

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

Tez Yöneticisi  
Yrd. Doç. Dr. Funda Sibel PALA

**MYRİCETİN'İN RADYOPROTEKTİF ETKİSİNİN  
MİKRONUKLEUS YÖNTEMİYLE İN VİTRO  
ŞARTLARDA İNCELENMESİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

**Bio. Damla EKER**

**Referans No: 10001372**

EDİRNE-2013

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

Tez Yöneticisi  
Yrd. Doç. Dr. Funda Sibel PALA

**MYRİCETİN'İN RADYOPROTEKTİF ETKİSİNİN  
MİKRONUKLEUS YÖNTEMİYLE İN VİTRO  
ŞARTLARDA İNCELENMESİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

**Bio. Damla EKER**

Destekleyen Kurum: TÜBAP-2011/110

**Tez no:**

EDİRNE-2013

**T.C.**  
**TRAKYA ÜNİVERSİTESİ**  
**Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğü**

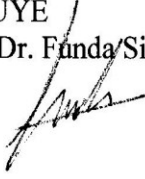
**ONAY**

Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı yüksek lisans programı çerçevesinde ve Yrd. Doç. Dr.Funda S. PALA danışmanlığında yüksek lisans öğrencisi Bio. Damla EKER tarafından tez başlığı “Myricetin’in Radyoprotektif Etkisinin Mikronukleus Yöntemiyle İn Vitro Şartlarda İncelenmesi” olarak teslim edilen bu tezin tez savunma sınavı **10/05/2013** tarihinde yapılarak aşağıdaki jüri üyeleri tarafından “**Yüksek Lisans Tezi**” olarak kabul edilmiştir.



İmza  
Unvanı Adı Soyadı  
JÜRİ BAŞKANI  
Doç. Dr. Oğuzhan DOĞANLAR

İmza  
Unvanı Adı Soyadı  
ÜYE  
Yrd. Doç. Dr. Funda/Sibel PALA



İmza  
Unvanı Adı Soyadı  
ÜYE  
Doç.Dr. Tammam SİPAHİ



Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Doç.Dr. Tammam SİPAHİ  
Enstitü Müdürü

## **TEŐEKKÜRLER**

Çalıőmamın her aşamasında bana verdikleri destekten ve gösterdikleri sabırdan dolayı başta danıőman hocam Yrd. Doç. Dr. Funda S. PALA'ya, T.Ü Tıp Fakóltesi Tıbbi Biyoloji A.D. Başkanı Doç. Dr. Oğuzhan DOĞANLAR'a, Yrd. Doç. Dr. Zeynep B. DOĞANLAR'a, Radyasyon Onkolojisi A.D. Prof. Dr. Cem UZAL'a ve Uzm. Fizikçi őule PARLAR ile radyasyon onkolojisi çalıőanlarına, Tıbbi Biyoloji A.D. Araő. Gör. Dr. Kıymet TABAKÇIOĐLU'na ve projemizi destekleyen TÜBAP baőkanlıđına en içten teőekkürlerimi sunarım.

Bio. Damla EKER

## İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
GENEL BİLGİLER .....	3
RADYASYON .....	3
SERBEST RADİKAL-ANTIOKSİDAN İLİŞKİSİ.....	22
FLAVONOİDLER .....	24
MYRICETİN .....	26
MİKRONÜKLEUS ANALİZİ YÖNTEMİ.....	29
GEREÇ VE YÖNTEMLER .....	31
BULGULAR .....	38
TARTIŞMA.....	59
SONUÇLAR.....	69
ÖZET .....	70
SUMMARY .....	73
KAYNAKLAR.....	75
ŞEKİLLER VE TABLOLAR LİSTESİ .....	82
ÖZGEÇMİŞ .....	86
EKLER	

## SİMGE VE KISALTMALAR

<b>BaP</b>	: Benzo(a)pyrene
<b>BN</b>	: Binukleat
<b>BNMN</b>	: Binukleattaki mikronukleus
<b>CaCo2</b>	: Epitelyal kolorektal adenokarsinoma hücre serisi
<b>CAT</b>	: Katalaz
<b>CHO</b>	: Çin hamster ovaryum hücreleri
<b>Co<sup>60</sup></b>	: Cobalt-60
<b>Cs<sup>137</sup></b>	: Cesium-137
<b>Cyt-B</b>	: Sitokalazin B
<b>DMSO</b>	: Dimetil sülfoksit
<b>DNA</b>	: Deoksiribo Nükleik Asit
<b>FCS</b>	: Fetal Calf Serum
<b>Fe-NTA</b>	: Demir-nitriloasetat
<b>GP<sub>x</sub></b>	: Glutatyon Peroksidaz
<b>Gy</b>	: Gray
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	: Hidrojen Peroksit
<b>HaCaT</b>	: Malign olmayan ölümsüz insan karatinosit hücre serisi
<b>HeLa</b>	: İnsan servikal kanser hücre serisi
<b>HepG2</b>	: Hepatosellüler karsinoma hücre serisi
<b>KCL</b>	: Potasyum Klorür
<b>LET</b>	: Lineer Enerji Transferi
<b>MN</b>	: Mikronukleus

<b>NDBA</b>	: N-nitrozodibütilamin
<b>NPIP</b>	: N-nitrozopiperidin
<b>NPYR</b>	: N-nitrozopyrolidine
<b>PHA</b>	: Fitohemaglutinin
<b>RBE</b>	: Relatif Biyolojik Etkinlik
<b>rpm</b>	: Revolutions per minute (dakika/devir sayısı)
<b>SOD</b>	: Süperoksit Dismutaz
<b>SSD</b>	: Kaynak deri yüzey mesafesi

## GİRİŞ VE AMAÇ

Radyasyon, tıpta birçok hastalığın tanı ve/veya tedavisinde kullanılmaktadır. Radyasyonun, hücre üzerinde DNA (Deoksiribo nükleik asit) ve kromozom bazında doza bağlı değişen oranlarda etkisi olduğu uzun yıllardan beri bilinmektedir. Radyasyonun bu özelliği, kanser hücrelerinin genetik stabilitesini bozarak hücreleri öldürmek veya apoptoza götürmek için kullanılmaktadır.

Radyasyonla tedavide tümör dokuları yok edilirken normal dokuları korumak önemlidir. Tümörlü dokuların yok edilmesi amacıyla external tedavide yaygın olarak Cobalt-60 ( $Co^{60}$ ) radyoaktif gama ( $\gamma$ ) kaynağından yararlanılmaktadır.

Radyasyon uygulaması sırasında ortamda bulunan bazı maddelerin varlığı radyasyonun yarattığı etkiyi değiştirebilir. Bu değişim, etkiyi arttırabileceği gibi oluşan etkinin planlanandan daha az uygulanmasına da neden olabilir. Radyoterapide, uygulanması gereken radyasyon dozu önemlidir. Ortamda bulunan radyoprotektör maddenin radyasyon dozunu etkilemesi ve planlanandan daha az doz uygulanması halinde tedavi başarıya ulaşmadığı gibi ikincil kanserler de gelişebilir.

Radyasyonun yarattığı genotoksik etkilerden korunmak için kullanılan radyoprotektör maddeler arasında bitkisel kaynaklı moleküller öne çıkmaktadır. Bunlara örnek olarak quercetin, myricetin, ficetin, sillymarin gibi flavonoidler sayılabilir.

Myricetin, meyva ve sebzelerde bol miktarda bulunan bir bioflavonoidtir. Yapısındaki 3 -OH (hidroksil) grubu sayesinde en iyi antioksidan madde olduğunu bildiren çalışmalar mevcuttur (1-3).



Hücre ve organizma düzeyinde fiziksel ve/veya kimyasal ajanların genotoksik etkilerinin belirlenmesinde birçok biyolojik bazlı metod kullanılabilir. Kimyasal ve fiziksel ajanların bir arada kullanıldığı durumlarda, hem araştırılan radyoprotektif ajanın kendisinin oluşturabileceği olası hasarları hem de radyasyonun etkisini birlikte ve doğru değerlendirmeye en fazla olanak sağlayan yöntem mikronukleusların (MN) analizi yöntemidir (4).

Mikronukleuslar, sitoplazma içinde ana nukleusun dışında fakat nukleus yapı ve boyanma özelliklerini yansıtan küçük küresel yapılardır (4). Herhangi bir mutajene maruz kalan lenfosit hücrelerinde meydana gelen disentrik kromozomlar, asentrik parçaları veya mitotik iğdeki hatalar nedeniyle kutuplara çekilemeyen kromozomların sitoplazmada yoğunlaşması sonucu oluşurlar (5,6). Çok uzun zamandan beri absorblanan dozu belirlemek amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır.

Bu çalışmadaki amacımız, bir bioflavonoid olan myricetin'in farklı konsantrasyonlarının, uygulanan farklı gama radyasyon dozunu etkileyip etkilemediğini mikronukleusların analizi yöntemini kullanarak incelemektir. Literatür çalışmaları, Myricetin'in olası radyoprotektif etkisinin, antioksidan özelliğinin yanı sıra DNA tamir mekanizması üzerine etkilerinden de kaynaklanabileceğini göstermektedir (1). Bu nedenle radyasyon öncesi ve sonrasında myricetin uygulaması ile etki mekanizmasının ortaya çıkartılması amaçlanmıştır.

## GENEL BİLGİLER

### RADYASYON

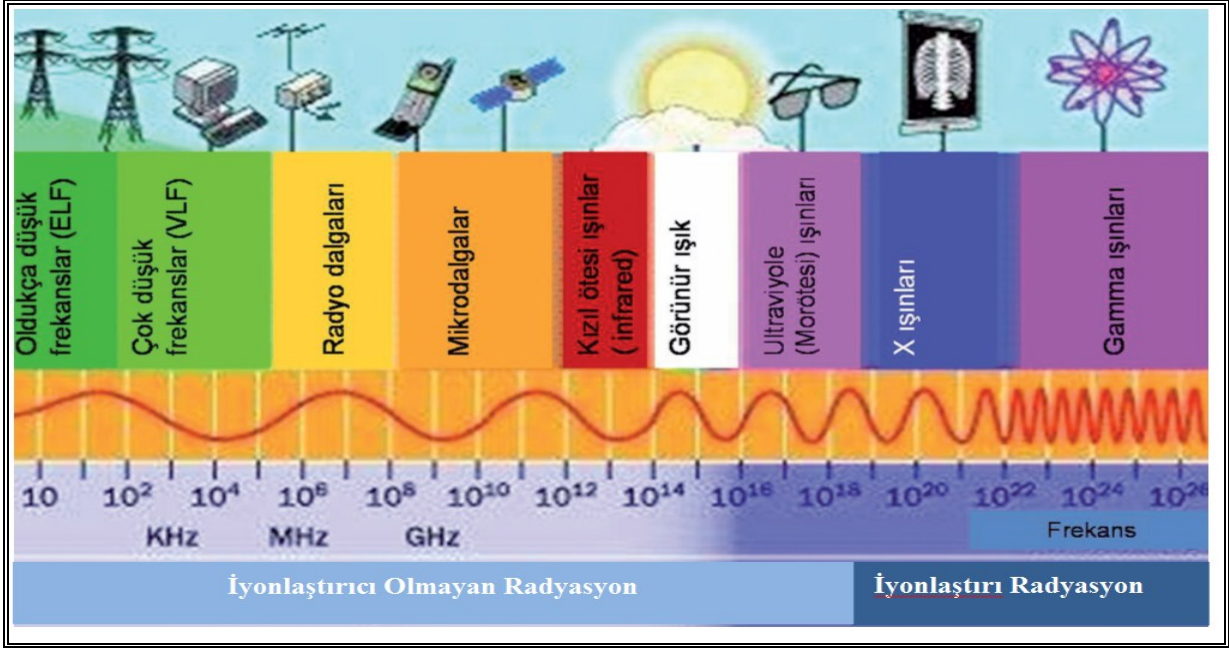
Radyasyon, diğerk bir ifadeyle ışınım, enerjinin elektromanyetik dalgalar (foton) veya parçacıklar biçiminde yayımı ya da aktarımıdır. Tüm canlılar, yaşamları boyunca yerkabuğunda bulunan, solunum ya da sindirim yoluyla içimize aldığımız radyonüklidlerden ve kozmik ışınlardan kaynaklanan milyarlarca partikül ve/veya foton nedeniyle doğal radyasyonun etkisi altında bulunurlar. İlk olarak 1895 yılında Röntgen'in X-ışınını keşfi ile hayatımıza giren yapay radyasyonlar günümüzde pek çok alanda kullanılmaktadır (Tablo 1).

Radyasyon, maddesel ortamlarda yayılırken önüne çıkan atomlarla veya moleküllerle çarpışır. Bu arada da enerjisine bağlı olarak ortamın molekülleriyle iyonlaşma ve uyarılma olaylarına yol açar. Eğer madde ile etkileşen foton yeterli enerjiye sahipse çarptığı atomdan en az bir elektron (e-) kopartır. Bunu gerçekleştirebilecek enerjiye sahip radyasyon, iyonlaştırıcı radyasyon olarak adlandırılır (7).  $\alpha$ ,  $\beta$  gibi parçacık özellikli radyasyonlar, X ve  $\gamma$  ışınları gibi elektromagnetik dalga karakterli radyasyonlar iyonlaştırıcı radyasyonlardır. Enerjisi iyonlaşma için yeterli olmayan radyasyonlar iyonlaştırmayan radyasyon olarak adlandırılır. Bu gruptaki radyasyonlar elektromagnetik dalga özelliklidir. Ancak bu elektromanyetik dalgaların foton enerjileri, atomları ve molekülleri iyonlaştıracak düzeyde değildir. Bu gruba, kızılötesi ışık, mor ötesi ışık, görünür ışık, radyo dalgaları ve mikrodalgalar girer (7).

**Tablo 1. Radyasyonun kullanım alanları ve kullanım amaçları (8,9)**

<b>Kullanım Alanı</b>	<b>Kullanım Amacı</b>
<b>Tıp</b>	Birçok hastalığın tanı ve teşhisi için görüntüleme sistemlerinde, tümör hücrelerinin yok edilmesi için radyoterapide,
<b>Nükleer reaktörler</b>	Tıpta ve endüstride kullanılacak olan radyonükleoidlerin yapımında, temel nükleer fizik deneylerinin yapımında ve elektrik üretiminde,
<b>Endüstri</b>	Petrol ve doğalgaz boru hatlarında, buhar kazanları ile makine parçaları gibi endüstriyel ürünlerin hata içerip içermediklerinin kontrolünde, tıbbi malzemelerin sterilizasyonunda,
<b>Jeoloji</b>	Yer kabuğunun jeolojik yapısının tespitinde,
<b>Tarım</b>	Tarımda zararlı böceklerin ortamdaki uzaklaştırılması ya da böceklerin kısırlaştırmada, radyasyon uygulaması ile tohumlarda mutasyona sebep olarak verimliliğin ve dayanıklılığın artırılmasında,
<b>Gümrük ve ulaşım</b>	Paket ya da kargo içeriklerinin görüntülenmesinde,
<b>Gıda üretimi</b>	Hazır et, tavuk, süt, sebze üretiminde oluşacak mikroorganizmaların yok edilmesinde,
<b>Atık kontrolü</b>	Evsel ya da tıbbi atıkların hastalık etmeni oluşturmaması için doğaya salınmadan önce biyolojik olarak yok edilmesinde,
<b>Kimya endüstrisi</b>	Bazı endüstriyel materyalin (polietilen, lastik yapıştırıcısı) kimyasal olarak yapılarının değiştirilmesinde.

Elektromagnetik spektrumda iyonlaştırıcı olan ve olmayan radyasyonun dalga frekansları Şekil 1’de gösterilmiştir.



Şekil 1. İyonlaştırıcı radyasyon ve iyonlaştırıcı olmayan radyasyonun dalga frekansları (10)

### İyonlaştırıcı Radyasyonun Biyolojik Etkileri

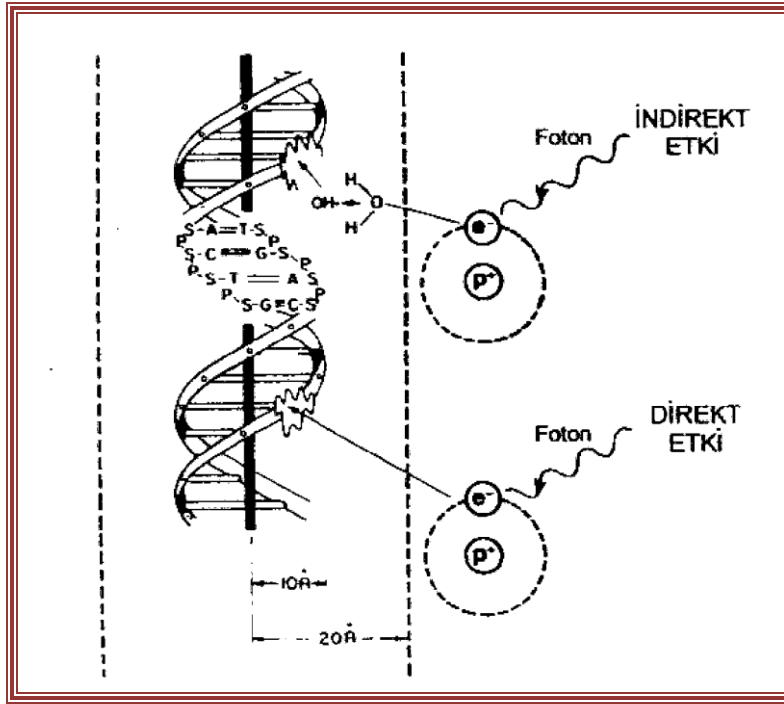
Canlı organizmalar; temeli hücre olan doku, organ ve organ sistemlerinden meydana gelmiştir. Radyasyonun biyolojik etki oluşturabilmesi için öncelikle enerjisini dokuyu oluşturan hücrelere transfer etmesi ve dokunun, fizyolojik veya morfolojik olarak zarar görmesi için yeterli sayıda hücrenin etkilenmesi gerekmektedir. İyonlaştırıcı radyasyonda, radyasyon enerjisinin absorblanması ve biyolojik etkilerin ortaya çıkması 3 kademede meydana gelmektedir (11).

1. Fiziksel Kademe
2. Kimyasal Kademe
3. Biyolojik Kademe

**1. Fiziksel kademe:** Biyolojik etki olarak sonlanabilecek olaylar zinciri, iyonlaştırıcı radyasyonun enerjisinin maddeye transfer edilmesiyle başlar. Fiziksel kademe olarak da adlandırılan bu aşamada absorblanan enerji iyonlaşma ve uyarılma olaylarına yol açar. Bu noktada iyonizan radyasyonla etkileşmeye giren molekülün yapısı meydana gelecek biyolojik sonuç açısından oldukça önemlidir.

Radyasyon enerjisi eğer DNA ile veya hücrede anahtar rol oynayan diğer bir makro molekülle etkileşime girmiş ve sonucunda fiziksel bir olaya neden olmuşsa, bu etkiye

radyasyonun direkt (doğrudan) etkisi denir. Eğer gelen radyasyon enerjisini biyomoleküllerden birine değilse, o biyolojik yapının civarındaki başta su molekülü olmak üzere diğer moleküllerden birine aktarmışsa biyomolekül, ortam moleküllerinin absorbladığı enerji nedeniyle meydana gelen elektronlardan etkileneceğinden bu durum radyasyonun indirekt (dolaylı) etkisi olarak adlandırılır (7,11). Radyasyon sonucu oluşan direkt ve indirekt etki Şekil 2 de gösterilmiştir.



Şekil 2. DNA'da direkt ve indirekt etki (12)

Direkt etki radyasyon enerjisinin doğrudan DNA molekülünün yapısını oluşturan pürin ya da pirimidin bazlarının arasında bulunan hidrojen bağlarını kırarak kimyasal bağları etkilemesi sonucu yapısal değişikliklere sebep olur (11,13).

İndirekt etkide ise ortamdaki su molekülleri serbest radikallerin oluşmasına sebep olmaktadır. Karasız yapıya sahip olan serbest radikaller DNA molekülündeki kimyasal bağları kırarak kararlı yapıya geçmeye çalışırlar. Bundan dolayı serbest radikaller ile DNA molekülünde hasar oluşmaktadır (11,14).

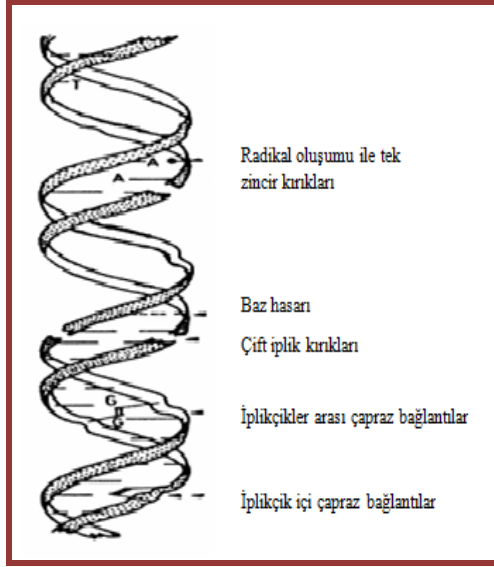
Fiziksel kademede radyasyon enerjisinin ortam tarafından absorblanması sonucunda meydana gelen serbest elektronlar diğer komşu atom ve moleküllerle etkileşerek zincirleme iyonlaşma olaylarına neden olur. Bu birincil reaksiyonları ikincil reaksiyonlar izler (11,14).

**2. Kimyasal kademe:** Fiziksel kademe sonunda oluşan, kararsız yeni ürünlerin meydana getirdiği reaksiyonları kapsar. İyonize radyasyon sonucu hasar görmüş atom ya da moleküller diğer hücrenel yapılar ile reaksiyona girerek serbest radikallerin oluşmasına neden olur (11,15).

Serbest radikaller, yörüngesinde  $e^-$  boşluğu bulunan elektriksel olarak nötral atomlar olmaları nedeniyle elektrofilik ve son derece reaktiftir. Biyolojik sistemlerdeki temel molekül olan su molekülü, enerjiyi absorblayınca değerlik kabuğunda paylaşılmamış elektron olan iki serbest radikale ( $H^\bullet$  ve  $OH^\bullet$ ) ayırır. Ayrıca ortamda oksijenin miktarı ile doğru orantılı olarak  $H_2O_2$  (hidrojen peroksit) gibi aktif yapıların varlığı da görülür.

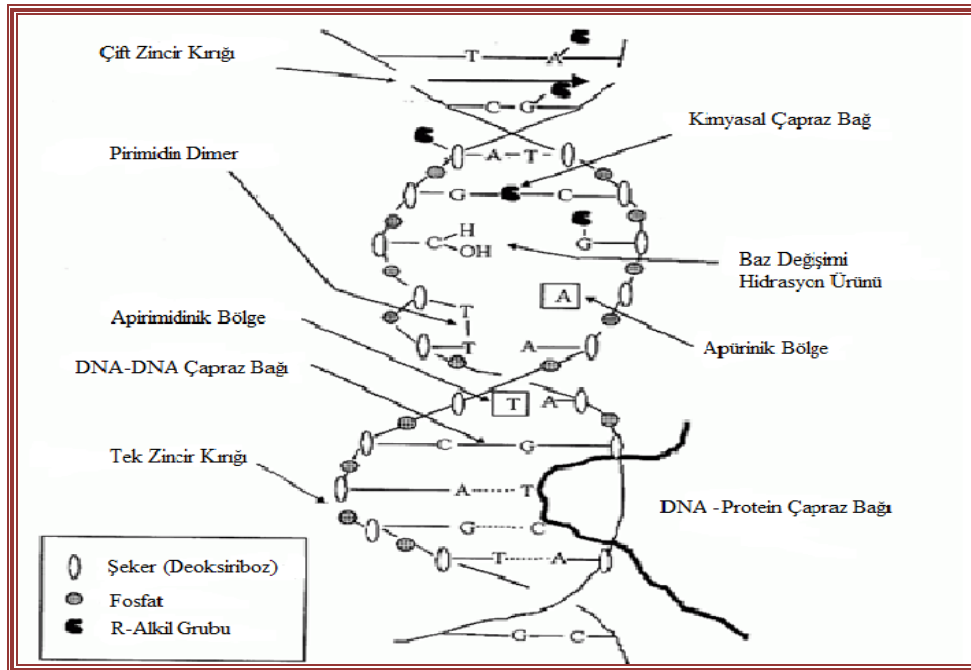
Hidrojen ve hidroksil radikallerinin yaşam süreleri  $10^{-10}$  saniye gibi çok kısadır. Bu nedenle çok reaktif olmalarına rağmen genel olarak hücre nükleusuna ulaşamazlar. Buna karşın hidrojen peroksit serbest radikalinde olduğu gibi oksijen ile oluşan serbest radikaller daha kararlı olduğundan, hücre nükleusuna ulaşabilecek kadar yeterli bir süre ortamda kalırlar. Bir biyolojik moleküle serbest radikalın transferi, bağ kırığına veya temel bir fonksiyonun aktivitesini yitirmesine neden olabilecek düzeyde hasar verebilir. Buna ilaveten, organik peroksit serbest radikali, bir molekülden diğerine taşınabilir ve gittiği moleküllerin her birinde hasara neden olabilir. Böylece toplamda görülen etki büyüyebilir (16-18).

**3. Biyolojik kademe:** Canlı organizmada radyasyon etkisinin ortaya çıktığı kademe biyolojik kademedir. Bu kademe çeşitli hasarlara yol açan enzim reaksiyonları ile başlar. Bu arada DNA molekülünde hücrenin yapısal fonksiyonlarını bozarak hücrenin hayatta kalmasını veya çoğalmasını önleyebilecek hasarlar oluşturabilir (Şekil 3).



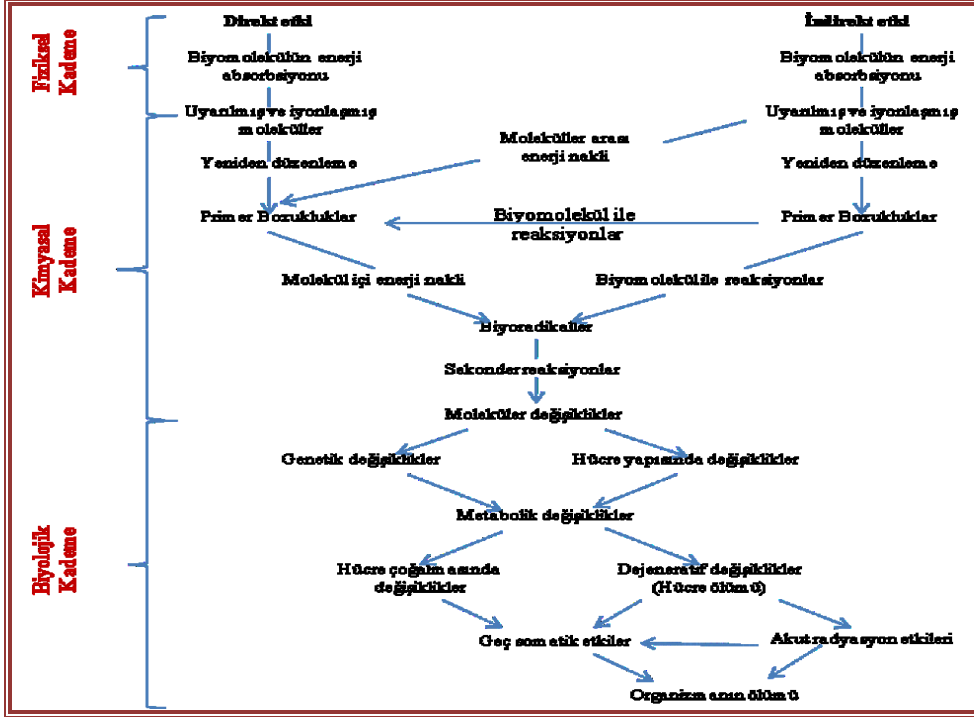
**Şekil 3. Radyasyon ile uyarılma sonucu oluşan DNA lezyonları (19)**

Bu durum radyasyonun canlıda oluşturduğu etkilerin son kademesidir. Oluşan serbest radikaller sonucu hücre ölümü, organizma ölümü, DNA'da tek veya çift zincir kırıkları, DNA tamir genlerinde ya da enzimlerinde hasar oluşması, mutasyon ve kanser oluşumları meydana gelebilir (Şekil 4).

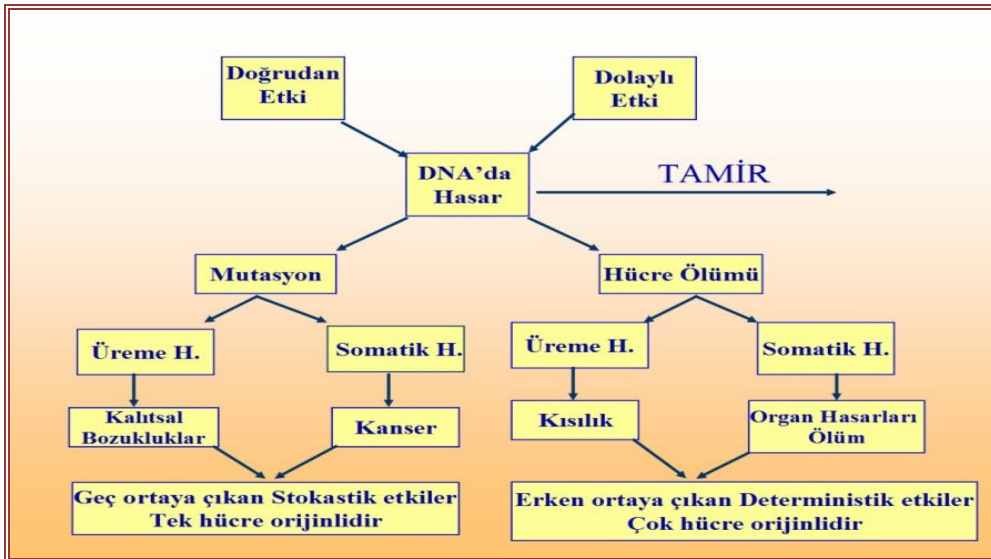


**Şekil 4. DNA'da oluşan yapısal hasarlar (20)**

Hücreler, radyasyon tarafından ister direkt ister indirekt olarak etkilenmiş olsun radyasyon enerjisinin absorblanması ve biyolojik etkilerin ortaya çıkması arasında geçen tüm basamaklar benzerdir (Şekil 5). Direkt ve indirekt etki ile DNA’da oluşan hasar sonucu ortaya çıkan etkiler Şekil 6’da gösterilmiştir.



Şekil 5. Radyasyonun canlıdaki etki kademeleri (11)



Şekil 6. Direkt ve indirekt etki ile DNA’da ki hasar sonucu ortaya çıkan etkiler



## **Radyasyonun DNA Üzerine Etkileri**

X-ışınlarının 1895'te ve doğal radyoaktivitenin 1896'da keşfedilmesinden çok kısa bir süre sonra iyonlaştırıcı radyasyonun faydalarının yanı sıra insan sağlığı üzerine olumsuz etkilerinin de olabileceğini işaret eden klinik etkiler görülmeye başlanmıştır. Daha sonraları meme kanseri tedavisinde radyasyonu ilk kullanan doktor olarak da bilinen Emile Grubbe'nın 1896'da öğrenciyken çalışır haldeki bir Crooke tüpünü kaldırması nedeniyle ellerinde meydana gelen yanıklar tarihte ilk radyasyon yaralanması olarak bilinmektedir (21).

Radyasyonun biyolojik etkilerinin temelinde hücrenin aldığı hasarın etkin olduğu anlaşıldıktan sonra hücrede hedef molekülü belirlemek için bazı memeli hücrelerinde ve tek hücreli organizmalarda çalışmalar gerçekleştirilmiştir (22). Bugün radyasyona maruz kalmada kritik hedefin DNA olduğunu ve radyasyonun DNA molekülünde fonksiyonların etkilenmesi, yapısal moleküllerin ya da sentezlenen ürünün etkilenmesi şeklinde hasar verebildiğini biliyoruz.

