

T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

IN VİTRO KOŞULLARDA FARKLI GÜÇ VE CİNSTEKİ
AYDINLATMA KAYNAKLARININ MONONÜKLEER
HÜCRE DNA HASARI ÜZERİNE ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI

Dr. İbrahim Halil DİKİCİ
Uzmanlık Tezi

DANIŞMAN
Prof. Dr. Abdurrahim KOÇYİĞİT

ŞANLIURFA
2011

T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

IN VİTRO KOŞULLARDA FARKLI GÜÇ VE CİNSTEKİ
AYDINLATMA KAYNAKLARININ MONONÜKLEER
HÜCRE DNA HASARI ÜZERİNE ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI

Dr. İbrahim Halil DİKİCİ
Uzmanlık Tezi

DANIŞMAN
Prof. Dr. Abdurrahim KOÇYİĞİT

ŞANLIURFA
2011

TEŞEKKÜR

Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda eğitimim süresince, benden hiçbir konuda desteğini esirgemeyen, beni bu çalışmaya teşvik edip yönlendiren değerli danışman hocam Prof. Dr. Abdurrahim KOÇYİĞİT'e teşekkür ederim.

Eğitimim süresince her türlü desteklerini esirgemeyen, ilgi ve anlayış ile eğitimimde katkıları olan değerli hocalarım Prof. Dr. Nurten AKSOY ve Yrd. Doç. Dr. Şahbette SELEK e teşekkür ederim.

Ayrıca benimle tecrübe ve birikimini paylaşan, bana yardımlarını esirgemeyen Öğr. Görevlisi Abdullah TAŞKIN'a da teşekkür ederim.

Çalışmamın istatistiksel analizlerinde bana yardımcı olan Öğr. Görevlisi Hakim ÇELİK e teşekkür ederim.

Çalışmamda bana yardımcı olan arkadaşım Mahmut Nedim BAHAR a teşekkür ederim.

Bu tezin yapılmasında maddi destek veren Harran Üniversitesi Bilimsel Akademik Kurulu kurumuna teşekkür ederim.

Gösterdiği özveri, destek, sabır, yardımlarında dolayı beni hiç yalnız bırakmayan eşim ve en iyi arkadaşım Sibel Esra DİKİCİ ve varlığı ile umut ve yaşam sevinci veren değerli kızım Ahsen Ece DİKİCİ ye sevgilerimle.

Bütün eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi desteğini esirgemeyen babam Ökkaş DİKİCİ ve annem Servet DİKİCİ ye teşekkür ederim...

Dr. İbrahim Halil DİKİCİ

İÇİNDEKİLER.....	ii
ŞEKİLLER VE TABLOLAR DİZİNİ	ii
KISALTMALAR.....	ix
ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	xii
1.GİRİŞ ve AMAÇ.....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	3
2.1.DNA'nın Yapısı ve Fonksiyonu.....	3
2.2. Nükleotidlerin Bileşenleri.....	4
2.2.1 Nükleotidlerdeki azotlu bazlar.....	5
2.3. Chargaff Kuralları.....	6
2.4. DNA'nın Farklı Yapısal Formları.....	9
2.5.Kromatin.....	10
2.6. Kromozomlar ve Genler.....	10
2.7DNA Hasar Oluşum Nedenleri.....	12
2.8. DNA Hasarına Neden Olan Etkenler.....	13
2.9. DNA Hasarı Tipleri.....	15
2.9.1.Deaminasyon.....	16
2.9.2. Depürinasyon	17
2.9.3. Alkilasyon.....	18
2.9.4. T-T ve T-C dimerleri oluşumu.....	19
2.9.5. Replikasyon Hataları.....	20
2.9.6. Çift İplik Kırıkları Oluşumu.....	20
2.9.7. Oksidatif Stresin Neden Olduğu DNA Hasarı.....	22
2.10.DNA Tamiri.....	24
2.10.1. DNA Tamir Mekanizmaları.....	25
2.10.1.1. Direkt Tamir Mekanizmaları.....	25
2.10.1.1.1. Fotoreaktivasyon.....	25
2.10.1.1.2. O6-Metilguanin Tamiri.....	26

2.10.1.1.3. Basit Tek Zincir Kırıklarının Ligasyonu.....	27
2.10.1.2. Eksizyon (Kesip-Çıkarma) Tamiri.....	27
2.10.1.2.1. Baz Eksizyon Tamiri (BER).....	27
2.10.1.2.2. Nükleotid Çıkarma Onarımı.....	29
2.10.1.2.3. Hatalı Eşleşme Onarımı.....	30
2.10.1.3. Replikasyon sonrası (post-replikasyon) tamiri.....	31
2.10.1.4. Acil (SOS) Tamir Sistemi.....	32
2.10.1.5. Çift Zincir Kırıklarının Tamiri.....	32
2.10.1.5.1. Homolog Olmayan Uç Birleşmesi.....	33
2.10.1.5.2. Homolog Uç Birleşmesi.....	33
2.11. Serbest Radikaller.....	34
2.11.1. Reaktif oksijen türleri.....	34
2.11.1.1. Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂).....	35
2.11.1.2. Süperoksit radikalleri.....	36
2.11.1.3. Hipoklorik asit.....	36
2.11.1.4. Singlet O ₂	37
2.11.1.5. Hidroksil radikali.....	37
2.11.2. Reaktif nitrojen türleri.....	38
2.11.3. Başlıca serbest radikal oluşum kaynakları.....	39
2.11.3.1. Endojen serbest radikal üretim kaynakları.....	39
2.11.3.1.1. Mitokondriyal elektron transport sistemi.....	40
2.11.3.1.2. Endoplazmik retikulum.....	40
2.11.3.1.3. Redoks döngüsü.....	41
2.11.3.1.4. Araşidonik asit metabolizması.....	41
2.11.3.1.5. Fagositoz.....	42
2.11.3.1.6. Otooksidasyon.....	43

2.11.3.1.7. Oksidan enzimlerin reaksiyonları.....	43
2.11.3.2. Ekzojen serbest radikal üretim kaynakları.....	44
2.12. Antoksidan Savunma Sistemleri.....	44
2.12.1. Enzimatik antioksidanlar.....	45
2.12.1.1. Süperoksit dismutaz	45
2.12.1.2. Katalaz	46
2.12.1.3. Glutasyon Peroksidaz.....	46
2.12.1.4. Glutation-S-Transferazlar	47
2.12.1.5. Mitokondrial Sitokrom Oksidaz.....	47
2.12.2. Enzimatik olmayan antioksidanlar.....	48
2.12.2.1. Askorbik Asit.....	48
2.12.2.2. β -Karoten.....	49
2.12.2.3. Vitamin E	49
2.12.2.4. Polifenoller.....	50
2.12.2.5. Transferin ve Laktoferrin.....	51
2.12.2.6. Seruloplazmin.....	51
2.12.2.7. Albümin.....	51
2.12.2.8. Ürik Asit.....	52
2.12.2.9. Bilirubin.....	52
2.13. Işık.....	52
2.13.1. Dalga Olarak Işık.....	53
2.13.2. Enerji Parçacığı Olarak Işık.....	54
2.13.3. Işık ve Rengin Algılanması.....	54
2.13.4. Aydınlatma ve Aydınlanma Şiddeti.....	55
2.13.5. Işık Kaynakları.....	55
2.13.5.1. Yapay Işık Kaynakları.....	55
2.13.5.2. Lambalar ve Çalışma Mekanizmaları.....	57

2.13.5.3. Akkor Lamba.....	58
2.13.5.4. Floresan Lamba.....	58
2.13.5.5.Kompakt Floresan Lamba	59
2.13.5.6. Işık Üzerine Yapılan Çalışmalar.....	60
2.14. Hücre Kültürü.....	62
2.14.1. Kaynaklarına göre kültürler.....	63
2.14.1.1. Primer kültürler.....	63
2.14.1.2. Hücre soyları.....	63.
2.14.3. Besiyerleri.....	64
2.14.4. Dondurularak saklama.....	65
3. MATERYAL VE METOD.....	65
3.1. Materyal.....	65
3.1.1. Kullanılan Cihazlar.....	65
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	66
3.1.3. Hazırlanan Tampon.....	67
3.2. Metot.....	67
3.2.1. Lökositlerin süspansiyonu.....	67
3.2.1.1. Mononükleer Lokositlerin İzolasyonu.....	67
3.2.1.2.Mononükleer Lökosit Süspansiyonunun Hazırlanışı.....	68
3.2.1.3.Mononükleer Lökositlerin Sayımı.....	68
3.2.2. Yapay Aydınlatma Kaynaklarının Hazırlanması.....	69.
3.2.3. Kontrol solüsyonlarının hazırlanması.....	69
3.2.3.1. Pozitif kontrol solüsyonu	70
3.2.3.2. Negatif Kontrol.....	70
3.2.3.3. Pozitif Kontrol Ortamının Hazırlanışı.....	70

3.2.4. Alkali Tek Hücre Elektroforezi (Comet Assay) yöntemi ile DNA Hasarının Ölçülmesi.....	70
3.2.4.1. Yöntemin prensibi.....	71
3.2.4.2. Yönteminin Uygulanışı.....	71
3.2.4.2.1. Slaytların Hazırlanması.....	71
3.2.4.2.2. Lizis aşaması.....	72
3.2.4.2.3. Elektroforez tamponu.....	72.
3.2.4.2.4. Elektroforezde yürütme.....	73
3.2.4.2.5. Nötralizasyon.....	73
3.2.4.2.6. Boyama.....	73
3.2.5. Total Antioksidan Seviye (TAS).....	75
3.2.5.1. Total Antioksidan Seviye Ölçümünde Kullanılan Ayıraçlar.....	75
3.2.5.2. Prensip.....	75
3.2.6. Total Oksidan Seviye (TOS)	76
3.2.6.1. Total Oksidan Seviye Ölçümünde Kullanılan Ayıraçlar.....	76
3.2.6.2. Prensip.....	76
3.2.7.Yapılan istatistiksel analizler.....	77
4. BULGULAR.....	77
4.1. Mononükleer Lökosit Sayım Bulguları.....	77
4.2. Mononükleer Lökosit DNA Hasarı bulguları.....	77
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	90
KAYNAKLAR.....	94

ŞEKİLLER ve TABLOLAR DİZİNİ

ŞEKİLLER

Şekil 1. DNA'nın çift sarmallı yapısı.....	4
Şekil 2. Adenin, Guanin, Sitozin, Timinin molekül yapıları.....	6
Şekil 3. DNA'nın karakteristik bir X-ışını difraksiyon	7
Şekil 4. DNA'nın çift sarmallı yapısı.....	8
Şekil 5. DNA'nın farklı yapısal formları	9
Şekil 6. İnsan genomundaki kromozomlar	10
Şekil 7. DNA'da replikasyon oluşumu	11
Şekil 8. DNA Hasarı nedenleri	13
Şekil 9. Deaminasyon oluşumu	16
Şekil 10. Deamine bir bazın tamir edilememesi durumundaki nokta mutasyon	17
Şekil 11. Depürinasyon oluşumu	18
Şekil 12. Guanindeki kimyasal hasar bölgeleri	19
Şekil 13. Timin timin dimeri oluşumu.....	20
Şekil 14. Çift İplik Kırıkları.....	21
Şekil 15. 8-hidroksiguanin ve FapyGuo'in oluşum mekanizmaları	23
Şekil 16. DNA Hasarı sonucu oluşan süreç	24
Şekil 17. Fotoreaktivasyon mekanizması	26
Şekil 18. Baz eksizyon tamiri (BER) mekanizması	29
Şekil 19. Hatalı Eşleşme Onarım (Mismatch Repair) Mekanizması.....	31
Şekil 20. Akkor Lamba	57
Şekil 21. Akkor lambanın dalga boyu.....	58
Şekil 22. Floresan lamba.....	59
Şekil 23. Kompakt Floresan Lamba.....	60
Şekil 24. Etidyum Bromid ile Boyanmış DNA ların floresan mikroskop görüntüsü.	74
Şekil 25. Meydana gelen DNA hasarlarının floresan mikroskop altındaki görüntüleri	74
Şekil 26. 100 w lık BKFL ile yapılan çalışmada DNA hasarı(AU).....	79
Şekil 27. 100 w lık SKFL ile yapılan çalışmalarda DNA hasarı(AU).....	81
Şekil 28. 100 w lık FL ile yapılan çalışmalarda DNA hasarı(AU).....	83

TABLULAR

Tablo 1. BKFL ile yapılan çalışmalarda süre arttıkça görülen DNA hasarı.....	79
Tablo 2. BKFL ile yapılan çalışmalarda ışık şiddeti arttıkça görülen DNA hasarı.....	79
Tablo 3. BKFL ile yapılan çalışmalarda TAS Sonuçları.....	80
Tablo 4. BKFL ile yapılan çalışmalarda TOS Sonuçları.....	80
Tablo 5. BKFL ile yapılan çalışmalarda OSİ Sonuçları.....	80
Tablo 6. SKFL ile yapılan çalışmalarda süre arttıkça görülen DNA hasarı.....	81
Tablo 7. SKFL ile yapılan çalışmalarda ışık şiddeti arttıkça görülen DNA hasarı.....	82
Tablo 8. SKFL ile yapılan çalışmalarda TAS Sonuçları.....	82
Tablo 9. SKFL ile yapılan çalışmalarda TOS Sonuçları.....	83
Tablo 10. SKFL ile yapılan çalışmalarda OSİ Sonuçları.....	83
Tablo 11. FL ile yapılan çalışmalarda süre arttıkça görülen DNA hasarı.....	84
Tablo 12. FL ile yapılan çalışmalarda ışık şiddeti arttıkça görülen DNA hasarı.....	85
Tablo 13. FL ile yapılan çalışmalarda TAS Sonuçları.....	85
Tablo 14. FL ile yapılan çalışmalarda TOS Sonuçları.....	85
Tablo 15. FL ile yapılan çalışmalarda OSİ Sonuçları.....	86
Tablo 16. AL ile yapılan çalışmalarda süre arttıkça görülen DNA hasarı.....	87
Tablo 17. FL ile yapılan çalışmalarda ışık şiddeti arttıkça görülen DNA hasarı.....	87
Tablo 18. FL ile yapılan çalışmalarda TAS Sonuçları.....	87
Tablo 19. FL ile yapılan çalışmalarda TOS Sonuçları.....	88
Tablo 20. FL ile yapılan çalışmalarda OSİ Sonuçları.....	88

Tablo 21.Luxmeter ile yapılan ölçümlerde ışık şiddetleri.....89

KISALTMALAR

A	Adenin
AMT	Allil mercaptan
AP	Apürinik/ Apirimidinik
BER	Baz Eksizyon Tamiri
BKFL	Beyaz Kompakt floresan lamba
C	Sitozin
Cl	Klor
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DSB	Çift iplik kırıkları
EBSS	Earle's Balanced Salt Solution
EMEM	Eagle's Minimum Essential Medium
EDTA	Etilen daimin tetra asetik asit
ETS	Elektron transport sistemi
FBS	Fetal Bovin Serum (Fetal sığır serumu)
Fe	Demir
FL	Floresan lamba
G	Guanin
GC	Guanilat Siklaz
GSH-Px	Glutasyon Peroksidaz
GST	Glutation-S-Transferaz
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HPNCC	Kalıtsal nonpolipozal kolon kanseri
HR	Homolog Rekombinasyon
LMP	Low melting point (Agaroz Jel)
LT	Lökotrien
Nm	Nanometre
MDA	Malondialdehit
MER	Yanlış eşleşme eksizyon tamiri
mG	O6-Metilguanin
mRNA	Messenger (Mesajcı) RNA

NER	Nucleotide Excision Repair (Nükleotid Çıkarma Onarımı)
NHEJ	Serbest Uçların Non-homolog Bağlanması
NO ₂	Nitrojen dioksit
NOS	Nitrik oksit sentaz
OSCs	Organosülfür
PAH	Polisiklik aromatik hidrokarbon
PBS	Phosphat Buffer Solution (Fosfat Tampon Solüsyonu)
PCB	Poliklorlubifenil
PCC	Protein karbonil bileşiklerinin
PCR	Polimeraz zincirleme tepkimesi
PG	Prostaglandin
RNA	Ribonükleik Asit
RNS	Reaktif Nitrojen Türleri
ROOH	Hidroperoksit
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
SAL	Sarı Akkor lamba
SKFL	Sarı Kompakt floresan lamba
SOD	Süperoksit distumulaz
tRNA	Translation (taşıyıcı) RNA
T	Timin
TAK	Total Antioksidan Kapasite
TAS	Total Antioksidan Seviye
TOS	Total oksidan seviye
U	Urasil
UV	Ultraviyole
XDH	Ksantindehidrogenaz
XOD	Ksantin oksidaz
5-OH-Cyt	5-hidroksisitozin
5-OH-Ura	5-hidroksi urasil
8-OH-dGua	8-hidroksideoksiguanozin

ÖZET

İn vitro koşullarda farklı güç ve cinsteki aydınlatma kaynaklarının mononükleer hücre DNA hasarı üzerine etkisinin araştırılması.

Genom, DNA hasarına neden olan ekzojen veya endojen sayısız farklı etkene maruz kalır. Tüm organizmalar genetik materyallerini bu çevresel etkenlerin oluşturduğu hasarlara karşı korumak amacıyla DNA onarım mekanizması içerirler.

Normal şartlarda DNA hasarı ile tamir denge halindedir. Bu dengenin bozulması durumunda, DNA'da meydana gelen hasar; genetik kararsızlığa, kontrollü hücre ölümüne veya kansere giden hastalıklara neden olmaktadır.

Son yıllarda DNA hasarına neden olan etkenler artmıştır. Bu çalışmada farklı güç ve cinsteki lambaların farklı sürelerde DNA hasarı ve oksidatif etkilerini araştırmak amacıyla yapıldı. Çalışmada mononükleer lökositler ile oluşturulan invitro hücre kültürü ortamında 1m uzaklıktan farklı güç ve cinsteki lambaların DNA hasarı üzerine etkileri araştırıldı. Hücreleri 1, 2, ve 3 saat lamba ışıklarına maruz bıraktık. İnsan mononükleer lökosit hücrelerinin bulunduğu hücre kültürü ortamında DNA hasarı etkilerini alkalın tek hücre elektroforezi(Comet Assay) ile, antioksidatif özellikleri, total antioksidan seviyesi(TAS) ve total oksidatif aktivite(TOS) seviyeleri EREL yöntemi ile analiz edildi. DNA hasarını en fazla yapan 100 w lık floresan lambalar, en az DNA hasarı yapan ise 20 w lık lambalardı. Süre arttıkça oksidatif stresin arttığı görüldü. Bu sonuçlar göstermektedirki yapay ışık kaynakları farklı yollarla DNA hasarına neden olmaktadır.

Anahtar sözcükler: Hücre kültürü, DNA hasarı, Yapay aydınlatma kaynakları, Oksidatif durum

ABSTRACT

The investigation on the effects of different power and types illumination sources on the mononuclear cell DNA damage in the conditions of in vitro.

Genom is exposed to countless different endogenous and exogenous that caused damage on DNA. All organisms contain DNA repair mechanism in the aim of protecting their genetic materials against the damage of the environmental factors .

Normally , There is a balance between DNA damage and repair . In the situation of breaking down of this balance ,DNA damages andit causes the genetic instability, inspecting cell division or diseases causing cancer .

In last years , factors causing DNA damage , have increased. This investigation has been performed in the aim of researching the effects of different power and type lamps on the DNA damage in different periods and oxidative effects . In the study , we have researched the effects of different power and type lamps on DNA damage from 1 meter distance in the condition of in vitro cell cultivation , formed with mononuclear leukocytes. We have subjected the cells to the lamp light for 1, 2, and 3 hours. On the atmosphere of cell cultivation in which human mononuclear leukocyte cells take place , DNA damage effects ,alcaline unique cell electrophoresis (Comet Assay), antioxidative features , total oxidative capacity (TAK) and total oxidative activity (TOS) levels have been analised with ERELmethods. 100 walt fluorescent lamps have given the most damage to DNA and 20 watt fluorescent lamps have given the least damage to DNA .The exposed time increases , the more oxidative stres increases .These conclusions show that artificial light sources cause DNA damage in different ways.

Key Words: Cell Cultivation, DNA damage, Artificial Illumination Sources, Oxidative Condition.

1.GİRİŞ ve AMAÇ

Canlının bütün genetik bilgilerini deoksiribonükleik asit (DNA) molekülü taşır. DNA, tüm organizmalar ve bazı virüslerin canlılık işlevleri ve biyolojik gelişmeleri için gerekli olan genetik talimatları taşıyan bir nükleik asittir. DNA'da meydana gelen kalıcı değişiklikler kendisinden sonra gelen nesillere aktarılabilmektedir. Genom, DNA hasarına neden olan sayısız farklı etkene maruz kalır(1). DNA hasarını oluşturan nedenlerin en başında, çevresel nedenler, sürekli artan sanayi ve teknolojik atıklar, UV ışıklar, alkol, bazı kimyasal ilaçlar, eksoz dumanı, sigara gibi faktörler gelmektedir.DNAhasarı sadece dış faktörlerden kaynaklanmaz. DNAreplikasyonu verekombinasyonu gibi olaylar sırasında, hücre metabolizmasının yan ürünü olarak üretilen serbest radikaller gibi endojen ajanlar da DNA hasarına neden olabilmektedir. Tüm organizma (bakteri, maya, drosophila, balıklar ve insanlar dahil), DNA'ları çevresel hasarlara karşı korunmak amacıyla DNA tamir mekanizması içerirler(1). DNA onarımı, hücre ölümünü, mutasyonu, replikasyon hatalarını, genomik kararsızlığı azaltan bütün işlemlerde kullanılır(1).

Fizyolojik şartlarda hasarlanan hücre, DNA ları hasarın derecesine göre ya tamir mekanizması ile onarılmakta, ya tamir edilemeyecek derecede hasarlı ise kontrollü hücre ölümü (apoptozis) yolu aktive edilmekte veya bazen tamir mekanizması ve apoptozis yetersiz kalırsa kalıcı mutasyonlar oluşabilmektedir. Canlının her bir hücresinde günde onbinlerce DNA molekülü hasara uğramakla birlikte oluşan hasar DNA tamir mekanizmaları ile tamir edilmektedir. Çift ve tek zincir kırıkları, insersiyon ve delesyonlar, abazik alanlar ve DNA protein çaprazbağ oluşması DNA hasarlarına örnek olarak verilebilir. Bu daDNA molekülünde kalıcı değişikliklere neden olabilmektedir.

DNA hasarını önlemenin yolları bir taraftan DNA molekülünü hasar veren etkenlerden uzak durmakken diğer taraftan DNA hasar oluşumunu önleyici tedbirler almaktır.

DNA hasarına neden olan önemli çevresel faktörlerden biride özellikle deri hastalıklarına ve kansere neden olabilen ışınlardır(2-10). Işınlar, güneş ışınları veya yapay ışık kaynaklarından elde edilen ışınlar olabilir. İnsanlar değişen hayat koşullarıyla birlikte günlük hayatta uzun süreler yapay ışık kaynaklarına maruz kalmaktadır. Yapay ışıklar kullanım amacına göre birçok çeşidi bulunmaktadır. Bunlar arasında en sık kullanılanlar, akkor lamba, floresan lamba, kompakt floresan lamba, halojen lamba, yüksek basınçlı civa buharlı lambalar örnek olarak verilebilir. Akkor lamba, elektrikli yapay aydınlatma kaynakları içerisinde kullanılan en eski lambadır. Akkor lamba genellikle tungsten filamanın(telinin) ısı etkisiyle ışık yayma prensibine dayanır. Akkor lambanın dalga boyu 390-780 nm arasındadır. Akkor lambanın ışık şiddeti diğer elektrikli aydınlatma kaynaklarına göre çok düşüktür. Teknolojinin ilerlemesiyle birlikte yapay aydınlatma kaynaklarında bitakım değişiklikler ve yenilikler meydana gelmiştir. Bununla birlikte günlük hayatta akkor lambanın yerini giderek floresan lamba ve kompakt floresan lamba almıştır. Floresan lambaların dalga boyları 380 ila 700 nm arasındadır ayrıca floresan lamba az miktarda UV ışında yaymaktadır. UV ışınlar ve görünür dalga boyundaki ışınlar iki farklı mekanizma ile primidin dimerleri oluşturarak ve serbest radikaller üzerinden DNA hasarı yaparlar. Floresan lambaların ışık şiddetleri diğer lambalara kıyasla çok daha fazladır. Bu ışıklar insan sağlığını olumsuz yönde etkilemekte hatta kansere dahi yol açabilmektedir. Yapılan araştırmalarda UV ışık karmaşık bir şekilde cilt immün sistemini etkiler. UV radyasyon patojenik inflamatuvar yolla alerji ve otoimmüniteye yol açabilir. UV radyasyonu bir fototerapi olarak deri bağışıklık yanıtlarını bastırmak içinde kullanılabilir(1). UV ışınlar hücrelerin DNA sında bitişik pirimidinler oluşumuna neden olabilir(2-13). UV ışının indüklediği DNA hasarı ve maling transformasyonu önlemek için hücre apoptozise gidebilir(14). UV ışın keratinositlerden, derideki lokositlerden sitokin ve kemokin salgılatır. Güneş ışığına maruziyette reaktif oksijen ürünleri artarak deride melanomaya ve Xeroderma pigmentosuma neden olduğu gösterilmiştir(15). Cilt kanserleri batı toplumunda en sık görülen kanserlerdendir. UV ışınlara maruz kalmak cilt kanseri için önemli bir risk faktörüdür. UV ışınları yol açtığı mutasyonlar cilt kanserlerine onkogenlerin aktivasyonuna ve tümör süpresör genlerin inaktivasyonuna neden olabilir(5).

Bu çalışmada amaç, günlük hayatta sıkça kullanılan yapay ışık kaynaklarının, farklı şiddet ve sürelerde mononükleer lokositler ile oluşturulan hücre kültürü ortamına uygulanmasının hücrelerin DNA hasarı üzerine etkisinin araştırılmasıdır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. DNA'nın Yapısı ve Fonksiyonu

Kimyasal olarak DNA, nükleotit olarak adlandırılan basit birimlerden oluşan iki uzun polimerden oluşur(16,17) . Nükleotidler, bütün hücrelerdeki metabolik süreçleri (temel olarak biosentezleri) yürüten enerjice zengin bileşiklerdir; hücre metabolizmasına önemli destekleyici rollerinin çokluğu ile bizzat hücre metabolizmasına katılan biyomoleküllerdir. Nükleotidler, aynı zamanda hormonlara ve diğer ekstrasellüler uyarılara cevap veren sellüler sistemlerde kimyasal sinyal olarak ta görev yaparlar; ayrıca bir grup enzim için kofaktör ve metabolik ara ürünlerin yapısal komponentleridirler.

Nükleik asitler, nükleotidlerin polimerleridirler ve bir hücrede meydana gelen her olayın önceden planlayıcıdır. Başlıca nükleik asitler, deoksiribonükleik asit (DNA) ve ribonükleik asit (RNA)'dır.

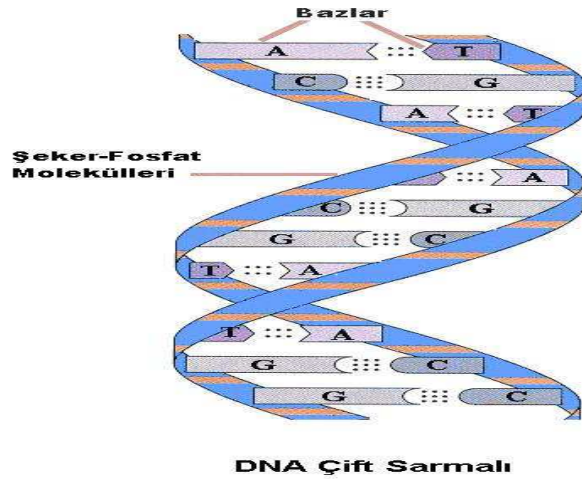
DNA molekülleri bölünme evresinde olmayan ökaryotik hücrede kromatini oluştururlar; hücrenin bölünme evresinde ise genellikle kromozomlar denen yapıları oluştururlar. Bir organizmadaki her protein molekülünün amino asit dizisi ve her RNA molokülünün nükleotid dizisi, organizmanın DNA molekülleri tarafından belirlenir; protein veya RNA yapısı için gerekli bilgi, DNA'daki nükleotid dizisinin karşılığı olarak bulunur. DNA, genetik bilginin saklandığı yerdir ve genetik bilginin depolanması da DNA'nın fonksiyonudur. Protein veya RNA gibi bir fonksiyonel biyolojik ürünün sentezi için gereken bilgiyi saklayan bir DNA

segmenti veya bir kromozom bölümü genolarak adlandırılır. Bir hücre tipik olarak binlerce gene sahiptir ve bunun gereği olarak DNA molekülleri çok büyük olma eğilimindedirler.

