

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**İYONİZE RADYASYONA MARUZ KALAN RADYOLOJİ
ÇALIŞANLARINDA OLUŞAN DNA HASARLARININ ALKALİ
COMET METODU İLE BELİRLENMESİ**

Vehbi Atahan TOĞAY

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Nurten ÖZÇELİK

**Bu Tez Süleyman Demirel Üniversitesi ÖYP Koordinasyon Birimi tarafından
ÖYP05708-YL-13 proje numarası ile desteklenmiştir
Tez. No: 133**

ISPARTA-2015

KABUL ve ONAY SAYFASI

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğüne;

Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı** Çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 08/09/2015

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Nurten ÖZÇELİK
Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fak. Tıbbi Biyoloji AD

Üye : Prof. Dr. Nurten ÖZÇELİK
Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fak. Tıbbi Biyoloji AD

Üye : Doç. Dr. Nilüfer ŞAHİN CALAPOĞLU
Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fak. Tıbbi Biyoloji AD

Üye : Yrd. Doç. Dr. Funda YILDIRIM BAŞ
Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fak. Aile Hekimliği AD

ONAY: Bu Yüksek Lisans tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'nca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve kabul edilmiştir.

.....
Enstitü Müdürü

BEYAN

“İyonize Radyasyona Maruz Kalan Radyoloji Çalışanlarında Oluşan DNA Hasarlarının Alkali Comet Metodu İle Belirlenmesi” adlı Yüksek Lisans tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Vehbi Atahan TOĞAY

İmza

Danışman

Prof. Dr. Nurten ÖZÇELİK

İmza

ÖNSÖZ

İyonize radyasyon, çarptığı maddede yüklü parçacıklar (iyonlar) oluşturabilen radyasyondur. Maruz kalındığında DNA hasarına yol açabilir ve mutasyon frekansında artmaya sebep olabilir. Birçok hastalığın sebebi ise DNA'da meydana gelen bu hasarlardır. DNA hasarının oluşması engellenerek birçok hastalığın önüne geçilebilir. Genetik bilginin nesilden nesile sağlıklı olarak aktarılabilmesi ve bireyin yaşamını sağlıklı olarak sürdürebilmesi için DNA yapısının korunması son derece önemlidir.

İnsanlar günlük yaşamda düşük dozlarda iyonize radyasyona maruz kalmaktadır. Ancak hastanelerin Radyoloji, Nükleer Tıp gibi radyolojik tanı ve tedavide birimlerinde çalışanlar iyonize radyasyona çok daha fazla maruz kalmaktadır. Bu maruziyetin DNA üzerindeki etkileri tespit edilerek önlem alınmalıdır.

"Tek Hücre Jel Elektroforezi" veya "Comet Metodu" iyonize radyasyonun meydana getirdiği DNA hasarını düşük dozlar için bile hassas bir şekilde ortaya koyabilecek, hızlı, güvenilir ve benzer diğer metotlara göre ekonomik bir metottur. Araştırmamız kapsamında comet metodu, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi radyasyon çalışanlarının DNA hasar miktarının tespit edilebilmesi amacı ile kullanılmıştır. Çalışmamızın literatüre ve ilgilenenlere katkı sağlamasını umuyor, gelecekte yapılabilecek daha kapsamlı çalışmalara ışık tutmasını diliyorum.

Vehbi Atahan TOĞAY

Isparta, 2015

Bu tezi, beni yetiştirip bugünlere getiren aileme ithaf ediyorum...

Isparta, 2015

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince bana değerli bilgileri ve yol göstericiliği ile sürekli destek olan danışmanım Prof. Dr. Nurten ÖZÇELİK'e, gerekli biyolojik materyallerin toplanmasında bana yardımcı olan Yrd. Doç. Dr. Funda YILDIRIM BAŞ'a ve istatistik değerlendirmelerde destek olan Doç. Dr. Mustafa CALAPOĞLU'na teşekkürlerimi sunarım. Çalışmalarım boyunca gerek laboratuarda gerek laboratuvar dışında bana bilgi ve yardımları ile destek olan anabilim dalımız hocaları Doç. Dr. Nilüfer ŞAHİN CALAPOĞLU, Yrd. Doç. Dr. Pınar ASLAN KOŞAR, Yrd. Doç. Dr. Nilgün GÜRBÜZ ve çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim. Bu zorlu süreç boyunca maddi manevi desteğini esirgemeyen, yanında olamadığım zamanlara sabır gösteren eşim Duygu TOĞAY'a ve hayatımın her evresinde eğitim almamı kolaylaştırarak beni bugünlere getiren aileme teşekkür ederim. Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi ÖYP Koordinasyon Birimi tarafından ÖYP05708-YL-13 nolu proje ile maddi olarak desteklenmiştir. Desteklerinden ötürü teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL ve ONAY SAYFASI	i
BEYAN.....	iii
ÖNSÖZ.....	iv
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Radyasyon.....	4
2.1.1. İyonize Radyasyon.....	5
2.2. Comet Metodu.....	8
2.2.1. Comet Metodunun Tarihsel Gelişimi	11
2.2.2. Comet Metodunun Kullanım Alanları.....	13
2.2.3. Comet Metodunun Avantajları ve Dezavantajları	14
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	17
3.1. Comet Metodunda Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Araç - Gereçler	17
3.2. Tez Çalışmasının Dizaynı	18
3.3. Comet Metodunun Uygulanışı	19
3.3.1. Comet Metodunda Kullanılan Çözeltiler ve Mikroskop Lamlarının Hazırlanışları	19
3.3.2. Çalışma Basamakları.....	22
3.3.2.1. Hücresel Materyalin Hazırlanması	22
3.3.2.2. Yayma	23
3.3.2.3. Lizis.....	23
3.3.2.4. Elektroforez	24
3.3.2.5. Nötralizasyon.....	24
3.3.2.6. Fiksasyon.....	24
3.3.2.7. DNA'nın Boyanması, Cometlerin Görüntülenmesi ve Fotoğraflarının Çekilmesi	24

3.3.2.8. Bilgisayar Programı ile Değerlendirme	26
3.4. İstatistiksel Analiz	27
4. BULGULAR.....	30
5. TARTIŞMA.....	41
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	44
ÖZET.....	46
ABSTRACT	47
KAYNAKLAR.....	48
BEYAN.....	53
ÖZGEÇMİŞ	54

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

SCGE	: Tek Hücre Jel Elektroforez Yöntemi
Gy	: Gray
Sv	: Sievert
DNA	: DeoksiriboNükleil Asit
RNA	: RiboNükleik Asit
Na₂EDTA	: Sodyum Etilen DiaminoTetra Asetik Asit
PBS	: Fosfat tamponu
NaCl	: Sodyum klorür
LMA	: Düşük erime noktalı agaroz
NMA	: Normal erime noktalı agaroz
NaOH	: Sodyum hidroksit
DMSO	: Dimetilsülfoksit
mL	: MiliLitre
TL	: Kuyruk Uzunluğu
TM	: Kuyruk Momenti
TDNAP	: Kuyruk DNA Yüzdesi
%	: Yüzde
µg	: Mikrogram
°C	: Santigrat
mM	: MiliMolar
g	: Gram
HCl	: Hidrojen Klorür
L	: Litre
mA	: MiliAmper
mg	: MiliGram
RPM	: Dakikadaki devir sayısı
V	: Volt
EtBr	: Etidyum Bromid
Tris-HCl	: Tris Hidroklorik Asit
UV	: Ultra Viyole

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. Radyasyonun Etkilerine Örnekler	7
Tablo 2. Stok Fosfat Tamponunun Hazırlanışı	20
Tablo 3. Stok Lizis Çözeltisinin Hazırlanışı	20
Tablo 4. Alkali Elektroforez Tamponunun Hazırlanışı	20
Tablo 5. Alkali Comet metodunun radyasyon çalışanları ve kontrol grubundaki bireysel sonuçları ve bireylere ait bilgiler	31
Tablo 6. Radyasyon Çalışanı ve Kontrol Gruplarının DNA hasarlarının Mann - Whitney U Testi ile karşılaştırılması.	36
Tablo 7. Radyasyon Çalışanlarının Kuyruk Uzunluğu (TL), Kuyruk Momenti (TM) ve Kuyruk DNA Yüzdesi (TDNAP) Değerlerinin Kruskal Wallis Testi ile Yaş Bakımından Değerlendirilmesi	36
Tablo 8. Kruskal Wallis Testi ile Radyasyon Çalışanlarının Kuyruk Uzunluğu (TL), Kuyruk Momenti (TM) ve Kuyruk DNA Yüzdesi (TDNAP) Değerlerinin İyonize Radyasyona Maruziyet Yılına Göre Değerlendirilmesi	37
Tablo 9. Mann Whitney U Testi Radyasyon Çalışanlarının Kuyruk Uzunluğu (TL), Kuyruk Momenti (TM) ve Kuyruk DNA Yüzdesi (TDNAP) Değerlerinin Cinsiyetleri Bakımından ile Değerlendirilmesi	38

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Dünya Genelinde Doğal ve Yapay Radyasyon Kaynaklarından Alınan Dozların Oranları	4
Şekil 2. Dünya Genelinde Yapay Radyasyon Kaynaklarından Maruz Kalınan Radyasyon Dozları ve Oransal Değerleri.....	5
Şekil 3. Farklı Radyasyon Tiplerinin Etki Düzeyleri	6
Şekil 4. Çeşitli Termoluminesans Dozimetreler	7
Şekil 5. Comet Metodunun Genel Basamakları	9
Şekil 6. Radyasyon Miktarı ve Comet Hasarı Arasındaki Genel İlişki	10
Şekil 7. Radyasyon doz miktarına bağlı olarak çeşitli hücre tiplerinde meydana gelen Kuyruk Momenti değişikliklerinin alkali ve nötral comet metodları ile gösterimi.....	11
Şekil 8. DNA tek ve çift zincir kırıkları.....	12
Şekil 9. Comet Hasar dereceleri	25
Şekil 10. Kontrol Grubuna ait Comet Görüntüleri	26
Şekil 11. Open Comet Programı ile Değerlendirilmiş Cometler	27
Şekil 12. Open Comet Programının Vermiş Olduğu Parametreler ve Programın Örnek Görseli	27
Şekil 13. Radyasyon Çalışanları Grubuna Ait 1. (a) ve 2. (b) Derece Hasarlı Cometler	28
Şekil 14. Radyasyon Çalışanları Grubuna Ait 3. Derece Hasarlı Bir Comet.....	29
Şekil 15. Radyasyon Çalışanları Grubuna Ait 4. Derece Hasarlı Bir Comet.....	29
Şekil 16. Kontrol ve Radyasyon Çalışanlarının Kuyruk Uzunluğu (TL)	35
Şekil 17. Kontrol ve Radyasyon Çalışanlarının Kuyruk Momenti (TM)	35
Şekil 18. Kontrol ve Radyasyon Çalışanlarının Kuyruk DNA Yüzdesi (TDNAP) ...	36
Şekil 19. Radyasyon Çalışanlarının Yaşa Göre Ortalama Kuyruk Uzunlukları (TL)	37
Şekil 20. Radyasyon Çalışanlarının Kuyruk Uzunluklarının (TL) Cinsiyetleri ile Karşılaştırılması.....	38
Şekil 21. Radyasyon Çalışanlarının Ortalama Kuyruk Momentlerinin (TL) Cinsiyetleri ile Karşılaştırılması	39
Şekil 22. Radyasyon Çalışanlarının Ortalama Kuyruk DNA Yüzdelерinin (TDNAP) Cinsiyetleri ile Karşılaştırılması.....	39

1. GİRİŞ

Genetik bilginin nesilden nesile sağlıklı olarak aktarılabilmesi ve bireyin yaşamını sağlıklı olarak sürdürebilmesi için DNA yapısının korunması son derece önemlidir. Çift sarmal DNA, bazlar üzerindeki polar gruplar ve bu gruplar arasında oluşan hidrojen bağlarından oluşur. DNA'nın bu yapısında meydana gelen değişiklikler replikasyon sırasında yanlış eşleşmeye ve sonuçta mutasyona neden olur (1). DNA'nın fosfat iskeletinde meydana gelen kopmalar ise replikasyonu bloke eder ve hücre ölümüne yol açabilir. Her bir insan hücresinin DNA'sında günde binlerce kodlanmayan veya yanlış kodlamaya neden olan hasar meydana gelebilmektedir. DNA üzerinde oluşan bu hasarları onaran spesifik onarım sistemleri vardır. DNA onarım kapasitesini aşan düzeyde hasar oluştuğunda, bu DNA hasarı kısa dönemde, deoksiribonükleotid trifosfat havuzunun miktar ve bileşiminde değişikliklere, replikasyonun durmasına, transkripsiyon ve protein sentezinin inhibisyonuna, proteolitik aktivitenin indüksiyonuna; uzun vadede ise mutasyona ve kromozom anomalilerine sebep olur (1). DNA hasarı düşük seviyede ise DNA onarım mekanizmaları tarafından verimli bir şekilde onarılır. Ağır hasarlar apoptotik mekanizmaları uyarak hücre ölümüne sebep olur.

DNA'da hasara yol açabilen birçok iç ve dış faktör bulunmaktadır. DNA hasarına yol açan çevresel faktörler, fiziksel ve kimyasal ajanlardır. Fiziksel ajanların başında ise iyonize radyasyon gelir. İyonize radyasyon, çarptığı maddede yüklü parçacıklar (iyonlar) oluşturabilen radyasyon demektir. İyon meydana gelmesi yani iyonizasyon olayı herhangi bir maddede meydana gelebileceği gibi insanlar dahil tüm canlılarda da oluşabilir (2). İyonize radyasyon, maruz kalındığında başta DNA tek zincir kırıkları olmak üzere tek ve çift zincir kırıkları oluşturabilirken; radyasyonla açığa çıkan enerjiyle uyarılan moleküllerin (hidroksil radikalleri) DNA ile etkileşimi hem DNA zincir kırıklarına hem de oksidatif baz modifikasyonlarına neden olmaktadır. DNA üzerinde oluşan bu kırıklar hücre ölümüne kadar varan etkilere neden olur. DNA hasarının yaşlanma, kanser, kardiyovasküler hastalıklar, immün sistem hastalıkları, dejeneratif hastalıklar gibi doku fonksiyonlarının bozulması ile ortaya çıkan hastalıkların oluşmasında önemli rol oynadığı ileri

sürülmektedir. Bu sebeplerle DNA hasarı ve bu hasarın etkenleri insan yaşamında oldukça önemlidir. Birçok hastalık, DNA hasarının oluşması engellenerek önüne geçilebilir.

"Tek Hücre Jel Elektrofrezisi" veya "Comet Metodu" iyonize radyasyonun meydana getirdiği DNA hasarını düşük dozlar için bile hassas bir şekilde ortaya koyabilecek, hızlı, güvenilir ve benzer diğer metotlara göre ekonomik bir metottur. Radyoaktif işaretleme gerektirmemesi nedeniyle özellikle insanlarda yapılan in vivo çalışmalarda DNA hasar ölçümünde sıklıkla tercih edilen bir yöntemdir. Alkali ortamda DNA süperkoil yapısının açılması ve kırıkların ortaya çıkmasının ardından uygulanan elektrofrezde kırılmış DNA zincirlerinin anoda doğru göçerek bir kuyruklu yıldız görüntüsü oluşturması prensibine dayanmaktadır. Oluşan kuyruk ne kadar fazla ise hasar derecesi de o kadar yüksek olarak kabul edilir.

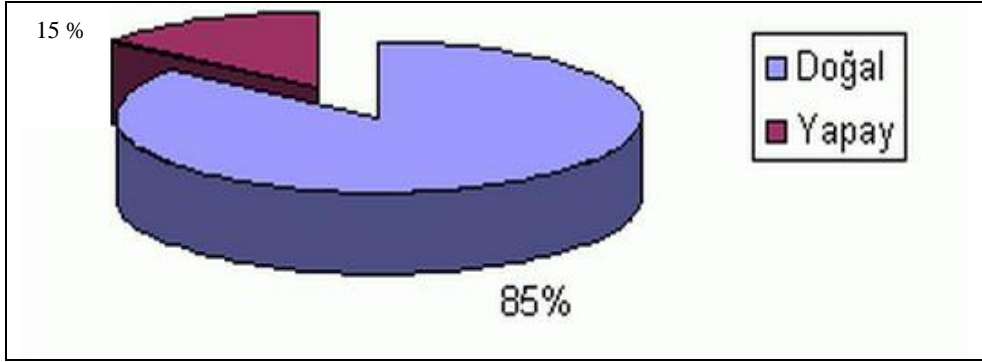
İş yaşamı ile sağlık arasında doğrudan bir ilişki vardır. Çalışma ortamları çeşitli sağlık ve güvenlik tehlikelerini barındırmaktadır. Bu tehlikeler bireyin sağlığını doğrudan etkileyebilecek meslek hastalıkları ve iş kazalarını içermektedir. Bu nedenle çalışma ortamının sağlık koşullarına uygun hale getirilmesi, bir takım tehlike olasılıklarının ortadan kaldırılması, kullanılan araç ve gerecin işe ve kullanan kişiye uyumunun sağlanması temel amaç olmalıdır (3). İnsanlar normal günlük yaşantıları içerisinde bir miktar radyasyona maruz kalmaktadırlar. İnsan vücudu bu radyasyonun olumsuz etkilerini efektif bir biçimde tolere edebilmektedir. Fakat hastanelerin Radyoloji, Nükleer Tıp gibi radyolojik tanı ve tedavide birimlerinde çalışanlar iyonize radyasyona çok daha fazla maruz kalmaktadır. Gelişen teknoloji ile birlikte alınan önlemler artmış, radyolojik tanı cihazlarının yaydığı radyasyon miktarı da azalmıştır. Yine de bu birimlerde çalışan bireyler radyasyona maruziyet yönünden düzenli olarak kontrol edilmeli ve ekstra önlemler alınmalıdır. Türkiye Atom Enerjisi Kurumu'nun Radyasyon Güvenliği Yönetmeliği'ne göre "Radyasyon görevlileri için etkin doz, ardışık beş yılın ortalaması 20 mSv'i (miliSievert), herhangi bir yılda ise 50 mSv'i geçemez" ve "çalıştığı süre boyunca yılda en az bir kez tıbbi muayeneleri yaptırılır" (4). Bu yönetmelik kapsamında Termolumünisans dozimetreler (TLD) ile maruz kalınan radyasyon miktarı ölçülmekte ve belli bir değeri geçmesi engellenmektedir. Yılda bir defa ise Aile Hekimliği'nde yüzeysel tıbbi muayeneden geçmektedirler. Ancak radyasyon çalışanlarının aldıkları bu dozların DNA'da ki

etkilerine yönelik kısa veya uzun vadeli ek bir muayene veya çalışma yapılmamaktadır. Her hastanede, hatta her birimde kullanılan cihaz, çalışma saatleri, çalışanların ve amirlerin bilinçlilik düzeyine göre değişebilecek etkiler meydana gelmesi muhtemeldir. Bu nedenle bu tez kapsamında Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi bünyesinde çalışmakta olan 48 radyasyon personelinin risk seviyesinin Comet metodu ile ortaya konması ve karşılaşılabilecek problemlere yönelik çözüm önerileri sunulması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Radyasyon

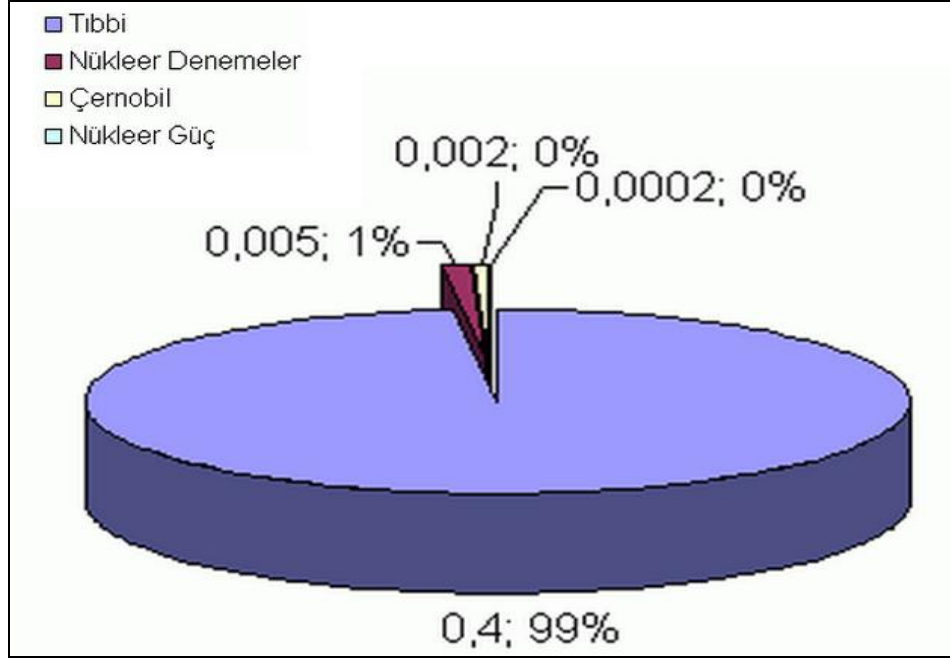
Radyasyon ya da Işınım, elektromanyetik dalgalar veya parçacıklar biçimindeki enerji yayımı ya da aktarımıdır (5). Radyasyon kaynaklarını, "doğada doğal olarak bulunan radyasyon" ve "insan eli ile oluşturulan radyasyon" olarak ikiye ayırmak mümkündür. Dünyamızda doğal olarak bulunan radyasyonun kaynağı uzaydan gelen kozmik ışınlar ve doğada bulunan radyoaktif elementlerdir (6). Televizyon, bilgisayar gibi elektronik aletler, nükleer silahlar ve santraller ile tıbbi cihazlar insan eli ile oluşan radyasyon kaynaklarına örnek olarak verilebilir (6).



