



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



Yüksek Lisans Tezi

**RADYASYON UYGULAMASI SONUCU MEYDANA GELEN
KROMOZOM ABERASYONLARI İLE MİKRONÜKLEUS
OLUŞUMLARI ARASINDAKİ İLİŞKİNİN İNCELENMESİ**

Leyla AKPUNAR

Biyoloji Anabilim Dalı

Genel Biyoloji Programı


**DANIŞMAN
Prof. Dr. Tuncay ORTA**

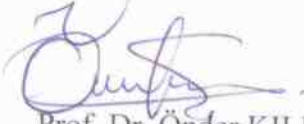
Ağustos, 2019


İSTANBUL

Bu çalışma, 19.08.2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı, Genel Biyoloji Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi


Prof. Dr. Tuncay ORTA (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi


Prof. Dr. Önder KILIÇ
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi


Dr. Öğr. Üyesi Narin ABDULLAH
İstanbul Aydın Üniversitesi
Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu



20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin aboneli olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 21252 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Bu tez, 21252 numaralı BAP projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgi ve deneyimi ile yol gösteren, tezimin hazırlanmasında emeği geçen, sahip olduğu güzel aile yapısıyla bizlere örnek olan, desteği ve ilgisi ile başarıya ulaşmamı sağlayan Değerli Hocam Prof.Dr. Tuncay ORTA'ya sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Laboratuvar çalışmalarımda yardım eden, tez yazım süremde her an yanımda olan, desteğini esirgemeyen arkadaşım, Doktora Öğrencisi Merve CİVELEK'e çok teşekkür ederim.

Deneyim ve bilgisi ile bana yol gösteren, destek veren arkadaşım Dr. Öğr.Üyesi Narin ABDULLAH'a teşekkür ederim.

Tez yazım sürecimde desteklerini her zaman hissettiğim arkadaşlarım, Gözde KILIÇ, MSc. Esmâ PURUT, MSc. Ebru EFE, Dr. Narin SEZER, Medine TOY, Gülnihal YILDIRIM, Nurcan BOZDEMİR ve Esra AKBAŞ'a teşekkür ederim.

Varlıklarıyla var olduğum, eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi olarak her zaman destek olan, güvenen ve her koşulda başarılı olacağıma inanan güzel aileme, ismine yakışır bir şekilde yaşayan Babam Kahraman AKPUNAR ve güzel eşi Annem Hatice AKPUNAR'a çok teşekkür ederim.

Çocukluk dönemimden bu sürece kadar her anımızı birlikte geçirdiğimiz, sahip olduğum en güzel varlıklarım ablalarım, Halime AKPUNAR, Nursefa AKPUNAR, kardeşlerim Yasemin AKPUNAR ve Emir Taha AKPUNAR'a çok teşekkür ederim.

Desteklerini hissettiğim Karaman ve Dumlu ailelerine, sevgileriyle motive olmamı sağlayan yeğenlerim, Mücteba, Sevde, Almıla ve Hamza'ya teşekkür ederim.

Ağustos 2019

Leyla AKPUNAR

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	vii
TABLO LİSTESİ.....	viii
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ.....	ix
ÖZET	xi
SUMMARY	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR.....	2
2.1. RADYASYON	2
2.1.1. İçsel Işınlama	2
2.1.1.1. Solunum Yoluyla İçsel Işınlama.....	3
2.1.1.2. Yutma (İngesyon) Yolu İle İçsel Işınlama	3
2.1.2. Dışsal Işınlama	3
2.2. RADYASYONUN KISA TARİHİ VE SINIFLANDIRILMASI.....	3
2.2.1. Non-İyonize (iyonlaştırıcı olmayan) Elektromanyetik Radyasyon	4
2.2.2. İyonize (iyonlaştırıcı) Elektromanyetik Radyasyon	4
2.2.3. İyonize (iyonlaştırıcı) Partiküler Radyasyon	4
2.2.3.1. İyonlaştırıcı Radyasyonun Etkileri	6
2.3. RADYASYON ÖLÇÜ BİRİMLERİ	8
2.3.1. Aktivite Birimi.....	8
2.3.2. Absorbe Doz	8
2.3.3. Eşdeğer Doz.....	9
2.3.4. Işınlanma Seviyesi	9
2.3.5. Kanser	10
2.3.6. Hücrenin Yapısı.....	10
2.3.6.1. Hücre Döngüsü.....	11
2.3.6.2. Mitoz Bölünme	12
2.3.7. DNA Hasarı, Onarımı ve Radyasyon ile İlişkisi	12
2.3.7.1. DNA Onarım Tipleri.....	13

2.3.8.	Kromozomun Yapısı	19
2.3.8.1.	<i>Radyasyonun Kromozomlara Etkisi</i>	20
2.3.8.2.	<i>Kromozom Yapısı ve Sayısındaki Değişiklikler</i>	20
2.3.9.	Kromozom Aberasyonları	20
2.3.9.1.	<i>Kromozom Tipi Aberasyonlar</i>	21
2.3.9.2.	<i>Kromatit Tipi Aberasyonlar</i>	22
2.3.10.	Mikronükleus Testi	24
2.3.11.	Kromozom Aberasyon Testi	24
2.3.12.	Mikronükleus ile Kromozom Aberasyonlarının Karşılaştırılması	25
3.	MALZEME VE YÖNTEM	27
3.1.	HÜCRELERİN KÜLTÜRE ALINMASI	28
3.2.	UYGULANAN MİKRONÜKLEUS TEKNİĞİ	28
3.2.1.	TK6 Lenfoblast Hücrelerine <i>In Vitro</i> Radyasyon Uygulaması	28
3.3.	UYGULANAN KROMOZOM ABERASYON TEKNİĞİ	31
3.4.	PREPARATLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ	31
3.5.	İSTATİSTİKSEL YÖNTEMLER	32
4.	BULGULAR	33
4.1.	MİKRONUKLEUS OLUŞUMLARI	33
4.1.1.	Mikronukleus Oluşum Frekansları	35
4.2.	KROMOZOM ABERASYONLARI	38
5.	TARTIŞMA VE SONUÇ	42
	KAYNAKLAR	45
	ÖZGEÇMİŞ	50

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa No
Şekil 2.1: Elektromanyetik spektrum.....	05
Şekil 2.2: DNA hasarı ve etkileri.....	14
Şekil 2.3: DNA tamiri.....	15
Şekil 2.4: Baz kesip çıkarma.....	16
Şekil 2.5: Kromozomun yapısı.....	19
Şekil 2.6: Kromozomal değişiklikler.....	22
Şekil 3.1: Bolus materyali üzerindeki flaskların gösterimi.....	29
Şekil 3.2: Co-60 teleterapi cihazı ile ışınlanan flasklar.....	30
Şekil 4.1: Mikronukleus oluşumu.....	33
Şekil 4.2: Binükleat hücrelerdeki mikronukleus görünümü.....	34
Şekil 4.3: Radyasyon dozu ile MN / BN arasındaki ilişki	36
Şekil 4.4: Radyasyon dozu ile proliferatif indeks arasındaki ilişki	37
Şekil 4.5: Asentrik fragmentler ve disentrik kromozom görünümü.....	38
Şekil 4.6: Farklı radyasyon dozları uygulanan hücrelerdeki mikronukleus oluşumu ile aberasyon sıklıklarının karşılaştırılması.....	40

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 4.1: Binükleat hücrelerdeki MN ve çoklu nukleus oluşumları.....35

Tablo 4.2: TK6 Lenfoblast hücrelerde kontrol ve deney grubundaki kromozom aberasyon frekansları.....39



SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
Bq	: Becquerel
C	: Coulomb
Ci	: Curie
Gy	: Gray
MV	: Megavolt
R	: Röntgen
Rad	: Absorbe edilen radyasyon dozu
Rem	: Röntgen insan eşdeğeri
Sv	: Sievert
V	: Volt

Kısaltmalar	Açıklama
BER	: Baz kesip çıkarma
BN	: Binükleat
CA	: Kromozom aberasyonu
CBMN	: Sitokinez blok micronukleus
CIN	: Kromozomal kararsızlık kaynağı
cm	: Santimetre
CO₂	: Karbondioksit
Co-60	: Kobalt-60
CPDs	: Siklobütan pirimidin dimerleri
DNA	: Deoksiribonükleik asit
Dsb	: Çift zincir kırığı
Hg	: Cıva
HR	: Homolog rekombinasyon
KCl	: Potasyum klorür
Kg	: Kilogram
Ku	: Onarım proteini
LET	: Lineer enerji transferi

MMR	: Yanlış eşleşme
mm	: Milimetre
MN	: Mikronukleus
NER	: Nükleotit kesip çıkarma
NHEJ	: Homolog olmayan uç birleştirme
PBL	: Periferel kan lenfositleri
Pİ	: Proliferatif indeks
Pk	: Protein kinaz
RBE	: Rölatif biyolojik etkinlik
RNA	: Ribonükleik asit
SCE	: Kardeş olan kromatitlerdeki değişimler
SI	: Uluslararası Birim Sistemi
SMR	: Standart insidans oranı
SSB	: Tek zincir kırığı
UV	: Ultraviyole

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

RADYASYON UYGULAMASI SONUCU MEYDANA GELEN KROMOZOM ABERASYONLARI İLE MİKRONÜKLEUS OLUŞUMLARI ARASINDAKİ İLİŞKİNİN İNCELENMESİ

Leyla AKPUNAR

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Tuncay ORTA

DNA molekülünde meydana gelen hasarlar kalıtsal veya çevresel faktörler sonucu oluşmaktadır. Meydana gelen bu hasarlar karsinogenez sürecini başlatmaktadır. Sitogenetik işaretleyiciler olarak kromozom aberasyonlarının DNA hasarlarının belirlenmesinde kullanılabilirliği, bu oluşumları ölçen tekniklerin, kanser tanısında kullanılmasını gündeme getirmektedir.

Bu tez çalışmasında, kromozom aberasyonlarını ölçen mikronukleus ve kalıcı olmayan kromozom aberasyonları teknikleri karşılaştırılarak karsinojenik bir faktör olan radyasyona vermiş oldukları yanıtta benzerlikler ve farklılıklar yönünden incelenmesi amaçlanmıştır. Bunun için *in vitro*da büyüyen hücrelere radyasyon uygulanmıştır. Elde edilen mikronukleus ve kalıcı olmayan kromozom aberasyonlarının frekansları arasındaki ilişki doz-cevap eğrileri yönünden karşılaştırılmıştır.

Doz-cevap eğrilerinin belirlenmesi insan kökenli hücre soyu olan TK6 lenfoblast hücreleri ile yapılmıştır. Farklı hücre kültür şişeleri içinde büyüyen hücrelerden biri kontrol olarak ayrılmış olup diğerlerine 1 Gy, 2 Gy, 3 Gy, 4 Gy radyasyon dozu *in vitro* olarak uygulanmıştır. Uygulanan dozlar sonrası elde edilen disentrik ve serbest asentrik frekansları kromozom aberasyon tekniği ile belirlenmiştir. Mikronukleus (MN) frekansları ise mikronukleus tekniği ile belirlenerek istatistiksel olarak en uygun doz-cevap eğrileri oluşturulmuştur.

Oluşturulan eğriler arasındaki ilişki incelenmiştir. Bu tez çalışmasında, çizilen grafikler, regresyon analizinin lineer olmayan özelliği kullanılarak ikinci dereceden polinom olarak çizilmiştir. Elde edilen veriler, radyasyon dozunun artışı ile MN/BN oranının arttığı ve radyasyona özgü olan disentrik ile asentrik fragmentlerinde de artış olduğunu göstermiştir. Radyasyon dozunun artışı ile artan MN ve aberasyonlar arasında anlamlı derecede farklılık ($p<0,05$) olduğunu göstermiştir.

Ağustos 2019, 64 sayfa.

Anahtar kelimeler: Radyasyon, TK6 lenfoblast hücreleri, Kromozom aberasyonları, Mikronukleus oluşumu.



SUMMARY

M.Sc. THESIS

INVESTIGATION OF THE RELATIONSHIP BETWEEN CHROMOSOME ABERRATIONS AND MICRONUCLEI FORMATION AFTER IRRADIATION

Leyla AKPUNAR

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Biology

Supervisor : Prof. Dr. Tuncay ORTA

DNA molecule damage is caused by hereditary or environmental factors. These damage start the carcinogenesis process. The usefulness of chromosomal aberrations as DNA cytogenetic markers in the detection of DNA damage brings the use of techniques that measure these occurrences to the diagnosis of cancer.

In this thesis, micronucleus and non-permanent chromosomal aberration techniques which measure chromosomal aberrations are compared and investigated in terms of similarities and differences in their response to radiation, a carcinogenic factor. For this purpose, *in vitro* cells were irradiated with radiation. The relationship between the frequencies of micronucleus and non-permanent chromosome aberrations was compared in terms of dose-response curves.

Dose-response curves were determined with TK6 lymphoblast cells, a human cell line. One of the cells growing in different cell culture flasks was separated as control and the others received 1 Gy, 2 Gy, 3 Gy, 4 Gy radiation dose *in vitro*. Dicentric and free acentric frequencies obtained after doses were determined by chromosome aberration technique. Micronucleus (MN) frequencies were determined by micronucleus technique. Statistically optimal dose-response curves were generated.

The relationship between the curves is examined. In this thesis, graphs are plotted as second order polynomials using non-linear feature of regression analysis. The data obtained showed that the increase in the radiation dose increased the MN/BN ratio and increased radiation specific dicentric and acentric fragments. Increases in radiation dose showed a significant differences ($p < 0,05$) between MN and chromosome aberrations.

August 2019, 64 pages.

Keywords: Radiation, TK6 lymphoblast cells, Chromosome aberrations, Micronucleus formation.



1. GİRİŞ

Radyasyon Biyolojisi

Radyasyon biyolojisi, disiplinler arası bir bilim olarak tanımlanmaktadır. Yaşamın kaçınılmaz bir parçası haline gelmiş olan iyonize radyasyonun canlı sistemlerdeki biyolojik etkilerini inceler. Biyoloji ve radyasyon arasında var olan ilişkiyi kavrayabilmek ve problemleri çözebilmek için fizik, mühendislik gibi diğer bazı bilim dallarının çalışmalarıyla da ilişkilendirilmelidir [1]. Radyasyonun hücre üzerindeki etkisi incelendiğinde, hücreler küçük dozlarda radyasyona maruz kaldıklarında mitoz bölünmede gecikme görülebilir. Protein sentezinin gerçekleşmemesi, mitoz bölünmede gerekli olan kimyasal maddelerdeki değişiklik, replikasyonda meydana gelen yavaşlama, mitoz bölünmenin gecikmesine sebep olan etmenler arasındadır. Yüksek dozlarda radyasyona maruziyet ise hücre ölümüne sebep olabilir. Radyasyona maruz kalan hücrelerin organel bütünlüğü korunur ancak hücre zarında meydana gelen farklılıklar, hücrenin parçalanarak büzülmesine sebep olur. Bu da hücrenin ölümüne sebep olabilir [2].

İyonize radyasyonun hücre ile olan etkileşimi, DNA'nın zincirinde kırılmalara sebep olan direkt etki ve serbest oksijen radikallerinin oluşumuna neden olan indirekt etki olmak üzere iki şekilde görülmektedir. Direkt etkinin en fazla görüldüğü ışınlar, yüksek LET'e sahip nötron, alfa ve beta ışınlarıdır. İndirekt etkide oluşan serbest oksijen radikalleri DNA'nın bileşenleriyle etkileştiği zaman zincir kırılmalarına (tek veya çift zincir kırığı) veya baz hasarına sebep olur. DNA'nın zincirinde meydana gelen kırık küçük olduğunda hücrenin ölümüne sebep olmaz ancak genelde kırıklar tamir edilse de yeni nesillerde olumsuz etkilere sebep olabilir. Ya da radyasyon sonucu asentrik, disentrik fragman ve halka şeklinde kromozomal değişiklikler görülebilir [2].

2. GENEL KISIMLAR

2.1.RADYASYON

Maddenin en küçük yapı taşı olan atom, pozitif yüklü proton ve yüksüz olan nötronlardan oluşan bir çekirdek ve çekirdeğin etrafında dönmekte olan eksi yüklü elektronlardan oluşmaktadır. Eğer herhangi bir maddenin atom çekirdeğindeki protonların sayısı nötronların sayısından az ise çekirdekte kararsızlık oluşur ve fazla olan nötronlar parçalanmaya başlar. Bu parçalanma esnasında alfa ve beta partikülleri, gama ışınları ortaya çıkar. Etrafa yayılan bu ışınlar “radyasyon” denir. Radyasyon, elektromanyetik dalga ya da parçacıklar şeklindeki enerjinin aktarımı veya emisyonudur. Sürekli doğada var olan, hayatımızın kaçınılmaz bir parçası haline gelmiş olgudur [3].

Radyasyon yayılımına sebep olan maddelere radyoaktif madde denilmektedir. Radyoaktif madde ve radyasyon yaşamın başlangıcından beri yeryüzünün bir parçasıydı. 19.yüzyılın son yıllarında keşfedilmiştir ve hala onu kullanma yollarını öğrenmeye devam ediyoruz. Radyasyon doku veya organda biyolojik hasara neden olur [4]. Biz farkında olmadan doku ve organlarımız devamlı olarak radyasyona maruz kalmaktadır. Bu maruziyet bazen gözle görülebilir derecede fark gösterirken bazen de herhangi bir belirti göstermeden vücudumuzu etkilemeye devam etmektedir [3].

Radyasyonun insanlara ulaşması genel olarak iki şekilde gerçekleşir. Birincisi içsel ışınlama ikincisi ise dışsal ışınlamadır.

2.1.1. İçsel Işınlama

Radyasyon kaynaklarının vücudun içinden geçerek vücudu ışınlamasına içsel ışınlama denir. Işınlanmaya sebep olan bu kaynaklar vücudun bileşenlerinde bulunabileceği gibi vücuda dışarıdan alınmış olma ihtimali de vardır. Radyoaktif kaynağın vücuda dışarıdan alınması iki şekilde gerçekleşebilir. Bunlar; solunum yoluyla içsel ışınlanma ve yutma (ingesyon) yoluyla içsel ışınlanmadır [5].

