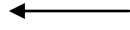


Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak .



Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak



Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

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

(DOKTORA TEZİ)

**PANORAMİK GRAFİLERDE X-IŞININA BAĞLI HÜCRE
ÇEKİRDEĞİ VE DNA HASARININ İNCELENMESİ**

HÜLYA ÇAKIR KARABAŞ

**DANIŞMAN
PROF. DR. İLKNUR ÖZCAN**

**AĞIZ, DİŞ VE ÇENE RADYOLOJİSİ ANABİLİM DALI
AĞIZ, DİŞ VE ÇENE RADYOLOJİSİ PROGRAMI**

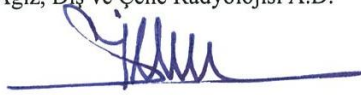
İSTANBUL-2016

TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Diş Hekimliği Fakültesi, Ağız Diş ve Çene Radyolojisi Anabilim Dalı, Ağız, Diş ve Çene Radyolojisi Programında Doktora öğrencisi Hülya ÇAKIR KARABAŞ tarafından Prof. Dr. İlknur ÖZCAN'nın danışmanlığında hazırlanan "PANORAMİK GRAFİLERDE X-IŞININA BAĞLI HÜCRE ÇEKİRDEĞİ VE DNA HASARININ İNCELENMESİ" başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 27/06/2016 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı

Prof. Dr. İlknur ÖZCAN
İstanbul Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi
Ağız, Diş ve Çene Radyolojisi A.D.



Jüri-Danışman

Prof. Dr. Tamer L. ERDEM
Okan Üniversitesi
Diş Hekimliği Fakültesi
Ağız, Diş ve Çene Radyolojisi A.D.



Jüri

Prof. Dr. Işıl ALBENİZ
İstanbul Üniversitesi,
İstanbul Tıp Fakültesi
Temel Tıp Bilimleri Bölümü
Biyofizik A.D.



Jüri

Prof. Dr. Banu GÜRKAN KÖSEOĞLU
İstanbul Üniversitesi,
Diş Hekimliği Fakültesi
Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi A.D.



Jüri

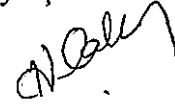
Prof. Dr. Dilhan İLGÜY
Yeditepe Üniversitesi,
Diş Hekimliği Fakültesi,
Ağız Diş ve Çene Radyolojisi A.D.



BEYAN

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

Hülya ÇAKIR KARABAŞ



İTHAF

Sevgili eşim ve aileme ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş ve Çene Radyolojisi Anabilim Dalı'nda doktora eğitimime katkıda bulunan başta tez danışmanım Sayın Prof. Dr. İlknur ÖZCAN'a,

Tez çalışmamın planlama ve uygulama süresince yönlendirme ve yardımlarını esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Tamer Lütfi ERDEM'e,

Tezimin laboratuvar aşamasını yapabilecek vakti arttırmak için fedakârlıkta bulunan başta sevgili arkadaşım Yrd. Doç. Dr. Belde ARSAN'a, çalışma arkadaşlarım Dr. Neslihan ŞENEL'e, Dr. Taha Emre KÖSE'ye, Uzm. Dt. Gülay ALTAN'a, Dt. İpek KARABULUT'a,

İş yüklerini arttırmama rağmen hiçbir zaman yardımlarını esirgemeyen Ağız, Diş ve Çene Radyolojisi Anabilim Dalı'nın teknisyenleri Nilgün SAZAK'a, Özgül DAYAKOĞLU'na, Nergiz ÇAĞLAR'a, Yeliz KARA'ya ve Mesude YAREN'e,

Tezimin bir bölümü olan DNA hasarı incelenmesini laboratuvarlarında yaptığım İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Bölümü Biyofizik Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Işıl ALBENİZ'e, tezimin laboratuvar aşamasında bana yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen, güler yüzlülüğü ve pozitif yanıyla tanımaktan ve arkadaş olmaktan büyük keyif ve mutluluk duyduğum Arş.Gör. Leyla TÜRKER ŞENER'e,

Tezimin diğer bir bölümü olan hücre hasarı incelemesini bölümlerinde yaptığım İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Klinik Onkoloji Anabilim Dalı Onkolojik Sitoloji Bilim Dalı öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Fatma Canan ALATLI'ya, Dr. Semra DÖLEK GÜLER'e ve laboratuvar çalışanlarına,

Hayatımın her evresinde sevgilerini ve desteklerini hissettiğim fedakâr anneme ve babama,

Aldığım kararların her daim arkasında duran, eğitim hayatımı sonuna kadar destekleyen, tüm olumsuzluklara rağmen hep pozitif olmamı sağlayan sevgili eşime,

Sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 35838

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ	X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİİ
ÖZET	Xİİİ
ABSTRACT.....	XİV
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. HÜCRE YAPISI	3
2.1.1. HÜCRE ZARI.....	3
2.1.2. SİTOPLAZMA	3
2.1.3. ÇEKİRDEK (NÜKLEUS)	4
2.1.3.1. Çekirdek zarı	4
2.1.3.2. Çekirdek sitoplazması (nükleoplazma)	4
2.1.3.3. Kromatin ağ.....	4
2.1.3.4. Çekirdekcik (Nükleolus)	5
2.2. HÜCRE DÖNGÜSÜ	6
2.3. HÜCRE HASARI	10
2.3.1. HÜCRE HASARININ NEDENLERİ.....	12
2.3.1.1. Fiziksel Etkenler.....	12
2.3.1.2. Kimyasal Etkenler	12
2.3.1.3. Oksijen Eksikliği.....	12
2.3.1.4. Yaşlanma.....	12
2.3.1.5. Mikrobiyolojik Ajanlar	12
2.3.1.6. Bağışıklık Reaksiyonları	13
2.3.1.7. Beslenme Dengesizlikleri.....	13

2.3.1.8. Genetik Faktörler	13
2.3.2. HÜCRE HASARININ MORFOLOJİSİ	13
2.4. DNA YAPISI	17
2.4.1. DNA HASARI	20
2.4.2. DNA ONARIMI	24
2.4.3. DNA HASARI ve ONARIM HATALARI İLE HASTALIKLAR ARASINDAKİ İLİŞKİ	26
2.5. PANORAMİK RADYOGRAFİ	26
2.6. RADYASYON	28
2.6.1. İyonlaştırıcı etkisi olmayan radyasyon	29
2.6.2. İyonlaştırıcı radyasyon	29
2.6.2.1. İyonlaştırıcı elektromanyetik radyasyon	30
2.6.2.2. İyonlaştırıcı partiküler radyasyon	30
2.7. İYONLAŞTIRICI RADYASYONUN CANLILAR ÜZERİNE ETKİSİ	30
2.7.1. Doğrudan Etki	30
2.7.2. Dolaylı Etki	31
2.8. COMET ASSAY İLE DNA HASARININ BELİRLENMESİ	31
2.8.1. Comet assay yöntemi	32
2.8.2. Comet assay basamakları	32
2.8.2.1. Hücrelerin hazırlanması	32
2.8.2.2. Lamların hazırlanması	33
2.8.2.3. Lizis	33
2.8.2.4. Alkali ortamda DNA süpersarmal yapısının açılması	33
2.8.2.5. Elektrophorez	33
2.8.2.6. Nötralizasyon	33
2.8.2.7. DNA boyama ve Cometlerin görüntülenmesi	33
2.8.2.8. Comet görüntülerinin sayılması ve hasarın belirlenmesi	34
2.9. MİKRONÜKLEUS TESTİ	34
3. GEREÇ VE YÖNTEM	37
3.1. GEREÇLER	37
3.1.1. Çalışmada Kullanılan Maddeler	37
3.1.1.1. Tek Hücre Jel Elektrophorez Yöntemi İçin Kimyasal Maddeler ve Gereçler	37
3.1.1.2. Mikronükleus Testi Kullanılan Kimyasal Maddeler:	38

3.1.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar:	38
3.1.3. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler:	39
3.1.3.1. Tek Hücre Jel Elektrophorez Yöntemi İçin Kullanılan Çözeltiler	39
3.1.4. Çalışmaya dahil edilen bireyler:	40
3.1.4.1. Hasta Seçimi:	40
3.1.4.2. Araştırmaya Dahil Olma Kriterleri:	41
3.1.4.3. Araştırmaya Dahil Olmama Kriterleri	41
3.2. YÖNTEMLER.....	41
3.2.1. Sürüntü hücre alınması.....	41
3.2.2. Alınan hücrelerin çekirdek yapılarının incelenmesi	42
3.2.2.1. Hücrelerin alınması	42
3.2.2.2. Lamların hazırlanması.....	42
3.2.3. Alınan hücrelerin DNA hasarının comet assay yöntemi ile incelenmesi.....	42
3.2.3.1. Hücrelerin alınması	42
3.2.3.2. Slaytların Hazırlanması	43
3.2.3.3. Hücre İzolasyonu/Uygulanması	43
3.2.3.4. Mikrojel Slaytlarının Elektrophorezi	43
3.2.3.5. DNA Hasarının Değerlendirilmesi.....	43
3.2.4. İstatistik Analiz	43
4. BULGULAR.....	45
4.1. Hastaların Değerlendirilmesi	45
4.2. Tek Hücre Jel Elektrophorez” Yöntemi (Comet Analizi) ile DNA Hasar	47
4.3. Mikronükleus Testi ile Hücre Hasarı Analizi	50
4.4. Binükleus varlığının tespiti	51
4.5. Piknozis varlığının tespiti	52
4.6. Karyolizis Varlığının Tespiti	54
4.7. Karyoreksis Varlığının Tespiti.....	55
5. TARTIŞMA	57
KAYNAKLAR	66
FORMLAR	76
ETİK KURUL KARARI	80
ÖZGEÇMİŞ	81

TABLolar LİSTESİ

Tablo 2-1: Nekroz ve apoptozun özellikleri	17
Tablo 4-1: Yaş ortalaması.....	45
Tablo 4-2: DNA ve hücrel değişikliklerin cinsiyete göre dağılımı	46
Tablo 4-3: DNA ve hücrel değişikliklerin cinsiyete göre dağılımı	46
Tablo 4-4: Deney ve kontrol grupları arasında kuyruktaki DNA yüzdesinin istatistiksel değerlendirilmesi.	47
Tablo 4-5: Deney ve kontrol grupları arasındaki kuyruk uzunluklarının istatistiksel değerlendirilmesi.	47
Tablo 4-6: Deney ve kontrol grupları arasındaki mikronükleus sayısının istatistiksel değerlendirilmesi.	50
Tablo 4-7: Deney ve kontrol grupları arasındaki binükleus sayısının istatistiksel değerlendirilmesi.	51
Tablo 4-8: Deney ve kontrol grupları arasındaki piknozis sayısının istatistiksel değerlendirilmesi.	53
Tablo 4-9: Deney ve kontrol grupları arasındaki karyolizis sayısının istatistiksel değerlendirilmesi.	54
Tablo 4-10: Deney ve kontrol grupları arasındaki karyoreksis sayısının istatistiksel değerlendirilmesi.	55
Tablo 5-1: MN testi ile Comet analizi arasındaki farklar	63

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Hücre yapısı .	3
Şekil 2-2: Çekirdek yapısı	4
Şekil 2-3: Kinetokor fibrillerine tutunmuş metafaz kromozomu	5
Şekil 2-4: Hücre döngüsü	7
Şekil 2-5: Hücre döngüsü kontrol noktaları	8
Şekil 2-6: DNA hasarı sonrası p53 seviyesi artarak hücre siklusunu G1 kontrol noktasında durdurur	9
Şekil 2-7: Stres ve hasar verici uyarılar karşısında hücre cevabının aşamaları .	11
Şekil 2-8: Karyolizis (Görüntüler, tez çalışmasının bulgularından elde edilmiştir.)	15
Şekil 2-9: Piknozis (Görüntüler, tez çalışmasının bulgularından elde edilmiştir.)	15
Şekil 2-10: Karyoreksis (Görüntüler, tez çalışmasının bulgularından elde edilmiştir.)	16
Şekil 2-11: Riboz ve Deoksiriboz şekerlerinin yapısı	18
Şekil 2-12: Pürin bazlarının yapısı	18
Şekil 2-13: Pirimidin bazlarının yapısı	19
Şekil 2-14: Nükleotidlerin yapısı	19
Şekil 2-15: DNA yapısı	20
Şekil 2-16: Deaminasyon sonucu sitozinin urasile dönüşümü	22
Şekil 2-17: Timin dimeri	23
Şekil 2-18: Kromotid ve kromozom aberasyonu	24
Şekil 2-19: DNA hasarına karşı hücrel cevaplar ve DNA tamir yolları	25
Şekil 2-20: Radyasyon	29
Şekil 4-1: Panoramik radyografi çekilmeden önce alınan hücrelerde kırığa sahip olmayan normal ağız içi epitel hücreleri. (Görüntüler, tez çalışmasının bulgularından elde edilmiştir.)	48
Şekil 4-2: Panoramik radyografi çekildikten sonra alınan hücrelerde kırığa sahip olduğu belirlenen ağız içi epitel hücreleri (Görüntüler, tez çalışmasının bulgularından elde edilmiştir.)	49
Şekil 4-3: Panoramik radyografi çekildikten sonra alınan hücrelerde kırığa sahip olduğu belirlenen ağız içi epitel hücreleri (Görüntüler, tez çalışmasının bulgularından elde edilmiştir.)	49

Şekil 4-4: Epitel hücrelerinin sitoplazmasında mikronükleus oluşumu görülmektedir. (Pap, X1000).....	50
Şekil 4-5: Epitel hücrelerinin sitoplazmasında mikronükleus oluşumu görülmektedir. (Pap, X1000) (Görüntüler, tez çalışmasının bulgularından elde edilmiştir.).....	51
Şekil 4-6: Bir tane epitelyum hücrelerinin içerisinde üç çekirdek izlenmektedir. (Pap, X1000) (Görüntüler, tez çalışmasının bulgularından elde edilmiştir.)	52
Şekil 4-7: Epitel hücrelerinin sitoplazmalarında çok sayıda çekirdek görülmektedir. (Pap, X1000).....	52
Şekil 4-8: Yan yana iki hücrede karyolizis başlangıcı ve piknozis görülmektedir. (Pap, X1000) (Görüntüler, tez çalışmasının bulgularından elde edilmiştir.)	53
Şekil 4-9: Epitel hücrelerinin çekirdeğinin koyulaştığı ve küçüldüğü (piknozis) izlenmektedir. (Pap, X1000) (Görüntüler, tez çalışmasının bulgularından elde edilmiştir.).....	54
Şekil 4-10: Epitel hücrelerinin çekirdeğindeki kromatin yapısının silindiği (karyolizis) izlenmektedir. (Pap, X1000) (Görüntüler, tez çalışmasının bulgularından elde edilmiştir.).....	55
Şekil 4-11: Epitel hücrelerinin çekirdeğinde kromatin yapısının parçalandığı (karyoreksis) görülmektedir. (Pap, X1000) (Görüntüler, tez çalışmasının bulgularından elde edilmiştir.).....	56
Şekil 5-1: Normal hücrenin hasara uğraması sonucu kansere dönüşümü	64

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

MN	Mikronükleus
CCD	Charge-Coupled Device
CMOS	Complementary Metal Oxide Semiconductor
PSP	Photo-Stimulable Phosphor
LMPA	Düşük Erime Noktali Agaro
NMPA	Normal Erime Noktali Agaro
FBS	Fetal Bovine Serum
DMEM F12	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
EtBr	Etidium Bromur
EDTA	Etilendiamin Tetra Asetik Asit

ÖZET

Çakır Karabaş H. Panoramik Grafilerde X-Işınına Bağlı Hücre Çekirdeği ve DNA Hasarının İncelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Ağız, Diş ve Çene Radyolojisi ABD. Doktora Tezi. İstanbul. 2016

X ışınları, hem gen mutasyonlarına hem de kromozomal aberasyonlara sebep olabilen potansiyel mutajenik ajanlardan biridir. DNA hasarının çeşitli hastalıkların etyolojisinde, kanserde, infertilitede ve yaşlanmada etkili bir rolünün olduğu düşünülmektedir. Kanserlerin büyük bir kısmı onarılamamış DNA hasarlarından kaynaklanmaktadır. Panoramik radyografi hastalıkların teşhisinde önemli bir araç olup dental uygulamalarda sıkça kullanılmaktadır. Bu çalışmada, panoramik radyografi çekilen hastaların hücre çekirdeğinde ve DNA yapısında meydana gelebilecek hasarı görmek amacıyla mikronükleus testi ve Comet Assay yöntemi uygulanmıştır.

Çalışmamızda, dental tanı nedeniyle panoramik radyografi alınması gereken 30 gönüllü hastanın yanak mukozalarından radyografi alınmadan hemen önce ve alındıktan 2 hafta sonra sürüntüler alınmıştır. Panoramik radyografi öncesi ve sonrası alınan birer sürüntü örneğinin 1000 hücre çekirdeğindeki değişiklikler (piknozis, karyolizis, karyoreksis, mikronükleus ve binükleus) ışık mikroskobunda sayılarak kaydedilmiştir. Ayrıca, diğer sürüntü örneklerinin yüzer adet hücresi ise Comet Assay yöntemi ile analiz edilerek "Comet Score" isimli bilgisayar programında değerlendirilmiştir. DNA hasar düzeyini gösteren comet parametrelerinden kuyruk uzunluğu ve kuyruktaki DNA yüzdesi her iki grupta incelenerek karşılaştırılmıştır.

Çalışmamızda, X ışını maruziyeti öncesi ve sonrası kuyruktaki DNA yüzdesi ve kuyruk uzunluğu sonuçları istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,001$). Benzer şekilde, X ışını maruziyeti sonrası yanak mukoza hücrelerinde görülen mikronükleus sıklığındaki artış anlamlı ($p<0,001$) bulunmuştur. Sitotoksositeye ilişkin diğer hücre çekirdeği değişimlerinden karyoreksis ve karyoliziste istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiş; ancak, piknozis artışı istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Sonuç olarak, dental teşhis ve tedaviler esnasında alınan panoramik radyografiler oral mukoza hücrelerinde sitotoksositeye ve DNA hasarına da sebep olmaktadır. Bu sebeple panoramik radyografi gerektiğinde ve uygun dozda alınmalıdır.

Anahtar Kelimeler: Panoramik Radyografi, DNA Hasarı, Hücre Zedelenmesi, Mikronükleus Testi, Comet Analizi.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 35838

ABSTRACT

Çakır Karabaş H. The Evaluation of Cell Nucleus and DNA Damage due to X-Ray in Panoramic Radiography. Istanbul University, Institute of Health Science, Department of Oral and Dentomaxillofacial Radiology. Doctoral Thesis. Istanbul. 2006.

X-rays are one of the potential mutagenic agents that can cause both the gene mutations and chromosomal aberrations. DNA damage is believed to have an effective role in the etiology of various diseases, cancer, infertility and aging. Most cancers are caused by DNA damages that cannot be repaired. Panoramic radiography is a significant tool for the diagnosis of diseases, and is frequently used in dental applications. In this study, micronucleus test and Comet Assay methods are implemented in order to observe the damage that can occur in the cell nucleus and in the structure of DNA of the patients who had taken panoramic radiographs.

In our study, buccal mucosa swabs were obtained just before the radiography and two weeks after the radiography from 30 volunteer patients who had to take radiography due to dental diagnosis. Changes in the nuclei (pyknosis, karyolysis, karyorrhexis, micronucleus and binucleus) of 1000 cells of each swab sample have been counted under a light microscope and recorded. Besides, 100 cells of each other swab samples were analyzed by Comet Assay method and have been evaluated by a computer program named "Comet Score". Tail length and % DNA in tail, comet parameters which indicate the level of DNA damage, were analyzed and compared in both groups.

In our study, results of % DNA in tail and tail length before and after X-ray exposure were statistically significant ($p < 0.001$). Likewise, increase in the micronucleus frequency observed in buccal mucosa cells after X-ray exposure was found significant ($p < 0.001$).

Regarding other changes in the cell nucleus related to cytotoxicity, statistically significant increase was observed concerning karyorrhexis and karyolysis; however, the increase in pyknosis was not statistically significant.

As a result, panoramic radiographs taken during dental diagnosis and treatment also causes cytotoxicity and DNA damage in oral mucosal cells. Therefore, panoramic radiographs should be applied in appropriate doses if necessary.

Key Words: Panoramic Radiography, DNA Damage, Cell Injury, Micronucleus Test, Comet Assay.

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 35838

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Fiziksel, kimyasal ve biyolojik çevresel ajanların birçoğu DNA ile etkileşime girerek mutasyonları tetikleme yeteneğine sahiptir. X ışınları hem gen mutasyonlarına hem de kromozomal aberasyonlara sebep olabilen potansiyel mutajenik ajanlardan biridir. DNA molekülü ile doğrudan etkileşime girebildikleri gibi, dolaylı olarak da DNA molekülü ile etkileşime giren reaktif bileşikler oluşturarak DNA üzerinde etkili olurlar (1). DNA hasarlarına örnek olarak çift ve tek zincir kırıkları, insersiyon (DNA dizisine bir veya daha fazla baz çiftinin eklenmesi) ve delesyonlar (kromozomun bir parçasının kopup kaybolması) ve DNA-protein arası çapraz bağ oluşturması gösterilebilir (2). Oluşan hasarı, DNA onarım sistemleri onarmaktadır. Ancak hasar fazla veya onarım sistemleri yetersiz ise DNA hasarı sonucu hücre ölümüne kadar varmaktadır. DNA hasarının doku fonksiyonlarının bozulması ile ortaya çıkan hastalıkların (kanser, kardiyovasküler hastalıklar, bağışıklık sistemi hastalıkları, yaşlanma vb.) etyolojisinde etken rol oynadığı düşünülmektedir (3). Mutajenik potansiyellerine rağmen ve iyonlaştırıcı bir radyasyon tipi olmasına karşın, X ışınları hastalıkların teşhisinde önemli bir araç olup medikal ve dental uygulamalarda sıkça kullanılmaktadır.

Mikronükleus, çekirdek bölünmesi sırasında ana nükleusun yanında yer alan kromozom fragmentinin veya kromozomların varlığını sürdürmesidir (4). Mikronükleus oluşumunun temelini DNA hasarı oluşturmaktadır. Organizmanın çeşitli mutajenik (mutasyonlara sebep olabilen), klastojenik (kromozom kırıklarına neden olabilen) ve karsinojenik (kansere neden olabilen) ajanlara maruz kalması sonucunda DNA'da hasar meydana gelmektedir (5). Kromozomal hasarı tespit etmek ve değerlendirmek için mikronükleus testi çok güvenilir bir analiz yöntemidir (1). Mikronükleus testi, insan periferik kan lenfositlerinde, kemik iliğinde ve bukkal mukoza hücrelerinde kimyasal ajanların genotoksik etkilerinin değerlendirilmesinde uygulanabilir (5). Basit uygulaması, kısa zamanda sonuca ulaşılması ve güvenilir bilgi vermesi tekniği önemli hale getirmiştir. Mikronükleusa ilaveten apoptozis (karyoreksis, piknozis, ve yoğunlaşmış kromatin) ve nekrozisin (karyoreksis, karyolizis, piknozis ve yoğunlaşmış kromatin) göstergesi olan dejeneratif çekirdek değişikliklerinin kaydedilmesi ile mikronükleus testinin hassasiyeti artırılır (1).

DNA hasar düzeyinin ölçülmesinde en yaygın kullanılan yöntemlerden biri olan tek hücre jel elektroforez yöntemi, diğer adıyla Comet Assay yöntemi pek çok testte kullanılan görsel floresan bir tekniktir (3). Comet Assay yöntemi, alkali pH da molekül ağırlıkları ve elektrik yükleri farklı olan DNA moleküllerinin elektriksel alanda farklı hızlarda hareket etmeleri esasına dayanır. Elektroforezde hareket esnasında hasarsız DNA'lar bütünlüğünü kaybetmeden yürürler ve kuyruk oluşturmazlar. Diğer yandan hasar görmüş DNA'ların parçaları hasardan dolayı farklı moleküler ağırlıklara ve farklı elektrik yüklerine sahip olmakta ve elektriksel alanda farklı hızlarda hareket ederek kuyruk şeklinde bir görüntü oluşturmaktadırlar. Elde edilen DNA görüntüleri değerlendirilip DNA kırıkları hakkında karar verilir (3).

Panoramik radyografiler diş hekimlerinin tanı ve tedavi sürecinde başvurduğu bir görüntüleme yöntemidir (1). Göz çukurunun 1/3 üst kısmına kadar maksiller bölgenin, tüm dişlerin ve çenelerin, temporomandibular eklemin, maksiller sinüslerin görüntüsünü içeren geniş bir alan panoramik radyografilerde görüntülenir. Radyasyon dozu, ağız içi seri periapikal radyografilere oranla oldukça azdır.

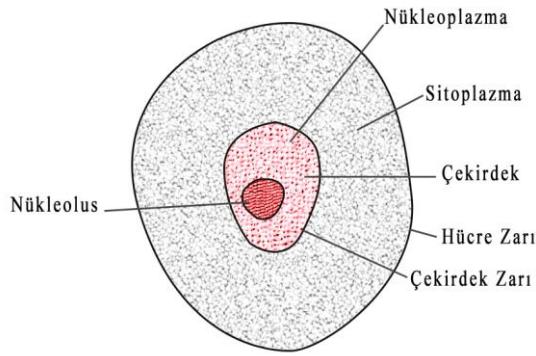
Çalışmanın amacı diş hekimliğinde çok yaygın olarak kullanılan panoramik radyografinin hücre çekirdeğinin ve DNA'nın yapısı üzerine etkilerini gözlemleyerek bu alanda yapılmış yeterli bir çalışma olmaması nedeni ile de literatüre katkı sağlamak ve ileride yapılacak çalışmalara baz oluşturmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. HÜCRE YAPISI

Canlının yapısal ve işlevsel özellikler gösterebilen en küçük birimi olan hücre, genel olarak üç kısımdan meydana gelir (6,7) (Şekil 2-1).

- Hücre zarı
- Sitoplazma
- Çekirdek



Şekil 2-1: Hücre yapısı (8).

2.1.1. HÜCRE ZARI

Tüm canlıların hücrelerinde bulunan bu zar çok ince (ortalama yaklaşık 7,5 nanometre), kıvrılabilir ve elastik bir yapıya sahiptir. Lipit, protein ve az miktarda karbonhidrattan oluşmuştur (7). Hücrenin sınırlarını belirlenmesi, çeşitli maddelerin hücre içine giriş çıkışını denetlenmesi, sinyallerin tanınması ve belirlenmesi başlıca görevleri arasındadır (6,7).

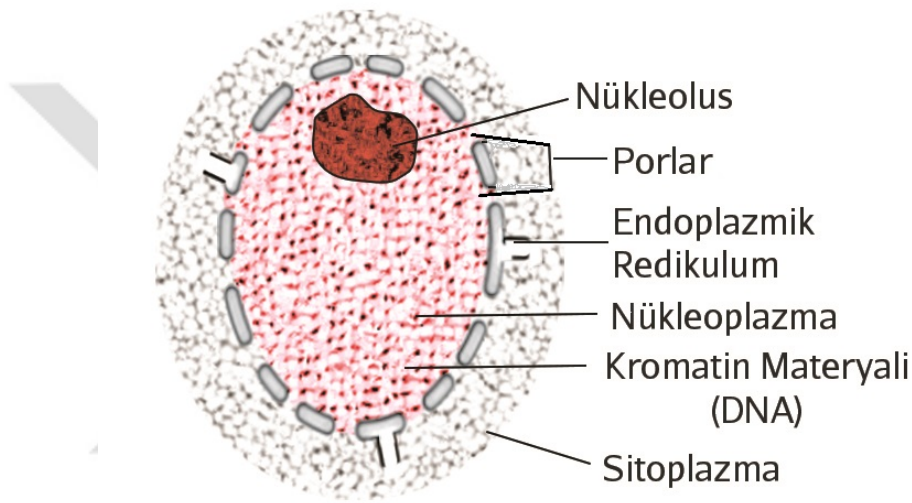
2.1.2. SİTOPLAZMA

Hücre zarı ile nükleus arasında yer alan viskoz kısım sitoplazma olarak anılır. Sitoplazma sitozol ve organelerden meydana gelir. Sitozol çeşitli protein, enzim, karbonhidrat ve mineral içeren sıvı kısımdır. Organel ise sitozol içine dağılmış bir zar ile kuşatılmış şekilli elemanlardan meydana gelmektedir. Sitoplazmada bulunan başlıca

organeller; endoplazmik retikulum, ribozom, golgi kompleksi, lizozom, peroksizom ve mitokondridir (6).