Radyasyona maruz kalma sonucunda DNA'da oluşacak hasarları 3 ana sınıfta toplayabiliriz:

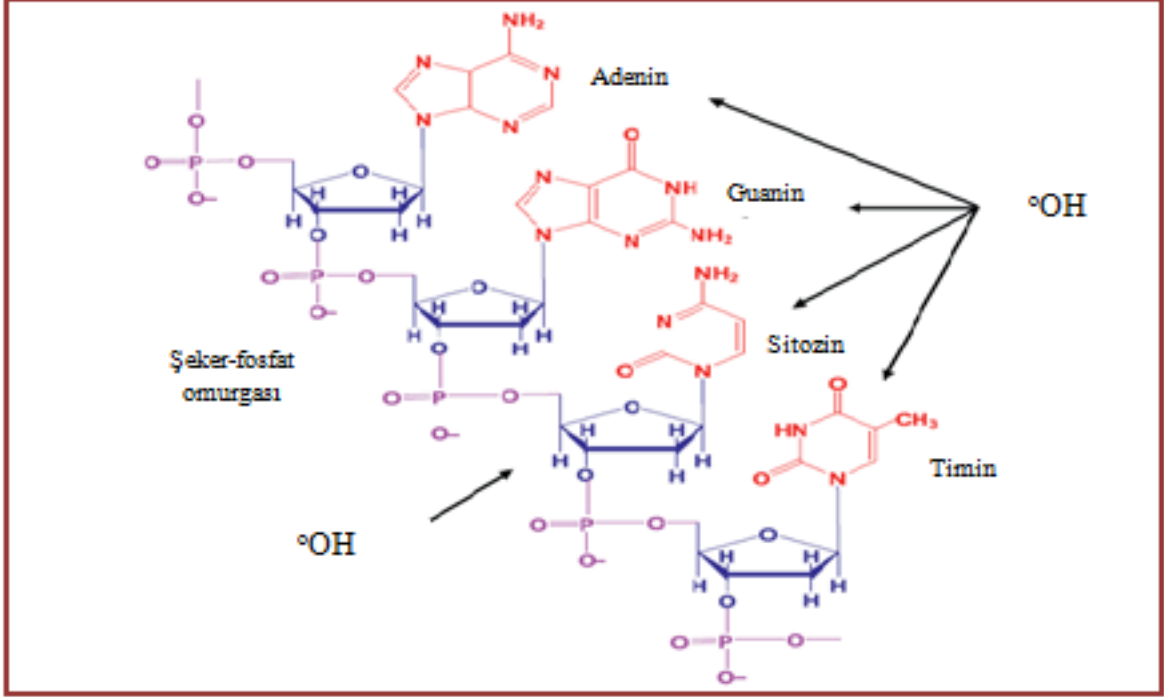
**1. Zincir kırılmaları:** Radyasyon sonucu oluşan hasarın büyük bir kısmını oluşturmaktadır. DNA'da tek zincir ya da çift zincir kırıkları oluşabilir.

Tek zincir kırıkları, DNA zincirinin bir tanesinde şeker-fosfat bağında radyasyon sonucu kopmaların oluşmasıyla meydana gelir. Bu kırılmalar genellikle düşük iyonizasyon yoğunluklu radyasyonlar sonucu oluşur.

Çift zincir kırılmaları ise iki zincirde de kırılmaların karşılıklı ya da birbirine çok yakın oluşması sonucu meydana gelir. Tek bir enerji transferi sonucu oluşur (11).

**2. Baz hasarları ve baz kayıpları:** Radyasyon sonucu oluşan serbest radikallerin pürin ya da pirimidin bazlarına yaptığı -OH radikali atağı ile oluşur. Pürin-OH ya da pirimidin-OH radikallerinin meydana gelmesi ve bu radikallerin oksijen ile reaksiyonu sonucunda pürin-hidroksi-hidroperoksit ve pirimidin-hidroksi-hidroperoksit oluşturarak baz kayıpları meydana gelir. DNA'da -OH radikalinin atak yaptığı noktalar Şekil 7'de gösterilmiştir.

### 3. Denatürasyon bölgelerinin veya bağların kopması sonucu çapraz bağlanmaların oluşması



Şekil 7. DNA'da OH radikalinin atak yaptığı noktalar (23)

Hidroksil radikalinin etkisiyle DNA'da pürin ve pirimidin bazlarına çift bağların eklenmesi ile timin bazının metil grubundan H<sup>•</sup> radikali ve 2'-deoksiriboz şekerinden başka bir C-H bağı koparılarak ayrılır. Oksitlenme ile uyarılmış DNA'da pürin hasarı, pirimidin hasarı, şeker bağlarının hasarlanması, 8,5'siklopürin-2'nükleosit hasarı, ardışık lezyon hasarı, kümelenmiş DNA hasarı, DNA-protein çapraz bağlantıları oluşmaktadır (23).

Ayrıca bu reaksiyonla guanin bazının 4., 5. ve 8. karbon atomları ile adenin bazının 5. ve 8. karbon atomlarına –OH radikalinin eklenmesiyle pürin hasarı oluşmaktadır (23).

DNA'da meydana gelen hasarlar sonucunda memeli hücrelerinde farklı sonuçlar oluşur. Bunun nedeni DNA'da meydana gelen hasarın tipleridir. Radyasyonun hücrelerde oluşturduğu hasar 3 tiptir:

1. Letal hasar, adından da anlaşıldığı gibi hücreleri ölüme götüren hasarlardır. Bölünmeyen hücrelerin fonksiyon kaybına ve bölünen hücrelerin bölünme yeteneklerinin kaybına sebep olur.

2. Subletal hasar, radyasyon sonrasında oluşan hasarın hücreler tarafından tamir edilebildiği ancak hücrenin daha duyarlı haline gelmesine sebep olan hasarlardır.

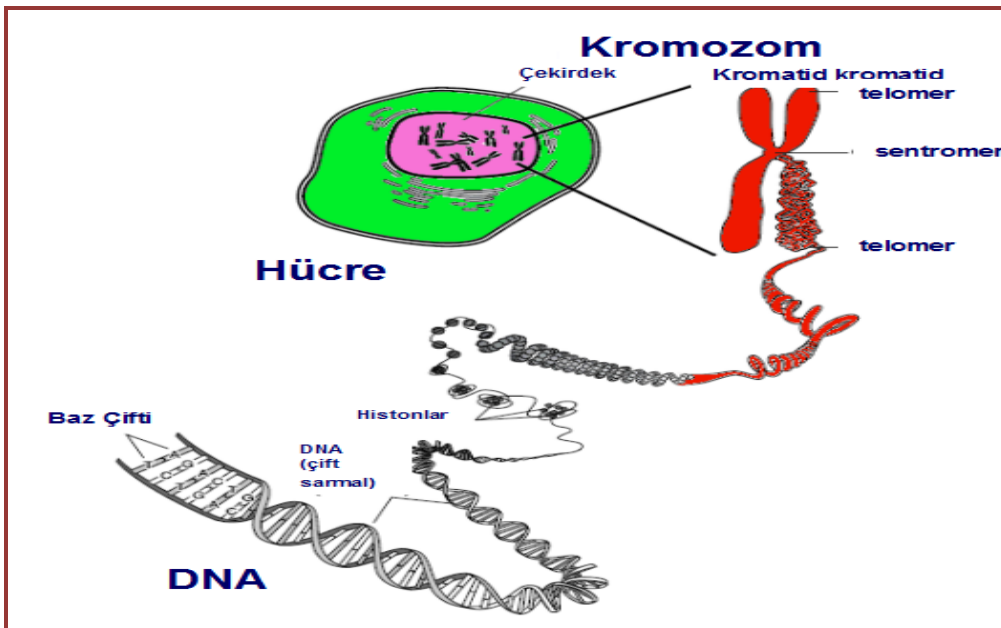
3. Potansiyel subletal hasar ise, büyüme halindeki hücrenin bulunduğu ortama göre aldığı iyonize edici radyasyona karşı hücrenin ölmesi yerine bu hasarın tamir edilebilmesidir (11).

Oluşan hasarların bazıları tamir edilemeyip mutasyonları oluştururken, bazı hasarlarda DNA tamir mekanizmaları ile ortadan kaldırılmaktadır.

Eğer hasar DNA'nın tek zincirde oluşmuşsa, diğer zincir hasara uğramadığından doğru nükleotidler yerleştirilerek hasar giderilebilir. Oluşan hasar tek zincir kırıklarına sebep olursa kolay tamir edilebilir ancak çift zincir kırıklarına sebep olursa tamiri zordur (24,25).

### Radyasyonun Kromozomlar Üzerine Etkisi

DNA, düzensiz fakat tesadüfi olmayan bir dizi halinde, milyonlarca nükleotidden oluşan çok uzun, dallanmayan lineer bir polimerdir (26). Bölünmeyen hücrelerde çekirdekte yayılmış halde bulunan kromatin materyalinin içinde yer alır. Hücreler bölünmeye hazırlanırken kromatin yoğunlaşır, spiralleşir kalınlaşır ve türe özgü sayıda iyice belirginleşerek kromozomlara dönüşür (Şekil 8).



Şekil 8. Kromozomların oluşması (27)

Nukleustaki her bir DNA molekülü, kromozomlarda yer alır. Her bir kromozom çiftinde bulunan yüzde DNA miktarı aşağıdaki Tablo 2’ de verilmiştir (16).

**Tablo 2. Kadın genomunda, kromozom çiftlerinde bulunan yüzde DNA içeriği (19)**

Kromozom numarası	p kolu	q kolu	Her iki kol	Kromozom numarası	p kolu	q kolu	Her iki kol
1	3.97	4.18	8.15	13	0.49	3.04	3.53
2	3.07	4.83	7.90	14	0.50	2.88	3.38
3	3.07	3.56	6.63	15	0.53	2.76	3.29
4	1.74	4.55	6.29	16	1.21	1.83	3.04
5	1.61	4.40	6.01	17	0.87	1.98	2.85
6	2.02	3.66	5.68	18	0.62	2.01	2.63
7	2.01	3.29	5.30	19	0.93	1.15	2.08
8	1.55	3.25	4.80	20	0.96	1.27	2.23
9	1.58	2.91	4.49	21	0.34	1.21	1.55
10	1.36	3.10	4.46	22	0.40	1.34	1.74
11	1.80	2.66	4.46	X	1.92	3.16	5.08
12	1.21	3.22	4.43			Total	100

X-ışınlarının drosophila kromozomlarında aberasyonlara neden olduğu ilk kez 1927 yılında Müller tarafından rapor edilmiştir (28). 1929’da ise Painter ve Müller tarafından sitolojik olarak da onaylanmıştır (29).












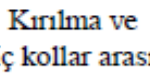
Bugün biliyoruz ki başta radyasyon olmak üzere pek çok fiziksel ve kimyasal ajan DNA’da hasara neden olmaktadır. Bu hasarlar DNA tamir mekanizmaları tarafından düzeltilebilir. Tamir edilemeyen veya yanlış tamir edilen hasarlar nokta mutasyonlara ve/veya kromozomal aberasyonlara neden olur. Radyasyona maruz kalan hücrenin bulunduğu evreye göre kromozom veya kromatid tip aberasyonlar meydana gelebilir (19).

**1. Kromozom tipi aberasyonlar:** Bu tip aberasyonlar, interfazın erken evresinde DNA replikasyonundan önce kromozomlarda hasar oluşturan radyasyon ya da kimyasal ajanlara maruz kalınması sonucu nükleotidlerin yapısında değişikliklerin oluşması ile meydana gelmektedir (11). Kromozom tipi aberasyonlar oluşum şekillerine göre farklılık göstermektedir (Şekil 9).

Karşılıklı değişim	Kollar arası değişim	Kol içi değişim	Kırık ve kopmalar
 Disentrik Asentrik	 Sentrik halka	 Ara delesyon	 Asentrik
 Resiprokal translokasyon	 Perisentrik inversiyon	 Parasentrik inversiyon	

Şekil 9. Kromozom tipi aberasyonlar (30)

2. **Kromatid tipi aberasyonlar:** DNA sentezinden sonraki interfaz evresinde aynı ya da farklı kromozomlar arasındaki fosfodiester bağlarının kırılması ile kromatidde parça değişimlerinin oluşması ile meydana gelir (11). Kromozom tipi aberasyonlar gibi kromatid tipi aberasyonlar da oluşan hasara göre farklılık göstermektedir (Şekil 10).

Karşılıklı değişim	İç kollar arası değişim		Kollar arası değişim		Kırık kopukluk
 Disentrik	 Sentrik halka	 Disentrik	 Asentrik halka	 İzokromozom delesyon	
 Resiprokal translokasyon	 Perisentrik inversiyon	 Duplikasyon/ delesyon	 Parasentrik inversiyon	 Duplikasyon/ delesyon	 Kırılma ve İç kollar arası değişim

Şekil 10. Kromatid tipi aberasyonlar (30)

Kromozomal aberasyonlar, kişilerin absorbladıkları dozları belirlemede kullanılır. Tamir edilmemiş veya yanlış tamir edilmiş lezyonları gösteren kromozomal aberasyonlar tiplerine göre metafazda, anafazda ya da interfazda sayısal olarak belirlenebilirler.

İyonizan radyasyon hücre döngüsünün  $G_1$  evresinde uygulanırsa kromozom tip aberasyonlar,  $G_2$  evresinde uygulanırsa kromatid tip aberasyonlar gözlemlenir.  $G_2$

evresinde hücreler mutajene maruz kalırsa, onu takip eden mitoz bölünmede aberasyon gözlemlenmez. Aberasyonun sabitlemesi için hücrelerin bir sentez fazı (S) geçirmeleri gerekir. Bu durumda bir sonraki mitoz bölünmede oluşan aberasyonlar ortaya çıkmaktadır.

Kırıklar metafazdaki kromatid veya kromozom kırıkları gibi tek veya çift olabilir. Anafaz grupları arasında tek veya çift köprüler olabildiği gibi çok kutuplu iğler (2 den fazla) ve kromozomların olmaması da gözlemlenebilir. Disentrikler çift köprüye neden olurken asimetrik intra veya inter kromatid değişimleri tek köprü oluşturur (31).

### **Radyasyonun Biyolojik Etkisini Değiştiren Faktörler**

İyonizan radyasyonun canlı organizma tarafından absorblanan kısmı radyasyona maruz kalma sonucunda oluşabilecek potansiyel biyolojik etkinin belirlenmesinde en önemli fiziksel büyüklüktür. Radyasyon dozu röntgenle ifade edilir. 1 Röntgen, 0°C’de ve 760 mm Hg basıncında 1 cm<sup>3</sup> havada (0.001293 gr) 1 elektrostatik yük birimlik elektrik yükü taşıyan pozitif ya da negatif yüklü iyonları oluşturan X ve  $\gamma$  radyasyon miktarı olarak tanımlanır (11). Bu dozun canlıda meydana getireceği etkiyi belirleyen iyonizan radyasyon tarafından maddeye aktarılan dozun birimi ise Gray (Gy) dir. 1 Gray, ışınlanan maddenin 1 kg’ına 1 joule’lük enerji veren radyasyon miktarıdır (32).

Farklı radyasyon dozlarında yapılan hücre sağkalım çalışmaları absorblanan dozun canlıdaki sonuçlarını etkileyen bazı faktörler olduğunu ortaya koymuştur (11,15,33).

Bunlar;

- a) Radyasyonun kalitesi
- b) Doz hızı ve dozun aralıklarla verilmesi
- c) Ortamın sıcaklığı
- d) Hücre siklusunun hangi fazında olduğu
- e) Hücrenin tipi
- f) Ortamda radyoprotektörler/radyoduyarlılaştırıcıların bulunması şeklinde sıralanabilir.

**a) Radyasyonun kalitesi:** Canlı dokuda hücresel seviyede enerji tutulumu iyonizan radyasyonun tipine göre değişiklikler gösterir. Bu durum farklı radyasyon tiplerinin birim maddeye transfer ettikleri enerji miktarlarının farklı olmasıyla ilişkilidir. Radyasyonun biyolojik etkilerinin değerlendirilmesinde güçlüğü neden olan bu sorun

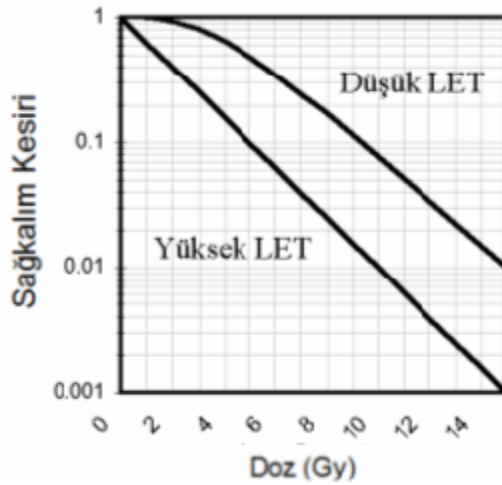
1940'da Zirkle tarafından önerilen 1991'de de ICRP (International Commission on Radiation Protection) tarafından doz değerlendirmelerinde kullanılmaya başlanan Lineer Enerji Transferi (LET) kavramı ile çözülmüştür (33,34).

LET, radyasyonun yolu boyunca birim mesafede maddeye transfer ettiği enerji miktarı olarak ifade edilir. Tablo-3'te radyasyon tiplerinin LET değerleri verilmiştir (11).

**Tablo 3. Radyasyon tiplerinin LET değerleri (11)**

Radyasyon Tipi	LET (keV/ $\mu\text{m}$ )
$^{60}\text{Co}$ $\gamma$ ışınları	0.3
250 keV'lik X-ışınları	2.0
H $\beta$ parçacıkları	5.0
14 MeV nötronlar	12.0
Ağır yüklü parçacıklar	100-20000

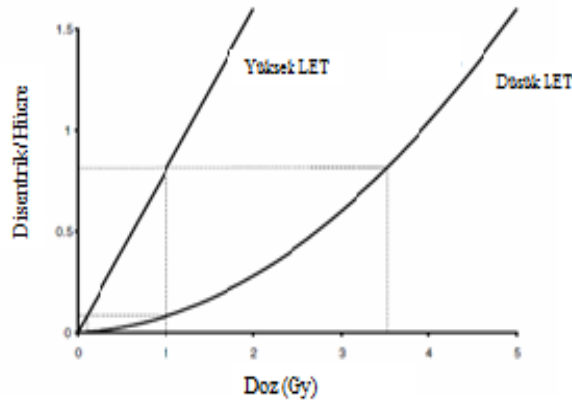
LET değeri arttıkça aynı dozda sağ kalan hücre sayısı azalır (Şekil 11). Bunun nedeni kısa mesafede yoğun enerji transferiyle hücrede geri dönüşümsüz hasarın artmasıdır (35). Buna göre X ve  $\gamma$  ışınları gibi düşük LET li radyasyonlar, yüksek LET'li  $\alpha$ ,  $\beta$  ve nötronlara göre daha az hasar vericidir.



**Şekil 11. Radyasyonun LET'le değişimi (11)**

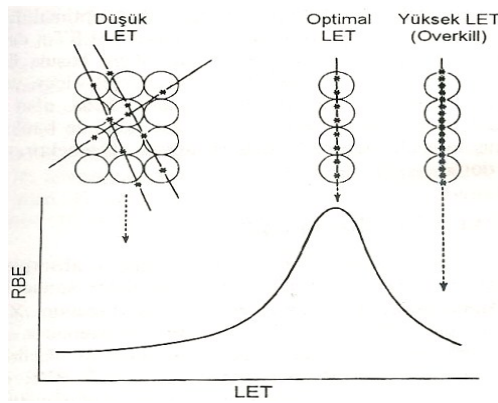
Farklı tipteki iyonlaştırıcı radyasyonların aynı dozları aynı biyolojik etkileri oluşturmayabilir (Şekil 12). Organizmada aynı biyolojik etkiyi oluşturmak için gerekli olan

250 keV'lik X ışını dozunun, herhangi bir iyonlaştırıcı radyasyonun aynı etkiyi oluşturmak için gerekli olan dozuna oranı relatif biyolojik etkinlik (RBE) olarak tanımlanır (11).



**Şekil 12. Farklı LET değerlerine sahip radyasyonların doz cevap eğrileri (19)**

LET'in yaklaşık 10 keV/mm değerine kadar artışı ile paralel olarak RBE'de yavaş bir şekilde artar. 10 ile 100 keV/mm arasında artış hızlanır. 100 keV//mm'de maksimuma ulaşır. Ardından overkill etkisi başlar (15) (Şekil 13).



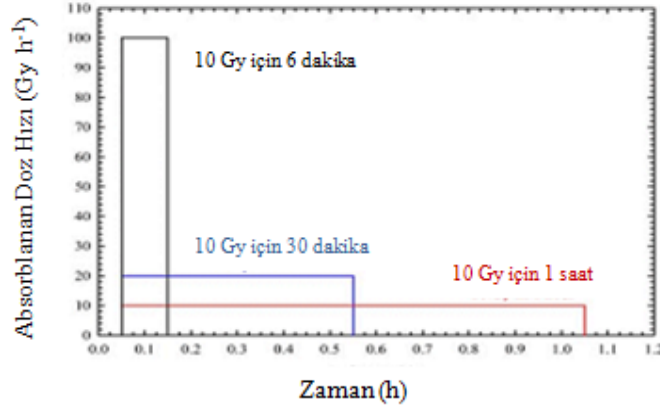
**Şekil 13. LET ile RBE arasındaki ilişki ve overkill etkisi (15)**

**b) Doz hızı ve dozun aralıklarla verilmesi:** Düşük doz hızları ve dozun aralıklarla verilmesi yüksek doz hızlarından ve aynı dozun bir seferde verilmesinden daha az hasar meydana getirir (36,37).

Doz hızı etkisi ilk olarak Berry ve Cohen (1962) tarafından gösterilmiştir. Bunu Hall ve Bedford'un (1964) HeLa (İnsan servikal kanser) hücreleriyle, Fox ve Nias (1970)'in CHO (Çin Hamster ovaryum) hücreleriyle yaptığı in vivo çalışmalar takip



etmiştir (38). Hall 0.60 Gy/saatlik ve 60 Gy/saatlik doz hızlarıyla yaptığı çalışma doz eğrileri arasında %37'lik bir fark olduğunu göstermiştir (36). Absorblanan doz ve zamanın değişimi Şekil 14'te gösterilmiştir.

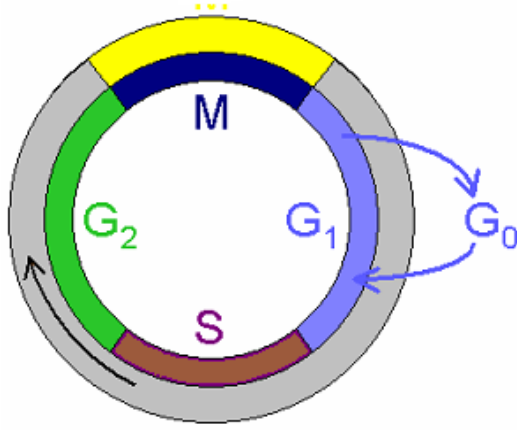


**Şekil 14. Absorblanan dozun hız ve zamanla değişimi (39)**

Düşük doz hızlarında hasarın az olmasının nedeni meydana gelen hasarın çoğunlukla subletal katakterli olması nedeniyle tamir mekanizmasının etkin olabilmesidir. Dozun aralıklarla verilmesinde de yine tamir mekanizması nedeniyle aynı dozun bir seferde verilmesinden daha az hasar meydana gelir (39). Bu durum yüksek LET'li radyasyonlarda oluşan hasarın çoğunun letal hasar olması nedeniyle sadece düşük LET'li radyasyonlar için geçerlidir (35).

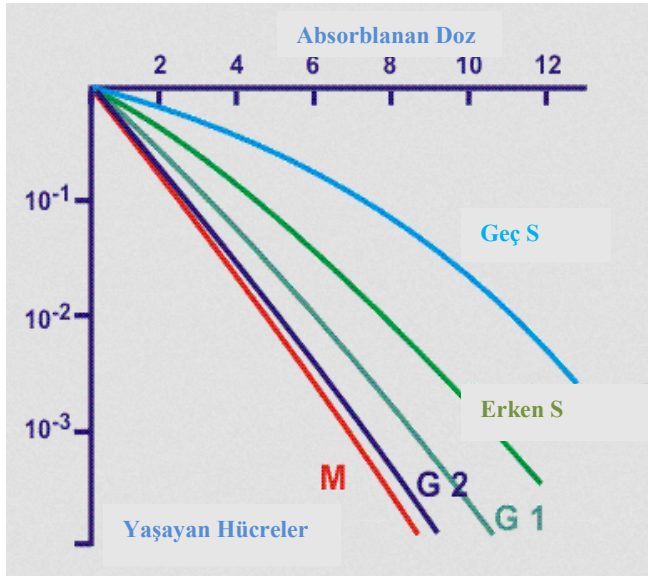
**c) Ortamın sıcaklığı:** Biyomoleküllerin radyasyona duyarlılıklarının sıcaklığın artması ile arttığı gözlemlenmiştir. Yüksek ısıda hücrelerin çoğu radyasyona daha duyarlı iken kromozom aberasyonu sayısı düşük ısıda daha fazladır. Bu durum düşük ısılarda DNA onarımının baskılanmasından kaynaklanmaktadır (40).

**d) Hücre siklusunun fazları:** İnsan vücudunda bulunan çok farklılaşmış bazı hücreler hariç (sinir hücreleri ve eritrositler) bütün somatik hücreler mitoz bölünme ile çoğalırlar (41). Hücre siklusunun mitoz dışında kalan evreleri (**G<sub>1</sub>**, **S**, **G<sub>2</sub>**) interfaz olarak adlandırılır (Şekil 15). İnterfaz evresi mitozun bir parçası değil, hücrenin mitoz bölünmeye geçmeden önceki hazırlık evresidir (26).



**Şekil 15. Hücre siklusu**

Hücre siklusunun fazlarının radyasyona duyarlılıkları farklılıklar gösterir (Şekil 16). Sağkalım çalışmaları hücrelerin radyasyona en duyarlı olduğu evrelerin M fazından hemen önce olan geç metefazda (G<sub>2</sub>) ve mitoz sırasında olduğunu ortaya koymuştur. Mitoz fazında radyoduyarlılık yaklaşık dört kat daha fazladır. S fazındaki, geç G<sub>1</sub> fazındaki ve G<sub>0</sub> fazındaki hücrelerde daha yüksek bir direnç görülür. S fazındaki direnç, DNA kırıklarının hızlı onarma kabiliyetinde olan sentez enzimlerinin varlığı nedeniyle olabilir. Bununla beraber S fazından hemen önceki hücrelerde mutasyon sıklığı artar (11,15). Hücre ölümüne karşı en duyarlı olan geç G<sub>2</sub> fazındaki ve mitoz evresindeki hücrelerdir.



**Şekil 16. Hücre siklusunun değişik fazlarındaki hücrelerin relatif sağkalım eğrileri (42)**

S fazı boyunca DNA miktarı iki katına çıkar. G<sub>2</sub> ye gelindiğinde DNA miktarı 4n dir. Radyasyona karşı primer hedef DNA olduğu düşünüldüğünde DNA miktarının arttığı evrelerin radyasyona daha duyarlı olması beklenir. Oysaki radyasyona en dirençli faz DNA miktarının 4n'e çıktığı geç S fazıdır. Yapılan çalışmalar hücrede doğal olarak bulunan ve canlıyı radyasyona karşı koruyucu etkisi olan sülfidril (SH) gruplarının değişik hücre fazlarında farklı miktarlarda bulunduğunu ortaya koymaktadır (15,43).

e) **Hücre tipi:** İyonizan radyasyonların etkilerinin şiddetini belirleyen faktörlerden biri dokuların radyasyona karşı gösterdikleri duyarlılıktır (Şekil 17).



**Şekil 17. Bazı insan hücre ve dokularının sağkalımları esas alınarak radyasyona karşı duyarlılıkları**

Dokuların radyasyona karşı duyarlılıkları onları meydana getiren hücrelerin bölünme kapasiteleriyle doğru, farklılaşma dereceleriyle ters orantılıdır. Yani dokuyu oluşturan hücreler mitotik açıdan aktifse, peş peşe birçok kez bölünüyorsa morfolojik ve fonksiyonel açıdan farklılaşmamışsa radyasyona duyarlıdır (15).

Diferansiyon azlığının neden radyoduyarlılığı arttırdığı açık değildir. Az diferansiye hücreler veya diferansiyasyon sürecindeki hücrelerin radyasyon ile kolayca öldüğü gösterilmiştir. Uzun süre bölünen hücrelerin radyasyona duyarlılığı daha fazladır. Bu konuda bir istisna dolaşan kan lenfosit hücreleridir. Dolaşan kanda lenfositler hiç bölünmedikleri halde radyasyona en duyarlı hücre grubunu oluştururlar. Bu nedenle biyolojik doz değerlendirmelerinde lenfositler kullanılır.

**f) Radyoduyarlılaştırıcılar/Radyoprotektörler:** Radyasyon ışınlanması sırasında ortamda bulunan bazı maddelerin varlığı radyasyonun etkisini arttırıcı veya azaltıcı olabilir.

Hücre içinde ve çevresindeki oksijen konsantrasyonu, radyasyona duyarlılığı etkileyen en önemli faktördür. Oksijenli ortamlardaki hücre kültürlerinin anoksik ortamlardakilere oranla düşük LET'li radyasyonlara daha fazla duyarlı oldukları gözlemlenmiştir (39).

Birçok doğal veya yapay kimyasal ajan eğer ışınlamadan önce doku veya hücrelerde bulunuyor ise radyasyona duyarlılığını etkileyebilir. Dokulardaki çözünmüş oksijen, serbest radikallerin stabilitesini ve toksisitesini artırır (11). Oksijenasyonun bir sonucu olarak etkideki artma derecesi oksijenin etkiyi yükseltme oranı (oxygen enhancement ratio) (OER) olarak bilinir (15) ve bu oran;

$$\text{OER} = \frac{\text{Oksijensiz ortamda etkiyi oluşturmak için gerekli doz}}{\text{Oksijenli ortamda aynı etkiyi oluşturmak için gerekli doz}}$$

olarak belirlenir. OER'in maksimum değeri 3'tür (15). Oksijenizasyon serbest radikaller üzerinden olan indirekt etkiyi düzenleyebilir. Yüksek LET'in radyasyonun direkt etkisinde rolü yoktur (11,15).

Katyonlar, metromidasol ve mizonidasol gibi elektron afinitesi yüksek bileşikler radyasyonun hasar verici etkisini arttırabilir. Alkol, morfin ve trankilizanlar solunumu azaltarak oksijenasyonu düşürür ve radyorezistansı artırır.

Buna karşın thioller ve fazla miktarda -SH radikalleri içeren diğer bileşiklerin, vitamin A, C, E gibi antioksidanların radyasyon hasarını azaltıcı etkileri vardır. Bu bileşiklerin serbest radikalleri uzaklaştırarak, hipoksi oluşturarak ve proteinlerde disülfid bağları oluşturarak onları güçlendirip hücreleri korudukları düşünülmektedir (11).

Thioller aynı zamanda DNA sentezini geçici olarak inhibe ederek, onarım enzimlerinin subletal hasarı tamamen onarmaları için zaman tanır. Epinefrin doku hipoksisine neden olur ve bu nedenle bazı koruyucu özellikleri vardır (39).

