

T.C
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**İYONİZE RADYASYON VE GÜÇLÜ MANYETİK
ALAN ETKİSİ ALTINDA BIRAKILAN RAT KEMİK
İLİĞİ STEM HÜCRELERİNDE MİKROÇEKİRDEK
SIKLIĞI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

EYLEM GÜL

DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ

DOÇ.DR.ÖZTÜRK ÖZDEMİR

2005

SİVAS

**T.C
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**İYONİZE RADYASYON VE GÜÇLÜ MANYETİK
ALAN ETKİSİ ALTINDA BIRAKILAN RAT KEMİK
İLİĞİ STEM HÜCRELERİNDE MİKROÇEKİRDEK
SIKLIĞI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

EYLEM GÜL

DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ

DOÇ.DR.ÖZTÜRK ÖZDEMİR

2005

SİVAS

T.C
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**İYONİZE RADYASYON VE GÜÇLÜ MANYETİK
ALAN ETKİSİ ALTINDA BIRAKILAN RAT KEMİK
İLİĞİ STEM HÜCRELERİNDE MİKROÇEKİRDEK
SIKLIĞI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

EYLEM GÜL

DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ

DOÇ.DR.ÖZTÜRK ÖZDEMİR

2005

SİVAS

Bu tez, Cumhuriyet Üniversitesi Senatosunun 05.01.1984 tarihli toplantısında kabul edilen tez yazma yönergesine göre hazırlanmıştır.

Sevgili babama ...

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamda gerek konu seçimimde gerekse tüm çalışma boyunca desteğini ve yardımını esirgemeyen kişiliğini ve bilimselliğini örnek aldığım danışman hocam DoçDr.Öztürk ÖZDEMİR'e, yetişmemde emeğini ve bilgisini esirgemeyen değerli hocalarım Prof.Dr.Ahmet ÇOLAK, Prof.Dr.İlhan SEZGİN, Doç.Dr.Ergün PINARBAŞI ve Yrd.Doç.Dr.İzzet YELKOVAN'a ;

Tez çalışmam esnasında yarımalarını esirgemeyen Yrd.Doç.Dr.Hulusi EĞİLMEZ'e, istatistiksel verilerimi değerlendirmemde yardımcı olan Yrd.Doç.Dr.Hafize SEZER'e, tez çalışmam esnasında hep yanımda olan Yrd.Doç.Dr.Fikriye POLAT'a ve manevi desteğini eksik etmeyen tüm arkadaşlarıma;

Varolma sebebim, maneviyatını hep yanımda hissettiğim babama, anneme, kardeşime ve hayatıma farklı bir yön vermeme sağlayan en büyük destekçim dayıma tüm kalbimle teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
1.GİRİŞ ve AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	5
2.1. Radyasyon ve Radyoaktivite	5
2.2. Radyasyonun Yaşamımızda Yeri	7
2.2.1. Tıbbi Uygulamalar	7
2.2.1.1. MR	10
2.2.1.2. X-ray	10
2.3. Radyasyonun Biyolojik Etkileri	13
2.3.1. Radyasyonun DNA Üzerine Etkileri	15
2.3.2. Radyasyonun Kromozomlar Üzerine Etkileri	16
2.4. Biyolojik Etkenlerin Sınıflandırılması	17
2.5. Biyolojik Doz Tayininde Radyasyon Sitogenetiği	18
2.5.1. Disentrik Aberasyonlar ve Analiz Yöntemi	18
2.5.2. FISH Analiz Yöntemi	19
2.5.3. Mikronükleus Analiz Yöntemi	20
2.6. Mikronükleus Testinin Kullanım Alanları	22
2.7. Biyolojik Doz Birimi	22
3.MATERYAL ve YÖNTEM	24
3.1. Deney Hayvanı	24
3.2. Kullanılan Maddeler ve Aletler	24
3.3. Deney Grupları ve Dozlar	24
3.4. Deney Analizi	25
3.5. Preparatların Boyanması	26
3.6. Preparatların Değerlendirilmesi	26
4.BULGULAR	27
5.TARTIŞMA ve SONUÇ	52
6.ÖZET	62
7.SUMMARY	64

ŞEKİLLER

- Şekil 1.** Kontrol grubu, X-ray, MR ve X-ray+MR uygulaması yapılan gruplara ait rat kemik iliği kök hücrelerinde saptanan normal ve anormal nükleer yapıdaki Mikronükleus (MN), Anafaz köprüsü (AB), Çift nükleuslu hücre (BN), Nükleer tomurcuk (NB) hücre dağılımları.....29
- Şekil 2.** Kontrol grubuna ait rat kemik iliği kök hücrelerinde saptanan normal ve anormal nükleer yapıdaki Anafaz köprüsü (AB), Mikronükleus (MN), Nükleer tomurcuk(NB), Çiftnükleuslu hücre(BN) hücre dağılımları.....32
- Şekil 3.** X-ray ve MR'a maruz bırakılmayan kontrol grubu normal sağlıklı rat kemik iliği stem hücre profilleri. Normal mitotik indeks ve nükleer materyale sahip çeşitli hücre grupları → ile gösterilmiştir. a-d-e-f:Lenfosit, b:Eosinofil, c:Nötrofil.....33
- Şekil 4.** X-ray ve MR'a maruz bırakılmayan kontrol grubu normal sağlıklı rat kemik iliği stem hücre profilleri. Normal mitotik indeks ve nükleer materyale sahip çeşitli hücre grupları → ile gösterilmiştir. g:Retikülosit, h:Retikülosit, Lenfosit ve Nötrofil, ı:Lenfosit ve Bazofil hücreleri gösterilmektedir.....34
- Şekil 5.** X-Ray grubuna ait rat kemik iliği kök hücrelerinde saptanan normal ve anormal nükleer yapıdaki Anafaz köprüsü (AB), Mikronükleus (MN), Nükleer tomurcuk (NB), Çiftnükleuslu hücre (BN) hücre dağılımları.....35
- Şekil 6.** X-ray uygulamasına maruz bırakılan deney grubu rat kemik iliği stem hücre profilleri. Normal mitotik indeks ve nükleer materyale sahip hücrelerle birlikte gözlenen MN'a sahip hücre grupları → ile gösterilmiştir. a-f:1/3-1/16 oranlarına sahip mikronükleusları.....36
- Şekil 7.** X-ray uygulamasına maruz bırakılan deney grubu rat kemik iliği stem hücre profilleri. Normal mitotik indeks ve nükleer materyale sahip hücrelerle birlikte gözlenen MN'a sahip hücre grupları → ile gösterilmiştir. g, h, j, k, l:1/3-1/16 oranlarına sahip mikronükleuslar. ı:Ana çekirdeğe bitişik durumda bulunan mikronükleus (CC MN).....37

Şekil 8. X-ray uygulamasına maruz bırakılan deney grubu rat kemik iliği stem hücre profilleri. Normal mitotik indeks ve nükleer materyale sahip hücrelerle birlikte gözlenen MN'a sahip hücre grupları → ile gösterilmiştir. m:Çok nükleuslu hücre (MULT) ve 1/3 oranında MN. n, o:Ana çekirdeğe bitişik olmayan mikronükleuslar(NCC MN), p:1/3 oranında ana çekirdeğe bitişik olmayan mikronükleus. r:Sağlıklı retikülosit ve MN. s:Ana çekirdeğe bitişik olmayan mikronükleus (NCC MN).....38

Şekil 9. X-ray uygulamasına maruz bırakılan deney grubu rat kemik iliği stem hücre profilleri. Normal mitotik indeks ve nükleer materyale sahip hücrelerle birlikte gözlenen MN'a sahip hücre grupları → ile gösterilmiştir. ş-v:Ana çekirdeğe bitişik olmayan mikronükleuslar (NCC MN).
y , z :Ana çekirdeğe bitişik durumda çok nükleuslu mikronükleus (CC MULT MN).....39

Şekil 10. X-ray uygulamasına maruz bırakılan deney grubu rat kemik iliği stem hücre profilleri. Normal mitotik indeks ve nükleer materyale sahip hücrelerle birlikte gözlenen NB(nükleer tomurcuk) ve BN(çift nükleuslu hücre)' ye sahip hücre grupları → ile gösterilmiştir.a-c:Nükleer tomurcuk (NB), d:Çift nükleuslu hücre (BN).....40

Şekil 11. X-ray uygulamasına maruz bırakılan deney grubu rat kemik iliği stem hücre profilleri. Normal mitotik indeks ve nükleer materyale sahip hücrelerle birlikte gözlenen AB(anafaz köprüsü)'ne sahip hücre grupları → ile gösterilmiştir.a-d:Anafaz köprüsü(AB), e:Anafaz köprüsü(AB), sağlıklı bir lenfosit.....41

Şekil 12. MR grubuna ait rat kemik iliği kök hücrelerinde saptanan normal ve anormal nükleer yapıdaki Anafaz köprüsü(AB), Mikronükleus(MN), Nükleer tomurcuk(NB), Çiftnükleuslu hücre(BN) hücre dağılımları.....42

Şekil 13. MR uygulamasına maruz bırakılan deney grubu rat kemik iliği stem hücre profilleri. Normal mitotik indeks ve nükleer materyale sahip hücrelerle birlikte gözlenen MN'a sahip hücre grupları → ile gösterilmiştir. a-b-e-f:Ana

çekirdeğe bitişik durumda olmayan mikronükleuslar (NCC MN), c-d:Ana çekirdeğe bitişik durumda bulunan mikronükleuslar(CC MN).....43

Şekil 14. MR uygulamasına maruz bırakılan deney grubu rat kemik iliği stem hücre profilleri. Normal mitotik indeks ve nükleer materyale sahip hücrelerle birlikte gözlenen MN'a sahip hücre grupları → ile gösterilmiştir. h-j:Ana çekirdeğe bitişik durumda olmayan mikronükleuslar (NCC MN), g-ı-k-l:Ana çekirdeğe bitişik durumda bulunan mikronükleuslar(CC MN).....44

Şekil 15. MR uygulamasına maruz bırakılan deney grubu rat kemik iliği stem hücre profilleri. Normal mitotik indeks ve nükleer materyale sahip hücrelerle birlikte gözlenen MN'a sahip hücre grupları → ile gösterilmiştir. n-o-p:Ana çekirdeğe bitişik durumda olmayan mikronükleuslar (NCC MN). m-r:Ana çekirdeğe bitişik durumda bulunan mikronükleuslar(CC MN).....45

Şekil 16. MR uygulamasına maruz bırakılan deney grubu rat kemik iliği stem hücre profilleri. Normal mitotik indeks ve nükleer materyale sahip hücrelerle birlikte gözlenen NB(nükleer tomurcuk), BN(çift nükleuslu hücre) ve AB(anafaz köprüsü)'ye sahip hücre grupları → ile gösterilmiştir. a:Nükleer tomurcuk(NB), b:Çok nükleuslu hücre(MULT), c:Çift nükleuslu hücre(BN), d-e-f:Anafaz köprüsü(AB).....46

Şekil 17. X-Ray+MR grubuna ait rat kemik iliği kök hücrelerinde saptanan normal ve anormal nükleer yapıdaki Anafaz köprüsü (AB), Mikronükleus (MN), Nükleer tomurcuk (NB), Çiftnükleuslu hücre (BN) hücre dağılımları.....47

Şekil 18. X-ray ve MR uygulamasına maruz bırakılan deney grubu rat kemik iliği stem hücre profilleri. Normal mitotik indeks ve nükleer materyale sahip hücrelerle birlikte gözlenen MN sahip hücre grupları → ile gösterilmiştir.

a-b-c-d :Ana çekirdeğe bitişik durumda olmayan mikronükleuslar(NCC MN), e-f:Ana çekirdeğe bitişik durumda olan mikronükleuslar(CC MN).....48

Şekil 19. X-ray ve MR uygulamasına maruz bırakılan deney grubu rat kemik iliği stem hücre profilleri. Normal mitotik indeks ve nükleer materyale sahip hücrelerle birlikte gözlenen MN sahip hücre grupları → ile gösterilmiştir. ı-j-

l:Ana çekirdeğe bitişik durumda olmayan mikronükleuslar(NCC MN), g-h-
k:Ana çekirdeğe bitişik durumda olan mikronükleuslar(CC MN).....49

Şekil 20. X-ray veMR uygulamasına maruz bırakılan deney grubu rat kemik iliği stem hücre profilleri. Normal mitotik indeks ve nüklear materyale sahip hücrelerle birlikte gözlenen NB(nüklear tomurcuk), BN(çift nükleuslu hücre) ve AB(anafaz köprüsü)'ye sahip hücre grupları → ile gösterilmiştir. a-b:Anafaz köprüsü(AB), c-d:Çift nükleuslu hücre(BN),e-f-g-h:Nüklear tomurcuk(NB).....50

Şekil 21. X-ray veMR uygulamasına maruz bırakılan deney grubu rat kemik iliği stem hücre profilleri. Normal mitotik indeks ve nüklear materyale sahip hücrelerle birlikte gözlenen nekrotik ve apoptotik yapılar → ile gösterilmiştir. a-b:Nekrotik hücre, c:İki nekrotik hücre arasında meydana gelmiş olan anafaz köprüsü, d-e-f:Apoptotik hücre.....51

TABLolar

Tablo1. Yapay radyasyon kaynaklarından alınan yıllık ortalama doz miktarları.....7

Tablo2. Bazı radyolojik tetkikler sonucu, ülke seviyelerine ve yapılan tetkiklere göre, hastaların maruz kaldıkları etkin dozlar.....9

Tablo3. Rat retikülosit hücreleri üzerinde tıbbi radyasyonun *in vivo* radyotoksitesisi. Tablo bu çalışmada yer alan toplam retikülosit hücrelerden normal ve anormal yapıda tespit edilenler göstermektedir.....28

Tablo4. Tabloda kontrol ve deney grubu hayvanlarının *in vivo* olarak tıbbi radyasyona maruz kalmasıyla tespit edilen farklı genomik istabiliteye sahip hücre tipleri ve sayıları gösterilmektedir.....31

1.GİRİŞ ve AMAÇ

Teknolojinin baş döndürücü bir hıza ulaştığı günümüzde bütün biyolojik sistemlerin giderek artan doz ve çeşitlilikte radyoaktif maddelerle etkileşimleri kaçınılmaz bir hal almıştır. Günümüzde radyasyon enerjisi, enerji üretiminden endüstriye, askeri amaçlı kullanımlardan tıpta tanı ve tedaviye, bilimsel çalışmalardan tarımsal araştırmalara kadar hemen her alanda yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunun sonucu olarak doğal ve yapay radyasyonla karşı karşıya kalmaktayız(1). Doğal radyasyon insan katkısı olmaksızın dış ve iç kaynaklardan meydana gelen radyasyondur. Dış kaynaklar, uzaydan yeryüzüne gelen kozmik ışınlar ve gama radyasyonudur. Dış kaynaklı olan ve sıklıkla karşılaşılan radyasyon, yeryüzündeki kayalar ve toprağın yapısında bulunan radyoaktif elementlerin yaydığı radyasyonlardır. İç kaynaklı radyasyon ise; su, yemek ve hava yolu ile alınan çekirdekten gelir ve canlıların vücudunda doğal olarak bulunan K^{40} , Ca^{14} , Ra^{226} gibi radyoaktif izotopların yaydığı radyasyondur. Dünyanın neresinde yaşarsa yaşasın insanlar kaçınılmaz olarak doğrudan ya da dolaylı, az ya da çok bu tip radyasyona maruz kalırlar.

Yapay radyasyon insan aktiviteleri sonucu oluşan ve çevreye eklenecek radyoaktif maddeler sebebiyle oluşur. Son yıllarda yapılan silah testleri ve nükleer güç tesislerinin aktiviteleri doğal radyasyon düzeylerinin artışına neden olmuştur. Doğal kaynaklı çevre radyasyonu herkesi etkilediği halde yapay radyasyonlar belli zamanlarda ve sadece radyasyona doğrudan maruz kalan kişileri etkiler. Yapay radyasyon günümüzde başta tarım ve endüstri olmak üzere tıp, sterilizasyon ve gıda koruması gibi pek çok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır.

Tıp alanında hastalıkların tanı ve tedavisinde radyoaktif ışınların (X-ışınları) ve maddelerin kullanımı çok yaygındır. Bazı radyoaktif maddeler vücuda verilerek dokular kolaylıkla incelenebilmektedir. Radyasyon tedavi amacı ile de kullanılır. Radyasyonun kanser yapıcı etkisine karşın kanserli tümörlerin yoğun olarak ışınlanmasıyla tümöral hücrelerin fonksiyonlarını

kaybetmeleri ve kanseri tedavi amacı ile kullanılması en iyi bilinen yöntemlerdendir. Yüksek enerjili X-ışınları veya Co^{60} kaynağının yaydığı γ -ışınları tümörün dışardan tedavi edilmesi amacı ile kullanılmaktadır. Nötron demeti veya diğer iyonlaştırıcı radyasyonlar ve troid kanseri tedavisinde I^{131} gibi çeşitli radyonüklidler de tedavi amacı ile sıklıkla kullanılmaktadır. Tıbbi alandaki bu çeşitlilik arz eden radyasyon uygulamaları hastaların gelecek nesillere dolaylı olarak zarar verebilir. Bu nedenle özellikle tanı amacı ile kullanılan radyasyon uygulamaları hücre ve dokularda neden olabileceği çeşitli hasarlar açısından hep tartışılır olmuştur (1,2).

Radyasyon, gelişen teknolojiye paralel olarak insan yaşamına farklı tip ve dozda yaygın olarak girmektedir. İnsanlar radyasyonun çok farklı tip ve dozlarına bir şekilde maruz kalmaktadırlar. Bu durum diagnostik amaçlı radyasyon kullanılan alanlarda daha fazladır. Dolayısı ile de ilgili alanlarda bir şekilde radyasyonun doz ve tiplerine maruz kalan kişilerde DNA ve genetik materyalin incelenmesi gerekmektedir. Nitekim Fenech ve arkadaşlarının HUMN project kapsamında radyasyonun toplum üzerinde ki bu riskine önemle dikkat çekilmektedir(3). Biyolojik dozların doğru olarak değerlendirilmesi; mesleki ve çevresel ışınlanma düzeylerinin belirlenmesinde, kaza ışınlanmalarında uygun tedavi programlarının saptanması ve gecikmeden başlatılması, düşük doz ve geç etkileri konusunda kişilerin bilinçlendirilmesi tümörlerin radyasyona karşı duyarlılıklarının belirlenmesi ve radyoterapi sırasında sağlam dokuların korunması gibi alanlarda önem kazanmaktadır (4,5).

Biyolojik doz tayinleri için kullanılan dozimetrik analizler içinde en güvenilir olanlar; kişilerin absorbe ettikleri biyolojik doz ile kromozomlarda radyasyon etkisi ile oluşan aberasyonlar arasındaki kantitatif ilişkinin değerlendirilebildiği sitogenetik yöntemlerdir. Bu yöntem 1960'lerden bu yana kişilerin tüm vücut veya bölgesel ışınlanmalarında absorbe ettikleri dozun radyobiolojik ve istatistiksel olarak değerlendirilmesinde rutin , standart olarak güvenle kullanılmaktadır(2).

Radyasyona karşı duyarlılık yasasına göre karaciğer, böbrek, kas, beyin, kemik, kıkırdak ve bağ dokuları gibi ergin canlılarda farklılaşmış oldukları ve bölünemedikleri için dirençli doku ve organları oluşturmaktadırlar. Buna karşın; kemik iliği, ovaryum ve testislerin bölünen hücreleri, mide-bağırsak ve deri epitel hücreleri ise radyasyona karşı duyarlıdırlar (2). Biyolojik doz tayinleri için hücresele seviyede hemogram, kemik iliği incelenmesi, spermogram, kromozom analizleri, serum analizleri, idrarda amino asit, nötron aktivasyonu, ESR(Elektron Spin Resonans) spektroskopisi gibi bir çok değerlendirme kriteri bulunmaktadır(2,9).

İlk kez 1906 yılında Bergonie ve Tribondeau tarafından “Radyasyonun Biyolojik Temel Kanunu” olarak adlandırılan radyasyonun biyolojik etkilerini temel alan bir hipotez geliştirildi (6,7,9). Işınlanan canlılarda gözlenen biyolojik etkiler genel olarak ışınlanan hücrelerin bölünme kapasiteleri ile doğru, farklılaşma dereceleri ile ters orantılıdır (6,7,9).

Radyasyonun neden olduğu kromozom hatalarını belirlemek için kullanılan yöntemlerin en çok tercih edilenlerinden biride çift nükleuslu hücrelerde mikronükleusların analizidir (MN). Mikronükleus, hücre sitoplazması içinde ana nükleusların dışında fakat onunla aynı şekil, yapı ve boyanma özellikleri gösteren küçük küresel yapılar olarak tanımlanmaktadır. Radyasyon veya kimyasal mutajenlerle hasar görerek bölünme sonrasında yeni oluşan çekirdeklere dahil olmayan tüm kromozom veya kromozom parçaları sitoplazmada yoğunlaşarak mikronükleusları meydana getirirler(3,8).

Mikronükleus analizi uluslararası düzeyde kabul edilen ve biyolojik sistemlerde genomik instabilitenin saptanmasında kullanılan önemli bir *ex vivo* mekanizmadır. Diğer yandan mikronükleus analizi bir ajanın (genotoksik, sitotoksik yada karsinojenik) ökaryotik bir hücrede neden olduğu DNA hasarı mutasyonlar ve diğer hücrenin patojenitesine katkı yapabilme olasılığı olan parametrenin saptanmasında kabul edilen en geçerli mutasyon analiz tekniğidir. Ajanın ne oranda mutasyon oluşturabildiğinin saptandığı

önemli bir mekanizmadır. Fenech ve arkadaşları mikronükleus kriterlerini 'HUMN Projeleri' kapsamında ortaya koymuşlardır (3,8).

Çalışmamızda, tekrarlı diagnostik amaçlı doğrudan grafi (X-Ray) ve manyetik rezonans (MR) çekimleri yapılan hastalara eşdeğer doz uygulanan kemik iliği stem hücrelerinde meydana gelen nükleopolimorfik hücreler değerlendirilerek ilgili parametrelerin ne oranda genotoksik olabilecekleri mikronükleus analizleri ile ortaya konmuştur. Bu amaçla X-Ray ve MR yöntemleri ratlara ayrı ayrı ve birlikte değişik kombinasyonlar şeklinde uygulanmıştır. Uygulamalardan 3 gün ve 5 gün sonra ratlar servikal dislokasyon ile öldürülerek kemik iliği alınmıştır. Direk fırça yayması ve kemik iliğinin emilerek çıkarılması şeklinde iki farklı yöntem kullanılarak *in situ* yayma preparatları hazırlanmış ve ışık mikroskopta incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Radyasyon ve Radyoaktivite

Doğal ya da yapay radyoaktif çekirdeklerin kararlı yapıya geçebilmek için dışarı saldıkları hızlı parçacıklar ve elektromanyetik dalga şeklinde taşınan fazla enerjiler “radyasyon” olarak adlandırılır. Radyasyon, daima doğada var olan ve birlikte yaşadığımız bir olgudur. Işık, gözle görebildiğimiz bir radyasyon olup, elektromanyetik spektrumun yaklaşık 400-700nm’lik bir kısmıdır. Diğer yandan ısı hissettiğimiz bir radyasyondur. Mikrodalga ve X ışınlarını ise ne görebildiğimiz ne de hissedebildiğimiz radyasyon tipidir (9,10).

Atom çekirdeklerini oluşturan nükleonların (nötron ve proton) oranı hafif elementlerde 1 iken, ağır elementlere doğru gidildikçe nötronlar lehine artmaya başlar ve bir noktadan sonra çekirdek içindeki kararlılık tamamen bozulur. Radyonüklid adı verilen bu tür çekirdekler bol miktarda nükleonları nedeniyle kararsızdırlar ve yapılarındaki fazla enerjiyi radyasyon yayarak düzenlemeye çalışırlar. Çekirdeklerin gerek bu doğal yol gerekse dışardan verilen bir uyarımla bombardımanı neticesinde yapay olarak parçalanmasına radyoaktivite veya radyoaktif parçalanma adı verilmektedir (10).

Radyasyonun tarihine şöyle bir göz atacak olursak; 1800’lerin sonlarına doğru Alman fizikçi Wilhelm Röntgen bir elektron demetinin cama çarptığında yeni ve garip bir ışının oluştuğunu keşfetmiştir. Bu ışınlar bilinmeyen bir yapıda olduklarından, “X ışınları” olarak adlandırılmıştır. Bu keşiften yaklaşık iki ay sonra Fransız fizikçi Henry Bequerel değişik elementleri siyah fotografik plakalara sardığı bir deney yapmıştır. Bequerel deney sonunda uranyum gibi birkaç elementin herhangi bir enerji girişi olmadan enerjili ışınlar yaydıklarını bulmuştur. Bequerel’in deneyinin anlamı bazı doğal olayların bazı elementlerin enerjili X ışınları yaymalarından sorumlu olduklarıdır. Bu da göstermektedir ki ;

bazı elementler doğal olarak kararsız bir yapıdadırlar çünkü bu elementler değişik enerji çeşitlerini kendiliklerinden yaymaktadırlar(9,10).