2.1.3. ÇEKİRDEK (NÜKLEUS)

Biçim ve büyüklüğü hücreden hücreye değişiklik gösteren çekirdek hücrenin kontrol merkezidir. İnterfaz safhasında (bölünme arasındaki evre) hücre çekirdeğinde 4 bölge ayırt edilir (6) (Şekil 2-2).



Şekil 2-2: Çekirdek yapısı (8).

2.1.3.1. Çekirdek zarı

İki tabakadan oluşan çekirdek zarının dış tabakası endoplazmik retikulumla devam eder. Çekirdek zarında çok miktarda por bulunur.

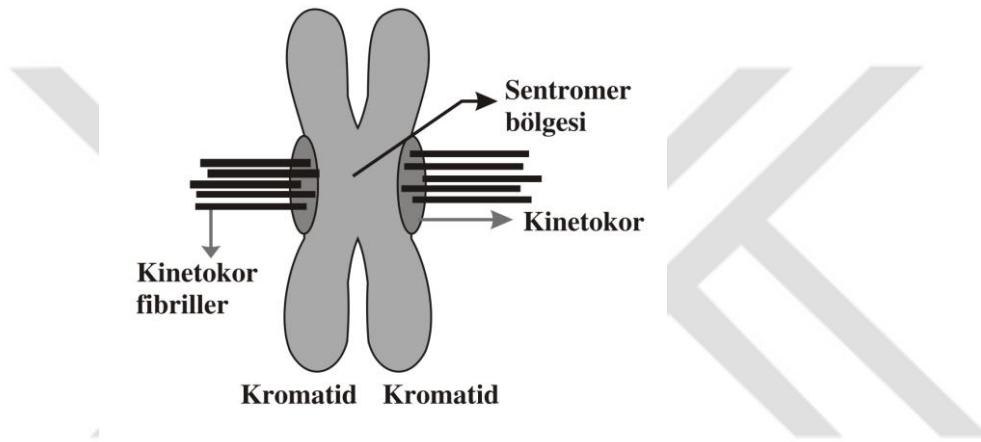
2.1.3.2. Çekirdek sitoplazması (nükleoplazma)

Nükleoplazma proteinler, lipitler, inorganik tuzlar v.s. içeren çekirdek zarı ile kromatin ağ ve çekirdekcik arasını dolduran homojen sıvıdır.

2.1.3.3. Kromatin ağ

İnterfaz safhasında nükleoplazma boyunca koyu boyanmış kromatin iplikleri görülürken mitoz safhasında kromatin iplikleri kısalıp kalınlaşarak ışık mikroskopunda

kolayca fark edilebilen kromozomlara dönüşürler. Kromozomlar DNA, histon ve nonhiston proteinlerinden oluşur. Bölünmeyen hücrelerde kromozomlar belli değildir. Sitogenetik çalışmalar bu sebeple, bölünen hücrelerde yoğunlaşmış metafaz kromozomları ile yapılır. Her bir metafaz kromozom iki kardeş kromatitden oluşur. Bu iki kardeş kromatit sentromer denilen kısımdan birbirlerine tutunmuşlardır. Sentromer, hücre bölünmesi esnasında iç ipliklerinin tutunarak iki kardeş kromatidin farklı kutuplara çekilmesinde görev alır. Bu görevi, sentromer bölgesinde oluşan kinetokorlar ile sağlar (Şekil 2-3) (6,8).



Şekil 2-3: Kinetokor fibrillerine tutunmuş metafaz kromozomu (6)

2.1.3.4. Çekirdekcik (Nükleolus)

Çekirdekcik, etrafında kendini çevreleyen bir zarı olmayan ve çok miktarda proteinleri içeren (RNA'da ve ribozomlarda bulunan) çekirdekte gözlenen koyu renkli bir alandır. Hücre aktif olarak protein sentezi yapmaya başladığında nükleolus belirgin şekilde büyür (6,8). Nükleolus boyutu farklı hücrelerde farklı büyüklükte görülebildiği gibi, aynı hücrenin (hücre siklusu esnasında değişime uğradığından) nükleolus büyüklüğü de değişebilir. G1 ve S evrelerinde büyüyen nükleolusun, profaz evresi ile birlikte boyutu azalır. Mitoz aşamalarında kromozom yoğunlaşırken nükleolus da görünmez olur. Metafaz evresinde tamamen ortadan kaybolan nükleolus (RNA sentezi durduğu için), telofaz evresinde tekrar görünür hale gelir (6).

2.2. HÜCRE DÖNGÜSÜ

Organizmanın büyüme, gelişme ve çoğalması hücre bölünmesi ile gerçekleşir. Hücre bölünmesi mitoz bölünme (bölünerek genetik özdeşliği olan iki yeni hücre olması) ve mayoz bölünme (genetik devamlılığı sağlayan) olarak ikiye ayrılır (6). Somatik hücreler sürekli olarak mitoz ve mitoz öncesi hazırlık fazından geçer. Hücre döngüsü G1 (ilk aralık), S(sentez), G2 (ikinci aralık) ve M (mitoz) olmak üzere dört aşamadan oluşur. G1-S- G2 fazları interfaz olarak adlandırılır. Bölünme sinyali almadıkları sürece hücreler interfaza girmeyip istirahat fazı olan G0 fazında durmaktadırlar. Mitoza girmeden önceki interfaz evresinde hücre bölünmesi için gerekli proteinler (siklin vs.) ve makromoleküller (Deoksiribonikleik asit (DNA), Ribonükleik asit (RNA)) sentezlenir. G1 evresinde, gerekli RNA ve proteinler sentezlenir. DNA sentezi için hazırlık yapılır. S fazında DNA sentezi yapılarak iki katına çıkarılır. RNA sentezi ve protein sentezi devam eder. G2 fazında DNA sentezi tamamlanmıştır. RNA ve protein sentezi az da olsa devam ederek hücre mitozu hazırlanır.

Mitoz; profaz, metafaz, anafaz ve telofaz olarak 4 aşamadan oluşur. Anafaz esnasında başlayıp mitotik döngünün sonuna kadar devam eden sitokinez, sitoplazmanın bölünerek iki yeni hücre oluşması ile son bulur.

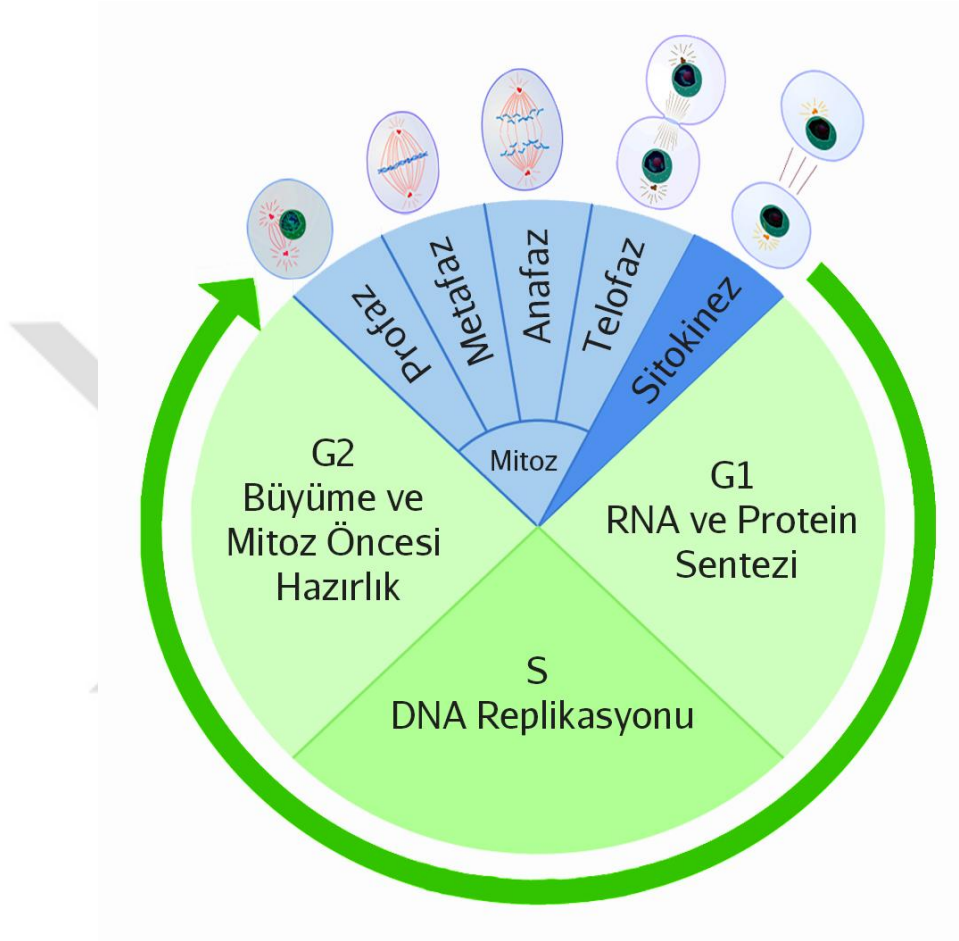
a) Profaz: İnterfaz aşamasında nükleoplazma içerisinde yayılmış olan kromatin iplikleri yavaş yavaş kalınlaşarak belirgin kromozom haline gelmeye başlar. S fazında her bir kromozom duplike olarak kardeş kromatitli hale geçmiştir. Sentioller hücrenin farklı kutuplarına doğru hareket eder. Mitoz iğciği oluşmaya başlar. Çekirdek zarı ve çekirdekçik eriyerek tamamen kaybolur.

b) Metafaz: Her bir sentromer üzerinde özelleşmiş protein kompleksi olan kinetokorlar oluşmaya başlar. Kinetokorlar iğcik mikrotübüllerine bağlanırlar. Kromozomlar iğciğin ekvator düzleminde sıralanırlar.

c) Anafaz: Her bir kromozomdaki kinetokor çiftlerinin ayrılması ile kardeş kromotidler farklı kutba doğru aynı hızla çekilirler.

d) Telofaz: Kromatidler kutuplara ulaşır. Kromatidler etrafında yeni çekirdek zarı oluşarak yoğunlaşmış kromatinler yaygınlaşır.

e) Sitokinezis: Hücrenin ekvator bölgesine denk gelen kısımdaki hücre zarı, kontraktıl halkaların etkisi ile iki yeni nükleus arasında ayrışma oluğu oluşur. Bu bölge iyice daralıp kaynaşarak iki yeni hücre meydana gelir (6,9,10,11) (Şekil 2-4).

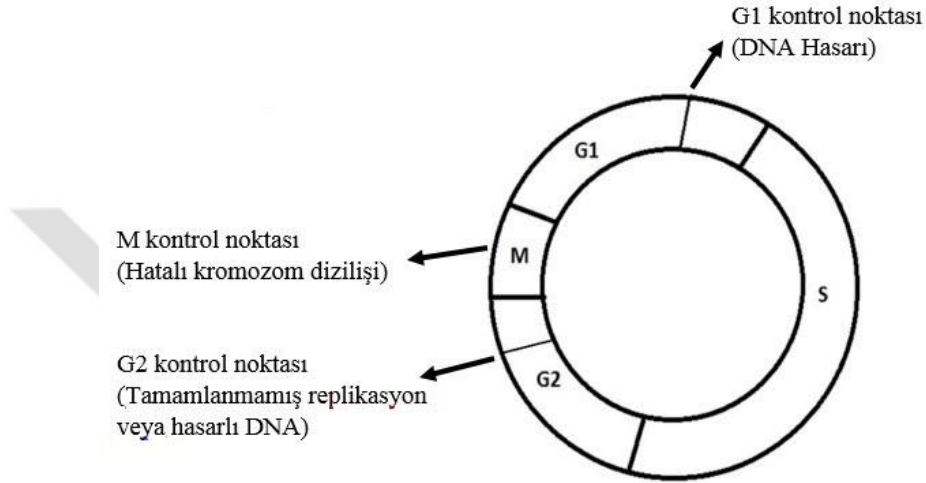


Şekil 2-4: Hücre döngüsü (12).

Hücre döngüsünde G1-S, G2-M ve metafaz-anafaz geçişlerinde hücrenin bölünmeye devam edip etmeyeceğine karar verilen kontrol noktaları vardır.

Replike olmamış DNA'ya karşı hassas olan G2 kontrol noktası, hücrenin bölünmeye devam etmemesi için sinyaller üreterek hücrenin mitozla geçişini engeller. Böylece S fazı tam olarak tamamlanıp DNA sentezi yapıldıktan sonra M fazına geçilebilir. Hücre siklusu esnasında radyasyon gibi etkenler sonucu DNA hasarı oluşacak olursa, G2 kontrol noktası hücrenin tamir edilene kadar mitozla geçişini de engeller. Böylece hasarlı DNA'nın genetik olarak aktarılması engellenmiş olur. Hasarlı

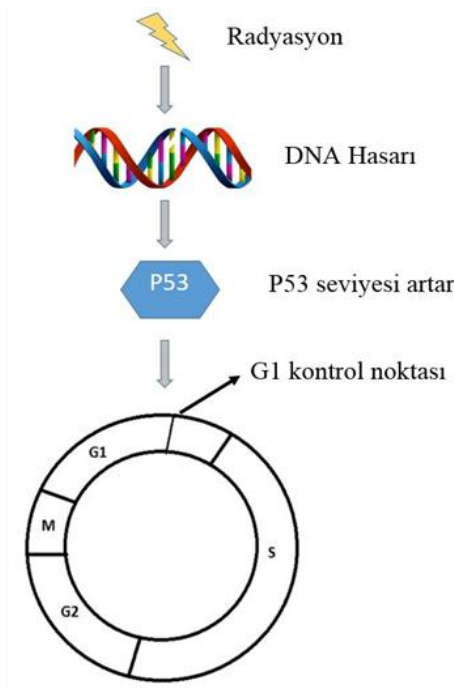
DNA eğer G2 kontrol noktasından daha önce oluşmuşsa G1 kontrol noktasında da durdurularak sentez öncesi DNA'nın tamiri için fırsat verilmiş olur. Kromozomların mitotik iğcik üzerinde düzenli yer almalarını kontrol eden M kontrol noktası ise hatalı kromozom dizilişi durumunda mitozun metafaz evresinde kalmasını sağlayarak eksik kromozomlu olarak yavru hücrelere geçmesini engeller (6) (Şekil 2-5).



Şekil 2-5: Hücre döngüsü kontrol noktaları (6).

Hücre döngüsü özgün proteinler olan siklinler, siklin bağımlı kinazlar (CDK) ve siklin bağımlı kinaz inhibitörleri ile kontrol edilirler. Bu proteinlerin düzeyleri hücre döngüsünün farklı aşamalarında değişiklik göstererek komplike bir düzen içerisinde hücre döngüsünün ilerlemesini sağlarlar. Siklinler hücre döngüsünün çeşitli evrelerinde bir taraftan yapılırken bir taraftan yıkılırlar. Siklin D ve siklin E, G1-S geçişinde sentezlenir. Hücre S fazına geçer geçmez hızla yıkılırlar. Siklin A ve siklin B, G2- M geçişinde sentezlenerek M evresine geçişi sağlarlar. Cdk'lar yalnız olarak inaktiftirler. Ancak siklin ile bağlandıklarında aktif siklin-Cdk kompleksleri meydana getirirler. Siklinler düzenleyici, Cdk'lar hızlandırıcı alt ünitelerdir. Cdk'ların aktiviteleri sadece siklinlerle değil aynı zamanda fosforilasyon ve defosforilasyona sebep olan bir takım yollarla da düzenlenmektedir. Siklin bağımlı kinaz inhibitörleri (p15,p16,p21,p27 vb.) siklin-Cdk kompleksi oluşumunu ve DNA replikasyonunu inhibe ederek hücre döngüsünün kontrolünde görev alırlar.

Hücreler radyasyon veya toksinlere maruz kaldıklarında DNA da ortaya çıkan hasara göre kontrol noktalarında G1 evresinden S evresine geçiş, G2 evresinden M evresine geçiş engellenir. Hasar DNA sentezini de engelleyebilir. DNA replikasyonu tamamlanmamış hücrelerde siklin- Cdk kompleksinin inaktivasyonu ile hücrenin mitozaya girişi engellenir. Hücre döngüsünde iki tip gen grubunun rolü vardır. Bu genler n-myc, ras gibi onkogenler ve Retinoblastoma geni gibi tümör baskılayıcı genlerdir. Onkogenler, kanser gelişimini doğrudan ve dolaylı olarak etkileyen gen grubudur. Tümör baskılayıcı genler ise kanser gelişimini baskılar. Memeli hücrelerinde G1 kontrol noktasında etkin bir rolü olan, tümör baskılayıcı gen tarafından kodlanan p53 proteinin hücrede hasar oluşması durumunda hızlıca üretimi artar. Artan p53 seviyesi Cdk inhibitörü olan p21'i uyarır. Hücrenin G1 evresinde kalmasını sağlayarak, S evresine geçmesini önler. Böylece DNA'ya tamir için süre tanınır (Şekil 2-6). Hasar tamir edilemiyorsa hücre apoptoza gider. P53 geni işlevini kaybederse, DNA da hasar olmasına rağmen hücre döngüsü G1 evresinde durmayarak replikasyon için S evresine devam eder. Böylece hasarlı DNA tamir edilemeden yavru hücrelere geçmiş olur. İnsan kanserlerinde p53 geni mutasyona uğramış olup kontrol görevini yapamamaktadır (6,9).



Şekil 2-6: DNA hasarı sonrası p53 seviyesi artarak hücre siklusunu G1 kontrol noktasında durdurur (6).

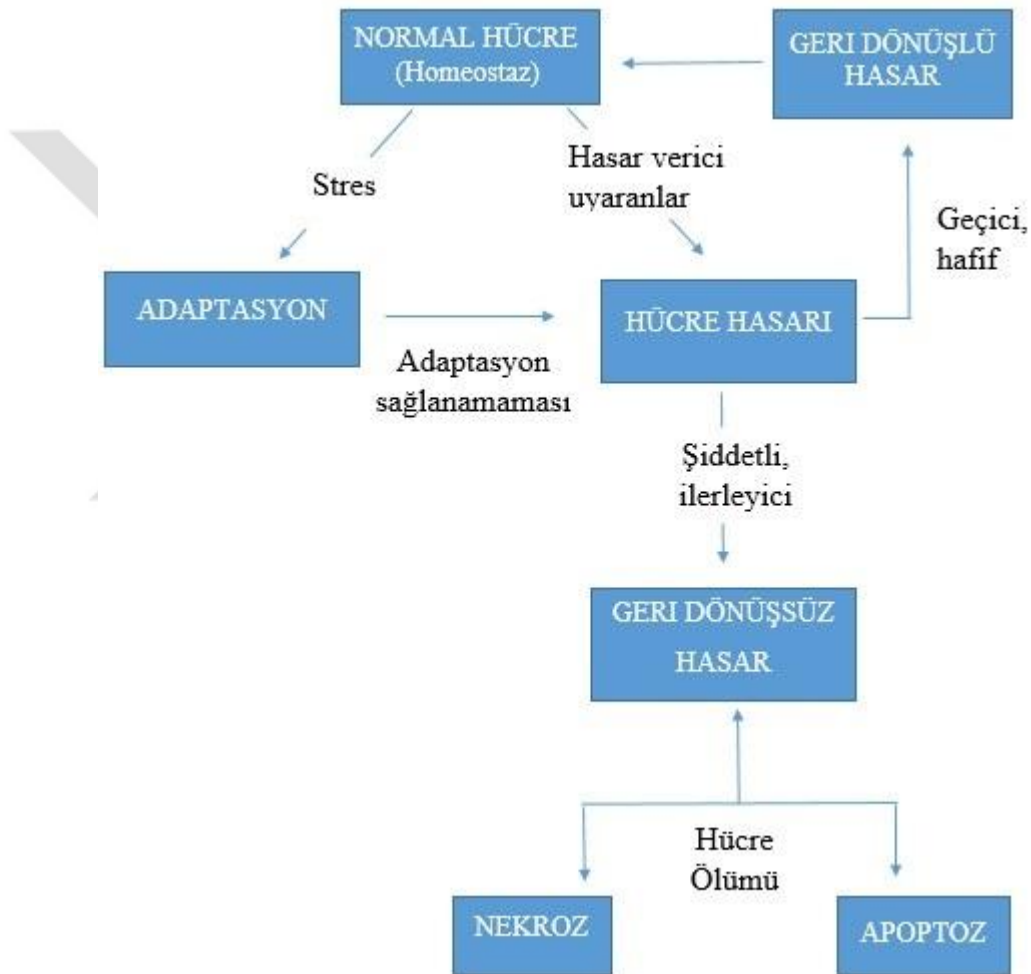
Hücrenin büyümesinde, farklılaşmasında ve çoğalmasında görevi olan proto-onkogenlerin herhangi bir nedenle meydana gelen mutasyonu sonucu onkogenlere dönüşmesi nedeniyle tümör gelişimi ortaya çıkar. Tümör baskılayıcı genlerde ortaya çıkan mutasyonlar ise hücre döngüsünün inhibisyonunu engelleyerek anormal hücre büyümesine yol açar. (9).

2.3. HÜCRE HASARI

Hücreler, yapı ve fonksiyonlarını hücre dışı streslere ve değişen ihtiyaçlara göre sürekli uyum sağlayarak yaşamlarını devam ettirirler. Normal bir hücre genetik yapısının izin verdiği ölçüde çevresindeki fizyolojik sınırlar içerisinde meydana gelen değişikliklere karşı yapısal ve fonksiyonel bütünlüğünü azami oranda korumaya çalışır. Hücrenin bu kararlı denge durumuna homeostaz denir. Homeostaz; hücrenin çoğalmasıyla, büyümenin durdurulmasıyla ve apoptozis yoluyla sağlanmaktadır. Hücre büyümesi ve ölümü arasındaki dengesizlik hiperplazi veya neoplaziye sebep olabilmektedir (9,13).

Hücreler iç ve dış ortamlarında bir çok değişikliğe sebep olan hasar verici etkenlerle karşılaşır. Fizyolojik streslerle veya patolojik uyarılarla karşılaştıklarında adaptasyon sağlayarak canlılıklarını ve fonksiyonlarını korudukları yeni bir kararlı duruma gelirler. Fizyolojik adaptasyonlar, hücrelerin hormonlar gibi normal uyarılara verdikleri yanıtlardır. Patolojik adaptasyonlar ise hücrelerin hasara karşı yapı ve fonksiyonlarını değiştirerek verdikleri cevaplardır. Atrofi (besin maddelerinde azalma veya kullanılamama sonucu hücre ve organ boyutlarının küçülmesi), hiperplazi (hormonlara ve diğer büyüme faktörlerine yanıt olarak hücre sayısının artması), hipertrofi (hücre ve organların boyutlarının artması) ve metaplazi (çoğu kez kronik irritasyona bağlı olarak gelişen, farklılaşmış hücrelerin fenotipinde değişme) gibi yanıtlar, hücreler üzerinde öldürücü etkisi olmayan uyarılara karşı verilen yanıtlardır. Uyum sağlama kapasitesini aşan fizyolojik sınırlar dışında fizyolojik veya patolojik uyarı ile karşılaştığında hücre hasarı gelişir. Bu hasar belirli sınırlar içerisinde kalırsa geri dönüşlü bir hasar olup kararlı haline geri döner. Geri dönüşlü hücre hasarında, uyarı hasarın erken dönemlerinde ortadan kaldırılmış veya hafif düzeydedir. Bu dönemde yapısal ve fonksiyonel anormallikler görülse bile membran hasarı ve çekirdek dağılması meydana gelmemiştir. Stres şiddetliyse, hızlı başlamış ve uzun süreli ise

etkilediği hücrenin geri dönüşsüz hasarına sebep olur. Artık normal fonksiyonlarına geri dönemeyen hücre; mekanizmaları, morfolojileri, hastalıklarda ve fizyolojik durumlardaki rolleri farklı, iki hücre ölüm tipi olan nekroz veya apoptoz yolu ile ortadan kaldırılır. Hücre ölümü bir dokuda veya organda hastalık gelişmesinde önemli bir olaydır (13,14) (Şekil 2-7).



Şekil 2-7: Stres ve hasar verici uyarılar karşısında hücre cevabının aşamaları (13).

2.3.1. HÜCRE HASARININ NEDENLERİ

2.3.1.1. Fiziksel Etkenler

Travma, aşırı sıcak ve soğuk, radyasyon ve atmosfer basıncındaki aşırı dengesizlikler hücreler üzerinde hasara sebep olan fiziksel etkenler arasında sayılabilir (13).

2.3.1.2. Kimyasal Etkenler

Hava kirliliğine neden olan maddeler karbon monoksit ve sülfür dioksit gibi maddeler, asbest ve silica gibi inorganik maddeler, böcek ilaçları potansiyel toksik maddelerdir. Tedavi amacıyla kullanılan bir çok ilaç; duyarlı bir insanda veya uygun olmayan dozlarda kullanıldığında hücre hasarına sebep olabilir. Şeker ve tuz gibi zararsız maddeler fazla miktarda alındığında hücrenin elektrolit dengesini bozarak hücre hasarına hatta ölümüne neden olduğu gibi oksijenin yüksek basınç değerleri de hücre için toksiktir (13,14).

2.3.1.3. Oksijen Eksikliği

Kanın yetersiz oksijenlenmesinden veya karbonmonoksit zehirlenmesinde olduğu gibi kanın oksijen taşıma kapasitesinin azalmasından kaynaklanabilen hipoksi veya oksijen eksikliği, aerobik (oksijenli) solunumu engeller. Hücre zedelenmesi veya hücre ölümünün en önemli ve sık görülen nedeni arasındadır (13).

2.3.1.4. Yaşlanma

Yaşlanma ile birlikte hücre ve dokuların çoğalma ve kendini onarma yeteneğinde değişiklikler meydana gelir. Bu değişiklikler, hasara karşı hücrenin cevap yeteneğinde azalmaya ve hücrelerin ölümüne sebebiyet verir (13).

2.3.1.5. Mikrobiyolojik Ajanlar

Virusler, riketsiyalar, funguslar, bakteriler ve parazitler gibi mikrobiyolojik ajanlar hücre hasarına sebep olabilirler. Bazı bakteriler ve funguslar salgıladıkları toksinler ile hücre üzerine olumsuz etki yaparak hücresel yapıların eritilmesine sebep olabilirler. Virüsler ise, hücre metabolizması için gerekli enzimlere ortak olarak kendi çoğalmasını sağlarlar. Böylece hücrenin yaşamı için gerekli protein, lipid ve nükleik asit yapımını engelleyerek hücreye hasar verirler (14).

2.3.1.6. Bağışıklık Reaksiyonları

Bazı ilaç ve proteinlere karşı gelişen anafilaktik reaksiyonlar veya kişinin kendi dokularına karşı oluşan otoimmün reaksiyonlar sonucu hücre ve doku hasarı ortaya çıkabilir (13,14).

