



T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL
ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**İYONİZE RADYASYON UYGULANAN BÖBREK HÜCRE HATTINDA
TİMOKİNONUN DNA HASARI VE APOPTOTİK GENLERE ETKİSİ**

Eczacı Elanur DEMİR
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
(VETERİNER PROGRAMI)
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Sedat ÇETİN

VAN-2024

T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL
ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İYONİZE RADYASYON UYGULANAN BÖBREK HÜCRE HATTINDA
TİMOKİNONUN DNA HASARI VE APOPTOTİK GENLERE ETKİSİ**

Eczacı Elanur DEMİR
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
(VETERİNER PROGRAMI)
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Sedat ÇETİN

VAN-2024

ETİK BEYAN

T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Yüksek Lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum “*İyonize Radyasyon Uygulanan Böbrek Hücre Hattında Timokinonun DNA Hasarı ve Apoptik Genlere Etkisi*” başlıklı tezim; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir. Bu tezdeki bütün bilgiler akademik kurallara ve etik ilkelere uygun olarak hazırlanıp, bu kural ve ilkeler gereği, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce ve sonuçlara atıf yapılmış ve kaynak gösterilmiştir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Elanur DEMİR

Tarih: 21/05/2024

İmza:

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam sırasında yoğun çalışmalarına rağmen maddi ve manevi desteğini esirgemeyen, özveriyle her konuda bana destek olan Danışman Hocam Doç. Dr. Sedat ÇETİN'e, bilimsel desteklerini esirgemeyen Anabilim Dalımızın değerli öğretim üyelerine, tezimin istatistiklerini yapan Dr.Öğr.Üyesi Ahmet Fatih DEMİREL'e, tez çalışmam boyunca bana her konuda yol gösterici ve yardımcı olan Doç. Dr. Osman YILMAZ'a teşekkür ederim.



ÖZET

Demir E. İyonize Radyasyon Uygulanan Böbrek Hücre Hattında Timokinonun DNA Hasarı ve Apoptotik Genlere Etkisi. Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Ana Bilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Van,2024. İyonize radyasyon ışınları olarak bilinen X ve gamma ışınlarıyla birlikte alfa ve beta parçacıkları da geçtikleri ortamda iyonizasyona yol açarlar. Bu çalışmada, böbrek hücre hattında iyonize radyasyon sonucu oluşabilecek DNA hasarı ve apoptotik genlere etkisini belirlemek ve bu oluşan hasara karşı timokinon uygulamasının etkilerinin komet assay ve qRT-PCR yöntemiyle belirlemesi amaçlandı. Böbrek hücreleri hücreleri; 37°C, %5 CO₂ ve %95 nem içeren ortamda, %10 FBS, %1 L-Glutamin ve %1 penisilin/streptomisin DMEM high glukoz besi yeri (medyum) ortamında çoğaltıldı. MTT canlılık testi sonucuna göre belirlenen Timokinon'un hücre proliferasyonunu en çok arttıran konsantrasyonu 10 µM uygulandı. Çalışma grupları; Kontrol, Timokinon, İyonize Radyasyon, İyonize Radyasyon+Timokinon ve Timokinon+İyonize Radyasyon olmak üzere 5 grup oluşturuldu. Çalışma sonucunda 24 ve 72 saat sonunda belirlenen İyonize Radyasyon toksik dozu gruplarına 18 ve 10 Gy olarak belirlendi. 24 saat inkübe edilen hücrelerden Comet assay ile DNA hasar ve RT-qPCR ile de hedef genlerin ekspresyon düzeyleri belirlendi. DNA Hasarı ve Kuyruk Momenti ölçüm değerleri bakımından gruplar arasındaki istatistiklere göre, her ikisinde de RD grubu diğer gruplardan anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur (p<0.05). 24. saatte kaspaz 3,8,9 da TQ ve RD grupları arasında anlamlı fark tespit edilmiştir (p<0.05).72. saatte ise kaspaz 3,8,9 ile kontrol ile diğer gruplar arasında anlamlı fark tespit edilmiştir. Sonuç olarak, yüksek doz iyonize radyasyon uygulamasının 24 ve 72. saatin sonunda böbrek hücre hattında DNA hasarı ve apoptotik enzimleri üzerine etkili olduğu, bununla birlikte, timokinon'un radyasyona bağlı oluşabilecek yan etkileri azaltmada veya etkiler sonucu oluşabilecek komplikasyonları önlemede etkili olabileceği kanısına varıldı.

Anahtar kelimeler: İyonize Radyasyon, Böbrek Hücre Hattı, Timokinon, DNA Hasarı, Apoptozis

ABSTRACT

Demir E.Effect of Thymoquinone on DNA Damage and Apoptotic Genes in the Kidney Cell Line Applied to Ionizing Radiation. Van Yüzüncü Yıl University, Institute of Health Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Biochemistry, Master's Thesis, Van, 2024. Along with X and gamma rays which are known as ionizing radiation, alpha and beta particles also cause ionization in the medium they pass through. In this study, it was aimed to determine the DNA damage that may occur as a result of ionizing radiation in the kidney cell line and its effect on apoptotic genes, and to determine the effects of thymoquinone application against this damage by comet assay and qRT-PCR methods. Kidney cells were reproduced in an environment containing 37°C, 5% CO₂ and 95% humidity, in DMEM high glucose medium with 10% FBS, 1% L-Glutamine and 1% penicillin/streptomycin. According to the MTT viability test results, the concentration of Thymoquinone that increased cell proliferation the most was 10 µM. As working groups, 5 groups were created: Control, Thymoquinone, Ionized Radiation, Ionized Radiation+Thymoquinone and Thymoquinone+Ionized Radiation. As a result of the study, the toxic dose of Ionizing Radiation was determined as 18 and 10 Gy for the groups at the end of 24 and 72 hours. DNA damage was determined by Comet assay from cells which are incubated for 24 hours and expression levels of target genes were determined by RT-qPCR. According to the statistics between the groups in terms of DNA Damage and Tail Moment measurement values, the RD group was found to be significantly higher than the other groups in both ($p<0.05$). A significant difference was detected between TQ and RD groups in caspase 3,8,9 at the 24th hour ($p<0.05$). At the 72nd hour, a significant difference was detected between the control and other groups in terms of caspase 3,8,9. As a result, it was concluded that high dose ionizing radiation application was effective on DNA damage and apoptotic enzymes in the kidney cell line at the end of the 24th and 72nd hours, and that thymoquinone may be effective in reducing the side effects that may occur due to radiation or preventing complications that may occur as a result of the effects.

Key words: Ionizing Radiation, Kidney Cell Line, Thymoquinone, DNA Damage, Apoptosis

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay.....	II
Etik Beyan.....	III
Teşekkür.....	IV
Özet.....	V
Abstract.....	VI
İçindekiler.....	VII
Simgeler ve Kısaltmalar.....	IX
Tablolar Listesi.....	XI
Şekiller Listesi.....	XII
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Nigella Sativa (Çörek Otu).....	3
2.2. Timokinonun Fizikokimyasal Özellikleri.....	4
2.3. Timokinonun Moleküler Etki Mekanizması.....	4
2.4. Timokinonun Farmakolojik Etkileri.....	7
2.4.1. Antidiyabetik etkisi.....	7
2.4.2. Sindirim sistemine etkisi.....	8
2.4.3. Kardiyoprotektif ve antihipertansif etkisi.....	8
2.4.4. Hipolipidemik etkisi.....	8
2.4.5. Antimikrobiyal etkisi.....	9
2.4.6. Antikanser etkisi.....	9
2.4.7. Antialerjik etkisi.....	9
2.4.8. Antiinflamatuvar etkisi.....	10
2.4.9. Sinir sistemine etkisi.....	10
2.4.10. Antioksidan etkisi.....	10
2.5. DNA.....	10
2.6. Radyasyon ve Radyoaktivite.....	11
2.7. Radyasyon Çeşitleri.....	12
2.8. Radyasyonun Biyolojik Etkileri.....	13
2.9. Radyasyonun Hücre Üzerine Etkileri.....	13

2.9.1. Radyasyonun hücre üzerine biyolojik etkileri.....	14
2.10. Apoptozun Tanımı ve Tarihçesi.....	14
2.11. Apoptotik Hücrede Gözlenen Morfolojik Değişiklikler.....	15
2.12. Apoptozun Biyokimyasal Özellikleri.....	15
2.13. Apoptozda Rol Oynayan Düzenleyici Moleküller.....	16
2.14. Apoptozun Mekanizması.....	18
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	19
3.1. Gereçler.....	19
3.1.1. Kullanılan hücre serileri.....	19
3.1.2. Kullanılan alet ve malzemeler.....	20
3.1.3. Kullanılan kimyasal maddeler.....	26
3.2. Yöntem.....	31
3.2.1. Hücre kültürü.....	31
3.2.2. İyonize radyasyon ile böbrek hücre hatlarında (NRK52-E) sitotoksite oluşturulması ve TQ uygulaması.....	32
3.2.3. Komet assay.....	32
3.2.4. cDNA sentezi ve real time-PCR.....	33
3.2.5. İstatistik analiz.....	33
4. BULGULAR.....	35
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	42
KAYNAKLAR.....	45
ÖZGEÇMİŞ.....	51
EKLER.....	52
EK 1. Araştırma Kesin Sonuç Onay Belgesi.....	52
EK 2. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu.....	53
EK 3. Tez Orjinallik Raporu.....	54

SİMGELER VE KISALTMALAR

TQ	: Timokinon
DTQ	: Ditimokinon
THQ	: Timohidrokinon
TMY	: Timol
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
CAT	: Katalaz
COX	: Siklooksijenaz
LOX	: Lipooksijenaz
NF-kB	: Nükleer Faktör Kabba B
TNF-a	: Tümör Nekroz Faktör alfa
Bcl	: B-cell Lymphoma Gene
Bcl-2	: B-cell Lymphoma Gene-2
T2D	: Tip-2 Diyabet
APAF-1	: Apoptotik Proteaz Aktive Edici Faktör-1
Gy	: Radyasyon Dozu Birimi (Gray)
TNFR	: Tümör Nekroz Faktör Reseptörü
STZ	: Streptozotosin
NSO	: Nigella Sativa Oil
Ca	: Kalsiyum
Mg	: Magnezyum
LDL	: Düşük Yoğunluklu Lipoprotein (Low Density Lipoprotein)
VEGF	: Damar Endoteli Büyüme Faktörü
NS	: Nigella Sativa (Çörek Otu)
LET	: Lineer Enerji Transferi
IL-1	: İnterlökin-1

IL-2	: İnterlökin-2
IL-6	: İnterlökin-6
IL-10	: İnterlökin-10
LPS	: Lipopolisakkarit
DNA	: Deoksiriboz Nükleik Asit
AIF	: Apoptoz İndükleyici Faktör
AKT	: Protein Kinaz B
PUMA	: P53 Upregulated Modulatör of Apoptosis
P53	: Tümör Baskılayıcı Protein
CD36	: Cluster of Differentiation 36
GR	: Glutasyon Redüktaz
GPx	: Glutasyon Peroksidaz
SOD	: Süperoksit Dismutaz
FADD	: Fas'a Bağlı Ölüm Bölgesi
BAK	: Bcl-2 Homolog Antagonisti
BAD	: Bcl-2 İlişkili Ölüm Düzenleyici
BAX	: Bcl-2 İlişkili X-proteini
BIM	: Bcl-2 Benzeri X-proteini
Bcl-XL	: Bcl-2 Homolog Protein Ligand
NOXA	: Forbol-12-Miristat-13-Asetat-İndüklenmiş Protein I
Fas	: Cd95, Apo-1

TABLÖLER LİSTESİ

Tablo 1. NRK-52E hücre dizisinin genel özellikleri.....	19
Tablo 2. Ekspresyon hnalizinde kullanılan primerler.....	31
Tablo 3. Gruplara göre DNA hasarı ve kuyruk momenti ölçüm değerlerinin tanımlayıcı istatistikleri ve karşılaştırma sonuçlar.....	38
Tablo 4. Gruplara göre DNA hasarı ve kuyruk momenti ölçüm değerleri arasındaki ilişki.....	39
Tablo 5. Gruplara göre Kaspaz 3, 8, 9 ve Bcl-2 genlerinin ölçüm değerlerinin tanımlayıcı istatistikleri ve karşılaştırma sonuçlar.....	40

ŞEKİLLER LİSTESİ

- Şekil 1.** İmaje J programı kullanılarak Comet ölçüm değerlerinin elde edilmesi.....33
- Şekil 2.** Farklı konsantrasyonlarda TQ uygulanmış hücrelerin MTT canlılık testi sonuçları.....35
- Şekil 3.** Farklı dozlarda iyonize radyasyon uygulanmış NRK-52-E hücrelerine çalışma gruplarının ait 24 saat sonundaki MTT canlılık testi sonuçları.....36
- Şekil 4.** Farklı dozlarda iyonize radyasyon uygulanmış NRK-52-E hücrelerine çalışma gruplarının ait 72 saat sonundaki MTT canlılık testi sonuçları.....37

1. GİRİŞ

Günümüzde İyonize radyasyon, *in vivo* ve *in vitro* etkileri, korunma yolları, canlıdaki meydana getirdiği organ, doku ve hücre düzeyindeki hasar ve etkileri oldukça yaygın bir şekilde çalışılmaktadır (Dede ve ark., 2019, Yılmaz ve ark., 2019). Bununla birlikte güçlü antioksidan özelliğe sahip olan timokinonun, DNA hasarı, ve apoptotik parametreleri üzerine etkileri her geçen gün gittikçe artan bir şekilde araştırılmakta ve bu moleküler hasar parametreleri üzerindeki rolü anlaşılmaya çalışılmaktadır (Gümüş ve ark., 2018).

İyonize ışımlar, canlılarda moleküler ve hücresel düzeylerde biyolojik, fiziksel ve kimyasal birçok farklılıklara yol açar. Bu oluşan farklılıklar uygulanan iyonize radyasyonun miktarına, süresine ve cinsine göre geçici veya kalıcı olabilir. İyonize radyasyon ışımları olarak bilinen X ve gamma ışımlarıyla birlikte alfa ve beta parçacıkları da geçtikleri ortamda iyonizasyona yol açarlar (Hendee ve Edwards, 1998).

İyonize radyasyon serbest radikal oluşumuna sebep olmaktadır. Serbest radikallerin oluşumu ve uzaklaştırılması vücutta düzenli şekilde gerçekleşmektedir. Canlı da oluşan moleküllerin oluşum hızı ile uzaklaştırılması arasındaki denge sabit kaldığı ya da bozulmadığı süre boyunca canlı bundan etkilenmemektedir. Bu denge bozulduğunda, serbest radikallerin artması veya antioksidanların etkisiz kalması canlıda oksidatif strese sebep olur. Bu durum karşısında, hücrelerde hasar, işleyiş bozukluğu, yaşlanma ve yaşamsal öneme sahip görevlerini yerine getirememe gibi durumlar oluşur (Ofloğlu, 2007; Pari ve Sankaranarayanan, 2009).

Yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar Timokinon'un oksidanları etkisiz hale getirdiği ve iyi bir süpürücü etkisi olduğunu göstermiştir. (Burits ve Bucar, 2000; Gündüz ve ark., 2002). Bununla birlikte, Timokinon'un; antioksidan, antiinflamatuvar etkileri, antikanser etkileri ve toksik ajanlarlar üzerine koruyucu etkisi olduğu oldukça yaygın bir şekilde bilinmektedir (Woo ve ark., 2012).