Böylece X ışınları gibi enerjili parçacıkların kararsız atomların bozunumlarından salınmalarına radyoaktivite denilmiştir. Daha sonraları Fransız fizikçiler Pierre ve Marie Curie radyoaktivite üzerine önemli araştırmalar yapmışlardır. Uzun yıllar süren çalışmalar sonucunda radyoaktif olaylardan oluşan birkaç değişik parçacık sınıfı tanımlanmış ve 1898'de radyumu keşfetmişlerdir (12).

Radyasyonun çeşitleri;

Radyasyonu temel olarak iki şekilde sınıflandırmak mümkündür. Bunlar; parçacık radyasyonu ve dalga tipi radyasyonlardır.

Parçacık radyasyonu; belli bir kütle ve enerjiye sahip çok hızlı hareket eden minik parçaları ifade eder.

Dalga tipi radyasyon ise belli bir enerjiye sahip ancak kütesiz radyasyon çeşididir. Bir tür enerji yayılımı olan elektromanyetik radyasyon, manyetik ve elektriksel olmak üzere iki vektörel yöne sahip sinüzoidal bir dalga şeklindedir.

Radyasyon kaynaklarını doğal radyasyon kaynakları ve yapay radyasyon kaynakları olarak sınıflayabiliriz. Doğal radyasyon kaynakları dış ve iç kaynaklardan gelebilir. Dış kaynaklar, uzaydan yeryüzüne gelen kozmik ışınlar ve gama radyasyondur. İç kaynaklar su, yemek ve hava yolu ile alınan radyo çekirdeklerden gelir. Yapay radyasyon kaynakları ise (Tablo 1) tıbbi yöntemler, nükleer silah denemelerinden oluşan radyoaktif yağışlar, nükleer tesislerden çevreye verilen miktarlar, mesleki ışınlamalardır (12).

Tablo 1.Yapay radyasyon kaynaklarından alınan yıllık ortalama doz miktarları.

Kaynak	Doz μSv
Tıbbi İşlemler	500
Radyoaktif Yağış	10
Çevreye verilen	3
Görev nedeni ile ışınlanma	9
Diğer Kaynaklar	8
TOPLAM	530

2.2. Radyasyonun Yaşamımızdaki Yeri

Son elli yıl içerisinde radyasyondan faydalanılarak yapılan çalışmalar yaşam standartlarımızın gelişmesine önemli katkılarda bulunmuştur. Radyasyon tıp alanında teşhis ve tedavide, endüstriyel uygulamalarda, gıda ve tarım uygulamalarında, tüketici ürünlerinde, jeofizik ve jeokimya uygulamalarında kullanılmaktadır (12).

2.2.1. Tıbbi Uygulamalar

Tıbbi alandaki radyasyon uygulamaları, radyasyonla görüntü elde edebilme ve radyasyonun hücre ve tümörleri yok edebilme yeteneğine sahip olması temeline dayanır. Bu iki özelliğinden dolayı radyasyon hastalıkların teşhis ve tedavisinde önemli rol oynar. Radyasyonun tıbbi alanda halen kullanılmakta olan ve gün geçtikçe geliştirilen en eski çeşidi X ışınlarıdır. Hastalıkların teşhisi amacıyla kullanılan X ışınları hasta X ışınlarına maruz bırakılarak hastalıklı bölgenin görüntüsü röntgen filmi olarak da adlandırılan radyografi filmi şeklinde elde edilir (Tablo 2). Tıpta Radyoloji olarak adlandırılan bu yöntem hastalıkların tanısında yaygın olarak kullanılmakta ve her yıl milyonlarca kişi X ışınları ile muayene edilmektedir (12).

Tablo 2.Bazı radyolojik tetkikler sonucu, ülke seviyelerine ve yapılan tetkiklere göre, hastaların maruz kaldıkları etkin dozlar.

TETKİKLER	Seviye 1*	Seviye 2**	Seviye 3-4***	DÜNYA
Göğüs Radyografisi	0,14	0,14	0,20	0,14
Göğüs Fotofloroskopisi	0,65	0,65	0,65	0,65
Göğüs Floroskopisi	1,1	1,1	1,1	1,1
Kol,bacak ve eklemler	0,06	0,06	0,1	0,06
Bel	1,8	1,8	2	1,8
Göğüs	1,4	1,4	1,5	1,4
Boyun	0,27	0,27	0,3	0,27
Kalça ve Kalça eklemi	0,83	0,83	1	0,83
Kafa	0,1	0,1	0,15	0,1
Üst sindirim sistemi	3,6	4	4	3,7
Alt sindirim sistemi	6,4	6,4	6,4	6,4
Safra kesesi grafisi	2	2	2	2
Üriner sistem grafisi	3,7	3,9	4	3,7
Mamografi	0,5	0,5	0,5	0,5
Bilgisayarlı Tomografi	8,8	5	5	8,6
Anjiyografi	12	12	12	12
Cerrahi işlemler	20	20	20	20
Diş	0,02	0,1	0,1	0,03

*Seviye 1 ; Doktor başına 1000'den az hasta düşen ülkeler.

**Seviye 2 ; Doktor başına 1000-3000 arası hasta düşen ülkeler (Ülkemiz de bu grupta yer almaktadır).

***Seviye 3 ; Doktor başına 3000-10000 arası hasta düşen ülkeler.

Seviye 4 ; Doktor başına 10000'den fazla hasta düşen ülkeler.

2.2.1.1. MR (Manyetik Resonans Görüntülme)

Kullanıldığı enerji türü itibarı ile iyonizan özellik taşımayan manyetik alan ve radyo frekans enerjisi yardımı ile görüntü oluşturan MR görüntüleme sistemi 1980'li yıllarda radyolojiye girmiştir. Polar özellik gösteren atomların şiddetli manyetik alan içersinde sıraya sokularak üzerlerine gönderilen radyo frekans enerjisini önce soğurup sonra geri vermelerinden yararlanarak ortaya çıkan elektrik sinyallerinin bilgisayar yardımı ile görüntüye dönüştürülmesi esasına dayanır. MR görüntüleme sistemlerinde ana manyetik alanı oluşturan mıknatıs bölümü, radyo frekans enerjisini veren ve alan bobinleri, kumanda konsolu ve görüntü işleme birimleri vardır. Son zamanlarda geliştirilen çeşitli yazılımlarla ve kontrast madde yardımı ile yumuşak doku ayrımı en üst düzeylere taşınmış bunun yanında yalnızca istenilen kısımların görüntülenip diğer kısımları silindiği (MR Anjiyografi, MR Kolanjiyografi) inceleme sekansları elde edilmiştir (13).

2.2.1.2. X-ray

Röntgen Makinaları;

Röntgen makinaları temel olarak yüksek voltaj üreten jeneratör, cihazı kumanda eden konsol ve X ışını üreten tüp olmak üzere 3 temel bölümden meydana gelir. Diğer aksam, uygun koşullarda çalışma sağlayabilmek için yardımcı gereçlerdir.

X ışını tüpü istenilen bölgenin dışına X ışını emisyonuna engel olacak şekilde dizayn edilmiş aralıktan X ışınları hedefe isabet edecek şekilde dışarıya bırakılır. Sağlanan X ışını fotoğraf filmi üzerine isabet ettiğinde fotografik etki ile film üzerine ince tabaka halinde kaplanmış gümüş bromür kristallerini serbest gümüşe dönüştürerek özel banyo işlemi sonrasında görünür hale gelen görüntüyü meydana getirir. Tüp ile film arasına konulan objenin yapısına göre X ışınını

çeşitli derecelerde absorbe edip çeşitli derecelerde geçmesine izin vermesi film üzerinde değerlendirilebilir bir görüntü oluşturur.

Konvansiyonel radyolojide her türlü radyografik görüntünün elde edilişi bu şekildedir. Film yerine floresan özelliğe sahip ekran bulunduğu karanlık odada uyum sağlamış göz, floresan ekran üzerinde oluşan görüntüleri hareketli olarak izleyebilirler. Bu floresan ekran üzerinde oluşan görüntüler özel bir kapalı devre televizyon sistemi ile güçlendirilerek bir televizyon monitöründe izlenebilir. Karanlık odada yapılan işleme floroskopi veya radyoskopi denir. Televize olan sistemin adı televize radyoskopidir.

Bu tür röntgende görüntüyü oluşturan bütün oluşumların üst üste binmiş görüntüleridir. Birbiri üzerine superpoze olarak görüntüyü bozan oluşumları silmek, istenilen bölgedekini daha net görmek amacıyla tomografi geliştirilmiştir. Konvansiyonel tomografide obje sabit kalırken tüp ve film, farklı yönlerde hareket ettirilerek grafi alınır. Böylelikle tüple filmi birleştiren eksenin sabit tutulduğu noktanın isabet ettiği plan grafide net olarak çıkarken alt ve üstte kalanlar silikleşir.

Radyolojide çeşitli organ ve dokuların X ışını absorpsiyon farklılıklarından faydalanılır. Ancak birbirine çok yakın absorpsiyon özelliğine sahip doku ve organları birbirinden ayırdetmek mümkün olmayabilir. Bu nedenle kontrast madde denilen ajanlar kullanılır. Kontrast maddeler içinde buldukları veya komşu oldukları yumuşak dokuya göre daha fazla X ışını absorbe etme özelliğine sahip ise pozitif kontrast madde, tersi olduğu durumlarda negatif kontrast madde olarak adlandırılır. Pozitif kontrast madde olarak yüksek atom ağırlıklı elementler kullanılır. Üriner sistem, vasküler sistem, bilier sistemin incelenmesinde iyotlu bileşikler kullanılırken gastrointestinal sistemin incelenmesinde baryum sülfat gibi yüksek yoğunluklu pozitif kontrast maddeler kullanılır. Negatif kontrast madde olarak oda havası veya karbondioksit tercih edilir. Santral sinir sisteminin ve tuba uterin yapıların incelenmesinde de pozitif kontrast madde olarak iyotlu bileşikler kullanılır. Pozitif ve negatif kontrast maddelerin birlikte kullanıldığı durumlarda çift kontrast inceleme denir.

Gastrointestinal sistemde ve artrografilere yaralı olur. İyotlu kontrast maddeler iyonik ve non-iyonik olmak üzere iki türe ayrılır. İyonik olanlar daha önceden kullanılan uygulanmasında bazı sınırlamalar bulunan kontrast maddelerdir. Non-iyonik kontrast maddeler daha sonra keşfedilmiş olup uygulama sınırları genişletilmiştir. Özellikle pozitif kontrast maddelerden iyotlu olanların hafif bulantıdan anaflaktik ölüme kadar alerjik etkilerinin olabileceği unutulmamalıdır. Non-iyonik kontrast maddelerde bu riskler belirgin derecede azalmıştır (13).

Kesit Görüntüleme Yöntemleri;

Konvansiyonel radyolojide özellikle santral sinir sisteminin görüntülenmesinde büyük sınırlamaların bulunması ve görüntüyü oluşturan katmanların üst üste süperpoze olarak değerlendirme güçlüğü yaratması sonucundaki arayışlar radyoloji bilgisayarlı tomografiye götürmüştür. Bilgisayarlı tomografide (BT) görüntülenecek objenin çevresinde değişik esaslara göre hareket eden X ışınının oluşturduğu elektrik sinyalleri bir bilgisayar vasıtası ile görüntüye dönüştürülür. Bilgisayarlı tomografide görüntü konvansiyonel röntgendekinin aksine bir salam rulusunun ince ince dilimlenmesi gibi kesitler halindedir.

Görüntülerin oluşturulması ve yorumlanması için bilgisayar yardımı kullanıldığından yumuşak dokuların ayırt edilebilmesi çok yüksek duyarlılık kazanmıştır.

İlk ortaya çıktığı 1973 yılından günümüze çok büyük gelişmeler gösteren BT günümüzde spiral yada helikal BT diye adlandırılan maddeleri ile belli vücut volümlerini bir anda volüm olarak görüntüleyebilmektedir. Bilgisayar yardımı ile üç boyutlu görüntüler veya farklı kesitlerle görüntüler elde etmek mümkün olmaktadır.

Kesit görüntüleme yöntemlerinden BT Konvansiyonel Röntgen cihazı gibi X ışını kullanılan tek yöntemdir. Bunun dışında kalan ultrasonografi ve MR

incelemeleri kullandıkları enerji bakımından bundan önce anlatılan yöntemlerden ayrılırlar. Son iki yöntem iyonizan enerji kullanmaz (13).

2.3. Radyasyonun Biyolojik Etkileri

Radyasyonun insan sağlığı üzerinde meydana getirebileceği zararlı etkiler uzun zamandır bilinmektedir. Bu etkiler radyasyon yanıkları, radyasyon hastalıkları, doğal ömür sresinin kısılması, kanser ve kalıtsal bozuklulardır. Çok yüksek dozlara maruz kalınması sonucunda ani ölümlere bile rastlanmaktadır. Tıbbi ve endüstriyel uygulamalardan ve Hiroşima ve Nagazaki'ye atılan atom bombalarından maruz kalınan radyasyonun etkileri aralıksız bir Şekilde araştırılmaktadır. Bu çalışmaların yanı sıra denek olarak kullanılan hayvanlar üzerinde de araştırmalar yapılmaktadır. Radyasyon yanığı ilk kez 1985 yılında Röntgen'in X ışını bulduğunu açıkladığı ilk ay içersinde rastlanmıştır. Doğal radyoaktiviteyle çalışan ilk araştırmacılar da bu tip yanıklar gözlenmiştir.

Aşırı derecede radyasyon dozunun kansere neden olduğu ve elleri defalarca radyasyona maruz kalan bir çok işçinin ölümcül deri kanserlerine yakalandıkları bildirilmiştir. Kanserin yayılmasını önlemek amacıyla binden fazla kişinin organları kesilmiş ve pek çok radyolog bu tip deri kanserinden ölmüştür (10,12).

Radyasyonlar canlı madde içerisinden geçerken etkisi farklı zamanlarda ortaya çıkabilecek birçok fiziksel, kimyasal ve biyolojik olaylara neden olmaktadırlar. Radyasyonun canlı üzerindeki etkisi direkt ve dolaylı olarak ikiye ayırmak mümkündür (1).

Radyasyonun doğrudan etkisi: Bir canlıda radyasyon etkisi ile başlayan olayların, DNA molekülü veya bir enzim molekülü gibi özel bir biyolojik yapıyı doğrudan etkilemesi ile başlamasıdır. Radyasyon enerjisini doğrudan biyolojik bir moleküle transfer etmektedir.

Radyasyonun dolaylı etkisi: Radyasyon, enerjisini içinden geçtiği ortamın moleküllerine transfer etmişse radyasyonun dolaylı etkisi söz konusu olur. Canlı organizmaların yaklaşık olarak %70-90'ı sudan ibaret olduğu için en çok su moleküllerinin etkilenmesi ve bunun sonucunda vücut için oldukça zehirli olan hidroksil radikalleri (OH) ve hidrojen radikalleri (H) oluşması beklenir. Bunların birbirleriyle ve biyolojik moleküllerle etkileşmeleri sonucunda yine çok zehirli hidrojen peroksit (H₂O₂) molekülleri oluşabilir. İyonlaştırıcı radyasyonların biyolojik sistemlerde oluşturduğu etkiler radyasyonun cinsine göre farklılık göstermektedir. İnsanların en çok karşılaşabilecekleri radyasyon tipleri temel olarak iki özel grupta toplanabilir.

1. Partiküler radyasyon: Alfa(α),beta(β^+ , β^-) radyasyonları partiküler patiküler (tanecik) tipte radyasyonlardır. Partiküler radyasyon, taneciklerin yüksek hızla kazandıkları kinetik enerji olarak tanımlanır.

2. Elektromagnetik radyasyon: Gama(γ) ve X ışınları elektromagnetik radyasyon grubuna dahil edilirler. Elektromagnetik radyasyon, enerjinin uzayda ışık hızıyla titreşerek taşınması durumudur. Bu tip radyasyon dalga tabiatın olup, dalga boyu ve titreşim frekansı radyasyonun dozunu ve etkisini belirler. Genellikle dalga boyları çok düşük fakat frekansları çok yüksektir. Örnek:Görünür ışık dalgaları, radyo dalgaları,elektrikli aletlerden yayılan bazı dalgalar bu gupta değerlendirilir. Elektromagnetik radyasyonların enerjisi arttıkça birer enerji paketi anlamına gelen "foton" adını alırlar. Fotonların yük ve kütlesi olmadığı için partiküler radyasyondan ayrılırlar.

Canlı organizmaların temel yapısı hücrelerdir ve hücre çekirdeğinin içende genetik bilgileri barındıran DNA, hücrenin bölünmesinden ve protein sentezinden sorumludur. Işınlanmış hücrelerde esas hedefin DNA olduğu kanıtlanmıştır. Özellikle hücre bölünmesi sırasında hücre radyasyona karşı en

duyarlı evrededir. Bunda mitoz bölünme ile çoğalma sırasında DNA'nın iki katına çıkması ve radyasyonlar için daha fazla ışınlanacak bölge oluşturmasının payı olduğu kabul edilmektedir. Radyasyon etkisi ile DNA'da tek kolda , çift kolda kırıklar ve baz hasarları oluşabilir. Radyasyona karşı duyarlılığı en hassastan en dirençliye doğru sıralayacak olursak; hızlı bölünen, farklılaşmamış en duyarlı hücreler eritroblastlar , bağırsak kript hücreleri , sperm ana hücreleri ve epidermis bazal hücreleridir. Hücreler farklılaştıkça hızlı bölünme devam etmesine karşın, duyarlılıkları da azalmaktadır. Düzensiz bölünen ve dokulara destek sağlayan bağ dokusu hücrelerinin duyarlılıkları ise ara derecededir. Normalde bölünmeyen ancak ihtiyaç halinde bölünme kapasitesine sahip olan karaciğer, pankreas hücrelerinde az olmakla beraber hala bir duyarlılık mevcuttur. Radyasyona karşı en dirençli hücreler ise bölünemeyen ve ileri derecede farklılaşmış olan kas, sinir, hücreleri ve olgun eritrositlerdir. Bu sınıflamaya uymayan tek hücre grubu dolaşan kana geçtikten sonra bölünemeyen ve son derece farklılaşmış olmasına karşın radyasyona karşı duyarlı olan lenfositlerdir. Radyasyona karşı duyarlılık yasasına göre karaciğer, kas, beyin, kemik, kırık ve bağ dokuları dirençli doku ve organları oluşturmaktadırlar. Kemik iliği, ovaryum ve testislerin bölünen hücreleri, mide-bağırsak ve epitel hücreleri ise radyasyona karşı en duyarlı hücre gruplarını oluştururlar (11).

2.3.1. Radyasyonun DNA Üzerine Etkileri

Radyasyonun biyomoleküllerde neden olduğu değişiklikler incelenirken canlılık yönünden çok önemli rolleri olan iki biyo molekülün ilerde radyasyonun biyolojik etkilerinin ortaya çıkmasında büyük payları olduğu gözlenmiştir. Bu moleküller nükleik asitler ve proteinlerdir. DNA molekülünde radyasyonun meydana getirdiği en önemli yapısal hasarlar; DNA yapısındaki zincir kırılmaları, baz hasarları, baz kayıpları, denatürasyon ve çapraz baz eşleşmeleridir.

Zincir kırılmaları DNA molekülünde meydana gelen en önemli hasar grubunu oluşturur. Bu hasarlar tek zincir kırılmaları ve çift zincir kırılmaları şeklinde iki gruba ayrılır. Tek zincir kırılmalarında DNA molekülünün çift zincirlerinden bir tanesinde kopma meydana gelmesiyle oluşur. Çift zincir

kırılmaları ise, ya tek bir enerji transferi olayı ile ya da iki tek zincir kırılmasının birbirine yakın ve karşılıklı bölgelerde oluşması sonucu ortaya çıkar.

Çok yüksek radyasyon dozlarında, DNA moleküllerinde bahsedilen kırılmaların dışında ağır nükleer parçalanmaların meydana gelebileceği bilinmektedir. Bu şekilde çok küçük moleküller ortaya çıkar ve bunların birleşmesi sonucunda küçük DNA parçasından oluşan agregasyonlar meydana gelebilmektedir. Bu durum interfaz hücrelerinde mikroçekirdek olarak değerlendirilir.

DNA molekülünde radyasyon etkisi ile ortaya çıkabilecek diğer bir yapısal değişiklik baz hasarları ve kayıplarıdır. Bu hasarlar açısından pirimidinler purinlere oranla yaklaşık 2 kat daha duyarlıdır. Timin ise en duyarlı baz olup çapraz bağlanmalar da önemli bir yapısal hasar grubunu oluşturur. Bu tip bağlanmalar DNA, molekülü içinde aynı zincirde yada zincirler arası oluşabileceği gibi DNA-protein çapraz bağlanmaları şeklinde olabilirler (9,11,14).

2.3.2. Radyasyonun Kromozomlar Üzerine Etkileri

Kromozomların radyasyon etkisine karşı çok duyarlı oldukları 0,1 Gray (Gy)'den düşük dozlarda bile bitki, hayvan ve insan kromozomlarında kırılmaların olduğu saptanmıştır. Bir hücreye radyasyon uygulanması sonucunda kromozomda kırılmalar oluşur. Kromozomların kırılan uçları yapışkan özellik taşırlar ve herhangi kırık bir başka uca yapışabilir. Kromozom kırılmaları ve sonrasında meydana gelen yapışma olayları çeşitli şekillerde meydana gelebilir. Bunları şu şekilde sıralayabiliriz;

- 1-Kırılan parça eski yerine yapışabilir.
- 2-Kırılan parça yapışmaz sonraki mitozda delesyon olarak adlandırılan bir aberasyon şeklinde tespit edilir.
- 3-Kırılan parça diğer bir kırık uca yapışabilir ve bu durum bir sonraki mitozda ağır kromozom aberasyonu olarak değerlendirilir.

Kromozomal aberasyonlar metafaz ve anafazda incelenen aberasyonlar olmak üzere iki gruba ayrılır. Bunlar kromozom tipi aberasyonlar ve kromatit

tipi aberasyonlardır. Radyoaktif ışınlanma eğer interfazın erken evrelerinde meydana gelmişse kromozom tipi aberasyonlar meydana gelir. İnterfazın geç safhalarında bir ışınlanma meydana gelmişse kırılmalar kromatitde oluşur ve buna kromatit tipi aberasyon adını alır. Kromozom tipi aberasyonlarda terminal delesyonlar ile aynı kromozomda ya da farklı kromozomlar arasında simetrik veya asimetrik parça değişimleri meydana gelebilir. Kromatit tipi aberasyonlar terminal delesyonlar, izokromatit delesyonlar, aynı ya da farklı kromozomlar arasında simetrik ve asimetrik parça değişiklikleri ile triradialler şeklinde meydana gelebilirler (9,11,14).

2.4. Biyolojik Etkilerin Sınıflandırılması

Radyasyonun hücre ile etkileşmesi sonucunda kromozomlarda meydana gelen hasarlar bir takım biyolojik etkilerin oluşmasına yol açar. Bu etkiler, bedensel (somatik) ve/veya kalıtsal (genetik) etkiler şeklinde olabilir. Işınlanan kişinin kendi bedeninde meydana gelebilecek hasarlar bedensel etkiler, kendisinden sonraki nesillerde çıkabilecek hasarlar ise kalıtsal etkiler olarak adlandırılır. Bedensel ve kalıtsal etkiler de erken ve gecikmiş etkiler olmak üzere iki farklı kategoride incelenebilir. Erken etkiler, kısa zaman içinde ve bir defada yüksek dozlara maruz kalınması sonucunda kısa bir zaman aralığında ortaya çıkabilecek hasarlardır. Gecikmiş etkiler ise uzunca bir süre aralıklı olarak düşük dozlara maruz kalınması sonucu ortaya çıkar (11).

Işınlanma etkileri akut ya da kronik olabilir. Akut ışınlanmalar olarak adlandırılan bu tip ışınlanmalar genellikle bir kaza sonucu meydana gelen istem dışı ışınlanmalardır. İstatistikler, dünya genelinde 1945 ile 1997 yılları arasında araştırma, tıp, nükleer ve diğer endüstriyel alanlarda çalışanlarının yanı sıra halktan kişileri de kapsayan 140'ı ölümcül olmak üzere yüzlerce kişinin yaralandığı 137 radyasyon kazası meydana geldiğini göstermektedir. Akut ışınlanmalar sonucu meydana gelebilecek etkileri genel olarak akut radyasyon sendromları ve bölgesel radyasyon hasarları olarak sınıflandırmak mümkündür.