2.3.1.7. Beslenme Dengesizlikleri

Açlık durumunda ortaya çıkan protein ve besin eksikliği yaygın doku hasarına yol açabildiği gibi, besinlerin fazla tüketilmesi de önemli bir hücre zedelenmesi nedenidir. Pellegra ve beriberi hastalıklarında, yetersiz beslenme nedeniyle vitamin ve mineral eksikliklerinin yol açtığı hasarlar görülür. Obeziteye bağlı olarak ise ateroskleroz ve tip 2 diabet riskinin arttığı bilinmektedir (13,14).

2.3.1.8. Genetik Faktörler

Genetik bozukluklar hücrede homeostazın düzenlenmesi, sentez, katabolizma gibi birçok alanı etkilerek hücre hasarına sebep olabilirler. Genetik değişiklikler, Down sendromunda gözlenen kongenital malformasyonlar kadar gözle görülür olabildiği gibi, orak hücreli anemiye yol açan bir aminoasitin yer değiştirmesi kadar moleküler düzeyde farklılıklarda da olabilir (14).

2.3.2. HÜCRE HASARININ MORFOLOJİSİ

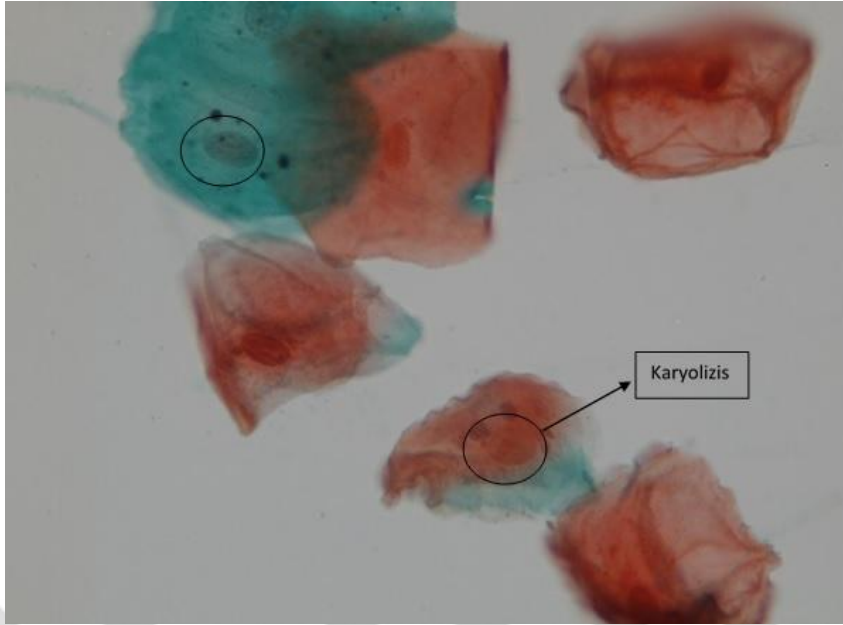
Stresler ve hasar verici etkenler önce moleküler veya biyokimyasal düzeyde etkilerini gösterirler. Hasar verici etkenin hücrede yarattığı morfolojik değişiklikler (hücrelerin iç yapısından kaynaklanan bir çok faktöre bağlı olarak farklı hücrelerde farklı sürelerde gerçekleşebilen değişiklikler) elektron mikroskobu, ışık mikroskobu veya makroskobik inceleme ile saptanabilir (13,14). Geri dönüşlü hücre zedelenmesinin iki morfolojik özelliği; plazma membranındaki iyon ve sıvı homeostazının devam etmemesine bağlı olarak gelişen hücre şişmesi ile birlikte hipoksik, toksik veya metabolik hasarda gelişen sitoplazmada küçük veya büyük lipid vakoulleri ile görülen yağlı değişikliktir. Elektron mikroskobu ile incelemede görülebilen hücre bağlantılarında gevşeme gibi plazma membran değişiklikleri, şişen mitokondride fosfolipitten zengin küçük amorf dansitelerin varlığı, ribozomların şişen endoplazmik retikulumdan ayrılması, kromatin kümelenmesi, hücre zarından kaynaklanan fosfolipit kitleleri içeren sitoplazma değişiklikleri ile birlikte geri dönüşlü hücre zedelenmesindeki hücre içi değişiklikleridir (13). Hasara yol açan uyaran erken dönemde veya hafif

düzeyde ortadan kaldırılırsa ortaya çıkan morfolojik ve fonksiyonel anormallikler geri dönüşlüdür (13). Hasarın devam etmesi sonucu zedelenme, hücrenin iyileşmesinin artık mümkün olmadığı geri dönüşsüz duruma gelerek hücre ölümüne sebep olur. İki tip hücre ölümü olan nekroz ve apoptozun mekanizmaları farklıdır. Nekroz her zaman patolojik bir süreç sonrası gelişirken, apoptozun patolojik hücre hasarı ile birlikte olması gerekmez.

Nekroz, enzimlerin geri dönüşümsüz şekilde hasar görmüş hücreler üzerine yıkıcı etkileri sonucu gerçekleşen, membran bütünlüğünün bozulması ve hücre içeriğinin dışarı sızması ile hücrelerin parçalandığı hücre ölüm tipidir. Dışarı sızan hücre içeriği lokal konak cevabına yol açarak ölü hücrelerin ortadan kaldırılmasına ve onarım sürecinin başlamasına neden olur. Nekrozun erken döneminde hücrenin kendi lizozomal enzimleri hücre yıkımına yol açarak hücrenin kendi kendini sindirmesine neden olur (otoliz). İlerleyen dönemde nekroz alanına gelen lökositlerden salınan enzimler hücre yıkımına katılır (heteroliz). Nekrozdaki morfolojik görünüm, hemen hemen aynı anda gerçekleşen hücrenin enzimatik yıkımı sonucu organellerin parçalanması ve makromoleküllerin denaturasyonu sonucu olabilir.

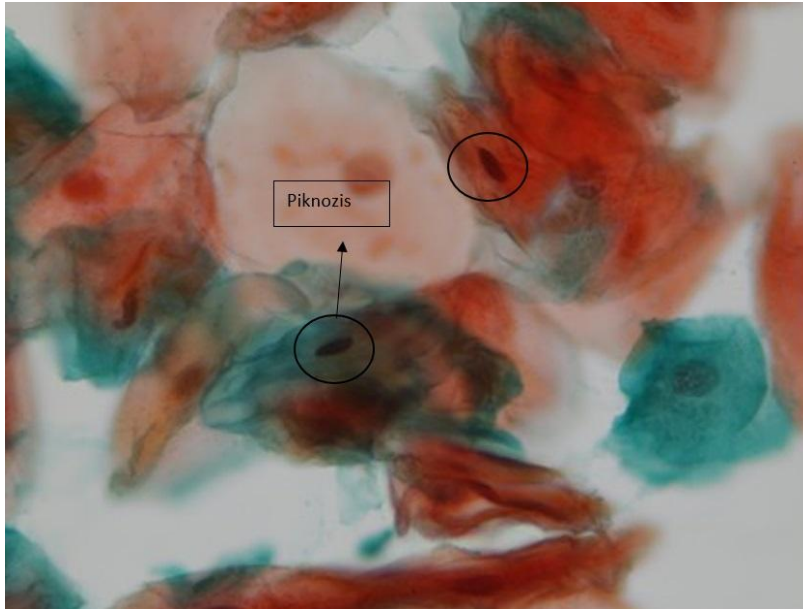
Nekrozda, sitoplazmada kısmen eozinin denatüre plazma proteinlerine bağlanmasıyla kısmen de sitoplazmadaki ribonükleik asit (RNA) tarafından sağlanan bazofilin (hematoksilen boyası ile mavi renge boyanma özelliği) azalması ile açıklanan eozinofili artışı (eozin boyası ile pembe renge boyanma özelliğinin artması) görülür. Sitoplazma, glikojen partiküllerinin kaybı sonucu camsı ve homojen bir görüntü, organellerin enzimler tarafından sindirilmesi sonucu güve yeniği görünümü alır (13,14). Hücre çekirdeğindeki değişiklikler ise, DNA ve kromatin yıkımı sebebiyle oluşan üç yapıdan biri şeklinde görülür.

1. Muhtemelen deoksiribonükleaz (DNAz) aktivitesi sonucu kromatin bazofilisi soluklaşması (karyolizis) (Şekil 2-8).



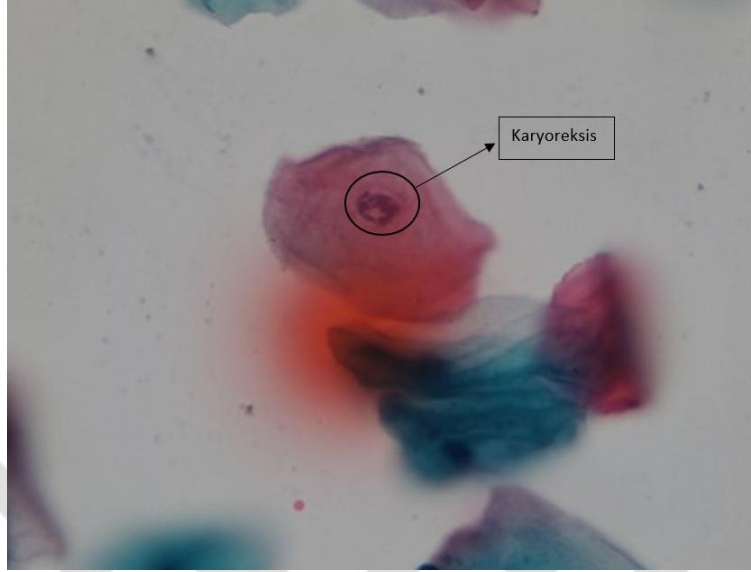
Şekil 2-8: Karyolizis (Görüntüler, tez çalışmasının bulgularından elde edilmiştir.)

2. DNA'nın büzülmüş solid bir yapı alması ile çekirdek büzülebilir ve bazofili görülür (piknozis) (Şekil 2-9).



Şekil 2-9: Piknozis (Görüntüler, tez çalışmasının bulgularından elde edilmiştir.)

3. Piknotik çekirdek parçalanır (karyoreksis) (Şekil 2-10).



Şekil 2-10: Karyoreksis (Görüntüler, tez çalışmasının bulgularından elde edilmiştir.)

Apoptoz ise, hücrenin kendi DNA'sının, nükleer ve sitoplazmik proteinlerinin yıkımına sebep olacak enzimleri aktive etmesiyle gerçekleşen, organizmaya ait istenmeyen hücreleri ortadan kaldırmak için programlanmış hücre ölümü tipidir. Gen kontrollü hücre ölümlerinin hepsi apoptozis ile açıklanamayacağı gibi radyasyon maruziyeti sonucu da hücre de apoptozis gelişebilmektedir. Apoptoz membran bütünlüğünün bozulduğu, hücrelerin dışarı sızdığı, konak reaksiyonun olduğu nekrozdan farklıdır. Nekroz yalnızca patolojik durumlarda ortaya çıkarken, apoptoz çoğu zaman fizyolojik olup bazı hücre hasarı şekillerinde patolojik olabilir. Canlılığına devam edemeyen hücre, hücre içeriğinin dışarı sızmasına zaman kalmadan hızla ortadan kaldırılır. Böylece apoptoz yolu ile hücre ölümü konakta inflamatuvar yanıtı neden olmaz. Apoptozis ve nekrozis bir arada da bulunabildiği gibi bazı patolojik uyarılarla başlayan apoptozis nekrozis ile de ilerleyebilir (Tablo 2-1) (13,14).

Tablo 2-1: Nekroz ve apoptozun özellikleri (13)

Bulgu	Nekroz	Apoptoz
Hücre Boyutu	Artmış (şişme)	Azalma (büzülme)
Hücre Çekirdeği	Piknoz, Karyolizis, Karyoreksis	Parçalara bölünme
Plazma membranı	Bozulmuş	Sağlam, yapısı değişmiş
Hücre içeriği	Enzimatik sindirim; hücre dışına sızabilir	Sağlam, apoptotik cisimciklerin içine bırakılabilir
Çevrede İnflamasyon	Sık	Yok
Fizyolojik veya patolojik rol	Kesinlikle patolojiktir	Çoğu zaman fizyolojiktir. İstenmeyen hücrelerin ortadan kaldırılma yolu. Bazı hücre hasarı şekillerinde patolojik olabilir (DNA ve protein hasarı gibi).

Işık mikroskopunda rutin hematoksilin eosin boyası ile boyanan doku kesitlerinde apoptotik hücreleri saptamak mümkündür. Apoptotik hücrelerin çekirdeklerinde kromatin kondensasyonu ve kümelenmesinin çeşitli evreleri (piknozis) ve karyoreksis görülür. Bu morfolojik görünüm moleküler düzeyde DNA'nın nükleozom boyutundaki parçalara ayrılması ile ortaya çıkar. Hücreler hızla büzülerek sitoplazmik tomurcuklar oluşturur. Membranla çevrili sitozol ve organeller içeren veziküllerden oluşan apoptotik cisimlere parçalanır. Apoptotik cisimler dışarı atılarak inflamatuvar yanıtı yol açmaksızın hızla fagosite edilirler. Fagositik hücrelerden salgılanan sitokinler inflamatuvar yanıtın gerçekleşmesini inhibe ederler. Apoptotik cisimlerin hızla fagosite edilmeleri de enflamasyonun ortaya çıkmaması için sebep olan diğer bir nedendir (13,14).

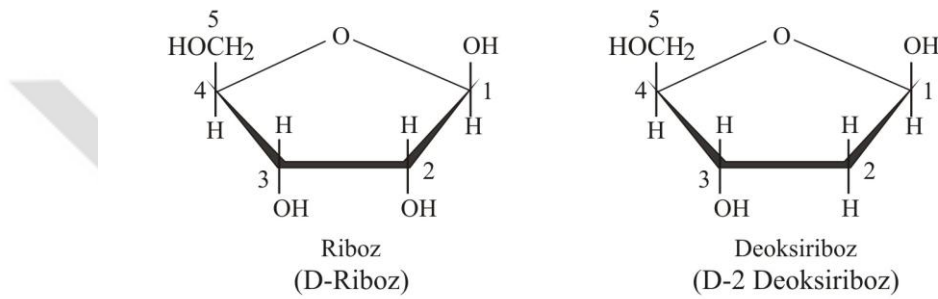
2.4. DNA YAPISI

Hücrede kalıtsal bilgiyi taşıyan ve bu bilgiyi proteinlere aktarmaktan sorumlu olan makromoleküller nükleik asitler olup deoksiribonükleik asit (DNA) ve ribonükleik asit (RNA) olarak iki çeşittir. Kalıtsal bilginin taşınmasından DNA sorumludur.

Genetik materyalin biyokimyasal yapısına ilişkin çalışmalar 19. yüzyılın ikinci yarısında başlamıştır. Genetik bilgiyi taşıyan moleküllerin ise nükleik asitler özellikle de DNA olduğu, ilk defa 1943 yılında Oswald T. Avery, Colin Macloed ve Maclyn McCarty tarafından kanıtlanmıştır. Sonrasında DNA'nın yapısını anlamak için bir çok çalışma yapılmış olup 1953 yılında James D. Watson ve Francis H.C. Crick tarafından

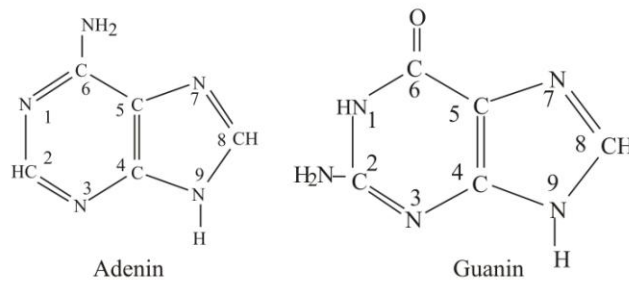
yapılan çalışmada bugün de halen geçerliliğini koruyan DNA'nın üç boyutlu yapısı tarif edilmiştir (6,15).

Nükleik asitlerin ana yapısını 5 karbonlu şeker, azotlu baz ve fosfat oluşturmaktadır. DNA yapısında 5 karbonlu deoksiriboz şekeri, RNA yapısında ise yine 5 karbonlu riboz şekeri bulunmaktadır. Riboz ve deoksiriboz şekerleri arasındaki temel fark deoksiriboz şekerinin 2 nolu karbon atomuna bağlı -OH grubunun bulunmamasıdır (6,8) (Şekil 2-11).

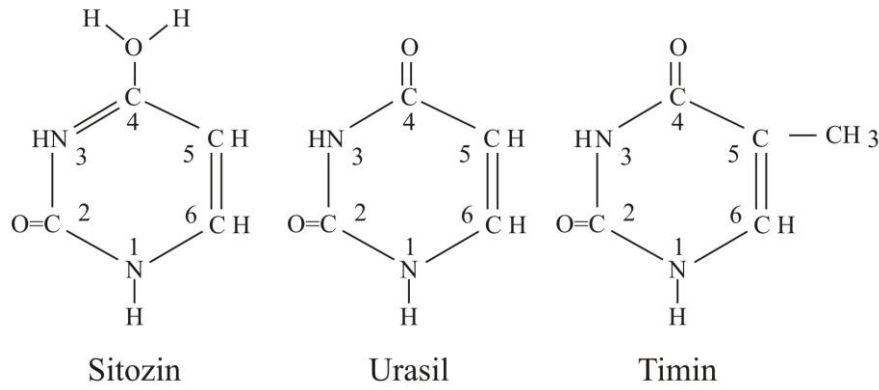


Şekil 2-11: Riboz ve Deoksiriboz şekerlerinin yapısı (6).

Nükleik asitlerin yapısında bulunan bazlar pürin ve pirimidin bazları olarak ikiye ayrılır. Pürin bazları adenin ve guanin, pirimidin bazları ise sitozin, urasil ve timindir. Pirimidin bazlarından timin ve sitozin DNA yapısında, urasil ve sitozin RNA yapısında bulunmaktadır (Şekil 2-12) (Şekil 2-13).

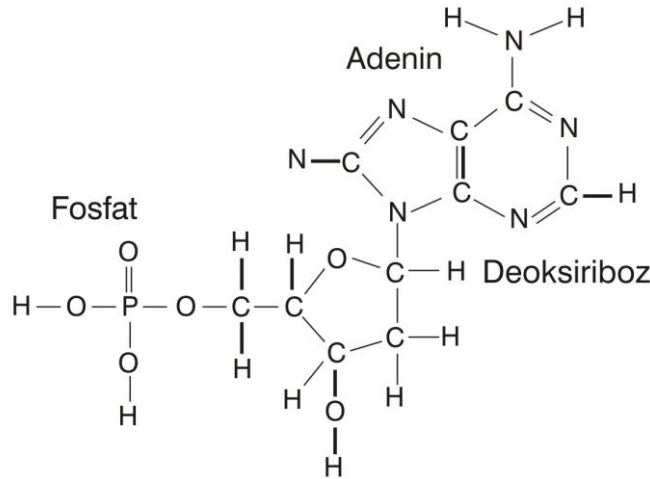


Şekil 2-12: Pürin bazlarının yapısı (6)



Şekil 2-13: Pirimidin bazlarının yapısı (6)

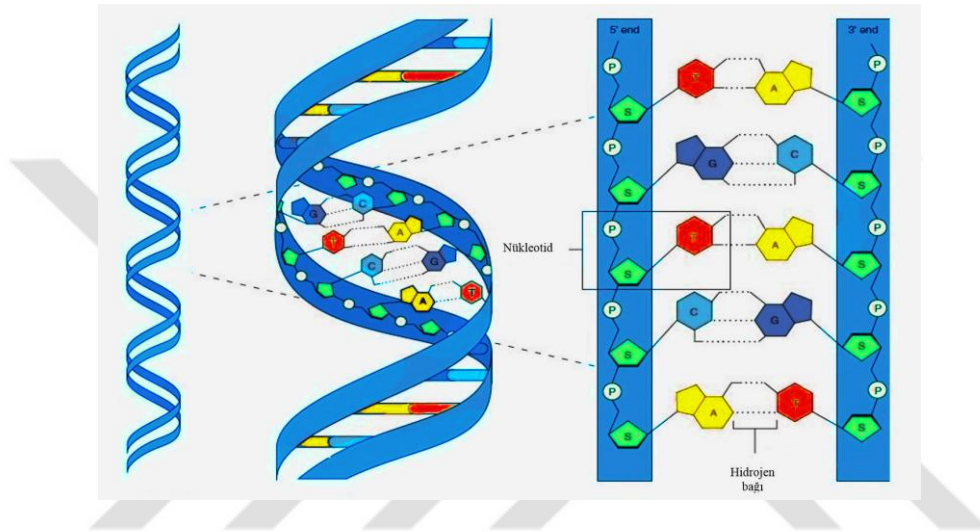
5 karbonlu şekerin 1 nolu karbon atomuna bir pürin (adenin ve guanin) veya primidin (sitozin ve timin) bazı eklenmesiyle nükleozid, nükleozidin 5 nolu karbon atomuna bir fosforik asit eklenmesiyle nükleotidler meydana gelir. Bu nükleotidlerin bir araya gelmesiyle de nükleik asitler oluşur (Şekil 2-14) (6).



Şekil 2-14: Nükleotidlerin yapısı (8)

DNA bir eksen etrafında, birbirine antiparalel olarak devam eden çift zincirden oluşmuş sarmal bir yapıdadır. Çift sarmalın dışa bakan yüzünde ve su moleküllerine dönük olarak hidrofilik (bir molekülün hidrojen bağları kurarak suya bağlanabilme özelliği) özelliğe sahip şeker ve negatif yüklü fosfat üniteleri, içe bakan yüzünde ise ana

eksene dik olarak hidrofobik (bir molekülün sudan kaçınma özelliği) özelliğe sahip olan pürin ve pirimidin bazları yer almaktadır. Şeker ve negatif yüklü fosfat üniteleri birbirine fosfodiester bağları ile tutunurlar. Adenin daima iki hidrojen bağı ile timine, guanin ise daima üç hidrojen bağı ile sitozine bağlanmaktadır. Dolayısıyla, DNA molekülünün iki zincirini pürin ve pirimidin bazları arasında yer alan hidrojen bağları bir arada tutmaktadır (6,8,15) (Şekil 2-15).



Şekil 2-15: DNA yapısı (16)

DNA molekülünün boyu organizmadan organizmaya çeşitlilik gösterir. DNA'daki baz çifti sayısı kilobaz (1000 bazlık uzunluk) olarak ifade edilir. DNA molekülü oda sıcaklığında (20-25 °C) ve pH 7.0 civarında viskoz bir yapıdadır. Yüksek sıcaklık, düşük veya yüksek pH derecelerine tabi tutulan DNA molekülünün yapısında hidrojen bağları ve hidrofobik etkileşimler bozulacağından DNA sarmalı açılmaya başlar. Fosfodiester bağları kopmadan bazlar arasındaki hidrojen bağlarının kopması ve DNA'nın çift zincirinin birbirinden ayrılmasına DNA denatürasyonu denir (6).

2.4.1. DNA HASARI

Genetik bilgiyi taşıyan ve bu bilgiyi nesilden nesile aktarılmasını sağlayan DNA üzerinde sürekli hasar meydana gelmektedir (17). Genetik toksisite ya da genotoksisite terimi çekirdek, kromozom ve DNA yapısında meydana gelen DNA eklentileri, DNA kırıkları, gen mutasyonları, kromozom anormallikleri, klastojenite (kromozom kırılması ve buna bağlı olarak kromozom parçalarındaki kayıp, artma ya da düzensizliklerin

olması) ve anöploidi (kromozomların normal diploid (46) sayıdan farklı sayıda olması) gibi hasarları kapsamaktadır (18). Her bir insan DNA'sında bir günde kodlanamayan veya yanlış kodlamaya sebep olan yaklaşık 10^4 adet hasar meydana gelir (19). DNA üzerinde oluşan hasarlar onarım mekanizmaları tarafından tamir edilirler. Tamir mekanizmasının yetersiz kaldığı veya DNA üzerinde fazla hasar meydana geldiği durumlarda ise oluşan hasar, hücre ölümüne veya mutasyonlara sebep olur (17).

DNA üzerinde oluşan hasarlar iki gruba ayrılır. Bunlar;

1. Kendiliğinden değişimler sonucu oluşan hasarlar

a) Yanlış eşleşme: DNA sentezi sırasında bazların Adenin (A) = Timin (T) , Guanin (G) $\equiv$ Sitozin (C) şeklinde eşleşmesi gerekirken yanlış baz eşleşmesinin gerçekleşmesi sonucu DNA hasarı oluşur. Yanlış eşleşme DNA sentezi sırasında gerçekleşebileceği gibi, DNA tamiri esnasında da meydana gelebilir.

b) Oksidatif hasar: Serbest oksijen radikalleri deoksiriboz fosfat iskeletinde hasara, bazların modifikasyonuna ve DNA- protein çapraz bağlarının oluşumuna sebep olur (17).

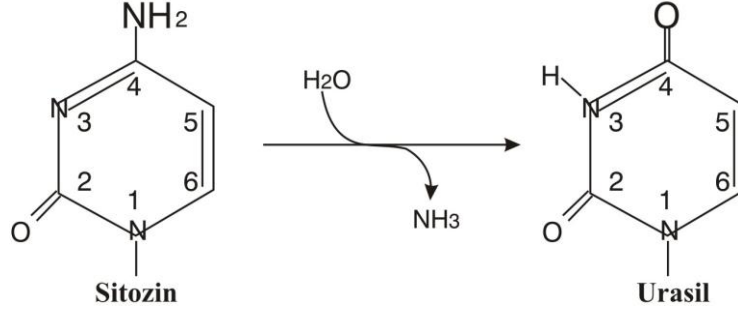
Normal DNA metabolizması sırasında bir günde her hücrede 178 adet 8-OH guanin kalıntısı oluştuğu belirlenmiştir (20). DNA oksidasyon ürünleri arasında en çok oluşan 8-OH guaninin $G \equiv C \rightarrow T = A$ mutasyonuna sebep olduğu bilinmektedir (17).

c) Bazların yapısında spontan gelişen değişimler

Keto-enol tautomerizm: Bazların yapısal izomerinin olması, o bazın eşleşme özelliğini değiştirir. Bazlardaki azot atomları genellikle $-NH_2$ formunda görülürken, bazen $-NH$ formuna da dönüşebilir. Bu dönüşüm nedeniyle de yanlış baz eşleşmeleri meydana gelmektedir. Örneğin; timin çoğu zaman keto ($C=O$) formunda iken, nadir olarak enol ($C-OH$) formuna dönüştüğü zaman, yeni konumları yanlış baz eşleşmesine uygun hale gelir (17).

Bazların deaminasyonu: Her bir bazın deaminasyonu (bir molekülden bir amin grubunun çıkarılması) sonucu farklı yapılar oluşur (Şekil 2-16). Adenin, guanin ve sitozinin deaminasyonu sonucu oluşan yapılar DNA tamir mekanizması tarafından onarılır. Fakat DNA metilasyonu (bir kimyasal bileşiğe bir metil grubunun bağlanması)

sonucu oluşan 5-metil sitozinin deaminasyona uğraması sonucu timin oluşur. Timin DNA'nın kendi bazı olduğu için onarım mekanizmaları tarafından gözden kaçırılarak, mutasyonlara sebep olur (17).



Şekil 2-16: Deaminasyon sonucu sitozinin urasile dönüşümü (21)

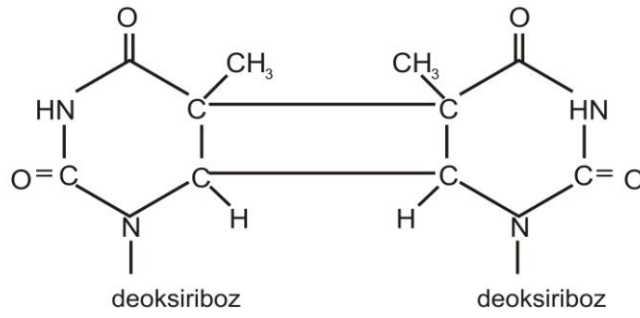
d) Baz kaybı: Pürin ve pirimidin bazlarının termal dayanıklılığına bağlı olarak bazların uzaklaştırılmış olduğu bölgeler meydana gelir. Baz kaybı replikasyonu etkileyeceği gibi fosfodiester bağlarının kolayca hidroliz olması sonucu zincir kırıklarına da sebep olacaktır (17).

