

**T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİMDALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

Tez Yöneticisi
Doç. Dr. Oğuzhan DOĞANLAR

**QUERCETİN'İN FARKLI SÜRELERDE
UYGULANMASININ OLASI RADYOPROTEKTİF
ETKİSİNE KATKISININ IN VIVO (RATLARDA)
ŞARTLARDA MİKRONUKLEUS YÖNTEMİYLE
İNCELENMESİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

Ayten DOĞAN

Referans no: 10035152

EDİRNE-2014

**T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİMDALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

Tez Yöneticisi
Doç. Dr. Oğuzhan DOĞANLAR

**QUERCETİN'İN FARKLI SÜRELERDE
UYGULANMASININ OLASI RADYOPROTEKTİF
ETKİSİNE KATKISININ IN VIVO (RATLARDA)
ŞARTLARDA MİKRONUKLEUS YÖNTEMİYLE
İNCELENMESİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

Ayten DOĞAN

Destekleyen Kurum: TÜBAP-2011/111

EDİRNE-2014

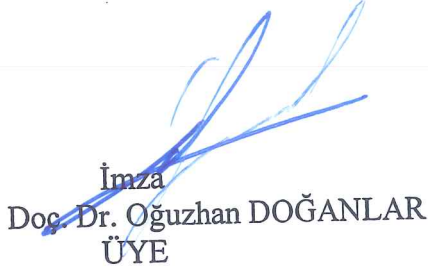
T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğü

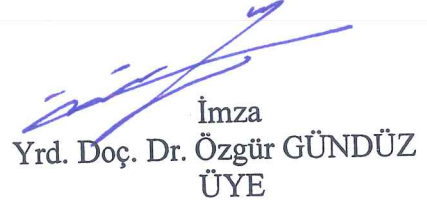
ONAY

Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı yüksek lisans programı çerçevesinde ve Doç. Dr. Oğuzhan DOĞANLAR'ın danışmanlığında yüksek lisans öğrencisi Ayten DOĞAN tarafından tez başlığı "Quercetin'nin Farklı Sürelerde Uygulamasının Olası Radyoprotektif Etkisine Katkısının In Vivo (Ratlarda) Şartlarda Mikronukleus Yöntemiyle İncelenmesi" olarak teslim edilen bu tezin tez savunma sınavı 18/04/2014 tarihinde yapılarak aşağıdaki jüri üyeleri tarafından "Yüksek Lisans Tezi" olarak kabul edilmiştir.


İmza

Doç. Dr. Tammam SİPAHI
JÜRİ BAŞKANI


İmza
Doç. Dr. Oğuzhan DOĞANLAR
ÜYE


İmza
Yrd. Doç. Dr. Özgür GÜNDÜZ
ÜYE

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Doç. Dr. Tammam SİPAHI
Enstitü Müdürü

TEŐEKKÖRLER

Çalıőmamın her aşamasında bana verdikleri destekten ve gösterdikleri sabırdan dolayı başta danışman hocam T.Ü Tıp Fakóltesi Tıbbi Biyoloji A.D. Başkanı Doç. Dr. Oğuzhan DOĞANLAR'a, Doç. Dr. Zeynep B. DOĞANLAR'a, Radyasyon Onkolojisi A.D. Prof. Dr. Cem UZAL'a ve Uzm. Fizikçi Őule PARLAR ile Radyasyon Onkolojisi çalıőanlarına, Biyoistatistik ve Tıbbi Biliőim A.D Başkanı Prof. Dr. Necdet SÖT'e, Tıbbi Biyoloji A.D. emekli öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Funda Sibel PALA'ya, Araő. Gör. Dr. Kıymet TABAKÇIOĐLU'na, projemizi destekleyen TÜBAP Baőkanlıđı'na ve beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan aileme en içten teőekkürlerimi sunarım.

Ayten DOĞAN

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	3
KANSER	3
KANSER GELİŞİMİNE NEDEN OLAN AJANLAR	8
RADYOTERAPİ	11
MİKRONUKLEUS	12
FLAVONOİDLER	16
QUERCETİN	19
GEREÇ VE YÖNTEMLER	22
BULGULAR	28
TARTIŞMA	51
SONUÇLAR	57
ÖZET	59
SUMMARY	61
KAYNAKLAR	63
ŞEKİLLER VE TABLOLAR LİSTESİ	74
ÖZGEÇMİŞ	78
EKLER	

SİMGE VE KISALTMALAR

C	: Karbon
CAT	: Katalaz
Cdk	: Cyclin-dependent kinase
Co⁶⁰	: Cobalt-60
Cu²⁺	: Bakır
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
Fe²⁺	: Demir
GSH	: Glutasyon
GSHP_x	: Glutasyon Peroksidaz
Gy	: Gray
H	: Hidrojen
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
MN	: Mikronukleus
MNPCE	: Mikronukleus taşıyan polikromatik eritrosit
NCE	: Normokromatik Eritrosit
-OH	: Hidroksil
PCE	: Polikromatik Eritrosit
ROS	: Reaktif oksijen türleri
rpm	: Revolutions per minute (dakika/devir sayısı)
SOD	: Süperoksit Dismutaz
SSD	: Kaynak deri (yüzey) mesafesi

GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser çağımızın en yaygın hastalığıdır. Günümüzde değişen yaşam koşulları, beraberinde gelen hastalıklar ve stres nedeniyle kanser olguları her geçen gün artmaktadır. Kanser, hücre döngüsünü düzenleyen mekanizmalardaki bozukluklar sonucu ortaya çıkan hücrenin kontrolsüz bir şekilde çoğalmasdır. Kanser olgularının artışı nedeniyle bilim insanları kanser çalışmaları üzerine yoğunlaşmıştır.

Günümüzde radyasyondan farklı amaçlarla yararlanılmaktadır. Birçok yan etkisi olan radyasyon aynı zamanda insan sağlığı yararına da kullanılmaktadır. Radyasyon iyonlaştırıcı ve iyonlaştırıcı olmayan radyasyon olmak üzere ikiye ayrılır. Yüksek enerjili elektromanyetik radyasyonlardan X-ışınları, gama ışınları ve kozmik ışınlar ile elektron, proton, α partikülü gibi hızlandırılmış atomaltı parçacıklar iyonize radyasyonu oluştururlar. X-ışınları ve radyoaktivitenin keşfedilmesiyle birlikte radyasyonun tıp, endüstri ve tarım gibi alanlarda kullanımı ortaya çıkmıştır. Kanser tedavisinde çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Olguların yaklaşık yarısına tedavinin herhangi bir döneminde tek başına veya kemoterapi/cerrahi gibi diğer yöntemlerle birlikte radyoterapi uygulanmaktadır. Radyoterapide kanserli hücrelerin ortadan kaldırılmasında bu olası değilse tümörün küçültülmesinde iyonlaştırıcı radyasyonlar kullanılır. Radyoterapide temel hedef tümör çevresindeki normal dokuları yapısal ve fonksiyonel olarak tahribata uğratmadan tümörün tamamen yok edilmesidir.

Radyoterapide kullanılan dozlardaki radyasyonun hücre çoğalmasını durdurucu etkisi DNA üzerinde görülür. Tedavi uygulanırken sağlıklı hücrelerin de hasara uğraması radyoterapinin dezavantajlarından biridir. Radyasyon uygulaması sırasında hücre dışı ve içindeki sıvı ortamında bulunan bazı kimyasal maddelerin varlığı radyasyonun DNA üzerinde

direkt veya dolaylı yoldan yarattığı etkiyi değiştirebilir. Bu değişim, etkinin artması şeklinde olabileceği gibi etkinin planlanandan daha az oluşmasına da neden olabilir.

Kanserli olgularda tedavinin yan etkilerini azaltmak için bazı flavonoidlerin kullanıldığı bilinmektedir. Antioksidan özelliğe sahip bir bitki pigmenti olan Quercetin (QN) de bu flavonoidlerden biridir. Quercetin (3,3',4',5,7- pentahidroksiflavon) sık tüketilen elma, soğan, çay, kiraz ve çilek gibi yumuşak kabuklu meyveler, lahana, brokoli gibi yeşil yapraklı sebzelerde bulunmaktadır. Ayrıca Quercetin'in radyoprotektif etkisinin olduğu da bilinmektedir. Bu özelliğinden dolayı Quercetin'in radyoterapi sırasında oluşan iyonizasyonu etkilemesi ve bunun sonucunda da tedaviye cevabı değiştirmesinin mümkün olabileceği düşünülmektedir.

Bu nedenle bu çalışmada, Polikromatik Eritrosit (PCE) hücrelerinde Quercetin'in radyoprotektif etkisi, deoksiribonükleik asit (DNA) hasarının biyomonitörü olan mikronukleus (MN) testi ile araştırılmıştır.

Mikronukleus testi, kromozom ya da DNA seviyesindeki hasarları ortaya çıkarmak için oldukça sık kullanılan bir metottur. Bu metot ile bölünen hücrelerde kromozom parçalarının ya da tüm kromozomların oluşturduğu MN'lerin sıklığı ölçülebilir. Radyasyonun biyolojik etkisini değerlendirmekte uzun yıllardır kullanılan MN'ler hem fiziksel hem de kimyasal ajanların genotoksik etkilerini birlikte değerlendirmeye olanak sağlarlar. Bu çalışmada Quercetin'in olası radyoprotektif etkisinin yanı sıra varsa kromozomal aberasyon oluşturma etkisinin birlikte değerlendirilmesi de amaçlandı.

GENEL BİLGİLER

KANSER

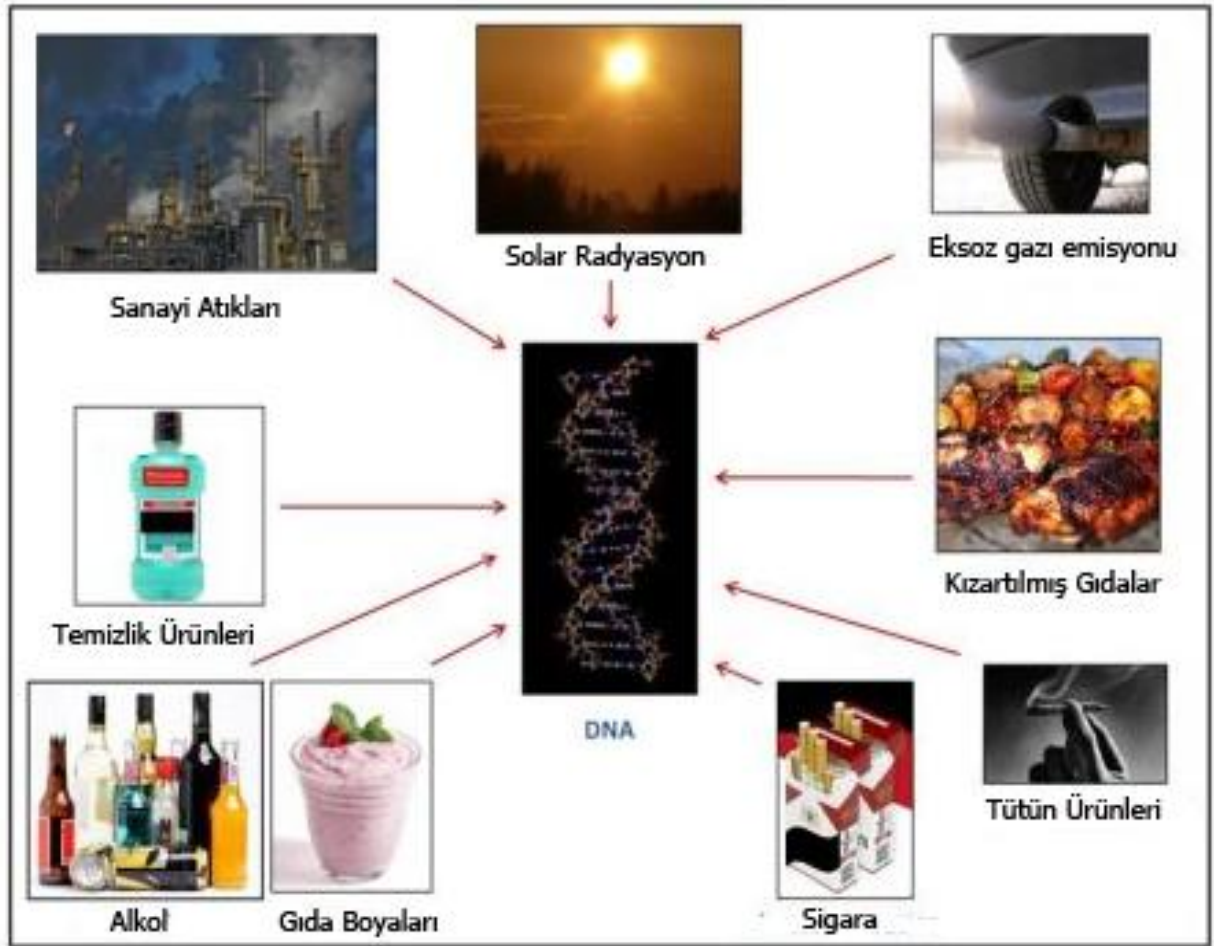
Sanayileşme, hızlı nüfus artışı ve kırsal alanlardan kentlere plansız göç sebebiyle tarım alanları yok olmakta, nüfus orantısız olarak belli bölgelerde yoğunlaşmakta ve antropojenik etkiler ile doğaya verdiğimiz hasar her geçen gün artmaktadır. Bunların sonucu olarak artan insan popülasyonunun ihtiyaçlarının karşılanması amacıyla, kısıtlı tarım arazilerinden daha fazla ürün alınması ihtiyacı doğmakta, bunun sonucu olarak pestisit ve suni gübre kullanımı artmaktadır. Ayrıca modern moleküler tekniklerin gelişimi ile insanların beslenme taleplerini karşılamak için doğanın dengesine doğrudan müdahale edilmekte ve bitkisel ürünlerin genlerinde oluşturulan değişimler ile daha fazla ürün alınabilecek çeşitler geliştirilmektedir. Genetiği değiştirilmiş organizmalar (GDO) olarak bilinen bu türler her geçen gün artmakta, şu an için tekstil sanayinden, bebek mamalarına, gıda sektöründen, biyoyakıtlara kadar her alanda karşımıza çıkmaktadır (1).

Plansız kentleşme sadece nüfus hareketi değildir. Beraberinde ekonomik, sosyal birçok değişimi de beraberinde getirir. Kentlerde yaşayan insanların ihtiyaçlarının karşılanması ayrıca ekonomik olanaklarının sağlanması hızlı bir sanayileşmeye yol açar. Artan nüfus baskısı nedeniyle oluşan plansız sanayileşme sonucu bu bölgelerde ekolojik denge, uçucu organik bileşikler, diğer organik maddeler, endüstriyel atıklar, petrol ve türevleri, pestisitler, deterjanlar, yapay tarımsal gübreler, radyoaktivite, ağır metaller gibi kirletici maddeler nedeniyle bozulmaktadır (2). Sanayi faaliyetleri sonucu ortaya konulan ürünler baca gazları, endüstriyel atıklar ile bu maddeler sürekli olarak doğaya salınmakta, üretilen ürünler ile doğrudan son tüketici olan insanlara ulaşmaktadır. Gerek solunum,

gerekse dokular ile temas sonucu alınan bu maddeler canlı organizmada birikerek yaşamı tehdit edici bir hal almaktadır (2).

Endüstrileşme besin üretiminin ve işlenmesinin artışı beraberinde getirmiştir. Çalışan nüfus artmış ve beslenme alışkanlıklarını değiştirmiştir. Hazır gıdalarla beslenme artışı gıdalarda katkı maddelerinin kullanımının artmasına neden olmuştur (3). Doğal ürünlerin daha az tüketilmesi nedeniyle organizmanın metabolik gereksinimleri için gerekli maddelerin alımı azalmıştır. Bununla birlikte birçok hastalık gelişmeye başlamıştır.

Var olan çevresel kirleticilerin etkileri, alkol ve tütün ürünlerinin kullanımı, ilaç dolgu maddeleri, ekolojik dengenin bozulması sonucu mutajenik mikroorganizmaların oluşturduğu enfeksiyonlar, hazır gıdalar ile beslenme alışkanlıkları ve günümüzün en büyük sorunlarından biri olan stres sebebiyle kanser olguları hızla artmıştır (Şekil 1).

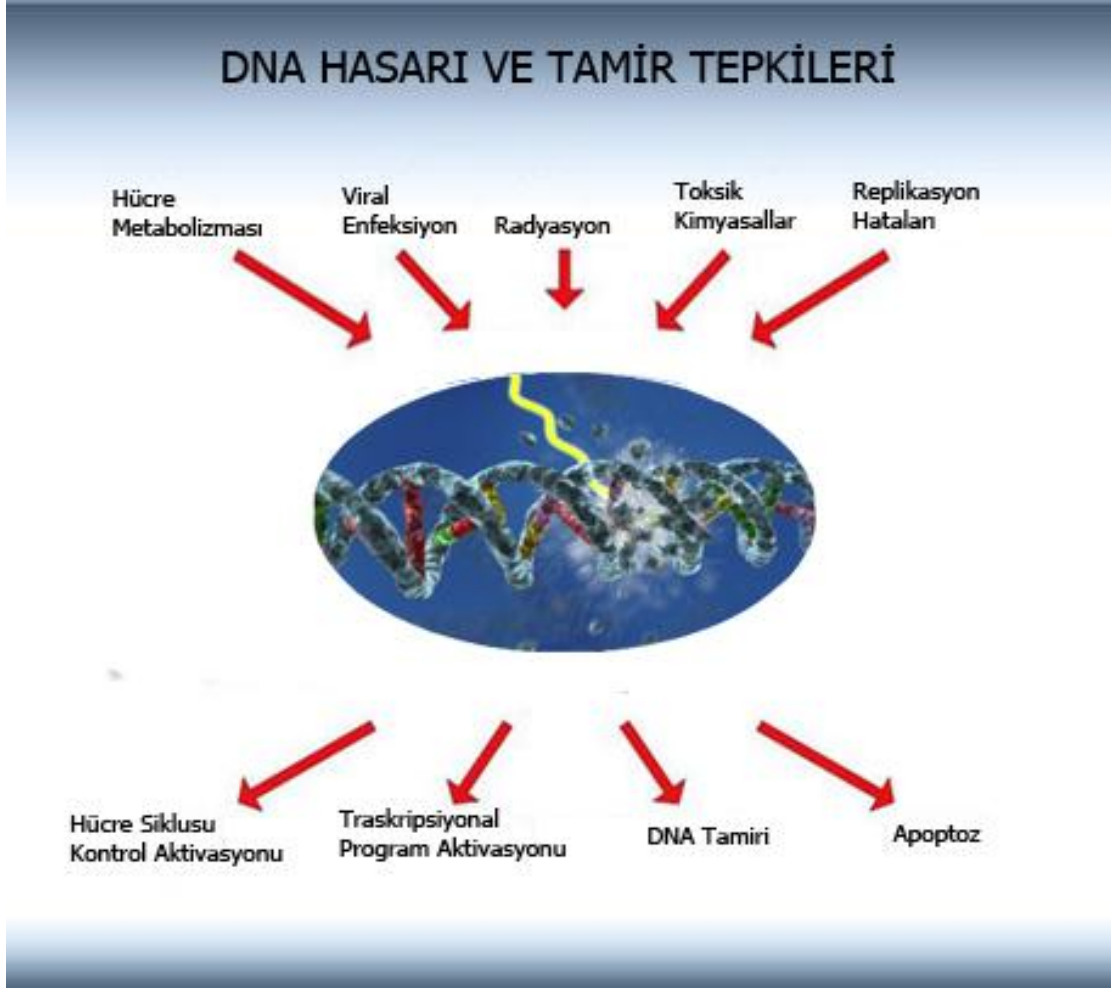


Şekil 1. DNA hasarına yol açan ekolojik kirlilik kaynakları

İnsan vücudundaki hücreler çeşitli mekanizmaların kontrolü altında ihtiyaca göre bölünür ve farklılaşırlar (4). Kontrol dışında çoğalma veya farklılaşmaya yönelik hücreler programlı hücre ölümü yani apoptoz ile yok edilerek dengelenirler (5). Hücre döngüsünü düzenleyen bu mekanizmalardaki bozukluklar sonucu hücre kontrolsüz bir şekilde çoğalmaya başlar (4). Normal büyüme oranı ölen hücre oranını aştığında ve kontrolsüz bir şekilde çoğalmaya başladığında denge bozulur ve kanser oluşumu gözlenir (6). Hücre büyümesi, farklılaşması ve çoğalmasında rolü olan proto-onkogenlerde meydana gelen mutasyonlar tümör gelişimine, tümör baskılayıcı genlerde meydana gelen mutasyonlar ise hücre siklusunun inhibisyonunu engelleyerek, hücre büyümesine neden olur. Homeostasis; hücre çoğalması, büyümenin durdurulması ve apoptoz ile sürdürülmektedir (6,7). Hücrelerin aşırı çoğalması, apoptozisin baskılanması ya da her ikisinin de gözlemlenmesiyle atipik hücrelerde aşırı bir artış meydana gelir ve kanser dokusu çevre dokularla etkileşmeye başlayıp normal fizyolojik akışı bozar (5).

Kanser gelişimi (karsinogenez) biyolojik, kimyasal ve fiziksel ajanların neden olduğu DNA hasarları sonucunda ortaya çıkan genetik değişimlerden kaynaklanan mutasyonları içerir. Çok aşamalı bir süreç sonunda çoğalma, canlı kalma, invazyon ve metastaz yetenekleri artan hücrelerin seçilmesi ortaya çıkar (5-7).

Karsinogenezde DNA üzerindeki hasar kadar hücrenin moleküler bileşenlerinin de bu hasara verdikleri cevap da önemlidir. DNA hasara uğradığı zaman verilecek ilk yanıt tamir mekanizmasını aktif hale getirmektir. Endojen ve eksojen sayısız farklı etkenler nedeniyle genomik DNA'da hasar meydana gelebilmektedir. Eksojen kaynaklar; fiziksel ve kimyasal olabilmektedir. Fiziksel ajanlar (ultraviyole radyasyon, iyonlaştırıcı radyasyonlar v.b) ve kimyasal ajanlar (alkilleyici ajanlar, kemoterapi ilaçları v.b) farklı DNA hasarlarına neden olmaktadır. Tek ve çift zincir kırıkları, delesyonlar ve insersiyon ve DNA-protein çapraz bağ oluşturması DNA hasarlarına örnek olarak verilebilir (8). Endojen kaynaklardan; DNA'da meydana gelen spontan değişimler, hücresel metabolizmanın yan ürünü olan serbest radikallerin neden olduğu oksidatif hasar, kimyasal değişiklikler ve baz kayıpları nedeniyle de DNA hasarı meydana gelmektedir (8,9) (Şekil 2).



Şekil 2. Canlı dokularında DNA hasarına yol açabilen etmenler ve hücrenin DNA hasarına verdiği yanıtlar

Hücreler genetik materyallerinin bu hasarlardan korumak amacıyla DNA onarım mekanizması geliştirmişlerdir. Meydana gelen farklı DNA hasarları farklı onarım yolları ile tamir edilmektedir.

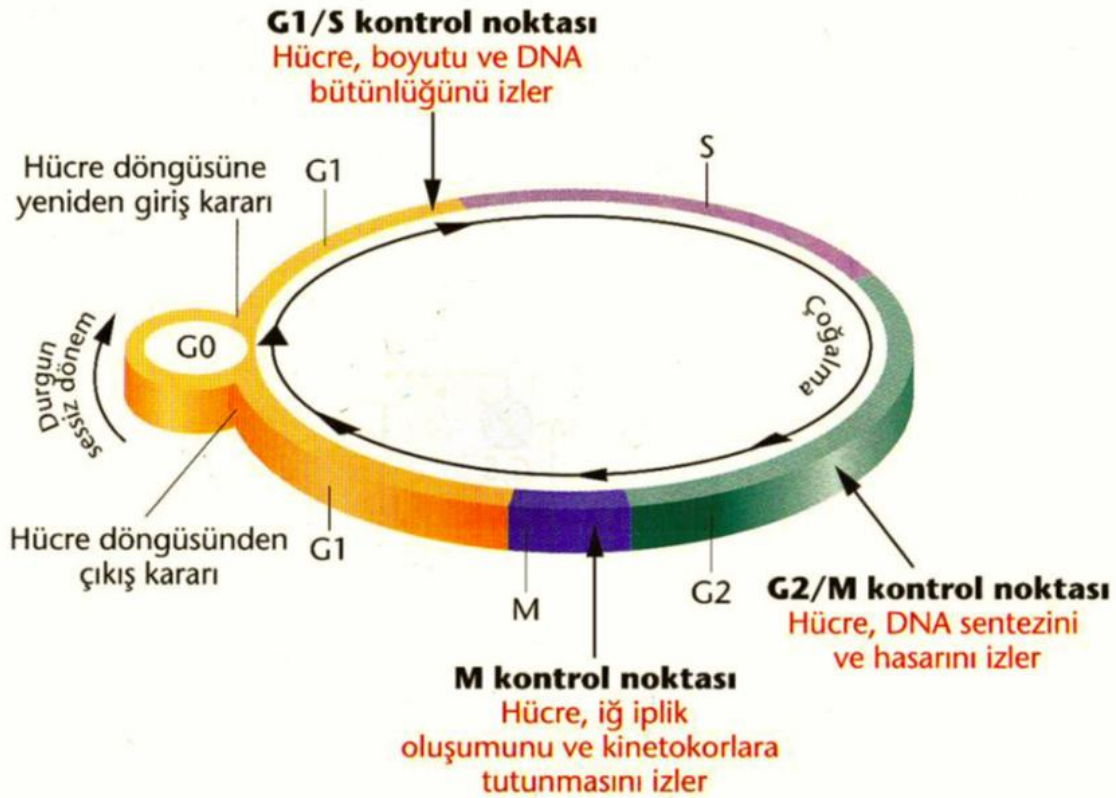
Hücrede DNA hasarı oluştuğunda dört önemli yanıt oluşur;

1. DNA hasarı kontrol noktalarının aktivasyonu ile hücre döngüsünün ilerlemesinin engellenmesi, bu şekilde hasarlı genetik materyalin onarımına imkân sağlanması ve hasarlı kromozomların genetik geçişinin önlenmesi,
2. Hücredeki gen transkripsiyon düzeylerinin hücrenin yararına olacak şekilde değişmesi (transkripsiyonel cevap)
3. Hasarlı DNA'nın çıkarılarak DNA çift zincirinin doğru bir şekilde yeniden yapılandırılması (DNA onarımı)
4. Ciddi olarak hasar görmüş hücrelerin elenmesi (programlı hücre ölümü, apoptoz)

Hücre döngüsü (siklus) hücrenin genetik materyalinin iki katına çıkması ve ikiye bölünerek çoğalmasıyla sonuçlanan bir süreçtir (10,11). Ökaryot canlılarda somatik hücreler (sinir hücreleri ve eritrositler hariç) mitoz bölünme ile çoğalırlar. Hücre döngüsü 4 evrede gerçekleşir. Bu evreler G1, S, G2 ve M fazıdır. G1, S, G2 fazları interfaz evresini, M fazı ise mitoz bölünmeyi ifade eder. İnterfaz evresi mitoz bölünmeye geçmeden önceki hazırlık evresidir.

DNA'nın dölden dölle hasarsız devam edebilmesi için hücreler DNA'da meydana gelebilecek hatalara karşı yanıt vermek için ek mekanizmalar oluşturmuştur. Bu mekanizmalar DNA kendini onarana kadar hücre döngüsünün ilerlemesini geciktirir (7,12).

Bu döngünün sağlıklı işleyişi, döngüde bulunan kontrol noktaları ile gerçekleşir. Hücre döngüsünde DNA hasarı kontrol noktaları kanser gelişiminin engellenmesi için bariyer görevi yapmaktadır. Bu kontrol noktaları hücre döngüsünde 3 ayrı noktada bulunmaktadır. Bunlar; G1 Kontrol Noktası, G2 Kontrol Noktası ve M Kontrol Noktasıdır. Hücre döngüsünde bulunan kontrol noktaları Şekil 3 de verilmiştir (7).



Şekil 3. Hücre döngüsü kontrol noktaları (10)

Hücre döngüsündeki kontrol noktalarındaki inhibisyon ya da inaktivasyon; hücrenin büyümesinin durması, hücre yaşlanma veya apoptoz ile sonuçlanabilir (12).

Hücre döngüsünde yer alan protoonkogenler, onkogenler ve tümör baskılayıcı genler bu süreçleri kontrol eden genlerdir. Tümör baskılayıcı genler kanser gelişimini baskılar. Normal hücrelerde DNA hasara uğradığında p53 geni hücre döngüsünü G1'de inhibe eder ve hücreye tamir edilmesi için zaman kazandırır. Hücre hasarı tamir edilemezse hücre apoptoza gider (5-7).

Kanserlerde farklı genlerde delesyonlar ve nokta mutasyonları vardır. İnsan kanserlerinde en sık görülen mutant gen p53'tür. Tümör baskılayıcı genlerden olan p53 geni işlevini kaybettiği zaman hücre büyümesi kontrol edilemez ve DNA tamir edilmeden hücre döngüsü kontrolsüz devam eder. İyonlaştırıcı radyasyon gibi etkenlere maruz kalan hücrelerde hücre döngüsünde hatalar olmaktadır. Mesela gama radyasyonuna maruz kalan hücrelerde p53 geni yetersiz kalır. Bu hücreler G1'de durmaz ve S (sentez) fazında hasarlı DNA'yı duplike ederek gen mutasyonuna, hatalı kromozom dizilimine neden olur (7). Bu mutasyonlar sonucunda tümör baskılayıcı özelliklerinde kayıp olurken diğer taraftan onkojenik özellikleri ortaya çıkabilir.

