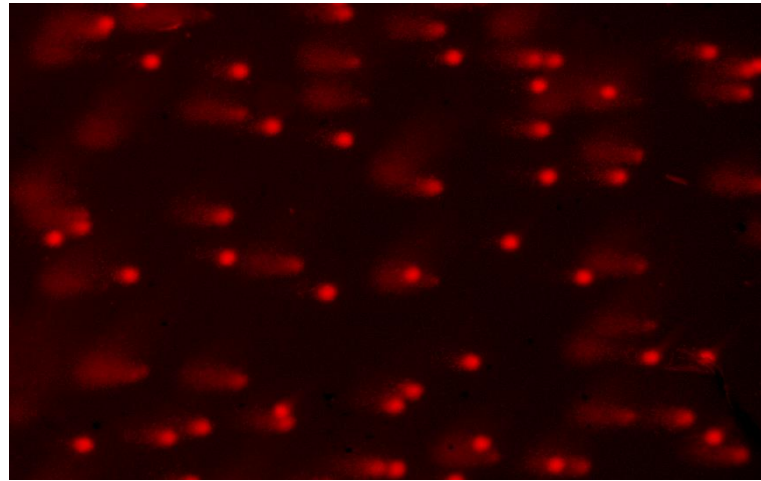
Şekil 4. 10. Örnek Komet Görüntüleri Devam. : a.Alkali 0.5 Gy+100 µM Mir , b. FPG 0.5 Gy+ 100 µM Mir, c. Alkali 0.5 Gy+200 µM Mir, d. FPG 0.5 Gy+200 µM Mir.



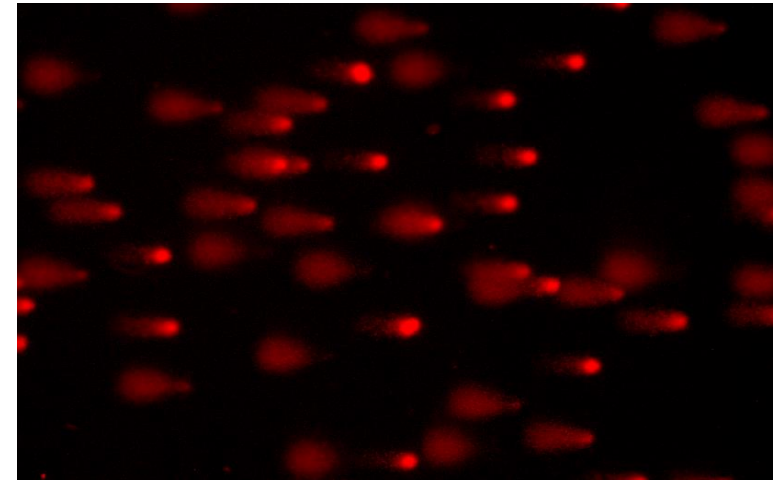
a



b



c



d

Şekil 4. 10. Örnek Komet Görüntüleri Devam. : a .Alkali 2 Gy+100 μ M Mir , b. FPG 2 Gy+100 μ M Mir, c. Alkali 2Gy+ 200 μ M Mir, d.

FPG 2 Gy+ 200 μ M Mir

4.3. ELİSA SONUÇLARI

Yapılan ölçümler sonucu; her gönüllü için beklenenden çok farklı sonuçlar elde edildi. Örneğin; Kontrol DNA'sı çok yüksek bir absorbans verdiği halde 2 Gy radyasyon uygulamada absorbansın gözlenmemesi gibi. Örneklerin hemen hepsinde buna benzer sonuçlar gözleendiğinden, Mirisetin ve/veya radyasyonla muamele edilmiş kan örneklerinden elde edilen DNA'larda 8-OH-dG tayinini ELİSA yöntemi ile yapmanın objektif sonuç vermediği düşünöldü. Bu nedenle de radyasyon etkisiyle oluşan 8-OH-dG miktarını ölçmede kullanılmasının uygun olmadığı kanaatine varıldı.

BÖLÜM 5

TARTIŞMA

İnsanlar hayatlarının en az bir döneminde gerek tanı amaçlı gerekse tedavi için çeşitli radyasyon tiplerine maruz kalabilmektedirler. Uzun yıllardır yapılan çalışmalar radyasyonun insan organizmasına kanser oluşumu, ölüm gibi çok ciddi yaşamsal hasarlar verebildiğini ortaya koymuştur. Bununla birlikte radyasyon kanser tedavisinde vazgeçilmez bir araçtır. Hastaların radyasyonla tedavi edilirken sağlam dokuların korunması gerekliliği, radyoprotektif özellikli maddelerin kullanımını tedavi sürecine eklemiştir. Hali hazırda lisanslı ilaç olarak kullanılan radyoprotektifler yanında hastalar arasında tedaviye destek olarak bitkisel ilaç kullanımı da oldukça yaygındır.

Bu bitkisel ilaçlar içinde, antioksidan özellikli bitkisel flavonoidler oldukça popülerdir. Bu popüleritenin sebebi serbest radikallerin kanserle ilişkili olduğu, antioksidanların bunları etkisiz hale getirmesi nedeniyle kullanılması gerektiği görüşüdür. Bu görüş kanser hastalarının tedavilerine destek olarak antioksidanlara yönelmelerine neden olmaktadır. Öte yandan radyasyonun da serbest radikal oluşturduğu bilindiğinden, bu antioksidanların aynı zamanda sağlıklı dokular için radyoprotektif etkilerinin olması muhtemel gözükmektedir.

Mirisetin de flavonoidler içinde antioksidan özellikleri çeşitli çalışmalarla ortaya konmuş bir maddedir [6,7,8,51,52,53].

Bu çalışmada, radyasyonun iyonlaştırıcı etkisi nedeniyle oluşan serbest radikallerin mirisetin tarafından etkisiz hale getirilebileceği ve böylece radyoprotektif etki gösterebileceği teorisinden yola çıkılarak, mirisetin'in insan lenfositlerini radyasyonun meydana getirdiği hasarlardan koruyup korumadığı incelenmiştir.

