



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**ORGANİK ÇÖZÜCÜLERE MARUZ KALAN BİREYLERDE
LENFOSİT DNA HASARININ XRCC1 VE XRCC3 GEN
POLİMORFİZMLERİ İLE İLİŞKİSİ**

Ayşegül BACAKSIZ

**DİSİPLİNLERARASI ADLİ BİLİMLER ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

DANIŞMAN

Prof. Dr. Gülin GÜVENDİK

İKİNCİ DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Zeliha KAYAALTI

2012-ANKARA

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ORGANİK ÇÖZÜCÜLERE MARUZ KALAN BİREYLERDE
LENFOSİT DNA HASARININ XRCC1 VE XRCC3 GEN
POLİMORFİZMLERİ İLE İLİŞKİSİ**

Ayşegül BACAKSIZ

**DİSİPLİNLERARASI ADLİ BİLİMLER ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

DANIŞMAN

Prof. Dr. Gülin GÜVENDİK

İKİNCİ DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Zeliha KAYAALTI

2012-ANKARA

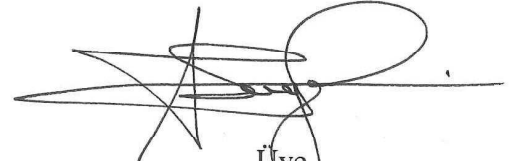
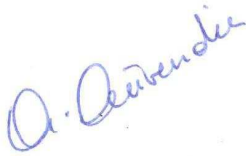
Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Disiplinlerarası Adli Bilimler Anabilim Dalı
Adli Kimya ve Adli Toksikoloji
çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından
Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 14/03/2012

Jüri Başkanı
Prof. Dr. Tülin SÖYLEMEZOĞLU
A.Ü. Adli Bilimler Enstitüsü



Üye
Prof. Dr. Gülin GÜVENDİK
A.Ü. Eczacılık Fakültesi



Üye
Prof. Dr. Ahmet SAYAL
G.A.T.A

Üye
Prof. Dr. Birsen KAPLAN
G.Ü. Sağlık Hiz. M.Y.O



Üye
Doç. Dr. Gürol CANTÜRK
A.Ü. Tıp Fakültesi



İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	vii
Şekiller	ix
Çizelgeler	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Organik Çözücüler	1
1.1.1. Organik Çözücülerin Özellikleri	7
1.2. Organik Çözücülere Mesleksi Maruziyet	8
1.2.1. Absorbsiyon Yolları	10
1.2.1.1. İnhalasyon	10
1.2.1.2. Deriden Absorbsiyon	11
1.3. Organik Çözücülerin Toksik Etkisi	13
1.4. DNA Hasarı ve Mekanizmaları	17
1.4.1. Spontan (Endojen) DNA Hasarları	19
1.4.1.1. DNA Replikasyonu Sırasında Ortaya Çıkan Yanlış Eşleşmeler	19
1.4.1.2. DNA'da Varolan Kararsızlıklar Sonucu Oluşan Hasarlar	19
1.4.1.3. Oksidatif Hasar	21
1.4.2. Çevresel Nedenlerden Kaynaklanan Hasarlar (İndüklenmiş Hasarlar)	22
1.5. DNA Onarımı ve Önemi	25
1.5.1. Baz Kesip-Çıkarma Onarım Mekanizması	27
1.5.2. Nükleotid Kesip-Çıkarma Onarım Mekanizması	31
1.5.3. Yanlış Eşleşme Onarım Mekanizması	33
1.5.4. Çift Zincir Kırıklarının Onarımı	34
1.5.5. Hasarın Doğrudan Onarımı	36
1.6. Genotoksik Etki ve Belirlenmesi	38

1.6.1. Comet Yöntemi [Tek hücre jel elektroforezi (Single cell gel electrophoresis, SCGE)]	40
1.6.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction, PCR)	43
1.6.3. Restriksiyon Fragman Uzunluk Polimorfizmi (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP)	44
1.6.4. DNA Onarım Gen Polimorfizmleri ve Önemi	45
1.7. XRCC1 Geni (X-Ray Repair Cross-Complementing Gene 1)	47
1.8. XRCC3 Geni (X-Ray Repair Cross-Complementing Gene 3)	50
2. GEREÇ VE YÖNTEM	53
2.1. Gereçler	53
2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	53
2.1.2. Kullanılan Araç ve Gereçler	54
2.1.3. Deney Protokolü	55
2.1.3.1. Çalışma Grubunun Seçilmesi	55
2.1.3.2. Çalışma ve Kontrol Grubundan Biyolojik Materyalin Toplanması	55
2.1.4. Yöntem	56
2.1.4.1. Periferik Kan Lenfositlerinde DNA Hasarının Comet Yöntemi ile Belirlenmesi	56
2.1.4.1.1. Yöntemde Kullanılan Çözeltiler	56
2.1.4.1.2. Comet Yönteminin Uygulanışı	57
2.1.4.2. XRCC1 (Arg399Gln) ve XRCC3 (Thr241Met) Genotiplerinin Belirlenmesi	59
2.1.4.2.1. Sıvı Kan Örneklerinden DNA İzolasyonu	59
2.1.4.2.2. Genomik DNA'nın Agaroz Jel Elektroforezi ile Belirlenmesi ve %0.5'lik Agaroz Jel Hazırlanması	61
2.1.4.2.2.1. Agaroz Jel'e Yükleme İçin Örnek Hazırlanması ve Yürütme Koşulları	61
2.1.4.2.3. PCR	62
2.1.4.2.3.1. Primer Listesi	62
2.1.4.2.3.2. PCR Bileşenleri ve PCR Programı	63
2.1.4.2.3.3. PCR Ürünlerinin Jele Uygulanması ve Elektroforez	65

2.1.4.2.4. PCR Ürünlerinin Restriksiyon Enzimi ile Kesilmesi (RFLP)	66
2.1.4.2.4.1. Kullanılan Kesim Koşulları	66
2.1.4.2.4.2. Kesim Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezine Uygulanması ve Genotip Tayini	67
2.1.5. İstatistiksel Analiz Yöntemi	68
3.BULGULAR	69
3.1. Comet Yöntemi Sonuçları	70
3.2. Comet Parametreleri Arasındaki İlişkinin Değerlendirilmesi	73
3.3. Organik Çözücülere Maruz Kalan Bireylerde XRCC1 Arg399Gln (G→A) Polimorfizm Analiz Sonuçları	74
3.4. Organik Çözücülere Maruz Kalan Bireylerde Comet Yöntemi Sonuçları ile XRCC1 Arg399Gln Polimorfizm Sonuçlarının Karşılaştırılması	77
3.5. Organik Çözücülere Maruz Kalan Bireylerde XRCC3 Thr241Met (C→T) Polimorfizm Analiz Sonuçları	80
3.6. Organik Çözücülere Maruz Kalan Bireylerde Comet Yöntemi Sonuçları ile XRCC3 Thr241Met Polimorfizm Sonuçlarının Karşılaştırılması	84
3.7. Organik Çözücülere Maruz Kalan Bireylerdeki XRCC1 ve XRCC3 Genotiplerinin Kombinasyonunun DNA Hasar Parametreleri ile İlişkisi	87
4. TARTIŞMA	91
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	102
ÖZET	104
SUMMARY	105
KAYNAKLAR	106
EKLER	125
Ek-1	125
ÖZGEÇMİŞ	127

ÖNSÖZ

Endüstriyel çözücüler, mesleki hastalıklarda etkisi olduğu kabul edilen ve araştırılması gereken önemli bir sorundur. Bu çalışmada, maruziyetin neden olduğu klinik sorunların temelindeki genotoksik etkinin araştırılması ve bireysel duyarlılığın değerlendirilmesi hedeflenmiştir.

Tezimin planlanması ve sonuçlanma aşamasına kadar değerli vaktini ve bilimsel desteğini hiç bir zaman esirgemeyen, anabilim dalının her türlü olanaklarını sunan Sayın Prof. Dr. Tülin SÖYLEMEZOĞLU'na,

Tez çalışmam süresince bana destek olan danışmanın Sayın Prof. Dr. Gülin GÜVENDİK'e,

Çalışmalarına yön veren, her türlü sorunda desteğini ve yardımını her zaman hissettiğim, yetişmemi sağlayan eş danışmanım, sevgili hocam Sayın Yrd.Doç.Dr. Zeliha KAYAALTI'na,

Tezim için gerekli olan biyolojik materyallerin toplanması aşamasındaki yardımlarından dolayı, Ankara Meslek Hastalıkları Hastanesinden Sayın Dr. Engin TUTKUN'a,

Dostluğu ve yardımıyla her zaman yanımda olduğunu hissettiğim, arkadaşım Dr. Bio. Dilek KAYA'ya,

Comet Assay laboratuvar çalışmasında yardımını ve zamanını esirgemeyen, arkadaşım Uzm. Bio. Esmâ SÖYLEMEZ'e,

Doktora eğitimim boyunca birlikte olmaktan mutluluk duyduğum bütün arkadaşlarıma,

Ayrıca;

Tez çalışmam boyunca bana inanan ve hiçbir özveriden kaçınmayarak bana destek olan sevgili babam K. Eşref Bacaksız ve annem Ayşe Bacaksız'a,

Sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

SİMGELER VE KISALTMALAR

DNA	Deoksiribonükleik asit
SNP	Tek Nükleotid Polimorfizm (Single Nucleotid Polymorphism)
A	Adenin
C	Sitozin
T	Timin
G	Guanin
U	Urasil
AP	Apürinidik/Apirimidinik
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
dNTP	Deoksiribonükleozidtrifosfat
RNA	Ribonükleik Asit
RFLP	Restriksiyon Fragman Uzunluk Polimorfizmi
RE	Restriksiyon Endonükleaz
F primer	Forward Primer
R primer	Reverse Primer
Bp	Baz çifti (Base pair)
PAH	Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlar
ROT	Reaktif Oksijen Türleri
O_2^-	Süperoksit Radikali
$OH\bullet$	Hidroksil Radikali
BER	Baz Kesip-Çıkarma Onarımı (Base Excision Repair)
NER	Nükleotid Kesip-Çıkarma Onarımı (Nucleotide Excision Repair)
MMR	Yanlış Eşleşme Onarımı (Mismatched Repair)
XRCC1	X-Ray Repair Cross-Complementing Gene 1
XRCC3	X-Ray Repair Cross-Complementing Gene 3
GGR	Genel Genom Onarımı (Global Genome Repair)
TCR	Transkripsiyona Bağlı Onarım (Transcription Coupled Repair)
HR	Homolog Rekombinasyon (Homologous Recombination)

NHEJ	Serbest Uçların Homolog Olmayan Şekilde Bağlanması (Non-Homologous End-Joining)
SCGE	Tek Hücre Jel Elektroforezi (Single Cell Gel Electrophoresis)
SCE	Kardeş Kromatid Değişimi (Single Chromatide Exchange)
CA	Kromozomal Aberrasyon (Chromosomal Aberration)
MN	Mikro Çekirdek (Mikro Nucleus)
MSS	Merkezi Sinir Sistemi
PSS	Periferik Sinir Sistemi
TI	Tail Intensity
DNA _t	DNA Tail
TM	Tail Moment
OTM	Olive Tail Moment
OSAH	Occupational Safety and Health Administration
WHO	World Health Organization
HMA	Yüksek Erime Noktalı Agar
PBS	Phosphate Buffer Saline
LMA	Düşük Erime Noktalı Agar
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
TE	Tris-EDTA
EDTA	Etilendiamin Tetraasetikasit
TBE	Tris-Borikasit-EDTA
NaOH	Sodyumhidroksit
NaCl	Sodyumklorür
DMSO	Dimetil Sulfoxide
mM	Milimolar
M	Molarite
µl	Mikrolitre
g	Gram
µg/ml	Miligram/mililitre
mg	Miligram
ml	Mililitre

ŞEKİLLER

Şekil.1.1. Aromatik hidrokarbonlara örnekler	4
Şekil.1.2. Vinil Klorid metabolizması sonucu oluşan karsinojenik kloretilen oksit ve DNA katım ürünü	5
Şekil.1.3. Keton ve aldehit örnekleri	6
Şekil.1.4. Mesleksel olarak organik çözücülere maruziyet alanları	9
Şekil.1.5. Organik çözücülerin genotoksik mekanizması	16
Şekil.1.6. Sitozin bazının deaminasyonu	20
Şekil.1.7. Depürinasyon sonucu oluşan AP bölgesi	20
Şekil.1.8. UV ışığı etkisi sonucu dimer oluşumu ve DNA'daki dirsek görünümü	23
Şekil.1.9. Alkillenme ve replikasyon sırasında hatalı baz eşleşmesi	24
Şekil.1.10. DNA'da hasara neden olan başlıca ajanlar, neden olduğu hasarlar	25
Şekil.1.11. Hücrede DNA hasarına karşı verilen cevaplar	26
Şekil.1.12. Baz kesip-çıkarma onarım mekanizması (BER)	30
Şekil.1.13. Nükleotid kesip-çıkarma onarım mekanizması (NER)	32
Şekil.1.14. İnsan yanlış eşleşme tamir mekanizması (MMS)	34
Şekil.1.15. Çift zincir kırıklarının onarım mekanizması	35
Şekil.1.16. O ⁶ -metilguaninin tamir mekanizması	37
Şekil.1.17. Değişik nedenlerden kaynaklanan DNA lezyonları ve başlıca onarım mekanizmaları	38
Şekil.1.18. Comet Görüntüsü; hücrenin kromozomal DNA'sının, hücre çekirdeğinden elektroforezin anoduna doğru hareket etmesiyle oluşan kuyruklu yıldız benzeri görüntü	42
Şekil.1.19. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) basamakları	44
Şekil.1.20. Genotoksik ajanlar, genetik polimorfizm ve DNA mutasyonları arasındaki ilişki	47
Şekil.1.21. a) 19. kromozomda XRCC1 gen lokalizasyonu, b) XRCC1 proteini üç boyutlu yapısının şematik görüntüleri	48
Şekil.1.22. XRCC1 proteini ve gen yapısı. a) XRCC1 domainleri ve ilişkili olduğu BER bileşikleri, b) Gen yapısı ve çalışılan SNP'ler	49

Şekil.1.23. a) 14. kromozomda XRCC3 gen lokalizasyonu, b) XRCC3 proteini üç boyutlu yapısının şematik görüntüleri	50
Şekil.1.24. Rad51 paraloglarının oluşturduğu kompleks yapılar	51
Şekil.2.1. Comet yöntemi	59
Şekil.2.2. XRCC1 Arg399Gln genotipleme için PCR ile çoğaltılan 403 bp'lik baz dizilimi, XRCC1-F ve XRCC1-R primerleri ve tek nokta mutasyonu	65
Şekil.2.3. XRCC3 Thr241Met genotipleme için PCR ile çoğaltılan 456 bp'lik baz dizilimi, XRCC3-F ve XRCC3-R primerleri ve tek nokta mutasyonu	65
Şekil.3.1. Maruz grubundaki bireylerin mesleklerine göre dağılımı	69
Şekil.3.2. 403 bp'lik amplifikasyon ürününün MspI enzimi ile kesim sonucunda oluşan oligonükleotid uzunlukları	74
Şekil.3.3. MspI restriksiyon enziminin tanıma bölgesi ve kesim ürünlerinin şematik gösterimi	75
Şekil.3.4. Organik çözücülere maruz kalan bireylerde; a) XRCC1 Arg399Gln polimorfizmi ile TI, b) XRCC1 Arg399Gln polimorfizmi ile DNAt, c) XRCC1 Arg399Gln polimorfizmi ile TM, d) XRCC1 Arg399Gln polimorfizmi ile OTM değerleri	77
Şekil.3.5. 456 bp'lik amplifikasyon ürününün NlaIII enzimi ile kesim sonucunda oluşan oligonükleotid uzunlukları	81
Şekil.3.6. NlaIII restriksiyon enziminin tanıma bölgesi ve kesim ürünlerinin şematik gösterimi	82
Şekil.3.7. Organik çözücülere maruz kalan bireylerde; a) XRCC3 Thr241Met polimorfizmi ile TI, b) XRCC3 Thr241Met polimorfizmi ile DNAt, c) XRCC3 Thr241Met polimorfizmi ile TM, d) XRCC3 Thr241Met polimorfizmi ile OTM	84
Şekil.3.8. XRCC1 ve XRCC3 genotip kombinasyonlarının DNA hasar riski açısından değerlendirilmesi	88

ÇİZELGELER

Çizelge.1.1. Organik çözücüler ve endüstride kullanım alanları	2
Çizelge.1.2. Deri yolu ile absorpsiyonu gerçekleşen solventler	12
Çizelge.1.3. Çözücülere mesleksi maruziyet sonucu sıklıkla gözlenen spesifik etkiler	13
Çizelge.1.4. Kemoterapötik ajanlar ve neden olduğu DNA hasarları	18
Çizelge.1.5. Spesifik lezyonlar ve insan DNA glikozilazları	28
Çizelge.1.6. Tek hücre jel elektroforezi (Single cell gel electrophoresis, SCGE) modifikasyonları	41
Çizelge.2.1. Amplifikasyonda kullanılan primerler ve özellikleri	63
Çizelge.2.2. PCR bileşenleri ile stoktaki ve reaksiyondaki konsantrasyonları	64
Çizelge.2.3. XRCC1 Arg399Gln ve XRCC3 Thr241Met genotiplemesi için PCR şartları	64
Çizelge.3.1. Maruz ve kontrol grubu comet parametreleri istatistikleri	70
Çizelge.3.2. Maruz ve kontrol grubunun comet yöntemi sonuçları	71
Çizelge.3.3. Sigara içen, maruz ve kontrol bireylerindeki DNA hasarı	71
Çizelge.3.4. Maruz bireylerin çalışma yılları ile DNA hasar parametreleri arasındaki ilişkiye ait istatistiksel veriler	72
Çizelge.3.5. Comet parametrelerinin birbirine göre korelasyonu	73
Çizelge.3.6. Organik çözücülere maruz kalan bireylerde XRCC1 Arg399Gln polimorfizmi ile oluşan genotip ve alel frekansları	76
Çizelge.3.7. Çalıştığımız populasyonun Hardy-Weinberg dengesinde olup olmadığının tespiti	76
Çizelge.3.8. Organik çözücülere maruz kalan bireylerde XRCC1 Arg399Gln polimorfizmi ile TI, DNAt, TM, OTM comet parametrelerinin istatistiksel değerleri	80
Çizelge.3.9. Organik çözücülere maruz kalan bireylerde XRCC3 Thr241Met polimorfizmi ile oluşan genotip ve alel frekansları	83
Çizelge.3.10. Çalıştığımız populasyonun XRCC3 genotipinin Hardy-Weinberg dengesinde olup olmadığının tespiti	83

Çizelge.3.11. Organik çözücülere maruz kalan bireylerde XRCC3 Thr241Met polimorfizmi ile TI, DNAt, TM, OTM comet parametrelerinin istatistiksel değerleri

87

Çizelge.3.12. XRCC1 ve XRCC3 genotiplerinin kombinasyonunun DNA hasar parametreleri açısından incelenmesi

88

1. GİRİŞ

1.1. Organik Çözücüler

Organik çözücüler birçok endüstri alanında sıklıkla kullanılan ve ticari amaçlı evsel temizlik ürünlerinde de yer alan önemli kimyasal bileşiklerdir. Endüstriyel alanda kullanılan organik sıvılar *endüstriyel çözücüler* ya da *organik çözücüler* olarak adlandırılır (Schenker ve Jacobs, 1996).

Diğer maddeleri fiziksel olarak çözebilen maddeler anlamına gelen solventler, gerek sanayi ürünlerinin üretiminde ara ürün, gerekse günlük yaşamda son ürün olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Organik çözücülerin; 1) Çözücü (kauçuk, plastik, reçine gibi maddelerin eritilmesinde), 2) Yapıştırıcı (ayakkabı, deri endüstrisi), 3) Antifiriz maddesi (arabalarda), 4) Temizleyici (tekstil, metal boya), 5) Boya ve matbaa mürekkebi yapımında ve kimyasal yapılarına bağlı olarak birçok endüstri dalında çeşitli kullanım alanları bulunmaktadır (Flanagan ve Meredith, 1996), (Çizelge.1.1).

Çözücülerin bu şekilde yaygın olarak kullanılması çözücülere ya da çözücü buharlarına maruziyeti kaçınılmaz kılmaktadır. Sık ve yaygın kullanılan endüstriyel çözücüler, işçinin çalışma ortamında korunmadığı takdirde, akut ve kronik etkilere neden olabilecek maddelerdir. Yapılan araştırmalar ile sadece endüstri alanında çalışan işçiler de değil, değişik nedenlerle gerek havaya, gerekse suya ya da yiyeceklere karışarak insanlarda toksik etki oluşturma potansiyeli de gösterilmiştir. Bu nedenle organik çözücülere mesleksi veya çevresel maruziyetler söz konusu olup, toksikolojinin önemli çalışma alanlarından birini oluşturmaktadır (Hahn ve ark., 2001).

Çizelge.1.1. Organik çözücüler ve endüstride kullanım alanları (<http://emedicine.medscape.com> adresinden ulaşılarak düzenlenmiştir).

Bileşikler	Endüstriyel Kullanım Alanı
Aseton	Temizleyici çözücüler
Akrilamit	Tünel-maden çalışmaları, atık arıtımı, yapıştırıcılar
Benzen	Petrol, deterjanlar, boya çözücüler, diğer çözücülerin imalatında
Karbon disülfür	Rayon lifi, patlayıcılar, boyalar, koruyucu maddeler, tekstil, lastik solüsyon, cila, elektrokaplama
Etilen oksit	Cihaz sterilizasyonu
N- hekzan	Yapıştırıcı, petrol bileşeni, cila-kaplama, metal temizleme bileşenlerinde
Metan	Endüstriyel alanda
Metil merkaptan	Doğal gaz ve akaryakıt
Metill-N- butil keton	Birçok endüstride alanında
Metilen klorür	Çözücü, soğutucu
Organoklorin	İnsektisit
Organofosfat	İnsektisit
Perkloretilen	Kuru temizleme, yağ çözücü, tekstil endüstrisi
Stiren	Fiberglas bileşenleri, gemi yapımı
Toluen	Boya, cila, akaryakıt, temizleyici,
Metilkloroform	Yağ çözücü ve roket yakıtı
Trikloretlen	Temizleyiciler, boya bileşenleri, cila
Vinil klorür	Plastikler, yer-kaplama, döşemecilik, paketlenme
Ksilen	Boya, cila, mürekkep, yapıştırıcı, patolojik örneklerin fiksasyonu.

Organik çözücüler, genel yapıları en az 1 karbon atomu ve 1 hidrojen atomu içeren, genellikle lipofilik ve uçucu özellikte olup oda sıcaklığında sıvı halde bulunan bileşiklerdir (Viaene, 2002). Daha çok n-hekzan gibi alifatik; benzen ve ksilen gibi altı karbonlu halkalı yapıya sahip aromatik bileşikleri içerirler. Alifatik ve aromatik hidrokarbonlar, halojen elementini içererek perkloretilen (PCE), trikloretilen (TCE) ve karbon tetraklorit (CCl_4) gibi halojenli hidrokarbonları oluştururlar. Alkoller, ketonlar, glikoller, esterler, eterler, aldehitler ise hidrojen grubu içermektedir.

Organik çözücüler kimyasal yapılarına göre sınıflandırılır. Her sınıfın üyeleri genel olarak benzer çözücü özelliğe ve kimyasal davranışlara sahiptir. Ancak endüstride kullanılan çözücülerin yapısı tam anlamıyla saf olmayıp, genellikle çözücü karışımlarının kullanılmasından dolayı bu durum kimyasal özelliklerini etkilemektedir (Schenker ve Jacobs, 1996).

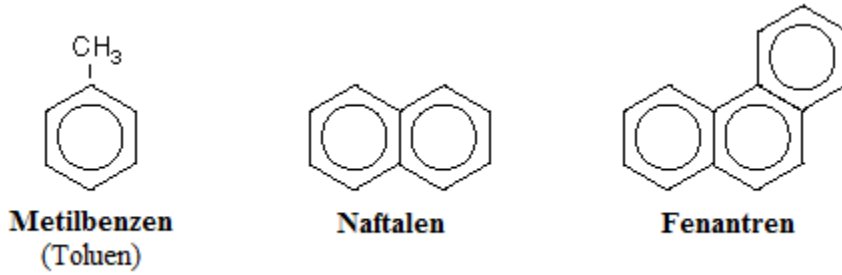
Organik çözücüler kimyasal yapılarına göre sekiz önemli grupta incelenebilir: 1. Alifatik hidrokarbonlar, 2. Siklik (halkalı) hidrokarbonlar, 3. Aromatik hidrokarbonlar, 4. Halojenli hidrokarbonlar, 5. Alkoller, 6. Ketonlar ve aldehitler, 7. Esterler, 8. Eterler olmak üzere sınıflandırılır (Schenker ve Jacobs, 1996; Hahn ve ark., 2000).

Alifatik hidrokarbonlar; ya doymuş hidrokarbonlar (alkanlar) veya yapısında bir ya da daha fazla karbon-karbon çift bağı içeren (alkenler), bir ya da daha fazla karbon-karbon üçlü bağı içeren (alkinler) doymamış hidrokarbonlar olarak bulunurlar. Bu bileşiklerden dört ya da daha az karbon atomuna sahip olanlar oda sıcaklığında gaz formunda olup, beş ya da daha fazla karbon atomuna sahip olanlar ise sıvı formdadır. Onbeşden fazla karbon atomuna sahip bileşikler ise katı formda bulunurlar. Birçok üyesi endüstriyel bakımdan önemli olup benzin ve kerosen alifatik hidrokarbonların kompleks karışımlarıdır.

Siklik (halkalı) hidrokarbonlar; doymuş veya üç ya da daha fazla karbon atomlu halkalı doymamış bileşikler halinde bulunurlar. Birçoğu düşük toksisite ile

metabolize olurlar. Benzin, mineral alkol, kerosen gibi petrol çözücüler bu bileşikler yoğunlukla içermektedir.

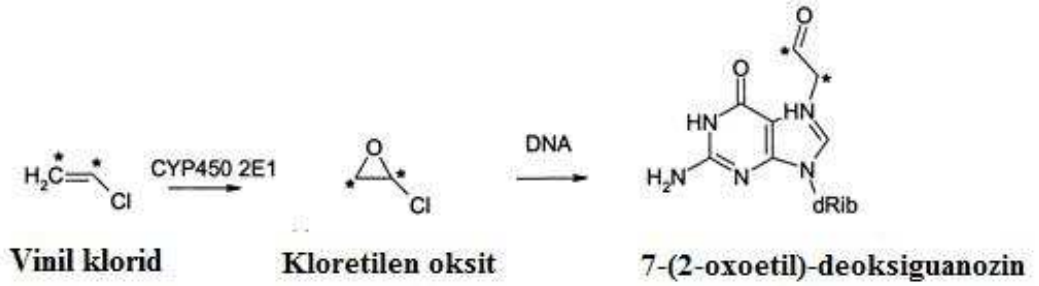
Aromatik hidrokarbonlar; çözücüler içerisinde önemli bir sınıfı oluşturmaktadır. Karbonlar arasında alternatif karbon-karbon çift bağına sahip halkalı bileşikler halinde bulunurlar yani bir ya da daha fazla benzen halkası (6 karbonlu) içermektedirler (Şekil.1.1). Toluene ve ksilen gibi aromatik hidrokarbonlar boya sanayisinde en çok kullanılan çözücülerdir. Benzen altı karbon atomlu aromatik halkaya sahip olup hematopoetik ve karsinojenik etkisinden dolayı en iyi çalışılmış aromatik hidrokarbonlar arasında yer alır. Benzene kronik maruziyet aplastik anemi ve lösemiye de içine alan sağlık sorunlarına neden olabilmektedir (Schenker ve Jacobs, 1996). Ayrıca benzen metabolitleri biyolojik sistemlerdeki DNA (Deoksiribonükleik Asit) ve proteinlere güçlü bir şekilde bağlanarak hücresel replikasyonu inhibe ederek ve karsinojeniteye neden olarak toksik etkisini göstermektedir (Varela, 2008).



Şekil.1.1. Aromatik hidrokarbonlara örnekler.

Halojenli hidrokarbonlar; bir ya da daha fazla halojen (florin, klorin, bromin, iodin) içeren hem doymuş hem de doymamış hidrokarbon zincirine sahiptirler. Çözücüler içinde en zehirli gruptur. Karbontetraklorür dört klor (Cl) atomu içerirken, kloroform ise üç (Cl) klor atomu içerir ve benzer toksisite özelliği gösterirler. Halojenli hidrokarbonların öncelikli hedef organları; merkezi sinir sistemi (MSS), kalp, karaciğer ve böbreklerdir. Özellikle kloroform ve karbontetraklorür karaciğer ve böbrekler için yüksek toksik etki gösterir. Bu toksik etki, bu bileşiklerin bu organlardaki metabolizması sonucu oluşan serbest radikallerden ve oluşturdukları

hücre hasarından kaynaklanmaktadır (Srilaxmi ve ark., 2010). Halojenli hidrokarbonlar içersinden vinil klorid yüksek toksisite özelliğine sahip olup karaciğerde metabolizması sırasında karbon atomları arasındaki çift bağ, eklenen oksijen atomu tarafından kırılır ve reaktif epoksit molekülüne dönüşür. Bu reaktif epoksit molekülleri DNA ile beraber kovalent bir şekilde *DNA katım (adduct) ürünlerine* dönüşebilir ve kansere neden olan mutasyonlara yol açabilir (Fernandes ve ark., 2010), (Şekil.1.2).



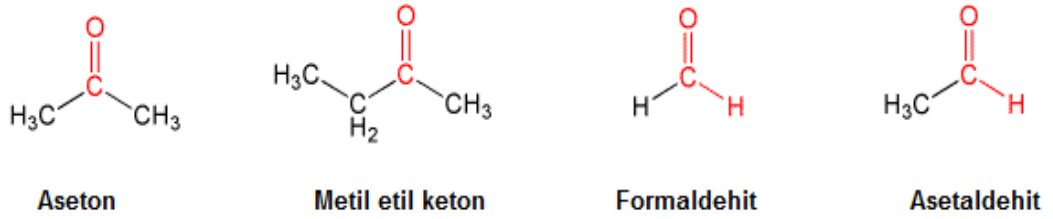
Şekil.1.2. Vinil Klorid metabolizması sonucu oluşan karsinojenik kloretilen oksit ve DNA katım ürünü (Morinello ve ark., 2002).

Alkoller; –OH grubu içeren hidrokarbon bileşiğidir. En iyi bilinen alifatik alkol ise etanoldür. Diğer çözücüler gibi alkolün akut etkisi MSS depresyonunu içerir (Schenker ve Jacobs, 1996). Karaciğerlerdeki kronik hasarı siroza neden olmakla beraber karaciğer kanserine de yol açabilmektedir. Etanol ve metanolün metabolizasyonunda görevli birincil enzim alkol dehidrojenaz (ADH) olup bu alkollerin toksisitesi, metabolitleri olan asetaldehit ve formik asitten kaynaklanmaktadır. Metanolün en önemli etkisi formik asitten kaynaklanan körlüktür (Flanagan ve Meredith, 1996). Ayrıca alkoller membran hasarına ve iyon dengesizliğine neden olmaktadır (Varelle, 2008).

Glikoller; iki tane –OH grubu içeren karbon bileşiğinden oluşurlar. Etilen glikol en iyi bilinen 2 C’lu glikol bileşiğidir, düşük derecede uçucu özelliğe sahip olduğu için maruziyeti daha çok oral yolla gerçekleşir. Birincil derecede hedef organ böbrek ve sinir sistemidir. Bu iki organdaki etkisi ADH ile metabolizması sonucu ortaya çıkan

ve sonrasında oksalik asite dönüştürülen glikolik asitten kaynaklanmaktadır (Brent, 2001).

Ketonlar ve aldehitler; genel formülleri R-CO-R olup oksijen ve karbon atomu arasında çift bağ bulunmaktadır. Düşük maliyeti ve çözücü özelliğinden dolayı endüstride kullanımı tercih edilmektedir. Oda sıcaklığında sıvı formda bulunan aseton, metil etil keton bu grup içinde yer almaktadır. Aldehitler de ketonlara benzerlik gösterip bir R grubu yerine H atomu içerirler (Şekil.1.3). Formaldehit ise oda sıcaklığında gaz formunda olup su ile beraber formalini oluşturup solunum yolu irritasyonuna ve yüksek konsantrasyonu astıma neden olabilmektedir.



Şekil.1.3. Keton ve aldehit örnekleri.

Esterler; inorganik veya organik asitler ile alkollerin reaksiyonu sonucu oluşur. Ciltte ve solunum bölgesinde tahriş özelliğine sahiptir. Etil- ve metil-asetat gibi bileşikler bu grup içersinde yer alır.

Eterler; iki hidrokarbonun oksijen atomu ile biraraya gelmesiyle oluşurlar. Yüksek oranda çözücü özelliğine sahip olup endüstride sıklıkla kullanılan kimyasallardır. Dietil eter ve izopropil eter bu grup içersinde yer alan bileşiklerdir (Schenker ve Jacobs, 1996). Alkoller, esterler, glikoller ve ketonlar oksijenli solventler grubunda olup özellikle boya sektöründe hidrokarbonlarda çözünmeyen reçineleri çözmek için kullanılmaktadır.

1.1.1. Organik Çözücülerin Özellikleri

Organik çözücülerin özelliğini ve toksik etkilerini, uçuculuk ve lipofilitesi belirlemektedir. Birçok organik çözücü büyük ölçüde uçucu olup, kolay bir şekilde buharlaşarak solunum yoluyla absorbe olmaktadır. Ayrıca sıvı formdaki çözücülerin deri yoluyla da absorpsiyonu mümkündür ancak havadaki uçucu çözücülere maruziyet olduğu zaman bu miktar gözardı edilmektedir.

Belli sıcaklık derecesinde, buhar basıncı yüksek olan bir maddenin uçuculuğu, diğerlerine göre daha fazladır. Çözücüler genel olarak uçucu kimyasallar olup, işyeri ortamında bulunması patlamaya neden olabilir. Yanıcı bir sıvı olan çözücü buharları hava ile belli konsantrasyonlarda karışımlar oluşturduğunda ve alev kaynağının bulunması halinde hızlı bir yanma ve patlama gerçekleşebilir. Organik çözücüler genellikle stabil olup metaller ve plastiklerle tepkime vermezler. Ancak sıcaklık ve basınçtaki değişiklikler bazı çözücülerin kimyasal yapısını değiştirebilirler ve belli şartlarda yabancı materyallerle reaksiyon verebilirler. Örneğin kaynak sırasında çıkan ultraviyole enerji, klorlu hidrokarbonları etkileyip fosgen gibi güçlü bir toksinin oluşmasına neden olur.

Lipitteki çözünürlük özelliği, çözücü ve metabolitlerinin bazı organlarda toksik etkisini, hücresel proteinlere, membrana ve DNA'ya bağlanarak da genotoksik etkisini göstermesine olanak sağlamaktadır.

İnhalasyon ile uçucu çözücüler polar özellikli, mukoza ile kaplı olan solunum epiteliinden geçer. Birçok solventin non-polar özelliği kan dolaşımına, absorpsiyonun gerçekleşeceği alveollere ulaşmasını sağlar. Daha sonra lipofilitesine göre basit difüzyon ile çeşitli dokulara yayılırlar. Bazıları ise enzimatik olarak polar özellikteki metabolitlerine dönüşür ve konjuge şekilde atılımları gerçekleşir.

Endüstride kullanılan çözücü karışımları kimyasal kirlilikleri de içererek çözücünün özelliğini etkileyebilmektedir. Bu özelliklerinden dolayı çözücülere maruziyet

sonucu oluşan klinik cevabı ve sağlık problemlerini yorumlamak da zorlaşmaktadır (Schenker ve Jacobs, 1996; Flanagan ve Meredith, 1996).

1.2. Organik özücölere Mesleksel Maruziyet

Endüstriyel alanda farklı özücölere ihtiyaç her gün giderek artmaktadır. Genellikle yağ-boya, benzin ve diğer organik karışımlar için seyreltici ve tiner şeklinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bugün yüzlerce organik çözücü farklı çalışma alanlarında kullanılıp, bu alanlarda çalışan bireyler bu bileşiklere maruz kalabilmektedir (Viaene, 2002), (şekil.1.4).

özücölere maruziyet, yoğunluk ve süreç ile değerlendirilebilir. Yoğunluk; ortam havalandırması, sıcaklık, çözücünün hacmi, malzemeye uygulanan metot gibi birçok faktöre bağlı olan çözücü konsantrasyonunu ifade etmektedir (Hahn ve ark., 2000). Maruziyet daha çok yapılan iş ve çalışma alanına bağlı olarak değişmektedir. İş günü içinde farklı düzeylerde maruziyet, farklı şekilde absorbsiyonu, kişisel koruyucu malzemelerindeki tutarsızlık, çözücülerin sıklıkla çeşitli karışımlar halinde kullanılması gibi birçok faktörden dolayı da her işçinin eşit oranda özücölere maruz kalma olasılığı söz konusu değildir (Viaene, 2002).

Maruziyetin şiddeti maruz kalınan maddenin toksisitesine, maruziyet süresine ve absorbsiyon yoluna bağlıdır. Uçucu özellikteki anestezikler veya diğer uçucu bileşikler daha çok fiziksel özelliklerinden dolayı toksik etkileri benzer özellik gösterir. Diğer taraftan, periferel nöropati ve hepatorenal hasarlar gibi toksisite belirtileri ise metabolik transformasyon ve benzer kimyasal yapıdaki bileşikler arasındaki belirgin farklılıklardan kaynaklanır (Flanagan ve Meredith, 1996). Ayrıca iş ortamında kişiler birden fazla kimyasal madde buharına maruz kalabilir. Bu buharın toplu etkileri ise sinerjik veya antagonist tipte olabilmektedir (Jenkins ve ark., 2005; Keshava ve Ong, 1999).



Şekil.1.4. Mesleksel olarak organik çözücülere maruziyet alanları.

Çözücülerin birçok ortamda sıklıkla kullanılması insan sağlığı üzerinde olumsuz etkiler de meydana getirmiştir. MSS toksisitesi, dermatit, hematolojik etkiler, karaciğer ve renal hasarları da içine alan birçok sağlık sorununa neden olmaktadır. Epidemiyolojik çalışmalar ve hayvan toksikoloji çalışmaları da organik çözücülerin sağlık üzerine olumsuz etkilerini ve toksik etkilerini açık şekilde göstermektedir (Yang, 2011; Viaene, 2002).

Mesleksel olarak maruz kalınan kimyasal maddelerin çoğunun absorpsiyonu; buhar, gaz, toz, duman şeklinde solunarak ya da doğrudan deri ve gastrointestinal sistem aracılığıyla gerçekleşir.

1.2.1. Absorbsiyon Yolları

Çoğu çözücü için başlıca absorpsiyon yolu inhalasyon olmasına rağmen çalışma ortamında deri yolu ile absorpsiyon veya kazara gerçekleşen zehirlenmelerde ise gastrointestinal sistem önemli bir yolu oluşturur. Genelde uçucu bileşikler olmalarından dolayı gastrointestinal ya da dermal maruziyet geri planda kalmaktadır.

1.2.1.1. İnhalasyon

Çözücülerin absorpsiyonu en sık inhalasyon yolu ile gerçekleşir. Bu yol ile gerçekleşen absorpsiyon bazı parametrelere bağlıdır;

Maruz kalma (ortamdaki konsantrasyon farklılığı, maruziyet süresi, fiziksel güç): Çözücünün alveollardaki konsantrasyonu veya hava ve kan konsantrasyon düzeyleri arasındaki farklılık, çözücünün alveolar kan damarlarında yayılma sürecini etkilemektedir. Çalışma esnasında harcanan fiziksel güç ise ventilasyon gibi akciğer parametrelerini ve bu sebeple alveolar ve kan konsantrasyonunu da etkilemektedir.

Akciğer parametreleri (pulmoner ve alveolar ventilasyon, pulmoner perfüzyon, hava-kan katsayısı, kan-doku katsayısı): Bütün bu etkenler maruz kalınan çözücünün miktarını belirler. Doku-kan katsayısı dokudaki konsantrasyon dengesini etkiler. Düşük doku-kan katsayısından dolayı, çözücüler güçlü hidrofobik özellikleri (toluen gibi) ile hızlıca dengeye ulaşırlar. Bu parametre yetişkin ve çocuk bireyler arasında farklılık gösterir.

Çözücülerin fizikokimyasal özellikleri: Çözünürlük yani hidrofobik ve hidrofilik özellik, sıvı, gaz ve uçuculuk inhalasyonu etkileyen parametreler içersinde yer alır. Çözücülere maruziyet fiziksel özelliklerine de bağlıdır (Hahn ve ark., 2000; Flanagan ve Meredith, 1996).

İnhalasyon yolu ile absorbe olan çözücü hızlı bir şekilde alveollerden kana geçer. Özellikle fiziksel olarak güç harcanan işlerde solunum yoğunluğundan dolayı absorbsiyon oranı daha fazla gerçekleşir. Çözücülerin dağılımı; kan akışı ve organ sisteminin lipid içeriğine bağlıdır. Genel olarak yağları çözen ve yağda çözünen her madde fizyolojik bakımdan aktiftir ve bu nedenle iyi bir çözücü belirli koşullarda toksik özelliğe sahiptir. İnhalasyonla alınan çözücülere en çok duyarlı sistem MSS'dir. MSS'nin lipid bakımından zengin olmasından dolayı kan dolaşımına absorbe olan çözücüler çok kısa sürede kalp ve MSS'de toplanırlar, buna bağlı olarak solunum, kan ve sinir sisteminde hasarlar meydana gelir (Viaene, 2002; Schenker ve Jacobs, 1996).