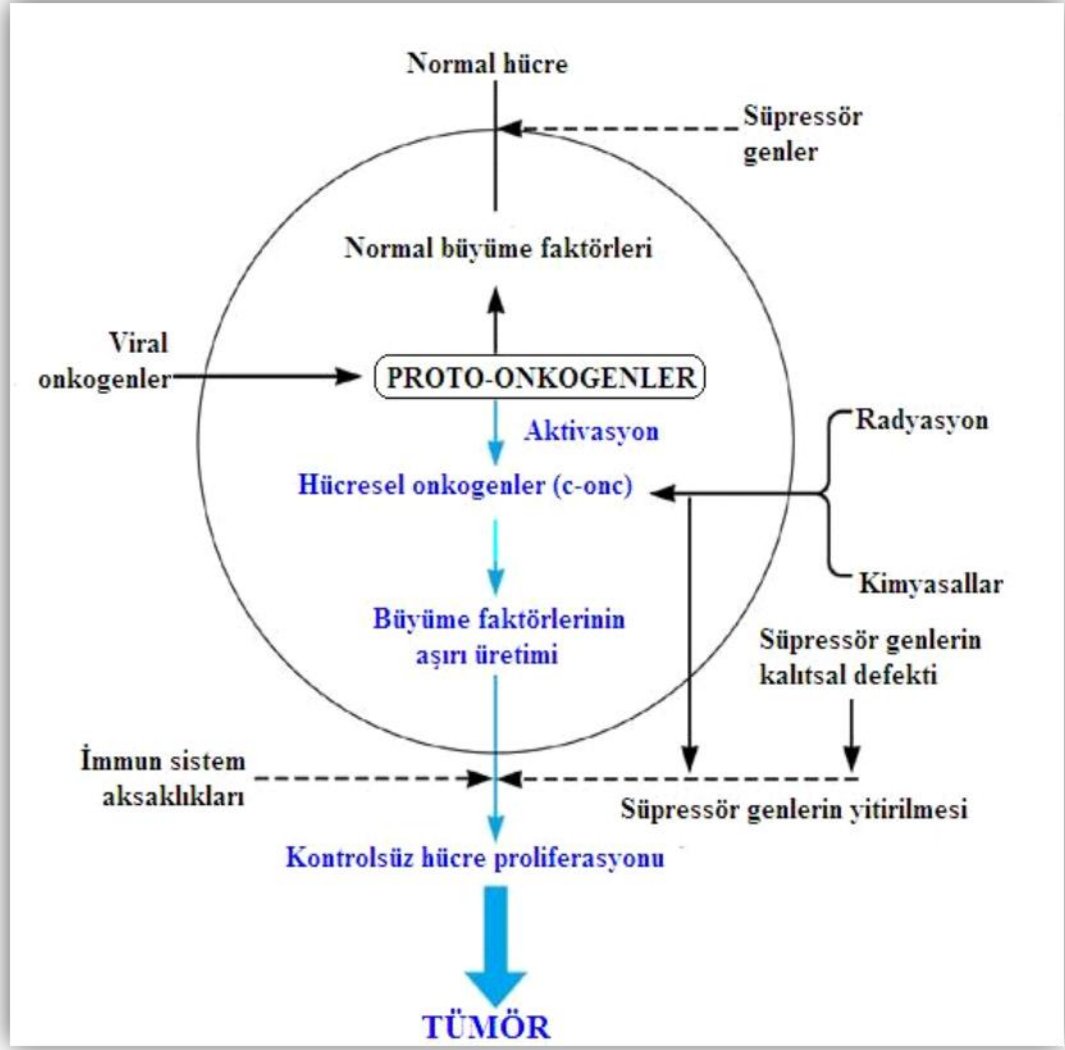
Bu yanıtlardan herhangi birinin işlev görmemesi hücre düzeyinde genomik kararsızlıkla, organizma düzeyinde ise genetik hastalıklar, kanser veya yaşlanma ile sonuçlanır (5-8). Apoptoz, normal hücre ölümünün yanı sıra mutant hücre çoğalmasını önleyen önemli bir yoldur. Çevresel faktörlerle meydana gelen DNA hasarı hücre döngüsü kontrol mekanizmalarının bozulmasına neden olur. Pek çok kanser tipinde hücre döngüsü kontrol noktalarında mutasyonlar belirlenmiştir. Büyümenin durdurulması, DNA onarımı ve apoptozisin engellenmesi kanser gelişiminde önemli yolaklardır (7).

KANSER GELİŞİMİNE NEDEN OLAN AJANLAR

Kanser gelişimine biyolojik (virüsler, GDO'lu besinler), kimyasal (sigara, pestisitler, ağır metaller, alkilleyici ajanlar) ve fiziksel (iyonlaştırıcı radyasyon ve ultraviyole ışınlar) faktörler neden olabilmektedir. Genel olarak onkogenler olarak bilinen faktörlerin, kanser oluşumuna sebep oldukları yolaklar Şekil 4'de verilmiştir.

Biyolojik Faktörler

Virüsler doğrudan genetik materyal üzerinde yaptıkları etkiler ile bilinirler. RNA virüslerinden insan T hücresi lösemi virüsü (Tip I, Tip II) ve HIV virüsü, DNA virüslerinden; Papilloma virüs ve Hepatit B virüsünün insan kanserlerine neden olan faktörlerden olduğu bilinmektedir (12).



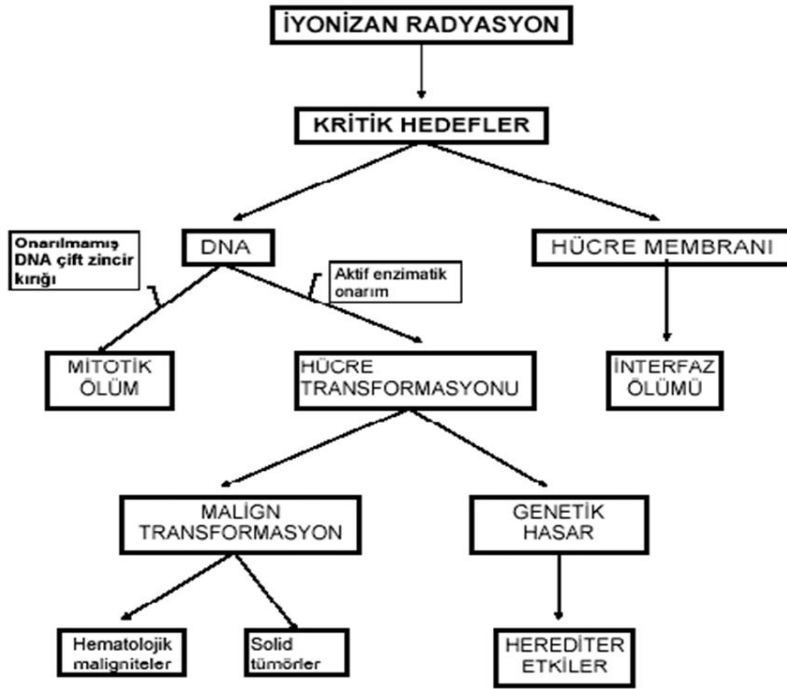
Şekil 4. Kanserojen ajanlar ve kanser yolları

Kimyasal Faktörler

İnsanlar yaşamları süresince çok sayıda kimyasal karsinojen ve mutajene maruz kalmaktadır. Bu ajanlar nedeniyle DNA’da bazı hasarlar meydana gelebilmektedir. Maruziyet sonucunda yanlış baz eşleşmeleri, baz artışı ve eksilmesi yada baz-şeker bağlarının ve bazlar arasında yer alan hidrojen bağlarının kopmasıyla mutasyonlar meydana gelmektedir. Bu ajanlar içerisinde sigara dumanı ve alkilleyici ajanlar başta gelmektedir. Alkilleyici ajanlar tümör hücrelerde ve normal bölünen hücrelerde nükleik asitlere kovalent bağlarla bağlanarak antimitotik etkilerini gösterirler. Alkillenme, DNA bazlarına değişik pozisyonlarda metil veya etil gruplarının bağlanmasıdır. (12) Alkil grubu DNA’nın yapısına girerek sitotoksik, mutajenik ve karsinojenik etkilere yol açar. Bu ajanlar DNA’nın zincirleri ile reaksiyona girerek zincir kırıklarına yol açabilir ve DNA’da çapraz bağlanmaya sebep olabilir (13,14).

Fiziksel Faktörler

İyonlaştırıcı radyasyon DNA’da direkt ya da dolaylı olarak 2 farklı şekilde hasar oluşturabilir. Direkt etkide yüksek enerjili elektronlar DNA’nın fosfodiester bağlarını koparırlar, DNA molekülünün yapısını oluşturan pürin ya da primidin bazlarının arasında bulunan hidrojen bağlarını kırarlar ve yapısal değişikliğe neden olurlar. Dolaylı etki de ise iyonlaştırıcı radyasyon başta su molekülü (H₂O) olmak üzere hücre içi moleküllerle etkileşir ve oksijen radikalleri (·O₂⁻ ve ·OH) meydana getirir (10). Kararsız yapıya sahip olan serbest radikaller DNA molekülündeki kimyasal bağları kırarak kararlı yapıya geçmeye çalışırlar. Her iki yoldan etkileşme DNA’da tek ve çift zincir kırıklarına, tamir genlerinde ya da enzimlerinde hasar oluşmasına, onkogen ve tümör baskılayıcı genlerde mutasyonlara ve sonuç olarak kanser oluşumlarına yol açabildiği gibi DNA hasarının daha yüksek olduğu durumlarda hücre ve organizmanın ölümüne yol açabilir (14). İyonlaştırıcı radyasyonun hücrede etkisi Şekil 5’de verilmiştir.



Şekil 5. İyonizan radyasyonun hücrede etkisi (11)

Kanserojen ajanların tetikledikleri yollardaki tamir ve kontrol mekanizmalarının aktivitesinin azalması, ya da doğrudan oluşan bir işlev kaybı sonucu bir kanser hücresi meydana gelebilir. Bölünerek hızla çoğalan kanser hücreleri vücudun herhangi bir bölgesinde bir kitle (tümör) oluşturur. Tümördeki bu kanser hücreleri buldukları bölgeden ayrılıp

vücudun diğer bölgelerine kan ya da lenf dolaşımı aracılığı ile dağılabilir ve bu dağılan hücreler buldukları yerlerde yeni koloniler oluşturabilirler. Buna metastaz denir. Kanseler oluşmaya başladıkları organ ve hücresele görünüşlerine göre sınıflandırılırlar. Kanseler türüne göre farklı hızlarda büyürler ve birbirlerinden farklı yayılma biçimleri gösterirler. Buna bağılı olarak tedaviye verdikleri cevaplarda farklıdır. Bu nedenle kanser hastalarının tedavisinde, var olan kanser türüne göre farklı tedaviler uygulanır.

Kanser tedavisinde çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Yaygın olarak kullanılan yöntemler cerrahi, kemoterapi ve radyoterapidir. Daha az sıklıkla hormon tedavileri, biyolojik tedavi yöntemleri ve hedefe yönelik tedaviler kullanılmaktadır. Tedavi yöntemleri hastalığın türüne, yerleşimine ve evresine göre tek başına veya birlikte uygulanabilir (15).

RADYOTERAPİ

Radyasyon tedavisi (radyoterapi) 1895 yılında Wilhelm Conrad Röntgen'in X ışını keşfetmesi ve 1898 yılında Curie'lerin radyoaktiviteyi keşfetmesi sonrasında uygulanmaya başlanmıştır (16). Radyoterapide yüksek enerjili elektromanyetik radyasyonların (x ve gama ışını) veya elektron gibi hızlandırılmış parçacıkların hücrede DNA üzerinde yarattığı iyonlaştırıcı etki kullanılarak tedavi uygulanır. Kanserli hücrelerin ortadan kaldırılmasında ve/veya tümörün küçültülmesinde iyonizan radyasyon tedavi amaçlı kullanılmaktadır (17-19). Kanser hücreleri çevresindeki birçok normal hücreye göre daha hızlı bölünür ve bu nedenle daha yavaş bölünen sağlam doku hücrelerine göre radyasyondan daha fazla etkilenirler. Bunun nedeni hücre siklusunda radyasyona en duyarlı fazın mitoz fazı olması ve bölünen hücrenin devamlı yeni DNA üretmesi gerektiğinden daha fazla mutasyona maruz kalmasıdır (20). Radyoterapide temel hedef tümör çevresindeki normal dokuları tahribata uğratmadan tümörün yok edilmesidir. Bu nedenle planlama yapılırken etkilenebilecek dokuların minimum düzeyde olması önemlidir (16). Kanser tedavisinde en yaygın şekilde kullanılan radyoterapi yöntemlerinden biri Şekil 6'da verilen Co-60 teleterapi (harici/eksternal radyoterapi) makinalarıyla yapılmakta olanlardır (17-19,21). Radyoaktif kobalt 60 izotopundan yayınlanan gama ışınlarının kullanıldığı bu tedavi derinde yerleşmiş ve geniş alan ışınlanmasının gerektiği tüm kanser türlerinde uygulanabilir. Ancak tedavi sırasında kanserli hücrelere verilen zarardan fazlası üst seviyede bulunan sağlam hücrelere verilebilir. Bunun nedeni dokularda derinlere doğru indikçe bu bölgelere ulaşan foton sayısı giderek azalmasıdır. Bu tahribatı en aza indirmek amacıyla tedavi birkaç seansta ve farklı yönlerden uygulanarak yapılır (21). Dozun aralıklarla birçok seansta verilmesi sağlam dokularda tamir mekanizması nedeniyle

aynı dozun bir seferde verilmesinden daha az hasar meydana getirir (22). Verilmesi planlanan toplam doz, fraksiyonlara bölünerek verilir ve böylece tümör çevresinde bulunan ve ışın alanına dahil olan normal dokularda meydana gelebilecek yan etkiler azaltılmış olur. Tedavi genellikle haftanın beş günü günde bir seans şeklinde uygulanır ve haftasonu 2 gün hastanın dinlenmesi öngörülür. Bu dinlenme süresince normal hücrelerin hasarının tamirine de fırsat tanınmış olur (17,19).



Şekil 6.Co-60 Teleterapi cihazı

MİKRONUKLEUS

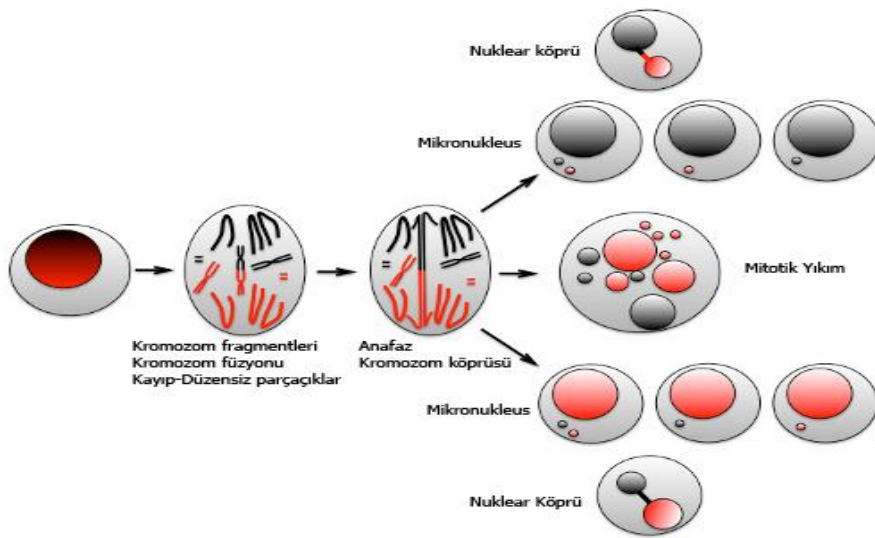
İyonlaştırıcı radyasyonun karsinojen bir etkiye sahip olduğu, bunun nedeninin de kromozomlarda meydana getirdiği mutasyonlar olduğu bilinmektedir. İyonlaştırıcı radyasyon direkt veya dolaylı etki ile DNA'da hasara neden olmaktadır. İyonlaştırıcı radyasyon gibi fiziksel bir mutajene maruz kalan canlı hücrelerinde meydana gelen MN oluşumu buna bir örnektir.

İyonlaştırıcı radyasyonun dokularda yol açtığı yıkım birçok yöntemle belirlenebilmektedir. MN testi bu yöntemlerden biridir. Rutin amaçlı olarak ilk kullanımı Ukrayna'nın Kiev iline bağlı Çernobil kentindeki Nükleer Güç Reaktörünün 26 Nisan 1986 günü meydana gelen nükleer kaza sonrasında atmosfere büyük miktarda fisyon ürünleri salındığı ve Çernobil Reaktör kazası olarak bilinen vaka ile gerçekleşmiştir. Kiev yakınındaki

Çernobil nükleer santral kazasının sonucu olarak başta Ukrayna olmak üzere komşu ülkeler Rusya ve Beyaz Rusya'daki insan popülasyonunun bir kısmı anlamlı derecede yüksek dozda radyoaktif serpintiye maruz kalmıştır.

Kaza sonrası bu insanlarda meydana gelen genetik hasarın ne derece olduğunun saptanması ve devamında meydana gelebilecek hüresel değişikliklerin neler olabileceğinin araştırılması, radyasyon maruziyet seviyesi ve yüksek derecede risk altında olan kişilerin belirlenmesi, radyasyon oranı ile bağlantı kurarak radyasyonun meydana getirdiği biyolojik etkilerin saptanması, zaman içinde genetik sonuçları takip etmek ve kurtarma operasyonlarının başarısını belirlemek için hızlı ve efektif sonuç verebilen yöntemler araştırılmıştır (23). Bu yöntemler içinde gözlemsel, hızlı sonuç verebilmesi ve yüksek doğruluğu olması nedeniyle MN testi kullanılmıştır (23,24). MN testi, klastojenik etkili bileşikler tarafından oluşturulan kromozomal hasarların değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılan standart genotoksisite test sistemi içerisinde yer alır ve in vivo ve in vitro olarak uygulanabilir (25).

Mikronukleuslar hücrenin mitoz bölünmesinin telofaz evresinde ortaya çıkan, esas çekirdeğe dâhil olmayan, tam kromozom veya asentrik kromozom fragmanlarından köken alan küçük çekirdekler olarak tanımlanmaktadır (26). Bu oluşumla genellikle hücre siklusunu kontrol eden genlerdeki eksikliklerden, mitotik iğdeki hatalardan, kinetokordan veya mitotik aygıtın diğer parçalarından ve kromozomal hasarlardan kaynaklanmaktadır. MN'ler hücre döngüsü boyunca meydana gelen hasar nerede olursa olsun hücre bölünmesi süresince oluşur (25) (Şekil 7).



Şekil 7. Mikronukleus oluşumu (12)

Mikronukleus sayısında meydana gelen artış, çeşitli ajanların hücrelerde oluşturduğu sayısal ve yapısal kromozom düzensizliklerinin indirekt göstergesi olarak değerlendirilmektedir. Klastojenler kromozom kırıkları oluşturarak MN oluşumuna katkıda bulunmaktadırlar. Bu nedenle hücrelerde MN sayısında artış saptanması somatik hücrelerdeki genomik kararsızlığın bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (27-29).

Kullanım alanlarından biri olan kanser genetiğinde de hastalığın tanısının konulması ve takibinin yapılmasında önemli bir yer tutmaktadır. Bu teknik hücrelerin morfolojik bozukluğunu, kromozom kırıklarını, premalign değişiklikleri ve kanseri gösterebildiğinden bir biyoişaretleyici olarak değerlendirilebilmekte ve karsinojenlere maruz kalmış bireylerde artmış kanser riskini göstermek amacıyla kullanılabilir. Tedavinin yanı sıra hastalığın ilerlemesi ile ortaya çıkan ikincil kromozomal değişikliklerin tespiti için oldukça kullanışlı bir yöntemdir.

In vivo MN testi, memeli eritrositlerindeki MN sıklığının belirlendiği testtir. Bu test genellikle kemik iliğinde ve/veya periferal kan hücrelerindeki eritrositlerin analizi yapılarak, test edilen bileşiğin kromozomal hasar oluşturup oluşturmadığının saptanmasında kullanılır (26,29).

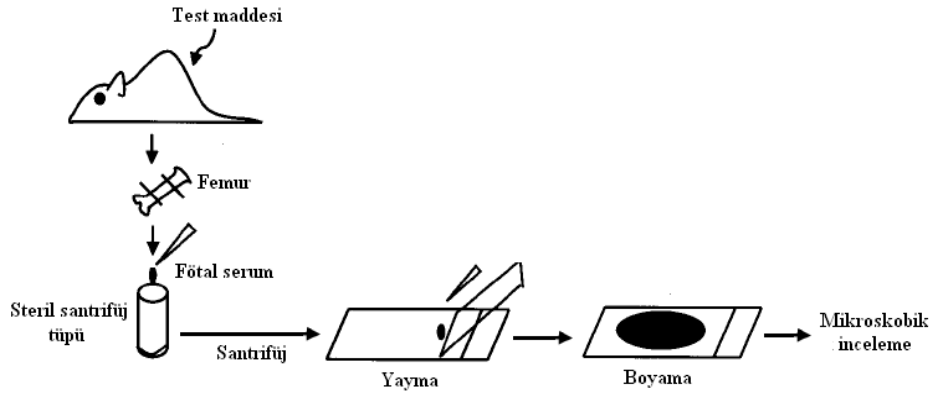
Genellikle in vivo MN çalışmalarında periferal kan daha az değişkenlik gösterdiğinden daha iyi çalışılmaktadır. Fakat kemiricilerde dalak, MN taşıyan polikromatik eritrositleri seçici olarak uzaklaştırdığı için MN çalışmalarında rodentler kullanıldığı zaman dolaşım kanı yerine kemik iliği tercih edilmelidir (29,30).

Kemik iliği ve dalak yetişkin kemiricilerde temel hematopoietik organlardır. Çeşitli kimyasal maddelerin uygulanması hematopoietik hücrelerin bölünmeleri sırasında, kromozom hasarına veya mitoz bölünmenin engellenmesine yol açmaktadır (29). Eritropoezis aşamasında son mitozdan sonra kemik iliğindeki eritroblastlar PCE'lere dönüşürken çekirdeklerini kaybetmekte ve bu sırada meydana gelen kromozomal hasar sitoplazmada MN oluşumuna neden olmaktadır. MN içeren tam olgunlaşmamış eritrosit sayısındaki artış kromozomal hasarın veya anafaz gecikmesi sonucu meydana gelen sitogenetik hasarın bir göstergesidir (26,29,30).

MN testinin kemik iliğinde uygulanması ile ilgili yöntem ilk kez Schmid tarafından geliştirilmiştir. Bu yöntemle göre;

- Test maddesinin hayvanlara uygulanmasından belirli süre sonra hayvan anestezi altında servikal dislokasyon yöntemi ile sakrifiye edilir.

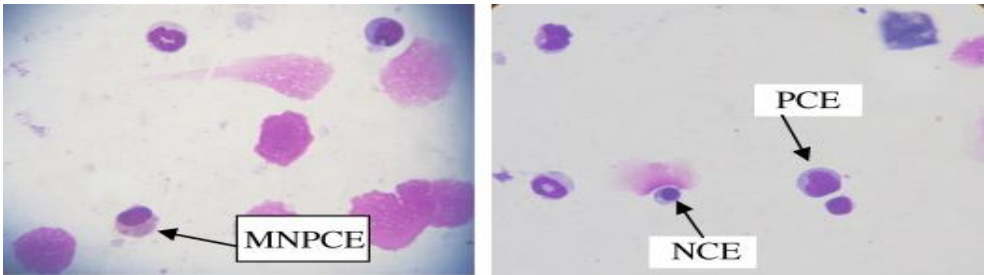
- Femurlar çıkarılır ve femura ait kemik iliği fetal serum içeren enjektör ile santrifüj tüpüne aktarılır.
- Kemik iliği numunesi santrifüj edilir ve süpernatant atılır.
- Geride kalan kısma bir miktar fetal serum konularak süspansiyon edilir ve temiz lamlara yayılır.
- Lamlar May-Grünwald boyası ile boyanarak incelemeye hazır hale getirilir (Şekil 8).



Şekil 8. In vivo MN test protokolü (25)

MN sıklığının belirlenmesi

Işık mikroskopunda her preparat üzerinde rastgele 1000 adet PCE sayılır ve bunların içerisindeki MN taşıyanların sayıları tespit edilerek yüzdeleri çıkarılır. PCE'ler gelişimlerinin ara aşamasında olan, olgun olmayan eritrositlerdir. Yapılarında hâlâ ribozom bulundurlar ve ribozomların boyanma özelliklerinden dolayı, gelişimlerini tamamlamış olgun normokromatik eritrositlerden (NCE) ayırt edilebilirler (26,29,30). NCE'ler ışık mikroskopunda sarımsı turuncu renkte görülürken, daha büyük olan PCE'ler mavi-yeşil arası bir renkte görülmektedirler. PCE'lerin içerisinde oluşan MN'ler ise, ana çekirdeğin üçte bir ya da daha az çapında, boyanma özelliği ana çekirdeğin boyanma özelliği ile aynı, yuvarlak şekilli, koyu mavi renkli olması nedeni ile kolaylıkla ayırt edilebilmektedirler (29) (Şekil 9).



Şekil 9. Kemik iliğindeki normal polikromatik (PCE) ve normokromatik (NCE) eritrositler ve MN taşıyan polikromatik eritrosit (MNPCE)

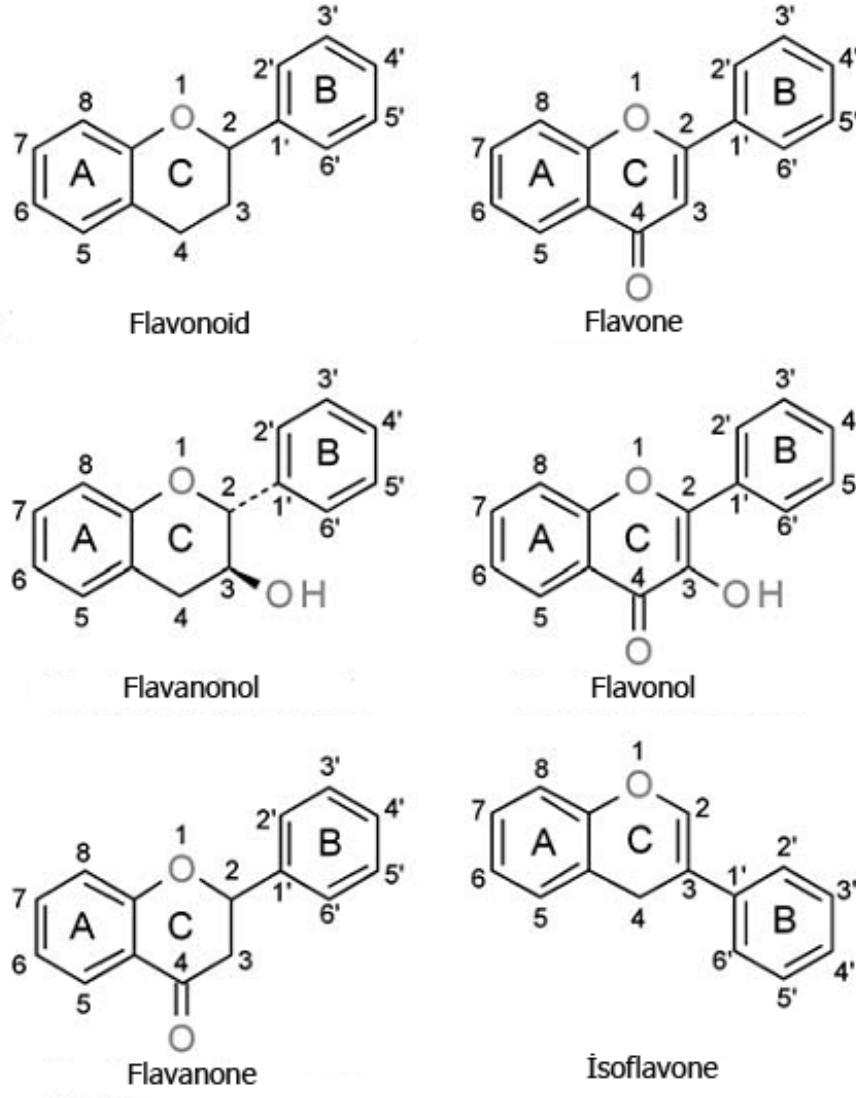
FLAVONOİDLER

Flavonoidler hububatlarda, sebzelerde, meyvelerde ve çay, kırmızı şarap gibi içeceklerde bol miktarda bulunan ve doğal olarak meydana gelen bileşiklerdir. Bu bakımdan insan diyetinin bir parçasını oluştururlar. Flavonoidler buldukları yiyeceklere renk ve tat verirler. Flavonoidlerin alerji, kanser, viral enfeksiyonlar, baş ağrısı, mide ve duodenal ülser ve inflamasyonlara karşı yararlı etkileri de tanımlanmıştır (31,32).

