



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



SİGARA KULLANANLARDA KAN KADMIYUM DÜZEYİ VE LENFOSİT DNA HASARININ BELİRLENMESİ

Esmâ SÖYLEMEZ

**DİSİPLİNLERARASI ADLİ BİLİMLER ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

DANIŞMAN

Prof. Dr. Halil GÜMÜŞ

2011-ANKARA

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SİGARA KULLANANLARDA KAN KADMİYUM DÜZEYİ VE
LENFOSİT DNA HASARININ BELİRLENMESİ**

Esmâ SÖYLEMEZ

**DİSİPLİNLERARASI ADLİ BİLİMLER ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

DANIŞMAN

Prof. Dr. Halil GÜMÜŞ

Bu tez ‘‘Aterosklerotik Kardiyovasküler Hastalığı Olan Bireylerin Bazı metal Düzeyleri ile Mitokondrial ve Nükleer DNA Hasarı Arasındaki İlişkinin Araştırılması’’ başlıklı ve 09B5150001 numaralı Ankara Üniversitesi BAP projesi kapsamında desteklenmiştir.

2011-ANKARA

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Disiplinlerarası Adli Bilimler Anabilim Dalı
Adli Kimya ve Adli Toksikoloji

çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından

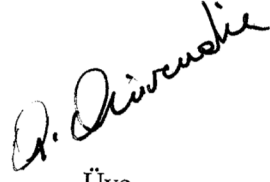
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.



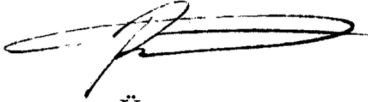
Jüri Başkanı
Prof. Dr. Halil GÜMÜŞ
A.Ü. Tıp Fakültesi



Üye
Prof. Dr. Tülin SÖYLEMEZOĞLU
A.Ü. Adli Bilimler Enstitüsü



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



Üye
Doç. Dr. Ali Rıza TÜMER
H.Ü. Tıp Fakültesi



Üye
Yrd. Doç. Dr. Zeliha KAYAALTI
A.Ü. Adli Bilimler Enstitüsü

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	vi
Simgeler Ve Kısaltmalar	vii
Şekiller	ix
Çizelgeler	x
1. GİRİŞ	1
1.1. Sigara	1
1.1.1. Sigaranın İçeriği	2
1.1.2. Sigaranın Etkileri	2
1.1.3. Sigara ve Kanser	3
1.2. Kadmiyum	5
1.2.1. Kadmiyumun Özellikleri ve Kadmiyum Maruziyeti	7
1.2.2. Kadmiyum Absorbsiyonu ve Metabolizması	9
1.3. DNA Yapısı	11
1.3.1. DNA Hasarı	13
1.3.2. DNA Hasarına Neden Olan Etkenler	14
1.4. Comet Assay	17
1.4.1. Comet Assay Basamakları	19
1.4.1.1. Mikroskop Lamının Hazırlanması	20
1.4.1.2. Hücresel Materyalin Hazırlanması	21
1.4.1.3. Yayma	21
1.4.1.4. Lizis	21
1.4.1.5. Alkali ortamda DNA Süperkoil Yapısının Açılması	21
1.4.1.6. Elektroforez	22
1.4.1.7. Nötralizasyon	22
1.4.1.8. Fiksasyon	22
1.4.1.9. DNA'nın Boyanması ve Comet'lerin Görüntülenmesi	22
1.4.1.10. Comet Sayımı ve DNA Hasarının Belirlenmesi	23

1.4.2. Comet Tekniğini Etkileyen Faktörler	24
1.4.3. Comet Tekniğinin Avantajları	24
1.4.4. Comet Assay ile İlgili Metodolojiler	25
1.4.4.1. Genotoksisite Araştırmaları	25
1.4.4.2. Apoptozis Araştırmaları	25
1.4.4.3. Biyolojik İzleme	26
1.4.4.4. Antioksidan Araştırmaları	26
1.4.4.5. Klinik Araştırmalar	26
1.4.4.6. DNA Onarım Araştırmaları	27
2. GEREÇ VE YÖNTEM	28
2.1. Gereçler	28
2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	28
2.1.2. Kullanılan Araç ve Gereçler	29
2.1.3. Çözeltiler	30
2.1.3.1. PBS Çözeltisi	30
2.1.3.2. Lizing Çözeltisi	30
2.1.3.3. Elektroforez Çözeltisi	31
2.1.3.4. Nötralizasyon Çözeltisi	31
2.1.3.5. Etidium Bromür Çözeltisi	31
2.1.3.6. Düşük Erime Noktalı Agar (LMA)	31
2.1.3.7. Normal Erime Noktalı Agar (NMA)	31
2.1.4. Deney Protokolü	31
2.1.4. 1. Sıvı Kan Örneklerinin Toplanması	31
2.1.5. Yöntem	32
2.1.5.1. Comet Assay ile Lenfosit DNA Hasarının Belirlenmesi	32
2.1.5.2. Sıvı Kan Örneklerindeki Cd Konsantrasyonunun Belirlenmesi	35
2.1.6. İstatistiksel Analiz	40
3. BULGULAR	41
3.1. Ölçülen Parametrelerin Tanımlayıcı İstatistikleri	41
3.2. Sigara İçimi ile Cd Düzeyi ve Comet Parametreleri Arasındaki İlişki	42
3.3. Sigara İçiminin Kadın ve Erkek Gruplarında Cd Düzeyine ve Comet Parametrelerine Etkisi	43

3.4. Sigara İndeks (SI) ve Sigara İçmeyen Gruplar ile Comet Parametreleri Arasındaki İlişki	45
3.5. Comet Parametreleri, Cd Düzeyi ve Yaş Arasındaki Korelasyon Sonuçları	46
4. TARTIŞMA	47
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	50
ÖZET	52
SUMMARY	54
KAYNAKLAR	56
EKLER	64
ÖZGEÇMİŞ	66

ÖNSÖZ

Tez konumun çalışılmasında bilgisi ve desteği ile yardımcı olan danışman hocam, Sayın Prof.Dr.Halil GÜMÜŞ'e;

Bilgisi, desteği ve görüşleriyle bana yön veren, tezimin her aşamasında desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen ve tezimin hazırlanmasında anabilim dalının olanaklarını sağlayan değerli hocam Ankara Üniversitesi Adli Bilimler Enstitüsü Müdürü, Sayın Prof. Dr. Tülin SÖYLEMEZOĞLU'na;

Tez sürecinin takibinde, tezin bulgularının istatistiksel olarak değerlendirilmesi ve yorumlanmasında katkıları olan ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen Ankara Üniversitesi Adli Bilimler Enstitüsü Müdür Yardımcısı, Sayın hocam Yrd. Doç.Dr. Zeliha KAYAALTI'na;

Comet Assay laboratuvar çalışmalarında ve preparatlarımın hazırlanmasında bilgisi, desteği ve sabrıyla bana yardımcı olan ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen Uzm. Bio. Emrah DURAL'a;

Tezimin metal analizleri kısmında, tez bulgularımın istatistiksel olarak değerlendirilmesinde ve tez yazım sırasında yardımlarını esirgemeyen Dr. Bio.Vugar ALİYEV'e;

Tezim için gerekli olan biyolojik materyalleri temin etmemde yardımcı olan, Hemşire Ayşe AKBAY'a ve Hemşire Bilgen ÇEVİK'e;

Laboratuvar çalışmalarında ve tez yazım sırasında her zaman yanımda olan arkadaşlarım Kim.Müh. Burçin KOÇ'a, Kim. Selda SERT'e, Dr. Bio. Serap YALÇIN'a, Uzm. Bio. Derya SÖYLEMEZ'e ve Uzm. Bio. Ayşegül BACAKSIZ'a;

Her zaman ve her konuda yanımda olan, anlayış, sabır ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen canım AİLEME;

Teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

DNA	Deoksiribonükleik Asit
PAH	Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlar
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
SCGE	Tek Hücre Jel Elektroforez Tekniği
CI	Comet İntensity
CL	Comet Length
HL	Head Length
HI	Head İntensity
TL	Tail Length
TI	Tail İntensity
DNA _t	DNA Tail
TM	Tail Moment
OTM	Olive Tail Moment
IARC	Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı
AAS	Atomik Absorbsiyon Spektroskopisi
PBS	Phosphate Buffer Saline
LMA	Düşük Erime Noktalı Agar
NMA	Normal Erime Noktalı Agar
HMA	Yüksek Erime Noktalı Agar
NaOH	Sodyumhidroksit

NaCl	Sodyumklorür
DMSO	Dimetil Sulfoxide
Cd	Kadmiyum
µg	Mikrogram
mM	Milimolar
M	Molarite
µL	Mikrolitre
mg/Ml	Miligram/mililitre
mL	Mililitre
µg/l	Mikrogram/litre
ppb	Milyarda Bir Ölçütü
ppm	Milyonda Bir Ölçütü

ŞEKİLLER

Şekil.1.1. Sigarada Bulunan Toksik Bileşikler	2
Şekil.1.2. Sigara ve Kanser	5
Şekil 1.3. DNA Çift Sarmalı	12
Şekil 1.4. DNA Çift Sarmal Yapısı	13
Şekil 1.5. DNA Hasar Örnekleri	14
Şekil 1.6. DNA'da Hasar Oluşturan Ajanlar, Hasar Tipleri ve Tamir Mekanizmaları	16
Şekil 1.7. Comet Assay Basamakları	20
Şekil 1.8. Comet Assay Görsel Değerlendirme	23
Şekil 2.1. Comet Görüntüsü	34
Şekil 2.2. BAB Bs Otomatik Analiz Sistemi	35
Şekil 2.3. Tam Kanda Kadmiyum Analizine Ait Örnek Kalibrasyon Grafiği	38

ÇİZELGELER

Çizelge.1.1. SCGE Yöntemiyle Farklı pH'larda Tayin Edilebilen DNA Hasar Tipleri	19
Çizelge 2.1. Mikrodalga fırına ait tam kan yakma programı.	36
Çizelge 2.2. Sıvı Kan Örneklerinden Kadmiyum Analizine Ait Grafit Fırın Sıcaklık Programı	37
Çizelge 2.3. Grafit Fırınlı Atomik Absorpsiyon Spektrometre Cihazında Kadmiyum Analizi İçin Tam Kanda Uygulanan Metot	38
Çizelge 3.1. Comet Parametreleri ve Cd Konsantrasyonlarının Ortalama, Standart Sapma, Minumum ve Maksimum Değerleri.	42
Çizelge 3.2. Sigara İçen ve İçmeyenlerde Cd ve Comet Parametreleri İstatistikleri	43
Çizelge 3.3. Sigara İçen ve İçmeyen Kadın ve Erkek Gruplarında Cd ve Comet Parametreleri Arasındaki İlişki.	44
Çizelge 3.4. Sigara İndeks (SI) ve Sigara İçmeyen Gruplar ile Comet Parametreleri Arasındaki İlişki	45
Çizelge3.5. Comet Parametrelerini Kendi Arasında Korelasyon İstatistikleri Sonuçları	46

1. GİRİŞ

1.1. Sigara

Sigara, bir taraftan dünyada en yaygın kullanılan bağımlılık yapıcı madde olarak kabul edilmekte iken diğer taraftan da taşıdığı 3800'den fazla bileşik nedeniyle çevresel toksikan madde modeli olarak ele alınmaktadır. Sigara dumanı, serbest radikaller de dahil olmak üzere diğer bileşiklerle kolaylıkla reaksiyona girebilen 3800'den fazla bileşik taşıyan kompleks bir karışımdır (Fahn ve ark., 1998). Sigara dumanının gaz fazı her sigara için 1×10^{16} serbest radikal içermektedir (Pryor, 1983). Bu serbest radikaller gaz fazda varlıklarını 5 dakikadan fazla sürdürmekte ve sigara içenlerin akciğerlerinde hücreleri biyokimyasal fonksiyonları bozacak şekilde etkilemektedirler. Serbest radikaller membran lipidlerinin peroksidasyonuna, fonksiyonu olmayan oksitlenmiş proteinlerin birikmesine ve DNA hasarının artmasına neden olurlar. Epidemiolojik çalışmalar sigara içenlerde amfizem ve kanser gibi akciğer hastalıklarının büyük oranda arttığını göstermiştir (Loeb ve ark., 1984, Janoff, 1985; Pryor, 1987; Sherrill, 1993; Burchfiel ve ark., 1995).

Sigara dumanında oluşan katran, kinon-semikinon-hidrokinon ($Q/Q\bullet-/QH_2$) kompleksi taşımaktadır (Pryor ve ark. 1983, 1998). Bu kompleks, moleküler oksijeni süperokside, hidrojen peroksidi de hidroksi radikaline çevirir (Pryor ve ark., 1993). Bu radikaller hücre membranındaki fosfolipidlerle lipid hidroperoksidlerini oluşturacak şekilde etkileşirler. Lipid peroksidasyon ürünlerinin sigara içenlerin plazmalarında miktarının artması sigara içiminin *in vivo* olarak da lipid peroksidasyonu arttırdığının göstergesidir (Morrow ve ark., 1995). Sigarada diğer kimyasalların yanı sıra metaller de bulunmaktadır (Kalcher ve ark., 1993), bu metaller arasında kadmiyumun sigara kullananların kanlarındaki düzeyinin yüksek bulunduğu birçok çalışmada gösterilmiştir (Mortada ve ark. 2004, Brockhaus ve ark. 1983). DNA'da görülen değişikliklerin çoğu onarılmaz ise genetik kararsızlığa, mutasyona ve hücre ölümüne neden olabilir. DNA onarım mekanizmaları, DNA'nın bütünlüğünün korunması ve kanser oluşumunun önlenmesi için önemlidir (Kiyohara ve Yoshimasu, 2007).

1.1.1. Sigaranın İçeriği

Sigara dumanının ana bileşenleri, azot, oksijen ve karbondioksittir. Sigaranın içerdiği potansiyel karsinojenler ise azot oksitler, izopren, butadien, benzen, stiren, formaldehit, asetaldehit, akrolein ve furandır. Ayrıca 3800 bileşiğin yanı sıra polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH), N-nitrozamin ve metallerin de dahil olduğu birçok karsinojen madde içermektedir. Sigaranın toksik bileşenlerinden en önemlileri nikotin ve kadmiyumdur (Pfeifer ve ark., 2002; Hoffmann ve ark., 2001; IARC, 1986).



Şekil 1.1. Sigarada Bulunan Toksik Bileşikler

1.1.2. Sigaranın Etkileri

Sigara, tütün olarak bilinen bitkilerin yapraklarından elde edilen ve tüm dünyada yasal olarak kullanılabilen, pek çok insanın keyif verdiğini düşündüğü en önemli bağımlılık maddesidir (Bruckert ve ark.,1992;). Sigara içmeyi bir kez deneyen her dört kişiden üçünün sigara tiryakisi olması, sigaranın bağımlılık yapma gücünün

önemli bir göstergesidir. Temininin kolay, kullanımının yasal olması ve eroin, alkol esrar gibi madde bağımlılıkları için geçiş maddesi olması nedeniyle; sigara bağımlılığı, en sık görülen ve en önemli madde bağımlılığı tipidir. Sigara kullanımı, hızlı bir şekilde artmaktadır. Sigaranın birçok hastalığa ve erken ölümlere sebep olması nedeniyle günümüzün en önemli halk sağlığı problemlerinin başında gelmektedir (Edwards, 2004; Hoffman ve ark., 1997). Düzenli bir şekilde sigara içmeye devam edenlerin yarısı, sigara nedeniyle yaşamlarını kaybetmektedir. Sigara nedeniyle 35-69 yaş arasında ölenlerin yaşamlarından kaybettikleri süre 20-25 yıl olarak hesaplanmıştır (Mayda ve ark.,2007).

Sigaranın içerdiği en önemli toksik madde olan nikotin, doku ve serumda kolesterol, fosfolipid, trigliserid ve trigliseritten zengin lipoprotein sentezini artırmaktadır. Nikotinin lipoprotein metabolizmasını etkileyerek ateroskleroza yol açtığı bildirilmektedir. Sigaranın içinde bulunan ve oldukça toksik maddelerden biri de kadmiyumdur.