Radyasyona en fazla maruz kalan kişiler olan radyasyon çalışanlarının kontrollü olarak aldıkları düşük dozların etkileri akut ışınlanmalardaki gibi

değildir. Ancak, bu kişilerin uzunca bir süre içinde aralıklı olarak düşük dozlara maruz kalması yani kronik olarak ışınlanması sonucu meydana gelebilecek etkiler yıllar sonra ortaya çıkabilir. Bunun sebebi; düşük dozda da olsa tekrarlanan ışınlanmalarda organizmanın bir sonraki ışınlamaya kadar geçen sürede hasarı onaramaması ve hasarların akümüle olmasından dolayıdır. Kronik olarak ışınlanan kişilerde yıllar sonra katarakt ve kanser olguları görülebileceği gibi doğal ömür sürelerinde bir kısalma söz konusu olabilir. Ayrıca bu kişilerin kendilerinden sonraki nesillerinde kalıtsal bozukluklara daha sık rastlanabilir (11).

2.5. Biyolojik Doz Tayininde Radyasyon Sitogenetiği

Biyolojik doz tayinleri için kullanılan dozimetri sistemleri içinde en güvenilir olarak kullanılanlar, kişilerin absorbe ettiği biyolojik doz ile kromozomlarda radyasyon etkisi ile oluşan aberasyonlar arasındaki kantitatif ilişkinin değerlendirildiği sitogenetik yöntemlerdir. İnsan dolaşan kan lenfosit hücrelerinde kromozom hasarlarının analizi kişilerin tüm vücut veya bölgesel ışınlanmalarında absorbe ettikleri dozun radyobiyojik ve istatistiksel olarak değerlendirilmesinde 1960'lerden günümüze rutin, standart olarak güvenle kullanılmaktadır.

Radyasyon sitogenetiğine dayanan dozimetri çalışmalarında genellikle lenfosit hücreleri kullanılmaktadır. Bunun nedeni lenfositlerin dolaşımda bölünmemeleri buna karşın radyasyona karşı son derece duyarlı olmaları, vücudun herhangi bir yerinde olan hasarı kana taşımaları ve *in vitro* şartlarda aynı anda bölünmeye başlamaları gibi önemli özelliklere sahip olmalarındandır. İyonizan radyasyonla ışınlanma sonucu oluşan DNA, dolayısı ile kromozom hasarları tamir edilebilir. Tamir edilemeyen hasar DNA/kromozom yapısında korunur veya yanlış tamir edilebilir. Yanlış tamir edilmesi sonucunda disentrik ve halka kromozomlar gibi karasız yapısal bozukluklar veya, translokasyonlar gibi kararlı kromozom ara değişimleri ortaya çıkmaktadır (2).

2.5.1. Disentrik Aberasyonlar ve Analiz Yöntemi

Biyolojik dozimetride iki farklı kromozomun kırılması ve yanlış tamir sonucu birbirleriyle birleşmeleri sonucu oluşan iki boğumlu (disentrik) aberasyonlar en sık gözlenen hata tipleridir. Disentrik aberasyona genellikle çift ve boğum (sentromer) içermeyen asentrik denilen kromozom parçaları eşlik etmektedir. Yine aynı kromozomun iki farklı kolunda kırılmaları takiben bir yanlış birleşme sonucunda oluşan halka (ring) kromozom hataları da disentrik aberasyonla birlikte doz değerlendirilmelerinde kullanılan diğer bir yapısal anomali tipidir. İnsan kan lenfositlerinde radyasyon etkisi ile oluşan disentrik kromozom aberasyonlarının kantitatif analizi esasına dayanan sitogenetik analiz yöntemi; rutin, standart ve güvenilir bir metod olarak biyolojik dozimetri amacıyla farklı radyasyon tipleri için doz cevap eğrileri yardımı ile pek çok ülkede başarıyla kullanılmaktadır. Fakat disentrik aberasyonların kararsız olması, analizlerin uzun zaman alması ve uzman değerlendirici gerektirmesi biyolojik dozimetride yeni yöntemlerin geliştirilmesine gerek duyulmuştur (2).

2.5.2. FISH (Fluorescence in situ hybridization) Analiz Yöntemi

İyonizan radyasyonlar disentrikler gibi kararsız aberasyonlar yanı sıra translokasyon adı verilen kararlı aberasyonlara da neden olurlar. Kromozomlar arası parça değişimleri olan translokasyonlar vücutta daha uzun süre kalma, hücre bölünmelerinden geçebilme gibi özelliklere sahiptir. FISH yöntemi ile seçilmiş bütün kromozomlar, kromozomun boğumları ve/veya uç bölgeleri flürosan boya ile boyanarak ayrıntılı olarak incelenmektedir.

Bu yöntemde klasik lenfosit kültürü protokölüne göre elde edilen slaytlar üzerine hücre ekilir ve -20°C'de bekletilir. RNAaz ve pepsin uygulamalarından geçirildikten sonra slaytlar PBS, SSC gibi tuzlar ve yüksek ısıda denatüre edilir. Özel flürosan olarak işaretlenmiş problemlerle hibridize olması için bir gece uygun ısı ve nemde bekletilir. Ertesi gün fazla problemleri uzaklaştırmak için ve sinyallerin daha net ve iyi alınabilmesi için yıkama işlemi ve antikor uygulamaları yapılır. Kromozomlar flürosan mikroskopta incelenerek anomaliler renklerine göre ayırt edilip kaydedilir(2). Boyanmış kromozomlardaki translokasyonları tanımlamak

kolay olduğu için hem karşılıklı hem uç hemde ara parça değişimlerini içeren kararlı aberasyonların analizi hızlı bir şekilde yapılabilmektedir. Disentrik aberasyonlar gibi kararsız aberasyonlara oranla ışınlanma üzerinden uzun yıllar geçmiş olsa bile saptanılma özelliği olması doz değerlendirmeleri açısından FISH analizini daha cazip hale getirmektedir. FISH analizinde kullanılan problemlerin ve kimyasal maddelerin pahalı olması, yaş ilerledikçe translokasyon sıklığının artması, tüm genomu temsil edebilmesi için analize tabi tutulan hücre sayısının artırılması gibi sebepler bu analiz yönteminin yaygın kullanımını sınırlı kılmaktadır (1,2).

2.5.3. Mikronükleus Analiz Yöntemi

Mikronükleuslar (MN) hücrenin mitoz bölünmesi sırasında ortaya çıkan , esas çekirdeğe dahil olmayan tam kromozom veya akrosentrik kromozom fragmanlarından köken alan oluşumlardır. Mikronükleus sayısındaki artış , çeşitli ajanların hücrelerde oluşturduğu sayısal ve yapısal kromozom düzensizliklerinin indirekt göstergesi olarak değerlendirilmektedir. Anöploidiyi uyaran ajanlar sentromer bölünme hatalarına ve iğ iplikçiklerinde fonksiyon bozukluklarına yol açarak , klastojenler ise kromozom kırıkları oluşturarak mikronükleus oluşuma katkıda bulunmaktadır (15,16).

Mikronükleus testi sitogenetik harabiyetin tespitinde, kromozom analizine göre kolay uygulanabilmesi, daha fazla sayıda hücre sayılması ve istatistiksel yönden daha anlamlı sonuçlar elde edilmesi avantajı sağlamasıyla yaygın kullanım alanı bulan bir tekniktir (17,18,19,20).

MN testi 1950'lerde bitki hücrelerinde kromozom hasarının ölçülmesinde, 1970'lerde hayvan hücrelerinde(22,23) ve daha sonra Haddle ve arkadaşları tarafından kültüre edilmiş (17) insan lenfositlerinde kimyasal karsinojenleri belirlemeye yönelik bir test olarak kullanılmaya başlanmıştır. Eastmand ve Tucker antikinetokor antikorumları kullanarak kinetokor pozitif MN'lerin tam bir kromozom, kinetokor negatif MN'lerin asentrik kromozom fragmanı içerdiğini ve bu yöntemin anöploidiyi uyaran ajanları klastojenlerden

ayırmada daha kesin bir yol olduğunu vurgulamışlardır. Fenech ve Morley tarafından gerçekleştirilen sitokinezi-blok (Cytokinesis-Bloked) metodu bazı kinetik problemlerin ortadan kalmasını ve tekniğin uygulanmasındaki güvenilirliğin artmasını sağlamıştır. Bu metod, küf mantarlarının metabolitlerinden biri olan Sitohalasin-B (Cyt-B) ile mitoz geçiren hücrelerde sitokinezi durdurma esasına dayanmaktadır. Standart lenfosit kültürlerine uygun konsantrasyonda Cyt-B eklenmesiyle, çekirdek bölünmesini tamamlamış ancak sitoplazmik bölünmesini gerçekleştirememiş çift çekirdekli hücreler kolaylıkla tanınarak sayılabilmekte, mikronukleus bulunduran hücrelerin oranı tespit edilebilmektedir (61,62).

Mikronuleus kriterlerini Fenech ve arkadaşları “HUMN projeleri” kapsamında ortaya koymuşlardır (3-8).

HUMN projeleri kurallarına göre mikroçekirdek;

1-Çapı normal çekirdeğin 1/3-1/16 oranında olmalı.

2-Oval , yuvarlak yapıda olmalı.

3-Refraktil olmamalı , diğer artefeklerden kolaylıkla ayırddilebilmeli.

4-Ana çekirdekten;

a-Ayrı

b-Bitişik

c-Yakın-Bitişik

yapıda olabilir.

5-Ana çekirdek üzerine overlap yapmamalı.

6-Sınırları belli ve kesin olmalı.

7-Ana çekirdek ile aynı boya yoğunluğunda olmalı (bazen daha yoğun olabilir).

HUMN projeleri kurallarına göre çift nukleuslu hücre (binucleated cell) kriterleri ise;

1-İki çekirdek yapısı (monocytoplasmic)

2-İki çekirdek ve kesin sınırlandırılmış iki farklı membran.

3-Çekirdekler eşit büyüklükte olmalı.

4-Ayrı veya bitişik olabilirler.

- 5-Overlap yapmamalıdır.
- 6-Membranları kesin ayırıcı özellikte olmalı.
- 7-Farklı boyama yoğunluğunda olmamalıdır.

2.6. Mikronükleus Testinin Kullanım Alanları

1980'den sonra deney hayvanlarında gerçekleştirilen kontrollü çalışmalarda kimyasal ve fiziksel ajanların sebep olduğu sitogenetik harabiyetin güvenilir bir göstergesi olarak kullanılan MN çalışmalarını sayısı çok hızlı bir şekilde artmıştır. MN testi sigara, pestisid ve parazitik enfeksiyonlar gibi çevresel ve mesleki etkileri değerlendirebilmek için kolaylıkla kullanılmaktadır (15). Günümüzde MN testi genotoksik, sitotoksik ve karsinojenik ajanların hücre genomu ve viabilitesi üzerine etkilerinin analizinde başarıyla kullanılmaktadır.

2.7. Biyolojik Doz Birimi

Radyasyon enerjisinin absorpsiyonu ve canlı sistemdeki dağılımı ile başlayan olaylar sonuçta biyolojik etkilerin ortaya çıkmasına neden olurlar. Her türlü radyasyonun uygulanmasında başlangıçta görülen reaksiyonlar genel nitelikleri bakımından benzer olmakla birlikte sonuçta ortaya çıkan biyolojik etkilerin farklı oldukları görülmektedir. Aynı tip iyonlaştırıcı radyasyonların farklı dozları ya da farklı tip iyonlaştırıcı radyasyonların aynı dozlarının oluşturdukları biyolojik etkenlerin benzer olmadıklarını söylemek mümkündür. Uygulanan radyasyon ve uygulama şekli ile ilgili bazı özellikler, enerji absorpsiyonu ve dağılımı süreçlerinde büyük ölçüde belirleyici olurlar. Bu özellikler, aynı zamanda radyasyonun biyolojik etkilerindeki farklılıkların da en önemli sebeplerinden birisini oluştururlar (9).

Doz, herhangi bir maddenin belli bir zaman içerisinde kullanılan veya tüketilen miktarı demektir. Radyasyon dozu ise hedef kütle tarafından belli bir sürede soğurulan veya alınan radyasyon miktarıdır. Bütün zararlı maddeler

genellikle vücutta bir takım biyolojik hasarlara neden olurlar. Bu hasarların büyüklüğü ise o maddenin cinsinin yanı sıra vücuda alınış şekli, süresi ve miktarına bağlı olarak değişir. Gerekli önlemler alınmadığı takdirde belli bir sürede belli bir miktarın üzerinde radyasyon enerjisi soğuran yani radyasyon dozu alan canlılarda da bazı zararlı etkilerin meydana gelmesi kaçınılmazdır.

Biyolojik doz radyasyonun canlı dokularda soğurulan miktarını ifade etmek için kullanılmaktadır. Ancak soğurulan dozun biyolojik etkinliği hakkında fikir vermez. Dolayısıyla radyasyonun canlı doku üzerindeki etkilerini belirlemede kullanılacak doz biriminin tüm faktörleri içermesi gerekir. Bu faktörler kalite faktörü adı altında toplanmıştır. Biyolojik dozun geleneksel birimi Rem'dir. Rem, Rad ile kalite faktörünün çarpımından oluşmaktadır. Rem'in SI sistemindeki yeni birimi Sievert (Sv) olup Gray'ın kalite faktörü ile çarpımından elde edilmektedir. X ışını kalite faktörü 1 olarak belirlenmiştir. Bu nedenle pratik olarak $1 \text{ Rad} = 1 \text{ Rem}$ olarak bilinir. 1 Sv 'de 1 Gray 'e eşit olur. Birbirine dönüştürmeden $1 \text{ Sv} = 100 \text{ Rem}$ veya $10 \text{ mikrosievert} = 1 \text{ milirem}$ şeklindedir (1,9).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanı

Bu çalışmada Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarından temin edilen 100-110gr ağırlığındaki 20 adet rat (*Rattus norvegicus albino*) kullanıldı.

3.2. Kullanılan Maddeler ve Aletler

- 1.Hanks' Balanced Salts (Sigma)
- 2.Diseksiyon takımı
- 3.İnsülin iğnesi
- 4.BT (X-Ray) cihazı (Picker-PQS)
- 5.MR cihazı (Toshiba)
- 6.Lam
- 7.Mikroskop Axioskop 2 Plus (Zeiss)
- 8.Giemsa (Sigma)
- 9.Etanol (Sigma)
- 10.Metanol (Sigma)
- 11.Santrifüj cihazı (Sanyo)
- 12.Asetik asit (Sigma)

3.3. Deney Grupları ve Dozlar

1. Kontrol Grubu: Toplam 5 adet rat kullanıldı ve bu gruptaki deneklere X-Ray, MR uygulaması yapılmadı.

2. X-Ray Grubu: Bu gruptaki deneklere Picker-PQS marka spiral bilgisayarlı tomografi cihazı kullanılarak 120 kilovolt (Kv), 125 miliamper (mA) değerleri kullanılarak kesit kalınlıkları 3 mm , kesit intervalleri 3 mm alınarak toplam 30 aksiyal kesit alındı. Bu değerler ratın boyutlarına uygun inceleme parametreleri olup bu incelemede ratların aldığı doz ortalama 25 miligray (mGy) idi.

3. MR Grubu: Deneklere Toshiba"Excelart" marka 1,5 Tesla gücünde manyetik rezonans cihazı kullanılarak abdomen incelemesi için uygulanan protokol uygulandı. T1 aksiyal (TR:190, TE:4, SliceThickness:8mm, Matrix:96x256, FOV:35x35, flip angle:90°), T2 aksiyal (TR:2800, TE:100, Slice thickness:7mm, Matrix:128x256, FOV:28x34, flip angle: 90°), STIR aksiyal (TR:6800, TE:80, TR:140, Slice thickness:7mm, Matrix:96x256, FOV:28x34, flip angle:70°), T1 koronal (TR:190, TE:4, Slice thickness:8mm, Matrix:96x256, FOV:28x34, flip angle:70°) ve T2 koronal (TR:2800, TE:100, Slice thickness:7mm, Matrix:128x256, FOV:28x34, flip angle:90°) sekansları ile incelemeler yapıldı.

4. X-Ray + MR Grubu: Bu gruptaki deneklere Picker-PQS marka spiral bilgisayarlı tomografi cihazı kullanılarak 120 kilovolt (Kv), 125 miliamper (mA) değerleri kullanılarak kesit kalınlıkları 3 mm , kesit intervalleri 3 mm alınarak toplam 30 aksiyal kesit alındı. Bu değerler ratın boyutlarına uygun inceleme parametreleri olup bu incelemede ratların aldığı doz ortalama 25 miligray (mGy) idi. Toshiba"Excelart" marka 1,5 Tesla gücünde manyetik rezonans cihazı kullanılarak abdomen incelemesi için uygulanan protokol uygulandı. T1 aksiyal (TR:190, TE:4, Slice thickness:8mm, Matrix:96x256, FOV:35x35, flip angle:90°), T2 aksiyal (TR:2800, TE:100, Slice thickness:7mm, Matrix:128x256, FOV:28x34, flip angle: 90°), STIR aksiyal (TR:6800, TE:80, TR:140, Slice thickness:7mm, Matrix:96x256, FOV:28x34, flip angle:70°), T1 koronal (TR:190, TE:4, Slice thickness:8mm, Matrix:96x256, FOV:28x34, flip angle:70°) ve T2 koronal (TR:2800, TE:100, Slice thickness:7mm, Matrix:128x256, FOV:28x34, flip angle:90°) sekansları ile incelemeler yapıldı (63-66).

3.4. Deney Analizi

Her deney grubundaki deneklerden X-Ray, MR, X-Ray + MR uygulamaları yapılan deneklerden ilk ikisi 48 saat, diğer üçüde 72 saat sonra servikal dislokasyon yolu ile öldürüldü.

Femur kemikleri çıkarıldı. Deri ve kas dokusu gazlı bez yardımı ile temizlendi.

I. Doğrudan Fırça Yayması Yöntemi ile Preparat Hazırlanması:

Kemiğin proksimal ucu ilik kanalı görülecek şekilde dikkatlice kesildi. Temizlenip etiketlenirilmiş lam üzerine kemik iliği ince uçlu bir fırça kullanılarak direkt fırça yayması yöntemiyle yayma yapıldı. Her lam için yayma işlemi yapılmadan fırça Hanks solüsyonu ile yıkandı. Bu yöntemle her denek için 15 adet preparat hazırlandı.

II. Kemik İliğinin Emilerek Çıkarılması Yöntemi ile Preparat Hazırlanması:

1ml'lik eppendorf tüpü içindeki Hanks' solüsyonundan insülin enjektörüne 0,2 ml solüsyon çekildi. Proksimal bölgeden kesilmiş olan kemik içine girildi. Kemik iliği enjektöre çekildi. Hazırlanan süspansiyon 10.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant atıldı. Pellet üzerine 1ml Carnoy fiksatif (Metanol + Glisial Asetik Asit 3:1) ilave edilip 10.000 rpm'de 1dakika tekrar santrifüj edildi. Aynı işlemler bir kez daha tekrarlandı. Elde edilen süspansiyon mikropipet kullanılarak önceden temizlenip etiketlenirilmiş lamaların nemlenmesi sağlanarak 45°'lik bir açı ile 20-25 cm mesafeden damlatılarak yayma işlemi yapıldı.

3.5. Preparatların Boyanması

Hazırlanan preparatlar laboratuvar koşullarında açık havada bir gün bekletildikten sonra boyama işlemine tabi tutuldu.

Preparatlar dikey olarak şalelerde boyandı. Fosfat tamponu kullanılarak hazırlanan Giemsa boya içinde 10 dakika bekletilerek boyandı. Distile su ile yıkandı. Preparatların arkası filtre kağıdı ile kurutuldu.

3.6. Preparatların Değerlendirilmesi

Kontrol ve deney grubundaki her preparat ışık mikroskobu (ZEISS Axioskop 2 plus) kullanılarak 100X immersiyon objektifinde (final büyütme:X1000) değerlendirildi. Değerlendirilen preparatların CCD kamera kullanılarak resimleri çekildi.

4. BULGULAR

Çalışmamızda, tekrarlı diagnostik amaçlı doğrudan grafi (X-Ray) ve manyetik rezonans (MR) incelemeleri yapılan hastalara eşdeğer doz uygulanan ratlarda uygulanan ilgili parametrelerin ne oranda genotoksik olabilecekleri mikronukleus analizleri ile ortaya konmuştur. Bu amaçla X-Ray ve MR yöntemleri ratlara ayrı ayrı ve birlikte değişik kombinasyonlar şeklinde uygulanmıştır. Uygulamalardan 3 gün ve 5 gün sonra ratlar servikal dislokasyon ile öldürülerek kemik iliği alınmıştır. Direk fırça yayması ve kemik iliğinin emilerek çıkarılması şeklinde iki farklı yöntem kullanılarak yayma preparatları hazırlanmış ve mikroskopta incelenmiştir. Şekil 1’de verilen grafikte ve Tablo 3’te yapılan inceleme sonunda tespit edilen normal ve anormal hücre sayıları verilmiştir.Yapılan değerlendirme sonucunda kontrol grubunda saptanan MN, AB, BN ve NB yapıları Şekil 2’deki grafikte gösterilmemektedir. Kontrol grubuna ait sağlıklı rat retikülosit hücreleri Şekil 3-4’te verilmektedir. X-ray uygulamasına maruz bırakılan deney grubunda tespit ettiğimiz MN, AB, BN ve NB yapıları Şekil 5’teki grafikte gösterilmektedir. X-ray uygulaması sonucunda rat kemikliliği retikülosit hücrelerinde oluşan MN’lar Şekil 6-9’da, NB, BN yapıları Şekil 10’da ve tespit edilen AB ise Şekil 11’de gösterilmektedir. X-ray uygulaması yapılan deney grubunda MN sıklığında önemli bir artış gözlenmektedir. Bu da bize X-ray’in genotoksik bir ajan olduğunu göstermektedir. MR uygulaması yapılan deney grubuna tespit ettiğimiz MN, AB, BN ve NB oluşumları Şekil 12’de verilen grafikte gösterilmektedir. MR uygulaması yapılan rat kemikliliği retikülosit hücrelerinde mitotik indeksin düşmesiyle birlikte tespit ettiğimiz MN’lar Şekil 13-15’te, NB, AB ve BN

oluşumları Şekil 16’da verilmiştir. X-ray ve MR’ın birlikte uygulandığı deney grubunda saptanan MN, AB, BN ve NB yapıları Şekil 17’de verilen grafikte gösterilmiştir. Tıbbi radyasyonun kombine olarak uygulandığı bu deney grubundaki rat kemikiliği retikülosit hücrelerinde tespit edilen MN yapıları Şekil 18,19’da, NB, BN ve AB yapıları Şekil 20’de gösterilmektedir. Bu deney grubunda bu oluşumlar dışında düşen mitotik indeksle birlikte nekrotik ve apoptotik hücreler tespit edilmiştir. Saptanan nekrotik ve apoptotik hücreler Şekil 21’de gösterilmektedir.

Elde ettiğimiz bu bulgular ışığında X-ray ,MR ve X-ray ve MR uygulamalarının rat kemikiliği retikülosit hücreleri üzerinde genotoksik ve sitotoksik bir etkiye sahip oldukları, genomik instabiliteye yol açtıkları saptanmıştır.