Yaptığımız çalışmada, böbrek hücre hattında (NRK52-E) iyonize radyasyonun sebep olabileceği DNA hasarı ve apoptotik genlere etkisini belirlemek ve meydana

gelen hasara karşı timokinon uygulamasının etkilerinin komet assay ve qRT- PCR yöntemiyle belirlenmesi amaçlanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Nigella Sativa (Çörek Otu)

Nigella sativa (Çörek Otu), Güneybatı Asya ve Akdeniz Bölgesi'nde doğal olarak yetişen Ranunculaceae familyasına ait bir yıllık tıbbi bir bitkidir (Kara ve ark., 2015). Ayrıca Suudi Arabistan, Suriye, Orta Doğu, Kuzey Afrika, Güney Avrupa, Türkiye ve Pakistan gibi ülkelerde de yaygın olarak yetiştirilmektedir (Assı ve ark., 2016). Tohumları siyah renkli olduğu için ismini bu şekilde almıştır. Latince nigellus siyahımsı anlamına gelmektedir. *Nigella sativa* bitkisi Türkçe de çörek otu, siyah kimyon ve bereket tohumu olarak bilinir (Baytop, 1999). *Nigella Sativa*, ortalama 20-30 cm uzunluğuna sahip çiçekli yıllık bir bitkidir. Yaprakları doğrusal şekildedir. Çiçekleri 5-10 petaldan oluşmaktadır ve sarı, beyaz, pembe ve mor renklidir. Bitkinin meyveleri kapsül şeklinde 3-7 adet folükülden oluşmuş geniş yapıya sahiptir. Her biri birçok tohum içermektedir. Siyah olan tohumları yassı, anguler, oblong ve huni biçimindedir. Tohumların uzunluğu 0.2 cm, genişliği 0.1 cmdir (Güzelsoy ve ark., 2018). *Nigella sativa* tohumları bitkinin en önemli maddeleri içeren kısımdır. *Nigella sativa* tohumları, kimyasal bileşimi bakımından zenginlik ve çeşitlilik gösterir. Tohumlarda karbonhidratlar, proteinler, amino asitler, uçucu ve sabit yağlar bulunur (Assı ve ark., 2016). Farmakolojik olarak en etkili bileşeni uçucu yağ içinde bulunan timokinon (TQ), ditimokinon (DTQ), timohidrokinon (THQ) ve timol (TMY)'dir. Ayrıca içinde nigellon, karvakrol, p-simen, d-limonen, α ve β -pinen yer almaktadır (Tıranbeşli, 2020). Çörek otunun ana bileşikleri uçucu yağ ve sabit yağdır. Çörek otunda yer alan esansiyel yağ antiinflamatuvar, antimikrobiyal, antikanser ve antioksidan aktiviteye sahiptir.

Çörek otu veya siyah tohum olarak bilinen *Nigella sativa* Orta Doğu'nun birçok ülkesinde ve dünyanın diğer bölgelerinde astım, öksürük, bronşit, baş ağrısı, romatizma, hipertansiyon, ateş ve grip gibi rahatsızlıkların tedavisinde doğal ilaç olarak tıbbi amaçla kullanılmaktadır (Uras ve ark., 2010).

2.2. Timokinonun Fizikokimyasal Özellikleri

Çörek otu tohumunun en önemli farmakolojik etkiye sahip bileşeni kinin yapısına sahip olan timokinondur (Güzelsoy ve ark., 2018). TQ IUPAC adı 2-izopropil-5metil-1,4-benzokinon olan 10 karbonlu bir bileşiktir. Erime noktası 49-50°C olan pullu kristallere sahip katı, parlak bir bileşiktir. TQ özellikle alkali pH'ta sulu çözeltilerde kararsızdır ve ayrıca ciddi ışık duyarlılığına sahiptir. İki karbon-karbon çift bağı ve iki karbon-oksijen çift bağı vardır (Ahmad ve ark., 2019).

2.3. Timokinonun Moleküler Etki Mekanizması

Timokinonun etki mekanizması tam olarak bilinmemekle beraber çok karmaşıktır. Timokinonun patofizyolojik durumlarda birden çok faktörü hedef aldığı belirtilmiştir. En önemli etkileri inflamasyon, oksidatif stres, anjiyogenez ve apoptozdur. İnflamasyon-oksidatif stres, zararlı dış uyaranlara karşı vücut savunma mekanizmasının ilk hattıdır. Bu reaksiyonun nihai amacı, organizmayı ilk yaralanmadan ve yaralanmanın sonucundan korumaktır. Bu inflamatuvar reaksiyonlar, doğal fizyolojik süreçler tarafından kontrol edilmediğinde, dünya çapında yaygın olarak yayılan inflamatuvar hastalıklara sebep olabilir. Timokinon bazı enflamatuvar hastalıklarda kullanılacağı kanıtlanmıştır. TQ'nun, sırasıyla inflamasyon siklooksijenaz (COX) ve lipooksijenaz (LOX) seviyelerini etkileyerek eikazonoidlerin üretimini esas olarak tromboksan B ve lökotrienler B₄'ü inhibe ettiği rapor edilmiştir. Bu enzimler inflamatuvar yoldaki ana faktör olup, oksidatif strese neden olan ve nötrofil ile makrofajların infiltrasyonuna ve sonuçta doku hasarına sebep olan farklı sitokinlere etki gösterir. TQ'nun anti-inflamatuvar etkisini makrofajlar tarafından üretilen nitrik okside inhibe etmesiyle kanıtlanmıştır. TQ'nun ayrıca katalaz, glutatyonperoksidaz ve glutatyontransferaz gibi antioksidan enzimlerin etkisini koruduğu kanıtlanmıştır. Enflamasyonda önemli interlökin (IL-1, IL-2, IL-6, IL10) gibi çok sayıda sitokinler ve tümör nekroz faktör-a (TNF-a) vardır. Bunlardan TNF-a ve IL-1, sepsis sırasında organ yetmezliğine neden olabilen diğer proinflamatuvar sitokinlerin, reaktif oksijen/nitrojen türlerinin ve lipid mediatörlerin aşırı ekspresyonu için önemlidir. Bu sitokinlerin seviyesi, TQ ile tedavi edildiğinde sepsiste modüle edilir. Bunun dışında Nükleer Faktör Kabba B (NF-kB) ayrıca proinflamatuvar sitokinlerin seviyesini yükselterek sepsiste

mühim bir rol oynar. TQ ayrıca sepsis sırasında NF-kB üzerinde önleyici bir etkiye sahiptir, öyle ki proinflatuar sitokinlerin üretimini inhibe eder, böylece inflamatuvar hücrelerin infiltrasyonunu azaltır ve doku ve organ hasarına karşı koruyucu etki gösterir.

Sistemik inflamasyondaki oksidatif stresin ayrıca hafıza ve öğrenme bozukluğunda kritik bir rolü olduğu bildirilmiştir. Çalışmalar ayrıca, lipopolisakarit tarafından indüklenen nöro-enflamasyonun, proinflatuar sitokinlerin salınması ve aşırı Reaktif Oksijen Türleri (ROS) üretimi yoluyla öğrenme ve hafızanın bozulmasına neden olduğunu ileri sürülmüştür. Bir fare modelinde, lipopolisakarit (LPS)'in neden olduğu öğrenme ve hafıza bozukluğu, hipokampalde TNF-a ve IL-6'nın ve kortikal dokuda IL-6'nın artan seviyesi ile ilişkilendirilmiştir. TQ uygulaması, hipokampal TNF-a ve IL-6 düzeylerinde bir azalma ile ilişkilidir ve ayrıca TQ, NF-kB'yi baskılayarak ve sitokin üretimini inhibe ederek anti-inflatuar aktivitesini sergilediği kanıtlanmıştır. Bu çalışmada yazarlar, TQ'nun nöroprotektif etkilerinin, LPS ile indüklenen modelde öğrenme ve hafızadaki gelişme açısından ifade edildiğini açıklamıştır (Ahmad ve ark., 2019)..

Anjiyogenez yeni kan damarlarının oluşumu veya kan damarlarının gelişimi anjiyogenez olarak bilinir. Önceki çalışmalar, timokinonun birçok kanser hücre hattı türünün hücre proliferasyonu üzerinde inhibe edici etkiler gösterdiğini bildirmiştir. Endotel hücreleri, endotel hücre migrasyonu, proliferasyonu, invazyonu, adezyonu ve tüp oluşumu dahil olmak üzere tümör anjiyogenezinin her adımında önemli bir rol oynar. Endotel hücre göçünü, çoğalmasını, büyümesini ve hayatta kalmasını düzenleyen endotel hücre sinyal yolları vardır. Endotel hücrelerinde bu sinyal yollarının aktivasyonu, anjiyogenez için gereklidir. Serin/treonine özgü bir protein kinaz olan AKT (protein kinaz B), endotel hücrelerinin migrasyon, büyüme, proliferasyon, apoptoz ve metabolizma gibi temel hücresel fonksiyonlarında yer alan önemli bir düğümdür. AKT, endotel nitrik oksit sentaz aktivasyonunu düzenler, vazodilatasyon, vasküler yeniden şekillenme ve anjiyogenezi uyarır. AKT sinyali, hipoksi ile indüklenebilir faktör a (HIFa) transkripsiyon faktörlerinin üretimini uyarır, böylece VEGF'nin ve önemli proanjiojenik faktörler olan diğer büyüme faktörlerinin salgılanmasına aracılık eder. Hücre dışı sinyalle ilişkili kinaz (ERK), endotel hücre döngüsü, çoğalma, büyüme, göç ve apoptozu düzenlemede kritik bir kinazdır. Hücre dışı büyüme faktörü

stimülasyonu üzerine, aktive edilmiş ERK, NFκB ve c-Jun gibi birçok substratını düzenler, böylece anjiyogenezi düzenler. Timokinonun, AKT/ERK aktivasyonunu azaltarak HUVEC göçünü, istilasını, çoğalmasını ve tüp oluşumunu engelleyebildiğini kanıtlanmıştır. Timokinon ayrıca hem in vitro aortik halka tahlilinde hem de in vivo matrigel tıkaç tahlillerinde anjiyojenik özellikleri bloke ettiği raporlanmıştır (Yi ve ark., 2008).

Apoptoz ölü, mutasyona uğramış veya yaşlanmış hücreyi ortadan kaldırmaya yönelik patolojik veya fizyolojik değişikliklere yanıt olarak programlanmış hücre ölümüdür. Yani biyolojik bir sistemin vücuttan atılmadığı takdirde potansiyel bir sağlık tehdidi oluşturabilecek ölü hücrelerden temizlenme yolu olduğu söylenebilir. Apoptozun iki ana yolu vardır - birincisi, B-cell Lymphoma Gene (Bcl) protein ailesi tarafından düzenlenen içsel yol/mitokondriyal yol. Bu yolda başlangıçta çeşitli uyarılar mitokondriyal membran geçirgenliğinin artmasını tetikler ve son olarak membran bozulmasına ve mitokondriyal disfonksiyona neden olan apoptojenik faktörleri serbest bırakır. Bu işlev bozukluğu, çeşitli apoptojenik proteazları, örneğin kaspazları aktive eder. İkincisi, bu kaspazlar ayrıca hücre yüzeyinde bir ölüm reseptörünün oluşumu ile aktive edilir. Örneğin, kaspaz-3, kaspaz-9 veya bölünmüş kaspaz -3 gibi kaspazların aktiviteleri, kanser hücrelerinde apoptozun ayırt edici işaretleri olarak incelenir. TQ'nun omurilik yaralanmasında kaspaz-3 ve kaspaz-9'un aktivitesini azalttığı ve bir hayvan modelinde apoptozu inhibe ettiği ve aynı mekanizmanın mide karsinomunda etkili olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca hücre, onarılabilir veya onarılamaz DNA hasarına maruz kalabilir. Bu da DNA hasarının doğru bir şekilde onarıldığı veya onarılamaz hale getirilebileceği anlamına gelir. Hücreler DNA hasarına uğradığında ve onarılamazsa, glioblastoma hücresinde TQ tedavisi ile atfedilen apoptoz meydana gelebilir. Ayrıca TQ'nun yüksek Bax ve sitokrom c proteinleri seviyesi aracılığıyla apoptozu indüklediği sonucuna varılmıştır. TQ'nun p53 bağımsız yolu aracılığıyla apoptozu indüklediği de gösterilmiştir. Mesane kanseri hücre hatlarında TQ, artan Bax/Bcl-2 ve sitokrom-c oranının bulunduğu endoplazmik retikulum aracılı mitokondriyal yol yoluyla apoptozu indükler. Prostat kanseri hücre hattında gerçekleştirilen başka bir çalışmada, TQ'nun apoptotik aktivitesi rapor edilmiştir ve bunun ROS aracılığından kaynaklandığı bildirilmiştir (Ahmad ve ark.,

2019). Timokinonun kanser hücrelerinde ROS üreterek apoptozu indüklediği başka bir çalışmada kanıtlanmıştır (Güzelsoy ve ark., 2018). Meme kanseri hücre dizisinde apoptotik etkiyi gempitabin ile kombinasyon halinde ve tek başına göstermiştir.

2.4. Timokinonun Farmakolojik Etkileri

2.4.1. Antidiyabetik etkisi:

Diabetes mellitus, esasen insülin sekresyonu ve/veya etkisinin bozulmasına bağlı olarak vücutta karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmasında anormallikler ile uzun bir süre boyunca hiperglisemi ile karakterize kronik bir metabolik bozukluktur. Diyabetin patofizyolojisi düzensiz inflamasyon, bozulmuş redoks homeostazı yoluyla artan oksidatif stres ve dengesiz kan lipid profilleri ile yakından ilişkilidir. Diyabetle ilişkili komplikasyonlar nöropati, nefropati ve retinopatiyi içerir. Geleneksel ilaçların bir parçası olan çörek otu ve uçucu yağ, anti-diyabetik ajanlar olarak büyük potansiyele sahiptir. Çörek otu ekstraktlarının, antioksidan enzimlerin aktivitesini artırarak oksidatif stresin zayıflamasını içeren mekanizma yoluyla alloksan veya streptozotosin ile indüklenen diyabetik sıçanlarda veya farelerde hastalık sonuçlarını iyileştirdiği gösterilmiştir. Ayrıca, çörek otu tohumu ekstraktından elde edilen gümüş nanopartikül bazlı yeşil sentezin, enflamatuvar sinyali inhibe ederek, antioksidan sistemi eski haline getirerek ve beyindeki sinir büyüme faktörünü artırarak sıçanlarda streptozotosin (STZ) kaynaklı diyabetik nöropatiyi iyileştirdiği gösterilmiştir. Ek olarak, çörek otunun temel fonksiyonel preparasyonu olan Nigella Sativa Oil (NSO), çeşitli streptozotosin veya alloksan kaynaklı diyabetik modellerde iyileştirici etkiler göstermiştir. Çörek otu tohumlarının veya NSO'nun terapötik rollerini değerlendirmek için bugüne kadar tip 2 diyabet (T2D) çalışma yapılmıştır. T2D hastalığı olan hastalar üzerinde yapılan bir çalışmada NSO takviyesine lipid profili, glisemi, C-reaktif protein seviyesi ve lipid peroksidasyonu üzerinde düşürücü etkisi olduğu gösterilmiştir. Çeşitli prelinik ve klinik çalışmalardan elde edilen gözlemler, çörek otu ve NSO'nun diyabetik komplikasyonları olan hastaların tedavisinde etkili bitkisel ilaçlar olabileceğini göstermiştir (Hannan ve ark., 2021).

2.4.2. Sindirim sistemine etkisi

Etanol intragastrik uygulaması uzun süredir deney hayvanlarında mide lezyonlarını indüklemek için tekrarlanabilir bir yöntem olarak kullanılmıştır. Gastrik lezyona serbest radikallerin ve reaktif oksijen türlerinin oluşumu eşlik eder. Özellikle bu radikaller, birçok biyolojik moleküle saldırıp zarar verdikleri için, gastrointestinal sistemin ülseratif ve erozif lezyonlarında önemli bir rol oynamaktadır. Bu nedenle, antioksidanlar ile tedavi, etanolün neden olduğu gastrik mukozal hasarı azaltabilir. NS ve TQ ile ön tedavi, sıçanlarda etanolün neden olduğu gastrik mukozal hasarı inhibe ettiği kanıtlanmıştır (Kanter ve ark., 2005).