Hücrelerde her biri farklı fonksiyonlu birkaç RNA sınıfı bulunur. Ribozomal RNA'lar (rRNA), protein sentezinin gerçekleştiği büyük kompleksler olan ribozomların yapısal komponentleridirler; haberci veya mesenger RNA'lar (mRNA), genetik bilgiyi bir veya birkaç genden uygun proteinlerin sentezlenebildiği ribozomlara taşıyan nükleik asitlerdir; taşıyıcı veya transfer RNA'lar (tRNA), bir mRNA'daki genetik bilgiyi bir spesifik amino asit dizisi haline çeviren uyarlayıcı moleküllerdir.

2.2. Nükleotidlerin bileşenleri

Nükleotidler, bir azotlu baz, bir pentoz ve bir fosfat olmak üzere üç karakteristik komponente sahiptirler. (Şekil 1).



Şekil 1. DNA'nın çift sarmallı yapısı

Azotlu baz ve pentozun birbirine β -N-glikozit bağıyla bağlanmasıyla nükleozid oluşur, nükleozide fosfatın bağlanmasıyla nükleotid (mononükleotid, nükleozid monofosfat) oluşur:

2.2.1 Nükleotidlerdeki azotlu bazlar

Nükleotidlerdeki azotlu bazlar, pirimidin bazları ve pürin bazlarıdır:

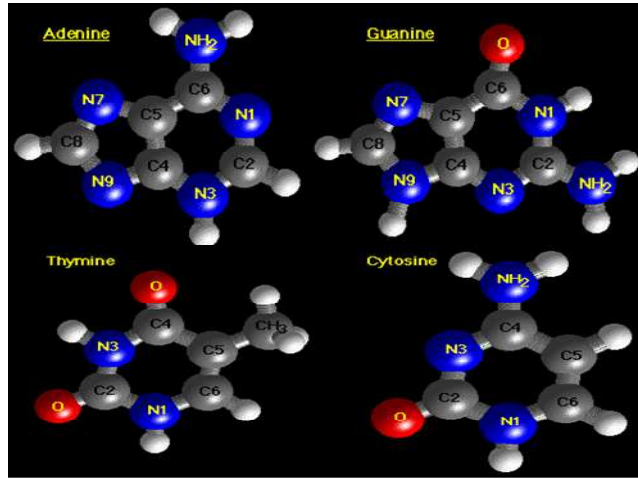
Pürin ve pirimidinler heterosiklik bileşiklerdir. Benzen yapısındaki karbon atomlarından ikisinin yerine azot atomlarının geçmesiyle pirimidin halkası oluşmaktadır; pirimidin ve imidazol halkalarının kondense olmalarıyla da pürin halka sistemi meydana gelmektedir.

Bu pürin ve pirimidin bazlarına timin(T), adenin(A), sitozin(C) ve guanin(G) denir.

Pürin ve pirimidin nükleotidleri, DNA ve RNA moleküllerinin monomerik birimleri olarak görev yapmaktadırlar. Hem DNA'da hem RNA'da nükleotidler, fosfat köprüleri vasıtasıyla art arda bağlanmışlardır; özellikle bir nükleotidin 5^I-hidroksil grubu sonraki nükleotidin 3^I-hidroksil grubuna bir fosfodiester bağı vasıtasıyla bağlanır. Böylece, nükleik asitlerin kovalent iskeleti, birbiri ardına gelen fosfat ve pentoz kalıntılarından oluşur; karakteristik bazlar, iskelete düzenli aralıklarla eklenmiş yan gruplar durumundadırlar.

Bir nükleotid dizisi, alışkanlık olarak, 5^I ucu solda 3^I ucu sağda yani 5^I→3^I yönünde gösterilir; Hem DNA'nın hem RNA'nın nükleotid dizisinden oluşan iskeleti hidrofiliktir; şeker kalıntılarının hidroksil grupları su ile hidrojen bağları oluşturur. Polar iskeletteki fosfat grupları, pH 7'de tamamen iyonize ve negatif yüklüdürler

Bir nükleotid dizisinde bütün fosfodiester bağları zincir boyunca aynı yönde bulunurlar ki bu, nükleotid zincirine farklı 5^I ve 3^I uçları ile spesifik bir polarite verir. Her baz çifti sabit bir şekilde eşleşebilir: Her zaman T ile A ve G ile C birleşir. Sarmaşık dalına benzer her molekül, bir DNA "ipliği"dir. Bu iplikler birbirlerine kimyasal olarak bağlanmış nükleotidlerden oluşur. Bu nükleotidlerinDNA üzerinde sıralanışı, DNA dizilimini belirler. Genetik şifre de bu dizilimde yer alır (Şekil 2.).



Şekil 2. Adenin, Guanin, Sitozin, Timinin molekül yapıları

2.3. Chargaff kuralları

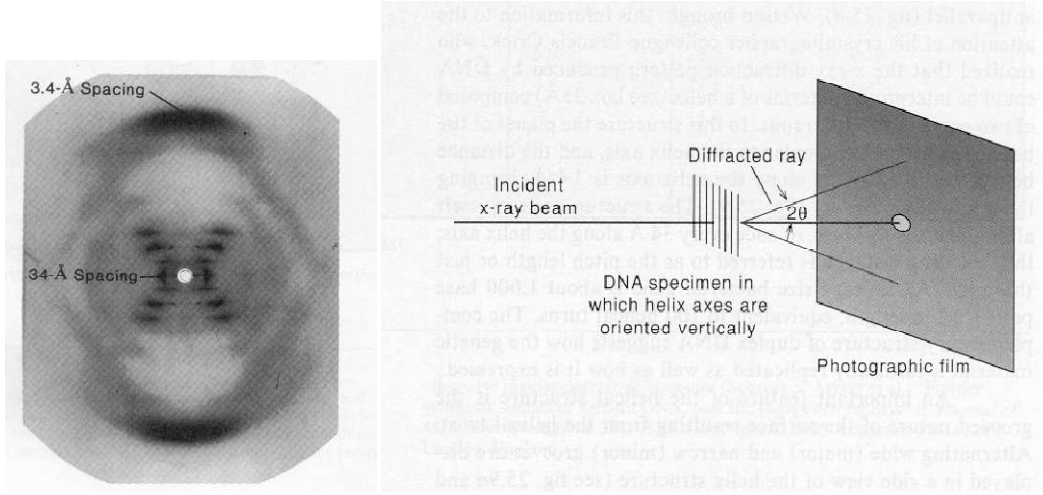
DNA, canlı hücrelerde genetik bilginin saklandığı tek kromozomal komponenttir. DNA'da saklı olan genetik bilgi, replikasyon suretiyle kalıtılabilmekte ve transkripsiyon olayı ile RNA'ya aktarıldıktan sonra translasyon olayı ile protein haline çevrilebilmektedir.

DNA'nın yapısı hakkında en önemli ipucu Erwin Chargaff ve meslektaşlarının 1940 sonlarındaki çalışmalarında bulundu. Erwin Chargaff ve meslektaşları, DNA'daki dört nükleotid bazının, farklı organizmaların DNA'larında farklı oranlarda bulunduğunu ve bazı bazların miktarları arasında ilişkiler olduğunu buldular ki bu çalışmaların sonuçları, **Chargaff kuralları** diye bilinir:

- 1) DNA'nın baz kompozisyonu genellikle türden türe değişir.
- 2) Aynı türlerin farklı dokularından izole edilen DNA örnekleri aynı baz kompozisyonuna sahiptirler.
- 3) Belli bir türdeki DNA'nın baz kompozisyonu yaş, beslenme durumu ve çevre değişimi ile değişmez.
- 4) Türler ne olursa olsun bütün DNA'larda adenin (A) kalıntılarının sayısı timin (T) kalıntılarının sayısına eşittir ve guanin (G) kalıntılarının sayısı sitozin (C) kalıntılarının

sayısına eşittir ($A = T$ ve $G = C$). Buna göre pürin kalıntılarının toplamı pirimidin kalıntılarının toplamına eşittir ($A+G = T+C$). Adenin ve guanin, DNA'larda en sık rastlanan pürinlerdir; sitozin ve timin, insan ve diğer tür DNA'larda en sık rastlanan pirimidinlerdir. $A+T/G+C$ oranı türe göre değişir ki insan ve hayvan DNA'larında A ve T çoktur, bakteri ve virüs DNA'larında G ve C çoktur.

Rosalind Franklin ve Maurice Wilkins, DNA'nın yapısını aydınlatmak ve DNA kristallerini analiz etmek için güçlü X-ışını difraksiyon metodu kullandılar ve 1950'lerde DNA'nın karakteristik bir X-ışını difraksiyon örneği oluşturduğunu buldular(18). (Şekil 3).

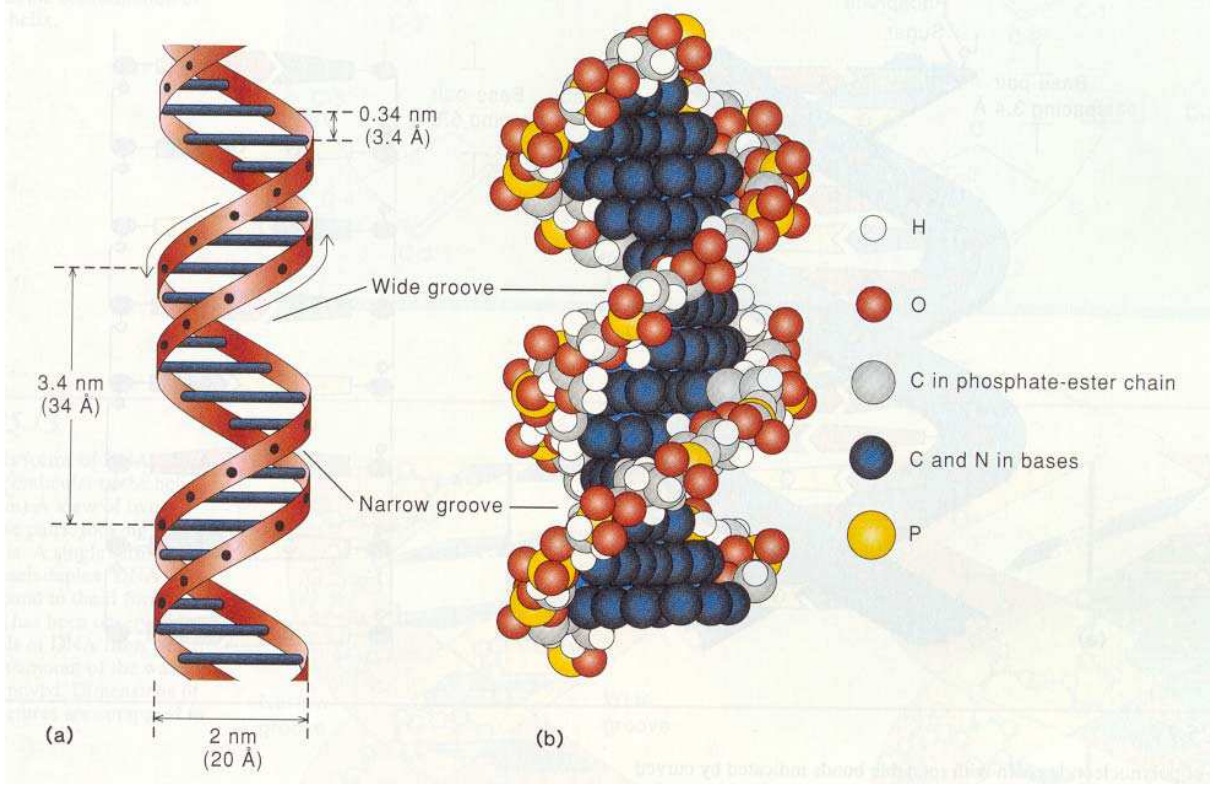


Şekil 3. DNA'nın karakteristik bir X-ışını difraksiyon

Bu örnekten DNA moleküllerinin uzun eksenleri boyunca biri 0,34 nm ikincisi 3,4 nm olan iki devirli heliks olduğu sonucuna varıldı. Örneğin aynı zamanda molekülün iki kol içerdiğini göstermesi yapıyı belirtmek için çok önemliydi.

1953'te James Watson ve Francis Crick, mevcut verilerin hepsini açıklayan üç boyutlu DNA yapısı modeli ileri sürdüler(19). Bu modele göre DNA, sağa dönen çift heliks (ikili sarmal) oluşturmak üzere aynı eksen etrafında iki helezon şeklinde DNA zincir kangalından (polinükleotid zinciri) oluşmuştur. Art arda gelen deoksiriboz ve negatif yüklü fosfat gruplarının oluşturduğu hidrofilik iskelet, ikili sarmalın çevre suyuna bakan dış tarafındadır. Her iki kolun pirimidin ve pürin bazları, hidrofobik ve neredeyse düzlemsel halka yapılarıyla heliksin uzun eksenine dik ve birbirine çok yakın olarak ikili sarmalın iç tarafında üst üste

gelirler. Kollar arasındaki uzaysal ilişki, iki kol arasında büyük oluk ve küçük oluklar meydana getirir.(Şekil 4.).



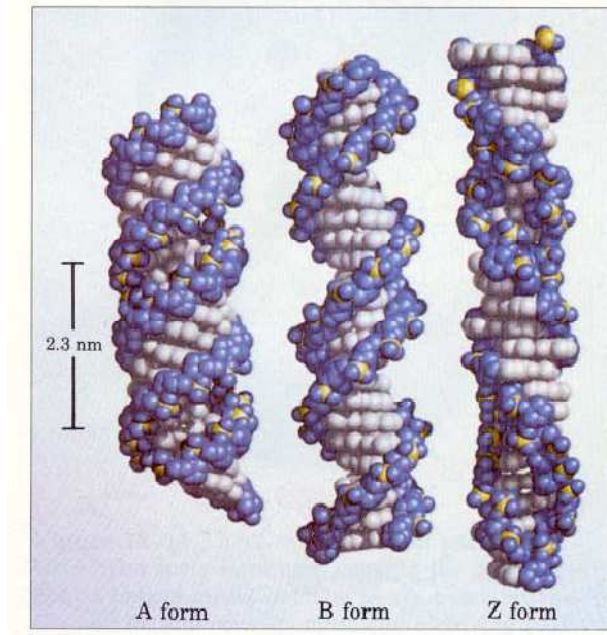
Şekil 4. DNA'nın çift sarmallı yapısı

DNA ikili sarmalında bir koldaki her bir baz, diğer kolun bir bazına hidrojen bağlarıyla bağlanmak suretiyle aynı düzlemde baz çifti oluştururlar. Bazlar arasında hidrojen bağı oluşmasını sağlayan gruplar, amino ve karbonil gruplarıdır. James Watson ve Francis Crick, yapı içinde Chargaff kuralları için bir mantık sağlayan en uygun baz çiftlerinin $A = T$ ve $G \equiv C$ baz çiftleri olduğunu buldular.

2.4. DNA'nın farklı yapısal formları

DNA, belirgin olarak fleksibl bir moleküldür; şeker-fosfat iskeletindeki bağların bir bölümü etrafında hatırı sayılır rotasyon mümkündür ve termal dalgalanma, yapıda bükülme, gerilme ve çift oluşumunun bozulmasına neden olabilir.

B-form DNA olarak tanımlanan yapı (Watson-Crick tarafından tanımlanan yapı), fizyolojik şartlar altında DNA molekülü için en stabil yapıdır ve bu nedenle DNA'nın özelliklerinin herhangi birinin incelenmesi için standart referans noktasıdır. B-form DNA'dan başka A- ve Z-form DNA'lar da vardır.(Şekil 5.).



Şekil 5. DNA'nın farklı yapısal formları

A-form DNA, nispeten susuz birçok çözeltide saptanır; belli bir DNA molekülü için

B-form DNA'dan daha kısa ve daha geniştir.

Z-form DNA, B-form DNA'dan daha farklıdır; en belirgin farklılık, sola dönen helezon şekli ve iskeletinin zikzak görünümüdür.

2.5. Kromatin

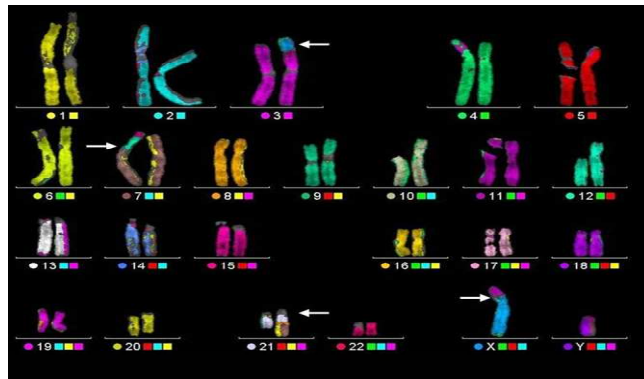
Bölünme evresinde olmayan ökaryotik hücrelerde nükleustan izole edilen kromozomal materyal **kromatin** olarak tanımlanır. Kromatin, biçimlenmemiştir ve çekirdeğin her tarafına dağılmıştır. Hücre bölünmeye hazırlanırken kromatin yoğunlaşır ve kendiliğinden türe özel sayıda kromozomlar halinde belirir.

Kromatin, izole edilmiş ve analiz edilmiştir; yaklaşık olarak eşit miktarlarda protein ve DNA ile az miktarda RNA içeren liflerden oluşmuştur.

2.6. Kromozomlar ve genler

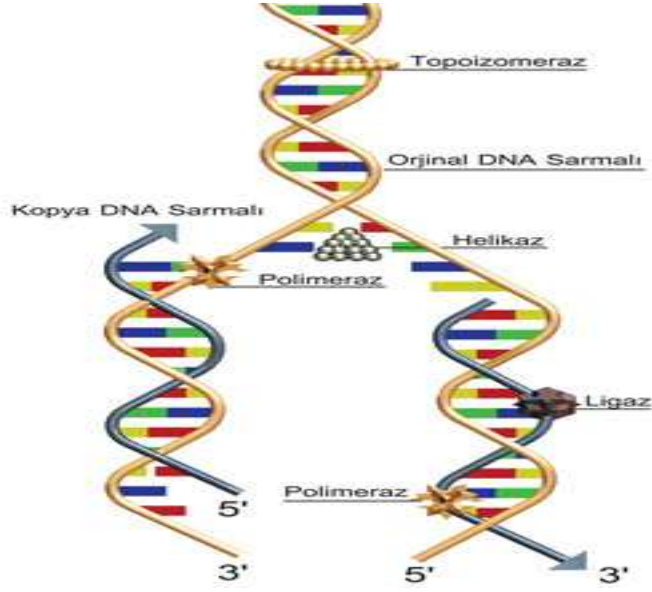
Bir çok hücreli organizmanın her hücresi genellikle aynı genetik materyal içerir. Hücresel genleri içeren DNA molekülleri, hücrelerdeki en büyük makromoleküllerdir ki bunlar, hücrenin bölünme evresinde, kompleks katlanmalarla kromozomdenen yapılar haline gelirler:

Bir hücredeki kromozomlar kümesine onun genomu denir. İnsan genomu 46 kromozom içinde yer alan yaklaşık 3 milyar baz çiftinden oluşur(20). (Şekil 6.) .



Şekil 6. İnsan genomundaki kromozomlar

DNA hücre bölünmesinin hazırlıkları sırasında kendi kopyasını yapar. Kromozomların ikiye bölünmesi sırasında DNA molekülü kendisinin bir kopyasını yapar, buna replikasyon veya duplikasyon denir. Bu olay yavru kromozomda aynı kısımların bulunabilmesi için gereklidir. DNA'nın kendini eşlemesi esnasında, iki sarmal ipliği bir arada tutan hidrojen bağları adeta bir fermuar gibi açılır (Şekil 7.).



Şekil 7. DNA'da replikasyon oluşumu

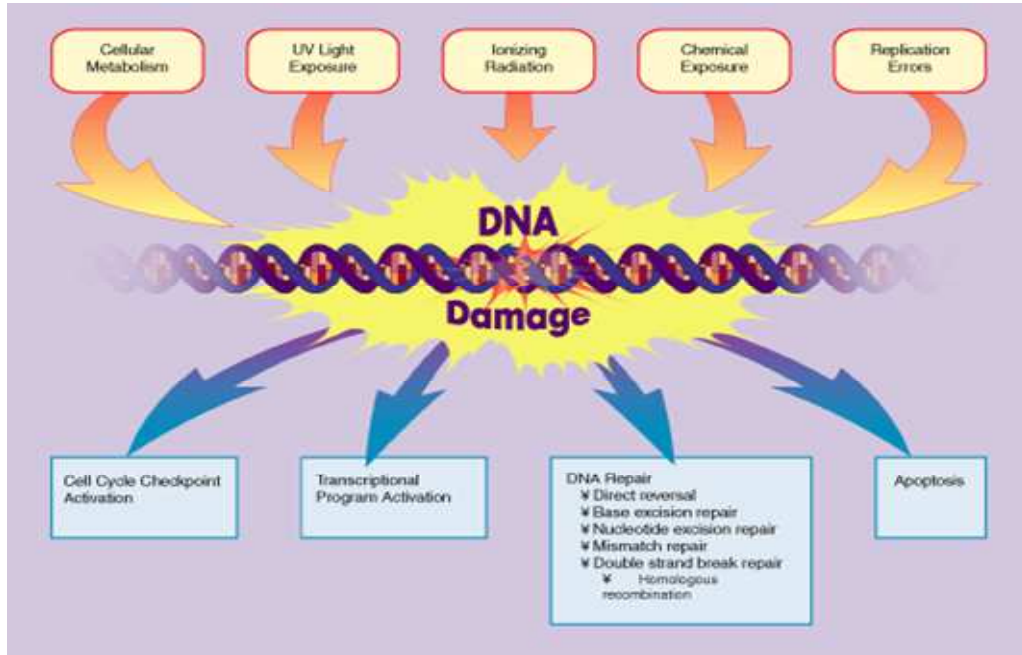
Açıkta kalan pürin ve pirimidin nükleotitlerin uçları, hücrede önceden sentezlenmiş nükleotitlerle tamamlanır. Böylece birbirinin aynı olan iki eş DNA meydana gelmiş olur. Hücre bölünmesinde her biri bir hücreye gider. Hücre mekanizması DNA ikili sarmalını birbirinden ayırıp her iki DNA ipliğini de yeni birer ipliği sentezlemek için şablon olarak kullanma yeteneğine sahiptir. Yeni üretilen iplikler öncekilerle hemen hemen tamamen aynıdır, fakat mutasyonle DNA sı birbirinden farklı yapılar oluşabilir. Hücrenin bu özelliğini laboratuvar ortamında çok hızlı bir şekilde arttırma işlemine polimeraz zincirleme tepkimesi(PCR) adı verilir.

2.7. DNA Hasarı Oluşum Nedenleri

Genetik materyalin moleküler bütünlüğünde ekzojen veya endojen faktörlerin etkisiyle meydana gelen tüm değişiklikler “DNA hasarı” olarak adlandırılır. Genom, DNA hasarına neden olan sayısız farklı etkene maruz kalır.

Ekzojen kaynaklı etmenler arasında stres, virüsler, enfeksiyon, parakuat, alloksan gibi kimyasalların etkisi altında kalma, pestisidler, karbon tetraklorür, parasetamol gibi ilaç toksikasyonları, iyonize ve ultraviyole radyasyon, hava kirliliği yapan fitokimyasal maddeler, sigara dumanı, solventler gibi çevresel faktörler, sisplatin, nitrofurantoin, bleomisin, doksorubisin ve adriamisin gibi antineoplastik ajanlar, hiperbarik oksijen, trisiklik antidepressanlar, demir, bakır, kadmiyum, nikel, krom, civa gibi metal iyonları, asbest lifleri, mineral tozlar, ozon, karbon monoksit, silika, aflatoksin B1 ve PCB (poliklorlubifenil)’ler sayılabilir Endojen kaynaklara örnek olarak, oksidatif metabolizma, DNA’nın spontan değişimleri, immünolojik çeşitliliği oluşturan V(D)J rekombinasyon mekanizmasını (antijen tanıma bölgelerini kodlayan ekson V,D ve J şeklinde üç segmentten oluşur ve bu segmentlerin birçoğu farklı kombinasyonlarla bir araya gelebilir) verebiliriz. (Şekil 8).

DNA HASARI NEDENLERİ



Şekil 8. DNA Hasarı nedenleri

2.8. DNA Hasarına Neden Olan Etkenler

1. Spontan veya kalıtsal oluşan gen mutasyonları

2.Çevresel faktörler

- ❖ Ultraviyole Işık
- ❖ İyonize radyasyon
- ❖ Elektromanyetik dalgalar
- ❖ Kimyasal ajanlar : Aflotoksin, benzopren, kemoterapi ilaçları, alkilleyici ajanlar, vinil klorid,mustard gazları v.b
- ❖ Sigara alkol ve uyuşturucu kullanımı
- ❖ Hava kirliliği ve fabrika atıkları
- ❖ Kötü beslenme alışkanlığı

3.Doğal hücresele metabolizmadan kaynaklanan faktörler

- ❖ Enflamasyon
- ❖ Detoksifikasyon işlemleri

Hücre tüm bu DNA hasarlarına farklı metabolik yollar ile cevap verir.

Hücre genetik materyallerini bu etkenlerin oluşturduğu hasarlara karşı korumak amacıyla DNA onarım mekanizması içerirler. Hücre, DNA hasarlarını "DNA tamir mekanizmaları" ile tamir edebilir. DNA tamir sisteminde 100'den fazla gen rol oynar ve bu genlerin kodladığı proteinler tamir mekanizmalarında görev alırlar. Her bir insan hücresinin DNA'sında günde yaklaşık olarak 500.000 adet kodlanmayan veya yanlış kodlamaya neden olabilen hasar meydana gelmektedir. DNA onarımı, hücrede tek bir mutasyonla başlayan, hasarlı DNA oluşumu ve kanser tablosuyla son bulabilen yolda, hücreyi koruyan önemli bir mekanizmadır. Farklı biyokimyasal stratejileri kullanan birçok mekanizma DNA hasarının birçok şeklini onarır. Genetik değişiklikler ve kanser arasındaki nedensel bir ilişkinin varlığı birçok deneysel ve epidemiyolojik veri ile desteklenmektedir. Genetik kararsızlık kanserin karakteristik özelliğidir. Mutajenite kanser gelişiminin hem başlangıç hem de gelişme evresinde rol oynar. DNA onarımındaki hatalar da genetik kararsızlığa neden olurlar ve kanserlerin çoğunluğu tamir edilmemiş DNA hasarından kaynaklanır.

Mutasyon genetik materyaldeki kalıtsal değişikliklerdir. Bu değişiklik gamet hücrelerinde ya da somatik hücrelerde olabilir. Gamet hücrelerindeki, sonraki nesillere aktarıldığı için, somatik hücrelerdeki, kansere neden olabildiği için önemlidir. Yüksek düzeydeki hasarlar ise apoptozisi uyararak "hücre ölümüne" yol açabilir ve böylelikle organizma kendini korumuş olur.

2.9. DNA Hasarı Tipleri

DNA çeşitli farklı mutagenler tarafından hasara uğrayabilir. Bunun sonucunda DNA dizisi değişebilir. Mutagenler arasında, yükseltgen (oksitleyici) etmenler, alkilleyici etmenler ve yüksek enerjili elektromanyetik ışınlar (morötesi ışık ve X ışınları gibi) sayılabilir. DNA'da meydana gelen hasarın tipi mutagenin tipine bağlıdır. Örneğin, mor ötesi ışık timin ikilileri (timin dimerleri) oluşturarak DNA'ya hasar verir(21). Buna karşın, serbest radikaller veya hidrojen peroksit gibi yükseltgen etmenler farklı türden hasar oluşturabilirler. Baz değişimi (özellikle guanozin) ve iki iplikçikli kırılmalar gibi(22) Her bir insan hücresinde günde 500 baz yükseltgeyici zarar görür(23,24). Bu yükseltgeyici hasarlardan en zararlısı çift zincirli kırılmalardır. Çünkü bunların onarımı zordur. Bunlar DNA dizilerinde noktasal mutasyonlara, insersiyonlara ve delesyonlara ayrıca kromozomal translokasyonlara yol açabilir(25) .