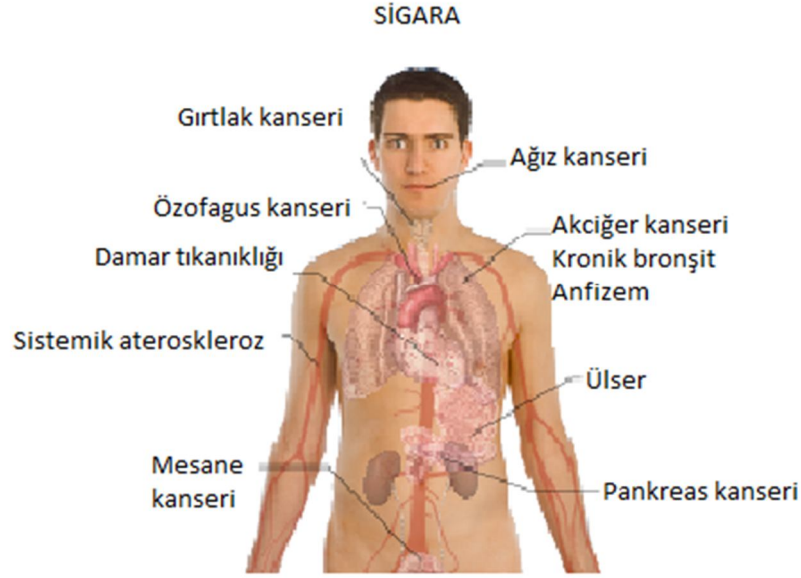
Uzun süreli kadmiyum maruziyeti, bu metalin karaciğer ve böbrekte birikmesine neden olurken, akut maruziyeti karaciğerde birikmesine neden olmaktadır. Kadmiyum uygulaması karaciğerde apoptozisi indüklemektedir. Bu bağlamda sigara dumanının uzun süre inhalasyonu karaciğer dokusunu etkilemektedir (Çolakoglu ve ark., 2005). Sigara dumanının meydana getirdiği sağlık risklerine akciğer kanseri başta olmak üzere dil, larinx, özofagus, mesane, renal pelvis, pankreas, kemik ve serviks kanserleri gibi çeşitli kanserler ile atheroskleroz ve kronik obstrüktif akciğer hastalığı olarak bilinen solunum yoluyla ilgili hastalıklar sayılabilir (Hoffman ve ark. 1997.; Pfeifer ve ark.,2002).Ayrıca sigara içilmesiyle çok sayıda serbest radikal ve reaktif oksijen ürünleri açığa çıkması oksidatif DNA hasarının oluşmasına sebep olmakta ve sigara içilmesi, birçok hastalık nedeni olarak görülmektedir (Halliwell ve Gutteridge, 1988; Mozaffarieh ve ark., 2010).

1.1.3. Sigara ve Kanser

Sigara içenlerde en sık görülen kanser türü akciğer kanseridir. Sigaranın içerdği PAH, 4-(metilnitrozamin)-1-(3piridil)-1-butan (NNK), 1,3-butadien, etil karbamate etil oksit, nikel, krom, kadmiyum, polonyum-210, arsenik, ve hidrazin gibi tütün özel nitrozaminlerin akciğer kanserine sebep olduğu yayınlanmıştır (Pfeifer ve ark., 2002). Ayrıca akciğer kanserine sebep olan bir diğer etken ise sigara dumanındaki serbest radikallerin tetiklediği DNA hasarıdır (Hoffmann ve ark., 2001).

Akciğer kanseri oluşunda da en önemli etken sigara içilmesidir. Sigara ile akciğer kanseri arasındaki ilişkiler geçtiğimiz yüzyılın ilk yarısından beri bilinmektedir. Bu konuda özellikle son 50 yıl içinde çok sayıda çalışma yapılmış ve akciğer kanserlerinin %85-90 kadarının nedeninin sigara olduğu sonucuna varılmıştır. Pek çok çalışmada sigara içenlerde akciğer kanseri riskinin 5 kat ile 15 kat arasında artmış olduğu ortaya konmuştur. Bu bilgilerin ışığında, sigara içilmeseydi bugün 10 akciğer kanserinden 9 tanesinin görülmeyeceği, 10 akciğer kanseri yerine sadece 1 tane kanser görüleceği sonucuna varılabilir. Benzeri şekilde sigara içenlerin sigarayı bırakması ile de akciğer kanserlerinin büyük bölümünün önlenileceği ifade edilebilir (Kaleli., 2010; Bilir., 2008).

Sigara, akciğer kanserinin yanı sıra özofagus, oral, orofarengeal, hipofarengeal, gırtlak, mesane, renal pelvis ve pankreas kanserine de sebep olmaktadır (Pfeifer ve ark., 2002).



Şekil 1.2. Sigara ve Kanser

Tüm dünyada 1,1 milyar kişi sigara içmektedir ve 2025 yılında bu sayının 1,6 milyarı aşacağı tahmin edilmektedir. Halen dünyada her yıl üç milyon ve her on saniyede bir kişi, tütünün yol açtığı bir hastalık nedeniyle ölmektedir ve bu sayı sigara kullanımının yaygınlaşması sonucu giderek de artmaktadır. Mevcut durum değiştirilmezse Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tahminlerine göre; 2020-2030'lu yılların başlarında dünyada yılda on milyon insan (%70'i gelişmekte olan ülkelerde) hayatını kaybedecektir.

Türkiye'de 1988 yılında yapılan ve ülkeyi temsil eden araştırmanın sonucuna göre sigara içme sıklığı %43,6 olarak saptanmıştır. Sigara içme alışkanlığı yaklaşık %40 oranında 15- 19 yaşlarında başlamakta; dünyada ve Türkiye'de 15 yaşın üzerindeki nüfusun %45'inin sigara bağımlısı olduğu varsayılmaktadır. Ergenlik çağındakiler de dahil edilince ülkemizde yaklaşık 16,5 milyon kişinin düzenli biçimde sigara içtiği tahmin edilmektedir. Bu durum da dünyada ve Türkiye'de sigaranın toplumsal bir yara olduğunu göstermektedir. Nitekim Türkiye'de 1985 yılında 64,8 milyar adet olan yıllık sigara satışı 2000 yılında 122,6 milyar adede ulaşmıştır. Yani söz konusu dönemde satışlar %89,2 oranında artmıştır (Mayda ve ark., 2007).

1.2. Kadmiyum

Kadmiyum atom numarası 48, bağıl atom kütlesi 112,40 periyodik tabloda 2B grubunda yer alan toksik bir metaldir. Doğada düşük konsantrasyonda çinko, kurşun ve bakırla birlikte bulunur. Ancak doğada çok yaygın olması sebebiyle, hemen hemen her şeyde (yiyecek, içecek, vb.) ölçülebilir miktarda mevcuttur (Thompson ve Bannigan, 2008). Kadmiyum çevresel ve endüstriyel kirlenmenin en önemli toksik elementi olarak da tanımlanmaktadır. Kadmiyum, orman yangınları ve volkanik patlamalar gibi olayların neden olduğu erozyon sonucunda atmosferde birikimi artan, çevre kirletici olarak bilinen ağır bir metaldir (Marcano ve ark., 2009; Cannino ve ark., 2009). Ancak atmosferde biriken kadmiyumun doğal kaynaklara oranla 3-10 kat daha fazlasının antropojenik kaynaklardan olduğu ileri sürülmektedir (Patra ve ark., 2011). Pigmentler, stabilizatörler, alaşımlar, elektronik bileşiklerin üretimi ve özellikle şarj edilebilir nikel-kadmiyum pillerinde kullanılması, atmosferdeki yoğunluğunun endüstriyel gelişimle birlikte arttığını göstermektedir (Jarup, 2003; Cannino ve ark., 2009; Joe ve ark. 2011).

Zehirlenmeye, Cd konsantrasyonunun yüksek olması sebebiyle öncelikle sigara aynı zamanda gıda, su ve hava kirliliği sebep olmaktadır (Tsutsumi ve ark., 2009). Cd esansiyel olmayıp tüm dozlarında toksik olarak kabul edilir, kalsiyum, demir ve çinko metabolizmasıyla etkileşir (WHO 1992). Cd ciddi hücresel hasarlara sebep olan, biyolojik olarak gerekli olmayan iki değerlikli tehlikeli bir metaldir (Joe ve ark., 2011). Cd toksisite molekül mekanizmaları farklı ve karmaşıktır. Diğer pek çok iz metallerin aksine (Cr, Fe, Cu) Cd, reaktif oksijen türleri (ROS) üretmek için elektron transfer reaksiyonlarına doğrudan katalize olmadığından redoks aktif bir metal değildir.

Ancak Cd, ROS üretimi ile glutatyon, metallotioneinler ve proteine bağlı sulfidril grubu gibi serbest radikal tutucular tarafından proteinler ve membran lipidleri ya da DNA hasarına neden olan spesifik olmayan oksidasyona yol açmasıyla dolaylı olarak hücre hasarına sebep olduğu ileri sürülmektedir. İntresellüler Cd, DNA tek zincir kırılmalarını ve membran bütünlüğünün yanısıra proteinleri, nükleik

asitlerin sentezini ve DNA onarım sistemini inhibe ettiği bilinmektedir (Jin, ve ark., 2003; Mitra, 1984; Rosen, ve ark., 2002; Stohs, 1995).

Kadmiyum toksisitesi (Cd^{+2}), daha önce bilinen güvenlik değerinden neredeyse 3 kat daha yavaş olarak belirlenen tolerans derecesi ABD Ajansı Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA, 2009) yanısıra yeni kurulan Toksik Maddeler ve Hastalık Kayıt Defteri (ATSDR, 2008) tarafından yeniden vurgulanmıştır. Üstelik Cd uluslararası kanser araştırma ajansı tarafından (IARC) 1. Grup karsinojen olarak sınıflandırılmıştır (IARC, 1993; Natascha ve ark., 2011).

Kadmiyumun vücuttan atılımının oldukça yavaş olduğu ve biyolojik yarılanma ömrünün 10-30 yıl arasında olduğu tahmin edilmektedir. Kronik kadmiyum maruziyeti, akciğer ve bağırsak üzerinden alınımı ve birikimi başta böbrek ve karaciğer olmak üzere pek çok organda toksisiteye sebep olmaktadır (ATSDR, 2008; Järup ve ark., 1998). Kadmiyuma akut ve uzun süreli kronik maruziyetin; nefrotoksisiteye, akciğer, karaciğer ve prostat kanserine, solunum sistemi hasarlarına ve kemik kırılmalarına neden olduğu belirlenmiştir.

Kadmiyum içeriği değişmekle birlikte tahıl ürünleri ve sebzeler gibi lifli besinler; çevresel kadmiyumun basta gelen kaynağıdır. Ancak besinlerle alınan kadmiyum oranı beslenme şekli ve alışkanlıklarına bağlı olarak değişir. Sigara içenlerde ise kadmiyuma daha yüksek oranlarda maruziyet söz konusudur ve sigara içenlerde bu oran içmeyenlere göre 4-5 kat fazladır (Jarup ve ark 1998). Kadmiyum özellikle yapraklı sebze ve tohumlu besinlerle alınır, tütün yaprakları önemli düzeyde kadmiyum taşıdıkları için sigara içenler besinlerle aldıkları kadmiyumdan daha fazlasını almış olurlar (Satarug ve ark. 2003).

1.2.1. Kadmiyumun Özellikleri ve Kadmiyum Maruziyeti

Kadmiyum, en tehlikeli çevresel ve mesleksi zehirlerden biri olarak kabul edilir (Brzoska ve ark., 1998). Kadmiyum çevrede konsantrasyonu 0,1 ila 1ppm arasında değişen, birincil olarak çinko ile birlikte bulunan, geniş bir alana yayılmış fakat seyrek bulunan bir elementtir (Elinder, 1985; IARC, 1993). Saf kadmiyum yumuşak,

iyi şekillendirilebilen korozyona dayanıklı, gümüş beyazı bir metaldir. Kadmiyum, çevrede genellikle saf metal olarak bulunmak yerine, oksijen [kadmiyumoksit (CdO)], klor [kadmiyumklorür (CdCl_2)] veya sülfür [kadmiyumsülfat (CdSO_4), kadmiyumsülfat ($\text{Cd}(\text{SO}_3)_2$)] gibi elementlerle bileşik halinde bulunur. Kadmiyum, 10–30 yıl arasında değişen uzun yarılanma ömrü ve vücuttaki tüm organlara dağılımı nedeni ile toksisitesi yüksek olan bir elementtir (Jarup ve ark., 1998).

Dünya üzerinde her yıl yaklaşık olarak 15,000 ton kadmiyum üretilmektedir. Endüstriyel alanda, Nikel-kadmiyum pillerinde, aktif elektrot maddelerinde, plastik, seramik ve camlarda kullanılan pigmentlerde, polivinilklorürün (PVC) ısı ve ışığa karşı dayanıklılaştırılmasında, çelik ve bazı demir içermeyen metallerin kaplanmasında, çeşitli alaşımlarda, kadmiyum içeren elemanların ve parçaların TV, ölçü gereçleri ve reaktör teknolojisinde, otomatik ve hayvancılık endüstrisinde, tarım ilaçları ve böcek ilaçlarının üretilmesinde, dericilikte kullanılmaktadır (Elinder, 1992; IARC, 1993; Thornton, 1992; USGS, 1997).

İnsanlarda kadmiyum maruziyeti, Cd endüstrisine bağlı olarak gelişen mesleki maruziyetin ve sigara içiciliğinin yanı sıra, bu metalle kontamine olmuş hayvansal gıda, sebze ve sudan kaynaklanmaktadır (Brzoska ve ark., 2001; El-Maraghy ve ark., 2001). Kadmiyum maruziyeti, topraktan aldığı kadmiyumu depo eden sebzelerin ve tütünün tüketilmesi ile olmaktadır. Lağım atığından toprağa kadmiyum transferi olduğu gibi, gübrelerle birlikte toprağa ve bitkilere kadmiyum geçmektedir (Wittman ve Hu, 2002; Jarup ve ark., 1998). Topraktaki kadmiyumun vücuda girişi, yeşil yapraklı sebzeler, meyveler ve patates tüketimi ile olmaktadır (Satarug ve Moore, 2004). Kadmiyum içeriği değişmekle birlikte tahıl ürünleri ve sebzeler gibi lifli besinler; çevresel kadmiyumun başta gelen kaynağıdır. Kadmiyum absorbe edildiğinde, vücuttan oldukça düşük miktarlarda atılabildiğinden yaşla beraber vücutta biriken Cd miktarının artmasına sebep olur ve böylece önemli organlarda biriken bu metal, hepatotoksisite, nefrotoksisite ve kardiyomiyopatiye neden olur (El-Maraghy ve ark., 2001).

Sigara ile kadmiyum maruziyeti, yiyeceklerle olan maruziyetten daha fazla önem taşır. Kadmiyum özellikle yapraklı sebze ve tohumlu besinlerle alınır, tütün

yaprakları önemli düzeyde kadmiyum taşıdıkları için sigara içenler besinlerle aldıkları kadmiyumdan daha fazlasını almış olurlar. Referans kan kadmiyum düzeyi sigara kullananlar için 0,30-3,92 µg/l ve kullanmayanlar için 0,3-1,2 µg/l arasında verilmektedir (Painter ve ark.,1999). Bir adet sigarada 1-2 µg kadmiyum bulunur ve % 40-60'ı akciğerler tarafından alınarak vücuda girer. Sonuç olarak, günde bir paket sigara içen bir bireyin günlük olarak fazladan aldığı kadmiyum miktarı 1-3 µg'dır. Sigara dumanının solunması ile alınan kadmiyum miktarı, sigara içilmesi ile alınan kadmiyum miktarı kadar fazla değildir (WHO, 1985; Lucas ve ark., 1980; Prigge, 1978).

Kadmiyuma akut ve uzun süreli kronik maruziyetin; nefrotoksisiteye, immunotoksisiteye, osteotoksisiteye, akciğer, karaciğer, böbrek ve prostat kanserine, solunum sistemi hasarlarına ve kemik kırılmalarına neden olduğu belirlenmiştir (Patra ve ark., 2011).

1.2.2. Kadmiyum Absorbsiyonu ve Metabolizması

Toplam kadmiyumun % 10-50'si inhalasyon yolu ile % 5'i gastrointestinal yolu ile vücuda alınır. Kadmiyum metali ve tuzlarının uçuculukları az olduğundan havada asılı ince parçacıklar halinde bulunurlar. Bu parçacıkların bir kısmı solunum yollarında, akciğerlerde tutulur ve inhalasyon yoluyla vücuda alınır, solunum havasıyla geri verilir. Küçük parçacıklar (yaklaşık olarak 0,1 pm çapında) alveollere nüfuz etme eğilimindeyken, büyük parçacıklar (çapı 10 pm'den büyük olanlar) üst solunum yollarında birikme eğilimindedir. Bir sigara yaklaşık olarak 1-3 µg Cd içerir ve sigara içen bireyler paket başına 1-3 µg kadmiyum alır ve böbreklerinde biriken kadmiyum miktarı sigara içmeyenlerdeki kadmiyum miktarının 2 katıdır (Jarup ve ark., 1998). Sigara içmeyen bireyler ise gıda, su ve egzoz gazları gibi kaynaklar günlük 30µg kadmiyumdan 1-3 µg alır. Kan kadmiyum konsantrasyonu, sigara içenlerde (~1-4 µg/l) içmeyenlere göre yaklaşık 4-5 kat daha fazladır (Messner ve ark., 2009; Bernhard ve ark.,2006).

Normal koşullarda, bağırsaklardan kadmiyum absorpsiyonu düşüktür. Ancak yetersiz beslenme veya diyet ile vücuda alınan kalsiyum, protein, çinko, demir ve bakır miktarı azaldıkça, kadmiyumun bağırsaklardan emilimi artar. Gastrointestinal

yolla artan kadmiyum Emilimi, kandaki konsatrasyonu artıarak bu metalin aynı zamanda doku ve organlara alınımına yol açar. Dolayısıyla bu durum diyetle kalsiyum eksikliğiyle birlikte, insan ve hayvanlarda kadmiyumun tutulmasına ve kümölasyonuna neden olur (Brzoska, ve ark., 1998).