Flavonoidlerin enzimler, hormon taşıyıcıları ve DNA gibi biyolojik polimerlere bağlanabildiği, metal iyonlar ile şelat geçişi yapabildiği ve serbest radikalleri süpürebildiği bilinmektedir. Fe^{2+} ve Cu^{2+} ile şelat oluşturma ve serbest radikalleri süpürme yeteneklerinden dolayı flavonoidler kuvvetli antioksidan özelliğe sahiptirler ve bu özellikleri ile birçok farmakolojik etkilerinin olduğu bildirilmiştir (31). Flavonoidlerin koruyucu etkileri, antioksidan aktiviteye sahip olmaları ve serbest radikal yakalama kapasitelerinden kaynaklanmaktadır.

Ortak bir fenilbenzopiron ($C_6-C_3-C_6$) yapısına sahip olan flavonoidler, merkezi piron halkasının açılmasına ve doymuşluk düzeyine göre sınıflandırılırlar (31-33). Flavonoid aglikonlar bitkilerde birçok yapı formlarında bulunur. Flavonoidlerin temel yapısında $C_6-C_3-C_6$ konfigürasyonunda dizilmiş 15 karbon atomu vardır. Bu konfigürasyonda iki aromatik halka, üçüncü bir halka oluşacak yada oluşmayacak tarzda birbirine üçlü bir karbon birimiyle bağlanmışlardır. Bu halkalar A, B ve C olarak adlandırılır (Şekil 10) (34). Bu üç halkaya hidroksil (-OH) grupları bağlanmaktadır. A halkası glikoz metabolizması sonucu oluşan koenzim A'dan oluşan malonil koenzim A molekülünden, B ve C halkaları da glukoz metabolizması sonucu oluşan şikimik asit üzerinden sinamik asit bileşiklerinden oluşmuştur (35). Tüm flavonoid yapılarına bakıldığında flavan çekirdeği veya bunun bir varyasyonu görülür (32,34).

Yapısal farklılıklarından dolayı flavonoidler farklı gruplara ayrılmıştır. Farklı sınıflarda bulunan flavonoid yapılarının arasında çok küçük farklar vardır. Bu farklılık flavonoid gruplarına karbon (C) atomlarının değişik pozisyonlarına hidroksil (-OH) gruplarının bağlanmasıyla oluşur (Şekil 10).



Şekil 10. Flavon grupları ve temel kimyasal yapıları (31)

Bu gün itibariyle 4000'den fazla farklı flavonoid tanımlanmıştır. Bu tanımlananlar içerisinde majör flavonoidler sınıflandırılmıştır. Bunlar; flavonoller, flavonlar, flavanonlar, kateşinler, antosiyanidler, izoflavonlar, dihidroflavonoller ve kalkonlardır (31-33). Flavonoidler güçlü antioksidanlar, metal şelatörleridir ve lipid peroksidasyonunu engellerler (31). Flavonoidler birincil olarak antioksidanlar gibi davranırlar. Bunun nedeni kendilerinin polifenolik doğası, flavonoid yapısında bulunan büyük sayıda hidroksil gruplarının varlığı ve yüksek antioksidan kapasiteye sahip olmalarıdır.

Canlı hücreler normal yaşam koşullarında herhangi bir stres faktörüne (karsinojenlere ya da iyonlaştırıcı radyasyona) maruz kaldıklarında metabolizmanın verdiği ilk cevap reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumudur. Reaktif oksijen türleri dış orbitalde çift oluşturmamış elektronları bulunan enerjisi yüksek oksijenli bileşiklerdir. Bu oksijen türleri hücrede ilk

etapda membran hasarı oluşturmakta, protein ve lipid dengesini bozarak enzim ve hormon mekanizmasını etkilemekte ayrıca, DNA, nükleotid ve koenzimler gibi birçok biyolojik materyale zarar vermektedir (36-39).

Canlı organizmalar serbest radikallerin yıkıcı etkilerine karşı korunmak için çeşitli mekanizmalar geliştirmişlerdir. Serbest radikallerin neden olduğu oksidasyonları önleyen veya geciktiren, serbest radikalleri tutma ve sabitleme özelliği olan maddelere “antioksidan maddeler” denir (40-43). Antioksidanlar, hem direkt hem de dolaylı olarak karsinojenlerin, ilaçların ve toksik radikal reaksiyonların istenmeyen etkilerine karşı hücreleri koruyan maddelerdir (44).

Antioksidan enzimler olarak adlandırılan bir grup enzim ROS’lar için birincil savunma mekanizmalarını içerirler. Süperoksit dismutaz (SOD), Katalaz (CAT), Glutasyon (GSH) ve Glutasyon Peroksidaz (GSHPx) en bilinen enzimatik antioksidanlardır (32,39,40,45,46). Normal koşullarda hücrede bulunan serbest radikaller antioksidan sistem tarafından etkili bir şekilde süpürülür. Ancak stres koşullarında meydana gelen reaktif oksijen türleri antioksidan savunma sistemi tarafından uzaklaştırılmaz ise hücre veya organizma oksidatif strese girer (47,48). Kanserojen ajanların sebep olduğu ikincil bir stres de oksidatif strestir. Oksidatif stres basit olarak, antioksidan savunması ile hücrelerdeki lipid peroksidasyonuna da sebep olan serbest radikal üretimi arasındaki bir dengesizlik olarak tanımlanabilir. Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller oksijenden oluşanlardır. Örneğin, son derece aktif ve birçok hücrede hasara yol açan süperoksit radikali, SOD ile hidrojen peroksite (H_2O_2) çevrilir. Süperoksitten çok daha az etkili olan H_2O_2 dokularda bulunan katalaz ve peroksidaz gibi enzimler aracılığıyla su ve oksijene dönüştürülerek zararsız hale getirilir (49-51).

İyonlaştırıcı radyasyondan en çok hasar gören hücresel hedef DNA’dır. Hasar gören DNA tamir edilemezse genomik kararsızlığa neden olabilir. Bunlarda mutasyonlara, kansere veya daha yüksek dozlarda doğrudan hücre ölümlerine yol açar. Flavonoidler, oksidatif stresi ve DNA’da hasar olduğunda genomik stabiliteyi artırıcı etkileri olan doğal ürünler ailesindedir. Bunun yanı sıra flavonoidlerin; normal hücreleri iyonlaştırıcı radyasyona karşı koruyucu etkisi ve kanser hücrelerine uygulanan radyasyonun genotoksik etkisini artırıcı etkisi yeni antikanser ilaçlarının tasarımında öne çıkmalarını sağlamaktadır (32).

Bazı flavonoidlerin normal insan hücrelerine toksik etkisi bulunmamaktadır. Bunun yanı sıra in-vitro şartlarda bazı kanser hücrelerinin çoğalmasını durdurduğunu gösteren çalışmalar da mevcuttur (52-56). Bu etkinin moleküler mekanizmasının tümör oluşmasına neden olan prooksidan oluşum sürecinin baskılanması ile ilgili olduğu belirtilmiştir. Çeşitli

karsinojenler tarafından aktive edilmekte olan prooksidan enzimler flavonoidler tarafından inhibe edilmektedir (33). Flavonoidlerin, karsinojenlerin yapısını ve metabolizmasını düzenlediği ve bu sayede kanseri önlemeye katkıda bulunduğu gösterilmiştir (57,58).Yapılan araştırmalarda karsinojenlerin hücrel hasara teşvik edilmesine neden oldukları, buna karşın flavonoidlerin ise hücrede oluşan bu hasara karşı koruyucu bir role sahip oldukları belirtilmiştir (59).

Flavonoidlerin karsinogenezi inhibe ettikleri in vivo ve in vitro çalışmalarda gösterilmiştir (60,61). Flavonoidlerin hücre döngüsünün ilerlemesini durdurduğu belirtilmiştir (59). Hücre döngüsünün ilerlemesini anahtar regülatörler olan siklin bağımlı kinazların (Cdk) aktivitesini ve düzenlemesini değiştirerek yaptıklarını rapor eden çalışmalar mevcuttur (62,63). Flavonoidlerin bazı kanser hücre topluluklarında apoptoza neden olduğu; DNA topoizomerez I/II aktivitesinin inhibisyonunu (64-67) reaktif oksijen türlerini azalttığı (32,43,68) ısıya duyarlı proteinlerin gen seviyesinde anlatımını düzenlediği belirtilmiştir (69).

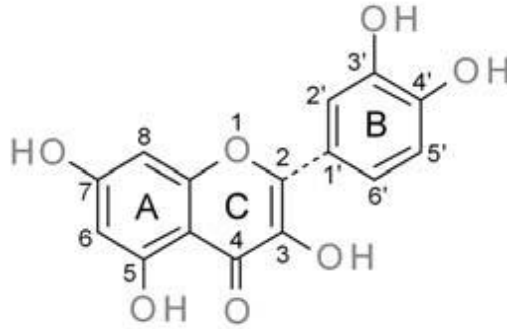
Favonoidlerin antioksidan özelliğinden başka, antitümör, antiinflamatuvar, antiviral, antimitojenik, antibakteriyel, antitrombotik, antiallerjik, aterosklerosis ve koroner kalp hastalıklarından koruma, vasodilatasyon etkisi, hücrel immunitenin stimülasyonu etkisi ve kolesterol düşürücü gibi birçok farmakolojik özellikleri bulunduğu ortaya konmuştur (32,35,70-72).

Flavonoidler önemli doğal antioksidanlardır ve sayısız biyolojik aktiviteleri nedeniyle yaygın bir şekilde çalışılmaktadır. Bugün birçok bitkisel ilaç içerisinde kullanılan flavonoidler ticari açıdan önemli bir yer tutmaktadır. Örneğin Quercetin biyolojik olarak aktif ve popüler olan diyetel flavonoiddir ve diyetel tamamlayıcı olarak kullanılmaktadır (31).

QUERCETİN

Quercetin (3,3',4',5,7- pentahidroksiflavon) en bol bulunan doğal flavonoidlerden biridir. Flavonoidlerin flavon grubundandır. Quercetin doğal polifenolik flavonoid maddelerinin geniş bir grubunu oluşturmaktadır ve sağlığa olan yaygın faydalarından dolayı araştırılmaktadır (31,73-75). Bu faydalar beklenen olası antioksidan ve antiinflamatuvar aktivitesidir. Fakat son zamanlarda yapılan in vitro çalışmalar gelişmiş mitokondriyal biyogenezde önemli bir rol oynayabileceğini akla getirmektedir (73).

Tüm flavonoidler, hidroksil (-OH) gruplarının bağlandığı 3 halkalı molekül yapısına sahiptir. Yapısında 3,3',4' ve 5,7 pozisyonlarında -OH grubu bağlıdır (Şekil 11).



Şekil 11. Quercetin'in kimyasal yapısı – 3,3',4',5,7- pentahidroksiflavon

Flavonoidler besinlerde glikozit formunda bulunurlar. Yani, merkez halkaya bağlanmış bir şeker (ramnoz, glukoz, galaktoz) molekülüne sahiptirler. Quercetin; rutin, quercetrin, isoquercetrin ve hyperoside gibi bir aglikondur, yani glikozit formdadır. Quercetin hariç bu moleküllerin hepsi aynı yapıya sahiptir. Quercetin'in C halkasındaki hidroksil grubu bu moleküllerde özel bir şeker molekülü ile yer değiştirmiş olarak bulunur (75,76).

Quercetin'in biyolojik aktivitesi metal iyonlarının varlığı ile etkilenmektedir. Quercetin yapısında bulunan hidroksi- ve oxo- gruplarının varlığı çeşitli metal iyonları ile kompleksler oluşturma kabiliyeti sağlar (31). Quercetin, sık tüketilen yiyeceklerin çoğunda; elma, soğan, çay, kiraz ve çilek gibi yumuşak kabuklu meyveler, lahana, brokoli gibi yeşil yapraklı sebzelerde, çoğu tohumda, yemişlerde, çiçekler, kabuklar ve yapraklarda bulunmaktadır (31,77,78). Quercetin insan diyetinde bol olarak bulunmaktadır. Amerika'da günlük besinle alınan Quercetin'in 25 mg olduğu tahmin edilmektedir (79).

Quercetin, biyokimya, gıda kimyası ve boya kimyası alanlarında ve doğal sarı boya ekstratı olarakda kullanılmaktadır (61). Genellikle birçok bitkide farklı flavonoidlerle birlikte bulunur (80-82). Quercetin flavonoidlerin flavonol alt grubunda yer alır. Flavonol bileşiklerin antioksidan potansiyellere sahip oldukları bilinir ve geniş bir kullanım alanları vardır (83-85).

Antioksidan özellikleri fenolik bileşiklerin reaktivitesinden kaynaklanmaktadır. Bu yolla serbest radikal türlerini daha az reaktif olan fenoksi radikallere dönüştürmektedir (86).

Yapılan araştırmalarda flavonoidlerin antioksidan aktivitesinin flavonoid yapısında bulunan OH gruplarının sayısına ve pozisyonuna bağlı olduğu belirtilmiştir. Cu-Quercetin kompleksinin, saf Quercetin ile karşılaştırıldığında daha yüksek antioksidan aktiviteye sahip

olduğu gösterilmiştir. Buda Cu^{2+} gibi metal iyonlarının Quercetin'in kimyasal özelliklerini anlamlı derecede değiştirdiğini göstermektedir (31).

Quercetin'in en önemli görevi; metabolizmayı hızlandırmaktır. Bu sayede vücudumuzdaki yağları yakar ve toksinlerden arınmamızı sağlar (73). Elma, soğan, ahududu, yaban mersini, kırmızı yaban mersini, kiraz, brokoli ve lifleri olan yeşillikler iyi birer Quercetin kaynağıdır. Quercetin, antioksidan özellikleri olan bir bitki pigmentidir. Bu pigment, kötü kolesterolün okside olmasını önleyebilir ve hücrelerin kansere dönüşmesini engelleyebilir. Çok güçlü bir antioksidan olan Quercetin kolesterolü düşürmekte, kalp hastalıkları ve akciğer kanseri riskini azaltmaktadır. Ayrıca akciğerleri ve solunum yollarını sigara ve kirli havanın etkilerinden korumaya yardımcı olduğu saptanmıştır (87). Quercetin alerji ve astım tedavisi içinde genellikle tavsiye edilmektedir. Aynı zamanda vücuttaki hücreleri serbest radikallerin zararlarından da korumaktadır.

Quercetin, hücre döngüsünü uygulanan hücrenin tipine bağlı olarak kontrol noktalarında durarak (88,89) ve apoptozu indükleyerek malignant tümör hücrelerinin büyümesini inhibe edebilmektedir. Lösemi hücreleri (90), meme kanseri, kolon adenokarsinoması (91), prostat kanseri (92) ve endometriyal kanser (93) gibi insan kanserlerinin büyümesini inhibe ettiği gösterilmiştir.

Quercetin aynı zamanda güçlü bir mutajendir. DNA'ya bağlandığında tek zincir kırıklarına (94), DNA'da yeniden düzenlemelere (95) ve kromozomal hasara da neden olabilmektedir (96).

Quercetin'in; anti-kanser, anti-viral, anti-trombotik, anti-iskemik, anti-inflamatuar, anti-alerjik olduğu, aterosklerozisi ve koroner kalp hastalıklarını önleyici bir etkisinin olduğu, hücrenel bağışıklığı uyardığı çeşitli çalışmalarında gösterilmiştir (97-100).

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Onayı

Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul tarafından, araştırmanın amacı, gerekçesi, gereç ve yöntemler incelendikten sonra 31 Mayıs 2011 tarih ve 05 oturum sayılı toplantısında Tez önerisi ve Tez danışman ataması yapılmış, Bilimsel Araştırma Değerlendirme Komisyonu tarafından 31.05.2011 tarihinde 2011.02.03 karar numarası (TÜHDYEK 2011-31 protokol nolu) ile onaylanmıştır (Ek-1).

Çalışma Popülasyonu- Hayvan Tanımı

Çalışma Trakya Üniversitesi Deney Hayvanları Birimi'nde yürütülmüştür. *Sprague Dawley* ratlar üreme performanslarının iyi olması, erkek ratların 8-10 haftada erginliğe ulaşması ve ortalama 250-300 gr ağırlığında olmaları nedeni ile toksikoloji, davranış, yaşlanma, onkoloji, nutrisyon (beslenme) ve farmakolojik araştırmalarda sıklıkla kullanılan model organizmalardır (Şekil 12). Bizim çalışmamızda ise *Sprague Dawley* ratların daha önceki kemik iliği ve MN çalışmalarında kullanılmış ve olumlu sonuçlar alınmış olması nedeni ile tercih edildi (101-103).



Şekil 12. *Sprague Dawley* ırkı albino erkek rat(104)

Sprague Dawley ırkına ait albino özellikte 12-14 haftalık yaş grubundaki 43 adet hayvan 12:12 aydınlık-karanlık fotoperiyotta, oda sıcaklığında barındırıldı. Hayvanlara radyasyon uygulaması Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı'nda kurulu Co-60 cihazında, mikronukleus testi ise Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı'nda yapıldı.

GEREÇLER

Araştırma Araçları ve Kimyasalları

Kullanılan Cihazlar

- ✓ Etüv (Heraeus-UB6)
- ✓ Laminar air flow kabini (Heraeus-HERA Safe-HS15)
- ✓ Vorteks (Yellow Line TTS2)
- ✓ Soğutmalı santrifüj (Heraeus)
- ✓ Hassas dijital terazi (Scaltec)
- ✓ -20 °C derin Dondurucu (BOSCH GSD30N12NE)
- ✓ 4°C Buzdolabı (Arçelik)
- ✓ Işık Mikroskobu (Olympus CK2)
- ✓ Faz-Kontrast Mikroskobu (Olympus Bx50)

Kimyasal sarf ve diğer malzemeler ekler bölümünde verilmiştir (Ek-2).

YÖNTEMLER

Hayvanların Işınlanması (Hayvanlara radyasyon uygulanması)

Kan örneklerine in vivo şartlarda radyasyon uygulanması Trakya Üniversitesi Radyasyon Onkolojisi bölümünde yapıldı. Bu çalışmada radyasyon cihazı olarak Cobalt-60 kullanıldı. Işınlanacak hayvanlar çalışmaya göre gruplara ayrıldı. Her bir grup Co-60 teleterapi cihazında 2 Gy dozunda 20x25 cm'lik alanda 92,28-94,38 cm (SDD)'de ışınlandı.

Quercetin'in Hazırlanması

Quercetin'in moleküler ağırlığı 338.28 gr'dır. 0.018 gr Quercetin tartıldı ve 15ml'lik flask içerisine konuldu. 1.792 ml Dimetil sülfoksit (DMSO) Quercetin üzerine eklendi ve stok çözelti elde edildi. 25 µM Quercetin elde etmek için stok çözelti içerisinden 717 µl alınarak başka bir 15 ml'lik flaska aktarıldı. Oda sıcaklığına getirilen ve filtre edilmiş fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) ile 10 ml'e tamamlandı.

Hayvanların Gruplara Ayrılması

Araştırmada kullanılacak olan hayvanlar 3 kontrol ve 6 deney grubu olmak üzere 9 farklı gruba ayrıldı. Her grupta 5'er adet hayvan kullanıldı;

- 1. Kontrol:** Kör (0)
- 2. Kontrol:** 2 Gy
- 3. Kontrol:** DMSO (Çözücü)
- 1. Grup:** 25 µM QN-30 dk
- 2. Grup:** 25 µM QN-30 dk+2 Gy
- 3. Grup:** 25 µM QN-2 saat
- 4. Grup:** 25 µM QN-2 saat+2 Gy
- 5. Grup:** 25 µM QN-24 saat
- 6. Grup:** 25 µM QN-24 saat+2 Gy

QN: Quercetin

Uygulama grupları ve gruplara yapılan uygulamalar Tablo 1'de ayrıntılı olarak verilmiştir.

Tablo 1. Kontrol ve uygulama gruplarında yapılan uygulamalar ve iş akışı

Kontrol Grupları		
1. Kontrol (0)	2. Kontrol (2 Gy)	3. Kontrol (DMSO)
<ul style="list-style-type: none">• Kemik iliği örnekleri alındı.• Kemik iliği protokolü uygulandı.	<ul style="list-style-type: none">• Hayvanlar 2 Gy ışınlandı• Işınlamadan 24 saat sonra kemik iliği örnekleri alındı.• Kemik iliği protokolü uygulandı.	<ul style="list-style-type: none">• Hayvanlara DMSO uygulandı• Uygulamadan 24 saat sonra kemik iliği örnekleri alındı.• Kemik iliği protokolü uygulandı
Tedavi Grupları		
1. Tedavi Grubu (T1) (Quercetin-30 dk)	2. Grup (T _{Q2}) (Quercetin-30 dk + 2 Gy)	3. Grup (T3) (Quercetin-2 saat)
<ul style="list-style-type: none">• Hayvanlara 25µM QN verildi.• 30 dk sonra kemik iliği örnekleri alındı.• Kemik iliği protokolü uygulandı.	<ul style="list-style-type: none">• Hayvanlara 25µM QN verildi.• 30 dk sonra hayvanlar 2 Gy ışınlandı.• Işınlamadan 24 saat sonra kemik iliği örnekleri alındı• Kemik iliği protokolü uygulandı.	<ul style="list-style-type: none">• Hayvanlara 25µM QN verildi.• 2 saat sonra kemik iliği örnekleri alındı.• Kemik iliği protokolü uygulandı
4. Grup (T _{Q4}) (Quercetin 2 saat + 2 Gy)	5. Grup (T5) (Quercetin 24 saat)	6. Grup (T _{Q6}) (Quercetin-24 saat + 2 Gy)
<ul style="list-style-type: none">• Hayvanlara 25µM QN verildi.• 2 saat sonra hayvanlar 2 Gy ışınlandı.• Işınlamadan 24 saat sonra kemik iliği örnekleri alındı.• Kemik iliği protokolü uygulandı.	<ul style="list-style-type: none">• Hayvanlara 25µM QN verildi.• 24 saat sonra kemik iliği örnekleri alındı.• Kemik iliği protokolü uygulandı.	<ul style="list-style-type: none">• Hayvanlara 25µM QN verildi.• 24 saat sonra hayvanlar 2 Gy ışınlandı.• Işınlamadan 24 saat sonra kemik iliği örnekleri alındı.• Kemik iliği protokolü uygulandı.
Preparatların Hazırlanması		
<p>Kemik iliği protokolünden sonra tüm kontrol ve uygulama gruplarında,</p> <ul style="list-style-type: none">• Preparatların hazırlanması• Preparatların boyanması ve saklanması işlemleri uygulandı.		

Kemik İliği Örneklerinin Alınması

1. Hayvanların femur kemikleri çıkarıldı.
2. Çıkarılan kemikler iyice temizlenerek görünür hale getirildi.
3. Kemikler iki ucundan kesilerek pens ile tutuldu ve her femura ait kemik iliği içerisinde oda sıcaklığına getirilen 1 ml sığır serumu (fetal bovine/calf serum) içeren enjektör ile santrifüj tüpüne aktarıldı.

4. Bu işlem yine 1 ml sığır serumu içeren enjektör ile diğer ucundan da verilerek kemik iliğinin tamamının santrifüj tüpüne aktarılması sağlandı. Dolayısıyla her femur için 2 ml sığır serumu kullanıldı.
5. Tüpe alınan kemik iliği hücrelerinin pipetaj işlemiyle birbirleriyle ayrılması sağlandı.

Preparat Hazırlanması

1. İçinde kemik iliği bulunan tüpler 2000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.
2. Altta biriken kemik iliği hücrelerine zarar vermeden üstte biriken süpernatant atıldı.
3. Geride kalan kısma bir damla sığır serumu konularak süspansiyon edildi.
4. Altta kalan hücrelere pipetaj yapıldıktan sonra, önceden temizlenen ve dondurulmuş lamın üzerine bir damla solüsyon damlatıldı, bir başka lamla bu damlanın yayılması sağlandı.

Preparatların Boyanması ve Saklanması

1. Lamlar havada kurutuldu ve metil alkolde 10 dakika fikse edildi.
2. Lamlar fikse edildikten sonra 1 gün boyunca kurumaya bırakıldı.
3. Slaytlara 1:1 oranında May-Grünwald:Buffer ile 5 dakika yatay şekilde tespit yapıldı ve slaytlardaki boya döküldü.
4. Yıkama yapılmadan slaytlar 1:9 oranında Giemsa:Buffer ile 15 dakika yatay şekilde boyandı.
5. Slaytlar buffer içeren jar içerisinde 1 kez durulandı.
6. Slaytlar bol çeşme suyu ile durulandı.
7. Son olarak slaytlar distile su içeren jarda 2-5 dakika arası durulandı.
8. Slaytlar eğik pozisyonda kurumaya bırakıldı.

9. Boyamadan 1 gün sonra lamalar entellan ile kapatılarak daimi preparat haline getirildi.

Her hayvandan 2'şer preparat hazırlandı.

Mikroskopik İnceleme ve MN sıklığının Değerlendirilmesi

Hazırlanan preparatlar Olympus Bx50 marka faz-kontrast mikroskopunda immersiyon objektifi ile 1000'lik büyütmede incelendi.

Mikronukleus Tanımlama Kriterleri

Hücreler Schmid (1975) tanımlama kriterlerine göre değerlendirildi.

Mikronukleus Sayma Kriterleri

Hazırlanan preparatlar üzerinde rastgele 1000 adet PCE sayıldı ve içlerindeki MNPCE'lerin sayıları tespit edilerek yüzdeleri çıkartıldı. MN yüzdesi aşağıdaki şekilde hesaplandı;

$$\% \text{ MN Frekansı} = \text{MNPCE sayısı} / \text{TOPLAM PCE sayısı}$$

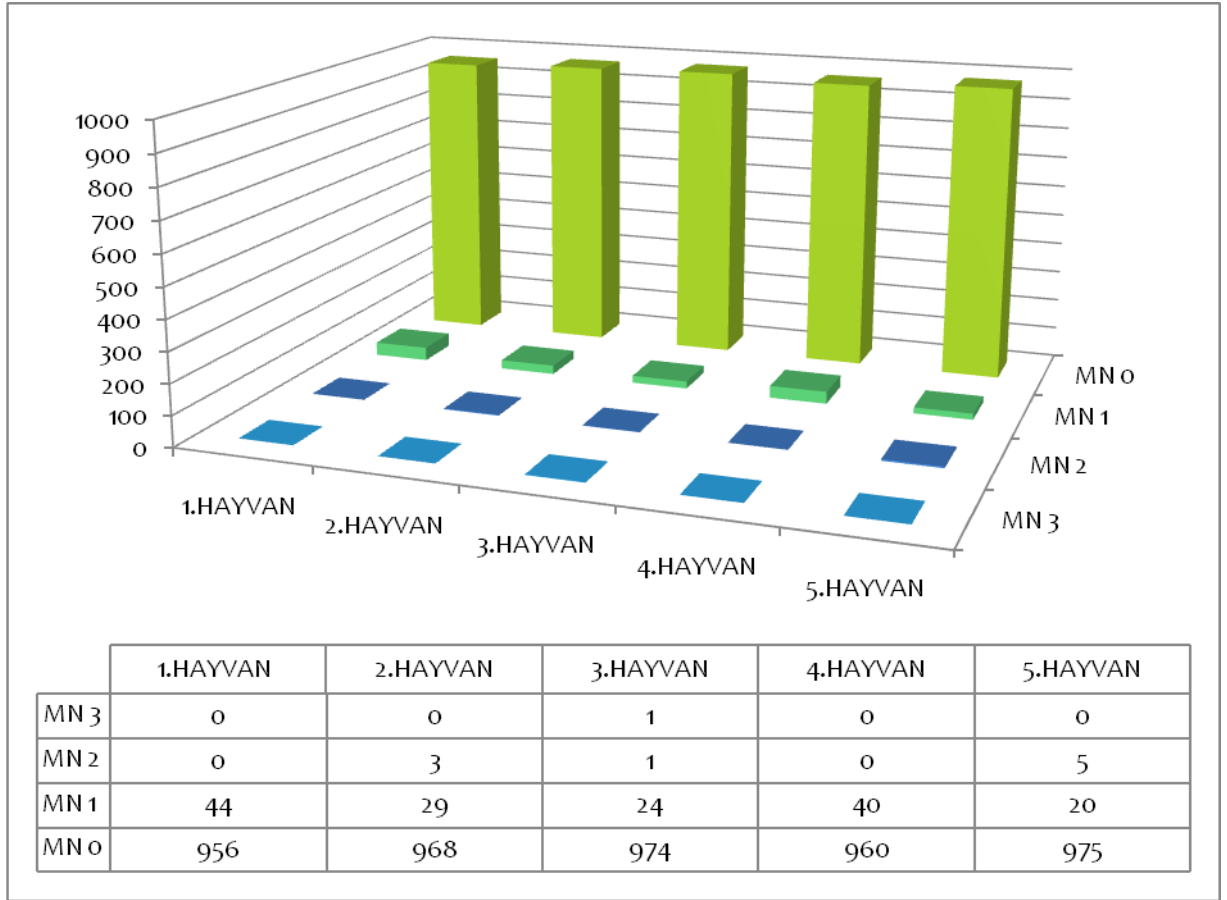
İSTATİKSEL DEĞERLENDİRME

Çalışmada verilerin istatistiksel analizi XL STAT-2013 (serbest yazılım) programı yardımıyla yapıldı. Her bir grupta gönüllüler arasındaki fark tek yönlü (ANOVA) varyans analizi ile değerlendirildi. Her bir olgunun, Varyans/Ortalama sonuçları, Standart hataları Ctampois programı (Alan Edwards-NRPB-İngiltere) ile hesaplanırken; %95 Güven aralıkları ise Instant Programı yardımı ile hesaplandı. Verilerin tümü üzerinde yapılan analizlerde ortalamalar arasındaki hipotez kontrolleri tek yönlü-ANOVA ile belirlendi, ortalamaların girdiği grupların tespitinde Duncan Testi kullanıldı. Tüm istatistikler için anlamlılık sınırı $p \leq 0.05$ olarak seçildi.