1.2.1.2. Deriden Absorbsiyon

Deri yolu ile maruziyet ciltten temas halinde gerçekleşir ve cilt yüzey alanı, kalınlığı, cildin fiziksel özelliği, çözücüye maruz kalınan süre önemli değişkenlerdir. Ayrıca organik çözücüler dermatite ve alerjik reaksiyonlara yol açarlar. Çözücülerin deri içerisine girişine karşı başlıca bariyer stratum corneum ve özellikle intersellüler lipidler ve fibröz keratin yapılarıdır. Etanol gibi polar çözücülerle uzaklaştırılan lipidler veya stratum corneumun hidrasyonu derinin geçirgenliğinin artışı ile ilişkilidir. Stratum corneum'daki hasar veya yoksunluk cilt hastalıklarının sebebi olabilir, saç folikülleri ve glandula gibi bazı deri bölgeleri de çözücülerin deriden geçişini arttırabilmektedir.

Çözücüler deride tahriş, hücrel hiperplazi ve şişme gibi hasar ve hastalıkların oluşmasına neden olabilir. Sıklıkla kullanılmaları derideki hasarın tetiklenmesine ve absorbsiyonunun artmasına etki eder (Çizelge.1.2). Benzen gibi lipofilik özellikteki kimyasallar ise daha kolay absorbe olurlar ve maruziyeti durumunda buharın önemli bir bölümü cilt tarafından absorbe edilmektedir (Hahn ve ark., 2000).

Çizelge.1.2. Deri yolu ile absorpsiyonu gerçekleşen çözücüler (Hahn ve ark., 2000).

Benzen	Dimetilformamid	2-Hekzanon	1,1,2,2 Tetrakloretan
Bromometan	Dimetilsulfoksit	Metanol	Tetrakloroeten
2-Butanon	1,4-Dioksan	2-Metoksietanol	Tetraklorometan
2-Butoksietanol	2-Etoksietanol	Metil format	Toluen
Karbon disulfid	Etilbenzen	Nitrobenzen	Toluidinler
2-Kloroetanol	Etil format	Nitrotoluenler	1,1,2-Trikloroetane
Klorometan	Etilen glikol	Fenol	Triklorometan
Kresoller	n-Hekzan	iso-Propil benzen	Ksilen
Sikloheksanol		n-Propanol	

Çalışma alanındaki uçucu çözücülerin bir kısmı havalandırma sistemleri sayesinde ortamdan uzaklaştırılırken, maruziyet sonucu ise sitokrom P450 gibi karışık fonksiyonlu oksidaz sistemi ile karaciğerde ve diğer organlarda metabolize edilerek uzaklaştırılır. Maruziyetten sonra ilk önce hepatik metabolizma bu sistemik durumu azaltabilir. Ekzojen bileşikler birçok yol ile metabolize edilir ve sıklıkla polar özellikteki metabolitlerine dönüşürler. Diğer ekzojen bileşiklerde olduğu gibi faz I (genellikle oksidasyon, redüksiyon ve hidroliz) ve faz II (glukuronik asit, sülfat, glisin ile konjugasyon) reaksiyonları bazı çözücü bileşikler için de gerçekleşir. Metabolizma süreci ve hızı; yaş, hastalık, doz, diğer çözücü ve ilaçlara maruziyet gibi faktörlerden de etkilenmektedir. Örneğin stirene maruz kalındıktan sonra alınan alkol mandelik asit atılımını inhibe etmektedir (Hahn ve ark., 2000).

Alkoller ve asetat ile ilişkili olarak metil ve etil asetat hızlı bir şekilde hidrolize edilirken, tolue ve ksilen gibi aromatik hidrokarbonlar büyük ölçüde oksidasyon ve glisin konjugasyonu ile metabolize edilirler. Benzen ise halka yapısının hidroksilasyonu ve konjugasyon ile metabolize edilir. Hekzan gibi alifatik hidrokarbonlar ise ikincil karbonlarının oksidasyonu ile metabolize edilmektedir (Flanagan ve Meredith, 1996). Böylece çözücüler de değişen miktarlarda değişik yapıda metabolitler halinde atılabildiği gibi, ekstrahepatik dokudaki biyotransformasyonu, o doku için toksikolojik önem taşıyabilir.

1.3. Organik Çözücülerin Toksik Etkisi

Organik çözücülere maruz kalmak çalışma şartlarına ve yapılan eyleme bağlı olup ciddi sağlık problemlerine neden olmaktadır. Bu maruziyetler vücudun belli bölümlerinde (bölgesel etki) toksik etkiye ya da organ fonksiyonlarının değişimine (sistemik etki) neden olabilir (OHS, 2010).

Organik çözücülerin en önemli toksikolojik özellikleri buharlaşmaları ve yağları çözmeleridir. Yağ çözücü özelliklerinden dolayı MSS'ne, hematopoetik dokulara, üreme sistemine, parankimatöz organlara hasar verebilmektedirler (Çizelge.1.3.). Buharlaşma özelliklerinden dolayı da hızlı bir şekilde çalışma ortamını kontamine edebilir ve mesleki zehirlenmelere neden olabilirler (Stefanović ve ark., 2007).

Çizelge.1.3. Çözücülere mesleki maruziyet sonucu sıklıkla gözlenen spesifik etkiler (Hahn ve ark., 2000).

Organ-sistem	Çözücü Grubu	Semptomlar
Karaciğer	Halojenli hidrokarbonlar (örn. kloroform, karbontetraklorür) ve Etanol gibi	Akut ve kronik hepatotoksik semptomlar
Böbrek	Halojenli hidrokarbonlar (örn. karbontetraklorür), Toluen, diokzan, glikol gibi	Akut tübüler nekroz, Glomerüler ve tübüler işlev bozukluğu (albüninüri, proteinüri)
Üreme sistemi	Karbon disülfid, benzen, glikol eter, nitrobenzen	Menstrual siklus bozuklukları; azalan sperm sayısı ve embriyotoksik etkiler
Hematopoetik sistem	Benzen metabolitleri	Lösemi, miyelotoksik etkiler
Sinir sistemi	n-hekzan, etanol, stiren, tetrakloretilen	Periferik nöropati
Göz	Metanol	Görme kaybı

Organik çözücülerin nörotoksik etkisi mesleki sağlık problemleri içinde en önemli alanı oluşturur. Solventlerin sinir sistemi üzerindeki etkisi sinir dokusunun lipit yapısında, özellikle aksonların miyelin kılıfı ve hücre membranında görülür. Lipitte çözünürlük özelliği, çözücü ve metabolitlerinin MSS ve PSS'ne sıklıkla girişine izin vermektedir. Sinir hücreleri kan-beyin bariyerini geçen organik çözücülere karşı oldukça hassas olup demiyelinizasyon, hücre ölümü gibi geri dönüşümü olmayan toksik etkilere neden olmaktadır. Ayrıca organik çözücü karışımlarının görme fonksiyonu üzerindeki etkisi birçok çalışmada incelenmiştir. Çalışma ortamında organik çözücülere maruziyetin diskromotopsi ile ilişkili olduğu ve retina ile optik sinirleri etkilediği bildirilmiştir (Gonzalez ve ark., 1998; Zavalic ve ark., 1998; Gong ve ark., 2003).

Davranış toksisitesi ile ilgili birçok araştırmalar olup, en çok karbon sülfür'ün (CS_2) etkisi araştırılmıştır. Ruh halindeki değişiklikler (depresyon), organik psiko-sendromun klinik olarak esas kısmını oluşturmakta ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO; World Health Organization), ruh halinin değişmesini organik psiko-sendrom açısından birinci klinik işaret olarak ifade etmiştir. Eğer, görünürde etiyolojik olarak bir faktör yoksa veya terapiye karşı direnç varsa, çözücülere maruz kalan bireylerin dikkatli bir şekilde takibe alınması gerektiğini belirtmişlerdir. Organik çözücülerin sinir sistemi üzerindeki etkilerinden dolayı, özellikle çalışma ortamlarında nörolojik düzensizliklerin engellenmesi için medikal ve çevresel kontrol programlarının hayata geçirilmesinin gerekli olduğu düşünülmektedir (Stefanović ve ark., 2007).

Çözücülere mesleki olarak uzun süreli maruziyetin, nevroitik durumlara neden olduğu ve sosyal kişiliği etkilediği belirlenmiştir (Chen ve ark., 2001). Parkinson, Alzheimer hastalığı gibi nörodejeneratif hasarlar ekzojen nörotoksinler ile ilişkili olup, etilen oksit ve metanol gibi organik çözücülerin de parkinson hastalığı üzerinde etkisi belirtilmiştir (Viaene, 2002).

Bazı çözücüler mikrozomal yağlara ve hücresel makromoleküllere bağlanarak böbrek hasarına, membran yapısını bozarak hücre enerji üretimini engellerler.

Örneğin, karbon tetraklorür protein sentezini engelleyen triklormetil radikali aracılığıyla karaciğer ve böbrek hasarına neden olmaktadır. Organik çözücüler karaciğerde ise siroz ve hepatik nekrozis gibi dejenerasyona yol açarak toksisitesini gösterir. Çünkü bu bileşiklerin biyotransformasyonunda oluşan serbest radikaller hücresel makromoleküllerle ve membran proteinleri ile reaksiyona girip hücre hasarına ve ölüme neden olabilmektedir (Flanagan ve Meredith, 1996).

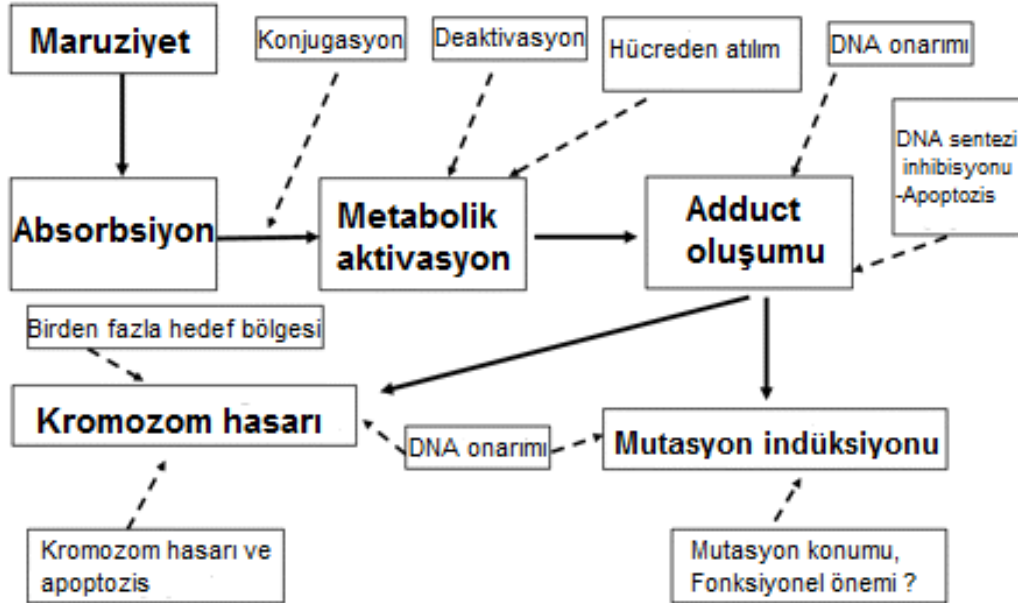
Birçok organik çözücünün genotoksik ve karsinogenik etkileri bulunmaktadır. Çözücüler, kimyasal özelliklerinden dolayı DNA hasarına, buna bağlı olarak da kromozomal kararsızlığı içine alarak hücresel yapıda bir takım değişikliklere neden olmaktadır (Roma-Torres ve ark., 2006). Organik çözücüler redoks reaksiyonları ile reaktif oksijen türlerinin oluşumuna da etki ederler (Ross, 2000). Reaktif oksijen molekülleri ve benzokininler baz oksidasyonuna, tek ve çift zincir kırıklarına ve çapraz bağlar gibi oksidatif hasarlara neden olup, bu durum kromozomal kararsızlıkla ifade edilmektedir (Zhang, 1993; Kim, 2004).

Formaldehit ve polisiklik aromatik hidrokarbonları (PAHs) içeren kimyasallar, genomik DNA hasarına ve onarım kapasitesinde azalmaya neden olabilmektedirler (Goud ve ark., 2001). Toluen ve dioksan gibi toksinlere maruziyette ise oksidatif stresin olası bir durum olduğu, beyinde serbest radikal üretimine neden olduğu belirtilmiştir (Burmistrov ve ark., 2001). Organik çözücüler serbest radikal üretimine bağlı olarak lipid peroksidasyonuna, süperoksit dismutaz aktivitesinde ve glutatyon düzeyinde azalmaya neden olmaktadır (Baydas ve ark., 2003). Toluen gibi maruz kalan genotoksik ajanlar ise, germ hücrelerinde genetik değişiklikler ve üreme sistemi hasarlarını tetiklemektedir. Maruziyetler, ölü doğumlar ve kromozomal anormallikle ilişkili olarak erkek bireylerde infertiliteye de neden olduğu bildirilmiştir (Nakai ve ark., 2003; McMartin ve ark., 1998).

Birçok organik çözücü, organizma üzerinde genotoksik etkiye ve hedef bölgede genetik değişikliklere neden olan potansiyel ajanlardır. Hücre büyümesi ve farklılaşmasında rol alan proto-onkogenlerde veya tümör supresor genlerde

meydana gelen bu genetik hasarlar kanserli hücrelerin oluşumuna neden olmaktadır. (Keshava ve Ong, 1999). Avrupa iş sağlığı ve güvenliği ajansı (OSHA) verilerine göre dünya çapındaki mesleki kanserlerin, tüm kanser ölümlerinin yaklaşık % 9.6'sına ulaştığı belirtilmiştir. Endüstriyel alanda kullanılan benzene uzun süre maruziyetin ise artan lösemi riski ile ilişkili olup, dünya çapında lösemi vakalarının yaklaşık % 2'sinin benzen ve 1,3-bütadien'e mesleki maruziyetten kaynaklandığı bildirilmiştir (Yang, 2011). Sistemik etkilere ilaveten, organik çözücüler ciltte dermatit gibi hasarlara da neden olmaktadır (Schenker, 1996). Stratum corneum lipitce zengindir. Buradaki hasar ve yoksunluk, cilt hastalıklarının sebebi olabilir. Sıklıkla kullanılan çözücülerden dolayı derideki hasar tetiklenir ve absorpsiyonun artmasına neden olarak deride tahriş, hücresel hiperplazi ve şişme gibi hasar ve hastalıkların oluşmasını etkileyebilir (Hahn ve ark., 2000).

Bu nedenlerden dolayı; genotoksik ajanlara mesleksel olarak maruziyet işçi sağlığı açısından önemli olup, bazı biyogöstergeler ve araştırmalar, organik çözücüler gibi birçok ksenobiyotiğin neden olduğu genotoksik etkinin belirlenmesi açısından önem taşımaktadır (Şekil.1.5.).



Şekil.1.5. Organik çözücülerin genotoksik mekanizması (Jenkins ve ark., 2005).

1.4. DNA Hasarı ve Mekanizmaları

Genom, DNA hasarına neden olan birçok farklı etkenlere maruz kalmaktadır. Genetik materyalin moleküler bütünlüğünde ekzojen veya endojen faktörlerin etkisiyle meydana gelen tüm değişiklikler "*DNA hasarı*" olarak adlandırılır. DNA hasarı, baz düzeyinde değişiklikler olabileceği gibi delesyonlar, translokasyonlar veya anöploidi gibi daha kompleks değişimleri de içermektedir (Sancar ve ark., 2004).

Reaktif oksijen molekülleri, diğer reaktif metabolitler, hidroliz olayı gibi birçok kimyasal olay DNA hasarına neden olmaktadır. Endojen faktörlerden kaynaklanan DNA'da meydana gelen mutasyonlar, ekzojen faktörlerle beraber niteliğini değiştirerek daha etkili hale gelmektedir (De Bont ve van Larebeke, 2004). Bu değişimler tek hücreli organizmalarda hücreSEL ölüme, çok hücreli organizmalarda ise mutajenezis, karsinogenezis ve yaşlanmada önemli bir rol oynamaktadır (Sancar ve ark., 2004).

Bazı DNA hasarları normal metabolik aktivite sonucu kendiliğinden meydana gelirken; bazıları ise, ekzojen nedenlerden kaynaklı hasarlardır. Ekzojen kaynaklar; güneşten gelen ultraviyole radyasyon, radon bozunumundan kaynaklanan iyonize radyasyon, mantar kaynaklı aflatoksin, yanmış tütün ve birçok kemoterapötik içine almaktadır. Kemoterapötik ajanlar doğrudan veya dolaylı olarak DNA hasarına neden olmaktadır. Farklı kategorideki bu ajanların DNA hasarındaki rolleri de farklıdır (Çizelge.1.4). Endojen kaynaklara ise; oksidatif metabolizma, DNA'da kendiliğinden oluşan değişimler, immünolojik çeşitliliği oluşturan V(D)J rekombinasyon mekanizması örnek olarak verilebilir (Lieberman, 2008; Chu, 2000).

Çizelge.1.4. Kemoterapötik ajanlar ve neden olduğu DNA hasarları (Lieberman, 2008).

Kemoterapötik Ajanlar	DNA hasar rolü
<u>Alkilleyici ajanlar</u> Piperazinler (TFMPP, MCPP, PFPP), triazinler (dakarbazin) vb.	- Guanine etil veya diğer alkil gruplarının eklenmesi - DNA çapraz bağları oluşumu
<u>Antibiyotikler</u> Bleomisin, Daktinomisin, Doksorubisin	- DNA'ya bağlanarak replikasyon ve transkripsiyonun inhibisyonu - DNA zincir kırığı oluşumu
<u>Topoizomeraz I ve II inhibitörleri</u> İrinotekan (I), Etoposid (I)	Rekombinasyonel onarımın etkilenmesi
<u>Mitotik inhibitör</u> Taksanlar	Mikrotübül fonksiyonlarının bozulması
<u>Diğerleri</u> Sisplatin, Hidroksiüre	- DNA çapraz bağ oluşumu, ribonükleotid redüktaz inhibisyonu, - Hücre döngüsünün engellenmesi ve DNA degradasyonu.

Spontan (Endojen) DNA hasarları; DNA replikasyonu sırasında ortaya çıkan yanlış eşleşmeler, DNA'da varolan kararsızlıklar sonucu oluşan hasarlar (Urasil bazının katılımı, bazların deaminasyonu, depürinasyon ve depirimidinasyon) ve oksidatif hasar olarak gruplandırılırken, çevresel nedenlerden kaynaklanan hasarlar (indüklenmiş hasarlar) ise; fiziksel ajanlardan (İyonize radyasyonun neden olduğu baz hasarı ve zincir kırıkları, UV radyasyonun neden olduğu siklobütan pirimidin dimerleri ve fotoürünü) ve kimyasal ajanlardan [Alkilleyici ajanlar, baz analogları (Bromourasil), interkalasyon ajanları (proflavin, etidyum bromür)] kaynaklı DNA hasarları olarak gruplandırılabilir (Montelone, 1998).

Farklı biyokimyasal yolları kullanan birçok mekanizma, bu DNA hasarlarının birçok şeklini onarmaya çalışır. DNA onarım genleri de bu süreçte genomun önemli bir bölümünden sorumludur (Chu, 2000).

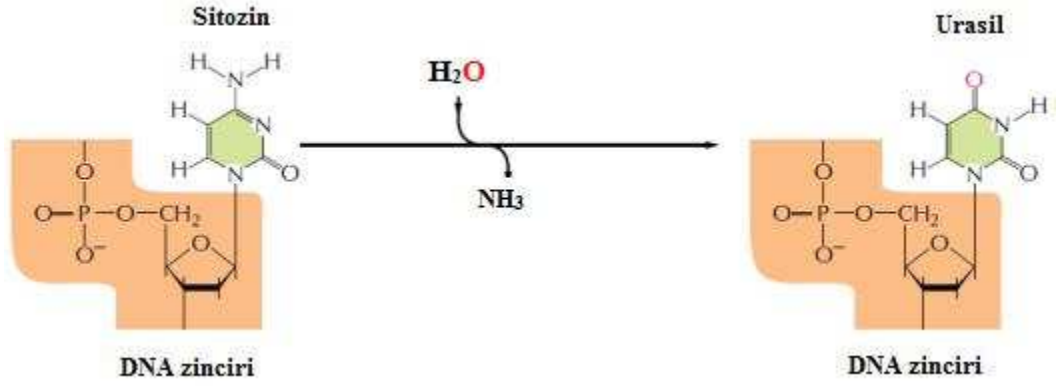
1.4.1. Spontan (Endojen) DNA Hasarları

1.4.1.1. DNA Replikasyonu Sırasında Ortaya Çıkan Yanlış Eşleşmeler

DNA replikasyonunun doğruluğundan sorumlu mekanizma, DNA polimerazın hata okuma (proofreading) 3'-5' ekzonükleaz aktivitesidir (Garland Science, 2003). Bazen DNA replikasyonunda yanlış nükleotidin eklenmesiyle oluşan hata, replikasyonun bir sonraki döngüsünde hatalı nükleotidin kopyalanmasına ve mutasyona sebep olur. DNA polimerazın hata yapma (yanlış bazı ekleme) sıklığı spontan mutasyon oluşumunu etkiler (Montelone, 1998).

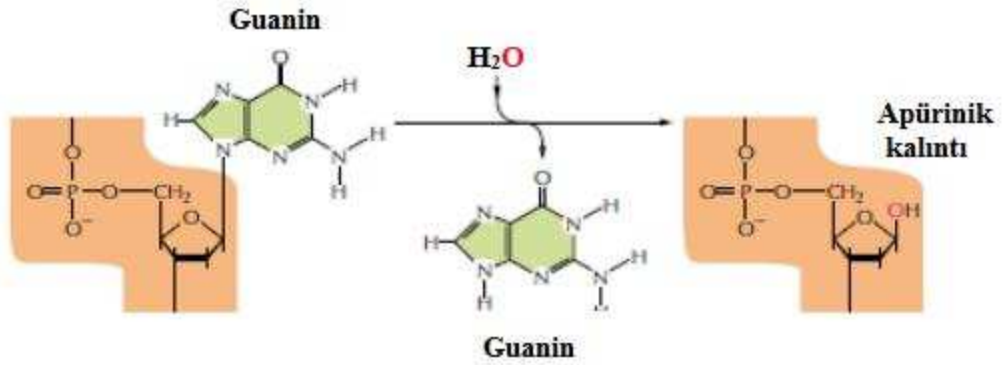
1.4.1.2. DNA'da Varolan Kararsızlıklar Sonucu Oluşan Hasarlar

Bazların deaminasyonu: Nükleik asit ve nükleotitler enzimatik olmayan değişimlere uğrarlar. Nükleotit bazlarının dış halka amino gruplarını kendiliğinden kaybetmesi (deaminasyon), bu grup mutasyonlar içinde yer alır (Garland Science, 2003). Örneğin sitozin amino grubunu kaybedince urasil haline dönüşür (Şekil.1.6). Her insan hücresinde günlük 100-500 kere urasil oluşumu hesaplanmış olup, hücrede yaygın olarak görülen deaminasyon ürünüdür. Bu hasar ortadan kaldırılmaz ise replikasyon sırasında U karşısına A gelmesi sonucu C:G → T:A değişimi ve transisyonel mutasyona neden olmaktadır (Akbari ve ark., 2004). Şayet DNA normal olarak urasil içerseydi, sitozinin deaminasyonu sonucu oluşan urasilin tayini çok daha güç olacak ve onarılmamış urasiller kalıcı dizilim değişikliğine neden olarak replikasyon sırasında daima adeninle birleşecekti. G-C baz eşleşmesinde azalmaya, A-U baz eşleşmesinde artışa neden olarak zaman içinde genetik şifreleme yok olacaktı (Nelson ve Cox, 2005).



Şekil.1.6. Sitozin bazının deaminasyonu (Garland Science, 2003).

Depürinasyon ve depirimidinasyon: Deoksiribonükleotitlerinin baz ve pentoz arasındaki N- β -glikozil bağlarının hidrolizi olayına ise *depürinasyon* denir. Bu tepkime pürinler için pirimidinlere nazaran daha hızlı oluşur (Şekil.1.7). Pürin ve pirimidin bazlarının kaybı sonucu apürinik/apirimidinik (AP) bölgeler meydana gelir. Bu kimyasal değişim sonucu DNA replikasyonu sırasında yanlış eşleşmeler gerçekleşir (Nelson ve Cox, 2005; Cooper ve Hausman, 2006).



Şekil.1.7. Depürinasyon sonucu oluşan AP bölgesi (Garland Science, 2003).

1.4.1.3. Oksidatif Hasar

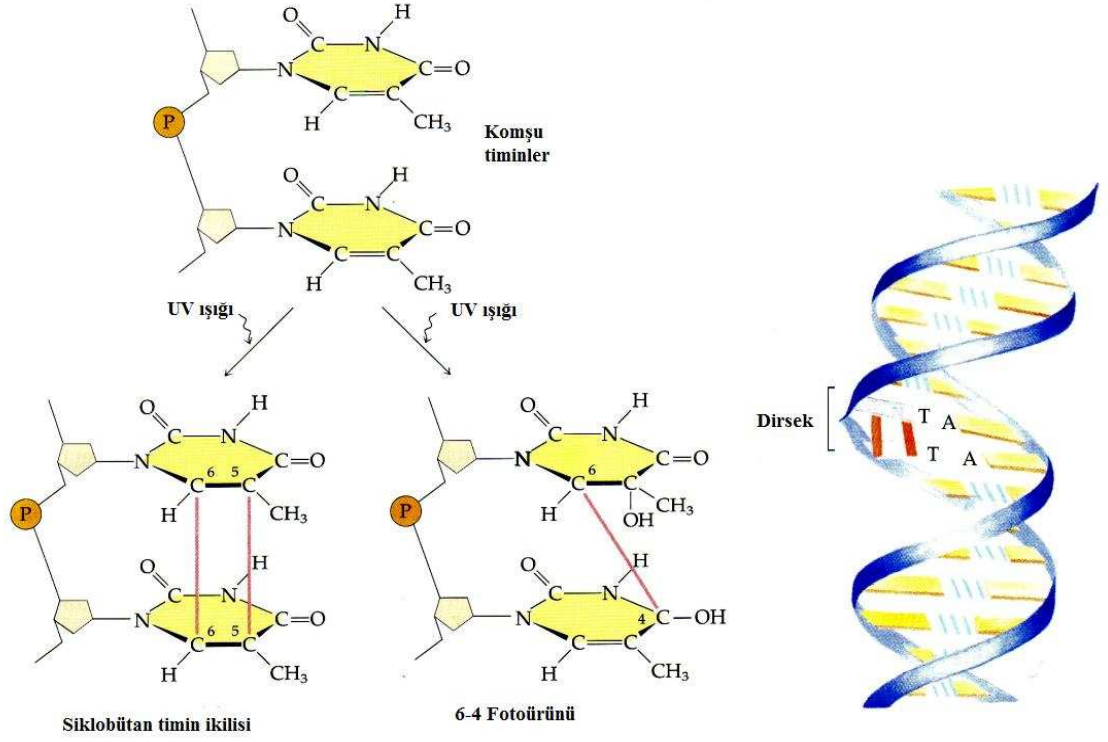
Oksidatif DNA hasarı organizmadaki mutasyonların temel kaynağı olup, 100'ün üzerinde oksidatif DNA ürünlerinin oluşmasına neden olmaktadır. İnsan hücresinde bir günde oluşan oksidatif DNA hasar düzeyi 10^4 olarak belirlenmiştir (Lu ve ark., 2001; Dizdaroglu, 1992). Biyolojik sistemlerde en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir. Yaşayan hücrelerde hem metabolik aktivite hem de diğer biyokimyasal reaksiyonlar sonucu reaktif oksijen türleri (ROT) oluşur (De Bont ve van Larebeke, 2004). ROT'lar başta mitokondri elektron taşıyıcı sistem olmak üzere, ksenobiyotik mekanizması, fagositik aktivasyon, inflamasyon, radyasyon, çeşitli sentez ve yıkım reaksiyonları sonucu meydana gelmektedirler (Loft ve Moller, 2006). Süperoksit anyon radikali (O_2^-), hidroksil radikali ($OH^\bullet$), nitrikoksit radikali ($NO^\bullet$), veya hidroperoksil ($HOO^\bullet$) gibi reaktif oksijen türleri hücrede metal katalizli dönüşümden sonra veya doğrudan DNA'da hasar oluştururlar (Boiteux ve Radicella, 1999; Ahsan ve ark., 2003). Bu tip DNA hasarı *oksidatif DNA hasarı* olarak tanımlanır. Bu hasarlar mutajenez, karsinogenez ve yaşlanma gibi biyolojik olaylarda etki gösterirler. Ayrıca akut ve yüksek oksidatif hasar, hücreler için sitotoksik olup, düşük düzeydeki kronik hasar ise hücre döngü kontrolünü etkilemektedir (Choy, 2001).

Serbest radikaller bütün hücresel makromoleküllerle reaksiyona girebilirler. Plazma ve organel membranlarında lipid peroksidasyonuna, aminoasit yan zincirleri oksidasyonuna neden olarak protein-protein bağlarının oluşmasına, protein yapısında ana zinciri okside ederek proteinlerin parçalanmasına neden olurlar (Wakamatsu ve ark., 2008). Ayrıca DNA'nın dört farklı bazında serbest radikallerin reaksiyonu sonucunda 20 veya daha fazla DNA katım ana ürünleri oluşmaktadır (Jaruga ve Dizdaroglu, 1996). Bu hasarlar hücrede normal oksidatif metabolizma sonucu ya da farmasötikler, endüstriyel kimyasallar, radyasyon gibi fiziksel etkenler nedeniyle de oluşabilirler (Ikehata ve Ono, 2011).

İyonize radyasyon sonucu meydana gelen serbest radikallerin DNA molekülü ile reaksiyonuyla şeker-fosfat bağı tek zincir veya çift zincir kırılmalarının oluşması da muhtemeldir. Serbest radikaller, özellikle de OH• radikali hemen hemen her moleküle karşı atak oluşturmakta ve hasar meydana getirmektedir. OH• radikali DNA'nın deoksiriboz parçalarını okside ve hidrolize ederek DNA kırıklarına karşı hassas olan apürinik ve apirimidinik bölgelerin oluşmasına neden olur (Choy, 2001). Bütün bu reaksiyonlar sonucu, DNA molekülünde meydana gelen bu hasarların doğru bir şekilde onarılmaması gen mutasyonlarına, DNA zincir kırıklarına ve DNA-protein çapraz bağlarının oluşumuna neden olmaktadır (Jaruga ve Dizdaroğlu, 1996; Choy, 2001).

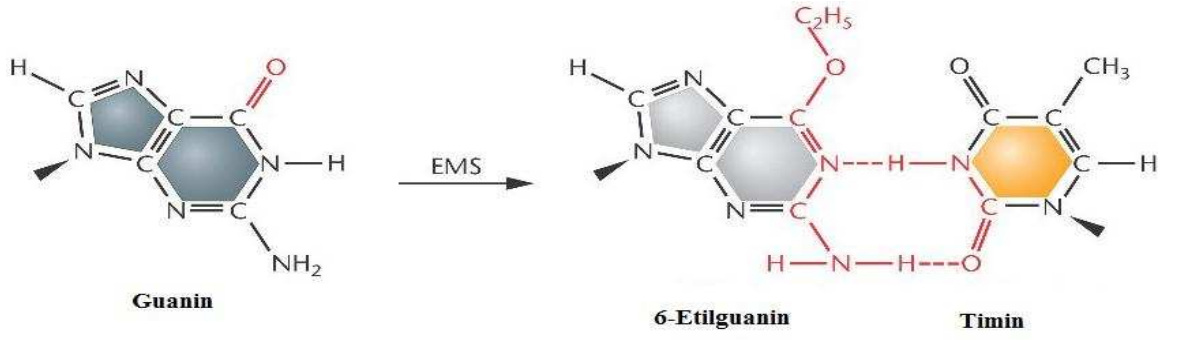
1.4.2. Çevresel Nedenlerden Kaynaklanan Hasarlar (İndüklenmiş Hasarlar)

Herhangi bir yapay faktörün etkisi sonucu oluşur. Genetik mutasyonları indükleyen, arttıran kimyasal veya fiziksel ajana *mutajen* denir. Baz analogları, alkilleyici ajanlar, akrinin boyalar ve UV'nin DNA üzerinde hasar etkileri bulunmaktadır (Montelone, 1998). İki etilen grubu UV ışık yardımıyla kondenslenir ve siklobütan halkası oluşturur. Hücre içinde ise nükleik asit üzerindeki komşu iki pirimidin bazı aynı tepkimeyle siklobütan-pirimidin dimerlerini meydana getirebilir. Dimerler aynı zamanda yakın iki pirimidinin 6 ve 4 pozisyonları arasında kovalent bağ oluşumu sonucu da meydana gelebilir. Yani bir pirimidinin C-6'sı ve komşu pirimidinin C-4'ü arasında gerçekleşir ve bu lezyon 6-4 fotoürünü olarak adlandırılır (Şekil.1.8). Ayrıca siklobütan pirimidin ikilisinin oluşumu DNA zincirinin yapısında kıvrılma ve dirsek yapılarına neden olur (Ikehata ve Ono, 2011; Nelson ve Cox, 2005).



Şekil.1.8. UV ışığı etkisi sonucu dimer oluşumu ve DNA'daki dirsek görünümü (Nelson ve Cox, 2005).

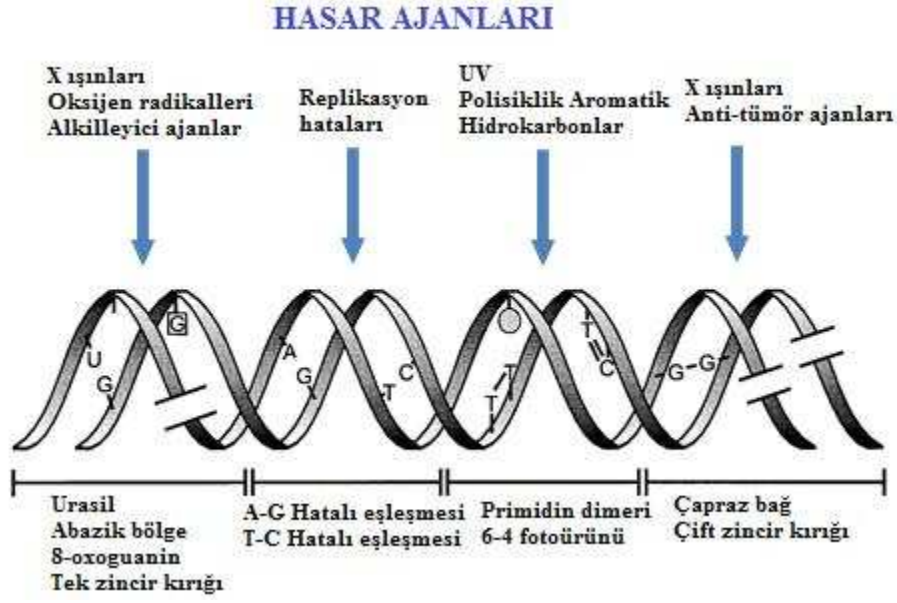
Alkilleyici ajanlar da DNA'nın, özgül bazlarının yapısını ve eşleşme özelliğini değiştiren kimyasallardır. Bazlarla reaksiyona girerek, bazlara metil ya da etil grupları eklerler. Örneğin dimetilsülfat guanini metilleyerek O^6 -metilguanini oluşturur, oluşan ürün sitozinle baz çifti oluşturmaz (Kondo ve ark., 2010). Alkilasyon sonrası GC $\rightarrow$ AT transisyonel mutasyonu gözlenir ve hatalı eşleşmeye neden olur. Sonuçta çerçeve kayması (frameshift) mutasyonu gözlenir (Christmann ve ark., 2003), (Şekil.1.9).



Şekil.1.9. Alkilenme ve replikasyon sırasında hatalı baz eşleşmesi (<http://www.nicerweb.com/bio3400/Locked/media/ch15/alkylating.html>).

Baz analogları (bromourasil, aminopürin) ise yapısal olarak pürin veya pirimidinlere benzeyen ve replikasyon esnasında normal bazların yerine geçerek DNA yapısına katılan kimyasallardır. Transisyonel mutasyona neden olurlar. Akridin oranj, proflavin, etidyum bromür gibi moleküller de DNA bazlarının arasına girerek sarmalın gerilmesine ve DNA polimerazın hata yaparak fazladan nükleotid eklemesine neden olurlar. DNA bazlarına bağlanan büyük moleküller (NAAAF), DNA zincirleri arasında çapraz bağlar oluşturan etkenler (psoralenler), DNA çift zincir kırıklarına neden olan kimyasallar da (peroksitler) DNA yapısını değiştiren etkenler içinde yer alıp, mutajenik onarım işlemlerini etkilerler. Çevresel mutajenler aynı zamanda apoptozu düzenleyen ve DNA tamir mekanizmasında rol oynayan ürünlerin sentezlendiği gen bölgelerinde de mutasyona neden olabilmektedirler (Montelone, 1998).

Özetle, insan hücresinde hergün oksidasyon, hidroliz, alkilasyon, radyasyon ve diğer toksik kimyasallardan kaynaklanan sayısız DNA hasarı meydana gelmektedir. Birçok endojen ve ekzojen kaynaklı ajanlar için DNA en önemli hedeflerden biridir (Şekil.1.10). Çeşitli baz hasarları ve şeker-fosfat bağı kırılmaları sonucu meydana gelen DNA hasarları replikasyon, transkripsiyon gibi hücresel programları engellemekte, genomik kararsızlığa ve hücre ölümüne neden olmaktadır (de Boer ve Hoeijmakers, 2000). Bu hasarlara karşı hücre önemli yanıtlar vermektedir. Bunların en önemli kısmını da DNA onarım mekanizmaları oluşturmaktadır.



Şekil.1.10. DNA’da hasara neden olan başlıca ajanlar, neden olduğu hasarlar (de Boer ve Hoeijmakers, 2000).

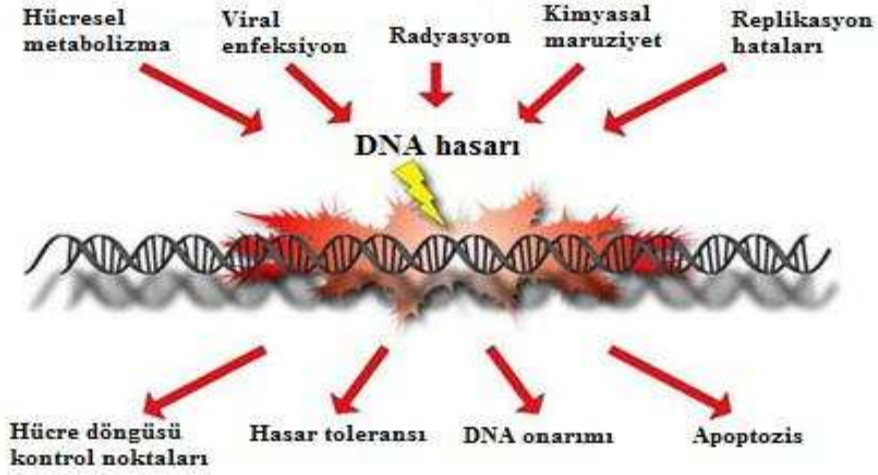
1.5. DNA Onarımı ve Önemi

Genomik DNA’nın bütünlüğü iyonize radyasyon, kimyasal bileşikler gibi çevresel ajanlar ve serbest radikaller gibi endojen ajanlar ile sürekli tehdit altındadır. Hücreler genomun bütünlüğünü korumak için çeşitli DNA onarım mekanizmalarına sahip olup, fonksiyonel durumu gereği ya hasarı onarır ve genomu düzenler ya da hasarın olumsuz etkilerini ortadan kaldırabilir (Friedberg ve ark., 1996).

Bakteriden insana kadar bütün organizmalar DNA onarım sistemine sahiptir ve DNA hasarlarını onarmak üzere evrimleşmişlerdir. Bu sistem onarım sürecinin belirlenmesi için kullanılmış olup, özellikle onarım genlerinin fonksiyonunu ve yapısını anlamak için mikroorganizmalarda çok iyi karakterize edilmiştir (Morita, 2010). 2001 yıllarının başlarında insan genom sekansının yayınlanmasıyla beraber, 125 DNA onarım enziminin ve bazı gen ürünlerinin DNA hasarına karşı hücresel cevapla ilişkili oldukları belirlenmiştir. 2005 yılı son verilerine göre yaklaşık 150 adet DNA onarım geni tanımlanmıştır. DNA onarım genlerindeki polimorfizmler protein fonksiyonunu ve bireyin hasarlı DNA’yı onarma kapasitelerini de

etkilemektedir. Bu nedenle bu genler birçok hastalığın mekanizmasının aydınlatılmasında önem taşımaktadır (Wood ve ark., 2005).

