



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**TÜRK PROPOLİS EKSTRAKTLARININ
İYONİZAN (γ -GAMA) RADYASYONLA
UYARILMIŞ İNSAN FİBROBLAST HÜCRE
SERİLERİ ÜZERİNE OLASI
RADYOPROTEKTİF ETKİSİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

CAN ÖZGÜR YALÇIN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. Yüksel ALİYAZICIOĞLU

TRABZON-2012



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**TÜRK PROPOLİS EKSTRAKTLARININ
İYONİZAN (γ -GAMA) RADYASYONLA
UYARILMIŞ İNSAN FİBROBLAST HÜCRE
SERİLERİ ÜZERİNE OLASI
RADYOPROTEKTİF ETKİSİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

CAN ÖZGÜR YALÇIN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. Yüksel ALİYAZICIOĞLU

TRABZON-2012

ONAY

Bu tez Yüksek Lisans Tezi Standartlarına Uygun Bulunmuştur

Prof. Dr. Asım ÖREM

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı

.....

Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Can Özgür YALÇIN'nın hazırladığı “Türk propolis ekstraktlarının iyonizan (γ -gama) radyasyonla uyarılmış insan fibroblast hücre serileri üzerine olası radyoprotektif etkisinin değerlendirilmesi” başlıklı tez KTÜ Lisansüstü Eğitim - Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca kapsam ve bilimsel kalite yönünden değerlendirilerek Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman Prof. Dr. Yüksel ALİYAZICIOĞLU

Yüksek Lisans Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Yüksel ALİYAZICIOĞLU

Prof. Dr. Orhan DEĞER

Doç. Dr. Mehmet YILDIRIM

Tarih:/.../2012

Bu tez KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/....../2012 tarih ve ... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

.....

Prof. Dr. Ahmet KALKAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının KTÜ Sağlık Bilim Enstitüsü tez yazım klavuzu standartlarına uygun olarak yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eserim olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışması ve yazımı aşamalarda patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

25.05.2012

Can Özgür YALÇIN

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamda danışmanlığımı yapan Sayın Prof. Dr. Yüksel ALİYAZICIOĞLU'na;

Yüksek lisans eğitimim boyunca ilgilerini ve güler yüzlerini hiçbir zaman esirgemeyen Tıbbi Biyokimya Anabilim dalımızın saygıdeğer hocaları Prof. Dr. Orhan DEĞER, Prof. Dr. E. Edip KEHA, Prof. Dr. Asım ÖREM, Doç. Dr. Birgül KURAL ve Doç. Dr. Ahmet ALVER'e;

Tezimle ilgili çalışmalarda yanımda bulunup bana yardımcı olan Selim DEMİR'e, sevgili Sema MISIR'a, Müge KOPUZ, Yelda BİRİNCİ, Diler US ve İbrahim TURAN'a ve manevi desteklerini hiç eksik etmeyen enstitüdeki tüm arkadaşlarıma;

KTÜ Farabi Hastanesi Radyasyon Onkolojisi Anabilim dalı başkanı Sayın Prof. Dr. Zümrüt BAHAT'a, radyasyon fizikçisi Emel HACİİSLAMOĞLU ve Ayşe DEMİR'e ve ismini sayamadığım bütün bölüm çalışanlarına;

Ve son olarak, bana her zaman destek olan ve benim için çok değerli olan sevgili aileme teşekkürlerimi sunarım.

Can Özgür YALÇIN

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
BEYAN	iv
TEŞEKKÜR	v
TABLolar DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
SİMGELER KISALTMALAR ve FORMÜLLER DİZİNİ	xi
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ ve AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	5
4.1. Propolis	5
4.1.1. Propolisin Arılar Tarafından Yapımı ve Kullanımı	5
4.1.2. Propolisin Fiziksel Özellikleri	7
4.1.3. Propolisin Kimyasal Özellikleri ve İçeriği	8
4.1.4. Propolisin İçeriğinde Bulunan Flavonoidler	9
4.1.5. Propolisin Farmakolojik Özellikleri	10
4.2. Radyoaktifliğin tanımı	13
4.2.1. İyonlaştırıcı Radyasyonun Biyolojik Etkileri	16
4.2.2. İyonlaştırıcı Radyasyonun DNA Üzerindeki Etkileri	17
4.2.3. Radyoprotektif Ajanlar	18
4.2.3.1. Radyoprotektif Etki Mekanizmaları	19
4.2.3.2. Radyoprotektif Ajanların Sınıflandırılması	21
4.3. Serbest Radikaller	23
4.3.1. Serbest Radikal Türleri	26
4.3.1.1. Süperoksit Radikalleri	26
4.3.1.2. Hidroksil Radikalleri	26
4.3.1.3. Hidrojen Peroksit	27
4.3.1.4. Singlet Oksijen	28

4.3.2. Serbest Oksijen Radikallerinin Etkileri	28
4.3.3. Serbest Radikallerin DNA Üzerindeki Etkileri	29
4.3.4. DNA Tamir Mekanizmaları	32
4.3.5. Antioksidan Savunma Sistemleri	33
4.3.5.1. Antioksidan Etki Mekanizmaları	34
4.4. DNA Hasarını Belirlemede Kullanılan Yöntemler	35
4.4.1 Comet Analizi	36
4.4.1.1. Kullanım Alanları	37
4.4.1.2. Comet Protokolü	37
4.4.1.3. Comet Görüntülerinin Değerlendirilmesi	39
4.4.1.4. Comet Tekniğinin Avantajları	40
4.4.1.5. Comet Tekniğini Etkileyen Faktörler	40
5. GEREÇ ve YÖNTEMLER	41
5.1. Gereçler	41
5.1.1. Cihaz ve Malzemeler	41
5.1.2. Kimyasal Malzemeler	41
5.2. Yöntemler	42
5.2.1. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	42
5.2.2. Jellerin Döküleceği Lamaların Lamaların Polilizin ve NMP Agaroz ile Kaplanması	44
5.2.3. Hücre Kültürü	44
5.2.3.1. Primer Fibroblast Hücrelerinin Elde Edilmesi ve Çoğaltılması	45
5.2.3.2. Primer Fibroblast Hücrelerinin Pasajlanması	45
5.2.4. Primer Fibroblast Hücrelerinin Canlılıklarının Tespiti ve Sayılması	46
5.2.5. Comet Yönteminin Uygulanması	46
5.2.6. Fantom Düzeneginin Oluşturulması	48
5.2.7. Çalışma Gruplarının Oluşturulması	49
5.2.8. Fibroblast Hücrelerinin Deney İçin Hazırlanması	50
5.2.9. Fibroblast Hücre Serilerine <i>in vitro</i> Radyasyon Uygulanması ve Uygun Dozunun Bulunması	50

5.2.10. İyonlaştırıcı Radyasyon Kaynaklı DNA Hasarını Engelleyebilecek Propolis Konsantrasyonunun Belirlenmesi	51
5.2.11. İstatistiksel Analiz	52
6. BULGULAR	53
6.1. Fibroblast Hücre Serilerine <i>in vitro</i> Radyasyon Uygulanması ve Uygun Radyasyon Dozunun Bulunmasına İlişkin Sonuçlar	53
6.2. İyonlaştırıcı Radyasyon Kaynaklı DNA Hasarının Propolis ile Engellenebilmesine İlişkin Sonuçlar	54
6.3. Pozitif Kontrol Grubunun Oluşturulmasına İlişkin Sonuçlar	54
7. TARTIŞMA ve SONUÇ	56
8. SONUÇ ve ÖNERİLER	66
8.1. Sonuçlar	66
8.2. Öneriler	66
9. KAYNAKLAR	68
10. ÖZGEÇMİŞ	77

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo	Sayfa No
Tablo 1. Propoliste bulunan başlıca bileşenler	9
Tablo 2. Propolisin içerisinde bulunan polifenoller ve diğer bileşikler	10
Tablo 3. Propolisin yapısında bulunan bileşiklerin farmakolojik aktiviteleri	13
Tablo 4. Oksijenden ve nitrik oksitten oluşan başlıca reaktif türler	25
Tablo 5. Propolis konsantrasyonuna bağlı olarak comet skoru ve hücre canlılığı değişimi	54
Tablo 6. Amifostin konsantrasyon ve süresine bağlı olarak comet skoru ve hücre canlılığı değişimi	55

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa No
Şekil 1. Arı peteklerinin kenarlarındaki propolis kalıntıları	6
Şekil 2. Propolis örnekleri	8
Şekil 3. Elektromanyetik radyasyonun enerji spektrumu	15
Şekil 4. Amifostinin alkalin fosfat ile aktiflenmesi	22
Şekil 5. Primidinlerde oluşan çeşitli oksidatif DNA hasarları	30
Şekil 6. Fapy Guanin oluşum mekanizması	31
Şekil 7. Alkali comet tekniğinde kritik basamakların şematik gösterimi	39
Şekil 8. Görsel analiz ile comet skorlaması	39
Şekil 9. Çalışmada DNA'ların skorlanmasında kullanılan skala	48
Şekil 10. Çalışmada kullanılan fantom	49
Şekil 11. Fibroblast hücre serilerinin ışınlanmasında kullanılan ^{60}Co radyoaktif kaynaklı teleterapi cihazı	51
Şekil 12. Primer fibroblast hücrelerinde verilen radyasyon dozuna karşılık comet skorları ve hücre canlılığı	53

SİMGELER KISALTMALAR ve FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

AET	: 2-(2-aminoetil) isotiyoüronyum bromit dihidromiromit
ALS	: Alkali labil bölgeler
AP	: Apürinik/apirimidinik bölge
BER	: Baz eksizyon tamir mekanizması (Base excision repair)
DMEM	: Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DSB	: Çift zincir kırığı
EDTA	: Etilendiamintetra asetikasit
FBS	: Fetal bovine serum
FPG	: Formamidopirimidin DNA glikozilaz
GC-MS	: Gaz kromatografisi-kütle spektrometresi
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
LMP agaroz	: Düşük kaynama noktalı agaroz
MMS	: Metil metan sülfonat
NMP agaroz	: Normal kaynama noktalı agaroz
PBS	: Fosfat tuz tamponu
RAS	: Reaktif azot ürünleri
ROS	: Reaktif oksijen ürünleri
SCGE	: Tek hücre jel elektroforezi (Comet analizi)
SSB	: Tek zincir kırığı
8-OH-Gua	: 8-hidroksi guanin

Formüller

H_2O_2	: Hidrojen peroksit
NO	: Nitrik oksit
$O_2^{\cdot}$	: Süperoksit radikali
OH^-	: Hidroksil radikali

ÖZET

TÜRK PROPOLİS EKSTRAKTLARININ İYONİZAN (γ -GAMA) RADYASYONLA UYARILMIŞ İNSAN FİBROBLAST HÜCRE SERİLERİ ÜZERİNE OLASI RADYOPROTEKTİF ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Propolis, polifenolik bileşikler ve flavonoidler açısından zengin, toplandığı bölgenin coğrafyasına ve iklimine göre kompozisyonu değişebilen, antibakteriyel, antitümöral, antiinflamatuvar, antioksidatif, antimutajenik ve diğer faydalı aktiviteleri ile doğal bir ilaç olarak kullanılan önemli bir arı ürünüdür. Propolisin biyolojik etkisi, çoğunlukla flavonoidlerin varlığına atfedilmektedir. İyonlaştırıcı radyasyona maruziyet canlılarda doğrudan ve dolaylı genotoksik hasara yol açar. Doğrudan etki DNA üzerinde tek ve çift zincir kırıkları şeklinde olurken; dolaylı etki iyonlaştırıcı radyasyonun su ile etkileşimi sonucu meydana gelen serbest radikaller üzerinden gerçekleşir. Oluşan bu serbest radikaller DNA, protein, lipid, karbonhidratlar gibi biyomoleküllerle etkileşime girebilir ve oksidatif DNA hasarı sonucu mutajenik ve karsinojenik etki oluşturabilirler. Günümüzde genotoksisite çalışmalarında birçok yöntem kullanılmakla birlikte; basit, ucuz ve tekrarlanabilir bir metot olan comet analizi diğer yöntemlerden bir adım öne çıkmaktadır. Bu çalışmada, Türk propolisinin farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış etanolik ekstraktlarının 3 Gy gama radyasyon (30cGy/dak.) ile uyarılmış fibroblast hücre serileri üzerindeki olası radyoprotektif etkisi comet yöntemi ile incelenmiştir. Hücrelerin ışınlanmadan önce 100, 200 ve 300 $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonlardaki etanolik propolis ekstraktı ile 15 ve 30 dakikalık ön muameleleri sonrasında elde comet skorları ile sadece 3 Gy hasarlı hücrelerden elde edilen değerler arasında anlamlı fark görüldü ($p<0.001$). Pozitif kontrol grubu oluşturmak için radyasyona karşı koruyucu etkinliği bilinen sentetik bir aminotiyol bileşiği olan amifostin kullanıldı. Sonuç olarak Türk propolisinin etanolik ekstraktlarının; fibroblast hücre serilerinde, 3 Gy gama radyasyon kaynaklı DNA hasarını engellediği ve radyoprotektif etkinliğe sahip olabileceği neticesine varıldı.

Anahtar Kelimeler: Comet analizi, Flavonoidler, İyonizan radyasyon, Propolis, Radyoprotektif ajanlar

SUMMARY

EVALUATION OF POSSIBLE RADIOPROTECTIVE EFFECT OF TURKISH PROPOLIS EXTRACTS ON IONIZING (γ -GAMMA) RADIATION INDUCED HUMAN FIBROBLAST CELL LINES

Propolis is an important bee product, rich of polyphenolic compounds and flavonoids, it has antibacterial, antitumoral, antiinflammatory, antioxidative, antimutagenic properties and changeable composition according to climate and geography of harvest region, and is used as a natural drug with other useful activities. Biological effect of propolis is predominantly attributed to its content of flavonoids. Exposure of ionizing radiation leads to direct and indirect genotoxic damage on living. Direct effect occurs by single and double strand bonds on DNA; indirect effect occurs by free radicals which are resulting from interaction of radiation and water. These free radicals may interact with biomolecules such as DNA, proteins, lipids, carbohydrates and may cause mutagenic, carcinogenic effects because of oxidative DNA damage. However many methods have been used in genotoxicity studies, comet analysis, a cheap, simple and repeatable method, steps forward other techniques. In the present study, the radioprotective effect of ethanolic extracts of Turkish propolis on 3 Gy gamma radiation (30cGy/min) induced fibroblast cell lines was investigated using comet analysis. Comet scores obtained from pretreatments of cells 15 and 30 minutes with concentration of 100, 200 and 300 $\mu\text{g/mL}$ ethanolic extracts of propolis before irradiation showed significant difference between just 3 Gy irradiated cells ($p < 0.001$). For generating positive control group amifostine synthetic aminothiol compound with radioprotective effect; was used. It was concluded that ethanolic extracts of Turkish propolis prevent 3 Gy gamma radiation induced DNA damage in fibroblast cell lines and might have radioprotective activity.

Key Words: Comet assay, Flavonoids, Ionizing radiation, Propolis, Radioprotective agents

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Günümüzde kullanılan sentetik ilaçların yan etkilerinin varlığı insanların daha az yan etkiye sahip doğal ürünlere olan ilgisini arttırmıştır. Bu doğal ürünler arasında bal arılarının sunduğu ürünlerden biri olan propolis önemli bir yer tutar. Propolis, birçok hastalığın iyileştirilmesinde tarihin eski çağlarında olduğu gibi günümüzde de tıp alanında alternatif ürün olarak kullanılmaktadır (1).

Propolis, bal arılarının çeşitli bitkilerin tomurcuk ve sürgünlerinde bulunan reçineye balmumu katarak oluşturduğu; kovanda oluşan çatlakların kapatılması, giriş deliğinin küçültülmesi, petek hücrelerinin cilalanması, kovanda öldürülen yabancı böceklerin kokuşmasının engellenmesi ve bakteriyel kontaminasyonun önlenmesi gibi pek çok amaçla kullandıkları maddedir (2). Propolis kimyasal açıdan son derece karmaşık bir yapı göstermekte ve bu özelliği toplandığı bölgenin bitki örtüsüne göre değişebilmektedir (1). Yapılan çalışmalarla propolisin; antioksidan, antibakteriyel, antifungal, antiviral, antienflamatuar, radyoprotektif ve diğer faydalı biyolojik etkileri ve kimyasal yapısına ait değerli bilgiler ortaya konulmuştur (3).

DNA, yaşam boyunca hücresel metabolitler ve ekzojen ajanlar tarafından sürekli olarak hasara maruz kalır. Genetik materyalin moleküler bütünlüğünde endojen veya ekzojen faktörlerin etkisiyle meydana gelen tüm değişiklikler genotoksisite olarak adlandırılır (4). Ekzojen faktörlerden biri olan iyonlaştırıcı radyasyon soğurulduğunda genetik materyal üzerinde doğrudan ve dolaylı hasara yol açar. İyonlaştırıcı radyasyonun doğrudan etkisi sonucu DNA molekülündeki şeker-fosfat bağlarının kopması ile tek ve/veya çift zincir kırıkları meydana gelebilir. İyonlaştırıcı radyasyonun su ile etkileşimi sonucu meydana gelen serbest radikaller ile hasar oluşturması da dolaylı etki olarak tanımlanır. Hücreler büyük oranda sudan oluştuğundan, radyasyon enerjisinin su molekülleri tarafından absorblanmasıyla birçok serbest radikal oluşur (5). Serbest radikaller; DNA, protein, lipid, karbonhidratlar gibi biyomoleküllerle etkileşime girebilir ve oksidatif DNA hasarı sonucu mutajenik ve karsinojenik etki oluşturabilirler (4). Canlıların somatik ve genetik özellikleri kromozomlarda taşındığı için radyasyonun

DNA üzerinde meydana getirdiği zararlı etkiler günümüzde ve gelecekte toplum sağlığı açısından oldukça önemlidir (6).

DNA'daki hasar düzeyinin ölçülmesinde kullanılan en yaygın ölçme yöntemlerinden birisi olan "Tek Hücre Jel Elektroforezi" hassas, basit ve hızlı bir görsel floresan tekniğidir. Teknik, hücrelerde çeşitli ajanların indüklediği DNA hasarı ve onarım bozukluklarının tayini amacıyla genetik toksikolojiden moleküler epidemiyolojiye kadar pek çok alanda kullanılmakta olup "Comet Yöntemi" olarak da adlandırılmaktadır (7).

Bu tez çalışması ile yöremizden elde edilen propolisin farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış ekstraktlarının gama radyasyon ile uyarılmış fibroblast hücre serileri üzerindeki olası radyoprotektif etkisinin comet yöntemi ile incelenmesi amaçlanmıştır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Propolis

Bal arıları, gerek yaşamları, gerekse oluşturdıkları değerli ürünler ile insanların ilgisini çekmiştir. İnsanların dengeli ve sağlıklı beslenmesinde önemli bir yeri olan bal ürünü yanında; propolis, polen, arı sütü ve arı zehiri gibi birçok hastalığın iyileştirilmesinde tarihin eski çağlarında olduğu gibi günümüzde de tıp alanında alternatif ürünler kullanılmaktadır (1). Propolis, eski Yunan'da *pro* (ön, giriş) ve *polis* (şehir) anlamında, bal arılarının kovan savunması ile ilgili madde anlamında kullanılmıştır. Diğer bir adı ise bee glue'dir (1,8).

4.1.1. Propolisin Arılar Tarafından Yapımı ve Kullanımı

Bal arıları (*Apis mellifera* L.) ağaç kabuklarından, bitkilerin filiz, dal ve tomurcuklarından toplayarak arka bacaklarındaki polen sepetçiklerinde biriktirdiği reçinemsi maddeleri ve bitki öz sularını, başı ile toraksı arasında bulunan bezlerden salgılamış olduğu aktif enzimlerle karıştırıp pelet haline getirir. Pelet ön ve orta bacakların yardımıyla ve bacak hareketleri ile arka bacaklardaki polen sepetçiğinde paketlenir. Polen sepetçiği yeteri kadar propolis ile doldurulduğunda kovana taşınır. Propolis, genç işçi arılar tarafından 25-30 dakikada boşaltılır ve hemen gerekli yerde kullanılır (9-11).

Bal arıları propolisi, kovanda oluşan çatlak ve yarıkların kapatılması, giriş deliğinin küçültülmesi, yavru yetiştirmek üzere hazırlanan petek hücrelerinin cıllanması ve kovan çatlaklarından suyun buharlaşıp kaybolmasını engelleyerek kovan içi olması gereken nem oranı koruyabilmek, kovanda öldürülen yabancı böceklerin kokuşmasının engellenmesi ve bakteriyel kontaminasyonun önlenmesi gibi pek çok amaçla kullanılmaktadırlar (2). Şekil 1'de arı peteklerinin kenarlarındaki propolis kalıntıları görülmektedir.

Propolisin kaynağını oluşturan bitkiler kavak (*Populus spp.*), kayın (*Fagus sylvatica*), huş (*Betula alba*), kestane (*Castanea sativa*), atkestanesi (*Aesculus hippocastanum*), akça ağaç (*Alnus glutinosa*) ve çeşitli kozalaklı ağaçlardır (12).



Şekil 1. Arı peteklerinin kenarlarındaki propolis kalıntıları

Propolis insanların dikkatini tıbbi açıdan binlerce yıl önce çekmiş ve bu doğal ürün eski çağlarda Avrupa ve Kuzey Afrika’da, Mısır, Yunan ve Romalılar tarafından yaygın olarak kullanılmıştır. Nitekim ünlü Yunan filozofu Aristo arıların çalışmasını saydam kovan kullanarak incelemek istemiş, ancak kovanın koyu renkte mumsu maddeler ile kaplanarak saydamlığını yitirdiğini bildirmiştir. Bu maddenin propolis olduğu tahmin edilmektedir. Geleneksel hekimlikte yaygın olarak kullanılan ve Hipokrat, Herodot, Aristo ve diğer antik dönem bilginleri tarafından övgü ile söz edilen propolis, çok eski çağlardan bu yana insanlar tarafından ya çeşitli hastalıkların tedavisinde ya da etkilerinin azaltılmasında kullanılmıştır. Propolis ilk kez Yunanlılar tarafından keşfedilerek doğal bir antibiyotik olarak kullanılmıştır. Mısırlılar, hastalıkların tedavisinde ve ölümlerin mumyalanmasında, Yunanlılar ve Romalılar da deri apselerini iyileştirmede yüzyıllarca ilaç olarak kullanmışlardır. İbranice eski vasiyetnamelerde *Tzori* olarak geçmektedir ve tedavi edici özelliklerinden bahsedilmektedir. İbni Sina, ak balmumu ve kara balmumu olarak iki çeşit bal mumu olduğunu ayırt etmiştir. İbni Sina’nın siyah balmumu olarak ifade ettiği şeyin propolis olduğu yaptığı çalışmalarda yeterince açıktır. Avrupa’daki on ikinci yüzyıl kayıtları,

propolisin medikal preparatlarının ağız ve yara enfeksiyonlarının tedavisi ve diş sağlığı için kullanımından bahsetmektedir. İkinci Dünya Savaşı sırasında yaraların tedavisinde propolis kullanılmıştır (9,12-14).

Eski zamanlardan günümüze kadar farmakolojik özellikleri nedeniyle insanlar tarafından kullanılan propolis 1960 yıllarında bilim adamlarının dikkatini çekmiş ve son 40 yılda pek çok araştırmacı propolisin kimyasal kompozisyonu, biyolojik aktivitesi, farmakolojik ve tedavi edici özellikleri üzerine yayınlar yapmıştır. Bu konudaki ilk çalışmalar Ghisalberti tarafından 1978 yılında yayınlanmıştır. Bu çalışmalardan 20 yıl sonra propolisin su, metanol, etanol, eter ve yağ ekstraktlarının antioksidan, antigenotoksik, antibakteriyel, antimikrobiyal, antifungal, antienflamatuar, antimutajenik, antitümoral, immünostimülan, radyoprotektif ve diğer faydalı biyolojik etkileri ve kimyasal yapısına ait değerli bilgiler ortaya konulmuştur (2,3,14-20). Doğal bir ürün olan propolis özellikle antibakteriyel etkisi sebebiyle ağız ve diş sağlığını koruyucu diş macunları, gargaralar ve diş ipi yüzeylerinde kullanılmaktadır (8,21).

