

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

***Ephestia kuehniella* Zell (PYRALIDAE: LEPIDOPTERA)
ÜZERİNE RADYASYON ETKİSİNİN TEK HÜCRE JEL
ELEKTROFOREZ TEKNİĞİ (KOMET TESTİ) İLE
İZLENMESİ**

**Hazırlayan
Handan KILIÇOĞLU**

**Danışman
Prof. Dr. Aydın Ş. TUNÇBİLEK**

Yüksek Lisans Tezi

**Eylül 2012
KAYSERİ**

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

Yüksek Lisans Tezi

***Ephestia kuehniella* Zell (PYRALIDAE: LEPIDOPTERA)
ÜZERİNE RADYASYON ETKİSİNİN TEK HÜCRE JEL
ELEKTROFOREZ TEKNİĞİ (KOMET TESTİ) İLE
İZLENMESİ**

**Hazırlayan
Handan KILIÇOĞLU**

**Danışman
Prof. Dr. Aydın Ş. TUNÇBİLEK**

**Bu Çalışma Erciyes Üniversitesi Araştırma Projeleri Birimi
Tarafından FBY-10-3305 Kodlu Proje İle Desteklenmiştir.**

**Eylül 2012
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Handan KILIÇOĞLU

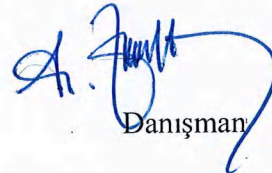


YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI

Ephestia kuehniella Zell (Pyralidae: Lepidoptera) Üzerine Radyasyon Etkisinin Tek Hücre Jel Elektrophorez Tekniği (Komet Testi) İle İzlenmesi adlı Yüksek Lisans tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi'ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Handan KILIÇOĞLU



Danışman

Prof. Dr. Aydın Ş. TUNÇBİLEK



Biyoloji ABD Başkanı

Prof. Dr. Nusret AYYILDIZ

Prof. Dr. Aydın Ş. TUNÇBİLEK danışmanlığında **Handan KILIÇOĞLU** tarafından hazırlanan “*Ephestia kuehniella* Zell (Pyralidae: Lepidoptera) Üzerine Radyasyon Etkisinin Tek Hücre Jel Elektroforez Tekniği (Komet Testi) İle İzlenmesi” adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında **Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

18.09.2012

JÜRİ:

Başkan: Prof. Dr. Aydın Ş. TUNÇBİLEK

Üye : Prof. Dr. Coşkun TEZ

Üye : Doç. Dr. Abdurrahman AYVAZ

ONAY:

Bu tezin kabulü, Enstitü Yönetim Kurulunun 25/09/2012 tarih ve 2012/44-15 sayılı kararı ile onaylanmıştır.



Prof. Dr. Necmettin MARAŞLI

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın tüm aşamalarında yardım ve değerli önerilerini esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Aydın Ş. TUNÇBİLEK'e ve saygıdeğer hocam Arş. Gör. Ülkü CANPOLAT'a teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Bunun yanında laboratuvar çalışmaları aşamasında desteklerini esirgemeyen Uzman Biyolog Nizamettin YAZICI, Gıda Mühendisi Yakup EREL, Yrd. Doç. Dr.Servet ÖZCAN, Arş. Gör. Sevgi BAKIR, Arş. Gör. Arzu YAY, Sunay TEKİN, Dilek DABANLI ve Metin KILIÇ'a çok teşekkür ederim.

İki yıllık yüksek lisans dahil olmak üzere, altı yıllık üniversite hayatımda da dualarını ve desteklerini esirgemeyen sevgili aileme teşekkürlerimi borç bilirim.

Bu çalışmayı FBY-10-3305 kodlu proje ile destekleyen Erciyes Üniversitesi Araştırma Projeleri Birimine teşekkür ederim.

Handan KILIÇOĞLU

Kayseri, Eylül 2012

***Ephestia kuehniella* ZELL (PYRALIDAE: LEPIDOPTERA) ÜZERİNE
RADYASYON ETKİSİNİN TEK HÜCRE JEL ELEKTROFOREZ TEKNİĞİ
(KOMET TESTİ) İLE İZLENMESİ**

Handan KILIÇOĞLU

Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü

Yüksek lisans Tezi, Eylül 2012

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Aydın Ş. TUNÇBİLEK

ÖZET

Bu çalışmada *E. kuehniella* Zell (Lepidoptera: Pyralidae) üzerine radyasyon etkisini tek hücre jel elektroforez tekniği (komet testi) ile tespit çalışması yapılmıştır. *E. kuehniella* Zell (Lepidoptera: Pyralidae)'nin ergin, larva ve pupalar 0, 50, 100, 150 ve 200 Gy dozlarında ışınlanmıştır. Erginle yaptığımız çalışmada kontrol gurubuna göre radyasyon dozu arttıkça DNA'nın kuyruk oluşturma yüzdesi de artmış ve DNA'da farklı komet görüntüleri izlenmiştir. Bu dozların erginde yüksek dozlara gerek kalmadan DNA'ya zarar verdiği tespit edilmiştir. Kontrol erginde kuyruk uzunluğu 27.514 µm iken 50 Gy'de 94.875 µm olarak ölçülmüştür. DNA komet yöntemi DNA kırıklarını çabuk, hassas güvenli ve oldukça ucuz ölçebilen bir yöntemdir.

Anahtar Kelimeler: DNA, komet testi, radyasyon, *Ephestia kuehniella*

THE SINGLE CELL GEL ELECTROPHORESIS TECHNIQUE (COMET ASSAY) FOR MONITORING RADIATION EFFECTS ON *Ephestia kuehniella* ZELL (PYRALIDAE: LEPIDOPTERA)

Handan KILIÇOĞLU

Erciyes University, Graduate School of Natural and Applied Sciences

M.Sc. Thesis, September 2012

Thesis Supervisor: Prof. Dr. Aydın Ş. TUNÇBİLEK

ABSTRACT

In this study, the effect of radiation was determined in *E. kuehniella* Zell (Lepidoptera: Pyralidae) with single cell gel electrophoresis (comet test). Adult, larvae and pupae of *E. kuehniella* Zell (Lepidoptera: Pyralidae) were radiated with 0, 50, 100, 150 and 200 Gy doses. In our study with adults, as the radiation dose increased, percentage of tail formation of DNA was also increased and different comet images were observed in comparison with control group. These dosages were seen to damage DNA without higher dosage amounts. While the extent of tail was measured 27.514 µm in control adults, it was 94.875 µm in 50 Gy. DNA comet method is a quick, sensitive safe and reasonably cheap method in measuring DNA breaks.

Keywords: DNA, comet assay, radiation, *Ephestia kuehniella*

İÇİNDEKİLER

Ephestia kuehniella Zell (PYRALIDAE: LEPIDOPTERA) ÜZERİNE RADYASYON ETKİSİNİN TEK HÜCRE JEL ELEKTROFOREZ TEKNİĞİ (KOMET TESTİ) İLE İZLENMESİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK SAYFASI.....	i
YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI.....	ii
KABUL VE ONAY SAYFASI.....	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
TABLolar LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLER LİSTESİ	xi
KISALTMALAR.....	xiii
GİRİŞ	1

1. BÖLÜM

GENEL BİLGİLER

1.1. Kullanım Alanları	11
1.2. Uygulama Protokolü	11
1.3. Komet Tekniğini Etkileyen Faktörler	14
1.4. Komet Tekniğinin Avantajları.....	15

2. BÖLÜM

GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Böcek Yetiştirilmesi.....	16
2.1.1. <i>Ephestia kuehniella</i> (Zeller, 1879) (Lepidoptera: Pyralidae).....	16
2.1.2. Ergin, Larva ve Pupalardan Toplanması	19
2.1.3. <i>E. kuehniella</i> Ergin, Larva ve Pupalardan Işınlanması.....	20
2.2. Tek Hücre Süspansiyonlarının Hazırlanması	20
2.2.1. Lamların Kaplanması.....	20

2.2.2. Lizis	21
2.2.3. Elektroforez.....	22
2.2.4. Boyama Aşaması.....	22
2.3. Mikroskopta Fotoğraf Çekme	23
2.4. Veri Analizi.....	23

3. BÖLÜM

BULGULAR

3.1. Işınlanan <i>E. kuehniella</i> Erginlerinin Komet Analizi.....	25
3.2. Işınlanan <i>E. kuehniella</i> Larvaların Komet Analizi	28
3.3. Işınlanan <i>E. kuehniella</i> Pupaların Komet Analizi.....	30

4. BÖLÜM

TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER

4.1. Tartışma	31
4.2. Sonuç ve Öneriler.....	33
KAYNAKLAR.....	34
ÖZGEÇMİŞ	39

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 1.1. Komet yöntemiyle farklı pH'larda tayin edilebilen DNA hasar tipleri.....	10
Tablo 3.1. <i>E. kuehniella</i> erginlerin komet parametlerinin veri analizleri	25

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1.	Alkali komet tekniğinde kritik basamakların şematik gösterimi.....	12
Şekil 1.2.	Görsel Skorlama Tekniği (AU) İle Hücrelerin Sınıflandırılması (0:Hasarsız DNA Görüntüsü, 1-4: Hasarlı DNA'ları hasarın derecesine göre puanlanması)	13
Şekil 1.3.	Görüntü analizinin şematik şekli	14
Şekil 2.1.	<i>E. kuehniella</i> ergini.....	16
Şekil 2.2.	<i>E. kuehniella</i> larvası.....	17
Şekil 2.3.	<i>E. kuehniella</i> pupası.....	17
Şekil 2.4.	<i>E. kuehniella</i> 'nın yetiştirme kapları	18
Şekil 2.5.	<i>E. kuehniella</i> ergin toplama aspiratörü	19
Şekil 2.6.	<i>E. kuehniella</i> erginlerinin tüplere alınması ve ışınlanmaya hazırlanması	19
Şekil 2.7.	Hücre süspansiyonunun karıştırılma aşaması	20
Şekil 2.8.	Hücre süspansiyonunun lama yayılması.....	21
Şekil 2.9.	Preparatların lizis aşaması.....	21
Şekil 2.10.	Elektroforez tamponu	22
Şekil 2.11.	Ethidium bromide ile preparatların boyama aşaması	23
Şekil 2.12.	Elektron mikroskobu ve görüntü çekimi.....	23
Şekil 2.13.	Numunelerin görüntü analizindeki kafa ve kuyruk görüntüleri	24
Şekil 3.1.	0 Gy (kontrol) ile ışınlanmış <i>E. kuehniella</i> erginlerinden elde edilen komet görüntüleri	26
Şekil 3.2.	50 Gy ile ışınlanmış <i>E. kuehniella</i> erginlerinden elde edilen komet görüntüleri.	26
Şekil 3.3.	100 Gy ile ışınlanmış <i>E. kuehniella</i> erginlerinden elde edilen komet görüntüleri.	26
Şekil 3.4.	150 Gy ile ışınlanmış <i>E. kuehniella</i> erginlerinden elde edilen komet görüntüleri.	27
Şekil 3.5.	200 Gy ile ışınlanmış <i>E. kuehniella</i> erginlerinden elde edilen komet görüntüleri.	27

- Şekil 3.6. *E. kuehniella* larvasında tek hücre jel elektroforez yöntemi ile radyasyon sonucu hasara uğramış hücrelerin DNA görüntüleri (I:0 Gy (kontrol), II: 50 Gy, III: 100 Gy, IV: 150 Gy, V: 200 Gy). 28
- Şekil 3.7. *E. kuehniella* pupasında tek hücre jel elektroforez yöntemi ile kontrol grubu hücrelerin DNA görüntüleri (I ve II 0 Gy (kontrol)). 29
- Şekil 3.8. *E. kuehniella* pupasında tek hücre jel elektroforez yöntemi ile radyasyon sonucu (100 Gy) oluşan hasara uğramış hücrelerin DNA görüntüleri (I ve II 100 Gy). 30

KISALTMA VE SİMGELER

Gy	: Gray
µl	: Mikro litre
ml	: Mili litre
°C	: Celcius derece
⁶⁰Co	: Kobalt 60
Sn	: Saniye
dk	: Dakika
M	: Molar
SDS	: Sodyum dodesilsülfat
V	: Volt
mg	: Mili gram
%	: Yüzde

GİRİŞ

Ülkemizde tarımsal üretimin önemli kısmını oluşturan tahıl ürünleri depolama döneminde birçok zararlı tarafından tahrip edilmektedir. *Ephestia. kuehniella*, *E. cautelle*, *Lasioderma serricorne*, *Oryzaephilus surinamensis*, *Plodia interpunctella*, *Rhyzopertha dominica*, *Sitophilus spp.*, *Tribolium spp.* ve *Trogoderma granarium* ülkemizde sık rastlanan önemli depo zararlılarıdır [1].

Zararlı kontrolü gerek sağlık açısından, gerekse ekonomik açıdan önemli zararlara neden olduğundan yapılması şarttır. Bu amaçla çeşitli yöntemler uygulanmaktadır. Uygulanan bu yöntemler de böcekler hakkında elde edilen bilgiler arttıkça değişebilmektedir. En yaygın olarak kullanılan yöntem insektisit olarak adlandırılan kimyasal preparatların kullanımınıdır. Ancak; gerek kimyasal preparatların çevreye ve canlılara verdiği zararların anlaşılması ve gerekse de böceklerin bu tür bileşiklere karşı oluşturdukları direnç mücadele yöntemlerini temelinden değiştirmiştir. Yapılan araştırmaların sonuçlarına paralel olarak çevreye ve doğal hayata en az zararlı, böceklerde bağımsızlık oluşturmeyen, sadece hedef alınan böcekleri etkileyip doğal denge açısından gereksinim duyulan böceklere zarar vermeyen mücadele yöntemlerinin geliştirilmesi sağlanmıştır. Zararlı böceklerle mücadelede günümüze kadar biyolojik mücadele strateji ve yöntemleri değişik şekillerde incelenmiş ve uygulanmıştır. Bu yöntemlerden birisi olan gama radyasyonu depo zararlılarına karşı uygulanabilir bir alternatiftir. Bu uygulama hızlı ve etkili bir yöntemdir. Ayrıca bu uygulama sonucunda fosfine karşı direnç oluşturmuş zararlıların kontrolü de sağlanabilir. Depolanmış ürünlerdeki zararlıların gama radyasyonuna karşı toleransında farklılıklar vardır. Buna ilaveten belirli bir evrede olan (ergin, larva, vb.) böcek türünün iyonize radyasyona karşı hassaslığı da belirlenebilir. Çünkü bireyin bazı hayat evrelerinde öldürücü seviyenin altındaki ışınlamada gelişmesini devam ettirebilme kabiliyeti vardır [2].