İçsel ışınlanmaya engel olabilmek için iyi hijyen, havalandırma, açık yaraların kapatılması gerekir. Radyoaktif kirlenmenin sulardaki limitleri, kaynaklarda var olan ışınlanmanın limitleri ve toprakta yetişen ürünlerin sık sık kontrol edilmesi alınan tedbirlerden bazılarıdır [5].

2.1.1.1 Solunum Yoluyla İçsel Işınlama

Solunum yoluyla içsel ışınlanmanın temel kaynakları, radyoaktif maddeler ile kirlenmiş toz, duman ya da radon gibi radyoaktif olan gazlardır. İnsanların nefes almaları sırasında bu radyoaktif maddeler ciğerlerine girdiği takdirde içsel ışınlama başlar [5].

Işınlanmaya neden olan bu radyoaktif maddeler ciğerlerde yer edinerek uzun süre kalabilirler. Bu maddeler vücudun içerisinde kalarak bozdukları süre boyunca içsel ışınlama devam etmiş olur. Yavaş bozunma özelliği olan radyoizotoplar için içsel ışınlanmanın süresi uzun zaman alabilmektedir [5].

2.1.1.2. Yutma (İngesyon) Yolu İle İçsel Işınlanma

Yutma yolu ile gerçekleşen ışınlanma, radyoaktif maddenin bireyin ağzına girmesiyle başlamış olur. Kişi eğer radyoaktif maddeyi yutmuş ise ışınlanma devam eder. Yutulmuş olan madde sindirim sistemi boyunca ilerleyebilir. En tehlikeli olan maddeler alfa ve beta partikülleridir. Radyoaktif kaynakların yarı ömürleri oldukça önemlidir. Çünkü radyoaktif kaynaklar tüm sindirim sistemi boyunca ilerlediği zaman bu radyoizotoplar böbreklere, diğer organlara ve kemiklere ulaşarak zarar verebilir. Yarı ömürleri düşük olan, kendileri bozularak vücuttan atılan radyoizotopların etkileri daha azdır [5].

2.1.2. Dışsal Işınlama

Radyasyon kaynağının vücudun dışından radyasyona maruz kalmasına dışsal ışınlama denir [5]. Uzaklık, zaman ve zırhlama ile koruma gerçekleştirilebilir.

2.2. RADYASYONUN KISA TARİHİ VE SINIFLANDIRILMASI

Radyasyon ilk çağlardan beri vardır ancak insanlığın radyasyonu keşfetmesi 1895 yılının kasım ayında Alman bir fizikçi olan Wilhelm Roentgen tarafından katot tüpleri ile deney yaptığı esnada X-ışınlarını keşfetmesiyle başlamıştır. Elini floresan ekran ile tüp arasına uzattığında elindeki kemiklerin ekrana yansıdığını görmüştür [6].

Roentgen'in keşfinden sonra 1896 yılında Fransız bilgini olan ve 1903 yılında Nobel fizik ödülünü alan Antoine Henri Becquerel uranyum tozlarıyla deney yaptığı esnada fotoğraf filmindeki değişikliği fark etmesi sonucu radyoaktiviteyi bulmuştur [6].

1898 tarihinde ise Marie Curie ve Pierre Curie bir Uranyum minerali olan pitchblende'den, uranyumdan çok daha radyoaktif olan alfa, beta ve gama ışınlarını saçıyan radyum ve polonyum elementlerini ayırmayı başarmışlardır. Radyumun gerçek tehlikesi ise ancak 1920'li yıllarda Amerika Birleşik Devletleri'nde ortaya konulmuştur [6].

Herman J Muller'in, 1946'da kendisine Nobel tıp ödülünü kazandırmış olan x ışınlarının mutajen olduğunu ve mutasyon hızı ile doz arasında lineer ilişki varlığını keşfetmesinin ardından iyonizan olan radyasyonun insanlarda mutasyonel risk kaynağı olabileceği konusu bilim dünyasında büyük merak uyandırmıştır [7].

Radyasyon; iyonize radyasyon ve iyonize olmayan radyasyon olmak üzere ikiye ayrılır. İyonlaşmayan radyasyon dalga boyları $> 10^{-7}$ m'dir. İyonize olmayan radyasyonun < 12 elektron volt (eV) enerjileri vardır. 12 eV bir iyonlaştırıcı radyasyonun sahip olabileceği en düşük enerji olarak kabul edilir [8].

2.2.1. Non-İyonize (iyonlaştırıcı olmayan) Elektromanyetik Radyasyon

- Radyo dalgaları
- Mikrodalgalar
- Kızılötesi ışınlar
- Görünür ışık
- Mor ötesi ışınlar

2.2.2. İyonize (iyonlaştırıcı) Elektromanyetik Radyasyon

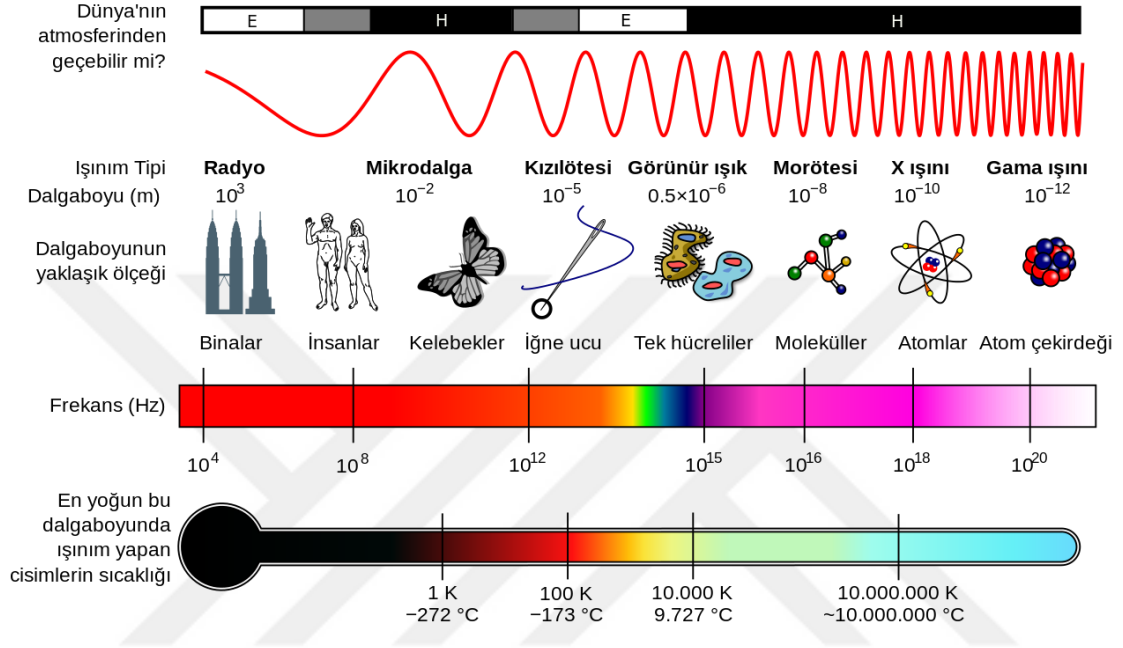
- X ışınları
- Gama ışınları
- Kozmik ışınlar

2.2.3. İyonize (iyonlaştırıcı) Partiküler Radyasyon

- Beta parçacıkları

-Alfa parçacıkları

-Nötronlar [9].



Şekil 2.1: Elektromanyetik spektrum

İyonlaştırıcı radyasyon, kararsız olan radyoaktif madde atomları tarafından üretilen enerji veya parçacıklar şeklinde ifade edilir. Atomları iyonize etme yeteneğine sahiptir. İyonlaştırıcı radyasyon, bir atomdan elektronları koparmak için yeterli enerjiye sahiptir. Bu sayede atomu yüklü halde bırakırken radyo dalgaları, görünür ışık veya ultraviyole radyasyon gibi iyonlaştırıcı olmayan radyasyon ise bu enerjiye sahip değildir. İyonlaştırıcı radyasyona maruz kalmak hem doğal hem de yapay radyasyon kaynaklarının etkileri ile ilgilidir [4].

İyonize radyasyon elektromanyetik ve partiküler (parçacık) radyasyon olarak ikiye ayrılır. Kararsız bir yapıya sahip radyoaktif madde atomlarının ürettiği enerji veya parçacıklar iyonlaştırıcı radyasyon olarak adlandırılır. Uzaydan gelen kozmik radyasyon ile doğal oluşabilen radyoaktif minerallerin sonucu olarak çevrede bulunabilir. İyonlaştırıcı radyasyon,

tıp ve sanayi gibi alanlarda insanlar tarafından yapılan faaliyetler sonucunda da üretilebilir ve nükleer enerji santrallerinde meydana gelen patlamalardan da kaynaklanabilir [10].

Radyasyonun vücut tarafından absorbe edilmesi, toksik özellikteki serbest radikallerin oluşumuna sebep olur. Uzun süre düşük dozlarda radyasyona maruz kalmak, insan sağlığının bozulmasının artışıyla ilişkilendirilirken yüksek dozlarda radyasyona maruz kalmak ise vücudumuzdaki dokulara önemli ölçüde zarar verebilir ve hatta ölüme bile yol açabilir [10].

İyonizan radyasyon Geiger-Müller sayacı, iyon odaları, sintilasyon sayaçları, floresan ekranlar gibi farklı dedektörlerle saptanabilme özelliğine sahiptir. Moleküler, hücresel, doku ve sistem düzeyinde insan sağlığını olumsuz etkileyebilmektedir. Bu etkiler somatik ve genetik düzeyde olabilir. En önemlisi gastrointestinal, hematopoietik, ve nörovasküler düzeyde sendromları olan akut radyasyondur. Radyasyonun etkilerinden kurtulabilmenin önemli kriterleri mevcuttur. Bunlar; radyasyon kaynağına olan uzaklık, radyasyona maruz kalış süresi ve zırlama olarak sıralanabilir [9].

2.2.3.1. İyonlaştırıcı Radyasyonun Etkileri

Hücredeki iyonlaşmanın sebep olduğu değişiklikler fiziksel, kimyasal ve biyolojik düzeydedir.

*Direkt Etki: Yüksek LET'e sahip alfa, beta, nötron ışınım tiplerinde daha çok görülür.

DNA hasarı

-DNA'daki tek veya çift zincir kırıklarının oluşması

-Hidrojen bağlarında görülen kırılmalar

-Çapraz bağlantılarda hataların olması

*İndirekt Etki:

DNA'da dolaylı olarak hasarın ortaya çıkmasına sebep olan serbest oksijen radikallerinin oluşmasına neden olur. Zincir kırıkları veya baz hasarı gibi bozulmalara sebep olur.

Kanser hücrelerinde bölünme yeteneklerini ortadan kaldırarak çoğalmalarını engeller [11].

- X Işınları

X ışınlarının keşfedilmesi Alman fizikçi Wilhelm Conrad Roentgen tarafından 1895'te gerçekleşmiştir [12]. X ışınları kısa dalga boylu, yüksek enerjiye sahiptir. Roentgen tüpü, 1913 tarihinde William David Coolidge tarafından geliştirilmiştir. Yüksek enerji (106-108 V) potansiyelinin uygulanmış olduğu 10^{-3} mm-Hg basınca sahip olan cam tüpten oluşmaktadır [13]. Elektronların anotta oluşturduğu Coulomb etkileşimleri, hızlı hareket etmekte olan elektronların aniden yavaşlamasına bağlı olarak x ışınları üretilir. Hızlı hareket etmekte olan elektronların aniden yavaşlamasına bremsstrahlung denilmektedir [13].

- Gama Işınları

Gama ışınlarının fiziksel görünümü x ışınları ile aynıdır, ancak atom çekirdeğinden kaynaklanır. Kararsız olan atom çekirdeği sahip olduğu fazla enerjisini beta partikülü olarak ya da helyum çekirdeği biçiminde tutmaktadır [13].

Gama ışınlarının dalga boyu kısa olmasına rağmen enerjileri çok yüksektir. Ancak alfa, beta parçacıklarıyla kıyaslandığında iyonlaşmaya sebep olma konusunda etkili oldukları söylenemez [14]. Örneğin, kobalt 60'ın bozunması esnasında 0,31 MV enerjinin beta ışını olarak yayılmasından sonra ortalama 1,25 MV enerjiye sahip olan iki monoenerjetik gama yayılır [13].

Kobalt-60 (Co-60) : Doğal kobalt sağlam ve sert bir yapıya sahip mavimsi gri renkte, kolay kırılabilme özelliği olan bir metaldir. Radyoaktif olmayan kobalt, doğada farklı mineraller ile karıştırılmış bir şekilde bulunabilir. Uzun süredir cam ve seramikleri mavi renge boyamak için kullanılmaktadır. Co-60'ın yarı ömrünün yaklaşık olarak 5,27 yıl olduğu belirtilmiştir. Pratik amaçlar için kullanılan Co-60'ın on yarı ömür geçtikten sonra aktif olmadığı için zarar vermediği, etkisinin olmadığı kabul edilir. Bu nedenlerden dolayı Co-60'ın yaklaşık olarak 53 yıl güvenli bir şekilde korunması gerekmektedir. Co-60'ın ticari amaçlar için üretimi nükleer reaktörlerde yapılabilmektedir. Co-60 teleterapi üniteleri, çapı 2 cm olan silindirik özellikte bir kaynağa sahiptir. Etkinliği genellikle 5.000 ile 15.000 Ci (Curie) arasındadır. Aktivitesi 3000 Ci'den daha az olan kaynaklar 5-7 yıl kullanıldıktan sonra yenisi ile değiştirilir. Co-60 teleterapi üniteleri < 10 cm derinliklerde bulunan tümörler açısından iyi performans sağlarken daha derinde bulunan tümörlerde linak kullanımının daha uygun olduğu belirtilmektedir [13].

- Alfa Radyasyonu

Alfa radyasyonu, pozitif yüke sahip olan helyum çekirdeğidir ve kararsız olan büyük bir atom çekirdeği tarafından yayılmaktadır. Ağır bir parçacık olmasına rağmen havada kısa bir menzile (1-2 cm) sahiptir. Kütlelerinin büyük olması sebebiyle etraflarındaki maddeyi geçerken çok çabuk soğurulduklarından fazla ilerleyemezler. İnce kağıt ile durdurulabileceği gibi cilt tarafından da tamamen soğurulabilme özelliğine sahiptir [15].

- Beta radyasyonu

Beta radyasyonu, negatif veya pozitif yüke sahip olan elektronlardan oluşur ve kararsız olan atom çekirdeğinden yayılmaktadır. Normal bir şekilde cildin üst tabakasından geçemeyen beta parçacıkları, daha az yüke sahip oldukları için doku veya malzemeler üzerinde fazla etkili gösterebilir. Ve alfa parçacıklarına göre daha delici bir özelliğe sahiptir [15].

2.3. RADYASYON ÖLÇÜ BİRİMLERİ

İyonize olan radyasyonla yapılan çalışmaların güvenli sonuçlar verebilmesi ve bu radyasyonun etkilerini belirtebilmek için radyasyon dozunun ölçülmesi gerekmektedir. Ölçüm yapılırken birbirinden farklı iki birim bulunur. Bunlar Klasik (Eski) ve Yeni Birim SI (Uluslararası Birim Sistemi) 'dır. Bu birimler radyasyonun ölçüm birimleri hakkında bilgi verir [5].

2.3.1. Aktivite Birimi

Birim zamandaki radyoaktif olan bir maddenin bozunma sayısı olarak tanımlanmaktadır.

Eski Birim: Curie (Ci)

Yeni Birim (SI): Becquerel (Bq)

$$1 \text{ Ci} = 3,7 \times 10^{10} \text{ Bq} \quad 1 \text{ Bq} = 2,7 \times 10^{-11} \text{ Ci}$$

2.3.2. Absorbe Doz

İyonlaştırma özelliğinden dolayı bir ortamda radyasyon enerjisinin depolandığı miktar olarak tanımlanmaktadır [5].

Eski Birim : rad

Yeni Birim (SI): Gray (Gy)

$$1 \text{ Gy} = 100 \text{ rad} \quad 1 \text{ rad} = 0,01 \text{ Gy}$$

Birim zamandaki absorbe edilen dozun miktarı da absorbe doz hızı olarak tanımlanır [5].

2.3.3. Eşdeğer Doz

Kalite faktörü ile absorbe edilen dozun çarpımı eş değer dozu vermektedir [5].

Eski Birim: Rem

Yeni Birim (SI): Sievert (Sv)

$$1 \text{ Sv} = 100 \text{ rem} \quad 1 \text{ rem} = 0,01 \text{ Sv}$$

Kalite Faktörü; Farklı türlerdeki radyasyon çeşitlerinin biyolojik etkileri farklı olduğu için, dokulardaki absorbe edilen enerjiyi hesaplamak için tüm radyasyonlara özgü olan faktördür [5].

Tüm radyasyon çeşitlerinin biyolojik etkinliği (RBE) LET ile bağlantılı olarak değişiklik göstermektedir. Eşdeğer dozun kullanılmasının amacı, farklı türlerdeki radyasyonların dokularda meydana getirdiği biyolojik etkileri karşılaştırmaktır [16].

LET: Doku benzeri bir materyalde biriken enerjinin yoğunluğu doğrusal enerji transferi (LET) olarak tanımlanmaktadır. LET, farklı türlerdeki radyasyon kaynaklarının kalitesini göstermektedir. Radyasyonun biyolojik olarak gösterdiği etki (RBE) ise LET'e bağlıdır [16].

2.3.4. Işınlanma Seviyesi

Elektromanyetik özellikte olan radyasyon için tanımlanan, atomları iyonlaştırma özelliğindeki radyasyonun bir ortamdaki ölçümüdür [5].

Eski Birim: Röntgen (R)

Yeni Birim (SI): Coulomb / Kg (C / Kg)

$$1 \text{ C / Kg} = 3876 \text{ R} \quad 1 \text{ R} = 2,58 \times 10^{-4} \text{ C / Kg}$$

2.3.5. Kanser

Kanser, hücrelerin kontrolsüz bölünmesi ve çoğalması ile ortaya çıkan, genetik ve çevresel koşulların etkisi altında olan kompleks bir hastalıktır. Tüm ölümlerin yaklaşık olarak % 20'sini kanser oluşturmaktadır. Sanayileşmiş ülkelerde kardiyovasküler hastalıktan sonra en yaygın ölüm nedenleri arasındadır. Radyasyona maruziyet söz konusu olmasa dahi genel popülasyona bakıldığında her on kişiden dört kişide kanser oluşumu beklenmektedir. Son yıllarda, erkekler arasında en yaygın kanser çeşitleri, akciğer, prostat, kolorektum, mide ve karaciğer kanseri iken kadınlar arasında ise en yaygın türleri meme kanseri, kolorektum, akciğer, serviks ve mide kanseri olmuştur.

