



İyonize Radyasyona Maruz Kalan Sıçan Ovaryumunda PARP-1 Ekspresyonu ve Follikülogenez Üzerine Curcuminin Koruyucu Etkisi Protective Effect of Curcumin on Folliculogenesis, and PARP-1 (Poly ADP-ribose polymerase) Expression Exposed Ionising Raditation in Rat Ovary

Kanat Gülle¹, İbrahim Pala², Meryem Akpolat³, Bekir Hakan Bakkal⁴

¹Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Isparta, Türkiye.

²Medicalpark Tüp Bebek Merkezi, Karşıyaka, İzmir, Türkiye.

³Bülent Ecevit Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Zonguldak,, Türkiye.

⁴Bülent Ecevit Üniversitesi, Tıp Fakültesi Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı, Zonguldak,, Türkiye.

Özet

Amaç: Çalışmamızda, iyonize radyasyonun folliküler atrezi üzerine etkilerini göstererek, oluşacak hasarlara karşı curcuminin koruyucu etkisinin olup olmadığını ve hücre çekirdeklerinde meydana gelen DNA hasarını tamir eden Poli (ADP-riboz)polimeraz-1 enziminin immünohistokimyasal boyama yöntemiyle gösterilmesi amaçlandı.

Materyal-Method: Çalışmamız için seçilen dişi sıçanlar, biri kontrol olmak üzere toplam 4 gruba ayrıldı. Radyasyon hasarı oluşturmak amacıyla kontrol ve curcumin grubu dışındaki deneklere tek doz tüm vücut 8.3 Gy iyonize radyasyon uygulandı. Curcumin ve radyasyon+curcumin grubu deneklere; ışınlamadan 7 gün önce başlayarak günde 100 mg/kg curcumin oral yoldan verildi. Işınlamadan sonraki 4. günde deneklerden anestezi altında ovarium dokuları alınarak mikroskopik incelemeler için işlemlendirildi.

Bulgular: Radyasyon uygulamasından 4 gün sonra alınan ovarium dokularının kesitlerini incelediğimizde, ışınlanmış gruplardaki atretik özellik gösteren folliküller sayıca fazlaydı. Radyasyon ile ışınlanan curcumin tedavili grupta ise atretik follikül oranı radyasyon grubuna göre daha düşüktü. Curcumin ile tedavi edilen grupta, curcuminin radyasyona bağlı meydana gelen hasarları kısmen engellediği tespit edildi.

Sonuç: Bu sonuçlar curcuminin ovarium hasarında koruyucu etkisi olduğunu göstermiştir.

Anahtar kelimeler: İyonize Radyasyon, Follikülogenezis, Curcumin, PARP1, Sıçan

Abstract

Objective: : The aim of our study was to show the effects of ionising radiation on ovarium follicular atresia so that the protective effect of curcumin on the resulting damage could be determined, and in addition to immunohistochemically determining to level of expression of PARP-1 enzyme is responsible for DNA repair in the nucleus of the cells protected from radiation or irradiated the cells.

Material-Method: The female rats chosen for the study were divided into 4 groups, one being the control group. The whole body of the rats in the other groups with the exception of those in the control group and the curcumin group was exposed to a single dosage of ionising radiation (8.3 Gy) with a view to causing radiation-induced damage. The animals in the curcumin and in the irradiated with treated curcumin had been fed a daily 100 mg/kg of curcumin through the intragastric tract for seven days in a row before the radiation process was launched. Ovarium tissues sample of these animals were collected for the purpose of microscopic examinations.

Results: The ovarium tissues cultivated at the 4 day of the application of ionising radiation showed that there were the number of follicles showing atretic features was significantly high in the irradiated group. On the other hand, in the irradiated with treated curcumin group showed that the number of atretic follicles was lower than that in the irradiated group. The irradiated group given curcumin were observed to prevent the follicular damage caused by radiation.

Conclusions: These results suggest that curcumin is protective effect in ovarian damage.

Keywords: Ionizing Radiation, Folliculogenesis, Curcumin, PARP1, Rat

Giriş

Memelilerde ovarium gelişimi ve işlevi süresince, ovariumdan oositlerin ve folliküllerin elenmesi ve yok olmasıyla meydana gelen folliküler atrezi, kusursuz işleyen periyodik bir süreçtir. (1,2). Folliküler atrezinin en önemli

etkileri arasında, olgun ve büyük folliküllere ait oositleri yok etmesi gelmektedir (3). Atretik folliküller: piknotik çekirdekli hücreler, granüloza hücre proliferasyonunda azalma, bazal membran parçalanması ve hipertrofik teka tabakası gibi morfolojik karakteristikler içermektedir (4). Folliküler

atreziye neden olan ve hızlandıran, patolojik uyarılardan birisi radyasyondur. (5). Radyasyon, kanser tedavilerinde kullanılır ve aktiviteleri DNA'sı hasar görmüş tümör hücrelerini yok etmek üzerinedir. Bu tedavi, hastaların sağ kalımı için gerekli olmasına rağmen, üreme sistemi üzerine zararlı etkileri kapsayan olumsuz yan etkilere sahiptir (6-8). Ovaryum follikül havuzunun tükenmesi, sonrasında kalıcı infertilite ve tedavinin bazı tiplerinde primordiyal folliküllerin tedaviye duyarlı olduğunu destekleyen kanıtlar vardır. Ayrıca, bazı hastalarda döngünün geçici ve hızlı kaybı, antral folliküller üzerinde de toksik etki oluşturmaktadır (6, 9,10).

PARP-1, 116 kDa ağırlığında yüksek derecede korunmuş, ADP-riboz polimerlerinin sentezini katalizleyen, DNA zincir kırıkları tarafından aktive olan nükleer bir enzimdir (11-13). PARP-1; alkilleyici ajanlar, oksidatif stres ve iyonize radyasyon gibi tek zincir hasarlarını oluşturan ajanlar tarafından aktive olmaktadır (14). PARP-1 aktivasyonu, DNA hasarına yanıt olarak, modifikasyon bölgesindeki proteinlerle temas kurarak gerçekleşmektedir. Bu proteinler, XRCC1, DNA Polimeraz β ve DNA Ligaz III'ü kapsamakta olup, daha sonra baz çıkarım onarımı (BER) yolu gibi bazı DNA tamir mekanizmalarını harekete geçirmektedirler (15-16).

Kurkumin, *Curcuma longa* Linn. bitkisinin rizomlarından izole edilen doğal sarı pigmentler olup, antioksidan özellikleri iyi bilinen önemli fitokimyasallardan birisidir. Kurkumin, turmerik (kurkumin turmeriğin bileşenlerinden biridir) bileşiminin % 3-4'ünü oluşturmaktadır (11,17,18). Kurkumin, radyoprotektif özelliği ve önemli fitokimyasallardan birisi olması sebebiyle, radyomodifiye bir ajan olarak kabul edilmektedir (11). Kurkuminin radyoprotektif etkisinden birden fazla mekanizma sorumludur. Radyasyon aracılı serbest radikalleri süpürme ve ışınlanmış sistemlerde kurkumin ile hücrel antioksidanların yükseltilmesi bu aktiviteden sorumlu temel mekanizmalar olarak düşünülmektedir (19).

Materyal-Method

Deney Hayvanları ve Grupları

Çalışma için Bülent Ecevit Üniversitesi (BEÜ) Rektörlüğü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı'ndan 31.08.2012 tarihinde 2012-16-28/03 numaralı etik kurulu onayı alınmıştır. 40 adet dişi Wistar albino sıçan (12-14 haftalık), BEÜ Deney Hayvanları Araştırma Merkezinden temin edildi. Sıçanlar, deney süresi boyunca uygun laboratuvar koşulları ($22 \pm 2^\circ\text{C}$, 12 saat aydınlık/karanlık siklusunda, nem oranı %55-60) altında, günlük içme suyu ve % 21 ham protein içeren pelet yemlerle beslendi.