Raporlara göre fiziksel ajanlar (sıcak, soğuk, basınç, ses, elektromanyetik ışınım ve elektrik akımı), gama radyasyonu, X ışınları, kimyasal bileşikler canlı hücredeki DNA'ya zarar verebilirler [3]. Diploid (2n kromozom taşıyan hücre) memeli hücrelerinde 1 Gray (Gy) iyonize radyasyon ortalama 1000 tek ve 30 çift zincir kırığına yol açtığı bilinmektedir. İlk olarak 1960'ların ortalarında *E. coli*'de yapılan çalışmada radyasyon sonucu oluşan DNA zincir kırıkları McGrath ve Williams tarafından tespit edilmiştir [4].

DNA zincir hasarlarını belirlemede çeşitli metotlar geliştirilmiştir. Genotoksik veya mutajenik etkilere sahip olan fiziksel veya kimyasal maddelerin (pestisitler, gama veya UV ışıklar) hedef organizma üzerinde belirli bir periyot ve konsantrasyonda DNA hasarı oluşturup oluşturmadığı komet analiziyle belirlenebilir. DNA üzerinde stres faktörlerinin hasar oluşturup oluşturmadığı, eğer hasar oluşturuyor ise hasar derecesinin belirlenmesi hedef organizmanın geleceği açısından önemlidir. Şimdiye kadar DNA hasarının belirlenmesi ile ilgili çok sayıda teknikler kullanılmıştır. Bunların birçoğunun pahalı ve uzun çalışma süresi gerektirmesi, kimi zaman da beklenen başarımın elde edilememesi bu alandaki güçlükleri ortaya koymaktadır [5].

Son yıllarda tıp ve biyoloji alanlarında yukarıda belirtilen sorunlara cevap verebilecek 'tek hücre jel elektroforez' veya 'komet analizi' moleküler test sistemi gibi yöntemler geliştirilmiştir. Bu metot sayesinde DNA'da hasar olup olmadığı, varsa hasar seviyelerinin anlaşılması ile farklı bir boyut kazanmıştır [6]. DNA hasarını ölçmek ve analiz etmek amacıyla kullanılan hızlı, basit, duyarlı ve yaygın kullanım alanına sahip bir tekniktir. İlk defa 1978 yılında Rydberg ve Johanson tarafından DNA sarmal kırıklarının ölçülmesi amacıyla kurulan, daha sonra 1984 yılında Östling ve Johanson tarafından geliştirilen teknik nötral pH'daki lysing şartlarında uygulanarak DNA çift sarmal kırıklarını tayin etmede kullanılmıştır. 1988 yılında Singh ve arkadaşları tarafından protokolda birtakım değişiklikler yapılarak yöntem alkali lysing koşullarında uygulanmıştır. Singh ve arkadaşlarının komet yöntemi protokolü bugün küçük değişikliklerle dünya genelinde en yaygın kullanılan protokoldür [7].

Bu teknikte hücreler, agaroz jelle kaplı lamlara gömülür. Bu hücreler yüksek tuz tamponu ve deterjanlar tarafından lizis edilir. Nötral koşullar altında kromatinler elektroforez yöntemiyle serbest kalır (pH: 9.5). DNA; floresan boya ile boyandıktan sonra (ethidium bromide) "kuyruk" ve "baş" yapılarından bir komet oluşur [8].

Zincir kırılmasıyla oluşan baş ve kuyruktaki DNA miktarı orantılıdır. Bu yöntem hemen hemen tüm ökaryot hücrelerinde özellikle erken ortaya çıkan ya da tamir edilememiş, DNA'da ortaya çıkan hasarları bulmaya yardımcı olur. Çeşitli amaçlara ulaşmak için farklı modifikasyonlu komet tekniği geliştirilmiştir. Bu yöntemlerden en çok kullanılanı tek ve çift zincir kırıklarını tespit edebilen alkali komet tekniğidir [9].

Hasar parametrelerini ölçmek için birçok görüntüleme sistemi uygulanmıştır. En çok kullanılan yöntem ise çekirdek merkezinden kuyruk sonuna doğru ölçülen kuyruk uzunluğu, kuyruktaki DNA yüzdesi ve kuyruk momentidir (kuyruk momenti= kuyruk uzunluğu \times kuyruktaki DNA yüzdesi) [10].

Bu çalışmada ülkemizde yaygın olarak bulunan ve depolanmış ürünlerde önemli zararlara neden olan *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae) üzerine radyasyonun meydana getirdiği değişikliklerin komet yöntemiyle izlenmesi amaçlanmıştır. Farklı dozlardaki ışınlamanın böcek popülasyonunda ve farklı hayat safhalarında etkisi tespit edilmiştir. Bu yöntemde radyasyona maruz kalan bireylerde bir direnç oluşmadığı için sadece hedef organizmayı etkilemiştir. Böylelikle radyasyonun hücre üzerindeki olası etkileri ortaya konmuştur.

1. BÖLÜM

GENEL BİLGİLER

İnsanların, böceklerin doğrudan veya dolaylı zararlarından kurtulma gayretlerinin başlangıcı çok eskilere dayanmaktadır. Genel bir deyişle, insanlar yaratıldıkları günden beri, böcekleri yok etmek veya hiç olmazsa zararlarından kurtulabilmek için, uğraşmalarına rağmen bunda hâlâ tamamen başarılı olamamışlardır. Halen, insanlar elde edecekleri ve ettikleri ürünlerinin en az onda birini böceklere kaptırmaktadırlar [11].

Biyolojik kontrolün uygulandığı en yaygın organizma grubu böceklerdir. Dünya genelinde 543'ü aşkın böcek türüne karşı 1200'den fazla biyolojik kontrol programı uygulanmıştır ve çoğunun amacı doğal düşmanların korunması ve yetiştirilmesi programlarına dayanır. Hedef türlerin en önemlilerini Homoptera, Diptera, Hymenoptera, Coleoptera ve Lepidoptera takımlarına ait zararlılar oluşturmaktadır [12].

Lepidoptera takımından önemli bir tür olan un güvesi *Ephestia kuehniella*'nın erginleri dumanlı gri renkte ve 10-14 mm boyunda olup, ön kanatları üzerinde enine zikzak bantlar bulunmaktadır, arka kanatları sarımsı beyaz renkte, geniş ve uçları saçaklıdır ve kanat açıklığı 16-25 mm'dir. Yumurtalar oval ve beyaz renklidir. Larvalar krem renkte ve kıllarla kaplı, kıl diplerinde kahve renkte pigment halkaları bulunmakta ve olgun larvalar 10-19 mm boyunda, pupalar ise sarımsı kahve renkte ve 9 mm boyundadır. Un güvesinin larvaları birinci derecede un ve mamullerinde, ikinci derecede tahıllarda zarar yapmaktadır. Bu türün larvaları ördükleri ağlar ile unlarda topaklanmalara neden olmakta, beslenmeleri sonucu gıda maddelerini kirletmekte, kızışma sonucu bozulma ve kokuşmaların ortaya çıkmasına sebep olmaktadır. Dişiler çiftleştikten sonra yumurtalarını un, tahıl taneleri ile diğer gıda maddeleri, depo veya değirmenlerdeki çatlak veya delikler ile makine aksamına yapıştırılmaktadır. Bir diş yaşama boyunca 100-600 adet yumurta bırakmakta ve yumurtalar 4-6 gün içinde açılmaktadır. Yumurtalardan

çıkan larvalar ilk devrelerde kendine undan veya diğer gıda parçacıklarından yapılmış bir kılıf yaparak bunun içerisinde beslenmektedir. Larva beş deri değiştirmekte, olgun larva gıda ortamını terk ederek depolardaki yarık, çatlak ve girinti gibi yerlerde kokon öreerek pupa olmaktadır. Böcek, gelişme süresini normal şartlarda 8-9 haftada tamamlamakta ve yılda 3-4 döl vermektedir. Erginler bir iki hafta kadar yaşamaktadır [13].

E. kuehniella pek çok üründe zarar meydana getirmektedir. Un, incir, kuru üzüm, makarna, mısır, şehriye, yulaf, irmik, bisküvi, buğday, pirinç, kepek, erik kurusu, şeftali kurusu, ay çiçeği, pestil, ceviz içi, fındık ve iç badem üzerinde belirlenmiştir [14].

Tarımsal ürün ve gıdanın; depolanmış ürün zararlılarından korunması üretici, işletme ve ihracatçılar için yaşamsal öneme sahiptir. Ülkemizde depolarda ve işletmelerde ürünlerin zararlılardan korunmasında en yaygın yöntem pestisit kullanımınıdır. Depolanmış ürün zararlıları ile mücadele amacı ile dünyada ve ülkemizde yaygın olarak insektisitler kullanılmaktadır. Bu amaçla kullanılan insektisitler zararlıları kısa sürede öldürmesinin yanı sıra çevreye ve insan sağlığına zarar verebilmektedir. Ülkemizde 1998 yılında hasat sonrası uygulamalarda yaklaşık 297 ton pestisit kullanıldığı kayıtlıdır. Kullanılan pestisitlerden, kalıcı insektisitler (255 ton)'den 20 tonu boş depo ilaçlamalarında ve 235 tonu ise ürüne uygulama yöntemi ile kullanılmıştır. Bu dönemde fümigantlardan metil bromit (Mbr) kullanımı yaklaşık 40 ton olmuştur [15]. Depolarda kullanılan birçok pestisite zararlıların direnç geliştirdiği bilinmektedir. Depolarda kullanılmakta olan malathion, chlorpyrifos-methyl, fenitrothion, pirimiphos-methyl, etrimfos ve benzeri birçok etkili maddeye karşı bazı zararlıların direnç geliştirdiği bildirilmektedir [16]. 1950'den beri pestisit kullanımı 12 kat artmış, buna bağlı olarak da ilaca dayanıklı tür sayısı 1960'da 50 civarında iken 1990'da 490'a ulaşmıştır [17].

Bu yüzden araştırmacılar kontrol için gelişmiş metotlar bulma ihtiyacı duymuşlardır. Ülkemizde depolanmış ürün zararlıları ile savaşında zaman zaman radyasyon ve mikrodalga uygulamalarının da kullanılabileceği bildirilmekle birlikte, yaygın bir kullanımı söz konusu değildir [18]. Gama ışınları gibi iyonize ışınların mikroorganizmalar üzerindeki etkileri hücre içerisine giren ışınların atomlardan elektron uzaklaştırarak iyonize moleküller oluşturması ile gerçekleştirilir. Bunun sonucu hücre DNA'sı ve membranının fonksiyonlarında önemli ölçüde değişimler oluşur ve serbest radikaller meydana gelir. Serbest radikallerin reaktiviteleri de ikincil değişimlere yol

açar. Mikroorganizmaların radyasyona karşı olan dirençleri radyasyon dozuna, mikroorganizmanın cinsine, spor veya vejetatif formda oluşuna, ortamın bilişimine ve sıcaklığa göre değişir. İnsan ve hayvanlar 0,005–0,01 kGy, böcekler ise 0,001–0,1 kGy düzeyindeki ışın dozu ile letal etkilenirler [19]. Düşük dozda ışınlama (1 kGy'den az) gıdaları kemirgenlerden arındırmak ve bu zararlıları karantina altına almak için kullanılabilir. Giderek artan sayıda ülke gıda ışınlama tekniğini kabul etmiştir. Aynı zamanda, ışınlanmış gıda belirleme yöntemleri yetkililer tarafından gerekli kılınmıştır [20]. Ayrıca özellikle üçüncü dünya ülkelerinde yer ve israf her zaman bir sorun oluşturduğu için gıdayı korumak ve gıda kaynaklı hastalıkların sıklığını azaltmak için radyasyon kullanımı büyük faydalar sağlayabilir. Radyasyonun kullanıldığı bazı çalışmalar aşağıda verilmiştir:

- Buzdolabında et ve et ürünlerinin raf ömrünü uzatmak,
- Baharatlarda bozulmaya yol açan organizmaların azaltmak,
- Patates ve soğanın çimlenmesinin engellenmesini sağlamak,
- Tahıllardaki böcek ve parazitlerin yok edilmesi,
- Meyve olgunlaşma sürecini geciktirmek,
- Et, kümes hayvanları ve su ürünleri sterilizasyonu [21].