Kanserin gelişim evreleri birkaç aşamadan oluşur ve bu süreç oldukça karmaşıktır. Yalnızca bir hücreyi etkileyebilecek süreç gibi görünse bile hücrenin malign hale gelmeden, tümör gelişiminden önceki süreç esnasında bir dizi olayın gerekli olduğu belirtilmektedir. Radyasyona maruziyet sonrasında kanser oluşma ihtimali yüksektir. Ve bu durum endişe kaynağıdır. Kansere sebep olabilecek yüksek radyasyona maruz kalan gruplar için istatistiksel analizler yapılabilir [4].

Lösemi, tiroid ve kemik kanserinin genel olarak radyasyona maruziyetten birkaç yıl sonra ortaya çıkmasının yanında diğer kanser çeşitleri ise maruziyetten en az 10 yıl sonra ortaya çıkar. Hiçbir kanser çeşidi radyasyona maruz kalmanın gerçek sebebi değildir. Bu nedenle radyasyona bağlı olarak gelişen tümörleri diğer farklı sebeplerden kaynaklanan tümörlerden ayırt etmek mümkün değildir [4].

Radyasyona maruz kalmanın sınırlarını belirleyebilmek için sağlam bir bilimsel temel gereklidir. Çünkü alınan radyasyon dozu sonrasında kanser oluşma ihtimalini tahmin etmek önemlidir. Radyasyon ile tıbbi tedavi gören kişiler, mesleki açıdan radyasyona maruz kalan insanlar ve bunlardan farklı olarak atom bombalarından kurtulan insanlar, radyasyona maruz kalma ile kanser oluşumu arasındaki ilişki hakkındaki bilginin temelini oluşturmaktadır [4].

2.3.6. Hücrenin Yapısı

Maddenin en küçük yapı birimi olan atomlar molekülleri, moleküller makromolekülleri, makromoleküller ise daha karmaşık yapıya sahip kompleks molekülleri oluşturur. Bu yapıların bir araya gelmesiyle dokuların en küçük birimi hücreler oluşur.

Bitkisel ve hayvansal organizmaların hepsi “hücre”lerden oluşmaktadır. Canlıların canlılık özelliğini gösteren en küçük yapı birimi olan bu hücrelerin içerisinde yarı akışkan bir sıvı olan sitoplazma, sitoplazmanın içerisinde ise yaşamsal olayları gerçekleştiren organel adı verilen yapılar bulunur. Bu hücrelerin dış kısmı “hücre membranı” olarak adlandırılan canlı, esnek seçici geçirgen özelliğe sahip katmandan oluşur [13].

2.3.6.1. Hücre Döngüsü

Bir hücrenin bölünmeye başlaması ve onu takip eden bir sonraki hücre bölünmesine kadar geçen süre hücre döngüsü olarak adlandırılır. Hücre döngüsü oldukça uzun olan interfaz evresi ile kısa bir bölünme evresi olan mitotik evreden (Mitotik evre = Mitoz + Sitokinez) oluşur.

İnterfaz, bölünmüş hücrenin yeniden bölünebilmesi için yapılan hazırlık evresidir. Hücre döngüsünün en uzun olan aşamasıdır. Örneğin ; insan derisinin interfazı 22 saat iken hücre döngüsünün tamamı 24 saatte tamamlanır. İnterfaz üç aşamalı olarak gerçekleşmektedir [13].

G₁: Sitokinezin hemen sonrasındır. Metabolik olaylar yoğun bir şekilde devam eder. Bu aşama; madde taşınması, sentez, organel oluşumu, RNA sentezi ve doku fonksiyonlarının en yüksek seviyede olduğu evredir. En uzun aşamadır. Hücre hacimce artıp bölünme büyüklüğüne ulaşır. Bölünme yeteneklerini yitiren hücreler, işlevlerine ve yaşam aktivitelerine devam ederler. Örneğin ; kas ve sinir hücreleri [13].

S: DNA kopyalanır ve yeni kromatitler şekillenmeye başlar. En yoğun protein sentezi bu aşamada gerçekleşir. Duplikasyon gözlemlenir.

G₂: Bölünme ile ilgili enzimler sentezlenir. Organellerin sayısı artar. DNA sentezi biterken, RNA sentezi devam eder. Sentrozom duplikasyonu biter ve sentrozomlar karşıt kutuplara hareket etmeye başlar.

G₀: Hücreler gelişim sırasında onları koruyan doğal bir mekanizmaya sahiptir. Bu koşullar altındaki hücreler, hücrel aktivitesini geçici olarak durdururlar. Dinlenme fazı olarak adlandırılan bu evreye G₀ evresi denir. G₀ fazında hücreler metabolik olarak aktif olmalarına rağmen replikasyon gerçekleştirip bölünme hazırlığı yapamadığı için çoğalamazlar [13].

Hücre döngüsünün erken G₂ ve M evreleri en radyosensitif oldukları evrelerdir. Bir hücrenin radyosensitivitesi, mitotik faz sırasında, interfaz sırasında olduğundan dört kat fazladır.

Radyorezistans S, geç G_1 ve G_0 fazlarında yüksektir. S fazındaki direnç, DNA'yı hızla onarabilecek sentez enzimlerinin fazla miktarlarda bulunmasından dolayıdır [13].

2.3.6.2. Mitoz Bölünme

Bir hücreden genetik olarak birbirleri ve ata hücre ile tamamen aynı olan iki hücrenin oluşmasıdır. Somatik hücreler mitoz yoluyla oluşurken üreme hücreleri mayoz bölünme geçirirler.

1) Profaz: Nükleer membran ve endoplazmik retikulum kaybolur. Kromozom kısalıp, kalınlaşır. Sentrozom karşı kutuplara doğru hareket eder. Nükleus kaybolur. İğ iplikleri, kutuplardan merkeze doğru uzayarak oluşurlar.

2) Metafaz: Kromozomlar kısalıp, kalınlaşmaya devam eder. Kardeş kromatidler sentromerler ile tutunurlar. Kromozomlar ekvatorial düzlemde yan yana dizilirler. Kromozomlar sentromerleri ile iğ ipliklerine tutunur.

3) Anafaz: İğ ipliklerinin kasılma ve gevşeme hareketi sentromerleri bozar. Daha sonra kardeş kromatitler birbirinden ayrılır ve karşı kutuplara taşınır. Anafazın sonunda karşı kutuplara çekilen kromatitler artık kromozom olarak adlandırılır.

4) Telofaz: Kromozomlar hareket etmeyi bırakır. Kromozom helezonları gevşer ve kromatine dönüşür. Nükleus yeniden ortaya çıkar. RNA ve protein sentezi başlar. İğ iplikleri kaybolur. Nükleer membran ve endoplazmik retikulum tekrar oluşur. Hayati olaylar hücrede yeniden başlar. Sitokinez meydana gelir ve bölünme tamamlanır [13].

2.3.7. DNA Hasarı, Onarımı ve Radyasyon ile İlişkisi

Radyasyon, DNA'daki fosfodiester bağlarında tek iplikte kopmanın olması, zincirin karşılıklı bölgelerinde çift iplikte kopmanın görülmesi, organik bazlarda yer değişikliği sonucu hasarın meydana gelmesi gibi çeşitli lezyonların oluşmasına sebep olur. Genomik instabilite olarak tanımlanan bu değişikliklerin kanser oluşumu, apoptozis ve reaktif oksijen türlerinin oluşumu gibi hücresel mekanizmaları aktive ettiği belirtilmiştir. Artmakta olan kanıtların sonucu göstermektedir ki yüksek LET ışınlama sonrasında kompleks çift zincir kırıkları meydana

gelmektedir. Genetik materyalin moleküler bütünlüğünde ekzojen veya endojen faktörlerin etkisiyle meydana gelen tüm değişiklikler "DNA hasarı" olarak adlandırılır.

Endojen faktörler; DNA'da kendiliğinden meydana gelen hatalar olabildiği gibi hücre metabolizmasının yan ürünü olarak üretilen reaktif oksijen ve nitrojen türleri, lipid peroksidasyon ürünleri, endojen alkilasyon ajanları, östrojen ve kolesterol metabolitleri ve reaktif karbonil türleri de olabilmektedir [17, 18].

Ekzojen faktörler ise ultraviyole ışığı, iyonize radyasyon, ağır metaller, hava kirliliği, sigara dumanı, kemoterapötik ilaçlar olarak sayılabilmektedir [17]. Bir memeli genomunda her gün yaklaşık olarak 10^4 'ten daha fazla DNA hasarının ortaya çıktığı tahmin edilmektedir [19].

2.3.7.1. DNA Onarım Tipleri

Farklı türlerdeki lezyonlara etki eden hücrelerde DNA tamirinin çoklu olan enzimatik mekanizmaları bulunmaktadır. Çift zincir kırıklarının tamirinde esas olan iki onarım yolu vardır. Homolog olmayan uç birleştirme (NHEJ) ile homolog rekombinasyon (HR)'dur. NHEJ onarım yolu, kırık olan fosfodiester bağlarından kaynaklanmış DNA'daki fragmentler üzerindeki çalışmalardır. Lezyon tipini tanıma, Ku-heterodimerin DNA-Pk'ye (Protein Kinaz) bağlanabilmesi ve XRCC4 ligaz enziminin enzimatikten sonraki parçalarının en son yeniden birleştirilerek aktive edilebilmesi için Ku70 / Ku80 onarım proteinlerine ihtiyaç vardır. DNA molekülünün kırılmış uçlarının onarılacak başka proteinlerle ligasyonu gerçekleştirilebilir. NHEJ onarımı, hücre döngüsü süresince çalışmaktadır. Ancak G_1 / S evrelerinde aktiftir. Onarım hataya açık olabilmektedir. Homolog rekombinasyonla çift zincir kırıklarının (Dsb) onarımı, kırık olan bölgenin zarar görmemiş bir kopyasını kullanarak onarım gerçekleştirilmektedir. Hücre döngüsünün yalnızca S veya G_2 evrelerinde çalışabilmektedir [16].

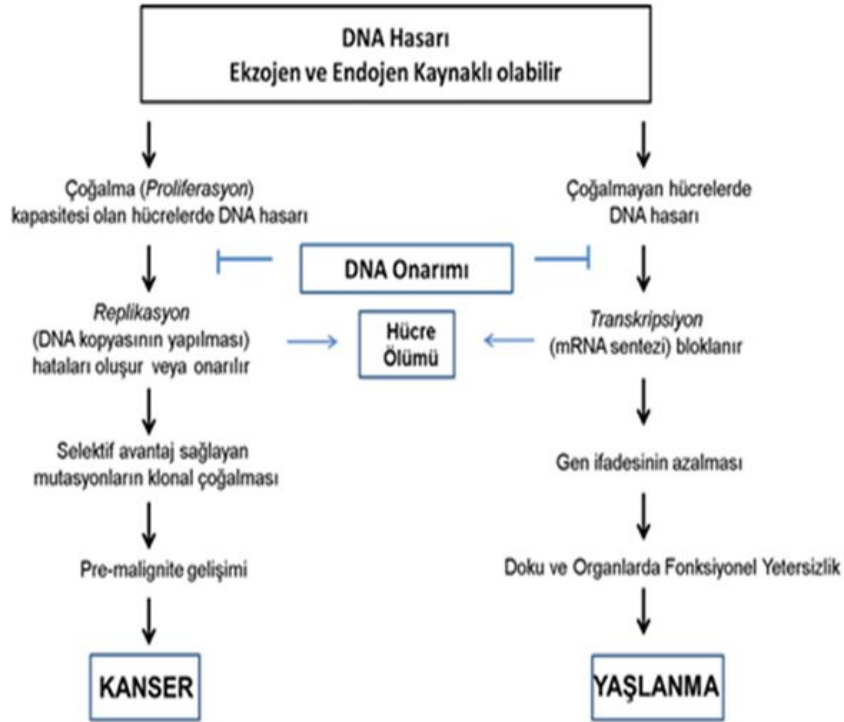
DNA'daki hasarlar; baz değişimi, (deaminasyon, depürinasyon, baz alkilasyonu, delesyon, insersiyon vs), tek veya çift zincir kırıkları, aynı veya farklı DNA zincirleri arasında çapraz bağlanma gibi çeşitli şekillerde olabilmektedir.

DNA hasarının yol açtığı yanıtlar:

1) Hasarlı DNA'nın çıkarılarak DNA çift zincirinin doğru bir şekilde yeniden yapılandırılması

- 2) DNA hasarı kontrol noktalarının aktivasyonu ile hücre döngüsünün ilerlemesinin durdurulması, bu şekilde hasarlı genetik materyalin onarımına imkan sağlanması
- 3) Hücrede gen transkripsiyon düzeylerinin hücrenin yararına olacak şekilde değiştirilmesi
- 4) Ciddi olarak hasar görmüş hücrelerin apoptozla elenmesi

Bu yanıtlardan herhangi birinin gerçekleşmemesi durumunda, hücre düzeyinde genomik kararsızlık; organizma düzeyinde ise genetik hastalıklar, kanser ve yaşlanma görülebilir [19].



Şekil 2.2: DNA hasarı ve etkileri [19].

DNA'nın onarımı birkaç yolla gerçekleşmektedir. Doğrudan ve dolaylı olarak gerçekleşen bu onarım mekanizmaları aşağıdaki şekilde gösterilmiştir.

DNA TAMİRİ



Şekil 2.3: DNA tamiri

Fotoreaktivasyon:

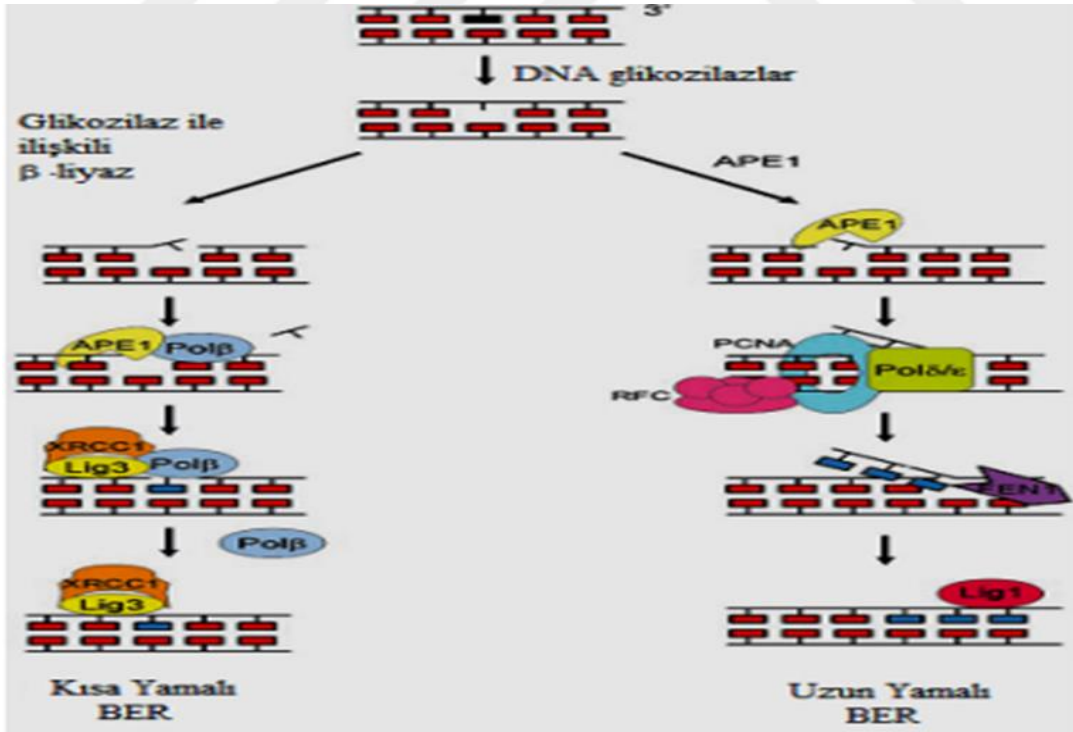
Hasarın geri döndürülmesi onarım için en kolay yol gibi görünmesine rağmen çoğu durumda termodinamik ve kinetik nedenlerden dolayı reaksiyonun geri dönmesi mümkün değildir. Bazı durumlarda ise enzim aracılığı (Fotoliyaz ve O-6-Metil-DNA-alkiltransferaz) ile gerçekleşen tek adımlı reaksiyonlar ile hasar onarılır. Siklobütan pirimidin dimerleri (CPDs), fotoliyaz enzimi tarafından ayrılarak hasar giderilir. Reaksiyona fotoreaktivasyon denir [20].

Fotoreaktivasyon onarım sistemi bakterilerde, mantarlarda, bitkilerde ve çoğu omurgalıda bulunmasına rağmen, insan dahil pek çok ökaryotik türde olmamasından dolayı evrensel bir onarım sistemi değildir [20].

Baz kesip çıkarma (BER):

Alkilasyonun, deaminasyonun, oksidasyonun ve DNA replikasyon hatalarının neden olduğu küçük DNA modifikasyonları önemli DNA tamir süreçlerinden birisi olan BER ile tamir edilmektedir. BER’de, kısa yamalı (short-patch) BER ve uzun yamalı (long-patch) BER olmak üzere iki ayrı alt yolak bulunur. Kısa yolakta tek nükleotid değişimi gerçekleşirken, uzun yolakta 2-8 arası nükleotidin kesip çıkarılması gerçekleşir.

Her ikisinde de ilk basamakta tamir, hataya spesifik tek fonksiyonlu ya da birden fazla fonksiyona sahip DNA glikozilazlar tarafından başlatılabilir [22]. İnsanda en az 12 farklı DNA glikozilaz tanımlanmıştır. Hasar veya hata tanınır ve enzimatik olarak bir nükleaz tarafından kesip çıkarılır. DNA polimeraz oluşan boşlukları doldurur. DNA ligaz son bağı kurar ve boşluk tamamen kapanır.



Şekil 2.4: Baz kesip çıkarma [20].