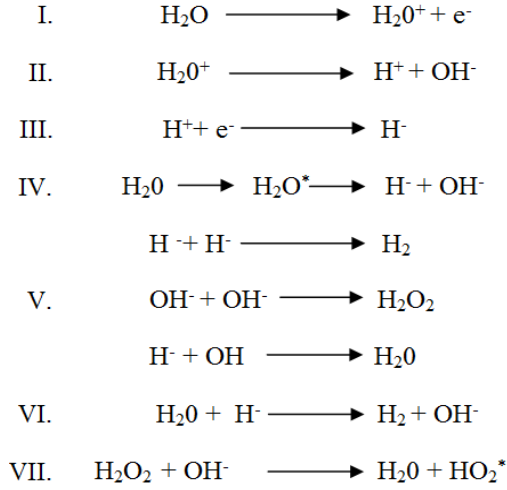
## SERBEST RADİKAL-ANTIOKSİDAN İLİŞKİSİ

### Serbest Radikaller

Serbest radikaller, son yörüngelerinde en az bir tane eşleşmemiş elektron bulunduran ve bu elektronu çiftlemek için diğer moleküller ile tepkimeye girmeye yatkın olan kısa ömürlü, kararsız, molekül ağırlığı küçük olan bir moleküldür (44-46). Kararlı hale geçmek için elektron alıcı (oksitleyici) ya da elektron verici (redükleyici) olarak davranırlar (11). Radyasyon sonucu baz çiftleri ya da şeker-fosfat bağları arasındaki hidrojen bağlarının kırılması ile oluşan elektronlarla su molekülü etkileşir ve serbest radikaller oluştururlar.

Canlıların %70-90'ında su molekülünün bulunduğunu düşünürsek biyolojik dokularda oksijen ile reaksiyona girerek oluşan serbest radikaller çok önemlidir. Su molekülü iyonlaştırıcı radyasyon etkisiyle iyonlarına, uyarılmış atom veya moleküllerine ayrılarak kimyasal olarak parçalanır. Bu parçalanma sonucunda hidrojen peroksit molekülleri ( $H_2O_2$ ), radikal hidrojen ( $H^\cdot$ ), moleküler hidrojen ( $H_2$ ), hidroksil radikali ( $-OH$ ), hidroperoksit radikali ( $HO_2^\cdot$ ) ve süperoksit ( $O_2$ ) oluştururlar (14,23,45). Hücre hasarına neden olan süperoksit, süperoksit dismutaz (SOD) enzimi yardımıyla hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve oksijene çevrilir (46).  $H_2O_2$  ise dokularda bulunan katalaz, peroksidaz enzimleri ile su ve oksijene ayrılarak daha etkisiz hale dönüştürülür (46).

İlk olarak su molekülü, radyasyon etkisi ile iyonlaşarak serbest elektron ve pozitif yüklü iyon oluşturur. Pozitif yüklü iyon hidrojen iyonu ve hidroksil radikali oluşturur. Serbest elektron ile hidrojen iyonunun birleşmesi ile hidrojen radikali meydana gelebilir.  $OH$  ve  $H^\cdot$  radikalleri sadece suyun iyonlaşması ile oluşmaz su molekülünün uyarılması ile de meydana gelebilir.  $H^\cdot$  radikalleri çok reaktiftir ve radikal-radikal reaksiyonları ile hidrojen peroksit moleküllerini oluşturabilir. Reaksiyonlar sonucu oluşan ürünler kendi aralarında reaksiyona girerek hidroperoksit radikali gibi farklı radikaller ortaya çıkararak oksidatif strese neden olabilir (Şekil 18) (11,14).



### Şekil 18. Su molekülünün iyonlaşması ve serbest radikallerin oluşumu

Radyasyon uygulaması sırasında ortamdaki oksijen miktarı da önemlidir. Radyasyonun oluşturduğu hasar ortamdaki oksijen miktarına bağlı olarak artabilir (11). Radyasyonun absorblanmasından sonra su molekülünün parçalanması ile oluşan serbest elektron ( $\text{e}^-$ ) ya da hidrojen iyonu ( $\text{H}^-$ ) ile ortamdaki oksijen reaksiyona girerek hidrojen peroksit ve  $\text{HO}_2^-$  oluşturur (11). Serbest radikallerden kaynaklı oluşan hasarları nükleik asitlerde hidrojen bağlarının kırılması ile oluşan kimyasal değişiklikler, şeker-baz bağlarının kırılması ve şeker oksidasyonunun oluşumu olarak sıralayabiliriz (14).

Serbest radikaller antioksidanlar tarafından etkisiz hale getirilebilir.

#### Antioksidanlar

Canlı hücrelerde protein, lipit, karbonhidrat ve DNA gibi okside olabilen yapılarda serbest radikallerin neden olduğu oksidasyonu önleyen ya da geçiktiren maddelere “antioksidan maddeler” denir (45-48). Antioksidanlar, doğal olarak şifalı bitkilerde, tahıllarda ve sebzelerde bulunabilir. Bu gruptaki antioksidan maddeler, tokoferoller, flavonoidler, fenolik bileşikler, klorofil ve karotenler olarak sıralanabilir (49).

Antioksidan maddeler;

1. Toplayıcı ve giderici etki ile serbest radikalleri kendine bağlayarak ya da daha kararlı hale getirerek,

2. Zincir kırıcı etki ile serbest radikal oluşumunu engelleyerek,

3. Baskılayıcı etki ile reaksiyon hızını azaltarak,
4. Onarıcı etki ile protein ve DNA gibi molekülerde oluşan hasarı tamir ederek,
5. Hücresel kinaz kayıplarını önleyip oksidasyonları durdurarak,
6. Antioksidan enzimler ile enzimatik olmayan antioksidanların sentezini artırarak etki etmektedir (50,51).

Antioksidan maddeler etki etme yollarına göre ikiye ayrılır.

1. **Hücre içinde bulunan antioksidanlar:** Mevcut diğer radikaller ile reaksiyona girerek onların daha zararlı formlara dönüşmesini önleyen bileşiklerdir. Hücre içinde bulunan bu antioksidanlar, süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx) ve katalaz (CAT) enzimleridir. Bu enzimler oluşan serbest radikalleri yok etmektedirler (45,46,49,52,53).

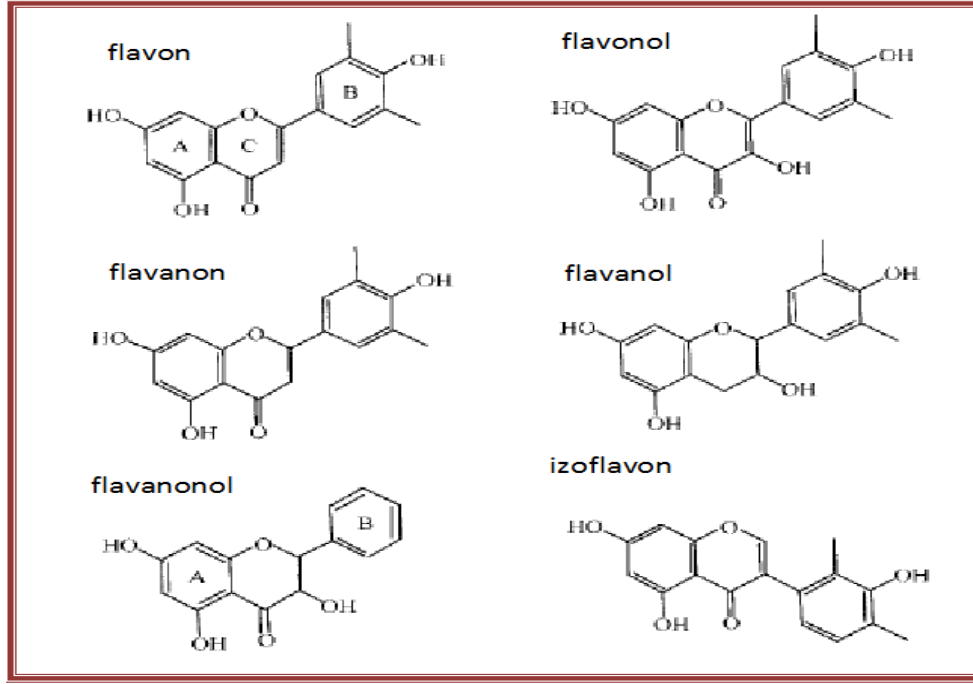
2. **Hücre dışında bulunan antioksidanlar:** Oksijen radikallerini yakalar ve daha sonra oluşacak radikal zincir reaksiyonlarını kırarak yeni oluşumları önleyen bileşiklerdir. Bu antioksidanlar da E vitamini, C vitamini (53), transferin, haptoglobin, seruloplazmin, albumin, bilirubin, P-karoten, polifenoller ve flavonoidler'dir (46,49,52,54).

## FLAVONOİDLER

Renkleri nedeniyle latince "sarı" anlamına gelen "Flavus" sözcüğünden türetilen bir grup kimyasal bileşiktir.

15 C atomlu 2-fenil benzopiron (difenil propan) yapısında olduğundan polifenolik bileşikler olarak kabul edilirler (55). Yapılarındaki 2- fenil benzopiron yapısı 3 halkadan oluşmaktadır. Bu halkalara hidroksil (-OH) grupları bağlanmaktadır. A halkası glikoz metabolizması sonucu oluşan koenzim A'dan oluşan malonil Koenzim A (CoA) molekülünden, B ve C halkaları da glukoz metabolizması sonucu oluşan şikimik asit üzerinden sinnamik asit bileşiklerinden oluşmuştur (55).

Karbon (C) atomlarının değişik pozisyonlarına hidroksil (-OH) gruplarının bağlanmasıyla oluşan farklı flavonoid gruplar Şekil 19'da gösterilmiştir.



**Şekil 19. Flavonoidlerin kimyasal yapısı (56)**

C atomunun bulunduğu yere göre alt gruplara ayrılmaktadır (Tablo 4).

**Tablo 4. Flavonoidlerin alt sınıfları ve besinsel kaynakları (56)**

Flavonoid Alt Grupları	Flavonoidler	Temel Besin Kaynakları
Flavonoller	Kaemherol, Myricetin, Quercetin, Rutin	Soğan, Kiraz, Elma, Brokoli, Lahana, Domates, Böğürtlen, Çay, Kırmızı Şarap, Karabuğday
Flavonlar	Apigenin, Chrysin, Luteolin	Maydonoz, Kekik
İsoflavonlar	Daidzein, Genistein, Glycitein, Formononetin	Soya Fasülyesi, Kekik
Flavanoller	Catechin, Galocatechin	Elma, Çay
Flavanonlar	Eriodiktol, Hesperidin, Naringenin	Portakal, Greyfurt
Flavanonoller	Taxifolin, Amentoflavon	Limon, Narenciye

Flavonoidlerin biyolojik aktiviteleriyle ilgili ilk çalışma 1936 yılında Rusznyak ve Szent-Gyorgi tarafından yapılmıştır (57). Daha sonra in vivo veya in vitro olarak gerçekleştirilen pek çok çalışmada başta antioksidan özelliği olmak üzere, antitümör, antienflamatuvar, antiviral, antiallerjenik, antitrombotik, aterosklerosis ve koroner kalp hastalıklarından koruma, vasodilatasyon etkisi ve hücrel immünitenin stimülasyon



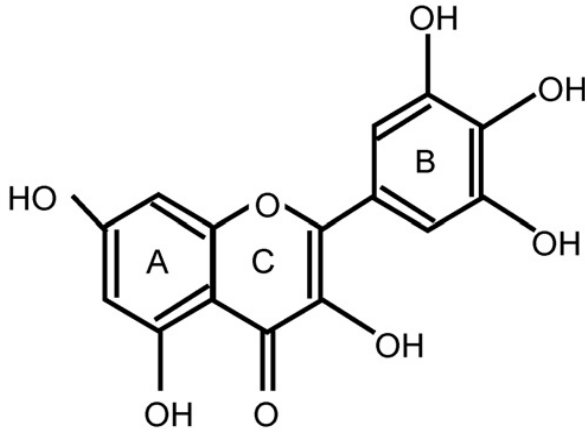
özellikleri bulunduğu ortaya konmuştur (55,58-61). Bu flavonoidlerin antioksidan özellikleri, özellikle ksantine oksidaz'ı yok etme yetenekleri, hidroksil radikalleri ve süperoksit anyonları bağlama ve lipid peroksidasyonunu yok etme özelliklerinden kaynaklanmaktadır (58).

Flavonoidler buldukları ortama göre serbest radikallerin varlığında antioksidan özelliği gösterirken, geçiş metali varlığında da prooksidan aktivitesi göstermektedir (49,60). Serbest radikal yakalama ve antioksidan özellikleri yapılarında bulunan B halkasındaki o-dihidroksi grubundan, C halkasındaki 4-okso grubu ile 2 ya da 3 çift bağdan, 3 ve 5 hidroksil gruplarından kaynaklanmaktadır (62). B halkasındaki hidroksilasyon, antioksidan aktivitesine katkı sağlar (49).

## MYRICETİN

### Myricetin'in Kimyasal Yapısı ve Özellikleri

Myricetin, 3,3',4',5,5',7 pozisyonlarında hidroksil değişmeler ile oluşan bitkisel kaynaklı doğal bir flavonoiddir (Şekil 20) (63).



Şekil 20. Myricetin'in kimyasal yapısı (C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>8</sub>)

Çay, çilek, soğan, sarımsak, lahana, elma, kiraz, üzüm gibi meyve, bazı sebzelerde ve tıbbi bitkilerde (1-3,58,64,65) yüksek miktarda bulunmaktadır.

Myricetin, 5' pozisyonunda bulunan 3. hidroksil grubu sayesinde en iyi antioksidan aktivitesine sahip olan flavonoiddir (49,66). Myricetin'in hücreleri serbest radikallerle oluşan hücre hasarından koruduğu çeşitli araştırmalarda bildirilmiştir (1-3).

Bitkilerde çoğunlukla glikozid yapısında bulunmakta olup aglikon formu daha nadirdir (65). Diğer flavonoidlere oranla serbest radikalleri yakalamada yapısındaki 3. (üçüncü) –OH grubu sayesinde daha etkilidir (3,66).

Cao ve ark, sarımsağın içerisinde yüksek oranda myricetin bulunduğundan dolayı peroksil radikallere karşı antioksidan olduğunu rapor etmiştir (60). Şuana kadar myricetin metabolizması ile ilgili olarak insanlarda in vivo çalışma yapılmamıştır. Sadece Griffiths ve ark. tarafından ratlarla yapılmış bir çalışmada myricetin oral olarak verilmiş, idrar ve feçeste myricetin metabolitleri incelenmiştir. Myricetin'in ana metabolitinin idrarla atılan 3-5-hidroksifenil asetik asit olduğu rapor edilmiştir (67).

Myricetin, radyasyon sonrası oluşan serbest radikalleri, yapısında bulunan –OH radikalleri sayesinde kendine bağlar ve DNA'da oluşacak oksidatif hasarları engeller. Bu, bilinen en önemli biyolojik etkisi olup antioksidan özelliğinden kaynaklanmaktadır (1-3).

Myricetin'in sadece iyi bir antioksidan madde olmasının yanı sıra antikanserojen (68), antimutajen (69,70), antiinflamatuvar (71), antiviral, antidiyabetik (72), antitrombotik, antiaterosklerotik olduğu ayrıca antioksidatif ve sitoprotektif özellikleri bulunduğu(65) bilinmektedir. Bazı çalışmalarda myricetin'in özafagus (73), lösemi (74), akciğer (75), ve prostat (76) kanser hücrelerinde antiproliferatif etkisinin olduğu rapor edilmiştir.

Myricetin, hiperoksit ile aynı temel yapıya sahip olduğundan oksidatif strese karşı koruyucu özelliği olduğu düşünülmektedir (2).

Myricetin ile ilgili yapılan bazı çalışmalar ve sonuçları Tablo 5'te verilmiştir.

**Tablo 5. Farklı hücre gruplarında farklı hasarlayıcı yöntemler kullanılarak oluşturulan DNA hasarına karşı myricetin'in etkileri**

Yapılan Çalışmalar	Çalışılan Hücre Grubu	Hasarlama Yöntemi	Çalışılan Yöntem	Sonuçlar
Duthie ve ark. (1)	İzole edilen lenfosit hücreleri	Hidrojen Peroksit	Comet yöntemi	<ul style="list-style-type: none"> <li>Hidrojen peroksit ile muamele sonucu DNA iplik kırıkları ve pirimidin bazlarının oksitlenmesinin arttığı</li> <li>Hidrojen peroksit ile uyarılmadan yarım saat önce uygulanan 100 µM konsantrasyonda Myricetin'in önemli ölçüde DNA zincir kırıklarını azalttığı</li> </ul>
Wang ve ark. (2)	Çin hamster akciğer fibroblast hücreleri (V79-4)	Hidrojen peroksit	Comet yöntemi	<ul style="list-style-type: none"> <li>Myricetin'in hücre içinde serbest oksijen radikallerini 1,1-difenil-2-pisirilhidrazil-(DPPH) ve 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radikallerini temizlemediği,</li> <li>Hidrojen peroksit uygulaması sonrası SOD, CAT ve GPx gibi hücresel antioksidan enzimlerinin protein ekspresyonu ve aktivitesini tamir ettiği,</li> <li>Hidrojen peroksit sonucu oluşan hücre hasarını serbest oksijen radikallerin oluşumunu engelleyerek koruduğu,</li> <li>DNA kuyruk bölgesinde oluşan hasarı önlediği,</li> <li>Azalmış SOD proteininin ekspresyonunu ve aktivitesini iyileştirdiği</li> </ul>
Huang ve ark. (3)	HaCaT	Ultraviyole-B (UV-B)	Flow sitometri, Western blott	<ul style="list-style-type: none"> <li>UVB ile uyarılmış keratinosit ölümlerini engellediği</li> <li>Apoptotik DNA oligonükleotid zincir kırıklarını azalttığı</li> <li>Fotohasara karşı hücre içi hidrojen peroksit üretimi, lipid peroksidasyonu ve c-jun-NH2 terminal kinaz (JNK) aktivasyonunun inhibe ettiği</li> <li>Lipit peroksidasyonunun inhibisyonu ve oksijen radikallerinin yok edilmesi ile ciltte oluşan hasarları önlediği</li> </ul>
Duthie ve ark. (58)	CaCo-2, HepG2, HeLa	0-2500 µM konsantrasyonda farklı flavonoidler	Comet yöntemi	<ul style="list-style-type: none"> <li>HepG2 hücrelerinde ve lenfositlerde doza bağımlı olarak DNA zincir kırıkları oluşumunu azalttığı,</li> <li>Sadece yüksek konsantrasyonlarda genotoksisite gösterdiği</li> <li>Myricetine olan cevabın serbest oksijen radikallerini temizleme yeteneğinden çok farklı DNA tamir mekanizmalarını etkileyebildiği,</li> </ul>
Delgado ve ark. (77)	HepG2	NDBA ve NPIP	Comet yöntemi	<ul style="list-style-type: none"> <li>0,1 µM myricetin DNA zincir kırıklarını azalttığı,</li> <li>0,1 µM myricetin NDBA ile uyarılmış hücrelerde oksitlenmiş pürinleri %17, pirimidinleri %15 azalttığı,</li> <li>0,1µM-5µM konsantrasyonundaki myricetin'in NDBA ile uyarılmış hücreleri DNA hasarına karşı koruduğu,</li> <li>NPIP ile uyarılmış pirimidin bazlarına karşı myricetin'in koruyucu olmadığı</li> </ul>

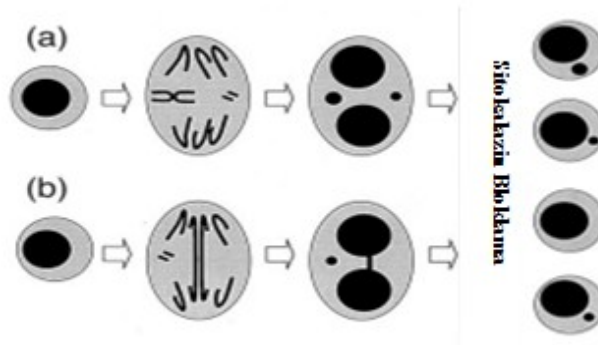
**HaCaT:** Malign olmayan ölümsüz insan karatinosit hücre serileri, **CaCo2:** Epitelyal kolorektal adenokarsinoma hücre serileri, **HepG2:** Hepatosellüler karsinoma hücre serisi, **HeLa:** İnsan servikal kanser hücre serileri, **NDBA:** N-nitrozodibütilamin, **NPIP:** N-nitrozopiperidin

## MİKRONÜKLEUS (MN) ANALİZİ YÖNTEMİ

Mikronukleuslar (MN), tüm kromozomda veya kromozom parçalarında bölünme esnasında mitozun metafaz-anafaz geçisi sırasında oluşan, hücre sitoplazması içinde ana nükleusun dışında bulunan küçük, küresel nükleus dışı yapılardır (4-6). Radyasyon ya da karsinojenler ile hasarlanan tüm kromozom veya kromozom parçalarının iğ ipliklerine tutunamaması sonucu kutuplara çekilemeyen kromozomların yoğunlaşmasıyla oluşur (Şekil 21) (4,6,78). Ana nükleus ile şekil, yapı ve boyanma özellikleri bakımından aynı olup, daha küçük yapılardır (5,6).

### Mikronukleuslar:

1. DNA kırıkları sonucu oluşan asentrik kromozom/kromatid fragmanları,
2. Tüm kromozomun/kromatidin kinetokorları üzerindeki tubulin fiberlerinin tutunmasındaki hatalar sonucu nükleus dışında kalması,
3. Sentromerik DNA'da oluşan hatalar sonucu kromozom/kromatidlerin nükleus dışında kalması,
4. Kinetokor proteinlerinde hataların oluşması sonucu kromozom/kromatidlerin nükleus dışında kalması,
5. Nükleoplazmik köprü oluşumları ve kırılması,
6. Histon modifikasyonları ve geç replikasyon,
7. BFB (bridge-fusion-break) (kırık-füzyon-kırık) sonucu oluşan gen amplifikasyonu nedeniyle nüklear tomurcuklanma sonucunda oluşabilir (79).



Şekil 21. MN oluşumu (5)

- a) Mikronukleus kökeni, anafazdaki tüm kromozom ve asentrik kromozom parçalarından oluşmakta,
- b) Nükleoplazmik köprü, disentrik kromozomdan köken alarak oluşmakta

Mikronukleus yöntemi, hem fiziksel hem de kimyasal genotoksik ajanların etkilerinin belirlenmesinde uzun yıllardan beri kullanılmaktadır. Diğer kromozom aberasyon tekniklerine göre daha basit ve radyasyon hasarı incelemelerinde duyarlı bir yöntem olmasından dolayı tercih edilmektedir. Sadece radyasyon hasarının incelenmesinde değil biyomarker olarak birçok çalışmada tercih edilmiştir.

Mikronukleus tekniği,

1. Farmasötik ajanların sitogenetik etkilerinin incelenmesinde,
2. Karsinojenlerin sitogenetik etkilerinin incelenmesinde,
3. İn vivo/in vitro genotoksik hasarların incelenmesinde,
4. Radyolojik kazalarda genetik materyalin hasarının belirlenmesinde,
5. Kanser riskinin değerlendirilmesinde kullanılmaktadır (6).

Mikronukleus yöntemi uzun yıllardan beri kromozom aberasyon tekniklerine göre hem daha kolay hem de kısa zamanda değerlendirilebildiği için birçok radyasyon çalışmasında oluşan DNA hasarını incelemek için kullanılmıştır.

1986 yılında meydana gelen Çernobil Nükleer Reaktör kazasında radyoaktif alana 100-200 km uzaklıkta bulunan 80 bireyin absorbladıkları dozların belirlenmesinde (19), 1987 yılında hastane bahçesine bırakılan teleterapi cihazının Sezyum-137 (Cs-137) kaynağına temas eden kişilerin belirlenmesi için 1000'e yakın kişinin hızlı analizine ihtiyaç duyulan Goiana kazasında (80) ve ülkemizde 1998 yılında meydana gelen eski bir Co 60 radyoterapi kafasının bir grup hurdacı tarafından oksijen kaynağı ile kesilmesi sonucunda 20 kişinin radyasyona maruz kalmasıyla sonuçlanan İstanbul kazasında (81,82) başarıyla kullanılmıştır. Bu olayların her birinde fiziksel olarak hesaplanan ve diğer biyolojik dozimetri yöntemleriyle tespit edilen dozlar mikronukleusların analizi yöntemiyle tespit edilenlerle uyum göstermiştir (19,81,82).

## **GEREÇ VE YÖNTEMLER**

### **ÖRNEKLEM GRUBUNUN OLUŞTURULMASI**

Çalışmada kullanılan kan örnekleri sağlıklı 3 erkek gönüllüden alınmıştır. Gönüllüler için bazı kriterler oluşturulmuştur. Bu kriterler;

1. Tanısal, tedavi ya da mesleki olarak radyasyona ve/veya toksik maddeye maruz kalmamış olmak,
2. 25-35 yaşları arasında bulunmak,
3. Sigara ve alkol kullanmamak,
4. Ailesel kanser riski taşımamak,
5. Metabolik hastalık taşımamak ve düzenli bir ilaç kullanmamak,
6. Kan örneği alınacağı dönemden 1 ay öncesine kadar antibiyotik vb. ilaç kullanmamış olmak.

### **Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu**

Çalışmamızdaki olgulara araştırmanın içeriğini kısaca anlatan, araştırma esnasında kendilerine uygulanacak işlemler hakkında bilgi veren, araştırmayla ilgili sahip oldukları haklar ve yükledikleri sorumlulukları bildiren “Bilgilendirilmiş Olur Formları” kullanıldı (Ek 1). Bu formlar çalışmaya katılan olgulara okutulduktan ve/veya okunduktan sonra yazılı onayları alınarak saklandı.

## **Etik Kurul Onayı**

Çalışmamız Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul tarafından, araştırmanın amacı, gerekçesi, gereç ve yöntemler ile gönüllü bilgi metni incelendikten sonra 29 Haziran 2011 tarih ve 17 sayılı toplantısında Tez önerisi ve Tez danışmanı ataması kabul edilip onaylanan ve Bilimsel Araştırma Değerlendirme Komisyonu tarafından 08.06.2011 tarihinde 12/10 karar numarası ve sayılı belge (TÜBADK 2011-124) ile onaylanmıştır (Ek 2).

## **GEREÇLER**

### **Cihazlar**

- ✓ Laminar air flow kabini (Heraeus)
- ✓ Soğutmalı santrifüj (Heraeus)
- ✓ Vorteks (Yellow Line)
- ✓ Etüv (Heraeus)
- ✓ Hassas dijital terazi (Scaltec)

Kimyasal sarf ve diğer sarf malzemeler ekler bölümünde verilmiştir (Ek 3).

## **YÖNTEMLER**

### **Örnek Alınması**

Araştırmada kullanılan periferik kan örnekleri steril şartlarda, vakumlu ve lityum-heparinli tüplere alındı. Alınan kanlar 1 saat oda ısısında bekletildi ve 10-15 dakika ara ile alt-üst edildi.

**Myricetin'in Çözülmesi:** Myricetin'in moleküler ağırlığı 318,24 gr'dır. 11 mg Myricetin tartıldı ve steril 1.5 ml'lik bir tüp içerisine konuldu. 100 mM Myricetin elde etmek için 345,5 µl DMSO eklendi ve stok Myricetin elde edildi. 1 ml kan için 100 µM konsantrasyon istendiğinde 1 µL, 200 µM konsantrasyon istendiğinde 2 µL Myricetin eklendi.

### **Örneklerin Gruplara Ayrılması**

Araştırmada kullanılacak olan kan örnekleri 14 farklı gruba ayrıldı.

### Gruplar:

1. Grup: K r (bazal MN seviyesi için)
2. Grup: DMSO (% 0,2)
3. Grup: 100  $\mu$ M Myricetin
4. Grup: 200  $\mu$ M Myricetin
5. Grup: 2 Gray (Gy)
6. Grup: 4 Gy
7. Grup: 100  $\mu$ M Myricetin + 2 Gy
8. Grup: 200  $\mu$ M Myricetin + 2 Gy
9. Grup: 100  $\mu$ M Myricetin + 4 Gy
10. Grup: 200  $\mu$ M Myricetin + 4 Gy
11. Grup: 2 Gy + 100  $\mu$ M Myricetin
12. Grup: 2 Gy + 200  $\mu$ M Myricetin
13. Grup: 4 Gy + 100  $\mu$ M Myricetin
14. Grup: 4 Gy + 200  $\mu$ M Myricetin

Bu grupların her biri için steril kabin içerisinde 2 ml'lik steril eppendorf tüplerine 1.5 ml kan  rneği konuldu. 1 numaralı tüpe hiçbir uygulama yapılmadı, 2 numaralı tüpe ise % 0,2'lik DMSO eklendi diğer tüplerle eŐ zamanlı ekim yapılması için 30 dakika daha dinlendirildi.

3, 7, 9 numaralı tüplere 100  $\mu$ M ( 1,5 $\mu$ L) Myricetin; 4, 8, 10 numaralı tüplere 200  $\mu$ M (3  $\mu$ L) Myricetin eklendi ve tüpler alt-üst edildi. Daha sonra yarım saat bekletildi.

3. ve 4. tüplerin 30 dakika sonra kültür ekimleri yapıldı. 7. ve 8. tüplere 30 dakika sonra 2 Gy ışın uygulandı. 9 ve 10. Tüplere 30 dakika sonra 4 Gy ışın uygulandı. IŞınlamadan sonra kan örnekleri 1 saat bekletildi ve kültür ekimleri yapıldı.

5, 6, 11, 12, 13, 14. tüplere  niversitemize ait radyasyon onkolojisinde bulunan Co-60 cihazında radyasyon uygulaması gerçekleştirildi. 5. ve 6. tüpler ışınlama uygulandıktan sonra 1 saat dinlendirildi ve paralel olarak kültür ekimleri yapıldı. 11. ve 12. tüpe 2 Gy ışın uygulandıktan hemen sonra sırasıyla 100  $\mu$ M ve 200  $\mu$ M Myricetin uygulandı, 13. ve 14. tüpe ise 4 Gy ışın uygulandıktan hemen sonra sırasıyla 100  $\mu$ M ve 200  $\mu$ M Myricetin uygulandı ve tüpler alt-üst edildi. Kan  rnekleri 1 saat dinlendirildi ve kültür ekimleri yapıldı.



### **Radyasyon Uygulanması**

Kan örneklerine in vitro şartlarda radyasyon uygulanması Trakya Üniversitesi Radyasyon Onkolojisinde yapıldı. Alınan örnekler uygulanacak çalışmaya göre gruplara ayrıldı. Her bir örnek uygulanacak doza göre Co-60 terapi cihazında 2 Gy ve 4 Gy dozlarında bollus içerisinde 15x15 cm'lik alanda 80 cm SSD'de (Source to skin distance)(Kaynak deri yüzey mesafesi) ışınladı.

### **Hücrelerin Kültüre Alınması**

Kan örnekleri Moorhead ve ark. (6)'nın geliştirdiği mikro kültür yöntemi kullanılarak kültüre alındı. Kültür işlemleri UV ışıkla (210-300 nm dalga boyunda) steril edilen bir doku kültür laboratuvarında, laminar air flow kabini içinde gerçekleştirildi. Kültür medyumunu olarak L-Glutaminli PRMI-1640 kullanıldı. 100 ml L-Glutaminli RPMI içerisine kültür ortamını zenginleştirmek amacıyla %10 Fetal Calf Serum (FCS) ve bakteri kontaminasyonunu önlemek amacıyla %1 Penisillin/Streptomisin ilave edildi ve tüm flasklara 9 ml olarak dağıtıldı. Kültür medyumuna 0,5 ml uygun olan kan örneği konuldu ve lenfositleri bölünmeye teşvik etmek amacıyla uygun konsantrasyonda (Stok 1,2 mg/ml) 0,5 ml fitohemaglutinin (PHA) eklendi. Hazırlanan kültür örnekleri 37°C'de %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde kültüre alındı. Kültüre 44. saatte aktin filamentlerini oluşumunu inhibe ederek hücre bölünmesini engelleyen Sitokalsin-B (Cyt-B)' den uygun konsantrasyonda (stok 6µg/ml) 360 µl (0,36 ml) eklendi ve kültür 68. saatte durduruldu.