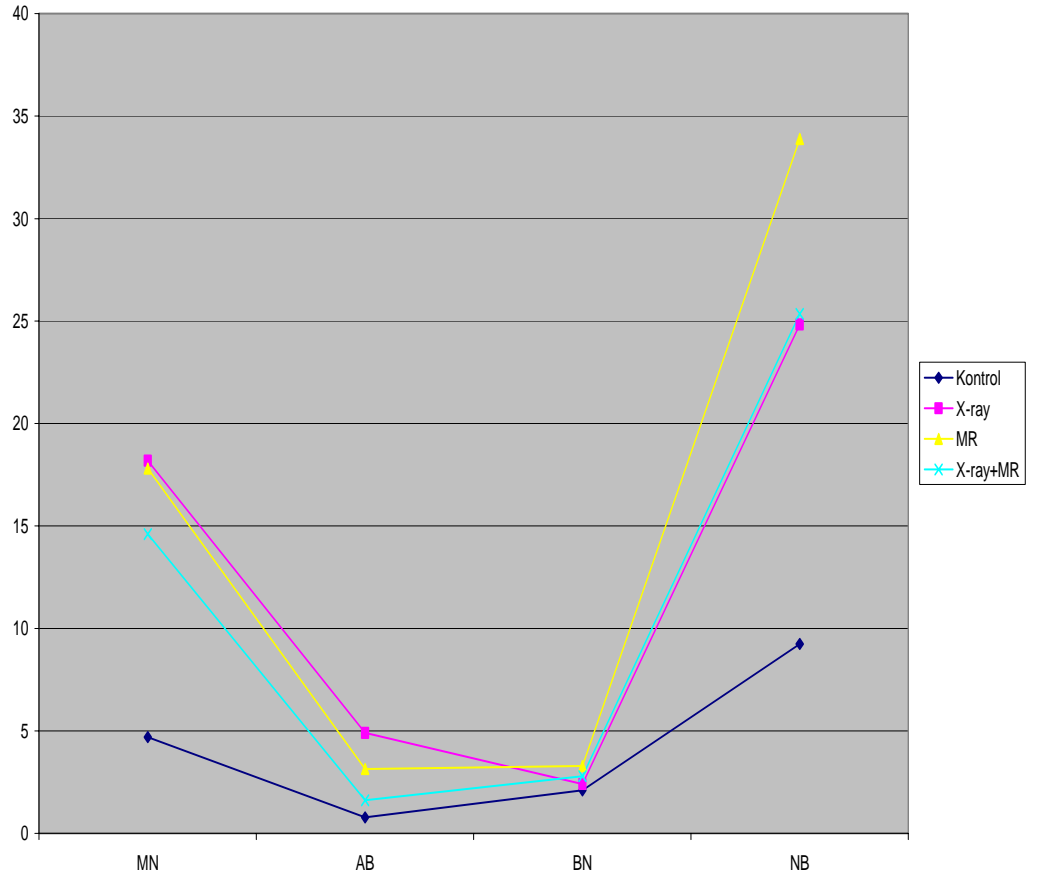
Tablo 3. Rat retikülosit hücreleri üzerinde tıbbi radyasyonun *in vivo* radyotoksitesitesi. Tablo bu çalışmada yer alan toplam retikülosit hücrelerden normal ve anormal yapıda tespit edilenler göstermektedir.

GRUPLAR	NORMAL	%	ANORMAL	%	TOTAL	%
KONTROL	20.975	98.3	366	1.7	21.341	100.0
GRUP I(X-ray)	22.457	93.3	1604	6.7	24.061	100.0
GRUP II(MR)	21.660	92.1	1848	7.9	23.508	100.0
GRUPIII(X-ray + MR)	19.587	93.0	1480	7.0	21.067	100.0

İstatistiksel Değerlendirme

Kontrol grubu ve deney grupları Kruskal-Wallis testi ile kendi aralarında değerlendirildi ve çift nükleuslu (BN) hücreler dışındaki tüm yapılar açısından gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulundu($p<0,05$).

Mann Whitney U testi kullanılarak deney grupları birbirileri ile ve kontrol grubu verileri ile karşılaştırılarak değerlendirildi.



Şekil 1. Kontrol grubu, X-ray, MR ve X-ray+MR uygulaması yapılan gruplara ait rat kemik iliği kök hücrelerinde saptanan normal ve anormal nükleer yapıdaki (Mikronükleus-MN, Anafaz köprüsü-AB, Çift nükleuslu hücre- BN Nükleer tomurcuk-NB,) hücre dağılımları.

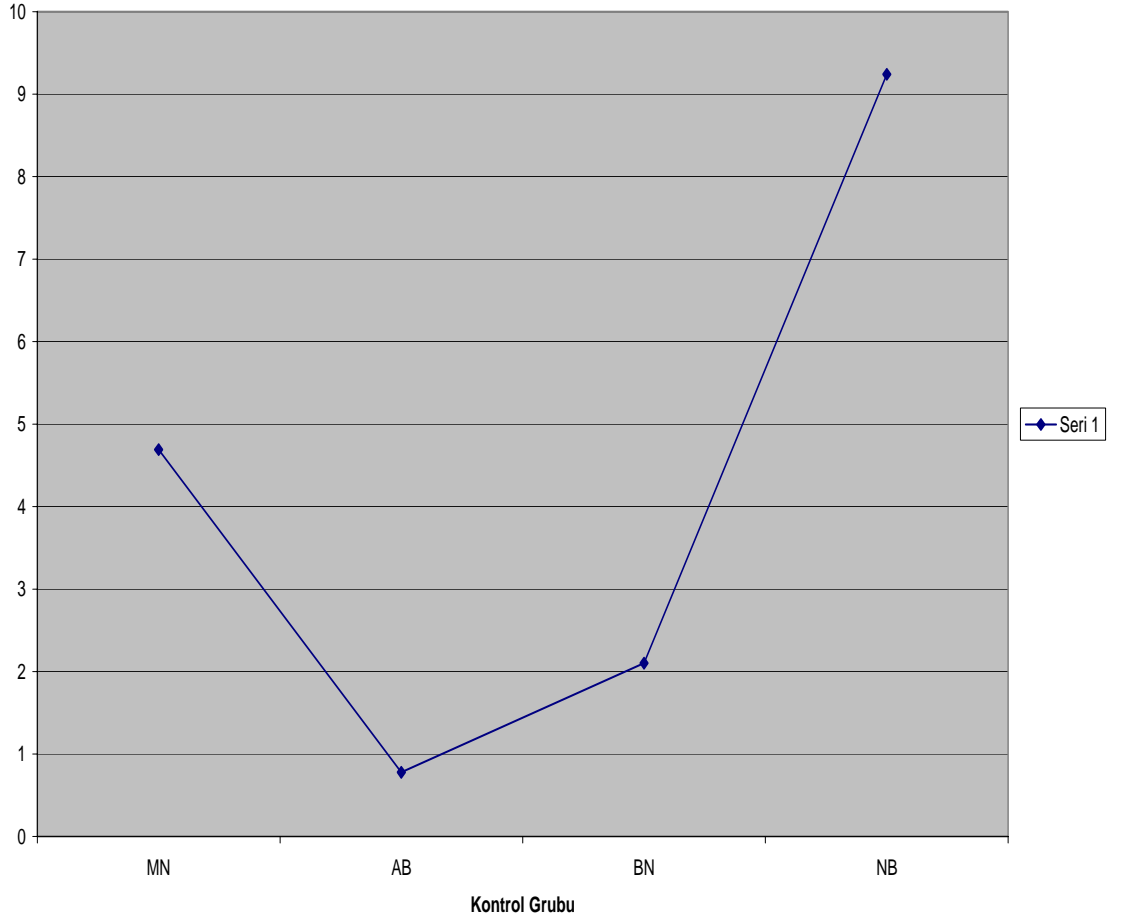
Kontrol grubu ve X-ray grubunun karşılaştırılması sonucunda MN, AB, NB açısından anlamlı, kontrol grubu ve MR grubunun karşılaştırılması sonucunda MN, AB, NB açısından anlamlı, kontrol grubu ve X-ray+MR grubunun karşılaştırılması sonucunda MN ve NB açısından anlamlı bir fark tespit edildi ($p<0,05$).

X-ray ,MR ve X-ray + MR uygulaması yapılan denet gruplarının birbirileri ile yağılan karşılaştırılmaları sonucunda anlamlı bir fark tespit edilemedi($p>0,05$). Kontrol ve deney gruplarında yapılan incelemede tespit edilen MONO, MN, AB, BN, MULT ve NB yapıları Tablo 4'te verilmiştir.

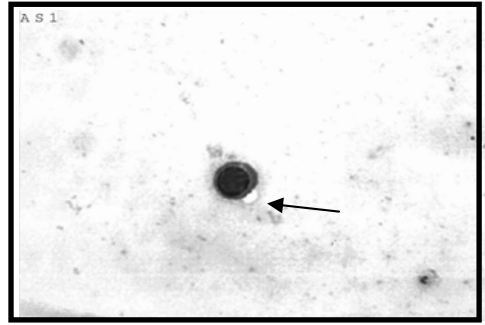
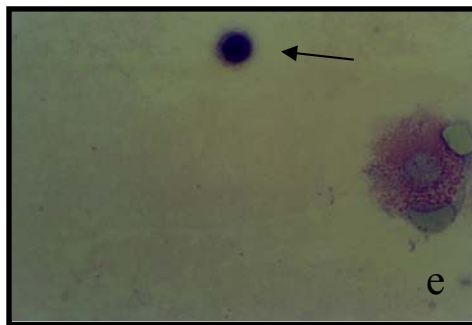
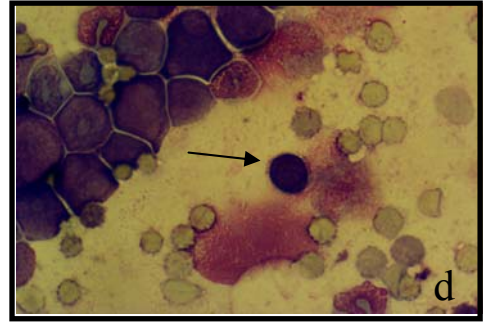
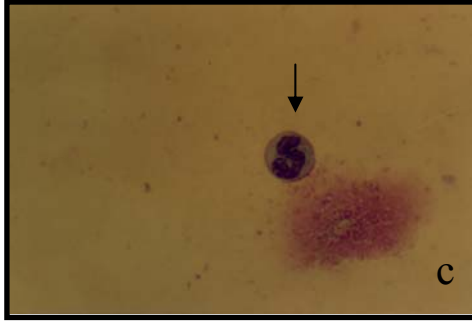
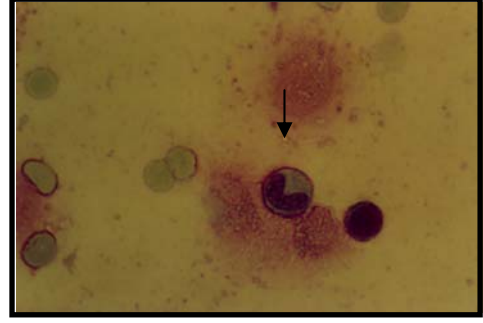
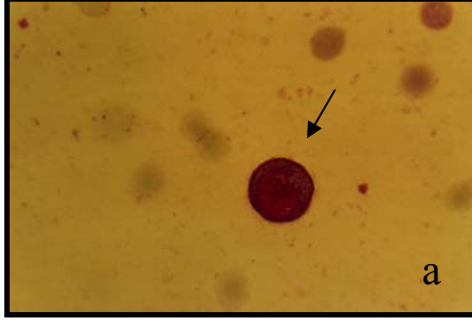
Tablo 4. Tabloda kontrol ve deney grubu hayvanlarının *in vivo* olarak tıbbi radyasyona maruz kalmasıyla tespit edilen farklı genomik istabiliteye sahip hücre tipleri ve sayıları gösterilmektedir.

MONO: Tek nükleuslu hücre normal yapı **AB:** Anafaz köprüsü **BN:** Çift nükleuslu hücre **MN:** Mikronükleus **NB:** Nükleer tomurcuk

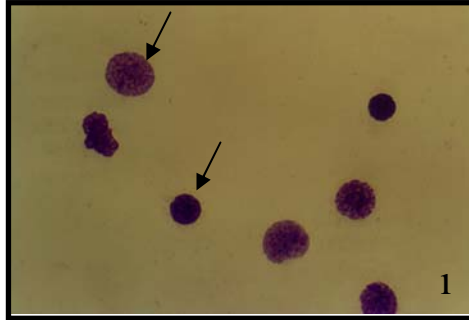
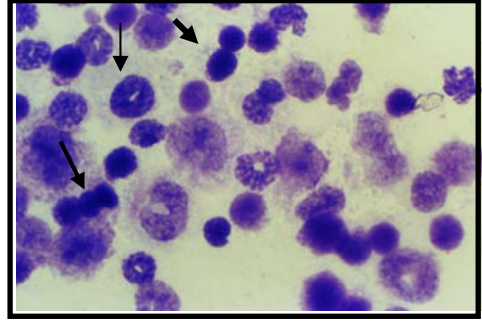
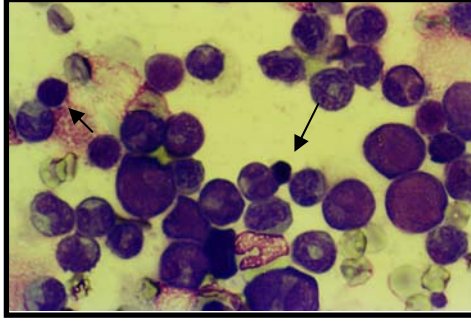
GRUPLAR	MONO	MN	AB	BN	MULT	NB	TOTAL
KONTROL	20.975	101	31	58	-	176	21.341
X-ray	22.457	578	156	77	5	788	24.061
MR	21.660	563	103	101	3	1078	23.508
X-ray+MR	19.587	488	53	104	1	834	21.067



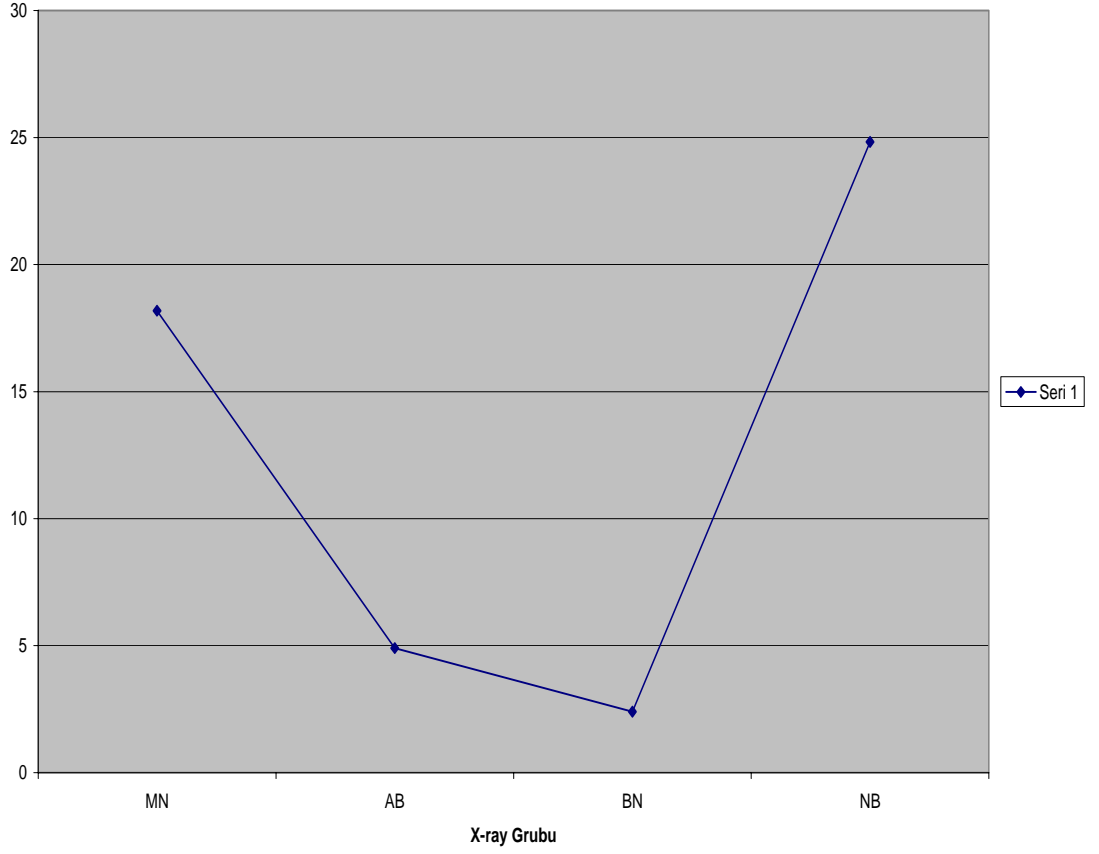
Şekil 2. Kontrol grubuna ait rat kemikiliği kök hücrelerinde saptanan normal ve anormal nükleer yapıdaki Anafaz köprüsü (AB), Mikronükleus (MN), Nükleer tomurcuk (NB), Çiftnükleuslu hücre(BN) hücre dağılımları.



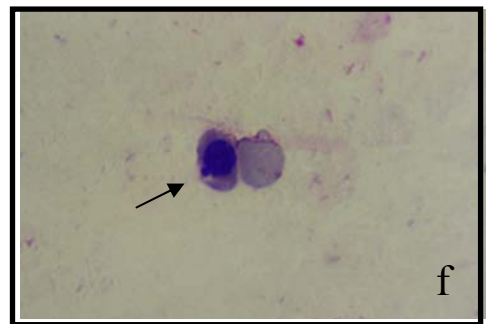
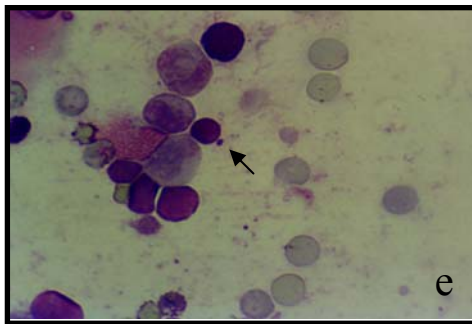
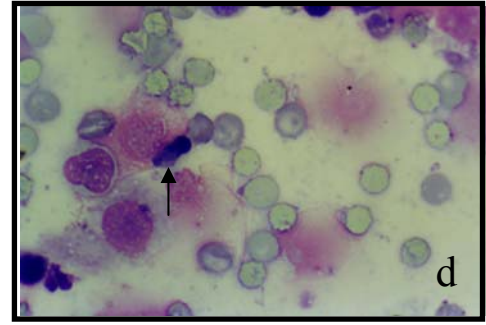
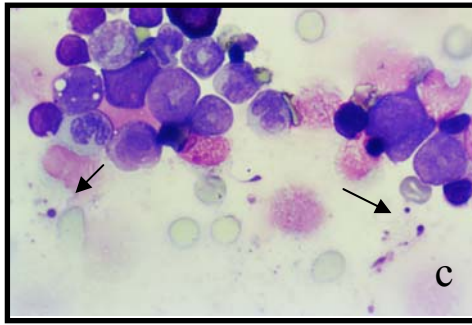
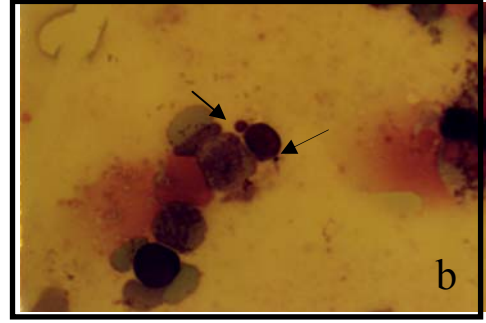
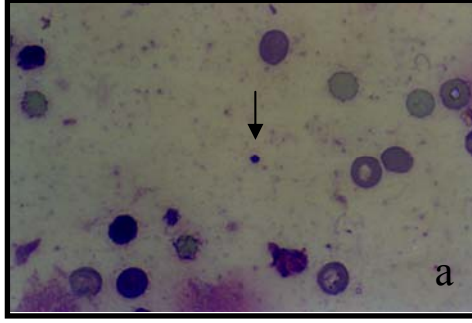
Şekil 3. X-ray ve MR'a maruz bırakılmayan kontrol grubu normal sağlıklı rat kemik iliği stem hücre profilleri. Normal mitotik indeks ve nükleer materyale sahip çeşitli hücre grupları → ile gösterilmiştir. a-d-e-f: Lenfosit, b: Eosinofil, c: Nötrofil. (X 100)



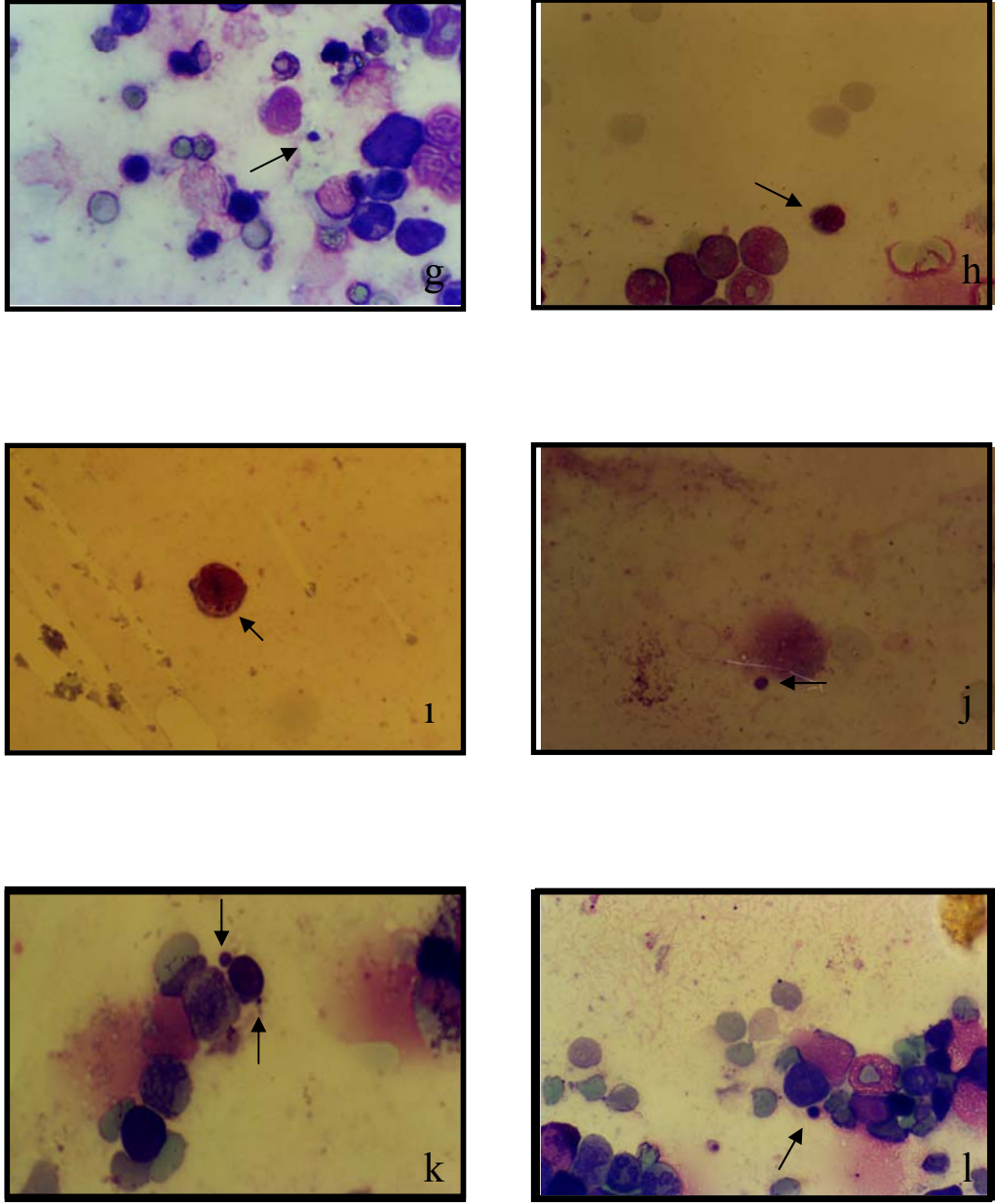
Şekil 4. X-ray ve MR'a maruz bırakılmayan kontrol grubu normal sağlıklı rat kemik iliği stem hücre profilleri. Normal mitotik indeks ve nükleer materyale sahip çeşitli hücre grupları → ile gösterilmiştir. g:Retikülosit, h:Retikülosit, Lenfosit ve Nötrofil, ı:Lenfosit ve Bazofil hücreleri gösterilmektedir.(X 100)



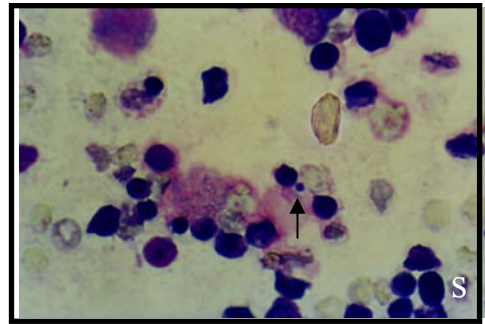
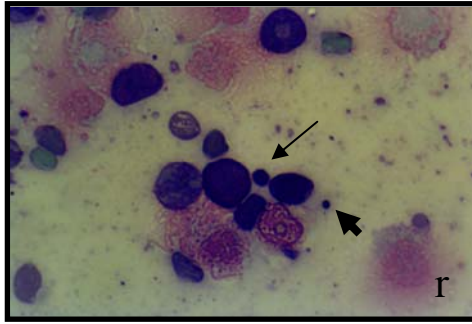
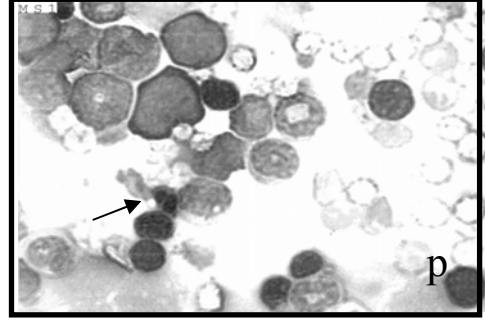
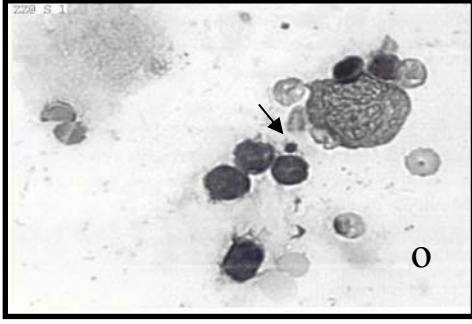
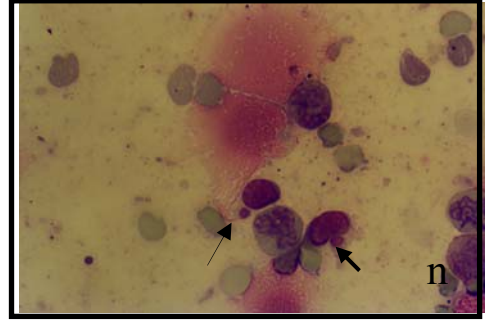
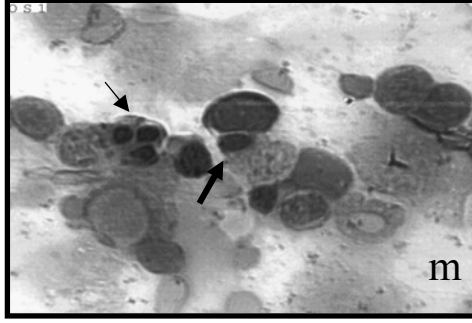
Şekil 5. X-Ray grubuna ait rat kemikiliği kök hücrelerinde saptanan normal ve anormal nükleer yapıdaki Anafaz köprüsü (AB), Mikronükleus (MN), Nükleer tomurcuk(NB), Çiftnükleuslu hücre (BN) hücre dağılımları.