Kadmiyum toksikokinetiğinin en önemli özelliklerinden biri düşük molekül ağırlıklı bir protein olan ve molekül başına yedi kadmiyum atomu bağlayabilen metallotiyoneinlerle etkileşimidir. Çoğu dokudaki metallotiyonein, kadmiyum, çinko ve diğer metallere maruziyet ve beslenme eksikliği, egzersiz, hipotermi ve inflamasyon gibi çeşitli fizyolojik stres olayları sonucunda indüklenir (Waalkes ve Goering, 1990). Metallotiyoneinin tam fizyolojik fonksiyonu bilinmemektedir. Kadmiyumun metallotiyoneinle etkileşimi kadmiyum ve çinko arasındaki kimyasal benzerlikten kaynaklandığı ileri sürölmektedir (Waalkes ve Goering, 1990). Kadmiyum öncelikle plazmada albümine bağlanır, metallotiyoneinle bağlanarak karaciğere girer ve sonra kan dolaşımına katılır. Metallotiyoneine bağlanmış kadmiyum renal glomerüller tarafından süzölür ve proksimal tüböl hücreleri tarafından yeniden absorbe edilir (Foulkes, 1978).

Kadmiyum aynı zamanda kemik, pankreas, böbreküstü bezleri ve plasentada akümüle olur. Vücutta biriken kadmiyumun % 50'si karaciğer ve böbrekte toplanır (Pope ve Rall, 1995). Kadmiyumun neden olduğı başlıca patolojiler, renal hasar ve kemik kaybıdır. Böbrekteki kadmiyum konsantrasyonundaki artış beraberinde osteoporozu da getirir (Jarup ve ark., 1998).

Akut maruziyette dizüri, poliüri, nefes darlığı, göğüs ağrısı, irritabilite, aşırı yorgunluk, baş ağrısı ve baş dönmesi görölür. Kadmiyumun indüklediğı renal hasarda ilk olarak idrardaki mikroglobölünde yükselme görölür (Wittman ve Hu., 2002).

Genom stabilitesi, doğru hücre fonksiyonları özellikle replikasyon, gen ekspresyonu ve protein sentezi için önemlidir. İndüklenmiş DNA hasarı, hücre döngüsünün etkilenmesine, genom kararsızlığa, kansere ve ayrıca hücre ölümüne (apoptozis) sebep olabilir.

Kadmiyum genom stabilitesini, oksidatif stres artışıyla oluşan DNA hasarına sebep olmasıyla, dolaylı olarak etkilediği görülür. Ayrıca baz eksizyon onarımı (BER), nükleotid eksizyon onarımı (NER), uyumsuzluk onarımı (MMR) gibi bir çok hücrel DNA onarım sistemlerini kadmiyumun etkilediği bilinmektedir (Bertin ve Averbeck., 2006).

Kadmiyumun toksisite mekanizması tam olarak anlaşılmamakla birlikte, bazı hücrel etkiler ortaya konmuştur. Kadmiyuma maruziyetine uğramış toplumların % 50-60'lık kesimde kromozomal hasar olduğu gösterilmiştir (Fowler, 1978). Vücutta bulunan düşük düzeylerdeki kadmiyumun hücredeki mitokondriye bağlanarak hücrel solunumu %75 oranında; oksidatif fosforilasyonu ise neredeyse tamamen inhibe ettiği gösterilmiştir (Nordberg,1985).

Kronik kadmiyum maruziyeti sonucu oluşan ortaya çıkan doku hasarında oksidatif stres ve tiyol tüketiminin de etkisi vardır. Kadmiyum dokulardaki sülfidril gruplarına bağlanarak, lipid peroksidasyona ve glutatyon tüketimine neden olur ve sonucunda hücrel hasar oluşur (Ercal ve ark., 2001). Kadmiyum glutatyona yüksek afinite duyar ve safra ile elimine olabilen glutatyon kompleksleri oluşturur. Kadmiyum aynı zamanda katalaz, mangan-süperoksit dismutaz ve bakır/çinko-süperoksit dismutaz (Cu/Zn-SOD) gibi antioksidan enzimleri de inhibe eder (Casalino, 2002).

Kadmiyum toksisitesi,

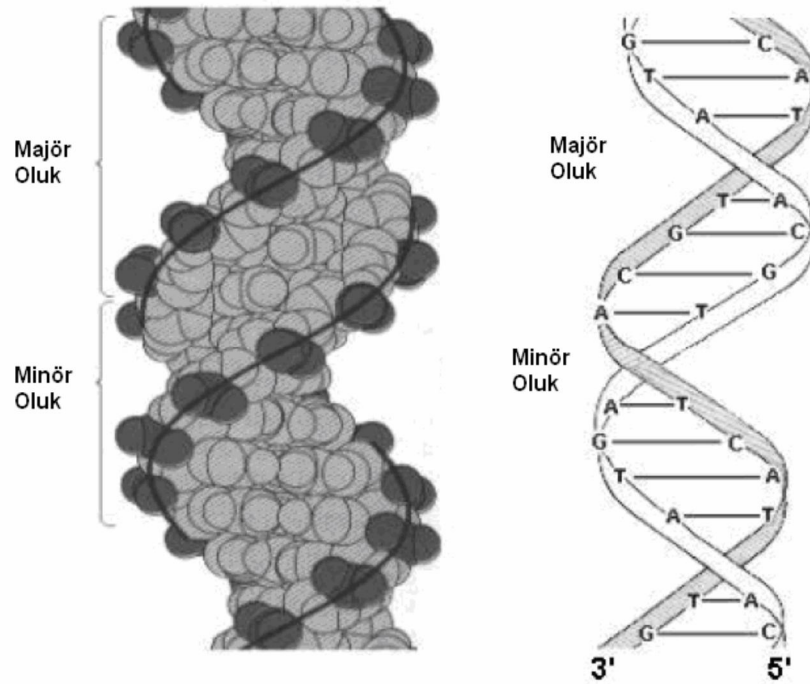
DNA zincir kırılmalarına, oksidatif DNA hasarına ve lipid peroksidasyonuna, apoptoz ve DNA onarım mekanizmalarını etkilemesi gibi dolaylı ve direkt genotoksik etkiye sebep olduğu,

Hücrel homeostaziye bozarak, hücreleri apoptozise, nekroza ve hücrel proliferasyona sürüklediği,

Cd maruziyetinin mutajenik ve karsinojenik etki gösterebileceği, yapılan calismalarda rapor edilmistir (Mourón ve ark.,2001; Jeong ve ark., 2000).

1.3. DNA Yapısı

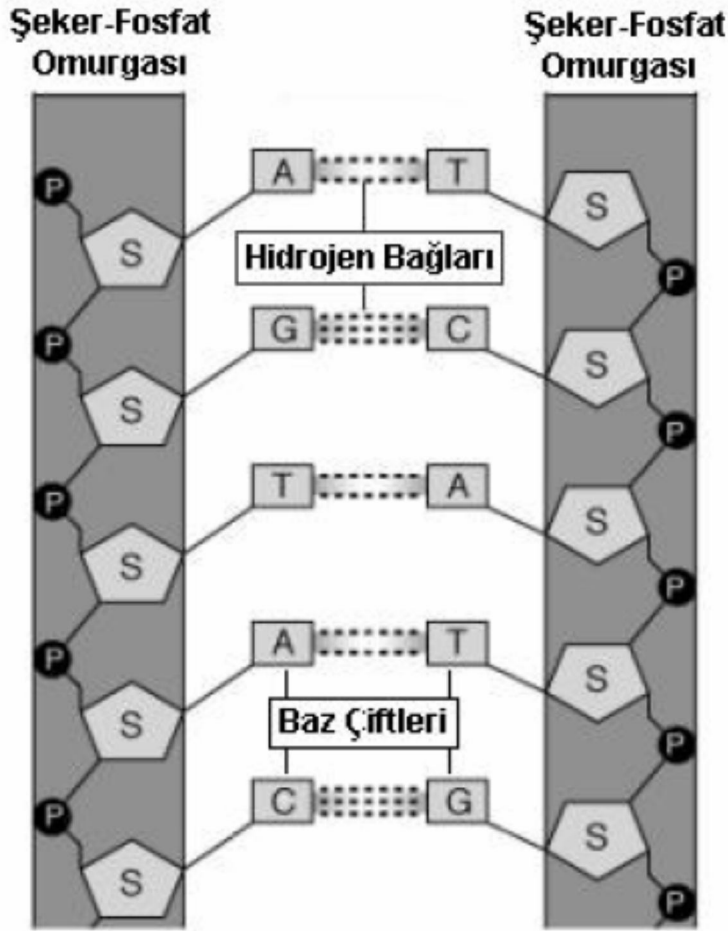
Tek sarmallı DNA içeren birkaç virüs dışında, DNA çift sarmallıdır. Sarmalı oluşturan iki zincir ortak bir eksen etrafında dönerek, çift heliks yapısını oluştururlar. Bu yapıda zincirler birbirine anti paralel konumda bulunurlar. Sarmalın 5' ucu diğer sarmalın 3' ucu ile eşleşir. DNA heliksinin en sık rastlanan şekli, klasik "B" şeklidir. Burada zincirlerin hidrofilik deosiriboz fosfat ana iskeleti molekülün dış kısmında bulunur. Hidrofobik bazlar ise içe doğru, heliks eksenine dik olarak yerleşmişlerdir. Heliksdeki bu yerleşim düzeni sarmallar arasında bir tane geniş (majör), bir tane de dar (minör) oluk ortaya çıkarır.



Şekil 1.3. DNA Çift Sarmalı

DNA molekülünün iki zinciri, pürin ve pürimidin bazları arasında yer alan hidrojen bağları tarafından bir arada tutulmaktadır. Çift zincirli helikste bazlar heliksin iç kısmında, fosfat ve şeker omurgası ise dış kısmında yer aldığı için heliksin iç kısmı hidrofobik, dış kısmı ise hidrofilik özelliktedir. Pürin ve pürimidin nükleotitleri arasındaki eşleşmeler A karşısında T; G karşısında C bulunduğu için son

derece spesifiktir. Bu nedenle çift heliks yapısında yer alan bir zincirdeki baz dizisi verildiğinde; ikinci zincirdeki baz dizisi belirlenebilir (Ravanat, 1999; Ersöz ve ark.,2008).

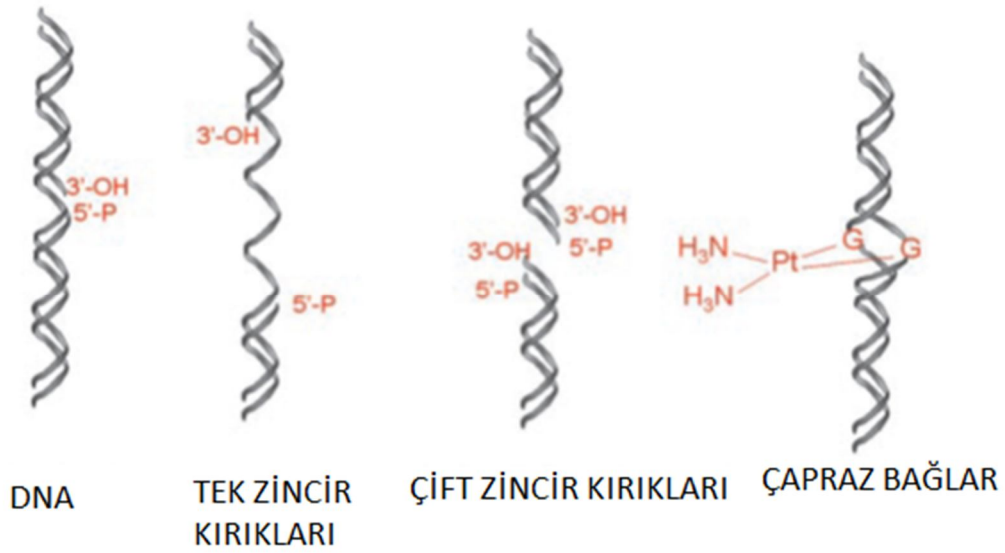


Şekil 1.4. DNA Çift Sarmal Yapısı

1.3.1. DNA Hasarı

Gerek çevresel etkenler gerekse fizyolojik metabolizma ürünlerinin etkisi sonucunda DNA’da çeşitli hasarlar oluşmaktadır. Farklı DNA hasarlarına neden olan ultraviyole,X-ışınları, kimyasal bileşikler gibi çevresel ajanlar, insan genomik DNA’sının bütünlüğünü sürekli tehdit etmektedir. Çift ve tek zincir kırıkları, insersiyon ve delesyonlar, abazik alanlar ve DNA-protein çapraz bağ oluşması DNA

hasarlarına örnek olarak verilebilir. DNA hasarı sadece dış faktörlerden kaynaklanmaz. DNA replikasyonu ve rekombinasyonu gibi olaylar sırasında, hücresel metabolizmanın yan ürünü olarak üretilen serbest radikaller gibi endojen ajanlar da DNA hasarına neden olmaktadır. DNA onarımı, hücre ölümünü, mutasyonu, replikasyon hatalarını, DNA hasarının devamlılığını ve genomik kararsızlığı azaltan bütünüşlemlerde devreye girmektedir. Bu işlemlerdeki herhangi bir anormallik kanser, yaşlanma ve birçok genetik hastalığa yol açabilmektedir (Burçak ve Andican, 2004; Onur ve ark.,2009).



Şekil 1.5. DNA Hasar Örnekleri

1.3.2. DNA Hasarına Neden Olan Etkenler

Genetik materyalin moleküler bütünlüğünde ekzojen veya endojen faktörlerin etkisiyle meydana gelen tüm değişiklikler "DNA hasarı" olarak adlandırılır.

A. Endojen (spontan) Etkenler

1. Yanlış eşleşmeler, insersiyon/delesyonlar
2. Kimyasal değişiklikler: deaminasyon, metilasyon

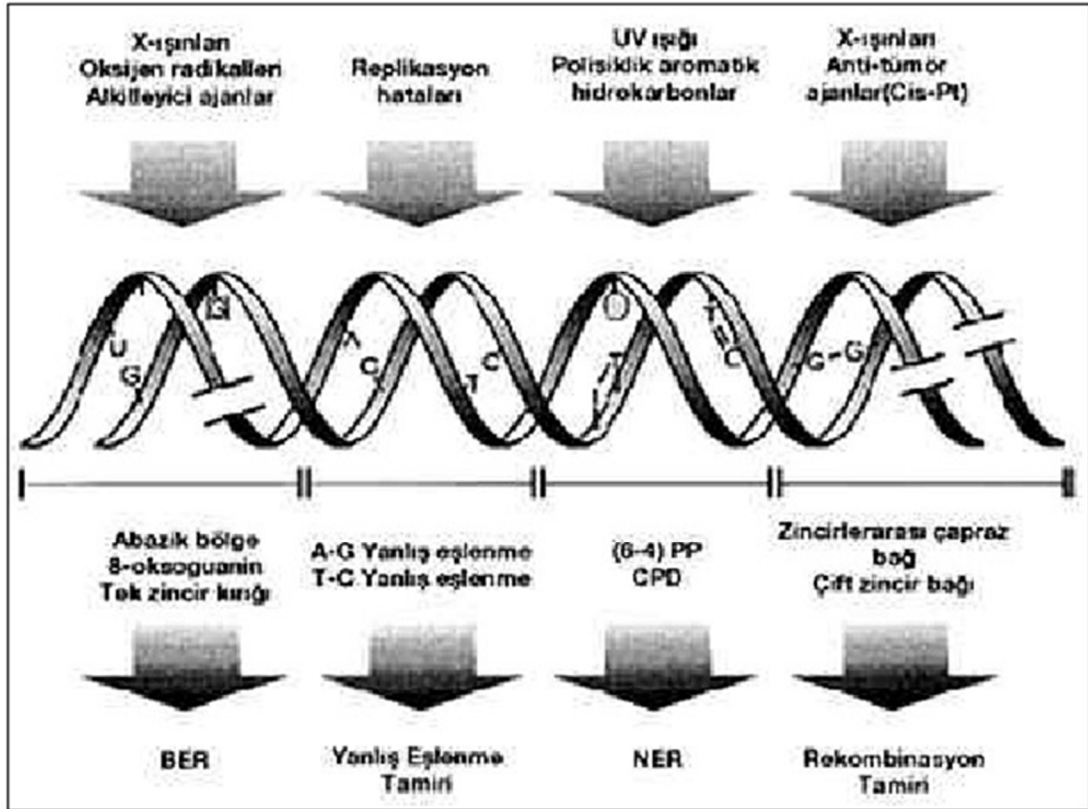
3. Baz kayıpları: depurinasyon/depirimidi nasyon
4. Oksidatif Hasar: 100.000 /hücre/gün
5. Replikasyon hataları

Deamine bir bazın onarılamaması durumunda nokta mutasyonları görülebilir. DNA'dan her gün yaklaşık 5000 purin bazı (adenin ve guanin) glikozil bağları hidrolizeolduğu için kaybolur. Bu olaya depurinasyon adı verilir. Benzer şekilde DNA dizisinde sitozinin urasile deaminasyonu günde yaklaşık 100 baz çiftini etkiler. Endojen etkenlerle oluşan hasar onarılmaz ise somatik mutasyonlar ortaya çıkar

B. Ekzojen (çevresel) Etkenler

1. Kimyasal ajanlar: aflotoksin, benzopren, kemoterapi ilaçları, alkilleyici ajanlar, vinil klorid, mustard gazları v.b.
2. Fiziksel ajanlar: UV radyasyon, iyonize radyasyon v.b.