Hücrede DNA hasarına karşı verilen cevapta dört olasılık bulunmaktadır (Şekil.1.11). Bunlardan ilki; hasar tipine göre işlev gören onarım mekanizmalarının görev alması, ikincisi; hücre döngüsünün düzenlenmesi ve kontrol noktalarının (checkpoint) aktivasyonu sağlanarak hasarlı DNA'nın onarımı, üçüncüsü; *hasar toleransı* olarak adlandırılan ve hasarlı bölgenin onarılmadan önce replikasyon mekanizması tarafından tanınarak lezyonun üzerinden atlanmasıyla replikasyona devam edilmesi, dördüncü yol ise; ciddi olarak hasar görmüş hücrelerin elenmesidir (apoptozis) (Wang, 2001; Liebermann, 2008).



Şekil.1.11. Hücrede DNA hasarına karşı verilen cevaplar (<http://www.paterson.man.ac.uk/damage> adresinden ulaşılarak düzenlendi).

Canlı organizmalar genetik materyalin bütünlüğünü korumak için çeşitli DNA onarım mekanizmalarına sahiptirler. Bu mekanizmaları birbirine bağlayan olaylar zinciri genom stabilitesini koruyup, herhangi birinin işlev görmemesi hücre düzeyinde genomik kararsızlıkla, organizma düzeyinde ise genetik hastalıklar, kanser veya yaşlanma ile sonuçlanır (Christmann ve ark., 2003).

Hasarlı bölgenin DNA'dan uzaklaştırılmasında başlıca beş mekanizma görev almaktadır; baz-kesip çıkarma onarımı (BER), nükleotid-kesip çıkarma onarımı (NER), yanlış eşleşme onarımı (MMR), çift zincir kırıkları onarımı ve hasarın

doğrudan onarımıdır (Morita, 2010; Wang, 2001). Endojen kaynaklı yani kendiliğinden oluşan DNA hasarları genellikle BER mekanizması ile onarılırken, NER mekanizması DNA’ya yapısını bozan daha büyük hasarlarının onarılmasında görevli önemli yolaklardandır. DNA polimerazdan kaynaklanan küçük delesyonlar ve insersiyonlar gibi hatalar ise yanlış eşleşme onarımı ile tamir edilip, özellikle iyonize radyasyondan kaynaklanan çift zincir kırıkları da homolog rekombinasyonel onarım yolağı ile kontrol altına alınmaktadır (Wang, 2001).

1.5.1. Baz Kesip-Çıkarma Onarım Mekanizması

Baz kesip-çıkarma onarımında (BER; base excision repair) DNA’daki hasarlı bazın çıkarılıp uzaklaştırılmasında görevli olan DNA glikozilaz enzimidir. İyonize radyasyon, UV gibi ekzojen ajanlara maruz kalma sonucunda hücre içerisinde spontan olarak artan okside olmuş DNA bazları bu onarım yolağı için temel hasarlardandır. Endojen alkilleyici ajanlar ile alkilenen DNA ve nitrozamin gibi ekzojen karsinogenlerden kaynaklanan lezyonların da bu yolla onarımı gerçekleşir. Çizelge 1.5’de bu yolla uzaklaştırılan spesifik lezyonlar ve onarımda görevli olan DNA glikozilazlar yer almaktadır (Christmann ve ark., 2003). Çoğu organizma, genomu hasarlara karşı korumak için birden fazla glikozilaz üretir. Glikozilazlar, sadece glikozilaz aktivitesi olan tek fonksiyonlu glikozilazlar ve hem glikozilaz aktivitesi olan hem de hasarlı bölgeyi 3’ ucundan keserek uzaklaştıran iki fonksiyonlu glikozilazlar olmak üzere iki sınıfa ayrılırlar (Yang, 2008).

Çizelge.1.5. Spesifik lezyonlar ve insan DNA glikozilazları (Christmann ve ark., 2003).

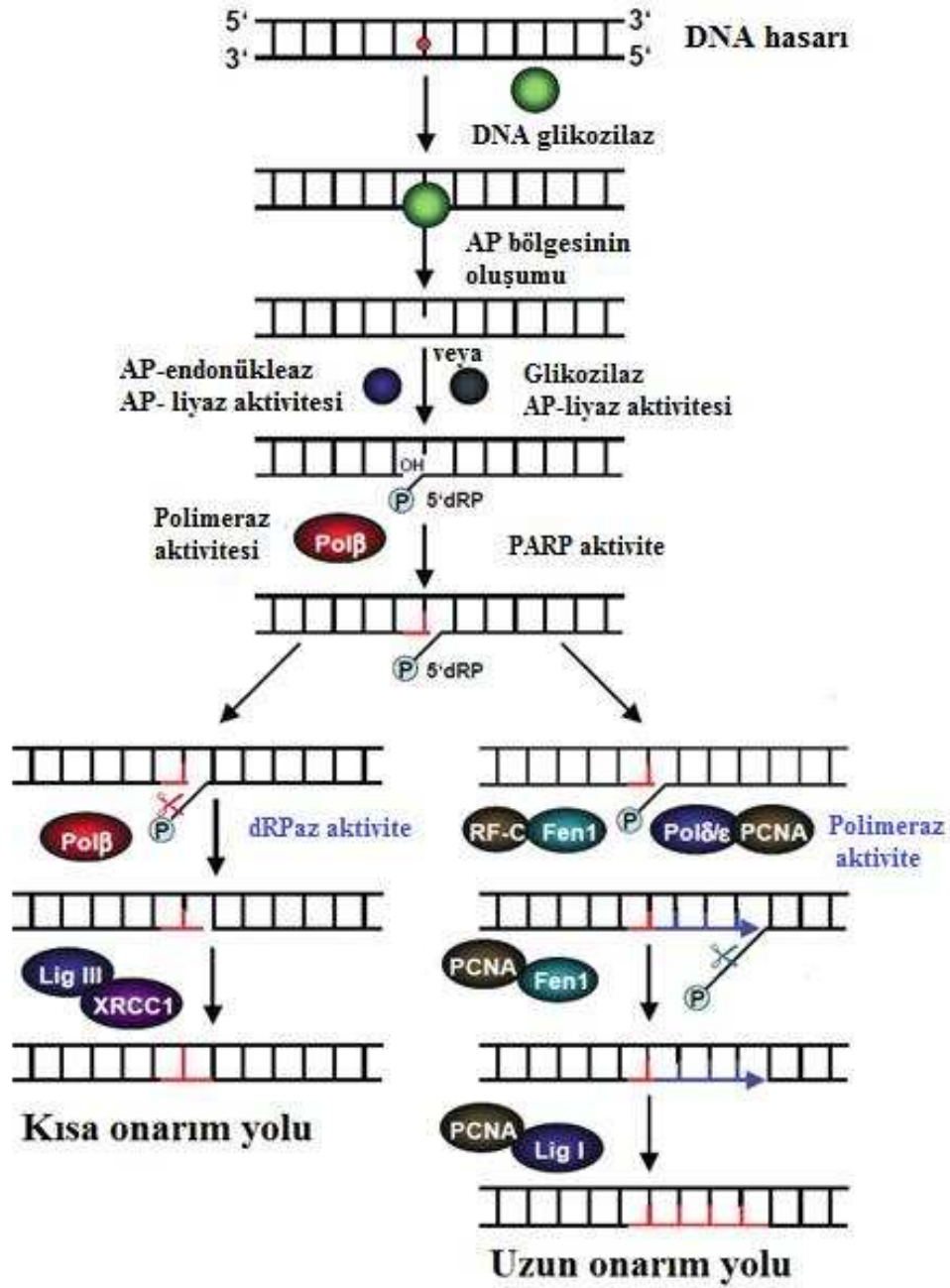
İnsan DNA glikozilazları	
Glikozilazlar	Onardığı spesifik lezyonlar
MBD4	T/G yanlış eşleşmesinde
MPG	3-MeA, 7-MeG, 3-MeG gibi modifiye bazların uzaklaştırılması.
MYH	8-OxoG ile yanlış eşleşen adenin bazının uzaklaştırılması.
NEIL1	Timin glikolun uzaklaştırılması.
NEIL2	5-hidroksiurasil; 5-hidroksisitozin
NEIL3	Parçalanmış, okside olmuş pirimidinlerin uzaklaştırılması
NTH1	Okside olmuş pirimidin türevlerinin uzaklaştırılması
SMUG1	Urasil'in uzaklaştırılması
OGG1	8-OxoG uzaklaştırılması
TDG	T/G yanlış eşleşmesinde
UNG	Urasil'in uzaklaştırılması

Bu onarım mekanizması ile replikasyon sırasında hataya neden olabilecek yanlış eşleşmiş bazların uzaklaştırılması ile onarım sağlanır. Okside olmuş 8-Oxo-G adeninle yanlış eşleşme yapan önemli mutajenik lezyonlardan biridir. N-β-glikozil bağlarının hidrolizi sonucu sıklıkla oluşan apürinik ve apirimidinik bölgeler (bir günde $>10^4$ oranında) potansiyel letal lezyonlardır. Modifiye olmuş bu bazlar ve AP bölgeleri baz-kesip çıkarma yolağı ile onarılır (Lindahl, 1990; Lindahl, 2001).

Modifiye olmuş baz uygun bir DNA-glikozilaz enzimi ile uzaklaştırılır. DNA glikozilaz enzimi değişmiş baz ile şeker-fosfat iskeleti arasındaki glikozidik bağa bağlanarak şeker ile baz arasındaki bağı koparır. Glikozilaz etkinliği sonucu AP bölgesi oluşur. Hasarlı DNA'ya AP bölgesinin 5' ucuna doğru AP endonükleaz tarafından çentik atılır ve 3'-OH grubu oluşturulur. AP bölgesi kesilip çıkarılarak

uzaklaştırılır ve DNA polimeraz tarafından 3'-OH ucu uzatılır ve DNA ligaz III bu süreci tamamlar (Friedberg, 1996; Tudek, 2007), (Şekil.1.12).

AP bölgesine APE endonükleaz ile oluşturulan çentik sonrası, tamir kısa ve uzun yolak olmak üzere iki alternatif yoldan devam etmektedir. Diğer taraftan uzun yolak onarımı, farklı polimerazlar (Pol δ veya Pol ϵ), prolifer edici hücre nükleer antijeni (PCNA), flap endonükleaz 1 (FEN 1), replikasyon faktörü (RF-C) ve ligaz I kullanarak farklı bileşenlerle tamamlanır (Tudek, 2007). Uzun onarım yolu ile kısa onarım yolu arasındaki kritik aşama, ilk nükleotidin eklenebilmesi için 5'-dRP bölgesinin uzaklaştırılmasıdır. Kısa yolak tek bir nükleotidin onarılmasını sağlarken, uzun yolak 2-10 nükleotidlik lezyonları onarmaktadır (Weiss ve ark., 2005; Tudek, 2007). XRCC1 onarım enzimi, baz çıkarma onarımının kısa yolağında görevli olup, BER mekanizması ve DNA da tek zincir kırığının onarılmasında diğer proteinler ile etkileşerek merkezi görev üstlenir (Hung ve ark., 2005b). XRCC1 DNA glikozilaz, AP-endonükleaz ve PARP (poli ADP-riboz polimeraz) enzimleri tarafından onarıma dahil edilir ve ligasyon sonuna kadar bütün süreci koordine ederek düzenler (Tudek, 2007).



Şekil.1.12. Baz kesip-çıkarma onarım mekanizması (BER) (Christmann ve ark., 2003).

1.5.2. Nükleotid Kesip-Çıkarma Onarım Mekanizması

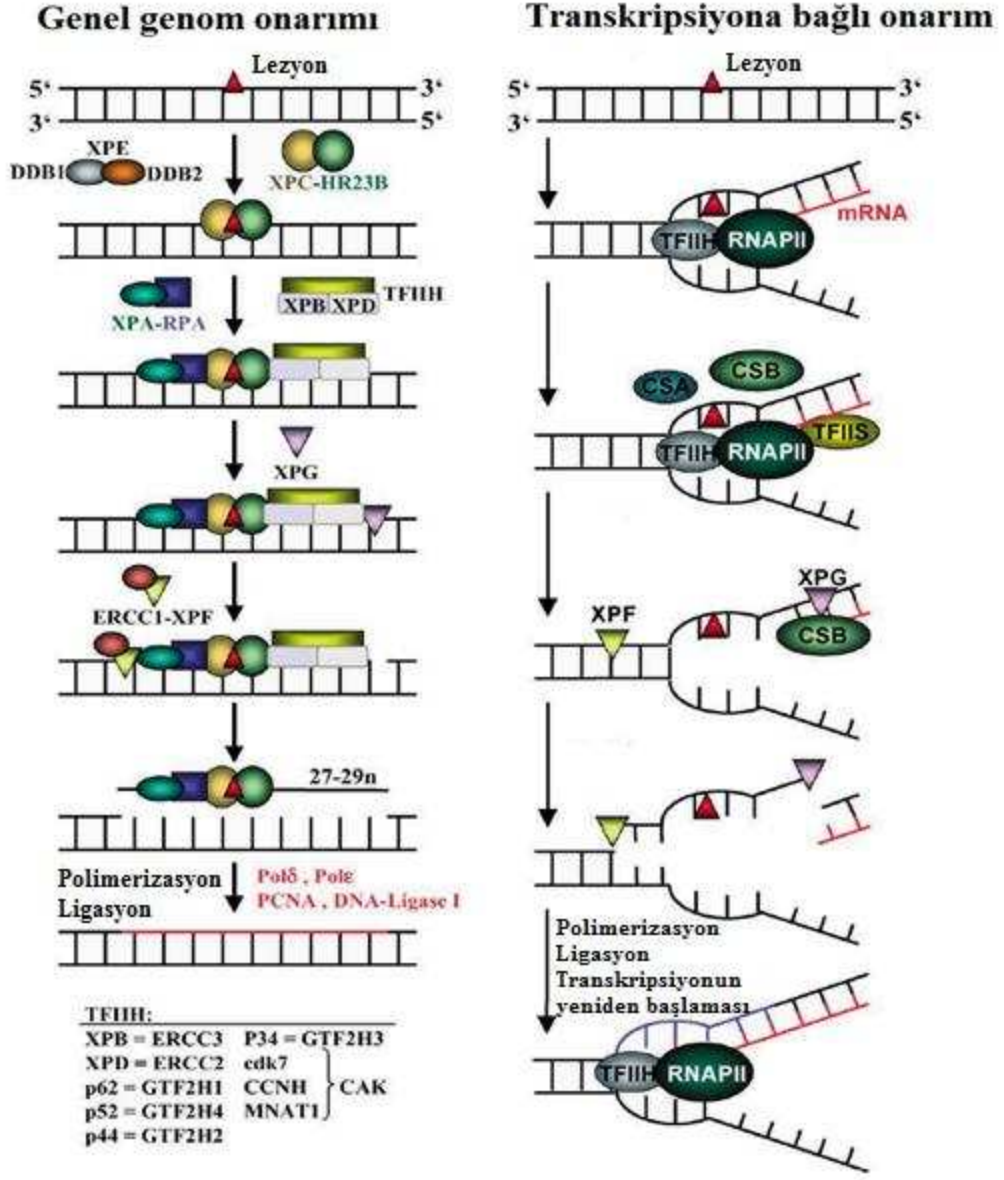
Nükleotid kesip-çıkarma onarım (NER: Nucleotide excision repair) yolağı büyük DNA lezyonlarının onarılmasında etkili olmasından dolayı önem taşımaktadır. UV ile indüklenmiş pirimidin dimerleri, 6-4 fotoürünleri ve aflatoksin, benzo(a)piren ve diğer toksik ajanların neden olduğu büyük kimyasal kalıntılar bu mekanizma ile onarılır (Friedberg, 2001; Hanawalt, 2001; Yang, 2008). Polisiklik aromatik hidrokarbonlardan kaynaklanan büyük lezyonlar, sisplatin gibi kemoterapötik ajanlardan kaynaklanan DNA-çapraz bağlarının da bu yolla onarımı sağlanır. Küçük baz hasarlarını içeren lezyonlar BER yolağı ile onarılırken, NER mekanizması da bu hasarların onarılmasında BER yolağına destek veren ikinci bir yoldur. Hasarlı bazların, lezyonu içeren oligonükleotidle birlikte uzaklaştırılması nedeniyle bu onarım formu, nükleotid çıkarma onarımı olarak bilinir (de Boer, 2000).

NER mekanizmasında lezyonun belirlenmesinde, lezyonun yer aldığı çift sarmalın açılarak hasarlı zincirin her iki ucunun kesilmesinde yaklaşık 30 protein görev almaktadır. NER; genel genom onarımı (GGR: global genomic repair) ve transkripsiyona bağlı onarım (TCR: transcription-coupled repair) olmak üzere iki onarım mekanizması içermektedir (Şekil.1.13). 6-4 fotoürünü GGR ile onarılırken, pirimidin dimerlerinin ise TCR ile onarımı gerçekleşmektedir (Hanawalt, 2002).

GGR onarım yolağında; DNA hasarı XPC/HR23B kompleksi tarafından tanınır. XPB (3'→5') ve XPD (5'→3') helikazlarını barındıran transkripsiyon faktörü TFIIH ve XPG hasarlı bölgeye getirilir. XPB ve XPD ile DNA'nın açılmasının ardından hasar XPA ile doğrulanır ve XPF/ERCC1, XPG endonükleazlar tarafından kesilir, serbest bırakılan 24-32 nükleotidlik hasarlı oligonükleotid XPC/HR23B proteinine bağlı olarak ortamdan uzaklaştırılır. Oluşan boşluk daha sonra PCNA (çoğalma hücre nükleer antijeni), ile ilişkili olarak DNA polimeraz tarafından doldurulur ve ligaz ile bağlantı tamamlanır (de Boer, 2000; Cooper ve Hausman, 2006).

TCR onarım yolağında; RNA polimeraz transkribe olan DNA ipliğinde hasarla karşılaştığında sentezi durdurur ve transkripsiyona bağlı onarım yolu ile hasarın

onarılmasında görev alır. Duran RNA polimeraz, CSA ve CSB proteinleri tarafından tanınır ve hasarlı bölgeye TFIIH, XPG proteinlerinin katılımı sağlanır. Onarım daha sonra genel nükleotid-çıkarma onarım mekanizması ile gerçekleştirilir (Cooper ve Hausman, 2006).

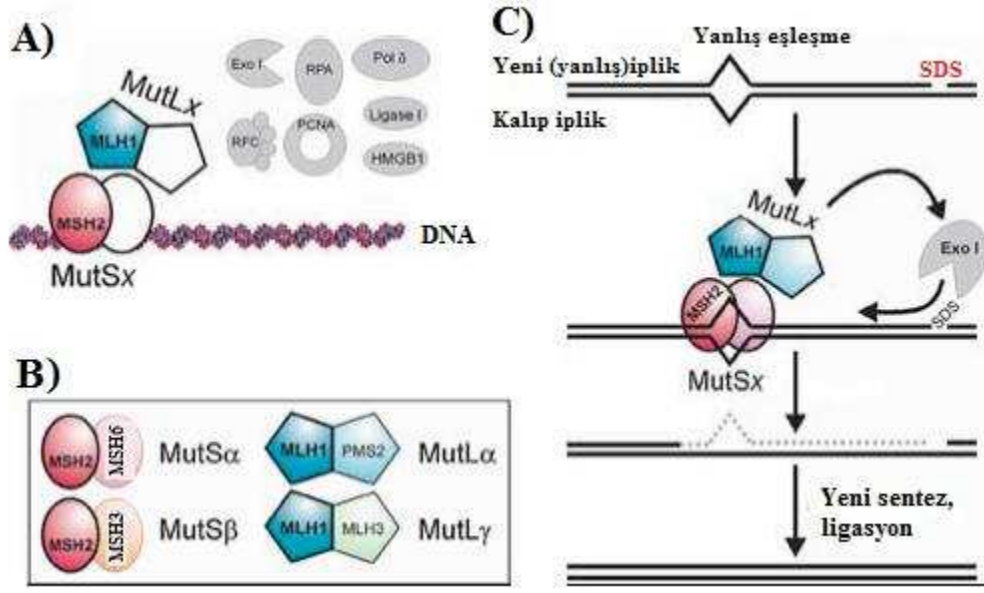


Şekil.1.13. Nükleotid kesip-çıkarma onarım mekanizması (NER) (Christmann ve ark., 2003).

1.5.3. Yanlış Eşleşme Onarım Mekanizması

Yanlış eşleşme onarımı (MMR: mismatch repair), DNA replikasyonu sonucu genomun stabilitesini sağlayan önemli onarım sistemidir. Birçok yanlış eşleşmiş baz, DNA polimerazın kendi yanlışını düzeltme aktivitesi ile uzaklaştırılır. Bu sistem DNA'da gözden kaçan yanlış eşleşmeleri, replikasyon sonrası kontrol altına alan önemli protein kompleksinden oluşmaktadır (Jun ve ark. 2006; Christmann, 2003). Özellikle baz deaminasyonu, oksidasyonu, metilasyonu ve replikasyon hatası sonucu oluşan yanlış eşleşmelerin onarılması, bu sistem ile gerçekleşmektedir. MMR mekanizması için G/T, G/G, A/C, C/C yanlış eşleşmeleri başlıca onarılması gereken lezyonlardır (Wang, 2011), (Şekil.1.14).

E.coli'de yanlış eşleşme 7 proteinden oluşan bir sistem tarafından belirlenir. Bu proteinler MutS, MutL, MutH, UvrD, ekzonükleaz I, SSB ve DNA polimeraz III'dür. Onarım mekanizması yeni replike olan DNA'yı henüz metillenmemiş olmasıyla atasal iplikten ayırt ederek yanlış eşleşmiş bazı bulur ve onarır. Yani sentezlenmiş zincirdeki GATC dizilerinin geçici metillenmemiş durumu, bu dizilerin yakınındaki yanlış eşleşmelerin ayırt edilmesine olanak sağlar. Ökaryotlar *E.coli*'de bulunan proteinlere homolog olan proteinlere sahiptir (Chu, 2000; Yasbin, 2002). İnsanda MutS homolog heterodimeri MSH2 ve MutL homolog heterodimeri olan MLH1 bulunurken MutH'nin homologu bulunmaz. Bunlar insan yanlış eşleşme tamirinde replikasyon faktörlerine bağlanırlar. PCNA, replikasyon faktörü C (RPC), ekzonükleaz I (Exo I), replikasyon faktörü A (RPA), HMGB1, polimeraz δ ve DNA ligaz yanlış eşleşme tamirinde görevli diğer proteinlerdir (Jun ve ark., 2006). Ancak ökaryotlarda yeni sentezlenen zinciri ayırmak için *E.coli*'de kullanılan metilasyon işlemi yerine kullanılan mekanizma henüz tam aydınlatılamamıştır. Replikasyon sırasında meydana gelen tek zincir kırıklarının varlığı veya MSH2 ve MLH1'in replikasyon sistemi ile birleşmesinin, onarılacak ipliğin belirlenmesinde etkili olduğu düşünülmektedir (Christmann ve ark., 2003; Plotz ve ark., 2006), (Şekil.1.14).



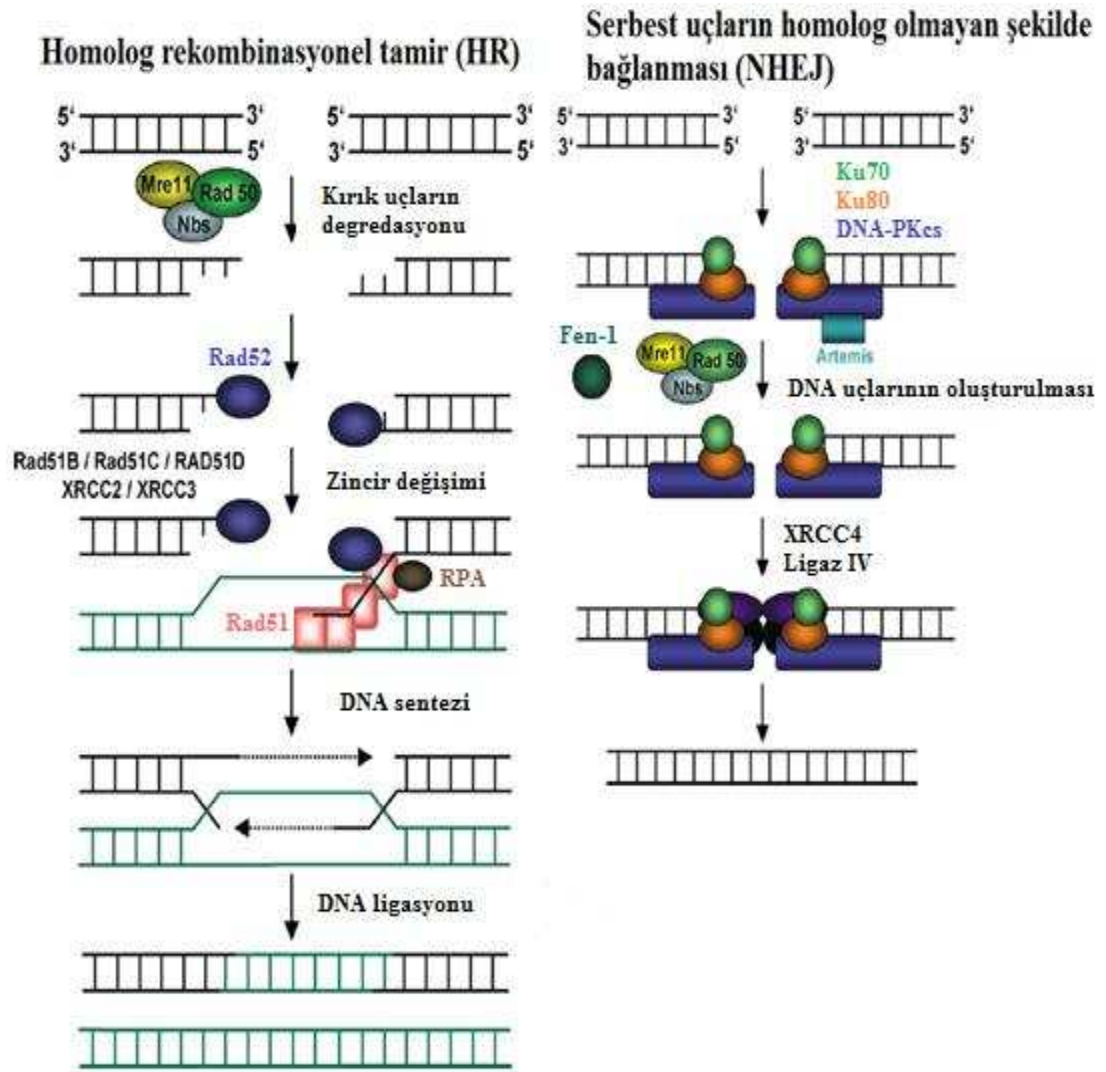
Şekil.1.14. İnsan yanlış eşleşme tamir mekanizması (MMS). A) MMS reaksiyonunda genel dizilim B) MMS'de MutS ve MutL protein dimeri ve diğer proteinler. C) İnsanda yanlış eşleşme tamiri (Plotz ve ark., 2006).

1.5.4. Çift Zincir Kırıklarının Onarımı

DNA çift zincir kırıkları serbest radikaller ve iyonize radyasyon gibi ekzojen kaynaklı nedenlerden meydana gelebilmektedir. DNA'da çift zincir kırıkları genotoksik etkilere ve hücre ölümüne neden olabilmektedir. Bu nedenle, çift zincir kırıklarının onarımı kromozomal parçalanmaları, translokasyon ve delesyonları engellemesinden dolayı önem taşımaktadır (Kanaar ve ark., 1998). Çift zincir kırıklarının onarılmasında 2 yol vardır. İlki; homolog rekombinasyonel DNA tamiri (HR: homologous recombination), diğeri ise serbest uçların homolog olmayan şekilde bağlanması (NHEJ: Non-Homologous End-Joining)'dır. Bu onarım yolları hücre döngüsü fazlarına bağlı olarak gerçekleşir. NHEJ başlıca G0/G1 fazında, HR ise S ve G2 fazlarında meydana gelmektedir (Johnson ve Jasin, 2000; Christmann ve ark., 2003), (Şekil.1.15).

HR'da, MRE11-RAD50-NBS1 kompleksinin nükleaz aktivitesi ile kırık uçlar degradasyona uğrar. RAD52 proteini 3' uçlara bağlanır. RAD51 rekombinasyon

oluşturmak üzere kardeş kromatid zincirinin hasar bölgesine invazyonunu sağlar. Bu zincir kalıp olarak kullanılarak sentez yapılır ve hasar onarılır. NHEJ'de ise, Ku 70-Ku 80 kompleksleri DNA kırık uçlarına bağlanırlar. DNA bağımlı protein kinaz aktive olarak diğer proteinlerin hasar bölgesine gelmelerini sağlar. Bu protein komplekslerinin formasyonu DNA ligaz IV-XRCC4 kompleksinin kırık uçları bağlamasını sağlar ve onarım tamamlanır (Kanaar ve ark., 1998; Rai ve ark., 2007).



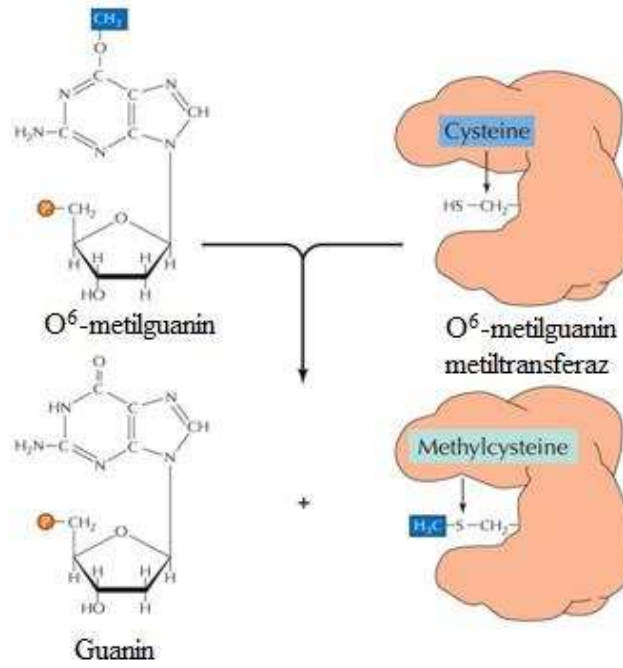
Şekil.1.15. Çift zincir kırıklarının onarım mekanizması (Christmann ve ark., 2003).

1.5.5. Hasarın Doğrudan Onarımı

Organizmalar iki tane önemli doğrudan onarım mekanizmasına sahiptirler. Birincisi; UV'nin neden olduğu pirimidin dimerlerinin DNA fotolizazlar tarafından doğrudan onarılması, ikincisi ise; O⁶-metilguaninin doğrudan tamirinin metilguanin DNA-metiltransferaz ile gerçekleştirilmesidir (Morita ve ark., 2010).

UV ışığı ile DNA ipliği üzerinde komşu iki pirimidinin 5. ve 6. C'ları arasındaki çift bağın doyurulması sonucunda ve iki pirimidinin siklobütan halkası ile birleşmesi ile oluşan pirimidin dimerleri de bu yolla doğrudan tamir edilebilir. Fotolizazlar bu kusurları yok etmek için absorblanan ışıktan elde edilen enerjiyi kullanırlar. FADH kromofor olarak görev alan kofaktördür. Siklobütan halka yapısının kırılması için gerekli olan enerji görünür ışıktan sağlandığı için, bu süreç *fotoreaktivasyon* olarak adlandırılır. Bununla birlikte fotoreaktivasyon genellenemez, evrimsel süreçte bakterilerde bu onarım sistemi korunmuştur (Cooper ve Hausman, 2006). Ancak insan hücrelerinde UVB radyasyonla (290-320 nm) uyarılmış pirimidin dimerlerinin oluşumları kesip-çıkarma tamir sistemi ile düzeltilmektedir (de Boer, 2000).

Alkilleyici ajanların etkisiyle oluşan O⁶-metilguaninin tamiri ise O⁶-metilguanin DNA-metiltransferaz ile gerçekleşir. Bu protein O⁶-metilguaninin metil grubunu kendi sistein birimlerine aktarır. Metil grubu bu proteini metilleyerek inaktif duruma getirir. Tamir eylemiyle birlikte inaktif olan bu enzim kendi geninin ve tamir işlevine karışan diğer birkaç enzimin genlerinin ifadenmesini artırır (Şekil.1.16). Doğrudan onarım reaksiyonunu katalizleyen enzimler, insanlar dahil ökaryot ve prokaryotlarda yaygındır (Sancar ve ark., 2004; Lieberman, 2008).

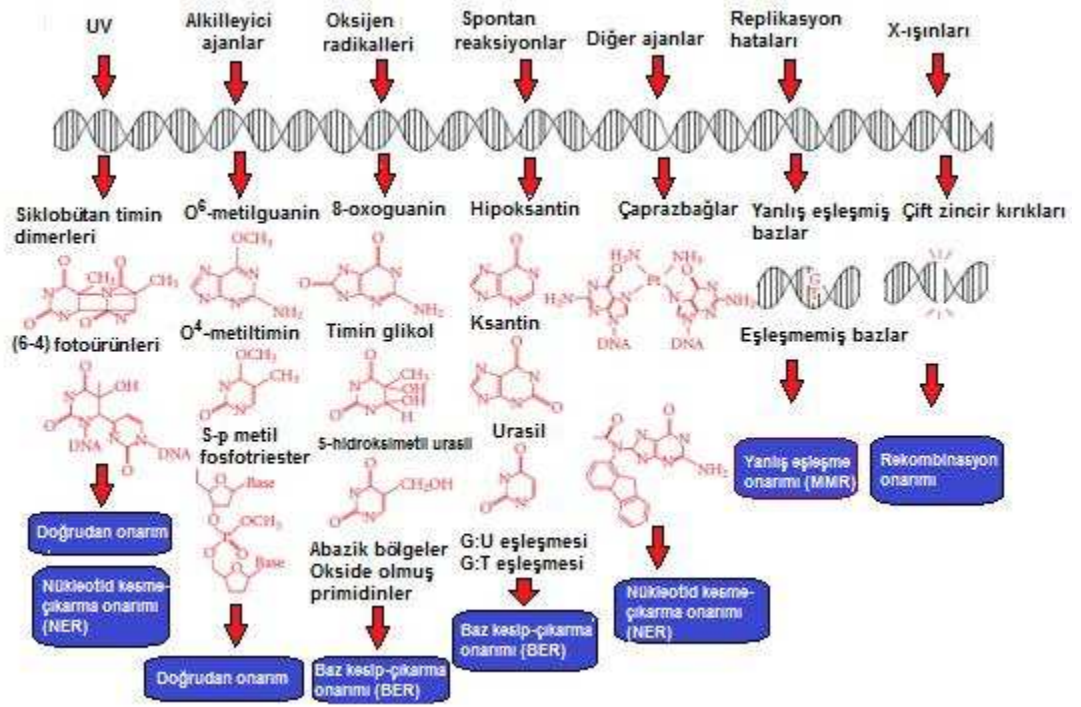


Şekil.1.16. O⁶-metilguaninin tamir mekanizması (Cooper ve Hausman, 2006).

Hasarın doğrudan uzaklaştırılması ve kesip çıkararak onarım sistemleri DNA hasarını replikasyondan önce onarırlar. Bu sistemler başarısız olursa, hücrelerin replikasyon çatalında hasarlı DNA'yı onarabileceği alternatif mekanizmaları bulunmaktadır. DNA'da oluşan birçok lezyon tipi DNA polimerazın normal işleviyle kopyalanamaz, bu nedenle replikasyon bu hasarlı bölgeye geldiğinde durur. Hücreler, DNA hasarlı bölge üzerinden replikasyonu devam ettirebilen birkaç özelleşmiş DNA polimeraz ile replikasyon sonucu doğru olmayan bazların eklenerek hasarın üstesinden gelmeye çalışır. Bu polimerazlar normal replikatif DNA polimerazlara göre, hata oranları 100 ile 10.000 kez daha yüksek olup DNA polimerazlar için karakteristik olan 3' den 5' yanlışını düzeltme aktivitesine sahip değildir. Bu nedenle DNA hasarının bu şekilde üstesinden gelmeye ise *hata-eğilimli onarım* adı verilir (Cooper ve Hausman, 2006).

Hücreler çeşitli çevresel ve endojen ajanların neden olduğu DNA hasarlarını onarmak için birçok mekanizmaya sahiptir (Şekil.1.17). Ancak, hücre DNA hasarlarına karşı çaresiz kaldığı durumlarda ise programlanmış ölüm sürecine girer.

DNA bazlarının alkilasyonu, DNA çapraz bağları, büyük lezyonlar ve DNA çift zincir kırıkları hücrenin apoptozise gitmesine neden olmaktadır. Sonuç olarak; hücreler DNA hasarlarına karşı DNA onarımına, hasar toleransına, hücre kontrol noktalarına ve apoptotik yollara sahiptir. Herhangi birinin işlev görmemesi hücre düzeyinde genomik kararsızlıkla, organizma düzeyinde ise genetik hastalıklar, kanser veya yaşlanma ile sonuçlanır (Lieberman, 2008).



Şekil.1.17. Değişik nedenlerden kaynaklanan DNA lezyonları ve başlıca onarım mekanizmaları (Morita ve ark., 2010).

1.6. Genotoksik Etki ve Belirlenmesi

Genetik toksikoloji çalışmaları çevresel, mesleki, farmasötik ve tarımsal kimyasalların mutajenisitesini belirlemek için otuz yıldan bu yana devam etmektedir. Bu alandaki birçok çalışma yeni metodların gelişimi, prosedürlerin standardizasyonu, mutajen veritabanı oluşturma ve bu test sonuçlarının sağlanması üzerine

odaklanmıştır. Yıllardır süre gelen bu çalışmalardan sonra modern, rutin genetik toksikoloji testleri mutajenlerin belirlenmesinde güvenilir araçlar haline gelmiştir.

DNA dizilerindeki kalıcı değişiklikler *mutasyon* olarak adlandırılır ve gen fonksiyonunda kalıtsal değişimlere neden olabilir. Bu nedenden dolayı, DNA dizilerinde değişime neden olan toksik ajanlar *genotoksik* olarak adlandırılır (Choy, 2001). Gamet hücrelerinde meydana gelen bir mutasyon sonraki nesillere aktarıldığı için önemliken, somatik hücrelerdeki mutasyon kanser nedeni olabildiği için önemlidir. Tipik bir memeli hücresi genomu, 24 saatlik bir zaman dilimi içinde binlerce hata biriktirir. Bununla birlikte, DNA tamirinin bir sonucu olarak bu hataların binde birinden daha azı mutasyona neden olmaktadır. Mutasyonlar zararlı olabilmekle beraber, organizma için bazı yararlı sonuçları da sözkonusu olabiliyor. Ayrıca genetik varyasyonların kaynağı olmasından dolayı da genetikçiler için önemli bir konu olup, genlerdeki mutant aleller çalışmalar için ilgi çekici bir duruma gelmiştir (Montelone, 1998).

Pestisitler, metaller, PAH'lar, çözücüler gibi kimyasallara akut veya kronik maruziyetin, hedef bölgelerde belirgin toksisiteye neden oldukları gösterilmiştir. Çeşitli kimyasal ve fiziksel ajanların bu etkileri *genotoksik* olarak adlandırılır. Genotoksikitenin yol açtığı mutasyonlar makrolezyonlar (sayısal ve yapısal) ve mikrolezyonlar (çerçeve kayması, baz çifti değişimi) şeklinde sınıflandırılabilir (Nussbaum ve ark., 2005). Bu kimyasallar DNA yapısında değişiklikler oluşturma ya da kırıklar meydana getirmesinden dolayı hücresel hasarlara neden olmaktadır. Çevresel ve çalışma ortamında mesleki olarak bu kimyasallara maruz kalmanın genetik etkisini ve çeşitli hastalıklarla ilişkisini araştırmak amacıyla genotoksikite testleri kullanılmaktadır (Keshava ve Ong, 1999). Mutasyonların oluşmasında genotoksik hasarın önemli bir faktör olmasından dolayı bu amaçla geliştirilen çeşitli genotoksikite testleri mevcut olup, bu hasarları belirleyebilecek biyogöstergelerin geliştirilmesine karşı ilgi giderek artmaktadır. Ayrıca genetik toksisite testleri potansiyel karsinogen etkili endüstriyel kimyasalların ayırtedilmesini, ilave çalışmalarla kimyasalları önem sırasına göre düzenlemek, spesifik kimyasalların neden olabileceği genetik etki derecesini karakterize ederek toksisite ve karsinogenite

test sonuçlarının yorumlanmasını sağlamaktadır. Bunlardan en sık kullanılanlar; sayısal ve yapısal kromozomal anomalilerini belirlemek amacıyla uygulanan kromozomal aberasyon testi (CA), kardeş kromatid değişimi (SCE), floresan in-situ hibridizasyon (FISH), mikro çekirdek (MN), comet (tek hücre jel elektroforezi) yöntemi şeklinde sıralanabilir (Valverde ve Rojas, 2009; Choy, 2001).