2.4.3. Kardiyoprotektif ve antihipertansif etkisi

Çok sayıda olumsuz uyarana karşı sitoprotektif etkilere sahip olan çörek otu tohumu, kalbi koruyucu etkiler sergilemektedir. Çörek otu oksidatif stresi azaltarak kalp hasarına karşı kardiyak fonksiyonları iyileştirmiştir. Çörek otu tohumu etanolik özü ile ön tedavi, kardiyak biyobelirteçleri ve antioksidan durumu iyileştirerek izoproterenol kaynaklı miyokard enfarktüsüne karşı umut verici bir kardiyoprotektif etki sergilemiştir. Hipertansiyon, dünya çapında kardiyovasküler hastalıkların ve buna bağlı ölümlerin önde gelen nedenidir. Çörek otu tohumu da hipertansiyonu düşürmede umut vaat etmektedir. Anjiyotensin II kaynaklı hipertansif sıçan modelinde, çörek otu tohumu, anjiyotensinII'nin kardiyovasküler etkilerini antagonize ederek hipertansiyon üzerinde olası bir normalleştirici etkiye sahip olduğu kanıtlanmıştır. Bununla birlikte, hipertansiyonu olan yaşlı hastalarda yapılan randomize kontrollü bir klinik çalışmada, çörek otu uygulaması kan basıncında hafif fakat önemsiz bir azalma göstermiştir. Hafif-orta şiddette hipertansiyonu olan hastalarda çörek otu yağı kullanılarak yapılan bir klinik çalışma, lipit profilleri ve kan basıncı üzerinde de olumlu sonuçlar göstermiştir (Hannan ve ark., 2021).

2.4.4. Hipolipidemik etkisi

Yapılan klinik çalışmalarda kolesterol seviyesi normalin üstünde olan hastalara düzenli bir şekilde 2 ay boyunca 1 gr çörek otu verildiğinde kandaki LDL ve trigliseritin seviyesinin azaldığı, HDL kolesterolünün ise arttığı gözlenmiştir. Yapılan bir diğer

çalışmada kolestrol seviyesi yüksek olan tavşanlarda çörek otunun lipit seviyesini pozitif bir şekilde etkilediği belirtilmiştir (Asal ve ark., 2018).

2.4.5. Antimikrobiyal etkisi

Timokinonun gram pozitif bakteriler üzerinde öldürücü etkisi olduğu gösterilmiştir. Böbrek epital hücrelerine yapışan Streptococcus pyogenes bakterilerinin timokinon alımı ile sayılarının düştüğü bildirilmiştir. Timokinonun prostat hastalarının ölümüne yol açan prostatitleri engellediği gösterilmiştir (Güzelsoy ve ark., 2018).

2.4.6. Antikanser etkisi

Timokinon in vitro ve in vivo olarak anti-inflamatuar, antioksidan ve anti-neoplastik etkiler gösterir. TQ, lösemik hücre, pankreasta en çok bilinen kanser tipi olan pankreas adenokarsinomu ve kas dokusunda görülen uterin sarkom adı verilen kanser türlerine karşı anti-neoplastik etki göstermektedir. TQ'nun kanser hücrelerinin büyümesine engel olduğu gösterilmiştir. Ancak TQ kaynaklı büyüme inhibisyonunun mekanizması tam olarak açıklanamamıştır. TQ'nun p53'e bağımlı ve p53'ten bağımsız yollarla apoptozu indüklediği gösterilmiştir (Zubair ve ark., 2013). Timokinonun özellikle antioksidan etkisinden dolayı DNA'nın yapısını hedef alıp, kansere sebep olana moleküllerinin sinyal yolaklarını değiştirerek ve bağışıklık dediğimiz immün yanıtı değiştirerek antikanser etki göstermektedir. Yapılan çalışmalarda timokinonun mide, pankreas, meme, prostat, rahim ağzı ve kalın bağırsak kanseri gibi birçok kansere olumlu etkisi olduğu bildirilmiştir (Yıldız ve Turan, 2020).

2.4.7. Antiallerjik etki

Timokinon bazı alerjik hastalıkların tedavisinde de kullanılmıştır. Ayrıca antihistaminik etkileri de gösterilmiştir. Timokinonun yapılan kobay deneylerinde nefes borusu ve ince bağırsak düz kaslarında serotonin ve histaminin etkilerini yok ettiği kanıtlanmıştır. Bu etkinin arachidonic asitten oluşan lipooksijenaz engellemesi ve histamin ile serotonin reseptörlerine karşı antagonist etki göstererek davranmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (Kurt, 2013).

2.4.8. Antiinflamatuvar etkisi

Bu etki önemli iki enzim olan COX ve LOX ile yürütülmektedir. Yapılan çalışmalarda timokinonun COX ve LOX enzimlerini inhibe ettiği rapor edilmiştir. Farelerde alerjik havayolu inflamasyonunda timokinonun akciğer eozinofili hücrelerinde hiperplaziye, PDG2 ve COX2 inhibisyonuna neden olduğu belirtilmiştir (Bacak ve Avcı, 2013).

2.4.9. Sinir sistemine etkisi

Yapılan çalışmalarda toluen verilerek nöronlarında yapı ve fonksiyon kaybı oluşturulan ratlarda NS ve TQ takviyesinin bu olumsuz durumu düzelttiği bildirilmiştir (Bacak ve Avcı, 2013).

2.4.10. Antioksidan etkisi

Timokinonun en önemli farmakolojik etkilerinden biride antioksidan özelliğe sahip olmasıdır. Timokinon süperoksitdismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) gibi antioksidan enzimlerin seviyesini arttırırken reaktif oksijen türleri (ROS) seviyesini düşürmektedir. Yapılan çalışmalarda timokinonun hidrojen peroksit kaynaklı nörotoksisiteye karşı koruyuculuğu rapor edilmiştir. Yapılan başka bir çalışmada kurşun subasetat ile kontamine edilmiş içme suyuna maruz bırakılan erkek sıçanlarda uygulanan timokinonun CAT, glutatyonredüktaz (GR), glutatyonperoksidaz (GPx) seviyelerini arttırdığı gözlenmiştir. Timokinonun oksidatif stres belirteçleri olan süperoksit, hidrojen peroksit ve nitrik oksidi azattığı başka bir çalışmada kanıtlanmıştır (Hannan ve ark., 2021).

2.5. DNA

Canlı organizmalarda genomik dizinin korunması yaşam için önemlidir. Kalıtımın temel birimi olan DNA reaktif bir moleküldür. Endojen ve ekzojen ajanlar tarafından kimyasal modifikasyonlara karşı oldukça duyarlıdır. DNA replikasyonu ve onarımı ile ilgili DNA polimerazları hatalar yaparak hücrelere potansiyel olarak dezavantajlı mutasyonlar yükler. Bununla birlikte hücreler DNA hasarı sonucu oluşacak

zararlı etkileri en aza indirmek adına hücre kontrolü, DNA tamiri, hücre ölüm ve kontrol yolları gibi karmaşık özelliklere sahiptir.

DNA'daki hasar kaynağına göre endojen ve eksojen olarak ikiye ayrılabilir. Endojen DNA hasarının büyük bir kısmı hücrelerde zaten var olan su ve serbest radikaller ile hidrolitik ve oksidatif tepkimelere giren kimyasal anlamda aktif DNA'dan kaynaklanır. DNA hasarına sebep olan endojen etkenler arasında hatalı şekilde eşleşmeler, baz kayıpları, kimyasal değişiklikler, oksidatif hasar, DNA replikasyon hataları yer alır. Eksojen DNA hasarı ise çevresel, fiziksel ve kimyasalların DNA'ya zarar vermesiyle oluşur. Aflatoksin, benzopren, kemoterapi ilaçları, alkilleyici ajanlar kimyasal ajanlardandır. Kemoterapötik ilaçlar DNA'da zincir kırılmalarına ve zincir içi çapraz bağların meydana gelmesine sebep olmaktadır (Onur ve ark., 2009). Çapraz bağlama maddeleri, alkile edici maddeler, UV ve iyonlaştırıcı radyasyon da buna örnektir (Chatterjee ve Walker, 2017).

İnsan vücudundaki hücrelerin her biri on binlerce DNA lezyonu alır. Bu lezyonlar genom replikasyonunu ve transkripsiyonunu bloke edebilir. Bu sorun onarılmazsa veya yanlış onarırsa hücre veya organizma canlılığını tehdit eden mutasyonlara yol açabilir.

DNA hasarının sebep olacağı olumsuz sonuçlarla mücadele etmek için hücreler DNA lezyonlarını tespit etmek, varlıklarını işaret etmek ve onarımlarını desteklemek için topluca DNA hasarı tepkisi olarak adlandırılan mekanizmalar geliştirmiştir. Bu mekanizmada kusurlu hücreler genellikle DNA'ya zarar veren ajanlara karşı yüksek hassasiyet gösterir (Jackson ve Bartek, 2009).

2.6. Radyasyon ve Radyoaktivite

Çekirdeğinin içinde dengeli sayıda proton ve nötron bulundurmayan atomlara radyoaktif atom denir. Radyoaktif atomlar kararlı yapıya geçmek için bu enerjilerini boşaltmak isterler. Radyoaktif çekirdeklerin kararlı bir hale geçmek için ortama saldıkları enerjiye radyasyon denir (Gökoğlu ve ark., 2020). Başka bir şekilde yüksek hızda partiküllerin ve elektromanyetik dalgaların enerjisi de diyebiliriz (Coşkun, 2011).

2.7. Radyasyon Çeşitleri

İyonize ve iyonize olmayan radyasyon şeklinde ikiye ayrılır. İyonize olmayan radyasyon düşük seviye de enerji içerdiği için etki ettiği madde içinde atomları uyarır fakat iyonlaşmaya sebep olmaz. İyonize radyasyondan daha düşük enerjiye sahiptir. Görünür ışık, morötesi ışık, kızılötesi ışık, radyo dalgaları ve mikro dalgalara iyonize olmayan radyasyon diyebiliriz (Gökoğlan ve ark., 2020). İyonize radyasyon başka bir tanımıyla yüksek enerjili radyasyon fazla enerjiye sahip olduğu için atomdan elektron koparır ve atomun iyonlaşmasını sağlar. İyonize radyasyon elektromanyetik ve partiküler olmak üzere iki şekilde karşımıza çıkar. Alfa, beta parçacıkları, elektron, proton, nötron partiküler tipe örnektir. Mor ötesi ışınlar, X ve gama ışınları ise fotonlardan oluşan elektromanyetik radyasyonlardır (Çimen ve ark., 2017).

Alfa parçacıkları çekirdekdeki nötron ve proton fazlalığı sonucu yayılır. İyonlaştırma gücü çok yüksektir. Penetrasyonu çok az olup ince bir kağıt parçası ile durdurulabilirler. Cilde giremezler ama inhalasyon yoluyla vücuda girebilirler (Dicle, 1991). 2 proton ve 2 nötrona sahip Helyum atomunun çekirdeğidir. Tanı ve tedavide kullanılmazlar. Enerjilerini madde ile etkileşerek uyarılma ve iyonlaşma gibi olaylar ile kaybederler. Çekirdekdeki enerji ve kararsızlık proton fazlalığından kaynaklanıyorsa artı yüklü betalar (pozitronlar) oluşur. Enerji nötron fazlalığından oluşuyorsa eksi yüklü betalar (negatronlar) oluşur. İyonlaştırma özelliği alfadan daha azdır.

Gama ve X ışınları elektromanyetik grup içinde yer alır. Elektromanyetik radyasyon, titreşerek enerjinin uzayda ışık hızıyla taşınmasıdır. Elektromanyetik radyasyonlar dalga tipindedir. Dalga boyları çok düşük, frekansları da çok fazladır. Elektromanyetik dalgalar frekansları, dalga boyları ve enerjilerinin farklı olması ile birbirinden ayrılır. Enerjileri artan elektromanyetik radyasyonlar foton adını alırlar. Fotonların yük ve kütleleri olmadığı için partiküler özellikteki radyasyonlardan farklıdır (Demir, 2013). Gama ve X ışınlarının, alfa ve beta parçacıklarına oranla madde içine daha fazla nüfuz edebilirken iyonlaşmaya etkileri çok daha azdır.

Radyasyon kaynakları doğal ve yapay olarak ikiye ayrılır. Doğal radyasyon kaynakları kendiliğinden var olan radyasyon çeşididir. Kozmik ışınlar, radon gazı, gama radyasyonu doğal kaynaklara örnektir. Radon yerküre de bulunan en ağır radyoaktif

soygazdır. Akciğer kanserine sebep olduğu kanıtlanmıştır. Yapay radyasyon kaynakları kendiliğinden var olmayan, teknolojik gelişmelerin de etkisiyle oluşturulan radyasyondur. Tıbbi uygulamalar, nükleer santraller, nükleer silah denemeleri, televizyon, bilgisayar, radyo yapay radyasyondur (Gökoğlan ve ark., 2020).

2.8. Radyasyonun Biyolojik Etkileri

İyonize radyasyonun etkileri sitokastik ve deterministik olmak üzere ikiye ayrılır. Sitokastik etkiler, çok düşük dozlarda ortaya çıkan, alınan doza bağlı olmayan ne zaman olacağı bilinmeyen etkilerdir. Kanser, kalıtsal etkiler örnek olarak verilebilir. Deterministik etkiler ise yüksek doz maruziyetinde birden bire meydana gelen ve organizmada büyük hasarlara sebep olabilecek durumlar doğurur (Manisalıgil ve Yurt, 2018). Ölüm, cilt yanıkları, kısırlık, katarakt bu etkiye örnektir.

İyonize radyasyona maruz kalmanın sağlık üzerine etkileri alınan doz miktarı, radyasyon türü, doz hızı, yaş, biyolojik farklılıklar, maruz kalan vücut kısmı, ısı gibi faktörlere bağlıdır.

2.9. Radyasyonun Hücre Üzerine Etkileri

İR'nin oluşturacağı hücre hasarı 3'e ayrılır: Subletal hasar, Letal hasar, Potansiyel letal hasar

Subletal hasar düşük LET'li İR'ların dolaylı etkisiyle oluşur. Absorbe edilen İR hücrelerde hasar oluşturur ancak hücre tamir mekanizmalarının devreye girmesiyle hücre onarılabilir. Eğer hücreye İR uygulamaya devam edilirse hasar kümülatif olarak birikir ve hücre ölümü gerçekleşebilir.

Letal hasar yüksek LET'li İR'ların doğrudan etkisiyle oluşur. İR dozunun yüksek olduğu ve hücre hasarı onarım mekanizmalarının yetersiz kaldığı durumlarda ortaya çıkan, geri dönüşümsüz ve hücre ölümüyle sonuçlanan hasarlardır.

Potansiyel letal hasar uygulanan İR hücrede hasar oluşturur. Hücre ölümü çevresel etkenlere bağlı olarak hücre ortamında meydana gelen değişikliklerle ortaya çıkar. Eğer hücre bölünmesi kısa sürede gerçekleşirse hasar ölümcüldür. Ancak bölünme gecikirse hücre hasarı onarılabilir (Yılmaz, 2022).