4.1.2. Propolisin Fiziksel Özellikleri

Propolis soğukta katı ve kırılgan, sıcakta ise yumuşak ve çok yapışkan olup, 15–25 °C arasında ise mum gibi elastik bir yapıdadır (17). Genel olarak 60–69 °C arasında bir erime noktasına sahiptir (13). Rengi toplandığı yöreye ve kaynağına bağlı olarak sarı yeşilden koyu kahverengine kadar değişir (22). Suda az erirken, % 95’lik alkolde büyük ölçüde erir. Eter, kloroform, aseton ve diğer organik çözücülerde ise kısmen erir (17). Şekil 2’de propolis örnekleri gösterilmiştir.



Şekil 2. Propolis örnekleri

4.1.3. Propolisin Kimyasal Özellikleri ve İçeriği

Propolis kimyasal açıdan son derece karmaşık bir yapı göstermekte ve bu özelliği toplandığı bölgenin bitki örtüsüne göre değişebilmektedir (1). Avrupa, Kuzey Amerika ve Asya'nın tropik olmayan bölgeleri gibi karasal iklime sahip bölgelerde kavak türleri propolisin başlıca kaynağıdır, ancak kavağın yetişmediği yerlerde arılar başka propolis kaynakları aramaktadır, örneğin Rusya'da Huş ağaçları (*Betula verrucosa*), Brezilya'da *Baccharis* türleri propolis kaynağı olabilmektedir (22). İşlenmemiş propolisin toplandığı kaynağa göre çeşitlilik gösteren bileşiminde, %50 reçine, % 30 balmumu, % 10 esansiyel ve aromatik yağlar, % 5 polen ve % 5 organik artıkları da içeren çeşitli diğer maddeler bulunmaktadır (23).

Kimyasal analizler, propolisin kompozisyonunda en az 300 bileşenin varlığına dikkat çekmektedir. Bu organik bileşenlerin arasında, fenolik bileşikler ve esterleri, flavonoidlerin her formu (flavonoller, flavonlar, flavononlar, dihidroflavonoller ve kalkonlar), terpenler, beta-steroidler, aromatik asitler, aromatik aldehytler ve alkoller, seskuiterpenler, stilben terpenler ve kafeik asit fenil esterleri (CAPE) bulunmaktadır (24). Propolisin içeriğinde mangan, çinko, bakır, kursun, nikel, kobalt, krom, kalay, kalsiyum, fosfor, potasyum, sodyum, klor, demir, magnezyum, molibden, alüminyum, silisyum, civa, flor gibi pek çok mineral de bulunmaktadır. Mangan ve çinkonun diğer

elementlere göre daha fazla miktarda bulunduğu tespit edilmiştir. Propolisin vitamin içeriği ise düşük olup B1, B2, B6, C, E, nikotinik ve pantotenik asit değişik miktarlarda bulunmaktadır. Ayrıca propolis içerisinde sayıları 8-17 arasında değişen serin, glikol, alanin, triptofan, fenilalanin, lösin, lizin, sistin, histidin, arjinin, prolin ve glutamik asit gibi aminoasitlerde bulunmaktadır (9). Tablo 1’de propoliste bulunan başlıca bileşenler özetlenmiştir (25).

Tablo 1. Propoliste bulunan başlıca bileşenler

Bileşenler	Ana Maddeler	Miktar (%)
Reçine	Flavonoidler	45–55
	Terpenler	
	Kumarinler	
	Fenolik asitler ve esterleri	
Mum ve yağ asitleri	Arılardan veya bitkilerden çoklu doymamış yağ asitleri	25–35
Esansiyel yağlar	Uçucu bileşenler	10
Polen	Proteinler	5
	Serbest aminoasitler	
	Vitaminler (A, B, C, E, PP, vs)	
Diğer maddeler	Eser elementler (Cu, Mn, Fe, Zn, Al, Ag, Ca, Mg, Co, vs)	5
	Ketonlar	
	Laktonlar	
	Kinonlar	
	Steroidler	
	Şekerler	

4.1.4. Propolisin İçeriğinde Bulunan Flavonoidler

Propolisten izole edilen bileşenlerin en geniş grubunu flavonoidler oluşturmaktadır ve propolisin biyolojik aktivitesinin önemli bir kısmından sorumludurlar (26). Bugüne kadar propolisten 38’den fazla flavonoid izole edilmiştir (13). Flavonoidlerin sağlık üzerindeki etkileri son yıllarda ön plana çıkmış, halka yapılarının ve hidroksil gruplarının özellikle antioksidan ve radikal yakalama fonksiyonları nedeniyle dikkat çekmeye başlamışlardır. Bu özellik, flavonoidlerin hidroksil gruplarının pozisyonu ve sayıları ile ilişkilidir. Flavonoidlerin *in vivo/in vitro* olarak yapılan çalışmalarda kansere karşı koruyucu birçok mekanizmada görev aldığı

görülmüştür. Bunlar; östrojenik/antiöstrojenik aktivite, antiproliferasyon, hücre siklusunun durdurulmasının ve apoptozisin indüksiyonu, oksidasyonun engellenmesi, deoksifikasyon enzimlerinin indüksiyonu, immun sistemin düzenlenmesi ve hücre içi sinyal iletimindeki değişikliklerdir (27,28). Flavonoidler alkilleyici ajanlara, polisiklik aromatik hidrokarbonlara, radyoaktif kimyasallara ve diğer mutajenlere/karsinojenlere karşı antigenotoksik aktiviteye sahiptir (13). Tablo 2’de propoliste bulunan polifenoller ve diğer bileşikler özetlenmiştir (29).

Tablo 2. Propolisin içerisinde bulunan polifenoller ve diğer bileşikler

Flavonlar	Flavonoller	Flavononlar	Dihidro - Flavoneller	Sinnamik asit türevleri	Diğerleri
Apigenin	Kaempferol	Pinosembrin	Pinobaksin	Ferulik asit	11-Farnesenol (seskiterpen)
Akasetin	Kaempferid	Sakuranetin			β -karyofilen
Baisetin	Galangin	İsosakuranetin	Pinobaksin -3-asetat	Kafeik asit	Terpinkol (terpenoid)
Krisin	İsohamnetin			p-Kumarik asit	Benzoik asit
Luteolin	Ramnetin		Pinobanksin-7-metil eter		Syringaldehit (diterpenikasit)
Tektokrisin	Mirisetin				Protocate huikasit (benzoik asit türevi)
	Fisetin				Vanillin (benzaldehit türevi)
	Rutin				

4.1.5. Propolisin Farmakolojik Özellikleri

Propolisin halk arasında kullanımı tarihin eski çağlarına kadar dayanır. Halk hekimleri en çok antiseptik, antibakteriyel, antiinflamatuvar ve rejeneratif amaçlarla çeşitli harici ve dahili hastalıkların tedavisinde doğal bir ilaç olarak kullanılmıştır. Propolis çok eski zamanlardan beri kullanılsa bile propolis hakkında klinik çalışmalarla ispatlanmış bilgilere ihtiyaç vardır. Son 40 yıl boyunca, propolisin kimyasal kompozisyonu, biyolojik aktivitesi, farmakolojisi ve tedavi edici kullanımları hakkında çok sayıda yayın yapılmıştır. Propolis, immunomodülatör, antitümör, antimikrobiyal, antiinflamatuvar, antioksidan gibi birtakım biyolojik ve farmakolojik özellikleri ile bilim

adamlarının ilgisini çekmekte ve doğal ürün propolis içeren ürünler bugün ilaç endüstrisi ve sağlık ürünleri arasında yer almaktadır (2,22,30).

Propoliste yer alan farmakolojik aktiviteye sahip en önemli bileşenler flavonlar, flavonoller ve flavononlar ile çeşitli fenolik maddeler ve aroma maddeleridir. Flavonoidler, renk oluşumunda büyük rol oynarlar. Biyolojik polimerlere bağlanma afiniteleri, ağır metal iyonlarını bağlama, elektron transportunun katalizleme ve serbest radikalleri yakalama yetenekleri sebebiyle propolisin biyolojik aktivitelerinin çoğunluğunun flavonoidlerden kaynaklandığı düşünülür. Propolisin antibakteriyel, antifungal, antiviral, antimitojenik, antikarsinogenik, lokal anestezi, antiinflamatuvar, antioksidan, hepatoprotektif, immünostimülatör, radyoprotektif ve sitostatik etkileri tanımlanmıştır (11,18,24,31).

Flavonoidler antioksidan etkilerini reaktif oksijen, azot ve klor türlerini doğrudan yakalayarak ve antioksidan enzim sistemlerini aktifleştirerek gösterirler. Son yıllarda yapılan çalışmalar ile flavonoidlerin DNA (tek-çift zincir kırığı, şeker ve baz rezidülerinin oksidasyonu, kromozomal aberasyon ve mutasyon gibi) ve hücrelerdeki diğer bileşenleri oksidatif hasara karşı koruduğu gösterilmiştir (15).

Propolisin antibakteriyel etki gösteren aktif bileşenleri pinocembrin, galangin, kafeik asit, benzil ester, sakuraretin ve pterostilben'dir. Antibakteriyel etki bakteriyel RNA polimeraz inhibisyonuna bağlanmaktadır (8). Antiviral etkiden sorumlu bileşenler kafeik asit, lutseolin ve kuersetin'dir. Arı propolisi, kovani zararlı bakterilerden, virüslerden ve mantarlardan koruduğu için değişik bölgelerden elde edilen propolis örnekleri benzer antimikrobiyal etki gösterir (11). Propolis antimikrobiyal aktivitesini çoğunlukla, Gram pozitif (*Staphylococci*, *Streptococci spp.*, *S.aureus*, *Enterococcus spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Bacillus cereus* ve *B. subtilis*) ve Gram negatif bakteri (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. vulgaris* ve *P. Aeruginosa* *Mycobacterium tuberculosis*), *Helicobacter pylori*, protozoa (*T. cruzi*), fungi (*Candida albicans*) ve virüslere (HIV, Herpes virüsleri veya influenza virüsleri) karşı gösterir (24).

Propolis antiinflamatuvar etkinliğini, trombosit agregasyonunu önleyerek; prostoglandinler ve lökotrienler gibi eikozanoidlerin sentezini inhibe ederek ve histamin gibi inflamasyonda rol oynayan mediatörlerin salınımını engelleyerek oluşturduğu öne sürülmüştür. Propolis ekstraktlarının dihidrofolat redüktaz enzimini inhibe ederek antiinflamatuvar etki oluşturduğu ve bu enzim üzerindeki inhibisyonun CAPE'ye bağlı olduğu belirtilmektedir (32).

Propolisin en önemli etkilerinden biriside karsinostatik etkidir. Karsinostatik etkiden sorumlu olan en önemli bileşik CAPE'dir. CAPE'nin adenovirüs transforme rat embriyo fibroblastlarının çoğalmasını engellediği ve seçici olarak sitotoksik etki gösterdiği görülmüştür. Bununla beraber insan tümör hücrelerinin de çoğalmasını mitojenik uyaran tarafından indüklenen oksidatif süreci inhibe ederek engelleyebilir (2).

Propolis içeriğinde bulunan metil kafeat, fenil etil kafeat ve fenil etil dimetil gibi CAPE'nin etkisiyle kemoproflaktik etki gösterir. Bu maddelerin üçünün de azoksi metil ile oluşturulan kolon kanseri üzerine inhibitör etkisi gösterilmiştir. İnsan kolon adenokarsinomunda bu maddelerin trozinproteinkinaz enziminin etkisini engellediği gösterilmiştir (2).

Propolis, radyasyonun indüklediği apoptoza karşı radyoprotektif etki gösterir. Radyasyona bağlı ortaya çıkan erken ve geç etkileri tedavi etmek her zaman mümkün olmadığı için yan etki oluşumunu önleyebilecek ajanların geliştirilmesi önem kazanmıştır. Ortaya çıkan hasarların büyük oranda serbest radikal kaynaklı olduğu ve antioksidan maddeler kullanarak olumsuz etkilerin kısmen önlenebileceği çeşitli deneysel çalışmalar ile ortaya konulmuştur. Amifostin, 2-aminoetilisotiyoüroniyum bromit/hidrobromit (AET), defosforile amifostin (WR-1065) gibi birçok radyoprotektif etkisi bilinen maddeler toksik yan etkileri sebebiyle sınırlı medikal kullanıma sahiptir. İyonlaştırıcı radyasyonun oluşturduğu genetik hasara karşı etkili, nontoksik, radikal yakalayıcı bileşikler büyük ilgi görmektedir (16). Propolisin yapısında bulunan bileşiklerin farmakolojik aktiviteleri Tablo 3'de özetlenmiştir (11,24,33-36).

Tablo 3. Propolisin yapısında bulunan bileşiklerin farmakolojik aktiviteleri

Bileşik	Farmakolojik Aktivite
Acacetin	Antiviral, antioksidan, antiinflamatuvar
Apigenin	Antiülser
Atrepilin C (Brezilya propolisi)	Antitümör
Baicalin	Antigenotoksik
Benzoik asit	Bakteriyostatik, bakterisid
Bisabodol	Antipiretik
Dikeafeoilkuinik asit türevleri	Güçlü antioksidan
Diterpenik asitler	Antibakterial, sitotoksik
Galangin	Antiinflamatuvar, antioksidan, antiviral, antibakterial, hepatoprotektif
Hesperitin	Antiülser
İzopentil ferulat	Antiviral
Kaempferid	Spazmolitik, anti-mycobacterium phlei
Kaempferol	Antiviral, antiülser
Kafeikasit	Antibakterial, antifungal, antiviral, antiinflamatuvar
CAPE	Antiinflamatuvar, antibakterial, antitümör, hepatoprotektif, antikanser
Kaffeoilkuinik asit türevleri	İmmunomodulator, hepatoprotektif
Krisin	Antiinflamatuvar, antiviral
Kuersetin	Antiviral, antibakterial, antihistaminik, antiülser, kapiller güçlendirici
Naringin	Antiülser
Pigenin	Antiviral
Pinobanksin / Pinobanksin-3-asetat	Antibakteriyel, antifungal
Pinocembrin	Antibakterial, antifungal, lokal anestezi
Pinostrobin	Lokal anestezi
Prenillenmiş p-kumarik	Antibakterial, sitotoksik
Propol (Brezilya propolisi)	Güçlü antioksidan
Rutin	Antiviral

4.2. Radyoaktifliğin tanımı

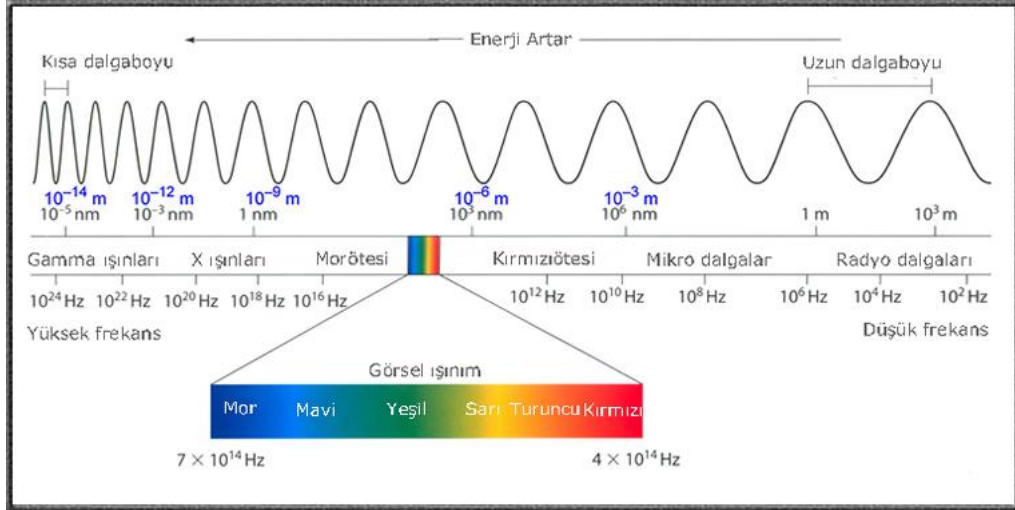
İlk kez 1895 yılında Wilhelm Conrad Röntgen, üzeri siyah kaplanmış Crookes tüpü ile karanlık bir odada deney yaparken, deney tüpünden uzakta baryum platin siyanür kaplanmış levhada floresans adı verilen ışınımın olduğunu fark etti. Röntgen,

X-ışını adını verdiği bu keşfi ile ilgili birçok deney yaptı ve tarihteki ilk tıbbi X-ışını radyografisini bu deneyleri sırasında gerçekleştirdi. 1986 yılında gelindiğinde konu ile ilgili 1000'den fazla makale ve 50'den fazla kitap yayımlanmıştı (37). 1896'da Henri Becquerel, uranyum tuzundan bazı tür ışınımın yayımlandığını gözledi ve bu ışınımın Bequerel ışınları adını verdi. Bu isim daha sonra birçok maddelere yayınlanan farklı radyasyon tiplerini de ihtiva edecek şekilde değiştirildi. Uranyumdan başka bazı maddelerinde radyasyon yaydığı gözlemlendi ve bu olaya radyoaktivite isimi verilirken bu şekilde ışınım yapan elementlerde radyoaktif element denildi (38). 1898'de Marie Curie ve Pierre Curie radyoaktif elementler olan polonyum ve radyumu keşfetti ve yaptıkları çalışmalarla radyoaktif maddelerin daha iyi açıklanmasını sağladı. Birkaç yıl sonra Ernest Rutherford alfa (α), beta (β), gama (γ) ışınlarını tanımladı. Atomla ilgili radyasyon ve özelliklerini inceleyerek radyasyonun yapısının daha iyi anlaşılmasını sağladı ve 1911 yılında atom çekirdeğinin varlığını önerdi. Rutherford'un bu önerisinin kabulüyle beraber yeni gelişmelerin günümüzde de hala devam ettiği bir bilim alanı ortaya çıktı (37,39).

Radyasyon; İç dönüşüm geçiren atomlar tarafından yayımlanan, boşlukta ve madde içerisinde hareket edebilen enerji olarak tanımlanır. Bu yolla enerji veren elementlere radyoaktif elementler adı verilir. Bir radyoaktif çekirdeğin bir başka çekirdeğe dönüşmesi olayına desintegrasyon, yapay olarak bir çekirdekten başka bir çekirdek elde edilmesi olayına da transmutasyon denir. Bu sırada, çekirdekten parçacıklar ve enerji dalgaları ortaya çıkar (40). Bir atomun kararlılığı çekirdek içindeki nötron ve proton sayıları ile ilişkilidir. Nötron/Proton oranı 1'e ne kadar yakınsa çekirdek aynı oranda kararlıdır. Elementlerde N/P oranı 1–1.5 arasında iken kararlılık görülür. Hafif elementlerin N/P oranı 1'dir ve bu çekirdekler kararlıdır. Ağır elementlere gidildikçe nötron sayısı proton sayısını aşar. En ağır kararlı çekirdek bir bizmut izotopudur (Bi-209); sonraki elementler N/P oranı 1.5'dan büyük olan radyoaktif elementlerdir (41).

Radyasyon, yüksek hızda partiküllerin ve elektromanyetik dalgaların enerjisidir ve türüne göre iki şekilde sınıflandırılır. Bunlar partiküler ve elektromanyetik radyasyonlardır. Partiküler radyasyon; belli bir kütle ve enerjiye sahip çok hızlı hareket eden minik parçacıkları ifade eder. Elektromanyetik radyasyon, belli bir enerjiye sahip

ancak kütsüz radyasyon çeşididir. Bunlar, enerjinin uzayda ışık hızıyla titreşerek taşınması anlamına gelir (42,43). Elektromanyetik dalgaların tümünün dalga boylarına ve enerji düzeylerine göre sınıflandırıldığı tabloya elektromanyetik spektrum adı verilmektedir (44). Elektromanyetik radyasyonun enerji spektrumu Şekil 3’de gösterilmiştir.



Şekil 3. Elektromanyetik radyasyonun enerji spektrumu

Radyasyon enerjisine göre de iki gruba ayrılır. Bunlar, iyonlaştırıcı ve iyonlaştırıcı olmayan radyasyonlardır.

a. İyonlaştırıcı radyasyon: Yüksek enerjili radyasyon olarak da tanımlanır ve atomdan elektron koparabilen, dolayısıyla iyonize edebilen radyasyon türüdür. Diğer bir ifadeyle madde ile etkileştiğinde elektrik yüklü parçacıklar veya iyonlar oluşturan radyasyonlar iyonlaştırıcı radyasyon olarak tanımlanır. Bunlar radyoizotopların parçalanması ile oluşan α , β , γ -ışınları, nötronlar ve yapay olarak oluşturulan X-ışınıdır.

b. İyonlaştırıcı olmayan radyasyon: Düşük enerjili radyasyon olarak da tanımlanır dolayısıyla etkileştiği materyal içindeki atomları yeteri kadar enerjisi olmadığı için iyonize edemez ve sadece uyarmakla yetinir. Ultraviyole (UV), kızılötesi, radyo dalgaları, mikrodalgalar şeklinde sınıflandırılır (42,44).

4.2.1. İyonlaştırıcı Radyasyonun Biyolojik Etkileri

İyonlaştırıcı radyasyon soğurulduğunda hücre içerisindeki çok önemli makro moleküllerde doğrudan ve dolaylı hasara yol açar (5). İyonize radyasyonların canlılarda biyolojik bir etkiye yol açabilmesi için sahip oldukları enerjinin, canlıyı oluşturan hücre ve dokular tarafından absorbe edilmesi ve dokularda dağılması gerekir. İyonlaştırıcı radyasyonların canlıda oluşturduğu etkileri üç basamakta sıralamak mümkündür. İyonize radyasyon enerjisinin canlı dokuya transferi sonucunda, dokuyu oluşturan atom ve moleküllerde meydana gelen iyonlaşma ve uyarılma, radyasyon etkisinin ilk kademesi olan fiziksel kademeyi oluşturur. Hücre içerisindeki çok önemli makro moleküllerde oluşan doğrudan hasar bu kademedede gerçekleşir. Bunu izleyen kimyasal kademedede, hasar görmüş atom ve moleküller diğer hücresel yapılar ile reaksiyona girerek serbest radikalleri meydana getirirler ve radyasyonun dolaylı etkilerinin ortaya çıkmasına neden olurlar. Organizmada radyasyonun etkisi ile oluşan bu tür moleküler değişiklikler, son kademe olan biyolojik kademeyi başlatır. Bu kademedede çeşitli hasarlara yol açan enzimatik reaksiyonlar meydana gelir (5,42).

Radyasyonun organizmaya olan etkileri akut ve kronik şekilde olmaktadır (6). Her hücre tipinin radyasyona duyarlılığı farklıdır. Sık bölünen ve andiferansiye olan hücrelerin (over ve testisin germinal hücreleri, hematopoetik sistem hücreleri, gastrointestinal sistem epitel hücreleri) duyarlılığı fazla iken, bölünmeyen ve üst diferansiasyon gösteren hücrelerin (karaciğer, böbrek, kartilaj, kas, sinir hücreleri) duyarlılığı daha azdır (45). Akut etkiler insanda radyasyona maruz kalındıktan kısa bir süre sonra klinik bulgular ile ortaya çıkmaktadırlar. Bunlar merkezi sinir sistemi, gastrointestinal ve hematopoietik sendromlardır. Sendromların ortaya çıkışı absorbe edilen dozla ilişkilidir. Bu sendromlar bir süre sonra bireyi ölüme götürür. Radyasyonun kronik etkileri ise hücrenin ölümüne yol açmayan ancak genetik materyallerinde onarılamayan bozukluklara neden olan olaylar sonucunda ortaya çıkarlar. Kanser yapıcı etkisi ve genetik etkisi ve bunlara örnektir (6).

4.2.2. İyonlaştırıcı Radyasyonun DNA Üzerindeki Etkileri

DNA üzerinde oluşan hasarlar genel olarak iki grupta incelenebilir (46).