Nükleotid kesip çıkarma (NER):

NER mekanizması, çift zincir DNA'nın normal heliks yapısını bozan, UV ile indüklenmiş pirimidin dimerlerini ya da çoğunlukla mutajenik kimyasalların ve kemoterapötik ajanların oluşturduğu DNA eklentilerinden kaynaklanan hasarların onarımını yapar.

NER, DNA hasarının tanınması, hasarı içeren oligonükleotit fragmentin kesilmesi, oluşan boşluğun DNA polimerazlarca doldurulması ve son olarak ligasyon adımlarından meydana gelmektedir.

NER mekanizması bozukluğu, Xeroderma Pigmentosum (XP), Cockayne Sendromu (CS) ve Trikotiodistrofi (TTD)'nin bir ışığa duyarlı formu gibi her bir UV radyasyon duyarlılığı ile karakterize hastalıklar ile ilişkilidir.

Bu bireylerde güneşe duyarlılık, bazı dokularda erken yaşlanma, nörolojik bozukluklar ve genellikle UV kaynaklı cilt kanseri insidansında artış gözlenir [18]. İnsanda çift zincir kırıklarının tamiri iki majör mekanizma ile sağlanmaktadır. Homolog rekombinasyon (HR) ve homolog olmayan uç birleştirme (NHEJ) 'dir.

Homolog rekombinasyon:

DNA'ların zarar görmüş parçasının değiştirilmesinde kalıp olarak kullanılacak tamamlayıcı ipliğin bulunmadığı durumda kullanılan, ve replikasyondan sonra aktif olan bir onarım mekanizmasıdır.

HR kardeş kromatit iplikçliğini kalıp olarak kullanarak çift zincir kırık onarımının hatasız olarak yapılmasına izin verir. HR bölünen hücrelerde, homolog kardeş kromatite ulaşılabildiği zaman yani hücre döngüsünün S, G₂ / M fazlarında gerçekleşmektedir. Ek olarak HR, replikasyon çatalının korunması, telomer bakımını da gerçekleştirir [18].

Homolog olmayan uç birleştirme (NHEJ) :

NHEJ çift zincir kırık uçları modifiye ederek birbirine bağlar. Bu tamir sistemi ile hasarlanmamış DNA kalıbına ihtiyaç duyulmaksızın hataya meyilli olarak, birkaç nükleotit

kaybı ile DNA onarımı gerçekleşir. NHEJ, hücre döngüsünden bağımsız olarak, bölünen ve bölünmeyen hücrelerde görülebilirken, en aktif olduğu aşama G₁ fazıdır.

Bazı kaynaklar NHEJ'in HR onarımından daha fazla sıklıkta görüldüğünü desteklemektedir. Ancak çift zincir kırıklarının tamirinde hangi mekanizmanın seçileceği, hücre döngüsüne ya da her iki mekanizmanın kullanılabilir spesifik bileşenlerinin seviyesine bağlı olabilir.

HR, yalnızca çift iplik kırığı onarımında yer almaktadır. Onarım için bir şablon olarak homolog DNA dizisi veya kardeş kromatit kullanılır. Hücre döngüsünün S ve G₂ fazları sırasında aktiftir. NHEJ, hücre döngüsü boyunca aktiftir ve özellikle yüksek iyonlar, iyonize edici radyasyon ile indüklenen çift iplik kırığının onarımı için baskın yoldur.

Ataksi telenjektazi, Nijmegen breakage sendromu gibi nörolojik, immünolojik ve gelişimsel defektler sonucu oluşan çeşitli insan hastalıklarının HR ya da NHEJ onarımlarında meydana gelen hatalardan kaynaklandığı rapor edilmiştir [18].

Tüm organizmalar tarafından geliştirilen DNA onarım mekanizmaları olan baz eksizyon onarımı, nükleotit eksizyon onarımı, rekombinasyon onarım yolları ile bu hatalar giderilmeye çalışılmaktadır [23].

Yanlış eşleşme onarımı (MMR):

Bu onarım mekanizması, DNA replikasyonu esnasında meydana gelen ve çift sarmalda anormal boyutlara neden olan, normal bazların hatalı eşleşmesi şeklindeki hataları düzeltir [24]. MMR sistemi küçük tek zincir DNA halkalarının ve yanlış eşleşmenin replikasyon sonrası tamirinden de sorumludur. DNA replikasyonu doğruluğunun en son sorumlusudur. MMR sisteminde meydana gelen hatalar hücre yapısını ve fonksiyonlarını etkileyebilmekte, tümör oluşumu veya dejeneratif hastalıklar meydana gelebilmektedir.

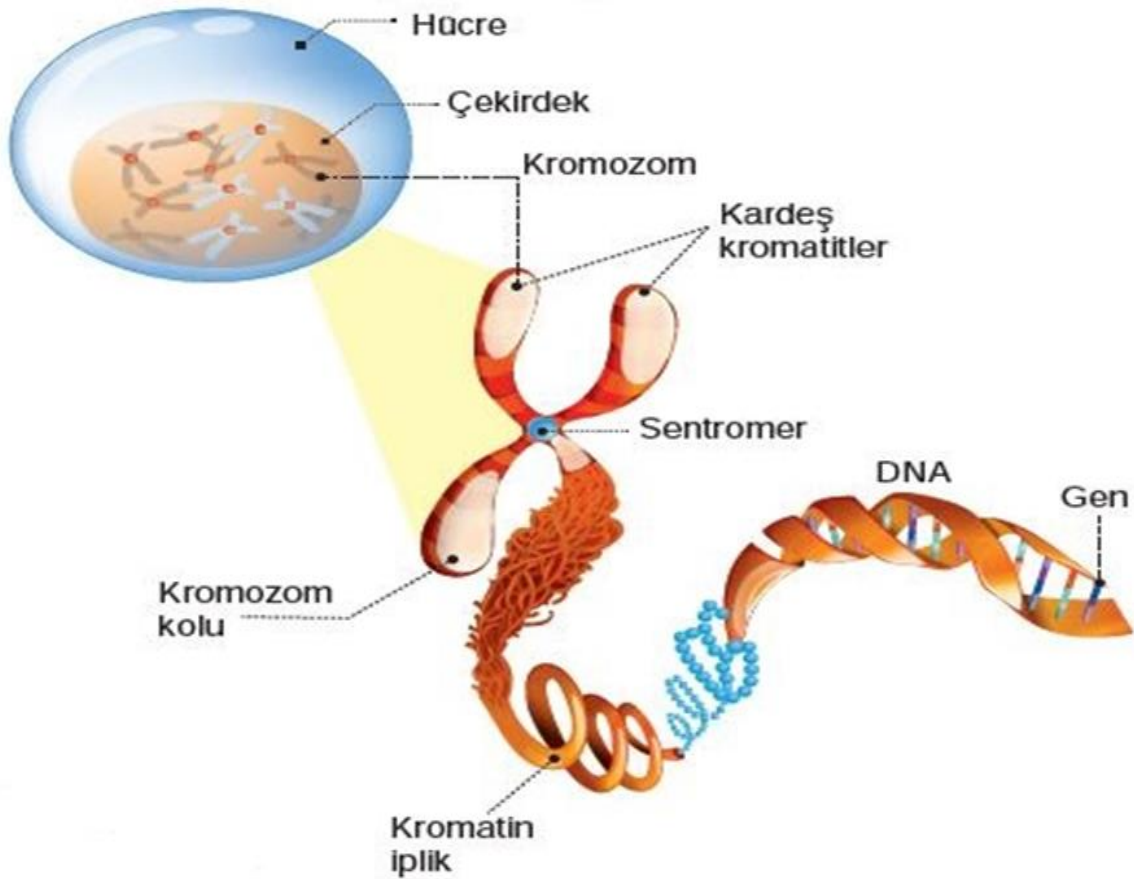
Karsinogenez ve Hücre Döngüsü:

Kanser hücrelerinin hücresel düzeyde olan gelişimleri “karsinogenez” olarak tanımlanır. Hücrelerin canlı olması, mutasyonların kademeli bir şekilde gerçekleşmesi ve büyümenin kontrolü karsinogenezin temelini oluşturmaktadır. Kanser ilerleyen aşamalarında tümör hücrelerinin fenotipik özelliklerinin değişmesi, bu hücrelerin sınırsız, hızlı bir şekilde çoğalmasına ve metastaz yapmalarına sebep olur [13].

2.3.8. Kromozomun Yapısı

DNA molekülü, ökaryot hücrelerde çekirdek içerisinde proteinlerle birlikte bulunmaktadır. Hücrede bölünme gerçekleşmediğinde DNA molekülü ince, uzun bir iplik halinde görülmektedir. Bu şekilde görülen DNA protein kompleksine kromatin adı verilmektedir.

Bir hücre bölünmeye hazırlandığında DNA sentezi (replikasyon) gerçekleşir. Hücre bölünürken kromatin ipliklerinin kısalıp kalınlaşmasıyla kromozom adı verilen çoklu lineer DNA dizeleri oluşmaktadır [25]. Kromozomlar, hücre döngüsü sırasında çoğunlukla DNA ve kromatitten oluşan kompleks formunda bulunur. DNA molekülünün eşlenmesi sonucu bir kromozom kromatit denilen aynı genetik bilgiye sahip iki iplikten oluşur. Bu ipliklerin birbirine tutunduğu bölgeye ise sentromer denir [13].



Şekil 2.5: Kromozomun yapısı [26].

2.3.8.1.Radyasyonun Kromozomlara Etkisi

İnsan, hayvan ve bitkilerde 0,1 Gy gibi çok düşük radyasyon dozunun bile kromozomlarda hasara yol açtığı, kırılmalara sebep olduğu gözlemlenmiştir. Memeli kromozom sayıları çok ve küçük olduğu için bitki kromozomlarına nazaran daha zor incelenmektedir. Kromozomlardaki radyasyonun sebep olduğu etkilerin en net görüldüğü evre metafaz evresidir [27]. Çünkü bu evrede kardeş kromatitler sentromerler ile tutunurlar. Kromozomlar ekvatorial düzlemde yan yana dizilirler [13].

İyonize radyasyona maruz kalan hücrelerde; translokasyon, halka kromozom ve asimetrik kromozom değişimi gibi kromozom anomalilerinin görülme sıklığı, disentrik kromozom ile benzerdir.

2.3.8.2.Kromozom Yapısı ve Sayısındaki Değişiklikler

Kromozomlar üzerinde bulunan, karakterlerin oluşumunda etkili olan genlerde meydana gelen değişiklikler mutasyon olarak adlandırılır. Bir kromozomdaki yapısal ve sayısal olarak gözlenebilen değişiklikler ise kromozom mutasyonu olarak adlandırılır. Mutasyonların çok az bir kısmı yararlı olabileme özelliğine sahiptir. Ancak bir çoğu ölümcüldür. Ölümcül olabilen mutasyonlar letal (öldürücü) mutasyon olarak tanımlanmaktadır. Radyasyon, x-ışınları, gama ışınları, beta partikülleri gibi klastojenler mutasyon oluşturabilecek faktörler arasında yer almaktadır. Mutasyona sebep olan bu faktörler mutajen olarak isimlendirilir [28].

2.3.9. Kromozom Aberasyonları

Kromozom sapma analizi, radyasyon dozunun belirlenmesinde, kromozomlardaki hasar tespitinde verilerin yorumlanmasında zorluklar olduğunda dozimetrik teknolojiye bir boşluğu dolduran önemli bir doz değerlendirme yöntemi olarak kabul edilmektedir [29].

X ışınlarının kromozom aberasyonlarını tetiklediği, ilk olarak Muller tarafından Drosophila'da yapılan genetik çalışmalarda kanıtlanmıştır. İyonize radyasyon, SSB, DSB ve BD'yi indükler. LET'lerinde değişiklik gösteren farklı radyasyon türlerinin RBE değerlerinin karşılaştırmalı analizi, DSB'nin doğrudan kromozom sapmalarına yol açabileceğini ve değişim sapmasının oluşumu için lezyon olması gerektiğini göstermektedir [29].

DNA hasarı normal bir şekilde onarılabılır ya da bir değişim oluşturmak için yanlış bir şekilde tamir edilebilir veya onarılamaz bir şekilde kalabilir [29].

Kromozom aberasyonları, karyokinezin metafaz veya anafaz evrelerinde net bir şekilde görölmektedir. Aberasyonlar iki başlık altında incelenmektedir.

2.3.9.1. Kromozom Tipi Aberasyonlar

Radyasyonun neden olduğu kromozom aberasyonları, kromozom türünde olacaktır. Bir kromozomun her iki kromatitini de içerir [29]. Kromozom tipi aberasyonlar genel olarak hücre döngüsünün G₁ fazındaki bir hücrenin ışınlanmasından sonra ortaya çıkarlar [30]. Kromozomlarda kırılmalar meydana gelir. Replikasyon gerçekleşir ve kromatitler oluşmaya başlar [27].

- Terminal ve Ara Delesyonlar:

Radyasyon etkisi ile kromozomun bir parçasının kopması sonucu oluşan aberasyonlardır. Kardeş olmayan izokromatid tipi delesyonlar ile kromozom tipindeki terminal delesyonları birbirinden ayırt etmek olası değildir. Bu nedenden dolayı anomaliler kromozom tipinde görülürse radyasyona maruz kalma sırasında, eşleştirilmiş olan bütün asentrik fragmentlerin terminal delesyon olarak sınıflandırılması uygundur [29]. Ara delesyonlar nokta görünümüdür.

- Asimetrik Değişimler:

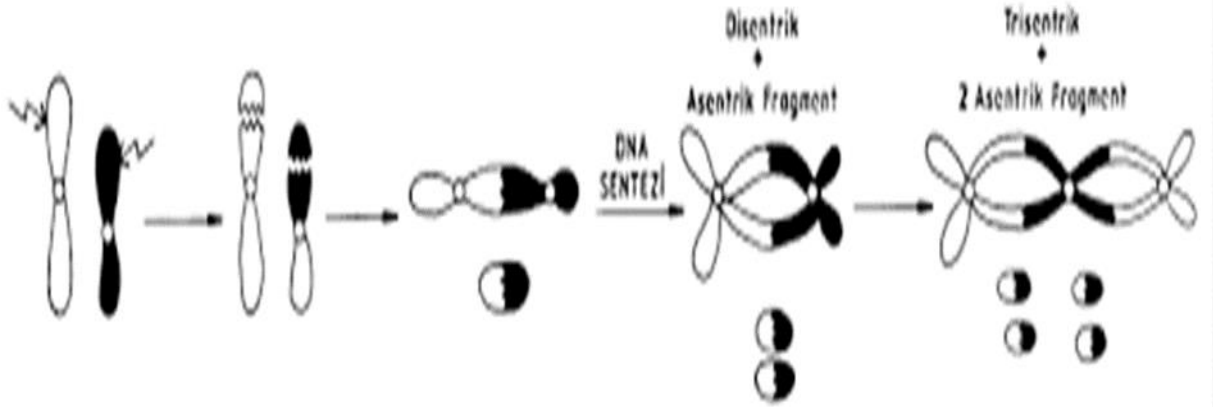
In vitro koşullar altında ilk olarak metafazda gözlemlenen, asimetrik olan değişimler diğer aberasyon çeşitlerinden daha iyi analiz edilebilmektedir. Ve genel olarak radyasyon doz tahminlerinde kullanılan frekans sıklığı > % 95'dir. Buna benzer tespitlerde bir trisentrik sapmanın iki disentrik sapmaya eşdeğer olduğu varsayılmaktadır [29]. Bir kromozomun iki kromatitinde oluşan kırılmalar disentrik aberasyonların oluşmasına neden olur [31]. Asimetrik değişimler iki kromozom arasında veya aynı kromozom üzerinde görülebilir.

- Simetrik Değişimler:

Değiştirilen parçalar normal karyotipten farklı olan iki kromozom üretmemişlerse simetrik değişimlerin (karşılıklı translokasyonlar) alışılmış şekilde boyanmamış preparatlarda gözlemlenmesi oldukça zordur. Preparatlardan bantlı olanlar analiz edildiğinde

çözünürlüklerinde bir miktar artış söz konusu olabilir. Ancak bu durumda bile simetrik değişimlerin hesaplamadaki verimi insan hücreleri için yaklaşık % 50'dir. Simetrik değişimlerden belirgin olanların analiz edilmesi önerilmektedir. Ancak bu analizler çok zaman aldığı için tavsiye edilmemektedir [29].

Simetrik değişimler, iki kromozom arasında veya aynı kromozom üzerinde de görülebilir. Aynı kromozom üzerindeki değişimler iki şekilde sınıflandırılır. Bunlar; perisentrik ve parasentrik inversiyondur. Perisentrik inversiyon, bir kromozomun iki kolunun uç kısmında meydana gelen kopma sonucu oluşan parçaların yer değiştirmesi olarak tanımlanır. Parasentrik inversiyon ise bir kromozomun iki kolunun uç kısmındaki kopma sonucu oluşan parçaların ters dönerek koştığı yere bağlanmasıdır. Bu değişimlerin gözlenebilmesi için boyanmış preparatlar kullanılır [29].



Şekil 2.6: Kromozomal değişiklikler [31].

2.3.9.2. Kromatit Tipi Aberasyonlar

Kromatit tipi aberasyonlar genel olarak hücre döngüsünün G_2 fazında bir hücrenin ışınlanmasından sonra ortaya çıkarlar [30]. Kromatit tipi aberasyon görülmesi, bunların radyasyon ile indüklenmediği ancak DNA'da replikasyon gerçekleşirken oluşabilecek hatalardan kaynaklanan değişimler olabileceği varsayılabilir. Kromatit tipi aberasyon sıklığı bu şekilde düşünülebilir.

Kromatit tipi aberasyonlarda sınıflandırma yapılırken, doğru bir şekilde kaydedilerek ve kromozom tipi aberasyonlarla arasındaki farklar dikkate alınarak değerlendirme yapılmaktadır. Aberasyonların çoğunun ilk olarak *in vitro* koşullarda, metafaz evresinde analiz edilebileceği belirtilmektedir [29]. Kromatit tipi aberasyonlar genel olarak kromozom tipi aberasyonlar ile aynı şekilde sınıflandırılır. Bir kromatit tipi aberasyonda belirgin olan birim, çoğunlukla tek iplikli kromatittir ve kromozom tipi aberasyonlarda olduğu gibi tam bir kromozom değildir [29].