Şekil 1. Dünya Genelinde Doğal ve Yapay Radyasyon Kaynaklarından Alınan Dozların Oranları (<http://www.taek.gov.tr/bilgi-kosesi/184-radyasyonla-birlikte-yasiyoruz/500-radyasyon-ve-yasam.html>)

Yukarıdaki şekilden de anlaşılacağı gibi günümüzde insanların maruz kaldığı radyasyon miktarının %15 kadar bir kısmı yine yapay olarak yani insan eli ile oluşturulmaktadır.

Marie Curie'nin Polonyum ve Radyum'u keşfi ile başlayan süreçte radyoizotoplar, endüstri, tarım ve tıp gibi alanlarda oldukça sık kullanılmıştır. Özellikle tıbbi araştırma, teşhis ve tedavilerde geniş bir uygulama alanı bulan radyasyon, günlük yaşamımızda da faydalı kullanım alanları ile oldukça önemlidir.



Şekil 2. Dünya Genelinde Yapay Radyasyon Kaynaklarından Maruz Kalınan Radyasyon Dozları ve Oransal Değerleri

(<http://www.taek.gov.tr/bilgi-kosesi/184-radyasyonla-birlikte-yasiyoruz/502-yapay-radyasyon-kaynaklari.html>)

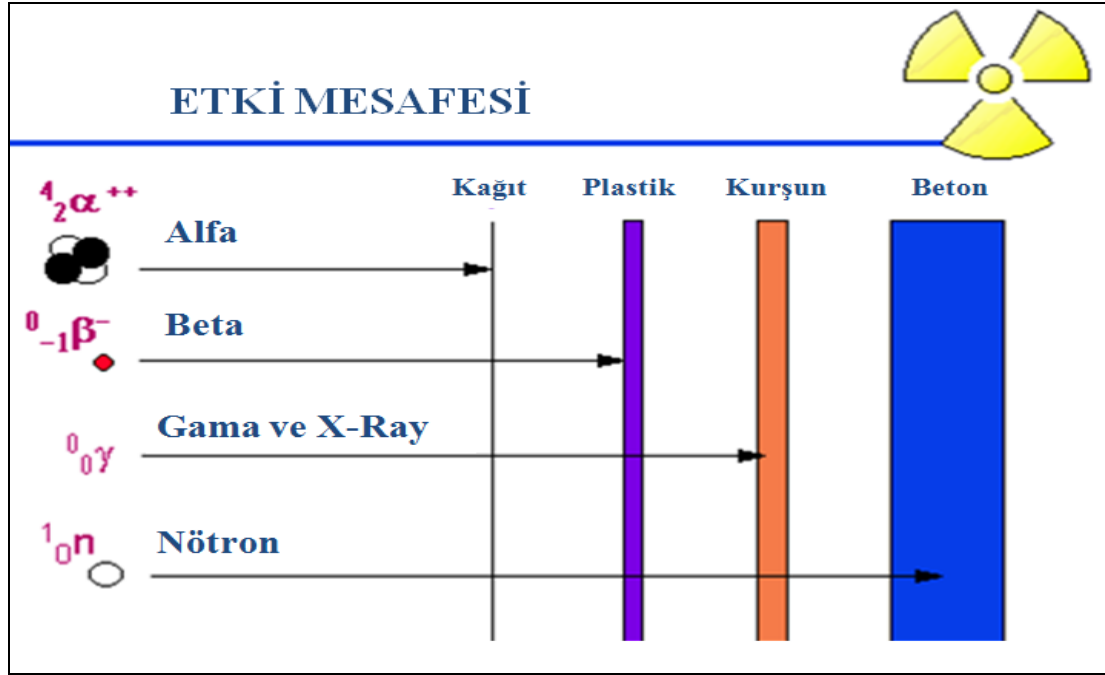
Şekil 2'de de görüldüğü gibi yapay kaynaklardan maruz kalınan radyasyonun çok çok büyük bir kısmını tıbbi uygulamalar oluşturmaktadır. Ancak radyasyon daha önce de belirtildiği gibi son derece tehlikeli sonuçların doğmasına da sebep olabilmektedir. Maruz kalınan radyasyon doza bağlı olarak hiçbir biyolojik etki göstermeyebileceği gibi ölüme kadar varabilen etkilere de neden olabilir.

Elektromanyetik spektrum incelenecek olursa radyasyonları iki sınıfta değerlendirmek mümkündür. Buna göre radyasyon, iyonize ve iyonize olmayan radyasyonlar olarak ikiye ayrılabilir. Her iki tür radyasyon tipine de aşırı maruziyet, canlılarda geri döndürülemez hasarlara yol açabilmektedir. Ancak bu iki radyasyon tipi karşılaştırıldığında, iyonize radyasyonun çok daha tehlikeli olduğu açıktır (7).

2.1.1. İyonize Radyasyon

İyonize ışınlar, canlılarda moleküler ve hücresel düzeylerde fiziksel, kimyasal ve biyolojik çeşitli değişikliklere yol açar. Bu değişiklikler maruz kalınan iyonize radyasyonun cinsine, miktarına ve süresine göre geçici veya kalıcı olabilir.

İyonize ışınlar olarak tanımlanan X ve gamma ışınlarının yanı sıra alfa ve beta parçacıkları da geçtikleri ortamda iyonizasyona yol açarlar.



Şekil 3. Farklı Radyasyon Tiplerinin Etki Düzeyleri

(<http://gtcceis.anl.gov/images/photos/PenetratingRad.gif>adresinden değiştirilerek)

Radyasyona tamamıyla dirençli hiçbir hücre yoktur ve kromozomlar radyasyona hücre sitoplazmasına göre çok daha duyarlıdır. Ayrıca iyonize radyasyon mutasyon frekansında da artmaya neden olur (7). Radyasyon dozunun meydana getireceği etki, radyasyonun çeşidine, doz hızına ve bu doza maruz kalış süresine bağlıdır. İyonlaştırıcı radyasyonlarla yapılan çalışmalarda sonuca ulaşabilmek ve zararlı biyolojik etkileri belirleyebilmek için radyasyon dozunun bilinmesi gerekir. Bu amaçla çeşitli ölçüm yöntemleri geliştirilmiştir. Radyasyonun algılanması ve ölçülmesi radyasyona hassas cihazlar vasıtasıyla yapılır. Genelde radyasyonu algılamak ve ölçmek için 2 tip cihaz kullanılır. Portatif “surveymeter” bulunduğu yerdeki radyasyon doz hızını (mSv/saat) ölçerken, dozimetre ise toplam radyasyon dozunu ölçmektedir (8).

Thermoluminesans dozimetreler (TLD), özel filtreler ve uygun taşıyıcı kombinasyonu ile X, gamma, β ve nötron gibi iyonlaştırıcı radyasyonların dozlarını ölçebilmektedir. Dozimetreler yaklaşık insan dokusu eşdeğerine sahiptir (8).



Şekil 4. Çeşitli Termoluminesans Dozimetreler

(www.cygm.gov.tr/CYGM/Files/.../Radyasyon_olcum_sunum.pdf)

Uluslararası Radyolojik Korunma Komisyonu (ICRP) 1990 yılında yayınladığı bir bilgilere ile radyasyonun etkilerini ikiye ayırmıştır. Buna göre radyasyonun bir canlıdaki etkilerini stokastik (doz bağımsız) ve deterministik (doz bağımlı) etkiler olarak sınıflandırmak mümkündür (6).

Tablo 1. Radyasyonun Etkilerine Örnekler

Deterministik Etkiler	Stokastik Etkiler
ölüm, cilt yanıkları	kanser, genetik etkiler
katarakt, kısırlık	

İyonize radyasyon doğrudan DNA ve proteinler ile etkileşime girer. Serbest radikaller oluşturarak oksidatif hasar oluşmasına ve hücrelerin ciddi zararlar görmesine sebep olabilir. DNA'da oluşan hasar kırıklara, çaprazlamalara, kopmalara dolayısıyla mutasyonlara yol açar ve kanser riskini artırır. Bu etkiler sonucunda saç dökülmesi, solunum sistemi hastalıkları, mide ve bağırsak sistemi kanamaları, kemik iliği supresyonuna bağlı kanamalar ve kansızlık görülebilir. Bu etkiler radyasyonun dozuna ve doz alım hızına bağlı olarak kısa veya uzun vadede ortaya çıkabilir.

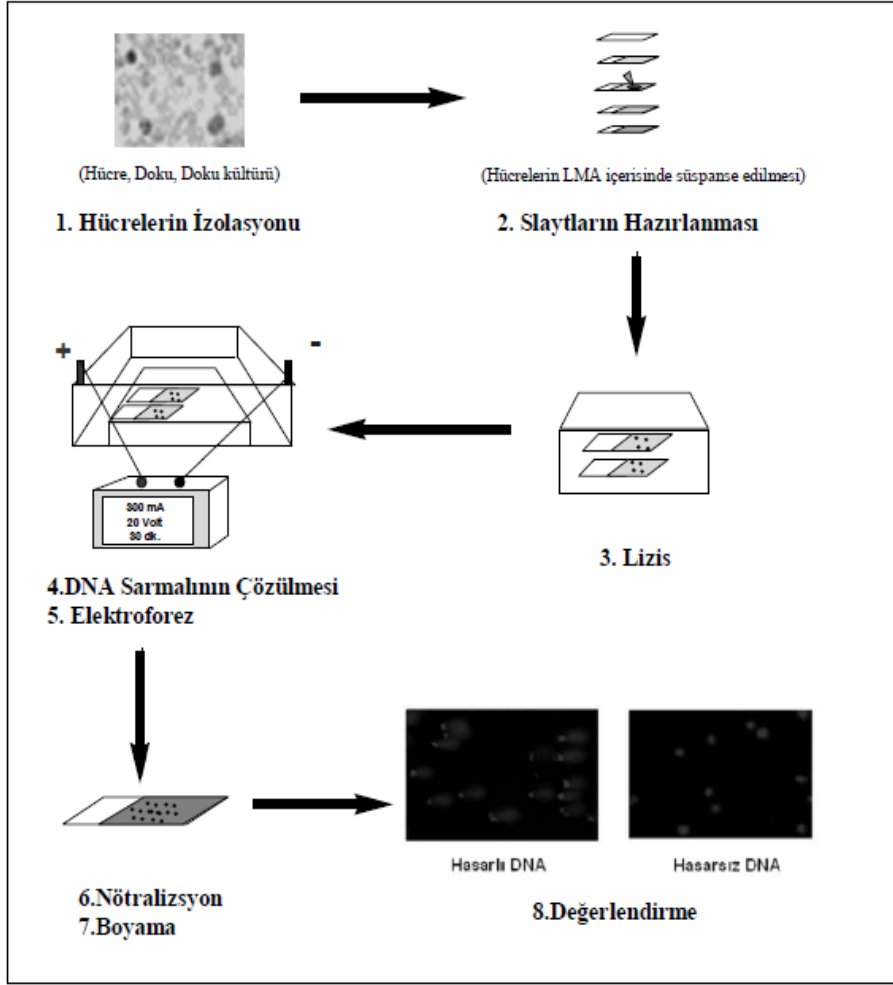
Radyasyon, önlem alınmadığı takdirde yaşam kalitesini ve yaşam süresini ciddi olarak düşürebilir (6-10).

Bütün bu sebeplerle iyonize radyasyon kaynaklı DNA hasarı ve varsa hasar derecesinin belirlenmesi genotoksik etkilerin ortaya konması açısından önemlidir.

2.2. Comet Metodu

“Comet Metodu” veya “Tek Hücre Jel Elektroforezi” DNA sarmal kırıklarının tespiti için hassas, hızlı ve benzer diğer metotlara göre ucuz bir yöntemdir (1, 11-18). 1984 yılında Ostling ve Johanson tarafından hücredeki DNA hasarının direkt gösterilmesinde kullanılmıştır (18). Mikroskopik incelemede hasarlı DNA’ların “kuyruklu yıldız” şeklinde görünmesi sebebi ile “Comet Metodu” olarak isimlendirilmiştir (11). Metot günümüze kadar geliştirilerek ve çeşitli modifikasyonları üretilerek gelmiş ve literatürde DNA hasarının tespitinde çok kullanılan, güvenilir metotlardan biri olmuştur. Comet metodu, hızlı, duyarlı olması, farklı hücre tipleri ve DNA hasar çeşitleri için uygulanabilirliği ve radyoaktif işaretleme gerektirmemesi nedeniyle DNA hasar ölçümünde sıklıkla tercih edilen bir yöntemdir (1).

Mikroskop lamı üzerindeki agaroz jel içine gömülen hücreler, zarların parçalanıp çekirdekte bulunan süperkoil DNA’nın serbestleşmesi için lizis işlemine tabi tutulur. Alkali ortamda süperkoil yapının gevşeyerek açılması ve kırıkların ortaya çıkması sağlandıktan sonra uygulanan elektroforezde, kırılmış DNA zincirleri anoda doğru geçerek bir kuyruklu yıldız görüntüsü oluşturur (1). Gerekli floresan veya gümüş boyama işlemi yapıldıktan sonra boyamaya uygun mikroskop altında gerçekleştirilen inceleme ile ortaya konan veriler, uygun istatistik yöntemler kullanılarak değerlendirilmektedir.



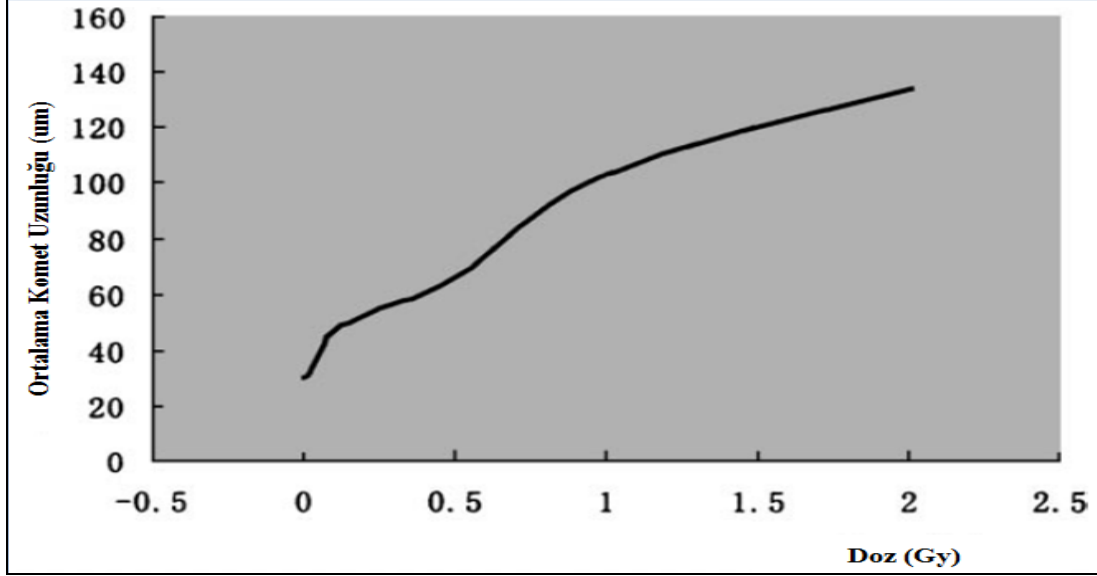
Şekil 5. Comet Metodunun Genel Basamakları (Fidan AF., 2008)

Uygulama alanı giderek genişleyen ve metot olarak önemli derecede geliştirilen Tek Hücre Jel Elektroforezi iyonize radyasyonun meydana getirdiği hasarı hassas bir şekilde ortaya koyabilmektedir. Bu konuda son yıllarda comet metodunun, biomarker olarak tanı ve tedavide kullanılabilirliği düşünülmekte ve buna yönelik bir çok çalışma ortaya konulmaktadır (19-23).

İyonize Radyasyon, genotoksin olarak kolayca tanımlanabilir. Dolayısı ile iyonize radyasyon kaynaklı DNA hasarı ve hasar derecesinin belirlenmesi genotoksik etkilerin ortaya konması açısından önemlidir. 1 Gray (Gy) iyonize radyasyona maruz kalan diploid bir memeli hücrelerinde, hücre tipi ne olursa olsun, 1000 adet tek zincir kırığı ve 30 adet çift zincir kırığı meydana geldiği tespit edilmiştir (24). Comet metodu düşük dozlarda dahi olsa bu hasarı efektif biçimde tespit edebilen bir testtir.