A. Kendiliğinden değişimler sonucu oluşan hasar

- a) Yanlış eşleşme
- b) Bazların kimyasal yapısında kendiliğinden meydana gelen değişimler
 - 1- Keto-enol tautomerizasyonu
 - 2- Bazların deaminasyonu
 - c) Baz kaybı
 - d) Oksidatif hasar

B. Çevresel hasar

- a) DNA hasarına yol açan fiziksel etkenler
 - 1- İyonlaştırıcı radyasyon
 - 2- UV
- b) DNA hasarına yol açan kimyasal etkenler
 - 1- Alkilleyici maddeler
 - 2- Çapraz bağlayıcılar
 - 3- Elektrofilik reaktanlara metabolize edilen kimyasallar

İyonlaştırıcı radyasyon, DNA üzerinde ki kimyasal bağların kopmasına neden olarak hasar oluşturur. Mutasyon olarak adlandırılan bu genetik hasarlar hücre tarafından tamir edilemez ise, hücreyi ölüme götüren süreci başlatan metabolik değişiklikler meydana gelir. Bu etki nedeniyle iyonlaştırıcı radyasyonlar, devamlı hücre çoğalması ile kendini gösteren kanser hastalığının tedavisinde kullanılmaktadır. Ancak, sağlam doku hücrelerindeki genetik hasar hücrenin ölümüyle sonuçlanmazsa yıllar sonra kansere neden olabilmektedir (47).

İyonlaştırıcı radyasyonlar doğrudan olarak DNA zincirinde kırılmalar ve hücre içindeki moleküllerle etkileşimi sonucu oluşan oksijen radikalleri ile dolaylı hasar oluşturur (5). İyonlaştırıcı radyasyonun doğrudan etkisi sonucu DNA molekülündeki şeker-fosfat bağlarının kopması ile zincir kırıkları meydana gelebilir. Radyasyon

darbesiyle zincirlerden yalnız birinde iki nükleotid arasındaki bağ yıkılmışsa oluşan hasara tek zincir kırığı (SSB) denir. Bu kırıklar molekülde kalıcı ve sürekli olmayan hasarlar meydana getirmeleriyle bilinirler. Daha sonra bu hasarlar onarım mekanizmalarıyla tamir edilebilir. DNA molekülünde doğrudan etki ile meydana gelen diğer önemli hasar çift zincir kırığı (DSB)'dır. SSB oluşan bölgenin karşı zincirinde de meydana gelen SSB sonucu oluşur. Eğer kırıklar tam karşılıklı noktalarda değilse fakat birbirine uzaklıkları birkaç baz çifti kadar ve aradaki hidrojen bağları molekülü bir arada tutacak kadar kuvvetli değilse DSB oluşabilir. Karşılıklı zincirlerdeki SSB'leri birbirlerine daha uzak ve bu aradaki hidrojen bağları molekülü bir arada tutabilecek kuvvetteyse bu kırıklar daha sonra onarılabilir (48).

Dolaylı etki, iyonlaştırıcı radyasyonun su ile etkileşimi sonucu meydana gelen serbest radikaller ile hasar oluşturmalarıdır. Hücreler büyük oranda sudan oluştuğundan, radyasyon enerjisinin su molekülleri tarafından absorblanma olasılığı çok yüksektir (5). Suyun radyolizi ile hidrojen peroksit (H_2O_2), moleküler hidrojen (H_2), hidrojen radikali ($H\cdot$), hidroksil radikali ($OH\cdot$), hidroperoksil radikali ($HO_2\cdot$), süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$) oluşur (5). Serbest radikaller bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip, kısa ömürlü, kararsız, molekül ağırlığı düşük ve çok etkin moleküller olarak tanımlanır (49). Serbest radikaller DNA, protein, lipid, karbonhidratlar gibi biyomoleküllerle etkileşime girebilir ve oksidatif DNA hasarına neden olarak mutajenik ve karsinojenik etki oluşturabilirler (4). Canlıların somatik ve genetik özellikleri kromozomlarda taşındığı için radyasyonun DNA üzerinde meydana getirdiği zararlı etkiler günümüzde ve gelecekte toplum sağlığı açısından oldukça önemlidir (6).

4.2.3. Radyoprotektif Ajanlar

Radyoprotektif etki ve radyoprotektif ajan terimleri ilk olarak 1942 yılında Dale tarafından tanımlanmıştır. Dale enzimleri kullanarak deney hayvanları üzerinde çalışmalar yapmıştır. İnsanlarda kullanılabilecek radyoprotektif etkili ajanlara yönelik ilk çalışma ise 1949 yılında Patt ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir. Sıçanlarla yapılan denemelerde ölümcül dozda ışınlamadan 15 dakika önce intravenöz yolla sülfür içeren sistein aminoasidi uygulamasının kobayların yaşam sürelerinde belirgin bir artış

sağladığını göstermiştir. 1957’de ABD Savunma Bakanlığı’nca başlatılan radyoprotektif ajanların geliştirilmesine yönelik çalışmalarda etki gücü bakımından çok sayıda etkili ajan bulunmuştur (50).

4.2.3.1. Radyoprotektif Etki Mekanizmaları

Radyoprotektif etki mekanizmalarının altında kullanılan ajanların kimyasal ve biyolojik etkileri yatmakla beraber bu konuda birçok teori ileri sürülmüştür. Bunlar: radyasyon hasarı sonucu oluşan serbest radikallerin yakalanması, hedef moleküllere hidrojen atomu bağlanması, karışık disülfid bileşiklerinin oluşumu, endojen radyoprotektörlerin salınması, biyokimyasal şok etkisi ile hücre bölünmesinin yavaşlatılması, dokularda hipoksi gelişiminin uyarılmasıdır (51).

İyonlaştırıcı radyasyonun radyasyonun absorblanması sonucu eksitasyon/iyonizasyonu oluşur ve kimyasal ve biyolojik etkiler ortaya çıkar. Bu etkileşim hücre içerisindeki makromoleküllerde veya su moleküllerinde görülebilir. Etkileşime göre radyasyonun etkileri doğrudan veya dolaylı olarak ikiye ayrılır. Radyasyonun doğrudan etkisinde radyasyon doğrudan biyolojik hedef moleküllerle (DNA, enzim vb.) etkileşime girerek, enerjisini doğrudan olarak transfer eder. Dolaylı etkileşimde, hücrelerin büyük oranda su molekülü içermesi nedeniyle, suyun hidroliziyle açığa çıkan serbest radikaller diğer hücre molekülleriyle reaksiyona girer. Dolaylı gerçekleşen etkileşim radyobiyolojik açıdan doğrudan etkileşimden daha önemlidir ve memeli hücrelerinde iyonlaştırıcı radyasyonun olası etkilerinin %70’ini dolaylı yolla gösterdiği düşünülmektedir. Serbest radikaller oksijen molekülleri ile de etkileşime girerler ve bu etkileşimler sonucunda gerek hidrojen gerekse bazı organik moleküllerin peroksit radikalleri oluşur ve bunlar biyolojik açıdan son derece aktiftirler. Oksijen varlığıyla, sözü geçen peroksit radikallerinin oluşum sıklığındaki artış, bu etkinin mekanizması olarak kabul edilir (52).

Radyoprotektör ajanlar, radyasyon etkisiyle oluşan hidroksil, süperoksit ve hidroperoksil radikali gibi su metabolitlerini okside ederek bunların diğer hücre içi yapılarla etkileşime girme yeteneğinden yoksun kararlı yapılı bileşiklerin oluşmasını

sağlayarak etki gösterebilirler. Bu mekanizma sayesinde serbest radikallerin yaşamsal öneme sahip hücrel moleküller üzerindeki olumsuz etkisi büyük ölçüde sınırlandırılmış olur (50,51). Diğer bir radyoprotektif etki mekanizması, serbest radikale hidrojen atomu bağlanmasıdır. R-H şeklinde sembolize edilen bir molekülün radyasyon etkisiyle radikal metabolitine dönüşmesi halinde, koruyucu etkili ajan, radikal metabolitin yapısına bir hidrojen atomu ekleyerek kararlı yapıdaki R-H formunun yeniden oluşmasını sağlar (50).

Aminotiyol bileşiklerinin radyoprotektif etkisi deney hayvanları üzerinde yapılan pek çok çalışmada gösterilmiştir. Aminotiyollerin koruyucu etkisi, radyasyona maruziyet sonrasında hücrel proteinlerin yapısındaki sülfhidril bileşiklerinde okside ve redükte formda sülfür atomlarının oluşumu üzerinden gerçekleşir. Okside ve redükte formların birlikteliğine karışık disülfidler adı verilir ve aminotiyollerin yapısındaki sülfhidril gruplarının hücrel proteinlerdeki sülfhidril gruplarıyla reaksiyona girmesi sonucunda oluşur. Disülfidler serbest radikal tarafından saldırıya uğradığında sülfür atomlarından birisi indirgenir diğeri ise yükseltgenir. İndirgenen sülfür atomunun proteine ait olması halinde aminotiyol bileşiğinin sülfür atomu yükseltgenir. Bu durum hücrel proteinin serbest radikal hasarından %50 oranında korunması anlamına gelir. Ayrıca aminotiyoller, DNA molekülüne bağlanmaları halinde geri dönüşümlü olarak replikasyonu inhibe eder ve genetik materyalin yapısını stabil vaziyette tutar. Bu durum DNA yapısındaki bozulmanın düzeltilmesine yönelik faaliyetler için zaman kazandırır.

Bir diğer mekanizma oksijenin, oksidasyon sürecinde tüketilmesi ve özellikle hücre içi ortamda oksijen doygunluğunda bir düşüşle beraber oksidasyonun azalması şeklinde gelişir. Nitekim yapılan çalışmalarda ortamın hipoksik hale getirilmesinin radyoprotektif etkili olabileceği ve/veya aminotiyol bileşikleri gibi ajanların koruyucu etkilerine katkıda bulunabileceğini göstermiştir (50).

Çok az bilinmekle beraber olası mekanizmalardan bir diğeri de koruyucu etkili ajanın, hücre içi geri dönüşümsüz bir hasar meydana geldiğinde, düzeyleri azalmış olan yaşamsal öneme sahip moleküllerin yerine geçerek biyokimyasal süreçleri idame ettirmesidir. Ayrıca koruyucu etkili ajanlar, ışınlama ya da diğer yollardan gelişen

hücrel strese bağı olarak hücrel metabolizmayı yavaşlatmak suretiyle radyorezistans eğilimi arttırabilirler (50).

4.2.3.2. Radyoprotektif Ajanların Sınıflandırılması

Prasad'a göre radyoprotektif ajanlar başlıca 4 grupta incelenirler:

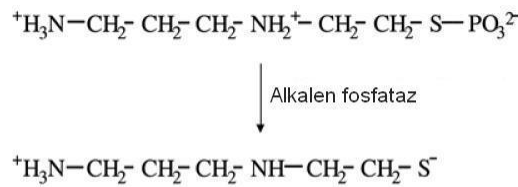
i) Tiyol bileşikleri: Bu grupta sistein, sisteamin, sistamin, AET ve 2-merkaptotetilguanidin bulunur. Sülfhidrilaminler vücut ısını ve fizyolojik pH'yı düşürebilen potent radyoprotektif etkili ajanlardır. Memelilerde hücreleri radyasyon hasarına duyarlı kılan oksidasyon ve redüksiyon gibi biyokimyasal reaksiyonlarda, aminotiyol bileşiklerinin koruyucu etkilerine katkıda bulunmak üzere bazı endojen kaynaklı maddeler de görev alabilir. Bu maddelerin en tipik örneğı glutatyondur. Vücutta normal şartlarda yüksek düzeylerde bulunan glutasyon, sistein ve sisteamine benzer şekilde serbest radikalleri bağlayarak etkisizleştirebilir ve bir radyoprotektif etkinlik gösterebilir (50).

ii) –SH radikali içeren diğer bileşikler: Yapısında –SH radikali bulunduran yüzlerce bileşik test edilmiş ancak bunlardan sadece tiyoüre, tiyoursil, ditiyokarbamat, tiyazolin, sülfoksit ve sülfonların radyoprotektif etkili olduğu gösterilmiştir (50).

iii) Farmakolojik ajanlar: Bu grupta morfin, eroin gibi analjezikler, asetilkolin, metakolin gibi kolinomimetikler, adrenalin, noradrenalin, dopamin, serotonin, alkol vb. gibi radyoproektif etkinliğe sahip bileşikler bulunmaktadır (50).

iv) Diğer radyoprotektif ajanlar: Bu grupta siyanür, ATP, adenzin ve cAMP gibi nükleik asit türevleri, eritropoetin, CO, vitamin-C, vitamin-E, glutasyon, hidroklorik merkaptotetilamin, amifostin, sodyum hidrojen S-(2-aminoetil) fosforotiyolik asit, S-2-(3-aminopropilamino) propilfosforotiyolik asit gibi radyoprotektif etkili birçok ajan bulunmaktadır (50).

Tiyol bileşiği olan amifostin, keşfedildiği günden itibaren radyasyona karşı koruyucu etkinliğiyle tedavi ve profilakside kullanılan FDA tarafından onaylanmış tek radyoprotektif ilaçtır. 1959 yılında Amerika Ordusuna bağlı Walter Reed Ordu Araştırma Enstitüsü tarafından geliştirilmiştir. Bu enstitü tarafından tanımlanan ve tiyol içeren bütün bileşikler Walter Reed'in kısaltmasıyla "WR" ön eki ile adlandırılmıştır. Bu bileşiklerin iyonlaştırıcı radyasyon ve kemoterapi ajanları tarafından oluşturulan serbest radikalleri yok etme potansiyeli vardır. Organik bir tiyofosfat olan amifostin; normal dokularda alkalen fosfataz ile aktif şekli olan WR-1065'e defosforile olur ve bu şekliyle normal doku içine girer. Amifostinin defosforilasyonu Şekil 4'de gösterilmiştir. WR-1065 normal hücre içine girdikten sonra yine serbest radikal temizleme özelliği olan metabolitlerine dönüşür. Yapısındaki fosfor amifostini inaktif formda tutarken, sülfür ise bileşiğe serbest radikal temizleme özelliği kazandırır. Fosfat grubunun uzaklaşması sonucu oluşan -SH grubu serbest radikalleri yakalayarak etkinliğini gösterir. Bu etkinin malign dokular yerine belirgin olarak sağlıklı dokularda görülmesi amifostini radyoterapi ve kemoterapi gibi klinik uygulamalarda değerli kılmaktadır (51-54).



Şekil 4. Amifostinin alkalen fosfataz ile aktiflenmesi.

Hemapoetik büyüme faktörleri ve interlökin-7, interlökin-11, granülosit-koloni uyarıcı faktörü, kök hücre faktörü, granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktörü gibi sitokinler, antiapoptotik sitokin kombinasyonları, keratinosit büyüme faktörü gibi epiteliyal hücre spesifik büyüme faktörleri radyasyona karşı kök hücreleri ve dolayısıyla da hematopoezi uyarmak suretiyle koruyucu etki gösterdiği ifade edilmektedir (54).

İmmünomodülatörler, deney hayvanlarında yapılan çalışmalarda, radyasyona maruziyet halinde yaşam süresini uzattığı ortaya konulmuş olan yeni radyoprotektif

etkili ajanlar grubudur. Endotoksinlerden arındırılmış liyofilize bakteriyel ekstrakt olan Bronco-Vaxom isimli radyoprotektif etkili immünomodülatör ajan, hematopoetik kök hücrelerinin büyük kısmını hücre siklusunun nispeten daha radyorezistan faza geçişini uyarak ve/veya radyasyona maruziyet sonrasında kök hücre popülasyonunun sayısını arttırarak radyoprotektif etki oluşturur. Bir diğer immünomodülatör olan amonyum trikloro (dioksietilen-0-0') tellurat, koruyucu etkisini interlökin-1, interlökin-6, TNF- α ve c-kit ligand gibi çeşitli sitokinlerin üretimini uyarak gösterir (50).

Radyoprotektif etki mekanizmalarının incelendiği çalışmalarda, poliamin bileşiklerinin de serbest radikalleri bağlamak suretiyle DNA molekülünde radyasyon ile ilişkili SSB ve DSB'ye karşı koruyucu etki oluşturabildiği görülmüştür. Putresin, spermin ve spermidin normal şartlarda bütün memeli hücrelerinde bulunan doğal poliamin bileşikleridir ve söz konusu koruyucu etkinlik bakımından spermin ve spermidinin etkisi, putresine göre daha yüksek bulunmuştur. Stobadin, piridoindol yapısında antioksidan etkili bir ajandır. Farelerde yapılan çalışmalarda stobadinin DNA'da tamir sürecini hızlandırdığı ve aynı zamanda hidroksil radikallerini bağlayarak gama ışını kaynaklı kromozomal anomali gelişimini önlediği görülmüştür (50).

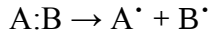
4.3. Serbest Radikaller

Serbest radikallerin kimyasal olarak mevcudiyeti konusunda, yaklaşık 100 yıl önce bir sonuca ulaşmakla birlikte, varlıkları ilk 30-40 yıl boyunca dünya çapında kabul görmemiştir. Yirminci yüzyılın ikinci yarısının büyük bir kısmında, reaktif oksijen türevlerine, doku hasarı ve hastalığına yol açan bir tür biyokimyasal oksitleyici ajan gözüyle bakılmıştır. Yirmi birinci yüzyıla girerken reaktif oksijen biyokimyası bir disiplin olarak olgunlaşmış ve biyomedikal bilimler arasındaki önemi yerleşmiştir (55).

Serbest radikaller, hücresel metabolizma sırasında veya ekzojen ajanlarla meydana gelen kimyasal ürünlerdir. Bu ürünler hücrelerde DNA, protein, lipid, karbonhidratlar gibi biyomoleküllerle etkileşime girmekte ve sonuçta meydana gelen oksidatif DNA hasarı mutajenite, karsinojenite ve yaşlanmaya yol açmaktadır (4). Serbest radikaller bir veya daha fazla esleşmemiş elektrona sahip, kısa ömürlü, kararsız,

molekül ağırlığı düşük ve çok etkin moleküller olarak tanımlanır (49). Çeşitli fiziksel etkenler ve kimyasal olaylar nedeniyle hücrel koşullarda devamlı bir radikal yapımı vardır. Serbest radikaller başlıca üç temel mekanizma ile meydana gelirler:

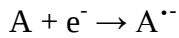
1- Kovalent bağların homolitik kırılması: Yüksek enerjili elektromanyetik dalgalar ve yüksek sıcaklık kimyasal bağların kırılmasına neden olur. Kırılma sırasında bağ yapısındaki iki elektronun her biri ayrı ayrı atomlar üzerinde kalıyorsa, bu tür kırılmaya homolitik kırılma denir ve her iki atom üzerinde de paylaşılmamış elektron kalır. Organik moleküllerdeki bağların heterolitik kırılması durumunda zıt yüklü iyon çiftleri oluşur ve bu türler de reaktiftir.



2- Normal bir molekülden tek bir elektronun kaybı: Kovalent bağı oluşturan her iki elektron atomların birinde kalır. Böylece serbest radikaller değil iyonlar meydana gelir.



3- Normal bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi: Radikal özelliği taşımayan bir moleküle, bir elektron transferi ile dış orbitalinde paylaşılmamış elektron taşıy hale gelirse, bu indirgenme radikal oluşumuna neden olur (56).



Serbest radikaller zincir reaksiyonları oluşturabilen kuvvetli reaktif ürünlerdir (57). Serbest radikaller hidroksil, süperoksit, nitrik oksit ve lipid peroksit radikalleri gibi değişik kimyasal yapılara sahiptir. Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir ve bunlara reaktif oksijen türleri (Reactive Oxygen Species, ROS) adı verilmektedir (4,49). Tablo 4’de oksijenden ve nitrik oksitten oluşan başlıca reaktif türler verilmiştir. Kimyasal olarak radikal yapısına sahip olan türler

paylaşılmamış elektron içeren atom üzerine konulan nokta ile belirtilmişlerdir. Nitrojen oksit türlerinin çoğu paylaşılmamış elektron içermeseler bile çok reaktiftirler (56).

Tablo 4. Oksijenden ve nitrik oksitten oluşan başlıca reaktif türler.

Tür	Adı	Tür	Adı
O ₂	Singlet oksijen	NO [•]	Nitrik oksit
O ₂ ^{••}	Süperoksit	NO ₂ [•]	Nitrojen dioksit
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit	NO ₂ ⁺	Nitril Katyonu
OH [•]	Hidroksil radikali	NO [•]	Nitroksil
ROO [•]	Peroksi radikali	NO ⁺	Nitrozil
ROOOH	Hidroperoksit	ONOO [•]	Peroksinitrit
RO [•]	Alkoksil radikali	ONOO [•]	Peroksinitrit radikali
ROOR	Endoperoksit	N ₂ O ₃	Dinitrojen trioksit
HO ₂ [•]	Hidroperoksit radikali	N ₂ O ₄	Dinitrojen tetroksit

Mitokondrilerdeki oksijenli solunumda olduğu gibi birçok anabolik ve katabolik işlemler sırasındaki reaksiyonlarda moleküler düzeyde elektron kaçışları olurken radyoaktivite, travma, ilaç kullanımı gibi durumlarda da ROS'lar oluşur. ROS'ların *in vivo* ortamdaki kaynakları aşağıda özetlenmiştir (58).

I - Normal biyolojik işlemler

- 1 - Oksijenli solunum
- 2 - Katabolik ve anabolik işlemler

II - Oksidatif stres yapıcı durumlar

- 1 - İskemi - hemoraji - travma - radyoaktivite - intoksikasyon
- 2 - Ksenobiotik maddelerin etkisi
 - a-) İnhal edilenler
 - b-) Alışkanlık yapan maddeler
 - c-) İlaçlar
- 3 - Oksidan enzimler
 - a-) Ksantin oksidaz
 - b-) İndolamin dioksigenaz
 - c-) Triptofan dioksigenaz

d-) Galaktoz oksidaz

e-) Siklooksijenaz

f-) Lipooksijenaz

g-) Monoamino oksidaz

4 - Stres ile artan katekolaminlerin oksidasyonu

5 - Fagositik inflamasyon hücrelerinden salgılanma (nötrofil, monosit, makrofaj, eosinofil, endotelyal hücreler)

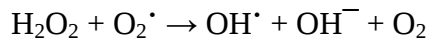
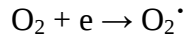
6 - Uzun süreli metabolik hastalıklar

7 - Diğer nedenler: Sıcak şoku, güneş ışını, sigara

4.3.1 Serbest Radikal Türleri

4.3.1.1. Süperoksit Radikalleri

Canlılarda oluştuğu ilk gösterilen radikal süperoksit radikalidir (56). Oksijene tek elektron transferi ile oluşan süperoksit radikali zayıf bir oksidandır. Doğrudan metabolizma sırasında veya ışınlanma gibi fiziksel nedenlerle oluşabilir ve metallerin veya enzimlerin katalizlemesi ile diğer moleküllerle etkileşerek sekonder ROS'ların oluşmasına sebep olur (59). Süperoksit radikalleri ortamdaki O_2 ve H_2O_2 demir varlığında etkileşerek oldukça reaktif olan hidroksil radikallerini oluşturmaktadır. Bu reaksiyon Haber-Weiss reaksiyonudur (57).

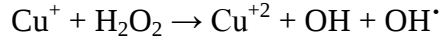
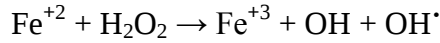


4.3.1.2. Hidroksil Radikalleri

Biyolojik sistemlerin tanıdığı en reaktif tür olan hidroksil radikalleri, su dahil ortamda rastladığı her biyomolekülle difüzyon limiti hızı ile tepkimeye girer. Bu nedenle 10^{-9} saniyeden daha kısa bir ömüre sahiptir. Biyolojik ve kimyasal sistemlerde üretilen hidroksil radikali canlılarda iki mekanizma ile oluşabilir:

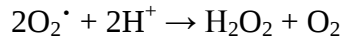
1. İyonlaştırıcı radyasyonun etkisiyle sulu ortamda su moleküllerinin iyonlaşması ile gerçekleşir.

