

**BİTKİSEL FENOLİK BİR BİLEŞİK OLAN KLOROJENİK ASİDİN
RADYODUYARLILIK OLUŞTURMA ETKİSİNİN İN VİTRO
GENOTOKSİSİTE VE ENZİM TEST SİSTEMLERİ YARDIMIYLA
ARAŞTIRILMASI**

ÖZGÜN TEKSOY



T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BİTKİSEL FENOLİK BİR BİLEŞİK OLAN KLOROJENİK
ASİDİN RADYODUYARLILIK OLUŞTURMA ETKİSİNİN
İN VİTRO GENOTOKSİSİTE VE ENZİM TEST
SİSTEMLERİ YARDIMIYLA ARAŞTIRILMASI**

ÖZGÜN TEKSOY

Doç. Dr. NİLÜFER ÇİNKİLİÇ
(Danışman)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Bursa – 2013

Her Hakkı Saklıdır

TEZ ONAYI

ÖZGÜN TEKSOY tarafından hazırlanan “Bitkisel fenolik bir bileşik olan klorojenik asidin radyoduyarlılık oluşturma etkisinin in vitro genotoksisite ve enzim test sistemleri yardımıyla araştırılması” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Doç. Dr. Nilüfer Çinkılıç

Başkan: Doç. Dr. Nilüfer Çinkılıç
Uludağ Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi
Biyoloji Anabilim Dalı

İmza

Üye: Doç. Dr. Tolga Çavaş
Uludağ Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi
Biyoloji Anabilim Dalı

İmza

Üye: Prof. Dr. Lütfi ÖZKAN
Uludağ Ü. Tıp Fakültesi
Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı

İmza

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Ali Osman DEMİR
Enstitü Müdürü
. .2013

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

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

. . 2013

ÖZGÜN TEKSOY

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BİTKİSEL FENOLİK BİR BİLEŞİK OLAN KLOOROJENİK ASİDİN RADYODUYARLILIK OLUŞTURMA ETKİSİNİN İN VİTRO GENOTOKSİSİTE VE ENZİM TEST SİSTEMLERİ YARDIMIYLA ARAŞTIRILMASI

ÖZGÜN TEKSOY

Uludağ Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Nilüfer ÇİNKİLİÇ

Yapılan bu çalışmada klorojenik asidin radyasyona maruz bırakılan Caco2 insan kolon adenokarsinom hücreleri üzerindeki radyoduyarlılık etkileri tek hücre jel elektroforezi (Komet) ve M30 testi kullanılarak araştırılmıştır.

Çalışmamızda, klorojenik asit ve radyasyonun tek başlarına oluşturdukları sitotoksik etkilerin belirlenmesi amacıyla XTT ve klorojenik test uygulanmıştır. Çeşitli dozlarda klorojenik asit (11–5780 µM) ve radyasyona (0,5 – 6 Gy) maruz bırakılan Caco2 hücrelerinde hayatta kalış eğrileri hazırlanmıştır. XTT testi ile klorojenik asidin IC50 dozu 1816 µM olarak belirlenmiştir. Klorojenik test sonuçlarına göre ise çalışmamızda kullanılacak radyasyon dozu 2 Gy olarak tespit edilmiştir. Komet ve M30 apoptoz testi için kullanılacak optimum klorojenik asit konsantrasyonları (908, 1816 ve 2724 µM) ve radyasyon dozu (2 Gy) olarak belirlenmiştir. Bu konsantrasyonlar tek başına ve kombine olarak kullanılmıştır. Komet testi sonucunda klorojenik asitin belirlenen konsantrasyonlarda artan bir genotoksositeye neden olduğu tespit edilmiştir. Radyasyon ile muamelede ise 2 Gy dozda genotoksitede istatistiksel anlamlı şekilde artış olduğu gözlenmiştir. Radyasyon hassasiyetini belirlemek için gerçekleştirilen kombine doz uygulamalarında ise, hücreler 2 Gy radyasyona maruz bırakılmadan 24 saat önce 908, 1816 ve 2724 µM konsantrasyonlardaki klorojenik asit ile muamele edilmişlerdir. Radyasyona maruz bırakılmadan önce klorojenik asit uygulanması durumunda Caco2 hücrelerinde DNA hasarının tek başına radyasyon verilen hücelere göre istatistiksel anlamlı arttığı gösterilmiştir. M30 apoptoz testinde ise tek başına radyasyon ile muamele edilen hücrelerle karşılaştırıldığında klorojenik asidin apoptoz oranını istatistiksel anlamlı oranda arttırmadığı belirlenmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlara göre, radyasyon ile kombine uygulanan klorojenik asidin IC 50 konsantrasyonu üzerindeki dozlarda radyasyonca indüklenen sitotoksik ve genotoksik etkiyi arttırdığı ancak apoptoz oranını arttırmadığı yani Caco2 kanser hücre hatlarında radyoduyarlılık etkisinin olmadığı ortaya konmuştur.

Anahtar Kelimeler: Klorojenik Asit, iyonize Radyasyon, radyoduyarlılık, Caco2 kolon adenokarsinom hücreleri, apoptoz, DNA hasarı, komet, XTT canlılık testi

2013, ix + 77 sayfa

ABSTRACT

MSc Thesis

INVESTIGATION OF THE RADIOSENSITIVE EFFECT OF PLANT PHENOLIC CHLOROGENIC ACID USING GENOTOXICITY TESTS AND ENZYME ASSAY IN VITRO

ÖZGÜN TEKSOY

Uludag University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr Nilüfer ÇİNKİLİÇ

This study investigated the radiosensitivity effects of chlorogenic acid alone or in combination with radiation on Caco2 human colon cancer cells using viability assays (clonogenic and XTT), single cell gel electrophoresis (Comet) and M30 apoptosis enzyme assays.

The aim of our work, to determine firstly cytotoxic effects of chlorogenic acid and radiation alone or in combination using XTT and clonogenic assay. Survival curve in Caco2 cells exposed to several doses of chlorogenic acid (11-5780 μ M) and radiation (0.5-6 Gy) was prepared. IC50 dose of chlorogenic acid was found as 1816 μ M with XTT assay. According to results of clonogenic assay, optimum radiation dose to be used in our study was determined as 2 Gy. Optimal chlorogenic acid concentrations were chosen as IC25, IC50 and IC75 doses (908, 1816 and 2724 μ M respectively) and these doses were used alone and in combination with 2 Gy radiation dose.

In consequence of comet assay we have been identified increasing genotoxicity in different concentrations of chlorogenic acid at statistically significant levels. There was also significant increase in DNA damage ratios at 2 Gy radiation dose. We combined three doses of chlorogenic acid with a single radiation dose in comet assay and found that while chlorogenic acid may have ability to induce DNA damage alone, combination with radiation did not show increased DNA damage compared with single radiation treatment. The chlorogenic acid showed radioprotective effect at the lower doses. We used M30 Elisa apoptosis assay to understand the radiosensitivity effect of chlorogenic acid on radiation induced apoptosis on Caco2 cells. Single radiation dose increased the frequency of cytokeratin 18 M30 antibodies compared to solvent control. However chlorogenic acid combined with radiation did not increase the M30 antibody level and did not affect apoptosis induced by 2 Gy radiation in Caco2 cell lines. Consequently chlorogenic acid increased the cytotoxic and genotoxic effects induced by single dose of radiation at the higher doses such as IC50 and IC75 but it did not elevate the apoptotic effect of single radiation treatment in Caco2 human colon adenocarcinoma cells.

Key Words: Chlorogenic Acid, ionizing radiation, radiosensitivity, Caco2 colon adenocarcinoma cells, apoptosis, DNA damage, comet, XTT viability assay.

2013, ix + 77 pages

TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesi, yürütülmesi ve bütün çalıŐmalarım boyunca bana rehber olan, ilgi ve yardımlarımı esirgemeyen, ğrencisi olmaktan onur ve mutluluk duyduğum Sayın Hocam Doç. Dr. Nilüfer INKILI' a,

Tez deneylerimde, deneyimlerimden ve yardımlarımdan faydalandığım sevgili hocalarımda Doç. Dr. TOLGA ÇAVAŞ, ArŐ. Gör. Dr. Özgür VATAN' a,

Deney aŐamalarında yardımları ile bana destek olan sevgili arkadaşlarımda ArŐ. Gör. Dilek YILMAZ ve Mmn Coşkun'a,

Yüksek lisans eğitimim süresince birlikte eğitim gördüğüm ve arkadaşlıkları ile bana moral olan herkese,

Tüm bu zahmetli süreçte destek ve yardımlarımı devamlı üzerimde hissettiğim, evlatları olmaktan büyük gurur ve mutluluk duyduğum sevgili aileme,

Sonsuz teŐekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	3
2.1. Radyasyon	3
2.1.1. Radyasyon çeşitleri	3
2.1.2. Suyun hidrolizi.....	7
2.1.3. Radyasyonun Biyolojik Etkileri.....	7
2.1.4. Radyasyonun DNA molekülüne etkileri.....	8
2.1.5. Radyasyonun kromozomlara etkisi.....	15
2.1.6. Serbest radikaller	17
2.1.7. Radyo duyarlılık	20
2.1.8.Radyoterapi.....	21
2.2. Apoptoz	21
2.2.1. Apoptozun düzenleyicileri.....	23
2.2.2. Apoptozun indüklenmesi	24
2.2.3. Kaspazlar	27
2.2.4. Bcl-2 ailesi	28
2.2.5. p53	28
2.2.6. Apoptozu belirlemede kullanılan yöntemler.....	30
2.3. Bitkisel Fenolik Bileşikler	31
3. MATERYAL VE YÖNTEM	37
3.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar	37
3.2. Çözeltilerin Hazırlanması	40

3.3. Hücre Kültürü.....	42
3.4. Çalışma Planı.....	42
3.5. Işınlama Prosedürü	43
3.6. Klonojenik Test	43
3.7. XTT testi.....	45
3.8. Komet Testi	45
3.9. M30 Testi	46
3.10. İstatistiksel Analizler	47
4. BULGULAR.....	47
4.1. Radyasyonun Caco2 Hücre Hattı Üzerindeki Etkisinin Klonojenik Test ile Belirlenmesi	47
4.2. XTT Testi ile % İnhibisyonun Belirlenmesi	48
4.3. CGA ile Radyasyon Kombinlendiğinde Caco2 Hücrelerinin Canlılığı Üzerindeki Etkilerinin Klonojenik Test ile Gösterilmesi.....	50
4.4. CGA'nın DNA Hasarı Oluşturma Etkisi, Komet Testi Sonuçları	51
4.5. M30-Antijen Apoptoz Testi Bulguları	56
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	59
KAYNAKLAR	64
ÖZGEÇMİŞ	76

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
Caco2	İnsan kolon kanseri hücre hattı
e ⁻	Elektron iyonu
EtBr	Etidyum Bromür
Gy	Gray
H	Hidrojen atomu
H ₂ O	Su
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
KCl	Potasyum klorür
M	Molar
mA	Miliamper
mg	Miligram
ml	Mililitre
NaCl	Sodyum Klorür
NaOH	Sodyum Hidroksit
Na ₂ EDTA	Etilendiamintetraasetik asit Disodyum
OH [•]	Hidroksil radikali
O ₂	Oksijen molekülü
O ₂ ^{•-}	Süperoksit anyonu (radikali)
XTT	(2,3 Bis-[2-Metoxi-4-Nitro-5-Sulfophenyl]-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide)
µg/mL	Mikrogram / mililitre
µg	Mikrogram
µM	Mikromolar
-OH	Hidroksil grubu
-COOH	Karboksil grubu

Kısaltmalar	Açıklama
ACO	Aktif cevap oranı
ATCC	American Type Culture Collection
CBMN	Cytokinesis Block MicroNucleus
CGA	Klorojenik asit
cGy	Santi Gray
Cyt-B	Sitokalazin-B
ÇZK	Çift zincir kırığı
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DHC	DNA Hasar Cevabı
DNA	Deoksiribonükleik asit
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffer Saline
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
HT	Hidrolize edilebilir tanen
IR	İyonize edici radyasyon
LMA	Düşük yoğunluklu agaroz
MRI	Manyetik Rezonans Görüntüleme
PCO	Plasebo cevap oranı
PV	Plate Verimi
ROS	Reactive Oxygen Species (Reaktif Oksijen Türleri)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
SOD	Süperoksit dismutaz
SK	Sağ Kalım Oranı
TK	Terapötik kazanç
TZK	Tek Zincirli DNA Kırığı
UV	Ultraviyole ışık

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Elektromanyetik spektrum.....	4
Şekil 2.2. Radyasyonun canlıdaki fiziksel ve kimyasal etki kademeleri.....	5
Şekil 2.3. Radyasyonun canlıdaki biyolojik etki kademeleri.....	6
Şekil 2.4. Su Molekülünün radyasyon ile hidrolizi.....	7
Şekil 2.5. İyonize radyasyonun DNA ve protein üzerindeki etkileri.....	10
Şekil 2.6. Tek ve çift iplik DNA kırıkları.....	11
Şekil 2.7. İyonize radyasyon sonucu timin glikol oluşumu.....	11
Şekil 2.8. 4,6-diamino-5-formamidopirimidin ve 7-metilguanin yapısı.....	12
Şekil 2.9. İyonize radyasyonun neden olduğu tek zincir ve çift zincir kırıkları.....	16
Şekil 2.10. CBMN (Cytokinesis Block MicroNucleus) Dağılımı.....	17
Şekil 2.11. Apoptoz.....	22
Şekil 2.12. Apoptoza yol açan hücre içi ve dışı yollar.....	25
Şekil 2.13. Apoptoz şeması.....	26
Şekil 2.14. Kaspazların filogenetik ilişkisi.....	27
Şekil 2.15. p53 ilişkili apoptoz için model.....	28
Şekil 2.16. Fenolik bileşiklerin oluşumunun gösterildiği biyosentetik yollar.....	32
Şekil 2.17. Flavonoidlerin alt sınıfları.....	33
Şekil 2.18. Flavonoidlerin nükleer yapısı.....	34
Şekil 2.19. Benzoik asit ve sinamik asit türevlerinin moleküler yapısı.....	35
Şekil 2.20. Klorojenik asidin organik yapısı.....	36
Şekil 4.1. Çeşitli dozlarda radyasyona maruz bırakılan Caco2 hücrelerinde klonojenik test ile belirlenen % hayatta kalış oranları.....	48
Şekil 4.2. Çeşitli konsantrasyonlarda CGA'ya maruz bırakılan Caco2 hücrelerinde XTT testi ile belirlenen % canlılık oranları.....	49
Şekil 4.3. Radyasyon ile kombine edilen CGA'nın Caco2 hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisinin klonojenik test ile gösterilmesi.....	50
Şekil 4.4. Radyasyon ile kombine CGA'ya maruz bırakılan Caco2 hücrelerindeki koloni görüntüleri.....	50
Şekil 4.5. Komet testinden elde edilen mikroskopik görüntüler.....	51
Şekil 4.6. Caco2 hücre hattında uygulanan çeşitli dozlardaki CGA'nın Komet testi ile belirlenen Kuyruk Uzunluğu (μm) değerleri.....	52
Şekil 4.7. CGA uygulanan Caco2 hücre hattında yapılan Komet testi sonucu Kuyruk % DNA değerlendirmesi.....	54
Şekil 4.8. CGA uygulanan Caco2 hücre hattında yapılan komet testi sonucu Olive Kuyruk Momenti değerlerinin grafiği.....	55
Şekil 4.9. M30 Antijen standart eğri grafiği.....	57
Şekil 4.10. CGA aktivitesinin 24 saatte Caco2 hücre hatlarında kaspazla kırılmış sitokeratin 18 (M30-Antijen) üzerine etkisi.....	57

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Serbest radikallerin etkilediği moleküller.....	19
Çizelge 2.2 Apoptozis ve genler.....	23
Çizelge 2.3 Apoptozun özellikleri.....	24
Çizelge 3.1 Deneylerde kullanılan cihazlar.....	37
Çizelge 3.2 Çalışmada kullanılan kimyasallar.....	39
Çizelge 3.3 XTT testinde kullanılan CGA dozları	43
Çizelge 4.1 CGA'nın tek başına ve radyasyonla kombine dozları.....	49
Çizelge 4.2 Komet Testinde elde edilen ortalama değerler.....	52

1. GİRİŞ

Radyasyon, dalga, parçacık veya foton olarak adlandırılan enerji paketleri ile yayılan enerjidir. Radyasyon, daima doğada var olan ve birlikte yaşadığımız bir olgudur. Radyo ve televizyon iletişimini olanaklı kılan radyo dalgaları; tıpta, endüstride kullanılan X-ışınları; güneş ışınları; günlük hayatımızda alışkın olduğumuz radyasyon çeşitleridir (Ryan 2012). Radyasyon iki sınıfa ayrılır: iyonize radyasyon ve iyonize olmayan radyasyon. İyonize radyasyon hayvanda ve insanda sinir hücresi ölümünü ve kanseri indükleyebilir ya da hücrelerde kromozom aberasyonlarını, mutasyonu ve ölümü başlatabilir. İnsanlar yaşamları boyunca düşük doz radyasyona maruz kalırlar ancak Çernobil gibi nükleer santral bulunan bölgelerde yüksek oranda radyasyon bulunur. (Sutherland ve ark. 1999).

Çalışmamızda iyonize radyasyon ile oluşturulan apoptotik etkinin bitkisel fenolik bileşik olan klorojenik asit ile artıp artmayacağı belirlenmeye çalışılmıştır. İyonize radyasyon kaynağı olarak hastanelerin Radyasyon Onkolojisi bölümlerinde kullanılan lineer hızlandırıcı cihazı kullanılmıştır. Bu cihaz radyoterapide yaygın olarak kullanılmaktadır.

Radyoterapide kanser hücrelerini yok etmek ya da parçalamak için gama ışını ile X-ışını veya yüksek enerjili parçacıklar kullanılır. Radyasyon terapisi, kanser için en yaygın tedavilerden birisidir. Radyoterapi, cerrahi ya da kemoterapi gibi diğer tedavilerle birlikte uygulanabildiği gibi tek başına da kullanılabilir (Hall ve Giaccia 2006).

Radyo duyarlaştırıcılar iyonizan radyasyonun etkilerini artırabilen ilaç veya diğer maddelerdir. Bu maddeler radyoterapiden önce, radyoterapi sırasında veya sonra verilebilirler (Gridhani ve ark. 2012). Bu bağlamda biyolojik cevap modifikasyonu sağlarlar. Oksijen bilinen en önemli radyo duyarlaştırıcıdır. Potansiyel olarak yararlı elektron bağlanma eğilimli "nitroimidazol" ler, misonidazol ve metronidazol gibi ilaçlar radyo duyarlaştırıcı olarak klinik uygulamalarda araştırılmış ve oral yüksek dozlarda lokal tümör kontrolünde belirgin artma sağlarken periferik nöropati, bulantı ve nadiren

ensefelopati gibi yüksek doza bağlı toksisite sergilemişlerdir. İdeal radyo duyarlaştırıcı henüz bulunmamakla birlikte ideal radyo duyarlaştırıcının tanımı non-toksik ve normal hücrelere zarar vermeden kanser hücrelerinin radyo duyarlılığını selektif olarak artıran diye yapılabilir. 5-FU, mitomycin, cis-platin ve doxorubicin gibi birçok ilaç günümüzde ideal seviyede olmasa da bu özelliklere sahiptir. Radyo duyarlaştırıcıların kullanımı ile özofagus, anüs ve mesane kanserlerinin tedavisinde büyük ilerlemeler kaydedilmiştir ancak bu uygulamalar henüz rutin tedavi kapsamında değildir. (Girdhani ve ark. 2005). Çalışmamızda kinik asit ile kafeik asitin esterleşmesinden oluşan bitkisel fenolik bileşik olan klorojenik asidin kolorektal adenokarsinom insan epitelyal Caco2 hücre hatlarında radyasyon ile oluşturulan apoptotik etkiyi artırıp arttırmayacağını Canlılık testleri, komet testi ve M30 apoptoz Elisa testi ile belirlemeye çalıştık.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Radyasyon

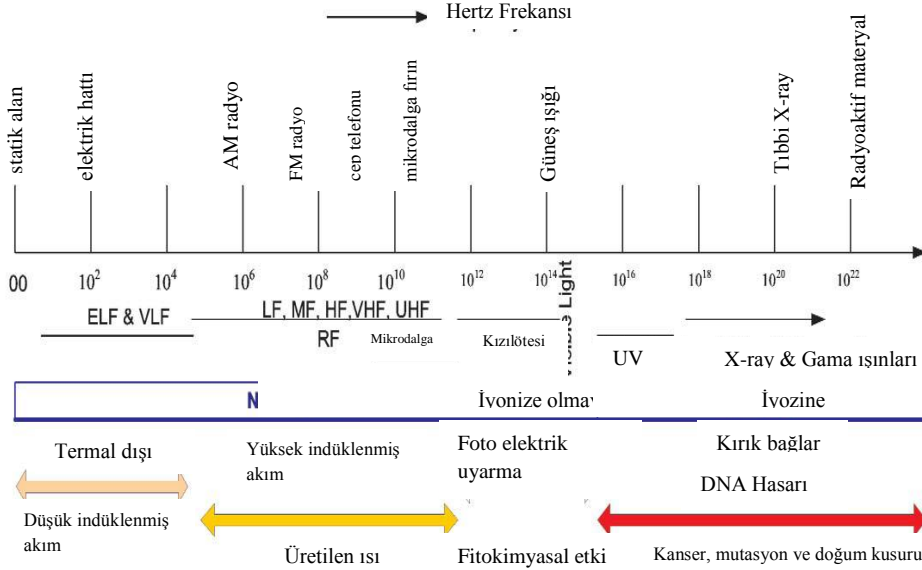
Atomda kararsız halde bulunan proton ve nötronların kararlı hale geçmek için yaydıkları ışımalara radyasyon denir (Bülbül 2003). Modern dünyada radyasyondan izole yaşamak artık mümkün olmamaktadır. Radyasyon bir enerji olup, uzaydan, soluduğumuz havadan, yediğimiz yiyeceklerden, evlerimizin yapı malzemelerinden radyasyona maruz kalırız. Bu nedenle, radyasyon yaşadığımız çevrenin bir parçasıdır ve zamanın başlangıcından itibaren vardır (Hızarcı 2010). Radyasyonda kullanılan X ışınları 1895 yılında Alman fizikçi Wilhelm Conrad Roentgen tarafından keşfedildi. 1896 ve 1898 yılları sırasında sırası ile Antoine Becquerel ve Marie Curie uranyum ve radyumun radyoaktif özelliklerini buldular (Nias 1990).

2.1.1. Radyasyon çeşitleri

Radyasyon iyonlaştırıcı ve iyonlaştırıcı olmayan radyasyon olmak üzere iki çeşittir. İyonlaştırıcı olmayan radyasyon kaynakları mikrodalga, çok yüksek ve düşük frekanslı radyo dalgaları ile kızıl ve mor ötesi ışınlar iken iyonlaştırıcı radyasyon kaynakları, X ve gamma (γ) ışınları ile alfa (α), beta (β) partiküllerini ve nötronu kapsar. (Ryan 2012).

İyonlaştırıcı radyasyonun canlılarda oluşturduğu fizikokimyasal değişikliklerin neden olduğu hücre ölümü ve mutasyon gibi biyolojik sonuçların ortaya çıkması için günler, aylar ve hatta yılların geçmesi gerekebilir (Özalpan 2001). İyonize radyasyon, iki sınıfa ayrılır: Parçacık tipi ve dalga tipi radyasyon. Biyolojik sistemlerdeki bütün deneyler dalga tipi radyasyonun iki formu (x - ve γ ışını)nu içerir (Hall ve Giaccia 2006). X- ve γ -ışınları doğada farklı değildir ancak meydana geliş şekilleri farklıdır. X-ışınları çekirdek dışında oluşan elektromanyetik kaynaklıdır, γ -ışınları ise radyoaktif çekirdeğin kararlı hale geçmesi sonucu çekirdek içi oluşur (Hall ve Giaccia 2006; Coşkun 2011). X-ışınları genellikle volfram ya da altından yapılan elektromanyetik cihazda üretilir. X-ray, radyo dalgaları ve radyan ısı dalga tipi radyasyonun formlarıdır. Elektromanyetik spektrum Şekil 2.1'de gösterilmiştir. İyonize radyasyonun diğer tipi doğada oluşan parçacık radyasyonudur ve parçacık radyasyonunda ağır yüklü iyonlar, nötronlar, beta (β) partikülleri ve α -parçacıkları kullanılmaktadır. Bazıları radyasyon terapisinde

kullanılır ve tanısal radyolojide henüz keşfedilmemiş potansiyele sahiptir (Hall ve Giaccia 2006).