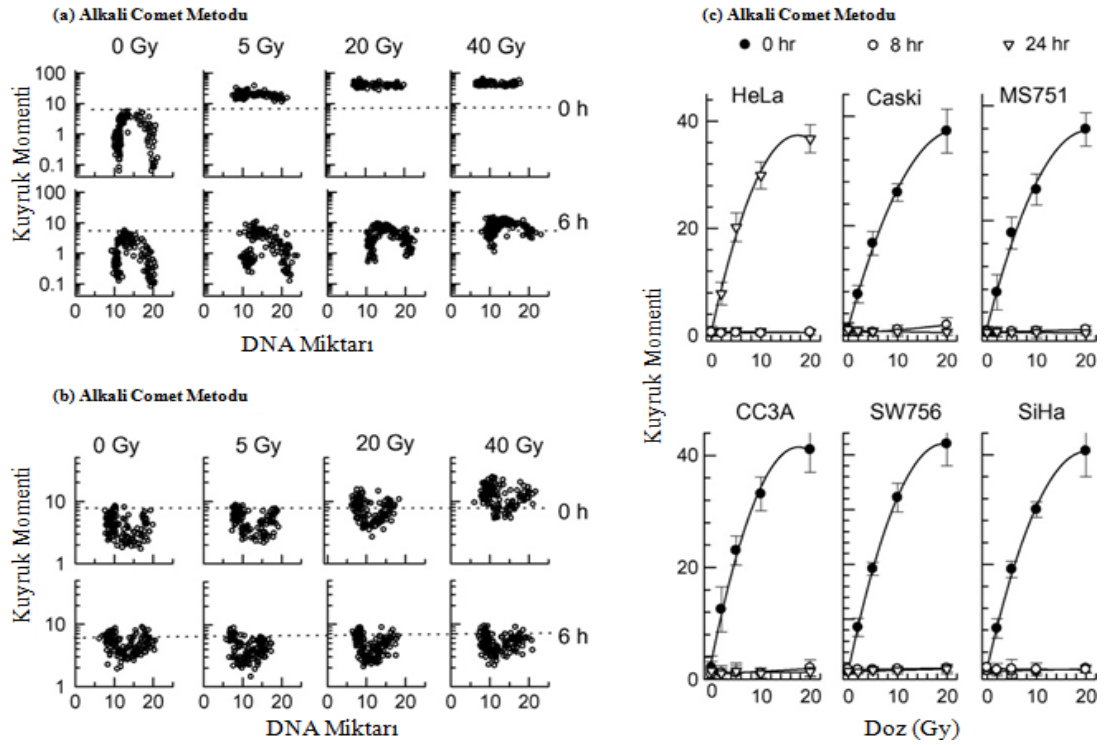
Diğer metotlar radyasyon zararını tek hücre bazında değil, hücre toplulukları bazında belirleyebilir. Comet metodunun bu farklılığı oldukça önemlidir (24).

Radyasyonun hücrelere verdiği hasara bakıldığında, kimi hücreler aşırı hasarlı iken, kimi hücreler hasarsızdır. Bu durumda tek bir hücrenin hasarını ölçemeyen metotlar, zarar meydana gelme dinamiklerini ve hücre tiplerindeki farklılıkları ortaya koyamamaktadır.



Şekil 6. Radyasyon Miktarı ve Comet Hasarı Arasındaki Genel İlişki (He ve ark., 2000)

Sağlık çalışanları, özellikle de radyoloji, nükleer tıp ve biyokimya gibi alanlarda görev yapan sağlık çalışanları, devamlı olarak iyonize radyasyon kaynağı olan cihazlarla aynı ortamda bulunmalarından dolayı en büyük risk gruplarından birini oluşturmaktadır.



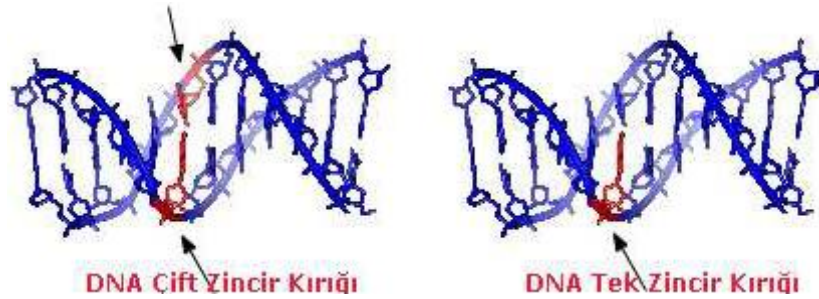
Şekil 7. Radyasyon doz miktarına bağlı olarak çeşitli hücre tiplerinde meydana gelen Kuyruk Momenti değişikliklerinin alkali ve nötral comet metodları ile gösterimi (Olive P., 2009'dan değiştirilerek)

2.2.1. Comet Metodunun Tarihsel Gelişimi

Agaroz içine gömülmüş hücrelerde DNA hasarı ilk kez 1978'de Rydberg ve Johanson tarafından belirlenmiştir (1, 12, 18). Hücreler mikroskop lamı üzerindeki agaroz tabakasının içine gömülmüş ve DNA sarmalının açılımını sağlayabilmek için hafif alkali koşullar altında hücre membranları parçalanmıştır. Rydberg ve Johanson mikroskop lamı üzerindeki hücreleri analiz için akridin turuncusu ile boyamıştır. Bu boyama sonucunda çift sarmal DNA yeşil flüoresan, tek sarmal DNA kırmızı flüoresan ışık yaymıştır. Yeşil flüoresanın kırmızı flüoresana oranı çift sarmal DNA'nın tek sarmal DNA'ya oranını belirlemekte kullanılmıştır (1, 12). Daha sonra elektroforez sırasında negatif yüklü kırık uçlar anoda doğru serbestçe hareket ederek kuyruklu yıldız benzeyen şekiller oluşmuştur. Bu şekillerin oluşumunda DNA parçalarının boyutu ve kırık uçların sayısı DNA'nın elektrik alanda hareket kabiliyetine etki etmektedir (1). Fakat bu teknik çok yaygın kullanılmamıştır (12).

Comet yöntemi, Rydberg ve Johanson'un çalışmalarını baz alarak ilk kez 1984 yılında Östling ve Johanson tarafından tek bir hücredeki DNA hasarının doğrudan görüntülenmesi için bir mikro jel elektroforez tekniği olarak tanıtılmıştır (18). Ostling ve Johanson agaroz ortamda desteklenen radyasyona maruz bırakarak hasar verdikleri hücreleri lam üzerine yaymış, yüksek tuz ve deterjanla lize olmalarını sağlamışlardır. Ardından elektroforeze tabi tuttuktan sonra akridin turuncusu gibi DNA bağlayıcı floresan boyasıyla boyamışlardır. Eğer DNA kırık içeriyorsa, gevşemiş ve kırılmış DNA fragmentleri nedeni ile elektrik yük kazanmış olan DNA, çekirdekte anoda doğru göç ederek kuyruklu yıldız görünümünü vermiş ve DNA hasarını saptamak için kuyruk uzunluğu ölçülmüştür (12). Ölçülen kuyruk uzunlukları verilen radyasyon ile doğru orantılı çıkmıştır.

DNA çift sarmal kırıklarının tespitine izin veren nötral şartlar, tek sarmal kırıklarının belirlenmesine izin vermemektedir. Ancak DNA'da hasar oluşturan çoğu fiziksel veya kimyasal ajan DNA'da çift zincir kırıklarından daha çok tek zincir kırıkları meydana getirmektedir. Bunun yanı sıra nötral şartlarda proteinler tam olarak uzaklaştırılmamaktadır. 1988'de Singh ve arkadaşları, Östling ve Johanson'ın kullandığı yöntemi modifiye ederek lizis aşamasını pH>13'de gerçekleştirmiştir. Böylece sadece alkali teknikle ortaya çıkarılabilen DNA tek zincir kırıklarının tanımlama imkânı doğmuştur. Alkali Comet yöntemi olarak tanımlanan bu yöntem comet metodunun en sık kullanılan çeşididir. Kullanılan daha güçlü lizis koşulları proteinlerin % 95 inden fazlasını yok edebilmekte, böylelikle SCGE tekniğinin yeni dizaynı bireylerde hücrelerinin hemen hepsinde DNA hasar büyüklüğünün direkt olarak tespitini sağlamaktadır (1, 11, 12, 14, 16, 18).



Şekil 8. DNA tek ve çift zincir kırıkları (Yavuz İ., 2013)

Hemen hemen tüm genotoksik ajanlar çift zincir kırıklarından daha çok tek zincir kırıkları ve alkali labil bölgeler oluşturur. Bu nedenle bu yöntem genotoksik

ajanları belirlemede çok daha hassastır. Alkali comet yöntemi, hücrelerde çapraz DNA bağlarını, alkali labil bölgeleri ve DNA tek ve çift zincir kırıklarını yüksek hassasiyet ile her hücre için ayrı ayrı belirleyebilmektedir (1, 11, 12, 14, 16, 18). Bu yöntemde bir hücre süspansiyonu mikroskop lamı üzerinde ince bir agaroz tabakasına gömülür ve yüksek tuz konsantrasyonunda deterjanla hücre membranları parçalanır, çözünen hücre içerikleri ve histonlar uzaklaştırılır. Bu işlemin ardından DNA süperkoil yapıda ve nükleer matrikse bağlı olarak serbest kalır. Aynı alkali koşullarda DNA kırıklarının olduğu bölgelerde DNA sarmalı açılır ve elektroforez sırasında genotoksik ajanların neden olduğu negatif yüklü zincir kırıkları içeren gevşek haldeki DNA anoda doğru göç eder. Bütün ve süperkoil yapıdaki DNA baş kısmında kalır. Daha sonra lamlar nötralize edici solüsyonlarla yıkanır ve DNA'ya bağlanan flüoresan boyalar ile boyanır.

Alkali Comet metodunun keşfinden sonra Comet metodu giderek artan bir sıklıkta DNA hasarının gösterilmesi için kullanılmaya başlanmış ve ana metot aynı kalmakla birlikte farklı amaçlara yönelik bir çok modifikasyonu da kullanılmıştır.

Comet metodunun hassaslığı, benzer diğer metodlar ile karşılaştırıldığında daha iyi anlaşılabilir. Micronükleus, μ -FADU gibi metotlar ile karşılaştırıldığında DNA hasarını çok hassas olarak ortaya koyabildiği belirlenmiş ve hücre bazında DNA hasarını tespit edebiliyor olması araştırmacılar tarafından artı olarak gösterilmiştir (25-30).

2.2.2. Comet Metodunun Kullanım Alanları

Günümüzde Comet metodu insanlarda, hayvanlarda, bitkilerde, hücre kültüründe, deney hayvanlarında ve hatta funguslar ve bakteriler gibi çeşitli biyolojik materyallerde efektif olarak farklı amaçlar ile uygulanmaktadır. Bu çalışmaların başında insanlarda çeşitli amaçlar ile uygulan biyo-izleme (biomonitoring) çalışmaları gelmektedir.

Comet metodu, çevresel ve mesleki maruziyetlerin (kimyasal ya da radyoaktif maruziyet gibi) izlenmesinde, kan veya idrar gibi biyolojik materyallerden faydalanılarak kullanılabilir. Comet, yüksek risk altındaki bireylerin belirlenmesinde,

hastalıklara neden olan ajanlara maruziyet seviyesinin izlenmesinde veya besinlerin koruyuculuklarını belirlemede kullanılabilir ya da bu faktörlere cevapta bireysel farklılıklar hakkında bilgi verebilir (18).

Comet metodu tek bir hücrede DNA hasarının direk tayininin yanı sıra, bir popülasyondaki tüm hücrelerin aynı oranda hasara uğrayıp uğramadığının tespitine, dolayısıyla da bir tedavi sırasında hücrelerin cevabının özellikle radyoterapi ve kemoterapi rejimlerinde tümör cevabının saptanmasına yardımcı olabilmekte, dirençli hücre popülasyonunun tanımlanmasını sağlamaktadır. Ayrıca metod, pek çok deneysel şartlarda DNA hasar ve onarımını incelediğinden, son yıllarda genotoksisite ve DNA onarım mekanizmalarının incelemesinde kullanımı artan bir yöntemdir. Yöntem tek hücre süspansiyonu şeklinde elde edilebilen hemen hemen her ökaryot hücrede DNA hasar ve onarımını tespit etmektedir (31).

Özellikle trafik, fabrika artıklarının çevreye verdiği zarar, kimyasal atıklar, zehirli gazlar, pestisitler, gürültü ve günlük yaşamın stresi gibi bir çok durumda DNA hasarının oluştuğu kanıtlanmıştır. Bütün bu durumların DNA üzerindeki etkileri ile bu etkilerin önlenmesi veya tedavi edilebilmesinde herhangi bir canlıda comet metodu sayısız alternatifle uygulanabilir.

Kısaca comet, bakteriler, funguslar, algler, teorik olarak tüm yüksek bitkiler, deniz canlıları, insanlar, böcekler ve omurgalılar üzerinde çok rahat uygulanabilen, onları hem çevre sağlığı açısından monitor etmede hem de hedef organizmaların savunma potansiyelleri ve gelecekteki sağlık durumları hakkında bilgi vermede kullanılan önemli bir metottür (11).

2.2.3. Comet Metodunun Avantajları ve Dezavantajları

Comet Metodu, diğer benzer amaçlı metodlara göre birçok avantaja sahiptir. Diğer metodlara göre daha uygun maliyetler ile uygulanabilmesi en önemli avantajlarından biridir. Kolay uygulanabilir. Oldukça küçük hacimde örneklerle çalışılabilmekte, sonuçlar bir gün içinde elde edilebilmektedir. Çok çeşitli materyaller ile hemen hemen her amaçla kullanılabilir. Tek hücre seviyesinde bilgi verebildiği gibi bütün bir organizmanın hatta popülasyonun araştırılmasında da

rahatlıkla kullanılabilir. Olive (2006), yayınladığı derlemesinde comet metodu bulunana kadar radyasyonun tek bir hücre üzerindeki etkilerinin belirlenmesinde kısıtlı metotlarla çalışıldığını ve comet metodunun bu açığı kapattığına değinmiştir (32). Yine He ve arkadaşları (2000), comet ve Micronucleus metotlarını iyonize radyasyonun hücrede meydana getirdiği hasarın belirlenmesi açısından karşılaştırmışlardır. Çalışmada her iki metodun da hasarı ortaya koyabilmesine rağmen comet metodunun Micronucleus metodundan çok daha hassas ve kullanışlı bir metot olduğu ortaya konmuştur (25).

Yöntem alkali elüsyon (kromatografi işlemi ile bir maddeyi, durgun ve hareketli sıvı fazlar arasındaki dağılıma farkına dayanarak adım adım yürüterek başka maddelerden ayırma işlemi) gibi diğer uzun DNA analizleri kadar duyarlıdır (31). Ayrıca radyoaktif maddelerle işaretleme gibi zararlı işlemleri içermemesi sebebi ile insanlarda da kolaylıkla çalışma imkanı tanımaktadır (31).

Metodun avantajlarının yanı sıra tabiki çeşitli dezavantajları da bulunmaktadır. Çalışma ve değerlendirmeler mümkünse karanlıkta veya loş ışıkta ve soğuk ortamda yapılmalıdır.

Comet tekniğinin farklı şekillerde uygulanması sonuçları etkilemektedir. Örneğin, elektroforez şartları (süre, uygulanan voltaj), lizis solüsyonu şartları (tuz konsantrasyonu, süre ve pH) ve agaroz konsantrasyonu metodun hassasiyetini etkileyebilmektedir. Sirota ve ark. (2014), laboratuvarlar arasında çeşitli farklılıklar olabileceğini ve bu farklılıkların çok büyük bir kısmının elektroforez basamağından kaynaklandığını tespit etmişlerdir (33). Bu nedenle, deneylerde şartlar standart tutulmalıdır (31, 34). Dolayısı ile çalışmalarda deneyimli bir personele ihtiyaç vardır. Mümkünse solüsyonların ve lamların hazırlanması, elektroforez şartlarının ayarlanması (ve eğer değerlendirme aşamalarında cometlerin sayımı gözle yapılacaksa) ve cometlerin sayılması işlemleri tek bir kişi tarafından yapılması, diğer aşamalarda ise göreceli olarak yardımcı personel desteğinin alınması önemlidir. Mümkünse değerlendirme aşamalarında bilgisayar programlarının kullanılması da yorgunluk, dikkatsizlik, öznellik vb. sebepler ile araştırmacıdan kaynaklanabilecek diğer sorunların da önüne geçecektir. Bu durumlara dikkat edilmesi testin ve de elde edilecek sonuçların güvenilirliğini ciddi şekilde arttıracaktır.

Bunlara ek olarak araştırmacılar; çalışmalarda daha sağlıklı sonuçlar elde edilebilmesi amacı ile çalışma dizaynının önceden yapılmasını, mümkünse profesyonel bir istatistikçi yardımı alınmasını, çalışmaların krleme yöntemi ile yapılmasını, prosedür esnasında karışıkların önlenmesi amacı ile numaralandırmaların çok dikkatli yapılmasını, örnek başına en az iki lamla çalışılmasını, her lamdan en az 50 comet sayılmasını ve değerlendirmelerin mümkünse bilgisayar programları aracılığı ile yapılmasını önermektedirler (35-38).

Sonuç olarak, olumsuz yanlarının azlığı ve birçok olumlu yönüyle Comet metodu hızlı ve güvenilir bir test olarak kabul görmektedir.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma; Süleyman Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Süleyman Demirel Üniversitesi Rektörlüğü Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanlığı'ndan 03.09.2014 tarih ve 135 sayılı kararı ile etik kurul izni alınmıştır.

3.1. Comet Metodunda Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Araç - Gereçler

Histopak (lökosit ayırma çözeltilisi)

Na₂EDTA

Fosfat tampon tabletleri (PBS)

Sodyum lauril sarkosinat

Triton X-100

Sodyum klorür (NaCl)

Asetik asit

Düşük erime noktalı agaroz (LMA)

Normal erime noktalı agaroz (NMA)

Trizma Base

Sodyum hidroksit (NaOH)

Dimetilsülfoksit (DMSO)

Etidyum bromür

Saf etanol

Ultra saf deiyonize su

Flüoresan Mikroskop

Elektroforez Tankı
Güç Kaynağı
Otoklav
Soğutmalı Santrifüj
Dijital Hassas Terazî
Vorteks Karıştırıcı
Pipet Uçları (100 ml, 1000 ml, 5 ml, 10 ml)
Otomatik Mikro Pipetler
Manyetik Karıştırıcı
pH metre
Cam Malzemeler

3.2. Tez Çalışmasının Dizaynı

Çalışmaya Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi bünyesinde bir yıldan uzun süredir görev yapan 48 radyasyon çalışanı ve son altı ay içerisinde herhangi bir radyolojik muayene geçirmemiş 51 kişilik kontrol grubu dahil edilmiştir. Toplam 99 gönüllünün tamamından heparinli tüpe kanlar sistematik bir planlama ile alındıktan sonra 2 saat içerisinde çalışılmış ve gerekli boyama işlemlerinin ardından mikroskop altında görsel değerlendirmeye tabi tutulmuştur. Her örnek için iki adet lam hazırlanmış ve her lamdan ortalama 50 hücrenin fotoğrafı mikroskop altında çekilmiştir. Fotoğrafları çekilen örnekler Open Comet açık kaynak kodlu görsel değerlendirme programında değerlendirilmiş ve gerekli istatistik testler SPSS paket programı aracılığı ile uygulanmıştır (39, 40).