Bu çalışmada radyasyon için düşük doz olarak 0.5 Gy seçilmiştir. 0.5 Gy insanlarda kan tablosunun değişmeye başladığı doz olarak kabul edilir [15]. Radyoterapide ise normal dokuları korumak amacıyla, hastalara verilecek toplam doz

nispeten daha düşük dozlara bölünerek verilir. Günlük tek seferde uygulanan doz ortalama 2 Gy'dir. [19]. 2 Gy aynı zamanda akut radyasyon sendromlarını gösteren büyük dozlardan biridir. Bu nedenle çalışmamızda düşük dozları temsilen 0.5 Gy, yüksek dozları temsilen de 2 Gy seçilmiştir.

Bu çalışmada mirisetin'in, lenfosit DNA'sı üzerindeki olası etkileri MN ve Komet yöntemleri ile araştırılmıştır. Mikronukleuslar hem radyasyon gibi fiziksel ajanlar, hem de kimyasal ajanların etkisiyle meydana gelebilirler. Mirisetin'in radyoprotektif etkisi yanı sıra olası genotoksik etkisini, radyasyonla birlikte değerlendirebilmek amacıyla tercih ettiğimiz yöntemlerden birincisi MN yöntemidir.

Mikronukleuslar hem kimyasal hem de fiziksel ajanların etkileri ile oluştuklarından doğal sıklıkları toplumlar arasında, yaşla ve maruz kalınan hasar verici etmenlerin varlığına bağlı olarak farklılık gösterir [100,101]. Bu nedenle biyolojik dozimetri çalışmalarında her laboratuvarın kendi doz cevap eğrisini elde etmesi, olası kazaları kendi eğrileriyle değerlendirmesi esastır. Bizim çalışmamızda da absorblanan dozu belirleyebilmek için önce MN doz cevap eğrileri elde edildi. 0.1-5 Gy arasında Co-60 ışınlarına ait elde edilen MN doz cevap eğri denklemi $Y=0.0107+0.0353D+0.0371D^2$ olarak hesaplandı. Eğri lineer kuadratik karakterdedir. Daha önce elde edilmiş MN doz cevap eğrileriyle uyumlu bulundu [75,76].

Çalışmada öncelikle uygulanan mirisetin dozlarının lenfosit DNA'sı üzerinde genotoksik etkisinin olup olmadığı MN yöntemi ile incelendi ve mirisetinin MN sayıları üzerinde anlamlı ($p>0.05$) bir artışa neden olmadığı tespit edildi (Tablo 4.6, Şekil 4.2). Kontrol grubu MN sıklığı ortalama 8.4 ± 2.2 (6.6-10.2) bulundu. DMSO'lu kan örneklerinin MN sıklığı ortalama 7.2 ± 1.8 (6.1-8.8) iken bu değer 100µM mirisetin için 8.2 ± 2.5 (6.4-10.4) , 200 µM mirisetin için ise 8.6 ± 2.0 (6.9-10.6) olarak tespit edildi. Bu sonuç 100 µM ve 200 µM mirisetin'in sağlıklı hücrelerde genotoksik etki yapmadığını rapor eden Duthie ve ark [6] (Lenfosit) ve Snyder ve ark.'nın [64] (Çin Hamsteri V79) sonuçlarıyla uyumlu bulundu.

Mirisetin'in olası radyoprotektif etkisini araştırmak amacıyla 100 ve 200 µM mirisetin eklenmiş kan örnekleri 30 dk. inkübe edildikten sonra 0.5 ve 2 Gy'lik dozlara maruz bırakıldı. MN sonuçları Tablo 4.7-4.10 arasında verilmiştir. 0.5 Gy'de 100 µM mirisetin MN sıklığını ortalama % 22.8 oranında düşürürken bu değer 200 µM mirisetin'de % 43.1 oldu (Tablo 4.11). 2 Gy'de ise 100 ve 200 µM mirisetin'in MN

sıklığında sırasıyla % 24.4 ve % 40.1 lik düşmeye neden olduğu görüldü. İki konsantrasyon arasında, MN sıklığını düşürme kapasitesi açısından yaklaşık % 50' lik bir fark görülürken; aynı mirisetin dozları için düşüş yüzdelerinde fark görülmedi. Absorblanan radyasyon dozu açısından karşılaştırdığımızda ise, 0.5 Gy'de düşme oranı 200 µM mirisetin varlığında % 64'de kadar çıkarken, bu değer 2 Gy'de % 36'da kaldı (Tablo 4.12). Bunun altında yatan sebebin, 0.5 Gy'de gözlenen 1'li MN sıklığının 2 Gy'den çok fazla olması olduğu düşünüldü .

Her iki dozda 100 ve 200 µM mirisetin varlığında düşüş oranları benzerlik göstermekle birlikte, düşüşün karakteri dozla farklılık gösterdi (Tablo 5.1-5.2). 0.5 Gy'de 1 hücrede görülen maksimum MN sayısı 2 olarak tespit edildi. Ancak 2 MN taşıyan hücrelerin oranı ise oldukça düşük bulundu. Bu nedenle azalmanın esas itibariyle 1 MN'lu hücrelerden kaynaklandığı sonucuna varıldı. Normal BN hücre sayısında ise artış çok sınırlı bulundu. MN'lu BN sayılarının normal BN hücreye oranı 0.5 Gy'de % 3.25 iken, 100 µM mirisetin varlığında % 2.54'e, 200 µM mirisetin varlığında % 1.85'e düştüğü tespit edildi. Bu oranın toplam MN sıklığındaki düşüşe çok yakın olduğu görüldü (Tablo 4.11).

Tablo 5.1. 0.5 Gy ve 2 Gy Işınlanmış Örneklerde 1'li ve Çoklu MN'ların Dağılımı

	MN'suz BN*	MN'lu BN*	1 MN'lu BN*	1'den fazla MN'lu BN*
0.5 Gy	970	30	28	2
0.5 Gy + 100 µM Mir	976	23	21	2
0.5 Gy + 200 µM Mir	982	18	17	1
2 Gy	829	171	132	39
2 Gy + 100 µM Mir	861	146	113	33
2 Gy + 200 µM Mir	885	112	95	17

*Binde.