Benzopren karsinojen olmadığı halde hücre içinde okside olduğunda karsinojenik hale gelir. Ardından, DNA'da guanin gruplarına bağlanarak G-C bağlantısının arasına girer ve heliks yapısında bozulmalara neden olur. Ultraviyole ışığının neden olduğu hasarlar (siklobütan ve 6-4 ışın ürünü pirimidin dimerleri) daha çok deri kanseri riski ile bağlantılıdır. Mutajenik olan UV ışını, pirimidinlerin kovalent olarak bağlandığı dimer formlarının oluşmasına neden olur. TT dimer en sık oluşandır. Timin dimerleri, DNA konformasyonunu ve DNA polimerazın aktivitesini bozarak replikasyonu durdurur. Sisplatin ve alkilleyici ajanlar gibi kemoterapötik ilaçlar DNA'da çift zincir kırıklarına ve zincir içi çapraz bağların oluşumuna neden olmaktadır. Reaktif oksijen türlerinin (ROS) neden olduğu 100'den fazla oksidatif DNA hasarı tanımlanmıştır. Bu hasarların biyolojik önemi henüz açıklık kazanmamakla birlikte 8-hidroksideoksiguanin'in (8-OH-Gua) mutasyon neden olduğu bilinmektedir. Bu yapı adeninle baz çifti oluşturabilme yeteneğine sahip olduğu için oldukça mutajeniktir ve replikasyon sırasında adeninle baz çifti oluşturur. G:C yerine insan kanserlerinde en çok görülen mutasyon olan T:A transversiyonuna yol açar.



Şekil 1.6. DNA'da Hasar Oluşturan Ajanlar, Hasar Tipleri ve Tamir Mekanizmaları

DNA hasarı hücrede, hasarla başa çıkabilecek veya bunu gerçekleştiremiyorsa programlı hücre ölümünü sağlayacak birçok hücresel olayı tetikler. Hücre, DNA hasarlarına karşı farklı metabolik yollar ile cevap verir. Ağır DNA hasarları hücrenin apoptoz yolunu aktive ederek hücreyi ölüme götürür ya da hasar DNA onarım mekanizmaları ile onarılabilir. Dinamik bir yapıya sahip olan DNA molekülü, onarılabilen tek biyomolekül olması bakımından önemlidir. DNA hasarı replikasyon sırasında onarılamazsa mutasyona vesouç olarak genomik kararsızlığa neden olur. DNA'da birçok özgün değişimi içine alan genomik kararsızlık, pek çok hastalığın yanı sıra hem kanserin hem de yaşlanmanın önemli bir belirtisidir (Kulaksız ve Sancar, 2007; Onur ve ark., 2009; Sancar ve ark., 2004).

1.4. Comet Assay

Comet assay, DNA hasarını yüksek hassasiyetle belirlemede kullanılan genotoksisite testlerinden biridir (M. Valverde, ve ark.,2001; Poli ve ark., 1999).

Genotoksisite kimyasal, fiziksel veya biyolojik ajanın genetik materyalde hasar yapabilme özelliği olarak tanımlanır. Bir ajanın genotoksitesini bir çok değişik hastalıkla sonuçlanabilir, ancak kanser en sık rastlanılanıdır. Birçok insan karsinojeninin, genotoksik olduğu sağlam verilere dayanmaktadır. Bundan dolayı kimyasal genotoksisite ve karsinogenezis arasındaki ilişki iyi bağdaştırılmıştır ve genotoksisitenin kanser oluşumunu başlatan en önemli mekanizma olduğuna inanılmaktadır. Genotoksisite ve karsinogenezis arasındaki çok yakın bir ilişkinin ve genotoksik testlerin karsinogenleri tespit etmede etkinliğinin olması genotoksisite araştırmalarının önemini göstermektedir (Kurtulmus ve Aydın, 2007).

Comet assay yönteminin temel prensibi; kimyasal ve fiziksel nedenlerle oluşangenetoksik ve sitotoksik ajanların canlı hücreleri üzerindeki etkilerini, hücrelerin DNA'larını tek tek inceleyerek tespit etmektir. Genel olarak, canlı dokulardan izole edilen çekirdek içindeki DNA, ince bir agaroz jel içine fiks 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 bromid gibi DNA spesifik boyalarla boyanıp floresanmikroskop altında incelendiğinde hasarın derecesine göre DNA'lar dairesel formdankuyruklu yıldıza benzer forma kadar çeşitli derecelerde görüntüler oluşturdıklarından yönteme İngilizce "kuyruklu yıldız" anlamına gelen "Comet Assay" adı verilmiştir(Dikilitaş ve Koçyiğit, 2010).

Bireylerde hücresel seviyedeki DNA hasarının ölçülmesinde kullanılan en yaygın genotoksisite ölçme yöntemlerinden birisi olan "*Tek Hücre Jel Elektroforezi*" (SCGE) hassas, basit ve hızlı bir görsel floresan tekniğidir. Teknik, hücrelerde çeşitli ajanların indüklediği DNA hasarı ve onarım bozukluklarının tayini amacıyla genetik toksikolojiden moleküler epidemiyolojiye kadar pek çok alanda kullanılmakta olup

“Single Cell Gel Electrophoresis”, “Comet Analiz” ya da *“Microgel Electrophoretic Tecnique”* olarak da adlandırılmaktadır (Collins ve ark., 1997; Yeni ve ark., 2010).

Spesifik hücrelerde DNA hasarı ilk kez 1978 yılında Rydberg ve Johanson tarafından belirlenmiştir. Mikroskop lamı üzerinde agaroz jel içine gömülen hücreler alkali şartlarda bekletilerek membranları parçalanıp DNA sarmalının kısmi açılması sağlanmıştır. Daha sonra nötralize edilen hücreler akrinin turuncu ile işaretlenmiş ve DNA hasarının düzeyi, yeşil floransanın kırmızı floresans oranının fotometrik ölçümü ile belirlenmiştir (yeşil floresans çift sarmal DNA’yı kırmızı floresans ise tek sarmal DNA’yı belirtir) (Rydberg ve Johanson. 1978; Dinçer ve Kankaya,2010).

Günümüzde bu teknik çok sayıda kritik basamak içerdiğinden tamamen terk edilmiştir. 1984 yılında Ostling ve Johanson tarafından tek hücre düzeyinde DNA hasar tespitinin hassasiyetini artırmak üzere ‘Tek Hücre Jel Elektroforez Tekniği’ geliştirilmiştir. Bu teknikte mikroskop lamı üzerinde, ince bir tabaka agar jeline süspanse edilen az sayıda hücre yoğun tuz ve deterjan içeren lizis çözeltisinde bekletilip nötral pH şartlarda kısa bir süre elektroforeze tabi tutulmuştur. Sonuçta kırık içeren DNA’ların gevşediğini, kırılmış DNA fragmanları nedeni ile elektrik yük kazandığını ve çekirdekten anoda doğru göç ederek kuyruklu yıldız görünümünü vermesinden dolayı hasarlı hücreleri *“COMET”* olarak adlandırmışlardır. DNA göçünün miktarı DNA’ların etidyum bromür ile boyanmasıyla oluşan floresansın yoğunluğunun floresans mikroskobu ile ölçülmesi sonucu belirlenmiştir. Yine kuyruk uzunluğu DNA hasarını saptamak için ölçülmüş ve kuyruk uzunluğunun radyasyon dozunun bir fonksiyonu olduğu belirlenmiştir (Ostling, ve Johanson.1984; Tice ve ark., 2000; Yeni ve ark.,2010).

Nötral şartlarda gerçekleşen bu teknik ile DNA çift sarmal kırılmaları tespit edilirken, tek sarmal kırılmaları tespit edilememiştir. Oysa ki DNA hasarına sebep olan çoğu ajan, DNA çift sarmalından çok DNA tek sarmalında daha çok hasar meydana getirmektedir. Üstelik nötral koşullar altında çalışılan bu teknikte proteinler tam olarak uzaklaştırılmamaktadır. Yöntem daha sonra 1988 yılında Singh ve arkadaşları tarafından modifiye edilmiştir.

Günümüzde birçok comet assay versiyonu vardır. Kullanılan tüm versiyonlar fiziksel ve kimyasal ajanların tetiklediği DNA hasarını alkali ($\text{pH} > 13$) elektroforez ile belirleyen, Singh ve arkadaşlarının 1988 yılında yayınladığı versiyonu temel alır. Bu versiyon, uygulanan daha güçlü lizis şartları ile proteinlerin % 95'inden fazlasını yok edebilmektedir. Alkali elektroforez uygulaması ile çift zincir kırıklarının yanısıra tek zincir kırıkları ve alkali labil bölgeleri, onarımı tamamlanmamış DNA bölgeleri basit ve hasas bir şekilde belirlenmesi sağlanmıştır (Hoffmann ve ark., 2005; M. Valverde ve ark.2009).

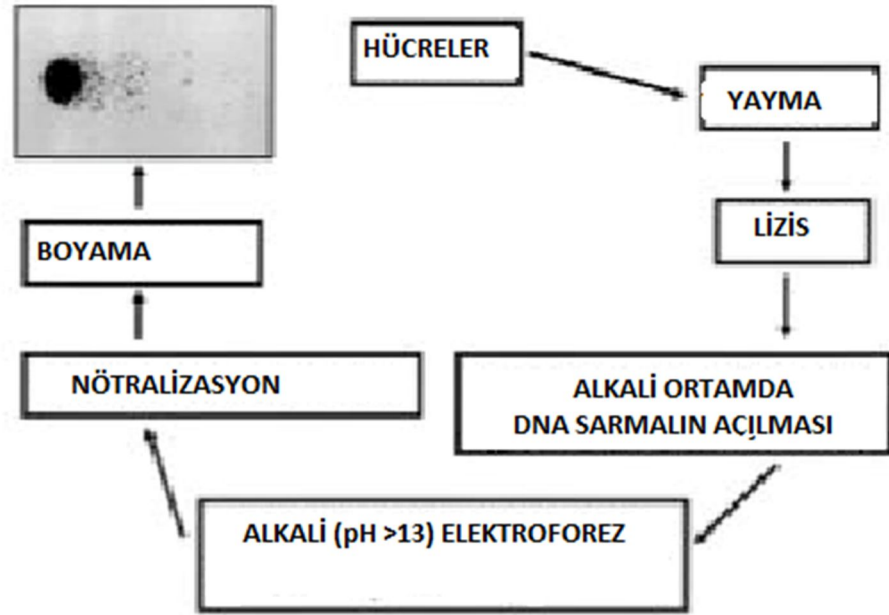
Çizelge.1.1. SCGE Yöntemiyle Farklı pH'larda Tayin Edilebilen DNA Hasar Tipleri

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

1.4.1. Comet Assay Basamakları

1. Mikroskop lamalarının hazırlanması
2. Hücresel materyalin hazırlanması
3. Yayma
4. Lizis
5. Alkali ortamda DNA süperkoil yapısının açılması(Alkali unwinding)
6. Elektroforez
7. Nötralizasyon

8. Fiksasyon
9. DNA'nın boyanması ve “comet” lerin görüntülenmesi
10. Comet sayımı ve DNA hasarının belirlenmesi



Şekil 1.7. Comet Assay Basamakları

1.4.1.1. Mikroskop Laminin Hazırlanması

Lamin itina ile hazırlanmasında en önemli amaç; çalışma tamamlanıncaya kadar jelin deforme olmamasını sağlamak ve cometlerin görüntülenmesi, sayımı ve hasar belirlenmesi sırasında temiz, net bir görüntü elde etmektir. Deneyden bir gün önce normal erime noktalı agaroz jeli mikroskop lamaları batırılıp oda sıcaklığında kurumaya bırakılır. Bu işleme ön kaplama denir.

1.4.1.2. Hücresel Materyalin Hazırlanması

Test sonuçlarının doğruluğunu ve güvenilirliğini etkileyen önemli aşamalardan biri olan hücre materyalinin hazırlanması, hücrelerin hassas bir şekilde itinayla çalışılmasını gerektirir. Kültüre edilmiş hücreler, tam kan örnekleri (polimorf lökositler, mononükleer hücre fonksiyonları), primer insan fibroblastları doku örnekleri materyal olarak kullanılabilir ve bunların her birinin hazırlanması spesifiktir.

1.4.1.3. Yayma

Hücre materyalin hazırlanması sırasında izole edilen hücreler, düşük erime noktalı agaroz ile muamele edilerek ön kaplama yapılmış ve numaralandırılmış olan lamaların üzerine yayılır. Böylece iki jel tabakası arasında gömülü hücreleri içeren sandviç benzeri bir sistem oluşturulur. Bir sonraki aşamaya için jelin donması sağlanır.

1.4.1.4. Lizis

Lizis solüsyonu hücre ve çekirdek zarını lize edip DNA sarmallarının agaroz içinde serbest kalmasını sağlamak amacıyla kullanılmakta olup lenfositler lam üzerinde agaroz jele gömüldükten sonra, slaytlar yüksek yoğunlukta tuz ve deterjan içeren taze hazırlanmış soğuk lizis solüsyonunda (2.5 M NaCl, 100 mM Na₂-EDTA, 10 mM Tris, 1% Triton X-100 ve 10% dimethyl sulfoxide (DMSO), pH 10 yaklaşık 1 saat süre ile inkübe edilir.

1.4.1.5. Alkali ortamda DNA Süperkoil Yapısının Açılması

SCGE yönteminde, DNA sarmalının çözülmesi ve elektroforez süresi, çalışılmakta olan hasar ile incelenmekte olan hücre tipine bağlı olarak değişebilmektedir. Elektroforezde yürütmeden önce DNA zincirlerinin ayrılması için slaytlar elektroforez tamponunda 20-30 dk. arasında inkübasyona bırakılırlar. Çift sarmal

DNA yapısının açılması için elektroforez çözeltisinde yüksek alkali özellikteki(pH >13) elektroforez tamponunda inkübe edilir. Bu inkübasyon döneminin amacı yüksek yoğunluklu tuzlu lizis solüsyonun DNA ile bir elektrotmuş gibi mücadele ettiği tabakadaki agardan ayrılmasını sağlamaktır.

Alkali tampon içinde, çekirdekteki çift sarmal DNA, zincir kırıklarının bulunduğu noktalardan açılmaya başlar(Yeni ve ark.,2010; Dinçer ve Kankaya,2010).

1.4.1.6. Elektroforez

Alkali ortamda DNA sarmalının açılmasından sonra, jel içinde oluşan tek zincir DNA'ya alkali koşullarda elektrik akımı uygulanır. Anoda doğru hareket eden DNA parçaları bir kuyruklu yıldız görüntüsü verir.

1.4.1.7. Nötralizasyon

Elektroforezde yürütme işlemi tamamlandıktan sonra alkali elektroforez çözeltisini slaytlardan uzaklaştırmak ve jel pH'sının nötralizasyonu için slaytlar taze hazırlanmış Tris tamponuyla (40 mM Tris, pH 7.5) her biri 5 dk olmak üzere 3 kez yıkanarak nötralizasyon sağlanır.

1.4.1.8. Fiksasyon

Nötralizasyon aşamasından sonra her biri 5 dakika olmak üzere sırayla %50, %75 ve % 100'lük alkolle yıkanır.

1.4.1.9. DNA'nın Boyanması ve "Comet" lerin Görüntülenmesi

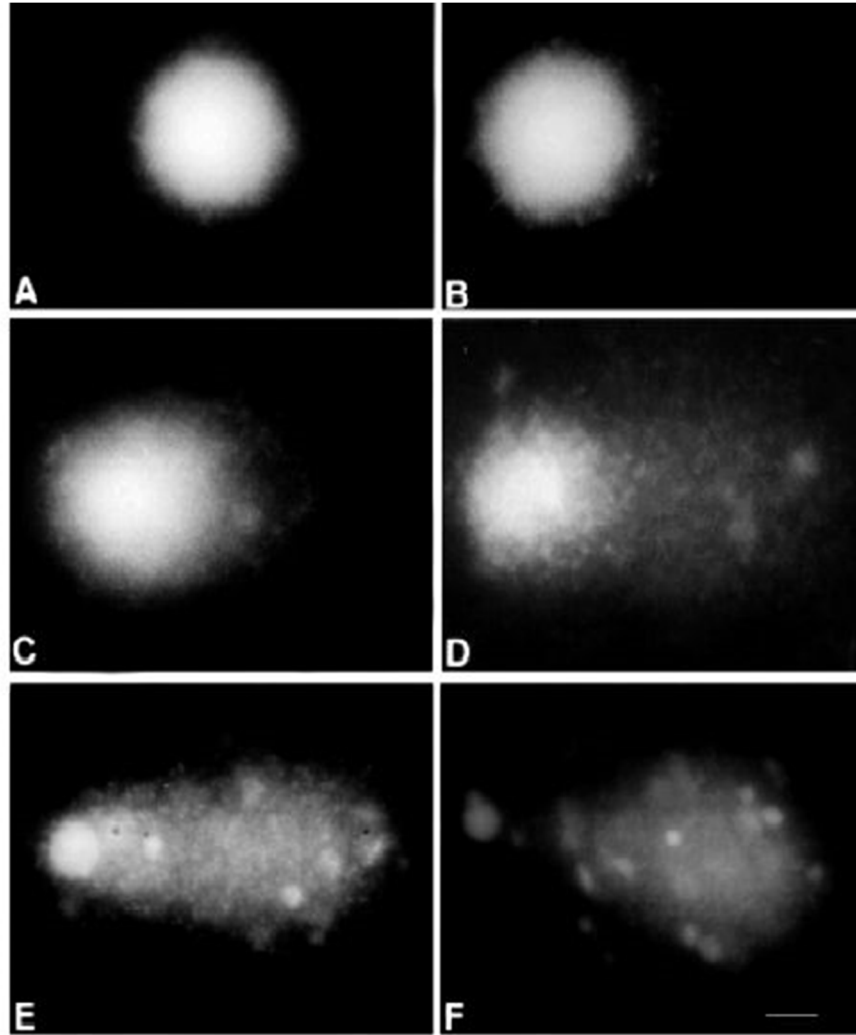
Cometlerin görüntülenmesi için yaygınlıkla kullanılan floresan boya etidyum bromürdür. Boyama sonrasında floresan mikroskopunda seçilen uygun büyütme ile

anoda doğru göç eden DNA fragmanları kuyruklu yıldız şeklinde görüntülenir. Hasarsız DNA ise spot şeklinde görülür.