Başlıca hasar tipleri;

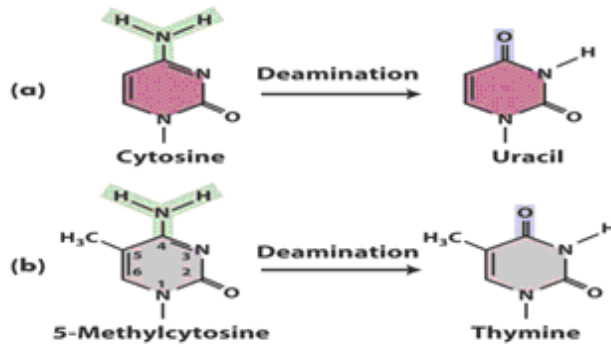
1. Deaminasyon
2. Depurinasyon
3. Alkilasyon
4. T-T and T-C dimerleri oluşumu
5. Replikasyon hataları
6. Çift iplik kırıkları (DSB)
7. Oksidatif hasardır.

2.9.1. Deaminasyon

Deaminasyonda, Adenin (A) ve Sitozin (C)'deki bir amino grubu, keto grubuna dönüştürülmektedir. Bir memeli hücresinde, günde, haploid genom başına 100 urasil oluşur

HNO_2 (nitroz asit) deaminasyon yoluyla Sitozin (C) => Urasil (U) ve Adenin (A) => hipoksantine dönüşmesine neden olur. Adenin deaminasyonu ile oluşan hipoksantin sitozinle yanlış eşleşir.

Deaminasyon, DNA'da normalde bulunmaması gereken urasilin fark edilmesiyle onarılır. Yoksa replikasyon sırasında U karşısına A gelmesi sonucu C:G↔T:A değişimi ve transisyonel mutasyon gerçekleşir. (Şekil 9.,10.)



Şekil 9. Deaminasyon oluşumu

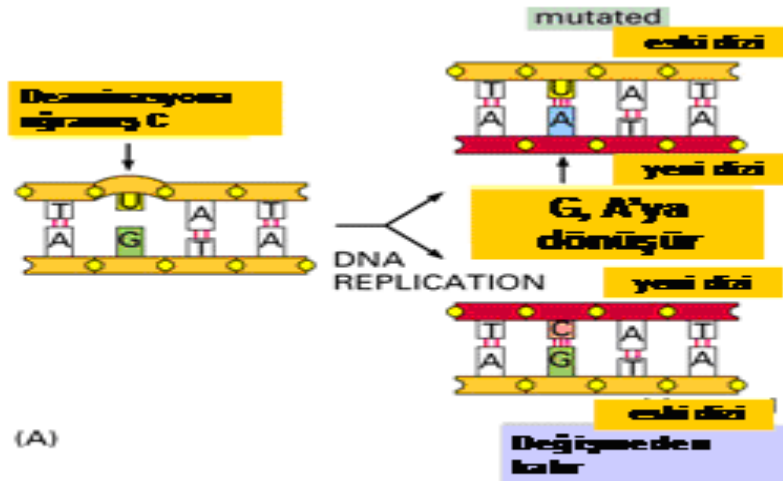
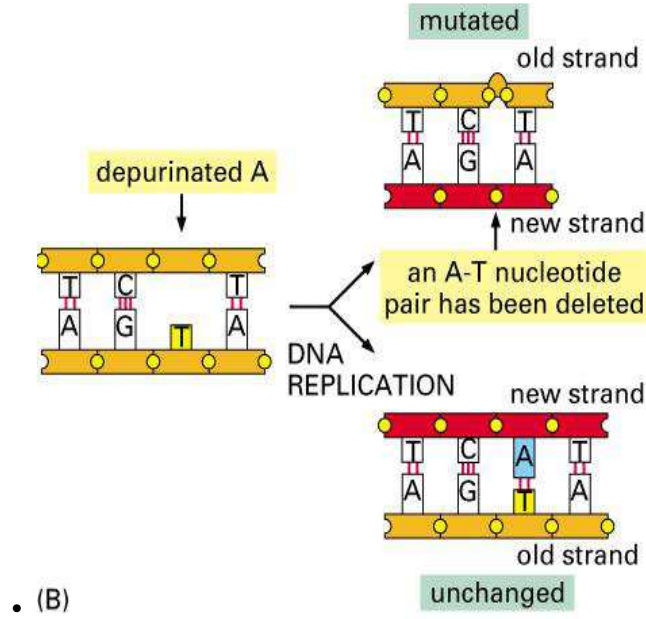


Figure 5-49 part 1 of 2. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

Şekil.10. Deamine bir bazın tamir edilememesi durumundaki nokta mutasyon

2.9.2. Depürinasyon

Depürinasyon Adenin ve Guanin bazının rasgele bir baz ile değişmesidir. Memeli hücreleri spontan olarak 37 derecede 20 saatlik bir üreme periyodunda yaklaşık 10000 purinini kaybeder. Aflatoksin depurinasyonu indükler (purin bazı kaybı) ancak depurinasyon spontan da olabilir. Depurine dizideki tamir eksikliği delesyonlara neden olabilir. Eğer bu mutasyonlar varsa replikasyon sırasında önemli DNA kayıplarına neden olur. Baz olmayan yerin karşısına baz eklenemez veya buraya bir baz eklenir fakat bu baz, mutant bir baz olur.(Şekil 11.)



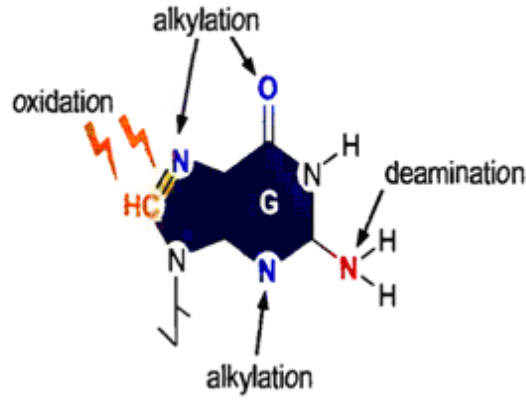
• (B)

Şekil 11. Depürinasyon oluşumu

2.9.3. Alkilasyon

Alkilasyon, nükleotidlerdeki amino ve keto gruplarına metil (CH₃ -) ya da etil (CH₃ - CH₂) gibi bir alkil grubu eklenmesi işlemidir. Bazen mutasyon oluşturur replikasyonda yanlış eşleşmeye neden olur veya polimerazı da durdurabilir. Nitrozaminler, etilmetilsülfonat ve N-metil-N1 -nitrosoguanidin en önemli alkilleyici ajanlardır. En önemli alkilasyon bölgesi, guaninin 6. karbon atomundaki oksijendir(26). Alkilasyon sonucunda oluşan O6 - etilguanin (ya da O6-metilguanin), adeninin baz analogu gibi davranarak timinle eşleşir. Bunun sonucunda hasarlı DNA replike olduğunda G:C baz çifti yerine A:T baz çifti geçer. Birçok kimyasal mutajen bazlarda modifikasyonlara neden olur. Bu ajanlar genellikle küçük alkilerdir (örneğin metil grupları). Aynı zamanda birçok mutajen polisiklik bileşenlerden oluşur.

O6-Metilguanin (mG) alkilleyici ajanlar varlığında oluşur ve yüksek oranda mutajeniktir. O6-Metilguanin-DNA metil transferaz enzimi, DNA'daki yanlış metillenen bazların CH₃ gruplarını kendi sistein rezidülerine transfer ederek normal Guanin oluşumunu sağlar. Bunu yaparken enzim de geri dönüşümsüz olarak baskılanmış olur ve işlev dışı kalır. Böylece bu onarımda enzimin özgünlüğü kadar sayısı da önem kazanmaktadır.



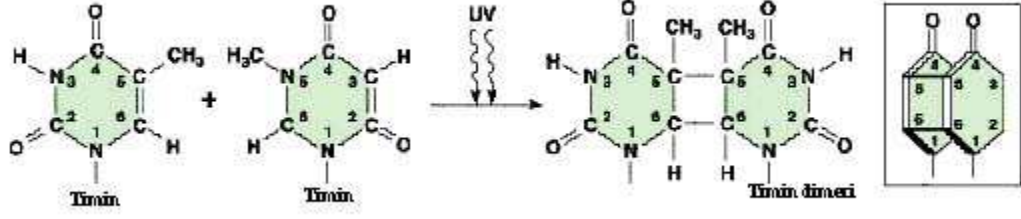
Şekil 12. Guanindeki kimyasal hasar bölgeleri

(alkilasyon, oksidasyon, radyasyon)

2.9.4. T-T ve T-C dimerleri oluşumu

Özellikle, DNA tarafından kuvvetlice absorblanan UV-C (~260nm.) ve

UV-B ışınları, DNA ve diğer biyolojik moleküllerle reaksiyona girerler. Pirimidin dimerleri (T-T, T-C) oluştururlar, bu dimerler replikasyonu ve transkripsiyonu bloke ederler. DNA hasarı güneş yanığına ve melanin üretiminin artmasına neden olur ve tüm melanomaların %8 inden de sorumludur.



Şekil 13. Timin timin dimeri oluşumu

2.9.5. Replikasyon Hataları

DNA replikasyonu esnasında, hatalı eşleşme, küçük baz girişleri veya çıkışları olabilir. DNA polimerazın doğru çalışma oranının yüksek olmasına rağmen, ayrıca oluşan hataları düzelteren bir hata okuma (proofreading) mekanizması varlığına karşın, replikasyon işlemi mükemmel değildir.

Replikasyon işleminde oluşan hataları tamir mekanizmaları düzeltir.

2.9.6. Çift İplik Kırıkları Oluşumu

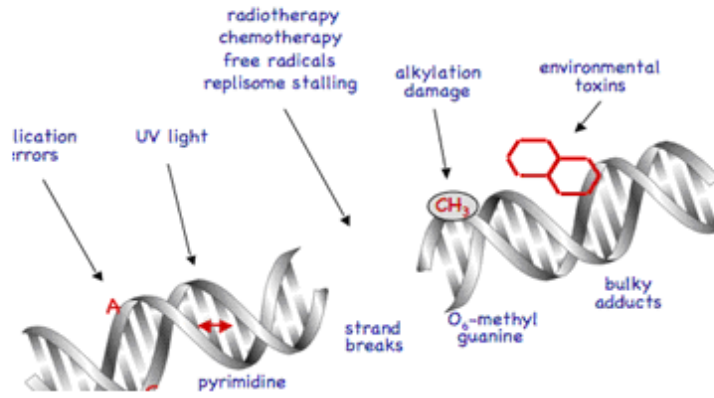
DNA çift zincir kırığının kaynakları:

- İyonize radyasyon, oksitleyici ajanlar
- Topoizomeraz inhibitörleri (etoposide, adriamycin),
- V(D)J rekombinasyonu.

İyonize radyasyon, transposonlar, topoisomerazlar, endonukleazlar, kromozomlar üzerindeki mekanik stres, tek iplikli bölgede tek iplik kesimi ile (örneğin replikasyon ve transkripsiyon sırasında) oluşurlar.

DNA'daki zararın potansiyel olarak en tehlikeli tipi onarım için bozulmamış kalıp bir DNA ipliği bırakmayacak şekilde çift sarmalın her iki ipliğinin de kırıldığı durumdur. Eğer bu bölgeler onarılmadan bırakılırsa kromozomların hızlı bir şekilde daha küçük parçalara ayrılmasına neden olabilir

DSB'ler hem endojen hem de ekzojen unsurlardan kaynaklanabilir ve mutasyon oluşumuna, onkogenik dönüşüme ya da hücre ölümüne yol açabilecekleri için, genom için önemli bir tehlikedirler.



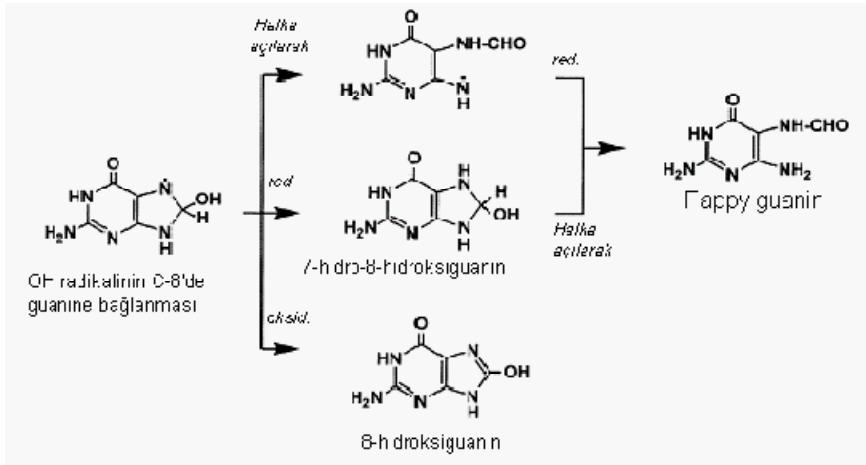
Şekil 14. DNA Çift İplik Kırıkları

2.9.7. Oksidatif Stresin Neden Olduğu DNA Hasarı

Endojen serbest radikallerin her bir hücrede, günde 200.000 kadar bazı hasara uğrattığı tahmin edilmektedir. Serbest radikaller, DNA atakları, mutasyonlara ve hücre ölümlerine yol açmaktadır. Hidroksil radikali bazlarla ve deoksiribozlarla kolayca reaksiyona girer. Hidrojen peroksit ise membranlardan kolayca geçebileceğinden hücre çekirdeğindeki DNA'ya ulaşır ve hücre disfonksiyonuna hatta ölümüne yol açar. Bu nedenle DNA kolay zarar görebilen bir moleküldür(27,28) .

ROS (Reaktif Oksijen Türleri) ve RNS (Reaktif Nitrojen Türleri) ile, DNA hasarlarının çok az bir kısmı doğal olarak meydana gelmektedir(29) . DNA hasarlarının oluşumunda yer alan endojen reaksiyonlar; Oksidasyon, metilasyon, depürinasyon ve deaminasyon reaksiyonlarıdır. Nitrik oksid veya nitrojen dioksit (NO_2), peroksinitrit (ONOO-), dinitrojen trioksit (N_2O_3) ve nitrikasid (HNO_3) gibi reaktif ürünleri, nitrozasyon ve deaminasyon reaksiyonları ile mutajenik aktivite gösterirler. Farklı ROS türleri farklı yollardan DNA hasarlarına neden olurlar. Örneğin O_2 ve H_2O_2 hiçbir zaman bazlarla reaksiyona girmezken OH radikali DNA'daki dört bazdan herhangi birine bağlanarak farklı reaktif ürünlerin oluşmasına yol açmaktadır(30). Singlet oksijen ise guanine spesifik bağlanarak hasar oluşturur(27,28) .

Hidroksil radikali pürin bazları ile C_4 , C_5 ve C_8 pozisyonlarından reaksiyona girerek sırasıyla $\text{C}_4\text{-OH-}$, $\text{C}_5\text{-OH-}$, ve $\text{C}_8\text{-OH-}$ pürin radikallerini oluşturmaktadır(28) . $\text{C}_4\text{-OH-}$ ve $\text{C}_5\text{-OH-}$ pürin radikalleri dehidrasyona uğrayarak okside pürin radikallerini oluştururlar. $\text{C}_8\text{-OH-}$ pürin radikallerinin bir elektronlarının oksidasyonu ve bir elektronlarının redüksiyonu ile sırasıyla 8-hidroksipürinler (7,8-dihidroksi-8-oxopürinler) ve formamidopirimidinler oluşur(28). Her ikisi de hem oksijenli hem de oksijensiz ortamlarda meydana gelebilmektedir. İndirgeyici ajanlar formamidopirimidinlerin oluşumunu artırırken 8-OH-pirimidinlerin oluşması için oksijenli ortam uygun görülmektedir. 8-OH-guanin çok yaygın olarak meydana gelen bir baz hasar ürünü olduğundan oksidatif DNA hasarlarının ölçülmesinde hasar indeksi olarak kullanılmaktadır. Çoğu zaman 8-hidroksideoksiguanozin (8-OH-dGua) nükleoziti şeklinde ölçülmektedir(31) .



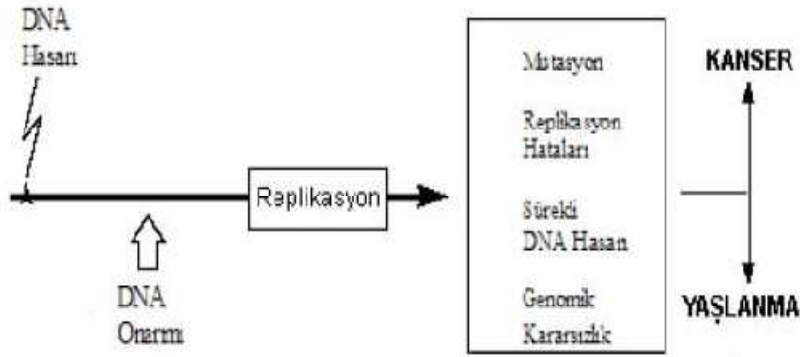
Şekil 15. 8-hidroksiguanin ve FapyGuo'in oluşum mekanizmaları

Hidroksil radikali fraksiyonunun DNA'daki şeker grubu ile etkileşmesi, beş karbon atomunun herhangi birinden bir H atomunun çıkarılmasıyla olmaktadır(32). Şeker radikalleri birçok farklı reaksiyonla meydana gelmektedir. Oksijensiz sistemlerde C₄ merkezli radikaller parçalanmaya uğrarlar ve DNA zincirleri kırılarak sağlam baz ve değişikliğe uğramış şeker serbest kalır. Cl merkezli radikallerin oksidasyonu ile şeker laktonu oluşumu ve sağlam bazın salınımı gerçekleşir. Oksijen yokluğunda, baz radikalleri kendilerine komşu olan şeker grubundan H atomu alarak şeker radikallerini oluştururlar ve sonuçta zincir kırılmalarına neden olurlar. Oksijenli sistemlerde karbon merkezli şeker radikaline moleküler oksijenin eklenmesi sonucu peroksil radikalleri oluşmaktadır. Şeker peroksil radikallerinin en karakteristik özelliği karbon-karbon bağı kırarak alkali bölge oluşturmalarıdır. C₅ merkezli peroksil radikali oksil radikaline dönüştürülerek parçalanma ile DNA zincirinin kırılmasına, sağlam bazın ve değişmiş şekerin serbest kalmasına yol açmaktadır. DNA'daki değişikliğe uğramış şeker grupları DNA zincirinden salınabilir ya da fosfat bağlarıyla DNA'ya bağlı kalabilir(33).

Baz ve şeker radikallerinin reaksiyonları; değişik modifiye baz ve şekerler, kontrolsüz baz dizilimi, zincir kırılmaları ve DNA-protein çapraz bağlarını meydana getirirler. Oksidatif DNA hasarları da denilen bu tip hasarlar mutagenize, kanserogeneze ve yaşlanmaya yol açmaktadır(34).

2.10. DNA Tamiri

DNA'da oluşan küçük hasarlar çoğu zaman DNA onarım sistemleri tarafından onarılır. Bu cevaplardan herhangi birinin işlev görmemesi, hücre düzeyinde genomik kararsızlıkla, organizma düzeyinde ise genetik hastalıklar, kanser veya yaşlanma ile sonuçlanır(35).



Şekil 16. DNA Hasarı sonucu oluşan süreç

İnsanda DNA onarımı ile bağlantılı 130 genin klonlanması ve dizi analizi tamamlanmıştır. DNA onarım genleri iki alt gruba ayrılabilir:

- 1) DNA onarımında sinyal iletimi ve onarımın düzenlenmesi ile ilgili genler,
- 2) Hatalı eşleşme onarımı, baz çıkarma onarımı, nükleotit çıkarma onarımı gibi ayrı onarım mekanizmaları ile ilgili genler

2.10.1. DNA Tamir Mekanizmaları

1. Direkt Tamir ya da Hasarın Geri Döndürülmesi (Reversal of Damage)

A- Fotoreaktivasyon

B- O6-metilguanin tamiri

C- Basit tek zincir kırıklarının ligasyonu

2. Eksizyon (kesip-çıkarma) Tamiri

A- Baz eksizyon tamiri (BER) (base excision repair)

B- Nükleotid eksizyon tamiri (NER) (nucleotide excision repair)

C- Mismatch (yanlış eşleşme) eksizyon tamiri (MER)

3. Replikasyon sonrası (post-replikasyon) tamiri

4. SOS Tamiri

5. Çift Zincir Kırıklarının Tamiri

A- Serbest Uçların Non-homolog Bağlanması (NHEJ)

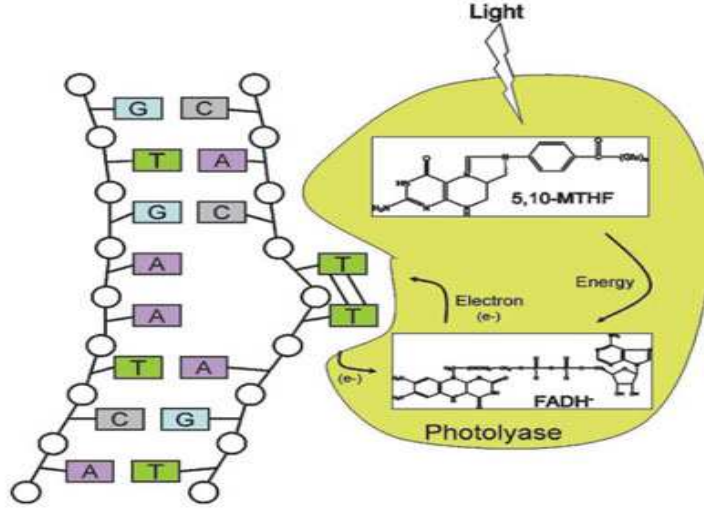
B- Homolog Rekombinasyon (HR)

2.10.1.1. Direkt Tamir Mekanizmaları

2.10.1.1.1. Fotoreaktivasyon

UV-ışığın etkisiyle meydana gelen pirimidin (veya pürin) dimerleri, görünür ışıkla aktif hale geçirilen bir enzim (*fotoliyaz*) tarafından yok edilmesi olayıdır. Fotoliyaz ışık

enerjisini tutar ve timin dimerlerinin bulunduğu bölgede DNA'ya bağlanıp dimerler arasındaki kovalent bağları kırmakta kullanılır; zarar görmüş bazıları doğrudan eski biçimine döndürür(35,36). CPD fotolizazlar bakterilerde, mantarlarda, bitkilerde ve çoğu omurgalıda bulunur ancak plasentalı memelilerde bulunmaz.



Şekil 17. Fotoreaktivasyon mekanizması

2.10.1.1.2. O6-Metilguanin Tamiri

O6-Metilguanin (mG) alkilleyici ajanlar varlığında oluşur ve yüksek oranda mutajeniktir. O6-Metilguanin-DNA metil transferaz enzimi, DNA'daki yanlış metillenen bazların CH₃ gruplarını kendi sistein rezidülerine transfer ederek normal Guanin oluşumunu sağlar. Bunu yaparken enzim de geri dönüşümsüz olarak baskılanmış olur ve işlev dışı kalır. Böylece bu onarımda enzimin özgünlüğü kadar sayısı da önem kazanmaktadır.

2.10.1.1.3. Basit Tek Zincir Kırıklarının Ligasyonu

X-ışını ya da peroksitler gibi bazı ajanlar DNA zincirinde basit kırıklara neden olabilmektedir. Bir zincirde olan basit kırıklar DNA ligaz enzimi ile hemen tamir edilmektedir. DNA ligaz; enerji gerektiren bir reaksiyon ile 5'fosfat grubu ile 3'OH grubu arasındaki fosfodiester bağı oluşturmakta ve söz konusu hasarı tamir etmektedir.

2.10.1.2. Eksizyon (Kesip-Çıkarma) Tamiri

DNA'daki hasarlı bazın oligonükleotid parçaları olarak çıkartılıp bu bölgenin doğru bazlarla doldurulması ve oluşan çentiğin ligasyonla kapatılması ana prensiptir. Tamir sistemi 3 temel basamak içerir:

- 1-Hasar veya hata tanınır ve enzimatik olarak bir nükleaz tarafından kesip çıkarılır.
- 2- DNA polimeraz oluşan boşlukları doldurur.
- 3- DNA ligaz son bağı kurar ve boşluk tamamen kapanır.

2.10.1.2.1. Baz Eksizyon Tamiri (BER)

DNA hasarının doğrudan geri döndürülmesinde, bazlardaki her kimyasal değişiklik kendine özgü bir onarım mekanizması gerektirir. Ancak, hücreler birçok kimyasal hasar tipini

düzeltebilecek genel bir onarım mekanizmasına ihtiyaç duyarlar. Bu da eksizyon onarımıdır(excision repair).

Yanlış yerleştirilen ve hasarlı bazları uzaklaştırmak için kullanılan onarım mekanizmasıdır. Her yanlış baz tipine özgün birçok yolak vardır. Bu yolaklar 2. ve 3. basamaklar ortak olmak üzere 3 adımdan oluşur.

1. Yanlış bazın uygun bir DNA N-glikozilaz tarafından uzaklaştırılması ve bir AP (Apürinik/ Apirimidinik) bölge oluşması. AP bölgeleri spontan olarak kaybolan ya da glikozilaz etkisiyle uzaklaştırılan DNA bölgeleridir. Bir memeli hücresi günde 10000 pürin ve 500 pirimidin kaybeder.

2. Hasarlı DNA'ya AP bölgesinin 5' ucuna doğru AP endonükleaz tarafından çentik atılması ve AP bölgesine komşu bir 3'-OH ucu oluşturulması.

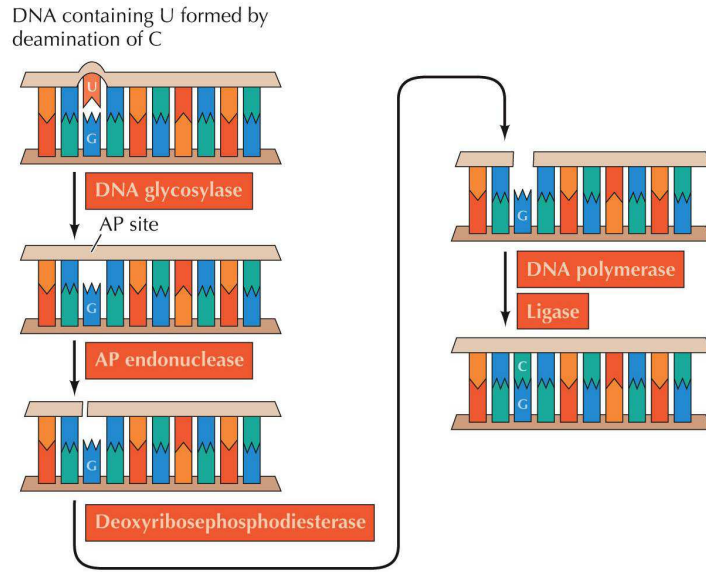
3. AP bölgesinin kesilip çıkarılarak (excision) uzaklaştırılması ve DNA polimeraz tarafından 3'-OH ucunun uzatılması.

İnsan hücrelerinde çok sayıda DNA N-glikozilaz tanımlanmıştır. Diğer ökaryotik organizmalarda ve prokaryotlarda da benzer yapıda glikozilaz enzimi bulunmaktadır.

DNA N-glikozilaz, DNA sarmalı üzerinde hatalı eşleşmeden kaynaklanan bükülmüş yapıyı tanır, baz ve deoksiriboz arasındaki N-glikozidik bağı hidroliz ederler. Ayrıca glikozilazlar bazların yüksek afinite gösterdiği bağlanma bölgelerine sahiptirler. Bu iki etken birleşince yanlış eşleşen bazın DNA çift sarmalından çıkarılması kolaylaşır. DNA N-glikozilazlar ayrıca AP liyaz aktivitesine sahiptirler .

Bu şekilde AP bölgedeki 3'-OH ucunda DNA omurgasını keserler. Bir sonraki adımda AP endonükleazları 5' fosfodiester bağı hidroliz ederler ve uygun nükleotidin yer alması için abazik deoksiribozu uzaklaştırırlar.