Tablo. 5.2. Taşınan MN Sayılarına Göre Düşme Oranları

	MN oranında düşme (%)	MN'suz BN	MN'lu BN	1 MN'lu BN	1'den fazla MN'lu BN
0.5 Gy + 100 µM Mir	21	+0.6	-23.4	-25	0
0.5Gy + 200 µM Mir	43	+1.23	-40	-39.3	-50
2 Gy + 100 µM Mir	24	+3.86	-14.6	14.4	-15.4
2 Gy + 200 µM Mir	39	+6.8	34.5	29	-57.5

Buna karşın 2 Gy'de 1 hücrede görülen MN sayısının 5'e kadar çıktığı gözlemlendi (Tablo 4.9, Tablo 4.10). Bu dozda MN'lu BN yüzdesi 22 iken bu değer 100 µM mirisetin varlığında % 16.7, 200 µM mirisetin varlığında % 13.4 olarak tespit edildi. 2 Gy'de aberasyon ve 1 hücreye düşen MN sayısı 0.5 Gy'den daha fazla olduğu için (Tablo 5.1) 1'den fazla MN taşıyan hücrelerdeki düşüş daha anlamlı bulundu. Laboratuvarımızda 4 Gy kullanılarak gerçekleştirilen başka bir çalışmada [102] MN'suz hücre sayılarında 100 µM mirisetin için ortalama % 11, 200 µM için ise % 21 artış görüldü. Birden fazla MN sayıları ise 100 µM mirisetin için % 37, 200 µM mirisetin için ise % 61 olarak bulundu. Bu sonuçlar aberasyonlu hücre sayısı arttıkça fazla aberasyonlu hücrelerin mirisetin varlığında ortadan kalktığı görüşümüzü destekledi.

Sonuç olarak; MN yani kromozom hasarı açısından değerlendirdiğimizde mirisetin'in radyasyona bağlı olarak gelişen MN sıklığında ve absorplanan dozda ciddi bir düşüşe neden olduğu yani lenfosit DNA'sı için radyoprotektif etki gösterdiği sonucuna varıldı.

MN sayılarında meydana gelen bu düşmenin, hücrelerde mirisetin'in olası apoptik etkisiyle meydana gelebileceğine dair bir ilk varsayım oluşturuldu. Çünkü şimdiye kadar yapılan yayınlar içerisinde mirisetin'in özellikle kanserli hücrelerde (DNA hasarı taşıyan) apoptoza yol açtığını gösteren bir takım bulgular mevcuttu. Örneğin, Snyder ve ark'nın [64] yaptığı çalışmada, mirisetin'in DNA'nın replikasyonu, transkripsiyonu ve G₂ kontrol noktasının çalışması sırasında sarmalda çift zincir kırığı yaparak DNA'nın açılmasını sağlayan Topoizomeraz II enzimini inhibe ettiği

gösterilmiştir. MN sıklığındaki bu düşmelerin, mirisetin'in radyasyon etkisiyle meydana gelen çift zincir kırıklarının da tamirini engelleyip çok miktarda kırık içeren hücreleri apoptoza sürüklenmesinden kaynaklanabileceği düşünüldü.

Topoizomeraz II ve radyasyon ilişkisine dair bir diğer çalışmada ise [103] topoizomeraz II ekspresyonunun inhibe edildiği durumlarda DNA'nın radyasyona hassasiyetinin azaldığı bildirilmektedir. Topoizomeraz II α ekspresyonu düşük HL-60 hücreleri radyasyona maruz bırakılmış ve kromatid kırıklarının azaldığı tespit edilmiştir. Bizim çalışmamızda da mirisetin'in Topoizomeraz II inhibisyonu yapması sonucu radyasyona maruz kalan lenfositlerde radyasyona duyarsızlaşma gelişip kırıklarda azalmalar meydana gelmiş olabileceği öngörüldü.

Mirisetin'in apoptoza yol açtığını gösteren bir diğer çalışmada da UV-B ile hasarlanmış ölümsüz keratinositlerde mirisetin'in Akt'ye bağlanarak yolaktaki Bad molekülünün mitokondriyal apoptotik proteinlerin salınımına yol açtığı gösterilmiştir [57].

Mirisetin'in apoptoz'u indüklemeye yolları arasında pankreas kanseri hücreleri için PI-3K (Fosfatidil İnozitol 3 kinaz) inhibisyonu [54], akciğer kanseri hücre serileri için ERK1/2 yolağı [104], HL-60 hücreleri için Kaspaz 3 ve 9'un etkilendiği kaspaz yolağı, Bcl-2/Bax oranının düşme gösterdiği ve sitokrom c salınımının gözlemlendiği mitokondriyal yolak da vardır [105].

Ayrıca Morales'in [56] HL-60 (İnsan Lösemi Hücre Serisi) hücreleri ile yaptığı çalışmada da, yolak ayrımı yapılmadan mirisetin'in apoptozu indüklediğini göstermektedir. Bizim çalışmamızda da MN seviyelerinde meydana gelen düşmeler radyasyon tarafından hasar verilen hücrelerin apoptoz yoluyla ortamdan uzaklaştırılmasıyla meydana gelmiş olabilir.

Çalışmamızda ayrıca DNA hasarının oksidatif düzeyini belirlemek ve mirisetin'in radyasyon etkisiyle oluşan oksidatif hasarı önlemede etkili olup olmadığını anlamak için Komet analizi yapıldı.

Alkali Komet analizi DNA hasar seviyelerinin ölçülmesine olanak sağlayan bir yöntemdir. Bu yöntemde izole edilen canlı hücreler lam üzerinde hazırlanan agaroz jel içerisine gömüldükten sonra DNA'nın etrafındaki yapılar uzaklaştırılıp DNA'nın

pH>13 elektroforetik ortamda yürütülmesi esasına dayanır [77,84]. Kırık DNA parçaları normal elektroforezde olduğu gibi büyüklükleri ile ters orantılı bir hızda anoda doğru hareket ederler. Bu yöntemde hücreler çoğunlukla floresan boyalar ile boyandıktan sonra floresan mikroskop altında değerlendirilir. Yöntem DNA'ya hasar verebilen oksidatif stres, kimyasal ajanlar, ilaçlar, UV ve radyasyon gibi çeşitli genotoksik ajanların DNA sarmalları üzerinde oluşturduğu tek veya çift zincir kırıklarını belirlemede kullanılabilir [77,86]. Alkali Komet yönteminde deney sürecine FPG, Endonukleaz III gibi oksitlenmeyle oluşan DNA lezyonlarını tanıyan enzimlerin eklenmesiyle oksidatif hasarların tespitinde duyarlılığı arttırılmaktadır. Bu çalışmada hem Alkali hem de FPG Komet yöntemleri birlikte kullanılarak radyasyonun yarattığı oksidatif hasarın düzeyi ve mirisetin'in bu hasarı önlemedeki etkinliği saptanmaya çalışıldı.