### **Hücre Fiksasyonu**

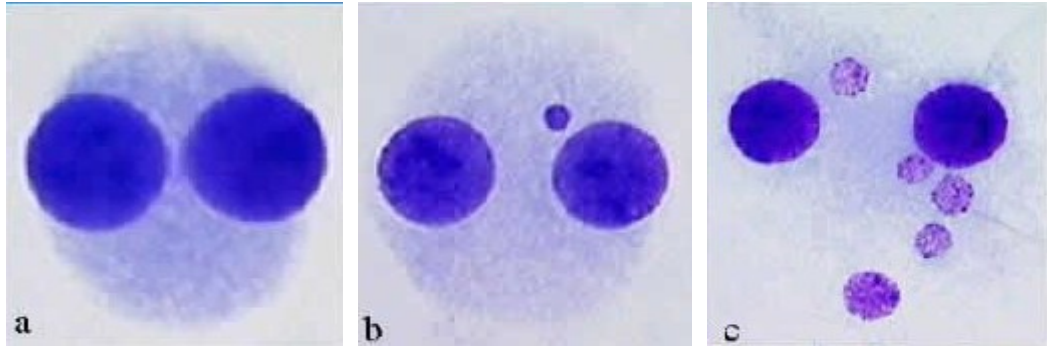
Kültür materyali 68. saat sonunda 15 ml'lik falkon tüplerine aktarıldı. 800 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra buz soğukunda 0.075 M KCl çözeltisi toplam hacmi 10 ml'ye tamamlanacak şekilde vorteks üzerinde damla damla ilave edilerek hipotonik şok uygulandı. Örnekler 800 rpm'de 8 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant atıldı. Altta kalan pelletin üzerine vorteks üzerinde damla damla Carnoy Fiksatif (3:1 (v/v) metanol:asetik asit) eklendi. Tüpler 5 dakika 1000 rpm'de santrifüj edildi. Tekrar süpernatant atıldı ve pellet üzerine vorteks eşliğinde damla damla fiksatif eklenerek 5 dakika 1000 rpm'de santrifüj edildi. Üstte kalan süpernatant atıldıktan sonra pellet üzerine sitoplazmayı koruyabilmek amacıyla %1'lik formaldehit vorteks üzerinde eklendi ve 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra altta kalan pellet üzerine fiksatif eklendi ve 5 dakika 1000 rpm'de santrifüj edildikten sonra hücreler -20 °C'ye kaldırıldı.

### **Preparatların Hazırlanması**

Hücre kültürü yapılarak hazırlanmış hücreler, önceden temizlenmiş ve dondurulmuş slaytların üzerine 45°C'lik açı ile 30 cm yükseklikten 7-8 damla damlatılarak pastör pipeti yardımıyla yayıldı. Hazırlanan slaytlar oda ısısında kurutuldu. Hücrelerin yeterli olup olmadıkları faz kontrast mikroskopunda incelendi ve değerlendirildi. Hücre yoğunlukları yeterli görülen slaytlar, boyama işlemi için oda ısısında 1 gece bekletildi.

### **Preparatların Boyanması**

Fosfat tampon çözeltisi ile %10'luk Giemsa solüsyonu hazırlandı. Hazırlanan boya filtre kağıdıyla süzüldü. Kurutulan slaytlar 30 dakika giemsa solüsyonu ile boyandı. Boyama işleminden sonra slaytlar 2 kez saf suda çalkalanarak yıkandı ve kurutulmaya bırakıldı. Hazırlanan preparatlar olympus marka ışık mikroskobu ile kontrolleri yapıldıktan sonra entellan ile kapatıldı ve sayıldı. Giemsa ile boyanan slaytların görüntüleri aşağıda Şekil 22'de verilmiştir.



**Şekil 22. Giemsa boyama yapılarak sayım yapılan BN hücreler ve MN görüntüleri (6,83)**

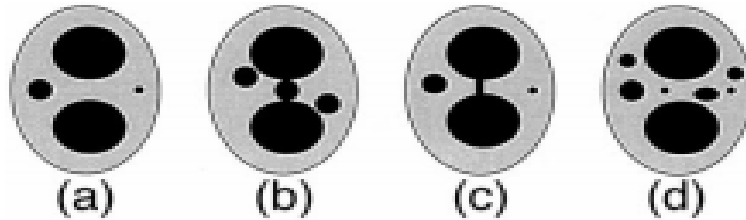
a) BN hücre, b) 1 MN içeren BN hücre, c) 5 MN içeren BN hücre

Binukleat (BN) hücrelerde mikronükleusların değerlendirilmesinde Fenech (82)'in kriterleri göz önünde bulunduruldu (Şekil 23).

### **Fenech'in (5) sayım kriterleri,**

1. Hücreler BN olmalıdır.
2. BN'lar her bir nükleus membranla temas halinde olmalı ve aynı sitoplazmik sınır içinde yer almalıdır.

3. BN içindeki iki nukleus da yaklaşık aynı boyutta, aynı yapıda olmalıdır, aynı şekilde boya almış olmalıdır.
4. BN içindeki iki nukleus nukleoplazmik köprü ile bağlanabilir. Bu nukleoplazmik köprü nukleus çapının 1/4'ünden büyük olmamalıdır.
5. BN'ın iki nukleusu birbirine temas edebilir ancak üst üste binmemelidir. Üst üste binmiş binukleatlarda ancak iki nukleusun sınırları da birbirinden ayrı seçilebiliyorsa sayılmalıdır.
6. BN hücrenin sitoplazma sınırı ve zar yapısı bozulmamış olmalı ve komşu hücrelerin sitoplazma sınırından açıkça ayırt edilmelidir.
7. MN'lar ana çekirdek ile temas edebilir ancak üst üste binmiş olmamalıdır ve mikronükleer sınır çekirdek sınırından ayırt edilebilir olmalıdır.
8. MN'ların çapı, genellikle ana nukleusun ortalama çapının 1/16 ve 1/3'ü aralığında değişmektedir.
9. MN'lar genellikle ana çekirdek ile aynı yoğunlukta boyanmalıdır, bazen ana çekirdek daha yoğun boyanabilir (5,6).



**Şekil 23. Değerlendirme kriterlerine uygun BN hücreler ve MN (6)**

- a) 2 MN içeren BN hücre, b) 3 MN içeren BN hücre, c) 1 nukleoplazmik köprü ve 2 MN içeren BN hücre, d) 5 MN içeren BN hücre

### **Mikronukleus Sayımı**

Her bir lamda 2500 binukleat hücre sayıldı. Mikronukleus sayıları kaydedildi. MN ve BN sayıldıktan sonra MN sayısı, toplam BN sayısına bölünerek mikronukleusların binde oranları bulundu.

Sayımları esnasında, MN içeren BN hücre sayıları sayım kağıdına kaydedildi (Ek 4).

## **İSTATİKSEL DEĞERLENDİRİLMESİ**

Çalışmada verilerin istatistiksel analizi XL STAT-2013 (serbest yazılım) programı yardımıyla yapıldı. Her bir grupta gönüllüler arasındaki fark ki-kare testi ile değerlendirildi. Radyasyon öncesi ve sonrası grupların karşılaştırılması ise Studen't T testi ile hesaplandı.

Her bir olgunun Mann Whitney U testi, Varyans/Mean sonuçları, Standart hataları Ctampois programı ile hesaplanırken; %95 Güven aralıkları ise İstant Programı yardımı ile hesaplandı. Tüm istatistikler için anlamlılık sınırı  $P \leq 0.05$  olarak seçildi.

## BULGULAR

Bu çalışmada, genç, sağlıklı 3 erkek gönüllüden alınan kan örneklerinde kontrol, 2 Gy ve 4 Gy'lik radyasyon uygulanması öncesi ve sonrasına ait 14 ayrı kriter incelenerek sonuçları karşılaştırıldı (Tablo 6).

**Tablo 6. Kontrol ve radyasyon karşılaştırma grupları**

KONTROL	Co-60 gama radyasyon uygulaması	
	2 Gy	4 Gy
0 Gy	100µM Myricetin + 2 Gy	100µM Myricetin + 4 Gy
DMSO	200µM Myricetin + 2 Gy	200µM Myricetin + 4 Gy
100µM Myricetin	2 Gy+100µM Myricetin	4 Gy+100µM Myricetin
200µM Myricetin	2 Gy+200µM Myricetin	4 Gy+200µM Myricetin

Her bir gönüllüye ait toplu sonuçlar Tablo 7, Tablo 8 ve Tablo 9'da, 3 gönüllünün sonuçlarının karşılaştırılması Tablo 10'da, 3 gönüllünün BN ve MN dağılımlarının toplamı Tablo 11'de verilmiştir.

**Tablo 7. 1. gönüllüye ait MN dağılımları**

1. GÖNÜLLÜ															
	GRUPLAR	SH*	ORAN** (1000)	TOPLAM MN	MİKRONUKLEUS DAĞILIMI							U†	Var/Mean††	SE	%95 CI†††
					1	2	3	4	5	6	9				
1	0 Gy	2500	5.2	13	9	2	0	0	0	0	0	11.1	1.3	0.027	2.8-8.9
2	DMSO	2500	4.8	12	12	0	0	0	0	0	0	-0.16	0.99	0.027	2.5-8.4
3	100µM Myricetin	2500	6	15	13	1	0	0	0	0	0	4.67	1.12	0.027	3.4-9.9
4	200µM Myricetin	2500	6.8	17	15	1	0	0	0	0	0	4.05	1.11	0.027	4.0-10.9
5	2 Gy	2500	203.6	509	337	65	10	3	0	0	0	8.52	1.24	0.028	188.0-219.9
6	4 Gy	2500	657.6	1644	718	287	84	21	2	1	1	8.12	1.23	0.028	638.6-676.2
7	100µM Myricetin + 2 Gy	2500	173.2	433	306	53	5	1	0	0	0	5.98	1.16	0.028	158.6-188.6
8	200µM Myricetin + 2 Gy	2500	151.6	379	279	45	2	1	0	0	0	5.29	1.15	0.028	137.8-166.3
9	100µM Myricetin + 4 Gy	2500	479.2	1198	598	216	41	10	1	0	0	7.21	1.20	0.028	459.5-499.0
10	200µM Myricetin + 4 Gy	2500	320.4	801	474	132	17	3	0	0	0	6.43	1.18	0.028	302.1-339.1
11	2 Gy+100µM Myricetin	2500	193.6	484	358	55	4	1	0	0	0	3.83	1.10	0.028	178.3-209.6
12	2 Gy+200µM Myricetin	2500	134.8	337	253	39	2	0	0	0	0	4.69	1.13	0.028	121.6-148.8
13	4 Gy+100µM Myricetin	2500	478	1195	678	197	31	5	2	0	0	3.23	1.09	0.028	458.3-497.8
14	4 Gy+200µM Myricetin	2500	379.2	948	619	126	23	2	0	0	0	2.04	1.05	0.028	360.1-398.6

\* Toplam Sayılan Hücre Sayısı,  
\*\*1000 BN hücrede MN Sayısı

† Mann Withney U Testi  
††: Varyans/Ortalama Değeri  
†††:%95'lik Güven Aralığı

**Tablo 8. 2. gönüllüye ait MN dağılımları**

2. GÖNÜLLÜ															
	GRUPLAR	SH*	ORAN** (1000)	TOPLAM MN	MİKRONUKLEUS DAĞILIMI							U†	Var/Mean††	SE	%95 CI†††
					1	2	3	4	5	6	9				
1	0 Gy	2500	4.8	12	12	0	0	0	0	0	0	-0.16	0.99	0.027	2.5-8.4
2	DMSO	2500	4.8	12	12	0	0	0	0	0	0	-0.16	0.99	0.027	2.5-8.4
3	100µM Myricetin	2500	6	15	15	0	0	0	0	0	0	-0.20	0.99	0.027	3.4-9.9
4	200µM Myricetin	2500	6.8	17	15	1	0	0	0	0	0	4.05	1.11	0.027	4.0-10.9
5	2 Gy	2500	184	460	306	57	12	1	0	0	0	8.73	1.24	0.028	169.0-199.8
6	4 Gy	2500	552.4	1381	634	223	78	14	1	1	0	9.47	1.26	0.028	532.7-572.0
7	100µM Myricetin + 2 Gy	2500	146.4	366	262	46	1	1	1	0	0	7.40	1.20	0.028	132.8-160.9
8	200µM Myricetin + 2 Gy	2500	132.4	331	246	38	3	0	0	0	0	5.38	1.15	0.028	119.3-146.3
9	100µM Myricetin + 4 Gy	2500	430.4	1076	586	181	40	2	0	0	0	5.37	1.15	0.028	410.9-450.1
10	200µM Myricetin + 4 Gy	2500	309.2	773	478	126	9	4	0	0	0	5.27	1.14	0.028	291.1-327.7
11	2 Gy+100µM Myricetin	2500	161.6	404	283	48	7	1	0	0	0	7.43	1.21	0.028	147.4-176.6
12	2 Gy+200µM Myricetin	2500	137.6	344	263	34	3	1	0	0	0	5.23	1.14	0.028	124.3-151.7
13	4 Gy+100µM Myricetin	2500	417.2	1043	601	157	35	3	1	1	0	5.94	1.16	0.028	397.8-436.8
14	4 Gy+200µM Myricetin	2500	329.6	824	528	111	22	2	0	0	0	4.58	1.13	0.028	311.2-348.4

\* Toplam Sayılan Hücre Sayısı,

\*\*1000 BN hücrede MN Sayısı

† Mann Withney U Testi

††: Varyans/Ortalama Değeri

†††:%95'lik Güven Aralığı

**Tablo 9. 3. gönüllüye ait MN dağılımları**

3. GÖNÜLLÜ															
	GRUPLAR	SH*	ORAN** (1000)	TOPLAM MN	MİKRONUKLEUS DAĞILIMI							U†	Var/Mean††	SE	%95 CI†††
					1	2	3	4	5	6	9				
1	0 Gy	2500	4.8	12	12	0	0	0	0	0	0	-0.16	0.99	0.027	2.5-8.4
2	DMSO	2500	3.6	9	7	1	0	0	0	0	0	8.21	1.21	0.027	1.6-6.8
3	100µM Myricetin	2500	4.8	12	12	0	0	0	0	0	0	-0.16	0.99	0.027	2.5-8.4
4	200µM Myricetin	2500	5.2	13	13	0	0	0	0	0	0	-0.17	0.99	0.027	2.8-8.9
5	2 Gy	2500	174.4	436	327	53	1	0	0	0	0	2.93	1.08	0.028	159.7-189.9
6	4 Gy	2500	474.4	1186	550	218	48	14	0	0	0	9.83	1.27	0.028	454.7-494.2
7	100µM Myricetin + 2 Gy	2500	138	345	288	27	1	0	0	0	0	1.28	1.03	0.028	124.7-152.1
8	200µM Myricetin + 2 Gy	2500	117.6	294	244	25	0	0	0	0	0	1.87	1.05	0.028	105.2-130.9
9	100µM Myricetin + 4 Gy	2500	373.2	933	590	142	17	2	0	0	0	2.35	1.06	0.028	354.2-392.5
10	200µM Myricetin + 4 Gy	2500	290.8	727	465	109	9	3	1	0	0	5.68	1.16	0.028	273.1-309.0
11	2 Gy+100µM Myricetin	2500	155.6	389	317	33	2	0	0	0	0	1.60	1.04	0.028	141.6-170.4
12	2 Gy+200µM Myricetin	2500	131.6	329	263	27	4	0	0	0	0	3.75	1.10	0.028	118.6-145.5
13	4 Gy+100µM Myricetin	2500	351.2	878	500	141	28	3	0	0	0	7.17	1.20	0.028	332.5-370.3
14	4 Gy+200µM Myricetin	2500	260.4	651	454	88	7	0	0	0	0	2.65	1.07	0.028	243.3-278.1

\* Toplam Sayılan Hücre Sayısı,  
\*\*1000 BN hücrede MN Sayısı

†Mann Withney U Testi  
††: Varyans/Ortalama Değeri  
†††:%95'lik Güven Aralığı



**Tablo 10. 3 gönüllünün MN sıklıklarının karşılaştırılması**

		1. GÖNÜLLÜ			2. GÖNÜLLÜ			3. GÖNÜLLÜ		
		SH	MN	BNMN±SE	SH	MN	BNMN±SE	SH	MN	BNMN±SE
1	O Gy	2500	13	5.2 ± 1.4	2500	12	4.8 ± 1.4	2500	12	4.8 ± 1.4
2	DMSO	2500	12	4.8 ± 1.4	2500	12	4.8 ± 1.4	2500	9	3.6 ± 1.2
3	100µM Myricetin	2500	15	6 ± 1.5	2500	15	6 ± 1.5	2500	12	4.8 ± 1.4
4	200µM Myricetin	2500	17	6.8 ± 1.6	2500	17	6.8 ± 1.6	2500	13	5.2 ± 1.4
5	2 GY	2500	509	203.6 ± 9	2500	460	184 ± 8.5	2500	436	174.4 ± 8.3
6	4 GY	2500	1644	657.6 ± 16.2	2500	1381	552.4 ± 14.9	2500	1186	474.4 ± 13.8
7	100µM Myricetin + 2 GY	2500	433	173.2 ± 8.3	2500	366	146.4 ± 7.6	2500	345	138 ± 7.4
8	200µM Myricetin + 2 GY	2500	379	151.6 ± 7.8	2500	331	132.4 ± 7.3	2500	294	117.6 ± 6.8
9	100µM Myricetin + 4 GY	2500	1198	479.2 ± 13.8	2500	1076	430.4 ± 13.1	2500	933	373.2 ± 12.2
10	200µM Myricetin + 4 GY	2500	801	320.4 ± 11.3	2500	773	309.2 ± 11.1	2500	727	290.8 ± 10.8
11	2 GY + 100µM Myricetin	2500	484	193.6 ± 8.8	2500	404	161.6 ± 8	2500	389	155.6 ± 7.9
12	2 GY + 200µM Myricetin	2500	337	134.8 ± 7.3	2500	344	137.6 ± 7.4	2500	329	131.6 ± 7.2
13	4 GY + 100µM Myricetin	2500	1195	478 ± 13.8	2500	1043	417.2 ± 12.9	2500	878	351.2 ± 11.8
14	4 GY + 200µM Myricetin	2500	948	379.2 ± 12.3	2500	824	329.6 ± 11.5	2500	651	260.4 ± 10.2

**SH:** Toplam sayılan hücre sayısı**BNMN:** 1000 Binukleat (BN) hücrede MN sayısı**SE:** Standart Hata

**Tablo 11. 3 gönüllüye ait bulgulardan elde edilen toplam MN dağılımı**

Toplam MN Dağılımları															
	GRUPLAR	SH*	ORAN** (1000)	TOPLAM MN	MİKRONUKLEUS DAĞILIMI							U†	Var/Mean††	SE	%95 CI†††
					1	2	3	4	5	6	9				
1	0 Gy	7500	4.9	37	33	2	0	0	0	0	0	6.41	1.10	0.016	3.5-6.8
2	DMSO	7500	4.4	33	31	1	0	0	0	0	0	3.50	1.05	0.016	3.0-6.2
3	100µM Myricetin	7500	5.6	42	40	1	0	0	0	0	0	2.61	1.04	0.016	4.0-7.6
4	200µM Myricetin	7500	6.3	47	43	2	0	0	0	0	0	4.88	1.07	0.016	4.6-8.3
5	2 Gy	7500	187.3	1405	970	175	23	4	0	0	0	11.9	1.19	0.016	178.6-196.4
6	4 Gy	7500	561.5	4211	1902	728	209	49	3	1	1	15.9	1.26	0.016	550.1-572.7
7	100µM Myricetin + 2 Gy	7500	152.5	1144	856	127	7	2	1	0	0	8.87	1.14	0.016	144.5-160.9
8	200µM Myricetin + 2 Gy	7500	133.9	1004	769	108	5	1	0	0	0	7.55	1.12	0.016	126.2-141.8
9	100µM Myricetin + 4 Gy	7500	427.6	3207	1774	539	98	14	1	0	0	9.22	1.15	0.016	416.4-438.9
10	200µM Myricetin + 4 Gy	7500	306.8	2301	1417	367	35	10	1	0	0	10.0	1.16	0.016	296.4-317.4
11	2 Gy+100µM Myricetin	7500	170.3	1277	958	136	13	2	0	0	0	7.52	1.12	0.016	161.8-179.0
12	2 Gy+200µM Myricetin	7500	134.6	1010	779	100	9	1	0	0	0	7.89	1.12	0.016	127.0-142.6
13	4 Gy+100µM Myricetin	7500	415.5	3116	1779	495	94	11	3	1	0	9.47	1.15	0.016	404.3-426.7
14	4 Gy+200µM Myricetin	7500	323.1	2423	1601	325	52	4	0	0	0	5.75	1.09	0.016	312.5-333.8

\* Toplam Sayılan Hücre Sayısı,  
\*\*1000 BN hücrede MN Sayısı

† Mann Withney U Testi  
††: Varyans/Ortalama Değeri  
†††:%95'lik Güven Aralığı

## KONTROL DEĞERLERİ

Doğal mikronukleus sıklıkları, myricetini çözmede kullanılan DMSO ve 100 µM ve 200 µM Myricetin'in doğal sıklığa katkısı 3 ayrı kan örneğinde araştırıldı. Sonuçlar Tablo 12 ve Şekil 24'de verildi.

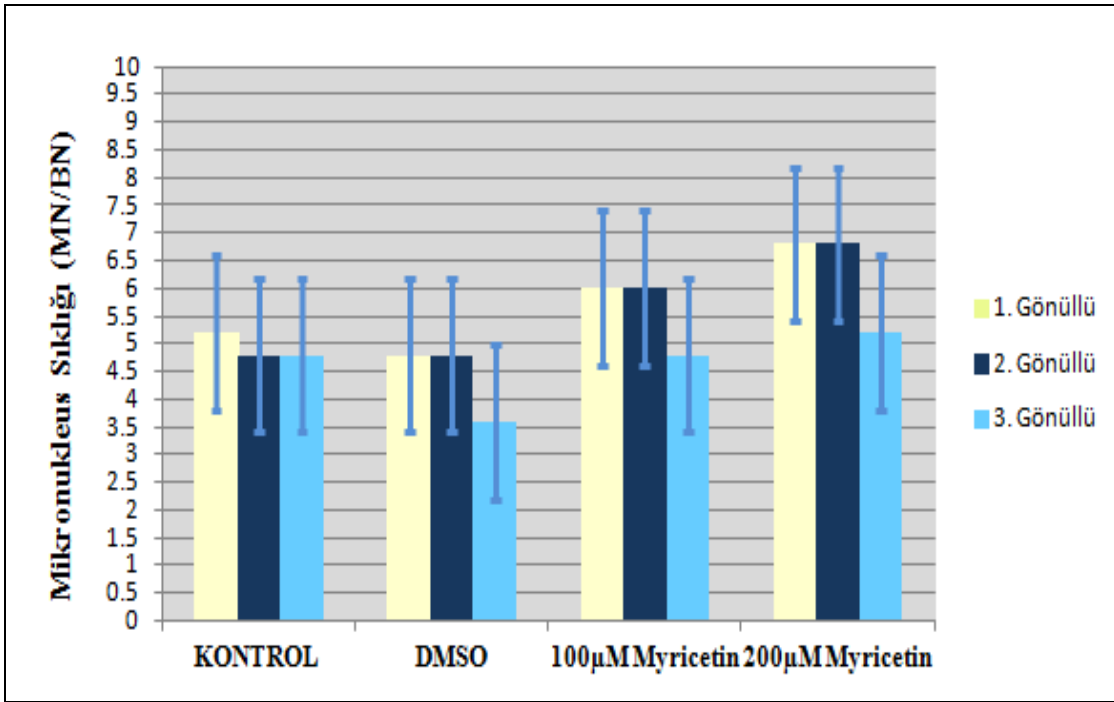
3 gönüllüde doğal mikronukleus ( $p=0.075$ ,  $x^2=0.223$ ), DMSO ( $p=0.074$ ,  $x^2=0.223$ ), 100 µM ( $p=0.075$ ,  $x^2=0.225$ ) ve 200 µM ( $p=0.075$ ,  $x^2=0.223$ ) Myricetin sonuçları arasındaki istatistiksel olarak fark görülmemiştir.

**Tablo 12. 3 ayrı kan örneğine ait doğal MN sıklıklarının DMSO ve myricetin ile karşılaştırılması**

GRUP	KONTROL	DMSO	100µM Myricetin	200µM Myricetin
	BNMN*±SD	BNMN*±SD	BNMN*±SD	BNMN*±SD
1. Gönüllü	5,2±1,4	4,8±1,4	6,0±1,5	6,8±1,7
2. Gönüllü	4,8±1,4	4,8±1,4	6,0±1,5	6,8±1,7
3. Gönüllü	4,8±1,4	3,6±1,2	4,8±1,4	5,2±1,4

SD: Standart sapma

\*1000 BN hücrede MN taşıyan BN sayısını göstermektedir.



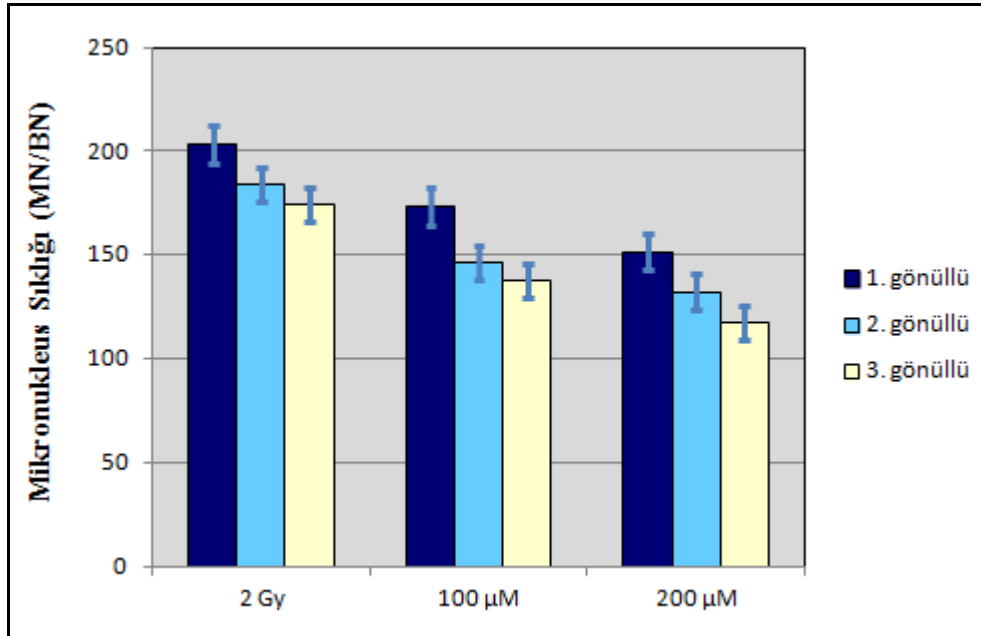
**Şekil 24. 3 gönüllüye ait kontrol grubu sonuçlarının karşılaştırılması**

## RADYASYON ÖNCESİ MYRICETİN UYGULAMASI

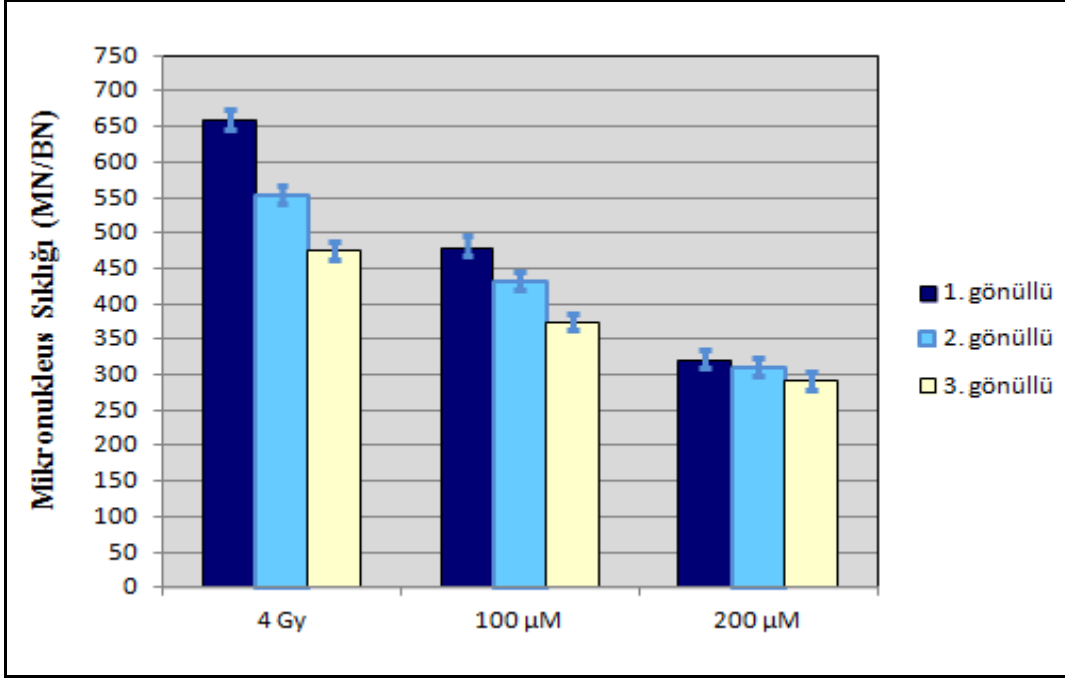
Kan örnekleri 100 µM ve 200 µM Myricetin varlığında 2 Gy ve 4 Gy'lik Co-60 gama ışınlarına maruz bırakıldı. Sonuçlar Tablo 13, Şekil 25 ve Şekil 26'ta verildi.