1.4.1.10. Comet Sayımı ve DNA Hasarının Belirlenmesi

Comet'lerin sayılması iki farklı şekilde gerçekleştirilir.

Görsel Analiz: Farklı derecelerdeki hasarı gösteren “comet”leri insan gözü kolaylıkla ayırt eder. Görsel değerlendirmeye göre “comet”ler DNA göç uzunluğuna göre 5 kategoride tanımlanır (0-4). Sınıflandırma “comet”lerin görünümüne göre şekil.1.8’deki gibi gerçekleştirilir.



Şekil 1.8. Comet Assay Görsel Değerlendirme; A, Hasarsız, Kategori 0; B, Kategori 1; C, Kategori 2; D Kategori 3; Kategori 4 E Çok Hasarlı, F Apoptik Hücre

Parlak başlı objeler ve görünmeyen kuyruklar 0 kategorisine girer (kuyruksuz spot şeklindeki görüntüler), çok küçük başlı cometler ve uzun dağınık kuyruklar 4. Kategoriye girer, 0-4 kategorileri arasında yer alan “comet”ler kolaylıkla ayırt edilebilecek şekilde 1, 2 ve 3 kategorilerinde yer alır. Sayma işlemi için her lamda 100 comet seçilir ve herbirine içinde bulundukları kategoriye göre bir değer verilir (0,1,2,3 veya 4). Her bir kategorideki “comet” sayısı belirlenerek spesifik formüller ile DNA hasarı belirlenir.

Bilgisayarlı Görüntü Analizi Mikroskop üzerine monte edilen kapalı sistem dijital kamera bağlantısı ile otomatik olarak karakteristik “comet”lerin görüntüleri analiz edilir. Bu analizlerin yapılabilmesi için yazılım programları kullanılır. Programlar comet başını kuyruktan ayırt edebilecek ve kuyruk uzunluğu, baş ve kuyruktaki floresans yüzdesi, kuyruk momenti gibi çeşitli parametreleri belirleyebilecek özelliktedir (Dinçer ve Kankaya,2010).

1.4.2. Comet Tekniğini Etkileyen Faktörler

Comet assay tekniğinin tüm işlem basamakları azami dikkat ve özenle uygulanması, şartların stabil olması sonuçların güvenilirliği açısından kaçınılmazdır. Örneğin elektroforez şartları (süre,uygulanan voltaj, pH konsantrasyonu), lysing solüsyon şartları (tuz konsantrasyonu süre ve pH), ortamın ışık düzeyi metodun hassasiyetini etkilemektedir. Bu sebeple deneylerde koşullar standart tutulmalıdır (Dinçer ve Kankaya,2010).

1.4.3. Comet Tekniğinin Avantajları

Tek hücre düzeyinde bilgi edinilebilir.

Az sayıda hücre gerektirir.

Kolay uygulanabilir.

Hassas, güvenilir ve hızlı bir yöntemdir.

Diğer genotosisite yöntemlerinden daha ekonomiktir.

Değişik hücre ve doku gruplarına uygulanabilir (M. Valverde ve ark 2009; R. R. Tice ve ark.2000; Darragh G ve ark 2009).

1.4.4. Comet Assay İle İlgili Metodojiler

1.4.4.1. Genotoksisite Araştırmaları

Genotoksisite DNA zincir kırıkları ile karakterize olduğundan “Comet Assay” ile belirlenebilmektedir. İn vitro ve in vivo genetik toksikoloji alanında “Comet Assay” önemli uygulama alanına sahiptir. Farklı hücre dizileri ve herhangi bir ortamdan alınan hemen her tip hücre bu teknikle test edilebilmektedir. Tanımlanmış genotoksik ve mutagenik ajanların farklı hücre tipleri ve farklı dokulardaki spesifik aktiviteleri (hücreye spesifik metabolik aktivasyon ve in vitro DNA onarımı ; toksikokinetikler ve bir maddenin farklı yollarla vücuda verilmesini takiben doz-toksik yanıt ilişkisi) Comet Assay ile araştırılabildiği gibi, genotoksik etkisi henüz tam olarak tanımlanmamış olan araştırma kimyasallarının toksik etkileri ve doz toksisite ilişkisi de bu yöntemle belirlenebilmektedir.

1.4.4.2. Apoptozis Araştırmaları

Nekroz ya da apoptoz aracılı sitotoksisite nedeni ile oluşan DNA kırıkları elektroforezde DNA göçünün artmasına neden olur. Her iki durumda da çift sarmal zincir kırıkları oluşmaktadır. Apoptotik ve nekrotik hücreler nötral veya alkali ortamda uyulanacak elektroforez ile belirlenebilir. Genel olarak apoptotik hücreler küçük baş ve yelpaze şeklinde kuyruğu olan cometler; nekrotik hücreler ise geniş baş ve değişik uzunluklarda dar bir kuyruğa sahip cometler oluşturmaktadır.

1.4.4.3. Biyolojik İzleme

Comet Assay göreceli olarak kolay, ucuz, hızlı ve non-invaziv bir teknoloji olduğu ve 10-20 mikrolitre kan örneğinde uygulanabildiğinden beslenme, yaşlanma, egzersiz gibi biyolojik süreçlerin izlenmesinde, çevresel değişikliklerin canlı sistemlerdeki etkisinin belirlenmesinde, hipoksi, ozon ve kemoterapi etkilerinin değerlendirilmesinde, sperm kalitesinin belirlenmesinde tercih edilmektedir.

1.4.4.4. Antioksidan Araştırmaları

Oksidatif stresin kanser, diyabet, ateroskleroz, nörodejeneratif hastalıklar gibi çeşitli patolojilerin temelinde yer aldığının belirlenmesinden sonra araştırmalar antioksidanlar üzerinde yoğunlaşmıştır. Enzimatik ve enzimatik olmayan çeşitli antioksidanlar farklı mekanizmalarla oksidatif hasarı önlemekte, sınırlamaktadır. Antioksidan özelliği bilinen çeşitli maddelerin klinik kullanımına ilişkin çalışmalar yürütülürken bir yandan da yeni bir takım bitkisel moleküllerin antioksidan özelliği olup olmadığı araştırılmaktadır. “Comet Assay”, sayıları büyük bir hızla artmakta olan in vivo ve in vitro antioksidan çalışmalarında sıklıkla kullanılan bir yöntemdir.

1.4.4.5. Klinik Araştırmalar

“Comet Assay”ın klinik araştırmalarda kullanılması çeşitli hastalıkların patolojik mekanizmalarının aydınlatılmasına önemli katkı sağlamıştır. Bazı kalıtsal hastalıkların prenatal tanısında, kansere duyarlılığın belirlenmesinde, kanser tedavisinin takibinde, diabetes mellitus, katarakt, romatoid artrit-sistemik lupus eritematozus, polikistik over sendromu ve Alzheimer gibi hastalıklarda artmış DNA hasarı “Comet Assay” ile gösterilmiş, post menopozal kadınlarda hormon replasman tedavisi bu yöntemle incelenmiştir. Reprodüktif tedavide erkek infertilitesi söz konusu olduğunda sperm DNA’sının bütünlüğü “Comet Assay” ile test edilmiştir.

1.4.4.6. DNA Onarım Araştırmaları

Doğal DNA zincir kırıklarının yanı sıra, kesip çıkarma onarımı sırasında oluşan geçici zincir kırıkları da elektroforezde DNA göçünü artırır. DNA kesip çıkarma onarım mekanizmasının ilk basamağında spesifik bir endonükleaz hasara yakın bir bölgede DNA sarmalını keserek zincir kırığı oluşturur. Kesme işleminden sonra ortama deoksiribonkleozit trifosfatlar ilave edilip uygun sıcaklıkta inkübe edilirse onarım gerçekleşir ve kırık uçlar bağlanır. ‘‘Comet Assay’’, DNA hasarı oluşturan bir madde ile muamele edildikten sonra DNA onarım aktivitesinin belirlenmesinde de kullanılmaktadır (Dinçer ve Kankaya,2010).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereçler

2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

PBS	Sigma-Aldrich
Histopaque (lenfosit ayırma çözeltisi)	Sigma-Aldrich
Na ₂ EDTA	Merck
Sodyum lauril sarkosinat	Sigma-Aldrich
Triton X-100	Sigma-Aldrich
NaCl (Applichem)	Sigma-Aldrich
Asetik asid	Merck
LMA	Prona
NMA	Biotechnology Grade
HMA	Sigma-Aldrich
Trizma Base	Merck
NaOH	Sigma-Aldrich
DMSO	Merck
Triton X-100	Merck
Agaroz	Prona

Etidyum Bromür	Applichem
Etanol	Sigma-Aldrich
Cd Standart Çözeltilisi	AA Standart Etanol pour SCP
Nitrik asit	Merck
Ortofosforik asit	Merck
Ultra Saf Deiyonize Su	

2.1.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

Floresan Mikroskop	Olympus BX50
Yatay elektroforez cihazı	Scie-Plas
Güç Kaynağı	Bio-Rad
Otoklav	Nüve
Santrifüj cihazı	Hettich
Mikrodalga fırın	Arçelik
Hassas Terazî	Mettler Toledo 4 digit
Vorteks karıştırıcı	Biosan
1.5 ml. ve 0.2 ml'lik ependorf steril tüpler	Axygen Genuine
Pipet uçları	Finntip
(100 µl, 1000 µl, 5 ml, 10 ml)	
Otomatik mikropipet	Ependorf, Thermo,

Manyetik Karıştırıcı	Mirak
Ph metre	Seven Multi Mettler Toledo
Atomik Absorpsiyon Spektrometresi	Varian AA240Z Zeeman
Grafit Tüp Atomlaştırıcı	Varian GTA 120
Grafit Tüpleri	Varian GTA
Sample Cup 2 ml Vial	Pothtech Elkay
Mikrodalga Fırın	CEM Mars Xpres
Su Pürifikasyon Sistemi	Human UP 900 Scholar-UV
Cam Malzemeler	
Argon Tüğü	
Santrifuj	Heraeus Sepatech Labofuge 200
Etüv	Memmert
Cd Oyuk Katod Lambası	Varian
Polipropilen, Kapaklı Tüpler (50 ml' lik)	

2.1.3. Çözeltiler

2.1.3.1. PBS Çözeltisi

140 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1 mM NaH₂PO₄ ile hazırlandı.

2.1.3.2. Lizing Çözeltisi

2,5 M NaCl, 10 mM Tris, 100 mM Na₂EDTA distile suda karıştırıcı yardımı ile çözüldükten sonra pH:10'a ayarlandı. Karışıma % 1 sodyum lauril sarkosinat ilave edilerek manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı ve oda sıcaklığında saklandı.

Kullanılacağı gün taze olarak %1 triton ve % 10 DMSO ilave edildi ve +4 °C' de soğutuldu.

2.1.3.3. Elektroforez Çözeltisi

1mM Na₂EDTA ve 300 mM NaOH distile suda karıştırıcı yardımı ile çözülerek pH> 13'e ayarlandı ve +4 °C'de saklandı.

2.1.3.4.Nötralizasyon Çözeltisi

0,4 M Trizma base distile suda manyetik karıştırıcı yardımı ile çözülerek Ph: 7.5'a ayarlandı ve +4 °C'de saklandı.

2.1.3.5. Etidium Bromür Çözeltisi

200 µg /ml stok çözeltiden 100 ml hazırlandı. Oda sıcaklığında saklandı. Çözelti şişesi karanlıkta saklandı. Bu stok çözeltiden boyama esnasında 20 µg/ml hazırlanarak her bir lama 60 µL damlatılarak kullanıldı.

2.1.3.6. Düşük Erime Noktalı Agar (LMA)

% 0,63'lük çözeltisi PBS ile çözülerek hazırlandı ve +4°C'de saklandı. Deney esnasında mikrodalga fırında çözüldü ve 37°C' ye getirilerek kullanıldı.

2.1.3.7. Normal Erime Noktalı Agar (NMA)

Yüksek erime noktalı agar (HMA): %1' lik çözeltisi PBS ile çözülerek hazırlandı. Çözelti sıcak iken lamalar bu çözeltinin içine daldırılarak agar ile kaplanıp oda sıcaklığında kurutuldu.

2.1.4. Deney Protokolü

2.1.4. 1. Sıvı Kan Örneklerinin Toplanması

Çalışmaya 21-59 yaş arası, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi polikliniklerine başvuran bireylerden 4.5 ml. kan örneği heparinli vakumlu tüpler içerisine alındı ve

tüplerin üzerleri etiketlenerek comet analizi için kanlar taze çalışılıp, metal analizi için ise +4 °C’de muhafaza edildi.

Bu çalışma; Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik kurulunun 23.02.2009 tarih, 147-4532 sayılı kararı ve izni ile yürütülmüştür.

2.1.5. Yöntem

Çalışmamız iki bölümden oluşmaktadır. İlk bölümde toplumumuzda sigara içen ve sigara içmeyen bireylerin comet analizi ile DNA hasar derecesi belirlenmiş, ikinci bölümde ise hasarı belirlenmiş kan örneklerinin Cd düzeyleri ölçülerek aralarında korelasyon olup olmadığı araştırılmıştır.

2.1.5.1. Comet Assay ile Lenfosit DNA Hasarının Belirlenmesi

2.1.5.1.1. Lenfosit izolasyonu

Periferik beyaz kan hücrelerinden kolay elde edilebilmesi ve vücuttaki oksidatif stres düzeyini iyi yansıtabilmesi nedeniyle, genotoksisite çalışmalarında en çok lenfositler kullanılmaktadır.

1. Heparinli tüplerde alınan 2,5 mL periferik venöz kan steril cam tüplere alındı.
2. Kan 1:1 oranında PBS ile sulandırılıp vortex işleminden geçirildi.
3. 2 ml ficoll histopaque tüpün alt kısmına tabakalandırıldı.
4. 2000 rpm de 12 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında oluşan 3 fazdan ortadaki lenfositlerin olduğu bulutsu tabaka pastör pipet yardımıyla alındı.
5. Üzerine 8 ml PBS eklenerek santrifüj işlemi tekrarlandı.
6. Hücreler, jelde yayma işleminde kullanılmak üzere tüpün alt kısmında kalması sağlanmış oldu.

2.1.5.1.2. Preparatların Hazırlanması

1. % 1'lik normal erime dereceli agaroz ve % 1'lik yüksek erime dereceli agaroz PBS solüsyonu kullanılarak hazırlandı.
- 2.Çözelti mikro dalga fırında çözüldü.
- 3.Lamlar hazırlanan çözeltiye batırılıp çıkarılarak tek yüzünün kaplanması sağlandı
4. Üzerleri kaplanan lamlar oda sıcaklığında bir gece kurumaya bırakıldı.

2.1.5.1.3. Lamların Jelle Kaplanması

Hücrelerin gömülmesi ve elektroforetik göçe hazırlık amacıyla,

1. Steril bir eppendorf tüpte 100mikrolitre LMA (37°C) içine 50 mikrolitre hücre eklendi.
2. Pipetaj yapılarak homojen karışımları sağlandı.
3. Mikropipet yardımıyla lam üzerine nazikçe damlatıldı lamelle kapatılarak yayma işlemi gerçekleştirildi.
4. Buz üzerinde 5-10 dakika katılaşması sağlandıktan sonra lameller yavaşça kaldırılarak lizing çözeltisine aktarıldı.

2.1.5.1.4. Lizis

- 1.Lizis solüsyonuna %1'lik triton X ve %10 DMSO kullanmadan hemen önce ilave edilerek taze solüsyon elde edildi.
- 2.Preparatların üzeri bu solüsyon ile kaplanarak buzdolabına kaldırıldı. 1 saat lizis solüsyonunda bekletildi.

2.1.5.1.5. Elektroforez

DNA kırıklarının görünür hale getirmek için elektroforetik yürütme işlemi uygulandı.

1. Taze hazırlanmış elektroforez tamponu, kullanılmadan önce buzdolabında soğutuldu.
2. Çözelti elektroforez tankına aktarıldı.

3. Lamlar artı kutba ve birbirlerine mümkün olduğunca yakın olacak şekilde elektroforez tankına yerleştirildi.
4. Tampon içinde lamlar DNA unwinding (çift sarmal DNA'nın tek sarmala dönüşmesi) için 20 dakika süreyle bekletildi.
5. Bu esnada direk ışıktan kaçınmak amacıyla tankın kapagı kapalı tutulup alüminyum folyo ile kaplandı.
6. Güç kaynağı 300 mA, 25 volta ayarlanarak 20 dakika süreyle elektroforetik yürütme işlemi gerçekleştirildi.

2.1.5.1.6. Nötralizasyon

Oluşan kimyasal reaksiyonu stabilize etmek ve fazla tuz ve deterjanı uzaklaştırmak amacıyla yapılır.

