T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
RADYASYON BİYOLOJİSİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

Tez Yöneticileri
1. Dr. Öğr. Üyesi Kıymet TABAKÇIOĞLU
2. Prof. Dr. Vuslat YÜRÜT ÇALOĞLU

WR-1065 VE ASETİL SALİSİLİK ASİTİN RADYOPROTEKTİF ETKİNLİĞİNİN MİKRONUKLEUS YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI

(Yüksek Lisans Tezi)

Aydoğan YALÇIN

EDİRNE-2021

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
RADYASYON BİYOLOJİSİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

Tez Yöneticileri
1. Dr. Öğr. Üyesi Kıymet TABAKÇIOĞLU
2. Prof. Dr. Vuslat YÜRÜT ÇALOĞLU

WR-1065 VE ASETİL SALİSİLİK ASİTİN RADYOPROTEKTİF ETKİNLİĞİNİN MİKRONUKLEUS YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI

(Yüksek Lisans Tezi)

Aydoğan YALÇIN

Destekleyen kurum: TÜBAP (Proje No: 2019/119)

Tez No:

EDİRNE-2021

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimi ve tez çalışmasının her bir aşamasında değerli bilgilerini benimle paylaşan, her zaman destek olan danışman hocalarım Dr. Öğr. Üyesi. Kıymet TABAKÇIOĞLU'na, Prof. Dr. Vuslat YÜRÜT ÇALOĞLU'na, Prof. Dr. M. Cem UZAL'a, değerli hocalarım Prof. Dr. Zafer KOÇAK'a, Prof. Dr. H. Murat ÇALOĞLU'na, Prof. Dr. Mert SAYNAK'a, Doç. Dr. Ruşen COŞAR'a, Prof.Dr. İmran KURT ÖMÜRLÜ'ye, çalışma süresince her türlü imkânı sağlayan Tıbbi Biyoloji AD hocalarına, tüm çalışma arkadaşlarıma, aileme ve projemizi destekleyen TÜBAP başkanlığına sonsuz teşekkürlerimi sunarım. (Bu çalışma Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje numarası: 2019/119)

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ 1

GENEL BİLGİLER 3

- **RADYASYON** 3
- **RADYASYONUN BİYOLOJİK ETKİLERİ** 7
- **RADYASYONUN DNA ÜZERİNE ETKİSİ** 13
- **ANTİOKSİDANLAR** 15
- **RADYOPROTEKTÖRLER** 16
- **AMİFOSTİN ve WR-1065** 18
- **ASETİL SALİSİLİK ASİT (ASA)** 19
- **RADYASYON DOZİMETRİSİ** 21
- **BİYOLOJİK DOZİMETRİ** 23

GEREÇ VE YÖNTEMLER 27

BULGULAR 36

TARTIŞMA 41

SONUÇLAR 46

ÖZET 47

SUMMARY 48

KAYNAKLAR 50

TABLOLAR VE ŞEKİLLER LİSTESİ 58

ÖZGEÇMİŞ 60

EKLER

SİMGE VE KISALTMALAR

α **:** Alfa Parçacığı

AA **:** Araşidonik Asit

Ar **:** Argon

ARS **:** Akut Radyasyon Sendromu

ASA **:** Asetil Salisilik Asit

β **:** Beta Parçacığı

$B^{\bullet}$ **:** Biyolojik Radikal

BH **:** Biyolojik Moleküller

BN **:** Binükleat

BT **:** Bilgisayarlı Tomografi

DNA **:** Deoksiribo Nükleik Asit

C **:** Karbon

C_{max} **:** Maksimum Konsantrasyon

Co-60 **:** Kobalt 60

COX **:** Siklooksijenaz

Cs-137 **:** Sezyum

Cyt-B **:** Sitokalazin-B

DMSO **:** Dimetil Sülfoksit

e^- **:** Serbest Elektron

e^-_{aq} **:** Hidrat Elektron

EMD **:** Elektromanyetik Dalga

FDA **:** Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi

FBS **:** Fetal Bovin Serum

FISH : Fluoresans İn-Situ Hibridizasyon

γ : Gamma Işınları

GSH : Glutatyon

GSH-Px : Glutatyon Peroksidaz

Gy : Gray

H^+ : Serbest Proton (Hidrojen)

$H^\bullet$: Hidrojen Radikali

$HO_2^\bullet$: Hidro Peroksit Radikali

H_2O_2 : Hidrojen Peroksit

I-125, I-131 : İyot

Ir-192 : İridyum

İR : Kızılötesi

iv : İntravenöz

LET : Lineer Enerji Transferi

LİNAK : Lineer Akseleratör

LD : Letal Doz

kv : Kilo Volt

keV : Kilo elektron Volt

MDA : Malondialdehit

MeV : Milyon elektron Volt

MN : Mikronukleus

MPO : Myeloperoksidaz

MU : Monitör Ünite

MV : Milyon Volt

N : Azot

Ne : Neon

NO : Nitrik Oksit

NSAİ : Nonsteroidal Antienflamatuvar İlaç

$O_2^\bullet$: Süperoksit

$OH^\bullet$: Hidroksil Radikali

PG : Prostaglandin

PHA- L : Fitohemaglütinin

RBE : Rölatif Biyolojik Etkinlik

RNA **:** Ribo Nükleik Asit

rpm **:** Revolutions per minute (Dakika / devir sayısı)

SD **:** Standart deviation (Standart sapma)

SH **:** Sülfhidril

SNR **:** Serbest Nitrit Radikalleri

SOR **:** Serbest Oksijen Radikalleri

SR **:** Serbest Radikaller

Sv **:** Sievert

$T_{1/2\alpha}$ **:** Dağılım Yarılanma Ömrü

$T_{1/2\beta}$ **:** Eliminasyon (Atılım) Yarılanma Ömrü

TPS **:** Tedavi Planlama Sistemi

TÜTF-BAEK **:** Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu

UV **:** Mor Ötesi

WR-1065 **:** Amifostin Metaboliti

WR-2721 **:** Amifostin (Ticari adı Ethyol®)

GİRİŞ VE AMAÇ

Tüm canlılar doğal ve yapay yollardan radyasyona maruz kalmaktadırlar. Doğal radyasyon kaynakları kozmik ışınlar ve yeryüzü kaynaklı ışımalardır. Yapay kaynaklar ise endüstride, tarımda, elektrik üretiminde ve tıpta yaygın olarak kullanılan radyoaktif kaynaklar ve radyoaktif ışın üreten cihazlardır (1). Yapay kaynaklardan radyasyon alımı kontrol altında tutulmaktadır ancak nükleer silahlar ya da nükleer santrallerdeki kazalar nedeniyle çok sayıda insan aynı anda iyonizan radyasyonun hayatı tehdit edici etkilerine maruz kalabilmektedir. (Çernobil, Rusya-1986, Fukuşima, Japonya-2011) (2).

Radyasyon enerjisi, elektromanyetik dalgalar (EMD) veya parçacıklar halinde yayılan bir enerji türüdür. Radyasyon enerjisinin madde tarafından absorblanması sonucu maddede (Atom ve moleküllerde) ısı artışı, eksitasyon (Uyarılma) ve iyonizasyon meydana gelirken, bu fiziksel etkiler canlıdaki hücrelerin organik moleküllerinde biyokimyasal reaksiyonlara neden olur. X, γ (Gamma) ve elektron ışınları gibi iyonizasyon yapan (İyonizan) radyasyonların düşük dozlarda dahi organizmada hasarlara yol açan en önemli etkisi, hücre DNA'sı üzerinde olmaktadır. Direkt olarak ve dolaylı yoldan (İyonlaşan diğer atom ve moleküller üzerinden) etkilenen DNA'da kırıklar oluşabilmekte, onarılamayarak biriken bu hasarlar mitozun durmasına, hücre ölümüne yol açabilmektedir. Sağkalan hücrelerde oluşan mutasyonlar ise, hücre çoğalması ile nesilden nesile aktarılarak uzun vadede kansere neden olabilmektedir. (3, 4).

Radyasyonun hasar verici etkilerini azaltan ajanların (Radyoprotektörlerin) araştırılması, nükleer kazalar veya işleri nedeniyle iyonizan radyasyona maruz kalanlar için hayati öneme haizdir. En bilinen radyoprotektör ajan Amifostindir. Uzay çalışmalarında

geliştirilen ve radyoterapi veya kemoterapi uygulanan hastalarda normal dokuları korumak için radyoprotektör olarak kullanılmış olan WR-2721 (Amifostin) molekülü bir tiyol bileşiğidir (1, 5). Radyasyondan koruyucu etkisini, metabolize olarak (WR-1065'e dönüşür) iyonizan radyasyona maruziyet sırasında hücre içinde oluşan serbest radikalleri (SR) etkisiz hale getirerek gösterir (6). WR-1065'in memeli hücrelerinde radyasyona bağlı genetik hasarı (DNA zincirindeki kırılmaları, kromozomal anomalileri ve mutasyon gelişimini) önleyebildiği gösterilmiştir (7-13).

Asetil salisilik asit (ASA) ise siklooksijenaz enzim inhibisyonu yapan nonsteroidal antienflamatuvar (NSAİ) ilaç grubundandır. ASA gibi diğer bazı NSAİ ajanlar (Örn. Mefenamik asit, indometazin ve ketoprofen) serbest oksijen radikallerini (SOR) ve serbest nitrit radikallerini (SNR) direkt olarak ve doza bağlı bir şekilde etkisiz hale getirebildiği gösterilmiştir (14, 15). ASA'nın ayrıca antioksidan enzim aktivitesini arttırdığı da bildirilmiştir (16). ASA'nın radyasyondan koruyucu etkisini çeşitli hücre modellerinde ve organizma boyutunda araştıran çalışmalar mevcuttur (16-22). Ancak bu çalışmalar arasında MN yöntemi ile biyodozimetik açıdan yapılan bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Bu çalışmanın amacı, ASA'nın iyonizan radyasyonun oluşturduğu DNA hasarını engelleyip engellemediğini, insan lenfosit hücre kültüründe mikronukleus (MN) yöntemi ile araştırmak ve radyoprotektif etkinliği kanıtlanmış olan WR-1065 ajanının etkinliği ile karşılaştırmaktır. ASA'nın böyle bir radyoprotektif etkinliğe sahip olmasının kanıtlanması durumunda, tıbbı açıdan uygun hastalarda, maliyeti yüksek olan ve iv uygulama gerektiren Amifostin'e alternatif olarak, oral yoldan verilebilecek düşük maliyetli bir ajan olarak değerlendirilebilecektir. Radyasyon çalışanlarında da proflaktik olarak kullanımı gündeme gelebilecektir.

GENEL BİLGİLER

RADYASYON

Alman fizikçi Wilhelm Conrad Röntgen'in 1895 yılında kendi adıyla anılan X- ışınlarını keşfi, insanların iyonizan radyasyonlarla tanışmasının başlangıcı olarak kabul edilir. Zamanla X, γ ve elektron ışınları gibi maddede iyonizasyon yapan radyasyonların, canlı organizmalar üzerinde zararlı etkilere yol açtığı anlaşılmıştır (23). Günümüzde insanlar doğal radyasyonun yanında, kullanılan modern cihazlar nedeniyle yapay radyasyonlara da maruz kalmaktadırlar (Şekil 1). Endüstride (Elektrik üretimi), tarımda (Gıdaların bozulmadan saklanabilmesi için kimyasal kullanılmadan ışınlanarak sterilize edilmesi), tıpta görüntülemede ve tedavide (Radyoloji, radyoterapi, nükleer tıp uygulamaları) sağladığı yararların vazgeçilemez olması, insan sağlığı üzerindeki olumsuz etkilerine rağmen iyonizan radyasyonların kontrollü olarak kullanılmalarını zorunlu kılmıştır (1).

Planlı maruziyetlerde, alınacak radyasyon miktarı, hangi vücut bölgesine uygulanacağı, ışının hangi doz hızında verileceği, oluşacak biyolojik etkinin kontrolünü sağlarken, nükleer kazalarda, iyonizan radyasyona maruz kalanlarda radyasyonun özelliklerine bağlı olarak (Örn. Radyasyonun tipi, enerjisi, doz hızı, alınan toplam doz, ışınlanan vücut hacmi vb.) ağır doku hasarları meydana gelebilmekte, radyasyona bağlı sendromlar kısa dönemde ölümlere yol açabilmekte, sağkalanlarda ise radyasyon nedeniyle kalıcı genetik hasarlar oluşabilmekte, uzun dönemde kanserler gelişebilmektedir (1, 23).

Radyasyonun yol açtığı iyonizasyon, DNA zincirinde kırıklar oluşturmakta, buna bağlı olarak hücre bölünmesi durmakta ve programlı hücre ölümü gerçekleşebilmektedir. Sağkalan hücrelerde DNA hasarlarının doğru olarak onarılamadığı durumlarda meydana gelen

mutasyonlar ise, hücre bölünmeleri sonucunda nesiller boyu taşınabilmekte ve uzun vadede kanserleşmeye neden olabilmektedir (1, 24).



Şekil 1. Dünya üzerindeki radyasyon kaynakları (25)

Bir kaynaktan spesifik bir enerji yayınlanması olarak tanımlanabilecek radyasyonun iki türü vardır: Biri EMD, bir başka deyişle fotonlar, diğeri ise partikül radyasyonları (Atom altı parçacıklar ve ağır iyonlar). Bu radyasyonların taşıdığı enerjinin, etkileştiği madde tarafından fiziksel olarak absorblanması sonucu temelde 3 fiziksel olay ortaya çıkar: Atom ve moleküllerde ısı artışı (1), elektronlarda eksitasyon (Uyarılma) (2), iyonizasyon (3). İyonizan radyasyonları non-iyonizan radyasyonlardan ayıran en önemli özellik, EMD'ler için enerjilerinin 10 eV'tan yüksek olması ve bu sayede etkileştikleri atom ve moleküllerden elektron kopartarak iyonlaşma yapmalarıdır. Bu yolla kimyasal olarak reaktif hale gelen hücre içi atom ve moleküller zincirleme biyokimyasal reaksiyonlara yol açarak hücrede hasara neden olmaktadırlar (26, 27).

İyonizasyonun tanımı, bir atom veya molekülden bir veya birkaç elektronun kopmasıdır (27). Bu olay sonucunda artık atom çekirdeğindeki proton sayısı, yörüngelerdeki elektron sayısı ile eşit değildir yani atom elektrik yükü olarak nötr değildir ve atom taşıdığı pozitif veya negatif elektrik yük nedeniyle iyon olarak adlandırılır (Örn. Na^{+}, Cl^{-}, Ca^{++}, Fe^{+++}). Dış yörüngesinde eşleşmemiş yani bekar elektron bulunan atom ve moleküller SR olarak adlandırılırlar (Simgesi "•"). İyonlar ve SR'ler stabil (Nötr olan ve dış yörünge elektronları eşli olan) organik moleküllerle (Örn. DNA) kolayca kimyasal reaksiyonlara girebilirler, dolayısıyla moleküler yapılarında bozulmalara yol açarlar.

Uyarılma etkisi ise, elektronunun atomda bulunduğu yörüngeden daha yüksek enerji düzeyindeki (Yani daha dıştaki) bir yörüngeye geçmesidir ki, bu uyarılmış elektronlar (Tıpkı

bekar elektronlar gibi) bulunduğu atom veya molekülün kolayca kimyasal reaksiyona girmesini sağlar. İyonizasyon yapacak kadar yüksek enerjide olmayıp ancak uyarılma yapacak enerjide olan UV ışınları, derine nüfuz edemeseler de vücut yüzeyindeki hücrelerde DNA hasarına neden olabilirler (3, 4).

EMD'ler iyonizan ve non-iyonizan olmak üzere (Uzun dalga boyundan kısa dalga boyuna, dolayısıyla düşük frekanstan yüksek frekansa yani düşük enerjiden yüksek enerjiye doğru) aşağıdaki gibi sıralanır (Şekil 2) (27).

1. Non-iyonizan EMD'ler:
   - Radyo dalgaları
   - Mikrodalgalar
   - Kızılötesi (İnfrared/İR) ışınlar
   - Görünür ışık
   - Mor ötesi (Ultraviyole/UV) ışınları
2. İyonizan EMD'ler:
   - X-ışınları
   - γ ışınları

İyonizan EMD'lerin genel özellikleri şöyledir:

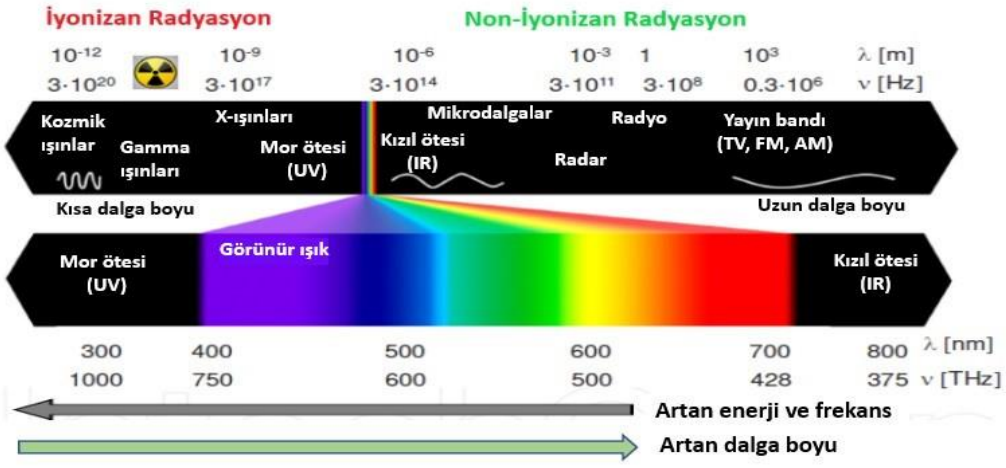
1. **X-ışınları:** Radyoaktif bir çekirdekten yayınlanan radyasyonlar (Örn. γ ışını) gibi sürekli yayınlanmazlar. "Karakteristik X-ışınları" atomun iç yörünge elektronlarının birisinin kopması halinde yayınlanırken, röntgen cihazı ya da parçacık hızlandırıcı cihazlarda X-ışınları, bir filamentten ısıtılarak serbestlenen elektronların elektrik ve manyetik alanda hızlandırılarak (Kinetik enerji kazandırılarak) bir hedefe çarptırılmasıyla elde edilmektedir. X-ışınları, γ ışınları gibi monoenerjetik değildir ve istenilen sürece üretilirler.
2. **γ (Gamma) ışınları:** Radyoaktif maddelerin atom çekirdeklerinden, zaman içinde azalmakla birlikte durdurulamaz bir şekilde sürekli yayınlanırlar ve her radyonüklid/radyoizotop için spesifik bir enerjileri vardır (Monoenerjetiktirler).

Partiküler radyasyonlarda iyonizan EMD'ler (X ve γ ışınları) gibi iyonizandır ve atom ile etkileştiğinde elektron kopartabilir. Bu hızlı parçacıkların kaynağı radyoaktif atom çekirdeği olabildiği gibi, günümüzde parçacık hızlandırıcı cihazlardan da (Linak ve siklotronlar) çok daha

yüksek enerjilerde, eksternal radyoterapide olduğu gibi dokuya dışarıdan uygulandığında daha yüksek erişim mesafesinde, daha penetran olacak şekilde elde edilebilmektedir.

Parçacık tipi radyasyonlar ve özelikleri aşağıda verilmiştir:

1. **α (Alfa) parçacıkları:** Radyoaktif atom çekirdeğinden fırlatılan iki nötron ve iki protondan oluşur ve bir helyum atomunun çekirdeği ile aynıdır. Diğer atom altı parçacıklarından daha ağır olan ve elektron veya protondan daha fazla (+2) elektrik yükü taşıyan α parçacığı, çekirdekten fırlatıldıktan sonraki kısa erişim mesafesinde diğer atomaltı parçacık radyasyonlarından ve fotonlardan daha yüksek oranda iyonlaşma yapar. Bu sayede DNA'da ölümcül hasarlara yol açan çift zincir kırıklarına, daha yüksek oranda neden olur.
2. **β (Beta) parçacıkları:** β parçacıkları, radyoaktif bir atomun çekirdeğinden fırlatılan elektron ya da pozitronlardır.
3. **Nötronlar:** Atom çekirdeğinde protonlarla birlikte bulunur ve protonların birbirlerini manyetik olarak itmeleri sonucu çekirdeğin parçalanmasını engelleyen kütle çekim ve nükleer çekimi sağlarlar. Nötronun kütlesi protona eşittir, elektrondan ise 1856 kat fazladır. Ancak elektriksel olarak yüksüz parçacıklardır.
4. **Protonlar:** Atom çekirdeğinde bulunan ve elektriksel olarak pozitif (+) yüklü parçacıklardır.
5. **Ağır iyonlar:** Elektronlarından yoksun Azot (N), Karbon (C), Neon (Ne), Argon (Ar) gibi (α parçacığından daha ağır) atom çekirdekleridir. Doğal olarak hepsi pozitif yüklüdür. (3, 27-30).



Şekil 2. Elektromanyetik spektrum (31)

RADYASYONUN BİYOLOJİK ETKİLERİ

Radyasyonun biyolojik bir etki oluşturabilmesi için, taşıdığı enerjinin içinden geçtiği canlının doku ve hücre içi yapılar tarafından absorbe edilmesi gerekmektedir. Absorbe edilen bu enerjinin yarattığı biyolojik etkiler, doz hızı, toplam doz, LET ve toplam doz fraksiyonasyonu gibi faktörler tarafından belirlenir (32).

Dozla ilgili durumlar uygulama esnasında ayarlanabilirken LET uygulanan radyasyonun tipine göre özgünlük gösterir. Lineer Enerji Transferi (LET), iyonizan radyasyonun izlediği yol boyunca birim mesafede, içinden geçtiği maddeye transfer ettiği enerji miktarına denir. LET birimi keV/µm'dir. Radyasyonun LET değeri ile, hücre seviyesinde (En önemlisi DNA'da) oluşan biyolojik etki arasında doğru bir orantı bulunmaktadır (35).