- Terminal ve ara delesyonlar:

Terminal bir delesyon, kromatit fragmanının gözle görülebilir bir şekilde yer değiştirmesidir. Bu tanım, terminal delesyonlar ile akromatik lezyonları birbirinden ayırt etmek için kullanılmaktadır.

Kromatit tipi intersisyel (ara) aberasyonlar, kromozom tipi aberasyonlar kadar kolay gözlenemezler. Bunun sebebi ise kısmen silinen küçük fragmentin kopan kromozomdan ayrılması ve gözlenememesidir [29].

- Akromatik lezyonlar:

Akromatik lezyonlar veya boşluklar, bir kromatitte ya da kardeş kromatitlerin ikisinde de özdeş bölgelerde yer alan, kromozomların bulunduğu bölgelerin boyanmadığı veya çok az boyanmış olan bölgeleridir. Boyanmamış olan bölgenin kapladığı alan, bir kromatitin bulunduğu alandan daha küçük ise akromatik lezyon olarak tanımlanır. Akromatik lezyonların kaydedilmesi tavsiye edilmektedir. Fakat her zaman kromatit delesyonlarından ayrı değerlendirilmelidir. Onların sıklığı olmamalıdır. Diğer gerçek aberasyon çeşitlerine göre önemi belirsiz olduğu için hücre başına toplam aberasyonlara dahil edilmiştir [29].

- İzokromatid delesyonlar:

İzokromatid delesyonları, kromatit tipi aberasyonlar sınıfında nadiren görülmektedir. Çünkü görünüşe göre her ikisi de aynı konumda “kırılmalar” ile her iki kromatiti de içerirler. İzokromatid delesyon görülme sıklığı lenfositlerde düşüktür. Lenfositlerde, G₀ evresinde radyasyona bağlı olarak gözlemlenen aberasyonlar kromozom tipi aberasyonlardır [29].

- İki kromozomun kromatitleri arasındaki asimetrik değişimler

- İki kromozomun kromatitleri arasındaki simetrik değişimler
- Kromatit içi simetrik ve asimetrik değişimler
- Triradialler (i kollu konfigürasyonlar)

2.3.10. Mikronükleus Testi

Mikronkleuslar (MN), hücre bölünmesi sırasında anafaz evresinde geride kalan kromozom fragmanlarından ya da tam bir kromozomdan kaynaklanabilen küçük ve ekstra nükleer olan birimlerdir [32]. Mikronkleuslar, hücre mitoz bölünme geçirdiği zaman grlmektedir. Esas çekirdeğe dahil değildir. Tam bir kromozomdan da köken alabilirler asentrik fragmanlardan da köken alabilirler. Mikronükleus sayısının artması, kromozom yapısı ve sayısında meydana gelen değişikliklerin göstergesi olarak kabul edilmektedir. Bu duruma mutajenik faktörlerin indirekt olarak sebep olduğu varsayılmaktadır [33]. Mikronükleus testinde, kromozomlardaki kırılmaların sebepleri arasında olan ultraviyole ışınlar, arsenik ve benzen gibi klastojenler pozitif sonuçlar vermiştir [34]. MN testi, insanda genotoksik maruziyeti değerlendiren, in vitro uygulanan testtir [32]. Kromozomlarda sayısal ya da yapısal değişikliğe neden olan bir ajan, hücre bölünmesinin G_0 veya G_1 fazında etkili olduğunda kromozom tipi aberasyonlara, S veya G_2 fazında etkili olursa kromatit tipi aberasyonlara yol açar. Kromozomlarda gözlenen kırıklar, G_1 fazında sadece bir kromatitte bir kırık oluşumuna neden olursa ve bu oluşum S fazı süresince devam ederse, metafaz evresinden sonra iki kromatitte de kırık meydana gelir. Ve kromozom tipi kırık olarak adlandırılır. Bu kırık yeniden birleşmez ise bir delesyona sahip olan kromozom ile bir tane asentrik fragment oluşur. Kromozomlardaki kırılmaların sonucunda meydana gelen asentrik fragmentler metafaz evresinde kaybolur veya anafaz evresinde mikronkleusları oluşturur [35, 36, 37, 38].

2.3.11. Kromozom Aberasyon Testi

Kromozom aberasyon analiz testi, absorbe edilen radyasyon dozunun belirlenmesinde kullanılan önemli doz değerlendirme teknikleri arasında yer almaktadır. 20.yüzyılın başlarından itibaren iyonize radyasyonun kromozomlar üzerinde hasar meydana getirdiği bilinmektedir.

X-ışınlarının kromozomların yapısında aberasyona sebep olduğu ilk olarak *Drosophila*'da gözlemlenmiştir. Radyasyon doz tespiti için, kromozom aberasyon kullanımı ilk olarak 1962 tarihinde gerçekleştirilmiştir [31].

Silahlı Kuvvetler Radyobioloji Araştırma Enstitüsü, hücrelerde fazlar arasında radyasyonun neden olduğu kromozomlardaki sapmaları ölçebilmek için alternatif yöntem geliştirmiştir. Bu yöntemde hücreler dinlenme halinde (G_0 fazında) iken insanlarda periferal kan lenfositlerindeki kromozomlarda erken yoğunlaşmayı önlemek için kimyasal ajanlar kullanılmıştır. DNA'da oluşan mutasyonlar, gen ekspresyonları ve radyasyona karşı duyarlı olan moleküler biyobelirteçleri tanımlayabilmek için bu yöntem kullanılmaktadır. Bu yöntemin kullanılmasının amacı ise radyasyona maruz kalma durumunda daha hızlı, pratik olan ve doğru sonuçların elde edilebileceği analiz sistemlerini oluşturabilmektir. Yeni yöntemler geliştirilmeye devam edilmesi Birleşik Devletler ordusunun bu konularda daha çabuk müdahale edebilmesini, tıbbi olarak yapılan hazırlıkların artmasını sağlayabilir [45].

2.3.12. Mikronükleus ile Kromozom Aberasyonlarının Karşılaştırılması

Mikronükleuslar, insanlarda *in vitro* koşullarda lenfositlerde kolsemid, x-ışınları gibi klastojenlerle indüklenmiş, stoplazması olan hücrelerde analiz edilen oluşumlardır [46]. Anöploidiye sebep olan etmenler, hücrede sentromer bölünmesi sırasında hatanın oluşması, iğ ipliklerinde fonksiyonel bozukluğun ortaya çıkması gibi durumlara da sebep olabilir. Bunun yanı sıra klastojenler ise kromozomların yapısında kırıklar meydana getirerek mikronükleusların oluşumuna katkı sağlamaktadır [47, 34].

Mikronükleus testi, bitki, hayvan ve insan hücrelerinde çeşitli kimyasal ajanlar, klastojenler ve radyasyon dozunu tayin etmek için kullanılmaya başlanan yöntemler arasında yer almaktadır [48, 49]. Kromozom aberasyon tekniği de mikronükleus test tekniği gibi iyonize radyasyonun sebep olduğu etkilerin araştırılmasında kullanılan sitogenetik yöntemler arasında yer almaktadır. Bu iki teknik de kromozomlardaki hasar tespitinde ve olası kanser vakalarının belirlenebilmesinde büyük bir öneme sahip olan biyobelirteç olarak adlandırılır [50, 51]. Kromozom tipi aberasyonlar hücre bölünmesinin G_0 fazında ya da G_1 evresinde görülmektedir. Bu oluşuma sebep olan faktör ise iyonize radyasyondur. Kromatit tipi aberasyonlar ise sentez fazında ya da G_2 evresinde görülmektedir. Bunların oluşumuna sebep olan etmenler ise daha çok kimyasal ajanlardır [45].

Kromozom aberasyon tekniğinde, metafazdaki hücrelerin kromozom sayılarının 46 ve üzerinde olup olmadığına dikkat edilmelidir. Kromozom kollarının birbirinden ayrılabilmesi için kromozomlar boyanırken iyi boyanmasına dikkat edilmelidir.

Kromozom sayımı yapılırken üst üste gelen kromozomların metafazları değerlendirilmeye alınmamalıdır. Bu teknik uygulanırken hücreler tek tek ele alınır. Ayrıca farklı tiplerde olan kromozomlardaki hasar analizinin doğru bir şekilde yapılması, skorlama yapılırken otomatik bir şekilde yapılması yerine aktif olarak skorlanması kromozom aberasyon tekniğinin avantajlarından biridir. Skorlamanın yapılabilmesi yeterli bilgi ve beceri gerektirmektedir. Kromozom aberasyon sayımının zor olması ve uzun sürmesi fazla sayıda hücrenin değerlendirilememesine sebep olur [42, 45].

Mikronukleus (MN) testi, insanların maruz kaldığı genotoksik etkileri inceleyen genotoksisite testi olarak adlandırılmaktadır. Mikronukleus (MN) skorlanması kromozom aberasyon skorlamasına kıyasla daha az zaman gerektiren oldukça kolay bir testtir [52].

Mikronukleus tekniğinde hücreler tek tek değerlendirilebilir. Nekroz ve apoptozun aynı anda çalışması mümkündür. Nükleoplazmik köprülerin teyit edilmesi gibi avantajlara sahiptir [42, 50]. Mikronukleus tekniği ile çift çekirdekli (binükleat) hücrelerde skorlama yapılırken farklı olan hücre tipleri uyum sağlamaktadır. Biyolojik yarı ömürlerinin uzun olması ve kolay elde edilebilmesi sebebiyle genelde lenfositlerin kullanımı yaygındır. Uygulanan kültürde lenfositlere 45. saatte sitokinezi durdurmak için yapısal bir protein olan aktin (mikrofilament) in oluşmasını engellemek amacıyla Sitokalsin-B (cyt-B) verilmektedir. Böylece karyokinezi (çekirdek bölünmesi) tamamlayan çift çekirdekli (binükleat) hücreleri tek çekirdekli (mononükleat) hücrelerden ayırt edebilmek mümkündür [53, 54]. Ancak kullanılan cyt-B'nin aynı zamanda zehir içeren kimyasal etkisinin olması ve her hücrede farklı etkiler gösterebilmesi bu tekniğin dezavantajı olarak belirtilmektedir [42, 50].

3. MALZEME VE YÖNTEM

Bu tez projesinde, TK6 lenfoblast hücrelerine 0 Gy, 1 Gy, 2 Gy, 3 Gy ve 4 Gy olmak üzere farklı dozlarda radyasyon uygulanmıştır ve kromozomlarda oluşan kalıcı olmayan aberasyonlar ile mikronükleuslara ait olan doz-cevap eğrileri oluşturulmuştur. Birbirinden farklı uygulama tekniğine sahip olan bu sitogenetik teknikler ile belirlenmiş doz-cevap eğrilerinden yararlanılarak, mikronükleuslara ait frekanslar ile kromozomlardaki kalıcı olmayan aberasyonlardaki frekanslar karşılaştırılmıştır. Bu frekanslar sonucunda mikronükleus (MN) oluşumu ile kromozom aberasyonları arasındaki ilişki benzerlik ve farklılık yönünden incelenmiştir.

Bu çalışma, insan kökenli hücre soyu olan TK6 lenfoblast hücreleri ile yapılmıştır. Farklı hücre kültür şişeleri içinde büyüyen hücrelerden biri kontrol olarak ayrılmıştır, diğerlerine 1 Gy, 2 Gy, 3 Gy ve 4 Gy radyasyon dozu *in vitro* olarak uygulanmıştır. Kontrol ve radyasyon uygulanmış hücreler içinde Fetal bovine serumu bulunan RPMI-1640 Hepes medyumuna içine ekilerek 37 derecede inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra kromozom aberasyon tekniği uygulanmış olan kültürlerle kolsemid ilave edilmiştir. Böylece hücre döngüsü metafaz evresinde durdurulmuştur. Mikronükleus (MN) tekniği uygulanmış olan kültürlerle ise sitokalsin-B ilave edilerek anafazda durdurulmuştur. Hücreler hipotonik (0,075M) KCI çözeltisi ile muamele edilmiştir.

Metanol / asetik asit karışımı ilave edilerek fiksasyonları sağlanan hücreler pipetaj yapılarak lamalar üzerine pastör pipetleriyle damlatılmıştır. Daha sonra % 5'lik Giemsa ile 5 dakika boyunca boya ile işlem gören preparatlar, kurutulup kapatıldıktan sonra ışık mikroskopunda incelenmiştir. İncelenen preparatlarda skorlanan mikronükleus (MN) frekansları ve kromozom aberasyonları frekanslarına ait doz-cevap eğrileri oluşturulmuştur. Elde edilen doz-cevap eğrilerinden yararlanarak, mikronükleus (MN) ve kromozomlarda kalıcı olmayan aberasyon oluşum frekansları karşılaştırılıp, radyasyona vermiş oldukları yanıtta benzerlikler ve farklılıklar yönünden incelenmiştir. Bu tez çalışmasında yapılan deney üç kez tekrar edilerek veriler analiz edilmiştir. Analiz edilen veriler Graphpad prism 8.0 programı kullanılarak doz-cevap eğrileri oluşturulmuştur.

3.1. HÜCRELERİN KÜLTÜRE ALINMASI

Deney grubunda kullanılan hücreler, TK6 lenfoblast hücreleridir. Bu hücreler, insan kökenli hücre soyu olup toksikoloji çalışmalarına uygun olduğu için kullanılmıştır. Deneyin gerçekleştirilme sürecinde bu hücrelerin *in vitro* koşullarda sürekliliğini sağlayabilmek için düzenli aralıklarla pasaj yapılmıştır. Deneyler tamamlanana kadar yapılan pasajlarda % 10 Fetal bovine serum ile RPMI-1640 HEPES medyumunu kullanılmıştır. Bu hücreler % 5 CO₂ bulunan 37 °C'lik etüvde korunmuştur.

Deney grubundaki hücreler ışılandıktan sonra, Morhead ve arkadaşlarının tekniği olan mikrokültür tekniğine uygun bir şekilde, laboratuvar koşullarımıza uyarlanarak kültüre alınmıştır [53, 55].

3.2. UYGULANAN MİKRONÜKLEUS TEKNİĞİ

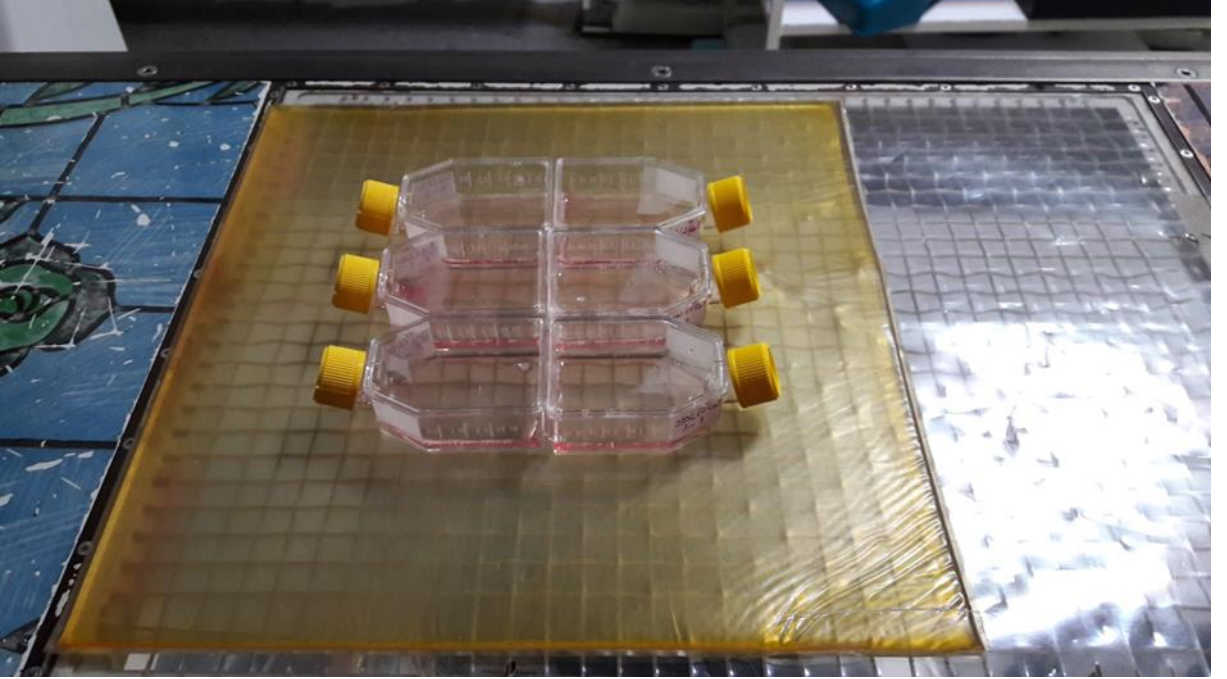
Kültür aşamasının MN kısmını oluşturan 0 Gy, 1 Gy, 2 Gy, 3 Gy, 4 Gy'lik flasklara ışınlamadan sonraki inkübasyonlarının 4. saatlerinin bitiminde, hücreleri sitokinezde durdurmak için 3 µg / ml Sitokalsin-B eklendi. Flasklar 44 saat daha 37 °C'de inkübasyona bırakıldıktan sonra kültürler cam tüplere aktarıldı. 48 saatlik kültür sürelerini tamamlayan hücreler 200 g'de 8 dakika santrifüj edilerek süpernatantlarından ayrılması sağlanmıştır. Tüplerde kalan peletlere 0,075 M soğuk KCl hipotonik şok çözeltisi uygulandıktan sonra vorteksenerek tekrar 200 g'de 8 dakika santrifüj edildi. Bu işlem üç kez tekrar edildi. Süpernatant atıldıktan sonra 7:1 oranında metanol / asetik asit ile hazırlanan soğuk fiksatif ile hücreler fikse edildi. Peletlere pipetaj yapılarak - 20 °C'de bekletilmiş olan lamaların üzerine pastör pipeti ile damlatıldı. Daha sonra preparatlar kurumaya bırakıldı. Kurutulan preparatlar % 5 'lik Giemsa ile yaklaşık olarak 5 dakika boyanarak Entellan yardımıyla lamel ile kapatıldı. Işık mikroskopunda sayılmak üzere kurumaya bırakıldı. Bu tez çalışmasının deney aşaması üç kez tekrar edilmiştir.