**Tablo 13. 3 gönüllüde radyasyon öncesi myricetin uygulamasına ait MN sıklığının karşılaştırılması**

	1. gönüllü	2. gönüllü	3. gönüllü
2 Gy	203,6±9,0	184±8,5	174,4±8,3
100µM Myricetin+2 Gy	173,2±8,3	146,4±7,6	138±7,4
200µM Myricetin+ 2 Gy	151,6±7,8	132,4±7,3	117,6±6,8
4 Gy	657,6±16,2	552,4±14,9	474,4±13,8
100µM Myricetin+4 Gy	479,2±13,8	430,4±13,1	373,2±12,2
200µM Myrcetin+4 Gy	320,4±11,3	309,2±11,1	290,8±10,8



**Şekil 25. 2 Gy'lik radyasyon uygulaması öncesinde Myricetin uygulaması sonucu MN sıklığı karşılaştırılması**

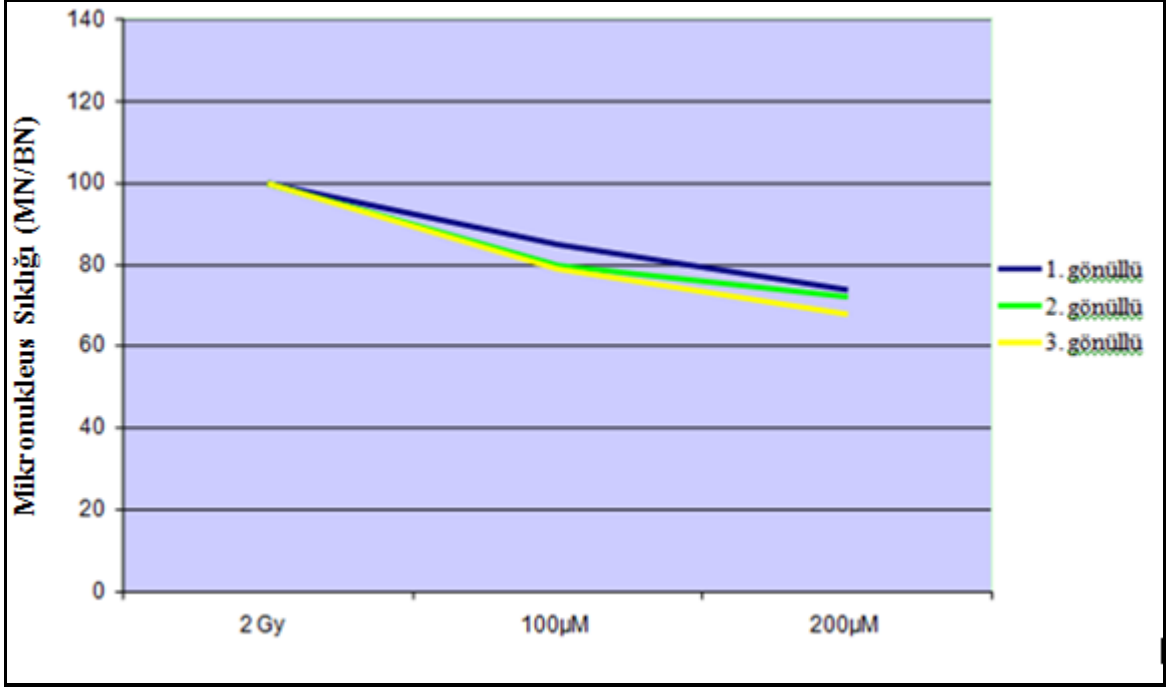


**Şekil 26. 4 Gy'lik radyasyon uygulaması öncesinde Myricetin uygulaması sonucu MN sıklığı karşılaştırılması**

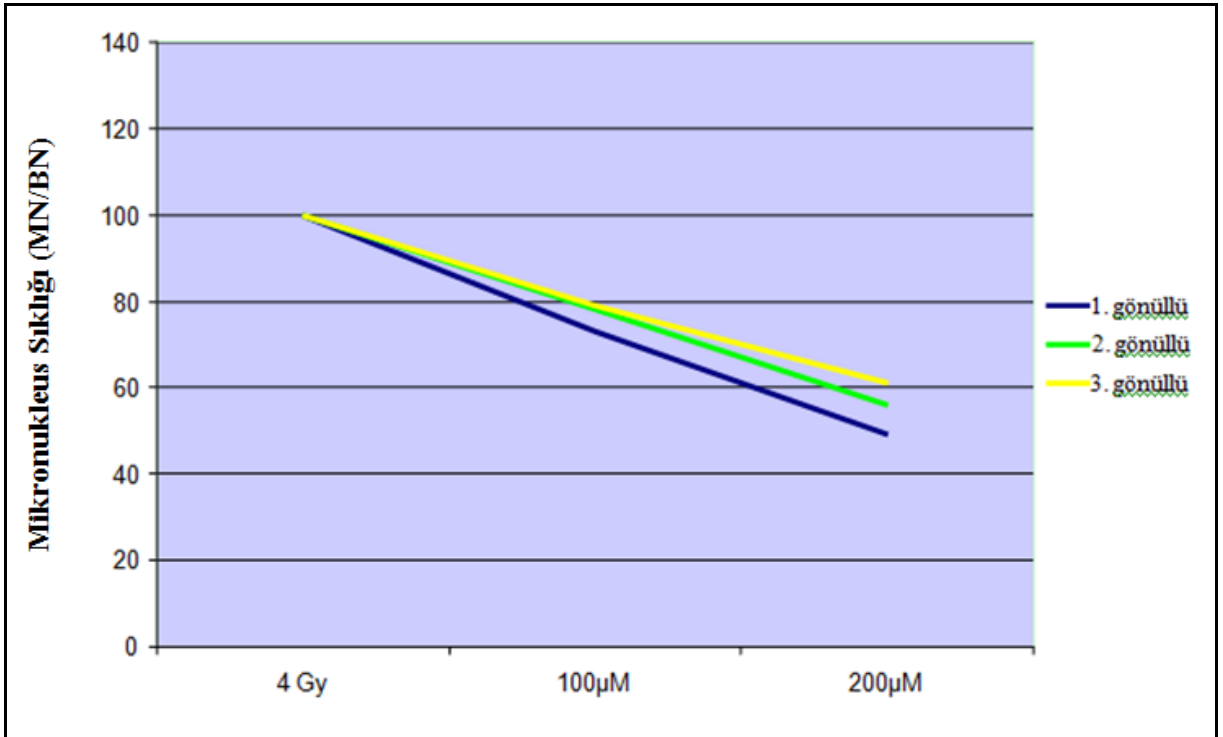
Işınlanma öncesi 100 µM Myricetin uygulanması mikronukleus sıklığında 2 Gy'lik dozda %15-21, 4 Gy'lik dozda ise %21-27 arasında azalmaya neden oldu. 200 µM Myricetin varlığında gerçekleştirilen 2 Gy'lik uygulamada ise mikronukleus sıklığı %26 ile %32 arasında değişirken 4 Gy'de bu değer %39-51 oldu (Tablo 14, Şekil 27, Şekil 28).

**Tablo 14. Myricetin uygulaması sonrası MN sıklığında azalma yüzdeleri**

	1. Gönüllü (%)	2. Gönüllü (%)	3. Gönüllü (%)
100µM Myricetin +2 Gy	15	20	21
200µM Myricetin + 2 Gy	26	28	32
100µM Myricetin + 4 Gy	27	22	21
200µM Myricetin + 4 Gy	51	44	39



Şekil 27. 2 Gy’de MN sıklığının azalma yüzdesi



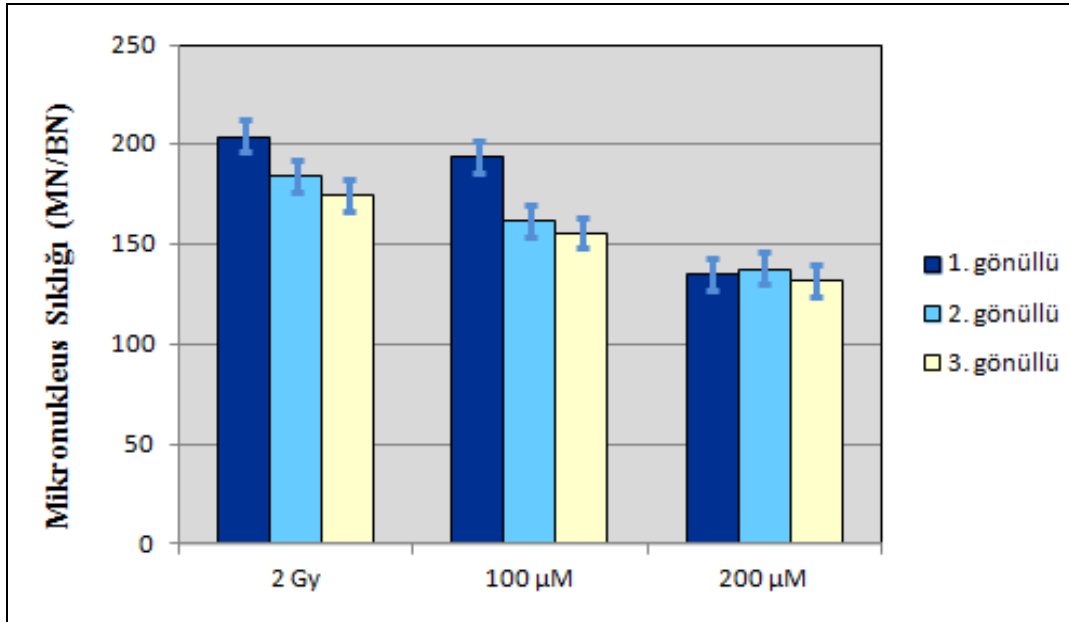
Şekil 28. 4 Gy’de MN sıklığının azalma yüzdesi

## RADYASYON SONRASI MYRICETİN UYGULAMASI

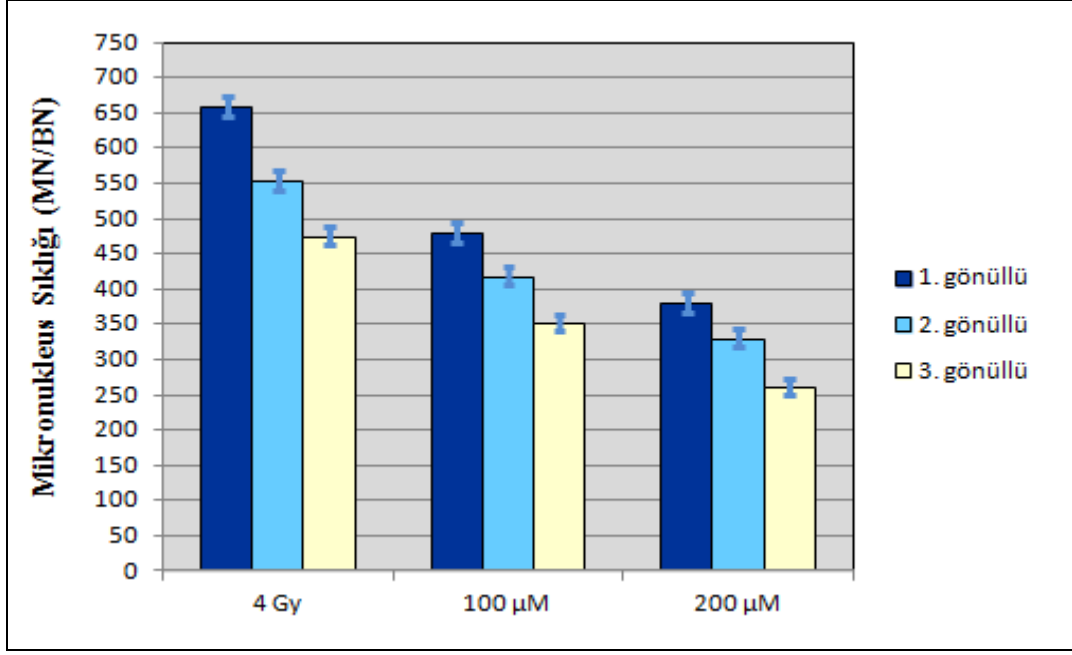
2 Gy ve 4 Gy'lik Co-60 gama ışınlarına maruz bırakılan kan örneklerine ışınlamayı takiben 100  $\mu$ M ve 200  $\mu$ M Myricetin uygulandı. 3 bireye ait sonuçlar ve myricetin uygulaması sonrası mikronukleus sıklığındaki azalma Tablo 15, Şekil 29 ve Şekil 30' da verildi.

**Tablo 15. 3 gönüllüde radyasyon sonrası myricetin uygulaması ile oluşan MN sıklıklarının karşılaştırılması**

	1. Gönüllü	2. Gönüllü	3. Gönüllü
2 Gy	203,6 $\pm$ 9,0	184 $\pm$ 8,5	174,4 $\pm$ 8,3
2 Gy +100 $\mu$ M Myricetin	193,6 $\pm$ 8,8	161,6 $\pm$ 8	155,6 $\pm$ 7,9
2 Gy +200 $\mu$ M Myricetin	134,8 $\pm$ 7,3	137,6 $\pm$ 7,4	131,6 $\pm$ 7,2
4 Gy	657,6 $\pm$ 16,2	552,4 $\pm$ 14,9	474,4 $\pm$ 13,8
4 Gy +100 $\mu$ M Myricetin	478 $\pm$ 13,8	417,2 $\pm$ 12,9	351,2 $\pm$ 11,8
4 Gy +200 $\mu$ M Myricetin	379,2 $\pm$ 12,3	329,6 $\pm$ 11,5	260,4 $\pm$ 10,2



**Şekil 29. 2 Gy'lik radyasyon uygulaması sonrasında Myricetin uygulaması ile oluşan MN sıklığının karşılaştırılması**



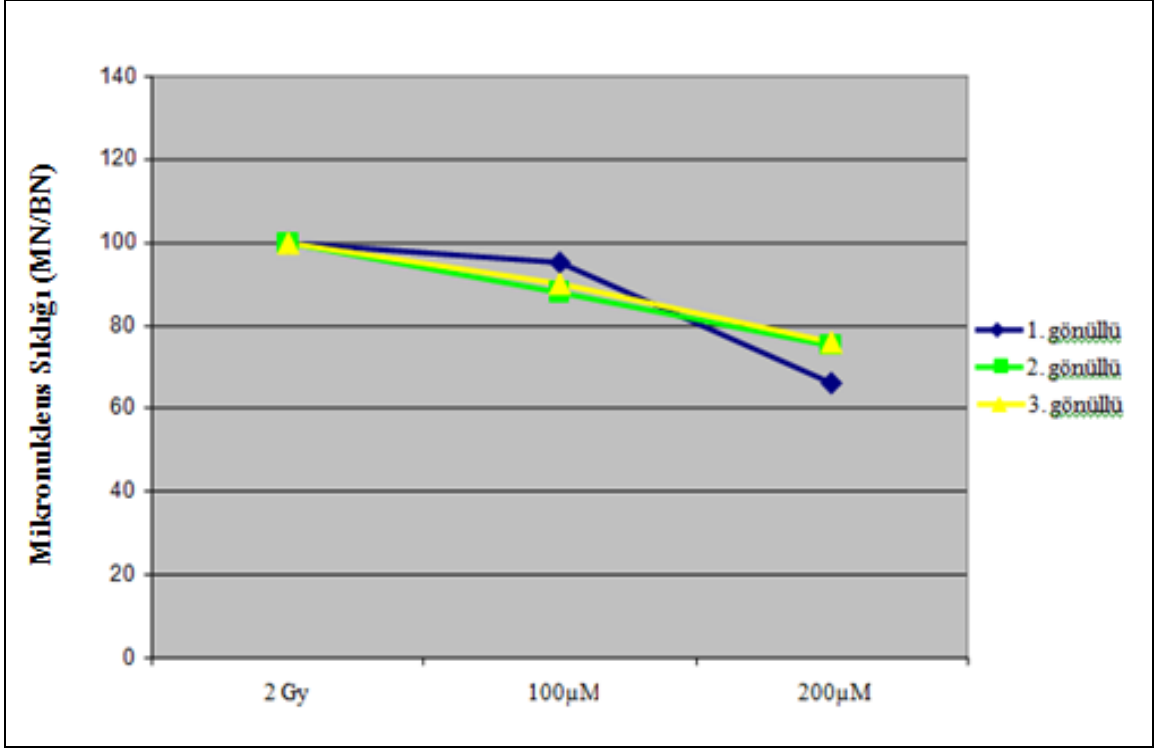
**Şekil 30. 4 Gy'lik radyasyon uygulaması sonrasında Myricetin uygulaması ile oluşan MN sıklığının karşılaştırılması**

Işınlanma sonrası 100 µM Myricetin uygulanması mikronukleus sıklığında 2 Gy'lik dozda %5-12, 4 Gy'lik dozda ise %25-27 arasında azalmaya neden oldu. 200 µM Myricetin uygulanması ise mikronukleus sıklığını 2 Gy için %24 ile %34 arasında düşürürken 4 Gy'de bu değer %40-45 oldu (Tablo 16, Şekil 31 ve Şekil 32).

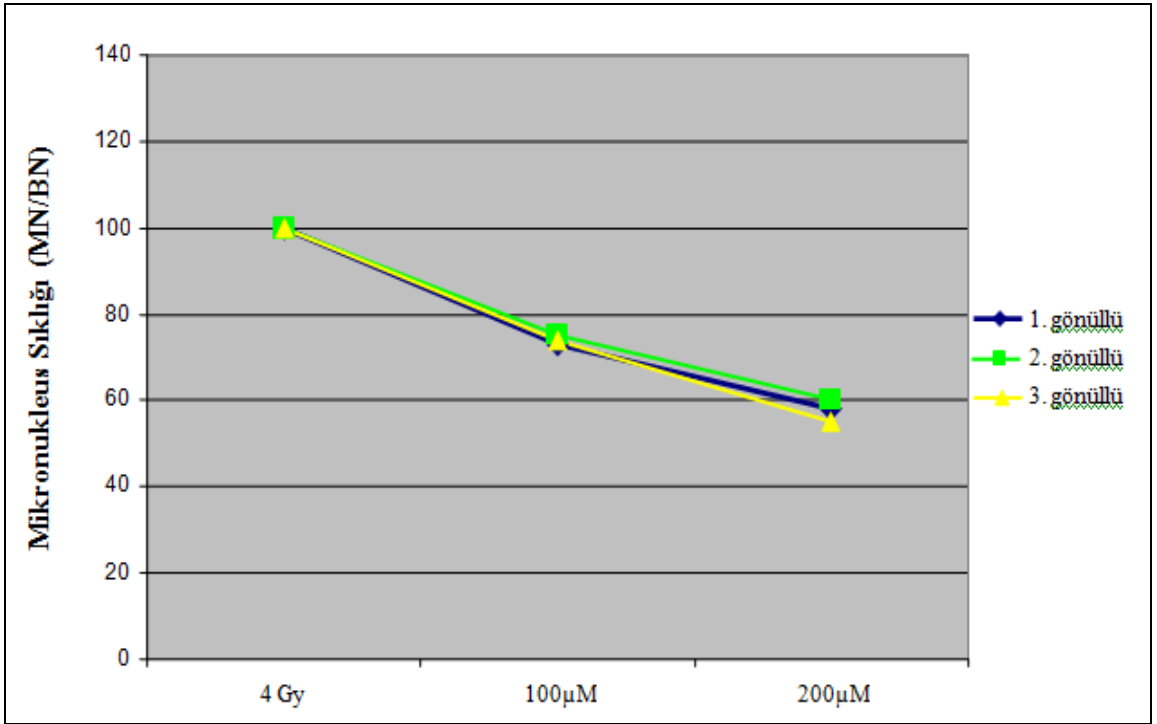
**Tablo 16. Myricetin uygulaması sonrası MN sıklığında azalma yüzdeleri**

	1. Gönüllü (%)	2. Gönüllü (%)	3. Gönüllü (%)
2 Gy +100µM Myricetin	5	12	10
2 Gy +200µM Myricetin	34	25	24
4 Gy +100µM Myricetin	27	25	26
4 Gy +200µM Myricetin	42	40	45





Şekil 31. 2 Gy’de MN sıklığının azalma yüzdesi



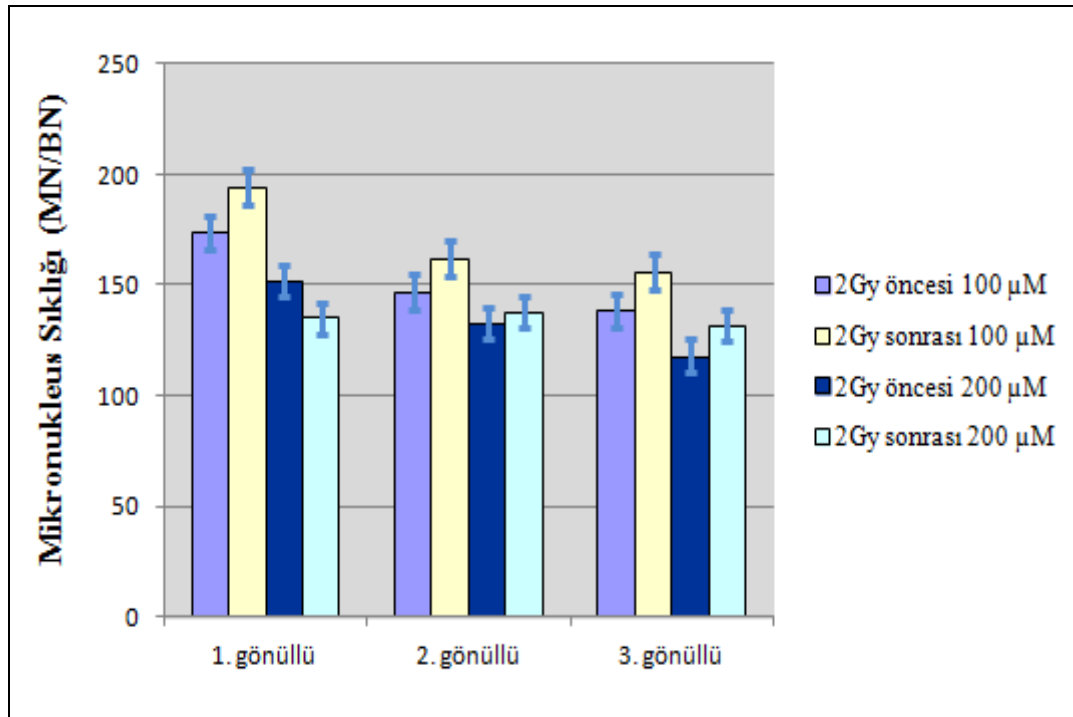
Şekil 32. 4 Gy’de MN sıklığının azalma yüzdesi

Her iki doz için 2 farklı konsantrasyonda uygulanan myricetin'in radyasyon öncesi ve sonrası uygulanmasının mikronukleus sıklığına etkisi karşılaştırıldı.

2 Gy ve 4 Gy'lik doz öncesi ve sonrasında uygulanan 100 µM ve 200µM myricetin konsantrasyonların her ikisinde de gönüllüler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ( $p>0.05$ ) (Tablo 17, Şekil 33, Tablo 18, Şekil 34).

**Tablo 17. Her 3 kan örneğinde 2 Gy İçin Myricetin'in MN sıklığını Azaltma Katsayıları**

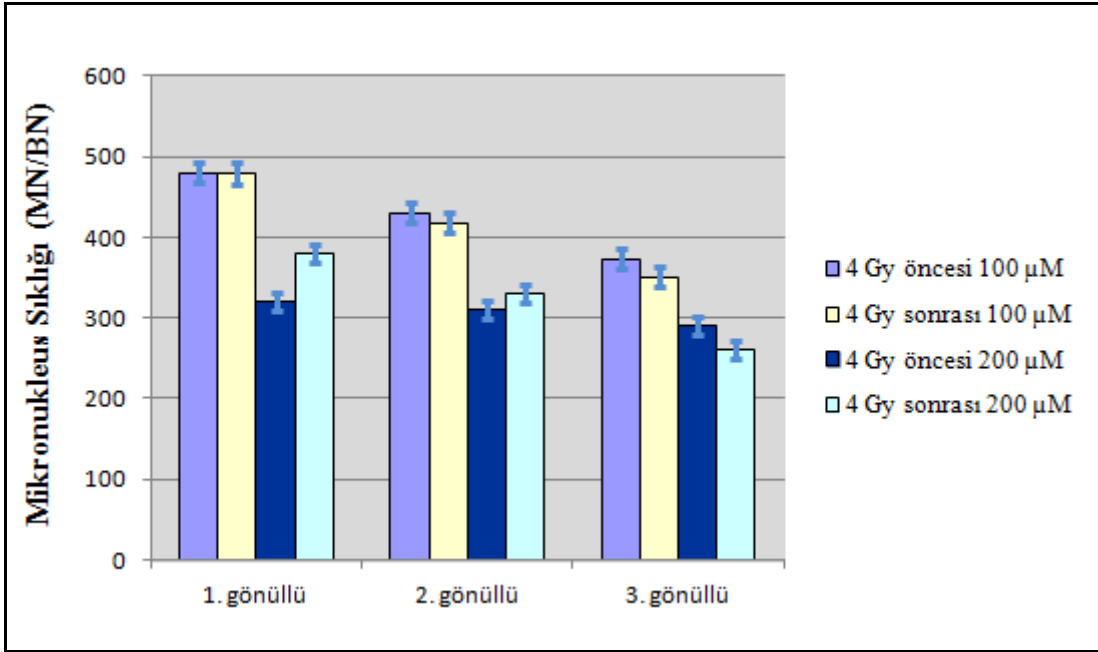
	100µM Myricetin			200µM Myricetin		
	Radyasyon Öncesi	Radyasyon Sonrası	Fark (%)	Radyasyon Öncesi	Radyasyon Sonrası	Fark (%)
<b>1. Gönüllü</b>	173,2±8,3	193,6±8,8	+11	151,6±7,8	134,8±7,3	-12
<b>2. Gönüllü</b>	146,4±7,6	161,6±8	+10	132,4±7,3	137,6±7,4	+4
<b>3. Gönüllü</b>	138±7,4	155,6±7,9	+12	117,6±6,8	131,6±7,2	+10



**Şekil 33. 2 Gy radyasyon öncesi ve sonrası Myricetin varlığında MN sıklığı**

**Tablo 18. Her 3 kan örneğinde 4 Gy için Myricetin'in MN sıklığını azaltma katsayıları**

	100µM Myricetin			200µM Myricetin		
	Radyasyon Öncesi	Radyasyon Sonrası	Fark (%)	Radyasyon Öncesi	Radyasyon Sonrası	Fark (%)
1. Gönüllü	479,2±13,8	478±13,8	+1	320,4±11,3	379,2±12,3	-15
2. Gönüllü	430,4±13,1	417,2±12,9	+3	309,2±11,1	329,6±11,5	-7
3. Gönüllü	373,2±12,2	351,2±11,8	+6	290,8±10,8	260,4±10,2	11



**Şekil 34. 4 GY radyasyon öncesi ve sonrası Myricetin varlığında MN sıklığı**

3 bireyin mikronucleus sıklıkları istatistiksel olarak fark göstermediği için birleştirildi (Tablo19). Co-60 gamma ışınlarıyla elde edilmiş,

$$Y=0.013 \pm 0.0009 +0.074\pm 0.003D +0.028\pm 0.0008 D^2 \quad (4)$$

mikronucleus doz cevap eğrisi kullanılarak absorblanan doz değerlendirildi.

**Tablo 19. 3 gönüllünün radyasyon öncesi ve radyasyon sonrasına ait MN sıklıklarının istatistiksel karşılaştırılması**

GRUPLAR	3 Gönüllünün radyasyon öncesi *	3 Gönüllünün radyasyon sonrası *
2 Gy	p =0.090	p =0.090
100µM Myricetin+2 Gy	p =0.088	p =0.090
200µM Myricetin+ 2 Gy	p =0.086	p =0.084
4 Gy	p =0.150	p =0.150
100µM Myricetin+4 Gy	p =0.123	p =0.123
200µM Myricetin+4 Gy	p =0.102	p =0.111

\*p değerleri Studen't T testi ile hesaplandı.

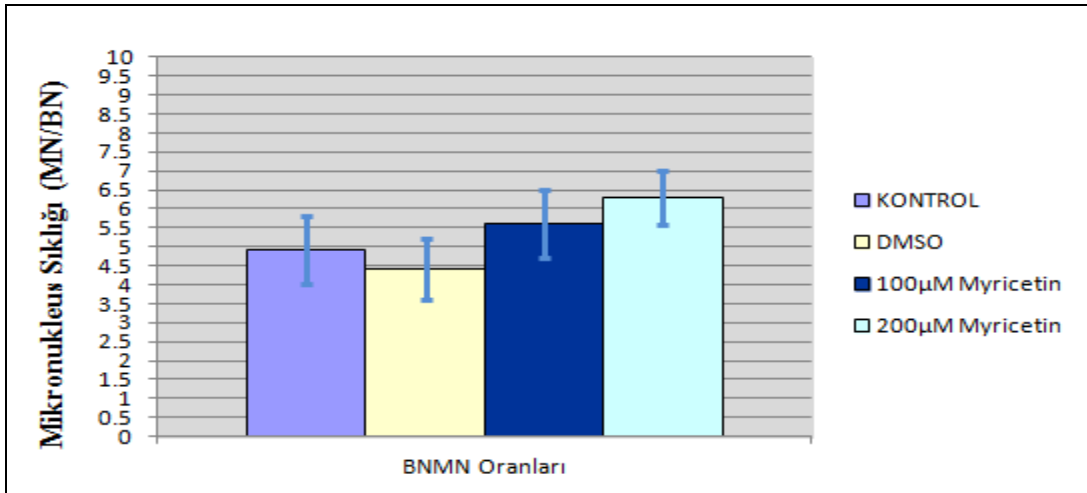
### KONTROL

Çalışmada kullanılan kan örneklerinin doğal ve DMSO uygulaması sonrası mikronukleus sıklığı ortalaması 1000 hücrede 4,9±0,9 ve 4,4±0,8 olarak tespit edildi. 100µM (p=0.205,  $\chi^2=0.157$ ) ve 200µM (p=0.205,  $\chi^2=0.140$ ) Myricetin uygulaması da mikronukleus veriminde anlamlı bir artışa neden olmadı (Tablo 20, Şekil 35).

**Tablo 20. Birleştirmiş kontrol grubu MN sıklıkları**

	Sayılan Hücre	MN	BNMN*
<b>KONTROL</b>	7500	37	4,9±0,9
<b>DMSO</b>	7500	33	4,4±0,8
<b>100µM Myricetin</b>	7500	42	5,6±0,9
<b>200µM Myricetin</b>	7500	47	6,3±0,7

\*1000 BN hücrede MN taşıyan BN sayısını göstermektedir.



**Şekil 35. Birleştirilmiş kontrol grubu MN sıklıkları**

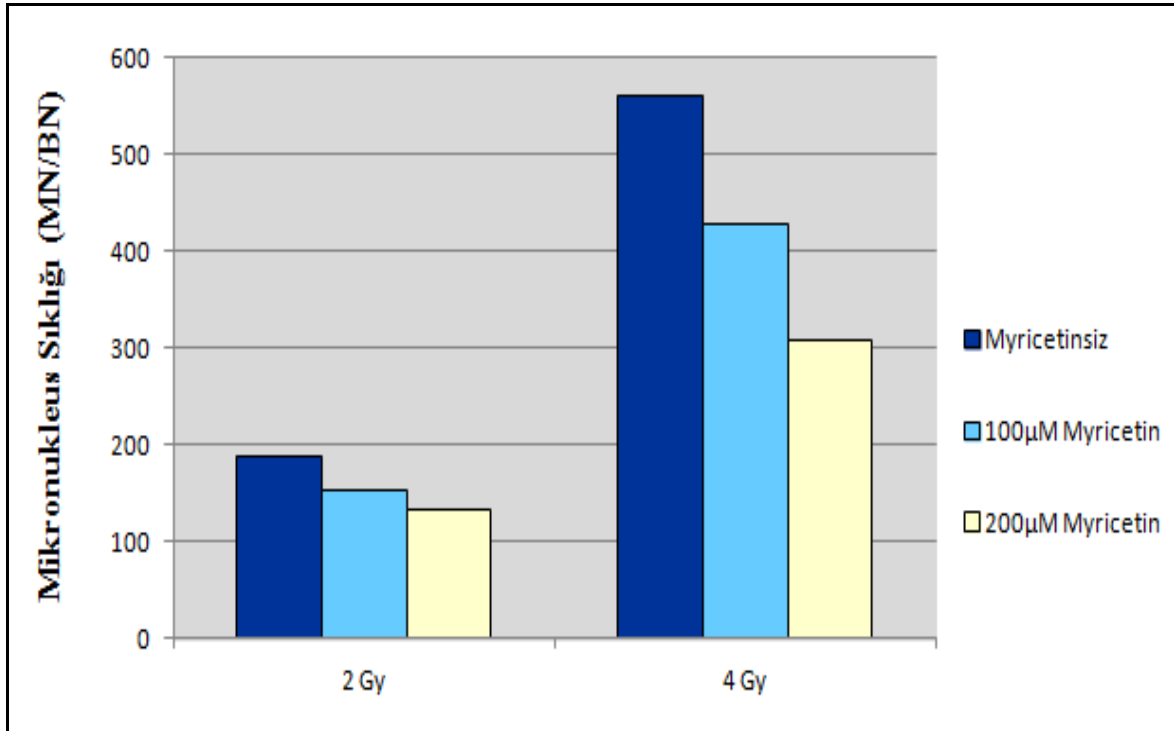
## RADYASYON ÖNCESİ MYRICETİN UYGULAMASI

Myricetin uygulaması sonrası mikronukleus sıklığında azalma görülmüştür. Azalma yüzdesi hem dozla hem de konsantrasyonla değişiklik gösterdi. Sonuçlar Tablo 21, Şekil 36, Şekil 37’de verilmiştir.