3.3. Comet Metodunun Uygulanışı

Comet metodu, sistemli bir şekilde çalışılması halinde DNA hasarının tespitinde hızlı sonuç veren bir metottür. Ancak metodun prosedürü laboratuvar koşullarına, amaca ve kullanılan materyale göre farklılık gösterebilmektedir. Dusinska (2000), çalışmasında bakteriyel DNA tamir enzimleri ile okside olmuş bazları tespit etmek için modifiye bir comet metodu ortaya koymuştur (41). Yine balık (42, 43), bitki (42), böcek (31), hücre kültürü (44) ve *Drosophila* gibi model organizmalarda (45) farklı prosedürleri takip eden araştırmacılar mevcuttur. Sperm gibi farklı hücreler için de küçük değişiklikler ile geliştirilmiş farklı prosedürler bulunmaktadır (46). Fish (Floresan İn Situ Hibridizasyon) gibi metotlar ile birleştirilerek kullanılabilir (44, 47). Genel olarak memeli lökosit hücrelerinde uygulanan prosedür benzerdir (17, 48, 49) ve lökositlerin bir aracı ile kandan izole edilmesinin ardından lamlara yayılması ve alkali aşamaların uygulanmasını içermektedir. Yine de araştırmacılar Chuang ve Hu yayınladıkları makalelerinde, özellikle maddi kaynakların kısıtlı olması gibi durumlarda klasik prosedüre alternatif olması amacı ile lökosit seperasyonu olmadan kanın direk kullanılması ile comet metodunun, hücrelerin hasar derecesinde herhangi bir farklılık olmadan uygulanabildiğini öne sürmektedirler (50).

Bu çalışmada, son halini 1988 yılında Singh ve arkadaşlarının (51) verdiği ve daha sonra birçok araştırmacının kullandığı (1, 12, 20, 22, 29, 30, 48, 49, 52) alkali comet metodu takip edilmiş ve uygulama aşamaları aşağıda belirtilmiştir.

3.3.1. Comet Metodunda Kullanılan Çözeltiler ve Mikroskop Lamlarının Hazırlanışları

Fosfat Tamponu (PBS)

Fosfat tamponu, hazır olarak satılan tablet veya toz karışımların ilgili markanın yönergesine uygun olarak distile su içerisinde çözülmesi ile veya gerekli kimyasalların laboratuvar ortamında karışımı ile elde edilebilir. Çalışma süresince fosfat tamponu Tablo 2'de belirtilen kimyasalların belirtilen oranlarda 1 litre distile

su içerisinde karıştırılması ile stok olarak +4 °C 'de saklanmış ve çalışma solüsyonu prosedür öncesinde distile su ile on kat dilüe edilerek taze olarak hazırlanmıştır. Hazırlanırken ısıtılmamalıdır.

Tablo 2. Stok Fosfat Tamponunun Hazırlanışı

NaCl	80 gr
KCl	2 gr
KH ₂ PO ₄	2 gr
Na ₂ HPO ₄ veya Na ₂ HPO ₄ -7H ₂ O	11, 5 gr veya 29 gr
TrisHCl	32 gr

Lizis Çözeltisi

Lizis çözeltisi Tablo 3'de belirtilen kimyasalların belirtilen oranlarda 500 ml distile su içerisinde karıştırılması ile stok olarak hazırlanmış, +4 °C 'de saklanmıştır. Çalışma solüsyonu prosedür öncesinde %1 Triton X- 100'den 1 ml, % 10 DMSO'dan 10 ml ve stok lizis solüsyonundan 89 ml alınması ile 100 ml tamamlansısı ile taze olarak hazırlanmıştır. Hazırlanırken ısıtılmamalıdır. Stok lizis çözeltisi hazırlanırken önce EDTA'nın daha sonra diğer kimyasalların çözülmesine dikkat edilmesi, çözeltinin daha hızlı hazırlanması açısından önemlidir. pH = 10 olmalıdır.

Tablo 3. Stok Lizis Çözeltisinin Hazırlanışı

2.5 M NaCl	73.5 gr
100 mM Na ₂ EDTA	18.6 gr
10 mM Trizma Base	0.6 gr

Alkali Elektroferez Tamponu

Alkali elektroferez tamponu Tablo 4'de belirtilen kimyasalların belirtilen oranlarda 500 ml distile su içerisinde karıştırılması ile çalışma öncesinde taze olarak hazırlanmış ve +4 °C 'de saklanmıştır. Hazırlanırken ısıtılmamalıdır. pH > 13 olmasına ve uygulama esnasından donmamış fakat buz soğukluğunda olmasına dikkat edilmelidir.

Tablo 4. Alkali Elektroferez Tamponunun Hazırlanışı

300 mM NaOH	6 gr NaOH
1 mM EDTA	0.18 gr Na ₂ EDTA

Nötralizasyon Çözeltisi

Nötralizasyon çözeltisi, 97 gram Tris'in distile suyla 1 L'ye tamamlanması ile hazırlanır. Çözelti pH'sı 7.5'a getirildikten sonra +4 °C 'de saklanarak prosedür öncesinde 1:1 oranında distile su ile seyreltilerek kullanılmıştır (0.4 M Tris).

Boyama Solüsyonu

Boyama solüsyonu, 5 mg etidyum bromür'ün 50 ml distile su içerisinde çözülmesi ile stok olarak hazırlanmış ve çalışma solüsyonu prosedür öncesinde distile su ile 1/5 - 1/10 oranında seyreltilerek kullanılmıştır. 1 lam için ortalama 30 µL kullanılması yeterlidir. Etidyum bromürün seyreltilme miktarı da laboratuardan laboratuara değişebilir. Fakat az veya çok seyreltilmesi görüntü kalitesini doğrudan etkilemektedir.

Etidyum bromür son derece kanserojen bir maddedir. Boyama solüsyonu olarak başka floresan boyalar veya gümüş boya olarak tercih edilebilir. Gümüş boyama yapılan preparatlar daimi hale getirilebilir ve floresan mikroskoba ihtiyaç kalmadan değerlendirilebilir. Fakat daha yüksek maliyetli ve çok daha zahmetlidir. McNamee ve ark. 2000, SYBR Gold boyasının kullanıldığı preparatların daha uzun ömürlü olduğunu bildirmiştir (53). Fakat yine gümüş boyama gibi daha yüksek maliyet gerekmektedir. Düşük bütçeler için etidyum bromür uygundur ancak dikkatli çalışılmalıdır.

Düşük Erime Noktalı Agaroz (LMA)

LMA, lam başına 80 - 110 µL düşecek şekilde % 0.75 - 1 oranında PBS solüsyonu içerisinde ısı yardımı ile çözülerek hazırlanmıştır.

Normal Erime Noktalı Agaroz (NMA)

NMA, lam başına 100 - 120 µL düşecek şekilde % 1 - 1,5 oranında PBS solüsyonu içerisinde ısı yardımı ile çözülerek hazırlanmıştır. Çok yoğun konsantrasyonlarda hazırlanması elektroforez esnasında DNA göçünü engellemektedir (14).

Lamların Hazırlanması

Comet metodunda lam hazırlanırken amaç, değerlendirme aşamasına kadar bozulmadan kalabilen homojen bir jel elde etmektir. Lamların stabilitesinin sağlanmasının zor olması sebebi ile ticari olarak bu amaçla üretilmiş lamlar kullanılabilir. Ancak çalışmanın bütçesine ciddi yük getirmektedir. Lamların laboratuarda hazırlanması çok daha ekonomik bir yöntemdir.

Temiz ve net bir comet görüntüsü elde etmek için arka planda mümkün olduğu kadar az kirlilik olmalıdır. Çalışma boyunca lamlar, prosedürün uygulanmasından en az bir gün önce üzerine bir başka lam veya pipet ucu yardımı ile NMA yayılarak hazırlanmış ve oda sıcaklığında veya buzdolabında kurumaya bırakılmıştır. Bu işlemin ardından lamların en az bir gece soğukta bekletilmesi çalışmanın minimum lam kaybı ile tamamlanabilmesi açısından önemlidir. Çalışma boyunca lamlara nazik davranılmalı ve slaytların kaymasına sebep olabilecek hareketlerden kaçınılmalıdır. Rodajlı lamlar slaytları daha iyi tuttuğundan önerilmektedir.

3.3.2. Çalışma Basamakları

3.3.2.1. Hücresel Materyalin Hazırlanması

Comet metodunda kullanılacak materyalin canlılığı önem arz etmektedir. Kanlar alındıktan sonra en geç 4 saat içerisinde çalışılmaya başlanmalıdır. Ancak hücrelerin dondurulması ve saklanması için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir (16). Duthie ve arkadaşları dondurarak saklamanın taze olarak izole edilmiş insan lenfositlerindeki DNA hasarı seviyesini artırmadığını belirtmiştir. Hininger ve arkadaşları 2004'de donmuş tam kandaki DNA hasarını değerlendirmek için bir yöntem geliştirmiştir. Tam kan örneği %20 DMSO içeren eşit hacimde medyum ile karıştırılmış ve -80 °C'de saklanmıştır. Taze ve donmuş kanda DNA zincir kırıkları arasında fark görülmemiştir (18). Ancak bu prosedürler çalışma süresi ve maliyetini arttırmaktadır.

Çalışma boyunca heparinli tüpe alınan kanlar hemen laboratuara getirilerek işleme alınmıştır. Gönüllülere ait kanlar ayrı bir ependorfta 1:1 oranında Histopak ile karıştırılarak 20 dk 2000 RPM'de santrifüj edilmiştir. Bu aşamada histopak ependorfa önce eklenmeli, kan histopakın üzerine sızma olarak yavaşça eklenerek üstte kalması sağlanmalıdır.

Santrifüj işleminin ardından lökositler ependorfta ara kısımda bulutumsu bir görüntü oluşturmaktadır. Bu kısım alınıp ayrı bir ependorfa aktarılmış, 1:1 oranında PBS eklenerek 2500 RPM'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısım uzaklaştırılmış ve dipte kalan hücre yoğunluğuna bağlı olarak 25 - 50 µL PBS ile sulandırılarak örnek başına değerlendirilmek istenilen lam kadar ayrı ependorflarda yaklaşık 20 mikrolitre hücre ve 100 mikrolitre LMA karıştırılmıştır. Bu aşamada LMA'nın hücrelere zarar vermemesi için vücut sıcaklığında olmasına dikkat edilmiştir.

3.3.2.2. Yayma

İzole edilerek LMA ile karıştırılan hücreler, NMA ile ön kaplama yapılmış ve numaralandırılmıştır. Hücreler lamaların üzerine otomatik pipet yardımı ile 4 - 5 noktadan damlatılmış ve lamalar uzun lameller ile kapatılarak donması için buzdolabına veya buz kasedine konmuştur. 5 dk sonra lameller çıkarılarak lizis aşamasına geçilmiştir.

3.3.2.3. Lizis

Agaroz jel donduktan sonra lamalar, lizis solüsyonunda hücre ve çekirdek zarlarının parçalanması amacı ile karanlıkta ve soğukta 90 dk bekletilmiştir.

3.3.2.4. Elektroforez

Lizis aşamasından sonra lamalar elektroforez tankına alınarak elektroforez tamponu eklenmiş, karanlık ve soğuk ortamda 30 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda 25 V ve 300 mA'de 25 dakika elektroforezde yürütülmüştür.

3.3.2.5. Nötralizasyon

Elektroforez işleminin ardından lamalar Nötralizasyon tamponu ile 5'er dakikalık sürelerle 2 kez yıkanmıştır. Yıkama sayısının arttırılmasında bir sakınca yoktur fakat lam üzerinden slaytların kaymamasına dikkat edilmelidir.

3.3.2.6. Fiksasyon

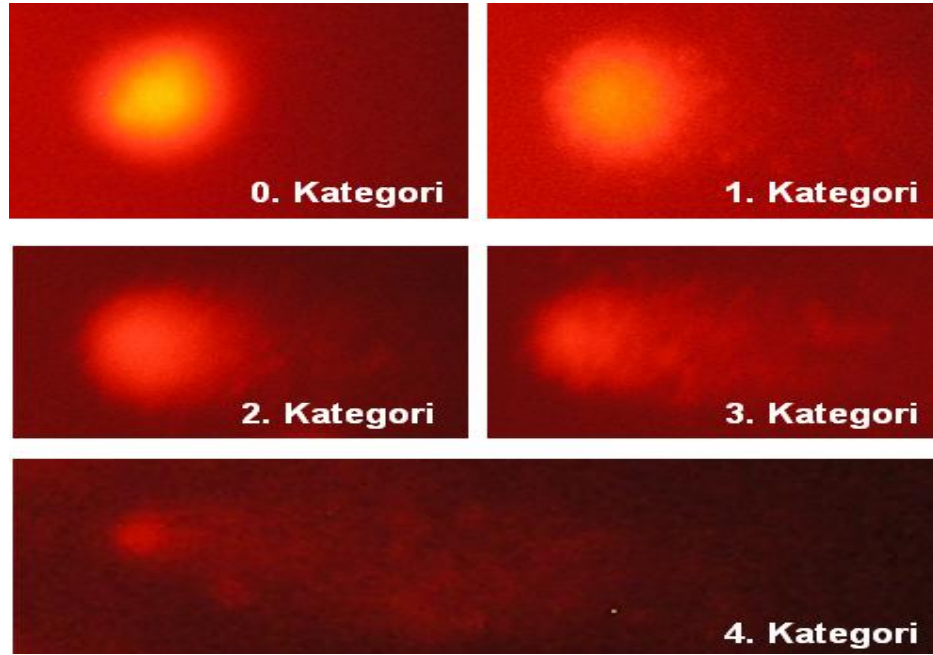
Nötralizasyondan sonra jelde DNA'nın difüzyonunu engellemek için sonuçlar kısa süre içerisinde değerlendirilmelidir. Ancak lamalar absolut alkolde kısa süre bekletilerek sonuçların uzun süre sonra incelenmesi amacı ile fiksasyon uygulanabilir. Woods ve ark. (1999), fiksasyon ile bekletilmiş lamalar ile taze hazırlanmış lamaların sonuçları arasında önem arz edecek bir fark bulunmadığını ileri sürmüşlerdir (54).

Çalışma süresince bütün örnekler en geç 24 saat içerisinde değerlendirilmiş ve fiksasyona tabi tutulmamıştır.

3.3.2.7. DNA'nın Boyanması, Cometlerin Görüntülenmesi ve Fotoğraflarının Çekilmesi

Comet metodunda sonuçlar gözle veya bilgisayar programları aracılığı ile değerlendirilebilir. Araştırmacı tarafından gözle görsel değerlendirmeye tabi tutulacak cometler DNA göç uzunluğuna göre 5 kategoride tanımlanır (0-4). 0 en düşük hasar derecesini ifade ederken 4 en yüksek hasar derecesini ifade etmektedir.

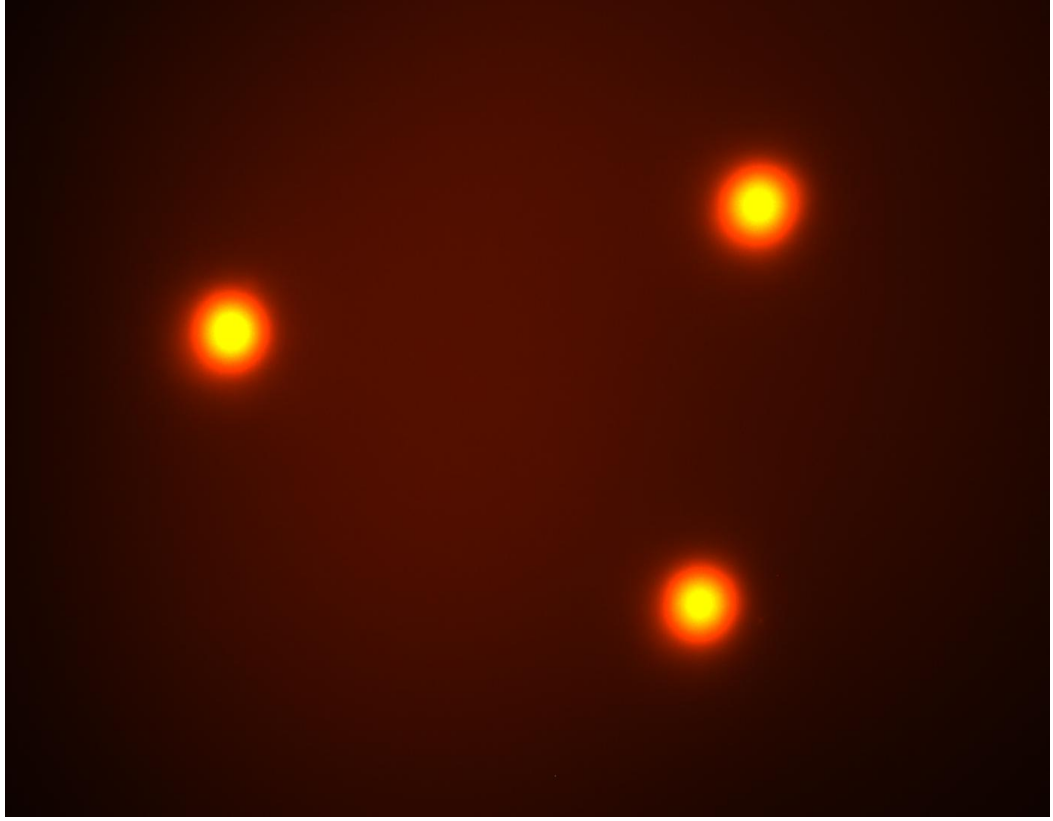
Kuyruksuz parlak noktalar 0, çok küçük baş kısmına sahip ve kuyrukları ile kuyruklu yıldız görünümü verenler ise 4. kategoriye girer. 0-4 kategorileri arasında yer alan cometler kolaylıkla ayırt edilebilecek şekilde 1, 2 ve 3 kategorilerinde yer alır. Her lamdan minimum 50 comet kategorize edilerek spesifik formüller ile DNA hasarı belirlenir.



Şekil 9. Comet Hasar dereceleri (Dinçer ve Kankaya, 2010)

Bu yöntemin yanı sıra özel fotoğraf analiz programları aracılığı ile de cometlerin değerlendirilmeleri yapılabilir. Programlar comet başını kuyruktan ayırt edebilecek ve kuyruk uzunluğu, baş ve kuyruktaki flüoresans yüzdesi, kuyruk momenti gibi çeşitli parametreleri belirleyebilecek özelliktedir.