Farklı radyasyon tiplerinin LET değerleri aşağıda verilmiştir. (4, 33, 34) (Tablo 1).

Tablo 1. İyonlaştırıcı radyasyon tiplerine göre LET değerleri

Radyasyon Tipi	LET (keV/µm)
γ ışınları (1,25 MV/Co-60)	0,2
X-ışınları (250 kV)	2
X-ışınları (6 MV)	~ 0,2
Elektron ışınları (9 MeV)	~ 0,2
Protonlar (10 MeV)	4,7
^{3}H β^{-} partikülleri (Maks.18,6 keV)	5,7
Nötronlar (14 MeV)	12
Karbon iyonları (100 MeV)	160
α partikülleri (2,5 MeV)	166
Demir iyonları (2 GeV)	1000

keV/kV: kilo elektron volt/kilovolt**; MeV/MV:** milyon elektron volt/milyon volt**; GeV:** giga elektron volt.

İyonizan radyasyonun canlı üzerindeki etkisi direkt ya da dolaylı (İndirekt) yoldan meydana gelmektedir.

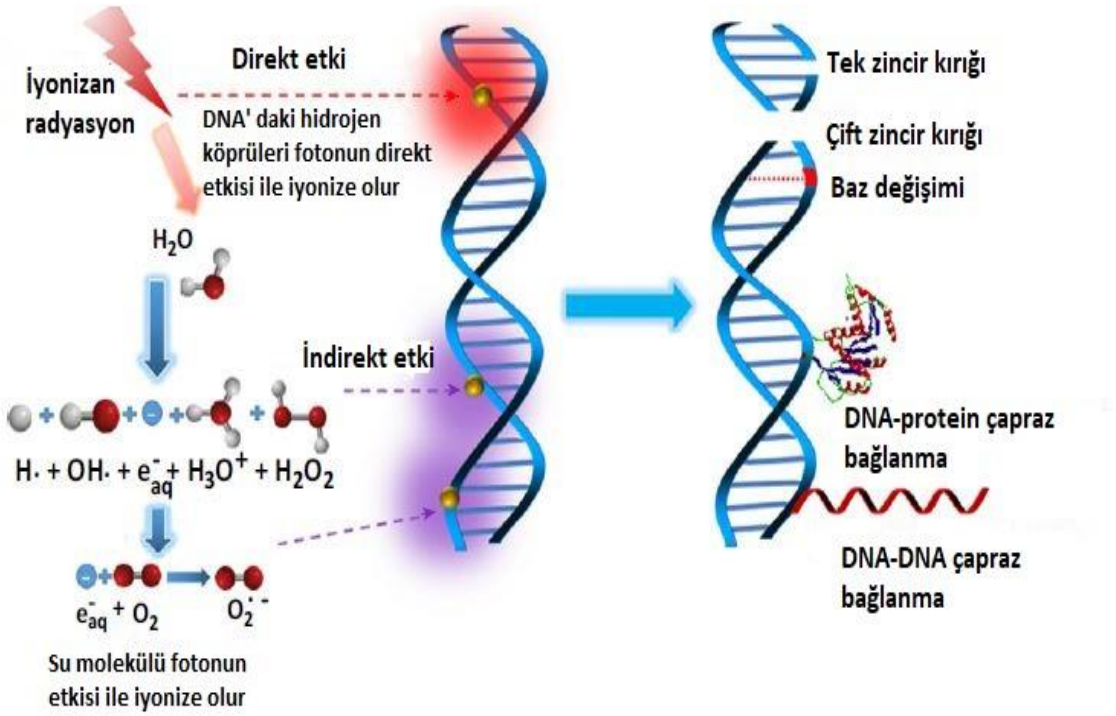
Direkt Etki

İyonizan radyasyonun hücre membranı, organeller, sitoplazmadaki enzimler ve hücre çekirdeğindeki DNA, RNA gibi biyolojik/organik moleküller ile direkt olarak etkileşmesi sonucu oluşan değişikliklerdir. Radyasyonla etkileşime giren organik molekül ve atomlarda, iyonizasyon ve uyarılmalar olur. Yüksek LET'li radyasyonun DNA ile etkileşmesinde baskın

yol direkt etkidir. X, γ ve elektron ışınları gibi düşük LET'li radyasyonların DNA ile direkt etkileşim oranı ise %5-15 arasındadır (3, 35, 36).

İndirekt Etki

Basamaklı olan bu etki mekanizmasında ilk etap, iyonizan radyasyon enerjisinin ortam molekülleri (Büyük oranda su molekülleri) tarafından absorblanmasıdır. İyonlaşan su molekülleri hidroksil kökü ($OH^{\bullet}$) gibi SOR'ların, serbest protonların (H^{+}) ve hidrojen peroksitin (H_2O_2) oluşmasına yol açar. Kimyasal olarak çok reaktif olan tüm bu moleküller **SR** olarak adlandırılırlar. Oluşan SR'ler, reaksiyona girdikleri hücredeki diğer organik molekülleri de biyolojik radikallere ($B^{\bullet}$) dönüştürürler. DNA molekülünün tüm bu basamaklarda oluşan radikallerin herhangi biriyle kimyasal etkileşime girmesi sonucu DNA'da indirekt etki oluşur (35, 36) (Şekil 3). X ve γ ışınları ve elektronlar gibi düşük LET'li radyasyonların indirekt etkisi sonucu oluşan bu SR'ler lethal DNA hasarının yaklaşık %75'inden sorumludur (37).



Şekil 3. İyonizan radyasyonun direkt ve indirekt etkisi (36)

Kanda, organ ve dokularda, hücrelerarası ve hücre içi sıvılarda bulunmak üzere insan vücudu %55-60 oranında su içermektedir. Düşük LET'li ışınlara maruz kalan organizmada iyonizan radyasyon enerjisinin büyük bir kısmı (%70-90) su molekülleri tarafından absorbe edilmektedir (5). Bu absorbsiyon sonucunda serbest radikaller oluşur.

Aşağıdaki basamaklarda görüldüğü gibi başlıca hidroksil radikalinin yol açtığı zincirleme kimyasal reaksiyonlar sonucunda, diğer reaktif radikallere göre ortamda daha uzun bir süre kalabilen (Stabil) $B^{\bullet}$ ler oluşur. Bu süre zarfında çevresinde 2 nm mesafede bulunan her radikal, SR veya $B^{\bullet}$, DNA ile etkileşerek indirekt etki ile zincir kırığı oluşturabilir. H_2O_2 hidroksilden daha düşük reaktiflikte bir radikal olsa da ortamda daha uzun süre kaldığından ve bu sayede nukleus membranından geçebilmek için zaman bulduğundan, DNA ile en fazla reaksiyona giren moleküldür (3, 4, 28, 29, 37, 38).

Radyasyon

$H_2O \longrightarrow H_2O^+ + e^-$

$e^- \longrightarrow e^-_{aq}$ (Hidrat elektronları)

$H_2O^+ \longrightarrow H^+ + OH^{\bullet}$ (Çok reaktif)

$e^-_{aq} + H^+ \longrightarrow H^{\bullet}$ (Çok reaktif)

} (Fiziksel etki kademesi)

$H_2O \longrightarrow H_2O^* \longrightarrow H^+ + OH^{\bullet}$ } (Fiziko-kimyasal etki kademesi)

$H^{\bullet} + H^{\bullet} \longrightarrow H_2$ (Hidrojen)

$OH^{\bullet} + OH^{\bullet} \longrightarrow H_2O_2$ (Toksik hidrojen peroksit

$H^{\bullet} + OH^{\bullet} \longrightarrow H_2O$

$H_2O + H^{\bullet} \longrightarrow H^+ + OH^{\bullet}$ (Radikaller)

$H_2O + OH^{\bullet} \longrightarrow H_2O + HO_2^{\bullet}$ (SR)

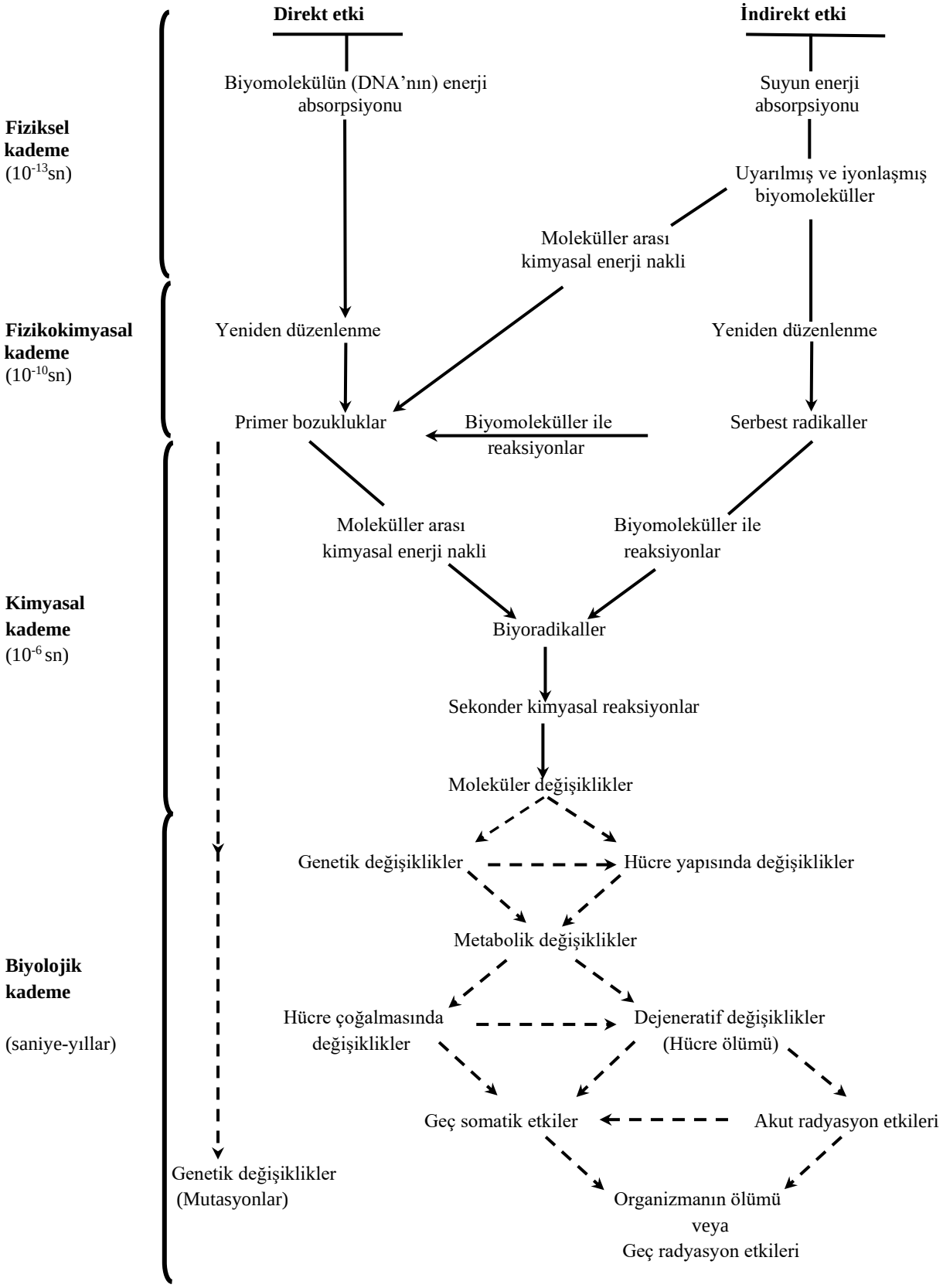
} (Kimyasal etki kademesi)

$B\text{-}H + OH^{\bullet} \longrightarrow B^{\bullet} + H_2O$ (Biyolojik Radikaller)

$B\text{-}H + H^{\bullet} \longrightarrow B^{\bullet} + H_2$

$B\text{-}H \longrightarrow B^{\bullet} + H^{\bullet}$ (Direkt Etki)

} (Biyolojik etki kademesi)



Şekil 4. Radyasyonun canlıdaki etki kademeleri (Kesik çizgili oklarla gösterilen kademeler metabolik olaylardan etkilenen kademeleri göstermektedir) (38)

Sonuç olarak iyonizan radyasyonun canlıdaki etkisinin ortaya çıkması, birbiri ardına gerçekleşen üç etki kademesi ile gerçekleşir (3, 38) (Şekil 4).

Fiziksel Kademe:

İyonizan radyasyonlar ile canlı dokuları oluşturan atom ve moleküller arasındaki ilk etkileşimin olduğu kademedir. Radyasyon enerjisi maddeye transfer edilir ve bu enerjiyi absorbe eden hücre bileşenlerinde, iyonlaşma ve uyarılmalara neden olur. İyonize olan atom ve moleküllerden fırlatılan serbest elektronlar komşu atomlar ve moleküllerde de iyonlaşmalara neden olurlar. Fiziksel kademe yaklaşık 10^{-18}-10^{-12} saniye arasında neticelenir.

Kimyasal Kademe:

İlk kademede oluşan ve elektrik yükü artık nötr olmayan iyonlaşmış atom ve moleküller diğer organik moleküller ile reaksiyona girerek sekonder kimyasal reaksiyonlar oluştururlar. Bu aşamada son derece reaktif olan ve ortamda daha uzun süre kalıcı olan SR'ler oluşur ve hücresel yapılarda (Özellikle DNA'da) geçici veya kalıcı hasarlar oluşur. Bu olaylar 10^{-12} saniye ile birkaç saat arasında gerçekleşir.

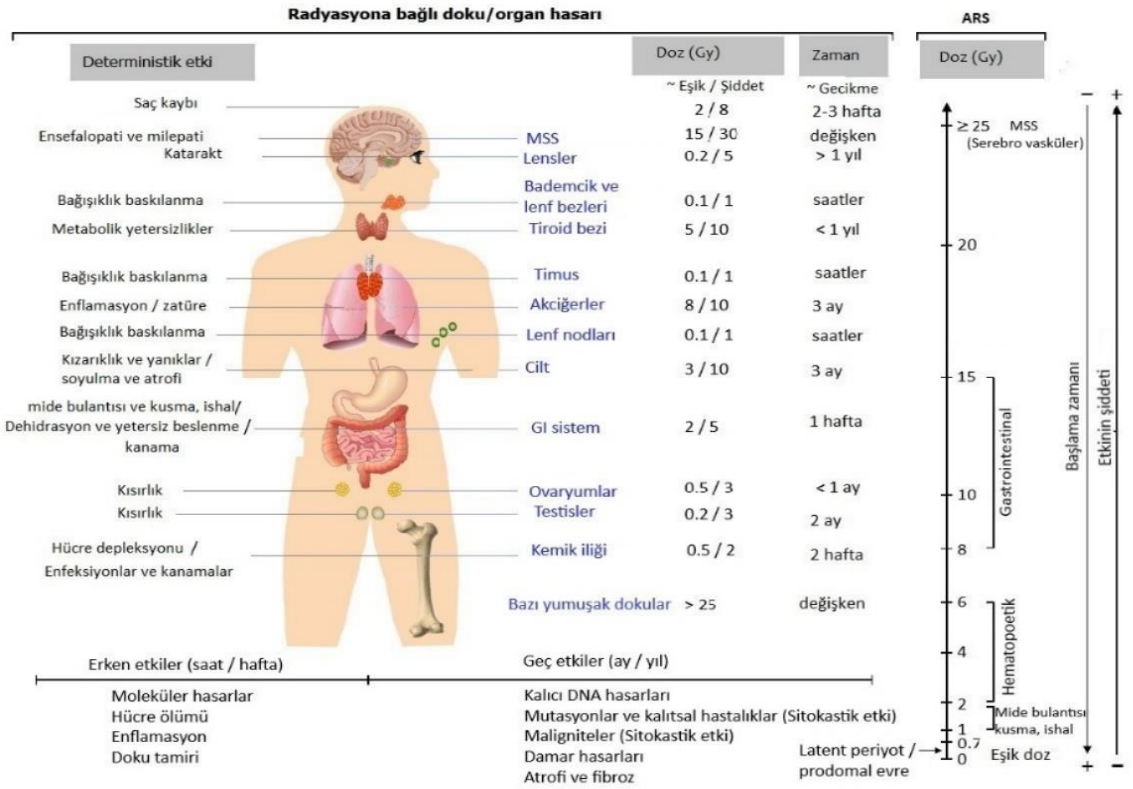
Biyolojik Kademe:

İyonizan radyasyonun zincirleme etkilerinin sonlandığı kademedir. Dakikalar içinde oluşmaya başlar, ancak kalıcı etkilerin ortaya çıkması yıllar sürebilir. Hücresel düzeyde çeşitli hasarlar oluşur. Bu hasarların bir kısmı onarılabilir. Özellikle DNA'daki onarılamayan hasarların kısa dönemde mitoz durması, hücre ölümü gibi etkilere yol açmasının yanında, dokularda geri dönüşsüz fonksiyon kayıplarının meydana gelmesi mümkündür (Örn. Nekroz, fibroz). Ayrıca DNA'larında mutasyon gerçekleştiği halde sağ kalarak çoğalmaya devam eden hücrelerde, kalıcı genetik bozukluklar ve bu mutasyonların zamanla artması sonucu kanserleşme gibi etkiler görülmektedir.

Organizma boyutunda ise insanı örnek alacak olursak iyonizan radyasyona maruz kalmanın olumsuz etkisi iki kategoride değerlendirilir. Birincisi **Deterministik (Öngörülebilir) etkidir**. Bu etkide doku veya organlarda hasar oluşabilmesi için belirli bir eşik radyasyon dozuna maruziyet söz konudur ve hasarın şiddeti doza bağımlı olarak artmaktadır. Deterministik etkiler akut etkilerdir (Örn. Cilt lezyonları, lenste katarakt, fibroz, kısırlık, vb.). İkincisi, **Stokastik (Rastgele) etki** ise düşük dozlarda radyasyona maruz kalınmasında bile ortaya çıkabilen eşik değerin söz konusu olmadığı etkidir. Bu etki radyasyonun kronik etkilerinden olan mutasyonlar ve kanser oluşumunu içerir (Tablo 2) (Şekil 5) (27, 32).

Tablo 2. İyonizan radyasyonun memeli sistemleri üzerindeki etkileri (3, 27, 29, 32)

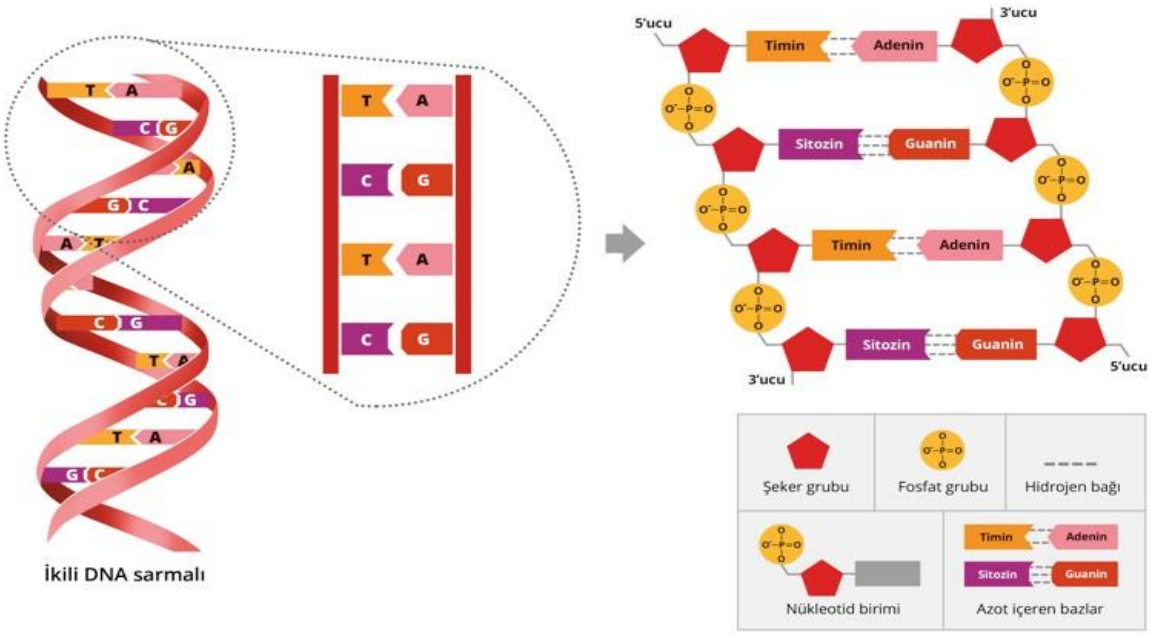
Etkinin karakteristiği	Oluşma zamanı	Hücredeki sonucu	Organlar üzerindeki sonucu
Deterministik etki	Akut etkiler	Somatik etki	Cilt (Dermatit, mukozit) Üriner sistem (Sistit) Üreme sistemi (Sterilite) Kan yapıcı sistem (Löko/lenfopeni, trombopeni, anemi) Sindirim sistemi (Özofajit, gastrit) Merkezi sinir sistemi (Miyelit)
	Kronik etkiler		Lens (Katarakt) İmmün sistem (Febril nötropeni)
Stokastik etki		Genetik etki	Kanser Kalıtımsal mutasyonlar



Şekil 5. Radyasyon maruziyetiyle doku ve organlarda meydana gelen hasarlar (32)

RADYASYONUN DNA ÜZERİNE ETKİSİ

Doğada bulunan ve en uzun molekül olan DNA hücrenin metabolizma, hücre çoğalması ve farklılaşması gibi yaşamsal tüm aktivitelerini yöneten, genetik bilgiyi taşıyan ve bu bilgileri yavru hücreler yoluyla gelecek jenerasyonlara aktaran bir nükleik asit molekülüdür. Nükleotidlerden oluşan DNA'nın yapısında genetik bilgi taşımayan ancak bir omurga oluşturan 5 karbonlu şeker (Deoksiriboz) grubu ve fosfat grubu (PO_4^{+3}) bulunur. Bu omurga üzerinde sıralanan ve 3'lü baz kodlaması ile RNA üzerinden amino asitlerle protein sentezini sağlayan 4 çeşit azotlu organik baz (Adenin/A, Guanin/G, Sitozin/C, Timin/T), genetik şifreyi taşıyan yapılardır. İnsan DNA'sı birbirine anti-paralel uzanan bir çift zincirden oluşur ve bu iki zincir karşılıklı bazlar (A=T, G≡C) arasındaki hidrojen bağları ile birbirine bağlanmıştır. İnsan hücrelerinde DNA çekirdek ve mitokondri içerisinde bulunur. Mitokondri DNA'sı halkasal bir yapı gösterirken çekirdek DNA'sı histon proteinleri ile üst üste katlanarak paket halinde kromatin yapılarını oluşturur (39) (Şekil 6).