40 adet dişi Wistar albino sıçan biri kontrol grubu olmak üzere 4 gruba bölündü ve her bir grup 10 denekten oluştu. Deney grupları: Kontrol (Grup I), kurkumin (Grup II), Radyasyon (Grup III) ve Radyasyon+kurkumin (Grup IV).

İlaç Kullanımı

Kurkumin ve Radyasyon+kurkumin grubuna ışınlamadan 1 hafta önce başlamak koşuluyla, deney süresince (7 gün ışınlama öncesi 4 gün de ışınlama sonrası toplam 11 gün) gün

aşırı olmak üzere 100 mg/kg vücut ağırlığı hesaplanarak oral yoldan kurkumin verildi. Kontrol ve radyasyon grubuna ise benzer şekilde çeşme suyu verildi.

Işınlama

Radyasyon hasarı oluşturmak amacıyla BEÜ Tıp Fakültesi Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı'nda, kontrol grubu ve kurkumin grubu hariç diğer gruplardaki her bir denek, intraperitoneal (i.p.) yoldan 10 mg/kg xylazine (Rompun-Bayer/Türkiye), 90 mg/kg ketamin (Ketalar-Eczacıbaşı/Türkiye) ile anestezi yapıldıktan sonra supin (sırt üstü) pozisyonunda sabitlendi. Gerekli doz hesaplaması yapılarak, linear akseleratör cihazı ile tek fraksiyonda tüm vücuda toplam 8,3 Gy X ışını uygulandı.

Işık Mikroskopik İncelemeler

Işınlamadan 4 gün sonra tüm denekler anestezi altında servikal dislokasyon ile öldürüldü. Deneklerden çıkarılan ovaryumlar nötral formalin ile 2 gün tespit edildikten sonra dokular 1 gün süre ile akar çeşme suyu altında yıkama işlemine alındı ve alkol serisinden geçirildikten sonra parafine gömüldü. Parafin bloklardan 5 μm kalınlığında 1/25 örnekleme yapılarak seri kesitler alındı ve Hematoksilin-Eozin (H-E [Sigma-Aldrich/Almanya]) ve Periyodik Asit Schiff-Hemalen (PAS-HL [Sigma-Aldrich/Almanya]) boyaları ile ışık mikroskopik incelemeler için boyandı. Folliküller; primordiyal, primer, preantral ve antral follikül olmak üzere sınıflandırıldı (20) ve folliküllerde, oosit çekirdekleri dikkate alınarak, atretik ve sağlıklı follikül yoğunluğuna göre sayım yapıldı. Tüm inceleme ve bulguların fotoğraflandırılmasında, Zeiss AX10 marka foto mikroskop kullanıldı.

İmmünohistokimyasal İncelemeler

Radyasyona bağlı ortaya çıkan DNA hasarının göstergesi olarak ovaryum dokusunda DNA onarıcı bir enzim olan PARP1 ifadesi immünohistokimyasal yöntemler ile gösterildi.

Ovaryum dokusundan 5 μm kalınlığında kesitler alındı ve deparafinizasyon işlemi takiben kesitler suya indirildi. Suya indirilen kesitler sitrat tamponu içerisinde mikrodalga fırında 5 dk kaynatıldı. Ardından %3'lük H_2O_2 ile 15 dk muamele edildi. Distile sudan geçen kesitler PBS ile yıkandı. Bu işlemin ardından %1 preimmün rabbit serum (Ultra V Block, LabVision, TA-015-UB/ Amerika Birleşik Devletleri) uygulandı. Daha sonra, nemli kabin içinde 1/100 oranında sulandırılmış primer PARP1 (ab6079, abcam/İngiltere) antikoru ile 1 saat süre ile inkübe edildi. Kesitler PBS ile yıkandıktan sonra, 30 dk sekonder antikorda tutuldu. Hemen ardından PBS ile yıkanan kesitlere 3 dk diaminobenzidin (DAB (vectorlab/ Amerika Birleşik Devletleri) kromojen solüsyonu uygulaması yapıldı. Kesitler distile su ile yıkandıktan sonra 30 sn Mayer's Hematoksilene [Sigma-Aldrich/Almanya] tabi tutuldu. Yıkama işleminin ardından kesitler kapatma solüsyonu ile kapatıldı.

İstatistiksel Analiz

İstatistiksel değerlendirme SPSS 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) programı kullanılarak yapıldı. Tanımlayıcı istatistikler Medyan (Q1-Q3) olarak ifade edildi. Dört grubun karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis varyans analizi kullanıldı.

Kruskal-Wallis varyans analizinde alt grupların ikişerli karşılaştırılması ise Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney U testi ile yapıldı. Tekrarlı ölçümlerin değerlendirilmesinde ise Friedman testinden faydalanıldı. Alt grupların ikişerli karşılaştırılması Bonferroni düzeltmeli Wilcoxon testi ile yapıldı. Sonuçlar % 95 güven aralığında değerlendirildi ve $p<0.05$ değeri anlamlı kabul edildi.

Bulgular

Morfolojik Bulgular

Kontrol, kurkumin, radyasyon ve radyasyon+kurkumin gruplarının son ağırlıkları bakımından gruplar arasındaki fark anlamlıydı ($p<0.001$) (Tablo 1. Tüm vücut ışınlamaya bağlı olarak ovaryum ağırlığı bakımından gruplar arasındaki fark anlamlı bulunmadı. Kontrol grubuna ait ovaryumların korteks bölgelerini en dıştan çevreleyen germinal epitelin genellikle tek tabakalı kübik hücrelerden oluştuğu gözlemlendi. Tunika albuginea tabakasının hemen altında yerleşim gösteren gelişimin farklı aşamalarında sağlıklı follüküller gözlemlendi. Özellikle, primordiyal follüküllerin kümeler halinde kortekste yerleşim gösterdiği izlendi (Şekil 1-2). Gelişmekte olan follüküllerde PAS (+) boyanan Zona Pellusida (ZP) ve bazal membran net bir şekilde ayırt edildi (Şekil 3A). Kontrol ve

kurkumin gruplarının benzer histolojik yapıya sahip oldukları gözlemlendi. Kurkumin grubu ile kontrol grubunun farklı gelişim evrelerindeki sağlıklı follükül sayılarının benzer olduğu tespit edildi (Tablo 2). İyonize radyasyon maruziyetinden 4 gün sonra alınan ovaryum doku kesitlerinde kontrol grubunda kortekste yer alan gelişimin farklı aşamasındaki sağlıklı follüküllerin radyasyon alan grupta yerini atretik follüküllere bıraktığı izlendi (Şekil 2). Tüm gruplara ait farklı gelişim aşamasındaki sağlıklı ve atretik follükül sayıları değerlendirildiğinde, atretik follükül sayısının radyasyon ve kontrol grubu arasında anlamlı düzeyde ($p<0.001$) fark olduğu tespit edildi (Tablo 2). Germinal epitel altında yer alan kortekste bölgesinde, neredeyse hiç bir primordiyal follükül izlenmedi (Şekil 2). Follükül sayıları incelendiğinde özellikle primordiyal ve primer follükül evresindeki sayının kontrol ve kurkumin grubuna oranla anlamlı düzeyde ($p<0.001$) düştüğü gözlemlendi. Atretik follüküllerde meydana gelen değişiklikler; genellikle çok sayıda piknotik çekirdekli granüloza hücreleri, antral boşluktaki apoptotik cisimcikler, granüloza hücreleri ile oosit arasındaki ayrışmalar, granüloza hücrelerindeki sitoplazmik kayıplar, hücrelerde vakuolizasyon, oosit morfolojisinde bozulmalar, oosit çekirdeği dejenerasyonu ve teka tabaka hipertrofisi olarak gözlemlendi (Şekil 2). PAS-HL