Birçok böcek, radyasyona yüksek toleransı olan farklılaşmış hücrelerden oluşur. Işınlamaya bağlı olarak hasarlı hücreler bölünmüş veya farklılaşmamış hücrelerden tipik olarak çok daha dayanıklıdır. Ancak, gonadlarda (eşey bezlerinde) oluşan kök hücreler ışınlamayla genellikle kolayca öldürebilen hücrelerdir. Biyolojik sistemlerde iyonize radyasyonun aynı zamanda reaktif radikallere yol açtığı da bilinmektedir. Reaktif oksijen türleri ve hücre bileşenlerinin yapısal bütünlüğünü sağlayan antioksidanlar gibi serbest radikaller arasında da uygun bir denge sağlanmalıdır. Eğer serbest radikal düzeyinde bir dengesizlik varsa DNA, yağlar ve proteinler gibi hassas biyolojik yapılar zarar görebilir. Bu araştırmalar, böcek gelişim evrelerinde iyonize radyasyona karşı toleransın olduğunu ortaya koymaktadır. Holometabolik böceklerde (tam başkalaşım geçiren böcekler), pupa evresinde doku ve organlar tekrar yapılandığı için bu fazdaki böcekler zararlı ajanlara karşı daha hassastır. Yapılan çalışmalarda, larva ve yetişkinlere göre pupada komet parametrelerini kapsayan kuyruktaki DNA miktarı üç kat daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. Pupa fazında apoptozis olayı (hücre ölümü) larva ve yetişkine göre daha fazla olması bu olayı açıklamaktadır [22].

Genetik olayların moleküler düzeydeki temeli genetik materyal görevini üstlenen nükleik asitlerin yapı ve özelliklerine dayanır. Nükleik asitlerin iki türü olan deoksiribonükleik asit (DNA) ve ribonükleik asit (RNA) temelde aynı yapısal özelliklere sahiptir. DNA sadece kalıtsal bilgiyi taşıyan makro moleküller olmayıp bu bilgiyi protein sentezine aktarmaktan da sorumludur [23]. DNA kolay zarar görebilen bir moleküldür ve üzerinde sürekli olarak hasar oluşmaktadır [24]. DNA üzerinde kendiliğinden değişimler sonucu veya çevresel etmenler sonucu hasar meydana gelebilmekte, oluşan hasar DNA onarım sistemleri tarafından giderilmekle birlikte, hasarın çok fazla olduğu veya onarım sistemlerinin yetersiz kaldığı durumlarda DNA üzerinde oluşan hasar mutasyona veya hücre ölümüne neden olmaktadır [25].

Kendiliğinden değişimler sonucu oluşan DNA hasarının nedenleri arasında; DNA sentezi sırasında bazların yanlış eşleşmesi, pürin ve pirimidin bazların ketoenol tautomerizm ve deaminasyon (bir aminoasit ya da başka bir organik bileşikten bir $-NH_2$ (amino) grubunun ayrılması) sonucu kimyasal yapısında gelişen değişimler, DNA yapısında bulunan pürin ve pirimidin bazlarının termal dayanıklılığına bağlı olarak hidrolitik baz kaybı ve hücre metabolizmasının yan ürünü olarak üretilen serbest radikallerin neden olduğu DNA hasarları önemli yer tutmakta olup çevresel hasar ise fiziksel ve kimyasal hasar olmak üzere iki grupta incelenmektedir. DNA'nın bütünlüğünü bozup ve farklı DNA hasarlarının oluşmasına neden olan fiziksel etkenler arasında ultraviyole ve X-ışınları önemli yer tutmaktadır. DNA hasarlarının oluşmasına neden olan kimyasal ajanlar içinde, çevresel mutajen ve karsenojenlerin en geniş grubu olan ve çeşitli gıda maddelerinde, antitümöral ilaçlarda ve tütünde bulunan alkilleyici maddeler, foto aktive olmuş psoralenler gibi çapraz bağlayıcılar ve ksenobiotikler gibi elektrofilik reaktanlara metabolize edilebilen kimyasallar yer almaktadır. Hücre, DNA hasarlarına farklı metabolik yollar ile cevap verir. Ağır DNA hasarları hücrenin apoptoz yolunu (kansereleşen hücrenin programlı olarak öldürmesi) aktive ederek hücreyi ölüme götürür. DNA hasarı replikasyon sırasında tamir edilemezse mutasyona ve sonuç olarak genomik kararsızlığa neden olabilmektedir [26].

Fizikokimyasal etkileşim ile hücre DNA; tek zincir kırıkları (SSBs), çift zincir kırıkları (DSBs), DNA–DNA ve DNA–protein çapraz bağları, pürin ve pirimidin bazlarında hasar veren çeşitli primer lezyonları üretir. Memeli hücreleri bu tür zararlar için etkili bir enzimatik tamir mekanizmasına sahiptir. Fakat radyasyon etkisiyle oluşan

çift zincir DNA kırıkları geri dönüşümsüzdür. Böylelikle ortaya çıkan çift zincir DNA kırıkları önemli mutajenik ve kanserojen lezyonlarına sebep olur. Bu onarılamayan DNA, kromozomal delesyon ve düzensiz (translokasyon ve aralarında delesyon) birleşmelere yol açarak çeşitli kanserleri ortaya çıkarır. Her zaman DNA hasarının izlenmesi için hızlı ve duyarlı yöntemler geliştirilmesine ihtiyaç duyulmuştur. Yıllar içinde, kromozomal anomaliler, mikronukleus ve kardeş kromatit değişimi gibi rutin sitogenetik bir takım göstergeler, iyonize radyasyonun genotoksik etkilerini tespit etmek için uygulanmıştır. Son yıllarda komet analizi (tek hücre jel elektroforezi) iyonize radyasyon tarafından oluşturulan DNA hasarı ve DNA hasarına yol açan mutajen ve kanserojen etkilerini izlemek için kullanılmıştır. Moleküler epidemiyoloji çalışmalarında, komet analiziyle DNA hasarı değerlendirilmesi bir belirteç olarak kullanılmaktadır. Komet analiz testi; birincil DNA hasarı tespitinde ve tek hücre düzeyinde tamir çalışmasına izin verir. Diğer genotoksisite testler karşılaştırıldığında, komet analizi en az zaman alıcıdır. Bu yöntem hassas, çeşitli alanlarda kullanılabilecek (biyomedikal araştırma, genetik toksikoloji, radyasyon biyolojisi, klinik ve moleküler epidemiyoloji, kanser radyoterapi analizi gibi) çok yönlü bir tekniktir [27].

Son 20 yılda DNA hasarlarını belirleyebilen yeni metotların araştırılmasıyla belli bir düzeye gelinmiştir [28]. DNA'daki hasar düzeyinin ölçülmesinde kullanılan en yaygın ölçme yöntemlerinden birisi olan "Tek Hücre Jel Elektroforezi" (Single Cell Gel Electrophoresis) hassas, basit ve hızlı bir görsel flüoresans tekniğidir [29]. Teknik, hücrelerde çeşitli ajanların indüklediği DNA hasarı ve onarım bozukluklarının tayini amacıyla genetik toksikolojiden moleküler epidemiyolojiye kadar pek çok alanda kullanılmakta olup "Komet Analiz" ya da "Microgel Electrophoretic Tecniqe" olarak da adlandırılmaktadır [28, 29].

Genel olarak, canlı dokulardan izole edilen çekirdek içindeki DNA, ince bir agaroz jel içine fikse edilir ve elektroforetik ortamda yürütülür. Eğer çeşitli genotoksik ajanlarla hasarlanan DNA'lar tamir mekanizmaları ile tamir edilememiş, tek veya çift DNA zincirlerinde kırılmalar oluşmuş ise kırılan farklı molekül ağırlıklarına ve farklı elektrik yüküne sahip kırılmış DNA molekülleri elektroforetik ortamda farklı hızlarda göç ederler. DNA molekülleri ethidium bromide gibi DNA spesifik boyalarla boyanıp floresan mikroskop altında incelendiğinde hasarın derecesine göre DNA'lar dairesel formdan kuyruklu yıldız benzer forma kadar çeşitli derecelerde görüntüler

oluşturduklarından yönteme İngilizce “kuyruklu yıldız” anlamına gelen “Comet Assay” adı verilmiştir. Tek hücre jel elektroforez veya komet analiz yöntemi ilk kez Östling ve Johansson (1984) tarafından temelleri oluşturulmuş daha sonra çeşitli araştırmacılar tarafından günümüze kadar modifiye edilmiş ve yeni teknikler ile birlikte sunulmuştur [30]. Bu uygulamada agarozda süspansiyon edilmiş radyasyona maruz kalmış hücreler lam üzerine yayılarak, yüksek tuz ve deterjanla liz edilmiş ve ardından elektroforeze tabi tutulduktan sonra DNA bağlayıcı floresan boya olan akrinin oranla boyanmışlardır [31]. Sonuçta kırık içeren DNA’ların gevşediğini, kırılmış DNA fragmanları nedeni ile elektrik yük kazandığını ve çekirdekte anota doğru göç ederek kuyruklu yıldız görünümünü vermesinden dolayı hasarlı hücreleri “komet” olarak adlandırmışlardır. Yine kuyruk uzunluğu DNA hasarını saptamak için ölçülmüş ve kuyruk uzunluğunun radyasyon dozunun bir fonksiyonu olduğu belirlenmiştir [32].

DNA çift sarmal kırılmalarının tespitine izin veren nötral şartlar, tek sarmal kırılmalarının belirlenmesine izin vermemektedir. Oysa DNA'da hasar oluşturan çoğu ajan, DNA çift sarmalından çok, DNA tek sarmalında hasar meydana getirmektedir. Bunun yanında nötral şartlarda proteinler tam olarak uzaklaştırılamamaktadır. Bu nedenlerden dolayı 1988'de Singh ve arkadaşları tarafından alkali şartlar altında ($pH > 13$), DNA tek sarmal kırılmalarının tespitine izin veren komet tekniği oluşturulmuştur. Kullanılan daha güçlü lizis koşulları, proteinlerin %95'inden fazlasını yok edebilmektedir. Alkali elektroforez uygulaması ile alkali oynak bölgelerin ve tek zincir kırıklarının basit ve duyarlı bir şekilde tanınması sağlanmıştır. Pek çok genotoksik ajanın çift zincir kırıklarından çok tek zincir kırıkları ve/veya alkali oynak bölgeler oluşturması nedeniyle metodun bu versiyonu daha çok önerilir hale gelmiştir [33].

Araştırmalar sonucunda nötral deney şartlarının denatürasyonu hızlandırmadığı ve bunun sadece çift bağ hasarının tanınmasına yol açtığı gözlenmiştir. Bu ise genotoksikite hakkında daha az hassas sonuçlar elde edilmesine yol açmıştır. Bu nedenle konu üzerinde çalışmalar devam etmiş ve yöntemin alkali versiyonu Singh tarafından 1988 yılında bulunmuştur. Klade ve Collins kuyruk oluşturmanın altında yatan nedenin alkali şartlarda iplikçiklerin gevşemesi olduğunu bulmuşlar ve yaptıkları çalışmalarda nötral şartlarda kuyruk kısmında sadece gevşek iplikçikler varken DNA parçacıklarının alkali ortamda bulunduğunu göstermişlerdir. Zira alkali ortamda

bağların çözülmesi ve DNA moleküllerinin denatürasyonu daha kolaydır. Bu DNA'da tek bağ hasarına neden olur. Bu nedenle son yıllarda tercih edilen yöntem alkali ortamda DNA hasarını çalışmak olmuştur [34].

Diğer araştırmacıların da katkısı ile komet uzunluğu ve komet kuyruk mesafeleri gibi görüntü analizi ve ek parametrelerin tanıtılması yönünde bir iyileşme sağlanmıştır. Genellikle, komet testinin manuel analizi üç bölümden oluşur:

- i. Seçilmiş hücre çekirdeği ölçülecek,
- ii. Etkileşimli eşikler ile görüntü segmentasyonu,
- iii. Komet miktarı [35].

Metot öncelikle alkali ortamlarda uygulandığı için alkali komet analizi ya da alkali tek hücre jel elektroforez şeklinde kullanılmıştır. Ancak son yıllarda, N/N (Nötr gevşeme/Nötr elektroforez) ve A/N (Alkali gevşeme/Nötr elektroforez) şeklinde de uygulanmaya başlanmıştır. Metodun alkali versiyonu, A/A (Alkali gevşeme/Alkali elektroforez, pH 13) DNA'nın çift ve tek sarmal yapıda olan hasarlarını ölçmek için kullanılmaktadır. Sadece genotoksik ve mutajenik maddeler değil, aynı zamanda oksidatif stres de DNA üzerinde hasar oluşturduğundan, bu çalışma konuları içinde de yer alabilecek önemli bir yöntemdir [30].

Elektroforez ve lizis aşamalarının pH'sına bağlı olarak tekniğin duyarlılığı değişebildiğinden nötral ve alkalın lizis solüsyonları sırasıyla çift ve tek sarmal kırılmalarını belirlemek için kullanılmaktadır (Tablo 1.1.).

Tablo 1.1. Komet yöntemiyle farklı pH'larda tayin edilebilen DNA hasar tipleri [22].

pH:7-8	pH: 10-12	pH>13
Çift sarmal kırıkları	Çift sarmal kırıkları	Çift sarmal kırıkları
Çapraz bağlar	Tek sarmal kırıkları	Tek sarmal kırıkları
	Eksizyon tamir bölgeleri	Eksizyon tamir bölgeleri
	Çapraz bağlar	Çapraz bağlar
		Alkali ortamda açığa çıkan hasarlar

1.1. Kullanım Alanları

Komet tekniği tek bir hücrede DNA hasarının direk tayininin yanı sıra, bir popülasyondaki tüm hücrelerin aynı oranda hasara uğrayıp uğramadığının tespitine, dolayısıyla da bir tedavi sırasında hücrelerin cevabının özellikle radyoterapi ve kemoterapi rejimlerinde tümör cevabının saptanmasına yardımcı olabilmekte, dirençli hücre popülasyonunun tanımlanmasını sağlamaktadır. Komet tekniği pek çok deneysel şartlarda DNA hasar ve onarımını incelediğinden, son yıllarda genotoksisite ve DNA onarım mekanizmalarının incelemesinde kullanımı artan bir yöntemdir. Yöntem tek hücre süspansiyonu şeklinde elde edilebilen hemen hemen her ökaryot hücrede DNA hasar ve onarımını tespit etmektedir. Oldukça küçük hacimde örneklerle çalışılabilmekte, sonuçlar bir günde elde edilebilmektedir. Yöntem alkali elüsyon (kromatografi işlemi ile bir maddeyi, durgun ve hareketli sıvı fazlar arasındaki dağılıma farkına dayanarak adım adım yürüterek başka maddelerden ayırma işlemi) gibi diğer uzun DNA analizleri kadar duyarlıdır [36].