1.6.1. Comet Yöntemi [Tek hücre jel elektroforezi (Single cell gel electrophoresis, SCGE)]

Tek hücre jel elektroforezi (Single Cell Gel Electrophoresis, SCGE) veya comet yöntemi, DNA hasarını ölçmek ve analiz etmek amacıyla kullanılan hızlı, basit, duyarlı ve yaygın kullanım alanına sahip bir yöntemdir. Ayrıca genotoksisite testi olarak mutajenite ve karsinojenite tayini için modifiye edilebilmektedir (Tice, 2000). İlk defa 1978 yılında Rydberg ve Johanson tarafından DNA sarmal kırıklarını ölçmek amacıyla kullanılmıştır. Daha sonra Östling ve Johanson tarafından 1984 yılında bu teknik nötral şartlarda uygulanıp geliştirilmiş ancak, nötral şartlarda DNA sarmalı denatüre edilemediği için sadece DNA çift zincir kırıkları saptanabilmiştir (Valverde ve Rojas, 2009; Collins ve ark., 2008). 1988 yılında Singh ve arkadaşları comet yöntemini alkali lizing koşullarında değişiklikler yaparak uygulamışlar ve günümüzde alkali comet yöntemi, küçük bazı değişikliklerle yaygın olarak kullanılmaktadır (Mussali-Galante ve ark., 2005).

Alkali comet testi genetik toksikolojiden, ekotoksikolojiye, yaşlanmadan, klinik araştırmalara kadar toksikolojide yaygın kullanım alanına sahiptir (Dusinska ve Collins, 2008). Günümüzde sıklıkla genotoksik etkinin biyogöstergesi olarak pek çok maruziyetin incelenmesinde kullanılmaktadır. Comet tekniği, periferik kan, hücre kültürleri, ağız mukoza hücreleri, solit tümör, kanser hücreleri, sperm gibi birçok materyal üzerinde çalışmayı sağlayan çok yönlü bir tekniktir (Nandhakumar ve ark., 2011). Bu yöntem, tek ve çift sarmal kırıkları, oksidatif DNA baz hasarı, DNA-DNA/ DNA-protein/ DNA çapraz bağları gibi DNA hasarının farklı formlarının ve DNA onarımının belirlenmesi için modifiye edilerek avantajı arttırılmıştır (Moller,

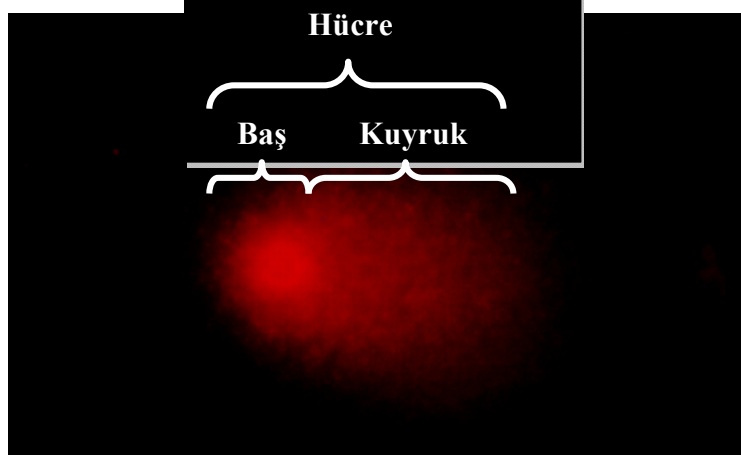
2006; Faust ve ark., 2004), (Çizelge.1.6). Birçok genotoksisite testlerinde olduğu gibi comet testinde de sıklıkla periferik kan lenfositleri kullanılmaktadır. Lökositlerin kolay ve çok sayıda elde edilmesi, hücre kültürüne ihtiyaç duyulmaması, diploit ve hepsinin hücre döngüsünde aynı fazda (G0) yer almasından dolayı comet testi dahil biyogösterge çalışmalarında tercih edilen materyaldir (Collins ve ark., 2008).

Çizelge.1.6. Tek hücre jel elektroforezi (Single cell gel electrophoresis, SCGE) modifikasyonları (Nandhakumar ve ark., 2011).

SCGE formları	Modifikasyonlar	Uygulama alanı
Alkali comet testi	pH <13	Çift ve tek zincir kırıkları
Nötral comet testi	pH =7	Tek zincir kırıkları
Comet testinin lezyon spesifik enzimleri ile kullanımı	Endonükleaz III ve formamido pirimidin DNA glikozilazların kullanımı	Okside olmuş pürin, pirimidin ve UV'den kaynaklı dimerlerin görüntülenmesi
Bromodeoksiüridin ile işaretleme	Replikasyon sürecinde işaretleme	Hücrelerin S fazı ve diğer fazlardaki farkının belirlenmesi
DNA onarımında ara ürünlerin belirlenmesi	Hücrelerin UV inkübasyonu	UV'nin hasar etkisini belirlemek
Floresan in situ hibridizasyon-comet	FISH problemleri uygulanır	Comet kuyruğunda belli kromozoma özgü DNA'nın belirlenmesi

Bu yöntemde temel prensip, hücrelerin izole edildikten sonra agar içine gömülerek mikroskopik lamlara yayılması ve lize edilmesi (DNA'nın çıplak hale getirilmesi), sonra da elektroforeze bırakılıp floresan boya ile boyanmak suretiyle değerlendirilmesidir (Moller ve ark., 2000). Hasarsız hücrelerde çekirdek parlaktır ve flüoreasan şiddeti baş tarafta yoğundur. Çeşitli genotoksik ajanlarla hasarlanmış DNA'lar onarım mekanizması ile tamir edilmemişse, artan DNA hasarı sonucunda hücrenin kromozomal DNA'sı, hücre çekirdeğinden elektroforezin anoduna doğru hareket ederek, kuyruklu yıldız benzeri şekil oluşturur ve floresan kuyruk bölgesinde daha yoğun gözlenir (Şekil.1.18). Kuyruktaki floresan yoğunluğu hasarın derecesi ile paralellik gösterir. En fazla kullanılan alkali elektroforezde, tek sarmal DNA kırıkları

ve alkali pH'da sarmal kırıklarına dönüşen lezyonlar (alkali-labil bölgeler) belirgin hale gelir (Dusinska ve Collins, 2008).



Şekil.1.18. Comet Görüntüsü; hücrenin kromozomal DNA'sının, hücre çekirdeğinden elektroforezin anoduna doğru hareket etmesiyle oluşan kuyruklu yıldız benzeri görüntü.

Comet testinde hasar düzeyinin değerlendirilmesinde iki yol vardır: İlki gözle değerlendirme, ikincisi ise bilgisayar destekli comet görüntü analiz tekniği ile hasarın sayısallaştırılmasıdır (Azqueta ve ark., 2009). Gözle değerlendirmede; hasarsız hücreler yuvarlak, ortası parlak olarak görülür ve bu tip hücreler non-migration (NM) olarak değerlendirilir. DNA hasarı oluşmaya başlamışsa, DNA kırıkları çekirdek dışına göç etmeye başlar ve hücreler düzensiz kenarlı görünür ve bu tip hücreler low migration (LM) olarak değerlendirilir. Hasar daha da artarsa, hücrelerde kuyruklu yıldız gibi bir şekil alır ve bu tip hücreler de high migration (HM) olarak değerlendirilir. Gözle değerlendirme ucuz, kolay ve etkili bir değerlendirme şeklidir (Collins, 2002).

Comet tekniği ile DNA hasarının kantitatif olarak tayin edilmesinde DNA göçü gözle değerlendirilebileceği gibi; bilgisayar destekli '*comet görüntü analiz*' tekniği ile sayısallaştırılabilmektedir ve kuyruk uzunluğu (Tail lenght = TL), kuyruk yoğunluğu (Tail intensity = TI) ve kuyruk momenti (Tail moment = TM) lenfosit DNA hasarının göstergesi olarak kullanılan en yaygın parametrelerdendir (Collins ve ark., 1997).

Organik çözücüler (PAH'lar gibi), toksik metal, X-Işınları ve pestisit gibi genotoksik ajanlara mesleki maruziyetin genotoksik etkisinin belirlenmesinde comet testi biyogösterge çalışmalarının önemli bir kısmını oluşturmaktadır. (Faust ve ark., 2004). 1990'lı yılların başlarında comet testinin mesleki maruziyetin belirlenmesinde önemli olabileceği düşünülmüştür. Yapılan çalışmaların büyük bir kısmında, maruz kalınan DNA hasar ajanlarının pozitif etkisi belirlenmiştir. Comet testi ile bulunan pozitif sonuçlar, bazı çevresel ya da mesleki ajanlarla ilişkili olan biyolojik etkilerin göstergesi olarak değerlendirilmiştir (Moller, 2000).

1.6.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction, PCR)

PCR (Polymerase Chain Reaction) yönteminin geliştirilmesi moleküler biyoloji üzerinde geniş bir etkiye sahip olup, ilk defa Cetus firması araştırmacısı Kary Mullis tarafından bulunmuş ve 1993 yılında kimya dalında nobel ödülünü getirmiştir (Goodwin ve ark., 2007).

PCR, hedef DNA dizilerinin enzimatik olarak çoğaltılması şeklinde tanımlanan, in vitro bir yöntemdir (Goodwin ve ark., 2007). PCR analizi; moleküler biyoloji, toksikoloji, kriminoloji, farmakoloji, sistematik-evrim gibi birçok alanda kullanılmaktadır (Arı, 2008).

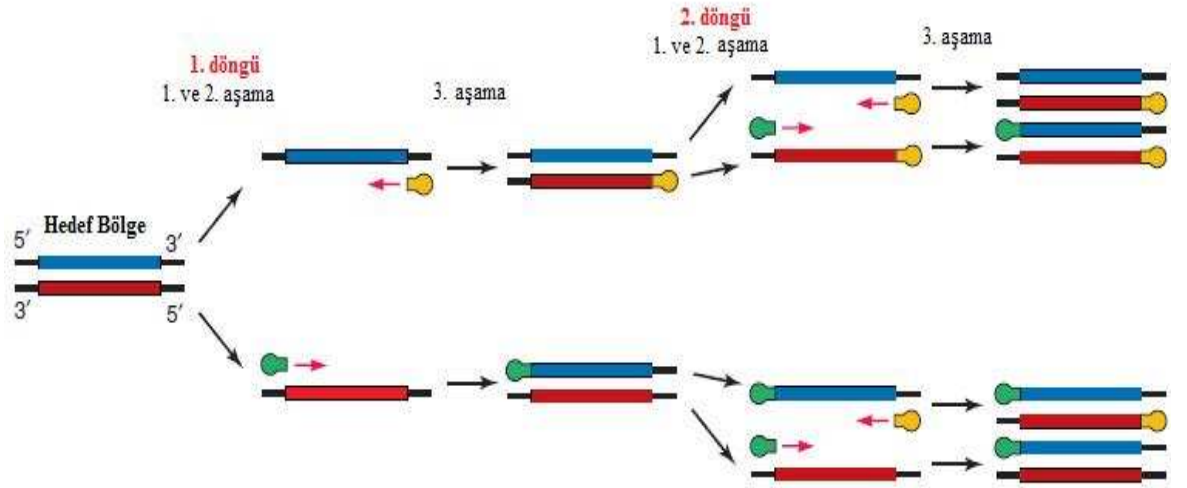
Bir PCR döngüsü; denatürasyon, primerlerin bağlanması (annealing) ve uzama (extension) olarak adlandırılan üç basamaktan oluşur (Şekil.1.19).

1. Denatürasyon: Amplifiye edilecek DNA molekülündeki hidrojen bağlarının yüksek sıcaklıkta (90-95 °C) birbirinden ayrılması ve tek sarmal haline getirilmesidir.

2. Primerlerin Hedef Bölgelerle Birleşmesi (Annealing): Primerler, amplifiye edilen segmentin yanındaki dizilere spesifik olarak bağlanan 17-30 nükleotid uzunluğundaki sentetik oligonükleotidlerdir. Primerlerin spesifik olarak hedef

dizilere bağlanması düşük sıcaklıklarda (55-70 °C) gerçekleşir ve böylelikle DNA üzerinde komplementer olduğu bölgeye bağlanması sağlanır.

3. Zincir Uzaması (Elongation): DNA polimeraz enzimi, uygun tampon ve dört çeşit deoksiribonükleozit trifosfat (dNTP) varlığında primerlerin 3' hidroksil uçlarına dNTP'leri ekleyerek polimerizasyonu (70-75 °C) gerçekleştirir. DNA her zaman 5' ucundan 3' ucuna doğru uzar. Böylece hedef DNA'nın birçok komplementer kopyaları elde edilir. Bu üç basamağın defalarca tekrarlanması sonrasında her bir döngü sonunda kalıp DNA iki katına çıkar. Böylece hedeflenen bölgenin milyarlarca kez çoğaltılmasıyla PCR ürününün kolay analiz edilmesi sağlanır (Walker ve Rapley, 2000).



Şekil.1.19. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) basamakları (Tamarin, 2001).

1.6.3. Restriksiyon Fragman Uzunluk Polimorfizmi (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP)

Restriksiyon endonükleaz (RE) enzimleri, DNA fragmanlarını tanıyan ve bu dizilimlere yakın bölgelerden veya bu dizilimler içerisindeki spesifik yerlerden DNA'yı kesen enzimlerdir. Bu kesim genellikle simetriktir. Yani bir zincirdeki bir

yöndeki serilerin baz dizilimi diğer zincirdeki baz dizilimi ile ters yönde simetri özelliği gösterir. RE enzimlerinin tanıdığı bu dizilerin karakteristiği *palindrom* olarak adlandırılır (Walker ve Rapley, 2000). DNA'nın bu enzimlerle kesilmesinden sonra agaroz jel elektroforezine tabi tutulmasıyla oluşan DNA bantlarının yeri ve sayısı kıyaslanarak elde edilen çeşitliliğe *Restriksiyon Fragman Uzunluk Polimorfizmi* (RFLP) adı verilir (Botstein ve ark., 1980).

Restriksiyon enzimi ilk defa 1970 yılında Hamilton Smith ve Kent Wilcox tarafından izole edilmiş (Roberts, 2005) ve genetik analiz için ilk kez 1974 yılında RFLP metodu uygulanmıştır (Botstein ve ark., 1980). Bu yıldan sonra hızla rekombinant DNA teknolojisinde, protein üretilmesinde, gen dizilimlerinin belirlenmesinde ve polimorfizm çalışmalarında kullanılmaya başlanmıştır (Aggarwal, 1995).

1.6.4. DNA Onarım Gen Polimorfizmleri ve Önemi

Genom hareketliliğine bağlı olarak DNA'daki baz dizilimlerindeki değişimlerin bireyler arası farklılık göstermesine *polimorfizm* denir. Fonksiyonel polimorfizmler; genlerde farklı düzeyde protein ve enzim ekspresyonuna neden olan DNA sekanslarındaki değişimlerdir. Polimorfizmler, delesyon ve insersiyonlara, genomda ardışık olarak tekrarlayan DNA dizilerinin sayısında görülen değişikliklere VNTR (variable number of tandem repeats) ve STR (short tandem repeat) ve SNP'lere neden olmaktadır (Smith, 2002; Goodwin ve ark., 2007). DNA sekanslarında oluşan varyasyonların en iyi bilineni tek nükleotid polimorfizmi olup insan genomunun 1/1000'inde mevcut olan bir durumdur. Genetik varyasyonların kanser gibi etyolojisi kompleks olan hastalıklarla ilişkili olduğu bilinmektedir. Hangi SNP'lerin kanser riskine neden olduğunu belirlemek için genotip-fenotip kompleks ilişkisini anlamak önemli basamaklardan biridir. Ayrıca hangi sekans varyasyonunun kanser riski ile ilişkili olduğunu bilmek hastalıkların mekanizmasının aydınlatılmasında yararlı olmaktadır (Iarmarcovai ve ark., 2008).

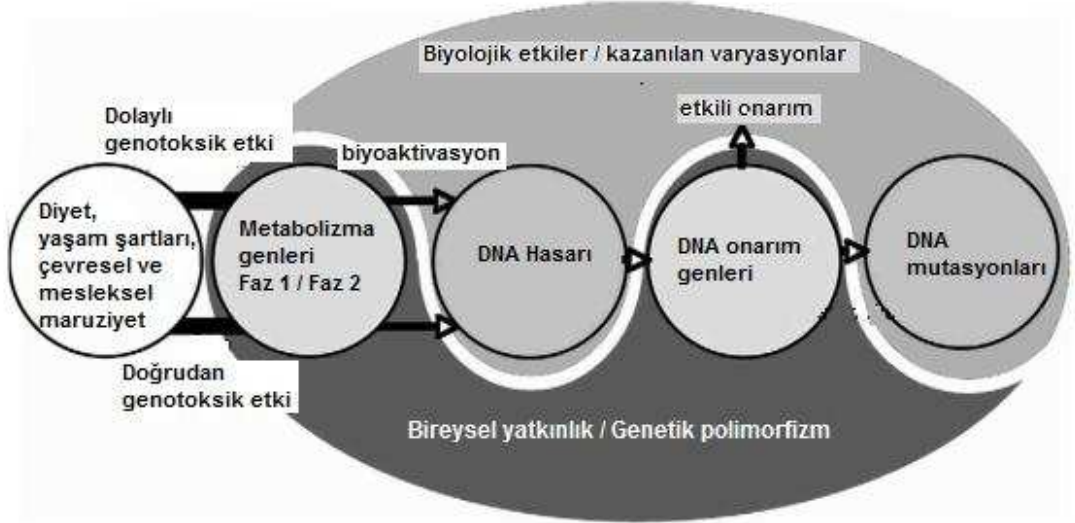
Bir popülasyondaki genetik çalışmalar birçok hastalık ve toksisite mekanizmasının anlaşılmasında, mutasyonların kalıtımı ve dağılımı hakkında bilgi vermektedir. Ancak birçok polimorfizmin kökeni hakkında çok az bilgi bilinmesine rağmen polimorfizmler, mutasyonel mekanizmalardan etkilenen, geçmişte birçok fonksiyonun kullanılması için yararlı olan, seleksiyon ile korunmuş, nesilden nesile geçiş yapmış ve bireylerin çevredeki toksik bileşiklere karşı verdiği cevabı etkilemiştir (Au, 2006).

İnsanlardaki yaklaşık 150 onarım geni farklı şekillerde DNA hasarının onarımını gerçekleştirmektedir. Bu onarım genlerindeki polimorfizmler, DNA onarım enzimlerindeki fonksiyonel değişimlerden dolayı DNA onarım kapasitesi üzerinde varyasyonlara neden olup, bu nedenle kansere karşı hassasiyetin oluşmasını tetiklemektedir (Pramanik ve ark., 2011). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda da, DNA onarım genleri ve kimyasalların metabolizmasında görev alan bu genlerdeki SNP'lere odaklanılmıştır.

DNA onarım genlerindeki sekans varyanslarının, DNA onarım kapasitesini etkilediği ve bu nedenle kanser riski ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Ancak epidemiyolojik çalışmalar birbirleri ile çelişmektedir. İstatistiksel olarak düşük etkinlik ve hatalar, yanlış pozitif sonuçlar, çalışılan popülasyondaki heterojenlik, çevresel maruziyet gibi etkileri belirlerken hata yapmak ya da gözönünde bulundurmamak ve sonuçların yayınlanmasında önyargılı olma bu durumun olası nedenleri arasında sayılmaktadır. Hangi sekans varyansının kanser riski ile ilişkili olduğu hakkındaki güvenilir bilgiler, kanser gelişimi yüksek olan kişilerin belirlenmesine yardımcı olabileceği gibi kanser etiyojisine de ışık tutmasından dolayı önem taşımaktadır (Hung ve ark., 2005a).

Genotoksik ajanlara çevresel ve mesleksi maruziyet, genetik yatkınlık, yaşam koşulları gibi faktörler DNA hasarı ve DNA mutasyonlarının oluşumunda etkili olup, ilgili genlerdeki polimorfizmler de bu süreçte risk faktörleri arasında yer almaktadır (Iarmarcovai ve ark., 2008), (Şekil.1.20).

Organik çözücülerin metabolitlerinin neden olduğu oksidatif hasarlar, başlıca baz-kesip çıkarma ve homolog rekombinasyon mekanizması ile tamir edilmektedir. XRCC1, BER mekanizmasında rol alan esas proteinlerden olup, XRCC3 ise HR ile DNA zincir kırıklarının onarılmasında görevli proteinlerdendir. Bu genlerdeki polimorfizmlerin ise metabolizma süresince bireylerde aktivasyon ve detoksifikasyon farklılığına neden olabileceği düşünülmektedir (Hoyos-Giraldo ve ark., 2009). Bu nedenle, mutajenez mekanizmasının aydınlatılması için kullanılan biyogöstergeler ve DNA onarım genlerindeki polimorfizmlerin belirlenmesi genotoksikolojinin önemli çalışma alanlarından birini oluşturmaktadır.



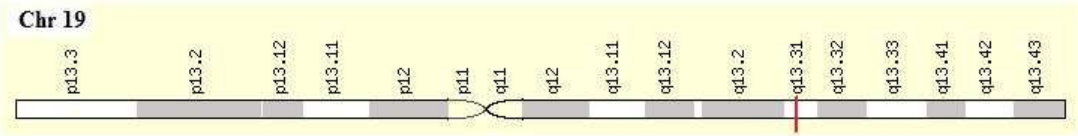
Şekil.1.20. Genotoksik ajanlar, genetik polimorfizm ve DNA mutasyonları arasındaki ilişki (Iarmarcovai ve ark., 2008).

1.7. XRCC1 Geni (X-Ray Repair Cross-Complementing Gene 1)

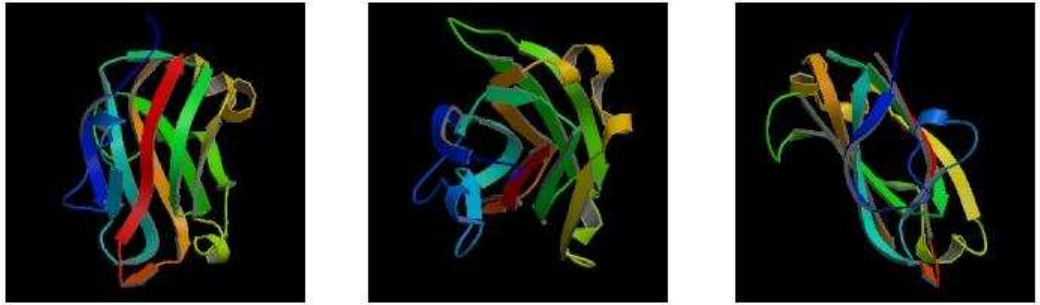
XRCC1 geni, (X-Ray Repair Cross-Complementing Gene 1) 19. kromozomun uzun kolu üzerinde yer alan (19q13.2), 32kb uzunluğunda ve 17 ekzondan oluşan bir gendir. XRCC1'in transkripsiyon ürünü ise 69.5 KDa ağırlığında ve 633 aminoasitten oluşan bir proteindir (Sterpone ve Cozzi, 2010; Ladiges, 2006), (Şekil.1.21). XRCC1 proteini enzimatik aktiviteye sahip olmamasına rağmen, özellikle aktif oksijen, iyonize radyasyon ve alkilleyici ajanlar tarafından oluşturulan

tek zincir kırıklarının tamirinde ve baz hasarlarının onarılmasında koordinasyonu sağlar (Thacker ve Zdzienicka, 2003; Thompson ve West, 2000). XRCC1 çeşitli enzimlerle ilişkili olup, bu enzimler XRCC1 domainlerinin fonksiyonel bölgelerine bağlanırlar (Ginsberg, 2011). XRCC1; polinükleotid kinaz, DNA polimeraz- β , DNA ligaz IIIa, apürinik/apirimidinik endonükleazlar (APE/APEX), poli ADP-riboz polimeraz (PARP), 8-oksoguanin DNA glikozilaz (OGG1) ile kompleks oluşturarak DNA onarımını kolaylaştırır (Sterpone ve Cozzi, 2010). Ayrıca hücrel antijenin çoğalmasıyla da etkileşim içindedir (Hung, 2005a).

a)



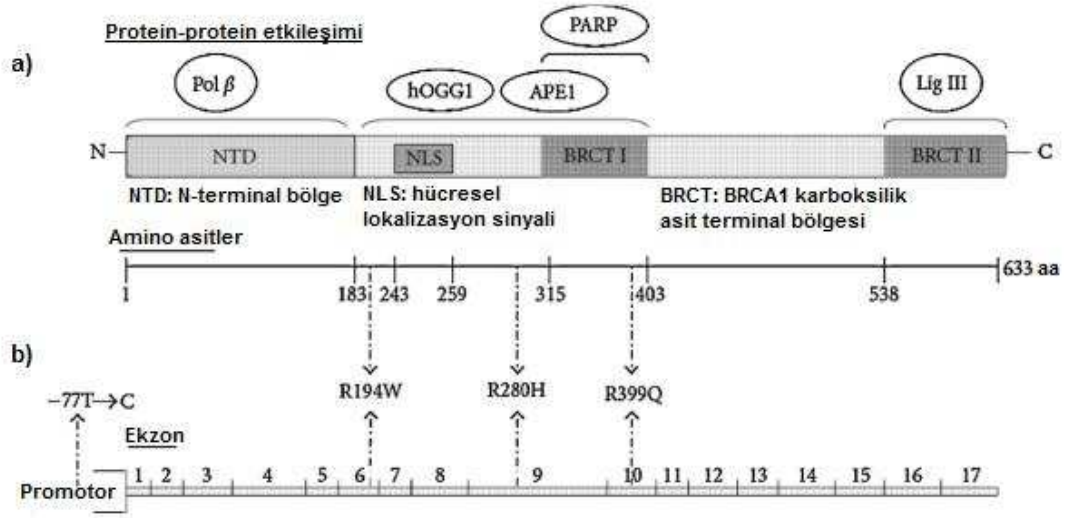
b)



Şekil.1.21. a) 19. kromozomda XRCC1 gen lokalizasyonu, b) XRCC1 proteini üç boyutlu yapısının şematik görüntüleri [(<http://genome.ucsc.edu/>), (<http://www.genecards.org/>) adreslerinden ulaşılarak derlendi].

XRCC1 Şekil.1.22’de görüldüğü gibi NLS; hücrel lokalizasyon sinyali ve fosforilasyon bölgesi, NTD; DNA polimeraz- β ’nın bağlandığı N-terminal bölgesi ve BRCT bölgeleri olmak üzere üç tane etkili bölgeye sahiptir. BRCT1 bölgesi PARP’ın bağlandığı BRCT2’de ise ligaz III ile etkileşime giren C-terminal bölgesidir. NTD ve BRCT1 arasındaki bölgeler ise AP endonükleaz (APE1), 8-oksoguanin DNA glikozilaz (OGG1) gibi diğer proteinler ile etkileşime girerek BER sisteminde etkili olmaktadır (Thompson ve West, 2000; Sterpone ve Cozzi, 2010). XRCC1’in fonksiyon kaybı genomik stabilitenin bozulmasına yol açar. Bu nedenle XRCC1 genindeki polimorfizmler, gen fonksiyonunda değişime ve DNA onarım

kapasitesinin azalmasına neden olabilir (De Ruyck ve ark., 2007). NCBI (National Center for Biotechnology Information) verilerine göre XRCC1 geninde 500'ün üzerinde SNP bulunmaktadır ve bunlardan 30 varyasyon ekzon ve promotor bölgelerde lokalize olmuştur. Sıklıkla çalışılan SNP'ler 6. ekzonda bulunan Arg194Trp (dbSNP no. rs1799782), 9. ekzonda bulunan Arg280His (dbSNP no. rs25489) ve 10. ekzonda bulunan Arg399Gln (dbSNP no. rs25487)'dir (Hung, 2005a; Liu ve ark., 2011), (Şekil.1.22).

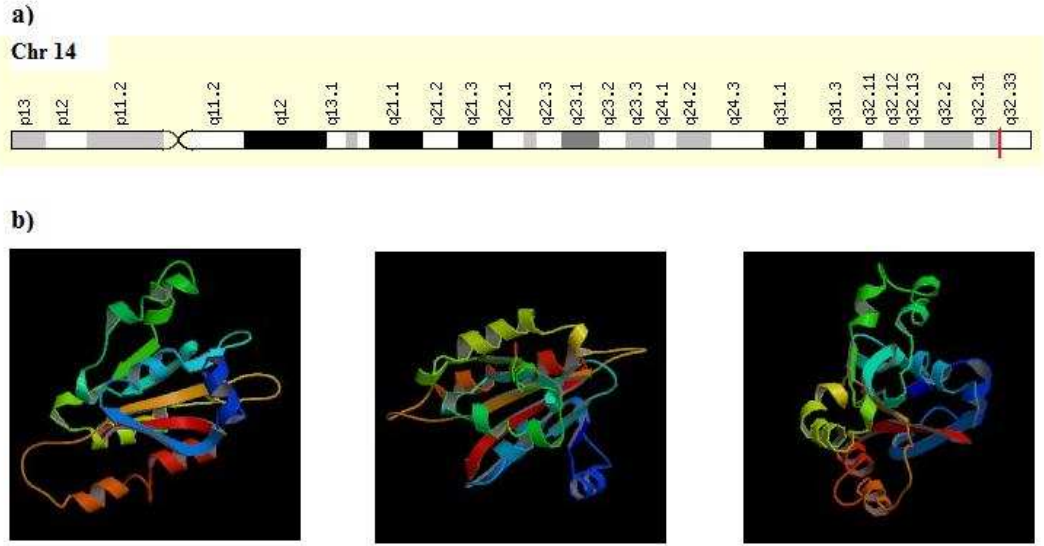


Şekil.1.22. XRCC1 proteini ve gen yapısı. a) XRCC1 domainleri ve ilişkili olduğu BER bileşikleri, b) Gen yapısı ve çalışılan SNP'ler (Sterpone ve Cozzi, 2010).

PARP proteininin bağlandığı BRCT I'in karboksilik asit terminal bölgesinde bulunan Arg399Gln, 399. kodondaki bir guaninin adenine değişmesi sonucu Arjinin aminoasidinin yerini Glutaminin alması ile oluşur (Hung, 2005a). PARP proteini çinko parmak enzimi (zinc-finger) içermesi ve DNA zincir kırıklarını belirlemesinden dolayı, Arg399Gln polimorfizminin DNA tamir mekanizmasını etkileyebileceği belirtilmiştir. (Shall ve de Murcia, 2000).

1.8. XRCC3 Geni (X-Ray Repair Cross-Complementing Gene 3)

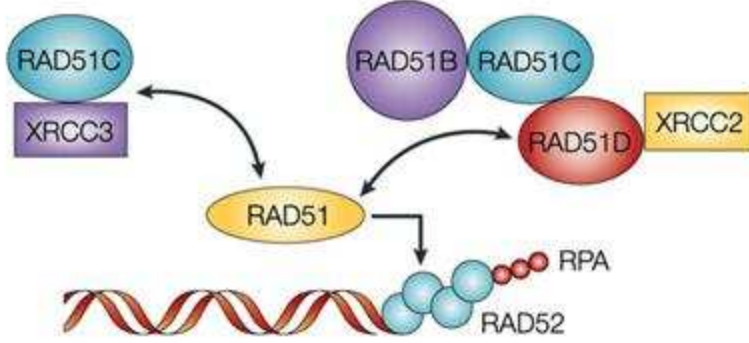
XRCC3 geni (X-Ray Repair Cross-Complementing Gene 3) 14. kromozomun uzun kolu üzerinde yer alan (14q32.3) yaklaşık 17kb uzunluğunda ve 9 ekzondan oluşan bir gendir. XRCC3'ün transkripsiyon ürünü 346 aminoasitten oluşmaktadır (Şekil.1.23).



Şekil.1.23. a) 14. kromozomda XRCC3 gen lokalizasyonu, b) XRCC3 proteini üç boyutlu yapısının şematik görüntüleri (<http://www.genecards.org/>, <http://genome.ucsc.edu/> adreslerinden ulaşılarak derlendi).

XRCC3 proteini DNA çift zincir kırıkları ve çapraz bağların onarımında görevli olup homolog onarım yolağında görevli Rad51 protein ailesinin bir üyesidir (XRCC2, XRCC3, Rad51B, Rad51C, and Rad51D). Ökaryotik Rad51 paralog genlerinin, homolog rekombinasyonda önemli rolü olup mitotik ve mayotik hücre döngülerinde kromozomal bütünlüğü korumaktadırlar (Lin ve ark., 2006). Rad51 protein ailesi; dimerik yapıdaki XRCC3-Rad51C kompleksi ve XRCC2-Rad51B-Rad51C-Rad51D kompleks yapısı olmak üzere iki önemli stabil yapıdan meydana gelir (Skorski, 2002), (Şekil.1.24). Bu genlerdeki mutasyonlar kromozomal anomalilere, iyonize radyasyona karşı aşırı hassasiyet ve DNA çapraz bağlarına neden olmaktadır. Rad51; DNA'ya bağlanıp zincir transferaz aktivitesi gösteren Walker A ve B olmak üzere iki dizi motif içerir, bunlar bu gen ailesinin protein ürünlerine ATP hidroliz etkinliği sağlar. Rad51 paralogları da Walker A ve B ATPaz'a sahiptir. XRCC3 Walker A

motifi ise, Rad51C-XRCC3 kompleks yapısı ve XRCC3'ün HRR'deki biyolojik aktivitesi için gereklidir, ancak bu ATPaz motiflerinin biyolojik anlamı tam olarak bilinmemektedir.



Şekil.1.24. Rad51 paraloglarının oluşturduğu kompleks yapılar (Skorski, 2002).

XRCC3, kimyasal ajanlar ve iyonize radyasyona karşı, kromozomal bütünlük ve hücre direncini sağlayan önemli proteinlerdendir. Rad51C-XRCC3 kompleks yapısı XRCC3'ün biyolojik fonksiyonu için gerekli olup, XRCC3 çift zincir kırıkları, çapraz bağların onarımında HR onarım yolağında anahtar rolü üstlenir. Çift zincir kırığında HR onarımının önemi bilinmesine rağmen biyokimyasal özelliği ve spesifik fonksiyonu hakkındaki bilgiler tam yeterli değildir (Yamada, 2004). HR onarımında DNA çift zincir kırıkları nedeni ile kaybolan genetik bilgileri, ikinci sağlam kopyayı içeren homolog kromozomu kalıp olarak kullanarak düzenler ve onarımı gerçekleştirir (Duarte ve ark., 2005).

Polisiklik aromatik hidrokarbonlar, aromatik aminler gibi çevresel ve mesleksi karsinojenler DNA molekülünde çapraz bağlara, reaktif oksijen molekülleri de DNA çift zincir kırıklarına neden olmaktadır. Bu hasarların onarımı, homolog rekombinasyon ya da NHEJ onarım mekanizması ile gerçekleştirilir (Manuguerra ve ark., 2006).

NCBI SNP verilerine göre XRCC3 geni 200'ün üzerinde tek nükleotid polimorfizmine sahiptir. Belirlenmiş en önemli polimorfizm 7.ekzonda meydana gelen Thr241Met'dir (dbSNP no. rs18067). Yani 241. kodonda sitozinin timine değişmesi sonucu, treonin aminoasidinin yerini metioninin almasıyla gerçekleşir. Bu gendeki varyasyonların fonksiyonel sonuçlarıyla ilgili bilinenler çok fazla değildir. Ancak bazı çalışmalarda, lenfosit DNA'larındaki yüksek DNA katım ürünlerinin XRCC3 Thr241Met varyant aleli ile ilişkili olduğunu ve bu polimorfizmlerin DNA onarım kapasitesini etkilediği belirtilmiştir (Matullo ve ark., 2001). Bu nedenle, HR onarım yolağındaki eksik DNA onarımı, kromozomlarda onarılmamış DNA'lar ile çift zincir kırıklarının birikmesine ve genomik kararsızlığa neden olabilmektedir (Thompson ve ark., 2001).

Bu çalışmada, iş yerinde organik çözücülere maruz kalan bireylere ait örneklerde lenfosit DNA hasarı ve XRCC1 Arg399Gln ve XRCC3 Thr241Met polimorfizmleri arasındaki olası korelatif ilişkinin araştırılması amaçlanmıştır.

Bu amaçla;

1. Çalıştığı iş yeri nedeni ile organik çözücülere maruz kalan bireylerdeki lenfosit DNA hasar düzeyleri,
2. Bu bireylerin XRCC1 Arg399Gln ve XRCC3 Thr241Met polimorfizmleri belirlenmiştir.

Bu bulguların toplumumuzda organik çözücülere maruziyet ile ortaya çıkabilecek sağlık problemlerinin belirlenmesi ve risk gruplarının değerlendirilmesinde önemli olacağı düşünülmektedir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereçler

2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Restriksiyon enzimi (Nla III), (Msp I)	Neb (New England Biolab)
Primerler	Alpha DNA, Montreal
Agaroz	Prona
Etidyum bromür	Applichem
6X loading çözeltisi	Qiagen
Saf etanol	Sigma-Aldrich
DNA's RNA's free water	Bome
Hot Star Taq DNA polimeraz	Qiagen
Fenol-kloroform-izoamil alkol (25:24:1)	Applichem
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	Applichem
Proteinaz K	Merck
100 bp ladder	Fermentas
Sodyum klorür (NaCl)	Sigma-Aldrich
Dimetilsülfoksit (DMSO)	Merck
Sodyum hidroksit (NaOH)	Merck
Fosfat tampon tabletleri (PBS)	Sigma-Aldrich
Histopaque 1077	Sigma-Aldrich
Sodyum lauril sarkosinat	Sigma-Aldrich
Düşük kaynama dereceli agar (LMA)	Prona, A-4018
Yüksek kaynama dereceli agar (HMA)	Sigma-Aldrich, A-7174
Etilendiamin tetraasetikasit (EDTA)	Merck
Trizma base	Merck
Triton-X 100	Merck

2.1.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

Floresan ataçmanlı mikroskop	Olympus BX51
Jel görüntüleme cihazı	Syngene
Laminar flow kabin	Esco
Thermal Cycle PCR cihazı	Techne Tc 512
Soğutmalı santrifüj	Hettich
Mikro santrifüj	Biosan
Otoklav	Nüve
Su banyosu	Nüve
Etüv	Nüve
Su pürifikasyon sistemi	Human UP 900 Scholar-UV
Vorteks karıştırıcı	Biosan
Dijital hassas terazi	Mettler Toledo
Elektroforez tankı	Scie-Plas
Güç kaynağı	Bio-Rad
Manyetik karıştırıcı	Mirak
Mikrodalga fırın	Arçelik
pH metre	Mettler Toledo
Eppendorf tüpler (1.5 ml. ve 0.2 ml'lik)	Axygen Genuine
Otomatik mikro pipetler	Eppendorf, Rainen
Pipet uçları (100 µl, 1000 µl, 5 ml, 10 ml)	Finntip
Steril eldiven	TopGloves
Cam malzemeler	
Parafilm	

2.1.3. Deney Protokolü

2.1.3.1. Çalışma Grubunun Seçilmesi

Ankara Meslek Hastalıkları Hastanesine sağlık kontrolüne gelen, çalıştığı işyeri nedeniyle organik çözücülere maruz kalma olasılığı olan 23-60 yaş arası bireyler çalışma grubuna dahil edilmiştir (n=118). Gönüllülerle yapılan ön görüşmeden sonra bireyler çalışma hakkında bilgilendirilmiş ve venöz kan örnekleri alınmıştır.

Kontrol grubu (n=118), yaş, cinsiyet ve sigara içme alışkanlıkları çalışma grubu ile uyumlu olacak şekilde, mesleki olarak organik çözücülere maruz kalmamış, sağlıklı bireylerden oluşturulmuştur. Bu kişiler de çalışma hakkında bilgilendirilmiş ve venöz kan örnekleri alınmıştır.

Bu çalışma; Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik kurulunun 08 haziran 2009 tarih, 153-4852. sayılı kararı ile yürütülmüştür. Çalışmamız, Ankara Üniversitesi Adli Bilimler Enstitüsü laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

2.1.3.2. Çalışma ve Kontrol Grubundan Biyolojik Materyalin Toplanması

Çalışmamızda, biyolojik materyal olarak, bireylerin periferik kan örnekleri EDTA ve heparin içeren vakumlu kan tüplerine toplanmıştır. Heparinli tüpe alınan kan örneklerine nDNA hasarının analizi için aynı gün içinde comet yöntemi uygulanmış ve EDTA'lı tüplerdeki kan örneklerinden ise DNA izolasyonu yapılmıştır. Tüm DNA örnekleri analizlere alınıncaya kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

2.1.4. Yöntem

Çalışmamız iki bölümden oluşmaktadır. İlk bölümde toplumumuzda çalıştığı iş yeri nedeniyle organik çözücülere maruz kalan bireylerin lenfosit DNA hasar düzeyleri comet yöntemi ile belirlenmiş, ikinci bölümde ise bireylerin XRCC1 geni Arg399Gln ve XRCC3 geni Thr241Met polimorfizmleri belirlenerek aralarındaki ilişki araştırılmıştır.

2.1.4.1. Periferal Kan Lenfositlerinde DNA Hasarının Comet Yöntemi ile Belirlenmesi

2.1.4.1.1. Yöntemde Kullanılan Çözeltiler

- **Fosfat tamponu (PBS)**

Bir tane PBS tableti 200 ml distile suda çözüldü ve +4 °C’de muhafaza edildi.

- **Yüksek kaynama dereceli agar (HMA) (%1)**

PBS ile çözülerek hazırlandı. Çözelti sıcak iken lamalar bu çözeltinin içine daldırılarak agar ile kaplanıp oda sıcaklığında kurutuldu.