Tablo 1. Deney süresince total vücut ve ovaryum ağırlığında gözlenen değişiklikler

	Kontrol n=10	Curcumin n=8	Radyasyon n=9	Radyasyon+Curcumin n=9
Başlangıç denek ağırlığı	196.50 (191-208)	183.50 (174-210)	211.00 (177-230)	205.00 (192-206)
Işınlama sonrası denek ağırlığı (1. Gün)	208 (200-226)	201 (184-230)	214.00 (187-236)	208.00 (200-220)
Sakrifikasyon denek ağırlığı	217.5 (212-244)	212.00 (191-235)	183.00 (170-205) ^a	180.00 (163-190) ^a
Ovaryum ağırlığı (gr)/100gr vücut ağırlığı	0.0209 (0.0164-0.0285)	0.0242 (0.0171-0.0291)	0.0231 (0.0163-0.0275)	0.0208 (0.0144-0.0238)

Veriler ortanca (minimum-maksimum) olarak sunulmuştur.

$p<0.05$ olduğunda istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

^a $p<0.001$ Kontrol ve Curcumin grubu ile kıyaslandığında (Başlangıç denek ağırlığı ve ışınlama sonrası denek ağırlığına göre)

Tablo 2. Tüm gruplara ait farklı gelişim aşamasındaki sağlıklı ve atretik follükül sayılarının değerlendirilmesi

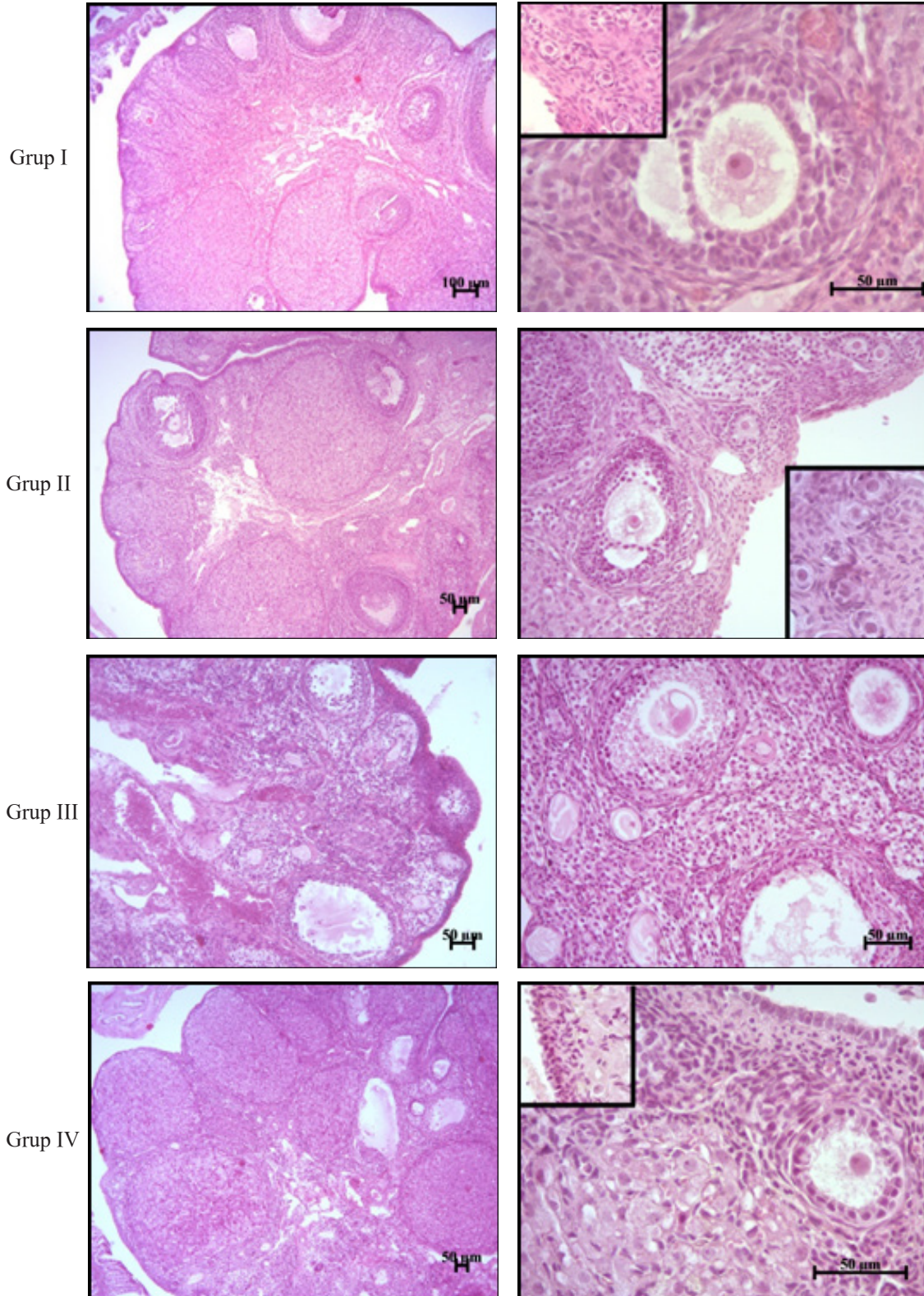
	Kontrol n=10	Curcumin n=8	Radyasyon n=9	Radyasyon+Curcumin n=9
Primordiyal	133 (110-220)	148.50 (63-173)	1.00 (1-11) ^a	9.00 (4-27) ^b
Primer	46.50 (18-66)	50.00 (22-87)	8.00 (3-17) ^a	12.00 (9-18) ^a
Preantral	9.00 (4-19)	9.00 (2-14)	3.00 (0-8) ^a	1.00 (0-5) ^a
Antral	7.00 (2-15)	6.00 (0-12)	0.00 (0-3) ^a	0.00 (0-1) ^a
Atretik	56.00 (28-73)	68.00 (39-82)	103.00 (67-114) ^a	98.00 (70-103) ^a

Veriler ortanca (minimum-maksimum) olarak sunulmuştur.

$p<0.05$ olduğunda istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

^a $p<0.001$ Kontrol ve Curcumin grubu ile kıyaslandığında.