BULGULAR

Bu çalışmada, Trakya Üniversitesi Deney Hayvanları Birimi'nde üretilen aynı yaş grubunda olan (12-14 haftalık), toplam 43 adet sağlıklı *Sprague Dawley* ırkı albino erkek rat kullanıldı. Hayvanlardan alınan kemik iliği örneklerinde farklı sürelerde uygulanan Quercetin'in etkisi 9 ayrı kriter incelenerek sonuçları karşılaştırıldı. Her bir grup için 5 paralel ile çalışıldı.

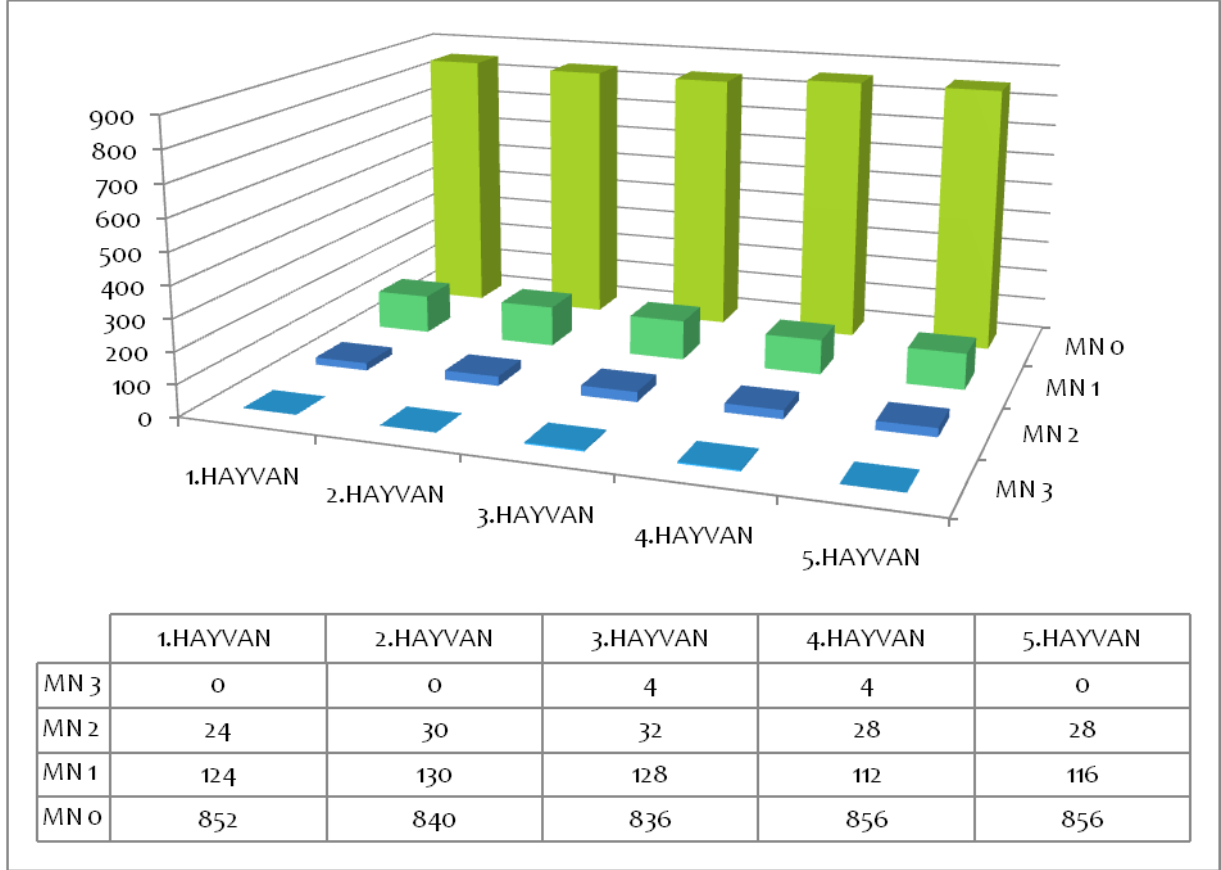
Uygulama yapılmamış kontrol grubundaki MN sıklıkları ve dağılımı Şekil 13’de verildi.



Şekil 13. K1 Kontrol (0) grubuna ait mikronukleus dağılımları

Uygulama yapılmamış kontrol grubunda hayvan başına 1000 adet PCE sayıldı. Hücrelerde belirlenen MN sayıları sırasıyla 44 ± 6.6 , 35 ± 5.9 , 29 ± 5.3 , 40 ± 6.3 , 30 ± 5.4 olarak bulundu. Popülasyon içerisinde en düşük Varyans/ortalama 0.9 en yüksek Varyans/ortalama 1.3 olarak belirlendi, % 95 güven aralığında en düşük alt limit 19.5, en yüksek üst limit 58.6 olarak bulundu.

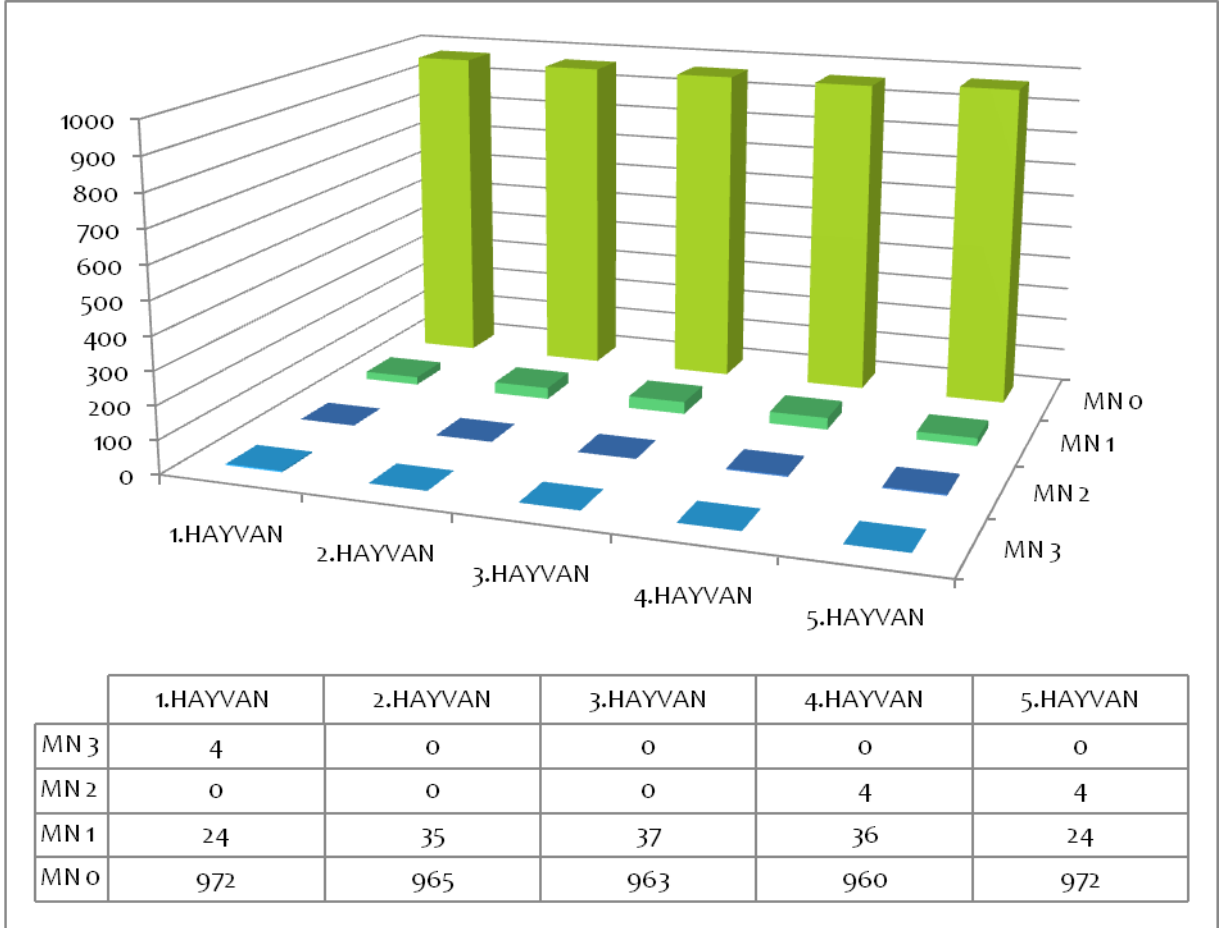
2 Gy radyasyon uygulaması yapılan hayvanlardaki MN sıklıkları ve dağılımı Şekil 14'de verildi.



Şekil 14. K2 Kontrol (2 Gy) grubuna ait mikronukleus dağılımları

2 Gy radyasyon uygulaması yapılan kontrol grubunda hayvan başına 1000 adet PCE sayıldı. Hücrelerde belirlenen MN sayıları sırasıyla 172 ± 13.1 , 190 ± 13.7 , 204 ± 14.2 , 180 ± 13.4 , 172 ± 13.1 olarak bulundu. Popülasyon içerisinde en düşük Varyans/ortalama 1.01 en yüksek Varyans/ortalama 1.2 olarak belirlendi, % 95 güven aralığında en düşük alt limit 149.1, en yüksek üst limit 230.3 olarak bulundu.

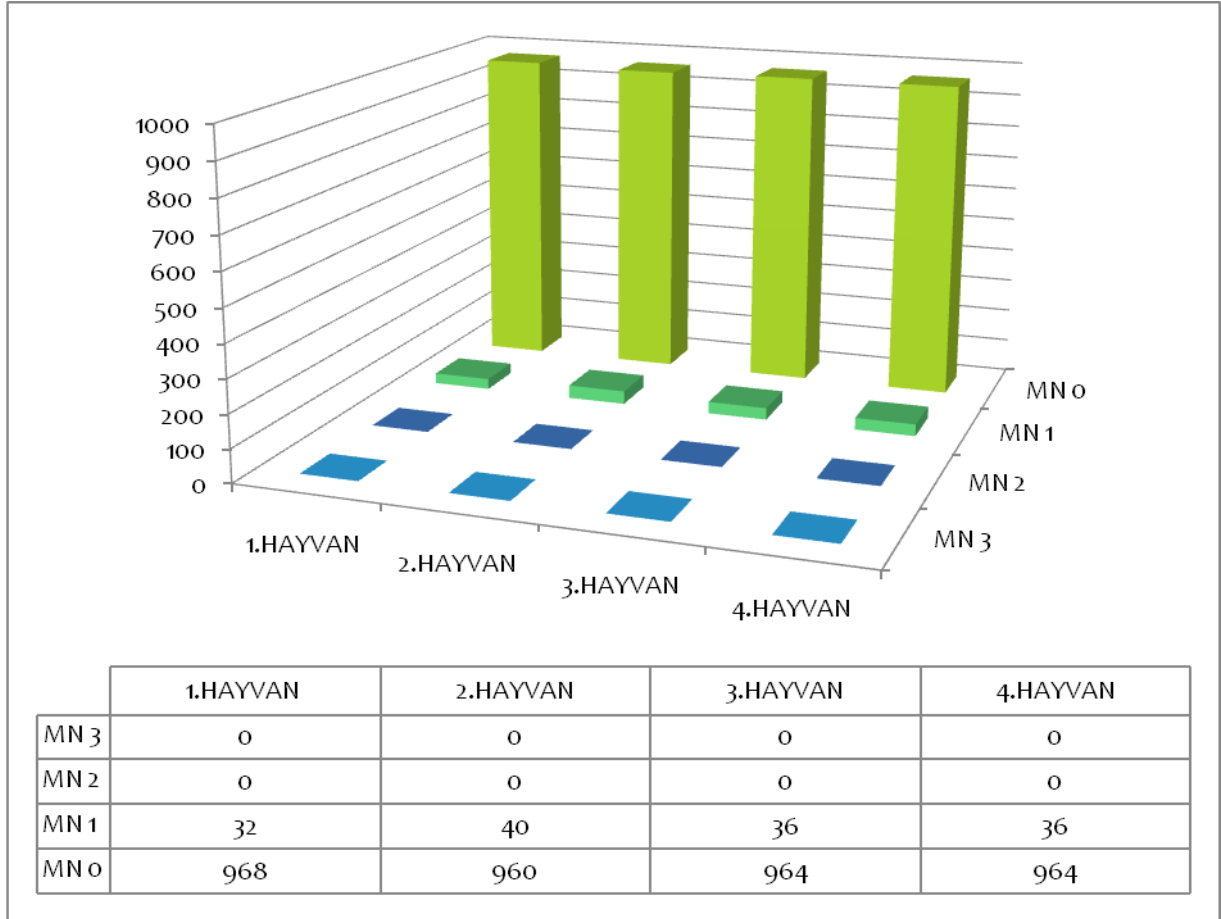
Çözücü (DMSO) uygulaması yapılan hayvanlardaki MN sıklıkları ve dağılımı Şekil 15’de verildi.



Şekil 15. K3 Kontrol (DMSO) grubuna ait mikronukleus dağılımları

Çözücü (DMSO) uygulaması yapılan kontrol grubunda hayvan başına 1000 adet PCE sayıldı. Hücrelerde belirlenen MN sayıları sırasıyla 36 ± 6 , 35 ± 5.9 , 37 ± 6.08 , 44 ± 6.6 , 32 ± 5.6 olarak bulundu. Popülasyon içerisinde en düşük Varyans/ortalama 0.9 en yüksek Varyans/ortalama 1.6 olarak belirlendi, % 95 güven aralığında en düşük alt limit 22, en yüksek üst limit 58.6 olarak bulundu.

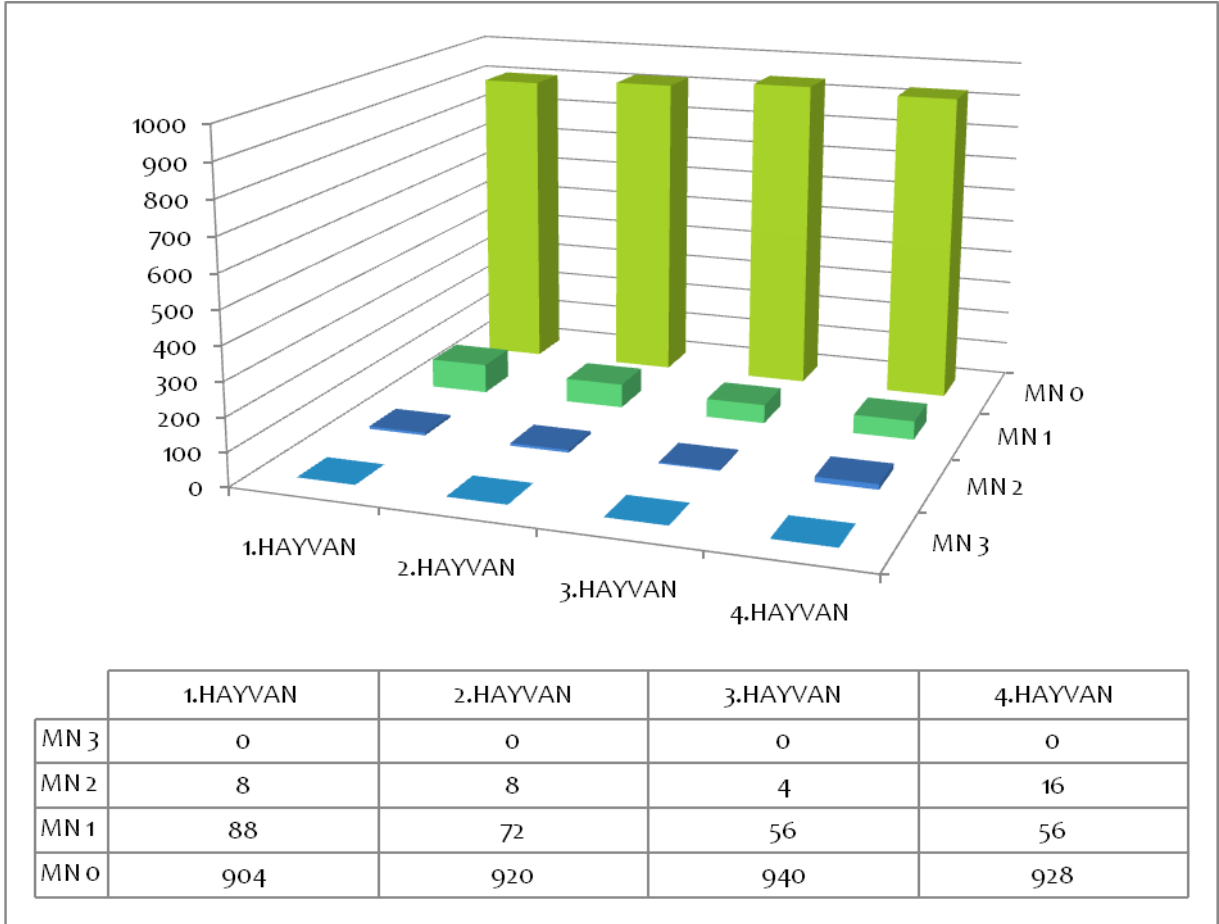
Quercetin uygulaması yapıldıktan 30 dakika sonra hayvanlardaki MN sıklıkları ve dağılımı Şekil 16'da verildi.



Şekil 16. T1 Tedavi grubuna (25µM QN-30 dk) ait mikronukleus dağılımları

Quercetin uygulaması yapıldıktan 30 dakika sonra örnek alınan grupta hayvan başına 1000 adet PCE sayıldı. Hücrelerde belirlenen MN sayıları sırasıyla 32 ± 5.6 , 40 ± 6.3 , 36 ± 6 , 36 ± 6 olarak bulundu. Popülasyon içerisinde en düşük ve en yüksek Varyans/ortalama 0.9 olarak belirlendi, % 95 güven aralığında en düşük limit 22, en yüksek üst limit 54.1 olarak bulundu.

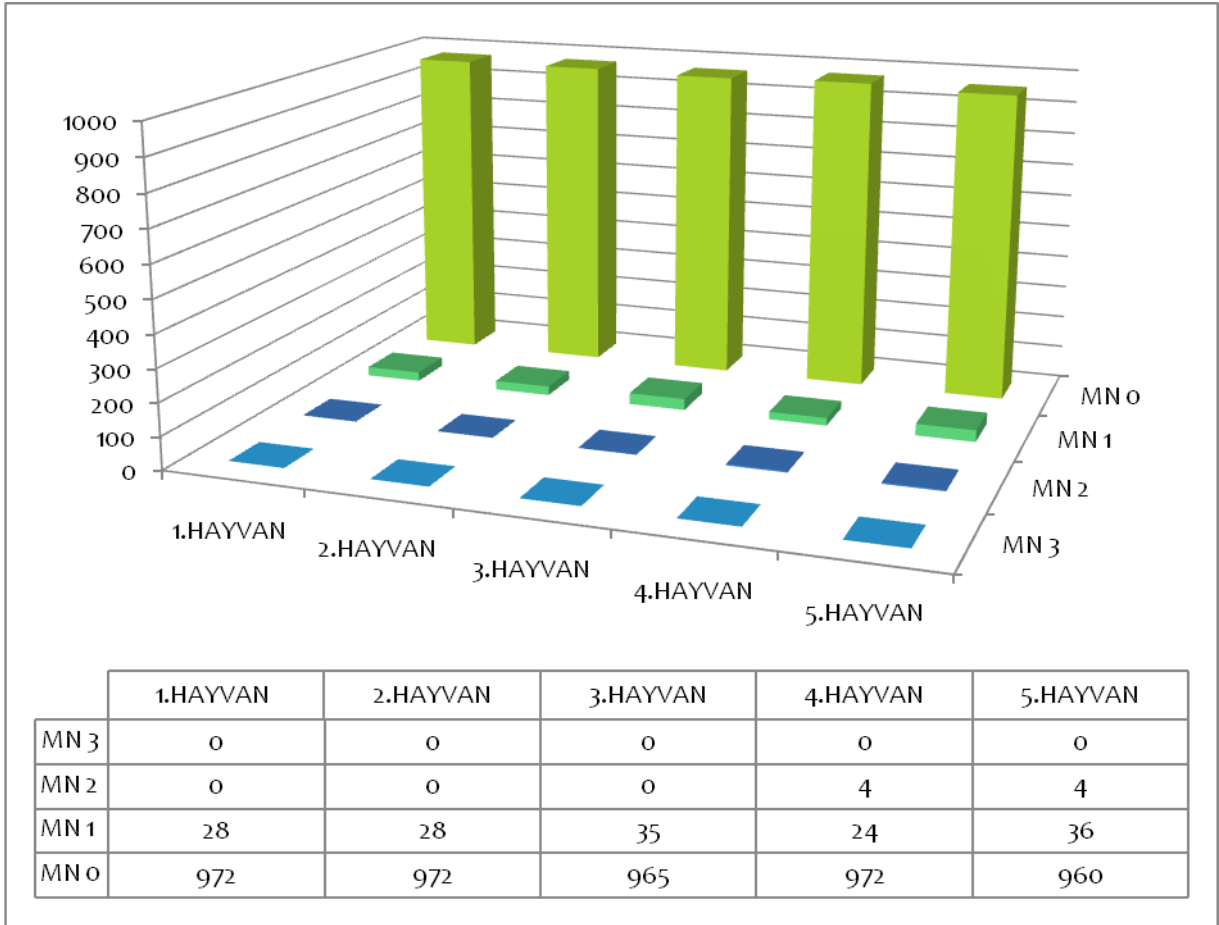
Quercetin uygulaması yapıldıktan 30 dakika sonra 2 Gy radyasyona maruz bırakılan hayvanlardaki MN sıklıkları ve dağılımı Şekil 17’de verildi.



Şekil 17. TQ2 Tedavi grubuna (25µM QN-30 dk+ 2 Gy) ait mikronukleus dağılımları

Quercetin uygulaması yapıldıktan 30 dakika sonra 2 Gy radyasyon ile ışınlanan grupta hayvan başına 1000 adet PCE sayıldı. Hücrelerde belirlenen MN sayıları sırasıyla 104 ± 10.1 , 88 ± 9.3 , 64 ± 8 , 88 ± 9.3 olarak bulundu. Popülasyon içerisinde en düşük Varyans/ortalama 1.05 en yüksek Varyans/ortalama 1.2 olarak belirlendi, % 95 güven aralığında en düşük alt limit 49.6, en yüksek üst limit 124.6 olarak bulundu.

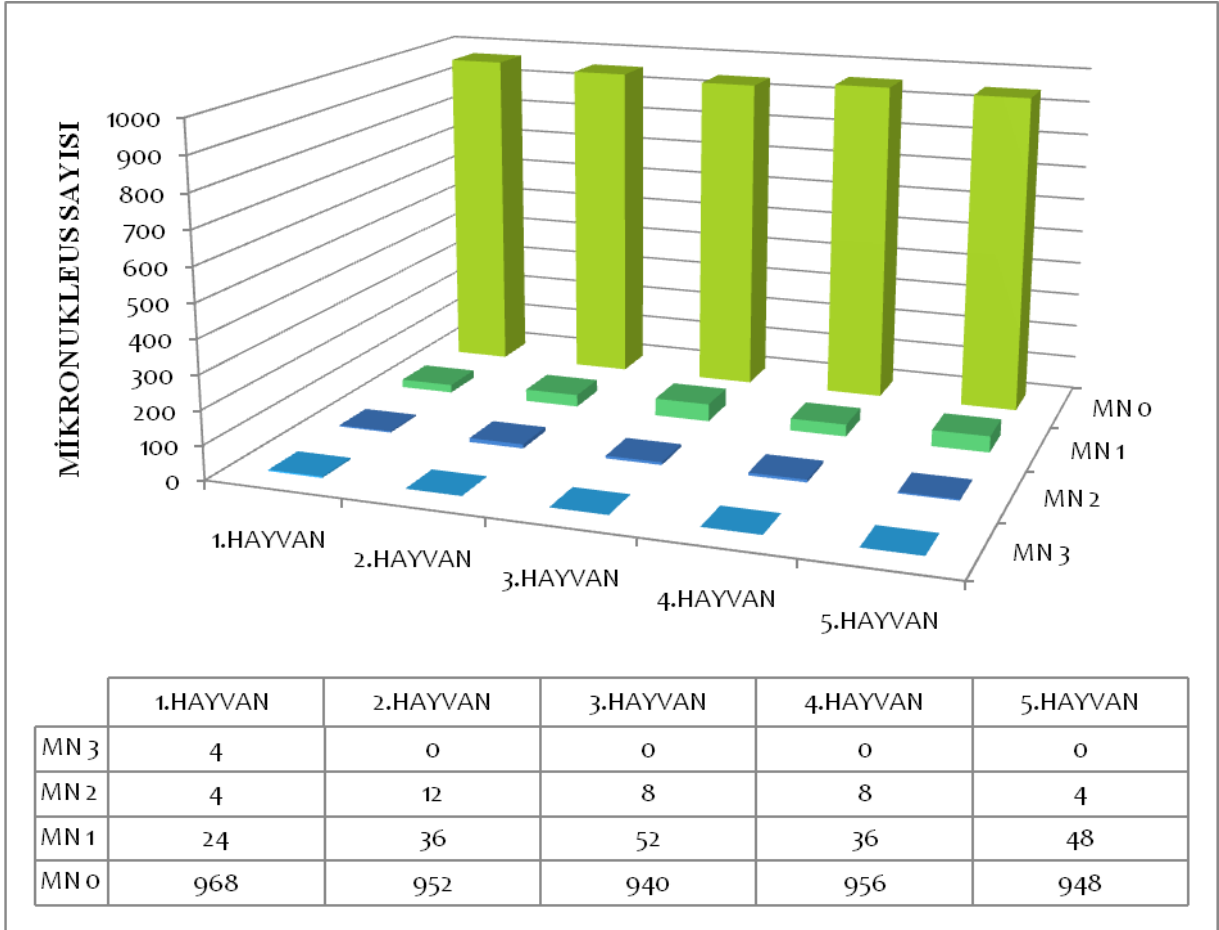
Quercetin uygulaması yapıldıktan 2 saat sonra hayvanlardaki MN sıklıkları ve dağılımı Şekil 18’de verildi.



Şekil 18. T3 Tedavi grubuna (25µM QN- 2 saat) ait mikronukleus dağılımları

Quercetin uygulaması yapıldıktan 2 saat sonra örnek alınan grupta hayvan başına 1000 adet PCE sayıldı. Hücrelerde belirlenen MN sayıları sırasıyla 28 ± 5.3 , 28 ± 5.3 , 35 ± 5.9 , 32 ± 5.6 , 44 ± 6.6 olarak bulundu. Popülasyon içerisinde en düşük Varyans/ortalama 0.9 en yüksek Varyans/ortalama 1.2 olarak belirlendi, % 95 güven aralığında en düşük alt limit 18.7, en yüksek üst limit 58.6 olarak bulundu.

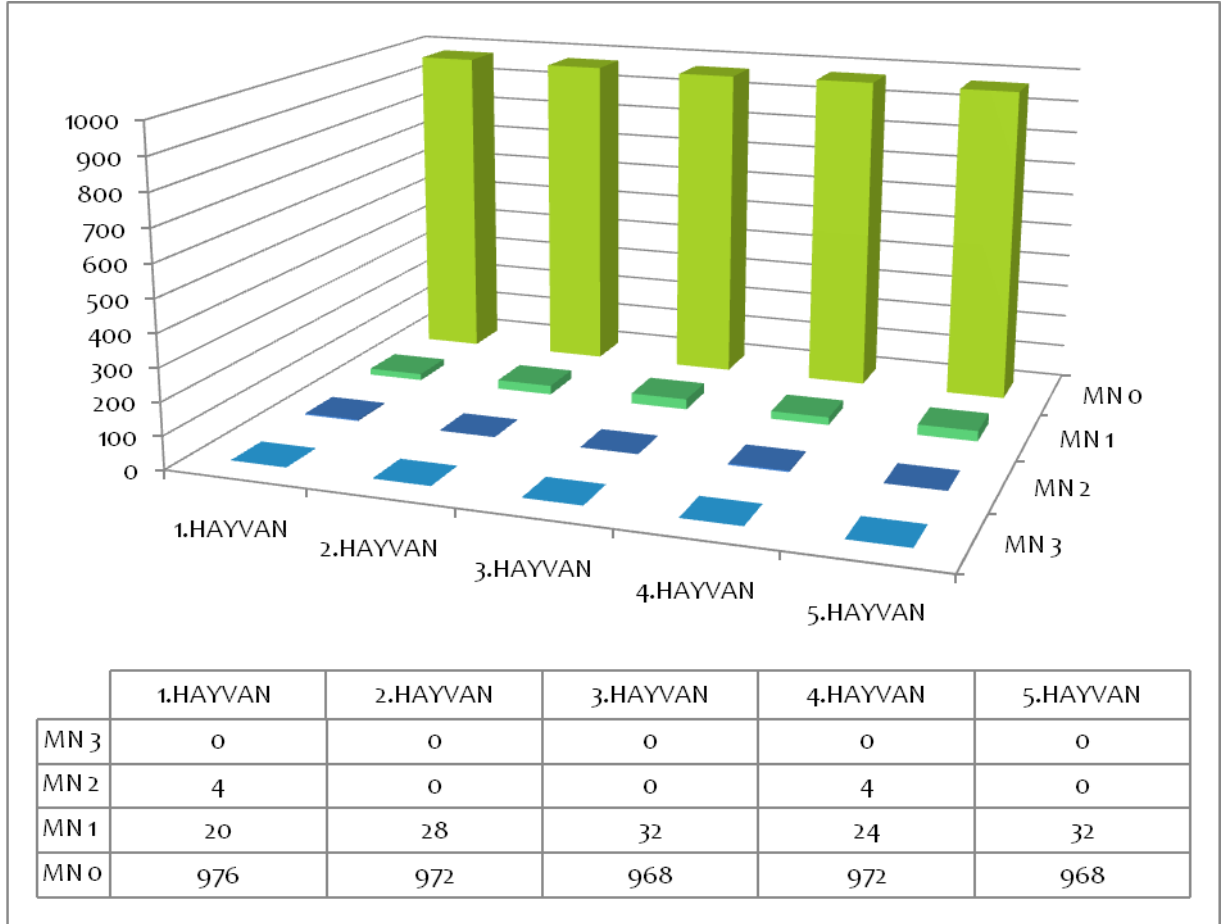
Quercetin uygulaması yapıldıktan 2 saat sonra 2 Gy radyasyona maruz bırakılan hayvanlardaki MN sıklıkları ve dağılımı Şekil 19'da verildi.