- **Düşük kaynama dereceli agar (LMA) (%0,63)**

PBS ile çözülerek hazırlandı ve +4 °C’de saklandı. Deney esnasında mikrodalga fırında çözüldü ve 37 °C’ ye getirilerek kullanıldı.

- **Elektroforez tamponu (%3 NaOH, %0,5 EDTA)**

0.3 M NaOH.....12 g

1 mM EDTA.....1.186 g

Distile su.....100 ml

Çözeltinin pH’ı > 13’e ayarlandı ve +4 °C’de saklandı.

- **Nötralizasyon tamponu**

0. 4 M Tris.....48.5 g

Distile su.....1000 ml

Çözeltinin pH'ı 7.5'a ayarlandı ve +4 °C'de saklandı.

- **Stok 100 µg/ml Etidyum Bromür (EtBr) çözeltisi**

EtBr.....5 mg

Distile su 50 ml

Hazırlanan stok çözelti +4 °C'de saklandı. Lamlar boyanacağı zaman çözelti, distile su ile 1:5 oranında seyreltilerek, her bir lama 60 µL damlatılarak kullanıldı.

- **Stok Lizis çözeltisi**

2. 5 M NaCl.....146.1 g

100 mM EDTA.....37.2 g

10 mM Tris.....1.2 g

Distile su.....1000 ml

Çözeltinin pH'sı 10 M NaOH ile 10'a ayarlandı. Karışıma % 1 sodyum lauril sarkosinat ilave edilerek manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı ve oda sıcaklığında saklandı. Kullanılacak her 100 ml lizis çözeltisi, 89 ml stok lizis çözeltisi, 10 ml DMSO ve 1 ml Triton-X 100 karıştırılarak hazırlandı. Kullanılana kadar da +4 °C'de saklandı.

2.1.4.1.2. Comet Yönteminin Uygulanışı

Çalışmaya başlamadan önce %1'lik HMA çözeltisi hazırlandı. Lamlar bu agar çözeltisine batırılarak kaplandı ve oda sıcaklığında kurutuldu.

Hücrelerin hazırlanması: Her lam için ependorf tüpüne 1'er ml PBS (+4 °C'de saklanan PBS'den) konuldu. 100 µl taze kan tüplerdeki PBS üzerine eklenip karıştırıldı. 100 µl histopaque tüpün dibine eklendi ve ependorf tüpler 1500 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi. Pembe kısmın üstündeki tabakada yer alan lenfositlerden 50 µl mikropipet yardımıyla alındı.

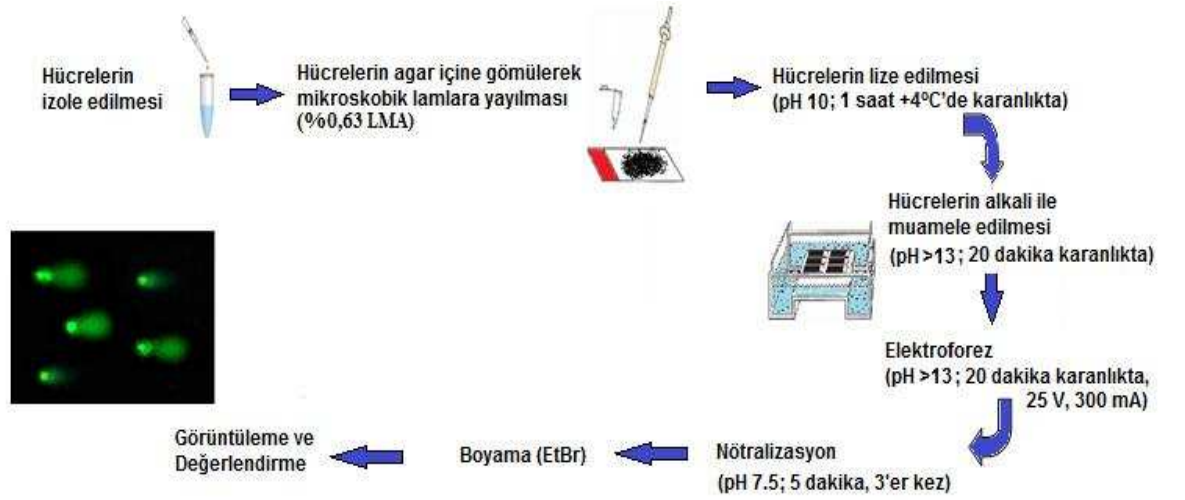
Hücrelerin lama yayılması: Hücreler 100 µl 37 °C'deki PBS içinde hazırlanmış % 0.63'lük LMA ile karıştırılarak (iyice pipetaj yapılarak) önceden HMA'ya batırılıp kurutulmuş lama yayıldı ve 32x64 mm lamelle kapatılarak yayma işlemi gerçekleştirildi. Agar katılaşınca kadar buz üzerinde 5-10 dakika bekletildi. Agarı katılaştıran lamların üzerinden lameller agarı kaldırmadan yavaşça çekildi ve tüm işlemler DNA'da ekstra hasar oluşmasını önlemek için çok az miktarda ışıkla aydınlatılmış ortamda gerçekleştirildi.

Hücrelerin lize edilmesi: Şaleye yerleştirilen lamların üzerine taze olarak hazırlanmış liziz çözeltisi eklendi ve +4 °C'de 1 saat bekletildi.

Hücrelerin alkali ile muamele edilmesi ve elektroforez: Taze olarak hazırlanmış soğuk elektroforez çözeltisi elektroforez tankına konuldu. Lamlar son kenarları anoda doğru gelecek şekilde dizildi ve soğuk elektroforez çözeltisi ile dolu olan tank içinde DNA çift sarmalının açılması için 20 dk bekletildi. Sonrasında 20 dk 25 V, 300 mA'de elektroforez uygulandı. Böylece sağlanan elektrik akımı sayesinde negatif yüklü DNA sarmal kırıklarının anoda doğru göç etmesi sağlanmış oldu.

Nötralizasyon, fiksasyon ve boyama: Elektroforezden çıkartılan lamlar ışıktan korunmuş cam şaleye alındı. Oluşturan kimyasal reaksiyonu stabilize etmek, fazla tuz ve deterjanı uzaklaştırmak amacıyla lamlar nötralizasyon tamponuyla 3 defa 5'er dakika nötrale edildi. Sonrasında lamlar % 50, % 75, % 100'lük alkollerde 5'er dakika oda sıcaklığında fikse edildi. Daha sonra her preparat floresan renk vermesi için 60 µl EtBr ile boyandı.

Görüntüleme ve değerlendirme: Lamlar BAB Bs otomatik analiz sistemi kullanılarak floresan ataçmanlı mikroskopta 40x büyütmede değerlendirildi. Her birey için 50 hücre sayıldı. Comet yönteminde lenfositlerdeki hasar bilgisayarda comet görüntü analiz programı ile ölçüldü. Tail intensity (TI), DNA tail (DNAt), tail moment (TM) ve olive tail moment (OTM) lenfosit DNA hasarının göstergesi olarak incelendi (Şekil.2.1).



Şekil.2.1. Comet yöntemi.

2.1.4.2. XRCC1 (Arg399Gln) ve XRCC3 (Thr241Met) Genotiplerinin Belirlenmesi

2.1.4.2.1. Sıvı Kan Örneklerinden DNA İzolasyonu

Sıvı kan örneklerindeki nDNA'yı açığa çıkarabilmek amacıyla fenolkloroform-izoamil-alkol ekstraksiyon yöntemi kullanıldı.

1. 200 µl sıvı kan örneğinin üzerine 1000 µl TE konularak 12000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Alt faz 100 µl kalıncaya kadar üst faz atıldı. Bu işlem 3 defa tekrarlandı.

2. Üzerine;

45 µl NaCl (1 M),

40 µl SDS (%20'lik),

400 µl TE ve

7 µl proteinaz K eklenerek kısaca vortekslendi.

3. 56 °C'lik su banyosunda 1.5-2 saat inkübe edildi.

4. Fenol-kloroform-izoamil alkol karışımından 500 µl ilave edildi ve kısaca vortekslendi.

5. 2500 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi.

6. Alt faz hareket ettirilmeden üst faz yeni bir ependorf tüpe alındı ve alt faz atıldı.

7. 1000 µl soğuk saf etil alkol ilave edildi.

8. 10000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.

9. Alkol oluşan pelete zarar vermeden dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı.

10. 500 µl %70'lik oda sıcaklığında etil alkol ilave edildi.

11. 10000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.

12. Ependorf tüpün içerisinde bulunan tüm alkol dikkatlice uzaklaştırıldı.

13. Tüpün dibinde kalan alkol de tamamen uçurulduktan sonra 150 µl DNase-RNase free su ilave edildi. Tüm DNA örnekleri analizlere alınıncaya kadar -20 °C'de muhafaza edildi.

2.1.4.2.2. Genomik DNA'nın Agaroz Jel Elektroforezi ile Belirlenmesi ve %0.5'lik Agaroz Jel Hazırlanması

Sıvı kan örneklerinden genomik DNA'nın izole edilip edilmediğinin analizi %0.5'lik agaroz jel elektroforezi ile belirlendi.

1. 0.6 g agaroz tartıldı ve 120 ml 1X TBE çözeltisi ile karıştırıldı.
2. Mikrodalga fırında ağzı alüminyum folyo ile kapatılıp üzerinde delikler açılarak maksimum ayarda kaynatıldı.
3. Çözelti oda sıcaklığında 50–60 °C'ye düşünceye kadar bekletildi.
4. Üzerine 10 µl EtBr (10 mg/ml) eklendi ve hafifçe çözelti pembeleşip homojen karışım sağlanıncaya kadar erlen çalkalandı.
5. Bu karışım jel tarakları yerleştirilmiş jel kalıplarına hava kabarcığı kalmayacak şekilde döküldü. Jel üzerinde hava kabarcıkları oluşmuş ise, jel katılaşmaya başlamadan pipet ucu yardımı ile patlatıldı.
6. Jelin katılaşması için bir süre oda sıcaklığında bekletildi.
7. Taraklar ve bariyerler dikkatlice çıkarılarak kalıp elektroforez tankına yerleştirildi.
8. Jelin üzerini kaplayacak miktarda tank içerisine 1X TBE çözeltisi eklendi.

2.1.4.2.2.1. Agaroz Jele Yükleme İçin Örnek Hazırlanması ve Yürütme Koşulları

1. 15 cm uzunluğunda parafilm kesilerek buz kalıbı üzerine yerleştirildi.
2. 1 µl 6X Jel Loading Buffer ve 5 µl DNA örneği parafilm üzerine konuldu ve homojenizasyon için mikropipet yardımı ile yavaşça karıştırıldı.
3. Toplam 6 µl karışım dikkatli bir şekilde jel kuyucuklarına yerleştirildi.

4. Güç kaynağı 100 V ve 70 mA ayarlanarak, numuneler 45 dakika jel üzerinde yürütüldü.

5. UV ışığında, jel görüntüleme cihazında sonuçlar değerlendirildi.

2.1.4.2.3. PCR

DNA örneklerinde XRCC1 Arg399Gln ve XRCC3 Thr241Met genotiplmeleri için ilk önce tek nokta mutasyonunu içeren gen dizilimleri PCR yöntemi ile çoğaltıldı. PCR işlemi TECHNE TC 512 Thermal Cycle cihazı ile gerçekleştirildi ve hedeflenen DNA bölgesinin her biri 2³⁵ defa çoğaltıldı.

2.1.4.2.3.1. Primer Listesi

Amplifikasyon için Forward (F: direkt) ve Reverse (R: karşıt) primerleri kullanıldı. Primerler HPSF (High Performance Salt Free) yöntemi ile Montreal'deki Alpha DNA firmasına sentezletirildi. Kullanılan primerler ve özellikleri Çizelge 2.1'de gösterilmiştir.

Çizelge.2.1. Amplifikasyonda kullanılan primerler ve özellikleri.

	F PRİMER	R PRİMER
XRCC1	5'- TCTCCCTTGGTCTCCAACCT-3'	5'- AGTAGTCTGCTGGCTCTGG-3'
Uzunluk	20 bp	20 bp
GC içeriği	%55	%55
Erime Sıcaklığı (T _m)	61.0 °C	55.6 °C
Primerler arası T _m farkı	5.4 °C	
XRCC3	5'-GGTCGAGTGACAGTCCAAAC-3'	5'-TGCAACGGCTGAGGGTCTT-3'
Uzunluk	20 bp	20 bp
GC içeriği	%55	%55
Erime Sıcaklığı (T _m)	58.1 °C	64.3 °C
Primerler arası T _m farkı	6.2 °C	

2.1.4.2.3.2. PCR Bileşenleri ve PCR Programı

Standart bir PCR reaksiyonunda PCR Buffer, dNTP karışımı, Hot Star Taq DNA Polimeraz, F Primer, R Primer ve DNA bileşenleri bulunmaktadır. Çalışmada kullanılan PCR reaksiyonunun bileşenleri, bileşenlerin stok konsantrasyonları, reaksiyondaki miktarları ile reaksiyon karışımındaki final konsantrasyonlarına ait bilgiler Çizelge 2.2’de verilmiştir.

Çizelge.2.2. PCR bileşenleri ile stoktaki ve reaksiyondaki konsantrasyonları.

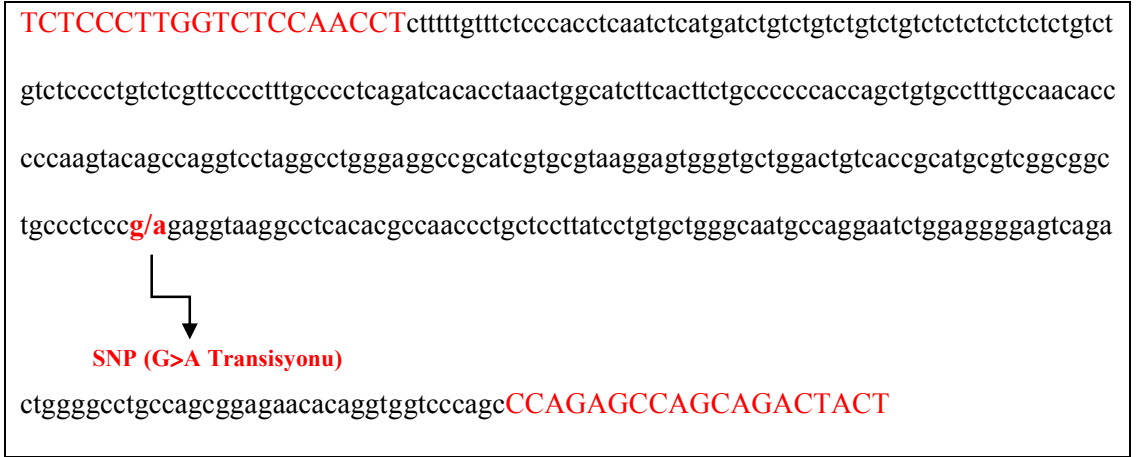
Bileşen	Stok konsantrasyon	Reaksiyona konulan miktar	25 µl'lik reaksiyon karışımındaki final konsantrasyon
10 X PCR Buffer	10X	2.5 µl	1X
dNTP karışımı	2mM	2 µl	200 µM
F Primer	10 pmol/ µl	0.5 µl	10 pmol/ µl
R Primer	10 pmol/ µl	0.5 µl	10 pmol/ µl
Hot Star Taq DNA Polimeraz	5 U/ µl	0.125 µl	1.25 U
DNA		5 µl	~200 ng
Steril H₂O		17 µl	

XRCC1 (Arg399Gln) ve XRCC3 (Thr241Met) için PCR programı Çizelge 2.3'de belirtilen şekilde gerçekleştirildi.

Çizelge.2.3. XRCC1 Arg399Gln ve XRCC3 Thr241Met genotipleme için PCR şartları.

Şartlar	°C	Süre (dakika)
Başlangıç denatürasyonu	94 °C	10
Denatürasyon	94 °C	1
Bağlanma	60 °C	1
Uzama	72 °C	1
Son uzama	72 °C	5
	4 °C	∞dakika
Siklus sayısı	35 döngü	

PCR sonucunda XRCC1 geni için 403bp'lik, XRCC3 geni için ise 456 bp'lik PCR ürünleri elde edildi. Bu ürünlerin baz dizilimi, XRCC1 Arg/Gln ve XRCC3 Thr/Met aminoasit değişimine neden olan tek nokta mutasyonlarının yeri ve primer dizilimleri aşağıda gösterilmiştir (Şekil.2.2), (Şekil.2.3).



Şekil.2.2. XRCC1 Arg399Gln genotipleme için PCR ile çoğaltılan 403 bp'lik baz dizilimi, XRCC1-F ve XRCC1-R primerleri ve tek nokta mutasyonu.



Şekil.2.3. XRCC3 Thr241Met genotipleme için PCR ile çoğaltılan 456 bp'lik baz dizilimi, XRCC3-F ve XRCC3-R primerleri ve tek nokta mutasyonu.

2.1.4.2.3.3. PCR Ürünlerinin Jele Uygulanması ve Elektroforez

PCR işlemi bitiminde, polimorfizmin yer aldığı istenilen dizinin amplifikasyonunun doğru olarak gerçekleştiğini kontrol etmek amacıyla 8 µl PCR ürünü ile 1 µl 6X Jel Loading Buffer karıştırılarak % 2'lik normal agaroz jele yüklendi. Bunun için 2.4 gr. agaroz tartılarak 120 ml 1XTBE içerisinde çözüldü ve bölüm 2.1.4.2.2' de yapıldığı şekilde işleme devam edildi. 100 bp DNA ladder kullanıldı ve 1 µl DNA ladder, 1 µl 6X Jel Loading Buffer ve 6 µl distile su karıştırılarak yükleme yapıldı. Jel 100 Volt ve 70 Amperde 1 saat elektroforeze tabi tutuldu ve PCR ürünleri UV ışığında, jel görüntüleme sistemi ile değerlendirildi.

2.1.4.2.4. PCR Ürünlerinin Restriksiyon Enzimi ile Kesilmesi (RFLP)

SNP'ler DNA dizisinde restriksiyon endonükleaz (RE) kesim bölgesi meydana getirebilir veya mevcut kesim bölgesini ortadan kaldırabilir. Bu değişiklikler RE'larca DNA'nın farklı uzunlukta kesilmesine yol açar.

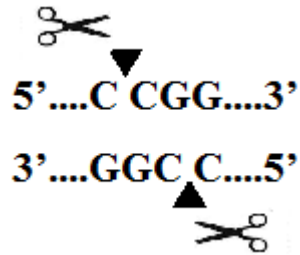
PCR sonucu amplifiye edilen polimorfik gen bölgeleri bu bölgelere spesifik restriksiyon endonükleazlar ile muamele edilerek kesildi. XRCC1 (Arg399Gln) PCR ürünlerinde 25487. bazdaki G→A transisyonu MspI enzimi için, XRCC3 (Thr241Met) PCR ürünlerinde 18067. bazdaki C→T transisyonu ise NlaIII enzimi için restriksiyon bölgesini oluşturur. Böylece RFLP yöntemi ile Arg399Gln ve Thr241Met değişimleri belirlenmiştir. PCR ürününün RFLP yöntemi ile kesim işleminde negatif ve pozitif örnekler de kontrol amacıyla analizlere alındı.

2.1.4.2.4.1. Kullanılan Kesim Koşulları

- XRCC1(Arg399Gln) gen bölgesi için kesim koşulları:
 - 15 µl Nükleaz Free H₂O
 - 2 µl 10X Buffer
 - 0.25 µl MspI
 - 10 µl PCR ürünü

olmak üzere her bir örnek için toplam hacim 27.25 µl'dir. Enzim kesimi için 37 °C'de bir gece inkübe edildi.

MspI enziminin tanıma bölgesi:



- XRCC3 (Thr241Met) gen bölgesi için kesim koşulları:

10 µl Nükleaz Free H₂O

2 µl NEB4 Buffer

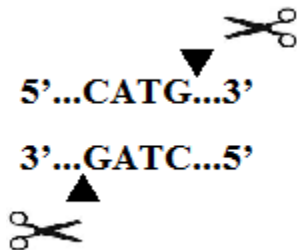
0.2 µl BSA

0.5 µl Nla III

10 µl PCR ürünü

olmak üzere toplam hacim her bir örnek için 22.7 µl'dir. Enzim kesimi için 37 °C'de bir gece inkübe edildi.

NlaIII enzimi tanıma bölgesi:



2.1.4.2.4.2. Kesim Ürünlerinin Agaroza Jel Elektrofrezine Uygulanması ve Genotip Tayini

XRCC1 (Arg399Gln) ve XRCC3 (Thr241Met) genotiplemesi için çoğaltılan PCR ürünlerinin restriksiyon enzimleri ile kesilmesiyle elde edilen ürünler 6X yükleme boyası ile (8 µl kesim ürünü 1 µl boya ile karıştırıldı) bölüm 2.1.4.2.3.3'te anlatıldığı şekilde % 2'lik jelle yüklendi ve elektroforeze tabi tutuldu. Sonuçlar UV ışığında, jel görüntüleme sistemi ile değerlendirildi.

2.1.5. İstatistiksel Analiz Yöntemi

Comet parametreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı doğrusal ilişkinin olup olmadığı Pearson'un Korelasyon testiyle araştırılmıştır. XRCC1 ve XRCC3 tek nükleotid polimorfizminin genotip ve alel frekansları, direkt olarak hesaplanmış ve Hardy-Weinberg eşitliği "Haldane exact" testi ile belirlenmiştir. Tanımlayıcı istatistik olarak nitel değişkenlerde oran, nicel değişkenlerde ise ortalama±standart sapma veya ortanca (minimum-maksimum) verilmiştir.

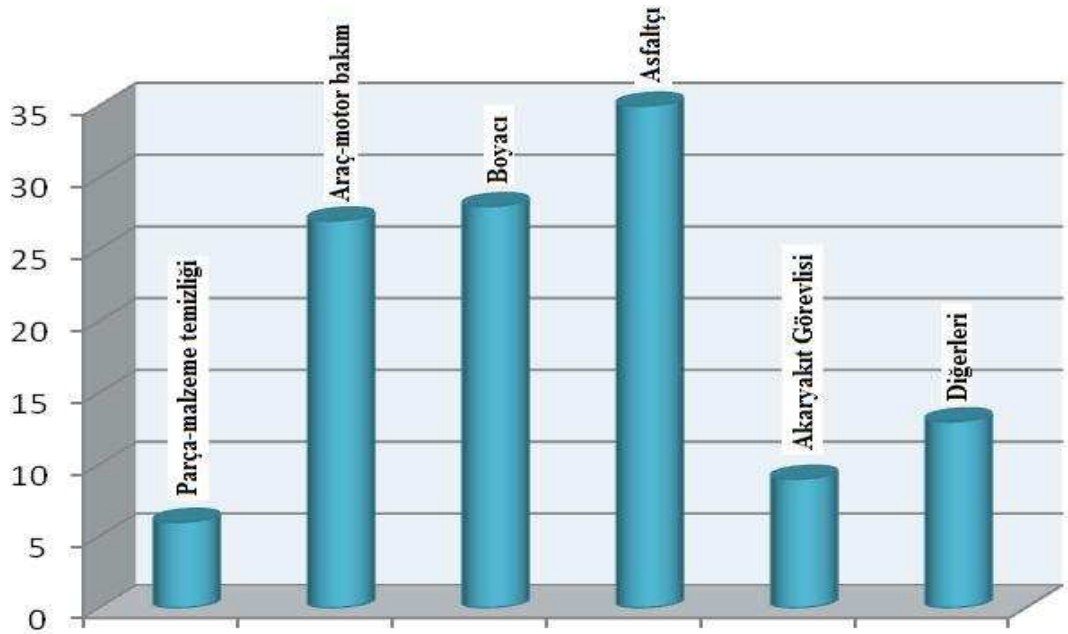
Organik çözücülere maruz kalan bireylerdeki lenfosit DNA hasarı düzeyleri ve aynı bireylerin XRCC1 (Arg399Gln) ve XRCC3 (Thr241Met) polimorfik genotip özellikleri arasındaki ilişki "*Oneway Anova*" testi ile belirlenmiştir. Analizler "SPSS Version.16" paket programında değerlendirilmiş ve $p < 0.05$ için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

3. BULGULAR

Çalıştığı işyeri nedeniyle organik çözücülere maruz kalma olasılığı olan bireyler maruz grup ve aynı yaş grubundan seçilen kronik hastalığı bulunmayan bireyler ise kontrol grubu olarak çalışmamıza dahil edilmiştir. nDNA hasarının analizi için toplam 236 bireyden toplanan kan örnekleri aynı gün içinde analiz edildi. Bu bireylerin yaş ortalaması 38.63 ± 9.31 ve yaş aralığı 21 ile 60 arasındadır.

Maruz grubundaki bireylerin, anket formundaki soruların yanıtlarına göre yaş, çalışma yılları ve maruziyet açısından risk faktörü olarak kabul edilen sigara tüketimi de değerlendirilmiştir.

Maruz gruba ait yaş ortalaması ise 43.40 ± 7.53 olup, nDNA hasarının XRCC1 ve XRCC3 gen polimorfizmi ile ilişkisi istatistiksel açıdan değerlendirilmiştir. Şekil 3.1’de maruz grubundaki bireylerin mesleksel olarak dağılımı yer almaktadır.



Şekil.3.1. Maruz grubundaki bireylerin mesleklerine göre dağılımı (Diğerleri: temizlikçi, teknisyen, marangoz, işçi).

3.1. Comet Yöntemi Sonuçları

Hasta ve kontrol grubunda nDNA hasarı comet yöntemi ile periferik kan lenfositlerinde incelenmiştir. Sonuçlar, lenfosit DNA hasarının göstergesi olarak; tail intensity (TI), DNA tail (DNAt), tail moment (TM) ve olive tail moment (OTM) olmak üzere dört parametrede değerlendirilmiş ve elde edilen ortalama, standart sapma, minimum ve maksimum değerleri hesaplanarak Çizelge 3.1’de gösterilmiştir.

Çizelge.3.1. Maruz ve kontrol grubu comet parametreleri istatistikleri.

Comet Parametresi	Gruplar	n	Ortalama	Standart sapma	Minimum değerler	Maksimum değerler
Tail Intensity	Maruz	118	44627.96	15246.43	9743	85435
	Kontrol	118	34852.01	7406.20	13902.41	51915.20
DNA Tail	Maruz	118	79.56	29.10	27.13	148.12
	Kontrol	118	70.51	19.11	20.88	116.13
Tail Moment	Maruz	118	4.21	1.51	1.36	10.28
	Kontrol	118	3.17	0.54	1.41	4.11
Olive Tail Moment	Maruz	118	566.94	636.60	9.92	2998.43
	Kontrol	118	447.82	448.63	8.92	2591.34

Comet yöntemi sonuçlarına göre lenfosit DNA hasar parametreleri, maruz grubunda kontrol grubuna göre yüksek olup, istatistiksel olarak OTM hariç diğer parametreler anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0.05$), (Çizelge.3.2).

Çizelge.3.2. Maruz ve kontrol grubunun comet yöntemi sonuçları (ortalama±standart sapma).

	TI	DNA_t	TM	OTM
Maruz	44627.96±15246.43	79.56±29.10	4.21±1.51	566.94±636.60
Kontrol	34852.01±7406.20	70.51±19.11	3.17±0.54	447.82±448.63
p	0.001*	0.005*	0.001*	0.098

*p<0.05

Bu anlamlılık her iki gruptaki sigara içen bireyler kıyaslandığında da devam etmekte ve maruz grubundaki sigara içen bireylerin DNA hasarı, kontrol grubundaki sigara içen bireylere göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p<0.05), (Çizelge.3.3).

Çizelge.3.3. Sigara içen, maruz ve kontrol bireylerindeki DNA hasarı.

Gruplar	n	TI Ortalama±S.S	DNA_t Ortalama±S.S	TM Ortalama±S.S	OTM Ortalama±S.S
Sigara içen maruz	79	45816.80±15013.43	81.11±28.69	4.35±1.64	587.95±661.59
Sigara içen kontrol	56	32891.40±8930.75	63.94±23.31	3.01±0.65	317.39±319.62
p		0.001*	0.001*	0.001*	0.005*

*p<0.05

Ancak, hem maruz grup hem de kontrol grubunun DNA hasar parametreleri, sigara kullanımı ve yaşla karşılaştırıldığında ise aralarında istatistiksel açıdan anlamlı bir ilişki bulunmamıştır (p>0.05).

Maruz grup kendi içinde sigara içimi ve comet parametreleri açısından değerlendirildiğinde ise DNA hasarı, sigara kullanan maruz bireylerde sigara

kullanmayan maruz bireylere göre yüksek olmasına karşın istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$).

Maruz bireylere ait DNA hasar parametreleri ile bireylerin çalışma yılları değerlendirildiğinde ortalama çalışma yılı 15.47 ± 9.05 bulunmuştur. Çizelge 3.4'te görüldüğü gibi çalışma yılı >15 olan bireylerdeki DNA hasarı <15 olan bireylere göre yüksek olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki gözlenmemiştir ($p>0.05$). Ayrıca DNA hasar parametreleri, maruz gruptaki bireylerin meslekleri ile karşılaştırıldığında da istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ($p>0.05$).

Çizelge.3.4. Maruz bireylerin çalışma yılları ile DNA hasar parametreleri arasındaki ilişkiye ait istatistik veriler.

	Çalışma yılları	n	Ortalama$\pm$S.S	p
TI	<15	64	43004.43 $\pm$ 13814.52	p>0.05
	>15	54	46552.13 $\pm$ 16713.73	
DNA_t	<15	64	77.85 $\pm$ 27.37	p>0.05
	>15	54	81.59 $\pm$ 31.17	
TM	<15	64	4.11 $\pm$ 1.47	p>0.05
	>15	54	4.32 $\pm$ 1.57	
OTM	<15	64	463.15 $\pm$ 532.96	p>0.05
	>15	54	689.95 $\pm$ 727.02	

3.2. Comet Parametreleri Arasındaki İlişkinin Değerlendirilmesi

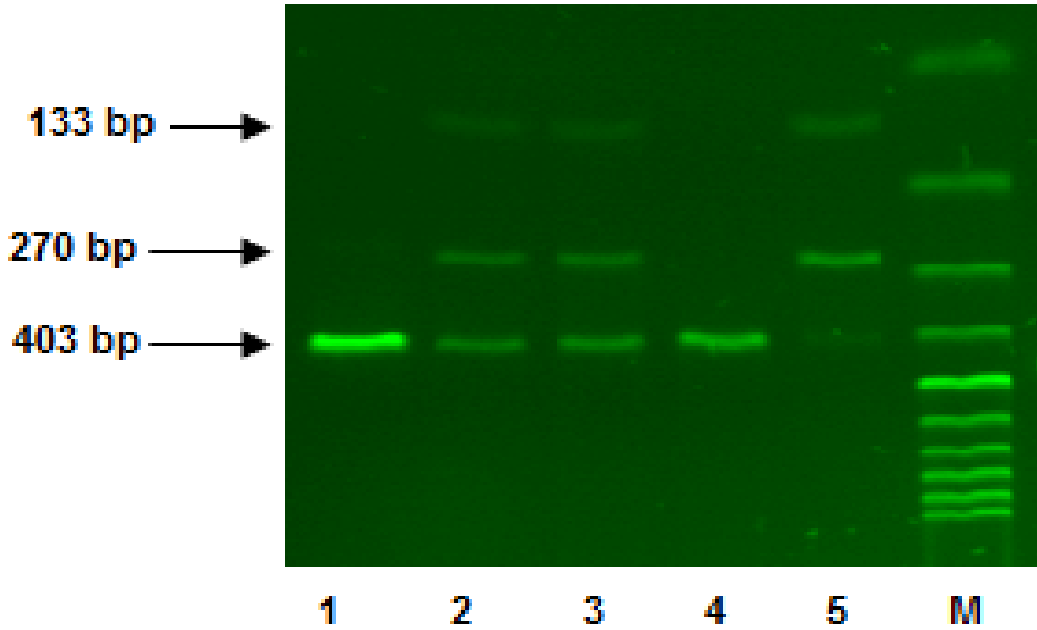
Comet parametrelerinin birbirleri ile ilişkisinin istatistiksel değerlendirmesi korelasyon analizi ile yapılmıştır. Yapılan korelasyon analizi sonucunda, comet parametreleri arasında kuvvetli ve doğrusal bir ilişkinin olduğu görülmüştür ($p < 0.001$), (Çizelge.3.5).

Çizelge.3.5. Comet parametrelerinin birbirine göre korelasyonu.

		Tail Intensity	DNA Tail	Tail Moment	Olive Tail Moment
Tail Intensity	Pearson korelasyonu	1	0.688**	0.905**	0.461**
	p değeri		0.001	0.001	0.001
DNA Tail	Pearson korelasyonu	0.688**	1	0.557**	0.609**
	p değeri	0.001		0.001	0.001
Tail Moment	Pearson korelasyonu	0.905**	0.557**	1	0.394**
	p değeri	0.001	0.001		0.001
Olive Tail Moment	Pearson korelasyonu	0.461**	0.609**	0.394**	1
	p değeri	0.001	0.001	0.001	

3.3. Organik Çözücülere Maruz Kalan Bireylerde XRCC1 Arg399Gln (G→A) Polimorfizm Analiz Sonuçları

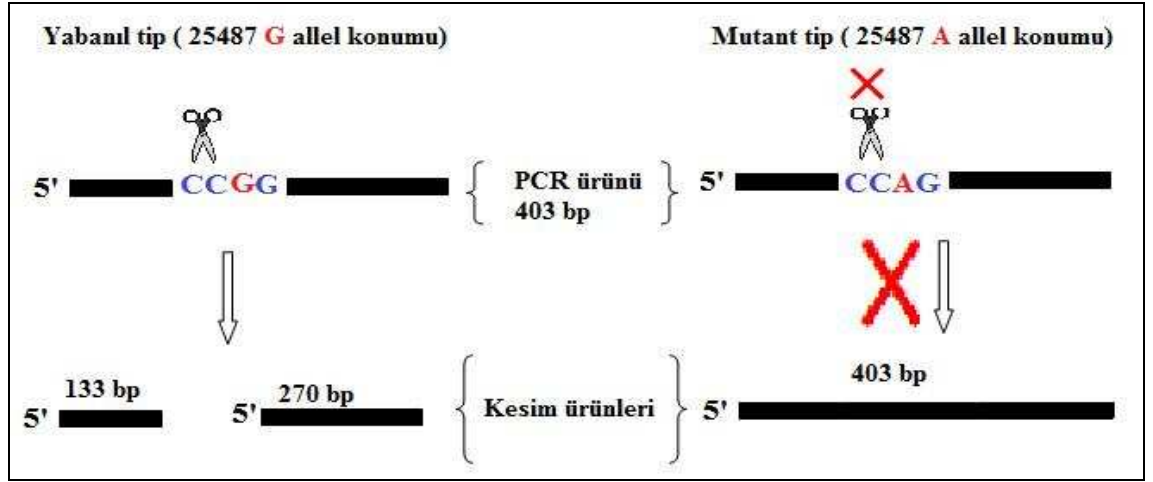
DNA örneklerinin XRCC1 enzimini kodlayan, ekzon 10'daki 403 bp'lik bölgesi PCR yöntemi ile amplifiye edilmiştir. PCR ürünleri RFLP tekniği ile *MspI* enzimi kullanılarak kesilmiştir. XRCC1 Arg399Gln genotiplemesi için *MspI* enzimi 5'...C↓CGG ...3' ve 3'...GGC↑C...5' bölgelerinden amplifiye edilmiş DNA dizisini tanıyarak keser. Bu sonuçlar jel görüntüleme cihazında UV ışık altında fotoğraflanarak değerlendirilmiştir (Şekil.3.2).



Şekil.3.2. 403 bp'lik amplifikasyon ürününün *MspI* enzimi ile kesim sonucunda oluşan oligonükleotid uzunlukları. (M=100 bp Ladder; 1= 403 bp'lik PCR ürünü; 2 ve 3 Arg/Gln genotip: 133 bp, 270 bp, 403 bp; 4=Gln/Gln genotip: 403 bp; 5= Arg/Arg genotip: 133 bp, 270 bp).

Bireyler *homozigot tipik genotipli: Arg/Arg (GG) ise*; *MspI* enzimi 403 bp'lik bölgeyi 5' ucundan CCGG dizisini tanıyarak keser. Bunun sonucu olarak da 403 bp'lik amplifikasyon ürünü; 133 bp ve 270 bp'lik iki oligonükleotid parçasına ayrılmış olur ve iki bant gözlenir. *Homozigot atipik genotipli: Gln/Gln (AA) ise*; CCAG dizisine bağlanamaz ve bu bölgedeki kesim işlemini gerçekleştiremez ve 403 bp'lik oligonükleotid parçası gözlenir. Bireyler *heterozigot genotipli: Arg/Gln (GA)*

ise; bireylerin tek DNA ipliğinde “-5G”, diğer DNA ipliğinde “-5A” olduğundan; MspI enzimi ile kesim sonucunda; bir DNA ipliği, GG genotipli bireylerde olduğu gibi, 133 bp ve 270 bp olarak iki oligonükleotide ayrılır. Diğer DNA ipliğinde ise AA genotipli bireylerde olduğu gibi, kesim işlemi gerçekleştiremez ve heterozigot genotiplilerin oligonükleotid bantları 133 bp, 270 bp ve 403 bp olarak üç bant şeklinde gözlenir. XRCC1 Arg399Gln kesim ürünleri Şekil 3.3’te şematize edilerek gösterilmiştir.



Şekil.3.3. MspI restriksiyon enziminin tanıma bölgesi ve kesim ürünlerinin şematik gösterimi.

Çalışmamız sonucunda; organik çözücülere maruz kalan bireylerde (n:118), XRCC1 Arg399Gln polimorfizminin; % 33.9’u homozigot tipik (Arg/Arg), % 52.5’i heterozigot (Arg/Gln) ve % 13.6’sı homozigot atipik (Gln/Gln) genotip olarak belirlenmiştir. XRCC1 Arg399Gln polimorfizmi ile oluşan alel frekansları ise (n:236); Arg alel frekansı; % 60.2 (n:142), Gln alel frekansı ise % 39.8 (n:94) olarak belirlenmiştir (Çizelge.3.6).

Çizelge.3.6. Organik çözücülere maruz kalan bireylerde XRCC1 Arg399Gln polimorfizmi ile oluşan genotip ve alel frekansları.

XRCC1 Polimorfizm	Genotip Frekansı (n:118)	
	n	%
Arg/Arg (Homozigot tipik)	40	33.9
Arg/Gln (Heterozigot)	62	52.5
Gln/Gln (Homozigot atipik)	16	13.6
Alel (Arg/Gln)	Alel Frekansı (n:236)	
	n	%
Arg	142	60.2
Gln	94	39.8

Yapılan istatistiksel analizler sonucunda çalıştığımız populasyonun XRCC1 geninin 399. kodonunda sahip oldukları genotipler Hardy-Weinberg eşitliğinde olup gösterdikleri genotip dağılımı Çizelge 3.7’de gösterilmiştir.

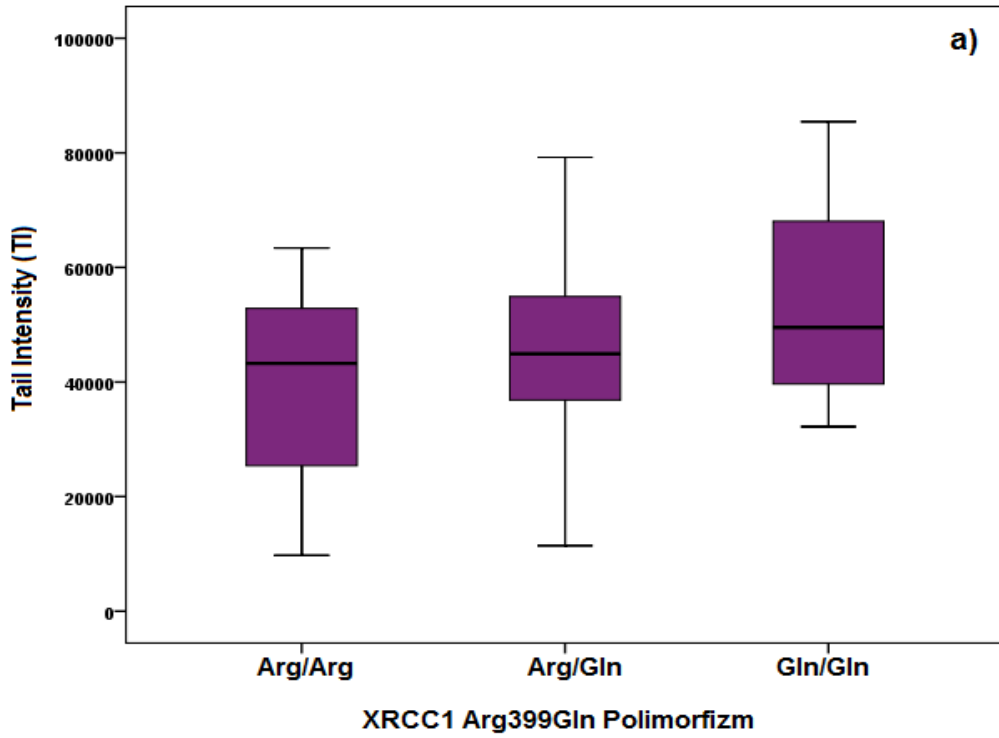
Çizelge.3.7. Çalıştığımız populasyonun Hardy-Weinberg dengesinde olup olmadığının tespiti.