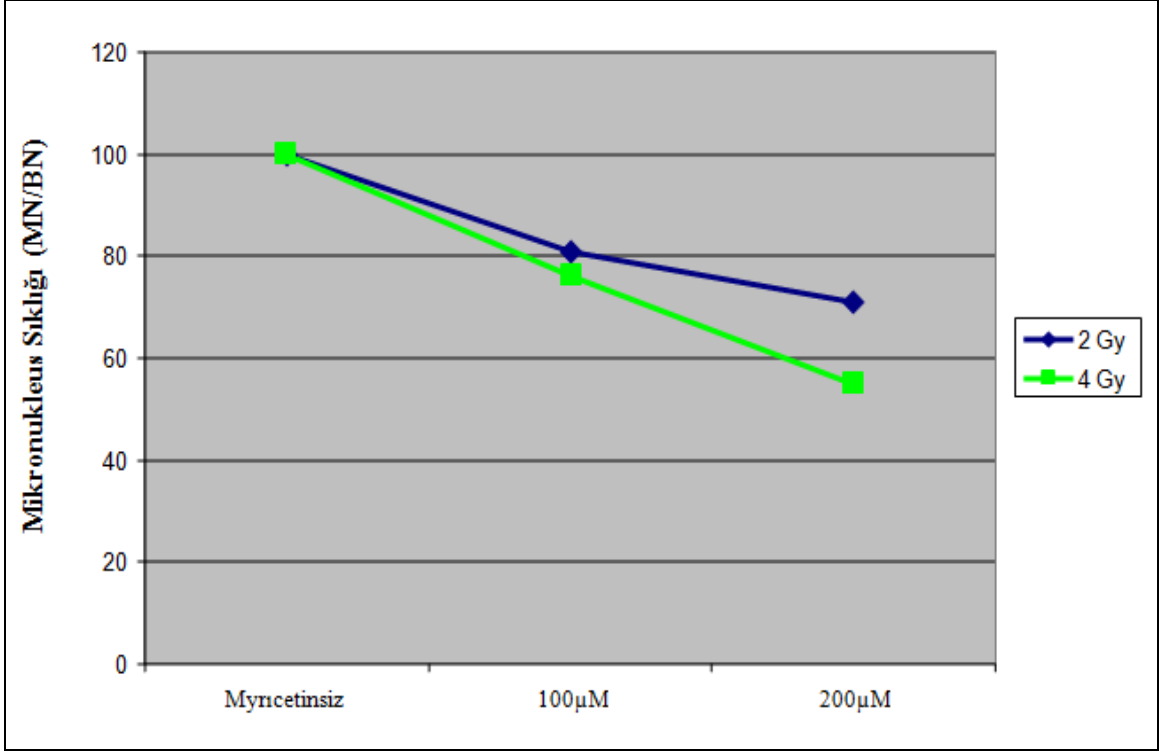
**Tablo 21. Radyasyon öncesi myricetin uygulamasının MN sıklıklarına etkisi**

	Sayılan Hücre	MN	BNMN*	Azalma (%)	Absorblanan Doz (Gy)
<b>2 Gy</b>	7500	1405	187,3±5,0		2
100µM Myricetin	7500	1144	152,5±4,5	19	1.29±0.13
200µM Myricetin	7500	1004	133,9±4,2	29	1.15±0.12
<b>4 Gy</b>	7500	4211	561,5±8,7		4
100µM Myricetin	7500	3207	427±7,6	24	2.74±0.17
200µM Myricetin	7500	2301	306,8±6,4	45	2.18±0.14

\*1000 BN hücrede MN taşıyan BN sayısını göstermektedir.



**Şekil 36. Radyasyon öncesi myricetin uygulamasının MN sıklıklarına etkisi**



**Şekil 37. Radyasyon öncesi myricetin uygulamasının MN sıklığına etkisi**

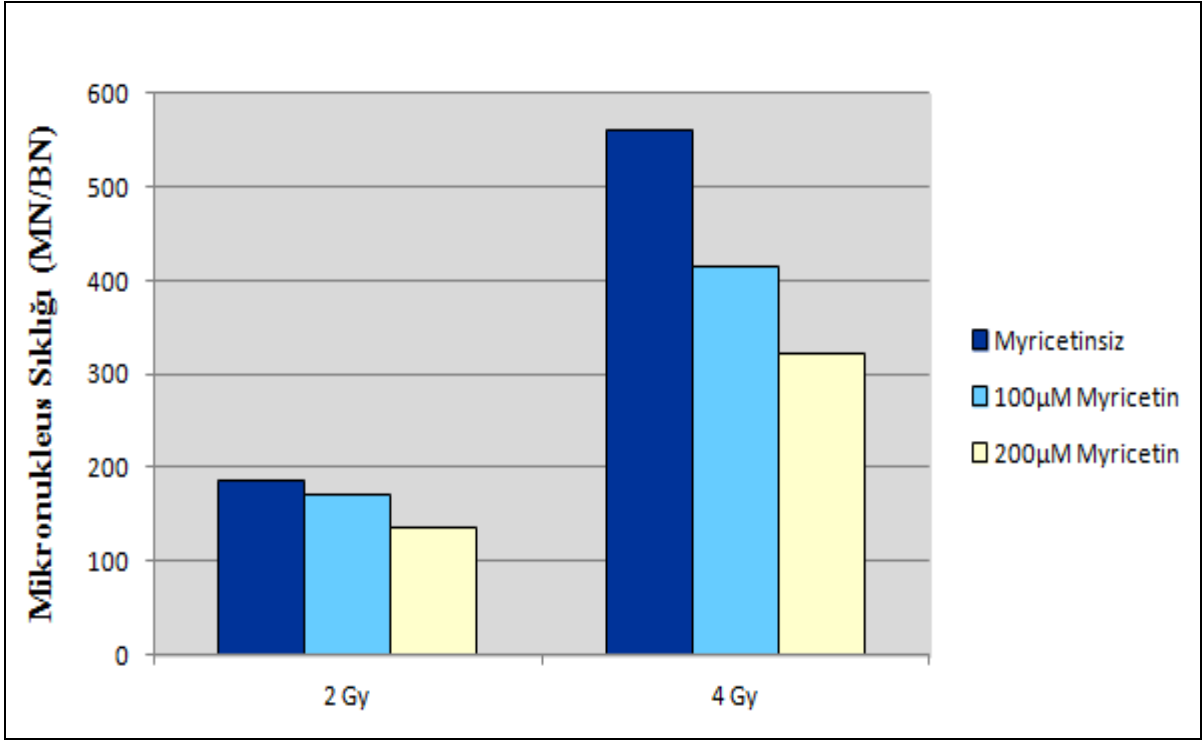
### **RADYASYON SONRASI MYRICETIN UYGULAMASI**

Radyasyon uygulamasını takiben myricetin uygulaması da mikronukleus sıklığında azalmaya neden oldu. Azalma yüzdesi hem dozla hem de konsantrasyonla değişiklik gösterdi. Sonuçlar Tablo 22, Şekil 38, Şekil 39'da verildi.

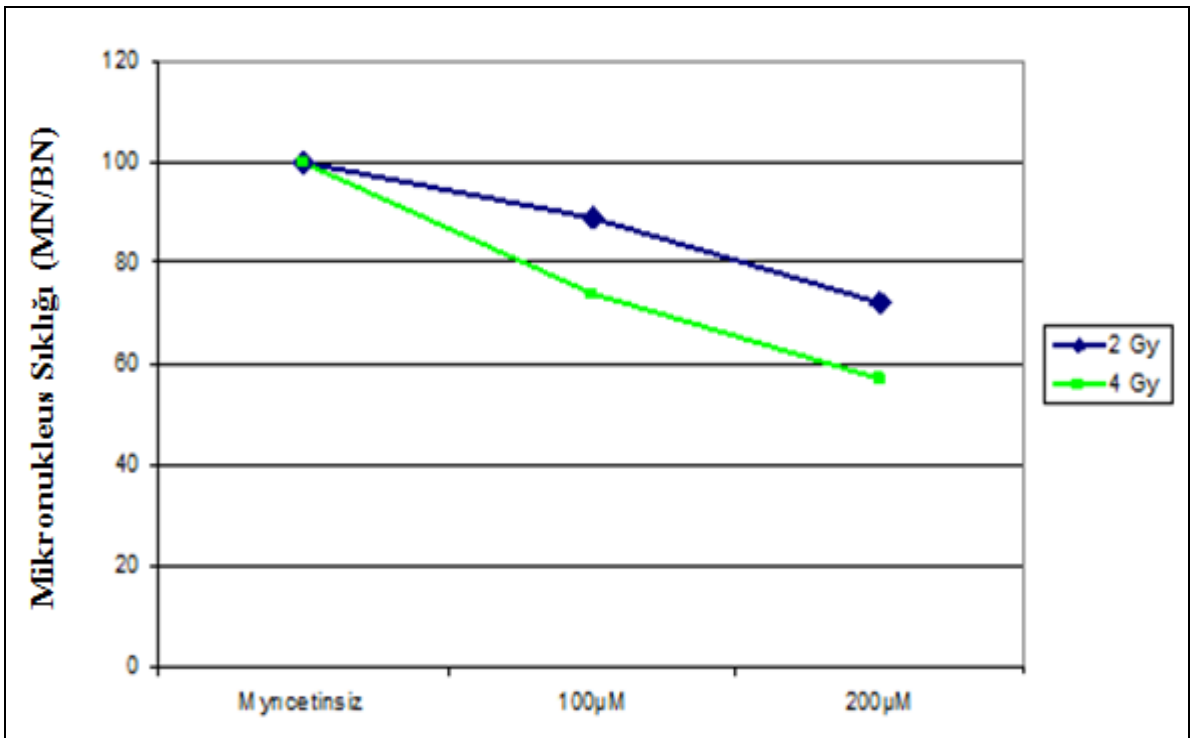
**Tablo 22. Radyasyon sonrası myricetin uygulamasının MN sıklıklarına etkisi**

	Sayılan Hücre	MN	BNMN*	Azalma (%)	Absorblanan Doz (Gy)
<b>2 Gy</b>	7500	1405	187,33±5,0		2
100µM Myricetin	7500	1277	170,3±4,8	11	1.39±0.14
200µM Myricetin	7500	1010	134,7±4,2	28	1.15±0.12
<b>4 Gy</b>	7500	4211	561,5±8,7		4
100µM Myricetin	7500	3116	415,5±7,4	26	2.70±0.17
200µM Myricetin	7500	2423	323,1±6,6	43	2.26±0.13

\*1000 BN hücrede MN taşıyan BN sayısını göstermektedir.



Şekil 38. Radyasyon sonrası myricetin uygulamasının MN sıklığına etkisi



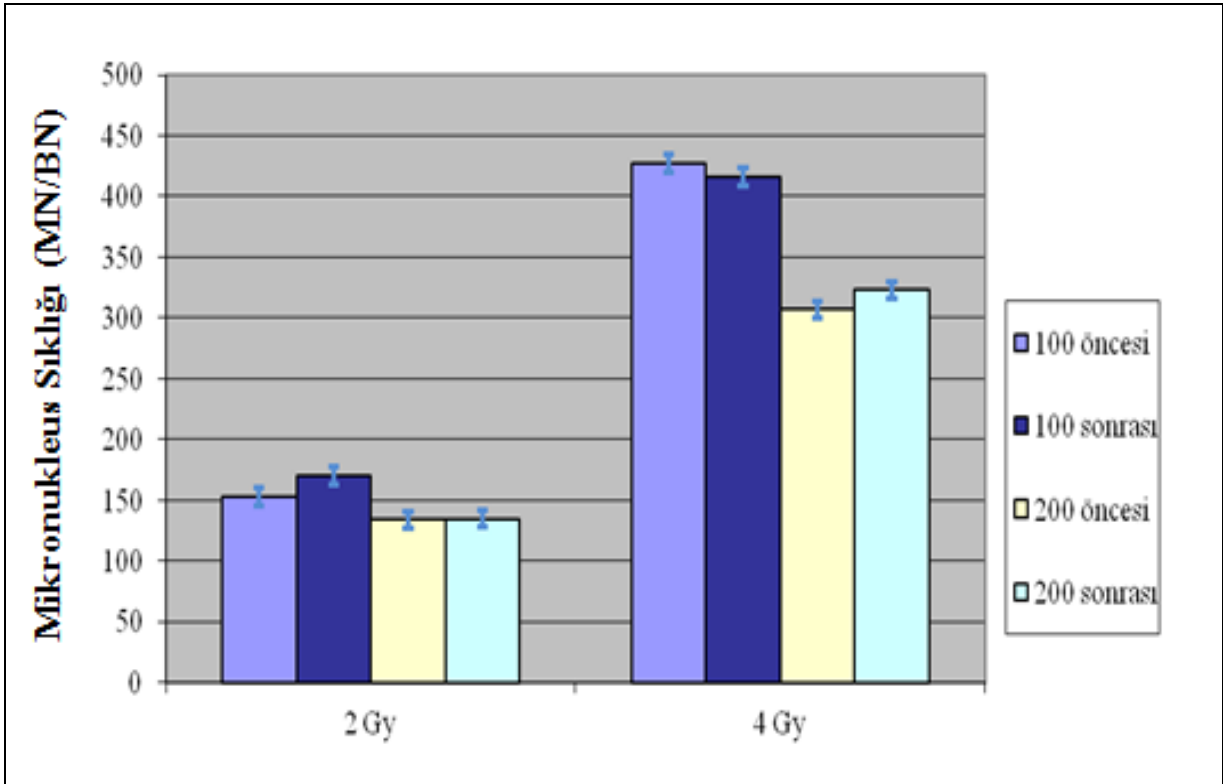
Şekil 39. Radyasyon sonrası myricetin uygulamasının MN sıklığına etkileri

## RADYASYON ÖNCESİ VE SONRASI

Radyasyona maruz kalma öncesi ve sonrası myricetin uygulanmasının etkileri karşılaştırıldığında 2 Gy dozda 100  $\mu$ M ( $p=0.224$ ) ve 200  $\mu$ M ( $p=0.223$ ) ile 4 Gy dozda 100  $\mu$ M ( $p=0.281$ ) ve 200  $\mu$ M ( $p=0.252$ ) anlamlı bir fark görülmedi (Tablo 23, Şekil 40).

**Tablo 23. Radyasyon öncesi ve sonrası uygulanan farklı konsantrasyonlardaki myricetin'in MN sıklıklarına etkisi**

		Radyasyon Öncesi	Radyasyon Sonrası	Fark(%)
2 Gy	100 $\mu$ M Myricetin	152,5 $\pm$ 4,5	170,3 $\pm$ 4,8	+10
	200 $\mu$ M Myricetin	133,9 $\pm$ 4,2	134,7 $\pm$ 4,2	-1
	Fark(%)	12	21	
4 Gy	100 $\mu$ M Myricetin	427 $\pm$ 7,6	415,5 $\pm$ 7,4	3
	200 $\mu$ M Myricetin	306,8 $\pm$ 6,4	323,1 $\pm$ 6,6	-5
	Fark(%)	28	22	



**Şekil 40. Radyasyon öncesi ve sonrası myricetin varlığında MN sıklıkları**



Sonuçta absorblanan doz açısından karşılaştırıldığında Myricetin konsantrasyonunun artmasının dozu etkilediği, ancak öncesinde veya sonrasında myricetin uygulanmasının anlamlı bir fark ortaya koymadığı görüldü. Myricetin varlığında absorblanan radyasyon dozlarının sonuçları Tablo 24’te verilmiştir.

**Tablo 24. Radyasyon öncesi veya sonrası Myricetin uygulanmasının absorblanan doza etkileri**

		<b>Radyasyon Öncesi (Gy)</b>	<b>Radyasyon Sonrası (Gy)</b>
<b>2 Gy</b>	<b>100µM Myricetin</b>	1.29±0.13	1.39±0.14
	<b>200µM Myricetin</b>	1.15±0.12	1.15±0.12
<b>4 Gy</b>	<b>100µM Myricetin</b>	2.74±0.17	2.70±0.17
	<b>200µM Myricetin</b>	2.18±0.13	2.26±0.13

## TARTIŞMA

Emil Grubbe'in çalışır haldeki bir Crooke tüpünü kucaklaması sonucunda ellerinde ve vucudunda meydana gelen lezyonların büyüklüğü, radyasyonun kanserli hücreleri öldürmekte kullanılabileceği fikrinin ortaya çıkmasına neden oldu. X ışınları keşfedildikten çok kısa bir süre sonra Ocak 1896'da Meme karsinomu tedavisi gören Ms. Rose Lee ilk radyoterapi hastası olarak tarihe geçti (21,84). Aradan geçen 100 yıllık süreçte geliştirilen bilgisayarlı cihazlar sayesinde radyoterapi kanser tedavisinin ana yöntemleri arasında yerini aldı.

Radyoterapinin temeli iyonlaştırıcı radyasyon kullanarak hücrelerin ölmesinin sağlanması ve/veya bölünmelerinin ( oğalmalarının) engellenmesidir. Tedavinin başarılı olmasında en önemli nokta, t m rl  bölgeye doğru radyasyon dozunun uygulanmasıdır. Aksi halde t m rl  hücreler ortadan kaldırılamadığı gibi uygulanan radyasyon ikincil kanserlerin oluşmasına da zemin hazırlayabilir (39). Bunun yanı sıra tümöre planlanan yüksek doz verilirken, tümörün etrafındaki normal dokuların mümkün olduğunca düşük doz alması gereklidir.

Kanser hastaları bitkilerden elde edilen çeşitli ilaçları tedaviye destek amacıyla kullanmaktadır. Bu bitkisel ürünlerin bir kısmı psikolojik etki dışında bir fayda sağlamazken, özellikle flavonoid grubu kimyasalların antioksidan özellikleri nedeniyle tamamlayıcı tedavi olarak önerilebileceğini gösteren çalışmalar mevcuttur (58,75,77,85).

Bir bioflavonoid olan myricetin, hem kanseri önleyici hem de tedaviyi tamamlayıcı olarak önerilen bitki ekstrelerinin başında gelir. Yapılan  alışmalar myricetin'in hem DNA'yı

oksidatif hasara karşı koruyucu hem de DNA tamir mekanizmalarını uyarıcı etkisi olabileceğine işaret etmektedir (1-3,58).

Radyasyon nedeniyle DNA'da hasar meydana geldiği bilinmektedir. Oluşan bu hasarların bazıları tamir edilemeyip mutasyonlar ve/veya kromozomal aberasyonlara neden olurken, bazı hasarlarda DNA tamir mekanizmaları ile ortadan kaldırılmaktadır. Ortamda radyoprotektörlerin olması radyasyon etkisiyle meydana gelebilecek hasarı azaltır (11).

Myricetin'in güçlü bir antioksidan olması nedeniyle hücreleri serbest radikallerle oluşan hasarlardan koruduğu çeşitli araştırmalarda bildirilmiştir (1-3). Bu durumda radyasyon nedeniyle oluşabilecek serbest radikalleri azaltıp radyoprotektif bir etki göstermesi beklenebilir.

Bu çalışmadaki amacımız, kanser tedavisinde destek olarak kullanılan myricetin'in absorblanan doza etkisini mikronukleusların analizi yöntemiyle araştırmaktır. Literatür çalışmaları Myricetin'in olası radyoprotektif etkisinin antioksidan özelliğinin yanı sıra DNA tamir mekanizması üzerinde de etkili olabileceğine işaret etmektedir (1). Radyasyon nedeniyle meydana gelen serbest radikaller çok kısa bir sürede ortamdan kaybolur. Bu nedenle hem radyasyon ışınlanması öncesi hem de sonrasında myricetin uygulaması myricetin'in radyoprotektif karakterinin ortaya çıkartılmasına yardımcı olabilir.

Bu etkiyi araştırabilmek için, radyoterapide fraksiyone uygulamada en çok kullanılan 2 Gy ve çok sayıda hücreyi etkileyen ve bir hücrede çok sayıda aberasyon oluşmasına neden olan 4 Gy radyasyon dozu seçilmiştir.

Literatürde Myricetin'in antioksidan etkisini araştırmak üzere farklı konsantrasyonlarda çalışmalar yapılmıştır (1,86,87). Duthie ve ark. Myricetin'in 50 µM üzerindeki konsantrasyonlarının 200 µM hidrojen peroksitin insan lenfosit hücrelerinde neden olduğu DNA kol kırıklarını azalttığını, 50 ve 100 µM arasında etki açısından ise anlamlı bir fark olmadığını göstermişlerdir (1). Noroozi ve ark. 64 µM Myricetin'in 100 µM Hidrojen peroksidin neden olduğu DNA hasarının %50'sini azalttığını, 279 µM Myricetin konsantrasyonunun ise %90 etkili olduğunu ileri sürmüşlerdir (86). O'brien ve ark.'ları CaCo2 ve HepG2 hücreleriyle yaptıkları çalışmada 200 µM Myricetin'in DNA hasarını azalttığını buna karşın hücre canlılığını etkilemediğini rapor etmiştir. Aynı çalışmada Myricetin'in 200 µM konsantrasyonun DNA hasarı oluşturmadığı ileri sürülmüştür (87). Literatürde iyonlaştırıcı radyasyonlarla yapılmış bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu nedenle çalışmamızı planlarken myricetin konsantrasyonları olarak DNA kol kırıklarını azalttığı daha

önceki çalışmalarda gösterilmiş 100 µM ve toksik etki göstermediği bilinen 200 µM myricetin kullanılmıştır.

Absorblanan dozlar mikronukleus analizi yöntemi ile belirlenmiştir. Mikronukleuslar, sitoplazma içinde ana nukleusun dışında fakat nukleusun yapı ve boyanma özelliklerini yansıtan küçük küresel yapılardır. Artan radyasyon dozuyla lineer quadratik doz cevabı oluşturur (4). Hem radyasyon gibi fiziksel ajanlar, hem de kimyasal ajanlar mikronukleus oluşturabilir. Myricetin'in radyoprotektif etkisinin yanı sıra olası genotoksik etkisini radyasyonla birlikte değerlendirebilmek amacıyla bu yöntem tercih edilmiştir.

3 paralel olarak planlanan çalışmada kontrol, radyasyon öncesi ve radyasyon sonrası myricetin uygulaması olmak üzere 3 ana kategoride 14 ayrı seri oluşturulmuş (Tablo 6) ve sonuçlar karşılaştırılmıştır (Tablo 7, Tablo 8, Tablo 9, Tablo 10, Tablo 11).

Kontrol grubunda 3 gönüllünün doğal mikronukleus sıklıkları yanı sıra myricetin'in çözülmesinde kullanılan DMSO ve çalışmada kullanılan 100 µM ve 200 µM'lük Myricetin konsantrasyonlarının da MN sıklığına katkısı araştırıldı. Her 3 gönüllüye ait doğal mikronukleus sıklığı ortalama  $4,9 \pm 0,9$  (4,8-5,2) bulundu. DMSO'lu kan örneklerinin MN sıklığı ortalama  $4,4 \pm 0,8$  (3,6-4,8) iken bu değer 100µM Myricetin için  $5,6 \pm 0,9$  (4,8-6,0), 200 µM Myricetin için ise  $6,3 \pm 0,7$  (5,2-6,8) olarak tespit edildi. 200 µM Myricetin'e ait MN sıklıkları, kontrol grubunun en yüksek değerlerine ulaşmakla birlikte (Tablo 12), gruplar arasında ve 3 gönüllüye ait kan örnekleri arasındaki istatistiksel olarak fark görülmedi ( $P > 0,05$ ). Bu sonuç DMSO ve 100 µM Myricetin'in DNA kol kırıklarının arttırmadığını ileri süren Duthie ve ark. (1) ve 200 µM'ün toksik etki yapmadığını rapor eden O'brein ve ark. (87) nin sonuçlarıyla tutarlı bulundu.

Antioksidan etkisini araştırmak amacıyla 2 farklı konsantrasyonda myricetin varlığında 2 Gy ve 4 Gy'lik Co-60 gamma radyasyonu uygulaması yapıldı. Myricetin'in iki konsantrasyonu da her iki dozda mikronukleus sıklığında azalmaya neden oldu (Tablo 13, Şekil 25, Şekil 26). Myricetin konsantrasyonunun artması, MN sıklığında azalmayı arttırdı ( $p > 0,05$ ). 2 Gy'lik dozda 100 µM Myricetin %15-21 arasında bir azalmaya neden olurken, bu değer 200 µM Myricetin'in varlığında %26-32'ye kadar yükseldi. 4 Gy'de etki 2 Gy'den daha şiddetli oldu. 100 µM Myricetin konsantrasyonunda MN sıklığı %21-27 arasında değişirken, 4 Gy'de %39-51 oranında azalma görüldü (Tablo 14, Şekil 27, Şekil 28). 3 olgu arasında istatistiksel olarak fark olmadığından ( $P > 0,05$ ) sonuçlar birleştirildi. 2 Gy'lik dozda MN sıklığı 100 µM Myricetin varlığında ortalama %19 azalırken, 200 µM Myricetin konsantrasyonunda bu değer %29 oldu. Co-60 gama ışınıyla hazırlanmış doz cevap eğrisiyle

(4) absorblanan dozlar hesaplandığında 2 Gy radyasyon dozu 100 µM Myricetin'in varlığında 1.29±0.13 Gy, 200 µM Myricetin'in varlığında ise 1.15±0.12 Gy olarak bulundu. 2 Gy'lik absorblanan doz 100 µM Myricetin ile %36, 200 µM Myricetin'le ise %43 azaldı (p>0.05). 4 Gy'lik dozda mikronukleus sıklığı 100 µM Myricetin varlığında ortalama %24 azalırken 200 µM Myricetin konsantrasyonunda bu değer %45'e yükseldi. 4 Gy radyasyon dozu 100 µM Myricetin'in varlığında 2.74±0.17, 200 µM Myricetin'in varlığında ise 2.18±0.13 Gy olarak hesaplandı. 4 Gy için dozda azalma 100 µM Myricetin ile %33, 200 µM Myricetin'le ise %46 oldu (Tablo 21, Şekil 36, Şekil 37).

Radyasyon öncesi myricetin uygulaması MN sıklığını farklı oranlarda etkilemekle birlikte farklı konsantrasyonlarda absorblanan dozlardaki düşüş arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmedi (p>0.05).

Literatürde Myricetin'in radyoprotektif etkisiyle ilgili iyonlaştırıcı radyasyonlarla yapılmış çalışmalara rastlanılmamıştır. Myricetin çalışmalarında genellikle antioksidan etkisini açıklamak amacıyla DNA hasarı oluşturacak kaynak olarak hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) kullanılmıştır (Tablo 25). Rueff ve ark. 0,5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in yaklaşık 2 Gy'in meydana getirdiği DNA kol kırığına eşdeğer hasar meydana getirdiğini göstermişlerdir (88).

Kromozomal aberasyonların oluşması için ilk hedefin DNA molekülü olduğu bilinmektedir. Ancak DNA hasarlarının tamamı, matematiksel bir oranla kromozomal hasara dönüşmez. Kromozom aberasyonlarının oluşması için DNA'nın hedef molekül olmasının yanı sıra tamir mekanizmasının da önemi vardır. Mutajenler ile oluşturulan ilk lezyonlar, ikinci bir lezyona dönüştürülebilir, onarılabilir veya orijinal haline geri dönebilir (19). Örneğin 20 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in neden olduğu kromozomal aberasyon sayısı 1 Gy'lik dozun neden olduğu sıklığın yaklaşık yarısı kadardır (89). Bu nedenle H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in farklı konsantrasyonlarıyla yapılan çalışmalardaki azalma yüzde değerleriyle bizim azalma yüzde değerlerimizi matematiksel olarak karşılaştırmak mümkün değildir. Ancak araştırmalardan çıkan ortak sonuç, serbest radikal oluşturan etken ne olursa olsun, Myricetin'in etkene maruz kalma öncesinde ortamda bulunmasının DNA'nın hasarını azalttığıdır. Bizim çalışmamızda her iki dozda ve her iki konsantrasyonda mikronukleus sıklıklarındaki azalma da bu sonucu destekler niteliktedir.

**Tablo 25. Farklı konsantrasyonlardaki Myricetin'in DNA hasarını azaltma oranları**

Araştırmacı	Hücre tipi	Serbest radikal kaynağı	Etkide azalma
<b>Duthie ve ark. (1)</b>	İnsan lenfosit hücreleri	10, 25, 50, 100 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	• 50 µM Myricetin DNA hasarını %30, 100 µM Myricetin ise % 31 oranında azalttı
<b>Delgado ve ark. (77)</b>	HepG2 hücre serisi	3 mM NDBA, 44 mM NPIP	• 0.1 µM myricetin NDBA ya karşı %15 pürin hasarını, %17 pirimidin hasarını azalttı
<b>Noroozi ve ark.(86)</b>	İnsan lenfosit hücreleri	100 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	• 64 µM Myricetin'in DNA hasarını %50, 279 µM Myricetin konsantrasyonunun ise %90 azalttı
<b>O'Brien ve ark. (87)</b>	CaCo2 ve HepG2 hücre serileri	50 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	• 50 µM Myricetin DNA hasarını CaCo2 ve HepG2 hücrelerinde %17, 200 µM Myricetin ise CaCo2 hücrelerinde %30, HepG2 hücrelerinde %40 azalttı.
<b>Chen w. ve ark. (90)</b>	Sprague dawley kortikal astrosit hücreleri	100 µM peroksinitrit	• 10µM Myricetin hidroksil radikallerini %48.6 düşürdü
<b>Delgado ve ark. (91)</b>	HepG2 hücre serisi	27 mM NDBA, 5 mM NPYR, 50 µM BaP	• 0.1-5 µM Myricetin NDBA ile oluşturulan DNA iplik kırıklarını %32, 5-10 µM Myricetin'in BaP ile oluşturulan kırıklarını % 5-20 azalttı,
<b>Abalea ve ark. (92)</b>	Sprague dawley hepatosit hücreleri	100 µM Fe-NTA	• 100 µM Myricetin'in 100 µM Fe-NTA ile oluşturulmuş hasarı % 34 azalttı

NPYR: N-nitrozopyrolidine, **BaP**: Benzo(a)pyrene, **Fe-NTA**: Demir Nitritotriasetat

Canlı organizmanın %70-90'ını su molekülü oluşturur. Biyolojik sistemlerdeki temel molekül olan su molekülü enerjiyi absorblayınca değerlik kabuğunda paylaşılmamış elektron olan iki serbest radikale ( $H^{\circ}$  ve  $OH^{\cdot}$ ) ayrışır. Ayrıca ortamda oksijenin miktarı ile doğru orantılı olarak  $H_2O_2$  gibi aktif yapıların varlığı da görülür. Serbest radikaller ortamdaki diğer moleküller ile etkileşerek hücrede oksidatif strese neden olur. Antioksidanlar, serbest radikallerle birleşerek onları ortadan kaldırır. İyonlaştırıcı radyasyonun neden olduğu serbest radikaller çok kısa bir sürede ortamdan uzaklaştığından antioksidanların ışınlanma öncesinde ortamda bulunması halinde etkili olması mümkündür. Radyasyon uygulaması sırasında Myricetin'in varlığında absorblanan dozun ve mikronukleus sıklığının düşmesi onun antioksidan özelliğinden kaynaklanabilir. Flavonoidlerin antioksidan özellikleri, özellikle ksantine oksidaz'ı yok etme yetenekleri, hidroksil radikalleri ve süperoksit anyonları bağlama ve lipit peroksidasyonunu yok etme özelliklerinden kaynaklanmaktadır (1). Diğer flavonoidlere oranla Myricetin, serbest radikalleri yakalamada daha etkilidir (3,66). Radyasyon sonrası oluşan serbest radikalleri, yapısında bulunan  $-OH$  radikalleri sayesinde kendine bağladığı ve DNA'da oluşacak oksidatif hasarları engellediği düşünülmektedir (1-3,86,90).

Çalışmanın 2. aşamasında radyasyon sonrasında Myricetin uygulanmasının kromozomal aberasyon sıklığı üzerine etkileri de araştırıldı (Tablo 7, Tablo 8, Tablo 9, Tablo 10, Tablo 11).