Şekil 6. DNA'nın yapısı

DNA molekülü fiziksel (UV, X ve γ ışınları), kimyasal (Oksitleyiciler, alkilleyiciler, SR, B• ler) veya biyolojik (Virüs DNA'ları ve bakteriler) birçok mutajenden etkilenerek yapısal hasara uğrayabilir. Bu hasarlar oksitlenmeler, hidroliz, alkillenmeler, DNA-DNA ve DNA-Protein arasındaki çapraz bağlanmalar, baz hasarları, replikasyon hataları, tek veya çift zincir kırıkları

şeklinde olabilir (35, 36, 40, 41). Oluşan hasarlar orijinaline uygun onarılamazsa, apoptoz yolağının indüklenmesi ile hücrede programlı ölüm gerçekleşebilir ya da sağ kalan hücre nesillerinde oluşan mutasyonlar sebebiyle hücrelerin metabolik aktivitesinde değişiklikler yanında, uzun dönemde kanserleşme meydana gelebilir.

İyonizan radyasyonun DNA'da yaptığı başlıca hasarlar şunlardır: (40, 42, 43) (Şekil 3)

- Tek ya da çift zincir kırıkları
- Çapraz bağlanmalar: DNA-DNA, DNA-Protein
- Baz hasarları ve baz kayıpları (Deaminasyon- depürinasyon)
- Kümelenmiş hasar bölgeleri

250 kV enerjisindeki X-ışınına 1 Gy'lik dozda maruz kalan bir hücrede 2000'den fazla baz hasarı, 1000 civarı tek zincir kırığı, sonuçları çok daha yıkıcı olan yaklaşık 40 çift zincir kırığı ve 30 DNA–DNA çapraz bağı oluşmaktadır (4).

İyonizan radyasyonun etkisi ile DNA'da oluşan hasarların hücrede oluşturduğu olumsuz etkiler 3 başlık altında incelenir:

Letal Hasar:

Tamir edilemeyen, hücrenin yaşamsal olaylarını etkileyen ve hücrenin ölümüne neden olan hasarlardır. Sürekli bölünen hücrelerde mitoz kaybı, farklılaşmış hücrelerde ise fonksiyon kaybına neden olur.

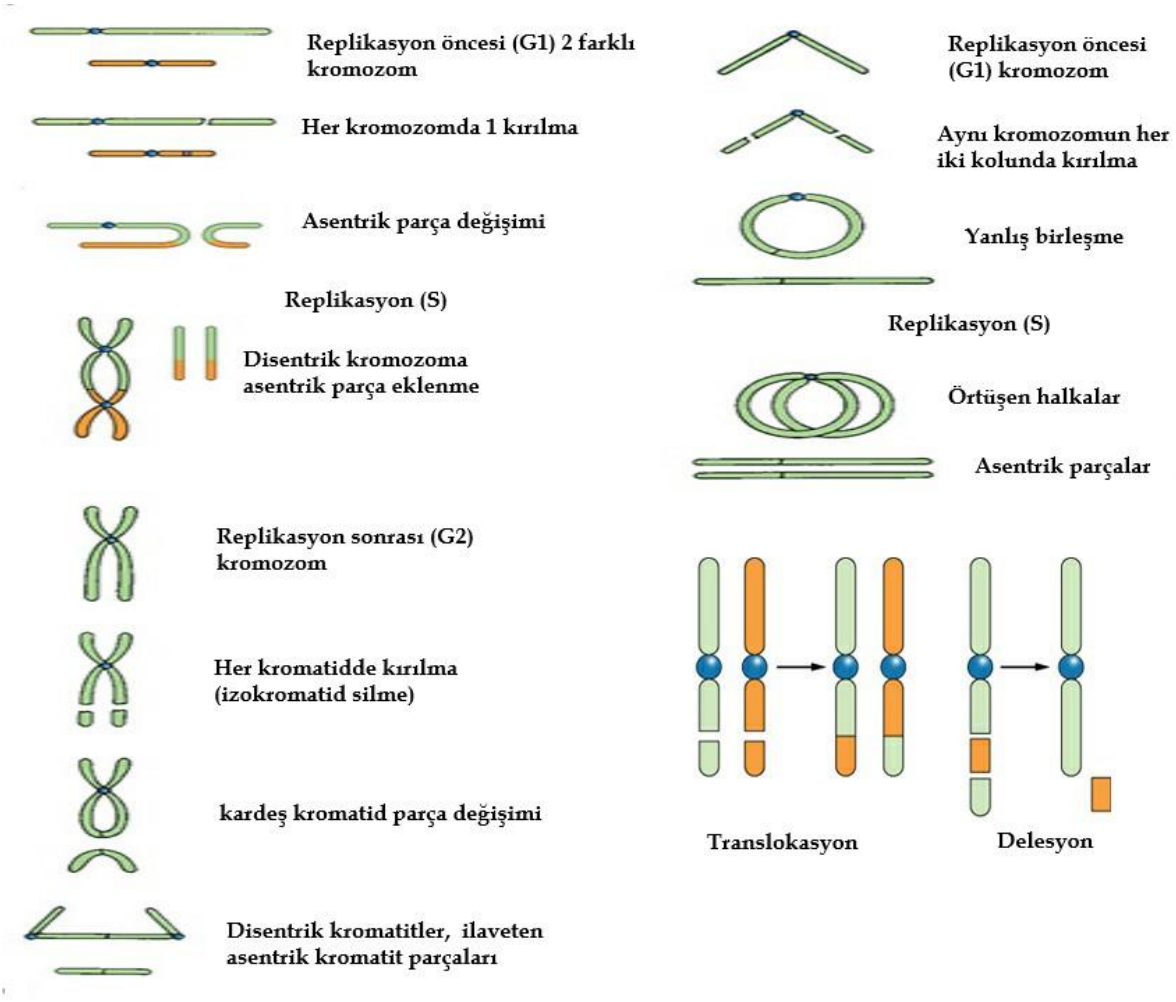
Subletal Hasar:

Tamir edilebilen ölümcül olmayan hasarlardır. Fakat hasar çok sayıda olursa hücre ölümüne neden olabilir.

Potansiyel Letal Hasar:

Işınlama sonrasında DNA'da oluşan hasarın onarılabileceği, ancak hücrelerin bulunduğu ortam koşullarına göre (Hipertermi, kemoterapi ajanlarına ışınla eşzamanlı maruziyet, anaerobik enfeksiyonlarda etkili imidazol türevi radyosensitiviteyi arttırıcı ilaçlar vb.) hücre ölümüne yol açabilen hasarlardır (3).

DNA'nın yapısında radyasyonla meydana gelen hasarlar kromozom yapısında da gözlenebilmektedir. Bu hasarlar kromozom tipi ve kromatid tipi aberasyonlardır. Bu aberasyonlar aynı ya da farklı kromozomlar arasında sentrik veya asentrik olarak kırılmalar, kopmalar, parça değişimi şeklinde oluşabilir. Bunun sonucunda asentrik, disentrik kromozomlar, halka kromozomları, translokasyonlar, delesyonlar meydana gelir (Şekil 7) (4).



Şekil 7. Kromozom ve kromatid tipi aberasyonlar (4)

ANTİOKSİDANLAR

Oksidatif stres, hücreler ve dokularda SOR üretimi ve birikimi ile biyolojik bir sistemin bu reaktif ürünleri antioksidanlarla temizleme yeteneği arasındaki dengesizlik sonucu ortaya çıkan bir olgudur. Oksidatif stres, membranlar, lipidler, proteinler, lipoproteinler ve DNA gibi hücresel yapıları olumsuz yönde etkileyerek kanser, kardiyovasküler hastalıklar, nörolojik hastalıklar, solunum yolu hastalıkları, romatizmal hastalıklar, böbrek hastalıkları gibi birçok hastalığa neden olurlar. Yaşlanmada da oksidatif stresin önemli bir etkisi vardır (44, 45).

Oksidatif stresi oluşturan serbest radikaller hem iyonizan radyasyonun indirekt etkisi ile hem de havadan solunan oksijenin çeşitli metabolik reaksiyonlardaki etkileşimleri ile meydana gelmektedir (46).

Oksidatif stresin yarattığı olumsuz etkileri SR'leri kendilerine bağlayarak ortamdan kaldıran ve bu şekilde SR'lerin hücrede oluşturabileceği hasarı engelleyen maddelere **antioksidan**

madde denir. Antioksidanlar bu etkiyi aynı zamanda SR sentez reaksiyonlarını inhibe ederek ya da oluşmuş hasarları tamir ederek de gösterirler (47).

Antioksidanlar radyasyonun özellikle indirekt etkisiyle meydana gelen artmış oksidatif stresin etkilerini azaltmak bakımından önemli moleküllerdir. Radyasyon uygulamaları sırasında antioksidan özellikli moleküllerin kullanılması, sağlık hücrelerin radyasyondan korunması için mecburi bir durumdur.

RADYOPROTEKTÖRLER

Radyoprotektörler, normal dokuları ve sağlıklı hücreleri iyonizan radyasyonun zararlı etkilerden koruyan ve organizmayı radyasyona karşı daha dirençli hale getiren, antioksidan özelliği olan kimyasal veya biyolojik bileşiklerdir (1, 48). Radyoprotektörlerin koruyucu etkilerini gösterebilmeleri için radyasyon uygulamasının hemen öncesinde ve maruziyet sırasında hücrelerarası sıvıda ve hücre içinde (Sitoplazma/nukleus) bulunmaları gerekmektedir. Işınlamadan sonra uygulanan radyoprotektörlerin genel olarak koruyucu bir etkisi yoktur. Radyoterapide sağlıklı dokuları korumak amacıyla kullanılan en yaygın radyoprotektif ajan Amifostindir. (49, 50).

Bir bileşiğin ideal bir radyoprotektör olabilmesi için birkaç işlevsel yetenek mevcut olmalıdır (1):

a) DNA'yı ve hücresel hasarı onarabilmeli

b) Hasarlı dokuların kendini tamir etmesine yardımcı olabilmeli

c) İmmünomodülasyon sağlamalı

d) Serbest radikalleri süpürebilmeli

e) Oksidatif stresi azaltabilmeli

Radyoprotektif etki mekanizması, su metabolitlerine ve SR moleküllerine H atomu bağlanması esasına dayanmaktadır (Redüksiyon/indirgeme). Genelde disülfid bağları bulunan (Tiyol bileşikleri gibi) moleküller bu kimyasal etkileşimde çok etkilidirler. İyonizan radyasyon etkisiyle hücre içinde ve dışında oluşan su metabolitleri ($OH^{\bullet}$, $HO_2^{\bullet}$, $O_2^{\bullet}$ ve H_2O_2), diğer organik molekülleri okside edebilirler. B-H şeklinde sembolize edilen stabil bir organik molekülün, direk radyasyon etkisiyle ya da su metabolitleri üzerinden $B^{\bullet}$ radikaline dönüşmesi olasıdır (3, 4, 27). Radyoprotektif etkili ajan, $B^{\bullet}$ radikalinin yapısına bir hidrojen atomu ekleyerek tekrar kararlı yapıdaki B-H formunun oluşmasını sağlamaktadır. Dolayısıyla su metabolitlerine, SR'lere ve $B^{\bullet}$ radikallerine hidrojen vererek kendilerine bağlayan, bunları indirgeyerek kararlı yapılı bileşikler haline getiren ve diğer hücre içi organik moleküllerle kimyasal etkileşime girmelerini engelleyen moleküller, radyoprotektif özelliğe sahiptirler. Radyoprotektörler bu etkileri sayesinde hücrede

yaşamsal öneme sahip DNA, mitokondri, hücre zarı gibi molekül, yapı ve organeller üzerinde SR'lerin oluşturabileceği hasarları önemli ölçüde azaltırlar (8, 14, 32, 51, 52).

Radyoprotektörler sentetik radyoprotektörler ile doğal radyoprotektörler olarak iki grupta sınıflandırılırlar (1, 35, 53).

İdeal bir radyoprotektör ajan farmakolojik olarak da aşağıda belirtilen özellikleri taşımalıdır (1, 35, 53):

1. Organların çoğunluğu üzerinde genel koruyucu etkisi olmalı
2. Terapötik konsantrasyonlarda düşük toksisiteye sahip olmalı
3. Hızla emilip vücutta hızla dağılabilmeli, kan beyin bariyerini geçebilmeli
4. Oral ya da intravenöz yollarla uygulanabilmeli
5. Hastalar veya personel tarafından kullanılabilecek diğer ilaçlarla uyumlu olmalı
6. Yeterince uzun raf ömrüne sahip, kolay erişilebilir ve ekonomik olmalı
7. Acil durumlarda minimum sürede etkili olmalı ve uzun süre koruma sağlamalı

Son yıllarda yapay ya da doğal pek çok bileşiğin radyoprotektif etkisi araştırılmaktadır. Kurkumin, mirisetin gibi flavanoidler, susam, gingseng gibi bitkiler ve daha pek çok bileşik araştırılan moleküller arasındadır.

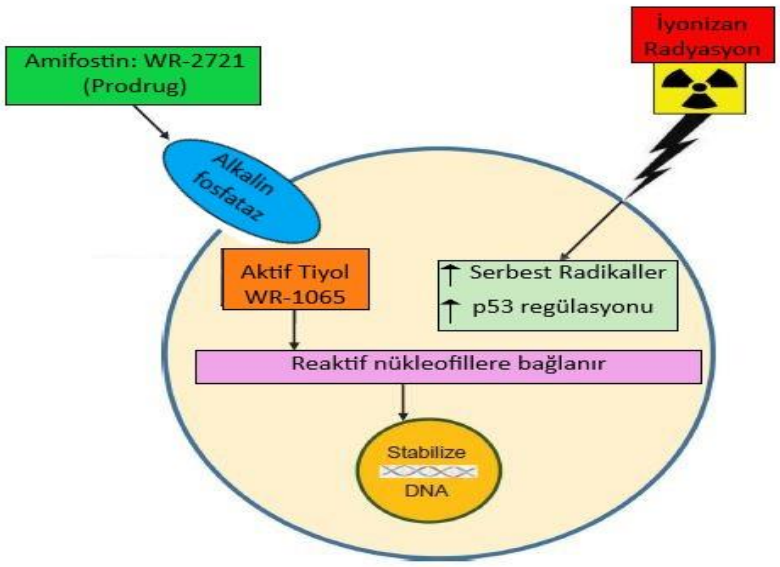
Günümüzde en sık kullanılan ve bizim çalışmamızda da ASA'nın etkisini kıyaslamak için seçilen WR-1065 Amifostinin metabolitidir ve radyoprotektif etkisi FDA tarafından onaylanan bir tiyol bileşiğidir.

Tiyol Bileşikleri

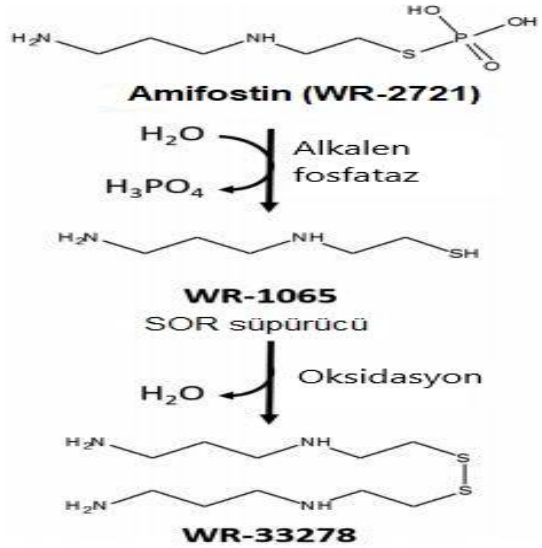
Serbest veya potansiyel sülfhidril (SH) komponentleri içeren tiyol molekülleri, ilk keşfedilen radyoprotektör ajanlarıdır. Aminotiyoller ve bunların fosfotioat türevleri, son otuz yılda doku ve hücre kültürlerinde yaygın olarak araştırılmıştır. Tiyol bileşiklerinin hidrojen transferi, hipoksiyi indükleme, SR süpürme ve doğrudan bağlanma yoluyla DNA'yı stabilize etme gibi çeşitli etki mekanizmaları vardır (54). Tiyol bileşiği olan radyoprotektörler Amifostin (WR-2721), 2-merkaptoetan sodyum sülfonat, sistein, N-Asetil sistein, sisteamin, sistamin, 2-merkapto-etil-guanidin (MEG), 2- aminoetil- izotiouronyum-bromür/hidrobromür (AET) ve Aminothiol PrC-210'dur (32).

AMİFOSTİN ve WR-1065

WR-1065 molekülünün kimyasal formülasyonu "2-[(Aminopropil) amino]-etantiyol" şeklindedir ve Amifostin (Ethyol®) olarak bilinen WR-2721 molekülünün serbest tiyol metabolitidir (5). Diğer radyoprotektörler gibi koruyucu etkisini, iyonizan radyasyona maruziyet sırasında hücre içinde oluşan SR'leri kendine bağlayarak gösterir (6, 55). Bu koruyucu etki belirgin olarak sağlıklı doku hücrelerinde görülürken, kanser hücrelerinde hemen hiç görülmemektedir. Bir başka deyişle sağlam dokular radyasyondan korunurken, radyasyonun tümör üzerindeki etkisi azalmamaktadır. Bu özellik Amifostinin diğer radyoprotektörlere karşı en önemli üstünlüğüdür ve bu nedenle kanserin radyasyonla tedavisinde onaylanmış olan tek ajandır (54). Şekil 8 ve 9 da görüldüğü gibi Amifostinin etkili olabilmesi için, hücre içinde alkalen fosfataz enzimi tarafından defosforilize edilerek efektif metaboliti olan WR-1065 molekülüne dönüştürülmesi gerekmektedir. Ayrıca WR-1065, bu dönüşüm sırasında oluşan poliaminler tarafından da, kendisine benzer özellikler taşıyan başka bir simetrik disülfür molekülüne (WR-33278) dönüştürülmektedir (56, 57). Kanser hücreleri alkalen fosfataz enzimini ancak çok düşük düzeyde sentezleyebildiklerinden, intrasellüler WR-1065 düzeyleri normal hücrelerden (%1-%0,1 oranında) daha düşük kalmaktadır. WR-1065'in memeli hücrelerinde radyasyona bağlı genetik hasarı (DNA zincirindeki kırılmaları, kromozomal anomalileri ve mutasyon oluşumunu) önleyebildiği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (7-10, 12, 58-62).



Şekil 8. Amifostinin etki mekanizması (55)



Şekil 9.Amifostinin (WR-2721) WR-1065'e ve WR-33278'e kimyasal dönüşümü (49, 57)

Amifostin genelde hastaya radyoterapi uygulanmadan 30 dk. önce 150 ml %0,9 NaCl (Serum fizyolojik) içinde iv. yoldan 15 dk. infüzyonla verilir. Uygulamaya göre dozaj farklılıkları olabilir. Örneğin; radyoterapi ile tedavi edilen baş-boyun tümörlerinde radyasyona bağlı gelişen ağız kuruluğunun şiddetini ve insidansını azaltmada her fraksiyon öncesinde 200 mg/m^2 olarak (35), ayrıca yumurtalık kanserli hastalarda tekrarlanan sisplatin dozlarına bağlı olarak gelişen kümülatif renal toksisitenin azaltılmasında kemoterapi öncesi 740-910 mg/m^2 dozunda kullanılır. Laboratuvar şartlarında intakt hücre kültürlerinde etkin dozu (1-6) µM'dir (60).

ASETİL SALİSİLİK ASİT (ASA)

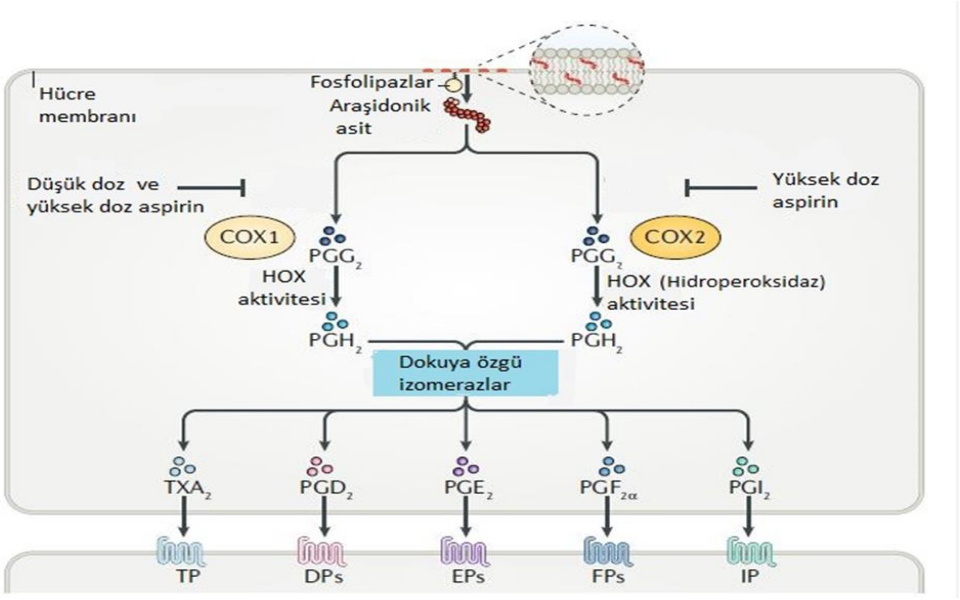
Geleneksel bir ilaç olarak 3500 yıldan beri kullanılan ve yeryüzünün pek çok bölgesinde yetişen söğüt ağacının (*Salix sp.*) kabuğunda bulunan ASA, kimyager Felix Hoffman tarafından 1897'de saflaştırarak sentetik olarak üretilmiştir (63).