2. Çevresel nedenlerle oluşan hasarlar

Fiziksel ajanlar

a) Ultraviyole ışınları (UV)

UV ışınının DNA tarafından absorbe edilmesi sonucu hasarlar meydana gelir. Sıklıkla timin dimeri (komşu iki timin bazının kovalent bağ ile bağlanması) şeklinde pirimidin dimerleri meydana gelir. Bu dimerler replikasyon ve transkripsiyonu engeller (Şekil 2-17).



Şekil 2-17: Timin dimeri (17)

UV ışınının sebep olduğu diğer hasar şekilleri ise DNA çapraz bağları (DNA-protein ve daha az DNA-DNA çapraz bağları) ve zincir kırıklarıdır (17,21).

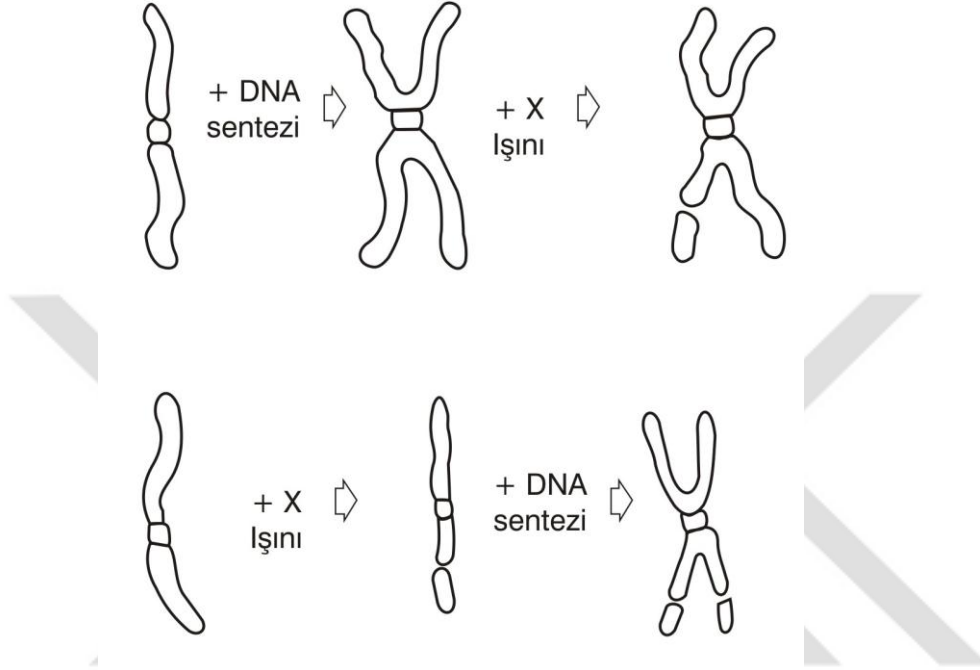
b) İyonize radyasyon

Radyasyondan kaynaklanan hücre ölümü, genetik mutasyonlar ve kanser oluşumunun ana sebebi olan DNA hasarı, farklı şekillerde görülebilir: Tek veya çift DNA zincirinin kırılması, heliks yapısı içerisindeki DNA zincirlerinin diğer DNA zincirleri veya proteinlerle çapraz bağlanması, baz değişimi veya kaybı, DNA zincirleri arasındaki hidrojen bağlarının kopması.

Radyasyondan kaynaklanan hasarların en önemlisi tek ve çift zincir kırıklarıdır. Tek zincir kırıklarının çoğu, sağlam diğer zincir şablon olarak kullanılarak tamir edilebilmektedir. Yanlış tamir edilmesi sonucu mutasyona sebep olabilir ve hücre bölünmesini engelleyebilir. Çift zincir kırıklarında ise, DNA molekülünün her iki zinciri hasar görmüştür. Her iki zincirdeki hasar gören bölgeler birbirinden uzak olduğunda, hasar kolaylıkla tamir edilebilmekteyken; aynı lokasyon veya birkaç baz çifti içinde oluşan hasarın tamiri, sağlam şablon zincir eksikliği nedeniyle zorlaşır ve genellikle yanlış tamir ile sonuçlanabilir. Çift zincir kırıklarının, hücre ölümü, karsinogenezis ve kalıtsal etkilerin çoğunun sorumlusu olduğu düşünülmektedir (22).

Kırılan nükleik asit bağlarının çeşidi ve sayısı, radyasyonun çeşidi ve dozu, maruziyetler arasındaki süre, hücrenin hasar tamir yeteneği ve maruziyet esnasında hücre döngüsünün hangi aşamasında bulunduğu hücre hasarını etkileyen çeşitli faktörler arasındadır (23). Radyasyona maruziyet esnasında hücrenin, hücre döngüsünün hangi aşamasında olduğuna bağlı olarak oluşabilecek hasar değişir. Eğer maruziyet DNA sentezinden sonra oluşursa, etkilenen kromozomun sadece bir kolu kırılır (kromatit

aberrasyonu). Kırık, DNA sentezi öncesi oluşursa hasar bir sonraki mitozda her iki kolda kırık olarak ortaya çıkmaktadır (kromozom aberrasyonu). Bir çok basit kırık tamir mekanizmaları tarafından düzeltilebilmektedir (Şekil 2-18) (22).



Şekil 2-18: Kromotid ve kromozom aberrasyonu (22)

Kimyasal ajanlar: Alkilleyici maddeler (pek çoğu anti-kanser ilacı olarak kullanılır), çapraz bağlayıcılar (nitroz oksit, kükürt mustard v.s.), fenitoin, warfarin, rifampin gibi kimyasallar DNA hasarına sebep olabilmektedir (17).

2.4.2. DNA ONARIMI

Bir hücrenin bütünlüğü ve hayatta kalması ciddi olarak gen stabilitesine bağlıdır. İnsan genomu sürekli olarak DNA hasarına yol açan iç ve dış ajanların (serbest oksijen radikalleri, iyonize radyasyon, UV ışığı ve çeşitli kimyasal ajanlar) tehdidi altındadır (24). DNA da kendiliğinden oluşan hasarlar, hasarı tanıyıp tamir eden sistemler tarafından en aza indirilmektedir. Hücrenin yaşamını devam ettirebilmesi için gerekli olan bu tamir sistemi replikasyon kadar kompleks bir sistemdir. DNA hasarı oluştuğu zaman hücrede dört cevap oluşmaktadır;

1. Hasar almış DNA çıkarılıp DNA'nın yeniden yapılandırılmasının sağlanması.

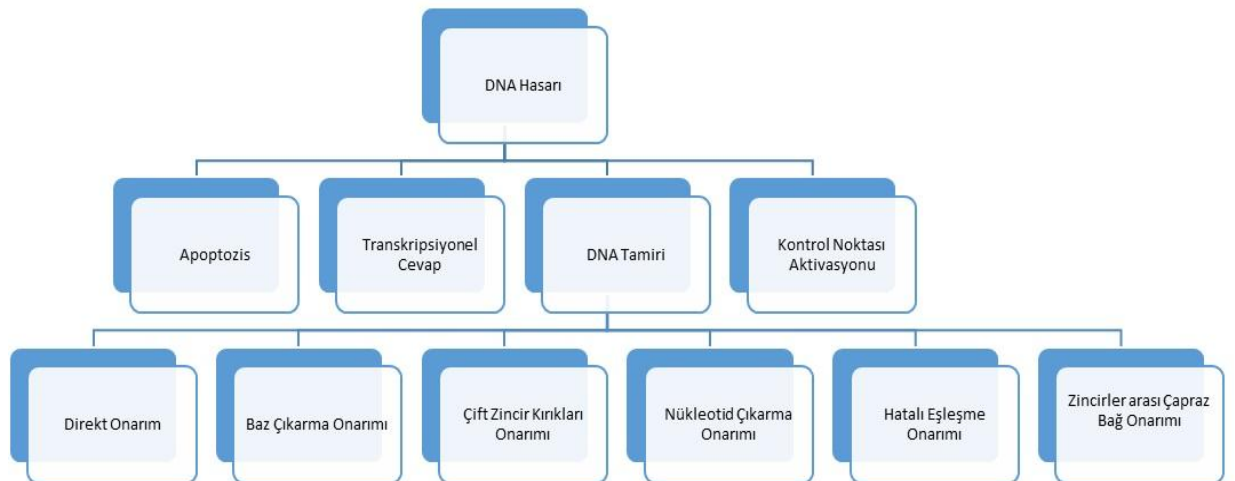
2. Kontrol noktalarının aktivasyonu ile hücre döngüsünün durdurulması ve DNA'nın kendini tamir için imkan sağlanması.

3. Hücrenin gen transkripsiyonunun düzeyi, hücrenin yararına olacak biçimde değiştirilmesi (transkripsiyonel cevap).

4. Tamir edilemeyecek düzeyde ciddi hasar görmüş hücrelerin elenmesi (apoptozis) (2,24,25).

Bir bütün olarak bu cevaplar hücrenin kaderini belirler. DNA hasarına yol açan ajanların tetiklediği farklı DNA lezyonları ve eklentileri geniş bir aralıkta olduğundan hücrede çoklu DNA tamir yollarına ihtiyaç vardır. Bu yollar:

- a) O-6- alkilguanin DNA alkil transferaz ile direkt onarım
- b) Baz çıkarma onarımı ile baz hasarlarının ve tek zincir kırıklarının onarımı
- c) Homolog rekombinasyon, homolog olmayan serbest uç bağlanması ve tek zincir bağlanması ile çift zincir kırıklarının onarımı
- d) DNA eklentilerinin nükleotid çıkarma onarımı ile tamiri
- e) DNA zincirler arası çapraz bağ onarımı
- f) DNA hatalı eşleşme onarımı ile hatalı eşleşmelerin insersiyon delesyon noktalarının tamiri (24) (Şekil 2-19).



Şekil 2-19: DNA hasarına karşı hücresel cevaplar ve DNA tamir yolları (24)

2.4.3. DNA HASARI ve ONARIM HATALARI İLE HASTALIKLAR ARASINDAKİ İLİŞKİ

Hasar görmüş hücrede tamir mekanizmalarının herhangi birinin işlev görmemesi sonucu hücre düzeyinde varolan DNA hasarı nedeni ile genomik kararsızlığın, organizma düzeyinde ise çeşitli hastalıkların (kardiyovasküler hastalıklar, immün sistem hastalıkları gibi) etyolojisinde, kanserde, infertilitede ve yaşlanmada etkili bir rolünün olduğu düşünülmektedir (3,17,18). Mutasyona uğramış DNA içeren mitokondrilerin varlığı ile ilişkili olarak fizyolojik yaşlanma, Alzheimer hastalığı, diyabet, kalp yetersizliği, sağırılık, kanser ve kas hastalıklarının görüldüğü yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur (26).

Kanserlerin büyük bir kısmı onarılamamış DNA hasarından kaynaklanır. Hatalı eşleşmenin onarımındaki bozukluğa bağlı olarak kalıtsal non-polipozal kolorektal kansere, baz çıkarma onarımındaki bir bozukluğa bağlı olarak kolorektal kansere, nükleotid çıkarma onarımına bağlı olarak güneşe duyarlılık ve UV kaynaklı cilt kanseri riskinde artışa sebep olmaktadır. Prostat kanseri başlangıcında genetik bir faktör olarak DNA metilasyonu önemli bir rol oynar (21). Nükleotid çıkarma onarım mekanizmasında görev alan proteinlerden herhangi birini kodlayan genlerdeki mutasyona bağlı olarak nadir görülen, resesif geçişli üç farklı hastalığa sebep olmaktadır. Bu sendromlar kseroderma pigmentosum, cockayne sendromu ve trikotiyodistrofidir (27).

2.5. PANORAMİK RADYOGRAFİ

Ekstra-oral bir teknik olan panoramik radyografi, alt çene ve üst çeneyi, dişleri ve çevreleyen dokuları, kısaca kavisli yüzeyleri düz bir satır halinde tek bir film üzerinde göstermeye yarayan bir tekniktir. Panoramik radyografik görüntü, dönen bir X ışını kaynağı tarafından üretilen, alt çene ve üst çenenin farklı kalınlıklarda tomografik görüntüsünü alan kavisli kesittir. Uygulanması kolay bir teknik olması ve göreceli olarak düşük radyasyon dozunun olması nedeniyle diş hekimliğinde çok sık tercih edilir (23,28,29,30).

Panoramik radyografi metodunu ilk tasarlayan (1933) ve deneyini uygulayan (1934) Japonya'dan Dr. Hisatugu Numata'dır. Numata, kavisli bir filmi ağız içine dişlerin lingualine yerleştirmiş ve filmi ekspoz etmek üzere hastanın çenesinin etrafında

dönen dar X-ışını demeti kullanmıştır. 12 yıl sonra, 1946'da, Finlandiya'dan Dr. Yrjö Veli Paatero, diş arkları için panoramik radyografinin dar ışın demeti (slit beam) metodunu tasarlamıştır. Dr. Paatero klinik radyografi çekimine uygun ilk orthopantomografiyi 1959 yılında tamamlamış olup akabinde 1960 yılında klinik uygunluk onayını almıştır. Ticari olarak ilk üretilen orthopantomograf 1961 yılında piyasaya çıkmıştır (31,32).

Panoramik radyografi analog ve dijital olarak iki şekilde elde edilebilir. 20. yüzyılın ikinci yarısında analog olarak kullanılmaya başlanan panoramik radyografi, 1987 yılından itibaren dijital olarak da kullanılmaya başlanmıştır. Dijital radyografinin analog radyografiye kıyasla en temel üstünlüğü radyasyon dozunda %80'e varan azalma sağlamasıdır. Diğer avantajları arasında, görüntünün kısa sürede elde edilebilmesi, karanlık oda ile banyo işlemini ve dolayısıyla bu süreçten kaynaklanan hataları ortadan kaldırması ve ilave radyasyon maruziyetine gerek olmaksızın üretilen görüntünün kontrast, keskinlik vb. açılardan tekrar işlenebilmesine imkan vermesi sayılabilir. Halihazırda, direkt sistem olarak CCD (Charge-Coupled Device) ve CMOS (Complementary Metal Oxide Semiconductor), indirekt sistem olarak PSP (photo-stimulable phosphor) olmak üzere dental görüntülemeye kullanılan 3 tip dijital radyografi sistemi vardır (22,29).

Panoramik radyografi, görüntülenmek istenen objenin yerleştirildiği ve imaj tabakası denilen merkezi bir nokta veya düzlem etrafında bir X ışını kaynağı ve görüntü alıcısının karşılıklı hareketine dayalı bir prensip ile çalışır (22). İmaj tabakası, yapıların uniform magnifikasyon gösterdiği ve radyografıta daha keskin görüldüğü bölgedir. İmaj tabakasının şekli ve genişliği, cihazdan cihaza değişmekle birlikte, genelde at nalı şeklindedir. İmaj katmanı dışındaki yapılar bulanık, magnifikasyona uğramış veya boyut olarak küçülmüş görünürler. Bazen de tanınmayacak kadar distorsiyona uğrayabilirler. Magnifikasyonun veya distorsiyonun şiddeti yapıların görüntü tabakasına olan uzaklığına göre değişir (22,30). Radyografinin kalitesi hasta pozisyonunun tam olarak ayarlanması ve çekim esnasında hastanın bu pozisyonu koruması ile mümkün olur (22,29). Panoramik radyografi %10 ile %30 arasında değişen bir magnifikasyona sahiptir. Bazen magnifikasyon, aynı panoramik görüntü içerisinde farklı bölgelerde bile değişiklik gösterir. Ayrıca görüntü magnifikasyonu konumlama hataları olduğunda daha değişkendir (30).

Yüz kemiklerinin ve dişlerin geniş kapsamlı bir şekilde görüntülenebilmesi, 10 μSv gibi düşük dozda radyasyona sahip olması, düşük maliyetli olması, hastalar için uygulama kolaylığı, ağız açıklığı kısıtlı hastalarda da kullanılabilmesi, görüntülemenin çok kısa sürede alınabilmesi ve hasta eğitimi ve vaka sunumlarında faydalı bir araç olması panoramik radyografinin başlıca avantajları arasındadır. İyi anatomik detay vermemesi ve görüntüde eşit olmayan magnifikasyon ile distorsiyonlar ise temel dezavantajlarıdır (22,33).

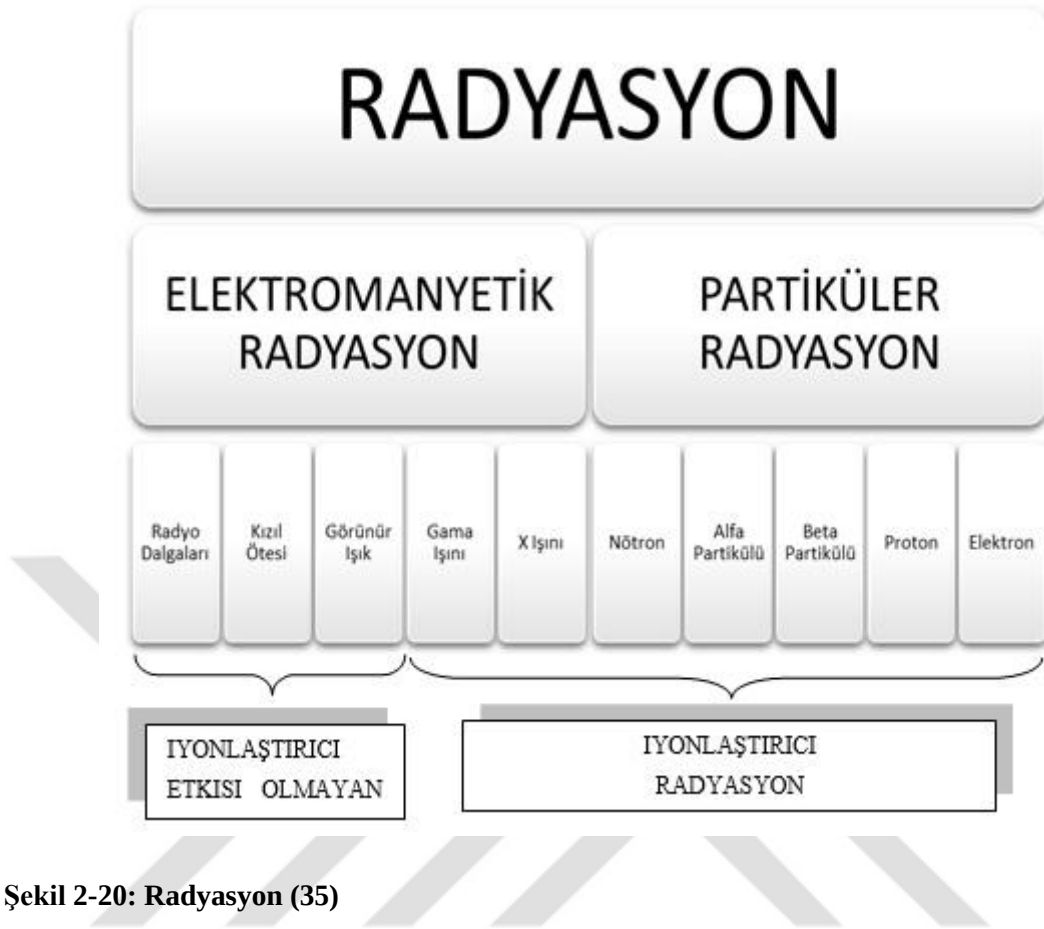
Panoramik radyografi ile tüm dişler ve tutucu dokular, orbita boşluğunun 1/3 üst kısmına kadar olan maksiller bölge, maksiller sinüsler, mandibula, temporomandibular eklem rahatlıkla izlenebilmektedir (34). Radyasyon dozu, ağız içi seri periapikal radyografilere oranla oldukça azdır. Tek bir periapikal radyografide iyonize radyasyon dozu 5 μSv iken panoramik radyografinin ise 9-26 μSv dir. Seri periapikal radyografilere göre daha geniş bir alan (dişler, çene kemikleri, komşu anatomik yapılar) aynı film üzerinde görüntülenebilir (22).

Panoramik radyografi, travma, 3. molar dişlerin pozisyonunun belirlenmesi, geniş kapsamlı dental veya kemik içi patolojiler, bilinen veya şüphe edilen büyük lezyonlar, kemik gelişimi (özellikle karma dentisyonda), kalmış diş veya kök, temporomandibular eklem ağrıları ve gelişimsel anomaliler gibi teşhisinde çenelerin geniş kapsamlı görüntüsüne ihtiyaç duyulan durumlarda klinik olarak en faydalı görüntüleme yöntemidir (22).

Konumlama hataları olmaması kaydıyla panoramik radyografiler, kret kemiği yüksekliği, kemik kalitesi ve yoğunluğu ve mandibular kanal, maksiler sinüs ve nazal fossanın kortikal sınırlarını ön değerlendirilmesinde faydalıdır (30).

2.6. RADYASYON

Radyasyon atomlardan enerji salınması olarak tanımlanır (35). Bu salınma parçacıklar veya elektromanyetik dalgalar şeklinde gerçekleşir (36,37). İyonlaştırıcı etkisi olmayan ve iyonlaştırıcı radyasyon olarak iki ana başlıkta incelenir (Şekil 2-20).



Şekil 2-20: Radyasyon (35)

2.6.1. İyonlaştırıcı etkisi olmayan radyasyon

İyonlaştırıcı etkisi olmayan radyasyonlar dalga boyu 10^{-7} metre'ye eşit veya daha yukarı olan elektromanyetik radyasyonlardır. İyonize olmayan radyasyonlar arasında radyo dalgaları, kızıl ötesi ve görünür ışık sayılabilir. İyonlaştırıcı etkisi olmayan radyasyonların foton enerjileri moleküllerin iyonizasyonuna sebep olmak için çok düşüktür. Kimyasal bağların kırılması için de oldukça zayıftır (12 elektron volttan daha düşük) (37).

2.6.2. İyonlaştırıcı radyasyon

Bir atom veya molekülden bir elektron koparıp iyonlaşmaya sebep olan iyonlaştırıcı radyasyon, kütleli yapısı olan partiküler radyasyon ve foton enerjili dalga karakterinde elektromanyetik radyasyon olmak üzere iki gruba ayrılır. Partiküler iyonlaştırıcı radyasyon tipleri alfa (α) ve beta (β) partikülleri, elektron, proton ve nötronlardır. İyonlaştırıcı yeteneği olan yüksek enerjili fotonlardan oluşan elektromanyetik radyasyonlar ise X ve γ ışınlarıdır (38).

2.6.2.1. İyonlaştırıcı elektromanyetik radyasyon

Belirli bir enerjiye ve frekansa sahip kütsüz elektromanyetik dalgalarıdır. Meydana geliş şekilleri itibariyle birbirinden ayrılan X ve γ ışınları bu gruptadır (35). γ ışınları, radyoaktif bir çekirdeğin kararlı hale geçmesi esnasında parçalanarak açığa çıkan fazla enerji iken, X ışınları çekirdek dışında meydana gelen elektron kaynaklı ışınlarıdır (38).

2.6.2.2. İyonlaştırıcı partiküler radyasyon

Belirli bir kütlesi ve enerjisi olan hızlı hareket eden parçacıklardır. Alfa (α) ve beta (β) partikülleri, elektron, proton ve nötronlar bu gruptadır.

2.7. İYONLAŞTIRICI RADYASYONUN CANLILAR ÜZERİNE ETKİSİ

Canlılarda biyolojik etkiye yol açabilecek düzeyde bir iyonlaştırıcı radyasyon ancak radyasyon enerjisinin, canlıyı meydana getiren hücre ve dokuları tarafından soğurulması ve dokularda dağılması ile mümkündür (38).

İyonlaştırıcı radyasyonun canlılar üzerine etkisi doğrudan etki ve dolaylı etki olarak iki şekilde gerçekleşir.

2.7.1. Doğrudan Etki

Doğrudan etkiler biyolojik moleküllerin iyonlaştırıcı radyasyondan kaynaklanan enerjiyi absorbe etmesi ve kararsız serbest radikaller oluşturması ile gerçekleşir. Bu etkiler 10^{-10} saniyeden daha kısa bir sürede oluşur. Serbest radikaller çok reaktif olup çok kısa süre içerisinde ayrışarak veya çapraz bağlantılar kurarak kararlı hale gelirler. Radyasyona maruz kalan organizmalarda, biyolojik moleküller yapısal ve fonksiyonel olarak asıl molekülden tamamen farklılaşmakta, dolayısıyla biyolojik değişimlere sebep olmaktadır. X ışını maruziyetinin biyolojik etkilerinin yaklaşık olarak üçte biri doğrudan etkilerden kaynaklanır. X ışınları hücrede duyarlı bölgeler olan DNA veya enzim molekülü ile etkileşime girebilir. X ışınlarının DNA üzerine etkisiyle hidrojen bağları kopar, bir veya iki DNA zinciri kırılır, şeker fosfat iskeleti bozulur, DNA- DNA veya DNA- protein çapraz bağlanmalarına sebep olabilir. Biyolojik değişimler nedeniyle hücre ölümü ile sonuçlanabilir.

2.7.2. Dolaylı Etki

Biyolojik sistemin ağırlık olarak yaklaşık %70'ini oluşturan su ile X ışını fotonları ve diğer biyolojik moleküller sık sık etkileşime girer. İyonlaştırıcı radyasyona maruziyet sonrasında ortaya çıkan karmaşık kimyasal değişiklikler en nihayetinde suyun radyolizine sebebiyet verir. Su ile etkileşime giren X ışını, serbet radikallerin oluşmasına sebep olur. Serbest radikaller birleşerek H_2O_2 gibi toksik ürünler oluşturur. Hem peroksit radikalleri hem de hidrojen peroksit gibi toksik ürünler biyolojik moleküllerde değişikliklere ve hücre yıkımına sebep olabilen okside edici ajanlardır. (22,35)

Suyun radyasyona maruziyeti sonucu ortaya çıkan hidrojen ve hidroksil serbest radikallerinin, organik moleküllerle etkileşime geçmesi sonucu organik serbest radikaller oluşur. Radyasyon kaynaklı biyolojik hasarın yaklaşık üçte ikisi dolaylı etkilerden kaynaklanır. Dolaylı ve doğrudan etkiler, 10^{-5} saniyede gerçekleşirken oluşan zarar saatler ile yıllar içerisinde ortaya çıkabilir (22).

Canlılarda radyasyonun biyolojik etkileri deterministik ve stokastik etki olarak sınıflandırılır: Eşik dozun üzerinde radyasyon maruziyeti nedeniyle bir çok hücrenin ölümünün yol açtığı hasarlar (cilt yanığı, katarakt, ölüm vb.) deterministik etki olarak adlandırılır. Stokastik etki ise herhangi bir doz miktarına bağlı olmaksızın düşük dozlarda bile etkisi olabilen, kanser oluşumu ve kalıtsal mutasyon ile sonuçlanabilecek hücre düzeyindeki subletal hasar olarak adlandırılır. Klinik etki derecesi deterministik etkide doz ile doğru orantılı iken, stokastik etkide dozdan bağımsızdır. Etki ihtimali deterministik etkide dozdan bağımsız iken (eşik doz üzeri tüm bireyler etkilenir.), stokastik etkide doz ile doğru orantılıdır. Stokastik etkinin en önemli sonucu karsinogenezdır. Kalıtsal etkiler de çok az ihtimal dahilinde olsa da mümkündür (22).

