

T.C
GENELKURMAY BAŐKANLIĐI
GÜLHANE ASKERİ TIP AKADEMİSİ KOMUTANLIĞI
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ
ANKARA

PROTEZ ÜRETİMİNDE ÇALIŞAN PERSONELDE
MESLEKİ MARUZ KALMAYA BAĞLI ETKİLERİN TOKSİKOLOJİK
YÖNDEN ARAŞTIRILMASI

Uzm. Ecz. Buğra SOYKUT

Farmasötik Toksikoloji Programı

Doktora Tezi

ANKARA

2015

T.C
GENELKURMAY BAŐKANLIĐI
GÜLHANE ASKERİ TIP AKADEMİSİ KOMUTANLIĞI
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

**PROTEZ ÜRETİMİNDE ÇALIŞAN PERSONELDE
MESLEKİ MARUZ KALMAYA BAĞLI ETKİLERİN TOKSİKOLOJİK
YÖNDEN ARAŞTIRILMASI**

Uzm.Ecz.Buğra SOYKUT

Gülhane Askeri Tıp Akademisi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Lisansüstü EĞitim-ÖĞretim Yönetmeliğinin

Farmasötik Toksikoloji Programı

İçin Öngördüğü

DOKTORA TEZİ

olarak hazırlanmıŐtır.

TEZ DANIŞMANI

Doç.Dr. Cemal AKAY

Ankara

2015

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne:

Bu çalışma jürimiz tarafından Farmasötik Toksikoloji Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

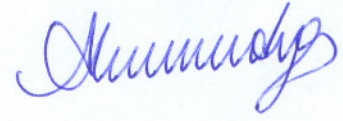
Tez Danışmanı : Doç.Dr. Cemal AKAY
Gülhane Askeri Tıp Akademisi



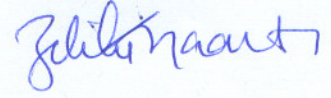
Üye : Prof.Dr. H.Sinan SÜZEN
Ankara Üniversitesi



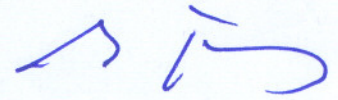
Üye : Prof.Dr. Ahmet AYDIN
Yeditepe Üniversitesi



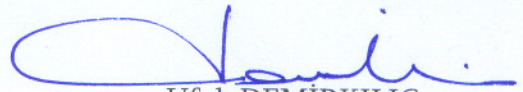
Üye : Doç.Dr. Zeliha KAYAALTI
Ankara Üniversitesi



Üye : Doç.Dr. Onur ERDEM
Gülhane Askeri Tıp Akademisi



ONAY:



Ufuk DEMİRKILIÇ
Prof.Tbp. Tuğgeneral
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması, sivil kuruluşlarda ve TSK bünyesinde protez üretiminde çalışan personeldeki olası toksikolojik etkilerin değerlendirilmesi amacıyla, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kurulu'nun 09 OCAK 2014 gün ve 226 sayılı oturumunda alınan karara uygun olarak, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir. Tez çalışması, TÜBİTAK-SBAG: 114R045 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Doktora eğitimim süresince desteklerinden dolayı, başta GATA Ecz. Bil. Mrk. Başkanı Prof.Dr. Yalçın ÖZKAN olmak üzere, Ecz. Bil. Mrk. Öğretim Üyeleri ve Personeline,

Farmasötik Toksikoloji AD Başkanı ve tez danışmanım Doç.Dr. Cemal AKAY'a,

Bu çalışmanın fikri oluşumunda asıl pay sahibi olan ve doktora eğitimimin ilk gününden itibaren beni en çok destekleyen Doç.Dr. Onur ERDEM'e,

Hava ölçümleri için verdiği destekten dolayı, Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji AD Başkanı Prof.Dr. Sema BURGAZ'a,

COMET analizindeki desteklerinden dolayı, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji AD Öğretim Üyesi Prof.Dr. Yalçın DUYDU, Dr.Ecz. Aylin ÜSTÜNDAĞ ve Uzm. Ecz. Can Özgür YALÇIN'a,

Tez kapsamındaki parametrelerin tamamına yakınının ölçümünde, GATA-FAVOR laboratuvarı desteği için Doç.Dr. Erkan DEMİRKAYA'ya ve çok değerli emekleri için Biyolog İ.Yeşim ÖNEN ve Biyolog Burcu ESER'e,

Tez bulgularının istatistiksel olarak değerlendirmesindeki katkılarından dolayı Doç.Dr. Cengizhan AÇIKEL'e,

Farmasötik Toksikoloji AD asistanları Ecz. Eyüp ÇIRAK ve Ecz. Serdar ÇETİNKAYA'ya; Farmasötik Teknoloji AD asistanları Uzm. Ecz. Özgür EŞİM, Ecz. Filiz ATALAY ve Ecz. Alper ARSLAN'a,

Tezin ilk aşamasında, örneklerin toplanması ve hazırlığında en önemli katkıları sağlayan Biyolog Ebru AKYOL ARAZ ve Uzm. Ecz. Özge ÇEVİK'e,

Sabırla ve desteğiyle yanımda olan eşime ve aileme, teşekkür ederim.

ÖZET

Buğra SOYKUT, Protez üretiminde çalışan personelde mesleki maruz kalmaya bağlı etkilerin toksikolojik yönden araştırılması, Farmasötik Toksikoloji Doktora Tezi, Ankara, 2015. Protez malzemelerinin üretimi ve uygulanması, özellikle diş hekimliğinde oldukça yaygındır. Bu materyallerin üretimleri, çeşitli kimyasalların kullanım sürecini kapsamaktadır. Akrilik asit esterleri ve metaller, bu protezlerin yapımında kullanılan en önemli bileşenlerdir. Bu tezin amacı, özellikle protetik diş tedavileri ve ortodonti uygulamalarında önemli yer tutan protezlerin üretiminde kullanılan, özellikle metil metakrilat monomerleri ve metallere çalışma yaşamları boyunca mesleki olarak maruz kalan bireylerde, olası toksikolojik etkilerin değerlendirilmesidir.

Bu tez çalışmasında, eksternal maruz kalmanın göstergesi olarak, çalışma ortamındaki metakrilat hava düzeyleri ölçülmüştür. Protez üretiminde çalışan 69 kişilik maruz grup ile 67 kişilik kontrol grubu arasında, olası toksik etkilerin sistemik açıdan değerlendirilmesi amacıyla; birçok hastalığın oluşum sürecinde de önemli rol oynadığı düşünülen oksidatif stres durumu, alınan kan örneklerindeki “süperoksit dismutaz”, “katalaz” ve “glutasyon peroksidaz” enzimlerinin aktiviteleri (UV) spektroskopik ölçümle belirlenmiştir. Söz konusu gruplarda, önemli bir diğer antioksidan olan ‘glutasyon’ düzeyleri de aynı yöntemle tespit edilmiş, lipid peroksidasyonu düzeyini saptamak amacıyla “malondialdehit” ölçümü yapılmıştır. Bunun yanında, ilk maruziyet bölgesi olan bukkal mukozada “mikroçekirdek sitom analizi” ile mikroskopik inceleme yapılarak, muhtemel genotoksik etkilerin belirlenmesine çalışılmıştır. Ayrıca lenfositlerde, DNA hasarının önemli göstergelerinden olan “tek hücre jel elektroforez (COMET)” analizi uygulanmış; oksidatif DNA hasarının tespiti için ise “8-hidroksi-2’-deoksiguanozin (8-OHdG)” ölçümü; yine spektroskopik yolla (UV) gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, her iki gruptaki bireylerde atomik absorpsiyon spektroskopisiyle kan metal ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

Yapılan tüm ölçüm sonuçları istatistiksel olarak karşılaştırıldığında, maruz grubun SOD, Glutasyon ve MDA düzeylerinde; ayrıca bukkal mikroçekirdek sıklığında kontrol grubuna göre anlamlı artış ($p<0,001$); GPx aktivitesi ve 8-OHdG düzeylerinde ise anlamlı azalma ($p<0,05$) saptanmıştır. Maruz grubun kan bakır ve çinko düzeylerinde kontrol grubuna göre anlamlı düşüş ($p<0,001$) saptanmıştır. İncelenen diğer parametrelerde ise gruplar arasında istatistiksel anlamlı farklılık saptanmamıştır. Bu tez çalışmasında elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, düşük düzey mesleki MMA maruziyetine karşı, diş teknisyenlerinde bir adaptif cevap gelişmiş olabileceği düşünülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Antioksidan, Metakrilat, Mikroçekirdek, COMET, Hormesis
Destekleyen Kurumlar: TÜBİTAK/SBAG:114R045 no.lu proje ile desteklenmiştir.

ABSTRACT

Buğra SOYKUT, Research of the toxicological effects on prosthesis production personnel due to occupational exposure, Pharmaceutical Toxicology PhD Thesis, Ankara, 2015. Prostheses manufacturing and application are highly common in dentistry. Various chemicals are used in the production of this material. Acrylic acid esters and metals are the main materials used in the production of the prostheses. The purpose of this thesis is the evaluation of possible toxicological effects on personnel, who exposed to production materials of prostheses and orthodontic appliances during their entire working life.

In this thesis, the level of methyl methacrylate in air was measured as an indicator of external exposure on the personnel. In order to evaluate the possible toxic effects of oxidative stress which is thought to play an important role in the formation process of many diseases, was examined via UV-spectroscopic determination of “superoxide dismutase”, “catalase” and “glutathione peroxidase” antioxidant enzyme activities in blood between exposed (n=69) and control (n=67) groups. In these groups, "malondialdehyde" (in order to determine the level of lipid peroxidation), and “glutathione” levels (which is another important cellular antioxidant) were also determined by the same method. Moreover, “Micronucleus Cytome Assay” which is one of the most important biomarkers of possible genotoxic effects determined in buccal mucosa, the first exposure area, was performed by microscopic examination. “Single cell gel electrophoresis (COMET)” analysis and “8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG)” measurements were performed with UV-spectroscopy, for detecting DNA damages and oxidised DNA bases, respectively. In addition, measurements of blood metal levels in both groups were performed by atomic absorption spectroscopy.

The results showed that SOD activity, buccal micronuclei frequency, glutathione and MDA levels were significantly higher in exposed group when compared with the control group ($p<0,001$). A significant decrease was determined in the GPx activities and 8-OHdG levels of exposed group ($p<0,05$). Also, copper and zinc blood levels of exposed group was found lower than those of control group ($p<0,001$). It has not been found any significant difference in other parameters between groups. When the results obtained in this thesis are considered, it has been thought that an adaptive response might be developed by dental technicians against low level MMA exposure.

Keywords : Antioxidant, Methacrylate, Micronucleus, COMET, Hormesis
Supported by : TÜBİTAK / Project No.114R045

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
İNGİLİZCE ÖZET	vi
İÇİNDEKİLER	
SİMGELER VE KISALTMALAR	vii
ŞEKİLLER	viii
TABLolar	ix
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	7
2.1. Protezlerin Tarihçesi	7
2.2. Protez Üretimi	8
2.3. Protezlerin Bileşiminde Bulunan Metakrilat Dışındaki Maddeler ve Toksik Etkileri	9
2.4. Metakrilatların Olası Toksik Etkileri	11
2.4.1. Protez Kullanıcılarında Oluşabilen Etkiler	11
2.4.2. Mesleki Maruziyet Sonucu Oluşabilen Etkiler	12
2.5. Düzenleyici Toksikoloji Bakımından Yapılan Testler ve Limitler	14
2.6. Metakrilat Türevlerinin Toksik Etki Mekanizmaları	15

2.7. Oksidatif Stres	17
2.8. Serbest Radikaller ve Reaktif Oksijen Türleri	18
2.8.1. Serbest Radikal Oluşturan Başlıca Hücresel Yapılar	22
2.9. Antioksidan Savunma Sistemleri	26
2.9.1. Enzimatik Savunma Mekanizmaları	28
2.9.2. Enzimatik Olmayan Savunma Mekanizmaları	31
2.10. Lipid Peroksidasyonu	36
2.11. DNA Üzerinde Oluşan Oksidatif Hasarlar	40
2.11.1. Oksidatif DNA Hasarlarının Onarımı	44
2.12. DNA Hasarlarının Tanımlanması	47
2.12.1. Yanak Epitel Hücrelerinde Mikroçekirdek Analizi	47
2.12.2. Tek Hücre Jel Elektroforez (COMET) Yöntemi	50
2.13. Protezlerin Bileşiminde Bulunan Metaller ve Etkileri	51
GEREÇ VE YÖNTEM	54
3.1. Grupların oluşturulması	54
3.2. Gönüllülerden örneklerin toplanması ve ortam havasında ölçüm yapılması	55
3.3. Analizlerin uygulanması	56
3.3.1. Katalaz enzim aktivitesinin ölçümü	56
3.3.2. Süperoksit dismutaz enzim aktivitesinin ölçümü	58

3.3.3. Glutasyon peroksidaz enzimi aktivitesinin ölçümü	60
3.3.4. MDA düzeyinin ölçümü	61
3.3.5. Glutasyon düzeyinin ölçümü	63
3.3.6. Oksidatif DNA hasarının ölçümü	64
3.3.7. Bukkal epitel hücrelerinde sitom taraması	65
3.3.8. Tek Hücre Jel Elektroforez (COMET) analizi	67
3.3.9. Metal Analizleri	71
3.4. İstatistiksel Analiz	72
BULGULAR	73
TARTIŞMA	78
SONUÇ VE ÖNERİLER	90
KAYNAKLAR	93
EKLER	119

SİMGELER VE KISALTMALAR

MMA	: Metilmetakrilat monomeri
PMMA	: Polimetilmetakrilat polimeri
DMPT	: N,N-dimetil-p-toluidin
ROT	: Reaktif Oksijen Türleri
SOD	: Süperoksit dismutaz
GPx	: Glutasyon peroksidaz
CAT	: Katalaz
MDA	: Malondialdehit
GSH	: İndirgenmiş Glutasyon
GCL	: Glutamat sistein ligaz (γ -glutamilsisteinil sentetaz)
COMET	: Tek Hücre Jel Elektroforez Analizi
8-OHdG	: 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin
MN	: Mikronükleus (Mikroçekirdek)
UDMA	: Üretan dimetakrilat
Bis-GMA	: Bisfenol A glisidil metakrilat
HEMA	: 2-Hidroksietil metakrilat
GDMA	: Gliserol dimetakrilat
TEGDMA	: Trietilenglikol dimetakrilat
HNE	: 4-hidroksi-2-nonenal
pAH	: Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlar
AChE	: Asetilkolin esteraz
IARC	: Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı
NIOSH	: Ulusal Mesleki Güvenlik ve Sağlık Enstitüsü (ABD)
OSHA	: Mesleki Güvenlik ve Sağlık İdaresi (ABD)
ACGIH	: Amerikan Kamu Endüstriyel Hijyen Uzmanları Birliği
ESCODD	: Avrupa Oksidatif DNA Hasar Standartları Komitesi
TLV	: Eşik Limit Değer
TWA	: Zaman Ağırlıklı Ortalama
STEL	: Kısa Süreli Maruziyet Limiti

ŞEKİLLER

Şekil 2.1. Metil metakrilat sentezi	8
Şekil 2.2. MMA'nın polimerleşmesi	9
Şekil 2.3. Protez üretiminde kullanılan MMA dışındaki başlıca maddeler	10
Şekil 2.4. Reaktif oksijen/nitrojen türevlerinin oluşumu	22
Şekil 2.5. Mitokondri'nin yapısı	23
Şekil 2.6. Peroksizom'un yapısı	24
Şekil 2.7. Antioksidanların hücre içerisindeki aktivite bölgeleri	27
Şekil 2.8. Serbest radikallere karşı antioksidan enzimlerin aktiviteleri	30
Şekil 2.9. Glutasyon indirgenme-yükseltgenme (redoks) döngüsü	33
Şekil 2.10. Glutasyon'un indirgenmiş ve yükseltgenmiş formları	33
Şekil 2.11. Lipid peroksidasyonu mekanizmaları	37
Şekil 2.12. Başlıca lipid peroksidasyonu ürünleri	38
Şekil 2.13. MDA ile DNA nükleozitlerinin başlıca katım ürünleri	39
Şekil 2.14. En önemli DNA baz hasarı ürünleri	42
Şekil 2.15. 8-OHdG molekülünün oluşumu	43
Şekil 3.1. Katalaz aktivitesi ölçümüne ait kalibrasyon grafiği	58
Şekil 3.2. Süperoksit dismutaz aktivitesi ölçümüne ait kalibrasyon grafiği	60
Şekil 3.3. Malondialdehit düzeyi ölçümüne ait kalibrasyon grafiği	62
Şekil 3.4. Glutasyon düzeyi ölçümüne ait kalibrasyon grafiği	64
Şekil 3.5. Oksidatif DNA hasar düzeyi ölçümüne ait kalibrasyon grafiği	65

TABLÖLAR

Tablo 2.1. Metil metakrilat'ın fizikokimyasal özellikleri	7
Tablo 2.2. Diş hekimliğinde sık kullanılan metakrilat türevleri	8
Tablo 2.3. Bazı önemli reaktif oksijen/nitrojen türevleri	19
Tablo 3.1. Katalaz aktivitesi için hazırlıklar ve ölçümün tasarımı	57
Tablo 3.2. Süperoksit dismutaz aktivitesi için hazırlıklar ve ölçümün tasarımı	59
Tablo 3.3. Glutasyon peroksidaz aktivitesi için hazırlıklar ve ölçümün tasarımı	61
Tablo 3.4. Malondialdehit düzeyi için hazırlıklar ve ölçümün tasarımı	62
Tablo 4.1. Gruplara ait demografik veriler	73
Tablo 4.2. Antioksidan molekül aktiviteleri ve lipid peroksidasyon ürünü düzeylerinin gruplar arasında karşılaştırılması	73
Tablo 4.3. Gruplara ait oksidatif DNA hasarı ve COMET analiz sonuçlarının karşılaştırılması	74
Tablo 4.4. Serum eser element düzeylerinin gruplar arasında karşılaştırılması	74
Tablo 4.5. Ölçülen parametrelerde gruplar arası farklılığa etki eden faktörler ve etkilerinin anlamlılık düzeyleri	75
Tablo 4.6. Bukkal epitel sitom taraması bulgularının istatistiksel karşılaştırılması	76
Tablo 4.7. Bukkal sitom sonuçlarında gruplar arası farklılığa etki eden faktörler ve etkilerinin anlamlılık düzeyleri	76

GİRİŞ

Günümüzde, akrilik bazlı materyaller plastikler, tekstil ürünleri, yazıcı mürekkepleri, elektronik ürünleri ve yapıştırıcılar gibi günlük yaşamı kolaylaştıran birçok üründe kullanımlarının yanı sıra; tıbbi amaçlı olarak diş hekimliği (ağız içi protezler), ortopedi (artroplasti ameliyatları), oftalmoloji (intraoküler lensler), çene ve yüz cerrahisi ile plastik cerrahi (rekonstrüksiyon amaçlı) alanlarında da kullanılmaktadırlar (1,2). Metakrilat türevlerinin günlük olarak yoğun şekilde kullanımları, özellikle diş protezlerinin üretiminde gerçekleşmektedir. Diş teknisyeni olarak protez üretiminde çalışan personel de, bundan dolayı metil metakrilat (MMA) monomerlerine en fazla maruz kalan ve aynı zamanda bu monomerlerin yol açtığı allerjik reaksiyonların en sık görüldüğü meslek grubudur (3). Diş hekimliği ve ortopedi alanındaki uygulamalarda önemli yer tutan bu protez materyallerinin sağlık üzerine istenmeyen etkilerini konu edinen; genellikle hücre kültürleri üzerinde veya üretilmiş protezleri kullananlarla gerçekleştirilmiş, farklı parametrelerin değerlendirildiği birçok araştırma bulunmaktadır. Mesleki olarak bu maddelerin üretiminde çalışmak suretiyle bunlara maruz kalan kişiler üzerinde yapılan çalışmalar ise son derece sınırlı sayıdadır (4).

Akrilik bazlı protez materyalleri, genellikle “iki bileşenli sistem” olarak tarif edilen, toz ve sıvı kısımların karıştırılmasıyla elde edilmektedirler. Sıvı kısım, ana bileşen olarak MMA içermektedir. MMA, kimyasal yapı olarak metakrilik asit’in polimerleşebilen çifte bağ içeren esteri olup; suda zayıf çözünürlüğe sahip, renksiz, berrak, yoğun kokulu ve alevlenebilen bir sıvıdır (5). Sıvı kısımda bundan başka; aktivasyonu sağlamak için kullanılan ‘N,N-dimetil-p-toluidin (DMPT)’ ile ısı ve ışık gibi etkenlerle oluşabilecek istenmeyen polimerizasyonların önüne geçmek için kullanılan ‘hidrokinon’ bulunmaktadır (6,7). Toz kısımda ise, polimerizasyon başlatma amaçlı olarak ‘benzoil peroksit’ bulunmaktadır (8). Burada, toz kısımdaki benzoil peroksit ile sıvı kısımdaki

DMPT 'nin etkileşerek serbest radikal oluşturmaları, “başlama reaksiyonu” olarak adlandırılmaktadır. Polimerizasyon, bu radikaller aracılığıyla başlayıp, ekzotermik bir reaksiyon olarak gerçekleşmektedir (5,6). Tüm bunların yanında, protez üretiminde sağlamlık ve renk gibi özelliklerin sağlanabilmesi amacıyla krom, kobalt, molibden, nikel, alüminyum, gümüş, gibi metallerin de kullanımları söz konusudur (9).

Bağlanmamış olarak kalan monomerler, sitotoksik ve allerjik etkilerden doğrudan sorumlu tutulmaktadır (4). Artık monomerler aracılığıyla, özellikle oral mukozada irritasyon ve enflamasyon oluşabilmektedir (10). İrritan etkinin de, metabolizma (ester hidrolizi) sonucu açığa çıkan metakrilik asitten dolayı oluştuğu düşünülmektedir (11). Diş hekimliğinde ve cerrahide yaygın kullanılan lateks ve vinil eldivenlerden birkaç dakika içerisinde geçerek cildi etkileyen bu maddelerin, “Amerikan Kontakt Dermatit Topluluğu (ACDS)” tarafından 2012 yılında ‘Yılın Temas Allerjisi’ olarak belirlenmiş olması; sağlık üzerine etkileri bakımından halen gündemde olan çok önemli bir kimyasal grubu olduğunun göstergelerindendir (12).

Çok hızlı metabolizmaya uğraması dolayısıyla, solunumla maruz kalınan metakrilat esterlerini kanda net olarak saptamak, günümüz teknikleriyle mümkün olamamaktadır (13,14). Bundan dolayı, metakrilat türevlerinin biyolojik izlenmesi amacıyla, kan ve idrarda metabolit olarak metanol düzeyi ölçümü veya ortam havasında metakrilat buharının saptanması gibi yöntemlerin kullanımı önerilmektedir (15).

MMA monomerleri için öne çıkan sitotoksik etki mekanizmalarının ilki, monomerlerin karışım yoluyla polimerleşmesi aşamasında kısa süreli monomer salımı dolayısıyla oluşabilmektedir. İkincisi ise, zamanla oluşabilecek degradasyon ve erozyonla birlikte, uzun dönemde oluşabilecek sızıntılar sonucudur. İlk yol mesleki maruz kalma bakımından önem arz ederken; ikinci yol, bu protez

materyalini kullanan hastalar bakımından önemlidir (4). MMA kaynaklı sitotoksik etkilerin moleküler temelinde ise, glutatyon düzeylerinde azalma ve reaktif oksijen türlerinin (ROT) oluşması yatmaktadır(6).

Reaktif Oksijen Türleri'nin, çeşitli otoimmün ve enflamatuvar hastalıklar, diyabet, kanser, yaşlanma ve ilaç toksisiteleri gibi birçok rahatsızlığın gelişiminde önemli rolü olduğu belirlenmiştir (16,17,18). ROT miktarındaki aşırı artışa bağlı olarak hücresel onarım kapasitesinin aşıl原因arak redoks dengesinin bozulması, "Oksidatif Stres" durumunu ortaya çıkarmaktadır (19). Bu durumun uzaması halinde ise hücredeki lipidlerin, proteinlerin ve nükleik asitlerin oksidatif hasara uğraması da söz konusu olmakta; böylece hücrede sinyal iletimi bozulmalarından, mutajenite ve hatta hücre ölümüne kadar gidebilen, ciddi sonuçlar ortaya çıkmaktadır (20).

Reaktif Oksijen Türleri, düzeylerine göre hücreye yararlı veya hasar oluşturuıcı özellikte olabilmektedirler (9). Normal şartlarda insan vücudu, düşük miktardaki ROT ile bakteri ve virüslara karşı direnç gösterebilmektedir (16,20). Ancak, mitokondrideki aşırı ROT birikimi, istenmeyen etkilerin oluşumuna yol açmaktadır (17,21).

Oluşan bu reaktif moleküllerin ortadan kaldırılması ve negatif etkilerinin onarılması, vücuttaki oksidatif stresle savaşıyan antioksidan moleküllerle sağlanmaktadır (22). Hücresel seviyede etkili olan ve vücudun antioksidan savunmasını oluşturan en önemli moleküller, enzimatik yapıdaki Süperoksit dismutaz (SOD), Glutatyon peroksidaz (GPx), Katalaz (CAT) ile enzimatik olmayan Glutatyon (GSH), C ve E vitaminleri ile ürik asit gibi maddelerdir (21,23). SOD enzimi, mitokondride elektron transport zinciri sonucu oluşan süperoksit radikalının hidrojen peroksit'e dönüştürülmesini sağlamaktadır (17,24). Oluşan H_2O_2 de reaktif özellik taşıdığından, detoksifikasyon amacıyla

GPx ve CAT enzimleri aracılığıyla, su ve moleküler oksijene dönüştürülmektedir (25).

Serbest radikallerin mikrosaniye düzeyleriyle ifade edilen çok kısa yarı ömre sahip olmaları, onların laboratuvar ortamındaki ölçümelerini son derece güç hale getirmektedir. Ayrıca, yüklerinden dolayı hücre zarını geçememekte ve etkin şekilde kan dolaşımına katılamamaktadırlar. Bundan dolayı, doğrudan bu reaktif türlerin ölçümü yerine oluşturdukları hasarların ölçülmesi, ileri dönük risklerin değerlendirilebilmesi bakımından çok daha gerçekçi bir yol olarak değerlendirilmektedir (26).

Bununla birlikte, günümüzde oksidatif stres durumunu ve bunun sonucunda oluşabilen hasarı doğrulukla ölçen, tek bir yöntem bulunmamaktadır. Nitekim antioksidan moleküller için, hücre içinde ve vücut sıvılarında (kan ve idrar gibi) olmaları gereken bir referans değer de söz konusu değildir. Antioksidan kapasitenin *in vivo* olarak tanımlanması ise, birçok faktöre bağlıdır. Bunlara örnek olarak biyolojik ulaşılabilirlik, metabolizma, lokalizasyon, dağılım, antioksidan radikallerinin akıbeti ve diğer antioksidanlarla etkileşim gibi faktörler verilebilir (27).

Hücrede oluşan reaktif türlerin, hücresel biyomoleküllerin ve membran lipidlerinin peroksidasyonu gibi oksidatif hasarlara yol açmaları da söz konusudur (21). Lipid peroksidasyonu ve sonucunda oluşan “malondialdehit (MDA)” gibi ürünler, hücre yaşamı için tehlike oluştururlar. Lipid peroksidasyonunun birikmiş etkileri sonucunda ise ateroskleroz, hemolitik anemi, iskemi-reperfüzyon hasarı gibi birçok patolojik durumun görülme riski artmaktadır (24).

Metakrilat monomerlerinin sorumlu tutulduğu toksik etkilerin en önemlilerinden biri de, genotoksik etkilerdir. Bu etkilerin mekanizmaları kesin olarak bilinmemekle birlikte, protez bileşenlerinin “Reaktif Oksijen Türleri” oluşturmaları ve hücredeki en önemli non-enzimatik serbest radikal süpürücü

molekül sayılan “Glutasyon” düzeylerinde azalmaya yol açması, en çok kabul gören moleküler toksisite mekanizmalarıdır (28,29). Bu reaktif ürünler, DNA yapısındaki şeker, baz ve kromatin gibi kısımlarla etkileşerek oksidatif DNA hasarına sebep olabilmekte; bundan başka çift sarmal kırıklarına ve DNA üzerindeki mutasyonlara da yol açabilmektedirler (30,31).

Hücrede en hassas yapılardan biri olan DNA üzerindeki oksidatif hasarlara örnek olarak, 8-OHdG (8-hidroksi-2'-deoksiguanozin), FapyGuanin ve Timin glikol gibi oluşumlar sayılabilir. Bu hasar türlerinin biyolojik materyalde ölçümleri gerçekleştirilerek, hasarın boyutu hakkında fikir edinilebilmektedir (24). DNA üzerinde gerçekleşen mutasyonlar (hasar), karsinojenite açısından kritik basamağı oluşturmaktadır ve birçok tümör hücresinde bunun bir göstergesi olarak, artmış 8-OHdG düzeyleri tespit edilmiştir (16).

Kanser, oluşmuş genetik hasarların birikmesiyle ortaya çıkan bir hastalıktır. Bu hastalığın erken aşamalarında, genom stabilitesinde bozulmalar ve kromozomal hasarlar ön plana çıkmaktadır. Kromozomal hasarların bir biyogöstergesi olarak periferik lenfositlerdeki mikroçekirdek sıklığının ölçülmesi gibi, düşük maliyetli ve gerçek durumu yansıtabilen bazı yöntemler, günümüzde yaygın şekilde kullanılmaktadır (32). Hücrelerin mitoz bölünmeleri sırasındaki bozukluklar dolayısıyla, kromozom ayrılmalarındaki veya DNA onarımındaki aksaklıkların ortaya çıkardığı kromozom kırıkları; bölünmekte olan hücrelerde ana çekirdekten ayrı bir mikroçekirdekçik oluşumuna neden olmaktadır. Bu oluşuma yol açan başlıca etkenler, oksidatif stres, mutajen maddelere maruziyet ve DNA metabolizmasındaki bozukluklar olarak sıralanabilir (33). MMA monomerlerine en önemli mesleki maruz kalma solunumla olduğundan, ilk maruziyet bölgesi olarak bukkal hücrelerin uğradığı genetik hasarın ölçümü de, uçucu olan diğer maddeler için olduğu gibi MMA için de önemli bir gösterge niteliği taşımaktadır. Ayrıca COMET (tek hücre jel elektroforez) tekniği de,

insanlarda lenfosit ve tükürük bezi gibi örneklerde metakrilat türevi dental materyallerin oluşturduğu genotoksik etkilerin son dönemdeki en etkili tespit yöntemlerinden biri olarak kullanılmaktadır (34,35).

Nörodejeneratif hastalıklar, diyabet ve kanser gibi, oksidatif stres ve genetik toksisite katkısıyla oluştuğu bilinen birçok kronik hastalığın yanı sıra; özellikle meslek hastalıklarının da bireysel ve toplumsal olarak negatif etkileri dikkate alındığında, ülkemizde protez üretiminde çalışarak çeşitli kimyasallara kronik maruziyeti bulunan bireylerdeki risklerin değerlendirilmesi, büyük önem arz etmektedir.

Gerçekleştirilen bu tez araştırması, söz konusu maruziyet grubunda bir arada incelenecek parametreler bakımından ülkemiz için bir ilk olma niteliği taşımaktadır. Bu tez çalışması ile protez üretimi sırasında, özellikle diş hekimliği ve daha az olarak ortopedi alanında, hem sivil hem de Türk Silahlı Kuvvetleri bünyesindeki sağlık kuruluşlarında sıklıkla kullanılan metakrilat türevlerine, metallere ve partiküllere mesleki olarak maruz kalan personeldeki olası kronik toksik etkilerin, moleküler düzeyde etki ve maruziyet biyogöstergelerinin ölçümleri yapılarak değerlendirilmesi ve buna bağlı olarak risklerin belirlenmesi amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

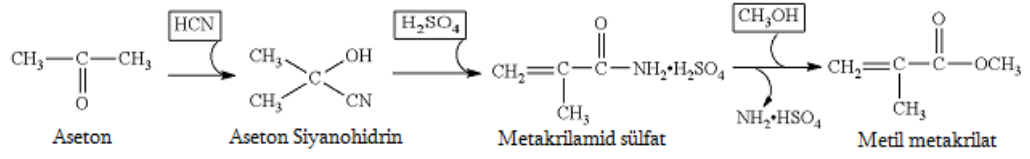
2.1. Protezlerin Tarihçesi

Diş protezlerinin kullanımı, çok eski tarihlere dayanmaktadır ve geçmişten günümüze birçok materyal bu amaçla kullanılmıştır. Geçtiğimiz yüzyılda vulkanit, fenol-formaldehit, selüloz ve vinil yapılı materyaller 1930'lu yıllara kadar yaygın olarak kullanılmışlardır. 1935 yılında, diş protezlerinde akrilik bazlı materyallerin ilk kullanımları görülmüştür. Akrilik yapılı maddelerin sağlamlığı ve uyumu dolayısıyla kullanımları hızla yaygınlaşmış; 1946 yılına gelindiğinde tüm protezlerin % 95'i MMA ile oluşturulan polimerlerden yapılır hale gelmiştir (36). İlk kez Almanya'da sentezlenen MMA' ya ait fizikokimyasal özellikler, Tablo 2.1'de verilmiştir (37).