Şekil 19. TQ4 Tedavi grubuna (25µM QN- 2 saat+ 2 Gy) ait mikronukleus dağılımları

Quercetin uygulaması yapıldıktan 2 saat sonra 2 Gy radyasyon ile ışınlanan grupta hayvan başına 1000 adet PCE sayıldı. Hücrelerde belirlenen MN sayıları sırasıyla 44 ± 6.6 , 60 ± 7.7 , 68 ± 8.2 , 52 ± 7.2 , 56 ± 7.4 olarak bulundu. Popülasyon içerisinde en düşük Varyans/ortalama 1.08 en yüksek Varyans/ortalama 1.6 olarak belirlendi, % 95 güven aralığında en düşük alt limit 32.1, en yüksek üst limit 85.4 olarak bulundu.

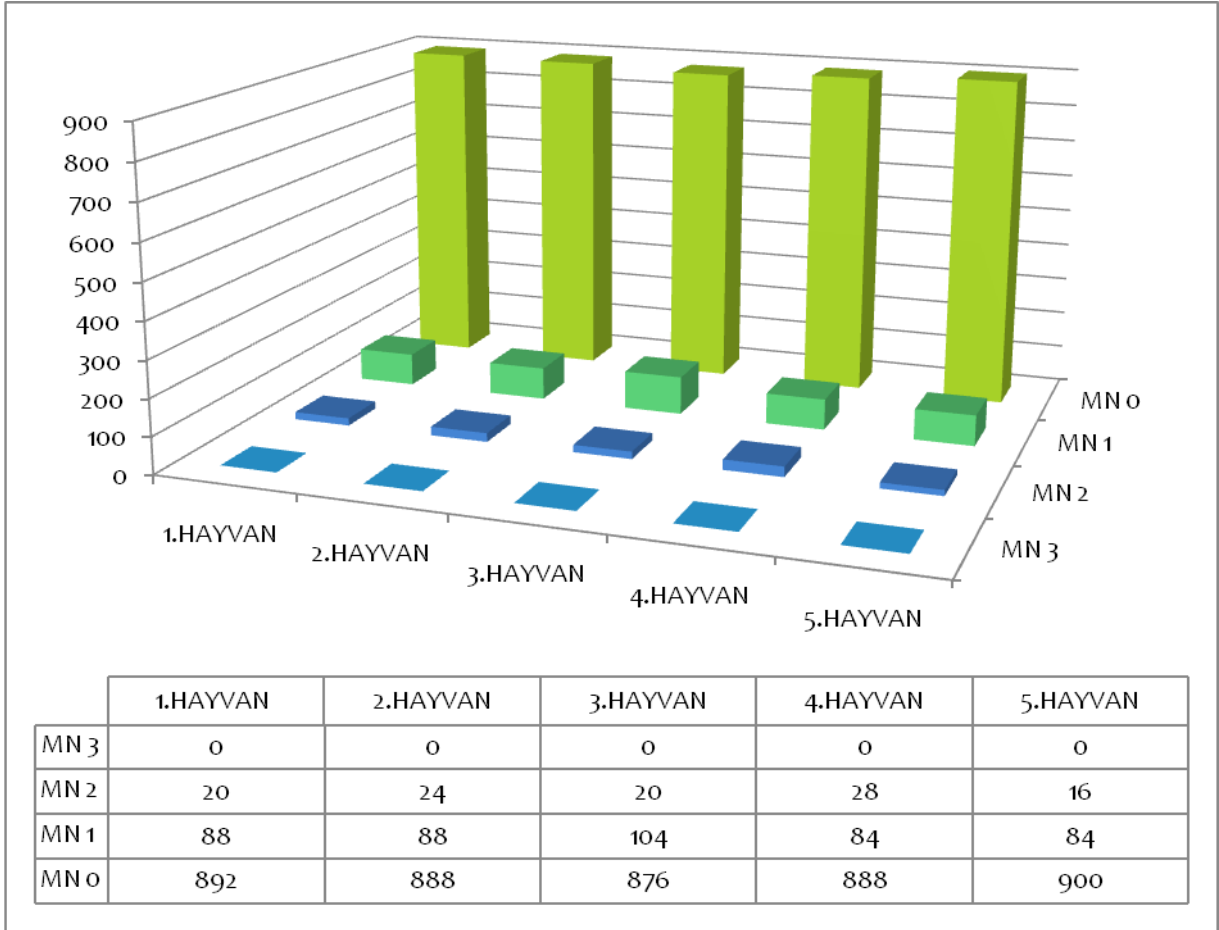
Quercetin uygulaması yapıldıktan 24 saat sonra hayvanlardaki MN sıklıkları ve dağılımı Şekil 20’de verildi.



Şekil 20. T5 Tedavi grubuna (25µM QN- 24 saat) ait mikronukleus dağılımları

Quercetin uygulaması yapıldıktan 2 saat sonra örnek alınan grupta hayvan başına 1000 adet PCE sayıldı. Hücrelerde belirlenen MN sayıları sırasıyla 28 ± 5.3 , 28 ± 5.3 , 32 ± 5.6 , 32 ± 5.6 , 32 ± 5.6 olarak bulundu. Popülasyon içerisinde en düşük Varyans/ortalama 0.9 en yüksek Varyans/ortalama 1.2 olarak belirlendi, % 95 güven aralığında en düşük alt limit 18.7, en yüksek üst limit 44.9 olarak bulundu.

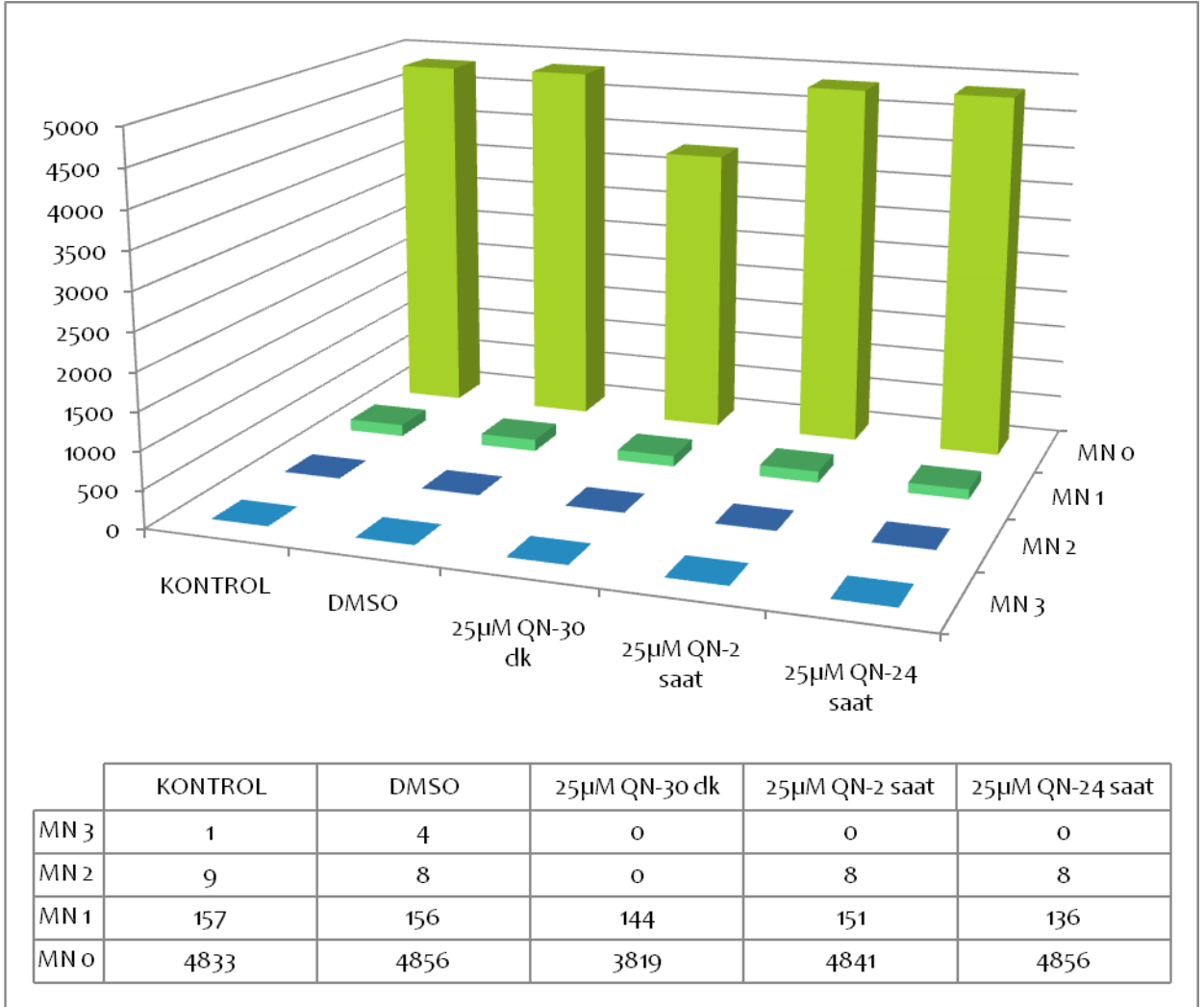
Quercetin uygulaması yapıldıktan 24 saat sonra 2 Gy radyasyona maruz bırakılan hayvanlardaki MN sıklıkları ve dağılımı Şekil 21’de verildi.



Şekil 21. TQ6 Tedavi grubuna (25µM QN- 24 saat+ 2 Gy) ait mikronukleus dağılımları

Quercetin uygulaması yapıldıktan 24 saat sonra 2 Gy radyasyon ile ışınlanan grupta hayvan başına 1000 adet PCE sayıldı. Hücrelerde belirlenen MN sayıları sırasıyla 128 ± 11.3 , 136 ± 11.6 , 144 ± 12 , 140 ± 11.8 , 116 ± 10.7 olarak bulundu. Popülasyon içerisinde en düşük Varyans/ortalama 1.1 en yüksek Varyans/ortalama 1.2 olarak belirlendi, % 95 güven aralığında en düşük alt limit 96.8, en yüksek üst limit 167.3 olarak bulundu.

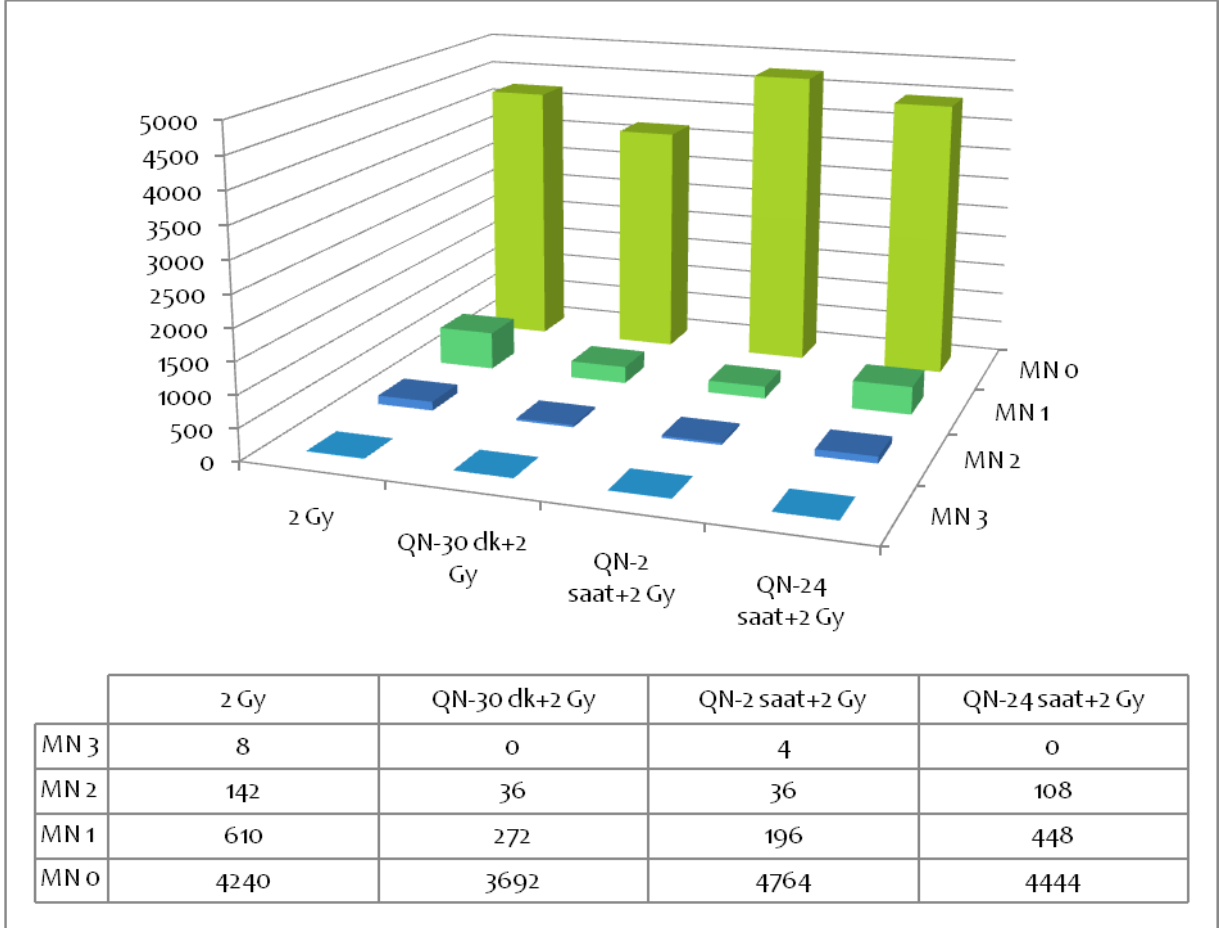
Farklı sürelerde uygulanan Quercetin ve çözücü olarak kullanılan DMSO'nun doğal MN sıklıkları üzerine etkileri Şekil 22'de verildi.



Şekil 22. Kontrol, Quercetin (30 dk- 2 saat- 24 saat) ve DMSO uygulanan gruplarda mikronukleus sıklıkları

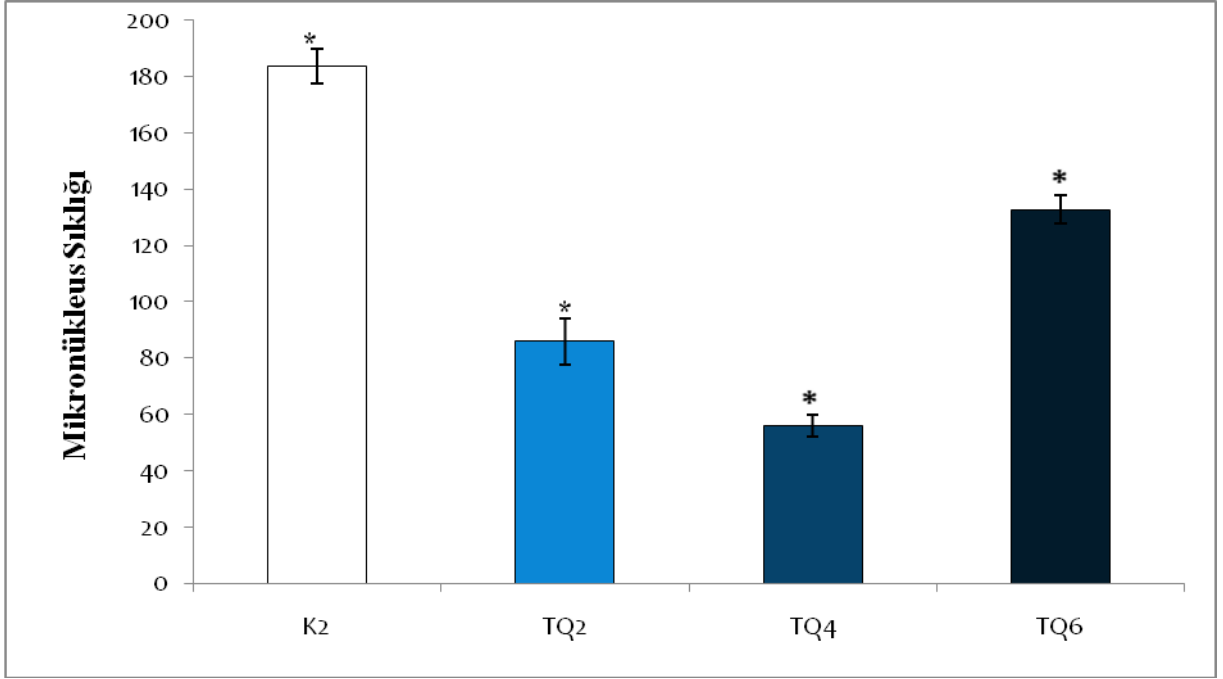
Kontrol, Quercetin (30 dk- 2 saat- 24 saat) ve DMSO uygulanan gruplarda grup başına 5000 adet PCE sayıldı. Hücrelerde belirlenen MN sayıları sırasıyla 35.6 ± 2.7 , 36.8 ± 2.7 , 36 ± 3 , 33.4 ± 2.6 , 30.4 ± 2.5 olarak bulundu.

2 Gy dozunda radyasyon uygulanan gruplarda, farklı sürelerde uygulanan Quercetin'in MN sıklıkları üzerindeki etkileri Şekil 23'de verildi. Çalışmada en etkili zamanın Quercetin uygulamasından 2 saat sonra olduğu belirlendi.



Şekil 23. 2 Gy ışına maruz bırakılan hücrelerde, farklı zaman aralıklarında Quercetin uygulamanın mikronukleus sıklığına etkisi

2 Gy ışına maruz bırakılan hücrelerde, farklı zaman aralıklarında Quercetin uygulanan gruplarda grup başına 5000 adet PCE sayıldı. Hücrelerde belirlenen MN sayıları sırasıyla 183.6 ± 6.1 , 86 ± 4.6 , 56 ± 3.3 , 132.8 ± 5.1 olarak bulundu.



Şekil 24. Farklı zamanlarda Quercetin uygulanmasının mikronükleus sıklıklarına etkisi

(K2_{kontrol 2Gy}, TQ2_{QN-30 dk+2 Gy}, TQ4_{QN-2 saat+2 Gy}, TQ6_{QN-24 saat+2 Gy})

*Ortalamalar istatistik olarak farklıdır. Tek yönlü- ANOVA, Duncan test $p \leq 0.05$ (Şekil 25)

Farklı sürelerde Quercetin uygulanan TQ2, TQ4 ve TQ6 gruplarında 2 Gy'lik dozun MN oluşumunu düşürdüğü gözlemlendi. MN sayısında en fazla düşüş 2 saat önce Quercetin uygulanan grupta, en az düşüşün ise 24 saat önce Quercetin uygulanan grupta olduğu gözlemlendi ($p \leq 0.05$).

Kontrol ve tedavi grupları arasındaki 1000 hücrede belirlenen toplam MN dağılım ortalamaları karşılaştırıldı. Sonuçlar Tablo 2'de verildi.

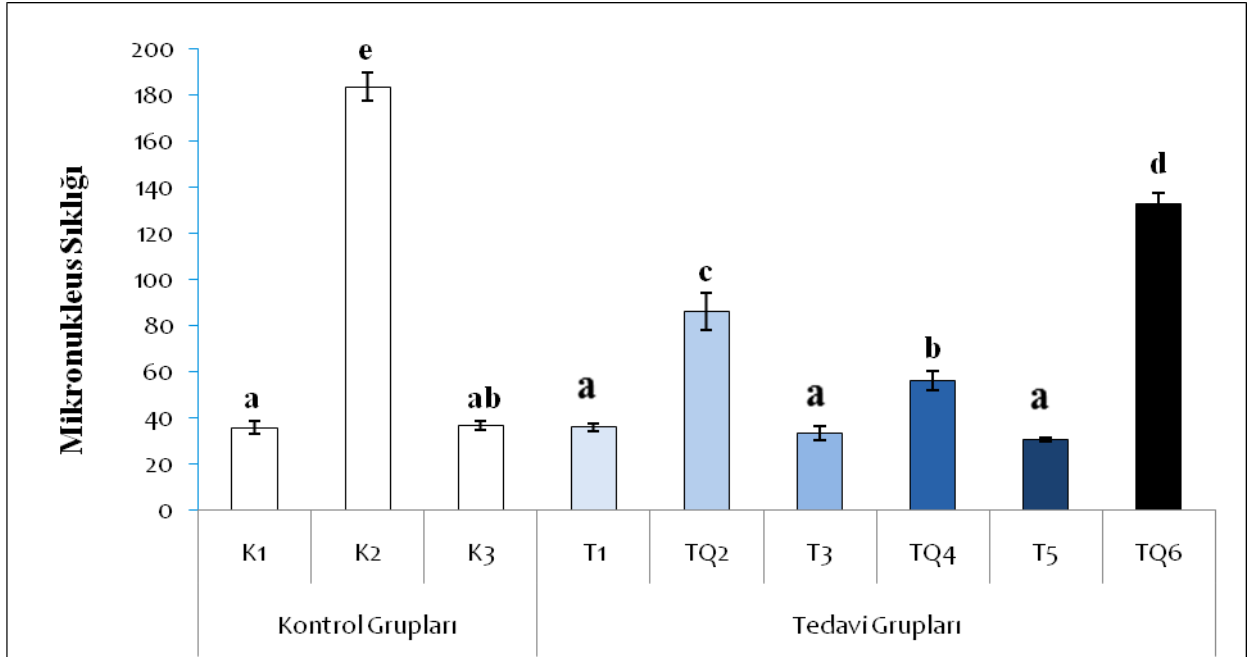
Tablo 2. Kontrol ve tedavi gruplarında 1000 hücrede belirlenen toplam mikronukleus dağılım yüzdesi (Ortalama±Standart hata) ve minimum-maksimum değerleri

Gruplar	N*	Ortalama±SH**	Minimum	Maksimum
K1	5	35.60±2.87	29	44
K2	5	183.60±6.08	172	204
K3	5	36.80±1.98	32	44
T1	4	36.00±1.63	32	40
TQ2	4	86.00±8.24	64	104
T3	5	33.40±2.95	28	44
TQ4	5	56.00±4.00	44	68
T5	5	30.40±0.98	28	32
TQ6	5	132.80±4.96	116	144
Total	43	70.48±8.14	28	204

N*: Birey sayısı

SH:** Standart Hata

Kontrol grupları ve tedavi gruplarında yapılan sayım sonucu toplam MN sayıları karşılaştırıldı. Sonuçlar Şekil 25’te verildi.



Şekil 25. Kontrol grupları ve tedavi grupları sonuçlarının karşılaştırılması (K1_{kontrol 0}, K2_{kontrol 2Gy}, K3_{kontrol DMSO}, T1_{QN-30 dk}, TQ2_{QN-30 dk+2 Gy}, T3_{QN-2 saat}, TQ4_{QN-2 saat+2 Gy}, T5_{QN-24 saat}, TQ6_{QN-24 saat+2 Gy})

- Farklı harf ile gösterilen ortalamalar istatistik olarak farklıdır. Tek yönlü- ANOVA, Duncan test $p \leq 0.05$

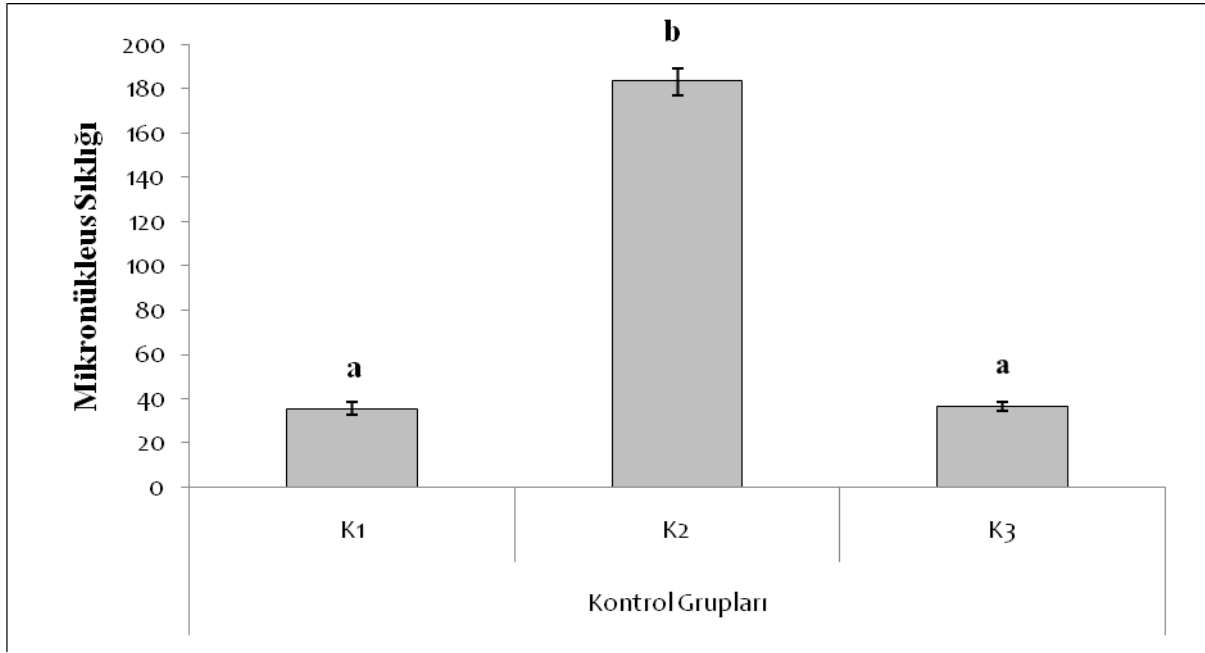
Tablo 3. Toplam mikronukleus sıklığı tek yönlü varyans analizi

	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F	Önem Seviyesi
Gruplar Arası	116828.344	8	14603.543	174.930	.000
Gruplar Dışı	2838.400	34	83.482		
Toplam	119666.744	42			

K1 Kontrol grubu ile farklı sürelerde Quercetin uygulanan T1, T3, T5 tedavi gruplarının toplam MN sayıları bakımından karşılaştırıldığında istatistiksel olarak aynı gruba girdiği, QN uygulandıktan 30 dk, 2 saat ve 24 saat sonrasında 2 Gy ışınlama yapılan TQ2,

TQ4, TQ6 tedavi gruplarının ise ayrı bir grup oluşturduğu belirlendi. Bunlar içinde 2 Gy ışınlanmadan 2 saat önce QN uygulanan TQ4 tedavi grubunun toplam MN sayısı bakımından K3 Kontrol grubu ile aynı grupta yer aldığı ancak diğer tüm gruplardan istatistik olarak önemli derecede ayrıldığı belirlendi (Tablo 3) (F:174.93; sd:8,42; $p=0.0001$, tek yönlü ANOVA).