^b $p<0.001$ Kontrol, Curcumin ve radyasyon grubu ile kıyaslandığında

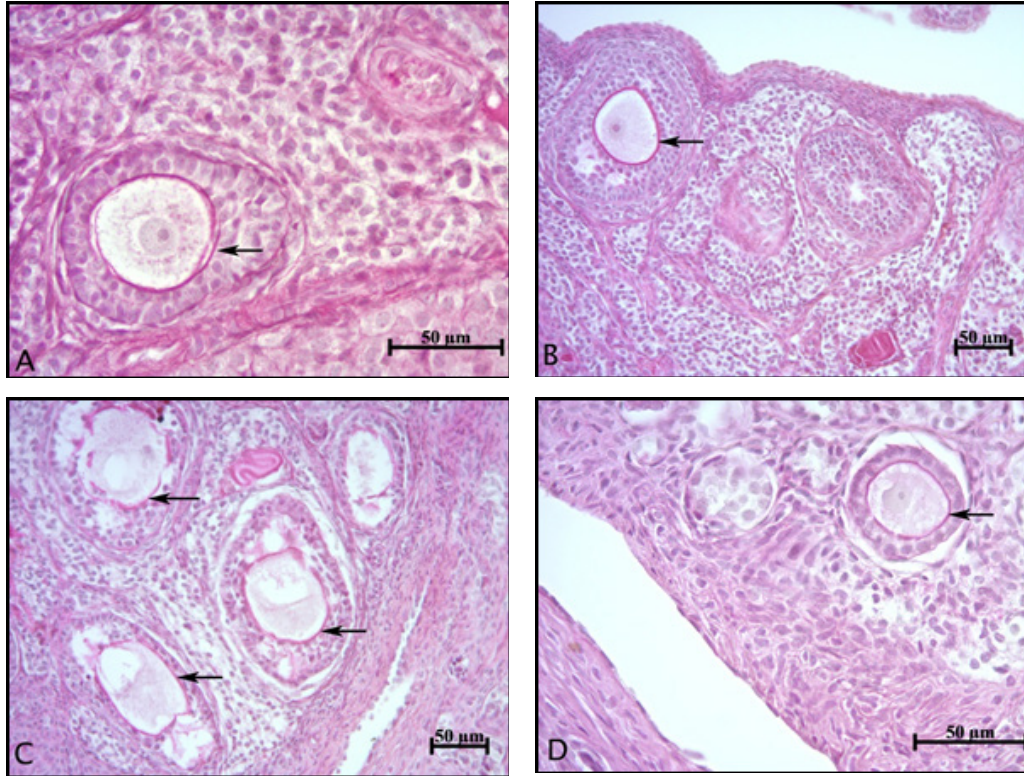


Şekil 1. (sol) Tüm gruplara ait ovaryum kesitlerinin görüntüsü

Grup I (Kontrol) ve Grup II (kurkumin)'ye ait normal görünümlü çeşitli evredeki foliküller, korpus luteumlar ve interstisyel bezler gözlenmektedir. Radyasyon uygulanan ovaryum dokusu incelendiğinde korteks bölgesinde yer alan farklı aşamalarındaki foliküllerin atretik süreçlerde olduğu belirgin şekilde izlenmekte (Grup III). Rad+kur uygulanan gruptaki (Grup IV) foliküllerinde bir kısmının atretik süreçte olduğu izlenmektedir. (H-E) grup I (sol) skala bar=100µm

Şekil 2. (sağ) Tüm gruplara ait ovaryum kesitleri

Kontrol ve kurkumin grubuna ait histolojik kesitler incelendiğinde çeşitli evredeki sağlıklı foliküller izlenmektedir. Primordiyal foliküller tunika albugeniannın hemen altında korteksde gruplar halinde yer almakta (Grup I ve Grup II sağdaki fotoğraf da inset şeklinde gösterilmiştir). Radyasyon grubunda (Grup III) atretik foliküllerin çokluğu ve primordiyal foliküllerin yokluğu dikkat çekmektedir. Grup IV'te (Rad+Kur) sayıları azda olsa preantral aşamada sağlıklı foliküller gözlenmektedir. (H-E) grup I (sağ) ve grupII-III-IV skala bar= 50µm



Şekil 3. Tüm Gruplara ait ovaryum kesitlerin PAS+HL boyaması

A) Kontrol grubuna ait fotoğrafta multilaminar bir primer follikül yer almakta. Granüloza hücrelerinde yer yer açılmaların olduğu gözlenmektedir. Bu folliküldeki oosit çevreleyen Zona pellusida (ok) belirgin olarak izlenmektedir. B) Kurkumin grubuna ait ışık mikroskop görüntüsünde sekonder follikülü ve follikül içerisinde yer alan oosit çevreleyen zona pellusida (ok) kontrol grubunda olduğu gibi düzenli bir yapı göstermektedir. C) Radyasyon uygulanmış gruba ait resimde sekonder folliküllerdeki zona pellusida yapısının belirgin olarak bozulduğu dikkat çekmektedir (oklar). D) Radyasyon ve sonrasında kurkumin uygulanmış grubu incelediğimizde primer folliküldeki zona pellusida (ok) yapısının sadece radyasyon uygulanan gruba kıyasla daha düzgün olduğu görülmektedir. PAS+HL skala bar=50µm

Tablo 3. PARP-1 immünoaktivitesi için histolojik skor değerleri

	Kontrol n=10	Curcumin n=8	Radyasyon n=9	Radyasyon+Curcumin n=9
PARP1 için H-Skor	187.50 (184.75-194.50)	201.00 (199.50-202.50) ^b	234.00 (230.75-237.25) ^a	193.00 (190.50-195.50)

Veriler ortanca (25-75 persantil) olarak sunulmuştur.

p<0.05 olduğunda istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

^ap<0.001. Kontrol, curcumin ve radyasyon+curcumin grubu ile kıyaslandığında.

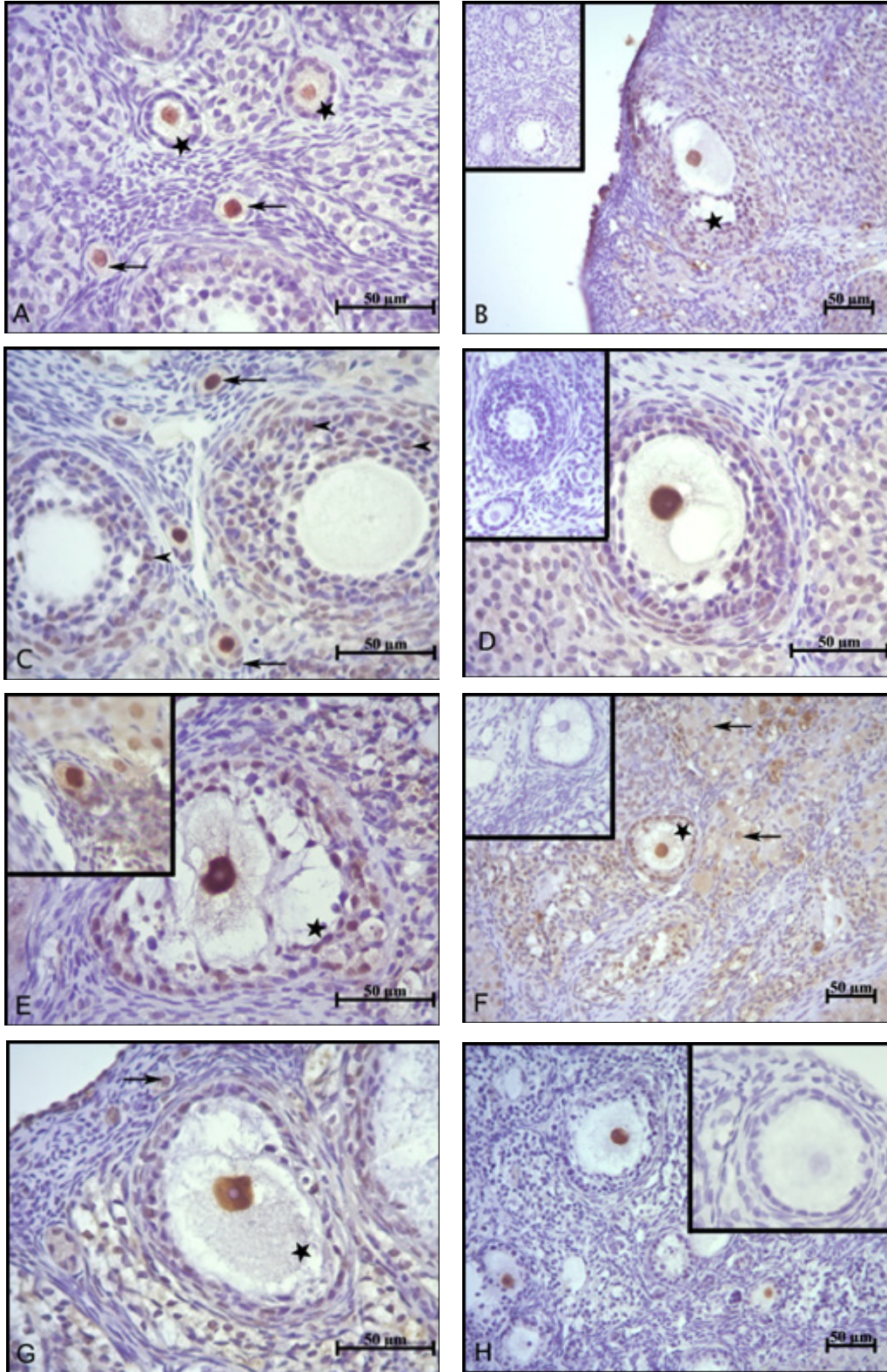
^bp<0.001. Kontrol, radyasyon ve radyasyon+curcumin grubu ile kıyaslandığında