Bir penset yardımıyla tanktan çıkarılan lamlar, pH'ı 7.5 olan 4°C'deki nötralizasyon tamponunda 5'er dakika süreyle 3 kez yıkandı.

2.1.5.1.7. Fiksasyon

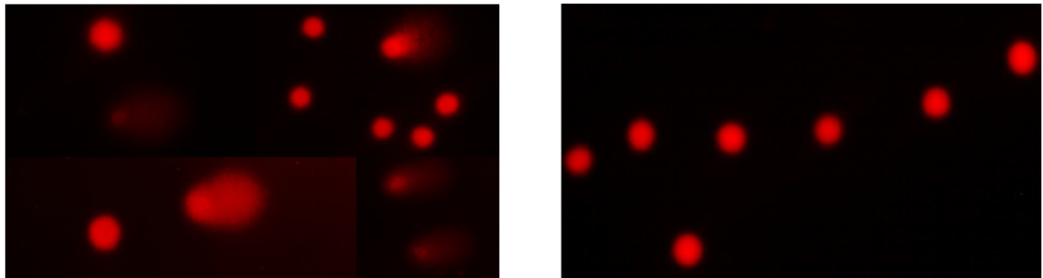
Lamlar sırasıyla % 50, % 75, % 100'lük alkollerde 5'er dakika bekletildi.

2.1.5.1.8. Boyama

Stok çözeltiden 20 µg/ml çözelti hazırlandı ve her bir lama 60 µL damlatılarak kullanıldı.

2.1.5.1.9. Görüntüleme

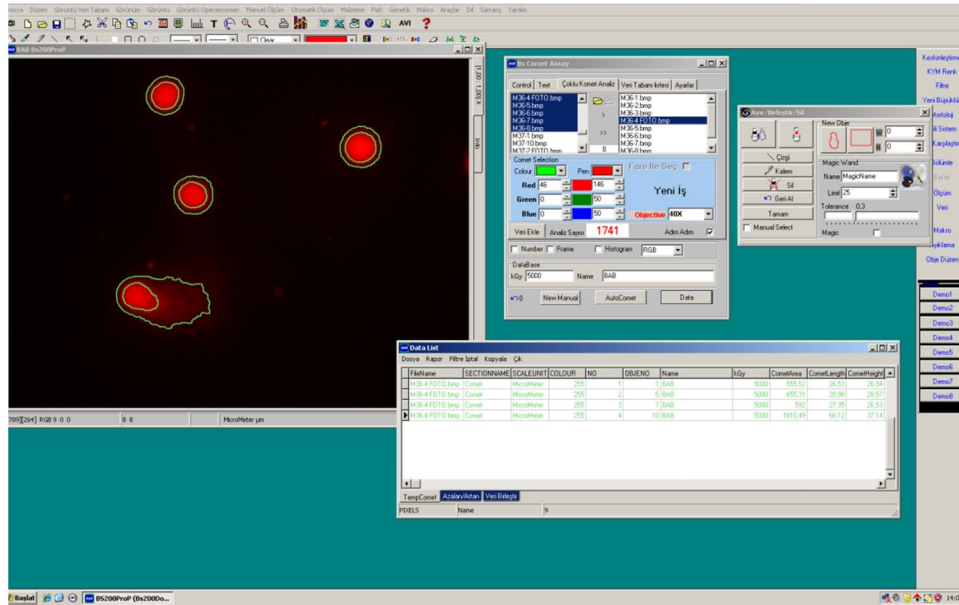
Boyanan preparatlar floresan mikroskopta incelendi.



Şekil 2.1. Comet Görüntüsü

2.1.5.1.10. Sayım ve Hesaplama

Her bir örnek için 50 comet sayılıp, BAB Bs otomatik analiz sistem ile 9 parametreye[comet length (CL), comet intensity (CI), head length (HL), head intensity (HI), tail length (TL), tail intensity (TI), DNA tail (DNAt), tail moment (TM) and olive tail moment (OTM)]göre hasar derecesi belirlendi.



Şekil 2.2. BAB Bs Otomatik Analiz Sistemi

2.1.5.2. Sıvı Kan Örneklerindeki Cd Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Sıvı kan örneklerindeki Cd konsantrasyonu belirlemek amacıyla Atomik Absorbsiyon Spektroskopisi (AAS) kullanıldı.

Grafit fırınlı atomik absorbsiyon spektroskopisi (GFAAS) ile numune sıcaklığı basamaklı olarak elektrik enerjisiyle artırılarak kurutma işlemi yapılır, ardından külleme işlemiyle numunedeki matriks uzaklaştırılır ve atomizasyonla element serbest atomlarına ayrılır. Metodun prensibi; yüksek sıcaklıkta gaz halinde bulunan element atomlarının elektromanyetik ışınları (genellikle görünür alan ve UV ışınlarıdır) absorblaması temeline dayanır.

Bir atomik absorbsiyon spektroskopisi şu kısımlardan oluşur:

- İstenilen dalga boyunda ışık verebilen bir ışık kaynağı,
- Atomlaştırma (Atomizasyon kısmı),
- Dalga boyu seçicisi (Monokromator),
- Elektrik sinyalleri alan kısım (Fotodedektör),
- Elektronik okuma sistemi.

2.1.5.2.1. Cd konsantrasyonunun Belirlenmesi

Tam kan örneklerinden 1'er ml alınarak üzerine 9 ml % 65 'lik HNO₃ eklenerek mikrodalga fırına ait yüksek ısıya dayanıklı teflon tüplere kondu. Yakma işlemine ait mikrodalga fırın programı Çizelge 2.1.'de gösterilmiştir. Asitle yakılan kan örnekleri kapaklı 50 ml'lik polipropilen tüplere alınarak toplam hacim deiyonize su ile 20 ml'ye tamamlandı. Karışım vorteksle karıştırıldıktan sonra örnekler analiz işlemine kadar kapaklı polipropilen tüplerin içinde, +4 °C' de saklandı.

Çizelge 2.1. Mikrodalga fırına ait tam kan yakma programı.

Max. Güç (Watt)	Güç %	Zaman (dak.)	Sıcaklık (°C)	Bekleme (dak.)
800	100	15:00	200	5:00

Kandaki Cd konsantrasyonunu belirlemek amacıyla, Varian AA240Z Zeeman Atomik Absorbsiyon Spektroskopisi cihazı kullanıldı. 1000 ppm'lik ana Cd stoğundan 2 ppb'lik ara stok hazırlanarak cihaza verildi, böylece bu stoktan analizlerde kullanılmak üzere 0,2 ppb, 0,4 ppb ve 0,8 ppb'lik standartların cihaz tarafından hazırlanması sağlandı. Hazırlanan standartlara ve ultra saf suya kontaminasyonun önlenmesi ve keskin bir pik elde edilebilmesinin sağlanması için %65 saflıkta nitrik asit eklendi.

Kalibrasyon eğrisi için her bir standart çözelti için 3 kez ölçüm yapıldı. Kadmiyum analizi için dalga boyu 228,8 nm olarak ayarlandı. Ölçüm kalibrasyon

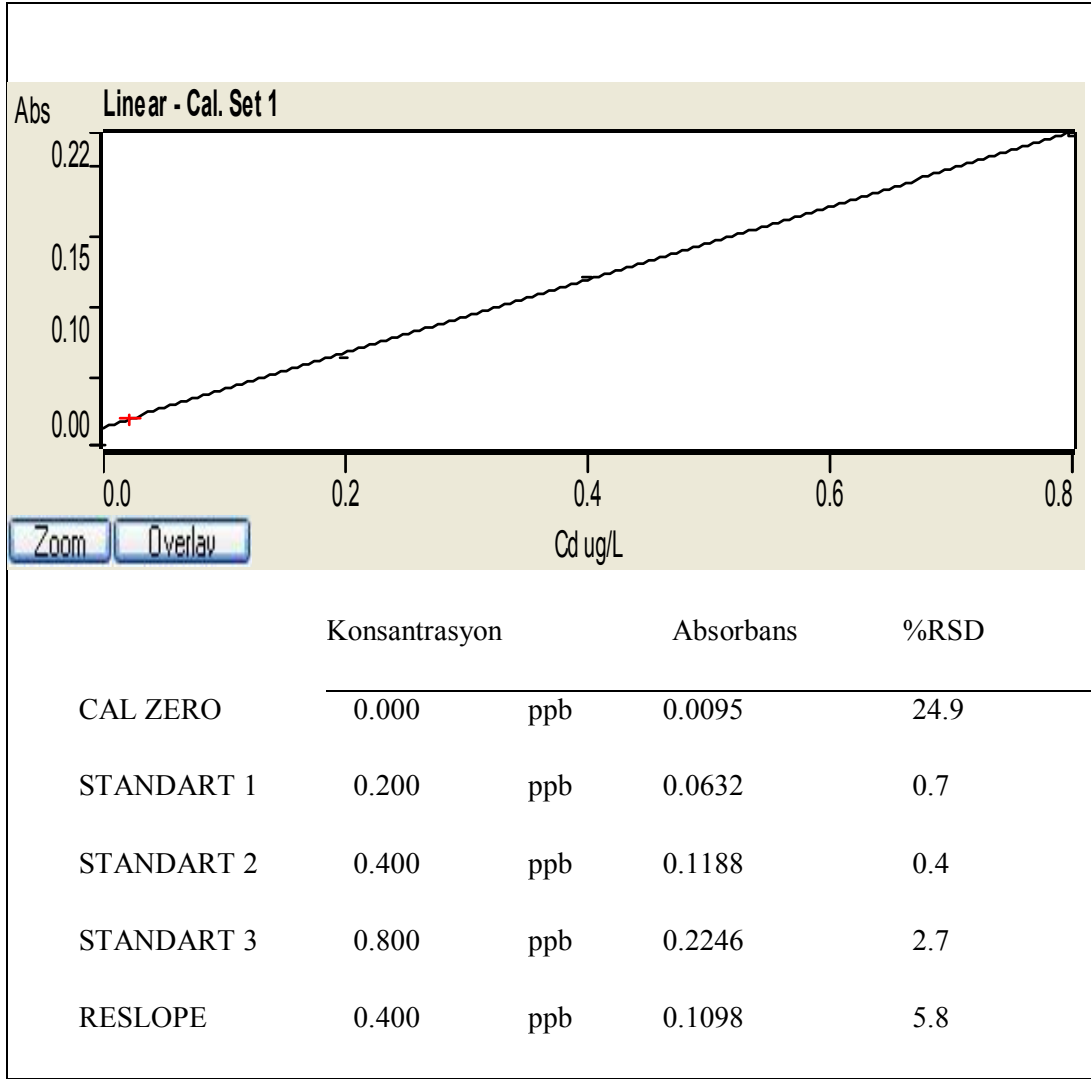
eğrisi için konsatrasyon, kan örnekleri için pik yüksekliği ile yapıldı. Kalibrasyon 50 örnekte bir tekrarlandı. Örnekler için ise 3 kez ölçüm yapıldı.

Atomlaştırıcı olarak grafit fırın ve ortam gazı olarak Argon kullanıldı. Absorbans verisi 1700⁰C’de toplandı. Matriks modifier olarak %1’lik amonumdihirojen fosfat solüsyonu kullanıldı. Toplam enjeksiyon hacmi 25µl olacak şekilde ana standart seyreltilerek, matriks modifier eklendi.

Kadmiyum analizine ait grafit fırın sıcaklık program Çizelge 2.2.’de, örnek kalibrasyon grafiği Şekil.2.3. ’de verilmiş ve cihaza ait metod ayrıntıları Çizelge ’de özetlenmiştir.

Çizelge 2.2. Sıvı Kan Örneklerinden Kadmiyum Analizine Ait Grafit Fırın Sıcaklık Programı

Basamak	Sıcaklık (°C)	Süre (sn)	Gaz akışı (L/dak)	Okuma	Sinyal Toplama
1	85	5	0.3	----	----
2	95	40	0.3	----	----
3	140	20	0.3	----	----
4	300	10	0.3	----	----
5	450	5	0.1	----	----
6	450	5	0.1	----	----
7	650	10	0.3	----	----
8	650	10	0.3	----	✓
9	650	1	0.0	✓	✓
10	1750	1	0.0	✓	✓
11	1750	1	0.3	✓	✓



Şekil 2.3. Tam Kanda Kadmiyum Analizine Ait Örnek Kalibrasyon Grafiği

Çizelge 2.3. Grafit Fırnlı Atomik Absorpsiyon Spektrometre Cihazında Kadmiyum Analizi İçin Tam Kanda Uygulanan Metot

Element - matriks	: Cd –Tam Kan
Enstrüman	: Zeeman
Konsantrasyon birimi	: µg /L
Enstrüman modu	: Absorbans
Örnekleme	: Otonormal
Kalibrasyon modu	: Konsantrasyon

Ölçüm modu	: Pik yüksekliği
Standart tekrarı	: 3
Örnek tekrarı	: 3
Ekspansiyon faktör	: 1.0
Eğri çizimi	: 7 noktalı
Konsantrasyon ondalık aralığı	: 2 basamak
Dalga boyu	: 228.8 nm
Slit genişliği	: 0.5 nm
Gain	: % 58
Akım	: 4 mA
Background	: BC on
Standart 1	: 0.2 µg /L
Standart 2	: 0.4 µg /L
Standart 3	: 0.8 µg /L
Reslope	: 25 örnekte bir
Reslope standardı	: Standart 2
Reslope alt limit	: % 75
Reslope üst limit	: % 125
Rekalibrasyon	: 50 örnekte bir
Kalibrasyon algoritması	: New Rational
Total enjeksiyon hacmi	: 25 µl
Ana standart konsantrasyonu	: 2 µg /L

2.1.6. İstatistiksel Analiz

Tüm istatistiksel analizlerde SPSS V16 kullanılmıştır. İkili grupların karşılaştırılmasında Student-T testi, ikiden fazla grupların karşılaştırılmasında one way anova testi(tek yönlü varyans analizi) kullanılmıştır. Datalar ortalama standart sapma (ortalama $\pm$ S.S), minimum ve maksimum değerleri kullanılarak verilmiştir. Ölçümle elde edilen sonuçların korelasyonu, Pearson korelasyon analizi ile karşılaştırıldı. $p<0,05$ ve $p<0,01$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3. BULGULAR

Çalışmaya 21-59 yaş arası, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi polikliniklerine başvuran bireyler deney grubu olarak alındı. Tam fizik muayene ve aynı metotla çalışılmış rutin laboratuvar sonuçlarıyla değerlendirilmiş aynı yaş grubundan seçilen kronik hastalığı bulunmayan bireyler, sigara içen ve içmeyen olmak üzere iki gruba ayrılarak kontrol grubu olarak alındı. Bu çalışmada, toplam 120 bireyden kan toplanarak aynı gün analiz edildi. Bu bireylerin yaş ortalamaları 33.32 ± 8.38 ve yaş aralığı 21 ile 59 arasında bulundu. Çalışmaya 60 sigara içen (30 kadın ve 30 erkek) ve 60 kontrol grubu bireyleri (30 kadın ve 30 erkek) dahil edildi. Çalışmada her gönüllü için belirlenen sağlık sorunu yanında; yaş, cinsiyet, meslek, yaşadıkları bölge, sigara kullanımı ve süresi kaydedildi. Bu örneklerde kandaki DNA hasarı ve Cd düzeyleri belirlendi. Ayrıca, gruplar cinsiyete, yaşa, yaş gruplarına ve sigara indekslerine (SI) göre istatistiksel açıdan değerlendirildi.

3.1. Ölçülen Parametrelerin Tanımlayıcı İstatistikleri

Çalışılan kan örneklerinde Comet parametreleri ve Cd konsantrasyonları için elde edilen ortalama, standart sapma, minimum ve maksimum değerleri hesaplanarak Çizelge 3.1.'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Comet Parametreleri ve Cd Konsantrasyonlarının Ortalama, Standart Sapma, Minimum ve Maksimum Değerleri.

	n	Ortalama	S. Sapma	Minimum	Maksimum
Comet Length	120	26,06	3,39	14,05	37,75
Comet Intensity	120	58019,53	18797,35	32859,00	148116,00
Head Length	120	16,09	1,72	9,27	21,06
Head Intensity	120	84366,74	15977,59	39234,00	129995,00
Tail Length	120	5,20	1,15	2,50	10,58
Tail Intensity	120	37980,31	8099,62	15399,00	68610,00
Tail Moment	120	3,40	0,59	1,88	5,10
Olive Tail Moment	120	495,80	457,91	11,70	2591,34
Cd (ppb)	120	1,21	1,42	0,10	13,10

3.2. Sigara İçimi ile Cd Düzeyi ve Comet Parametreleri arasındaki ilişki

Sigara içen ve içmeyen gruplardaki Cd düzeyleri ile 9 comet parametresi arasındaki ilişki istatistiksel olarak hesaplanmış ve sonuçlar sonuçlar çizelge 3.2’ de gösterilmiştir.

Sigara içen ve kontrol grubu arasında, Cd düzeyi, CI, TL ve OTM comet parametreleri açısından istatistiksel olarak oldukça anlamlı ilişki bulunmuştur ($p < 0,05$), ancak diğer comet parametreleri arasında (CL, HL, HI, TI, DNAt ve TM) istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır ($p > 0,05$).