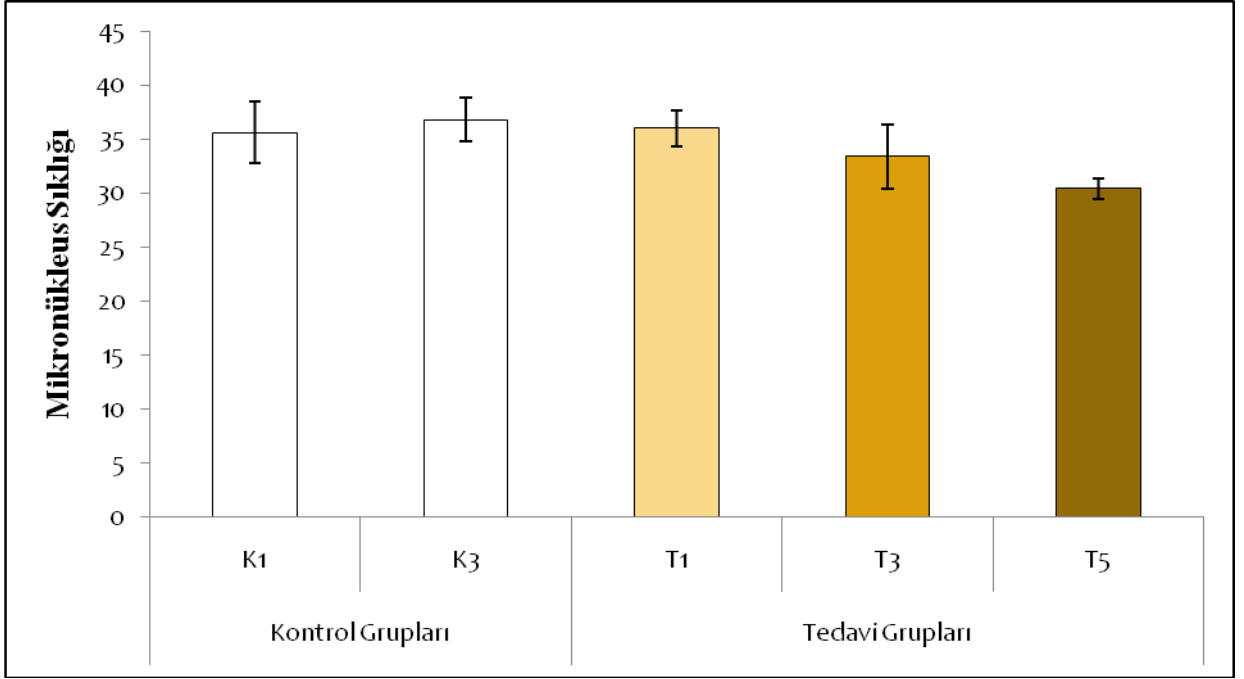
Doğal MN sıklıkları, Quercetin'i çözümede kullanılan DMSO ve 2 Gy ışın almış olan kontrol gruplarında araştırıldı. Toplam MN sayıları bakımından değerlendirildiğinde K1 Kontrol grubu ve K3 Kontrol grubunun arasında istatistiksel olarak bir fark olmadığı, K2 Kontrol grubunun ise istatistik olarak önemli seviyede ayrı bir grup oluşturduğu gözlemlendi (F:441.982; df:2,14; $p=0.001$). Toplam MN sayısının 2 Gy ışın almış olan K2 Kontrol grubunda en yüksek seviyeye ulaştığı belirlendi. Sonuçlar Tablo 2 ve Şekil 26'da verildi.



Şekil 26. Kontrol gruplarının toplam mikronükleus sayısının karşılaştırılması (K1_{kontrol 0}, K2_{kontrol 2Gy}, K3_{kontrol DMSO})

- Farklı harf ile gösterilen ortalamalar istatistik olarak farklıdır. Tek yönlü- ANOVA, Duncan test $p \leq 0.05$ (Şekil 26)

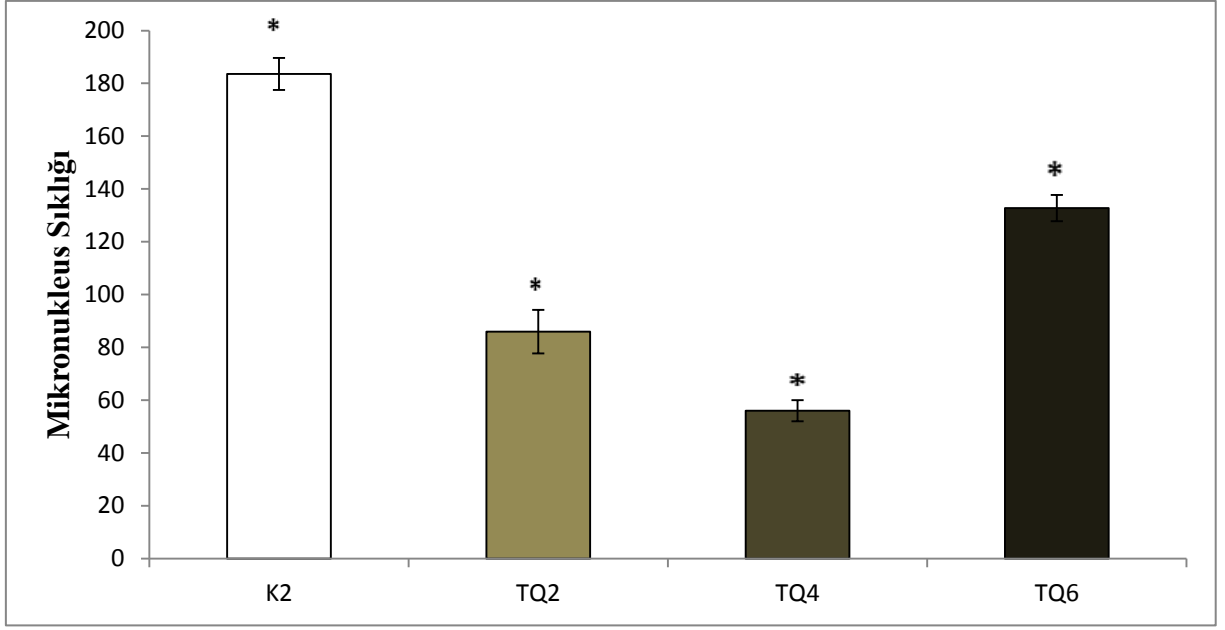
Çözücü olarak kullanılan DMSO'nun ve farklı sürelerde uygulanan Quercetin'in doğal sıklığa etkisi araştırıldı. Toplam MN sayıları bakımından değerlendirildiğinde K1 Kontrol grubu ve K3 Kontrol grubu ile sırasıyla 30 dk, 2 saat ve 24 saat öncesinde Quercetin uygulanan T1, T3, T5 tedavi gruplarının aynı gruba girdiği belirlendi (F:1.325; sd:4,23; $p=0.297$). Sonuçlar Tablo 2 ve Şekil 27'de verildi.



Şekil 27. Kontrol grupları ve Quercetin tedavisi uygulanmış grupların sonuçlarının karşılaştırılması (K1_{kontrol 0}, K3_{kontrol DMSO}, T1_{QN-30 dk}, T3_{QN-2 saat}, T5_{QN-24 saat})

Sonuç olarak, toplam MN sayısı bakımından değerlendirildiğinde farklı sürelerde (30 dk, 2 saat, 24 saat) kullanılan Quercetin tedavi grupları ile herhangi bir uygulama yapılmayan K1 Kontrol grubu arasında anlamlı bir fark olmadığı gözlemlendi ($p>0,05$).

Hayvanlar Quercetin varlığında farklı sürelerde 2 Gy'lik Co-60 gama ışınına maruz bırakıldı. Toplam MN sayıları bakımından değerlendirildiğinde K2 Kontrol grubu (2 Gy) ve Quercetin uygulandıktan 30 dk, 2 saat ve 24 saat sonra 2 Gy ışınlama yapılan TQ2, TQ4, TQ6 tedavi gruplarının istatistik olarak farklı gruplara girdiği gözlemlendi ($p\leq 0,05$). Toplam MN sayısının her üç deneme grubunda da azaldığı belirlendi. Ancak en yüksek etki Quercetin uygulandıktan 2 saat sonra 2 Gy ışınlama yapılan TQ4 tedavi grubunda, en az etki ise Quercetin uygulandıktan 24 saat sonra 2 Gy ışınlama yapılan TQ6 deneme grubunda gözlemlendi. Sonuçlar Tablo 2, Şekil 28'de verildi.



Şekil 28. 2 Gy'lik radyasyon uygulaması sonucu MN sıklığı karşılaştırılması (K2_{kontrol 2Gy}, TQ2_{QN-30 dk+2 Gy}, TQ4_{QN-2 saat+2 Gy}, TQ6_{QN-24 saat+2 Gy})

*Ortalamalar istatistik olarak farklıdır. Tek yönlü- ANOVA, Duncan test $p \leq 0.05$ (Şekil 28)

Kontrol ve tedavi grupları arasındaki MN dağılım ortalamaları karşılaştırılmıştır. Sonuçlar Tablo 4'de verilmiştir.

Tablo 4. Kontrol ve tedavi grupları arasındaki 1000 hücrede belirlenen mikronukleus dağılım yüzdesi (Ortalama±Standart hata)

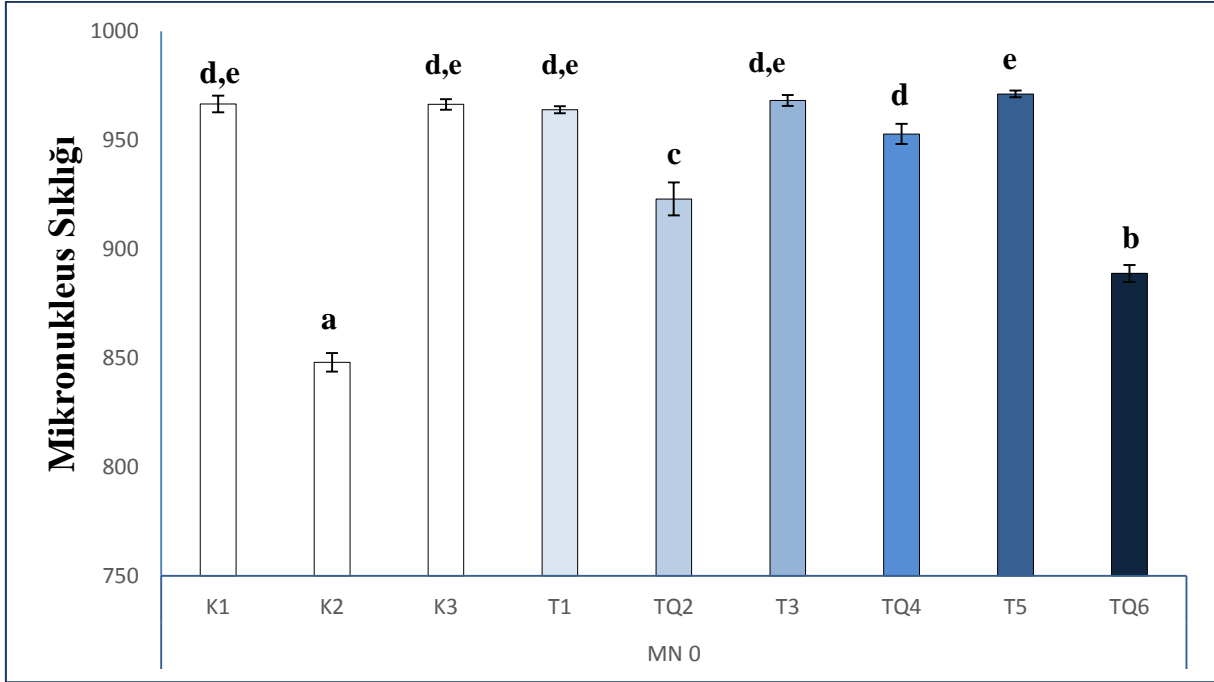
Gruplar	MN Dağılımı “0”	MN Dağılımı “1”	MN Dağılımı “2”	MN Dağılımı “3”
	*‡	*‡	*‡	†
1. Kontrol (n=5)	966.60±3.76	31.40±4.60	1.80±0.96	0.20±0.20
2. Kontrol (n=5)	848.00±4.19	122.00±3.46	28.40±1.32	1.60±0.97
3. Kontrol (n=5)	966.40±2.42	31.20±2.95	1.60±0.97	0.80±0.80
1. Grup (n=4)	964.00±1.63	36.00±1.63	0±0	0±0
2. Grup (n=4)	923.00±7.54	68.00±7.65	9.00±2.51	0±0
3. Grup (n=5)	968.20±2.45	30.20±2.28	1.60±0.97	0±0
4. Grup (n=5)	952.80±4.63	39.20±4.96	7.20±1.49	0.80±0.80
5. Grup (n=5)	971.20±1.49	27.20±2.33	1.60±0.97	0±0
6. Grup (n=5)	888.80±3.87	89.60±7.70	21.60±2.03	0±0
P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.05
χ²	34,13	32,10	34,29	7,96

*: Tek Yönlü (ANOVA) Varyans Analizi ile değerlendirildi.

†: Kruskal Wallis test ile değerlendirildi.

‡: Gruplar arası karşılaştırmalar Tukey testi ile yapıldı.

K1 ve K3 Kontrol grubu mikronukleus içermeyen (MN0) hücre sayıları bakımından, 30 dk ve 2 saat öncesinde Quercetin uygulanan T1, T3 tedavi grupları ile aynı gruba girdiği; K2 Kontrol grubu, 2 Gy ışınlamadan 30 dk önce Quercetin uygulanan TQ2, 2 Gy ışınlamadan 24 saat önce Quercetin uygulanan TQ6 ve 24 saat önce Quercetin uygulanan T5 tedavi gruplarının ayrı bir grup oluşturduğu belirlendi (Tablo 4, Şekil 29) (F:5.349; sd:1,9 $p=0.49$, tek yönlü ANOVA, Duncan Testi).



Şekil 29. Tüm kontrol ve tedavi gruplarının mikronukleus içermeyen (MN0) hücre sayıları bakımından karşılaştırılmaları (K1_{kontrol 0}, K2_{kontrol 2Gy}, K3_{kontrol DMSO}, T1_{QN-30 dk}, TQ2_{QN-30 dk+2 Gy}, T3_{QN-2 saat}, TQ4_{QN-2 saat+2 Gy}, T5_{QN-24 saat}, TQ6_{QN-24 saat+2 Gy})

- Farklı harf ile gösterilen ortalamalar istatistik olarak farklıdır. Tek yönlü- ANOVA, Duncan test $p \leq 0.05$

Mikronukleus içermeyen hücre sayısı (MN0) bakımından karşılaştırıldığında herhangi bir uygulama yapılmayan K1 Kontrol grubu ile çözücü olarak kullandığımız DMSO uygulaması yapılan K3 Kontrol grubu arasında istatistik bir fark belirlenmedi. ($p > 0.05$). Başka bir ifade ile çözücü olarak kullandığımız DMSO'nun MN oluşumunu etkilemediği belirlendi. Ayrıca K1 ve K3 Kontrol grubu ile T1 ve T3 Tedavi grubu arasında da mikronukleus içermeyen hücre sayısı (MN0) sayısı bakımından anlamlı bir fark olmadığı gözlemlendi ($p > 0.05$). Bu sebeple 25 μ M konsantrasyonda kullandığımız Quercetin'in MN oluşumuna etkide bulunmadığı düşünülmektedir.

Çalışma bulgularımıza göre mikronukleus içermeyen hücre sayısı (MN0) bakımından; TQ4 ve T5 Tedavi grubu arasında istatistik bir fark saptanmadı. Yani 2 Gy radyasyon uygulamasından 2 saat önce Quercetin verilen grup ile radyasyon uygulanmayan, 24 saat öncesinde Quercetin verilen grupta aynı etki oluştu ve sağlam hücre sayısı arasında istatistik bir fark oluşmadığı belirlendi ($p>0.05$).

Tek mikronukleus içeren (MN1) hücrelerin sayısı bakımından karşılaştırıldığında K1 ve K3 Kontrol grubunun sırasıyla 30 dk, 2 saat ve 24 saat öncesinde Quercetin uygulanan T1, T3, T5 tedavi grupları ve QN uygulamasından 2 saat sonra 2 Gy ışınlama yapılan TQ4 tedavi grubu ile aynı gruba girdiği belirlendi ($p>0.05$).

K2 kontrol grubu ile Quercetin uygulanan TQ2 ve TQ6 tedavi grupları arasında istatistik olarak bir fark olduğu belirlendi ($p\leq 0.05$). Bunlar içinde en yüksek MN1 oranı K2 Kontrol grubunda olduğu gözlemlendi (Tablo 4-5) .

Tek mikronukleus içeren (MN1) hücrelerin sayısı bakımından kontrol gruplarından K1 ve K3, tedavi gruplarından 30 dk ve 2 saat öncesinde Quercetin uygulanan T1, T3, Quercetin uygulamasından 2 saat sonra 2 Gy ışınlama yapılan TQ4 tedavi grubu ve 24 saat öncesinde Quercetin uygulanan T5 tedavi grubu arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0.05$). Bu sonuçlara göre; ışınlamadan 2 saat önce verilen 25 μ M Quercetin'in tekli MN oluşumunu azalttığı ve ışın uygulaması yapılmayan tedavi grupları ile aynı grup içerisine girdiği belirlendi.

Tablo 5. Kontrol ve tedavi gruplarının tek mikronukleus içeren (MN1) hücre dağılım yüzdesi (Ortalama \pm Standart hata)

Kontrol Grupları	1.Kontrol (n=5)	2.Kontrol (n=5)	3.Kontrol (n=5)			
MN Dağılımı "1"	31.40 \pm 4.60	122.00 \pm 3.46	31.20 \pm 2.95			
Tedavi Grupları	1.Grup T1(n=5)	2.Grup TQ2(n=5)	3.Grup T3(n=5)	4.Grup TQ4(n=5)	5.Grup T5(n=5)	6.Grup TQ6(n=5)
MN Dağılımı "1"	36.00 \pm 1.63	68.00 \pm 7.65	30.20 \pm 2.28	39.20 \pm 4.96	27.20 \pm 2.33	89.60 \pm 7.70

Çift mikronukleus içeren (MN2) hücre sayısı bakımından karşılaştırıldığında K1 ve K3 Kontrol grubu, sırasıyla 30 dk, 2 saat ve 24 saat öncesinde Quercetin uygulanan T1, T3 tedavi grupları ile aynı gruba girdiği belirlendi K2 Kontrol grubu, 2 Gy ışınlamadan 30 dk önce Quercetin uygulanan TQ2, 2 Gy ışınlamadan 2 saat önce Quercetin uygulanan TQ4, 2 Gy ışınlamadan 24saat önce Quercetin uygulanan TQ6 tedavi gruplarının ayrı bir grup oluşturduğu belirlendi (F:9.170; sd:1,9 $p=0,016$, tek yönlü ANOVA, Duncan Test $p<0.05$). Bunlar içinde TQ2 tedavi grubunun çift mikronukleus içeren hücre sayısı bakımından TQ4 tedavi grubu ile aynı grupta yer aldığı belirlendi ($p>0.05$) (Tablo 4-6).

Tablo 6. Kontrol ve tedavi gruplarının çift mikronukleus içeren (MN2) hücre dağılım yüzdesi (Ortalama±Standart hata)

Kontrol Grupları	1.Kontrol (n=5)	2.Kontrol (n=5)	3.Kontrol (n=5)			
MN Dağılımı “2”	1.80±0.96	28.40±1.32	1.60±0.97			
Tedavi Grupları	1.Grup T1(n=5)	2.Grup TQ2(n=5)	3.Grup T3(n=5)	4.Grup TQ4(n=5)	5.Grup T5(n=5)	6.Grup TQ6(n=5)
MN Dağılımı “2”	0.00±0.00	9.00±2.51	1.60±0.97	7.20±1.49	1.60±0.97	21.60±2.03

3 mikronukleus içeren (MN3) hücre sayısı bakımından karşılaştırıldığında K1 Kontrol grubunun; sırasıyla 30 dk, 2 saat ve 24 saat öncesinde Quercetin uygulanan T1, T3, T5 tedavi grupları ve Quercetin uygulamasından 30 dk ve 24 saat sonra 2 Gy ışınlatma yapılan TQ2, TQ6 tedavi grupları ile aynı gruba girdiği bulundu ($p>0.05$)

K2 Kontrol grubu, K3 Kontrol grubu ve Quercetin uygulamasından 2 saat sonra 2 Gy ışınlatma yapılan TQ4 tedavi grubu ayrı bir grup oluşturdu. Bunlar içinde K3 Kontrol grubunun 3 mikronukleus içeren hücre sayısı bakımından Quercetin uygulamasından 2 saat sonra 2 Gy ışınlatma yapılan TQ4 tedavi grubu ile aynı grupta yer aldığı belirlendi (Tablo 4-7) (F:0.529; sd:1,9 $p=0.488$, tek yönlü ANOVA).

Tablo 7. Kontrol ve tedavi gruplarının 3 mikronukleus içeren (MN3) hücre dağılım yüzdesi(Ortalama±Standart hata)

Kontrol Grupları	1.Kontrol (n=5)	2.Kontrol (n=5)	3.Kontrol (n=5)			
MN Dağılımı "3"	0.20±0.20	1.60±0.97	0.80±0.80			
Tedavi Grupları	1.Grup T1(n=5)	2.Grup TQ2(n=5)	3.Grup T3(n=5)	4.Grup TQ4(n=5)	5.Grup T5(n=5)	6.Grup TQ6(n=5)
MN Dağılımı "3"	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	.80±0.80	0.00±0.00	0.00±0.00

TARTIŞMA

Çalışmamızda kanser tedavi yöntemlerinden biri olan radyoterapi üzerinde durulmuştur. Günümüzde kanser hastalarında standart tedavi seçenekleri cerrahi, radyoterapi, kemoterapi ve immunoterapidir. Bu tedavi yöntemlerinden radyoterapi kanserin hem erken evresinde, hem de metastatik evrede sıkça kullanılan tedavi şeklidir. İyonlaştırıcı radyasyonun tümörlerdeki biyolojik cevabı DNA hasarı, sinyal iletiminin zayıflaması ve tümör mikro çevresinde değişim şeklinde olmaktadır (105,106). Yüksek doz iyonlaştırıcı radyasyon tümör hücrelerinin ölmesini, lokalize veya metastatik olan tümörlerin kontrolünü sağlar (18,19,107). Radyoterapide kanser hücrelerinin bölünmesini engellemek için iyonizan radyasyon kullanılır. Tedavi sırasında, tümörlü bölgeye X ve gamma ışınları ile belirli bir oranda enerji verilmektedir. Bunun amacı, tümörlü hücrenin genetik materyalini (DNA) bozmak, bölünmelerini engelleyerek mitotik hücre ölümünü ya da apoptozis ile hücre ölümünü sağlamaktır (108). Radyoterapide hedef volüm ışınlanması sırasında normal dokunun da ışınlanması kaçınılmazdır (109). Radyasyon tümörlü hücrelerin yanı sıra sağlıklı hücrelerin de hasar görmesine neden olabilir. Fakat sağlıklı hücreler çeşitli tamir mekanizmaları ile yeniden fonksiyonel hale gelebilirler (110,111). İyonlaştırıcı radyasyon hücre DNA'sında iki farklı etki yapabilir. Bunlardan birincisi DNA'yı oluşturan bazların arasındaki kimyasal bağları iyonize ederek DNA zincirinin doğrudan kırılması diğeri de hücre içerisinde bulunan su moleküllerini iyonlaştırarak ortaya çıkan serbest radikaller ile dolaylı olarak DNA'nın yapısında elektron kopması ile kırıklar oluşturmasıdır (10,108,112). Bu durum kanser hücresinde olduğu gibi sağlam dokularda da görülmektedir. Bu sebeple radyoterapi uygulamasında doz seçimi önemlidir. Kim ve ark. (1997) yaptıkları çalışmada farklı dozda

(100, 200, 400 cGy) gamma ışını uygulanan 4 türün (insan, keçi, tavşan, fare) lenfositlerinde sitokinezi bloke edilmiş MN'leri incelemiştir. Her donörde radyasyon sonrası yapılan ölçümler MN frekansının doza bağımlı olarak arttığını göstermiştir (113). 5 grup fareye sırasıyla 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 Gy gama ışını uygulanan başka bir çalışmada, femur kemik iliğindeki polikromatik eritrosit hücrelerinde mikronukleuslu PCE frekansının uygulama gruplarında, kontrol gruplarına göre anlamlı derecede yüksek çıktığı belirlenmiştir. Ayrıca mikronukleuslu PCE frekansının radyasyon dozu ile orantılı olarak arttığı belirtilmiştir (114). Bu bilgiler ışığında çalışmamızda doku ve hücre hasarına sebep olan 2 Gy dozu seçildi.

İyonlaştırıcı radyasyon gibi fiziksel bir mutajene maruz kalan canlı hücrelerinde MN oluşumu meydana gelmektedir (27). Çalışmamızda bu DNA hasarları MN yöntemi ile araştırıldı. MN sayısındaki artış, çeşitli ajanların hücrelerde oluşturduğu sayısal ve yapısal kromozom düzensizliklerinin indirekt göstergesi olarak değerlendirilmektedir. Bu nedenle hücrelerde MN sayısında artış saptanması somatik hücrelerdeki genomik kararsızlığın bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (28,29). Mikronukleus gerek gözlemsel, gerek hızlı sonuç verebilmesi gerekse yüksek doğruluğu sebebiyle gereksinimleri karşılayan bir yöntemdir. Mikronukleus çalışmaları insan periferik kan lenfositlerinde, sıçan periferik kanı, dalak ve kemik iliği gibi birçok dokuda çalışılmıştır (30). In vivo MN çalışmalarında periferik kan daha az değişiklik gösterdiğinden daha iyi sonuçlar vermektedir. Fakat kemiricilerde dalak, mikronukleus taşıyan PCE'leri seçici olarak uzaklaştırdığı için MN çalışmalarında kemiriciler kullanıldığı zaman çalışmada dolaşım kanı yerine kemik iliği tercih edilmektedir (30,115,116). Bu kapsamda yapılan çalışmada *Sprague Dawley* ırkı sıçanlar kullanıldı. Önceki çalışmalarda daha başarılı sonuçlar alındığı için kemik iliği eritrositleri tercih edildi.

Yapılan çalışmada hayvanlara 2 Gy radyasyon uygulandı. Uygulama sonucunda MN sıklıkları 183.6 ± 6.08 olarak belirlendi. Belirlenen bu sıklıklar kontrole göre (35.60 ± 2.87) anlamlı derecede yüksek bulundu. Shahidi ve ark. (2003) yaptıkları çalışmada çalışmamıza benzer şekilde Balb/c erkek farelerde 2 Gy gamma radyasyonu ile ışınlama yapmışlar ve ışınlamadan 24 saat sonra kemik iliği eritrositlerinde MN frekansı belirlenmiştir. Araştırmacılar sonuç olarak gamma radyasyonu tek başına uygulandığında kontrole göre MN sıklığının artmasına ve hücre çoğalma oranında azalmaya neden olduğunu rapor etmişlerdir (117). Bulgularımızı destekleyen bir diğer çalışmada Bilwade ve ark. (2004) 4 farklı dozda (0.125, 0.25, 0.50, 1 Gy) radyasyon uyguladığı 7 farklı doğal suştan farelerin kemik iliğindeki MN sıklığının en düşük doz olan 0.125 Gy de bile kontrole göre anlamlı bir artışa neden olduğunu bildirmişlerdir (118).

İyonize edici radyasyon yüksek dozlarda uygulandığı zaman pek çok sistem, organ ve doku üzerinde toksik etkilere neden olarak organizmaya zararlar vermektedir. Radyasyon hücrelerde serbest radikaller ve ROS oluşturur ve bu oluşumlar DNA, membran lipidleri ve proteinler gibi hayati hücresel hedeflere zarar verir (40,111,119). Buna karşın canlı organizmalar, karsinojenlere maruz kalınması nedeniyle dokularda meydana gelen ROS ve serbest radikallerin yıkıcı etkilerine karşı korunmak için çeşitli mekanizmalar geliştirmişlerdir (32,40,46). Serbest radikallerin neden olduğu oksidasyonları önleyen veya geciktiren, serbest radikalleri tutma ve stabilize etme özelliği olan antioksidan maddeler (40-43) karsinojenlerin, ilaçların ve toksik radikal reaksiyonların istenmeyen etkilerine karşı hücreleri korurlar (44). Doğal olarak oluşan antioksidanlar, serbest radikalleri süpürme ya da reaksiyonlarını nötralize etme yeteneklerinden dolayı etkili radyoprotektörlerdir. Bu doğal radyoprotektif bileşikler kanser tedavisinde radyoterapi amaçlı, nükleer kazalarda temizleme operasyonları ve tanı amaçlı görüntüleme nedeniyle de büyük ilgi uyandırmaktadırlar (18,119).

Flavonoidler doğal bileşiklerdir. Potansiyel radyoprotektörler olan flavonoidlerin kullanımı antioksidan aktivitesi ve diyetlerdeki bolluğu nedeniyle gün geçtikçe ilgi odağı olmasını sağlamaktadır (111,120). Flavonoid grubu kimyasalların antioksidan özellikleri nedeniyle kanser hastalarında tamamlayıcı tedavi olarak önerilebileceğini gösteren çalışmalar mevcuttur (71,121). Bu flavonoidlerin başında gelen Quercetin birçok bitki ve bitkisel besin kaynaklarında yaygın olarak bulunur ve popüler bir diyetsetel tamamlayıcı olarak kullanılmaktadır (31,74,75). Quercetin içerdiği aktif OH⁻ grupları sebebiyle reaktif O⁻ türleri hile çok hızlı bir şekilde reaksiyona girebilmekte ve onların hücreye verdiği hasarı azaltabilmektedir, bu özelliği nedeniyle güçlü bir antioksidandır. Bu sayede hücreleri serbest radikallerle oluşan hasarlardan koruduğu çeşitli araştırmalarda bildirilmiştir (120,122). Bu durumda Quercetin'in radyasyon gibi karsinojenler nedeniyle oluşabilecek serbest radikalleri azaltıp radyasyondan koruyucu bir etki göstermesi beklenmektedir. Bütün bu özelliklerinden dolayı kanser hastalarında uygulanan radyoterapi ve/veya kemoterapi gibi tedavilerden önce hastalara Quercetin ile yoğun diyet uygulanması gerekliliği akla gelmektedir.