Şekil 10. ASA'nın yapısı

ASA, siklooksijenaz (COX) enzim inhibisyonu yapan NSAİ ilaç grubundandır. Klinikte ağrı kesici ve ateş düşürücü amaçla klinikte 300-500 mg dozlarda kullanılmaktadır. Ayrıca daha düşük dozlarda (75-100 mg/gün) antiagregan olarak kullanılır. Trombositlerin damar içinde birbirine yapışarak arter ve venlerde pıhtı oluşturmasını engelleyerek, çeşitli organlarda emboli oluşumunu, miyokard infarktüsünü, serebrovasküler hastalıkların oluşmasının önler. ASA'nın içlerinde yer aldığı COX-2 inhibitörlerinin potansiyel olarak kolon kanserini ve metastazlarının gelişimini önleyebileceği de öne sürülmüştür (64-66).

ASA'nın temel etki mekanizması, COX enzimlerini geri dönüşümsüz bir şekilde asetilleyip inhibe ederek, prostaglandin (PG) sentezini baskılamasıdır. ASA'nın bu inhibasyonu COX-1 enziminin 529. noktasındaki serinin (Ser 529), COX-2'de ise 516 noktasındaki serinin (Ser 516) asetillenmesi ile gerçekleştirir. COX enziminin (PGH-sentaz 1 ve 2 olarak da adlandırılan) COX-1 ve COX-2 olmak üzere 2 formu bulunmaktadır. Hücre membranında fosfolipidlere bağlı olarak bulunan araşidonik asit (AA) sentezi, fosfolipaz-A2 enziminin aktivasyonu ile artar. COX-1 ve COX-2 enzimleri ise AA'yı prostaglandin endoperoksit üzerinden PGH_2'ye dönüştürürler. Bu şekilde COX aktivitesi sayesinde hücre membranında PGH_2 sentezlenmektedir (Şekil 11) (66-68).



Şekil 11. ASA'nın etki mekanizması (68)

ASA, oral alımı takiben, yaklaşık 15-20 dakikada kanda minimum etkin dozu aşar ve etkisi başlar. Alınımından 30-40 dakika sonra plazmada en üst düzeye ulaşır. ASA'nın kanda yarılanma ömrü 15 dakika, karaciğerde hidrolize edilerek dönüştürüldüğü salisilatın ise 2-30 saat arasındadır. ASA COX-1'i COX-2 ye göre daha fazla inhibe etmektedir. Düşük doz (72-100 mg) ASA COX-

1 inhibe edebilirken (Antitrombotik etki), COX-2 inhibisyonu (Antienflamatuvar etki) için daha yüksek dozlar gerekmektedir (68, 69).

ASA'nın antienflamatuvar, antipiretik, analjezik, antitrombotik, antikanser, etkilerinin yanı sıra antioksidan etkisinin olduğu da bildirilmiştir. ASA'nın radyoprotektif etkisi antioksidan özelliği sayesinde olur. ASA, $OH^{\bullet}$ radikalinin yapısındaki H^{+} atomlarına kolayca bağlanarak, fenton reaksiyonu yoluyla Fe^{+++} ve Cu^{++} gibi geçiş metallerinin şelatlanması ile ortamdaki SR'leri süpürebilmektedir. Ayrıca ASA, PG sentezini inhibe ederek hücrede bulunan güçlü antioksidanlar GSH ile GSH-Px enzimi aktivitesini arttırır ve böylece SR'leri temizleyerek, silika kaynaklı lipid peroksidasyonuna ve DNA zincir kırıklarına karşı koruma sağlayarak biyolojik hasarın azalmasında etkin rol oynar (14, 18, 70-75).

ASA'nın radyasyon kaynaklı hasarlar üzerindeki etkisini farklı metodolojilerle ve farklı organizma ve hücre tiplerinde inceleyen çeşitli çalışmalar yapılmıştır (16-22).

RADYASYON DOZİMETRİSİ

Organizma tarafından absorbe edilen radyasyonun miktarını belirlemek için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemler fiziksel ve biyolojik olarak iki çeşittir (Tablo 3).

Tablo 3. Dozimetri çeşitleri (76-78)

Fiziksel Dozimetri	Biyolojik Dozimetri
– Elektron Spin Rezonansı – Optik Olarak Uyarılmış Lüminesans – Termolüminesans – Nükleer Aktivasyon	**a) Sitogenetik Biyodozimetri** - Disentrik Kromozom Analizi - Prematüre Kromozom Yoğunlaşma Analizi - Mikronukleus - Fluoresans İn-Situ Hibridizasyon
	b) DNA Hasar Biyodozimetrisi - γ-H2AX Analizi
	c) Biyobelirteçler - Gen Ekspresyonları - MikroRNA Ekspresyonları - Metabolik Biyobelirteçler
	c) Hematolojik Biyodozimetri - Lenfosit Tükenmesi Kinetik Analizi - Nötrofil / Lenfosit Analizi

Dozimetrinin Sahada Kullanılması ve Dozimetri ile İlgili Kavramlar

Dozimetrik çalışmalar radyasyon çalışanlarının, hastaların ve kazara radyasyona maruz kalanların ışınlanma düzeyini belirlemek, uzak ve yakın gelecekte bu kişilere uygun şekilde müdahale edebilmek için gerçekleştirilen çalışmalardır.

Örneğin Çernobil kazası sonrasında I-131, Cs-137, Co-60 gibi havaya karışan radyonüklitler, bulutlarla uzak coğrafyalara taşınmış ve yağmurlarla tekrar yeryüzüne inmiştir. Bunların ciltten temasla, solunan hava ile ya da daha çok rastlandığı şekli ile içilen su, yenilen hayvansal (Et, süt, peynir, yumurta) ve bitkisel gıdalar (Çay, fındık, tütün) yolu ile vücuda alınması söz konusu olmuştur (23, 79).

Bu kaza örneğinde olduğu gibi, radyonüklidler kan dolaşımıyla doku ve organlara ulaşmakta, buralarda farklı oranlarda birikmekte ve vücutta belli bir süre kaldıktan sonra birçoğu idrar, safra ya da dışkı yolu ile vücuttan atılmaktadırlar.

Her radyonüklidin yayınladığı radyasyon (γ, β, proton, nötron ve α ışınları) kendisine özgüdür ve bu ışınların o radyonüklide spesifik enerjileri vardır. Ayrıca her radyonüklidin spesifik bir yarı ömrü vardır. Ayrıca dokular ve organlar bu radyonüklidleri farklı oranlarda tutmaktadırlar. Her kişinin bulunduğu yere, maruziyet koşullarına ve vücuda alınan farklı radyonüklidlere bağlı olarak, tüm vücut dozları ve kümülatif dozların oluştuğu süreler (Doz hızları)[1] farklı olmaktadır (23).

Bu kişilerin vücutlarında toplam olarak absorbe edilen dozların standart bir yöntemle hesaplanması gerekir. Ancak bu şekilde farklı bireyler tarafından alınan dozlar karşılaştırılabilir ve etkileri aynı doz skalası üzerinde değerlendirilebilir. Bunun için farklı kalitedeki radyasyonların farklı doz hızları da hesaba katılarak eşdeğer bir doz hesaplanma yöntemi geliştirilmiştir. Bu eşdeğer doz birimi Sievert (Sv)[2]'tir. Tıpta tanı ve tedavi için kullanılan belirli iyonizan radyasyonların dokularda, enerji transferi ile oluşturdukları iyonlaşma miktarının birimi ise Gray (Gy)[3]'dir (3, 27, 29, 32).

İyonizan radyasyonların tipine ve enerjisine bağlı olarak **rölatif biyolojik etkinlikleri (RBE),** kalite faktörleri üzerinden belirlenmiştir ve **biyolojik eşdeğer dozlar (BED)** bunun üzerinden hesaplanmaktadır (32). RBE, absorbe edilen standart radyasyon dozu (Tipik olarak X-ışını) ile aynı miktarda biyolojik hasara neden olan diğer herhangi bir radyasyon türünün absorbe olan dozu arasındaki orandır ve LET'teki artışla orantılı olarak artar. RBE'yi değerlendirmek için yaygın olarak kullanılan radyasyonlar, düşük LET'li X veya γ ışınlarının RBE değeri 1 dir. Yüksek LET'li radyasyonların RBE değeri 3-100 arasında değişmektedir. Bu şekilde yapılacak hesaplama ile hem biyolojik eşdeğer dozlar tayin edilebilir, hem de buna göre gelişebilecek

muhtemel biyolojik sonuçlar, ister klinikte belirlenebilen bir hasar olsun (Deterministik etki), ister belirlenemeyecek/ölçülemeyecek ama uzun yıllar sonra sonuçları görülebilecek bir etki olsun (Stokastik etki), bu hesaplamalar ile önceden tahmin edilebilir (3, 27, 29).

(1) Doz hızı: Birim zamanda soğurulan doz miktarıdır.

(2) Sievert: Eşdeğer doz birimidir. Birim kütlede absorbe edilen enerji miktarıdır. (1 Sv= 1 joule/kg)

(3) Gray: Absorbe edilmiş doz birimidir.1 kilogram maddenin soğurduğu 1 joule'lük radyasyon enerjisidir. (1 Gy =1 joule/kg)

BİYOLOJİK DOZİMETRE

Alınan radyasyon dozunun hücre temelli biyolojik yöntemler kullanılarak belirlenmesine *biyolojik dozimetri* denir (80). Biyolojik dozimetri çalışmalarında sitogenetik biyobelirteçler, absorbe edilen dozu ölçmek için kullanılan biyolojik göstergeler arasında en hassas ve güvenilir belirteçler olarak kabul edilir (78).

Bunların ilki olan **disentrik kromozom analizi yöntemi** 1960'lardan itibaren, radyasyon kazalarında iyonizan radyasyona maruz kalmış kişilerde kullanılmaya başlanmıştır. Disentrik kromozom analizi radyasyon biyodozimetrisi için *altın standart* olarak kabul edilen güvenilir bir "kişisel absorbe doz tayin" yöntemidir (81, 82). Kromozomal aberasyonlar çok düşük dozlarda dahi bir eşik değeri olmadan oluşabilmektedir (Stokastik etki). Disentrik kromozom analizinin en önemli handikapı değerlendirme için uzman gereksinimidir (83).

Disentrik kromozom analizine göre DNA hasarlarını daha kolay ve hızlı bir şekilde ortaya koyan **mikronukleus (MN) analizi ise,** günümüzdeki araştırmalarda çoğunlukla kullanılan, güvenilir diğer bir yöntemdir. Değerlendirmesi disentrik analizine göre daha az uzmanlık gerektirmektedir (84, 85). Aşağıda verilen biyolojik dozimetri koşullarını da büyük oranda karşılamaktadır.

Biyolojik dozimetri için ideal koşullar aşağıdaki gibidir (77, 86):

1. Radyasyona duyarlılığı yüksek olmalı ve gözlenen etki radyasyona özgü olmalıdır.
2. Radyasyona maruz kalma sonucu oluşan etki kalıcı olmalı, eğer kalıcı değilse zamana bağlı olarak oluşan değişiklikler bilinmelidir.
3. Kalite faktörleri farklı olan iyonizan radyasyonların (γ, β, nötron vb.) tümüne duyarlı olmalıdır.
4. Analiz sonucunda oluşturulan doz-cevap grafiklerinde tespit edilebilen en düşük ve en yüksek dozların aralığı, mesleki ışınlamalarda olduğu gibi μSv seviyesinden, nükleer kaza durumlarında olduğu gibi birkaç yüz Sv'e varan dozlara kadar geniş olmalıdır.
5. Biyolojik materyal örneğinin elde edilmesi, kan alma işlemi gibi kolay olmalıdır.

6. Analizdeki ölçümler kolay ve hızlı yapılabilmeli, kısa sürede sonuç vermelidir.

7. Analiz sonuçları yeni yapılacak tetkiklerde de tekrarlanabilir olmalıdır.

8. Lenfositler gibi senkron bir hücre popülasyonu içermelidir.

9. İncelenecek örneklerden elde edilecek sonuç, tüm vücudun aldığı dozları temsil edebilmelidir.

10. İn-vitro şartlarda elde edilen doz cevap eğrilerinin, in-vivo şartlarla uyumlu olması gereklidir.

11. Uzun süren ve homojen olmayan ışınlamalara da uygun olmalıdır.

Mikronukleus Yöntemi ile Biyodozimetri

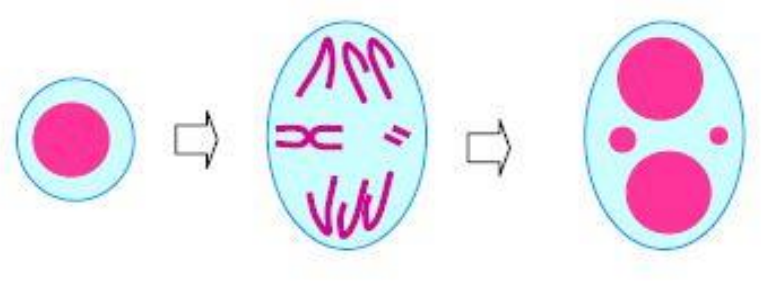
Lenfositler periferik kandan kolayca elde edilebilen ve 0,1 Gy kadar düşük radyasyon dozlarında dahi MN oluşumu gösteren, böylece ideal biyolojik dozimetri kriterlerini karşılayan radyoduyarlı hücrelerdir (87). İnsan periferik kan dolaşımındaki lökositler dahil tüm beyaz kürelerin %20'sini oluşturlar. Kemik iliğinde hematopoetik pluri-potent kök hücrelerinin ürettiği ve farklılaştıktan sonra kan dolaşımına çıkan B-lenfositleri, plazma hücreleri ve NK (Naturel Killer) lenfositleri dahil matür periferal lenfositlerin %70-80'ini T-lenfositleri oluşturur (88). Genelde hücre siklusunun G0 fazındadırlar. Hücre döngüsünde G0 fazı metabolik faaliyetlerin devam ettiği, bölünme faaliyetlerinin gözlenmediği safhadır. Hücre bölünmesi için bir sinyal aldığı zaman G0 fazından G1 fazına geçerek hücre döngüsünü başlatır (39).

Lenfositlerin yıkılmadan dolaşımda kalma süreleri farklıdır. Plazma hücreleri için bu süre 3 gün kadar kısa olabilirken, T-lenfositleri için 3 yıla kadar uzayabilmektedir. Periferik dolaşımdan çok lenfatik sistemde (Lenf nodları) yerleşen lenfositlerin ancak %2'si siklusta ilerlemekte ve bölünebilmektedir. Bu az sayıdaki lenfositte iyonizan radyasyona maruziyet sonucu, mitoz fazında kalıcı kromozom aberasyonları meydana gelmektedir. Kandaki lenfositler yıkılmadıkları sürece edindikleri bu aberasyonları taşırlar. Radyasyona maruz kalan kişilerden alınan kan örneklerinden ayrıştırılan lenfositler mikroskobik olarak incelenerek, oluşmuş olan bu aberasyonlar istenildiği zaman belirlenebilir. Lenfositlerin vücutta radyasyona en duyarlı hücreler olması nedeniyle, kanda dolaşan milyonlarcası dozimetri probu işlevi görmektedir. Bu yöntemle akut radyasyon semptomlarını ortaya çıkaran yüksek dozların (1-100 Sv) kolayca belirlenmesi kadar, belirlenmesi daha zor olan (Görünüşte hiçbir semptomun, kan sayımlarının düşmesi gibi basit laboratuvar bulgularının olmadığı) çok düşük dozların dahi tespit edilmesi mümkündür. Örneğin lenfositlerde yapılan kromozom aberasyon analizinin duyarlılığı, X ve γ ışınları gibi düşük LET'li radyasyonlar için 0,1 Sv, α parçalıkları ve nötronlar için 0,01 Sv kadar düşük dozlardır (89). Maruziyetten 24

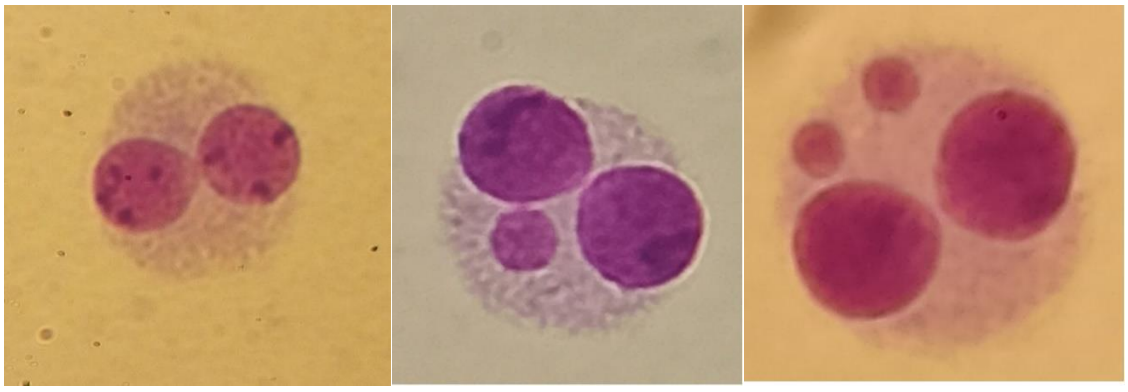
saat sonra alınacak 5-10 ml'lik periferik kan örneği, değerlendirme yapmak için yeterlidir. Periferik kanda bulunan T-lenfositlerinin %95'i 3 yıllık bir ömre sahip olduğundan, maruziyetten uzun zaman sonra bile absorblanan dozun belirlenebilmesi mümkün olmaktadır (90).

Biyolojik doz tayini için kromozomal aberasyon analizleri ve MN analizleri 1960'lı yıllardan bu yana başarıyla uygulanmaktadır. Sadece iyonizan radyasyon gibi fiziksel ajanlar değil, çeşitli kimyasal ajanlar da bölünen lenfositlerde MN oluşturabilir. Doğal süreçler boyunca (Yaşla birlikte artarak) lenfositlerde MN oluşumu az oranda da olsa mevcuttur. Bu nedenle fiziksel ve kimyasal tüm ajanların olası biyolojik etkilerinin değerlendirilirken, normal popülasyondaki bireylerin yaş aralıklarına göre mevcut MN oranlarının bilinmesi, bilinmiyorsa deney öncesinde tayin edilmesi gerekmektedir. Farklı ışın dozları ile fazladan oluşan MN sayıları bir grafikte çizdirildiği zaman, doz ile MN arasındaki ilişkinin lineer kuadratik modele uygun olduğu görülmektedir. Böyle bir grafikten yapılacak olan ekstrapolasyonla, canlının absorbe ettiği iyonizan radyasyon dozunun gerçeğe yakın olarak belirlenmesi mümkündür, ampirik hesaplardan çok daha güvenilirdir ve en önemlisi o kişiye özel bir dozimetridir (91).

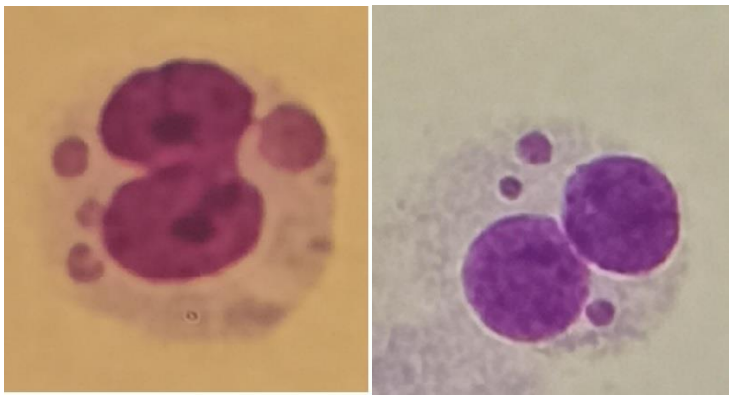
Mikronukleuslar lenfositlerin mitoz bölünmesi sırasında hücre nukleusunun dışında, ondan ayrı olarak ortaya çıkan, nukleus yapı ve boyanma özelliklerini taşıyan, ana çekirdekle bağlantısı olmayan, ana çekirdekten daha küçük boyutlarda, sitoplazma içinde yer alan küresel yapılardır (92). MN'ler, asentrik bir kromozom parçasının ya da tam bir kromozomun mitozun anafaz safhasında kutuplara çekilemeyip, nukleus dışında kalması sonucunda ortaya çıkar (Şekil 12-13). Sitokalazin-B, bölünen hücrenin mitoz fazında telofaz gerçekleştikten sonra, nukleus bölünmesini tamamlamış olan hücrelerin sitokinezden (Stoplazma bölünmesinden) önce durdurulmasını sağlar (Nukleus bölünmüştür ancak hücre bölünmemiştir). Bu şekilde sitokinez bloklanarak hücre siklusunu tamamlayan hücrelerin bölünmeden önceki binükleat görünümleri mikroskopta ayırt edilebilir. Cyt-B bu etkisini, bölünen hücrenin ikiye ayrılmasını sağlayan kasılabilir halkadaki mikroflamentleri oluşturacak aktin moleküllerine bağlanarak ve aktin polimerizasyonunu inhibe ederek gösterir. Bunun sonucunda aktine bağlı tüm kinetik engellenmiş ve sitokinez (Hücrenin 2'ye bölünmesi) bloklanmış olur (92-94)



Şekil 12. Mikronukleus oluşumu (95)



a **b** **c**



d **e**

Şekil 13. Normal Binukleat Hücre (a) ve Mikronukleuslu Binukleat Hücrelenin (b,c,d,e) Mikroskop Görüntüsü (400 büyütme, Giemsa ile boyandı) (Çalışma Görüntüsü)

GEREÇ VE YÖNTEMLER

GEREÇ

Kan Örnekleri

Çalışmamızda 20-30 yaş arasında, alkol ve sigara kullanmayan, herhangi bir kronik veya sistemik hastalığı bulunmayan, son 15 gün içerisinde herhangi bir ilaç kullanmamış olan ve radyasyon ilgili bir işte çalışmayan 4 erkek gönüllü bireyden alınan venöz kan örnekleri kullanıldı.