Çalışmamızda Alkali Komet DNA'nın sarmal yapısında meydana gelen çift ve tek zincir kırıklarının düzeyini ölçmek için, FPG Komet ise DNA'da oksidatif hasarla meydana gelen oksitlenmiş pürinlerin ve halkasal yapısı bozularak açık halkalı hale gelen pürinlerin tanımlanması için kullanıldı [77, 95]

Alkali ve FPG Komet deneyleri 3 gönüllünün kan örnekleri ile yapıldı. MN analizi için kullanılan deney protokolu uygulandı. Her gönüllü için 10 farklı deney yapıldı ve değerlendirme flöresan mikroskopta görsel olarak gerçekleştirildi. Alkali ($p<0.002$) ve FPG ($p<0.005$) komet grupları Friedman testi ile kendi aralarında karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar bulunduğu tespit edildi (Tablo 4.22,4.23).

Alkali grubunun kendi içinde yapılan Post Hoc değerlendirmesi sonucu radyasyon uygulanan deneylerde görsel olarak DNA hasarının varlığı gözlene de istatistik değerlendirmeye göre anlamlı bir sonuç elde edilemedi. 100 μ M mirisetin uygulaması DNA'ya istatistiksel olarak anlamlı bir hasar vermezken, 200 μ M mirisetin uygulamasının yaptığı DNA hasarının istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek olduğu tespit edildi (Tablo 4.24). Grup içinde yapılan diğer değerlendirmelerde radyasyon ve mirisetin'in birlikte uygulandığı gruplarda hasar düzeylerinin yüksek olduğu gözlemlendi ancak bu yüksekliğin mirisetin'den kaynaklı olduğu sonucuna varıldı.

Radyasyon uygulamalarının istatistiksel olarak anlamlı olmaması (0.5 Gy ve 2 Gy için sırasıyla $p= 0.500$ ve $p= 0.281$) diğer bazı çalışma sonuçlarıyla [106,107]

uyumlu değildi. Bu durumun, Komet deneyinin çalışma grupları arasında hala farklı modifikasyonlarla (pH değeri, akım parametreleri, kimyasal kombinasyon vs.) kullanılmasından kaynaklanabileceği düşünöldü.

Mirisetin'in ve diğer bazı flavonoidlerin fizyolojik seviyelerde antioksidan potansiyellerinin incelendiği bir çalışmada mirisetin'in 100 µM konsantrasyonda oksidatif DNA ürünlerini düşük oranda arttırırken 1 µM gibi düşük bir konsantrasyonda 8-OH dG ve Fapy Gua oluşumunu anlamlı derecede arttırdığı gösterilmiştir [108].

Çalışmamızdaki mirisetin uygulamasında ise, 100 µM istatistiksel olarak anlamlı bulunmasa da anlamlılık değeriine yakın bir değeri (p=0.106) elde edildi. 200 µM'da ise istatistiksel olarak anlamlı fark (p<0.005) bulundu. Bu sonuç mirisetin'in DNA hasarı yapma potansiyeli olduğunu bildiren bir çalışma sonucuyla uyumlu bulundu [62]. Radyasyon ve mirisetin uygulamasının birlikte yapıldığı deneylerde Komet skorlarının, özellikle 200 µM uygulanan deneylerde yüksek bulunması mirisetinin hasar verici etkisine bağlandı.

Çalışmamız, bir koruyucu etki araştırması olduğundan, Komet deneyinde 30 dakikalık mirisetin uygulamasının hemen ardından ışınlama yapılmış ve örnekler tamir sürecinin devreye girmemesi için hemen buz üzerine alınmıştır. Koruyucu etkisi araştırılan mirisetin, seçilen dozlarda kendisi de hasar yaptığından radyoprotektif etkisinin bu şekilde değerlendirilemeyeceği sonucuna varıldı.

Oksidatif hasarın varlığını belirlemek amacıyla alkali Komet ve FPG Komet grupları karşılaştırıldığında ise (Tablo 4.26). Kontrol, DMSO, 100 µM mirisetin, 0.5 Gy ve 2 Gy uygulamalarında FPG Komet skorlarının istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı gözlendi. Kontrol ve DMSO gruplarında gözlenen artışın deney şartlarından kaynaklandığı düşünöldü. Çünkü deney sürecinde, açık havayla temas eden hücrelerde minimal düzeyde de olsa oksidasyondan kaçınmak mümkün değildir. Hücrelerin oksidasyon durumunun deneye göre, hazırlama şartlarından etkilendiğini gösteren bir çalışma sonucuna göre; izole lenfositler ve taze tam kan lökositleriyle yapılmış bir çalışmada izole lenfositlerde izolasyon sonrası kırık miktarının arttığı gözlenmiş ancak bu kırıkların mekanik stres sonucu meydana geldiği belirtilmiştir. Yine aynı çalışmada elde edilen sonuçlar, aslında H₂O₂'ye dayanıklı olan lenfositlerin izolasyon süreci sonucunda duyarlı hale geçtiklerini göstermiştir [85]. Bizim deneyimizde de Kontrol ve DMSO gruplarının FPG komete daha yüksek skorlar göstermelerinin mekanik

zorlanmaya bağlı oksidatif duyarlılığın artışından kaynaklandığı kanısını oluşturdu. Tüm gruplar aynı mekanik süreçten geçtikleri için deney sonuçları üzerine etkisi olmayacağı sonucuna varıldı.

Radyasyona maruz kalmış hücrelerde oksidatif hasarın fazla olması zaten beklenen bir durum olduğundan elde ettiğimiz sonuçlar bu bulgu ile uyumlu bulundu. Çünkü radyasyon hasarlarının yaklaşık $\frac{2}{3}$ ' si düşük LET'li radyasyonlar (rn: X ışınları, γ ışınları) tarafından indirekt yoldan meydana getirilmektedir [21].

100 μ M mirisetin uygulamasında FPG skorlarının anlamlı düzeyde yüksek, 200 μ M ise istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olmayışı ($p=0.123$) ancak anlamlılık düzeyine yakın oluşu diğer deney sonuçları da göz önüne alınınca örnek sayısının arttırılması durumunda bu değerin de değişebileceği yönünde düşünmemizi sağladı. Bu sonuçlardan yola çıkarak FPG skorlarını değerlendirerek; deney sürecinin minimal düzeyde de olsa bir oksidasyona yol açtığı, radyasyon uygulamalarının oksidatif hasar yaptığı, mirisetin uygulamalarının 100 μ M dozda oksidatif hasara neden olduğu sonucuna varıldı.