Son olarak, DNA polimeraz (polimeraz- β) tarafından doğru nükleotidin yerleştirilmesi ve zincirin ligasyonu ile onarım tamamlanır .



THE CELL, Fourth Edition, Figure 6.21 © 2006 ASM Press and Sinauer Associates, Inc.

Şekil 18. Baz eksizyon tamiri (BER) mekanizması

2.10.1.2.2. Nükleotid Çıkarma Onarımı (Nucleotide Excision Repair / NER)

Bilinen en genel ve etkili onarım mekanizmasıdır. Güneşten gelen UV ışığının karsinojenik etkilerine(dimerler) ve sisplatin, 4-nitrokuinolin oksit gibi etkenlerle reaksiyon sonucu oluşan büyük eklentili hasarlara karşı önemli bir savunma mekanizmasıdır. Yeterince işlev görememesi yaşlanma, kanser oluşumu, çeşitli kalıtsal ve nörodejeneratif bozukluklar ile sonuçlanır. NER mekanizmasında bozukluk bireylerde güneşe duyarlılık, bazı dokularda erken yaşlanma, nörolojik bozukluklar ve genellikle UV kaynaklı cilt kanseri insidensinde artış gözlenir .

Nükleotid eksizyon onarım mekanizmasının bozuk olduğu genetik geçişli nadir görülen üç sendrom tanımlanmıştır:

Kseroderma pigmentosum,

Cockayne sendromu,

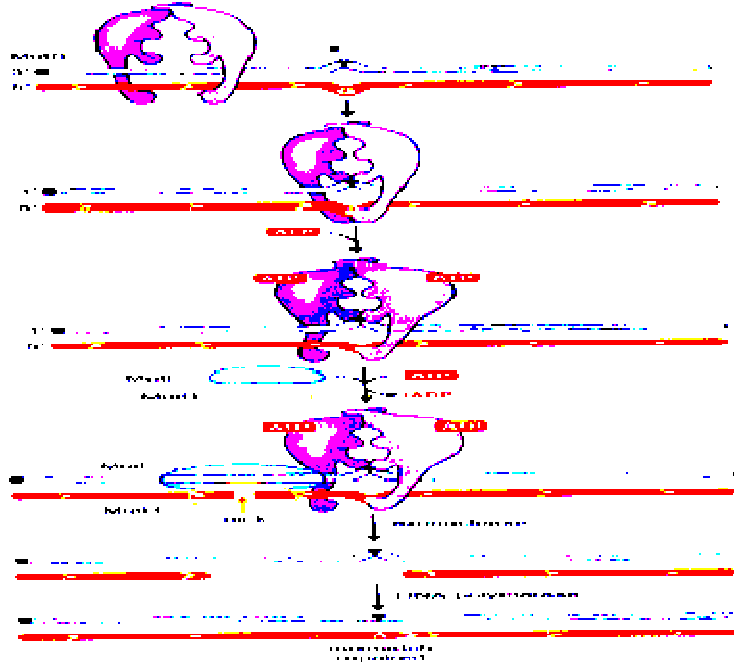
Trikotiyodistrofi(35) .

2.10.1.2.3. Hatalı Eşleşme Onarımı (Mismatch Repair)

Bu onarım mekanizması, DNA replikasyonu esnasında meydana gelen ve çift sarmalda anormal boyutlara neden olan, **normal bazların hatalı eşleşmesi** şeklindeki hataları düzeltir.

Yanlış eşleşme onarım protein dimeri (MutS) DNA'yı tarayarak omurgadaki bükülmeden yanlış eşleşmeyi bulur. MutS yanlış eşleşme taşıyan DNA'yı kuşatır. MutS-DNA kompleksi, MutL proteininin yapıya katılmasını sağlar. MutL yanlış eşleşmenin olduğu yerin yakınındaki bir zincirde bir kırılma (ya da çentik) meydana getirecek olan MutH enzimini aktifleştirir. Çentik oluşumundan sonra bir helikaz (UvrD) DNA'yı çözer ve bir ekzonukleaz zincirdeki büyükçe (1000-2000 nükleotid kadar) bir bölgeyi yok eder. Tek zincirli boşluk DNA polimeraz tarafından doldurulur ve DNA ligaz tarafından kapatılır.

Hatalı eşleşme onarım mekanizması genlerinde mutasyon olan bireylerin kalıtsal nonpolipozal kolon kanserine (HPNCC) yatkın oldukları tespit edilmiştir.



Şekil 19. Hatalı Eşleşme Onarım (Mismatch Repair) Mekanizması

2.10.1.3. Replikasyon sonrası (post-replikasyon) tamiri

DNA hasarı diğer tamir sistemleri ile tamir edilememişse, replikasyondan sonra aktif olan mekanizma sistemidir. Lezyon bulunduran DNA replike olurken, DNA polimeraz önce lezyon yerine gelerek duraklar. Hasarlı bölgeyi de içine alacak şekilde boşluk bırakarak atlar ve DNA sentezine devam eder. Rec A proteini, rekombinasyonel bir değiş tokuş işlemi ile hasarsız komplementer zincirde bulunan sekansı transfer eder. Komplementer zincirde oluşan boşluk DNA polimeraz – DNA ligaz enzimleri sayesinde doldurulur.

2.10.1.4. Acil (SOS) Tamir Sistemi

DNA hasarının yüksek oranda olduğu ve diğer tamir mekanizmalarının başarılı olamadığı durumlarda devreye giren acil cevap sistemidir. DNA sentezi sırasında, bir lezyonun üzerinden atlamak yerine, sistem, DNA polimerazın lezyon karşısında replikasyonu devam ettirmesini sağlar. SOS yanıtında görev alan birçok proteini kodlayan genler normalde Lex A proteini tarafından baskılanmış durumdadır. DNA hasarı ile karşılaşıldığında, baskılanmış olan Rec A proteini hasarlı tek zincire bağlanır ve Rec A-ssDNA kompleksi oluşur. Rec A, DNA'ya bağlandıktan sonra Lex A proteininin otoproteolitik yıkımını aktive eder. Rec A, DNA polimeraza bağlanır ve lezyonu da geçerek DNA'yı replike etmesini sağlar. Rec A'nın, polimerazın 3'-->5' ekzonükleaz aktivitesini inhibe etmesiyle translezyon replikasyon gerçekleşir. Hataya meyilli tamir sistemidir.

2.10.1.5. Çift Zincir Kırıklarının Tamiri

Çift zincir kırıkları spontan oluşur ve genellikle hücrenin reaktif oksijene yanıtı olarak ortaya çıkar ve iki ayrı mekanizma bu potansiyel ölüm lezyonlarını düzeltir. Çift zincir kırıkları düzeltilmediğinde kromozom aberasyonlarına ve kanser öncesi evreye geçişe neden olabilir.

DNA çift zincir kırıkları iki şekilde tamir edilir. Bunlar serbest uçların homolog olmayan şekilde bağlanması (non-homolog end joining) (NHEJ) ve homolog rekombinasyon olmak üzere iki farklı mekanizma ile gerçekleşebilir.

2.10.1.5.1. Homolog Olmayan Uç Birleşmesi

Eğer bölünmeyen bir hücrede çift zincir kırıkları oluşmuşsa kardeş kromatidler de kalıp olarak kullanılmaz ve bu kırıklar hiç tamir edilmemektense hatalı da olsa, hatta bazı baz dizileri kayıp bile olsa tamir edilirler.

Homolog bir kromozomdan faydalanmaksızın DNA uçlarının bağlanmasının biyokimyasal bir yoludur. Çünkü kırık DNA uçları bağlanabilir durumda (ligatable) olmayabilir ve bu yol bazen genetik bilgide kayba da neden olur. Homolog olmayan uç bağlanmasındaki hatalar iyonize radyasyon duyarlılığına ve immün yetersizliğe (severe combined immunodeficiency) neden olur.

2.10.1.5.2. Homolog Uç Birleşmesi

Çift iplik kırıkları onarımının daha etkili bir yoludur. Homolog rekombinasyon kardeş kromatidleri kullanarak çift zincir kırıklarını onarır. Bu nedenle onarım hatadan arınmış bir onarımdır. Sağlam DNA'daki dizi bilgisi bir genel rekombinasyon mekanizması ile çift iplik kırığı olan bölgeye taşınır. Reaksiyon, eşleşen DNA dizilerini tanıyıp bir araya getiren rekombinasyon proteinlerini gerektirir.

Bu komplementer dizi onarım reaksiyonunda kalıp olarak kullanılacaktır. Komplementer dizi bulunduktan sonra homolog hasarlı ve hasarsız DNA arasında birleşik bir molekül yapısı oluşur. Hasarlı dizideki kaybolan dizi kardeş kromatiddeki diziden kopyalanır.

2.11. Serbest Radikaller

Serbest radikaller bir ya da birden fazla eşleşmemiş elektron taşıyan ve diğer moleküllerden elektron koparma eğiliminde olan atom veya moleküllerdir. Serbest radikaller, tek elektronu ile birlikte pozitif yüklü, negatif yüklü veya yüksüz olabilirler. Bu tip maddeler ortaklanmamış elektronlarından dolayı reaktif yapıya sahip olduklarından biyolojik sistemde lipid, protein, DNA, karbonhidrat ve enzim gibi önemli unsurlara geri dönüşümsüz zarar verebilirler. Serbest radikaller somatik hücrelere ve bağışıklık sistemine saldıran moleküllerdir. Antioksidanlar da bu serbest radikallerin etkilerini nötralize eden, kanser, kalp hastalıkları ve erken yaşlanmaya neden olabilecek zincir reaksiyonlarını engelleyen moleküllerdir. Oksidasyona neden olan serbest radikaller temel olarak oksijen kaynaklı metabolitler, (süperoksit anyonları O_2^- , hidrojen peroksit H_2O_2 , hidroksil radikali (OH) hipoklorik asit, kloraminler, azot dioksit, ozon ve lipid peroksitlerdir. Bunlar organizmalar tarafından hücre içinde mitokandriyal solunum zincirinde, ya da hücre dışında, özellikle de fagositler tarafından oluşturulur. Serbest radikaller yaşam için gereklidir. Elektron transferi enerji üretimi ve pek çok diğer metabolik işlevde temel oluşturur. Eğer zincir reaksiyonu kontrolsüz bir davranış gösterirse hücrede hasarlara neden olur. Bir bağ koptuğunda elektronlar ya birlikte kalır (ikisi de bir atoma katılır) ya da ayrılırlar (biri bir atoma, diğeri diğerine). Eğer birlikte kalırlarsa oluşan atom bir iyon olur, eğer ayrılırlarsa da serbest radikaller oluşur. Bu eşleşmemiş elektronlar yüksek enerjilidir ve eşleşmiş elektronları ayırıp işlerine engel olurlar. Bu işlem serbest radikalleri hem tehlikeli hem kullanışlı yapar(37,38) .

2.11.1. Reaktif oksijen türleri

Serbest radikallerin birçoğu reaktif oksijen türleri olup en önemlileri aşağıdadır.

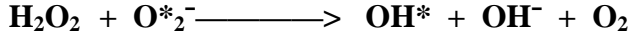
1. Hidrojen peroksit
2. Süperoksit radikali
3. Hipokloröz asit
4. Singlet oksijen
5. Hidroksil radikali
6. Alkil radikali
7. Peroksil radikali
8. Organik peroksit radikali
9. Perhidroksil radikali
10. Alkoksil radikali

2.11.1.1. Hidrojen peroksit (H₂O₂)

Hidrojen peroksit, oksijenin enzimatik olarak iki elektron ile indirgenmesiyle ya da süperoksitlerin enzimatik veya non-enzimatik dismutasyonu tepkimeleri sonucu oluşur. Karaciğerden salgılanan katalaz enzimi yardımıyla 1/2 mol hidrojen ve 1 mol suya dönüştürülerek etkisiz hale getirilir. Yapısında paylaşılmamış elektron içermediğinden radikal özellik taşımaz, reaktif bir tür değildir. Hidrojen peroksitin oksitleyici bir tür olarak bilinmesinin sebebi demir, bakır gibi metal iyonlarının varlığında hidroksil radikalinin öncülü olarak davranmasıdır(39,40) .

2.11.1.2. Süperoksit radikalleri ($O^*_{2^-}$)

Süperoksit radikalleri hücrelerde redükte elektron taşıyıcılarının oksidasyonu ile üretilmektedir. Hücrede enerji metabolizmasında oksidasyon sırasında ya da oksidazlar gibi bazı enzimlerin aktivitesi sonucu oluşurlar. Süperoksit oluşumu elektron taşıyıcısının redoks durumuna ve ortamdaki oksijen derişimine bağlıdır. Zayıf bir oksidan olan süperoksit radikalinin kendi başına önemli hücre hasarlarına yol açması mümkün görülmemektedir. Ancak süperoksit radikalleri oksidatif strese yol açabilen bir dizi reaksiyonları başlatabilir(41). Bu reaksiyonların en önemlilerinden biri Haber-Weiss reaksiyonudur. Bu reaksiyonda O_2 ve H_2O_2 demirvarlığında etkileşerek oldukça reaktif olan HO^* radikalini oluşturmaktadır.

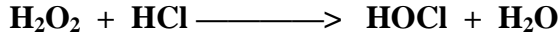


Üretilen bu OH^* radikalleri oldukça reaktif olup hücrede önemli hasarlara yol açar. O_2 radikalleri, hücre içi demir depolarından demiri serbest hale getirir. Serbest hale geçen demir iyonu Haber-Weiss gibi radikal üreten reaksiyonlarda veya diğer serbest radikal aracılıklı hücre hasarında rol oynayabilir. Süperoksit radikalleri çok kısa bir yarı ömre sahip olup dismutasyon reaksiyonu ile H_2O_2 ve O_2 oluştururlar.

2.11.1.3. Hipoklorik asit (HOCl)

Hipoklorik asit de radikal olmadığı halde reaktif oksijen türleri içinde yer almaktadır. Fagositik hücrelerin bakterileri öldürmesinde önemli rol oynar. Aktive olan nötrofiller, monosit makrofajlar ve eozinofiller süperoksit radikallerini üretirler. Radikal üretimi fagositik hücrelerin bakterileri öldürmesinde büyük önem arz etmektedir. Başlıca hedefinin proteinler

olduğu ve protein karbonil bileşiklerinin (PCC) oluşumunu induklediği bildirilmektedir. Özellikle nötrofiller miyeloperoksidaz enzimleri aracılığıyla önce O_2^- 'i oluştururlar ve daha sonra dismutasyonu ile oluşan hidrojen peroksiti klorür iyonu ile birleştirek güçlü bir antibakteriyel ajan olan HOCl'i meydana getirirler.



2.11.1.4. Singlet O_2

Yapısında eşleşmemiş elektronu bulunmadığından serbest radikal olarak değil ancak serbest radikal reaksiyonları başlattıklarından serbest radikal sınıfına dahil edilmiştir. Singlet O_2 , oksijen elektronlarından birinin dışarıdan enerji alması sonucu kendi dönüş yönünün tersi yönde olan farklı bir yörüngeye yer değiştirmesi neticesi oluşabileceği gibi süperoksit radikalinin dismutasyonu ve hidrojen peroksitin hipoklorit ile reaksiyonu sonunda da oluşabilir(42) . Vücutta deri ve retina gibi gün ışığına maruz kalan bölgelerde sıkça oluştuğu tespit edilmiştir

2.11.1.5. Hidroksil radikali (OH^*)

Hidroksil radikali (OH^*), ‘‘Fenton reaksiyonu’’ ve ‘‘Haber-Weiss reaksiyonu’’ sonucunda hidrojen peroksitten oluşmaktadır Hidroksil radikali, en aktif ve en toksik oksijen radikali olup üretildiği her yerde birçok molekül ile reaksiyon verir. Yarı ömrü çok kısadır ama verdiği zararlar çok fazladır. Hidroksil radikali, iyonlaştırıcı radyasyonun (X-ışınları) etkisiyle su moleküllerinin homolitik kırılması sonucunda oluşabileceği gibi hidrojen peroksit molekülünün metaller ile reaksiyonu sonucunda eksik indirgenmesi ile de oluşabilmektedir. Biyolojik sistemlerin tanıdığı en reaktif tür olan OH, su dahil ortamda rastladığı her molekül

ile tepkimeye girer. Bütün bu tepkimeler, OH'ın paylaşılmamış elektron içeren dış orbitaline elektron alma ilgisinden kaynaklanır.

Hidroksil radikalının sebep olduğu en önemli hasar, lipid peroksidasyonu olarak bilinen serbest radikal zincir reaksiyonudur. Hücre zarı su içermediğinden OH'ın başlıca hedefi yağ asididir. Zar lipidlerinin peroksidasyonu zarın yapısını bozar ve geçirgenliğini artırıp hücre ölümüne sebep olabilir(39, 43,44) .

2.11.2. Reaktif nitrojen türleri (NO, NO₂, NO⁻, NO⁺)

Biyolojik sistemlerde oluşan reaktif nitrojen türevlerinin en önemlisi oksidasyon değeri +2 olan nitrik oksittir. NO; bir atom azot ile bir atom oksijenin çiftleşmemiş elektron vererek birleşmesinden meydana gelmiştir ve bu yüzden radikal tanımına uymaktadır. Lipofilik özellikte olup, oksijensiz ortamda oldukça stabildir. Düşük konsantrasyonlarda iken, ortamda oksijen varlığında dahi stabilitesini koruyabilir.

Bu lipofilik serbest radikal, damar endotel hücrelerinde nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi aracılığıyla L-argininden sentezlenir. NOS'ın birçok izoformu tanımlanmıştır. NO'in yarı ömrü 10-20 saniyedir. Kolayca düz kasa geçerek Guanilat Siklaz (GC) enziminin "hem" demirine bağlanır ve cGMP sentezini uyarıp damar gevşemesini uyarır. Sentezlenen NO, aynı zamanda tiyol gruplarını S-nitrozilasyona uğratarak protein ve reseptör fonksiyonlarını da değiştirir. NO metabolize olurken moleküler oksijen ile bağlanıp nitrojen dioksidi (NO₂) oluşturur(45).

2.11.3. Başlıca serbest radikal oluşum kaynakları

Serbest radikaller, besinlerin oksijen kullanılarak enerjiye dönüşümü sırasında meydana gelen reaktif moleküllerdir. Serbest radikaller organizmada normal olarak meydana gelen oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonları sırasında oluştuğu gibi çeşitli dış kaynaklı nedenlerin etkisiyle de oluşabilir.

Reaktif oksijen türleri/metabolitleri olarak bilinen bu moleküller lipit, protein ve DNA gibi hücre bileşenlerine zarar verir. Hücre organellerinin her biri farklı miktarda radikal oluşumuna sebep olurlar. Bunların yanı sıra radyasyon, UV ışınları, ilaçlar, yağ oksidasyonu, immunolojik reaksiyonlar, sigara, alkol stres ve ksenobiyotikler aktive olmuş fagositlerde serbest radikal üretimini artırır. Sitokrom P 450, sitokrom b5, ksantin oksidaz, triptofan dioksijenaz, lipooksijenaz, prostoglandin sentetaz, hemoglobin, flavoproteinler, lipit peroksidasyonu, oksidatif stres yapan iskemi, travma ve intoksikasyon gibi durumlar, mitokondrial elektron transport sistemi (ETS), moleküler otooksidasyon yapan tiyol, hidrokinon, katekolamin, flavin ve antibiyotik gibi moleküllerin hepsi hücrel serbest radikalleri oluşturur(46,47) .

2.11.3.1. Endojen serbest radikal üretim kaynakları

- ❖ Mitokondrial elektron transport zinciri
- ❖ Endoplazmik retikulum
- ❖ Redoks döngüsü
- ❖ Araşidonik asit metabolizması
- ❖ Fagositik hücreler
- ❖ Ksantin oksidaz, NADPH oksidaz gibi oksijen enzimler
- ❖ Otooksidasyon reaksiyonları

2.11.3.1.1. Mitokondriyal elektron transport sistemi

Mitokondrideki enerji üretimi sırasında oksijen kullanılırken, tüketilen oksijenin az bir miktarı süperoksit oluşumuna neden olur. Buradaki radikal yapımının nedeni NADH dehidrogenaz ve koenzim Q gibi elektron taşıyıcılardan oksijene elektron kaçağının olmasıdır. Fizyolojik olarak reaktif oksijen türlerinin temel kaynağı normal oksijen metabolizmasıdır. Dolayısıyla fizyolojik koşullar altında mitokondriyal elektron transport sistemi serbest radikal üretiminin en önemli kısmını oluşturmaktadır(48) .

2.11.3.1.2. Endoplazmik retikulum

Endoplazmik retikulumda özellikle ksobiyotiklerin metabolizmaları esnasında ve diğer endojen maddelerin metabolizmaları esnasında yan ürün olarak serbest radikaller üretilir. Oksijen molekülünün bir atomu substrata bağlanır, diğer atomu ise su oluşturmak üzere kullanılır. Bu reaksiyon monooksijenaz veya karışık fonksiyonlu oksidaz reaksiyonu olarak adlandırılır. Kimyasal ajanların serbest radikal oluşturmadaki en önemli mekanizmaları, mikrozomal sitokrom P-450 sistemi ile aktivasyonudur. Bu sistem, molekülleri indirgeyerek veya oksitleyerek serbest radikal oluşturur. Son durumda bir elektron eksikliği vardır ve elektrofilik bileşik oluşur. Oluşan bu elektrofilik ürün bir nükleofil ile reaksiyona girer. Bu elektrofilik bileşiği çeken en önemli bileşik sistein kalıntıları üzerindeki tiyol (-SH) grubudur. Tiyol grubu ise pek çok endojen makromolekülde (DNA, RNA, enzimler gibi) bulunduğu için reaktif ara ürünler bu moleküllerle kovalent bağlanarak toksisite gösterebilirler(49) .

2.11.3.1.3. Redoks döngüsü

Ksenobiyotiklerden serbest radikal oluşumu sadece mikrozomal reaksiyonlarla olmamaktadır. Menadion, parakuat, dikuat, nitrofurantoin gibi bileşikler alternatif bir redoks siklusuna girerler. Bu bileşikler, ilave bir çiftlenmemiş elektron kazanma eğilimindedirler. Bu ajanlardan oluşan radikaller, tekrar ana bileşiğe dönüşmek için kolayca oksijenle oksitlenir ve süperoksit radikalini oluştururlar. Oluşan ksenobiyotik ve süperoksit radikalleri intra sellüler ferritin depolarından demiri serbest hale getirirler. Sitozole salınan demir, serbest radikaller arasında en reaktif olan ve dolayısıyla daha yıkıcı olan hidroksil radikali gibi ikincil radikallerin olduğu Fenton reaksiyonunda katalitik rol oynar(50). Redoks tepkimesinden oluşan serbest radikallerin oluşumu desferroksamin ile engellenebilir.

2.11.3.1.4. Araşidonik asit metabolizması

Hücre membranlarında prostaglandin için en önemli doymamış yağ asidi prekürsörü araşidonik asittir. Fagositik hücrelerin uyarılması, fosfolipaz ve proteinkinazın aktivasyonu, plazma membranlarında araşidonik asidin salınımına yol açar.

Araşidonik asit, membran yapısında bulunan, önemli fizyolojik fonksiyonları olan eikazonoidler ailesinin sentezinde başlangıç maddesi olan 20 karbonlu çoklu doymamış bir yağ asididir. Araşidonik asidin siklooksijenaz tarafından katalizlenen oksidasyonu ile PGD₂, PGF_{2a} ve tromboksan içeren prostaglandinler oluşur, lipooksijenaz tarafından katalizlenen oksidasyonu ise LTC₄, LTD₄ ve LTE₄ verir ve bu tepkimeler sırasında serbest radikaller oluşur. Araşidonik asit oksidasyonu, başlatılmış bir serbest radikal reaksiyonudur. Siklooksijenaz ve lipooksijenaz enzimlerinin her ikisi de aktiviteleri için peroksitlere ihtiyaç duyarlar. Siklooksijenaz aktivitesi daha sonra prostaglandinlerin sentezi içinde gerekli olan

endoperoksitlerin oluşumuyla sonuçlanır. Öte yandan lipooksijenaz lipid peroksitleri üzerinden lökotrienlerin oluşumunu katalize eder. Aynı zamanda bazı kisenobiyotiklerden bu esnada reaktif ara ürünler oluşmaktadır. Bu ara ürünler hedef yapılarla etkileşerek toksisite gösterirler(51) .

2.11.3.1.5. Fagositoz

Lökositler, mikrobisid fonksiyonlarını, mikroorganizmanın hücre içine alınıp sindirildiği fagositoz olayı ile gerçekleştirirler. Fagositoz, serbest radikal oluşumunun sorumlu olduğu, oksidatif mekanizmalar ve çoğu lökosit granüllerinden salınan bakterisid etkili sitokinlerin rol aldığı, oksidatif olmayan mekanizmaların birlikte çalıştığı bir biyokimyasal süreçtir. Lökosit aktivasyonu, çeşitli hücre dışı uyaranlar aracılığı ile meydana gelir. Sonuçta fagozom membranında lokalize olan NADPH Oksidaz aracılığı ile solunum patlaması (respiratory burst) adı verilen, oksijen tüketiminin hızla arttığı ve süperoksit radikalinin olduğu bir süreç gerçekleşir. **Fagositlerin ürettiği reaktif oksidan ürünler:**

Trombositler, H_2O_2 , $O_2\cdot$, OH

Nötrofiller, H_2O_2 , $O_2\cdot$, OH., HOCl

Eozinofiller, H_2O_2 , $O_2\cdot$, OH., HOCl,

Makrofajlar, H_2O_2 , $O_2\cdot$, OH., HOCl, NO

2.11.3.1.6. Otooksidasyon

Doku bileşenlerinin çoğu moleküler oksijenin varlığında kimyasal olarak stabil değildirler ve metabolik şartlar altında az ya da çok otookside olurlar. Monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu H₂O₂ peroksitler ve okzalaldehyitler oluşabilir. Okzalaldehyitler DNA, ribonükleik asit (RNA) ve proteinlere bağlanarak antimitotik etki göstererek kanser ve yaşlanma olaylarında rol oynarlar. Bunlar arasında, Hemoglobın gibi metallo proteinler, hormonlar, tiyoller, doymamış membran lipitleri sayılabilir. Bütün otooksidasyonlar sırasında serbest radikal intermediyerleri kadar aktive oksijen türleri de üretilir. Böylece otooksidasyonlar vücutta serbest radikal oluşumuna sebep olurlar(52,53,54).

2.11.3.1.7. Oksidan enzimlerin reaksiyonları

Aerobik organizmalarda oksijenin katıldığı birçok reaksiyonda oksijenin tek değerlikli indirgenmesiyle süperoksid anyonu meydana gelebilir. Glikojen oksidaz, ksantin oksidaz, NADPH oksidaz, NADH oksidaz, diamin oksidaz, ürat oksidaz gibi enzimler bunlardan bazılarıdır. Üzerinde en çok çalışılan enzim Ksantin oksidaz (XOD) aslında ksantindehidrogenaz (XDH) olarak sentezlenmekte ve bu şekilde dokularda yaygın olarak bulunmaktadır. Bu enzim elektronlarını moleküler oksijene değil NAD'ye verir ve süperoksid anyon radikali oluşturmaz. Fakat XOD sülfidril oksidasyonu ya da sınırlı proteolizis ile dehidrogenaz formunda oksidaz formuna dönüşebilir. XOD moleküler oksijeni kullanarak H₂O₂ ve O₂ oluşturmaktadır(55) .

2.11.3.2. Ekzojen serbest radikal üretim kaynakları

- ❖ Pestisitler
- ❖ Sigara dumanı
- ❖ Zehirli gazlar
- ❖ İlaçlar
- ❖ Karsinojen maddeler
- ❖ Radyasyon

2.12. Antoksidan Savunma Sistemleri

Antioksidan veya yükseltgeme önleyici, yağların otoksidasyonunu yavaşlatan maddedir. Canlılarda, kimyasal süreçler (prosesler), özellikle oksitlenme, serbest radikallerin oluşmasına neden olur. Yüksek derecede reaktif olan serbest radikaller farklı moleküller ile kolayca reaksiyona girebilir ve böylece hücrelere, canlıya zarar verebilir. Antioksidanlar serbest radikallerle reaksiyona girerek (onlarla bağ kurarak) hücrelere zarar vermelerini önler. Bu özellikleriyle hücrelerin anormalleşme ve sonuç olarak tümör oluşturma risklerini azalttıkları gibi, hücre yıkımını da azalttıkları için, daha sağlıklı ve yaşlılık etkileri minimum olur. Reaktif oksijen türlerinin ve serbest radikallerin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta “antioksidan savunma sistemi” adı verilen kompleks bir savunma sistemi gelişmiştir. Bütün hücreler güçlü savunma sistemlerinin varlığı ile oksidatif strese karşı kendilerini ve organizmayı korumaktadırlar. Savunma sistemlerini serbest radikal tutucuları ve bazı enzimler oluşturmaktadır ve savunma sisteminde öncelikle enzim sistemi etkili olmaktadır(56).