2.9.1. Radyasyonun hücre üzerine biyolojik etkileri

İyonize radyasyon direkt etki göstererek hücrenin atomik yapısını bozup kimyasal veya biyolojik değişiklikler oluşturur. İndirekt etki göstererek suyun hidrolizi sonucu oluşan reaktif oksijen türleri ile protein, nükleik asitler ve lipidlerin yapısının bozulması ile hücreye zarar verir (Manisalıgil ve Yurt, 2018). Direkt etkide iyonize radyasyon atom ya da molekülden elektron koparır. Radyasyonun çarptığı noktada molekül iyonlaşmasına bağlı olarak DNA'nın yapısında reaktif iki komşu parça oluşur. Ayrılan bu parçalar aynı molekülü oluşturmak için birleşirse hasar oluşmaz. Direkt etki sonucunda DNA molekülündeki pürin bağları açılabilir, fosfodiester bağları kopabilir ve DNA sarmalı üzerinde tek ya da çift zincir kırıkları gözlenebilir. Endirekt etki: Radyasyonun vücutta bulunan molekülleri etkileyerek iyonize etmesi ve serbest radikaller oluşturmalarıdır. Oluşan bu serbest radikallerin DNA'yı etkilemesi endirekt etkidir. Serbest radikalde bulunan ortaklanmamış tek elektron canlı için büyük tehlike oluşturabilir. İyonizan partiküller DNA ile tepkimeye girerler. Kimyasal bağları kırıp yapısal parçalanmalar oluştururlar. İyonize radyasyonun direkt etkisine kıyasla endirekt etkisinde DNA hasarı 2 kat daha fazladır (Yeyin, 2015).

Radyasyon etkisi ile oluşan serbest radikallerin bazıları modifiye etmesi ve DNA tek zincir kırıkları oluşumu ile DNA hasarı meydana gelir. Hücre için radyasyonun sebep olacağı en tehlikeli hasar DNA'da çift zincir kırıkları oluşmasıdır. DNA tek zincir kırıklarının ve baz modifikasyonu ile oluşan hasarların büyük bir kısmı baz kesip-çıkarma tamir yolağı üzerinden tamir edilir. DNA'da görülen tek zincir kırığı çift zincir kırığına göre daha fazla olmasına rağmen çift zincir kırıklarının onarımına çok zordur. Kimyasal yapıların DNA ile etkileşime geçmesi sonucu oluşan bu hasara cevap olarak hücre kendini onarabilir yaşayabilir, onaramayıp ölebilir ya da mutasyon gerçekleşebilir (Bozkurt, 2013).

2.10. Apoptozisin Tanımı ve Tarihçesi

Apoptozis birçok gen ile bağlı olup hareketli, Yunancada yaprak dökümü anlamına gelmektedir (Akşit ve Bildik, 2008). Apoptozis enerji bağımlı, spesifik morfolojik özellikleri olan bir kimyasal bir mekanizmadır (Eröz ve ark., 2012). Apoptoz

fizyolojik bir olay olup hücrelerin korunması, gelişim ve yaşlanma gibi hemostatik bir mekanizmanın oluşması için meydana gelir (Güleş ve Eren., 2008).

2.11. Apoptotik Hücrede Gözlenen Morfolojik Değişiklikler

Apoptoz gerçekleşirken hücrede birden fazla biyokimyasal ve morfolojik değişiklikler meydana gelir. Hücre giderek küçülür, hücrenin temel iskeleti dağılır ve çekirdeği erimeye başlar. DNA yavaş yavaş parçalanmaya başlar. Apoptoz gerçekleşen bir hücrede laminin ve aktin filamentlerinin kesilmesi ile stoplazma küçülür. Çekirdekte yer alan temel proteinler parçalanır. Hücre küçülerek normal hücrelerden daha kolay membran ile çevrilerek makrofajların tanıyabileceği bir hale gelir. Apoptik hücrelerin membranındaki en özel değişim sitoplazmik yüzeyde bulunan negatif yüklü fosfatidilserinlerin hücre zarının dış kısmına çıkmasıdır. Hücre zarında saklı olarak bulunan N-asetil glukozamin ve N,N-diasetilsitabroz molekülleri ortaya çıkar ve makrofajlar tarafından kolayca tespit edilirler. Apoptotik yapıdaki hücreler sürecin sonlarına doğru görülmeye başlanan apoptotik cisimler hücre içeriklerini içine alan membranla çevrili yapılar olarak ortaya çıkar (Güleş ve Eren., 2008).

2.12. Apoptozun Biyokimyasal Özellikleri

Apoptotik hücrelerde , proteinlerin bölünmesi ve çapraz bağlanması, DNA parçalanması, fagositik tanıma gibi çeşitli biyokimyasal olaylar gözlenir. Kaspazlar, hücrelerin çoğunda aktif formda olmayan bir proenzim şeklinde yaygın olarak ifade edilir ve bir kez aktif hale geldiğinde genellikle diğer procaspazları aktif hale getirerek bir proteaz kaskadının başlatılmasına sağlarlar. Bazı procaspazlar ayrıca toplanabilir ve kendiliğinden etkinleştirilebilir. Bir kaspazın başka kaspazları aktif edebildiği bu proteolitik kaskad, apoptotik sinyal yollarını güçlendirir ve hızlı bir şekilde hücre ölümüne yol açar. Kaspazlar, sistein proteaz enzim ailesidir ve aspartik asitten sonra gelen peptik bağı kırarlar. Hücrede inaktiflerdir, yalnız proteolitik olarak birbirlerini aktive ederler. 3 tiptirler başlatıcılar (kaspaz-2,-8,-9,-10), efektörler veya yürütücüler (kaspaz-3,-6,-7) ve enflamatuar kaspazlar (kaspaz-1,-4,-5) olarak kategorize edilir. Protein çapraz bağlanması, apoptotik hücrelerin başka bir özelliğidir ve doku transglutaminazın ekspresyonu ve aktivasyonu yoluyla elde edilir. Ca^{+2} ve Mg^{+2} bağımlı endonükleazlar tarafından DNA parçalanması da meydana gelir. Bu durumda

180-200 baz çifti DNA fragmanlarıyla sonuçlanır. Başka bir biyokimyasal özelliği komşu hücreler tarafından apoptotik hücrelerin erken fagositik olarak tanınmasıyla sonuçlanan hücre yüzeyinde oluşan belirteçleridir. Komşu dokuya minimum düzeyde zara vererek hızlı fagositoza izin verir. Bu hücrenin lipid çift tabakasındaki normal içe bakan fosfatidilserinin plazma zarının dış tabakasındaki hareketiyle sağlanır. Fosfatidilserinin dışsallaştırılması, apoptotik hücrenin dış kısmında fagosit hücreler için iyi bilinen bir tanıma ligandı olmasına rağmen son araştırmalar apoptotik hücre temizlenmesi sırasında diğer proteinlerin de hücre yüzeyinde açığa çıktığını göstermiştir. Bunlar Annexin I ve calreticulini içerir. Annexin V fosfatidilserin kalıntıları ile güçlü ve spesifik olarak etkileşime giren ve apoptozun sağlanması için kullanılabilen bir rekombinant fosfatidilserin bağlayıcı proteindir. Calreticulin, yutan hücrede LDL reseptörü ile ilgili bir proteine bağlanan ve bir tanıma sinyali olarak fosfatidilserin ile birlikte çalıştığı öne sürülen bir proteindir. Yapışkan glikoprotein, trombospondin-1, aktive edilmiş mikrovasküler endotel hücrelerinin dış kısmında eksprese edilebilir ve CD36, kaspaz-3 gibi proteazlar ve başka proteinlerle beraber reseptör aracılı apoptozu indükler (Elmore, 2007).

2.13. Apoptoz'da Rol Oynayan Düzenleyici Moleküller

Programlı hücre ölümünün gerçekleşmesinde birçok molekül görev alır. Apoptozun düzenli şekilde çalışmasında Bcl-2, kalsiyum, kaspazlar, p53, sitokrom-c proteinleri ile çok sayıda mitokondri görev almaktadır. Kalsiyum hücrenin ölümü süresince görev alan önemli bir elementtir. Kalsiyum tepkime süresince kimyasalların aktivasyonundan sorumludur (Dağdeviren, 2021).

-Bcl-2 Ailesi: Dış mitokondriyal zar, endoklazmik retikulum ve nükleer zar da bulunan zar bağlayıcı bir proteindir (Ulukaya, 2003). Hücrelerin apoptoza gidip gitmeyeceği Bcl-2 ailesi tarafından belirlenir. Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) gen ailesinin bir kısmı apoptozu indüklerken bir diğer kısmı baskılar. Bcl-2 gen ailesinin birbirine zıt iki farklı grupta toplanır. Bu gruplar proapoptotik üyeler ve antiapoptotik üyeler olmak üzere ikiye ayrılır. Proapoptotik proteinlerin çok olduğu hücrelerde hücre apoptoza eğilimli iken antiapoptotik proteinlerin yoğun olduğu hücrelerde hücre apoptoza çok fazla eğilim göstermez. Proapoptotik üyeler arasında BAD, BAX, BIK, BIM, PUMA, NOXA ve BAK proteinleri yer alır. Bu proteinler hücrenin sitozolünde bulunur.

Sitokrom-c proteini ve AIF (Apoptoz indükleyici faktör) salınımını arttırarak apoptozu indükler. Antiapoptotikler arasında ise BCL-2, BCL-XL, BCL-W ve MCL-1 yer alır. Bu proteinler mitokondriyal dış membranında, endoklazmik retikülümde ve çekirdek zarında bulunur. Por oluşumundan sorumlu olup iyon transportunu düzenlerler. Hücredeki kalsiyum iyonu miktarını denetlerler. Kaspazlar için öncü form olan AIF ve sitokrom-c proteininin salınımını engelleyerek apoptozun önüne geçer (Dağdeviren, 2021).

-p53: Hücrede DNA hasarı oluştuğunda devreye girip hücreye DNA onarımı için fırsat veren bir transkripsiyon etkenidir. Oluşan hasar kendini onaramayacak durumda ise BAX, Apoptotik Proteaz Aktive Edici Faktör-1 (APAF-1) ve FAS yapımını arttırıp BCL-2 ve BCL-XL'yi baskılayıp apoptozu indükler.

-Fas (Cd95-Apo-1): Fas 24 üyeli TNF reseptör ailesindendir. Bağışıklık sisteminde hücre ölümünden sorumlu olan Fas hücre reseptörü sitotoksik T hücreleri ve naturel killer hücreleri üzerinde yer alır. Fas proteini hücre yüzeyinde kendi reseptörüne bağlanır ve reseptör trimerizasyonunu sağlar. Aktif hale gelen reseptörler FADD reseptör molekülü ile birleşir. Fas reseptörlerinin karboksil ucuna yakın 80 aminoasitlik bölgenin uyarılmasıyla prokaspazlar aktive olur ve apoptoz başlar (Dağdeviren, 2021).

-Kaspaz Ailesi: Sistein proteaz grubunda yer alan enzimlerdir ve aspartik asitten sonraki peptid bağına kırarlar. Apoptozun başlatılmasında önemli role sahiptirler. Kaspaz mekanizması üç farklı hruza ayrılır. İlk olarak başlatıcı kaspazlar (kaspaz 2,8,9,10), ikinci olarak efektör kaspazlar (3,6,7) ve son olarak inflamatuvar kaspazlar (1,4,5,11,12,13,14). Apoptotik süreçte ölüm sinyali veren başlatıcı kaspazlardır. Hücrenin büsbütün ölümünden sorumlu değildir. Başlatıcı kaspazlar hücrenin ölümünü gerçekleştirecek moleküllerin aktif hale gelmesini sağlar. Hücrenin tamamen ölümünde başrol alan efektör kaspaz grubudur. Başlatıcı kaspazlar kendilerini aktive edebilirler. Efektör kaspaz proteinleri başlatıcı kaspazlar tarafından aktive edilir. Kaspazlar DNA'nın tamiri ve replikasyonu için ihtiyaç duyulan enzimleri inaktif hale getirirler. Hücre iskeleti proteinlerini keserek hücre zarının dışa doğru çıkıntı yapmasına neden olurlar (Dağdeviren, 2021).

2.14. Apoptozisin Mekanizması

Apoptoz mekanizmaları, enerji ile olan moleküler boyutta gerçekleşen karmaşık bir süreçtir. Yapılan çalışmalar apoptozun iki ana yolla gerçekleştiğini ortaya çıkarmıştır. BU iki ana yol instrinsik (mitokondriyal) ve ekstrinsik yoldur. Ayrıca T-hücresi aracılı sitotoksikite ve hücrenin perforin-granzima bağlı olarak öldürülmesini içeren başka bir yol vardır. Perforin/granzim yolu, granzim B veya granzim A yoluyla apoptozu indükleyebilir. Ekstrinsik, intrinsik ve granzim B yolları aynı terminalde yürütme yoluyla birleşir. Bu yol kaspaz-3 ün bölünmesiyle başlar ve DNA fragmentasyonu, hücre iskeleti ve nükleer proteinlerin bozulması, proteinlerin çapraz bağlanması, apoptotik cisimlerin oluşumu, fagositik hücre reseptörleri için ligandların ekspresyonu ve son olarak fagositik hücreler tarafından alımı ile sonuçlanır. Granzim A yolu tek sarmallı DNA hasarı yolu ile paralel, kaspazdan bağımlı olmadan bir hücre ölüm yolunu aktif hale getirir (Elmore, 2007).

İntrinsik (iç) mitokondriyal yol Bcl-2 ailesi üyeleri tarafından düzenlenir. Sağlıklı hücrelerde antiapoptotik Bcl-2 ailesi üyeleri Bax/Bak mekanizmasını baskılar. Bcl-2'nin Bax'a oranı apoptotik uyarının yaşamsal mı ölümcül mü devam edeceğini belirler. Çeşitli nedenler DNA hasarına sebep olabilir. Bu durum sonucunda bazı proteinler ve genler aktif hale gelir. Aktivasyondan sonra mitokondri membranı üzerinde yer alan Bax ailesini uyarak mitokondri zarının geçirgenliğini değiştirir. Kalsiyum, hidrojen ve bazı proteinler sitozole geçer. Sitozole geçen sitokrom-c APAF ile birleşerek prokaspaz 9 a bağlanır ve onu aktifleştirir. Aktif kaspaz 9 kaspaz kaskadını aktifleyerek apoptozun oluşmasını sağlar (Gökhan ve ark., 2020).

Ekstrinsik yol tehlikeli hücrelerin ortadan kaldırılması için Tümör Nekroz Faktör Reseptörü (TNFR) süper ailesine ait hücre yüzey ölüm reseptörleri (death receptors ,DR) ölüm ligandlarını tanır. Ölüm ligandları ile ölüm reseptörleri arasındaki etkileşimle oldukça spesifik protein-protein bağlantıları oluşmaktadır. Bu bağlantı apoptozun indüksiyonu için sinyalin hücrenin yüzey kısmından hücrenin içine doğru iletilmesinde önemli rol oynar (Gökhanve ark., 2020).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı mevcut kurulu olan Hücre Kültürü Laboratuvarında yapılmıştır.

3.1. Gereçler

3.1.1. Kullanılan hücre serileri

Çalışmada renal epitelyal (NRK-52E (ATCC® CRL-1571™) hücreleri kullanılmıştır.

Tablo 1. NRK-52E hücre dizisinin genel özellikleri.

