



T.C.  
Uludağ Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü

**CİNNAMİK (SİNNAMİK) ASİDİN  
RADYASYONDAN KORUYUCU ETKİSİNİN  
İN VİTRO KISA SÜRELİ GENOTOKSİTE  
TEST YÖNTEMLERİ İLE ARAŞTIRILMASI  
Ece TÜZÜN**

Yüksek Lisans Tezi

**CİNNAMİK (SİNNAMİK) ASİDİN  
RADYASYONDAN KORUYUCU ETKİSİNİN İN  
VİTRO KISA SÜRELİ GENOTOKSİTE TEST  
YÖNTEMLERİ İLE ARAŞTIRILMASI  
Ece TÜZÜN**



T.C.

ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**CİNNAMİC (SİNNAMİK) ASİDİN RADYASYONDAN KORUYUCU  
ETKİSİNİN İN VİTRO KISA SÜRELİ GENOTOKSİSİTE TEST  
YÖNTEMLERİ İLE ARAŞTIRILMASI**

Ece TÜZÜN

Doç. Dr. Nilüfer ÇİNKİLİÇ

(Danışman)

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BURSA-2013  
**Her Hakkı Saklıdır**

## TEZ ONAYI

Ece TÜZÜN tarafından hazırlanan “Cinnamic (sinnamik) asidin radyasyondan koruyucu etkisinin in vitro kısa süreli genotoksisite test yöntemleri ile araştırılması” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

**Danışman** : Doç Dr. Nilüfer ÇİNKİLİÇ

**Başkan** : Doç. Dr. Nilüfer ÇİNKİLİÇ

İmza

Uludağ Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü  
Genel Biyoloji Anabilim Dalı

**Üye** : Prof. Dr. Rahmi BİLALOĞLU

İmza

Uludağ Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü  
Genel Biyoloji Anabilim Dalı

**Üye** : Prof. Dr. Lütfi ÖZKAN

İmza

Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyasyon Onkolojisi  
Anabilim Dalı

**Yukarıdaki sonucu onaylarım**

**Prof. Dr. Kadri ARSLAN**

**Enstitü Müdürü**

**.././....(Tarih)**

**U.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;**

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
  - görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
  - başkalarının eserlerinden yararlanması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
  - atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
  - kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
  - ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı
- beyan ederim.**

**04.02.2013**

**İmza**

**Ece TÜZÜN**

## ÖZET

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

Bireylerden heparinize olarak alınan periferel kandan lenfosit izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen lenfositler kültüre edilmiş ve kültür sonunda hücreler 1 ve 2 Gy radyasyona maruz bırakılmıştır. Radyasyon maruziyetinden 30 dakika önce hücreler 1, 2, 4 µg/ml sinnamik asit dozları ile inkübe edilmiştir. Bu işlemlerde sonra in vitro comet ve mikronukleus testleri gerçekleştirilmiştir. COMET testi sonuçlarına göre genetik hasar indeksi ve hasarlı hücre değerlerinden yararlanılarak karşılaştırmalar yapılmıştır. Genetik hasar indeksleri açısından 1 Gy.R. ile 1, 2, 4 µg/ml sinnamik asit kombine dozları ve 2 Gy.R. ile 1, 2, 4 µg/ml sinnamik asit kombine dozlarıyla yapılan ikili karşılaştırmalar açısından istatistiksel olarak bir anlamlılık bulunmuştur ( $p < 0,001$ ). COMET testinden yararlanılarak % Hasarlı Hücre değerleri ile de 1 Gy.R. ile 1, 2, 4 µg/ml sinnamik asit kombine dozları ve 2 Gy.R. ile 1, 2, 4 µg/ml sinnamik asit kombine dozlarıyla da karşılaştırmalar yapılmış bir anlamlılık burada da bulunmuştur ( $p < 0,005$ ). Mikronukleus testinden yararlanılarak MN frekansı ve Nükleer Bölünme İndeksi (NBİ) ortalama değerlerine göre gerekli istatistiksel test yöntemleri kullanılarak karşılaştırmalar yapılmıştır. NBİ değerleri açısından bir anlamlılık bulunmamıştır ( $p > 0,05$ ). MN frekansı açısından ise 1 Gy.R. ile 1, 2, 4 µg/ml sinnamik asit kombine dozları ve 2 Gy.R. ile 1, 2, 4 µg/ml sinnamik asit kombine dozlarıyla yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda bir anlamlılık bulunmuştur ( $p < 0,05$ ).

Sonuç olarak radyasyonun 1 ve 2 Gy' lik dozları COMET ve mikronukleus testlerine göre genotoksik etki göstermiştir. Sinnamik asitte bu radyasyonun indüklediği genetik hasarı azaltmıştır. COMET ve mikronukleus testlerine dayanarak sinnamik asitin radyoprotektif etkisinin olduğu ortaya konmuştur.

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

## ABSTRACT

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

Blood samples were drawn into tubes with heparin as an anticoagulant and lymphocytes are isolated. Isolated lymphocytes were cultured. After 24 hours following culture initiation, the lymphocytes were incubated with 1, 2 and 4 µg/ml doses of cinnamic acid. Thirty minutes after cinnamic acid treatment, all lymphocyte culture petri dishes excluding control lymphocytes were exposed to ionizing radiation. On cell viabilities were ensured, more than 80%, the lymphocytes were subjected to the COMET and micronucleus assay after irradiation. According to COMET assay results, comparisons were made using the values of % Damaged Cells and Genetic Damage Index. In terms of Genetic Damage Index, as a result of the comparisons of 1 Gy.R. with 1, 2 and 4 combined of cinnamic acid and 2 Gy.R. with 1, 2 and 4 combined of cinnamic acid statistically significant difference was found ( $p < 0,001$ ). Using the COMET assay, according to percentage of damaged cells, 1 Gy.R. with 1, 2 and 4 combined of cinnamic acid and 2 Gy.R. with 1, 2 and 4 combined of cinnamic acid significant differences were found ( $p < 0,005$ ).

According to MN frequency and Nuclear Division Index, statistical comparisons were made using the required test methods. No statistically significant differences were found in terms of NBI ( $p > 0,05$ ). In terms of frequency of MN as a result of the comparisons of 1 Gy.R. with 1, 2 and 4 combined of cinnamic acid and 2 Gy.R. with 1, 2 and 4 combined of cinnamic acid significant difference was found ( $p < 0,05$ ).

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

Keywords: Ionizing Radiation, Cinnamic acid, COMET assay, Micronucleus test, Antioxidant, Genotoxicity, Radioprotection.

**İÇİNDEKİLER SAYFA**

TEZ ONAY SAYFASI	I
ÖZET	II
ABSTRACT	III
İÇİNDEKİLER	IV
KISALTMALAR DİZİNİ	VI
ÇİZELGELER DİZİNİ	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ	VIII
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
<b>2. KAYNAK ARAŞTIRMASI</b>	<b>3</b>
2.1 Bitkisel Fenolik Bileşikler	3
2.1.1 Sinnamik asit	6
2.2 RADYASYON	8
2.2.1 Suyun Hidrolizi	8
2.2.2 Radyasyon Hasarları	11
2.2.3 Radyasyonun DNA molekülüne etkileri	12
2.2.3.1 Yapısal Hasarlar	12
2.2.4 Radyasyonun Kromozomlara Etkisi	14
2.2.5 Radyasyonun RNA Molekülüne Etkileri	16
2.2.6 Radyasyonun Protein ve Enzimlere Etkileri	17
2.2.7 Radyasyonun Zar Sistemlerine Etkisi	17
2.2.8 Radyasyonun İnsanlar Üzerine Etkisi	18
2.2.8.1 Radyasyonun Geç Etkileri	18
2.2.8.1.1 Genetik Değişikler	18



2.2.8.1.2 Karsinogen Etki	20
2.2.9.Radyoprotektörler	21
2.2.9.1 Antioksidanların ve Fenolik BileşiklerinRadyoprotektif Etkileri	22
2.2.9.2 Vitaminler	23
2.2.9.3 Selenyum ve Selenyum/Vitamin E Kombinasyonları	24
2.2.9.4 Fitokimyasallar	24
2.2.9.5 Fenolik Bileşikler ve FlavonoidlerinRadyoprotektif Etkileri	25
2.3 Genotoksisite ve Antigenotoksisite Değerlendirmelerinde Kullanılan Test Kısa Süreli Yöntemleri	28
2.3.1 SCE Yöntemi	28
2.3.2 CA Yöntemi (Kromozomların homojen boyanması)	28
2.3.3 COMET Testi (Tek Hücre Jel Elektroforezi)	29
2.3.4 Mikronukleus (MN) Testi	31
<b>3. MATERYAL VE METOT</b>	<b>33</b>
3.1. Çalışmada Kullanılan Deney Ekipmanı	33
3.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler	34
3.3 Çalışmada Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması	35
3.4 Yöntem	38
<b>4. BULGULAR</b>	<b>45</b>
4.1. COMET Testi İçin Ede Edilen Sonuçlar	48
4.2. Mikronukleus Testi İçin Ede Edilen Sonuçlar	59
<b>5. FOTOĞRAFLAR</b>	<b>68</b>
<b>6. TARTIŞMA</b>	<b>73</b>
<b>7. KAYNAKLAR</b>	<b>78</b>

**KISALTMALAR DİZİNİ**

C: Karbon

CA: Kromozom aberasyonu tekniği

Ca+2: Kalsiyum

CH3: Metil grubu

DMSO: Dimetilsülfoksit

DNA: Deoksiribonükleik asit

GHI: Genetik Hasar İndeksi

H+: Hidrojen

H2O: Su molekülü

H2O2: Hidrojen peroksit

HH: Hasarlı hücre

MN: Mikronukleus

OH: Hidroksi radikali

SCE: KardeşKromatid Değişimi

SSB: Tek zincir kırıkları

UV: Ultraviyole

## **ÇİZELGELER DİZİNİ**

Çizelge 2.1. Radyasyonun genetik etkileri

Çizelge 2.2. Bazı radyoprotektif özelliğe sahip bitkiler ve radyoprotektif özellikleri

Çizelge 4.1. Trypan Blue testi ile tüm donörlere ait canlı hücre sayımları sonuçları

Çizelge 4.2. 1ve 2 Numaralı Donöre ait kontrol, pozitif kontrol, sinamik asit, radyasyon ve radyasyon ile birlikte kinik asit muamelerini içeren COMET testi verileri

Çizelge 4.3. Tüm donörlere ait Genetik Hasar İndeks, % Hasarlı Hücre ortalama değerleri ve radyasyondan koruma indeksi

Çizelge 4.4. Comet Testindeki Genetik Hasar İndekslerinin İstatistiksel anlamlılıklarının karşılaştırma sonuçları

Çizelge 4.5. Comet Testindeki % HH İstatistiksel anlamlılıklarının karşılaştırma sonuçları

Çizelge 4.6. MN testi sonucunda 1. Donör ve 2. Donör için elde edilen veriler

Çizelge 4.7. MN testi ile elde edilen tüm Donörlere ait verilerin özet bulguları

Çizelge 4.8. MN testinin İstatistiksel anlamlılıklarının karşılaştırma sonuçları

**ŞEKİLLER DİZİNİ**

Şekil 2.1.: Sinamikasitin moleküler yapısı

Şekil 2.2.: Su Molekülünün radyasyon ile hidrolizi

Şekil 2.3.: Radyasyonun canlıdaki etki kademeleri

Şekil 2.4.: 8-oksoguaninin moleküler yapısı

Şekil 2.5.a.: Tek zincir kırıkları

Şekil 2.5.b.: Çift zincir kırıkları

Şekil 2.6.: Lenfosit, binükleat hücre ve mikronukleuslubinükleat hücre

Şekil 2.7.: Radyoprotektörlerin etki mekanizmaları

Şekil 2.8.: COMET testi aşamaları

Şekil 4.1. Tüm gruplara ait % Hasarlı hücre ortalama değerlerinin grafiksel olarak dağılımı.

Şekil 4.2. Tüm gruplara ait % Hasarlı hücre ortalama değerlerinin grafiksel olarak dağılımı.

Şekil 4.3. Tüm gruplara ait MN frekansı ortalama değerlerinin grafiksel olarak dağılımı.

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

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

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

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

Şekil 5.5. COMET testine göre Tip 4 olarak değerlendirilen hücre

Şekil 5.6. Mikronukleus Testine göre tek çekirdekli hücre

Şekil 5.7. Mikronukleus Testine göre çift çekirdekli hücre

Şekil 5.8. Mikronukleus Testine göre çift çekirdekli hücre de mikronukleus

Şekil 5.9. Mikronukleus Testine göre üç çekirdekli hücre

Şekil 5.10. Mikronukleus Testine göre dört çekirdekli hücre

## 1. GİRİŞ

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

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

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

Kanserde radyoterapi önemli bir tedavi seçeneğidir ve radyasyonun insanlarda oluşturduğu olumsuz yan etkiler nedeniyle radyoterapide sağlıklı hücreleri korumak tümör hücrelerini ise ölüme götürmek hedeflenmiştir. Çalışmamızda iyonize radyasyonun olumsuz yan etkilerinden koruyucu olası ajan olarak bitkisel bir doğal bileşik olan sinamik asit çalışılmıştır. İyonize radyasyon kaynağı olarak hastanelerin genellikle radyasyon onkolojisi bölümlerinde kullanılan lineer akseleratör cihazı kullanılmıştır. Bu cihaz radyoterapide yaygın olarak kullanılır ve bu cihaz sayesinde yüksek enerjili ışınlar elde edilir (Kutluk ve Kars 1992).

Geçtiğimiz yıllar içerisinde radyoprotektif amaçlı yapılan çalışmalarda radyoprotektör ajan olarak bitkisel fenolik bileşikler kullanılmıştır. Radyasyon hücrel

oksidatif hasara ve indirekt etki olarak serbest oksijen radikallerinin oluşumuna neden olabilir. Fenolik bileşikler antioksidan özellikleri sayesinde bu serbest oksijen radikallerinin uzaklaştırılmasında önemli rol oynarlar (Devipriya ve ark. 2008).

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

Çalışmamızda fenolik asitlerden olan sinnamik asitin, radyasyonun indüklediği genotoksik hasara karşı radyokoruyucu etkisi incelenecektir. Sinnamik asit tarçın, balmumu ve Shea bitkisi yağında bulunan tatlandırıcı ve koku elemanı olarak kullanılan bir fenolik asittir. Sinnamik asit unlu mamüllerde, içkilerde, diş macunu ve sakız gibi ürünlerde yaygın olarak kullanılmaktadır (Sharma, 2011). Sinnamik asit pek çok bitkide lignin üretiminde önemli bir ara basamaktır (Boerjan et al., 2003). Doğal hidroksi sinnamat bileşiklerinin anti-tümör ve antioksidan özellikleri gösterilmiştir (Epifano et al., 2007; Fiuza et al., 2004 and Gomes et al., 2003). Ancak bu bileşiklerin radyokoruyucu etkileri ile ilgili bir çalışma mevcut değildir.

Çalışmamızda insan periferik kan lenfositlerinde iyonize radyasyon ile genotoksik hasar oluşturulmuştur. İyonize radyasyonun DNA molekülüne zincir kırıkları, kromozom düzensizlikleri, oksidatif hasar gibi birçok etkisi vardır (Özalpan 2001).

Radyasyonun indüklediği hasardan korunmak için, birçok antioksidan fenolik maddenin biyosentezinde ve yapısında bulunan sinnamik asitin, serbest radikalleri azaltıcı etkisinden dolayı radyasyonun indüklediği hasarı azaltacağı düşünülmüştür. Çalışmamızda in vitro COMET testi ve Mikronukleus (MN) tekniği kullanılmıştır. Bu testler önemli genotoksisite test yöntemleridir ve hızlı güvenilir sonuçlar verirler. Bu testler sayesinde radyasyonun indüklediği genetik materyal hasarı belirlenebilmektedir (Tice ve ark 2000, Fenech 1993). Bilinçli veya bilinçsiz olarak maruz kalınan radyasyonun insandaki geç etkileri göz ardı edilemeyecek kadar çoktur. Bu etkileri azaltma amacıyla bitki kaynaklı fenoliklerin tüketilmesi önemlidir. Bu zamana kadar

birçok fenolik ile çalışma yapılmıştır. Bu çalışmada, radyasyonun genotoksik ve sinamik asitin radyokoruyucu etkisi hakkında bilgi verilecektir.

## **2. KAYNAK ARAŞTIRMASI**

### **2.1 Bitkisel Fenolik Bileşikler**

Fenolik bileşikler bitkilerde doğal olarak oluşan maddelerdir. Bir veya daha fazla aromatik benzen halkaları ile bir veya daha fazla hidroksil gruplarının (-OH) bir araya gelmesiyle oluşur (Frank 2004). Fenolik bileşikler ikincil metabolitler olarak tanınmaktadırlar. Bitki dokularının normal gelişimi sırasında, enfeksiyon, yaralanma ve UV ışınlarına maruz kalma gibi stres koşulları altında sentezlenmektedir. Meyvelerde ürünlerin keskinlik, sertlik, renk, aroma, koku ve oksidatif hasar onarımına katkıda bulunmaktadır. Ancak fenolik bileşiklerin dokulardaki ve hücrelerdeki düzeyi daima aynı değildir (Naczki ve Shaidi 2004).

Fenolik bileşiklerin bir kısmı suda çözünebilen glikozidik formda bulunurlar. Glikozidik fenolik bileşikler hücrede merkezi kofulda bulunur. Diğer fenolik bileşikler lipofiliktir ve hücrede sitoplazmada bulunurlar. Doğal olarak oluşan 8000 bitkisel fenolik bileşik vardır ve bunların yaklaşık olarak yarısı flavonoidlerdir (Harbourne 1999).

Bütün fenolik bileşikler bir ya da birden fazla benzen ile bir veya daha fazla hidroksil grubuna sahiptir. Metil, metoksil, amino veya glikosil grupları eklenerek farklılaşabilirler (Beckman 2000). Bitki fenolik bileşiklerinin farklı kromatografik teknikler ile analizi sayesinde çeşitli türlerde tanımlama ve taksonomik amaçlı araştırmalar gerçekleştirilmiştir (Ulubelde 1984, Martelock ve ark. 1994). Bitki fenolikleri; basit fenoller (benzoik ve sinamik asit türevleri), kumarinleri, flavonoidleri, stilbenleri, tanenleri, lignanları, ligninleri (Naczki ve Shaidi 2004) ve kinonları (Harbourne 1994) içermektedirler.

Basit fenoller fenolik asitleri ve fenolik ketonları içerirler. Fenilpropanoidler C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> çekirdek yapısına sahiptirler. Koumarinler, fenilpropanoid türevleridirler. Koumarinler bitkisel orjinli yiyeceklerde serbest ya da glikozid formunda bulunan cis-O-hidroksisinamik asit türevlerinin laktonlarıdır. En önemli grupları basit coumarinler,

füranokoumarinler ve püranocoumarinlerdir. Bu gruplar bitkisel yiyeceklerde serbest yada glikozid formlarında bulunur. Coumarinler, Umbelliferae ve Rataceae familyalarında bulunur (Murray et al. 1982).

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

Tanenler yüksek bitkilerde bulunan polifenolik ikincil metabolitlerdir. Tanenler gallik asit türevleridirler. Dört ana gruba ayrılırlar. Bu gruplar gallotanenler, elajitanenler, kompleks tanenler ve kondense tanenlerden oluşurlar (Khanbabae ve Van Ree, 2001). Kinonlar ortak bir kinon çekirdeğine sahip ve benzokinon, naftakinon ve anthokinonlar olarak 3 alt gruba ayrılan pigmentlerdir ( Harbourne, 1999). Stilbenoidler, sinamik asit ve molinil koenzim A dan türevlenen C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> iskeletine sahip fenolik bileşiklerdir. Stilbenoidlere, Angiospermae altbölümüne ait bitkilerde rastlanır (Gorham 1996).

Flavonoidler 5 ayrı başlık altında sınıflandırılabilirler. Antosiyanin maviden kırmızı ya kadar olan pigmentlerdir. Antoklorlar ise sarı pigmentlerdir. Antosiyaninler suda çözülebilir pigmentlerdir ve 3. konumdaki karbonil grupları eksik olduğundan dolayı flavanlar olarak da bilinirler. Minör flavonoidler; dihidriflavonları, dihidrokolkonları, flavanonları, flavonları, flavonolları, Leguminosae familyasında bulunan izoflavonoidleri ve proteinlerle birleşme affinitesi gösteren tanenleri içerirler. Flavonoidler yakın ilişkili yapılara sahiptirler ve flavonun C<sub>15</sub> heterosiklik çekirdeğini esas alırlar (Harbourne 1994).

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



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

Fenolik bileşikler biyolojik özelliklerinin dışında aynı zamanda gıda, kozmetik ve farmakolojide de kullanılmaktadır (Moure ve ark. 2001). Ayrıca yoğunluğu düşük lipoproteinler (LDL) ve trombositlerin toplanması üzerine fenolik bileşiklerin faydalı etkileri vardır. Aynı zamanda fenolik bileşikler kalp damarlarının kan pıhtısı ile tıkanmasında bazı temel risk faktörlerini azaltmaktadır (Poyrazoğlu ve ark. 2002).

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

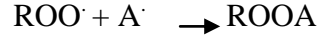
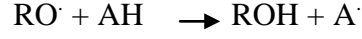
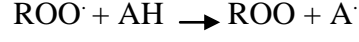
Yapılan farmakolojik araştırmalara göre; yüksek fenolik bileşik içeren sebze ve meyvelerin tüketimi kalp, beyin hastalıkları ve kanser ölüm oranını azaltmaktadır. (Hertog ve ark. 1997).