Tablo 2.1. Metil metakrilat'ın fizikokimyasal özellikleri

Kimyasal Adı – Formülü	2-metil-2-propenoik asit metil ester $C_5H_8O_2$ (CAS no.: 80-62-6)
Fiziksel Durumu	Sıvı
Renk	Renksiz
Koku	Keskin, Meyvemsi
Molekül ağırlığı	100.1158 g/mol
Yoğunluğu	0.944
Kaynama noktası	100.36 °C
Suda çözünürlük	Zayıf (20°C'de 15.3g/L)
Parlayabilirlik	Yüksek
Patlayıcılık	Yok

Dünya çapındaki üretimi yıllık milyon tonlarla ifade edilen MMA, günümüzde halen çok çeşitli endüstriyel ve tıbbi uygulamalarda yaygın olarak kullanılan bir materyal olma özelliğini korumaktadır.



Şekil 2.1. Metil metakrilat sentezi.

Günümüzde tüm dünyada, protez üretimi amacıyla MMA 'ya ek olarak, yeni geliştirilen bazı metakrilat türevleri de kullanılmaktadır. En yaygın olarak kullanılan bazıları, Tablo 2.2 'de formülleriyle gösterilmiştir (29).

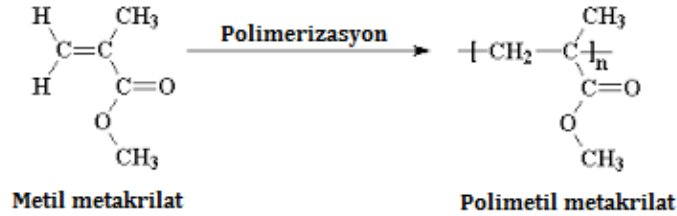
Tablo 2.2. Diş hekimliğinde sık kullanılan metakrilat türevleri.

Metakrilat türevi	Molekül formülü	Yapısı
HEMA	$\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_3$	
TEGDMA	$\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{O}_6$	
BisGMA	$\text{C}_{29}\text{H}_{36}\text{O}_8$	
GDMA	$\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{O}_5$	
MMA	$\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2$	

2.2. Protez Üretimi

Dental protezler, ana madde olan metil metakrilat monomerlerini içeren sıvı ve toz kısımların karıştırılmasıyla, polimer oluşumu şeklinde elde edilmektedirler (Şekil 2.2)(7). Polimerizasyon, karıştırılmayla başlamakta ve iki farklı süreçten oluşmaktadır. İlk aşamada viskoz bir karışım elde edilirken; ikinci aşamada kimyasal olarak materyalin sertleşmesi gerçekleşmektedir. Ancak bu radikal polimerizasyonu, hiçbir zaman % 100 oranında gerçekleştirememektedir.

Mutlak surette bir miktar (genellikle % 2-6 civarı) monomer artık olarak kalmakta ve bu miktar, üç hafta içerisinde % 0,5 düzeylerine kadar düşmektedir (5,29).



Şekil 2.2. MMA'nın polimerleşmesi.

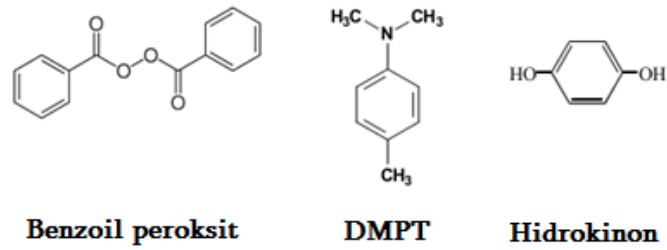
Protezin üretim metoduna göre, kalıntı monomerin miktarı değişiklik göstermektedir. Özellikle polimerizasyon tipi (soğuk veya sıcak), karıştırma zamanı, ısı, karışım oranı ve dozu da, kalıntı monomer miktarını etkileyen faktörlerdir (7). Süre ve ısı artışı, belirli bir yere kadar kalıntı monomer miktarını azaltmaktadır (10).

MMA, diş protezi üretiminden başka ortopedik cerrahideki artroplasti ameliyatlarında da sıklıkla kullanılan bir materyaldir. Bundan başka, insanlarda göz içi lens implantlarında ve takma tırnaklarda kullanımı da söz konusudur (2). Ülkemizde de protez materyali olarak, yoğunlukla MMA ile elde edilen polimerler (PMMA) kullanılmaktadır.

2.3. Protezlerin Bileşiminde Bulunan Metakrilat Dışındaki Maddeler ve Toksik Etkileri

Metakrilat polimerizasyonu için kullanılan sıvı monomer çözeltisinde MMA 'dan başka, polimerizasyon başlatıcı olarak DMPT (N,N-dimetil-p-toluidin) ve istenmeyen reaksiyon inhibitörü olarak hidrokinon (2-100 ppm) bulunmaktadır. Toz kısımda ise, polimerizasyon başlatıcı olarak benzoil peroksit

ve renklendiriciler bulunmaktadır (Şekil 2.3). Tüm bu maddelere bağlı olarak da, protez materyali kaynaklı toksik etkiler açığa çıkabilmektedir (38).



Şekil 2.3. Protez üretiminde kullanılan MMA dışındaki başlıca maddeler.

Protez malzemelerinin karışım öncesi bileşiminde bulunan benzoil peroksit, ilk olarak 1858’de sentez edilmiştir. Benzoil klorür, NaOH ve H₂O₂ reaksiyonuyla elde edilen bu madde, iyi bir serbest radikal kaynağı olması dolayısıyla, plastikleştirme gereksinimi bulunan endüstriyel alanlarda da halen kullanılmaktadır. Bundan başka, tıbbi amaçla akne preparatlarında da kullanımı söz konusudur. Toksisite testleri sonucunda karsinojen, mutajen ya da teratojen etki varlığı saptanmamış olmakla birlikte, özellikle solunum yolu ve gözler için irritan özellikte olduğu bildirilmiştir (39). Tekrarlayan doz toksisite testlerinde ise, NOAEL değeri (oral) 500 mg/kg/gün olarak saptanmıştır (40).

DMPT için başlıca maruziyet yolu ise inhalasyon ve dermal yol olup, birçok test sistemi sonucunda (Ames, Mikroçekirdek ve Kromozomal Aberasyon) genotoksik etkili bulunmuştur. Kronik toksisitesi ve karsinojenitesi hakkında elde bulunan veriler kısıtlıdır ve negatif yöndedir (41).

Bir başka yan madde olan hidrokinon da, hücre kültüründeki *in vitro* toksisite testlerinde (SCE ve Kromozomal Aberasyon) mutajenik etki göstermiştir. Okside olan hidrokinon metabolitlerinin, hücresel makromoleküllere bağlanabildiği ve glutatyon gibi düşük molekül ağırlıklı nükleofillere bağlanmak suretiyle, enzim inhibisyonu ve nükleik asit yapılarında değişiklikler

oluşturabildiği, oksidatif strese yol açabildiği saptanmıştır. Ayrıca, deney hayvanlarındaki karsinogenitesi hakkında da bazı deliller elde edilmiştir (42).

2.4. Metakrilatların Olası Toksik Etkileri

2.4.1. Protez Kullanıcılarında Oluşabilen Etkiler

Tamamlanmayan polimerizasyon sonucunda arta kalan monomerler, protez kullanıcılarında, ağız ortamına sızıntılar sonucu mukozal irritasyon, enflamasyon ve allerjik cevapların ortaya çıkmasına neden olabilmektedirler (10). Sızan metakrilat monomerleri, kullanıcıların ağızında bulunan protezden tükürüğe salınarak, buradan gingiva, mukoza ve tükürük bezine ulaşabilmektedir. Hatta buradan sistemik dolaşıma geçişleri de söz konusu olabilmektedir (35). Protez kullanıcılarında, salınan monomerler dolayısıyla oluşabilen toksik etkiler kullanımın ilk dönemlerinde yüksek düzeyde iken; ilerleyen dönemlerde bu toksisite giderek azalmaktadır (4).

Akrilat türevi protezleri kullananlarda, tükürük karakteristikleri (su içeriği, enzimler, flora, vb.), çiğneme kuvveti ile termal ve kimyasal diyet değişiklikleri (gıda ısısı, ağız içi pH değişimi, gıda katkıları, vb.) gibi bireysel faktörlere bağlı olarak, materyalin biyolojik parçalanması ve olası toksik bileşenlere böylece maruz kalınması söz konusu olabilmektedir (6,43). Monomer sızıntılarına sebep olan madde kaynaklı faktörler ise, polimer karışımındaki toz-sıvı oranı, polimerizasyon metodu (ısı, kimyasal, mikrodalga) ve materyalin özellikleri olarak gösterilmektedir (10).

MMA ve diğer metakrilat türevleri, organizmaya alındıktan sonra başlıca iki ana yolla metabolize edilmektedir (11). Burun mukozası da dâhil birçok dokuda bulunan karboksilesterazlar tarafından hidroliz; bu grup kimyasallar için birincil metabolizma (detoksifikasyon) yoludur (1). Bunun sonucunda, metakrilik asit ve alkol grubu açığa çıkar. Oluşan bu asit yapısı, sitrik asit döngüsü

aracılığıyla CO₂ ve H₂O'ya metabolize olmaktadır (5). Alkol kalıntısı ise, endojen alkoldehidrojenaz enzimi ile metabolize edilmektedir (1). İkinci ana metabolizma yolu da, glutatyon konjugasyonu ile merkaptürik asit oluşumudur. Enzimatik yolla kendiliğinden oluşan bu konjugasyon, yüksek metakrilat konsantrasyonlarında gerçekleşmektedir (11).

Tükürükteki esteraz enzimleri, metakrilatların parçalanmasında önemli paya sahiptir (44,45,46). İnsan tükürük sıvısında, normalde metakrilat türevlerinin parçalanmasını sağlayabilecek yeterlilikte esteraz enzim aktivitesi bulunmaktadır. Bununla birlikte materyalin kimyasal yapısı (karbon zincir uzunluğu gibi), enzimatik parçalanmaya karşı direnç bakımından önemli bir faktördür. UDMA ve Bis-GMA gibi monomerler, bu direnci artırmak amacıyla hizmet etmektedirler (47).

Yapılarında çeşitli metalleri de bulunduran diş hekimliğindeki protez malzemeleri, zaman içerisinde korozyon sonucu bu metal iyonlarını salılabilmekte; salınan bu iyonlar lokal ve sistemik olarak istenmeyen zararlı etkilere yol açabilmektedirler. Sitotoksik olmayan konsantrasyonlarda dahi bu metaller, IL-6 artışı gibi enflamatuar yanıtları ve makrofaj aracılıklı immun yanıtları uyatabilirler (48).

2.4.2. Mesleki Maruziyet Sonucu Oluşabilen Etkiler

Mesleki olarak MMA maruziyeti sonucunda başlıca cilt, solunum ve sinir sistemleri olumsuz yönde etkilenmektedir (7). Metakrilat türevlerine mesleki olarak maruz kalma, başlıca MMA monomerlerine ait buharların inhalasyonu yoluyla gerçekleşmektedir (29). İnhalasyonla MMA maruziyetinde toksikolojik açıdan önemli hedefler, solunum sistemine ait dokulardır (14). Bu şekilde gerçekleşen MMA maruziyetinin düzeyi, üretilen polimer miktarı ve havalandırma koşulları gibi faktörlere göre değişkenlik gösterebilmektedir (2).

Mesleki maruziyetin solunum sistemi üzerine etkilerinin incelendiği bir çalışmada, akrilat türevi protez malzemelerinin solunum yolunda muhtemelen IgE aracılıklı aşırı duyarlılık reaksiyonlarını tetikleyebileceği ortaya konmuştur (49). Ülkemizde yapılmış bir çalışmada da, yıllar boyu aynı ortam ve koşullarda çalışan diş teknisyenlerinde, solunum sisteminin etkilenme düzeyi yedi yıl arayla değerlendirilmiş ve pnömokonyoz gibi solunum sistemini ciddi düzeyde etkileyen meslek hastalıklarında önemli ilerlemeler olduğu sonucuna varılmıştır (50). Protez üretiminin polimerizasyon sonrasındaki uyumlama ve bitim aşamalarında ortaya çıkan tozlara maruziyet, pnömokonyoz oluşumunun altında yatan asıl etken olarak görülmektedir (51).

Diş hekimlerini, diş teknisyenlerini ve hemşireleri kapsayan başka bir araştırmada ise, metakrilat ve akrilat türevlerine mesleki olarak maruz kalmanın ciltteki etkileri değerlendirilmiş; hekim ve hemşirelerde HEMA'nın, teknisyenlerde ise MMA'nın en allerjen özellik gösteren monomer olduğu sonucu ortaya çıkmıştır (3). Akrilik türevi maddeler, cilt üzerindeki olumsuz etkilerinden dolayı ACDS (Amerikan Kontakt Dermatit Topluluğu) tarafından, 2012 yılında "Yılın Temas Allerjisi" olarak seçilmişlerdir (12). Cilt üzerinden geçişi mümkün olan MMA, özellikle ciltte dermatit ve periferik sinir uçlarında parestezi, demiyelinizasyon gibi sorunlara da yol açabilmektedir (52). Akrilat türevlerine karşı, cilt koruma amaçlı kullanılan ve farklı materyallerden üretilmiş eldivenlerin koruyuculuk özellikleri de farklılık göstermektedir. MMA ve HEMA gibi düşük molekül ağırlıklı monomerler, vinil veya lateks yapılı eldivenlerden çok kısa sürelerde (ilk dakika itibarıyla) rahatlıkla geçebilmektedirler. Neopren yapılı eldivenler, diğerlerine göre daha az geçirgenliğe sahip olmakla birlikte (25 dakika koruma), MMA'ya karşı yüksek dayanıklılık gösterememektedirler (12,53). Eldivenler bundan başka, kapatıcı etki yaratarak monomerin hassasiyet oluşturu ve iritan etkilerinin artmasına dahi yol açabilmektedirler (52). Özellikle kısa süreli çalışmalar esnasında 2-3 kat eldiven kullanımının, korunma

amacıyla görece yarar sağlayabileceği önerilmiştir (53). Ancak başka bir çalışmanın sonucunda, dermal yolla MMA maruziyetinin oluşturduğu etkiler bakımından, hiç eldiven kullanmamış olan bir personel ile ara sıra kullanmakta olan personel arasında çok hafif düzeyde bir farklılık bulunduğu görülmüştür (54).

Mesleki olarak çok yüksek düzeylerde MMA maruziyeti bulunan ve büyük fabrikalarda çalışan işçilerin mide, kolorektal ve solunum sistemi kanserleri bakımından potansiyel risklerinin incelendiği bir diğer çalışmada ise, MMA'nın bu kanserlere neden olabileceğine dair yeterli kanıt bulunamamıştır (55).

Dermal yolla MMA maruziyeti ile ortam havasından inhalasyonla maruz kalınan konsantrasyon arasında, etkiler bakımından bir ilişki bulunmamaktadır (54). Laboratuvar ortamındaki MMA konsantrasyonu, laboratuvarın tasarımı ve üretim kapasitesi, havalandırma koşulları, kullanılan donanım ve güvenlik önlemlerine bağlı olarak değişkenlik göstermektedir (51). Polimerizasyon sırasında, inhalasyonla MMA'ya maruz kalan personelin serum düzeyleri, karıştırma başlangıcından itibaren 30 saniye ve 3 dakika aralığında analiz edilmiş; ancak MMA varlığı tespit edilememiştir. Esas itibarıyla, "inhalasyonla maruz kalma" sonucunda serumda MMA tespitinin başarıldığı bir araştırma, henüz bilimsel literatürde bulunmamaktadır (56).

2.5. Düzenleyici Toksikoloji Bakımından Yapılan Testler ve Limitler

Dünyada toksikolojinin gelişimiyle uyumlu olarak, özellikle yaygın maruziyet söz konusu olan kimyasallarla ilgili risk ve limitlerin doğru şekilde tanımlanabilmesi amacıyla, ilgili uluslararası otoriteler tarafından sürekli olarak bilimsel değerlendirmeler yapılmaktadır. Bu kapsamda aynı otoritelerce, önemli bir kimyasal olan MMA'nın ve yanı sıra kullanılan diğer kimyasalların da oluşturabileceği etkilerin toksikolojik değerlendirmesi yapılmış, mesleki maruziyet limitlerinin tespiti gerçekleştirilmiştir.

In vitro ve *in vivo* olarak farklı otoritelerce yapılmış değerlendirmelerin sonuçlarına göre, rodentlerde MMA'nın geniş kapsamlı inhalasyon maruziyeti denemelerinde karsinojenik etki saptanmamıştır. *In vitro* olarak bakteriyel sistemlerde mutajenik değilken; memeli hücre kültürlerinde mutajenik ve klastojenik etkili olduğu görülmüştür. *In vivo* olarak ise, inhalasyon maruziyeti sonucu hedef dokularda toksisite kanıtlarına rastlanmıştır. *In vivo* olarak genotoksisite kanıtlarının kısıtlı olduğu MMA, IARC tarafından Grup 3 (İnsanlarda karsinojenik etki bakımından sınıflandırılmayan kimyasal) olarak değerlendirilmiştir (37). Mesleki maruziyet bakımından da, birçok düzenleyici otorite tarafından MMA için değerlendirme sonucunda TLV değerleri, TWA (8 veya 10 saat) = 50 ppm (210 mg/m³) ve STEL (15 dk) = 100 ppm (410 mg/m³) olarak saptanmıştır (39,57,58,59).

2.6. Metakrilat Türevlerinin Toksik Etki Mekanizmaları

Metakrilatlar, farklı kimyasal yapılarda olmalarına karşın; tamamının ortak özelliği, asit kalıntısının α ve β karbonu arasındaki çifte bağ ile konjuge olmuş karboksilik ester yapısı içermeleridir (Tablo 2.2). Elektrofilik özellikteki β karbonu, glutatyon, DNA ve proteinler gibi nükleofilik yapılarla reaksiyona girebilmektedir. Farklı yapıdaki metakrilat türevlerinin oluşturdukları toksisite mekanizmaları, birbiriyle benzerlik göstermektedir. Bunlar arasında, *in vitro* olarak gözlenmiş olan hücresel glutatyon düzeylerinin azalması, kritik önem taşımaktadır. Metakrilat türevi monomerlerin GSH ile katım ürünü oluşturucu özellikleri, GDMA>Bis-GMA>TEGDMA>HEMA>MMA şeklinde azalarak sıralanmaktadır. GSH ile bağlanma özelliği, bu maddelerin tek toksisite mekanizması olmamakla birlikte; toksik cevapların oluşumunda büyük önem taşımaktadır (29).

Genomik materyal olarak DNA da, dental protez materyallerinin moleküler hedefi konumundadır. HEMA ve MMA gibi metakrilatların DNA

hasarını indükledikleri tespit edilmiş olmakla birlikte, bunlarla doğrudan ilişkilendirilen bir mutasyon henüz bulunmamaktadır (28). MMA'nın karsinogenik etkileri konusunda da, halen delil yetersizliği söz konusudur (2).

Maruz kalınan monomerler, absorbe olduktan sonra epoksi ara ürünler oluşturmakta ve bu ara ürünler de, başta DNA olmak üzere biyolojik moleküllere atak yapabilmektedir. Bunun sonucu olarak, çift sarmal kırıkları gibi hasarlarla başlayan, dolayısıyla mutajenite/karsinogenite 'ye yol açabilen etkiler oluşabilmektedir (60). Metakrilat türevi monomerler, çift sarmal kırıklarını indükleyici etkileri bakımından hücre kültürü üzerinde incelendiğinde, hasar oluşturuca etkilerin Bis-GMA>UDMA>TEGDMA>HEMA sırasıyla azaldığı sonucuna ulaşılmıştır (61). Ayrıca, metakrilat türevi monomerlerin mikroçekirdek sıklığında artışa sebep olduğu, hücre kültüründe yapılan denemelerde gösterilmiştir (62).

MMA 'nın, *in vitro* koşullarda kana eklenişini takip eden dört saat içerisinde metanol'e hidroliz edildiği saptanmıştır (15). MMA'nın hidroliz yoluyla metabolize edilmesi, serumda bulunan non-spesifik esterazlarca gerçekleştirilmektedir. Bundan dolayı, esteraz aktivitesinin düşüklüğü, MMA toksisitesinde artışa yol açabilecek bir etkidir (14). MMA'nın, metakrilik asit ve metanol'e enzimatik olmayan yolla doğrudan hidrolizinin, tükürük'te gerçekleşmesi mümkün değildir (13).

Tıp ve diş hekimliği alanında, daha güvenli metakrilatların kullanımı için denemeler yapılmaktadır. Örnek olarak, polimerizasyonu polietil metakrilat oluşan monomer "butil metakrilat", MMA'ya göre daha az toksik olduğu gözlenmiş bir moleküldür (7).

İnsan vücudundaki birçok hücre türü, zararlı ksenobiyotik etkilerine karşı adaptasyonun bir yolu olarak, metabolizma kapasitesini artırmak gibi değişimler gerçekleştirebilmektedir. CYP3A4, CYP3A7 ve CYP2E1 gibi enzimler,

metakrilatların toksisitesinde değişikliğe neden olabilecek adaylardandır (63). Gelişen bu adaptif cevaplarda en önemli rol oynayan antioksidan ise, enzimatik olmayan glutatyon'dur. Monomerlerin metabolizmalarından başka, glutatyon ile oluşturdıkları katım ürünlerinden dolayı hücre sel glutatyon düzeylerinde azalma meydana geldiği, buna bağlı olarak da ROS miktarının arttığı düşünölmektedir. Bu durumda, okside glutatyon (GSSG) düzeylerinde bir artış oluşmadan; redükte glutatyon (GSH) düzeylerinde, monomerlerin bu etkilerinden dolayı azalma olabileceği ortaya çıkmaktadır (64,65). Günümüze kadar yapılmış çalışmalarda elde edilen bulguların çoğunluğu, metakrilat türevi monomerlerin, reaktif oksijen türlerinin oluşumunda artışa yol açabileceğini ortaya çıkarmıştır (31). Ancak, metakrilat türevlerinin reaktif oksijen türü oluşturucu ve sitotoksik etkileri, doza bağımlıdır (66).

2.7. Oksidatif Stres

Birçok yaşam formu için tehlikeli sayılan oksijen'in, aynı zamanda enerji üretimi için vazgeçilmez olması, "Oksijen Paradoksu" adıyla anılmıştır (24). Oksidanlar ve antioksidanlar arasındaki dengenin, potansiyel olarak zarara yol açacak şekilde oksidanlar lehine kayması durumuna ise "Oksidatif Stres" adı verilmektedir (19). Oksidasyondan korunma; sitotoksik, mutajenik ve karsinojenik etkilere yol açmasından dolayı, tüm aerobik organizmalar için yaşamsal önemi olan bir süreçtir (25). Oksidatif stres, başlıbaşına bir hastalık olarak görülmemekle birlikte yaşlanma, kanser ve nörodejeneratif hastalıklar gibi birçok hastalığın önemli bir bileşeni olarak değerlendirilmektedir (27). Normal fizyolojik koşullarda pro-oksidan ve antioksidan dengesi, hafif şekilde pro-oksidanlar lehinedir; yani normal şartlarda da organizmada bir miktar oksidatif stres zaten mevcuttur (67). Hücreler, genellikle hafif düzeydeki oksidatif stres durumunu, koruyucu ve onarıcı sistemleri aracılığıyla tolere edebilmektedirler. Ciddi boyutlara ulaşması halinde oksidatif stres, hücre ölümüne dahi yol

açabilmektedir (26). Oksidatif stresin oluşumunda, iç ve dış kaynaklı birçok etkenin değişik düzeylerde rolü bulunmaktadır. Dengesiz veya yetersiz besin değerine sahip olan beslenme tarzı dahi, hücrel savunma mekanizmalarını bozduğu için, dolaylı yoldan oksidatif stres oluşumuna katkıda bulunmaktadır (68).

2.8. Serbest Radikaller ve Reaktif Oksijen Türleri

Oksidatif stres oluşumu, vücutta meydana gelen ve çabuk reaksiyona girebilen, oksijen veya nitrojen türevi radikal veya radikal olmayan özellikteki ürünlerin aktiviteleri sonucu gerçekleşmektedir. Serbest radikal tanımı, tek başına varlığını sürdürebilen (serbest) ve bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron içeren (radikal), bundan dolayı kararsız kimyasal doğaya sahip olup, reaktif özellik sergileyen moleküler türler için kullanılmaktadır. Bu özellikleri dolayısıyla söz konusu reaktif türler DNA, RNA, protein ve lipidlerle reaksiyona girerek hücrede toksik etkiler oluşturabilmektedirler. Serbest radikal tanımı, hem reaktif oksijen türlerini (süperoksit, hidroksil, hidroperoksil, peroksil, alkoksil, vb.), hem de reaktif nitrojen türlerini (nitrik oksit, peroksinitrit, nitrojen peroksit, vb.) tanımlamada kullanılabilmektedir (Tablo 2.3). Serbest radikal özelliği bulunmayan, ancak reaktif özellikte olan hidrojen peroksit ve nitrik oksit gibi moleküller de, oksidatif stres oluşumunda önemli rol oynamaktadırlar (Şekil 2.4). Serbest radikaller, genel itibarıyla vücudumuzun gıda ve oksijenden enerji elde etmesi sırasında oluşmaktadır. Bunun yanında mikrobiyal enfeksiyonlar, iyonize edici radyasyon, kirleticilere ve toksinlere maruz kalma, aşırı egzersiz, sigara, alkol, pestisitler gibi birçok etken de serbest radikal oluşumuna sebep olmaktadır (69).

Tablo 2.3. Bazı önemli reaktif oksijen/nitrojen türevleri.

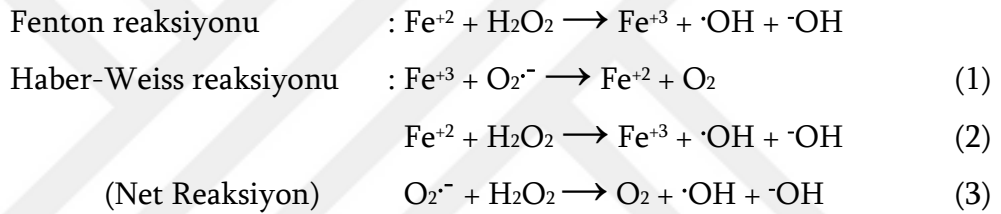
<u>Reaktif Oksijen Türü</u>	<u>Sembolü</u>	<u>Reaktif Nitrojen Türü</u>	<u>Sembolü</u>
Hidroksil	$\text{OH}^\bullet$	Nitrik oksit	$\text{NO}^\bullet$
Süperoksit	$\text{O}_2^{\bullet -}$	Peroksil	$\text{RO}_2^\bullet$
Lipid peroksil	$\text{LOO}^\bullet$	Peroksinitröz asit	ONOOH
Hidrojen peroksit	H_2O_2	Nitroksil anyonu	NO^-
Singlet oksijen	$^1\text{O}_2$	Nitrojen dioksit	$\text{NO}_2^\bullet$
Hipokloröz asit	HOCl	Dinitrojen trioksit	N_2O_3
		Nitröz asit	HNO_2
		Nitril klorür	NO_2Cl
		Nitrozil katyonu	NO^+

Reaktif oksijen türleri, genellikle kısa yarı ömürlü olmaları dolayısıyla yalnızca bulundukları yerlerde hasar oluşturabilirler; ancak H_2O_2 gibi uzun yarı ömre sahip türler, bulundukları yerden daha uzak bölgelerde de hasar oluşturma yeteneğine sahiptirler (70). Reaktif oksijen türleri arasında en çok ilgi duyulanlar, hidroksil ve süperoksit radikalleri ile hidrojen peroksit olmuştur. Ancak, süperoksit radikali ve H_2O_2 molekülü, düşük kimyasal reaktivliğe sahip olduğundan DNA, protein ve lipid gibi hücresel yapılarla reaksiyona girememektedir. Hidroksil radikali ise, farklı olarak yüksek reaktivlik özelliği sayesinde DNA'daki purin (Adenin/Guanin C8-OH katım radikalleri) ve pirimidinlerle (Sitozin/Timin C5-OH ve C6-OH katım radikalleri) reaksiyona girebilmektedir (71). Süperoksit, hidroksil, peroksinitrit gibi radikaller, lipid tabakalara sahip olan hücre zarını serbest halde geçememektedirler (72). Ancak, nitrik oksit ve hidrojen peroksit, membranlardan difüze olabilen moleküllerdir. Hidroksil radikaline göre daha az reaktif ve daha uzun ömürlü olduklarından, hücre içi ve hücreler arası sinyal molekülü olarak da işlev görebilmektedirler (73).

DNA sarmallarında doğrudan oluşan kırıklar, kimyasallar veya metabolitlerince oluşturulan reaktif oksijen türlerinin, DNA ile etkileşmesi sonucu ortaya çıkmaktadırlar (74). Başta hidroksil radikali ($\text{OH}^\bullet$) ve daha az

reaktif olmak üzere singlet oksijen ($^1\text{O}_2$) molekülleri guanin, histidin, triptofan ve tirozin gibi spesifik hedeflere saldırmak suretiyle, DNA ve protein yapılarıyla etkileşime girebilirler (70). Hidroksil radikali bundan başka, DNA yapısında oluşturduğu tek ve çift sarmal kırıklarından dolayı genomik bütünlüğe zarar verebilmekte; böylece gen ekspresyonunda bozulmalar oluşabilmektedir (69).

In vivo olarak yarı ömrünün 1 ns'den daha kısa olması dolayısıyla çok yüksek reaktiviyete sahip olan hidroksil radikalının demir, bakır, krom, kobalt ve diğer bazı geçiş metalleri aracılığıyla oluşması, başlıca Fenton ve/veya Haber-Weiss reaksiyonu sonucu gerçekleşmektedir (16,75).



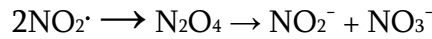
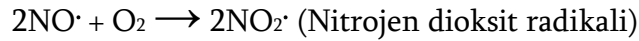
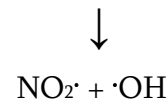
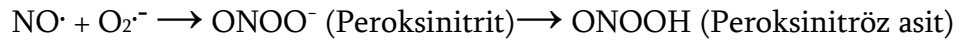
Oksijenin belki de en reaktif ve toksik formu olan hidroksil serbest radikali, yüksek reaktifliği ve kısa yarı ömrü dolayısıyla baz, şeker ve serbest nükleotit gibi en yakınındaki hücresel yapıyla reaksiyona girme eğilimi göstermektedir. Bu radikalın öncü molekülü olan hidrojen peroksit ise, daha az reaktiftir ve daha çok baz oksidasyonuna yol açmaktadır (75). *In vivo* olarak hidroksil radikalını süpürecek hızda bir antioksidan molekül, hâlihazırda mevcut değildir. Hidroksil radikali gibi alkoksil radikalleri de, birçok biyolojik moleküle, antioksidanların temizleyemeyeceği kadar hızlı etkileşime girmektedirler (76).

Süperoksit anyon radikali, mitokondri'de normal oksidatif fosforilasyon sürecinin bir yan ürünü olarak ortaya çıkmaktadır (77). Neredeyse hiç enerji gerektirmeden, difüzyonla reaksiyona girebilen bu radikal, $\text{Fe}^{+3} \rightarrow \text{Fe}^{+2}$ dönüşümüyle, depolanan demirin serbest hale geçmesini sağlar. Hidrojen peroksit

ile reaksiyon sonucunda, önemli toksisiteye sahip hidroksil radikali oluşur (Süperoksit aracılıklı Fenton Reaksiyonu = Haber-Weiss Reaksiyonu)(25).

Normalde “süperoksit dismutaz (SOD)” enzimi tarafından etkisizleştirilen süperoksit anyon radikali, kararında üretildiği zaman normal ve kullanışlı bir metabolittir ve hücre bölünmesi gibi önemli olaylarda, sinyal molekülü olarak görev almaktadır. Süperoksit anyon radikali, bunun yanı sıra organizmanın adaptasyonunu sağlaması bakımından kimi zaman yararlı da olabilen, DNA mutasyonlarına da sebep olmaktadır (27).

Süperoksit anyon radikali, yine reaktif bir molekül olan nitrik oksit ile çabuk reaksiyon verme özelliğine sahiptir ve bu iki molekülün “nitrik oksit sentetaz” ve “NADPH oksidaz” gibi enzimler aracılığıyla reaksiyona girmesi sonucu, peroksinitrit ve nitrojen dioksit gibi “Reaktif Nitrojen Türleri” açığa çıkmaktadır (77). Peroksinitrit, hücreler arasında taşınabilir özelliktedir. Enflamasyon sırasında aktifleşmiş makrofajlarca da oluşturulan bu molekül, DNA bazlarında hasara yol açabilmektedir (75).

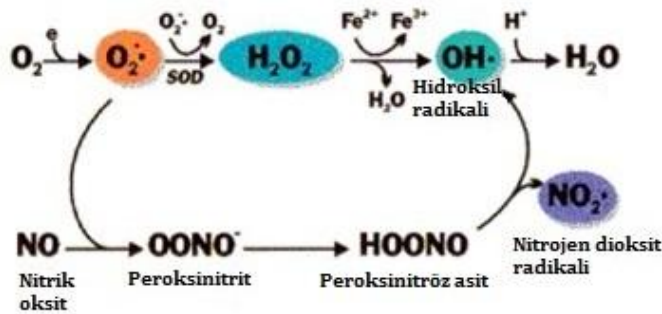


Reaktif özellikli diğer bir molekül olan nitrik oksit’in ($\text{NO}\cdot$) yarı ömrü, birkaç saniye kadardır. Ancak, düşük oksijen konsantrasyonlarında stabilitesi artmakta ve yarı ömrü 15 sn.’ye kadar uzamaktadır. Hem hidrofilik hem lipofilik ortamlarda çözünebilen nitrik oksit, bu sayede plazma membranlarında ve

sitoplazmada rahatlıkla ilerleyebilmektedir. Aynı zamanda, hücre dışı ortamlarda oksijen ve suyla reaksiyona girerek, nitrit ve nitrat anyonlarını oluşturmaktadır (16).