2.8. COMET ASSAY İLE DNA HASARININ BELİRLENMESİ

Comet assay veya tek hücre jel elektroforez yöntemi hücre düzeyinde DNA hasarının tespiti için geliştirilen bir yöntemdir. DNA hasarı spesifik hücre düzeyinde ilk kez 1978 yılında Rydberg ve Johanson tarafından belirlenmiştir. İzole edilmiş hücrelerde DNA hasar tespitinin hassasiyetini arttıran mikrojel elektroforez tekniği ise 1984 yılında Östling ve Johanson tarafından geliştirilmiştir (39,40). Ancak bu teknik

nötral koşullarda uygulandığından tek zincir kırıklarını tespit edememiştir. Singh ve ark. 1988 yılında elektroforezi kuvvetli alkali ortamda ($\text{pH} > 13$) uygulayarak tek ve çift zincir kırıklarının tamamının belirlenmesine imkan sağlayan ve bugün de kullanılan metodu geliştirmişlerdir (40).

2.8.1. Comet assay yöntemi

Comet assay basit ve hızlı olması, tek hücre düzeyinde veri toplandığından daha sağlam istatistiki analizlere imkan vermesi, örneklem için daha az sayıda hücreye ihtiyaç duyulması (< 10000), DNA hasarının tespitindeki hassasiyeti farklı hücre tipleri ve DNA hasar çeşitleri için uygulanabilirliği ve radyoaktif işaretleme gerektirmemesi nedeniyle, DNA hasar ölçümünde yaygın kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemde süspanse edilen hücreler düşük erime noktalı agaroz jel ile karıştırılarak lamalar üzerine sürülür. Yüksek konsantrasyonda tuz ve deterjan içeren lizis işlemine tabi tutulan hücrelerde zarlar parçalanıp çekirdekte bulunan süpersarım yapı alkali ortamda gevşeyerek açılır ve kırıklar ortaya çıkar. Daha sonra uygulanan elektroforez tekniği ile ise anoda doğru hareket eden kırık DNA zincirleri, kuyruklu yıldız görüntüsü oluştururlar. Serbestleşen DNA ışığa duyarlı olduğundan, işlemler karanlık odada yürütülür. Comet sayımı tüm çalışma boyunca aynı kişi tarafından ve lamaların orta kısmından yapılır (40,41).

2.8.2. Comet assay basamakları

2.8.2.1. Hücrelerin hazırlanması

Tam kan örnekleri, kültüre edilmiş hücreler, kemik iliği, primer insan fibroblastları ve doku örnekleri Comet assay yönteminde kullanılabilir. Her bir hücrenin hazırlık aşamasında farklılıklar vardır. DNA hasar çalışması tam kan örneklerinde uygulandığında heparinize kan, kültür ortamına alınmaktadır. Düşük erime noktalı agaroz ile karıştırılır. Lenfosit ve mononükleer hücrelerde DNA hasar çalışmalarında hücre fraksiyonları histopak ile izole edilerek kullanılır. Fibroblastta ve bazı doku örneklerinde proteinlerin uzaklaştırılması için tripsin-EDTA uygulanır. Bu tip ön işlemler uygulanan hücreler daha önce agaroz jel ile ön kaplama yapılmış lamalar üzerine uygulanır.

2.8.2.2. Lamların hazırlanması

Ön kaplama adı verilen normal erime noktalı agaroz jelin lamlar üzerine yayılması deneye başlamadan önceden hazırlanır ve kurutulur. Düşük erime noktalı agaroz jel içinde süspanse edilmiş hücreler ön kaplama yapılmış lamlar üzerine yayılır. Böylece iki jel içerisine hücreler gömülür. Yüksek hücre konsantrasyonu cometlerin üst üste gelmesine neden olabilirken, yüksek agaroz konsantrasyonu ise DNA göç hızını ve diğer işlem basamaklarını etkileyeceğinden sağlıklı sonuç için hücre ve agaroz konsantrasyonu önemlidir.

2.8.2.3. Lizis

Agaroz jel donduktan sonra yüksek konsantrasyonda tuz, deterjan ve proteinaz K içeren lizis çözeltisinde bir gece bekletilir. Lizis işlemi sırasında membranlar parçalanır ve hücre içeriği çekirdekten uzaklaştırılır.

2.8.2.4. Alkali ortamda DNA süpersarmal yapısının açılması

Çift sarmal DNA yapısının çözülmesi için hazırlanmış olan preparatlar yüksek alkali özellikteki elektroforez tamponunda bekletilir. DNA, zincir kırıklarının bulunduğu noktalardan açılmaya başlar. İşlem süresi hücre tipine ve araştırmacıya göre değişmekle birlikte genellikle 20 dk olarak uygulanır.

2.8.2.5. Elektroforez

Jel içerisinde oluşan tek zincir DNA yine alkali ortamda elektroforeze tabi tutulur. Hasar almamış DNA, çekirdekten çıkamadığı için kuyruklu yıldız görüntüsü oluşmaz. Ancak anoda doğru hareket eden DNA parçalarından hasarlı olanlar daha geride kalarak kuyruklu yıldız görüntüsünü verir. Elektroforez 25 V 300 mA akım ve genellikle 25 dk sürede gerçekleştirilir.

2.8.2.6. Nötralizasyon

Jel pH'sının nötralizasyonu için lamlar nötralizasyon tamponu ile beşer dakika ara ile üç kez yıkanır.

2.8.2.7. DNA boyama ve Cometlerin görüntülenmesi

Cometlerin görüntülenebilmesi için DNA spesifik boyalar ve mikroskopta uygun büyütme seçilir. Comet sayımı hangi yöntemle yapılırsa yapılsın cometlerin iyi boyanması çok önemlidir. Floresan boya olarak en yaygın etidyum bromür kullanılır.

Genotoksisite analizlerinde en iyi tercih etidyum bromürdür. Boyama sonrası mikroskosta anoda doğru ilerleyen DNA kırıkları kuyruklu yıldız görüntüsü verirken hasarsız DNA lar ise spot şeklinde görülür.

2.8.2.8. Comet görüntülerinin sayılması ve hasarın belirlenmesi

Cometlerin sayılmasında iki farklı yol izlenebilir.

a) Görsel analiz:

Görsel değerlendirmede cometler hasar durumlarını gösteren DNA kuyruk uzunluklarına göre 5 katagoride değerlendirilir. Parlak başlı kuyuksuz spot şeklindeki görüntüler (hasar görmemiş DNA) 0 katagorisine girerken çok küçük başlı ve uzun dağınık kuyruklu görüntüler 4. katagoridedir. Her lamdan rastgele 100 hücre seçilir. Her biri için 0-4 katagorileri arasında bir değer verilir. Her katagorideki comet sayısı belirlenerek, spesifik formüllerle DNA hasarı belirlenir.

b) Bilgisayarlı görüntü analizi:

Mikroskoba bağlı bir kamera sistemi ile cometlerin görüntüleri otomatik olarak alınarak bilgisayar ortamında analiz için özel geliştirilmiş özel yazılımlarda değerlendirilir. Bu yazılımlar comet başını kuyruktan ayırt edebilecek kuyruk uzunluğu, kuyruk momenti gibi çeşitli parametreleri belirleme imkanı sunar (40,41)

2.9. MİKRONÜKLEUS TESTİ

Mikronükleuslar hücrenin mitotik bölünme aşamasında geride kalarak iğ iplikçiğine tutunmayı başaramayan ve yavru hücrelerin ana çekirdeğine dahil olmayan, sitoplazmada ana çekirdeğe benzer tam kromozom veya kromatit parçacıklarından oluşan yapılardır (1,42-46). Mikronükleus oluşumu hücre döngüsünü kontrol eden genlerin eksikliğinden, mitotik iğde oluşan hatalardan, kinetokordan veya mitotik iğ aygıtının diğer parçalarından ve kromozom hasarlarından kaynaklanmaktadır (45). Anöploidiye yol açan ajanlar iğ iplikçiğini etkileyerek, klastojenler kromozom kırıklıklarına sebep olarak mikronükleus oluşumunu tetiklemektedir. Bu nedenle mikronükleus sayısındaki artış genomik kararsızlığın göstergesi kabul edilmektedir (43-46,48).

Günümüzde moleküler epidemiyoloji çalışmalarında üç tip biyomarker öne çıkmaktadır; maruziyet biyomarkerları (kromozomal aberasyonlar, mikronükleus, kardeş kromatit değişimi), duyarlılık biyomarkerları (genetik polimorfizm), hastalık biyomarkerları (tümör biyomarkerları). Genetik hasarın ve sebep olduğu hastalıkların biyoizlenmesi, teşhisi ve tedavi uygulamalarının geliştirilmesi için çok iyi bir aday olan mikronükleus testi, güvenilir ve minimal invaziv bir markerdir (48).

Mikronükleus testi kromozomal hasarın değerlendirilmesinde çok güvenilir bir yöntemdir. Yaygın olarak kullanılan standart genotoksisite test sisteminde yer almakta olup in vivo ve in vitro olarak uygulanabilmektedir (1,45). Mikronükleus testinin avantajları arasında sayımının nispeten kolay olması, farklı hücre tiplerinde uygulanabilmesi (lenfositler, kemik iliği hücreleri, bukkal epitel hücreler v.b.), daha fazla sayıda hücre sayımından elde edilebilen istatistik gücü ve maliyetinin az olması sayılabilir (4,43,45,47). Noninvaziv metotla örnek toplama kolaylığı testin geniş çalışma gruplarında uygulanabilmesine imkan verir (44).

Mikronükleus testi ilk defa 1959 yılında in vitro olarak Vicia faba (bakla) köklerinde yapılan radyasyon çalışmasında kullanılmıştır (48). İn vivo olarak ise hayvan kemik iliği çalışmalarında 1970'lerin başında kullanılmıştır. 1976 yılında insan hücresi kan lenfositlerinde kullanılmış ve test sistemlerinde biyomarker olarak kullanılması önerilmiştir (49). Mikronükleus testinin insan biyoizleme çalışmalarında uygunluğu, döküntü bukkal mukoza hücreleri ile 1982 yılında yapılan çalışmada ilk defa tanımlanmıştır (5,44,46,48).

Mikronükleus (MN) testinin in vivo ve in vitro uygulamalarında farklılıklar vardır. İn vitro MN testinde hücrelerin mitoz bölünmesini sağlayan medyum içerisinde steril tüplere ilave edilen hücreler inkübe edilir. Kimsayal bir maddenin genotoksik etkisinin incelenmesi isteniyorsa, test maddesi inkübasyonun 24. saatinde hücre ortamına ilave edilir. İnkübasyon başlangıcından 44 saat sonra tüplere sitokalsin-B maddesi ilave edilir. Bu madde sitokinezi engellemekte ve iki çekirdekli hücre oluşumunu sağlamaktadır. Daha sonra uygun protokoller uygulanarak hazırlanan preparatlar mikronükleusların görünür olması için boyanır. Her bir preparattan iki çekirdekli hücreler (genellikle 2000 tane) ışık mikroskobu altında sayılır. Bu sayılan hücreler içerisinde mikronükleus oluşumu gözlenen hücreler belirlenir. İn vivo MN testlerinde ise sitokalsin-B uygulaması yapılmadan uygun protokollerle hazırlanan

hücreler yine ışık mikroskobu altında gözlemlenerek mikronükleus oluşumları tespit edilir. Genellikle in vivo MN testlerinde periferik kan veya kemik iliği hücrelerindeki tam olarak olgunlaşmamış (polikromatik) eritrositlerin analizi yapılarak, test edilen maddenin kromozomal hasar yapıp yapmadığı araştırılır. Kemik iliği ile yapılan çalışmada yöntem şu şekildedir: Test maddesi uygulanan hayvanlar belirli bir süre sonra öldürülerek femur çıkartılır. Femurdan alınan hücreler fetal bovine serum içerisine alınarak santrifüj edilir. Süpernatant atılıp geri kalan kısma bir miktar daha fetal bovine serum ilave edilerek süspanse edilir. Daha sonra temiz lam üzerine yayılırlar. Lamalar boyanarak incelenmeye hazır hale getirilir. Lenfosit kültür hücrelerinin yanında eksofoliyatif hücreler ile de çalışmalar yapılmaktadır. Böylelikle ağız, burun ve bronş hücrelerinde de kimyasalların ve enfeksiyonların etkilerinin değerlendirilmesi imkanı elde edilmiştir. Hızla çoğalan bu epitel dokuların yüzeyini oluşturan döküntü hücreler kolaylıkla elde edilebilmekte ve uğradıkları genotoksik hasarı gösterilebilmektedirler. Bu hücreler kromozom kırıklarını, premalign değişikliklerini ve kanseri gösterebildiklerinden biyomarker olarak değerlendirilmekte ve karsinojenlere maruz kalmış kişilerdeki artmış kanser riskini belirlemek amacıyla kullanılmaktadır. Döküntü hücrelerde uygulanan MN testinde, alınan hücrelere uygun boyama teknikleri uygulanarak preparatlar hazırlanır. Işık mikroskobu altında mikronükleus gözlenen hücreler sayılır (45,46)

MN testi genotoksik, sitotoksik ve karsinojenik ajanların hücre üzerindeki etkilerinin analizinde kullanılmaktadır. Genomik hasarın gelişimsel ve dejeneratif hastalıkların en önemli sebeplerinden biri olabileceği ve genotoksinlere çevresel ve mesleki maruziyet, medikal prosedürler (radyasyon ve kimyasallar), mikrobelerin yetmezliği (folik asit), yaşam tarzı faktörleri (alkol, sigara uyuşturucu, stres) ve genetik faktörler (DNA metabolizma ve veya tamirinde kalıtsal defektler) tarafından kaynaklandığı bilinmektedir (48,44,45).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇLER

Çalışmamıza dahil edilen hastalardan panoramik radyografi çekilmeden hemen önce ve 15 gün sonra alınan hücrelerindeki hücre hasarını gözlemlemek amacıyla uygulanan mikronükleus testinde gerekli olan kimyasal maddeler ile alınan hücrelerin DNA hasarını gösteren Comet Assay yönteminde kullanılan kimyasal maddeler ve gereçler aşağıda belirtilmiştir. Comet Assay yönteminde kullanılan çözeltiler; PBS (Tuz içeren yıkama eriyiği), normal erime noktalı agaroz (%1), düşük erime noktalı agaroz (%1), lizis tamponu, elektroforez tamponu, nötralizasyon tamponu ve boyama solüsyonu hazırlama prosedürü ayrıntılı olarak anlatılmıştır.

3.1.1. Çalışmada Kullanılan Maddeler

3.1.1.1. Tek Hücre Jel Elektroforez Yöntemi İçin Kimyasal Maddeler ve Gereçler

Triton X-100 (Sigma)

Normal erime noktalı agaroz (Sigma)

Düşük erime noktalı agaroz (Sigma)

Ethidium bromid (MP Biotech)

Trizma Base (Sigma)

Sodium chloride NaCl (Merck)

Sodium Hydroxide NaOH (Merck)

Disodium EDTA (Etilendiamin tetra asetik asit) (Amresco)

Phosphate Buffered Saline (PBS) (Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ free) (Pan biotech)

Proteinaz K (MP Biomedicals)

15 ml falcon tüp (TPP)

Mikropipet ve uç (CAPP)

Eppendorf tüp 0.5 ml (CAPP)

Eppendorf tüp 1.5 ml (CAPP)

Lam (Lamtek)

Lamel 24x60 (Lamtek)

Dmem f12 with 15mm hepes (Lonza)

Fetal bovine serum (Gibco)

Penicillin streptomycin solusyon (Pan biotech)

Sybr Green (Biotium)

5 ml round bottom tubes (Falcon)

3.1.1.2. Mikronükleus Testi Kullanılan Kimyasal Maddeler:

%96- %80-%70-%50 derecelik alkol

Hematoksilen boyası (Merck)

Asit alkol

Orange G boyası (Bio Optica/Papanicolaou OG6)

EA-65 (Papanicolaou) boyası (Merck)

Aseton

Ksilol

3.1.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar:

Distile su cihazı (GFL),

Elektroforez güç kaynağı (Biorad Model 200/2.0),

Işık Mikroskobu (Olympus),

Floresan mikroskobu (Olympus BX51),

Görüntüleme sistemi (DP2-BSW),

Santrifüj (Hettich-Universal 30 2S),

pH metre (WTW İmolab),

Isıtıcı Tabla (Wisd),

Maxi yatay elektroforez tankı (Peqlab),

İnkübatör (Heraeus)

3.1.3. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler:

3.1.3.1. Tek Hücre Jel Elektrophorez Yöntemi İçin Kullanılan Çözeltiler

PBS (Tuz içeren yıkama eriyiği)

1,44 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

0,2 g/l KH_2HPO_4

8,0 g/l NaCl

0,2 g/l KCl

800 ml dH_2O ile çözülerek pH:7.4 olacak şekilde ayarlanarak son hacim 1 lt'ye tamamlanmıştır.

Normal Erime Noktalı Agaroz (%1)

30 mg Normal Erime Noktalı Agaroz

3000 μl dH_2O içerisinde çözülür.

Düşük Erime Noktalı Agaroz (%1)

10 mg Normal Erime Noktalı Agaroz

1000 μl dH_2O içerisinde çözülür.

Lizis Tamponu

2,5 M NaCl

100 mM EDTA

10 mM Trizma Base

% 1 Triton X-100

pH 10 olacak şekilde ayarlanarak son hacim dH_2O ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

Elektroforez Tamponu

200 g NaOH

500 ml dH₂O içinde çözülür.

14,89 g EDTA

pH 10 olacak şekilde ayarlanarak son hacim dH₂O ile 200 ml'ye tamamlanmıştır.

Bu hazırlanan iki çözeltiden

30 ml NaOH

5 ml EDTA

pH >13 olacak şekilde ayarlanarak son hacim dH₂O ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

Nötralizasyon Tamponu

48,5 g Trizma Base

pH 7,5 olacak şekilde ayarlanarak son hacim dH₂O ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

Boyama Solüsyonu

10X Stok:

10 mg etidyum bromür (20 µg/mL)

50 ml dH₂O ile karıştırılmıştır.

1X Stok:

10X stoktan 1 ml alınarak son hacim 9 ml dH₂O ile tamamlanmıştır.

3.1.4. Çalışmaya dahil edilen bireyler:**3.1.4.1. Hasta Seçimi:**

Kliniğimize diş tedavisi amacıyla başvuran zaten panoramik radyografi çekim endikasyonu almış ve kriterlerimize uygun gönüllü hastalar dahil edilmiştir. Çalışmaya

dahil edilen hastalardan Kodak 8000 dijital panoramik röntgen cihazında radyografler çekilmiştir (Kadınlarda 68-70 KVp 4mA; erkeklerde 70-75 KVp 6,3-8 mA 13,9s parametreleri ile).

3.1.4.2. Araştırmaya Dahil Olma Kriterleri:

Çalışmaya dahil edilecek hastaların son bir sene içinde baş-boyun bölgesinden herhangi bir radyografik tetkik uygulanmamış olması,

Araştırmaya dahil olan tüm bireylerin, çalışmanın amacı ve yöntemi açıklandıktan ve Gönüllü Bilgilendirme ve Onay Formu' nu okumaları sağlandıktan sonra, gönüllü olarak Gönüllü Onay Formunu imzalamış olmaları,

Sigara içmeyen ve alkol kullanmayan hastalar,

Herhangi bir sistemik hastalığı olmayan hastalar,

Düzenli olarak ağız gargaraları kullanmayan hastalar olarak belirlenmiştir.

3.1.4.3. Araştırmaya Dahil Olmama Kriterleri

Araştırma süresince araştırmadan gönüllü olarak ayrılmak isteyenler,

Son 1 sene içerisinde baş-boyun bölgesinden radyografik tetkik yapılmış olması,

Sigara ve alkol kullanan hastalar,

Düzenli olarak ağız gargaraları kullanan hastalar,

Çalışmaya katılmasına engel olacak herhangi bir sistemik rahatsızlığı olan hasta olan hastalar araştırmamıza dahil edilmemiştir.

3.2. YÖNTEMLER

3.2.1. Sürüntü hücre alınması

Diş tedavisi nedeniyle panoramik radyografi çekilecek olan ve çalışmaya katılmayı kabul eden hastalardan ağzını üç kez su ile çalkalaması istenmiş ve sonrasında cytobrush yardımı ile hem sağ hem sol yanak mukozalarından nazikçe sürülerek hücreler alınmıştır. Hücre alma işlemi panoramik röntgen çekilmeden hemen önce ve 15 gün sonra gerçekleştirilmiştir.

3.2.2. Alınan hücrelerin çekirdek yapılarının incelenmesi

3.2.2.1. Hücrelerin alınması

Cytobrush ile yanak içerisinden alınan hücre örnekleri hemen lam üzerine seri bir şekilde ince bir tabaka halinde yayılmıştır. Lam hemen %96'lık alkolle fikse edilerek şalelerde alkol içerisinde sitoloji laboratuvara götürülmüştür.

3.2.2.2. Lamaların hazırlanması

Şale içerisindeki lamalar en az 30 dakika bekletilmiştir. Bu süre dolduktan sonra sırasıyla %96'lık, %80'lik, %70'lik, %50'lik etil alkol bulunan şalelerde her birinde 10'ar kez daldırılıp çıkarılmıştır. Su ile yıkanmıştır. Hematoksilen boyasında 5 dakika tutulup boyanın uzaklaştırılması için suya alınan lamalar burada yıkanmıştır. Lamaların fazla boyası asit alkolde giderilmiş %4'lük amonyaklı suda morartılmıştır. Tekrar sırasıyla %50'lik, %70'lik, %80'lik ve %96'lık etil alkolden geçirilmiştir. Orange G de 5 dakika bekletilmiştir. İki farklı şalede bulunan 96'lık etil alkollerden geçirilmiştir. 5 dakika EA65 boya solüsyonunda (papanicolau) bekletilmiştir. 4 farklı şalede bulunan %96'lık etil alkollerden geçirilmiştir. İki farklı şalede bulunan aseton aşamasından geçirilmiştir. İki farklı şalede bulunan ksilolden geçirilen lamalar kapatma solüsyonu ile kapatılmıştır.

Sitolojik materyal ışık mikroskobunda incelenmiş olup her bir örnekten 1000 hücre sayılmıştır. Bu sayılan hücrelerin mikronükleus varlığı, nükleusta görülen piknoz, karyolizis ve karyoreksis değerlendirilmiştir.

3.2.3. Alınan hücrelerin DNA hasarının comet assay yöntemi ile incelenmesi

3.2.3.1. Hücrelerin alınması

Cytobrush yardımı ile hem sağ hem sol yanak mukozalarından iki tur döndürerek örnek toplanmıştır. %10 FBS (Fetal Bovine Serum), %1 Penisilin-Streptomisin üzerine DMEM F12 (Dulbecco's Modified Eagle's medium) eklenerek toplam hacmin 30 ml olması sağlanmıştır. Hazırlanan solüsyona örnek bırakılmış 30 dakika içerisinde İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Bölümü Biyofizik Anabilim Dalı'na götürülmüştür. 3000 devirde 5 dk. santrifüj yapılarak supernatant atılmış ve peletin üzerine aynı solüsyondan 1 ml eklenip thoma lamında sayım yapılmıştır.

3.2.3.2. Slaytların Hazırlanması

% 1'lik düşük erime noktalı agaroz (LMPA) ve % 1'lik normal erime noktalı (NMPA) agaroz distile su içerisinde hazırlanmış ve agaroz çözülünceye kadar ısıtılmıştır. Lamları metanole batırarak daha sonra ateşten geçirilmiştir. NMPA sıcakken lamen üzerine dökülmüş (160µl) ve kuruması için ya açık havada veya 50°C ortamda bekletilerek kullanana kadar oda sıcaklığında tutulmuştur.

3.2.3.3. Hücre İzolasyonu/Uygulanması

Hazırlanmış olan lamen üzerine 5-10µl PBS içinde 10.000 hücre olacak şekilde 75µl LMPA ile karıştırılıp yavaşça yayılmıştır. 5-10 dk tabakanın sertleşmesi beklenmiştir. Lizis solüsyonunda bırakılan slaytlar mümkün olduğunca yakın aralıklarla jel kutusuna dizilerek +4 derecede buzdolabında bir gece bekletilmiştir. Ertesi gün lizis tamponuna proteinaz K eklenerek (500µg/ml) +37 derece inkübatörde bir gün bekletilmiştir.

3.2.3.4. Mikrojel Slaytlarının Elektrofrez

Taze hazırlanmış Elektrofrez Tamponu slaytların üzeri tamamen kapanacak şekilde doldurulmuştur. 20-40 dk boyunca tampon içinde bekletilip, güç kaynağı 25 volt 300 mA olacak şekilde ayarlanmıştır. Slaytlar 20-30 dakika elektroforeze maruz bırakılarak daha sonra akım kesilmiştir. Slaytlar tampondan çıkarılıp, kuru bir yere dizilmiştir. Üzerlerine nötralizasyon tamponu dökülüp 5 dakika beklenmiş ve aynı işlem iki kere daha tekrarlanmıştır. Slaytlar 20 µg/ml EtBr ile boyanmıştır. 5 dakika bekletilip soğuk distile su ile boyanın fazlası akıtılarak lamel ile kapatılmıştır.

3.2.3.5. DNA Hasarının Değerlendirilmesi

40X objektif altında floresan mikroskop ile rastgele seçilmiş 100 hücre değerlendirilerek bilgisayar aracılığı ile resimleri çekilmiştir. Görüntüler “bmp” formatında kaydedilmiş DNA hasarı olmayan hücreler nokta şeklinde görülürken, DNA hasarı varsa fragmentasyon oluşmuş ve kuyruklu yıldız benzeri bir görüntü alınmıştır. Hasar ne kadar fazla ise kuyruğun o kadar uzun olduğu görülmüştür. Görüntüler “Comet Score” bilgisayar programında değerlendirilmiştir.

3.2.4. İstatistik Analiz

Veriler; ortalama, standart sapma, medyan, minimum, maksimum, yüzde ve sayı olarak sunulmuştur. Sürekli değişkenlerin normal dağılımına Shapiro Wilk testi ile

bakılmıştır. İşlem öncesi ve sonrası değişkenlerin kıyaslanmasında Wilcoxon testi kullanılmıştır. Değişkenlerin iki grup ile kıyaslamalarında normal dağılıma uyan değişkenlerde Independent Samples t testi ve normal dağılıma uymayan değişkenlerde Mann-Whitney u testi kullanılmıştır. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p<0,05$ olarak alınmıştır.



4. BULGULAR

İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş ve Çene Radyolojisi Anabilim Dalı'na diş tedavileri nedeniyle başvuran hastalar İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Klinik araştırmalar etik kurulunun 02.07.2013 tarihli 757 sayılı kararı doğrultusunda çalışmaya dahil edilmişlerdir. Araştırmaya dahil olan tüm hastalara çalışmanın amacı ve yöntemi açıklandıktan ve Gönüllü Bilgilendirme ve Onay Formu' nu okumaları sağlandıktan ve gönüllü olarak Gönüllü Onay Formunu imzalatıldıktan sonra çalışmaya katılmışlardır. Çalışmada diş tedavisi nedeniyle panoramik radyografi alınması gereken gönüllü 30 hastadan radyografi alınmadan hemen önce ve 2 hafta sonra yanak mukozasından sürüntü hücre alınmıştır. X ışını maruziyetinden önce ve sonra alınan her bir örneğin 1000 hücresinin çekirdeğindeki değişiklikler (piknozis, karyolizis, karyoreksis, mikronükleus ve binükleus) ışık mikroskopunda sayılarak kaydedilmiştir.