ile boyanmış kesitlerde yapılan mikroskopik incelemelerde ise bazı folliküllerde oositin ZP'dan ayrıldığı, ZP'nın kıvrımlı hale geldiği ve bazılarında ZP'nın bütünlüğünü kaybettiği tespit edildi (Şekil 3C). Işınlamadan 1 hafta önce kurkumin tedavisi alan radyasyon grubunda, sadece iyonize radyasyon alan tedavisiz grupta görülen folliküler atrezi ve dejenerasyon oranının, bu grupta kurkumin tarafından kısmen önlediği fakat aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edildi. (Tablo 2) Bu grubun deneklerine ait ovaryum kortekslerinde farklı aşamalarda çeşitli sağlıklı folliküller izlendi. Özellikle primordiyal follikül sayısının sadece radyasyon alan gruba göre anlamlı düzeydeki artışı dikkat çekiciydi (p<0.001) (Tablo 1). İyonize radyasyon+curcumin grubundan alınan kesitlerde, folliküller her ne kadar dejenere olsada zona pellusidanın PAS (+) boyandığı gözlemlendi (Şekil 3D).

İmmünohistokimyasal Bulgular

Morfolojik bulgular, histolojik skorlama (H-skor) yöntemi ile semikantitatif verilere dönüştürülerek, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olup olmadığı analiz edildi. H-skor, folliküllerde yer alan 100 oositin çekirdeğinde PARP1 immünoaktivite şiddeti değerlendirilerek gerçekleştirildi (zayıf:1, orta:2, kuvvetli:3).

Kontrol grubunda, PARP1'in özellikle, primordiyal follikül ve primer follikül gelişim evrelerindeki oosit çekirdeğinde kuvvetli bir boyanma gösterdiği tespit edildi (Şekil 4A-4B). Sadece kurkumin alan grupta, PARP1 ifade düzeyinin kontrol grubundan daha kuvvetli olduğu gözlemlendi (p<0.001) ve PARP1 ifadesinin özellikle, primordiyal ve primer folliküllerde (Şekil 4C-4D) daha fazla olduğu tespit edildi (Tablo3). 8.3 Gy iyonize radyasyon maruziyetine kalan deneklerin ovaryum



Şekil 4. Sıçan ovaryum dokusunda PARP1 ifadesinin immünohistokimyasal olarak gösterilmesi

Kontrol grubuna ait fotoğrafta (A) Primordiyal (oklar) ve primer folliküllerin oosit çekirdeklerinde PARP-1 ifadesi belirgin olarak izlenmektedir. Follikül hücreleri (yıldız). Yine kontrol grubuna ait resimde (B) Sekonder folliküle ait pozitif ifade gözlenmektedir. Follikül hücreleri (yıldız). Kurkumin grubuna (C) ait kesitte pozitif reaksiyon gösteren folliküller ve granuloza hücreleri (ok başı). (D) Kurkumin grubuna ait sekonder folliküle dönüşen oositin çekirdeğinde kuvvetli PARP-1 ifadesi görülmektedir. Radyasyon grubuna ait sekonder folliküle (yıldız) şiddetli reaksiyonun yanı sıra luteal hücrelerde de (oklar) belirgin bir immünoreaktivite fark edilmekte (inset) (E ve F). Rad+Kurkumin grubunda primordiyal folliküle (ok) sekonder folliküle (yıldız) pozitif reaksiyon izlenmektedir (G). Rad+kurkumin grubuna ait PARP1 ifadesi (H). Sağ sütündeki resimler içerisinde yer alan kutulardaki resimler gruplara ait negatif kontrolleri göstermektedir. (ABC peroksidadz skala bar=50μm)

doku kesitlerinde PARP1 ifadesi incelendiğinde diğer 3 grup ile kıyaslandığında, radyasyona bağlı olarak H-skorun anlamlı ($p<0.001$) düzeyde artmış olduğu gözlemlendi (Tablo 3). Diğer gruplardan farklı olarak PARP1 ifadesinin korpus luteumun luteal hücrelerinin çekirdeklerinde de orta şiddette olduğu tespit edildi (Şekil 4E-4F). Radyasyon+kurkumin grubu ile kontrol grubu arasında H-skorun anlamlı bir farklılık göstermediği tespit edildi. Ancak sadece kurcumin ve sadece radyasyon uygulanan gruplar ile karşılaştırıldığında H-skorun anlamlı ($p<0.001$) düzeyde farklılık gösterdiği tespit edildi (Tablo 3). PARP1 ifadesinin yine oosit çekirdeklerinde ve granüloza hücrelerinde olduğu gözlemlendi (Şekil 4G-4H).

Tartışma

Memelilerde reproduktif dönem süresince, ovaryum folliküllerin pek çoğu atrezi olarak isimlendirilen ve folliküllerin dejenere olması ile sonuçlanan bir süreçte maruz kalmaktadırlar (4). Doğal olarak gerçekleşen folliküler atrezinin mekanizması hala tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır. Folliküler atreziiyi hızlandıran atretojenik uyarılardan birisi de modern tıbbın integral bir parçası olan ve diagnostik amaçların yanı sıra terapötik amaçlar için de kullanılan iyonize radyasyondur (4,21). Bazı vakalarda, radyasyonun belki de kanserin en iyi tedavi edici yöntemi olabileceği düşünülmüştür. Malign hücrelerin yok olmasının yanı sıra normal hücrelerde de hasarla sonuçlanan radyoterapi ağır yan etkilere sahiptir. Radyasyonun olumsuz biyolojik etkileri, hücre hasarının oluşması ve zararlı sitotoksik etkilere neden olan oksidatif stres ile birlikte ortaya çıkan H_2O_2 , OH^\cdot ve $O_2^{\cdot-}$ u kapsayan ROT (Reaktif Oksijen Türleri)'nin üretimidir (21,22). Ovaryum follikülleri dikkat çekici bir şekilde DNA hasarına neden olan iyonize radyasyona karşı oldukça hassastır. Çalışmaların birçoğunda radyoterapiyi takiben ovaryum histolojisi ışık mikroskopisi düzeyinde incelenmiştir (22). İncelemeler sonunda dejenere olan folliküller; piknotik çekirdekli granüloza hücreleri, teka tabakası hipertofisi, bazal membran ayrışması ve ondülasyonu gibi morfolojik özellikler göstermişlerdir (24). Kim ve Lee (25) yapmış oldukları bir çalışmada farelere, çalışmamızdaki radyasyon modeline benzer bir biçimde tüm vücut 8.3 Gy iyonize radyasyon uygulamışlar ve radyasyondan sonraki 2, 8 ve 14. saatlerde ovaryumları alarak dejenere follikül oranlarını göstermişlerdir. Kontrol grubunda sağlıklı primordiyal follikül oranı % 61.6 iken radyasyon uygulanan gruplarda bu değerler; 2., 8. ve 14. saatlerde sırasıyla % 51.6, 11.1 ve 7.1'e düştüğünü bildirmişlerdir. Primer folliküllerde bu değerler; kontrol 2., 4. ve 14. saatlerde sırasıyla % 82.5, 80, 45,5 ve 33.3, preantral ve antral folliküllerde ise % 31'i sağlıklı iken 2., 4. ve 14. saatlerde sırasıyla % 15.9, 7.5, ve 1.6'ya düştüğünü rapor etmişlerdir. Yapmış olduğumuz çalışmada benzer şekilde sadece radyasyon uyguladığımız gruptaki primordiyal ve primer follikül sayının azalması dikkat çekiciydi (Tablo 1). Aktaş ve ark. (26) yaptıkları bir çalışmada dişi farelere tüm vücut 8.3 Gy iyonize radyasyon uygulamışlar ve ışınlamadan sonraki 3. ve 12. saatlerde ovaryum dokularını alarak dejenere follikül değerlendirmesi yapmışlardır. Işınlamadan sonraki 3. saatte alınan ovaryumlarda erken atretik özellik gösteren folliküller