NRK-52E Hücre dizisinin genel özellikleri	
Organizma	<i>Rattus norvegicus</i>
Doku	Böbrek epitelyal
Morfoloji	Düzensiz şekilli, genellikle yuvarlak
Yüzey	Yapışan hücreler
Tümörjenik	Hayır
Besi yeri	DMEM high glukoz, %10 FBS, %1 L-Glutamin, %1
Besi yeri	haftada 2-3 defa
Pasaj Metodu	0.25% trypsin, 0.02% EDTA
Ayırma oranı	1:3-1:4
Biyogüvenlik	1

3.1.2. Kullanılan alet ve malzemeler

Hücre kültürü için

<u>Alet/malzeme</u>	<u>Marka</u>	<u>Model</u>
Azot tankı	MRC	5 litrelik
Buzdolabı (+4 °C)	Profilo	Profilo
Derin dondurucu (-20 °C)	İndesit	İndesit
Derin dondurucu (-80 °C)	Sanyo	Sanyo
Cryovial tüpler	Corning incorporated	430659 (2 ml'lik)
Falkon tüpler	BIOLOGIX	15, 50 ml' lik
Otomatik Pipetler	Eppendorf	10, 100, 200, 1000 µl'lik
Pipet uçları	BIOLOGIX	10, 100, 200 ve 1000 µl'lik
Eppendorf tüpler	Eppendorf	683965 (1.5 ml'lik)
Soğutmalı santrifüj	Universal	320R
Distile su cihazı	Merck	Millipore Direct-Q 3 UV
Flask	SPL	75, 25 cm ²

Hassas terazi	Radwag	220.R2
Laminar kabin	Biobasafety cabinet	BSC-L300
Kronometre	Elabscience	Elabscience
İnkübatör	ESCO	CellCultureCO2Incubator
İnverted (ters) Mikroskop	Nikon	ECLİPSE TS100
Thoma lamı	MARIENFELD	0,0025mm ² 'lik
Portüp	ISOLAB	Plastik
Su banyosu	MRC	WBO-100

MTT canlılık testi ve doz belirlenmesi için

<u>Alet/malzeme</u>	<u>Marka</u>	<u>Model</u>
ELISA cihazı	Anthos-Zenyth	200 rt
Kültür Plakları	Costar 96'lık	3599
Otomotik Pipetler	Eppendorf	10, 100, 200, 1000 µl'lik
Pipet uçları	BIOLOGIX	(10, 100, 200 ve 1000 µl'lik)
Eppendorf tüpler	Eppendorf	683965 (1.5 ml)

Falkon tüpler	PPL	15, 50 ml'lik
Soğutmalı santrifüj	Universal	320R
Distile su cihazı	Merck	Millipore Direct-Q 3 UV
Flask	SPL	75, 25 cm ²
Hassas terazi	Radwag	220.R2
Laminar kabin	Biobasafety cabinet	BSC-L300
Kronometre	Elabscience	Elabscience
İnkübatör	ESCO	CellCulture CO2 Incubator
İnverted (ters) Mikroskop	Nikon	ECLIPSE TS100
Thoma lamı	MARIENFELD	0,0025mm ² 'lik
Portüp	ISOLAB	Plastik
Fotoğraf makinası	CMEX	DC. 5000C
Karıştırıcı-Vorteks	Yellowline	TTS 2

Hücre örneklerinin toplanması için

<u>Alet/malzeme</u>	<u>Marka</u>	<u>Model</u>
Azot tankı	MRC	5 L'lik
Buzdolabı (+4 °C)	Profilo	Profilo
Derin dondurucu (-20 °C)	İndesit	İndesit
Derin dondurucu (-80 °C)	Sanyo	Sanyo
Cryovial tüpler	Corning incorporated	430659 (2 ml'lik)
Otomatik Pipetler	Eppendorf	10, 100, 200, 1000 µl'lik
Pipet uçları	BIOLOGIX	10,100, 200 ve 1000 µl'lik
Eppendorf tüp	Eppendorf	683965 (1,5 µl'lik)
Soğutmalı santrifüj	Universal	320R
Distile su cihazı	Merck	Millipore Direct-Q 3 UV
Flask	SPL	75, 25 cm ²
Hassas terazi	Radwag	220.R2

Laminar kabin	Biobasafety cabinet	BSC-L300
Kronometre	Elabscience	Elabscience
İnkübatör	ESCO	CellCultureCO2Incubator
İnverted (ters) Mikroskop	Nikon	ECLIPSE TS100
Thoma lamı	MARIENFELD	0,0025mm ² 'lik
Portüp	ISOLAB	Plastik
Su banyosu	MRC	WBO-100
Karıştırıcı-Vorteks	Yellowline	TTS 2

Biyokimsal analizler için

<u>Alet/malzeme</u>	<u>Marka</u>	<u>Model</u>
Falkon tüpler	SPL	15, 50 ml' lik
Kültür Plakları	Costar 96'lık	3599
Otomotik Pipetler	Eppendorf	10, 100, 200, 1000 µl'lik
Pipet uçları	BIOLOGIX	10, 100, 200 ve 1000 µl'lik

Ependorf tüpler	Ependorf	683965 (1.5 ml'lik)
Soğutmalı santrifüj	Universal	320R
Distile su cihazı	Merck	Millipore Direct-Q 3 UV
Hassas terazi	Radwag	220.R2
Kronometre	Elabscience	Elabscience
Karıştırıcı-Vorteks	Yellowline	TTS 2
<i>Genetik analizler için</i>		

<u>Alet/malzeme</u>	<u>Marka</u>	<u>Model</u>
Otomotik Pipetler	Eppendorf	10, 100, 200, 1000 µl'lik
Pipet uçları	BIOLOGIX	10, 100, 200 ve 1000 µl'lik
Falkon tüpler	SPL	15, 50 ml' lik
Ependorf tüpler	Ependorf	683965 (1.5 ml'lik)
Soğutmalı santrifüj	Universal	320R
Kronometre	Elabscience	Elabscience

Karıştırıcı-Vorteks	Yellowline	TTS 2
RT-PCR	Rotor Gene	RotorGene BioDrop

3.1.3. Kullanılan kimyasal maddeler

Hücre kültürü için

<u>Kimyasal madde</u>	<u>Marka</u>	<u>Katalog no</u>
Dimetilsulfoksit (DMSO)	AppliChem Panreac	A3672,0250
FBS	Capricorn Scientific	FBS-12B
PBS (pH: 7,4)	Sigma (Ca ⁺⁺ ve Mg ⁺⁺ içermeyen)	P4417
L-Glutamin	Capricorn Scientific (200mM 100ml)	GLN-B
Penisilin-Streptomisin	Capricorn Scientific (100x)	PS-B
Etil alkol (%96)	Sigma	Sigma
Trypsin-EDTA(%0,25 %0,1)	Capricorn Scientific	TRY-1B
DMEM High Glikoz	Capricorn Scientific	DMEM-HA
Ham's F12 with L-glutamin	Capricorn Scientific	HAM-12-A

MTT canlılık testi ve doz belirlenmesi için

<u>Kimyasal madde</u>	<u>Marka</u>	<u>Katalog no</u>
Dimetilsulfoksit(DMSO)	AppliChem Panreac	A3672,0250
FBS	Capricorn Scientific	FBS-12B
PBS (pH: 7,4)	Sigma	P4417
L-Glutamin	Capricorn Scientific (200mM 100ml)	GLN-B
Penisilin-Streptomisin	Capricorn Scientific (100x)	PS-B
Etil alkol (%96)	Sigma	Sigma
Trypsin-EDTA(%0,25 %0,1)	Capricorn Scientific	TRY-1B
DMEM High Glikoz	Capricorn Scientific	DMEM-HA
Ham's F12 with L-glutamin	Capricorn Scientific	HAM-12-A
Thiazoly Blue Tetrazolium Bromide (MTT)	Sigma	M56555-1G
Vitamin A Palmitat	Sigma-Aldrich	PHR1235-1G
Vitamin D Kolekalsiferol	Sigma-Aldrich	PHR1237-500MG

Vitamin E Alfa Tocoferol	Sigma-Aldrich	PHR1031-500MG
--------------------------	---------------	---------------

Vitamin C Askorbik Asit	Sigma-Aldrich	PHR1008-2G
-------------------------	---------------	------------

Hücre örneklerinin toplanması için

<u>Kimyasal madde</u>	<u>Marka</u>	<u>Katalog no</u>
FBS	Capricorn Scientific	FBS-12B
PBS (pH: 7,4)	Sigma	P4417
L-Glutamin	Capricorn Scientific (200mM 100ml)	GLN-B
Penisilin-Streptomisin	Capricorn Scientific (100x)	PS-B
Etil alkol (%96)	Sigma	Sigma
Trypsin-EDTA(%0,25 %0,1)	Capricorn Scientific	TRY-1B
DMEM High Glikoz	Capricorn Scientific	DMEM-HA
Ham's F12 with L-glutamin	Capricorn Scientific	HAM-12-A

Biyokimsal analizler için

<u>Kimyasal madde</u>	<u>Marka</u>	<u>Katalog no</u>
Kaspaz 3 geni	Shangai LZ biotech Co., Ltd	YHB0311Ra
Kaspaz 8 geni	Shangai LZ biotech Co., Ltd	YHB1249Ra
Kaspaz 9 geni	Shangai LZ biotech Co., Ltd	YHB0312Ra

RNA izolasyonu için

<u>Kimyasal madde</u>	<u>Marka</u>	<u>Katalog no</u>
Trizol Reagent	Thermo-Scientific	1029608
PBS	Sigma	P4417-50TAB
Kloroform	Sigma	24216-2,5L,R
İzopropil Alkol	Merck marka	109634
Etil Alkol (%75,soğuk)	Merck	100986.2500
Diethylpyrocarbonate	Sigma	1609-47-8
DEPC'li su	%0,1 konsantrasyonda. 100 ml steril distile su (dH ₂ O)'ya 0,1 ml DEPC eklendi. Bu solüsyon oda sıcaklığında 1 saat bekletildi, ardından otoklanıp soğutuldu (15 dakika, 100°C)	

Agaroz jel elektroforezi için

<u>Kimyasal madde</u>	<u>Marka</u>	<u>Katalog no</u>
Borik asit	Vivantis	PR 0607
Tris baz	Vivantis	PR 0612
EDTA	Vivantis	PC 0706
10XTBE solüsyon (pH:7,5)	Tris baz (54 gr), borik asit (27,5) ve 20 ml EDTA (0,5 M) steril distile suda çözülerek 1 litreye tamamlanmıştır.	
Agaroz	Vivantis	PC 0701
% 1'lik agaroz	1 gr agaroz, 100 ml 1XTBE içerisinde mikro dalga fırın yardımıyla eritilerek hazırlandı. İçerisine 2,5 µl Etidyum bromür karıştırıldı.	
Etidyum Bromür	İnvitrogen	15585-011
Brom fenol mavisi	Amresco	115-39-9

Komplementer DNA (cDNA) izolasyonu

<u>Kimyasal madde</u>	<u>Marka</u>	<u>Katalog no</u>
cDNA sentez kiti	GeneAll HyperScriptFirst Syntesis	Strand 601-005

Gerçek zamanlı PZR (RT-PCR)

Reaksiyon tamponu, enzim, dNTP, MgCl₂ karışım halinde Biotium marka Fast-Plus Eva Green master kit kullanılmıştır. Kitin içeriğinde Eva Green boyası ve enzim olarak Cheetah Taq DNA polimeraz bulunmaktadır. Kullanılan ekspresyon primerleri aşağıda yer almaktadır.

Tablo 2. Ekspresyon analizinde kullanılan primerler.

Primer Kaspaz -3 rat	F: 5'-ATGGCCCTGAAATACGAAGTC R: 5'-GTTCCACTGTCTGTCTCAATACC
Primer Kaspaz -8 rat	F: 5'-GAAAGCAATCTGTCCTTCCT R: 5'-ATGACCCTCTTCTCCATCTC
Primer Kaspaz -9 rat	F: 5'- GATCCAGAAGCTGTTACACC R: 5'- CTTCACTACTTTCTGCTCCT
Primer Bcl-2 rat	F: 5'- GTGGTGGAGGAACTCTTCAG R: 5'- GTTCCACAAAGGCATCCCAG
Kontrol Primer (G6PDH) rat	F: 5'-AGG GCT GCT TTT AAC TCT GGT R: 5'-CCC CAC TTG ATT TTG GAG GGA

3.2. Yöntem

3.2.1. Hücre kültürü

Çalışma materyali olarak NRK52-E böbrek hücre serisi kullanıldı. NRK52-E hücreleri; 37°C, %5 CO₂ ve %95 nem içeren ortamda, %10 FBS, %1 L-Glutamin ve %1 penisilin/streptomisin DMEM high glukoz besi yeri (medyum) ortamında çoğaltılıp çalışmada kullanıldı. Çalışmada iyonize radyasyon dozu belirlemek için 6'lık pleytlere, kuyucuk başına 10⁵ hücre, TQ konsantrasyonunu belirlemek için ise 96'lık kuyucuklara kuyucuk başına 7.5x10⁴ hücre ve çalışma grupları için ise 25 cm² flasklara flask başına 10⁶ hücre ekimi yapıldı. Ekimden sonra hücrelerin yapışması için bir gece inkübe edildi.

İnkübasyondan sonra hücrelerin üzerindeki medyumlar atılarak çalışma gruplarına göre yeni medyum içinde çalışma gruplarına göre uygulamalar gerçekleştirildi.

Çalışma grupları; Kontrol, İyonize Radyasyon, Timokinon, Timokinon+ İyonize Radyasyon ve İyonize Rdyasyon+Timokinon olmak üzere 5 grup olarak belirlendi.

3.2.2. İyonize radyasyon ile böbrek hücre hatlarında (NRK52-E) sitotoksite oluşturulması ve TQ uygulaması

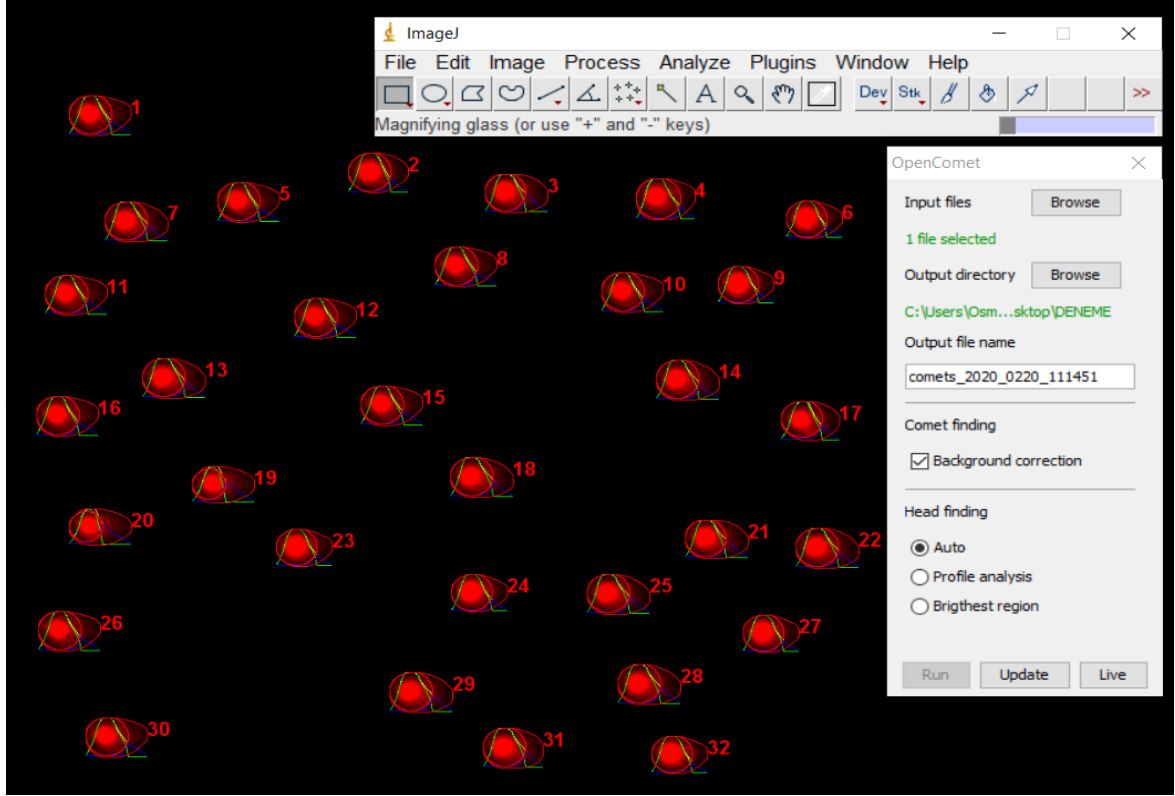
Çalışmada uygulanacak olan iyonize radyasyon ve timokinonun uygun konsantrasyonları hazırlandı. Böbrek hücre hattına uygulanacak olan iyonize radyasyon dozları literatür esas alınarak uygulandı (Szymczyk ve ark., 2004). Yapılan MTT sonuçlarına göre 24 saat sonunda İyonize Radyasyon gruplarına 18 Gy iyonize radyasyon uygulandı. Işınlamalar, Cobalt-60 Teleterapi cihazında, gamma radyasyonu verilerek gerçekleştirildi. Hücreler flaskların tabanında bulunduğu için, build-up bölgesindeki doz düşüşünden dolayı 1 cm'lik boluslar kullanıldı, flask içindeki sıvı dikkate alınarak ışın eş merkezi uygun derinliğe yerleştirilerek iyonize radyasyon uygulandı.