Benkoviç ve ark. (2008) propolis ve flavonoidlerin radyoprotektif etkisini incelemek için fareleri 4 ve 9 Gy dozlarında ışınlamışlar ve radyasyon öncesi verilen propolis ve flavonoidlerin fareleri tüm vücut ışınlamasının letal etkilerinden koruduğunu ve birincil DNA hasarını indirgediğini bildirmişlerdir (111). Benzer bir çalışmada 4 Gy radyasyona maruz bırakılan insan lenfosit hücrelerine Quercetin uygulaması yapılmış ve MN sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlemlendiğini belirtmiştir. Bu çalışma ile Quercetin'in iyonize radyasyonun neden olduğu DNA hasarına karşı istatistiksel olarak anlamlı düzeyde

bir koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir (120). Literatür bilgilerinde verilen bu koruyucu etkisi ve en etkili konsantrasyonun 24 µM olması nedeni ile çalışmamızda 25µM Quercetin kullanıldı (122).

Daha önce yapılan araştırmalarda Quercetin'in radyoprotektif etkisi belirtilmesine rağmen radyasyon uygulamasından ne kadar süre önce verilmesi gerektiğine dair herhangi bir çalışmaya rastlanılmadı (120,122). Bu sebeple çalışmamızda kanser tedavisine destek olarak kullanılan Quercetin'in uygun dozda (25µM) kullanılarak radyasyon dozuna etkisinin ve radyasyon uygulaması öncesinde farklı zaman aralıklarında verildiğinde koruyucu etkisinin değişip değişmediğini eğer değiştiriyorsa en etkili olduğu zaman diliminin belirlenmesi amaçladı.

Kontrol grubunda uygulama yapılmamış hücrelerdeki MN sıklıkları yanı sıra çözücü (DMSO) ve 2 Gy radyasyon dozunun MN sıklığına etkisi belirlendi. Uygulama yapılmayan her 5 hayvana ait MN sıklığı ortalaması 35.6±2.8, DMSO uygulanan örneklerin MN sıklığı ortalaması 36.8±1.9 bulunurken, bu değer 2 Gy ışın alan hayvanlarda ise 183.6±6.1 olarak tespit edildi. 2 Gy gamma ışınına ait MN sıklıkları kontrol grubumuzdaki en yüksek değerlere ulaşmakla birlikte (Tablo 2, Şekil 26) uygulama yapılmayan hayvanlardaki MN sıklıkları ile DMSO uygulanan gruplar arasında istatistiksel olarak fark görülmedi ($p>0,05$).

Çalışmamıza göre 30 dk, 2 saat ve 24 saat önce QN verilen gruplardaki toplam MN ortalamaları sırası ile 36±1.6, 33.4±2.9, 3.4±1 olarak belirlendi (Tablo 2). Toplam MN sayıları bakımından değerlendirildiğinde farklı zaman aralıklarında kullandığımız 25 µM konsantrasyondaki Quercetin'in sağlıklı hücrelerde MN sıklığına etki etmediği tespit edildi (Şekil 27).

Kullandığımız flavonoidin antioksidan etkisini araştırmak amacıyla 25 µM konsantrasyondaki Quercetin varlığında farklı sürelerde (30 dk, 2 saat, 24 saat) hayvanlara 2 Gy dozunda Co-60 gamma radyasyonu uygulaması yapıldı. 25 µM Quercetin konsantrasyonu 2 Gy radyasyon uygulaması sonunda 3 farklı sürede de azalmaya neden oldu (Tablo 2, Şekil 29). 2 Gy ışın uygulamasından 30 dk, 2 saat ve 24 saat önce QN verilen gruplardaki toplam MN ortalamaları sırası ile 86±8.2, 56±4, 132.8±5 olarak belirlendi. Toplam MN sayısı her üç tedavi grubunda da azaldı ancak en yüksek etki 2 saat önce Quercetin verilen grupta, en az etki ise 24 saat önce Quercetin uygulanan grupta gözlemlendi (Tablo 2, Şekil 28). Bu sonuç insan periferik kan lenfositlerinde gamma radyasyonuna karşı en koruyucu etkinin 24 µM konsantrasyondaki QN'in olduğunu rapor eden Devipriya ve ark. (122) sonuçlarına paralellik göstermektedir.

Quercetin'in iyonlaştırıcı radyasyona karşı protektif etkisiyle ilgili yapılmış çalışmalar mevcuttur (120,122). Ancak yapılan literatür araştırmasında farklı sürelerde Quercetin uygulanmasının radyoprotektif etkisine katkısı ile ilgili çalışmaya rastlanılmadı. Bizim çalışmamızın sonuçları ile değerlendirildiğinde Quercetin'in radyasyona maruz kalma öncesinde ortamda bulunmasının DNA hasarını azalttığı düşünüldü. Aynı zamanda farklı sürelerde uygulanmasının da radyoprotektif etkisini değiştirdiği belirlendi.

Sonuç olarak, çalışma bulgularımıza göre Quercetin hücrelerde belirlenen MN sıklığını istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaltmaktadır, bu sebeple iyonlaştırıcı radyasyonun sebep olduğu DNA hasarları üzerinde koruyucu bir etkiye sahip olduğu düşünülmektedir.

Bu etki QN'in farklı sürelerde (30 dk, 2 saat, 24 saat) uygulanmasıyla MN sıklığında azalma sağladığı ve 2 saat önce Quercetin uygulaması yapılan grupta MN sıklığındaki azalmanın en üst seviyeye ulaştığı gözlemlendi. Bu durumun Quercetin'in antioksidan özelliği sayesinde serbest radikalleri bağlayarak DNA hasarını azaltması nedeniyle ortaya çıktığı düşünüldü. Farklı sürelerde Quercetin uygulaması yapıldığında radyoprotektif etkisinin süreyle bağımlı olarak değişmesi sebebiyle Quercetin'in vücutta metabolize olma süresi ile koruyucu etkisi arasında bir ilişki olduğu düşünülmektedir. Utesch ve ark.'nın (2008) oral yolla Quercetin uygulaması yapmış olduğu bir çalışmada, total Quercetin'in plazma seviyesi 48 saatlik bir periyotta takip edilmiştir ve Quercetin'in 1 saat sonra sıçan plazmasında maksimum seviyeye ($16.57 \pm 1.64 \mu\text{g/ml}$) ulaştığını, en düşük flavonol miktarının ($1.78 \pm 0.21 \mu\text{g/ml}$) ise uygulamadan 48 saat sonra ölçüldüğünü belirtmişlerdir (123). Bu çalışmanın sonuçları Quercetin'in vücutta metabolize olma süresi ile koruyucu etkisi arasında bağlantı olduğu düşüncemizi destekler niteliktedir. Çalışmamızdaki 2. saatte Quercetin vücutta yüksek seviyede iken maksimum koruma, 24. saatte düşük seviyede iken ise minimum koruma oluşturması da Utesch ve ark.'nın sonuçları ile paralel bulundu.

Radyoterapi esnasında absorblanan dozun doğru bir şekilde uygulanması çok önemlidir. Radyoterapi esnasında amaç tümörlü dokuların yok edilmesinin yanı sıra tümörü çevreleyen sağlıklı dokuya en az zarar verilmesini sağlamaktır. Bu sayede tedavi sonrası ilerleyen zamanlarda ikincil kanserlerle karşılaşılması engellenmelidir (17-19,22).

Çalışmamızda radyasyon uygulanan hayvanlara, uygulamadan iki saat önce Quercetin verilmesinin radyoprotektif etkiyi arttırdığı ve bu sonucun istatistik olarak anlamlı olduğu belirlendi. Bu sonuç bize QN'in normal dokuları radyoterapinin zararlı etkilerinden koruyabildiğini düşündürmektedir. Normal dokuların korunması hastalar için ikincil kanserlerin oluşmasının engellenmesi açısından önemlidir. Fakat bu tedavi yönteminin

(ışınlamadan 2 saat önce QN verilmesi) kanser hücre serilerinde absorblanan dozun etkilerini değiştirip değiştirmediği hakkında sadece çalışma bulgularımızdan yola çıkılarak net bir yorum yapılamayacağı dūřınılmektedir. Yapılan uygulama normal dokuların yanı sıra tūmōr hūcrelerinde absorblanan dozun etkilerini değiştiriyorsa, bu durum radyoterapi alan hastaların tedavisini eksik almasına neden olacaktır. Bu durumda hastaların QN'i kullanmaları, tedavileri açısından olumsuz bir etki yaratabilir. Bu nedenle QN'in radyoprotektif etki mekanizmasının tam olarak anlaşılması için tūmōr oluşturulmuş hayvanlar ile yapılacak ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

SONUÇLAR

Çalışma ile;

- 1- Farklı zaman aralıklarında (30 dk, 2 saat, 24 saat) Quercetin verilen hayvanlardaki mikronukleus sıklıkları araştırıldı ve farklı zaman aralıklarında uygulanan 25µM Quercetin'in mikronukleus sıklığını değiştirmediği belirlendi.
- 2- İyonlaştırıcı radyasyon uygulaması öncesinde farklı zamanlarda verilen Quercetin'in mikronukleus sıklığını nasıl etkilediğini belirlemek için 30 dakika, 2 saat ve 24 saat önce Quercetin verilen ve sonrasında radyasyon uygulanan gruplarda mikronukleus sıklığının bu üç farklı zaman aralığında da azaldiğı gözlemlendi.
- 3- Mikronokleus sıklığında en yüksek seviyedeki azalma radyasyon uygulamasından 2 saat önce Quercetin uygulaması yapılan grupta saptandı
- 4- Çalışmamızda radyasyon öncesi farklı zaman aralıklarında (30 dk, 2 saat, 24 saat) Quercetin uygulanmasının, hücre başına düşen mikronukleus sıklığında azalmaya neden olması, Quercetin'in hücreleri serbest radikallerin zararlı etkilerinden koruyucu etkisinin olabileceğini düşündürdü.
- 5- Farklı zaman aralıklarında Quercetin verilen ve sonrasında radyasyon uygulanan (2 Gy) gruplarda mikronukleus içeren PCE hücre dağılımları araştırıldı ve mikronukleus taşıyan PCE'lerin sayısının farklı zaman aralıklarına göre değişiklik gösterdiğiği, her üç uygulamada da Quercetin belli oranda mikronukleus taşıyan PCE'lerin sayısını azalttığı belirlendi.

- 6- Mikronukleus sayısında en fazla azalmanın 2 saat önce Quercetin uygulanan grupta, en az düşüşün ise 24 saat önce Quercetin uygulanan grupta olduğu gözlemlendi.
- 7- Sonuç olarak radyasyon verilmeden önce yapılacak Quercetin uygulamasının dokularda mikronukleus oluşumu açısından radyoprotektif bir etkisi olduğu belirlendi. Bu sonuç, radyoterapi gören hastaların terapiden 2 saat önce Quercetin almasının normal dokuları radyasyonun etkisinden koruyacağını destekler niteliktedir. Ancak mikronukleus taşıyan PCE'lerin sayısının azalmasındaki temel nedenin tam olarak anlaşılması için tümör oluşturulmuş hayvanlarla yapılacak olan daha ileri çalışmalara gerek olduğu düşünüldü.

ÖZET

Radyoterapide karşılaşılan en önemli zorluklardan bir tanesi uygulama esnasında normal dokuların korunmasıdır. Çünkü radyasyon kanserli hücreleri yok ederken, aynı zamanda normal dokularda da genetik hasara, mutasyona, DNA ve kromozom düzeyinde aberasyonlara neden olabilir. Bu nedenle normal dokuları koruyan toksik olmayan, seçici ve efektif hücre koruyucu bileşikler üzerinde çalışılmaktadır.

Yapısal aktivitesi nedeniyle Quercetin etkili bir flavanoiddir. Aynı zamanda flavonoidler arasında yüksek farmakolojik aktiviteye ve potansiyel terapötik uygulamaya sahiptir. Yüksek antioksidan etkinliği nedeniyle Quercetin gibi flavonoidlerin iyonlaştırıcı radyasyonun oluşturacağı serbest radikallerin olumsuz etkilerinin azaltılmasında rol oynayabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmada, 2 Gy radyasyon uygulanan, *Sprague Dawley* ırkı albino erkek sıçanların kemik iliği dokularındaki polikromatik eritrosit hücrelerinde Quercetin'in radyoprotektif etkisi, DNA hasarının biyomonitörü olan mikronukleus testi ile araştırıldı.

Radyasyon uygulamasından önce farklı zaman aralıklarında (30 dk, 2 saat, 24 saat) 25 µM Quercetin uygulanan kemik iliği dokularına, 2 Gy radyasyon uygulaması yapıldı. Uygulama sonrası ratların kemik iliği örnekleri alındı. Hazırlanan preparatlar boyandı ve mikroskopik inceleme yapıldı. Hazırlanan preparatlar üzerinde rastgele 1000 adet polikromatik eritrosit sayıldı ve içlerindeki mikronucleus içeren polikromatik eritrositlerin sayıları tespit edilerek yüzdeleri çıkartıldı. Her uygulama grubuna ait sonuçlar kendi iç kontrolleri ile karşılaştırıldı.

Sonuç olarak, radyasyon uygulaması öncesinde farklı zamanlarda verilen (30 dk, 2 saat, 24 saat) 25 µM konsantrasyondaki Quercetin'in mikronukleus sıklığını bu üç farklı

zaman aralığında da azalttığı bulundu. Ancak radyasyon uygulamasından 2 saat önce Quercetin uygulaması yapılan tedavi grubunda mikronukleus sıklığındaki azalmanın en üst seviyede olduğu belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Quercetin, in vivo, mikronukleus, radyoprotektif etki, kanser

**INVESTIGATION OF POSSIBLE RADIOPROTECTIVE EFFECTS OF
QUERCETIN TREATMENT AND THE CONTRIBUTION OF
DIFFERENT TREATMENT TIME IN RATS (IN VIVO) BY
MICRONUCLEI ANALYSIS ASSAY**

SUMMARY

One of the important challenges in radiotherapy is to protect normal tissues during the application, because radiation can cause genetic damages, mutations and DNA-chromosome level aberrations in normal tissues, whereas it kills cancer cells. Hence, studies have been carried out based on cell protector compounds that are selective, effective and non-toxic.

Quercetin is one of the flavonoids, due to its structural activity. It has higher pharmacological activity and potential therapeutic applications compare to the other flavonoids. It was thought that flavonoids such as Quercetin can decrease negative effects of free radicals formed by ionizing radiation, due to its high antioxidant activity.

In this study, the radioprotective effect of Quercetin was investigated in polychromatic erythrocyte obtained from bone marrow cells belonging to *Sprague Dawley*, albino male rat, that exposed to 2 Gy radiation using micronucleus assay which is biomonitor of DNA damage.

Before radiation application, the 25 μ M Quercetin was treated to rat bone marrow cells in different time intervals (30 min, 2 hours and 24 hours) and then these cells were irradiated by 2 Gy dose. Irradiated cells were dissected from bone marrow and prepared for the microscopic examinations. Randomised choosing 1000 polychromatic erythrocyte cells were

observed by floresans microscope to determine the percent micronucleated polychromatic erythrocyte. Each treated group was compared to their respective controls.

In conclusion, the 25 μ M Quercetin treatment by different time intervals before the radiation exposure (30 min, 2 hours and 24 hours) was determined to reduce the micronucleus frequencies on the each applications time. But the most effective exposure time was found to be 2 hours before the radiation exposure according to the decrease in micronucleus frequencies.

Keywords: Quercetin, In vivo, micronucleus, radioprotective effect, cancer

KAYNAKLAR

1. Çan M. Kentleşme, sanayileşme ve kalkınma etkileşimi. T.C. Kalkınma Ajansı
2. Kayhan F, Muşlu MN, Kuç ND. Bazı ağır metallerin sucul organizmalar üzerinde yarattığı stres ve biyolojik yanıtlar. J Fish Sci 2009;3(2):153-162
3. Yurttagül M, Ayaz A. Katkı maddeleri: yanlışlar ve doğrular. Hacettepe Üniv Besl Diyet Böl, 2008
4. Başaran A. Tıbbi biyoloji ders kitabı. Güneş&Nobel Tıp Kitapevi, 2002
5. Çataroğlu E. Y. Karsonogenezis (tez). İzmir; J Dent Fac Ege Univ Patol Bir, 2008
6. Foster I. Cancer: A cell cycle defect. Radiography 2008;14:144-149
7. Cabadak H. Hücre siklusu ve kanser. ADÜ Tıp Fak Derg 2008;9(3):51-66
8. Onur E, Tuğrel B, Bozyiğit F. DNA hasarı ve onarım mekanizmaları. Türk Klin Biyokim Derg 2009;7(2):61-70
9. Müftüoğlu M. DNA tamiri ve erken yaşlanma sendromları. Türk Klin Biyokim Derg 2003;28(1):20-24
10. Taş M. Kanserli olgularda mikronukleus sıklığının belirlenmesi ve mikronukleus orijininin MN+FISH yöntemi ile değerlendirilmesi (tez). Trakya Üniv Tıp Fak; 2010

11. [http://194.27.141.99/dosya-depo/ders-notlari/alevmeltemercan/Radyasyonun molekulerduzeydekietkisi.pdf](http://194.27.141.99/dosya-depo/ders-notlari/alevmeltemercan/Radyasyonun_molekulerduzeydekietkisi.pdf)
12. Çakmakçoğlu B. Kanser oluşumunda DNA tamir mekanizmalarının önemi. IV. Multidisipliner Kanser Araşt Kongr Aralık; 2012
13. Bilgin O, Bolaman Z, Ayyıldız O. Sitotoksik ilaçlar. Turk Klin J Med Sci 1995,15
14. Debeleç B, Kantarcı G. Mutasyon, DNA hasarı, onarım mekanizmaları ve kanserle ilişkisi. Ankara Ecz Fak Derg 2006;35(2):149-170
15. <http://www.kanser.gov.tr/kanser/kanser-tedavisi/38-kanser-tedavisi.html>
16. <http://www.kanser.gov.tr/Dosya/tedavisi/kanser-tedavisinde-radyasyon.pdf>
17. Pala FS. Radyasyon ünitelerinde meydana gelen kazalar; nedenler ve sonuçları. Trakya Üniv Tıp Fak Derg 2006;23(2):103-108
18. Khan FM. Physics of Radiation Therapy, The, 4th Edition, 2010 Lippincott Williams & Wilkins, Department of Therapeutic Radiology, University of Minnesota Medical School, Minneapolis, Minnesota
19. Seyrek E. Radyoizotopların Üretimi Ve Radyoterapide Kullanılması. (tez) Gazi Üniv Gazi Eğitim Fak Fiz Eğit AD, 2007
20. <http://www.istanbul.edu.tr/duyurular/2011/Radyoterapi.pdf>
21. Hatayoglu ŞE. In vitro radyasyon uygulaması sonucu lenfositlerde meydana gelen kalıcı olmayan kromozom aberasyonları ile mikronukleus oluşumları arasındaki ilişkinin incelenmesi (tez). İstanbul Üniv Fen Bilim Enst, 2004
22. Levitt SH, Khan FM, Potish R.A. Levitt and Tapley's Technological Basis of Radiation Therapy: Practical Clinical Applications. Rationale for treatment planning in radiation therapy. 2th ed. London: Philadelphia; 1992;14-25
23. Fenech M, Perepetskaya G, Mikhalevich L. A More Comprehensive Application of the Micronucleus Technique for Biomonitoring of Genetic Damage Rates in Human Populations Experiences From the Chernobyl Catastrophe. Environ Mol Mut 1997;30:112-118

24. Müller WV. Micronucleus formation in lymphocytes of children from the vicinity of Chernobyl after ¹³¹I therapy. *Radioac Environ Biophys* 2004;43:7-13
25. Yırtıcı Ü. Tartrazinin *Cyprinus carpio*'daki genotoksik etkisinin MN yöntemi ile araştırılması. (tez), Erciyes Üniv Fen Bilim Enst, 2007
26. Krishna G, Hayashi M. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutat Res* 2000;455:155-166
27. Vanparys P, Vermeiren F, Sysmans M, Temmerman R. The micronucleus assay as a test for the detection of aneugenic activity. *Mutat Res* 1990;244:95-103
28. Demirel S, Zamani A. MN tekniği ve kullanımları. *Gen Tıp Derg* 2002;12(3):123-7
29. Yener Y. Akrilamid uygulanan sıçanların kemik iliği hücrelerinde mitotik aktivite ile emperipolez ve mikronukleus sıklığının belirlenmesi. (tez) Selçuk Üniv Fen Bilim Enst Biyol AD; 2008
30. Şekeroğlu V, Atlı-Şekeroğlu Z. Genotoksik hasarın belirlenmesinde mikronukleus testi. *Türk Hij Den Biyol Derg* 2011 68(4):241-252
31. Misiak M, Chruscinská EL. Interactions of flavonoids with transitionmetal ions. *Pharma Chem* 2010;39-42
32. Hoosinimehr S. Flavonoids and genomic instability induced by ionizing radiation, *Drug Discovery Today* 2010;15
33. Başara B. Kersetin'in Malignant Mezotelyoma Hücre Döngüsü Ve Hücre Ölümüne Etkisi (tez). Gebze Yük Tek Enst Müh Fen Bilim Enst Biyol AD, 2006
34. Ergüzel ET. Quercetin (3,3',4',5,7-pentahidroksiflavon)'in Bakır (II) ve Çinko (II) Komplekslerin Kararlılık Sabitlerinin Tayini (tez). Marmara Üniv Kim AD
35. Kahraman A, Serteser M, Köken T. Flavonoidler. *J Med Kocatepe* 2002;3:01-08
36. Economos AC, Miquel J, Ballard RC, Blunden M, Lindseth KA, Fleming J. et al. Effects of simulated increased gravity on the rate of aging of rats: implications for the rate of living theory of aging. *Arch Gerontol Geriatr* 1982;1(4):349-63

37. Çimen MBY. Flavonoidler ve antioksidan özellikleri. Türkiye Klinikleri J Med Sci 1999;19:296-304.
38. Ruddle K, Morgan WB, Pfafflin JR. Harwood Publishers 1988
39. Le Bourg E. Oxidative stress, aging and longevity in *Drosophila melanogaster*. FEBS Letters 2001;498: 183-186
40. Koca N, Karadeniz F. Serbest radikal oluşum mekanizmaları ve vücuttaki antioksidan savunma sistemleri. Gıda Müh Derg 2003:32-37
41. Elliot JG. Application of antioxidant vitamins in food and beverages. Food Tech 1999;53(2):46-48
42. Çavdar C, Sifil A, Çamsarı T. Reaktif oksijen partikülleri ve antioksidan savunma. Türk Nefrol Diyal Transplant Derg 1997;3(4):92-95
43. Derviş E. Oral antioksidanlar. Dermatoz 2011; 2(1):263-267
44. Mercan U. Toksikolojide serbest radikallerin önemi. Yüzüncü Yıl Üniv Vet Fak Derg 2004;15(1-2):91-96
45. Halliwell B. Drug antioksidant effect. Drugs 1991;42(4):569-605
46. Dündar Y, Aslan R. Bir antioksidan olarak Vitamin E. Gen Tıp Derg 1999;9(3);109-116
47. Bachowski S, Koloja KL, Xu Y, Ketcham CA, Stevenson DE, Walborg EF. et al. Role of oxidative stress in the mechanism of Dieldrin's hepatotoxicity. Ann Clin Lab Sci 1997;27:196-209
48. Bowler DM. Theory of mind in asperger syndrome. J Child Psychol Psychiat 1992;33:877-893
49. Dixit PN, Coope PJM, Rao KP, Dimes J. Adding value to field based agronomic research through climate risk assessment: A case study of maize production in Kitale, Kenya. Exp Agric 2011;47(2):317-338

50. Chaoui D, Legrand O, Roche N, Cornet M, Lefebvre A, Peffault de Latour R. et al. Incidence and prognostic value of respiratory events in acute leukemia. *Leukemia* 2004;18:670-675
51. Varanda EA, Tavares DC. Radioprotection: Mechanisms and radioprotective agents including honeybee venom. *J Venom Anim Toxins* 1998;4(1):5-21
52. Hirano T, Gotoh M, Oka K. Natural flavonoids and lignans are potent cytostatic agents against human leukemic HL-60 cells. *Life Sci* 1994;55:1061-1069
53. Kawaii S, Tomono Y, Katase E, Ogawa K, Yano M. Antiproliferative activity of flavonoids on several cancer cell lines. *Biosci Biotechnol Biochem* 1999;63:896-899
54. Kuntz S, Wenzel U, Daniel H. Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines. *Eur J Nutr* 1999;38:133-142
55. Wenzel U, Kuntz S, Brendel MD, Daniel H. Dietary flavone is a potent apoptosis inducer in human colon carcinoma cells. *Cancer Res* 2000;60:3823-3831
56. Pouget C, Lauthier F, Simon A, Fagnere C, Basly JP, Delage C. et al. Flavonoids: Structural requirements for antiproliferative activity on breast cancer cells. *Bioorg Med Chem Lett* 2001;11:3095-3097
57. Wattenberg LW. Inhibition of carcinogenesis by minor dietary constituents. *Cancer Res* 1992;52:2085-2091
58. Carroll KK, Guthrie N, So FV, Chambers AF. Anticancer properties of flavonoids, with emphasis on citrus flavonoids. In: Rice-Evans C, Packer L, eds. *Flavonoids in health and disease*. New York:Marcel Drekker Inc 1998;437-45
59. Ren W, Qiao Z, Wang H, Zhu L, Zhang L, Flavonoids: Promising Anticancer Agents. *Med Res Rev* 2003;4 (23):519-534
60. Caltagirone S, Rossi C, Poggi A, Ranelletti FO, Natali PG, Brunetti FB. et al. Flavonoids apigenin and quercetin inhibit melanoma growth and metastatic potential. *Int J Cancer* 2000;87:595-600

61. Miyagi Y, Om AS, Chee KM, Bennink MR. Inhibition of azoxymethane-induced colon cancer by orange juice. *Nutr Cancer* 2000;36:224-249
62. Senderowicz AM. Flavopiridol: The first cyclin-dependent kinase inhibitor in human clinical trials. *Invest New Drugs* 1999;17:313-320
63. Senderowicz AM. Development of cyclin-dependent kinase modulators as novel therapeutic approaches for hematological malignancies. *Leukemia* 2001;15:1-9
64. Markovits J, Linassier C, Fosse P, Couprie J, Pierre J, Jacquemin-Sablon A. et al. Inhibitory effects of the tyrosine kinase inhibitor genistein on mammalian DNA topoisomerase II. *Cancer Res* 1989;49:5111- 5117
65. Wang IK, Lin-Shiau SY, Lin JK. Induction of apoptosis by apigenin and related flavonoids through cytochrome c release and activation of caspase-9 and caspase-3 in leukaemia HL-60 cells. *Eur J Cancer* 1999;35:1517-1525
66. Bailly C. Topoisomerase I poisons and suppressors as anticancer drugs. *Curr Med Chem* 2000;7:39-58
67. Sukardiman, Darwanto A, Tanjung M, Darmadi MO. Cytotoxic mechanism of flavonoid from Temu Kunci (*Kaempferia pandurata*) in cell culture of human mammary carcinoma. *Clin Hemorheol Microcirc* 2000;23:185-190
68. Lee WR, Shen SC, Lin HY, Hou WC, Yang LL, Chen YC. Wogonin and fisetin induce apoptosis in human promyeloleukemic cells, accompanied by a decrease of reactive oxygen species, and activation of caspase 3 and Ca²⁺- dependent endonuclease. *Biochem Pharmacol* 2002;63:225-236
69. Rong Y, Yang EB, Zhang K, Mack P. Quercetin-induced apoptosis in the monoblastoid cell line U937 in vitro and the regulation of heat shock proteins expression. *Anticancer Res* 2000;20:4339-4345
70. Duthie SJ, Johnson W, Dobson VL. The effect of dietary flavonoids on DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) and growth in human cells. *Mutat Res* 1997;390:141-151

71. Hertog MGL, Fesken EJM, Hollman PCH, Katan MB, Kromhout D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen elderly study. *Lancet* 1993;342:1007-1011
72. Cao G, Sofic E, Prior RL. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: Structure-activity relationships. *Free Rad Biol Med* 1997;22(5):749-760
73. Quindry JC, Hosick P, Dumke C, McAnulty LS, Henson D, Morrow JD. et al. Dept. of Health, Leisure, and Exercise Science, Appalachian State Univ, Boone, NC, USA. *Int J Sport Nutr Exerc Metab*, 2008
74. Graefe EU, Derendorf H, Veit M. Pharmacokinetics and bioavailability of the flavonol quercetin in humans. *Int J Clin Pharmacol Ther* 1999;37:219
75. Davis WL. and Matthew SB. Antioxidants and Cancer III: Quercetin. *ND Altern Med Rev* 2000;5(3):196-208
76. Cody V. Plant Flavonoids Biology, Medicine, part II. *Prog Biol Res* 1988;280
77. http://www.thorne.com/pdf/journal/3-2/quercetin_monograph.pdf, 2006, alternative medicine review
78. Obinaju BE and Martin FL. Dose-related effects of Quercetin in the human breast carcinoma MCF-7 cell line. *J Am Sci and Indust Res* 2010;1(2):242-261
79. NTP Technical Report, 1991
80. Karadag R, Böhmer H. Dyes in History and Archaeology 2001;106
81. Miller E. and Schreier P. Studies on flavonol degradation on peroxidase (donor: H₂O₂-oxidoreductase, EC 1.11.17) 2. Quercetin. *Food Chem* 1985;17:301-317
82. Dean FM, Goodchild J, Martin JA et al. *Tetrahedron Lett* 1966;35:4153-4159
83. Miura S, Watanabe J, Sano M, Tomita T, Osawa T, Hara Y. et al. Effects of various natural antioxidants on the Cu²⁺- mediated oxidative modification of low density lipoprotein. *Biol Pharm Bull* 1995;18(1)