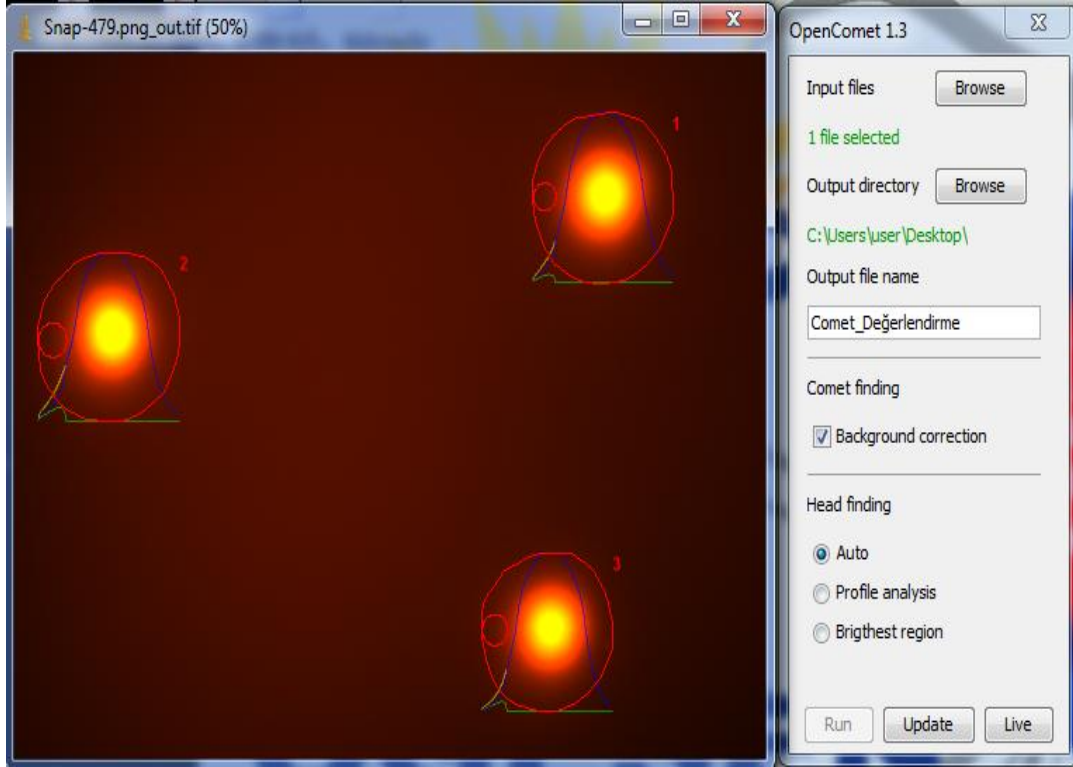
Tez çalışması süresince prosedürün tamamlanmasının ardından örnekler etidyum bromür ile boyanmış ve Zeiss İmager A1 marka floresan mikroskop altında Zeiss Axiocam Icc 1 kamera ile değerlendirilmek üzere fotoğrafları çekilmiştir.



Şekil 10. Kontrol Grubuna ait Comet Görüntüleri

3.3.2.8. Bilgisayar Programı ile Değerlendirme

Fotoğrafları çekilen örnekler Open Comet açık kaynak kodlu görsel değerlendirme programında değerlendirilmiştir. Şekil 11'de görüldüğü gibi programa yüklenen fotoğraflar otomatik olarak değerlendirilmiş, sonuçları Şekil 12'de görüldüğü gibi parametreler halinde istenilen kelime işlemci program aracılığı ile verilmiştir.



Şekil 11. Open Comet Programı ile Değerlendirilmiş Cometler

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S
	File Name	Num	Flag	Comet Area	Comet Intensity	Comet Length	Comet DNA	Head Area	Head Intensity	Head Length	Head DNA	Head DNA Percent	Tail Area	Tail Intensity	Tail Length	Tail DNA	Tail DNA Percent	Tail Moment	Olive Moment
1	263.bmp	1	normal	6603	56.07739	129	370279	448	69.69866	24	31225	8.43283	6155	55.08595	105	339054	91.56717	96.14553	54.9403
3	263.bmp	2	normal	5158	94.95405	93	489773	538	106.6803	26	57394	11.71849	4620	93.58853	67	432379	88.28151	59.14861	33.54697
4	263.bmp	3	normal	6450	119.9746	114	773836	912	140.8706	34	128474	16.60223	5538	116.5334	80	645362	83.39777	66.71822	35.86104
5	263.bmp	4	normal	4918	32.91501	111	161876	661	38.51891	30	25461	15.72871	4257	32.04487	81	136415	84.27129	68.25975	45.5065
6	263.bmp	5	normal	7063	68.15447	130	481375	613	78.30832	28	48003	9.972059	6450	67.18946	102	433372	90.02794	91.8285	52.21621
7	263.bmp	6	normal	7431	60.80716	142	451858	797	51.91468	32	41376	9.156859	6634	61.87549	110	410482	90.84314	99.92746	56.32275
8	263.bmp	7	normal	6486	37.21986	128	241408	439	47.1344	24	20692	8.571381	6047	36.50008	104	220716	91.42862	95.08576	55.77146
9	263.bmp	8	normal	6539	56.44839	118	3691116	383	65.1201	22	24941	6.756954	6156	55.90887	96	344175	93.24305	89.51332	52.21611
10	263.bmp	9	outlier	14265	41.77638	126	595940	12694	42.87916	127	544308	91.33604	1571	32.86569	0	51632	8.663959	0	0.173279
11	263.bmp	10	normal	6287	120.7857	109	759380	912	129.4901	34	118095	15.5515	5375	119.3088	75	641285	84.4485	63.33637	37.15734
12	263.bmp	11	outlier	11603	44.07705	160	511426	1563	39.21241	46	61289	11.98394	10040	44.83436	114	450137	88.01606	100.3383	60.73108
13	263.bmp	12	outlier	6768	39.34161	137	266264	602	42.59468	28	25642	9.630292	6166	39.024	109	240622	90.36971	98.50298	59.64401
14	263.bmp	13	normal	9715	85.75903	153	833149	540	84.54444	26	45654	5.479692	9175	85.83052	127	787495	94.52031	120.0408	65.21901
15	263.bmp	14	normal	5891	43.4826	114	256156	316	56.98418	20	18007	7.029701	5575	42.71731	94	238149	92.9703	87.39208	50.20396

Şekil 12. Open Comet Programının Vermiş Olduğu Parametreler ve Programın Örnek Görseli (Gyori ve ark., 2014)

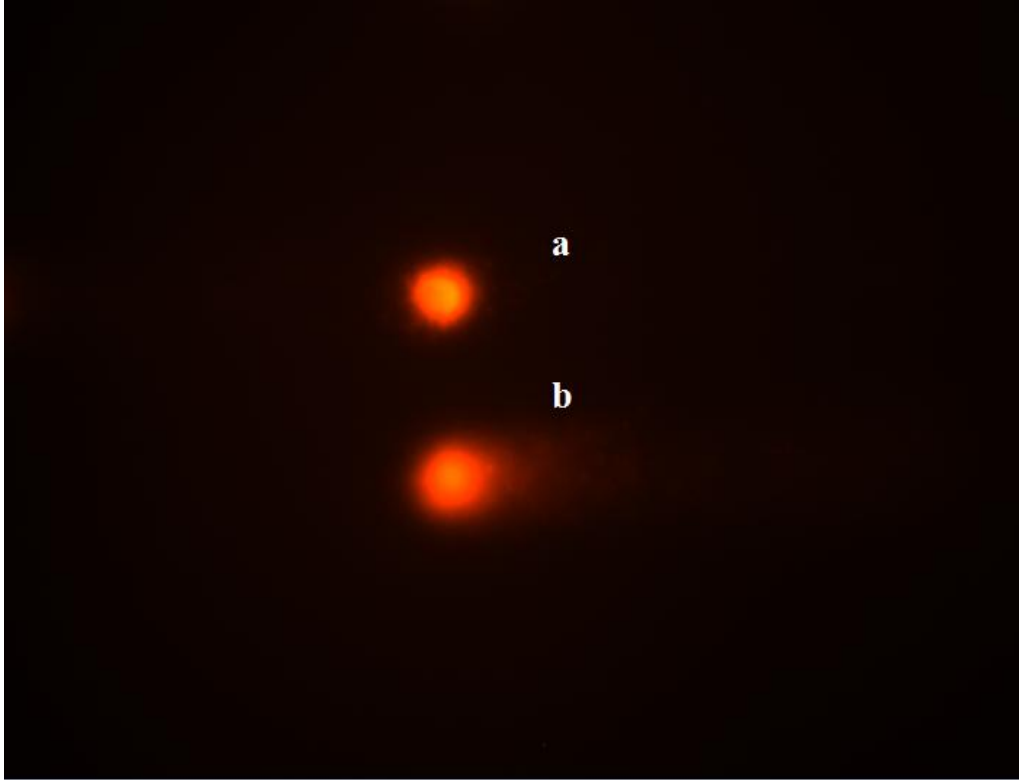
3.4. İstatistiksel Analiz

Kumaravel ve Jha (2006), yaptıkları çalışmaları ile insan kan hücrelerini farklı iyonize radyasyon dozlarına maruz bırakarak comet parametrelerinin kullanılabilirliğini ortaya koymuşlardır. Çalışma sonucunda comet kuyruk ve baş

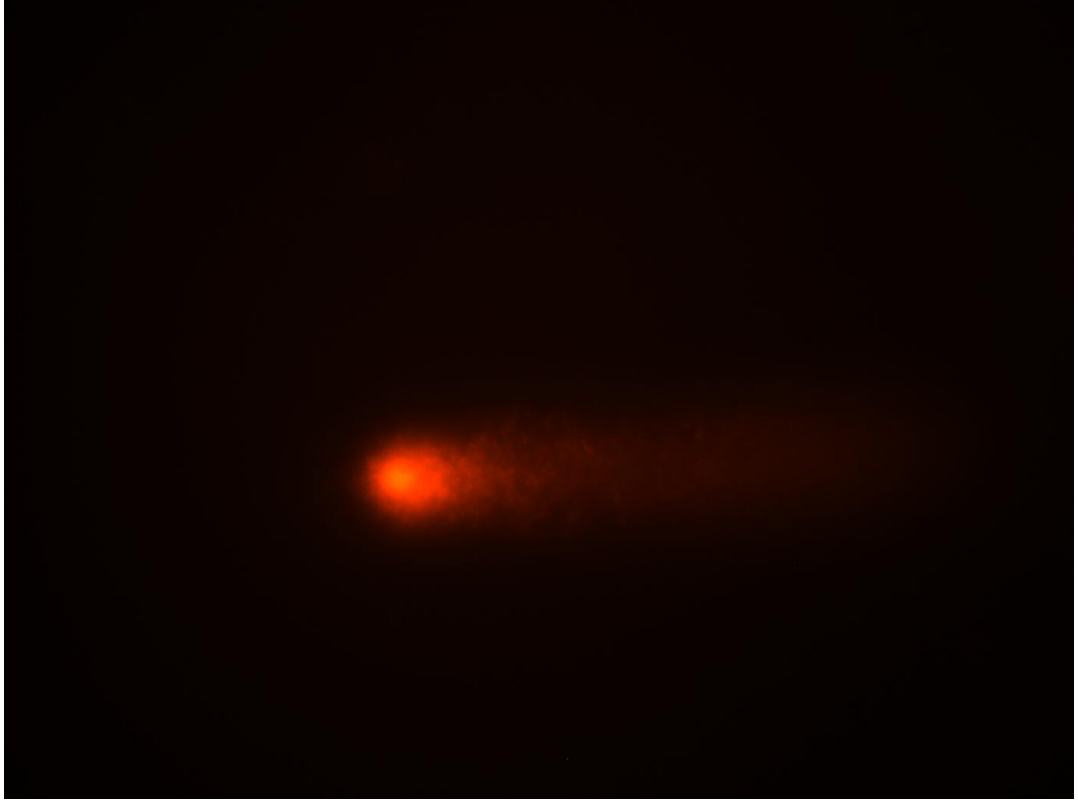
uzunluğu, kuyruk momenti gibi parametrelerin iyonize radyasyon kaynaklı hasarın belirlenmesinde çok kullanışlı oldukları bulunmuştur (55).

Elde edilen sonuçlardan Kuyruk Uzunluğu, Kuyruk Momenti ve Kuyruk DNA Yüzdesi parametreleri DNA hasar miktarını yansıtmaları açısından seçilmiştir. Kuyruk Uzunluğu ve Kuyruk momenti parametreleri birçok araştırmacı tarafından DNA hasar miktarını yansıtmaları için kullanılmaktadır ve ana parametreler olarak kabul edilebilir. Olive Moment veya Kuyruk DNA Yüzdesi parametreleri benzer parametreler olmakla birlikte Ueno ve arkadaşarı (2007), fare ve ratlarda bütün vücuda radyasyon verildikten sonra Kuyruk DNA Yüzdesi parametresinin DNA hasarını Olive Moment'den daha fazla yansıttığını göstermiştir (9).

Sonuçlar için "Mann Whitney U" ve "Kruskal Wallis H" istatistik testleri SPSS V20 paket programı aracılığı ile uygulanmıştır. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.



Şekil 13. Radyasyon Çalışanları Grubuna Ait 1. (a) ve 2. (b) Derece Hasarlı Cometler



Şekil 14. Radyasyon Çalışanları Grubuna Ait 3. Derece Hasarlı Bir Comet



Şekil 15. Radyasyon Çalışanları Grubuna Ait 4. Derece Hasarlı Bir Comet

4. BULGULAR

Çalışmaya 18 - 57 yaş aralığında 29'u erkek 19'u kadın 48 radyasyon çalışanı ve 23'ü erkek 28'i kadın 51 kontrol grubu olmak üzere 50 erkek 49 kadın toplam 99 kişi dahil edilmiştir. Radyasyon çalışanlarının yaş ortalaması $36,16 \pm 6,63$, kontrol grubunun yaş ortalaması ise yaklaşık $32,33 \pm 7,89$ 'dur. Çalışma sırasında her gönüllünün yaşı, cinsiyeti, sigara alışkanlığı ve radyasyona maruz kalma yılları kaydedilmiş ve bu parametrelerin DNA hasarına etkisi istatistik olarak değerlendirilmiştir.

Tablo 5. Alkali Comet metodunun radyasyon çalışanları ve kontrol grubundaki bireysel sonuçları ve bireylere ait bilgiler

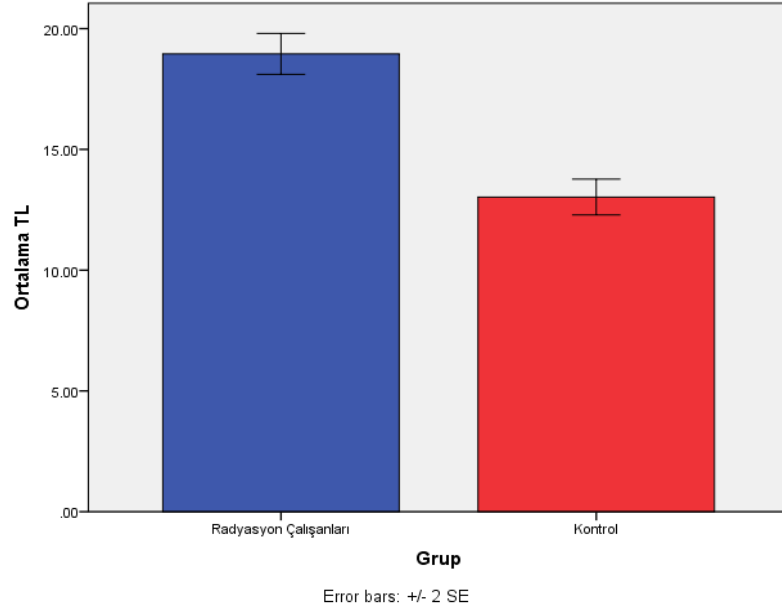
Örnek No	Grubu	Yaş	Cins.	Sigara	Maruziyet	Kuyruk Uzunluğu				Kuyruk Momenti				Kuyruk DNA Yüzdesi			
						Mean	Std. Hata	Minimum	Maksimum	Mean	Std. Hata	Minimum	Maksimum	Mean	Std. Hata	Minimum	Maksimum
1.00	Radyasyon Çalışanı	40	K	Hayır	9 Yıl	1.15	0.48	0.00	5.98	15.00	4.40	0.00	44.00	4.80	1.64	0.11	20.26
2.00	Radyasyon Çalışanı	41	K	Hayır	1,5 Yıl	2.43	0.25	0.00	8.10	28.38	1.88	0.00	42.00	7.45	0.62	0.01	19.75
3.00	Radyasyon Çalışanı	33	E	Hayır	10 Yıl	1.72	0.17	0.00	4.22	22.48	1.64	0.00	45.00	6.24	0.47	0.05	19.35
4.00	Radyasyon Çalışanı	26	E	Evet	1 Yıl	1.09	0.31	0.00	7.12	14.42	2.73	0.00	61.00	4.92	0.68	0.03	11.68
5.00	Radyasyon Çalışanı	50	E	Evet	25 Yıl	1.94	0.24	0.00	6.26	23.18	2.00	0.00	36.00	6.97	0.69	0.15	17.38
6.00	Radyasyon Çalışanı	41	K	Evet	20 Yıl	0.66	0.26	0.00	2.45	13.40	2.83	0.00	28.00	3.75	0.90	0.29	9.41
7.00	Radyasyon Çalışanı	44	K	Evet	21 Yıl	1.70	0.46	0.00	17.48	17.33	1.48	0.00	37.00	9.12	2.31	1.40	83.22
8.00	Radyasyon Çalışanı	29	E	Evet	4 Yıl	0.46	0.25	0.12	0.95	8.67	1.76	6.00	12.00	4.56	1.77	2.01	7.95
9.00	Radyasyon Çalışanı	27	E	Hayır	1,5 Yıl	0.27	0.02	0.17	0.34	10.17	0.87	8.00	14.00	2.76	0.29	1.93	3.73
10.00	Radyasyon Çalışanı	37	E	Hayır	12 Yıl	0.64	0.14	0.00	2.97	13.32	1.20	0.00	25.00	4.15	0.77	0.15	16.51
11.00	Radyasyon Çalışanı	35	K	Hayır	11 Yıl	0.88	0.20	0.00	3.12	14.06	1.71	0.00	28.00	5.43	0.92	0.11	13.03
12.00	Radyasyon Çalışanı	44	E	Hayır	20 Yıl	0.96	0.63	0.15	3.46	11.00	2.49	6.00	20.00	6.71	2.78	1.22	17.31
13.00	Radyasyon Çalışanı	40	E	Hayır	19 Yıl	0.93	0.53	0.01	3.47	12.00	3.55	1.00	23.00	5.48	2.22	0.66	15.11
14.00	Radyasyon Çalışanı	38	K	Evet	3 Yıl	1.93	0.94	0.00	12.39	13.40	3.01	0.00	50.00	9.20	3.99	0.41	61.94
15.00	Radyasyon Çalışanı	33	K	Hayır	14 Yıl	0.35	0.15	0.00	1.81	10.36	1.51	0.00	19.00	2.68	0.72	1.10	9.51
16.00	Radyasyon Çalışanı	42	E	Evet	20 Yıl	0.76	0.28	0.41	1.61	12.00	2.38	9.00	19.00	5.85	0.89	4.59	8.45
17.00	Radyasyon Çalışanı	32	K	Hayır	8 Yıl	1.22	0.64	0.00	8.02	15.33	2.98	0.00	37.00	5.02	1.62	0.86	21.68
18.00	Radyasyon Çalışanı	34	E	Hayır	15 Yıl	1.28	0.52	0.00	7.62	15.83	3.21	0.00	46.00	4.70	1.11	0.77	17.31
19.00	Radyasyon Çalışanı	38	E	Evet	20 Yıl	0.60	0.30	0.10	2.35	12.86	2.77	6.00	28.00	3.71	0.89	1.38	8.41
20.00	Radyasyon Çalışanı	34	K	Evet	10 Yıl	0.96	0.53	0.43	1.48	12.50	0.50	12.00	13.00	7.84	4.52	3.32	12.36
21.00	Radyasyon Çalışanı	33	K	Hayır	9 Yıl	3.64	0.88	0.00	20.60	21.19	2.92	0.00	66.00	11.41	1.50	0.59	33.23