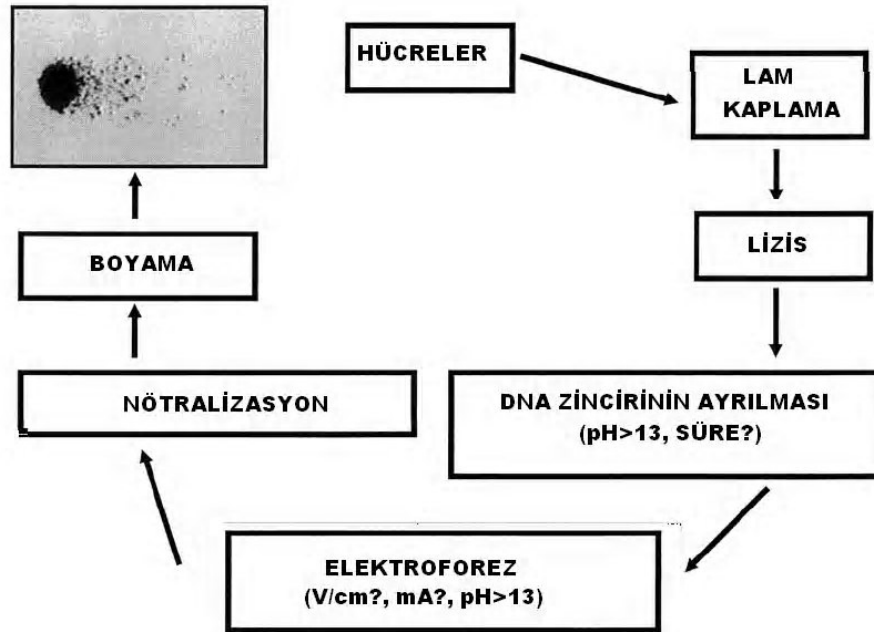
Günümüzde komet tekniği insan popülasyonlarından alınan lenfosit örneklerinde oksidatif hasar, UV ve iyonize radyasyona duyarlılıkların incelenmesi yönünden başarılı bir şekilde uygulanmaktadır. Özellikle izleme (görüntüleme sistemi) çalışmalarında, meslekleri nedeniyle veya çevresel ya da kazayla çeşitli kimyasal maddelere maruz kalan kişilerde, DNA hasarının incelemesinde son yıllarda rağbet gören bir tekniktir [36, 37].

Komet ölçümü insan çalışmalarında kullanılacak en uygun testlerdendir. Çünkü radyoaktif maddelerle işaretleme gibi zararlı işlemleri içermez ve kolaylıkla görünebilir hücrelere uygulanabilir [37].

1.2 Uygulama Protokolü

Tekniğin uygulanmasında tek tabakalı jel ve sandviç jel olmak üzere iki tip jel modeli vardır. Daha yaygın olarak kullanılan, sandviç modelidir. Gömülen bu hücreler, lizis solüsyonunda bekletilir. En çok tercih edilen yöntem, en az bir saat süreyle, pH>10-12'de, deterjanla ve yüksek tuz konsantrasyonunda hücrelerin bekletilmesi şeklindedir (Şekil 1.1). Elektroforezden önce lamalar, alkali elektroforez solüsyonunda DNA sarmalının ayrılması için bekletilir. Bu solüsyon pH>12 ve düşük tuz konsantrasyonunda olmalıdır. Uygulanacak olan elektroforez süresi ve voltajı hücrelerdeki DNA göçünü etkilediği için, her denemede standart seçilen bir tanesi

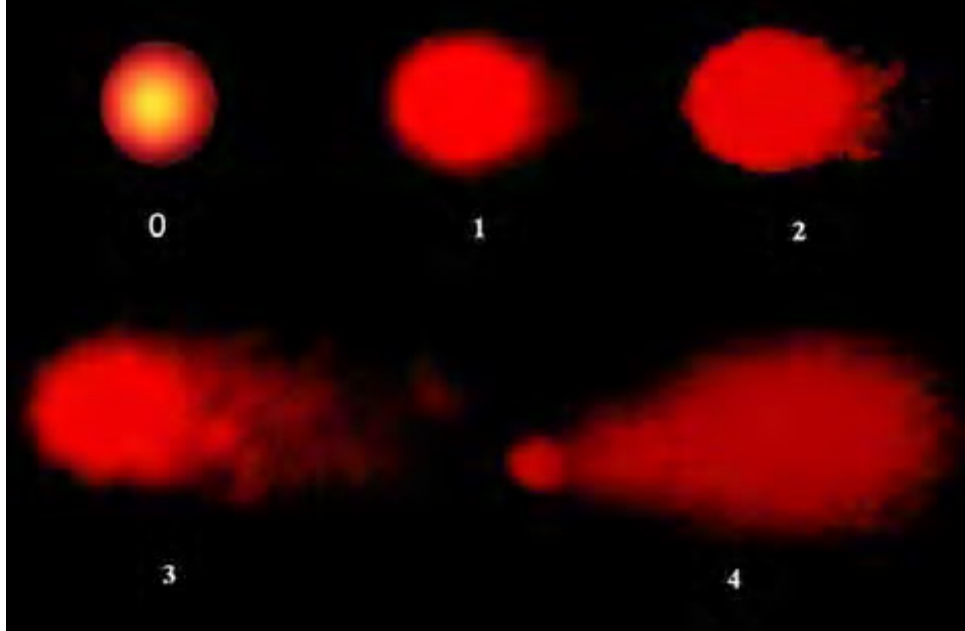
kullanılmalıdır. Elektroforezi takiben lamaların yıkanması için en çok tris tamponu tercih edilir. En son olarak DNA bağlayıcı boyalarla (akridin oranj, ethidium bromide, propidyum iyodür, DAPI gibi) flüoresans renk oluşturulur [29].



Şekil 1.1. Alkali komet tekniğinde kritik basamakların şematik gösterimi [38].

Teknikte hasarsız hücrelerin incelenmesinde yuvarlak, kenarları daha az yoğun olmak üzere ortası parlak bir ışık görünümüdür. Hücrelerin bu görünümü göç etmemiş olarak değerlendirilir. Eğer DNA hasarı oluşmaya başlamış ise göç uzunluğu fragmentlerin miktarına, DNA zincir kırılmalarına ve alkali-labil bölgelerin seviyesine bağlı olarak değişiklik göstereceğinden, normalde düzgün kenarlı olan görüntü DNA kırıklarının çekirdek dışına göçmesi nedeniyle düzensiz kenarlı bir görünüm alır. Hasarın şiddetine göre merkezden kenara doğru uzama oluşur. Bu görünüme gerilmiş ya da düşük dereceli göç adı verilmektedir. Hasar arttıkça hücreler kuyruklu yıldız (komet), yüksek dereceli göç şeklini alır. Son aşama ise apoptozistir. Bu uzama hasar ile doğru orantılıdır. Ayrıca kuyruktaki floresan yoğunluğu da hasarın derecesine paraleldir. Fakat bu yaklaşım hasarlı hücreler arasındaki tahribatın büyüklüğü hakkında bilgi vermekte yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle hasarlı hücreler, oluşan hasarın derecesine göre DNA görüntüleri çeşitli alt kategoride sınıflandırılarak puanlandırılır. Hasar bulunmayan

DNA'lar 0, hasar olan DNA'lar hasarın derecesine göre Şekil 1.2.'de görüldüğü gibi 1 den 4'e kadar puanlandırılır ve sonuçlar görsel skorlama (AU) ile değerlendirilir [26].



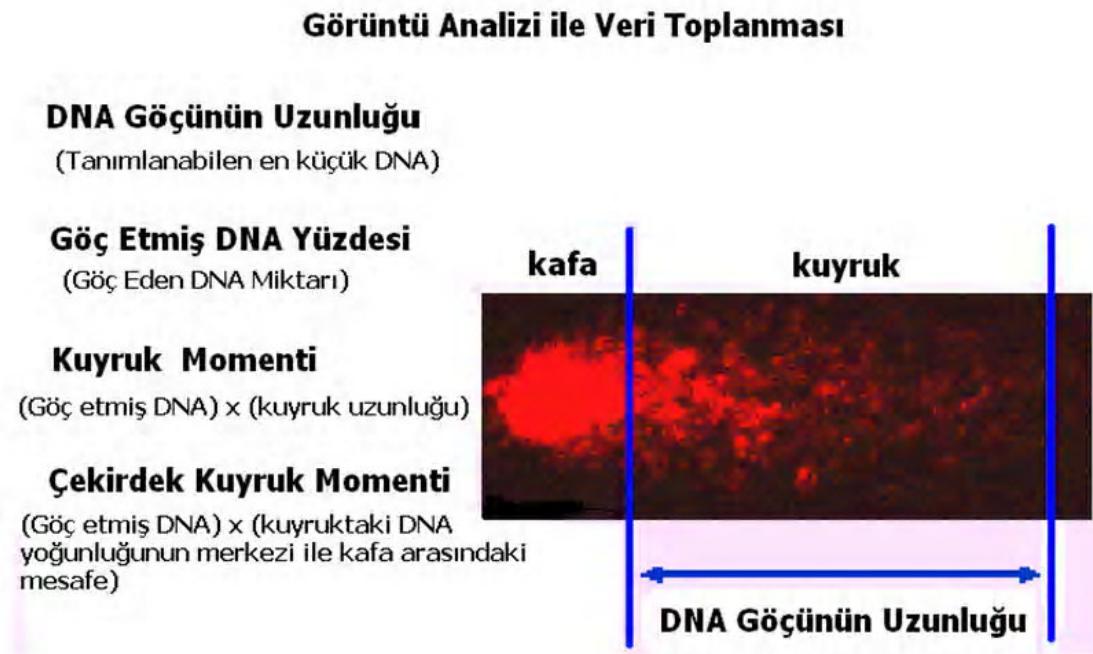
Şekil 1.2. Görsel skorlama tekniği (AU) ile hücrelerin sınıflandırılması (0:hasarsız DNA görüntüsü, 1-4: hasarlı DNA'ları hasarın derecesine göre puanlanması) [26].

Belli bir bölgedeki DNA miktarı, o bölgedeki floresan yoğunluğu ile doğru orantılıdır. Bu özellikten yararlanarak dijital görüntü sistemlerinde ve analiz yazılım programlarındaki ilerlemeye paralel olarak daha hassas ve doğru sonuç veren miktar tayini yöntemleri geliştirilmiştir. Hasarlı hücrelerin baş uzunluğu, baş ve kuyruktaki DNA yüzdesi, kuyruk uzunluğu ve kuyruk moment gibi çeşitli komet parametreleri ölçülebilmektedir [39].

Kuyruk uzunluğu, kuyruktaki DNA ve DNA dağılımı komet analizinde kullanılan temel parametrelerdir. Diğer tüm ölçümler yukarıda bahsedilen 3 veriden elde edilir. Bunlar arasında kuyruk momenti ve kuyruk uzunluğu en sık kullanılanlar olmasına rağmen, önerilen ve kullanımı gittikçe artan ölçüm parametresi kuyruk DNA yüzdesidir. Çünkü bu parametre kometlerin görünür kısmıdır ve DNA kırık frekansı ile doğru orantılıdır. Kuyruk momenti; kuyruk uzunluğu ve kuyruk içindeki toplam DNA oranının çarpımı olarak tanımlanmaktadır. Araştırmacı hangi ölçüm parametresini kullanırsa kullansın, parametreler çalışmalarda açıkça not edilmelidir [40].

Gelişmiş laboratuvarlarda ise genellikle görüntüleme analizlerinden yararlanılmaktadır. Son yıllarda ise ölçümler LSM (Laser-scanning microscopy) teknolojisiyle geliştirilmiştir. Böylece sarmal kırılmalarındaki farklılıklar kolaylıkla belirlenebilmektedir [41].

Deney hücre düzeyindeki DNA zararını ölçme esasına dayanmaktadır. DNA'sı zarara uğramış hücre, kafa ve kuyruk diye 2 kısımdan meydana gelmiştir. Şekil 1.3.'de "Kafa" bölgesi çekirdek dışına göç etmeyen, "kuyruk" ise parçalanmaya ve yapısal kayba bağlı olarak çekirdek dışına göç etmiş DNA'yı belirtir. [34].



Şekil 1.3. Görüntü analizinin şematik şekli [34].

1.3. Komet Tekniğini Etkileyen Faktörler

Komet tekniğinin farklı uygulanması sonuçları etkilemektedir. Örneğin, elektroforez şartları (süre, uygulanan voltaj), lizis solüsyonu şartları (tuz konsantrasyonu, süre ve pH), metodun hassasiyetini etkilemektedir. Bu nedenle deneylerde şartlar standart tutulmalıdır [39].

1.4. Komet Tekniğinin Avantajları

Yöntem *in vivo* (canlı içerisinde) modellerde herhangi bir dokuya da uyarlanabildiğinden, sadece hızlı proliferasyon (çoğalan) olan hücrelerde uygulanabilir olan diğer genotoksikite testlerinden daha üstündür. Aynı zamanda tek bir doku hasarını belirlemek de mümkündür. Komet tekniğinin avantajları aşağıda özetlenmiştir.

- ✓ Az sayıda hücre gerektirir
- ✓ Değişik hücre ve doku gruplarına uygulanabilir
- ✓ Kolay uygulanabilir
- ✓ Hassastır
- ✓ Hızlıdır
- ✓ Ekonomiktir
- ✓ Güvenilirdir
- ✓ Çeşitli türlerde DNA hasarlarını tespit edebilir
- ✓ Tek hücre seviyesinde bilgi edinilebilir
- ✓ Endüstriyel, çevresel ve genetik toksikoloji alanındaki çalışmalarda kullanılabilir [39].