Kontrol (panoramik radyografi öncesi alınan hücreler) ve deney (panoramik radyografi sonrası alınan hücreler) gruplarının her birinden yüzer adet hücre, Comet Assay yöntemi ile analiz edilerek “comet score” isimli bilgisayar programında değerlendirilmiştir. DNA hasar düzeyini gösteren parametrelerden kuyruk uzunluğu (tail length) ve kuyruktaki DNA yüzdesi (%DNA in tail) her iki grupta incelenerek karşılaştırılmıştır.

4.1. Hastaların Değerlendirilmesi

Çalışmaya katılan hastaların doğum yılı bilgileri alınarak istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Yaşları maksimum 46, minimum 20 olarak belirlenmiştir. (Yaş ortalaması 23) (Tablo 4-1).

Tablo 4-1: Yaş ortalaması

Yaş				
Ortalama	Ss	Median	Maksimum	Minimum
23	5	22	46	20

Çalışmaya dahil edilen hastaların 9'u kadın (%30) ve 21'i erkek (%70) olup cinsiyet açısından anlamlı bir fark bulunmamıştır (Tablo 4-2), (Tablo 4-3).

Tablo 4-2: DNA ve hücresel değişikliklerin cinsiyete göre dağılımı

	Ortalama (Kadın)	ss	Ortalama (Erkek)	ss	t	p
%DNA in tail	16,18	7,20	15,70	8,08	0,154	0,878
fpiknozis	11,33	30,29	1,33	37,06	0,712	0,482
fkaryolizis	12,56	51,79	24,00	23,79	-0,840	0,408
fmikronükleus	21,00	27,60	30,05	10,90	-1,305	0,202

İndependent samples t testi

Tablo 4-3: DNA ve hücresel değişikliklerin cinsiyete göre dağılımı

	Ortalama $\pm$ ss (Kadın)	Median (min-mak)	Ortalama $\pm$ ss (Erkek)	Median (min-mak)	z	p
fbinükleus	3 $\pm$ 4,64	2 (-3 - 9)	1,86 $\pm$ 3,86	0 (-4 - 11)	-0,701	0,483
ftail lenght	32,39 $\pm$ 24,87	27,03 (11,5-92,05)	23,85 $\pm$ 17,04	19,77 (3,44-59,79)	-0,973	0,331

mann-whitney u testi

4.2. Tek Hücre Jel Elektroforez” Yöntemi (Comet Analizi) ile DNA Hasar Analizi

Panoramik radyografi alınmadan önceki kuyruktaki DNA yüzdesi ile panoramik radyografi alındıktan sonraki kuyruktaki DNA yüzdesi değişkenlerinin medyanları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,001$) (Tablo 4-4).

Tablo 4-4: Deney ve kontrol grupları arasında kuyruktaki DNA yüzdesinin istatistiksel değerlendirilmesi.

Kuyruktaki DNA yüzdesi kontrol		Kuyruktaki DNA yüzdesi deney		z	p
Ortalama $\pm$ ss	Median (min-mak)	Ortalama $\pm$ ss	Median (min-mak)		
0,11 $\pm$ 0,24	0,01 (0-1,20)	15,96 $\pm$ 7,66	14,15 (2,06-31,89)	-4,782	<0,001

wilcoxon testi

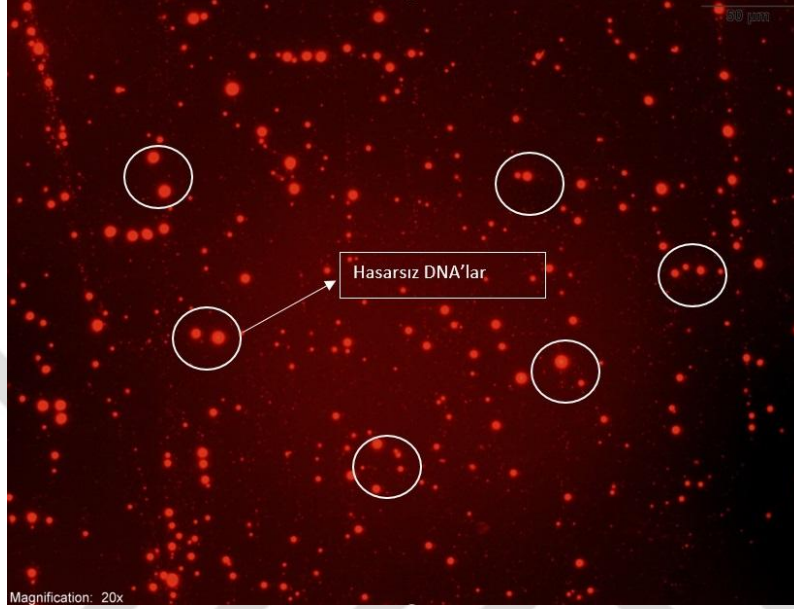
Panoramik radyografi alınmadan önceki kuyruk uzunluğu ile panoramik radyografi alındıktan sonraki kuyruk uzunluğu değişkenlerinin medyanları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,001$) (Tablo 4-5).

Tablo 4-5: Deney ve kontrol grupları arasındaki kuyruk uzunluklarının istatistiksel değerlendirilmesi.

Kuyruk uzunluğu kontrol		Kuyruk uzunluğu deney		z	p
Ortalama $\pm$ ss	Median (min-mak)	Ortalama $\pm$ ss	Median (min-mak)		
3,42 $\pm$ 2,08	2,74 (0,34-7,90)	29,83 $\pm$ 19,87	23,31 (5,35-94,41)	-4,782	<0,001

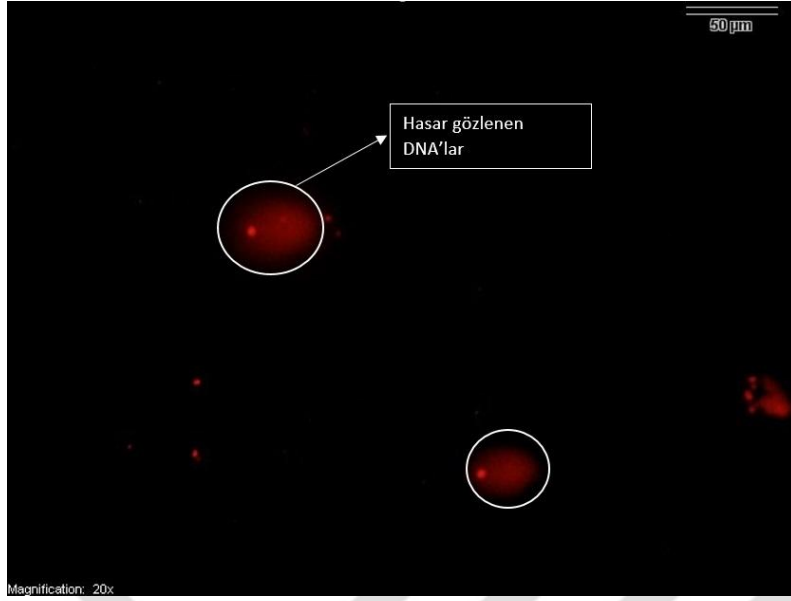
wilcoxon testi

Panoramik radyografi çekilmeden önce alınan bukkal sürüntü hücrelerinin Comet Assay yöntemi ile alınan görüntülerinde kırık görülmeyen normal DNA yapısı görülmektedir (Şekil 4-1).

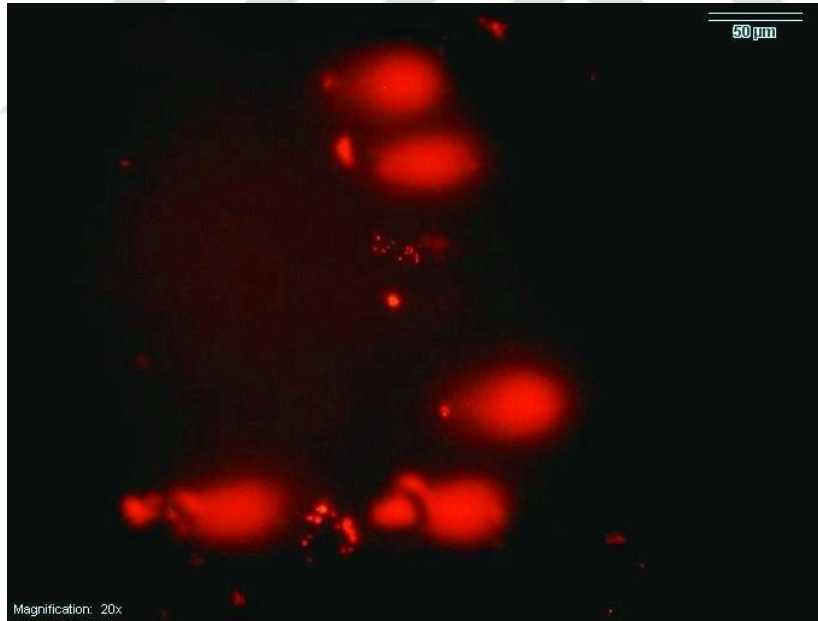


Şekil 4-1: Panoramik radyografi çekilmeden önce alınan hücrelerde kırığa sahip olmayan normal ağız içi epitel hücreleri. (Görüntüler, tez çalışmasının bulgularından elde edilmiştir.)

Panoramik radyografi çekildikten sonra alınan bukkal sürüntü hücrelerinin comet assay yöntemi ile alınan görüntülerinde ise DNA'ların kuyruklu yıldız (comet) görüntüsü gözlenmiştir (Şekil 4-2) (Şekil 4-3).



Şekil 4-2: Panoramik radyografi çekildikten sonra alınan hücrelerde kırığa sahip olduğu belirlenen ağız içi epitel hücreleri (Görüntüler, tez çalışmasının bulgularından elde edilmiştir.)



Şekil 4-3: Panoramik radyografi çekildikten sonra alınan hücrelerde kırığa sahip olduğu belirlenen ağız içi epitel hücreleri (Görüntüler, tez çalışmasının bulgularından elde edilmiştir.)

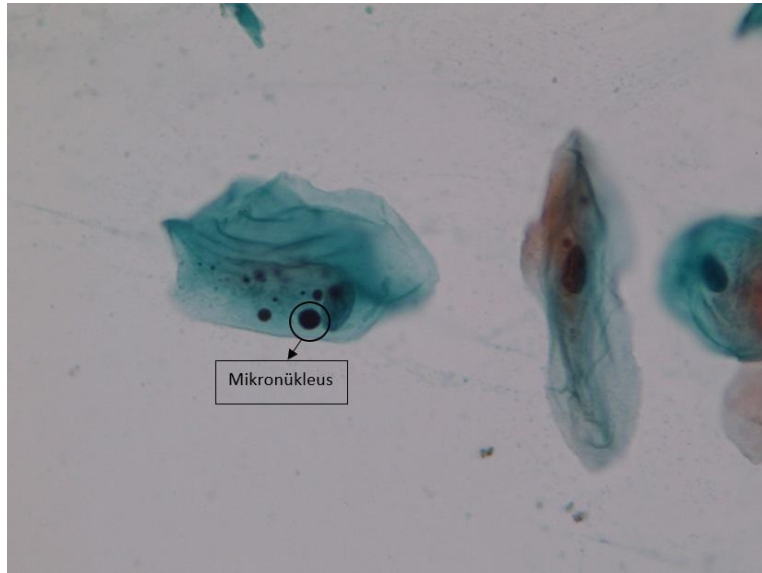
4.3. Mikronükleus Testi ile Hücre Hasarı Analizi

Mikronükleus kontrol ile mikronükleus deney değişkenlerinin medyanları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,001$) (Tablo 4-6). Işık mikroskopundaki görüntüde hücrenin sitoplazmasında mikronükleus görüntüsü gözlenmektedir (Şekil 4-4) (Şekil 4-5).

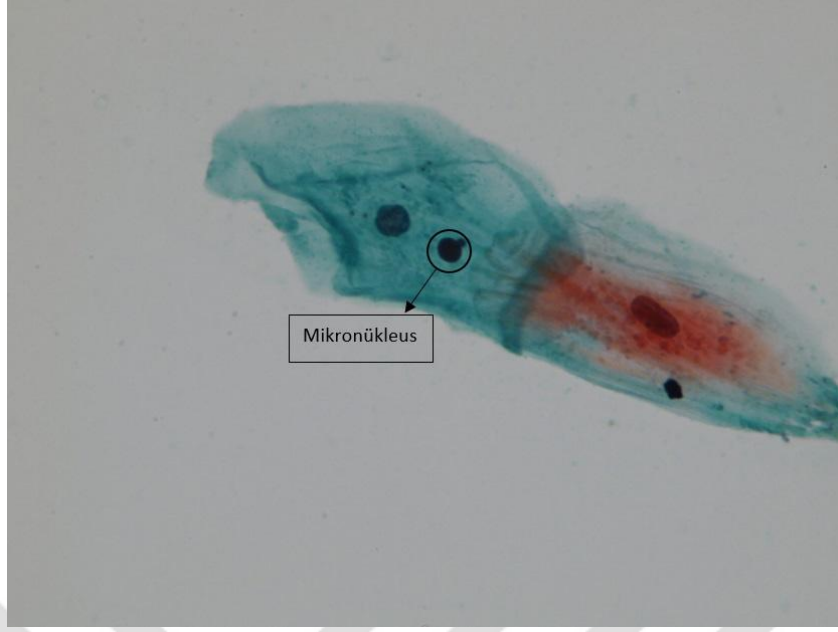
Tablo 4-6: Deney ve kontrol grupları arasındaki mikronükleus sayısının istatistiksel değerlendirilmesi.

Mikronükleus kontrol		Mikronükleus deney		z	p
Ortalama $\pm$ ss	Median (min-mak)	Ortalama $\pm$ ss	Median (min-mak)		
30,2 $\pm$ 18,12	24 (11-76)	57,53 $\pm$ 17,16	54 (34-104)	-4,578	<0,001

wilcoxon testi



Şekil 4-4: Epitel hücresinin sitoplazmasında mikronükleus oluşumu görülmektedir. (Pap, X1000)



Şekil 4-5: Epitel hücresinin sitoplazmasında mikronükleus oluşumu görülmektedir. (Pap, X1000) (Görüntüler, tez çalışmasının bulgularından elde edilmiştir.)

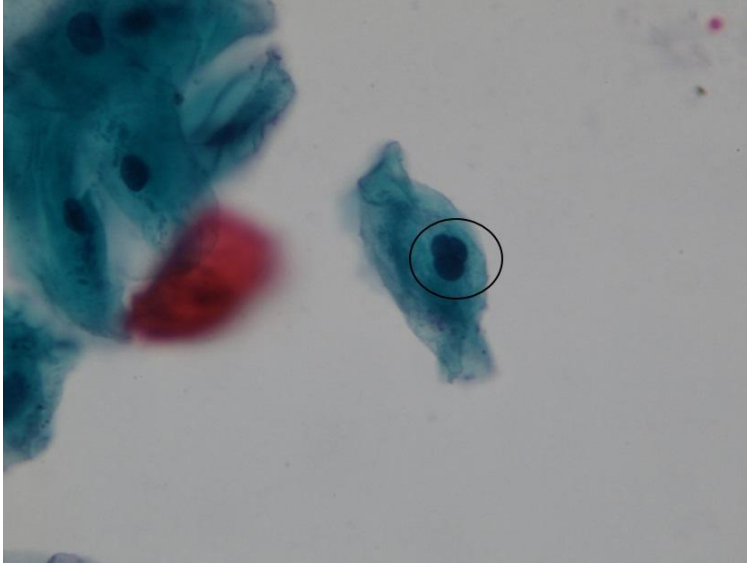
4.4. Binükleus varlığının tespiti

Binükleus kontrol ile Binükleus deney değişkenlerinin medyanları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,035$) (Tablo 4-7). Epitel hücrelerinin sitoplazmalarında çok sayıda çekirdek görülmektedir (Şekil 4-6) (Şekil 4-7).

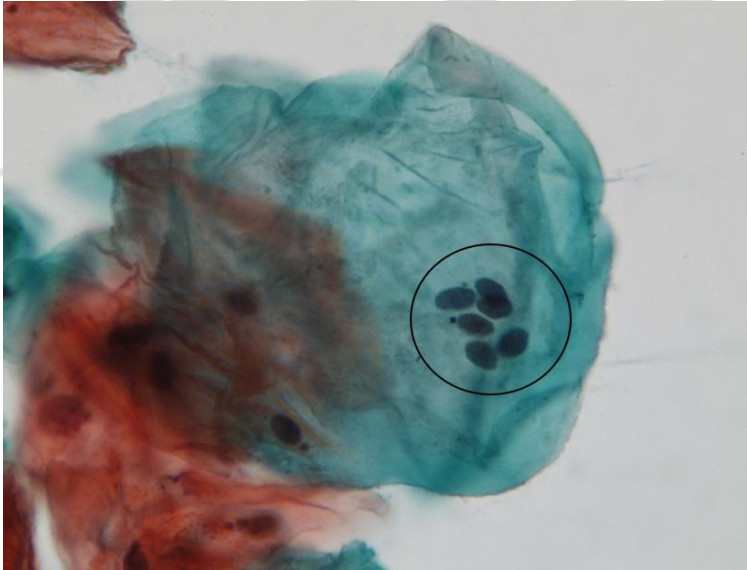
Tablo 4-7: Deney ve kontrol grupları arasındaki binükleus sayısının istatistiksel değerlendirilmesi.

Binükleus kontrol		Binükleus deney		z	p
Ortalama $\pm$ ss	Median (min-mak)	Ortalama $\pm$ ss	Median (min-mak)		
3,6 $\pm$ 2,48	2,5 (1-9)	5,46 $\pm$ 4,21	3,5 (1-16)	-2,107	0,035

wilcoxon testi



Şekil 4-6: Bir tane epitelyum hücresinin içerisinde üç çekirdek izlenmektedir. (Pap, X1000) (Görüntüler, tez çalışmasının bulgularından elde edilmiştir.)



Şekil 4-7: Epitel hücrelerinin sitoplazmlarında çok sayıda çekirdek görülmektedir. (Pap, X1000)

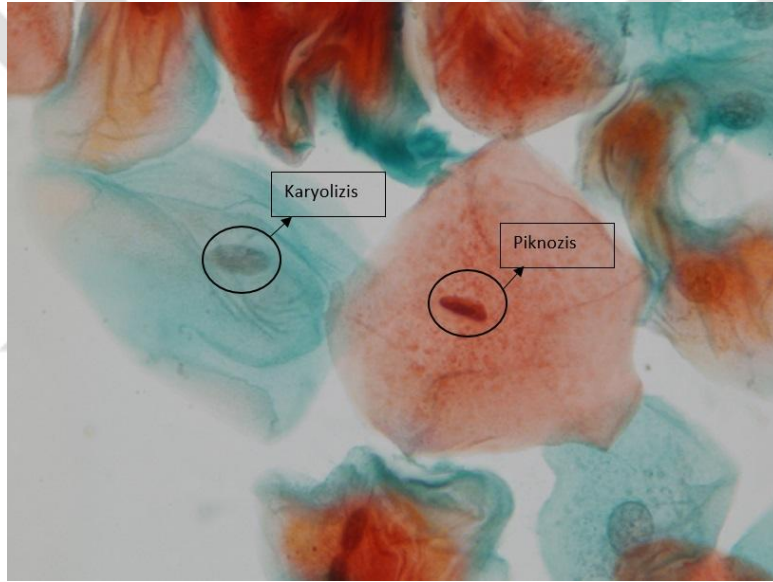
4.5. Piknozis varlığının tespiti

Piknozis kontrol ile piknozis deney değişkenlerinin medyanları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,765$) (Tablo 4-8). Işık mikroskopundaki görüntüde hücre çekirdeğindeki piknozis görüntüsü gözlenmektedir (Şekil 4-8) (Şekil 4-9).

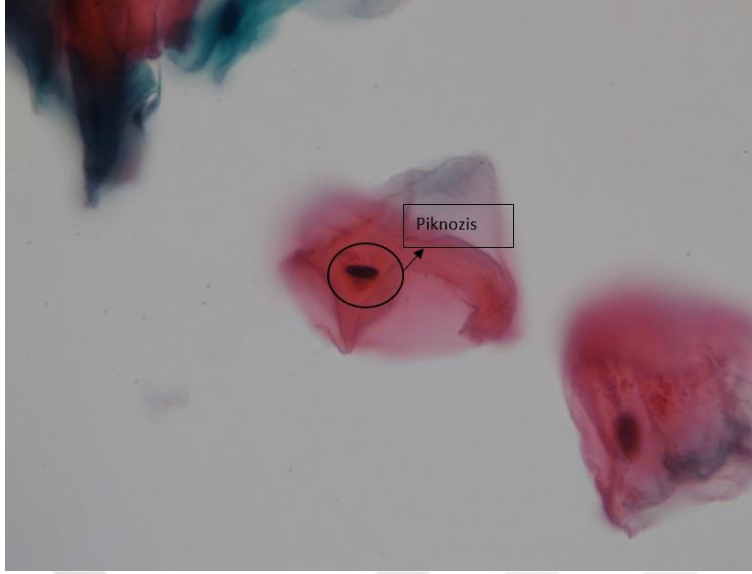
Tablo 4-8: Deney ve kontrol grupları arasındaki piknozis sayısının istatistiksel değerlendirilmesi.

Piknozis kontrol		Piknozis deney		z	p
Ortalama $\pm$ ss	Median (min-mak)	Ortalama $\pm$ ss	Median (min-mak)		
95,8 $\pm$ 41,96	92 (17-177)	100,13 $\pm$ 42,99	104,5 (25-210)	-0,298	0,765

wilcoxon testi



Şekil 4-8: Yan yana iki hücrede karyolizis başlangıcı ve piknozis görülmektedir. (Pap, X1000) (Görüntüler, tez çalışmasının bulgularından elde edilmiştir.)



Şekil 4-9: Epitel hücresinin çekirdeğinin koyulaştığı ve küçüldüğü (piknozis) izlenmektedir. (Pap, X1000) (Görüntüler, tez çalışmasının bulgularından elde edilmiştir.)

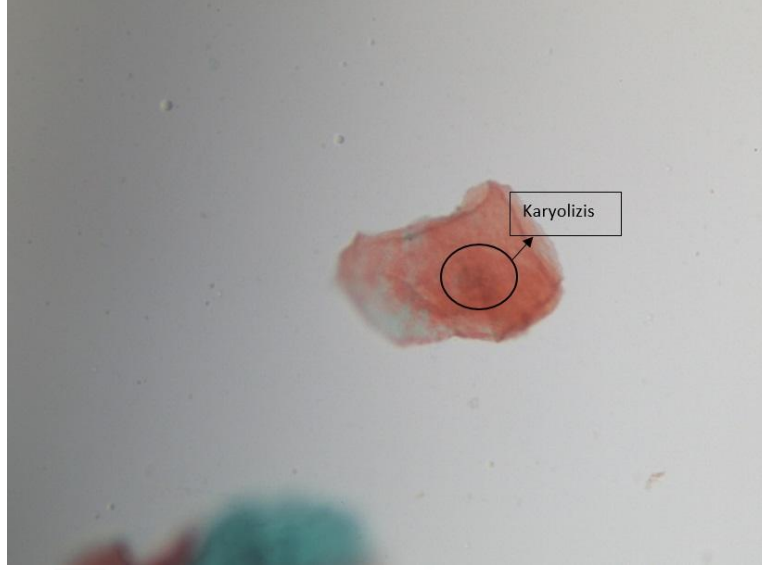
4.6. Karyolizis Varlığının Tespiti

Karyolizis kontrol ile Karyolizis deney değişkenlerinin medyanları arasındaki fark, istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,001$) (Tablo 4-9). Işık mikroskopundaki görüntüde hücre çekirdeğindeki karyolizis görüntüsü gözlenmektedir (Şekil 4-10).

Tablo 4-9: Deney ve kontrol grupları arasındaki karyolizis sayısının istatistiksel değerlendirilmesi.

Karyolizis önce		Karyolizis sonra		z	p
Ortalama $\pm$ ss	Median (min-mak)	Ortalama $\pm$ ss	Median (min-mak)		
48,47 $\pm$ 49,44	23,5 (10-207)	69,03 $\pm$ 49,14	55,5 (28-286)	-3,376	<0,001

wilcoxon testi



Şekil 4-10: Epitel hücresinin çekirdeğindeki kromatin yapısının silindiği (karyolizis) izlenmektedir. (Pap, X1000) (Görüntüler, tez çalışmasının bulgularından elde edilmiştir.)

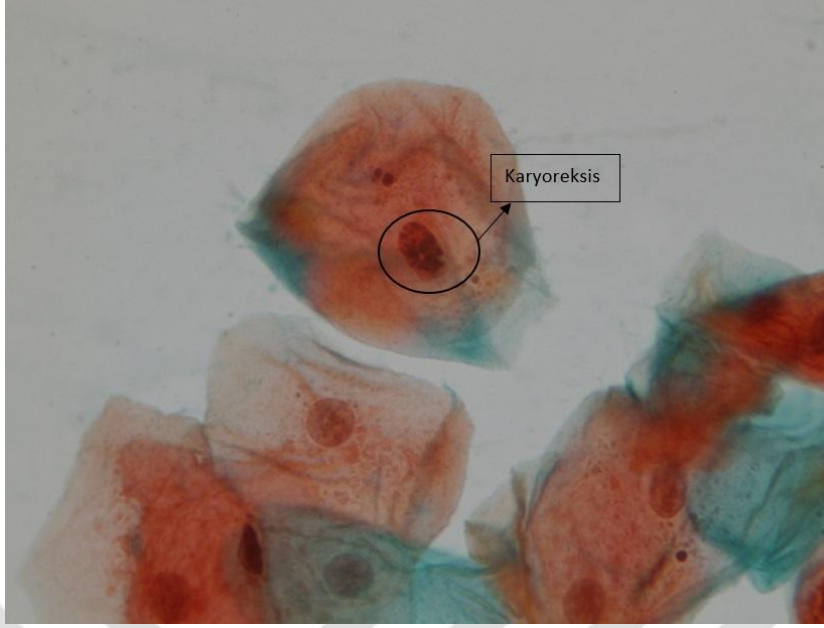
4.7. Karyoreksis Varlığının Tespiti

Karyoreksis kontrol ile karyoreksis deney değişkenlerinin medyanları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,001$) (Tablo 4-10). Işık mikroskopundaki görüntüde, hücre çekirdeğindeki karyoreksis görüntüsü gözlenmektedir (Şekil 4-11).

Tablo 4-10: Deney ve kontrol grupları arasındaki karyoreksis sayısının istatistiksel değerlendirilmesi.

Karyoreksis kontrol		Karyoreksis deney		z	p
Ortalama $\pm$ ss	Median (min-mak)	Ortalama $\pm$ ss	Median (min-mak)		
34,07 $\pm$ 28,96	25 (12-152)	58,67 $\pm$ 19,87	54,5 (23-99)	-3,662	<0,001

wilcoxon testi



Şekil 4-11: Epitel hücresinin çekirdeğinde kromatin yapısının parçalandığı (karyoreksis) görülmektedir. (Pap, X1000) (Görüntüler, tez çalışmasının bulgularından elde edilmiştir.)

5. TARTIŞMA

İnsan genomu DNA'ya hasar veren çeşitli ajanlara sürekli olarak maruz kalır. İyonize radyasyon, ultraviyole ışın ve bir çok genotoksik kimyasal gibi çevresel ajanlar DNA bütünlüğüne yönelik olarak sürekli bir hasar kaynağıdır. Normal hücre metabolizması ürünleri ile DNA'ya tutunarak fizyolojik koşullar altında spontan bir şekilde DNA parçalanmasına sebep olabilen çeşitli kimyasal ajanlar, DNA ile etkileşime girerek mutasyonlara sebep olabilirler (1,50,51). Mutajen ve karsinojen etkileri bilinen X ışınları, sitotoksisiteyi başlatabilmekte ve DNA hasarına sebep olabilmektedir (42,47,52). İçerdiği genetik materyal nedeniyle çekirdek, hücrenin sitoplazmik yapısından daha fazla radyasyona duyarlıdır (53,54). İyonize radyasyon, biyolojik moleküllerle reaksiyona girdiğinde reaktif iyonlar oluşturarak tek veya çift zincir kırıklarına, baz hasarına veya kaybına ve DNA'nın kendisiyle veya proteinlerle çapraz bağlar oluşturmaya neden olur (21,43,47). İyonize radyasyondan kaynaklanan DNA hasarı; DNA yapısındaki bazlarda ciddi yapısal değişikliklere, apürinik ve apirimidinik bölgeler oluşturulmasına, iki heliks arasında H bağlarının kırılmasına, bir veya iki polinükleid zincirini kırılmasına ve hücreler arası veya hücre içi çapraz bağları artırılmasına sebep olur (55).