22.00	Radyasyon Çalışanı	20	E	Evet	3 Yıl	1.56	0.29	0.07	8.19	15.94	1.08	5.00	31.00	8.77	1.65	1.31	54.60
23.00	Radyasyon Çalışanı	38	E	Evet	18 Yıl	0.89	0.19	0.21	1.78	12.90	1.41	7.00	21.00	6.29	0.85	2.35	10.09
24.00	Radyasyon Çalışanı	25	E	Evet	1 Yıl	1.98	1.32	0.03	12.44	16.00	2.59	6.00	31.00	9.38	5.36	0.46	51.85
25.00	Radyasyon Çalışanı	44	E	Evet	20 Yıl	1.08	0.29	0.00	3.55	16.94	3.22	0.00	42.00	4.31	0.78	0.09	9.70
26.00	Radyasyon Çalışanı	34	E	Evet	10 Yıl	0.85	0.17	0.54	1.34	11.00	1.08	9.00	14.00	7.56	0.80	6.03	9.55
27.00	Radyasyon Çalışanı	35	K	Evet	5 Yıl	1.64	1.11	0.30	6.08	16.40	5.69	9.00	39.00	7.09	2.21	3.39	15.59
28.00	Radyasyon Çalışanı	32	E	Hayır	7 Yıl	0.48	0.10	0.08	0.75	10.67	1.28	6.00	15.00	4.27	0.77	1.33	6.80
29.00	Radyasyon Çalışanı	44	E	Hayır	20 Yıl	4.56	2.70	0.00	30.37	19.67	6.34	0.00	78.00	11.75	3.63	0.98	38.93
30.00	Radyasyon Çalışanı	34	E	Hayır	8 Yıl	2.90	1.94	0.00	33.46	19.88	4.49	0.00	71.00	6.72	2.63	0.76	47.13
31.00	Radyasyon Çalışanı	32	E	Evet	14 Yıl	2.69	1.64	0.12	19.94	13.77	2.73	6.00	43.00	11.60	6.19	1.33	83.10
32.00	Radyasyon Çalışanı	40	E	Hayır	18 Yıl	3.02	1.42	0.00	29.80	15.70	1.49	0.00	38.00	11.85	3.99	0.18	84.86
33.00	Radyasyon Çalışanı	37	E	Evet	14 Yıl	0.71	0.57	0.01	1.83	11.00	5.51	1.00	20.00	4.15	2.53	0.93	9.15
34.00	Radyasyon Çalışanı	20	E	Evet	1 Yıl	1.10	0.56	0.05	3.62	13.67	2.94	6.00	25.00	5.84	2.24	0.88	14.46
35.00	Radyasyon Çalışanı	43	E	Hayır	14 Yıl	0.09	0.03	0.00	0.22	7.57	1.94	0.00	14.00	1.15	0.19	0.51	2.02
36.00	Radyasyon Çalışanı	42	K	Hayır	20 Yıl	1.39	0.34	0.00	5.31	18.53	3.01	0.00	33.00	5.24	1.04	0.05	16.09
37.00	Radyasyon Çalışanı	33	K	Hayır	13 Yıl	1.62	0.17	0.00	2.88	19.83	2.04	0.00	31.00	6.77	0.66	0.07	10.27
38.00	Radyasyon Çalışanı	39	E	Evet	16 Yıl	1.48	0.16	0.00	5.47	18.60	0.97	0.00	27.00	7.03	0.57	0.06	20.27
39.00	Radyasyon Çalışanı	47	K	Hayır	7 Yıl	1.72	0.14	0.00	4.87	23.75	0.93	1.00	38.00	6.82	0.36	0.47	12.81
40.00	Radyasyon Çalışanı	41	E	Evet	6 Yıl	0.92	0.24	0.00	5.26	13.85	2.06	0.00	31.00	4.09	0.87	0.02	20.24
41.00	Radyasyon Çalışanı	40	K	Hayır	2,5 Yıl	1.19	0.22	0.00	4.08	18.73	1.94	0.00	42.00	4.97	0.61	0.28	10.02
42.00	Radyasyon Çalışanı	26	E	Evet	3 Yıl	1.19	0.23	0.00	3.88	18.79	2.67	0.00	39.00	4.34	0.64	0.02	9.94
43.00	Radyasyon Çalışanı	38	E	Evet	10 Yıl	0.99	0.28	0.00	2.98	13.69	3.17	0.00	32.00	4.08	0.98	0.02	11.03
44.00	Radyasyon Çalışanı	46	K	Hayır	16 Yıl	1.94	0.28	0.03	7.48	27.58	2.34	3.00	56.00	5.59	0.54	0.94	14.97
45.00	Radyasyon Çalışanı	30	K	Hayır	2 Yıl	1.84	0.24	0.00	4.28	20.71	2.43	0.00	38.00	6.59	0.76	0.10	11.45
46.00	Radyasyon Çalışanı	37	K	Hayır	3 Yıl	2.25	0.47	0.27	5.73	34.87	4.65	8.00	74.00	5.75	0.68	1.83	10.16
47.00	Radyasyon Çalışanı	35	K	Hayır	9 Yıl	2.83	0.32	0.00	6.06	26.50	2.55	0.00	45.00	8.22	0.74	0.04	14.82

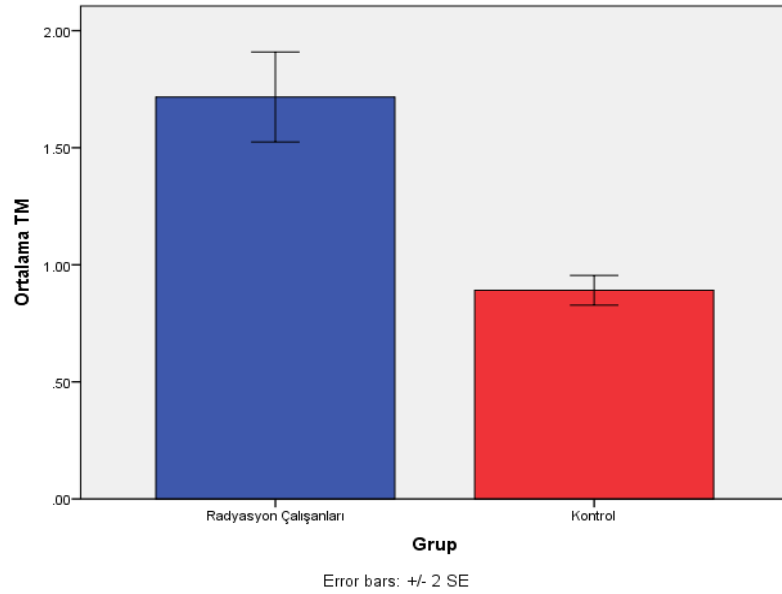
48.00	Radyasyon Çalışanı	33	E	Hayır	7 Yıl	2.00	0.82	0.00	14.16	20.59	5.05	0.00	71.00	4.98	1.27	0.06	19.95
49.00	Kontrol	28	K	Hayır		0.42	0.17	0.00	2.65	8.62	2.35	0.00	33.00	2.05	0.54	0.02	8.27
50.00	Kontrol	26	K	Hayır		0.34	0.16	0.00	2.96	8.17	2.37	0.00	38.00	1.94	0.49	0.12	7.78
51.00	Kontrol	25	E	Hayır		0.39	0.08	0.00	1.93	10.88	1.57	0.00	27.00	2.52	0.35	0.09	7.16
52.00	Kontrol	35	K	Hayır		0.61	0.14	0.00	2.05	12.32	2.23	0.00	30.00	3.00	0.47	0.09	6.96
53.00	Kontrol	34	K	Hayır		1.58	0.30	0.00	5.29	16.10	2.58	0.00	38.00	5.73	0.95	0.10	14.00
54.00	Kontrol	33	E	Hayır		1.46	0.24	0.00	3.65	20.44	2.76	0.00	36.00	5.16	0.69	0.02	10.14
55.00	Kontrol	44	E	Hayır		1.50	0.40	0.00	2.37	19.57	5.00	0.00	31.00	5.74	1.35	0.69	9.30
56.00	Kontrol	27	E	Hayır		0.87	0.20	0.00	3.12	12.14	2.49	0.00	36.00	3.36	0.67	0.12	9.25
57.00	Kontrol	38	K	Hayır		1.26	0.23	0.00	3.21	16.90	2.57	0.00	35.00	4.67	0.71	0.09	10.74
58.00	Kontrol	40	E	Hayır		1.55	0.29	0.00	5.00	19.43	3.09	0.00	36.00	5.36	0.89	0.07	13.88
59.00	Kontrol	30	K	Hayır		1.38	0.32	0.00	3.79	16.56	3.01	0.00	42.00	5.52	1.00	0.21	11.26
60.00	Kontrol	31	K	Hayır		1.01	0.38	0.00	2.22	14.71	5.27	0.00	29.00	3.88	1.38	0.03	7.66
61.00	Kontrol	40	K	Hayır		0.96	0.30	0.00	3.46	11.50	3.40	0.00	43.00	3.28	0.96	0.03	10.54
62.00	Kontrol	32	K	Hayır		1.15	0.25	0.00	3.12	16.86	3.04	0.00	34.00	4.19	0.76	0.02	9.74
63.00	Kontrol	53	E	Evet		0.64	0.20	0.00	2.38	8.70	2.40	0.00	28.00	2.85	0.75	0.04	8.84
64.00	Kontrol	33	E	Evet		0.24	0.21	0.00	2.49	5.25	2.42	0.00	28.00	1.41	0.73	0.07	8.90
65.00	Kontrol	35	E	Hayır		1.18	0.27	0.00	3.26	16.00	3.24	0.00	33.00	4.54	0.85	0.00	9.87
66.00	Kontrol	47	K	Hayır		0.16	0.06	0.00	1.48	4.64	1.22	0.00	27.00	2.16	0.26	0.18	5.48
67.00	Kontrol	31	E	Hayır		1.03	0.22	0.00	2.79	15.53	2.80	0.00	31.00	4.20	0.80	0.01	8.99
68.00	Kontrol	35	K	Evet		1.35	0.30	0.00	3.95	19.09	3.13	0.00	42.00	4.75	0.82	0.18	11.60
69.00	Kontrol	40	E	Evet		1.25	0.19	0.00	3.57	18.32	2.20	0.00	36.00	4.69	0.57	0.09	10.18
70.00	Kontrol	20	E	Evet		0.83	0.33	0.00	2.24	12.80	4.51	0.00	30.00	3.20	1.08	0.07	7.72
71.00	Kontrol	40	K	Hayır		1.29	0.27	0.00	3.98	15.64	2.71	0.00	31.00	5.05	0.91	0.04	12.82
72.00	Kontrol	24	K	Evet		1.47	0.16	0.00	3.30	21.44	1.94	0.00	32.00	5.66	0.53	0.27	10.32
73.00	Kontrol	31	K	Hayır		0.57	0.18	0.00	2.16	9.17	2.28	0.00	29.00	3.57	0.68	0.21	8.64

74.00	Kontrol	29	E	Hayır		0.88	0.18	0.00	2.20	14.00	2.46	0.00	28.00	3.98	0.69	0.13	8.47
75.00	Kontrol	27	E	Hayır		0.92	0.33	0.00	4.94	9.57	2.75	0.00	32.00	3.63	1.07	0.06	15.43
76.00	Kontrol	24	K	Hayır		1.43	0.22	0.00	3.89	19.58	2.69	0.00	38.00	5.01	0.69	0.01	10.24
77.00	Kontrol	24	K	Hayır		1.21	0.21	0.00	3.92	14.21	2.06	0.00	34.00	5.16	0.74	0.00	13.19
78.00	Kontrol	29	K	Hayır		1.04	0.34	0.00	3.55	14.42	3.74	0.00	35.00	4.04	1.12	0.10	10.16
79.00	Kontrol	30	K	Hayır		1.24	0.21	0.00	3.26	17.76	2.39	0.00	34.00	4.87	0.68	0.12	10.86
80.00	Kontrol	28	E	Hayır		1.27	0.19	0.00	2.91	17.00	2.25	0.00	31.00	5.10	0.67	0.12	10.67
81.00	Kontrol	34	K	Hayır		0.35	0.10	0.00	1.24	8.40	1.76	0.00	23.00	2.54	0.46	0.11	5.97
82.00	Kontrol	34	K	Hayır		0.59	0.15	0.00	2.02	10.73	1.92	0.00	27.00	3.03	0.57	0.06	8.07
83.00	Kontrol	24	K	Evet		0.25	0.07	0.00	1.33	6.73	1.42	0.00	23.00	2.17	0.41	0.10	7.39
84.00	Kontrol	18	E	Hayır		0.97	0.14	0.00	1.91	17.86	2.05	0.00	28.00	4.28	0.50	0.01	6.83
85.00	Kontrol	18	K	Hayır		0.68	0.17	0.00	2.41	12.65	2.47	0.00	37.00	3.28	0.65	0.17	8.40
86.00	Kontrol	43	K	Hayır		0.15	0.11	0.00	3.04	2.15	1.15	0.00	27.00	1.10	0.43	0.03	11.24
87.00	Kontrol	29	K	Evet		0.77	0.19	0.00	2.84	12.16	2.64	0.00	32.00	3.04	0.65	0.03	9.81
88.00	Kontrol	33	K	Hayır		0.89	0.24	0.00	3.71	13.00	2.85	0.00	32.00	3.44	0.81	0.00	11.59
89.00	Kontrol	34	K	Hayır		1.50	0.10	1.30	1.62	26.00	1.15	24.00	28.00	5.78	0.44	5.01	6.54
90.00	Kontrol	28	E	Hayır		1.26	0.26	0.00	2.86	19.40	3.76	0.00	36.00	4.40	0.85	0.09	9.86
91.00	Kontrol	36	K	Hayır		0.01	0.01	0.00	0.27	0.86	0.60	0.00	13.00	0.41	0.09	0.04	2.06
92.00	Kontrol	27	E	Evet		0.20	0.12	0.00	1.96	4.41	1.55	0.00	21.00	1.99	0.52	0.26	9.31
93.00	Kontrol	26	K	Hayır		1.03	0.19	0.00	2.33	16.85	2.75	0.00	31.00	4.17	0.66	0.14	8.13
94.00	Kontrol	29	K	Hayır		0.17	0.05	0.00	0.53	5.77	1.72	0.00	13.00	1.74	0.37	0.13	4.06
95.00	Kontrol	43	E	Evet		0.85	0.20	0.00	3.71	10.81	2.12	0.00	33.00	3.82	0.71	0.11	11.85
96.00	Kontrol	32	E	Evet		0.88	0.25	0.00	3.44	11.38	2.83	0.00	37.00	3.17	0.76	0.14	10.06
97.00	Kontrol	57	E	Evet		0.75	0.18	0.00	3.34	12.17	1.86	0.00	29.00	3.77	0.61	0.10	11.93
98.00	Kontrol	31	E	Evet		0.50	0.13	0.00	2.68	7.78	1.75	0.00	27.00	2.42	0.51	0.01	10.32
99.00	Kontrol	30	K	Hayır		1.16	0.17	0.00	3.12	17.04	1.88	0.00	29.00	5.15	0.61	0.18	12.01

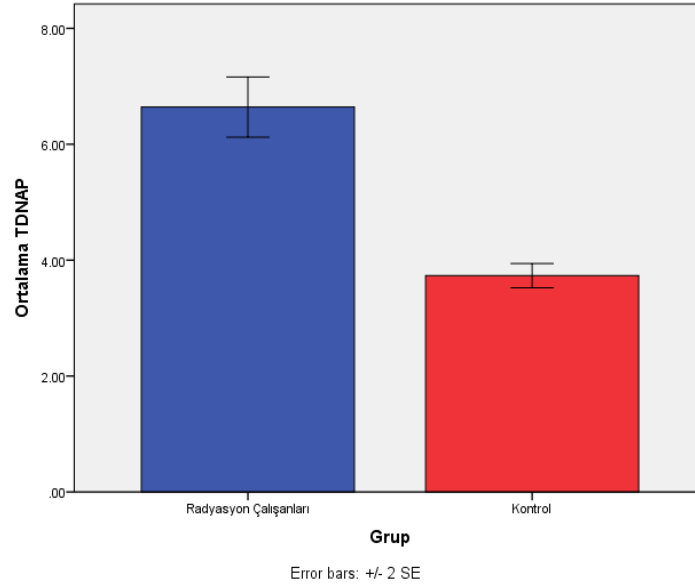
İyonize radyasyona maruz kalan radyasyon çalışanları ile kontrol grubunun karşılaştırması kuyruk uzunluğu, kuyruk momenti ve kuyruk DNA yüzdesi parametreleri için Mann Whitney U Testi ile yapılmış ve oldukça anlamlı sonuçlar elde edilmiştir ($p < 0.05$). Buna göre radyasyon çalışanları kontrol grubuna göre daha yüksek DNA hasar seviyesine sahiptir.



Şekil 16. Kontrol ve Radyasyon Çalışanlarının Kuyruk Uzunluğu (TL)



Şekil 17. Kontrol ve Radyasyon Çalışanlarının Kuyruk Momenti (TM)



Şekil 18. Kontrol ve Radyasyon Çalışanlarının Kuyruk DNA Yüzdesi (TDNAP)

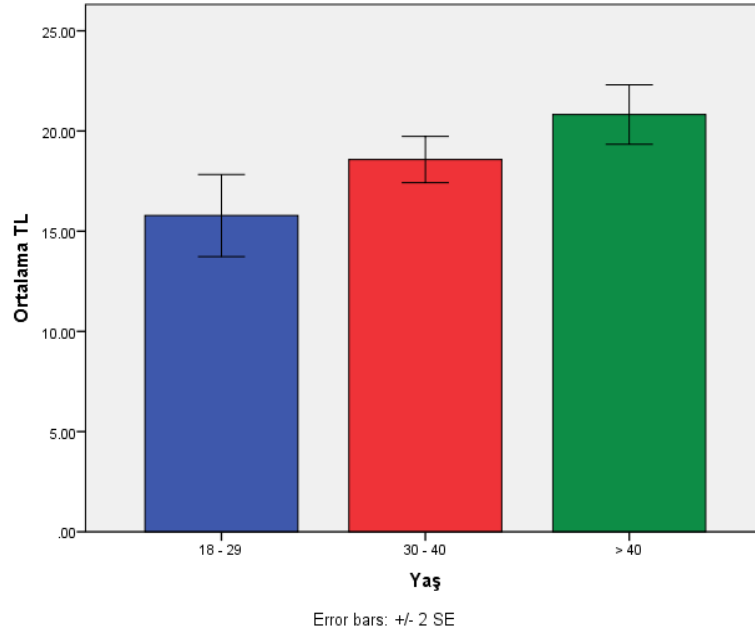
Tablo 6. Radyasyon Çalışanı ve Kontrol Gruplarının DNA hasarlarının Mann - Whitney U Testi ile karşılaştırılması. $P < 0.05$ olarak bulunmuştur. (TL: Kuyruk Uzunluğu, TM: Kuyruk Momenti, TDNAP: Kuyruk DNA Yüzdesi)

	TL	TDNAP	TM
Mann-Whitney U	367724.000	332256.500	348783.500
Asymp. Sig. (2-tailed) (p Değeri)	.000	.000	.000

Radyasyon çalışanlarının DNA hasarlarının yaşları ile olan ilişkileri Kruskal Wallis Testi ile karşılaştırılmıştır. Radyasyon çalışanları 18 - 29, 30 - 40 ve > 40 olmak üzere 3 farklı yaş grubuna ayrılmıştır. Kuyruk uzunluğu ve kuyruk momentini parametreleri $P < 0.05$ yani anlamlı olarak bulunmuş ancak kuyruk DNA yüzdesi parametresinde yaş ile herhangi bir ilişki bulunamamıştır ($P > 0.05$) Buna göre yaş arttıkça Kuyruk uzunluğu ve Kuyruk Momenti, dolayısı ile DNA hasarı artmaktadır.