2. Hidrojen peroksidin eksik indirgenmesi ile oluşur. Bu şekilde oluşan OH[•] üretimi, vücutta bu radikalın en önemli kaynağıdır. H₂O₂'in iki elektron ile indirgenmesi ile su oluşurken, tek elektronla indirgenmesi OH[•] yapımına neden olur. Fe, Cu gibi metal iyonları varlığında katalizlenen bu reaksiyon Fenton reaksiyonu olarak adlandırılır (56,60).

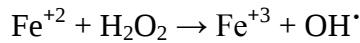


4.3.1.3. Hidrojen Peroksit

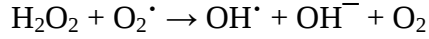
Hidrojen peroksit serbest radikal olmayan bir oksidandır. Süperoksit radikalının, hidrojen ile reaksiyona girmesiyle H₂O₂ oluşur. Bu reaksiyona dismutasyon reaksiyonu denir (61). Oluştuktan sonra yarı ömrü uzun olmakla beraber çok uzak mesafelere difüze olabilir.



Geçiş metalleri varlığında Fenton reaksiyonu ile kuvvetli reaktif olan OH[•] radikalleri meydana gelir (60).



Hidrojen peroksit, süper oksit radikalleri ortamdaki O₂ ve demir varlığında etkileşerek oldukça reaktif olan hidroksil radikallerini oluşturmaktadır. Bu reaksiyona Haber-Weiss reaksiyonu denir (57). Günümüzde hidroksil radikalının ürün olarak açığa çıktığı bilinen bu reaksiyona Haber-Weiss reaksiyonu denir ve hücrede meydana gelen ROS'lerinin pek çoğunun oluşumundan sorumlu tutulmaktadır (55).



4.3.1.4. Singlet Oksijen

Singlet oksijen normal oksijenden çok daha hızlı bir biyolojik moleküldür. Singlet oksijen molekülü yapısında iki adet çiftlenmemiş elektron taşır. Özellikle karbon-karbon çift bağları singlet oksijenin tepkimeye girdiği bağlardır. Singlet oksijen hücre membranındaki poliansatüre yağ asitleriyle doğrudan reaksiyona girerek lipid peroksitlerin oluşumuna yol açar. Güneş ışığının polimerler gibi birçok organik molekül üzerindeki hasar verici etkileri sıklıkla singlet oksijene dayandırılmaktadır (57,58).

4.3.2. Serbest Oksijen Radikallerinin Etkileri

Serbest radikaller, hücrel metabolizma sırasında veya ekzojen ajanlarla meydana gelen kimyasal ürünlerdir. Bu ürünler hücrelerde DNA, protein, lipid, karbonhidratlar gibi biyomoleküllerle etkileşime girmekte ve sonuçta meydana gelen oksidatif DNA hasarı mutajenite, karsinojenite ve yaşlanmaya yol açmaktadır (4). DNA'daki *in vivo* oksidatif hasarın varlığı 1980'li yıllara kadar saptanamamıştır. 1981 yılında Frenkel ve arkadaşları ince tabaka kromatografisi tekniğini kullanarak fare karaciğerinin DNA'sında oksidatif hasar sonucu timidin glikol oluştuğunu göstermişlerdir (55). ROS çoğu hastalıkların primer sebebi olmasa da patogenezlere rol oynayabilir ve doku hasarını arttırabilir. Birçok hastalıkta artmış ROS, primer bozukluğa ikincil olarak oluşur ve ardından patogeneze yer alır (62). Günümüzde hemen her hastalığın bir dereceye kadar oksidatif strese bağlı olduğu kabul edilmektedir (55). İskemi/reperfüzyon hasarı, Parkinson hastalığı, Alzheimer hastalığı, karaciğer rahatsızlıkları, romatolojik hastalıklar, akut renal yetmezlik, diyabet, anfizem/bronşit, kanser, yaşlanma, serebrovasküler bozukluklar gibi durumlarda ROS etkilidir (62). ROS, hücre zarlarının fosfolipid, glikolipid, gliserid ve sterol yapısındaki doymamış yağ asitleriyle reaksiyona girerek peroksitler, alkoller, aldehitler, hidroksi yağ asitleri, etan ve pentan gibi çeşitli lipid peroksidasyon ürünlerini oluştururlar (49).

4.3.3. Serbest Radikallerin DNA Üzerindeki Etkileri

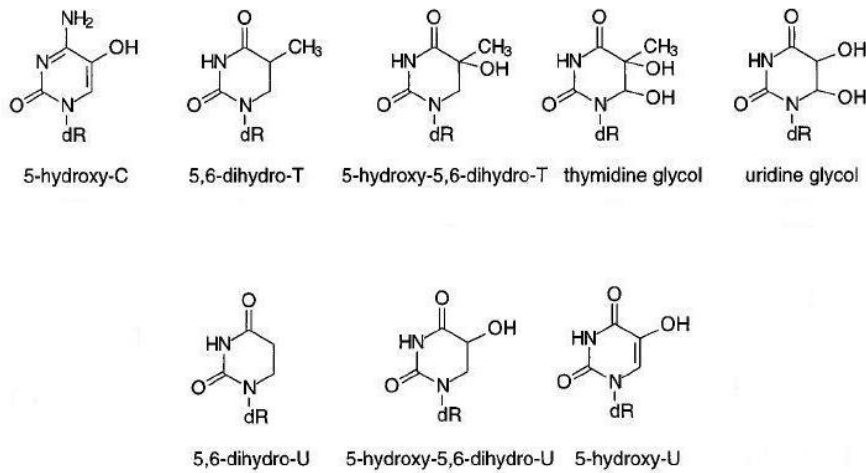
DNA, yaşam boyunca hücrel metabolitler ve ekzojen ajanlar tarafından sürekli olarak değişimlere maruz kalır. Genetik materyalin moleküler bütünlüğünde endojen veya ekzojen faktörlerin etkisiyle meydana gelen tüm değişiklikler genotoksisite olarak adlandırılır. DNA hasarı, hücrenin yaşamı boyunca yaygın olarak görülen ve mutasyon, kanser, yaşlanma ve sonuçta hücre ölümüne yol açabilen bir olaydır. Serbest oksijen radikalleri DNA hasarına neden olur. ROS, hücrel solunum, fagositoz, hücre yaralanması ve bazı enzimatik reaksiyonlar esnasında endojen olarak üretilebildiği gibi; çeşitli kimyasallar, hava kirliliği, sigara dumanı ve iyonlaştırıcı radyasyon gibi çevresel faktörler tarafından da oluşturulabilmektedir (4,46).

Vücutta doğal metabolik yollarla oluşan serbest radikaller normalde radikal parçalayan antioksidan sistemlerle ortadan kaldırılmaktadır (4). Yani sağlıklı bir organizmada oksidan düzeyi ve bunları etkisizleştirme gücü bir denge içindedir (62). Ancak, çeşitli nedenlerle ROS artması ve etkisizleştirme mekanizmalarının (antioksidan) yetersiz kalması sonucu oksidatif stres adı verilen bir dizi patolojik olay meydana gelmektedir. Oksidatif stresin, farklı mekanizmalar ile DNA üzerinde pürin/pirimidin bazları ve deoksiriboz-fosfat iskeleti hasarları, SSB, DSB, abazik bölgeler, DNA-protein çapraz bağlanması gibi bir takım lezyonlara neden olarak hasara yol açtığı bilinmektedir (4,57). DNA hasarı, ile oluşan bu değişimler tek hücreli organizmalarda hücrel ölüme veya çok hücreli organizmalarda dejenerasyon ve yaşlanmaya sebep olabilir (4). ROS'nin neden olduğu 100'den fazla oksidatif DNA hasarı tanımlanmıştır. DNA hasarlarının 20'den fazlası oksidatif baz hasar ürününün oluşmasından kaynaklanmaktadır (4,63). DNA'nın deoksiriboz iskeletinin oksidasyonu baz salınımını ve DNA zincir kırıklarını indüklerken, oksidatif baz modifikasyonları mutasyonlara yol açar (46).

Yapılan çeşitli araştırmalar süperoksit anyonunun ve onun dismutasyonu ile oluşan hidrojen peroksitin doğrudan DNA ile etkileşerek baz oksidasyonuna veya zincir kırıklarına yol açmadığını ancak geçiş metal iyonları varlığında Fenton reaksiyonu ile oluşan hidroksil radikallerinin DNA hasarı oluşturduğunu göstermiştir. Ayrıca beyinde

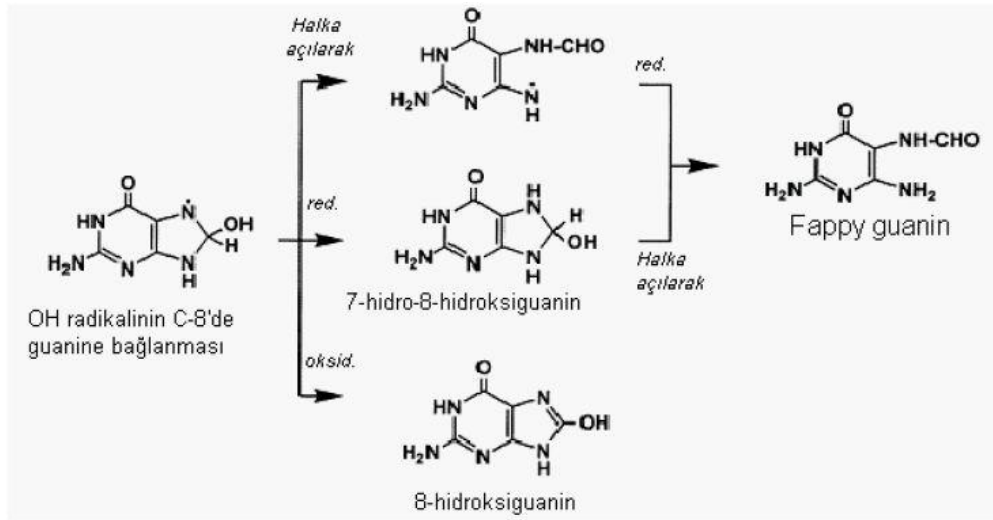
arginiden sentezlenen ve kan basıncının kontrolünde rol oynayan NO^- , süperoksit anyonuyla reaksiyona girerek peroksinitrit (ONOO^-) anyonunu oluşturur. ONOO^- protonlanarak kuvvetli bir oksidan olan peroksinitroz asidini oluşturur buda DNA hasarına sebep olur (46).

Elektron yönünden zengin olan pürin ve primidin heterosiklikleri alkali ajanlar, halojenler, okside edici ajanlar gibi elektrofiller için birinci hedefdir (64). Hidroksil radikalleri pirimidin bazları ile reaksiyona girerek birçok okside ürün meydana getirebilir (65). Primidinlerin 5C, 6C konumları kimyasal değişikliklerin en sık görüldüğü bölgedir (64). 5,6-dihidroksitimin (timin glikol) en çok çalışılan okside primidin bazlarındandır. Timin glikol, hidrojen peroksit, iyonlaştırıcı radyasyon, potasyum permanganat gibi ajanlara maruziyetten sonra en yaygın meydana gelen lezyondur ve DNA'nın çift sarmallı yapısında bozulmaya yol açar (66). Timin glikol, hücre içinde oluşuktan 24 saat sonra kandan temizlenerek idrara geçer. İdrarda bulunan deoksitimin glikol diyet kaynaklı değildir. İdrar timin glikol düzeyi de oksidatif DNA hasarının bir belirteci olarak değerlendirilebilir (46). Hidroksil radikallerinin sitozin bazına saldırmasıyla sitozin glikol oluşur. Sitozinin N4 amino grubu hidrolitik deaminasyona karşı hassastır (64). Sitozin glikol çok kararsız olduğu için deaminasyon ile urasil glikole veya dehidrasyon ile 5-hidroksisitozine dönüşür. Urasil glikol de dehidrasyona uğrayarak 5-hidroksiurasil dönüşebilir (66). Şekil 5'de pirimidinlerde oluşan çeşitli oksidatif DNA hasarları gösterilmiştir (64).



Şekil 5. Primidinlerde oluşan çeşitli oksidatif DNA hasarları

Hidroksil radikalleri DNA'nın pürin bazları ile C4, C5 ve C8 pozisyonlarından reaksiyona girerek sırasıyla C4-OH-, C5-OH-, ve C8-OH-pürin radikallerini oluşturmaktadır (65). Guanin bazının imidazol halkasının C8 konumunun oksidasyona uğraması ile DNA oksidasyon ürünleri içerisinde en çok oluşan ve en mutajenik olan 7,8-dihidroksi-8-oksoguanin (8-oksoG) oluşur (46). 8-oksoG halka açılmasını takiben indirgenerek ve yükseltgenerek Fapy Guanin olarak adlandırılan 2,6-diamino-4-hidroksi-5-formamidoprimidini oluşturur (65). Guaninin hidroksil radikali ile oluşan ara ürünlerin dehidratasyonu veya guaninin deprotonasyonu ile oluşan guanin radikali imidazolon ve oksazolon ürünlerini oluşturur (64). 8-OH guaninin, $G \equiv C \rightarrow T = A$ mutasyonuna neden olduğu çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur. Karsinogenez ile arasında doğrudan korelasyon olduğu *in vivo* olarak gözlenmiştir (46). Şekil 6'da Fapy Guanin oluşum mekanizmaları görülmektedir.



Şekil 6. Fapy Guanin oluşum mekanizması

DNA hasarında adeninin hidroksillenmesi daha az görülmekle beraber guanine benzer şekilde adenin bazının imidazol halkasının C8 pozisyonunda oksidasyona karşı oldukça duyarlıdır. Oksidasyona uğrayarak 7,8-dihidro-8-oksoadenin oluşur ve tıpkı guanine olduğu gibi 5-formamido-4,6-diaminoprimidine dönüşebilir (64-66).

4.3.4. DNA Tamir Mekanizmaları

DNA'da çevresel etmenlerle veya kendiliğinden oluşan hasarlar çeşitli DNA onarım mekanizmaları ile onarılır veya hücrenin programlı ölümüne neden olur (67). Hücrede DNA hasarına karşı dört önemli yanıt oluşur (68). Bunlar:

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

Canlı organizmalarda doğrudan DNA onarımı, nükleotid (NER) ve baz eksizyon onarımı (BER), rekombinasyonel onarım gibi çeşitli DNA onarım mekanizmaları tanımlanmıştır (67).

DNA hasarının en yıkıcı şekli DSB'dir ve onarılmazsa kromozomların kırılmasına, hücre ölümüne kadar varan sonuçlar doğurabilir. Yanlış onarılsa kromozom translokasyonuna ve kansere sebep olur. DSB'ye neden olan en önemli eksojen ajan iyonlaştırıcı radyasyondur. Ayrıca radon bozunumu ve antikanser ilaçlar da etkilidir. DSB oluşturan endojen ajanlar ise serbest radikaller oluşturan oksidatif metabolizma ve V(D)J rekombinasyonudur. DSB, genetik bilgi korunarak, homolog DNA ile rekombinasyon aracılığıyla tamir edilebilir. Ayrıca homolog bir kromozomdan faydalanmaksızın DNA uçları biyokimyasal olarak da bağlanabilir. Tek zincirdeki basit kırıklar DNA ligaz tarafından onarılır. Ancak, DNA ligaz, sadece, 5'-fosfat ve 3'-hidroksil gruplarına sahip uçları birleştirebilir. Kırık DNA uçları bağlanamadığı durumda genetik bilgi kaybı meydana gelir (69).

DNA'daki kimyasal olarak değişmiş, yanlış eşleşmiş veya uygun olmayan bazlar eksizyon tamiri ile genomdan kesilir ve yerlerine doğru dizideki bazlar koyularak tamir edilir. Eksizyon tamiri, BER ve NER olmak üzere ikiye ayrılır (63).

BER yanlış yerleştirilen ve hasarlı bazları uzaklaştırmak için kullanılan onarım mekanizmasıdır. BER sırasında hasarlı bazlar serbest baz olarak kesilir ve çıkartılır. Her yanlış baz tipine özğün birçok yolak vardır. Bu yolaklar son iki basamağı ortak olmak üzere üç adımdan oluşur. İlk önce yanlış bazın uygun bir DNA N-glikozilaz tarafından uzaklaştırılması ve bir apürinik/apirimidinik (AP) bölge oluşturulur. Daha sonra hasarlı DNA'ya AP bölgesinin 5' ucuna doğru AP endonükleaz tarafından çentik atılarak AP bölgesine komşu bir 3'-OH ucu oluşturulur. Son olarak da AP bölgesinin kesilip çıkarılarak uzaklaştırılır ve DNA polimeraz tarafından doğru nükleotid yerleştirilerek zincirin ligasyonu ile onarım tamamlanır. BER ile iyonlaştırıcı radyasyon, ROS ve monofonksiyonel alkilleyici ajanlar ile oluşun baz hasarları tamir edilir (63,69).

NER mekanizmasında ise hasarlı bazlar oligonükleotid fragmanları olarak kesilir. NER 20'den fazla proteinin görev aldığı bir kesme ve yapıştırma mekanizmasıdır. Bu mekanizmanın ilk basamağı, hasarın tanınması ve hasarlı zincirin 24-32 bazlık kısmının oligonükleotid olarak çıkartılmasıdır. Bu basamağı, DNA zincirinin DNA polimeraz-I ile uzatılarak boşluğun doldurulması ve ligasyon basamağı izler. NER mekanizması siklobütan pirimidin dimerleri gibi büyük DNA adüktlerinin tamirinde görev alır (63).

4.3.5. Antioksidan Savunma Sistemleri

ROS, normal hücrenel metabolizma sırasında veya dış etkenler aracılığı ile de meydana gelebilir. Oldukça dayanıksız ve aynı zamanda reaktif olan bu moleküller, hücredeki diğer moleküllerle etkileşime girerek oksidatif stres meydana getirirler (55). ROS zararlarına karşılık vücuttaki farklı doğal savunma sistemleri serbest radikalleri kontrol altında tutmaktadır. Yani sağlıklı bir organizmada oksidan düzeyi ve bunları etkisizleştirme gücü bir denge içindedir. Bu sistemler farklı hücrelerde ve farklı serbest radikaller üzerinde rol oynadıkları için birbirlerini tamamlayıcı niteliktedir (62,70).

Serbest radikallerin neden olduğu oksidasyonları önleyen, serbest radikalleri yakalama ve stabilize etme yeteneğine sahip maddelere antioksidan adı verilir (70).

Antioksidanlar, hem doğrudan, hem de dolaylı olarak serbest radikal reaksiyonlarının istenmeyen etkilerine karşı hücreleri koruyan maddelerdir (49). Antioksidanlar mekanizmalarına göre, birincil ve ikincil antioksidanlar olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Birincil antioksidanlar; mevcut radikallerle reaksiyona girerek bunların daha zararlı formlara dönüşmelerini ve yeni serbest radikal oluşumunu önleyen süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx) ve katalaz (CAT) gibi enzim sistemleridir (70). SOD'un yapısında bakır, çinko ve manganez; GPx'de ise selenyum iyonu bulunduğundan bu enzimler metaloenzim olarak da adlandırılırlar. İkincil antioksidanlar enzim yapısında olmayan, vitamin-C, vitamin-E, glutatyon, ürik asit, bilirubin, karetonoidler, flavonoidler ve polifenoller gibi serbest oksijen radikallerini yakalayan ve radikal zincir reaksiyonlarını kıran bileşiklerdir (58,59).

4.3.5.1. Antioksidan Etki Mekanizmaları

Antioksidanlar yükseltgenebilen maddeler olduğundan zincirleme reaksiyonu koparmaları sırasında kendileri yükseltgenerek bozunurlar. Bu nedenle antioksidanlar yalnız sınırlı bir zaman için okside olması muhtemel maddeyi koruyabilir ve belli bir noktadan sonra madde ortamda hiç antioksidan yokmuş gibi yükseltgenmeye devam eder. Antioksidanların kimyasal aktiviteleri yani indirgeme potansiyelleri onların serbest radikal yutucu olarak göstermiş oldukları potansiyel ile ifade edilir (71). Bir antioksidanın aktivitesi şu esaslara bağlıdır;

1- Radikal süpürme yeteneği: Özellikle enzimatik reaksiyonlar aracılığıyla ve serbest radikalleri yakalama veya daha az etkili moleküllere çevirme işlemidir. Tiyol grupları içeren enzimler hücresel antioksidanlardır. Fenolik bileşiklerde radikal yakalayıcı etki gösterirler.

2- Hidrojen veya elektron donör aracı olarak göstermiş olduğu aktivite yani indirgeme potansiyellerine bağlı olan bastırıcı etkidir. Bilirubin, vitaminler, vb.

3- Metal kelatlama potansiyeli: Süperoksit radikali ve hidrojen peroksit özellikle serbest demir ve bakır iyonu varlığında hidroksil grubu gibi daha tehlikeli radikallere dönüşebilir. Bu durumda demir ve bakır iyonlarının bağlı duruma getirilerek antioksidan etki oluşturulabilir. E ve C vitamini, transferrin, seruloplasmin, albumin vb.

4- Zincir kırıcı etki: Serbest radikal üreten kimyasal reaksiyonları durdurarak etkinlik gösterebilirler. SOD, GPx, CAT, E ve C vitamini vb.

5- Onarıcı etki: Lipid, protein ve DNA gibi yapılarda oluşmakta olan biyolojik moleküler hasarı rejenere ederek etki gösterebilirler. Bazı polifenolik bileşikler, BER mekanizmasında görev alan 8-oxoG DNA glikosilaz-I, AP endonükleaz ve DNA polimeraz- β gibi DNA tamir enzimlerinin aktivitelerini ve ekspresyonlarını indükleyerek antioksidan etki gösterirler.

6- Endojen savunmayı artırma: SOD gibi antioksidan enzimler ile enzimatik olmayan antioksidanların sentezini arttırarak etkinliklerini gösterebilirler. Ör: E vitamini (58,70-73).

4.4. DNA Hasarını Belirlemede Kullanılan Yöntemler

Fiziksel ve kimyasal ajanların etkisiyle DNA üzerinde SSB, DSB, alkali labil bölgeler ve DNA adductları oluşur. Genetik materyal üzerinde oluşan bu hasarlar tamir edilemediğinde DNA sekans değişiklikleri, kromozom aberasyonları ile sonuçlanabilen tek veya birden fazla nükleotid değişiklikleri ve bunların sonucu olarak da rekombinasyon, mutasyon, doku hasarı, yaşlanma, kanser oluşabilmektedir (74). Son yıllarda DNA hasarlarının belirlenmesi için çok sayıda kimyasal ve biyokimyasal testler geliştirilmiştir (4,7). Bunlar immunokimyasal teknikler, kapiller elektroforez, comet testi, florometrik DNA unwinding analizi (FADU), kardeş kromatid değişim yöntemi (SCE), mikronükleus yöntemi (MN), ^{32}P post labeling ölçüm teknikleri, alkalın elüsyon testi ve kromatografik teknikler (HPLC-ECD, GC-MS, LC-MS, LC-MS-MS) şeklinde sıralanabilir (4). DNA'daki hasar düzeyinin ölçülmesinde kullanılan en yaygın ölçme yöntemlerinden birisi olan comet yöntemi, hassas, basit ve hızlı bir görsel floresan tekniğidir. Comet yöntemi, hücrelerde çeşitli ajanların indüklediği DNA hasarı ve onarım bozukluklarının tayini amacıyla genetik toksikolojiden moleküler epidemiyolojiye kadar pek çok alanda kullanılmaktadır (7).