Yapılan MTT canlılık testi sonunda proliferasyonu maksimum oranda artıran TQ konsantrasyonu kullanıldı.

3.2.3. Komet assay

Tek hücreli jel elektroforezi veya "Comet Assay" tekniği hücre düzeyinde DNA hasarını saptamak ve miktarını belirlemek için uygulanan hızlı ve hassas bir floresan mikroskopik yöntemdir. Çalışmada toplanan hücre komet protokoline göre jelle kaplı lamaların üstünde uygulanarak yayması sağlanır. Hazırlanan lamalar elektroforez yönteminde yürütülür. Oluşan DNA hasarına göre DNA'lar yürütülür. Komet testi olarak isimlendirilmesinin nedeni, hasarlı DNA'ların hasar büyüklüğüne göre yürümesi ve mikroskopta boyandığında hasarlı kısmın kuyruk şeklinde görüntülenmesidir. Hazırlanan lamalar DNA hasarı ve oluşturduğu kuyruk momentinin incelenmesi için, floresan mikroskopta incelendi ve lamaların tüm bölgesini teşkil edecek şekilde her birinde yaklaşık 30 hücresinin yer aldığı 6 adet fotoğraf alındı. Alınan bu görüntülerden

% DNA Hasarı ve % Kuyruk Momenti ölçümleri, image J programı kullanılarak hesaplandı (Şekil 1). Elde edilen ölçüm değerlerinin istatistik olarak analizi yapıldı.



Şekil 1. İmaje J programı kullanılarak Comet ölçüm değerlerinin elde edilmesi.

3.2.4. cDNA sentezi ve Real Time-PCR

qRT-PCR'da gen ekspresyonlarının saptanması amacıyla Syber Green Master Kit kullanıldı. Apoptosis mekanizması için Bcl-2, Caspase 3, 8, 9 gen ekspresyonları araştırıldı. Ekspresyon analizlerinde kontrol geni olarak gliseraldehit fosfat dehidrogenaz (GAPDH) kullanıldı. Her bir örnek 3 bağımsız tekrar ile tekrarlandı ve bir CT (cycle treshold) amplifikasyonların logaritmik fazının başlangıcı itibariyle belirlendi. Ekspresyon düzeyini belirlemede $2^{-\Delta\Delta Ct}$ analiz formülü kullanıldı.

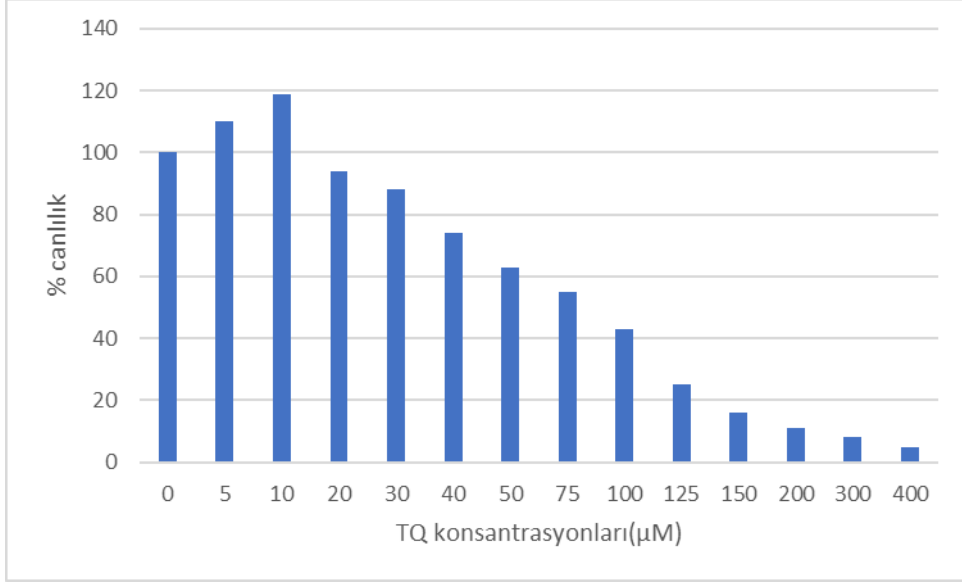
3.2.5. İstatistik analiz

Böbrek hücre hattında iyonize radyasyon sonucu oluşan sitotoksiteyi belirlemek ve bu sitotoksite sonucu oluşan genotoksik hasar, apoptoze karşı timokinon uygulamasının etkilerinin komet assay ve qRT- PCR yöntemiyle belirlemesi amacıyla

yapılan bu çalışmanın örnek genişliğini hesaplamada, her değişken için Power (Testin Gücü) en az 0,80 ve 1. Tip Hata 0,05 alınarak belirlenmiştir. Çalışmamızdaki tanımlayıcı istatistikler; medyan, ortalama, standart sapma, minimum ve maksimum olarak ifade edilmiştir. Çalışmadaki ölçüm ortalamalarının normal dağılıp dağılmadığına Shapiro-Wilk testi ($n < 50$) ile bakılmış ve değişkenlerin grupların bir kısmının ölçüm değerlerinin normal dağılmadığından dolayı Nonparametrik testler uygulanmıştır. Ölçümlerin Gruplara göre karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis H testi hesaplanmış ve farklı grupları belirlemede ise Bonferroni Düzeltmeli Post-Hoc (Çoklu) Karşılaştırma Testleri kullanılmıştır. Gruplarda ayrı olmak üzere, ölçümler arasındaki ilişkiyi belirlemede Spearman Korelasyon katsayıları hesaplanmıştır. Hesaplamalarda istatistik anlamlılık düzeyi (α) %5 olarak alınmış ve hesaplamalar için SPSS (IBM SPSS for Windows, Ver.24) istatistik paket programı kullanılmıştır.

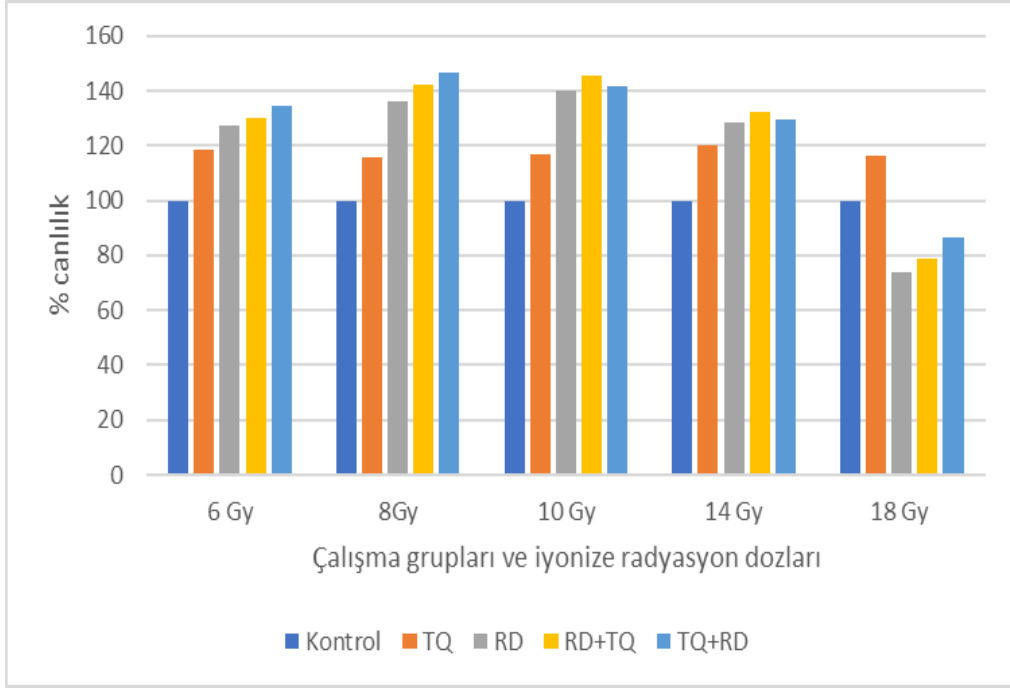
4. BULGULAR

1.MTT Bulguları



Şekil 2. Farklı konsantrasyonlarda TQ uygulanmış hücrelerin MTT canlılık testi sonuçları.

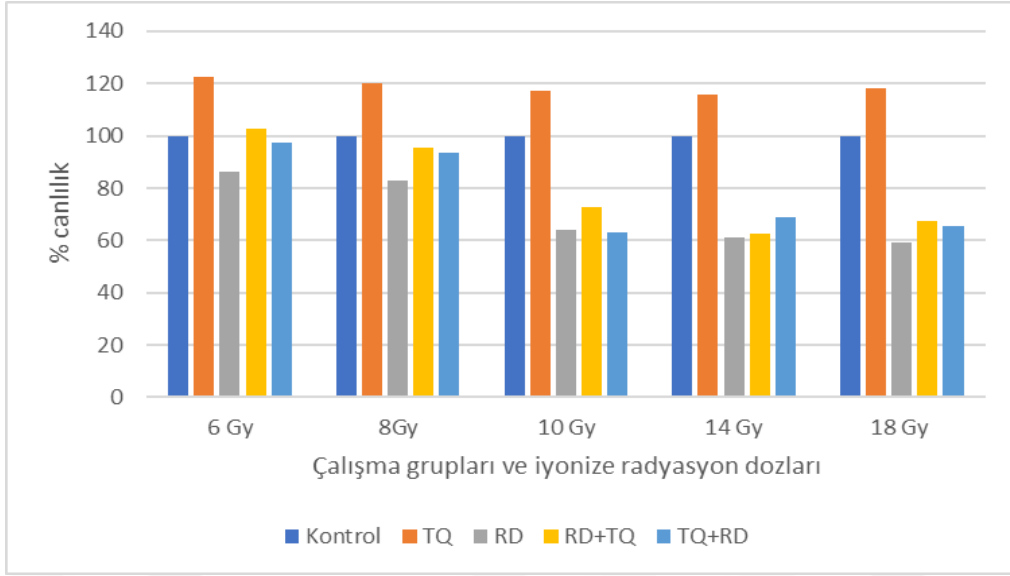
İyonize radyasyonun neden olduğu, moleküler düzeydeki hasarı azaltacak veya önleyecek TQ konsantrasyonunun bulmak için hücrelere 24 saat boyunca farklı konsantrasyonda TQ uygulandı. Uygulama sonunda, kontrol grubu %100 canlı kabul edilerek, yapılan MTT sonucunda 5 ve 10 µM konsantrasyonlarının hücre canlılığını artırdığı, 10 µM'dan sonrakilerin ise artan bir şekilde sitotoksik etki gösterdiği ve hücre proliferasyonunu azalttığı tespit edildi. Bu sonuçlara göre, hücre proliferasyonunun maksimum oranda artıracak en iyi TQ konsantrasyonunun yaklaşık %20 oranında arttıran 10 µM konsantrasyon olarak tespit edildi. Belirlenen 10 µM TQ konsantrasyonu faydalı doz olarak çalışma gruplarına uygulandı.



Şekil 3. Farklı dozlarda iyonize radyasyon uygulanmış NRK-52-E hücrelerine çalışma gruplarının ait 24 saat sonundaki MTT canlılık testi sonuçları.

Kontrol; iyonize radyasyon uygulanmayan **TQ;** iyonize radyasyon uygulanmayan sadece timokinon verilen, **RD;** sadece iyonize radyasyon uygulanan, **RD+TQ;** iyonize radyasyon uygulandıktan sonra timokinon verilen, **TQ+RD;** timokinon verilip iyonize radyasyon uygulanan grup

Çalışma gruplarına uygulanacak ve hücre ölümüne neden olabilecek iyonize radyasyon dozunu bulmak için hücrelere farklı dozlarda iyonize radyasyon uygulandı. Bu uygulamadan 24 saat sonra MTT canlılık testi yapıldı. Canlılık testi sonuçlarına göre iyonize radyasyon verilen gruplardan 6, 8 ve 10 Gy iyonize radyasyon verilen tüm gruplarda % 20-40 arasında değişen oranlarda bir hücre proliferasyon artışı tespit edildi. 18 Gy iyonize radyasyon verilen R ve RD+TQ gruplarında hücre canlılığını % 20-25 oranında TQ+ RD grubunda ise yaklaşık olarak %15 oranında azaldığı tespit edildi. Bu sonuçlara göre, hücre ölümüne neden olabilecek ve moleküler düzeyde hasar oluşturabilecek konsantrasyonun 18 Gy olabileceği tespit edildi ve çalışma gruplarına zararlı doz olarak bu doz uygulandı.



Şekil 4. Farklı dozlarda iyonize radyasyon uygulanmış NRK-52-E hücrelerine çalışma gruplarının ait 72 saat sonundaki MTT canlılık testi sonuçları.

Çalışma gruplarına uygulanacak ve hücre ölümüne neden olabilecek iyonize radyasyon dozunu bulmak için hücrelere farklı dozlarda iyonize radyasyon uygulandı. Bu uygulamadan 72 saat sonra MTT canlılık testi yapıldı. Canlılık testi sonuçlarına göre 6 ve 8 Gy iyonize radyasyon verilen grupta hücre proliferasyonu %15-20 oranında azalırken 10,14 ve 18 Gy verilen gruplarda yaklaşık %40 oranında azaldığı tespit edildi. TQ radyasyon üzerindeki etkilerine bakıldığında 6 ve 8 Gy’de RD+TQ yaklaşık %15-20 oranında hücre çoğaldığı, 10 Gy de ise %5 artış tespit edildi. TQ+RD grubunda ise 6 ve 8 Gy’de %10-15 oranında hücre proliferasyonunda artış tespit edildi. Bu sonuçlara göre, hücre ölümüne neden olabilecek ve moleküllere düzeyde hasar oluşturabilecek konsantrasyonun 10 Gy olabileceği tespit edildi ve çalışma gruplarına zararlı doz olarak bu doz uygulandı.

2- Comet Assay Bulguları

Tablo 3. Gruplara göre DNA hasarı ve kuyruk momenti ölçüm değerlerinin tanımlayıcı istatistikleri ve karşılaştırma sonuçları.

			24 saat		72 saat	
		N	Mean $\pm$ S.D.	*p.	Mean $\pm$ S.D.	*p.
DNA Hasarı	Kontrol	6	20.985 $\pm$ 1.757 ^d	<005	22.217 $\pm$ 2.519 ^d	<005
	TQ	6	18.277 $\pm$ 1.455 ^d		19.509 $\pm$ 2.274 ^d	
	RD	6	52.359 $\pm$ 3.585 ^a		59.668 $\pm$ 1.972 ^a	
	RD+TQ	6	35.131 $\pm$ 1.221 ^b		39.715 $\pm$ 4.897 ^b	
	TQ+RD	6	31.029 $\pm$ 2.475 ^c		35.189 $\pm$ 2.894 ^c	
Kuyruk Momenti	Kontrol	6	7.328 $\pm$ 1.982 ^c	<005	6.993 $\pm$ 1.378 ^c	<005
	TQ	6	6.086 $\pm$ 1.430 ^c		6.595 $\pm$ 1.557 ^c	
	RD	6	36.046 $\pm$ 4.080 ^a		41.513 $\pm$ 3.293 ^a	
	RD+TQ	6	20.235 $\pm$ 2.373 ^b		17.216 $\pm$ 2.318 ^b	
	TQ+RD	6	17.802 $\pm$ 3.430 ^b		15.678 $\pm$ 2.646 ^b	

Kruskal-Wallis Test; a, b, c, d: Gruplar arası farkı gösterir (Bonferroni Post-Hoc Test); S.D.: Standart Deviation; N: Grupların her birinde yaklaşık 30 hücresinin yer aldığı 6 adet fotoğraftaki hücrelerin ölçüm değerlerinin ortalamasını ifade etmektedir.