Çalışmada elde edilen bulgulara göre şu değerlendirmeler yapılmıştır;

1. Mirisetin insan lenfosit DNA'sı üzerinde yüksek oranda kırıklara neden olmaktadır (Komet bulgusu). Bu oklu kırıklar hücreyi apoptoza sürükleyip MN oranlarının düşük gözlenmesine neden olabilir. (Mirisetin'in özellikle kanser hücrelerini çeşitli yolaklar aracılığığla apoptoza sürüklediği çeşitli çalışmalar ile bildirilmiştir [54,46,57,104,105].
2. Mirisetin'in Topoizomeraz II inhibisyonu yapma potansiyeli olduğu ve Topoizomeraz inhibisyonu yapılan hücrelerde radyasyona duyarsızlaşma olduğu bilinmektedir [103]. Bu duyarsızlaşma, çalışmamızda uygulanan radyasyon düzeylerinde lenfositleri koruyarak MN sayılarının düşük gözlenmesine neden olabilir.
3. Mirisetin'in yol açtığı kırıklar tamir mekanizmalarının aşırı uyarımına neden olarak MN gözlenme sıklığını düşürmüş olabilir.

Bu bulgulardan yola çıkılarak, bundan sonra yapılacak çalışmalarda, Mirisetin'in sağlıklı hücrelerdeki etkilerinin apoptoz ve DNA tamir mekanizmaları açısından değerlendirilmesi düşünülmektedir.

BÖLÜM 6

KAYNAKLAR

- [1] Ç Algüneş, *Radyasyon Biyofiziği*, Trakya Üniversitesi Rektörlüğü Yayınları, Edirne, 2002.
- [2] A Özalpan, *Temel Radyobiyojoloji*, Haliç Üniversitesi Yayınları, İstanbul, 2001.
- [3] N Devipriya, AR Sudheer, M Srinivasan, VP Menon, *Quercetin ameliorates gamma radiation-induced DNA damage and biochemical changes in human peripheral blood lymphocyte.*, Mutat Res, Jun 30,654(1),1-7, (2008).
- [4] K Shimoi, S Masuda, B Shen, M Furugori, N Kinae, *Radioprotective effects of antioxidative plant flavonoids in mice*, Mutat Res, Feb 19,350(1),153-161, (1996).
- [5] N Begum, NR Prasad, G Kanimozhi, AQ Hasan, *Apigenin ameliorates gamma radiation-induced cytogenetic alterations in cultured human blood lymphocytes.* Mutat Res, Aug 30, 747(1),71-76, (2012).
- [6] SJ Duthie, AR Collins, GG Duthie, VL Dobson, *Quercetin and myricetin protect against hydrogen peroxide-induced DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human lymphocytes.* Mutat Res, 393(3), 223-31, (1997).
- [7] ZH Wang, K Ah Kang, R Zhang, MJ Piao, SH Jo, JS Kim, SS Kang, JS Lee, DH Park, JW Hyun, *Myricetin suppresses oxidative stress-induced cell damage via both direct and indirect antioxidant action.* Environ Toxicol Pharmacol, Jan, 29(1), 12-8, (2010).
- [8] JH Huang, CC Huang, JY Fang, C Yang, CM Chan, NL Wu, SW Kang, CF Hung , *Protective effects of myricetin against ultraviolet-B-induced damage in human keratinocytes*, Toxicol In Vitro, Feb;24(1),21-8, (2010).
- [9] KC Ong, HE Khoo, *Biological effects of myricetin.* Gen Pharmac, 29(2),121-126, (1997).
- [10] EB Podgorsak, *Radiation Physics for Medical Physicist*, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, 2010.

- [11] <http://roachperiodictrends.wikispaces.com/Ionization+Energy>
- [12] SA Göksel, ***Radyasyonların Biyolojik Etkileri ve Radyasyon Korunması***, İstanbul Teknik Üniversitesi Matbaası, Gümüşsuyu, 1973.
- [13] <http://www.kollewin.com/blog/electromagnetic-spectrum/>
- [14] <http://www.epa.gov/radiation/radionuclides/cobalt.html#wheredoes>
- [15] UNSCEAR 2000 Report Vol. II ***Sources And Effects of Ionizing Radiation***
<http://www.unscear.org/docs/reports/annexg.pdf>
- [16] EJ Hall, ***Radiobiology for the Radiologist (3rd Ed)***, J.B. Lippincott Co. Philadelphia, 1988.
- [17] <http://www.epa.gov/radiation/understand/beta.html#use>
- [18] www.taek.gov.tr/belgeler-formlar/mevzuat/yonetmelikler/radyasyon-guvenligi/radyasyon-guvenligi-yonetmeligi/Ek-4-Tibbi-Işınlamalar-İçin-Doz-Doz-Hızı-ve-Aktivite-Referans-Seviyeleri/
- [19] JV Pine (Ed.), ***Radiation Oncology: Management Decisions***, SA Ammundson, ***Altered Fractionation Schedules (s.57)***, Lippincott Williams &Wilkins, Philadelphia, 2011.
- [20] M Dizdaroğlu, ***Oxidatively induced DNA damage: mechanisms, repair and disease***, Cancer Lett, Dec 31, 327(1-2), 26-47, (2012).
- [21] JO Blaisdell, L Harrison, SS Wallace, ***Base excision repair processing of radiation induced clustered DNA lesions***, Radiation Protection Dosimetry, Vol. 97, No. 1, 25–31, (2001).
- [22] EB Podgorsak, ***Radiation Oncology Physics: a Handbook for Teachers and Students***, International Atomic Energy Agency, 2005.
<http://www-naweb.iaea.org/nahu/DMRP/documents/ToC.pdf>
- [23] International Commission on Radiological Protection (ICRP). 1990
Recommendations of International Commission on Radiological Protection, Oxford Pergamon Pres, Oxford, ICRP Publication 60, 21(1-3), (1991).
- [24] CDC Guideline 2005: ***Acute Radiation Syndrome: A Fact Sheet for Physicians***.
www.bt.cdc.gov
- [25] <http://www.thd.org.tr/thdData/Books/29/akut-radyasyon-sendromu-muhit-ozcan-pervin-topcuoglu.pdf>