4.4.1. Comet Analizi

DNA'nın kısmi olarak çözünmesine izin veren hafif alkali koşullar altında preparat üzerindeki agarozda hücrelerin liziz edilmesi ve gömülmesi ile bu hücrelerdeki DNA hasarını ilk belirleyenlerin Rydberg ve Johanson olduğu bilinmektedir. Nötralizasyondan sonra akrinin oranı ile DNA'yı boyamışlar ve DNA'daki hasarın boyutunu fotometre ile yeşil floresansın (DSB gösteren) kırmızı floresansa (SSB gösteren) oranı olarak belirlemişler ancak bu teknik çok yaygın olarak kullanılmamıştır (7). İlerleyen zaman içerisinde hücrelerdeki DNA hasar tespitinde duyarlılığı geliştirmek için 1984 yılında Östling ve Johannson hücrelerde gama radyasyondan sonra nötral şartlarda DNA hasarını çalışmak için gelişmiş bir mikro-elektroforetik yöntem uygulamışlardır (75). Bu uygulamada agarozda süspanse edilen radyasyona maruz kalmış hücreler lam üzerine yayılarak, yüksek tuz ve deterjanla lize edilmiş ve ardından elektroforeze tabi tutulduktan sonra DNA bağlayıcı floresan boya olan akrinin oranı ile boyanmışlardır. Sonuçta kırık içeren DNA'ların gevşediğini, kırılmış DNA fragmanları nedeni ile elektrik yük kazandığını ve çekirdekte anota doğru göç ederek kuyruklu yıldız görünümünü vermesinden dolayı hasarlı hücreleri comet olarak adlandırmışlardır. Yine kuyruk uzunluğu DNA hasarını saptamak için ölçülmüş ve kuyruk uzunluğunun radyasyon dozunun bir fonksiyonu olduğu belirlenmiştir (7). Araştırmalar sonucunda nötral deney şartlarının denatürasyonu hızlandırmadığı ve bunun sadece DSB tanınmasına yol açtığı gözlenmiştir. Bu ise genotoksosite hakkında daha az hassas sonuçlar elde edilmesine yol açmıştır (75). Konu üzerinde çalışmalar devam etmiş ve 1988'de Singh ve arkadaşları 1989'da Olive ve arkadaşları tarafından yöntemin iki farklı alkali versiyonu bulunmuştur (76). Klaude ve Collins kuyruk oluşturma altında yatan nedenin alkali şartlarda iplikçiklerin gevşemesi olduğunu bulmuşlar ve yaptıkları çalışmalarda nötral şartlarda kuyruk kısmında sadece gevşek iplikçikler varken DNA parçacıklarının alkali ortamda bulunduğunu göstermişlerdir. Zira alkali ortamda bağların çözülmesi ve DNA moleküllerinin denatürasyonu daha kolaydır. Bu DNA'da tek bağ hasarına neden olur. Bu nedenle son yıllarda tercih edilen yöntem alkali ortamda DNA hasarını çalışmak olmuştur (75). Kullanılan daha güçlü lizis koşulları proteinlerin %95'inden fazlasını yok edebilmekte böylelikle tekniğin yeni tasarımı hücrelerin hemen hepsinde DNA hasar büyüklüğünün doğrudan tespitine

olarak sağlamaktadır (7). Ayrıca son yıllarda, N/N (Nötr gevşeme/Nötr elektroforez) ve A/N (Alkali gevşeme/Nötr elektroforez) şeklinde de uygulanmaya başlanmıştır (77). Lezyon spesifik endonükleazlar kullanılarak modifiye protokoller geliştirilmiştir. Standart alkali comet yöntemi zincir kırıklarını ve alkali labil bölgeleri belirlerken; endonükleazların kullanıldığı bir basamak ile okside bazların varlığı kolaylıkla saptanabilir. Bunun için lizizden sonra, agaroz gömülü hücreler lezyon spesifik endonükleazlarla muamele edilir. Formamidopirimidin DNA glikozilaz (FPG); okside pürin 8-oksoG, halkası açılmış pürinleri, ve formamidoprimidinleri tanır. Endonükleaz-III okside pirimidinleri zincir kırığına çevirir. FPG'nin kullanıldığı comet yöntemi, insan hücrelerindeki oksidatif DNA hasarının, bazal 8-oksoG seviyesi ile belirlenmesinde kullanılır. Bununla beraber FPG alkilasyon hasarlarını da tanıyabilmektedir. T4 pirimidin dimer glikozilaz; siklobütan pirimidin dimerlerini zincir kırığına çevirir ve UV ışığın verdiği DNA hasarını belirlemede etkilidir. Ayrıca, urasil DNA glikozilaz kullanılarak yanlış birleşmiş urasiller tanınabilir (78).

4.4.1.1. Kullanım Alanları

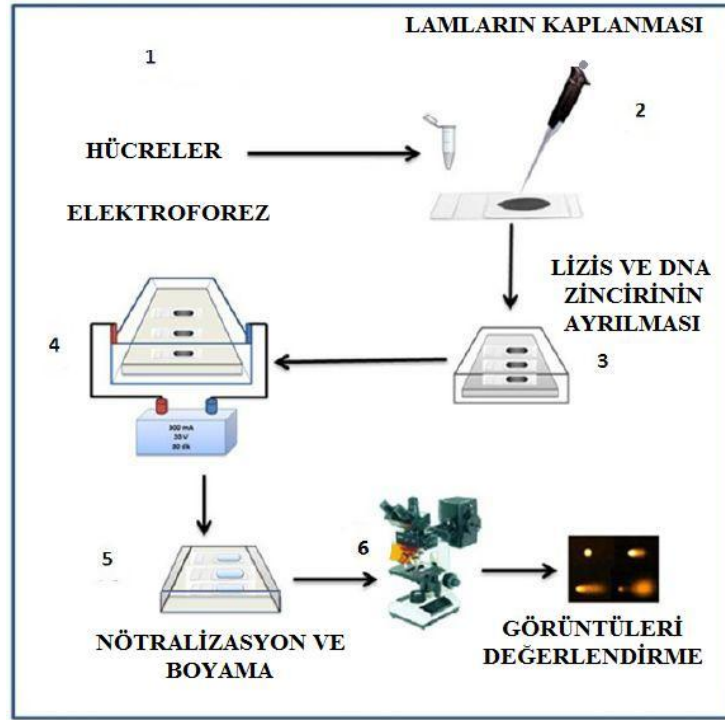
Comet yöntemi günümüzde ilaçlar, tarım ilaçları ve endüstriyel kimyasalların oluşturduğu genotoksitenin araştırılmasında kullanılmaktadır (79). Kemoterapi tedavisi sonrasında veya mesleki olarak DNA üzerine zarar veren etkenlere maruz kalma sonucu oluşan hasarın belirlenmesinde de kullanıldığına dair birçok çalışma vardır (76). Comet yöntemin spesifik lezyonları tespit edebilme özelliği hücresel DNA tamiri konusunda yeni bir araştırma alanı açmıştır. Ayrıca insan popülasyonlarındaki DNA hasarının biyoizleniminde lezyona özgü enzimlerle modifiye comet protokolünden yararlanılmaktadır (80).

4.4.1.2. Comet Protokolü

Singh ve arkadaşları tarafından geliştirilen alkali comet protokolü 7 basamaktan oluşmaktadır (77,81,82).

- 1-Mikroskopik lamaların hazırlanması
- 2-DNA'nın serbestleşmesi için hücrelerin lizizi
- 3-Zincir kırıkları gibi lezyonların açığa çıkması için alkali muamele (pH>13)
- 4-Alkali şartlarda elektroforez (pH>13)
- 5-Alkali şartların nötralizasyonu (pH=7.5)
- 6-DNA'nın boyanması ve comet görüntülemesi
- 7-Comet skorlaması

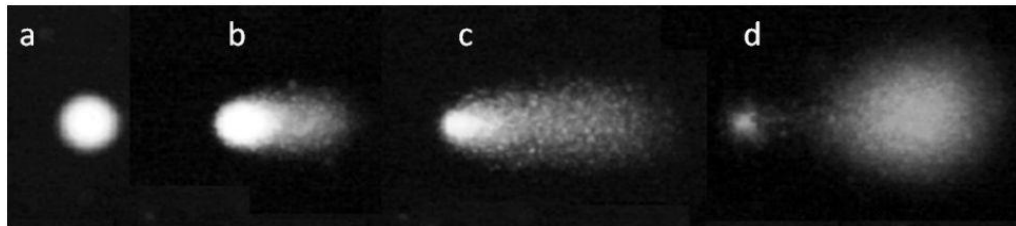
Tekniğin uygulanmasında 2 tip jel modeli vardır. Tek tabakalı jel ve sandviç jeller. Daha yaygın olarak kullanılan, sandviç modelidir (82). Hücreler %1 düşük kaynama noktalı agaroz jel, %1 normal kaynama noktalı agaroz jel arasına sandviç edilir. Gömülen bu hücreler, 1 saat boyunca pH'sı 10 olan, 100 mM EDTA, 2.5 mM NaCl, 10 mM Tris , %1 (v/v) ve Triton X-100'den oluşan liziz solüsyonunda bekletilir. Deterjan ve yüksek tuz konsantrasyonunda bekletilen hücreler lizize uğrayarak protein ve lipidlerden kurtulur ve membran üzerinde porlar açılmış olur (81). Elektroforezden önce lamalar alkali elektroforez solüsyonunda DNA sarmalının ayrılması için bekletilir. Bu solüsyon pH>12 ve düşük tuz konsantrasyonunda olmalıdır. Uygulanacak olan elektroforez süresi ve voltajı hücrelerdeki DNA göçünü etkilediği için, her denemede standart seçilen biri kullanılmalıdır. Elektroforezi takiben lamaların yıkanması için en çok tris tamponu tercih edilir. En son olarak akridin oranj, ethidium bromit, propidium iodit gibi DNA bağlayıcı boyalarla flöresan renk oluşturulur (82). Daha hassas fakat oldukça pahalı olan YOYO-1, DAPI gibi boyalar ve bazı preparat hazırlama teknikleri ve ortamları, kullanılan tekniğin hassasiyetini ve güvenilirliğini arttırmak ve çok daha düşük düzeyde seyreden DNA hasarlarını tespit etmek için kullanılmıştır (77). Şekil 7'de alkali comet tekniğinde kritik basamakların şematik olarak gösterilmiştir (7).



Şekil 7. Alkali comet tekniğinde kritik basamakların şematik gösterimi

4.4.1.3. Comet Görüntülerinin Değerlendirilmesi

DNA hasarının tek hücre düzeyinde mikroskopik olarak tespit edildiği comet yönteminde görüntülerinin değerlendirilmesi görsel analiz ve bilgisayar analizi olmak üzere iki şekilde yapılır. Görsel analizde hücre DNA'ları floresan boya ile boyandıktan sonra floresan mikroskop altında farklı şekil ve kuyruk uzunluklarına göre hasar büyüklüğü hasarsızlıktan en çok hasara doğru 0-4 arasında olacak şekilde sınıflandırılır. Görsel analiz hızlı, basit, pahalı analitik ekipman ve yazılım gerektirmediği için daha kullanışlı bir tekniktir (77,83). Şekil 8'de görsel analiz ile comet skorlaması gösterilmiştir (7).



Şekil 8. Görsel analiz ile comet skorlaması (a: Normal, b, c ve d: Hasarlı DNA)

Bilgisayar analizinde ise mikroskoba bağlı bilgisayar ve çeşitli yazılımlar yardımıyla kuyruklu hücrelerin yüzdesi, kuyruk uzunluğu, kuyruktaki DNA yüzdesi, kuyruk momenti gibi parametreler ile DNA hasarı başarılı ve objektif olarak belirlenebilir. Son yıllarda değerlendirmede lazer taramalı mikroskop teknolojisi kullanılarak DNA sarmal kırıklarındaki farklılıklar kolaylıkla tespit edilmektedir (7,83).

4.4.1.4. Comet Tekniğinin Avantajları

Diğer genotoksisite tayin yöntemleri ile karşılaştırıldığında; düşük düzeylerde DNA hasarlarının saptanabilmesindeki yüksek sensitivitesi, tek hücre düzeyinde çalışılabilir olması, kısa sürede ve kolay uygulanabilirliği ve düşük maliyeti comet yönteminin avantajlarındanr (75). Sadece hızlı çoğalan hücrelerde uygulanabilen genotoksisite testlerine göre comet yöntemi *in vivo* modellerde herhangi bir dokuya uyarlanabildiği için daha üstündür (79). Beyaz kan hücreleri kolaylıkla kullanılabilir (81). İnsan popölasyonlarındaki DNA hasarının belirlenmesinde başarılı bir şekilde uygulanabilmektedir (80). İnsan biyoizleme çalışmalarında çok düşük düzeydeki genotoksin maruziyetinin ölçümünde etkili bir yöntemdir. Lezyon spesifik endonükleazlarla modifiye edilmiş comet protokolü ile insanlarda oksidatif DNA hasarı ve tamir mekanizmaları incelenebilir (81).

4.4.1.5. Comet Tekniğini Etkileyen Faktörler

Bu ölçüm yönteminde yapılan işlemler laboratuvar koşullarına göre farklılık göstermekle beraber agaroz jelin konsantrasyonu, pH, sıcaklık, alkali ortamın pH'sı, voltaj, amper ve elektroliz süresine bağlı olarak tekniğin duyarlılığı değişebilmektedir (7,79). Ayrıca sağlıklı ve tedavi almamış kişilerin; yaşı, hava kirliliği, diyet, cinsiyet, sigara, güneş ışığına maruziyet, enfeksiyon ve meslek gibi nedenlerden dolayı DNA hasarlarında değişiklik oluşturan faktörler vardır; dolayısıyla mevcut şartlarda, çevresel ve fizyolojik değişikliklerin comet yönteminin varyasyonlarına katkısını tahmin etmek zordur (76).

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. Gereçler

5.1.1. Cihaz ve Malzemeler

Co-60 Teleterapi Cihazı (General Electric Alcyon-II P), hücre kültürü kabini (Heraeus KS-12 Air Flow), ışık mikroskobu (Nikon Eclipse TS 100), CO₂ inkübatörü (Heraeus-Heracell 240), santrifüj (Eppendorf 5810), floresan mikroskop (Nikon Eclipse E800), hassas terazi (Mettler Toledo AB204-S), pH metre (Hanna Instrument), mikro dalga fırın (Altus ALMD 17I), çalkalayıcı inkübatör (Shellab/Sheldon S14-2), vorteks (IKA Genius 3), magnetik karıştırıcı (Termal), aspiratörlü pipet (JetPip Pipette Aid), membran filtreleri (Agilent Econofilter 0.2 µm), semiotomatik pipetler (0.5-10 µL, 10-100 µL, 100-1000 µL), standart T-25 ve T-75 hücre kültür flasks, 15 mL'lik ve 50 mL'lik steril falkon tüpler, 25 mL, 10 mL ve 2 mL'lik steril disposable pipetler, steril pipet uçları (Sarstedt biosphere filter tips), beher, erlen, balonjoje, cam şişe gibi çeşitli cam malzemeler, 5-10-20 ve 50 mL'lik steril enjektör, steril cerrahi eldiven, UV lamba, etüv, Neubauer lamı ve lameli, 0.5 ve 1.5 mL'lik eppendorf tüpler, 1/3 rodajlı lamalar, 24x24 mm lameller, elektroforez tankı, elektroforez güç kaynağı, pens, yatay ve dikey tip boyama şaleleri, lam sepeti, kurutma kağıdı, magnetik bar, buzdolabı, çeker ocak, tüp sporu.

5.1.2. Kimyasal Malzemeler

Dimetil sülfoksit (DMSO, Ambresco), penisilin+streptomisin (Gibco 15140), fetal bovine serum (Biochrom S0113), tripsin/EDTA solüsyonu (Gibco 25300), tripan blue (Sigma), etanol (Carlo Erba reagent), DMEM (Lonza BE12-604F), EDTA disodyum tuzu (Sigma), NMP Agaroz (Lonza), agarose type 1-A low EEO (Sigma), poly L-Lysine (Biochrom), etidyum bromür (Sigma), PBS tablet (Oxoid), pH metre kalibrasyon çözeltileri (4.01, 7.00, 9.18), sodyum klorür (NaCl, Sigma), tris baz (Vivantis), triton X-100 (Sigma), sodyum hidroksit (NaOH, Riedel-de-Haen), amifostine (ETHYOL®), parafin, silikon yapıştırıcı.

5.2. Yöntemler

5.2.1. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

DMEM Hazırlanması

442.5 mL DMEM (glukoz içeren) üzerine 50 mL FBS ve 7.5 mL penisilin-streptomisin eklendi. 50 mL'lik falkon tüplere bölünerek +4 °C'de saklandı.

Propolisin Etanolik Ekstraktlarının Hazırlanması (25 mg/mL)

Fanus Gıda tarafından, Türkiye'nin çeşitli yörelerinden toplanarak temin edilen ve buzdolabında -20 °C'de dondurulmuş olan doğal propolis ürünü rendelendi. Rendelenen propolis, öğütücüde toz haline getirildi ve -20 °C'de donduruldu. 0.5 g toz propolis 10 mL saf etanol ile çözüldü. Saf etanol ile 20 mL'ye tamamlandı. İyice vortekslendikten sonra 60 °C'de 150 rpm'de sürekli çalkalanarak 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra 4000 rpm'de 10 dk santrifüjlendi. Partikülleri tam çökmeyen propolis ekstraktları 10000 g'de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatantlar süzgeç kağıdından süzüldü ve ardından 0.22 µm'lik filtrelerden geçirildi. Daha sonra kullanılmak üzere alikotlanıp -20 °C'de, karanlıkta saklandı.

PBS (Phosphate Buffered Saline), pH 7.4, 1 L

Temiz bir behere 900 mL kadar saf su ve 10 tane PBS tablet konularak manyetik karıştırıcıda manyetik bar yardımıyla çözüldü. pH-metrenin kalibrasyonu yapıldıktan sonra çözeltinin pH'sı 7.4'e ayarlandı. Çözelti balon jojeye aktararak, saf su ile son hacim 1 L'ye tamamlandı ve +4 °C'de saklandı.

Liziz Çözeltisi, pH 10, 250 mL

NaCl, 2.5 M, 36.525 g, EDTA, 100 mM, 9.306 g, TRİS, 10mM, 0.3025g tartılarak behere konuldu. Üzerine 200 mL saf su ilave edilip magnetik karıştırıcıda magnetik bar

yardımıyla çözünür hale getirildi. Kalibre edilmiş pH metre ile pH 10'a ayarlandı. Balon jojeye aktarıldıktan sonra saf su ile son hacim 250 mL'ye tamamlandı ve 2-8 °C'de saklandı. Kullanılmadan önce son konsantrasyonu %1 (v/v) olacak şekilde 247.5 mL liziz çözeltisi içerisine, 2.5 mL Triton X-100 eklendi.

Elektroforez Tampon Çözeltisi, pH 13.1, 500 mL

3M NaOH: 60 g NaOH tartıldı, 500 mL saf suda çözüldü ve 2-8 °C'de saklandı. 10 mM EDTA: 0.37224 g EDTA tartıldı, 100 mL saf suda çözüldü ve 2-8 °C'de saklandı. 50 mL 3 M NaOH, 50 mL 10 mM EDTA, 10 mL DMSO mezürle ölçülerek behere aktarıldı ve üzerine 400 mL saf su ilave edildi. Kalibre edilmiş pH metrede pH 13.1'e ayarlandı. Çözelti balon jojeye aktarılıp saf su ile son hacim 500 mL'ye tamamlandı ve çözelti 4 °C'de saklandı.

Nötralizasyon Tampon Çözeltisi, 0.4 M, pH 7.5, 250 mL

24.2289 g TRİS tartıldı ve temiz bir behere aktarıldı ve 200 mL kadar saf su içerisinde magnetik karıştırıcıda magnetik bar yardımıyla çözüldü. Çözelti balon jojeye aktarılarak son hacim saf su ile 250 mL'ye tamamlandı ve 2-8 °C'de saklandı.

LMP Agaroz Jel, % 1 (PBS içinde)

0.1 g LMP agaroz tartıldı, üzerine 10 mL PBS (pH 7.4) eklendi. Mikrodalga fırında orta ısı ayarında 30 saniye kaynatılarak hazırlandı.

NMP Agaroz Jel, % 0.75 (PBS içinde)

0.075 g NMP agaroz tartıldı, üzerine 10 mL PBS (pH 7.5) eklendi. Mikrodalga fırında orta ısı ayarında 30 saniye kaynatılarak hazırlandı.

Polilizin Kaplama Çözeltisi, 70 mL

7 mL poli L-Lizin, 7 mL PBS ile karıştırıldı ve üzerine 56 mL saf su ilave edildi. Karışım 4 °C’de saklandı.

Etidyum Bromür

80 mL PBS (pH 7.4) içine 32 µL etidyum bromür (100 µg/mL) eklenerek hazırlandı.

5.2.2. Jellerin Döküleceği Lamaların Polilizin ve NMP Agaroz ile Kaplanması

Lamlar polilizin ile normal kaynama noktalı agaroz jelin tutunmasını kolaylaştırmak için önceden kaplandı (13,79). Bu kaplama işleminde sırasıyla;

1. Lamlar ve lameller % 70’lik alkol çözeltisiyle iyice silinerek oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı.
2. Kuruyan lam alındı, üzerine 75 µL polilizin damlatılıp ikinci bir lam ile sandviç modeliyle sıkıca bastırılıp çekilmek suretiyle polilizin her iki lam arasında yayılması sağlandı ve lamlar oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı.
3. Kuruyan lamlar alındı ve üzerine mikrodalga fırının orta ısı ayarında 30 saniye kaynatılmış % 0.05’lik NMP agaroz çözeltisinden 75 µL aktarılıp, kabarcık oluşturmada lamel kapatıldı. Lamel kapatılan lamlar 4 °C’de 5 dakika bekletildi. Süre sonunda çıkarılan lamaların üzerindeki lameller çekilerek alındı ve lamlar oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı.

5.2.3. Hücre Kültürü

Bütün hücre kültürü çalışmaları hücre kültürü kabininde steril ortamda gerçekleştirildi. Hücre kültürü çalışmalarına başlamadan önce kabin % 70’lik etanol ile silindi. UV ışıktan etkilenmeyen ve kabin içerisinde kullanılacak olan malzemeler kabin içerisine konularak 15 dakika UV ışığa maruz bırakıldı. Çalışma sonunda kabin %

70'lik etanol ile tekrar silindi. Kabinin kapağı kapatıldı. Kabin ve hücre kültürü odası 1 saat UV ışığa maruz bırakıldı.

5.2.3.1. Primer Fibroblast Hücrelerinin Elde Edilmesi ve Çoğaltılması

Çalışmada K.T.Ü Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan temin edilen primer fibroblast hücreleri kullanıldı. Fibroblast hücreleri L-Glutaminli, % 10 FBS, % 1 penisilin+streptomisin içeren DMEM besiyerinde, % 5 CO₂ ortamında, 37 °C'de, T-25 ve T-75'lik flasklarda, inkübatörde çoğaltıldı. Donmuş hücreler aşağıdaki şekilde çözüldü.

1. Kriyovial içinde bulunan 1 mL fibroblast hücreleri azot tankından çıkarıldıktan sonra 37 °C su banyosunda tamamen çözüldü.
2. Fibroblast hücreleri (1 mL) 15 mL'lik falkon tüpe aktarıldı ve hacmi L-Glutaminli, %10 FBS, %1 penisilin+streptomisin ve yüksek oranda (4.5 g/dL) glukoz içeren DMEM besiyeri ile 10 mL'ye tamamlandı.
3. Hücre süspansiyonu 400 g'de 5 dakika santrifüj edildi.
4. Santrifüj sonunda süpernatant kısmı 1 mL kalacak şekilde uzaklaştırıldı ve hücre çökeleği tüpün ucuna parmak ucuyla vurularak, hücreler 1 mL besiyeri içinde çözüldü.
5. Çözülen hücrelerin üzerine istenilen miktarda taze DMEM besiyeri eklendi ve %5 CO₂ ortamında, 37 °C'de, T-75'lik flasklarda, inkübatörde çoğaltıldı.

5.2.3.2. Primer Fibroblast Hücrelerinin Pasajlanması

Büyütülen hücreler flask yüzeyinin % 70-80'lik kısmını kapladıktan sonra hücre pasajlaması yapıldı.

1. Pasajlama için öncelikle hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırıldı.
2. 5 mL PBS ile hücreler yıkandıktan sonra flasklara, 1 mL tripsin-EDTA solüsyonu eklendi. Eklenen tripsin 1 dakika hücreler üzerinde gezdirildi ve flasklar inkübatörde 2 dakika bekletildi.