Komet yöntemi kolay olmasına rağmen bazı önemli dezavantajları da vardır. Deneyimli bir personele ihtiyaç vardır. Farklı araştırmacıların değişken becerileri, zor verileri doğrudan bir karşılaştırma yapmasını sağlarken; araştırmacıların yorgun olması ve konsantrasyon bozukluğu yanlış verilerin alınmasına sebep olabilir. Görüntü analizi iki bölüme ayrılmıştır:

- 1) Otomatik hücre tanıma ve komet sınıflandırma
- 2) Komet parametrelerin ölçülmesi şeklindedir.

Deney aşaması tamamlandıktan sonra çekilen görüntülerin analizlerinin yapılabilmesi için algoritmalara dayalı matematiksel hesaplamaları geliştirilmiştir [35].

2.BÖLÜM

GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Böceğin Yetiştirilmesi

2.1.1. *Ephestia kuehniella* (Zeller, 1879) (Lepidoptera: Pyralidae)

Sistematikteki yeri:

Takım: Lepidoptera

Familya: Pyralidae

Cins: *Ephestia*

Tür: *Ephestia kuehniella* Zeller



Şekil 2.1. *E. kuehniella* ergini



Şekil 2.2. *E. kuehniella* larvası



Şekil 2.3. *E. kuehniella* pupası

Besin ortamında istenmeyen zararlıların elimine edilmesi için sterilizasyon işlemi gereklidir. Bunun için besi yeri hazırlamada kullanılan un 65°C'ye ayarlı etüvde 10 saat süreyle bekletilmiş ve steril edilen besi yeri polietilen torbalarda saklanmıştır. Şekil 2.3.'de *E. kuehniella* için besi yerinin 1 kg un içerisinde %5 bira mayası ve 30 gr buğday tohumu ilave edilerek hazırlanması belirtilmekte iken besi yeri modifiye edilerek 2 kısım buğday unu, 1 kısım mısır unu ve 1 kısım kepek karışımı kullanılmıştır. *E. kuehniella* stok kültürü hazırlanırken sert beyaz küvetler içerisinde besin konulmuş ve içerisinde hassas terazide tartılan 100 mg yumurta homojen olarak karıştırılmıştır.



Şekil 2.4. *E. kuehniella*'nın yetiştirme kapları

Larvaların hava alması ve dışarı kaçmalarının engellenmesi için küvet kapağının ortasında 5 cm. çapında bir daire kesilerek çıkarılmış ve boşluğa gergin tülbent bez yapıştırılmıştır. Kültür, $27 \pm 1^\circ\text{C}$ ve $\%70 \pm 5$ nispi neme ve 16: 8 (Aydınlık: Karanlık) saatlik ışınlama süresine (fotoperiyot) ayarlanan yetiştirme odasında üretilmiştir.

Bir litrelik plastik kavanozun alt kısmı kesilerek yumurtaların geçebileceği genişlikte tül elek yerleştirilmiş; kavanozun kapağında ise 5 cm çapında bir daire kesilerek çıkarılmış ve gergin bir tülbent bez yapıştırılmıştır. Bu şekilde hazırlanan yumurtlatma kapları içerisine aspiratörle Şekil 2.4. toplanan erginler konmuş ve yumurtlamaları sağlanmıştır. 24 saat sonra elekten aşağıya dökülen yumurtalar beyaz kâğıda alınmış, kağıtlar arasında aktararak böcek pulu ve diğer vücut parçalarından arındırılmış ve petri kaplarına konarak 4°C 'de saklanmıştır.



Şekil 2.5. *E. kuehniella* ergin toplama aspiratörü

2.1.2. Ergin, Larva ve Pupaların Toplanması

Cam tüplerin her birine 0, 50, 100, 150 ve 200 Gy kalemle yazılmış ve içerisine *E. kuehniella* ergin (1 günlük) ve olgun larva (22 günlük) ve pupalar (1 günlük) her tüpün içinde 10 birey olacak şekilde konmuştur. Şekil 2.5.'deki gibi tüplerin ağzı pamukla kapatılmıştır.



Şekil 2.6. *E. kuehniella* erginlerinin tüplere alınması ve ışınlanma için hazırlanması

2.1.3. *E. kuehniella* Ergin, Larva ve Pupaların Işınlanması

Ergin, larva ve pupalar ışınlama merkezinde (^{60}Co -499 sn) 0, 50, 100, 150 ve 200 Gy dozlarında ışınlanmıştır. Tüpler ışınlamadan sonra deney yapımı aşamasına kadar buz kalıpların arasında muhafaza edilmiştir.

2.2. Tek Hücre Süspansiyonlarının Hazırlanması

2.2.1. Lamların Kaplanması

0, 50, 100, 150 ve 200 Gy dozlarında ışınlanmış ergin ve larvalar beherlere aktarılmış ve beher içindeki bireyler cam baget yardımıyla hafifçe ezilmiştir. Beherin içine 1,5 ml FTT (fosfatla tamponlanmış tuz çözeltisi) pH: 7,4 ilave edilmiş ve karıştırıcıda 500 devirde 1 dk süreyle karıştırılmıştır (Şekil 2.6.). Beher içindeki hücre süspansiyonu süzülerek ependorf tüplerine aktarılmış ve (+4°C) buzdolabında 20 dakika dinlendirilmiştir.



Şekil 2.7. Hücre süspansiyonunun karıştırılma aşaması

Hücrelerin lama daha iyi tutunmasını sağlamak için lam önceden ince bir agaroz (damıtık suda %0,5lik agaroz) tabakasıyla kaplanmış ve 50°C'lik etüvde kurumaya bırakılmıştır. 100 µl hücre süspansiyonu 1 ml döküm jel çözeltisi (FTT'de %0,8'lik agaroz) ile karıştırılmıştır. Bu karışımın 100 µl'si önceden kaplanmış lam üzerine aktarılıp pipet ucu ile kabaca yayılmıştır (Şekil 2.7.). Lamların üzeri hava kabarcıkları önlenecek şekilde kapama lameli ile kapatılmıştır.



Şekil 2.8. Hücre süspansiyonunun lama yayılması

Hücre süspansiyonlarını yaydığımız lamalar agaroz jelin katılaşması için 20 dk süre ile buz üzerinde bekletilmiştir. Kapama lameli bistürü ucu ile kenarı çekilmiş ve alttaki agaroz kaplı lam dikkatlice kaydırılarak kaplama lamelinden ayrılmıştır.

2.2.2. Lizis

Lamellerden ayrılan lamalar daldırma sepetine dizilmiştir. Şekil 2.8.'deki gibi lizis çözeltisinde (%1.25'lik) boyama kavanozunun sepeti kapatacak şekilde konulmuş ve 2 dakika bekletilmiştir. Buradan alınan preparatlar 1 dk elektroforez çözeltisinde (TBE: 0,045M ve SDS pH: 8,4) bekletilmiştir.



Şekil 2.9. Preparatların lizis aşaması

2.2.3 Elektroforez

Alınan preparatlar elektroforez tankına dizilmiştir (Şekil 2.9.). Lamlar elektroforez tankına tıraşlı kısımlar katoda bakacak şekilde, lamlar arasında herhangi bir boşluk bırakılmadan dizilmiştir. Akım kesildikten sonra lamlar tanktan dikkatlice çıkarılmıştır. 26 V ve 10 dk süreyle akım uygulanmıştır. Elektroforezden alınan lamlar sepete alınmış ve soğuk suda 1 dakika bekletilerek nötralizasyonu sağlanmıştır. Ardından 50°C'lik etüvde 1 saat kurumaya bırakılmıştır.



Şekil 2.10. Elektroforez tankı

2.2.4. Boyama Aşaması

Boyama çözeltisi hazırlarken 100 mg ethidium bromide 100 ml balon jodede suyla eritilerek stok çözeltisi hazırlanmıştır. Buzdolabında yaklaşık 1 hafta kadar ışık almayan cam kaplarda bekletilmiştir. Boyama işleminde stok çözeltisinden 2 ml ethidium bromide alınmış ve boyama kavanozunda (Şekil 2.10.) boyama işlemi yapılmıştır. Preparatlar 2 dk floresan boyaya (ethidium bromide) daldırılmış ve ardından boyama kavanozundan çıkartılıp saf suda 1 dk bekletilmiştir. Lamlar kurutulmadan hemen lamellerle kapatılmış, mikroskop görüntüsü için hazır hale getirilmiştir.



Şekil 2.11. Ethidium bromide ile preparatların boyama aşaması

2.3. Mikroskopta Fotoğraf Çekme

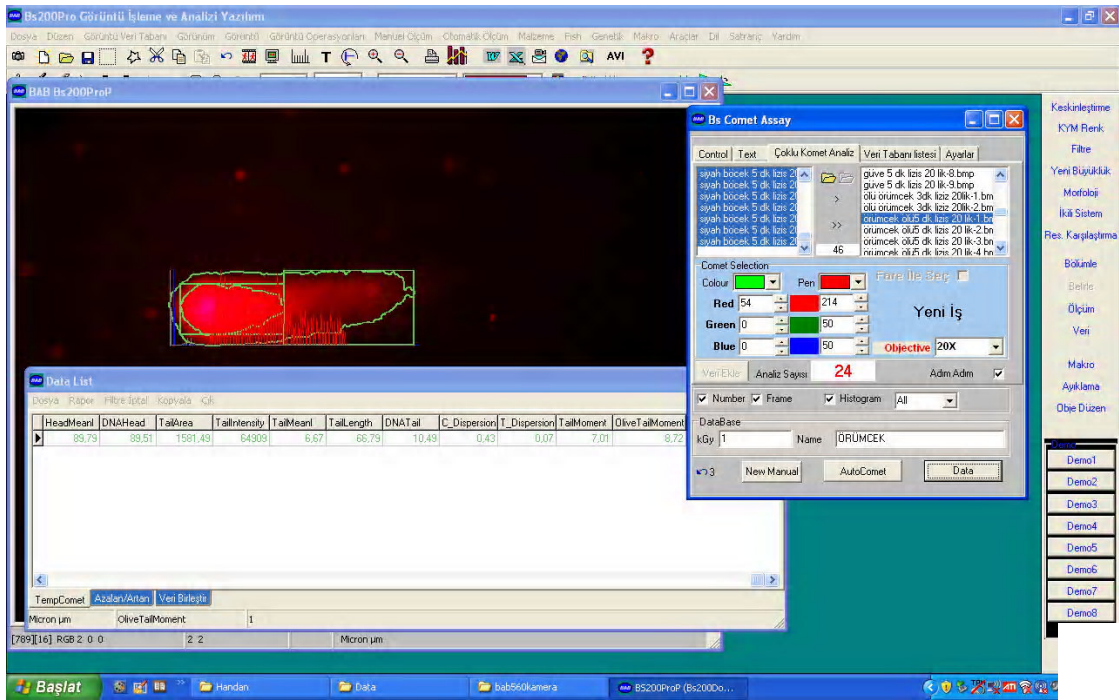
Fotoğraf çekme işlemi, Olympus marka BX51 floresan mikroskobunda 1000 büyütmede yapılmıştır. Çekilen ergin, larva ve pupa görüntüleri kaydedilmiştir.



Şekil 2.12. Floresan mikroskobu ve görüntü çekimi

2.4. Veri Analizi

DNA hasarının ölçülmesinde Comet Assay IV programı ile hücre skorlamaları yapılmıştır. Bu skorlamalarda her bir grup için baş, kuyruk uzunluğu, kuyruk momenti, kuyruktaki DNA yüzdeleri hesaplanmıştır.



Şekil 2.13. Numunelerin görüntü analizindeki kafa ve kuyruk görüntüleri

3.BÖLÜM

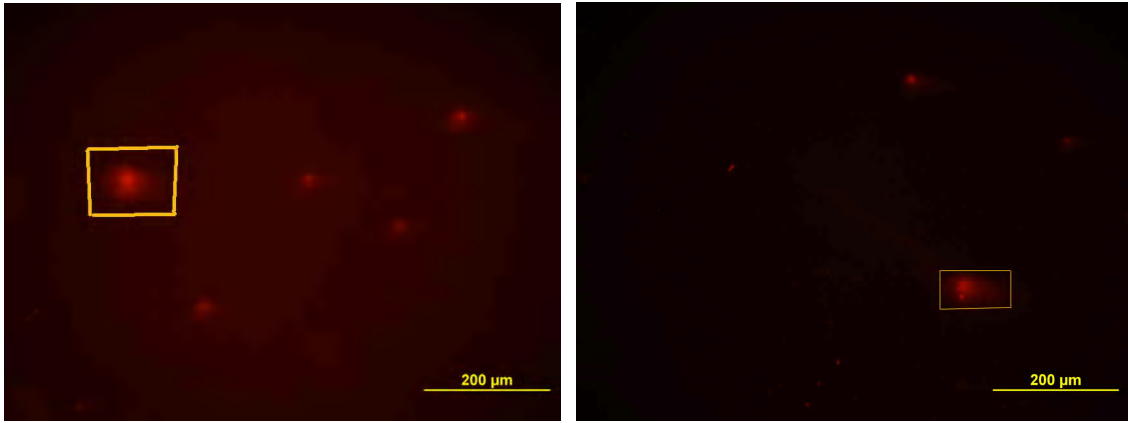
BULGULAR

3.1. Işınlanan *E. kuehniella* Erginlerin Komet Analizi

0, 50 Gy, 100 Gy, 150 Gy, 200 Gy'den alınan görüntülerin (50 veri analizi) ortalamaları alınarak değerlendirmeleri yapılmıştır. Bu sonuçlar doğrultusunda *E. kuehniella* erginin kontrol grubunda kuyruk uzunluğu 27.51 μm iken bu değer 50 Gy, 100 Gy, 150 Gy ve 200 Gy dozlarda sırasıyla 94.87, 111.05, 166.00 ve 183.57 μm bulunmuştur (Tablo 3.1.). Işınlama dozu arttıkça kuyruk uzunluğu artarken kuyruk momentinde de artış görülmüştür. Bu artışlar ergin kontrolde kontrol grubunda kuyruk uzunluğu 5.12 μm iken bu değer 50 Gy, 100 Gy, 150 Gy ve 200 Gy dozlarda sırasıyla 29.75, 65.82, 91.90 ve 111.92 μm bulunmuştur.