Antioksidanlar başlıca dört yolla oksidanları etkisiz hale getirirler;

1. Süpürme etkisi (Scavenging): Oksidanları daha zayıf yeni bir moleküle dönüştürerek etkisizletirir. Antioksidan enzimler ve mikromoleküller bu yolla etki eder.

2. Söndürme etkisi (Quenching): Vitaminler bu yola etki gösterirler. Oksidanalara hidrojen eklenerek etki gösterirler.

3. Zincir reaksiyonlarını kırma etkisi (Chain Breaking): Hemoglobin, serüloplazmin ve ağır mineraller oksidanları kendilerine bağlar ve inaktive eder.

4. Onarma etkisi (Repair): Oksidatif olarak hasar görmüş biyomolekülü onarılır.

2.12.1.Enzimatik antioksidanlar

2.12.1.1. Süperoksit dismutaz

Süperoksit distumulaz (SOD) süperoksit anyonunun hidrojen perokside dismutasyonunu katalizleyen molekül ağırlığı 17-85 k DA aralığında olan metalloenzimlerdir. SOD enzimi oksijeni metabolize eden tüm hücrelerde bulunur. Ökaryotik hücrelerde 2 tip SOD bulunur. SOD, glutatyon peroksidaz ve katalaz oksijen radikalleriyle oluşan hasara karşı başlıca enzimatik savunma mekanizmalarıdır. SOD, O₂'nin dismutasyonu H₂O₂ molekülünü oluşturur. Oluşan H₂O₂ molekülü sitotoksik olduğundan yine endojen üretilen katalaz ve glutatyon peroksidaz enzimleri ile serbest oksijen ve suya dönüştürülerek toksik etkisi ortadan kaldırılır(57,58).

2.12.1.2. Katalaz

Katalaz, yapısında hem grubu içerdiğinden bir hemoprotein olarak kabul edilmiştir. Kan, kemik iliği, karaciğer, böbrek ve mukoz membranda yüksek miktarda vardır. H_2O_2 oluşum hızının düşük olduğu durumlarda peroksidatif tepkimeyle veya H_2O_2 oluşum hızının yüksek olduğu durumlarda ise katalitik tepkimeyle hidrojen peroksiti suya dönüştürerek ortamdan uzaklaştırır(58,59) .

CAT'ın temel fonksiyonu, moleküler oksijen mevcudiyetinde metabolizmanın bazı kademelerinde sentezlenen, hidrojen peroksitin ve ROOH gibi bir peroksidi giderek, özellikle membranlarda oluşturabilecekleri geri dönüşümsüz hasarları engellemektedir

2.12.1.3. Glutatyon Peroksidaz

Glutatyon Peroksidaz organik hidroperoksitlerin (lipit hidroperoksitler, DNAhidroperoksitler) veya hidrojen peroksitin GSH tarafından indirgenmesi tepkimesini katalizler(56). 1957'de Mills tarafından keşfedilmiştir Tetramerik ve 4 selenyum atomu ihtiva eden sitozolik bir enzimdir. Birbirine kenetli enzim sistemi GSH-Px ve GSH-Rd glutatyon harcayarak H_2O_2 nin redüksiyonunu katalizler .



2.12.1.4. Glutation-S-Transferazlar

Glutation-S-Transferazlar(GST) antioksidan aktivitelerine ilave olarak birçok kimyasal faaliyette görev alırlar. Hem detoksifikasyon yaparlar hem de hücre içi bağlayıcı ve taşıyıcı rolleri vardır. Katalitik olarak; yabancı maddeleri glutatyon (GSH)'daki sisteine ait –SH grubu ile bağlayarak onların elektrofilik bölgelerini nötralize ederler ve ürünün daha fazla suda çözünür hale gelmesini sağlarlar. Oluşan bu GSH konjugatları böylece organizmadan atılabilir veya daha ileri metabolize olurlar. Bu yol, GST'ların kanserojen, mutagen ve diğer zararlı kimyasalların hücre içi detoksifikasyonunda rolleri olduğunu gösterir. Metabolize edilmeyen lipofilik-hidrofobik pek çok bileşiği bağlamaları ise bu enzimler için depo ve taşıma rolü üstlendiğini gösterir. Birçok pigment (bilirubin, hematin, bromsülfattalein, indosiyanın gren gibi), kolik asitler, steroid hormonlar, polisilik aromatik hidrokarbonlar bu proteinler tarafından bağlanıp taşınabilmektedirler.

2.12.1.5. Mitokondrial Sitokrom Oksidaz

Solunum zincirinin son enzimi olan sitokrom oksidaz, süperoksidi detoksifiye eden enzimdir. Bu reaksiyon, fizyolojik şartlarda sürekli cereyan eden normal bir reaksiyon olup bu yolla yakıt maddelerinin oksidasyonu tamamlanır ve bol miktarda enerji üretimi sağlanır. Ancak, süperoksid üretimi çoğu zaman bu enzimin kapasitesini aşar. Bu durumda diğer antioksidan enzimler devreye girerek süperoksidin zararlı etkilerine engel olurlar.

2.12.2. Enzimatik olmayan antioksidanlar

2.12.2.1. Askorbik Asit

C vitamini, suda çözünme özelliği gösterir; Askorbik asitin (C vitamini) efektif bir sudaerir antioksidan olduğu öne sürülmektedir Vitamin C (askorbik asit) organizmada birçok hidroksilasyon reaksiyonunda indirgeyici ajan olarak görev yapar. Süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$) ve hidroksil radikali (OH^{\cdot}) ile reaksiyona girerek onları ortamdaki temizler. Lipit peroksidasyonunu başlatan radikallerin etkilerini yok ederek, lipitleri oksidasyona karşı korur. C vitamini, antiproteazların oksidan maddeler ile inaktive olmasını engeller. C vitamini, fagositoz için de gereklidir. Bu vitaminin kemotaktik cevabı artırdığı görülmüş; oksidatif patlama sırasında çevreye yayılan reaktif bakterisidal moleküllerin antibakterisidal etkisini sağlayan intrasellüler konsantrasyonlarında bir azalma yapmadan, oksidatif parçalanma ürünlerinin zarar verici etkilerini önlediği gözlenmiştir. C vitamini, antioksidan etkileri yanında organizmada Fenton reaksiyonunda ferridemiri ferro demire indirgeyerek, hidrojen peroksitle etkileşmeye uygun olan süperoksit radikalinin üretimine neden olur. Bu etkisi sebebiyle askorbik asit aynı zamanda pro-oksidan olarak kabul edilmektedir; fakat bu tip etkisi sadece düşük konsantrasyonlarda olduğundan oksidan olarak kabul edilir.

Suda çözünen bir vitamin olan C vitamini vücut sıvısında genellikle askorbat olarak bulunur. Kolayca elektron vererek dehidro askorbik asite kendiliğinden okside olur ve süperoksit, hidrojen peroksit, hipoklorit, hidroksil radikali, peroksil radikali ve singlet oksijeni süpürücü etki gösterir. C vitamini lipid peroksidasyonunu başlatmadan peroksil radikallerini su fazında inhibe ederek, biyolojik membranları peroksidatif hasardan korur(60).

2.12.2.2.β-Karoten

Beta karoten retina gibi bazı dokuların membranlarında yüksek konsantrasyonlarda birikebilir. Serbest radikallerle direkt reaksiyona girer. E vitamini ile sinerjik etki gösterir. Malonildialdehit oluşumunu ve lipid peroksidasyonunu inhibe edebilir.

β-karoten yağda çözünen bir antioksidan olarak serbest radikaller biyolojik hedeflerle interaksiyonuna girmeden önce direkt olarak onları yakalayabilir ve aynı zamanda zincir kıran bir antioksidan olarak etki ederek de peroksit radikalleri oluşumunu önler. Genel olarak havuç, domates, greyfurt, portakal, ıspanak gibi sebze ve meyvelerin kırmızı, turuncu, sarı ve yeşil renklerinden sorumludur. Karotenoidler insanda ince barsakta %5-50 oranında pasif diffüzyon ile emilir. Bu emilim oranı diyetdeki yağ miktarıyla ilişkilidir. Karotenoidler hücreyi oksidatif stresten; triplet molekülleri ve singlet oksijeni süpürerek, serbest radikalleri inhibe ederek korur(60,61).

2.12.2.3. Vitamin E (α-Tokoferol)

α-Tokoferol yağda çözünen ve zincir kırıcı bir antioksidandır. Antioksidan aktivitesi en yüksek olan tokoferol alfa-tokoferoldür

En önemli görevi oksijen serbest radikallerinin ataklarına karşı membran lipidlerindeki yağ asitlerini korumaktır. Sonuçta steroidlerin neden olduğu karaciğer hücre hasarı ve tümör gelişimine karşı kullanılabilir Mitokondri, endoplazmik retikulum ve plazma membran fosfolipitlerinin α-tokoferole karşı çok yüksek affinitesi vardır. Tokoferoller fenolik bir hidrojeni peroksidasyona uğramış bir doymamış yağ asidindeki serbest peroksit radikale aktarırlar. Bunun sonucunda serbest radikal zincir reaksiyonları kırılır(62). Oluşan serbest α-

tokoferol radikali bundan sonra yeni bir serbest peroksit radikaliyle reaksiyona girer. Kroman halkası ve yan zincir şeklindeki serbest olmayan radikal ürününe okside olur. Bu oksidasyon ürünü ikinci konumundaki hidroksil grubu üzerinden glukuronik asit ile konjugasyona uğrayarak safra yoluyla atılır(63). Tokoferolün antioksidan etkisi yüksek oksijen konsantrasyonlarında etkilidir. Bundan dolayı en yüksek oksijen kısmi basınçlarına maruz kalan lipit yapılarında örneğin eritrosit ve solunum sistemi membranlarında etkileri belirgindir(64,65) .

2.12.2.4.Polifenoller

Fenoller, aromatik halkaya bağlı OH grubu içeren etkili antioksidanlardır, çünkü bu bileşiklerden oluşan radikaller, rezonans kararlılığına sahiptir. Bu nedenle diğer radikallere göre etkin olmayan radikallerdir.

Laboratuar araştırmaları, çaydaki polifenollerin kanser oluşumunu önlemeye yardımcı olabildiğini ve var olan kanserin ilerlemesini engelleyebildiğini veya kanseri azaltıp yayılmasını önleyebildiğini göstermektedir. Bu etkinin, polifenollerin, DNA'nın zarar görmesine ve normal hücrelerin kanserli hücrelere dönüşmesine neden olan oksidasyonu engelleme ve kanserojik bileşimlerin habisliğini artıran enzim aktivitelerini kısıtlama yetisinden kaynaklandığı sanılmaktadır. İnsanlarda bulgulara yönelik belirli bir sonuç bulunmamaktadır; ancak gözleme dayanan kanıtlar, arada bir bağlantı olduğunu göstermektedir. Aradaki bağlantı kanserde olduğu kadar güçlü olmasa da çayın kalp hastalığına karşı koruma sağladığını gösteren kanıtlar da mevcuttur. Bunun nedeni, çay polifenollerinin kan kolesterolünü ve tansiyonu düşürüp kalp krizine veya felce yol açabilecek pıhtıların oluşmasını engellemesi olabileceği düşünülmektedir.

2.12.2.5. Transferin ve Laktoferrin

Demiri bağlayarak lipid peroksidasyonu ve demir katalizli Haber-Weiss reaksiyonlarına katılımını durdurur veya yavaşlatır.

2.12.2.6. Seruloplazmin

Plazma antioksidan aktivitesinin önemli bir kısmını akut faz proteini olan seruloplazminden kaynaklanır. Seruloplazmin oksijen radikal ara ürünleri salınmaksızın Fe(II)'yi Fe(III)'e oksitler. Seruloplazmin demir ve bakır bağımlı lipid peroksidasyonu inhibe eder. Daha az önemli olmakla birlikte süperoksit radikali ile reaksiyona da girer.

2.12.2.7. Albümin

Albümin, kuvvetli şekilde bakır ve zayıf olarak da demiri bağlar. Yüksek konsantrasyonlarda (40-60 mg/ml) bulunur. Albumine bağlı bakır, Fenton reaksiyonuna katılabilir fakat albumin yüzeyinde oluşacak olan OH radikali albumin tarafından temizlenir ve radikalın serbest solüsyona kaçmasına izin vermez. Bu biyolojik olarak önemli olmayan, albumine ait bir reaksiyon örneğidir. Aynı zamanda myeloperoksidaz türevi bir oksidan olan HOCl'i hızlı bir şekilde temizler.

2.12.2.8. Ürik Asit

Kuvvetli olarak demir ve bakır bağlama yeteneği antioksidatif rolünün önemli bir parçasıdır. Lipit peroksidasyonunu inhibe etme ve radikalleri temizleme görevine sahiptir.

2.12.2.9. Bilirubin

Hem katabolizması ile meydana gelen ve albumine bağlı olarak taşınan bir safra pigmentidir. Yağ asitlerini peroksidasyona karşı koruma görevine sahiptir.

2.13. IŞIK

Işık çevremizdeki cisimleri görmemize ve renkleri ayırt etmemize yarayan enerji şekli ya da doğrusal dalgalar halinde yayılan elektromanyetik dalgalara verilen addır.

Işık, 380 - 780 m. dalga boyları arası dalga boyu gözle görülebilir ancak bilimsel terminolojide gözle görünmeyen dalga boylarına da ışık denilebilir. Işığın özellikleri, radyo dalgalarından gamma ışınlarına kadar gidebilen, elektromanyetik dalganın boyuna göre değişir.

Işığın, temel olarak üç özelliği vardır:

1. **Frekans:** Dalga boyu ile ters orantılıdır, insan gözü bu özelliği renk olarak algılar.

2. **Şiddet:** Genlik olarak da geçer, insan gözü tarafından parlaklık olarak algılanır.
3. **Polarite:** Titreşim açısidır, normal şartlarda insan gözü tarafından algılanmaz.

Isaac Newton (1642-1727), beyaz güneş ışığının kırmızıdan mora kadar tam bir renkler grubundan ibâret olduğunu göstermiştir. Bu konuda Newton'dan çok önceleri, İslâm âleminin yetiştirdiği fen âlimlerinden İbn-i Heysem de çalışmalar yapmıştır. Hattâ birçok bilim adamları onun modern anlamdaki geometrik optiğin kurucusu olduğunu, ışığın yansıma ve kırılma kânunlarını ilk kez onun bulduğunu kabul etmektedirler. Ayrıca, ışığın, saydam ortamların yüzeyinden kısmen yansıyıp kısmen de kırılmasını, ışık tâneciklerinin zamanla periyodik olarak değişen bir özelliği olduğunu açıklamaya çalışmıştır. Kendi adı verilen ve bir girişim olayı olan Newton halkalarını ilk defa Newton bulduysa da, bunların dalga teorisindeki önemini fark edememiştir. Newton'un bu tanecik teorisi ışığın bir engele rastlayınca kırınım (difraksiyon) uğraması ve benzer olayları açıklamaktan uzak kalmıştır.

2.13.1. Dalga Olarak Işık

Işığın dalga şeklindeki yapısı gözlendikten sonra, sorular dalganın ne olduğu konusuna yöneldi. Bütün mekanik dalga hareketleri, bir ortamın düzenli periyodik titreşimini gerektirdiğinden, ışığın boşlukta da yayılması için maddî bir ortamın bulunması gerektiği sonucuna vardılar. Böylece tamâmen tasavvur olan Ether'in varlığını kabul ettiler. Kabullere göre Ether, bütün uzayı doldurmakta ve elektromanyetik dalga yayılışını mümkün kılmaktaydı.

Diğer tür dalga hareketleri ile ışığı kıyaslanarak, dünyânın Ether içindeki hareketinin, hareket yönünde ve ona dik yönde ışığın hızını değiştireceği sonucu ortaya kondu. Ancak 1887'de yapılan hassas deneyler böyle bir farklılığın olmadığını ve ışığın her yöndeki hızının aynı olduğunu gösterdi.

2.13.2. Enerji Parçacığı Olarak Işık

Dalga teorisiyle açıklanamayan bazı olaylar ortaya çıktı. Atom fiziği ile ilişkili olan bu deneyler ise ışığın foton, (enerji yüklü parçacıklar) şeklinde yayıldığına işaret etmekteydi. Bu ise eski teoriye dönüşü gerektirmekteydi. Ancak, bu ikisi Kuantum Teorisi'yle bir araya getirilmiştir. Kuantum Teorisi, dalga teorisinde değişiklik meydana getirmemekte, ışık yayılışında, dalga biçiminde olduğu halde, maddeyle olan karşılıklı ilişkilerinde enerji kuantası şeklinde olduğunu söylemektedir.

2.13.3. Işık ve Rengin Algılanması

İnsan tarafından renklerin algılanması, ışığın cisimler tarafından yansıtılışına, ışığın saydam cisimlerin içinden geçişine ve nesnenin göz yardımıyla beyne iletilmesi sayesinde gerçekleşir.

Göz tarafından algılanan ışık, retinada sinirsel sinyallere dönüştürülüp, buradan optik sinir olan Nervus opticus aracılığıyla beyne iletilir. Göz, üç temel birleştirici renk olan; kırmızı, sarı ve yeşile tepki verir ve beyin, diğer renkleri bu üç rengin farklı kombinasyonları olarak algılar. Renklerin algılanışı dış koşullara bağlı olarak değişir.

2.13.4. Aydınlatma ve Aydınlanma Şiddeti

Üzerlerine ışık düşen bütün cisimler aydınlanırlar. Aydınlanma şiddeti, cismin yüzeyine gelen ışınların “gelme açısı”na, ışık kaynağına olan uzaklığına ve ışık kaynağının şiddetine bağlıdır. Aydınlatma birimi olarak mum-metre veya lüks kullanılır. Bu birim, bir mum şiddetindeki ışık kaynağından bir metre uzaklıkta olan bir metre karelik yüzeyin aydınlanma miktarını gösterir. Bir yüzeye ne kadar çok ışık düşerse aydınlanma o kadar çok olur. Aydınlatma şiddeti cismin ışık kaynağına olan uzaklığının karesiyle ters orantılıdır. Evlerde aydınlatma amacıyla kullanılan tungsten fitilli elektrik lambalarının her wattı, bir mumdan biraz daha çok ışık verir. Mesela, 75 watt'lık bir lambanın ışık şiddeti yaklaşık olarak 83 mumdur. Floresans lambalarının ışık şiddeti yüksektir ve watt başına 4 mum kadardır.

2.13.5. Işık Kaynakları

Doğal ışık kaynakları: güneş, yıldızlar, ateş böceği.

Yapay ışık kaynakları: ateş, mum, gaz lâmbası, bütan gazı lâmbası, elektrik ampülü.

2.13.5.1. Yapay Işık Kaynakları

Ana yapısı ince bir karbon teli olan ilk elektrik lambası 1879 yılında yapıldı. Bu ilk lambanın ışıksal verimi 2 lm/W gibi oldukça düşük bir değerdedi. Bu değer ilk etapta çeşitli geliştirmeler sonucu 4,5 lm/W değerine çıkarıldı. Daha sonra, karbon tel yerine günümüzde de akkor lambaların yapısında bulunan ve sıcaklığa en dayanıklı maddelerden biri olan tungsten telin kullanılmasıyla lambanın verimi 8 lm/W değerine yükseltildi. 1950 yılının son

çeyreğinde, akkor lambaların ampulleri iyot grubundan gazlarla doldurularak daha etkili kullanılmaya başlandı ve verimleri 20-22lm/Wdeğerlerine ulaştı.

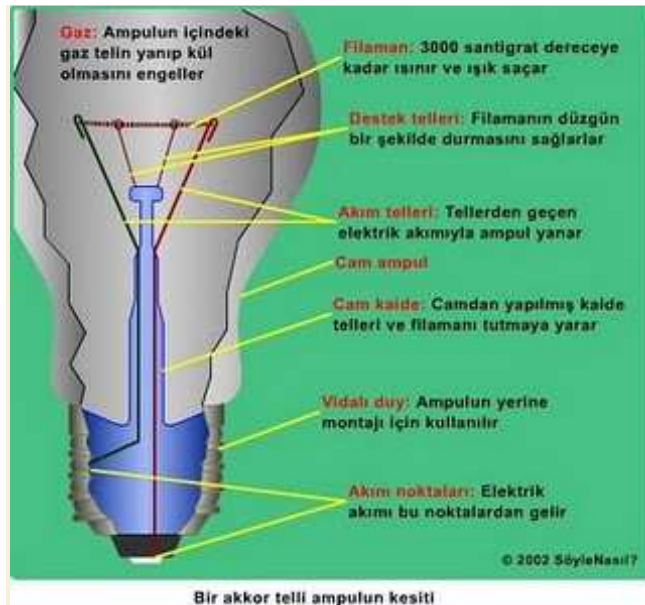
Işık kaynaklarının gelişim süreci sadece akkor lambalarla sınırlı değildi. 1930'lu yıllara gelindiğinde deşarj lambaları üreilmeye başlandı. 1932 yılına gelindiğinde ise dünyanın birçok yerinde düşük basınçlı sodyum buharlı ve yüksek basınçlı civa buharlı lambalar kullanılmaya başlandı. Oldukça yüksek verime sahip olan bu lambalar, kötü renk özellikleri nedeniyle o dönemde sokak lambası olmaktan öteye gidemedi.

1950'li yıllarda bu lambaların camlarının kırmızı fosforla kaplanmasıyla renksel ve ışıksal geriverimleri arttırıldı. 1960'lı yıllarda civa buharlı bazı tuzlar eklenerek metalik halojenürlü ya da diğer adıyla Metal Halide lambalar üreilmeye başlandı. Eklenen tuzların etkisiyle lambaların renksel geriverimi yükseltildi ve yüksek verimli metalik halojenürlü lambalar kullanılmaya başlandı. 1970'li yıllara kadar hızlı bir gelişim süreci geçiren civa buharlı lambalar bu dönemden sonra alternatif lambalardaki gelişmeler nedeniyle duraklama sürecine girmiştir.

Floresan lambalar ilk olarak 1938 yılından sonra kullanılmaya başlandı. İlk üretilen floresan lambalarda kullanılan çinko berilyum sülfat fosforları insan sağlığı açısından sakıncalıydı. 1948 yılında floresan lambalarda İngiltere'de keşfedilen ve sağlık açısından risk taşımayan halofosfatlar kullanılmaya başlandı. 1974 yılından itibaren trifosforların kullanılmaya başlanmasıyla floresan lambaların verim ve renksel özellikleri de geliştirildi. İlerleyen yıllarda multifosforların kullanılmasıyla floresan lambaların renksel geriverimlerinde çok ciddi bir artış sağlandı ve renksel geriverim indeksi Ra=95-98 değerlerine kadar ulaştı. Günümüzde floresan lambalar, kompakt medellerinin üretilmesi ve kalite parametrelerinin düzeltilmesiyle iç aydınlatmada en çok tercih edilen ışık kaynakları olmuşlardır

2.13.5.2. Lambalar ve Çalışma Mekanizmaları

İngiliz Joseph Swan ve Amerikalı Thomas Edison. Şaşırtıcı bir şekilde her ikisinde birbirinden habersiz, 1878-1879 yıllarında, o zamana göre uzun dayanan (yaklaşık 12-13 saat) ampulleri yapmışlardı. Ampullerinde kullandıkları tel ise kömürleşmiş pamuk lifiydi. Yani karbon elementiydi. Daha sonra 1880 yılında Edison kömürleşmiş bambu lifinden 40 saate kadar dayanan ampulünü yaptı. Edison'un ampullerindeki sorun filaman telinin ömrünün kısa olmasıydı. Kullandığı karbon lifleri 2675 °C 'de ışık saçıyordu. Bu karbon lifleri kısa sürede buharlaşarak inceliyor ve kopuyordu. Çözüm düşük sıcaklıktı, fakat bu da az ve loş ışık demekti. Diğer mucitlerde çalışmalarını sürdürdüler. 1898 'de Karl Auer filaman olarak erime derecesi 2700 °C olan osmiyumu kullandı. 1903 'de Siemens ve Halske tantalumu kullandı. Erime noktası 2996 °C idi. Fakat hiçbirisi bugün kullandığımız ampul değildi. Nihayet 1906-1910 yıllarında General Electric Firması ve William Coolidge bugünkü modern ampullerde kullanılan tungsten filamanlı ampulü geliştirdiler.

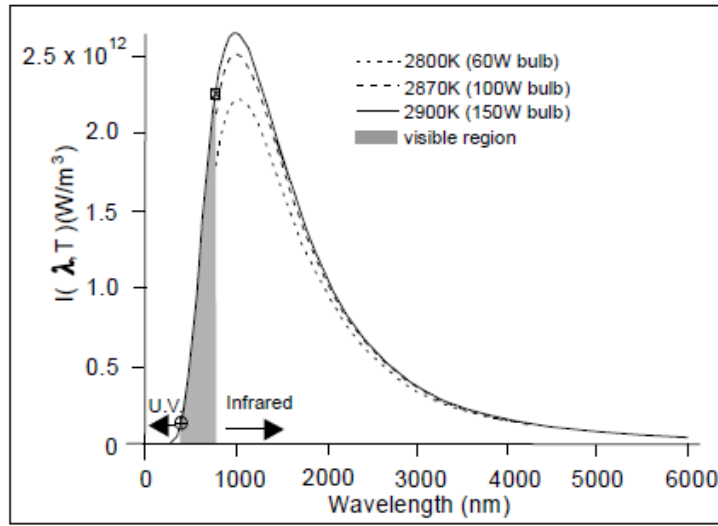


Bir akkor telli ampulün kesiti

Şekil 20. Akkor Lamba

2.13.5.3. Akkor Lamba

Aslında ampullerin çok basit bir ışık sistemi yapısı vardır. Hepimiz biliriz ki üzerinden elektrik akımı geçen bir metal direnç gösterir. Bu direnç karşısında ısınır. Bunu en yakın elektrik sobalarında ve elektrik ocaklarında görebilirsiniz. İşte ampulde bu prensibe göre çalışır. Ampulün içinde bulunan çok ince filaman dediğimiz (çoğunlukla tungsten metalinden yapılmış) bir tel bulunur. Bu telden geçen elektrik akımı sonucunda tel aşırı derecede ısınarak (yaklaşık 3000 °C) ışık yaymaya başlar.

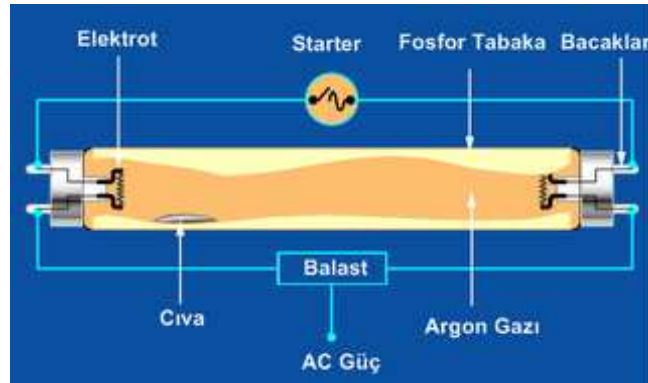


Şekil 21. Akkor lambanın dalga boyu

2.13.5.4. Floresan Lamba

Çeşitli renklerde ya da gündüz ışığına yakın renkte ışık veren ampuldür. Cam tüpün iki ucunda da madenlerden yapılmış birer elektrot vardır. Bu elektrotların bir ucu elektrik kaynağına, bir ucu da starter denen otomatik bir anahtara bağlıdır. Tüpün her iki ucunda bulunan elektrotlara elektrik verildiğinde elektrotlar arasında bir gerilim farkı oluşur. Oluşan

bu gerilim tüp içerisindeki cıvanın bir bölümünün sıvıdan gaz haline geçmesine neden olur. Verilen gerilimle, başlangıçta açık olan starter kapanır. Akım, bir elektrottan startere, starterden sonra da öteki elektrota geçerek devresini tamamlar. Ayrıca oluşan gerilim elektrotlardan birinden bir elektron koparıp büyük bir hızla tüp içerisinde diğer elektrota doğru hareket etmeye zorlar. Kopan ve yüksek hızla hareket eden elektronlar tüp içerisinde gaz halinde bulunan cıva atomlarıyla çarpışırlar. Çarpışma sonucu cıva atomları ışımaya yaparlar. Ancak oluşan ışımaya mor ötesidir ve insan gözü tarafından algılanamaz. Bu ışığın aydınlatma yapabilecek görünür bir ışığa dönüştürülmesi gerekir. Bu noktada, cam tüpün iç yüzeyine kaplanan fosfor tozu atomları devreye girer. Fosfor ışığa maruz kaldığında, kendisi de ışık veren bir maddedir. Cıva atomlarının yaptığı ışımaya fosfor yüzey tarafından emilir ve insan gözünün algılayabileceği görünür bir ışığa dönüştürür. Fosfor atomlarının yaydığı beyaz ışık fotonlarının dalga boyu elektromanyetik yelpazenin görünür bölgesine denk geldiğinden, floresan lambalar da beyaz ışık yayar.