Flavonoidler ve diğer bitki fenoliklerinin süperoksit, peroksit ve nitrik oksit gibi radikalleri temizleme, demir ve bakır şelasyonu,  $\alpha$ -tokoferol rejenerasyonu fonksiyonlarına ek olarak; vazodilatör, immünstimülan, antialerjik, östrojenik, antiviral etkileri de söz konusudur (Çimen ve Burak 1999).

İnsanda bulunan serbest radikaller; yağlar, proteinler ve nükleik asitlerin oksidatif deformasyonuna neden olmaktadır. Antioksidan bileşikler ise bu serbest radikalleri etkisiz hale getirme yeteneğine sahiptir (Clifford 1999). Fenolik bileşikler ve onların bazı türleri otooksidasyonun önlenmesinde çok etkili rol oynarlar. Bazı bitki fenolikleri son zamanlarda antioksidan olarak kabul edilmişlerdir ve ticari olarak üretilmektedirler (Feridoon ve ark. 1992).

Fenolik bileşiklerin antioksidan aktivitesi; serbest radikalleri temizlemesi ve hidrojen atomlarını veya elektronlarını vermesinden kaynaklanmaktadır. Fenolik bileşiklerin yapıları serbest radikallerin belirlenmesinde bir anahtardır. Fenolik bileşiklerin antioksidan etkileri ve faydaları onların emilimine ve metabolizmasına bağlıdır (Balasundram ve ark. 2005). Fenolik antioksidanlar (AH), lipid radikallere

hızlı  $H^+$  vererek lipid oksidasyonu ile etkileşir. Görevleri lipid peroksi (ROO) ve alkoksil (RO) radikalini parçalamak ve böylece lipid peroksidasyon zincir reaksiyonunu sonlandırmaktır.

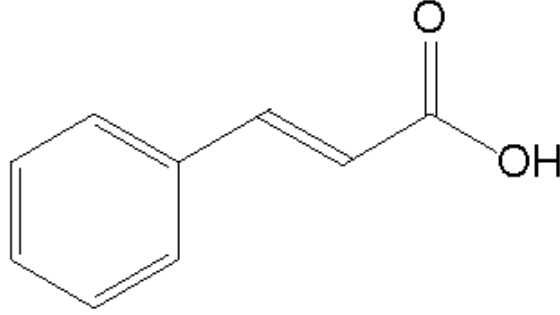


Sonuçta oluşan fenoksi radikali yeni bir serbest radikal oluşumunu başlatmamalı veya zincir reaksiyonu ile hızlı bir oksidasyona maruz kalmalıdır. Bu yönden fenolik antioksidanlar mükemmel  $H^+$  ve  $e^-$  donörleridir ( Feridoon ve ark. 1992, Tüzün C 1996).

Cai ve ark. (2004), Çin'deki antikanserojen özelliğe sahip geleneksel tıbbi bitkilerin 112 türünde fenolik bileşikler ile antioksidan aktivitesi arasındaki ilişkiyi incelemişlerdir. Sonuç olarak, incelenen tıbbi bitkilerde fenolik bileşiklerin baskın antioksidan özelliğe sahip olduğunu bulmuşlardır. Geçtiğimiz 10 yılda yapılan çalışmalara göre; bitkilerdeki fenolik bileşiklerin antioksidan özelliği bakımından, vitamin E ve vitamin C' den daha fazla etkili olduğu bulunmuştur (Rene ve ark. 2001)

### 2.1.1 Sinnamik Asit

Sinnamik asit tarçın, balmumu ve Shea bitkisi yağında bulunan tatlandırıcı ve koku elemanı olarak kullanılan bir fenolik asittir. Sinnamik asit unlu mamüllerde, içkilerde, diş macunu ve sakız gibi ürünlerde yaygın olarak kullanılmaktadır (Sharma, 2011). Sinnamik asit pek çok bitkide lignin üretiminde önemli bir ara basamaktır (Boerjan et al., 2003).



Şekil 2.1. Sinnamik asitin moleküler yapısı

Kimyasal olarak sinnamik asit ve türevlerinde 3- fenil akrilik asit işlevselliği başlıca üç reaktif bölgenin oluşumunu sağlar; fenil halkasında yer değiştirme,  $\alpha,\beta$ - doymamış halkadan eklenme ve karboksilik asit işlevi ile reaksiyonlara girme gibi olmaktadır (Baltas ve Bedos-Belval, 2011).

Ekmekçioğlu ve ark. (1998) sinnamik asitin hücre proliferasyonu ve alkalın fosfataz, sukraz ve aminopeptidaz N farklılaşma belirteçleri üzerine etkisini insan kolon adenokarsinoma (Caco-2) hücrelerinde incelemiştir. Bu çalışmada sinnamik asitin önemli bir antiproliferatif ajan olduğu ve büyüyen hücrelerde DNA sentezini inhibe ettiği ortaya konmuştur (Ekmekçioğlu ve ark. 1998).

Sinnamik asit ve türevleri ile yapılan antioksidan aktivite çalışmalarında bu bileşiklerin yüksek oranda antioksidan aktivite gösterdikleri belirlenmiştir. Antioksidan özelliklerinin ortamdaki serbest radikalleri uzaklaştırma ve lipid peroksidasyonu yeteneğinden geldiği bilinmektedir (Sharma 2011). Bazı sinnamik asit analoglarının tirozin kinaz inhibitörleri gibi hareket ederek tümör hücre çoğalmasını engelledikleri öne sürülmüştür (Shiraishi ve ark. 1989).

## 2.3 RADYASYON NEDİR?

Radyasyon, dalga, parçacık veya foton olarak adlandırılan enerji paketleri ile yayılan enerjidir. Bu enerji, doğal ya da yapay radyoaktif çekirdeklerin kararlı yapıya geçebilmek için dışarı saldıkları hızlı parçacıklar ve elektromanyetik dalga şeklinde taşınır.

- Enerjisi (düşük ve yüksek enerjili radyasyon )
- Türü (parçacık radyasyonu ve elektromanyetik radyasyon)
- Kaynağı (doğal ve yapay radyasyon kaynakları)

Parçacık radyasyonu; belli bir kütle ve enerjiye sahip çok hızlı hareket eden minik parçacıkları ifade eder. Bunlar hızla giden mermilere benzerler, ancak gözle görülemeyecek kadar küçüktürler. Alfa(  $\alpha$  ) ve Beta( $\beta$ ) ışınları bu tür radyasyona örnektir (Önen 1997).

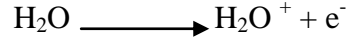
Elektromanyetik tipi radyasyon; belli bir enerjiye sahip ancak kütsüz radyasyon çeşididir. Bunlar, titreşim yaparak ilerleyen elektrik ve manyetik enerji dalgaları gibidir. Yayılmaları sırasında belirli bir ortama ihtiyaç göstermeyen ve yolları üzerinde bir cisme çarpmadıkları sürece enerjilerinden bir şey kaybetmeyen elektromanyetik dalgalar boşlukta yayılmaları sırasında aynı hıza sahiptir ( $3 \times 10^8$  m/saniye). Ancak elektromanyetik radyasyonlar yolları üzerinde bir cisimle çarpıştıklarında enerji transferi gerçekleşir ve çarpışma sonrası ikinci bir elektromanyetik dalga oluştuğunda, ikinci dalganın enerjisi birinciye göre farklılık gösterir. Bütün elektromanyetik dalgalar aynı hıza sahip olmakla beraber frekansları ile doğru, dalga boyları ile ters orantılı olan enerji seviyelerine göre bir spektruma sahiptirler.

1895 yılında Alman fizikçi Wilhelm Conrad Roentgen, X ışınlarını keşfetti. 1896 ve 1898 yılları sırasında sırası ile Henri Becquerel ve Marie Curie uranyum ve radyumun radyoaktif özelliklerini buldular ( Nias 1990).

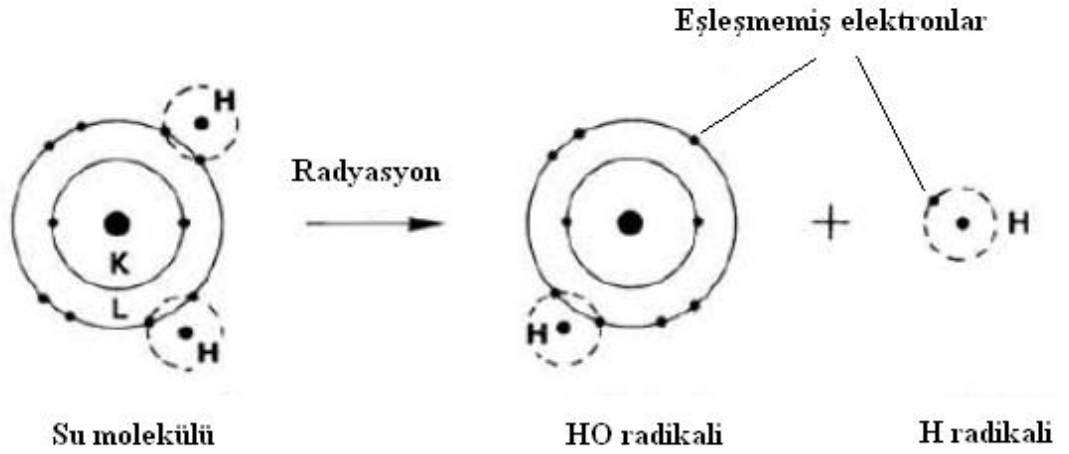
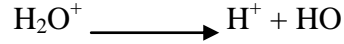
### 2.2.1 Suyun Hidrolizi

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

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



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



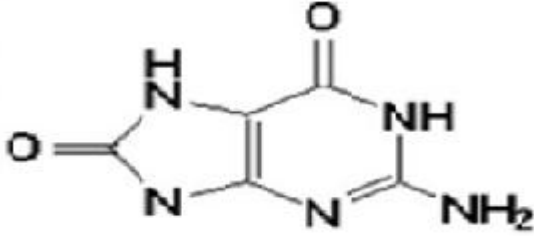
Şekil2.2. Su Molekülünün radyasyon ile hidrolizi

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

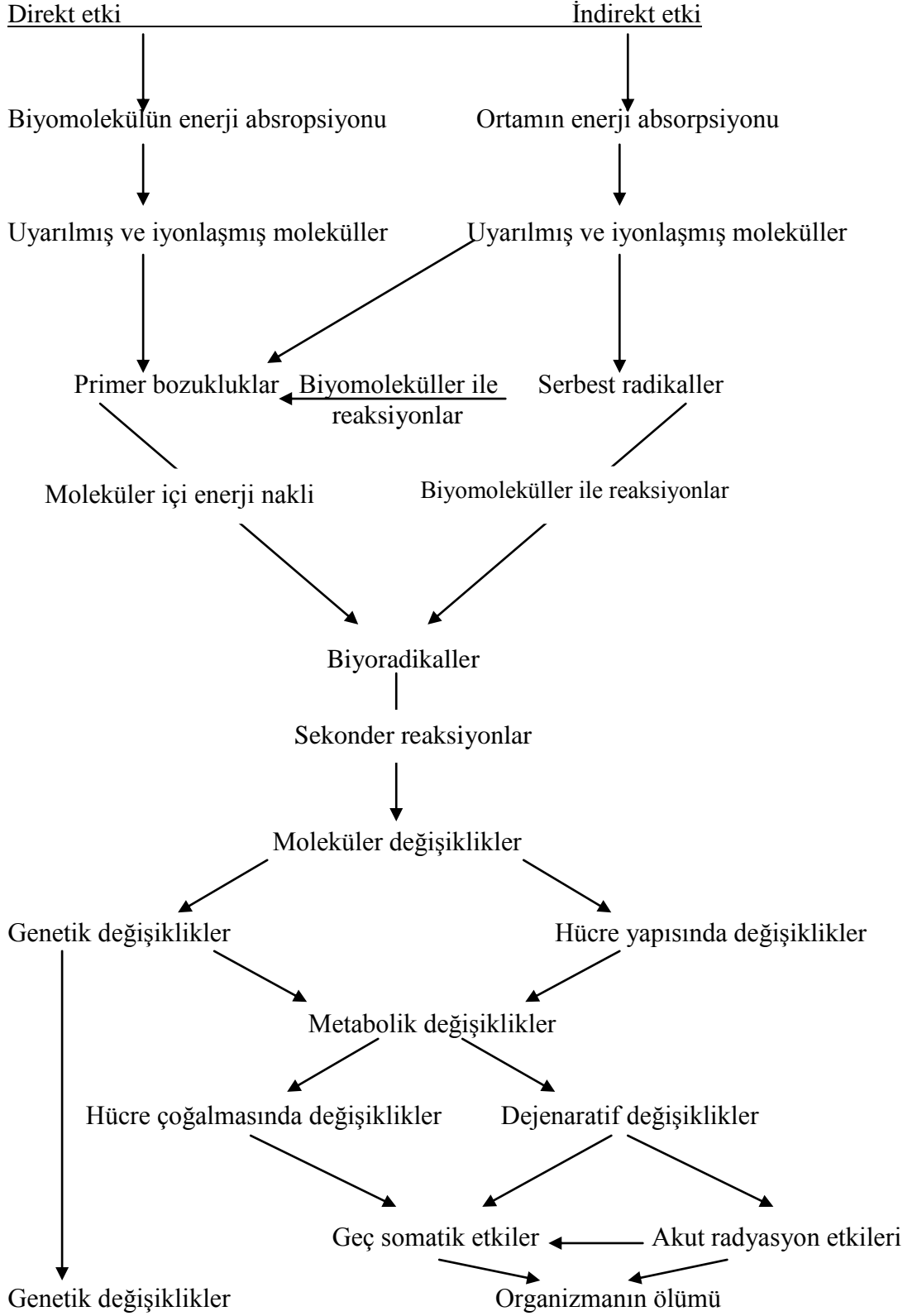
Radyasyonun canlıda oluşturduğu etkilerin incelenmesinde, radyasyon enerjisinin absorplanması ile biyolojik etkinin ortaya çıkışı arasındaki sürede birbirini izleyen olaylar zincirini üç etki kademesinde sıralamak mümkündür (Şekil2.3). Bir biyolojik sistemde radyasyonun etkisi ile oluşan bütün bu olaylar zinciri, eğer radyasyon enerjisinin, örneğin DNA ya da bir enzim molekülü gibi özel bir biyolojik yapı tarafından absorplanması ile başlamışsa, böyle bir etkiye radyasyonun direkt etkisi adı verilir. Radyasyonun dolaylı etkisi atoma enerji transferi sonucu, serbest radikaller

oluşturarak molekülün parçalanmasını kapsar. Serbest radikal, yörüngesinde paylaşılmamış elektron bulunan elektriksel olarak nötral atomlardır. Radikal elektrofilik ve son derece reaktiftir. Bu serbest radikaller, biyolojik moleküllerle reaksiyona girerek onları değişikliğe uğratırlar. Örneğin guaninin oksidasyonu 7,8-dihidro-8-oksoguanin (oxoG) yapısını oluşturur. Bu yapı replikasyon sırasında adeninle baz çifti oluşturur. İnsan kanserlerinde sıkça görülen bir hasardır. OxoG yapısı radyasyonun etkisi ile oluşur (Dertinger ve Jung 1960).

### 8-Oksoguanin



Şekil 2.4. 8-oksoguaninin moleküler yapısı (Tubiana ve ark. 1990).



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

### 2.2.2 Radyasyon Hasarları

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

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

2- Subletal Hasarlar: Hücreler tarafından normal şekilde tamir edilebilen hasara Subletal Hasar denir. Subletal hasar genellikle radyasyon verilmişinden sonraki 2-6 saat içinde tamir edilir. Subletal hasar öldürücü değil, fakat daha sonraki ışınlamaya olan sensitiviteyi artırıcıdır. Eğer bir radyasyon dozundan sonra uygun tamir için gerekli zaman periyodu yoksa öldürücü olabilir.

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

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

### 2.2.3 Radyasyonun DNA molekülü ile etkileşimi

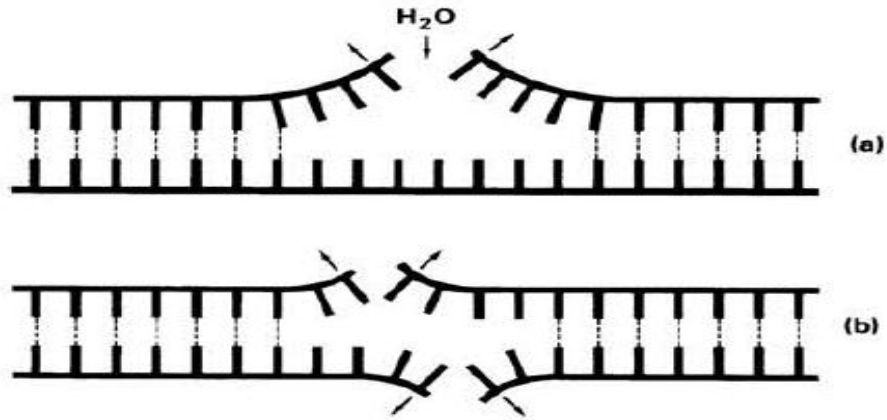
Radyasyonun DNA molekülünün yapı, fonksiyon ve sentezine olan etkileri ile ilgili çok sayıda araştırma yapılmıştır. Bu araştırmalar genel olarak radyasyonun DNA'ya etkisinin doza, zamana ve hücrenin siklustaki durumuna bağlı olduğunu göstermektedir.

#### 2.2.3.1 Yapısal Hasarlar

DNA molekülünde radyasyon etkisi ile meydana gelebilecek yapısal hasarlar Şekil. 2.5. a ve b'de gösterilmiştir. Bu hasarların en önemlileri zincir kırılmaları (Olive, 1998), baz hasarları ve baz kayıpları, denatürasyon bölgelerinin oluşması ve çapraz bağlanmalardır (McMillan ve Steel 1997).



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



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

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

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

DNA çift zincir kırıkları, DNA lezyonları içinde en sitotoksik lezyon olarak kabul edilir. İyonize radyasyon tarafından indüklenebilir ve tamir edilmemiş olarak kalırsa hücre ölümüne neden olabilir. Ayrıca yanlış onarılmış bir DNA çift zincir kırığı

genomik instabiliteye ve kromozomal translokasyonlara neden olabilir (Mehaney Bl ve ark. 2009).

#### **2.2.4 Radyasyonun Kromozomlara Etkisi**

Kromozomların radyasyon etkisine karşı çok duyarlı oldukları ve 0.1 Gy den daha düşük dozlarda bile bitki, hayvan ve insan kromozomlarında kırılmaların olduğu saptanmıştır. İyonlaştırıcı radyasyonların kromozomlara etkileri ışınlamadan sonraki ilk bölünmenin metafaz veya anafaz evrelerinde izlenebilir. Bu evreler kromozom yapılarının belirgin olduğu evrelerdir ( Sparrow ve Moses 1952).

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

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

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

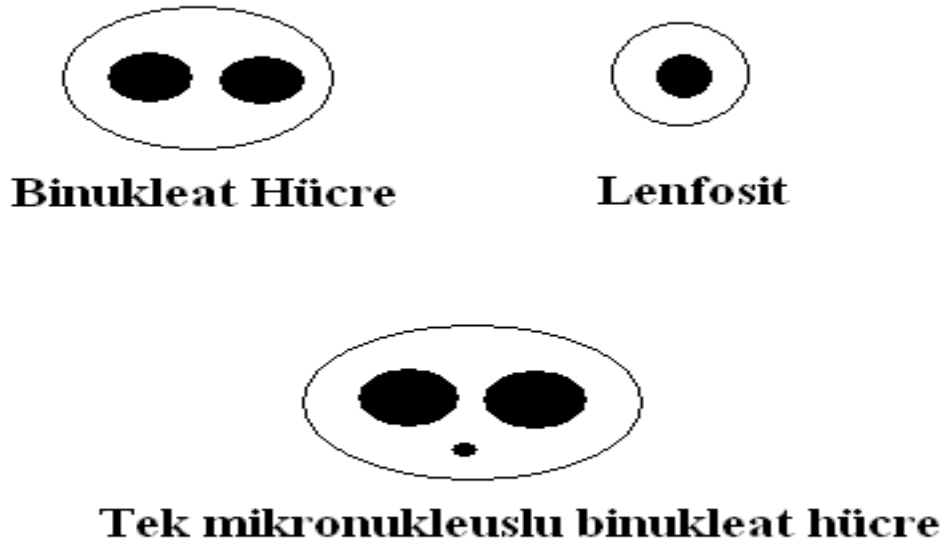
Metafaz ve anafazda izlenen aberasyonları iki gruba ayırmak mümkündür. Bunlar kromozom tip ve kromatit tip aberasyonlar olarak adlandırılır (Ahluwalia, 2009).

Kromozom tip aberasyonlar S fazından önce radyasyona maruz kalınması sonucu oluşur. Eğer replikasyondan önce hasar tamir edilmezse, kardeş kromatitlerin her ikisinde hasarlı olur. G<sub>1</sub> fazında yapılan ışınlamalar sonucu en fazla gözlenen kromozom tipi aberasyonlar: terminal delesyonlar, simetrik parça değişimleri ve asimetric parça değişimleridir. Kromatit tip aberasyonlar S fazından sonra radyasyona maruz kalınması sonucu oluşur. Eğer hücreler S fazı esnasında radyasyona maruz kalırlarsa her iki tip aberasyon gözlenir. G<sub>2</sub> fazında yapılan ışınlamalar sonucu en fazla görülen gözlenen kromatit tipi aberasyon tipleri; terminal delesyon izoromatit delesyon, simetrik parça değişimi, asimetric parça değişimi ve triradial aberasyondur. Eğer hücreler profaz

safhasında radyasyona maruz kalırlarsa kromatidlerin alt ünitelerinde subkromatid aberasyonlar gözlenir (Tubiana ve ark. 1990, Özalpan, 2001).