Gruplara göre DNA hasarı ve kuyruk momenti ölçüm değerlerinin tanımlayıcı istatistikleri Tablo 3’de verilmiştir. DNA Hasarı ve Kuyruk Momenti bakımından gruplar arasında istatistik olarak anlamlı farklılıklar gözlenmiştir ($p < 0.05$). Buna göre, 24 saat için, DNA Hasarı ölçüm değerlerinin, kontrol ile TQ gruplarının ölçümleri arasında fark bulunamamıştır ($p > 0.05$). Ek olarak, kontrol ve TQ grupları ile RD, RD+TQ ve TQ+RD grupları arasında anlamlı farklılıklar tespit edilmiştir ($p < 0.05$). Kuyruk momenti ölçümlerine bakıldığında kontrol ve TQ grupları ile RD+TQ ve TQ+RD ölçümleri arasında fark bulunamamıştır ($p > 0.05$). Buna rağmen kontrol ve TQ

grupları ile RD, RD+TQ ve TQ+RD grupları arasında istatistiki olarak anlamlı farklılıklar tespit edilmiştir ($p<0.05$).

72 saat DNA hasarı sonuçlarına bakıldığında, kontrol ve TQ gruplarının ölçüm değerleri arasında farklılık gözlenmezken ($p>0.05$); diğer gruplar arasında istatistik olarak anlamlı farklılık tespit edilmiştir ($p<0.05$). Ayrıca, 72 saat kuyruk momenti analiz sonuçlarına bakıldığında, Kontrol ve TQ grupları arasında bir farklılık görülmemiştir ($p>0.05$). Aynı şekilde, RD+TQ ve TQ+RD grupları arasında da bir farklılık gözlenmemiştir ($p>0.05$). Ancak, RD grubunun diğer gruplardan istatistik olarak anlamlı seviyede yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$).

Tablo 4. Gruplara göre DNA hasarı ve kuyruk momenti ölçüm değerleri arasındaki ilişki.

			DNA Hasarı				
			Kontrol	TQ	RD	RD+TQ	TQ+RD
24 saat	Kuyruk Momenti	R	0.600	0.029	0.886*	0.086	0.543
		P	0.208	0.957	0.019	0.872	0.266
72 saat	Kuyruk Momenti	R	0.072	0.357	0.842*	0.844	-0.086
		P	0.642	0.524	0.028	0.313	0.944

r: Spearman's rho korelasyon katsayısı.

** $p<0.01$

Tablo 4'te, Gruplara göre DNA Hasarı ve Kuyruk Momenti ölçüm değerleri arasındaki ilişki hesaplanmıştır. Buna göre, 24 ve 72. Saat için RD grubundaki DNA hasarı ile kuyruk momenti arasında istatistiki olarak anlamlı bir korelasyon ya da ilişki tespit edilmiştir ($p<0.01$). Bu korelasyon pozitif yönlüdür. Yani RD grubunda DNA hasarı arttıkça hem 24 hem de 72. saat de kuyruk momenti de artmaktadır.

24. ve 72. Saatte RD grupları dışında diğer gruplarda DNA hasarı ve kuyruk momenti arasında istatistik olarak anlamlı bir ilişki tespit edilmemiştir ($p>0.01$).

3- Real Time- PCR sonuçları

Tablo 5. Gruplara göre Kaspaz 3, 8, 9 ve Bcl-2 genlerinin ölçüm değerlerinin tanımlayıcı istatistikleri ve karşılaştırma sonuçları.

			24 saat		72 saat	
	Grup	N	Mean $\pm$ S.D.	*p.	Mean $\pm$ S.D.	*p.
Kaspaz 3	Kontrol	3	1.000 ^a $\pm$ 0.000 ^a	0.009	1.000 $\pm$ 0.000 ^a	0.015
	TQ	3	0.463 $\pm$ 0.017 ^b		0.765 $\pm$ 0.006 ^c	
	RD	3	0.314 $\pm$ 0.026 ^c		0.844 $\pm$ 0.009 ^b	
	RD+TQ	3	0.268 $\pm$ 0.009 ^d		0.597 $\pm$ 0.096 ^d	
	TQ+RD	3	0.243 $\pm$ 0.010 ^d		0.344 $\pm$ 0.008 ^e	
Kaspaz 8	Kontrol	3	1.000 $\pm$ 0.000 ^a	0.019	1.000 $\pm$ 0.000 ^c	0.015
	TQ	3	0.539 $\pm$ 0.035 ^b		1.257 $\pm$ 0.009 ^b	
	RD	3	0.389 $\pm$ 0.018 ^c		1.705 $\pm$ 0.008 ^a	
	RD+TQ	3	0.387 $\pm$ 0.012 ^c		0.977 $\pm$ 0.005 ^d	
	TQ+RD	3	0.425 $\pm$ 0.028 ^c		0.776 $\pm$ 0.007 ^d	
Kaspaz 9	Kontrol	3	1.000 $\pm$ 0.000 ^a	0.009	1.000 $\pm$ 0.000 ^b	0.015
	TQ	3	0.423 $\pm$ 0.022 ^b		1.485 $\pm$ 0.008 ^a	
	RD	3	0.393 $\pm$ 0.012 ^b		0.165 $\pm$ 0.008 ^e	
	RD+TQ	3	0.197 $\pm$ 0.007 ^c		0.544 $\pm$ 0.006 ^c	
	TQ+RD	3	0.239 $\pm$ 0.033 ^d		0.329 $\pm$ 0.009 ^d	
Bcl-2	Kontrol	3	1.000 $\pm$ 0.000 ^a	0.012	1.000 $\pm$ 0.000 ^c	0.015
	TQ	3	0.536 $\pm$ 0.022 ^b		1.143 $\pm$ 0.008 ^b	
	RD	3	0.307 $\pm$ 0.006 ^c		0.687 $\pm$ 0.007 ^d	

	RD+TQ	3	0.135 ± 0.011^d		0.988 ± 0.005^c	
	TQ+RD	3	0.139 ± 0.006^d		1.396 ± 0.019^a	

* $p < 0.05$; Kruskal-Wallis Test; a, b, c: Gruplar arası farkı gösterir (Bonferroni Post-Hoc Test); S.D.: Standart Deviation; N: Tekrar sayısını göstermektedir.

Gruplara göre Kaspaz 3, 8, 9 ve Bcl-2 genlerinin ölçüm değerlerinin tanımlayıcı istatistikleri Tablo 5’te verilmiştir.

24 saat analiz sonuçlarına göre;Kaspaz 3 kontrol ,TQ ve RD arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilirken ($p < 0.05$), RD+TQ ve TQ+RD arasında anlamlı fark bulunamamıştır ($p > 0.05$).Kaspaz 8 ölçümüne bakıldığında kontrol ve TQ ve RD grupları arasında anlamlı fark tespit edilmiştir ($p < 0.05$). Buna rağmen RD, RD+TQ ve TQ+RD arasında anlamlı fark bulunamamıştır ($p > 0.05$). Kaspaz 9 ölçümünde kontrole göre TQ, RD, RD+TQ ve TQ+RD istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmiştir ($p < 0.05$). Bcl-2 kontrole göre TQ, RD, RD+TQ grupları arasında anlamlı fark tespit edilmiştir ($p < 0.05$).

72 saat analiz sonuçlarına göre; Kaspaz 3 kontrol grubuna göre TQ, RD, RD+TQ,TQ+RD grupları arasında anlamlı olarak istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmiştir ($p < 0.05$). Kaspaz 8’in ölçüm değerlerine bakıldığında;kontrol ile TQ, RD arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilirken ($p < 0.05$), RD+TQ ve TQ+RD grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p > 0.05$). Kaspaz 9 ve Bcl-2 ölçümlerine bakılığında; kontrol ile diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmiştir($p < 0.05$).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

İyonize radyasyon, DNA’da yaptığı hasarın sonucu olarak hücre ölümüne sebep olmaktadır. Bundan dolayı, hücresel metabolizma işleyişi bozulur, hücresel yaşlanma, çeşitli düzeylerde moleküler yıkım ve birçoğu hayati öneme sahip organlarda doku ve hücre hasarı oluşur (Halliwell, 1994; Ofluoğlu, 2007). Programlı hücre ölümü olarak da bilinen apoptozis, oldukça karmaşık ve kompleks moleküler kaskat olaylarını içermektedir. Bir hücrenin apoptozise ya da nekrozise gidip gitmeyeceğinde radyasyon, sıcaklık, hipoksi, sitotoksik etkili ilaçlar gibi çeşitli zararlı uyarıların tipi de oldukça önem arz etmektedir. Kaspaz 3, Kaspaz 8, Kaspaz 9 genleri apoptotik yolda etkinliği olan proteinlerden iken, Bcl-2 geninin ise apoptozisi düzenleyici proteinlerden olduğu bilinmektedir (Kaya ve ark., 2012). Bununla birlikte, iyonize radyasyon sonucu oluşan serbest radikallerin oluşumu ve uzaklaştırılması vücutta hassas bir şekilde kontrol edilmektedir. Bu moleküllerin oluşum hızı ve yok edilme hızı arasındaki denge bozulmadığı süre boyunca organizma ya da hücre bundan etkilenmemektedir. Bu denge bozulduğunda, oksidanların arttığı veya antioksidanların yetersiz kaldığı durumlarda oksidatif stres meydana gelmektedir (Halliwell, 1994., Ofluoğlu, 2007).

Szymczyk ve ark. (2004), MC3T3-E₁ fare osteoblast hücre hattı üzerine iyonize radyasyonun etkisinin araştırıldığı çalışmada, iyonize radyasyon uygulamasından 24 saat sonra hücre canlılığında çok az azalmanın olduğu, özellikle yaptıkları MTT canlılık testinde 15 Gy uygulanan yüksek doz iyonize radyasyonun 24 saatin sonunda hücrede önemli bir değişikliğin olmadığını, 30 Gy olarak uygulanan yüksek doz iyonize radyasyonun ise, 24 saatin sonunda hücre MTT aktivitesinde sadece %20 oranında azalmanın olduğunu tespit etmişlerdir. Sunulan bu çalışmada ise, 24 saatin sonunda MTT canlılık testinde ise, 10 Gy iyonize radyasyonun hücre proliferasyonunu %40 oranında, 14 Gy iyonize radyasyonun %25 oranında artırdığı, ancak 18 Gy’lik bir iyonize radyasyon uygulamasının hücre canlılığını yaklaşık %25 oranında azalttığı tespit edilmiştir. Bu sebeple çalışma gruplarına zararlı doz olarak 18 Gy’lik doz uygulandı. Szymczyk ve ark. (2004) tarafından yapılan çalışmada yüksek doz iyonize radyasyonun 24 saatin sonunda *in vitro* çalışmalarda osteoblast hücrelerinde ölüme neden olmadığı göstermiştir. Bu durum, apoptotik yolların iyonize radyasyonla aktive edildiği bildirilen diğer hücre hatlarıyla keskin bir tezat oluşturmaktadır (Hendry ve

West, 1997; Somosy, 2000; Alphonse ve ark., 2002). Bizim yaptığımız çalışmadaki uygulanan yüksek doz iyonize radyasyonun 24 saatin sonundaki hücrelerde ekleyici bir ölüme sebep olmaması yönünden, Szymczyk ve ark. (2004)'nı desteklemektedir. Bu bulguya dayanarak, ışınlamanın etkilerinin hücre tipine özgü ya da süresine göre değişebileceğini ve NRK-52-E hücre hattının nekroz ya da apoptozdan kendini koruyan spesifik özelliklere sahip olabileceğini göstermektedir.

Yapılan çalışmalar radyasyona duyarlı hücrelerin hücresel cevabını Kaspaz 3, 8, 9 yoluyla meydana getirdiğini göstermektedir (Rudner ve ark., 2001a; Alphonse ve ark., 2002). Bununla birlikte, Bcl-2 geninin ise, mitokondriyal ve endoplazmik retikulum yoluyla radyasyonun meydana getirdiği bu apoptozisi engellediği bildirilmektedir (Annis ve ark., 2001; Rudner ve ark., 2001b).

Bizim çalışmamızda, iyonize radyasyon uygulamasından 24 saat sonra elde edilen ölçüm değerlerinin istatistiki değerlerine bakıldığında, Kaspaz 3 kontrol ,TQ ve RD arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilirken ($p<0.05$), RD+TQ ve TQ+RD arasında anlamlı fark bulunamamıştır ($p>0.05$). Kaspaz 8 ölçümüne bakıldığında kontrol ve TQ ve RD grupları arasında anlamlı fark tespit edilmiştir ($p<0.05$). Buna rağmen RD, RD+TQ ve TQ+RD arasında anlamlı fark bulunamamıştır ($p>0.05$). Kaspaz 9 ölçümünde kontrole göre TQ, RD, RD+TQ ve TQ+RD istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmiştir ($p<0.05$). Bcl-2 kontrole göre TQ, RD, RD+TQ grupları arasında anlamlı fark tespit edilmiştir ($p<0.05$). Bu durumda 24 saatlik iyonize radyasyonda verilen TQ kaspaz 9 yolağını harekete geçirerek hücreyi apoptoza götürmüştür. 72. saatte ise, kaspaz 8 hariç diğer diğer apoptotik yolları (kaspaz 3,9) yani instrintik yolağı aktif hale getirdiği bunun yanında Bcl-2 yolağını da etkilemiştir.

Yapılan çalışmalarda iyonize radyasyonun hücrede DNA hasarına, hücre ölümüne veya mutasyona neden olduğu bildirilmektedir (Calini ve ark., 2003; Olive, 1999). İyonize radyasyon sonucu hücre DNA'sında meydana gelen hasarın tespit edilmesinde Comet asay yöntemi oldukça yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Bacová ve ark., 2000; García ve ark., 2011). Bu yöntem sayesinde hücrede meydana gelen DNA hasarının heterojenitesin yanı sıra kuyruk momenti de hesaplanabilmektedir (Olive ark., 1990; Olive, 1999; García ve ark., 2011). Sunulan bu çalışmada, İyonize radyasyonun NRK-52-E hücre hattı üzerindeki DNA Hasarı ve oluşturduğu kuyruk

momenti etkisi Comet assay yöntemi ile incelenmiştir. Daha sonra floresan mikroskopta görüntüler elde edildi ve Imaje J programı kullanılarak DNA hasarı ve Kuyruk momenti ölçüm değerleri elde edildi. Elde edilen bu ölçüm değerlerinin istatistik sonuçlarına bakıldığında, hem DNA Hasarı hem de Kuyruk Momenti ölçüm değerlerinin her ikisinde de, kontrol ile TQ gruplarının ölçümleri arasında fark bulunmamıştır ($p>0.05$). Benzer şekilde RD+TQ ve TQ+RD grupları arasında fark bulunmamıştır ($p>0.05$). Ancak, RD grubu diğer gruplardan anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Bu durum iyonize radyasyonun NRK-52-E hücre hattında DNA hasarı meydana getirdiğini, çok güçlü bir antioksidan olan timokinonun ise, bu hasarı engellediği hatta bu hasarı düzenlemeye çalıştığını göstermektedir.