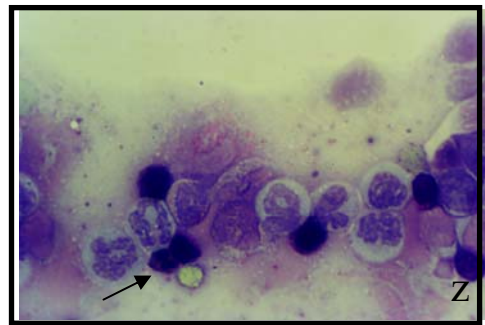
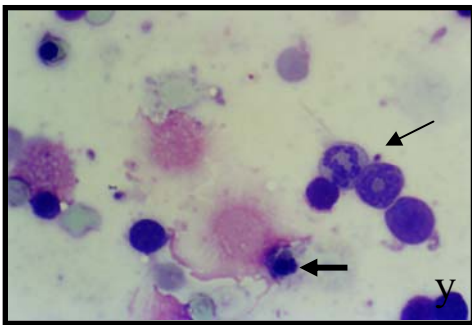
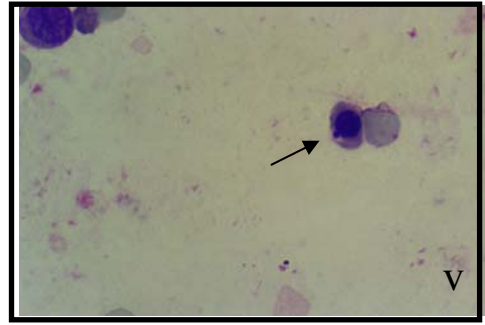
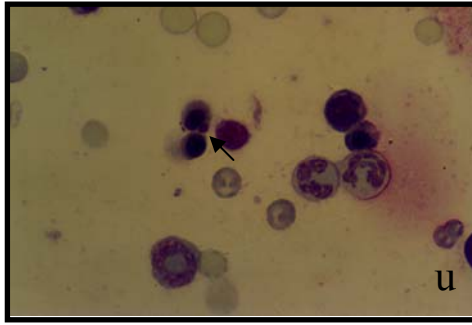
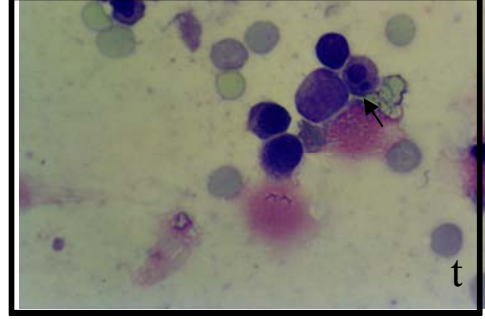
Şekil 6. X-ray uygulamasına maruz bırakılan deney grubu rat kemik iliği stem hücre profilleri. Normal mitotik indeks ve nükleer materyale sahip hücrelerle birlikte gözlenen MN'a sahip hücre grupları → ile gösterilmiştir. a-f:1/3-1/16 oranlarına sahip mikronükleusları. (X 100)



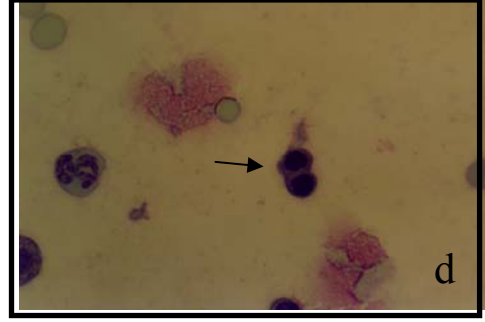
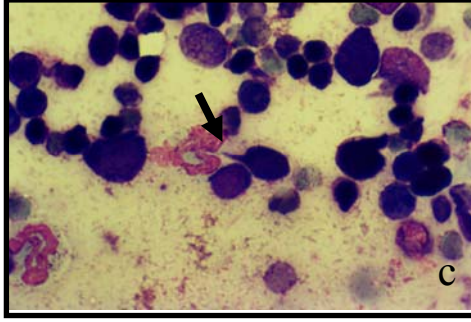
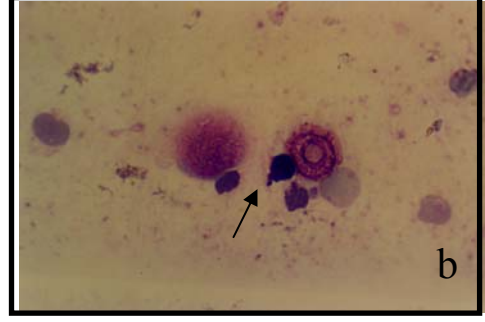
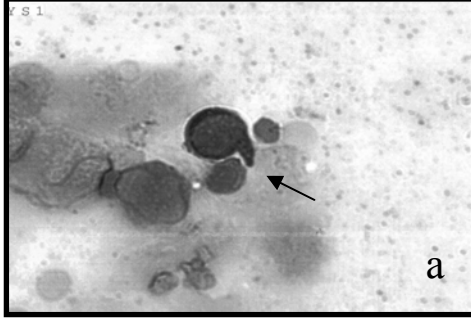
Şekil 7. X-ray uygulamasına maruz bırakılan deney grubu rat kemik iliği stem hücre profilleri. Normal mitotik indeks ve nükleer materyale sahip hücrelerle birlikte gözlenen MN'a sahip hücre grupları → ile gösterilmiştir. g, h, j, k, l:1/3-1/16 oranlarına sahip mikronükleuslar. i:Ana çekirdeğe bitişik durumda bulunan mikronükleus (CC MN).(X 100)



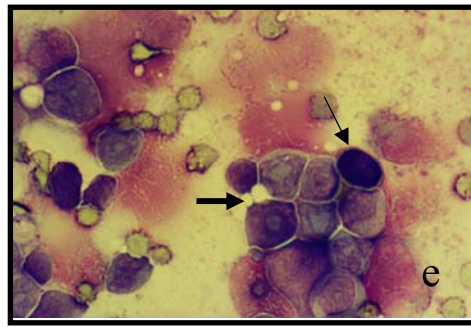
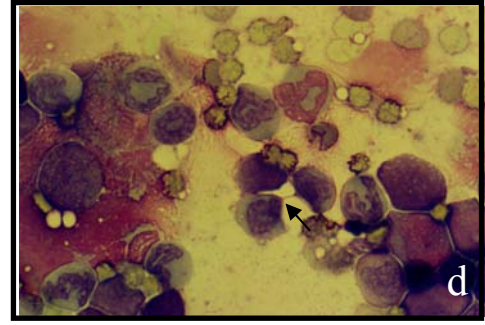
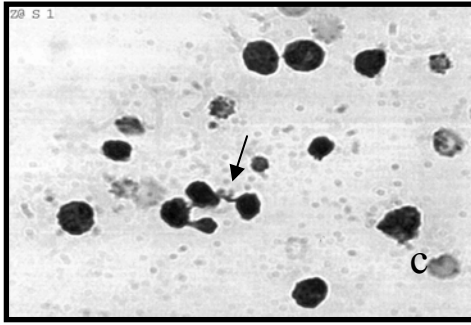
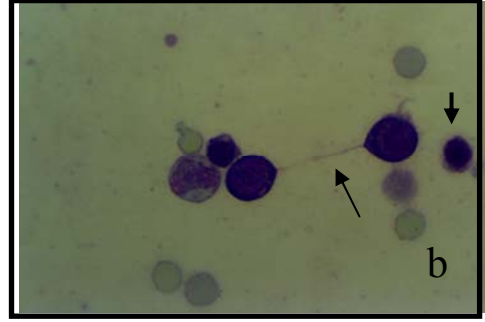
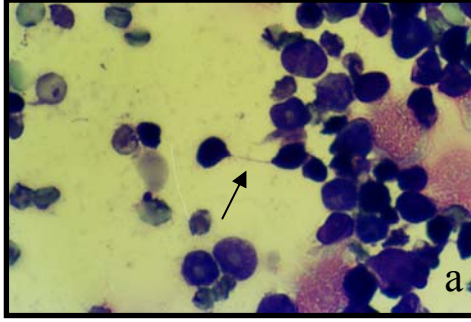
Şekil 8. X-ray uygulamasına maruz bırakılan deney grubu rat kemik iliği stem hücre profilleri. Normal mitotik indeks ve nüklear materyale sahip hücrelerle birlikte gözlenen MN'a sahip hücre grupları → ile gösterilmiştir. m:Çok nükleuslu hücre (MULT) ve 1/3 oranında MN. n, o:Ana çekirdeğe bitişik olmayan mikronükleuslar(NCC MN), p:1/3 oranında ana çekirdeğe bitişik olmayan mikronükleus. r:Sağlıklı retikülosit ve MN. s:Ana çekirdeğe bitişik olmayan mikronükleus (NCC MN).(X 100)



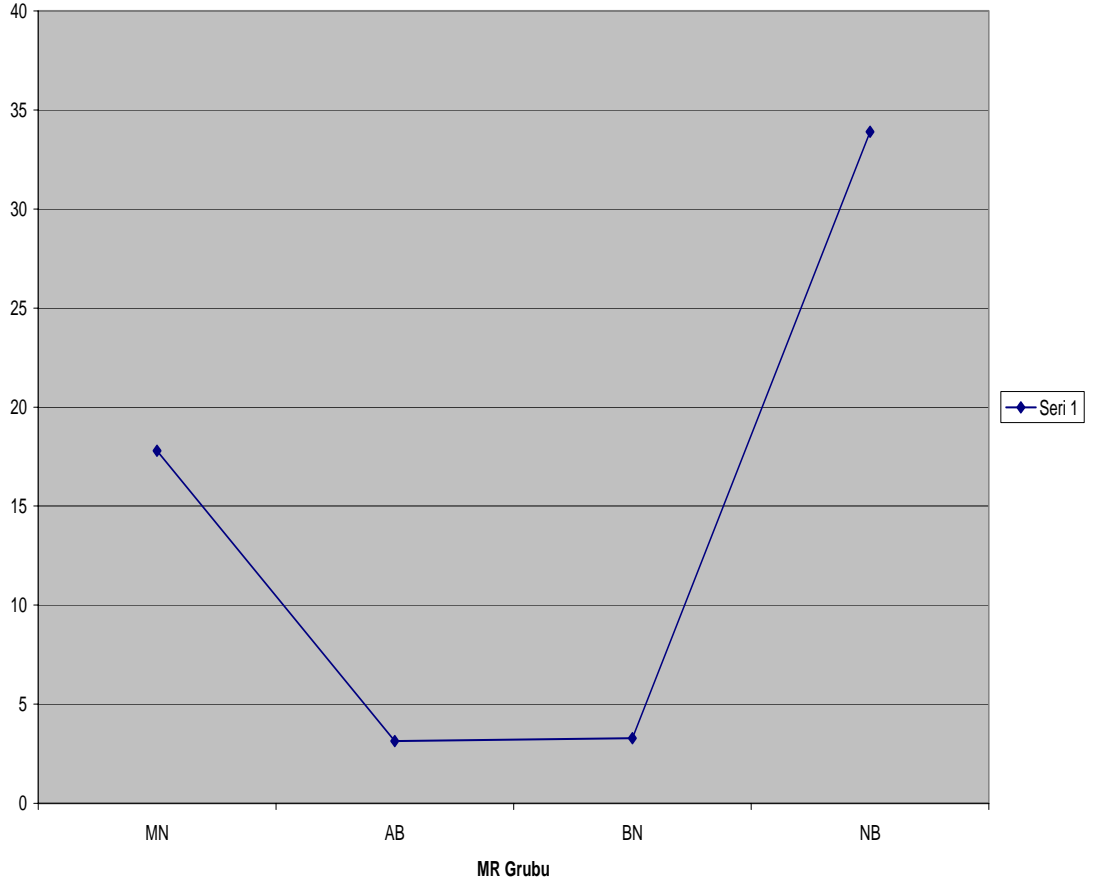
Şekil 9. X-ray uygulamasına maruz bırakılan deney grubu rat kemik iliği stem hücre profilleri. Normal mitotik indeks ve nüklear materyale sahip hücrelerle birlikte gözlenen MN'a sahip hücre grupları → ile gösterilmiştir. ş-v:Ana çekirdeğe bitişik olmayan mikronükleuslar (NCC MN). y , z :Ana çekirdeğe bitişik durumda çok nükleuslu mikronükleus (CC MULT MN). (X 100)



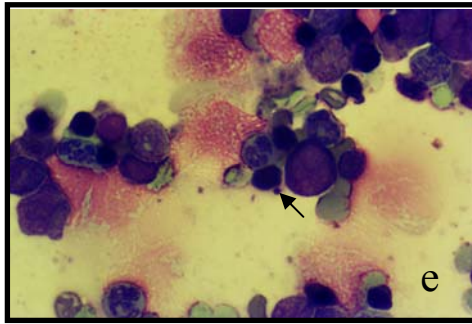
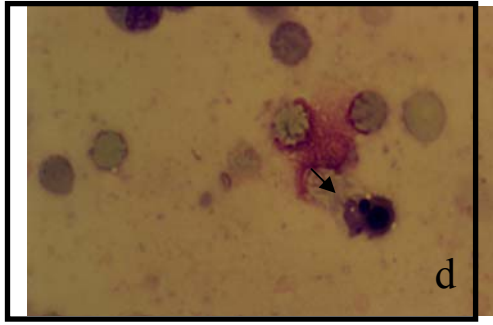
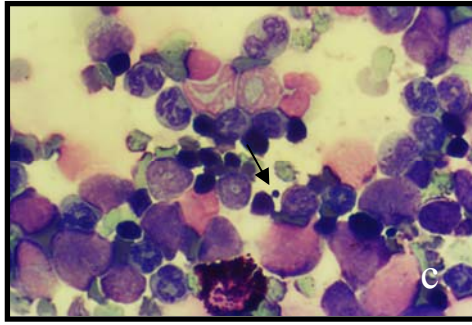
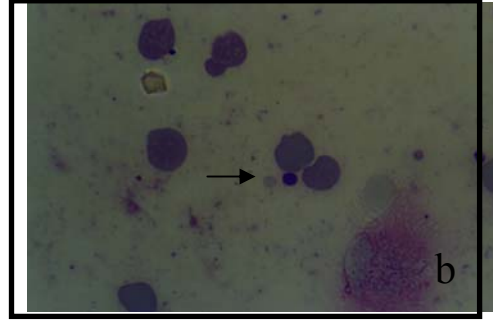
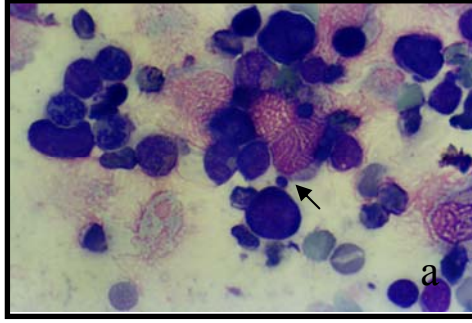
Şekil 10. X-ray uygulamasına maruz bırakılan deney grubu rat kemik iliği stem hücre profilleri. Normal mitotik indeks ve nükleer materyale sahip hücrelerle birlikte gözlenen NB(nükleer tomurcuk) ve BN(çift nükleuslu hücre)' ye sahip hücre grupları → ile gösterilmiştir.a-c:Nükleer tomurcuk (NB), d:Çift nükleuslu hücre (BN). (X 100)



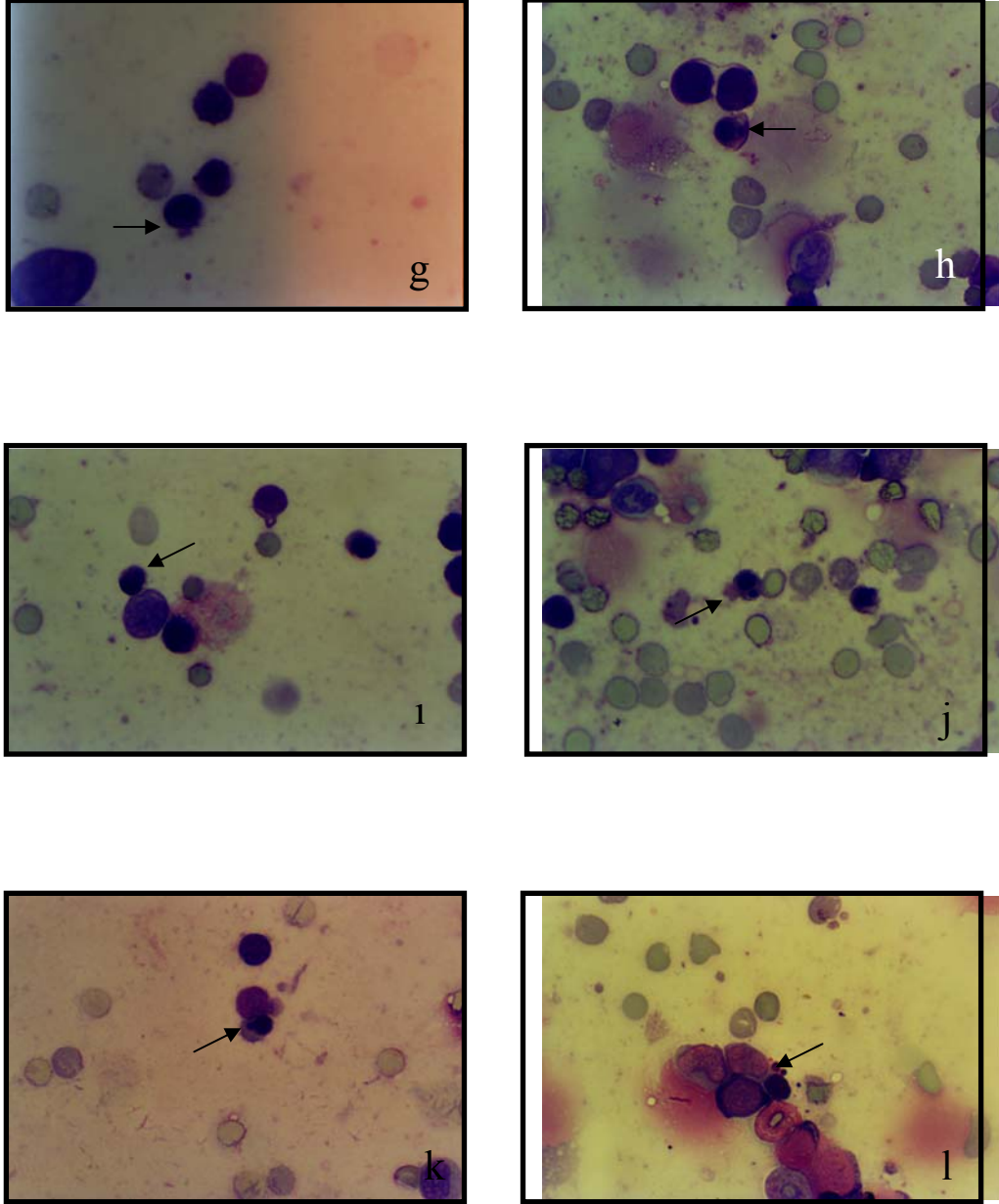
Şekil 11. X-ray uygulamasına maruz bırakılan deney grubu rat kemik iliği stem hücre profilleri. Normal mitotik indeks ve nükleer materyale sahip hücrelerle birlikte gözlenen AB(anafaz köprüsü)'ne sahip hücre grupları → ile gösterilmiştir. a-d:Anafaz köprüsü(AB), e:Anafaz köprüsü(AB), sağlıklı bir lenfosit.(X100)



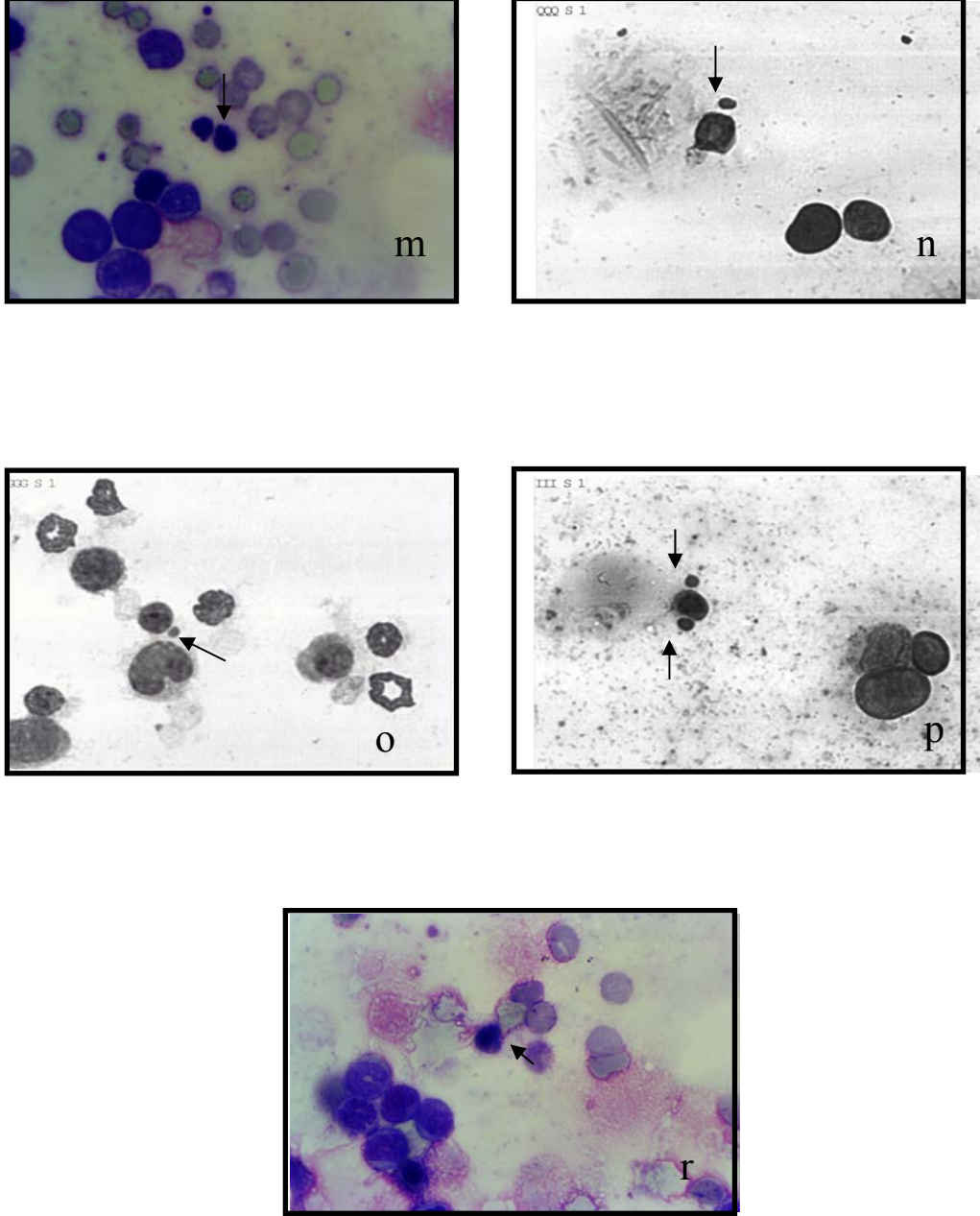
Şekil 12. MR grubuna ait rat kemikiliği kök hücrelerinde saptanan normal ve anormal nükleer yapıdaki Anafaz köprüsü (AB), Mikronükleus (MN), Nükleer tomurcuk(NB), Çiftnükleuslu hücre (BN) hücre dağılımları.