2.8.1. Serbest Radikal Oluşturan Başlıca Hücresel Yapılar

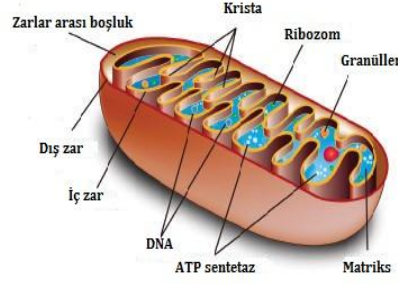
Hücresel oksijen tüketimi, birçok metabolik reaksiyonda ve başta mitokondri, peroksizomlar ve endoplazmik retikulum olmak üzere; farklı hücresel bölgelerde gerçekleşmektedir (73). Bundan dolayı, reaktif oksijen türleri'nin oluşumu iç (Fenton reaksiyonu, mitokondriyal elektron taşıma zinciri, peroksizomal β -oksidasyon ve endoplazmik retikulumda bulunan CYP450 metabolizma enzimleri, enflamatuar fagositik hücre aktivasyonu) ve ayrıca dış (sigara, alkol, UV ışık, iyonizan radyasyon, ozon, kimyasallar) kaynaklı olabilmektedir (28,69).



Şekil 2.4. Reaktif oksijen/nitrojen türevlerinin oluşumu.

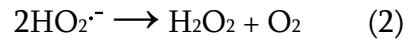
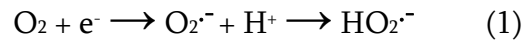
Mitokondri, oksijen tüketiminin ve dolayısıyla süperoksit ve hidrojen peroksit gibi reaktif ürünlerin oluşumunun gerçekleştiği başlıca organel konumundadır (78,79). Bundan dolayı, membran kısmının her iki yanında bulunan SOD, GPx gibi antioksidan enzimler ve glutatyon gibi antioksidan moleküller bakımından da zengin durumdadır. Süperoksit dismutaz enziminin insan hücrelerinde bulunan alt türlerinden Mn-SOD enzimi, mitokondrinin

matriks kısmında yer alırken; Cu,Zn-SOD enzimi iç ve dış membranların arasındaki boşlukta bulunmaktadır (Şekil 2.5)(16).



Şekil 2.5. Mitokondri'nin yapısı.

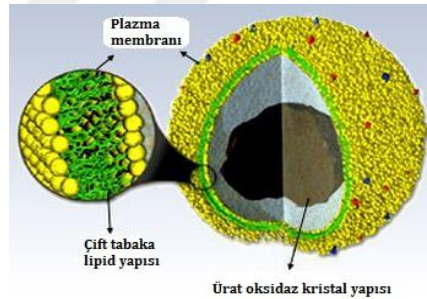
Mn-SOD enzimi tarafından, mitokondri'de oluşan süperoksit radikali dismutasyona uğrayarak, H_2O_2 oluşur. Bu aşamadan sonra, geçiş metal iyonları varlığında Fenton ve/veya Haber-Weiss reaksiyonları sonucu, yüksek reaktivliğe sahip olan hidroksil radikali açığa çıkar (80). SOD tarafından katalizlenen süperoksit radikalinin dismutasyon reaksiyonunda, ara ürün olarak hidroperoksil radikali de oluşmaktadır (73).



Mitokondri'de oluşmuş olan süperoksit anyon radikali, enzimatik olmayan yolla da, hidrojen peroksit ve singlet oksijen'e dönüştürülebilmektedir. Akut hipoksi gibi durumlarda, kemotaktik moleküller, sitokinler ve adipokinler gibi enflamatuar aracı moleküllerin arttığı durumlarda, mitokondriyal elektron taşıma zinciri tarafından reaktif oksijen türlerinin üretimi aşırı düzeyde gerçekleşmektedir (17). Bununla birlikte, mitokondrideki reaktif oksijen

türlerinin kesin üretim mekanizması, halen tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır (79). Mitokondriyal süperoksit ve hidrojen peroksit'in makul miktarları, hücrenin yaşamını sürdürebileceği sinyal yollarının aktive edilmesi ve hormesis mekanizmasına dayalı hastalık direncinin sağlanmasında önemli role sahiptir (81).

Peroksizomlar, şekil esnekliğine sahip ve dinamik yapıları organellerdir (Şekil 2.6). Peroksizomlardaki solunum mekanizması, oksidatif fosforilasyonla bağıntılı değildir ve sonucunda ATP oluşmamaktadır. Burada gerçekleşen yağ asidi oksidasyonları sonucu oluşan serbest enerji, ısı olarak açığa çıkmaktadır (73,82). Peroksizomlar, membran lipid bileşiminin ideal tutularak hücrenin oksidatif strese karşı korunmasına yardımcı olmaktadır (21). Yapısında “hem” olan veya olmayan, ancak demir bulunduran enzimleri de yüksek miktarlarda içermektedirler (83).



Şekil 2.6. Peroksizom'un yapısı.

Peroksizomlar, normal katalitik aktivitelerinin sonucu olarak, hücrede oksijen tüketimi gerçekleştirirler. Bundan dolayı da, ksantin oksidaz gibi süperoksit oluşturan ve nitrik oksit sentetaz-2 (NOS2=iNOS) gibi nitrik oksit oluşturan enzimleri içermelerinin yanı sıra; bunları etkisizleştiren antioksidan enzimleri (hidrojen peroksit için CAT ve GPx, süperoksit radikali için SOD-1, peroksinitrit için peroksiredoksin-5, epoksitler için epoksit hidrolaz-2 ve lipid peroksitler için GST-κ) de bünyelerinde barındırmaktadırlar (21,79,84). Memeli

peroksizomlarında, enzimler aracılığıyla hidroksil veya peroksinitrit radikallerinin üretildiğine dair, günümüzde kanıt bulunmamaktadır. Ancak, enzimatik yolla peroksizomlarda süperoksit radikali ve nitrik oksit üretimi söz konusudur ve bu iki molekülün kinetik olarak reaksiyonu sonucu, peroksinitrit oluşabilmektedir (83). Peroksizomlarda H_2O_2 oluşumuna sebep olan başlıca metabolik süreçler ise, yağ asitlerinin β -oksidasyon reaksiyonları, flavin oksidazların enzimatik reaksiyonları ve süperoksit radikalının etkisizleştirilme süreci olarak sıralanabilir.

Ksenobiyotikler gibi bazı etkenlerle, peroksizomlarda genellikle karmaşık formda bulunan demir ve bakır gibi geçiş metal iyonları salınarak, Fenton reaksiyonu aracılığıyla hidroksil radikali oluşumuna ve sonrasında lipid peroksidasyonu sonucu membran hasarına; böylece peroksizomal fonksiyon kayıplarına sebep olabilmektedirler (73). Peroksizomlardaki fonksiyon kayıpları sonucunda, yağ asitleri ve ftanik asit gibi toksik maddelerin birikimi ve miyelin lipidleri gibi peroksizom ürünlerinin kısalığı oluşabilmektedir. Sayılan bu bozukluklardan dolayı, sinirlerde miyelin defektleri, hepatomegali, siroz ve kraniofasyal dismorfî gibi erken çocukluk döneminde ölüme yol açan durumlar ortaya çıkabilmektedir (85).

Dolaşımda bulunan nötrofiller gibi fagositik hücreler tarafından da, enfekte hücrelerde hasar oluşturan süperoksit, nitrik oksit ve peroksinitrit gibi reaktif türler üretilmekte; böylece enflamatuar hücreler, oluşturdukları reaktif oksijen türleri sayesinde bakterileri öldürmek gibi yararlı bir işlev de görmektedirler (77,79). Oluşan H_2O_2 ile fagositik bir enzim olan myeloperoksidaz etkileşerek, klor iyonlarının varlığıyla hipokloröz asit (HOCl) oluşturmakta ve bu sayede çok çeşitli patojenler üzerinde antibakteriyel aktivite görülebilmektedir (Şekil 2.8). Ancak, enflamatuar yanıtın bir parçası olarak oluşan HOCl, güçlü oksidan özelliği dolayısıyla vücudun kendi hücresel bileşenlerinin de

oksidasyonuna yol açabilmekte; hatta bunun sonucu apoptoz veya nekroz dahi olabilmektedir (86).

Fagositler tarafından oluşturulan süperoksit, hipokloröz asit ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türleri, çok çeşitli bakteri ve mantar türlerine karşı önemli bir savunma sergilemektedirler. Süperoksit radikali, fagositlerin yanı sıra lenfosit ve fibroblast gibi hücre türleri tarafından da oluşturulmaktadır (87).

Mikrozomlar da normal fizyolojik koşullarda hücre içerisinde hidrojen peroksit üretebildiği için, önemli hücresel ROS kaynakları arasında yer almaktadırlar (16). Hücrede, bunların dışındaki diğer ROS/RNS kaynakları olarak plazma membranındaki NADPH oksidazlar, peroksizomlardaki flavin oksidazlar ve farklı bölgelerde bulunan nitrik oksit sentetazlar sıralanabilir (88).

2.9. Antioksidan Savunma Sistemleri

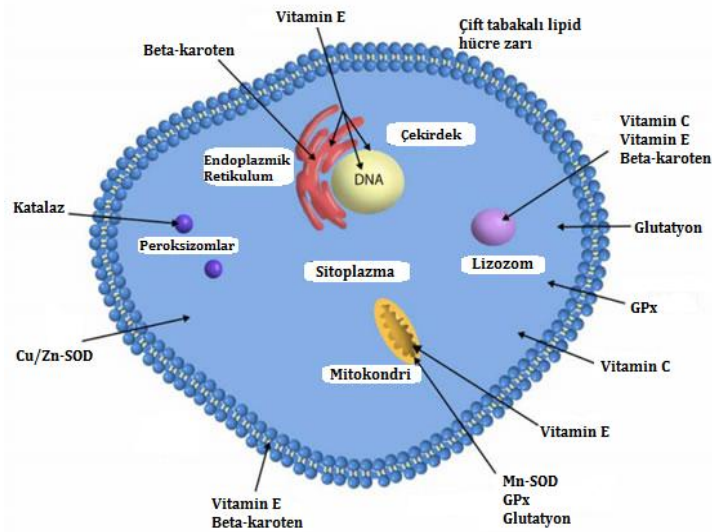
Reaktif oksijen türlerinin zararlı etkileri, vücut tarafından antioksidan enzimler ve enzimatik olmayan antioksidanların işlev görmesiyle dengelenmeye çalışılmaktadır. Antioksidan bir molekül serbest radikalle etkileştiği zaman, onu radikal olmayan kararlı bir ürüne dönüştürürken; kendisi de antioksidan türevi radikal oluşturmaktadır. Antioksidan'ın etkinliğinin bilinmesinde, bu radikalın yazgısı önem taşımaktadır. Bu durumda, antioksidanların birlikte hareket edebiliyor olmaları önem arz etmektedir (76).

İyi bir antioksidan molekül, şu özelliklere sahip olmalıdır (16);

- Özel olarak serbest radikalleri süpürebilmeli
- Redoks metallerini bağlayabilmeli
- Diğer antioksidanları rejenere edebilmeli/onlarla birlikte aktivite gösterebilmeli
- Gen ekspresyonunu olumlu yönde etkilemeli

- Absorbe edilebilir olmalı
- Dokularda ve biyolojik sıvılarda, fizyolojik olarak etkili düzeylerde bulunmalı
- Hidrofilik ve lipofilik ortamlarda işlev görebilmeli

Önemli bazı antioksidan moleküller GPx, SOD, CAT gibi enzimler ile askorbik asit, α - tokoferol, vitamin A, β -karoten, metallothionein, melatonin, NADPH, adenosin, koenzim Q₁₀, ürik asit, ubiquinol, flavonoidler, homosistein, taurin, metionin, resveratrol, glutatyon, gibi enzimatik olmayanlar olarak sıralanabilirler (25). Gerek SOD, GPx ve katalaz gibi antioksidan enzimlerin düzeylerinde; gerekse glutatyon, Vitamin C ve tiyoredoksin gibi enzimatik olmayan antioksidanların düzeylerinde oluşan değişimler, insanlardaki birçok kanser olgusunda kanıtlanmış durumdadır (89). Antioksidan maddeler, metal iyonlarını indirgeyebilme özellikleri bakımından da önem arz etmektedirler (76). Ayrıca, bazı antioksidanlar sadece hidrofilik (Vitamin C gibi) veya sadece lipofilik ortamlarda (Vitamin E gibi) etki gösterebilirken, bazıları (α -lipoik asit gibi) hem hidrofilik hem de lipofilik ortamlarda aktif olabilmektedirler (16).



Şekil 2.7. Antioksidanların hücre içerisindeki aktivite bölgeleri.

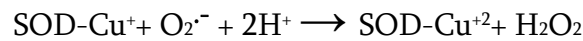
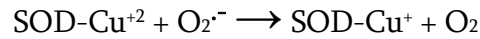
2.9.1. Enzimatik Savunma Mekanizmaları

Süperoksit dismutaz (SOD) enzimi

Süperoksit dismutaz enzimi (EC 1.15.1.1), süperoksit radikalının hidrojen peroksite dönüşmesini sağlar ve oluşan H_2O_2 , katalaz ve glutatyon peroksidaz tarafından yok edilebilir (25).



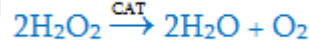
SOD ailesinin tüm üyeleri, aktif merkezlerinde geçiş metallerini barındırırlar (24). İnsanda, sitozolik (Cu/Zn-SOD, SOD1), mitokondriyal (Mn-SOD, SOD2) ve ekstrasellüler (EC-SOD, SOD3) olarak üç farklı formda süperoksit dismutaz bulunabilmektedir. Özellikle, bakır ve çinko içeren iki aktif merkeze sahip olan Cu/Zn-SOD enziminin, süperoksit radikalının temizlenmesinde en önemli rolü oynadığı bilinmektedir.



Mn-SOD enziminin, antitümöral aktivitesi de bulunmaktadır ve aktif bölgesinde Mn^{+3} içermektedir (16). Solunum zincirini içermesi dolayısıyla, oksijen radikallerinin hücredeki asıl kaynağı olan mitokondride bulunmaktadır ve bu radikalleri yok etmek gibi önemli bir görevi vardır. EC-SOD ise, bakır ve çinko içeren, ekstrasellüler sıvıda ve interstisyel doku boşluklarında bulunan, glikoprotein yapılı bir enzimdir. Herhangi bir oksidan tarafından indüklenemeyen bu enzimin memeli dokularındaki regülasyonu sitokinler tarafından sağlanmaktadır (25).

Katalaz (CAT) enzimi

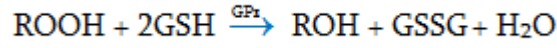
Katalaz enzimi (EC 1.11.1.6), hücrede “peroksizom” adlı organelde bulunmaktadır. En hızlı aktivite gösteren enzimlerden biri olan katalaz’ın her bir molekülü, dakikada yaklaşık olarak altı milyon hidrojen peroksit molekülünün su ve oksijene dönüşümünü sağlamaktadır (16). Katalaz, homotetramerik ve “hem” içeren bir enzimdir. Memelilerde katalaz, aynı zamanda bir oksidaz özelliği de göstermekte ve substrat olarak H_2O_2 bulamadığında, oksijeni de kullanabilmektedir. Katalaz enzimi, organizma için çok büyük önem arz etmekle birlikte, aktivitesi yaşamsal öneme sahip değildir (83). Bilinen en etkili enzimlerden olan katalaz’ın aktivitesi, H_2O_2 tarafından hiçbir konsantrasyonda durdurulamaz (25).



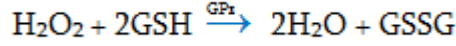
Katalaz enzimi genellikle peroksizomlarda oluşan H_2O_2 moleküllerini parçalarken; sitoplazmadaki H_2O_2 moleküllerinin parçalanması ise GPx tarafından sağlanmaktadır (24).

Glutasyon peroksidaz (GPx) enzimi

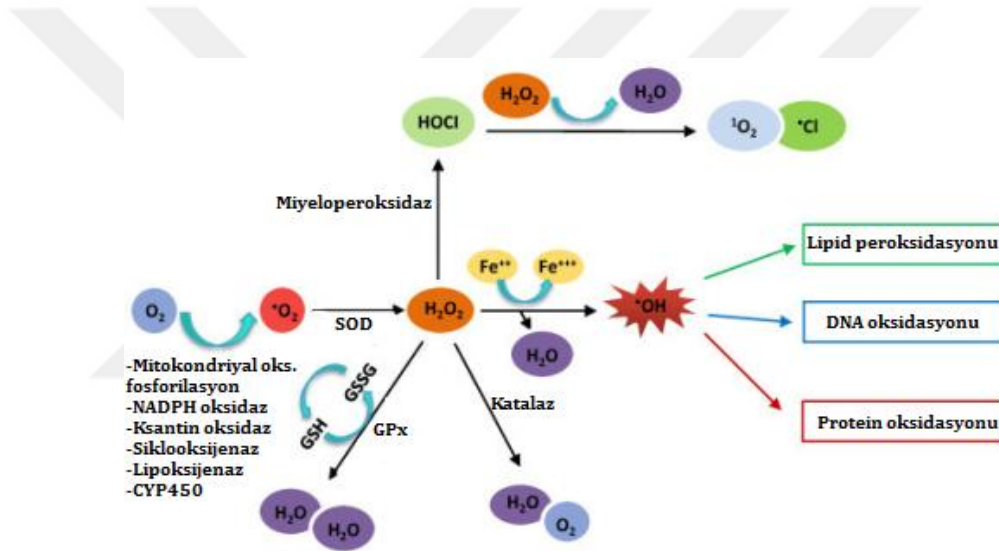
GPx enzimi (EC 1.11.1.9), dört alt ünitesinin herbirinde, etkinliği için gerekli olan selenyum atomunu içerir ve H_2O_2 ’nin yanında birçok başka hidroperoksit’in indirgenmesini katalizleyerek, hücreyi oksidatif hasara karşı korur. Bu işlevleri esnasında, indirgenmiş glutatyon (GSH) molekülüne ihtiyaç duyar. Özellikle insan eritrositlerinde, H_2O_2 detoksifikasyonu için birincil önemdeki enzim, GPx olarak bilinmektedir (25).



veya,



GPx enzimi, hücrede yüksek düzeylerde (μM) bulunan glutatyon ile ortak çalışmaktadır ve hem H_2O_2 hem de organik peroksitleri, sırasıyla su ve alkole dönüştürmektedir. H_2O_2 için katalaz ile yarışan GPx, kendi redoks döngüsüyle düşük düzeydeki oksidatif strese karşı vücudun asıl koruma kaynağıdır (16).



Şekil 2.8. Serbest radikallere karşı antioksidan enzimlerin aktiviteleri.

Diğer enzimler

Bir başka önemli antioksidan enzim olan “DT diaforaz (Kinon redüktaz; EC 1.6.5.2)”, birçok çevresel ajan ve kinonoid ilaçları, daha güvenli sayılabilecek “kinol” formuna dönüştürülerek, diğer enzimlerce konjugasyon ve atılımına hazırlar (24). Tiyoredoksin de, hücre içi redoks ortamının sürdürülebilmesi için glutatyon sistemiyle birlikte çalışan oksidoredüktaz bir enzimdir (17).

2.9.2. Enzimatik Olmayan Savunma Mekanizmaları

Glutasyon

Vücut için enzimatik olmayan antioksidanlar arasında belki de en önemlisi, tiyol yapılı bir tripeptit olan glutasyon'dur. Hücre içi glutasyon havuzu sitozol, mitokondri, endoplazmik retikulum ve çekirdek kısımlarındaki moleküllerden oluşmaktadır (80). Glisin, sistein ve glutamik asit'ten oluşan glutasyon, hem indirgenmiş formda (GSH), hem de yükseltgenmiş disülfid formunda (GSSG) bulunmaktadır. Redükte glutasyon, toplam glutasyon'un % 98'den fazlasını oluşturur. Ökaryotik hücrelerde ana glutasyon depoları (% 85) sitozol'de bulunurken, kalan kısım çoğunlukla (% 10-15) mitokondri'de ve bir miktar da endoplazmik retikulum'da depolanmaktadır (90).

Reaktif Oksijen Türleri'ne karşı ilk savunma glutasyon tarafından oluşturulurken, ikincil savunma da ona bağımlı enzimler tarafından oluşturulmaktadır (91). Glutasyon, tiyol grubunun yüksek nükleofilik potansiyeli dolayısıyla, birçok reaktif elektrofil için iyi bir süpürücü özelliği taşır (92). Reaktif oksijen türleri'nin artması veya HNE gibi reaktif oksijen türleri oluşumuna yol açan moleküller, glutasyon'un sentezini artırmak suretiyle miktarında artışa sebep olabilmektedirler (16). Bu yönüyle hücrenin glutasyonu indirgeme veya sentezleme yeteneği, oksidatif stresle mücadele yeteneğini gösteren bir anahtar niteliği taşımaktadır (25).

Glutasyon, memeli hücrelerinin sitoplazmasında, sırasıyla hız kısıtlayıcı enzim olan 'γ-glutamilsisteinil sentetaz (veya Glutamat sistein ligaz-GCL)' ve 'glutasyon sentetaz (GS)' enzimleri tarafından sentezlenmektedir ve bu basamaklarda, ATP yanında Mg^{++} veya Mn^{++} da kullanılmaktadır (93). Sentezdeki ilk basamağı oluşturan GCL enziminin (EC 6.3.2.2), ağır ve hafif alt üniteleri bulunmaktadır. Her iki alt ünite de farklı genler tarafından kodlanmaktadır ve farklı dokularda farklı düzeylerde eksprese edilmektedir (94). Katalitik

aktiviteden sorumlu olan ağır alt ünite 637 aminoasit'ten oluşmaktadır. Düzenleyici işleve sahip hafif alt ünite ise 274 aminoasit'ten oluşur (95).

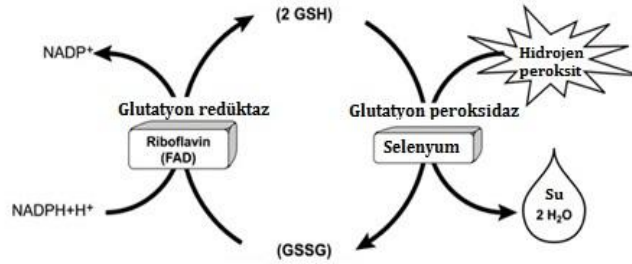
Glutasyon düzeylerindeki artışlar, GCL enziminin (kendisini kodlayan genin artan ekspresyonu sonucu) indüklenmesi ve sistein aminoasiti'nin kullanılabilirliği sayesinde oluşmaktadır (94). Glutasyon molekülü aynı zamanda, aktivitesi için gerekli olan sülfidril grubunu bulunduran sistein aminoasiti'nin deposu ve taşıyıcısıdır (96). Glutasyon artışına yol açan başlıca etkenlere, oksidatif stres, faz 2 enzimlerini aktive eden maddeler, antioksidanlar, ilaca dirençli tümör hücreleri, hormonlar ve diyabet örnek verilebilir (93). GCL enziminin her iki alt ünitesi de, oksidatif stres oluşturan etkenler tarafından, kendilerini kodlayan genlerin transkripsiyonel aktivasyonu aracılığıyla indüklenmektedir (91).

Glutasyon, sentezinden sonra plazma membrandan geçebilir ve organlar arasında taşınabilir. Başlıca sentez bölgesi olan karaciğerden kan dolaşımı ile diğer dokulara ulaşabilir (97). Sistemik olarak glutasyon homeostazı ve plazma glutasyonunun neredeyse tamamı, karaciğer tarafından sağlanır. Hücrel savunmanın artırılmasına ihtiyaç duyulan durumlarda, GCL enziminin ekspresyonu artırılarak, glutasyon seviyeleri artış sağlanmaktadır (90).

Aktif olan indirgenmiş form, oksidatif stres sonucunda okside olarak disülfid formuna dönüşür ve GSH/GSSG oranı da, hücrel oksidatif stresin bir biyogöstergesi sayılmaktadır (98). Normal fizyolojik koşullarda, karaciğer gibi dokularda 100/1 kadar olabilen GSH/GSSG oranı, oksidatif stres ve apoptosis gibi durumlarda düşüş gösterebilmektedir (99).

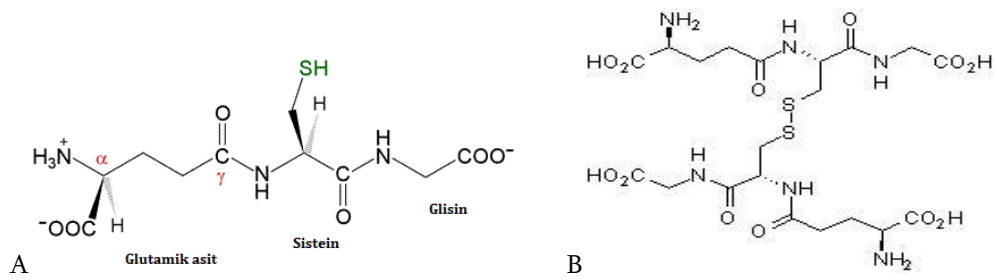
İki molekül GSH' un okside olarak disülfid bağıyla bağlanmasına karşılık, bir molekül H_2O_2 indirgenmektedir. Glutasyon redüktaz enzimiyle, NADPH aracılığıyla bir molekül GSSG, yine iki molekül GSH haline getirilir. Bu sayede, GPx enziminin aktivitesinin sürekliliği sağlanmaktadır (Şekil 2.9)(24). Glutasyon'a ait redoks döngüsü, düşük düzeydeki oksidatif strese karşı birincil

önemdeki korunma kaynağı iken; yüksek düzeydeki oksidatif stres için bu koruyuculuk başlıca katalaz tarafından sağlanmaktadır (100).



Şekil 2.9. Glutasyon indirgenme-yükseltgenme (redoks) döngüsü.

Okside formdaki glutasyon'un yüksek düzeylere çıkması durumunda, diğer enzimlerde de oksidatif hasar oluşabilmektedir. Glutasyon'un, hücrel redoks ortamını dengeleyerek, hücreyi apoptosis'e karşı koruma işlevi de bulunmaktadır (16).



Şekil 2.10. Glutasyon'un indirgenmiş (A) ve yükseltgenmiş (B) formları.

Glutasyon molekülünün oksidatif strese karşı başlıca koruyucu görevleri şöyle sıralanabilir (93,101);

- Glutasyon peroksidaz ve Glutasyon-S-transferaz gibi detoksifiye edici enzimler için, kofaktör olarak görev yapar
- Plazma membranından aminoasit taşınmasında rol alır
- Hidroksil radikali ve singlet oksijen için doğrudan süpürücü etki gösterirken, H_2O_2 ve lipid peroksitlere karşı GPx ile birlikte görev yapar
- Vitamin C ve E gibi önemli antioksidanları, aktif formlarına rejenere etme özelliği taşır
- Proteinlerin tiyol gruplarının korunması ve oksidatif stres sonucu oluşmuş disülfit bağlarının indirgenmesini sağlar
- Sistein depolanması ve taşınmasını sağlar.

Glutasyon'un bunların dışındaki önemli fonksiyonları arasında, lökotrien C4 ve türevlerinin sentezi de bulunmaktadır (102).

Diğer Moleküller

İnsan vücudunda, hidrofilik ve/veya lipofilik ortamlarda etki gösterebilen birçok antioksidan molekül vardır. Sulu fazda aktif antioksidanlar arasında, Glutasyon'dan başka Vitamin C en başta gelmektedir. Ürik asit, flavonoller ve seruloplazmin; bu gruptaki diğer örnekler olarak sıralanabilir. Membran bağlı (lipofil) antioksidan olarak da başlıca Vitamin E gelirken; ubikinon ve β - karoten gibi moleküller de bu grupta bulunmaktadır (24).

Askorbik asit (Vitamin C), önemli ve güçlü bir antioksidan olup; vücutta göz ve akciğer de dâhil birçok hidrofilik ortamda bulunabilmektedir. Antioksidan özelliği sayesinde, çeşitli uyarılar tarafından tetiklenen hücre ölümüne karşı da koruma sağlayan Vitamin C, tek başına aktivite gösterebildiği gibi, Vitamin E ve karotenoidler gibi diğer antioksidanlarla da işbirliği yapabilmektedir (16). Askorbik asit, ortamda serbest olarak bulunan geçiş metal iyonları varlığında,

hidroksil ve alkoksil radikalleri oluşturarak pro-oksidan özellik de gösterebilmektedir (103).

Ürik asit, insanlarda purin metabolizmasının son ürünü olup; kendisi okside olmadan bakır ve demir gibi geçiş metallerinin şelasyonunu sağlayarak, onların aracılık ettiği oksidasyon reaksiyonlarını engellemektedir (24).

Vitamin E, lipofilik ortamda aktivite gösterebilen ve sekiz farklı formda bulunabilen bir antioksidandır. En aktif formu olan α -tokoferol sayesinde, membranları lipid peroksidasyonuna karşı korumaktadır. Koruyucu etkisi, serbest radikal oluşumunu ve endonükleaz aktivasyonunu önlemek şeklinde gelişir (16). Güçlü bir radikal süpürücü olan α -tokoferol, lipoksijenaz enziminin oluşturulan lipid peroksidasyonu üzerinde ise, zayıf antioksidan etki göstermektedir (76).

Oktanoik asit'in disülfid türevi olan α -lipoik asit (tioktik asit), hem suda hem de yağda çözünür özelliği sayesinde membran ve sitozolde etkili olabilen, doğal bir antioksidan moleküldür. Diyetle alındıktan sonra, dokularda hızlı bir şekilde antioksidan özellikli olan "dihidrolipoik asit" formuna indirgenir. Glutasyon, Vitamin C ve E gibi antioksidanların rejenerasyonunu sağlayabilen α -lipoik asit, Cu^{+2} , Fe^{+2} ve Cd^{+2} gibi bazı metaller için de şelasyon yapıcı özelliğe sahiptir (16). α -lipoik asit, ağır metal zehirlenmelerinin tedavisinde çok etkindir ve bundan başka *Amanita* türü mantarlarla oluşan zehirlenmelerin tedavisinde de başarılı olmuştur (104). Önemli bir antioksidan olan lipoik asit'in, çeşitli hücre kültürlerinde ve periferik kan lenfositlerinde, hücrel glutasyon düzeylerinde artış sağladığı gösterilmiştir. Lipoik asit'in glutasyon artırıcı etkisi, GCL enziminin aktivitesini gerektirmektedir. Lipoik asit hidroksil radikalini, singlet oksijeni ve hipokloröz asit'i süpürebilme yeteneğine de sahiptir (105).

Polifenollerin en önemli sınıfı sayılan flavonoidlerin sayıları dört bini geçmektedir. Serbest radikal süpürümü, redoks aktif metallerin şelasyonu gibi özellikleri bulunan fenolik antioksidanlar, yüksek konsantrasyonlarda ve yüksek

pH değerlerinde, bakır ve demir gibi metallerin varlığıyla pro-oksidan özellik gösterebilmektedirler (16).

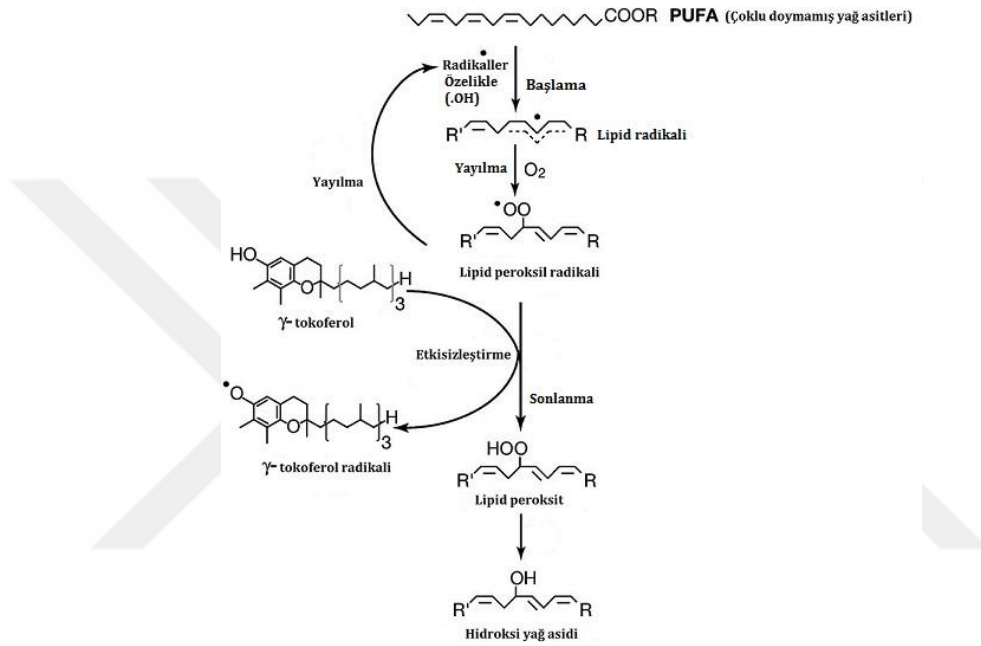
Hidrokinon ve polifenol yapılı maddeler, *in vivo* olarak önemli antioksidan etkinlik göstermektedirler. Bu maddelerin serbest radikallerle reaksiyonları sonucunda, semikinon radikalleri oluşmaktadır. Bu radikaller, başka bir semikinon radikali veya oksijenle reaksiyona girerek, tekrar kinon yapısını ve hidroperoksil radikalini oluşturmaktadırlar. Bu radikal molekülü ise, sulu fazda süperoksit radikaline dönüşmektedir (76).