Söz konusu genetik etkiler kromozomların sayı ve yapısında değişiklikler meydana getirerek mutasyonlara sebebiyet verebilir (53). Mutasyon sonucu, DNA tamir genleri ve/veya hücre proliferasyonu ve diferansiyasyonu kontrol genleri işlevselliklerini yitirdiklerinde kanser gelişme riski artar (1,53,56,57,58).

Genetik hasar/sitotoksite ve karsinogenezis arasındaki ilişkiye dair sağlam kanıtlar olmasına rağmen, X ışını medikal ve dental uygulamalarda teşhis için yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (52,59,60). Panoramik radyografi diş hekimliğinde çok sık olarak kullanılmaktadır. Panoramik radyografi, periapikal radyografilere göre daha az zararlı kabul edildiğinden bütün dişlerin ve alt ve üst çene arklarının değerlendirilmesi gerektiğinde diş hekimleri tarafından talep edilmektedir (1,59). Radyasyona maruziyetin güvenli bir düzeyi olmadığı, zamanla birikim yaparak biyolojik etki oluşturabileceği, sık ve düşük düzeyli maruziyetin kromozomal aberasyonların sıklığını arttırabileceği ve düşük dozlu medikal maruziyetin ise hem hastalar hem de çalışanlar üzerinde genotoksik etkilere sebep olabileceği dikkate alınmalıdır (59,61-66). Bu sebeplerden

dolayı X ışını maruziyetiyle ilişkili muhtemel riskler ile klinik muayenenin yararları karşılaştırılmalıdır (43). Muhtemel riskin derecesinin belirlenmesi, hastaların ve doktorların potansiyel risklerinin minimize edilmesi açısından da önemlidir (52). Düşük dozlu teşhis amaçlı radyografik maruziyetin etkilerini tespit edebilmek için hassas bir analiz ve spesifik bir yaklaşıma ihtiyaç vardır (42).

Kromozomal hasarın değerlendirilmesinde çok güvenilir bir yöntem olan MN testi, standart genotoksisite test sisteminde yer almakta olup mitoz bölünme geçiren tüm hücre tipleri üzerinde in vivo ve in vitro olarak uygulanabilmektedir (1,45,67,68). Çalışmamızda, panoramik radyografinin bukkal hücreler üzerinde hasara yol açıp açmadığının tespiti için de MN testi uygulanmıştır.

Radyasyon dozundaki farklılıklar, maruziyet sıklığı, farklı anatomik bölgelerden örnek alma, değerlendirilen hücre tipleri, hücrelerin toplanması, fikse edilmesi ve değişik hazırlama prosedürleri, değerlendirilen hücre sayısı ve mikronükleus için sayım kriterleri gibi yöntem farklılıkları ile popülasyonun karakteristiği ve farklı etnik gruplar ile çalışma MN test sonuçlarını etkileyebilmektedir (44,53,69,70).

Radyoterapi alan hastalar (71,72), düşük dozlarda ancak sık mesleki maruziyete uğrayan çalışanlar (73,74) ve tek dental radyografi çekilen hastalar üzerinde yapılan literatür çalışmaları (42,47,75,76) mikronükleus oluşumu ve hücre ölümünün radyasyon dozu ile birlikte arttığını ortaya koymaktadır. Örneğin bir çalışmada (77) 2000 cGy (0,01Gy) maruziyet sonrası 1000 hücrede 68 mikronükleus tespit edilirken, bir başka çalışmada (78) 1000 cGy maruziyet sonrası 1000 hücrede 16 mikronükleus sayılmıştır.

Literatürdeki çalışmaların büyük bir kısmında, alınan örnek başına 1000-2000 arası hücre sayıldığı görülmektedir (1,44,47,69,79). MN testi için en az 1000 hücre sayılması gerektiğini, sayımdan sonra anlamlı mikronükleus artışı gözlemlenmezse sayının 2000-3000'e arttırılması tavsiye edilmektedir (44,48,78). Ayrıca, apoptozis (karyoreksis, piknozis, kondense kromatin) göstergesi dejeneratif nükleer değişiklikler ile nekrozisin (karyoreksis, karyolizis, piknozis ve kondanse kromatin) de kaydedilmesi suretiyle mikronükleus testinin hücre hasarını tespit hassasiyetinin arttırılabileceği belirtilmektedir (1,78,80,81). Bu nedenle, çalışmamızda örnek başına 1000 hücre sayılmış olup söz konusu hücrelerin mikronükleus sayımının yanı sıra piknozis, karyoreksis ve karyolizis durumları da değerlendirilmiştir.

Mikronükleus morfolojisi çok net tanımlanabiliyor olmasına rağmen değerlendirme bireyden bireye değişebilmektedir. Tolbert ve ark. (80) tarafından yapılan bir çalışmada, 91 slayt birbirinden bağımsız iki değerlendirici tarafından ikişer defa okunmuş ve bu dört okumanın toplam güvenilirliği sadece % 47.2 çıkmıştır (44). Kişiden kaynaklanabilecek farklılıkları ortadan kaldırmak için çalışmamızın tüm aşamaları ve değerlendirmeleri aynı kişi tarafından yapılmıştır.

Mikronükleus sıklığı ile ilgili yapılan literatürdeki çalışmaların çoğunda kişilerin yaş ve cinsiyet bilgilerinin de kaydedildiği görülmektedir. Bir çok çalışmada (42,43,66,82-85) yaş ile mikronükleus görülme sıklığı arasında anlamlı bir ilişki olduğu belirtilirken, bazı çalışmalarda önemli bir korelasyon tespit edilememiştir (1,69). Mikronükleus görülme sıklığı ile cinsiyet arasında ise, çalışmaların çoğunda anlamlı bir ilişki tespit edilemezken (1,42,86) cinsiyet ile mikronükleus arasında korelasyon olduğunu gösteren çalışmalar da vardır. (67,68,87,88). Yapılan çalışmalarda, mikronükleus sıklığının kadınlarda, bulundukları yaş grubuna bağlı olarak 1,2 ile 1,6 arasında değişen oranlarda, erkeklerden daha fazla görüldüğü tespit edilmiştir (4,89,90). Bu nedenlerden dolayı, çalışmaya 46 yaşındaki bir hasta dışında 20'li yaşlardaki gençler de dahil edilmiştir (hastaların yaş ortalaması 23). Hastaların %70'i erkeklerden oluşan bizim çalışmamızda da cinsiyet ile mikronükleus sıklığı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edilememiştir.

Coğrafi bölge ve etnik grup ile mikronükleus sıklığı arasındaki ilişkiyi tespit etmek üzere yapılan bir çalışmada, farklı coğrafi bölgelerde yaşayan ve tütün çiğneyen kişilerin mikronükleus sıklığı değerlendirilmiştir. Karşılaştırma sonuçları mikronükleus sıklığının büyük oranda coğrafi bölge ve etnik gruba göre değiştiğini göstermektedir. Bu farkın, sigara içme gibi bölgelere göre değişen yaşam tarzı alışkanlıkları ve farklı etnik grupların genetik faktörlerinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir (44,91). Bizim çalışmamızda farklı etnik gruba ait bir birey dışında tüm bireyler aynı etnik gruba aittir. Bu bireyin sonuçları diğer bireylerle benzer çıkmış olup sonucun yaşam tarzları ve alışkanlıklarının benzer olması nedeniyle böyle olduğu düşünülmüştür.

Sigara içiminin DNA hasarını arttırabildiği ve günde içilen sigara sayısına (92,93,94) ve çiğneme, ters içme gibi sigara içim şekline (95,96,97) bağlı olarak mikronükleus oluşumunu arttırdığı belirtilmektedir (1,44). Ancak, sigara ve mikronükleus artışı arasında anlamlı ilişki bulmayan çalışmalar da mevcuttur (55).

Alkolün mutajenik potansiyeli de tartışmalı ve oldukça komplikedir (1,43,44). Alkol ve sigara tüketiminin birlikte değerlendirildiği ve alkol tüketimi etkilerinin ayrıştırılamadığı çalışmalar (98,99) olduğu gibi, genotoksik etki tespit edilemeyen çalışmalar da (77,100) vardır. Bu nedenlerden dolayı, çalışmamıza sigara ve alkol alışkanlığı olan bireyler dahil edilmemiştir.

Düzenli oral antiseptik solüsyon kullanımı ile mikronükleus görülme sıklığı arasında bir ilişki tespit eden çalışmalar olduğu gibi her hangi bir ilişki tespit edemeyen çalışmalar da vardır (1). Bu nedenle çalışmamıza düzenli oral antiseptik solüsyon kullanan hastalar dahil edilmemiştir.

X ışınına maruziyet öncesi ve sonrası mikronükleus görülme sıklığı değişikliğine ilişkin yapılan çalışmalarda, mikronükleus görülme sıklığı ile bir ilişki tespit edilemeyen çalışmalar (42,43,59) olmakla birlikte, birçok çalışma X ışını maruziyetinin -düşük dozlarda bile- genetik hasarı tetiklediğini ortaya koymaktadır (1,68,72,101-104). Panoramik radyografi çekilen hastalarda yapılan çalışmamızda, mikronükleus görülme sıklığı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,001$). Aynı zamanda X ışını maruziyetinden önce ve sonra görülen binükleus oluşumu da anlamlı çıkmıştır ($p=0,035$).

Epitel hücreler, yüksek düzeyde proliferasyon gösterip bütün insan kanserlerinin %90'ından fazlasının kaynağıdır. Çeşitli bölgelerden kolaylıkla toplanabilmeleri, kimyasal ajanlarla etkileşimde ilk temas noktası olmaları nedeniyle, epitelyum hücrelerinde mikronükleus test uygulaması insan popülasyonunda genetik hasarın takibi için hassas bir araç olarak kullanılmaktadır (4,42). Ayrıca, DNA hasarını etkin bir şekilde tamir yeteneğine sahip hücre tiplerinin, hücrede daha düşük düzeylerde kalıcı hasara sebebiyet verdiği bilinmektedir (79,105). Bukkal hücrelerinin periferik kan lenfositlerine nispeten daha sınırlı DNA tamir kapasiteleri nedeniyle epitel dokulardaki genomik kararsızlık olaylarını daha doğru yansıttıkları belirtilmiştir (70,79). Bu hücreler panoramik radyografik muayenede doğrudan radyasyona maruz kalmakta olup radyasyon kaynaklı hasar için ana hedeftir. Ayrıca, söz konusu hücreler fırça ile kolayca ağız içerisinden elde edilebilirler (42,53). Bu sebeplerden dolayı, çalışmamızda bukkal hücreler kullanılmıştır.

Mikronükleus oluşumuna sebep olan hasar, hücrelerin mitoz geçirdiği epitel dokunun bazal tabakasında gerçekleşir. Epitel dokunun hızlı hücresel dönüşümü sonucu

söz konusu hücreler yüzeye çıkar ve burada dökülürler. Dolayısıyla, döküntü hücrelerde mikronükleus oluşumu en yüksek oranda, genotoksik ajana maruziyetten 1-3 hafta sonra görülür (1,42,47,79). Bu husus dikkate alınarak çalışmamızda bukkal hücreler panoramik radyografi çekilmeden hemen önce ve 15 gün sonra alınmıştır.

Nekrozis sitotoksik ajanların hasarı sonrası oluşan bir çeşit hücre ölümüdür. Nekrozis geçiren hücrelerde piknozis, karyoreksis ve karyolizis görülür. Apoptozis genetik olarak kontrol edilen temel biyolojik bir süreç olup normal gelişim ve doku homeostazisi için gerekli bir hücre ölümüdür (59,106). Apoptozisin erken aşamalarına piknozis ve karyoreksis eşlik eder. DNA hasarı olan hücreler için en tercih edilesi durum kendi kendini tamir veya apoptozistir. Eğer hücreler kendini tamir edemez veya apoptozis geçirmezse neoplastik süreç tetiklenebilir. Radyasyonun en endişe verici tarafı da hücrelerdeki bu neoplastik dönüşüme yol açabilmesidir (53).

X ışınına maruziyet öncesi ve sonrası piknozis oluşumu benzer olan çalışmalar da vardır (1,52,59). Bizim çalışmamızda da piknozis artışı istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,765$). Piknozis hem nekrozis hem de apoptozis göstergesi bir hücresel değişiktir. Bu nedenden dolayı çalışmada elde edilen bu sonuç, hücreyi apoptozise götüren birden çok yolun olduğunu ve piknozisin tercihen apoptotik süreçte oluştuğunu ortaya koymaktadır (1).

Karyolizis ve piknozis artışı anlamlı bulunmayan literatürdeki iki çalışmadan birinde, X ışınına bağlı nekrozis gelişmediği düşünülürken, diğer bir çalışmada ise çekirdeğin sınırının bozulması ve kromatin büzülmesi gibi nekrozis fikrini güçlendiren hücresel değişiklikler gözlemlendiğinden X ışınına bağlı nekrozis geliştiği düşünülmüştür (1,59). Bununla birlikte X ışını maruziyeti ile sitotoksite arasında yakından ilişkili olduğunu belirten çalışmalarda da karyoreksis, piknozis ve karyolizis gibi diğer çekirdek değişiklikleri gösterilmiştir (1,42,43,52,81). Bizim çalışmamızda karyolizis artışı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,001$). Aynı zamanda karyoreksis sayısındaki değişiklik de istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,001$). Bu göstergeler, radyasyonun sitotoksik etkisini ortaya koymaktadır.

Yaygın bir çevresel ajan olan iyonize radyasyonun hücre DNA'sı ile etkileşimi, tek ve çift zincir kırıkları, DNA-DNA ve DNA-protein çapraz bağları ile pürin ve pirimidin bazlarının hasarı gibi çeşitli primer lezyonlara sebep olmaktadır (104,107). DNA hasarlarının tespitinde Comet analizi yaygın olarak kullanılan bir araçtır.

Comet analizi adından da anlaşılacağı gibi, kuyruklu yıldıza benzer görüntü elde edilen DNA kırıklarını sayısal olarak değerlendiren görsel bir metottur. Görüntü zarar görmemiş DNA içeren belirgin bir baş ile hasar görmüş veya kırık DNA parçacıkları içeren kuyruktan oluşur. Elektroforez aşamasında baştan ayrılan DNA miktarı değerlendirilen mutajenin etki düzeyine göre değişir (50,55).

Nötral pH da yapılan comette temel olarak çift zincir kırıkları ve çapraz bağlanma tespit edilirken, alkali pH da tek ve çift zincir kırıkları, tamamlanmamış kesip çıkarma onarım bölgeleri ve çapraz bağlanmaların tespitine imkan verir (108).

Comet analizi ile MN testini karşılaştıran çalışmalarda, MN testinin DNA hasarı potansiyelini değerlendirmede daha az hassasiyete sahip olduğu, hassasiyet farkının söz konusu testlerin çıktılarının farklı olmasından kaynaklandığı belirtilmektedir. Özellikle düşük dozlarda X ışınlarına maruziyet DNA tek zincir kırıklarına sebep olabilmekte iken mikronükleus oluşumuna yol açmayabilir. Bu nedenle düşük dozlarda MN testine ilaveten Comet analizine de ihtiyaç vardır (104). Bu çerçevede, çalışmamız genel olarak düşük dozda çekilen panoramik radyografinin hücre DNA'sı ve çekirdeği üzerine etkilerini incelediğinden, çalışmamızda MN testine ilaveten Comet analizine de yer verilmiştir.

Comet analizinde genel aşamalar iyi tanımlanmış olup bir çok laboratuvar, lizis elektroforez veya DNA boyaması için kendi yöntemlerini geliştirmişlerdir. Farklı çalışmalarda farklı değerlendirme parametreleri kullanılmıştır (109,110). Singh (111) kuyruk uzunluğunu kullanırken, Olive ve ark. (112) kuyruk momentini kullanmıştır. Collins ve ark. (113) ise görsel bir sayım metodu tanımlayarak cometleri 0-4 arasında derecelendirmiştir. Ancak sonuçlardaki değişkenliği azaltmak üzere birden çok elektroforez içeren çalışmalarda “kuyruktaki DNA yüzdesi” kullanılması önerilmektedir (108). Kuyruktaki DNA yüzdesi ile DNA zincir kırığı doğru orantılıdır (40). Comet analizinin dezavantajları arasında, güvenilir sonuçlar elde edebilmek için çok hücre değerlendirilmesi gerekmesi, teknik değişkenlik ve yorum farkları sayılmaktadır (50). Çalışmamızda her bir örnekten 100 hücre sayılmış ve olası yorum farkları ile teknik aşamalarda oluşabilecek farklılıkların önüne geçmek üzere tüm çalışma tez yazarı tarafından yürütülmüştür. Değerlendirme parametresi olarak kuyruktaki DNA yüzdesi ve kuyruk uzunluğu birlikte değerlendirilmiştir. Kuyruktaki DNA yüzdesinde ve kuyruk uzunluğunda cinsiyete bağlı bir değişiklik gözlemlenmemiştir. Ancak panoramik

radıyografi öncesi ve sonrası alınan hücrelerin kuyruktaki DNA yüzdesi ($p<0,001$) ve kuyruk uzunluğu istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,001$.)

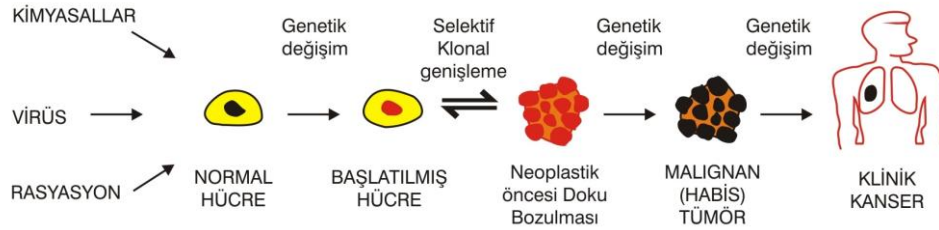
Comet analizi kısa sürede oluşan tamir edilebilir DNA hasarını tespit ederken, MN testi sağlık riskleri ile ilişkili daha ciddi gen kararsızlığına yol açan kromozomal düzeydeki hasarı tespit eder (114,115,116). Oluşan mikronükleus, hücreden uzaklaştırılarak hücreyi genetik materyal açısından yetersiz bırakacak veya mikronükleus oluşmuş hücre apoptozis yoluyla ortada kaldırılacaktır. Bu nedenle Comet Assay ile tespit edilen primer hasarın aksine hücredeki bir mikronükleus varlığı, tamir edilemez genomik kararsızlığa işaret eder. Primer DNA hasarları tamir edilmezse, genom hasarı kromozomal yapıda mutasyonlara ve aberasyonlara dönüşebilir. Söz konusu aberasyonlar da hücre bölünmesinin daha sonraki aşamalarında mikronükleus oluşumunu sonuç verecektir (116).

Maluf (55) tarafından yapılan çalışmada MN testi ile comet analizi arasındaki farklar özet olarak tablo 5-1’ de belirtilmiştir.

Tablo 5-1: MN testi ile Comet analizi arasındaki farklar (55).

	Mn	Comet assay
Hasar türü	Kromozomal mutasyon	DNA hasarı
Tamir	Edilemez	Edilebilir
Hücre bölünmesi	Gerekli	Gerekmez
Maruziyet süresi	Orta/uzun(günler/aylar)	Kısa/orta(dakikalar/saatler)
Anöploidi tespiti	Evet	Hayır

Hücre artışı ile kanserin tetiklenmesi arasında bir korelasyon olduğu varsayılır. Sitotoksik bir ajan olan X ışınına devamlı maruziyet, kronik hücre zedelenmesi, dengeleyici hücre artışı, hiperplazi ve en nihayetinde tümör gelişimine sebebiyet verebilir (43,47,52). Özellikle hücre artışı, hedef hücrelerde mutasyon riskini arttırarak başlatılmış hücrelerin selektif klonal genişlemesiyle preneoplastik odaktan tümörlere dönüşümünde önemli rol oynar (43) (Şekil 5-1).



Şekil 5-1: Normal hücrenin hasara uğraması sonucu kansere dönüşümü (117)

Mikronükleus oluşmuş hücre varlığı genomik kararsızlığı yansıtabilir. Belirli bir popülasyonda artmış mikronükleus yoğunluğunun tespiti artan kanser riskinin göstergesidir (43,47,52). Yapılan çeşitli MN testlerinde, yüksek bulunan mikronükleus oranları nedeniyle, DNA hasarı defektleri ve çeşitli genotoksik ajanların bazı kanser tiplerini (oral, mesane, serviks kanseri) tetiklediği düşünülmektedir (44). Yapılan bir diğer çalışmada oral submukoza fibrozis, oral lökoplaki, ve oral liken planus gibi prekanseröz oral lezyonlu hastaları sağlıklı bireylerle karşılaştırmış ve hastalarda 6 kata kadar mikronükleus oranı artışı tespit edilmiştir (44,118).

Kanser gelişimi ile hedef veya çevreleyen dokulardaki mikronükleus görülme sıklığı arasında doğrudan bir ilişki olduğuna dair hipotez, bir dizi bulgu ile desteklenmektedir:

1. Kanser hastalarında mikronükleus sıklığı, periferik lenfositlerin yanı sıra hedef dokularda da net bir şekilde artmaktadır.
2. Konjenital hastalığı olan bireylerin, hem mikronükleus görülme sıklığı hem de kanser riski yüksektir.
3. Oral premalignansilere ilişkin klinik kemo-önleme çalışmalarında MN testi çok eskiden beri yaygın olarak kullanılmaktadır.
4. Karsinogenetik ve genotoksik bazı ajanlar, insanlarda ve hayvanlarda mikronükleus görülme sıklığını arttırabilmektedir.
5. Eksiklikleri bazı kanser tiplerinin oluşma risklerini arttıran vitamin ve folatın kandaki konsantrasyonlarının düşüklüğü ile mikronükleus görülme sıklığı arasında güçlü bir ilişki vardır.

Bu bulgular mikronükleus ile kanser arasında nedensel bir ilişkiyi net bir şekilde ortaya koyduğundan, MN testi çeşitli karsinogenik tehlikelere maruziyetten kaynaklanan insan sağlığı risklerini izlemek için uygun bir araçtır (4,44).

Radyasyonun tetiklediği kanserleri kesin olarak tespit etmek mümkün olamayabilir. Çünkü radyasyonun tetiklediği kanserleri diğer nedenlerden kaynaklanan kanserlerden ayırt etmek zordur. Radyasyon yeni mutasyonları tetiklemekten ziyade spontan mutasyonların sıklığının artmasına sebebiyet verir. Mutasyonların görülme sıklığı, bilinen bir eşik değeri olmaksızın düşük dozlarda bile alınan doz ile doğru orantılı olarak artar. Radyasyonun tetiklediği kanser ile ilgili veriler öncelikli olarak radyasyona yüksek düzeylerde maruz kalmış insan popülasyonları içermekle birlikte, prensipte düşük düzeylerdeki radyasyon bile tek bir hücre içerisinde kanser oluşumunu başlatabilir (22). Unutulmamalıdır ki monoklonal olarak adlandırılan malin tümörlerin gelişimleri için uzun yıllar gerekse de süreç tek bir hücre hasarı ile başlamaktadır (117).

Sonuç olarak, dental teşhis ve tedaviler esnasında alınan panoramik radyografiler oral mukoza hücrelerinde sitotoksositeye sebep olmaktadır. Aynı zamanda panoramik radyografilerin DNA hasarına da sebep olduğu çalışmamızda tespit edilmiştir. Her ne kadar basit DNA hasarları tamir mekanizmaları ile onarılabiliyor olsa da tamir mekanizmasında bir hasar olduğunda bu mümkün olamamaktadır.

DNA hasarından kanser oluşumuna giden gelişim sürecinin izlenmesi de önem arz etmektedir. Çalışmamızda sadece DNA hasarı tespit edilmiş olup bu hasarın hangi yöne yönlendiğine ilişkin olarak benzer bir çalışmanın bu çalışmanın devamı olacak şekilde 6 ay ve 1 sene sonra tekrarlanması, bu çalışmanın desteklenmesi açısından uygun olacaktır.

İyonlaştırıcı radyasyonun kanser oluşumunda tetikleyici rol aldığı genel olarak kabul edilmektedir. Bu çalışma da söz konusu görüşü desteklemekte olsa da, bir çok fiziksel, kimyasal ve biyolojik çevresel faktör varlığında hiç bir kanser çeşidinin tek başına iyonlaştırıcı radyasyona bağlanmaması gerekir. Ancak yine de, dental panoramik radyografiler teşhis ve tedavi esnasında gerekli ise istenmeli, uygun dozda talep edilmeli ve tekrarlardan kaçınılmalıdır. Periapikal radyografinin yeterli olduğu tek diş tedavilerinde veya çenenin bir bölümünü ilgilendiren diş tedavilerinde, panoramik radyografi yerine periapikal radyografi tercih edilmelidir.

KAYNAKLAR

1. Cerqueira EM, Meireles JR, Lopes MA, Junqueira VC, Gomes-Filho IS, Trindade S, ve ark. Genotoxic effects of X-rays on keratinized mucosa cells during panoramic dental radiography. *Dentomaxillofac Radiol.* 2008; **37**(7): 398-403.
2. Onur E, Tuğrul B, Bozyiğit F. DNA Hasarı ve Onarım Mekanizmaları. *Türk Klinik Biyokimya Derg* 2009; **7**(2): 61-70
3. Fidan AF. DNA Hasar Tespitinde Tek Hücre Jel Elektrophorezi. *AKÜ-Fen Bilimleri Dergisi* 2009; **8**(1): 41-52
4. Fenech M, Holland N, Chang WP, Zeiger E, Bonassi S. The Human Micronucleus Project-An international collaborative study on the use of he micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutat Res.* 1999; **428** (1-2): 271-83.
5. Üstüner D. Kromozom Kırıkları ve Mikronükleus-Apoptoz Bağlantısı. *TÜBAV Bilim* 2011; **4**(1): 64-69.
6. Güneş HV. *Moleküler Hücre Biyolojisi*. Eskişehir: Kaan Kitapevi; 2003
7. Vasudeva N, Mishra S. *Inderbir Singh's Textbook of Human Histology with Colour Atlas and Practical Guide*. 7th ed. New Delhi: Jaypee Brothers, Medical Publishers; 2014
8. Guyton AC, Hall JE. *Textbook of Medical Physiology*. 10th ed. Philadelphia: W.B Saunders Company; 2001
9. Cabadak H. Hücre Siklusu ve Kanser. *ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi*. 2008; **9**(3): 51-61.
10. Mohan H, Mohan S. *Essential Pathology for Dental Students*. 4th ed. New Delhi: 10. Jaypee Brothers, Medical Publishers; 2011
11. Dey P. *Diagnostic Cytology*. New Delhi: Jaypee Brothers, Medical Publishers; 2014
12. Erişim13.05.2015,
<https://humanphysiology2011.wikispaces.com/03.+Cell+Physiology>
13. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. *Robin's Basic Pathology*. 9th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2013

14. Kuzey GM, editör. *Temel Patoloji*. İstanbul: Güneş Kitabevi; 2007
15. Watson JD, Crick FHC. Molecular structure of nucleic acids. A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*. 1953; **171**:737-738.
16. Erişim 13.05.2016, <http://geneticseleanitza.weebly.com/>
17. Dinçer Y, Akçay T. DNA Hasarı. *Türk Biyokimya Dergisi*. 2000; **25**: 73-77
18. Şekerlioğlu ZA, Şekerlioğlu V. Genetik Toksisite Testleri. *TÜBAV Bilim Derg.* 2011; **4**: 221-229.
19. Lindahl T. Repair of intrinsic DNA lesions. *Mutat Res*. 1990; **238**: 305-11.
20. Shigenaga MK, Gimeno CJ, Ames BN. Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as a biological marker of in vivo oxidative DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989; **86**: 9697-701.
21. Debeleç-Bütüner B, Kantarcı G. Mutasyon, DNA Hasarı, Onarım Mekanizmaları ve Kansere İlişkisi. *Ankara Ecz. Fak. Derg.* 2006; **35** (2): 149 – 170.
22. White SC, Pharoah MJ. *Oral Radiology Principles and Interpretation*. 6th Ed. Mosby Elsevier; 2009
23. Whaites E. *Essentials of Dental Radiography and Radiology*. 3rd ed. Churchill Livingstone; 2002
24. Madhusudan S, Middleton MR. The emerging role of DNA repair proteins as predictive, prognostic and therapeutic targets in cancer. *Cancer Treat Rev*. 2005; **31**(8): 603-17.
25. Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Unsal-Kaçmaz K, Linn S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem*. 2004; **73**: 39-85
26. Ögüt S, Atay E. Yaşlılık ve oksidatif stres *S.D.Ü. Tıp Fak. Derg.* 2012; **19**(2): 68-74.
27. Kulaksız G, Sancar A. Nükleotid Eksizyon Onarımı ve Kansere. *Türk Biyokimya Dergisi*. 2007; **32** (3): 104–111.
28. Rondon RH, Pereira YC, do Nascimento GC. Common positioning errors in panoramic radiography: A review. *Imaging Sci Dent*. 2014; **44**(1): 1-6.
29. Shah N, Bansal N, Logani A. Recent advances in imaging technologies in dentistry. *World J Radiol*. 2014; **6**(10): 794-807.