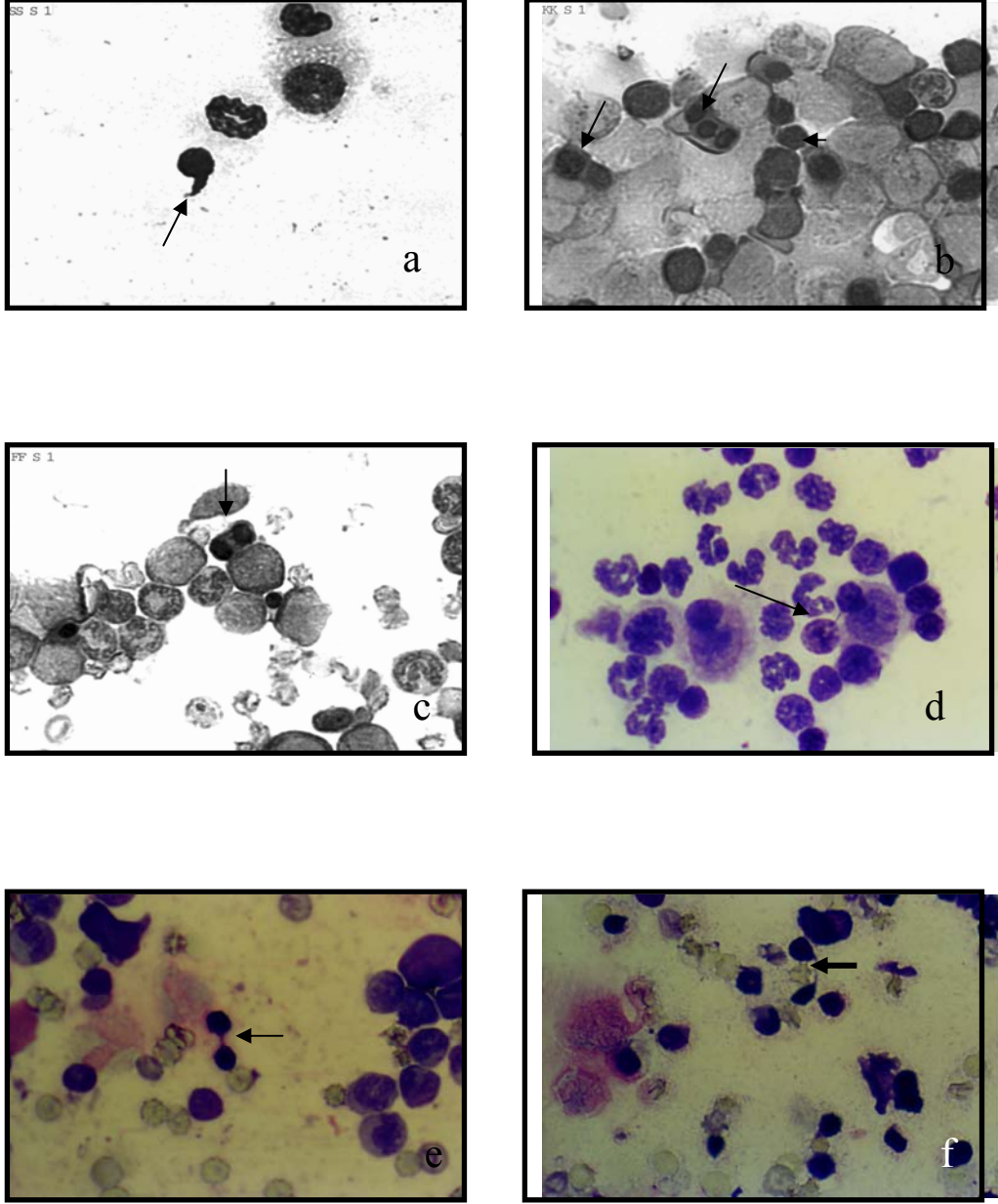
Şekil 13. MR uygulamasına maruz bırakılan deney grubu rat kemik iliği stem hücre profilleri. Normal mitotik indeks ve nükleer materyale sahip hücrelerle birlikte gözlenen MN'a sahip hücre grupları → ile gösterilmiştir. a-b-e-f:Ana çekirdeğe bitişik olmayan mikronükleuslar (NCC MN), c-d:Ana çekirdeğe bitişik durumda bulunan mikronükleuslar(CC MN).(X 100)



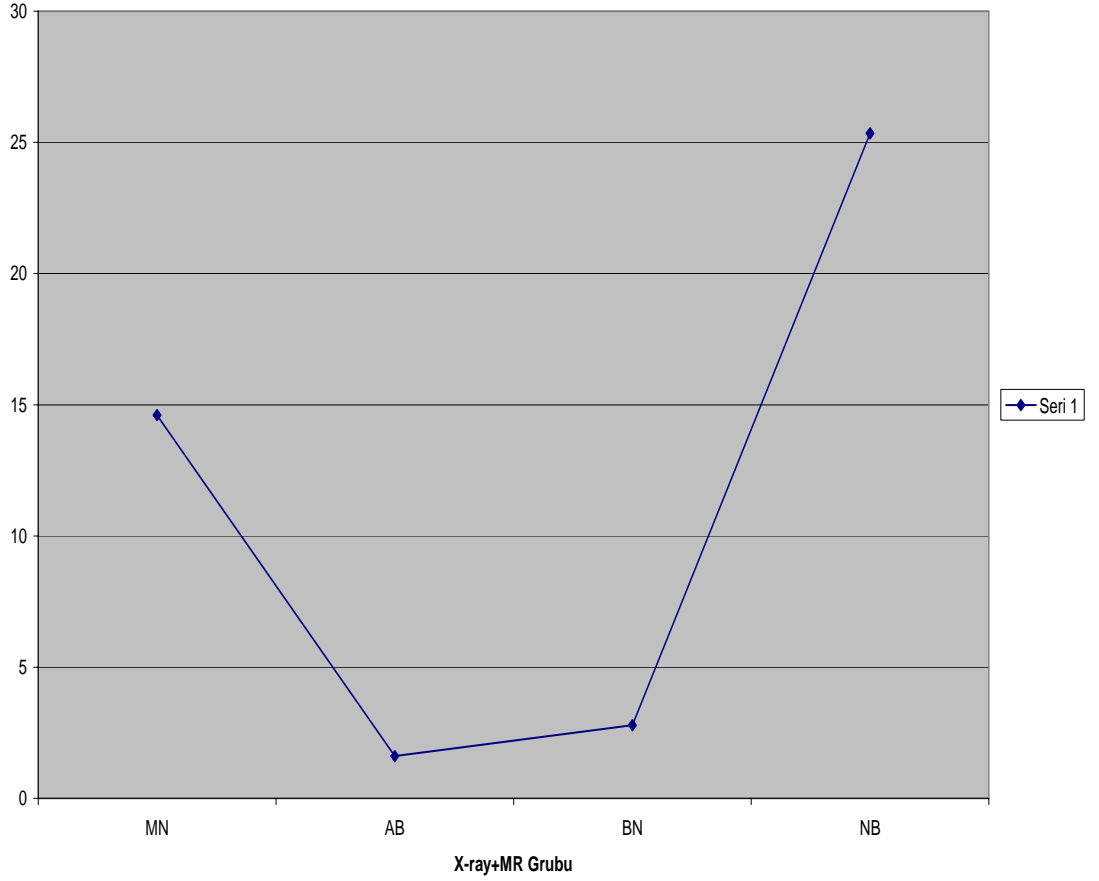
Şekil 14. MR uygulamasına maruz bırakılan deney grubu rat kemik iliği stem hücre profilleri. Normal mitotik indeks ve nüklear materyale sahip hücrelerle birlikte gözlenen MN'a sahip hücre grupları → ile gösterilmiştir. h-j:Ana çekirdeğe bitişik durumda olmayan mikronükleuslar (NCC MN), g-ı-k-l:Ana çekirdeğe bitişik durumda bulunan mikronükleuslar(CC MN).(X 100)



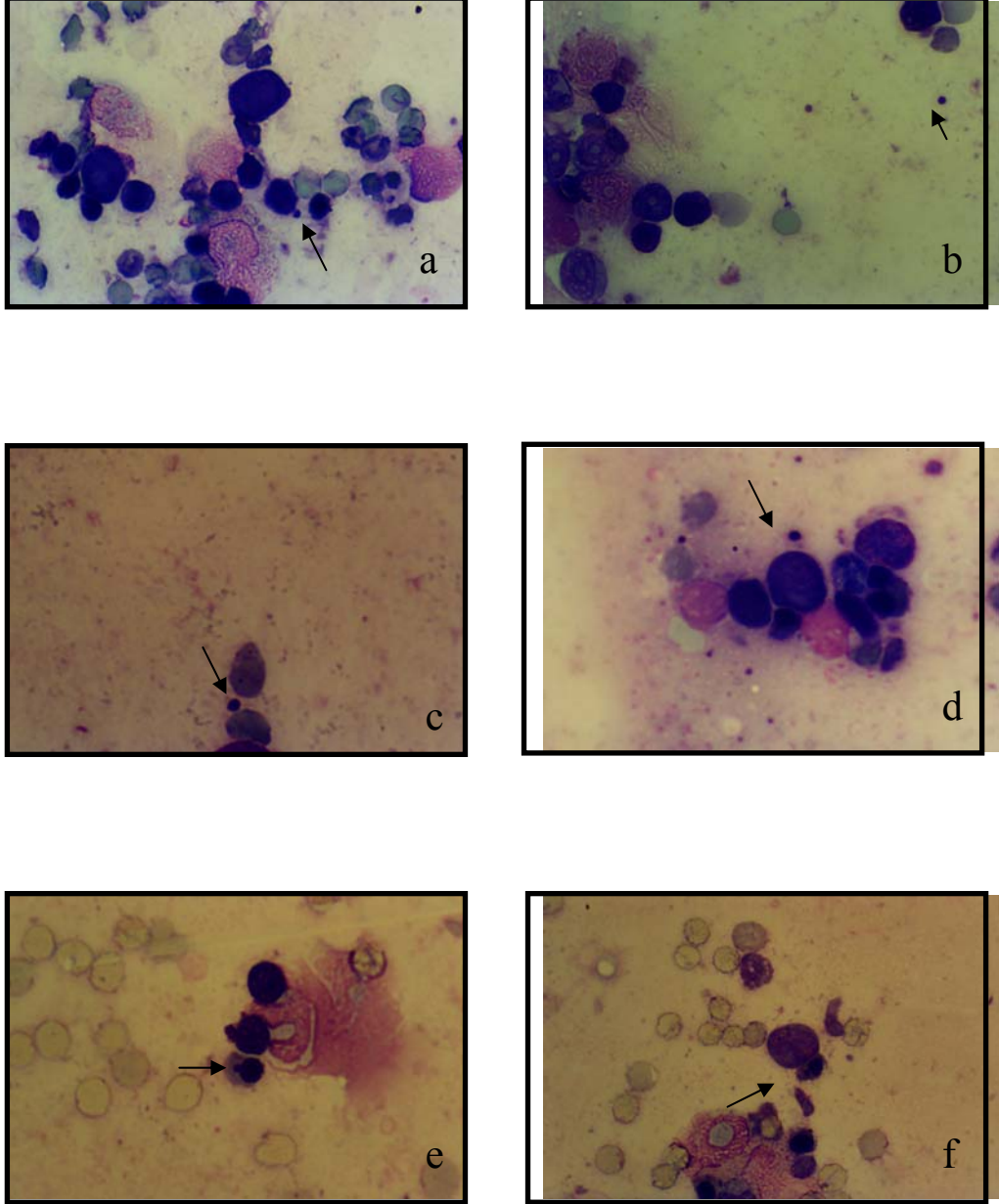
Şekil 15. MR uygulamasına maruz bırakılan deney grubu rat kemik iliği stem hücre profilleri. Normal mitotik indeks ve nükleer materyale sahip hücrelerle birlikte gözlenen MN'a sahip hücre grupları → ile gösterilmiştir. n-o-p:Ana çekirdeğe bitişik olmayan mikronükleuslar (NCC MN). m-r:Ana çekirdeğe bitişik durumda bulunan mikronükleuslar(CC MN).(X 100)



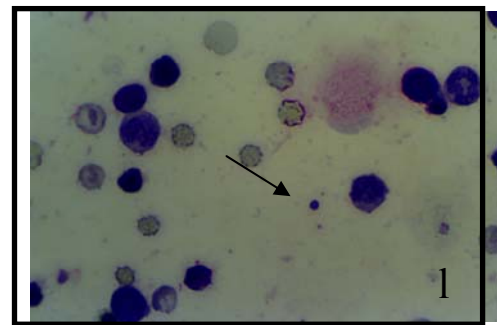
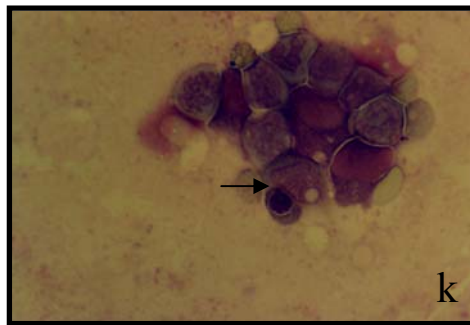
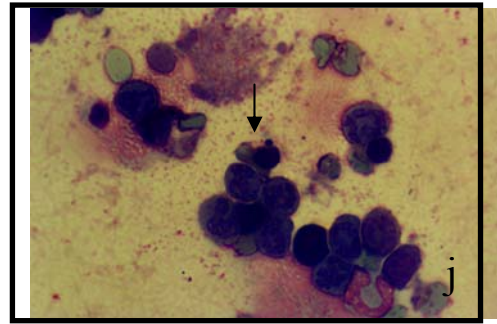
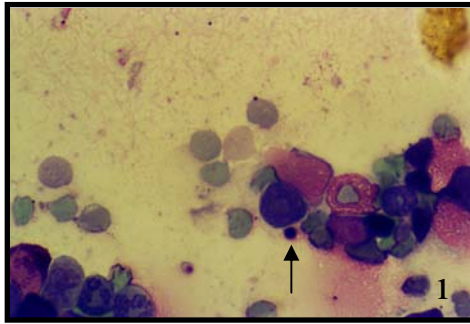
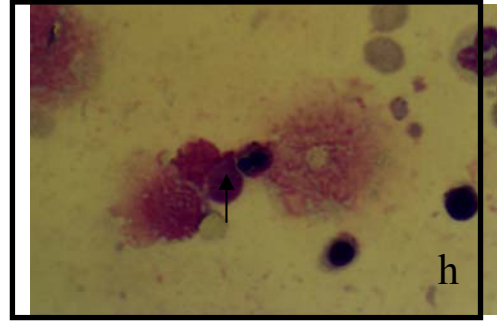
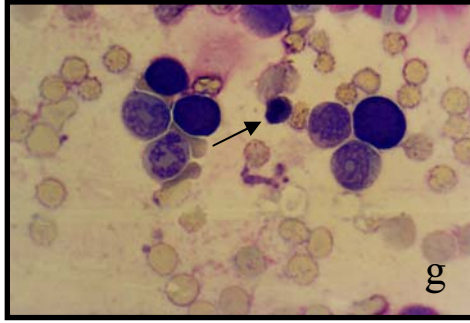
Şekil 16. MR uygulamasına maruz bırakılan deney grubu rat kemik iliği stem hücre profilleri. Normal mitotik indeks ve nükleer materyale sahip hücrelerle birlikte gözlenen NB(nüklear tomurcuk), BN(çift nükleuslu hücre) ve AB(anafaz köprüsü)'ye sahip hücre grupları → ile gösterilmiştir. a:Nüklear tomurcuk(NB), b:Çok nükleuslu hücre(MULT), c:Çift nükleuslu hücre(BN), d-e-f:Anafaz köprüsü(AB).(X 100)



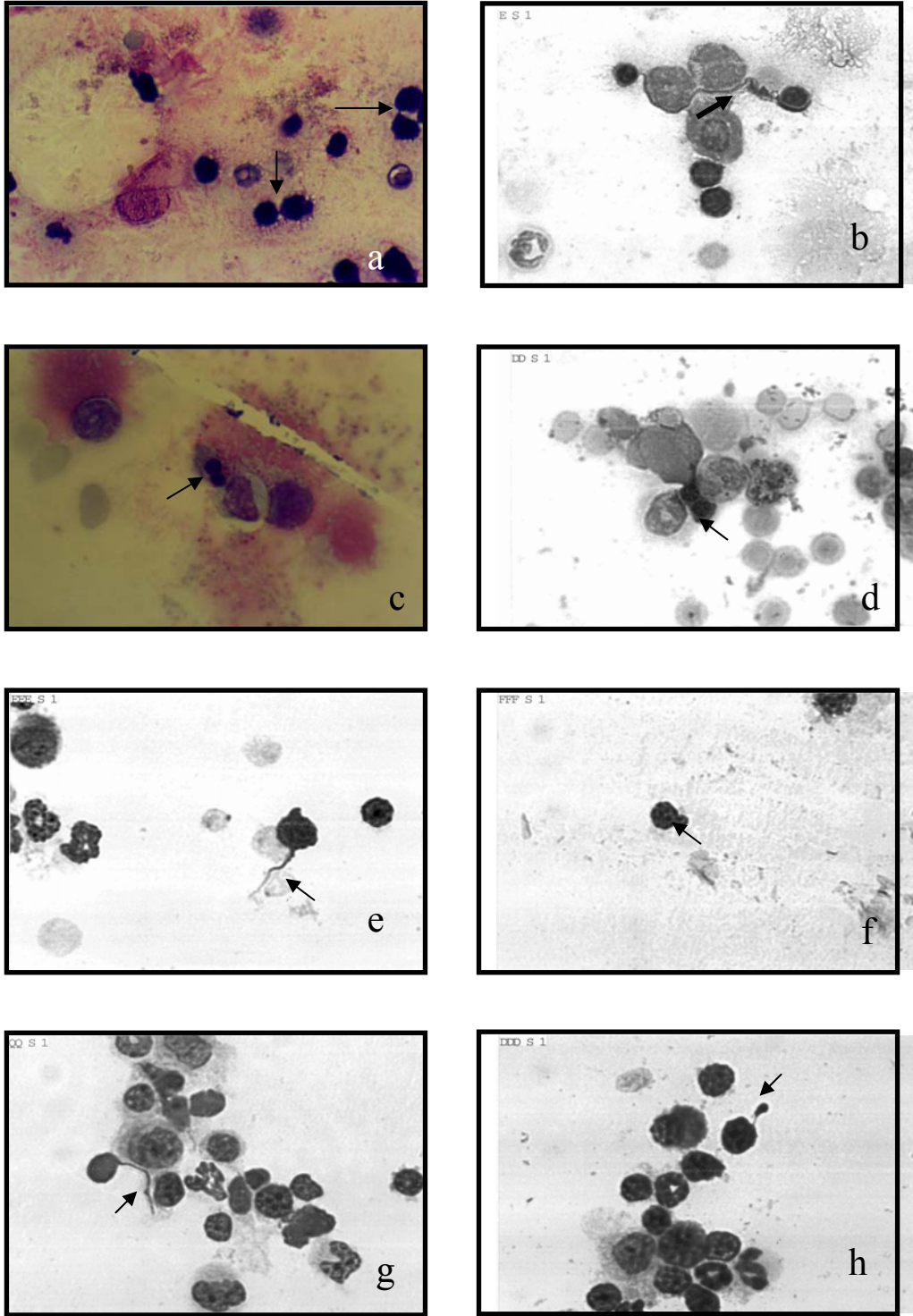
Şekil 17. X-Ray+MR grubuna ait rat kemikiliği kök hücrelerinde saptanan normal ve anormal nükleer yapıdaki Anafaz köprüsü (AB), Mikronükleus (MN), Nükleer tomurcuk (NB), Çiftnükleuslu hücre (BN) hücre dağılımları.



Şekil 18. X-ray ve MR uygulamasına maruz bırakılan deney grubu rat kemik iliği stem hücre profilleri. Normal mitotik indeks ve nükleer materyale sahip hücrelerle birlikte gözlenen MN sahip hücre grupları → ile gösterilmiştir.a-b-c-d :Ana çekirdeğe bitişik olmayan mikronükleuslar(NCC MN), e-f:Ana çekirdeğe bitişik durumda olan mikronükleuslar(CC MN).
(X 100)

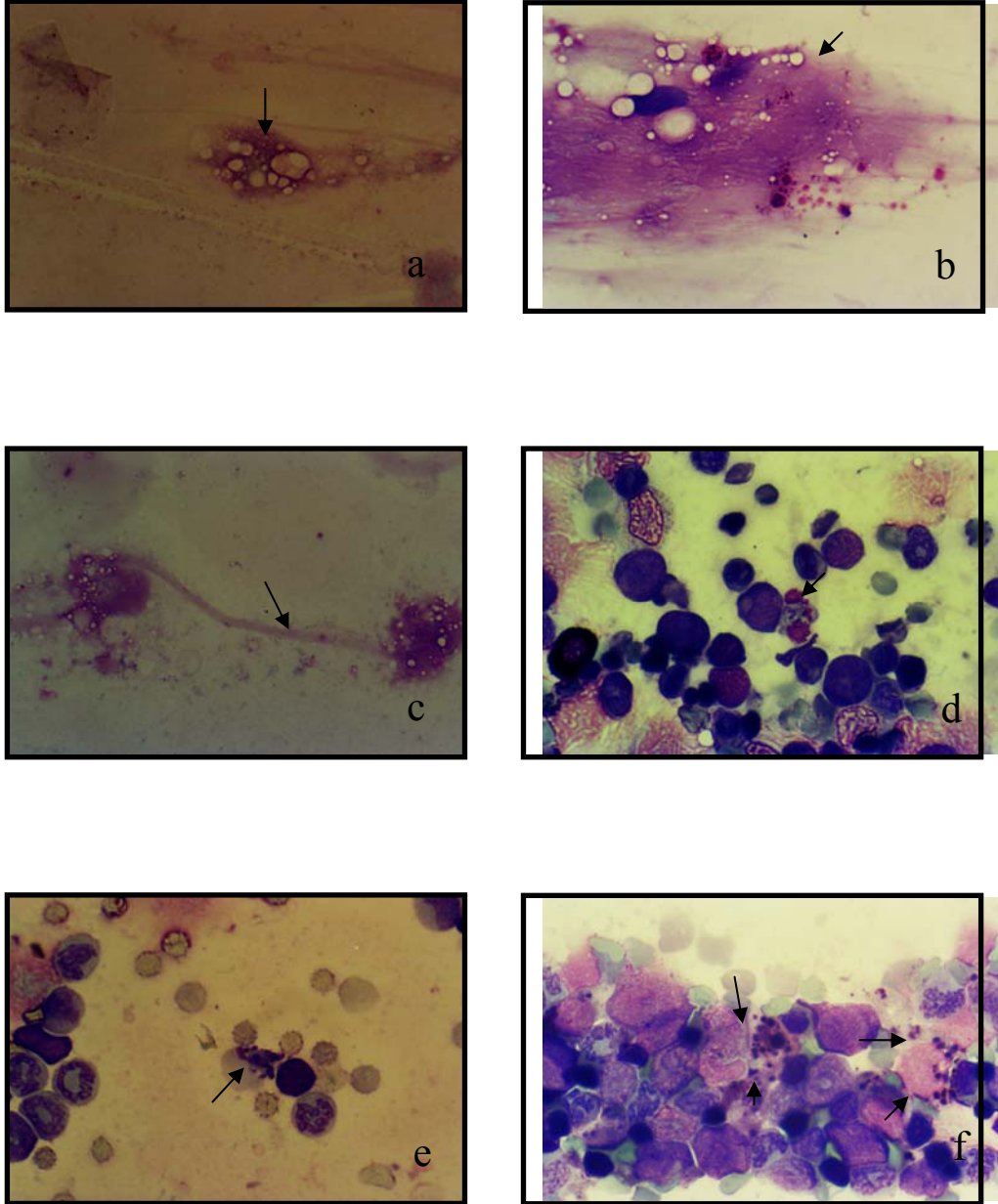


Şekil 19. X-ray ve MR uygulamasına maruz bırakılan deney grubu rat kemik iliği stem hücre profilleri. Normal mitotik indeks ve nükleer materyale sahip hücrelerle birlikte gözlenen MN sahip hücre grupları → ile gösterilmiştir. ı-j-l:Ana çekirdeğe bitişik durumda olmayan mikronükleuslar(NCC MN), g-h-k:Ana çekirdeğe bitişik durumda olan mikronükleuslar(CC MN).(X 100)



Şekil 20. X-ray veMR uygulamasına maruz bırakılan deney grubu rat kemik iliği stem hücre profilleri. Normal mitotik indeks ve nükleer materyale sahip hücrelerle birlikte gözlenen NB(nüklear tomurcuk), BN(çift nükleuslu hücre) ve AB(anafaz köprüsü)'ye sahip hücre grupları → ile

gösterilmiştir. a-b:Anafaz köprüsü(AB), c-d:Çift nükleuslu hücre(BN), e-f-g-h:Nüklear tomurcuk(NB).(X 100)



Şekil 21. X-ray veMR uygulamasına maruz bırakılan deney grubu rat kemik iliği stem hücre profilleri. Normal mitotik indeks ve nüklear materyale sahip hücrelerle birlikte gözlenen nekrotik ve apoptotik yapılar → ile gösterilmiştir.a-b:Nekrotik hücre, c:İki nekrotik hücre arasında meydana gelmiş olan anafaz köprüsü, d-e-f:Apoptotik hücre.(X 100)

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Ökaryotik hücre genomu kompleks olduğu kadar çeşitli fenomenlerin meydana geldiği bir potansiyele sahiptir. Normal biyolojik fonksiyonları yanı sıra bir patojeniteye maruz kaldığı, buna bağlı olarak hücre hücre genomunda mutasyona neden olduğu ve geri dönüşümü olmayan bir maceraya atılabilir.