3.2.1. TK6 Lenfoblast Hücrelerine *In Vitro* Radyasyon Uygulaması

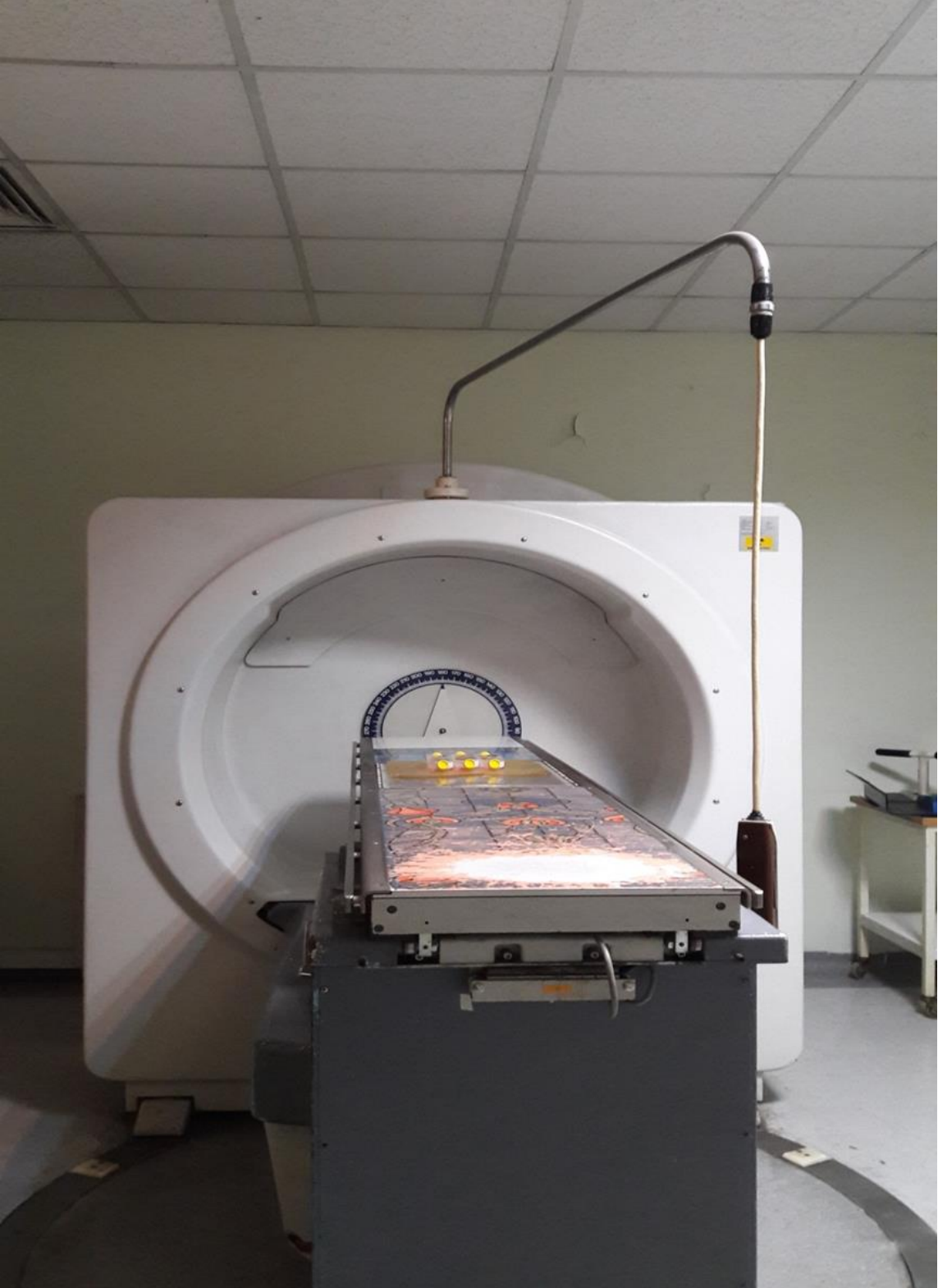
İstanbul Üniversitesi Çapa Onkoloji Enstitüsünde TK6 lenfoblast hücrelerine *in vitro* koşullarda radyasyon uygulaması gerçekleştirilmiştir. Co-60 teleterapi cihazı ile hücreler 0-4 Gy (1 Gy = 1,54 sn, 2 Gy = 3,08 sn, 3 Gy = 4,62 sn, 4 Gy = 6,16 sn) arasındaki radyasyon dozlarında ışınlanmıştır. Işınlama esnasında Co-60 cihazında bolus materyali kullanılmıştır.

Çünkü bu cihazdaki build-up bölgesi olarak adlandırılan, enerjinin absorbe edildiği yer ışınlama yüzeyinden 5 mm derinliktedir.

Işınlama alanı ile bu derinlik arasındaki mesafenin ortadan kaldırılması ve ışınlanan flasklarda oluşabilecek doz farklılıklarını engellemek için flasklar insan dokusu ile eşdeğer kabul edilen bolus materyali ile birlikte ışınlama yüzeyine yerleştirilmiştir.



Şekil 3.1: Bolus materyali üzerindeki flaskların gösterimi



Şekil 3.2: Co-60 teleterapi cihazı ile ışınlanan flasklar

3.3. UYGULANAN KROMOZOM ABERASYON TEKNİĞİ

İnsan kökenli hücre soyu olan TK6 lenfoblast hücrelerine uygulanan kültür aşamasında, 0 Gy, 1 Gy, 2 Gy, 3 Gy ve 4 Gy'lik flasklara ışınlamadan sonraki inkübasyonlarının 21. Saatlerinin bitiminde 0,5 µg / ml kolsemid eklenmiştir. 3 saat daha inkübasyona bırakılan flasklar 24 saatlerinin bitiminde tüplere aktararak kültürler 200 g'de 8 dakika santrifüj edilip süpernatantlar atılmıştır. Süpernatantlar atıldıktan sonra kromozomların belirgin hale gelebilmesi için peletlerin üzerine oda sıcaklığındaki 0,075 M KCl eklenerek pipetaj yapılmıştır. Süpernatant atıldıktan sonra 3:1 oranında metanol/asetik asit çözeltisi kullanılmıştır. Tekrar 200 g'de 8 dakika santrifüj edilmiştir. Üç kez tekrarlanan fiksasyon işlemi sonucunda bir miktar (0,25 ml) çökelti tüplerin içerisinde bırakılmıştır. Daha sonra vortekslenen hücrelerin tek hücre süspansiyonu haline gelmesi sağlanmıştır.

Hücrelerin patlayarak stoplazmalarının dağınık olabilmesi için, oluşturulan süspansiyon yaklaşık olarak 15 cm yükseklikten lamların üzerine damlatılmıştır. Preparatlar kurutulmuştur. Fosfat tamponu kullanılarak hazırlanan % 5'lik Giemsa boya çözeltisi kullanılmıştır. Kurutulan preparatlar boyanarak mikroskopta incelenmeye hazır hale getirilmiştir [29, 56, 57, 58]. Bu tez çalışmasının deney aşaması üç kez tekrar edilmiştir.

3.4. PREPARATLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ

Preparatların değerlendirilmesi NİKON E100 ışık mikroskobunda gerçekleştirilmiştir. Preparatların incelenmesi, mikronukleus ve kromozom aberasyonları açısından iki farklı şekilde yapılmıştır. İlk inceleme X400 büyütme ile yapılırken gözlemlenen mikronukleus ve kromozomların doğrulanması ise X1000 büyütmede gerçekleştirilmiştir.

Preparatlarda gözlemlenen binükleat hücreler, mikronukleus içerip içermemesine göre incelenerek mikronukleus frekansları hesaplanmıştır. Ayrıca 1'li, 2'li, 3'lü, 4'lü, 5'li çekirdekten oluşan hücreler belirlenerek, her doz için ayrı ayrı proliferatif indeksler (PI) hesaplanmıştır. Uygulanan farklı radyasyon dozları için oluşan mikronukleus frekansları karşılaştırılarak, proliferatif indeksler üzerinde değerlendirme yapılmıştır.

Preparatlar incelenirken, metafazdaki kromozomların belirgin olmasına ve birbirinden ayrılmış olmasına dikkat edilmiştir. TK6 hücrelerinin işlem görmeden önceki kromozom sayısının 47 olduğu göz önünde bulundurularak, metafazdaki kromozom sayıları 47 ve üzerinde olanlar

dikkate alınarak sayım yapılmıştır. Sayım yapılırken, disentrik bulunan bir metafazda asentrik fragmentin bulunup bulunmadığına dikkat edilmiştir. Metafazda yalnızca bir tane asentrik fragment (disentriğe eşlik eden) varsa kromozom sayısının 47 olması gerektiği, metafazda sentrik halka gözlemlenmesi durumunda ise bu sentrik halka'ya bir tane asentrik fragmentin eşlik ederek kromozom sayısının 48 olması gerekliliği gibi bilgiler dikkate alınarak sayım değerlendirilmesi yapılmıştır [29].

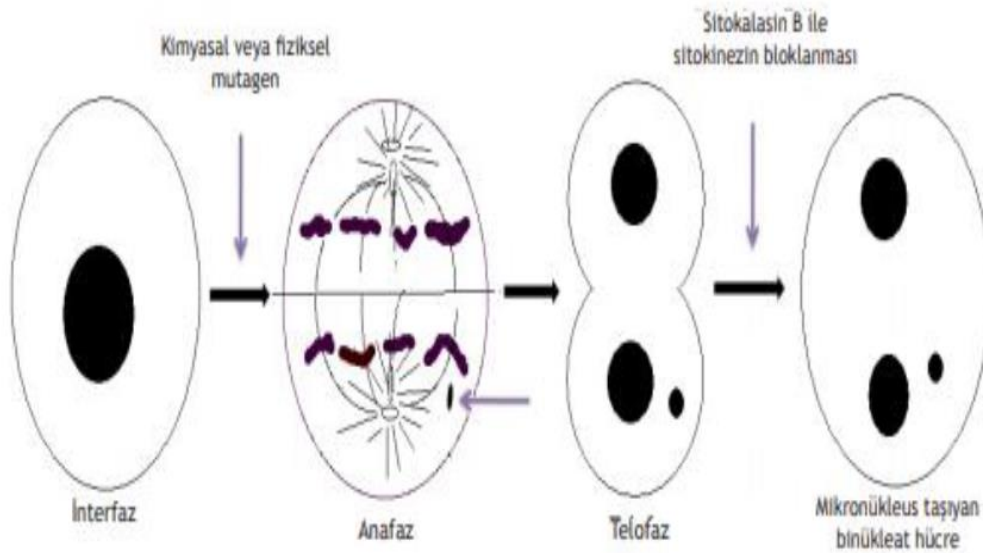
3.5. İSTATİSTİKSEL YÖNTEMLER

İnsan kökenli hücre soyu olan TK6 lenfoblast hücrelerinde farklı dozlarda uygulanan radyasyon sonucu meydana gelen mikronukleus ve kromozom aberasyonları ile kontrol grubundaki mikronukleuslar ve kromozom aberasyonları F testi kullanılarak karşılaştırılmıştır. Farklı radyasyon dozları ile değişen Pİ değerleri araştırılmıştır.

4. BULGULAR

4.1.MİKRONUKLEUS OLUŞUMLARI

İlk olarak eritrositlerde gözlenen mikronukleus oluşumunu Howell ve arkadaşları gözlemlemiştir. Tanımlanması Jolly tarafından gerçekleştirildiği için Howell-Jolly cisimciği olarak da adlandırılmaktadır. Mikronukleus (MN), bir hücrede yarı akışkan sıvı olan sitoplazmanın içerisindeki esas nukleusun yanında bulunan oluşumlardır [39]. Bütün bir kromozomlardan oluşturulan mikronukleuslar daha ilgi çekicidir. Çünkü hem kanser hem de kanser olmayan hücrelerde geç kalan kromozomlar gözlenir ve kanser hücrelerinde önemli bir kromozomal kararsızlık kaynağı (CIN) olarak kabul edilir [40].



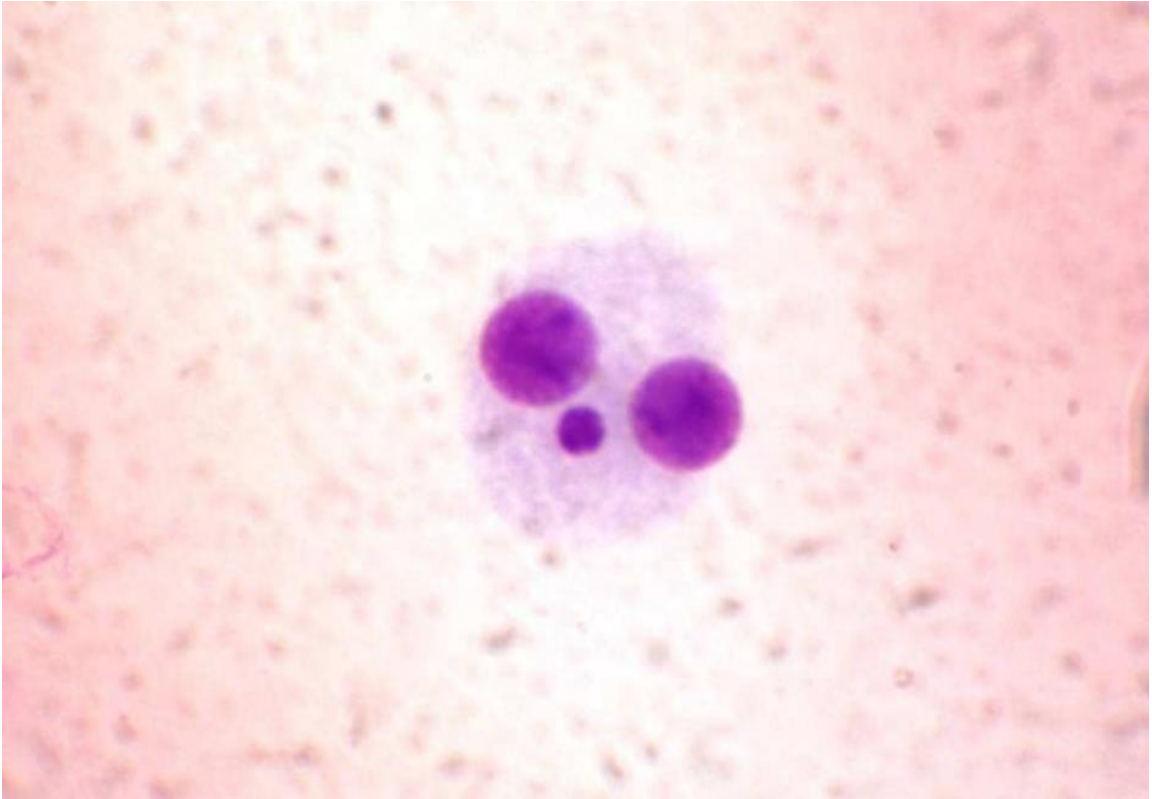
Şekil 4.1: Mikronukleus oluşumu [Fenech, 2003].

Mikronukleus (MN) oluşmasının asıl sebebi DNA’da meydana gelen hasarlardır. Mutajen, karsinojen gibi çeşitli ajanların organizmayı etkilemesi DNA’da genetik olarak hasar oluşturmaktadır. Bu ve buna benzer hasar tespitinde mikronukleus (MN) testinin önemli olduğu anlaşılmıştır [41]. Kromozom düzeyinde DNA hasarının incelenmesi genetik toksikolojinin önemli bir parçasıdır. Çünkü kromozomal mutasyon karsinogenezde önemli bir olaydır [42]. Mikronukleus (MN) analizleri, kromozomlardaki hasarı doğru belirleyebilmek için kullanılan

yöntemler arasında yer almaktadır. Çünkü hem kromozomlarda meydana gelen kayıpların hem de kromozomlardaki kırılmanın daha güvenilir bir şekilde ölçülmesini sağlamaktadır.

Mikronukleus (MN) tekniği DNA hasarının tespit edilmesinde ekonomik açıdan en uygun olan ve kolay teknikler arasında yer almıştır [39, 41, 42, 43, 44].

Deneylerde gözlemlenen binükeat hücrelerdeki mikronukleus oluşumları şekil 4.2'deki gibidir.