Çalışmanın Etik Kurul Onayı (TÜTF-BAEK 2019/80) alındıktan sonra, gönüllülere gerekli bilgilendirmeler yapılarak araştırma hakkındaki soruları cevaplandı. Bilgilendirilmiş onam formları imzalatıldı.

Deneylerde Kullanılan Kimyasallar

- WR-1065 (Sigma-W2020)
- ASA (Sigma-A5376)
- RPMI 1640 (L- Glutaminli) (Sigma-R8758)
- Fetal Bovine Serum (Caprıcorn-FBS-HI-11B)
- PHA- L Fitohemaglütinin (Sigma-L2769)
- Sitokalazin B (Sigma-C6762)
- Penisilin Streptomisin (Sigma-P4333)

Deneylerde Kullanılan Cihazlar

- Linak (Elekta Infinity)
- Toshiba Asteion Bilgisayarlı Tomografi
- Konturlama (Elekta Focal-Sim)
- Doz hesapları TPS (Elekta Xio)

- Etüv (Heraeus-UB6)
- Laminar air flow kabini (Heraeus-HERA Safe-HS15)
- Santrifüjler (Heraeus Biofuge, Hettich Micro)
- Hassas dijital terazi (Scaltec)
- Işık Mikroskobu (Olympus CK2)
- Faz-Kontrast Mikroskobu (Olympus Bx50)

Kültür medyumu

Kültür medyumu RPMI 1640 içinde %10 Fetal Bovin Serum ve %1 Pen-Strep karıştırılarak hazırlandı. Porsiyonlanarak -20°C'de de muhafaza edildi.

WR-1065

WR-1065 (Molekül ağırlığı 207,16 g/mol) stok konsantrasyonu 50 mM olacak şekilde PBS ile çözdürülerek hazırlandı. Stok çözelti porsiyonlanarak 1 ay içinde kullanılmak üzere -80°C'ye kaldırıldı. WR-1065 final konsantrasyonu 40 µM olarak kullanıldı (7).

ASA

ASA (Molekül ağırlığı 180,16 g/mol) stok konsantrasyonu 2,5 mg/ml olacak şekilde tam medyum içinde çözdürülerek her deneyden önce taze olarak hazırlandı. ASA final konsantrasyonu 25 µg/ml olarak kullanıldı (16).

PHA-L

PHA-L çözeltisi stok konsantrasyonu 1 mg/ml olacak şekilde distile su ile hazırlandı. Porsiyonlanarak -20°C'de muhafaza edildi. Final konsantrasyonu 5 µg/ml olarak kullanıldı (96).

Cyt-B

Cyt-B çözeltisi stok konsantrasyonu 10 mg/ml olacak şekilde DMSO ile hazırlandı. Porsiyonlanarak -20°C'de de muhafaza edildi. Final konsantrasyonu 6µg/ml olarak kullanıldı (97, 98).

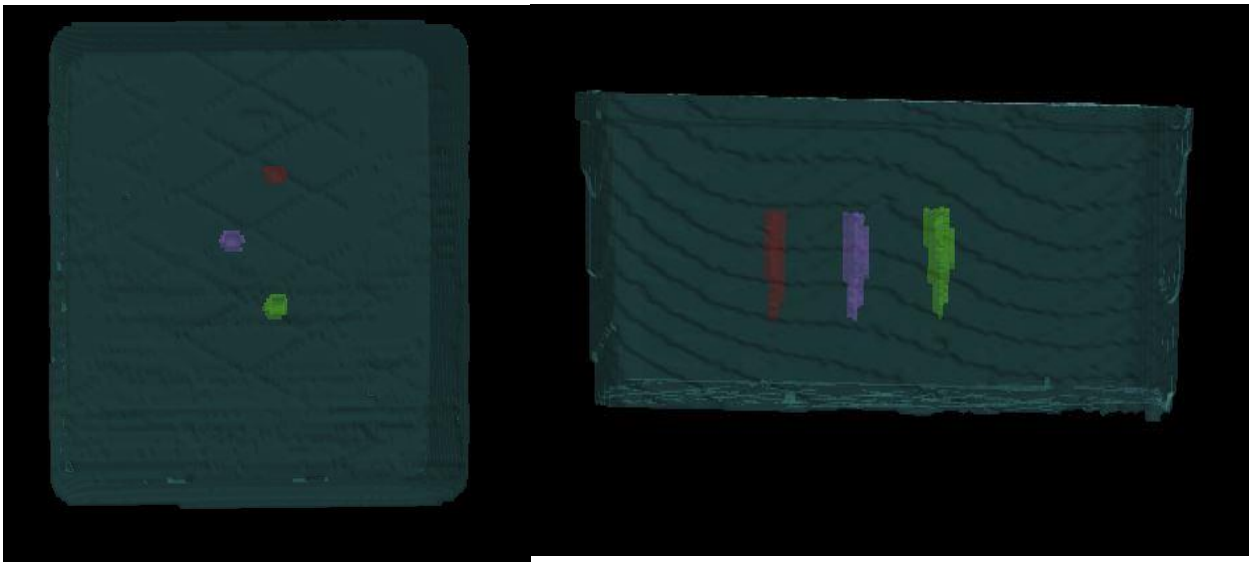
Işınlama ve tedavi planlama cihazları

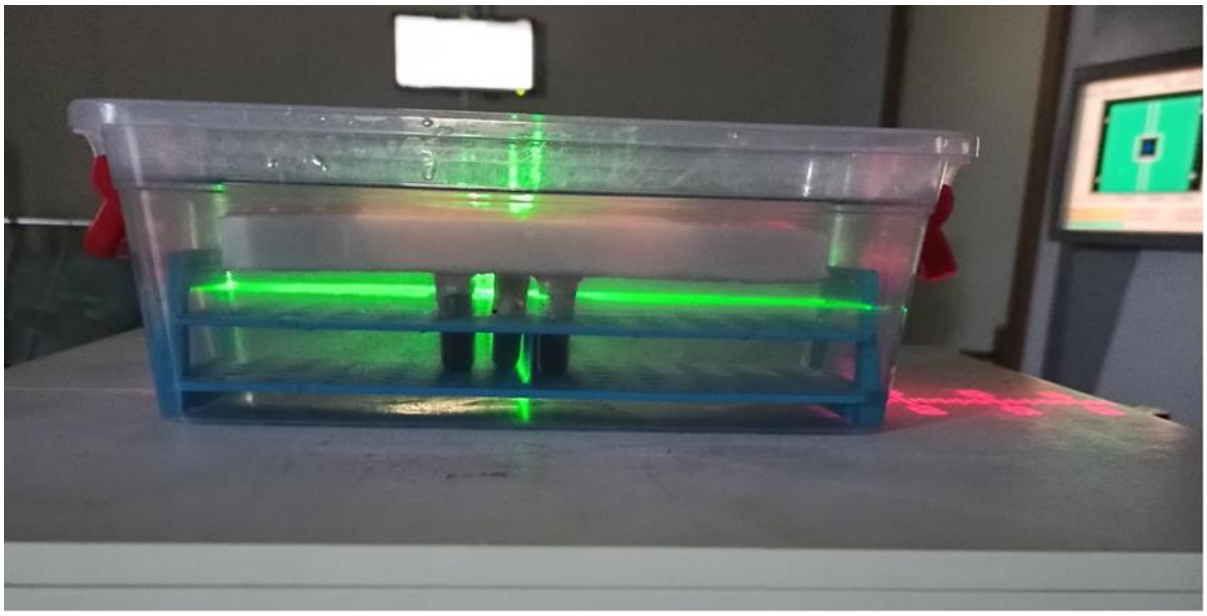
Kan örnekleri linak cihazında (Elekta Synergy Platform) 6 MV X-ışınları ile, iki farklı dozda (2 ve 4 Gy) 400 MU/dk. doz hızında ışınlandı. Doz hesapları tedavi planlama sistemi (TPS) Elekta Xio bilgisayarında yapıldı. Doz planlaması için gerekli olan, kan numunelerinin içinde bulunduğu içi su dolu düzeneğin ışınlama pozisyonundaki simülasyon görüntülemesi, Toshiba Asteion bilgisayarlı tomografi (BT) cihazında yapıldı.

Araştırmamızda kullanılan 2 Gy'lik doz, küratif lokorejyonel radyoterapide (Konvansiyonel fraksiyonasyonda) kullanılan günlük fraksiyon dozudur. 4 Gy ise tüm vücudun radyasyona maruz kaldığında, tedavi edilmez ise kemik iliği ve immün baskılanma sonucu gelişebilecek enfeksiyonlarla ölümlerin görülmeye başlandığı minimum doz değeridir.

Işınlama düzeneğinin ayarlanması

Şekil 14'de görülen ışınlama düzeneğinde bir Eppendorf tüp taşıyıcısı plastik kap içine yerleştirildi. 2 ml'lik kan örneğini temsil edecek kadar içine su konulan, ağzı kendi kapağı ile kapatılan, su geçirmemesi için ince parafilm ile sarılan 3'er tüp, ışınlanacak kabın merkezinin etrafındaki en yakın tepsi deliklerine, eşit uzaklıklarda yerleştirildi. Işınlama öncesinde tüplerin yerleştirildiği tepsinin içinde bulunduğu kap, kullanılacak 6 MV X-ışınının build-up derinliği göz önüne alınarak tüplerin 2 cm üstüne kadar distile su ile dolduruldu. Tüplerin yerleştirildikleri tepsideki yuvalarında sabit olarak kalması için üstlerine (Su içine batarak tüpleri sabitleyecek şekilde) 1,5 cm kalınlığında su eşdeğeri bolus materyali konuldu. Düzeneğin bu şekli ile Toshiba Asteion BT cihazında 2 mm aralıklı kesitlerle görüntüleri alındı. Görüntüler konturlama için Focal-Sim bilgisayarına gönderildi. Düzenek materyali, her ışınlamada ışınlanan 3 tüp ve içlerindeki 2 ml kan ayrı ayrı konturlandı ve sanal ortamda 3 boyutlu rekonstrüksiyonu yapılarak doz planlaması için Xio TPS'e gönderildi. Linak cihazının izomerkez uzaklığı (100 cm), düzenek içindeki tüplerdeki 2 ml kan hacminin ortasından geçen yatay düzleme gelecek (Işın kaynağına olan uzaklık her ışınlama için 100 cm olacak) şekilde ayarlandı. Bu şekilde düzenekteki su yüzeyindeki SSD mesafesi 95,7 cm oldu (Tüplerde kültür medyumu ilave edilerek 2 ml'ye tamamlanmış olan kan hacminin merkezleri ışın giriş yüzeyinden, 4,3 cm derinliğe getirilmiş oldu). Tek ön alandan 6 MV X-ışını ile yapılacak ışınlamalarda, izomerkezde 10 x 10 cm'lik açık alanlar kullanıldı. TPS'te kan tüplerinin merkezlerinin bulunduğu derinlikte (4,3 cm) oluşan izodoz %100 olarak kabul edilerek, izomerkezde 2 Gy ve 4 Gy dozlar elde edilecek şekilde ışınlama süreleri (Monitör üniteleri/MU) hesaplandı. Bu şartlarda 2 ml kan hacminde oluşan doz farkı ± %7 idi (Min=%93, Max=%107).





Şekil 14. Deney düzeneği

Işınlama

İşlemleri bittikten sonra ışınlama cihazına alınan tüpler düzeneğe yerleştirildi ve ışınlandı. Aynı dozu alacak tüpler bir seferde ışınlandı.

YÖNTEM

Deney grupları

Çalışmada her gönüllüden, 2 ml'lik lityum heparinli (Li-heparin) tüplere (10 adet) kubital venlerden alınan kan örnekleri dengeye gelebilmeleri için 1 saat oda ısısında dinlendirildi. Daha sonra örnekler steril kabin içinde 2 ml'lik Eppendorf tüplere (Her tüpte 2 ml kan olacak şekilde) aktarılarak, her gönüllü için 9 tüp hazır edildi ve etiketlendi. Her gönüllü için aşağıdaki 9 grup oluşturuldu.

1. Tüp: Kontrol
2. Tüp: WR1065
3. Tüp: ASA
4. Tüp: 2 Gy
5. Tüp: 4 Gy
6. Tüp: 2 Gy + WR-1065
7. Tüp: 2 Gy + ASA
8. Tüp: 4 Gy + WR-1065
9. Tüp: 4 Gy + ASA

ASA oral yolla alındıktan sonra mide ve bağırsaklarda emilir. Alınımından yaklaşık 30 dakika sonra plazmada en üst seviyeye ulaşır. Bu sebeple kan örneklerine, ışınlamadan 30 dakika önce uygulandı. Final konsantrasyonun 25 μg/ml olarak seçilmesinin bir nedeni bu dozlardan daha yüksek dozlarda mitotik indeksi düşürmesidir (16). Ayrıca terapötik doz aralığındadır. 250 mg iv uygulamada elde edilen C_{max} (29,62 mg/l) değerine yaklaşıktır (99).

WR-1065'de ASA deney grubuyla eş zamanlı ve ışınlamadan 30 dakika önce uygulandı. WR 1065'in $T_{1/2\alpha}$ değeri 11 dakika, $T_{1/2\beta}$ değeri 7,3 ±3,6 saattir. Seçilen süre, ilacın eliminasyonu gerçekleşmeden, dokuların ilaç maruziyetini yaklaşık olarak taklit etmektedir. Doz olarak toksik etki yaratmayan 40 μM kullanılmıştır (7). Ayrıca bu değer tek doz Amifostin uygulaması ile 1.saatte elde edilen C_{max} (47,5 μM) değerine yaklaşık bir değerdir (100).

Belirlenen konsantrasyonlarda ASA (Final kon.: 25 μg/ml) ve WR-1065 (Final kon.: 40 μM) ve WR-1065 eklenen deney tüpleri diğer tüplerle birlikte 37°C'de 30 dk. karbondioksitli etüvde inkübe edildi. İnkübasyonu takiben ASA ve WR-1065'in ortamdan uzaklaştırılması için diğer tüm tüplerde dahil olacak şekilde hücreler tam medyum ile 2 kez yıkandı.

Yıkama prosedürü aşağıdaki gibidir:

1. Deney tüpleri 2900 rpm de 5 dakika santrifüjlendi.

2. Süpernatant atıldı. Hücre pelletinin üzerine hacim 2 ml ye tamamlanacak şekilde tam medyum eklendi.
3. Bu işlem bir kez daha tekrar edildi.

(Tüm uygulamalar ve yıkama işlemleri steril kabin içinde gerçekleştirildi.)

Yıkama işlemini takiben hücreler medyum içinde beklemeden hızlıca ışınlamaya götürüldü.

Hücre Kültürü

Kültür flasklarına uygun miktarda tam medyum konulduktan sonra, lenfosit çoğalmasını indüklemek üzere her bir flaska final konsantrasyonu 5 µg/ml olacak şekilde PHA-L eklendi.

Işınlama işlemini takiben ışınlanan ve ışınlanmayan tüm kan örnekleri, kan medyum oranı 1:9 olacak şekilde ayarlanarak hücre kültür medyumuna eklendi.

Kanlar eklendikten sonra flasklar 37°C'de inkübasyon için karbondioksitli etüve konuldu. Kültürün 44. saatinde kültür flasklarının içerisine final konsantrasyon 6 µg/ml olacak şekilde Cyt-B eklendi. Flasklar tekrar karbondioksitli etüve yerleştirildi. Hücre kültürü 68. saatte sonlandırıldı. Deney protokolü Fenech'in standart MN protokolüne göre oluşturuldu (92).

Harvest

1. Kültür süresi biten örnekler 15 ml'lik falkon tüplere aktarıldıktan sonra 1000 rpm'de 8 dk. santrifüj edildi.
2. Süpernatantları pastör pipetle atıldıktan sonra altta kalan pelletin üzerine 37°C'e ısıtılmış 0,075 M KCL solüsyonu vorteks üzerinde damla damla (800-1000 rpm devirde) eklendi ve tüpler 30 dk. 37°C lik etüve kaldırıldı.
3. Süre sonunda tüpler 800 rpm'de 8 dk. santrifüj edildi.
4. Süpernatantları pastör pipetle atıldıktan sonra altta kalan pelletin üzerine, hücreleri fikse etmek amacıyla vorteks üzerinde fiksatif solüsyon (3 kısım metanol + 1 kısım asetik asit) damla damla eklendi.
5. Tüpler 1000 rpm'de 5 dk. santrifüj edildi.
6. Süpernatantları atıldıktan sonra altta kalan pelletin üzerine vorteks üzerinde fiksatif eklendi.
7. Tüpler 1000 rpm'de 5 dk. santrifüj edildi.
8. Süpernatantları atıldıktan sonra altta kalan pelletin üzerine vorteks üzerinde %1 formaldehitli fiksatif eklendi.

9. Tüpler 1000 rpm'de 5 dk. santrifüj edildi.

10. Süpernatantları atıldıktan sonra altta kalan pelletin üzerine fiksatif eklenerek hücreler saklanması için -20 °C'de soğutucuya kaldırıldı.

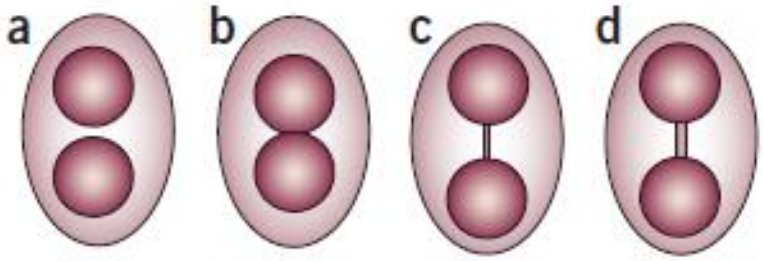
Hücrelerin Boyanması

Temizliği yapılıp etiketlenen lamların üzerine 6-8 damla fiksatif içindeki hücre çözeltisi damlatıldı ve havada kurumaya bırakıldı. Kuruyan lamlarda hücre kalitesi ve sıklığı faz kontrast mikroskopta kontrol edildi. Uygunluğuna karar verilen lamlar boyaya alındı. Fosfat tampon çözeltisi ile %10'luk Giemsa boyası hazırlandı ve filtre kağıdından geçirildi. Yatay olarak dizilen lamların üzerine 2-3 ml kadar Giemsa boyası konuldu ve lamlar 37 °C'de 20-25 dk. bekletildi. Süre sonunda boyası süzdürülen lamlar şale içinde birkaç kez boyası akana kadar distile suyla yıkandı ve havada kurumaya bırakıldı. Havada kuruyan lamlar ışık mikroskobunda (400 büyütme ile) kalite açısından kontrol edildikten sonra, uygunluğuna karar verilen lamlar entellan ile kapatılıp sayıma hazır hale getirildi.

Mikroskopik Değerlendirme

Aşağıdaki özelliklere sahip olan binükleat hücreler skorlama için kullanıldı (Şekil 15).

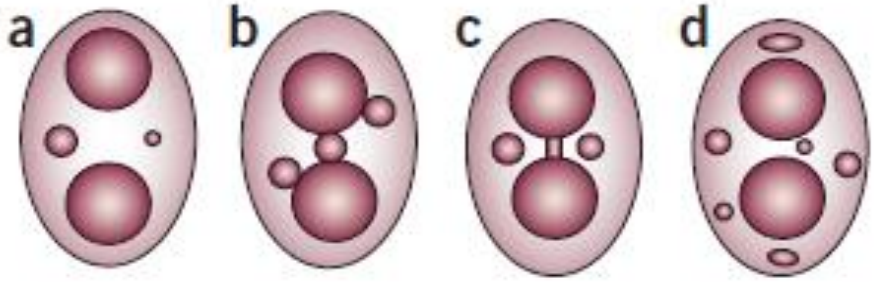
- BN hücrede bulunan iki çekirdek, sağlam nükleer membranlara sahip olmalı ve aynı sitoplazmik alan içinde bulunmalıdır.
- BN hücrede bulunan iki çekirdeğin büyüklüğü, boyama şekli ve boyama yoğunluğu yaklaşık olarak eşit olmalıdır.
- BN hücre içindeki iki nukleus birbiriyle nukleoplazmik köprü ile bağlanabilir. Fakat bu köprü, nukleus çapının 1/4 'ünden büyük olmamalıdır.
- BN hücrenin iki nukleusu birbirine temas edebilir, ancak ideal olanı üst üste binmemeleridir. Üst üste binmiş BN hücrelerde ancak her bir nukleusun sınırları ayırt edilebiliyorsa sayılmalıdır.
- BN hücrelerin sitoplazmik sınırı veya zarı sağlam olmalı ve komşu hücrelerin sitoplazmik sınırından açıkça ayırt edilebilmelidir.