Çizelge 3.2. Sigara İçen ve İçmeyenlerde Cd ve Comet Parametreleri İstatistikleri

	Kontrol grubu n=60 (Ort. ± S. S.)	Sigara İçen Grubu n=60 (Ort. ± S. S.)	p
Cd (ppb)	0,64±0,47	1,77±1,78	<0,01*
Comet Length	25,53±1,26	26,60±4,59	>0,05
Comet Intensity	53581,33±3952,60	62457,73±25631,69	<0,01*
Head Length	16,01±0,74	16,17±2,32	>0,05
Head Intensity	83080,74±5916,58	85652,73±21829,43	>0,05
Tail Length	4,94±0,32	5,47±1,55	<0,01*
Tail Intensity	37624,85±3779,95	38335,78±1085,39	>0,05
DNA Tail	78,83±7,88	72,02±25,71	>0,05
Tail Moment	3,39±0,29	3,40±0,79	>0,05
Olive Tail Moment	603,83±513,90	387,77±367,54	<0,01*

3.3. Sigara İçiminin Kadın ve Erkek GruplarındaCd Düzeyine ve Comet Parametrelerine Etkisi

Çalışmadaki kadın ve erkek gruplar, sigara içen ve kontrol grubu olarak ayrılarak, Cd düzeyi ve 9 comet parametresi açısından istatistiksel olarak değerlendirme yapılmış ve sonuçlar, çizelge 3.3’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.3. Sigara İçen ve İçmeyen Kadın ve Erkek Gruplarında Cd ve Comet Parametreleri Arasındaki İlişki.

	Kadın			Erkek		
	Kontrol grubu (Ort. $\pm$ S. S.) (n =30)	Sigara İçen Grubu (Ort. $\pm$ S. S.) (n=30)	p	Kontrol grubu (Ort. $\pm$ S. S.) (n =30)	Sigara İçen Grubu (Ort. $\pm$ S. S.) (n=30)	p
Cd	0,59 $\pm$ 0,41	1,98 $\pm$ 2,30	<0,05*	0,69 $\pm$ 0,53	1,56 $\pm$ 1,04	<0,01**
Comet Length	25,48 $\pm$ 1,31	27,66 $\pm$ 4,15	<0,01**	25,58 $\pm$ 1,22	25,54 $\pm$ 4,83	>0,05
Comet Intensity	53518,84 $\pm$ 4453,24	65944,78 $\pm$ 24412,60	<0,01**	53643,82 $\pm$ 3456,20	58970,68 $\pm$ 26748,63	>0,05
Head Length	15,90 $\pm$ 0,70	16,97 $\pm$ 2,07	<0,01**	16,11 $\pm$ 0,77	15,36 $\pm$ 2,31	>0,05
Head Intensity	81501,92 $\pm$ 6123,98	93780,03 $\pm$ 21551,04	<0,01**	84659,56 $\pm$ 5344,03	77525,44 $\pm$ 19192,99	>0,05
Tail Length	4,97 $\pm$ 0,34	5,60 $\pm$ 1,40	<0,01**	4,91 $\pm$ 0,29	5,33 $\pm$ 1,70	>0,05
Tail Intensity	36483,84 $\pm$ 3376,3	41573,08 $\pm$ 9035,40	<0,01**	38765,86 $\pm$ 3869,83	35098,48 $\pm$ 11674,27	>0,05
DNA Tail	76,59 $\pm$ 6,93	75,31 $\pm$ 27,10	>0,05	81,08 $\pm$ 8,24	68,74 $\pm$ 24,24	<0,05*
Tail Moment	3,31 $\pm$ 0,26	3,59 $\pm$ 0,70	<0,05*	3,47 $\pm$ 0,30	3,21 $\pm$ 0,84	>0,05
Olive Tail Moment	499,46 $\pm$ 441,17	348,79 $\pm$ 294,10	>0,05	708,21 $\pm$ 565,80	426,76 $\pm$ 430,33	<0,05*

Sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildiğinde;

Kadınlarda, sigara içen ve kontrol grubu arasında CL, CI, HL, HI, TL ve TI comet parametreleri açısından oldukça anlamlı ($p<0,01$), Cd düzeyi ve TM parametreleri açısından anlamlı bir ilişki bulunurken ($p<0,05$), DNAt ve OTM parametrelerinde anlamlı bir ilişki tespit edilememiştir ($p>0,05$).

Erkeklerde, sigara içen ve kontrol grubu arasında sadece Cd düzeyi açısından istatistiksel olarak oldukça anlamlı ($p<0,01$), DNAt ve OTM parametreleri açısından anlamlı bir ilişki bulunurken ($p<0,05$), diğer comet parametreleri açısından anlamlılık bulunamamıştır ($p>0,05$).

[illegible]

3.5. Comet Parametreleri, Cd Düzeyi ve Yaş Arasındaki Korelasyon Sonuçları

Comet parametrelerini kendi arasında korelasyon açısından değerlendirilip istatistikleri yapılmıştır ve Çizelge 3.5’de gösterilmiştir. Ayrıca, comet parametreleri ile bireylerin Cd düzeyleri ve yaşları arasında da korelasyon analizleri yapılmıştır.

Çizelge 3.5. Comet Parametrelerini Kendi Arasında Korelasyon İstatistikleri Sonuçları

Comet parameters								
Comet Length	Comet Length							
Comet Intensity	p<0,01*	Comet Intensity						
Head Length	p<0,01*	p<0,01*	Head Length					
Head Intensity	p<0,01*	p<0,01*	p<0,01*	Head Intensity				
Tail Length	p<0,01*	p<0,01*	p<0,01*	p<0,01*	Tail Length			
Tail Intensity	p<0,01*	p<0,01*	p<0,01*	p<0,01*	p<0,01*	Tail Intensity		
DNA Tail	p<0,01*	p<0,01*	p>0,05	p>0,05	p<0,01*	p<0,01*	DNA Tail	
Tail Moment	p<0,01*	p>0,05	p<0,01*	p<0,01*	p>0,05	p<0,01*	p<0,01*	Tail Moment
Olive Tail Moment	p<0,01*	p<0,01*	p>0,05	p>0,05	p<0,01*	p>0,05	p<0,01*	p<0,01*

Çalışmada ölçülen 9 comet parametresinin birbiri ile korelasyonu hesaplanmış ve istatistiksel olarak oldukça anlamlı korelasyon tespit edilmiştir (p<0,01). Bu da bize çalışmada kullandığımız comet parametrelerinin kendi aralarında sıkı bir ilişki içerisinde olduğunu göstermektedir. Ayrıca çalışmada, comet parametreleri ile bireylerin Cd düzeyleri ve yaşları arasında da korelasyon analizleri yapılmış ancak istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon bulunamamıştır (p>0,05),

4. TARTIŞMA

Sigara, polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH), aromatik aminler, N-nitrozaminler, aldehitler, gibi zararlı maddelerin ana sınıfını oluşturan pek çok karsinojen maddeyi içerdiği bilinmektedir (Hecht, 1999; Stabbert ve ark., 2003). Sigara içerdiği serbest radikaller membran lipidlerinin peroksidasyonunu, fonksiyonu olmayan oksitlenmiş proteinlerin birikmesini ve DNA hasarının artmasını tetikler (Fenger ve ark., 1998; Wetscher ve ark., 1995; Pryor ve ark. 1983, 1998).

Sigarada birçok kimyasalın yanı sıra ağır metaller de bulunmaktadır (Kalcher ve ark. 1993). Bu metaller arasında kadmiyumun sigara kullananların kanlarındaki düzeyinin yüksek bulunduğu birçok çalışmada gösterilmiştir (Mortada ve ark. 2004, Brockhaus ve ark. 1983). İntresellüler Cd, DNA tek zincir kırılmalarını ve membran bütünlüğünün yanı sıra proteinleri, nükleik asitlerin sentezini ve DNA onarım sistemini inhibe ettiği bilinmektedir (Jin, ve ark., 2003; Mitra, 1984; Rosen, ve ark., 2002; Stohs, 1995).

DNA hasar düzeyi ölçümünün yanı sıra sigara kullanımı, alkol içiciliği vb. gibi yaşam şartlarını bilmek önemlidir. Bu parametrelerin her biyoizleme çalışmasında dikkate alınması gerekir. Bu nedenle çalışmamızda Comet assay tekniği kullanılarak sigara ile DNA hasarı arasındaki ilişki incelenmiştir.

Comet yöntemi, yaşam şartları, meslek ve çevresel faktörlerin sebep olduğu insan genotoksisite biyoizleme çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Pandey ve ark., 2005). Teknik jel içindeki çekirdek DNA'sının elektroforez sırasında tek ve çift zincir kırıklarına ve genotoksik hasarın sebep olduğu göçe dayandığı düşünülmektedir. Pek çok çalışmada sigara kullanımı ile DNA göçünün arttığı bulunmuştur (Tice, 1995; Collins ve ark., 1995; Speit ve ark., 2002; Hininger ve ark., 2004) ve sonuçlarımız bu bulgularla tutarlıdır. Alkali comet yöntemiyle bazı insan biyoizleme çalışmalarında sigara alışkanlığı ve DNA hasarı arasındaki ilişki anlamlı bulunmuştur (Faust ve ark., 2004). Ancak bazı çalışmalar sigara içen ve içmeyen bireyler arasında DNA hasarının farklı olmadığını göstermiştir. Bu çalışmalarda, eski içiciler sigara içmeyen bireyler olarak referans edilmesiyle ya da

örnek sayısının az olmasıyla ilişkilendirilmiştir (Stabbert ve ark, 2003; DeMarini, 2004).

Giovannelli ve arkadaşları çalıştıkları örneklerde az miktarda sigara kullananlar (16.9%) olması sebebiyle sigara kullanımı ve DNA oksidasyon arasında bir ilişki bulamamışlardır. (Giovannelli ve ark., 2002).

Önceki çalışmalarda DNA göç artışının yaşlanma ile ilişkilendirilmesi önerilmiştir (Tice ve ark., 1985; Singh, 1990). Singh ve arkadaşları DNA hasarının yaşlanmayla anlamlı derecede farklılık bulmasına rağmen, DNA hasar derecesinin yalnızca biraz arttığını gözlemlemiştir (Singh ve ark., 1991). Biz çalışmamızda comet parametreleri ile yaş arasında anlamlılık bulmadık. Ancak bu durum örneklerimizde yaş aralığının az olmasından kaynaklanabilir.

Sigara kullananların kanlarında kadmiyum düzeyinin yüksek olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir (Mortada ve ark. 2004, Brockhaus ve ark. 1983) ve sonuçlarımız bu çalışmalarla tutarlıdır.

Kim ve arkadaşları yaptıkları çalışmada ağır sigara içenlerin kanlarındaki kadmiyum konsantrasyonunun sigara içenlere ve içmeyenlere göre yüksek derecede anlamlı bulmuşlardır (Kim ve ark.,2010). Bu çalışmada ise, sigara içen bireyleri ağır içiciler ve hafif içiciler olarak ayrılıp değerlendirildiğinde, kan kadmiyum düzeyinin ağır içiciler grubunda fazla olduğu gözlemlendi ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Bu durum sigara içen bireyler gruplandırıldığında ağır içici olan bireylerin sayısının az olmasından kaynakladığı söylenebilir

Sigara, çevresel kadmiyum maruziyetinin en büyük kaynaklarından biridir. Yapılan çalışmalar kadınların erkeklere göre çevresel kadmiyuma daha çok maruz kaldığını göstermişlerdir (Olsson ve ark.,2002; Satarug ve ark.,2004). Biz çalışmamızda sigara içen bireyleri kadın ve erkek olarak gruplandırdığımızda kadınların erkeklere oranla kandaki kadmiyum düzeylerinin daha yüksek olduğunu gözlemledik ve istatistiksel olarak anlamlı bulduk. Yetersiz beslenmenin sebep olduğu demir ve kalsiyum alım eksikliği, kadınların vücutlarında daha çok kadmiyum birikimine yol açtığına inanılmaktadır (Akesson ve ark.,2005;Berglund ve

ark.,1994;Diamond ve ark., 2003). Ancak çalışmamızda sigara içmeyen grupta erkeklerin kadınlara oranla kadmiyum maruziyetinin fazla olduğunu bulduk.

Bu çalışmada, sigara içen ve içmeyen bireylerde oksidatif hasarın fazla olduğu lenfosit hücrelerin DNA zincir kırılmaları comet yöntemi kullanılarak gözlemlenmiştir.

Sigara içen içmeyen kadın ve erkek grupları dokuz comet parametresiyle değerlendirilmiştir ve dokuz parametrenin yedisinde sigara içen ve içmeyen kadın gruplarında istatistiksel olarak anlamlılık bulunmuş, erkek bireylerde sigara içen ve içmeyen gruplarda yalnızca iki parametrede istatistiksel olarak anlamlılık bulunmuştur. Ancak sigara içen kadınların erkeklere oranla DNA hasarının altı comet parametresiyle istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Ayrıca çalışmamızda Cd düzeyleri ve comet parametreleri, sigara içen ve içmeyen kadın gruplarda TM parametresi ile erkeklerde ise DT ve OTM parametrelerinde istatistiksel olarak anlamlılık gözlenmiştir

Çalışmamızın sonuçlarına göre, sigara kullanımının sebep olduğu DNA hasarına karşı kadınların daha duyarlı olduğu düşünülebilir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışma 21-59 yaş arası, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi polikliniklerine başvuran sigara içen ve içmeyen toplam 120 bireylerden alınan kanlardan yapılmıştır. Tam fizik muayene ve aynı metotla çalışılmış rutin laboratuvar sonuçlarıyla değerlendirilmiş aynı yaş grubundan seçilen kronik hastalığı bulunmayan bireyler, sigara içen ve içmeyen olmak üzere iki gruba ayrılarak çalışılmıştır. Çalışmaya 60 sigara içen (30 kadın ve 30 erkek) ve 60 kontrol grubu bireyleri (30 kadın ve 30 erkek) dahil edilmiştir. Ayrıca, gruplar cinsiyete, yaşa, yaş gruplarına ve sigara indekslerine (SI) göre istatistiksel açıdan değerlendirilmiştir. Bu örneklerin kanındaki DNA hasarı ve kan Cd düzeyleri belirlendi. Bu çalışmada, sigara içen ve içmeyen bireylerde oksidatif DNA hasarının fazla olduğu lenfosit hücrelerin DNA zincir kırılmaları comet yöntemi kullanılarak gözlemlenmiştir. Kandaki kadmiyum düzeyini belirlemede ise grafit fırın atomik absorpsiyon spektroskopisi cihazı kullanılmıştır.

Çalışma sonucunda, DNA hasar derecesi 9 comet parametresine göre değerlendirilmiştir. Sigara içen ve içmeyen gruplarda Cd düzeylerine ve CI, TL and OTM gibi comet parametrelerine göre istatistiksel olarak çok anlamlı bulunmuştur ($p<0,01$), bununla birlikte diğer comet parametreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Sigara içen bireyleri cinsiyete göre ayırıp sonuçları değerlendirdiğimizde ise sigara içen kadınlarda içmeyenlere göre CL, CI, HL, HI, TL, TI comet parametreleri çok anlamlı ($p<0,01$), bunula birlikte Cd düzeyi ve TM parametresi ise istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Buna karşın, sigara içen erkekler ile içmeyenler karşılaştırıldığında, sadece Cd düzeyi, DT ve OTM comet parametrelerine göre istatistiksel olarak anlamlılık bulunmuştur ($p<0,05$). Korelasyon açısından değerlendirildiğinde, Cd düzeyi ile yaş ve comet parametreleri arasında anlamlılık bulunmazken ($p>0,05$), comet parametrelerinin kendi arasında istatistiksel olarak çok anlamlı sonuçlar bulunmuştur ($p<0,01$). Sigara indeksine göre değerlendirildiğinde, kadın bireylerde TM comet parametresine göre, erkek bireylerde ise CL, HL, HI, TI and OTM parametrelerine göre istatistiksel olarak

anlamlılık bulunmuştur. Ayrıca, yaş, Cd düzeyi ve comet parametrelerinin korelasyonunda ise her hangi bir istatistiksel anlamlılık bulunamamıştır ($p>0,05$).

Çalışmamızın sonuçlarına göre, sigara kullanımının sebep olduğu DNA hasarına karşı kadınların daha duyarlı olduğu düşünülebilir.

Sonuç olarak; sigara kullanımı ve comet assay çalışması daha önce araştırmacılar tarafından yapılmıştır ancak farklı sonuçlar bulunduğu gözlenmektedir. Dolayısıyla sigara kullanımının lenfosit DNA hasarı üzerine etkisini her araştırmacı farklı değerlendirmiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda, alınan örneklerin cinsiyete göre ayrılması, sigara içen ve kontrol grubu sayılarının eşit olmaması sonuçların farklı olmasına ve farklı yorumlara neden olmuştur. Yaptığımız çalışma, bu farklılıkların nedenlerini göstermeye yardımcı olmuştur. Ayrıca sigara ile lenfosit DNA hasarı arasındaki ilişki ilk kez 9 comet parametresine göre değerlendirilmiştir. Comet assay çalışması, biyoizleme ve pek çok alanda DNA hasar derecesinin ölçülmesinde kullanılan bir yöntemdir. Bu çalışma, yapılacak comet assay çalışmaların sonuçları değerlendirilirken sigara kullanımının dikkate alınması gereken, önemli verilerden biri olduğunu göstermektedir.