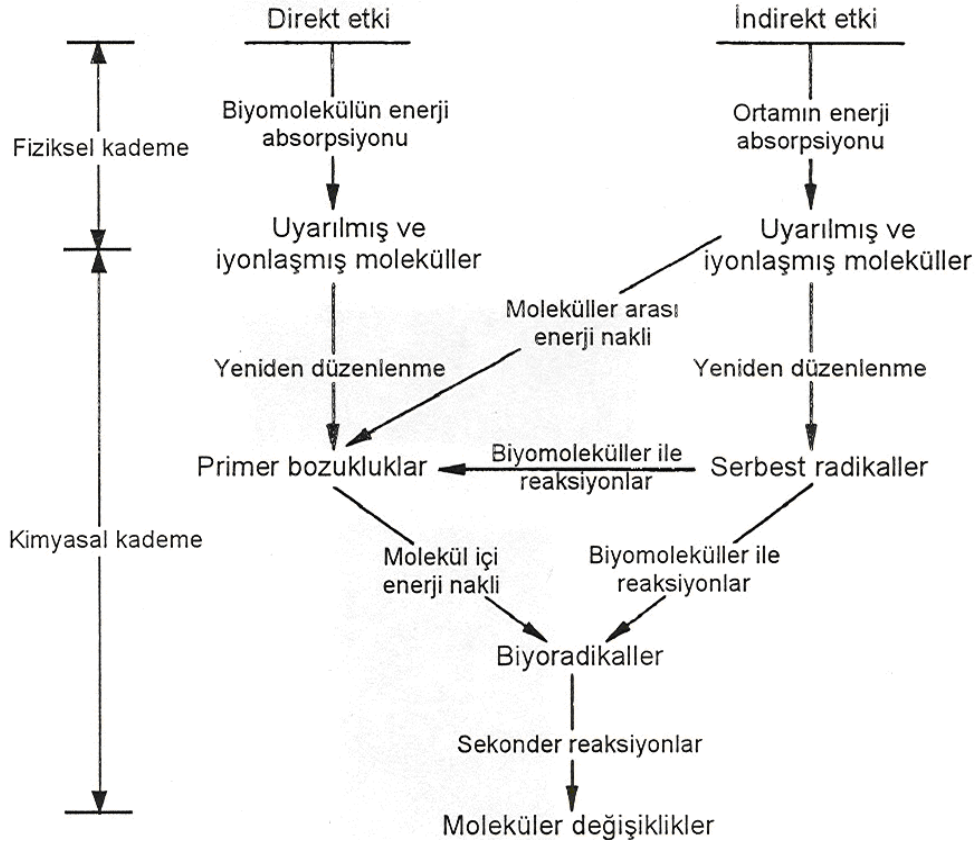


Şekil 2.1. Elektromanyetik spektrum (Zamanian ve Hardiman 2005)

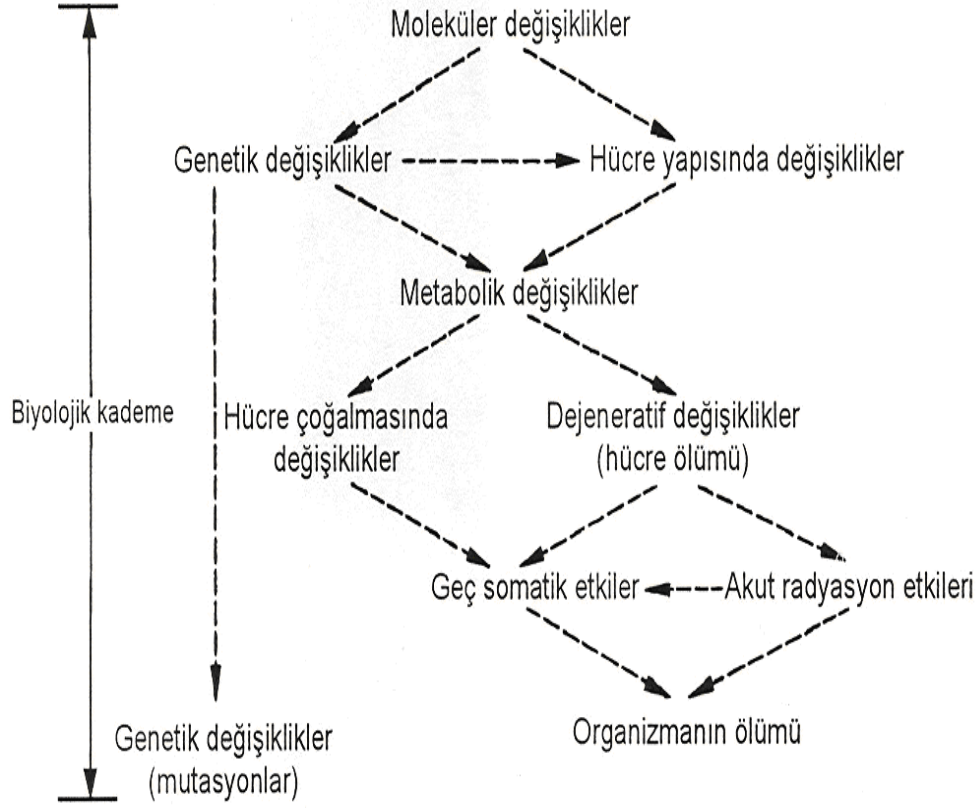
Radyasyonun canlılarda oluşturduğu etki kademeleri iki başlık altında incelenebilir. Direkt etki, radyasyonun DNA ya da enzim molekülü tarafından absorblanması ile başlayan süreci inceler. Biyolojik moleküllerin içinde bulunduğu ortam molekülleri tarafından da absorblanabilir. Bu durumda değişikliğe uğrayan ortamın molekülleridir fakat ortam molekülleri biyolojik moleküllerle reaksiyona girerek onları da değişikliğe uğratır buna da endirekt etki denir (Coşkun 2011, Joiner ve ark. 2009).

Şekil 2.2 ve Şekil 2.3'te gösterildiği gibi radyasyon canlılarda üç kademede etki eder. 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. Fiziksel kademe (Başlatıcı olaylar), iyonlaşma ve uyarılmalardır ve etki süresi 10^{-18} saniyeden 10^{-12} saniye kadardır. Bunu izleyen kimyasal kademede, hasar görmüş atom ve moleküller diğer hücre sel yapılar ile reaksiyona girerek serbest radikallerin ortaya çıkmasına neden olurlar. Kimyasal kademe (Biyomoleküler bozukluklar), serbest radikaller, nükleik asitlerde ve proteinlerde hasarları içerir ve etki süresi 10^{-12} sn ile birkaç saat arasındadır.

Organizmada radyasyonun etkisi ile oluşan bu tür moleküler değişiklikler, son kademe olan biyolojik kademeyi başlatır. Biyolojik kademe ise, hücre ölümü, organizma ölümü, mutasyonlar ve kanser oluşumunu içerir ve etki süresi saatler hatta yıllar alır (Coşkun 2011; Joiner ve ark. 2009).



Şekil 2.2. Radyasyonun canlıdaki fiziksel ve kimyasal etki kademeleri (Dertinger ve Jung, 1970).



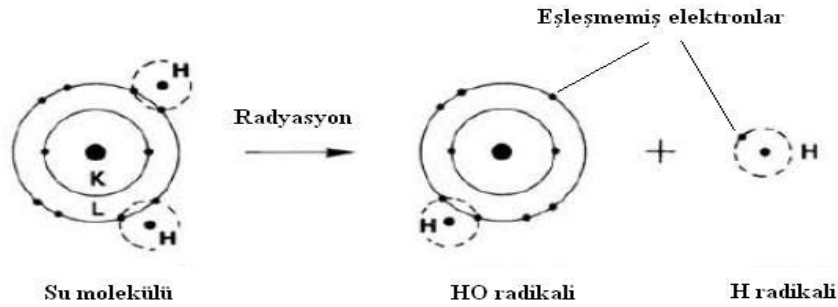
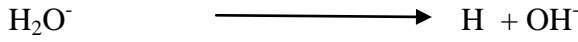
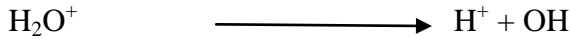
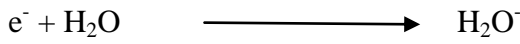
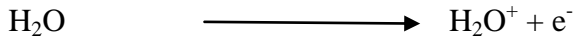
Şekil 2.3. Radyasyonun canlıdaki biyolojik etki kademeleri (Dertinger ve Jung, 1970).

Radyasyon gibi fiziksel faktörlere maruz kalma neticesinde iyonizasyon ve serbest radikal oluşumu gündeme gelmektedir. Serbest radikaller negatif yüklü elektron sayısının çekirdekdeki pozitif yüklü proton sayısı ile eşit olmadığı moleküllerdir. Elektron konfigürasyonlarını pozitif yükü dengelemeleri gerektiğinden çok reaktiftirler. Eşleşmemiş elektron fazlası olan bir serbest radikal bağlanabileceği bir molekül arar. O₂ radikali başka bir molekülden elektron aldığında diğer moleküle oksitlenir hale getirir. Serbest radikaller vücutta önemli moleküllere zarar veren bir seri reaksiyonu başlatabilir ve sonuçta hücre ölümüne neden olabilir (Meineke ve Dörr 2011). İyonize radyasyonun hücrede bol miktarda bulunan su molekülünün ayrışmasına sebep olarak serbest radikallerin oluşmasına yol açmaktadır.

Oluşan serbest radikal unsurlarının hücrede yeni reaksiyonlar aracılığı ile daha başka serbest radikal oluşumları, lipid peroksidasyon zincir reaksiyonları ve başta intestinal kanamalar olmak üzere miyokardiyal iskemi karsinogenezi, katarak oluşumu solunum düzensizliği, DNA zincir kırılması, mutajenik ve karsinojenik etkiler oluşturduğu saptanmıştır.

2.1.2. Suyun hidrolizi

İnsan vücudunun % 80'i sudan oluşmaktadır. Canlı organ ışınlandığında radyasyon enerjisinin büyük oranda su molekülleri tarafından soğrulma olasılığı çok yüksektir. Şekil 2.4'te gösterildiği gibi su, radyasyona maruz kaldığında başka moleküler yapılara bölünür. Bu durumda su molekülleri iyonlaşırlar ve pozitif yüklü su molekülü ile hızlı bir serbest elektron oluşur (Brahme, 2011).



Şekil 2.4. Su Molekülünün radyasyon ile hidrolizi (Özalpan 2001).

2.1.3. Radyasyonun Biyolojik Etkileri

Radyasyonun dokuya etkisi atomik seviyede olmaktadır. İnsanda görülen radyasyon hasarı, atomik seviyede olan etkilere bağlı moleküler yapının bozulması sonucudur. Makro moleküller üzerinde yapılan *in vivo* çalışmalarda daha az dozda zararlı etki gözlenirken, *in vitro* çalışmalarda hasarı gözlemek için daha yüksek doz gerekmektedir (Meineke 2011).

2.1.4. Radyasyonun DNA molekülüne etkileri

Radyasyonun DNA'yı etkilemesi organizmaya 3 şekilde zarar verebilir.

- 1- Genetik Hasar
- 2- Malignite
- 3- Hücre Ölümü

Genetik hasar

Tüm organizmalar (bakteri, maya, Drosophila, balıklar ve insanlar dahil), hücrelerini çevresel hasarlara karşı korumak amacıyla DNA onarım mekanizması içerirler. DNA onarımı; hücre ölümünü, mutasyonu, replikasyon hatalarını, DNA hasarının devamlılığını ve genomik kararsızlığı azaltma da kullanılır. Bu işlemlerdeki bir anormallik kansere yol açar (Hawkins ve ark. 2011).

Radyasyon yine DNA molekülünün fonksiyon kaybına ve inhibisyonuna yol açar. DNA molekülünün transformasyon yeteneğini azaltır ve eğer bu tür etkiler onarılmazsa hücrenin ölümüne yol açarlar (Hawkins ve ark. 2011) .

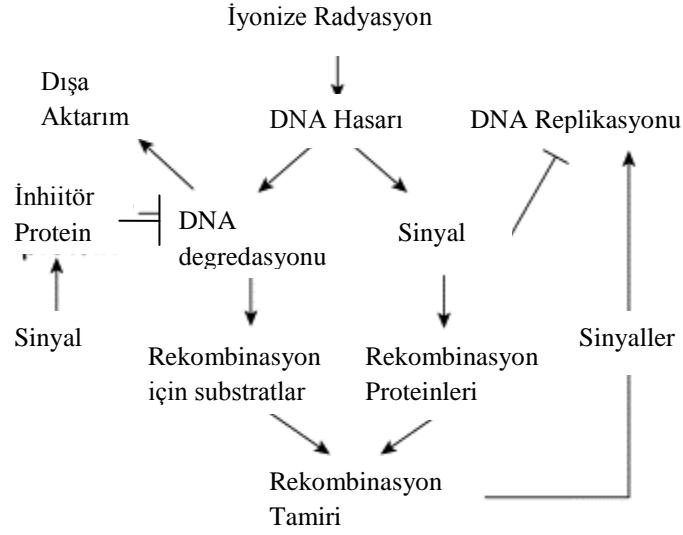
İyonize radyasyonun DNA sentezinde oluşturduğu diğer bir etki de, düzensiz DNA sentezidir. Bu olay, hücre döngüsünün G1 ve G2 fazlarında da DNA sentezi yapılması durumudur. Bu sentez S fazındaki senteze göre daha yavaştır ve hasar görmüş hücredeki hasarın onarımı için yapılır (Özalpan 2001).

İyonize radyasyon kültür edilmiş insan hücrelerinin neoplastik transformasyonuna neden olabilir ancak kültürdeki hücrelerin transformasyonu tek olaydan kaynaklanmaz. İyonize radyasyon oksijen türevli serbest radikallerin oluşumu boyunca etkisini ortaya koyar. Oksijenin böyle reaktif formları aerobik metabolizmanın yan ürünü olarak meydana gelir (Breimer 1988).

İlgili moleküler mekanizma UV radyasyon ya da alkilleyici ajanlar durumunda teknik nedenlerden ötürü açıkça anlaşılammıştır. Baz değişimi hem transisyon hem de transversiyon, G-C baz çiftinin yanı sıra A-T baz çiftinde de bulunan iyonize radyasyon tarafından neden olunan mutasyonun en yaygın tipidir (Breimer 1988).

Şekil 2.5'te iyonize radyasyonun insan DNA'sı ve proteinleri üzerindeki etkisi gösterilmiştir. İnsanlar hava seyahati boyunca, evde radonda, uzay yolculuğu sırasında veya düşük seviyeli kirlenmiş alanlarda nükleer silah yapımının alanları dahil radyasyonun düşük doza maruz kalır ve radyoterapi boyunca ya da Çernobil gibi kirlenmiş bölgelerde daha yüksek radyasyon dozuna maruz kalınabilir. Canlı organizmalarda iyonize radyasyonun düşük ve yüksek dozunun uzun süreli etkisinin anlaşılması ile kritik radyasyon indüklü DNA lezyonlarının tanımlanması, onların tamir edilebilirliğinin ölçülmesi ve yanlış tamir edilmiş ya da tamir edilmemiş kalıcı lezyonların sonucunun belirlenmesi gerekir (Sutherland ve ark.1999).

Zincir kırılmalarının DNA molekülünde ortaya çıkan en önemli hasar grubunu oluşturduğu kabul edilmektedir. Bu hasarlar tek zincir kırılmaları ve çift zincir kırılmaları şeklinde 2 gruba ayrılır. Tek zincir kırılmaları, DNA molekülünün çift zincirlerinden bir tanesinde, şeker-fosfat iskeletinde meydana gelen bir kopma şeklinde oluşurlar. Bu tür kırılmalar, düşük iyonizasyon yoğunluklu radyasyonlar tarafından meydana getirilen en yaygın hasarlardır. Çoğunlukla OH radikallerinin aksiyonu sonucu oluşurlar. Çift zincir kırılmaları ise, tek veya bir enerji transferi olayı ile ya da iki tek zincir kırılmasının birbirine çok yakın ve karşılıklı bölgelerde oluşması sonucunda ortaya çıkarlar. Bu tip zincir kırılmalarının oluşması için yüksek iyonizasyon yoğunluğuna sahip radyasyonlar gerekmektedir (Friedberg 1995; Hawkins ve ark. 2011).

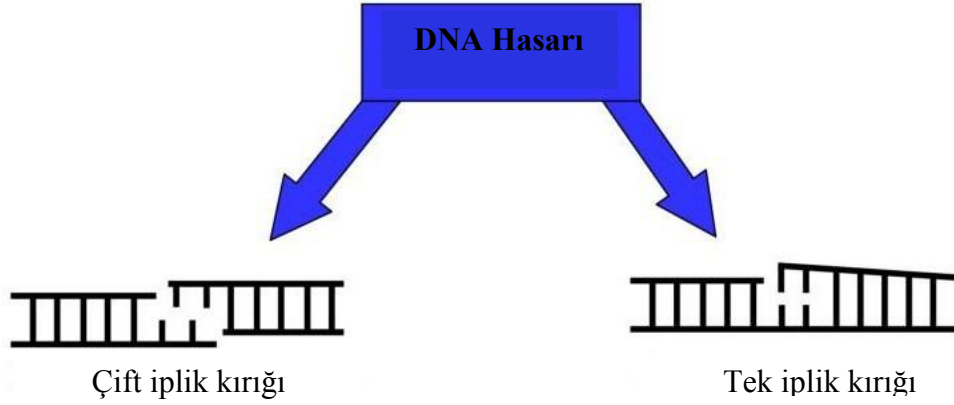


Şekil 2.5. İyonize radyasyonun DNA ve protein üzerindeki etkileri (Friedberg 1995)

İyonize radyasyonun letal ve mutajenik etkisi esas olarak eksik ya da hatalı tamir edilmiş DNA lezyonlarının sonucudur. İyonize radyasyon DNA lezyonlarının, TZK'ların, baz hasarlarının ve diğer hasarlardan uzakta bulunan abazik bölgelerin oluşumunu indükler. Böyle izole edilen hasarlar genellikle etkili şekilde tamir edilir. İyonize radyasyon çift zincir kırığı (ÇZK) içeren birbirine çok yakın lezyonları indükler (Sutherland ve ark. 1999).

İnsan genomik DNA'sının bütünlüğü çevresel faktörlerin etkisiyle sürekli olarak tehdit altındadır. DNA replikasyonu ve DNA rekombinasyonu gibi hücresel olaylar sırasında da endojen olarak DNA'nın yapısında değişiklikler oluşabilir. Genetik materyalin moleküler bütünlüğünde ekzojen veya endojen faktörlerin etkisiyle meydana gelen tüm değişiklikler "DNA hasarı" olarak adlandırılır (Hawkins ve ark. 2011).

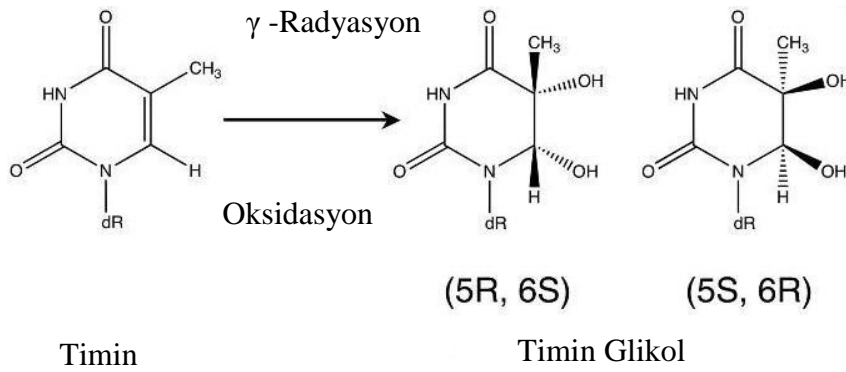
İyonize radyasyon oksijen türevli serbest radikallerin oluşumu boyunca etkisini toplamda ortaya koyar. Bu apuridik veya apirimidinik bölgeleri ve tek zincir kırıkları (TZK) ve çift zincir kırıkları (ÇZK) ve azotlu bazların modifikasyonuna neden olur. Şekil 2.6'da DNA kırıkları şematize edilmiştir. Aslında tek iplik kırığı geleneksel olarak en sık radyasyon lezyonu olarak kabul edilmiştir (Hawkins ve ark. 2011).



Şekil 2.6. Tek ve çift iplik DNA kırıkları (Fry ve ark. 2006)

Baz hasarları ve baz kayıpları genellikle şeker yapısında kimyasal değişikliklere yol açar. Bu değişiklikler N-glikozit bağının hidrolizi sonucu meydana gelirler. Şeker molekülündeki hasarlar genellikle nükleotid zincirinde kırılmalarının oluşmasına sebep olurlar. Bazların radyo duyarlılıklarına göre artan şekilde sıralanışı şöyledir: Timin > Sitozin > Adenin > Guanin (McMillan ve Steel 1997).

İyonize radyasyonun etkileri primidinin fragmentasyonuna, kontraksiyonuna ve halkasal doygunluğuna sebep olur. Bu eylem 5,6 çift bağına hidroksil radikali tarafından aracılık eder. Özet olarak timin glikol (5,6- dihidroksi-6 hidrothimin) oksidasyon ve γ -radyasyonda ortak lezyondur (Breimer 1988). Timinin radyasyon sonucu timin glikole dönüşümü Şekil 2.7’de gösterilmiştir.



Şekil 2.7. İyonize radyasyon sonucu timin glikol oluşumu (Depiro ve ark. 2005)

İyonize radyasyon pürinlerin imidazol halkasının fragmentasyonuna ve çözülmesine sebep olur. İmidazol açık halka Adenin, 4,6-diamino-5-formamidopirimidin, yapı olarak imidazol açık halka 7-metilguanin'e benzer (Şekil 2.8). Bu açık halkalı pürinler memeli hücrelerinde var olan formamidopirimidin-DNA glikosilaz tarafından DNA'dan kesilir (Breimer 1988).



Şekil 2.8. 4,6-diamino-5-formamidopirimidin ve 7-metilguanin yapısı (Folkes ve O'Neill 2013)

DNA çift zincir kırığının kaynakları:

- ✓ İyonize radyasyon,
- ✓ Topoizomeraz inhibitörleri (etoposide, adriamycin),

DNA çift zincir kırıkları (ÇZK'lar), DNA hasarının en yıkıcı şeklidir. Onarılmazsa kromozomların kırılmasına ve hücre ölümüne varan sonuçlar doğurabilir. Yanlış onarırsa kromozom translokasyonuna ve kansere sebep olur. ÇZK'ye neden olan en önemli ekzojen ajan iyonize radyasyondur. Ayrıca radon bozunumu ve anti kanser ilaçlar da etkilidir. Oksidatif serbest radikaller oluşturan Bleomisin, Adriyamisin, Etoposit Topoizomeraz II'yi inhibe ederek protein köprülü ÇZK'ler meydana getirirler. ÇZK oluşturan endojen ajanlar ise serbest radikaller oluşturan oksidatif metabolizmadır.

DNA iplik kırıkları Bleomisin gibi radyomimetik ilaçlar ve iyonize radyasyon içeren, serbest radikal türevli oksijen boyunca bir dizi etkili ajan tarafından üretilir. Tek iplik kırıkları direkt olarak iyonize radyasyon tarafından üretilir çift iplik kırıkları ise direkt

olarak tek iplik kırığı yakınında ya da enzimatik işlem sonucu olarak indüklenebilir (Brahme 2011).

İn vitro DNA'nın γ -radyasyonu ya 3'-fosforil parçası ile alakalı normal nükleotid ya da deoksiribozdan oluşmuş 3'-fosforil glikolik asid esterinin bir tarafında ya da diğer tarafında 5'-fosforil ile birlikte rastgele tek iplik kırığı içeren uçlar üretir. Tek iplik kesintileri en az bir nükleotid eksikliğinden kaynaklanan küçük boşluklardır (Hawkins ve ark. 2011).

Radyasyonla uyarılmış tek iplik ve çift iplik kırıkları hızlı şekilde hem prokaryotlarda hem de ökaryotlarda tamir edilir. ÇZK'ların ve birkaç TZK'nin tamiri rekombinasyon mekanizmasıyla meydana gelir (Hawkins ve ark. 2011).

DNA kırıklarının belirlenmesi (Komet Testi)

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

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

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

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

1. Potansiyel yüksek oranda sonuç içeren tarama çalışmaları
2. Genotoksisite ile indüklenen kromozom hasarını, sitotoksisite ile indüklenen kromozom hasarından ayırt etmek
3. *In vivo* çalışmalarda genotoksik ve genotoksik olmayan karsinojenleri ayırt etmek
4. İnsan mutajenlerini ve karsinojenlerini tayin etmek

Komet testinin yöntemine baktığımızda bu test şu basamaklardan oluşur:

1. Üzerine agaroz içinde hücrelerin yayıldığı mikroskop lamalarının hazırlanması
2. DNA molekülünü hücrelerden ayırmak için lizis
3. Tek zincirli DNA molekülünü ve tek zincir kırıklarını gözlemlemek için alkali (pH>13) ortam
4. Alkali koşullarda (pH>13) elektroforez
5. Nötralizasyon
6. Boyama, Görüntüleme ve Sayım

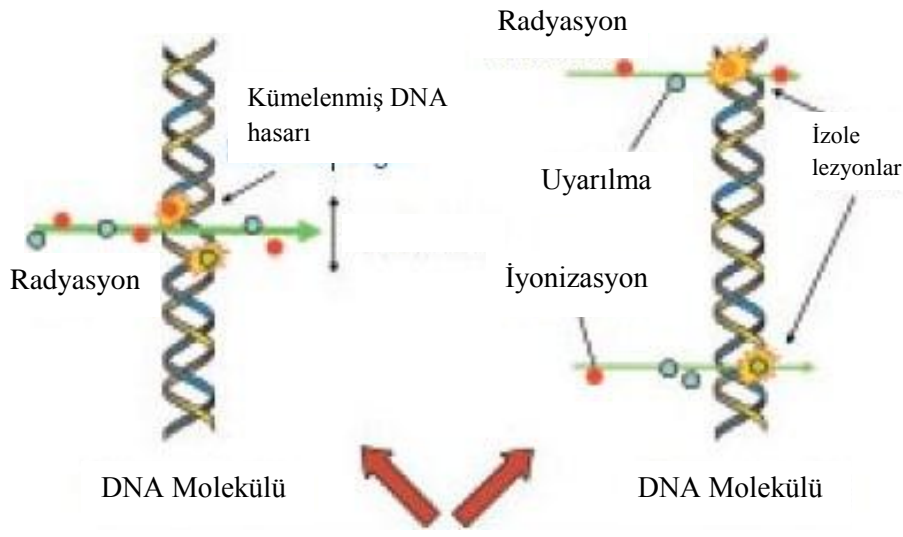
Lamların hazırlanması sırasında her lam üzerine 1–3 bağımsız jel yayılır. En alt tabaka ya tam buzlu mikroskop lamından veya yüksek konsantrasyonda normal erime noktası bulunan agaroz jelinden oluşur. Bunların üzerine hücrelerin düşük erime noktalı agaroz ile oluşan süspansiyonu yayılır. Bundan sonra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

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

Bu işlemden sonra elektroforez işlemi uygulanır, bu işlemde standart voltaj 0,7-1 V/cm'dir. Elektroforez sonrası alkali lamalar nötralizasyon tamponu ile yıkanır. Yıkama işleminden sonra lamalar etidyum bromür, DAPI (diamidino-2-fenilindol), propidyum iyot veya SYBR Green1 gibi floresan özellikli boyalarla veya gümüş nitrat gibi floresan olmayan boyalarla boyanırlar. Komet sayımı için metrik ve metrik olmayan teknikler vardır. Ayrıca Komet sayımı için bilgisayar sistemli programlarda geliştirilmiştir. En basit yöntemlerden biri Komet'leri büyüklüklerine göre kategorilere göre bölüp değerlendirmektir (Olive ve ark. 1991, Cotelle ve Ferard 1999, Tice ve ark. 2000).