3. İnkübasyon sonrası 5'er mL DMEM ile hücreler falkon tüp içerisinde toplandı ve hücre süspansiyonu 400 g'de 5 dakika santrifüjlendi.

4. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırıldı. Hücreler 1 mL besiyeri içinde sulandırılarak sayıldı. Hücre sayımı yapıldıktan sonra T-25 flasklara uygun sayıda hücre aktarıldı ve toplam besiyeri hacmi de 5 mL'ye tamamlandı.

5.2.4. Primer Fibroblast Hücrelerinin Canlılıklarının Tespiti ve Sayılması

Tripsinizasyonla kaldırılan hücreler santrifüjlenerek 1000 µL DMEM 1 640 (%10 FBS, %1 Pen/Strep) besiyeri ile çözüldü. Oluşan bu hücre süspansiyonundan 10 µL alındı ve 10 µL tripan blue ile karıştırılarak neubauer hematositometre lamına aktarıldı. Işık mikroskobu altında canlı hücreler sayıldı. Ölü hücrelerde boya membran tarafından absorblanır fakat işlev görmeyen Na^+ - K^+ ATPaz pompası nedeniyle dışarı atılamaz (84). Dolayısıyla ölü hücreler mikroskopta mavi renkte görünürken; canlı hücreler sarı-yeşil renkte görüldü.

5.2.5. Comet Yönteminin Uygulanması

Işınlamanın ardından hücreler comet laboratuvarına getirildi ve bundan sonraki aşamalar mümkün olduğu kadar karanlıkta gerçekleştirildi. Önceden polilizin ve NMP agaroz ile kaplanmış lamalar çıkarılıp numaralandırılarak, bu aşamaya kadar olan her şey laboratuvar defterine kaydedildi. Farklı gruptaki hücreleri içeren flasklardan 40 µL hücre süspansiyonu alınarak 0.5 mL'lik eppendorf tüplere dağıtıldı. Bu esnada çalışma sabahı hazırlanan LMP agaroz, mikrodalga fırının orta ısı ayarında 30 saniye kaynatıldı ve bir müddet bekletilerek 37 °C'ye gelmesi sağlandı. LMP agarozdan 80 µL alınarak eppendorfa aktarıldı ve pipetaj yapılarak hücre süspansiyonu ile homojen bir şekilde karışması sağlandı. Bu karışımdan 80 µL alınarak daha önceden polilizin ve NMP agaroz ile kaplanmış ve uygun numaradaki lama otomatik pipet ile yayılarak üzerine lamel kapatıldı. 5 lam da bu şekilde hazırlandıktan sonra lamalar 4 °C'de 5 dakika bekletildi. Bu süre sonunda buzdolabından çıkarılan lamalar üzerindeki lameller hafifçe çekilerek uzaklaştırıldı ve lamalar tekrar 4 °C'de 5 dakika bekletildi. Daha sonra liziz çözeltisi içine son konsantrasyonu % 1 (v/v) olacak şekilde Triton X-100 ilave edildi ve

karıştırıldı. Hazırlanan çözelti 4 °C’de bekleyen hücreler üzerine hafifçe tatbik edildi ve hücreler liziz çözeltisi içinde 1 saatlik inkübasyona bırakılarak, lizize uğratıldı.

Bir saatlik lizizden sonra, lamalar liziz çözeltisinden çıkarılarak hepsi aynı yöne bakacak şekilde elektroforez tankına yerleştirildi. Elektroforez tankı lamaların üzerini kapayacak seviyeye kadar elektroforez tamponuyla (pH 13.1) dolduruldu. Elektroforeze tabi tutulmadan önce hücrelerin nükleuslarındaki DNA, pH 13.1’de 30 dakika süreyle alkali muameleye uğratıldı. Böylece, DNA denatüre edilerek, tek zincir haline gelmesi sağlandı.

Alkali muamelenin bitiminde elektroforez tankının üzerine ve kenarlarına buz aküleri yerleştirildi. Güç kaynağı açılarak volt değeri 22 V (1V/cm), akım değeri 300 mA olacak şekilde ayarlandı ve hücreler 20 dakika elektroforeze tabi tutuldu.

Elektroforezden sonra lamalar, elektroforez tankından çıkarılarak pH 7.4’de nötralizasyon tamponu içerisinde 20 dakika nötralize edildi. Nötral pH değerinde DNA’nın renatürasyonu sağlanmış oldu.

40 mL PBS içerisine 16 µL etidyum bromür ilave edilerek karıştırıldı. Nötralize edilen DNA’ları içeren lamalar bu boyanın içinde 20 dakika bekletildi. Bu sayede DNA’nın floresan boya ile boyanması sağlandı.

Boyanan jellerdeki DNA’lar, fotoğraf makinesi ile bağlantılı olan floresans mikroskopta (Nikon Eclipse E800) etidyum bromürün dalga boyuna uygun olarak (G-2A, eksitasyon 510-565 nm, DM 575, BA 590) değerlendirildi. Skorlamada görsel analiz metodu kullanıldı.

Görsel analiz metodu gerçekleştirilmek üzere lam mikroskop altında 40 kat büyütüldü. Jelin kapladığı 10x10 mm²’lik alanın bütün köşelerinden 2’şer mm içerde olacak şekilde 8x8 mm²’lik alan rastgele tarandı. Üst üste gelen ve aşırı kuyruk oluşturmuş hücreler dikkate alınmadan 100 hücre seçildi, seçilen hücreler kuyruk uzunluğuna göre en hasarsız 0 ve en çok hasarlı olan 3 olmak üzere, 0-3 arasında

sınıflandırıldı. Baş yapısı kaybolmuş ve aşırı uzamış kuyruğa sahip, skorlamada +4 derecesine girebilecek DNA görüntüleri değerlendirme dışı bırakıldı (84). Çalışmada kullanılan skala Şekil 9’da gösterilmiştir (83).

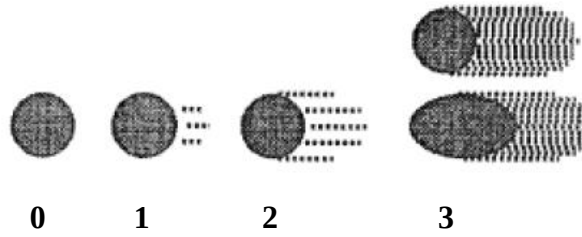
Cometlerin Skorlanması:

0 → hasarsız, kuyuksuz DNA

1 → baş yapısı korunmuş, kuyruk uzunluğu baş çapından küçük DNA

2 → kuyruk uzunluğu, başın çap uzunluğundan 1 ile 2 katı kadar uzun DNA

3 → kuyruk uzunluğu, başın çap uzunluğundan 2 kattan daha uzun DNA



Şekil 9. Çalışmada DNA’ların skorlanmasında kullanılan skala

Maksimum hasar 300 olabilecek şekilde bütün lamalar aşağıdaki formüle göre skorlandı (84).

$$\text{Skor} = (1 \times n_1) + (2 \times n_2) + (3 \times n_3) \text{ (n: her skor için sayılan hücre sayısı)}$$

5.2.6. Fantom Düzeneginin Oluşturulması

Sert plastik malzemeden 2 adet 30x30 cm², 4 adet 5.5x30 cm² ve 4 adet 9.5x30 cm²’lik plakalar kesildi. Kesilen plakalardan silikon yapıştırıcı yardımıyla 5.5cm derinliğinde, 30x30 cm² tabanlı ve 9.5 cm derinliğinde 30x30 cm² tabanlı 2 adet kalıp hazırlandı. Hazırlanan kalıpların içerisine homojenliğin sağlanabilmesi için tek seferde eritilmiş olan parafin döküldü. Parafinin donmasının ardından bloklar kalıplardan çıkarıldı ve 9.5 cm’lik blok parafinin üzerine 4 adet T25 flaskın yerleştirilebileceği hazneler açıldı. Sonuç olarak alt kısmı 9.5 cm kalınlığında, üst (kapak) kısmı da 5.5 cm kalınlığında 30x30 cm² ısıtılma alanına sahip aynı anda 4 adet numunenin

ışınlanabileceği bir fantom düzeneği oluşturuldu. Çalışmada kullanılan fantom Şekil 10’da gösterilmiştir.



Şekil 10. Çalışmada kullanılan fantom

5.2.7. Çalışma Gruplarının Oluşturulması

Negatif kontrol grubu: Bu grupta hazırlanan hücelere propolis ve/veya iyonlaştırıcı radyasyon verilmedi. Hücreler flasklardan tripsinizasyonla kaldırılarak, santrifüjlendi ve canlılık sayımının ardından comet protokülü başlatıldı

Sadece gama radyasyon verilen grup: Bu grupta hücelere herhangi bir madde verilmedi. Hücreler belirlenen dozda iyonlaştırıcı radyasyona maruz bırakılarak oluşturulan DNA hasarı comet yöntemiyle değerlendirildi.

Pozitif kontrol grubu: Propolisin gama radyasyona karşı olası radyoprotektif etkisini kıyaslayabilmek için amifostin kullanıldı. 450 mg amifostin tartılıp üzerine 15 mL steril PBS ilave edilip vorteksenerek çözülerek 140 mM’lık amifostin çözeltisi hazırlandı. Yapılan literatür taramasında amifostinin çeşitli hücre gruplarında 4-14 mM konsantrasyonda ve 15-30 dakikalık ön muamelelerle kullanıldığı belirlendiğinden dolayı çalışmalarda bu muamele süreleri ile belirtilen konsantrasyonlar kullanılmıştır (85-87). T25 flaskların sıvı hacminin 62 mL olduğu ölçüldü, 24 saat önceden hazırlanan

hücrelerin bulunduğu flasklara flask son hacminde 4, 7 ve 14 mM olacak şekilde sırasıyla 1.8, 3.1 ve 6.2 mL amifostin stoğundan ilave edildi ve flasklar içinde hava kabarcığı kalmayacak şekilde steril PBS ile tamamlandı. Flasklar amifostin ilavesini takiben 15. ve 30. dakikalarda belirlenen gama radyasyon dozunda ve aynı ortam şartlarında ışınladı. Hücreler flasklardan tripsinizasyonla kaldırılarak, santrifüjlendi ve canlılık sayımının ardından comet protokülü başlatıldı.

Hücrelerin propolis ile muamele edildiği grup: Bu grupta etkin dozları belirlenen propolisin etanolik ekstraktı, hücrelerin bulunduğu flasklara ilave edilerek 15. ve 30. dakikalarda ışınlama işlemi gerçekleştirildi. Her iki süre sonunda verilen gama radyasyonun etkisine karşı propolisin olası koruyucu tepkisi comet yöntemiyle değerlendirildi.

Bütün gruplarda deneyler birbirlerinden bağımsız olarak üçer kez tekrarlandı (n=3).

5.2.8. Fibroblast Hücrelerinin Deney İçin Hazırlanması

Hücreler yeterli miktarda çoğaltıldıktan sonra deneylerin yapılması için ışınlama yapılmayacak olan negatif kontrol, sadece ışınlanacak olan pozitif kontrol ve propolis veya amifostin verilerek ışınlanacak deney flaskları olmak üzere 5'er adet 200 000 hücre içeren 25 cm²'lik flasklar hazırlandı.

5.2.9. Fibroblast Hücre Serilerine *in vitro* Radyasyon Uygulanması ve Uygun Radyasyon Dozunun Bulunması

Fibroblast hücre serilerine *in vitro* radyasyon uygulaması KTÜ Farabi Hastanesi Radyasyon Onkolojisi bölümünde yapıldı. T25 flasklar 30x30 cm²'lik alanın merkezine yerleştirildi. ⁶⁰Co radyoaktif kaynaklı teleterapi cihazında 1 Gy, 2 Gy, 3 Gy, 4 Gy, 5 Gy (30cGy/dak.) dozlarında, 80 cm uzaklıktan, 30x30 cm²'lik bir alan içinde ve oda sıcaklığında ışınladı. Flasklar ışınlamanın hemen akabinde buz aküleri yardımıyla soğuk tutularak çalışmanın gerçekleştirileceği laboratuara getirildi. Radyasyona maruz

bırakılmayan negatif kontrol numunesiyle beraber comet analizi 30 dakika içerisinde başlatıldı. Fibroblast hücre serilerinin ışınlanmasında kullanılan ^{60}Co radyoaktif kaynaklı teleterapi cihazı Şekil 11’de gösterilmiştir.



Şekil 11. Fibroblast hücre serilerinin ışınlanmasında kullanılan ^{60}Co radyoaktif kaynaklı teleterapi cihazı

5.2.10. İyonlaştırıcı Radyasyon Kaynaklı DNA Hasarını Engelleyebilecek Propolis Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Hücrelerde toksik etki yaratmadan, gama radyasyon kaynaklı DNA hasarını engelleyebilecek propolis konsantrasyonunun belirlenmesi için 24 saat önceden hazırlanmış olan flaskların içerikleri uzaklaştırıldı, 5 mL PBS ile 2 kez yıkandı. Flasklara 4 mL taze DMEM eklendi. 25 mg/mL’lik propolis ekstraktından flastaki son konsantrasyonları 100, 200 ve 300 $\mu\text{g/mL}$ olacak şekilde sırasıyla 1.6, 3.25 ve 4.85 μL propolis stoğundan ilave edildi. 15. ve 30. dakikaların sonunda steril PBS ile hava kabarcığı olmayacak şekilde tamamlandı ve önceden belirlenen dozda ışımaya tabi tutuldu. Işınlanan numuneler hemen akabinde buz aküleri yardımıyla soğuk tutularak çalışmanın gerçekleştirileceği laboratuara getirildi ve radyasyona maruz bırakılmayan negatif kontrol numuneleriyle beraber hücreler tripsinizasyonla kaldırıldı, santrifüjlenip canlılık sayımının ardından comet protokolü başlatıldı.

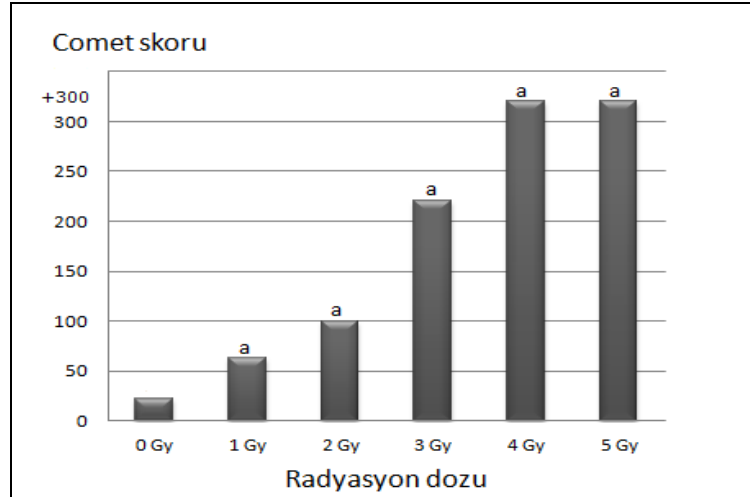
5.2.11. İstatistiksel Analiz

Elde edilen değerler, aritmetik ortalama±standart sapma ($\bar{x}\pm S.D$) olarak ifade edildi. Veriler Statistical Package for the Social Sciences 11.3 bilgisayar paket programına aktarılarak, istatistiksel değerlendirmeler yapıldı. Gruplar arasındaki ilişkinin ortaya konabilmesi için One Way ANOVA ve Post-hoc Tukey analizleri kullanıldı. Comet skoru ve hücre canlılığı verilerinin negatif kontrol grubu ile gama radyasyon ve propolis muamelesine maruz bırakılan hücreler grubunda karşılaştırılması yapıldı ve $p<0.05$ olanlar anlamlı kabul edildi.

6. BULGULAR

6.1. Fibroblast Hücre Serilerine *in vitro* Radyasyon Uygulanması ve Uygun Radyasyon Dozunun Bulunmasına İlişkin Sonuçlar

Primer fibroblast hücrelerinde, hücre canlılığını azaltmadan maksimum DNA hasarı oluşturacak ^{60}Co radyoaktif kaynaklı γ -ışını dozunun bulunması için yapılan çalışmada elde edilen sonuçlar Şekil 12’de verilmiştir. Elde edilen bu sonuçlara göre bundan sonraki çalışmalarda istenilen düzeyde DNA hasarı yaratmak için 200-250 arası değere en yakın comet skorunu veren 3 Gy’lik radyasyon dozunun kullanılmasına karar verildi. Şekil 12’de fibroblast hücre serilerine 1 Gy ve 2 Gy’lik doz verilerek elde edilen değerlerin istenilen düzeyin altında olduğu görülmektedir. Diğer taraftan 4 Gy ve 5 Gy’lik doz ile ışınlanan hücrelerin comet görüntülerinde ise 100 tane 3. derece hasarlı DNA sayılamadığı için comet skorlaması yapılamamıştır. Bu preparatlarda maksimum 70 tane 3. derece hasarlı DNA sayılabilirken; geri kalanları baş yapısı tamamen kaybolmuş, oldukça uzun kuyruklu DNA yapıları oluşturmaktaydı.



^a Negatif kontrole göre anlamlı fark görüldü ($p < 0.05$).

* Tüm gruplarda tripan blue ile yapılan canlılık analizinde hücre canlılığı %97’nin üzerinde bulunmuştur.

Şekil 12. Primer fibroblast hücrelerinde verilen radyasyon dozuna karşılık comet skorları ve hücre canlılığı* (n=3)

6.2. İyonlaştırıcı Radyasyon Kaynaklı DNA Hasarının Propolis ile Önlenebilmesine İlişkin Sonuçlar

Hücreler üzerinde toksik etki oluşturmada gama radyasyonun neden olduğu DNA hasarının propolis ile önlenebilmesine ait sonuçlar Tablo 5’de verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre 100, 200 ve 300 µg/mL etanolik propolis ekstraktı verilen gruplarda sadece iyonlaştırıcı radyasyon kaynaklı DNA hasarı oluşturulan gruba göre (pozitif kontrol) anlamlı fark görüldü ($p<0.001$). Propolis ile muamele edilen grupların kendi aralarında ise anlamlı bir fark görülmedi ($p>0.05$).

Tablo 5. Propolis konsantrasyonuna bağlı olarak comet skoru ve hücre canlılığı değişimi* (n=3)

	15 dakika ön muamele	30 dakika ön muamele
Negatif Kontrol	20 ± 4.2 ^a	21 ± 8.4 ^a
3Gy	217 ± 1.4	212 ± 4.2
100 µg/mL propolis+3Gy	106 ± 11.3 ^a	132 ± 4.2 ^a
200 µg/mL propolis+3Gy	115.5 ± 9.2 ^a	148 ± 14.1 ^a
300 µg/mL propolis+3Gy	120 ± 18.3 ^a	155.5 ± 6.3 ^a

^a Pozitif kontrole göre anlamlı fark görüldü ($p<0.001$).

* Tüm gruplarda tripan blue ile yapılan canlılık analizinde hücre canlılığı %98’nin üzerinde bulunmuştur.

6.3. Pozitif Kontrol Grubuna İlişkin Sonuçlar

Propolisin gama radyasyona karşı olası radyoprotektif etkisini kıyaslayabilmek için radyasyona karşı koruyucu etkinliği bilinen bir bileşik olan amifostin ile 4, 7, 14 mM konsantrasyonlarda 15 ve 30 dakikalık ön muamele uygulandı. Bu konsantrasyonlarda sadece iyonlaştırıcı radyasyon kaynaklı DNA hasarı oluşturulan gruba (pozitif kontrol) göre anlamlı fark oluşurken ($p<0.001$); Amifostin ile muamele edilen grupların kendi aralarında ise anlamlı bir fark görülmedi ($p>0.05$). Negatif ve pozitif grupların değerlendirilmesiyle elde edilen comet skorları ve hücre canlılığı değerleri Tablo 6’da verilmiştir.

Tablo 6. Amifostin konsantrasyon ve süresine bağlı olarak comet skoru ve hücre canlılığı değişimi* (n=3)

	15 dakika ön muamele	30 dakika ön muamele
Negatif Kontrol	22.5 ± 0.7 ^a	31 ± 5.6 ^a
3Gy	226.6 ± 5.0	240.3 ± 11
4 mM amifostin+3Gy	134.3 ± 16 ^a	184.6 ± 12.6 ^a
7 mM amifostin+3Gy	141.6 ± 17 ^a	180.3 ± 4.7 ^a
14 mM amifostin+3Gy	138.5 ± 20.5 ^a	170.5 ± 4.9 ^a

^a Pozitif kontrole göre anlamlı fark görüldü (p<0.001).

* Tüm gruplarda tripan blue ile yapılan canlılık analizinde hücre canlılığı %98'nin üzerinde bulunmuştur.

7. TARTIŞMA ve SONUÇLAR

Günümüzde kullanılan sentetik ilaçların yan etkileri daha az yan etkiye sahip doğal ürünlere rağbeti arttırmaktadır. Bu doğal ürünler arasında bal arılarının sunduğu propolis önemli bir yer tutar. Propolis, birçok hastalığın iyileştirilmesinde tarihin eski çağlarında olduğu gibi günümüzde de tıp alanında alternatif ürün olarak kullanılmaktadır (1).

Propolis, bal arılarının çeşitli bitkilerin tomurcuk ve sürgünlerinde bulunan reçineye balmumu katarak oluşturduğu bir ürün olmakla beraber kimyasal açıdan son derece karmaşık bir yapı gösterir ve bu özelliği toplandığı bölgenin bitki örtüsüne göre değişebilmektedir (1). Yapılan çalışmalarla propolisin; antioksidan, antigenotoksik antibakteriyel, antifungal, antiviral, antienflamatuar, antimutajenik, antikarsinojenik, radyoprotektif ve diğer faydalı biyolojik etkileri ve kimyasal yapısına ait değerli bilgiler ortaya koyulmuştur (2,11,19,20). Kimyasal analizler, propolisin kompozisyonunda en az 300 bileşenin bulunduğunu göstermektedir. Bu organik bileşenlerin arasında, fenolik bileşikler ve esterleri, flavonoidlerin her formu (flavonoller, flavonlar, flavononlar, dihidroflavonoller ve kalkonlar), terpenler, beta-steroidler, aromatik asitler, aromatik aldehitler ve alkoller, seskuiterpenler, stilben terpenler ve CAPE bulunmaktadır (24).

Propolisten izole edilen bileşenlerin en geniş grubunu flavonoidler oluşturmaktadır ve propolisin biyolojik aktivitesinin önemli bir kısmından sorumludur (26). Flavonoidler, son yıllarda sağlık üzerine olumlu etkileriyle ön plana çıkmaktadır. İhtiva ettikleri halka yapılarının ve hidroksil gruplarının, özellikle antioksidan ve radikal yakalama fonksiyonları nedeniyle dikkat çekmektedirler (27,71). Yapılan *in vivo/in vitro* çalışmalarda flavonoidlerin alkilleyici ajanlara, polisiklik aromatik hidrokarbonlara, radyoaktif kimyasallara ve diğer mutajenlere/karsinojenlere karşı antigenotoksik aktiviteye sahip oldukları gösterilmiştir (13,71,73). Yine flavonoidlerin özellikle kansere karşı koruyucu birçok mekanizmada görev aldıkları görülmüştür. Bu mekanizmalar: östrojenik/antiöstrojenik aktivite, antiproliferasyon, hücre siklusunun durdurulmasının ve apoptozisin indüksiyonu, oksidasyonun engellenmesi, deoksifikasyon enzimlerinin indüksiyonu, immun sistemin düzenlenmesi, hücre içi

sinyal iletimi değişiklikleri vb. şeklindedir (27,28). Ayrıca yapılan son çalışmalar flavonoidlerin, DNA ve hücredeki diğer bileşenleri oksidatif hasara karşı koruduğunu göstermiştir (15,71).

Çalışmamızda flavonoidlerin DNA hasarına karşı bilinen koruyucu etkisinden yola çıkarak; Türk propolisinin, bugüne kadar üzerinde çalışılmamış gama radyasyonla uyarılmış insan kaynaklı fibroblast hücre serileri üzerindeki olası radyoprotektif etkisini değerlendirdik. Ayrıca propolisin değişen muamele süresi ve konsantrasyonları karşısında elde edilen sonuçlar, radyasyon hasarına karşı koruyucu özelliği bilinen günümüzde tedavi ve profilakside kullanılan bir kimyasal olan amifostin ile karşılaştırıldı (51,88-90).