Şekil 22.Floresan Lamba

2.13.5.5.Kompakt Floresan Lamba (Tasarruflu Lamba)

Kompakt floresan ampüller yukarıda bahsedilen floresan ampüllerin bütün özelliklerini taşırlar. Ancak şekil ve kullanım yerleri bakımından floresan ampüllerden ayrılırlar. Bu lambalar akkor flamanlı ampüllerin kullanıldıkları her yerde kullanılabilir şekilde

tasarlanmıştır. Elektrik bağlantısını sağlayan duyu yapısı akkor flamanlı ampüller gibidir. Floresan ampüllerin çalışması için gerekli olan starter ve balast işlevini ampül içerisine yerleştirilmiş elektronik devreler yapar. Bu lambalarda aynen floresan lambalarda olduğu gibi dimmer kullanarak ışık miktarı ayarlanamaz. Kompakt floresan ampüller elektrik tüketiminin %80'ini ışığa çevirirler. Böylece oldukça yüksek kabul edilecek bir verimliliğe sahip olur.



Şekil 23. Kompakt Floresan Lamba

2.13.5.6. Işık Üzerine Yapılan Çalışmalar

Dar-bant (312 nm) ultraviyole B ışığı (UVB) sedef tedavisinde yeni bir tedavi şekli olarak kullanılmaktadır fakat etki etki mekanizması bilinmemektedir. İn vitro olarak ciltten edilmiş T hücreleri 312 nm UVB maruz bırakıldığında apoptozisin arttığı görüldü(2).()

UV ışınlar ve görünür dalga boyundaki ışınlar farelerde yapılan deneylerde DNA hasarına neden olmuştur. Solar radyasyon iki farklı mekanizma ile DNA hasarı yapmışlardır. Birincisi direk etki ile pirimidin dimerleri oluşturmuş olup ikinci mekanizma ile serbest radikaller üzerinden DNA hasarı yapmışlardır. 300 nm ve üzeri serbest radikaller üzerinden DNA hasarı yapmıştır(66).

Görünür dalga boyundaki ışınlar memeli hücrelerinde indirek etkiyle oksidatif DNA hasarı yapmaktadır. Genotoksit etkiyle ve antioksidan etkiyi inhibe ederek etki etmektedir. DNA da meydana gelen değişiklikler ise karsinogenez için önemli bir risktir. UV B direk olarak DNA hasarı yapmaktadır(67).

UV ışık karmaşık bir şekilde cilt immün sistemini etkiler. UV radyasyon patojenik inflamatuvar yolla alerji ve otoimmüniteye yol açabilir. UV radyasyonu bir fototerapi olarak deri bağışıklık yanıtlarını bastırmak içinde kullanılabilir. UV ışınlar hücrelerin DNA sında bitişik pirimidinler oluşumuna neden olabilir. UV ışının indüklediği DNA hasarı ve malign transformasyonu önlemek için hücre apoptozise gidebilir. UV ışın keratinositlerden, derideki lökositlerden sitokin ve kemokin salgılatır(3)

UV ve görünür ışık pürin ve benzopürin üzerine fotogenetoksittir. Doza bağımlı olarak pürin ve benzopürinde comet assay tekniğiyle DNA hasarının arttığı görülmüştür(7).

Melanoma için güneş ışığına maruz kalma ana risk faktörüdür UVB doğrudan, DNA tarafından emilircyclobutane pirimidin dimerleri dahil dimerik pirimidin oluşturur.(5)

Apoptozis cilt gelişimi ve hemostazın yanısıra karsinogenezde önemli rol oynar. Apoptozis hızı epidermal hücre kalınlığında önemlidir. Apoptozis premalign hücreleri ve mutasyon hücrelerini ortadan kaldırır. Cilt kanserleri batı toplumunda en sık görülen kanserkindir. UV ışınlar maruz kalmak cilt kanseri için risk faktörüdür. UV B ışını P 53 geninde mutasyona neden olur. P 53 geninde mutasyon tüm insan kanserlerinin % 50 sinde cilt kanserlerinin ise çoğunda tespit edilmiştir. Premalign aktinik keratozis lezyonlarında yüksek sıklıkla P 53 mutasyonu bildirilmiştir.(68)

Squamous hücreli karsinom ve bazal hücreli karsinom sıklığı son yıllarda güneş maruziyeti ile birlikte dramatik bir şekilde artmıştır. UV ışınlar doğrudan veya reaktif oksijen ürünleri aracılığıyla DNA hasarı yapar. UV ışınları yol açtığı mutasyonlar cilt kanserlerine

onkogenlerin aktivasyonuna ve tümör süpresör genlerin inaktivasyonuna neden olur. UV ışınına yanıt olarak apoptotik sistem hücre öümüne neden olur. Mitojen aktivite, aktive protein kinaz (MAPKS, JNK ve P38) ve tümör baskılayıcı protein P 53 tarafından düzenlenir(69)

Solar radyasyon insan ve deri hayvan hücrelerinde akut ve kronik reaksiyona neden olur. Kronik maruz kalma tekrarlayan benign ve malign deri tümörlerine ilk başta da malign melanoma neden olur. Solar radyasyon türleri arasında UVB(290-320 nm) hayvan deneylerine göre UVA(320-400nm) dan daha mutajenik ve karsinojeniktir. Epidemiyolojik çalışmalar deri tümör gelişimi için gen mutasyonu ve immünsüpresyonda UV ışınların neden olduğunu göstermiştir. Bu çalışma UV ışınların direkt ya da dolaylı olarak DNA hasarı yaptığını göstermiştir.(70)

2.14. Hücre Kültürü

Hücre kültürleri, günümüzde sitogenetik, biyokimyasal ve moleküler biyolojik çalışmalarda, tanı veya araştırma amacıyla yoğun olarak kullanılmaktadır. Hücre kültürünün amacı, bir grup hücreyi yaşatmak, ileri çalışmalar için çoğaltmak, gerektiğinde kullanmak için dondurarak saklamaktır. Hücrelerin çoğaltılması, yapılabilecek deneylerin sayısını artırmayı, deney yapılan pasajdaki hücrelerin dondurulması, ileride deneyin aynı pasajdaki hücrelerle tekrarlanabilmesini sağlar. Her aşamada üzerinde dikkatle durulan, hücrelerin canlılığıdır. Hücre kültüründe başarı, steril çalışma ortamının oluşturulmasında yatmaktadır (71)

Bir hücre kültür laboratuvarında; steril çalışma kabini, CO₂ inkübatörü, CO₂ tankı, invert ışık mikroskobu, santrifüj, vakum hattı ya da pompası, malzemenin sterilize edilebileceği bir otoklav, hücrelerin saklanabilmesi için sıvı azot tankı temel cihazlardır. Otoklav ve sıvı azot

tankı haricindeki sayılan malzemeler, tercihen penceresiz, toza kapalı, lavabo gideri olmayan bir odada bulunmalıdır. (71).

2.14.1. Kaynaklarına göre kültürler

2.14.1.1. Primer kültürler

Hayvan ya da bitki hücreleri izole edildikten sonra kültüre edilirse primer kültür elde edilir. Bu anda hücre soyu "sonlu" (finite)'dur, yani pasajlamalar sonunda hücreler yaşlanırlar ve ölürlür. Bu nedenle, primer hücrelerle belirli bir sayıda pasajlama yapılabildiğinden; deneyleri bu dönemde yapmak ve bitirmek gereklidir. Primer hücrelerle çalışılabilecek pasaj sayısı hücre tipine göre değişmektedir. Primer hücreler pasajlamalar sonunda ölümsüz (immortalize) olabilirler; bu durumda, bir hücre soyu (cell line) elde edilmiş olur. Örnek olarak primer aortik, mikrovasküler ya da göbek kordonu endotel hücreleri, primer hepatositler, primer düz kas hücreleri verilebilir (71, 72).

2.14.1.2. Hücre soyları

Primer kültürlerden spontan mutasyonlar sonucunda kendiliğinden ya da kimyasal ajanlar ya da virüsler eklenerek oluşturulurlar. Tümör dokusundan alınan hücrelerden de elde edilirler. Primer kültürlerden farkları; kültürde yüksek yoğunluğa ulaşabilmeleri, büyüme faktörleri ve seruma daha az gereksinim göstermeleri, çoğalmak için bir zemine tutunma gereksinimlerinin az olması, sonsuz çoğalma yetenekleri olarak sıralanabilir. Örnek olarak 3T3 fibroblastlar, L929, CHO, HL60 verilebilir.

Bir dokudan mekanik ya da enzimatik yöntemlerle izole edilen primer hücreler için 4 farklı gelişme aşaması belirlenmiştir. Bunlar; hücrelerin dokunun dışındaki bu in vitro ortama

alışmaları, eksponansiyel çoğalma aşaması (yaklaşık 20.- 30. pasaja dek), hücrelerin giderek çoğalma hızının yavaşladığı durum, son olarak, hücrelerin yaşlandığı, çok zor bölündüğü ve ölmeye başladıkları aşamadır (71).

Deneyle eksponansiyel büyüme döneminde planlanmak, bu hücrelerin bir kısmı dondurularak, ilerdeki çalışmalar için saklanmalıdır.

Belirli sayıda pasajlanma sonrasında, primer hücreler ya ölür, ya da hücre soylarına dönüşürler. Bu dönüşüm, "in vitro transformasyon" olarak adlandırılır. Bu hücreler genellikle anöplodidiler, seruma az gereksinim, kontakt inhibisyonunda azalma, tutunmaya olan gereksinimin zayıflaması gibi özellikleri, tümör hücreleri ile paylaşırlar (71,72).

2.14.3. Besiyerleri

Besiyerleri, inorganik iyon bileşimleri bakımından, dengeli tuz çözeltileridir. 1950'li yıllarda yayınlanmış olan Earle's Balanced Salt Solution (EBSS), Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM), Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) ve bunların zenginleştirilmiş formları; EMEM'e Dulbecco modifikasyonu (DMEM), Ham's F12, DMEM ve F12'nin 1:1 karışımı olan DMEM/F12, RPM1 1640, M199 en sık kullanılan çözeltilerdir. Bunlara eklenen diğer moleküller, esansiyel aminoasitler, vitaminler (özellikle B vitaminleri), hormonlar (insulin, hidrokortizon) ve glikozdur.

Büyüme çözeltileri pek çok dayanıksız madde içerdiklerinden, + 4 °C'de muhafaza edilmeli, ancak hücrelere eklenmeden hemen önce 37 °C'lik su banyosunda 10 dakika kadar bekletilmelidir. Hücreler haftada iki kez büyüme çözeltileri değiştirilerek beslenmelidirler (71, 72).

2.14.4. Dondurularak saklama

Hücreler sıvı azot içinde -196 °C'de, bu düşük sıcaklığa dayanacak özel plastik tüpler ya da cam vialler içinde saklanır. Hücreler, büyüme çözeltileri % 10-20 serum ve % 5-10 gliserol ya da DMSO içeren bir çözelti içine alınarak dondurulurlar. Bu sırada konsantrasyonları, 1:10 sulandırılarak çözüldüklerinde normal ekilme konsantrasyonunun "örneğin 10^5 hücre/ml" 5 katı olacak biçimde ayarlanmalıdır.

3. MATERYAL ve METOD

3.1. MATERYAL

3.1.1. Kullanılan cihazlar

1. Soğutmalı santrifüj (Hettich)
2. Ultrasantrifüj (Beckman Coulter)
3. Floresan invert mikroskop (Olympus)
4. Işık mikroskobu (Olympus)
5. $\pm 4^\circ\text{C}$ Buzdolabı (Profilo)
6. -20°C derin dondurucu (Uğur)
7. -80°C derin dondurucu (Revco)
8. Manyetik karıştırıcı (Hangping, Variomag)
9. Vorteks (Nüve NM 110)
10. Pipet tabancası (Boeco)
11. Pipetler (0,5-2 pl, 0,5-100 pl, 50-200 pl, 200-1000 pl, 1-5 ml) (Gilson)
12. Otoklav (Nüve ot 032)

13. Hassas Terazi (Sartorius)
14. Deiyonize Su Cihazı (Easypure RF)
15. Distile Su Cihazı (Nüve)
16. Elektroforez düzeneđi (Biolab)
17. Hotplate (Thermolyne)
18. Vertex (Nüve)
19. Manyetik karıştırıcı
20. Benmori (Nüve)
21. pH metre (Hanna Instruments)
22. Thoma lamı (IsoLab)
23. Beyaz kompakt floresan lamba (Philips)
24. Sarı kompakt floresan lamba (Philips)
25. Floresan lamba (Philips)
26. Akkor lamba (Philips)
27. Lux meter

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

1. Normal erime noktasına sahip (NMP, 65 °C) agaroz jel (Sigma)
2. Düşük erime noktasına sahip (NMP, 37 °C) agaroz jel (Sigma)
3. Sodyum-EDTA (Carlo Erba)
4. Sodyum klorür (Merck)
5. Potasyum Klorür (KCl) (Merck)
6. Trizma base (Sigma)
7. Triton X-100 (Sigma)
8. Sodyum hidroksid (Merck)
9. Disodyum hidrojen fosfat (Merck)

10. Sodyum dihidrojen fosfat (Merck)
11. Etidyum bromit (Sigma)
12. Hidrojen peroksit (Merck)
13. Trizma HCl (Sigma)
14. Histopaque-1077 (Sigma)
15. Giemza boyası (Merck)
16. Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Carlo Erba) 17. DMEM (Sigma)

3.1.3. Hazırlanan Tampon

PBS (Fosfat) Tamponu: 10 mM KH₂PO₄ ve 10 mM K₂HPO₄ solüsyonları hazırlandıktan sonra bir beher içinde pH= 7,2 olacak şekilde birleştirildi. Hazırlanan tampon solüsyonuna 0,15 M NaCl eklendi.

3.2. Metot

3.2.1. Lökositlerin süspansiyonu

3.2.1.1. Mononükleer Lokositlerin İzolasyonu

Sağlıklı, gönüllü bir kişiden çalışmaların yapıldığı günlerde 10 ml heparinli kan örneği alındı. Boş steril bir tüp içine 2 ml histopaque-1077 solüsyonu eklendi. Bunun üzerine 2 ml taze heparinize kan yavaşça konuldu ve bu işlem 3 ayrı tüpe uygulandı. 2100 rpm'de 25°C'de

30 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üç ayrı tabaka meydana geldi. En alt tabaka lökositler dışında kalan eritrosit, trombosit ve diğer şekilli elemanlardan oluşuyorken, orta tabakada lökositlerin içinde olduğu histopaque solüsyonundan ve en üst tabakada ise plazma kısmından oluşuyordu. Santrifügasyon sonrası orta tabakada biriken mononükleer lökositler 2 ml'lik pipet yardımıyla boş bir tüpe alındı. Histopaque solüsyonunu uzaklaştırmak için lökosit içeren histopaque üzerine 1 ml, 1 M PBS (fosfat **tampon** solüsyonu) (pH=7.4) ile karıştırıldıktan sonra 1600 rpm'de 25°C'de 10 dakika santrifüj edildi. Üstteki süpernatant atıldı ve lökosit pelleti elde edildi.

3.2.1.2. Mononükleer Lökosit Süspansiyonunun Hazırlanışı

Elde edilen lökosit pelleti üzerine 10 ml DMEM besiyeri eklendikten sonra bir pipet yardımıyla lökositlerin besiyeri ortamına homojen dağılımı sağlandı. Elde edilen bu lökosit süspansiyonu ile hücre sayımı yapıldı.

3.2.1.3. Mononükleer Lökositlerin Sayımı

Thoma lamı üzerine uygun lamel konulduktan sonra bir damla belirli lökosit hücre süspansiyonu lamın yan kenarlarından Thoma lamı üzerine yaydırılarak hücre süspansiyonunun lam ve lamel arasına yayılması sağlandı. Bu işlem yapılırken lam ve lamel arasında kabarcık olmamasına özen gösterildi. Hemositometre üzerinde 25 mm²'ye düşen hücreler sayıldı. Aşağıdaki formülden toplam lökosit hücre sayısı belirlendi.

$$\text{Toplam Hücre Sayısı} = \frac{10^4 \times \text{ml} \times \text{lamdaki hücre sayısı} \times \text{dilüsyon katsayısı}}$$

(Sabit katsayı) (Hacim)

3.2.2. Yapay Aydınlatma Kaynaklarının Hazırlanması

Deneilerimizde kullanılan gerekli elektrik devresi ve malzemeleri ve lambalar Gaziantep ve Şanlıurfadaki elektrik malzemesi ve lamba satan dükkanlardan satın alındı.

Deneilerimizde Beyaz Kompakt floresan Lamba, Sarı kompakt floresan Lamba, akkor Lamba ve Fluoresan lamba olmak üzere 4 farklı lamba türü kullanılmıştır.

Deneilerde kullanılan Lambaların markaları aynıdır. Deneilerde kullanılan lambaların her biri 20 watt gücündedir.

Beyaz kompakt floresan lamba, Sarı kompakt floresan lamba, floresan lamba ve akkor lamba 4 farklı tahtaya aynı türden lambalar aynı tahta üzerinde olacak şekilde monte edilmiştir.

Beyaz kompakt floresan lamba, Sarı kompakt floresan lamba, akkor lamba 30×30 cm çapında daire şeklindeki tahtanın üzerine aralarında 72 derece olacak şekilde tahtanın kenarlarına 5 er adet lambalar monte edilmiştir.

Çubuk Fuoresan Lambalar ise 40×90 cm uzunluğunda dikdörtgen bir tahtanın üzerine aralarında 0,4 cm olacak şekilde yan yana monte edilmiştir.

Elde edilen lökosit süspansiyonu 10 ml DMEM besiyeri içerisinde Flasklara konmuştur. Flasklar 37 derecedeki Benmarinin içine konulup ışığa maruz bırakılmıştır. Hücreler 1 mt uzaktan dikey olarak farklı türdeki lambaların ışıklarına farklı şiddet ve sürelerde maruz bırakılmıştır. Deneiler yapılırken ortamda etkisi araştırılan yapay aydınlatma kaynaklarının dışında herhangi bir ışık ve ışık kaynağı bulunmamaktadır.

Her Lamba türü için 20w, 40w, 60w, 80w ve 100w olmak üzere 5 farklı şiddette ve 3 farklı sürede 1.2. ve 3. saatlerin sonlarında DNA hasarlarına bakılmıştır. Her çalışma üç defa tekrarlanmıştır.

3.2.3. Kontrol solüsyonlarının hazırlanması

Her deneyde bir pozitif ve bir de negatif kontrol çalışması yapıldı.

3.2.3.1. Pozitif kontrol solüsyonu

100 ml'lik balon joje içerisinde distile su ile %30'luk H₂O₂ (Merck) solüsyonundan 10 mmol H₂O₂ çözeltisi hazırlandı.

3.2.3.2. Negatif Kontrol

Deneyimizde negatif kontrol olarak, herhangi bir ekstrakta veya H₂O₂'e maruz kalmayan besiyerinde inkübe edilen bir hücre süspansiyonu kullanıldı.

3.2.3.3. Pozitif Kontrol Ortamının Hazırlanışı

Steril 25 ml'lik steril flaslara 10 ml DMEM besiyeri konulduktan sonra elde edilen mononükleer lokosit süspansiyonunda 1000 µl ve hazırlanan 10 mmolarlık H₂O₂ stok solusyonundan 50 µl ilave edilerek karıştırıldı. 10 dakika inkübasyondan hemen sonra flask içeriği santrifüj tüpüne aktarılarak 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra H₂O₂ içeren süpernatantlar döküldü.

3.2.4. Alkali Tek Hücre Elektroforezi (Comet Assay) yöntemi ile DNA Hasarının Ölçülmesi

3.2.4.1. Yöntemin prensibi

Mononükleer lökosit DNA hasarı, Sigh ve ark. (73), Alkali tek hücre elektroforezi (Comet Assay) yöntemi modifiye edilerek çalışıldı. Yöntemin prensibi, alkali pH'da farklı molekül ağırlıklarına ve farklı elektrik yüküne sahip DNA moleküllerinin elektriksel alanda farklı göç etmeleri esasına dayanmaktadır. Tek hücreler veya çekirdekçikler agarozta yerleştirilir ve lizisten sonra zarar görmemiş DNA'lar taşınma sırasında comet (kuyruk) oluşturmazlar. Oysa DNA zincirinde herhangi bir nedenle kırılmalar oluşmuşsa farklı moleküler ağırlıklara ve farklı elektrik yüklerine sahip olacaklarından, elektriksel alanda farklı hızlarda hareket ederek kuyruk şeklinde bir görüntü oluştururlar (37-40). Elektroforezden sonra DNA molekülleri, DNA spesifik floresan boyalar ile boyanıp floresan mikroskopla incelendiğinde boyanmış DNA'lar gözle veya kinetik okuma programları ile değerlendirilebilir.

3.2.4.2. Yönteminin Uygulanışı

3.2.4.2.1. Slaytların Hazırlanması

% 1,0 'lik normal melting point (NMP) agaroz jel hazırlanarak 80 µl kadar jel kenarları buzlanmış lam üzerine damlatıldı ve üzeri lamel ile kapatılarak buzdolabında (2-4 °C) 5 dakika bekletildikten sonra lamelleri kaldırıldı. Hazırlanan lamlar nemli kutularda bekletildi. PBS (Fosfat buffered saline) ile mm³ te 10⁴ hücre olacak şekilde dilüe edilmiş mononükleer hücrelerden 10 µl alınarak 80 µl %0,5'lik low melting point (LMP) agaroz jel (37°C) ile karıştırılarak birinci tabaka üzerine tabakalandırıldı ve tekrar lamel ile kapatılarak

buzdolabında donması için 5 dakika bekletildi. Üçüncü aşamada da aynı konsantrasyonda LMP agaroz jel hazırlanarak ikinci tabakanın üzerine ince bir tabaka halinde tabakalandırılarak slaytların hazırlanması tamamlandı (37-40).

3.2.4.2.2. Lizis aşaması

Hazırlanan slaytlar yaklaşık bir saat süre ile yüksek konsantrasyonda tuz ve deterjan içeren soğuk lizis solüsyonunda bekletildi. Lizis solüsyonunun içeriği 100 mM EDTA, 2,5 M Sodyum klorid, 10 mM trizma base ve %1 oranında triton X-100'den oluşmaktadır. Bu solüsyonun pH 'sı 10'a ayarlandı. Lizis tamponu ile hücre ve çekirdek zarı lizise uğratıldı (37-40).

3.2.4.2.3. Elektforez tamponu

Elektroforezde yürütülmeden önce DNA zincirlerinin ayrılması için slaytlar alkali elektroforez tamponunda 20-30 dakika inkübasyona bırakıldı. Alkali çözeltisi 1mM EDTA ve 300 mM sodyum hidroksit (pH <13) .

3.2.4.2.4. Elektroforezde yürütme

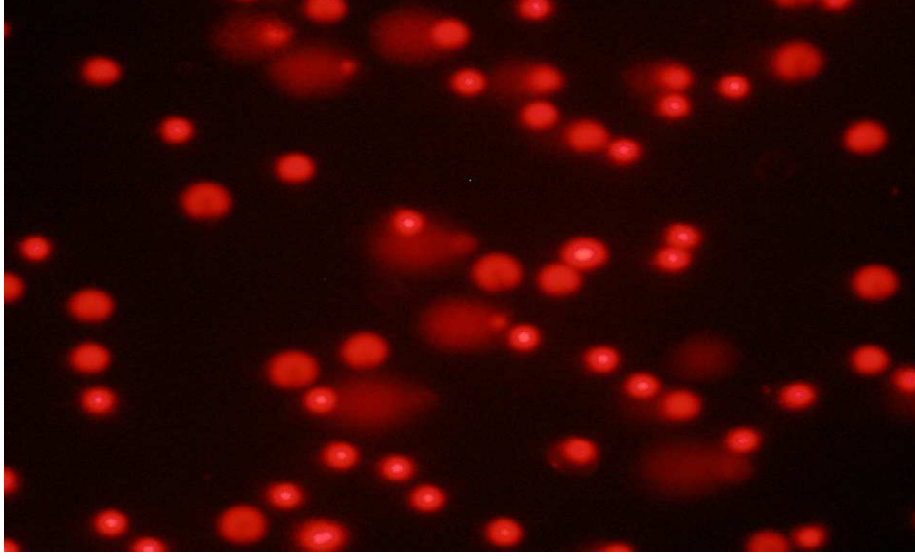
Alkali elektroforez tamponunda inkübasyon tamamlandıktan sonra DNA'lar bu tampon çözeltisi içerisinde 300 mA, 14 volt'luk elektriksel alanda ve 5–25 °C'de 30 dakika yürütüldü.

3.2.4.2.5. Nötralizasyon

Elektroforezde yürütme işlemi tamamlandıktan sonra alkali tampon çözeltisini ortamdaki uzaklaştırmak için slaytlar 3 dakika süre ile 3 kez nötralizasyon tamponu ile (0.4 M Tris-HCL, pH 7.5) yıkandı (37-40).

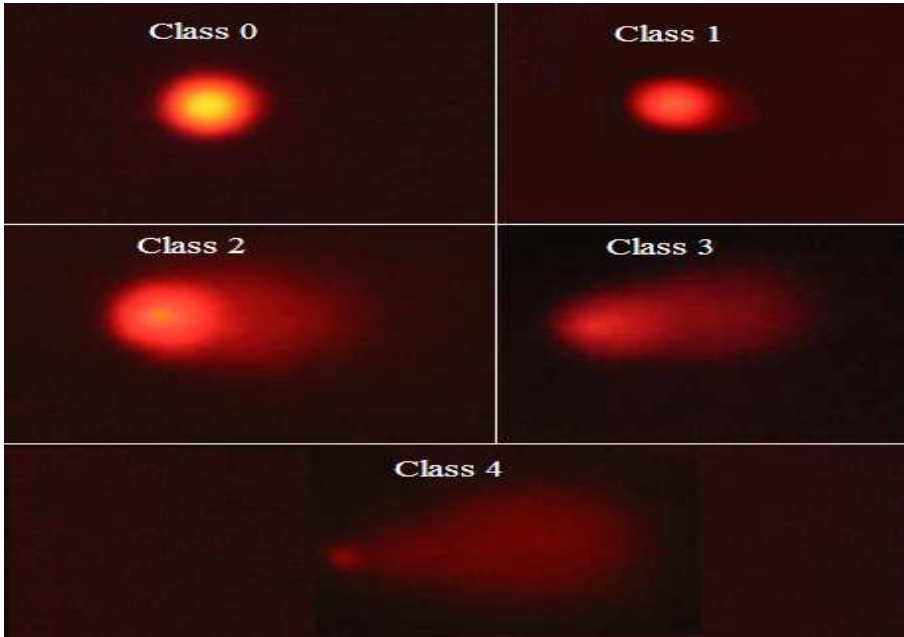
3.2.4.2.6. Boyama

Nötralizasyon tamamlandıktan sonra boyama yapılarak cometler sayılır veya jel oda sıcaklığında kurutulmuş slaytlar nemli ortamda en fazla bir hafta depolanabilir. Boyama işlemi için floresan boya olan etidyum bromit boyası (5 µg/ml) kullanıldı. Her bir slayt için 80 µL boya slayt üzerine damlatıldıktan sonra lamel ile üzeri kapatılarak 20 büyütme floresan mikroskop ile (Eksitasyon DB: 546 nm, Emisyon DB: 580 nm) 100 adet DNA görüntüsü değerlendirildi.