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

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



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

### **2.2.5 Radyasyonun RNA Molekülüne Etkileri**

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

### **2.2.6 Radyasyonun Protein ve Enzimlere etkileri**

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

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

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

### **2.2.7 Radyasyonun Zar Sistemlerine Etkisi**

Hücrelerin yapı ve işlevleri zarlara sıkıca bağlıdır. Zarlar yalnızca hücrenin içini çevresinden ayırmakla kalmazlar ayrıca ökaryot hücrelerin, nükleus ve sitoplazmik

organeller de dahil olmak üzere, iç bölümleri belirler. Biyolojik zarların transport, madde geçişlerini denetlemek, elektron taşınımı, oksidatif fosforilasyona katılmak gibi önemli görevleri vardır. Ayrıca hücre metabolizmasında önemli rol oynarlar. Bu sebeple meydana gelebilecek bir hasarın, söz konusu fonksiyonların bozulmasına yol açması kaçınılmazdır (Cooper 2006).

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

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

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

## **2.2.8 Radyasyonun İnsanlar Üzerine Etkisi**

### **2.2.8.1 Radyasyonun Geç Etkileri**

#### **2.2.8.1.1 Genetik Değişikler**

Radyasyonun akut etkileri, vücutta hücre ölümü ve canlının ölümüne yol açar. Akut etkiler, stokastik olmayan etkiler olarak da adlandırılırlar. En önemli genetik değişiklikler ve karsinojen etkiler stokastik etkiler olarak adlandırılırlar. Bu etkilerde çok az sayıda hücrenin, hatta bazı durumlarda tek bir hücrenin etkilenmesi söz konusu

olabilir. Radyasyon fiziksel bir mutajen ajandır ve tamamen yeni, kendine özgü değişikliklere yol açmaz, sadece canlılarda doğal ve spontan oluşan mutasyonların frekansını artırabilir. Genetik değişiklikler, gen mutasyonları ve kromozom mutasyonları olarak ana başlıklar altında toplanabilirler (Coggle 1977).

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

Çizelge 2.1. Radyasyonun genetik etkileri (Coggle 1977).

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

çıkmiştir. Bu bulgular ışığında, radyasyonun insanda oluşturabileceği etkiler için genelleme yapmak mümkündür:

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

#### **2.2.8.1.2 Karsinogen Etki**

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

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

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

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

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

### **2.2.9 Radyoprotektörler**

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

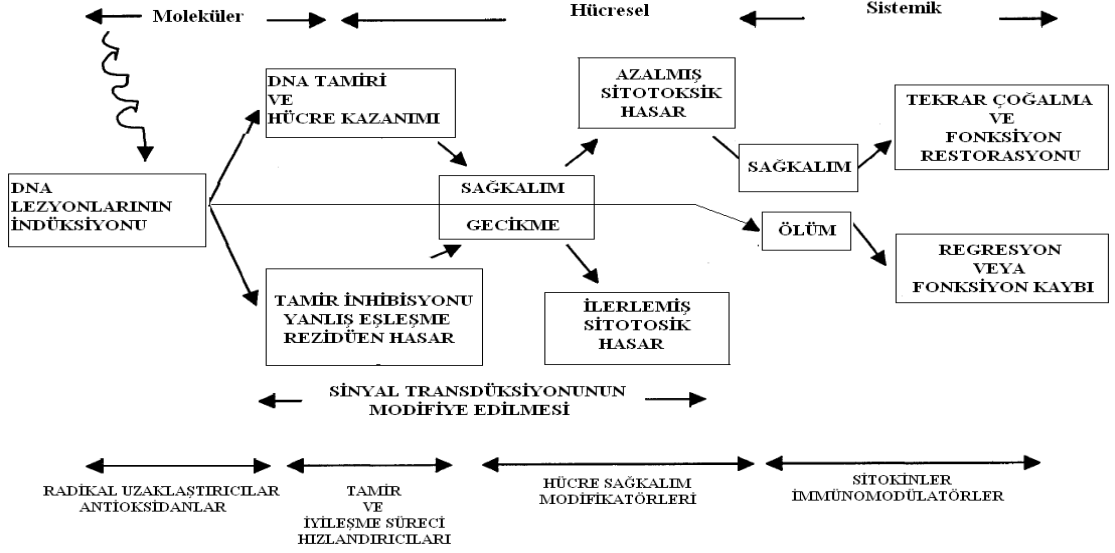
İlk başta bazı geliştirilen radyoprotektif ajanların, protektif etkilerinin yanında toksik etkilerinin de olduğu gözlenmiştir. Bunun en önemli örneği sülfidril grubu içeren bileşiklerdir. Yapılan geniş çalışmalar için bazı ideal radyoprotektör kriterleri aşağıdaki şekilde belirlenmiştir. İdeal bir radyoprotektör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

1. Serbest radikallerin çıkarılması
2. Oksidatif hasarın indirgenmesi
3. DNA ve hücresel tamirin kolaylaştırılması



4. İmmüno-modülasyon

5. Etkilenen veya hasar gören organın tekrar eski haline gelmesi (Upadhyay ve ark 2005).



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

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

### 2.2.9.1 Antioksidanların ve Fenolik Bileşiklerin Radyoprotektif Etkileri

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

Antioksidanlar dört ayrı şekilde etki etmektedirler.

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

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

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

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

### 2.2.9.2 Vitaminler

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

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

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

### **2.2.9.3 Selenyum ve Selenyum/Vitamin E Kombinasyonları**

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

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

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

### **2.2.9.4 Fitokimyasallar**

Bitkilerin çoğu çeşitli antioksidan fitokimyasallar içerir ve bu fitokimyasalların çoğu radyoprotektif etki gösterirler. Bu fitokimyasallar arasında, polifenoller, curcumin, elajik asit, klorojenik asit, likopenler, kuersetin, soya ürünleri, ginkgo biloba özütleri, metilksantinler, melatoninler ve daha birçok flavonoid bulunur. Çoğu flavonoidlerin

radıyoprotektif etkilerinin bilinmesine rağmen, toksik etkileri hala bilinmemektedir (Weiss ve Landauer 2003).

### 2.2.9.5 Fenolik Bileşikler ve Flavonoidlerin Radyoprotektif Etkileri

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## **2.3 GENOTOKSİSİTE VE ANTİGENOTOKSİSİTE DEĞERLENDİRMEDE KULLANILAN KISA SÜRELİ *in vitro* TEST YÖNTEMLERİ**

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

### **2.3.1 SCE Yöntemi**

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

### **2.3.2 CA Yöntemi (Kromozomların homojen boyanması)**

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



veya birkaç kromozomun bir veya iki kromatitini farklı konumlarda içermektedir (Hagmar ve ark. 1994, Bonassi ve ark. 2000).

### 2.3.3 COMET Testi (Tek Hücre Jel Elektroforezi)

Biyolojik ve fiziksel etmenlerin oluşturduğu DNA hasarını kontrol etmek için çeşitli teknikler geliştirilmiştir. Bu teknikler arasında COMET testi ya da Tek Hücre Jel Elektroforezi tekniği çok güvenilir ve kullanışlı bir metottur. COMET kelimesinin anlamı, bu teknikte hasarlı DNA ların göçü ile oluşan görüntüdür. Bu yöntem hem in vivo hem de in vitro şekilde uygulanabilir. Hasarlı DNA molekülleri kuyruklu yıldız görüntüsü oluşturur (Tice ve ark 2000). İlk olarak Östling ve Johanson (1984) , DNA hasarını belirlemek için tek hücre düzeyinde bir mikrojel elektroforezi geliştirmiştir. Bu teknikte hücreler bir jel içine gömülüp deterjanlar ve yüksek tuz konsantrasyonları ile lizis işlemi gerçekleştirilip daha sonra nötral koşullarda DNA molekülünün elektroforezine dayanır. Nötral koşullardan dolayı bu yöntemin potansiyelinde bazı sınırlamalar ortaya çıkmıştır (Singh ve ark 1988).

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

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

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

1. Potansiyel yüksek oranda sonuç içeren tarama çalışmaları
2. Genotoksisite ile indüklenen kromozom hasarını, sitotoksisite ile indüklenen kromozom hasarından ayırt etmek

3. İn vivo çalışmalarda genotoksik ve genotoksik olmayan karsinojenleri ayırt etmek

4. İnsan mutajenlerini ve karsinojenlerini tayin etmek

COMET testinin yöntemine baktığımızda bu test şu basamaklardan oluşur:

1. Üzerine agaroz içinde hücrelerin yayıldığı mikroskop lamalarının hazırlanması

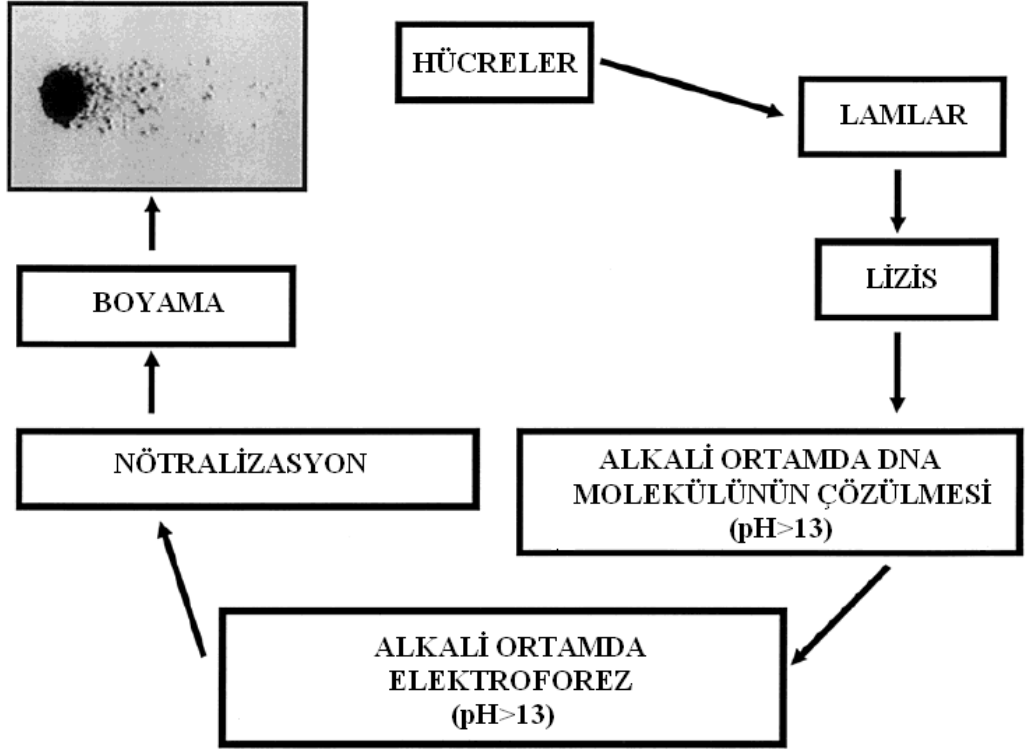
2. DNA molekülünü hücrelerden ayırmak için lizis

3. Tek zincirli DNA molekülünü ve tek zincir kırıklarını gözlemlemek için alkali (pH>13) ortam

4. Alkali koşullarda (pH>13) elektroforez

5. Nötralizasyon

6. Boyama, Görüntüleme ve Sayım



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

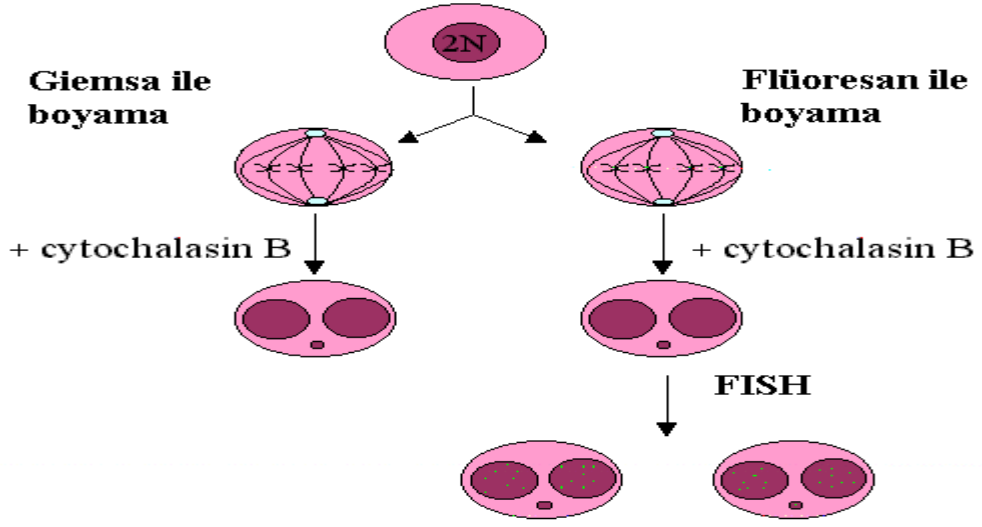
Lamların hazırlanması sırasında her lam üzerine 1–3 bağımsız jelyayıdır. En alt tabaka ya tam buzlu mikroskop lamından veya yüksek konsantrasyonda normal erime noktası bulunan agaroz jelinden oluşur. Bunların üzerine hücrelerin düşük erime noktalı agaroz ile oluşan süspansiyonu yayılır. Bundan sonra lizis işlemi gerçekleştirilir. Bu işlemde deterjanlar ve yüksek konsantrasyonlu tuz çözeltilerinden yararlanır. Üzerinde

hücreler bulunan lamalar en az 1 saat en çok 1 gece olmak üzere, lizis solüsyonlarında bekletilir. Elektroforez öncesi alkali yürütme tamponu içinde lamalar 20–25 dk arası bekletilir. Bu işlem DNA molekülünün çözülmesi için gereklidir.

Bu işlemden sonra elektroforez işlemi uygulanır, bu işlemde Standard voltaj 0.7-1 V/cm' dir. Elektroforez sonrası alkali lamalar nötralizasyon bufferi ile yıkanır. Yıkama işleminden sonra lamalar etidyum bromit, DAPI (diamidino–2-fenilindol), propiyum iyot veya SYBR Green1 gibi floresan özellikli boya larla veya gümüş nitrat gibi floresan olamayan boya larla boyanırlar. COMET sayımı için metrik ve metrik olmayan teknikler vardır. Ayrıca COMET sayımı için bilgisayar sistemli programlarda geliştirilmiştir. En basit yöntemlerden biri COMET'leri büyüklüklerine göre kategorilere göre bölüp değerlendirmektir (Olive ve ark. 1991, Cotelle ve Ferard 1999, Tice ve ark. 2000).

#### **2.3.4 Mikronukleus (MN) Testi**

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



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

### 3. MATERYAL VE METOT

#### 3.1. Çalışmada Kullanılan Deney Ekipmanı

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

### 3.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler

Kimyasal Madde	Firma	Katalog No
NaCl (Sodyum Klorür)	MERCK	106404
NaOH (Sodyum Hidroksil)	MERCK	106482
AGARÖZ	MERCK	101236
HCL (Hidroklorik asit)	MERCK	100314
TRİSMA BASE	SİGMA	T1503
TRİTON X-100	SİGMA	T8787
DMSO	SİGMA	D5879
AGARÖZ, LOW MELTING	SİGMA	A9414
SİTOKALASİN B	SİGMA	C6762
HİSTOPAQUE 1077	SİGMA	H8889
TYRPAK BLUE	SİGMA	T8154
EtBr (Etidium Bromid)	SİGMA	E8751
NEVPARİN	MUSTAFA NEVZAT	
RPMI MEDIUM	SİGMA	R8758
PENİSİLİN-STREPTOMYCİN	SİGMA	P0781
FETAL CALF SERUM	SİGMA	F9665
PHYTOHEMAGGLUTİNİN-A	SİGMA	L8754
L-GLUTAMİNE	SİGMA	G7513
DULBECCO'S PBS	SİGMA	D5652

Na <sub>2</sub> EDTA	SİGMA	E5134
MUTLAK ETANOL	GURUP DELTALAR	
SİNNAMİK ASİT	SİGMA	
KCL (Potasyum Klorür)	MERCK	104936
CH <sub>3</sub> OH (Metanol)	MERCK	106008
CH <sub>3</sub> COOH (Asetik asit)	MERCK	100056
GİEMSA	MERCK	109204
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Di Sodyum fosfat)	MERCK	1.06586
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Di Potasyum Fosfat)	MERCK	A325071137

### 3.3 Çalışmada Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması

#### Besiyerinin Hazırlanışı:

15 ml Fetal calf serum

2 ml L-Glutamin

0,5 ml Penicilin, streptomycin

2,5 ml Phytohemagglutinin

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

#### Sinnamik Asit çözeltisinin hazırlanışı:

0.0011 gr sinnamik asit tartılır ve 5 ml %5 DMSO çözeltisinde çözülerek stok hazırlanır.

#### Komet testi için gerekli solüsyonların hazırlanışı:

##### Fizyolojik serum hazırlanışı:

0.9 gr NaCl tartılır ve 100ml distile su da çözülür.

##### PBS çözeltisi hazırlanışı:

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

##### Lizis Tamponu hazırlanışı:

2.5 M NaCl: 29.22gr NaCl tartılır.

100 mM Na<sub>2</sub>EDTA: 7.4448 gr Na<sub>2</sub>EDTA tartılır.

10 mM Tris: 0.2422gr Trisma Base tartılır.

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

**Yürütme tamponu hazırlanışı:**

0.747 Na<sub>2</sub>EDTA ve 24gr NaOH tartılır ve 2 lt distile su ile çözülür. pH>13 olacak şekilde tampon hazırlanır. Buzdolabında +4°C de saklanır.

**Nötralizasyon tamponu hazırlanışı:**

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

**Fiksasyon tamponu hazırlanışı:**

100 ml absöü etanol kullanılır.

**Boyama solüsyonu:**

20gr/ml EtBr ile hazırlanır.

**Lamlar için Agaroj jel hazırlanışı:**

0.65 gr agaroj tartılır ve 100ml distile suda ısıtılarak çözülür.

**Hücreler için Low Melting Agaroj jel hazırlanışı:**

0.065gr Agaroj Low Melting (LMA) tartılır ve ısıtılarak 10 ml distile suda çözülür.

**%5 DMSO çözeltilisinin hazırlanışı:**

0.5 ml DMSO ile 10 ml distile su karıştırılır.

**Comet deneyi için değişik konsantrasyonlardaki sinnamik asit dozları şöyle belirlenir:**

1 µg/ml sinnamik asit dozu için, 7 µl sinnamik asit ile 1.5ml lenfosit solüsyonu karıştırılır.

2µg/ml sinnamik asit dozu için, 14 µl sinnamik asit ile 1.5ml lenfosit solüsyonu karıştırılır.

4 µg/ml sinnamik dozu için, 28 µl sinnamik asit ile 1.5ml lenfosit solüsyonu karıştırılır.



**Mikronukleus testi için gerekli solüsyonların hazırlanışı:****Fiksatif hazırlanışı:**

60 ml metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) buzdolabında difrizde saklanır.

20 ml asetik asit ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) ise dışarda saklanır, karıştırılarak 1:3 oranında fiksatif hazırlanır.

**Sitokalsin-B hazırlanışı:**

0.001 gr cyt B %70 lik az miktardaki etonolde çözünür ve streil saf su ile 5 ml' ye tamamlantıktan sonra koyu renkli bir şişede ışık görmeyecek bir yerde saklanır. Her kite 0.15 ml katılır.

 **$\text{Na}_2\text{HPO}_4$  Tamponu hazırlanışı:**

18 gr  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1000ml saf su içerisinde çözülerek hazırlanır.

 **$\text{KH}_2\text{PO}_4$  Tamponu hazırlanışı:**

6.85 gr  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  500 ml saf su içerisinde çözülerek hazırlanır.

**%5'lik Giemsa'nın Hazırlanması:**

56 ml  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 44 ml  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ve 5 ml Giemsa karıştırılarak üzerleri 100 ml oluncaya kadar saf su ile tamamlanmıştır. Sonra bu boya dik bir şale içine filtre kağıtları ile süzölmüştür. Kuruduğundan emin olunan preparatlar direkt olarak boya içerisine konmuş ve yaklaşık olarak 15 dk. boya içerisinde bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda preparatlar boyanın içinden çıkarılmış, saf su içinden geçirilerek preparatlar üzerindeki fazla boyanın akması sağlanmıştır. Bundan sonra praparatlar dik vaziyette konularak kurumaya bırakılmıştır. Preparatlar kuruduktan sonra mikroskopik inceleme yapılmıştır.

Mikronukleus deneyi için değişik konsantrasyonlardaki sinnamik asit dozları şöyle belirlenir:

1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  sinnamik asit dozu için, 25  $\mu\text{l}$  sinnamik asit ile 5ml lenfosit solüsyonu karıştırılır.

2 µg/ml sinnamik asit dozu için, 50 µl sinnamik asit ile 5 ml lenfosit solüsyonu karıştırılır.

4 µg/ml sinnamik asit dozu için, 100 µl sinnamik asit ile 5 ml lenfosit solüsyonu karıştırılır.