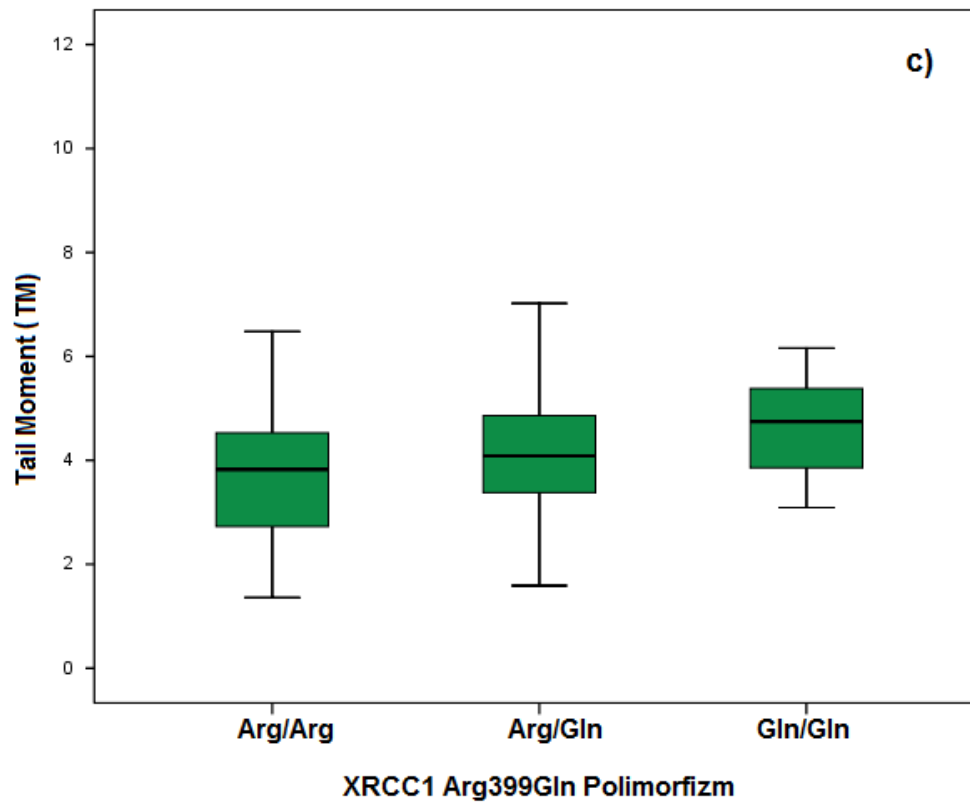
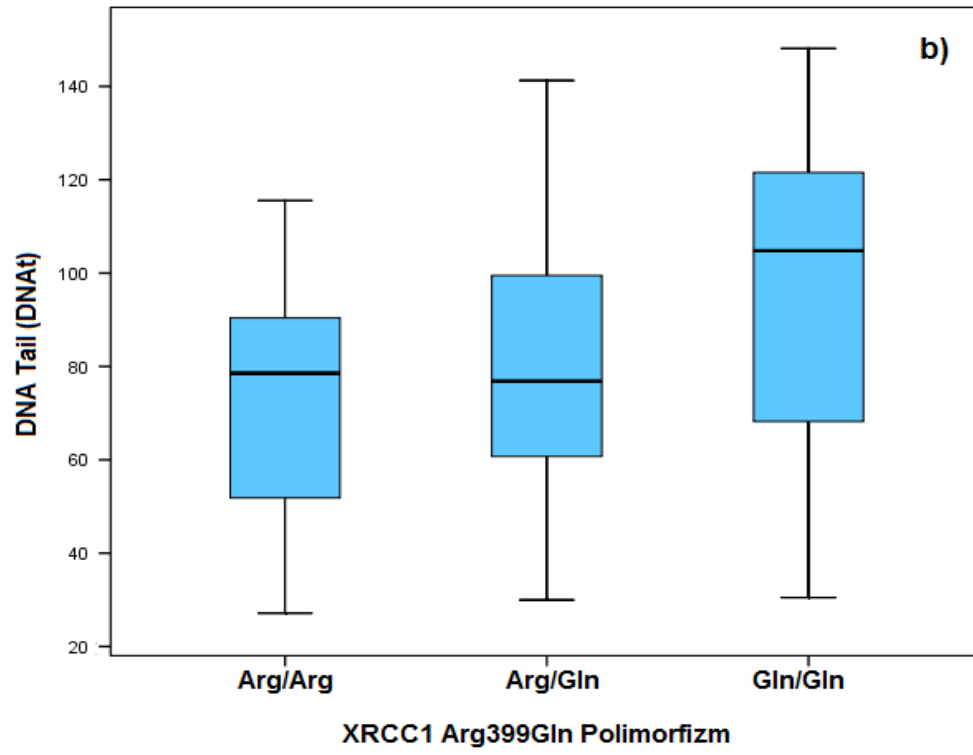
	Arg/Arg (Homozigot tipik) (n)	Arg/Gln (Heterozigot) (n)	Gln/Gln (Homozigot atipik) (n)	Toplam (n)
Gözlenen	40	62	16	118
Beklenen	42.72	56.56	18.72	118
P>0.05				

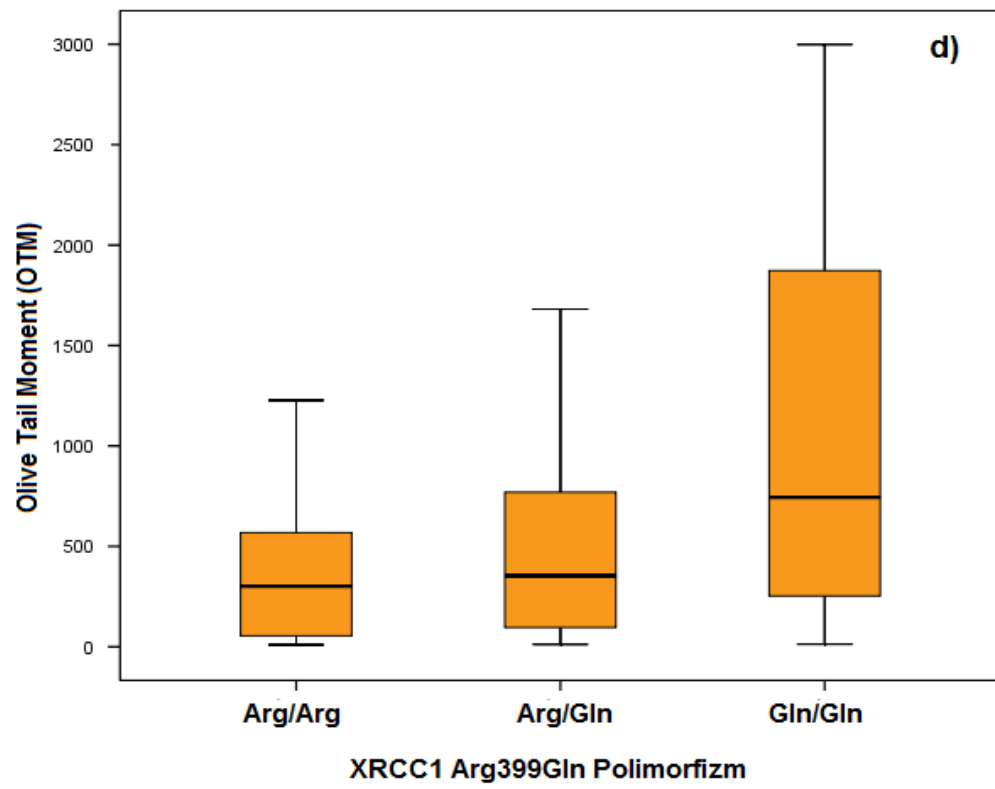
3.4. Organik Çözücülere Maruz Kalan Bireylerde Comet Yöntemi Sonuçları ile XRCC1 Arg399Gln Polimorfizm Sonuçlarının Karşılaştırılması

Organik çözücülere maruz kalan bireylerde, XRCC1 Arg399Gln polimorfizmi ile comet parametreleri arasında istatistiksel olarak oldukça anlamlı bir ilişki olduğu tespit edilmiştir ($p < 0.05$). XRCC1 Arg399Gln homozigot atipik (Gln/Gln) ile heterozigot (Arg/Gln) genotipe sahip bireylerde, homozigot tipik (Arg/Arg) bireylere göre lenfosit DNA hasarının oldukça yüksek olduğu belirlenmiştir (Şekil.3.4), (Çizelge.3.8).

Şekil.3.4. Organik çözücülere maruz kalan bireylerde; a) XRCC1 Arg399Gln polimorfizmi ile TI, b) XRCC1 Arg399Gln polimorfizmi ile DNAt, c) XRCC1 Arg399Gln polimorfizmi ile TM, d) XRCC1 Arg399Gln polimorfizmi ile OTM değerleri.







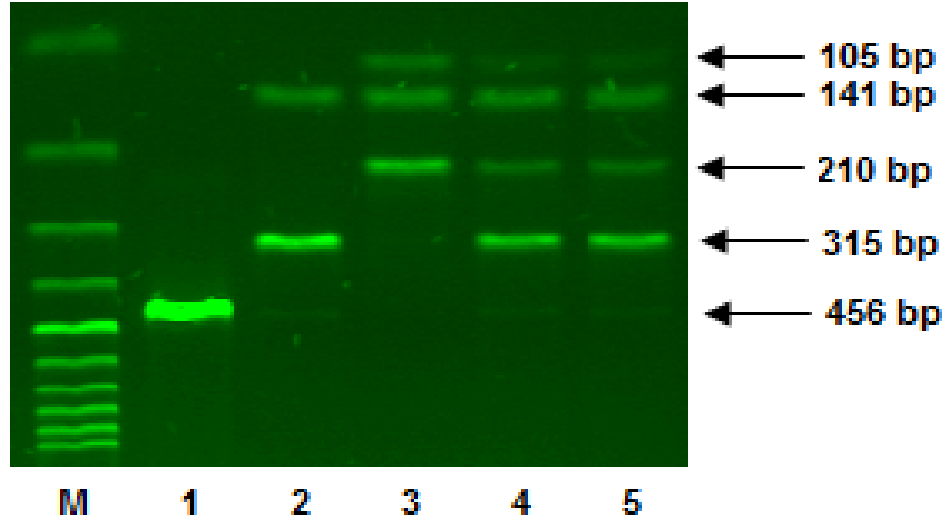
Çizelge.3.8. Organik çözücülere maruz kalan bireylerde XRCC1 Arg399Gln polimorfizmi ile TI, DNAt, TM, OTM comet parametrelerinin istatistiksel değerleri.

Comet Parametrelri	XRCC1	n	Ortalama±Standart Sapma	Minumum Değerler	Maksimum Değerler	P
TI	Arg/Arg	40	39407.75±16201.84	9743	63369	0.005*
	Arg/Gln	62	45750.88±13132.69	11431	79217	
	Gln/Gln	16	53327.15±16452.10	32211	85435	
DNAt	Arg/Arg	40	71.35±26.61	27.13	115.54	0.020*
	Arg/Gln	62	80.94±27.22	29.99	141.26	
	Gln/Gln	16	94.71±36.30	30.48	148.12	
TM	Arg/Arg	40	3.68±1.28	1.36	6.48	0.004*
	Arg/Gln	62	4.31±1.41	1.59	9.98	
	Gln/Gln	16	5.10±1.98	3.09	10.28	
OTM	Arg/Arg	40	421.16±492.73	9.92	2050.42	0.004*
	Arg/Gln	62	540.29±565.67	11.79	2395.17	
	Gln/Gln	16	1034.64±967.24	13.03	2998.43	

*p<0.05

3.5. Organik Çözücülere Maruz Kalan Bireylerde XRCC3 Thr241Met (C→T) Polimorfizm Analiz Sonuçları

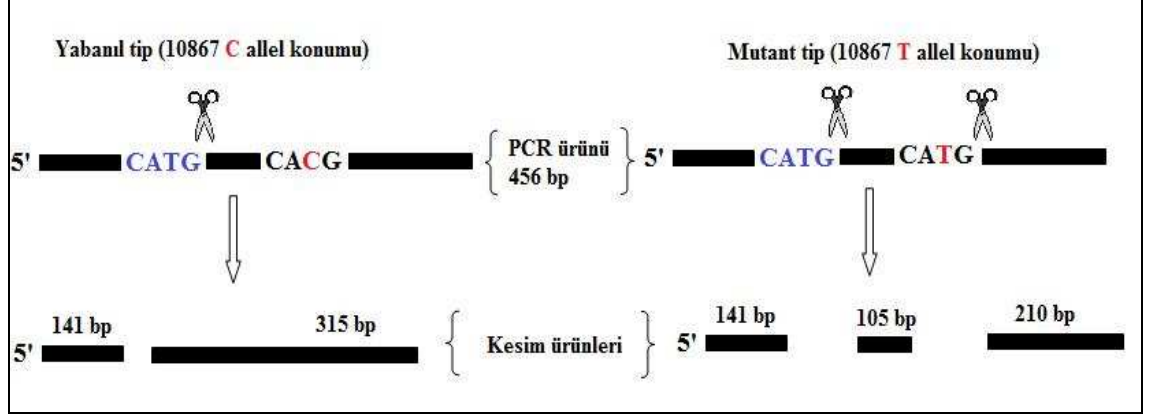
DNA örneklerinin XRCC3 enzimini kodlayan, ekzon 7'deki 456 bp'lik bölgesi PCR yöntemi ile amplifiye edilmiştir. PCR ürünleri RFLP tekniği ile *NlaIII* enzimi kullanılarak kesilmiştir. XRCC3 Thr241Met genotiplemesi için *NlaIII* enzimi 5' ...CATG↓ ...3' ve 3'...↑GTAC...5' bölgelerinden amplifiye edilmiş DNA dizisini tanıyarak keser. Bu sonuçlar jel görüntüleme cihazında UV ışık altında fotoğraflanarak değerlendirilmiştir (Şekil.3.5.).



Şekil.3.5. 456 bp'lik amplifikasyon ürününün NlaIII enzimi ile kesim sonucunda oluşan oligonükleotid uzunlukları. (M=100 bp Ladder; 1= 456 bp' lik PCR ürünü; 2 = Thr/Thr genotip: 141 bp, 315 bp; 3=Met/Met genotip: 105 bp, 141 bp, 210 bp; 4 ve 5=Thr/Met genotip: 105 bp, 141 bp, 210 bp, 315 bp).

Bireyler *homozigot tipik genotipli*: *Thr/Thr (CC)* ise, NlaIII enzimi 456 bp'lik bölgeyi 5' ucundan CATG dizisini tanıyarak keser. Bunun sonucu olarak da 456 bp'lik amplifikasyon ürünü; 141 bp ve 315 bp'lik iki oligonükleotid parçasına ayrılmış olur ve iki bant gözlenir. *Homozigot atipik genotipli*: *Met/Met (TT)* ise; CATG dizisine bağlanarak kesim işlemini gerçekleştirir ve 105 bp, 141 bp ve 210 bp'lik üç oligonükleotid parçası gözlenir. Bireyler *heterozigot genotipli*: *Thr/Met (CT)* ise; bireylerin tek DNA ipliğinde “-5C”, diğer DNA ipliğinde “-5T” olduğundan; Nla III enzimi ile kesim sonucunda; bir DNA ipliği, CC genotipli bireylerde olduğu gibi, 141 bp ve 315 bp olarak iki oligonükleotide ayrılır. Diğer DNA ipliğinde ise TT genotipli bireylerde olduğu gibi 105 bp, 141 bp ve 210 bp'lik üç oligonükleotide ayrılır ve heterozigot genotiplilerin oligonükleotid bantları 105

bp, 141 bp, 210 bp ve 315 bp olarak dört bant şeklinde gözlenir. XRCC3 Thr241Met kesim ürünleri Şekil 3.6’da şematize edilerek gösterilmiştir.



Şekil.3.6. NlaIII restriksiyon enziminin tanıma bölgesi ve kesim ürünlerinin şematik gösterimi.

Çalışmamız sonucunda; organik çözücülere maruz kalan bireylerde (n:118), XRCC3 Thr241Met polimorfizminin; % 40.7’si homozigot tipik (Thr/Thr), % 42.4’ü heterozigot (Thr/Met) ve % 16.9’u homozigot atipik genotip (Met/Met) olarak belirlenmiştir. XRCC3 Thr241Met polimorfizmi ile oluşan alel frekansları ise (n:236); C alel frekansı; % 61.8 (n:146), T alel frekansı ise % 38.2 (n:90) olarak belirlenmiştir (Çizelge.3.9).

Çizelge.3.9. Organik çözücülere maruz kalan bireylerde XRCC3 Thr241Met polimorfizmi ile oluşan genotip ve alel frekansları.

XRCC3 Polimorfizm	Genotip Frekansı (n:118)	
	n	%
Thr/Thr (Homozigot tipik)	40	4.7
Thr/Met (Heterozigot)	62	42.4
Met/Met (Homozigot atipik)	16	16.9
Alel (Thr/Met)	Alel Frekansı (n:236)	
	n	%
Thr	146	61.8
Met	90	38.2

Yapılan istatistiksel analizler sonucunda çalıştığımız populasyonun XRCC3 geninin 241. kodonunda sahip oldukları genotipler Hardy-Weinberg eşitliğinde olup gösterdikleri genotip dağılımı Çizelge 3.10’da gösterilmiştir.

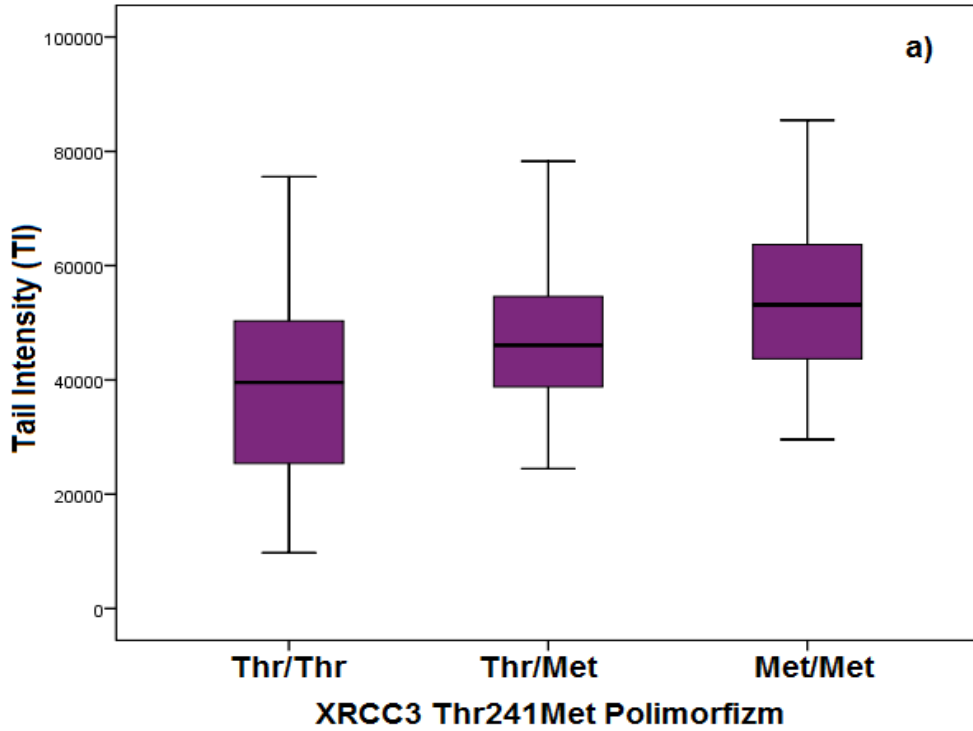
Çizelge.3.10. Çalıştığımız populasyonun XRCC3 genotipinin Hardy-Weinberg dengesinde olup olmadığının tespiti.

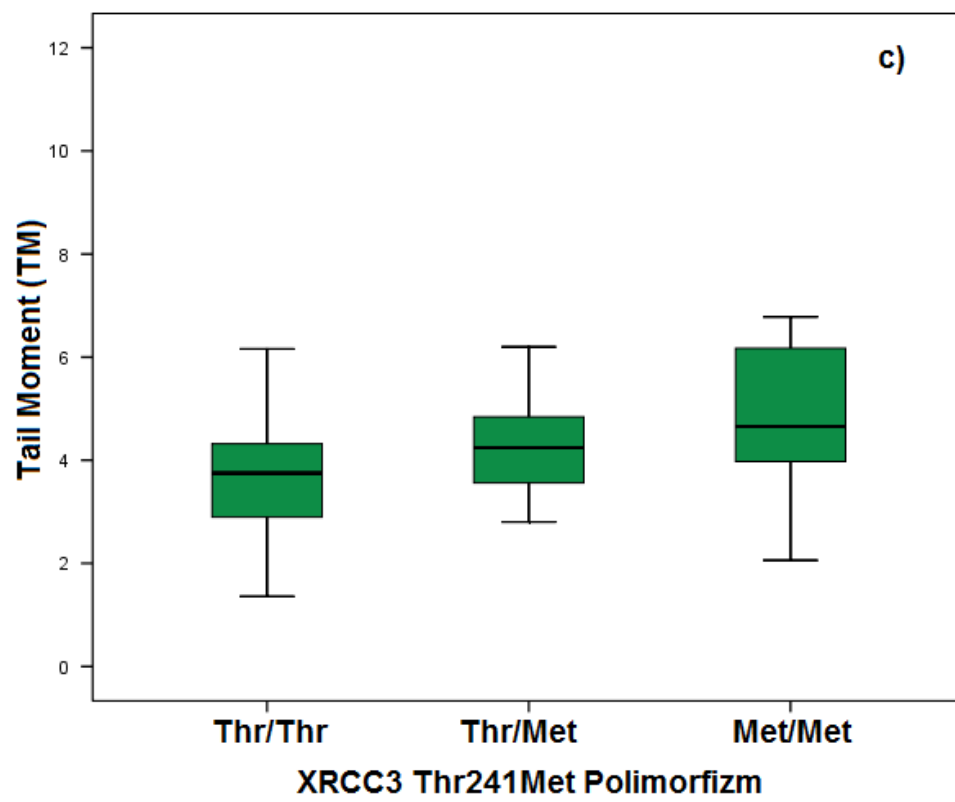
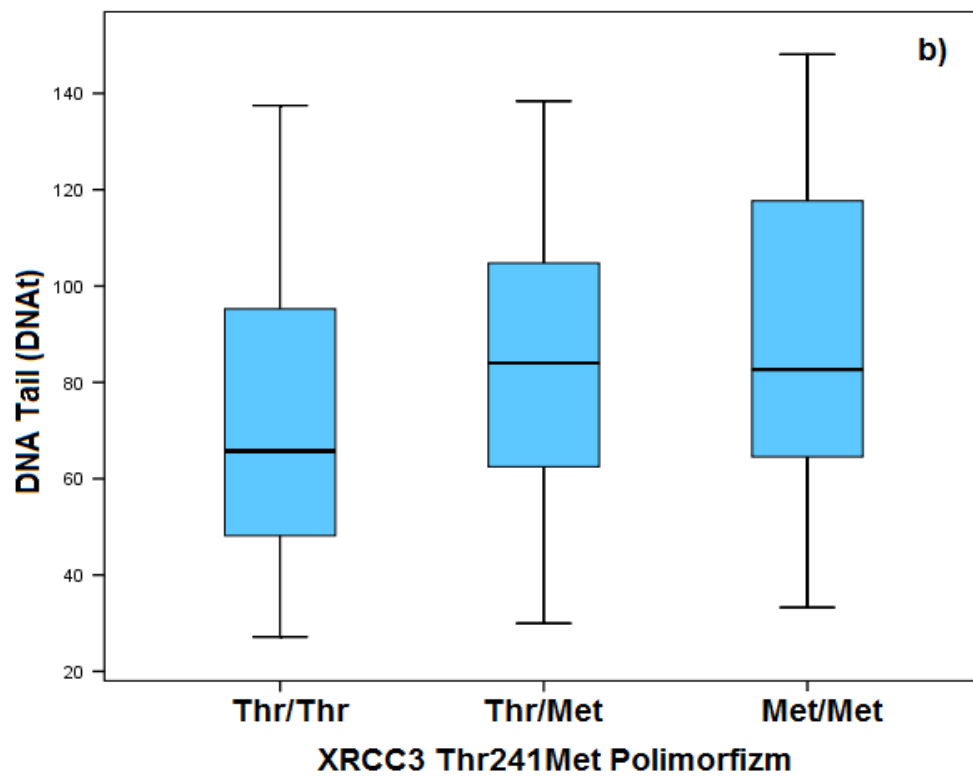
	Thr/Thr (Homozigot tipik) (n)	Thr/Met (Heterozigot) (n)	Met/Met (Homozigot atipik) (n)	Toplam (n)
Gözlenen	48	50	20	118
Beklenen	45.16	55.68	17.16	118
	P>0.05			

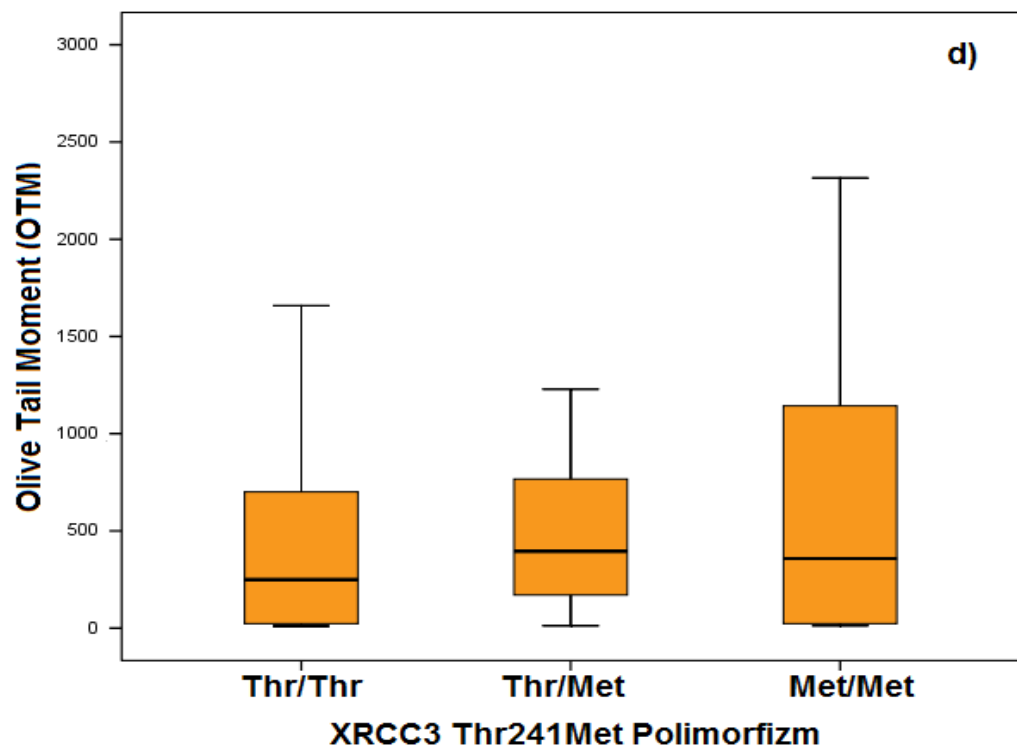
3.6. Organik Çözücülere Maruz Kalan Bireylerde Comet Yöntemi Sonuçları ile XRCC3 Thr241Met Polimorfizm Sonuçlarının Karşılaştırılması

Organik çözücülere maruz kalan bireylerde, XRCC3 Thr241Met polimorfizmi ile OTM parametresi hariç diğer comet parametreleri arasında istatistiksel olarak oldukça anlamlı bir ilişki tespit edilmiştir ($p < 0.05$). XRCC3 Thr241Met homozigot atipik (Met/Met) birey ile heterozigot (Thr/Met) genotipe sahip bireylerde, homozigot tipik (Thr/Thr) bireylere göre, lenfosit DNA hasar göstergesi TI, DNAt ve TM değerlerinin oldukça yüksek olduğu belirlenmiştir (Şekil.3.7), (Çizelge.3.11).

Şekil.3.7. Organik çözücülere maruz kalan bireylerde; a) XRCC3 Thr241Met polimorfizmi ile TI, b) XRCC3 Thr241Met polimorfizmi ile DNAt, c) XRCC3 Thr241Met polimorfizmi ile TM, d) XRCC3 Thr241Met polimorfizmi ile OTM.







Çizelge.3.11. Organik çözücülere maruz kalan bireylerde XRCC3 Thr241Met polimorfizmi ile TI, DNAt, TM, OTM comet parametrelerinin istatistiksel değerleri.

Comet Parametreleri	XRCC3	n	Ortalama±S.S	Minimum Değerler	Maksimum Değerler	P
TI	Thr/Thr	48	38434.86±15591.98	9743	75553	0.001*
	Thr/Met	50	46769.26±12174.75	11431	78271	
	Met/Met	20	54138.14±15608.35	29555	85435	
DNAt	Thr/Thr	48	71.45±29.61	27.13	137.49	0.036*
	Thr/Met	50	83.93±2562	29.99	138.40	
	Met/Met	20	88.11±32.55	33.30	148.12	
TM	Thr/Thr	48	3.64±1.21	1.36	7.02	0.001*
	Thr/Met	50	4.34±1.28	1.59	9.15	
	Met/Met	20	5.22±2.08	2.06	10.28	
OTM	Thr/Thr	48	496.07±611.84	9.92	2395.17	0.436
	Thr/Met	50	575.99±562.88	11.79	2425.58	
	Met/Met	20	714.40±846.53	12.45	2998.43	

*p<0.05

3.7. Organik Çözücülere Maruz Kalan Bireylerdeki XRCC1 ve XRCC3 Genotiplerinin Kombinasyonunun DNA Hasar Parametreleri ile İlişkisi

XRCC1 ve XRCC3 genotiplerinin kombinasyonu DNA hasar parametreleri açısından incelenmiş ve sonuçlar Çizelge 3.12’de verilmiştir. Organik çözücülere maruz kalan bireyler sahip oldukları XRCC1 ve XRCC3 genotiplerine göre DNA hasar parametreleri ile değerlendirildiğinde Arg/Gln+Gln/Gln ve Thr/Met+Met/Met genotip kombinasyonuna sahip bireylerin DNA hasar parametreleri diğer genotip kombinasyonlarına sahip bireylerin DNA hasarından yüksek olup OTM hariç istatistiksel olarak oldukça anlamlı bir ilişki belirlenmiştir (p<0.05). Ayrıca genotip kombinasyonları, XRCC1 Arg/Arg ve XRCC3 Thr/Thr genotip kombinasyonuna sahip bireylerle kıyaslandığında DNA hasar riski açısından anlamlı bir sonuç elde edilmiştir (Şekil.3.8).

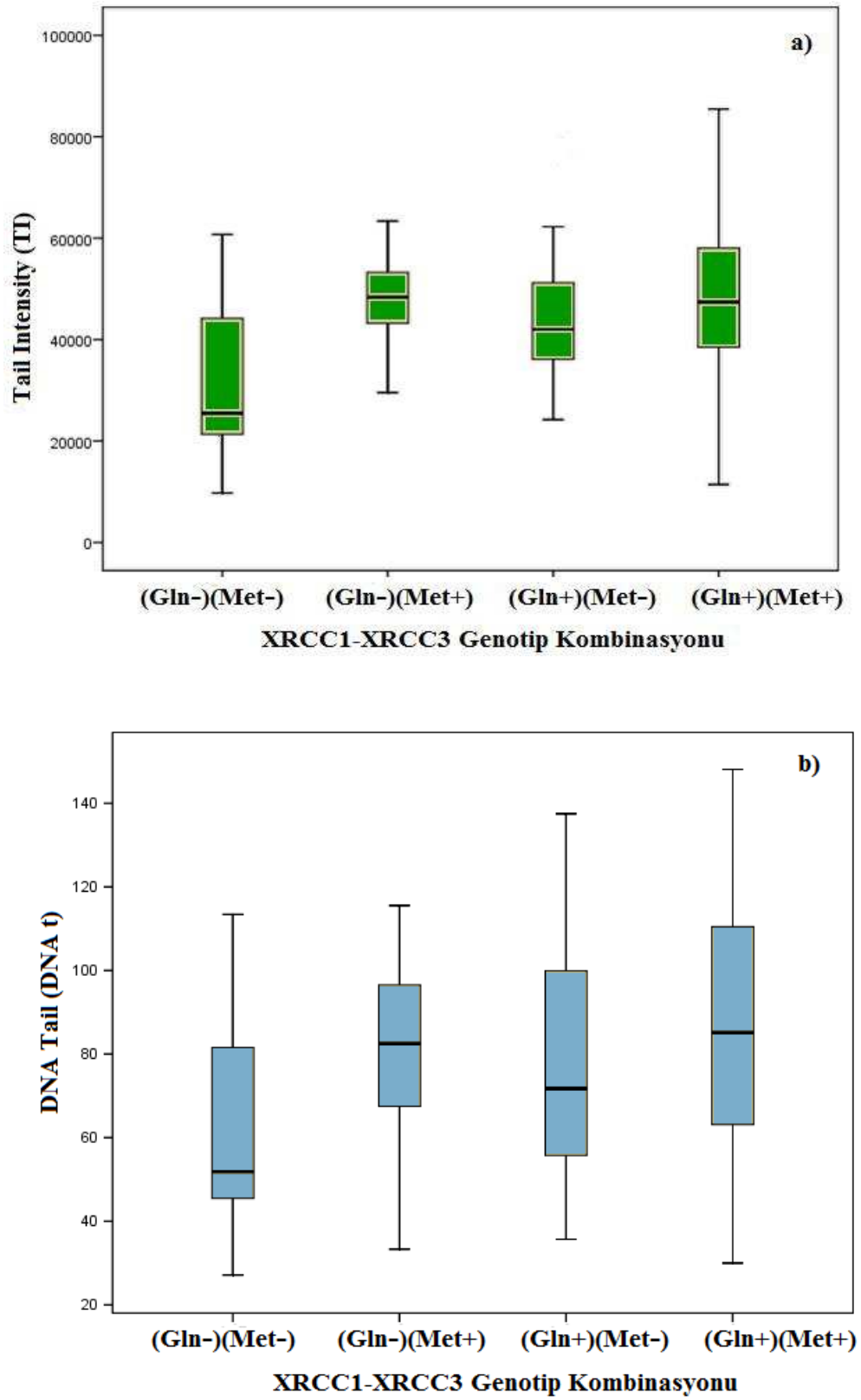
XRCC1 ve XRCC3 polimorfik varyantlarını karşılaştırmak için, Arg/Arg ve Thr/Met+Met/Met genotip kombinasyonuna sahip bireyler ile Arg/Gln+Gln/Gln ve Thr/Thr genotip kombinasyonuna sahip bireyler karşılaştırıldığında ise, Arg/Arg ve Thr/Met+Met/Met genotip kombinasyonunda TI, DNAt ve TM değerlerinin daha yüksek olduğu gözlenmiştir.

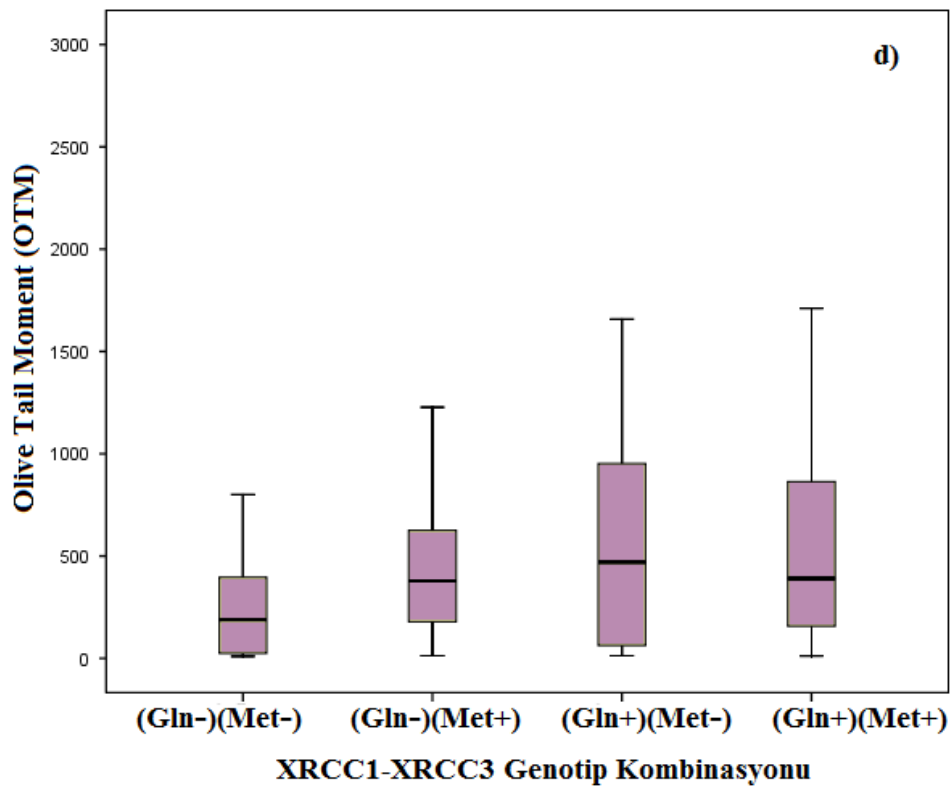
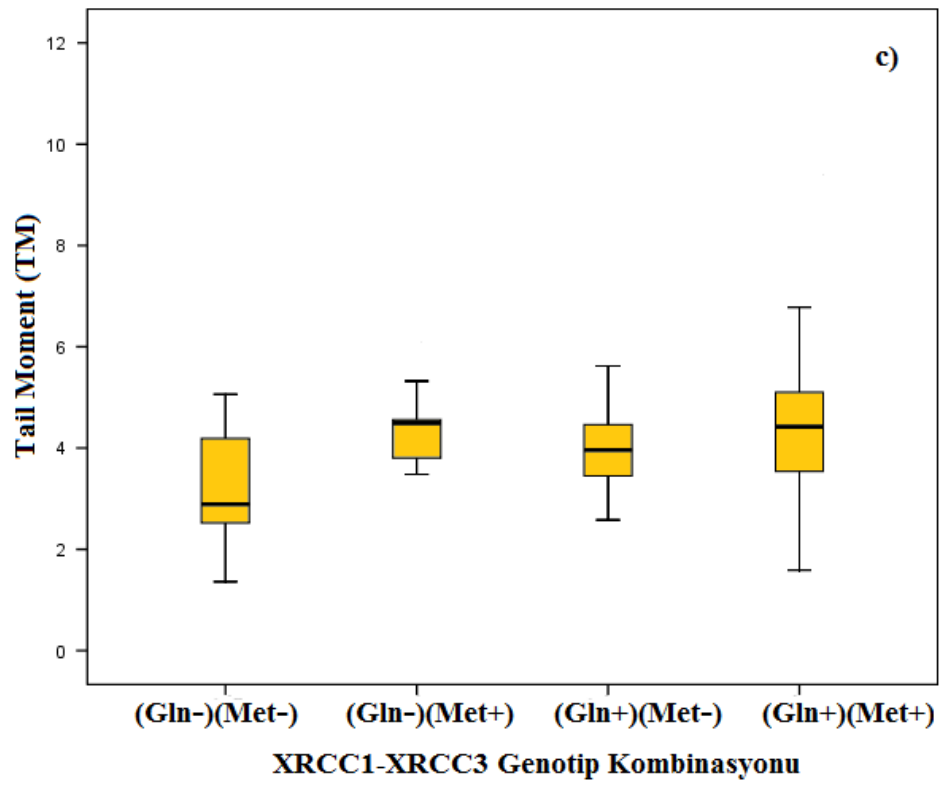
Çizelge.3.12. XRCC1 ve XRCC3 genotiplerinin kombinasyonunun DNA hasar parametreleri açısından incelenmesi.

	XRCC1	XRCC3	n	Ortalama±S.S	Minimum Değerler	Maksimum Değerler	P
TI	Arg/Arg	Thr/Thr	21	31503.99±17289.25	9743	60707	0.001*
	Arg/Arg	Thr/Met+Met/Met	19	48143.49±9120.53	29555	63369	
	Arg/Gln+Gln/Gln	Thr/Thr	27	43825.53±11855.56	24206	75553	
	Arg/Gln+Gln/Gln	Thr/Met+Met/Met	51	49147.05±14937.37	11431	85435	
DNAt	Arg/Arg	Thr/Thr	21	62.62±28.48	27.13	113.40	0.015*
	Arg/Arg	Thr/Met+Met/Met	19	81.01±21.11	33.30	115.54	
	Arg/Gln+Gln/Gln	Thr/Thr	27	78.31±29.14	35.70	137.49	
	Arg/Gln+Gln/Gln	Thr/Met+Met/Met	51	86.66±29.69	29.99	148.12	
TM	Arg/Arg	Thr/Thr	21	3.06±1.22	1.36	5.06	0.001*
	Arg/Arg	Thr/Met+Met/Met	19	4.36±0.98	2.06	6.48	
	Arg/Gln+Gln/Gln	Thr/Thr	27	4.10±1.01	2.58	7.02	
	Arg/Gln+Gln/Gln	Thr/Met+Met/Met	51	4.68±1.76	1.59	10.28	
OTM	Arg/Arg	Thr/Thr	21	326.66±462.33	9.92	2050.42	0.245
	Arg/Arg	Thr/Met+Met/Met	19	525.60±516.33	12.45	2009.80	
	Arg/Gln+Gln/Gln	Thr/Thr	27	627.83±686.362	12.85	2395.17	
	Arg/Gln+Gln/Gln	Thr/Met+Met/Met	51	649.04±698.63	11.79	2998.43	

*p<0.05

Şekil.3.8. XRCC1 ve XRCC3 genotip kombinasyonlarının DNA hasar riski açısından değerlendirilmesi.