Tablo 7. Radyasyon Çalışanlarının Kuyruk Uzunluğu (TL), Kuyruk Momenti (TM) ve Kuyruk DNA Yüzdesi (TDNAP) Değerlerinin Kruskal Wallis Testi ile Yaş Bakımından Değerlendirilmesi

	TL	TDNAP	TM
Chi-Square	17.258	1.221	6.325
Asymp. Sig.	.000	.543	.042



Şekil 19. Radyasyon Çalışanlarının Yaşa Göre Ortalama Kuyruk Uzunlukları (TL)

Radyasyon çalışanlarının DNA hasar miktarlarının radyolojik birimlerde çalışma yılları ile ilişkileri yine Kruskal Wallis Testi ile karşılaştırılmıştır. Radyasyon çalışanları 1 -5, 6 - 10 ve > 10 olmak üzere 3 farklı maruziyet grubuna ayrılmıştır. Kuyruk uzunluğu ve kuyruk momenti parametreleri $P < 0.05$ olarak bulunmuş ancak kuyruk DNA yüzdesi parametresinde çalışma yılı ile herhangi bir ilişki bulunamamıştır ($P > 0.05$) Buna göre radyolojik birimlerde çalışılan zaman arttıkça Kuyruk uzunluğu ve Kuyruk Momenti, dolayısı ile DNA hasarı artmaktadır.

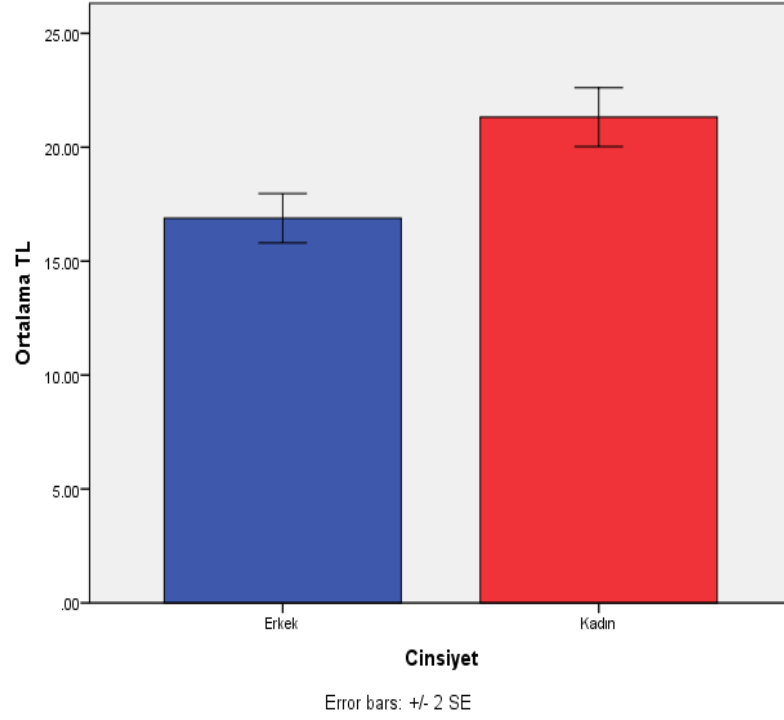
Tablo 8. Kruskal Wallis Testi ile Radyasyon Çalışanlarının Kuyruk Uzunluğu (TL), Kuyruk Momenti (TM) ve Kuyruk DNA Yüzdesi (TDNAP) Değerlerinin İyonize Radyasyona Maruziyet Yılına Göre Değerlendirilmesi

	TL	TDNAP	TM
Chi-Square	9.351	2.673	6.913
Asymp. Sig.	.009	.263	.032

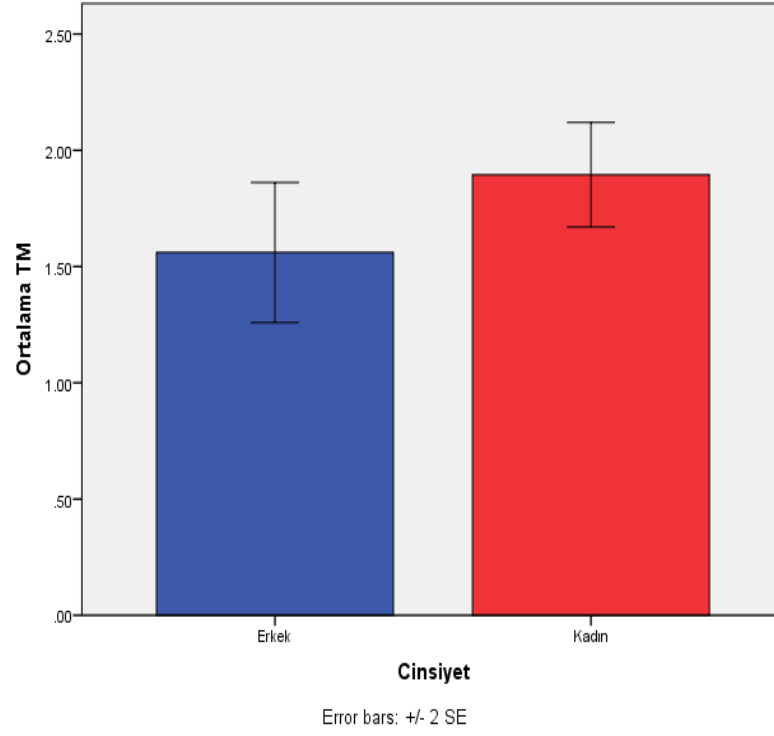
Radyasyon çalışanlarının DNA hasar miktarlarının cinsiyetleri ile ilişkileri Mann - Whitney U Testi ile karşılaştırılmıştır. Kadın Radyasyon çalışanlarının Kuyruk uzunluğu, kuyruk momenti ve kuyruk DNA yüzdesi parametreleri erkek çalışanlara göre anlamlı derecede farklı bulunmuştur. Buna göre kadınlar daha fazla DNA hasarına sahiptir.

Tablo 9. Mann Whitney U Testi Radyasyon Çalışanlarının Kuyruk Uzunluğu (TL), Kuyruk Momenti (TM) ve Kuyruk DNA Yüzdesi (TDNAP) Değerlerinin Cinsiyetleri Bakımından ile Değerlendirilmesi

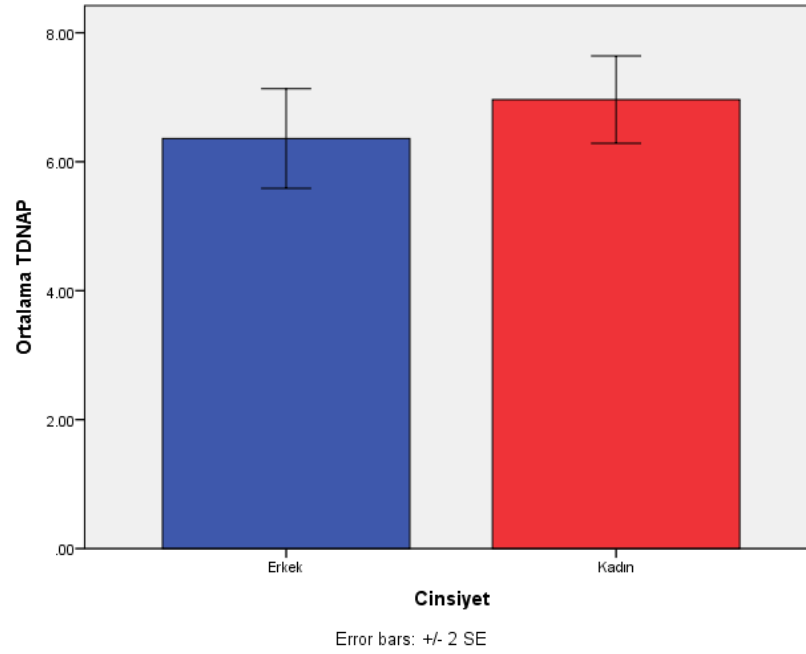
	TL	TDNAP	TM
Mann-Whitney U	76347.500	84249.500	79335.000
Asymp. Sig. (2-tailed)	.000	.001	.000



Şekil 20. Radyasyon Çalışanlarının Kuyruk Uzunluklarının (TL) Cinsiyetleri ile Karşılaştırılması



Şekil 21. Radyasyon Çalışanlarının Ortalama Kuyruk Momentlerinin (TL) Cinsiyetleri ile Karşılaştırılması



Şekil 22. Radyasyon Çalışanlarının Ortalama Kuyruk DNA Yüzdelerinin (TDNAP) Cinsiyetleri ile Karşılaştırılması

Radyasyon alışanlarının DNA hasar miktarlarının sigara alışkanlıkları ile ilişkileri Mann - Whitney U Testi ile karşılaştırılmıştır. Sigara kullanan Radyasyon alışanlarının Kuyruk uzunluğu, kuyruk momenti ve kuyruk DNA yüzdesi ile sigara kullanmayan alışanların Kuyruk uzunluğu, kuyruk momenti ve kuyruk DNA yüzdesi arasında herhangi bir ilişki bulunamamıştır.

5. TARTIŞMA

İyonize ışınlar, canlılarda moleküler ve hücresel düzeylerde fiziksel, kimyasal ve biyolojik çeşitli değişikliklere yol açar ve mutasyon frekansında da artmaya neden olur (7). İyonize radyasyon doğrudan DNA ve proteinler ile etkileşime girer. Oksidatif hasar oluşmasına ve hücrelerin ciddi zararlar görmesine sebep olabilir. DNA'da oluşan hasar kırıklara, çaprazlamalara, kopmalara dolayısıyla mutasyonlara yol açar ve kanser riskini artırır. Bu etkiler sonucunda saç dökülmesi, solunum sistemi hastalıkları, mide ve bağırsak sistemi kanamaları, kemik iliğinin baskılanmasına bağlı kanamalar ve kansızlık görülebilir. Bu etkiler radyasyonun dozuna ve doz alım hızına bağlı olarak kısa veya uzun vadede ortaya çıkabilir. Radyasyon, önlem alınmadığı takdirde yaşam kalitesini ve yaşam süresini ciddi olarak düşürebilir (6-10).

Her geçen gün gelişen teknoloji ile radyasyona maruz kalma oranımız artmaktadır. İnsan eli ile oluşturulan yapay radyasyon miktarı günlük yaşamda aldığımız radyasyonun %15'ine karşılık gelmekte ve bu miktarın yaklaşık % 96 - 99'lük bir kısmını tıbbi uygulamalar oluşturmaktadır (8).

Radyoloji birimlerinde çalışanlar için bu oran çok daha fazladır. İş yaşamları süresince ciddi miktarlarda iyonize radyasyona maruz kalmakta ve bu durumun yan etkileri ile karşılaşmaktadırlar. Çalışanlar, çeşitli ölçümlere tabi tutularak belirli dozların üzerinde radyasyona maruz kalmaları engellense de alınan doz miktarlarının DNA üzerindeki kümülatif etkileri önem arz etmektedir. Olive (2009), radyasyon kaynaklı hasarın comet metodu ile daha efektif tespit edilebileceğini ve çözüme yönelik yeni bakış açıları geliştirilebileceğini söylemektedir (24).

Araştırmamız sonucunda radyasyon çalışanlarının DNA hasar miktarının kontrol grubuna göre daha yüksek çıkması da bu konunun önemini ortaya koymaktadır. Radyolojik birimlerde çalışanların iyonize radyasyon kaynaklarına çok daha fazla maruz kalmaları sonucunda daha yüksek miktarlarda DNA hasarına sahip olabileceği yorumu rahatlıkla yapılabilir. Benzer şekilde Vellingiri ve ark. (2014), radyasyona maruz kalan hastane çalışanlarının DNA ve kromozom hasarlarının arttığını, (56) Ünderger ve ark. (1999), hastanede çalışan ve radyasyona maruz kalan

teknikerlerde DNA hasarının arttığını (57), Wojewodzka ve ark. (1998) ise iş sebebi ile radyasyona maruz kalanlarda DNA hasarının arttığını belirtmişlerdir (58). Yine Bedir ve ark. (2004), radyasyon doz miktarındaki artışın DNA hasarını arttırdığını tespit etmiştir (30).

Garaj-Vrhovac ve Kopjar (2003), benzer bir çalışma ile iyonize radyasyona maruz kalan 50 radyasyon personelinin DNA hasarını Alkali Comet Metodunu kullanarak ortaya koymuş ve çalışma sonucunda maruz kalınan iyonize radyasyonun kontrol grubuna oranla DNA hasarlarını ciddi şekilde arttırdığı bulunmuştur. Çalışmada sigara içme alışkanlığı ve cinsiyetin hasar ile bir bağlantısı gösterilememiştir (52). Çalışmamız ve konuyla ilgili literatür incelendiğinde radyasyon çalışanlarının iyonize radyasyona maruziyet ve yan etkileri bakımından daha yüksek risk taşıdığı anlaşılmaktadır. Ortaya konan bu risk gerek çalışanlar gerekse de idareciler tarafından iyi değerlendirilmeli ve gerekli önlemler alınmalıdır.

Araştırmamızda yaş arttıkça DNA hasarının da arttığı tespit edilmiştir. Ancak artan yaşın daha uzun çalışma yılına ve dolayısı ile daha uzun süre radyasyona maruziyete sebep olduğu kabul edilebilir. İyonize radyasyona maruziyet yılı ile yapılan karşılaştırmada bu sonucu desteklemektedir. Radyasyon çalışanlarının çalışma yılları arttıkça DNA hasarlarının arttığı görülmüştür.

Ueno ve ark. (2007), fare ve ratlarla yaptıkları çalışmalarında alınan radyasyonun farklı organlarda farklı derecelerde hasara sebep olduğunu ve hasar tamirinin de farklı hızlarda olabileceğini bildirmişlerdir (9). Bu durum DNA hasarının farklı doku ve organlarda farklı miktarlarda ortaya çıkabileceğini düşündürmektedir. Bu nedenle Farklı cihazlar ile çalışan personellerin ayrı ayrı değerlendirilmesi ileride planlanacak çalışmaların konusu olabilir.

Yapılmış çalışmalarda cinsiyetin DNA hasarı üzerine anlamlı bir etkisi olduğuna dair kanıt bulunamamış olsa da (56) bu çalışmada kadın radyasyon çalışanlarının DNA hasarı anlamlı derecede fazla bulunmuştur. Özellikle ülkemizde diğer gelişmiş ülkelere kıyasla kadınların daha stresli bir yaşam ve çalışma ortamına sahip olduğu ve bunun DNA hasarının artmasına ek bir etken olabileceği düşünülebilir.

Hoffmann ve Speit (2004), sigaranın mutajen ve karsinojen etkisi iyi bir şekilde ortaya konmuş olmasına rağmen bu etkilerin comet metodu ile gerek kendi çalışmalarında gerekse de diğer araştırmacıların çalışmalarında tam olarak gösterilemediğine değinmişler ve günde 20 sigaradan fazla tüketen kişiler ile hiç sigara tüketmemiş kişileri bir kaç yöntem ile detaylı olarak karşılaştırmışlardır. Buna rağmen sigaranın DNA hasarı üzerine anlamlı bir etkisi bulunamamıştır (27). Yine Hoffmann ve arkadaşları (2005), 38 araştırmayı baz aldıkları meta analizlerinde sigaranın DNA hasarı üzerine etkisi olduğunu fakat çelişkili araştırmalar bulunduğunu ve bu duruma DNA hasarının tespitinde bilgisayar programlarının kullanılmamasının ve örnek sayısının etkisi olabileceği ileri sürmüşlerdir (59). Literatürdeki duruma benzer şekilde çalışmamız sonucunda ne radyasyon çalışanlarında ne de kontrol grubunda sigara ile DNA hasarı arasında bir bağlantı gösterilememiştir. Tabi ki sigaranın olumsuz etkileri iyi bilinmektedir. Bu etkilerin comet metodu ile gösterilebilmesi için daha kontrollü çalışmalar yapılması etkili olabilir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Araştırmamız sonucunda radyasyon çalışanlarının DNA kontrol grubuna göre daha fazla olduğu görülmüştür. Daha önce de ifade edildiği gibi DNA hasarı birçok hastalığın kaynağıdır.

Çalışma ortamının sağlıklı ve güvenli hale getirilmesi çalışanın sağlığı ve güvenliği açısından oldukça önemlidir. Bir iş ortamında çalışanın sağlıklı olması sadece kendisini değil aynı zamanda hizmet verdiği kişileri de etkilemektedir. Sağlık çalışanlarının çalışma yaşamındaki risklerin azaltılması, hizmet verdikleri hastalara bakım kalitesinde artış olarak geri dönecektir (3). Sağlık açısından yüksek risk grubuna girdiği rahatlıkla söylenebilecek olan radyasyon çalışanları için de gerek bireysel gerekse de kurumsal gerekli önlemler alınmalıdır.

Radyoaktif maddelerden korunmada; bu maddelerden çıkan radyasyonla teması önlemek, DNA hasarının oluşmasını en baştan engelleyeceği için en önemli önlemdir. Bu amaçla çalışma ortamında ve giysilerde kurşun bariyerler kullanmak önem arz etmektedir.

Alınan radyasyon miktarının belirli sürelerle ölçülerek yönetmeliklerde belirtilen değerlerin üzerine çıkılmaması DNA'da daimi hasarların oluşmasını engellemek için önemlidir. Bu ölçümlerin yanı sıra çalışanların yılda en az 2 kere genel ve detaylı tıbbi muayeneden geçirilmesi ve herhangi bir olumsuz durumun öngörülebilmesi bakımından önemlidir. Bu muayeneler daha önceki sonuçlar ile karşılaştırılmalı ve devamlı olarak comet metodu gibi hassas testler ile biyo-izleme (biomonitoring) yapılmalıdır.

Teknoloji her geçen gün gelişmektedir. Her ne kadar radyasyon çalışanlarının maruz kaldığı iyonize radyasyon zaten teknolojinin bir yan etkisi olsa da daha gelişmiş ve modern cihazlar daha az radyasyon yayabilmekte veya daha yüksek korumaya sahip olabilmektedir. Gelişmiş teknolojinin sürekli takip edilerek yeni nesil cihazların tedarik edilmesi mevcut risk seviyesinde azalmaya sebep olacaktır.