2.1.5. Radyasyonun kromozomlara etkisi

Kromozom kırıkları, ya kendiliğinden ya da mutajenik ajanlar nedeniyle oluşabilirken; bazen de iyonize radyasyon veya DNA hasarına neden olan kimyasallardan köken alabilmektedir. Genellikle kırılmış uçlar yeniden birleşir ve kırık onarılır ancak bazı durumlarda, bir kırık kromozomlarda delesyona yol açabilir veya bir hücrede birden fazla kırık meydana gelmişse kromozomların yeniden düzenlenmeleri mümkün olabilmektedir (Bakhoun ve Compton 2012). Şekil 2.9'da iyonize radyasyonun neden olduğu tek iplik ve çift iplik kırığı gösterilmektedir (Urushibara ve ark. 2006).

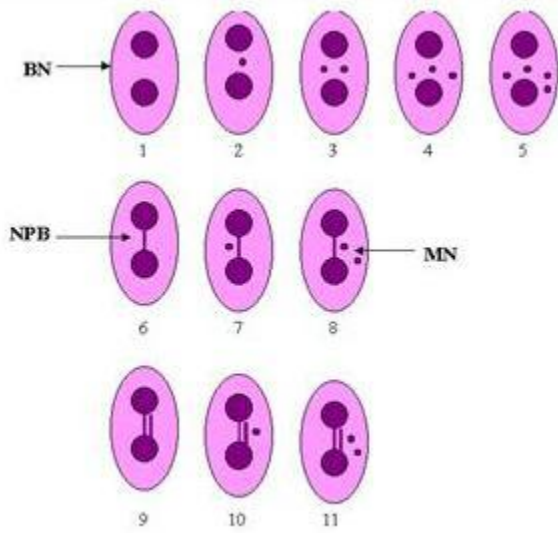


Şekil 2.9. İyonize radyasyonun neden olduğu tek zincir ve çift zincir kırıkları (Urushibara ve ark. 2006)

Kromozom kırıkları hücre döngüsünün G_1 , S ve G_2 evrelerinde mitoz ve mayoz süresince oluşabilir (Bakhoun ve Compton 2012). Kromozomlarda yapısal olarak iki tip kırık vardır. Bunlar, kromozom tipi kırık ve kromatid tipi kırıklardır. Bir ajanın kromozom ya da kromatid tipi kırıklara neden olması, hücre döngüsünün hangi fazında etkili olduğuna bağlıdır. Eğer ajan mitoz bölünmenin G_0 ya da G_1 fazında etkiliyse kromozom tipi kırıklara, S ya da G_2 fazında etkili ise kromatid tipi kırıklara neden olur. Kromozom kırıkları, eğer G_1 fazında maruz kalındıysa yalnız bir kromatid de kırık meydana gelir ve S fazı boyunca devam ederse, metafazdan sonra her iki kromatitte de kırık oluşur ve böylece kromozom tipi kırık meydana gelir. Bu kırık tekrar birleşmez ise, bir delesyonlu kromozom ve bir asentrik fragment meydana gelir. Kromozom kırılması sonucu oluşan asentrik parçalar ya metafazda kaybolmakta ya da anafazda mikronükleusları oluşturmaktadır (Conner ve Smith 1993, Gardner ve ark. 1996)

Radyasyona maruz kalma sonucu oluşan özel bir kromozom aberasyon tipi de mikronükleus oluşumudur. Mikronükleus, hücre bölünmesi sırasında serbest kalan kromozom fragmentinin ya da kromozomların ortamda varlığını sürdürmesidir. Bir nükleoplazma ile sarılarak sitoplazma içerisinde ana nükleusun yanında yer alan nükleer materyaldir. MN oluşumunun temelini, DNA hasarı oluşturmaktadır. Organizmanın çeşitli mutajenik, klastojenik ve karsinojenik ajanlara maruz kalması sonucunda DNA'da hasar meydana gelmektedir. Ancak bu durum diploit hücreler için geçerlidir (Fenech 2010).

CBMN (Cytokinesis Block MicroNucleus) analizleri, Cyt-B'nin (Cytochalasin-B) hücre bölünmesini sitokinez evresinde durdurması özelliği temel alınarak tanımlanmıştır. Cyt-B hücre bölünmesini sitokinez evresinde aktin filamentlerini etkileyerek durdurur. Şekil 2.10'da MN CBMN gösterilmiştir. Bu etkisini de aktin filamentlerin ucuna bağlanarak, aktinin polimerize olmasını önleyerek gerçekleştirir (Joskic ve ark. 2001).



Şekil 2.10 CBMN (Cytokinesis Block MicroNucleus) Dağılımı (Üstüner 2011)

2.1.6. Serbest radikaller

Serbest radikal; birçok fizyolojik, patolojik proseste üretilen, bir veya daha fazla eşleşmemiş elektronu bulunan herhangi bir atom ya da moleküldür. Bir bileşik bir elektron kaybederek veya ilave bir elektron alarak serbest radikal oluşabilir. Serbest radikaller homolitik bağ yıkımı ile de oluşabilir. Homolitik parçalanmada kovalent bağ simetrik olarak ayrılır ve ortaya çıkan iki parçada da tek birer elektron kalır ve serbest radikal oluşur. Serbest radikaller pozitif veya negatif yüklü veya nötral olabilirler. Radikaller daha büyük bir yapının parçası olabilir, daha immobil olabilir veya küçük ve serbestçe difüze olabilen türler halinde olabilir (Dizdaroğlu ve Jaruga 2012).

Serbest radikaller, iyonizan radyasyon ve bazı ksenobiyotiklere bağlı oluşuma ilaveten, vücuttaki normal biyokimyasal oksidoredüksiyon reaksiyonlarında da devamlı üretilir.

Bu serbest radikal kaynaklarına ek olarak; aktif lökosit ve makrofaj, doku iskemisi ve reperfüzyon ve araşidonik asit kaskadı da sayılabilir (Delibaş ve Özçankaya 1995).

İyonize radyasyon başlıca H^{\bullet} , OH^{\bullet} ve e^{-} gibi serbest radikalleri oluşturur. Böylece oluşan primer radikaller ve sulu ortamda bulunan elektronlar kolaylıkla biyomoleküllerle reaksiyona girerler. İyonlaşmamış radyasyon, kovalent bağları homolitik olarak parçalayabilecek enerjiye sahipse serbest radikaller meydana gelir (Akpoyraz ve Durak 1995).

İyonize radyasyon sonucu oluşan serbest radikaller DNA'da mutasyona neden olurlar. Kromozom değişikliklerine ve DNA'daki diğer değişikliklere bağlı olarak hücrede sitotoksik etki ortaya çıkar. OH^{\bullet} radikali bazlarla kolayca reaksiyona girebilir. H_2O_2 DNA hasarına, hücre bozukluklarına ve hatta hücre ölümüne yol açabilir (Meram ve Aktaran 2002, Özkan ve Fışkın 2004).

Radikal reaksiyonları zincir reaksiyonları olup, genel olarak üç basamakta incelenirler. Başlama safhası, radikalın oluşumunu kapsar. Sonra ilerleme basamağı gelir. İlerleme basamağı ara ürün olarak ortaya çıkan serbest radikaller üzerinden yürür. Bu arada hücresel tahribatlar meydana gelir. İlerleme reaksiyonları ya sonsuz devam eder veya radikal yakalayıcı maddeler yardımı ile sonlanır. Radikal yakalayıcı maddeler hücrenin sağlıklı gelişimi için gereklidir. Eğer serbest radikaller, radikal yok ediciler tarafından yakalanmazlarsa sitotoksikite ortaya çıkar. Çizelge 2.1'de serbest radikallerin etkilediği moleküller ve üzerindeki etkileri gösterilmiştir. (Goldstein ve ark. 1994, Poli 1993).

Çizelge 2.1. Serbest radikallerin etkilediği moleküller

1.Doymamış aminoasitler ve kükürt içeren aminoasitler	Protein denatürasyonu
	Çapraz bağlanma
	Enzim inhibisyonu
	Organ ve hücre geçirgenliğinde değişimler
2.Nükleik asit bazları	Hücre gelişiminde değişimler
	Mutasyon
3.Karbonhidratlar	Hücre yüzey reseptörlerinde değişim
4.Doymamış lipidler	Kolesterol ve yağ asitlerinin oksidasyonu
5.Kofaktörler	Nikotinamid ve flavin içeren kofaktörlerin aktifliğinde azalma
	Askorbat ve porfirin oksidasyonu
6.Antioksidanlar	α -tokoferol ve β -karoten gibi antioksidanların aktifliğinin azalması
7.Proteinler	Denatürasyon
	Peptit zincirinde kırılmalar
8.DNA	Baz modifikasyonları
	Zincirde kırılmalar
9.Hyaluronik Asit	Sinoviyal sıvının viskozitesinde değişim

İyonize radyasyon hücrelerde serbest radikal oluşumuna yol açar. Hidroksil radikalleri DNA'daki heterosiklik bazlarla ve deoksiriboz fosfatlarla reaksiyon verirler. Reaksiyon sonucu, DNA bazları modifiye olur ve riboz-fosfat zinciri kırılır. Enzimatik radikal yakalayıcılar öncü OH[•] radikallerinin konsantrasyonunu düşürerek DNA'yı korurlar (Richard ve ark. 2008).

Çözünen birçok hücre bileşeni serbest radikalleri yok edici görev yaparlar. Örneğin, oksihemoglobin gibi hemoproteinler O_2^{\cdot} ve H_2O_2 ile reaksiyona girerek methemoglobin oluştururlar (Halliwell ve John 1984).

Bu reaksiyon, hemoproteinlerin, oksijen radikalleri tarafından kolaylıkla tahrip edilebileceğini göstermektedir. Diğer önemli bir sitoplazmik hemoprotein, katalaz enzimidir. Katalaz O_2^{\cdot} radikali tarafından aynı şekilde tahrip edilebilmektedir. Bu tür bir reaksiyon katalaz aktivitesinin düşmesine ve hücrenin, daha çok radikal ve hidrojen peroksit tahribatına maruz kalmasına yol açmaktadır (Halliwell ve John 1984).

2.1.7. Radyo duyarlılık

LDR (düşük doz oranı) ve HDR (yüksek doz oranı) ile birlikte ışınlanmış farklı hücre tipleri için radyoduyarlılığı tanımlamada iki uç nokta: (Williams ve ark. 2008).

1. Klonojenik radyoduyarlılık olarak tanımlanan koloni oluşturma yeteneğinin kaybı
2. Hücre döngüsüne yeniden girişe yatkınlıktır.

DHC (DNA Hasar Cevabı) ya da ÇZK için gerekli proteinlerin herhangi birinin inhibisyonunun radyasyon duyarlılığına yol açabildiği tahmin edilmiştir (Ljungman 2008). Bununla birlikte kritik proteinleri direkt olarak inhibe eden terapötik ajanların hala klinik öncesi gelişimi devam etmektedir. Umut verici şekilde, FDA tarafından onaylanmış birçok ajanın DHC'yi düzenlediği gösterilmiştir ve radyasyon duyarlılaştırıcı olarak ışın tedavisi ile birlikte kombine edilebilir (Kesari ve ark. 2011). Radyoduyarlılaştırıcı olarak çalışmaları yapılan ilk ilaç metronidazoldür ve 1973'te çalışılmıştır. Bu çalışmayı 1974'te laboratuvar çalışmalarında daha etkili bir radyo duyarlılaştırıcı olan misonidazol takip etmiştir (Wing ve ark. 1980). Misonidazolle yapılan çalışmalarda artan dozlarda misonidazolün nörotoksisite, ensefalopati ve periferik nöropatiye neden olabileceği gösterilmiştir (Dische ve ark. 1977).

2.1.8.Radyoterapi

Radyoterapi, yüksek enerjili radyasyon kullanılarak uygulanan kanser tedavisidir. Radyoterapide genellikle X ışınları kullanılır. Uygulanan radyasyonun tipi ve miktarı kişiye göre değişmekle birlikte organizmadaki tümöre göre hesaplanır.

Radyoterapinin amacı normal hücrelerde mümkün oldukça daha az hasara neden olmak, kanser hücrelerini yok etmektir. Bu nedenle radyoterapinin verimliliği terapötik kazanç faktörü ile ölçülür. Terapötik kazancın formülü aşağıda verilmiştir (Fox ve ark. 2002):

Terapötik kazanç (TK): Aktif cevap oranı (ACO)- Plasibo cevap oranı (PCO)

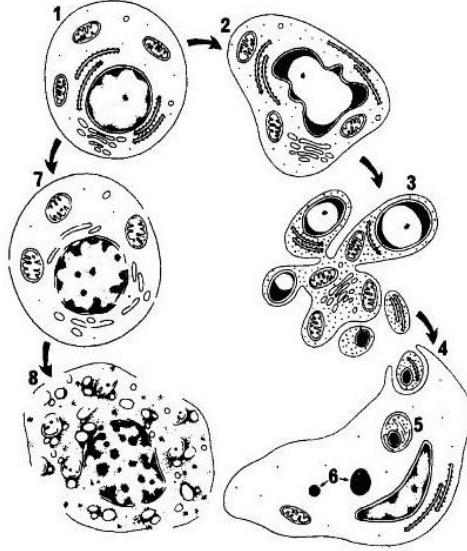
Vücudumuzun hemen her kısmında kanserin birçok türünü tedavi etmek için ışın tedavisi kullanılabilir (Meirow and Nugent 2001). Radyoterapi kanser hücrelerini yok ettiği kadar normal hücrelere de hasar verebilir ya onları da yok edebilir. (Meirow and Nugent 2001).

2.2. Apoptoz

Apoptoz hücre büzülmesi, membran yüzeyinde çıkıntı, kromozom yoğunlaşması ve nükleer parçalanma içeren morfoloji olarak tanımlanır. DNA hasarlı hücreler daha fazla hasara karşı organizmayı korumak için intihar eder (Mondello ve Scovassi 2011). Fizyolojik hücre ölümü, hücre intiharı, hücre delesyonu ya da programlanmış hücre ölümü terimleri her zaman apoptosis için kullanılmıştır. Apoptozun özellikleri Çizelge 2.3'te gösterilmiştir.

Apoptoz karakteristik olarak komşu hücre gruplarını değil, dağılmış tek hücreleri etkiler. Erken tanımlanan morfolojik değişiklikler sitoplazmanın yoğunlaşması ve nükleer zarfa karşı belirlenmeye başlayan keskin çizilmiş, düzgün ince granüller kütlelerinin oluşumu ile nükleer kromatinin ayrılması ve sıkışmasıdır. Yoğunlaşmanın

ilerlemesi nükleer ve hücre ana hatlarının kıvrılması ile beraberinde gelir ve bunu membran sınırlı apoptotik cisimleri üretmek için bir bütün olarak tomurcuklanarak ve çift katlı zar tarafından çevrilmiş farklı fragmentler içinde nükleusun parçalanması takip eder (Kerr ve ark. 1994). Apoptozun oluşma süreci Şekil 2.11’de gösterilmiştir.



Şekil 2.11. Apoptoz (Kerr ve ark. 1994)

Vücudumuzdan her saniye yaklaşık bir milyon hücre elimine edilirken yerine yenileri üretilir. Çoğalma (mitoz) apoptosis tarafından dengelenir. Organizmada apoptoz sürekli meydana gelmelidir yoksa apoptozun artması ya da azalması organizmada ölümcül hastalıkların gelişmesine neden olabilir. AIDS, nörodejeneratif hastalıklar, insülin bağımlı diyabet, hepatit C, miyokardiyal enfarktüs aterosklerosis, otoimmün hastalıklar ve kanser apoptozun artmasına ya da azalmasına bağlı olarak gelişen hastalıklara örnektir. (Ulukaya ve ark. 2011). Çizelge 2.2’de apoptozu inhibe eden ve düzenleyen genler belirtilmiştir.

Çizelge 2.2. Apoptozis ve genler

Apoptosisi baskılayan genler	Apoptosisi indükleyen genler
Bcl-2 grubundan BHRL-1, Bcl-X _L , bcl-w, bfl-1 brag-1, mcl-1 ve A1	Bcl-2 grubundan Bad, Bax, Bak, Bcl-X _S , Bid Hrk-1
c-abl geni	c-myc geni
ras onkogeni	p53,p21
Çözünebilir fas	fas (CD95/APO1)
p35	FADD/MORT, RIP, FAST
A20	İnterlökin dönüştürücü enzim benzeri proteinler (İCE)
	LOH (MTS1/CDK41)

2.2.1. Apoptozun düzenleyicileri

Apoptosisin nasıl çalıştığının bilgisi yaklaşık 1mm uzunluğunda mikroskobik nematod olan *Caenorhabditis elegans* ile yapılan çalışmalardan gelir. *C. elegans*'ın CED-3, CED-4 ve CED-9 genlerinin tanımlanması insanda homolog genlerin araştırılmasına yol açtı. CED-3, CED-4 ve CED-9'un homologları sırasıyla kaspaz-9, apaf-1 ve Bcl-2 olarak bulunmuştur. Kaspaz-9 proteaz, apaf-1 proteaz aktivasyonu içeren sitoplazmik faktör ve Bcl-2 apoptoz inhibitör proteindir (Chinnaiyan 1999).

Apoptosis bazı iyonlar (kalsiyum gibi) (Mattson 2003), genler (c-myc, Bcl-2/Bax, Fas, DR5 gibi), proteinler (p53, kaspazlar, IAP'ler gibi) (LaCasse 1998) ve hatta organeller (mitokondri, endoplazmik retikulum gibi) içeren çeşitli düzenleyiciler tarafından kontrol edilir.

Çizelge 2.3. Apoptozun özellikleri

Belirleyici nedenler	Oksidatif stres
	Büyüme faktörlerinin eksikliği
	HIV
	Kemoterapi
	Işınlama
	Ölüm reseptörlerinin indüklenmesi
	Sitotoksik T-lenfositleri
Morfolojik özellikler	Kromatin yoğunlaşması
	Hücrenin büzülmesi
	Apoptotik cisim oluşumu
Biyokimyasal/immünolojik özellikler	ATP gereklidir
	Kromozomlar arası DNA fragmentasyonu
	Kaspaz bölen sitokeratin 18 salınır
	İnflamasyon oluşmaz
Belirleme yöntemleri	M30 ELIZA testi
	Kaspaz-3 aktivasyonu
	Flow sitometride Sub G1 piki

Apoptotik süreç boyunca hücre içine sürekli kalsiyum girişi olur. Kalsiyum iyonları endonükleaz aktivasyonunda, doku transglutaminaz aktivasyonunda, gen regülasyonunda, proteazların aktivasyonunda ve hücre iskeleti organizasyonunda rol alabilirler. Fakat hücreye kalsiyum girişi apoptosisin gerçekleşmesi için esansiyel değildir. Bcl-2 ailesi, üyelerinin bir kısmının apoptosisi indüklediği (Bax, Bad, Bid, Bcl-X_S), bir kısmının ise inhibe ettiği (Bcl-2, Bcl-X_L) geniş bir ailedir (Orrenius 1992).

2.2.2. Apoptozun indüklenmesi

Apoptozu çeşitli faktörler indükler ama hücre dışı faktörler ve hücre içi faktörler önemli faktör olarak sınıflandırılabilir. Şekil 2.12’de hücre içi ve hücre dışı yollar gösterilmiştir. Hücre dışı faktörler granzim/perforin sistemi ya da hücre yüzeyi ölüm reseptörleri aracılığıyla rol oynar. Hücre içi faktörler mitokondriyal aktivasyona neden olur. Bununla birlikte mitokondriyal aktivasyon hücre dışı faktörler tarafından tetiklenir. Böylece mitokondri apoptosiste merkezi role sahiptir (Thiery ve ark. 2011).

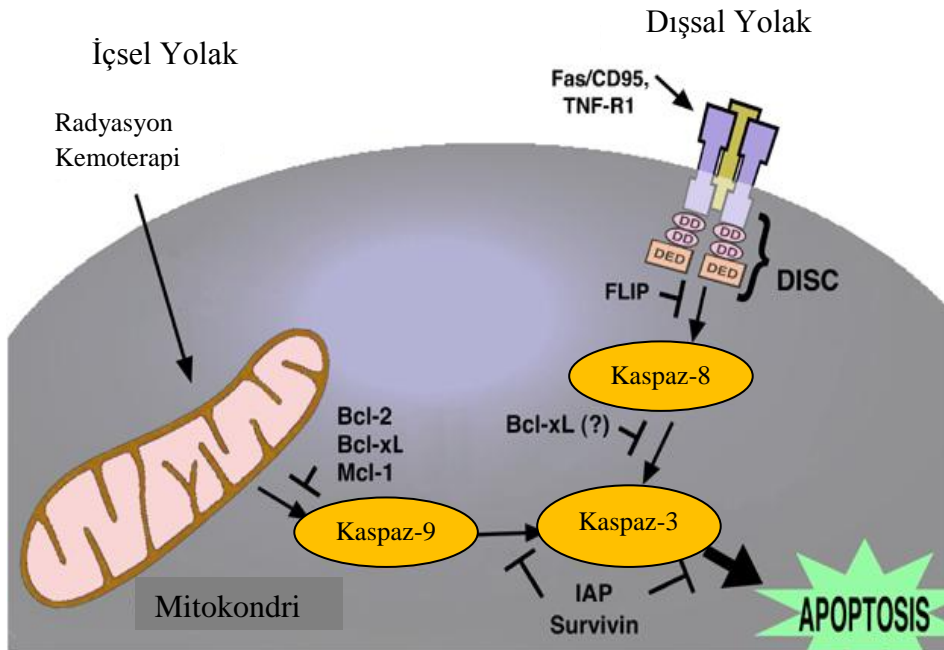
Hücre dışı faktörlere gelince, apoptoz Fas (Apo-1, CD95), TNF reseptör-1 (TNFR-1), DR3 (TRAMP), DR4 (TRAIL-R1), DR5 (TRAIL-R2) ve onların ligandlarıyla birlikte ölüm reseptörlerinin interaksyonu tarafından indüklenir (Pan ve ark.1997).

Hücre yüzey reseptörleri hücre membranına konuşlanmıştır ve onlar TNFR ailesinin üyeleridir. Ölüm reseptörlerinin ligandları böylece reseptörlerin aktivasyonuna ve oligomerizasyona neden olur (Pan ve ark.1997).

Ölüm domainleri pro-kaspaz 8'i aktive ederek kaspaz kaskadını başlatır. Kaspaz-8 oligomerizasyonu takiben aktive edilir (Martin ve ark. 1998). Aktif-kaspaz 8 apoptotik süreci iki şekilde yürütür;

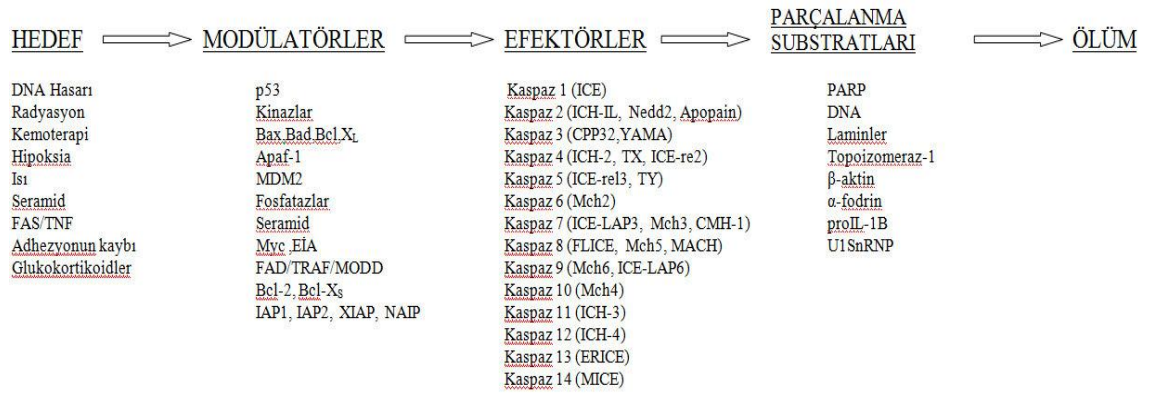
- i. Kaspaz-3'in aktivasyonu ve direkt kırılması
- ii. pro-apoptotik protein Bid'in kırılması

Kırılmış Bid sitozolden sitokrom c salınması indüklenen mitokondriye transloke olur ve aktive olmaya başlar (Collison ve ark. 2009).