2 Gy ve 4 Gy'lik Co-60 gamma radyasyonu ile ışınlamayı takiben kan örneklerine 2 farklı konsantrasyonda Myricetin eklendi. Radyasyon sonrası uygulamada Myricetin'in iki farklı konsantrasyonunda ve her iki dozda MN sıklığında azalma görüldü (Tablo 15, Şekil 29, Şekil 30). Myricetin konsantrasyonuna bağlı olarak, MN sıklığı da azaldı. 2 Gy'lik dozda 100  $\mu$ M Myricetin %5-12 arasında bir azalmaya neden olurken, bu değer 200  $\mu$ M Myricetin'in varlığında %24-34'e kadar yükseldi. 4 Gy'de ise 100  $\mu$ M Myricetin konsantrasyonunda MN sıklığı %25-27 arasında değişirken, 200  $\mu$ M Myricetin eklenecek kan örneklerinde %40-45 oranında azalma görüldü (Tablo 16, Şekil 31 ve Şekil 32). 3 gönüllü arasında istatistiksel olarak fark olmadığından (Tablo 19) ( $P>0.05$ ) sonuçlar birleştirildi. 2 Gy'lik dozda MN sıklığı 100  $\mu$ M Myricetin varlığında ortalama %11 azalırken, 200  $\mu$ M Myricetin konsantrasyonunda bu değer %28 oldu. 4 Gy'lik dozda bu değerler sırasıyla %26 ve %43 oldu. Co-60 gama ışınıyla hazırlanmış doz cevap eğrisiyle (4) absorblanan dozlar hesaplandığında 2 Gy radyasyon dozu 100  $\mu$ M Myricetin konsantrasyonu için  $1.39\pm 0.14$  Gy, 200  $\mu$ M Myricetin için ise  $1.15\pm 0.12$  Gy olarak bulundu. 2 Gy'lik absorblanan doz 100  $\mu$ M

Myricetin ile %31, 200 µM Myricetin'le ise %42 azaldı. 4 Gy 100 µM myricetin'in varlığında 2.70±0.17, 200 µM Myricetin'in varlığında ise 2.26±0.13 Gy olarak hesaplandı. 4 Gy için dozda azalma 100 µM Myricetin ile %32, 200 µM myricetin'le ise % 43 oldu (Tablo 22, Şekil 38, Şekil 39).

Radyasyon sonrasında da myricetin uygulaması MN sıklığını farklı oranlarda etkilemekle birlikte farklı konsantrasyonlarla absorblanan dozlardaki düşüş arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmedi ( $p>0.05$ ).

Radyasyon uygulaması öncesi ve sonrasında myricetin'in 2 konsantrasyonun mikronukleus sıklığı üzerine etkisi karşılaştırıldığında 2 Gy'lik dozda radyasyon öncesi 100 ve 200 µM myricetin uygulanması absorblanan dozu sırasıyla %36 ve %43 düşürürken, radyasyon sonrasında bu oranlar %31-%42 oldu. Aynı şekilde 4 Gy'de de radyasyon öncesi (%33-46) ve radyasyon sonrası (%33-43) myricetin uygulanması arasında anlamlı bir fark gözlemlenmedi ( $p>0.05$ ) (Tablo 24).

Myricetin'in radyasyon sonrasında uygulanmasında da MN sıklığını düşürmesi, DNA tamir mekanizması üzerine etkili olabileceği ve/veya hasarlı hücreleri apoptoza götürebileceğini düşündürdü.

Huang, ve ark.ları UV-B'nin neden olduğu keratinosit hasarında myricetin'in UV-B ile uyarılmış keratinosit ölümlerini engellediğini, myricetin konsantrasyonuna bağımlı olarak, apoptotik DNA oligonükleotit zincir kırıklarını azalttığını göstermiştir (3). HaCaT hücre serilerinde gerçekleştirilen bu çalışmada myricetin'in T hücre diferansiyasyonu ve apoptoz yolağında rol alan c-jun-NH<sub>2</sub> terminal kinazın (JNK) aktivitesini de azalttığı rapor edilmiştir. UV-B'nin keratinosit hücrelerinde hasar meydana getirmesi sonucunda uyarıldığı bilinen JNK'nın miktarının azalması, Myricetin'in apoptozu durdurması olarak yorumlanmıştır.

Buna karşılık aynı hücre serileriyle çalışan Kim ve ark. tamir edilebilecek düzeyde düşük dozda UV-B'ye maruz bırakılan hücrelerde, myricetin'in Akt ve Bad moleküllerinin aktivitesini düşürerek mitokondriyal apoptotik moleküllerin salınımını arttırdığını ve hücreyi p53'ten bağımsız bir yoldan apoptoza sürüklediğini ileri sürmüştür (89).

Myricetin'in kanser hücre serileriyle yapılan çalışmalarda da hücre çoğalmasını durdurduğu ve/veya apoptozu tetiklediği görülmektedir. Huang ve ark. bazal hücreli karsinoma veya melanom gibi tümör hücre serilerinde hücre çoğalmasını durdurduğunu rapor etmişlerdir (3). Sun ve ark. Myricetin'in T24 mesane kanseri hücre serilerinde doz ve zamana bağlı olarak tümör hücrelerinin canlılık ve çoğalma yeteneklerini azalttığını, siklin bağımlı kinaz cdc2 ve siklin B1'in baskılanmasını, T24 hücre serilerinde hücre siklusunun G<sub>2</sub>/M



evresinde tutulmasına yol açtığını ileri sürmüşlerdir. Myricetin-apoptoz arasındaki bağlantının, kaspaz-3'ün aktivasyonu ve Bcl-2 ailesi proteinlerinin modülasyonu ile ilişkili olabileceği ve Myricetin'in Akt fosforilasyonunu inhibe ederken, p38 MAPK fosforilasyonunu arttırdığı düşünülmektedir (68).

Morales ve ark.'ları ise Myricetin'in Lösemi HL-60 serisinde apoptozu doz ve zamana bağlı olarak indüklediğini, ancak HepG2 hücrelerinde böyle bir etki gözlenmediğini rapor etmiştir (93). Bunun nedenini, hepatositlerde mutajenik oksidasyon ürünlerinin yok edilmesinin, myricetin'in DNA eksizyon-tamir enzimlerinin aktivasyonundan kaynaklanması olabileceğini ileri sürmüşlerdir.

MN sıklığındaki azalma DNA tamir mekanizmasından kaynaklanıyorsa, normal hücrelerin sayısının artması ve 1 MN taşıyan binukleatların sayılarının azalması beklenir. Eğer bu azalma birden fazla mikronukleus taşıyan, tamiri güç hücrelerin apoptoza girmesinden kaynaklanıyorsa bu durumda birden fazla MN taşıyan hücrelerin dağılımında ve oranında düşme görülmesi doğal sonuç olacaktır. Bu nedenle her 2 doza ait BNMN dağılımlarını incelemek gerekir (Tablo 26). Her iki dozda da çok sayıda mikronukleus taşıyan binukleatların sayısı, myricetin uygulamasını takiben azalma göstermiştir.

**Tablo 26. 2 Gy ve 4 Gy radyasyon dozları için mikronukleuslu BN sayıları**

	<b>MN'suz BN</b>	<b>MN'lu BN</b>	<b>1 MN'lu BN</b>	<b>1den fazla MN'lu BN</b>
<b>2 Gy</b>	<b>6328</b>	<b>1172</b>	<b>970</b>	<b>202</b>
100+ 2 Gy	6507	993	856	137
2 Gy+100	6391	1109	958	151
200 + 2 Gy	6617	883	769	114
2 Gy+200	6611	889	779	110
<b>4 Gy</b>	<b>4608</b>	<b>2892</b>	<b>1902</b>	<b>990</b>
100+ 4 Gy	5074	2426	1774	652
4 Gy+100	5117	2383	1779	604
200 + 4 Gy	5670	1830	1417	413
4 Gy+200	5518	1982	1601	381

Bu düşüşler MN taşımayan binukleat sayıları açısından karşılaştırıldığında uygulama öncesi veya sonrası Myricetin eklenmesi arasında belirgin bir fark gözlenmemiştir. Konsantrasyon açısından karşılaştırıldığında ise 2 Gy'de 100 µM Myricetin için ortalama %2, 200 µM için ise %4,5 artış görülürken bu değerler 4 Gy'de %11 ve %21 oldu. Buna karşılık

birden fazla mikronukleuslu hücre sayıları 100 µM Myricetin için 2 Gy de ~%30, 4 Gy de ise %37 azalma gösterdi. Bu değerler 200 µM Myricetin için ise 2 Gy'de %45, 4 Gy için ise %61 oldu (Tablo 27). Birden fazla mikronukleus taşıyan binokletlerin sayısındaki dramatik düşüş, myricetin'in hasarlı hücrelerde apoptozu uyararak, hücreleri ortadan kaldırmış olabileceği olasılığını güçlendirdi. Mikronukleussuz hücre sayısındaki artışın ise relatif olduğunu düşündürdü.

**Tablo 27. 2 Gy ve 4 Gy'de mikronukleuslu BN sayılarındaki % azalma miktarları**

	<b>Toplam düşüş (%)</b>	<b>MN'suz BN</b>	<b>MN'lu BN</b>	<b>1 MN'lu BN</b>	<b>1den fazla MN'lu BN</b>
100+ 2 Gy	11	+2.4	-15.3	-11.7	-32.2
2 Gy+100	28	+1.0	-5.3	-1.2	-25.2
200 + 2 Gy	26	+4.5	-25	-20.7	-43.6
2 Gy+200	43	+4.5	-24	-19,6	-45.5
100+ 4 Gy	24	+10.1	-16.2	-6.7	-34.2
4 Gy+100	36	+11.0	-17.6	-6.5	-39.0
200 + 4 Gy	45	+23.0	-36.7	-25.5	-58.2
4 Gy+200	53	19.7	-31.5	15.9	-61.5

Sonuç olarak, Myricetin'in iyonlaştırıcı radyasyonun neden olduğu mikronukleus sıklığını düşürdüğü açıkça ortaya konulmuştur. Bu etki myricetin'in konsantrasyonuna bağlı olarak artış göstermiş, ancak uygulamanın radyasyon ışınlanması öncesi veya sonrası olması istatistiksel olarak anlamlı bir fark ortaya koymamıştır. Bu durum Myricetin'in antioksidan özelliği nedeniyle serbest radikalleri bağlayarak DNA hasarını azaltmak yerine, belki de DNA tamirini uyararak, tamir edilemeyen hücrelerin apoptoza girişini hızlandırması nedeniyle ortaya çıkmış olabilir. Literatürde iyonlaştırıcı radyasyonlarla yapılmış myricetin mekanizmasıyla ilgili çalışmalara rastlanılmamıştır. Bu mekanizmanın tam olarak anlaşılabilmesi radyoterapi açısından çok önemlidir. Radyasyon tedavisinin temeli absorblanan dozun doğru bir şekilde uygulanması esasına dayanır. Bu gerçekleşirken tümörün etrafındaki dokuların en az dozu alması, hastanın tedavisi sonrasındaki yaşamında ikincil kanserlerle karşılaşmaması açısından da çok önemlidir. Kanserli olguların, özellikle meme kanserli, mesane kanserli hastaların myricetini destek amacıyla kullandıkları bilinmektedir. Eğer myricetin düşündüğümüz gibi apoptozu tetkileyerek, fazla aberasyonlu hücreleri ortadan kaldırıyor, bu durumda hasta sağlığı açısından kullanılması faydalı olacaktır. Literatür bulguları normal dokularda koruyucu etkisi olabileceğine işaret etmektedir

(1,3). Öte yandan kanserli hücrelerde apoptozu tetiklemesi de tedavinin amacına uygun olacaktır. Ancak bazı kanserlere ait hücre serilerinde apoptozu tetiklediğine işaret eden bulgular varken, bazılarında ise olumlu sonuçlara varılamamıştır (58,68,93). Öte yandan mikronukleus taşımayan BN sayılarında artış olmaması en azından hücrelerin çoğalması için bir ortam yaratmayacağını düşündürmektedir. Kanser hücre serilerinde de absorblanan dozu değiştirip değiştirmediği mutlaka incelenmelidir. Tedaviyi etkileyecek şekilde tümör hücrelerinde de absorblanan dozu etkiliyorsa, bu durumda radyoterapi hastalarının bu flavonoidi kullanmaları tedavileri için olumsuz etki yapabilir. Myricetin'in tam olarak radyoprotektif etkisinin mekanizmasının açıklığa kavuşması için, kanser hücre serileriyle DNA tamir mekanizması ve apoptoz mekanizmasını açıklayacak moleküler çalışmalara ihtiyaç vardır.

## SONUÇLAR

Bu çalışmanın hedefi, bir bioflavonoid olan Myricetin'in radyoprotektif etkisinin karakterinin araştırılmasıdır.

Antioksidan özelliğini incelemek için 2 Gy ve 4 Gy radyasyon öncesinde ortamda 100 µM ve 200 µM olmak üzere farklı konsantrasyonlarda bulunan myricetin'in MN sıklığına etkileri değerlendirildi. Myricetin'in 2 farklı konsantrasyonunun uygulanan farklı dozlarda MN sıklığını azalttığı, ayrıca myricetin konsantrasyonunun artması ile MN sıklığının daha da azaldığı bulundu. 2 farklı konsantrasyondaki myricetin'in 2 Gy radyasyon dozunu yaklaşık %36-43 oranında, 4 Gy radyasyon dozunu ise %33-46 oranında düşürdüğü bulunmuştur.

DNA tamir mekanizması üzerinden etkili olup olmadığı incelemek için de 2 Gy ve 4 Gy radyasyon sonrası farklı konsantrasyonlarda (100 µM ve 200 µM) Myricetin uygulanarak MN sıklığına etkileri değerlendirildi. Farklı radyasyon dozları sonrasında uygulanan farklı myricetin konsantrasyonunun MN sıklığını azalttığı bulundu. Farklı konsantrasyondaki myricetin'in 2 Gy radyasyon dozunu yaklaşık %31-41 oranında, 4 Gy radyasyon dozunu ise %32-43 oranında düşürdüğü bulunmuştur. Radyasyon sonrası uygulanan myricetin'in de MN sıklığını düşürmesi, myricetin'in DNA tamir mekanizması üzerine etkili olabileceğini düşündürdü.

Radyasyon öncesi ve radyasyon sonrası uygulanan myricetin'in MN sıklıkları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak fark olmadığı bulundu ( $p>0.05$ ).

Yaptığımız literatür çalışmalarında, myricetin'in kanser hücre serileriyle çalışılması sonucu hücre çoğalmasını durdurduğu ya da apoptozu tetiklediği bulunmuştur. Bizim çalışmamızda da radyasyon sonrası farklı konsantrasyonlardaki myricetin uygulanmasının BN başına düşen MN sıklığını düşürmesi hücreleri apoptoza götürdüğünü düşündürdü.

Farklı radyasyon dozlarına ait MN'lu BN hücre dağılımları incelendi ve MN taşıyan BN'ların sayısının, konsantrasyon miktarının artmasıyla daha da azaldığı bulundu. Bu durum, myricetin'in fazla hasarlanmış hücreleri apoptoza sürükleyerek ortadan kaldırdığını ve bundan dolayı MN sıklığını azalttığı ihtimalini güçlendirdi.

Sonuç olarak, antioksidan özelliği ile bilinmesine rağmen myricetin'in radyoprotektif özelliğinin serbest radikalleri bağlamaktan ziyade DNA tamir mekanizması üzerinden etkili olabileceği görüşüne varıldı. BN başına düşen MN sıklığındaki azalma düşündüğümüz gibi fazla hasarlı hücrelerin apoptoza yönlendirilmesinden kaynaklanıyorsa kanser tedavisinde destek olarak kullanılabileceği görüşüne varıldı ancak MN sıklığındaki azalmanın temelinin tam olarak anlaşılabilmesi için kanser hücre serilerinde ileri moleküler çalışmaların yapılmasının radyoterapinin başarısı açısından önemli olduğu sonucuna varıldı.

## ÖZET

Günümüzde radyasyon, birçok hastalığın tanı ve tedavisinde kullanılmaktadır. Ancak sağaltım amacıyla da olsa, uygulanan radyasyon, genetik materyalde doza bağlı olarak hasarlar meydana getirebilmektedir. Hasarlar ya doğrudan radyasyonun DNA'yı hasarlaması ya da dolaylı yoldan ortamdaki su molekülleri ile etkileşerek serbest radikaller oluşturmasıyla meydana gelir. Oluşan hasarların bazıları farklı DNA tamir mekanizmaları ile onarılabildiği gibi bazıları onarılamayacak seviyede olabilir. Bu nedenle radyasyon hasarını azaltmak amacıyla hastalara bazı koruyucu ajanlar verilmektedir. Bu koruyucu ajanlar radyasyonun verilen dozunu düşürerek tedavi sürecinde istenmeyen bir etki oluşturabilse de sağlam dokuların radyasyon hasarından korunabilmesi için kullanılmalarının gerekli olduğu durumlar vardır.

Myricetin, bitkisel kaynaklı doğal bir flavonoid olup antioksidan özelliği olduğu bilinen bir maddedir. Bu nedenle radyasyon sonucu oluşan serbest radikalleri kendine bağlayarak DNA'da oluşacak oksidatif hasarı engelleyebileceği beklenmektedir.

DNA'da oluşan hasarları belirlemek için, farklı dozimetrik yöntemler kullanılmaktadır. Mikronukleus (MN) analiz yöntemi de, oluşan DNA hasarının belirlenmesinde ve DNA hasarına karşı hücrede oluşan yanıtın incelenmesinde kullanılan bir tekniktir. MN'lar, binukleat (BN) hücreler ile aynı sitoplazma içinde bulunan, hücre bölünmesi sırasında mitotik iğdeki hatalar nedeniyle kutuplara çekilemeyen kromozomlardan ve/veya kromozom parçalarından oluşmaktadır. Radyasyonun oluşturduğu hasarlar da MN analizi ile incelenebilmektedir.

Bu çalışmada, yapısında bulunan –OH ekleri sayesinde güçlü bir antioksidan olarak bilinen myricetin farklı radyasyon dozlarında, radyasyon öncesi ya da sonrasında kullanılmasının MN sıklığı üzerine etkileri incelendi.

Farklı konsantrasyonlardaki myricetin 2 Gray (Gy) ve 4 Gy radyasyon öncesi ve sonrasında MN sıklığı üzerine etkileri değerlendirildi. Farklı radyasyon dozlarında, 100 µM ve 200 µM konsantrasyonlarında uygulanan myricetin MN sıklığını azalttığı görüldü. Radyasyon öncesi ve sonrasında uygulanan myricetin ise MN sıklığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşturmadı ( $P>0.05$ ).

Uygulanan myricetin konsantrasyonlarında radyasyon dozunun azaldığı ancak bu azalmanın gruplar arasında anlamlı bir fark oluşturmadığı bulundu. Radyasyon öncesi ve sonrası arasında fark bulunmadığı için myricetin antioksidan etkisinden daha çok, DNA tamirini uyararak etki ettiği ya da radyasyon sonucu hücrede oluşan hasar miktarına göre hücreyi apoptoza götürdüğü düşünüldü. Birden fazla MN taşıyan BN hücrelerin sayısı azalırken, kromozom aberasyon taşımayan hücrelerin sayısı değişmedi.

Bu çalışmanın sonucu olarak, kanser hastalarında myricetin radyoterapi tedavisine ek olarak kullanılabilmesi için daha ileri çalışmaların yapılması gerektiği önerilmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Myricetin, mikronukleus, DNA hasarı, radyoprotektif etki

# **INVESTIGATION OF THE RADIOPROTECTIVE EFFECTS OF MYRICETIN WITH MICRONUCLEUS ASSAY IN VITRO CONDITIONS**

## **SUMMARY**

Nowadays the radiation is used in the diagnosis and treatment of many diseases. However, even for medical purposes, the radiation is able to cause damage in genetic material of the cell depending on its dose. Damages occur either direct effect of radiation to DNA, or indirect hazardous effect of free radicals generated from interaction of the radiation-water molecules in the environment. Some of damages can be repaired by some different DNA repair mechanisms but some of them may be unrepairable level. That's why, some protective agents have been given to patients in order to reduce radiation damage. Although these protective agents have some undesirable effects in the treatment process such as reducing the given radiation dose, there are many situations to use of protective agents that necessary to preserve healthy tissues from radiation damage.

Myricetin is a plant-derived natural flavonoid that's known as an antioxidant featured substance. Therefore, it is expected that myricetin may inhibit the oxidative damage by binding the free radicals produced by radiation.

To determine the damage in DNA, different methods have been used in dosimeter. Micronuclei (MN) analysis method is a preferred technique for determining of DNA damage and response against to DNA damage in the cells and Micronuclei are composed of chromosomes and/or chromo pieces which cannot pulled away to the poles due to mitotic



yarns errors and located in same cytoplasm with BN. Damages produced by ionizing radiation can be investigated by MN analysis method.

In this study, the effects of myricetin, a powerful antioxidant containing –OH adducts in its structure, on frequency of MN, was investigated in different radiation doses in before and after radiation treatment.

Effects of different concentrations of myricetin on frequency of MN were evaluated in pre and post-treatment of 2 Gy and 4 Gy radiation doses. In different radiation doses, applied myricetin in 100  $\mu$ M and 200  $\mu$ M concentrations, decreased frequency of MN. Myricetin that applied before and after radiation treatment did not make a statistically significant difference in MN frequency ( $P > 0.05$ ).

It was found that radiation doses were reduced by applied myricetin doses in different concentrations but no significant differences between the groups were observed. Since there is no difference between pre-and post-irradiation, instead of antioxidant effect, myricetin was thought working via inducing DNA repair or by triggering apoptosis by the amount of damage in the cell. Number of BN cells with more than one MN decreased, but the number of cells not bearing chromosome aberrations did not change.

As a result of this study, it is suggested that there is need to further studies to be able to use myricetin in addition to radiotherapy in patients with cancer.

**Keywords:** Myricetin, micronucleus DNA damage, radioprotective effect

## KAYNAKLAR

1. Duthie SJ, Collins AR, Duthie GG, Dobson VL. Quercetin and myricetin protect against hydrogen peroxide-induced DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human lymphocytes. *Mutat Res* 1997;393:223-231.
2. Wang ZH, Kang KA, Zhang R, Piao MJ, Jo SH, Kim JS, et al. Myricetin suppresses oxidative stress-induced cell damage via both direct and indirect antioxidant action. *Environ Toxicol Pharmacol* 2009;7:12-8.
3. Huang JH, Huang CC, Fang JY, Yang C, Chan CM, Wu NL, et al. Protective effects of myricetin against ultraviolet-B-induced damage in human keratinocytes. *Toxicol In Vitro* 2010;8:21-8.
4. Pala FS, Alkaya F, Tabakçioğlu K, Tokatlı F, Uzal C, Parlar Ş, ve ark. The effects of micronuclei with whole chromosome on biological dose estimation. *Turk J Biol* 2008;32:283-90.
5. Fenech M. The in vitro micronucleus technique. *Mutat Res* 2000;455:81-95.
6. Fenech M, Chang WP, Kirsch-Volders M, Holland N, Bonassi S, Zeiger E. HUMN Project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutat Res* 2003;534: 65-75.
7. Algüneş Ç. Radyasyon Biyofiziği. Trakya Üniversitesi Rektörlüğü Yayınları 2002:51.
8. Podgorsak EB. Radiation physics for medical physicist. Introduction to modern physics. 2<sup>th</sup> ed. London: Springer Heidelberg; 2010. s.12-3.
9. <http://www.taek.gov.tr/bilgi-kosesi/radyasyondan-korunma/283-iyonlastirici-radyasyonun-biyolojik-etkiler.html>. 08.03.2013.
10. <http://www.telekomtech.com/baz-istasyonlarinin-insan-sagligina-etkisi.html>. 05.04.2013.
11. Özalpan A. Temel radyobiyojoloji. Haliç Üniversitesi 2001:30-45.

12. <http://www.cixip.com/index.php/page/content/id/1835>. 05.04.2013.
13. Yaren H, Karayılanoğlu T. Radyasyon ve insan sağlığı üzerine etkileri. TSK Koruyucu Hekimlik Bülteni 2005;4(4):199-208.
14. Varanda EA, Tavares DC. Radioprotection: Mechanisms and radioprotective agents including honeybee venom. J Venom Anim Toxins 1998;4(1):5-21.
15. Hall EJ. Radiobiology for the radiologist. 3<sup>th</sup> ed. New York: 1988;10-209.
16. Riley PA. Free radicals in biology: Oxidative stress and the effects of ionizing radiation. Int J Radiat Biol 1994;65(1):27-33.
17. Hutchinson F. Chemical changes induced in dna by ionizing radiation. Prog Nucleic Acid Res 1985;32:115-54.
18. Cohn WE, Moldave K. Progress in nucleic acid research and molecular biology. Academic press 1985.
19. International Atomic Energy Agency. Cytogenetic analysis for radiation dose assessment. Thechnical report no: 405. A Manual VIENNA 2001.
20. <http://www.benbest.com/lifeext/aging.html#dna>. 11.03.2013.
21. Shrieve DC, Loeffler JS. Human radiation injury. In: Liu T, Million L (Eds). Pathology of radiation injury. New york: 2011:14-20.
22. Munro TR. The relative radiosensitivity of the nucleus and cytoplasm of chinese hamster fibroblasts. Radiat Res 1970;42(3):451-70.
23. Dizdaroğlu M. Oxidatively induced DNA damage: Mechanisms, repair and disease. Cancer Lett 2012;327:26-47.
24. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Hücrenin moleküler biyolojisi. 4<sup>th</sup> ed. Ankara: Türkiye Bilimler Akademisi; 2008.s.267-75.
25. Yıldırım A, Bardakçı F, Karataş M, Tanyolaç B. Moleküler biyoloji-protein sentezi ve yıkımı. Nobel Tıp Kitabevi, 2007:120.
26. Aydın F, Gürtekin M. Tıbbi Biyoloji. Çarın M (Editör). Nobel Tıp Kitabevi, 2002:1-20.
27. <http://www.chm.bris.ac.uk/motm/kisspeptin/kisspeptinjm.htm>. 05.04.2013
28. Müller HJ. Artificial transmutation of the gene. Science 1927;66:84-7.
29. Painter TS, Müller HJ. Parallel cytology and genetics of induced translocations and deletions in Drosophila. J Hered 1929;20:287-98.
30. Taş M. Kanserli olgularda mikronukleus sıklığının belirlenmesi ve mikronukleus orijininin MN+FISH yöntemi ile değerlendirilmesi (tez). Edirne: Trakya Üniv Tıp Fak; 2010.

31. International Atomic Energy Agency (IAEA). Biological dosimetry: Chromosomal aberration analysis for dose assessment. Thechnical Report Series 260. VIENNA 1986.
32. Türkiye Atom Enerjisi Kurumu (TAEK). Radyasyon, insan ve çevre. İstanbul 2009.
33. International Commission on Radiological Protection (ICRP). 1990 Recommendations of international commission on radiological protection. Oxford Pergamon Pres 1991: ICRP Publication 60;21(1-3).
34. International Commission on Radiation Units and Measurements (ICRU). Linear energy transfer. Rapor no: 16. Suite: 1970.
35. Sachs RK, Brenner DJ. Effects of LET on chromosomal aberration yields. I. Do long-lived, Exchange-prone double strand breaks play a role? Int J Radiat Biol 1993;64(6):677-88.
36. Hall EJ, Phil D. Radiation dose-rate: A factor of importance in radiobiology and radiotherapy. Brit J Radiol 1972;45:81-97.
37. Guedeney G, Grunwald D, Malabert JL, Doloy T. Time dependence of chromosomal aberrations induced in human and monkey lymphocytes by acute and fractionated exposure to Co-60. Radiat Res 1988;116(2):254-62.
38. Golden TJ. Physical aspects of brachytherapy-medical physics handbooks, ISSN 1988;19:143-203.
39. Levitt SH. Levitt and Tapley's technological basis of radiation therapy: practical clinical applications. Levitt SH, Khan FM, Potish RA (Eds). Rationale for treatment planning in radiation therapy. 2<sup>th</sup> ed. London: Philadelphia; 1992. s.14-25.
40. Sax K. Chromosome behavior and nuclear development in tradescantia. Genetics 1937;22(5):523-33.
41. Başaran A. Tıbbi biyoloji ders kitabı. Güneş&Nobel Tıp Kitapevi, 2002: 183-184
42. [http://www.oncoprof.net/Generale2000/g08\\_Radiotherapie/Images/gb-cyclecellulaire.gif](http://www.oncoprof.net/Generale2000/g08_Radiotherapie/Images/gb-cyclecellulaire.gif). 05.04.2013
43. Carrano AV. Induction of chromosomal aberrations in human lymphocytes by X rays and fission neutrons: Dependence on cell cycle stage. Radiat Res 1975;63:403-21.
44. Sabuncuoğlu S, Özgüneş H. Kemoterapi, serbest radikaller ve oksidatif stres. Hacettepe Üniv Eczacılık Fak Derg 2011;31(2):137-50.
45. Koca N, Karadeniz F. Serbest radikal oluşum mekanizmaları ve vücuttaki antioksidan savunma sistemleri. Gıda Mühendisliği Derg 2003:32-7.
46. Mercan U. Toksikolojide serbest radikallerin önemi. Yüzüncü Yıl Üniv Veterinerlik Fak Derg 2004;15(1-2):91-6.
47. Çavdar C, Sifil A, Çamsarı T. Reaktif oksijen partikülleri ve antioksidan savunma. J Turk Neph 1997;3(4):92-5.

48. Elliot JG. Application of antioxidant vitamins in food and beverages. *Food Tech* 1999;53(2):46-8.
49. Çimen MBY. Flavonoidler ve antioksidan özellikleri. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 1999;19:296-04.
50. Dündar Y, Aslan R. Bir antioksidan olarak Vitamin E. *Genel Tıp Derg* 1999;9(3);109-116.
51. Memişoğlu R. Diyetle serbest radikallerin rolü ve antioksidanların etkisi. *Dicle Tıp Fak Derg* 2005;3:30-9.
52. Halliwell B. Drug antioksidant effect. *Drugs* 1991;42(4):569-05.
53. Koca N, Karadeniz F. Gıdalardaki doğal antioksidan bileşikler. *Gıda mühendisliği Derg* 2005;30(4):229-36.
54. Ou B, Huang D, Hampsch-Woodill M, Flanagan JA, Deemer EK. Analysis of antioxidant activities of vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay: A comparative study. *J Agr Food Chem* 2000;50(11):3122-8.
55. Kahraman A, Serteser M, Köken T. Flavonoidler. *The Med J Kocatepe* 2002;3:01-08.
56. Ren W, Qiao Z, Wang H, Zhu L, Zhang L. Flavonoids: Promising anticancer agents. *Med Res Rev* 2003;4(23):519-34.
57. Çapanoğlu Güven E, Toydemir Otkun G, Boyacıoğlu D. Flavonoidlerin biyoyararlılığını etkileyen faktörler. *İstanbul Teknik Üniv, Gıda* 2010;35(5):387-94.
58. 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;390:141-51
59. Hertog MGL, Feskens EJM, Hollman PCH, Kafan MB, Kromhout D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: The Zutphen elderly study. *Lancet* 1993;342:1007-11.
60. Cao G, Sofic E, Prior RL. Antioksidant and prooksidant behavior of flavonoids: Structure-activity relationships. *Free Radical Bio Med* 1997;22(5):749-60.
61. Mian KH, Mohamed S. Flavonoid (Myricetin, Quercetin, Kaempferol, Luteolin, and Apigenin) content of edible tropical plants. *J Agr Food Chem* 2001(49);3106–112.
62. Bors W, Heller W, Michel C, Saran M. Flavonoid as antioxidants: Determination of radical-scavenging efficiencies. *Method Enzymol* 1990;(186):343-55.
63. Wollenweber E. Flavones and flavonols. In Harborne JB, Mabry TJ (Eds). *In the flavonoids: Advances in research*. London: Chapman and Hall; 1982. s.189-259.