Şekil 15. Değerlendirmeye uygun BN hücreler: a) İdeal BN hücre; b) Birbirine temas eden BN hücre; c) Nukleusları arasında dar nukleplazmik köprü olan BN hücre; d) Oldukça geniş nukleoplazmik köprülü BN hücre (92)

MN değerlendirme kriterleri de aşağıdaki gibidir (Şekil 16):

- MN'lar morfolojik olarak ana çekirdeğe özdeştirler fakat daha küçüktürler.
- MN'lar yuvarlak ya da oval şekillidir.
- MN çapı (BN insan lenfositlerinde) ana nukleusun çapının ortalama 1/16 ila 1/3 'ü arasında değişir.
- MN'lar ana nukleusla aynı şekilde kolayca boyanırlar ve mikroskopta boya ile artefakt yapmazlar.
- MN'lar ana çekirdekle aynı yoğunlukta (Nadiren de daha koyu) boyanırlar.
- MN'lar ana nukleus ile bağlantılı olmamalıdır.
- MN ana çekirdeklere dokunabilir ancak üst üste gelemez ve nükleer sınırları ayırt edilebilir olmalıdır (92).



Şekil 16. BN hücrelerdeki skorlanabilen tipik MN görünümleri (92)

Hazırlanan prepearatlar ışık mikroskobunda 40'lık objektifte 400 büyütmede incelendi. Her bir lamda yaklaşık 1000 binukleat (BN) hücre sayıldı ve skorlandı. BN hücreler ve içerdikleri MN sayıları kaydedildi. MN'lerin binde oranları saptandı.

Toplam MN sayısını tespit etmek için aşağıdaki formül kullanıldı.

(1 MN'li Hücre Sayısı x 1) + (2 MN'li Hücre Sayısı x 2) + (3 MN'li Hücre Sayısı x 3) + (4 MN'li Hücre Sayısı x 4) +…+ = Toplam MN Sayısı

Binde oranlarını tespit amacıyla da $\frac{x}{1000} = \frac{Toplam\ MN\ Sayısı}{Sayılan\ BN\ sayısı}$ eşitliği kullanıldı ve binde MN sayıları (x) tespit edildi.

İstatistik Değerlendirme

Çalışmamızın istatistik değerlendirmeleri R 4.1.0 ile yapılmıştır. Friedman Testi, Varyans analizi ve Spearman Korelasyon analizi kullanılmıştır.

BULGULAR

MN SAYIM SONUÇLARI

ASA'nın radyoprotektif etkisini belirlemek ve referans radyoprotektör Amifostin metaboliti WR-1065 ile kıyaslamak amacıyla 4 gönüllü vericide MN deneyleri yapıldı ve skorlandı. Her bir gönüllüye ait MN sayım sonuçları Tablo 4,5,6, ve 7'de bireysel olarak verildi. Bu tablolarda toplam MN sayısı ***"(1 MN'li Hücre Sayısı x 1) + (2 MN'li Hücre Sayısı x 2) + (3 MN'li Hücre Sayısı x 3) + (4 MN'li Hücre Sayısı x 4) +…+ = Toplam MN Sayısı"*** formülüne göre hesaplanıp 1000 BN hücreye göre oranlandı. Tablolarda MN/BN oranı 1000 hücreye göre verildi.

Gönüllü A.S.'ye ait kan örneklerinde 2 Gy + ASA deneyinde sayılacak kadar hücre elde edilemedi. Bazı deney setlerinde 1000 BN sayılamadı.

Tablo 4. Gönüllü A.S.'ye ait MN sayım sonuçları

Gruplar	Sayılan Toplam BN	MN Sayıları						Toplam MN	MN/BN Oranı*
		0	1	2	3	4	5		
Kontrol	1000	997	3					3	3
ASA	1000	998	2					2	2
WR-1065	1000	998	2					2	2
2 Gy	1000	919	69	12				93	93
2 Gy + ASA	Sayılamadı							-	-
2 Gy + WR-1065	1000	921	73	5	1			86	86
4 Gy	1000	729	217	49	4	1		331	331
4 Gy + ASA	1000	841	139	18	2			181	181
4 Gy + WR-1065	1000	786	179	34	1			250	250

* Binde.

Tablo 5. Gönüllü R.S. 'ye MN sayım sonuçları

Gruplar	Sayılan Toplam BN	MN Sayıları						Toplam MN	MN/BN Oranı*
		0	1	2	3	4	5		
Kontrol	1000	996	4					4	4
ASA	1000	997	3					3	3
WR-1065	1000	996	4					4	4
2 Gy	576	513	60	2	1			67	116
2 Gy + ASA	1000	872	122	5	1			135	135
2 Gy + WR-1065	1000	894	99	7				113	113
4 Gy	1000	642	269	68	18	3		471	471
4 Gy + ASA	1000	735	207	49	9			332	332
4 Gy + WR-1065	1000	691	241	52	10	2	1	388	388

* Binde.

Tablo 6. Gönüllü T.G. 'ye ait MN sayım sonuçları

Gruplar	Sayılan Toplam BN	MN Sayıları						Toplam MN	MN/BN Oranı*
		0	1	2	3	4	5		
Kontrol	783	781	2					2	3
ASA	942	940	2	2				6	6
WR-1065	865	864	1					1	1
2 Gy	1000	908	82	10				102	102
2 Gy + ASA	1000	901	89	10				109	109
2 Gy + WR-1065	1000	909	83	7	1			100	100
4 Gy	578	421	122	33		1	1	197	341
4 Gy + ASA	764	556	149	47	12			279	365
4 Gy + WR-1065	1000	723	211	59	7			350	350

* Binde.

Tablo 7. Gönüllü T.K. 'ya ait MN sayım sonuçları

Gruplar	Sayılan Toplam BN	MN Sayıları						Toplam MN	MN/BN Oranı*
		0	1	2	3	4	5		
Kontrol	1000	999	1					1	1
ASA	1000	999	1					1	1
WR-1065	1000	999	1					1	1
2 Gy	1000	934	59	7				73	73
2 Gy + ASA	1000	942	54	4				62	62
2 Gy + WR-1065	937	867	63	6	1			78	83
4 Gy	663	540	96	24	2	1		154	232
4 Gy + ASA	634	543	77	12	1	1		108	170
4 Gy + WR-1065	660	532	103	21	4			157	238

ASA ve WR-1065 uygulanan örneklerin doğal MN sıklığı üzerine etkisini belirlemek için Kontrol, ASA ve WR-1065 MN sıklıkları Friedman testi ile karşılaştırıldı ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (p= 0,497) (Tablo 8).

Tablo 8. Gönüllülerin Kontrol, ASA ve WR-1065 uygulamalarıyla gözlenen MN sıklıkları

GÖNÜLLÜ	Kontrol*	ASA*	WR-1065*
A.Ş.	3	2	2
R.S.	4	3	4
T.G.	2	6	1
T.K.	1	1	1
Ortalama ± sd Medyan (25-75 persantil)	2,5 ± 1,29 2,5 (1,25-3,75)	3 ± 2,16 2,5 (1,25-5,25)	2 ± 1,41 1,5 (1-3,5)
p		**0,497**	

**MN/BN 1000 hücrede.*

Bağımlı gruplar arası (Kontrol, 2 Gy, 4 Gy) karşılaştırmalarda tekrarlı ölçümlerde varyans analizi kullanıldı. Dozlar ile MN sayısı arasındaki ilişki ise Spearman Korelasyon analiziyle incelendi. (Tanımlayıcı istatistikler, ortalama ± standart sapma (sd) ve medyan (25-75 persantil) olarak gösterilmiştir). Korelasyon katsayısı r= 0,948 ve p<0,001 bulundu. Doz düzeyleri (Kontrol, 2 Gy, 4 Gy) ile MN sıklıkları arasında pozitif yönde kuvvetli ilişki olduğu yönünde değerlendirildi (Tablo 9).

Tablo 9. Bağımlı gruplar MN sıklıkları karşılaştırma tablosu

GÖNÜLLÜ	Kontrol	2 Gy	4 Gy
A.Ş.	3	93	331
R.S.	4	116	471
T.G.	3	102	341
T.K.	1	73	232
Ortalama ± sd Medyan (25-75 persantil)	2,75 ± 1,26 3 (1,5-3,75)	96 ± 18,02 97,5 (78-112,5)	343,75 ± 98,07 336 (256,75-438,5)
p		**0,006**	

İkili karşılaştırmalarda ise aşağıdaki sonuçlara ulaşılmıştır.
Kontrol ve 2 Gy grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır (p= 0,002).
Kontrol ve 4 Gy grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır (p= 0,006).
2 Gy ve 4 Gy grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır (p= 0,009).

2 Gy ile ASA ve WR-1065 uygulamaları 3 gönüllüden hazırlanan preparatlarda sayıldı. Ancak 1 gönüllünün 2 Gy + ASA preparatı değerlendirilemediği için 3 gönüllünün sonuçları kullanılarak istatistik yapıldı. Sonuçlar Tablo 10'da verildi. 2 Gy radyasyon dozunda MN sıklığı 1000 BN hücrede ortalama ± sd olarak 97 ± 21,93 olarak hesaplandı. 2 Gy ile birlikte ASA ve WR-1065 uygulamalarında MN sıklığı sırasıyla ortalama ± sd olarak 102 ± 37 ve 98,67 ± 15,04 bulundu. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilemedi (p= 0,864).

Tablo 10. Gönüllülerin 2 Gy, 2 Gy + ASA ve 2 Gy + WR-1065 uygulamalarıyla gözlenen MN sıklıkları

GÖNÜLLÜ	2 Gy	2 Gy + ASA	2 Gy + WR-1065
A.Ş.	-	-	-
R.S.	116	135	113
T.G.	102	109	100
T.K.	73	62	83
Ortalama ± sd	97 ± 21,93	102 ±3 7	98,67 ± 15,04
Medyan (25-75 persantil)	102 (73-)	109 (62-)	100 (83-)
p		**0,864**	

Deney grubunun 4 Gy'lik kolunda 4 gönüllünün MN frekansları kullanılarak istatistik hesaplar yapıldı. Tablo 11'de verildiği gibi 4 Gy, 4 Gy + ASA ve 4 Gy + WR-1065 gruplarında MN sıklığı 1000 BN hücrede ortalama ± sd olarak sırasıyla 343,75 ± 98,07-262 ± 100,89 ve 306 ± 74,02 olarak bulundu. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı (p= 0,089).

Tablo 11. Gönüllülerin 4 Gy, 4 Gy + ASA ve 4 Gy + WR-1065 uygulamalarıyla gözlenen MN sıklıkları

GÖNÜLLÜ	4 Gy	4 Gy + ASA	4 Gy + WR-1065
A.Ş.	331	181	250
R.S.	471	332	388
T.G.	341	365	350
T.K.	232	170	238
Ortalama ± sd	343,75 ± 98,07	262 ± 100,89	306,5 ± 73,98
Medyan (25-75 persantil)	336 (256,75-438,5)	256,5 (172,75-356,75)	300 (241-378,5)
p		**0,089**	

Grup istatistiklerinin dışında ASA ve WR-1065 uygulamalarının 2 Gy ve 4 Gy de MN sıklığını bireysel olarak nasıl değiştirdiği de aşağıda formüle göre ayrıca hesaplandı. Sonuçlar Tablo 12'de verildi.

$$Değişim\ Yüzdesi = \frac{2\ Gy\ \ MN\ sıklığı - \ ASA\ MN\ sıklığı}{2\ Gy\ \ MN\ sıklığı} * 100$$

Tablo 12. ASA ve WR-1065 uygulamalarının bireysel değerlendirmeleri (Değişim yüzdeleri)

GÖNÜLLÜ	2 Gy + ASA*	2 Gy + WR-1065*	4 Gy + ASA*	4 Gy + WR-1065*
A.Ş.	-	↓ 7,5	↓ 45,3	↓ 24,5
R.S.	↑ 16,1	↓ 2,9	↓ 29,5	↓ 17,6
T.G.	↑ 6,9	↓ 2,0	↑ 7,1	↑ 2,7
T.K.	↓ 15,1	↑ 14,0	↓ 26,7	↑ 2,4

**MN değişim yüzdesi, ↑: Artış, ↓: Azalma.*

TARTIŞMA

Günümüzde insanoğlu teknolojideki gelişmelerle birlikte, sağlık, enerji üretimi ve endüstriyel alanda kullanımı sebebiyle iyonizan radyasyonla sıklıkla karşı karşıya kalmaktadır. Yapılan çeşitli bilimsel çalışmalarla iyonizan radyasyonların canlı organizma üzerinde kuşaklar boyu aktarılabilen mutasyonlardan, kanser oluşumu ve ölüm arasında geniş bir skalada hayatı tehdit edici etkilerinin olduğu gösterilmiştir. İyonizan radyasyonların insan sağlığı üzerindeki bu olumsuz etkilerine rağmen, tıpta gerek görüntüleme de gerekse kanser tedavisinde kullanılmaları zorunludur. Bu kullanım esnasında sağlıklı dokuların korunması esastır. Radyasyonla yapılan tedavilerde tümör dokusu yok edilirken normal dokuların radyasyon hasarından korunması mecburidir. Bu amaçla tedavi protokollerinde radyoprotektör ajanlar kullanılır. En çok kullanılan ajan Amifostindir. Amifostin, radyoprotektif etkisini aktif metaboliti olan WR-1065 üzerinden gösterir. Kanser hücreleri alkalen fosfataz enzimini ancak çok düşük düzeyde sentezleyebildiklerinden Amifostin-WR-1065 dönüşümü açısından yetersiz kalmaktadırlar ve radyasyon sebebiyle oluşan yüksek oksidan ortam sebebiyle oluşan hücresel hasara ve DNA hasarına uygun yanıt verememektedirler. Böylece kanser hücreleri hücresel hasar ve DNA hasarları sebebiyle hücre ölümüne sürüklenmektedirler ve tümör dokusu yok edilmiş olmaktadır.

Çalışmamızda 3 ya da 4 gönüllüden alınan kan örneklerinde ASA ve WR-1065 uygulamalarının 2 Gy ve 4 Gy radyasyon maruziyetinde MN sıklığı üzerine etkileri incelenmiştir.

Tek başına ASA ve WR-1065 uygulamaları (Işınlamadan 30 dakika önce uygulandı ve hücreler 2 kez yıkandıktan sonra ışınlandı) MN'lerın doğal sıklığında istatistiksel olarak anlamlı bir artışa yol açmamıştır ($p= 0.497$) (Tablo 8). Ulaşılabilen tüm çalışma (12, 13, 58) sonuçları

birlikte değerlendirildiğinde WR-1065'in in-vitro şartlarda çok geniş bir doz aralığında doğal MN sıklığını arttırmadığı sonucuna varılmıştır.

ASA'nın doğal MN sıklığı üzerine etkisini değerlendiren az sayıda çalışmaya ulaşılabilmiştir. Aşağıda detayları verilen bu çalışma sonuçlarına göre ASA'nın doğal MN sıklığını etkilemediği görülmektedir.

Dandah ve ark.'nın (19), ASA ve İbuprofenin, meme kanseri hastaları ile sağlıklı bireylerin lenfositlerinde DNA hasarı üzerindeki etkilerini araştırdıkları çalışmada, 500 ng/ml ASA ile 250 ng/ml İbuprofen uygulayarak Komet ve MN analizi yapmışlardır. ASA'nın doğal MN sıklığını değiştirmediği bildirmişlerdir. Bu çalışmaya benzer başka bir çalışmada da Guma ve ark. (17), 500 µg/ml ASA ile 200 µg/ml İbuprofeni prostat kanseri hastaları ile sağlıklı bireylerin lenfositlerinde MN ve komet analizi ile inceleyerek ASA'nın doğal MN sıklığını etkilemediğini bildirmişlerdir.

2 Gy ve 4 Gy radyasyon uygulamalarının doğal MN sıklıkları üzerine etkisini değerlendirdiğimizde ise her iki dozun da doğal MN sıklıklarını istatistiksel olarak anlamlı derecede arttırdığı görülmüştür (p= 0.006) (Tablo 9).

Dikkat çeken başka bir husus da 2 Gy radyasyon uygulanan örneklerde MN sıklığının bazı çalışma sonuçlarına göre daha düşük olarak gözlenmesidir. Bizim çalışmamızda MN sıklığı 2 Gy' de ortalama ± sd= 97 ± 21,93 olarak bulundu (Tablo 10). Diğer çalışma sonuçlarında ise 153 ± 45 (101), 192,4 ± 31,0 (96) , 212,08 ± 6,9 (12), 220,8 ± 21,93 (102), 270 ± 19,8 (90), 274 ± 53,03 (103), 285 (87), 397 (104) olarak tespit edilmiştir. Bunun yanında Kopjar ve ark. (10) tarafından bulunan değer ortalama 89'dur.

Çalışmamızda 4 Gy radyasyon uygulanan örneklerde bulunan MN sıklığı ortalama ± sd 343,75 ± 98,07'dir (Tablo 11). Bu sonuç da diğer çalışma sonuçlarına göre (417 (96) , 449 (101), 712 (102), 760 (90), 790 (103), 899 (104)) daha düşük bulunmuştur. Bu durumun örneklem grupları arasındaki biyolojk çeşitlilik, ışınlanma şartları gibi nedenlere bağlı olabileceği düşünülmüştür. Her iki radyasyon dozunda da elde ettiğimiz sonuçlar ışınlamada kullandığımız linak cihazı için doz cevap eğrisi oluşturma gerekliliğini ortaya çıkarmıştır.

Literatürde, çalışmamızda ASA'nın radyoprotektif etkisini kıyaslamak için referans molekül olarak seçtiğimiz WR-1065'in, radyasyon sebebiyle oluşan oksidatif hücre hasarını ve DNA hasarını önleyebildiğini gösteren az sayıda çalışma bulunmuştur. Bu sebeple WR-1065'in yanında direkt Amifostin kullanılan çalışmalar da sonuçlarımızı değerlendirmek için kullanılmıştır. Farklı çalışma dizaynlarına sahip bu çalışmalar kısaca gözden geçirilecek olursa;

Littlefield ve ark. (58) WR-1065'in etkisini, insan lenfositlerinde kromozom aberasyon yöntemi ile incelemişlerdir. Gönüllülerden alınan lenfositlere ışınlamadan 30 dakika önce 1, 2, 4,

8 ve 12 mM konsantrasyonda WR-1065 uygulanarak ardından 3,1 Gy X-ışını ile ışınlama yapılmıştır. Deney sonucunda X-ışını ile indüklenen MN oluşumunun 1 ve 2 mM'lik konsantrasyonlarda ~%50 oranında, 4, 8 ve 12 mM da ise ~%80 oranında engellendiğini tespit etmiştirler. Aynı çalışmada disentrik analizi de yapılmış, monoenerjetik 1 ve 6 MeV nötronlarla ışınlanan lenfositlerde disentrik sayılarında verilen dozla uyumlu olmayan ve ~%70'e (%14-70) varan azalmaya neden olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada kullanılan WR-1065 dozları yüksek dozlardır. Bizim çalışmamızda Amifostinin farmokinetik çalışmalarında tespit edilen WR-1065 plazma pik konsantrasyon aralığında (C_{max}: 47,5 ila 135 μM) bir konsantrasyon kullanılmıştır (100, 105). Bu çalışma sonuçları ile bizim çalışama sonuçlarını karşılaştırdığımızda sonuçlar çelişmektedir. Bu durum kullandığımız dozun Littlefield'ın çalışmasındaki en düşük dozun 50 de 1'i olmasından kaynaklandığı düşünülmüştür.

Cs-137 γ ışınları ile 1 ve 2 Gy dozlarda WR-1065 ile Amerikan Gingseng (Panax quinquefolius L.) ekstarktının radyoprotektif etkisinin incelendiği bir çalışmada 12 sağlıklı gönüllüden alınan kan örneklerine MN testi 0. dakika ve ışınlamadan sonra 90.dakikada çeşitli dozlarda Gingseng ekstraktı ve WR-1065 uygulanmış ve WR-1065 0.saatte, 1 Gy de %57,5 (1 mM), ve %61,2 (3 mM), 2 Gy de %36,2 (1 mM), ve %54,4 (3 mM) oranında MN sıklığında azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (13). Aynı araştırmacı bir başka çalışmasında ise 40 gönüllü ile yaptığı Amerikan Gingeng'in ışınlama sonrası (90.dakika) radyoprotektif etkisini ortaya koymak için WR-1065 ile aynı deney şartlarında karşılaştırmış ve o çalışmada da 1 Gy de %42,6 (1 mM) ve %52 (3 mM), 2 Gy de %38,3(1 mM) ve %33,4 (3 mM) olarak bulunmuştur (12).

Bizim çalışmamızda 2 Gy ve 2 Gy + WR-1065 uygulanan grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir (Tablo 10). Ancak 4 Gy ve 4 Gy + WR-1065 uygulanan grup arasında istatistiksel olarak anlamlı olmasa da (p= 0,089) (Tablo 11) deney grubuna bireysel olarak bakıldığında 2 gönüllünün MN sayılarında %24,5 ve %17,6 düşüş gözlendiği görülmektedir. Diğer 2 gönüllüde ise çok minimal artışlar görülmektedir (Tablo 12). Bu durumun biyolojik çeşitlilik sebebiyle gözlenebilen farklardan ve çalışmamızdaki gönüllü sayısının görece az olmasından kaynaklandığı düşünülmüştür. Gönüllü sayısının arttırılmasının daha tutarlı bir veri elde edilmesini sağlayacağı kanaatine varılmıştır.

Karşılaştırmada kullanılan çalışmaların WR-1065 dozları bizim çalışmamıza oranla 50 ila 600 kat fazladır. Bu sebepten kullandığımız dozun Littlefield ve Lee'nin çalışmalarına oranla çok düşük kalan bir dozda yapıldığı için istatistiksel olarak anlamlı bir koruyucu etkiyi gösteremediği kanaatine varılmıştır.

Amifostinle yapılan çalışmaları değerlendirecek olursak;

Kopjar ve ark. (10), Amifostin ve Melatonin'in radyoprotektif etkilerini insan lenfositlerinde MN ve kardeş kromatid değişimi yöntemleri ile araştırmışlardır. 7,7 mM Amifostin, ve 2 mM Melatonin ve bunların kombinasyonu ile 30 dakika ön işleme tabi tutulan hücreler daha sonra 2 Gy Co-60 ile ışınlanmışlardır. Çalışma sonucunda Amifostinin MN sayılarında %42 azalmaya neden olduğu bildirilmiştir. Işınlama öncesi Melatonin ve Amifostin uygulamasının (Tekli ve kombine) lenfositlerde DNA hasarını önlediği ve Melatoninin Amifostine göre daha çok koruduğunu göstermişlerdir. Bu çalışma 1 kişinin kanı kullanılarak yapılmıştır.