Şekil 24. Etidyum Bromid ile Boyanmış DNA ların floresan mikroskop görüntüsü

Bu yöntemde DNA hasarı Floresan Mikroskopta (Olympus) gözle değerlendirildi. DNA da oluşan hasarın derecesi kuyruk oluşumuna göre her bir okumada 100 hücre DNA'sı incelenerek beş kategoride sınıflandırıldı. Hiç hasar bulunmayan DNA'lar 0 maksimum hasar olan DNA lar 4 olarak değerlendirildi. Migrasyonun uzunluğu fragmentlerin miktarına, DNA zincir kırılmalarına ve alkali-labil bölgelerin seviyelerine bağlı olarak değişiklik göstermekte idi. Hasar birimi olarak "Arbitrary Unit" (AU) kullanıldı (37-40).



Şekil 25. Meydana gelen DNA hasarlarının fleuresan mikroskop altındaki görüntüleri

3.2.5. Total Antioksidan Seviye (TAS)

EREL tarafından geliştirilen tam otomatik bir yöntem olup, güçlü serbest radikallere karşı vücudun total antioksidan seviyesini ölçen bir metottur.

3.2.5.1. Total Antioksidan Seviye Ölçümünde Kullanılan Ayraçlar

Reaktif 1: 75 mM Clark tamponu (pH:1.8) içerisinde 10 mM o-dianisidine dihydrochloride ve 45 uM Amonyum ferröz sülfat çözülerek hazırlanır.

Reaktif 2: Clark tamponu (pH:1.8) içerisinde 7,5 mM Hidrojen peroksit (H₂O₂) çözdürülerek hazırlanır.

240 nm'de spektrofotometrik olarak End-Point ölçüm yapılır.

3.2.5.2. Prensip

Fe²⁺-o-dianisidine kompleksi hidrojen peroksit ile Fenton tipi reaksiyon oluşturarak OH radikalini oluşturur. Bu güçlü reaktif oksijen türü indirgen düşük pH'da renksiz o-dianisidine molekülü ile reaksiyona girerek sarı-kahverengi dianisidyl radikallerini oluştururlar. Dianisidyl radikalleri ileri oksidasyon reaksiyonlarına katılarak renk oluşumu artırmaktadır. Ancak örneklerdeki antioksidanlar bu oksidasyon reaksiyonlarını bastırarak

renk oluşumunu durdurmaktadırlar. Bu reaksiyon otomatik analizörde 240 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülerek sonuç verilmektedir. Kalibratör olarak E vitamininin suda çözünür bir analogu olan Trolox kullanılır. Sonuçlar mmol Trolox equivalent/L olarak ifade edilir (73).

3.2.6. Total Oksidan Seviye (TOS)

EREL tarafından geliştirilen tam otomatik kolorimetrik bir yöntemdir.

3.2.6.1. Total Oksidan Seviye Ölçümünde Kullanılan Ayıraçlar

Reaktif 1: 140 mM NaCl çözeltisi içerisinde 25 mM H₂SO₄ çözülerek ana solüsyon hazırlanır. Ana solüsyonda önce % 10 oranında glycerol çözülüp daha sonra 250 uM ksilenol orange çözülerek hazırlanır.

Reaktif 2: Ana solüsyon içerisinde önce 10 mM o-dianisidine dihydrochloride çözündürülüp sonra 5 mM Amonyum ferröz sülfat çözülerek hazırlanır. 560 nm'de spektrofotometrik olarak End-Point ölçüm yapılır.

3.2.6.2. Prensiip

Örnekte bulunan oksidanlar ferröz iyon-o-dianisidine kompleksini ferrik iyona oksitlerler. Ortamda bulunan gliserol bu reaksiyonu hızlandırarak yaklaşık üç katına çıkarmaktadır. Ferrik iyonlar asidik ortamda ksilenol orange ile renkli bir kompleks oluştururlar. Örnekte bulunan oksidanların miktarıyla ilişkili olan rengin şiddeti

spektrofotometrik olarak ölçülmektedir. Standart olarak H₂O₂ kullanılır. Sonuçlar µmol H₂O₂ equivalent/L olarak ifade edilir.

3.2.7. Yapılan istatistiksel analizler

İstatistiksel analizler SPSS Versiyon (SPSS Inc. Chicago USA) bilgisayar programı kullanılarak yapıldı. Tekrarlı varyans analizi ve çoklu karşılaştırmalar için Bonferroni testi kullanıldı. Sonuçlar ortalama± standart deviasyon olarak belirtildi e p<0.05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Mononükleer Lökosit Sayım Bulguları

Araştırmamızda sağlıklı bireyden alınan venöz kan separe edilmek üzere heparinli tüp içerisine alındı. Heparinize edilmiş kandan histopaque-1077 yardımıyla mononükleer lökositler separe edilerek 20 ml'lik kültür ortamına alındı.

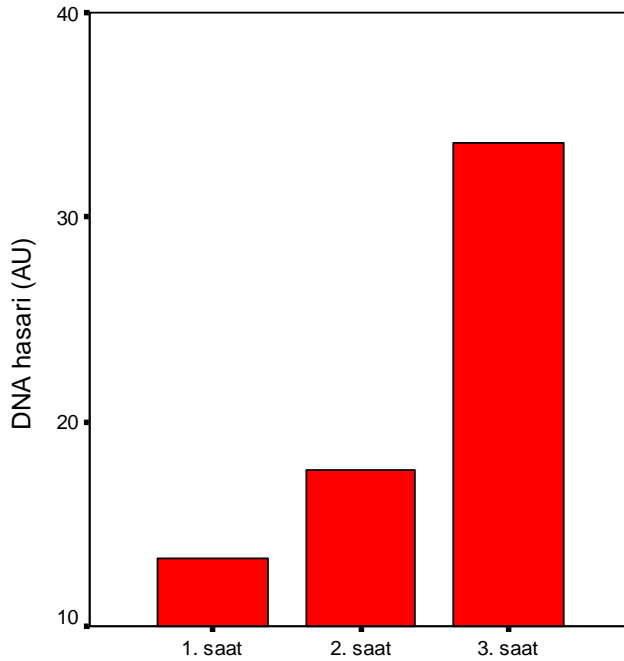
4.2. Mononükleer Lökosit DNA Hasarı bulguları

İn Vitro koşullarda farklı güç ve cinsteki aydınlatma kaynaklarının mononükleer hücre DNA hasarı üzerine etkisini araştırmayı amaçladık.

Yapılan bütün deneylerde yapay ışık kaynaklarının DNA hasarı yaptığını gördük. Işığın şiddeti ve maruz kaldığı süre arttıkça DNA hasarının arttığı bulunmuştur. Yapılan bütün deneylerde en fazla hasar 3. saatlerin sonlarında bulunmuştur. Ayrıca en fazla hasar 100 watt la yapılan deneylerde görülmüştür. Yapılan her çalışma üç defa tekrarlanmıştır.

Lamba türleri karşılaştırıldığında hücrelere aynı süre ve aynı şiddet de ışık uygulandığında en fazla DNA hasarını Beyaz kompakt floresan lamba(BKFL) ve Sarı kompakt floresan lambanın(SKFL) sonra Floresan Lambanın(FL) yaptığını en az hasarı ise Sarı akkor Lambanın(SAL) yaptığı görülmüştür.

Bütün deneylerde DNA hasarının pozitif kontrolün altında bulunmuştur. Deneylerde en fazla DNA hasarını floresan ampullerin yaptığı bulunmuştur. Yapay ışık kaynaklarının içinde en az DNA hasarını ise akkor lambanın yaptığı görülmüştür.



Şekil 26. 100 w lık BKFL ile yapılan çalışmada DNA hasarı(AU)

Beyaz kompakt floresan Lamba(BKFL) ile yapılan deneylerde en fazla DNA hasarı 100 watt la yapılan deneyin 3. Saatinde bulundu. En az DNA hasarı ise 20 watt la yapılan deneyin 1. Saatin de bulundu. Süre arttıkça bütün deneylerde DNA hasarının arttığı görülmüştür. 3.

Saatteki DNA hasarı 2. Saatteki DNA hasarından 2. Saateki DNA hasarı ise 1. Saate ki DNA hasarında daha fazla bulunmuştur.

	1. Saat	2. Saat	3.Saat	Pozitif kontrol	Negatif kontrol	p
20 Watt*	0±0	2,66±0,57 ^a	9,33±0,57 ^{b,c}	80,33±0,57	0±0	<0,05
40 Watt*	0,33±0,57	5±0 ^a	10,66±1 ^{b,c}	77,33±0,57	0±0	<0,05
60 Watt*	1,66±1,52	7,66±0,57 ⁷³	15,33±0,57 ^{b,c}	77,33±1,15	0±0	<0,05
80 Watt*	6,33±1,15	10±1 ^a	21±2 ^{b,c}	81,67±1,52	0±0	<0,05
100 Watt*	13,33±1,52	17,66±0,57	33,66±3,51 ^{b,c}	80,33±2,51	0±0	<0,05

a 1. saat ile 2. saat arasında, b 1.saat ile 3. saat arasında, c ise 2 saat ile 3. saat arasında anlamlı fark olduğunu göstermektedir.

Tablo 1. BKFL ile yapılan çalışmalarda süre arttıkça görülen DNA hasarı (AU)

Işık şiddeti fazla olan deneylerde DNA hasarı daha fazla bulunmuştur. En fazla DNA hasarı 100. Watt la yapılan deneyde bulunmuştur. DNA hasarı ışık güçlerine göre büyükten küçüğe doğru 100w,> 80w,> 60w,> 40w > 20w dır.

	20 watt	40 watt	60 watt	80 watt	100 watt	p
1. saat*	0±0	0,33±0,57	1,66±1,52	6,33±1,15	13,33±1,52	<0,05
2. saat*	2,66±0,57	5±0	7,66±0,57	10±1	17,66±0,57	<0,05
3. saat*	9,33±0,57	10,66±1	15,33±0,57	21±2	33,66±3,51	<0,05

Tablo 2.BKFL ile yapılan çalışmalarda ışık şiddeti arttıkça görülen DNA hasarı (AU)

BKFL ile yaptığımız çalışmalarda süre ilerledikçe besiyerinde alınan numunelerle yapılan TAS ölçümü sonucunda anlamlı olarak azaldığı tespit edilmiştir. Sadece 100w ile yapılan deneyde anlamlı bir fark olduğu gözlenememiştir.

Not: (*) Ortalama ± standart sapma, n=3

	1. Saat	2. Saat	3.Saat	P
20 Watt*	0,10±0,05	0,09±0,01	0,06±0,005	<0,05
40 Watt*	0,09±0,05	0,06±0	0,05±0,005	<0,05
60 Watt*	0,11±0,01	0,08±0,005	0,07±0	<0,05
80 Watt*	0,08±0,005	0,09±0	0,07±0,005	<0,05
100 Watt*	0,08±0,005	0,08±0,005	0,07±0,01	>0,05

a 1. saat ile 2. saat arasında, b 1.saat ile 3. saat arasında, c ise 2 saat ile 3. saat arasında anlamlı fark olduğunu göstermektedir.

Tablo 3.BKFL ile yapılan çalışmalarda TAS sonuçları

BKFL ile yaptığımız çalışmalarda 20 ve 40, w lık lambalarla yapılan çalışmalarda süre ilerledikçe TOS anlamlı olarak arttığı tespit edilmiştir. 60, 80 ve ve 100w ile yapılan deneyde anlamlı bir fark gözlenememiştir.(20 ve 40 w lık lambalar için $p<0.05$)

	1. Saat	2. Saat	3.Saat	p
20 Watt*	0,99±0	1,08±0 ^a	1,04±0,02	<0,05
40 Watt*	0,96±0,41	1,28±0,04	0,96±0,01 ^c	<0,05
60 Watt*	0,92±0,02	0,94±0,03	0,92±0,03	>0,05
80 Watt*	0,94±0,02	0,91±0,02	0,98±0,02	>0,05
100 Watt*	0,97±0,02	1,13±0,03	0,91±0,02	>0,05

a 1. saat ile 2. saat arasında, b 1.saat ile 3. saat arasında, c ise 2 saat ile 3. saat arasında anlamlı fark olduğunu göstermektedir

Tablo 4. BKFL ile yapılan çalışmalarda TOS sonuçları

BKFL ile yaptığımız bütün çalışmalarda süre ilerledikçe besiyerinde alınan numunelerle yapılan ölçümler sonucu hesaplanan OSİ sonucunda anlamlı olarak arttığı tespit edilmiştir.($P<0.05$)

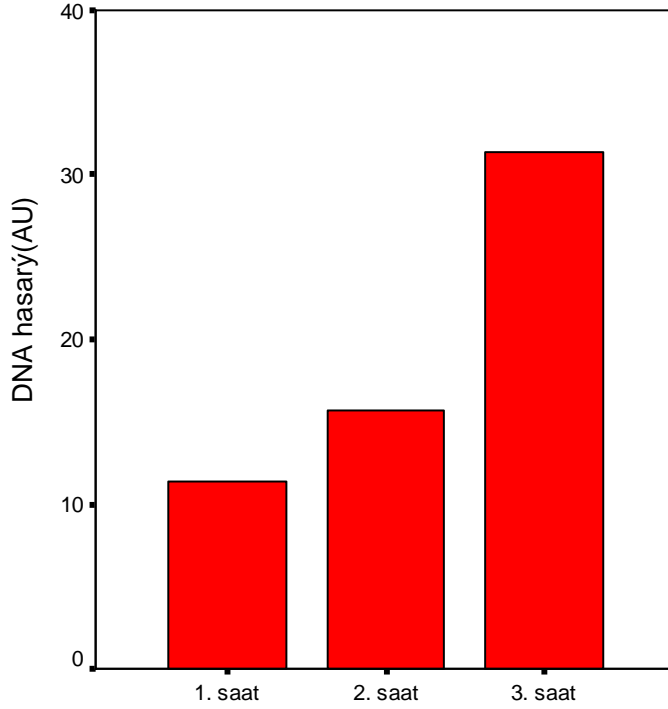
	1. Saat	2. Saat	3.Saat	P
20 Watt*	0,93±0,05	1,04±0,25	1,62±0,02	<0,05
40 Watt*	1,15±0,05	2,22±0,01	2,04±0,04	<0,05
60 Watt*	0,80±0,04	1,11±0,01	1,29±0	<0,05
80 Watt*	1,17±0,02	1,04±0,20	1,48±0,04	<0,05
100 Watt*	1,08±0,02	1,38±0,01	1,36±0,03	<0,05

a 1. saat ile 2. saat arasında, b 1.saat ile 3. saat arasında, c ise 2 saat ile 3. saat arasında anlamlı fark olduğunu göstermektedir

Tablo 5. BKFL ile yapılan çalışmalarda OSİ sonuçları

Not: (*) Ortalama ± standart sapma, n=3

Sarı kompakt floresan Lamba(SKFL) ile yapılan bütün deneylerde DNA hasarı yaptığı görülmüştür. Bütün deneylerde DNA hasarı pozitif kontrolün altında idi negatif kontrolün ise üstünde idi.



Şekil 27. 100 w lık SKFL ile yapılan çalışmalarda DNA hasarı

Deneylerde en fazla DNA hasarı 100 watt la yapılan deneyin 3. Saatinde bulundu. En az DNA hasarı ise 20 watt la yapılan deneyin 1. Saatin de bulundu. Süre arttıkça bütün deneylerde DNA hasarının arttığı görülmüştür. 3. Saatteki DNA hasarı 2. Saatteki DNA hasarından 2. Saatteki DNA hasarı ise 1. Saate ki DNA hasarında daha fazla bulunmuştur.

	1. Saat	2. Saat	3.Saat	Pozitif kontrol	Negatif kontrol	p
20 Watt*	0±0	2,33±1,15	7,66±1,15 ^b	83±3	0±0	<0,05
40 Watt*	0,66±1,15	3,66±0,57	9,33±0,57 ^{b,c}	82±1	0±0	<0,05
60 Watt*	2,33±0,57	7±0 ^a	15,33±0,57 ^{b,c}	74,3±2,51	0±0	<0,05
80 Watt*	6±1	9,66±0,57	22,33±0,57 ^{b,c}	81,3±1,52	0±0	<0,05
100 Watt*	11,33±0,57	15,66±0,57 ^a	31,33±2,08 ^{b,c}	79,67±1,53	0±0	<0,05

Tablo 6. SKFL ile yapılan çalışmalarda süre arttıkça görülen DNA hasarı (AU)

Not: (*) Ortalama ± standart sapma, n=3

Işık şiddeti fazla olan deneylerde DNA hasarı daha fazla bulunmuştur. En fazla DNA hasarı 100. Watt la yapılan deneyde bulunmuştur. DNA hasarı ışık güçlerine göre büyükten küçüğe doğru 100w,> 80w,> 60w,> 40w > 20w dır. (p<0.05)

	20 watt	40 watt	60 watt	80 watt	100 watt	p
1. saat*	0±0	0,66±1,15	2,33±0,57	6±1	11,33±0,57	<0,05
2. saat*	2,33±1,15	3,66±0,57	7±0	9,66±0,57	15,66±0,57	<0,05
3. saat*	7,66±1,15	9,33±0,57	15,33±0,57	22,33±0,57	31,33±2,08	<0,05

Tablo 7.SKFL ile yapılan çalışmalarda ışık şiddeti arttıkça görülen DNA hasarı (AU)

SKFL ile yaptığımız bütün çalışmalarda süre ilerledikçe besiyerinde alınan numunelerle yapılan TAS ölçümü sonucunda anlamlı olarak azaldığı tespit edilmiştir.(P<0.05)

	1. Saat	2. Saat	3.Saat	p
20 Watt*	0,08±0,0057	0,08±0,0577	0,07±0,0057	<0,05
40 Watt*	0,11±0,0057	0,09±0,0057	0,06±0,0057 ^b	<0,05
60 Watt*	0,16±0,0057	0,10±0,0057 ^a	0,05±0,0057 ^{b,c}	<0,05
80 Watt*	0,12±0,0057	0,15±0,0057	0,09±0,0057 ^{b,c}	<0,05
100 Watt*	0,20±0,0057	0,11±0,0057 ^a	0,11±0,0057	<0,05

a 1. saat ile 2. saat arasında, b 1.saat ile 3. saat arasında, c ise 2 saat ile 3. saat arasında anlamlı fark olduğunu göstermektedir

Tablo 8.SKFL ile yapılan çalışmalarda TAS sonuçları

SKFL ile yaptığımız çalışmalarda 80 w ve 100 w ile yapılan çalışmalarda süre ilerledikçe besiyerinde alınan numunelerle yapılan TOS ölçümü sonucunda anlamlı birdeğişiklik tespit edilmemiştir.

Not: (*) Ortalama ± standart sapma, n=3

	1. Saat	2. Saat	3.Saat	p
20 Watt*	1,03±0,01	0,97±0,01	0,96±0,05	>0,05
40 Watt*	1,08±0,12	1,03±0,07	1,11±0,08	>0,05
60 Watt*	1±0,05	1,03±0,04	1,20±0,17	>0,05
80 Watt*	1,32±0,10	1,17±0,06 ^a	1,11±0,10	>0,05
100 Watt*	1,17±0,01	1,40±0,10	1,20±0,16 ^b	>0,05

a 1. saat ile 2. saat arasında, b 1.saat ile 3. saat arasında, c ise 2 saat ile 3. saat arasında anlamlı fark olduğunu göstermektedir

Tablo 9.SKFL ile yapılan çalışmalarda TOS sonuçları

SKFL ile yaptığımız bütün çalışmalarda süre ilerledikçe besiyerinde alınan numunelerle yapılan ölçümler sonucu hesaplanan OSİ sonucunda anlamlı olarak arttığı tespit edilmiştir.(p<0.05)

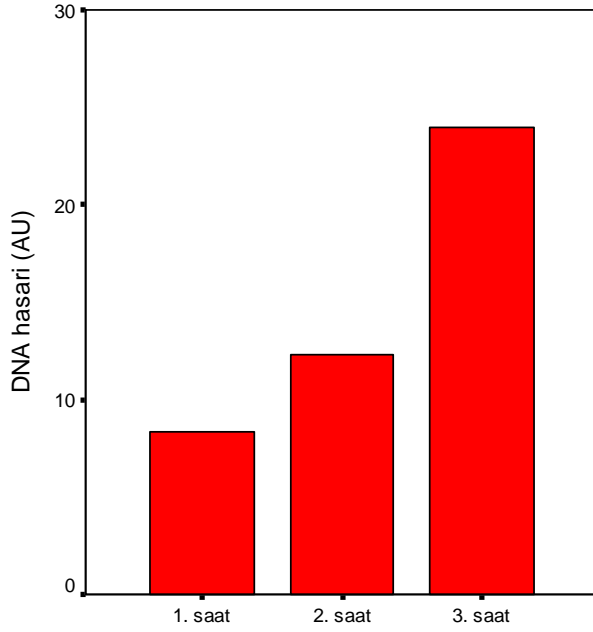
	1. Saat	2. Saat	3.Saat	P
20 Watt*	1,06±0,05	1,21±0,01	1,34±0,04	<0,05
40 Watt*	0,95±0,05	1,10±0,01	1,70±0,05	<0,05
60 Watt*	0,64±0,03	0,95±0,05	1,74±0,04	<0,05
80 Watt*	0,93±0,03	1,01±0,02	1,10±0,05	<0,05
100 Watt*	0,60±0,01	1,29±0,04	1,17±0,07	<0,05

a 1. saat ile 2. saat arasında, b 1.saat ile 3. saat arasında, c ise 2 saat ile 3. saat arasında anlamlı fark olduğunu göstermektedir

Tablo 10. SKFL ile yapılan çalışmalarda OSİ sonuçları

Fluoresan Lamba(FL) ile yapılan bütün deneylerde DNA hasarı yaptığı görülmüştür. Bütün deneylerde DNA hasarı pozitif kontrolün altında idi negatif kontrolün ise üstünde idi.

Not: (*) Ortalama ± standart sapma, n=3



Şekil 28. 100 w lık FL ile yapılan çalışmalarda DNA hasarı(AU)

Deneylerde en fazla DNA hasarı 100 watt la yapılan deneyin 3. Saatinde bulundu. En az DNA hasarı ise 20 watt la yapılan deneylerin 1. Saatin de bulundu. Süre arttıkça bütün deneylerde DNA hasarının arttığı görülmüştür. 3. Saatteki DNA hasarı 2. Saatteki DNA hasarından 2. Saatteki DNA hasarı ise 1. Saate ki DNA hasarında daha fazla bulunmuştur.

	1. Saat	2. Saat	3.Saat	Pozitif kontrol	Negatif kontrol	p
20 Watt*	0±0	2,33±1,15 ^a	7±0 ^{b,c}	83±1	0±0	<0,05
40 Watt*	0,33±0,57	3±0 ^a	7,66±1,15 ^{b,c}	76,7±1,53	0±0	<0,05
60 Watt*	1,33±0,57	5,66±0,57	10±1 ^{b,c}	81±2	0±0	<0,05
80 Watt*	5,66±0,57	7±0 ^a	15±2,64 ^{b,c}	82,67±1,53	0±0	<0,05
100 Watt*	8,33±0,57	12,33±0,57	25,66±1,15 ^{b,c}	81,3±0,58	0±0	<0,05

a 1. saat ile 2. saat arasında, b 1.saat ile 3. saat arasında, c ise 2 saat ile 3. saat arasında anlamlı fark olduğunu göstermektedir.

Tablo 11.FL ile yapılan çalışmalarda süre arttıkça görülen DNA hasarı(AU)

Işık şiddeti fazla olan deneylerde DNA hasarı daha fazla bulunmuştur. En fazla DNA hasarı 100. Watt la yapılan deneyde bulunmuştur. DNA hasarı ışık güçlerine göre büyükten küçüğe doğru 100w,> 80w,> 60w,> 40w > 20w dır.(P<0.05)

Not: (*) Ortalama ± standart sapma, n=3

	20 watt	40 watt	60 watt	80 watt	100 watt	p
1. saat*	0±0	0,33±0,57	1,33±0,57	5,66±0,57	8,33±0,57	<0,05
2. saat*	2,33±1,15	3±0	5,66±0,57	7±0	12,33±0,57	<0,05
3. saat*	7±0	7,66±1,15	10±1	15±2,64	25,66±1,15	<0,05

Tablo 12.FL ile yapılan çalışmalarda ışık şiddeti arttıkça görülen DNA hasarı (AU)

FL ile yaptığımız çalışmalarda süre ilerledikçe besiyerinden alınan numunelerle yapılan TAS ölçümü sonucunda anlamlı olarak azaldığı tespit edilmiştir.(P<0.05)

	1. Saat	2. Saat	3.Saat	p
20 Watt*	0,10±0,01	0,08±0,0057	0,07±0,0057	<0,05
40 Watt*	0,11±0,0057	0,09±0,0057	0,06±0,0057	<0,05
60 Watt*	0,16±0,0057	0,11±0,0057	0,06±0,0057	<0,05
80 Watt*	0,15±0,0115	0,11±0,0057	0,08±0,0057	<0,05
100 Watt*	0,13±0,0752	0,11±0,0057	0,11±0,0	<0,05

a 1. saat ile 2. saat arasında, b 1.saat ile 3. saat arasında, c ise 2 saat ile 3. saat arasında anlamlı fark olduğunu göstermektedir.

Tablo 13.FL ile yapılan çalışmalarda TAS sonuçları

FL ile yaptığımız çalışmalarda 20 w ve 40 w için süre ilerledikçe besiyerinde alınan numunelerle yapılan TOS ölçümü sonucunda anlamlı olarak arttığı tespit edilmiştir. (p<0.05)

	1. Saat	2. Saat	3.Saat	p
20 Watt*	1±0	0,94±0,41 ^a	1,02±0,20	<0,05
40 Watt*	0,93±0,02	0,94±0,04	1,04±0 ^c	<0,05
60 Watt*	1,03±0,02	1,04±0,05	1,07±0,10	>0,05
80 Watt*	0,95±0,05	1,22±0,02	1,39±0,04	>0,05
100 Watt*	1,06±0,13	1,42±0,06	1,34±0,01	>0,05

a 1. saat ile 2. saat arasında, b 1.saat ile 3. saat arasında, c ise 2 saat ile 3. saat arasında anlamlı fark olduğunu göstermektedir.

Tablo 14. FL ile yapılan çalışmalarda TOS sonuçları

FL ile yaptığımız bütün çalışmalarda süre ilerledikçe besiyerinde alınan numunelerle yapılan ölçümler sonucu hesaplanan OSİ sonucunda anlamlı olarak arttığı tespit edilmiştir.(p<0.05)

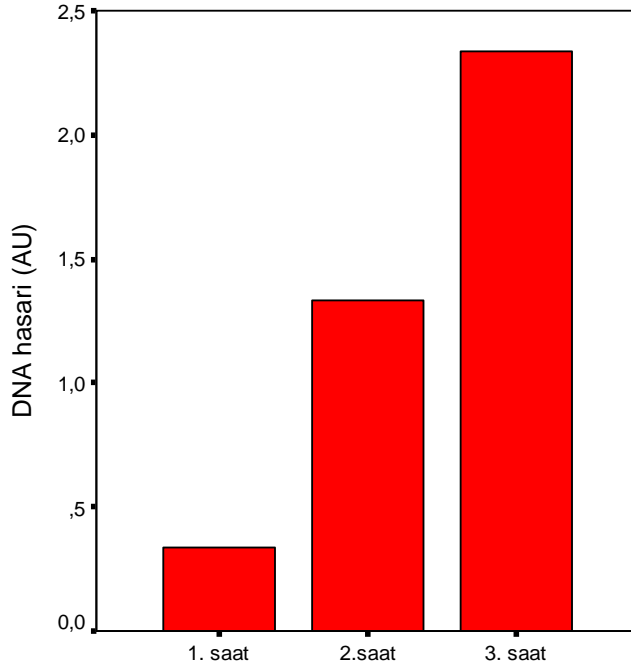
Not: (*) Ortalama ± standart sapma, n=3

	1. Saat	2. Saat	3.Saat	P
20 Watt*	1,07±0,06	1,26±0,12	1,32±0,07	<0,05
40 Watt*	0,93±0,03	1,15±0,04	1,64±0,06	<0,05
60 Watt*	0,63±0,02	0,95±0,05	1,69±0,08	<0,05
80 Watt*	0,95±0,03	1,06±0,05	1,15±0,04	<0,05
100 Watt*	0,96±0,03	1,34±0,05	1,24±0,06	<0,05

a 1. saat ile 2. saat arasında, b 1.saat ile 3. saat arasında, c ise 2 saat ile 3. saat arasında anlamlı fark olduğunu göstermektedir.