Şekil 2.12. Apoptoza yol açan hücre içi ve dışı yollar (Pai ve ark 2006)

Apoptosis, hücre ölüm reseptörlerinin aktivasyonu haricinde, genotoksik ajanlar tarafından neden olunan DNA hasarına cevap olarak p53'ün indüklenmesiyle başlatılır. İndüklenmiş p53 Bcl-2 ailesinin pro-apoptotik üyesi Bax'ı aktive ederek apoptosisi başlatır. p53 Fas ve DR5 gibi hücre yüzey ölüm reseptörlerini indükleyerek apoptosisi başlatır (Haupt ve ark. 2003). Apoptosis, reaktif serbest radikaller (oksidatif stres) tarafından neden olunan genom, plazma membranı ya da mitokondride hasarın sonucu olarak başlar (Kannan ve Jain 2000).



Şekil 2.13. Apoptoz şeması (Kasper ve ark. 1999)

Serum açlığına maruz bırakılan hücrelerde p53 apoptosis mekanizması ortaya çıkar. Bad'ın fosforile edilmemesi ve mitokondriden sitozole cyt-c salınımını ile apoptosisi indükler (Datta ve ark. 1997). Apoptosisi sitotoksik T lenfositlerinden granzim B salınması ile kaspaz sistemi aktive eder (Darmon 1995). Seramid, apoptosisin membran ilişkili aktivatörü, membrana bağlı asid olan sfingomiyelinazın aktivasyonunun ürünüdür (Pettus ve ark. 2002). Işınlama (Haimovitz-Friedman ve ark. 1994), hipertermi, hidrojen peroksit ve ultraviyole radyasyon sfingomiyelinazın aktivasyonuna ve böylece seramidin artışına yol açar (Ulukaya ve ark. 2011).

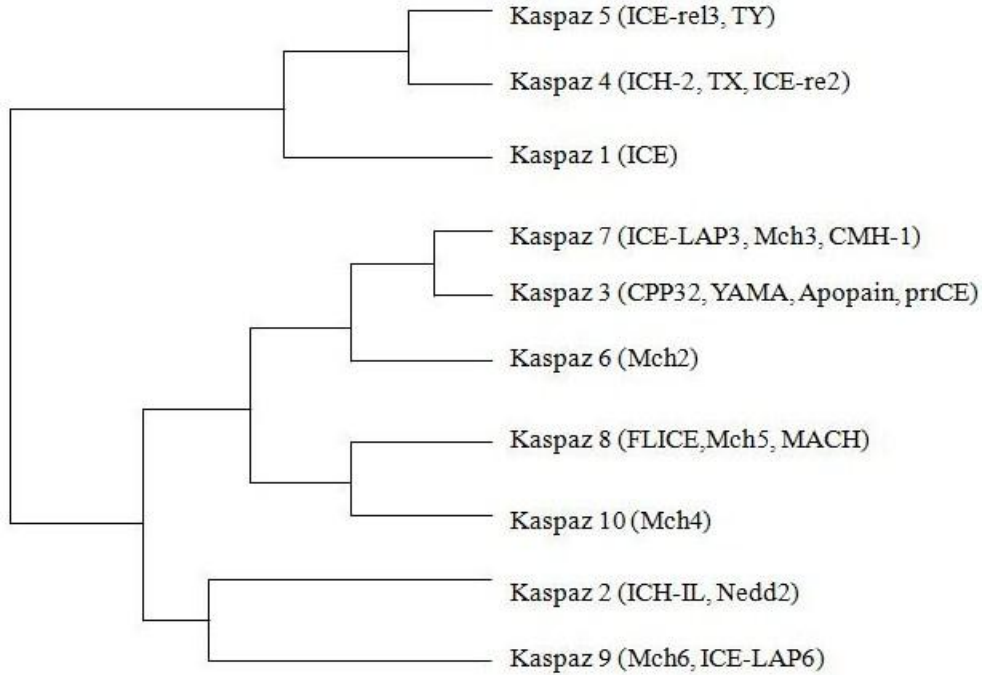
Hücre içi faktörlerde mitokondri anahtar rol oynar. Mitokondri sitokinler, büyüme faktörleri ve ölüm reseptörleri gibi hem ölüm hem de canlılık sinyallerinin kesişim noktasıdır. Apoptosis işlemi boyunca geri dönüşümsüz olarak mitokondriden sitozole sitokrom c salınır. Mitokondriyal aktivasyonda ana faktör Bcl-2 protein ailesidir. Bu ailenin pro-apoptotik ve anti-apoptotik üyeleri sitozole sitokrom c salınımını ya inhibe etmek ya da indüklemek için mitokondride etkilerini gösterirler (Wang ve Youle 2009). Apoptozun genel olarak özeti Şekil 2.13'te gösterilmiştir.

2.2.3. Kaspazlar

Kaspazlar aspartik asitten sonra peptid bağıını kesen sistein proteazdır. Kaspazlar hücrelerde zimojen olarak bulunur ve proteolitik reaksiyonun kaskadında aktive edilir. kaspazlar hücrelerin apoptotik morfolojisinden sorumlu efektör moleküllerdir (Li ve Yuan 2008). Şekil 2.14'te kaspazların filogenetik sınıflandırılması verilmiştir.

Kaspazlar 14 sınıfa ayrılır;

Kaspaz 1 (ICE), kaspaz 2 (ICH-IL, Nedd2), kaspaz 3 (CPP32, YAMA, Apopain, p1ICE), kaspaz 4 (ICH-2, TX, ICE-re2), kaspaz 5 (ICE-rel3, TY), kaspaz 6 (Mch2), kaspaz 7 (ICE-LAP3, Mch3, CMH-1), kaspaz 8 (FLICE, Mch5, MACH), kaspaz 9 (Mch6, ICE-LAP6), kaspaz 10 (Mch4), kaspaz 11 (ICH-3), kaspaz 12 (ICH-4), kaspaz 13 (ERICE), kaspaz 14 (MICE) (Alnemri ve ark. 1996).



Şekil 2.14. Kaspazların filogenetik ilişkisi (Donald ve Thorberry 1997)

Apoptozom ile başlatılmış kaspaz aktivasyon yolağı içinde kaspaz aktivasyonunun sırası hücresiz sistem kullanarak başlangıçta tanımlanmıştır (Slee ve ark. 1999). Bu yolakta, Bax/Bak kanalının açılmasının sonucu olarak mitokondriyal sitokrom c'nin

salınımı Apaf-1/kaspaz-9 apoptozom düzeneğinde ve bu kompleks içinde kaspaz-9 aktivasyonunda sonuçlanmıştır (Li ve ark. 1997).

Belirli dokular tarafından eksprese edilen kaspaz tipleri çeşitlidir. Sonuç olarak kaspaz-3 tüm dokularda fonksiyona sahip olan evrensel kaspazdır. Bu, farklı kaspazların farklı dokularda apoptoza yardımcı olduğunu ve aktive edildiğini gösterdi (Colussi ve Kumar 1999).

2.2.4. Bcl-2 ailesi

Bcl-2 ailesi zıt etkili iki grup içerir. Pro-apoptotik grup, apoptozu indükler ve anti-apoptotik grup, apoptozu inhibe eder (Tsujimoto 1998). Anti-apoptotik üyeler için etki mekanizması sitokrom c'nin içsel salınımını inhibe etmek ve dış mitokondriyal membran bütünlüğünü korumak içindir. Anti-apoptotik ve pro-apoptotik üyeler arasındaki denge ölüm ya da yaşam seçeneğini belirler (Fletcher ve Huang 2006). Bcl-2 ailesinin anti-apoptotik üyeleri ve pro-apoptotik üyeleri yukarıda Çizelge 2.2'de gösterilmiştir.

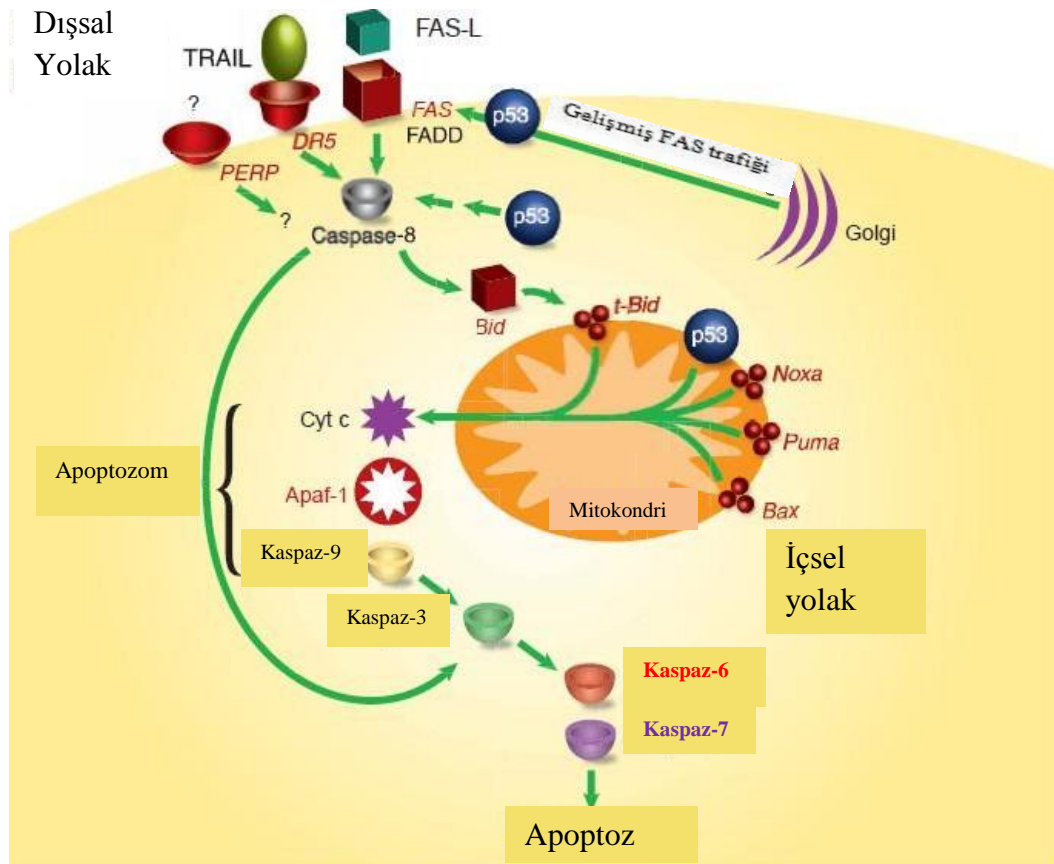
2.2.5. p53

p53, onkogen aktivasyonu, hipoksi, normal hücre temasının kaybı ve DNA hasarına cevapta anormal hücre büyümesini durdurmak için hayati hasarları önleyen işlemleri aktive eden transkripsiyon faktörüdür. p53 senesens, hücre döngüsü durdurma (G₁ ve/ya da G₂'de) ya da apoptozu uyararak hücre büyümesini kısıtlar (Haupt ve ark. 2003). 1992'de p53, DNA hasarını takiben genomik bütünlüğü koruma ve hücre döngüsü durdurmayı da içeren kontrol noktası proteinleri olarak belirlenmiştir. Apoptozda p53'ün rolü dolaylı olarak DNA hasarıyla bağlantılıdır ve doku spesifik ve uyarıcıdır (Lowe ve Lin 2000). Şekil 2.15'te p53 aracılı apoptoz gösterilmiştir.

p53 aktive olduğunda Bax yapımını uyarır. Bax proteini de mitokondri de yerleşmiştir. Bu durumda anti-apoptotik Bcl-2 proteinlerinin apoptotik Bcl-2 proteinlerine oranı azalır. Mitokondride Bax miktarının artması ile Bax-Bax homodimeri oluşur. Bu durum,

mitokondride por oluşturarak sitokrom c'nin sitoplâzmaya salınımı ile Apaf-1 aktivasyonuna neden olur (Çolakoğulları 2007).

Hücre döngüsü boyunca DNA hasarını belirlemede en az iki kontrol noktası vardır. G₁-S ve G₂-M'de meydana gelir. S fazına giren kontrol noktasında hasarlı DNA replike eden hücreleri korur ve ya G₁'de hücre döngüsü durdurma ya da apoptosis indükleyen p53 proteini boyunca ilişkilidir (Basu ve Haldar 1998).



Şekil 2.15. p53 ilişkili apoptoz için model (Haupt ve ark. 2003)

2.2.6. Apoptozu belirlemede kullanılan yöntemler

Apoptosisin belirlenmesinde kullanılan 5 sınıfta incelenmektedir:

1. Morfolojik görüntüleme yöntemleri

- Işık mikroskobu
- Floresan mikroskobu
- Elektron mikroskobu
- Faz kontrast mikroskobu
- Hoechst boyama
- Propidyum iyodür
- Giemsa boyama
- Hematoksilen boyama

2. İmmunohistokimyasal yöntemler

- M30 yöntemi
- Anneksin 5
- Kaspaz-3 yöntemi
- TUNEL yöntemi

3. Biyokimyasal yöntemler

- Agaroz jel elektroforezi
- Western Blotting
- Akışkan sitometrisi

4. İmmünolojik yöntemler

- ELISA
- Florometrik yöntem

5. Moleküler biyoloji yöntemleri

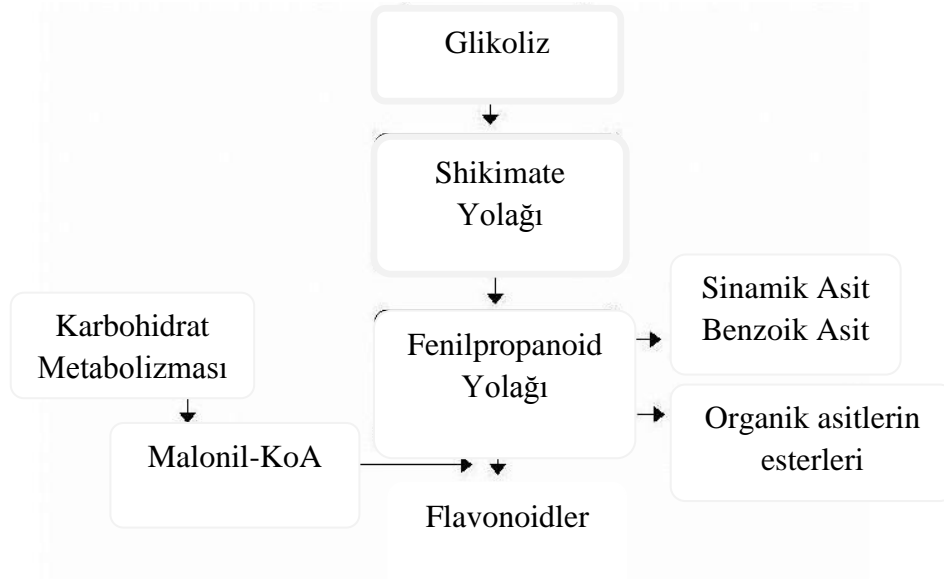
- DNA mikroarray (Güleş ve Eren, 2008)

2.3. Bitkisel Fenolik Bileşikler

Polifenoller bir ya da iki benzen halkası içerir (Tsuda ve ark. 2004). Aynı zamanda basit fenoller, flavonoid, hidroksisinnamik asit ve hidroksisinnamik asit türevlerini içerir (Kohlmeier ve ark.1995). Polifenollerin kökeni tirozin ve fenilalanin aminoasitleridir (Castellano ve ark. 2011). Fenolik bileşikler özellikle renk ve tat özellikleri gibi bitki türevli yiyecek ve içeceklerin başlıca organoleptik karakterleri için sorumludur. Fenolik bileşikler meyve, sebze ya da bitkisel türevli içeceklerde yüksek diyetlerin tüketimi ile ilişkili sağlık yararlarına katkıda bulunmak için rapor edilmiştir (Cheyner 2005).

Fenolik bileşikler bir dizi mekanizma boyunca karsinogenezi etkileyebilir. Bu bileşikler serbest radikaller ya da karsinojenleri temizleyebilir. Fenolik bileşikler reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini engelleyebilir (Kohlmeier ve ark.1995).

Fenolikler flavonoidler, taninler, hidroksisinnamat esterleri ve polimer lignin yapıları içeren ikincil metabolit grubudur. Fenolik bileşikler temel olarak primer (shikimate) ve sekonder (fenilpropanoid) yollarında sentezlenirler (Michalak 2005). Şekil 2.16'da fenolik bileşiklere ait yollar gösterilmiştir. Biyolojik aktiviteleri arasında fenolikler zararlı UV radyasyona, serbest radikallerin potansiyel temizleyicilerine ve diğer oksidatif türlere karşı ajan görüntüleme, herbivorlara ve patojenlere kimyasal önleyici olarak hareket ederek stres cevabında ilgilidir. Fenolik bileşikler antioksidan, anti mutajenik, anti viral, anti bakteriyel, algisidal, anti fungal, insektisidal, östrojenik ve keratolitik aktivite sunarlar (Grace ve Logan 2000).



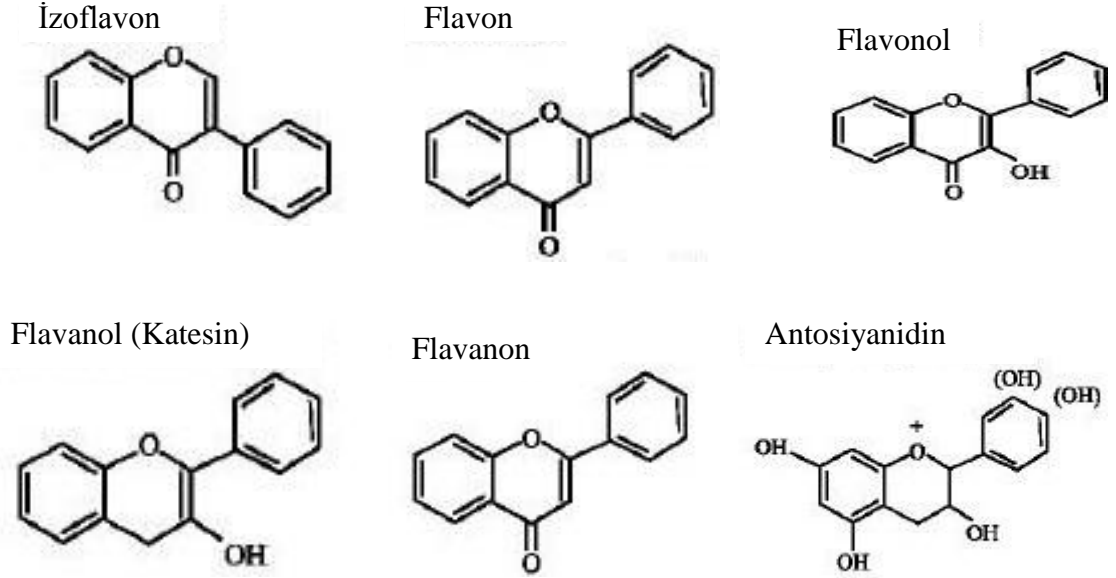
Şekil 2.16. Fenolik bileşiklerin oluşumunun gösterildiği biyosentetik yollar (Michalak 2005)

Fenolik yapılar genellikle fenolik hidroksil grupların hidrojen bağı potansiyeli ve hidrofobik benzoid halkası nedeniyle proteinlerle birlikte güçlü etkileşim potansiyeline sahiptir. Sitokrom p450 izoformları, lipooksijenazlar, siklooksijenazlar ve ksantin oksijenazlar gibi radikal üretiminde rol alan bazı enzimleri inhibe etmek için kapasitelerinin sonucu olarak antioksidanlar olarak hareket etme yeteneğini verir (Pereira ve ark. 2009).

Fenoller birkaç farklı gruba ayrılır, temel fenolik iskeletin (basit fenoller benzoik asitler, fenilpropanoidler ve flavonoidler) yapısı ile birlikte temel karbon atomlarının sayısı ayırt edicidir. Fenolikler bitkilerde çeşitli fonksiyonlara sahiptir. Fenolik bileşiklerin miktarı ve fenilpropanoid metabolizminin artması stres durumunda ve çeşitli çevresel faktörlerin altında gözlenebilir (Michalak 2005). Bitki fenolikleri flavonoidleri, tanenleri, kumarin, fenolik asit ve az miktarda stilben ve lignan içerirler (Dai ve Mumper 2010).

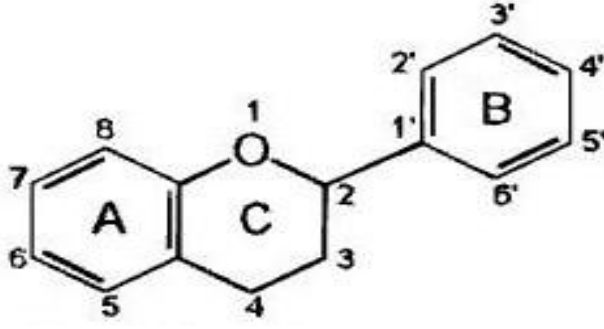
Flavonoidler aromatik amino grubu fenilalaninden, tirozinden ve malonattan oluşurlar. Flavonoidin temel yapısı 15 karbon atomundan oluşan Şekil 2.18'de gösterilen flavan

çekirdeğidir. Şekil 2.17’de gösterildiği gibi flavonoidler 6 sınıfa ayrılır (Gupta ve ark. 1999).



Şekil 2.17. Flavonoidlerin alt sınıfları (Gupta ve ark. 1999)

Flavonoidler genel olarak bitkide glikozillenmiş türevler olarak bitkide bulunurlar (Gupta ve ark. 1999). Çeşitli sebze ve meyvelerden oluşan flavonoidler tohumda, fındıkta, baharatta, üzümde ve şarap (özellikle kırmızı), çay ve bira (daha düşük seviyede) gibi içeceklerin yanı sıra çeşitli tıbbi bitkilerde de bulunur. Flavonoidler bitki ekolojisinde farklı roller oynarlar. Flavonoidler fosforilasyonda ilgili demir kanallarının düzenleyicisi olarak ve/ya da fotosentezin ışık fazında katalizör olarak rol oynar (Pietta 1999). Flavonoidler foto sentetik elektron transportu sistemi tarafından üretilen ROS temizlenerek bitki hücrelerinde stres koruyucu olarak görev yapabilirler (Harborne 1994). Ayrıca flavonoidlerin UV absorpsiyon özellikleri nedeniyle, bitkileri güneşin UV-radyasyonundan korurlar ve UV tarafından üretilen ROS’u temizlerler (Shirley 1996).



Şekil 2.18. Flavonoidlerin nükleer yapısı (Gupta ve ark. 1999)

Kumarinler, bitkiler alemindeki bileşiklerin çok büyük bir sınıfını oluştururlar. Meyvede, yeşil çayda ve hindiba gibi diğer yiyeceklerde bulunur. Bütün kumarinler yüksek yapılı bitkilerde bulunur ve en zengin kaynakları Rutaceae ve Umbelliferae aileleridir. Kumarinler en yüksek seviyede meyvede onu takiben kök, gövde ve yaprakta bulunurlar (O’Kennedy ve Lacy 2004). Kumarinler, *cis-orto*-hidroksisinnamik asidin siklizasyon ile elde edilen laktonlardır. Bu öncüler yapısal analoglar *trans*-hidroksisinnamik ve türevlerinin hidroksilasyon süreçleri ve izomerizasyon boyunca oluşur (Fresco ve ark. 2006)

Tanenler yüksek bitkilerde bulunan polifenolik ikincil metabolitlerdir ve iki gruba ayrılır: Hidrolize edilen tanenler ve kondense tanenler (Khanbabaee ve Van Ree 2001). Hidrolize edilebilir tanenler (HT) fenolik asitlerle esterleşmiş hidroksil grupları olan karbohidrat çekirdeğinden oluşurlar. Kondense tanenler ise flavonoid birimlerinin dallanmamış polimerleridir ve genellikle HT’den saha yüksek moleküler ağırlığa sahiptir (Frutos ve ark. 2004).

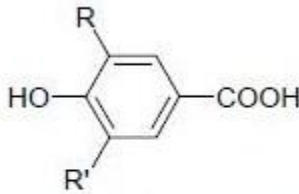
Fenolik asitler genellikle iki ana gruba ayrılır: 7 karbon atomu (C6-C1) içeren benzoik asid ve 9 karbon atomu (C6-C3) içeren sinnamik asid (Şekil 2.19). Bu bileşikler hidroksilleşmiş formlarda ağırlıklı olarak mevcuttur, böylece sırasıyla hidrobenzoik asid ve hidroksisinnamik asid olarak isimlendirilir. Hidroksibenzoik ve hidroksisinnamik asitler insan diyetinde tanımlanmıştır ve onların bolluğu ve çeşitliliği nedeniyle önemli rol oynadığı bilinir (Fiuza ve ark. 2004).

Stilbenler etilen köprüsü ile bağlanmış 2 aromatik halka gösteren fenolik bileşiklerdir. Resveratrol (3,5,4'-trihidroksistilben) üzüm ve şarap olmak üzere insan diyetinde bu kimyasal ailenin üyesidir (Fresco ve ark. 2006).

Flavonoidler, kapasiteleri nedeniyle LDL oksidasyonunu inhibe etmek için eşsiz kardioprotektif özellik göstermiştir (Kondo ve ark. 1996). Farelerle yapılan bir çalışmada flavonoid zengin diyetlerin miyokardiyal post-iskemik hasarı azalttığı gösterilmiştir (Facino ve ark. 1999). Flavonoidin koruyucu rolüyle ilgili yapılan bir çalışmada yüksek flavonoid alımının yaşlı erkeklerde miyokardiyal enfarktüsün insidansını düşürdüğü ve koroner kalp hastalıklarından oluşan ölüm oranı azalttığı öne sürüldü (Yochum ve ark. 1999).

Flavonoidler ve fenolik bileşikler ince ve kalın bağırsakta ile hepatik hücrelerde meydana gelen reaksiyonlarla emilmeden sonra glukuronidasyon, metilasyon ve sülfasyona maruz kalırlar (Del Rio ve ark. 2010).