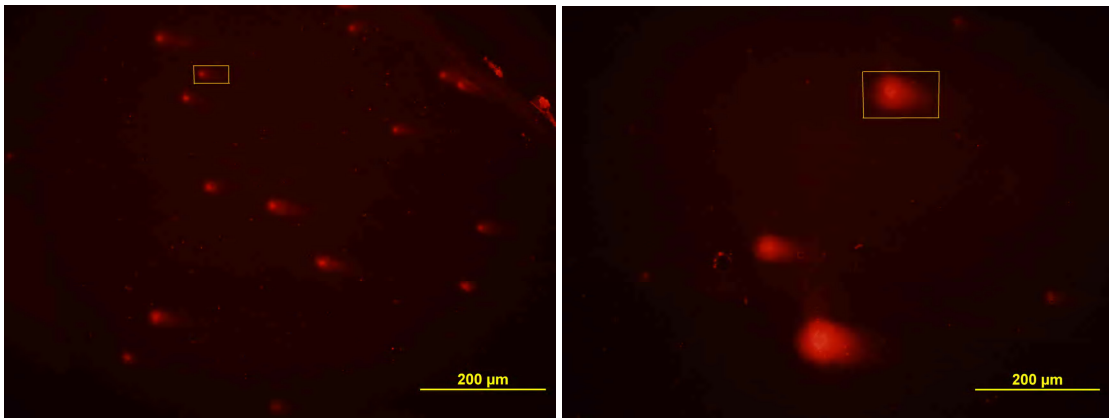
Tablo 3.1. *E. kuehniella* erginlerin komet parametlerinin veri analizleri

Komet parametleri				
Doz (Gy)	Kuyruk uzunluğu (μm)		Kuyruk momentini (μm)	
	Ortalama değer	Sapma aralığı	Ortalama değer	Standart sapma
Kontrol	27.51	3-75	5.12	0-32
50 Gy	94.87	4-250	29.75	0-148
100 Gy	111.05	76-169	65.82	24-121
150 Gy	166.00	98-244	91.90	37-177
200 Gy	183.57	131-278	111.92	51-252



Şekil 3.1. 0 Gy (kontrol) ile ışınlanmış *E. kuehniella* erginlerinden elde edilen komet görüntüleri.

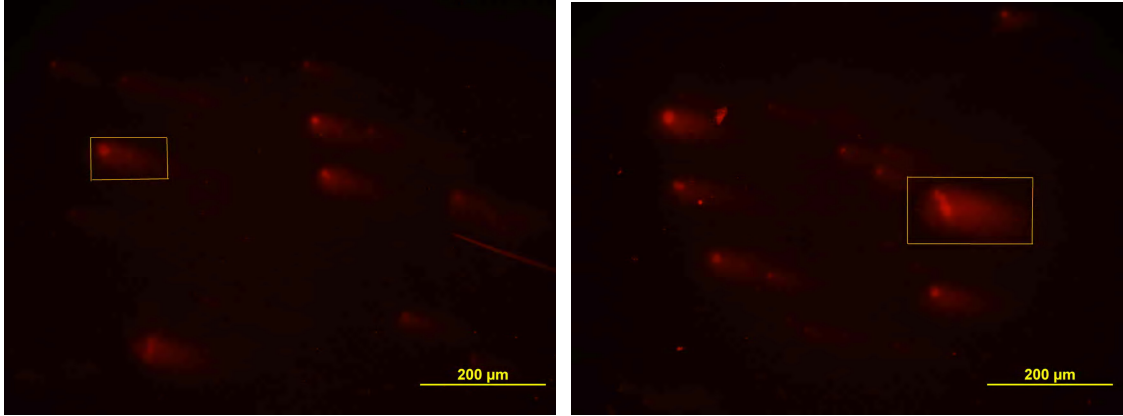
Şekil 3.1.'de sarı kutu içine alınan ergin kontrol (1)'de komet görüntüsü analiz edildiğinde kuyruk uzunluğu= 26.00 μm , kuyruktaki DNA yüzdesi=% 12.04, kafa uzunluğu= 67.00 μm , kuyruk momenti= 3.13 μm olarak ölçülmüştür. Şekil 3.1.'de sarı kutu içine alınan kontrol (2)'de komet görüntüsü analiz edildiğinde kuyruk uzunluğu= 27.00 μm , kuyruktaki DNA yüzdesi=% 19.23, kafa uzunluğu= 61.00 μm , kuyruk momenti= 5.19 μm olarak ölçülmüştür.



Şekil 3.2. 50 Gy ile ışınlanmış *E. kuehniella* erginlerinden elde edilen komet görüntüleri.

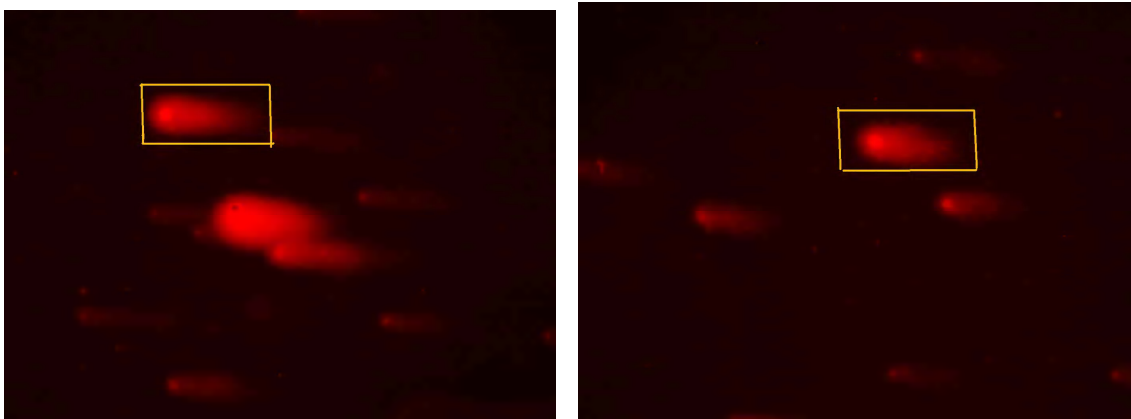
Şekil 3.2.'de sarı kutu içine alınan 50 Gy (1) dozla ışınlanan ergin hücreindeki komet görüntüsü analiz edildiğinde kuyruk uzunluğu= 81.00 μm , kuyruktaki DNA yüzdesi=% 30.34, kafa uzunluğu= 95.00 μm , kuyruk momenti= 24.58 μm olarak ölçülmüştür. Şekil 3.2.'de sarı kutu içine alınan 50 Gy (2) dozla ışınlanan ergin hücreindeki komet

görüntüsü analiz edildiğinde uzunluğu= 41.00 μm , kuyruktaki DNA yüzdesi=% 12.13, kafa uzunluğu= 85.00 μm , kuyruk momenti= 4.97 μm olarak ölçülmüştür.



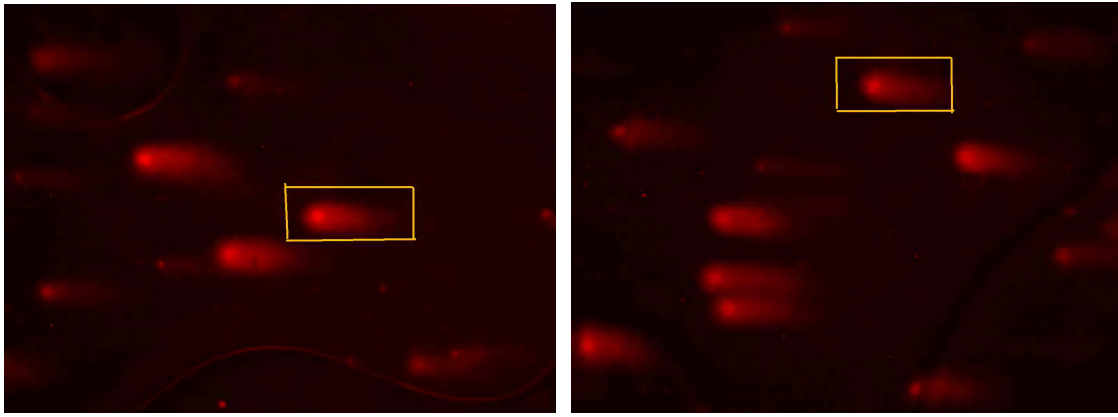
Şekil 3.3. 100 Gy ile ışınlanmış *E. kuehniella* erginlerinden elde edilen komet görüntüleri.

Şekil 3.3.'te sarı kutu içine alınan 100 Gy (1) dozla ışınlanan ergin hücrendeki komet görüntüsü analiz edildiğinde kuyruk uzunluğu= 169.00 μm , kuyruktaki DNA yüzdesi=% 51.34, kafa uzunluğu= 99.00 μm , kuyruk momenti= 86.77 μm olarak ölçülmüştür. Şekil 3.3.'te sarı kutu içine alınan 100 Gy (2) dozla ışınlanan ergin hücrendeki komet görüntüsü analiz edildiğinde uzunluğu= 100.00 μm , kuyruktaki DNA yüzdesi=% 43.09, kafa uzunluğu= 99.00 μm , kuyruk momenti= 43.09 μm olarak ölçülmüştür.



Şekil 3.4. 150 Gy ile ışınlanmış *E. kuehniella* erginlerinden elde edilen komet görüntüleri.

Şekil 3.4.'te sarı kutu içine alınan 150 Gy (1) dozla ışınlanan ergin hücredeki komet görüntüsü analiz edildiğinde kuyruk uzunluğu= 156.00 μm , kuyruktaki DNA yüzdesi=% 44.75, kafa uzunluğu= 127.00 μm , kuyruk momenti= 69.82 μm olarak ölçülmüştür. Şekil 3.4.'te sarı kutu içine alınan 150 Gy (2) dozla ışınlanan ergin hücredeki komet görüntüsü analiz edildiğinde uzunluğu= 156.00 μm , kuyruktaki DNA yüzdesi=% 49.89, kafa uzunluğu= 111.00 μm , kuyruk momenti= 77.82 μm olarak ölçülmüştür.

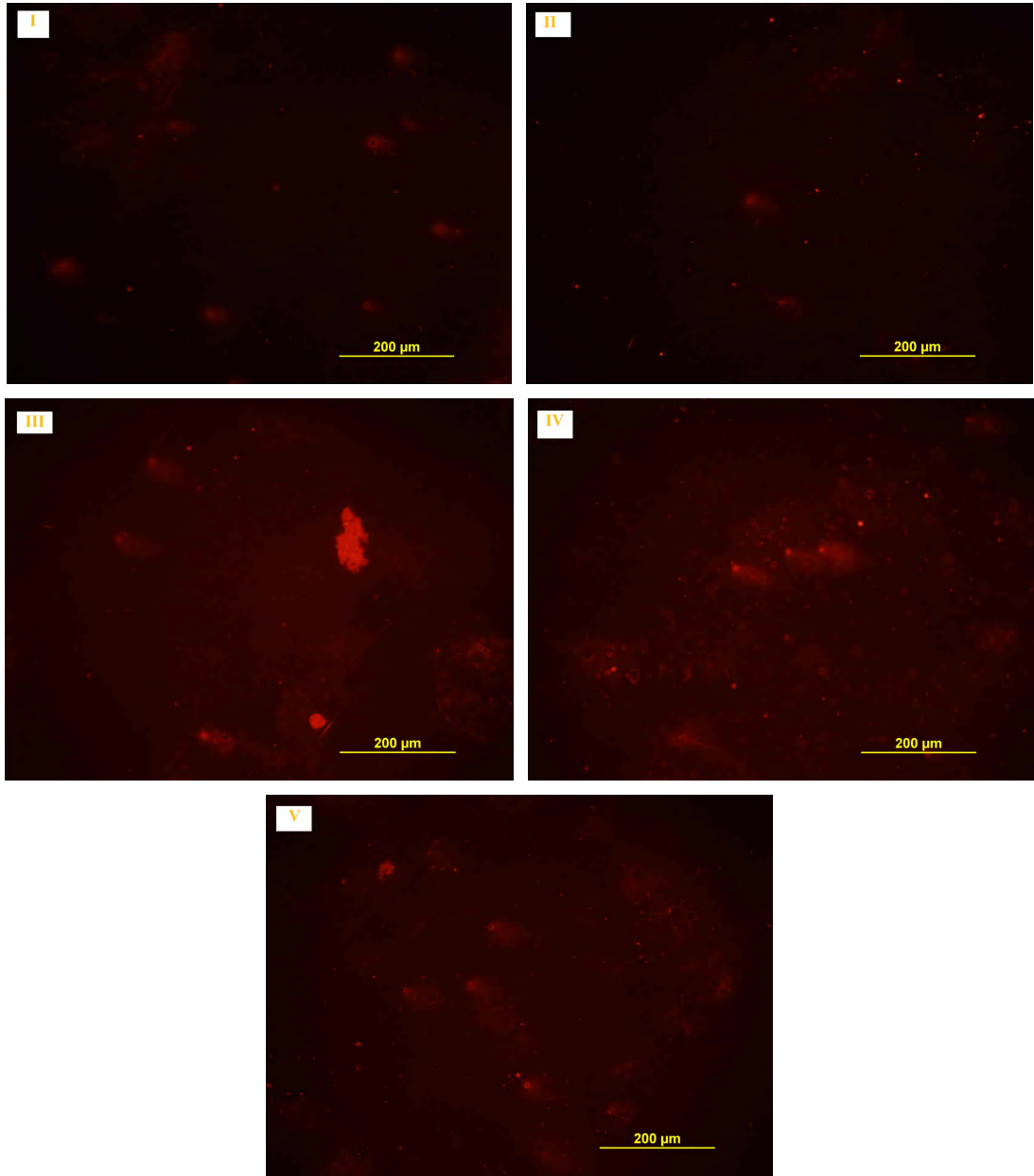


Şekil 3.5. 200 Gy ile ışınlanmış *E. kuehniella* erginlerinden elde edilen komet görüntüleri.