Tablo 15.FL ile yapılan çalışmalarda OSİ sonuçları

Sarı akkor Lamba(SAL) ile yapılan deneylerde DNA hasarı yaptığı görülmüştür. Bütün deneylerde DNA hasarı pozitif kontrolün altında idi.



Şekil 29. 100 w lık AL ile yapılan çalışmalarda DNA hasarı(AU)

Deneylerde en fazla DNA hasarı 100 watt la yapılan deneyin 3. Saatinde bulundu. Süre arttıkça bütün deneylerde DNA hasarının arttığı görülmüştür. 3. Saatteki DNA hasarı 2. Saatteki DNA hasarından 2. Saatteki DNA hasarı ise 1. Saate ki DNA hasarında daha fazla bulunmuştur.

Not: (*) Ortalama ± standart sapma, n=3

	1. Saat	2. Saat	3.Saat	Pozitif kontrol	Negatif kontrol	p
20 Watt*	0±0	0±0	1±1	81,67±1,53	0±0	>0,05
40 Watt*	0±0	0±0	0±0	78±1	0±0	>0,05
60 Watt*	0±0	0±0	0±0	81,67±1,15	0±0	>0,05
80 Watt*	0±0	0,33±0,57	0,66±1,15	79,67±1,53	0±0	>0,05
100 Watt*	0±0	1,33±0,57	2,33±1,15	78,3±2,3	0±0	<0,05

a 1. saat ile 2. saat arasında, b 1.saat ile 3. saat arasında, c ise 2 saat ile 3. saat arasında anlamlı fark olduğunu göstermektedir.

Tablo 16. AL ile yapılan çalışmalarda DNA hasarı sonuçları(AU)

Işık şiddeti fazla olan deneylerde DNA hasarı daha fazla bulunmuştur. En fazla DNA hasarı 100. Watt la yapılan deneyde bulunmuştur. DNA hasarı ışık güçlerine göre büyükten küçüğe doğru 100w,> 80w,> 60w,= 40w = 20w dır.(Sadece 100 w için p<0,05)

	20 watt	40 watt	60 watt	80 watt	100 watt	p
1. saat*	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	>0,05
2. saat*	0±0	0±0	0±0	0,33±0,57	1,33±0,57	>0,05
3. saat*	1±1	0±0	0±0	0,66±1,15	2,33±1,15	>0,05

Tablo 17. AL ile yapılan çalışmalarda ışık şiddeti arttıkça görülen DNA hasarı (AU)

AL ile yaptığımız bütün çalışmalarda besiyerinde alınan numunelerle yapılan TAS ölçümü sonucunda anlamlı olarak azaldığı tespit edilmiştir.(P<0.05)

	1. Saat	2. Saat	3.Saat	p
20 Watt*	0,15±0,0057	0,11±0,0057 ^a	0,08±0,0057 ^b	<0,05
40 Watt*	0,17±0,0057	0,13±0,0419	0,10±0,0057 ^{b,c}	<0,05
60 Watt*	0,12±0,0057	0,08±0,0057	0,06±0,0057	<0,05
80 Watt*	0,09±0,0057	0,08±0,0100 ^a	0,06±0,0057	<0,05
100 Watt*	0,11±0,0057	0,08±0,0057	0,09±0,0057 ^b	<0,05

a 1. saat ile 2. saat arasında, b 1.saat ile 3. saat arasında, c ise 2 saat ile 3. saat arasında anlamlı fark olduğunu göstermektedir.

Tablo 18. AL ile yapılan çalışmalarda TAS sonuçları

Not: (*) Ortalama ± standart sapma, n=3

AL ile yaptığımız çalışmalarda besiyerinden alınan numunelerle yapılan TOS ölçümü sonucunda anlamlı değişiklikler olduğu tespit edilememiştir.

	1. Saat	2. Saat	3.Saat	p
20 Watt*	1,27±0,01	1,16±0,02	0,97±0,01 ^{b,c}	>0,05
40 Watt*	1,36±0,03	1,24±0,07	1,11±0,01 ^{b,c}	>0,05
60 Watt*	1,01±0,01	0,97±0	0,94±0,01 ^b	>0,05
80 Watt*	0,91±0,02	0,95±0,04	0,95±0,02	>0,05
100 Watt*	1,06±0,11	0,93±0,04	0,91±0,02	>0,05

a 1. saat ile 2. saat arasında, b 1.saat ile 3. saat arasında, c ise 2 saat ile 3. saat arasında anlamlı fark olduğunu göstermektedir.

Tablo 19. AL ile yapılan çalışmalarda TOS sonuçları

FL ile yaptığımız bütün çalışmalarda süre ilerledikçe besiyerinde alınan numunelerle yapılan ölçümler sonucu hesaplanan OSİ sonucunda anlamlı olarak arttığı tespit edilmiştir.(p<0.05)

	1. Saat	2. Saat	3.Saat	P
20 Watt*	0,83±0,05	0,94±0,04	1,22±0,07c	<0,05
40 Watt*	0,73±0,04	1,18±0,67 ^a	1,02±0,02 ^{b,c}	<0,05
60 Watt*	0,77±0,03	1,21±0,25	1,34±0,05 ^b	<0,05
80 Watt*	0,88±0,02	1,07±0,02 ^a	1,36±0,03 ^{b,c}	<0,05
100 Watt*	1,15±0,15	1,01±0,01 ^a	1,00±0,08	>0,05

a 1. saat ile 2. saat arasında, b 1.saat ile 3. saat arasında, c ise 2 saat ile 3. saat arasında anlamlı fark olduğunu göstermektedir.

Tablo 20.AL ile yapılan çalışmalarda OSİ sonuçları

Lux meter ile 1m uzaktan yapılan ışık şiddetleri ölçümünde en fazla ışık şiddeti floresan lambalarda ölçüldü. Beyaz ve sarı kompakt lambanın ışık şiddetleri birbirine eşitti. En düşük ışık şiddeti akkor lambanın ışık şiddeti olarak tesbit edildi. Işıkların gücü ile ışık şiddetinin doğru orantılı olarak arttığı tesbit edildi.

Not: (*) Ortalama ± standart sapma, n=3

	BTL	STL	FL	AL
20 WATT	225	225	235	45
40 WATT	450	450	470	90
60 WATT	675	675	705	135
80 WATT	900	900	925	175
100 WATT	1125	1125	1160	215

Tablo 21.Luxmeter ile yapılan ölçümlerde ışık şiddetleri(Lüx)

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Çalışma, günlük hayatta herkesin sıkça kullandığı yapay aydınlatma kaynaklarının yaptığı DNA hasarı ile antioksidatif seviyeleri ve oksidatif stres arasındaki ilişkiyi araştıran ilk çalışmadır.Çalışmada elektrik enerjisi ile çalışan farklı türde yapay ışık kaynaklarının, farklı süre ve şiddetlerde mononükleer lokositler ile yapılan hücre kültür ortamında DNA hasarı ve oksidatif stres parametreleri araştırılmıştır. Bu amaçla dört farklı türde ve şiddetlerde yapay lambaların üç farklı süre (birinci, ikinci ve üçüncü saat) sonunda mononükleer lokosit DNA hasar seviyeleri ile TAS, TOS seviyeleri çalışıldı, OSI seviyeleri hesapla bulundu. Çalışmada, dört farklı türde ve beş farklı ışık şiddetinde (20w, 40w, 60w, 80w, ve 100w) lambalar kullanılmıştır Güçlü DNA hasar yapıcı özelliği nedeniyle pozitif kontrol olarak ta H_2O_2 ve negatif kontrol olarak da sadece DMEM besiyerinde inkübe edilen hücreler kullanılmıştır.

DNA hasar seviyesi genotoksik çalışmalarda sıklıkla kullanılan ve hassas bir yöntem olan alkalın tekli hücre elektroforez yöntemi (Comet Assay) ile, oksidatif durum EREL yöntemi olan TAK ve TOS ölçüm metodu ile tayin edilmiş, OSI seviyeleri hesapla bulunmuştur.In vitro ortamda flasklar içinde bulunan besiyerlerinde inkübe edilen mononükleer lokositler 1 metre uzaklıktan farklı şiddet süre ve türde yapay ışık kaynaklarından yayılan ışınlara maruz bırakılmıştır. Herbir ışık kaynağı ve süre için üçer adet numune konulmuştur. Deney yapılan ortamda ışık kaynağı dışında tamamen karanlık ve izole bir ortamdı. .

Günümüzde yapay aydınlatma kaynakları evlerde ve diğer yaşam alanlarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca belli dalga boylarındaki ışıklar cilt hastalıklarında, sarılık tedavisinde, sterilizasyon ve dezenfeksiyon işlemleri gibi sağlıkta ve endüstride sıklıkla kullanılmaktadır. .Bununla birlikte, son zamanlarda hayatımızla içi içe olduğumuz ışık kaynaklarının birçok faydalarının yanında, kanser oluşumuna kadar giden bir çok zararlı etkileri ile ilgili çalışmalar ve yayınlar artarak sürdürülmektedir. UV ışınların yanında son zamanlarda güneş ışınları ve bazı çeşit yapay ışık kaynaklarından elde edilen ışınların ve mutajen, kanserojen, immün sistemin fonksiyonlarını etkilediğine dair birçok çalışmalar

yapılmıştır. Günümüzde ev ve çevre aydınlatmasında, akkor, halojen, floresan v.s. gibi çok farklı özelliklere sahip yapay ışık kaynakları kullanılmaktadır ve son zamanlarda ekonomik olması az enerji harcaması ile birlikte fazla ışık yayması gibi nedenlerle kompakt floresan lambalar daha çok tercih edilmektedir. Ancak, bu tür lambalarla ilgili medyada ve görsel basında sıklıkla zararları ile ilgili yayınlara rastlanılmaktadır.

Biz çalışmamızı günlük hayatta sıklıkla kullanılan üç farklı türde lambanın (floresan, kompakt floresan ve akkor lamba) DNA hasarı ve oksidatif durum üzerine etkilerini araştırmak amacıyla gerçekleştirdik. *In vitro* çalışma için sağlıklı bir kişiden izole edilen mononükleer lökositleri kullanarak, lambaların hücre kültürü ortamında etkilerini araştırdık.

Yapılan deneysel çalışmada kullanılan ışık kaynaklarından akkor ışık kaynakları, ancak yüksek şiddetlerde ve sürelerde DNA hasarı oluştururken, kompakt floresan ve floresan lambaların daha düşük şiddette ve daha kısa sürelerde hasar oluşturduğu, DNA hasarı ile birlikte kültür medyumunda ölçülen oksidatif stresin de arttığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte, oluşan DNA hasarı ile oksidatif stres arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. DNA hasarını ölçmek için comet assay tekniğini kullandık. Comet assay tekniği son derece hassas ve güvenilir bir yöntem olmakla birlikte DNA hasarını araştırmakta en sık kullanılan tekniklerden biridir. Oksidatif durula ilgili ise TAS ve TOS parametreleri çalışılmış OSI parametresi ise hesaplamayla bulunmuştur. Bu parametreler hızlı ve güvenilir bir teknik olan EREL tekniğiyle çalışılmıştır.

Son zamanlarda yapay ışık kaynakları ve güneş ışığının oluşturduğu biyolojik zararlar ile ilgili yayınlar artmaya başlamıştır. Yapılan çalışmalarda genelde ışık kaynaklarının yaydığı ışınların dalga boylarına bağlı olarak çeşitli mekanizmalarla hasar oluşturduğu gösterilmiştir (66). Pflaum M ve ark (67), yaptıkları bir hücre kültürü çalışmasında memeli hücrelerinde görünür ışığın antioksidanları inhibe ederek oksidatif DNA hasarına neden olduğunu göstermişlerdir. Kielbassa C ve arkadaşları (66), yaptıkları hücre kültür çalışmasında, ultraviyole ve görünür ışın kaynaklarının dalga boyuna bağlı olarak farklı mekanizmalarla DNA hasarı oluşturduğunu tespit etmişlerdir. Yapılan çalışmada UV-B ve UV-C nin ihtiva ettiği 250-315 nm dalga boylarında direk etki ile primidin dimerleri oluşturarak, UV-A ve görünür alanın kapsadığı 320-740 nm dalga boylarında ise indirek etki ile endojen

fotosensitizasyonun reaksiyonu sonucu oluşan singlet oksijen, süperoksit ve hidroksil radikalleri aracılığı ile oksidatif DNA hasarı oluşturarak hücrelere zarar verdiğini bulmuşlardır. Botta C ve arkadaşları 320-800 nm deki UVA/görünür ışık ile 400-800 nm görünür ışığın poliaromatik hidrokarbonlar ve benzopireni fotoaktive ederek oksidatif reaksiyonları tetiklemesi sonucu genotoksisiteyi artırdığını bulmuşlardır.

Kompakt floresan ve floresan lambanın yaydığı ışınların dalga boyları 380 ila 700 nm arasındadır. Floresan lambalar görünür renkte ışınlar yayarlar. Ayrıca kompakt floresan lamba ve floresan lamba bir miktar UVA(320-400nm), UVB(280-320nm) ve UVC(200-280nm) dalga boylarındaki ışınları da yaymaktadır. Bilindiği gibi ultraviyole ışınlar iki farklı mekanizmayla DNA hasarı yapmaktadır. Direkt etkiyle UVB ve UVC DNA da pirimidin dimerleri oluşturarak DNA hasarı yapmaktadır. UVA ışınları ise dolaylı olarak DNA hasarı yapmaktadır. Hücredeki kromoforlar tarafından absorbe edilen ışınlar serbest radikaller üzerinden oksijen ve hidroksil radikal oluşumunu artırarak DNA hasarı yapar. Görünür renkteki ışınlarda Oksijen ve hidroksil radikali oluşturarak oksidatif DNA hasarı yaparlar. Akkor lambanın dalga boyu 390- 780 nm arasındadır fakat yaydığı ışık şiddeti floresan lambalara göre çok düşüktür ve UV dalga boyunda ışık yaydığı tespit edilememiştir. Bundan dolayı floresan lambalar DNA hasarına daha fazla sebebiyet vermektedir. UV ışınların yaptığı DNA hasarı üzerine birçok yayın bulunmaktadır.

Yukarıda bahsi geçen çalışmalar ışığında, çalışmada kullandığımız lambalardan akkor lambaların düşük seviyelerde DNA hasarı oluştururken floresan ve kompakt floresan lambalarda daha yüksek derecelerde DNA hasarı ve oksidatif stress tespit etmemizin nedeni, akkor lambaların sadece UVA ve görünür ışın yayması ve buna bağlı olarak sadece ışınların oluşturduğu indirek etki olan fotoreaksiyonla üretilen oksidatif radikaller üzerinden DNA hasarına neden olurken, floresan ve kompakt floresan lambaların görünür ışık yanında az miktarda direkt mekanizma ile T dimer oluşturarak DNA hasarı yapan UVB ve UVC ışınlarını da yaydığından daha fazla DNA hasarına neden olduğunu düşünmekteyiz.

Yaptığımız in-vitro hücre kültür çalışması ile, yaygın olarak kullandığımız ışık kaynaklarının çokta masum olmadıkları, yüksek şiddet ve sürelerde kullanımları durumunda ciddi DNA hasarları ve oksidatif strese eden olabilecekleri, dolayısı ile kullanacağımız

lambalardan daha az zarar görmek için lambanın şiddeti ve maruz kaldığımız süreyi olabildiğince kısıtlamanın yararlı olacağı, mümkünse az zarar görmek için akkor lambaların kullanılmasının daha iyi olacağı kanaatindeyiz. Çalışmamız in vitro hücre kültürü ortamında yapılan bir çalışmadır. In vivo çalışmalarla da desteklenmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Debeleç, B., Kantarcı, G.,2006. Mutation, DNA damage, repair mechanisms and the relation of cancer. 35 (2) 149 - 170
2. Ozawa M., Ferenczi K., Kikuchi T., Ultraviolet B Light (Narrow-Band UVB Induces Apoptosis of T Cells within Psoriatic Lesions.10021-6399
3. Maverakis E., Miyamura Y., Bowen M. P , Correa G., Ono Y. , Goodarzi H., 2010. Light, including ultraviolet. 247e-J257
4. Lemaire M., Ducommun B., Nebreda A. R. 2010 UV-induced downregulation of the CDC25B protein in human cells 1199–1204
5. Robinson K.S., Traynor N.J., Moseley H., Ferguson J., Woods J.A. 2010 Cyclobutane pyrimidine dimers are photosensitized by carprofen plus UVA in human HaCaT cells. 1126–1132
6. Schuch A. P., Menck C.,2010. The genotoxic effects of DNA lesions induced by artificial UV-radiation and sunlight 111–116
7. Botta C.,1 Giorgio C., Sabatier A.-S., De Me M. 2008. Effects of UVA and Visible Light on the Photogenotoxicity of Benzo[a]pyrene and Pyrene. 492–505
8. Heo S., Chun Ko S., Kang S-M., , Lee S., Kang H., Jung W-K., Affan A., Jeon Y-J. 2010. Inhibitory effect of diphenylhydroxycarmalol on melanogenesis and its protective effect against UV-B radiation-induced cell damage. 1355–1361
9. Trautlein D., Deibler M. , Leitenstorfer A. and Ferrando E. 2009. Specific local induction of DNA strand breaks by infrared multi-photon absorption 10.1093/nar/gkp932
10. Bito T., Sumita N., Masaki T., Shirakawa T., Ueda M., Tokura Y., and Nishigori C. 2010.

Ultraviolet light induces Stat3 activation in human keratinocytes and fibroblasts through reactive oxygen species and DNA damage

11. Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 2007. Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford University Press, New York.

12. Ikehata, H., Kawai, K., Komura, J., Sakatsume, K., Wang, L., Imai, M., Higashi, S., Nikaido, O., Yamamoto, K., Hieda, K., Watanabe, M., Kasai, H., Ono, T., 2008. UVA1 genotoxicity is mediated not by oxidative damage but by cyclobutane pyrimidine dimers in normal mouse skin. *The Journal of Investigative Dermatology* 128, 2289–2296.

13. Mouret, S., Baudouin, C., Charveron, M., Favier, A., Cadet, J., Douki, T., 2006.

Cyclobutane pyrimidine dimers are predominant DNA lesions in whole human skin exposed to

UVA radiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 13765–13770.

14. Nishigaki, R., Mitani, H., Tsuchida, N., Shima, A., 1999. Effect of cyclobutane pyrimidine dimers on apoptosis induced by different wavelengths of UV. *Photochemistry and Photobiology* 70, 228–235.

15. Stern, R.S., 2001. The risk of melanoma in association with long-term exposure to PUVA.

Journal of the American Academy of Dermatology 44, 755–761.

16. DNA Damage, http://saturn.roswellpark.org/cmb/huberman/DNA_Repair/damage_types.html.

17. Beranek DT., Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents, *Mutat Res.* 1990 Jul;231(1):11-30, Review.

18. Wetberg AB, Weitzman SA, Clarck EP. Effets on antioxidants on antioxidant induce: sister chromatid Exchange formation. *J. Clin. invest.* 1985; 75(3):35 - 7.
19. Slater TF. Free radical mechanism in tissue injury. *J. Biochem.* 1984; 222: 1-15.
20. Chung,K.T., Lu,Z., Chou,M.W. 1998. Mechanism of Inhibition of Tannic Acid and Related Compounds on the Growth of Intestinal Bacteria. *Food and Chemical Toxicology.* 36:1053-160.
21. Bhattacharya, A., M. Kumarm., S. Ghosal., S.K. Bhattacharya. 2000. Effect of Bioactive Tannoid Principler of *Emblca officinalis* on Iron-induced Hepatic Toxicity in Rats. *Phytomedicine.* 7: 173-175.
22. Galı-Muhtasib, H.U.,Younes,I.H., Karchesy, J.J., El-Sabban, M.E. 2001. Plant Tannins Inhibit the Induction of Aberrant Crypt Foci and Colonic Tumors by 1,2-dimethylhydrazine in Mice. *Nutrition Cancer.* 39: 108-116
23. Nagakawa,T., T.Yokozawa. 2002. Direct Scavenging of Nitric Oxide and Superoxide by Gren Tea. *Food and Chemical Toxicology.* 40: 1745-1750.
24. Cai,Y., Q.Luo., M. Sun., H. Corke. 2004. Antioxidant Activity and Phenolic Compounds of 112 Traditional Chinese Medicinal Plants Associated with Anticancer. *Life Sciences.* 74: 2157-2184.
25. Panovska,T.K., Kulevanova,S., Stefova,M., 2005. In vitro Activity of Some Teucrium Species (Lamiaceae). *Acta Pharm.* 55, 207-214.
26. Van den Akker E, Lutgerink JT, Laqueur MVM, Joenje H. Retel J. *Mutat. Res.* 1994; 309: 45-52.
27. Pillia G. R., 2004. Induction of Apoptosis in Human Lung Cancer Cells by Curcumin. *Cancer Letters.* 208: 163-170.

28. Watson J.D. and Crick F.H.C. (1953). "A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid". *Nature* 171: 737-738. doi:10.1038/171737a0. PMID 13054692.
29. The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1962 Nobelprize .org Accessed 22 Dec 06.
30. Al-Ghamdi MS. (2001) The antiinflammatory, analgesic and antipyretic activity of *Nigella sativa*. *JEthnopharmacol.* Jun;76(1):45-48.
31. Berg J., Tymoczko J. and Stryer L. (2002) *Biochemistry*. W. H. Freeman and Company ISBN 0-7167-4955-6.
32. Venter J, et al. (2001). "The sequence of the human genome". *Science* 297: 1304-51.
33. Douki T, Reynaud-Angelin A, Cadet J, Sage E (2003). "Bipyrimidine photoproducts rather than oxidative lesions are the main type of DNA damage involved in the genotoxic effect of solar UVA radiation". *Biochemistry* 42 (30): 9221-6.
34. Cadet J, Delatour T, Douki T, Gasparutto D, Pouget J, Ravanat J, Sauvaigo S (1999). "Hydroxyl radicals and DNA base damage". *Mutat Res* 424 (1-2): 9-21.
35. Shigenaga M, Gimeno C, Ames B (1989). "Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as a biological marker of in vivo oxidative DNA damage". *Proc Natl Acad Sci USA* 86 (24): 9697-701.
36. Cathcart R, Schwieters E, Saul R, Ames B (1984). "Thymine glycol and thymidine glycol in human and rat urine: a possible assay for oxidative DNA damage". *Proc Natl Acad Sci USA* 81 (18): 5633-7.
37. Steenken S. Purine bases, nucleosides, and nucleotides: aqueous solution redox chemistry and transformation reactions of their radical cations and e- and OH adducts. *J. Chem. Rev.* 1989; 89(24):503-520.

38. Halliwell B, Dizdaroglu M. Free radicals and the oxidant/antioxidant balance J. Free Radical Res. 1992; 16: 75-87.
39. Horwood E, Epe B. DNA and Free Radicals. Chichester 1993; 41-65.
40. Dizdaroglu M. Oxidative damage to DNA in mammalian chromatin. J. Mutat. Res. 1992; 275(35): 331-342.
41. Stevenson MA, Pollock SS, Coleman CN, Calderwood SK. J. Cancer Res. 1994; 54(6): 12-15.
42. Aruoma OI, Halliwell B. DNA and Free Radicals: Techniques Mechanisms and Applications. OICA International 1998; 3-26.
43. Totter JR. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1980; 77: 1763-7.
44. What is DNA repair?, <http://www.nih.gov/sigs/dna-rep/whatis.html>.
45. Chu G., Biochemistry 201: DNA repair, <http://cmgm.stanford.edu/biochem201/Handouts/dnarepair.pdf>.
46. DNA Damage, http://saturn.roswellpark.org/cmb/huberman/DNA_Repair/damage_types.html.
47. Beranek DT., Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents, Mutat Res. 1990 Jul;231(1):11-30, Review.
48. Meister A. Glutathione Ascorbate and cellcycle regulation FEBBS letters 1994 1,4.
49. Cros CE, Halliwell B, Borish ET. Oxygen radicals and human disease. J. Annals. int. Med. 1987;107(6): 526 - 45.
50. Southorn P, Powis G. Free radical in medicine I. Chemical nature and biological reactions. J. Mayo Clin. Proc. 1988; 63 (3): 381 - 8.

51. Tappel AL, Dillard JC. *invivo* lipid peroxidation measurement via exhaled pentane and protection by vitamin E. *J. Federation proceedings* 1981; 40(3):174- 8.
52. Brent JA, Rumack HH. Role of Free Radicals in Toxic Hepatic Injury I. Free Radical Chemistry. *J. Clinical Toxicology*. 1993; 49(4): 481- 93.
53. Gutteridge JMC. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *J. Clin Chem*.1995; 42(6):18-19.
54. Wetberg AB, Weitzman SA, Clark EP. Effects on antioxidants on antioxidant induced sister chromatid Exchange formation. *J. Clin. invest.* 1985; 75(3):35 - 7.
55. Slater TF. Free radical mechanism in tissue injury. *J. Biochem.* 1984; 222: 1-15.
56. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide. Physiology, pathophysiology, and pharmacology. *J. Pharmacol Review* 1991; 43(29): 109-37.
57. Gutteridge JMC. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *J. Clin Chem*.1995; 42(6):18-19.
58. Halliwell B. Oxygen is poisonous: The nature and medical importance of oxygen radicals. *J. Med Lab Sci.* 1984; 41(3):157-62.
59. Canbas A. Gıda Bilimi ve Teknolojisi. Ziraat Fakültesi Yayını No: 78, Ç. Ü. Adana.1983.
60. Sies H, De Groot H. Role of Reactive Oxygen Species in Toxicity. *J. Toxicology*. 1992; 64 (65): 547-51.
61. Brent JA, Rumack HH. Role of Free Radicals in Toxic Hepatic Injury I. Free Radical Chemistry. *J. Clinical Toxicology*. 1993; 49(4): 481- 93.

62. Mead J. Free radical mechanisms in lipid peroxidation and prostaglandins. Free radical in molecular biology. J. Aging and disease. 1984; 65(24): 53-66.
63. Notarjan D. Oxidants and signal transduction in vascular endothelium. J. Clin. Med. 1994; 125(35): 26-37.
64. Logani MK, Davies RE. Lipid Oxidation: Biologic effects and antioxidants J. Lipids. 1985; 15(5): 6-12
65. Reubset FAG, Veerkamp JH, Tirjbels JMF, Monnens LA. Total and peroxisomal oxidation of various saturated and unsaturated fatty acids in rat liver, heart. J. M. Quadri ceps. Lipids. 1992; 24(7):11-16.
66. Kielbassa C., Roza L. and Epe B., 1997. Wavelength dependence of oxidative DNA damage induced by UV and visible light 811-816
67. Pflaum M., Kielbassa C., Garmyn M., Epe B., 1998. Oxidative DNA damage induced by visible light in mammalian cells: extent, inhibition by antioxidants and genotoxic effects 137-146
68. Simon, J.C., J. Krutmann, C.A. Elmetts, P.R. Bergstresser, and P.D. Cruz, Jr. 1992. Ultraviolet B-irradiated antigen presenting cells display altered accessory signaling for T-cell activation: relevance to immune responses initiated in skin. J. 66-69
69. Rodust PM, Stockfleth E, Ulrick C, Leverkus M, Eberle J. 2009. UV induced squamous cell carcinoma-a role for antiapoptotic signalling pathways. 107-15
70. Ichihashi M. , Ueda M., Budiyo A., Bito T., Oka M., Fukunaga M., Tsuru K., Horikawa T. 2003. UV-induced skin damage. 21-39

71. Freshney, R. I., (1994) *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*. John Wiley and Sons, New York.

72. Barker K., (1998) *At the Bench: A Laboratory Navigator*. Cold Spring Harbor Press, New York.).

73. EREL O. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *J. Clinical Biochemistry* 2004; 37: 112– 9.