4. TARTIŞMA

Organik çözücüler endüstriyel bileşikler olarak gerek sanayi ürünlerinin üretiminde ara ürün olarak, gerekse son ürünlerin üretimine kadar çeşitli çalışma alanlarında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır ve bu sektörlerde çalışan bireyler mesleksi olarak birden fazla çözücü karışımlarına maruz kalabilmektedir (Viaene, 2002). Bu bileşiklerin toksisitesi genellikle lipofilik özelliklerinden kaynaklanmaktadır. Uzun süreli maruziyet yağ dokuda konsantrasyonunun artmasına ve toksik maddelerin hücresel membranın lipid tabakasında birikmelerine neden olur (Schenker ve Jacobs, 1996; Flanagan ve Meredith, 1996). Birçok organik çözücünün genotoksik ve karsinogenik etkileri bilinmektedir. Merkezi sinir sistemi toksisitesi, dermatit, hematolojik etkiler, karaciğer ve renal hasarları da içine alan sağlık sorunlarına neden olabilirler (Viaene, 2002).

Çalışma alanlarında kullanılan çözücülerin sayısı ve çeşitliliği, maruziyet şekli, çalışma süresince kimyasalların birbiri ile etkileşimi, absorpsiyonu ve metabolik ürünleri, maruz kalınan maddelerin genotoksitesinin değerlendirilmesini zorlaştırmaktadır. Ancak iş yerlerinde kimyasal maddelere maruziyetle ilgili biyolojik göstergeler, iş sağlığı ve güvenliği koşullarını iyileştirmede stratejik bir öneme sahip olup insan sağlığına yönelik risklerin belirlenmesi açısından da giderek önem kazanmaktadır.

Serbest radikaller, normal aerobik metabolizmanın devamı sırasında hücrelerde oksijen ve metabolitleri oluşurken ortaya çıkabildiği gibi farmasötikler, endüstriyel kimyasallar, radyasyon gibi fiziksel etkenler nedeniyle de oluşabilir (De Bont ve van Larebeke, 2004). Serbest oksijen radikalleri, DNA'da oksitlenmiş bazlar, abazik bölgeler, DNA sarmal kırıkları, DNA ve protein arasında çapraz bağlar gibi çeşitli lezyonları oluştururlar (Dizdaroğlu ve ark., 2002). DNA'da oluşan bu hasarların biyogöstergesi olarak kullanılan birçok yöntem bulunmaktadır. Çevrede bulunan potansiyel mutajen ve karsinogenlere maruziyet riskinin değerlendirilmesinde; kromozomal aberasyon (CA) tekniği, kardeş kromatid değişim yöntemi (SCE), mikro

çekirdek (MN) ve Comet (SCGE-tek hücre jel elektroforezi) gibi farklı genotoksisite testlerinden yararlanılmaktadır (Valverde ve Rojas, 2009; Moller, 2006). Bunlar içinde ilk kez 1988 yılında kurulan ve genotoksisite çalışmalarında çok sık kullanılan comet yöntemi daha sonraki yıllarda modifiye edilerek DNA hasarının farklı formlarının ve DNA onarımının belirlenmesinde kullanılmaya başlanarak avantajı arttırılmıştır (Valverde ve Rojas, 2009; Nandhakumar ve ark., 2011). Son yıllarda comet testi önemli biyogöstergeler arasında yerini almıştır. Özellikle günümüzde mesleksi olarak düşük düzeyde maruziyetlerin neden olduğu genotoksik etkinin belirlenmesinde yüksek düzeyde hassas yöntemler tercih edilip, comet testi de DNA hasarının kantitatif olarak belirlenmesine olanak vererek biyogösterge çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Faust ve ark., 2004).

Moleküler epidemiyoloji kansere yatkınlık faktörlerinin değerlendirilmesinde büyük bir potansiyele sahip olup birçok çalışma, genetik duyarlılığın kansere veya diğer hastalıklara yakalanma riski ile ilişkisini araştırmaktadır. Bu çalışmalarda ksenobiyotik metabolizmasında veya DNA onarımında rol oynayan enzimlere öncelik verilmektedir. Özellikle DNA tamir genlerindeki polimorfizmlerin belirlenmesi genotipik düzeyde gen-çevre etkileşiminin incelenmesini mümkün kılıp DNA tamir geni polimorfizmlerinin DNA onarım kapasitesini etkilediği ve bu nedenle toksisite ve hastalık riski ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Ginsberg, 2011; Au, 2006).

Toksikolojik araştırmaların kapsadığı en önemli alan, maruz kalınan kimyasal maddelerle ilgili olarak, maruziyeti hastalığa ve toksik cevaba dönüştüren hücresel mekanizmayı belirlemeye yönelik çalışmalardır. Şu ana kadar yapılan çalışmalarda, organik çözücülere maruziyetle genomik DNA hasarlarının oluşabileceği (Zhu ve ark., 2000; Pariselli ve ark., 2009; Roma-Torres ve ark., 2006) ve DNA onarım gen polimorfizmi ve kanser riski ile ilişkili olarak bireysel duyarlıklar tespit edilmiştir (Zhou ve ark., 2003; Shen ve ark., 2005; Custódio ve ark., 2011; Canbay ve ark., 2011; Yin ve ark., 2012).

Genetik polimorfizm çalışmalarının yanı sıra erken dönem genotoksik etkilerin belirlenmesi amacıyla son zamanlarda özellikle genotoksik parametrelerin, genetik polimorfizm testleri ile kombine edildiği çalışmalara önem verilmektedir (Norppa, 2003).

Çalışmamızda bu temel unsurlardan yola çıkılarak lenfosit DNA hasarı ve ilgili bazı gen polimorfizmlerinin rolünü araştırdık. Bu amaçla çalıştığı iş yeri nedeniyle organik çözücülere maruz kalma olasılığı olan bireyler ve sağlıklı kontrol grubunda comet yöntemi uygulayarak DNA hasarını, organik çözücülere maruz kalan bireylerin PCR-RFLP metodu ile de XRCC1 Arg399Gln ve XRCC3 Thr241Met genetik polimorfizmlerini ve elde edilen sonuçların DNA hasarı ile ilişkisini inceledik. Bu çalışmanın şu ana kadar yapılan çalışmalardan farkı; bugüne kadar yapılan birçok çalışma ile mesleksi olarak organik çözücülere maruz kalan bireylerde DNA hasar düzeyleri belirlenmiştir. Ancak DNA hasarı ve XRCC1 ve XRCC3 onarım gen polimorfizmleri arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışma sayısı çok fazla olmayıp ülkemizde bu alanda yapılan ilk çalışmadır.

Çalışmamızın comet yöntemi ile elde edilen sonuçlarına göre, organik çözücülere maruz kalan bireylerde gözlenen lenfosit DNA hasarının kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu bulunmuştur ($p<0.05$). Bu anlamlılık her iki gruptaki sigara içen bireyler kıyaslandığında da devam etmekte ve maruz grubundaki sigara içen bireylerin DNA hasarı, kontrol grubundaki sigara içen bireylere göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Ancak maruz grupta sigara içimi ile DNA hasarı kıyaslandığında ise istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p>0.05$).

Farklı meslek ve çalışma alanları için organik çözücülere maruziyetle oluşabilecek genetik hasarları, comet yöntemini uygulayarak (Zhu ve ark., 2001; Grower ve ark., 2003; Cavallo ve ark., 2006; Sardaş ve ark., 2010; Manikantan ve ark., 2010) ve mesleksi maruziyetle ilişkili erken dönem genotoksik etkilerin belirlenmesi

amacıyla da CA (kromozomal aberasyon), MN (mikroçekirdek), SCE (kardeş kromatid değişimi)'i belirleyen çalışmalar da mevcuttur.

Marczynski ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada, yol-yapım çalışmalarında asfalt buharına maruz kalan bireylerde anlamlı derecede yüksek DNA katım (adduct) ürünü ve DNA hasarı belirlenmiştir (Marczynski ve ark., 2011). Karaman ve arkadaşları da yapmış oldukları çalışma ile asfalt buharına maruziyetin genotoksik etkisini SCE ve MN formasyonu şeklinde maruz grup için göstermişlerdir (Karaman ve ark., 2009). Somorovska ve arkadaşları da plastik sanayiinde çalışan bireylerde, hem comet parametrelerini hem de MN ve CA değerlerini anlamlı derecede yüksek bulup comet tekniği ile gözlenen DNA kırıklarının onarılamadığı için kromozomal mutasyona neden olduğunu belirtmişlerdir (Somorovska ve ark., 1999).

Organik çözücülere maruziyet ve lenfosit DNA hasarı ile ilişkili çalışmaların sonuçları incelendiğinde, genotoksisite testi olarak comet yöntemini uygulayan ve bizim çalışmamızın sonuçlarıyla uyumlu olan çalışmalar da bulunmaktadır. Boya endüstrisinde çalışan bireyler de, boya imalatında kullanılan toluen, ksilen, alkol gibi çözücü bileşiklere maruz kalmaktadır. de Oliveira ve arkadaşları comet yöntemini kullandıkları çalışmada, boya endüstrisinde çalışan bireylerde hem epitel hücrelerdeki hem de periferik lökositlerdeki DNA hasarını kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulmuşlardır (de Oliveira ve ark., 2011).

Anestezi teknikerleri üzerinde yapılan diğer bir çalışmada ise, DNA hasarı kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek gözlenmiş, mesleki olarak anestezi gazlarına maruziyetin oksidatif DNA hasarını arttırdığı belirtilmiştir (Sardaş ve ark., 2006). Yapısında PAH'lar ve stiren gibi bileşikler içeren bilgisayar ve fotokopi yazıcılarının mürekkeplerine maruz kalan bireylerin yer aldığı bir diğer çalışmada ise, kontrol grubuna kıyasla bazal DNA hasarında anlamlı bir artış ve onarım düzeyinde azalma gözlenmiştir (Goud ve ark., 2001).

Bazı çalışmalarda ise organik çözücülere maruz kalan bireylerde DNA hasarıyla ilgili anlamlı herhangi bir sonuç bulunamamıştır. Järholm ve arkadaşlarının çalışmasında PAH'lara maruz kalan asfalt işçilerinin lenfositlerinde SCE ve MN oranları anlamlı bulunmamıştır (Järholm ve ark., 1999). Ayrıca Pitarque ve arkadaşlarının çalışmasında ise mesleksen olarak organik çözücülere maruziyetin comet parametreleri üzerinde herhangi bir etkisi olmadığı belirtilmiştir (Pitarque ve ark., 1999). Çelişkili sonuçları içeren çalışma sayısı oldukça az olup, sonuçlar çevresel faktörlerin etkisiyle, maruziyet şartlarındaki değişkenliğe bağlı olabileceği gibi, maruz kalınan çözücülerin genellikle birden fazla kimyasal karışımını içerdiği için de etkilerinin belirlenememesi ihtimali de söz konusu olabilmektedir.

Çalışmamızda DNA hasar parametreleri ile sigara kullanımı, yaş ve çalışma süresi arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ($p>0.05$). Farklı meslek gruplarından organik çözücülere maruz kalan bireylerin yer aldığı çalışmalarda sigara içimi, yaş ve DNA hasarı arasında çelişkili sonuçlar bulunmaktadır.

Roma-Torres ve arkadaşları 2006 yılında yayınladıkları çalışmada, petrol rafinerisinde çalışan bireylerden aldıkları kan örneklerinde comet yöntemini uygulayarak DNA hasarını değerlendirmişlerdir. Çalışmanın sonucu bizim sonuçlarımıza paralel olarak, bu bireylerdeki DNA hasarı istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuş, sigara kullanımı ile genotoksik etkiyi gösteren parametreler arasında anlamlı bir ilişki olmadığı tespit edilmiştir (Roma-Torres ve ark., 2006).

Bizim çalışmamızda da hem maruz hem de kontrol grubu için DNA hasar parametreleri ile sigara kullanımı ve yaş arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmayıp ($p>0.05$), Leng ve arkadaşları da çalışmamızla uyumlu olarak sigara kullanımı ve yaşı DNA hasar parametresi olarak inceledikleri TM değeri ile anlamlı bir ilişkisi olmadığını belirlemişlerdir (Leng ve ark., 2004). Bu sonuçlarla benzer olarak, organik çözücülere maruz kalan bireylerde DNA hasarı ile sigara ve yaş arasında anlamlı bir ilişki olmadığını belirten birçok çalışma bulunmaktadır.

(Somorovska ve ark., 1999; Sul ve ark., 2002; Zeljezic ve ark., 2001; Pitarque ve ark., 1999; Sardaş ve ark., 2006).

Çalışmamızda sigara içen maruz birey DNA hasarı ile sigara içen kontrol birey DNA hasarı karşılaştırıldığı zaman, sigara içen maruz bireylerin sigara içen kontrol bireylerine göre DNA hasarı anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Şu ana kadar yapılan çalışmalarla sigaranın genotoksik etkisi belirlenmiştir. Ancak hem maruz grup hem de kontrol grubundaki tek farkın maruziyet olduğu düşünülürse bu sonuç; maruz gruptaki DNA hasarının kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olmasının sigara kullanımı ile değil, maruz kalınan organik çözücülerin etkisinden kaynaklandığının bir göstergesi olabilir.

İlaveten çalışmamızda maruz grubunda sigara kullanımı ile DNA hasar parametreleri arasında bir ilişki gözlenmedi. DNA hasar parametreleri sigara içen ve içmeyen maruz bireylerde birbirine yakın değerlerde gözlenmiş olup, maruz grup için sigaranın, genotoksik bir sinerjik etki göstermediği düşünülebilir. Ancak bizim çalışmamızdan farklı olarak birkaç çalışmada ise, organik çözücü maruziyetinde sigara kullanımı veya yaşın DNA hasarı ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (Zhu ve ark., 2001; Lam ve ark., 2002).

Kronik olarak organik çözücülere maruziyet ile ilgili genotoksisite çalışmalarının yanında, in vitro ve hayvan çalışmalarıyla organik çözücülerin genotoksik etkilerini, comet yöntemi uygulayarak belirleyen çalışmalar da bulunmaktadır (Berthelot-Ricou ve ark., 2011; Liu ve ark., 2011; Chen ve ark., 2007; Ribeiro ve ark., 2006). Bu çalışmalar hem çevresel hem de mesleksi olarak maruz kalınan çözücülerin insan sağlığına yönelik risklerinin belirlenmesi açısından önemli olabilmektedir.

Çalışmamızın amaçlarından biri de lenfosit DNA hasarı ile DNA onarım gen polimorfizmi arasındaki ilişkinin araştırılmasıydı. Bu amaçla; PCR-RFLP metodu ile XRCC1 Arg399Gln ve XRCC3 Thr241Met genetik polimorfizmlerini inceledik. XRCC1 Arg399Gln ve XRCC3 Thr241Met polimorfizmlerini seçmemizin nedeni

ise, temel olarak DNA hasarı onarım mekanizmalarında rol alan enzimleri kodlayan genlerin içerisinde yer almalarıydı.

XRCC1 proteini özellikle aktif oksijen, alkilleyici ajanlar ve iyonize radyasyon tarafından oluşturulan tek zincir kırıklarının tamirinde ve baz hasarlarının onarılmasında koordinasyonu sağlamaktadır. Dolayısıyla bu enzimin DNA hasarına karşı koruyucu rolü de önemlidir (Thacker ve Zdzienicka, 2003). XRCC1 genindeki tek nokta mutasyonu (G/A) 399. kodonda 25487. pozisyonda Arjinin/Glutamin değişimine neden olur. XRCC3 proteini de çift zincir kırıkları, çapraz bağların onarımında HRR yolağında anahtar rolü üstlenir ve Rad51 protein ailesinin bir üyesidir (Yamada, 2004). XRCC3 genindeki tek nokta mutasyonu (C/T) ise 241. Kodonda 18067. pozisyonunda Treonin/Metionin değişimine neden olmaktadır. Bu polimorfizmler DNA onarımında görev alan XRCC1 ve XRCC3 enzimlerinin aktivitesini etkileyebilmektedir (De Ruyck ve ark., 2007). Bu nedenle XRCC1 ve XRCC3 gen polimorfizmleri genetik hasar ve kanser riski ile ilişkilendirilmiştir (Duarte ve ark., 2005; Shen ve ark., 2005; Au ve ark., 2003; Araujo ve ark., 2002).

Literatürde XRCC1 ve XRCC3 gen polimorfizmlerinin hastalık ve kanser riski ile ilişkisini inceleyen çalışmalar (Santos ve ark., 2010; Palli ve ark., 2010; Narter ve ark., 2009) ve farklı meslek gruplarında çeşitli ekzojen ajanlara maruz kalan bireylerde XRCC1 veya XRCC3 gen polimorfizmlerini ve DNA hasarını inceleyen çalışmalar bulunmaktadır (Andreassi ve ark., 2009; Cho ve ark., 2009; Iarmarcovai ve ark., 2005; Aka ve ark., 2004). Ayrıca ülkemizde de bazı kanserlerde XRCC1 ve XRCC3 gen polimorfizmin rolünü inceleyen çalışmalar da mevcuttur (Canbay ve ark., 2011; Cengiz ve ark., 2008; Karahalil ve ark., 2006).

Çalışmamız ülkemizde organik çözücülere maruziyeti olan bireylerde DNA hasarı ile XRCC1 ve XRCC3 gen polimorfizmleri arasındaki ilişkiyi inceleyen ilk çalışmadır.

Çalışmamızda, organik çözücülere maruz kalan bireylerdeki XRCC1 Arg399Gln ve XRCC3 Thr241Met genetik polimorfizmlerinin sıklığı ve comet yöntemi

sonuçlarının bu polimorfizmlere göre dağılımı incelenmiştir. XRCC1 Arg399Gln ve XRCC3 Thr241Met genotiplerinin dağılımları istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). Sonuçlarımıza göre, XRCC1 Gln/Gln homozigot atipik, Arg/Gln heterozigot ve XRCC3 Met/Met homozigot atipik, Thr/Met heterozigot genotipli bireylerdeki DNA hasarının homozigot tipik bireylere göre yüksek olduğu saptanmıştır. Ayrıca XRCC1 ve XRCC3 genotip kombinasyonları incelendiğinde OTM hariç comet parametreleri ile mutant genotip kombinasyonları (Arg/Gln+Gln/Gln ve Thr/Met+Met/Met) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkili olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$).

Organik çözücü maruziyetinde DNA hasarının, XRCC1 ve XRCC3 polimorfizmlerine göre dağılımını inceleyen çalışma sayısı oldukça az olup, var olan çalışmalar da birbirleriyle çelişkili sonuçlar içermektedir.

Leng ve arkadaşları, XRCC1 genindeki Arg194Trp, Arg280His ve Arg399Gln polimorfizmlerinin DNA hasarı üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Bu çalışmada, kok üretim fabrikasında, DNA hasarı ve zincir kırılmalarına neden olan PAH'lara maruz kalan bireylerdeki DNA hasarının kontrollere göre anlamlı derecede yüksek olduğu gözlenmiştir. Ancak XRCC1 Arg399Gln polimorfizmi ile DNA hasarı arasında bir ilişkisi bulunmazken, Arg280His polimorfizminin DNA onarım kapasitesi ile ilişkili olabileceği belirtilmiştir (Leng ve ark., 2004).

İspanya açıklarında 2002 yılında petrol tankeri kazasından sonra 63,000 ton petrolün Galiçya sahiline ulaşmasıyla, gönüllü olarak bu sahilin temizliğine katılan bireyler çeşitli uçucu organik bileşiklere maruz kalmışlardır. Laffon ve arkadaşları bu kimyasalların maruz bireylerdeki genotoksik etkisini comet ve MN yöntemlerini uygulayarak belirlemişlerdir. Maruz ve kontrol grubu karşılaştırılınca, MN frekansları anlamlı bulunmazken, maruz bireylerdeki comet parametresi kontrollere göre anlamlı derecede yüksek olup XRCC1 399Gln genotipli bireylerde DNA hasarının yüksek olduğu saptanmıştır. XRCC3 gen polimorfizmi ile DNA hasarı arasında ise anlamlı bir ilişki gözlenmemiştir (Laffon ve ark., 2006).

Godderis ve arkadaşları ise, stirene maruz kalan bireylerdeki DNA hasarı ile XRCC1 ve XRCC3 gen polimorfizimleri arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. Comet yöntemi sonucuna göre maruz ve kontrol arasında anlamlı bir fark olmadığını, ayrıca genetik polimorfizmin comet parametresini etkilemediğini bildirmişlerdir. Ancak XRCC1 399Gln ve XRCC3 241Met alellerine sahip bireylerdeki MN frekansının ise istatistiksel olarak yüksek olduğunu belirtmişlerdir (Godderis ve ark., 2004).

Zhang ve arkadaşları kronik olarak benzene maruz kalan bireylerde XRCC1, XRCC3, APE1 ve ADPRT gen polimorfizmlerini belirlemişlerdir. XRCC1 Arg399Gln, APE1 Asp148Glu, ADPRT Val762Ala ve XRCC3 Thr241Met polimorfizmlerini hasta ve kontrol gruplarında karşılaştırdıklarında anlamlı bir fark gözlenmediği ancak XRCC1 genetik varyantlarının kronik benzen maruziyeti ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir (Zhang ve ark., 2005).

Organik çözücülere maruz kalan bireylerdeki genotoksik etkileri belirlemek amacıyla CA ve MN düzeyleri ile DNA onarım gen polimorfizmlerini inceleyen çalışmalar arasında da çelişkili sonuçlar bulunmaktadır.

Organik çözücülere maruz kalan bireylerdeki kromozomal aberasyonları (CAs) ve ksenobiyotik metabolizma ve onarım genlerindeki polimorfizmi inceleyen Hoyos-Giraldo ve arkadaşlarının çalışmasında, XRCC1 Arg399Gln polimorfizmi ile CA arasında herhangi bir ilişki bulunamamıştır. Ancak XRCC3 Thr241 homozigot tipik genotip ile CA arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki belirlenmiştir. Literatüre göre bu farklı sonucun homolog rekombinasyon sürecinde Rad51 dengesindeki veya çift zincir kırıklarının onarılmasındaki eksiklikten kaynaklanabileceğini belirtmişlerdir (Hoyos-Giraldo ve ark., 2009). Bu çalışma, XRCC3 polimorfizm çalışmaları içinde Thr241 tipik genotipi ile genotoksik biyogösterge arasında anlamlı ilişkiyi bulan tek çalışma olup, şu ana kadar bu çalışmayı destekleyen başka bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Angelini ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise, benzene maruz kalan bireylerdeki genotoksik etkiyi belirlemek için MN testini uygulayıp, APEX1, hOGG1, NBS1, XPD, XRCC1 ve XRCC3 gen polimorfizmlerini incelemişlerdir. Çevresel olarak benzene maruz kalan trafik memurlarında MN değeri kontrole göre istatistiksel olarak yüksek olup MN değeri ile DNA onarım gen polimorfizmleri arasında herhangi bir ilişki bulunmamıştır (Angelini ve ark., 2012).

Musak ve arkadaşları ise genotoksik etkiyi CA testi ile belirleyerek XRCC1 ve XRCC3 gen polimorfizmlerini araştırmışlardır. Sitostatik ilaçların hazırlanmasında bu ajanlara maruz kalan bireylerdeki XRCC1 399Gln genotipli bireylerin Arg399 genotipli bireylere göre ve XRCC3 ekzon 7'deki mutant Met alelinin, Thr aleline göre yüksek CA düzeyine sahip olduğunu belirtmişlerdir (Musak ve ark., 2006). CA testi de önemli biyogösterge çalışmalarından biri olup, genotoksik parametrenin genetik polimorfizmi ile kombinasyonu olan bu çalışma bizim çalışmamızın sonucu ile uyumluluk göstermektedir.

Hücrede genomik bütünlüğü sağlamada ve kanserden korunmada DNA onarım enzimlerini kodlayan genler, başlıca kansere duyarlılık genleri olarak kabul edilmektedir (Goode ve ark., 2002). Şu ana kadar yapılan çalışmalarda tek bir polimorfizmin maruz kalınan çözücü toksisitesini etkileyebileceği fakat DNA onarım genleri ve ksenobiyotik mekanizmasında rol oynayan genlerdeki birden fazla polimorfizmin DNA hasarı, kanser riski ve diğer hastalıkların etkisini daha da fazla arttırabileceği belirtilmiştir (Krajinovic ve ark., 2002). Ancak genotoksik etkiyi belirlemek için kullanılan biyogöstergeler (CA, MN, Comet) ile onarım genlerindeki polimorfizmler arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışma sonuçları farklılık göstermektedir. Comet yöntemi ile sıklıkla onarılabilen DNA hasarları belirlenirken, MN ve CA testi ile geri dönüşümü olmayan yapısal ya da sayısal değişimler incelenebilmektedir. Bu nedenle comet yöntemi ile yakın süreçteki maruziyetler ile oluşan DNA hasarını ölçmek mümkün olabileceği gibi bireylerin sahip olduğu onarım kapasitesi hakkında da yorum yapılabilmektedir.

Çalışmamızda, organik çözücülere maruz kalan bireylerdeki DNA hasar duyarlılığını araştırmak amacıyla, iki farklı genetik polimorfizm (XRCC1 Arg399Gln ve XRCC3 Thr241Met) incelendi. Bu amaçla önce bireylerin lenfosit DNA hasarları belirlenmiş, daha sonra DNA hasar parametreleri ile DNA onarım gen polimorfizmleri arasındaki ilişki araştırılmıştır.

Çalışmamızda, organik çözücülere maruz kalan bireylerdeki XRCC1 Gln/Gln mutant genotipi ve XRCC3 Met/Met mutant genotipinin istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek DNA hasarına sahip olduğu gözlenmiştir. Ayrıca XRCC1 Arg/Gln+Gln/Gln ve XRCC3 Thr/Met+Met/Met mutant genotiplerinin kombinasyonu ile DNA hasar parametreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki belirlenmiştir. XRCC1 Arg/Arg ve XRCC3 Thr/Met+Met/Met kombinasyonuna sahip bireylerin DNA hasar parametreleri XRCC1 Arg/Gln+Gln/Gln ve XRCC3 Thr/Thr kombinasyonuna sahip bireylere göre daha yüksek bulunmuştur. Bu sonuç da, XRCC3 genotip varyantlarının XRCC1 genotip varyantlarına göre artan DNA hasarının gelişiminde daha etkili olduğunu gösterebilir.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Son yıllarda DNA onarım gen polimorfizm çalışmaları, bireylerin maruziyete ve hastalıklara duyarlılıklarının değerlendirilmesine, riskli genotiplerin kombinasyonlarının incelenmesine olanak sağladığı için daha da önem kazanmıştır. Ayrıca polimorfizm ile çeşitli genotoksik biyogöstergeler arasındaki ilişkinin belirlenmesi risk altındaki bireylerin belirlenerek gerekli önlemlerin alınması açısından önemli olabilir.

Çalışmamızda, çalıştığı iş yeri nedeniyle organik çözücülere maruz kalan 118 bireydeki lenfosit DNA hasarı incelenmiştir. Ayrıca DNA hasarı ile incelenen parametrelerin, bireysel duyarlılık ile ilgili olarak XRCC1 Arg399Gln ve XRCC3 Thr241Met genetik polimorfizmlerinin rolü araştırılmıştır.

Organik çözücülere maruz kalan bireylerde comet görüntü analiz tekniği ile belirlenen, TI, DNAt ve TM parametreleri, kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). İncelediğimiz XRCC1 ve XRCC3 genetik varyasyonlarının DNA hasar parametrelerini etkilediği sonucuna varılmıştır. Buna göre, XRCC1 399Gln ve XRCC3 241Met mutant alellerini taşıyan bireylerin istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek DNA hasarına sahip olduğu gözlenmiştir. Bu iki genetik polimorfizmin kombinasyonlarını da incelediğimizde, bu kombinasyonların DNA hasarına bireysel duyarlılıkla anlamlı derecede ilişkili olduğu belirlenmiştir.

Çalışmamızın yukarıda özetlenen sonuçları, DNA hasarında organik çözücülerin rolü olabileceğine ve bireysel duyarlılıkla ilgili olarak XRCC1 Arg399Gln ve XRCC3 Thr241Met polimorfizmlerinin rolü olduğuna dikkat çekmektedir. Ayrıca bu polimorfizmlerin, organik çözücülerin neden olduğu baz hasarları ve DNA kırıklarına karşı azalan onarım kapasitesi ile ilişkili olabileceği sonucuna varılmıştır. Bu sonuçlar farklı onarım mekanizmalarında görev alan XRCC1 ve XRCC3

enzimlerinin aktivitesinin yorumlanmasına ve riskli varyantların belirlenmesine olanak sağlayabilir.

Çalışmamız ülkemizde organik çözücülere maruziyeti olan bireylerde DNA hasarının XRCC1 ve XRCC3 gen polimorfizmleri arasındaki ilişkiyi inceleyen ilk bilimsel çalışma olmasından dolayı önemlidir. Bu alanda yapılan çalışma sayısının az olmasından dolayı DNA onarım genlerindeki diğer polimorfizmlerin de araştırılması hipotezimizin desteklenmesi için önemli olup, bu çalışmaların kronik organik çözücü maruziyeti olan bireylerde ortaya çıkabilecek sağlık sorunlarına dikkati çekebileceğini düşünmekteyiz. Her bireyin sahip olduğu polimorfik özelliklerin araştırması ve bu konuda bilgilendirilmesi mümkün olmayabilir. Ancak, bireyler mesleksel olarak çözücülere maruz kalabilecekleri iş yerlerinde çalışacaklarsa düzenli sağlık kontrollerinin yapılmasını önermekteyiz. Ayrıca mesleksel olarak maruziyeti azaltmak için çalışma sahalarında iş güvenliği ve sağlığı açısından gerekli tedbirlerin alınması ve kişisel koruyucu malzemelerinin kullanılması yönünde çalışanları bilgilendirerek bu konuya duyarlılık arttırılabilir.

Çalışmamızda incelediğimiz genlerinin yanı sıra, farklı genlerin bir arada araştırılması, diğer genotoksik biyogöstergeleri kullanarak nDNA hasarıyla beraber mtDNA hasarının da incelenmesi ilerdeki çalışma hedefi olarak belirlenebilir.

ÖZET

Organik Çözücülere Maruz Kalan Bireylerde Lenfosit DNA Hasarının XRCC1 ve XRCC3 Gen Polimorfizmleri ile İlişkisi

İş yerlerinde organik çözücülere mesleki maruziyet ciddi sağlık problemleri yaratabilir. Ayrıca çözücülerin metabolitleri protein ve DNA gibi makromoleküllere kovalent bağlanarak DNA hasarını içeren toksik etkiyi indükler. DNA onarım genlerindeki genetik varyasyonlar ise enzimlerin onarım faaliyetlerini etkileyebilir ve kanser riski ile ilişkili olabilir.

Bu çalışmada, endüstriyel organik çözücülere maruz kalan 118 işçinin periferik lenfositlerindeki DNA hasarı alkali comet tekniği ile tail intensity (TI), DNA tail (DNA_t), tail moment (TM), olive tail moment (OTM) parametrelerini değerlendirilerek tespit edilmiş ve bireysel duyarlılıkla ilgili olarak da X-ray repair cross-complementing gene 1 (XRCC1) Arg399Gln ve X-ray repair cross-complementing gene 3 (XRCC3) Thr241Met gen polimorfizmleri PCR-RFLP tekniği ile analiz edilmiştir. Ayrıca DNA hasar parametreleri ile DNA onarım gen polimorfizmleri arasındaki ilişki de araştırılmıştır.

DNA hasar düzeylerinin XRCC1 ve XRCC3 polimorfik genotipleri tarafından etkilendiği belirlenmiştir. XRCC1 399Gln genotipli bireylerin TI, DNA_t, TM ve OTM parametreleri XRCC1 Arg399 homozigot genotipli bireylere göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Benzer şekilde XRCC3 Thr241Met heterozigot ve XRCC3 241Met homozigot genotipleri de, OTM hariç DNA hasar parametrelerindeki artış ile istatistiksel olarak anlamlı derecede ilişkilidir ($p<0.05$).

Çalışmamızda XRCC1 Arg399Gln polimorfizm ve XRCC3 Thr241Met polimorfizm varyant genotiplerinin, baz hasarı ve zincir kırıklarını indükleyen organik çözücülere karşı azaltılmış DNA onarım kapasitesi ile ilişkili olabileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Comet Tekniği, Gen polimorfizmi, Lenfosit DNA Hasarı, Organik Çözücüler, XRCC1, XRCC3

SUMMARY

The Association of Lymphocytes DNA Damage with XRCC1 and XRCC3 Gene Polymorphisms in Workers Exposed to Organic Solvents

Occupational exposures of organic solvents at the work places can pose serious health hazard. Also, metabolites of solvents bind covalently to macromolecules, such as proteins and DNA in the tissue, and induce toxic effects, including DNA damage. Genetic variations in DNA repair genes might influence the repair activities of the enzymes and may relate to cancer risk.

In this study, alkaline comet assay was used to detect the DNA damage in peripheral blood lymphocytes in 118 workers exposed to industrial organic solvents, evaluated according to four image-analysis parameters including tail intensity (TI), DNA tail (DNAt), tail moment (TM), olive tail moment (OTM), and genetic polymorphisms of X-ray repair cross-complementing gene 1 (XRCC1) Arg399Gln and X-ray repair cross-complementing gene 3 (XRCC3) Thr241Met genes were analyzed by using PCR-RFLP technique as individual susceptibility parameters. We have also investigated the correlation between the DNA damage parameters and DNA repair gene polymorphisms.

We found that, DNA damage levels in workers were effected by the polymorphic genotypes of both XRCC3 and XRCC1 genes. TI, DNAt, TM and OTM parameters were significantly higher in workers with XRCC1 homozygote 399Gln genotype than workers with XRCC1 homozygote Arg399 genotype ($p < 0.05$). Accordingly, the XRCC3 heterozygote Thr241Met and XRCC3 homozygote 241Met genotypes were associated with a statistically significant increase of DNA damage parameters, except for OTM ($p < 0.05$).

In this study, it is suggested that variant genotypes of XRCC1 Arg399Gln polymorphism and XRCC3 Thr241Met polymorphism may be associated with decreased DNA repair capacity toward organic solvents induced base damage and strand breaks.

Key words: Comet Assay, Gene polymorphism, Lymphocyte DNA Damage, Organic Solvents, XRCC1, XRCC3

KAYNAKLAR

AGGARWAL, A.K. (1995). Structure and function of restriction endonucleases. *Curr Opin Struct Biol.* **5**(1):11-9.

AHSAN, H., ALI, A., ALI, R. (2003) Oxygen free radicals and systemic autoimmunity. *Clin Exp Immunol.* **131**(3):398-404.

AKA, P., MATEUCA, R., BUCHET, J.P., THIERENS, H., KIRSCH-VOLDERS, M. (2004). Are genetic polymorphisms in OGG1, XRCC1 and XRCC3 genes predictive for the DNA strand break repair phenotype and genotoxicity in workers exposed to low dose ionising radiations?. *Mutat Res.* **556**(1-2):169-81.

AKBARI, M., OTTERLEI, M., PENA-DIAZ, J., AAS, P.A., KAVLI, B., LIABAKK, N.B., HAGEN, L., IMAI, K., DURANDY, A., SLUPPHAUG, G., KROKAN, H.E. (2004). Repair of U/G and U/A in DNA by UNG2-associated repair complexes takes place predominantly by short-patch repair both in proliferating and growth-arrested cells. *Nucleic Acids Res.* **32**(18): 5486.

ANDREASSI, M.G., FOFFA, I., MANFREDI, S., BOTTO, N., CIOPPA, A., PICANO, E. (2009). Genetic polymorphisms in XRCC1, OGG1, APE1 and XRCC3 DNA repair genes, ionizing radiation exposure and chromosomal DNA damage in interventional cardiologists. *Mutat Res.* **666**(1-2):57-63.

ANGELINI, S., MAFFEI, F., BERMEJO, JL., RAVEGNINI, G., L'INSALATA, D., CANTELLI-FORTI, G., VIOLANTE, F.S., HRELIA, P. (2012). Environmental exposure to benzene, micronucleus formation and polymorphisms in DNA-repair genes: A pilot study. *Mutat Res.* 2012 Jan 11.

ARAUJO, F.D., PIERCE, A.J., STARK, J.M., JASIN, M. (2002). Variant XRCC3 implicated in cancer is functional in homology-directed repair of double-strand breaks. *Oncogene.* **21**:4176–80.

ARI, Ş. (2008). DNA'nın polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılması. *Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler*. Edt.: G. Temizkan, N. Arda. Nobel Tıp Kitabevleri. s.: 101-117.

AU, W.W., SALAMA, S.A., SIERRA-TORRES, C.H. (2003). Functional characterization of polymorphisms in DNA repair genes using cytogenetic challenge assays. *Environ Health Persp.* **1**: 1843–1850.

AU, W.W. (2006). Heritable susceptibility factors for the development of cancer. *J Radiat Res.* (Tokyo). 47 Suppl B:B13-7.

AZQUETA, A., SHAPOSHNIKOV, S., COLLINS, A.R. (2009). DNA oxidation: investigating its key role in environmental mutagenesis with the comet assay. *Mutat Res.* **674**(1-2):101-108.

BAYDAS, G., REITER, R.J., NEDZVEYSKII, V.S., YASAR, A., TUZCU, M., OZVEREN, F., CANATAN, H. (2003). Melatonin protects the central nervous system of rats against toluene-containing thinner intoxication by reducing reactive gliosis. *Toxicol. Lett.* **137**:169–174.

BERTHELOT-RICOU, A., PERRIN, J., DI GIORGIO, C., DE MEO, M., BOTTA, A., COURBIERE, B. (2011). Assessment of 1,2-propanediol (PrOH) genotoxicity on mouse oocytes by comet assay. *Fertil Steril.* **96**(4):1002-1007.

BOTSTEIN, D., WHITE, R.L., SKOLNICK, M., DAVIS, R.W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet.* **32**(3):314-331.

BOITEUX, S., RADICELLA, J.P. (1999). Base excision repair of 8-hydroxyguanine protects DNA from endogenous oxidative stress. *Biochimie.* **81**(1-2): 59-67.

BRENT, J. (2001). Current management of ethylene glycol poisoning. *Drugs.* **61**(7):979-88.

BURMISTROV, S.O., ARUTYUNYAN, A.V., STEPANOV, M.G., OPARINA, T.I., PROKOPENKO, V.M. (2001). Effect of chronic inhalation of toluene and

dioxane on activity of free radical process in rat ovaries and brain. *Bull. Exp. Biol. Med.* **132**:832–836.

CANBAY, E., CAKMAKOGLU, B., ZEYBEK, U., SOZEN, S., CACINA, C., GULLUOGLU, M., BALIK, E., BULUT, T., YAMANER, S., BUGRA, D. (2011). Association of APE1 and hOGG1 polymorphisms with colorectal cancer risk in a Turkish population. *Curr Med Res Opin.* **7**:1295-1302.

CAVALLO, D., URSINI, C.L., BAVAZZANO, P., CASSINELLI, C., FRATTINI, A., PERNICONI, B., DI FRANCESCO, A., CIERVO, A., RONDINONE, B., IAVICOLI, S. (2006). Sister chromatid exchange and oxidative DNA damage in paving workers exposed to PAHs. *Ann Occup Hyg.* **50**:211–218.

CENGİZ, S.L., ACAR, H., INAN, Z., YAVUZ, S., BAYSEFER, A. (2008). Deoxy-ribonucleic acid repair genes XRCC1 and XPD polymorphisms and brain tumor risk. *Neurosciences (Riyadh)*. **13**(3):227-232.

CHEN, R., DICK, F., SEMPLE, S., SEATON, A., WALKER, L.G. (2001). Exposure to organic solvents and personality. *Occup Environ Med.* **58**(1):14-18.

CHEN, C.S., HSEU, Y.C., LIANG, S.H., KUO, J.Y., CHEN, S.C. (2008). Assessment of genotoxicity of methyl-tert-butyl ether, benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene to human lymphocytes using comet assay. *J Hazard Mater.* **153**(1-2):351-356.

CHRISTMANN, M., TOMICIC, M.T, ROOS, W.P., KAINA, B. (2003). Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology.* **193**(1-2):3-34.

CHOY, W. N. (2001). Genetic Toxicity tests. *Genetic Toxicology and Cancer Risk Assessment.* Marcel Dekker, New York. p.:29-187.

CHO, Y.H., KIM, Y.J., AN, Y.S., WOO, H.D., CHOI, S.Y., KANG, C.M., CHUNG, H.W. (2009). Micronucleus-centromere assay and DNA repair gene polymorphism in lymphocytes of industrial radiographers. *Mutat Res.* **680**(1-2):17-24.

CHU, G., (2000). Biochemistry 201: DNA repair, Erişim: [http://cmgm.stanford.edu/biochem201/Handouts/dnarepair.pdf].