Şekil 3.5.'te sarı kutu içine alınan 200 Gy (1) dozla ışınlanan ergin hücredeki komet görüntüsü analiz edildiğinde kuyruk uzunluğu= 175.00 μm , kuyruktaki DNA yüzdesi=% 46.65, kafa uzunluğu= 97.00 μm , kuyruk momenti= 81.64 μm olarak ölçülmüştür. Şekil 3.5.'te sarı kutu içine alınan 200 Gy (2) dozla ışınlanan ergin hücredeki komet görüntüsü analiz edildiğinde uzunluğu= 170.00 μm , kuyruktaki DNA yüzdesi=% 50.77, kafa uzunluğu= 91.00 μm , kuyruk momenti= 86.32 μm olarak ölçülmüştür.

3.2. Işınlanan *E. kuehniella* Larvaların Komet Analizi

Deney sonucunda, larva safhasındaki kontrol ve ışınlanmış grupların görüntüleri çekilmiştir. Fakat her denemede farklı sonuçlar alındığı için analizleri yapılamamıştır.

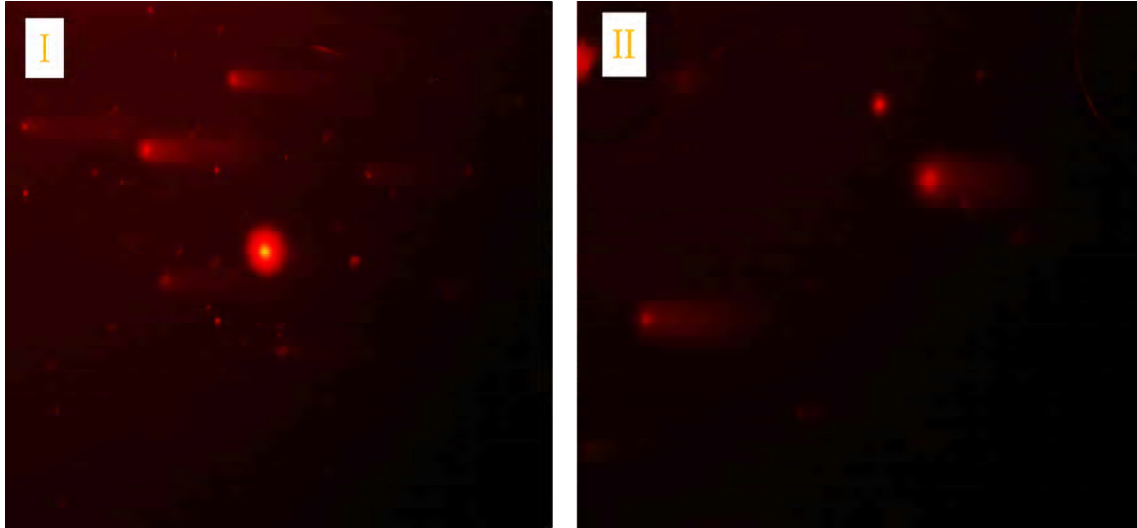


Şekil 3.6. *E. kuehniella* larvasında tek hücre jel elektroforez yöntemi ile radyasyon sonucu hasara uğramış hücrelerin DNA görüntüleri (I:0 Gy (kontrol), II: 50 Gy, III: 100 Gy, IV: 150 Gy, V: 200 Gy).

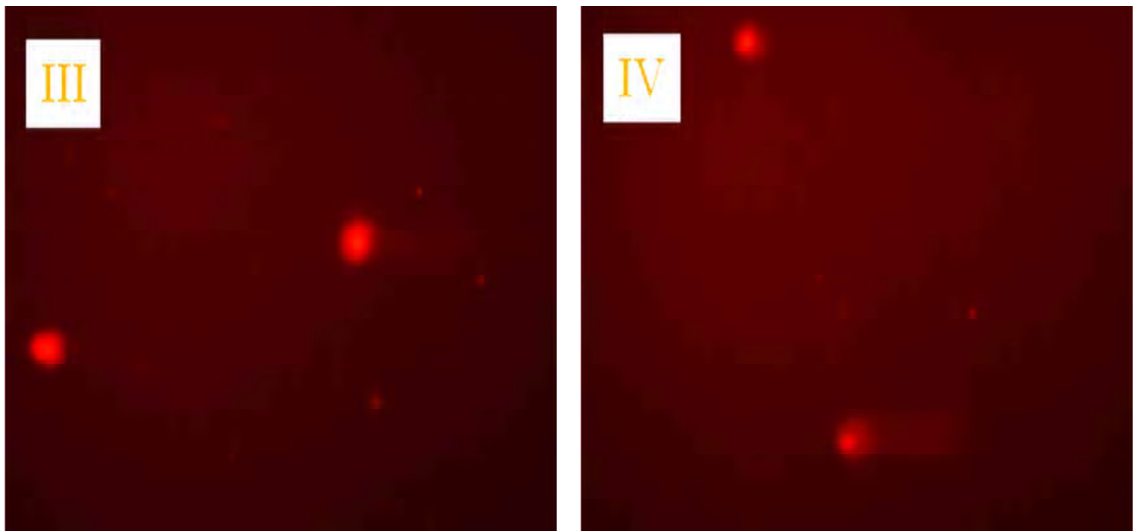
0 Gy (kontrol), 50 Gy, 100 Gy, 150 Gy ve 200 Gy ışınlanmış *E. kuehniella* larvalarının floresan mikroskopuyla yukarıdaki görüntüleri çekilmiştir. Bu görüntülerin ışınlama veya deney aşamasından kaynaklanan sebeplerden dolayı bazı DNA parçalanmalarının olabileceği sonucuna varılmıştır.

3.3. Işınlanan *E. kuehniella* Pupaların Komet Analizi

Deney sonucunda pupada görüntüler çekilmiştir. Çekilen görüntülerde kontrolde kuyruk oluşumu görülmüş, ışınlanmış hücrelerde ise yuvarlak görüntüler tespit edilmiştir.



Şekil 3.7. *E. kuehniella* pupasında tek hücre jel elektroforez yöntemi ile kontrol grubu hücrelerin DNA görüntüleri (I ve II 0 Gy (kontrol)).



Şekil 3.8. *E. kuehniella* pupasında tek hücre jel elektroforez yöntemi ile radyasyon sonucu (100 Gy) oluşan hasara uğramış hücrelerin DNA görüntüleri (I ve II 100 Gy).

4. BÖLÜM

TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER

4.1. Tartışma

Çalışmamızda *E. kuehniella* üzerine radyasyonun tek hücre jel elektroforez tekniği (komet tekniği) ile DNA üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Bu çalışmamızda erginde doz arttıkça DNA kırıklarının da arttığı komet tekniği ile gösterilmiş ve bu bulgularımızın literatürle uyumlu olduğu görülmüştür.

İyonize radyasyon, DNA baz bozuklukları, DNA-DNA çapraz bağları, tek ve çift zincir kırılmaları gibi DNA lezyonlarını meydana getirir. Kromatit zincirler ve kromozomlar içinde boşluk ve kırılmalar en sık gözlenen radyasyona bağlı kromozomal lezyonlardır [42]. İyonize radyasyon serbest radikaller vasıtasıyla hücresel DNA'da direkt ya da indirekt etkiye sahip bir ajandır. Işınlama dozu arttıkça hücrede döngü bozuklukları, anormal mitoz ya da hücre ölümlerinde de artış olabilir. Radyasyon hasarının ilk hedefi çekirdekten başlayarak DNA'dır. Radyobiyojide DNA hasarının değerlendirilmesinde hızlı ve daha hassas metotlara her zaman ihtiyaç vardır [43]. Son on yıl içerisinde, DNA hasar seviyesinin tespitinde DNA komet yöntemi kullanımında artış olmuştur. Komet tekniği; kimyasal genotoksitede (bir maddenin, hücredeki genetik materyal üzerindeki etkisi), insan görüntüleme sisteminde, moleküler epidemiyolojide (hastalıkları popülasyon düzeyinde inceleyen bilim dalı), temel araştırmalarda kullanılan bir uygulamadır [44]. DNA komet yöntemi serbest radikaller tarafından meydana gelen hücre hasarlarının bulunmasında daha fazla destek sağlamaktadır [22].

Bhalli ve ark., pestisitlerin insan sağlığındaki etkisini bulmak için pestisit üreten Pakistan'daki bir fabrikada çalışan benzer yaşlarda 35 kişiyle bir deney yapmıştır. Bu deneyde DNA hasarını ölçmek için komet test tekniğini kullanmışlardır. Kontrol

grubuna göre komet kuyruk uzunluğunda (ortalama \pm standart sapma(μm)) 19.98 ± 2.87 vs. 7.38 ± 1.48 , $P < 0.001$) önemli bir artış olduğu sonucuna varmışlardır [45].

Hasan ve ark., depo zararlısı olan *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae)'da yaptıkları bir çalışmada gama radyasyonunun DNA üzerindeki etkisini komet yöntemi ile analiz etmişlerdir. Bu analizlere göre kontrol grubuyla karşılaştırdıklarında, 40 ve 160 Gy dozları arasında kuyruktaki DNA yüzdesinde %15-30 arasında artış olduğunu gözlemlemişlerdir. Dayanıklı bireylerde kuyruktaki DNA%'si 0 Gy'de (kontrol)= % 14.62 ± 1.08 ; 40 Gy'de=% 30.12 ± 5.17 ; 60 Gy=% 44.57 ± 7.64 olarak ölçmüşlerdir. Kuyruk uzunluğunu ise 0 Gy'de (kontrol)= $34.46 \pm 3.52 \mu\text{m}$; 40 Gy'de= $54.36 \pm 7.92 \mu\text{m}$; 60 Gy= $101.00 \pm 14.08 \mu\text{m}$ olarak ölçmüşlerdir [46]. Yapılan araştırmalar gösteriyor ki her böceğin gelişim aşamasındaki radyasyona duyarlılığı farklılık göstermektedir [47]. Bizim çalışmamızda ise kuyruk uzunluğu ergin 0 Gy'de (kontrol) $27.51 \mu\text{m}$ ölçülürken 50 Gy'de $94.87 \mu\text{m}$ olarak ölçülmüştür.

Todoriki ve ark., kestane böceği olan *Curculio sikkimensis* (Heller) (Coleoptera: Curculionidae) larvasında radyasyon sonucu oluşan DNA hasarını komet yöntemi kullanarak bir çalışma yapmışlardır. Bu çalışmalarda 1 ve 4 kGy dozlarını kullanmışlardır. 1 ve 4 kGy radyasyon aralığında DNA hasarların arttığını gözlemlemişlerdir. Hücre karşılaştırmaları sonucunda *C. sikkimensis* larvasında değişik DNA fragmentleriyle birçok DNA hasarı tespit etmişlerdir. Bu yöntemi kullanarak; kuyruk uzunluğu, kuyruk momenti ve kuyruktaki DNA yüzdesinde ışınlama dozu arttıkça bu parametlerin de arttığını görmüşlerdir [48]. Bizim çalışmamızda ise larva evresindeki böceklere uygulanan 50, 100, 150 ve 200 Gy dozlarının DNA'ya verdiği zararlar gözlemlenememiştir.

Yine Hasan ve arkadaşlarının yapmış olduğu başka bir çalışmada mısır böceği olarak da bilinen *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae) gelişme evrelerinde (larva, pupa ve ergin) gama radyasyonu etkisini (0.5 kGy ve 1 kGy dozlarında) komet yöntemi ile tespit etmişlerdir. Komet yöntemi ile *S. zeamais*'ın bütün gelişme evrelerinde kuyruk uzunluğu ve kuyruktaki DNA yüzde verilerini ortaya koymuşlardır. Gama radyasyonunun (Doz: Varyans oranı (F)= 9.74; Olasılık düzeyi (P)= 50.01; Evre: F= 12.26, $p < 0.01$) büyük ölçüde DNA göçlerine sebep olduğunu görmüşlerdir. *S. zeamais* larva, pupa ve ergininde, kontrol grubuyla karşılaştırdıklarında 0.5 kGy dozda %60-70 hasar oluşurken 1 kGy'de %100'lük bir hasar oluştuğunu

görmüşlerdir. Erginde kuyruktaki DNA yüzdesini 0 kGy'de (kontrol)=% 8.43 ± 2.20 (ortalama ± standart sapma (%)); 0.5 kGy'de=% 16.62 ± 3.66; 1.0 kGy'de=% 32.83 ± 3.46 olarak ölçmüşlerdir. Kuyruk uzunluğunu ise ergin 0 kGy'de (kontrol)=19.67 ± 4.94 (ortalama ± standart sapma (µm)); 0.5 kGy'de= 68.28 ± 10.14; 1.0 kGy'de= 85.48 ± 7.87 µm olarak ölçmüşlerdir. Yaptıkları çalışmada *S. zeamais*'in pupa aşamasının larva ve ergin aşamalarından daha hassas olduğunu gözlemlemişlerdir. [22]. Bizim çalışmamızda ise pupada yaptığımız denemelerde görüntüler alınmış fakat görüntülerin analizleri yapılamamıştır.