### 3.4 Yöntem

Çalışmamızda in vitro COMET ve MN testi kullanılmıştır.

#### Çalışma Gruplarının Belirlenmesi:

Her donör için 15 tane çalışma grubu belirlenmiştir. Deneyler duplike yapılmıştır. Gruplar şu şekildedir:

#### Kontrol grupları:

Sadece Kan Kontrol

DMSO Kontrol

1 Gy ışınlama

2 Gy ışınlama

#### Tek başına Fenolik Dozları:

1 µg/ml sinnamik asit

2 µg/ml sinnamik asit

4 µg/ml sinnamik asit

#### Radyasyon ve Fenolik Kombine Dozları:

1 Gy + 1 µg/ml sinnamik asit

2 Gy + 1 µg/ml sinnamik asit

1 Gy + 2 µg/ml sinnamik asit

2 Gy + 2 µg/ml sinnamik asit

1 Gy + 4 µg/ml sinnamik asit

2 Gy + 4 µg/ml sinnamik asit

#### Radyasyon ve DMSO Kombine Dozları:

1 Gy + DMSO

2 Gy + DMSO

#### Bireylerin Seçimi:

Araştırma grubu donörleri, 25 yaşlarında hiç sigara kullanmayan, son 1 ay içinde antibiyotik kullanmamış ve kalıtsal hastalığı bulunmayan 1 erkek 1 bayan bireyden oluşmaktadır. Deney grubunun yaş ortalaması 25'tir. Donörlerden kan alımı

gerçekleştirilirken Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Etik Kurulunun onamı alınmıştır.

### **Kan Örneklerinin Alınması:**

Kan örnekleri bireylerden heparinize olarak, vakumlu kuru tüplere alınmıştır. Her bireyden 32 ml kan alınmıştır.

### **Lamların Temizlenmesi:**

Deneyden bir gün önce lamlar içi etanol dolu olan bir behere yerleştirilerek derin dondurucuda bekletilmiş ve preparatlar hazırlanmadan 5 saat önce kurularak üzerlerine hangi bireye ait olduğu ve dozlar yazılarak derin dondurucuda bekletilmiştir.

### **COMET Testi Prosedürü**

#### **Lamların Agaroz Jel ile Kaplanması:**

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

#### **Lenfosit İzolasyonu:**

1. Heparinize olarak alınan kan, 5 er ml olarak steril tüplere bölüştürülür.
2. Kan, taze hazırlanan serum fizyolojik tamponu ile 1:1 oranına sulandırılır ve karıştırılır.
3. Ayrı steril tüplere 2 ml Histopaque 1077 alınır. Daha sonra kan ve serum fizyolojik tamponu içinde Histopaque 1077 bulunan tüplere yavaşça aktarılır.
4. Aktarımdan sonra tüpler hemen 15 dakika 1500 rpm de santrifüj edilir.
5. Santrifüj ardından tüplerde oluşan tabakalardan, lenfosit içeren tabaka pipet yardımıyla boş tüplere aktarılır.
6. Aktarılan lenfosit süspansiyonu serum fizyolojik tamponu ile 5 ml ye tamamlanır ve 1500 rpm de 10 dakika çevrilir. Bu yıkama işlemidir, bu işlemle ortamdaki lenfosit

dışındaki maddeler uzaklaştırılır. Bu işlem ortamda sadece lenfositler kalana kadar tekrarlanır.

7. En sonuncu yıkama işleminden sonra serum fizyolojik tamponu ortamdan uzaklaştırılır.

8. Lenfositler besiyerlerine ekilmek için RPMI-1640 ile sulandırılır. Her tüpe 5 er ml RPMI-1640 eklenir. Daha sonra karıştırma işlemi yapılır ve daha önceden lenfositler hazırlanan besiyerlerine ekilir. Aynı bir eppendorf tüpüne 100µl lenfosit alınır ve Tyrpan Blue testi yapılır. Tyrpan Blue testi sonucunda lenfositlerde %80 canlılık oranı aranır.

9. Bu testte süspansiyon 1:1 oranında tyrpan blue boyası ile seyreltilir ve bu seyreltilen sıvıdan 100 µl alınıp hemasitometreye yayılır ve ışık mikroskopu altında yaşayan hücreler sayılır.

10. Bu aşamaya kadar ki tüm işlemler (Tyrpan Blue ve santrifüj işlemi hariç) steril flow kabin içerisinde yapılır. Tüpler daha sonra 37°C de 24 saat inkübe edilir.

#### **Işınlama işlemi:**

1. 24 saat sonra lenfosit ekilmiş besiyerleri çıkartılır ve 2000 rpm de 10 dakika santrifüj edilir.

2. Supernatant tüpte 1.5 ml kalacak şekilde atılır. Pellet iyice karıştırılıp, steril flow kabinde petrilere aktarılır.

3. Petriler çalışma gruplarına göre işaretlenir ve ilgili kimyasallarla muamele edilirler.

4. Muamele işleminden sonra petriler 30 dakika inkübasyon için 37oC ye bırakılırlar.

5. 30 dakika sonra petriler çıkarılır ve radyasyona maruz kalacak çalışma grupları ışınlamaya götürülür.

6. Işınlama yaparken petrilerin kaynaktan 80 cm uzakta ve üzerine 2 cm bolus olmasına dikkat edilir. Işın kaynağı olarak Siemens Lineer Hızlandırıcı (6MV Foton) kullanılmıştır.

7. Işınlama işlemi lineer akseleratörde gerçekleşir ve bu işlemden sonra petriler tekrar 1 saat boyunca 37 °C de inkübasyona bırakılırlar.
8. Işınlama işleminden sonra hücrelerin viabilitesini kontrol etmek amacıyla her çalışma grubu petrisinden 100 µl süspansiyon alınır ve eppendorf tüplerine konup Tyrpan Blue testi yapılır.
9. Süspansiyon 1:1 oranında tyrpan blue boyası ile seyreltilir ve bu seyreltilen sıvıdan 100 µl alınıp hemasitometreye yayılır ve ışık mikroskobu altında yaşayan hücrelersayılır.
10. 1 saat sonunda petriler açılır ve içindeki lenfosit süspansiyonu steril tüplere aktarılır.
11. Aktarılan süspansiyonlar 2000 rpmde 10 dakika santrifüj edilir. Bu işlemden sonra süpernatant atılır. Böylece pellet kısmında sadece lenfositler kalır ve lenfositler muamele edildikleri kimyasallardan uzaklaştırılır.

#### **COMET Testi Prosedürü**

1. Bu aşamada kullanılan bütün solüsyonlar soğuktur. Bu prosedür loş ışıktaki gerçekleştirilmiştir. Pellet olarak kalan lenfositler 1 ml PBS ile seyreltilir ve iyice karıştırılır..
2. Hücreleri jel içine gömmek için, düşük erime noktası olan agaroz (LMA) kullanılarak jel hazırlanır. 0.065 gr LMA tartılır ve 10 ml distile su içinde ısıtarak jel haline getirilir.
3. Daha sonra 10 ml lik jelden, eppendorf tüplerine 250 µl aktarılır. Bu eppendorf tüpleri 37°C de bekleyen sıcak su banyosuna yerleştirilir.
4. Seyreltilen lenfosit pelletlerinden 80 µl çekilir, su banyosunda bekleyen ve içinde 250µl LMA jeli bulunan eppendorf tüplerine aktarılır. Jel ve lenfosit süspansiyonu iyice pipet yoluyla karıştırılır.
5. Karıştırılan jel ve lenfosit karışımından 100 µl çekilir ve lam üzerine yayılır. Her çalışma grubu kendi lamının üzerine yayılır.
6. Üzerine karışım koyulan lamlar hemen lamelle kapatılır ve buz üzerine kaldırılır.
7. Yayma işlemi bittikten sonra lamlar 15 dakika +4°C de bekletilir.
8. 15 dakika sonra lamlar alınır ve lameller çıkarılır.

9. Lizis işlemi başlatılır. Lamelleri çıkmış olan lamalar şalelere dizilir ve lizis solüsyonuna daldırılır. Lamalar şaleler içinde 1 gece boyunca karanlıkta ve +4<sup>0</sup>C de bekletilir.
10. Ertesi gün lamalar lizis solüsyonundan çıkarılır ve COMET tankına dizilir.
11. Tanklar yürütme tamponu ile doldurulur ve lamalar 20 dk yürütme tamponu içinde bekletilir. Bu aşamada DNA sarmalları açılır.
12. 20 dakika sonunda yürütme işlemi başlar. Yürütme işlemi buz üzerinde gerçekleştirilir. Yürütme işlemi 300 mA, 25V, yarım saat boyunca yürütülür.
13. Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra lamalar tanlardan çıkarılıp nötralizasyon tamponuna daldırılır ve 5 dakika lamalar tampon içerisinde bekletilir.. Nötralizasyon işlemi karanlıkta gerçekleşir.
14. Nötralizasyon işlemi sonrasında lamalar tampondan çıkarılıp distile suya daldırılıp yıkanır ve kuruması beklenir.
15. Kuruduktan sonra lamalar absolü etanol içinde 5 dakika fikse edilir.

### **Boyama İşlemi**

EtBr ile hazırlanan boya solüsyonundan enjektör ile 0.2 ml çekilir ve lamlara damlatılır. Boya damlatıldıktan sonra lamalar lamellerle kapatılıp, mikroskopik inceleme için hazırlanır.

### **Mikroskopik İnceleme**

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

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

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

(\* işareti çarpma işlemi anlamına gelmektedir)

## COMET testinde radyasyondan koruma indeksinin hesaplanması

Sinnamik asidin radyasyondan koruma derecesi aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$\text{Koruma indeksi (\%)} = \left( \frac{\text{Ort}_{\text{radyasyonlu hücre GHİ sıklığı}} - \text{Ort}_{\text{SA+radyasyonlu hücre GHİ sıklığı}}}{\text{Ort}_{\text{radyasyonlu hücre GHİ sıklığı}}} \right) \times 100$$

$\text{Ort}_{\text{radyasyonlu hücre GHİ sıklığı}}$ : radyasyonla muamele edilmiş lenfositlerde GHİ ortalaması

$\text{Ort}_{\text{SA+radyasyonlu hücre GHİ sıklığı}}$ : Sinnamik asit +radyasyonla muamele edilmiş lenfositlerde GHİ ortalaması

### İstatistiksel Hesaplamalar

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

### MN testi prosedür:

#### Işınlama işlemi:

1. 24 saat önce sağlıklı insanlardan alınan periferik kandan 1 ml, 5 ml kromozom medyumuna ekilmiş lenfosit ekilmiş besiyerleri çıkartılır ve 2000 rpm de 10 dakika santrifüj edilir.
2. Supernatant tüpte 1.5 ml kalacak şekilde atılır. Pellet iyice karıştırılıp, steril flow kabinde petrilere aktarılır.
3. Petrilere çalışma gruplarına göre işaretlenir ve ilgili kimyasallarla muamele edilirler.
4. Muamele işleminden sonra petrilere 30 dakika inkübasyon için 37°C ye bırakılırlar.

5. 30 dakika sonra petripler çıkarılır ve radyasyona maruz kalacak çalışma grupları ışınlamaya götürülür.
6. Işınlama yaparken petriplerin kaynaktan 80 cm uzakta ve üzerine 2 cm bolus olmasına dikkat edilir. Işın kaynağı olarak Siemens Lineer Hızlandırıcı (6MV Foton) kullanılmıştır.
7. Işınlama işlemi lineer akseleratörde gerçekleşir ve bu işlemden sonra petripler açılır ve içindeki lenfosit süspansiyonu steril tüplere aktarılır.
8. Aktarılan süspansiyonlar 2000 rpmde 10 dakika santrifüj edilir. Bu işlemden sonra süpernatant atılır ve kalan lenfositler tekrardan kromozomal medyuma ekilip 2 gün boyunca 37 etüvde bekletilir.

#### **MN testi prosedür:**

1. İnkübasyonun başlangıcından 44 saat sonraher tüpe konsantrasyonu 6 µg/ml olacak şekilde sitokalsin-B maddesi ilave edilir ve böylece bölünen hücrelerde sitokinez engellenir.
2. İnkübasyonun sonunda, kültür tüpleri 1200 rpm'de 10 dk. santrifüj edilir süpernatant atılır ve hücrelerin bulunduğu tüplere hipotonik eriyik (0,075 M lık KCl) ilave edilerek 3 dakika kadar oda sıcaklığında bekletikten sonra tekrardan 1200 rpm' de 10 dk. santrifüj edilir ve ve süpernatant atılarak ilk fiksatif (3:1 MetanolAsetik Asit) ilave edilir.
3. Birinci fiksatif ile oda sıcaklığında belli aralıklarla vorteks yapılarak, 10 dakika harvest işlemi yapılır. İlk harvest işleminden sonra sitoplazmaların korunması için 3 damla %1 lik formaldehit damlatılır.
4. Bu harvest işlemi 3 kere tekrarlandıktan sonra son santrifüjde dipte 0.5-0.7 ml sıvı kalacak şekilde süpernatant atıldıktan sonra kültür tüplerinin dibinde toplanmış olan hücreler resüspanse edilir.
5. Daha sonra, bu hücre süspansiyonu temizlenmiş ve buzdolabında saklanana lamın üzerine farklı alanlara yaklaşık olarak 10-15 cm yükseklikten 1'er damla olmak üzere hücre süspansiyonu damlatılarak preparatlar hazırlanır. Bu şekilde hazırlanan preparatlar kurumak üzere bekletilir.



### **Preparatların Boyanması:**

Hazırlanan preparatlar tampon karışımı ile hazırlanmış % 5'lik giemsa boyası ile 15 dk. bekletilerek boyanması sağlanmıştır.

### **Mikroskopik İnceleme:**

Hazırlanmış olan daimi preparatlar ışık mikroskopunda 40'luk objektif ile incelenmiştir (10x40=400 büyütmede). Bu incelemeler sırasında mikronukleus sayısını belirlemek amacıyla her bir kişiden hazırlanan preparatlardan 1000 iki nukleuslu hücre sayılmış, bu iki nukleuslu hücreler içerisinde mikronukleuslu olanlar saptanmıştır. Toplam mikronukleus sayısının incelenen iki nukleuslu hücre sayısına bölünmesiyle hücre başına düşen mikronukleus sayısı (MN/hücre) hesaplanır. Bunradan da % MN oranı belirlenir.

Ayrıca kimyasalların nukleus bölünmesi üzerindeki etkisini saptamak için Nukleus Bölünme İndeksi saptanmıştır. Nukleus Bölünme İndeksini (NBI) bulmak için 2000 hücre incelenmiş, bu hücreler içerisinde 1, 2, 3 ve 4 nukleuslu hücreler saptanmıştır.

$NBI = \frac{1 \times N1 + 2 \times N2 + 3 \times N3 + 4 \times N4}{N}$  formülüne göre bulunmuştur.

N1 : 1 nukleuslu hücre sayısı; N2 : 2 nukleuslu hücre sayısı; N3 : 3 nukleuslu hücre sayısı; N4 : 4 nukleuslu hücre sayısı

### **MN testinde radyasyondan koruma indeksinin hesaplanması**

Sinnamik asidin radyasyondan koruma derecesi aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$\text{Koruma indeksi (\%)} = \left( \frac{\text{Ort}_{\text{radyasyonlu hücre MN frekansı}} - \text{Ort}_{\text{SA+radyasyonlu hücre MN frekansı}}}{\text{Ort}_{\text{radyasyonlu hücre MN frekansı}}} \right) \times 100$$

$\text{Ort}_{\text{radyasyonlu hücre MN sıklığı}}$ : radyasyonla muamele edilmiş lenfositlerde MN ortalaması

$\text{Ort}_{\text{SA+radyasyonlu hücre MN sıklığı}}$ : Sinnamik asit +radyasyonla muamele edilmiş lenfositlerde MN ortalaması

#### **4. BULGULAR**

Bu çalışmada fiziksel bir mutajen olan radyasyonun insan kan lenfositlerindeki genotoksik etkisi ve sinnamik asitin, radyasyonun yarattığı genotoksik hasara karşı göstermiş olduğu antigenotoksik etki in vitro COMET ve MN testleriyle ölçülmüş ve elde edilen sonuçlar çizelge 4.1., 4.2.,4.3., 4.4., 4.5., 4.6., 4.7. ve 4.8.' de ve şekil 4.1., 4.2., 4.3.'de verilmiştir.

##### **4.1. COMET Testinden Elde Edilen Sonuçlar**

COMET testini gerçekleştirebilmek için izole edilen lenfositlerin en az % 80 oranında canlı olmaları gerekmektedir. Bu sebeple trypan blue ile canlılık testi gerçekleştirilmiştir. Bu testin sonuçları Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Trypan Blue testi ile tüm donörlere ait canlı hücre sayımları sonuçları

Donör	Çalışma Grubu	Canlı Hücre	Ölü Hücre	% Canlılık
1	Kontrol	212	6	% 97,25
	DMSO	162	6	% 96,43
	1 µg/ml S.A	135	5	% 97,35
	2 µg/ml S.A	163	6	% 96,45
	4 µg/ml S.A	176	3	% 98,32
	1 Gy R.	160	5	% 96,43
	2 Gy R.	278	7	% 97,54
	1 Gy R. + DMSO	189	4	%98,44
	1 Gy R. + 1 µg/ml S.A	215	2	% 99,08
	1 Gy R. + 2 µg/ml S.A	146	6	% 96,10
	1 Gy R. + 4 µg/ml S.A	177	2	% 98,88
	2 Gy R. + DMSO	175	6	% 96,68
	2 Gy. R. + 1 µg/ml S.A	184	5	% 97,35
	2 Gy R. + 2 µg/ml S.A	231	2	% 99,14
	2 Gy R. + 4 µg/ml S.A	277	15	% 94, 86

S.A; Sinamik asit, DMSO;Dimetil sülfoksit R; İyonize Radyasyon

Çizelge 4.1.' in devamı

Donör	Çalışma Grubu	Canlı Hücre	Ölü Hücre	% Canlılık
2	Kontrol	250	7	% 97,23
	DMSO	189	10	% 94,97
	1 µg/ml S.A	192	6	% 96,96
	2 µg/ml S.A	170	7	% 96,04
	4 µg/ml S.A	178	5	% 97,26
	1 Gy R.	148	7	% 95,48
	2 Gy R.	136	4	% 97,14
	1 Gy R. + DMSO	146	5	%96,68
	1 Gy R. + 1 µg/ml S.A	167	9	% 94,88
	1 Gy R. + 2 µg/ml S.A	188	6	% 96,90
	1 Gy R. + 4 µg/ml S.A	176	8	% 95,65
	2 Gy R. + DMSO	140	5	% 96,55
	2 Gy. R. + 1 µg/ml S.A	218	7	% 96,88
	2 Gy R. + 2 µg/ml S.A	176	6	% 96,70
2 Gy R. + 4 µg/ml S.A	147	7	% 95,45	

S.A; Sinnamik asit, DMSO;Dimetil sülfoksit R; ,İyonize Radyasyon

(toplam hücre sayısı - ölü hücre sayısı) x 100

%Canlı Hücre = -----

toplam hücre sayısı

1 ml hücre sayısı = Sayılan hücre sayısı x 10 (mm3 çevirmek içindir) x 100 x 10ml

1 ml hücre sayısı = Sayılan hücre sayısı x 10.000

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

Bu dozların neden olduğu Genetik Hasar İndeksi (GHI) ve hasarlı hücre (%HH) değerleri her donör için ayrı ayrı olmak üzere çizelge 4.2 de gösterilmiştir. Non parametrik Kruskal-Wallis testine göre pozitif kontrol, 1 µg/ml sinnamik asit, 2 µg/ml sinnamik asit , 4 µg/ml sinnamik asit, dozlarında belirlenen Genetik Hasar İndeksi oranı kendi aralarında karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel anlamlı farklılık bulunmuştur ( $p<0,001$ ). Bunun üzerine Mann Whitney U testi kullanılarak ikili karşılaştırmalar yapılmıştır. Pozitif kontrol ile oluşan Genetik Hasar İndeksinin 1 µg/ml sinnamik asit ve 2 µg/ml sinnamik asit ile oluşan Genetik Hasar İndeksleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmazken ( $p>0,05$ ), 4 µg/ml sinnamik asit ile belirlenen Genetik Hasar İndeksi oranının pozitif kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmuştur ( $p<0,05$ ).

Non parametrik Kruskal-Wallis testi ile negatif kontrol DMSO ile 1 GyR. ile 2 Gy. R. yapılan karşılaştırmalarda Genetik Hasar İndeksleri bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunduğu için ( $p<0,001$ ) Mann Whitney U testi kullanılarak ikili karşılaştırmalar desteklenmiştir. Negatif kontrol DMSO, 1 Gy R. ve 2 Gy R. ile Genetik Hasar İndeksi oranı kendi aralarında tek tek ikili karşılaştırmaları yapılmış ve DMSO her ikisi arasında da anlamlı yüksek bulunmuştur ( $p<0,001$ ).

Sinnamik asidin 1 µg/ml, 2 µg/ml ve 4 µg/ml dozları, radyasyonun 1 Gy ve 2 Gy dozları ile kombine edilmiştir. Bu kombine dozların COMET testi sonuçları her donör için çizelge 4.2 de verilmektedir.