2.10. Lipid Peroksidasyonu

Hücre membranı yapısındaki fosfolipidler de, sürekli olarak oksidatif atakların hedefi konumundadırlar. Burada bulunan çoklu doymamış yağ asitleri, birden fazla sayıda çifte bağ içermektedir ve bu bağlar, reaktif oksijen türleri tarafından kolayca okside edilerek, ilk ürünler olan lipid peroksil radikalleri ve lipid hidroperoksitler oluşmaktadır. Bu süreç, “lipid peroksidasyonu” adı verilmektedir (Şekil 2.11). Bu süreç bir kez başladığı zaman, serbest radikal aracılıklı zincirleme reaksiyonlar (başlama, yayılma, sonlanma) şeklinde ilerlemektedir. Bu mekanizmanın başlangıcında, membran fosfolipidlerinin yapısında bulunan çoklu doymamış yağ asitlerinden, reaktif oksijen türleri tarafından bir hidrojen atomu koparılır. Serbest radikal ile lipid tarafından, yeni bir serbest radikal oluşturulmuş olur. Bu süreç, yayılma aşamasıyla çoğalarak devam eder. Bu sürecin sonlanması ise, ancak bu zinciri kırabilecek antioksidan bir molekül sayesinde gerçekleşmektedir (106,107). Örneğin, Vitamin E antioksidan özelliği sayesinde peroksil radikalini indirgeyerek radikal zincirinin kırılmasını ve lipid peroksidasyonunun yavaşlamasını sağlamaktadır (108).

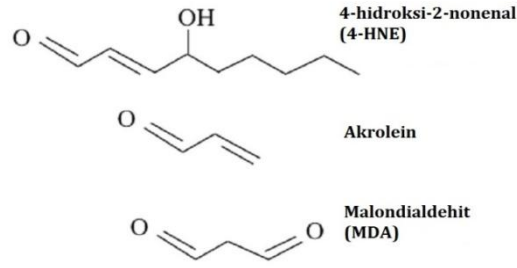
Peroksidasyona uğrayan membranlar seçici geçirgen özelliklerini yitirdikleri için, aldehitler gibi suda çözünen lipid peroksidasyon ürünleri, membranlardan difüze olarak hücre içindeki yapılara da ulaşabilirler (24). Lipid

peroksidasyonu sonucu oluşan birincil ürünler olan lipid hidroperoksitler, GPx ve fosfolipazlar gibi çeşitli enzimlerin substratı olarak işlev görmekte ve ikincil reaksiyonlara da girebilmektedirler (109). Sitozolde bulunan lipid hidroperoksitler, GPx enzimi tarafından indirgenerek “hidroksi yağ asitleri” şeklinde detoksifiye edilmektedirler.



Şekil 2.11. Lipid peroksidasyonu mekanizmaları.

Ancak bu lipid hidroperoksit yapıları, kolaylıkla lipid alkoksi radikalleri (LO•), aldehytler (MDA), alkanlar, lipid epoksitler ve alkoller gibi çeşitli reaktif türlere de dönüşebilmektedir (Şekil 2.12)(24). Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan bu karmaşık ürünler, ayrıca sitotoksik ve genotoksik etkiler de gösterebilmektedirler (110,111).



Şekil 2.12. Başlıca lipid peroksidasyonu ürünleri.

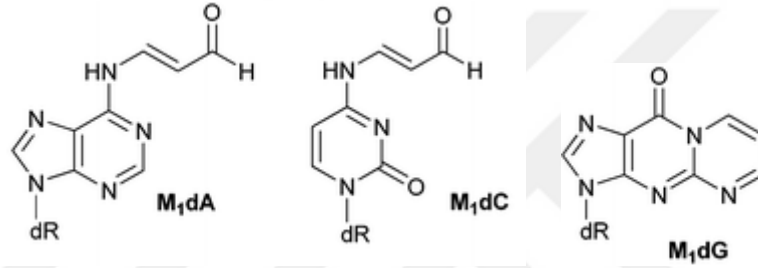
Lipid peroksidasyonu, üç mekanizma ile oluşabilmektedir. Bunlardan birincisi, serbest radikal aracılıklı oksidasyon iken; ikincisi serbest radikallerden bağımsız ve enzimatik olmayan oksidasyon şeklinde gerçekleşir. Üçüncü mekanizma ise, enzimatik oksidasyon şeklinde gerçekleşmektedir. Çoklu doymamış yağ asitleri ve kolesterol molekülü, hem enzimatik hem de enzimatik olmayan yolla okside olabilmektedirler (109).

Fenton reaksiyonu sonucu oluşan hidroksil radikalının, lipid peroksidasyonunu başlatıcı özellikte olduğu kesin olarak bilinmektedir. Demir aracılıklı lipid peroksidasyonunda, birincil hedef konumunda mitokondrideki çoklu doymamış yağ asitleri bulunmaktadır ve $Fe^{+2} : Fe^{+3}$ oranı (1:1) olduğunda en yüksek düzeyde olan lipid peroksidasyonu, ateroskleroz, iskemi-reperfüzyon hasarı, hemolitik anemiler, kanser ve enflamasyon gibi birçok hastalığın etiolojisinde önemli rol oynamaktadır (16,24).

Lipid peroksidasyonu sonucunda oluşan reaktif elektrofilik özellikteki ürünlerin en başında gelen, MDA ve 4-HNE gibi aldehit yapıları moleküller, protein ve DNA gibi makromoleküllerle katım ürünleri oluşturabilmektedirler (Şekil 2.13)(79). Lipid peroksidasyonundan başka, prostaglandin biyosentezi sonucu da oluşan MDA; guanin, sitozin, adenin gibi DNA bazlarıyla katım ürünleri verebilmesinden dolayı, bakteri ve memeli hücrelerinde mutajenik ve karsinojenik özellik gösteren bir üründür. MDA, DNA üzerinde en sık olarak baz

çifti değişikliklerine yol açmaktadır (108). MDA'nın kendisinden başka, oluşturduğu MDA-MDA dimerleri de mutajenik özellik göstermektedir (75).

En önemli katım ürünü olan M₁G, sağlıklı insan lökosit, pankreas ve karaciğer gibi vücut yapılarında, 10⁸ nükleotit'te 1-120 arası sıklıkta görülebilmektedir. Diğer bir ürün olan HNE ise, daha zayıf mutajenite göstermesine karşın; sülfidril proteinleriyle etkileşimi dolayısıyla lipid peroksidasyonunun en toksik ürünü olma özelliğini taşımaktadır (16).



Şekil 2.13. MDA ile DNA nükleozitlerinin başlıca katım ürünleri.

İnsanlarda lipid oksidasyon ürünlerinin saptanabilmesi için, çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Bunlardan en çok kullanılanları tiyobarbitürik asit reaktif ürünleri (TBARS), izoprostanlar, hidroperoksioktadekadienoik asit (HODE) ve oksisteroller olarak sıralanabilir. Bunlardan başka, ekshale edilen gazdaki (verilen nefesteki) etan ve pentan düzeyleri de, *in vivo* olarak lipid oksidasyonu biyogöstergesi amacıyla kullanılabilmektedir (109). Lipid oksidasyonunun gösterimi için, en kolay ve sık kullanımı olan yöntem, tiyobarbitürik asit reaksiyonudur. Bu reaksiyonda, güçlü asidik şartlarda ısıtma sonucu tiyobarbitürik asit ile reaksiyona giren biyolojik örnekler, kolorimetrik veya florometrik yöntemlerle ölçülebilen, pembe renkli ürünler vermektedirler (108).

MDA, tiyobarbitürik asit reaktif ürünlerinin bir örneği olarak, lipidlerin oksidatif hasarının geçerli bir biyogöstergesi olma işlevi dolayısıyla, uzun zamandan beri yoğun şekilde incelenmektedir (108). Günümüze kadar yapılmış birçok çalışmada, plazma MDA düzeyleri ile yaş, cinsiyet, alkol kullanımı gibi faktörler arasında belirgin ilişki varlığı saptanmıştır (112,113,114).

2.11. DNA Üzerinde Oluşan Oksidatif Hasarlar

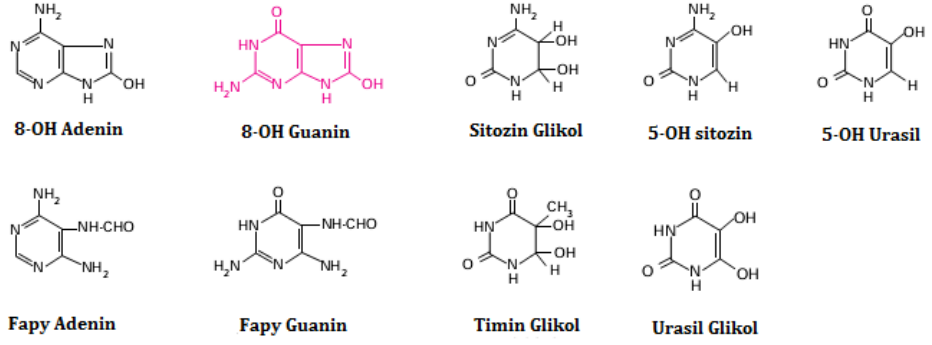
Oksidatif stres gibi oksidan artışının olduğu durumlar, oksidatif hasar ile ilişkili olmak zorunda değildir (68). Hücresel hasarın boyutu, reaktif oksijen türünün olduğu bölge, metal iyonlarının varlığı, hedefin uzaklığı ve reaktifliği gibi birçok faktöre bağlı olarak değişmektedir (77). Ayrıca, artan lipid peroksidasyonu ve azalan antioksidan korunma sonucunda oluşan epoksit yapılar, hücrede bulunan DNA, RNA ve proteinlerdeki nükleofilik merkezlerle, kendiliğinden kovalent bağlar oluşturabilirler (25). Endojen DNA hasarının başlıca sorumlusu olarak reaktif oksijen türleri'nin görülmesinin sebebi, bu türlerin baz oksidasyonu, abazik bölgelerin oluşumu ve sarmal kırıklarına sebep olmasıdır. Reaktif oksijen türleri aracılıklı DNA hasarının sürekliliği halinde mutasyonlar oluşarak, karsinogenez'e kadar gidebilen bir süreç başlayabilmektedir.

Malignant dönüşümlerde ve karsinogenez'in başlangıç aşamalarında önemli rol oynamakta olan reaktif oksijen türü kaynaklı DNA baz hasarı, sarmal kırıkları ve DNA-protein çapraz bağlanması gibi genetik hasarlara, bir de DNA onarım mekanizmasındaki bozukluklar eklendiği zaman, bu sorunun kansere dönüşüm olasılığı önemli ölçüde artmaktadır (69). Kanser gelişimi başlama, yükselme ve ilerleme gibi çok aşamalı bir süreçtir ve reaktif oksijen türleri'nin, bu süreçlerin tümünde aktif olduğu görülmüştür (75).

Bakteri, maya ve memelilerde bulunan 30-40 kadar gen, gelişebilecek oksidatif duruma karşı adapte olup hızla cevap verebilmek amacıyla, koordineli ve hazır durumdadırlar. Bu sayede, oksidatif strese maruz kalan organizma tarafından, bu duruma adaptasyon için antioksidan moleküllerin üretimleri artırılmaktadır (24).

Reaktif oksijen türleri tarafından oluşturulabilen başlıca DNA hasar tipleri abazik bölgeler, baz oksidasyonları, baz değişimleri, deoksiriboz değişimleri, çapraz bağlanma, tek sarmal kırıkları ve çift sarmal kırıkları olarak sıralanabilmektedir. Bu hasarlar uygun şekilde onarılmadığı zaman, hücre ölümü, mutasyon, replikasyon hataları, yanlış transkripsiyon ve sinyal uyarımları gibi karsinogenezle ilgilendirilen bozukluklara yol açmaktadır. Her bir hücrede bulunan DNA üzerinde, bir günde olduğu tahmin edilen oksidatif lezyonların sıklığı 10^4 kadardır (70,75). Oksidatif DNA lezyonlarının çoğu, kuvvetli mutajen olarak bilinmekte ve insan kanserlerinde yaygın olarak bulunmaktadır (71).

DNA üzerindeki purin bazlarının C8-OH katım radikalleri, indirgenebilir veya yükseltgenebilirler. Oksidasyonları sonucunda “8-OH-Gua” ve “8-OH-Ade” oluşmakta; imidazol halkasının açılmasını takip eden redüksiyonları sonucunda ise “4,6-diamino-5-formamidopirimidin” (FapyAde) ve “2,6-diamino-4-hidroksi-5-formamidopirimidin” (FapyGua) oluşmaktadır. Bunların dışında, oluşan en önemli hasar ürünleri olarak, “8-okso-7,8-dihidro-2'-deoksiguanozin (8-oxodG)” ve “5,6-dihidroksi-5,6-dihidrotimidin (timin glikol)” sıralanabilir (Şekil 2.14)(69,70,71).



Şekil 2.14. En önemli DNA baz hasarı ürünleri.

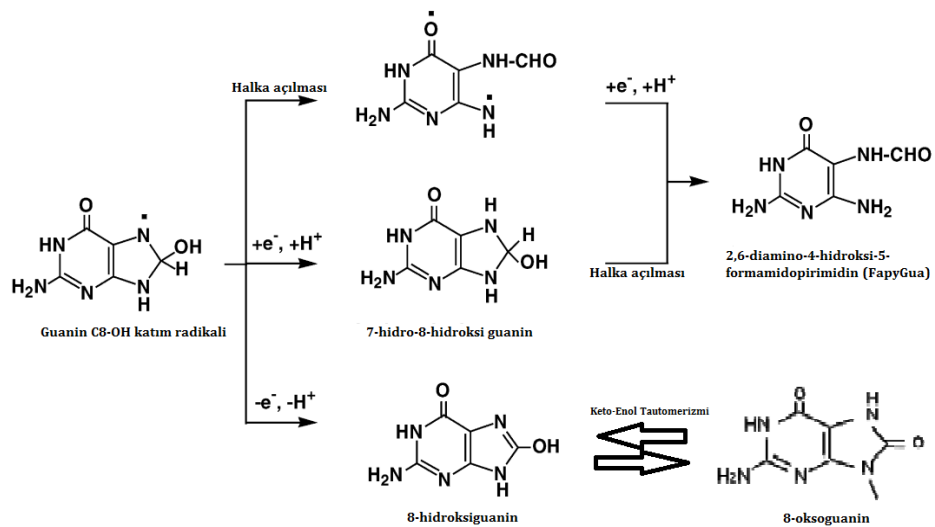
DNA baz modifikasyonları, özellikle hücrel oksijen metabolizması dolayısıyla reaktif oksijen türlerinin üretiminin süreklilik arz ettiği hücreler olmak üzere; tüm hücre tiplerinde bazal düzeylerde bulunabilmektedirler (115). DNA bazları arasında guanin, düşük oksidasyon potansiyeline sahip olması dolayısıyla, oksidatif hasar bakımından en hassas olanıdır (77). Guanin ile oluşan ve yüksek düzeyde mutajenik olan katım ürünleri, adenin ile oluşanlardan beş kat daha fazladır (108). Sitozin bazındaki hasar sonucu oluşan ürünler ise urasil glikol, 5-hidroksi sitozin ve 5-hidroksiurasil olarak sıralanabilir (Şekil 2.14). Bunlardan “5-hidroksi” ürünleri, mutajenik özelliğe sahiptirler (77).

Pirimidin (C ve T) bazlarıyla, en toksik reaktif oksijen türü sayılan hidroksil radikalının reaksiyonu sonucu en yaygın şekilde oluşan hasarlı DNA ürünleri, sitozin glikol ve timin glikol ’dür (Şekil 2.14). Hidroksil radikalının DNA üzerinde yol açtığı tek sarmal kırıkları ise, ‘2-deoksiriboz’ dan bir hidrojen atomu çıkarılması ve oluşan karbon merkezli radikalın, oksijen varlığında peroksil radikale (ROO•) dönüşümü şeklinde oluşmaktadır. Peroksil radikalleri ise, lipid peroksidasyonu aracılıklı DNA hasarlarında rol oynamaktadırlar (70).

Biyogösterge olarak en çok dikkat çeken DNA lezyonları, 8-OHdG ve 8-OH-Gua olup; bunun yanında 5-OH-Ura, 8-OH-Ade ve FapyGua ölçümleri de, idrardaki potansiyel biyogösterge olarak bilinmektedirler (71). Guanin bazının

C8 konumundan oksidasyonu sonucu oluşan 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG), yüksek düzeyde mutajenik özelliğe sahip olup; en sık rastlanan ve istikrarlı olması dolayısıyla oksidatif stres biyogöstergesi olarak en çok ölçümü yapılan DNA hasar ürünüdür. Bundan dolayı, birçok dokuda ve idrarda kolayca saptanabilir ve oksidatif DNA hasarı ile oksidatif stres için en yaygın kullanılan biyogöstergedir (78,80). İnsanlarda da idrar ve lökosit gibi örneklerde 8-OHdG'nin tanımlanması, oksidatif stres, yaşlanma ve karsinogenez gibi birçok durumda biyogösterge niteliğinde kabul görmektedir (116). Özellikle birçok kanser türünde, idrarla 8-OHdG atılımının arttığı görülmüştür (115).

8-hidroksiguanin, keto-enol tautomerizmi göstermektedir. Bundan dolayı, 8-okso guanin olarak da adlandırılmaktadır (Şekil 2.15). Normal bir insan hücresinde, 10^5 guanidin kalıntısında bir modifiye baz olarak rastlanmaktadır (16,115). 8-OHdG (8-oksodG), DNA'nın oksidatif hasarının biyogöstergesi olarak, karsinogenezin hem başlama hem de ilerleme dönemlerinde önem taşımaktadır. İnsanlarda kanser oluşturabilen sigara, ağır metaller, pAH'lar ve asbest gibi etkenlere, mesleki veya mesleki olmayan maruziyetler sonucunda oluşabilecek DNA hasarının tahmini için de, yaygın biçimde kullanılmaktadır (115).



Şekil 2.15. 8-OHdG molekülünün oluşumu.

İnsanlardaki kanser olgularında en sık görülen somatik mutasyonlardan olan G → T transversiyonunu indükleyici etkiye sahip olan, 8-OHdG kaynaklı mutagenез'e karşı hücrel savunma sistemleri baz eksizyon onarımı, nükleotit eksizyon onarımı ve yanlış eşleşme onarımı mekanizmalarından oluşmaktadır (117).

DNA ile reaktif oksijen türlerinin etkileşimlerinin sonuç ürünleri olan DNA lezyonlarının doğru olarak tanımlanması için, serbest radikallerin tiyoller ve histon proteinleri gibi yapılarca korunan DNA'ya erişebilirliği, onarım sistemlerinin çalışma doğruluğu ve antioksidan enzimlerin düzeyleri gibi birçok faktör göz önüne alınmaktadır (70).

2.11.1. Oksidatif DNA Hasarlarının Onarımı

Oksidatif hasarın onarılması, genel itibariyle doğrudan veya dolaylı onarım sistemleri aracılığıyla gerçekleşmektedir. Doğrudan onarımda, okside olan kısmın (proteinlerdeki sülfidril grupları gibi) tekrar indirgenmesi sağlanmaktadır. Ancak proteinlerdeki sistein kalıntıları, metal aracılıklı oksidasyona ve otooksidasyona karşı çok duyarlıdırlar. Dolaylı onarım ise, iki basamakta gerçekleşmektedir. İlk basamakta hasarlı molekülün/parçasının tanınması, çıkarılması veya parçalanması meydana gelirken; ikinci basamakta molekülün hasarlı parçasının yerine yenisinin yapılıp yerleştirilmesi ya da, molekülün tamamı hasarlı ise yeniden sentezlenmesi sağlanmaktadır (24).

DNA lezyonlarının onarımındaki bozukluklar mutajenite, sitotoksiste, hücre ölümü, karsinogeneز ve takip eden hastalık süreçlerinin gelişimine yol açmaktadır. Oksidatif DNA lezyonlarının onarımı için, baz eksizyon onarımı ve nükleotit eksizyon onarımı olarak iki ana mekanizma mevcuttur. Baz eksizyon onarımında, "DNA glikozilaz" tarafından N-glikozidik bağın hidrolizi sonucu "abazik bölge" oluşturularak, hasarlı baz çıkarılır. Abazik bölge, daha sonra

endonükleaz, DNA polimeraz ve DNA ligaz enzimleri tarafından onarılır (71). Baz eksizyon onarımı mekanizması, abazik bölgeleri, okside, alkillenmiş veya deaminasyona uğramış bazları, yanlış baz eşleşmelerini ve tek sarmal kırıklarını tanıyarak, onarımlarını sağlamaktadır (77). Nükleotit eksizyon onarım mekanizması ise bir bazdan daha büyük olan, hacimli DNA bozukluklarının onarımında uygulanır. Timin glikol ve 8-OH-Gua gibi lezyonların onarımında, bu mekanizma geçerlidir (71,115). Eksizyon onarım mekanizmalarının doğru çalışmaması sonucu, hasarlı DNA bölgeleri tek sarmal kırıklarına dönüşmektedirler (118)

Çekirdek DNA'sındaki okside bazların %90 kadarı tek nükleotit onarım mekanizmaları ile onarılırken, %10 civarındaki hasar da, baz eksizyon onarımına tabi tutulmaktadır. Bu yönüyle, çekirdek DNA'sının onarımı ile ilgili olarak literatürde çokça bilgi mevcutken; mitokondriyal DNA için onarım hakkında bilgi azdır ve buradaki onarımın daha düşük düzeyde olduğu düşünülmektedir (119). Mitokondriyal DNA, çekirdek DNA'sına göre oksidatif hasara karşı daha duyarlıdır. Çünkü mitokondriyal DNA çekirdekteki gibi histonlar tarafından korunmamaktadır, onarım kapasitesi düşüktür ve fizyolojik şartlarda mitokondride solunum zinciri dolayısıyla reaktif oksijen türlerinin oluşumu fazladır (69). Mitokondriyal DNA üzerindeki oksidatif hasarın, birçok kanser türünün gelişiminde önemli rolü olduğu saptanmıştır. Kanser hücrelerindeki mitokondriyal DNA üzerinde görülen mutasyon, çekirdekteki DNA mutasyonundan 220 kez fazla olarak bulunmuştur (120). En yaygın görülen baz hasarı sayılan 8-OHdG kaynaklı bozulmalara karşı, insan DNA'sının bütünlüğünün sağlanması için ana koruyucu mekanizma, DNA glikozilaz (hOGG1) aracılıklı baz eksizyon onarım mekanizmasıdır. OGG1 enzimi, bundan başka FapyGua lezyonunun da aynı mekanizma ile onarımında etkili olmaktadır (28,117).

DNA onarım enzimlerinden Fapy-DNAglikozilaz (FPG), 8-oksoguanin ve açık halka purin lezyonlarını tanımakta iken; Endonükleaz III enzimi okside pirimidin bazlarını, sarmal kırıklarına dönüştürmektedir. FPG enziminin insandaki analogu, hOGG1 enzimidir. FPG ve Endonükleaz III gibi enzimlerle lenfosit DNA'sındaki okside bazların ölçülmesi, vücut genelindeki oksidatif stres durumu hakkında bilgi sağlayabilmektedir (121).

Hücrel onarım kapasitesini aşan DNA hasarları, mutasyonlara sebep olarak apoptoz oluşumunu tetikleyebilmektedir (77). Bu yönüyle DNA mutasyonu, karsinogenez bakımından belki de en kritik aşama özelliği taşımaktadır (16). DNA onarım genlerinde oluşan mutasyonlar ise, onarım sisteminin işleyişinde bozulmalara yol açmaktadır ve bu mutasyonların, kanser hücrelerinin %60 kadarında görüldüğü ortaya çıkmıştır. Bundan başka, DNA onarım genlerindeki polimorfizmler de, kanser için bir risk faktörüdür (71).

Devam eden mitotik bölünme sürecindeki hücreler, bu sırada DNA'ları korunmasız durumda olduğu için oksidatif hasara karşı daha duyarlı konumdadırlar (24). Mitoz sonrasında ise, hücreler oksidatif strese karşı belirgin bir adaptif koruyucu cevap sergilemektedirler. Bu adaptasyonlar, DNA onarım enzimleri ve antioksidan enzimlerin düzeylerinin artırılması gibi cevapları içermektedir. Oksidatif strese adaptasyon, beyin, kalp ve iskelet kası gibi hayati önemi olan dokularda, hücrenin koruyucu savunmasının önemli bir bileşeni olarak açığa çıkmaktadır (122).

Reaktif oksijen türleri DNA'nın yanı sıra, hücre döngüsünün kontrolünde ve onarımda rol alan hücrel proteinlere de atak yaparak, bunlarla ilgili süreçleri de bozabilmektedirler (70). Örnek olarak, aminoasitler reaktif oksijen türleri tarafından yan zincir reaksiyonu sonucu değişime uğratılabilmektedir. Bu değişimler bakımından en duyarlı aminoasitler, aromatik yan zincire sahip olan fenilalanin ve histidin ile sülfidril grubu içeren sistein ve metionin'dir. Sülfür

içeren aminoasitlerin oksidatif değişimleri, geri dönüşümlü olmaktadır. Arjinin, prolin, histidin ve lizin gibi bazı aminoasitler ise, oksidasyonla geri dönüşümsüz karbonil ürünleri vermektedir ve bu ürünler, protein hasarının göstergesi olarak biyolojik örneklerde sıklıkla ölçülmektedirler. Karbonil ürünleri de, lizin kalıntılarının α -amino gruplarıyla reaksiyon vererek, molekül içi ve moleküller arası çapraz bağlanmalar sonucu yüksek molekül ağırlığına sahip kütlelerin (protein agregatları) oluşmasına yol açabilmektedir. Bu protein kütleleri ise yüksek sitotoksositeye sahip olup; hücreyi apoptoz veya nekroz'a sürükleyebilmektedirler (77).

2.12. DNA Hasarlarının Tanımlanması

Kanser, genetik hasarların birikmesi ile bağlantılı olarak ortaya çıkan, genomik bir hastalıktır. Genomik instabilite de, esas olarak yerleşmiş genom mutasyonlarının hücresel birikimi sonucu oluşmaktadır (32). Kromozom düzeyindeki DNA hasarlarının tanımlanması ise, bu düzeydeki mutasyonların karsinogenezdeki rolü nedeniyle, genetik toksikoloji bakımından büyük önem taşımaktadır. Kromozomal DNA hasarının değerlendirilmesinde, SCE, FISH, COMET gibi çeşitli yöntemler kullanılmakla birlikte, 'Sitokinez'de Durdurulmuş Mikroçekirdek' tekniği de, hasar ve kayıpların gerçekçi ölçümüne olanak sağlamasından dolayı, son yıllarda sıklıkla tercih edilen bir yöntem olarak öne çıkmıştır (123). Buna ek olarak, solunum yoluyla maruz kalınan ksenobiyotikler için ilk maruziyet bölgesi olması dolayısıyla, solunum sistemindeki giriş dokuları olan bukkal ve nazal hücrelerde mikroçekirdek oluşumunun incelenmesi de, bu maddelerin olası genotoksik etkileri hakkında önemli bilgiler sağlamaktadır (124).

2.12.1. Yanak Epitel Hücrelerinde Mikroçekirdek Analizi

Mikroçekirdek sıklığı incelenmesi bakımından eritrosit, lenfosit gibi kan hücreleri yanında, çeşitli epitel (oral, nazal, ürotelial, vb.) hücreler de uygun

niteliktedirler. Bukkal mikroçekirdek taraması, insan popülasyonlarındaki genetik hasarı gösteren ve girişimsel özelliğinin en az olması nedeniyle kolay uygulanabilen bir yöntemdir. (125). Bukkal mukoza gibi çabuk bölünebilen hücrelerde mikroçekirdek yöntemi, dış ortamda hücre bölünmesinin sağlanmasına ihtiyaç duyulmadan analizin gerçekleştirilebilmesini sağlamaktadır (124). Bukkal mukoza, potansiyel karsinojenlere ve vücuttaki metabolizma sonucunda reaktif özellikli ürünlere dönüşebilecek maddelere karşı bir bariyer görevi görmektedir. Kanseri olgularının % 90 kadarı epitel kaynaklı olduğundan, bukkal mukoza hücreleri inhalasyonla veya oral yolla maruz kalınan potansiyel karsinojenlerin erken genotoksik etkileri hakkında, önemli bir bilgi kaynağı durumundadırlar (126). Alımdan sonraki süreçte örneklerin işlem ve saklanmasıdaki kolaylık da, bu yöntemin diğer bir avantajıdır.

Bukkal hücreler, her 7 ile 21 gün arasında yenilenmektedirler. Buna göre, akut maruziyetin oluşturabileceği etkileri saptamak, ancak maruziyetten bu kadar süre geçtikten sonra mümkün olabilmektedir (126). Bu sebeple, maruziyet sonrası süreçte mikroçekirdek oluşumunun gözlenebilmesi için, 2-3 hafta kadar bir zamana ihtiyaç bulunmaktadır.

Bukkal hücrelerdeki mikroçekirdek oluşum mekanizması, lenfositlerdekiyle uyum göstermektedir (124). Ayrıca, bukkal ve lenfosit mikroçekirdek sıklıkları arasında da, güçlü bir korelasyon mevcuttur (125). Mikroçekirdek, çekirdek bölünmesinin erken aşamasında kromozom kaybı sonucu ortaya çıkmaktadır. Bukkal mikroçekirdek skorlamasında, sadece farklılaşmış (diferansiye) hücrelerdeki mikroçekirdekler sayıma tabi tutulmaktadır. Bukkal hücrelerdeki mikroçekirdeklerde çap, genelde ana çekirdeğin 1/3'ü ile 1/16'sı aralığında, yuvarlak veya oval şekilli ve ana çekirdekle aynı boyama yoğunluğuna sahiptir. Genellikle bukkal hücreler sadece bir mikroçekirdek içermektedirler. Bir hücrede daha fazla mikroçekirdek görülmesi, nadiren mümkün olmaktadır. Mikroçekirdek içeren hücreler, diğer hücrelerle

aynı morfolojiye sahip olmalı ve mikroçekirdek, sitoplazmada ana çekirdekten ayrı olarak bulunmalıdırlar (126).

Bukkal hücrelerdeki mikroçekirdek sıklığı üzerinde de, lenfositlerde olduğu gibi yaş, cinsiyet ve yaşam alışkanlıkları gibi faktörlerin karıştırıcı etkileri bulunmaktadır (127). Bundan başka, B vitamini düzeyleri, genetik altyapı ve sigara gibi etkenler, bukkal mikroçekirdek sıklığı üzerinde etkili olan diğer değişkenlerdir. Değerlendirmelerin çok daha doğru ve etkin olabilmesi için, genotoksin maruziyeti (toksin türü ve gücü, maruz kalma süresi ve düzeyi, örnek alımına kadar geçen süre, vb.) ile ilgili detaylı bilgiye sahip olunması gereklidir (126). Bukkal hücrelerde görülen bazal mikroçekirdek sıklığı, ortalama 1.10/1000 hücre (0.72 - 1.72) olarak tespit edilmiştir (128). Çözücüler, pAH bileşikler, sıvı yakıtlar, arsenik, antineoplastik ilaçlar gibi birçok etkene mesleki maruz kalma sonucunda, bukkal mikroçekirdek sıklığında önemli derecede artışlar oluşabilmektedir (124).

Bukkal epitel hücrelerindeki mikroçekirdek sıklığı ile sigara kullanımının ilişkisi, birkaç çalışmada pozitif yönde saptanmakla birlikte; çalışmaların neredeyse tümünde aralarında bir ilişki bulunmadığı sonucuna varılmıştır. Ancak, sadece sigara kullanımının var olup olmadığı değil; kullanım yoğunluğunun da bu inceleme sırasında göz önüne alınması gereken bir husus olduğu belirtilmektedir (128). Lenfositlerdeki spontan mikroçekirdek sıklığı kadınlarda erkeklere oranla daha yüksek iken; bukkal hücrelerde cinsiyetler arasında belirgin bir fark bulunmamaktadır. Günlük alkol kullanımı ile bukkal mikroçekirdek sıklığı arasında, bir ilişki olmadığı saptanmış; yeşil sebze ve meyve tüketimi çok olan bireylerdeki bukkal mikroçekirdek sıklığı, bunları tüketmeyenlere göre anlamlı derecede düşük çıkmıştır (124).