ile antrum ve folliküler duvardaki apoptotik hücrelerin sayısının oldukça fazla olduğunu göstermişlerdir. Diğer bir taraftan, ışınlamadan sonraki 12. saatte toplanan ovaryumlar ile 3. saatte toplanan ovaryumlar karşılaştırıldığında ileri atretik özelliklere sahip apoptotik hücreler içeren folliküllerin sayısının önemli derecede yüksek olduğunu rapor etmişlerdir. Mole ve Papworth (27) yüksek doz radyasyonun etkisiyle ovaryumda atretik folliküllerin baskın bir şekilde görüldüğünü rapor etmişlerdir. Ovaryumların radyasyona maruz kalması sonucu öncelikle oositler etkilenmektedir. Primordiyal folliküllerde yer alan oositler, olgun folliküllerdeki oositlerden daha radyosensitiftir. Genç hastalar daha fazla primordiyal follikül rezervine sahip olduğu için ovaryum işlevlerinin korunması daha önemlidir. Ovaryum follikülleri proliferatif faz sırasında aşırı radyosensitifken siklusun sonunda daha az radyosensitiftir. Diğer önemli bir faktör ise hücre membran direncidir. Oosit membranı radyasyona daha az duyarlı membranlar arasındadır (28).

İyonize radyasyon, suyun radyolizisi ile aktive olan serbest radikal türlerine ya da DNA ile doğrudan etkileşim boyunca çoklu biyolojik etkilere yol açmaktadır (29). Su içeriği yüksek olan dokularda iyonize radyasyonun etkileri özellikle su molekülleri üzerinden gelişmektedir. Su molekülünün radyolizisi; H_2O_2 ve H_2 gibi moleküllerin ve aynı zamanda H^\cdot , OH^\cdot , HOO^\cdot ve $O_2^{\cdot-}$ gibi yüksek aktiviteli radikallerin oluşumuna sebep olmaktadır. Serbest radikaller hücrenin genetik materyalinde de bir takım ciddi değişikliklere yol açmaktadır. Serbest radikal ürünlerinin etkisizleştirilmesi, hedef moleküllere hidrojen atomu bağlanması, karışık disülfid bileşiklerinin oluşumu, hücre bölünmesinin yavaşlatılması ve dokularda hipoksi gelişiminin uyarılması şeklinde tanımlanan radyoprotektif etki mekanizmaları sayesinde gerçekleşebilmektedir. Serbest radikallerin etkisizleştirilmesi süreci; OH^\cdot , HOO^\cdot ve $O_2^{\cdot-}$ gibi radyasyon etkisiyle oluşan su metabolitlerinin, ekzojen ya da endojen bir takım ajanları okside etmeleri sonucunda diğer hücre içi yapılarla etkileşime girme yeteneğinden yoksun kararlı yapıları bileşiklerin oluşması şeklinde özetlenebilir. Bu mekanizma sayesinde serbest radikallerin yaşamsal öneme sahip hücrenel moleküller üzerindeki etkisi büyük ölçüde sınırlandırılmaktadır (30). Kurkumin gibi polifenolik bileşiklerin, radyoterapi süresince normal hücreleri koruyan antioksidan özelliklere sahip oldukları gösterilmiştir (31). Fenoksil radikallerin oluşumuyla sonuçlanan lipid peroksil radikal, kırılan en zayıf bağa fenolik OH tarafında proton kaybını takiben elektron transferi ile oluşturulur. Kurkumin, sitosol içine plazma membranından kolaylıkla geçmekte ve doğrudan lipid peroksil radikalleri ile reaksiyona giren zincir sonlandırıcı antioksidan olarak davranarak hidroksil radikal, süperoksit anyon gibi serbest radikalleri süpürebilmektedir (32). Aktaş ve ark. (26) yaptıkları bir çalışmada dişi farelere 8.3 Gy tüm vücut iyonize radyasyon uygulamadan 10 gün önce başlayarak oral yoldan 100 mg/kg kurkumin vermişler ve kurkumin tedavisi sonucunda ovaryum folliküllerinde radyasyona bağlı olarak oluşan apoptoziste, kurcuminin folliküler atreziiyi engellediğini ve hücreleri önemli ölçüde koruduğunu göstermişlerdir. Oluşturduğumuz deneysel modelde kurcuminin benzer doz

oranında kullanılması sonucu ovaryum doku hasarının kısmen azalması ve antioksidan karakteri aracılığı ile toksik etkilere sahip serbest radikalleri süpürmesi sonucunda primordiyal follükül havuzunun korunmasına yapmış olduğu katkı dikkat çekiciydi. Huang ve ark. (33) yapmış oldukları bir çalışmada, kurkuminin yalnızca tümörlü fare yüzdesini azaltmadığı, aynı zamanda mide ve bağırsaktaki tümör büyüklüğünü de geriletmediğini bildirmişlerdir. Antunes ve ark. (31), kurkuminin γ -ışınlarına maruz kalan rodent kemik iliği hücrelerinde ortaya çıkan kromozomal aberasyonları azalttığını rapor etmişlerdir. Farelerin kurkumin ile tedavi edilmesi sonucunda mikronükleuslu polikromatik eritrositlerde, radyasyona bağlı kromozomal hasarları engellendiği bulunmuştur. Thresiamma ve ark. (34) yaptıkları bir çalışmada, ışınlanmanın neden olduğu genotoksisite üzerine kurkuminin koruyucu etkisini araştırmış, farelerde tüm vücut gamma ışınlanmasının yaptığı mikronükleus ve kromozomal sapmaların, oral kurkumin (400 μ mol/kg) verilerek anlamlı olarak inhibe edildiğini göstermişlerdir. Aynı zamanda kurkuminin mikronükleuslu polikromatik ve normokromatik eritrositlerin oluşumunu inhibe ettiği de tespit edilmiştir. Laboratuvar hayvanlarında kadmiyum aracılığı ile testiküler hasar, iyonize radyasyona bağlı ovaryum toksisitesi, iskemi reperfüzyon yoluyla oluşan testiküler hasarlarda kurkuminin koruyucu etkisi rapor edilmiştir (35). Thresiamma ve ark. (34) sıçanlarda oral verilen kurkuminin (200 μ mol/kg) tüm vücut ışınlanmasının meydana getirdiği akciğer fibrozisinde kollajen hidroksipirolinini serum ve karaciğer dokusunda ışınlama ile artan lipid peroksidasyon ürünlerini önemli ölçüde azalttığını bildirmişlerdir. Reddy ve ark. (36) yapmış oldukları farklı bir çalışmada kurkuminin H_2O_2 ile Fe^{+2} 'nin oksidasyonunu engellediğini ve ayrıca O_2^- ve OH^- radikallerini süpürdüğünü rapor etmişlerdir.