Kombine dozlar Genetik Hasar İndeksi açısından öncelikle Nonparametrik Kruskal-Wallis testine göre karşılaştırıldığında aralarında anlamlı farklılık bulunmuştur ( $p<0,001$ ). Bunun üzerine ikili karşılaştırmalar Mann Whitney U testi kullanılarak

yapılmıştır. İkili karşılaştırmalar ilk olarak 1 Gy radyasyon ile 1 Gy radyasyon artı sinamik asit dozlarının oluşturduğu kombine dozlar arasında yapılmıştır. Genetik hasar indeksleri açısından 1 Gy R. ile 1 Gy R. + DMSO arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p>0,05$ ). 1 Gy R. ile 1 Gy R. + 1 µg/ml sinamik asit kombine dozunun Genetik hasar indeksleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak bir anlamlılık vardır ( $p<0,05$ ). 1 GyR. ile 1 Gy R. + 2 µg/ml sinamik asit kombine dozu Genetik hasar indeksleri açısından karşılaştırıldıklarında anlamlı bir ifade bulunmuştur ( $p<0,005$ ). 1 Gy R. ile yapılan son karşılaştırma olan 1 Gy R. + 4 µg/ml sinamik asit kombine dozunun Genetik Hasar İndeksleri karşılaştırılmış ve yüksek bir anlamlılık bulunmuştur ( $p<0,001$ ).

2 Gy ile 2 Gy radyasyon ve sinamik asit dozlarının oluşturduğu kombine dozlar arasında karşılaştırma yapılmıştır. İkili karşılaştırmalar çizelge 4.5'da ve şekil 4.6 da gösterilmiştir. Genetik hasar indeksleri açısından 2 Gy R. ile 2 Gy R. + DMSO arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p>0,05$ ). 2 Gy R. + 1 µg/ml sinamik asit, 2 Gy R. + 2 µg/ml sinamik asit ve 2Gy R. + 4 µg/ml sinamik asit kombine dozlarının Genetik Hasar İndeksleri arasında anlamlı bir farklılık bulunmaktadı (p<0,001). COMET testinden elde edilen bulgulardan % hasarlı hücre oranlarını, Non parametrik Kruskal-Wallis testine göre karşılaştırdığımızda, pozitif kontrol, 1 µg/ml sinamik asit, 2 µg/ml sinamik asit, 4 µg/ml sinamik asit, dozlarında gruplar arasında istatistiksel anlamlı farklılık bulunmuştur ( $p<0,001$ ). Mann Whitney U testi kullanılarak ikili karşılaştırmalar yapılmıştır. Negatif kontrol ile % hasarlı hücre oranı bakımından 1, 2 ve 4 µg/ml sinamik asit dozları karşılaştırıldığında sadece en yüksek doz sinamik asitin % hasarlı hücre oranını anlamlı arttırdığı gözlenmiştir ( $p<0,05$ ). Non parametrik Kruskal-Wallis testi ile negatif kontrol DMSO ile 1 GyR. ile 2 Gy R. yapılan karşılaştırmalarda % Hasarlı Hücre bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunduğu dolay ( $p<0,001$ ) Mann Whitney U testi kullanılarak ikili karşılaştırmalar yapılmıştır. Negatif kontrol DMSO, 1 Gy R. ve 2 Gy R. ile % Hasarlı Hücre miktarları kendi aralarında tek tek ikili karşılaştırmaları yapılmış ve DMSO her ikisi arasında da anlamlılık yüksek olarak bulunmuştur ( $p<0,001$ ).

Kombine dozlar % Hasarlı Hücre açısından öncelikle Nonparametrik Kruskal-Wallis testine göre karşılaştırıldığında aralarında anlamlı farklılık bulunmuştur

( $p < 0,001$ ). Bunun üzerine ikili karşılaştırmalar Mann Whitney U testi kullanılarak yapılmıştır. İkili karşılaştırmalar ilk olarak 1 Gy radyasyon ile 1 Gy radyasyon artı sinnamik asit dozlarının oluşturduğu kombine dozlar arasında yapılmıştır. % Hasarlı Hücre bakımından 1 Gy. R. ile 1 Gy. R. + DMSO arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p > 0,05$ ). 1 Gy R. ile 1 Gy R. + 1 µg/ml sinnamik asit ve 1 GyR. + 2 µg/ml sinnamik asit kombine dozlarının % Hasarlı Hücre oranları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak bir anlamlılık vardır ( $p < 0,05$ ). 1 Gy R. ile 1 Gy R. + 4 µg/ml sinnamik asit kombine dozunun % Hasarlı Hücre oranları karşılaştırıldığında ise daha yüksek bir anlamlılık bulunmuştur ( $p < 0,005$ ). Regresyon analizi sonuçları sinnamik asidin 1, 2 ve 4 µg/ml dozlarının 1Gy radyasyon ile indüklenen Genetik Hasar İndeksi oranını doza bağımlı olarak azalttığını göstermiştir ( $R^2: 0,553; p < 0,001$ ).

2 Gy ile 2 Gy radyasyon ve kinik asit dozlarının oluşturduğu kombine dozlar arasında karşılaştırma yapılmıştır. %Hasarlı Hücre bakımından 2 Gy R. ile 2 Gy R. + DMSO arasında anlamlı bir fark bulunmazken ( $p > 0,05$ ) 2 GyR. ile 2 Gy R. + 1 µg/ml sinnamik asit, 2 Gy R. + 2 µg/ml sinnamik asit ve 1 Gy R. + 4 µg/ml sinnamik asit kombine dozlarının % Hasarlı Hücre oranları arasında yüksek bir anlamlılık bulunmaktadır ( $p < 0,001$ ). Regresyon analizi sonuçları sinnamik asidin 1, 2 ve 4 µg/ml dozlarının 2 Gy radyasyon ile indüklenen Genetik Hasar İndeksi oranını doza bağımlı olarak azalttığını göstermiştir ( $R^2: 0,572; p < 0,001$ ).

Tüm dozların neden olduğu Genetik Hasar İndeksi (GHI) ve % hasarlı hücre (%HH) değerleri her donör için ayrı ayrı olmak üzere çizelge 4.2' de gösterilmiştir.

Tüm donörlere ait Genetik Hasar İndeksi ve % Hasarlı hücre ortalama değerleri çizelge 4.3, şekil 4.1 ve şekil 4.2' de gösterilmiştir.

Genetik Hasar İndeksi (GHI) ve % hasarlı hücre (%HH)' lerin istatistiksel anlamlılıklarının karşılaştırma sonuçları çizelge 4.4 ve 4.5' de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. COMET Testi sonucunda 1. Donör ve 2. Donör için elde edilen veriler

Donör	Çalışma Grubu	Tekrar	Değerlendirilen Hücre Sayısı	Normal (Hasarsız) Hücre Sayısı	Tip 1	Tip 2	Tip 3	Tip 4	GHI	%HH
1	Kontrol	A	100	95	3	2	0	0	2	0,7
		B	100	93	4	3	0	0	3	0,1
	Kontrol Tkr.	A	100	97	0	2	0	1	3	0,08
		B	100	96	1	1	2	0	3	0,09
	DMSO	A	100	86	4	4	1	5	10	0,35
		B	100	88	3	6	2	1	9	0,25
	DMSO Tkr.	A	100	87	1	4	5	3	12	0,36
		B	100	89	3	2	4	2	8	0,27
	1 µg/ml S.A	A	100	93	2	3	1	1	5	0,15
		B	100	83	6	5	0	6	11	0,4
	1 µg/ml S.A Tkr.	A	100	85	3	7	3	2	12	0,34
		B	100	86	4	6	2	2	10	0,3
	2 µg/ml S.A	A	100	95	1	2	0	2	4	0,13
		B	100	80	2	5	5	8	18	0,59
	2 µg/ml S.A Tkr.	A	100	88	4	4	3	1	8	0,25
		B	100	89	4	3	3	1	7	0,23
	4 µg/ml S.A	A	100	75	7	6	3	9	18	0,64
		B	100	80	5	3	5	7	15	0,54
	4 µg/ml S.A Tkr.	A	100	89	5	4	1	1	6	0,2
		B	100	90	4	3	2	1	6	0,2
	1 Gy R.	A	100	78	7	1	2	12	15	0,63
		B	100	63	14	5	2	16	23	0,94
	1 Gy R. Tkr.	A	100	69	3	7	10	11	28	0,91
		B	100	69	3	8	10	10	28	0,89
	2 Gy R.	A	100	65	6	7	10	12	29	0,98
		B	100	63	3	13	6	15	34	1,07
	2 Gy R. Tkr.	A	100	60	2	6	13	16	38	1,23
		B	100	59	1	9	19	15	40	1,30
	1 Gy R. + DMSO	A	100	60	5	12	9	14	35	1,12
		B	100	61	9	10	7	13	30	1,02
	1 Gy R. + DMSO Tkr.	A	100	70	4	6	7	13	26	0,89
		B	100	69	5	9	7	10	26	0,84
1 Gy R. + 1 µg/ml S.A	A	100	75	4	5	10	6	21	0,68	
	B	100	76	3	5	8	8	21	0,69	



Çizelge 4.2' in devamı

Donör	Çalışma Grubu	Tekrar	Değerlendirilen Hücre Sayısı	Normal (Hasarsız) Hücre Sayısı	Tip 1	Tip 2	Tip 3	Tip 4	%HH	GHI
1	1 Gy R. + 1 µg/ml S.A Tkr.	A	100	73	2	7	8	10	25	0,8
		B	100	72	6	5	8	9	22	0,76
	1 Gy R. + 2 µg/ml S.A	A	100	78	7	6	5	4	15	0,5
		B	100	77	6	7	5	5	17	0,55
	1 Gy R. + 2 µg/ml S.A Tkr.	A	100	75	1	6	8	10	24	0,77
		B	100	76	4	6	5	9	20	0,67
	1 Gy R. + 4 µg/ml S.A	A	100	80	1	8	5	6	19	0,56
		B	100	82	3	5	6	4	15	0,47
	1 Gy R. + 4 µg/ml S.A Tkr.	A	100	78	3	5	7	7	19	0,62
		B	100	79	2	6	6	7	19	0,6
	2 Gy R. + DMSO	A	100	76	6	6	7	5	18	0,59
		B	100	71	3	8	10	8	26	0,81
	2 Gy R. + DMSO Tkr.	A	100	65	4	11	5	15	31	1,01
		B	100	67	1	5	13	14	32	1,06
	2 Gy.R. + 1 µg/ml S.A	A	100	70	4	9	8	9	26	0,82
		B	100	73	5	3	11	8	22	0,76
	2 Gy.R. + 1 µg/ml S.A Tkr.	A	100	70	5	6	9	10	25	0,84
		B	100	69	4	7	11	9	27	0,87
	2 Gy R. + 2 µg/ml S.A	A	100	74	2	7	9	8	24	0,75
		B	100	75	4	6	8	7	21	0,68
2 Gy R. + 2 µg/ml S.A Tkr.	A	100	73	4	7	8	8	23	0,74	
	B	100	72	5	6	7	10	23	0,78	
2 Gy R. + 4 µg/ml S.A	A	100	77	3	6	7	7	20	0,64	
	B	100	78	2	6	7	7	20	0,63	
2 Gy R. + 4 µg/ml S.A Tkr.	A	100	73	4	7	8	8	23	0,74	
	B	100	72	5	6	7	10	23	0,78	

Çizelge 4.2 devamı

Donör	Çalışma Grubu	Tekrar	Değerlendirilen Hücre Sayısı	Normal (Hasarsız) Hücre Sayısı	Tip 1	Tip 2	Tip 3	Tip 4	%HH	GHİ
2	1 Gy R. + 1 µg/ml S.A Tkr.	A	100	72	3	5	10	10	25	0,83
		B	100	73	3	7	10	7	24	0,75
	1 Gy R. + 2 µg/ml S.A	A	100	75	5	9	8	3	20	0,59
		B	100	78	2	5	9	6	20	0,63
	1 Gy R. + 2 µg/ml S.A Tkr.	A	100	75	5	9	8	3	20	0,59
		B	100	78	2	5	9	6	20	0,63
	1 Gy R. + 4 µg/ml S.A	A	100	83	3	2	1	11	14	0,54
		B	100	80	1	5	6	8	19	0,61
	1 Gy R. + 4 µg/ml S.A Tkr.	A	100	83	5	5	3	4	12	0,40
		B	100	84	4	4	3	5	12	0,41
	2 Gy R. + DMSO	A	100	53	7	9	11	20	40	1,38
		B	100	72	2	3	8	15	29	0,92
	2 Gy R. + DMSO Tkr.	A	100	65	5	8	6	16	30	1,03
		B	100	63	4	11	8	14	33	1,06
	2 Gy.R. + 1 µg/ml S.A	A	100	70	3	5	10	12	27	0,91
		B	100	72	3	5	15	5	25	0,78
	2 Gy.R. + 1 µg/ml S.A Tkr.	A	100	68	4	8	9	11	28	0,91
		B	100	72	3	5	10	10	25	0,83
	2 Gy R. + 2 µg/ml S.A	A	100	74	2	7	9	8	24	0,75
		B	100	73	4	6	8	9	23	0,76
2 Gy R. + 2 µg/ml S.A Tkr.	A	100	74	5	7	7	7	21	0,68	
	B	100	76	5	8	6	6	20	0,62	
2 Gy R. + 4 µg/ml S.A	A	100	80	4	5	6	5	16	0,52	
	B	100	78	3	4	8	7	19	0,63	
2 Gy R. + 4 µg/ml S.A Tkr.	A	100	79	6	5	6	4	15	0,50	
	B	100	79	5	6	7	3	16	0,50	

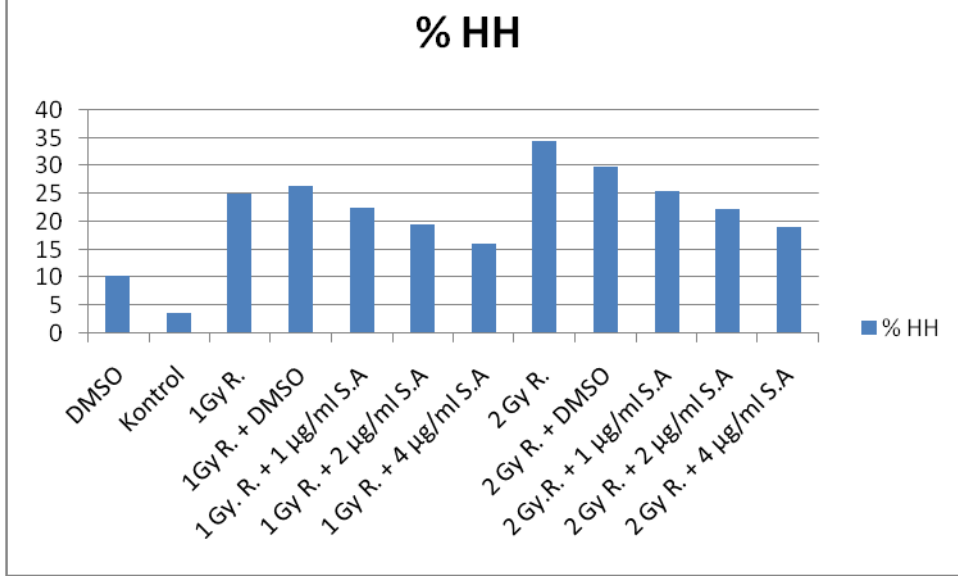
Çizelge 4.2 devamı

Donör	Çalışma Grubu	Tekrar	Değerlendirilen Hücre Sayısı	Normal (Hasarsız) Hücre Sayısı	Tip 1	Tip 2	Tip 3	Tip 4	%HH	GHİ
2	Kontrol	A	100	94	2	2	2	0	4	0,12
		B	100	92	2	3	2	1	6	0,18
	Kontrol Tkr.	A	100	95	2	2	1	0	3	0,09
		B	100	94	1	3	2	0	5	0,13
	DMSO	A	100	88	1	2	4	5	11	0,37
		B	100	86	2	2	4	6	12	0,42
	DMSO Tkr.	A	100	87	3	4	3	3	10	0,32
		B	100	85	4	5	2	4	11	0,36
	1 µg/ml S.A	A	100	86	3	4	6	1	11	0,33
		B	100	89	4	2	4	1	7	0,24
	1 µg/ml S.A Tkr.	A	100	90	2	3	3	2	8	0,25
		B	100	88	3	4	2	3	9	0,29
	2 µg/ml S.A	A	100	90	3	2	4	1	7	0,23
		B	100	90	4	3	2	1	6	0,2
	2 µg/ml S.A Tkr.	A	100	94	2	3	1	0	4	0,11
		B	100	92	2	2	3	1	6	0,19
	4 µg/ml S.A	A	100	85	2	5	6	2	13	0,38
		B	100	88	2	2	5	3	10	0,33
	4 µg/ml S.A Tkr.	A	100	96	2	1	0	1	2	0,08
		B	100	96	1	1	1	1	3	0,1
	1 Gy R.	A	100	72	3	6	8	11	25	0,83
		B	100	71	3	7	8	11	26	0,85
	1 Gy R. Tkr.	A	100	68	6	4	9	13	26	0,93
		B	100	67	3	6	9	15	30	1,02
	2 Gy R.	A	100	68	1	5	11	15	31	1,04
		B	100	66	1	8	14	11	33	1,03
	2 Gy R. Tkr.	A	100	59	5	9	9	18	36	1,22
		B	100	62	4	5	11	18	34	1,19
	1 Gy R. + DMSO	A	100	83	2	5	5	5	15	0,47
		B	100	72	4	9	9	6	24	0,73
1 Gy R. + DMSO Tkr.	A	100	69	4	8	7	12	27	0,89	
	B	100	70	1	5	13	11	29	0,94	
1 Gy R. + 1 µg/ml S.A	A	100	75	4	8	7	6	21	0,65	
	B	100	76	3	7	9	5	21	0,64	

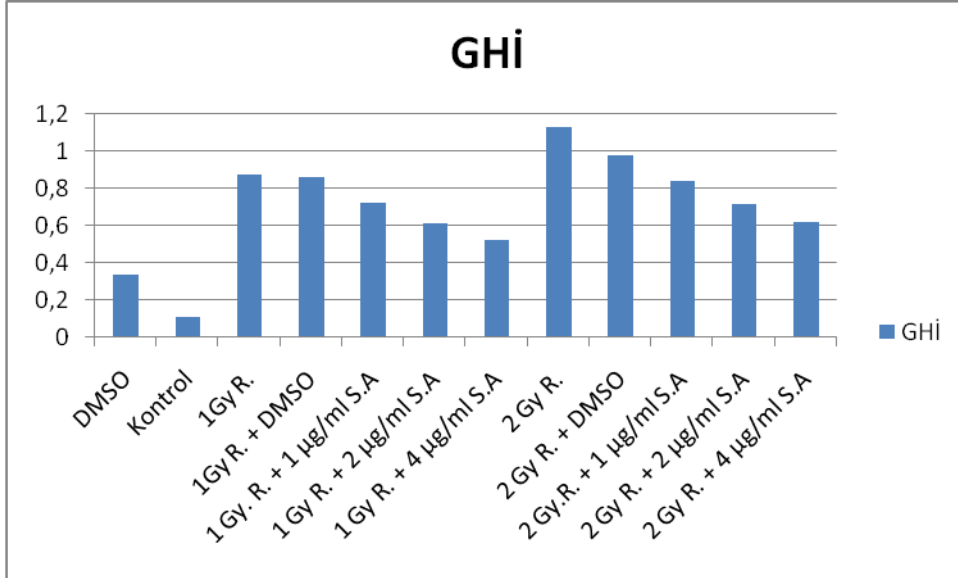
Çizelge 4.3. Tüm donörlere ait Genetik Hasar İndeks, % Hasarlı Hücre ortalama değerleri ve radyasyondan korunma indeksi.