Son yıllarda, lenfositlerde olduğu gibi bukkal mukozadaki genetik hasarın tespitinde de, ortamdaki tüm hücreleri skorlamayı esas alan “sitom” yaklaşımı,

daha yaygın hale gelmektedir. Bukkal mukoza sitom analizi, DNA hasarının, proliferatif potansiyelin ve hücre ölümünün etkili bir biyogöstergesi olarak değerlendirilmekte ve bu analiz sonucunda yaşlanma, kanser ve nörodejeneratif hastalıkların riskinde oluşabilecek artışlar, gerçekçi biçimde ortaya konabilmektedir (126). Ancak, bukkal mikroçekirdek analizi sırasında örnek toplama, boyama ve skora yöntemindeki farklılıklar, analiz sonuçlarının da değişkenlik göstermesine neden olmaktadır (124).

2.12.2. Tek Hücre Jel Elektroforez (COMET) Yöntemi

COMET yöntemi, DNA üzerindeki tek ve çift sarmal kırıklarının ölçümünde, yüksek duyarlılık gösteren ve hem hücredeki DNA hasarı, hem de hücrenin bu hasarı onarabilme kapasitesi hakkında bilgi veren bir yöntemdir. Baz eksizyon onarımı ve tek sarmal kırıklarının onarımı gibi süreçler, COMET tekniğiyle analiz edilebilmektedirler (121). COMET analizi, kolay uygulanabilen ve radyasyon, stiren, vinil klorür, 1,3-butadien, pestisitler, saç boyaları, antineoplastikler gibi birçok etkene mesleki maruziyetin biyolojik izlenmesinde kullanılan, hızlı sonuç veren, ucuz ve az miktarda biyolojik örnek gerektiren bir tekniktir (129).

Her bir hücredeki DNA üzerinde bulunan ve sayısı yüz ile birkaç bin arasında değişebilen kırıklar, bu yolla tespit edilebilmektedir. Çekirdek DNA'sındaki hasarlar bu yolla analiz edilebilirken; çok küçük boyutta olması dolayısıyla mitokondriyal DNA, COMET ile analiz edilebilmek için uygun değildir. Standart alkali COMET tekniği ile sarmal kırıkları (abazik bölgeler) ve alkali değişken (labil) bölgeler saptanabilmektedir. DNA üzerinde sıklıkla görülen bir başka hasar türü olan bazların oksidasyonu ise agaroz'daki hücrelerin parçalanması sonrasında, DNA'nın lezyona özgü endonükleazlarca kesime tabi tutulması sayesinde, COMET tekniğiyle analiz edilebilmektedir. Alkali işlem, DNA zincirlerinin kırık bölgelerden ayrılmasını sağlamaktadır. Normal

koşullarda, nükleozomlar'da histon proteinlerince koruma altına alınmış olan DNA, 2,5 M NaCl ile lize edilip histon proteinleri ve nükleozomlar uzaklaştırıldıktan sonra, alkali veya nötral koşullarda sarmallarının açılması sağlanmaktadır (121). COMET analizinde, alkali koşullar için pH>13,1 olduğunda, katım ürünü oluşmuş bazın depurinasyonu sonucu açığa çıkan abazik bölge sarmal kırıklarına dönüşerek, alkali değişken bölgeler oluşabilmektedir (129).

Lökositler, insan kanında COMET analizi aracılığıyla yapılan biyolojik izleme için yaygın kullanımı bulunan hücreler olup; bu yönüyle bazı avantajlar ve dezavantajlara sahiptirler. Kolay ve çok miktarda elde edilebilirler, hücre kültürüne ihtiyaç duymazlar. Dolaşımda olduklarından, vücudun genel durumu hakkında fikir verebilirler. Ancak, özel bir organ hasarının değerlendirilmesi için, bu yönüyle uygun değildirler. Ayrıca, *in vitro* ortamlarda fitohemaglutinin gibi bir mitojen olmadan, uzun süre yaşayamazlar (121). Lenfosit dışındaki hücre tiplerinde de, DNA hasarının değerlendirilmesi amacıyla COMET analizi kullanılabilir. Örnek olarak, nazal ve bukkal epitel hücreleri, inhalasyon veya oral yolla maruz kalınan maddelerle doğrudan temasta olduklarından, bu analiz için uygundur (129).

Beslenme, egzersiz, cinsiyet, enfeksiyonlar ve sigara gibi birçok karıştırıcı faktör COMET analizi sonuçları üzerinde etkili olabildiği için bu yöntem, DNA hasarının maruziyet düzeyleriyle ilişkilendirilmesi amacıyla kullanılamamaktadır. Çünkü maruz kalınan kimyasallar ile oluşan DNA hasarı arasında doz-cevap ilişkisi bulunmamaktadır (129).

2.13. Protezlerin Bileşiminde Bulunan Metaller ve Etkileri

Protez üretiminde, oran ve içerik değişikliği söz konusu olmakla birlikte; Cr, Co, Mo, Ni, Al, Fe, Be gibi metallerin bir arada bulunabildiği alaşımlar kullanılmaktadır. En sık kullanılan metal alaşımlar ise, Co-Cr içerikli olanlar ve Au, Ag, Pd içerikli olanlardır (130). Bu metallerin özellikle solunum yolunda

verdiği klinik bulgulara (9) ek olarak, oksidatif hasar oluşturabilme kapasiteleri de bulunmaktadır. Örnek olarak, krom'un hücre içerisinde indirgenmesi sonucu, Cr-DNA katım ürünleri (adduct) oluşabilmekte ve bu sayede mutajenik ve genotoksik etkiler görülebilmektedir. Nikel ise, zaten karsinojenik etkili bir metal olup, lipid peroksidasyonuna yol açmakta ve DNA onarım süreçlerini bozmaktadır. Ayrıca, bu iki metalin burun ve akciğer kanserleriyle bağlantılı oldukları saptanmıştır. Kobalt'ın da, karsinojenik özelliğinden şüphelenilmektedir (131).

Krom (+3), doğada bulunan bir esansiyel eser elementtir ve vücutta kan şekeri düzenlenmesinde rolü bulunmaktadır. Krom, hücre içerisinde DNA katım ürünleri, çapraz bağlanmalar gibi DNA hasarlarına da yol açabilmektedir. Cr⁺⁶'nın mutajenik ve genotoksik etkilerinden, Cr-DNA katım ürünleri sorumlu tutulmaktadır. Cr⁺⁶ gibi tüm kromatlar, sülfat ve fosfat gibi anyonların giriş yaptığı kanallar aracılığıyla, hücrelere aktif olarak giriş yapabilmektedirler. Çözünmeyen kromatlar ise hücre tarafından fagositoz yoluyla alınmaktadır. Kromatlar, hücre içerisine giriş yapmalarından itibaren serbest radikal oluşturabilmektedirler (16). Hücre içerisinde glutatyon ile Cr⁺⁶ hızlı bir kompleks oluşturmakta, daha sonra DNA üzerinde değişim oluşturma kapasitesine sahip olan Cr⁺⁵ şekline dönüşmektedir. Bu değişimi, H₂O₂ ile verdiği Fenton reaksiyonu sonucu açığa çıkan hidroksil radikali aracılığıyla gerçekleştirmektedir (132).

Kobalt, kardiyotoksik etkili bir metaldir. Ancak, B₁₂ vitamininin de yapısına girmektedir. Co⁺² ile H₂O₂ reaksiyonu sonucu süperoksit radikali oluşmaktadır ve bu etkinin, ADP veya sitrat ile şelasyonla inhibe edildiği görülmüştür (16). Kobalt tarafından, demir ile benzer kimyasal özellikler göstermesi sonucu Fenton benzeri reaksiyonlarla ROS üretimi gerçekleşebilmektedir (117).

Toksisitesinde hedef organın akciğer olduğu nikel, DNA metilasyonu özelliğinin yanı sıra DNA onarım süreçlerinin de bozulmasına yol açması dolayısıyla, karsinojen etki gösteren bir metaldir (16). Ayrıca nikel, allerjen etkisi de yüksek olan bir metaldir. Nikel ve kobalt, serum proteinleriyle dolaşımda bulunabilmektedirler (48).

Kadmiyum, çok toksik bir metaldir; doğrudan ve dolaylı olarak süperoksit ve hidroksil gibi birçok radikalın oluşumuna yol açmaktadır. Hücrede, sitoplazma ve membrandaki proteinlerin yapısında bulunan demir ve bakır ile yer değiştirebildiği; bu şekilde de fenton reaksiyonuyla serbest radikal oluşumuna yol açabilen bu iki metali serbestleştirerek, vücuttaki düzeylerini artırdığı gözlemlenmiştir (133). IARC tarafından “Kategori 1 - İnsan karsinojeni” olarak sınıflandırılan kadmiyum, mesleki maruziyet sonucu akciğer, prostat, böbrek ve pankreas kanserleriyle de ilişkilendirilmektedir (134).

Demir, DNA hasarı oluşturarak kanser hücrelerinin daha kolay büyümesine katkıda bulunan bir metaldir. Bakır, pro-oksidan özelliğe de sahip bir metal olması dolayısıyla, lipidlerin peroksidasyonuna da katkıda bulunabilmektedir (16). Memeli hücrelerinde, sitoplazmada demir bağlayan “ferritin” ve serumda bakır bağlayan “seruloplazmin” proteinlerinin de, radikal oluşturan reaksiyonlara aracılık eden bu metalleri bağlamaları dolayısıyla, antioksidan kapasite üzerinde önemli etkileri olduğu düşünülmektedir (24).

Antimutajenik bir ajan olarak görev yapan selenyum, DNA ve diğer hücresel bileşenleri oksidatif hasara karşı koruyan ‘Glutasyon Peroksidaz’ ve ‘Tiyoredoksin Redüktaz’ enzimlerinin yapısına girmek suretiyle aktivite göstermektedir (16). Zn ise, DNA polimeraz enziminin çalışmasında kofaktör olarak görev yapmaktadır (135).

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez çalışması, GATA Yerel Etik Kurulu'nun 06 OCAK 2014 tarih ve 31 no.lu oturumunda alınan onay sonrasında, Eczacılık Bilimleri Merkezi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı, Ar-Ge Merkezi Uluslararası Proje Koordinasyon ve Yürütme Kısmı (FAVOR) Laboratuvarı ve Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı bünyesindeki çalışmalarla gerçekleştirilmiştir. Tez çalışması, TÜBİTAK-SBAG tarafından 114R045 numaralı Hızlı Destek Projesiyle desteklenmiştir.

3.1. Grupların oluşturulması

Grupların seçiminde, aşağıdaki koşulları sağlayan bireylerden örnek alınmasına dikkat edilmiştir;

- Çalışma grubu, kesintisiz olarak en az bir yıldır protez üretiminde çalışan kişilerden oluşturulmuştur. Kontrol grubu ise, protez üretiminde kullanılan materyallere maruz kalmayan kişilerden oluşturulmuştur.
- Tüm gönüllüler 18 yaşından büyüktür.
- Gönüllüler, herhangi bir kronik ilaç tedavisi görmeyen, kalıtsal veya kronik bir hastalığı bulunmayan bireylerden seçilmiştir.
- Gönüllüler kronik alkol kullanımı olmayan bireylerden oluşmaktadır.
- Gönüllüler, radyoterapi ve/veya kemoterapi görmeyen bireylerden oluşmaktadır.
- Gönüllülerin tamamı, bilgilendirme ve olur (rıza) formunu okuyup imzalamıştır.

Aşağıdaki durumlara uyan bireyler ise çalışma dışı bırakılmıştır;

- Örnek alım gününde radyoterapi/kemoterapi/anestezi/diş tedavisi almış olanlar

- Ortopedik protezi bulunanlar
- Kronik ilaç ve/veya alkol kullanımı bulunanlar
- Kanama bozukluğu ve/veya kan hastalığı bulunanlar
- Bir yıldan az süredir protez üretiminde çalışanlar

3.2. Gönüllülerden örneklerin toplanması ve ortam havasında ölçüm yapılması

Tez çalışması kapsamında, gönüllü bireylerin dâhil olma kriterleri bakımından değerlendirilmesi için, bu çalışma için hazırlanmış anket/değerlendirme formu kullanılmıştır. Bu form aracılığıyla bireylerin sigara, alkol, kahve kullanımı alışkanlıkları, beslenme düzenleri, hastalık geçmişleri ve hasta grubunun maruziyet özellikleri ve süresi gibi değişkenler hakkındaki bilgiler kayıt altına alınmıştır. Bu sorgulama sayesinde, uygun olmayan bireylerin çalışma dışı bırakılması sağlanmış; uygun koşulları taşıyan bireylerin de doğru değerlendirilebilmesi için gerekli bilgiler alınmaya çalışılmıştır.

Bu çalışma kapsamında uygulanacak genotoksisite testleri için, sodyum heparin (BD Vacutainer, 367876) ve lityum heparin (BD Vacutainer, 368884) içeren tüplere, tek kullanımlık alım setleriyle (BD Vacutainer, Eclipse 368609) ayrı ayrı yaklaşık 5 'er ml kan örneği alınmıştır. Testlerle ilgili hazırlıklara (MN ve COMET), kan örnekleri alındıktan hemen sonrasında başlanmıştır. Yine eş zamanlı olarak, oksidatif stres parametrelerinin ve metal (eser element) düzeylerinin çalışılması amacıyla, EDTA içeren eser element tüplerine (BD Vacutainer, 368381) de yaklaşık 5 ml kan örneği, aynı sırada alınmıştır. Bu testler için de, kan örnekleri derhal laboratuara alınarak +4 °C 'de 4400 rpm'de 5 dakika süreyle santrifüj edilmiş; plazma kısmı polipropilen tüplere ayrılarak -80 °C 'de analiz yapılınca kadar saklanmıştır. Geride kalan şekilli elemanlar üzerine hacminin iki katı kadar % 0,9'luk NaCl solüsyonu ilave edilerek hafifçe ters yüz

edilmiş ve +4 °C 'de 5 dakika daha santrifüj edilerek üstteki süpernatant kısmı atılmıştır. Bu işlem iki defa daha tekrar edilerek, sonunda dipte kalan eritrosit kısmından polipropilen tüplere 1 ml alınmış, üzerine 4 ml soğuk distile su ilave edilerek vortekslenmiş; böylece eritrositlerin parçalanması sağlanmıştır. Sonrasında, numuneler analiz edilinceye kadar -80 °C 'de saklanmıştır. Bukkal mukoza epitel hücre örnekleri ise yanak içinden tahta bir spatül yardımıyla alınarak, derhal önceden kodlanmış olan lamlara yayılmış ve kurumaya bırakılmıştır.

Gönüllülerin çalışmakta olduğu tüm protez laboratuvarlarındaki örnek alımları sırasında, ortam havasındaki metil metakrilat düzeyleri de, bu amaçla üretilmiş özel ölçüm tüpleri (Gastec Detector Tube No.149, Japonya) aracılığıyla ölçülmüştür.

3.3. Analizlerin uygulanması

Bu tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen antioksidan enzim aktivitelerinin, tiyobarbitürik asit reaktif ürününün, oksidatif DNA hasarının ve glutatyon düzeylerinin ölçümleri; Cayman Chemical Company (ABD) marka kitlerle gerçekleştirilmiştir. Kitlerle ilgili bilgiler, ilgili başlıklar altında verilmiştir.

3.3.1. Katalaz enzim aktivitesinin ölçümü

Daha önce hazırlanmış olan plazma örneklerindeki katalaz enzim aktivitesi, katalaz enziminin peroksidatik fonksiyonu esasına dayalı olarak ölçülmüştür. Yöntemin temeli, ortamdaki H₂O₂ varlığında, enzimin substrat olarak metanol ile reaksiyon vermesi esasına dayanır. Açığa çıkan formaldehit ürünü, renk oluşturucu Purpald (4-amino-3-hidrazino-5-merkapt-1,2,4-triazol) ile mor tonlarında renkler oluşturmakta ve bu renk şiddeti de kolorimetrik olarak 540 nm dalga boyunda ölçülmektedir.

Kullanılan cihaz ve kimyasallar

- ✓ Cayman Chemical marka kit (No.707002)(Tablo 3.1)
- ✓ Metanol (Merck, 106009)
- ✓ Bidistile su
- ✓ Pipet (tek kanallı ve çok kanallı)
- ✓ Mikroplaka okuyucu (Biotek Synergy H1)

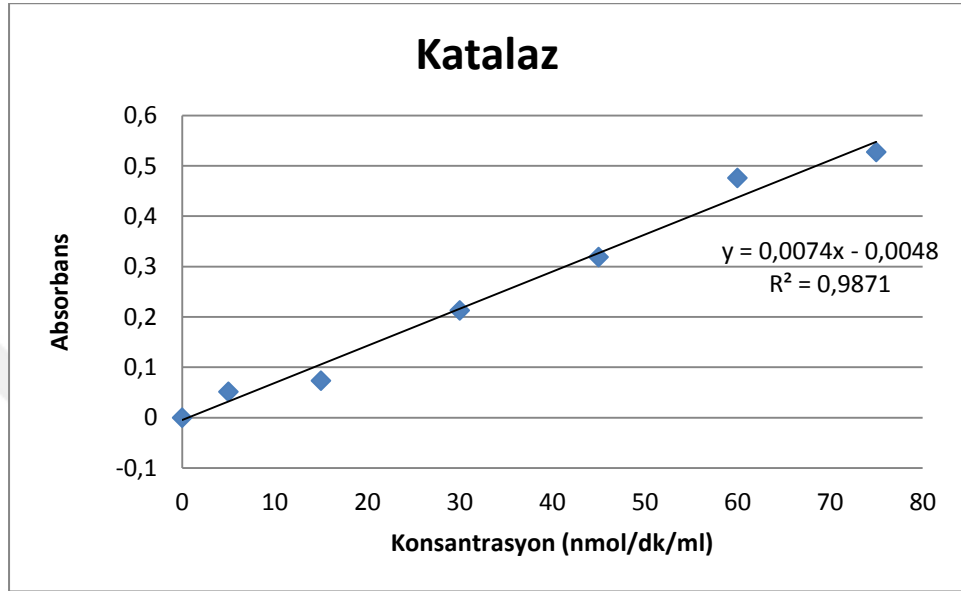
Deneyin yapılışı

Ölçümler, herbiri 96 kuyucuklu mikroplaklarla aşağıda oluşturulmuş olan tabloya göre gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.1. Katalaz aktivitesi için hazırlıklar ve ölçümün tasarımı.

CAT												
5 ml stok + 45 ml su = 50 ml Sample Buffer									KUYUCUK (WELL)			
Hazırlık									Reaktif	Standartlar (A-G)	Pozitif Kontrol	Örnek
2 ml stok + 18 ml su = 20 ml									Assay Buffer	100	100	100
Hazır									Metanol	30	30	30
Ana stok + 2 ml dilue Sample Buffer → Vortex → 100 µl + 1,9 ml dilue Sample Buffer									Pozitif Kontrol		20	
Standartlar	A	B	C	D	E	F	G	µl	Standart	20		
Stok	0	10	30	60	90	120	150	1000				
Sample Buffer	1000	990	970	940	910	880	850					
Dilusyonsuz okuma									Sample			20
40 µl stok + 9,96 ml su = 10 ml									H ₂ O ₂	20	20	20
4 ml soğuk su eklenerek hazırlandı									KOH	30	30	30
Hazır									Purpald	30	30	30
Hazır									Potasyum periyodat	10	10	10
540 nm. Tek okuma.									TOPLAM HACİM(µl)	240	240	240

Okumalar sonucunda, standartlarla elde edilmiş değerlerden bir kalibrasyon doğrusu çizilmiş ve buradan örneklerdeki enzim aktivitesi (nmol/dk/ml) cinsinden hesaplanmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Katalaz aktivitesi ölçümüne ait kalibrasyon grafiği.

3.3.2. Süperoksit dismutaz enzim aktivitesinin ölçümü

Plazma örneklerindeki SOD aktivitesi, ksantin oksidaz ve hipoksantin tarafından oluşturulan süperoksit radikalinin, tetrazolyum tuzu aracılığıyla saptanması esasına dayanmaktadır. Bir ünite SOD, süperoksit radikalinin %50 oranında dismutasyonunu sağlamak için gereken enzim miktarını ifade etmektedir. Kit aracılığıyla, 440 nm dalga boyunda total SOD aktivitesi ölçülmektedir.

Kullanılan cihaz ve kimyasallar

- ✓ Cayman Chemical marka kit (No.706002)(Tablo 3.2)
- ✓ Bidistile su
- ✓ Pipet (tek kanallı ve çok kanallı)

✓ Mikropılaka okuyucu (Biotek Synergy H1)

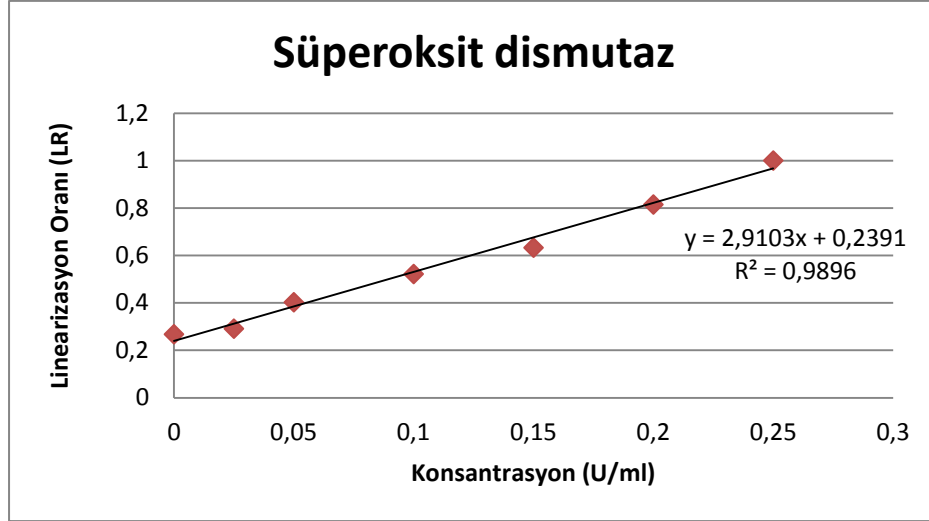
Deneyin yapılışı

Ölçümler, herbiri 96 kuyucuklu mikropılaklarla aşığıda oluşturulmuş olan tabloya göre gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.2. Süperoksit dismutaz aktivitesi için hazırlıklar ve ölçümün tasarımı.

SOD											
3 ml stok + 27 ml su = 30 ml Assay Buffer										KUYUCUK (WELL)	
2 ml stok + 18 ml su = 20 ml Sample Buffer											
Hazırlık									Reaktif	Standartlar (A-G)	Örnek
50 µl stok + 19,95 ml Dilue Assay Buffer = 20 ml									Radikal Detektor	200	200
Standart	A	B	C	D	E	F	G	µl	Standart	10	
Stok**	0	20	40	80	120	160	200	1000			
Sample Buffer	1000	980	960	920	880	840	800				
10 µl Plazma + 40 µl Sample Buffer									Numune		10
50 µl stok + 1,95 ml Dilue Sample Buffer = 2 ml									Ksantin oksidaz	20	20
440 nm. Tek okuma.									TOPLAM HACİM (µl)	230	230
**(20µl + 1,98 ml dilue sample buffer = 2ml)											

Okumalar sonucunda, standartlarla elde edilmiş değerlerden bir kalibrasyon doğrusu çizilmiş ve bu doğru aracılığıyla örneklerdeki enzim aktivitesi (U/ml) cinsinden hesaplanmıştır (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Süperoksit dismutaz aktivitesi ölçümüne ait kalibrasyon grafiği.

3.3.3. Glutasyon peroksidaz enzimi aktivitesinin ölçümü

Kullanılan kit aracılığıyla GPx aktivitesinin ölçülmesi, dolaylı yoldan “Glutasyon Redüktaz (GR)” reaksiyonuyla sağlanmaktadır. Hidroperoksitlerin indirgenmesi sırasında GPx aracılığıyla okside olan glutasyon molekülü, eski haline GR ve NADPH ile dönmektedir. Bu sırada kullanılan NADPH molekülü, NADP⁺ şekline okside olmakta ve bu oksidasyon, 340 nm dalga boyunda absorbans azalışı meydana getirmektedir. Bu azalışa göre de, GPx aktivitesi hesaplanmaktadır.

Kullanılan cihaz ve kimyasallar

- ✓ Cayman Chemical marka kit (No.703102)(Tablo 3.3)
- ✓ Bidistile su
- ✓ Pipet (tek kanallı ve çok kanallı)
- ✓ Mikroplaka okuyucu (Biotek Synergy H1)

Deneyin yapılışı

Ölçümler, herbiri 96 kuyucuklu mikroplaklarla aşağıda oluşturulmuş olan tabloya göre gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.3. Glutasyon peroksidaz aktivitesi için hazırlıklar ve ölçümün tasarımı.

GPx				
<i>2 ml stok + 18 ml su = 20 ml Sample Buffer</i>		KUYUCUK (WELL)		
<u>Hazırlık</u>	<u>Reaktif</u>	<u>Background</u>	<u>Pozitif Kontrol</u>	<u>Örnek</u>
3 ml stok + 27 ml su = 30 ml	Assay Buffer	120	100	100
3 vialin her birine 2'şer ml su	Ko-substrat	50	50	50
10 µl stok + 490 µl Sample Buffer	GPx Kontrol		20	
10 µl Plazma + 10 µl Sample Buffer	Numune			20
	Kümen Hidroperoksit	20	20	20
340 nm. 1 okuma/dk. (5 okuma)	TOPLAM HACİM	190	190	190

Okumalar sonucunda, kör (background) ve pozitif kontrol değerleri aracılığıyla, örneklerdeki enzim aktivitesi (nmol/dk/ml) cinsinden hesaplanmıştır.

3.3.4. MDA düzeyinin ölçümü

Yöntemin esası, biyolojik örneklerde bulunan lipid peroksidasyonunun majör ürünü sayılan MDA (malondialdehit) ile TBA (tiyobarbitürik asit) arasında yüksek sıcaklıkta (90-100 °C) oluşan katım ürününün vermiş olduğu pembe rengin şiddetinin, 530 nm dalga boyunda kolorimetrik yöntemle ölçümüne dayalıdır.

Kullanılan cihaz ve kimyasallar

- ✓ Cayman Chemical marka kit (No.10009055)(Tablo 3.4)
- ✓ Bidistile su
- ✓ Pipet (tek kanallı ve çok kanallı)
- ✓ Mikroplaka okuyucu (Biotek Synergy H1)
- ✓ Santrifüj cihazı (IEC Centra MP4R)
- ✓ Benmari

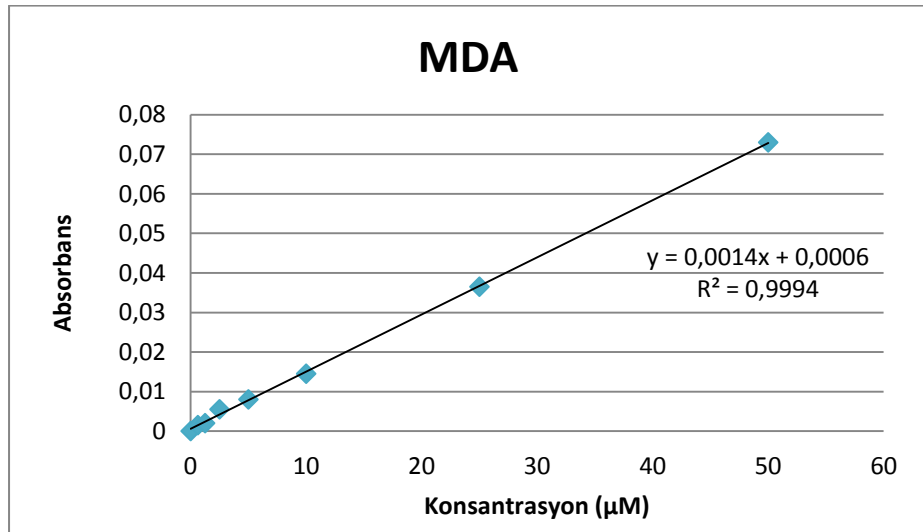
Deneyin yapılışı

Ölçümler, herbiri 96 kuyucuklu mikropiplarla aşağıda oluşturulmuş olan tabloya göre gerçekleştirilmiştir (Tablo 3.4).

Tablo 3.4. Malondialdehit düzeyi için hazırlıklar ve ölçümün tasarımı.

TBARS (MDA)											
<i>CH₃COOH</i> : 40 ml stok + 160 ml su									<i>NaOH</i> : 20 ml stok + 180 ml su		
Hazırlık									Reaktif	Standartlar (A-H)	Örnek
	A	B	C	D	E	F	G	H	Standart	100	
Stok	0	5	10	20	40	80	200	400			
Su	1000	995	990	980	960	920	800	600			
									Numune		100
									SDS	100	100
2 g TBA + 200 ml dilue CH ₃ COOH + 200 ml dilue NaOH									Renk Reaktifi	4000	4000
☉: 250 µl MDA stok st. + 750 µl su = 1 ml (=125µM MDA)									TOPLAM HACİM	150 µl /kuyucuk	150 µl /kuyucuk

Ölçümlerin sonucuna göre, standartlarla elde edilmiş değerlerden bir kalibrasyon doğrusu çizilmiş ve bu doğru aracılığıyla da, örneklerdeki MDA düzeyi (µM) cinsinden hesaplanmıştır (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Malondialdehit düzeyi ölçümüne ait kalibrasyon grafiği.

3.3.5. Glutasyon düzeyinin ölçümü

Yöntemin esası, glutasyon molekülündeki sülfidril grubunun, DTNB (5,5'-ditiyo-bis-2-(nitrobenzoik asit)) ile reaksiyon vererek sarı renkli TNB (5-tiyo-2-nitrobenzoik asit) açığa çıkarması; sonrasında da, GSH ile TNB arasında oluşan GSTNB adlı disülfid bileşiğinin GR enzimi tarafından indirgenmesiyle, GSH ve daha çok TNB oluşmasıdır. TNB'nin bu döngüsü sırasındaki değişim, örnekteki glutasyon düzeylerini saptayabilmek amacıyla, 405 nm dalga boyunda ölçülmektedir. Kullanılan kit aracılığıyla, bu şekilde dolaylı yoldan glutasyon düzeyleri ölçülmekte ve bu sayede hem indirgenmiş, hem de yükseltgenmiş (total) glutasyon düzeyleri ölçülmüş olmaktadır.

Kullanılan cihaz ve kimyasallar

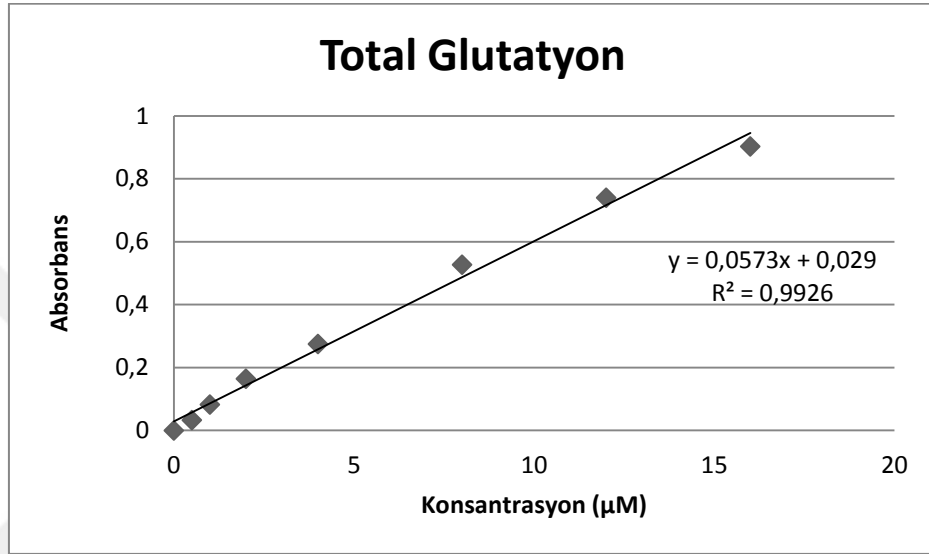
- ✓ Cayman Chemical marka kit (No.703002)
- ✓ Bidistile su
- ✓ Pipet (tek kanallı ve çok kanallı)
- ✓ Mikroplaka okuyucu (Biotek Synergy H1)
- ✓ Metafosforik asit (Alfa Aesar, 33267)
- ✓ Trietanolamin (Sigma, 90279)

Deneyin yapılışı

Örneklerin, analiz öncesinde deproteinasyona tabi tutulması gerekmektedir. Bunun için, %10 'luk metafosforik asit çözeltisi hazırlanarak örneklerin üzerine eşit hacimde eklenmiş ve vortekslenmiştir. Oda ısısında 5 dakika bekletilen örnekler, 2000 g devirde iki dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant alınarak, önceden hazırlanmış olan 4 M trietanolamin çözeltisinden 50 'şer µl eklenmiş ve derhal vortekslenmiştir.

Analize başlarken, öncelikle her kuyucuğa 50 µl örnek eklenmiştir. Kit içerisindeki reaktiflerle, tarif edilen şekilde "Assay Cocktail" hazırlanarak, derhal

her kuyucuğa 150 µl katılmış ve orbital çalkalayıcıda çalkalanmıştır. Mikroplaka okuyucuda 405-414 nm dalga boyunda, 5 dakikada bir olacak şekilde ve 30 dakika süreyle (toplamda 6 adet) okuma yapılmıştır. Okumalar sonucunda, standartlarla elde edilmiş değerlerden bir kalibrasyon doğrusu çizilerek, bu doğru aracılığıyla örneklerdeki glutatyon düzeyi (µM) cinsinden hesaplanmıştır (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Glutatyon düzeyi ölçümüne ait kalibrasyon grafiği.