Mozdarani ve ark. (9) MN yöntemi ile, Amifostinin radyoprotektif etkisini alkalen fosfataz ile ve alkalen fosfataz olmadan, 6 Gy γ ışınları kullanarak incelemişlerdir. Deney sonucunda; Amifostin uygulamasının tek başına ve alkalen fosfataz varlığında MN frekansını arttırdığı ancak bu artışın istatiksel olarak anlamlı olmadığı bildirilmiştir. Işınlanan kan örneklerine ışınlamadan 15 dakika önce ve sonra 2, 4 ve 6 mM dozlarda Amifostin ve/veya 1 IU/ml alkalen fosfataz uygulamışlardır. Işınlama öncesi (6 Gy) Amifostin uygulanan deney setlerinde sadece 2 mM Amifostin uygulaması MN sıklığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalmaya yol açmış, 4 ve 6 mM Amifostin uygulamaları ise bir azalmaya yol açsa da bu oran istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Alkalen fosfataz varlığında ise tüm Amifostin dozları radyoprotektif olarak anlamlı değerlendirilmiştir. Işınlama sonrası uygulamalarda ise Amifostinin bütün dozları radyoprotektif bulunmuştur ve alkalen fosfataz varlığında bu etki artmıştır. Bu çalışmanın örneklem sayısı 2 kişidir.

Islamian ve ark. (11), Amifostin ve Likopenin radyoprotektif etkisini kromozom aberasyonu yöntemi ile 40 sağlıklı gönüllüden alınan lenfosit örnekleri ile çalışmışlardır. Deney planında, ışınlamadan 30 dakika önce 250 µg/ml (= 1,17 mM) Amifostin ve 5 µg/ml Likopen ile bunların kombinasyonlarını uygulamışlar, daha sonra Co-60 γ ışınları ile 1, 2, 3 ve 4 Gy dozlarda ışınlamışlardır. Deney sonucunda Amifostin'in dozdan bağımsız olarak sırasıyla 1 Gy için %15,8, 2 Gy için %21,94, 3 Gy için %4,5 ve 4 Gy için %11,6 oranında disentrik kromozom aberasyonlarında anlamlı azalma sağladığı gösterilmiştir.

Amifostin kullanılan çalışmalarda Amifostin-WR-1065 dönüşümü doz anlamında tam olarak projekte edilemese de Amifostinin radyoprotektif etkisi olduğu görülmektedir. Bu etkinin hücreler tarafından WR-1065'e metabolize edilmesi sonucu ortaya çıktığı varsayılabilir.

WR-1065 için final olarak; diğer çalışmalarda kullanılan yüksek konsantrasyonların, kişide herhangi bir toksisiteye yol açmadan veya Amifostinin metabolizma hızı (100, 105) göz önüne

alındığında insanda elde edilmesi zor gözükmektedir. Bu yüzden bizim çalışmamızda kullanılan WR-1065 dozunun olası biyolojik sonuçları yansıtma konusunda diğer çalışma sonuçlarına göre daha gerçekçi olduğu kanaatine varılmıştır.

Yaptığımız literatür taramalarında bizim çalışmamızdaki gibi ASA'nın radyoprotektif etkinliğini insan lenfositlerinde MN analizi ile araştıran benzer bir çalışmaya rastlanılmamıştır. ASA'nın radyasyon kaynaklı hasarlar üzerindeki etkisini farklı metodolojilerle ve farklı organizma ve hücre tiplerinde inceleyen diğer çalışmalar kısaca şunlardır;

Demirel ve ark. (18), ratlarda akciğer dokusunda radyasyon sonucu oluşan oksidatif hasarın engellenmesinde ASA'nın etkisinin olup olmadığını incelemişlerdir. Çalışmada ışınlamadan 15 dakika önce 25 mg/kg ASA ve 200 mg/kg Amifostin uygulanmıştır. Ratlara 6 Gy tüm vücut ışınlaması yapılmış ve akciğer dokusunda glutatyon (GSH), malondialdehit (MDA), myeloperoksidaz (MPO), ve nitrik oksit (NO) seviyelerine ve histopatolojik değerlendirmeye bakarak ASA'nın radyoprotektif etkisi olduğunu bildirmişlerdir.

Niikawa ve ark. (106) tarafından farelerle yapılan bir çalışmada 0,5 Gy X-ışınları ile ışınlanan farelere 0,5 mg/kg, 5 mg/kg ve 50 mg/kg konsantrasyonlarda ASA, ışınlama öncesi ve sonrası (30 dk.) uygulaması yapılarak eritrosit ve retikülositlerde MN'lar skorlanmıştır. Önce uygulamada iyonizan radyasyon hem eritrosit hem de retikülositlerde MN sayısını tüm dozlarda azaltmıştır. 30 dakika sonra uygulamada ise sadece eritrositlerde MN sayısı azalmış, retikülositlerde bir azalma saptanmamıştır.

Erkek farelerle yapılan bir diğer çalışmada (22) 2 Gy ve 4 Gy γ ışınları ile tüm vücut ışınlaması yapılan albino farelere 72 saat öncesinde 0,5 mg/kg, 5 mg/kg ve 50 mg/kg ASA intraperitoneal uygulanmış ve kemik iliği hücrelerinde kromozomal aberasyonlar değerlendirilerek ASA'nın kromozomal aberasyon sayısında azalmaya neden olduğu bildirilmiştir. Aynı yazarların başka bir çalışmasında da ASA'nın sperm hücrelerinde radyasyon hasarını azalttığı bildirilmiştir (21).

Çalışmamızda radyasyon uygulanan deney serilerinde beraberinde ASA uygulamasının hem 2 Gy'de hem de 4 Gy'de MN sayılarında istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe yol açmadığı bulunmuştur. Ancak bireysel ham veriler incelendiğinde (Tablo 4-5-6-7) 2 gönüllünün ASA uygulamalarının özellikle 4 Gy'de MN sıklıklarında WR-1065'e göre daha fazla azalmaya neden olduğu saptanmıştır. Gönüllü sayımızın azlığı sebebiyle, istatistiksel olarak gösterilemese de ASA'nın daha büyük bir örneklem grubuyla çalışıldığında MN sayıları üzerine olan etkisinin ve bu etkinin WR-1065 sonuçlarına göre kıyaslamasının daha tutarlı olacağı kanaatine varılmıştır.

SONUÇLAR

Çalışmamızda, ASA'nın iyonizan radyasyonun organizmada oluşturduğu DNA hasarını engelleyip engellemediği 2 Gy ve 4 Gy X-ışınları kullanılarak, insan lenfosit hücre kültüründe MN yöntemi ile araştırıldı ve referans ajan olarak radyoprotektif etkinliği kanıtlanmış olan WR-1065 ajanının etkinliği ile karşılaştırıldı. Elde edilen sonuçlar şunlardır:

1. ASA ve WR-1065 uygulanan konsantrasyonlarda, (Sırasıyla 25 μg/ml ve 40 μM) doğal MN sıklığında istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe yol açmamıştır.
2. 2 Gy ve 4 Gy uygulamaları doğal MN sıklığında istatistiksel olarak anlamlı bir artışa yol açmıştır.
3. ASA ve WR-1065 uygulamaları 2 Gy uygulanan örneklerde MN sıklığında istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe yol açmamıştır.
4. ASA ve WR-1065, 4 Gy radyasyon uygulamalarında MN sıklığında istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır.

ÖZET

Bu çalışma, Asetil salisilik asitin (ASA) iyonizan radyasyonun oluşturduğu DNA hasarını engelleyip engellemediğini, insan lenfosit hücre kültüründe mikronukleus (MN) yöntemi ile araştırmak ve radyoprotektif etkinliği kanıtlanmış olan WR-1065 ajanının etkinliği ile karşılaştırmak amacıyla yapıldı.

Bu amaçla, gönüllü bireylerden venöz kan örnekleri alındı. Işınlama öncesi kan örneklerine 30 dakika süreyle 25 µg/ml ASA ve 40 µg/ml WR-1065 uygulandı. Uygulama sonrası hücreler 2 kez taze medyum ile yıkanarak ışınlama prosedürüne geçildi. Linak cihazinda 6 MV X-ışınları ile 2 Gy ve 4 Gy dozlarda ışınlandı. Kontrol, ASA, WR-1065, 2 Gy, 4 Gy, 2 Gy + ASA, 2 Gy + WR-1065, 4 Gy + ASA, 4 Gy + WR-1065 olmak üzere 9 tane deney grubu oluşturuldu. Işınlama sonrası hücreler kültür ortamlarına aktarılarak 37°C'de 30 dakika karbondioksitli etüvde inkübasyona alındı. Kültürün 44.saatinde sitokinez aşamasında kültürlere Sitokalazin-B eklendi. Kültür aşaması 68. saatte sonlandırıldı. Fiksasyon işlemini takiben elde edilen lenfosit hücreleri Giemsa ile boyanarak ışık mikroskobunda 400 büyütmede MN sayımları yapılarak istatistiksel değerlendirmesi yapıldı.

Deney sonuçlarına göre, seçilen konsantrasyonlarda ve deney modelinde ASA ve WR-1065 uygulamasının 2 Gy ve 4 Gy dozlarda MN sıklığında istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe yol açmadığı tespit edildi.

Anahtar kelimeler: Mikronukleus, Asetil Salisilik Asit, WR-1065, Radyobiyoloji, Radyoproteksiyon

INVESTIGATION OF RADIOPROTECTIVE EFFECTS OF WR-1065 AND ACETYL SALICYLIC ACID BY MICRONUCLEUS ASSAY

SUMMARY

This study was conducted to investigate whether acetyl salicylic acid (ASA) prevents DNA damage induced by ionizing radiation using micronucleus (MN) assay in human lymphocyte culture and to compare with the efficacy of WR-1065 agent, which radioprotective efficacy has been proven.

For this purpose, venous blood samples were taken from volunteers. Blood samples were treated with ASA and WR-1065 at final concentrations 25 μg/ml and 40 μg/ml respectively. 30 minutes before irradiation. After the treatment, the cells were washed with medium 2 times and the irradiation procedure was started. They were irradiated with 6 MV X-rays in the linak device at 2 Gy and 4 Gy doses. Nine experimental groups were formed as control, ASA, WR-1065, 2 Gy, 4 Gy, 2 Gy + ASA, 2 Gy + WR-1065, 4 Gy + ASA, 4 Gy + WR-1065 After irradiation, the cells were transferred to culture media and then culture flasks were placed into the CO_2 incubator at 37 °C. At the 44.th hour of culture, Cytochalasin- B was added to the cultures at the cytokinesis stage. The culture phase was terminated at 68.th hours. Lymphocytes obtained following the fixation process were stained with Giemsa, and MN scorings were made under the light microscope and statistical evaluation was performed.

According to the results of the experiment, it was determined that ASA and WR-1065 treatments at the selected concentrations and experimental model did not cause a statistically significant change in the frequency of MN at 2 Gy and 4 Gy doses.

Keywords: Micronucleus, Acetyl Salicylic Acid, WR-1065, Radiobiology, Radioprotection

This study was funded by Scientific Research Projects Coordination Unit of Trakya University Project number: 2019/119

KAYNAKLAR

1. Dowlath MJH, Karuppannan SK, Sinha P, Dowlath NS, Arunachalam KD, Ravindran B, et al. Effects of radiation and role of plants in radioprotection: A critical review. Sci Total Environ 2021;779:146431.

2. Ludovici GM, Cascone MG, Huber T, Chierici A, Gaudio P, de Souza SO, et al. Cytogenetic bio-dosimetry techniques in the detection of dicentric chromosomes induced by ionizing radiation: A review. The European Physical Journal Plus 2021;136(5):1-21.

3. Özalpan A. Temel Radyobiyoloji. İstanbul: Haliç Üniversitesi; 2001.

4. Hall EJ, Giaccia AJ. Radiobiology for the Radiologist: LWW. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2018.

5. Mun GI, Kim S, Choi E, Kim CS, Lee YS. Pharmacology of natural radioprotectors. Arch Pharm Res 2018;41(11):1033-1050.

6. Kuntic VS, Stankovic MB, Vujic ZB, Brboric JS, Uskokovic-Markovic SM. Radioprotectors - the evergreen topic. Chem Biodivers 2013;10(10):1791-1803.

7. Dziegielewski J, Baulch JE, Goetz W, Coleman MC, Spitz DR, Murley JS, et al. WR-1065, the active metabolite of amifostine, mitigates radiation-induced delayed genomic instability. Free Radic Biol Med 2008;45(12):1674-1681.

8. Varanda E, Tavares DJJoVA, Toxins. Radioprotection: mechanisms and radioprotective agents including honeybee venom. 1998;4(1):5-21.

9. Mozdarani H, Taheri A, Haeri SA. Assessment of radioprotective effects of amifostine, on human lymphocytes irradiated in vitro by gamma-rays using cytokinesis-blocked micronucleus assay. Iran J Radiat Res 2007;5(1):9-16.

10. Kopjar N, Miocic S, Ramic S, Milic M, Viculin T. Assessment of the radioprotective effects of amifostine and melatonin on human lymphocytes irradiated with gamma-rays in vitro. Arh Hig Rada Toksikol 2006;57(2):155-163.

11. Pirayesh Islamian J, Farajollahi A, Mehrali H, Hatamian M. Radioprotective effects of amifostine and lycopene on human peripheral blood lymphocytes in vitro. J Med Imaging Radiat Sci 2016;47(1):49-54.

12. Lee TK, O'Brien KF, Wang W, Johnke RM, Sheng C, Benhabib SM, et al. Radioprotective effect of American ginseng on human lymphocytes at 90 minutes postirradiation: a study of 40 cases. J Altern Complement Med 2010;16(5):561-567.

13. Lee TK, Wang W, O'Brien KF, Johnke RM, Wang T, Allison RR, et al. Effect of North American ginseng on 137Cs-induced micronuclei in human lymphocytes: a comparison with WR-1065. Phytother Res 2008;22(12):1614-1622.

14. Asanuma M, Nishibayashi-Asanuma S, Miyazaki I, Kohno M, Ogawa N. Neuroprotective effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs by direct scavenging of nitric oxide radicals. J Neurochem 2001;76(6):1895-1904.

15. Demirel C, Kilciksiz S. The effect of acetylsalicylic acid as a radioprotector. Turkish Journal Of Oncology 2011;26(1).

16. Antunes LM, de Barros ELBR, da Luz Dias F, de Lourdes Pires Bianchi M. Acetylsalicylic acid exhibits anticlastogenic effects on cultured human lymphocytes exposed to doxorubicin. Mutat Res 2007;626(1-2):155-161.

17. Guma A, Akhtar S, Najafzadeh M, Isreb M, Baumgartner A, Anderson D. Ex vivo/in vitro effects of aspirin and ibuprofen, bulk and nano forms, in peripheral lymphocytes of prostate cancer patients and healthy individuals. Mutat Res 2021;861-862:503306.

18. Demirel C, Kilciksiz SC, Gurgul S, Erdal N, Yigit S, Tamer L, et al. Inhibition of radiation-induced oxidative damage in the lung tissue: May Acetylsalicylic Acid have a positive Role? Inflammation 2016;39(1):158-165.

19. Dandah O, Najafzadeh M, Isreb M, Linforth R, Tait C, Baumgartner A, et al. Aspirin and ibuprofen, in bulk and nanoforms: Effects on DNA damage in peripheral lymphocytes from breast cancer patients and healthy individuals. Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen 2018;826:41-46.

20. Niikawa M, Nagase H. Effect of aspirin on DNA damage induced by MMC in Drosophila. Biomed Pharmacother 2007;61(5):250-253.

21. AlMathkour M, AlSuhaibani E. Protective effect of aspirin on γ radiation-induced sperm malformations in Swiss Albino male mice. American Journal of Life Sciences 2014;2(4):205-215.

22. AlMathkour M, AlSuhaibani E. Protective effect of aspirin on γ radiation induced chromosomal aberrations in Swiss Albino male mice. Research Journal of Radiology 2014;1:1-6.

23. Uzal C, Çaloğlu M. The role of ionizing radiation in the etiology of cancer. Balkan Medical Journal 2002;2002(3).

24. Çetingöz R, Garipağaoğlu M, Uzal C, Bilge H, Gökçe Ç, Özyiğit G, et al. Temel ve klinik radyoterapi. İstanbul: Türk Radyasyon Onkolojisi Derneği Yayınları; 2013.

25. Huang XJ, Song CX, Zhong CQ, Wang FS. Research progress in the radioprotective effect of superoxide dismutase. Drug Discov Ther 2012;6(4):169-177.

26. Joiner MC, van der Kogel AJ. Basic clinical radiobiology. Boca Raton: CRC press; 2018.

27. Beyzadeoglu M, Ozyigit G, Ebruli C. Basic radiation oncology. Heidelberg: Springer Science & Business Media; 2010.

28. Khan FM, Gibbons JP. Khan's the physics of radiation therapy. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2014.

29. Halperin EC, Perez CA, Brady LW. Perez and Brady's principles and practice of radiation oncology. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2020.

30. Uzal C. Kanserde Işınlama Teknikleri. Ankara: Sopha Developpement; 1995.

31. Agustí J, Abadal G, Alda J. Electromagnetic Radiation Energy Harvesting–The Rectenna Based Approach. In. London: InTechOpen; 2014. p. 80.

32. Obrador E, Salvador R, Villaescusa JI, Soriano JM, Estrela JM, Montoro A. Radioprotection and Radiomitigation: From the Bench to Clinical Practice. Biomedicines 2020;8(11).

33. Paillet P, Schwank J, Shaneyfelt M, Ferlet-Cavrois V, Jones R, Flarrient O, et al. Comparison of charge yield in MOS devices for different radiation sources. IEEE Transactions on Nuclear Science 2002;49(6):2656-2661.

34. Sato T, Tsuda S, Sakamoto Y, Yamaguchi Y, Niita K. Analysis of dose-LET distribution in the human body irradiated by high energy hadrons. Radiat Prot Dosimetry 2003;106(2):145-153.

35. Painuli S, Kumar N. Prospects in the development of natural radioprotective therapeutics with anti-cancer properties from the plants of Uttarakhand region of India. J Ayurveda Integr Med 2016;7(1):62-68.

36. Wang H, Mu X, He H, Zhang XD. Cancer Radiosensitizers. Trends Pharmacol Sci 2018;39(1):24-48.

37. Maier P, Wenz F, Herskind C. Radioprotection of normal tissue cells. Strahlenther Onkol 2014;190(8):745-752.

38. Dertinger H, Jung H. Molecular radiation biology: the action of ionizing radiation on elementary biological objects. Berlin Heidelberg: Springer Science & Business Media; 2013.

39. Pollard TD, Earnshaw WC, Lippincott-Schwartz J, Johnson G. Cell biology E-book. Philadelphia: Elsevier Health Sciences; 2016.

40. Chatterjee N, Walker GC. Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. Environ Mol Mutagen 2017;58(5):235-263.

41. Dizdaroglu M, Jaruga P. Mechanisms of free radical-induced damage to DNA. Free Radic Res 2012;46(4):382-419.

42. Cadet J, Ravanat JL, TavernaPorro M, Menoni H, Angelov D. Oxidatively generated complex DNA damage: tandem and clustered lesions. Cancer Lett 2012;327(1-2):5-15.

43. Begg A, Steel G. Basic clinical radiobiology. In. London: Oxford Univ. Press Inc.; 1993.

44. Luo J, Mills K, le Cessie S, Noordam R, van Heemst D. Ageing, age-related diseases and oxidative stress: What to do next? Ageing Res Rev 2020;57:100982.

45. Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F, Arcoraci V, et al. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. Oxid Med Cell Longev 2017;2017:8416763.

46. Sen S, Chakraborty R. The role of antioxidants in human health. In: Oxidative stress: diagnostics, prevention, and therapy. Washington, DC: ACS Publications; 2011. p. 1-37.

47. Sies H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. Redox Biol 2015;4:180-183.

48. Nair CK, Parida DK, Nomura T. Radioprotectors in radiotherapy. J Radiat Res 2001;42(1):21-37.

49. Andreassen CN, Grau C, Lindegaard JC. Chemical radioprotection: a critical review of amifostine as a cytoprotector in radiotherapy. Semin Radiat Oncol 2003;13(1):62-72.

50. Upadhyay S, Dwarakanath B, Ravindranath T, Mathew T. Chemical radioprotectors. Defence Science Journal 2005;55(4):403.

51. Muscatello AC. Nutritional supplements as radioprotectors: a review and proposal. In: The Founding Convention of the Mars Society, Boulder, CO, Proceedings. Pt. 3; 1998: Citeseer; 1998.

52. Hofer M, Hoferova Z, Falk M. Pharmacological Modulation of Radiation Damage. Does It Exist a Chance for Other Substances than Hematopoietic Growth Factors and Cytokines? Int J Mol Sci 2017;18(7).

53. Mishra K, Alsbeih G. Appraisal of biochemical classes of radioprotectors: evidence, current status and guidelines for future development. 3 Biotech 2017;7(5):292.

54. Hosseinimehr SJ. Trends in the development of radioprotective agents. Drug Discov Today 2007;12(19-20):794-805.

55. Singh VK, Seed TM. The efficacy and safety of amifostine for the acute radiation syndrome. Expert Opin Drug Saf 2019;18(11):1077-1090.

56. Andreassen CN, Grau C, Lindegaard JC. Chemical radioprotection: a critical review of amifostine as a cytoprotector in radiotherapy. In: Seminars in radiation oncology; 2003: Elsevier; 2003. p. 62-72.

57. Simon ES, Reyna D, Lister RJ, Harteg C, Lipka E. Evaluation of a method for measuring the radioprotective metabolite WR-1065 in plasma using chemical derivatization combined with UHPLC-MS/MS. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 2018;1080:82-89.