30. Angelopoulos C, Aghaloo T. Imaging technology in implant diagnosis. *Dent Clin North Am.* 2011; **55**(1): 141-58.
31. Langland OE, Langlais RP, Morris CR. *Principles and practice of panoramic radiology* Philadelphia: W.B. Saunders Company; 1982
32. Hallikainen D. History of panoramic radiography. *Acta Radiol.* 1996; **37**: 441-5.
33. Vandenberghe B, Jacobs R, Bosmans H. Modern dental imaging: a review of the current technology and clinical applications in dental practice. *Eur Radiol.* 2010; **20**(11): 2637-55
34. Açıkgöz A. Ortopantomografilerin klinik kullanımları. *Atatürk Üniv.Dış Hek.Fak.Derg.* 1996; **6**: 80-85,
35. Harorlu A, Akgül M, Dağıstan S. *Dişhekimliği Radyolojisi*. Erzurum Atatürk Üniversitesi Yayınları; 2006
36. Bora H. Radyasyon Güvenliği. AÜ. Dikimevi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Yıllığı. 2001; **2**: 91-98
37. Güden M, Ulutin C, Pak Y. Noniyonizan Elektromanyetik Alanların Biyolojik Etkileri. *T Klin Tıp Bilimleri* 2001; **21**: 441-444
38. Coşkun Ö. İyonize Radyasyonun Biyolojik Etkileri. *SDU Teknik Bilimler Dergisi* 2011; **1**: 13-17
39. Fairbairn DW, Olive PL, O'Neill KL. The comet assay: a comprehensive review. *Mutat Res.* 1995; **339**(1): 37-59.
40. Dinçer Y, Kankaya S. DNA Hasarının Belirlenmesinde Comet Assay. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2010; **30**(4): 1365-73
41. Kumaravel TS1, Vilhar B, Faux SP, Jha AN. Comet Assay measurements: a perspective. *Cell Biol Toxicol.* 2009; **25**(1): 53-64.
42. Popova L, Kishklova D, Hadjidekova VB, Hristova RP, Atanasova P, Hadjidekova VV ve ark. Micronucleus test in buccal epithelium cells from patients subjected to panoramic radiography . *Dentomaxillofac Radiol.* 2007; **36**(3): 168-71.
43. Angelieri F, Carlin V, Saez DM, Pozzi R, Ribeiro DA. Mutagenicity and cytotoxicity assessment in patients undergoing orthodontic radiographs. *Dentomaxillofac Radiol.* 2010; **39**(7):437-40.
44. Majer BJ, Laky B, Knasmüller S, Kassie F. Use of the micronucleus assay with exfoliated epithelial cells as a biomarker for monitoring individuals at elevated

- risk of genetic damage and in chemoprevention trials. *Mutat Res.* 2001; **489**(2-3): 147-72.
45. Şekeroğlu V, Atlı-Şekeroğlu Z. Genotoksik hasarın belirlenmesinde mikronükleus testi. *Türk Hij Den Biyol Derg.* 2011; **68**(4): 241-252
 46. Demirel S, Zamani AG. Mikronükleus tekniği ve kullanım alanları. *Genel Tıp Derg* 2002; **12**(3): 123-127
 47. Ribeiro DA, de Oliveira G, de Castro G, Angelieri F. Cytogenetic biomonitoring in patients exposed to dental X-rays: comparison between adults and children. *Dentomaxillofac Radiol.* 2008; **37**(7): 404-7
 48. Evans HJ, Neary GJ, Williamson FS. The relative biological efficiency of single doses of fast neutrons and gamma-rays on *Vicia faba* roots and the effect of oxygen. Part II. Chromosome damage: the production of micronuclei. *Int J Radiat Biol.* 1959; **1**: 216-29.
 49. Countryman PI, Heddle JA The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutat Res.* 1976; **41**(2-3): 321-32.
 50. Liao W, McNutt MA, Zhu WG. The comet assay: a sensitive method for detecting DNA damage in individual cells. *Methods.* 2009; **48**(1): 46-53
 51. Hoeijmakers JHJ. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature.* 2001; **411**: 366–374
 52. Ribeiro DA. Cytogenetic biomonitoring in oral mucosa cells following dental X-ray. *Dentomaxillofac Radiol.* 2012; **41**(3): 181-4.
 53. Lorenzoni DC, Cuzzuol Fracalossi AC, Carlin V, Araki Ribeiro D, Sant' Anna EF. Cytogenetic biomonitoring in children submitting to a complete set of radiographs for orthodontic planning. *Angle Orthod.* 2012; **82**(4): 585-90.
 54. Ward JF. DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1988; **35**: 95–125
 55. Maluf SW. Monitoring DNA damage following radiation exposure using cytokinesis-block micronucleus method and alkaline single-cell gel electrophoresis. *Clin Chim Acta.* 2004; **347**(1-2): 15-24.
 56. Moore LE, Warner ML, Smith AH, Kalman D, Smith MT. Use of the fluorescent micronucleus test to detect the genotoxic effects of radiation and

- arsenic exposure in exfoliated human epithelial cells. *Environ Mol Mutagen* 1996; **627**: 176–184
57. Natarajan AT. Chromosomal aberrations: past, present and future. *Mutat Res* 2002; **504**: 3–16.
 58. Obe G, Pfeiffer P, Savage JR, Johannes C, Goedecke W, Jeppesen P, et al. Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution. *Mutat Res* 2002; **504**: 17–36.
 59. Cerqueira EM, Gomes-Filho IS, Trindade S, Lopes MA, Passos JS, Machado-Santelli GM. Genetic damage in exfoliated cells from oral mucosa of individuals exposed to X-rays during panoramic dental radiographies. *Mutat Res.* 2004; **562**: 111–7.
 60. Holmberg K, Fält S, Johansson A, Lambert B. Clonal chromosome aberrations and genomic instability in X-irradiated human T-lymphocyte cultures. *Mutat Res.* 1993; **286**(2): 321–30.
 61. Paz-y-Miño C, Pérez JC, Dávalos V, Sánchez ME, Leone PE. Telomeric associations in cigarette smokers exposed to low levels of X-rays. *Mutat Res.* 2001; **490**(1): 77–80.
 62. Cochran ST, Norman A. Induction of micronuclei in lymphocytes of patients undergoing excretory urography with ioversol. *Invest Radiol* 1994; **29**: 210–212.
 63. Norman A, Cochran ST, Sayre JW. Meta-analysis of increases in micronuclei in peripheral blood lymphocytes after angiography or excretory urography. *Radiation Res* 2001; **155**: 740–743.
 64. Popova L, Hadjidekova V, Kakradjov G, Agova S, Traskov D, Hadjidekov V. Cytogenetic analysis in peripheral blood lymphocytes after arteriography (exposure to X-rays and contrast medium). *Radiol Oncol* 2005; **39**: 153–158.
 65. Jha AN, Sharma T. Enhanced frequency of chromosomal aberrations in workers occupationally exposed to diagnostic X-rays. *Mutat Res* 1991; **260**: 343–348.
 66. Thierens H, Vral A, Morthier R, Aousalah B, De Ridder L. Cytogenetic monitoring of hospital workers occupationally exposed to ionizing radiation using the micronucleus centromere assay. *Mutagenesis* 2000; **15**: 245–249.
 67. Pastor S, Gutiérrez S, Creus A, Cebulski-Wasilewska, Marcos R. Micronuclei in peripheral lymphocytes and buccal epithelial cells of Polish farmers exposed to pesticides. *Mutat Res* 2001; **495**: 147–156

68. Angelini S, Kumarb R, Carbonea F, Maffeia F, Fortia GC, Violanteb FS, et al. Micronuclei in humans induced by exposure to low level of ionizing radiation: influence of polymorphisms in DNA repair genes. *Mutat Res* 2005; **570**: 105–117
69. Waingade M, Medikeri RS. Analysis of micronuclei in buccal epithelial cells in patients subjected to panoramic radiography. *Indian J Dent Res.* 2012; **23**(5): 574-8.
70. Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Zeiger E, Knasmueller S, et al. The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: The HUMN project perspective on current status and knowledge gaps - Review. *Mutat Res* 2008; **659**: 93-108.
71. Minicucci EM, Kowalski LP, Maia MA, Pereira A, Ribeiro LR, de Camargo JL ve ark. Cytogenetic damage in circulating lymphocytes and buccal mucosa cells of head-and-neck cancer patients undergoing radiotherapy. *J Radiat Res.* 2005; **46**(2): 135-42.
72. Jagetia GC, Jayakrishnan A, Fernandes D, Vidyasagar MS. Evaluation of micronuclei frequency in the cultured peripheral blood lymphocytes of cancer patients before and after radiation treatment. *Mutat Res.* 2001; **491**(1-2): 9-16.
73. Şahin A, Tatar A, Öztas S, Seven B, Varoglu E, Yesilyurt A ve ark. Evaluation of the genotoxic effects of chronic low-dose ionizing radiation exposure on nuclear medicine workers. *Nucl Med Biol.* 2009; **36**(5):575-8.
74. Sari-Minodier I, Orsière T, Bellon L, Pompili J, Sapin C, Botta A. Cytogenetic monitoring of industrial radiographers using the micronucleus assay. *Mutat Res.* 2002; **521**(1-2): 37-46.
75. Ribeiro DA, Angelieri F. Cytogenetic biomonitoring of oral mucosa cells from adults exposed to dental X-rays. *Radiat Med.* 2008; **26**(6): 325-30.
76. Angelieri F, de Oliveira GR, Sannomiya EK, Ribeiro DA. DNA damage and cellular death in oral mucosa cells of children who have undergone panoramic dental radiography. *Pediatr Radiol.* 2007; **37**(6): 561-5.
77. Sarto F, Finotto S, Giacomelli L, Mazzotti D, Tomanin R, Levis AG. The micronucleus assay in exfoliated cells of the human buccal mucosa. *Mutagenesis.* 1987; **2**(1): 11-7.

78. Tolbert PE, Shy CM, Allen JW. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: a field test in snuff users. *Am J Epidemiol.* 1991; **134**(8): 840-50.
79. Carlin V, Artioli AJ, Matsumoto MA, Filho HN, Borgo E, Oshima CT ve ark. Biomonitoring of DNA damage and cytotoxicity in individuals exposed to cone beam computed tomography. *Dentomaxillofac Radiol.* 2010; **39**(5): 295-9
80. Tolbert PE, Shy CM, Allen JW. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. *Mutat Res* 1992; **271**: 69–77
81. da Silva AE, Rados PV, da Silva Lauxen I, Gedoz L, Villarinho EA, Fontanella V. Nuclear changes in tongue epithelial cells following panoramic radiography. *Mutat Res.* 2007; **632**: 121-5.
82. Pastor S, Gutierrez S, Creus A, Xamena N, Piperakis S, Marcos R. Cytogenetic analysis of Greek farmers using the micronucleus assay in peripheral lymphocytes and buccal cells. *Mutagenesis* 2001; **16**: 539–545
83. Fenech M, Morley AA. Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of in vivo aging and low dose X-irradiation. *Mutat Res* 1986; **161**: 193–198
84. Xu GL , Bestor HH , Bourc'his D , Hsich CL , Tommerup N , Bugge M ve ark. Chromosome instability and immunodeficiency syndrome caused by mutations in a DNA methyltransferase gene. *Nature* 1999; **402**: 187–191
85. Bolognesi C, Lando C, Forni A, Landini E, Scarpato R, Migliore L ve ark. Chromosomal damage and ageing: effect on micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes. *Age-Ageing* 1999; **28**: 393–397
86. Burgaz S, Karahalil B, Bayrak P, Taşkın L, Yavuzaslan F, Bökesoy I ve ark. Urinary cyclophosphamide excretion and micronuclei frequencies in peripheral lymphocytes and in exfoliated buccal epithelial cells of nurses handling antineoplastics. *Mutat Res* 1999; **439**: 97–104.
87. Bonassi S, Fenech M, Lando C, Lin Y, Ceppi M, Chang WP ve ark. Human micronucleus project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes. Part I. Effects of laboratory protocol, scoring criteria, and host factors on the frequency of micronuclei. *Environ Mol Mutagen* 2001; **37**: 31–45
88. Gonsebatt ME, Vega L, Salazar AM, Montero R, Guzman P, Blas J ve ark. Cytogenetic effects in human exposure to arsenic. *Mutat Res* 1997; **386**: 219-28.

89. Fenech M, Neville S, Rinaldi J. Sex is an important variable affecting spontaneous micronucleus frequency in cytokinesis-blocked lymphocytes. *Mutat Res.* 1994; **313**(2-3): 203-7.
90. Bolognesi C, Abbondandolo A, Barale R, Casalone R, Dalprà L, De Ferrari M et al. Age-related increase of baseline frequencies of sister chromatid exchanges, chromosome aberrations, and micronuclei in human lymphocytes. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1997; **6**(4): 249-56.
91. Stich HF, Rosin MP, Brunnemann KD. Oral lesions, genotoxicity and nitrosamines in betel quid chewers with no obvious increase in oral cancer risk. *Cancer Lett.* 1986; **31**(1): 15-25.
92. Maffei F, Angelini S, Forti GC, Lodi V, Violante FS, Mattioli S, et al. Micronuclei frequencies in hospital workers occupationally exposed to low levels of ionizing radiation: influence of smoking status and other factors. *Mutagenesis* 2002; **17**: 405–409.
93. Albrecht T, Deng CZ, Abdel-Rahman SZ, Fons M, Cinciripini P, El Zein RA. Differential mutagen sensitivity of peripheral blood lymphocytes from smokers and nonsmokers: effect of human cytomegalovirus infection. *Environ Mol Mutagen* 2004; **43**: 169–178.
94. Hoffmann H, Speit G. Assessment of DNA damage in peripheral blood of heavy smokers with the comet assay and the micronucleus test. *Mutat Res* 2005; **581**: 105–114
95. Trivedi AH¹, Dave BJ, Adhvaryu SG. Monitoring of smokeless tobacco consumers using cytogenetic endpoints. *Anticancer Res.* 1993; **13**(6A): 2245-9.
96. Livingston GK, Reed RN, Olson BL, Lockey JE. Induction of nuclear aberrations by smokeless tobacco in epithelial cells of human oral mucosa. *Environ Mol Mutagen.* 1990; **15**(3): 136-44.
97. Stich HF, Parida BB, Brunnemann KD. Localized formation of micronuclei in the oral mucosa and tobacco-specific nitrosamines in the saliva of "reverse" smokers, Khaini-tobacco chewers and gudakhu users. *Int J Cancer.* 1992; **50**(2): 172-6.
98. Ghose UR, Parida BB. Cytological study of exfoliated buccal mucosa cells of tribes in Orissa State (India) with high risk for oral cancer. *Indian J Cancer* 1995; **32**: 95–99.

99. Stich HF, Curtis JR, Parida BB. Application of the micronucleus test to exfoliated cells of high cancer risk groups: tobacco chewers. *Int J Cancer*. 1982; **30**(5): 553-9.
100. Burgaz S , Işcan A , Büyükbingöl ZK , Bozkurt A , Karakaya AE . Evaluation of micronuclei in exfoliated urothelial cells and urinary thioether excretion of smokers. *Mutat Res* 1995; **335**: 163–169.
101. Barquinero JF, Barrios L, Caballín MR, Miró R, Ribas M, Subias A ve ark. Cytogenetic analysis of lymphocytes from hospital workers occupationally exposed to low levels of ionizing radiation. *Mutat Res*. 1993; **286**(2): 275-9.
102. Little JB. Radiation carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2000; **21**: 397–404.
103. Cardoso RS, Takahashi-Hyodo S, Peitl Jr P, Ghilardi-Neto T, Sakamoto-Hojo ET. Evaluation of chromosomal aberrations, micronuclei and sister chromatid exchanges in hospital workers chronically exposed to ionizing radiation. *Teratog Carcinog Mutagen* 2001; **21**: 431–439.
104. He JL, Chen WL, Jin LF, Jin HY. Comparative evaluation of the in vitro micronucleus test and the comet assay for the detection of genotoxic effects of X-ray radiation. *Mutat Res*. 2000; **469**(2): 223-31.
105. Visvardis EE , Tassiou AM , Piperakis SM . Study of DNA damage induction and repair capacity of fresh and cryopreserved lymphocytes exposed to H₂O₂ and gamma-irradiation with the alkaline comet assay. *Mutat Res* 1997; **383**: 71–80.
106. Miller ML, Andringa A, Dixon K, Carty MP. Insights into UV-induced apoptosis: ultrastructure, trichrome stain and spectral imaging. *Micron*. 2002; **33**(2): 157-66.
107. Vijayalaxmi, Tice RR, Strauss GH. Assessment of radiation-induced DNA damage in human blood lymphocytes using the single-cell gel electrophoresis technique. *Mutat Res*. 1992; **271**(3): 243-52.
108. Fikrová P, Stětina R, Hronek M, Hyšpler R, Tichá A, Zadák Z. Application of the comet assay method in clinical studies. *Wien Klin Wochenschr*. 2011; **123**(23-24): 693-9
109. Böcker W, Bauch T, Müller WU, Streffer C. Image analysis of comet assay measurements. *Int J Radiat Biol*. 1997; **72**(4): 449-60.

110. Olive PL. DNA damage and repair in individual cells: applications of the comet assay in radiobiology. *Int J Radiat Biol.* 1999; **75**(4): 395-405.
111. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res.* 1988; **175**(1): 184-91.
112. Olive PL, Banáth JP, Durand RE. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay. *Radiat Res.* 1990; **122**(1): 86-94.
113. Collins AR, Ma AG, Duthie SJ. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. *Mutat Res.* 1995; **336**(1): 69-77.
114. Westphalen GH, Menezes LM, Prá D, Garcia GG, Schmitt VM, Henriques JA. In vivo determination of genotoxicity induced by metals from orthodontic appliances using micronucleus and comet assays. *Genet Mol Res.* 2008; **7**(4): 1259-66.
115. Vrzoc M, Petras ML. Comparison of alkaline single cell gel (Comet) and peripheral blood micronucleus assays in detecting DNA damage caused by direct and indirect acting mutagens. *Mutat Res.* 1997; **381**(1): 31-40.
116. Tadin A, Galic N, Mladinic M, Marovic D, Kovacic I, Zeljezic D. Genotoxicity in gingival cells of patients undergoing tooth restoration with two different dental composite materials. *Clin Oral Investig.* 2014; **18**(1): 87-96.
117. Stewart B.W, Kleihues P. World Cancer Report. (2003) Lyon: IARC Press
Erişim 02.05.2015 <http://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/wcr/2003/>
118. Desai SS, Ghaisas SD, Jakhi SD, Bhide SV. Cytogenetic damage in exfoliated oral mucosal cells and circulating lymphocytes of patients suffering from precancerous oral lesions. *Cancer Lett.* 1996; **109**(1-2): 9-14.

FORMLAR**FORM 1: GÖNÜLLÜLERİN BİLGİLENDİRİLMİŞ OLUR (RIZA) FORMU****FORM 2: HASTA TAKİP ve ANAMNEZ FORMU**

FORM 1: GÖNÜLLÜLERİN BİLGİLENDİRİLMİŞ OLUR (RIZA) FORMU

Sizi dişle ilgili şikayetleriniz nedeniyle çektiğiniz panoramik radyografinin etkilerini görmek üzere planladığımız bir çalışmaya davet ediyoruz. Çalışmamızın amacı, dental sebeplerle çekilen panoramik grafi sonrası çekirdek hücrelerinde değişim ve DNA daki hasarını incelemektir. Çalışmaya muayeneniz sonucu panoramik grafi görüntülerine ihtiyaç duyulduğu takdirde dahil edileceksiniz. Gereksiz yere röntgen çekilmeyecektir. Sizden panoramik grafi çekilmeden hemen önce ve 10 gün sonra bir fırça yardımı ile yanak içerisinden sürüntü hücreleri alınacaktır. Size hiçbir zararı yoktur, ağrısız bir işlemdir. Bu işlemin dental tedavinizi aksatmadığı gibi tedavinize bir faydası da olmayacaktır.

Çalışmada sadece fırça ile alınan hücreler kullanılacak olup gönüllüler üzerinde başka herhangi bir çalışma yapılmayacaktır. Gönüllülerin bu örneği verdikten sonra çalışmayla ilgili herhangi bir yükümlülükleri kalmayacaktır. Gönüllülerin, örnek verdikten sonra talep etmeleri durumunda ağız ve diş sağlığı açısından muayene ve tedavileri sağlanacaktır.

Bu formu imzalamış olsanız bile istemeniz halinde veya araştırmacının gerekli görmesi durumunda hiçbir mali ve hukuki yükümlülük olmaksızın çalışmadan ayrılabilirsiniz. Ayrılmanız halinde tedavinizle ilgili herhangi bir aksama ya da değişiklik olmayacak, bu durum tedavinizi etkilemeyecektir. Bu çalışmada sizin hiçbir hukuki ve mali sorumluluğunuz bulunmayıp tüm sorumluluk araştırmacı ve destekleyiciye aittir. Bu işlemler için sizden veya bağlı bulunduğunuz sosyal güvenlik kuruluşundan hiçbir ücret talep edilmeyecektir. Çalışmada yer almanız için size herhangi bir ücret ödenmeyecektir.

Bu işlemlerle ilgili karşılaşılabileceğiniz herhangi bir sorunda arayabileceğiniz kişi ve telefon aşağıda belirtilmiştir. Kişilik bilgileriniz, isminiz gizli tutulacaktır. Etik kurullar ve resmi makamlar size ait tıbbi bilgilere gerekirse ulaşabileceklerdir. Çalışmada hastalığınız ile ilgili önemli bir bilgiye ulaşırsa size bildirilecektir. Araştırmadan elde edilecek bilgiler ile genel sonuçlar, yurt içi ve dışında bilimsel toplantılarda ve/veya dergilerde bildiri olarak sunulabilir/yayınlanabilir. Ancak herhangi bir bildiri ya da yayında şahsınıza ait kimlik bilgileri hiç bir şekilde yer almayacaktır. Sunulan veya yayınlanan veriler ve çalışma sonuçları izlenerek size ulaşılması mümkün olmayacaktır.

Sayın Dt. Hülya ÇAKIR KARABAŞ tarafından İ.Ü. Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş ve Çene Radyolojisi Anabilim Dalı'nda tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya "katılımcı" olarak davet edildim.

Eğer bu araştırmaya katılırsam hekim ile aramda kalması gereken bana ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında da büyük özen ve saygı ile yaklaşılabileceğine inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin ihtimalla korunacağı konusunda bana yeterli güvence verildi.

Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim. *(Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemim uygun olacağının bilincindeyim)* Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı da tutulabilirim.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır.

İster doğrudan, ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorununun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi

müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim).

Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda Dt. Hülya ÇAKIR KARABAŞ, 0 212 414 20 20 dahili 30 324 / 30 273 ve 0 506 476 69 29 no'lu telefonlardan, İ.Ü. Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş ve Çene Radyolojisi Anabilim Dalı adresinden arayabileceğimi biliyorum.

Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun dental tedavime ve hekim ile olan ilişkiye herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir düşünme süresi sonunda adı geçen bu araştırma projesinde “katılımcı” olarak yer alma kararını aldım. Bu konuda yapılan daveti büyük bir memnuniyet ve gönüllülük içerisinde kabul ediyorum.

Yukarıda gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri gösteren metni okudum. Bunlar hakkında yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarla söz konusu araştırmaya kendi rızamla hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Gönüllünün adı:

Adresi:

Tel:

Tarih:

İmzası:

Varsa gönüllünün yasal temsilcisinin

Adı:

Adresi:

Tel:

Tarih:

İmzası:

Olur alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık eden kuruluş görevlisinin

Adı:

Görevi:

Tel:

Tarih:

İmzası:

Açıklama yapan araştırmacının

Adı:

Tel:

Tarih:

İmzası:

Not: Bu form iki nüsha olarak hazırlanmıştır. İmzalandıktan sonra bir nüshası gönüllüye verilecektir; diğer nüsha çalışma dosyasında saklanacaktır.

FORM 2: HASTA TAKİP ve ANAMNEZ FORMU

Ad :
 Soyad :
 Cinsiyet / Yaş :
 Olgu No :

1. Sistemik herhangi bir hastağı var mı?

- Evet ☐ Hastalığınız.....
- Hayır ☐

2. Sigara alışkanlığı:

Hayır ☐

- Kaç yıldır kullandığı:
- Miktarı:
- Sigara içimi bırakıldı ise ne zaman bırakıldığı:

3. Alkol alışkanlığı:

Hayır ☐

- Kaç yıldır kullandığı:
- Miktarı:
- Alkol alımı bırakıldı ise ne zaman bırakıldığı:

4. Düzenli oral antiseptik solusyon kullanımı:

- Evet ☐
- Hayır ☐

5. Daha önce baş-boyun bölgesinden radyografi alındı mı?

- Evet ☐ Evet ise ne zaman ☐
- Hayır ☐

ETİK KURUL KARARI

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU



Sayı : 757

Tarih : 02.07.2013

Konu : Prof.Dr.Tamer L. ERDEM

Sayın Prof.Dr.Tamer L. ERDEM
Diş Hekimliği Fakültesi

İlgi :Diş Hekimliği Fakültesinin 07/05/2013 gün ve 2620 sayılı yazısı

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz ve Dt.Hülya ÇAKIR KARABAŞ'IN yürüteceği 2013/685 dosya numaralı "Panoromik Grafilerde X-ışığına Bağlı Hücre Çekirdeği ve DNA Hasarının İncelenmesi" başlıklı tez çalışması kurulumuzun 21/06/2013 gün ve 12 sayılı toplantısında görüşülerek etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim.

Prof.Dr. A. Yağız ÜRESİN
İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar
Etik Kurul Başkanı

Eki: İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu Karar Formu