Benzoik asit türevleri



R=R'=H; p-hidroksibenzoik asit

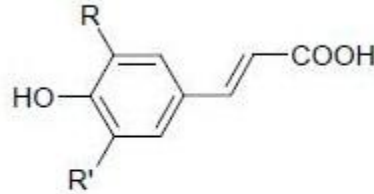
R= OH, R'=H; protokateşuik asit

R= OCH₃, R'=H; vanilik asit

R=R'=OH; gallik asit

R=R'=OCH₃; siringik asit

Sinamik asit türevleri



R=R'=H; p-kumarik asit

R=OH, R'=-; kafeik asit

R=OCH₃, R'=H; ferulik asit

R=R'=OCH₃; sinapik asit

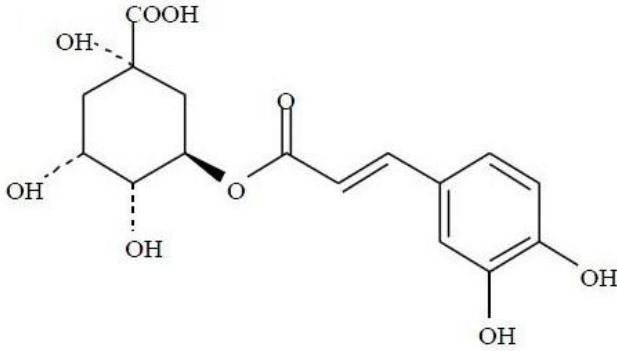
Şekil 2.19. Benzoik asit ve sinamik asit türevlerinin moleküler yapısı (Pereira ve ark. 2009)

Flavonoidler çiçekte ve tohumda pigmentasyonda, bitkide üremede ve çoğalmada rol oynarken avcı ve patojen gibi biyotik strese ya da UV ışığı gibi abiyotik strese karşı savunma reaksiyonlarında rol alırlar (Shirley 2001).

Flavonoidler ksantin oksidaz ve protein kinaz C gibi süperoksid anyon üretimi için sorumlu enzimi inhibe eder (Ursini ve ark. 1994). Ayrıca flavonoidlerin siklooksijenaz, monooksijenaz, glutatyon-S-transferaz, mitokondriyal süksinoksidaz ve NADH oksidaz'ı inhibe eder (Brown ve ark. 1998).

2.3.1. Klorojenik asit

CGA ($C_{16}H_{18}O_9$) kafeik asitle kinik asidin esterleşmesinden oluşur. Şekil 2.20'de klorojenik asidin açık yapısı gösterilmiştir. Umbelliferae, Cruciferae, Cucurbitaceae, Polygonaceae, Compositae, Labiatae, Solanaceae, Leguminosae, Saxifragaceae, Caprifoliaceae, Thaceae ve Valerianaceae ailelerinin sayısız bitki türünde bulunur. Böylece CGA birçok ortak meyve, sebze, baharat, tıbbi bitki ve içecekte oluşur. Klorojenik asidin bitki içeriği tıbbi ilaç olarak kullanılmaktadır ve bazı farmakolojik özelliklere sahiptir; anti-arterit, ant-diyaretik, ant-inflamatuar, anti-romatik, anti-tümör, anti-viral, astringent, kardiyotonik, gaz giderici, koroner vazodilatör, terletici, idrar söktürücü, kardiyotonik, gaz giderici, koroner vazodilatör, gastrik, sakinleştirici, bağırsak antiseptiği ve hipotansif etkiye sahiptir (Zeiger 1998).



Şekil 2.20. Klorojenik asidin organik yapısı (Zeiger 1998)

Stalmach ve ark. (2012) tarafından CGA üzerinde yapılan en son ve detaylı çalışmalar HPLC-MS tabanlı metodolojiden oluşan analiz yardımıyla sağlıklı kişilerde ve ileostomistlerde yapılmıştır. Bu çalışmada, CGA'nın insan metabolizmasından geçişi esnasında kolonda ve ince bağırsakta emilerek bazı bileşikler oluşturduğu gösterilmiştir.

İleostomistler tarafından alınan 385µmol CGA'nın 24 saat sonunda ileal sıvıda 275µmol düzeyinde bulunduğu gösterilmiştir. Bu veriler ışığında CGA'nın %30'unun ince bağırsakta emildiği belirlenmiştir (Del Rio ve ark. 2010).

Ayrıca CGA ile yapılmış çeşitli çalışmalarda antibakteriyel (Lou ve ark. 2011) etkisi, glukoz toleransını artırıcı etkisi (Rodriguez de Sotillo ve Hadley 2002) ve karaciğer koruyucu etkisi (Yun ve ark. 2012) olduğu belirlenmiştir.

Tez çalışmasında bilinen antioksidan özelliklere sahip olan klorojenik asidin radyasyonla birlikte verildiğinde radyoduyarlılığı artırıcı etkisi olup olmadığı Kolorektal adenokarsinom insan epitelyal Caco2 hücre hatlarında incelendi.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Tüm deneysel çalışmalarımız Uludağ Üniversitesi Biyoloji Bölümü bünyesinde bulunan Hücre Kültürü ve Genetik Toksikoloji laboratuvarında, radyasyon ile yürütülen çalışmalarımız Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir. Deneyleerde kullanılan cihazlar Çizelge 3.1'de, deneyleerde kullanılan kimyasallar ve firma isimleri Çizelge 3.2'de verilmiştir.

3.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar

Çizelge 3.1. Deneyleerde kullanılan cihazlar

CİHAZ	MARKA-MODEL
Su banyosu	NÜVEBATH NBS
Ultrasonik su banyosu	BANDELIN – RK 31
Azot tankı	INT. CRYOGENICS – IC 20R
pH metre	HANNA INSTRUMENTS – HI 221

Hassas terazi (Max: 2000 g)	RADWAG – WTB2000
Isıtmalı manyetik karıştırıcı	MTOPS – MS300HS
+4°C buzdolabı	REGAL
-80°C derin dondurucu	ELCOLD
Saf (Distile) su cihazı	MP MINI PURE – DEST UP
Pastör fırını	ELEKTRO-MAG – M 3025P
Floresan mikroskop	NIKON – ECLIPSE 80i
Floresan mikroskoba entegre dijital fotoğraf makinası ve ilgili software	Kameram-21 ve microsystem komet programı
Floresan mikroskop güç kaynağı	NIKON – C-SHG1
Elektroforez Tankı	
Elektroforez Tankı Güç Kaynağı	
Soğutmalı Santrifüj	SIGMA – 2-16PK
Etüv (37°C ve %5 CO ₂ takviyeli)	BINDER – CB 150
Inverted (Ters yüz) mikroskop	SOIF
Işık Mikroskobu	Olympus
60mm ve 100mm'lik steril petripler	FALCON
Besiyeri Tüpleri	
Sınıf II Laminar Akım	PRO LAB
Mikropipet	
Steril serolojik pipetler (5,10 ve 25 ml'lik)	COSTAR STRIPETTE
Serolojik pipet tabancası	BIOHIT MIDI PLUS
Steril plastik flasklar (T-12,5; T-25; T-75)	FALCON
Canlı hücre sayım cihazı ve yazılımı	INNOVATIS – CEDEX XS
Canlı hücre sayım cihaz lamı	ROCHE – CEDEX SMART SLIDE
Hücre sayım cihazı ve ucu	MILLIPORE – MA 01821
-20°C derin dondurucu	ALASKA – ADF 06 V
Lineer parçacık hızlandırıcı	SIEMENS MD2 (6MV FOTON)

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan kimyasallar

KİMYASAL MADDE	FİRMA	KATALOG NO
RPMI-1640 (500 ml)	THERMO SCIENTIFIC	SH30027.01
RPMI-1640 (500 ml)	LONZA	12-702F
DPBS (500 ml)	SIGMA	08537
Penisilin – Streptomisin solüsyonu (100 ml)	THERMO SCIENTIFIC	SH40003.12
Sodyum piruvat (100 ml)	THERMO SCIENTIFIC	SH30239.01
L-Glutamin (100 ml)	SIGMA – ALDRICH	G7513
Fetal Bovine Serum (100 ml)	SIGMA – ALDRICH	F9665
% 0,25 Tripsin-EDTA solüsyonu (100 ml)	SIGMA – ALDRICH	T4049
DPBS/Modified	THERMO SCIENTIFIC	SH30028.02
Sodyum Klorür (NaCl)	SIGMA	1064041000
Sodyum Hidroksit (NaOH)	SIGMA	06203
Na ₂ EDTA	SIGMA	E5134-500G
Tris	MERCK	K40452787001
Triton-X-100	GERBU	
DMSO		
Potasyum Klorür (KCl)	MERCK	1049361000
Mutlak Etanol	GURUP DELTALAR	
Mutlak Metanol	MERCK	1060082500
Asetik Asit	MERCK	1000632511
Giemsa	MERCK	1092040500
Kristal viyole	MERCK	1159400100
PBS (10 L)	SIGMA	D5652

Sitokalsin-B	SIGMA	C6762
Agaroz	MERCK	K33719436
Düşük Yoğunluklu Agaroz	SIGMA	A9414
Tripan Mavisi	SIGMA	
Etidyum Bromür (EtBr)	SIGMA	
96 kuyucuk	Orange Scientific	5530100
ELIZA	BioTek	ELx800
XTT çözeltisi	NIARA	
HRP konjugatı	PEVIVA	
Seyreltme Tamponu Konjugatı	PEVIVA	
Standartlar	PEVIVA	
Yıkama Tableti	PEVIVA	
TMB substratı	PEVIVA	
Kapama bandı	PEVIVA	

3.2. Çözeltilerin Hazırlanması

Klorojenik asid (CGA) çözeltisinin hazırlanması:

0.01926gr CGA tartılıp 200 µl %10 DMSO içeren saf suda (dH₂O) çözülür.

Hidrojen peroksit (H₂O₂) çözeltisinin hazırlanması:

%35'lik ana stok çözeltisinden 6,318 µl H₂O₂ üzerine 4993,682 µl saf su eklenerek 5 ml'lik yeni stok çözeltisi hazırlanmış olur. 5 ml'lik yeni stoktan 5ml besiyeri bulunan T-25 flaska 50µl aktarılır.

Hücre sayım lamına aktarılacak çözeltinin hazırlanması:

50µl hücre üzerine 50µl tripan mavisi eklenir. 100µl'lik karışımdan 10µl çekilerek lama yayılır.

Dulbecco's Phosphate Buffer Saline (DPBS) hazırlanması:

4.8g DPBS tartılarak 500ml saf suda çözülür.

Kristal viyole boyasının hazırlanması:

Toz halindeki kristal viyole boyasından 0.5g tartılarak üzerine 100ml metanol eklenir.

Komet testi için düşük yoğunluklu agaroz (LMA) hazırlanması:

0.065gr LMA tartılır ve 10ml suda ısıtılarak çözülür.

Komet testi için lizis tamponu hazırlanması:

2,5M NaCl: 29.22gr NaCl

100mM Na₂EDTA: 7,4448gr Na₂EDTA

10mM Tris: 0,2422 Trisma Base tartılır

Tartılan kimyasalların üzerine 178ml distile su eklenir ve manyetik karıştırıcıda ısıtmadan karıştırılarak pH'ı NaOH yardımıyla 10'a ayarlanır. Agaroz kaplı lama yayılan hücrelere lizis buffer eklenmeden önce ise 2ml triton ve 20ml DMSO eklenir.

Komet testi için yürütme tamponu hazırlanması:

0.747gr Na₂EDTA ve 18gr NaOH tartılarak 1,5lt distile suda çözülür. Çözeltinin pH>13 olmalıdır. +4°C'de çözelti saklanır.

Komet testi için nötralizasyon tamponu hazırlanması:

4.8456gr Trisma Base tartılarak 100ml distile suda çözülür. Çözeltinin pH'ı 7,5'a ayarlanır ve çözelti taze hazırlanır.

XTT çözeltisinin hazırlanması:

-20 derecede bulunan XTT^I ve XTT^{II} çözeltileri 37°C su banyosunda ısıtılır ve laminar akımda 1:50 oranında karıştırılır. Bütün bu işlemlerin ışiksiz ortamda yapılması gerekmektedir.

Çalışmamızda kullandığımız deneyler; klonojenik test, komet testi, XTT ve M30 testleri uygulanmıştır.

3.3. Hücre Kültürü

Kolorektal adenokarsinom insan epitelyal hücreleri (Caco2) RPMI-1640 besiyeri ile beslenmektedir ve %5 CO₂ içeren 37°C inkübatörde saklanmaktadır. RPMI-1640 besiyerinin içinde %10 fetal bovine serum (FBS), %1 Sodyum Piruvat, %1 Penisilin/Streptomisin ve %0,5 L-Glutamin eklenir. Besiyerlerinin çoğunda asidik ortamda sarıya bazik ortamda ise mora dönen ph indikaötrü bulunur. Fazlasıyla asidik veya bazik ortam kontaminasyonu, ölü veya fazla büyümüş kültürü belirlenebilir. Bulanık besiyeri ortamı ise kontaminasyonu aşırı büyümüş kültürü işaret eder.

3.4. Çalışma Planı

CGA ve radyasyon ile tek başına ve kombine olarak muamele edilen Caco2 hücrelerinde gerçekleştirilen XTT Elisa Testi, Klonojenik test, Komet Testi ve M30 Elisa testinde kullanılan dozlar ve çalışma planı Çizelge 3.3'te verilmiştir.

Çizelge 3.3. XTT testinde kullanılan CGA dozları

11 µM	23 µM	45 µM	90 µM	181 µM	361 µM
723 µM	1445 µM	2890 µM	5780 µM		

Radyasyonun sitotoksik etkilerinin belirlenmesi amacı ile Caco 2 hücreleri 0.5, 1, 2, 4 ve 6 Gy radyasyona maruz bırakılmışlardır. Klonojenik test sonuçlarına göre % 50 civarı yaşayabilirlik oranı gösteren tek bir değer seçilmiş ve CGA' nın XTT testinden elde edilen IC50 konsantrasyonu ile bir alt dozu ve bir üst dozu ile kombinlenerek komet ve M30 apoptoz testleri gerçekleştirilmiştir.

3.5. Işınlama Prosedürü

Flaskların içerisindeki hücrelerin ışınlama işlemi, 6-MV X-ışınları kullanılarak, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyoterapi Merkezinde gerçekleştirilmiştir. T-25 flasklarının filtreli kapakları iyice kapatılıp ağız kısımları kontaminasyonun önlemesi amacıyla sıkıca streç film ile sarılmıştır. Flasklar özel bir steril taşıma kabı içerisinde ışınlamaya götürülmüşlerdir.

Radyasyon uygulama dozları (0.5 – 6 Gy) lineer hızlandırıcı (Siemens Mevatron MD2) kullanılarak dakikada 2 cGy olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Verilen toplam doz, flaskların uygulama pozisyonundaki duruşlarının bilgisayarlı tomografik görüntülerine dayanarak, radyoterapi planlama sistemi (CMS-XİO) ile hesaplanmıştır.

3.6. Klonojenik Test

Klonojenik test hem CGA için hem de radyasyon için uygulanmıştır. Testin prosedürü;

1. T75 flaskta bulunan ve flaskı doldurmuş hücreler pasajlanır.
2. Flasklardan toplanan hücreler +4°C'de 1000rpm'da santrifüj edilir.

3. Santrifüjden sonra hücrelerin supernatant kısmı atılır ve geriye pellet yani hücreler kalır.
4. Peletteki toplam hücre sayısı hücre sayım cihazında ya da hemositometrede hesaplanır.
5. Deney gruplarımızın sayısı kadar T25 flaska istediğimiz sayıda hücre ekeriz.
6. Ekimden birkaç gün sonra hücreler T25 flaskın yüzeyini doldurmaya başladığı zaman hücreler belirlenen CGA ve/veya radyasyon dozlarıyla dozlanır.
7. Dozlamadan 24 saat sonra flakslardaki hücreler pasajlanır ve falkonlara alınır.
8. Santrifüjden sonra supernatant kısmı atılır ve kalan pelletten canlı hücre sayımı yapılır.
9. Canlı hücre sayımı için 50µl tripan mavisi ve 50µl hücre karıştırılarak hücre sayım cihazı lamına 10µl aktarılır ve cihazda okuma yaptırılır.
10. Okuma sonucuna göre her 60mm'lik petriye 500 canlı hücre aktarılacak şekilde hesaplama yapılır. Çalışılan hücre hattına göre kullanılan petri büyüklüğü değişebilmektedir. 100 mm'lik petriler kullanılıyor ise petrilere 1000 canlı hücre ekilir.
11. Her doz için 4 petri kullanılır.
12. Petrilere hücre aktarımından sonra petriler 37°C %5'lik inkübatöre kaldırılır.
13. Petriler hergün inverted mikroskopta kontrol edilir ve koloniler belli büyüklüğe ulaştıktan sonra petriler boyanır.
14. Koloni olarak sayım yapılabilmesi için her kolonide en az 40 hücre bulunması gerekmektedir.
15. Boyama için petriler PBS ile yıkanır, etanolle 5dk fikse edilir ve kristal viyole ile de 5 dk (hücreye göre süre artabilir) boyanır.

Çeşitli radyasyon dozlarının uygulanmasından sonra sağ kalan hücrelerin oranına sağ kalım oranı denir ve şöyle formüle edilir (Özalpan, 2001):

Sağ kalım oranı (SK) : $\text{Koloni sayısı} / (\text{Ekilen Hücre Sayısı} \times \text{PV})$

PV : $\text{Koloni sayısı} / \text{Ekilen Hücre Sayısı}$

Burada dikkat edilmesi gereken PV hesaplanırken kullanılan değerler büyüme kontrol grubuna aitken, SK hesaplamasındaki değerler ise, radyasyonlu gruplara aittir.

3.7. XTT testi

1. XTT için 96 kuyucuğa belirli sayıda hücre ekimi yapılır
2. Ekimden 2 gün sonra dozlama yapılır
3. Dozlamadan 1 gün sonra hazırlanan XTT solüsyonu her kuyucuğa 50µl olacak şekilde eklenir.
4. XTT dozlamasından 2 saat sonra 96 kuyucuk ELIZA'da 450 ve 630nm'de okunur.
5. ELIZA okuması sonucu oluşan absorbanlardan canlılık şu formülle hesaplanır:

$\% \text{Canlılık} = [100 \times (\text{Bileşik ile muamele edilen hücre absorbanı ortalaması} - \text{kör ortalaması}) / (\text{Kontrol hücre absorbanı ortalaması} - \text{kör ortalaması})]$

3.8. Komet Testi

1. Komet testinde kullanılmak üzere agaroz kaplı lamlarımız hazırlanır.
2. Deneyden bir gün önce (dozlama ile aynı gün) lizis tamponu hazırlanır.
3. Deney günü T25'lik flasklardaki hücreler kaldırılır ve santrifüj edilir. Santrifüjden sonra supernatant kısmı atılır ve geriye hücreler ile az miktarda besiyeri kalır.
4. Santrifüj esnasında hücreleri agaroz içine gömmek için düşük erime noktası olan (LMA) agar hazırlanır. Bunun için 0.065gr LMA tartılır ve 10ml suda ısıtılarak çözülür. Eriyen LMA su banyosunda 37°C'de bulunan ependorfların içine 250 µl aktarılır.
5. Falconlarda pelet halinde bulunan hücrelerimizden 100µl çekilir ve 250µl LMA bulunan ependorflara aktarılır. LMA ve hücre karışımı mikropipet yardımıyla iyice süspanse edilir.
6. Jel ve hücre karışımından 50µl alınarak agaroz kaplı lam üzerine yayılır. Her grup kendi lamına yayılır.
7. Lamaların üzeri lamelle kapatılır ve hemen preparat buz aküsünün üstüne konur.
8. Yayımından sonra lamalar +4°C'de 15dk bekletilir.
9. 15dk sonunda lameller çıkartılır

10. Lamlar şalelere konur ve üzerlerine 100µl lizis tamponu eklenir. Şaleler alüminyum folyo ile sarılarak +4°C'ye kaldırılır ve 1 gece bekletilir.
11. Ertesi gün lamlar şalelerden çıkartılır ve komet tankına dizilirler
12. Lamlar dizildikten sonra tanka yürütücü tampon eklenir ve lamlar 20dk tampon içinde bekletilir.
13. 20dk'nın sonunda yürütme işlemi başlatılır. Yürütme işlemi 25dk, 300mA ve 25V'ta gerçekleştirilir.
14. Yürütmeden sonra lamlar tekrar şaleye alınır ve üzerlerine nötralizasyon tamponu eklenir ve lamlar 5dk tamponda bekletilir. Bu işlem karanlıkta yapılır.
15. Nötralizasyon işleminden sonra lamlar distile suyla durulanır ve kurumaya bırakılır.
16. Kurutulduktan sonra lamlar 5dk soğuk mutlak etanolde fikse edilir, etanolden sonra kurumaya bırakılır.

Komet lamlarının boyanması:

Enjektör yardımıyla 0,1ml EtBr çekilip 100ml suya karıştırılır. Lamlar hazırlanan karışıma daldırılır ve yaklaşık 1dk sonunda lamlar karışımdan çıkarılır ve üzeri lamel ile kapatılarak floresan mikroskopta incelenir.

Komet lamlarının mikroskobik incelemesi:

Komet yönteminde sayım ve değerlendirme işlemleri NIKON marka ECLIPSE 80i model floresan mikroskopta yapılır. Her lamdan 100 hücre sayılır ve değerlendirme komet yazılımı yardımıyla yapılır. Çalışmamızda komet yazılımı ile şu değerleri ölçtük: Komet Yoğunluğu, Kuyruk % DNA ve Olive Kuyruk Momenti.

3.9. M30 Testi

1. T25 flasklara kullanılacak deney grubu sayısına göre 100000 hücre/flask ekim yapılır.
2. Ekimden bir hafta sonra eski besiyeri kaldırılır ve taze besiyeri eklenir. Hücreler CGA ile muamele edilir.

3. Hücrelerin ajana maruz bırakılmasından bir gün sonra hücre eski besiyeri kaldırılmadan ışınlanmaya götürülür.
4. Işınlamadan sonra flasklar -80°C 'de dondurularak tedavi sonlandırılır.
5. Dondurmadan 3 gün sonra flasklar çözülür ve flask başına $250\mu\text{l}$ %10 Triton-X-100 eklenir ve 96 kuyucuk 600rpm 'de 5 dakika çalkalanır. Amacımız hücrelerin lizize uğramasını sağlamaktır.
6. Her kuyucuktaki besiyeri toplanır ve santifüj edilir.
7. M30 CytoDeath mikroplakasına kuyucuk başına besiyeri/lizatın (supernatant) $2 \times 25\mu\text{l}$ transfer edilir. Transfer sırasında baloncuk oluşmamasına dikkat edilir.
8. Kuyucuk başına seyreltilmiş HRP konjugatı $75\mu\text{l}$ eklenir.
9. Mikroplaka oda sıcaklığında 4 saat 600rpm 'de çalkalanır.
10. Lizat/antikör çözeltisi kaldırılır ve hazırlanan yıkama çözeltisiyle 5 kez yıkanır
11. Kuyucuk başına $200\mu\text{l}$ TMB çözeltisi eklenir.
12. Oda sıcaklığında karanlıkta mikroşerit inkübe edilir.
13. Kuyucuk başına $50\mu\text{l}$ durdurma çözeltisi eklenir ve 5-10sn çalkalanır.
14. 5-30dk sonra Eliza'da 450nm 'de okuma yapılır

3.10. İstatistiksel Analizler

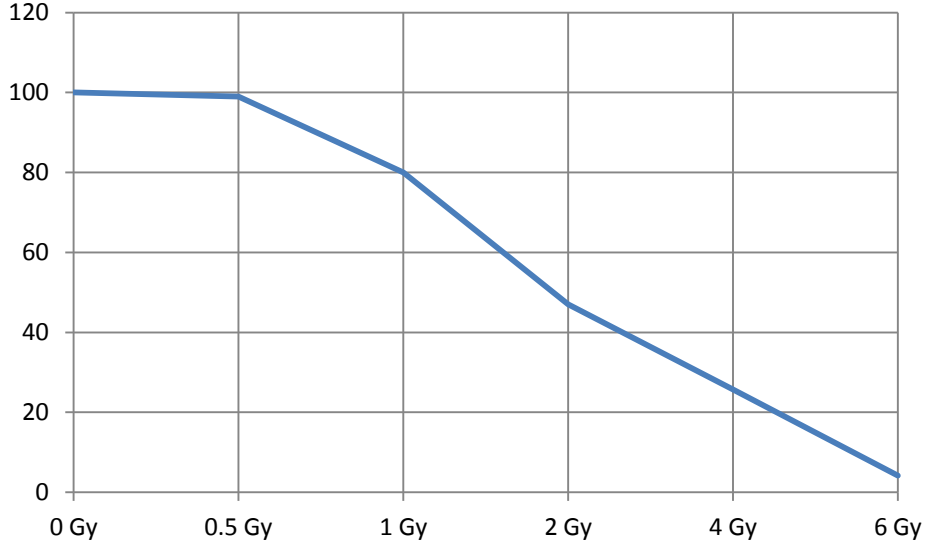
Sitotoksisite verileri ve Komet analizinde Tek Yönlü Anova testi kullanılmıştır. Doza bağımlı yanıtların karşılaştırılmasında ise regresyon analizi kullanılmıştır. Tüm istatistik analizler SPSS 2.0 yazılımı kullanılarak bilgisayarda gerçekleştirilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Radyasyonun Caco2 Hücre Hattı Üzerindeki Etkisinin Klonojenik Test ile Belirlenmesi

Tez çalışmamızda kullanılacak radyasyon dozlarının belirlenmesi amacıyla Caco2 hücreleri 0,5, 1, 2, 4 ve 6 Gy radyasyona maruz bırakılarak klonojenik test uygulanmıştır. Literatürde radyasyon ile sitotoksisite çalışmalarında XTT, MTT ve benzeri kolorimetrik testler ile sonuç alınmadığı belirtilmektedir. Bu sebeple

sitotoksisite belirlemek için radyasyon çalışmalarında klonojenik test uygulanması daha fazla tercih edilmektedir. Elde edilen sonuçlara göre test gruplarının % hayatta kalış oranları Şekil 4.1’de gösterilmiştir.