64. Tzeng TF, Liou SS, Liu IM. Myricetin ameliorates defective post-receptor insulin signaling via  $\beta$ -endorphin signaling in the skeletal muscles of fructose-fed rats. *Evid-Based Compl Alt* 2011;1-9.
65. Ong KC, Khoo HE. Biological Effects of Myricetin. *Gen Pharmac* 1997;29(2):121-6.
66. Larson RL. The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry* 1988;4:969-78.
67. Griffiths LA, Smith GE. Metabolism of myricetin and related compounds in the rat metabolite formation in vivo and by the intestinal microflora in vitro. *Biochem J* 1972;130:141-51.
68. Sun F, Zheng XY, Ye J, Wu TT, Wang J, Chen W. Potential anticancer activity of myricetin in human T24 bladder cancer cells both in vitro and in vivo. *Nutr Cancer* 2012;64(4):599-06.
69. Hayder N, Bouhleb I, Skandrani I, Kadri M, Steiman R, Guiraud P, et al. In vitro antioxidant and antigenotoxic potentials of myricetin-3-o-galactoside and myricetin-3-o-rhamnoside from *Myrtus communis*: Modulation of expression of genes involved in cell defence system using cDNA microarray. *Sci Direct Toxicol* 2008;22:567-81.
70. Duthie SJ, Dobson VL. Dietary flavonoids protect human colonocyte DNA from oxidative attack in vitro. *Eur J Nutr* 1999;38:28-34.
71. Park HH, Lee S, Son HY, Park SB, Kim MS, Choi EJ, et al. Flavonoids inhibit histamine release and expression of proinflammatory cytokines in mast cells. *Arch Pharm Res* 2008;31:1303-11.
72. Özcan F, Özmen A, Akkaya B, Alicigüzel Y, Aslan M. Beneficial effect of myricetin on renal functions in streptozotocin-induced diabetes. *Clin Exp Med* 2012;12(4):265-72
73. Zhang Q, Zhao XH, Wang ZJ. Flavones and flavonols exert cytotoxic effects on a human oesophageal adenocarcinoma cell line (OE33) by causing G2/M arrest and inducing apoptosis. *Food Chem Tox* 2008;46:2042-53.
74. Chen D, Daniel KG, Chen MS. Dietary flavonoids as proteasome inhibitors and apoptosis inducers in human leukemia cells. *Biochem Pharm* 2005;69:1421-32.
75. 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.
76. De Leo M, Braca A, Sanogo R. Antiproliferative activity of *Pteleopsis suberosa* leaf extract and its flavonoid components in human prostate carcinoma cells. *Planta Med* 2005;72(7):604-10.
77. Delgado ME, Haza AI, García A, Morales P. Myricetin, quercetin, (+)-catechin and (-)-epicatechin protect against N-nitrosamines-induced DNA damage in human hepatoma cells. *Toxicol In Vitro* 2009;23(7):1292-7.
78. Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nat Protoc* 2007;2(5):1084-104.

79. Nateuca R, Lombaert N, Aka PV, Decordier I, Kirsch-Volders M. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. *Biochimie* 2006;88(11):1515-31.
80. International Atomic Energy Agency (IAEA). The radiological accident in Goiana. IAEA, 1988.
81. International Atomic Energy Agency (IAEA). The Radiological Accident in Istanbul. Vienna, 2000.
82. Turai I, Günalp B, Lloyd D, Cosset JM. Medical aspects of the radiological accident in Istanbul. Oxford, 2000.
83. Giemsa ile boyanmış MN görüntüsü.  
[http://www.Massey.ac.nz/~imbs/images/al\\_micronucleus.jpg](http://www.Massey.ac.nz/~imbs/images/al_micronucleus.jpg). 03.02.2013
84. Knight N, Wilson JF. The early years of radiation therapy. McLennan B, Gegliardi RA (Eds). In: A history of the radiological sciences. Vol 1. Reston, VA: Radiology Centennial, 1996.
85. Hoensch H, Groh B, Edler L, Kirch W. Prospective cohort comparison of flavonoid treatment in patients with resected colorectal cancer to prevent recurrence. *World J Gastroentero* 2008;14(14):2187-93.
86. Noroozi M, AngersonWJ, Lean MEJ. Effects of flavonoids and vitamin C on oxidative DNA damage to human lymphocytes. *Am J Clin Nutr* 1998;67:1210-8.
87. O'brien NM, Woods JA, Aherne A, O'Callaghan YC. Cytotoxicity, genotoxicity and oxidative reactions in cell-culture models: modulatory effects of phytochemicals. *Biochem Soc T* 2000;28(2):22-6.
88. Rueff J, Brás A, Cristóvão L, Mexia J, Sá da Costa M, Pires V. DNA strand breaks and chromosomal aberrations induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and <sup>60</sup>Co gamma-radiation. *Mutat Res* 1993; 289(2):197-204.
89. Kim W, Yang HY, Youn H, Yun YJ, Seong KM, Youn B. Myricetin inhibits Akt survival signaling and induces Bad-mediated apoptosis in a low dose ultraviolet (UV)-B-irradiated HaCaT human immortalized keratinocytes. *J Radiat Res* 2010;51(3):285-96.
90. Chen W, Li Y, Li J, Han Q, Ye L, Li A. Myricetin affords protection against peroxynitrite-mediated DNA damage and hydroxy radical formation. *Food Chem Toxicol* 2011 49(9):2439-44.
91. Delgado ME, Haza AI, Arranz N, Garcı'a A, Morales P. Dietary polyphenols protect against N-nitrosamines and benzo(a)pyrene induced DNA damage (strand breaks and oxidized purines/pyrimidines) in HepG2 human hepatoma cells. *Eur J Nutr* 2008;47(8):479-90.
92. Abalea V, Cillard J, Dubos MP, Sergent O, Cillard P, Morel I. Repair of iron-induced DNA oxidation bythe flavonoid myricetin in primary rat hepatocyte cultures. *Free Radical Biol Med* 1999;26(11-12):1457-66.

93. Morales P, Haza AI. Selective apoptotic effects of piceatannol and myricetin in human cancer cells. *J Appl Toxicol* 2012;32(12):986-93.



## ŞEKİLLER VE TABLOLAR LİSTESİ

### ŞEKİLLER LİSTESİ

### SAYFA

Şekil 1. İyonlaştırıcı radyasyon ve iyonlaştırıcı olmayan radyasyonun dalga frekansları .....	5
Şekil 2. DNA'da direkt ve indirekt etki .....	6
Şekil 3. Radyasyon ile uyarılma sonucu oluşan DNA lezyonları .....	8
Şekil 4. DNA'da oluşan yapısal hasarlar .....	8
Şekil 5. Radyasyonun canlıdaki etki kademeleri .....	9
Şekil 6. Direkt ve indirekt etki ile DNA'da ki hasar sonucu ortaya çıkan etkiler .....	9
Şekil 7. DNA'da OH radikalinin atak yaptığı noktalar .....	11
Şekil 8. Kromozomların oluşması .....	12
Şekil 9. Kromozom tipi aberasyonlar .....	14
Şekil 10. Kromatid tipi aberasyonlar .....	14
Şekil 11. Radyasyonun LET'le değişimi .....	16
Şekil 12. Farklı LET değerlerine sahip radyasyonların doz cevap eğrileri .....	17
Şekil 13. LET ile RBE arasındaki ilişki ve overkill etkisi .....	17
Şekil 14. Absorblanan dozun hız ve zamanla değişimi .....	18
Şekil 15. Hücre siklusu .....	19
Şekil 16. Hücre siklusunun değişik fazlarındaki hücrelerin relatif sağkalım eğrileri .....	19
Şekil 17. Bazı insan hücre ve dokularının sağkalımları esas alınarak radyasyona karşı duyarlılıkları .....	20
Şekil 18. Su molekülünün iyonlaşması ve serbest radikallerin oluşumu .....	23
Şekil 19. Flavonoidlerin kimyasal yapısı .....	25
Şekil 20. Myricetin'in kimyasal yapısı .....	26

Şekil 21. Mikronukleus oluşumu.....	29
Şekil 22. Giemsa boyama yapılarak sayım yapılan BN hücreler ve MN görüntüleri .....	35
Şekil 23. Değerlendirme kriterlerine uygun BN hücreler ve MN .....	36
Şekil 24. 3 gönüllüye ait kontrol grubu sonuçlarının karşılaştırılması.....	44
Şekil 25. 2 Gy'lik radyasyon uygulaması öncesinde Myricetin uygulaması sonucu MN sıklığı karşılaştırılması .....	45
Şekil 26. 4 Gy'lik radyasyon uygulaması öncesinde Myricetin uygulaması sonucu MN sıklığı karşılaştırılması .....	46
Şekil 27. 2 Gy'de MN sıklığının azalma yüzdesi .....	47
Şekil 28. 4 Gy'de MN sıklığının azalma yüzdesi .....	47
Şekil 29. 2 Gy'lik radyasyon uygulaması sonrasında Myricetin uygulaması ile oluşan MN sıklığının karşılaştırılması .....	48
Şekil 30. 4 Gy'lik radyasyon uygulaması sonrasında Myricetin uygulaması ile oluşan MN sıklığının karşılaştırılması .....	49
Şekil 31. 2 Gy'de MN sıklığının azalma yüzdesi .....	50
Şekil 32. 4 Gy'de MN sıklığının azalma yüzdesi .....	50
Şekil 33. 2 Gy radyasyon öncesi ve sonrası Myricetin varlığında MN sıklığı .....	51
Şekil 34. 4 GY radyasyon öncesi ve sonrası Myricetin varlığındaMN sıklığı .....	52
Şekil 35. Birleştirilmiş kontrol grubu MN sıklıkları.....	53
Şekil 36. Radyasyon öncesi myricetin uygulamasının MN sıklıklarına etkisi .....	54
Şekil 37. Radyasyon öncesi myricetin uygulamasının MN sıklığına etkisi .....	55
Şekil 38. Radyasyon sonrası myricetin uygulamasının MN sıklığına etkisi .....	56
Şekil 39. Radyasyon sonrası myricetin uygulamasının MN sıklığına etkileri .....	56
Şekil 40. Radyasyon öncesi ve sonrası myricetin varlığında MN sıklıkları.....	57

## TABLolar LİSTESİ

## SAYFA

Tablo 1. Radyasyonun kullanım alanları ve kullanım amaçları .....	4
Tablo 2. Kadın genomunda, kromozom çiftlerinde bulunan yüzde DNA içeriği .....	13
Tablo 3. Radyasyon tiplerinin LET değerleri .....	16
Tablo 4. Flavonoidlerin alt sınıfları ve besinsel kaynakları) .....	25
Tablo 5. Farklı hücre gruplarında farklı hasarlayıcı yöntemler kullanılarak oluşturulan DNA hasarına karşı myricetin'in etkileri .....	28
Tablo 6. Kontrol ve radyasyon karşılaştırma grupları .....	38
Tablo 7. 1. gönüllüye ait MN dağılımları .....	39
Tablo 8. 2. gönüllüye ait MN dağılımları .....	40
Tablo 9. 3. gönüllüye ait MN dağılımları .....	41
Tablo 10. 3 gönüllünün MN sıklıklarının karşılaştırılması .....	42
Tablo 11. 3 gönüllüye ait bulgulardan elde edilen toplam MN dağılımı .....	43
Tablo 12. 3 ayrı kan örneğine ait doğal MN sıklıklarının DMSO ve myricetin ile karşılaştırılması .....	44
Tablo 13. 3 gönüllüde radyasyon öncesi myricetin uygulamasına ait MN sıklığının karşılaştırılması .....	45
Tablo 14. Myricetin uygulaması sonrası MN sıklığında azalma yüzdeleri .....	46
Tablo 15. 3 gönüllüde radyasyon sonrası myricetin uygulaması ile oluşan MN sıklıklarının karşılaştırılması .....	48
Tablo 16. Myricetin uygulaması sonrası MN sıklığında azalma yüzdeleri .....	49
Tablo 17. Her 3 kan örneğinde 2 Gy İçin Myricetin'in MN sıklığını Azaltma Katsayıları .....	51
Tablo 18. Her 3 kan örneğinde 4 Gy İçin Myricetin'in MN sıklığını azaltma katsayıları .....	52
Tablo 19. 3 gönüllünün radyasyon öncesi ve radyasyon sonrasına ait MN sıklıklarının istatitiksel karşılaştırılması .....	53
Tablo 20. Birleştirmiş kontrol grubu MN sıklıkları .....	53
Tablo 21. Radyasyon öncesi myricetin uygulamasının MN sıklıklarına etkisi .....	54
Tablo 22. Radyasyon sonrası myricetin uygulamasının MN sıklıklarına etkisi .....	55
Tablo 23. Radyasyon öncesi ve sonrası uygulanan farklı konsantrasyonlardaki myricetin'in MN sıklıklarına etkisi .....	57
Tablo 24. Radyasyon öncesi veya sonrası Myricetin uygulanmasının absorblanan doza etkileri .....	58
Tablo 25. Farklı konsantrasyonlardaki Myricetin'in DNA hasarını azaltma oranları .....	63

Tablo 26. 2 Gy ve 4 Gy radyasyon dozları için mikronukleuslu BN sayıları .....	66
Tablo 27. 2 Gy ve 4 Gy'de mikronukleuslu BN sayılarındaki % azalma miktarları .....	67

## **ÖZGEÇMİŞ**

1987 yılında Kırklareli ilinin Lüleburgaz ilçesinde doğdum. 2004 yılında Lüleburgaz Lisesin'den mezun oldum. 2004 yılının eylül ayında Pamukkale Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünü kazandım. 2004-2009 yılları arasında Lisans eğitimimi tamamladım. 2010 Eylül ayında Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimime başladım.

## **EKLER**

EK-1

## BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Bu form, yürütülmesi Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırmalar Değerlendirme Komisyonu'nun 08.06.2011 tarih ve 12/10 sayılı kararı ile onaylanan bilimsel bir araştırma konusunda sizi bilgilendirmek ve gönüllü katılımınızı sağlamak amacıyla düzenlenmiştir.

Araştırmaya katılmaya karar vermeden önce araştırmanın neden ve nasıl yapılacağını anlamanız çok önemlidir.

Araştırmaya katılmaya gönüllü olduğunuzda, sağlığınızın ve gönüllü olarak haklarınızın korunması ile gizliliğin sağlanması araştırmacıların ödevidir.

Araştırma, yalnızca uygun bilimsel eğitim ve niteliklere sahip araştırmacılar tarafından yürütülecektir.

Araştırmaya katılım tamamen gönüllülük ilkesine bağlı olup katılmayı reddetmeniz herhangi bir cezaya ya da elde edilecek herhangi bir yararın kaybedilmesine kesinlikle yol açmayacaktır.

Aynı şekilde araştırmaya katılmayı kabul ettikten sonra da araştırmanın herhangi bir yerinde hiçbir neden göstermeksizin herhangi bir zarar ya da elde edilmesi beklenen bir yarar kaybına yol açmadan araştırmadan çekilebilirsiniz.

Araştırma kapsamında yapılan işlemlerin mali giderleri araştırmacılar ya da destekleyici (TÜBAP) tarafından karşılanacak olup size ya da sosyal güvenlik kurumunuza hiçbir mali yük getirmeyecektir.

Aşağıdaki bilgileri dikkatlice okuyun ve araştırmaya katılmak isteyip istemediğinize karar vermek için lütfen biraz düşünün.

Açık olmayan bir bölüm varsa, daha ayrıntılı bilgiye ihtiyaç duyuyorsanız ya da araştırma başladıktan sonra sorularınız olursa istediğiniz zaman bize başvurabilirsiniz.

Katılacağınız araştırma ile ilgili bilgiler aşağıdadır:

**1. Araştırmanın bilimsel adı:** Myricetin'in Radyoprotektif Etkisinin Mikronükleus (MN) Yöntemiyle İn Vitro Şartlarda İncelenmesi

**2. Araştırmanın anlaşılabilir basit adı:** Işın tedavisi uygulamasında kanserli hücrelerin tedavi edilirken normal hücrelerin korunması için koruyucu bir madde eklenmesi sonucunda hücrelerin korunup korunmadığını incelemek

**3. Sorumlu Araştırmacının adı, unvanı ve görev yeri:**

Funda Sibel PALA, Yrd. Doç. Dr. Trakya Üniversitesi ,Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

**4. Araştırmanın konusu ve niteliği (ilaç, klinik, laboratuvar, epidemiyolojik - tez çalışması vb....):** Laboratuvar (deneysel) çalışması

**5. Araştırmanın amacı:** Işın tedavisi ile oluşacak zararlı maddeleri etkisiz hale getirmesi beklenen koruyucu bir etkenin farklı miktarlarının farklı ışın tedavi dozlarındaki olası koruma etkisi araştırılacaktır. Diğer bir amacı, koruyucu maddenin ışınlama anında veya hemen sonrasında ortamda olmasının olası koruyucu etkisini değiştirip değiştirmediğini incelemektir.

**6. Araştırmanın başlama tarihi ve öngörülen süresi:** Eylül-2011, 1 (Bir) yıl

**7. Araştırmaya katılan gönüllü sayısı:** 3

**8. Katılımcının araştırmaya dahil edilme nedeni:** Radyasyona ve toksik maddeye maruz kalmamış, sigara ve alkol kullanmayan aynı yaş grubu içerisinde bulunan ( 25-35 yaş arası) erkek sağlıklı birey olması

**9. Araştırmada uygulanacak yöntemler:** Kullanılan maddenin uygulanan ışın sonucunda hasarı önleyip önlemediğini incelemek için sizden alınacak 20ml'lik kana laboratuvar ortamında bir takım yöntemler uygulanacaktır.

**10. Uygulama sırasında karşılaşılabileceğiniz riskler, rahatsızlıklar ve olası yan etkiler:** Bu araştırmada gönüllüden periferik kan alınırken iğnenin batmasına bağlı olarak hafif bir acı duyulabilir. Çok düşük bir olasılıkla kan alınırken kanamanın durmasının uzun sürmesi ya da cilt altında kanama riski olabilir. Ancak bunların gönüllüye herhangi bir etkisi yoktur.

**11. Gönüllü için araştırmadan beklenen yarar:** Gönüllü için araştırmadan herhangi bir yarar beklenmemektedir.

**12. Araştırma yöntemine alternatif olan tedavi ve girişimler: -**

**13. Araştırmanın yürütülmesi sırasında olası yan etkiler, riskler ve zararlar ile araştırmaya katılan bir gönüllü olarak diğer hakları konusunda bilgi almak için bağlantı kurulacak kişinin adı-soyadı, ünvanı, görev yeri ve telefon numarası:** Araştırma hakkında ek bilgiler almak için ya da çalışma ile ilgili herhangi bir sorun, istenmeyen bir etki



ya da diğer rahatsızlıklarınız için Trakya Üniversitesi Tıp Fakóltesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, 0284 235 76 41(1449) – 0544 343 45 16 Bio. Damla EKER'e başvurabilirsiniz.

**14. Araştırma bütçesi kimin tarafından karşılanıyor? Üniversite**

**15. (Varsa) Sigortalamaya ilişkin bilgiler:** Herhangi bir sigortalama yapılmamaktadır.

**16. Kimlik bilgilerinin ve elde edilen verilerin gizliliği nasıl sağlanacak?** Tüm tıbbi ve kimlik bilgiler için kullanılan bilgisayarlara 2 tane güvenlik şifresi konulacak ve tüm veriler gizli tutulacaktır. Araştırma yayınlansa bile kimlik bilgileri verilmeyecektir, ancak araştırmanın izleyicileri, yoklama yapanlar, etik kurullar ve resmi makamlar gerektiğinde bu tıbbi bilgilere ulaşabilecek ve gönüllüler istediğinde kendisine ait tıbbi bilgileri öğrenebilecektir.

Araştırmamıza katıldığınız için teşekkür ederiz.

## GÖNÜLLÜNÜN ÇALIŞMAYA KATILMA OLURU

Yukarıda açıkça tanımlanan çalışmanın ne amaçla, kimler tarafından ve nasıl gerçekleştirileceği anlayabileceğim bir ifade ile bana anlatıldı.

Bu araştırmadan elde edilen bilgilerin bana ve başka insanlara sağlayacağı yararlar bana anlatıldı.

Araştırma sırasında meydana gelebilecek riskler ve rahatsızlıklar bana anlayabileceğim bir dille anlatıldı.

Araştırma sırasında oluşabilecek zarar durumunda gerçekleştirilecek işlemler bana anlatıldı.

Araştırmanın yürütülmesi sırasında olası yan etkiler, riskler ve zararlar ve haklarım konusunda 24 saat bilgi alabileceğim bir yetkilinin adı ve telefonu bana verildi.

Araştırma kapsamındaki bütün muayene, tetkik ve testler ile tıbbi bakım hizmetleri için benden ya da bağlı bulunduğum sosyal güvenlik kuruluşundan hiçbir ücret istenmeyeceği bana anlatıldı.

Araştırmaya hiçbir baskı ve zorlama altında olmaksızın gönüllü olarak katılıyorum.

Araştırmaya katılmayı reddetme hakkına sahip olduğum bana bildirildi.

Sorumlu araştırmacı / hekime haber vermek kaydıyla, hiçbir gerekçe göstermeksizin istediğim anda bu çalışmadan çekilebileceğimin bilincindeyim.

Bu çalışmaya katılmayı reddetmem ya da sonradan çekilmem halinde hiçbir sorumluluk altına girmediğimi ve bu durumun şimdi ya da gelecekte gereksinim duyduğum tıbbi bakımı hiçbir biçimde etkilemeyeceğini biliyorum.

Çalışmanın yürütücüsü olan araştırmacı / hekim ya da destekleyen kuruluş, çalışma programının gereklerini yerine getirmedeki ihmalim nedeniyle, benim onayımı almadan beni çalışma kapsamından çıkarabilir.

Çalışmanın sonuçları bilimsel toplantılar ya da yayınlarda sunulabilir. Ancak, bu tür durumlarda kimliğim kesin olarak gizli tutulacaktır.

Yukarıda yer alan ve araştırmadan önce gönüllüye verilmesi gereken bilgileri gösteren Gönüllü Bilgilendirme Formu adlı metni kendi anadilimde okudum.

Bu bilgilerin içeriği ve anlamı, yazılı ve sözlü olarak açıklandı.

Aklıma gelen bütün soruları sorma olanağı tanındı ve sorularıma doyurucu cevaplar aldım.

Bu koşullarla, söz konusu araştırmaya hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın gönüllü olarak katılmayı kabul ediyorum.

Bu formun tamamının imzalı bir kopyası bana verildi.

**Gönüllünün; (bu bölüm gönüllünün kendi el yazısı ile doldurulacaktır)**

Adı- Soyadı:

İmzası:

Adresi (varsa telefon ve/veya fax numarası):

.....

.....

Tarih:

**Velayet ya da vesayet altında bulunanlar için; (bu bölüm veli/vasinin kendi el yazısı ile doldurulacaktır)**

Veli ya da Vasinin Adı- Soyadı:

İmzası:

Adresi (varsa telefon ve/veya fax numarası):

.....

.....

Tarih:

**Gerekli durumlar için; (bu bölüm görüşme tanığının kendi el yazısı ile doldurulacaktır)**

Görüşme Tanığının Adı- Soyadı:

İmzası:

Adresi (varsa telefon ve/veya fax numarası):

.....

.....

Tarih:

**Açıklamaları Yapan Araştırmacının (bu bölüm araştırmacının kendi el yazısı ile doldurulacaktır)**

Adı- Soyadı, Ünvanı:

İmzası:

Tarih:

T.C. TRAKYA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI  
BİLİMSEL ARAŞTIRMA DEĞERLENDİRME KOMİSYONU Edirne, Türkiye

ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYBAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL KODU	TUBADK 2011/124				
	PROTOKOL ADI	Myricetin'in Radyoprotektif Etkisinin Mikronükleus (MN) Yöntemiyle İn Vitro Şartlarda İncelenmesi				
	SORUMLU ARAŞTIRICI ÜNVANI / ADI	Yrd. Doç. Dr. Funda Sibel PALA				
	ARAŞTIRMA MERKEZİ					
	DESTEKLEYİCİ					
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	<input checked="" type="checkbox"/> Tek Merkez <input type="checkbox"/> Ulusal	<input type="checkbox"/> Çok Merkez <input type="checkbox"/> Uluslararası				
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 12/ 10	Tarih:08.06.2011				
	Üniversitemiz Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında Görevli Yrd. Doç. Dr. Funda Sibel PALA'nın sorumluluğunda yapılması planlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen Yüksek Lisans Öğrencisi Damla EKER'in tez çalışmasının araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, araştırmaya ilişkin giderlerin T.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri (TÜBAP) tarafından karşılanması koşuluyla gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel standartlar açısından sakınca bulunmadığına mevcudun obyektifliği ile karar verilmiştir.					
DEĞERLENDİRME KOMİSYONU BİLGİLERİ						
ÇALIŞMA ESASI	Helsinki Bildirgesi, İyi Klinik Uygulamalar Kılavuzu, TÜBADK Yönergesi					
ÜYELER						
Ünvan/Ad/ Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki(*)	Katılım (**)	İmza
Prof. Dr. Ç. Hakan KARADAĞ Başkan	Tıbbi Farmakoloji	T.Ü.T.F. Farmakoloji A.D.	E	<input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Hasan ÜMİT Başkan Yardımcısı	İç Hastalıklar	T.Ü.T.F. İç Hastalıklar A.D.	E	<input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	İzinli
Doç. Dr. Ülfet VATANSEVER ÖZBEK Üye	Çocuk Sağ. ve Hast.	T.Ü.T.F. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları A.D.	K	<input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. F. Nesrin TURAN Üye	Biyostatistik	T.Ü.T.F. Biyostatistik A.D.	K	<input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Hilmi TOZKIR Üye	Tıbbi Biyoloji	T.Ü.T.F. Tıbbi Biyoloji A.D.	E	<input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Esin KARLIKAYA Üye	Tıp Tarihi ve Etik	T.Ü.T.F. Tıp Tarihi ve Etik A.D.	K	<input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Tunç KUTOĞLU Üye	Anatomi	T.Ü.T.F. Anatomi A.D.	E	<input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Erhan TABAKOĞLU Üye	Göğüs Hastalıklar	T.Ü.T.F. Göğüs Hastalıkları A.D.	E	<input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Figen KULOĞLU Üye	Enfeksiyon Hastalıklar	T.Ü.T.F. Enfeksiyon Hastalıkları A.D.	K	<input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	İzinli
Doç. Dr. Ömer Nuri PAMUK Üye	İç Hastalıklar	T.Ü.T.F. İç Hastalıkları A.D.	E	<input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Yener YÖRÜK Üye	Göğüs Cerrahisi	T.Ü.T.F. Göğüs Cerrahisi A.D.	E	<input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	İzinli
Doç. Dr. Recep YAĞIZ Üye	Kulak, Burun ve Boğaz Hastalıklar	T.Ü.T.F. K.B.B. Hast. A.D.	E	<input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Ümit Nusret BAŞARAN Üye	Çocuk Cerrahisi	T.Ü.T.F. Çocuk Cerrahisi A.D.	E	<input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Atakan SEZER Üye	Genel Cerrahi	T.Ü.T.F. Genel Cerrahi A.D.	E	<input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Avukat Gülden ATILLA ÖZTÜRK Üye		T.Ü. Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Müdürlüğü	K	<input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	

\*Araştırma ile ilişki  
\*\*Toplantıda Bulunma

Prof. Dr. Murat DİKMENGİL  
Dekan

### Ek-3

#### **Kültür İçin Kullanılan Malzemeler**

Flask (Cellstar)  
0,22 µm steril mini filtre  
Falkon tüpü (15 ml)  
Steril enjektörler (5 cc, 10cc'lik)  
Pastör pipeti

#### **Kültür İçin Kullanılan Kimyasal Malzemeler**

RPME-1640 Medyum (Sigma- Kat No:R8758)  
Fetal Calf Serum (Sigma- Kat No:F2442)  
Penisillin/Streptomisin (Sigma-Kat No:P4333)  
Heparin (Panpharma)  
Fitohemaglutinin (PHA) (stok 1mg/ml) (Sigma- Kat No:M-5030)  
Cytochalasin-B (DMSO içinde) (Stok 0.1 mg/ml) (Sigma- Kat No: C6762- 1MG)  
Etil Alkol (%96'lık Tekel)  
KCL (Riedel-de Haën Sigma-kat no: 7447-40-7)

#### **Kültür İçin Kullanılan Solüsyonlar**

##### **1. PHA (Fitohemaglutinin) Hazırlanması**

Steril Kabin içerisinde Toz haldeki 1 mg/ml PHA içerisine 5 ml steril distile su eklenir. İyice karıştırılır ve homojen bir solüsyon hazırlanır.

##### **2. Hücre Kültür Medyumu**

L-Glutaminli RPME-1640 medyuma %10 Fetal Calf Serum ve %1 Penisillin/Streptomisin ilave edilerek flasklara 9 ml olacak şekilde dağıtılır. Her bir flask içine kültür ekimi yapılırken 0.5 ml (1mg/ml) PHA eklenir.

##### **3. Sitokalazin-B Çözeltisi**

1 mg Sitokalazin-B stoğu (Final konsantrasyonu yaklaşık 6 µg/ml).  
0,85 gr Sodyum klorür (NaCl) 100 ml distile su içinde çözülür ve 0.2 mikronluk filtreden geçirilir. Filtrelenmiş NaCl çözeltisinde 9 ml alınarak 1 ml Dimetil Sülfoksit (DMSO) eklenir

ve 10 ml'lik stok hazırlanır. Bu stoktan 0.7 ml alınır ve 1mg Liyofilize sitokalazin-B üzerine eklenir. Partiküller çözülene kadar iyice karıştırılır. Son olarak bu çözeltinin üzerine 5 ml steril distile su eklenir ve tüplere bölünerek -20°C'de saklanır.

#### **4. 0,075 M KCL Çözeltisi**

0.5590 gr KCL (Potasyum Klorür) tartılır ve üzerine 100 ml distile su eklenerek çözdürülür. Üzerine 1 damla heparin damlatılarak +4°C'de saklanır.

#### **5. Fiksatif Çözeltisi**

Metanol/asetik asit (3:1) oranında karıştırılır. Çalışma esnasında, taze hazırlanır.

#### **6. %1 Formaldehitli Fiksatif Hazırlama**

1 ölçü hazırlanan fiksatiften 10 ml alınır ve başka bir falkona aktarılır. 10 ml'lik falkon içinden 100 µl'lik pipet ile alınır ve atılır. Kalan fiksatif içine 100 µl'lik %1'lik Formaldehit eklenir.

### **Boyama İçin Kullanılan Kimyasallar**

#### **1. Sorenson Buffer Hazırlama**

4.97 gr/lit Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> tartılır ve üzeri 500 ml'ye tamamlanır ve çözdürülür.

4,76 gr/lit KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> tartılır ve üzeri 500 ml'ye tamamlanır ve çözdürülür.

#### **2. Giemsa Boyası Hazırlanması**

Hazırlanan Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ten 45 µl ve KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ten 45 µl ölçülür ve üzerine 10 µl Giemsa boyası eklenerek karıştırılır. Karışım filtre kağıdından süzdürülerek üzerindeki yağ alınır.





Ek-5



T.C.  
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ  
İdari ve Mali İşler Daire Başkanlığı

SAYI : B.30.2.TRK.0.73.00.00/ 4241 -14307  
KONU :

EDİRNE  
26 TEM 2011

Sayın Yrd. Doç. Dr. Funda Sibel PALA  
Trakya Üniversitesi  
Tıp Fakültesi  
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı  
EDİRNE

Yöneticiliğini yapmış olduğunuz Bio. Damla EKER'in "Myricetin'in Radyoprotektif Etkisinin Mikronükleus (MN) Yöntemiyle İn Vitro Şartlarda İncelenmesi" başlıklı yüksek lisans projesinin, 12 (on iki) ay süre ve 6.858,00 TL ile desteklenmesine, Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu'nun 12.07.2011 tarih ve 2011/05 sayılı toplantısında mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilimsel Araştırma Projeleri Yönergesi'nin 12. maddesi uyarınca düzenlenen ve ekte sunulan Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Sözleşmesi'nin tarafınızca imzalanarak 1 (bir) hafta içinde Rektörlüğe iletilmesi hususunda bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

Prof. Dr. Beyhan KARAMANLIOĞLU  
Rektör Yardımcısı ve  
Komisyon Başkanı

EK: 1 adet protokol sözleşmesi