Shahidi ve ark., prostat kanseri hastalarında yaptıkları bir çalışmada gama ışınının (⁶⁰Co) kontrol grubuna göre kanserli lökosit hücrelerinde daha fazla DNA hasarı olduğu gözlemlemişlerdir. Farklı gruplara aynı doz ışın uygulamışlardır. 24 saat içinde (tamir mekanizmasından sonra) prostat kanseri olan hastanın lökosit hücrelerinde sağlıklı bireye göre %20 daha fazla DNA hasarı olduğunu görmüşlerdir [49].

4.2. Sonuç ve Öneriler

Deney sonuçlarına göre istatistiksel veriler ortaya konulmuştur. Bu veriler sonuçlarına göre tablo oluşturulmuş ve görüntü analizleri yapılmıştır. *E. kuehniella* ergin, larva ve pupa evreleri ışınlanarak deneyler yapılmış fakat bu deneylerin sonucunda larva ve pupa evrelerinden sonuç alınamazken erginde sonuç alınmıştır.

E. kuehniella ergininde yapılan çalışma sonucunda elde edilen verilerin analizleri yapılmıştır. Bu analizlerden ışınlama dozu arttıkça DNA'nın kuyruk oluşturma yüzdesinin de arttığı sonucuna varılmıştır. Ergin kontrolde kuyruk uzunluğu 27.514 µm iken 50 Gy' de 94.875 µm olarak bulunmuştur.

Bu deneylerin sadece *E. kuehniella* populasyonunda değil farklı böcek populasyonlarında da denenebileceği sonucuna varılmıştır. Çalışmaların ilerletilip böceklere göre doz ayarlamaları yapılarak bazı zararlı etkilerinin giderilebileceği düşünülmüştür. Böylelikle bu yöntemin, böceklerde yapılan radyasyon çalışmalarına alternatif olabileceği sonucuna varılmıştır.

Komet yöntemi; kolay uygulanabilen, güvenilir ve ucuz bir metot olarak biyolojik mücadelede yararlı bir araç olacaktır. En küçük dozda oluşan DNA hasarlarının tespitinde bile bu yöntem fayda sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

1. Karabörklü, S., 2008. Çeşitli Bitkilerden Elde Edilen Uçucu Yağların Depolanmış Ürün Zararlısı Böcekler Üzerindeki Öldürücü Etkilerinin Araştırılması, **Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Kayseri**, 99 s.
2. Tuncbilek, A.S., Canpolat, U., Ayvaz, A., 2009. Effects of gamma radiation on suitability of stored cereal pest eggs and the reproductive capability of the egg parasitoid *Trichogramma evanescens* (Trichogrammatidae: Hymenoptera). **Biocontrol Science and Technology**, **19** (1): 179-191.
3. Lee, R.F., Steinert, S., 2003. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. **Mutat. Res.**, 544: 43-64.
4. Olive, P.L., 2007. Impact of the comet assay in radiobiology. **Mutation Research-Reviews in Mutation Research**, 3 pp.
5. WHO, 2009. The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to the Classification 2009. World Health Organisation, Geneva, 81 pp.
6. Kocyigit, A., Keles, H., Selek, S., Guzel, S., Celik, H. ve Erel, O., 2005. Increased DNA damage and oxidative stress in patients with *Cutaneous leishmaniasis*. **Mutation Research**, **585** (1-2): 71-78.
7. Akıcı, N., 2008. Sigara Dumanına Maruz Kalan Pasif İçici Durumundaki Çocuklarda DNA Hasarının Araştırılması. Sağlık Bakanlığı Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Kliniği, Uzmanlık tezi, 70 s.
8. Vandghanooni, S., Eskandani, M., 2011. Comet assay: a method to evaluate genotoxicity of nano-drug delivery system. **Research Center for Pharmaceutical Nanotechnology, Student Research Committee, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran. BioImpacts**, **1** (2): 87-97.
9. Hovhannisyan, G.G., 2010. Fluorescence in situ hybridization in combination with the comet assay and micronucleus test in genetic toxicology. **Molecular Cytogenetics**, **3** (17): 1-11.
10. Singh, R.K., et all., 2010. Assessment of DNA damage by comet assay in Lymphocytes of workers occupationally exposed to petroleum fumes. **International Journal of Genetics**, **2** (1): 18-22.

11. Kansu, A., 1961. Böcek biyoloji ve ökojisine ait araştırmalarda radyoizotoplarından istifade. A. Ü. Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Kürsüsü Çalışmalarından, 2 (7): 24.
12. Driesche, V.G.R., Bellows, S.T., 1996. Biological Control. Section 1, Chapter 2, Kinds of Biological Control Targets, Agents and Methods, 21-23.
13. Esin, T., 1971. Hububat ve bakliyat ambar zararlıları mücadele talimatı. T. C. Tarım Bakanlığı Zirai Mücadele ve Zirai Karantina Genel Müdürlüęü, 21-24.
14. Dabbaloęlu, S., 2004. Parazitoit *Bracon hebetor* Say.(Hymenoptera: Braconidae) İle Konukçuları *Plodia interpunctella* Hübner (Lepidoptera: Pyralidae) ve *Ephestia kuehiella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) Arasındaki Biyolojik İlişkiler Üzerine Araştırmalar. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Ankara, 134 s.
15. Emekçi, M., Ferizli, A.G., 2000. Current status of stored product protection in Turkey. **IOBC/WPRS Study Group Integrated Protection of Stored Products, Berlin, IOBC wprs Bulletin, 23** (10): 39-45.
16. Arthur, F.H., 1996. Grain protectants: current status and prospect for the future. **J. Stored Prod. Res.**, 32 (4): 293-302.
17. Driesche, V.G.R., Bellows S.T., 1996. Biological control, section 1, chapter 1, pest origins, pesticides and the history of biological control. 3-20.
18. Ferizli, A.G., Emekçi, M., 2003. Depolanmış Ürün Zararlılarıyla Savaşım, Sorunlar ve Çözüm Yolları. A. Ü. Ziraat Fakültesi Bitki Koruma, 5-6.
19. Josephson, E.S., Peterson, M.S., 1983. Preservation of Food by Ionizing Radiation. CRC Press. Boca Raton, FL, 1054 pp.
20. Koppen, G., Cerda, H., 1997. Identification of low-dose irradiated seeds using the neutral comet assay. **Lebensm.-Wiss. U.-Technol.**, 30 (5): 452-457.
21. Rahman, R., Haque, A.K.M.M., and Sumar, S., 1995. Chemical and biological methods for the identification of irradiated foodstuffs. **Nutrition & Food Science**, (1): 4-11.
22. Hasan, M.M., et al., 2008. Detection of gamma radiation-induced DNA damage in maize weevil, *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae) assessed using the comet assay. **Int. J. Radiat. Biol.**, 84 (10): 815-820.
23. Sözbilir, N. B., 2007. Biyokimya. 1. Baskı. Ankara: Güneř Tıp Kitabevi, 632 s.

24. Fidan, A.F., 2007. Deneysel Diyabet Oluşturulmuş Ratlarda Diyete Katılan Farklı Yapılardaki Saponin İçerikli Bitkilerin DNA Hasarı, Protein Oksidasyonu ve Lipid Peroksidasyonu ile Bazı Biyokimyasal Parametrelere Etkilerinin Araştırılması. Afyon Kocatepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Afyonkarahisar, 138 s.
25. Dinçer, Y, Akçay, T., 2000. DNA Hasarı. *Türk Biyokimya Dergisi*, 25 (2): 73-79.
26. Yeni, D., Fidan, A.F., Gündoğan, M., 2010. Spermatozoon'da tek hücre jel elektroforezi (SCGE) ile DNA hasarı tespiti. **F.Ü. Sağ. Bil. Vet. Derg.**, 24 (3): 167- 173.
27. Garaj-Vrhovac, V. et al., 2002. Application of the alkaline comet assay in biodosimetry: assessment of in vivo DNA damage in human leukocytes after a γ radiation incident. **Radiation Protection Dosimetry Nuclear Technology Publishing**. 98 (4): 407–416.
28. Rojas, E., Lopez, M.C., Valverde, M., 1999. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. **J. Chromatogr B. Biomed Sci. Appl.**, 277 (1-2): 225-254.
29. Fairbairn, D.W., Olive, P.L., O'Neill, K.L., 1995. The comet assay: A comprehensive review. **Mutation. Res.**, 339 (1): 37-59.
30. Dikilitaş, M., Koçyiğit, A., 2010. Canlılarda “tek hücre jel elektroforez” yöntemi ile DNA hasar analizi (teknik not): comet analiz yöntemi. **HR. Ü. Z. F. Dergisi**, 14 (2): 77- 89.
31. Ostling, O., Johanson, K.J., 1984. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damage in individual mammalian cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 123 (1): 291-298.
32. Ertürk, Ş., 2001. Sevofluranın DNA Hasarı Üzerine Etkilerinin Bening ve Maling Olgularda Comet Assay Yöntemi İle Değerlendirilmesi. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Ankara.
33. Fidan, A.F., 2008. DNA Hasar Tespitinde Tek Hücre Jel Elektroforezi. **AKÜ-Fen Bilimleri Dergisi**, 8 (1): 41-52.
34. Başaran, A.A., 2004. Farmakognozide tek hücre jel elektroforezi uygulamaları. **14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Bildiriler, 29-31 Mayıs 2002, Eskişehir**, 4 s.

35. Böcker W., et al., 1999. Automated comet assay analysis. **Wiley-Liss, Inc. Cytometry**, **35** (2): 134–144.
36. Faust, F., Kassie, F., Knasmuller, S., et al., 2004. The use of the alkaline comet assay with lymphocytes in human biomonitoring studies. **Mutat. Res.**, **566** (3): 209-29.
37. Collins, A., Dusinska, M., Franklin, M et al., 1997. Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications. **Environ Mol Mutagen**, **30** (2): 139-46.
38. Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., et al., 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environ Mol Mutagen**, **35**: 206-21.
39. Karakükcü, Ç., 2008. Sarılıklı Yeni Doğanlarda Bilirubin Ve Fototerapiden Kaynaklanabilecek Genotoksik Etkilerin Alkali Comet Tekniği İle Değerlendirilmesi. Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Yayınlanmış Tıpta Uzmanlık Tezi, Kayseri, 89 s.
40. Tice, R.R., et al., 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, **35**: 206-221.
41. O'Neill, K.L., Fairbairn, D.W., Standing, M.D., 1993. Analysis of single-cell gel electrophoresis using laser-scanning microscopy. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, **319** (2): 129-34.
42. Akpolat, M., 2007. Gamma Radyasyonun İleum Kadehsi Hücrelerinde Oluşturduğu Hasarlara Karşı Curcumin ve C Vitamininin Koruyucu Etkilerinin Işık ve Elektron Mikroskopik Düzeylerde İncelenmesi. Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Morfoloji Anabilim Dalı Histoloji ve Embriyoloji Bilim Dalı, Doktora Tezi, 96 s.
43. Jagetia, G.C., Rao, S.K., 2011. Assessment of radiation-induced DNA damage by comet assay in cultured HeLa cells treated with guduchi (*Tinospora cordifolia* Miers) before exposure to different doses of γ -radiation. **Research In Pharmaceutical Biotechnology**, **3** (7): 93-103.
44. Muid K.A., et al., 2012. Zinc phosphide induced DNA damage in the blood cells of *Gallus* sp. using comet DNA assay. **American Journal of Agricultural and Biological Sciences**, **7** (1): 82-87.

45. Bhalli, J.A., et al., 2006. DNA damage in Pakistani pesticide-manufacturing workers assayed using the comet assay. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, **47** (8): 587–593.
46. Hasan, M.M., et al., 2006. Soft-electron beam and gamma-radiation sensitivity and DNA damage in phosphine-resistant and -susceptible strains of *Rhyzopertha dominica*. **J. Econ. Entomol.**, **99** (5): 1912-1919.
47. Willard, W.K., Cherry, D.S., 1975. Comparative radiosensitivity in the class. **Insecta. Journal of Theoretical Biology**, **52** (1): 149–158.
48. Todoriki, S., et al., 2006. Assessment of electron beam-induced DNA damage in larvae of chestnut weevil, *Curculio sikkimensis* (Heller) (Coleoptera: Curculionidae) using comet assay. **Radiation Physics and Chemistry**, **75** (2): 292–296.
49. Shahidi, M., et al., 2010. Radiosensitivity and repair kinetics of gamma-irradiated leukocytes from sporadic prostate cancer patients and healthy individuals assessed by alkaline comet assay. **Iranian Biomedical Journal**, **14** (3): 67-75.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: Handan KILIÇOĞLU

Uyruğu: Türkiye (TC)

Doğum Tarihi ve Yeri: 10 Mart 1986, Antalya

Medeni Durumu: Bekâr

Tel: +90 312 378 43 65

email: handankilic1986@hotmail.com

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Lisans	Niğde Üniversitesi	2009
Lise	Kanuni Lisesi	2004

YABANCI DİL

İngilizce

YAYINLAR

1. Tuncbilek, A.S., **Kilicoglu H.**, Yazici, N., Ozcan, S., Erel, Y., Canpolat U., Yay, A., Bakir, S., 2011. Detection of DNA damage in *Ephestia kuehniella* by single cell gel electrophoresis after exposure to gamma radiation. **Analele Universităţii din Craiova, seria Agricultură – Montanologie – Cadastru, 41 (2).**
2. Tuncbilek, A.Ş., **Kilicoglu, H.**, Yazici, N., Ozcan, S., Erel, Y., Canpolat U., Yay, A., Bakir, S., 2011. Detection of DNA damage in *Ephestia kuehniella* by single cell gel electrophoresis after exposure to gamma radiation. The XXXXth ESNA meeting, 7-10 September 2011, in Craiova, Romania, Book of Abstracts, 109 p.