3.3.6. Oksidatif DNA hasarının ölçümü

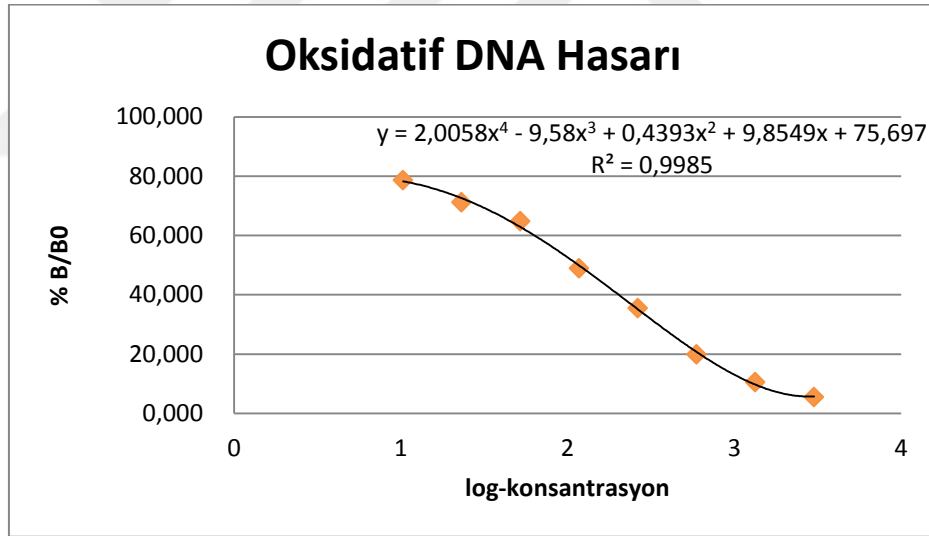
Analizin prensibi, keçi'den elde edilmiş olan "Anti-fare IgG monoklonal antikoru" ile kaplı kuyucuklara, tracer (AChE bağlı 8-OHdG) ile serbest haldeki oksidatif hasarlı guanin'in yarışmalı olarak bağlanması; sonrasında ise bağlanmayan moleküllerin Ellman Reajanı (AChE enziminin substratı) aracılığıyla uzaklaştırılarak, buradaki enzimatik reaksiyonun açığa çıkardığı sarı rengin şiddetinin 405-420 nm aralığında bir dalga boyunda ölçümüdür. Burada, bağlanan baz düzeyinin (tracer) saptanması aracılığıyla, bağlanmayan serbest hasarlı guanin miktarı (8-OHdG, 8-OHG ve 8-OH-guanozin toplamı) hesaplanmaktadır.

Kullanılan cihaz ve kimyasallar

- ✓ Cayman Chemical marka kit (No.589320)
- ✓ Ultra saf su
- ✓ Pipet (tek kanallı ve çok kanallı)
- ✓ Mikroplaka okuyucu (Biotek Synergy H1)

Deneyin yapılışı

Çalışmanın tasarımı ve uygulanması, kit içerisinde verilen yönergelere uygun olarak gerçekleştirilmiş ve hesaplamalar da yine kit içerisinde bildirilen yöntemle uygun olarak yapılmıştır. Standartların buna uygun şekilde kalibrasyonu, aşağıda gösterilmiştir (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Oksidatif DNA hasar düzeyi ölçümüne ait kalibrasyon grafiği.

3.3.7. Bukkal epitel hücrelerinde sitom taraması

Tez çalışması kapsamında tüm bireylerden alınmış olan bukkal epitel örnekleri, sitom taraması amacıyla Bolognesi ve diğ. tarafından yayımlanan yöntemle göre değerlendirilmiştir (136). Feulgen ve Light Green (Fast Green) ile

boyanan hücrelerin kalıcı ve parlak görünümlü olabilmesi ve bunun da mikroskopik analizde önemli kolaylık sağlamasından dolayı; boyamalar bu yolla yapılmıştır. Feulgen boyası DNA'ya özgü olarak, mikroskop altında parlak kırmızı görüntü oluşturan bir boyama yapmaktadır. Light green ise hücre sitoplazmasını parlak yeşil renge boyamaktadır. Giemsa ve May-Grünwald gibi boyalar ise, yanlış pozitif sonuçlara yol açarak mikroçekirdek sıklığının olduğundan daha yüksek değerlendirilmesine sebep olmakta ve bu yüzden bukkal hücre boyamalarında çok tercih edilmemektedirler (126).

Örneklerin değerlendirilmesi sırasında, analize uygun durumda bulunmayan 11 örnek (çalışma grubundan 1 örnek, kontrol grubundan 10 örnek) değerlendirme dışı bırakılmıştır.

Kullanılan cihaz ve kimyasallar

- ✓ Tıraşlı lam (Thermo Sci. Superfrost)
- ✓ Tahta spatül
- ✓ Metanol (Merck, 106009)
- ✓ Pararosanilin (Merck, 107509)
- ✓ Fast Green (Merck, 104022)
- ✓ Bidistile su
- ✓ Hidroklorik asit (Merck, 137007)
- ✓ Benmari
- ✓ Ksilen (Merck, 108665)
- ✓ Pipet (tek kanallı ve çok kanallı)
- ✓ Işık mikroskobu (Nikon Eclipse E200)

Deneyin yapılışı

Bireylerden, tahta bir spatül aracılığıyla her iki yanak içinden alınan sürüntü örnekleri, bekletilmeden ıslak lamalara yayılarak kurumaya bırakılmıştır. Kurumayı takiben %80 metanol ile fiksasyona tabi tutularak kurutulan örnekler,

Feulgen Boyama ile boyanmıştır. Bunun için, daha önceden kodlanmış lamalar, 1 N HCl ile sırasıyla 2 dak. oda sıcaklığında, 10 dak. 60 °C 'de ve 2 dak. oda sıcaklığında bekletilmiş, distile suyla yıkanarak kurumaya bırakılmıştır. Oda sıcaklığında ve karanlıkta 90 dak. süreyle Feulgen boyama (100 ml distile su içerisinde 1 g pararosanilin) yöntemi uygulanan lamalar, süre sonunda 5 dak. distile suyla yıkanmıştır. Lamalar, fast green solüsyonunda (100 ml etil alkol içinde 0.5 g fast green) 10 sn. için boyanmış ve 10 dak. ksilen'de bekletilmiştir. Son olarak kurutulan lamalar, ışık mikroskobu altında değerlendirmeye alınmıştır.

Değerlendirme amacıyla, literatürdeki sayım ve sınıflama kriterlerine uygun olarak, her birey için 2000 bukkal hücredeki anomali sıklıkları skorlanmış ve kayıt altına alınmıştır. Daha sonra, sayımı yapılan bu parametrelerin gruplar arası istatistiksel karşılaştırmaları gerçekleştirilmiştir.

3.3.8. Tek Hücre Jel Eletroforez (COMET) analizi

COMET analizinde hücreler agaroz kaplı lamlara eklenmekte; agaroz'da hücreler ve çekirdek zarları parçalanarak ortaya çıkan DNA, alkali veya nötral koşullarda elektroforez ile sürüklenmektedir. Hücreler uygun şekilde boyandıktan sonra, floresans mikroskopta analizleri gerçekleştirilmektedir. Sonuç çıktısı olarak, doğrudan oluşmuş veya DNA baz hasarından dönüşmüş olan sarmal kırıkları ölçülmektedir. DNA hasarının düzeyi, kuyruk uzunluğu (tail length) veya bu uzunluğun kuyruktaki floresans yoğunluğu ile çarpılması sonucu elde edilen değer (tail moment) olarak değerlendirilmektedir (129). Ayrıca, çok kullanışlı ve değişkenliği düşük bir değerlendirme yolu olması dolayısıyla, kuyruk bölgesindeki DNA'nın % olarak ifadesi (tail intensity) de, son yıllarda hasarın kantitatif ölçümü olarak yoğun şekilde kullanılmaktadır (137).

Bu tez çalışmasında COMET analizi, gerekli donanıma sahip olmasından dolayı Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Kullanılan cihaz ve kimyasallar

- ✓ R&D Systems Trevigen COMET Lamları (4250-200-03)
- ✓ Analiz Yazılımı (Perceptive Instruments COMET Assay IV)
- ✓ Yatay Jel Elektroforez Cihazı (Cleaver Scientific CSL-COM20)
- ✓ Floresans mikroskobu (Leica DM1000)
- ✓ pH metre (WTW pH330i / SET, Almanya)
- ✓ Lenfosit İzolasyon Tüpü (LeucoSep®)(Greiner Bio-One, Almanya)
- ✓ PBS tablet (Ambresco, ABD)
- ✓ Sodyum klorür (NaCl) (Merck, Almanya)
- ✓ Potasyum klorür (KCl) (Merck, Almanya)
- ✓ EDTA.2H₂O (Ambresco, ABD)
- ✓ Etanol (Merck, Almanya)
- ✓ Sodyum hidroksit (NaOH) (Ambresco, ABD)
- ✓ Düşük erime dereceli agar (LMA) (Sigma, ABD)
- ✓ Tris. HCl (Ambresco, ABD)
- ✓ Sodyum lauril sarkosinat (Ambresco, ABD)
- ✓ Triton X-100 (Ambresco, ABD)
- ✓ Dimetilsülfoksit (DMSO) (Sigma, ABD)
- ✓ Etidyum bromür (Sigma, ABD)

Deneyin yapılışı

PBS (Phosphate Buffered Saline)(pH 7.4): 10 tane PBS tablet, 900 ml kadar saf suda manyetik karıştırıcı yardımıyla çözülmüş ve çözeltinin pH'sı 7.4 olarak ayarlanmıştır. Çözelti balonjoje'ye aktararak, saf su ile 1 L hacme tamamlanmış ve +4 °C 'de saklanmıştır.

1 N NaOH: 4 gr NaOH tartılarak, distile su ile 100 ml hacme tamamlanmıştır.

Lizing Stok Çözeltisi: 146,1 g NaCl, 37,2 g EDTA ve 1,2 g Tris tartılarak, 500 ml distile su eklenmiştir. 10 gr NaOH eklenerek, pH=10 olarak ayarlanmıştır. Kimyasallar tamamen çözüldükten sonra, 10 g Sodyumlaurilsarkosinat eklenerek

çözününceye kadar karıştırılmış, sonrasında distile su ile 890 ml hacme tamamlanmıştır.

Lizing Çözeltisi: 0,7 ml Triton X-100, 7 ml DMSO ve 63 ml lizing stok çözeltisi, deneyin yapılacağı gün taze olarak karıştırılarak, buzdolabında soğuyuncaya kadar bekletilmiştir.

10 N NaOH çözeltisi: 200 g NaOH tartılarak, 500 ml distile suda çözülmüştür.

200 mM EDTA çözeltisi: 14,89 g EDTA tartılmış ve 200 ml suda çözülerek, pH=10 olarak ayarlanmıştır.

Elektroforez Çözeltisi: Deney gününde 6,5 ml 200 mM'lık EDTA, 39 ml 10 N NaOH ve 1254,5 ml soğuk su karıştırılmış; buzdolabında +4 °C 'de saklanmıştır.

Nötral Lizing Çözeltisi: 48,5 g Tris tartılarak 750 ml distile suda çözülmüş ve pH=7,5 olarak ayarlanmıştır. Daha sonra, distile su ile 1000 ml 'ye tamamlanmıştır.

Etidyum Bromür Çözeltisi: 10 mg etidyum bromür tartılarak 50 ml distile suda çözülmüş; bu stok (200 µg/ml) çözeltiden, boyama sırasında 1ml alınıp, 9 ml distile su eklenmiştir (20 µg/ml). Bu son çözeltiden, her bir lama 60 µl damlatılmıştır.

Düşük Erime Noktalı Agar (LMA) Çözeltisi: PBS (Na ve K içermeyen) ile çözülerek % 0,75 'lik çözeltisi hazırlanmış ve buzdolabında + 4 °C 'de saklanmıştır. Kullanılmadan önce su banyosunda 37 °C 'ye getirilmiştir.

Lenfosit izolasyonu için, LeucoSep® izolasyon tüplerine 3'er ml Biochrom koyularak, 1000 g devirde 10 saniye santrifüj yapılmış; bu şekilde lenfosit ayırım solüsyonunun dibe inmesi sağlanmıştır. Üzerlerine kan numuneleri koyularak, 1000 g devirde 10 dakika daha santrifüj yapılmıştır. Daha sonra, süpernatant 15 ml' lik tüpe alınmış; üzerine 10 ml'ye kadar PBS ilave edilerek, 250 g devirde 10

dakika daha santrifüj yapılmıştır. Süpernatant atılarak, lenfositlerden oluşan pellet PBS ile 2 ml 'ye tamamlanmış ve homojenize edilmiştir.

Hücreleri agara almak için, PBS içerisinde homojenize edilmiş olan hücrelerden, her bir lamda 10.000-20.000 arasında olacak şekilde hesaplanarak; 50 µl hücre süspansiyonunda 37 °C'de eritilmiş ve 100 µl % 0,5'lik LMA ile karıştırılarak, agar ile kaplanmış lamlara yayılmıştır. Lamaların üzerine lamel kapatıldıktan sonra, buzlu metal yüzey üzerinde yaklaşık 5 dakika bekletilerek agar'ın katılaşması sağlanmış; LMA donduktan sonra, lameller atılmıştır. Lamalar, daha önceden hazırlanıp buzdolabında bekletilen soğuk lizing çözeltisine daldırılarak, 1 saat süreyle buzdolabında bekletilmiştir.

Elektroforez uygulaması için tank, soğuk elektroforez çözeltisi ile uygun miktarda doldurulmuş; lizing çözeltisinden çıkarılan lamalar, agar yayılan kısımları üste gelecek ve hepsi aynı yöne bakacak şekilde tank içerisine yerleştirilmiştir. Lamalar bu çözeltide 20 dakika akım uygulamadan bekletildikten sonra, 25 V ve 300 mA akım altında, 20 dakika süreyle elektroforez uygulanmıştır. Bu sırada tankın ısınmasını engellemek amacıyla, tanka soğutucu su pompası bağlanmıştır.

Nötralizasyon ve hücrelerin fiksasyonu amacıyla, elektroforez işlemi sonucunda tanktan çıkarılan lamalar cam şale içerisine dizilmiş; bir kez distile sudan geçirilerek pH=7.4 'teki nötral lizing çözeltisi içerisinde 15 dakika bekletilmiştir. Hücreleri fikse etmek amacıyla, lamalar sırasıyla % 50, % 70 ve % 96'lık etil alkol içerisinde 5 'er dakika bekletilmiş; sonrasında kurutularak, okuma yapılıncaya kadar karanlıkta ve +4 °C 'de saklanmıştır.

Boyama ve mikroskopta değerlendirme için de, değerlendirilecek lamlara 60 µl (20 µg/ml) etidyum bromür çözeltisi eklenmiş; üzerine lamel kapatılarak 10 dakika karanlıkta bekletilmiştir. Bu sayede, DNA'nın floresan boya ile boyanması

sağlanmıştır. Daha sonra, floresan mikroskop aracılığıyla, jelin kapladığı alandaki bütün köşelerden 2 'şer mm içeride olacak şekilde rastgele tarama gerçekleştirilmiş; bu taramada üst üste gelen ve aşırı kuyruk oluşturmuş hücreler dikkate alınmamıştır. Lamlardaki okumalar, 'Comet Assay IV' yazılımı kullanılarak yapılmıştır. Kuyruktaki DNA yoğunluğu (tail intensity) değerleri, her lamda 100 hücre olacak şekilde kaydedilmiştir.

3.3.9. Metal Analizleri

Gönüllülerden alınan plazma örneklerindeki eser elementlerin ölçümleri yapılarak; her iki grup üzerinde karşılaştırılmalı olarak istatistiksel değerlendirme uygulanmıştır.

Kullanılan cihaz ve kimyasallar

- ✓ Mikrodalga asit dijesyon ünitesi (Milestone mls1200 mega)
- ✓ Atomik Absorbsiyon Spektrometresi (Perkin Elmer AAS-800)
- ✓ Santrifüj (IEC Centra MP4R)
- ✓ Bidistile su
- ✓ Pipet (tek kanallı ve çok kanallı)
- ✓ Nitrik asit (Merck, 100443)
- ✓ Hidrojen peroksit (Merck, 108597)

Deneyin yapılışı

Eser element tüplerindeki kan örnekleri santrifüj edilerek, plazma kısımlarından 1 ml alınmış ve asit dijesyon sisteminin teflon kaplarına konarak, üzerine 3 ml nitrik asit ve 0,5 ml hidrojen peroksit eklenmiştir. Kapakları sıkıştırılarak mikrodalga ünitesinde dijesyon işlemine tabi tutulmuştur. İşlem

sonrası kalan miktar, bidistile su ile 5 ml'ye tamamlanmış ve sonrasında Flame-AAS sistemiyle eser element düzeyleri tespit edilmiştir.

3.4. İstatistiksel Analiz

Ölçüm ve sayım yoluyla gerçekleştirilen analizler sonucu elde edilen veriler dağılımları itibariyle incelenmiş (Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro-Wilk), normal dağılıma uygunluk göstermedikleri saptanmıştır. Elde edilen verilerin normal dağılım göstermemeleri dolayısıyla, istatistiksel olarak yorumlanmalarında Mann-Whitney U testi, Spearman korelasyon analizi ve oluşan farklılıklar üzerinde yaş, cinsiyet ve sigara kullanımı gibi faktörlerin etkilerini değerlendirmek için de Kovaryans analizi yöntemleri kullanılmıştır. İstatistik hesaplamalar, gruplar arası farkın anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ kabul edilerek, bilgisayar ortamında SPSS 21.0 programı aracılığıyla gerçekleştirilmiştir.

BULGULAR

Numunelerin alındığı diş protez laboratuvarlarında yapılan hava ölçümleri sonucunda, çalışma ortamındaki metil metakrilat konsantrasyonları 25 – 50 ppm aralığında bulunmuştur.

Tez çalışmasında numune alınan gönüllülerin oluşturduğu maruziyet ve kontrol gruplarına ait önemli bazı veriler aşağıda sunulmuştur (Tablo 4.1)

Tablo 4.1. Gruplara ait demografik veriler.

GRUP ADI	Yaş (Ort.±St.Sapma)	Meslek süresi (Ort.±St.Sapma)	Erkek	Kadın	Sigara İçen	Sigara İçmeyen
Teknisyen (n=69)	35,289 ± 9,804	16,159 ± 9,111	61 (%88,4)	8 (%11,6)	40 (%58)	29 (%42)
Kontrol (n=67)	35,731 ± 8,682	—	45 (%67,2)	22 (%32,8)	23 (%34,3)	44 (%65,7)

Tüm gruplardaki analizler sonucu elde edilen, antioksidanlara ve lipid peroksidasyon ürününe ait veriler; normal olmayan dağılım sergilemelerinden dolayı, parametrik olmayan “Mann-Whitney U” testiyle değerlendirilmiş ve “Ortanca (En düşük – En yüksek)” şeklinde gruplara göre aşağıda gösterilmiştir (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. Antioksidan molekül aktiviteleri ve lipid peroksidasyon ürünü düzeylerinin gruplar arasında karşılaştırılması.

PARAMETRE	TEKNİSYEN (n=69)	KONTROL (n=67)	p
CAT (nmol/dk/ml)	80,451 (40,564 – 143,540)	74,139 (34,425 – 285,376)	>0,05
SOD (U/ml)	13,273 (5,271 – 28,624)	10,447 (0,471 – 18,607)	<0,001
GPx (nmol/dk/ml)	106,970 (2,546 – 187,962)	120,214 (0,509 – 166,059)	<0,05
Glutasyon (µM)	159,019 (46,017 – 324,769)	55,378 (16,894 – 179,747)	<0,001
MDA (µM)	5,000 (0,357 – 13,928)	3,500 (0,500 – 14,928)	<0,001

Tüm bireylerde yapılmış olan genetik hasar göstergelerine ait veriler de, “Mann-Whitney U” testiyle değerlendirilmiş ve “Ortanca (En düşük – En yüksek)” olarak gruplara göre aşağıda gösterilmiştir (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. Gruplara ait oksidatif DNA hasarı ve COMET analiz sonuçlarının karşılaştırılması.

PARAMETRE	TEKNİSYEN (n=69)	KONTROL (n=67)	p
8-OHdG (pg/ml)	6176,60 (2374,10 – 18019,80)	7643,10 (3498,72 – 30662,67)	<0,05
COMET (Tail intensity)	4,8882 (0,7649 – 30,6976)	4,75572 (0,5773 – 11,6133)	>0,05

Grupları oluşturan bireylerin serum eser element düzeylerinin istatistiksel olarak “Mann-Whitney U” testiyle karşılaştırılması, “Ortanca (En düşük – En yüksek)” şeklinde aşağıdaki tabloda sunulmuştur (Tablo 4.4).

Tablo 4.4. Serum eser element düzeylerinin gruplar arasında karşılaştırılması.

PARAMETRE	TEKNİSYEN (n=69)	KONTROL (n=67)	p
Bakır (µg/ml)	0,317 (0,063 – 0,666)	0,503 (0,265 – 2,039)	<0,001
Demir (µg/ml)	1,288 (0,411 – 3,935)	1,289 (0,168 – 2,209)	>0,05
Çinko (µg/ml)	0,259 (0,124 – 0,481)	0,376 (0,209 – 0,656)	<0,001

Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanan parametreler üzerinde cinsiyet, yaş ve sigara kullanımı gibi faktörlerin etkinliği de, kovaryans analiziyle istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve bu faktörlerin hangisinin oluşan farklılıkta etkili olduğu, aşağıdaki tabloda gösterilmiştir (Tablo 4.5).

Tablo 4.5. Ölçülen parametrelerde gruplar arası farklılığa etki eden faktörler ve etkilerinin anlamlılık düzeyleri.

PARAMETRE	FARKLILIK ETKENİ (p)			
	Maruziyet	Yaş	Cinsiyet	Sigara Kullanımı
SOD (U/ml)	<0,001	>0,05	>0,05	>0,05
GPx (nmol/dk/ml)	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
Glutasyon (µM)	<0,001	>0,05	>0,05	>0,05
MDA (µM)	=0,001	>0,05	>0,05	=0,008
8-OHdG (pg/ml)	<0,001	>0,05	=0,007	>0,05
Bakır (µg/ml)	<0,001	>0,05	<0,001	>0,05
Çinko (µg/ml)	<0,001	>0,05	>0,05	>0,05

Ölçümle elde edilen ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmış olan parametrelerden, SOD aktivitesi ile glutasyon ve çinko düzeylerinde gruplar arasındaki farkın diğer faktörlerden değil, metakrilat maruziyeti kaynaklı olabileceği değerlendirilmiştir. Gruplardaki GPx aktiviteleri arasında, sadece metakrilat maruziyetinin yarattığı fark anlamlılığa yakın bulunmakla birlikte (p=0,06); oluşan bu farklılığın değerlendirilen faktörlerden hiçbirinden etkilenmediği görülmüştür. Oksidatif DNA hasarı ve bakır düzeyleri arasındaki farkın nedeni incelendiğinde ise, metakrilat maruziyetinin yanı sıra cinsiyetin de bu farkın ortaya çıkmasında etkili olduğu görülmüştür. İki grup arasındaki MDA düzeylerinde görülen farkın da, metakrilat maruziyetinin ve sigara kullanımının etkisiyle ortaya çıktığı saptanmıştır.

Bukkal epitel hücrelerinde yapılmış olan mikroçekirdek sitom taraması ile ilgili parametrelerin, “Mann-Whitney U” testiyle elde edilen gruplar arası istatistiksel karşılaştırma sonuçları, “Ortanca (En düşük – En yüksek)” şeklinde aşağıdaki tabloda gösterilmiştir (Tablo 4.6). Bu analiz için hazırlanan numunelerden, maruz grupta bir adedi ve kontrol grubunda on adedi, uygun analiz koşullarını sağlamadığı için değerlendirme dışı bırakılmıştır.

Tablo 4.6. Bukkal epitel sitom taraması bulgularının istatistiksel karşılaştırılması.

PARAMETRE	TEKNİSYEN (n=68)	KONTROL (n=57)	p
Bazal Hücre	1,994 (0,000 – 19,733)	7,972 (0,000 – 97,463)	<0,001
Piknotik Hücre	8,496 (0,000 – 31,936)	2,000 (0,000 – 15,000)	<0,001
Karyolitik Hücre	44,422 (10,000 – 141,645)	58,970 (5,976 – 230,476)	<0,05
Karyorhektik Hücre	23,609 (3,976 – 122,000)	23,000 (0,000 – 108,945)	>0,05
Binükleer Hücre	0,969 (0,000 – 11,000)	0,000 (0,000 – 8,000)	>0,05
Kondanse Kromatin	14,877 (2,980 – 57,855)	37,981 (8,964 – 100,000)	<0,001
Kırık Yumurta	0,000 (0,000 – 4,992)	0,000 (0,000 – 5,896)	>0,05
Nükleer Tomurcuk (NBUD)	0,492 (0,000 – 3,994)	0,000 (0,000 – 1,000)	<0,001
MN içeren hücre sayısı	0,992 (0,000 – 6,012)	0,000 (0,000 – 3,000)	<0,001
MN sayısı	0,992 (0,000 – 10,000)	0,000 (0,000 – 6,000)	<0,001

Bukkal sitom taraması sonucunda, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmış parametreler üzerinde, yaş ve sigara kullanımının etkinliği de kovaryans analiziyle istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve bu farklılıkta hangi faktörlerin etkili olduğu, aşağıdaki tabloda gösterilmiştir (Tablo 4.7).

Tablo 4.7. Bukkal sitom sonuçlarında gruplar arası farklılığa etki eden faktörler ve etkilerinin anlamlılık düzeyleri.

PARAMETRE	FARKLILIK ETKENİ (p)		
	Maruziyet	Yaş	Sigara Kullanımı
Bazal Hücre	<0,001	<0,05	>0,05
Piknotik Hücre	<0,001	>0,05	>0,05
Karyolitik Hücre	=0,007	>0,05	>0,05
Kondanse Kromatin	<0,001	>0,05	>0,05
Nükleer Tomurcuk (NBUD)	<0,001	>0,05	>0,05
MN içeren hücre sayısı	<0,001	<0,05	>0,05
MN sayısı	<0,001	>0,05	>0,05

Bukkal sitom taraması sonucu elde edilen verilerdeki farklılıkların tamamında, metakrilat maruziyetinin etkili olduğu gör÷lm÷ştür. Bunun yanında, bazal hücre ve mikroçekirdek içeren hücre sayılarında yaş faktörünün de etkili olduğu, istatistiksel değ erlendirme sonucu saptanmı ştır.



TARTIŞMA

MMA kaynaklı olabileceği düşünölen patolojik ve toksikolojik etkiler, günümüze kadar yapılmış ve sayısı fazla olmayan bilimsel yayınlarda çoğunlukla *in vitro*; daha az olarak da *in vivo* olarak (protez kullanıcılarında) incelenmiş ve bu bileşenlerin sağlık riski oluşturabileceği yönünde sonuç ve görüşler ortaya konmuştur. Farklı parametrelerin değerlendirilmesiyle yapılmış bu çalışmalar, genellikle hücre kültürleri üzerinde veya üretilmiş protezleri kullananlarla gerçekleştirilmiştir. Mesleki olarak protez üretenlerdeki etkilerin incelendiği çalışmalar ise, daha da sınırlı sayıdadır. Bu tez çalışması kapsamında incelenmiş olan toksikolojik parametreler, ülkemizde daha önce mesleki MMA maruziyeti bulunan diş teknisyenlerinde incelenmemiştir.

Bu tez çalışması kapsamında, bireylerin maruziyetini gösterebilmek amacıyla işyeri ortam havasında MMA düzeyi ölçümü gerçekleştirilmiştir. İnhalasyonla maruz kalınan MMA'nın çok hızlı metabolize olması ve bu yüzden kan veya idrarda saptanamıyor olmasından dolayı, bu yöntem tercih edilmiştir.

Solunumla maruziyeti takiben MMA, çok hızlı bir şekilde metabolize olarak metakrilik asit ve metanol'e dönüşmekte; bu ürünler de kandan hızla uzaklaştırılmaktadır. MMA buharlarına solunum yoluyla maruz kalan teknisyenlerde, maruziyeti takiben derhal alınan kan örneklerinde MMA saptanması için yapılan bir çalışmada, serumda bu molekülü saptamak mümkün olmamıştır (14). Metabolitlerin saptanması amacıyla da, mesleki olarak MMA maruziyeti bulunan işçilerin, işyeri ortamında soludukları konsantrasyon ile idrar metanol düzeyleri arasındaki nicel ilişki incelenmiş ve solunan MMA konsantrasyonunun yalnızca % 1,5 kadarının idrarla metanol olarak atıldığı sonucu ortaya çıkmıştır (15). Ancak, metanol MMA'ya spesifik bir metabolit olmadığından, biyogösterge amaçlı kullanılmaktan uzak olarak kabul edilebilir.

Bu tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen işyeri ortam havası ölçümlerinin sonuçları (en yüksek 50 ppm), teknisyenlerin uluslararası otoritelerin belirlemiş olduğu maruziyet limitlerini aşmayan; düşük dozlarda MMA buharlarına maruz kaldığını ortaya koymuştur.

Tez kapsamında, mesleki olarak MMA maruziyetinin vücudun antioksidan savunma sistemi üzerindeki olası etkilerinin incelenmesi amacıyla, teknisyen grubunda ve kontrol grubunda SOD, CAT, GPx enzimlerinin aktiviteleri ile Total Glutasyon düzeyleri ölçülmüştür. İstatistiksel olarak yapılan karşılaştırma sonucunda, teknisyen grubundaki SOD aktivitesinin, kontrol grubuna göre belirgin artış gösterdiği görülmüştür ($p<0,001$). Bu artış üzerinde yaş, sigara kullanımı, cinsiyet gibi karıştırıcı faktörler ve MMA maruziyeti etkenlerinin hangilerinin etkili olabileceği istatistiksel olarak değerlendirilmiş, farkın sadece MMA maruziyetinden kaynaklandığı görülmüştür. CAT aktivitelerinde, gruplar arasında anlamlı sayılabilecek bir farklılık tespit edilmezken; teknisyen grubunun GPx aktivitelerinde, kontrol grubuna göre belirgin bir düşüş olduğu göze çarpmıştır ($p<0,05$). Bu farklılığın kaynağı olarak da yaş, cinsiyet, sigara kullanımı ve MMA maruziyetinin etkileri incelenmiş, sayılan hiçbir faktörün aradaki farklılıkta anlamlı bir etken olmadığı sonucu ortaya çıkmıştır. Bu çalışmada, hücre zarı lipidlerinin peroksidasyon ürünü olan MDA düzeylerinin teknisyenlerde yüksek çıkmasının; hücre zarı ve proteinlerini oksidasyona karşı koruyucu aktivite gösteren GPx enzim aktivitelerinde gözlenen bu düşüklükle bağlantılı olabileceği değerlendirilmiştir.

Vücudun antioksidan savunması üzerinde yaş, cinsiyet ve sigara kullanımı gibi faktörlerin etkilerini değerlendirmek amacıyla, ülkemizde yapılmış 257 kişiyi kapsayan bir çalışmada; yaş, cinsiyet ve sigara kullanımı faktörlerinin bazı oksidatif stres parametreleri üzerindeki etkileri incelenmiştir. Cinsiyetin, kandaki SOD, GPx ve MDA düzeyleri üzerinde istatistiksel açıdan anlamlı bir fark

yaratmadığı; yaş dikkate alındığında ise ileri yaş ile birlikte, SOD ve GPx değerlerinde anlamlı bir azalış; MDA düzeylerinde artış olduğu saptanmıştır. Sigara kullanımı göz önüne alındığında da, grupların GPx değerlerinde farklılık görülmezken; sigara içenlerin MDA değerlerinde içmeyenlere göre bir artış ve SOD değerlerinde azalış olduğu görülmüştür (138).

Bu tez çalışmasında görülen SOD ve GPx değerlerindeki farklılıklarda, yukarıda bahsi geçen çalışmayla uyumlu olarak, cinsiyet faktörü ve sigara kullanımının etkili olmadığı gözlemlenmiştir. Ancak, yukarıdaki çalışmadan farklı olarak, tezdeki parametreler üzerinde yaş faktörünün de bir etkisinin olmadığı sonucuna varılmıştır.

Tez çalışmasındaki teknisyen grupta, vücuttaki antioksidan savunmanın en önemli molekülü sayılan glutatyon düzeylerinde, kontrollere göre ciddi bir yükselme saptanmıştır ($p<0,001$). Bu yükseliş üzerinde de yaş, sigara kullanımı, cinsiyet faktörleri ve MMA maruziyetinden hangilerinin etkili olabileceği istatistiksel olarak incelenmiş; artışın sadece MMA maruziyeti kaynaklı olduğu görülmüştür. Tez çalışması kapsamında saptanmış olan GPx aktivitesi düşüklüğünün de, bu yükselişle ilişkili olabileceği değerlendirilmiştir.

Meister tarafından, radyasyon, oksidatif hasar ve toksikanların birçoğuna karşı hücre direncinin artırılmasının, hücrel glutatyon düzeylerinin artırılmasıyla sağlanıyor olabileceği yönünde görüş bildirilmiştir. Ancak, dışarıdan vücuda verilen glutatyon, GSH düzeylerinde çok hafif düzeyde artış sağlayabilmektedir (96). Parkinson, Wilson hastalığı, AIDS, pulmoner fibrosis ve kanser gibi oksidatif stresle bağlantılı olduğu öne sürülen birçok hastalıkta da, glutatyon düzeylerinde artışa rastlanabilmektedir. Hücrel glutatyon düzeylerinin sürdürülebilirliği ise, esas olarak yeniden (*de novo*) sentezle sağlanmaktadır (105).