Çalışmamızın bir diğer kısmını da yakın zamanda radyasyon hasarına karşı bir tamir mekanizması olarak işlev gören PARP1 enziminin etkisini araştırmak üzerine kurgulamıştık. Yapılan önceki çalışmalarda PARP'ın; beyin, kalp, böbrek, testis ve ovaryumu kapsayan çeşitli doku tiplerinin çekirdeklerinde ifade edildiği tespit edilmiştir (37-38). Ossovskaya ve ark. (39) yapmış oldukları bir çalışmada göğüs, akciğer, ovaryum ve deri kanseri gibi hastalıklara sahip birçok hastadan izole edilen malignan dokularda PARP1 ifadesinin kuvvetli derecede artmış olduğunu rapor etmişlerdir.

Poli ADP ribozilasyon ekanizması, iyonize radyasyon, alkilleyici ajanlar ve oksidanlar tarafından uyarılan DNA hasarına en hızlı hücre sel yanıtı vermektedir. Normal DNA zincir kırıklarının varlığında Poli ADP ribozilasyon çok nadir gerçekleşen bir olaydır, ancak DNA hasarı 100 kat artarsa PARP'ın temel aktivitesi de dikkat çekici bir şekilde artmaktadır. PARP'ın yaklaşık % 90'ı PARP1 tarafından sentezlenmektedir (13). Oksidatif stres çeşitli hastalıklara neden olan araçları içeren ROT'un aşırı üretimidir. Diğer genotoksik ajanların arasında; O_2^- , NO^- ve onların reaksiyonları sonucunda üretilen peroksinitrit bulunmaktadır. Tiyollerle reaksiyona giren peroksinitrit, oksidasyon aracılığı ile proteinleri inaktive etmektedir

ve lipid peroksidasyonu tetiklemektedir. Bu mekanizma, PARP'ın hızlı aktivasyonunu tetikleyen DNA kırıklarına sebep olmaktadır. DNA hasar bölgesine bağlanma, PARP-1'in ikinci çinko parmakçıkları üzerinden gerçekleşmektedir (40). PARP1'in DNA bağlanma domaini ve bir BRCT modeli bulunduran otomodifikasyon domaini XRCC1 (X-ray cross complementing enzim)'in DNA tamirinde önemli bir kontrol noktası olan BRCT-1 motifi ile bağlantı halindedir ve BER onarımında önemli rollere sahiptir. XRCC1'in PARP-1 ile olan etkileşimi PARP1'in DNA kırıklarına bağlanmasını sağlamakta, PARilasyon aktivitesini düzenlemekte ve diğer BER mekanizması enzimlerinin XRCC1'e bağlanarak DNA tamirini tamamlamasını sağlamaktadır (41).

İyonize radyasyon gibi çevresel genotoksik ajanların neden olduğu DNA hasarlarına yanıtlarda genomun bütünlüğünün korunmasında PARP1 için birçok destekleyici kanıt vardır (42). Qian ve ark. (37) yapmış oldukları bir çalışmada, fare ovaryumuna uyguladıkları immünohistokimyasal yöntemler sonucunda, PARP1'in primordiyal follükülden olgun follüküle kadar tüm follükül gelişim evrelerinde özellikle oosit çekirdeğinde oldukça kuvvetli bir boyanma gösterdiğini bulmuşlardır. Buna ek olarak primer follükül evresi ve sonrasında çok kuvvetli olmamakla beraber PARP1'in bazı granüloza hücrelerinde de var olduğunu gözlemlemişlerdir. Atorino ve ark. (43) yapmış oldukları bir çalışmada rat germinal hücrelerinde PARP1'in H_2O_2 hasarı ve γ ışınlaması ile oluşan DNA hasarının tamiri için gerekli olduğunu kaydetmişlerdir. 8 Gy gamma radyasyona maruz kalan PARP^{-/-} ve PARP^{+/+} fareleri ışınlamadan sonra yapılan kromozomal analizler sonucunda hücre çekirdeklerindeki kromozom kırılım oranının PARP^{-/-} farelerinde PARP^{+/+} farelerine göre 3 kat daha fazla olduğu rapor edilmiştir. Biyolojik fonksiyonunu belirlemek için, farelerin hedef genleri ile allellerin her ikisi de inaktivite edilerek yapılan bir çalışmada PARP^{-/-} farelerine γ ışınlaması ile uygulanmış ve radyasyona karşı yüksek genomik kararsızlık ve aşırı hassasiyet gösterdikleri ortaya çıkmıştır (44). Çalışmamızda da benzer şekilde radyasyon hasarına bağlı olarak PARP-1 ifadesinin artmış olduğunu gözlemledik.

Sonuç

Çalışmamızda kurkuminin ovaryum doku hasarı ve follükülogenez sürecinde kısmen olumlu etkilerini gördük. Ancak yeni planlanacak doz kontrollü deneysel bir modelde, kurkuminin optimum terapötik dozunun saptanmasının kliniğe katkı sağlayabileceği düşüncesindeyiz.

Kaynaklar

1. Baker T.G. A Quantitative and Cytological Study of Germ Cells in Human Ovaries. Proc R Soc Lond B Biol Sci 1963; 158: 417-433.
2. Faddy M.J, Gosden R.G, Gougeon A, Richardson S.J. and Nelson J.F. Accelerated disappearance of ovarian follicles in mid-life: implications for forecasting menopause. Hum Reprod 1992; (7)10:1342-1346.
3. Townson D.H. and Combelles C.M.H. Ovarian Follicular Atresia. In Tech 2012; 43-76.