- [26] WS Klug, MR Cummings, C Öner (Çev.), *Genetik Kavramlar*, Palme Yayıncılık, Ankara, 2012.
- [27] E Jorgensen (Ed.) *Ecotoxicology*, Academic Press (Elsevier), Oxford, 2010.
- [28] <http://www.benbest.com/lifeext/aging.html>
- [29] C Chen (Ed.) *Selected Topics in DNA Repair*, DK Maurya, TPA Devasagayam. ***Role of radioprotectors in the inhibition of DNA damage and modulation of DNA repair after exposure to gamma-radiation***, InTech, Rijeka, 2011.
- [30] J Cadet, T Douki, D Gasparutto, M Gromova, JP Pouget, JL Ravanat, A Romieu, S Sauvaigo, ***Radiation-induced damage to DNA: mechanistic aspects and measurement of base lesions***, Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B, 1511-1517, (1999).
- [31] B Yokuş, DÜ Çakır, ***In vivo oksidatif DNA hasarı biyomarkeri; 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine***, T Klin J Med Sci, 22, 535-543, (2002).
- [32] H Nilsen, HE Krokan, ***Base excision repair in a network of defence and tolerance***, Carcinogenesis, Jul;22(7), 987-998, (2001).
- [33] CY Ock, EH Kim, DJ Choi, HJ Lee, KB Hahm, MH Chung, ***8-Hydroxydeoxyguanosine: Not mere biomarker for oxidative stress, but remedy for oxidative stress-implicated gastrointestinal diseases***, World J Gastroenterol, January 28, 18(4), 302-308, (2012).
- [34] <http://www.saber.ula.ve/>
- [35] <http://atlasgeneticsoncology.org/Deep/Chromaber.html>
- [36] <http://www.nrc.gov/reading-rm/basic-ref/teachers/09.pdf>
- [37] KA Higley, DC Kocher, AG Real, ***Relative biological effectiveness and radiation weighting factors in the context of animals and plants***, Ann ICRP 41 (3-4), 233-245, (2012).
- [38] Committee to Assess Health Risks from Exposure to Low Levels of Ionizing Radiation, ***Health Risks From Exposure To Low Levels Of Ionizing Radiation BEIR VII Phase 2***, The National Academies Press, Washington D.C, 2006.
- [39] Y Xie, H Yang, C Cunanan, K Okamoto, D Shibata, J Pan, DE Barnes, T Lindahl, M McIlhatton, RFishel, JH Miller, ***Deficiencies in mouse Myh and Ogg1 result in tumor predisposition and G to T mutations in codon 12 of the K-ras oncogene in lung tumors***, Cancer Res, 64, 3096–3102, (2004).

- [40] CI Li, N Nishi, JA McDougall, EO Semmens, H Sugiyama, M Soda, R Sakata, M Hayashi, F Kasagi, A Suyama, K Mabuchi, S Davis, K Kodama, KJ Kopecky. ***Relationship between radiation exposure and risk of second primary cancers among atomic bomb survivors***, Cancer Res, September 15, 70(18), 7187–7198, (2010).
- [41] D Citrin, AP Cotrim, F Hyodo, BJ Baum, MC Krishna, JB Mitchell, ***Radioprotectors and mitigators of radiation-induced normal tissue injury***, Oncologist, 15(4): 360–371, (2010).
- [42] CKK Nair, DK Parida, ***Radioprotectors in Radiotherapy***, J Radiat. Res, 42, 21–37 (2001).
- [43] B Hazra, S Ghosh, A Kumar, BN Pandey, ***The prospective role of plant products in radiotherapy of cancer: a current overview***, Front Pharmacol, 2, 94, 1-13, (2011).
- [44] JR Kouvaris, VE Kouloulis, LJ Vlahos, ***Amifostine: the first selective-target and broad-spectrum radioprotector***, The Oncologist, 12,738-747, (2007).
- [45] JA Ross, CM Kasum, ***Dietary Flavonoids: Bioavailability, metabolic effects and safety***, Annu Rev Nutr, 22, 19–34, (2002).
- [46] ML Falcone Ferreyra, SP Rius, P Casati, ***Flavonoids: Biosynthesis, biological functions and biotechnological applications***, Front Pharmacol, September Vol. 3, A. 222, 1-15, (2012).
- [47] KH Mian, S Mohamed, ***Flavonoid (myricetin, quercetin, kaempferol, luteolin, and apigenin) content of edible tropical plants***. J Agric Food Chem, Jun;49(6), 3106-3112, (2001).
- [48] British Nutrition Foundation, G Goldberg .(Ed.), ***Plants: Diet and Health***, Wiley-Blackwell Publishing, Hampshire, 2003.
- [49] AT Canada, E Giannella, TD Nguyen, RP Mason, ***The production of reactive oxygen species by dietary flavonols***, Free Radical Biol Med, 9, 441-449, (1990).
- [50] LA Griffiths, GE Smith, ***Metabolism of myricetin and related compounds in the rat metabolite formation in vivo and by the intestinal microflora in vitro***, Biochemical Journal;130:141-151, (1972).
- [51] RA Mustafa, A AbdulHamid, S Mohamed, F AbuBakar, ***Total phenolic compounds, flavonoids and radical scavenging activity of 21 selected tropical plants***, J of Food Sci, 75, 1, 28-35, (2010).