Doz	%HH	GHI	Koruma İndeksi (%)
DMSO	10,3750±1,40789	0,3375±0,05548	-
Kontrol	3,6250±1,30247	0,1075±0,03536	-
1 µg/ml S.A	9,1250±2,35660	0,2875±0,07555	-
2 µg/ml S.A	7,5000±4,47214	0,2413±0,14923	-
4 µg/ml S.A	9,1250±5,81715	0,3088±0,20294	-
1Gy R.	25,1250±4,61171	0,8750±0,11489	-
1Gy R. + DMSO	26,5000±5,73212	0,8625±0,19667	-
1 Gy R. + 1 µg/ml S.A	22,5000±1,85164	0,7250±0,07031	17
1 Gy R. + 2 µg/ml S.A	19,5000±2,61861	0,6163±0,08123	30
1 Gy R. + 4 µg/ml S.A	16,1250±3,22656	0,5263±0,08879	40
2 Gy R.	34,3750±3,58319	1,1325±0,11634	-
2 Gy R. + DMSO	29,8750±6,26641	0,9825±0,22701	-
2 Gy.R. + 1 µg/ml S.A	25,6250±1,84681	0,8400±0,05503	26
2 Gy R. + 2 µg/ml S.A	22,3750±1,50594	0,7200±0,05425	36
2 Gy R. + 4 µg/ml S.A	19,0000±3,11677	0,6175±0,10647	50

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



Şekil 4.1. Tüm gruplara ait % Hasarlı hücre ortalama değerlerinin grafiksel olarak dağılımı.  
%HH; % Hasarlı Hücre, DMSO; Dimetil sülfoksit



Şekil 4.2. Tüm gruplara ait % Hasarlı hücre ortalama değerlerinin grafiksel olarak dağılımı.  
%HH; % Hasarlı Hücre, DMSO; Dimetil sülfoksit

Çizelge 4.4. Comet Testindeki Genetik Hasar İndekslerinin İstatistiksel anlamlılıklarının karşılaştırma sonuçları

Karşılaştırılan Gruplar	P Değeri	Farkların İstatistiksel anlamlığı
Kontrol – DMSO	p< 0,001	Anlamlı
Kontrol - 1 µg/ml S.A	p>0.05	Anlamsız
Kontrol - 2 µg/ml S.A	p>0.05	Anlamsız
Kontrol - 4 µg/ml S.A	p<0.05	Anlamlı
DMSO – 1 Gy R.	p< 0,001	Anlamlı
1 Gy R. - 1 Gy R. + DMSO	p>0.05	Anlamsız
1 Gy R. - 1 Gy R. + 1 µg/ml S.A	p<0.05	Anlamlı
1 Gy R. - 1 Gy R. + 2 µg/ml S.A	p<0.005	Anlamlı
1 Gy R. - 1 Gy R. + 4 µg/ml S.A	p< 0,001	Anlamlı
DMSO - 2 Gy R.	p< 0,001	Anlamlı
2 Gy R. - 2 Gy.R. + DMSO	p>0.05	Anlamsız
2 Gy R. - 2 Gy.R. + 1 µg/ml S.A	p< 0,001	Anlamlı
2 Gy R. - 2 Gy R. + 2 µg/ml S.A	p< 0,001	Anlamlı
2 Gy R. - 2 Gy R. + 4 µg/ml S.A	p< 0,001	Anlamlı

Çizelge 4.5. Comet Testindeki % HH İstatistiksel anlamlılıklarının karşılaştırma sonuçları

Karşılaştırılan Gruplar	P Değeri	Farkların İstatiksel anlamlığı
Kontrol – DMSO	p< 0,001	Anlamlı
Kontrol - 1 µg/ml S.A	p>0.05	Anlamsız
Kontrol - 2 µg/ml S.A	p>0.05	Anlamsız
Kontrol - 4 µg/ml S.A	p<0.05	Anlamlı
DMSO – 1 Gy R.	p< 0,001	Anlamlı
1 Gy R. - 1 Gy R. + DMSO	p>0.05	Anlamsız
1 Gy R. - 1 Gy R. + 1 µg/ml S.A	p<0.05	Anlamlı
1 Gy R. - 1 Gy R. + 2 µg/ml S.A	p<0.05	Anlamlı
1 Gy R. - 1 Gy R. + 4 µg/ml S.A	p< 0,005	Anlamlı
DMSO - 2 Gy R.	p< 0,001	Anlamlı
2 Gy R. - 2 Gy.R. + DMSO	p>0.05	Anlamsız
2 Gy R. - 2 Gy.R. + 1 µg/ml S.A	p< 0,001	Anlamlı
2 Gy R. - 2 Gy R. + 2 µg/ml S.A	p< 0,001	Anlamlı
2 Gy R. - 2 Gy R. + 4 µg/ml S.A	p< 0,001	Anlamlı

## 4.2. Mikronukleus Testinden Elde Edilen Bulgular

Tüm dozların neden olduğu MN frekansı ve Nükleer Bölünme İndeksi (NBI) değerleri donör 1 ve 2 ile donör 3 ve 4 için ayrı ayrı olmak üzere çizelge 4.6' da gösterilmiştir. Tüm donörlere ait MN frekansı ve Nükleer Bölünme İndeksi ortalama değerleri çizelge 4.7 şekil 4.4' de gösterilmiştir.

Non parametrik Kruskal-Wallis testine göre pozitif kontrol, 1 µg/ml sinnamik asit, 2 µg/ml sinnamik asit, 4 µg/ml sinnamik asit, dozlarındaki MN frekansı kendi aralarında karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel anlamlı farklılık bulunduğu zaman ( $p<0,001$ ) Mann Whitney U testi kullanılarak ikili karşılaştırmalar yapılarak desteklenmiştir. Pozitif kontrol ile oluşan MN frekansı 1 µg/ml sinnamik ile oluşan MN frekansı bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur ( $p>0,05$ ). 2 µg/ml sinnamik asit ve 4 µg/ml sinnamik asit sonunda oluşan MN frekansı pozitif kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmuştur ( $p<0,05$ ).

Non parametrik Kruskal-Wallis testi ile negatif kontrol olarak seçtiğimiz DMSO (%5 ' lik) ile 1 Gy.R. ile 2 Gy. R. yapılan karşılaştırmalarda MN frekansı bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmuştur ( $p<0,001$ ) ve Mann Whitney U testi kullanılarak ikili karşılaştırmaları yapılmıştır. Negatif kontrol DMSO, 1 Gy R. ve 2 Gy R. ile MN frekansı oranlarını kendi aralarında tek tek ikili karşılaştırmaları yapılmış ve DMSO her ikisi arasında istatistiksel olarak bir anlamlılık bulunmuştur ( $p<0,05$ ).

Kombine dozlar MN frekansı açısından öncelikle Nonparametrik Kruskal-Wallis testine göre karşılaştırıldığında aralarında anlamlı farklılık bulunmuştur ( $p<0,001$ ). Bunun üzerine ikili karşılaştırmalar Mann Whitney U testi kullanılarak yapılmıştır. MN frekansı bakımından 1 Gy R. ile 1 Gy R. + DMSO arasında anlamlı bir fark bulunmazken ( $p>0,05$ ). 1 Gy R. ile 1 GyR. + 1 µg/ml sinnamik asit, 1 Gy R. + 2 µg/ml sinnamik asit ve 1 Gy R. + 4 µg/ml sinnamik asit kombine dozlarının MN frekansları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak bir anlamlılık vardır ( $p<0,05$ ). Regresyon analizi sonuçları sinnamik asidin 1, 2 ve 4 µg/ml dozlarının 1 Gy radyasyon ile indüklenen Genetik Hasar İndeksi oranını doza bağımlı olarak azalttığını göstermiştir ( $R^2:0,923$ ;  $p<0,001$ ).



2 Gy ile 2 Gy radyasyon ve kinik asit dozlarının oluşturduğu kombine dozlar arasında da karşılaştırma yapılmıştır. MN frekansı bakımından 2 Gy R. ile 2 Gy R. + DMSO arasında anlamlı bir fark bulunmazken ( $p>0,05$ ) 2 GyR. ile 2 Gy R. + 1 µg/ml sinnamik asit, 2 Gy R. + 2 µg/ml sinnamik asit ve 1 Gy R. + 4 µg/ml sinnamik asit kombine dozlarının MN frekansları arasında istatistiksel açıdan bir anlamlılık vardır ( $p<0,05$ ). Regresyon analizi sonuçları sinnamik asidin 1, 2 ve 4 µg/ml dozlarının 2 Gy radyasyon ile indüklenen Genetik Hasar İndeksi oranını doza bağımlı olarak azalttığını göstermiştir ( $R^2:0,865$ ;  $p< 0,001$ ).

Çizelge 4.6. MN testi sonucunda 1. Donör ve 2. Donör için elde edilen veriler

Donör	Çalışma Grubu	NBİ	Mikronukleus / 1000 Çift Çekirdekli Hücre	Tek Çekirdekli Hücre	Çift Çekirdekli Hücre	Üç Çekirdekli Hücre	Dört Çekirdekli Hücre
1	Kontrol	1,537	3	1051	866	41	42
	Kontrol Tkr	1,548	3	1075	819	41	65
	DMSO	1,3085	8	1441	514	32	13
	DMSO Tkr	1,235	6	1551	430	17	2
	1 µg/ml S.A	1,202	4	1607	384	7	2
	1 µg/ml S.A Tkr.	1,485	2	1049	936	11	4
	2 µg/ml S.A	1,219	4	1582	402	12	4
	2 µg/ml S.A Tkr.	1,5645	5	1035	861	44	60
	4 µg/ml S.A	1,2405	6	1549	424	24	3
	4 µg/ml S.A Tkr.	1,42	5	1198	778	10	14
	1 Gy R.	1,2455	33	1542	430	23	5
	1 Gy R. Tkr.	1,296	30	1432	549	14	5
	2 Gy R.	1,241	42	1534	452	12	2
	2 Gy R. Tkr.	1,4185	45	1230	711	51	8
	1 Gy R. + DMSO	1,1975	29	1631	350	12	7
1 Gy R. + DMSO Tkr.	1,4435	30	1126	863	9	2	

Çizelge 4.6' in devamı

Donör	Çalışma Grubu	NBİ	Mikronukleus / 1000 Çift Çekirdekli Hücre	Tek Çekirdekli Hücre	Çift Çekirdekli Hücre	Üç Çekirdekli Hücre	Dört Çekirdekli Hücre
1	Kontrol	1,537	3	1051	866	41	42
	Kontrol Tkr	1,548	3	1075	819	41	65
	DMSO	1,3085	8	1441	514	32	13
	DMSO Tkr	1,235	6	1551	430	17	2
	1 µg/ml S.A	1,202	4	1607	384	7	2
	1 µg/ml S.A Tkr.	1,485	2	1049	936	11	4
	2 µg/ml S.A	1,219	4	1582	402	12	4
	2 µg/ml S.A Tkr.	1,5645	5	1035	861	44	60
	4 µg/ml S.A	1,2405	6	1549	424	24	3
	4 µg/ml S.A Tkr.	1,42	5	1198	778	10	14
	1 Gy R.	1,2455	33	1542	430	23	5
	1 Gy R. Tkr.	1,296	30	1432	549	14	5
	2 Gy R.	1,241	42	1534	452	12	2
	2 Gy R. Tkr.	1,4185	45	1230	711	51	8
	1 Gy R. + DMSO	1,1975	29	1631	350	12	7
1 Gy R. + DMSO Tkr.	1,4435	30	1126	863	9	2	

Çizelge 4.6' in devamı

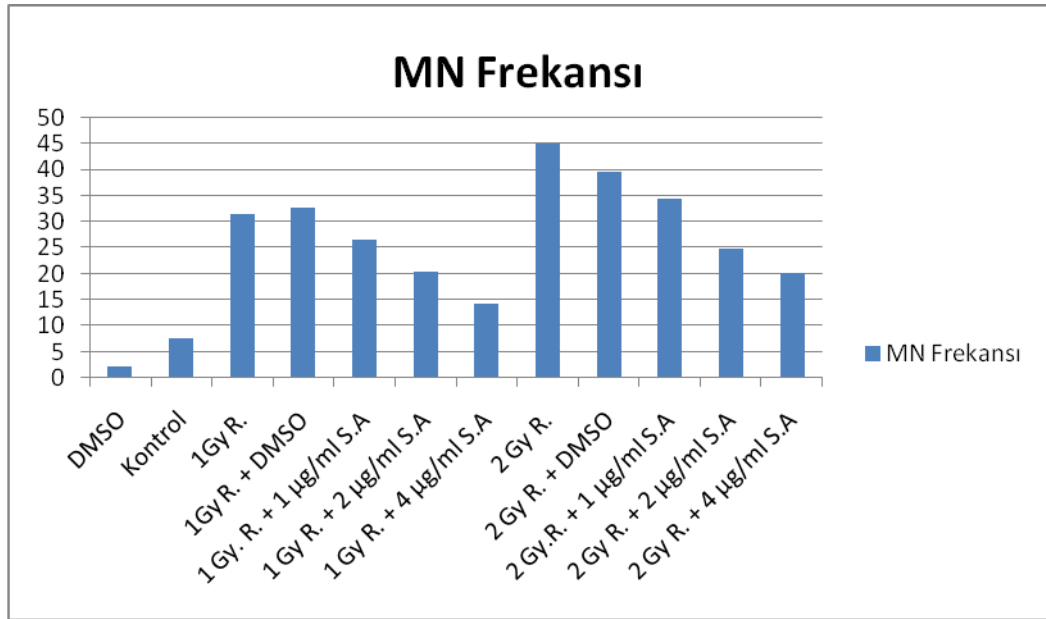
Donör	Çalışma Grubu	NBİ	Mikronukleus / 1000 Çift Çekirdekli Hücre	Tek Çekirdekli Hücre	Çift Çekirdekli Hücre	Üç Çekirdekli Hücre	Dört Çekirdekli Hücre
2	Kontrol	1,5585	2	1003	915	44	38
	Kontrol Tkr	1,2985	1	1437	534	24	5
	DMSO	1,338	8	1368	593	34	5
	DMSO Tkr	1,3585	9	1318	651	27	4
	1 µg/ml S.A	1,337	5	1368	594	34	4
	1 µg/ml S.A Tkr.	1,3825	4	1281	676	40	3
	2 µg/ml S.A	1,557	6	1008	909	44	39
	2 µg/ml S.A Tkr.	1,366	3	1322	632	38	8
	4 µg/ml S.A	1,4895	4	1134	793	33	40
	4 µg/ml S.A Tkr.	1,497	5	1102	820	60	18
	1 Gy R.	1,459	32	1136	818	38	8
	1 Gy R. Tkr.	1,453	312	1139	821	35	5
	2 Gy R.	1,4365	44	1156	820	19	5
	2 Gy R. Tkr.	1,4515	49	1132	840	21	7
	1 Gy R. + DMSO	1,4715	35	1099	868	24	9
1 Gy R. + DMSO Tkr.	1,4625	37	1106	869	19	6	

Çizelge 4.6'in devamı

Donör	Çalışma Grubu	NBİ	Mikronukleus / 1000 Çift Çekirdekli Hücre	Tek Çekirdekli Hücre	Çift Çekirdekli Hücre	Üç Çekirdekli Hücre	Dört Çekirdekli Hücre
2	1 Gy R. + 1 µg/ml S.A	1,3275	27	1383	585	26	6
	1 Gy R. + 1 µg/ml S.A Tkr.	1,3235	28	1392	574	29	5
	1 Gy R. + 2 µg/ml S.A	1,394	22	1246	724	26	4
	1 Gy R. + 2 µg/ml S.A Tkr.	1,435	21	1186	766	40	8
	1 Gy R. + 4 µg/ml S.A	1,412	16	1257	673	59	11
	1 Gy R. + 4 µg/ml S.A Tkr.	1,3205	12	1380	601	17	2
	2 Gy R. + DMSO	1,2635	43	1493	488	18	1
	2 Gy R. + DMSO Tkr.	1,2775	37	1467	513	18	2
	2 Gy.R. + 1 µg/ml S.A	1,461	39	1097	887	13	3
	2 Gy.R. + 1 µg/ml S.A Tkr.	1,458	37	1111	864	23	2
	2 Gy R. + 2 µg/ml S.A	1,234	28	1561	423	13	3
	2 Gy R. + 2 µg/ml S.A Tkr.	1,2925	25	1436	544	19	1
	2 Gy R. + 4 µg/ml S.A	1,4355	19	1186	766	39	9
	2 Gy R. + 4 µg/ml S.A Tkr.	1,428	22	1199	755	37	9

Çizelge 4.7. MN testi ile elde edilen tüm Donörlere ait verilerin özet bulguları

Doz	MN / 1000 Çift Çekirdekli Hücre	NBİ	Koruma İndeksi (%)
Kontrol	2,2500±0,95743	1,4855±0,12498	-
DMSO	7,7500±1,25831	1,3100±0,05405	-
1 µg/ml S.A	3,7500±1,25831	1,3516±0,11739	-
2 µg/ml S.A	4,5000±1,29099	1,4266±0,16612	-
4 µg/ml S.A	5,0000±0,81650	1,3993±0,10963	-
1Gy R.	31,5000±1,29099	1,3644±0,10814	-
1Gy R. + DMSO	32,7500±3,86221	1,3937±0,13135	-
1 Gy R. + 1 µg/ml S.A	26,5000±1,29099	1,3459±0,07504	16
1 Gy R. + 2 µg/ml S.A	20,5000±1,29099	1,3601±0,08804	35
1 Gy R. + 4 µg/ml S.A	14,2500±1,70783	1,3416±0,08583	55
2 Gy R.	45,0000±2,94392	1,3869±0,09818	-
2 Gy R. + DMSO	39,7500±2,50000	1,3030±0,11851	-
2 Gy.R. + 1 µg/ml S.A	34,5000±4,43471	1,3403±0,14273	23
2 Gy R. + 2 µg/ml S.A	25,0000±2,16025	1,3136±0,10145	44
2 Gy R. + 4 µg/ml S.A	20,2500±3,50000	1,3899±0,06442	55



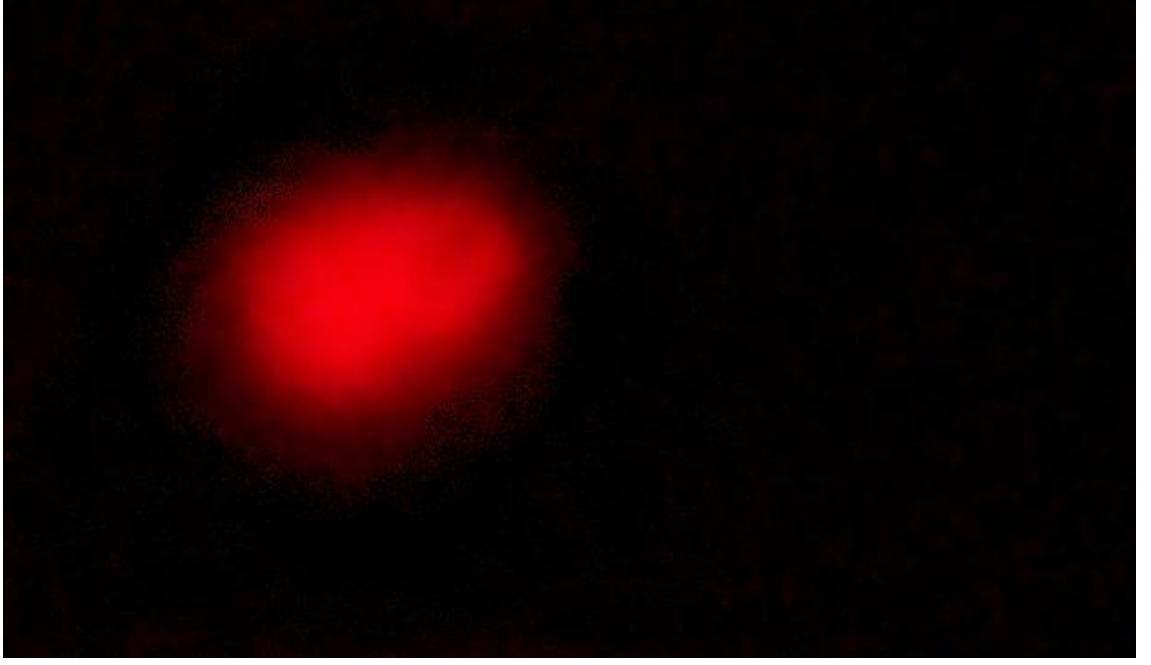
Şekil 4.4. Tüm gruplara ait MN frekansı ortalama değerlerinin grafiksel olarak dağılımı. MN; Mikronükleus,DMSO;Dimetilsülfoksit

Çizelge 4.8. MN testinin İstatistiksel anlamlılıklarının karşılaştırma sonuçları

Karşılaştırılan Gruplar	P Değeri	Farkların İstatistiksel anlamlığı
Kontrol – DMSO	p<0.05	Anlamlı
Kontrol - 1 µg/ml S.A	p>0.05	Anlamsız
Kontrol - 2 µg/ml S.A	p<0.05	Anlamlı
Kontrol - 4 µg/ml S.A	p<0.05	Anlamlı
DMSO – 1 Gy R.	p<0.05	Anlamlı
1 Gy R. - 1 Gy R. + DMSO	p>0.05	Anlamsız
1 Gy R. - 1 Gy R. + 1 µg/ml S.A	p<0.05	Anlamlı
1 Gy R. - 1 Gy R. + 2 µg/ml S.A	p<0.05	Anlamlı
1 Gy R. - 1 Gy R. + 4 µg/ml S.A	p<0.05	Anlamlı
DMSO - 2 Gy R.	p<0.05	Anlamlı
2 Gy R. - 2 Gy.R. + DMSO	p>0.05	Anlamsız
2 Gy R. - 2 Gy.R. + 1 µg/ml S.A	p<0.05	Anlamlı
2 Gy R. - 2 Gy R. + 2 µg/ml S.A	p<0.05	Anlamlı
2 Gy R. - 2 Gy R. + 4 µg/ml S.A	p<0.05	Anlamlı