4. Lee C.J, Park H.H, Do B.R, Yoon Y.D, Kim J.K. Natural and radiation – induced degeneration of primordial and primary follicles in Mouse ovary. *Ani. Repro. Sci* 2000; 59: 109-117.
5. Kim J.K, Lee C.J, Song K.W. γ -Radiation accelerates ovarian follicular atresia in immature mice. *In Vivo* 1999; 13(1): 21-24.
6. Byrne, J. Long-term genetic and reproductive effects of ionizing radiation and chemotherapeutic agents on cancer patients and their offspring. *Teratology* 1999; 59:210-215.
7. Meiorow, D, and Nugent. D. The effects of radiotherapy and chemotherapy on female reproduction. *Human Reproduction Update* 2001; 7(6): 535-543.
8. Chemaitilly, W, Mertens, A.C, Mitby, P, Whitton, J, Stovall, M, Yasui, Y, Robison, L.L, Sklar, C.A. Acute ovarian failure in the childhood cancer survivor study. *J. Clin Endocrinol Metab* 2006; 91:1723-1728.
9. Howell, S, Shalet, S. Gonadal damage from chemotherapy and radiotherapy. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1998; 27:927-943.
10. Nicosia, S.V, Matus-Riley, V, Meadows, A.T. Gonadal effects of cancer therapy in girls. *Cancer* 1985; 55:2364-2372.
11. Choudhary, D. Modulation of radioresponse of glyoxalase system by curcumin. *Journal of Ethnopharmacology* 1999; 46:1-7.
12. Jeggo, P.A. DNA repair: PARP-another guardian genome? *Curr Biol* 1998; 8:49-51.
13. Burkle, A. Poly (ADP ribose): The most elaborate metabolite of NAD⁺. *FEBS Journal* 2005; 272:4576-4589.
14. Quesada, R.C, Gamez, J.A.M, Oliva, D.M, Peralta, A, Valenzuela M.T, Romero, R.M, Perez R.Q, De Murcia, J.M, De Murcia, G, De Almodovar, M.R, and Oliver F.J. Interaction between ATM and PARP-1 in response to DNA damage and sensitization of ATM deficient cells through PARP inhibition. *BMC Molecular Biology* 2007; 29:1-8.
15. Schreiber, V, Dantzer, F, Amé, J. C, and de Murcia, G Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* 2006; 7, 517-528.
16. Bouchard, V.J, Rouleau, M, and Poirier, G. G. PARP-1, a determinant of cell survival in response to DNA damage. *Exp. Hematol* 2003; 31, 446-454.
17. Ammon, H.P, Wahl, M.A. Pharmacology of *Curcuma longa*. *Planta Medica* 1991; 57(1): 1-7.
18. Eigner, D, Scholz, D. *Ferula asafoetida* and *Curcuma longa* in traditional medical treatment and diet in Nepal. *Journal of Ethnopharmacology* 1999; 67(1): 1-6.
19. Akpolat, M, Topçu Tarladaçalışır, Y, Uz, Y.H, Sapmaz, M.M, Kızılay, G. Kanser Tedavisinde Curcuminin Yeri. *Yeni Tıp Dergisi* 2010; 27:142-147.
20. Tilly, J.L. Ovarian follicle counts not as simple as 1, 2, 3. *Reprod Biol Endocrinol* 2003; 1:11.
21. Srinivasan, M, Ram, Sudheer, Raveendran, P.K, Raghu, K.P, Sudhakaran, P.R, Menon, V.P. Modulatory effects of curcumin on γ - radiation-induced cellular damage in primary culture of isolated rat hepatocytes. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2007; 24:98-105.
22. Jagetia, G.C, Rajanikant, G.K. Role of curcumin, a Naturally occurring phenolic compound of Turmeric in Accelerating the repair of excision wound, in mice whole-body exposed to various doses of γ - radiation. *Journal of Surgical Research* 2004; 120:127-138.
23. Thibaud, E, Rodriquez, M.K, Trivin, C. Ovarian function after bone marrow transplantation during childhood. *Bone Marrow Transplant* 1998; 22:989-994.
24. Devine, P.J, Payne, C.M, McCuskey, M.K, Hoyer, P.B. Ultrastructural evaluation of oocytes during atresia in rat ovarian follicles. *Biol Reprod.* 2000; 65(5):1245- 52.
25. Kim, J.K, Lee, C.J. Effect of exogenous melatonin on the ovarian follicles in γ - irradiated mouse. *Mutat Res* 2000; 449:33-39.
26. Aktas, C, Kanter, M, Kocak, Z. Antiapoptotic and proliferative activity of curcumin on ovarian follicles in mice exposed to whole body ionizing radiation. *Toxicology and Industrial Health* 2011; 1- 12.
27. Mole, R.H., Papworth, D.G. The sensitivity of rat oocytes to X-rays. *Int Radiat Biol* 1966; 6:609-15.
28. Metindir, J, Bozkurt, C. Kanser tedavilerinin over fonksiyonlarına etkisi ve fertilitede koruyucu yaklaşımlar. *J Turkish German Gynecol Assoc* 2005; 6(1):23-29.
29. Uzal, C, Çaloğlu, M. Kanser etyolojisinde iyonizan radyasyonun yeri. *Trakya Üniv Tıp Fak Derg* 2002; 19:177-182.
30. Kelle, İ. Radyoprotektif Etkili Ajanlar. *Dicle Tıp Dergisi* 2008; 35(1):69-76.
31. Antunes, L.M.G, Araujo, M.C.P, Dia, P.B.L, Takahashi, C. Effect of H₂O₂, Fe⁺² and Fe⁺³ on curcumin-induced chosomal aberrations in CHO cells. *Genet. Mol. Biol* 2005; 28:161-164.
32. Khopde, S.M, Priyadarsini, K.I, Guha, S.N, Satav, J.G, Venkatesan, P, Rao, M.N.A. Inhibition of radiation-induced lipid peroxidation by tetrahydrocurcumin: Possible mechanisms by pulse radiolysis. *Biosci Biotechnol Biochem* 2000; 64(3):503-509.
33. Huang, M.T, Lou, Y.R., Me, W., Newmark, H.L, Reuhl, K.R, Conney, H. Inhibitory effects of dietary curcumin on forestomach, duodenal and colon carcinogenesis in mice. *Cancer Res* 1994; 54:5841-7.
34. Thresiamma, K.C, George, J, Kuttan, R. Protective effect of curcumin ellagic acid and bixin on radiation induced toxicity. *J Exp Biol* 1996; 34:845-7.
35. Kanter, M, Aktaş, C, and Erboğa, M. Curcumin attenuates testicular damage, apoptotic germ cell death, and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *Mol Nutr Food Res* 2012; 56:1-8.
36. Reddy, P, Lokesh, B.R. Studies on the inhibitory effects of curcumin and eugenol on the formation of reactive oxygen species and the oxidation of ferrous iron. *Mol Cell Biochem*

1994; 137:1-8.

37. Qian, H., Xu, J., Lalioti, M.D., Gulle, K., Sakkas, D. Oocyte numbers in the mouse increase after treatment with 5-Aminoisoquinolinone: A potent inhibitor of poly(ADP-ribose)ylation. *Biology of Reproduction* 2010; 82:1000-1007.
38. Tekcan, M, Koksall, T.K., Tasatargil, A., Kutlu, O., Gungor, E., Celik-Ozenci, C. Potential role of poly(ADP-ribose) polymerase activation in the pathogenesis of experimental left varicocele. *Journal of Andrology*. 2012; 33:122-132.
39. Ossovskaya, V, Chou, K.I, Kaldjian, E.P, Alvares, C, Sherman, B.M. Upregulation of Poly (ADP-Ribose) Polymerase-1 (PARP1) in Triple-Negative Breast Cancer and Other Primary Human Tumor Types. *Genes & Cancer* 2010; 1:812-821.
40. Bakondi, E. Alterations in PARP metabolism and calcium homeostasis in oxidatively stressed HaCaT and Mouse macrophage cell lines. University of Debrecen 2003.

41. Tezcan, G. PARP-1 ve XRCC1 polimorfizmlerinin astım'da DNA onarım mekanizması ile olan ilişkisinin araştırılması. İstanbul Üniversitesi İstanbul 2008.
42. Di Meglio, S., Denegri, M., Vallefucio, S., Tramontano, F., Scovassi, AI., Quesada, P. Poly(ADPR) polymerase-1 and poly(ADPR) glycohydrolase level and distribution in differentiating rat germinal cells. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2003; 248:85-91.
43. Atorino, L., Di Meglio, S., Farina, B., Jones, R., Quesada, P. Parp requirement of rat germinal cells in the recovery from DNA damage induced by gamma irradiation and H2O2 treatment. *Eur J Cell Biol* 2001; 80:222-229.
44. De Murcia, J.M., Neidergang, C., Trucco, C., Ricoul, M., Dutrillaux, B., Mark, M., Oliver, F.J., Masson, M., Dierich, A., Lemeur, M., Waltzinger, C., Chambon, P.P., De Murcia, G. Requirement of poly(ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells. *Proc Natl Acad Sci* 1997; 94:7303-7307.