Genomda ; kromozomal kırıklar, kromozomlar arası yeniden düzenlenmeler ve indüklenmiş DNA hasarları çeşitli kanser tiplerinin ortaya çıkmasına yol açan temel mekanizmalardır (25,26).

DNA/kromozomlarda hasar oluşturan çeşitli kanserojen, sitotoksik, anojenik ve genotoksik pek çok ajanın meydana getirdikleri hasarlar Fenech tarafından DNA'da hasar oluştuğunu gösteren biyomarkerlar olarak tespit edilmiştir. Bunlara birkaç örnek verecek olursak; DNA kırıkları, Kromozom aberasyonları, Mikronükleus, Anöploidi, Telomer kısalması, vs. Bizde çalışmamızda bu biyomarkerlardan biri olan mikronükleus artışını tespit etmeyi amaçladık (70).

Mikronükleus (MN) hücrenin mitoz bölünmesi esnasında ortaya çıkan ana çekirdek dışında oluşan tam bir kromozom veya asentrik kromozom fragmentlerinden köken alan nükleer orjinli yapılardır (15). MN analizi *in vivo* sistemlerde kimyasal ajanların ne oranda mutabl olduklarının araştırıldığı en önemli tekniklerin başında gelir (27,28,24). Bu teknik bölünme evresinden çıkan bir hücreye ait telofazdan hemen sonra yavru hücrelere ait ana nükleusun dışında aynı sitoplazmayı paylaşan ekstragenetik materyalin varlığı ile karakterize bir durumdur. MN analizi esasında fare kemikiliği dokusunda kromozom hasarının tespitine uygun olarak dizayn edilmiş bir tekniktir (29). Olası akut yada subkronik, toksikolojik ve farmakokinetik çalışmalarda bir çok araştırmacının başvurduğu önemli bir tekniktir. Fenech ve Morley tarafından geliştirilen sitokinezi-blok metodu tekniğin güvenilirliğinin artmasını sağlamıştır (61,62). Günümüzde eritrosit temelli mikronükleus çalışmaları bu amaçla yapılan araştırmaların en duyarlı olanıdır (30-37).

Bu nedenle DNA hasarı oluşturabilecek intrinsik ve extrinsik kaynaklı genotoksik ajanların (mutajenler, karsinojenler, toksik bileşenler) ilgili toksisitelerinin tespit edilebilmesi için duyarlı, güvenilir ve geçerli tekniklerin kullanılması çok önemlidir. İleri moleküler biyoloji ve genetik alanlarında, kimya ve farmakoloji alanlarında geliştirilen yeni teknikler ve farklı yaklaşımlar ile özellikle çevresel kaynaklı zararlı bileşenlerin analizinde önemli mesafe kat edilmiş durumdadır. Fakat sistem aynı zamanda yeni ve daha karmaşık bileşenlerin meydana gelmesine de yol açmaktadır. Biyolojik sistem gün geçtikçe bu yeni bileşenlerle karşılaşmakta ve bunların nükleer materyal üzerindeki etkileme hızları ve çeşitliliği gün geçtikçe artmaktadır. MN analizinin başında geldiği toksikolojik testlerde kişilerin bu ajanlara ne oranda maruz kaldıkları, genom üzerindeki etkileri güvenilir ve geçerli bir şekilde tespit edilmektedir.

Günümüzde bir ajanın genotoksik ajan olup olmadığını belirlediği belli başlı diğer teknikler ise kardeş kromatid değişimi (KKD), dozimetrik analiz teknikleri, FISH tekniğidir.

Bir çok araştırmacı MN analizi için çeşitli teknikler kullanmışlardır. Bunların başında flow sitometri, lenfosit hücre kültürü ve direkt kemik iliği hücre kültürleri gelmektedir. Boyama tekniklerinin başında ise Propidium, Acridin Orange, Giemsa, FISH, QuineAcridin, FITC, Fuelgen-Fast Gren gelmektedir.

Anöploidiyi uyaran ajanlar sentromer bölünme hatalarına ve iğ iplikçiklerinde fonksiyonel bozukluklara yol açmakta iken klastojenik ajanlar kromozom kırıkları oluşturmaktadırlar.

Çok iyi bilindiği gibi MN oluşumu bölünmekte olan bir hücrenin kimyasal genotoksikantlara ve radyasyona maruz kaldığı durumlarda kromozom kırılmaları (translokasyonlar, yeniden düzenlenmeler, disentrik aberasyonlar, makro delesyonlar) ve anoploidik oluşumlara bağlı olarak meydana gelen bir yapısal anomali şeklindedir. MN artışına neden olarak en iyi bilinen kimyasal ajan mitomisin C'dir. (39-42). X-ray ise klastojenik bir ajandır. Mitomisin C bir klastojen olmakla birlikte hücrede anoploidik bir etkiye sebep olması nedeni ile de anojenik bir ajan olarak kabul edilir (53). Bir çok alkali ajan hücrenin G1 ve S evresinde iken MN oluşumuna neden olurken tıbbi radyasyon (X-ray) G1,S evresi yanı sıra

G2 evresinde de MN oluşumuna sebep olmaktadır (43). Deneysel olarak Siklofosamid, Sitokalasin B, BrdU gibi çeşitli baz analogları, Sitotoksik ilaçlar ve Mitomisin C DNA hasarı yapan en yaygın kimyasal bileşenlerdir. Her iki ajanda radyoterapide kullanılırlar ve sitotoksitesi arttırıcı özelliğe sahiptirler.

Radyosensitivite ve kemosenitivite biyolojik sistemlerde hücre ve dokuların bölünür doku olup olmaması ve bulunduğu hücre siklusu ve basamağı çok önemlidir. Radyasyon bu açıdan bilinen en potansiyel mutajendir. İyonize radyasyon ise biyolojik sistemlerin en yaygın olarak maruz kaldıkları radyasyon tipidir (38). İyonize radyasyonun tüm tipleri yapısal değişimlere yol açmakta iken çok geniş etkileri olan kimyasal klastojenlerin birincil olarak sadece kromatid üzerinde etkileri bildirilmiştir (54). Uygulanan kimyasal mutajenler ve iyonize radyasyon kromozomlarda yapısal bir takım aberasyonlar oluşturmak ve bu yapısal aberasyonların pek çoğu ışık mikroskopunda tespit edilebilmektedir (55). Radyobiyojoloji ve genomdaki yeniden düzenlenmeler bu yapısal aberasyonların meydana gelmesine kaynak teşkil eder ve biyolojik dozimetri alanında pratik uygulamalarda ve klinik sitogenetikte kolaylıkla gözlenebilmektedir (56,57).

Undarmaa ve arkadaşlarının Ataxia Telangiectasia (AT) hastalarında mutant ATM geni üzerinde yaptıkları bir çalışmada gen bölgesinin sinyal transdüksiyonunda, hücre bölünmesindeki check pointlerde, DNA tamir mekanizmasında ve diğer DNA hasarlarına cevap oluşturulmasında sorumlu olduğunu bildirmişlerdir. Farelerdeki bu ATM gen bölgesi insan ATM gen bölgesiyle %91 oranında homoloji göstermektedir. AT hastalarında gelişim geriliği, nörolojik disfonksiyonlar, infertilite, T-hücrelerinde defektler ve iyonize radyasyona karşı aşırı duyarlılık gözlenmiştir. Yapılan çalışmada X-ray'a maruz bırakılan fare hücre kültürlerinden ATM^{-/-} fare fibroblastlarında FISH analiz tekniği kullanılarak ekstra telomer sinyalleri alınmıştır ve AT hastalarına ait fibroblast hücrelerindeki telomerik instabilite ile ilginç bir benzerlik tespit edilmiştir. Bu çalışmada radyasyonun kromozomlarda kırıklar oluşturduğu bu kırılmalar sonucunda kromozomlar arasında füzyon olduğu ve radyasyonun telomerik instabiliteyi bozduğu tespit edilmiştir (68).

Fenech ve Morley'in yaptığı bir takım çalışmalar sonucunda X-ray'in insan lenfositlerinde kromozomal hasar oluşturduğunu ve yaşlanmayı etkileyen genotoksik ajan olduğunu ileri sürmüşlerdir (61).

Yapılan bir başka çalışmada Chinese hamster over hücre kültürünün ultra viole ışına maruz bırakılması sonucunda hücrelerde artan mikronükleus ve çift nükleuslu hücre anomalileri tespit edilmiştir (70).

Bir çok araştırmacının sonuçlarına göre MN sıklığının radyasyon dozu ile doğru orantılı olarak arttığı bildirilmiştir (44,45,46). Radyasyon uygulamasından sonra oluşan MN'ların bir kısmı anafazda geri kalmaktan kaynaklanırken çoğu asimetrik yapısal bozukluklardan kaynaklandığı sanılmaktadır. Bu tip MN'lar kinetokora spesifik problemler kullanılarak FISH tekniği ile gösterilmişlerdir (58-60). Bir biyolojik sistemde radyasyon riskinden söz edebilmek için sistemin maruz kaldığı radyasyon dozunun çok iyi bilinmesi gerekir. Yüksek doz oranlarının varsayıldığı ortamlarda radyasyon doz hesaplamalarında önemli sayılabilecek spekülasyonlar söz konusudur. Bu noktada birçok araştırmacı farklı düşünmektedir.

Tıbbi radyasyonun hücrelerde MN oluşturma açısından bir eşik değeri vardır ve maruz kalınan doz miktarı, sıklığıda bu artışı etkilemektedir. Aynı şekilde radyasyonun kombine kullanımında oluşturacağı doz artışına bağlı olarak hücre üzerindeki MN artışına yol açmaktadır. Nitekim bizim çalışmamızda da MN açısından bu durum açıklıkla görülmektedir. Shin Ichiro-Masunaga ve arkadaşlarının solid tümörlerde yaptıkları bir çalışmada X-ray 4-25 Gy doz aralığında ışınladıkları rat grubu solid tümör dokusunda artmış apoptozis bildirmişlerdir (48). Bizim araştırmamızda da kombine tıbbi radyasyon ve güçlü manyetik alana maruz bırakılan grupta apoptozise bağlı hücre ölüm artışı saptanmıştır. Kombine olarak tıbbi radyasyon güçlü manyetik alana maruz bırakılan rat grubunda MN artışı yanı sıra apoptotik ve nekrotik hücre artışı gözlenmiştir (Şekil 21 d-e-f). Elde ettiğimiz bu sonuçlar kaynak bilgileriyle uyumluluk göstermektedir (48).

Joseph Roti Roti'nin çeşitli hücre parametrelerini değerlendirerek DNA hasarını saptadığı endojen radyasyona bağlı C3H 10T1-2 hücrelerinde (HeLa hücreleri) MN oluşumuna sebep olan minimum dozun 30cGy maksimum dozun

ise 40cGy olabileceği , DNA süpercoil yapısının hasar görmesine sebep olma minimum dozun 100cGy, maksimum dozun ise 500cGy olabileceği bildirmiştir (49). Araştırmamızda sabit 25mGy bir doz kullanılmıştır.

Suzuki ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada kimyasal bir ajan olan diethylnitrosamine (DEN) ile muamele edilen rat karaciğer hücrelerinde Acridine orange (AO) ve 4',6-diamidino-2phenylindole dihydrochloride (DAPI) boyama yöntemlerini kullanarak mikronükleus oluşumunu tespit edilmiştir (67).

Morales ve arkadaşlarının SCE tekniği kullanılarak yaptıkları bir başka çalışmada ise fare kemik iliği stem hücrelerinde gama ışınlarının SCE atışına neden olduğunu göstermişlerdir (47). Kasuba ve arkadaşlarının sitositatik ilaçlarla 20-31 yıl süre ile teması olan hemşireler üzerinde yaptığı bir in vivo araştırmada SCE artışında bir değişiklik tespit edilemezken ilacın MN frekansına artışa neden olduğu bildirilmiştir. Uzun süre ilaçlarla teması olan hemşirelerde kontrol grubuna oranla MN artışı saptanmıştır. SCE artışı olmadığı halde MN artışının olması mutagenez analizlerde MN analizinin SCE analizine oranla daha duyarlı bir teknik olduğunu göstermiştir (49,50).

Yoshioka ve arkadaşlarının yaptıkları bir araştırmada klastojenik ajan olan radyasyonun mitokondrial DNA'yı, ATP düzeyini ve MN oluşumu etkilediğini bildirmişlerdir (71).

Torous ve arkadaşları MN sıklığını iki farklı teknik kullanılarak (Flow sitometrik yöntem ve mikroskop) analiz etmişlerdir ve bu iki tekniğin birbiriyle uyumluluk sergilediği gösterilmiştir (51). Laboratuvarımızda daha önceden Erselcan ve arkadaşlarının tiroid kanserli hastalarda I¹³¹ tedavisi uygulanan kişilerde tedavi öncesi ve tedaviden 72 saat ve 6 ay sonra periferik kan alınıp lenfosit hücre kültürü yapılarak yapmış oldukları bir çalışmada sitotoksik ajanın SCE sıklığında artışa neden olduğu, 6ay sonrasında SCE sıklığının normale yakın oranda gerilediğini bildirilmişlerdir (52).

Bir çok laboratuvarında genotoksik ajanların değerlendirilmesinde çok farklı yöntemler kullanılmaktadır. Bunların başında da MN analiz yöntemi gelmektedir (3). Dünya HUMN Project standardizasyonuna göre en geçerli tekniğin MN analiz tekniği olduğu bildirilmiştir. Bizde çalışmamız da tıbbi radyasyon ve

manyetik rezonans kombine kullanımlarının yapıldığı rat kemik iliği stem hücrelerinde ajanlara bağlı oluşabilecek hücre morfolojilerini değerlendirmeyi amaçladık. Değerlendirme sonrasında her bir parametrenin gerek tek tek gerekse kombine etkilerine bağlı olarak MN artışına neden oldukları saptandı (Tablo 4). MN sıklığı artışı yanı sıra özellikle nükleer tomurcuk, anafaz köprüsü ve çift nükleuslu hücre yapılarının oluşumuna neden olduğu ortaya konuldu (Tablo 4). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında saptanan her bir parametrenin istatistiksel olarak önemli olduğu gözlemlendi. Bizim çalışmamızda MN artışının X-ray uygulaması yapılan grupta (Şekil 6-9), AB artışının yine X-ray uygulaması yapılan grupta (Şekil 11), BN artışı X-ray ve MR uygulamasının kombine olarak verildiği deney grubunda (Şekil 20 c-d) ve NB artışı ise MR uygulanan deney grubunda (Şekil 16 a) tespit edilmiştir. Ana çekirdeğe bitişik konumda bulunan mikronükleuslar en yüksek oranda X-ray ve MR uygulamasının kombine olarak verildiği deney grubunda (Şekil 18 a-b-c-d, Şekil 19 g-h-k) tespit edilmiştir.

Günümüzde radyasyonun çok yaygın olarak kullanılması iyonize radyasyonun gerek tanı amaçlı tıbbi radyasyon gerekse çevresel radyasyona bağlı olarak bir çok araştırmacı bütün biyolojik sistemlerin giderek artan bir risk altında olduğu tespit edilmiştir. Pek çok araştırmacı çalışmalarını bu alana kaydırmaktadırlar ve radyasyonun genotoksik etkisinin araştırıldığı en yaygın analiz teknikleri FISH, SCE ve MN analizleridir.

Fenech, mikronükleus testinin *in vitro* kemosensitivite analizlerinde çok geçerli bir analiz olduğunu ileri sürmüştür. Genotoksisite ve sitotoksisite için temel saydığı kromozom kayıpları, kromozom kırıkları ve yeniden düzenleme, hücre bölünmesi inhibisyonu, nekrosis ve apoptosis gibi morfolojik kriterler göz önüne alındığında MN analizinin çok geçerli olduğu ortaya çıkmıştır (72).

Bazı kimyasal ajanların tek başına ya da bir başka ajanla kombine olarak uygulanması durumunda hücre üzerindeki genotoksik etkisinin daha da artabileceği çok iyi bilinmektedir. Nitekim Lutz ve arkadaşlarının fare fibroblast hücrelerine üç farklı kimyasal kombine olarak uygulamaları sonucunda genotoksik etkilerin arttığı ve mitotik indeksin düştüğü gözlenmiştir, en ağır MN artışının üç ajanın kombine olarak uygulandığı grupta bulunmuştur (73).

Obe ve arkadaşları non-iyonize düşük doz elektromanyetik radyasyonun memeli somatik hücreleri üzerindeki sitotoksik etkiyi araştırmak için karşılaştırmalı SCE, MN ve diğer sitogenetik teknikler kullanarak yaptıkları bir çalışmada düşük dozda da olsa elektromanyetik radyasyonun sitotoksik olabileceği ve bunu ortaya koyabilmek için daha kontrollü araştırmaların yapılmasını önermişlerdir (74).

Popova ve arkadaşlarının yaptıkları bir başka çalışmada sitokinezi blok MN tekniği ile radyoaktif ¹³¹I uygulanan tiroid kanserli hastalarda, ajanın MN artışına sebep olduğu bildirilmiştir (75). Camps ve arkadaşları ise kanser hücrelerinde kromozomal instabiliteyi FISH ve sitokinesi blok MN tekniği ile ortaya koymuşlardır (76). Değişik doz paraquat uygulamaları yapılan ratlar kemik iliğinde MN artışı tespit edilmiş ve yüksek doz paraquatın genotoksik ve sitotoksik etkileri arttırdığı saptanmıştır (77). İnsan lenfosit hücre kültür ortamları izotiyosiyanat ve tiosiyanat'a maruz bırakıldığında ajanların hücreler üzerinde yüksek oranda genotoksik ve karsinojenik bir etkilerinin olduğu MN analiz tekniği ile ortaya konmuştur (78).

Anojenik ve klastojenik ajanlar MN ve apoptosis oluşumunda bilinen en iyi uyarıcılardır. Her iki ajanda bölünmekte olan hücrelerde direkt DNA kırıkları, asentrik fragment, kinetokor anomalileri, translokasyonlar, *in vivo* DNA amplifikasyonu (NB) ile karakterize genomik instabiliteye sebep olurlar.

Kawamura ve arkadaşları radyasyona maruz kalmış KK47 mesane kanserli hücrelerde artmış disentrik abersasyonlar ve sentromer duplikasyonları bildirmişlerdir. Bu hücre grubunda disentrik yapıların varlığı sentromerik DNA'nın hiperamplifikasyonu ile açıklanmıştır. Bizim çalışmamızda da Anafaz köprüsü (AB) oluşumları bununla bağdaştırılabilir. Hiperamplifikasyon sonucu karşı kutup orjinli iğ iplikleri sentromerlere bağlandığında sentromerler arası kromatin çekim gücü eşit olduğundan kromozom bölünmeye sağlıklı katılmayacaktır sitokinez ve karyokinezi takiben her iki hücre arasında varlığını koruyacaktır bu durum bir çok araştırmacı tarafından da AB olarak adlandırılmaktadır. Bizim araştırmamızda X-ray ve kombine ajanlara maruz bırakılan deney gruplarında AB artışı gözlemlendi. Bir çok araştırmacının da tespit

ettiği gibi radyasyonun sentromerik hiperamplifikasyonu ya da sentromerik duplikasyonu desteklediği görülmektedir (79).

Radyoloji ana bilimdalı çalışanları üzerinde yapılan çalışmada FISH ve MN testi retrospektif biyolojik dozimetreler olarak kabul edilmiştir. Bu da şu anlama gelmektedir ki; ilgili bölümde çalışan görevli kişilerin kazara radyasyona maruz kalmaları durumunda ne oranda radyasyona maruz kaldıkları ve bu dozun ne oranda genotoksik olduğunun anlaşılmasında başarıyla kullanılan testler olduğu ileri sürülmüştür (80).

Bu araştırmada tıbbi radyasyonun sitotoksik ve genotoksik etkisini direkt ortaya koyabilmek amacıyla pluripotent retikülosit hücrelerin *in situ* analizini tercih edilmiştir. Bizim çalışmamızın *in situ* olmasının nedeni doğrudan dokuda meydana gelen instabilitenin gözlemlenmesidir. Hücre kültürü yöntemi kullanılarak yapılan çalışmalarda kültürasyonun beraberinde getirdiği parametrelerinin giderilmesi gerektiğinden bizim yöntemimiz daha sağlıklı ve duyarlıdır. Bu tekniğin diğer *in vivo* / *in vitro* analizlerden geçerli olduğu olası bir nükleer anomalinin doku-hücre içindeki formasyonuna olanak sağlaması amacıyla tercih edilmesini önermekteyiz.

Sonuç olarak; tıbbi radyasyonun önemli bir genotoksik ve sitotoksik ajan olduğu, birden fazla kimyasal ve fiziksel ajan ile birlikte kullanılmasının genotoksitenin daha da ağır olacağını göstermektedir. Biyolojik sistem üzerindeki bu genotoksikite etkisinin geri dönüşümsüz ve önemli patolojik etkilerinin olabileceği düşünülmelidir. Bu amaçla ilaç tedavisi gören hastalarda kullanılan ilaçların hücre ve dokuların radyasyona olan duyarlılığının artmasına neden olabileceği göz önünde bulundurularak direkt grafi istenirken ve bu duruma dikkat edilmesinin önemi öne çıkmaktadır.

In situ rat model sistemi ile tıbbi radyasyonun genotoksik etkilerinin ortaya konduğu bu araştırma sonucunda X-ray ve MR'ın ayrı ayrı ve kombine olarak uygulanmasına bağlı olarak pluripotent non-diferensiyel retikülosit hücreleri üzerinde genel olarak iki şekilde genotoksik oldukları ortaya konmuştur. Bunlardan bir tanesi hücrenin bölünme potansiyelini zaafa uğratmak özellikle MR'a maruz bırakılan deney grubu rat retikülosit hücrelerinde NB artışı ve düşük

mitotik indeks bu durumu açıklıkla ortaya koymaktadır (Şekil 13-16), (Tablo 4). Diğer yandan MR'ın hücre potansiyelini zaafa uğratan bir genotoksik ajan olup olmadığının tespiti için daha ileri ve kontrollü araştırmaların yapılması gerekmektedir. X-ray'ın tek başına ve MR ile birlikte kombine uygulanmasının ise genomda yapısal anomalilere neden olarak genotoksik oldukları ortaya konmuştur.