Antioksidan, antiinflamatuvar etkileri, antikanser etkileri ve toksik ajanlarlar üzerine koruyucu etkisi olduğu oldukça yaygın bir şekilde bilinen timokinon *in vivo* ve *in vitro* apoptotik ve oksidatif stres çalışmalarında oldukça yaygın kullanılan bir antioksidandır (Woo ve ark., 2012). Bu özelliklerinden dolayı, yapılan bu çalışmada iyonize radyasyonun zararlı etkilerine karşı antioksan madde olarak, MTT canlılık testi yapılarak NRK-52-E hücre hattındaki proliferasyonu artırıcı dozu ($10 \mu\text{M}$) belirlenerek kullanılmıştır. Özellikle Comet bulgularına bakıldığında, iyonize radyasyon uygulanmasından önce ve sonra verilen timokinon'un hem DNA Hasarı hem de Kuyruk Momenti üzerinde olumlu yönde etkilerinin olduğu tespit edilmiştir.

hFOB 1.19 insan osteoblast hücre hattı üzerine iyonize radyasyonun etkisinde TQ uygulamasının DNA hasarı apoptotik ve oksidatif stres üzerine etkisinin araştırıldığı çalışmada; apoptotik ve oksidatif stresi düzenleyici enzimleri etkilediği, iyonize radyasyon kaynaklı DNA hasarına karşı hem korunma hem de oluşan hasarın giderilmesi için olumlu etkilere sahip olduğu, timokinon'un 24 saat gibi bir sürede bile iyonize radyasyonun zararlı etkilerini azaltmaya başladığı sonucuna varılmıştır (Yılmaz ve ark., 2021).

Sonuç olarak, yüksek doz iyonize radyasyon uygulamasının 24 ve 72. saatin sonunda NRK52-E hücre hattında DNA hasarı ve apoptotik enzimleri üzerine etkili olduğu, bununla birlikte, timokinon'un radyasyona bağlı oluşabilecek yan etkileri azaltmada veya etkiler sonucu oluşabilecek komplikasyonları önlemede etkili olabileceği kanısına varıldı.

KAYNAKLAR

Ahmad A, Mishra RK, Vyawahare A, Kumar A, Rehman M, Qamar W, ve ark. Thymoquinone (2-Isoprpyl-5-methyl-1, 4-benzoquinone) as a chemopreventive/anticanceragent: Chemistry and biological effects. Saudi Pharm J. 2019;27(8):1113-26.

Akşit H, Bildik A. Apoptozis. YYÜ Vet Fak Derg. 2008;19(1):55-63.

Alphonse G, Aloy MT, Broquet P, Gerard JP, Louisot P, Rousson R, Rodriguez-Lafrasse C. (2002). Ceramide induces activation of the mitochondrial/caspases pathway in Jurkat and SCC61 cells sensitive to gamma-radiation but activation of this sequence is defective in radioresistant SQ20B cells. Int J Radiat Biol 2002;78(9):821 –35.

Annis MG, Zemzami N, Zhu W, Penn LZ, Kroemer G, Leber B, ve ark. Endoplasmic reticulum localized Bcl-2 prevents apoptosis when redistribution of cytochrome c is a late event. Oncogene. 2001;20:1939-52.

Asal Ulus C, Sökölmez Kaya P, Taşçı B.Çörek otu tohumunun kimyasal bileşimi ve insan sağlığındaki yeri. Samsun Sağ Bil Dergisi. 2018;3(1):25-9.

Assı MA, MohdNoor MH, Bachek NF, Ahmad H, Haron AW, Yusoff SM, ve ark. The various effects of nigellasativa on multiple body system in human and animals. PJSRR. 2016;2(3):1-19.

Bacak Güllü E, Avcı G. Timokinon:NigellaSativa'nın biyoaktif komponenti. Kocatepe Vet Derg. 2013;6(1):51-61.

Bacová G, Hunáková LE, Chorváth M, Boljesíková E, Chorváth B, Sedlák J, ve ark. Radiation-induced DNA damage and repair evaluated with 'comet assay' in human ovarian carcinoma cell lines with different radiosensitivities. Neoplasma. 2000;47(6):367-74.

Baytop T. Türkiye'de bitkiler ile tedavi. 2. Baskı, Nobel Tıp Kitapevi İstanbul: s.189 (1999).

Bozkurt E. Radyasyona maruz bırakılan insan glioblastoma multiforme hücre kültürlerinde trabectedin aracılı zenginleştirilmiş sitotoksik etkide DNA tamir mekanizmalarının rolü (Yüksek Lisans Tezi). Manisa: Celal Bayar Üniversitesi; 2013.

Burits M, Bucar F. Antioxidant activity of Nigella sativa essential oil. *Phytother Res.* 2000;14(5):323-28.

Calini V, Urani C, Camatini M. Overexpression of HSP70 is induced by ionizing radiation in C3H 10T1/2 cells and protects from DNA damage. *Toxicol In Vitro.* 2003;17(5-6):561-6.

Chatterjee N, Walker G. Mechanisms of DNA damage, repair and mutagenesis. *Environ Mol Mutagen.* 2017;58(5):235-63.

Coşkun Ö. İyonize radyasyonun biyolojik etkileri. *SDU Tek Bil Derg.* 2011;1(2):13-17.

Çimen B, Erdoğan M, Oğul R. İyonlaştırıcı radyasyon ve korunma yöntemleri. *S.Ü. Fen Fak Fen Derg.* 2017;43(2):139-47.

Dağdeviren T. Programlı Hücre Ölümü; Apoptoz. *Gaziosmanpaşa Üniv Tıp Fak Derg.* 2021;13(3):120-35.

Dede S, Yüksel V, Yılmaz O, Çetin S, Usta A, Güney M. In Vitro Evaluation of The Effect of Vitamin C on Necrosis and Autophagy Caused by Ionizing Radiation. *Eurasian JHS.* 2019;2(4(suppl)):169-72.

Demir M. Radyasyon Güvenliği ve Radyasyondan Korunma. İstanbul: Yazın Basın Yayın Matbaacılık;2013.

Dicle O. Temel Radyoloji Fiziği. İzmir:Güneş kitapevi yayınları;1991

Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death.-*Toxicol Pathol* 2007;35(4): 495-516

Eröz R, Karataş A, Alkoç O, Baltacı D, Oktay M, Çolakoğlu S. Apoptozis Hakkında Bilinenler. *Düzce Tıp Derg.* 2012;14(2):87-101.

García O, Romero I, González JE, Moreno DL, Cuétara E, Rivero Y, Gutiérrez A, Pérez CL, Alvarez A, Carnesolta D, Guev ara I. (2011). Visual estimation of the percentage of DNA in the tail in the comet assay: evaluation of different approaches in an intercomparison exercise. *Mutat Res.* Feb 28;720(1-2):14-21.

Gökhan A, Kılıç K, Gülle K, Uyanıkgil Y, Çavuşoğlu T. Apoptotik Yolaklar ve Hedefe Yönelik Tedaviler. *Süleyman Demirel Üniv Tıp Fak Derg.* 2020;27(4):565-73.

Gökoğlu E, Ekin M, Özgenç E, Özdemir D, Aşıkoğlu M. Radyasyon ve İnsan Sağlığı Üzerindeki Etkileri. *Anadolu Kliniği Tıp Bil Derg.* 2020;25(3).DOI: 10.21673/anadoluklin.709434

Güleş Ö, Eren Ü. Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler. *YYÜ Vet Fak Derg.* 2008;(2):73-8.

Gümüş AF, Dede S, Yüksel V, Çetin S, Taşpınar M. In Vitro evaluation of thymoquinone on apoptosis and oxidative DNA damage in high glucose condition. *Cellular and Molecular Biology (Noisy-le-Grand, France).* 2018;64(14):79-83. PMID:30511625.

Gündüz H, Dede S, Ağaoğlu ZT, Atasoy N, Mert N. Serum trace elements status of rabbits supplemented with *Nigella sativa*, vitamins C and E, and selenium against damage by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Biol Trace Elem Res.* 2002;89(1):65-73.

Güzelsoy P, Aydın S, Başaran N. Potential effects of thymoquinone the active constituent of blackseed on human health. *J LitPharm. Sci.* 2018;7(2):118-35.

Halliwell B, Gutteridge JM, Cross CE. Free Radicals, antioxidants and human disease: Where are we now? *J Lab Clin Med.* 1992;119:598–620.

Handee WR, Edwards FM. Health effects of exposure to low-level ionizing radiation. *Acta Radiol.* 1998;39(4):453-4.

Hannan MA, Rahman MA, Sohag AAM, Uddin MJ, Dash R, Sikder MH, ve ark. Black Cumin (Nigelladasativa L.): A Comprehensive Review on Phytochemistry, Health Benefits, Molecular Pharmacology, and Safety. *Nutrients*. 2021;13:1784.

Hendry JH, West CM. Apoptosis and mitotic cell death: their relative contributions to normal-tissue and tumour radiation response. *Int J Radiat Biol*. 1997;71(6):709– 19.

Jackson S, Bartek J. The DNA damage response in human biology and disease. *Nature*. 2009;461(7267):1071-8.

Kanter M, Demir H, Karakaya C, Ozbek H. Gastroprotective activity of Nigelladasativa L oil and its constituent, thymoquinone against acute alcohol-induced gastric mucosal injury in rats. *World J Gastroenterol*. 2005;11(42):6662-6.

Kara N, Katar D, Baydar H. Yield and quality of black cumin (Nigella sativa L.) populations: (2015). The effect of ecological conditions. *Turk J. Field Crops*, 20, 1, 9-14.

Kaya C, Çalışkan Y, Yönden Z. Apoptosis. *Mustafa Kemal Üniv. Tıp Derg.* 2012;3 (11):26–37.

Kurt E. Timokinon Uygulanan Ratlarda Total Antioksidan Durumu ve Biyokimyasal Serum Profilinin Araştırılması [Yüksek Lisans Tezi]. Van: Yüzüncü Yıl Üniversitesi; 2013.

Manisalıgil Y, Yurt A. İyonlaştırıcı Radyasyonun Hücresel ve Moleküler Düzeydeki Etkileri. *Düzce Tıp Fak Derg.* 2018;20(2):50-3.

Olive PL, Banáth JP, Durand RE. Heterogeneity in Radiation-Induced DNA Damage and Repair in Tumor and Normal Cells Measured Using the “Comet” Assay," *Radiation Research*. 1990;122(1):86-94.

Olive PL. DNA damage and repair in individual cells: applications of the comet assay in radiobiology, *Int J Radiat Biol*. 1999;75(4): 395-405.

Ofluoğlu FE. Ratlarda beyin L-arjinin metabolizması üzerine kafeinin etkileri [Doktora Tezi]. Ankara: Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü; 2007.

Onur E, Tuğrul B, Bozyiğit F. DNA hasarı ve Onarım mekanizmaları. Türk Klinik Biyokimya Derg. 2009;7(2):61-70.

Pari L, Sankaranarayanan C. Beneficial effects of thymoquinone on hepatic key enzymes in streptozotocin-nicotinamide induced diabetic rats. Life Sci. 2009;16;85(23-26):830-4.

Rudner J, Belka C, Marini P, Wagner RJ, Faltin H, Lepple-Wienhues A, ve ark. Radiation sensitivity and apoptosis in human lymphoma cells. Int J Radiat Biol. 2001;77(1):1-11.

Rudner J, Lepple-Wienhues A, Budach W, Berschauer J, Friedrich B, Wesselborg S, ve ark. Wild-type, mitochondrial and ER-restricted Bcl-2 inhibit DNA damage-induced apoptosis but do not affect death receptor-induced apoptosis. J Cell Sci. 2001;114(23):4161-72.

Somosy Z. Radiation response of cell organelles. Micron. 2000;31(2): 165-81.

Szymczyk KH, Shapiro IM, Adams CS. Ionizing Radiation Sensitizes Bone Cells to Apoptosis. Bone. 2004;34:148-56.

Ofluoglu, F. E. Ratlarda Beyin L-Arjinin Metabolizması Üzerine Kafeinin Etkileri. PhD Thesis. Ankara University Institute of Health Sciences. Ankara, 2007.

Tıranbeşli G. Çörek Otu Yağı Kaynaklı Antiinflatuar Etkili Mikroemülsiyon Göz Formülasyonlarının Hazırlanması ve Değerlendirilmesi [Yüksek Lisans Tezi]. Edirne: Trakya Üniversitesi; 2020.

Ulukaya E.(2003) Apoptosis ders notları, Biyokimya Anabilim Dalı,1-19.

Uras S, Silahtaroglu S, İlçim A, Kökdil G. Fattyacid, tocopherol, mineralcomposition, total phenolic, flavonoid, thymoquinone content, and antioxidant activity of nigella sativa l. J.Fac.Pharm.Ankara. 2010;39(3):173-86.

Yeyin N.Radyasyonun Biyolojik Etkileri. Nük.Tıp Sem.2015;3:139-43.DOI:10.4274/nts.0022

Yi T, Cho SG, Yi Z, PangX, Rodriguez M, Wang Y, ve ark. Thymoquinone inhibit stumor angiogenesis and tumor grow ththrough suppressing AKT and ERK signaling pathways. Molcancer ther.2008;7(7):1789-96.

Yılmaz H. Ratlarda İyonizan Radyasyonun Neden olduğu Renal Hasara Karşı Kırmızı Ginseng ve Amifosfitinin Korutucu Etkisi [Doktora Tezi]. İstanbul: Sağlık Bilimleri Üniversitesi;2022.

Yılmaz O, Çetin S, Yüksek V, Dede S, Tuğrul T. The effect of vitamin C on apoptotic pathway in ionizing radiation induced NRK-52E cell line. 2nd International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (Eurasian Bio Chem 2019), June 28-29,2019 Ankara, Turkey, OP, 1872.

Yılmaz O, Yüksek V, Çetin S, Dede S, Tuğrul T. The effects of thymoquinone on DNA damage, apoptosis and oxidative stress in an osteoblast cell line exposed to ionizing radiation, Radiation Effects and Defects in Solids, 2021.

Yıldız Ş, Turan S. Fenolik bileşiklerin lipid oksidasyonunu önleme aktiviteleri ve timokinonun terapötik özellikleri. Bursa Uludağ Üniv Ziraat Fak Derg. 2020;34(2):397-416.

Zubair H, Khan HY, Sohail A, Azim S, Ullah MF, Ahmad A ve ark. Redoxcycling of endogenouscopperbythymoquinoneleadsto ROS-mediated DNA break ageand consequent cell death: putativeanti cancer mechanism of antioxidants. Cell Death Dis 2013;4:e660.

Woo CC, Kumar AP, Sethi G, Tan KH. Thymoquinone, potential cure for inflammatory disorders and cancer. Biochem Pharmacol. 2012;83(4):443-51.

EKLER

EK1: Araştırma Kesin Sonuç Onay Belgesi



EK 3. Tez Orjinallik Raporu



T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü



G19 –TEZ ORJİNALLİK RAPORU

Tez Başlığı / Konusu	İyonize Radyasyon Uygulanan Böbrek Hücre Hattında Timokinonun DNA Hasarı ve Aoptik Genlere Etkisi			
İntihal taraması yapılan bölümler ve sayfa sayıları				
Kapak sayfası	Giriş	Ana bölümler	Sonuç bölümleri	Toplam sayfa sayısı
1	2	16	10	29
İntihal taraması yapılan program		Taramanın yapıldığı tarih	Benzerlik oranı %	
Turnitin		23/05/2024	%18	
*Uygulanan filtreler aşağıda verilmiştir:				
- Kabul ve onay sayfası hariç, - Gereç ve yöntemler hariç, - Teşekkür hariç, - Kaynakça hariç, - İçindekiler hariç, - Alıntılar hariç, - Simge ve kısaltmalar hariç, - Tezden çıkan yayınlar hariç, - 7 kelimeden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç (Limit match size to 7 words)				
Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Lisansüstü Tez Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılmasına İlişkin Yönergeyi inceledim ve bu yönergede belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihali içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabulettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim. Gereğini bilgilerinize arz ederim. Elanur DEMİR Öğrencinin Adı Soyadı				

Öğrencinin Adı Soyadı	Elanur DEMİR
Anabilim Dalı	BİYOKİMYA (VETERİNER)
Öğrenci No	21930001001
Programı	☐ Yüksek Lisans ☐ Doktora

DANIŞMAN ONAYI UYGUNDUR Doç. Dr. Sedat ÇETİN	ENSTİTÜ ONAYI UYGUNDUR
--	----------------------------------