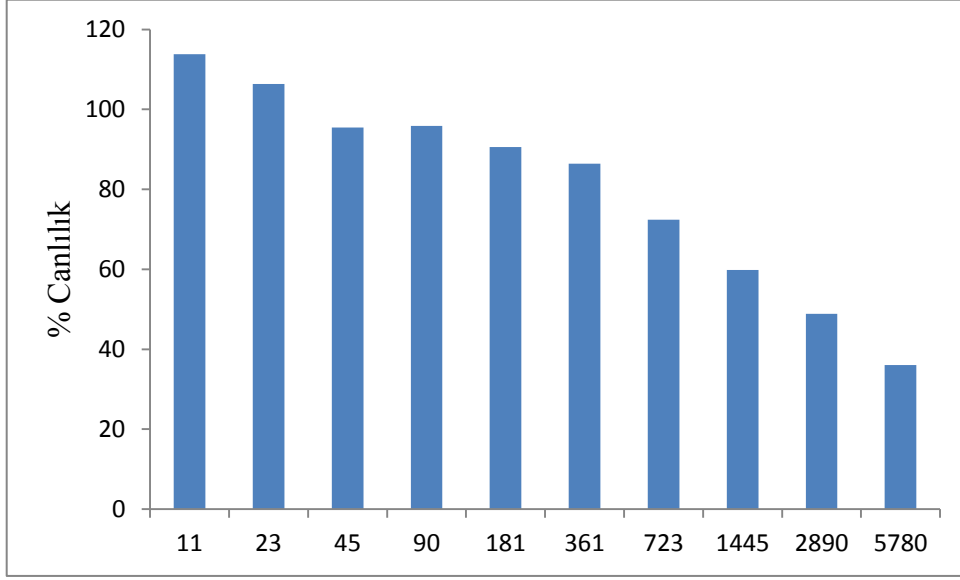


Şekil 4.1. Çeşitli dozlarda radyasyona maruz bırakılan Caco2 hücrelerinde klonojenik test ile belirlenen % hayatta kalış oranları

Şekil 4.1’de görüldüğü 0,5 Gy canlılığı %99’a, 1 Gy canlılığı %80’e, 2 Gy canlılığı %47’e, 4 Gy canlılığı %26’ya ve 6 Gy ise canlılığı %2’ye düşürmüştür. Bu sonuçlara göre 4 Gy ve 6 Gy % 50 inhibisyonun üzerindeki değerler olduğu için tercih edilmemiştir. 0,5 ve 1 Gy ise canlılığa anlamlı şekilde etki etmediğinden çalışmalarımızda 2 Gy radyasyon dozu kullanılmıştır.

4.2. XTT Testi ile % İnhibisyonun Belirlenmesi

Çalışmada apoptoz ve genotoksisite testlerinde kullanılacak CGA dozlarını belirlemek için Caco2 üzerinde çeşitli dozlardaki CGA’nın % inhibisyon etkisini XTT Eliza testi ile araştırdık. Kullandığımız dozlar: 11, 23, 45, 90, 181, 361, 723, 1445, 2890 ve 5780 µM. XTT testi ile belirlenen % canlılık grafiği Şekil 4.2’de gösterilmiştir.



Şekil 4.2. Çeşitli konsantrasyonlarda CGA'ya maruz bırakılan Caco2 hücrelerinde XTT testi ile belirlenen % canlılık oranları.

Şekil 4.2'de XTT testi ile belirlenen CGA'nın kolon kanser hücre hattı (Caco2) üzerindeki % canlılık grafiği görülmektedir. Grafiğe göre, 45 ve 90 M canlılık üzerine çok fazla etki yapmazken, 5780 M canlılığı % 36'ya düşürmektedir. XTT testimizde %50 inhibisyona (IC50) neden olan doz 1816 µM olarak belirlenmiştir.

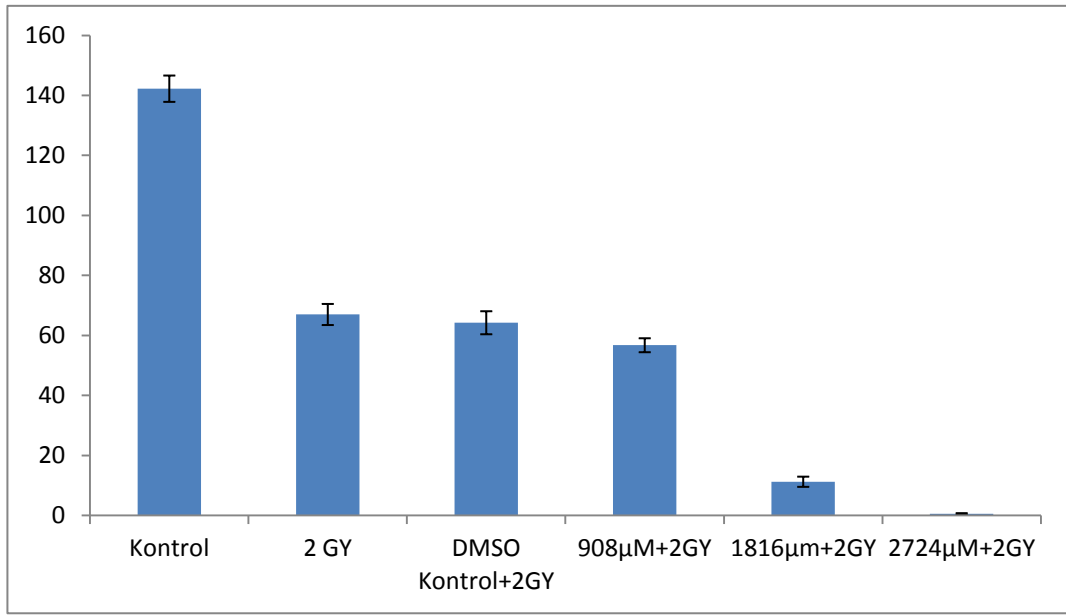
Klonojenik test ve XTT testleri sonucunda belirlenen optimumu radyasyon dozu ve klorojenik asit dozları Çizelge 4.1.'te verilmiştir.

Çizelge 4.1. CGA'nın tek başına ve radyasyonla kombine dozları

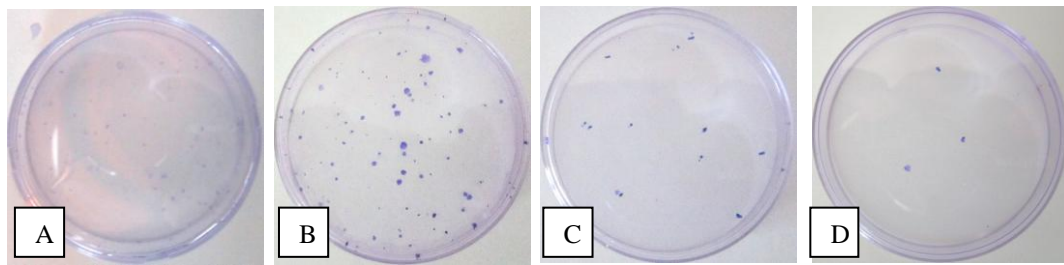
Kontrol Grupları	CGA Grupları (µM)	Radyasyon Dozu	CGA (µM) + Radyasyon
Negatif Kontrol	908	2 Gy	908 µM + 2 Gy
Solvent Kontrol	1816		1816 µM + 2 Gy
Pozitif Kontrol	2724		2724 µM + 2 Gy

4.3. CGA ile Radyasyon Kombinlendiğinde Caco2 Hücrelerinin Canlılığı Üzerindeki Etkilerinin Klonojenik Test ile Gösterilmesi

XTT sonucu belirlenen CGA dozları ile 2 Gy radyasyon dozu kombine edilmiştir. Radyasyon ile kombine CGA gruplarının klonojenik test ile belirlenen canlılık yüzdeleri Şekil 4.3'te ve kolonilerden örnekler ise Şekil 4.4'te gösterilmiştir.



Şekil 4.3. Radyasyon ile kombine edilen CGA'nın Caco2 hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisinin klonojenik test ile gösterilmesi



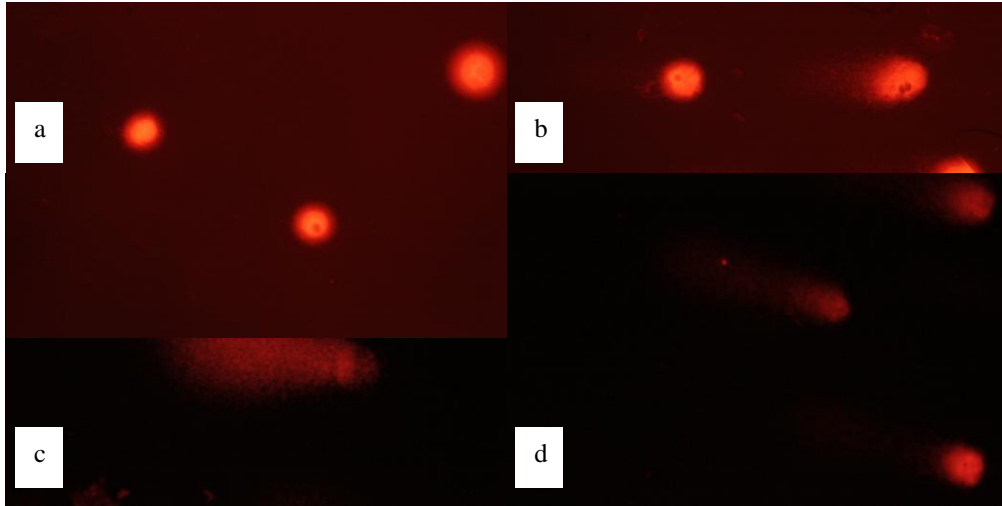
Şekil 4.4. Radyasyon ile kombine CGA'ya maruz bırakılan Caco2 hücrelerindeki koloni görüntüleri. A) 2 Gy B) 908µM+2 Gy C) 1816µM+2 Gy D) 2724µM+2 Gy

Grafikte görüldüğü gibi 2 Gy radyasyon canlılığı %47'e düşürmüştür bununla birlikte IC25 değeri olan 908µM CGA ise radyasyon ile kombine edildiğinde canlılığı % 39'a düşürmektedir. IC50 değeri olan 1816µM CGA'nın radyasyon ile kombinasyonu

sonucu canlılık %8'e kadar düşmüştür. IC75 değeri olan 2724µM CGA'nın ise radyasyon ile kombinasyonu sonucu canlılık %0'a düşmüştür. Bu sonuçlara göre çalışmada kullanılan CGA, radyasyonla kombinlendiğinde tek başına 2 Gy radyasyona göre hücre koloni oluşturma oranını azaltmaktadır.

4.4. CGA'nın DNA Hasarı Oluşturma Etkisi, Komet Testi Sonuçları

Komet testinde değerlendirilen Kuyruk Uzunluğu (µm), Kuyruk % DNA ve Olive Kuyruk Momenti değerleri standart hata değerleri ile birlikte Çizelge 4.1'te gösterilmiştir. Komet testinde elde edilen görüntü örnekleri Şekil 4.5'te verilmiştir.



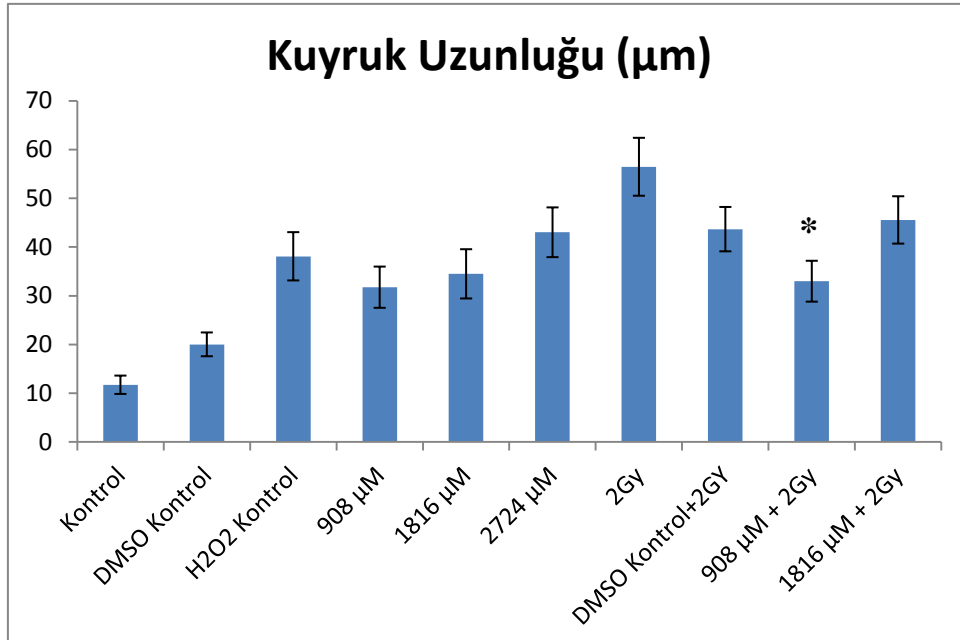
Şekil 4.5. Komet testinden elde edilen mikroskobik görüntüler (20X). a) Kontrol grubu b) 2 Gy c) 1816 µM d) H₂O₂ Kontrol

Çalışmada kullanılan klorojenik asidin DNA hasarı üzerindeki etkisini araştırmak için Caco2 hücreleri 24 saat öncesinden XTT testi ile belirlenen IC50 dozu, bu dozun yarısı ve 0,5 katı dozlar kullanılarak (908 µM, 1816 µM ve 2724 µM) CGA'ya maruz bırakılmıştır ve Komet testi uygulanmıştır. Yapılan Komet testi sonunda her çalışma grubu için; Kuyruk Uzunluğu, Kuyruk % DNA ve Kuyruk % DNA ile Kuyruk Moment Uzunluğunun çarpımı olan Olive Kuyruk Momenti değerleri hesaplanmıştır (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.2. Komet Testinde elde edilen ortalama değerler. CGA; Klorojenik Asit, H₂O₂; Hidrojen Peroksit, DMSO; Dimetilsülfoksit

	<u>Kuyruk Uzunluğu(μm)</u>	<u>Kuyruk % DNA</u>	<u>Olive Kuyruk Momenti</u>
Kontrol	11,72 ±1,88	8,74 ± 1,31	2,9 ± 0,82
DMSO Kontrol	20,01 ±2,44	19,76 ± 2,47	6,45 ± 1,06
H₂O₂ Kontrol	38,08 ±4,95	20,34 ± 2,76	12,44 ± 2,06
908μM CGA	31,74 ± 4,22	17,61± 2,56	10,51 ± 1,71
1816μM CGA	34,47 ± 5,05	20,3± 2,72	11,24 ± 1,94
2724μM CGA	43,01 ± 5,1	28,27 ± 3,34	16,79 ± 2,41
2GY	56,45 ± 5,94	24,89 ± 2,93	17,61 ± 2,39
DMSO Kontrol+2Gy	43,65 ± 4,55	27,77 ± 2,82	15,06 ± 2,03
908μM CGA +2Gy	32,98 ± 4,19	22,15 ± 1,55	14,6 ± 1,1
1816μM CGA +2Gy	45,54 ± 4,85	27,83 ± 2,68	15,38 ± 2

Şekil 4.6’da her test grubu için oluşan Kuyruk Uzunluğu oranları gösterilmiştir.

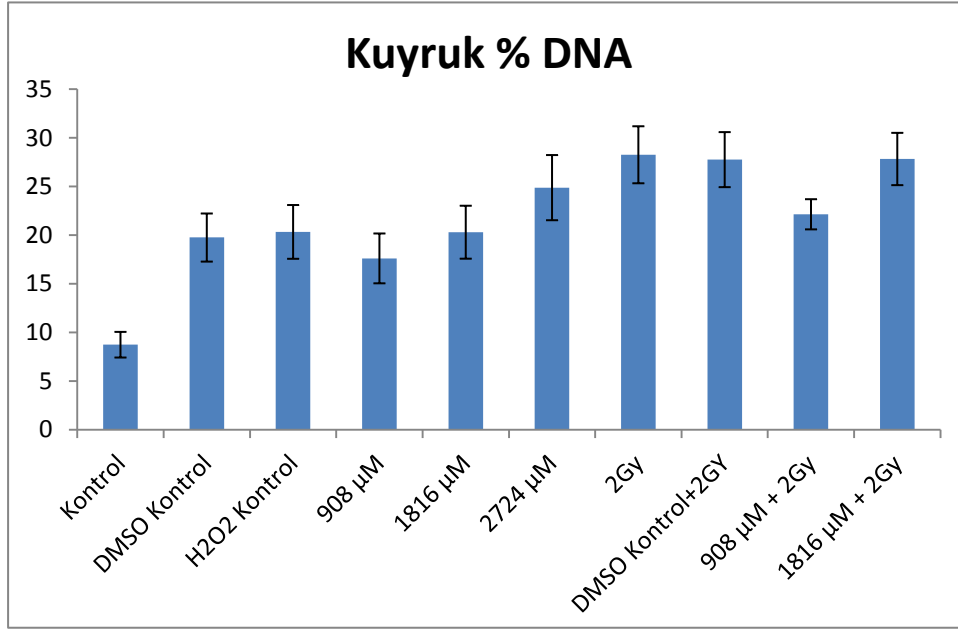


Şekil 4.6. Caco2 hücre hattında uygulanan çeşitli dozlardaki CGA’nın Komet testi ile Kuyruk Uzunluğunun (μm) değerleri. CGA; Klorojenik Asit, H₂O₂; Hidrojen Peroksit, DMSO; Dimetilsülfoksit (*p<0,001: 2 Gy radyasyon ile karşılaştırıldığında)

Kuyruk uzunluğu bakımından tüm gruplar kendi aralarında ANOVA testi ile karşılaştırılmış ve gruplar arası anlamlı farklılık olduğu belirlenmiştir. İkili karşılaştırmalar için Tamhane testi kullanılmıştır. Kontrol grubunda kuyruk uzunluğu değeri $11,72 \mu\text{m} \pm 1,88$ ve CGA'yı çözdüğümüz madde olan DMSO kontrol grubunda $20,01 \mu\text{m} \pm 2,44$ olarak belirlenmiştir. $908 \mu\text{M}$ CGA dozunda $31,74 \mu\text{m} \pm 4,22$ olarak belirlenen ortalama kuyruk uzunluğu değeri DMSO kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0,05$). $1816 \mu\text{M}$ CGA dozunda $34,47 \mu\text{m} \pm 5,05$ olarak belirlenen ortalama kuyruk uzunluğu değeri DMSO kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,0001$). $2724 \mu\text{M}$ CGA dozunda $43,01 \mu\text{m} \pm 5,1$ olarak belirlenen ortalama kuyruk uzunluğu değeri DMSO kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,01$). Genotoksisitesini bildiğimiz bir madde olan hidrojen peroksit (H_2O_2) kontrol grubunda kuyruk uzunluğu $38,08 \mu\text{m} \pm 4,95$ olarak ölçülmüştür.

2 Gy radyasyon grubunda kuyruk uzunluğu $56,45 \pm 5,94$ ve radyasyon ile kombin solvent kontrol (DMSO Kontrol + 2 Gy) grubunda $43,65 \pm 4,55$ olarak belirlenmiştir. $908 \mu\text{M}$ CGA $\pm 2 \text{ Gy}$ dozunda $32,97 \pm 4,19$ olarak belirlenen kuyruk uzunluğu değeri radyasyon dozu ile solvent kontrol dozun kombinasyonu olan DMSO Kontrol + 2 Gy ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,0001$). $1816 \mu\text{M}$ CGA $\pm 2 \text{ Gy}$ dozunda $32,97 \pm 4,19$ olarak belirlenen kuyruk uzunluğu değeri radyasyon dozu ile solvent kontrol dozun kombinasyonu olan DMSO Kontrol + 2 Gy ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0,05$). $2724 \mu\text{M}$ CGA + 2 Gy dozunda hiçbir çekirdek görülememiştir.

Komet testinde belirlenen bir başka ölçüm kuyruk % DNA miktarıdır. Caco2 hücre hattında CGA muamelesi sonrasında yapılan Komet testinde ölçülen Kuyruk % DNA grafiği Şekil 4.7'de gösterilmiştir.



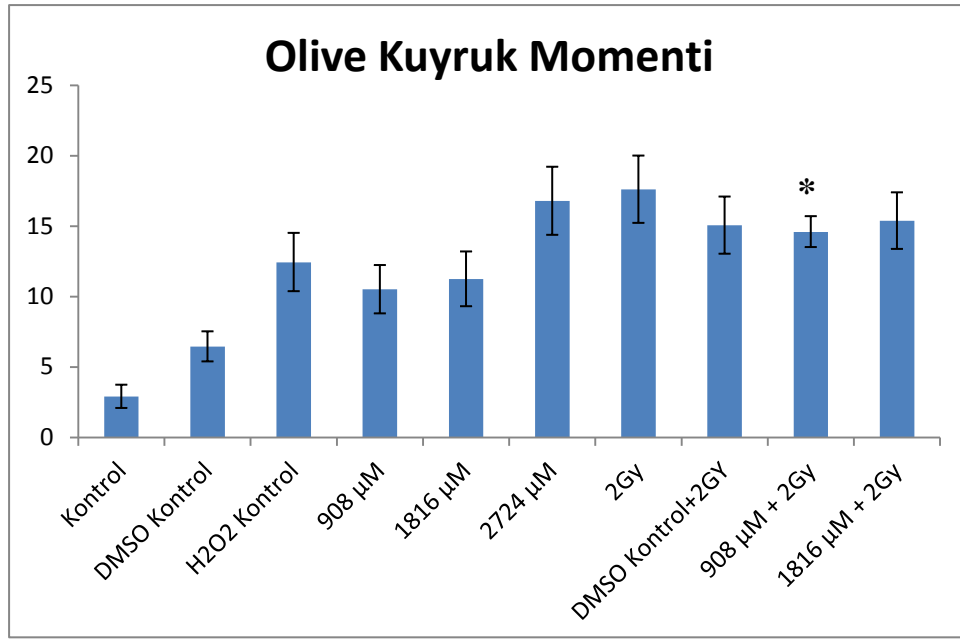
Şekil 4.7. CGA, 2 Gy radyasyon ve CGA+ radyasyon uygulanan Caco2 hücre hattında yapılan Komet testi sonucu Kuyruk % DNA değerlendirmesi. CGA; Klorojenik Asit, H₂O₂; Hidrojen Peroksit, DMSO; Dimetilsülfoksit (*p<0,001: 2 Gy radyasyon ile karşılaştırıldığında)

Kuyruk % DNA bakımından tüm gruplar kendi aralarında ANOVA testi ile karşılaştırılmış ve gruplar arası anlamlı farklılık olduğu belirlenmiştir. İkili karşılaştırmalar için Tamhane testi kullanılmıştır. Kontrol grubunda Kuyruk % DNA değeri % 8,74 ± 1,31, CGA'yı çözdüğümüz madde olan DMSO kontrol grubunda % 19,76 ± 2,47 olarak belirlenmiştir. 908 µM CGA dozunda % 17,61 ± 2,56 olarak belirlenen ortalama Kuyruk % DNA değeri DMSO kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p > 0,05). 1816 µM CGA dozunda % 20,03 ± 2,72 olarak belirlenen ortalama Kuyruk % DNA değeri DMSO kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p > 0,05). 2724 µM CGA dozunda % 28,27 ± 3,34 olarak belirlenen ortalama Kuyruk % DNA değeri DMSO kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p > 0,05). Genotoksisitesini bildiğimiz bir madde olan hidrojen peroksit (H₂O₂) kontrol grubunda Kuyruk % DNA değeri % 20,34 ± 2,76 olarak ölçülmüştür.

2 Gy radyasyon grubunda kuyruk % DNA 28,27 ± 2,93 ve radyasyon ile kombin solvent kontrol (DMSO Kontrol +2 Gy) grubunda 27,27 ± 2,82 olarak belirlenmiştir.

908 μM CGA \pm 2 Gy dozunda $22,15 \pm 1,55$ olarak belirlenen kuyruk % DNA değeri radyasyon dozu ile solvent kontrol dozun kombinasyonu olan DMSO Kontrol + 2 Gy ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,001$). 1816 μM CGA \pm 2 Gy dozunda $27,83 \pm 2,68$ olarak belirlenen kuyruk % DNA değeri radyasyon dozu ile solvent kontrol dozun kombinasyonu olan DMSO Kontrol + 2 Gy ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0,05$). 2724 μM CGA + 2 Gy dozunda hiçbir çekirdek görülemedi.

Komet testinden elde ettiğimiz bir diğer veride Olive Kuyruk Momentidir. Caco2 hücre hattında CGA muamelesi sonrasında yapılan Komet testinde ölçülen Olive Kuyruk Momenti grafiği Şekil 4.8’de gösterilmiştir.