84. Karadag R. The Determination of stability constants of luteolin (3',4',5,7-tetrahydroxyflavone) aluminium(III) and iron(III) complexes by potentiometric and spectrophotometric methods. *Chem Anal* 2003;48(6):931-937
85. Martini ND, Katerere DRP, Eloff JN. Biological activity of five antibacterial flavonoids from *Combretum erythrophyllum* (Combretaceae). *J Ethnopharma* 2004;93(2-3):207-2012
86. Lamson DW, Brignall MS. Natural agents in the prevention of cancer, Part two: Preclinical data and chemoprevention for common cancers. *Altern Med Rev* 2001;6(2):167-187
87. Samuel T, Fadlalla K, Turner T, Teshome E. Yehualaeshet. The flavonoid Quercetin transiently inhibits the activity of taxol and nocodazole through interference with the cell cycle. *Nutr Cancer* 2010;62(8):1025-1035
88. Wei YQ, Zhao X, Kariya Y, Fukata H, Teshigawara K and Uchida A. Induction of apoptosis by quercetin: involvement of heat shock protein. *Cancer Res* 1994;54: 4952-4957
89. Hosokawa N, Hirayoshi K, Kudo H, Takechi H, Aoike A, Kawai K. Inhibition of the activation of heat shock factor in vivo and in vitro by flavonoids. *Mol Cell* 1992;12: 3490-3498
90. Kang TB, Liang NC. Studies on the inhibitory effects of quercetin on the growth of HL-60 leukaemia cells. *Biochem Pharmacol* 1997;54:1013-1018
91. Salucci M, Stivala LA, Maiani G, Bugianesi R, Vannini V. Flavonoids uptake and their effect on cell cycle of human colon adenocarcinoma cells (Cacco2). *Br J Cancer* 2002;86:1645-1651
92. Kobayashi T, Nakata T, Kuzumaki T. Effect of flavonoids on cell cycle progression in prostate cancer cells. *Cancer Lett* 2002;176:17-23
93. Kaneuchi M, Sasaki M, Tanaka Y, Sakuragi N, Fujimoto S, Dahiya R. Quercetin regulates growth of Ishikawa cells through the suppression of EGF and cyclin D1. *Int J Oncol* 2003;22:159-164

94. Fazal F, Rahman A, Greensill J, Ainley K, Hadi SM, Parish JH. Strand scission in DNA by quercetin and Cu(II): identification of free radical intermediates and biological consequences of scission. *Carcinogenesis* 1990;11:2005-2008
95. Suzuki S, Takada T, Sugawara Y, Muto T, Kominami R. Quercetin induces recombinational mutations in cultured cells as detected by DNA fingerprinting. *Jpn J Cancer Res* 1991;82:1061–1064
96. Ishidate Jr, M, Harnois, MC, Sofuni T. A comparative analysis of data on the clastogenicity of 951 chemical substances tested in mammalian cell cultures. *Mutat Res* 1988;195:151-213
97. Grylewski RJ, Korbut R, Robak J, Swies J. On the mechanism of antithrombotic action of flavonoids. *Biochem Pharmacol* 1987;36:317-322
98. Deschner EE, Ruperto J, Wong G, Newmark HL. Quercetin and rutin as inhibitors of azoxymethanol-induced colonic neoplasia. *Carcinogenesis* 1991;12:1193-1196
99. Hertog MG, Feskens EJ, Hollman PC, Katan MB, Kromhout D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet* 1993;342:1007-1011
100. Formica JV, Regelson W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem Toxicol* 1995;33:1061-1080
101. İde T, Mülazımoğlu B. Ratlarda Bakım ve Beslenme. *J Clin Analyt Med. Gülhane Ask Tıp Akad Araşt Gelişt Merk*
102. http://www.taconic.com/user-assets/documents/spraguedawley_booklet.pdf
103. Mughal A, Vikram A, Ramarao P, Jena GBE. Micronucleus and comet assay in the peripheral blood of juvenile rat: Establishment of assay feasibility, time of sampling and the induction of DNA damage. *Mutat Res* 2010;700:86-94
104. Dauqan EMA, Sani HA, Abdullah A. Effect of Different Concentrations of Red Palm Olein and Different Vegetable Oils on Antioxidant Enzymes in Normal and Stressed Rat. *Biochemistry, Genetics and Molecular Biology “Antioxidant Enzyme”* 2012

105. Deng L, Liang H, Burnette B, Beckett M, Darga T, Weichselbaum R. Irradiation and anti-PD-L1 treatment synergistically promote antitumor immunity in mice. *J Clin Invest* 2014;124(2):687-695
106. Shahidi M, Mozdarani H. Potent radioprotective effect of therapeutic doses of ranitidine and famotidine against gamma-rays induced micronuclei in vivo. *Iran J Radiat Res* 2003;1(1):29-35
107. Atalar B, Özyar E. Radyoterapide Teknik Gelişmeler ve IGRT (Görüntü Kılavuzluğunda Radyoterapi). *Acıbadem Üniv Sağ Bil Derg* 2011;1(2)
108. http://www.rerf.jp/radefx/basic_kno_e/radcell.htm
109. http://kisi.deu.edu.tr/fadime.akman/kaynak/ders/SMYO_Tedavi_prensip.pdf
110. Kennedy R, D'Andrea A. Klinik Uygulamada DNA Onarım Yolları: Pediatrik Kansere Yatkinlık Sendromlarından Öğrenilenler. *J Clin Oncol* 2007;24:3799-3808
111. Benković V, Orsolić N, Knezević AH, Ramić S, Dikić D, Basić I, Kopjar N. Evaluation of the radioprotective effects of propolis and flavonoids in gamma-irradiated mice: the alkaline comet assay study. *Biol Pharm Bull* 2008;31(1):167-72
112. Pak Y. Radyasyon onkolojisi temel bilgiler kitabı. Bölüm- Radyasyon onkolojisi ve radyoterapi kavramları.
113. Kim SH, Han DU, Lim JT, Jo SK, Kim TH. Induction of micronuclei in human, goat, rabbit peripheral blood lymphocytes and mouse splenic lymphocytes irradiated in vitro with gamma radiation. *Genet Toxicol Environ Mut* 1997;(393):207-214
114. Sofyan R, Sumpena Y, Lukita M, Fitrisari A. The use of micronucleus assay on Swiss-Webster mice (*mus musculus*) bone marrow for the mutagenicity test of γ -irradiation. *RochestryS* 2005:103-104
115. Zetterberg LA, Grawé J, Zetterberg G. The micronucleus test in rat erythrocytes from bone marrow, spleen and peripheral blood: the response to low doses of ionizing radiation, cyclophosphamide and vincristine determined by flow cytometry. *Mutat Res* 1999;423(1-2):113-24

116. Vikram A, Ramarao P, Jena G. Prior bleeding enhances the sensitivity of peripheral blood and bone marrow micronucleus test in rats. *Mutagenesis* 2007;22(4):287-91
117. Shahidi M, Mozdarani H. Potent radioprotective effect of therapeutic doses of ranitidine and famotidine against gamma-rays induced micronuclei in vivo. *Iran J Radiat Res* 2003;1(1):29-35
118. Bhilwade HN, RChaubey CR, Chauhan SP. Gamma ray induced bone marrow micronucleated erythrocytes in seven strains of Mouse. *Gen Toxicol Environ Mut* 2004;560(1):19-26
119. Londhe JS, Devasagayam TP, Foo LY, Ghaskadbi SS. Radioprotective properties of polyphenols from *Phyllanthus amarus* Linn. *J Radiat Res* 2009;50(4):303-9
120. Benković V, Kopjar N, Knezevic AH, Dikić D, Ivan Basic, Ramić S. et al. Evaluation of radioprotective effects of propolis and quercetin on human white blood cells in vitro. *Biol Pharm Bull* 2008;31(9):1778-1785
121. Lu J, Papp LV, Fang J. Inhibition of mammalian thioredoxin reductase by some flavonoids: implications for myricetin and quercetin anticancer activity. *Cancer Res* 2006;66:4410-8
122. Devipriya N, Sudheer AR, Srinivasan M, Menon VP. Quercetin ameliorates gamma radiation-induced DNA damage and biochemical changes in human peripheral blood lymphocytes. *Mutat Res* 2008;654:1-7
123. Utesch D, Feige K, Dasenbrock J, Broschard TH, Harwood M, Danielewska NB, Lines TC. Evaluation of the potential in vivo genotoxicity of Quercetin. *Genet Toxicol Environ Mut* 2008;654:38-44

ŞEKİLLER VE TABLOLAR LİSTESİ

ŞEKİLLER LİSTESİ

SAYFA

Şekil 1. DNA hasarına yol açan ekolojik kirlilik kaynakları.	4
Şekil 2. Canlı dokularında DNA hasarına yol açabilen etmenler ve hücrenin DNA hasarına verdiği yanıtlar.	6
Şekil 3. Hücre döngüsü kontrol noktaları.....	7
Şekil 4. Kanserojen ajanlar ve kanser yolakları	9
Şekil 5. İyonizan radyasyonun hücrede etkisi	10
Şekil 6. Co-60 Teloterapi cihazı.....	12
Şekil 7. Mikronukleus oluşumu	13
Şekil 8. In vivo mikronukleus test protokolü	15
Şekil 9. Kemik iliğindeki normal polikromatik (PCE) ve normokromatik (NCE) eritrositler ve MN taşıyan polikromatik eritrosit (MNPCE)	15
Şekil 10. Flavon grupları ve temel kimyasal yapıları.....	17
Şekil 11. Quercetin'in kimyasal yapısı – 3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone.....	20
Şekil 12. <i>Sprague Dawley</i> ırkı albino erkek rat	23
Şekil 13. K1 Kontrol (0) grubuna ait mikronukleus dağılımları	29
Şekil 14. K2 Kontrol (2 Gy) grubuna ait mikronukleus dağılımları	30
Şekil 15. K3 Kontrol (DMSO) grubuna ait mikronukleus dağılımları	31
Şekil 16. T1 Tedavi grubuna (25µM QN-30 dk) ait mikronukleus dağılımları	32

Şekil 17. TQ2 Tedavi grubuna (25µM QN-30 dk+ 2 Gy) ait mikronukleus dağılımları.....	33
Şekil 18. T3 Tedavi grubuna (25µM QN- 2 saat) ait mikronukleus dağılımları.....	34
Şekil 19. TQ4 Tedavi grubuna (25µM QN- 2 saat+ 2 Gy) ait mikronukleus dağılımları.....	35
Şekil 20. T5 Tedavi grubuna (25µM QN- 24 saat) ait mikronukleus dağılımları.....	36
Şekil 21. TQ6 Tedavi grubuna (25µM QN- 24 saat+ 2 Gy) ait mikronukleus dağılımları.....	37
Şekil 22. Kontrol, Quercetin (30 dk- 2 saat- 24 saat) ve DMSO uygulanan gruplarda mikronukleus sıklıkları.....	38
Şekil 23. 2 Gy ışına maruz bırakılan hücrelerde, farklı zaman aralıklarında Quercetin uygulamanın mikronukleus sıklığına etkisi	39
Şekil 24. Farklı zamanlarda Quercetin uygulanmasının mikronukleus sıklıklarına etkisi	40
Şekil 25. Kontrol grupları ve tedavi grupları sonuçlarının karşılaştırılması	42
Şekil 26. Kontrol gruplarının toplam mikronukleus sayısının karşılaştırılması	43
Şekil 27. Kontrol grupları ve 25 µM Quercetin tedavisi uygulanmış grupların sonuçlarının karşılaştırılması.....	44
Şekil 28. 2 Gy'lik radyasyon uygulaması sonucu MN sıklığı karşılaştırılması	45
Şekil 29. Tüm kontrol ve tedavi gruplarının mikronukleus içermeyen (MN0) hücre sayıları bakımından karşılaştırılmaları	47

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1. Kontrol ve uygulama gruplarında yapılan uygulamalar ve iş akışı	25
Tablo 2. Kontrol ve tedavi gruplarında 1000 hücrede belirlenen toplam mikronukleus dağılım yüzdesi (Ortalama±Standart hata) ve minimum-maksimum değerleri	41
Tablo 3. Toplam MN sıklığı tek yönlü varyans analizi	42
Tablo 4. Kontrol ve tedavi grupları arasındaki 1000 hücrede belirlenen mikronukleus dağılım yüzdesi (Ortalama±Standart hata)	46
Tablo 5. Kontrol ve tedavi gruplarının tek mikronukleus içeren (MN1) hücre dağılım yüzdesi (Ortalama±Standart hata)	48
Tablo 6. Kontrol ve tedavi gruplarının çift mikronukleus içeren (MN2) hücre dağılım yüzdesi (Ortalama±Standart hata)	49
Tablo 7. Kontrol ve tedavi gruplarının 3 mikronukleus içeren (MN3) hücre dağılım yüzdesi (Ortalama±Standart hata)	50
Ek Tablo 8. Kontrol grubuna (0) ait mikronukleus dağılımları	
Ek Tablo 9. K2 Kontrol grubuna (2 Gy) ait mikronukleus dağılımları	
Ek Tablo 10. K3 Kontrol grubuna (DMSO) ait mikronukleus dağılımları	
Ek Tablo 11. T1 Tedavi Grubuna (25µM QN-30 dk) ait mikronukleus dağılımları	
Ek Tablo 12. TQ2 Tedavi Grubuna (25µM QN-30 dk+ 2 Gy) ait mikronukleus dağılımları	
Ek Tablo 13. T3 Tedavi Grubuna (25µM QN- 2 saat) ait mikronukleus dağılımları	
Ek Tablo 14. TQ4 Tedavi Grubuna (25µM QN- 2 saat+ 2 Gy) ait mikronukleus dağılımları	

Ek Tablo 15. T5 Tedavi Grubuna (25µM QN- 24 saat) ait mikronukleus dağılımları

Ek Tablo 16. TQ6 Tedavi Grubuna (25µM QN- 24 saat+ 2 Gy) ait mikronukleus dağılımları

ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında Sivas ilinin Gürün ilçesinde doğdum. 2003 yılında Çerkezköy Hacı Fahri Zübül Anadolu Lisesi'nden mezun oldum. 2004 yılının ağustos ayında Hacettepe Üniversitesi Eğitim Fakültesi Biyoloji Öğretmenliği bölümünü kazandım. 2004-2010 yılları arasında Lisans eğitimimi tamamladım. 2010 Eylül ayında Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimime başladım.

EKLER

T. Sibel Pala

T.C.

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ


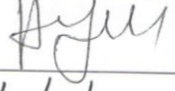
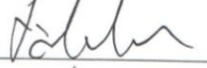




HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARLARI

Oturum Sayısı: 05

Karar Tarihi: 31.05.2011

KARAR NO: 2011.05.03

Yürütcülüğünü Tıp Fakültesi öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Funda Sibel PALA'nın yaptığı Ayten DOĞAN'ın Yüksek Lisans tezi olarak planlanan TÜHDYEK-2011/31 protokol nolu "Quercetin'in Farklı Sürelerde Uygulanmasının Olası Radyoprotektif Etkisine Katkısının İn Vivo (Ratlarda) Şartlarda Mikronükleus (MN) Yöntemiyle İncelenmesi" başlıklı çalışma görüşme başlıklı çalışma hakkında görüşüldü; araştırmanın amaç, yaklaşım, gereç ve yöntemler dikkate alınarak incelenmesi sonucunda: Hayvan Hakları Evrensel Bildirgesi ve etik kurallara uygun olarak hazırlandığına ve Radyasyon Güvenlik Komitesi olurundan sonra çalışmanın yapılabileceğine mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.

Ünvanı/Adı/Soyadı	Araştırma ile İlişki	Toplantı Katılımı	İmza
Doç.Dr. Burhan AKSU Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Yrd.Doç. Dr. Hayati ARDA Fen-Edebiyat Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input checked="" type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Vet.Hek. Ziya ÇUKUR Veteriner Hekim	<input type="checkbox"/> var <input type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Hüseyin KOÇ Sivil Toplum Örgütü Üyesi Sivil Üye	<input type="checkbox"/> var <input type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
İlyas ÖZMEN Sivil Üye	<input type="checkbox"/> var <input type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Yrd.Doç.Dr. Beytullah ÖZKAN Fen-Edebiyat Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Doç.Dr. S. Arzu VARDAR Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input checked="" type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Doç. Dr. Nilda TURGUT Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Yrd.Doç.Dr. Ruşen COŞAR-ALAŞ Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input checked="" type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Yrd.Doç.Dr. Y. Atakan SEZER Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	

Ek-2

- **Kemik İliği Örneklerinin Alınması İçin Kullanılan Malzemeler Ve Cihazlar**
 - ✓ Laminar air flow kabini (Heraeus-HERA Safe-HS15)
 - ✓ Hayvan laboratuvar ekipmanı (Özel hayvan barınma birimleri, diseksiyon birimi)
 - ✓ Falkon tüpü (15 ml)
 - ✓ Pipet Setleri (Eppendorf Research plus)
 - ✓ Steril enjektörler (1cc, 2cc, 10cc'lik)
 - ✓ Pastör pipeti
 - ✓ 0,22 µm steril mini filtre

- **Kemik İliği Örneklerinin Alınması İçin Kullanılan Kimyasal Maddeler**
 - ✓ Fetal Bovine/Calf Serum
 - ✓ Anestezikler (Rompun- Ketamin)
 - ✓ Etil Alkol (%96'lık Tekel)

- **Preparat Hazırlanması İçin Kullanılan Cihazlar**
 - ✓ Soğutmalı santrifüj (Heraeus)
 - ✓ Etüv (Heraeus-UB6)
 - ✓ Işık Mikroskobu (Olympus CK2)

- **Boyama İçin Kullanılan Kimyasal Maddeler**
 - ✓ Metil alkol

- ✓ May-Grunwald's (azur eosin methlene blue-1 lt)
- ✓ Giemsa (Sigma- Aldrich-500 ml)

- **Boyama İçin Kullanılan Solüsyonlar**

- 1. Sorenson Buffer Hazırlama**

- 1. Solüsyon:9,12 gr KH_2PO_4 balon joje içerisine konuldu. 500 ml'ye tamamlanana kadar ultra distile su eklendi ve çözdürüldü.

- 2. Solüsyon:23,90gr $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ balon joje içerisine konuldu. 500 ml'ye tamamlanana kadar ultra distile su eklendi ve çözdürüldü.

- 1. ve 2. Solüsyon 1:1 oranında karıştırlarak buffer hazırlandı.

- 2. Giemsa Boyası Hazırlanması**

- Hazırlanan Sorenson buffer ile Giemsa 1:9 oranında karıştırlıdı. Filtre kâğıdı ile süzdürülerek karışım üzerindeki yağ alındı.

Ek-3**Tablo 8. K1 Kontrol grubuna (0) ait MN dağılımları**

1. KONTROL (0)											
	GRUPLAR	SAYILAN HÜCRE	ORAN*	MİKRONÜKLEUS DAĞILIMI				Var/Mean[†]	SE	%95 CI^{††}	
				0	1	2	3			Alt Limit	Üst Limit
	1.HAYVAN	1000	44±6.6	956	44	0	0	0.95	0.04	32.1	58.6
	2.HAYVAN	1000	35±5.9	968	29	3	0	1.13	0.04	24.5	48.3
	3.HAYVAN	1000	29±5.3	974	24	1	1	1.24	0.04	19.5	41.4
	4.HAYVAN	1000	40±6.3	960	40	0	0	0.96	0.04	28.7	54.1
	5.HAYVAN	1000	30±5.4	975	20	5	0	1.30	0.04	20.3	42.6
	TOPLAM	5000	35.6±2.7	4833	157	9	1	1.09	0.01	30.6	41.1

*1000 PCE hücrede MN Sayısı

[†]: Varyans/Ortalama Değeri

^{††}:%95'lik Güven Aralığı

Tablo 9. K2 Kontrol grubuna (2 Gy) ait MN dağılımları

2. KONTROL- 2 Gy											
	GRUPLAR	SAYILAN HÜCRE	ORAN*	MİKRONÜKLEUS DAĞILIMI				Var/Mean[†]	SE	%95 CI^{††}	
				0	1	2	3			Alt Limit	Üst Limit
	1.HAYVAN	1000	172±13.1	852	124	24	0	1.10	0.04	149.1	196.8
	2.HAYVAN	1000	190±13.7	840	130	30	0	1.12	0.04	166.1	215.7
	3.HAYVAN	1000	204±14.2	836	128	32	4	1.22	0.04	179.4	230.3
	4.HAYVAN	1000	180±13.4	856	112	28	4	1.26	0.04	156.7	205.2
	5.HAYVAN	1000	172±13.1	856	116	28	0	1.15	0.04	149.1	196.8
	TOPLAM	5000	183.6±6.1	4240	610	142	8	1.17	0.01	173.0	194.6

*1000 PCE hücrede MN Sayısı

[†]: Varyans/Ortalama Değeri

^{††}:%95'lik Güven Aralığı

Tablo 10. K3 Kontrol grubuna (DMSO) ait MN dağılımları

3. KONTROL-DMSO											
	GRUPLAR	SAYILAN HÜCRE	ORAN*	MİKRONÜKLEUS DAĞILIMI				Var/Mean [†]	SE	%95 CI ^{††}	
				0	1	2	3			Alt Limit	Üst Limit
	1.HAYVAN	1000	36±6	972	24	0	4	1.63	0.04	25.3	49.5
	2.HAYVAN	1000	35±5.9	965	35	0	0	0.96	0.04	24.5	48.3
	3.HAYVAN	1000	37±6.08	963	37	0	0	0.96	0.04	26.2	50.6
	4.HAYVAN	1000	44±6.6	960	36	4	0	1.13	0.04	32.1	58.6
	5.HAYVAN	1000	32±5.6	972	24	4	0	1.21	0.04	22.0	44.9
	TOPLAM	5000	36.8±2.7	4832	156	8	4	1.18	0.01	31.8	42.4

*1000 PCE hücrede MN Sayısı

[†]: Varyans/Ortalama Değeri

^{††}:%95'lik Güven Aralığı

Tablo 11. T1 Tedavi Grubuna (25µM QN-30 dk) ait MN dağılımları

1. GRUP- 25µM QN-30 dk										
	GRUPLAR	SAYILAN HÜCRE	ORAN*	MİKRONÜKLEUS DAĞILIMI			Var/Mean[†]	SE	%95 CI^{††}	
				0	1	2			Alt Limit	Üst Limit
	1.HAYVAN	1000	32±5.6	968	32	0	0.96	0.04	22.0	44.9
	2.HAYVAN	1000	40±6.3	960	40	0	0.96	0.04	28.7	54.1
	3.HAYVAN	1000	36±6	964	36	0	0.96	0.04	25.3	49.5
	4.HAYVAN	1000	36±6	964	36	0	0.96	0.04	25.3	49.5
	TOPLAM	4000	36±3	3856	144	0	0.96	0.02	30.4	42.2

*1000 PCE hücrede MN Sayısı

[†]: Varyans/Ortalama Değeri

^{††}:%95'lik Güven Aralığı

Tablo 12. TQ2 Tedavi Grubuna (25µM QN-30 dk+ 2 Gy) ait MN dağılımları

2. GRUP- 25µM QN-30 dk+ 2 Gy										
	GRUPLAR	SAYILAN HÜCRE	ORAN*	MİKRONÜKLEUS DAĞILIMI			Var/Mean[†]	SE	%95 CI^{††}	
				0	1	2			Alt Limit	Üst Limit
	1.HAYVAN	1000	104±10.1	904	88	8	1.05	0.04	85.8	124.6
	2.HAYVAN	1000	88±9.3	920	72	8	1.09	0.04	71.2	107.3
	3.HAYVAN	1000	64±8	940	56	4	1.06	0.04	49.6	81.0
	4.HAYVAN	1000	88±9.3	928	56	16	1.22	0.04	71.2	107.3
	TOPLAM	4000	86±4.6	3692	272	36	1.12	0.02	77.5	95.1

*1000 PCE hücrede MN Sayısı

[†]: Varyans/Ortalama Değeri

^{††}:%95'lik Güven Aralığı

Tablo 13. T3 Tedavi Grubuna (25µM QN- 2 saat) ait MN dağılımları

3. GRUP- 25µM QN-2 saat									
GRUPLAR	SAYILAN HÜCRE	ORAN*	MİKRONÜKLEUS DAĞILIMI			Var/Mean[†]	SE	%95 CI^{††}	
			0	1	2			Alt Limit	Üst Limit
1.HAYVAN	1000	28±5.3	972	28	0	0.97	0.04	18.7	40.2
2.HAYVAN	1000	28±5.3	972	28	0	0.97	0.04	18.7	40.2
3.HAYVAN	1000	35±5.9	965	35	0	0.96	0.04	24.5	48.3
4.HAYVAN	1000	32±5.65	972	24	4	1.21	0.04	22.0	44.9
5.HAYVAN	1000	44±6.6	960	36	4	1.13	0.04	32.1	58.6
TOPLAM	5000	33.4±2.6	4841	151	8	1.06	0.01	28.6	38.8

*1000 PCE hücrede MN Sayısı

[†]: Varyans/Ortalama Değeri

^{††}:%95'lik Güven Aralığı

Tablo 14. TQ4 Tedavi Grubuna (25µM QN- 2 saat+ 2 Gy) ait MN dağılımları

4. GRUP- 25µM QN-2 saat+2 Gy											
	GRUPLAR	SAYILAN HÜCRE	ORAN*	MİKRONÜKLEUS DAĞILIMI				Var/Mean[†]	SE	%95 CI^{††}	
				0	1	2	3			Alt Limit	Üst Limit
	1.HAYVAN	1000	44±6.6	968	24	4	4	1.68	0.04	32.1	58.6
	2.HAYVAN	1000	60±7.74	952	36	12	0	1.34	0.04	46.1	76.6
	3.HAYVAN	1000	68±8.24	940	52	8	0	1.16	0.04	53.2	85.4
	4.HAYVAN	1000	52±7.21	956	36	8	0	1.25	0.04	39.1	67.6
	5.HAYVAN	1000	56±7.48	948	48	4	0	1.08	0.04	42.6	72.1
	TOPLAM	5000	56±3.3	4764	196	36	4	1.28	0.01	49.8	62.7

*1000 PCE hücrede MN Sayısı

[†]: Varyans/Ortalama Değeri

^{††}:%95'lik Güven Aralığı

Tablo 15. T5 Tedavi Grubuna (25µM QN- 24 saat) ait MN dağılımları

5. GRUP- 25µM QN-24 saat											
	GRUPLAR	SAYILAN HÜCRE	ORAN*	MİKRONÜKLEUS DAĞILIMI				Var/Mean[†]	SE	%95 CI^{††}	
				0	1	2	3			Alt Limit	Üst Limit
	1.HAYVAN	1000	28±5.3	976	20	4	0	1.25	0.04	18.7	40.2
	2.HAYVAN	1000	28±5.3	972	28	0	0	0.97	0.04	18.7	40.2
	3.HAYVAN	1000	32±5.6	968	32	0	0	0.96	0.04	22.0	44.9
	4.HAYVAN	1000	32±5.6	972	24	4	0	1.21	0.04	22.0	44.9
	5.HAYVAN	1000	32±5.6	968	32	0	0	0.96	0.04	22.0	44.9
	TOPLAM	5000	30.4±2.5	4856	136	8	0	1.07	0.01	25.80	35.5

*1000 PCE hücrede MN Sayısı

[†]: Varyans/Ortalama Değeri

^{††}:%95'lik Güven Aralığı

Tablo 16. TQ6 Tedavi Grubuna (25µM QN- 24 saat+ 2 Gy) ait MN dağılımları

6. GRUP- 25µM QN-24 saat+ 2Gy										
	GRUPLAR	SAYILAN HÜCRE	ORAN*	MİKRONÜKLEUS DAĞILIMI			Var/Mean[†]	SE	%95 CI^{††}	
				0	1	2			Alt Limit	Üst Limit
	1.HAYVAN	1000	128±11.3	892	88	20	1.18	0.04	107.9	150.3
	2.HAYVAN	1000	136±11.6	888	88	24	1.21	0.04	115.4	158.8
	3.HAYVAN	1000	144±12	876	104	20	1.13	0.04	122.8	167.3
	4.HAYVAN	1000	140±11.8	888	84	28	1.26	0.04	119.1	163.1
	5.HAYVAN	1000	116±10.7	900	84	16	1.16	0.04	96.8	137.5
	TOPLAM	5000	132.8±5.1	4444	448	108	1.19	0.01	123.5	142.5

*1000 PCE hücrede MN Sayısı

[†]: Varyans/Ortalama Değeri

^{††}:%95'lik Güven Aralığı