Glutasyon sentez enzimlerinin hepatik ekspresyonu, oksidatif stresin erken dönemlerinde adaptif bir cevap olarak artış göstermektedir (139). Oksidatif strese karşı gelişen hücresel adaptif cevap kapsamında, artan tiyol kullanımına cevaben glutasyon sentezinin artırılmasındaki kritik aşama, sentezdeki hız kısıtlayıcı basamağı oluşturan GCL (Glutamat sistein ligaz veya γ -glutamilsisteinil sentetaz) enziminin aktivitesinin artmasıdır. Bu artış da, GCL enzimini kodlayan genlerdeki transkripsiyonel aktivasyonla ortaya çıkmaktadır (91).

Oksidatif stres, GCL alt ünitelerinin doğrudan post-translasyonel modifikasyonu sonucunda da, enzimin aktivitesinde önemli artış oluşturabilmektedir (95). Hücrede oksidatif strese yol açan birçok etken (metilciva, menadion, sitokinler, radyasyon, H_2O_2 , vb.) tarafından GCL enziminin aktivitesi, glutasyon sentez aktivitesinden sorumlu ağır alt ünitesinin transkripsiyonu dolayısıyla artırılmaktadır (93).

İnsanlarda, tümör hücrelerindeki glutasyon düzeyleri normal hücrelerdekinden farklılık göstermektedir. Özellikle göğüs, baş-boyun, over ve akciğer tümörlerindeki glutasyon düzeylerinin, normalden daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir (140). Kanseri hücrelerindeki glutasyon düzeylerinin artmasının, tedaviye karşı direnç gelişiminin en önemli sebeplerinden biri olduğu bildirilmiştir. Bu artıştan dolayı, tümör hücrelerinin DNA ve proteinleri oksidatif hasara karşı korunmakta ve DNA onarım süreçleri aktifleşmektedir (94).

İnsan over tümörü hücre dizilerinde (141) ve hepatosellüler karsinoma hücrelerinde (94) yapılmış çalışmalarda, GCL enzimi ağır alt ünitesinin mRNA düzeylerindeki artış dolayısıyla glutasyon düzeylerinin katlarla ifade edilen düzeylerde artmış olduğu, cisplatin gibi kanser tedavilerine karşı direnç gelişiminde de, glutasyon düzeylerindeki bu artışın rol oynadığı öne sürülmüştür.

İnsan bronşial epitel hücrelerinde, menadion gibi kimyasallar aracılığıyla (142), yine insan fibroblast hücrelerinde hafif düzeydeki ısı şoku etkisiyle (143) ve rat pulmoner epitel hücrelerinde kinon maruziyeti (144) sonucunda oluşturulan ve hücre için ölümcül düzeyde olmayan oksidatif stresin, söz konusu hücrelerde hızlı ve etkin bir adaptif cevap oluşturduğu ve bu kapsamda, GCL enzimi ağır alt ünitesinin mRNA ve protein düzeylerindeki artış sağlanarak enzim aktivasyonunda artma ve böylece glutatyon seviyelerinde yükselme meydana geldiği gösterilmiştir.

Egzos gazları, hava kirliliği ve sigara kullanımı sonucu maruz kalınan ve α/β doymamış aldehit yapılı bir ksenobiyotik olan 'akrolein' toksisitesine karşı ilk savunma da, glutatyon tarafından sağlanmaktadır. İnsan bronşial epitel hücrelerinde, düşük dozlarda akroleine maruziyetin incelendiği bir çalışmada, adaptif cevap gelişimi sonucu, yüksek dozdaki akrolein toksisitesine karşı bir tür koruma geliştiği saptanmıştır. Burada da, GCL gen ekspresyonunun artırılması sonucu glutatyon düzeylerinin yükselmesi; yani hormetik bir cevap gelişiminin söz konusu olduğu görülmüştür (145).

Bu tez çalışmasında, maruz grupta saptanmış olan glutatyon yüksekliğinin de, yukarıda bahsi geçen çalışmalarla uyumlu olarak, oksidatif strese karşı gelişmiş adaptif cevap kapsamında ortaya çıktığı değerlendirilmiştir.

Lipid peroksidasyonunun en toksik ürünlerinden olan MDA, vücuttaki oksidatif stresin genel durumu bakımından da potansiyel bir biyogösterge niteliği taşımaktadır. Bu tez çalışmasında ölçülen MDA düzeylerinin iki grup arasında karşılaştırılması sonucunda, teknisyenlerde kontrol grubuna göre belirgin düzeyde artış saptanmıştır ($p<0,001$).

Aydın ve diğ. tarafından, uzun süreli MMA maruziyetine bağlı olarak solunum yolu ve antioksidan sistemin havalandırma koşullarından nasıl

etkilendiği, deney hayvanlarında gerçekleştirilen bir çalışmayla araştırılmıştır. Bu amaçla bir ay süresince, haftada 5 gün ve günde 6 saat boyunca, inhalasyon yoluyla 1000 ppm MMA'ya maruz bırakılan ratlar, değişik havalandırma koşullarına göre gruplara ayrılmış; gruplar arasında yapılan karşılaştırmada, zayıf havalandırma koşullarında MMA maruziyeti bulunan hayvanların eritrosit glutatyon düzeylerinde, kontrole göre anlamlı bir düşüş ve MDA düzeylerinde kontrole göre anlamlı artış olduğu saptanmıştır. Normal havalandırma koşulları uygulanan grubun glutatyon ve MDA değerleri arasında, belirgin fark saptanmamışken; tüm grupların SOD değerleri arasında, zayıf havalandırma koşullarında dahi farklılık görülmemiştir (146).

Tez çalışması için ölçüm yapılan diş protez laboratuvarlarındaki havalandırma koşullarının vasat durumda olduğu dikkate alınırsa; tezdeki maruz grubu oluşturan ve MMA buharlarına sürekli olarak kontrolsüz değişkenlikteki dozlarda maruz kalan bireylerin MDA düzeylerinde de, yukarıdaki çalışmada zayıf havalandırma koşullarında bulunan gruba benzer şekilde artış; glutatyon'da ise aksi yönde azalma değil artış olduğu görülmektedir. Bu durumun da, MMA maruziyeti kaynaklı artmış olan oksidatif stres ve lipid peroksidasyonuna karşı gelişen adaptif cevabın bir sonucu olduğu değerlendirilmiştir.

Bununla birlikte, MDA oluşumu üzerinde en etkilileri yaş, cinsiyet ve sigara kullanımı başta olmak üzere, birçok risk faktörleri de etkili olabilmektedir (114,147). Tez çalışmasındaki maruz grupta saptanmış olan MDA artışında da bahsi geçen risk faktörlerinin etkileri incelenmiş; yaş ve cinsiyetin bu artışta etkisiz olduğu, ancak MMA maruziyetinin ve sigara kullanımının, artan MDA düzeylerinde etkili olduğu bulunmuştur.

Lykkesfeldt tarafından, MDA (TBARS) düzeylerine sigara kullanımının etkileri konusunda yapılmış birçok çalışmanın derlenmesi sonucunda, sigara kullananların MDA düzeylerinde, incelenen çalışmaların % 80 kadarında

istatistiksel olarak anlamlı artış; % 12 kadar çalışmada ise anlamlı olmayan bir artış olduğu bildirilmiştir. Elde edilen veriler ışığında, plazma MDA konsantrasyonu ile sigara kullanımı arasında doza bağımlı bir ilişki olduğu düşünülmüştür (68). Tez çalışmasında elde edilen MDA verileri de, bu bulgularla uyumlu olarak, sigara kullanımının MDA düzeylerindeki artışa etki ettiğini göstermektedir.

Gerek çevresel, gerekse mesleki olarak birçok maruziyetin 8-OHdG düzeylerine etkileri, yapılmış birçok çalışmada araştırılmıştır ve geniş çeşitlilikte; yani çelişkili sonuçlar ortaya konmuştur. Maruziyetlere dair iyi tanımlanmış bir doz-cevap eğrisinin olmaması ve yaş, cinsiyet, beslenme, sigara, alkol, fiziksel aktivite, vitamin düzeyleri gibi birçok karıştırıcı faktörün 8-OHdG oluşumunu etkilemesinden dolayı, bu parametrenin özellikle 'işyeri maruziyetleri' için spesifik bir biyogösterge olamayacağı öne sürülmüştür(148).

Gerçekleştirilen bu tez çalışmasında, teknisyen grubunun 8-OHdG kan düzeylerinde kontrole göre istatistiksel olarak belirgin bir düşüklük saptanmıştır ($p<0,05$). Gruplar arasındaki farklılık sebepleri de istatistiksel olarak analiz edilmiş; yaş ve sigaranın bu farklılıkta etkisiz olduğu, farkın MMA maruziyeti ve cinsiyet faktörünün etkisiyle olduğu ortaya çıkmıştır.

8-OHdG için karıştırıcı faktör olarak sıklıkla sigara kullanımı tanımlanmış olmasına karşın; Pilger ve Rüdiger tarafından çeşitli mesleki maruziyet incelemeleri değerlendirilmiş ve sonuç olarak, aynı maruziyete sahip bireylerden sigara içenlerde daha yüksek 8-OHdG düzeylerine rastlanmadığı ortaya konmuştur (117). Tez çalışması sonunda elde edilen 8-OHdG düzeyi farkına sigara kullanımının etkili olmadığı yönündeki bulgular, buradakilerle uyum göstermektedir.

İnsan lökositlerindeki DNA hasarının biyogöstergesi olarak 8-OHdG düzeylerinin incelendiği bir çalışmada, kişiler arası geniş bir değer aralığı bulunmakla birlikte bu tez çalışmasından farklı olarak, günde 10 adetten fazla sigara kullanan sağlıklı insanlarda belirgin bir 8-OHdG artışı görülmüştür (149).

van Zeeland ve diğ. tarafından yapılan başka bir çalışmada da, yukarıda bahsedilen çalışmadan ve bu tezdeki bulgulardan farklı şekilde; özellikle günde 20'den fazla sigara içen sağlıklı erişkinlerin lökositlerindeki 8-OHdG düzeylerinin, hiç içmeyenlerinkinden daha düşük olduğu bulunmuştur. Bunun altında yatan sebebin de, oksidatif hasar onarım mekanizmalarının sigara tarafından uyarılması olduğu değerlendirilmiştir (150).

Pilger ve diğ. tarafından, mesleki kuvarz maruziyeti bulunan kişiler üzerinde yapılan bir başka çalışmada ise, silikozis gelişmiş olan kişilerin idrar ve lökosit 8-OHdG düzeylerinde, sağlıklı çalışanlara göre anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır. Yaş ve sigara kullanımı gibi faktörlerin de, bu tezdeki sonuçlara benzer şekilde, idrar ve lökosit 8-OHdG düzeylerinde anlamlı fark oluşturmadığı gözlenmiştir (151).

Yukarıda bahsedildiği gibi, bu tez çalışmasındaki 8-OHdG düzeylerinde ortaya çıkan farklılık, literatürde geçen ve geniş çeşitlilik arz eden sonuçların bir kısmıyla çelişmekte; bir kısmıyla da uyumluluk göstermektedir. Teknisyen grubun 8-OHdG düzeylerinde görülen düşüşün, vücudun düşük düzey MMA maruziyetine karşı geliştirdiği glutatyon artışı gibi adaptif mekanizmalar dolayısıyla, DNA'nın da oksidatif hasara karşı korunmuş olabileceği şeklinde değerlendirilmiştir.

Tez kapsamında incelenen parametrelerden, Glutatyon düzeyi ile SOD aktivitesi ($r=0,390$; $p<0,001$) ve Glutatyon ile MDA ($r=0,340$; $p<0,001$) düzeyleri arasında, pozitif yönde korelasyon saptanmıştır. Bu korelasyonun varlığı, maruz

grupta artmış olan SOD aktivitesinin sonucu olarak artan hidroksil radikali aracılığıyla, hem lipid peroksidasyonunda bir artma olduğunu; aynı zamanda oluşan bu radikalin bertaraf edilmesi için, savunma mekanizması olarak glutatyon düzeylerinin artırılmış olabileceğini düşündürmüştür. Bununla birlikte, 8-OHdG ile Glutatyon düzeyleri arasında, negatif korelasyon saptanmıştır ($r=-0,186$; $p=0,03$). Green ve diğ. tarafından yapılmış bir çalışmada da, bu tezdekine benzer bir negatif korelasyona rastlanmıştır; sonuç olarak mitokondriyal ve çekirdekteki glutatyon havuzlarının, özellikle DNA'yı oksidatif hasara karşı koruyucu özellikte olduğu görülmüştür (152).

Genetik toksisite göstergelerinden biri olarak bu tezde incelenmiş olan 'bukkal mikroçekirdek sitom analizi' sonucunda, diş teknisyenlerinin piknotik hücre, nükleer tomurcuk ve mikroçekirdek sıklığı değerlerinde, kontrol grubuna göre belirgin bir artış dikkati çekmiştir ($p<0,001$). Bu artışa etki edebileceği düşünülen, yaş ve sigara kullanımı gibi karıştırıcı faktörlerin istatistiksel olarak değerlendirilmesi sonucunda, sadece yaş faktörünün gruplar arasındaki MN içeren hücre sayısı ve bazal hücre farklılıkları üzerinde anlamlı etkisinin olduğu; oluşmuş farklılıkların tümündeki asıl kaynağın ise, MMA maruziyeti olduğu görülmüştür. Sigara kullanımının, gruplar arası bukkal mikroçekirdek sıklığı ve incelenen diğer parametrelerin farklılıkları üzerinde anlamlı bir etkisinin olmadığı sonucu ortaya çıkmıştır. Diş teknisyenlerinin bazal hücre ve kondanse kromatin değerlerinin ise, kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldığı dikkat çekmiştir. Bazal hücrelerdeki bu azalma, maruziyete bağlı olarak proliferasyon oranının azaldığını, yani hücre yenilenmenin yavaşlamış olduğunu; kondanse kromatin azalışı da, aynı maruziyet dolayısıyla mitoz depresyonu gelişimini düşündürmüştür.

Azhar ve diğ. tarafından, diş teknisyenlerinden oluşan küçük bir örneklem grubunda (13 maruz-14 kontrol) yapılmış bir çalışmada, bu tezdeki bulguların

aksi yönde; bukkal mikroçekirdek sıklığında kontrol grubuna göre anlamlı fark bulunmadığı sonucuna varılmıştır (153). Ancak, buradaki örneklem küçüklüğünün, durumun gerçek haliyle yansıtılmasını etkileyebileceği açıktır. Bu tez çalışmasındaki bulgularla uyumlu olarak ise, dizel yakıtlara (154), alkollü ağız sularına (155), pamuk (156) ve kömür tozuna (157) maruz kalan bireylerde gerçekleştirilen bukkal sitom taraması çalışmalarında, incelenen birçok parametrede sitotoksik ve genotoksik etkiler bakımından belirgin artış saptanmıştır.

Karahalil ve diğ. tarafından, mesleki olarak pAH maruziyeti bulunanlarda yapılmış bir başka çalışmada ise, bukkal mikroçekirdek sıklığı ile yaş ve sigara kullanımı arasında anlamlı bir ilişkinin bulunmadığı yönünde sonuçlar alınmıştır (158). Bu bulgunun aksine, bu tez çalışmasında yaş ile MN sıklığı arasında pozitif korelasyon bulunduğu görülmüştür ($r=0,283$; $p<0,05$).

Tez çalışmasında, diş teknisyenlerinin meslekte geçirdiği süre ile bukkal sitom taraması kapsamında incelenen hiçbir parametre arasında ilişki saptanmamış; bu durum bukkal hücrelerde görülen genotoksik etkilerin, MMA tarafından zamana bağlı olmadan da oluşturulabildiğini düşündürmüştür. Buna benzer bir sonuç, Bruschweiler ve diğ. tarafından, mesleki olarak odun tozuna maruz kalan bireylerde de gözlenmiş; genel olarak bukkal hücrelerde kontrole göre farklı sonuç bulunmakla birlikte, maruz kalma süresinin bu farklılıkta etkili olmadığı tespit edilmiştir (159).

Ülkemizde yapılmış bir başka çalışmada ise, diş teknisyenlerinde nazal mukoza ve lenfositlerdeki mikroçekirdek sıklıkları incelenmiştir. Genel olarak bakıldığında, diş teknisyenlerinin nazal mukoza ve lenfositlerindeki mikroçekirdek sıklığının, kontrol grubundakilere oranla 3 kat civarında artmış olduğu göze çarpmıştır. Nazal epitel hücrelerindeki mikroçekirdek sıklığı ile

meslek süresi arasında korelasyon görülmemiştir (131). Bu çalışmadan elde edilen sonuçlarla, tez çalışmasında elde edilenler arasında uyumluluk görülmektedir.

Sigara veya çiğneme şeklinde kullanılan alışkanlık yapıcı maddeleri kullananlarda gerçekleştirilmiş bir çalışmada, mikroçekirdek ve COMET analizlerinin genotoksik etkileri değerlendirmedeki etkinlikleri karşılaştırılmış ve aralarında güçlü bir korelasyon bulunduğu sonucuna varılmıştır. Buna göre, kandaki genotoksik etkilerin tespiti amacıyla, her iki yöntemin de aynı etkinlikte kullanılabileceği görüşü ortaya konmuştur (160).

COMET analizinde kuyruktaki % DNA oranının, değişkenlik göstermemesi nedeniyle değerlendirme yapılırken seçilebilecek en uygun parametre olduğu bildirilmiştir (121). Tez çalışması kapsamında, her iki gruptaki bireylerin lenfositlerinde gerçekleştirilen COMET analizi sonucunda, gruplar arasındaki 'kuyruk DNA yoğunluğu' değerlerinde anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir. Ayrıca, maruz grubun COMET değerleri üzerinde yaş ve meslek süresi gibi faktörlerin de etkili olmadığı görülmüştür. Bu sonuçların, maruziyetin düşüklüğü dolayısıyla ortaya çıkmış olabileceği değerlendirilmiştir.

COMET analizi, günümüze kadar birçok mesleki maruziyetin incelenmesinde kullanılmıştır. Bu kapsamdaki çalışmaların birinde, ameliyathane koşullarında anestezi gazlarına mesleki olarak maruz kalan personelde yapılan COMET analizi sonucunda, tez çalışmasının aksine, maruz gruptaki DNA hasarında, kontrole göre belirgin düzeyde artış olduğu saptanmıştır (161).

Onkoloji departmanında çalışan ve antineoplastik ilaçlarla mesleki olarak temasta bulunan hemşirelerde yapılmış bir çalışmada ise, COMET analizi sonucu DNA hasarının kontrole göre anlamlı değişiklik göstermediği saptanmış; tez kapsamında elde edilenlerle uyumlu olan bu sonuç, eldiven ve maske gibi koruyucu tedbirlerin kullanımına bağlanmıştır (162).

Toksikolojik veya biyolojik anlamıyla stres, “fiziksel, kimyasal veya biyolojik bir etken tarafından oluşturulan ve yaşayan sistemin etkileşme, adaptasyon veya hayatta kalabilmek gibi amaçlarla bir dizi cevap faaliyeti başlatmasına yol açan sinyal” olarak tanımlanmaktadır (81). Yüksek dozlarıyla toksisite yaratan stres oluşturunca etkenlerin (kimyasallar, radyasyon, ısı değişimleri, egzersiz, iskemi, vb.), maruz kalınan düşük dozlarına karşı, hücresel yaşamın sürdürülebilmesi için gereken proteinler ve antioksidan sistemler gibi savunma mekanizmalarının artırılarak adaptif biyolojik cevap oluşturulması, “hormesis” veya “hormetik cevap” olarak adlandırılmaktadır (163,164,165,166). Günümüzde biyolojik gerçekliği bakımından geniş kabul gören bu olgu, sonuç çıktıları, bunların elde edildiği biyolojik model ve stres etkeninin türünden bağımsız olarak; genel bir kavram şeklinde literatürde yer almaktadır (167).

Düşük doz maruziyetlerin oluşturduğu uyarıcı etkileri tanımlamakta kullanılan ve giderek daha geniş bilimsel kabul görmekte olan bu olgunun da katkısıyla, bu tez kapsamında, düşük dozda mesleki MMA maruziyeti bulunan bireylerden elde edilen veriler değerlendirilmiş ve adaptif cevap gelişimini gösteren sonuçlar ortaya çıkmıştır.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Diş teknisyenleri, MMA maruziyeti bakımından özel risk altındaki bir meslek grubudur. Bundan dolayı gerek sivil kuruluşlarda, gerekse Türk Silahlı Kuvvetleri sağlık teşkillerinde çalışan diş teknisyenlerinin, mesleki maruziyetler dolayısıyla karşılaşılabileceği toksikolojik risklerin incelenmesi önem arz etmektedir. Bu tez çalışmasıyla, söz konusu meslek grubundaki toksikolojik risklerin, oksidatif stres ve genotoksisite boyutlarıyla incelenmesine çalışılmıştır.

Toksikolojik yönden MMA, ulusal ve uluslararası düzenleyici otoriteler tarafından kapsamlı şekilde değerlendirilmiştir. Kanıtlar, deney hayvanlarında karsinogenik etkili olmadığı yönündedir; insanlarda ise karsinogenitesi hakkında yeterli kanıt bulunmamaktadır. Bu maddeye mesleki olarak maruz kalma sonucunda ise, malignant dönüşümlerin normale göre daha sık olduğunu gösteren yeterli düzeyde bilimsel veri bulunamamıştır. Hayvan deneyleri sonucunda, üreme organlarında ve fertilitede bozulmaya yol açmadığı görülen MMA, gözler, cilt ve solunum sistemi üzerinde iritan etki gösterebilmektedir. MMA monomerleri, iritan etkilerinden korunmak amacıyla kullanılan lateks ve vinil yapılı eldivenlerden kolaylıkla geçebilmektedir. Ayrıca, tıbbi amaçlı yüz maskelerinin de, MMA buharlarına karşı koruyucu etkisi bulunmamaktadır. Bu etkilerden korunmak amacıyla, nispeten daha dayanıklı olan neopren eldivenler kullanılmalı ve en önemli tedbir olarak da, çalışma ortamında sürekli ve etkin bir havalandırma sağlanmalıdır. Maruziyeti engellemenin en etkili yolu olarak, buharların ortamdan hızlı şekilde uzaklaştırılması sağlanmalıdır. Uçucu özellikli ksenobiyotiklere ilk maruziyet bölgesi olan ağız ve burun mukozasında oluşan; ayrıca bu tez çalışmasında da saptanmış olan mikroçekirdek oluşumu gibi genotoksik etkilerin önüne, ancak maruziyetin engellenmesiyle geçilebilecektir.

Yaşayan organizmalar, çevresel koşullarla başedebilmek için birçok mekanizma geliştirmişlerdir. Bu mekanizmaların temelinde, vücudun

homeostazının sürdürülebilmesi; bozulmuşsa da eski haline döndürülmesi yatmaktadır. Söz konusu bozukluk, günlük hayattaki birçok etken tarafından oluşturulan oksidatif stres dolayısıyla da ortaya çıkabilmektedir. Oksidatif stres ve buna neden olan birçok etkene maruziyet; sürekli incelenen ve bilimsel literatüre her geçen gün yeni bilgilerin eklendiği bir konu olarak, güncelliğini korumaktadır. Oksidatif stresin düzeyi, organizmanın vereceği yanıtı da etkileyen bir unsurdur. Yüksek dozlardaki oksidatif stres hücreler için ölümcül sonuçlara yol açabiliyorken; düşük dozlara karşı savunma mekanizması tarafından oluşturulan yanıt, organizma için koruyucu işlev de görebilmektedir. Vücudun, daha yüksek dozdaki olası maruziyetlere karşı tedbir amaçlı geliştirdiği ve 'hormetik cevap' olarak adlandırılan bu olguya, bilimsel literatürde gittikçe artan sıklıkta rastlanmaktadır.

Bu tez kapsamında elde edilen bulguların ilgili literatür verileriyle karşılaştırılması sonucu, diğ teknisyenlerinde MMA buharlarına solunum yoluyla düşük dozda maruz kalmanın, GPx aktivitesinde ve 8-OHdG düzeylerinde azalma ve GSH düzeylerinde artma şeklinde ortaya çıkan bir hormetik cevap gelişimine neden olduğu değerlendirilmiştir. Maruz grubun SOD aktivitesi ve MDA düzeylerindeki artışın da, hidroksil radikali aracılıklı olabilecek bir oksidatif stres durumunu gösterdiği ve oluşan hormetik cevabın, düşük düzeydeki bu oksidatif strese karşı oluştuğu düşünülmüştür.

Bu öngörünün aydınlatılabilmesi amacıyla, özellikle glutatyon redoks döngüsünün diğer bileşenleri olan 'glutatyon redüktaz' ve 'glutatyon-S-transferaz' enzimlerinin ve spesifik olarak okside glutatyon düzeylerinin ölçümü, daha ileri düzeyde detaylı değerlendirmeye olanak sağlayacaktır. Buna ek olarak, DNA onarım enzimlerinin ölçümlerinin yapılmasıyla, baz hasarlarının onarım durumları da netleştirilmiş olacaktır. Ayrıca, oksidatif stres ve buna bağlı DNA hasarlarının azaltılmasını destekleyen lipoik asit, askorbik asit, melatonin gibi

antioksidanların kullanımının, söz konusu personeldeki MMA kaynaklı potansiyel zararların önüne geçmede etkili olacağı düşünülmektedir.

Tez çalışması kapsamında, uçucu özellikteki MMA'ya mesleki yolla kronik şekilde maruz kalan diş teknisyenlerinde, ilk maruziyet bölgesi olmasından dolayı önem arz eden bukkal epitel hücrelerindeki mikroçekirdek sıklığının, belirgin olarak arttığı saptanmıştır. Bu maddenin ilk maruziyet bölgesinde oluşturduğu genotoksik etkilerin, sistemik olarak ne düzeyde ortaya çıktığının daha net şekilde saptanması amacıyla lenfositlerdeki mikroçekirdek sıklığının da tespit edilmesi, mesleki maruziyetin olası etkileri hakkında önemli bilgiler sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

1. Johannsen, F.R., Vogt, B., Waite, M., Deskin, R. Mutagenity assessment of acrylate and methacrylate compounds and implications for regulatory toxicology requirements. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 50(3), 322-335, 2008.
2. Leggat, P.A., Smith, D.R., Kedjarune, U. Surgical applications of methyl methacrylate: a review of toxicity. *Archives of Environmental and Occupational Health*, 64(3), 207-212, 2009.
3. Aalto-Korte, K., Alanko, K., Kuuliala, O., Jolanki, R. Methacrylate and acrylate allergy in dental personnel. *Contact Dermatitis*, 57, 324-330, 2007.
4. Goldberg, M. *In vitro* and *in vivo* studies on the toxicity of dental resin components: a review. *Clinical Oral Investigations*, 12(1), 1-8, 2008.
5. Kuehn, K.D., Ege, W., Gopp, U. Acrylic bone cements: composition and properties. *The Orthopedic Clinics of North America*, 36(1), 17-28, 2005.
6. Bettencourt, A.F., Neves, C.B., de Almeida, M.S., Pinheiro, L.M., e Oliveira, S.A., Lopes, L.P., Castro, M.F. Biodegradation of acrylic based resins: A review. *Dental Materials*, 26(5), 171-180, 2010.
7. Leggat, P.A. ve Kedjarune, U. Toxicity of methyl methacrylate in dentistry. *International Dental Journal*, 53, 126-131, 2003.
8. Shehata, M., Durner, J., Eldenez, A., Van Landuyt, K., Styllou, P., Rothmund, L., Hickel, R., Scherthan, H., Geurtsen, W., Kaina, B., Carell, T., Reichl, F.X.

Cytotoxicity and induction of DNA double-strand breaks by components leached from dental composites in primary human gingival fibroblasts. *Dental Materials*, 29(9), 971-979, 2013.

9. Rom, W.N., Lockey, J.E., Lee, J.S., Kimball, A.C., Bang, K.M., Leaman, H., Johns, R.E. Jr., Perrota, D., Gibbons, H.L. Pneumoconiosis and exposures of dental laboratory technicians. *American Journal of Public Health*, 74(11), 1252-1257, 1984.
10. Jorge, J.H., Giampaolo, E.T., Machado, A.L., Vergani, C.E. Cytotoxicity of denture base acrylic resins: a literature review. *Journal of Prosthetic Dentistry*, 90(2), 190-193, 2003.
11. Greim, H., Ahlers, J., Bias, R., Broecker, B., Hollander, H., Gelbke, H.P., Jacobi, S., Klimisch, H.J., Mangelsdorf, I., Mayr, W., Schön, N., Stropp, G., Stahnecker, P., Vogel, R., Weber, C., Ziegler-Skylakakis, K., Bayer, E. Assessment of structurally related chemicals: toxicity and ecotoxicity of acrylic acid and acrylic acid alkyl esters (acrylates), methacrylic acid and methacrylic acid alkyl esters (methacrylates). *Chemosphere*, 31(2), 2637-2659, 1995.
12. Sasseville, D. Acrylates. *Dermatitis*, 23(1), 3-5, 2012.
13. Baker, S., Brooks, S.C., Walker, D.M. The release of residual monomeric methyl methacrylate from acrylic appliances in the human mouth: an assay for monomer in saliva. *Journal of Dental Research*, 67(10), 1295-1299, 1988.

14. Bereznowski, Z. *In vivo* Assessment of Methyl Methacrylate Metabolism and Toxicity. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 27(12), 1311-1316, 1995.
15. Mizunuma, K., Kawai, T., Yasugi, T., Horiguchi, S., Takeda, S., Miyashita, K., Taniuchi, T., Moon, C.S., Ikeda, M. Biological monitoring and possible health effects in workers occupationally exposed to methyl methacrylate. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 65(4), 227-232, 1993.
16. Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160, 1-40, 2006.
17. Alfadda, A.A. ve Sallam, R.M. Reactive Oxygen Species in Health and Disease. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, Article ID 936486(doi:10.1155/2012/936486), 1-14, 2012.
18. Niki, E., Yoshida, Y., Saito, Y., Noguchi, N. Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 338(1), 668-676, 2005.
19. Sies, H. Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants. *Experimental Physiology*, 82, 291-295, 1997.
20. Demirci, M., Hiller, K.A., Bosl, C., Galler, K., Schmalz, G., Schweikl, H. The induction of oxidative stress, cytotoxicity, and genotoxicity by dental adhesives. *Dental Materials*, 24(3), 362-371, 2008.

21. Nordgren, M. ve Fransen, M. Peroxisomal metabolism and oxidative stress. *Biochimie*, 98, 56-62, 2014.
22. Buga, G.M., Gold, M.E., Wood, K.S., Chaudhuri, G., Ignarro, L.J. Endothelium-derived nitric oxide relaxes nonvascular smooth muscle. *European Journal of Pharmacology*, 161(1), 61-72, 1989.
23. di Ilio, C. Sacchetta, P, Del Boccio, G., La Rovere, G., Federici, G. Glutathione peroxidase, glutathione S-transferase and glutathione reductase activities in normal and neoplastic human breast tissue. *Cancer Letters*, 29(1), 37-42, 1985.
24. Davies, K.J.A. Oxidative Stress, Antioxidant Defenses, and Damage Removal, Repair and Replacement Systems. *IUBMB Life*, 50(4-5), 279-289, 2000.
25. Matés, J.M. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology*, 153(1-3), 83-104, 2000.
26. Poljsak, B., Šuput, D., Milisav, I. Achieving the Balance Between ROS and Antioxidants: When to Use the Synthetic Antioxidants. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, (doi:10.1155/2013/956792), 1-11, 2013.
27. McCord, J.M. ve Edeas, M.A. SOD, oxidative stress and human pathologies: a brief history and a future vision. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 59, 139-142, 2005.
28. Schweikl, H., Spagnuolo, G., Schmalz, G. Genetic and Cellular Toxicology of Dental Resin Monomers. *Journal of Dental Research*, 85(10), 870-877, 2006.

29. Ansteinsson, V., Kopperud, H.B., Morisbak, E., Samuelsen, J.T. Cell toxicity of methacrylate monomers-the role of glutathione adduct formation. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 101(12), 3504-3510, 2013.
30. Blasiak, J., Synowiec, E., Tarnawska, J., Czarny, P., Poplawski, T., Reiter, R.J. Dental methacrylates may exert genotoxic effects via the oxidative induction of DNA double strand breaks and the inhibition of their repair. *Molecular Biology Reports*, 39(7), 7487-7496, 2012.
31. Krifka, S., Spagnuolo, G., Schmalz, G., Schweikl, H. A review of adaptive mechanisms in cell responses towards oxidative stress caused by dental resin monomers. *Biomaterials*, 34(19), 4555-4563, 2013.
32. Bonassi, S., El-Zein, R., Bolognesi, C., Fenech, M. Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes and cancer risk: evidence from human studies. *Mutagenesis*, 26(1), 93-100, 2011.
33. Bonassi, S., Znaor, A., Ceppi, M., Lando, C., Chang, W.P., Holland, N., Kirsch-Volders, M., Zeiger, E., Ban, S., Barale, R., Bigatti, M.P., Bolognesi, C., Cebulska-Wasilewska, A., Fabianova, E., Fucic, A., Hagmar, L., Joksic, G., Martelli, A., Migliore, L., Mirkova, E., Scarfi, M.R., Zijno, A., Norppa, H., Fenech, M. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis*, 28(3), 625-631, 2007.
34. Kleinsasser, N.H., Wallner, B.C., Harréus, U.A., Kleinjung, T., Folwaczny, M., Hickel, R., Kehe, K., Reichl, F.X. Genotoxicity and cytotoxicity of dental

materials in human lymphocytes as assessed by the single cell microgel electrophoresis (comet) assay. *Journal of Dentistry*, 32, 229-234, 2004.