Şekil 4.2: Binükeat hücrelerdeki mikronukleus görünümü

4.1.1. Mikronukleus Oluşum Frekansları

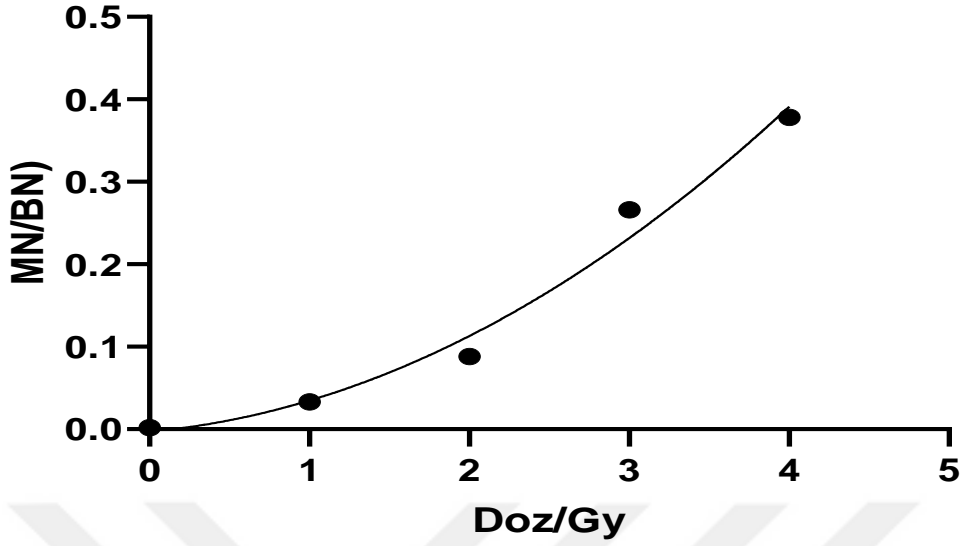
Tablo 4.1: Binükleat hücrelerdeki MN ve çoklu nukleus oluşumları

No	Gy doz	BN hücre	MN	MN/BN	Çoklu nukleuslar					Pİ
					M1	M2	M3	M4	M5	
1	0	1028	2	0,0019	1420	227	107	57	9	1,31
2	1	1019	34	0,0033	1055	103	81	46	6	1,62
3	2	1007	89	0,0883	701	74	63	42	5	1,71
4	3	1003	267	0,2662	589	56	44	33	7	1,72
5	4	1000	378	0,3780	432	35	39	39	27	1,77

BN; binükleat hücre, MN; mikronukleus, M1; 1 nukleuslu hücre, M2; 2 nukleuslu hücre, M3; 3 nukleuslu hücre, M4; 4 nukleuslu hücre, M5; 5 nukleuslu hücre, Pİ; proliferatif indeks, N; toplam hücre sayısı.

$$P\dot{I} = (M1 + 2M2 + 3 M3 + 4 M4 + 5M5) / N \quad (4.1)$$

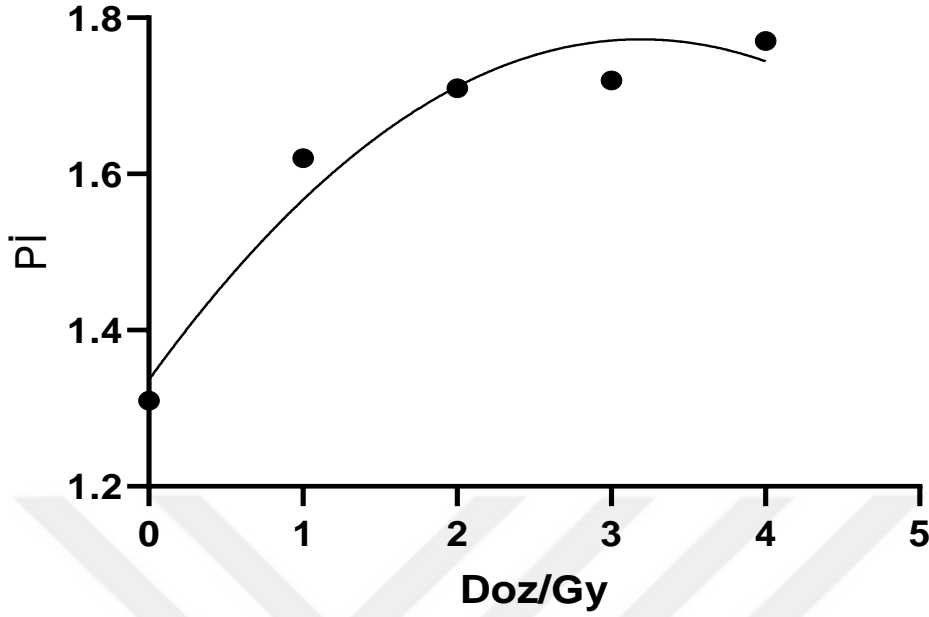
Tablo 4.1’de İnsan kökenli hücre soyu olan TK6 lenfoblast hücrelerindeki mikronukleus sıklıkları ve hücrelerin proliferatif indeksleri gösterilmiştir. Mikronukleus sıklıkları 0-4 Gy arasında radyasyon uygulanması ile elde edilmiştir. Ayrıca 1’li, 2’li, 3’lü, 4’lü, 5’li çekirdekten oluşan hücreler belirlenerek Pİ değerleri yukarıda verilen denklem (4.1) ile hesaplanmıştır [75]. Bu tez çalışmasında mikronukleus sayımı yapılırken her bir doz için en az 1000 binükleat hücre hedefi üzerinden değerlendirme esas alınarak sayım yapılmıştır.



Şekil 4.3: Radyasyon dozu ile MN / BN arasındaki ilişki

Farklı dozlarda radyasyon uygulanan TK6 lenfoblast hücrelerinin radyasyona karşı vermiş oldukları yanıt şekil 4.3'deki gibidir. Grafiklerdeki mikronukles (MN) ile radyasyon dozuna ait sayısal verilerin karşılaştırılması Graphpad Prism 8.0 programı kullanılarak çizilmiştir. Grafikler, regresyon analizinin lineer olmayan (Non-lineer) özelliği kullanılarak ikinci dereceden polinom olarak çizilmiştir. Elde edilen verilerin karşılaştırılması F-testi ile yapılmıştır.

Hücrelere uygulanan radyasyon dozu ile MN/BN oranının kuadratik olarak artış gösterdiği, doz arttıkça MN sayısının arttığı gözlemlenmiştir. Radyasyonun dozla etkisinin arttığı mikronukleus sayısına bakılarak (Tablo 4.1'de) gözlemlenebilir.



Şekil 4.4: Radyasyon dozu ile proliferatif indeks arasındaki ilişki

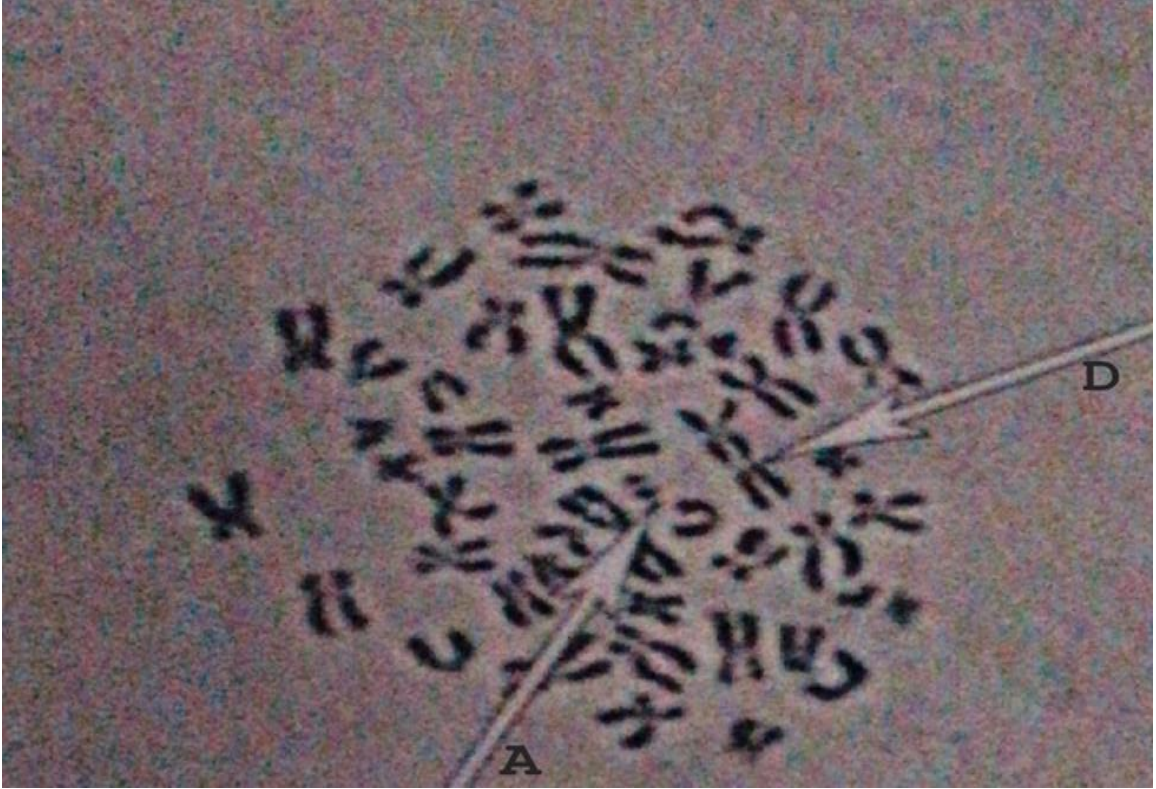
TK6 lenfoblast hücrelerine verilen ışınlamada elde edilen proliferatif indeks verileri Tablo 4.1’de gösterilmiştir. Bu veriler de ikinci dereceden polinom ile çizilmiştir. Radyasyon dozunun artması ile birlikte proliferatif indeks oranında artış olduğu görülmüştür.

Proliferatif indeksin artması hücrelerin hızlı bir şekilde bölündüğünü ifade etmektedir. Ancak 4 Gy ve daha fazla dozlarda ise proliferatif indeksin düşme eğiliminde olduğu gözlemlenmektedir. Deneyde gözlemlediğimiz sonuçlar, doz arttıkça hücrelerin hasara uğraması, hücre sayısında azalmanın da artış gösterdiği yönündedir.

4.2. KROMOZOM ABERASYONLARI

Kromozom tipi aberasyonlar mitotik siklustaki hücrelerin sentez fazından önce mitojenik bir ajanla müdahale edilmesi ile meydana gelen aberasyon çeşididir. Kromatit tipi aberasyon ise DNA sentezini tamamlamış hücrelerde oluşan kromozomal değişikliklerdir.

Deneylede gözlenen disentrik oluşumu şekil 4.5'deki gibidir.



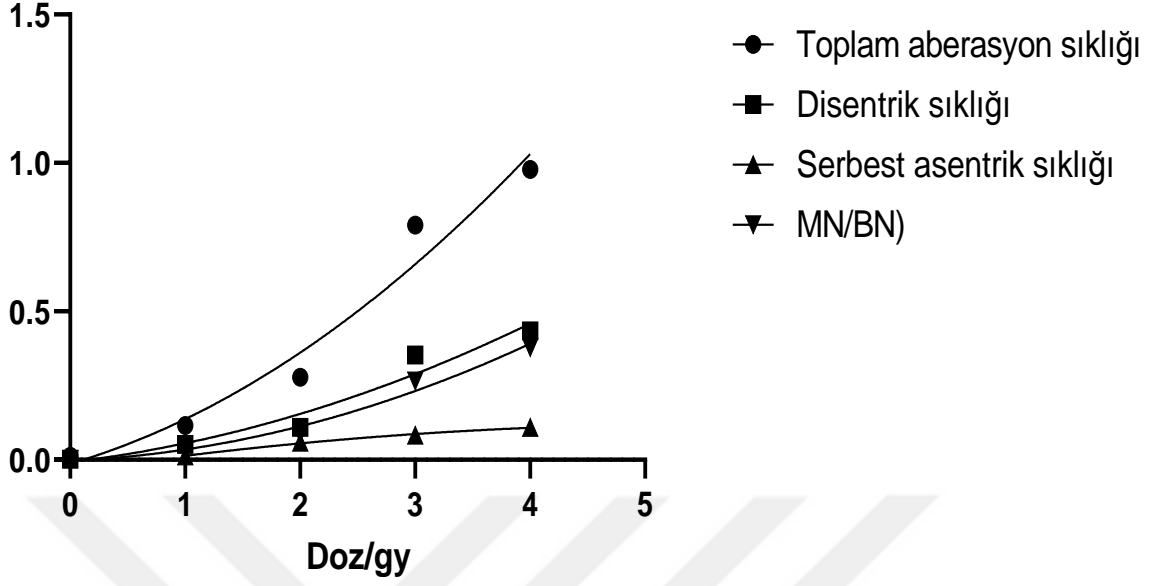
Şekil 4.5: Asentrik fragmentler ve Disentrik kromozom görünümü [77].

A: Asentrik fragment, D: Disentrik kromozom

Tablo 4.2: TK6 Lenfoblast hücrelerinde kontrol ve deney grubundaki kromozom aberasyon frekansları

No	Radyasyon dozu (Gy)	Metafaz Sayısı	Disentrik Sayısı	Serbest Asentrik Sayısı	Toplam Aberasyon Sayısı	Disentrik Sıklığı	Serbest asentrik sıklığı	Toplam Aberasyon Sıklığı
1	0	963	2	7	11	0,0020	0,0072	0,0114
2	1	874	45	11	101	0,0514	0,0125	0,1155
3	2	712	78	42	198	0,1095	0,0589	0,2780
4	3	611	216	51	483	0,3535	0,0834	0,7905
5	4	578	251	63	565	0,4342	0,1089	0,9775

Farklı dozlarda radyasyona maruz bırakılan TK6 lenfoblast hücrelerine ait kromozom aberasyon frekansları Tablo 4.2’de gösterilmiştir. Tabloda, metafazdaki skorlanan disentrikler ve bunlara eşlik eden serbest asentrikler bulunmaktadır. Tabloda yer alan toplam aberasyon sayısı, toplam asentrik sayısı ve disentrik sayısının toplamını ifade etmektedir. Toplam asentrik sayısı, serbest asentrik sayısı ve disentrik sayısının toplamına eşittir.



Şekil 4.6: Farklı radyasyon dozları uygulanan hücrelerdeki mikronukleus oluşumu ile aberasyon sıklıklarının karşılaştırılması

0 Gy ile 4 Gy arasında radyasyona maruz bırakılan hücre kültürlerindeki mikronukleus oluşumları ile aberasyon sıklıklarının karşılaştırılması şekil 4.6'da gösterilmiştir. Çizilen grafikteki deney sonuçlarına ait olan verilerin değerlendirilmesi için Graphpad Prism 8.0 programı kullanılmıştır. Eğriler, lineer olmayan (Non-linear) ikinci dereceden polinom ile çizilmiştir.

In vitro koşullar altında Co-60 teleterapi cihazı ile farklı dozlarda radyasyon verilen hücrelerdeki değişime bakıldığı zaman mikronukleus oluşumu ile aberasyon sıklıkları arasında gözle görülebilir derecede bir fark vardır. Disentrik kromozomların hücrelerdeki dağılımına bakıldığında radyasyon dozunun artışı ile birlikte disentrik sayısının arttığı tablo 4.2'de görülmektedir.

Grafikteki aberasyon ve MN oluşumları kıyaslandığı zaman eğimi en yüksek olan aberasyon sıklığı toplam aberasyonlara aittir. Disentrik eğrisi ikinci sırada yer almaktadır. Radyasyon dozu arttıkça daha az metafaz gözlemlenmiştir. Dozdaki artışlar ışınlanan hücrelerde daha yüksek disentrik frekanslarına neden olmuştur [65]. Grafikte disentrik artışını mikronukleus oluşumu izlemektedir. Radyasyonun artmasıyla birlikte asentrik sayısı da artmıştır (Tablo 4.2).

Bu sonuçlar literatürle desteklenmiş bulunmaktadır. Disentrikler radyasyon için belirteçtir ancak MN oluşumu için kesinlik söz konusu değildir.

Doz arttıkça disentrik, MN ve asentrik frekanslarında artış gözlemlenmesine rağmen asentrikler, diğer klastojenik ajanlara maruz kalmanın bir sonucu olarak da ortaya çıkabildiklerinden dolayı sadece radyasyona özgü olarak değerlendirilemezler. Bu nedenden dolayı bu tür sapmalar radyasyon doz tayinlerinde kullanılmamıştır [64, 65].

İstatistiksel hesaplamalar F testi uygulaması ile yapılarak F ve p değerlerine ulaşılmıştır. Elde edilen verilere göre değerlendirme yapıldığında toplam aberasyon sıklıkları ile mikronukleus oluşumları arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,05$) olduğu gözlemlenmiştir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Radyasyon, ışıma özelliğine sahip olan bir kaynağın başka bir doku veya ortama sahip olduğu enerjisinin yayılım göstererek absorbe edilmesi olarak tanımlanmaktadır [59, 60]. Radyasyonun yoğunluğunun dokularda yayılım gösterdikçe sürekli azalmasının sebebi, dokuların tipi ve kalınlığıdır [61]. Radyasyon, DNA'nın sahip olduğu çift zincirdeki kromatit-kol kopmalarını indükler. Bu kopmalar ışınlama sonrası ilk mitozda görülen kromozomal aberasyonlar, kırılma ve translokasyonlara sebep olur. Bu nedenlerden dolayı ışınlama sonucu oluşan kromozomal aberasyonlarda genellikle doğrusal olan kuadratik doz ilişkisi görülecektir [30].

Kromozom aberasyonları (CA), kardeş olan kromatitlerdeki değişimler (SCE), mikronukleus (MN) ler, periferel kan lenfositlerinde oluşan genotoksisiteyi incelemek için yıllardır kullanılan sitogenetik olan biyobelirteçlerdir. Bu uygulamanın gerçekleştirilmesinin temelinde ise sitogenetik hasarın giderek artmasının olası kanser riskini artırabileceği düşüncesi yer almaktadır. İtalyan ve İskandinav toplulukları kurularak bu hipotezi değerlendirme çalışmaları yapılmıştır. Ve yapılan analizler sonucunda kromozom aberasyon sıklığı ile kanser riskinde artış olduğu gözlemlenmiştir [62]. İskandinav çalışmasında kromozom aberasyonlarındaki sıklığın yüksek oluşu tüm kanser türlerinde insidans oranlarının yüksek olduğu, orta ve düşük kromozom aberasyon frekanslarında ise yüksek olmadığı bulgularla kanıtlanmıştır [62]. İtalyan çalışmasında da kromozom aberasyon (CA) sıklığı yüksek olanlarda yüksek kanser insidans oranları (SMR) görülürken orta ya da düşük frekanslarda ise gözle görülür bir fark ortaya çıkmamıştır [62].

Boveri ve diğ.tarafından yapılan çalışmalarda 20.yüzyılın başından itibaren kromozomlardaki hasar ile kanser arasındaki ilişkinin varlığından söz edilmiştir. Ancak yalnızca 1960 tarihinden itibaren bilinen ya da şüpheli olarak genotoksik kanserojenlere maruz kalmış insanların periferel kan lenfositleri (PBL)'lerinde kromozom aberasyonları (CA) nın sıklıkları hakkında geniş ölçüde veriler elde edilmiştir [63].

Biyolojik dozimetride aberasyon testinin uygulanmasının önemli katkıları olmuştur. Günlük hayatta ya da mesleki açıdan aşırı derecede radyasyona maruz kalan bireylerde teşhis ve prognozunda önemli role sahiptir [66].

Kararsız kromozomal sıklıkları bireyler tarafından alınan radyasyon doz tayininde kullanılmaktadır [29, 67]. Kararsız kromozomal sıklıklarının ölçüldüğü disentrik testi, biyolojik dozimetrisinin doz tahminleri arasında en genel olarak kabul edilen yöntem haline gelmiştir [68]. Bu test tekniğinde radyasyonun kalitesi ve doz oranının etkileri iyi bir şekilde karakterize edilmektedir [69].