ErişimTarihi:12.09.2011.

COLLINS, A. R. (2002). The comet assay. Principles, applications, and limitations. *Methods Mol Biol.* **203**:163–177.

COLLINS, A.R., OSCOZ, A.A., BRUNBORG, G., GAIVÃO, I., GIOVANNELLI, L., KRUSZEWSKI, M., SMITH, C.C., STETINA, R. (2008). The comet assay: topical issues. *Mutagenesis.* **23**(3):143-151.

COOPER, G.M., HAUSMAN, R.E. (2006). Genomik DNA'nın replikasyonu, korunması ve yeniden düzenlenmesi. *Hücre: Moleküler Yaklaşım.* Çev.Edt.: M. Sakızlı, N. Atabey. İzmir Tıp Kitabevi. s.:180-227.

COLLINS, A., DUSINSKÁ, M., FRANKLIN, M., SOMOROVSKÁ, M., PETROVSKÁ, H., DUTHIE, S., FILLION, L., PANAYIOTIDIS, M., RASLOVÁ, K., VAUGHAN, N. (1997). Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications. *Environ Mol Mutagen.* **30**(2):139-146.

CUSTÓDIO, A.C., ALMEIDA, L.O., PINTO, G.R., SANTOS, M.J., ALMEIDA, J.R., CLARA, C.A., REY, J.A., CASARTELLI, C. (2011). Analysis of the polymorphisms XRCC1Arg194Trp and XRCC1Arg399Gln in gliomas. *Genet Mol Res.* **10**(2):1120-1129.

DE BOER, J., HOEIJMAKERS, J.H. (2000). Nucleotide excision repair and human syndromes. *Carcinogenesis.* **21**(3):453-460.

DE BONT, R., VAN LAREBEKE, N. (2004). Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. *Mutagenesis.* **19**(3): 169–185.

DE OLIVEIRA, H.M., DAGOSTIM, G.P., DA SILVA, A.M., TAVARES, P., DA ROSA, L.A., DE ANDRADE, V.M. (2011). Occupational risk assessment of paint industry workers. *Indian J Occup Environ Med.* **15**(2):52-58.

DE RUYCK, K., SZAUMKESSEL, M., DE RUDDER, I., DEHOORNE, A., VRAL, A., CLAES, K., VELGHE, A., VAN MEERBEECK, J., THIERENS, H. (2007). Polymorphisms in base-excision repair and nucleotide-excision repair genes in relation to lung cancer risk. *Mutat Res.* **631**(2):101-110.

DIZDAROGLU, M. (1992). Oxidative damage to DNA in mammalian chromatin. *Mutat Res.* **275**:331–342.

DIZDAROGLU, M., JARUGA, P., BIRINCIOGLU, M., RODRIGUEZ, H. (2002). Free Radical-Induced Damage To DNA: Mechanisms and Measurement. *Free Radical Biology & Medicine.* **32**(11): 1102–1115.

DUARTE, M.C., COLOMBO, J., ROSSIT, A.R., CAETANO, A., BORIM, A.A., WORNATH, D., SILVA, A.E. (2005). Polymorphisms of DNA repair genes XRCC1 and XRCC3, interaction with environmental exposure and risk of chronic gastritis and gastric cancer. *World J Gastroenterol.* **11**(42):6593-6600.

DUSIŃSKA, M., COLLINS, A.R. (2008). The comet assay in human biomonitoring: gene-environment interactions. *Mutagenesis.* **23**(3):191-205.

FAUST, F., KASSIE, F., KNASMULLER, S., BOEDECKER, R.H., MANN, M., MERSCH-SUNDERMANN, V. (2004). The use of the alkaline comet assay with lymphocytes in human biomonitoring studies. *Mutat Res.* **566**(3):209-229.

FERNANDES, P.H., KANURI, M., NECHEV, L.V., HARRIS, T.M., LLOYD, R.S. (2005). Mammalian cell mutagenesis of the DNA adducts of vinyl chloride and crotonaldehyde. *Environ Mol Mutagen.* **45**(5):455-459.

FLANAGAN, R.J., MEREDITH, T.J. (1996). Solvents. *Human Toxicology.* Edt. J. Descotes. Elsevier Science B.V. The Netherlands. p.: 577-649.

FRIEDBERG, E.C., WOOD, R.D. (1996). DNA Excision Repair Pathways. *DNA Replication in Eukaryotic Cells.* Cold Spring Harbor Laboratory Press. p.:249-269.

FRIEDBERG, E.C.(2001). How nucleotide excision repair protects against cancer. *Nat Rev Cancer*. **1**(1):22-33.

GARLAND SCIENCE. (2003). DNA Replication, Repair and Recombination. Erişim: <http://www.whoisyourcreator.com/assets/PDFs/EssentialCellBiology.pdf> , Erişim Tarihi: 20.07.2011.

GINSBERG, G., ANGLE, K., GUYTON, K., SONAWANE, B. (2011). Polymorphism in the DNA repair enzyme XRCC1: utility of current database and implications for human health risk assessment. *Mutat Res*. **727**(1-2):1-15.

GODDERIS, L., DE BOECK, M., HAUFROID, V., EMMERY, M., MATEUCA, R., GARDINAL, S., KIRSCH-VOLDERS, M., VEULEMANS, H., LISON, D. (2004). Influence of genetic polymorphisms on biomarkers of exposure and genotoxic effects in styrene-exposed workers. *Environ Mol Mutagen*. **44**(4):293-303.

GOODE, E.L., ULRICH, C.M., POTTER, J.D. (2002). Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. **11**(12):1513-1530.

GOODWIN, W., LINACR, E. A., HALL, S. (2007). DNA structure and the genome . *An Introduction to Forensic Genetics*. John Wiley & Sons, Ltd. England. p. :7-15.

GONZALEZ, M., VELTEN, M., CANTINEAU, A. (1998). Increased acquired dyschromatopsia among solvent-exposed workers: an epidemiology study on 249 employees of an aluminum-foil printing factory. *Int Arch Occup Environ Health*. **71**:317–324.

GONG, Y., KISHI, R., KASAI, S., KATAKURA, Y., FUJIWARA, K., UMEMURA, T., KONDO, T., SATO, T., SATA, F., TSUKISHIMA, E., TOZAKI, S., KAWAI, T., MIYAMA, Y. (2003). Visual dysfunction in workers exposed to a mixture of organic solvents. *Neurotoxicology*. **24**(4-5):703-710.

GOUD, K.I., SHANKARAPPA, K., VIJAYASHREE, B., RAO, K.P., AHUJA, Y. R. (2001). DNA Damage and Repair Studies in Individuals Working with Photocopying Machines. *IJHG*. **1**(2): 139-143.

GROVER, P., DANADEVI, K., MAHBOOB, M., ROZATI, R., SALEHA, B., RAHMAN, M.F. (2003). Evaluation of genetic damage in workers employed in pesticide production utilizing comet assay. *Mutagenesis*. **18**:201–205.

HAHN, T., BOTZENHART, K., SCHWEINSBERG, F. (2001). Toxic Effects of Solvent Exposure. In: *Handbook of Solvents*. Edt: G. Wypych. ChemTech Publishing. p.:1315-1404.

HANAWALT, P.C. (2001). Controlling the efficiency of excision repair. *Mutat. Res.* **485**:3–13.

HANAWALT, P.C. (2002). Subpathways of nucleotide excision repair and their regulation. *Oncogene*. **21**:8949–8956.

HOYOS-GIRALDO, L.S., CARVAJAL, S., CAJAS-SALAZAR, N., RUÍZ, M., SÁNCHEZ-GÓMEZ, A. (2009). Chromosome aberrations in workers exposed to organic solvents: Influence of polymorphisms in xenobiotic-metabolism and DNA repair genes. *Mutat Res.* **666**(1-2):8-15.

HUNG, R.J., HALL, J., BRENNAN, P., BOFFETTA, P. (2005a). Genetic polymorphisms in the base excision repair pathway and cancer risk: a HuGE review. *Am J Epidemiol.* **162**(10):925-942.

HUNG, R.J., BRENNAN, P., CANZIAN, F., SZESZENIA-DABROWSKA, N., ZARIDZE, D., LISSOWSKA, J., RUDNAI, P., FABIANOVA, E., MATES, D., FORETOVA, L., JANOUT, V., BENCKO, V., CHABRIER, A., BOREL, S., HALL, J., BOFFETTA, P. (2005b). Large-scale investigation of base excision repair genetic polymorphisms and lung cancer risk in a multicenter study. *J Natl Cancer Inst.* **97**(8):567-576

IARMARCOVAI, G., SARI-MINODIER, I., CHASPOUL, F., BOTTA, C., DE MÉO, M., ORSIÈRE, T., BERGÉ-LEFRANC, J.L., GALLICE, P., BOTTA, A. (2005). Risk assessment of welders using analysis of eight metals by ICP-MS in blood and urine and DNA damage evaluation by the comet and micronucleus assays; influence of XRCC1 and XRCC3 polymorphisms. *Mutagenesis*. **20**(6):425-432.

IARMARCOVAI, G., BONASSI, S., BOTTA, A., BAAN, R.A., ORSIÈRE, T. (2008). Genetic polymorphisms and micronucleus formation: a review of the literature. *Mutat Res*. **658**(3):215-33.

IKEHATA, H., ONO, T. (2011). The mechanisms of UV mutagenesis. *J Radiat Res*. **52**(2):115-125.

JARVHOLM, B., NORDSTROM, G., HOGSTEDT, B., LEVIN, J.O., WAHLSTROM, J., OSTMAN, C., BERGENDAHL, C. (1999). Exposure to non-smoking Swedish road pavement workers. *Scand J Work Environ Health*. **25**(2):131-136.

JARUGA, P., DIZDAROĞLU, M. (1996). Repair of products of oxidative DNA base damage in human cells. *Nucleic Acids Research*. **24**(8): 1389–1394.

JENKINS, G.J., DOAK, S.H., JOHNSON, G.E., QUICK, E., WATERS, E.M., PARRY, J.M. (2005). Do dose response thresholds exist for genotoxic alkylating agents?. *Mutagenesis*. **20**(6):389-398.

JOHNSON, R.D., JASIN, M. (2000). Sister chromatid gene conversion is a prominent double-strand break repair pathway in mammalian cells. *EMBO J*. **19**: 3398–3407.

JUN, S.H., KIM, T.G., BAN, C. (2006). DNA mismatch repair system. Classical and fresh roles. *FEBS J*. **273**(8):1609-1619.

KANAAR, R., HOEIJMAKERS, J.H.J., VAN GENT, D., C. (1998). Molecular mechanisms of DNA double-strand break repair. *Trends in Cell Biology*. **8**:483-489.

KARAHALIL, B., KOCABAS, N.A., OZÇELİK, T. (2006). DNA repair gene polymorphisms and bladder cancer susceptibility in a Turkish population. *Anticancer Res.* **26**(6C):4955-4958.

KARAMAN, A., PIRIM, I. (2009). Exposure to bitumen fumes and genotoxic effects on Turkish asphalt workers. *Clin Toxicol.* **47**(4):321-326.

KESHAHA, N., ONG, T.M. (1999). Occupational exposure to genotoxic agents. *Mutat Res.* **437**(2):175-194.

KIM, S.Y., CHOI, J.K., CHO, Y.H., CHUNG, E.J., PAEK, D., CHUNG, H.W. (2004). Chromosomal aberrations in workers exposed to low levels of benzene: association with genetic polymorphisms. *Pharmacogenetics.* **14**(7):453-463.

KONDO, N., TAKAHASHI, A., ONO, K., OHNISHI, T. (2010). DNA damage induced by alkylating agents and repair pathways. *J Nucleic Acids.* **21**:543531.

KRAJINOVIC, M., LABUDA, D., MATHONNET, G., LABUDA, M., MOGHRAB, A.I., CHAMPAGNE, J., SINNETT, D. (2002). Polymorphisms in genes encoding drugs and xenobiotic metabolizing enzymes, DNA repair enzymes, and response to treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Clin. Cancer Res.* **8**(3):802-810.

LAFFON, B., FRAGA-IRISO, R., PÉREZ-CADAHÍA, B., MÉNDEZ, J. (2006). Genotoxicity associated to exposure to Prestige oil during autopsies and cleaning of oil-contaminated birds. *J.Food Chem Toxicol.* **44**(10):1714-1723.

LAM, T.H., ZHU, C.Q., JIANG, C.Q. (2002). Lymphocyte DNA damage in elevator manufacturing workers in Guangzhou, China. *Mutat. Res.* **515**:147–157.

LADIGES, W.C. (2006). Mouse models of XRCC1 DNA repair polymorphisms and cancer. *Oncogene.* **25**(11):1612-1619.

LENG, S., CHENG, J., PAN, Z., HUANG, C., NIU, Y., DAI, Y., LI, B., HE, F., ZHENG, Y. (2004). Associations between XRCC1 and ERCC2 polymorphisms and

DNA damage in peripheral blood lymphocyte among coke oven workers. *Biomarkers*. **9**(4-5):395-406.

LIEBERMAN, H. B. (2008). DNA Damage Repair and Response Proteins as Targets for Cancer Therapy. *Current Medicinal Chemistry*. **15**:360-367.

LIN, Z., KONG, H., NEI, M., MA, H. (2006). Origins and evolution of the recA/RAD51 gene family: evidence for ancient gene duplication and endosymbiotic gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **103**(27):10328-10333.

LINDAHL, T. (1990). Repair of intrinsic DNA lesions. *Mutat. Res*. **238**:305–311.

LINDAHL, T. (2001). Keynote: past, present, and future aspects of base excision repair. *Prog. Nucleic. Acid. Res. Mol. Biol*. **68**:xvii–xxx.

LIU, Y., ZHOU, Q., XIE, X., LIN, D., DONG, L. (2011). Oxidative stress and DNA damage in the earthworm *Eisenia fetida* induced by toluene, ethylbenzene and xylene. *Ecotoxicology*. **19**(8):1551-1559.

LIU, F., LI, B., WEI, Y., YAN, L., WEN, T., ZHAO, J., XU, M. (2011). XRCC1 genetic polymorphism Arg399Gln and hepatocellular carcinoma risk: a meta-analysis. *Liver Int*. **31**(6):802-809.

LOFT, S., MOLLER, P. (2006). Oxidative DNA Damage and Human Cancer: Need for Cohort Studies. *Antioxid. Redox Signal*. **8**:1021–1031.

LU, A. L., LI, X., GU, Y., WRIGHT, P. M., AND CHANG, D. Y. (2001). Repair of oxidative DNA damage: mechanisms and functions. *Cell Biochem Biophys*. **35**:141–170.

MANIKANTAN, P., BALACHANADAR, V., SASIKALA, K., MOHANADEVI, S., ARUN, M., KUMAR, A.K., KHAN MUSTAQ AHAMED, S.A., KRISHNAN, B.B., KUMAR, S.S. (2010). Cytogenetic methods for assessing human exposure to toluene in Coimbatore, South India. *Asian Pac J Cancer Prev*. **11**(6):1687-1693.

MANUGUERRA, M., SALETTA, F., KARAGAS, M.R., BERWICK, M., VEGLIA, F., VINEIS, P., MATULLO, G. (2006). XRCC3 and XPD/ERCC2 single nucleotide polymorphisms and the risk of cancer: a HuGE review. *Am J Epidemiol.* **164**(4):297-302.

MARCZYNSKI, B., RAULF-HEIMSOTH, M., SPICKENHEUER, A., PESCH, B., KENDZIA, B., MENSING, T., ENGELHARDT, B., LEE, E.H., SCHINDLER, B.K., HEINZE, E., WELGE, P., BRAMER, R., ANGERER, J., BREUER, D., KÄFFERLEIN, H.U., BRÜNING, T. (2011). DNA adducts and strand breaks in workers exposed to vapours and aerosols of bitumen: associations between exposure and effect. *Arch Toxicol.* **85** (1):53-64.

MATULLO, G., PALLI, D., PELUSO, M., GUARRERA, S., CARTURAN, S., CELENTANO, E., KROGH, V., MUNNIA, A., TUMINO, R., POLIDORO, S., PIAZZA, A., VINEIS, P. (2001). XRCC1, XRCC3, XPD gene polymorphisms, smoking and 32P-DNA adducts in a sample of healthy subjects. *Carcinogenesis.* **22**: 1437–1445.

MCMARTIN, K.I., CHU, M., KOPECKY, E., EINARSON, T.R., KOREN, G. (1998). Pregnancy outcome following maternal organic solvent exposure: a meta-analysis of epidemiologic studies. *Am J Ind Med.* **34**(3):288-92.

MØLLER, P., KNUDSEN, L.E., LOFT, S., WALLIN, H. (2000). The comet assay as a rapid test in biomonitoring occupational exposure to DNA-damaging agents and effect of confounding factors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* **9**(10):1005-1015.

MØLLER, P. (2006). The alkaline comet assay: towards validation in biomonitoring of DNA damaging exposures. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* **98**(4):336-345.

MONTELONE, B. A. (1998). Mutation, Mutagens, and DNA Repair Outline.
Erişim: [http://www-personal.ksu.edu/~bethmont/mutdes.html] Erişim
Tarihi:12.09.2011.

MORINELLO, E.J., KOC, H., RANASINGHE, A., SWENBERG, J.A. (2002). Differential induction of N(2),3-ethenoguanine in rat brain and liver after exposure to vinyl chloride. *Cancer Res.* **62**(18):5183-5188.

MORITA, R., NAKANE, S., SHIMADA, A., INOUE, M., IINO, H., WAKAMATSU, T., FUKUI, K., NAKAGAWA, N., MASUI, R., KURAMITSU, S. (2010). Molecular mechanisms of the whole DNA repair system: a comparison of bacterial and eukaryotic systems. *J Nucleic Acids.* **14**:179594.

MUSÁK, L., VODICKA, P., KLIMENTOVÁ, G., SOUCEK, P., HÁNOVÁ, M., MIKULKOVÁ, R., BUCHANCOVÁ, J., VODICKOVÁ, L., POLÁKOVÁ, V., PÉC, M. (2006). Chromosomal damage and polymorphisms of DNA repair genes XRCC1 and XRCC3 in workers exposed to cytostatics. *Neuro Endocrinol Lett.* **27** (2) :57-60.

MUSSALI-GALANTE, P., AVILA-COSTA, M.R., PIÑÓN-ZARATE, G., MARTÍNEZ-LEVY, G., RODRÍGUEZ-LARA, V., ROJAS-LEMUS, M., AVILA-CASADO, M.C., FORTOUL, T.I. (2005). DNA damage as an early biomarker of effect in human health. *Toxicol Ind Health.* **21**(7-8):155-166.

NAKAI, N., MURATA, M., NAGAHAMA, M., HIRASE, T., TANAKA, M., FUJIKAWA, T., NAKAO, N., NAKASHIMA, K., KAWANISHI, S. (2003). Oxidative DNA damage induced by toluene is involved in its male reproductive toxicity. *Free Radic Res.* **37**(1):69-76.

NANDHAKUMAR, S., PARASURAMAN, S., SHANMUGAM, M.M., RAO, K.R., CHAND, P., BHAT, B.V. (2011). Evaluation of DNA damage using single-cell gel electrophoresis (Comet Assay). *J Pharmacol Pharmacother.* **2**(2):107-11.

NARTER, K.F., ERGEN, A., AGAÇHAN, B., GORMUS, U., TIMIRCI, O., ISBIR, T. (2009). Bladder cancer and polymorphisms of DNA repair genes (XRCC1, XRCC3, XPD, XPG, APE1, hOGG1). *Anticancer Res.* **29**(4):1389-1393.

NELSON, D.L., COX, M.M. (2005). N kleotitler ve n kleik asitler. *Lehninger Biyokimyanın ilkeleri*.  ev.Edt.: N. Kılı . Palme Yayıncılık, Ankara. s.: 325-362.

NORPPA, H. (2003). Genetic susceptibility, biomarker responses, and cancer. *Mutation Research*. **544**:339–348.

NUSSBAUM, R. L., MCLNNES, R. R. AND WILLARD, H. F. (2005). İnsanlarda genetik varyasyon, mutasyon ve polimorfizm. *Tompson&Tompson Tıbbi Genetik*. G ne  Kitapevi, Ankara. s.: 79-94.

OHS (Occupational Health & Safety Unit) .(2010) *Organic solvents guideline*
Eri im: <http://www.uq.edu.au/ohs/pdfs/organicsolvents.pdf>. Eri im Tarihi. 04.05.2012.

PALLI. D., POLIDORO, S., D'ERRICO, M., SAIEVA, C., GUARRERA, S., CALCAGNILE, A.S., SERA, F., ALLIONE, A., GEMMA, S., ZANNA, I., FILOMENA, A., TESTA, I.E., CAINI, S., MORETTI, R., GOMEZ-MIGUEL, M.J., NESI, G., LUZZI. I., OTTINI, L., MASALA, G., MATULLO, G., DOGLIOTT , E. (2010). Polymorphic DNA repair and metabolic genes: a multigenic study on gastric cancer. *Mutagenesis*. **25**(6):569-575.

PARISELLI, F., SACCO, M.G., PONTI, J., REMBGES, D. (2009). Effects of toluene and benzene air mixtures on human lung cells (A549). *Exp Toxicol Pathol*. **61**(4):381-386.

PITARQUE, M., VAGLENOV, A., NOSKO, M., HIRVONEN, A., NORPPA, H., CREUS, A., MARCOS, R. (1999). Evaluation of DNA damage by the comet assay in shoe workers exposed to toluene and other organic solvents. *Mutat. Res*. **441**(1):115–127.

PLOTZ, G., ZEUZEM, S., RAEDLE, J. (2006). DNA mismatch repair and lynch syndrome. *J Mol Hist*. **37**:271-283.

PRAMANIK, S., DEVI, S., CHOWDHARY, S., SURENDRAN, S.T., KRISHNAMURTHI, K., CHAKRABARTI, T. (2011). DNA repair gene

polymorphisms at XRCC1, XRCC3, XPD, and OGG1 loci in Maharashtrian population of central India. *Chemosphere*. **82**(7):941-946.

RAI, R., PENG, G., LI, K., LIN, S.Y. (2007). DNA damage response: the players, the network and the role in tumor suppression. *Cancer Genomics Proteomics*. **4**(2):99-106.

RIBEIRO, D.A., MARQUES, M.E., SALVADOR, D.M. (2006). In vitro cytotoxic and non-genotoxic effects of gutta-percha solvents on mouse lymphoma cells by single cell gel (comet) assay. *Braz Dent J*. **17**(3):228-332.

ROBERTS, R. J. (2005). How restriction enzymes became the workhorses of molecular biology. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **102**(17):5905-5908.

ROMA-TORRES, J., TEIXEIRA, J.P., SILVA, S., LAFFON, B., CUNHA, L.M., MÉNDEZ, J., MAYAN, O. (2006). Evaluation of genotoxicity in a group of workers from a petroleum refinery aromatics plant. *Mutat Res*. **604**(1-2):19-27.

ROSS, D. (2000). The role of metabolism and specific metabolites in benzene-induced toxicity: evidence and issues. *J. Toxicol. Environ. Health*. **61**(5-6):357–372.

SANCAR, A., LINDSEY-BOLTZ, L. A., UNSAL-KAÇMAZ, K., LINN, S. (2004). Molecular mechanisms of mammalian dna repair and the dna damage checkpoints. *Annu. Rev. Biochem*. **73**:39–85.

SANTOS, R.A., TEIXEIRA, A.C., MAYORANO, M.B., CARRARA, H.H., ANDRADE, J.M., TAKAHASHI, C.S. (2010). DNA repair genes XRCC1 and XRCC3 polymorphisms and their relationship with the level of micronuclei in breast cancer patients. *Genet Mol Biol*. **33**(4):637-640.

SARDAS, S., IZDES, S., OZCAGLI, E., KANBAK, O., KADIOGLU, E. (2006). The role of antioxidant supplementation in occupational exposure to waste anaesthetic gases. *Int Arch Occup Environ Health*. **80**(2):154-159.

SARDAS, S., OMURTAG, G.Z., TOZAN, A., GUL, H., BEYOGLU, D. (2010). Evaluation of DNA damage in construction-site workers occupationally exposed to welding fumes and solvent-based paints in Turkey. *Toxicol Ind Health*. **26**(9):601-8.

SCHENKER, M.B., JACOBS, J.A. (1996). Respiratory effects of organic solvent exposure *Tuber Lung Dis*. **77**(1):4-18.

SHALL, S., DE MURCIA, G. (2000). Poly(ADP-ribose) polymerase-1: what have we learned from the deficient mouse model?. *Mutat Res*. **460**(1):1-15.

SHEN, J., GAMMON, M.D., TERRY, M.B., WANG, L., WANG, Q., ZHANG, F., TEITELBAUM, S.L., ENG, S.M., SAGIV, S.K., GAUDET, M.M., NEUGUT, A.I., SANTELLA, R.M. (2005). Polymorphisms in XRCC1 modify the association between polycyclic aromatic hydrocarbon–DNA adducts, cigarette smoking, dietary antioxidants, and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev*. **14** (2):336–342.

SKORSKI, T. (2002). Oncogenic tyrosine kinases and the DNA-damage response. *Nature Reviews Cancer*. **2**:351-360.

SMITH, K. (2002). Genetic Polymorphism and SNPs Erişim: http://www.cs.mcgill.ca/~kaleigh/compbio/snp/snp_summary.pdf, Erişim Tarihi. 21.12.2011.

SOMOROVSKA, M., SZABOVA, E., VODICKA, P., TULINSKA, J., BARANCOKOVA, M., FABRY, R., LISKOVA, A., RIEGEROVA, Z., PETROVSKA, H., KUBOVA, J., RAUSOVA, K., DUSINSKA, M., COLLINS, A. (1999). Biomonitoring of genotoxic risk in workers in a rubber factory: comparison of the comet assay with cytogenetic methods and immunology. *Mutat. Res*. **445**:181–192.

SRILAXMI, P., SAREDDY, G.R., KAVI KISHOR, P.B., SETTY, O.H., BABU, P.P. (2010). Protective efficacy of natansnin, a dibenzoyl glycoside from *Salvinia*

natans against CCl₄ induced oxidative stress and cellular degeneration in rat liver. *BMC Pharmacol.* **12**:10-13.

STEFANOVIĆ, V., MILOŠEVIĆ, Z., STOJANOVIĆ, M., STANOJEVIĆ, A. (2007). Effect of organic solvents on the peripheral Nervous system in exposed workers. *Working and Living Environmental Protection.* **4**(1): 41-48.

STERPONE, S., COZZI, R. (2010). Influence of XRCC1 Genetic Polymorphisms on Ionizing Radiation-Induced DNA Damage and Repair. *J Nucleic Acids.* pii: 780369.

SUL, D., LEE, D., IM, H., OH, E., KIM, J., LEE, E. (2002). Single strand DNA breaks in T- and B-lymphocytes and granulocytes in workers exposed to benzene, *Toxicol. Lett.* **134**(1-3):87–95.

TAMARIN, R.H. (2001). DNA: Its Mutation, Repair, and Recombination. *Principles of Genetics.* Ed. D. Brusick. The McGraw–Hill Companies. p.: 315-356.

THACKER, J., ZDZIENICKA, M.Z. (2003). The mammalian XRCC genes: their roles in DNA repair and genetic stability. *DNA Repair (Amst).* **2**(6):655-672.

THOMPSON, L.H., SCHILD, D. (2001). Homologous recombinational repair of DNA ensures mammalian chromosome stability. *Mutat Res.* **477**(1-2):131-53.

THOMPSON, L.H., WEST, M.G. (2000). XRCC1 keeps DNA from getting stranded. *Mutat.Res.* **459**(1):1-18.

TICE, R.R., AGURELL, E., ANDERSON, D., BURLINSON, B., HARTMANN, A., KOBAYASHI, H., MIYAMAE, Y., ROJAS, E., RYU, J.C., SASAKI, Y.F. (2000). Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol. Mutagen.* **35**(3):206-221.

TUDEK, B. (2007). Base excision repair modulation as a risk factor for human cancers. *Molecular Aspects of Medicine.* **28**(3-4): 258–275.

UCSC. Genome Bioinformatics. Erişim: <http://genome.ucsc.edu/>. Erişim Tarihi: 12.10.2011.

VALVERDE, M., ROJAS, E. (2009). Environmental and occupational biomonitoring using the Comet assay. *Mutat Res.* **681**(1):93-109.

VARELLA, S.D., RAMPAZO, R.A., VARANDA, E.A. (2008). Urinary mutagenicity in chemical laboratory workers exposed to solvents. *J Occup Health.* **50**(5):415-422.

VIAENE, K.M. (2002). Overview of the neurotoxic effects in solvent-exposed workers. *Arch Public Health.* **60**:217-232.

WAKAMATSU, T.H., DOĞRU, M., TSUBOTA, K. (2008). Tearful relations: oxidative stress, inflammation and eye diseases. *Arq Bras Oftalmol.* **71**(6):72-79.

WALKER, J.M., RAPLEY, R. (2000). Molecular analysis and amplification techniques. In: *Molecular Biology and Biotechnology*. The Royal Society of Chemistry. p.:25-64.

WANG, Z. (2001). DNA damage-induced mutagenesis: a novel target for cancer prevention. *Mol. Interv.* **1**:269-281.

WANG, H.H., XU, G., VONNER, A.J., CHURCH, G. (2011). Modified bases enable high-efficiency oligonucleotide-mediated allelic replacement via mismatch repair evasion. *Nucleic Acids Res.* **39**(16):7336-7347.

WEISS, J.M., GOODE, E.L., LADIGES, W.C., ULRICH, C.M. (2005). Polymorphic Variation in hOGG1 and Risk of Cancer: A Review of the Functional and Epidemiologic Literature. *Mol Carcinog.* **42**(3):127-141.

WOOD, R.D., MITCHELL, M., LINDAHL, T. (2005). Human DNA repair genes, 2005. *Mutat Res.* **577**(1-2):275-83.

YAMADA, N.A., HINZ, J.M., KOPF, V.L., SEGALLE, K.D., THOMPSON, L.H. (2004). XRCC3 ATPase activity is required for normal XRCC3-Rad51C complex dynamics and homologous recombination. *J Biol Chem.* **279**(22):23250-23254.

YANG, W. (2008). Structure and mechanism for DNA lesion recognition. *Cell Res.* **18**(1):184-97.

YANG, M. (2011). A current global view of environmental and occupational cancers. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev.* **29**(3):223-249.

YASBIN, R.E. (2002). DNA repair mechanisms and mutagenesis. *Modern Microbial Genetics*. Edt. U. N. Streips, R. E. Yasbin. Wiley-Liss, Inc., New York. p.:27-46.

YIN, G., MORITA, M., OHNAKA, K., TOYOMURA, K., HAMAJIMA, N., MIZOUE, T., UEKI, T., TANAKA, M., KAKEJI, Y., MAEHARA, Y., OKAMURA, T., IKEJIRI, K., FUTAMI, K., YASUNAMI, Y., MAEKAWA, T., TAKENAKA, K., ICHIMIYA, H., TERASAKA, R. (2012). Genetic Polymorphisms of XRCC1, Alcohol Consumption, and the Risk of Colorectal Cancer in Japan. *J Epidemiol.* **22**(1):64-71.

ZAVALIC, M., MANDIC, Z., TURK, R., BOGADI-SARE, A., PLAVEC, D., SKENDER, L.J. (1998). Qualitative color vision impairment in toluene-exposed workers. *Int Arch Occup Environ Health.* **71**(3):194–200.

ZELJEZIC, D., GARAJ-VRHOVAC, V. (2001). Chromosomal aberration and single cell gel electrophoresis (comet) assay in the longitudinal risk assessment of occupational exposure to pesticides. *Mutagenesis.* **16**(4):359–363.

ZHANG, L., ROBERTSON, M.L., KOLACHANA, P., DAVISON, A.J., SMITH, M.T. (1993). Benzene metabolite, 1,2,4-benzenetriol, induces micronuclei and oxidative DNA damage in human lymphocytes and HL60 cells. *Environ Mol Mutagen.* **21**(4): 339–348.

ZHANG, Z., WAN, J., JIN, X., JIN, T., SHEN, H., LU, D., XIA, Z. (2005). Genetic polymorphisms in XRCC1, APE1, ADPRT, XRCC2, and XRCC3 and risk of

chronic benzene poisoning in a Chinese occupational population. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* **14**(11 Pt 1): 2614-2619.

ZHOU, W., LIU, G., MILLER, D.P., THURSTON, S. W., XU, L.L., WAIN, J.C., LYNCH, T. J., SU, L., CHRISTIANI, D.C. (2003). Polymorphisms in the DNA repair genes XRCC1 and ERCC2, smoking, and lung cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* **12**(4): 359–365.

ZHU, C.Q., LAM, T.H., JIANG, C.Q., WEI, B.X., XU, Q.R., CHEN, Y.H. (2000). Increased lymphocyte DNA strand breaks in rubber workers. *Mutat Res.* **470**(2):201-209

ZHU, C.Q., LAM, T.H., JIANG, C.Q. (2001). Lymphocyte DNA damage in bus manufacturing workers. *Mutat. Res.* 491:173-181.

.

EKLER

Ek-1

1

ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ ETİK KURULU
RESEARCH ETHICS COMMITTEE OF MEDICAL FACULTY, ANKARA UNIVERSITY
ANKARA-TÜRKİYE
ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYI

BAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL KODU		
	PROTOKOL ADI	Organik çözücülere maruz kalan bireylerde mtDNA ve lenfosit DNA hasarının XRCC1 ve XRCC3 gen polimorfizmleri ile ilişkisi	
	SORUMLU ARAŞTIRICI ÜNVANI / ADI	Prof.Dr.Tülin Söylemezoğlu	
	ARAŞTIRMA MERKEZİ	Ankara Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü	
	DESTEKLEYİCİ FİRMA		

DEĞERLENDİRİLEN İLGİLİ BİLGİLER	Belge Adı	Değişiklik No. / Tarihi	Dili
	PROTOKOL		
	ARAŞTIRICI BROŞÜRÜ		
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLURU		
	OLGU RAPOR FORMU		

ÇALIŞMA ESASI	İYİ KLİNİK UYGULAMALARI KLAVUZU
---------------	---------------------------------

KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 153-4852	Tarih: 08 Haziran 2009
	Araştırma protokolüne tamamen uyulmak, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul Yönergesinde belirtilen hususlar yerine getirilmek ve Yönergenin 11/h maddesi gereği sorumluluk araştırmacılara ait olmak üzere bütçesi temin edildiği takdirde laboratuvar çalışmasının yürütülmesinde etik sakınca bulunmadığına toplantıya katılan öğretim üyelerinin oybirliği ile karar verildi.	

ETİK KURUL ÜYELERİ				
Ünvanı / Adı / Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İmza
Prof. Dr. İsmail Hakkı Ayhan Başkan	Farmakoloji	Ankara Tıp Fakültesi	E	
Prof. Dr. Efser Kerimoğlu Başkan Yardımcısı	Çocuk Psikiyatrisi	Ankara Tıp Fakültesi	K	
Prof. Dr. Özden Palaoğlu Sekreter	Farmakoloji	Ankara Tıp Fakültesi	K	

ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
A.Ü. Tıp Fakültesi Etik Kurul
25 Haziran 2009
ASLI GİBİDİR

Prof. Dr. Handan Onur Üye	Tıbbi Onkoloji	Ankara Tıp Fakültesi	E	Handan Onur
Prof. Dr. Ajlan Tükün Üye	Tıbbi Genetik	Ankara Tıp Fakültesi	K	Ajlan Tükün
Prof. Dr. Esra Erden Üye	Patoloji	Ankara Tıp Fakültesi	K	Esra Erden
Prof. Dr. Aydan İkinciogulları Üye	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	Ankara Tıp Fakültesi	K	Kongrede
Prof. Dr. Ethem Geçim Üye	Genel Cerrahi	Ankara Tıp Fakültesi	E	Ethem Geçim
Prof. Dr. Erdal Onar Üye	Hukuk	Ankara Üniv. Hukuk Fakültesi	E	Derste
Prof. Dr. Yasemin Oğuz Üye	Deontoloji	Ankara Tıp Fakültesi	K	Yasemin Oğuz
Prof. Dr. Bülent Gümüşel Üye	Farmakoloji-Eczacı	Hacettepe Üniv. Eczacılık Fakültesi	E	Bülent Gümüşel
Doç. Dr. Aslıhan Avcı Üye	Biyokimya	Ankara Tıp Fakültesi	K	Kongrede
Gülsüm Aslan	Sağlık Mesleği Dışı	Emekli	K	Gülsüm Aslan

Bülent Gümüşel

25.11.2022

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı: Ayşegül

Soyadı: BACAKSIZ

Doğum Tarihi ve Yeri: 1980, ANTALYA/Alanya

Uyruğu: T.C.

Medeni Durumu: Bekar

İletişim Adresi ve Telefonu: A.Ü. Adli Bilimler Enstitüsü Tıp Fakültesi
Cebeci Kampüsü Dikimevi/ANKARA Tel:0(312) 319 27 34

II- Eğitimi

2004-2006 Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü,
Tıbbi Biyoloji Programı (Yüksek Lisans; Tez Konu: Hepatoselüler Karsinom
Olgularında Her-2/Neu Gen Amplifikasyonunun Floresan in situ
Hibridizasyon Yöntemi Yöntemi ile Belirlenmesi)

2004-2006 Gazi Üniversitesi Eğitim Bilimleri Enstitüsü, Orta Öğretim
Alan Öğretmenliği/ Biyoloji Öğretmenliği-Tezsiz Yüksek Lisans

2000-2004 Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü

1993-1999 Alanya Lisesi –ALANYA

1988-1993 Özel Hamdullah Emin Paşa İlköğretim Okulu/Alanya

Yabancı Dili: İngilizce

III- Mesleki Deneyimi

2004-2006: Yüksek lisans eğitimim süresince Başkent Üniversitesi Tıbbi
Biyoloji ve Genetik ABD’da Moleküler Genetik ve Sitogenetik
Laboratuvarlarında rutin çalışmalarda yer aldım.

2009-2010: Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı Bitki Biyoteknolojisinde 10 ay TÜBİTAK destekli projede gönüllü araştırmacı olarak çalıştım. TUBİTAK-TAGEM 1007-Kurum projesi (Proje no: 105G078).

IV- Bilimsel İlgi Alanları

Uluslararası hakemli dergilerde yayınlanan makaleler:

1. Bacaksız A, Sahin FI, Bilezikci B, Yılmaz Z.(2008). Determination of HER-2/Neu status in hepatocellular carcinoma cases. *Genet Test.* (2):211-4.

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler:

1. Ayşegül Bacaksız, Zeliha Kayaaltı, Hınç Yılmaz, Gülin Güvendik, Tülin Söylemezoğlu. Determination of lymphocyte DNA damage by the comet assay in workers exposed to organic solvents. 47th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX 2011).
2. Tülin Söylemezoğlu, Zeliha Kayaaltı, Esmâ Söylemez, Ayşegül Bacaksız, Engin Tutkun. Evaluation of DNA damage by comet assay in metal exposed Turkish population. 47th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX 2011).
3. Emrah Dural, Görkem Mergen, Betül İşiner, EnesBoran, Ayşegül Bacaksız, Tülin Söylemezoğlu. Determination of BTEX metabolites in urine and plasma of occupationally exposed workers and non-exposed individuals . 47th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX 2011).

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler:

1. Ayşegül Bacaksız , Feride İffet Şahin , Banu Bilezikçi , Zerrin Yılmaz. ‘‘Hepatoselüler Karsinom Olgularında Her-2/Neu Gen Amplifikasyonunun FISH Yöntemi ile Belirlenmesi’’. *VII.Ulusal Prenatal Tanı ve Tıbbi Genetik Kongresi*, 2006.
2. Ayşegül Bacaksız, Zeliha Kayaaltı, Esmâ Söylemez, Engin Tutkun, Tülin Söylemezoğlu. ‘Metallere maruz kalan bireylerde lenfosit DNA hasarının belirlenmesi’’. Klinik Toksikoloji Derneği 16. Kongresi, 2011.

VI- Aldığı Ödül

2006 VII. Ulusal Prenatal Tanı ve Tıbbi Genetik Kongresi, Kanseri sitogenetiği alanında sözlü sunumum ödüle layık görüldü.

IV- Katıldığı Eğitim Kursları

- The Workshop of DNA Genotyping on Identification of Biological Evidence, Investigation Bureau, Ministry of Justice Taipei, Taiwan (16-29 Oct. 2011).
- Adli Biyolojik İncelemeler ve Moleküler Genetik Kursu. ABGEDER, İstanbul. (3-4 Nisan 2008).
- Kanseri Genetik Kursu. İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi, İstanbul. (1-5 Ekim 2005).
- Serbest Radikaller, DNA Hasarı, DNA Onarımı ve Hastalıklarla İlişkisi Kursu. Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir, (24- 28 Ocak 2005).

V-Çalıştığı-çalışmakta olduğu konular ve moleküler analiz yöntemleri alt yapısı;

Sitogenetik analizler; karyotipleme (periferik kan ve amnion sıvısı)

Moleküler sitogenetik alanında FISH Tekniği ile analiz

COMET Tekniği

Biyolojik örneklerden DNAekstraksiyonu ve amplifikasyon (PCR-RFLP)

Elektroforez teknikleri

Bitkilerde Gen Kaynaklarının Moleküler Yöntemlerle Tanımlanması
(SSR;Simple Sequence Repeat)