35. Kleinsasser, N.H., Hiller, K.A., Bolay, C., Kreissl, M., Kreismann, W., Nusser, A., Steinhauser, S., Wieczorek, J., Vasold, R., Schmalz, G. Cytotoxic and genotoxic effects of resin monomers in human salivary gland tissue and lymphocytes as assessed by the single cell microgel electrophoresis (Comet) assay. *Biomaterials*, 27(9), 1762-1770, 2006.
36. Murray, M.D., Darvell, B.W. The evolution of the complete denture base. Theories of complete denture retention - A review. Part 1. *Australian Dental Journal*, 38(3), 216-219, 1993.
37. World Health Organisation, International Agency for Research on Cancer, *IARC MONOGRAPHS ON THE EVALUATION OF CARCINOGENIC RISKS TO HUMANS*, 1994. <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol60/mono60.pdf> [16 02 2015 tarihinde erişilmiştir].
38. Lewis, G. Alternative acrylic bone cement formulations for cemented arthroplasties: present status, key issues, and future prospects. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 84(2), 301-319, 2008.
39. NIOSH (National Institute for Occupational Safety & Health). *NIOSH Pocket Guide to Chemical Hazards. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Prevention and Control* , 2007. <http://www.cdc.gov/niosh/docs/2005-149/pdfs/2005-149.pdf> [02 05 2015 tarihinde erişilmiştir].

40. European Chemical Bureau (ECB), *UNEP PUBLICATIONS SIDS INITIAL ASSESSMENT PROFILE OF METHYL METHACRYLATE*, 2001. <http://ecb.jrc.it/existing-chemicals/> [02 05 2015 tarihinde erişilmiştir].
41. National Toxicology Program, *SUMMARY OF DATA FOR CHEMICAL SELECTION*, 2015. http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/chem_background/exsumpdf/dmpt_508.pdf [02 05 2015 tarihinde erişilmiştir].
42. OECD, *UNEP PUBLICATIONS-SIDS INITIAL ASSESSMENT REPORT FOR HYDROQUINONE*, 2007. <http://www.chem.unep.ch/irptc/sids/OECD/SIDS/123319.pdf> [18.02.2015 tarihinde erişilmiştir].
43. Gupta, S.K., Saxena, P., Pant, V.A., Pant, A.B. Release and toxicity of dental resin composite. *Toxicology International*, 19(3), 225-234, 2012.
44. Lin, B.A., Jaffer, F., Duff, M.D., Tang, Y.W., Santerre, J.P. Identifying enzyme activities within human saliva which are relevant to dental resin composite biodegradation. *Biomaterials*, 26(20), 4259-4264, 2005.
45. Finer, Y., Jaffer, F., Santerre, J.P. Mutual influence of cholesterol esterase and pseudocholinesterase on the biodegradation of dental composites. *Biomaterials*, 25(10), 1787-1793, 2004.
46. Finer, Y. ve Santerre, J.P. Salivary esterase activity and its association with the biodegradation of dental composites. *Journal of Dental Research*, 83(1), 22-26, 2004.

47. Hagio, M., Kawaguchi, M., Motokawa, W., Miyazaki, K. Degradation of Methacrylate Monomers in Human Saliva. *Dental Materials Journal*, 25(2), 241-246, 2006.
48. Geurtsen, W. Biocompatibility of dental casting alloys. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, 13(1), 71-84, 2002.
49. Piirilä, P., Kanerva, L., Keskinen, H., Estlander, T., Hytönen, M., Tuppurainen, M., Nordman, H. Occupational respiratory hypersensitivity caused by preparations containing acrylates in dental personnel. *Clinical and Experimental Allergy*, 28(11), 1404-1411, 1998.
50. Özdemir Doğan, D., Berk, S., Gümüş, C., Özdemir, A.K., Akkurt, İ. A longitudinal study on lung disease in dental technicians: What has changed after seven years? *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health*, 26(5), 693-701, 2013.
51. Golbabaie, F., Mamdouh, M., Jelyani, K.N., Shahtaheri, S.J. Exposure to methyl methacrylate and its subjective symptoms among dental technicians, Tehran, Iran. *International Journal of Occupational Safety and Ergonomics*, 11(3), 283-289, 2005.
52. Rajaniemi, R. Clinical Evaluation of Occupational Toxicity of Methylmethacrylate Monomer to Dental Technicians. *Journal of the Society of Occupational Medicine*, 36(2), 56-59, 1986.

53. Thomas, S. ve Padmanabhan, T.V. Methyl methacrylate permeability of dental and industrial gloves. *New York State Dental Journal*, 75(4), 40-42, 2009.
54. Liljelind, I.E., Hagenbjörk-Gustafsson, A., Nilsson, L.O. Potential dermal exposure to methyl methacrylate among dental technicians; variability and determinants in a field study. *Journal of Environmental Monitoring*, 11(1), 160-165, 2009.
55. Tomenson, J.A., Carpenter, A.V., Pemberton, M.A. Critical review of the epidemiology literature on the potential cancer risks of methyl methacrylate. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 78(8), 603-612, 2005.
56. Homlar, K.C., Sellers, M.H., Halpern, J.L., Seeley, E.H., Holt, G.E. Serum levels of methyl methacrylate following inhalational exposure to polymethylmethacrylate bone cement. *The Journal of Arthroplasty*, 28(3), 406-409, 2013.
57. Occupational Safety and Health Administration (OSHA) *Air Contaminants*. (2006).29CFR1910.1000.http://www.osha.gov/pls/oshaweb/owadisp.showdocument?p_table=STANDARDS&p_id=9991 [02 05 2015 tarihinde erişilmiştir].
58. American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH), *Threshold Limit Values for Chemical Substances in the Work Environment*, 2014. <http://www.acgih.org/> [02 05 2015 tarihinde erişilmiştir].

59. European Union, *Indicative occupational exposure limit value 2009/161/EC*, 2009. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32009L0161&from=EN> [02 05 2015 tarihinde erişilmiştir].
60. Seiss, M., Nitz, S., Kleinsasser, N., Buters, J.T.M., Behrendt, H., Hickel, R., Reichl, F.X. Identification of 2,3-epoxymethacrylic acid as an intermediate in the metabolism of dental materials in human liver microsomes. *Dental Materials*, 23(1), 9-16, 2007.
61. Urcan, E. Scherthan, H., Styllou, M., Haertel, U., Hickel, R., Reichl, F.X. Induction of DNA double-strand breaks in primary gingival fibroblasts by exposure to dental resin composites. *Biomaterials*, 31(8), 2010-2014, 2010.
62. Schweikl, H., Hiller, K.A., Bolay, C., Kreissl, M., Kreismann, W., Nusser, A., Steinhauser, S., Wiczorek, J., Vasold, R., Schmalz, G. Cytotoxic and mutagenic effects of dental composite materials. *Biomaterials*, Cilt 26(14), 1713-1719, 2005.
63. Samuelsen, J.T., Holme, J.A., Låg, M., Schwarze, P.E., Dahl, J.E., Becher, R. Biotransformation enzymes and lung cell response to 2-hydroxyethyl-methacrylate. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 100(2), 462-469, 2012.
64. Samuelsen, J.T., Kopperud, H.M., Holme, J.A., Dragland, I.S., Christensen, T., Dahl, J.E. Role of thiol-complex formation in 2-hydroxyethyl-methacrylate-induced toxicity in vitro. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 96(2), 395-401, 2011.

65. Nocca, G., Ragno, R., Carbone, V., Martorana, G.E., Rossetti, D.V., Gambarini, G., Giardina, B., Lupi, A. Identification of glutathione-methacrylates adducts in gingival fibroblasts and erythrocytes by HPLC-MS and capillary electrophoresis. *Dental Materials*, 27(5), 87-98, 2011.
66. Krifka, S., Seidenader, C., Hiller, K.A., Schmalz, G., Schweikl, H. Oxidative stress and cytotoxicity generated by dental composites in human pulp cells. *Clinical Oral Investigations*, 16(1), 215-224, 2012.
67. Dröge, W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*, 82(1), 47-95, 2002.
68. Lykkesfeldt, J. Malondialdehyde as biomarker of oxidative damage to lipids caused by smoking. *Clinica Chimica Acta*, 380, 50-58, 2007.
69. Ziech, D., Franco, R., Pappa, A., Panayiotidis, M.I. Reactive Oxygen Species (ROS)—Induced genetic and epigenetic alterations in human carcinogenesis. *Mutation Research*, 711(1-2), 167-173, 2011.
70. Kryston, T.B., Georgiev, A.B., Pissis, P., Georgakilas, A.G. Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. *Mutation Research*, 711, 193-201, 2011.
71. Dizdaroğlu, M. Oxidatively induced DNA damage: Mechanisms, repair and disease. *Cancer Letters*, 327, 26-47, 2012.
72. Bienert, G.P., Schjoerring, J.K., Jahn, T.P. Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1758(8), 994-1003, 2006.

73. Schrader, M. ve Fahimi, H.D. Peroxisomes and oxidative stress. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1763, 1755-1766, 2006.
74. Moller, P. ve Wallin, H. Adduct formation, mutagenesis and nucleotide excision repair of DNA damage produced by reactive oxygen species and lipid peroxidation product. *Mutation Research*, 410, 271-290, 1998.
75. Klaunig, J.E. ve Kamendulis, L.M. The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annual Reviews of Pharmacology and Toxicology*, 44, 239-267, 2004.
76. Niki, E. ve Noguchi, N. Evaluation of Antioxidant Capacity. What Capacity is being Measured by Which Method? *IUBMB Life*, 50(4-5), 323-329, 2000.
77. Deavall, D.G., Martin, E.A., Horner, J.M., Roberts, R. Drug-Induced Oxidative Stress and Toxicity. *Journal of Toxicology*, (doi:10.1155/2012/645460), 1-13, 2012.
78. Olszewska, A. ve Szewczyk, A. Mitochondria as Pharmacological Target: Magnum Overview. *IUBMB Life*, 65(3), 273-281, 2013.
79. Klaunig, J.E., Wang, Z., Pu, X., Zhou, S. Oxidative stress and oxidative damage in chemical carcinogenesis. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 254, 86-99, 2011.
80. Circu, M.L. ve Aw, T.Y. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radical Biology and Medicine*, 48, 749-762, 2010.

81. Rattan, S.I.S. ve Demirovic, D. Hormesis can and does work in humans. *Dose-Response*, 8, 58-63, 2010.
82. Delille, H.K., Bonekamp, N.A., Schrader, M. Peroxisomes and Disease - An Overview. *International Journal of Biomedical Science*, 2(4), 308-313, 2006.
83. Fransen, M., Nordgren, M., Wang, B., Apanasets, O. Role of peroxisomes in ROS/RNS metabolism: Implications for human disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1822, 1363-1373, 2012.
84. Antonenkov, V.D., Grunau, S., Ohlmeier, S., Hiltunen, J.K. Peroxisomes are oxidative organelles. *Antioxidants and Redox Signaling*, 13(4), 525-537, 2010.
85. Islinger, M. ve Schrader, M. Peroxisomes. *Current Biology*, 21(19), R800-R801, 2011.
86. Pullar, J.M., Vissers, M.C.M., Winterbourn, C.C. Living with a Killer: The Effects of Hypochlorous Acid on Mammalian Cells. *IUBMB Life*, 50(4-5), 259-266, 2000.
87. Babior, B.M. ve Woodman, R.C. Chronic granulomatous disease. *Seminars in Hematology*, 27(3), 247-259, 1990.
88. Nathan, C. ve Ding, A. SnapShot: reactive oxygen intermediates (ROI). *Cell*, 140, 952, 2010.

89. McEligot, A.J., Yang, S., Meyskens, F.L. Redox regulation by intrinsic species and extrinsic nutrients in normal and cancer cells. *Annual Review of Nutrition*, 25, 261-295, 2005.
90. Lu, S.C. Glutathione synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1830, 3143-3153, 2013.
91. Hayes, J.D. ve McLellan, L.I. Glutathione and Glutathione-dependent Enzymes Represent a Co-ordinately Regulated Defence Against Oxidative Stress. *Free Radical Research*, 31, 273-300, 1999.
92. Knapen, M.F.C.M., Zusterzeel, P.L.M., Peters, W.H.M., Steegers, E.A.P. Glutathione and glutathione-related enzymes in reproduction. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 82, 171-184, 1999.
93. Lu, S.C. Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. *FASEB Journal*, 13, 1169-1183, 1999.
94. Huang, Z.Z., Chen, C., Zeng, Z., Yang, H., Oh, J., Chen, L., Lu, S.C. Mechanism and significance of increased glutathione level in human hepatocellular carcinoma and liver regeneration. *FASEB Journal*, 15(1), 19-21, 2001.
95. Franklin, C.C., Backos, D.S., Mohar, I., White, C.C., Forman, H.J., Kavanagh, T.J. Structure, function, and post-translational regulation of the catalytic and modifier subunits of glutamate cysteine ligase. *Molecular Aspects of Medicine*, 30(1-2), 86-98, 2009.

96. Meister, A. Glutathione Metabolism and Its Selective Modification. *The Journal of Biological Chemistry*, 263(33), 17205-17208, 1988.
97. Sies, H. Glutathione and its Role in Cellular Functions. *Free Radical Biology and Medicine*, 27(9-10), 916-921, 1999.
98. Schafer, F.Q. and Buettner, G.R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radical Biology and Medicine*, 30, 1191-1212, 2001.
99. Meister, A. ve Anderson, M.E. Glutathione. *Annual Review of Biochemistry*, 52, 711-760, 1983.
100. Yan, H. ve Harding, J.J. Glycation-induced inactivation and loss of antigenicity of catalase and superoxide dismutase. *Biochemical Journal*, 328, 599-605, 1997.
101. Masella, R., Di Benedetto, R., Vari, R., Filesi, C., Giovannini, C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 16(10), 577-586, 2005.
102. Knapen, M.F.C.M. The glutathione / glutathione-related enzyme system in reproduction. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 91, 127-129, 2000.
103. Putchala, M.C., Ramani, P., Sherlin, H.J., Premkumar, P., Natesan, A. Ascorbic acid and its pro-oxidant activity as a therapy for tumours of oral

- cavity – A systematic review. *Archives of Oral Biology*, 58(6), 563-574, 2013.
104. Bustamante, J., Lodge, J.K., Marcocci, L., Tritschler, H.J., Packer, L., Rihn, B.H. Alpha-lipoic acid in liver metabolism and disease. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 24(6), 1023-1039, 1998.
105. Han, D., Handelman, G., Marcocci, L., Sen, C.K., Roy, S., Kobuchi, H., Tritschler, H.J., Flohé, L., Packer, L. Lipoic acid increases de novo synthesis of cellular glutathione by improving cystine utilization. *Biofactors*, 6(3), 321-338, 1997.
106. Rice-Evans, C. ve Burdon, R. Free radical-lipid interactions and their pathological consequences. *Progress in Lipid Research*, 32, 71-110, 1993.
107. Gago-Dominguez, M., Castelao, J.E., Pike, M.C., Sevanian, A., Haile, R.W. Role of lipid peroxidation in the epidemiology and prevention of breast cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, 14(12), 2829-2839, 2005.
108. Marnett, L.J. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutation Research*, 424, 83-95, 1999.
109. Yoshida, Y., Umeno, A., Shichiri, M. Lipid peroxidation biomarkers for evaluating oxidative stress and assessing antioxidant capacity in vivo. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 52(1), 9-16, 2013.

110. Poli, G., Leonarduzzi, G., Biasi, F., Chiarpotto, E. Oxidative stress and cell signalling. *Current Medicinal Chemistry*, 11(9), 1163-1182, 2004.
111. Brown, H.A. ve Marnett, L.J. Introduction to lipid biochemistry, metabolism, and signaling. *Chemical Reviews*, 111(10), 5817-5820, 2011.
112. Nielsen, F., Mikkelsen, B.B., Nielsen, J.B., Andersen, H.R., Grandjean, P. Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: reference interval and effects of life-style factors. *Clinical Chemistry*, 43(7), 1209-1214, 1997.
113. Liu, C.S. ve Wei, Y.H. Age-Associated Alteration of Blood Thiol-Group-Related Antioxidants in Smokers. *Environmental Research Section A*, 80, 18-24, 1999.
114. Block, G., Dietrich, M., Norkus, E.P., Morrow, J.D., Hudes, M., Caan, B., Packer, L. Factors Associated with Oxidative Stress in Human Populations. *American Journal of Epidemiology*, 156(3), 274-285, 2002.
115. Valavanidis, A., Vlachogianni, T., Fiotakis, C. 8-hydroxy-2' -deoxyguanosine (8-OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. *Journal of Environmental Science and Health - Part C: Environmental Carcinogenesis & Ecotoxicology Reviews*, 27(2), 120-139, 2009.
116. ESCODD (European Standards Committee on Oxidative DNA Damage), Comparison of different methods of measuring 8-oxoguanine as a marker of oxidative DNA damage. *Free Radical Research*, 32(4), 333-341, 2000.

117. Pilger, A. ve Rüdiger, H.W. 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine as a marker of oxidative DNA damage related to occupational and environmental exposures. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 80(1), 1-15, 2006.
118. Fenech, M. The Cytokinesis-Block Micronucleus Technique and Its Application to Genotoxicity Studies in Human Populations. *Environmental Health Perspectives Supplements*, 101(3), 101-107, 1993.
119. Giulivi, C., Boveris, A., Cadenas, E. Hydroxyl radical generation during mitochondrial electron transfer and the formation of 8-OHdG in mitochondrial DNA. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 316, 909-916, 1995.
120. Czarnecka, A.M., Golik, P., Bartnik, E. Mitochondrial DNA mutations in human neoplasia. *Journal of Applied Genetics*, 47, 67-78, 2006.
121. Collins, A.R., Osoez, A.A., Brunborg, G., Gaivão, I., Giovannelli, L., Kruszewski, M., Smith, C.C., Stetina, R. The comet assay: topical issues. *Mutagenesis*, 23(3), 143-151, 2008.
122. Pacifici, R.E. ve Davies, K.J.A. Protein, lipid, and DNA repair systems in oxidative stress: The free radical theory of aging revisited. *Gerontology*, 37, 166-180, 1991.
123. Fenech, M. The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research*, 455, 81-95, 2000.

124. Bonassi, S., Coşkun, E., Ceppi, M., Lando, C., Bolognesi, C., Burgaz, S., Holland, N., Kirsch-Volders, M., Knasmueller, S., Zeiger, E., Carnesoltas, D., Cavallo, D., da Silva, J., de Andrade, V.M., Demircigil, G.Ç., Domínguez Odio, A., Dönmez-Altuntaş, H., Gattas, G., Giri, A., Giri, S., Gómez-Meda, B., Gómez-Arroyo, S., Hadjidekova, V., Haveric, A., Kamboj, M., Kurteshi, K., Martino-Roth, M.G., Montero Montoya, R., Nersesyan, A., Pastor-Benito, S., Favero Salvadori, D.M., Shaposhnikova, A., Stopper, H., Thomas, P., Torres-Bugarín, O., Yadav, A.S., Zúñiga González, G., Fenech, M. The HUman MicroNucleus project on eXfoLiated buccal cells (HUMN_{XL}): The role of life-style, host factors, occupational exposures, health status, and assay protocol. *Mutation Research*, 728(3), 88-97, 2011.
125. Ceppi, M., Biasotti, B., Fenech, M., Bonassi, S. Human population studies with the exfoliated buccal micronucleus assay: Statistical and epidemiological issues. *Mutation Research*, 705, 11-19, 2010.
126. Thomas, P., Holland, N., Bolognesi, C., Kirsch-Volders, M., Bonassi, S., Zeiger, E., Knasmueller, S., Fenech, M. Buccal micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*, 4(6), 825-837, 2009.
127. Fenech, M., Holland, N., Zeiger, E., Chang, W.P., Burgaz, S., Thomas, P., Bolognesi, C., Knasmueller, S., Kirsch-Volders, M., Bonassi, S. The HUMN and HUMN_{XL} international collaboration projects on human micronucleus assays in lymphocytes and buccal cells-past, present and future. *Mutagenesis*, 26(1), 239-245, 2011.
128. Bonassi, S., Neri, M., Lando, C., Ceppi, M., Lin, Y.P., Chang, W.P., Holland, N., Kirsch-Volders, M., Zeiger, E., Fenech, M.; HUMN collaborative group.

- Effect of smoking habit on the frequency of micronuclei in human lymphocytes: results from the Human MicroNucleus project. *Mutation Research*, 543(2), 155-166, 2003.
129. Møller, P., Knudsen, L.E., Loft, S., Wallin, H. The Comet Assay as a Rapid Test in Biomonitoring Occupational Exposure to DNA-damaging Agents and Effect of Confounding Factors. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, 9, 1005-1015, 2000.
130. Ishikawa, S., Ishikawa, H., Shindo, T., Yoshida, T., Shimoyama, Y., Satomi, T., Fujii, S., Hamamoto, Y., Iino, M., Fukao, A. Effects of occupational environmental controls and work management on chromosomal damage in dental technicians in Japan. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 216(1), 100-107, 2013.
131. Burgaz, S., Demircigil, G.Ç., Yilmazer, M., Ertaş, N., Kemaloğlu, Y., Burgaz, Y. Assessment of cytogenetic damage in lymphocytes and in exfoliated nasal cells of dental laboratory technicians exposed to chromium, cobalt, and nickel. *Mutation Research*, 521(1-2), 47-56, 2002.
132. Kasprzak, K.S. Oxidative DNA and protein damage in metal induced carcinogenesis. *Free Radical Biology and Medicine*, 32, 958-967, 2002.
133. Casalino, E., Sblano, C., Landriscina, C. Enzyme activity alteration by cadmium administration to rats: the possibility of iron involvement in lipid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 346, 171-179, 1997.

134. Waisberg, M., Joseph, B., Hale, B., Beyersmann, D. Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology*, 192, 95-117, 2003.
135. Fenech, M. ve Bonassi, S. The effect of age, gender, diet and lifestyle on DNA damage measured using micronucleus frequency in human peripheral blood lymphocytes. *Mutagenesis*, 26(1), 43-49, 2011.
136. Bolognesi, C., Knasmueller, S., Nersesyan, A., Thomas, P., Fenech, M. The HUMN_{XL} scoring criteria for different cell types and nuclear anomalies in the buccal micronucleus cytome assay – An update and expanded photogallery. *Mutation Research*, 753(2), 100-113, 2013.
137. Collins, A., Koppen, G., Valdiglesias, V., Dusinska, M., Kruszewski, M., Møller, P., Rojas, E., Dhawan, A., Benzie, I., Coşkun, E., Moretti, M., Speit, G., Bonassi, S.; ComNet project. The comet assay as a tool for human biomonitoring studies: The ComNet Project. *Mutation Research*, 759, 27-39, 2014.
138. Özbay, B. ve Dülger, H. Lipid Peroxidation and Antioxidant Enzymes in Turkish Population: Relation to Age, Gender, Exercise, and Smoking. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 197(2), 119-124, 2002.
139. Yang, H., Ramani, K., Xia, M., Ko, K.S., Li, T.W., Oh, P., Li, J., Lu, S.C. Dysregulation of Glutathione Synthesis During Cholestasis in Mice: Molecular Mechanisms and Therapeutic Implications. *Hepatology*, 49(6), 1982-1991, 2009.

140. Gamcsik, M.P., Kasibhatla, M.S., Teeter, S.D., Colvin, O.M. Glutathione levels in human tumors. *Biomarkers*, 17(8), 671-691, 2012.
141. Godwin, A.K., Meister, A., O'Dwyer, P.J., Huang, C.S., Hamilton, T.C., Anderson, M.E. High resistance to cisplatin in human ovarian cancer cell lines is associated with marked increase of glutathione synthesis. *PNAS*, 89(7), 3070-3074, 1992.
142. Ray, S., Watkins, D.N., Misso, N.L.A., Thompson, P.J. Oxidant stress induces gamma-glutamylcysteine synthetase and glutathione synthesis in human bronchial epithelial NCI-H292 cells. *Clinical and Experimental Allergy*, 32(4), 571-577, 2002.
143. Verbeke, P., Clark, B.F.C., Rattan, S.I.S. Reduced Levels of Oxidized and Glycoxidized Proteins in Human Fibroblasts Exposed to Repeated Mild Heat Shock During Serial Passaging *in vitro*. *Free Radical Biology and Medicine*, 31(12), 1593-1602, 2001.
144. Shi, M.M., Kugelman, A., Iwamoto, T., Tian, L., Forman, H.J. Quinone-induced Oxidative Stress Elevates Glutathione and Induces γ -Glutamylcysteine Synthetase Activity in Rat Lung Epithelial L2 Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(42), 26512-26517, 1994.
145. Stijns, M.M.J.P.E., Randall, M.J., Bast, A., Haenen, G.R.M.M. Adaptation to acrolein through upregulating the protection by glutathione in human bronchial epithelial cells: The materialization of the hormesis concept. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 446, 1029-1034, 2014.

146. Aydın, Ö., Attila, G., Doğan, A., Aydın, M.V., Canacankatan, N., Kanık, A. The effects of methyl methacrylate on nasal cavity, lung, and antioxidant system (an experimental inhalation study). *Toxicologic Pathology*, 30(3), 350-356, 2002.
147. Flemming, N., Mikkelsen, B.B., Nielsen, J.B., Andersen, H.R., Grandjean, P. Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: reference interval and effects of life-style factors. *Clinical Chemistry*, 43(7), 1209-1214, 1997.
148. Toraason, M. 8-Hydroxydeoxyguanosine as a biomarker of workplace exposures. *Biomarkers*, 4(1), 3-26, 1999.
149. Lodovici, M., Casalini, C., Cariaggi, R., Michelucci, L., Dolara, P. Levels of 8-hydroxydeoxyguanosine as a marker of DNA damage in human leukocytes. *Free Radical Biology and Medicine*, 28(1), 13-17, 2000.
150. van Zeeland, A.A., de Groot, A.J.L., Hall, J., Donato, F. 8-Hydroxydeoxyguanosine in DNA from leukocytes of healthy adults: relationship with cigarette smoking, environmental tobacco smoke, alcohol and coffee consumption. *Mutation Research*, 439(2), 249-257, 1999.
151. Pilger, A., Germadnik, D., Schaffer, A., Theiler, A., Pils, P., Sluka, F., Winker, N., Rüdiger, H.W. 8-Hydroxydeoxyguanosine in leukocyte DNA and urine of quartz-exposed workers and patients with silicosis. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 73(5), 305-310, 2000.

152. Green, R.M., Graham, M., O'Donovan, M.R., Chipman, J.K., Hodges, N.J. Subcellular compartmentalization of glutathione: Correlations with parameters of oxidative stress related to genotoxicity. *Mutagenesis*, 21(6), 383-390, 2006.
153. Azhar, D.A., Syed, S., Luqman, M., Ali, A.A. Evaluation of methyl methacrylate monomer cytotoxicity in dental lab technicians using buccal micronucleus cytome assay. *Dental Materials Journal*, 32(3), 519-521, 2013.
154. Torres-Bugarín, O., De Anda-Casillas, A., Ramírez-Muñoz, M.P., Sánchez-Corona, J., Cantú, J.M., Zúñiga, G. Determination of diesel genotoxicity in firebreathers by micronuclei and nuclear abnormalities in buccal mucosa. *Mutation Research*, 413, 277-281, 1998.
155. Zamora-Perez, A.L., Mariaud-Schmidt, R.P., Fuentes-Lerma, M.G., Guerrero-Velázquez, C., Gómez-Meda, B.C., López-Verdín, S., Zúñiga-González, G.M. Increased number of micronuclei and nuclear anomalies in buccal mucosa cells from people exposed to alcohol-containing mouthwash. *Drug and Chemical Toxicology*, 36(2), 255-260, 2013.
156. Khan, A.W., Nersesyan, A., Knasmüller, S., Moshhammer, H., Kundi, M. Nuclear anomalies in exfoliated buccal cells in Pakistani cotton weavers. *Mutagenesis*, (doi:10.1093/mutage/gev022), 2015.
157. León-Mejía, G., Quintana, M., Debastiani, R., Dias, J., Espitia-Pérez, L., Hartmann, A., Henriques, J.A.P., Da Silva, J. Genetic damage in coal miners evaluated by buccal micronucleus cytome assay. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 107, 133-139, 2014.

158. Karahalil, B., Karakaya, A.E., Burgaz, S. The micronucleus assay in exfoliated buccal cells: application to occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutation Research*, 442, 29-35, 1999.
159. Danişman-Bruschweiler, E., Hopf, N.B., Wild, P., Huynh, C.K., Fenech, M., Thomas, P., Hor, M., Charriere, N., Savova-Bianchi, D., Danuser, B. Workers exposed to wood dust have an increased micronucleus frequency in nasal and buccal cells: results from a pilot study. *Mutagenesis*, 29(3), 201–207, 2014.
160. Katarkar, A., Mukherjee, S., Khan, M.H., Ray, J.G., Chaudhuri, K. Comparative evaluation of genotoxicity by micronucleus assay in the buccal mucosa over comet assay in peripheral blood in oral precancer and cancer patients. *Mutagenesis*, 29(5), 325-334, 2014.
161. Şardaş, S., Aygün, N., Gamlı, M., Ünal, Y., Ünal, N., Berk, N., Karakaya, A.E. Use of alkaline comet assay (single cell gel electrophoresis technique) to detect DNA damages in lymphocytes of operating room personnel occupationally exposed to anaesthetic gases. *Mutation Research*, 418(2-3), 93-100, 1998.
162. Ündeğer, Ü., Başaran, N., Kars, A., Güç, D. Assessment of DNA damage in nurses handling antineoplastic drugs by the alkaline COMET assay. *Mutation Research*, 439, 277-285, 1999.
163. Mattson, M.P. Hormesis defined. *Ageing Research Reviews*, 7, 1-7, 2008.

164. Calabrese, E.J. ve Blain, R.B. The hormesis database: The occurrence of hormetic dose responses in the toxicological literature. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 61, 73-81, 2011.
165. Luna-López, A., González-Puertos, V.Y., López-Diazguerrero, N.E., Königsberg, M. New considerations on hormetic response against oxidative stress. *Journal of Cell Communication and Signaling*, 8(4), 323-331, 2014.
166. Calabrese, E.J. Hormesis: principles and applications. *Homeopathy*, 104, 69-82, 2015.
167. Calabrese, E.J. Hormesis is central to toxicology, pharmacology and risk assessment. *Human and Experimental Toxicology*, 29(4), 249-261, 2010.

ANKET FORMU

Adı Soyadı :.....

Yaşı :.....

Cinsiyeti: E ☐ K ☐

Adres, Telefon:.....

Kaç yıldır protez üretiminde çalışıyorsunuz?

Kontrol
Grubu ☐

Günlük çalışma süreniz saat.

Sigara kullanımı adet/günyıldır.

Sigara Kullanmıyorum ☐

Bulunduğunuz ortamda sigara içiliyor mu?

E ☐ H ☐

Alkol kullanımı gün/hafta

Alkol Kullanmıyorum ☐

Son bir hafta içinde kahve içtiniz mi?

E ☐ H ☐

Kronik bir hastalığınız (Astım, Allerji vb.) var mı? Varsa, bununla ilgili uzun süreli bir tedavi görüyor musunuz? Varsa, kullandığınız ilaç/tedavi?
.....

Sürekli kullandığınız bir vitamin/takviye var mı?

Var ☐ Yok ☐

Kendiniz diş protezi/ortopedik protez kullanıyor musunuz?

E ☐ H ☐

Daha önce hiç radyoterapi/kemoterapi aldınız mı?

E ☐ H ☐

Son 1 yıl içinde Röntgen Filmi/Tomografi çekirttiniz mi? E ☐ H ☐

Son 2 yıl içinde herhangi bir viral enfeksiyon (Sarılık, Kızamık, Kızamıkçık, Su Çiçeği, Kabakulak, Menenjit) geçirdiniz mi? E ☐ H ☐

Ailenizde Kanser, Diyabet, Kalp Rahatsızlığı, Akciğer Rahatsızlığı, Wilson Hastalığı, Hemokromatosis gibi hastalıklardan hayatını kaybeden oldu mu?
E ☐ H ☐

Çalışma esnasında aldığınız korunma tedbirleri nelerdir?
.....

Protez üretiminde çalışmaya başladığınızdan beri solunum yoluyla ilgili herhangi bir hastalık tanısı aldınız mı?

Cevabınız “Evet” ise, hangi hastalık? E ☐ H ☐

Aşağıdaki solunum sıkıntılarından, varsa son bir yıl içinde en az bir kez yaşadıklarınızı işaretleyiniz.

Nefes Darlığı ☐ Öksürük ☐ Diğer
Hırıltılı Soluk Alıp Verme ☐ Astım krizi ☐

Beslenme alışkanlığınız nasıldır?

Et Ağırlıklı ☐ Kuru Bakliyat Ağırlıklı ☐ Karışık ☐
Sebze Meyve Ağırlıklı ☐ Balık ve Deniz Ürünleri Ağırlıklı ☐