58. Littlefield LG, Hoffmann GR. Modulation of the clastogenic activity of ionizing radiation and bleomycin by the aminothiol WR-1065. Environ Mol Mutagen 1993;22(4):225-230.

59. Littlefield LG, Joiner EE, Colyer SP, Sallam F, Frome EL. Concentration-dependent protection against X-ray-induced chromosome aberrations in human lymphocytes by the aminothiol WR-1065. Radiat Res 1993;133(1):88-93.

60. Murley JS, Kataoka Y, Miller RC, Li JJ, Woloschak G, Grdina DJ. SOD2-mediated effects induced by WR1065 and low-dose ionizing radiation on micronucleus formation in RKO human colon carcinoma cells. Radiat Res 2011;175(1):57-65.

61. Murley JS, Kataoka Y, Baker KL, Diamond AM, Morgan WF, Grdina DJ. Manganese superoxide dismutase (SOD2)-mediated delayed radioprotection induced by the free thiol form of amifostine and tumor necrosis factor alpha. Radiat Res 2007;167(4):465-474.

62. Murley JS, Nantajit D, Baker KL, Kataoka Y, Li JJ, Grdina DJ. Maintenance of manganese superoxide dismutase (SOD2)-mediated delayed radioprotection induced by repeated administration of the free thiol form of amifostine. Radiat Res 2008;169(5):495-505.

63. Desborough MJR, Keeling DM. The aspirin story - from willow to wonder drug. Br J Haematol 2017;177(5):674-683.

64. Grosser N, Abate A, Oberle S, Vreman HJ, Dennery PA, Becker JC, et al. Heme oxygenase-1 induction may explain the antioxidant profile of aspirin. Biochem Biophys Res Commun 2003;308(4):956-960.

65. Henneman PL. Protective effects of aspirin against acute myocardial infarction and death in men with unstable angina: Lewis HE, Davis JW, Archibald DG, et al. N Engl J Med 1983; 309: 396–403. Journal of Emergency Medicine 1984;1(4):367.

66. Vane JR, Botting RM. The mechanism of action of aspirin. Thromb Res 2003;110(5-6):255-258.

67. Fiorucci S, Del Soldato P. NO-aspirin: mechanism of action and gastrointestinal safety. Dig Liver Dis 2003;35 Suppl 2:S9-19.

68. Patrono C, Baigent C. Role of aspirin in primary prevention of cardiovascular disease. Nat Rev Cardiol 2019;16(11):675-686.

69. Amann R, Peskar BA. Anti-inflammatory effects of aspirin and sodium salicylate. Eur J Pharmacol 2002;447(1):1-9.

70. Demirel C, Kilciksiz S, Ay OI, Gurgul S, Ay ME, Erdal N. Effect of N-acetylcysteine on radiation-induced genotoxicity and cytotoxicity in rat bone marrow. J Radiat Res 2009;50(1):43-50.

71. Demirel C, Kilciksiz S, Evirgen-Ayhan S, Gurgul S, Erdal N. The preventive effect of N-acetylcysteine on radiation-induced dermatitis in a rat model. J BUON 2010;15(3):577-582.

72. Oberle S, Polte T, Abate A, Podhaisky HP, Schroder H. Aspirin increases ferritin synthesis in endothelial cells: a novel antioxidant pathway. Circ Res 1998;82(9):1016-1020.

73. Shi X, Ding M, Dong Z, Chen F, Ye J, Wang S, et al. Antioxidant properties of aspirin: characterization of the ability of aspirin to inhibit silica-induced lipid peroxidation, DNA damage, NF-kappaB activation, and TNF-alpha production. Mol Cell Biochem 1999;199(1-2):93-102.

74. Drew JE, Padidar S, Horgan G, Duthie GG, Russell WR, Reid M, et al. Salicylate modulates oxidative stress in the rat colon: a proteomic approach. Biochem Pharmacol 2006;72(2):204-216.

75. Baltazar MT, Dinis-Oliveira RJ, Duarte JA, Bastos ML, Carvalho F. Antioxidant properties and associated mechanisms of salicylates. Curr Med Chem 2011;18(21):3252-3264.

76. Sullivan JM, Prasanna PG, Grace MB, Wathen LK, Wallace RL, Koerner JF, et al. Assessment of biodosimetry methods for a mass-casualty radiological incident: medical response and management considerations. Health Phys 2013;105(6):540-554.

77. Ainsbury EA, Bakhanova E, Barquinero JF, Brai M, Chumak V, Correcher V, et al. Review of retrospective dosimetry techniques for external ionising radiation exposures. Radiat Prot Dosimetry 2011;147(4):573-592.

78. Herate C, Sabatier L. Retrospective biodosimetry techniques: Focus on cytogenetics assays for individuals exposed to ionizing radiation. Mutat Res 2020;783:108287.

79. Michel R, Daraoui A, Gorny M, Jakob D, Sachse R, Romantschuk LD, et al. Retrospective dosimetry of Iodine-131 exposures using Iodine-129 and Caesium-137 inventories in soils--A critical evaluation of the consequences of the Chernobyl accident in parts of Northern Ukraine. J Environ Radioact 2015;150:20-35.

80. Coşkun M, Coşkun M. Biyolojik dozimetri ve ilgili gelişmeler. Cerrahpaşa Tıp Dergisi 2003;34(4).

81. Romm H, Wilkins RC, Coleman CN, Lillis-Hearne PK, Pellmar TC, Livingston GK, et al. Biological dosimetry by the triage dicentric chromosome assay: potential implications for treatment of acute radiation syndrome in radiological mass casualties. Radiat Res 2011;175(3):397-404.

82. Di Giorgio M, Barquinero JF, Vallerga MB, Radl A, Taja MR, Seoane A, et al. Biological dosimetry intercomparison exercise: an evaluation of triage and routine mode results by robust methods. Radiat Res 2011;175(5):638-649.

83. McNamee JP, Flegal FN, Greene HB, Marro L, Wilkins RC. Validation of the cytokinesis-block micronucleus (CBMN) assay for use as a triage biological dosimetry tool. Radiat Prot Dosimetry 2009;135(4):232-242.

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

85. Sommer S, Buraczewska I, Kruszewski M. Micronucleus Assay: The State of Art, and Future Directions. Int J Mol Sci 2020;21(4).

86. Swartz HM, Williams BB, Flood AB. Overview of the principles and practice of biodosimetry. Radiat Environ Biophys 2014;53(2):221-232.

87. Tewari S, Khan K, Husain N, Rastogi M, Mishra SP, Srivastav AK. Peripheral Blood Lymphocytes as In Vitro Model to Evaluate Genomic Instability Caused by Low Dose Radiation. Asian Pac J Cancer Prev 2016;17(4):1773-1777.

88. Gartner LP. BRS Cell Biology and Histology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2018.

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

90. Pala FS, Alkaya F, Tabakcioglu K, Tokatli F, Uzal C, Parlar S, et al. The Effects of Micronuclei with Whole Chromosome on Biological Dose Estimation. Turk J Biol 2008;32(4):283-290.

91. Sioen S, Cloet K, Vral A, Baeyens A. The Cytokinesis-Block Micronucleus Assay on Human Isolated Fresh and Cryopreserved Peripheral Blood Mononuclear Cells. J Pers Med 2020;10(3).

92. Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. Nat Protoc 2007;2(5):1084-1104.

93. Samanta S, Dey P. Micronucleus and its applications. Diagn Cytopathol 2012;40(1):84-90.

94. Şekeroğlu V, Atlı-Şekeroğlu Z. Genotoksik hasarın belirlenmesinde mikronükleus testi. Turk Hij Den Biyol Derg 2011;68(4):241-252.

95. Fenech M, Kirsch-Volders M, Natarajan AT, Surralles J, Crott JW, Parry J, et al. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. Mutagenesis 2011;26(1):125-132.

96. Fenech M, Morley AA. Measurement of micronuclei in lymphocytes. Mutat Res 1985;147(1-2):29-36.

97. Fenech M. Cytokinesis-Block Micronucleus Cytome Assay Evolution into a More Comprehensive Method to Measure Chromosomal Instability. Genes (Basel) 2020;11(10).

98. Tiwari P, Kumar A, Balakrishnan S, Kushwaha HS, Mishra KP. Radiation-induced micronucleus formation and DNA damage in human lymphocytes and their prevention by antioxidant thiols. Mutat Res 2009;676(1-2):62-68.

99. Nagelschmitz J, Blunck M, Kraetzschmar J, Ludwig M, Wensing G, Hohlfeld T. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of acetylsalicylic acid after intravenous and oral administration to healthy volunteers. Clin Pharmacol 2014;6:51-59.

100. Korst AE, Eeltink CM, Vermorken JB, van der Vijgh WJ. Pharmacokinetics of amifostine and its metabolites in patients. Eur J Cancer 1997;33(9):1425-1429.

101. Atanasova P, Hadjidekova V, Staynova A, Hristova R. The micronuclei frequency as a biological dosimeter of absorbed dose in case of radiation accidents. Trakia Journal of Sciences 2009;7(4):28-32.

102. Tabakçıoğlu K. Mirisetin'in insan lenfosit DNA'sı üzerindeki radyoprotektif etkisinin incelenmesi [Tez]. Edirne: Trakya Universitesi Fen Bilimleri Enstitüsü; 2013.

103. Rastkhah E, Zakeri F, Ghoranneviss M, Rajabpour MR, Farshidpour MR, Mianji F, et al. The cytokinesis-blocked micronucleus assay: dose-response calibration curve, background frequency in the population and dose estimation. Radiat Environ Biophys 2016;55(1):41-51.

104. Lusiyanti Y, Alatas Z, Syaifudin M, Purnami S. Establishment of a Dose-response Curve for X-ray-Induced Micronuclei in Human Lymphocytes. Genome Integr 2016;7:7.

105. Souid AK, Dubowy RL, Blaney SM, Hershon L, Sullivan J, McLeod WD, et al. Phase I clinical and pharmacologic study of weekly cisplatin and irinotecan combined with amifostine for refractory solid tumors. Clin Cancer Res 2003;9(2):703-710.

106. Niikawa M, Chuuriki K, Shibuya K, Seo M, Nagase H. Effect of aspirin on chromosome aberration and DNA damage induced by X-rays in mice. Radiat Eff Defect S 2008;163(7):655-660.

TABLOLAR VE ŞEKİLLER LİSTESİ

TABLOLAR

Tablo 1. İyonlaştırıcı radyasyon tiplerine göre LET değerleri 7
Tablo 2. İyonizan radyasyonun memeli sistemleri üzerindeki etkileri 12
Tablo 3. Dozimetri çeşitleri 21
Tablo 4. Gönüllü A.S.'ye ait MN sayım sonuçları 36
Tablo 5. Gönüllü R.S.'ye ait MN sayım sonuçları 37
Tablo 6. Gönüllü T.G.'ye ait MN sayım sonuçları 37
Tablo 7. Gönüllü T.K.'ya ait MN sayım sonuçları 37
Tablo 8. Gönüllülerin Kontrol, ASA ve WR-1065 uygulamalarıyla gözlenen MN sıklıkları. 38
Tablo 9. Bağımlı gruplar MN sıklıkları karşılaştırma tablosu 38
Tablo 10. Gönüllülerin 2 Gy, 2 Gy + ASA ve 2 Gy + WR-1065 uygulamalarıyla gözlenen MN sıklıkları 39
Tablo 11. Gönüllülerin 4 Gy, 4 Gy + ASA ve 4 Gy + WR-1065 uygulamalarıyla gözlenen MN sıklıkları 39
Tablo 12. ASA ve WR-1065 uygulamalarının bireysel değerlendirmeleri (Değişim yüzdeleri) 40

ŞEKİLLER

Şekil 1. Dünya üzerindeki radyasyon kaynakları 4
Şekil 2. Elektromanyetik spektrum 6
Şekil 3. İyonizan radyasyonun direkt ve indirekt etkisi 8

Şekil 4. Radyasyonun canlıdaki etki kademeleri 10
Şekil 5. Radyasyon maruziyetiyle doku ve organlarda meydana gelen hasarlar 12
Şekil 6. DNA'nın yapısı 13
Şekil 7. Kromozom ve kromatid tipi aberasyonlar 15
Şekil 8. Amifostinin etki mekanizması 18
Şekil 9. Amifostinin (WR-2721) WR-1065'e ve WR-33278'e kimyasal dönüşümü 19
Şekil 10. ASA'nın yapısı 19
Şekil 11. ASA'nın etki mekanizması 20
Şekil 12. Mikronukleus oluşumu 26
Şekil 13. Normal BN hücreler ve MN'li BN hücrelerin Mikroskop Görüntüsü (Çalışma görüntüsü) 26
Şekil 14. Deney düzeneği 30
Şekil 15. Değerlendirmeye uygun BN hücreler 34
Şekil 16. BN hücrelerdeki skorlanabilen tipik MN görünümleri 34

ÖZGEÇMİŞ

03 Nisan 1977 tarihinde Balıkesir'de dünyaya geldim. İlkokul, ortaokul ve liseyi İzmir'de okudum. 1997-2002 yılında Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünde lisans eğitimimi tamamladım. Migros Türk A.Ş ve Eti Gıda A.Ş gibi şirketlerde çalıştım. 2017-2018 eğitim- öğretim yılı bahar döneminde Trakya üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Radyasyon Biyolojisi Anabilim Dalı'nda Yüksek lisans programına başladım. 2014 yılından beri de Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalında Biyolog olarak görev yapmaktayım.

EKLER

Ek 1

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU Edirne, Türkiye

ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYIBAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL KODU	TÜTF-BAEK 2019/80	
	PROTOKOL ADI	WR-1065 ve Asetil Salisilik Asitin Radyoprotektif Etkinliğinin Mikronükleus Yöntemi ile Araştırılması	
	SORUMLU ARAŞTIRICI ÜNVANI / ADI	Prof. Dr. M. Cem UZAL	
	ARAŞTIRMA MERKEZİ		
	DESTEKLEYİCİ		
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	Tek Merkez Ulusal	Çok Merkez Uluslararası
KARAR BİLGİLERİ	**Karar No: 04/11**	**Tarih:25.02.2019**	
	Fakültemiz Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. M. Cem UZAL'ın sorumluluğunda yapılması planlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen Yüksek Lisans Öğrencisi Aydoğan YALÇIN'ın tez çalışmasının araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş; araştırmaya ilişkin giderlerin gönüllüye ve/veya bağlı bulunduğu sosyal güvenlik kurumuna ödetilmediği koşullarda ve veri toplanacak yerlerden gerekli izinler alındıktan sonra gerçekleştirilmesinde etik bilimsel standartlar açısından sakınca bulunmadığına mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.	
ETİK KURUL BİLGİLERİ			
ÇALIŞMA ESASI	Helsinki Bildirgesi, İyi Klinik Uygulamalar Kılavuzu, TÜTF-BAEK Yönergesi		

ÜYELER

Ünvan/Ad/ Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki(*)	Katılım (**)	İmza
Prof. Dr. Ülfet VATANSEVER ÖZBEK Başkan	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	T.Ü.T.F Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları A.D	K	E (H)	(E) H	
Doç. Dr. Rugül KÖSE ÇINAR Başkan Yardımcısı	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	T.Ü.T.F. Ruh Sağ. ve Has. A.D.	K	E (H)	(E) H	
Dr. Öğr.Üyesi Ruhan Deniz TOPUZ Üye	Tıbbi Farmakoloji.	T.Ü.T.F Tıbbi Farmakoloji A.D	K	E H	E H	Mazeretli
Doç. Dr. Üyesi F. Nesrin TURAN Üye	Biyoistatistik	T.Ü.T.F. BiyoistatistikA.D.	K	E (H)	(E) H	
Doç. Dr. Hakan GÜRKAN Üye	Tıbbi Genetik	T.Ü.T.F. Tıbbi Genetik A.D.	E	E (H)	(E) H	
Prof. Dr. Hasan ÜMİT Üye	İç Hastalıkları	T.Ü.T.F. İç Hastalıkları A.D.	E	**E (H)**	**(E) H**	
Dr. Öğr. Üyesi Oktay KAYA Üye	Fizyoloji	T.Ü.T.F. Fizyoloji A.D.	E	E (H)	(E) H	
Doç. Dr. Cafer Sadık ZORKUN Üye	Kardiyoloji	T.Ü.T.F. Kardiyoloji A.D.	E	E H	E H	Mazeretli
Prof. Dr. Galip EKUKLU Üye	Halk Sağlığı	T.Ü.T.F. Halk Sağlığı A.D.	E	E H	E H	Mazeretli
Prof. Dr. Niyazi Cenk SAYIN Üye	Kadın Hastalıkları ve Doğum	T.Ü.T.F. Kadın Hastalıkları ve Doğum A.D.	E	E H	E H	Mazeretli
Prof. Dr. Sevtap HEKİMOĞLU ŞAHİN Üye	Anestezi ve Reanimasyon	T.Ü.T.F. Anestezi ve Reanimasyon A.D.	K	E H	E H	Mazeretli
Prof. Dr. Atakan SEZER Üye	Genel Cerrahi	T.Ü.T.F. Genel Cerrahi A.D.	E	E H	E H	Mazeretli
Avukat Emine NURLU Üye		T.Ü. Rektörlüğü	K	E (H)	(E) H	
Emekli Öğretmen Sinan SEÇKİN Üye		Serbest Üye	E	E H	E H	

*Araştırma ile ilişki
**Toplantıda Bulunma

Prof. Dr. Ahmet TEZEL
Dekan a.
Dekan Yrd.

Ek 2

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

Sayı : 59803669-604.99 -E.145211
Konu : Sözleşme

13/05/2019

Sayın Prof. Dr. Mustafa Cem UZAL
Trakya Üniversitesi
Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Bölümü
Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı

Yöneticiliğini yapmış olduğunuz ve yüksek lisans öğrencisi Bio. Aydoğan YALÇIN'ın "WR-1065 ve Asetil Salisilik Asitin Radyoprotektif Etkinliğinin Mikronükleus Yöntemi ile Araştırılması" başlıklı yüksek lisans projesinin 12 (on iki) ay süre ve 14.965,00 TL ile desteklenmesine, Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu'nun 30.04.2019 tarih ve 2019/07 sayılı toplantısında mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilimsel Araştırma Projeleri Yönergesi'nin 8. maddesinin 4. bendi uyarınca düzenlenen Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Sözleşmesi'nin tarafınızca imzalanarak 1 (bir) hafta içinde Rektörlüğe iletilmesi hususunda bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

e-imzalıdır
Prof. Dr. Cem UZUN
Rektör Yardımcısı

Ek:Protokol sözleşmesi (2 sayfa)

BELGENİN ASLI
ELEKTRONİK İMZALIDIR
13/05/2019

T.C. TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ SÖZLEŞMESİ

PROJE NO: 2019/119
PROJE NİTELİĞİ: YÜKSEK LİSANS

1-PROJE BAŞLIĞI

WR-1065 ve Asetil Salisilik Asitin Radyoprotektif Etkinliğinin Mikronükleus Yöntemi ile Araştırılması

2-PERSONEL BİLGİLERİ

	Adı ve Soyadı	Unvanı	Telefon
Proje Yöneticisi	Prof.Dr. Mustafa Cem UZAL	Prof.Dr.	(284)236-1074
Araştırmacılar	Bio. Aydoğan YALÇIN	Bio.	(284)235-7651

3-PROJE BÜTÇESİ

Teçhizatın Tanımı :	**Detay listesi ektedir.**
Ekonomik Kod	**Toplam Fiyatı (TL)**
03.03 Yolluk	
03.05 Hizmet Alımı	
03.02 Tüketime Yönelik Mal ve Malzeme Alımı	14,965.00
03.07 Menkul Mal, Gayrimaddi Hak Alım, Bakım ve Onarım Giderleri	
06.01 Mamul Mal Alımı	
06.03 Gayrimenkul Hak Alım,Yazılım Alımları	
TOPLAM ÖDENEK	14,965.00

3-PROJE GELİŞİMİ

1.Projenin Kabul Tarihi: 30-04-2019		
2.Projenin Başlama Tarihi :06-05-2019	**1.Ara Rapor** : 05-11-2019	**Sonuç :** ..... (+ / -)
3.Projenin Bitiş Tarihi : 06-05-2020	**Sonuç Raporu** : 05-05-2020	**Sonuç :** ..... (+ / -)
4.Projenin Süresi: 12 Ay		

5.İLGİLİ BÖLÜM VE FAKÜLTE:

TIP FAKÜLTESİ / DAHİLİ TIP BİLİMLERİ BÖLÜMÜ

6.PROJENİN UYGULAMASI

1. Bu proje 2547 sayılı YÖK Kanununun 4684 sayılı Kanunla değişik 58.maddesi gereğince, Yükseköğretim Kurumları Bilimsel Araştırma Projeleri Hakkında Yönetmelik ve Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Uygulama Yönergesi çerçevesinde yürütülür.
2. Proje süresinde ve harcama fasıllarında Rektörlük onayı alınmadan değişiklik yapılamaz.
3. Proje Yöneticisi her 6 ayın sonunda gelişme raporunu, Bölüm Başkanlığı ve ilgili Dekanlık veya Enstitü Müdürlüğü aracılığı ile Rektörlüğe iletmekle yükümlüdür.
4. Projelerden alınan teçhizat tüm öğretim üyelerinin kullanımına açıktır.
5. Bir ay geçtiği halde gelişme raporu verilmemiş veya süresi bitmiş olup süre uzatımı talebinde bulunulmamış projeler iptal edilir. Bakiye ödenek, BAP Komisyonu tarafından kabul edilecek yeni projelere tahsis edilir veya diğer projelere aktarılır.

	Adı-Soyadı	Tarih	İmza
Proje Yöneticisi :	Prof.Dr. Mustafa Cem UZAL	14.05.2019	

Komisyon Başkanı

Prof. Dr. Cem UZAL
Rektör Yardımcısı