Yayınlanan raporlara göre, birkaç laboratuvarında Gy başına ölçülmüş olan disentrik frekanslarında farklılıklar görülmektedir [70]. Kalibrasyon eğrisi kullanılarak değerlendirilen dozlar başka bir laboratuvarında önemli bir belirsizlik gösterebilir. Bu ihtimaller göz önüne alınmalıdır. Her laboratuvarın disentrik indüksiyonu için kendi doz-cevap eğrilerini oluşturması tavsiye edilmektedir [67].

Mikronukleus tekniği, iyonize radyasyona maruz kalma durumunda biyolojik dozimetride kullanılan bir yöntem olarak savunulmuştur [71]. Mikronukleus (MN) testi, popülasyonlardaki genetik hasarın izlenebilmesi, olası genotoksik maruziyet için kimyasal ajanların taranması ve tümörlerin radyo-duyarlılıklarının değerlendirilmesi gibi amaçlar için farklı hücre tiplerine uygulanabilmektedir. *In vitro* sitokinez blok mikronukleus (CBMN) testi, mevcut yöntemiyle basit olan morfolojik kriterleri kullanarak kromozomlardaki kayıplar, nükleoplazmik köprüler, nekroz ve apoptoz gibi toksisite ölçümlerini sağlayabilmektedir [42].

Yöntemin dezavantajı ise analiz için tercih edilen hücrelerin, hücre siklusunun geçmişine ait belirsizliğin söz konusu olmasıdır. Bu belirsizliğin giderilebilmesi için ilk olarak Pincu ve arkadaşları tarafından Giemsa boyama yöntemi ile bromodeoksiüridin kullanılmıştır [72].

Son zamanlarda da kullanılan Stokalasin-B'nin kullanıldığı sitokinez blok MN yöntemi geliştirilmiş bir şekilde kullanılmaya başlanmıştır [73]. Sitokinez ile blok tekniğinde MN testinin uygun olup olmadığını değerlendirmek için incelemeler yapılmıştır.

Literatürdeki verilerin sonucu mikronukleusların konvansiyonel kromozom verimiyle karşılaştırıldığında MN veriminin daha yüksek olduğu bilgisini sunmuştur.

Daha yüksek dozlarda istatistiksel olarak analiz yapılabilmesi için hücrelerin daha fazla sayıda olması doz değerlendirmeleri açısından daha anlamlı sonuçlara ulaşılmasını sağlar. Genel olarak aberasyon mikronukleus frekans karşılaştırılmasında, mikronukleusların doğrusal bir katsayı gösterdiği belirtilmiştir [74].

Radyasyonun vermiş olduğu hasarlar kantitatif olarak değerlendirildiğinde, mikronukleus tekniğinde hücrelerin skorlanması daha kısa sürede ve daha kolay gerçekleştiği gözlemlenmiştir. Bu tez çalışmasında, hücrelere uygulanan radyasyon dozunun vermiş olduğu hasar tespitinde *in vitro* koşullarda iki teknik ile çalışma yapılmıştır. Mikronukleus tekniği ile radyasyon hasarını daha iyi ölçen yöntemlerden biri olan aberasyon tekniğidir. Bu iki tekniğin uygulanması sonucu frekanslar arasındaki benzerlik ve farklılık incelenmiştir. Radyasyon dozu arttıkça hücrelerde meydana gelen aberasyon ve MN sayısında artış gözlemlenmiştir.

Sonuç olarak bu tez projesinde, TK6 lenfoblast hücrelerine farklı dozlarda uygulanan radyasyon sonucu kromozom aberasyon tekniği sayesinde disentrik, asentrik fragmentlerin frekansları belirlenmiştir. Mikronukleus tekniği ile de MN oluşum frekansları belirlenerek doz-cevap eğrileri oluşturulmuştur. Düşük radyasyon dozlarında lineer bir ilişki gözlemlenirken yüksek radyasyon dozlarında kuadratik bir ilişki gözlemlenmiştir. Çizilen grafikte (şekil 4.6) disentrikler ile mikronukleuslar arasında anlamlı bir fark olmadığı ($p=0,7$) için MN testi biyolojik dozimetride radyasyon belirteci olarak kullanılabilir, fakat serbest asentrikler ile mikronukleuslar arasında yüksek düzeyde anlamlı fark olduğu ($p<0,01$) gösterilmiştir. Hücrelere ait olan kromozom aberasyonları ile mikronukleus frekansları birlikte değerlendirildiğinde ise anlamlı bir farklılığın ($p<0,05$) olduğu gözlemlenmiştir.

KAYNAKLAR

- [1]. Radiation Educator Guide https://www.nasa.gov/pdf/284277main_Radiation_MS.pdf [Ziyaret saati : 2 Temmuz].
- [2]. Aslan, N., 2017, Derleme, The Effects of Radiation on Biological Systems,
- [3]. www.Bilgiustam.com, [Ziyaret Tarihi: 23 Haziran 2019].
- [4]. Radiation: Effect and Sources, United Nations, UNEP, 2006, Austria.
- [5]. www.Afad.gov.tr, [Ziyaret Tarihi: 23 Haziran 2019].
- [6]. Daşdağ, S., 2010, İyonlaştırıcı radyasyonlar ve kanser. *Dicle Tıp Dergisi*, 37 (2), 177-185.
- [7]. Erdoğan, S., 2006, İyonlaştırıcı radyasyon insan sağlığına yararlı mı ? *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 26: (555-558).
- [8]. Kano, Y., 1966, The fluctuation formula for the photon number in stationary electromagnetic fields. *Il Nuovo Cimento B*, (1965-1970) 43 (1), 1–5.
- [9]. Yaren, H., Karayılanoğlu, T., Radyasyon ve İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri, TSK Koruyucu Hekimlik Bülteni, 4.
- [10]. www.who.int/topics/radiation_ionizing [Ziyaret saati: 23 Haziran 2019].
- [11]. Abdurrahman, K.,2002, İyonize radyasyonun biyolojik etkileri, *Dicle Tıp Dergisi*, C:29, S:3.
- [12]. Kostylev, V.A., 2000, Medical physics: yesterday, today, and tomorrow. *Biomedical Engineering*, 34 (2), 106–112.
- [13]. Beyzadeoğlu, M, Ozyiğit, G, Ebruli, C., 2010, *Basic radiation oncology book*.
- [14]. Radiation Emergency Assistance Center, 2017, The medical aspects of radiation incidents, 4th Edition.
- [15]. On Dokuz Mayıs Üniversitesi, 2013, Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi, *Radyasyon Güvenliği El Kitabı*, 39.
- [16]. International Atomic Energy Agency, 2010, Radiation Biology: A Handbook For Teacher And Students, Vienna.
- [17]. Hoeijmakers J.H., 2009, DNA damage, aging, and cancer. *New England Journal Medicine*, 361 (19), 1914.
- [18]. De Bont R, Van Larebeke N., 2004, DNA Damage in Humans: A review of Quantitative Data, 19 (3), 169-85.

- [19]. Iyama T, Wilson D.M., 2013, DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. *DNA Repair*, 12 (8), 620-36.
- [20] Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Unsal-Kaçmaz K, Linn S., 2004, Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annual Review Biochemistry*, 73, 39-85.
- [21]. Beranek D.T., 1990, Distribution of Methly and Ethly Adducts Following Alkylation with Monofunctional Alkylating Agents, 231 (1), 11-30.
- [22]. Slupphaug G, Kavli B, Krokan H.E., 2003, The İnteracting Pathways And Repair of Oxidative DNA damage, 531 (1-2), 231-51.
- [23]. Morita R, Nakane S, Shimada A, Inoue M, Lino H, Wakamatsu T, Fukui K, Nakaqawa N, Masui R, Kuramitsu S., 2010, Molecular mechanisms of the whole DNA repair system: a comparison of bacterial and eukaryotic systems.
- [24]. Bütüner, D. Kantarcı G, 2006, Mutasyon, DNA Hasarı, Onarım Mekanizmaları ve Kanserle İlişkisi, *Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 35 (2), 149-170.
- [25]. Karkucak, M., 2016, *Androloji bülteni*, 18 (64), 33-39.
- [26]. www.canlibilimi.com [Ziyaret Tarihi: 26 Haziran 2019].
- [27]. www.açıkders.Ankara.edu.tr [Ziyaret Tarihi: 26 Haziran 2019].
- [28]. Peri B, 2017, *Biyoloji Konu Anlatımlı A*, Palme yayıncılık, Ankara, 224.
- [29]. International Atomic Energy Agency, 1986, *Biological Dosimetry: Chromosomal, Aberations Analysis for Dose Assessment*, Vienna.
- [30]. Chadwick, K.H., Leenhouts, H.P., 1981, *The Molecular Theory of Radiation Biology*, New York.
- [31]. Coşkun, M. Coşkun, M., 2003, Biyolojik Dozimetri ile İlgili Gelişmeler, *Cerrahpaşa Journal Medical*, 34, 207-218.
- [32]. Üstüner, D., 2011, Kromozom Kırıkları ve Mikronukleus-Apoptoz Bağlantısı, *Tubav Bilim Dergisi*, Cilt:4 (1), 64-69.
- [33]. Demirel, S., Zamani A., 2002, MN Tekniği ve Kullanım Alanları, *Genel Tıp Dergisi*, 12 (3), 123-127.
- [34]. Vanparys P, Vermeiren F, Sysmans M, Temmeman R., 1990, The micronucleus assay as a test fort he detection of aneugenic activity, 244 (2), 95-103.
- [35]. Rooney, D.E., Czepulkowski, B.H., 1992, ‘‘Human Cytogenetics’’, Second Edition, Oxford University Press.
- [36]. Gardner, R. J. M. K., Sutherland, G. R., 1996, ‘‘Chromosome Abnormalities and Genetic Courseling’’, Oxford University Press.

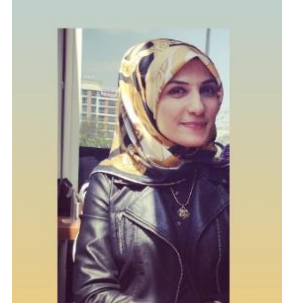
- [37]. Başaran, N., 1999, "Tıbbi Genetik", 7. Baskı, Güneş ve Nobel Tıp Kitabevi.
- [38]. Conner, J.M., Smith, F. M.A., 1993, "Essential Medical Genetics", Blackwell Scientific Publications, *Fourth ed.*
- [39]. Fenech, M., Crott, W.J., 2002, "Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes-evidence for breakage-fusion-bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay", *Mutation Research*, 504, 131-136.
- [40]. He B, Gnawali N, Hinman AW, Mattingly AJ, Osimani A, Cimini D, Chromosomes missegregated into micronuclei contribute to chromosomal instability by missegregating at the next division, 2019; 10 (28), 2660-2674.
- [41]. Fenech, M., 2010, "The lymphocyte cytokinesis-block micronucleus cytome assay and its application in radiation biodosimetry", *Health Phys*, 98 (2), 234-243.
- [42]. Fenech, M., 2000, "The in vitro micronucleus technique", 455 (1-2), 81-95.
- [43]. Thomas, P., Holland, N., Bolognesi, C., Kirsch-Volders, M., Bonassi, S., Zeiger, E K., Fenech, M., 2009, "Buccal micronucleus cytome assay", *Nature Protocols*, 4 (6), 825-837.
- [44]. Wu, J., Lyons, G.H., Graham, R.D., Fenech, M., 2009, "The effect of selenium, as selenomethionine, on genome stability and cytotoxicity in human lymphocytes measured using the cytokinesis-block micronucleus cytome assay", *Mutation Research*, 24 (3), 225-232.
- [45]. Blakely W.F., Prasanna P.G., Grace M.B., Miller A.C., 2001, "Radiation exposure assesment using cytological and molecular biomarkers", *Radiation Protection Dosimetry*, 97 (1), 17-23.
- [46]. Högstedt, B, Karlsson A., 1985, "The size of micronuclei in human lymphocytes varies according to inducing agent used", *Mutation Research*, 156 (3), 229-32.
- [47]. Zijno A, Marcon F, Leopardi P, Salvatore G, Carere A, Crebelli R., 1994, An assessment of the in vivo clastogenicity of erythrosine. *Food Chem Toxicol*, 32 (2), 159-63.
- [48]. Vanparys, P, Vermeiren F, Sysmans M, Temmerman R., 1990, The micronucleus assay as a test for the detection of aneuploid activity. *Mutation Research*, 244, 95-103.
- [49]. Widel M, Kolosza Z, Jedrus S, Lukaszczyk B, Raczek- Zwierzycka K, Swierniak A., 2001, Micronucleus assay in vivo provides significant prognostic information in human cervical carcinoma: The updated analysis. *International Journal of Radiation Biology*, 77, 631-6.
- [50]. Fenech, M., 2002, "Biomarkers of genetic damage for cancer epidemiology", *Toxicology*, (181-182), 411-6.
- [51]. Fenech, M., 2002, "Chromosomal Biomarkers of Genomic Instability Relevant to Cancer".

- [52]. Norppa, H., Ghita, C., Falck, M., 2003, What do human micronuclei contain ? UK Environmental Mutagen Society, 18 (3), 221-233.
- [53]. Orta, T., Günebakan, S., Coşkun, M., Bilge., H., 2001, Dose Response of Micronuclei in Human Lymphocytes with Co-60 Gamma or X-Rays, The scientific and Pedagogical News of Oldlar Yurdu Universty 6, 134-142.
- [54]. Kirsch-Volders, M., Fenech, M., 2001, Inclusion of Micronuclei in Non-Divided Mononuclear Lymphocytes and Necrosis / Apoptosis may Provide a More Comprehensive Cytokinesis-Block Micronucleus Assay for Biomonitoring Purposes, *Mutagenesis*, 16 (1), 51-58.
- [55]. Moorhead, P.S., 1960, Nowell, P.C., Mellnan, W.J., Chromosome Preparation of Leukocytes Cultured from Human Peripheral Blood, *Experimental Cell Research*, 20, 613-618.
- [56]. Bauchinger, M., 1995, Quantification of Low-Level Radiation Exposure by Conventional Chromosome Aberration Analysis, *Mutation Research.*, 339, 177-89.
- [57]. Lloyd, D.C., 1984, Biological Dosimetry in Radiological Protection: Recent Developments, *Journal of the Society for Radiological Protection*, 4, 216-230.
- [58]. Coşkun, M., Top, A., Orta, T., 2000, Biological Dosimetry Following X-ray Irradiation, *Turkish Journal of Medical Sciences*, 30, 563-569.
- [59]. Magill J, Galy J., 2005, Radioactivity, radionuclides, radiation. Springer, Heidelberg, pp 117–123.
- [60]. Goitein, M., 2008, Radiation oncology: a physicist's-eye view. Springer, New York, pp 5–6.
- [61]. Gökharman, F.D., Aydın, S., Koşar, P.N., 2016, Radyasyon güvenliğinde mesleki olarak bilmemiz gerekenler, *SDÜ, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, Cilt 7, Sayı:2.
- [62]. Bonassia, S., Znaorb, A., Norppac, H., Hagmar, L., 2004, Chromosomal Aberrations and Risk of Cancer in Humans: an Epidemiologic Perspective, *American Journal Experts*, 104, 376-380.
- [63]. Boveri, S., 1914, Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren.
- [64]. Zoetelief J. and Broerse J.J., 1990, Dosimetry for radiation accidents: present status and prospects for biological doseimeters. *International Journal of Radiation Biology*, 57, 737-50.
- [65]. S.A.Haeri, H. Mozdarani, M. Foroghizadeh, A. Mahmoudzadeh, 2004, Determination of dose-response relationship in cultured human lymphocytes for biological dosimetry, *Iran. Journal of Radiation Research*, 2 (2), 85-88.

- [66]. Voisin P., Benderitter M., Claraz M., Chambrette V., Sorokine-Durm I., Delbos M., Durand V., Leroy A, Paillole N., 2001, The cytogenetic dosimetry of recent accidental overexposure, *Cellular and Molecular Biology*, 47, 557-64.
- [67]. IAEA, 2001, Cytogenetic Analysis for Radiatio Dose Assessment: A Manual. (Technical Report series No. 405), Vienna: International Atomic Energy Agency.
- [68]. Muller W.U., Streffer C., 1991, Biological indicators of radiation damage, *International Journal of Radiation Biology*, 59, 863-873.
- [69]. Edwards A.A., 1997, The use of chromosomal aberrations in human lymphocytes for biological dosimetry, *Radiation Research*, 148, S39-S44.
- [70]. Lloyd D.C., Edwards A.A., Prosser J.S., Barjaktarovic N., Brown J.K., Horvat D., Ismail S.R., Koteles J., Imassy Z., Krepinsky A., Kucerova M., Littlefield L.G., Mukherjee U., Natarajan A.T., Sasaki M.S., 1987, A collaborative exercise on cytogenetic dosimetry for simulated whole and partial body accidental irradiation. *Mutation Research*, 179, 197-208.
- [71]. Fenech, M., Morley, A.A., 1986, Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of *in vivo* ageing and low dose X-irradiation, *Mutation Research*, 161, 193-198.
- [72]. Pincu, M., Bass, D., Norman, A., 1984, An improved micronuclear assay in lymphocytes, *Mutation Research*, 139, 61-65.
- [73]. Fenech, M., Morley, A.A., 1985, Measurement of micronuclei in lymphocytes, *Mutation Research*, 147, 29-36.
- [74]. Prosser, J.S., Moquet, J.C., Lloyd, D.C., Edwards, A.A., 1998, Radiation induction of micronuclei in human lymphocytes, *Mutation Research*, 199, 37-45.
- [75]. Eastmond, D.A., Tucker, J.D., 1989, Identification of aneuploidyinducing agents using cytokinesis blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody, *Enviromental and Molecular Mutagenesis*, 13 (1), 34-43.
- [76]. Top, A., 1998, Co-60 Gamma radyasyonu ile çalışan bireylerin biyolojik dozimetrisi, Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [77]. Durmuş, M., 2015, Kozmik radyasyon ve solar aktiviteye maruz kalan pilotların kromozom hasarlarının incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Leyla AKPUNAR
Doğum Yeri	Erzurum
Doğum Tarihi	10.12.1987
Uyruğu	<input checked="" type="checkbox"/> T.C. <input type="checkbox"/> Diğer:
Telefon	05058843473
E-Posta Adresi	Biyologist_4@hotmail.com
Web Adresi	



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Fakülte	Fen Fakültesi
Bölümü	Biyoloji
Mezuniyet Yılı	07.07.2011

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Biyoloji
Programı	Genel Biyoloji