Şekil 4.8. CGA uygulanan Caco2 hücre hattında yapılan komet testi sonucu Olive Kuyruk Momenti değerlerinin grafiği. CGA; Klorojenik Asit, H₂O₂; Hidrojen Peroksit, DMSO; Dimetilsülfoksit (* $p < 0,001$: 2 Gy radyasyon ile karşılaştırıldığında)

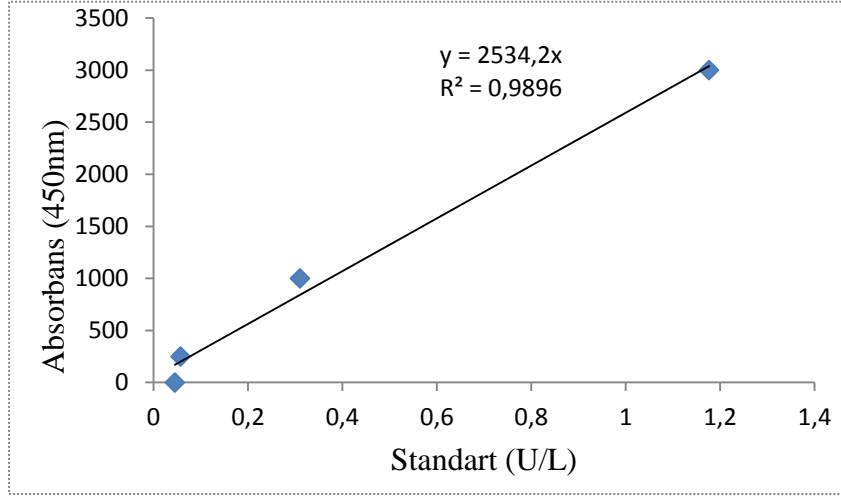
Olive Kuyruk Momenti bakımından tüm gruplar kendi aralarında ANOVA testi ile karşılaştırılmış ve gruplar arası anlamlı farklılık olduğu belirlenmiştir. İkili karşılaştırmalar için Tamhane testi kullanılmıştır. Kontrol grubunda Olive Kuyruk Momenti değeri $2,9 \pm 0,82$ CGA’yı çözdüğümüz madde olan DMSO kontrol grubunda

6,45 ± 1,06 olarak belirlenmiştir. 908 µM CGA dozunda 10,51 µm ± 1,71 olarak belirlenen ortalama Olive Kuyruk Momenti değeri DMSO kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p>0,05). 1816 µM CGA dozunda 11,24 ± 1,94 olarak belirlenen ortalama Olive Kuyruk Momenti değeri DMSO kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p<0,0001). 2724 µM CGA dozunda 16,79 ± 2,41 olarak belirlenen ortalama Olive Kuyruk Momenti değeri DMSO kontrol ile göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. (p<0,01). Genotoksisitesini bildiğimiz bir madde olan hidrojen peroksit (H₂O₂) kontrol grubunda Olive Kuyruk Momenti 12,44 ± 2,06 olarak ölçülmüştür.

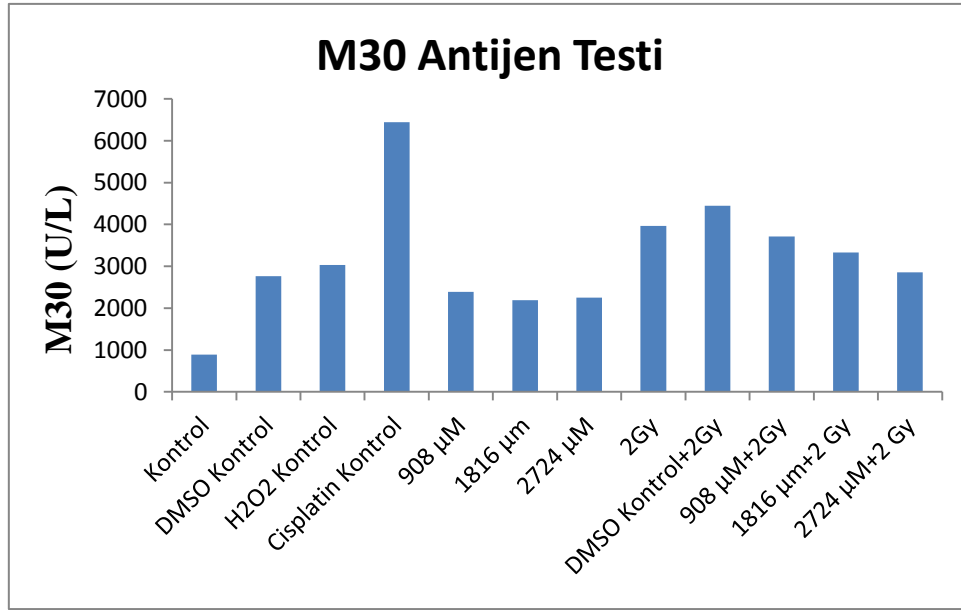
2 Gy radyasyon grubunda Olive Kuyruk Momenti 56,45 ± 5,94 ve radyasyon ile kombin solvent kontrol (DMSO Kontrol +2 Gy) grubunda 43,65 ± 4,55 olarak belirlenmiştir. 908 µM CGA ± 2 Gy dozunda 32,97 ± 4,19 olarak belirlenen Olive Kuyruk Momenti değeri radyasyon dozu ile solvent kontrol dozun kombinasyonu olan DMSO Kontrol + 2 Gy ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p < 0,0001). 1816 µM CGA ± 2 Gy dozunda 32,97 ± 4,19 olarak belirlenen Olive Kuyruk Momenti değeri radyasyon dozu ile solvent kontrol dozun kombinasyonu olan DMSO Kontrol + 2 Gy ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p >0,05). 2724 µM CGA + 2 Gy dozunda hiçbir çekirdek görülememiştir.

4.5. M30-Antijen Apoptoz Testi Bulguları

Tez kapsamında yapılan M30-Antijen testi sonuçlarının hesaplanması için öncelikle standart eğri grafiği hazırlandı (Şekil 4.9) ve ölçülen absorbanlar formül üzerinden değerlendirilerek M30 miktarları (U/L) cinsinden hesaplandı (Şekil 4.10)



Şekil 4.9. M30 Antijen standart eğri grafiği



Şekil 4.10. CGA aktivitesinin 24 saatte Caco2 hücre hatlarında kaspazla kırılmış sitokeratin 18 (M30-Antijen) üzerine etkisi

Şekil 4.10'da farklı dozlarda CGA'nın, radyasyon ve kombin dozlar ile apoptotik ajan olan cisplatin ve nekrotik ajan olan H2O2 ile 24 saat muamele edilen Caco2 hücre hatlarında apoptoz belirteci olan sitokeratin 18 üzerine olan etkisi gösterilmiştir. Caco2 hücrelerinde M30 seviyesinde cisplatin de 7-7,5 katlık bir artış meydana geldiği gösterilmiştir. Radyasyon ile kombin dozlarda ise, 908µM CGA+2Gy dozda M30

antijen seviyesinde 2 Gy kontrol grubuna göre bir değişiklik gözlenmezken, 1816µM CGA+2Gy ve 2724µM CGA+2Gy kombin gruplarında 1-1,5 katlık bir azalma meydana geldiği görölmektedir.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Çalışmada radyasyon ile Caco 2 kolon karsinom hücrelerinde oluşturulan apoptotik etkinin bitkisel fenolik bir bileşik olan klorojenik asit ile artıp artmadığı ve sonuç olarak klorojenik asitin radyoduyarlaştırıcı etkisi olup olmadığı belirlenmeye çalışılmıştır. Yapılan bu çalışmanın sonucunda klorojenik asitin kolon karsinom hücrelerinin yarısını öldürdüğü IC50 dozu ile bu dozun yarısı ve bir buçuk katı dozlarda sitotoksik ve genotoksik etki oluşturduğu XTT ve Komet testi ile belirlenmiştir. Klorojenik asitin bu dozları 2 Gy radyasyon ile kombinlenerek sitotoksik ve genotoksik etkisi olup olmadığı, ayrıca klorojenik asitin radyoduyarlaştırıcı etkisinin olup olmadığı da M30 testi ile incelenmiştir.

Klorojenik asit tek başına çalışmada belirlediğimiz IC50 dozu olan 1816 µM dozda kolon karsinom hücrelerinin yarısını öldürmüştür. 2 Gy radyasyon ile bu doz kombinlendiğinde tek başına 2 Gy radyasyona göre canlı hücrelerin oranı %8'e kadar düşmüştür. Benzer bir çalışmada Burgos-Moron ve ark. (2012) A549 akciğer kanseri hücre hattında klorojenik asitin IC50 dozunu 470 µM, MRC5 sağlıklı akciğer hücrelerinde ise 1970 µM olarak belirlemişlerdir. Aynı çalışmada, A549 akciğer kanser hücre hattı ile MRC5 akciğer fibroblast hücre hattı arasındaki sitotoksosite karşılaştırmasında ise A549 akciğer kanser hücre hattı hücrelerinin klorojenik asite daha duyarlı olduğu görülmüştür. En fazla duyarlılık ise K562 lösemi hücrelerinde belirlenmiştir. Bu çalışmadaki sonuçlarla karşılaştırıldığında çalışmamızda klorojenik asit IC50 dozunun yüksekliğine bakıldığında Caco2 kolon karsinom hücreleri için sitotoksik görünmemektedir. Jin ve ark. (2005) tarafından yapılan çalışmada, hepatoselüler karsinom hücre hattı (Hep3B) hücre hattında XTT ile yürütülen sitotoksosite çalışmasında 100 µg/mL klorojenik asitin herhangi bir sitotoksik etki göstermediği buna karşın 200 µg/mL klorojenik asitin canlılığı %12 düşürdüğü gösterilmiştir. klorojenik asitin bu yüksek dozu bizim çalışmamızda elde edilen IC50 den düşük görünmektedir. Yapılan bu çalışmalarda klorojenik asitin genel olarak kanser hücre hatlarında daha sitotoksik etki gösterdiği, ancak sağlıklı hücrelerde düşük sitotoksositeye sahip olduğu öne sürülmüştür. Bizim çalışmamızda kullandığımız Caco2 kolon kanser hücre hattı klorojenik asite duyarlı görünmemektedir. Bahsedilen çalışmaların bazılarında da yine klorojenik asit, Bcr-Abl+ hücre hattı olan K562

hücrelerinde düşük dozda yüksek sitotoksosite göstermiş ancak HSC-2 bazal hücre karsinoma HSG tükrük bezi tümör hücrelerinde daha yüksek dozlarda hücrelerin yarısını öldürebilmiştir, yani bu iki hücre hattı bizim çalışmamızdaki Caco2 ye benzer şekilde klorojenik asite daha az duyarlı görünmektedir (Bandyopadhyay ve ark. 2004).

Rakshit ve arkadaşlarının (2010) yaptığı bir çalışmada klorojenik asitin Bcr-Abl⁺ hücre hatları olan K562, KU812 and KCL-22 ve Bcr-Abl⁻ hücre hatları olan THP-1, U937 and MOLT-4 hücrelerinde sitotoksik, apoptotik ve hücre siklusu üzerindeki etkileri incelenmiştir. Pozitif hücrelerde apoptotik yolda fosforilasyonu bloke ederek etki gösterdiği belirtilen klorojenik asit 25 µg/ml gibi düşük dozlarda yüksek hücre öldürücü etkiye yol açmıştır. Negatif olan hücrelerde ise aynı yolağı etkilemediği için canlılıkta önemli bir azalma görülmemiştir.

Bitkisel radyoduyarlılaştırıcılarla ilgili literatürde pek çok *in vitro* ve *in vivo* çalışma bulunmaktadır. klorojenik asite benzer fenolik bileşikler olan kurkumin (Qiao ve ark. 2012) ve resveratrol (Rashid ve ark. 2011) gibi flavonoidler de radyoduyarlılaştırıcı ajan olarak *in vitro* kanser hücre hatlarında ve *in vivo* tümör yama çalışmalarında araştırılmıştır. Watanabe ve ark. (2007) yaptıkları çalışmada, apigenin ve radyasyon kombinasyonunun SQ5 insan akciğer skuamöz karsinom hücre hattı'nda radyoduyarlılığı arttırdığı belirtilmiştir.

Kotowski ve ark. (2011) tarafından yapılan bir çalışmada ise, sülforafan maddesinin radyoduyarlılık özelliği baş ve boyun skuamöz hücreli karsinom hücre hatları (SCC9, SCC25 ve FADU)'nda gösterilmiştir. Hücre hatlarına 2,5, 5 ve 10 µM sulforaphane ile birlikte 4 Gy radyasyon verilmiştir. Sonuçlar, radyasyon ve sülforafan kombine tedavisinin sadece radyasyon ya da sadece sülforafan uygulamasına göre hücrelerdeki yüzde canlılığı anlamlı oranda azalttığını göstermektedir.

Klorojenik asit ile yapılan genotoksosite çalışmasında (Glei ve ark. 2009), insan kolon kanser hücre hattı HT29 ve insan akciğer kanser hücre hattı HepG2'de komet testiyle klorojenik asitin kuyruk uzunluğunda anlamlı bir artışa neden olmadığı buna bağlı olarak ta klorojenik asidin genotoksisiteye neden olmadığı gösterilmiştir. Klorojenik

asitin genotoksitesisi ile ilgili Burgos-Moron ve ark. (2012) yaptıkları çalışma K562 lösemi kanser hücre hattı'nda kontrol grubuna göre yüksek dozlarda klorojenik asitin kuyruk uzunluğu ve kuyruk % DNA'sında anlamlı artışa neden olduğu gösterilmiştir.

Tez kapsamında yapılan sitotoksikite çalışmalarında elde ettiğimiz 908, 1816 ve 2724 µM dozların Caco2 hücre hattında yapılan komet testinde Kuyruk Uzunluğu sırasıyla %270, % 294 ve % 366'lık bir artış sağlamıştır. Kuyruk % DNA'da ise sırasıyla % 201, % 232 ve % 284 artış olurken Olive Kuyruk Momenti değerinde ise sırasıyla % 362, % 387 ve % 578'lik artış meydana gelmiştir. Bu sonuçlara göre klorojenik asit Caco2 hücre hatlarında ancak yüksek dozlarda sitotoksik etki oluşturmakta ve özellikle IC50 ve üzerindeki dozda komet testinde anlamlı genotoksik etki oluşturmaktadır. Klorojenik asit'in bu dozlarını 2 Gy radyasyon ile kombinelediğimizde en düşük klorojenik asit dozu radyasyonun oluşturduğu DNA hasarını bir miktar azaltıp radyokoruyucu etki yaparken IC50 dozunun radyasyonun oluşturduğu DNA hasarı üzerine herhangi bir etkisi olmadığı görülmektedir. En yüksek klorojenik asit dozu ile 2 Gy radyasyonu kombine uyguladığımızda ise canlı hücre elde edilemediğinden bu doz komet testinde değerlendirilememiştir.

Klorojenik asit ile yürütülen *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar incelendiğinde genel olarak radyasyonun sitotoksik ve genotoksik etkilerine karşı yapılan çalışmalarda klorojenik asidin radyokoruyucu etkisi gösterilmiştir. Bu çalışmalardan birisi Abraham ve ark. (1993) tarafından farelerde *in vivo* olarak gerçekleştirilmiştir. Deney farelerine oral yoldan klorojenik asit, kurkumin ve beta karoten uygulamasını takiben gamma radyasyona (1,15 Gy) maruz bırakılan tüm vücutta mikronükleuslu polikromatik eritrosit (MNPC) frekansının azaldığı gösterilmiştir. klorojenik asitin radyokoruyuculuğu ile ilgili bir başka çalışma, Çinkılıç ve ark. (2003) tarafından iki sağlıklı insandan elde edilen lenfositlerde klorojenik asitin radyasyonla kombine edilmesi sonucu protektif etkinin alkali komet ile gösterilmesine dayanır. Çalışmada donörlerden elde edilen lenfositlere 0,5µg, 1µg, 2µg ve 4µg dozlarında klorojenik asit ile 1 ve 2 Gy radyasyon uygulanmıştır. Deneyin sonucunda radyasyonun oluşturduğu DNA hasarının klorojenik asit tarafından %48,5 azaltıldığı alkali komet testi ile gösterilmiştir.

Çalışmamızdaki bulgular literatürle uyumlu olarak klorojenik asitin radyoduyarlılık etkisinden çok radyokoruyucu etkisi olduğunu göstermektedir.

Literatürde flavonoidlerin tek başına apoptoz üzerindeki etkisi ile ilgili pek çok çalışma yapılmıştır. Bunlardan Das ve ark. (2012) tarafından yapılan çalışmada bitkisel flavonoid olan apigeninin (5,7,4'-üçhidroksi flavon) akciğer kanseri hücrelerini (A375 ve A549) kontrol grubuna göre apoptoza daha fazla götürdüğü Annexin V-FITC/PI ikili boyaması yapılarak görülmüştür. Du ve ark. (2012) yaptıkları çalışmada ise, fenolik bir madde olan epigallokatesin gallat (EGCG)'ın insan kolon kanser hücre hattı (HCT-116 ve SW480) üzerindeki apoptotik etkisini Annexin V-FITC/PI ikili boyaması yapılarak araştırmışlardır. Aynı çalışmaya göre, 48 saat süreyle 60, 80 ve 100µM epigallokatesin gallat ile tedavi edilen hücrelerin kontrol grubuna göre erken apoptoza giden hücrelerin yüzdesini sırasıyla %14,1, %25 ve %23,5 arttırdığı belirlenmiştir. 80 ve 100µM epigallokatesin gallatın ise geç apoptozu indüklediği gösterilmiştir.

Klorojenik asit ile Yang ve ark.(2012) yapmış olduğu çalışmada ise, insan lösemi hücreleri (U937) üzerinde klorojenik asitin kaspaz-3 aktivitesini artırarak apoptozu indüklediği gösterilmiştir. Tez çalışmasında 24 saat süreyle 908, 1816 ve 2724 µM klorojenik asit ile muamele edilen insan kolon kanser hücre hattı (Caco2) hücrelerinin solvent kontrole göre sırasıyla 1,15, 1,26 ve 1,22 kat apoptoza gidişte azalma meydana geldiği gösterilmiştir.

Radyasyonla kombine fenolik bileşiklerde apoptoz ile ilgili literatürde sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Örnek olarak, Kasten-Pisola ve ark. (2007) yaptıkları çalışmada akciğer kanseri (A549 ve H1299), baş ve boyun sküamoz hücre karsinomu (FaDu), meme kanseri (MCF-7) ve prostat kanseri (Du145) hücre hatları üzerinde gossipol polifenolünün apoptoz etkisi DAPI boyama ile gösterilmiştir. Buna göre 4 µM gossipolün 6 Gy radyasyonla birlikte A549 ve HT1299 akciğer kanser hücre hatları üzerinde ışınlanmamış hücrelere göre apoptoza giden hücrelerin sayısında istatistiksel olarak anlamlı artış oluşturduğu gösterilmiştir. 2µM gossipol ile birlikte uygulanan 6 Gy radyasyon uygulandığında kaspaz-3/7 aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı düşüş gözlenmiştir. Tez çalışmasında sırasıyla 908, 1816 ve 2724 µM dozlarda klorojenik asit, 2 Gy radyasyonla kombine edilmiş ve tek başına uygulanan radyasyona göre apoptotik

etkiyi arttırıp arttırmadığı M30 Elisa apoptoz testi yardımıyla belirlenmeye çalışılmıştır. Çalışmanın sonucunda klorojenik asitin radyasyon ile arttırılan kaspazla kırılmış sitokeratin 18 enzim düzeylerini her üç dozda da azalttığı gözlenmiştir. Bu sonuçlara göre klorojenik asit sitokeratin 18 enzim yoluyla etkili hücre ölümü üzerinde etki göstermemektedir. Radyasyon ile kombine edildiğinde ise radyasyon ile oluşturulmuş apoptotik etkiyi de azaltıcı yönde etki göstermiştir. Buna göre klorojenik asitin caco2 hücrelerinde radyoduyarlılık etkisi göstermediği söylenebilir. Ayrıca klorojenik asitin sitotoksik etkisinin apoptotik yolaktan ziyade nekroz veya otofaji yolu ile olabileceği düşünülmektedir. Sonuç olarak klorojenik asit IC25 gibi düşük dozlarda antioksidan karakterine uyumlu bir şekilde radyokoruyucu özellik göstermekte, yüksek dozlarda ise sitotoksik ve DNA hasarı etkisi artmaktadır. Ancak klorojenik asidin sitotoksik etkisinin mekanizmasını belirlemek için daha ileri hücre ölüm mekanizma çalışmalarının yapılmasının gerektiğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

Abraham, S.K., Sarma, L., Kesavan, P.C. 1993. Protective effects of chlorogenic acid, curcumin and beta-carotene against gamma radiation-induced in vivo chromosomal damage. *Mutat Res*, 303 (3): 109-112.

Akpoyraz, M., Durak, İ. 1995. Serbest Radikallerin Biyolojik Etkileri. *Ankara Tıp Dergisi*, 48:253-262.

Alnemri, E.S., Livingston, D.J., Nicholson, D.W., Salvesen, G., Thornberry, N.A., Wong, W.W., Yuan, J. 1996. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell*. 87: 171.

Anonim, 2012. Radiotherapy: Yours questions answered. The Royal Marsden, yayın no: PI-0013-08, London.

Anonim, 2013. Understanding Radiation Therapy: A Guide for Patients and Families. American Cancer Society, <http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/003028-pdf>. -(Erişim Tarihi: 16/07/2013).

Avendano, C., Menendez, C. 2008. Medicinal Chemistry and Anticancer Drugs. Elsevier, Amsterdam, 383 s.

Ayares, D., Ganea, D., Cheturi, L., Campbell, C.R., Kucherlapati, R. 1987. Repair of single-stranded DNA nicks, gaps and loops in mammalian cells. *Mol. Cell Biol*, 7, 1656.

Bakhoun, S.F., Compton, D.A.J. 2012. Chromosomal instability and cancer: a complex relationship with therapeutic potential. *Clin Invest*, 122(4): 1138-43

Basu, A., Haldar, S. 1998. The relationship between Bcl-2, Bax ve p53: consequences for cell cycle progression and cell death. *Molecular Human Reproduction*, 4(12):1099-1109.

Başaran, N. 1999. Tıbbi Genetik. 7. Baskı, *Güneş ve Nobel Tıp Kitabevi*, Bursa, 400.

Boiteux S., Laval, J. 1983. Imidazole open ring 7-methylguanine: An inhibitor of DNA synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 110, 552.

Brahme, A. 2011. Accurate description of the cell survival and biological effect at low and high doses and LET's. *J Radiat Res*, 52(4): 389-407 .

Breckenridge, D.G., Germain, M., Mathai, J.P., Nguyen, M., Shore, G.C. 2003. Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways. *Oncogene*, 22: 8608–8618.

Breimer, L.H. 1988. Ionizing radiation-induced mutagenesis. *British Journal of Cancer*, 57:6-18.

Breimer, L.H., Lindahl, T. 1980. A DNA glycosylase from *Escherichia coli* that releases free urea from a polydeoxyribonucleotide containing fragments of base residues. *Nucleic Acids Res*, 8, 6199.

Breimer, L.H., Lindahl, T. 1984. DNA glycosylase activities for thymine residues damaged by ring saturation, fragmentation, or ring contraction are functions of endonuclease III in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem*, 259, 5543.

Breimer, L.H., Lindahl, T. 1985a. Thymine lesions produced by ionizing radiation in double-stranded DNA. *Biochemistry*, 24, 4018.

Breimer, L.H., Lindahl, T. 1985b. Enzymatic excision of DNA bases damaged by exposure to ionizing radiation or oxidizing agents. *Mutat. Res*, 150, 85.

Brenner, D.A., Smigocki, A.C., Camerini-Otero, R.D. 1986. Double strand gap repair results in homologous recombination in mouse L cells. *Proc. Natl Acad. Sci, USA.*, 83, 1762.

Brown, J.E., Khodr, H., Hider, R.C., Rice-Evans, C. 1998. Structural dependence of flavonoids interactions with Cu^{+2} ions: Implications for their antioxidant properties. *Biochem. J.*, 330: 1173-1178.

Burgos-Moron, E., Calderon-Montana, M.C., Orta, M.L., Pastor, N., Perez-Guerrero, C., Austin, C., Mateos, S., Lopez-Lazaro, M. 2012. The Coffee Constituent Chlorogenic Acid Induces Cellular DNA Damage and Formation of Topoisomerase I- and II-DNA Complexes in Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60: 7384-7391.

Burlacu, A. 2003. Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins. *J Cell Mol Med.* 7: 249-257.

Bülbül, M., Ş. 2003. Radyasyon. *Yüksek Lisans Tezi*, KÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Fizik Anabilim Dalı, Kars.

Castellano, G., Tena, J., Torrens F. 2011. Classification of phenolic compounds by chemical structural indicators and its relation to antioxidant properties of *Posidonia Oceanica* (L.) delile. *MATCH Commun. Math. Comput. Chem*, 67:231-250.

Cerutti, P.A. 1976. DNA base damage induced by ionizing radiation. In *Photochemistry and Photobiology of Nucleic Acids*, Wang, S.Y. (ed) vol. II, p. 375. Academic Press: New York.

Cheyrier, V. 2005. Polyphenols in foods are more complex than often thought. *AM J Clin Nutr*, 81:223S-9S.

Chinnaiyan, A.M. 1999. The apoptosome: heart and soul of the cell death machine. *Neoplasia*, 1: 5-15.

Chung, D.C., Rustgi, A.K. 1995. DNA mismatch repair and cancer. *Gastroenterology*. 109: 1685-1699.

Colussi, P.A., Kumar, S. 1999. Targeted disruption of caspase genes in mice: what they tell us about the functions of individual caspases in apoptosis. *Immunol Cell Biol*. 77: 58–63.

Conner, M., Smith, F.M. 1993. Essential Medical Genetics. Blackwell Scientific Publications, USA, 248.

Coşkun, A. 2011. İyonize Radyasyonun Biyolojik Etkileri. *SDÜ Teknik Bilimler Dergisi*, 1(2): 15-17

Cotelle, S., Ferard, J.F. 1999. Comet Assay in Genetic Ecotoxicology: A Review. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 34: 246-255.

Çinkiliç, N., Kahraman Çetintaş, S., Zorlu, T., Vatan, O., Yılmaz, D., Çavaş, T., Tunç, S., Özkan, L., Bilaloğlu, R. 2013. Radioprotection by two phenolic compounds: Chlorogenic and quinic acid, on X-ray induced DNA damage in human blood lymphocytes in vitro. *Food and Chemical Toxicology*, 53: 359-363.