DNA, yaşam boyunca hücresel metabolitler (ROS) ve ekzojen ajanlar (ksenobiyotikler, UV etkileşimler vb.) tarafından sürekli olarak hasarlayıcılara maruz kalır (4). İyonlaştırıcı radyasyon soğurulduğunda genetik materyal üzerinde doğrudan ve dolaylı hasara yol açan önemli etkenlerden biridir (5). Dolaylı gerçekleşen etkileşim radyobiyojik açıdan doğrudan etkileşimden daha önemlidir ve memeli hücrelerinde iyonlaştırıcı radyasyonun olası etkilerinin %70'ini serbest radikal kaynaklı dolaylı yolla gösterdiği düşünülmektedir (52). Radyasyona karşı koruyucu özellik gösteren bileşikler, radyasyon etkisiyle oluşan hidroksil, süperoksit ve hidroperoksil radikali gibi su metabolitlerini okside ederek bunların diğer hücre içi yapılarla etkileşime girme yeteneğinden yoksun kararlı yapılı bileşiklerin oluşmasını sağlayarak etki gösterebilirler. Bu mekanizma sayesinde serbest radikallerin yaşamsal öneme sahip hücresel moleküller üzerindeki olumsuz etkisi büyük ölçüde sınırlandırılmış olur (50,51). Nitekim yaptığımız çalışmada propolisin etanolik ekstraktlarının 15 ve 30 dakikalık n muamelerde 100-300 µg/mL konsantrasyon aralığında, fibroblast hücre serilerinde genotoksik etki yaratmadan, 3 Gy dozunda ⁶⁰Co radyoaktif kaynaklı γ-ışını'nın neden olduğu DNA hasarını engellediği görüldü. Bu etkinin, propolisin içeriğinde bulunan flavonoidlerin ihtiva ettikleri halka yapılarının ve hidroksil gruplarının sahip olduğu antioksidan ve radikal yakalama fonksiyonlarından ileri geldiği düşünülmektedir (27). Aşırı derecede radyasyona maruziyet, radyasyonun biyojik etkileri sebebiyle hücrelerin canlılıklarını kaybetmesine ve/veya DNA da çok sayıda

SSB ve/veya DSB oluşmasına sebep olabilir. Yapılan çalışmalarda, ^{60}Co radyoaktif kaynağı kullanılarak DNA hasarı oluşturmak için verilen γ -ışını dozunun, kullanılan hücre tipine göre 2-12 Gy arasında farklılık gösterdiği görülmektedir (3,16,85,88-92). Bu farklılık her hücre tipinin radyasyona karşı duyarlılığının aynı olmamasından kaynaklanır. Özellikle sık bölünen ve farklılaşmamış hücrelerin (over ve testisin germinal hücreleri, hematopoetik sistem hücreleri, gastrointestinal sistem epitel hücreleri vb.) duyarlılığı fazla iken, bölünmeyen ve farklılaşma gösteren hücrelerin (karaciğer, böbrek, kartilaj, kas, sinir hücreleri vb.) duyarlılığı daha azdır (45). Yüksek dozlarda ölü hücrelerin değerlendirme dışı olması ve aşırı uzayan DNA kuyruk boyuna sahip hücrelerin comet yöntemi ile görsel skorlama yapılamaması sebebiyle fibroblast hücrelerini görsel değerlendirebileceğimiz maksimum hasar dozunu ön denemelerle 3 Gy olarak belirlendi. Bu çalışmada insan derisi kaynaklı fibroblast hücre serileri; hızlı, kolay çoğaltılabilmesi, kültür ortamında dayanıklı olması, bölümümüzde yapılan daha önceki genotoksisite çalışmalarında başarılı bir şekilde kullanılması ve pozitif kontrol grubu oluşturabilmek için kullanılan amifostini defosforile edip onu yeteri kadar aktif formuna dönüştürebilecek alkalen fosfataz aktivitesine sahip olması sebebiyle tercih edildi (93). Birçok çalışmada farklı orjinli fibroblast hücre serileri kullanılmış; yapılan bu çalışmalarda 2-10 Gy aralığında γ -ışını verilerek DNA hasarı oluşturulduğu görülmüştür (88-90).

Son yıllarda DNA hasarlarının belirlenmesi için çok sayıda kimyasal ve biyokimyasal testler geliştirilmiştir (4,7). Bunlar immunokimyasal teknikler, kapiller elektroforez, comet testi, FADU, SCE, MN, ^{32}P post labeling ölçüm teknikleri, alkalın elüsyon testi ve kromatografik teknikler (HPLC-ECD, GC-MS, LC-MS, LC-MS-MS) şeklinde sıralanabilir (4). Bu çalışmada DNA hasarını belirlemede kullanılan comet analizi; diğer genotoksisite tayin yöntemleri ile karşılaştırıldığında, düşük düzeylerde DNA hasarlarının saptanabilmesindeki yüksek sensitivitesi, tek hücre düzeyinde çalışılabilir olması, kısa sürede kolay uygulanabilirliği ve düşük maliyeti sebebiyle tercih edildi (75-78).

Yapılan çeşitli çalışmalarda propolisin sulu, etanollü, metanollü, DMSO'lu, eter ve yağ ekstraktlarının hazırlanabildiği görülmüştür. Propolisin, suda çok az çözünürken

etanol ve metanolde daha iyi çözüldüğü; eter ve kloroformda tamamen, hidrokarbon çözücülerde ise çok az miktarda çözüldüğü tespit edilmiştir (94). Farklı çözücüler, farklı bileşenleri çözüp ekstrakte edeceği için propolis ekstraksiyon metodları, propolisin aktivitesini etkileyebilmektedir. Biyolojik ölçümlerde çok daha yaygın olarak kullanılan ekstraktların, farklı konsantrasyonlardaki etanol, metanol ve su olduğu tespit edilmiştir (30,32,33,35). İyonlaştırıcı radyasyonla oluşturulan DNA hasarının engellenmesine yönelik çalışmalarda ise daha çok propolisin ve bitkisel kaynaklı flavonoidlerin çeşitli konsantrasyonlarda hazırlanmış etanolik ekstraktlarının kullanıldığı görülmektedir. Bu çalışmalarda, propolisin ve bitkisel kaynaklı flavonoidlerin etanolik ekstraktlarının DNA hasarını engelleyebildikleri ortaya konmuştur (3,13,15,18). Anabilim dalımızda yapılan ve propolisin farklı çözücülerdeki çözünürlüğünün incelendiği bir çalışmada da propolisin etanolik ve DMSO'lu ekstraktlarının daha yüksek antioksidan kapasiteye sahip olduğu ortaya konulmuştur (94). Bu nedenle çalışmamızda propolisin etanolik ekstraktlarının kullanılması tercih edildi. Etanolik propolis ekstraktlarının yüksek antioksidan kapasite gösterdikleri bölümümüzde daha önceki antigenotoksisite çalışmalarında başarıyla kullanılmaları ve bir çalışmada da 50-300 µg/mL konsantrasyon aralığında MTT analizi sonucu fibroblast hücre serileri üzerinde canlılığı azaltmaması sebebiyle tercih edildi (3,13,16,100). Nitekim çalışmamız süresince tripan blue kullanılarak yapılan canlılık testlerinde de deneylerde kullandığımız konsantrasyondaki etanolün hücre canlılığını azaltmadığı görüldü.

Propolisin radyoprotektif etkisine yönelik birçok çalışma vardır. Montoro ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada 2 Gy gama radyasyonla uyarılmış insan lenfosit hücrelerine propolisin etanol ile hazırlanmış ekstraktının artan konsantrasyonları verilmiş, kromozomal aberasyon yöntemi kullanılarak propolisin etanolik ekstraktlarının artan konsantrasyonla beraber kromozomal aberasyon frekansında belirgin bir düşüş oluşturduğu gözlenmiştir. Maksimum korumaya 120 µg/mL konsantrasyonda ulaşılmıştır. Bu koruyucu etkinin propolisteki flavonoidlerin antioksidan kapasitesine bağlı radikal toplama özelliğinden ileri geldiğini öne sürmüşlerdir (16). Benzer olarak çalışmamızda propolisin 100, 200 ve 300 µg/mL konsantrasyonlardaki etanolik

ekstraktlarının, fibroblast hücre serilerinde 3 Gy dozunda ⁶⁰Co radyoaktif kaynaklı γ -ışını'nın neden olduğu DNA hasarını engellediği görüldü.

Benkoviç ve arkadaşları 4 Gy gama radyasyonla uyarılmış insan lenfosit hücrelerinde propolis su ile hazırlanmış ekstraktının, ve propolis içeriğinde bulunan kafeik asit, krisin, naringin gibi polifenolik bileşiklerin olası radyoprotektif etkisini araştırmışlardır. Test edilen maddeler, lenfosit hücre kültüründe 30 dakika inkübasyona bırakıldıktan sonra ⁶⁰Co kaynağı altında ışınlanmıştır. Comet yöntemi kullanarak propolis su ile hazırlanmış ekstraktından ve kafeik asit, krisin, naringin gibi polifenolik bileşiklerinden elde edilen sonuçları radyoprotektif etkisi bilinen bir kimyasal olan AET ile karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara test bileşenlerinin comet parametrelerine göre radyoprotektif etkinlikleri AET>krisin>naringin>CAPE>sulu propolis ekstraktı şeklinde sıralanırken, mikronükleus parametrelerine göre ise sulu propolis ekstraktı en yüksek koruyucu etkiyi göstermiştir ve bu durumun açıklanabilmesi için propolis karmaşık yapısı gereği daha çok çalışmaya ihtiyaç olduğunu vurgulamışlardır. Yine aynı çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılan AET'nin uzayan muamele sürelerinde hücrelerde sitotoksik etki oluşturduğu ve benzer durumun bu amaçla kullanılan amifostin ve diğer tiyol grubu içeren bileşikler için geçerli olduğu savunulmuştur (95).

Benkoviç ve arkadaşlarının bir başka çalışmalarında propolis etanolik ekstraktının ve kuersetinin lenfosit hücreleri üzerindeki radyoprotektif etkisi incelenmiştir. Lenfositler 100 μ g/mL propolis ve 50 μ g/mL kuersetin ile 30 dakika ön muamelenin ardından ⁶⁰Co kaynaklı teleterapi cihazı altında 4 Gy γ -ışını'na maruz bırakılmış; ışınlamanın hemen ardından ve 120 dakika sonrasında comet yöntemi, ayrıca kromozomal aberasyon ve mikronükleus yöntemleri uygulanmıştır. Elde edilen veriler hücrelerin radyoprotektif etkinliği bilinen bir kimyasal olan AET muamelesinin ardından karşılaştırılmıştır. AET ile mukayese edildiğinde propolis etanolik ekstraktının ve kuersetinin sitotoksitesi düşük radyoprotektif etkinlikleri ise yüksek bulunmuştur. Işınlamanın hemen ardından elde edilen comet parametreleri ile hücrelere 120 dakika zaman verilerek elde edilen comet parametreleri arasında anlamlı fark oluşmadığı gösterilmiştir (3).

Benkoviç ve arkadaşlarının yapmış olduğu *in vivo* bir çalışmada ise propolisin etanolik ekstraktı ve polifenolik bir bileşeni olan kuersetin farelere i.p yolla ayrı ayrı verilmiş daha sonra radyasyona maruz bırakılarak radyoprotektif etkinlik incelenmiştir. Pozitif kontrol grubu olarak i.p yolla verilen AET kullanılmıştır. ⁶⁰Co kaynaklı teleterapi cihazı altında 9 Gy dozunda γ -ışını verilmeden önce 3 gün süreyle etanolle hazırlanmış propolis ekstraktı ve kuersetin verilen farelerin lenfosit hücrelerinin comet analiz sonuçları negatif kontrol grubuna göre anlamlı derecede farklı bulunmuştur. Sonuç olarak propoliste bulunan flavonoidlerin radyoprotektif ve antigenotoksik özelliklerini *in vivo* ortamda da gösterebildikleri sonucuna varılmış ve ayrıca deneyde kullanılan propolisin bileşenleri HPLC yöntemiyle açıklığa kavuşturulmuştur (15).

Kanimozhi ve arkadaşları insan lenfosit hücrelerinde radyasyonla indüklenmiş oksidatif hasara karşı bir kumarin türevi olan umbelliferonun etkisini incelemişlerdir. Kumarinler propolisin içeriğinde de değişen oranlarda bulunabilen bileşiklerdir (25). Umbelliferonun antioksidan etki kapasitesinin doza bağımlı olduğu ve en iyi radyoprotektif etkinin DMSO ile hazırlanmış 124 μ M konsantrasyonda ⁶⁰Co kaynağı ile 3 Gy'lık ışınlamadan 30 dakika önce verilmesi halinde gerçekleştiğini göstermişlerdir. Umbelliferonun, MTT analizi ile lenfosit hücre kültüründe apoptotik hücreleri ve comet yöntemi ile radyasyonun indüklediği DNA hasarını azalttığını, lipid peroksidasyon parametrelerinde düşüşe ve antioksidan enzim kapasitesinde artışa neden olduğu sonucuna varılmıştır (92).

Kanokporn ve arkadaşları en yaygın görülen flavonoidlerden biri olan apigeninin insan lenfosit hücreleri üzerindeki antigenotoksik ve radyoprotektif etkilerini mikronükleus yöntemini kullanarak araştırmışlardır. Lenfosit hücrelerinin, değişen konsantrasyonlarda hazırlanmış apigenin ile 2 Gy γ -ışını verilmeden önce ve anında muamelesi sonucu, artan konsantrasyonla beraber sitokinez-blok proliferasyon indeksinde anlamlı azalış görülmüştür. Bu durumu apigeninin iyi bir serbest radikal toplayıcı ve antioksidan bileşik olmasıyla açıklamışlardır (96).

Prasad ve arkadaşları ferulik asitin gama radyasyonla uyarılmış insan lenfosit hücre kültürü üzerindeki radyoprotektif etkisini incelemiştir. Ferulik asit propolisin

bileşeninde de bulunan sinnamik asit türevi bir maddedir (29). Ferulik asitin 1, 5 ve 10 µg/mL konsantrasyonda DMSO'da hazırlanmış ekstraktları radyasyona maruziyetten 30 dakika önce kültür ortamına verilmiştir. 1, 2 ve 4 Gy γ -ışını ile ışınlanarak olası DNA hasarı incelenmiştir. Ferulik asitin artan konsantrasyonlarına bağlı disentrik kromozom ve mikronükleus frekansında azalış gözlenirken, radyasyonun neden olduğu GSH, SOD, CAT ve GPx enzim aktivitelerindeki düşüşü önlediği gösterilmiştir. Ferulik asitin ve diğer fenolik asitlerin radikal yakalayıcı özellikte olduğu, serbest radikalleri bağlayarak DNA hasarını önlediği, TBARS oluşumlarını inhibe ettiği vurgulanmıştır (97).

Zhang ve arkadaşları bitkisel kökenli bir flavonoid olan morinin gama radyasyonun etkisi sonucu Chinese hamster akciğer fibroblast hücre serilerinde oluşturulan reaktif oksijen türlerini azalttığı böylece hücresel komponentleri lipid peroksidasyonuna ve DNA hasarına karşı koruduğunu; SEK 1-JNK-AP yolğını zayıflatarak apoptozu inhibe ettiğini göstermişlerdir (98).

Kopjar ve arkadaşları amifostin ve melatoninin radyoprotektif etkinliğini insan lenfosit hücrelerinde mikronükleus yöntemi ve kardeş kromatid değişimi yöntemleri ile incelemişlerdir. 7.7 mM amifostin, 2 mM melatonin ve her ikisinin kombinasyonu ile 30 dakika ön muamele gören hücrelere ⁶⁰Co kaynağı yardımıyla 2 Gy dozda γ -ışını verilmiştir. Amifostin, melatonin ve kombinasyonları mikronükleus frekanslarında net bir azalışa neden olurken tek doz melatonin uygulaması tek doz amifostin uygulamasından daha etkili bulunmuş; kombinasyonların da ise anlamlı bir fark görülmemiştir. Amifostin ve melatoninin kardeş kromatid frekansları birbirine yakınen kombine halde verildiklerinde anlamlı bir fark görülmüştür. Yaptıkları çalışmada radyoprotektif özelliğe sahip her iki bileşiğin kombinasyonlarının daha düşük yan etkiye karşın daha yüksek koruyucu etkinlik gösterebileceği sonucuna varmışlardır (86). Nitekim çalışmamızda pozitif kontrol grubu olarak kullandığımız amifostin ile hücrelerin 4, 7, 14 mM konsantrasyonlarda 15 ve 30 dakika ön muamelesi sonucu elde edilen comet skorlarında muamele görmeyen gruba göre anlamlı fark görüldü (p<0.001).

Müller ve arkadaşları amifostinin *in vivo* ve *in vitro* radyoprotektif etkisini comet yöntemi ile araştırmışlardır. Çalışmanın *in vitro* kısmında sağlıklı gönüllülerden alınan kanlardan izole edilen lenfositler 0-5000 µg/mL konsantrasyon aralığında amifostin ve 0-210 U/mL konsantrasyon aralığında alkalen fosfataz ile 15 ve 30 dakika ön muamele edilmiş ve 6 Gy γ -ışını'na maruz bırakılmıştır. Alkalen fosfataz enzimi amifostini defosfirile ederek aktif metabolitine dönüştüren enzimdir. Nitekim yapılan çalışmada amifostinin lenfositlerde tek başına radyasyon hasarına karşı yeterli ölçüde koruyucu olmadığı buna karşın ortamda 0.5-1 U/mL konsantrasyon aralığında alkalen fosfataz enzimi mevcudiyetinde 250-5000 µg/mL aralığında etkinlik gösterebileceği sonucuna varılmış ve ayrıca comet yönteminin amifostinden gelebilecek olan küçük iyileşmeleri dahi ayırt edebilecek ölçüde hassas olduğu vurgulanmıştır (87).

Modarani ve arkadaşları amifostinin *in vitro* radyoprotektif etkinliğini insan lenfosit hücrelerinde mikronükleus yöntemi ile incelemişlerdir. Hücreler ^{60}Co kaynağı yardımıyla 1.5-6 Gy arasında ışınlanmış ve çalışılacak radyasyon dozu 6 Gy seçilmiştir. Amifostin fosfat tamponunda 2, 4 ve 6 mM konsantrasyonlarda hazırlanarak ortamda 1 U/ml alkalen fosfataz mevcutken ve mevcut değilken hücrelere radyasyona maruziyetten 15 dakika önce ve sonra verilmiştir. Ortamda amifostini defosfirilasyon ile aktif metabolitine dönüştürecek alkalen fosfataz enzimi yokken çok düşük radyoprotektif etkinlik görülmüştür. Amifostin 2 mM konsantrasyonda ve ortamda 1 U/ml alkalen fosfataz varken radyasyona maruziyetten 15 dakika önce verildiğinde mikronükleus frekansında önemli derecede azalış olduğu sonucuna varılmıştır. Amifostinin hücrelerde toksisiteyi azaltıcı etkisini ve radyasyonun neden olduğu biyolojik etkileri hidroksil radikallerini yakalayarak, DNA radikallerine hidrojen transfer ederek ve DNA'ya yakın bölgelerde hipoksik merkezler oluşturarak bertaraf edici özellikte olduğunu vurgulamışlardır (85).

Kang ve arkadaşları antioksidan etkinliğe sahip polifenolik bir bileşik olan geraninin 5 µg/mL konsantrasyonda Chinese hamster akciğer fibroblast hücre serilerine 10 Gy gama radyasyonla ışınlanmadan 1 saat önce verilmesi halinde DNA hasarını önemli ölçüde azalttığını göstermişlerdir. Bu çalışmada diğer DNA hasarı çalışmalarında olduğu gibi çok sık tercih edilen comet yöntemini kullanmışlardır.

Işınlamadan 48 saat sonra yapılan MTT analizinde ise geraninin hücre canlılığını önemli ölçüde arttırdığı, lipid peroksidasyon parametrelerini ve hücre içerisinde radyasyonun etkisi ile oluşan reaktif oksijen türlerini azalttığı, azalmış olan katalaz ve süperoksit dismutaz aktivitelerini normal seviyeye getirdiği sonucuna varmışlardır (99).

Konopacka ve arkadaşları ise lenfosit hücrelerini vitamin-C, E ve β -karoten ile ön ve sonradan muamele ederek 2 Gy γ -ışını'na maruziyet ile oluşan DNA hasarını micronükleus yöntemi kullanarak değerlendirmiş, antioksidan etkili bu vitaminlerin radyoprotektif etkilerinin konsantrasyon, muamele zamanı ve süresine bağlı olduğu neticesine varmışlardır. Vitamin-C, radyasyona maruziyet öncesinde en etkili 1 μ g/ml konsantrasyonda verildiğinde mikronükleus oluşumunu önlerken sonrasında verildiğinde 20 μ g/ml konsantrasyona kadar etkinlik görülmüştür. Vitamin-E, 5 ile 10 μ g/ml konsantrasyonlarda ön ve sonradan muamelede yakın etkinlik göstermiştir. β -karotenin ise 1 ile 5 μ g/ml arasındaki tüm konsantrasyonlarda etkili olurken ön muamelede 1 μ g/ml, sonradan muamelede ise 5 μ g/ml konsantrasyonda radyoprotektif etkisi gözlenmiştir (91).

Fujii ve arkadaşları farklı radyasyon türlerini kullanarak askorbik asitin normal insan fibroblast hücreleri üzerindeki radyoprotektif etkinliğini araştırmışlardır. Bunun için fibroblast hücre serilerini hasarlamada X-ışını ve bazı ağır iyonlar beraber ve ayrı ayrı kullanılmış, askorbik asit koruyucu etkinliği incelenmek üzere ortama ışınlamalardan 30 dakika önce, 30 dakika sonra, 1 saat sonra ve 6 saat sonra 5 mM konsantrasyonda ilave edilmiştir. Radyasyon türlerine maruziyetten 24 saat sonra hücre canlılığı, DSB miktarı ve SCE frekansı incelenmiştir. Yüksek derece antioksidan etkinliğe sahip olan askorbik asitin radyasyon türlerine karşı farklı radyoprotektif etkinlik gösterdiği; X-ışını tarafından oluşturulan hasar gibi kompleks olmayan türde DNA hasarlarına karşı etkili olabileceği sonucuna varılmıştır (101).

Yukarıda propolisin ve propolisin içeriğinde de bulunan flavonoid ve polifenolik özellikteki doğal bileşiklerin radyasyon hasarına karşı göstermiş olduğu koruyucu etkinliğinden bahsedilen çalışmalara benzer olarak çalışmamızda Türk propolisinin etanolik ekstraktlarının fibroblast hücre serilerinde, 3 Gy gama radyasyon kaynaklı

DNA hasarını engellediği ve radyoprotektif etkinliği ortaya konulmuştur. Türk propolisinin gösterdiği radyoprotektif etkinliğin, onun yüksek oranda flavonoid ve polifenolik türevi bileşik içermesinden kaynaklandığını söyleyebiliriz (94). Propolisin etanolik ekstrakları radyasyonun dolaylı etkisi ile oluşan serbest radikalleri, radikal toplayıcı özelliği sayesinde bertaraf ederek radyoprotektif etkinlik göstermiş olabilir. Nitekim literatürde de flavonoidler ve bazı vitaminler ile yapılan çalışmalarda benzer koruyucu etkinlik görülmüş ve bu etkinlik onların antioksidan özellikleri ve serbest radikal yakalama kapasiteleri ile açıklanmıştır (91,96,97,101).

8. SONUÇ ve ÖNERİLER

8.1. Sonuçlar

1. Çalışmada kullanılan fibroblast hücre serilerinde istenilen düzeyde DNA hasar yaratmak için 200-250 arası değere en yakın comet skorunu veren gama radyasyon dozu 3 Gy olarak bulundu.