- [52] V Abalea, J Cillard, MP Dubos, O Sergent, P Cillard, I Morel, ***Repair of iron-induced DNA oxidation by the flavonoid myricetin in primary rat hepatocyte cultures***, Free Radical Bio & Med, 26(11-12), 1457-1466, (1999).
- [53] NM O'brien, JA Woods, A Aherne, YC O'Callaghan, ***Cytotoxicity, genotoxicity and oxidative reactions in cell-culture models: modulatory effects of phytochemicals***, Biochem Soc Trans, 28(2),22-26, (2000).
- [54] PA Phillips, V Sangwan, D Borja-Cacho, V Dudeja, SM Vickers, AK Saluja, ***Myricetin induces pancreatic cancer cell death via the induction of apoptosis and inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) signaling pathway***, Cancer Letters, 308, 181–188, (2011).
- [55] F Sun, XY Zheng, J Ye, TT Wu, J Wang, W. Chen, ***Potential anticancer activity of myricetin in human T24 bladder cancer cells both in vitro and in vivo***, Nutrition and Cancer, 64(4),599-606, (2012).
- [56] P Morales, AI Haza, ***Selective apoptotic effects of piceatannol and myricetin in human cancer cells***, J of App Tox, 32(12), 986-993, (2012).
- [57] W Kim, HJ Yang, HS Youn, YJ Yun, KM Seong, BH Youn, ***Myricetin inhibits Akt survival signaling and induces Bad-mediated apoptosis in a low dose ultraviolet (UV)-B-irradiated HaCaT human immortalized keratinocytes***, J Radiat Res, 51(3), 285-296, (2010).
- [58] W Chen, Y Li, J Li, Q Han, L Ye, A Li, ***Myricetin affords protection against peroxynitrite-mediated DNA damage and hydroxyl radical formation***, Food Chem Toxicol, Sep,49(9), 2439-2444, (2011).
- [59] C Zelus, A Fox, A Calciano, BS Faridian, LA Nogaj, DA Moffet, ***Myricetin inhibits islet amyloid polypeptide (IAPP) aggregation and rescues living mammalian cells from IAPP toxicity***, Open Biochem J, 6, 66-70, (2012).
- [60] F Özcan, A Ozmen, B Akkaya, Y Alicigüzel, M Aslan, ***Beneficial effect of myricetin on renal functions in streptozotocin-induced diabetes***, Clin Exp Med, 12(4), 265-272, (2012).
- [61] V Chobot, F Hadacek, ***Exploration of pro-oxidant and antioxidant activities of the flavonoid myricetin***, 16(6),242-7, (2011).
- [62] FI Bisio, CM Rodrigues, D Rinaldo, MB Reis, CC Bernardi, JC de Mattos, A Caldeira-de-Araújo, W Vilegas, IM Cólus, EA Varanda, ***Assessment of DNA***

- damage induced by extracts, fractions and isolated compounds of Davilla nitida and Davilla elliptica Dilleniaceae*, Mutat Res, Sep 30,702(1), 92-99,(2010).
- [63] K Ono, H Nakane, *Mechanisms of inhibition of various cellular DNA and RNA polymerases by several flavonoids*, J Biochem, 108, 609–613, (1990).
- [64] RD Snyder, PJ Gillies, *Evaluation of the clastogenic, DNA intercalative, and topoisomerase II-interactive properties of bioflavonoids in Chinese hamster V79 cells*, Environ Mol Mutagen, 40(4), 266-276, (2002).
- [65] Z Ma, T Liu, *Myricetin facilitates potassium currents and inhibits neuronal activity of PVN neurons*, Neurochem Res, Jul, 37(7), 1450-1456, (2012).
- [66] KS Panickar, RA Anderson, *Mechanisms underlying the protective effects of myricetin and quercetin following oxygen-glucose deprivation-induced cell swelling and the reduction in glutamate uptake in glial cells*, Neuroscience, Jun 2, 183, 1-14, (2011).
- [67] ID Silva, J Gaspar , GG da Costa , AS Rodrigues , A Lares , J Rueff, *Chemical features of flavonols affecting their genotoxicity. Potential implications in their use as therapeutic agents*, Chem Biol Interact, Jan 3,124(1), 29-51, (2000).
- [68] M Fenech, *The in vitro micronucleus technique*, Mutat Res, 455, 81–95, (2000).
- [69] M Fenech, *Cytokinesis-block micronucleus cytome assay*, Nat Protoc, 2(5), 1084-1104, (2007).
- [70] M Fenech, M Kirsch-Volders, AT Natarajan, J Surralles, JW Crott, J. Parry, H Norppa, DA Eastmond, JD Tucker, P Thomas, *Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells*, Mutagenesis, Jan, 26(1), 125-32, (2011).
- [71] M Fenech, N Holland, WP Chang, E Zeiger, S Bonassi, *The HUMAN MicroNucleus Project-An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans*, Mutat Res, Jul 16, 428 (1-2), 271-283, (1999).
- [72] M Coşkun, M Coşkun, *Biyolojik Dozimetri ve İlgili Gelişmeler*, Cerrahpaşa J Med, 34, 207-218, (2003).
- [73] M Fenech, *The lymphocyte cytokinesis-block micronucleus cytome assay and its application in radiation biodosimetry*, Health Phys, 98(2), 234 –243, (2010).

- [74] CH Clement (Editor), *ICRP Statement on Tissue Reactions / Early and Late Effects of Radiation in Normal Tissues and Organs – Threshold Doses for Tissue Reactions in a Radiation Protection Context*, ICRP Publication 118. Ann. ICRP 41(1/2), Elsevier, 2012.
- [75] FS Pala, F Alkaya, K Tabakçioğlu, F Tokatlı, C Uzal, Ş Parlar, Ç Algüneş, *The effects of micronuclei with whole chromosome on biological dose estimation*, Turk J Biol, 32,283-290, (2008).
- [76] P Atanasova, V Hadjidekova, A Staynova, R Hristova, *The micronuclei frequency as a biological dosimeter of absorbed dose in case of radiation accidents*, Trakia J of Sci, Vol. 7, No. 4, 28-32, (2009).
- [77] AR Collins, AA Oscoz, G Brunborg, I Gaiva, L Giovannelli, M Kruszewski, CC Smith, R Stetina, *The comet assay: topical issues*, Mutagenesis, 23, 3, 143–151, (2008).
- [78] L Serre, K Pereira de Jésus, S Boiteux, C Zelwer, B Castaing, *Crystal structure of the Lactococcus lactis formamidopyrimidine-DNA glycosylase bound to an abasic site analogue-containing DNA*, The EMBO J, 21, 2854 – 2865, (2002).
- [79] <http://www.ebi.ac.uk/QuickGO/GTerm?id=GO:0000703>
- [80] DM Wilson, TM Sofinowski, DR McNeill, *Repair mechanisms for oxidative DNA damage*, Front. Biosci, 8, 963–981, (2003).
- [81] SS David, VL O’Shea, S Kundu, *Base-excision repair of oxidative DNA damage*. Nature, 447, 941–950, (2007).
- [82] W Krzyściak, A Cierniak, M Kózka, J Koziel, *Oxidative DNA damage in blood of CVD patients taking detralex*, Open Cardiovasc Med J, 5, 179-87, (2011).
- [83] SM Piperakis, *Comet assay: A brief history*, Cell Biol Toxicol, 25, 1–3, (2009).
- [84] RR Tice, E Agurell, D Anderson, B Burlinson, A Hartmann, H Kobayashi, Y Miyamae, E Rojas, JC Ryu, YF Sasaki, *Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for In vitro and In vivo genetic toxicology testing*, Environ Mol Mutagenesis, 35, 206-221, (2000).
- [85] L Giovannelli, V Pitozzi, S Riolo, P Dolara, *Measurement of DNA breaks and oxidative damage in polymorphonuclear and mononuclear white blood cells: a novel approach using the comet assay*, Mutat Res, Jul 8, 538(1-2), 71-80,(2003).