Çolakoğulları, M. 2007. Bcl-2 proteininin apoptoz yolları üzerine etkisinin incelenmesi. Doktora Tezi, UÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı, Bursa.

Dai, J., Mumper, R.J. 2010. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules*, 15: 7313-7352.

Darmon, A.J., Nicholson, D.W., Bleackley, R.C. 1995. Activation of the apoptotic protease CPP32 by cytotoxic T-cell-derived granzyme B. *Nature*. 377: 446–448.

Das, S., Das, J., Samadder, A., Boujedaini, N., Khuda-Bukhsh, A.R. 2012. Apigenin-induced apoptosis in A375 and A549 cells through selective action and dysfunction of mitochondria. *Exp Biol Med*, 237: 1433-1448.

Datta, S.R., Dudek, H., Tao, X., Master, S., Fu, H., Gotoh, Y., Greenberg, M.E. 1997. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell*. 91: 231–241.

de Sotillo, D.V.R., Hadley, M. 2002. Chlorogenic acid modifies plasma and liver concentrations of: cholesterol, triacylglycerol, and minerals in (fa/fa) Zucker rats. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13(12): 717-726.

de Laat, W.L., Jaspers, N.G.J., Hoeijmakers, J.J.H. 1999. Molecular mechanism of nucleotide excision repair. *Genes Dev*, 13: 768-785

Debatin, K.M. 2004. Apoptosis pathways in cancer and cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother*. 53: 153–159

Del Rio, D., Stalmach, A., Calani, L., Crozier, A. 2010. Bioavailability of Coffee Chlorogenic Acids and Green Tea Flavan-3-ols. *Nutrients*, 2: 820-833.

Delibaş, N., Ramazan, Ö. 1995. Serbest Radikaller. *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 2(3): 11-17.

Depiro, J.T., Talbert, R.L., Yees, G.C., Matzke, G.R., Weels, B.G., Posey, L.M. 2005. Pharmacotherapy – A Pathophysiologic approach. MCGRAW-HILL Medical Publishing Division, 6th edition, 1158-1159.

Digweed, M. 2003. Response to environmental carcinogens in DNA-repair-deficient disorders. *Toxicology*. 193(1-2):111-24.

Dische, S., Fowler J.F., Saunders, M.I., Stratford, M.R.L., Anderson, P., Minchinton, A.I, Lee, M.E. 1980. A Drug for Improved Radiosensitization in Radiotherapy. *Br. J. Cancer*, 42: 153.

Dische, S., Saunders, M.I., Lee, M.E., Adams, G.E., Flockhart, I.R. 1977. Clinical testing of the radiosensitizer Ro 07-0582: Experience with multiple doses. *Br. J. Cancer*, 35:657.

Dixon, K., Koprass, E. 2004. Genetic alterations and DNA repair in human carcinogenesis. *Seminars in Cancer Biology*.14: 441-48.

Dizdaroğlu, M., Jaruga, P. 2012. Mechanisms of free radical-induced damage to DNA. *Free Radical Research*, 46(4): 382–419

Donald, W.H., Thorberry, N.A. 1997. Caspases: Killer proteases. *Trends in Biochemical Sciences*, 22(8):299-306.

Dörr, H., Meineke, V. 2011. Acute radiation syndrome caused by accidental radiation exposure - therapeutic principles. *BMC Med*, 9: 126.

Du, G.S., Zhang, Z., Wen, X.D., Yu, C., Calway, T., Yuan, C.S., Wang, C.Z. 2012. Epigallocatechin Gallate (EGCG) Is the Most Effective Cancer Chemopreventive Polyphenol in Green Tea. *Nutrients*, 4: 1679-1691.

Facino, R.M., Carini, M., Aldini, G., Berti, F., Rossoni, G., Bombardelli, E., Morazzoni, P. 1999. Diet enriched with procyanidins enhances antioxidant activity and reduces myocardial post-ischaemic damage in rats. *Life Sci*, 64: 627–642.

Fenech, M. 2010.The lymphocyte cytokinesis-block micronucleus cytome assay and its application in radiation biodosimetry. *Health Phys*, 98(2): 234-243.

Fenech, M., Crott, W.J. 2002. Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes-evidence for breakage-fusion-bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutation Research*, 504: 131-136.

Fiuza, S.M., Gomes, C., Teixeira, L.J., Girao da Cruz, M.T., Cordeiro, M.N., Milhazes, N., Borges, F., Marques, M.P.M. 2004. Phenolic acid derivatives with potential anticancer properties—a structure-activity relationship study. Part 1: Methyl, propyl and octyl esters of caffeic and gallic acids. *Bioorg Med Chem*, 12:3581–3589.

Fletcher, J.I., Huang, D.C. 2006. BH3-only proteins: orchestrating cell death. *Cell Death Differ*, 13: 1268–1271.

Folkes, L.K., O’Neill, P.O. 2013. DNA damage induced by nitric oxide during ionizing radiation is enhanced at replication. *Nitric Oxide*, 34: 47-55.

Fox, A.W., Fibio, FFPM., Keywood, C., Sheftell, F.D., Spierings, E.L.H., do, P.W. 2002. Comparison of Therapeutic Gain With Therapeutic Ratio for the Assessment of Selective 5HT_{1B/1D} Agonist Efficacy in Migraine. *Headache: The Journal of Head and Face Pain*, 42(7): 680-688.

Fresco, P., Borges, F., Diniz, C., Marques, M.P.M. 2006. New Insights on the Anticancer Properties of Dietary Polyphenols. *Medicinal Research Reviews*, 26(6): 747-766.

Fresco, P., Borges, F., Diniz, C., Marques, M.P.M. 2006. New insights on the anticancer properties of dietary polyphenols. *Medicinal Research Reviews*, 26(6): 747-766.

Friedberg, E. C. 2003. DNA damage and Repair. *Nature*, 23(421):436-440.

Friedberg, E. C., Walker G.C., Siede, W. 1995. DNA Repair and Mutagenesis. *ASM Press*, Washington. p.91-453

Frutos, P., Hervas, G., Giraldez, F.J., Mantecon, A.R. 2004. Tannins and ruminant nutrition. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 2(2): 191-202.

Fry, C.R., DeMott, S.M., Cosgrove, J.P., Begley, T.J., Samson, L.D., Dedon, P.C. 2006. The DNA-damage signature in *Saccharomyces cerevisiae* is associated with single-strand breaks in DNA. *BMC Genomics*, 7(313): 1471-2164.

Game, J.C., Zamb, T.J., Braun, R.J., Resnick, M.A., Roth, R.M. 1980. The role of radiation (rad) genes in meiotic recombination in yeast. *Genetics*, 94, 51.

Gardner, R.J.M., Sutherland, G.R. 1996. ‘Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling. Oxford, University Press, England, 557.

Gautam, B., Tanusree, B., Keshab, C.R., Swapan, M., Chhabinath, M., Bikas, C.P., Samir, B., Srabanti, B., Srabanti, R., Dilip, K.B., Utpal, C, Aditya, K., Santu, B. 2004. Chlorogenic acid inhibits Bcr-Abl tyrosine kinase and triggers p38 mitogen-activated protein kinase- dependent apoptosis in chronic myelogenous leukemic cells. *Blood*, 104: 2514-2522.

Girdhani, S., Bhosle, S.M., Thulsidas, S.A., Kumar, A., Mishra, K.P. 2005. Potential of radiosensitizing agents in cancer chemo-radiotherapy. *J Cancer Res Ther*, 1 (3): 129-131.

Glei, M., Kirmse, A., Habermann, N., Persin, C., Pool-Zobel, B.L. 2006. Bread Enriched With Green Coffee Extract Has Chemoprotective and Antigenotoxic Activities in Human Cells. *NUTRITION AND CANCER*, 56(2): 182-192.

Goldstein, S., Czapski, G., Cohen, H., Meyerstein, D. 1994. Free radicals induced peptide damage in the presence of transition metal ions. *Free Radical Biology and Medicine*, 17(1):11

Grace, S.G., Logan, B.A. 2000. Energy dissipation and radical scavenging by the plant phenylpropanoid pathway. *Philos Trans R Soc*, 355:1499-1510.

Gross, A. 2006. BID as a double agent in cell life and death. *Cell Cycle*. 5: 582–584.

Gupta, V.K., Kumria, R., Garg, M., Gupta, M. 1999. Recent Updates on Free Radicals Scavenging Flavonoids: An Overview. *Asian Journal of Plant Sciences*, 9: 108-117

Güleş, Ö., Eren, Ü. 2008. Apoptozun belirlenmesinde kullanılan yöntemler. *YYÜ Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2:73-78.

Haimovitz-Friedman, A., Kan, C.C., Ehleiter, D., Persaud, R.S., McLoughlin, M., Fuks, Z., Kolesnick, R.N. 1994. Ionizing radiation acts on cellular membranes to generate ceramide and initiate apoptosis. *J. Exp. Med.*180: 525–535.

Hall, E., Giaccia, A. 2006. Physics and Chemistry of Radiation Absorption: Radiobiology for the Radiologist, Editörler: McAllister, L. Bierig, L. Barren, K., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA, pp: 5-16.

Hall, E.D., Andrus, P.K. 2001. Measurement of oxygen radicals and lipid peroxidation in neural tissues. *Current protocols in neuroscience*. 7:17.

Halliwell, B., John, M.C. 1984. Gutteridge, Oxygen Toxicity, Oxygen Radicals, Transition Metals and Diseases. *Biochem. J.* 219,1

Halliwell, B. 1989. Free Radicals, Reactive Oxygen Species and Human Disease. *Br. J. Exp. Path.* 70:737.

Harborne, J.B. 1994. In *Flavonoids: Advances in Research Since 1986*; London, 589-618 s.

Harrison, L.B., Chadha, M., Hill, R.J., Hu, K., Shasha, D. 2002. Impact of Tumor Hypoxia and Anemia on Radiation Therapy Outcomes. *The Oncologist*, 7:492-508.

Haupt, S., Berger, M., Goldberg, Z., Haupt Y. 2003. Apoptosis – the p53 network. *Journal of Science*, 116:4077-4085.

Hawkins, A.J., Golding, S.E., Khalil, A., Valerie, K. 2011. DNA double-strand break - induced pro-survival signaling. *Radiother Oncol*, 101(1): 13-7.

Henner, W.D., Grunberg, S.M., Haseltine, W.A. 1982. Sites and structure of γ -irradiation-induced DNA strand breaks. *J. Biol. Chem*, 257, 11750.

Hoetelmans, R.W., Vahrmeijer, A.L., Kejizer, R., van de Velde , C.J., Mulder, G.J., van dierendonck, J.H. 2003. The role of various Bcl-2 domains in the anti-proliferative effect and modulation of cellular glutathione levels: a prominent role for the BH4 domain. *Cell Prolif*, 36: 35–44.

Huttermann, J., Kohnlein, W., Teoule, R. 1978. Effects of Ionizing Radiation on DNA, Springer-Verlag: Berlin.

Jin, U.H., Lee, J.Y., Kang, S.K., Kim, J.K., Park, W.H., Kim, J.G., Moon, S.K., Kim, C.H. 2005. A phenolic compound, 5-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid), is a new type and strong matrix metalloproteinase-9 inhibitor: Isolation and identification from methanol extract of *Euonymus alatus*. *Life Sciences*, 77: 2760-2769.

Joiner, M., Kogel, A., Steel A. 2009. Introduction: the significance of radiobiology and radiotherapy for cancer treatment: Basic Clinical Radiobiology, Ed: Joiner, M. Kogel, A., Hachette UK Company, London, UK, pp: 1-11.

Joskic, G., Stankovic, M., Radovanovic, S., Dragic, M. 2001. The use of cytochalasin block (CB) micronucleus test to identify clastogenic and antiproliferative action of tiazofurin. *Archive of Oncology*, 9(1):47-8.

Kaina, B. 2003. DNA damage-triggered apoptosis: critical role of DNA repair, double-strand breaks, cell proliferation and signaling. *Biochemical Pharmacology*, 66: 1547–1554.

Kannan, K., Jain, S.K. 2000. Oxidative stress and apoptosis. 2000. *Pathophysiology*. 7: 153–163.

Kapp, D.S., Smith, K.C. 1970. Repair of radiation-induced strandbreaks in *E. coli*. II. Effect of *rec* and *uvr* mutations on radiosensitivity, and repair of X-ray induced single-stranded breaks in DNA. *J. Bacteriol*, 103, 49.

Karran, P., Ormerod, M.G. 1973. Is the ability to repair damage to DNA related to the proliferative capacity of a cell? The rejoining of X-ray-produced strandbreaks. *Biochim. Biophys, Acta*, 299, 54

Kasper, G.J.L., Pieters, R., Veerman, A.J.P. 1999. Drug resistance in leukemia and lymphoma III. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 621.

- Kasten-Pisula, U., Windhorst, S., Dahm-Daphi, J., Mayr, G., Dikomey, E. 2007.** Radiosensitization of tumour cell lines by the polyphenol Gossypol results from depressed double-strand break repair and not from enhanced apoptosis. *Molecular radiobiology*, 83: 296-303.
- Kaya, T. 1997.** Radyasyon sağlığı ve Radyasyondan korunma: Temel Radyoloji Tekniği, Editörler: Tamer, A., Güneş & Nobel Kitabevi, Bursa, Türkiye, s.117-139.
- Kaya, A. 2002.** İyonize radyasyonun biyolojik etkileri. *Dicle Tıp Dergisi*. Elazığ. 29:3
- Kerr, J.F.R., Winterford, C.M., Harmon, B.V. 1994.** Apoptosis: Its Significance in Cancer and Cancer Therapy. *Cancer*, 73(8): 2013-2026.
- Kesari, S., Advani, S.J., Lawson, J.D., Kahle, T.K., Ng, K., Carter, B., Chen, C.C. 2011.** DNA Damage Response and repair: Insights into Strategies for Radiation Sensitization of Gliomas. *Future Oncology*, 7(11): 1335-1346.
- Kohlmeier, L., Simonsen, N., Mottus, K. 1995.** Dietary Modifiers of Carcinogenesis. *Environ Health Perspect*, 103(8):177-184.
- Kondo, K., Hirano, R., Matsumoto, A., Igarashi, O., Itakura, H. 1996.** Inhibition of LDL oxidation by cocoa. *Lancet*, 348: 1514–1518.
- Kotowski, U., Heiduscka, G., Brunner, M., Czembirek, C., Czembirek, C.E., Schmidt, R., Fahim, T., MD, D.T. 2011.** Radio-sensitization of head and neck cancer cells by the phytochemical agent sulfophane. *Strahlentherapie und Onkologie*, 187(9):575-580.
- Kozluca, O. 1993.** Serbest Radikaller ve Kanser. Kartal Eğitim ve Araştırma Klinikleri. İstanbul. 4: 1-4.
- Krasin, F., Hutchinson, F. 1977.** Repair of DNA double-strand breaks in *Escherichia coli*, which requires recA function and the presence of a duplicate genome. *J. Mol. Biol*, 116, 81.
- Kutluk, T., Kars, A. 1992.** Kanser Konusunda Genel Bilgiler. *Türk Kanser Araştırma ve Savaş Kurumu Yayınları*. Ankara. s. 97.
- Kuwana, T., Nwemeyer, D.D. 2003.** Bcl-2-family proteins and the role of mitochondria in apoptosis. *Current Opinion in Cell Biology*, 15:691-699.
- LaCasse, E.C., Baird, S., Korneluk, R.G, MacKenzie, A.E. 1998.** The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. *Oncogene*, 17: 3247–3259.
- Lawrence, T.S., Ten, H.R.K., Giaccia, A. 2008.** *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. 8th ed. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, 3200 s.

- Lehman, I., R. 1997.** Eukaryotic DNA Repair Minireview Series, *J. Biol. Chem.* 272: 23463.
- Li, J., Yuan, J. 2008.** Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene.* 27: 6194–6206.
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S., Wang, X., 1997.** Cytochrome c and dATP-Dependent Formation of Apaf-1/Caspase-9 Complex Initiates an Apoptotic Protease Cascade. *Cell.* 91: 479-489.
- Ljungman, M. 2008.** Targeting the DNA Damage Response in Cancer. *Chemical Reviews*, 109: 2929-2950
- Ljungquist, S., Lindahl, T. 1974.** A mammalian endonuclease specific for apurinic sites in double-stranded deoxyribonucleic acid. *J. Biol. Chem.*, 249, 1536.
- Lou, Z., Wang, H., Zhu, S., Ma, C., Wang, Z. 2011.** Antibacterial Activity and Mechanism of Action of Chlorogenic Acid. *Journal of Food Science*, 76:398-403.
- Love, S.W., Lin, A.W. 2000.** Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis*, 21(3): 485-495.
- Mates, J.M. 2000.** Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology*, 153: 83-104.
- Mattson, M.P., Chan, S.L. 2003.** Calcium orchestrates apoptosis. *Nat Cell Biol*, 5: 1041–1043.
- McMillan, T.J., Stell, G.G. 1997.** DNA damage and cell killing. *In: Basic Clinical Radiobiology*, 2(58).
- Meirow, D., Nugent, D. 2001.** The effects of radiotherapy and chemotherapy on female reproduction. *European Society of Human Reproduction and Embryology*, 7(6): 535-543.
- Meram, İ., Aktaran, Ş. 2002.** Serbest Radikallerin Biomoleküller Üzerine Etkileri. *Arşiv*; 11: 299.
- Mercan, U. 2004.** Toksikolojide Serbest Radikallerin Önemi. *YYU Vet Fak Derg*, 15(1-2): 91-96
- Michalak, A. 2005.** Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. *Polish J. of Environ. Stud*, 15(4): 523-530.
- Mondello, C., Scovassi, A.I. 2011.** Apoptosis: a way to maintain healthy individuals. *Subcell Biochem*, 50: 307–323.
- O’Kennedy, R., Lacy, A. 2004.** Studies on Coumarins and Coumarin-Related Compounds to Determine their Therapeutic Role in the Treatment of Cancer. *Current Pharmaceutical Design*, 10: 3797-3811.

- Özalpan, A. 2001.** Temel Radyobioloji, Haliç Üniversitesi, İstanbul, 353s.
- Özkan, A., Fışkın, K. 2004.** Serbest Oksijen Radikalleri, Karsinogenez ve Antioksidant Enzimler. *Türk Hematoloji Onkoloji Dergisi*, 14: 52 – 60
- Patel, B., 2002.** DNA Repair. Griffith University, <http://trishul.sci.gu.edu.au/courses/ss12bmi/repair.html>-(Erişim tarihi: 10.09.2012).
- Pereira, M.D., Valentao, P., Pereira, J.A., Andrade, P.B. 2009.** Phenolics: From chemistry to biology. *Molecules*, 14: 2202-2211.
- Pettus, B.J., Chalfant, C.E., Hannun, Y.A. 2002.** Ceramide in apoptosis: an overview and current perspectives. *Biochim Biophys Acta*. 1585: 114–125.
- Pietta, P.G., Simonetti, P. 1999.** In *Antioxidant Food Supplements in Human Health*; Academic Press, San Diego, 283-308 pp.
- Poli, G. 1993.** Liver damage due to free radicals. *British Medical Bulletin*, 49 (3):004.
- Qiao, Q., Jiang, Y., Li, G. 2012.** Curcumin improves the antitumor effect of X-ray irradiation by blocking the NF-κB pathway: an in-vitro study of lymphoma. *Anticancer Drugs*, 23(6): 597-605.
- Quillet-Mary, A., Jaffrezou, J.P., Mansat, V., Bordier, C., Naval, J., Laurent, G. 1997.** Implication of mitochondrial hydrogen peroxide generation in ceramide-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 272: 21388–21395.
- Rakshit, A., Liu, C., Sanli, R., Tsiani, E., Singh, G., Bristow, R.G., Dayes, I., Lukka, H., Wright, J., Tsakridis, T. 2011.** Resveratrol enhances prostate cancer cell response to ionizing radiation. Modulation of the AMPK, Akt and mTOR pathways. *Radiation Oncology*, 6(1):144.
- Resnick, M. A., Martin, P. 1976.** The repair of double-strand breaks in the nuclear DNA of *Saccharomyces cerevisiae* and its genetic control. *Mol. Cell Genet*, 143, 119.
- Richard, D., Keft, K., Barbe, U., Bausero, P., Visioli, F. 2008.** Polyunsaturated fatty acids as antioxidants. *Pharmacological Research*, 57(6): 451-455.
- Ryan, J.L. 2012.** Ionizing Radiation: The Good, the Bad, and the Ugly. *Journal of Investigative Dermatology*, 132: 985–993;
- Schleif, R. 1993.** Genetics and Molecular Biology. John Hopkins University Press Baltimore. p.62-66.
- Shirley, W.B. 1996.** Flavonoid biosynthesis: “new” functions for an “old” pathway. *Trends Plant Sci*, 31: 377-382.

Shirley, W.B. 2001. Flavonoid Biosynthesis. A Colorful Model for Genetics, Biochemistry, Cell Biology and Biotechnology. *Plant Physiology*, 126: 485-493.

Sieber, O., Heinimann, K., Tomlinson, I. 2005. Genomic stability and tumorigenesis. *Semin Cancer Biol.* 15(1):61-6.

Slee, E.A., Harte, T.M., Kluck, R.M., Wolf, B.B., Casiano, C.A., Newmeyer, D.D., Reed, C.J., Nicholson, D W., Alnemri, S.E., Green, D.R., Martin, S.J. 1999. Ordering the Cytochrome c initiated Caspase Cascade: Hierarchical Activation of Caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a Caspase-9 Ddependent Manner. *The Journal of Cell Biology.* 144(2): 281-292.

Sutherland, M.B., Bennett, V.P., Sidorkina, O. Laval, J. 1999. Clustered DNA damages induced in isolated DNA and in human cells by low doses of ionizing radiation. *Plant research products*, 97:103-108.

Teolue, R., Cadet, J. 1978. Radiation-induced degradation of the base component in DNA and related substances – final products. *Mol. Biol. Biochem. Biophys.*, 27:171-203.

Teoule, R., Bert, C., Bonicel, A. 1977. Thymine fragment damage retained in the DNA polynucleotides chain after gamma irradiation in aerated solution. *Radiat. Res.*, 72, 190.

Thompson, C.B. 1995. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, 267: 1456–1462.

Tice, R.R., Agurrel, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F. 2000. Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35: 206-221

Tsuda, H., Ohshima, Y., Nomoto, H., Fujita, K., Matsuda, E., Iigo, M., Takasuka, N., Moore, M.A. 2004. Cancer prevention by Natural Compounds. *Drug Metab. Pharmacokin*, 19(4): 245-263.

Tsujimoto, Y. 1998. Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria? *Genes Cells.*3: 697–707.

Tubiana, M., Dutreix, J., Wambersie, A. 2005. An Introduction to Radiobiology. Taylor and Francis Ltd, London. 270 p.

Ulukaya, E., Acilan, C., Yilmaz, Y. 2011. Apoptosis: why and how does it occur in biology. *Cell Biochemistry and Function*, 29: 468-480.

Ursini, F., Maiorino, M., Morazzoni, P., Roveri, A., Pifferi, G. 1994. A novel antioxidant flavonoids (IDB 1031) affecting molecular mechanisms of cellular activation. *Free Radic. Biol. Med.*, 16: 547-553.

- Urushibara, A., Shikazono, N., Watanabe, R., Fujii, K., O'Neill, P., Yokoya A. 2006.** DNA damage induced by the direct effect of he ion particles. *Radiat Prot Dosimetry*, 122(1-4):163-165.
- Wang, C., Youle, R.J. 2009.** The role of mitochondria in apoptosis. *Annu. Rev. Genet.*, 43: 95–118.
- Ward, J.F., Kuo, I. 1976.** Strand breaks, base release, and postirradiation changes in DNA y-irradiated in dilute O₂- saturated aqueous solution. *Radiat. Res*, 66, 485.
- Wardman, P. 2007.** Chemical Radiosensitizers for Use in Radiotherapy. *Clinical Oncology*. 19: 397-417.
- William, S. K., Micheal, R.C. 2002.** Genetik Kavramlar. Palme Yayıncılık, Ankara, 784.
- Williams, J.R., Zhang, Y., Zhou, H., Koch, J.C., Slater, M.J., Little, J.B. 2008.** Overview of Radiosensitivity of Human Tumor Cells to Low-Dose-Rate Irridiation. *International Journal of Radiaiton Oncology*, 72(3): 909-917.
- Yang, J.S., Liu, C.W., Weng, S.W., Ma, Y.S., Tang, N.Y., Wu, S.H., Ji, B.C., Ma, C.Y., Ko, Y.C., Funayama, S., Kuo, C.L. 2012.** Chlorogenic acid induces apoptotic cell death in U937 leukemia cells through caspase- and mitochondria-dependent pathways. *In vivo*, 26(6): 971-978.
- Yun, N., Kang, J.W., Lee, S.M. 2012.** Protective effects of chlorogenic acid against ischemia/reperfusion injury in rat liver: molecular evidence of its antioxidant and anti-inflammatory properties. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 23:1249-1255.
- Yochum, L., Kushi, L.H., Meyer, K., Folsom, A.R. 1999.** Dietary flavonoid intake and risk of cardiovascular disease in postmenopausal women. *Am. J. Epidemiol.*, 149: 943–949.
- Zeiger, E. 1998.** Chlorogenic Acid ve Caffeic Acid- Review of Toxicological Literature. Research Triangle Park, North Carolina, 120 s.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : ÖZGÜN TEKSOY

Doğum Yeri ve Tarihi : BURSA/TÜRKİYE – 26.09.1987

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Bursa Süleyman Çelebi Lisesi / 2001 – 2004

Lisans : PAÜ. F.E.F. Biyoloji Bölümü / 2005 – 2010

Yüksek Lisans : U.Ü. F.B.E. Biyoloji A.B.D. Genel Biyoloji B.D./ 2011 – 2013