2. Propolisin 100, 200 ve 300 µg/mL konsantrasyonlardaki etanolik ekstraktlarının 15 ve 30 dakikalık ön muameleler sonrası hücreler üzerinde toksik etki oluşturmada gama radyasyonun neden olduğu DNA hasarını engelleyebildiği sonucuna varıldı ($p<0.001$).

3. Amifostin ile 4, 7, 14 mM konsantrasyonlarda 15 ve 30 dakikalık ön muameleler sonrası pozitif kontrol göre anlamlı fark görüldü ($p<0.001$).

8.2. Öneriler

1. Bu çalışma farklı çözücülerde hazırlanmış propolis ekstraktlarıyla *in vitro* yapılabilir.

2. Çalışmada kullanılan insan fibroblast hücre serileri yerine farklı hücre grupları kullanılarak propolisin farklı hücre gruplarına karşı sergileceği *in vitro* radyoprotektif etkinlik incelenebilir.

3. Bu çalışmada DNA hasarlayıcısı olarak kullanılan γ -ışını yerine farklı ışıma türleri kullanılarak propolisin farklı radyasyon türlerine karşı gösterebileceği radyoprotektif etkinlik araştırılabilir.

4. Propolisin kalitatif ve kantitatif içeriği farklı çözücüler kullanılarak HPLC ve GC-MS gibi ileri kromatografik yöntemlerle ortaya konabilir.

5. Radyoprotektif etkinin hangi etken maddelerden kaynaklandığı propolisin içeriğinin açığa çıkarılmasıyla beraber literatür karşılaştırması yapılarak bulunabilir.

6. Propolisin endojen antioksidan sistemde görevli enzimlerin (katalaz, glutatyon redüktaz, glutatyon peroksidaz gibi) aktivitesi üzerinden radyoprotektif etki gösterip göstermediği, bu enzimlerin aktivitesi ölçülerek ortaya konabilir.

7. Hücrelerin bulunduğu ortamda total antioksidan ve total oksidan kapasite ölçülerek,

propolis ilave edilen grupta antioksidan ve oksidan kapasitenin değişimi incelenebilir.

8. Propolisin radyoprotektif özelliğinin ortaya konması için gama radyasyona maruziyet sonrası propolisle ön muamele yapılan grup ile negatif ve pozitif kontrol grubu arasında RT-PCR ile DNA tamir enzimlerinin ekspresyonuna bakılabilir.

9. Deneysel hayvan çalışmaları ile propolisin *in vivo* koşullarda radyasyona karşı koruyucu bir etki gösterip gösteremeyeceği incelenebilir.

9. KAYNAKLAR

1. Kumova U, Korkmaz A, Avcı B, Ceyran G (2002). Önemli bir arı ürünü: Propolis. *Uludağ Bee Journal* 4: 10-23.
2. Hepşen İ, Tilge F, Er H (1996). Propolis: Tıbbi özellikleri ve oftalmolojik kullanımı. *Turgut Özal Tıp Merkezi Dergisi* 3(4): 386-391.
3. Benkovic V, Kopjar N, Knezevic HA, Dikic D, Basic I, Ramic S, Viculin T, Knezevic F, Orsolic N (2008). Evaluation of radioprotective effects of propolis and quercetin on human white blood cells *in vitro*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 31(9): 1778-1785.
4. Atmaca E, Aksoy A (2009). Oksidatif DNA hasarı ve kromatografik yöntemlerle tespit edilmesi. *YYÜ Veteriner Fakültesi Dergisi* 20(2): 79-83.
5. Hoisseinmehr SJ (2010). Flavonoids and genomic instability induced by ionizing radiation. *Drug Discovery* 15: 907-918.
6. Coşkun M (2003). Biyolojik dozimetri ile ilgili gelişmeler. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi* 34(4): 207-218.
7. Yeni D, Fidan AF, Gündoğan M (2010). Spermatozon'da tek hücre jel elektroforezi ile DNA hasarı tespiti. *Fırat Üniversitesi Veteriner Dergisi* 24(3): 167-173.
8. Uzel A, Sorkun K, Önçağ Ö, Gençbay Ö, Salih B (2005). Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. *Microbiological Research* 160: 189-195.
9. Kutluca S, Genç F, Korkmaz A (2006). Propolis. *Samsun Tarım İl Müdürlüğü Çiftçi Eğitim Serisi Yayını* 2: 6-30.
10. Gökçe M, Öztürk A, Solmaz C, Tutgun E, Bulut G, Yalçın Lİ, Över M, Yaşar N (2001). Arıcılık. *Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Yayın Dairesi Başkanlığı Çiftçi Eğitimi ve Yayın Serisi* 33: 5-20.
11. Özcan M, Ceylan D, Ünver A, Yetişir R (2003). Türkiye'nin çeşitli bölgelerinden sağlanan polen ve propolis ekstraktlarının antifungal etkisi. *Uludag Bee Journal* 3: 27-34.
12. Ghisalberti EL (1979). Propolis: a review. *Bee World* 60: 59-84.
13. Demir S (2010). Propolis ekstraktlarının fibroblast hücre serilerinde H₂O₂ ile uyarılmış DNA hasarı (genotoksosite) üzerine etkisinin comet assay yöntemi ile araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.

14. Lofty M (2006). Biological activity of bee propolis in health and disease. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 7: 22-31.
15. Benkovic V, Knezevic HA, Dikic D, Lisic D, Orsolic N, Basic I, Kosalec I, Kopjar N (2008). Radioprotective effects of propolis and quercetin in γ -irradiated mice evaluated by the alkaline comet assay. *Phytomedicine* 15: 851-858.
16. Montoro A, Barquinero JF, Almonacid M, Sebastica N, Verdu G, Sahuquillo V, Serrano J, Saiz M, Villaescusa JI, Soriano JM (2011). Concentration-dependent protection by ethanol extract of propolis against γ -ray-induced chromosome damage in human blood lymphocytes. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 10: 1155-1162.
17. Seven İ, Aksu T, Tatlı Seven P (2007). Propolis ve hayvan beslemede kullanımı. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 18(2): 79-84.
18. Orsolic N, Benkovic V, Knezevic HA, Kopjar N, Kosalec I, Bakmaz M, Mihalevic Z, Bendelja K, Basic I (2007). Assessment by survival analysis of the radioprotective properties of propolis and its polyphenolic compounds. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 30(5): 946-951.
19. Aliyazıcıoğlu Y, Demir S, Çakıroğlu T, Akalın I, Değer O, Bedir A (2011). Preventive and protective effects of Turkish propolis on H₂O₂ induced DNA damage in foreskin fibroblast cell lines. *Acta Biologica Hungarica* 62(4): 388-396.
20. Aliyazıcıoğlu Y, Değer O, Ovalı E, Barlak Y, Hoşver I, Tekelioğlu Y, Karahan SC (2005). Effects of Turkish pollen and propolis extracts on respiratory burst for K-562 cell lines. *International Immunopharmacology* 5: 1652-1657.
21. Hubbezoğlu İ, Özcan Ü, Sümer Z (2009). Sodyum hipoklorit, klorheksidin ve propolis içeren solüsyonların potasyum titanyum fosfat lazer ile birlikte kullanımlarının *Streptococcus mutans* üzerine etkilerinin incelenmesi. *Selçuk Üniversitesi Dışhekimliği Dergisi* 18: 281-287.
22. Silici S (2008). Farklı botanik orijine sahip propolis örneklerinde biyolojik olarak aktif bileşiklerin belirlenmesi. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi* 24(1-2): 120-128.
23. Biray Ç, Gündüz C, Yılmaz B, Şahin F, Topçuoğlu N (2006). Propolis ve etken maddeleri olan kafeik asit fenetil ester ve sinamik asitin, insan T hücreli akut lenfoblastik lösemi hücre dizisi (CCRF-CEM)'de sitotoksik ve apoptotik etkinliğinin değerlendirilmesi. *Ege Tıp Dergisi* 45(2): 83-92.
24. Barlak Y (2009). Türk propolisi ekstraktlarının prostat kanser hücre serilerinin proteomiklerine etkisi. *Doktora Tezi, KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.*

25. Cuesta A, Rodriguez A, Esteban MA, Meseguer J (2005). *In vivo* effects of propolis, a honeybee product, on gilthead seabream innate immune responses. *Fish and Shellfish Immunology* 18: 71-80.
26. Polat G, Koçan D (2006). Propolis ve Antimikrobiyel Etkisi. Türkiye 9. Gıda Kongresi, Bolu, 24-26 Mayıs 2006, 1003-1006.
27. Çapanoğlu Güven E, Toydemir Otkun G, Boyacıoğlu D (2010). Flavonoidlerin biyoyararlılığını etkileyen faktörler. *Gıda* 35(5): 387-394.
28. Atasever B, Akgün Dar K, Edem Kuruca S, Turan N, Seyhanlı V, Meriçli A (2003). *Cyanara syrica*'dan elde edilen flavonoidlerin lösemi hücreleri üzerine etkisi. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi* 32(3): 143-150.
29. Koo H, Rosalen PL, Cury JA, Park YK, Bowen WH (2002). Effects of compounds found in Propolis on *Streptococcus Mutans* growth and on glucosyltransferase activity. *Antimicrobial Agents Chemother* 46: 1302-1309.
30. Storfozin JM (2007). Propolis and the immune system: a review. *Journal of Ethnopharmacology* 113: 1-14.
31. Özdal Kurt F, Vatansever S, Sorkun K, Deliloğlu Gurhan S, Turkoz E, Gencay O, Salih B (2010). Inhibitory effects of propolis on human osteogenic sarcoma cell proliferation mediated by caspase pathway. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 16(3): 397-404.
32. Kleinrok Z, Borzecki Z, Scheller S, Matuga W (1978). Biological properties and clinical application of propolis: X. Preliminary Pharmacological Evaluation of Ethanol Extract of Propolis. *Arzneimittel Forschung - Drug Research* 28: 291-292.
33. Santos VR, Pimenta FJGS, Aguiar MCF, Carmo MAV, Naves MD, Mesquita RA (2005). Oral candidiasis treatment with Brazilian ethanol propolis extract. *Phytotherapy Research* 19: 652-654.
34. Kujumgiev A, Tsvetkova I, Serkedjieva Y, Bankova V, Christov R, Popov S (1999). Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *Journal of Ethnopharmacology* 64: 235-240.
35. Banskota AH, Tezuka Y, Kadota S (2001). Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytotherapy Research* 15: 561-571.
36. Aksoy Z, Dığrak M (2006). Bingöl yöresinde toplanan bal ve propolisin antimikrobiyel etkisi üzerinde *in vitro* araştırmalar. *Fırat Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi* 18(4): 471-478.
37. Flakus FN (1980). Detecting and measuring ionizing radiation-a short history. *International Atomic Energy Agency Bulletin* 23(4): 31-36.

38. Arya PA (1999). Fundamentals of Nuclear Physics. Çekirdek Fiziğinin Esasları. Çeviren: Şahin Y. Aktif Yayınevi, Erzurum, 24-30.
39. Krane SK (2001). Introductory Nuclear Physics. Nükleer Fizik. Çeviren: Şarer B. Palme Yayıncılık, Ankara, 3-10.
40. Özdal A (2009). İnternal ve eksternal iyonizan radyasyonun sitogenetik etkilerinin değerlendirilmesi. Tıpta Uzmanlık Tezi, Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi, Sivas.
41. Yaramış B (1985). Nükleer Fizik. İTÜ Fen Edebiyat Fakültesi Yayınları, No.7, İstanbul; 6-10.
42. Coşkun Ö (2011). İyonize radyasyonun biyolojik etkileri. Süleyman Demirel Üniversitesi Teknik Bilimler Dergisi 1(2): 13-17.
43. Türkiye Atom Enerjisi Kurumu. (2011) Bilgi Köşesi [online] Available from: <http://www.taek.gov.tr> [Accessed 01 August 2011].
44. Daşdağ S (2010). İyonlaştırıcı radyasyon ve kanser. Dicle Medical Journal 37(2): 177-185.
45. Yaren H, Karayılanoglu T (2005). Radyasyon ve insan sağlığı üzerine etkileri. Türk Silahlı Kuvvetleri Koruyucu Hekimlik Bülteni 4(4): 199-208.
46. Dinçer Y, Akçay T (2000). DNA Hasarı. Türk Biyokimya Dergisi 25(2): 73-79.
47. Akpolat M, Topçu Y, Kanter M (2008). İyonizan radyasyonun neden olduğu ince bağırsak hasarına karşı curcumin ve C-vitaminin koruyucu etkilerinin incelenmesi. Tıp Araştırmaları Dergisi 6(2): 77-85.
48. Colorado State University. (2006) Hayward Statistics Department [online]. Available from: <http://www.sci.csuhayward.edu/statistics/Resources/Quiz/dnaan.htm> [Accessed 13 August 2011].
49. Mercan U (2004). Toksikolojide Serbest Radikallerin Önemi. YYÜ Veteriner Fakültesi Dergisi 15(1-2): 91-96.
50. Varanda EA, Tavares DC (1998). Radioprotection: Mechanisms and radioprotective agents including honeybee venom. Journal of Venomous Animals and Toxins 4(1): 5-21.
51. Upadhyay SN, Dwarakanath BS, Ravindranath T (2005). Chemical Radioprotectors. Defence Science Journal 55(4): 403-425.

52. Kılınçsöz S, Demirel C (2008). Oksidatif stres, radyasyona bağlı hasar ve radyokoruyucu olarak N-asetil-sistein'in potansiyel rolü. *Türk Onkoloji Dergisi* 23(4): 200-207.
53. Santini V (2001). Amifostine: chemotherapeutic and radiotherapeutic protective effects. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 2(3): 479-489.
54. Arora R, Gupta D, Chawka R, Sagar R, Sharma A, Kumar R, Prasad J, Singh S, Samanta N (2005). Radioprotection by Plant Products: Present Status and Future Prospects. *Phytoteraphy Research* 19: 1-22.
55. Çakatay U, Kayalı R (2006). Serbest Radikal Biyokimyasının Tarihsel Süreçteki Gelişimi. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi* 37: 162-167.
56. Kılınç K, Kılınç A (2002). Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri. *Hacettepe Tıp Dergisi* 33(2): 110-118.
57. Buonocore G, Perrone S, Tataranno LM (2010). Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine* 15: 186-190.
58. Çavdar C, Sifil A, Çamsarı T (1997). Reaktif oksijen partikülleri ve antioksidan savunma. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi* 3(4): 92-95.
59. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The Internal Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39: 44-84.
60. Jensen Knak, JS (2003). Oxidative stress and free radicals. *Journal of Molecular Structure* 666-667: 387-392.
61. Yamamoto Y (2001). Role of active oxygen species and antioxidants in photoaging. *Journal of Dermatological Science* 27: 1-4.
62. Çavdar C, Sifil A, Çamsarı T (1997). Hastalıkların patogenezi ve tedavisinde reaktif oksijen partikülleri ve antioksidanlar. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi* 3(4): 96-101.
63. Müftüoğlu M (2003). DNA tamiri ve erken yaşlanma sendromları. *Türk Biyokimya Dergisi* 28(1): 20-24.
64. Burrows JC, Muler JG (1998). Oxidative Nucleobase modifications leading to strand scission. *Chemical Reviews* 98: 1109-1151.
65. Hallwell B, Auroma OI (1991). DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Letters* 281: 9-19.

66. Dizdaroğlu M (2002). Oxidative DNA damage and repair. *Free Radical Biology & Medicine* 33: 1-14.
67. Kulaksız G, Sancar A (2007). Nükleotid eksizyon onarımı ve kanser. *Türk Biyokimya Dergisi* 32(3): 104-111.
68. Sancar A, Lindsey Boltz LA, Ünsal Kaçmaz K, Linn S (2004). Molecular mechanisms of Mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annual Review of Biochemistry* 73: 39-85.
69. Bütüner Debeleş B, Kantarcı G (2006). Mutasyon, DNA hasarı, onarım mekanizmaları ve kanserler ilişkisi. *Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi* 35(2): 149-170.
70. Koca N, Karadeniz F (2003). Serbest radikal oluşum mekanizmaları ve vücuttaki antioksidan savunma sistemleri. *Gıda Mühendisliği Dergisi* 16: 32-37.
71. Rice Evans CA, Miller NJ, Paganga G (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science* 2: 152-159.
72. Arslan R, Dünder Y (1999). Bir antioksidan olarak E-vitamini. *Genel Tıp Dergisi* 9(3): 109-116.
73. Gao K, Henning SM, Niu Y, Youssefian AA, Seram NP, Xu A, Heber D (2006). The *Citrus* flavonoid naringenin stimulates DNA repair in prostate cancer cells. *Journal of Nutritional Biochemistry* 17: 89-95.
74. Bedir A, Bilgici B, Yurdakul Z, Gürsel BŞ, Alvur M (2004). DNA Hasarı Analizinde μ -FADU ve COMET yöntemlerinin karşılaştırılması. *Türk Klinik Biyokimya Dergisi* 2(3): 97-103.
75. Başaran AA (2002). Farmakognozide tek hücre jel elektroforezi uygulamaları. 14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Eskişehir, 29-31 Mayıs 2002, 53-60.
76. Moller P, Knudsen L, Loft S, Valin H (2000). The comet assay a rapid test in bio monitoring occupational exposure to DNA damaging agents and effect of confounding factors. *Cancer Epidemiology, Biomarker & Prevention* 9: 1005-1015.
77. Dikilitaş M, Koçyiğit A (2010). Canlılarda tek hücre elektroforez yöntemi ile DNA hasar analizi: Comet Analiz Yöntemi. *Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi* 14(2): 77-79.
78. Collins AR, Oscoz AA, Brunborg G, Gaivao I, Giovannelli L, Kruszewski M, Catherine CS, Stetina R (2008). The Comet Assay: Topical issues. *Mutagenesis* 23(3): 143-151.

79. Hartmann A, Agurell A, Beevers C, Brendler Schwaab S, Burlinson B, Clay P, Collins AR, Smith A, Speit G, Thybaud V, Tice RR (2003). Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline comet assay. *Mutagenesis* 18(1): 45-51.
80. Collins AR, Dobson VL, Dusinka M, Kennedy G, Stetina R (1997). The comet assay: What can it really tell us?. *Mutation Research* 375: 183-193.
81. Collins AR, Dusinska M, Franklin M, Somorovska M, Petrovska H, Duthie S, Fillion L, Panayiotidis M, Raslova K, Vaughan N (1997). Comet assay in human biomonitoring studies: Reliability, validation, and applications. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 30: 139-146.
82. Fairbairn DW, Olive PL, O'Neill KL (1995). The comet assay: a comprehensive review. *Mutation Research* 339: 37-59.
83. Kumaravel TS, Vilhar B, Faux SP, Awadhesh NJ (2007). Comet assay measurements: A perspective. *Cell Biology and Toxicology* 25: 53-64.
84. Munari CC, Alves JM, Bastos JK, Tavares DC (2009). Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic potential of *Baccharis dracunculifolia* extract on V79 cells by the comet assay. *Journal of Applied Toxicology* 30(1): 22-28.
85. Mozdarani H, Taherii A, Haeri SA (2007). Assessment of radioprotective effects of amifostine on human lymphocytes irradiated *in vitro* by gamma rays using cytokinesis-blocked micronucleus assay. *Iran Journal of Radiation Research* 5(1): 9-16.
86. Kopjar N, Miovic S, Ramic S, Milic M, Viculin T (2006). Assessment of the radioprotective effects of amifostine and melatonin on human lymphocytes irradiated with gamma rays *in vitro*. *Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju* 57: 155-163.
87. Müller AC, Pigorsch S, Beyer C, Lautenschlager C, Dunst J (2004). Radioprotective effects of amifostine *in vitro* and *in vivo* measured with the comet assay. *Strahlentherapie und Onkologie* 8: 517-525.
88. Deplanque G, Vincent F, Becherel M, Cajenave JP, Bergerat JP, Soyer C (2000). Caffeine does not cause override of the G2/M block induced by UV or gamma radiation in normal human skin fibroblasts. *British Journal of Cancer* 83(3): 346-353.
89. Davis J, Masilamoni G, Arul V, Kumar M, Baraneedharan U, Solomon FD, Sakthivelu VI, Jesudason PE, Jayakumar R (2009). Radioprotective effect of DL- α -lipoic acid on mice skin fibroblasts. *Cell Biology and Toxicology* 25: 331-340.

90. Bansal P, Paul P, Nayak PG, Pannakal ST, Zou J, Laatsch H, Priyadarsini KI, Unnikrishnan MK (2011). Phenolic compounds isolated from *Pilea microphylla* prevent radiation induced cellular DNA damage. *Acta Pharmaceutica Scientia* 1(4): 226-235.
91. Konopacka M, Rzeszowska Wolny J (2001). Antioxidant Vitamins C, E and β -carotene reduce DNA damage before as well as after g-ray irradiation of human lymphocytes *in vitro*. *Mutation Research* 491: 1-7.
92. Konimozhi G, Prasad NR, Ramachandran S, Pugalendi KV (2011). Umbelliferone modulates gamma radiation induced reactive oxygen species generation and subsequent oxidative damage in human blood lymphocytes. *European Journal of Pharmacology* 672: 20-29.
93. Fedde KN, Whyte MP (1990). Alkaline phosphatase (tissue-nonspecific isoenzyme) is a phosphoethanolamine and pyridoxal-5'-phosphate ectophosphatase: Normal and hypophosphatasia fibroblast study. *American Journal of Human Genetics* 47: 767-775.
94. Çakıroğlu T (2010). Çeşitli çözücülerde Türk propolisinin çözünürlüğünün incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
95. Benkovic V, Knezevic HA, Orsolic N, Basic I, Ramic S, Viculin T, Knezevic F, Kopjar N (2009). Evaluation of radioprotective effects of propolis and its flavonoid constituents: *In vitro* study on human white blood cells. *Phytotherapy Research* 23: 1159-1168.
96. Kanokporn NR, Tungjai M, Whorton EB (2005). Protective effect of apigenin on radiation induced chromosomal damage in human lymphocytes. *Mutation Research* 585: 96-104.
97. Prasad NR, Srinivasan M, Pugalendi KV, Menon VP (2006). Protective effect of ferulic acid on γ -radiation-induced micronuclei, dicentric aberration and lipid peroxidation in human lymphocytes. *Mutation Research* 603: 129-134.
98. Zhang R, Kang KA, Kang SS, Park JW, Hyun JW (2010). Morin (2',3,4',5,7-pentahydroxyflavone) protected cells against γ -radiation induced oxidative stress. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 108: 63-72.
99. Kang KA, Lee IK, Zhang R, Piao MJ, Kim CK, Kim SY, Shin T, Kim BJ, Lee NH, Hyun JW (2011). Radioprotective effect of geraniin via the inhibition of apoptosis triggered by γ -radiation induced oxidative stress. *Cell Biology and Toxicology* 27: 83-94.
100. Turan İ (2011). Türk propolis ekstraktlarının fibroblast hücre serilerinde genotoksisite üzerine etkisinin DNA tamir enzimleri vasıtasıyla incelenmesi. Doktora Tezi, KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.

101. Fujii Y, Kato AT, Uneo A, Kubota N, Fujimori A (2010). Ascorbic acid gives different protective effects in human cells exposed to X-rays and heavy ions. *Mutation Research* 699: 58-61.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Soyadı, Adı : Yalçın, Can Özgür
Uyruğu : TC
Doğum Tarihi ve Yeri : 1983, Trabzon
Medeni Hali : Bekar
E-Posta : canozguryalcin@ hotmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	KTÜ-SABE, Tıbbi Biyokimya AbD	
Lisans	Atatürk Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi	2006
Lise	Trabzon Yomra Fen Lisesi	2001
Ortaokul	Trabzon Kanuni Anadolu Lisesi	1998

AKADEMİK/MESLEKİ DENEYİM

Görevi	Kurum	Süre (Yıl-Yıl)
1. Eczacı,	Trabzon Kadın Doğum ve Çocuk Hastalıkları Hast.	(2007-2012)
2. Arş. Gör.,	KTÜ Eczacılık Fak. Farmasötik Toksikoloji AbD.	(2012-...)

YABANCI DİL

İngilizce

HOBİLER

Gitar, yüzme, dalış, tarih, resim, müzik, turistik gezi, belgesel, otomobil.