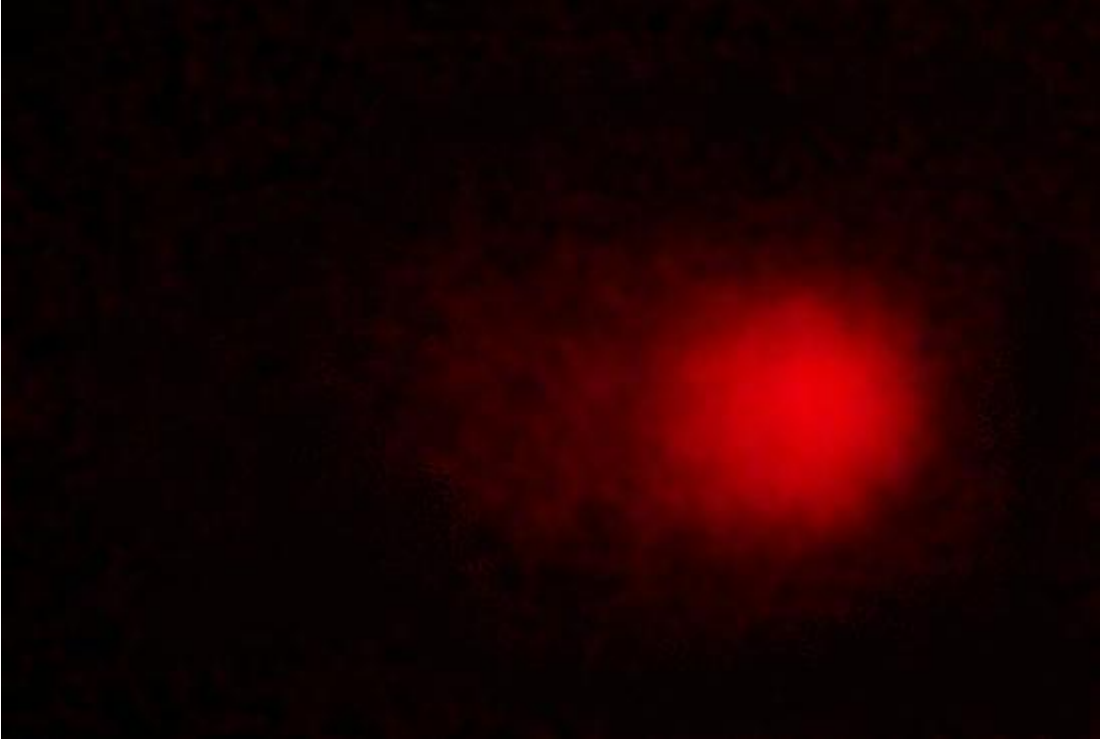
## 5.FOTOĞRAFLAR



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



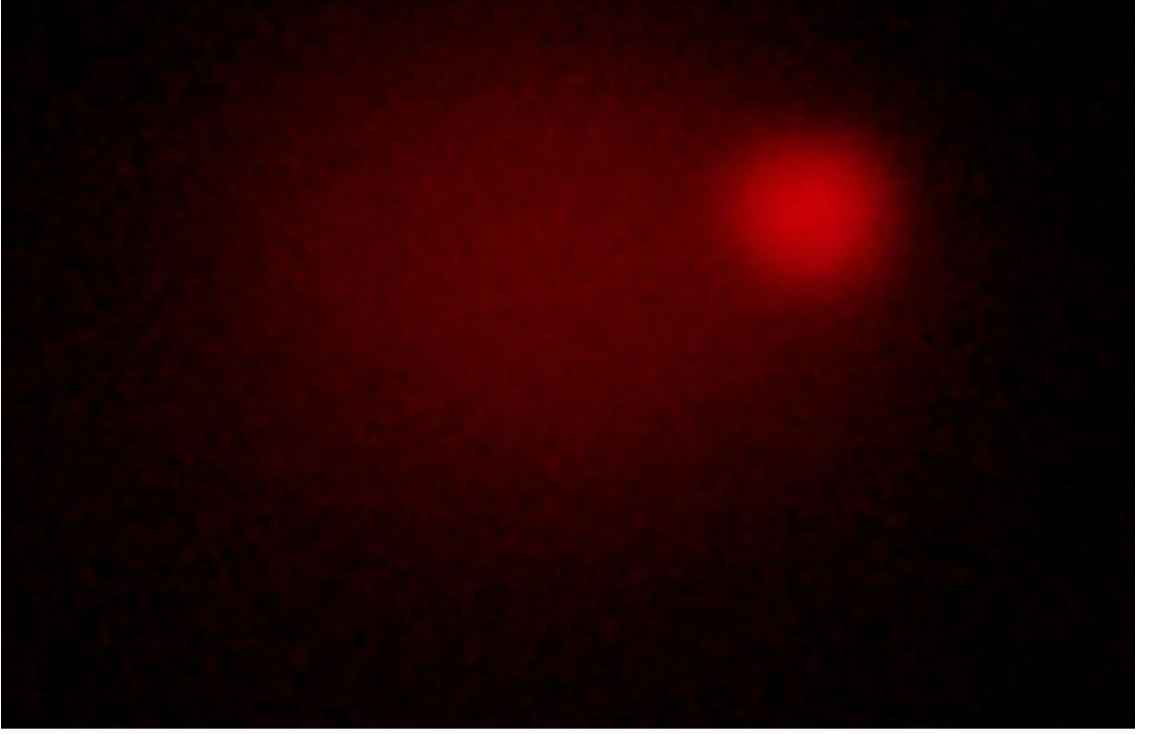
Şekil 5.2. COMET testine göre Tip 1 olarak değerlendirilen hücre.



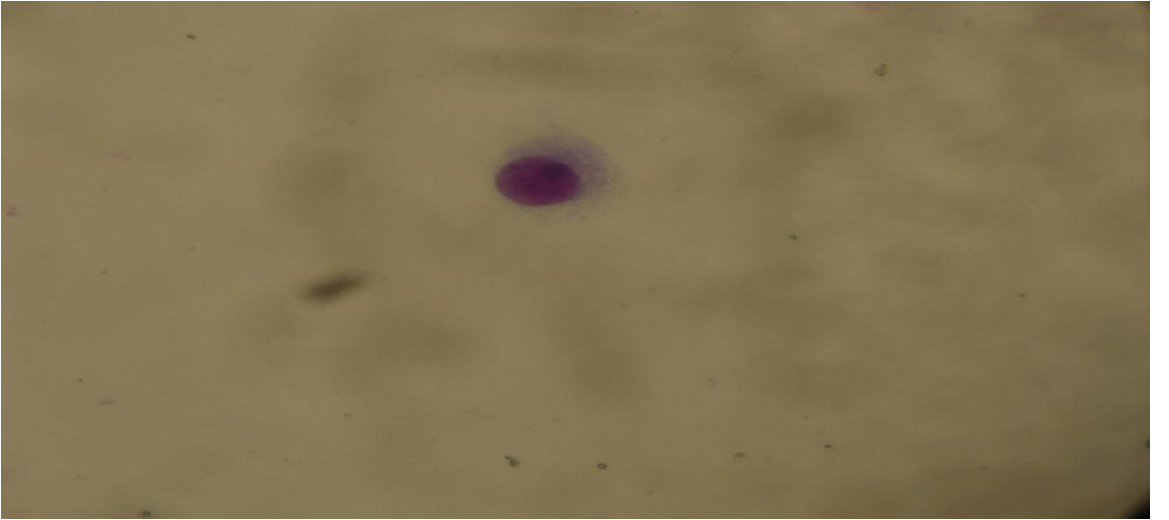
Şekil 5.3. COMET testine göre Tip 2 olarak değerlendirilen hücre.



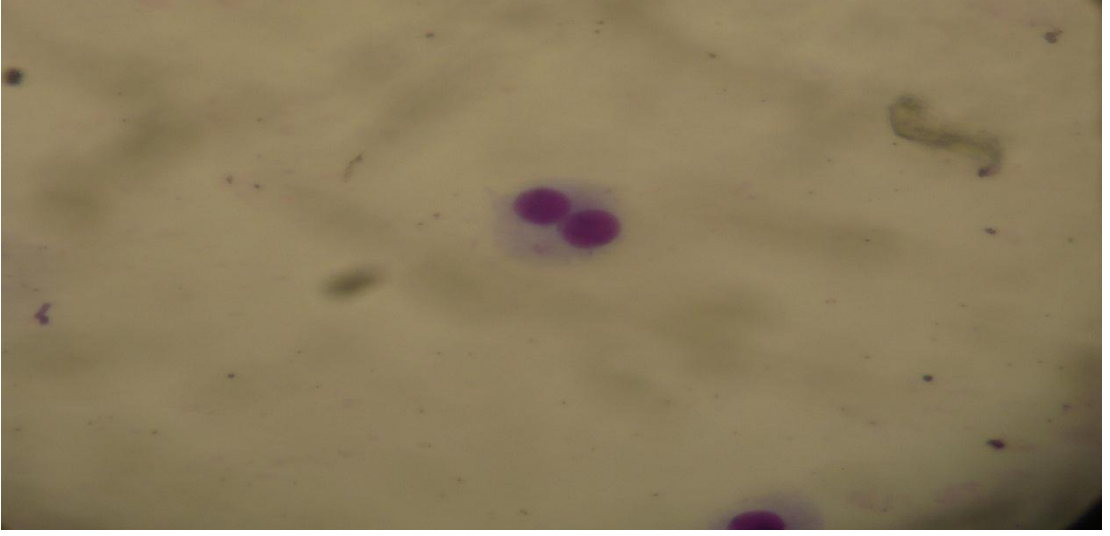
Şekil 5.4. COMET testine göre Tip 3 olarak değerlendirilen hücre.



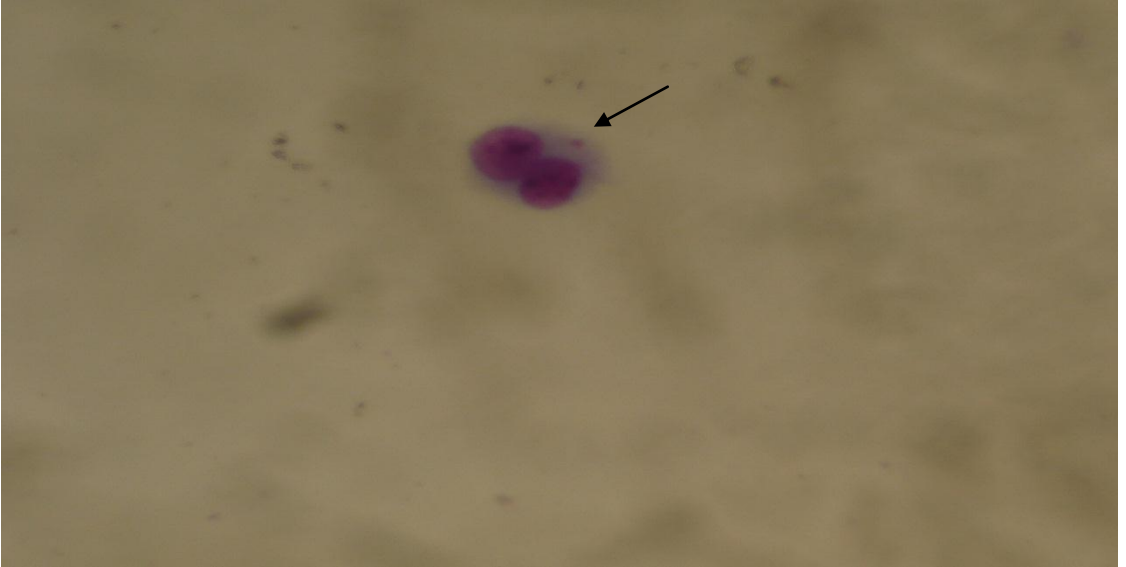
Şekil 5.5. COMET testine göre Tip 4 olarak değerlendirilen hücre.



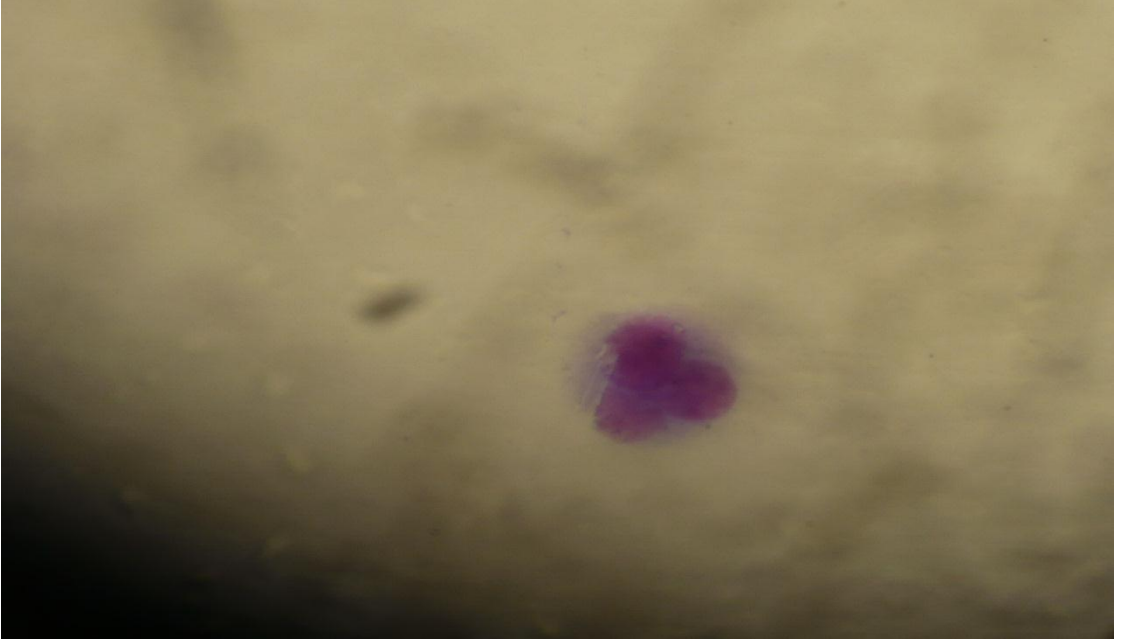
Şekil 5.6. Mikronukleus Testine göre tek çekirdekli hücre



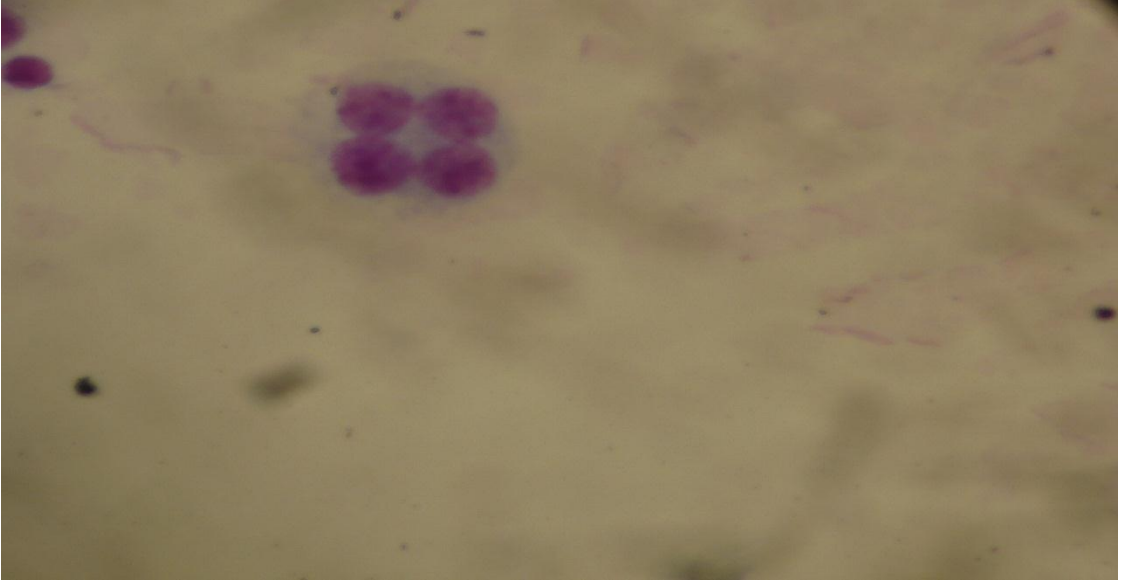
Şekil 5.7. Mikronukleus Testine göre çift çekirdekli hücre



Şekil 5.8. Mikronukleus Testine göre çift çekirdekli hücre de mikronukleus



Şekil 5.9. Mikronukleus Testine göreüç çekirdekli hücre



Şekil 5.10. Mikronukleus Testine göre dört çekirdekli hücre

## 6. TARTIŞMA

Radyasyonun oluşturduğu hasar genellikle suyun radyoliziyle oluşan serbest radikallerin indüksiyonuyla olabildiği gibi, DNA'yı doğrudan da etkileyebilir. Serbest radikaller hücre membranları ve nükleik asitlerle birleşerek mutasyon ya da hücre ölümünü indükleyen otokatalitik reaksiyonu başlatırlar (Özalpan 2001).

Radyasyonun biyomoleküllerde sebep olduğu değişiklikler incelenirken canlılık yönünden çok önemli rolleri olan iki biyomolekülün ilerde radyasyonun biyolojik etkilerinin ortaya çıkmasında büyük paylarının olduğu gözlemlenmiştir. Bu moleküller nükleik asitler ve proteinlerdir. Nükleik asitlerden de DNA'nın büyüme, farklılaşma ve metabolizmada önemli bir molekül olması ve genetik şifreyi taşımasından dolayı radyasyon hasarları bakımından RNA'ya oranla daha önemli olduğu belirtilmektedir. DNA molekülünde radyasyonun meydana getirdiği en önemli yapısal hasarlar; DNA yapısındaki zincir kırılmaları, baz hasarları ve baz kayıpları, denatürasyon bölgelerinin oluşması ve çapraz bağlanmalardır (McMillan ve Steel 1997).

Radyoterapi (ışın tedavisi), kanser tedavisinin vazgeçilmez unsurlarından biridir. Işın tedavisi kanser hücrelerinin doğrudan ya da dolaylı olarak iyonlaştırıcı radyasyonla öldürülmesine dayanmaktadır. Günümüzde radyoterapi cilt, beyin, meme, prostat ve rahim kanseri tedavilerinde, lenf ve kan kanseri tedavisinde etkin olarak kullanılmaktadır (Demir 2005).

Mikronükleuslar kromatin kaybı sonucunda oluştuğu için, özellikle kayıp kromatin, tümör baskılayıcı genler gibi kanser oluşumu ve gelişimi ile ilgili bir gen ya da genleri yapısında bulunduruyorsa, bu bir risk göstregesi olabilir. MN frekansı ile kanser gelişimi arasındaki direk ilişki birçok bulgu ile desteklenmektedir. Cheng ve ark. 1996'da, Duffaud ve ark. 1997'de yaptıkları çalışmalara göre; kanser hastalarında periferik lenfositlerde olduğu gibi hedef dokuda da MN frekansı artmaktadır (Fenech ve ark. 1999). Sorsa ve ark. 1992 yılında yaptıkları araştırmaya göre; bazı ajanlar insan ve hayvanlarda MN frekansını arttırabilmekte, kanserojenite ve genotoksisite arasında bir ilişki bulunmaktadır. Bu bulgular açıkça MN ve kanser arasında bağ olduğunu göstermektedir.

Comet yöntemi duyarlılığı, DNA hasarını tek hücre seviyesinde ölçmeye olanak sağlaması ve farklı hücre tiplerine uygulanabilirliği nedeni ile genotoksik etkisi merak

edilen bileşiklerin toksisitelerini hızlı olarak belirlemede kullanılan bir yöntemdir. Oksidatif stresin kanser, diyabet, ateroskleroz, nörodejeneratif hastalıklar gibi çeşitli patolojilerin temelinde yer aldığı belirlenmesinden sonra araştırmalar antioksidanlar üzerinde yoğunlaşmıştır, yeni bir takım bitkisel moleküllerin antioksidan özellikleri olup olmadığı araştırılmaktadır. “COMET Testi”, sayıları büyük bir hızla artmakta olan *in vivo* ve *in vitro* antioksidan çalışmalarında sıklıkla kullanılan bir yöntemdir (McKelvey-Martin ve ark. 1993;Silva ve ark. 2009).

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

Sinamik asit doğada bulunan bir bileşendir. Bitkiler aleminin bir üyesi olmakla birlikte genellikle tatlı kompozisyonlarda bulunur ve sinamon yağının yapısında bulunur (Hoskin 1984). Sinamik asit ve etken maddelerinin geniş bir terapötik spektrumda görevli oldukları bilinmektedir. Bunlara örnek olarak antimikrobiyal aktivite (Ramanan ve Raa 1987) ve antifungal aktivite (Tawata ve ark. 1996) verilebilir. Son yıllarda sinamik asidin insan malign tümörlerinde (Prostat ve akciğer melanoma, glioblastoma ve adenokarsinoma) antitümöral aktivite sergilediği de gösterilmiştir (Liu ve ark. 1995).

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

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

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

Bu bileşiklerden apigenin ile insan kan lenfositlerinde yapılan in vitro çalışmada apigeninin 2 Gy iyonize radyasyon dozunda oluşan mikronukleus oranını 2,5 ile 10 µg/ml dozlar arasında doza bağımlı olarak azalttığı belirlenmiştir ( Rithidech ve ark. 2005 ). Buna karşın beklendiği üzere apigenin tek başına mikronukleus oluşturmamıştır. Bizim çalışmamızda da sinamik asit özellikle 2 Gy radyasyonun oluşturduğu MN frekansını oldukça anlamlı oranda azaltmıştır. Ayrıca sinamik asit tek başına anlamlı oranda MN frekansı oluşturmamıştır.

DNA da DSBs nin derecelerini belirleyen MN oluşumu, IR'un neden olduğu genomik dengesizliğin belirlenmesinde kullanılan en iyi yöntemdir. Bu yöntem in vitro olarak insan lenfosit kültürlerinde in vivo olarak ta fare kemik iliği hücrelerinde ve periferik kan lökositlerinde uygulanmaktadır. Yüksek genomik dengesizliği sonucunda MNnin sıklığıda daha yüksek olmaktadır. Flavonoidler ile insan kan lenfositlerinin muamelesi sonucunda IR artırıldığında MN frekanslarında istatistiksel olarak önemli bir derecede azalma görülmektedir. Kuersetin, hesperidin ( Hosseinimehr ve ark 2009),



svertisin (Jankovic ve ark 2008) ve troxerutin insan binukleotit lenfositlerinde IR bağılı MNnin sıklığında istatistiksel olarak bir azalma olmuştur. Bu flavonoidler IR koruyucu dozlarında işlem görmüş insan lenfosit kültürlerinde MNnin sıklığını artırmaz. Troxerutin, naringin ve hesperidin gibi flavonoidlerin farede IR tarafından oluşan genotoksite karşısında koruyucu etkilerinin olduğu MNYöntemi ile gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda da sinnamik asitin bu etkisini görmekteyiz.