- [86] PL Olive, *Impact of the comet assay in radiobiology*, Mutat Res, Jan-Feb, 681(1), 13-23, Nov 12, (2009).
- [87] JP Pouget, T Douki, MJ Richard, J Cadet, *DNA damage induced in cells by and UVA radiation as measured by HPLC/GC-MS and HPLC-EC and comet assay*, Chem Res Toxicol, 13, 541-549, (2000).
- [88] A Dhawan, M Bajpayee, D Parmar, *Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models*, Cell Biol Toxicol, 25, 5–32, (2009).
- [89] M Valverde, E Rojas, *Environmental and occupational biomonitoring using the Comet assay*. Mutat Res, Jan-Feb, 681(1), 93-109, (2009).
- [90] RM Lequin, *Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)*, Clin Chem, 51, 12, 2415–2418, (2005).
- [91] JR Crowther, *ELISA Guide Book (Methods in Molecular Biology, Vol 149)*, Humana Press, New Jersey, 2001.
- [92] www.piercenet.com
- [93] M Fenech, WP Chang, M Kirsch-Volders, N Holland, S Bonassi, E Zeiger, *HUMAN MicroNucleus project. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures*, Mutat Res, Jan 10, 534(1-2), 65-75, (2003).
- [94] <http://www.cometassayindia.org/Dusinska-protocol.PDF>
- [95] M Mikloš, G Gajski, V Garaj – Vrhovac, *Usage of the standard and modified comet assay in assessment of DNA damage in human lymphocytes after exposure to ionizing radiation*, Radiol Oncol, 43(2), 97-107, (2009).
- [96] SJ Duthie, W Johnson, VL Dobson, *The effect of dietary flavonoids on DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) and growth in human cells*, Mutat Res, 390, 141-151, (1997).
- [97] D Anderson, TW Yu, MM. Dobrzyn'ska, G Ribas, R Marcos, *Effects in the comet assay of storage conditions on human blood*, Teratog Carcinog Mutagen, 17,115–125, (1997).
- [98] M Noroozi, WJ Angerson, MEJ Lean, *Effects of flavonoids and vitamin C on oxidative DNA damage to human lymphocytes*, Am J Clin Nutr, 67,1210-1218, (1998).

- [99] JC Wu , YC Hseu, CH Chen, SH Wang, SC Chen, *Comparative investigations of genotoxic activity of five nitriles in the comet assay and the Ames test*, J Hazard Mater, 169, 1–3, 492–497, (2009).
- [100] SW Maluf, *Monitoring DNA damage following radiation exposure using cytokinesis-block micronucleus method and alkaline single-cell gel electrophoresis*, Clin Chim Acta, Sep, 347(1-2),15-24, (2004).
- [101] KH Jones, TP York, J Juusola, A Ferreira-Gonzalez, HH Maes, C Jackson-Cook. *Genetic and environmental influences on spontaneous micronuclei frequencies in children and adults: a twin study*, Mutagenesis, 26, 6, 745–752, (2011).
- [102] Damla Eker (Tez Yöneticisi: Funda S.Pala), *Myricetin'in Radyoprotektif Etkisinin Mikronukleus Yöntemiyle İn Vitro Şartlarda İncelenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Edirne, 2013.
- [103] SY Terry, AC Riches, PE Bryant, *Suppression of topoisomerase II alpha expression and function in human cells decreases chromosomal radiosensitivity*, Mutat Res, Apr 26, 663(1-2), 40-45, (2009).
- [104] YW Shih, PF Wu, YC Lee, MD Shi, TA Chiang, *Myricetin suppresses invasion and migration of human lung adenocarcinoma A549 cells: possible mediation by blocking the ERK signaling pathway*, J Agric Food Chem, May 13,57(9), 3490-3499, (2009).
- [105] CH Ko, SC, Shen CS Hsu, YC Chen, *Mitochondrial-dependent, reactive oxygen species-independent apoptosis by myricetin: roles of protein kinase C, cytochrome c, and caspase cascade*, Mar 15, 69(6), 913-27, (2005).
- [106] A Güerci, L Zúñiga, R Marcos, *Construction and validation of a dose-response curve using the comet assay to determine human radiosensitivity to ionizing radiation*, J of Toxicol and Environ Health, PartA, Current Issues, 74,15-16, 1087-1093, (2011).
- [107] KB Kalpana, N Devipriya, M Srinivasan, VP Menon, *Investigation of the radioprotective efficacy of hesperidin against gamma-radiation induced cellular damage in cultured human peripheral blood lymphocytes*, Mutat Res, May 31, 676 (1-2), 54-61, (2009).
- [108] K Min, SE Ebeler, *Flavonoid effects on DNA oxidation at low concentrations relevant to physiological levels*, Food and Chem Toxicol, 46, 96–104, (2008).

BÖLÜM 7

ÖZGEÇMİŞ

29 Nisan 1970 tarihinde Tekirdağ'ın Saray ilçesinde dünyaya geldim. İlkokul, Ortaokul ve Liseyi Saray'da okudum. 1987 yılında Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi'ni kazandım. 1996 yılında mezun olduktan sonra pratisyen hekim olarak Amasya'nın Merzifon İlçesi, Yakupköy Sağlık Ocağı'na atandım. Sırasıyla Taşova- Boraboy S.O. (Amasya), Saray-Büyük Yoncalı S.O., Saray Devlet Hastanesi Acil Servis, Muratlı Merkez S.O.(Tekirdağ)'da pratisyen hekim olarak çalıştım. 2002-2005 yılları arasında Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nde Tıbbi Biyoloji Yüksek Lisansı yaptım. 2001 yılından beri de Trakya Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji A.D.'nda araştırma görevlisi olarak görev yapmaktayım.