Radyasyon çalışanlarına ek sosyal haklar verilmesi de risk seviyesinin azaltılması amacı ile kullanılabilir. Daha dūřuk çalışma saatleri ve erken emeklilik haklarının geliştirilmesi radyasyonun uzun vadeli etkilerini engelleyebilecektir.

Bütün bunların yanı sıra elbetteki çalışanların da bireysel sorumlulukları bulunmatadır. Radyasyon doz ölçümlerinin sağlıklı yapılabilmesi için bireysel dozimetreler düzenli olarak kullanılmalı, herhangi bir ihmale yer verilmemelidir. Ayrıca DNA hasarını arttıracak sigara gibi diğer zararlı faktörlerin azaltılması da önemlidir ve birey tarafından uygulanabilir.

ÖZET

İyonize Radyasyona Maruz Kalan Radyoloji Çalışanlarında Oluşan DNA Hasarlarının Alkali Comet Metodu İle Belirlenmesi

DNA hasarına yol açan çevresel faktörler, fiziksel ve kimyasal ajanlardır. Fiziksel ajanların başında iyonize radyasyon gelir. İyonize radyasyon, maruz kalındığında DNA'da hasara sebep olabilmektedir. DNA üzerinde oluşan bu hasarlar hücre ölümüne kadar varan etkilere neden olur. DNA hasarının yaşlanma, kanser, kardiyovasküler hastalıklar, immün sistem hastalıkları, dejeneratif hastalıklar gibi doku fonksiyonlarının bozulması ile ortaya çıkan hastalıkların oluşmasında önemli rol oynadığı ileri sürülmektedir.

Bu çalışmada Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi bünyesinde çalışan ve iyonize radyasyona maruz kalan radyasyon çalışanlarında DNA hasarı ile radyasyona maruziyet arasındaki bağlantı araştırılmıştır. 48 radyasyon çalışanın DNA hasarı comet metodu ile değerlendirilmiş ve kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar radyolojik birimlerde çalışanların maruz kaldığı düşük doz radyasyonun DNA hasarını arttırdığı yönündedir.

Ayrıca radyasyona maruziyet süresi, cinsiyet, yaş ve sigara alışkanlığı bakımından da karşılaştırmalar yapılmış maruziyet süresi, yaş ve cinsiyetin oluşan DNA hasarı ile bağlantılı olduğu bulunmuştur. Sigara alışkanlığı ile DNA hasar seviyeleri arasında herhangi bir bağ gösterilememiştir.

Anahtar Kelimeler: Comet Metodu, İyonize Radyasyon, Radyoloji Çalışanları, DNA Hasarı

ABSTRACT

Determination of DNA Damage With Alkaline Comet Assay Occur in Radiological Workers Exposed to Ionizing Radiation

Physical and chemical agents are environmental factors that cause DNA damage. Ionizing radiation comes at the beginning of physical agents. Exposed to ionizing radiation can lead to single and double strand breaks in DNA. These fractures occur in DNA can even cause cell death. It has been suggested that DNA damage play a role in the formation of different diseases such as aging, cancer, cardiovascular diseases and immune system disorders.

The aim of this study was to investigate association between DNA damage and radiation exposure in radiological workers exposed to ionizing radiation. To evaluate this association, DNA damage of 48 radiological workers assessed by comet assay and were compared with the control group. Our results show that exposure to low dose of ionizing radiation induces DNA damage as measured by comet assays.

In addition, comparisons were made for duration of radiation exposure, gender, age and smoking habits. Exposure time, age and sex, has been found to be associated with the DNA damage. There were found any link between Smoking habit and DNA damage.

Keywords: Comet Assay, Ionizing Radiation, Radiological Workers, DNA Damage

KAYNAKLAR

1. Dinçer Y, Kankaya S. Dna Hasarının Belirlenmesinde Comet Assay. *Türkiye Klinikleri Journal Of Medical Sciences*. 2010;30(4):1365-73.
2. Radyasyon Çeşitleri: Türkiye Atom Enerjisi Kurumu 2015 [Cited 2015 30.07.2015]. Available From: [Http://Www.Taek.Gov.Tr/Ogrenci/R02.Htm](http://www.taek.gov.tr/ogrenci/R02.htm).
3. Parlar S. Sağlık Çalışanlarında Göz Ardı Edilen Bir Durum: Sağlıklı Çalışma Ortamı. *Taf Preventive Medicine Bulletin*. 2008;7(6):547-54.
4. Radyasyon Güvenliği Yönetmeliği. In: Kurumu Tae, Editor.: Türkiye Atom Enerjisi Kurumu; 2000.
5. Radyasyon: Vikipedi; [Cited 2015 30.07.2015]. Available From: [Https://Tr.Wikipedia.Org/Wiki/Radyasyon](https://tr.wikipedia.org/wiki/Radyasyon).
6. Bozbıyık A, Özdemir Ç, Hancı İh. Radyasyon Yaralanmaları Ve Korunma Yöntemleri. *Sürekli Tıp Eğitimi Dergisi*. 2002;7(11):274.
7. Kaya A. İyonize Radyasyonun Siyolojik Etkileri. *Dicle Tıp Dergisi (Journal Of Medical School)*. 2002;100(29):3.
8. Hızarcı S. Radyasyon Kaynakları Ve Radyasyondan Korunma. In: Dairesi Rsvg, Editor. Ankara: Türkiye Atom Enerjisi Kurumu. P. 54.
9. Ueno S, Kashimoto T, Susa N, Natsume H, Toya M, Ito N, Et Al. Assessment Of Dna Damage İn Multiple Organs Of Mice After Whole Body X-İrradiation Using The Comet Assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology And Environmental Mutagenesis*. 2007;634(1):135-45.
10. Al-Baker Ea, Oshin M, Hutchison Cj, Kill Ir. Analysis Of Uv-İnduced Damage And Repair İn Young And Senescent Human Dermal Fibroblasts Using The Comet Assay. *Mechanisms Of Ageing And Development*. 2005;126(6):664-72.
11. Dikilitaş M, Koçyiğit A. Canlilarda “Tek Hücre Jel Elektroferez” Yöntemi İle Dna Hasar Analizi (Teknik Not): Comet Analiz Yöntemi. *Journal Of Agriculture Faculty Of Harran University*. 2010;14:77-82.
12. Fidan Af. Dna Hasar Tespitinde Tek Hücre Jel Elektroforezi. 2008.
13. Klaude M, Eriksson S, Nygren J, Ahnström G. The Comet Assay: Mechanisms And Technical Considerations. *Mutation Research/Dna Repair*. 1996;363(2):89-96.

14. Tice R, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Et Al. Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines For In Vitro And In Vivo Genetic Toxicology Testing. *Environmental And Molecular Mutagenesis*. 2000;35(3):206-21.
15. Nandhakumar S, Parasuraman S, Shanmugam M, Rao Kr, Chand P, Bhat Bv. Evaluation Of Dna Damage Using Single-Cell Gel Electrophoresis (Comet Assay). *Journal Of Pharmacology & Pharmacotherapeutics*. 2011;2(2):107.
16. Collins Ar. The Comet Assay For Dna Damage And Repair. *Molecular Biotechnology*. 2004;26(3):249-61.
17. Liao W, Mcnutt Ma, Zhu W-G. The Comet Assay: A Sensitive Method For Detecting Dna Damage In Individual Cells. *Methods*. 2009;48(1):46-53.
18. Yavuz İ. Kurşuna Maruz Kalan Bireylerde Lenfosit Dna Hasarının Belirlenmesi [Doktora Tezi]. Ankara Ankara Üniversitesi; 2013.
19. Dusinska M, Collins Ar. The Comet Assay In Human Biomonitoring: Gene–Environment Interactions. *Mutagenesis*. 2008;23(3):191-205.
20. Lee E, Oh E, Lee J, Sul D, Lee J. Use Of The Tail Moment Of The Lymphocytes To Evaluate Dna Damages In Human Biomonitoring Studies. *Toxicological Sciences*. 2004.
21. Valverde M, Rojas E. Environmental And Occupational Biomonitoring Using The Comet Assay. *Mutation Research/Reviews In Mutation Research*. 2009;681(1):93-109.
22. Faust F, Kassie F, Knasmüller S, Boedecker Rh, Mann M, Mersch-Sundermann V. The Use Of The Alkaline Comet Assay With Lymphocytes In Human Biomonitoring Studies. *Mutation Research/Reviews In Mutation Research*. 2004;566(3):209-29.
23. Møller P, Knudsen Le, Loft S, Wallin H. The Comet Assay As A Rapid Test In Biomonitoring Occupational Exposure To Dna-Damaging Agents And Effect Of Confounding Factors. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*. 2000;9(10):1005-15.
24. Olive Pl. Impact Of The Comet Assay In Radiobiology. *Mutation Research/Reviews In Mutation Research*. 2009;681(1):13-23.
25. He J, Chen W, Jin L, Jin H. Comparative Evaluation Of The In Vitro Micronucleus Test And The Comet Assay For The Detection Of Genotoxic Effects Of X-Ray Radiation. *Mutation Research/Genetic Toxicology And Environmental Mutagenesis*. 2000;469(2):223-31.
26. Palyvoda O, Polańska J, Wygoda A, Rzeszowska-Wolny J. Dna Damage And Repair In Lymphocytes Of Normal Individuals And Cancer Patients: Studies By The

Comet Assay And Micronucleus Tests. *Acta Biochimica Polonica-English Edition*-. 2003;50(1):181-90.

27. Hoffmann H, Speit G. Assessment Of Dna Damage İn Peripheral Blood Of Heavy Smokers With The Comet Assay And The Micronucleus Test. *Mutation Research/Genetic Toxicology And Environmental Mutagenesis*. 2005;581(1):105-14.

28. Boettcher M, Grund S, Keiter S, Kosmehl T, Reifferscheid G, Seitz N, Et Al. Comparison Of İn Vitro And İn Situ Genotoxicity İn The Danube River By Means Of The Comet Assay And The Micronucleus Test. *Mutation Research/Genetic Toxicology And Environmental Mutagenesis*. 2010;700(1):11-7.

29. Karaman A, Binici Dn, Melikoğlu Ma. Comet Assay And Analysis Of Micronucleus Formation İn Patients With Rheumatoid Arthritis. *Mutation Research/Genetic Toxicology And Environmental Mutagenesis*. 2011;721(1):1-5.

30. Bedir A, Bilgici B, Yurdakul Z, Gürsel Bş, Alvur A. Dna Hasarı Analizinde μ -Fadu Ve Comet Yöntemlerinin Karşılaştırılması. *Türk Klinik Biyokimya Dergisi*. 2004;2(3):97-103.

31. Kılıçoğlu H. *Ephestia Kuehniella Zell (Pyralidae: Lepidoptera) Üzerine Radyasyon Etkisinin Tek Hücre Jel Elektroferez Tekniği (Komet Testi) İle İzlenmesi [Yüksek Lisans Tezi]*. Kayseri: Erciyes Üniversitesi; 2012.

32. Olive Pl, Banáth Jp. The Comet Assay: A Method To Measure Dna Damage İn Individual Cells. *Nature Protocols-Electronic Edition*-. 2006;1(1):23.

33. Sirota Np, Zhanataev Ak, Kuznetsova Ea, Khizhnyak Ep, Anisina Ea, Durnev Ad. Some Causes Of İnter-Laboratory Variation İn The Results Of Comet Assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology And Environmental Mutagenesis*. 2014;770:16-22.

34. Azqueta A, Gutzkow Kb, Brunborg G, Collins Ar. Towards A More Reliable Comet Assay: Optimising Agarose Concentration, Unwinding Time And Electrophoresis Conditions. *Mutation Research/Genetic Toxicology And Environmental Mutagenesis*. 2011;724(1):41-5.

35. Lovell D, Thomas G, Dubow R. Issues Related To The Experimental Design And Subsequent Statistical Analysis Of İn Vivo And İn Vitro Comet Studies. *Teratogenesis, Carcinogenesis, And Mutagenesis*. 1999;19(2):109-19.

36. Lovell Dp, Omori T. Statistical İssues İn The Use Of The Comet Assay. *Mutagenesis*. 2008;23(3):171-82.

37. Hartmann A, Agurell E, Beevers C, Brendler-Schwaab S, Burlinson B, Clay P, Et Al. Recommendations For Conducting The İn Vivo Alkaline Comet Assay. *Mutagenesis*. 2003;18(1):45-51.

38. Wiklund Sj, Agurell E. Aspects Of Design And Statistical Analysis In The Comet Assay. *Mutagenesis*. 2003;18(2):167-75.
39. Gyori Bm, Venkatachalam G, Thiagarajan P, Hsu D, Clement M-V. Opencomet: An Automated Tool For Comet Assay Image Analysis. *Redox Biology*. 2014;2:457-65.
40. 2012. Icr. Ibm Spss Statistics For Windows, Version 20.0. . Armonk, Ny:: Ibm Corp.; 2011.
41. Dusinska M. The Comet Assay, Modified For Detection Of Oxidised Bases With The Use Of Bacterial Repair Endonucleases. 2000.
42. Akan T. Organofosforlu Pestisitlerin Arpa Bitkisi (*Hordeum Vulgare L.*) Ve Zebra Balığı (*Danio Rerio*) Üzerindeki İn Vitro Genotoksik Etkilerinin Comet Testi İle Araştırılması. İstanbul: Marmara Üniversitesi; 2012.
43. Jarvis R, Knowles J. Dna Damage İn Zebrafish Larvae İnduced By Exposure To Low-Dose Rate Γ -Radiation: Detection By The Alkaline Comet Assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology And Environmental Mutagenesis*. 2003;541(1):63-9.
44. Attia Am, Nabil Gm, Frankenberg D, Frankenberg-Schwager M. Measurement Of X-Ray-İnduced Dna Double-Strand Breaks At Various Stages Of The Cell Cycle Using The Total Fluorescence As A Comet Assay Parameter. *Radiation Physics And Chemistry*. 2011;80(11):1178-85.
45. Aksakal S. Gümüş Ve Kobalt Nanopartiküllerinin Ve İyonik Formlarının Genotoksik Potansiyellerinin Komet Yöntemi İle Araştırılması [Yüksek Lisans Tezi]. Antalya: Akdeniz Üniversitesi; 2014.
46. Singh Np, Muller Ch, Berger Re. Effects Of Age On Dna Double-Strand Breaks And Apoptosis İn Human Sperm. *Fertility And Sterility*. 2003;80(6):1420-30.
47. Gleis M, Hovhannisyan G, Pool-Zobel Bl. Use Of Comet-Fish İn The Study Of Dna Damage And Repair: Review. *Mutation Research/Reviews İn Mutation Research*. 2009;681(1):33-43.
48. Tice R, Vasquez M. Protocol For The Application Of The Ph^{> 13} Alkaline Single Cell Gel (Scg) Assay To The Detection Of Dna Damage İn Mammalian Cells. *Sigma (X-100)*. 1998;503:465-8353.
49. Dhawan A, Bajpayee Mm, Pandey Ak, Parmar D. Protocol For The Single Cell Gel Electrophoresis/Comet Assay For Rapid Genotoxicity Assessment. *Sigma*. 2009;1077:1.
50. Chuang C-H, Hu M-L. Use Of Whole Blood Directly For Single-Cell Gel Electrophoresis (Comet) Assay İn Vivo And White Blood Cells For İn Vitro Assay.

Mutation Research/Genetic Toxicology And Environmental Mutagenesis. 2004;564(1):75-82.

51. Singh Np, Mccoy Mt, Tice Rr, Schneider El. A Simple Technique For Quantitation Of Low Levels Of Dna Damage In Individual Cells. *Experimental Cell Research*. 1988;175(1):184-91.

52. Garaj-Vrhovac V, Kopjar N. The Alkaline Comet Assay As Biomarker In Assessment Of Dna Damage In Medical Personnel Occupationally Exposed To Ionizing Radiation. *Mutagenesis*. 2003;18(3):265-71.

53. Mcnamee J, Mclean J, Ferrarotto C, Bellier P. Comet Assay: Rapid Processing Of Multiple Samples. *Mutation Research/Genetic Toxicology And Environmental Mutagenesis*. 2000;466(1):63-9.

54. Woods J, O'leary K, Mccarthy R, O'brien N. Preservation Of Comet Assay Slides: Comparison With Fresh Slides. *Mutation Research/Fundamental And Molecular Mechanisms Of Mutagenesis*. 1999;429(2):181-7.

55. Kumaravel T, Jha An. Reliable Comet Assay Measurements For Detecting Dna Damage Induced By Ionising Radiation And Chemicals. *Mutation Research/Genetic Toxicology And Environmental Mutagenesis*. 2006;605(1):7-16.

56. Vellingiri B, Shanmugam S, Subramaniam Md, Balasubramanian B, Meyyazhagan A, Alagamuthu K, Et Al. Cytogenetic Endpoints And Xenobiotic Gene Polymorphism In Lymphocytes Of Hospital Workers Chronically Exposed To Ionizing Radiation In Cardiology, Radiology And Orthopedic Laboratories. *Ecotoxicology And Environmental Safety*. 2014;100:266-74.

57. Ündeger Ü, Zorlu Af, Basaran N. Use Of The Alkaline Comet Assay To Monitor Dna Damage In Technicians Exposed To Low-Dose Radiation. *Journal Of Occupational And Environmental Medicine*. 1999;41(8):693-8.

58. Wojewódzka M, Kruszewski M, Iwaneńko T, Collins Ar, Szumiel I. Application Of The Comet Assay For Monitoring Dna Damage In Workers Exposed To Chronic Low-Dose Irradiation: I. Strand Breakage. *Mutation Research/Genetic Toxicology And Environmental Mutagenesis*. 1998;416(1):21-35.

59. Hoffmann H, Högel J, Speit G. The Effect Of Smoking On Dna Effects In The Comet Assay: A Meta-Analysis. *Mutagenesis*. 2005;20(6):455-66.

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Tezi Hazırlayan

Vehbi Atahan TOĞAY

İmza

Danışman

Prof. Dr. Nurten ÖZÇELİK

İmza

ÖZGEÇMİŞ

Vehbi Atahan TOĞAY

KİŞİSEL BİLGİLER

Doğum Yeri : Ankara
Medeni Durum : Evli
E-Posta Adresi : atahantogay@gmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Lisans: 2007 – 2011, Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen – Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Böl.

Yüksek Lisans: 2013 – 2015, Süleyman Demirel Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji AD.

Pedagojik Formasyon: 2012 – 2013, Süleyman Demirel Üniversitesi, Pedagojik Formasyon Eğitimi

İŞ TECRÜBELERİ

Araştırma Görevlisi, Ocak 2013 – Halen, Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri Bölümü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı,

PROJELER

1- “TÜBİTAK 2209 - Üniversite örgencileri Yurt İçi/Yurt Dışı Araştırma Projeleri Destekleme Programı” projesi (Isparta İli Kovada Gölü Milli Parkı Örümceklerinin (Arachnida: Araneae) Sistematik ve Faunistik Yönden İncelenmesi), 2010 - 2011

2- "Süleyman Demirel Üniversitesi - ÖYP Koordinasyon Birimi Yüksek Lisans Araştırma Projesi, İyonize Radyasyona Maruz Kalan Radyoloji Çalışanlarında Oluşan DNA Hasarlarının Alkali Comet Metodu İle Belirlenmesi, 2014 - 2015

Yabancı Dil: İngilizce (İleri Derece, Üds: 78,75)