Flavonoidlerin genomik denge üzerindeki koruyucu etkileri sıklıkla gösterilmiştir. Komet yöntemi ya da tek hücre jel elektroforez yöntemi toksik maddeler ya da IR tarafından oluşan genotoksite için DNA'nın SSB ölçümleri duyarlı bir methodtur. Işınlanmış farelerin flavonoidler ile muamelesinde primer DNA hasarı seviyesinde azalma meydana gelmiştir. Bu koruyucu etki naringin, krisin ( Benkovic ve ark 2008), epikatesin ( Nair ve ark 2008) ve troxerutin ( Maurya ve ark 2005) görülmektedir. Bizde çalışmamızda COMET testine göre genetik hasar indeksi ve % hasarlı hücre bakımından 1 Gy ve 2 Gy radyasyonlar üzerinde sinnamik asitin koruyucu etkisini belirledik.

Bitkilerde doğal olarak oluşan fenolik bir bileşik olan curcumin ile yapılan radyoprotektif etki belirleme çalışmasında 1, 2 ve 4 Gy radyasyon dozları ile muamele edilen insan kan lenfositlerinde artmış mikronukleus ve disentrik kromozom aberasyon oranlarını curcumin 1, 5 ve 10 µg/ml lik dozlarda kullanıldığında doza bağımlı olarak azaltmıştır (Srinivasan ve ark. 2006). Çalışmamızda yaptığımız doz denemelerinde 4 Gy radyasyon dozu uygulandığında Trypan Blue canlılık testi sonuçlarına göre yüksek toksisite ve hücre ölümü sebebiyle değerlendirmeye yetecek canlı hücre elde edilememiştir. Bu sebeple bu doz çalışmada kullanılmamıştır. Curcuminle yapılan çalışmada bu bileşiğin fenolik hidroksil gruplarına sahip olması sebebiyle serbest radikal yakalama ve lipid peroksidasyonunu inhibe etme etkisine sahip olduğu vurgulanmaktadır. Çalışmamızda kullanılan sinnamik asit 1 ve 2 Gy radyasyonun oluşturduğu MN frekansını anlamlı oranda azaltmıştır. Ancak sinnamik asidin en yüksek dozu olan 4 µg/ml tek başına dozunda MN frekasında önemli bir değişikliğe neden olmadığı görülmüştür. Bu durum sinnamikasidin denenmeyen daha yüksek dozlarının toksik etkilerinin olabileceğini bize düşündürmektedir.

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

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

## 7. KAYNAKLAR

- ARORA, R., D. GUPTA, R. CHAWLA, R. SAGAR, A. SAHARMA, R. KUMAR, J. PRASAD, S. SINGH, N. SAMANTA, R. K. SHARMA, 2005. Radioprotection by Plant Products: Present Status and Future Prospects. *Phytother. Res.* 19:1–22.
- BADR, F. M., O. H. M. EL-HABIT, M. HAMDY, G. A. R. HASSAN, 1998. The Mutagenic Versus Protective Role of Vitamin A on the Induction of Chromosomal Aberration in Human Lymphocyte Cultures. *Mutat. Res./Gen. Toxi. And Environ. Mutagenesis.* 414(1):157-163.
- BASKIN, I. S. VE H. SALEM. 1997. Oxidants, Antioxidants, and Free Radicals . CRC Press. p.1-20,
- BECKMAN, C. H. , 2000, Phenolic-Storing Cells: Keys to Programmed Cell Death and Periderm Formation in Wilt Disease and in General Defence Responses in Plants, *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 57: 101-110
- BENAVENTE-GARCIA, O., J. CASTILLO, J. LORENTE, M. ALCARAZ, 2007. Radioprotective Effects In Vivo of Phenolics Extracted from *Olea europaea* L. Leaves Against X-Ray-Induced Chromosomal Damage: Comparative Study Versus Several Flavonoids and Sulfur-Containing Compounds. *Journal of Medicinal Food.* 5(3):125-135
- BENKOVIC, V., , A. H. KNEZEVIC, , D. DIKIC, D. LISISIC, N. ORSOLIC, I. BASIC, N. KOPJAR, 2009. Radioprotective Effects of Quercetin and Ethanolic Extract of Propolis in Gamma-Irradiated Mice. *Arh Hig Rada Toksikol*, 60:129-138.
- BERROUD, A., A. LE ROY, P. VOISIN, 1996. Membrane Oxidative Damage Ġnduced by Ġonizing Radiation Detected by Flourescence Polarization. *Radiat. Environ. Biophysics*, 35:289-295.
- BOLLUM, F. J., J. W. ANDREGG, A. B. McELYA, V. R. POTTER, 1960, Nucleic Acid Metabolism in Regenerating Rat Liver VII. Effect of X-Radiation on Enzymes of DNA Synthesis. *Cancer Research.* 20:138-143.
- BONASSI, L. HAGMAR, U. STRÖMBERG, A. H. MONTAGUD, H. TINNERBERG, A. FORNI, P. HEIKKILÄ, S. WANDERS, P. WILHARDT, I. L. HANSTEEN, L. E. KNUDSEN, H. NORPPA, 2000, Chromosomal Aberrations in Lymphocytes Predict Human Cancer Independently of Exposure to Carcinogens. *Cancer Research.* 60:1619–1625.
- BOREK, C., 2004. Antioxidants and Radiation Therapy. *J. Nutr.* 134:3207–3209.
- BORS, W. , HELLER, W. MĠCHAEL C., 1990, Flavonoids as Antioxidants: Determination of Radical Scavenging Efficiencies, *Methods in Enzymology*, 186: 343-355
- BORS, W. , HELLER, W. MĠCHAEL C., 1990, Flavonoids as Antioxidants: Determination of Radical Scavenging Efficiencies, *Methods in Enzymology*, 186: 343-355
- BRAUN, J. , TEVINI M., 1993. Regulation of UV Protective Pigment Synthesis in Epidermal Layer of Rye Seedlings, *Photochem. Photobio.* , 57: 518-523
- CAI, Y., Q. LUO, M. SUN ve H. CORKE, 2004. Antioxidant Activity and Phenolic Compounds of 112 Traditional Cheese Medicinal Plants Associated with Anticancer, *Life Sciences*, 77(17): 2157-2184
- CASTILLO, J., O. BENAVENTE GARCIA, J. LORENTE, M. ALCARAZ,

- A.REDONDO, A. ORTUNO, J. A. DELRIO, 2000, Antioxidant activity and Radioprotective Effects Against Chromosomal Damage Induced in vivo by X-rays of Flavan-3-ols (Procyanidins) from Grape Seeds (*Vitis vinifera*): Comparative Study Versus Other Phenolic and Organic Compounds. *J. Agric. Food Chem.* 48:1738-1745.
- CLIFFORD, M.N., 1998. Understanding The Biological Effects of Dietary Complex Phenols and Tannins and Their Implications for The Consumers Health and Well Being, VTT Symposium (Valtion Teknillinen Tutkimuskeskus), 187: 47-49
- COGGLE, J.E. 1977. Biological Effects of Radiation. Wykeham Pubs. Ltd. London. p.29-100,
- COOPER, M.G., R. E. HAUSMANN. 2006. The Cell: A Molecular Approach. ASM Press, Washington. p. 80-85.
- COTELLE, S., J. F. FERARD, 1999. Comet Assay in Genetic Ecotoxicology: A Review. *Environmental and Molecular Mutagenesis.* 34:246-255.
- DEMİREL, S., A. G. ZAMANI, 2002. Mikronükleus tekniği ve kullanım alanları, *Genel Tıp Dergisi*, 12(3):123-127
- DEVİPRİYA N., A. R. SUDHEER, V. P. MENON , 2008 , Caffeic Acid Protects Human Peripheral Blood Lymphocytes Against  $\gamma$ -radiation Induced Cellular Damage , *J. Biochem. Molecular Toxicology.* 22(3):175-186
- Ekmekcioglu, C feyertag, j Marktl, W. Cinnamic acid inhibits proliferation and modulates brush border membrane enzyme activities in Caco-2 cells. *Cancer Lett.*, 1998, 128, 137-144.
- EL-NAHAS, S. M., F. E. MATTAR, A. A. MOHAMED, 1993. Radioprotective Effect of Vitamins C and E. *Mutat. Res. Letters.* 301(2):143-147.
- FENECH, M., 2000, The In Vitro Micronucleus Test. *Mutat. Res.* 455:81-95.
- FENECH, M., 2000, The In Vitro Micronucleus Test. *Mutat. Res.* 455:81-95.
- FRANK, J., 2004. Dietary Phenolic Compounds and Vitamin E Bioavailability- Model Studies in Human and Rats, Doctoral Thesis (unpublished), Swedish University of Agricultural Sciences, p.1-55
- FRIEDBERG, E. C., G. C. WALKER, W. SIEDE, 1995. DNA Repair and Mutagenesis. ASM Press, Washington. p.91-453.
- GORHAM, J. , 1995, The Biochemistry of Stilbenoids, Chapman & Hall Press, London, p.2-6
- HAGMAR, L., A. BROGGER, I. L. HANSTEEN, S. HEIM, B. HÖGSTEDT, L. E. KNUDSEN , B. LAMBERT, K. LINNAINMAA, F. MITELMAN, I. NORDERSON. REUTERWALL, S. SALOMAA, , S. SKERFVING, S. SORSA, 1994. Cancer Risk in Humans Predicted by Increased Levels of Chromosomal Aberrations in Lymphocytes: Nordic Study Group on the Health Risk of Chromosomal Damage. *Cancer Research*, 54:2919-2922.
- HALL, E. J., R. C. MILLER, 1977. The How and Why of In Vitro Oncogenic Transformation. *Radiat Res.* 87:208-224.
- HARBOURNE, J. B. , H. Baxter, G. P. Moss, 1999, *Phytochemical Dictionary: A Handbook of Bioactive Compounds from Plants*, Taylor & Francis Ltd. , Padstowe, 359p. 359-360
- HERTOG, M.G.L, P.W. SWEETNAM, A.M. FEHILLY, P.C ELWOOD, D.KROMHOUT, 1997. Antioxidant Flavonols and Ischemic Heart Disease in Welsh Population of Men. The Caerphilly Study. *Am. J. Clin. Nutr.*, 65: 1489-1494
- HOSSEINIMEHR, S. J., A. NEMATI, 2006. Radioprotective Effects of

- Hesperidin Against Gamma Irradiation in Mouse Bone Marrow Cells. *The British Journal of Radiology*, 79:415–418.
- JAGETIA, G. C., V. A. VENKATESHA, T. K. REDDY, 2003. Naringin, A Citrus Flavonone, Protects Against Radiation-Induced Chromosome Damage in Mouse Bone Marrow. *Mutagenesis*. 18(4): p.337–343.
- KAGERUD, A., H. I. PETERSON, 1981. Tocopherol in Irradiation of Experimental Neoplasms. Influence of Dose and Administration. *Acta Radiol Oncol*. 20:97-100,
- KAYA, T., 1997. Temel Radyoloji Tekniği. Güneş & Nobel Kitabevi, Bursa. s.118-137.
- KHANBABAEE K., T. VAN REE, 2001, Tannins: Classification and definition, *Nat.Prod. Rep.*, 18: 641-649
- KİREMİDJIAN-SCHUMACHER, L., M. ROY, 2001. Effect of Selenium on the immunocompetence of Patients With Head and Neck Cancer and on Adoptive Immunotherapy of Early and eEstablished Lesions. *Biofactors* 14:161-168.
- KUTLUK, T., A. KARS, 1992. Kanser Konusunda Genel Bilgiler. *Türk Kanser Araştırma ve Savaş Kurumu Yayınlan*. Ankara. s. 97.
- LATT, S.A. 1974. Sister Chromatid Exchanges, Indices of Human Chromosome Damage and Repair: Detection by Fluorescence and Induction by Mitomycin C. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 71:3162-3166
- LEWIS, N. G., E. YAMAMOTO, 1990, Lignin: Occurrence , biogenesis and degradation, *Ann. Rev. Plant Phy. Plant Mol. Bio.* 41: 455-496
- LITTLE, J. B., 2000, Radiation Carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 21(3):397-404.
- LIU, S. Z., 2003. Non-linear Dose Response Relationship in the Immune System Following Exposure to Ionizing Radiation: Mechanisms and Implications. *Non Linearity in Biology, Toxicology and Medicine*. 1:72-92.
- MARTELOCK, G., H. BAUER ve D. TREUTTER, 1994. Characterization of P. Avium L. Varieties with Phenolic Compounds. *Fruit Varieties Journal*, 48(2): 81-88
- MAURYA, D. K., S. ADHIKARI, C. K. K. NAIR, T. P. A. DEVASAGAYAM, 2007. DNA Protective Properties of Vanillin Against  $\gamma$ -Radiation Under Different Conditions: Possible Mechanisms. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 634(2):69-80,
- MOURE, A., M.J. CRUZ, D. FRANCO, J.M. DOMÍNGUEZ, J. SINEIRO, M.J. MURRAY, R.D.H., NUNEZ, J.C. PARAJO, 2001. Natural Antioxidants from Residual Sources, *Food Chemistry*, 72: 145-171
- NIAS, A. H.W., 1990, An Introduction to Radiobiology. John Wiley and Sons Ltd. Chichester, 400p.
- NOAMAN, E., ZAHARAN, A.M., KAMAN, A.M., OMRAN, M.F., 2002. Vitamin E and Selenium Administration as a Modulator of Antioxidant Defense System: Biochemical Assessment and Modification. *Biol. Trace Elem. Res.* 86:55-64.
- OLIVE, P. L., 1998. The Role of DNA Single and Double Strand Breaks in Cell Killing by Ionizing Radiation. *Radiation Research*. 150:42-51.
- ONARAN, L., 1997. RADYASYON. *Biyoetik Derneği 3. Tıbbi Etik Sempozyumu*. Ankara. 23-25
- OWEN, R.W., A. GIACOSA, W.E. HULL, R. HAUBNER, B. SPIGELHALDER ve H. BARTSCH, 2000, The Antioxidant/Anticancer Potential of Phenolic Compounds Isolated from Olive Oil, *European Journal of Cancer*, 36(10): 1235-1247

- ÖNEN, S., 1993. Radyasyon Biyofiziği İ.Ü. Tıp Fakültesi Basömevi, 112 s., İstanbul
- ÖZALPAN, A. 2001. Temel Radyobioloji. Haliç Üniversitesi Yayınları, İstanbul. 353s.
- PANDEY, B.N., K.P. MISHRA, 2003. Oxidative Membrane Damage and Its Involvement in Gamma Radiation- induced Apoptotic Cell Death. *Iran. J. Radiat. Res.*,1(1):17-22.
- POYRAZOĞLU, E., V. GÖKMEN ve N. ARTIK, 2002. Organic Acids and Phenolic Compounds in Pomagrates ( *Punica Granatum L.*) Grown in Turkey. *Journal of Food Composition and Analysis*, 15: 567-575.
- PRASAD, N. R., V. P. MENON, V. VASUDEV, K.V. PUGALENDI, 2005. Radioprotective Effect of Sesamol on  $\gamma$ -Radiation Induced DNA Damage, Lipid Peroxidation and Antioxidants Levels in Cultured Human Lymphocytes. *Toxicology* 209:225–235.
- PROSSER, J.S., J. E. MOQUET, D. C. LLOYD, A. A. EDWARDS, 1988. Radiation Induction of micronuclei in human lymphocytes. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 199(1):37-45
- RENE, D.T., V. YOLANDA, A. ZENO, 2001. Comparison of the Antioxidant Content of Fruits, Vegetables and Tea Measured as Vitamin C Equivalents, *Toxicology*, 166:63-69
- RİTHİDECH, K. N., M. TUNGJAI, E. B. WHORTON, 2005. Protective Effect of SATYAMITRA, M., P. U. DEVI, H. MURASE, V. T. KAGIYA, 2001. *In Vivo* Protection by Alpha-TMG: Preliminary Studies. *Mutat. Res.* 479:53-61.
- SCHULL, W. L., M. OTAKE, J. V. NEAL, 1981. Genetic Effects of the Atomic Bomb: A Reappraisal. *Science*. 213:1220-1227
- SEIFTER, E., J. MENDENCKI, S. HOLTZMAN, J. D. KANOFSKY, E. FREĞDENTHAL, L. DAVĞS, J. WEINZWEIG, 1988. Role of Vitamin A and Beta Carotene in Radiation Protection: Relation to Antioxidant Properties. *Pharmacol. Ther.* 39:357-/365.
- SHIMOİ, K., S. MASUDA, M. FUROGORĞ, S. ESAKĞ, N. KINAE, 1994. Radioprotective Effect of Antioxidative Flavonoids in Gamma-ray Irradiated Mice. *Carcinogenesis* 15: 2669-/2672.
- Shiraishi, T.; Owada, M.K.; Tatsuka, M.; Yamashita, T.; Watanabe, K.; Kakunaga, T. Specific inhibitors of tyrosine-specific protein kinases: proper-ties of 4-hydroxycinnamide derivatives in vitro . *Cancer Res.* , 1989 ,49 ,2374-2378
- SINGH, N.P., M. T. McCOY, R. R. TICE, E. L. SCHNEIDER, 1988. A Simple Technique for Quantitation for Low Levels of DNA Damage in Individual Cell. *Experimental Cell Research*, 175:184-191.
- SPIGOTI, G., S. TSUTSUMI, P. BARTOLINI, K OKAZAKI, 2009. Protective Effect of Propolis on Radiation Induced Chromosomal Damage on Chinese Hamster Ovary Cells (CHO-K1). *International Nuclear Atlantic Conference*. Rio de Janeiro. 27 Ekim-2 Kasım, p.1-10 .
- SRINIVASAN, M. N. R. PRASAD, V. P. MENON, 2006. Protective effect of curcumin on  $\gamma$ -radiation induced DNA damage and lipid peroxidation in cultured human lymphocytes. *Mutation Research*. 611:96–103.
- SRINIVASAN, V., A. J. JACOBS, S. A. SIMPSON, J. F. WEISS, 1983. Radioprotection by Vitamin E: Effects on Hepatic Enzymes, Delayed Type Hypersensitivity and Postirradiation Survival of Mice. “in, *Modulation and*

- Mediation of Cancer by Vitamins, Eds F. L. Myekens and N. L. Prasad. Karger, Basel. p.119-131.
- TICE, R. R., E. AGURREL, D. ANDERSON, B. BURLINSON, A. HARTMANN, H.KOBAYASHI, Y. MIYAMAE, E. ROJAS, J. C. RYU, Y. F. SASAKI, 2000, SingleCell Gel/Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. Environmental and Molecular Mutagenesis. 35:206-221.
- TICE, R. R., E. AGURREL, D. ANDERSON, B. BURLINSON, A. HARTMANN, H.KOBAYASHI, Y. MIYAMAE, E. ROJAS, J. C. RYU, Y. F. SASAKI, 2000, SingleCell Gel/Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. Environmental and Molecular Mutagenesis. 35:206-221
- TUBIANA, M., J. DUTREIX, A. WAMBERSGÉ, 1990, An Introduction to Radiobiology. Taylor & Francis Ltd, London. 270 p.
- ULUBELDE, M., 1984. Citrus ve Prunus Cinsindeki Bazı Meyve Türlerinin Yaprak Fenolik Bileşik Yardımıyla Tamamlamaları Üzerine Araştırmalar. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Bornova İzmir, 100
- UPADHYAY, S. N., B. S. DWARAKANATH, T. RAVINDRANATH, T. L.MATHEW, 2005. Chemical Radioprotectors. Defence Science Journal. 55(4):403-425.
- WARD, J. F., 1988. DNA Damage Produced by Ionizing Radiation in Mammalian Cells: Identities, Mechanisms of Formations and Reparability. “ in, Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology, Vol 35, Eds W. E. Cohn and K. Moldave”, Academic Press, California. p. 103-121.
- WEISS, J. F., M. R. LANDAUER, 2000, Protection by Antioxidants. Ann New York Acad. Sci. 899:44-60,
- WHANGER, P.D., 2002. Selenocompounds in Plants and Animals and Their Biological Significance. J. Am. Coll. Nutr. 21: 223-232.

**TEŞEKKÜR**

Bana bu konuda çalışma olanağı veren ve tezimin her aşamasında yardımına başvurduğum danışmanım Doç. Dr. Nilüfer ÇİNKİLİÇ'a, deney ve yazım aşamasında tezle ilgili birçok konuda yardımına başvurduğum, deneylerimde emeği geçen ve deneyiminden faydalandığım Prof. Dr. Rahmi BİLALOĞLU, Doç. Dr. Tolga ÇAVAŞ, Araş. Gör. Özgür VATAN, Araş. Gör. Dilek YILMAZ, Özgün TEKSOY'a; çalışmalarında radyasyon kaynaklarını kullandığım U.Ü. Tıp Fakültesi Radyasyon Onkolojisi ABD Öğretim Üyeleri ve çalışanlarına, beni destekleyen aileme teşekkürlerimi sunarım.



**ÖZGEÇMİŞ**

Adı Soyadı : Ece TÜZÜN

Doğum Yeri ve Tarihi : Kırklareli 11.01.1987

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Atatürk Lisesi(Y.D.A.)

Lisans : U. Ü. Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans : U. Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl : Trakya Yem ve Yağ Sanayi Ticaret A.Ş (2012- )

İletişim (e-posta) : ecetuzun@hotmail.com