X-ray'ın bir genotoksik ajan olduğu ve kombine olarak bir başka fiziksel ya da kimyasa ajanla birlikte kullanılması durumunda ajanın genotoksik etkisi artmaktadır (Şekil 6-11), (Tablo 4). Bu bilgiler ışığında X-ray'ın diğer kimyasal ajanlarla kombine olarak kullanılmasının daha sakıncalı olduğu ve özellikle ilaç kullanan hastaların direkt grafi için ya da başka bir sebeple iyonize radyasyona maruz kalmalarının bu sakıncalı durumu daha da arttırabileceği düşünülmüştür.

Sonuç olarak ;

Çalışmamızda tıbbi radyasyon ve manyetik alan veher iki parametreye birden maruz bırakılan (X-ray, MR, X-ray + MR) rat pluripotent kemik iliği stem hücreleri alanı genotoksisite ve mutabilite açısından değerlendirildi.

- 1.Tüm deney gruplarında MN, AB, BN ve NB yapıları,
- 2.MN ve AB sıklığının X-ray uygulaması yapılan deney grubunda diğer deney gruplarına oranla daha yüksek olduğu,
- 3.BN sıklığının X-ray + MR uygulaması yapılan deney grubunda diğer deney gruplarına oranla daha yüksek olduğu,
4. NB sıklığının ise MR uygulaması yapılan deney grubunda diğer deney gruplarına oranla daha yüksek olduğu saptanmıştır.
- 5.Ayrıca X-ray + MR uygulaması yapılan deney grubunda bu yapılar dışında nekrotik ve apopitotik hücreler de tespit edilmiştir.

Sonuç olarak tıbbi radyasyon ve güçlü manyetik alana maruz bırakılan deney grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldıklarında ortaya hücre aberasyonları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğu saptandı. Tıbbi radyasyon ile birlikte güçlü manyetik alanın genom üzerinde önemli bir genotoksik etkisinin olduğu kombine tıbbi radyasyonun genom üzerindeki bu olumsuz ve ağır etkisinin ortaya konması için farklı doz ve gruplamaların karşılaştırılabildiği ileri araştırmaların yapılması gerektiği kanısına varılmıştır.

6. ÖZET

Günümüzde tıbbi radyasyonun kullanımı teknolojiye paralel olarak geniş bir çeşitlilikte artmaktadır. X-ray'ın ağır bir mutajen olduğu bilinmekle birlikte diagnostik amaçlı kullanılan X-ray ve MR'ın ne oranda genotoksik oldukları hakkında önemli spekülasyonlar mevcuttur. Bu amaçla rat model sistemi oluşturularak retikülosit hücrelerde X-ray, MR, X-ray ve MR'ın kombine olarak uygulanması sonucu olası *In situ* hücre anomalileri saptandı.

Rat model sistemine tıbbi radyasyon uygulamasından 72 saat sonra ratlar servikal dislokasyon yolu ile öldürülerek kemik iliklerinden direk fırça yayması tekniği ve kemik iliği emilmesi yöntemi ile preparatlar hazırlandı. Hazırlanan preparatlar uygun laboratuvar koşullarında bir gün bekletildikten sonra boyama işlemi yapıp ışık mikroskopunda değerlendirildi. Kontrol grubu ve deney grupları Kruskal-Wallis testi ve Mann Whitney U testi kullanılarak karşılaştırıldı.

Yapılan değerlendirme sonucunda tüm deney gruplarında MN sıklığında artış tespit edildi. X-ray uygulanan deney grubunda MN sıklığının %1,93 ve AB sıklığında %0,5 oranında arttığı, MR uygulaması yapılan deney grubunda NB sıklığının %3,76 oranında ve X-ray ve MR uygulamasının birlikte verildiği deney grubunda BN sıklığında %0,22 oranında arttığı tespit edildi. Elde edilen bu veriler istatistiksel olarakta önemli bulunmuştur ($p < 0.05$). Tıbbi radyasyon ve güçlü manyetik alan uygulamasının birlikte verildiği deney grubunda ayrıca nekrotik ve apoptotik hücreler saptandı.

Elde edilen veriler ışığında X-ray ve MR'ın gerek tek tek gerekse kombine uygulanmasının rat kemik iliği retikülosit hücreleri üzerinde genotoksik ve sitotoksik bir etkiye sahip oldukları, genomik instabiliteye neden oldukları saptanmıştır.

Sonuç olarak; hastanemizde 25 miligray (mGy) bebek abdominal dozu kullanılarak X-ray maruziyetinin puliripotent retikülosit hücrelerde ağır sayılabilir

bir genomik instabiliteye neden olduğu, özellikle X-ray kullanımının daha kontrollü ve profesyonelce kullanım gerektirdiği özellikle ilaç kullanan hastalarda zorunlu olmadıkça tekrarlı X-ray ve MR çekimlerinin yapılmaması önerilmektedir.

7.SUMMARY

IN VIVO EVALUATION OF MICRONUCLEI IN RAT RETICULOCYTES FOR THE RELATIVE EFFICACY OF GENOMIC INSTABILITY IN MEDICAL RADIATION EXPOSURE

The genomic DNA damage is an indicator of genotoxicity and the MN assay is a well known standard technique to manifests the *in vivo* effects of genotoxic and cytotoxic agents in biological systems. In the present study it was aimed to find out the effects of medical radiation on rat reticulocyte cells as a rat model system. *In vivo* erythrocyte micronucleus (MN) assays are widely used to evaluate the potential genotoxic and cytotoxic effects of chemical and physical agents. These assays are very important and efficient due to the MN formation in target cell / tissue DNA material indicates the genotoxicity, mutagenicity of such chemicals and parameters in biological systems. The direct brush spread technique was used for the scoring of MN in three different model groups that exposed to the medical radiation. For this purpose the induced bone marrow stem cells of treated and control group rats (X-ray,MR and X-ray+MR) were evaluated for some cell features in the present study.

Animals that used in the present study were non-transgenic and were bred and fed in optimal laboratory conditions. Twenty male 7 to 8-week-old Wistar albino rats (*Rattus norvegicus*), obtained from “The Experimental Animal Laboratory of Cumhuriyet University, Sivas, Turkey”. Animals were group housed and one control and three experimental group randomly selected. Control and three experimental group rats (X-ray,MR and X-ray+MR) were exposed to the medical radiation in Department of Radiation of Cumhuriyet University. The control group rats(5) were not treated any chemical substances and radiation. The (X-ray,MR and X-ray+MR) group(5 rats for each) were exposed to direct radiation and MR as an ordered human direct graphy for the establish experimental model. Modified direct brush spread technique was used for the

scoring of MN in radiation induced rat bone marrow stem cells in the present study. At the end of experimental manipulation the animals were sacrificed and bone marrow was removed by thin brush and cells were respread on enumerated clean-coded slides. After a few deep stroke into the bone marrow with very thin brush, the last superficial stroke was diluted with Hank's balance solution firstly and spread slides were prepared. Fifteen brush spread slides were prepared for control and each experimental groups. After staining with Giemsa dye of stem cell of control and experimental group slides were air-dried. One and half thousand mononucleated cells were evaluated to determine the percentage of mononucleated, binucleated and cells with other features that indicated in table I (Anaphase bridge, nuclear buds, binucleated cell) in light microscope (ZEISS Axioskop 2 plus) that equipped with a 100 X immersed objectives (the final magnification : X1000) and supported with CCD camera. All values were evaluated and compared to the control in Kruskal-Wallis and Meen-Witney-U tests statistically.

Medical radiation treated rat reticulocytes showed increased unexpected cell features such as cell with micronuclei and nuclear buds in the current study.

8. KAYNAKLAR

1. www.nukleer.gov.tr (Çekmece Nükleer Araştırma ve Eğitim Merkezi),2005.
2. www.taek.com.tr (Türkiye Atom Enerjisi Kurumu),2005.
3. Fenech M., Chang W.P., Krisch Volders M., Holland N., Bonnassi S., Zeiger E., HUMN Project:detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures, Mutat.Res. , 534 , 65-75 , 2003.
4. Awa A.A., Nakano M., Ohtaki K., Kodoma Y., Lucas J., Gray J., Factors that determine the vivo dose-responce relationse in A-bomb survivors., Journal of Radiation Research,33,206-14,1992.
5. Lloyd D.C., Edward A.A., Prosser J.S., Corp M.J., The dose response relationships obtained at consent irradiation times for the induction of chromosome aberations in human lymphocytes by cobalt-60 gamma rays.,Radiation Envromental Biophysics,23,179-189,1984.
6. Laugier A., The centruy of radiotherapy in France.,Bull.Acad.Natl.Med.,180(1),143-60,1996.
7. Ritenour E.R., Health effects of low level radiation: Carsinogenesis, teratogenesis and mutagenesis. Semin Nucl.Med., 16(2),106-17,1986.
8. M.Fenech ,The in vitro micronucleus technique.,Mutat. Res.,455,81-95,2000.
9. Özalpan A., Temel Radyobioloji,Haliç Üniversitesi Yayınları,No:3001,2001.

10. Uslu İ., Güven N., Gözbebek F., Radyasyon ve Bilmek İstediklerimiz,TAEK,2004.
11. Yiğit Ş., Radyasyonun Biyolojik Etkileri,Radyasyon Sağlığı ve Güvenliği Dairesi,TAEK,2004.
12. Togay Y.E., Radyasyon ve Biz, TAEK,2004.
13. Gülsoy U.K.,Radyolojiye Giriş ve Fizik Temeller,TAEK,2004.
14. Dalcı D.Ö., Radyasyonun etkisiyle meydana gelen kromozom aberasyonlarının biyolojik dozimetri olarak değerlendirilmesi, İstanbul Üniversitesi,1993.
15. Demirel S., Zamani A., Mikronükleus tekniği ve kullanım alanları,Genel Tıp Dergisi,12(3),123-127,2002.
16. Vanparys P, Vermeiren F, Sysmans M, Temmerman R, The micronucleus assay as a test for the detection of aneugenic activity.,Mutat Res,244,95-103,1990.
17. Labay K., Ould-Elhkim M., Kles V., Guffray M., Sanders J.M.P. and P., Effects of Griseofulvin in medium-Term liver Carcinogenesis Assay and Peripheral Blood Micronucleus Test in Rat.,Teratogenesis,Carcinogenesis and Mutagenesis,21,441-451,2001.
18. Rozgaj R, Kasuba V. Chromosome aberrations and micronucleus frequency in anaesthesiology personnel, Arh Hig Rada Toksikol,51,361-8,2000.

19. Pastor S., Gutierrez S., Creus A, Cytogenetic analysis of Greek farmers using the micronucleus assay in peripheral lymphocytes and buccal cells.,*Mutagenesis*,Vol:16,No:6,pp:539-545,2001.
20. Schweikl H, Schmalz G, Spruss T, The induction of micronuclei in vitro by unpolymerized resin monomers,*J.Dent.Res*,80,1615-20,2001.
21. Hessel H., Radon K., Pethran A., Maisch B., Grobmair S., Sautter I.,et al.,The genotoxic risk of hospital, pharmacy and medical personnel occupationally exposed to cytostatic drugs evaluation by the micronucleus assay,*Mutat Res.*,497,101-9,2001.
22. Widel M., Kolosza Z., Jedrus S., Lukaszczyk B., Raczek-Zwierzycka K., Swierniak A., Micronucleus assay in vivo provides significant prognostic information in human cervical carcinoma:The updated analysis.,*Int J Radiat Biol*, 77,631-6,2001.
23. Jagetia G.C., Jayakrishnan A., Fernandes D., Vidyasagar M.S., Evaluation of micronuclei frequency in the cultured peripheral blood lymphocytes of cancer patients before and after radiation treatment, *Mutat Res*,491,9-16,2001.
24. Schmid W., The micronucleus test.,*Mutat Res.*,31,9-15,1975.
25. Barret J.C., Mechanism of multistep carcinogenesis and carcinogen risk assessment,*Environ.Healt Perspect*,100,9-20,1993.
26. Bishop J.M., Molecular themes in oncogenesis,*Cell*,64,235-248,1991.
27. Hayashi M., Mac Gregor J.T., Gatehouse D.G., Adler I.D, Blakey D.H., Dertinger S., Krishna G., Morita T., Russo A. and Sutou S., *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay:Aspects of protocol desing including repeated

treatments, integration with toxicity testing, and automated scoring. A report from the International Workshop on Genotoxicity Test Procedures (IWGTP), *Environ. Mol. Mutagen.* 35, 234-252, 2000.

28. Heddle J., A rapid in vivo test for chromosome damage, *Mutat. Res.*, 18, 187-190, 1973.

29. MacGregor J., Wehr C. and Gould G., Clastogen-induced micronuclei in peripheral blood erythrocytes: The basis of an improved micronucleus test, *Environ. Mutagen.* 2, 509-514, 1980.

30. Abramsson-Zetterberg L., Grawe J. and Zetterberg G., The micronucleus test in rat erythrocytes from bone marrow, spleen and peripheral blood: The response to low dose of ionizing radiation, cyclophosphamide and vincristine determined by flow cytometry, *Mutat. Res.*, 423, 113-124, 1999.

31. Abramsson-Zetterberg L., Zetterberg G., Bergqvist M. and Grawe J., Human cytogenetic biomonitoring using flow-cytometric analysis of micronuclei in transferrin-positive immature peripheral blood reticulocytes, *Environ. Mol. Mutagen.*, 36, 22-31, 2000.

32. Asanami S., Shimono K., Sawamoto O., Kurisu K. And Uejima M., The suitability of rat peripheral blood in subchronic studies for the micronucleus assay, *Mutat. Res.*, 347, 73-78, 1995.

33. Hamada S., Sutou S., Morita T., Wakata A., Asanami S., Hosoya S., Ozawa S., Kondo K., Nakajima M., Shimada H., et al., Evaluation of the rodent micronucleus assay by a 28-day treatment protocol: Summary of the 13th collaborative study by the collaborative study group for the micronucleus test (CSGMT)/Environmental Mutagen Society of Japan (JEMS)-Mammalian Mutagenicity Study Group (MMS), *Environ. Mol. Mutagen.*, 37, 93-110, 2001.

34. Hayashi M., Kodoma Y., Awogi T., Suzuki T., Asita A.O. and Sufini T., The micronucleus assay using peripheral blood reticulocytes from mitomycin C and cyclophosphamide treated rats, *Mutat. Res.*, 278, 209-213, 1992.
35. Hynes G.M., Torous D.K., Tometsko C.R., Burlison B. And Gatehouse D.G., The single laser flow cytometric micronucleus test: A time course study using colchicines and urethane in rat and Mouse peripheral blood and acetaldehyde in rat peripheral blood, *Mutagenesis.*, 17, 15-23, 2002.
36. Torous D.K., Dertinger S.D., Hall N.E., Tometsko C.E., Enumeration of micronucleated reticulocytes in rat peripheral blood: A flow cytometric study., *Mut. Res.*, 465, 91-99, 2000.
37. Wakata A., Miyamae Y., Sato S., Suzuki T., Morita T., Asano N., Awogi T., Kondo K., Hayashi M., Evaluation of the rat micronucleus test with bone marrow and peripheral blood: Summary of the 9th collaborative study by CSGMT/JEMS.MMS, *Environ. Mol. Mutagen.*, 32, 84-100, 1998.
38. Fu K.K., Interaction of chemotherapeutic agents in radiation. In :Mayer JL, Vaeth JM, editors. *Radiotherapy/chemotherapy interaction in cancer therapy*, *Fron. Radiat. Oncol.*, Basel: Karger: p16-30, 1992.
39. Kleisch U., Danford N., Adler I.D., Micronucleus test and bone marrow chromosome analysis: a comparison of two methods in vivo for evaluating chemically induced chromosomal alterations, *Mutat. Res.*, 80, 321-332, 1981.
40. Hayashi M., Sufini T., Ishida Jr M., High sensitivity in micronucleus induction of Mouse strain (MS), *Mutat. Res.*, 105, 253-256, 1982.
41. Aeschbacher H.U., Rates of micronuclei induction in different Mouse strains, *Mutat. Res.*, 164, 109-115, 1986.

42. McFee A.F., Robertson S.D., Abbott M.G., Recovery of polychromatic erythrocytes and micronuclei following cellulose column separation of mouse bone marrow samples, *Mutat.Res.*, 260, 387-391, 1991.
43. Jenssen D., The induction of micronuclei. In: Allan R. editor. Sister chromatid exchange. New York: Allan R. Liss Inc.: p.47-63, 1982.
44. Jenssen D., Ramel C., Dose response at low doses of X-irradiation and MMS on the induction of micronuclei in mouse erythroblasts, *Mutat.Res.*, 41, 311-320, 1976.
45. Uma Devi P., Sharma ASKVS, Mouse bone marrow response to low doses of whole body gamma irradiation induction of micronuclei, *Int.J.Radiat.Biol.*, 57, 97-101, 1990.
46. Cole R.J., Taylor N.Cole J., Arlett C.F., Short term test for transplantally active carcinogens. I. Micronucleus formation in fetal and maternal mouse erythroblast, *Mutat.Res.*, 80, 141-157, 1981.
47. Morales-Ramirez P., Cruz-Vallejo V., In vivo effect of gamma ray pretreatment on sister chromatid exchange induction by mitomycin C in murine bone marrow cells, *Mutat.Res.*, 367, 225-232, 1996.
48. Masunga S.I., Ono K., Suzuki M., Kinashi Y., Tagaki M., Radiobiologic significance of apoptosis and micronucleation in quiescent cells within solid tumors following γ -rays irradiation., *Int.J.Radiation Oncology Biol.Phys.*, 49, 1361-1368, 2001.
49. Roti Roti J.R, Radiation-induced versus endogenous DNA damage and assays that measure parameters reflecting DNA damage on cell by cell basis: comments

on the article by Pollycove and Feinendegen.,*Human & experimental Toxicology*,22,309-313,2003.

50. Kasuba V., Rozgay R. And Garaj-Vrhovac V., Analysis of Sister Chromatid Exchange and Micronuclei in Peripheral Blood Lymphocytes of Nurses Handling Cytostatic Drugs.,*Journal of Applied Toxicology*,19,401-404,1999.

51. Torous D.K., Hall N.E., Murante F.G., Gleason S.E., Tometsko C.R., Dertinger S.D., Comparative scoring of micronucleated reticulocytes in rat peripheral blood by flow cytometry and microscopy.,*Toxicological Science*,74,309-314,2003.

52. Erselcan T., Sungu S.,Ozdemir S., Turgut B.,Dogan D.,Ozdemir O.,Iodine-131 treatment and chromosomal damage:in vivo dose-effect relationship., *Eur J Nucl Med Mol Imaging.*, 2004 Jan 28.

53. Malgorzata M., Dobrzynska and Antoni K.Gajewski, Induction of micronuclei in mouse bone marrow after combined X-Rays-Cyclophosphamide and X-Rays-Mitomycin C treatments.,*Teratogenesis,Carcinogenesis and Mutagenesis.*,19,267-274,1999.

54. Savage John R.K. ,*Micronuclei:Pitfalls and Problems.*,*Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*,July 2000.

55. Savage J.R.K., Annotation:Classification and relationships of induced chromosomal structural changes,*J.Med.Genet.*,13,103-122,1976.

56.Heddle J.A., Micronuclei in vivo:In“Mutation and the environment,B”,(eds.Mendelson M.L. and Abertini R.J),Wiley-Liss,Newyork,pp.185-194,1990.

57. Streffer C., Müller W.U., Kryscio A. and Böcker W., Micronuclei-biological indicator for retrospective dosimetry after exposure to ionizing radiation, *Mutation Research*, 404, 101-105, 1998.
58. Tucker J.D., and Eastmond D.A., Use of an antikinetochores antibody to discriminate between micronuclei induced by aneuploidogens and clastogens. In "Mutation and the environment, B.", (eds. Mendelsohn M.L. and Albertini R.J.), Wiley-Liss, New York, pp. 275-284, 1990.
59. Degraffi F. and Tanzarella C., Immunofluorescent staining of kinetochores in micronuclei: A new assay for detection of aneuploidy, *Mutation Research*, 203, 339-345, 1988.
60. Fenech M. and Morley A.A., Kinetochores detection in micronuclei: An alternative method for measuring chromosome loss, *Mutagenesis*, 2, 98-104, 1989.
61. Fenech M., Morley A.A., Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: Effect of in vivo ageing and dose X-irradiation, *Mutat. Res.*, 161, 193-8, 1986.
62. Fenech M., Morley A.A., Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay, *Cytobis*, 43, 233-46, 1985.
63. Fenech M., McNitt-Gray, AAPM/RSNA Physics tutorial for residents: Topic in CT, *RadioGraphics*, 33, 1541-1553, 2002.
64. Mayo J.R., Aldrich J., Müller N.L., Radiation exposure at chest CT: A statement of the Fleischner Society, *Radiology*, 228, 15-21, 2003.
65. Hamberg L.M., Rhea J.T., Hunter G.J., Trall J.H., Multi-Detector row CT: Radiation dose characteristics, *Radiology*, 226, 762-772, 2003.

66. İnce M.Z., Tanı radyolojisinde konvansiyonel sistemlerde doz düzeyleri ve önlemler,Radyasyon Sağlığı ve Güvenliği Dairesi/TAEK,Ankara,2002.
67. Suzuki H., Shirotori T. and Hayashi M., A liver micronucleus assay using young rats exposed to diethylnitrosamine: methodological establishment and evaluation.,Cytogenet Genome Res.,104,299-303,2004.
68. Undarmaa B., Kodoma S., Suzuki K., Niwa O., Watanabe M.,X-Ray-induced telomeric instabilitiy in Atm-deficient mouse cell.,Biochemical and Biophysical Research Communications,315,51-58,2004.
69. Fenech M., Biomarkers of genetic damage for cancer epidemiology.,Toxicology,181-182,411-416,2000.
70. Fell L.J., Paul N.D. and McMillan T.J., Role for non-homologous end-joining the repair of UVA-induced DNA damage., Int.J.Radiat.Biol.,78,11,1023-1027,2000.
71. Yoshioka Y.,Yamakazi H.,Yoshida K.,Ozeki S.,Inoue T.,Yoneda M. and Inoue T.,Impact of mitochondrial DNA on Radiation Sensivity of Transformed Human Fibroblast Cells:Clonogenic Survival,Micronucleus Formation and Cellular ATP Level.,Radiation Research,162,143-147,2004.
72. Fenech M.,In vitro micronucleus technique to predict chemosensitivity.,Methods Mol.Med.,111,3-32,2005.
73. Lutz W.K.,Tiedge O.,Lutz R.W.,Stoper H.,Different types of combination effects for the induction of micronuclei in Mouse lymphoma cells by binary mixtures of the genotoxic agents MMS,MNU and genistein.,Toxicol.Sci.,2005.

74. Obe G., Vijayalaxmi.,Controversial cytogenetic observation in mammalian somatic cells exposed to extremely low frequency electromagnetic radiation:A review and future research recommendations.,*Bioelectromagnetics.*,Review Article.,2005.
75. Popova L.,Hadjidekova V.,Hadjivave T.,Agova S.,Vasilev I.,Cytokinesis-block micronucleus test in patients undergoing radioiodine therapy for differentiated thyroid carcinoma.,*Hell.J.Nucl.Med.*,Jan-Apr;8(1):54-7,2005.
76. Camps J.,Ponsa I.,Ribas M.,Prat E.,Egozcue J.,Peinado MA.,Miro R., Comprehensive measurement of chromosomal instability in cancer cells:combination of fluorescence in situ hybridisation and cytokinesis-block micronucleus assay.,*FASEB J.*,May;19(7):828-30,2005.
77. D'Souza U.J.,Zain A.,Raju S.,Genotoxic and cytotoxic effects in bone marrow of rats exposed to a low dose of paraquat via the dermal route.,*Mutat.Res.*,7;581(1-2):187-90,2005.
78. Fimognari C.,Berti F.,Iori R.,Cantelli-Forti G.,Hrelia P.,Micronucleus formation and induction of apoptosis by different isothiocyanates and a mixture of isothiocyanates in human lymphocyte cultures.,*Mutat.Res.*,Apr 4;582(1-2):1-10,2005.
79. Kawamura K.,Fujikawa-Yamamoto K.,Ozaki M.,Iwabuchi K.,Nakashima H.,Domiki C.,Morita N.,Inoue M.,Tokunaga K.,Shiba N.,Ikeda R.,Suzuki K.,Centrosome hyperamplification and chromosomal damage after exposure to radiation.,*Oncology.*,67(5-6):460-70,2004.
80. Thierens H.,DeRuyck K.,Vral A.,de Gelder V.,Whitehose C.A.,Tawn E.J.,Boesman I.,Cytogenetic biodosimetry of an accidental exposure of a

radiological worker using multiple assays.,*Radiat.Prot.Dosimetry.*,113,408-414,2005.