Bunun yanı sıra sigara ve sigarada bulunan ağır metallerden olan kadmiyumun DNA hasarı ile ilişkisi ilk kez bu çalışmada gösterilmiştir. Bundan sonraki çalışmalarda sigara kullanan bireylerin kanlarındaki diğer ağır metal düzeyleri ölçülerek DNA hasar derecesine etkisi araştırılması planlanmaktadır.

ÖZET

Sigara Kullananlarda Kan Kadmiyum Düzeyi ve Lenfosit DNA Hasarının Belirlenmesi

Çalışmamızın amacı, kan kadmiyum düzeyini belirlemek ve sigaranın lenfosit DNA hasarına etkisini araştırmak ve sigaranın potansiyel genotoksik etkisini comet assay ile analiz etmektir.

Çalışma sonucunda, DNA hasar derecesi 9 comet parametresine göre değerlendirilmiştir. Sigara içen ve içmeyen gruplarda Cd düzeylerine ve CI, TL and OTM gibi comet parametrelerine göre istatistiksel olarak çok anlamlı bulunmuştur ($p<0,01$), bununla birlikte diğer comet parametreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Sigara içen bireyleri cinsiyete göre ayırıp sonuçları değerlendirdiğimizde ise sigara içen kadınlarda içmeyenlere göre CL, CI, HL, HI, TL, TI comet parametreleri çok anlamlı ($p<0,01$), bunula birlikte Cd düzeyi ve TM parametresi ise istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Buna karşın, sigara içen erkekler ile içmeyenler karşılaştırıldığında, sadece Cd düzeyi, DT ve OTM comet parametrelerine göre istatistiksel olarak anlamlılık bulunmuştur ($p<0,05$). Korelasyon açısından değerlendirildiğinde, Cd düzeyi ile yaş ve comet parametreleri arasında anlamlılık bulunmazken ($p>0,05$), comet parametrelerinin kendi arasında istatistiksel olarak çok anlamlı sonuçlar bulunmuştur ($p<0,01$). Sigara indeksine göre değerlendirildiğinde, kadın bireylerde TM comet parametresine göre, erkek bireylerde ise CL, HL, HI, TI and OTM parametrelerine göre istatistiksel olarak anlamlılık bulunmuştur. Ayrıca, yaş, Cd düzeyi ve comet parametrelerinin korelasyonunda ise her hangi bir istatistiksel anlamlılık bulunamamıştır ($p>0,05$).

Sigara içen içmeyen kadın ve erkek grupları dokuz comet parametresiyle değerlendirilmiştir ve dokuz parametrenin yedisinde sigara içen ve içmeyen kadın gruplarında istatistiksel olarak anlamlılık bulunmuş, erkek bireylerde sigara içen ve içmeyen gruplarda yalnızca iki parametrede istatistiksel olarak anlamlılık bulunmuştur. Ancak sigara içen kadınların erkeklere oranla DNA hasarının altı comet parametresiyle istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Çalışmamızda 120 kan örneğinin kadmiyum konsantrasyonları ölçülerek, comet parameteresi ile kadmiyum düzeyleri arasındaki ilişki araştırılmıştır. Sigara içen ve içmeyen gruplarda Cd derecesi CI, TI VE OTM parametrelerinde istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,01$), ancak diğer comet parametreleri arasında istatistiksel bir anlamlılık bulunmadı. Sigara içen ve sigara içmeyen kadınlarda 9 comet parametresi ile kadmiyum derecesi arasında değerlendirme yapıldığında Cd düzeyi ile TM arasında istatistiksel olarak bir anlamlılık bulundu ($p<0,05$). Ancak erkeklerde sigara içen ve içmeyen gruplar karşılaştırıldığında sadece Cd derecesi, DT ve OTM ile istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$).

Anahtar Kelimeler: Comet assay, DNA hasarı, Kadmiyum, Sigara.

SUMMARY

Determination of Blood Cadmium Levels and Lymphocyte DNA damage in Smokers

The aim of this study was to investigate determination of blood cadmium levels the relationship between the smoking and DNA damage in lymphocytes and a potential genotoxic effect of cigarette smoking was analyzed with the comet assay (single cell gel electrophoresis, SSGE).

This study, The nine parameters, including comet length (CL), comet intensity (CI), head length (HL), head intensity (HI), tail length (TL), tail intensity (TI), DNA tail (DNAt), tail moment (TM) and olive tail moment (OTM) defined on comet assay were used for the first time in this study. 120 volunteers (60 non-smokers, 60 smokers) were monitored in the way of DNA damage in blood lymphocytes. The levels of DNA damage was measured by BAB Bs Comet Assay system.

The highly significant associations were found between the non-smoker and smoker groups for CI, TL and OTM comet parameters ($p < 0.01$). Smoker female group had higher CL, CI, HL, HI, TL, TI ($p < 0.01$) and TM ($p < 0.05$) with regards to DNA damages than non-smoker female group. In contrast, only DNAt and OTM comet parameters were statistically differences between the smoker male and non-smoker male groups ($p < 0.05$). Smoking index (SI) of all the blood samples from females were compared based on all studied comet parameters and found statistically significant ($p < 0.05$) except for TM. On the other hand, the blood samples taken from male were significant using CL, HL, HI, TI and OTM ($p < 0.05$). Consequently, comet assay for the evaluation of DNA damages related with increased genotoxic effects could be used in smokers.

The nine comet assay parameters were evaluated among the females and males in the non-smoker and smoker groups, and seven of nine comet parameters were found statistically significant between smokers and non-smokers women, only two of them parameters were statistically significant in male smokers and non-smokers.

However, we have seen that more DNA damages in women smokers than men smokers for comparison with the six parameters of comet.

After the determination Cd concentration of the 120 blood samples were measured and the evaluated between the comet assay parameters and Cd level were investigated. Cd levels and CI, TL and OTM parameters were found statistically significant between non-smoker and smoker groups ($p < 0.01$), however another comet parameters were not found comet statistically significant. The nine comet assay parameters and cadmium levels were evaluated among the females in the non-smoker and smoker groups Cd levels and TM parameters were found statistically significant ($p < 0.05$). However, cadmium levels were evaluated among males in the non-smoker and smoker groups were compared, just Cd level, DT ve OTM were found statistically significant ($p < 0.05$).

Keywords: Cadmium, Comet assay, DNA Damage, Smoking.

KAYNAKLAR

- AKESSON, A., LUNDH, T., VAHTER, M., BELLERUP, P., LIDFELDT, J., NERBRAND, C., (2005). Tubular and glomerular kidney effects in Swedish women with low environmental cadmium exposure. *Environ. Health Perspect.* **13**: 1627–1631.
- ATSDR(AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY, DIVISION OF TOXICOLOGY AND ENVIRONMENTAL MEDICINE/APPLIED TOXICOLOGY BRANCH).(2008). Draft Toxicological Profile for Cadmium. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service Atlanta, Georgia, U.S.A
- BERLUND, M., AKESSON, A., NERMELL, B., VAHTER, M.(1994). Intestinal absorption of dietary cadmium in women depends on body iron stores and fiber intake. *Env- iron.Health Perspect.* **102**: 1058–1066.
- BERNHARD D., ROSSMANN A., HENDERSON B., KİND M. (2006). Increased Serum Cadmium and Strontium Levels in Young Smokers: Effects on Arterial Endothelial Cell Gene Transcription. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **26**: 833-838.
- BERTIN, G. ,AVERBECK, D. (2006). Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules,modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). *Biochimie* **88** : 1549–1559
- BILIR, N. (2008).Tütün ve Kanser _liskisi, Ülkemiz Açısından Önemi.*Environ Health*, **50**: 307-364.
- BROCKHAUS, A., FREIER, I., EWERS, U., JERMANN, E., DOLGNER, R.(1983). Levels of cadmium and lead in blood in relation to smoking, sex, occupation, and other factors in an adult population of the FRG. *Int Arch Occup Environ Health.* **52**: 167-75.
- BRUCKERT, E., JACOB, N., LAMAIRE, L., TRUFFERT, J., PERCHERON, F. VE DE GENNES, JL.(1992). Relationship between smoking status and serum lipids in a hyperlipidemic populationand analysis of possible confounding factors.*Clin Chem*,**38**: 1698-1705.
- BRZOSKA, M.M., JAKONIUK, J.M. (1998).The influence of calcium content in diet on cumulation and toxicity of cadmium in the organism. *Arch Toxicol.* **72**: 63±73
- BRZOSKA, M.M., JAKONIUK, J.M. (2001). Interactions between cadmium and zinc in the organism. *Food and Chemical Toxicology.* **39**: 967-980.

- BURCHFIEL, C.M., MARCUS, E.B., CURB, J.D., MACLEAN, C.J., VOLLMER, W.M., JOHNSON, L.R., FONG, K.O., RODRIGUEZ, B.L., MASAKI, K.H., BUIST, A.S. (1995). Effects of smoking and smoking cessation on longitudinal decline in pulmonary function. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **151**: 1778-1785.
- BURÇAK, G., ANDİCAN, G. (2004). Oksidatif dna hasari ve yaşlanma. *Cerrahpaşa tıp.derg.* **35**:4
- CANNINO, G., FERRUGGIA, E., LUPARELLO, C., RINALDI, A M. (2009). Cadmium and mitochondria. *Mitochondrion.* **9**: 377–384
- COLLINS AR, MA AG, DUTHIE SJ. (1995). The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. *Mutat. Res.* **336**: 69–77.
- ÇOLAKOĞLU, N., OZAN, E., SÖNMEZ, M.F., YILMAZ, S., OZAN, G. (2005). Sigaranın Karacigerde Olusturdugu Yapısal Degisiklikler Üzerine Melatonin ve C Vitamininin Etkileri. *Firat Tıp Dergisi.* **10**: 108-112
- DARRAGH, G., GEORGE M., HOWARD, C., KURT, S. (2009). Modelling the comet assay. *Biochemical Society Transactions.* 37-4
- DEMARINI DM. 2004. Genotoxicity of tobacco smoke and tobacco smoke condensate: a review. *Mutat. Res.* **567**: 447–474.
- DIAMOND, G.L., THAYER, W.C., CHUNDHURY, H. (2003). Pharmacokinetic/pharmacodynamics (PK/PD) modeling of risks of kidney toxicity from exposure to cadmium: estimates of dietary risks in the U.S. population. *J. Toxicol. Environ. Health* **66**: 2141–2164.
- DİKİLİTAŞ, M., KOÇYİĞİT, A. (2010). Canlılarda “tek hücre jel elektroforez” yöntemi ile dna hasar analizi (teknik not): comet analiz yöntemi. *HR.Ü.Z.F. Dergisi.* **14**: 77- 89
- DİNÇER, Y., KANKAYA, S. (2010). DNA Hasarının Belirlenmesinde Comet Assay. *Türkiye Klinikleri.* **30**: 1365-73
- EDWARDS R. (2004). The problem of tobacco smoking. *BMJ.* 328: 217-219
- ELIASSON, B., MERO, N., TASKINEN, MR. VE SMITH U. (1997). The insulin resistance syndrome and postprandial lipid intolerance in smokers. *Atherosclerosis.* **129**: 79-88
- EL-MARAGHY, S., GAD, M.Z., FAHIM, A.T., HAMDY, M.A. (2001). Effect of cadmium and aluminum intake on the antioxidant status and lipid peroxidation in rat tissues. *Journal Biochem Molecular Toxicology.* **15**: 207-214.
- ERSÖZ, A., SAY, R., BÜYÜKTİRYAKİ, S., KEÇİLİ, R. (2008). 8-OHdG Bellekli Polimerik Film Kaplanmış Kuvars Kristal Mikrobals Elektrot Geliştirilmesi ve

DNA'nın Oksidatif Zararının Saptanması için Biyosensör Olarak Kullanımı.
TÜBİTAK. 104 M 374

- FAHN H.J, WANG L.S, KAO S.H, CHANG S.C, HUANG M.H, WEI Y.H.(1998). Smoking-Associated Mitochondrial DNA Mutations and Lipid Peroxidation in Human Lung Tissues. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **9**: 901-909.
- FAUST F, KASSIEF, KNASMULLER S, BOEDECKER RH, MANN M, MERSCH-SUNDERMANN V. (2004). The use of the alkaline comet assay with lymphocytes in human biomonitoring studies. *Mutat. Res.* **566**: 209–229.
- FERGER B, SPRATT C, EARL CD, TEISMANN P, OERTEL WH, KUSCHINSKY K. (2002). Effects of nicotine on hydroxyl free radical formation in vitro and on MPTP-induced neurotoxicity in vivo. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 358-1998.
- GIOVANNELLI L, SAIEVA C, MASALA G, TESTA G, SALVINI S, PITOZZI V, RIBOLI E, DOLARA P, PALLI D. (2002). Nutritional and lifestyle determinants of DNA oxidative damage: a study in a Mediterranean population. *Carcinogenesis*. **23**: 1483–1489.
- HALLIWELL B, GUTTERIDGE JM. (1988). Free radicals and antioxidant protection: mechanisms and significance in toxicology and disease. *Hum. Toxicol.* **7**: 7-13.
- HECHT SS. (1999). Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *J. Natl Cancer Inst.* **91**: 1194–1210.
- HININGER I, CHOLLAT-NAMY A, SAUVAIGO S, OSMAN M, FAURE H, CADET J, FAVIER A, ROUSSEL AM. (2004). Assessment of DNA damage by comet assay on frozen total blood: method and evaluation in smokers and non-smokers. *Mutat. Res.* **558**: 75-80.
- HOFFMAN, D. AND HOFFMAN, I. (1997). The changing cigarette . *J. Toxicol.* 1950-1995
- HOFFMANN D, HOFFMANN I., EL-BAYOUMY K. (2001). *Chem.Res. Toxicol.* **14**: 767 ± 790
- HOFFMANN H, HOGEL J, SPEIT, G. (2005). The effect of smoking on DNA effects in the comet assay: a meta-analysis. *Mutagenesis*. **20**: 455-466.
- IARC.(1986). Tobacco Smoking. Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. 38. Lyon,France: IARC
- JANOFF, A. (1985). Elastase and emphysema: current assessment of the protease-antiprotease hypothesis. *Am. Rev. Respir. Dis.* **132**: 417-433
- JARUP, L.(2003). Hazards of heavy metal contamination. *Br. Med. Bull.* **68**: 167–182.

- JIN, Y. H., CLARK, A. B., SLEBOS, R. J., REFAI, H. AL., TAYLOR, J. A., KUNKEL, T. A., RESNICK, M. A. AND GORDENIN, D. A. (2003). Cadmium is a mutagen that acts by inhibiting mismatch repair. *Nat. Genet.* **34**: 326-329
- JOE, M.H., SUN, W. J., SEONG, H., SANG, Y. L., HYUN, P., S., OHSUK, K., AND DONG, H. K. (2011). Genome-Wide Response of *Deinococcus radiodurans* on Cadmium Toxicity. *Microbiol. Biotechnol.* **21**: 438–447
- KALCHER, K., KERN, W., PIETSCH, R. (1993). Cadmium and lead in the smoke of a filter cigarette. *Sci Total Environ.* **128**: 21-35.
- KALELI, S. (2010). Sigaranın Sağlık Üzerine Zararlı Etkileri. *Fırat Sağlık Hizmetleri Derg.* **5**: 14
- KIYOHARA, C., YOSHIMASU, K. (2007). Genetic polymorphisms in the nucleotide excision repair pathway and lung cancer risk: A meta-analysis. *Int J Med Sci.* **4**: 59-71.
- KIM, K., FUJIMOTO, VY., PARSONS, PJ., STEYERWALD, AJ., BROWNE, RW., BLOOM, MS. (2010). Recent cadmium exposure among male partners may affect oocyte fertilization during in vitro fertilization (IVF). *Assist Reprod Genet.* **8**: 463-8J.
- KULAKSIZ G, SANCAR A. (2007). Nükleotid Eksizyon Onarımı ve Kanser. *Türk Biyokimya Dergisi.* **32**: 104-11.
- KURTULMUS, S., AYDIN K.A. (2007). Dental Döküm Alasimlarının Genotoksisite, mutajenisite ve karsinogenisitesi. *SÜ Dishek Fak Derg.* **16**: 73-78
- VALVERDE, M., ROJAS, E. (2001) Environmental and occupational biomonitoring using the Comet assay. *Mutation Research* **681**: 93–109.
- MARCANO, L B.C., CARRUYO, I.M., MONTIEL, X.M., MORALES, C.B., DE SOTO, P.M. (2009). Effect of cadmium on cellular viability in two species of microalgae (*Scenedesmus* sp. and *Dunaliella viridis*). *Biol. Trace Elem. Res.* Doi. 10.1007/s120110098316.
- MAYDA, A.S., TUFAN, N., BAŞTAŞ, S. (2007). Düzce Tıp Fakültesi Öğrencilerinin Sigara Konusundaki Tutumları ve İçme Sıklıkları. *Kor Hek.* **6**: 364-370
- MESSNER, B., KNOFLACH, M., SEUBERT, A., RITSCH, A., PFALLER, K., HENDERSON, B., YING, H., ZELLER, I., WILLEIT, J., LAUFER, G., WICK, G., KIECHL, S., AND BERNHARD, D. (2009). Cadmium Is a Hecht SS. 1999. Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *J. Natl Cancer Inst.* **91**: 1194–1210.
- MITRA, R. S. (1984). Protein synthesis in *Escherichia coli* during recovery from exposure to low levels of Cd 2+. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**: 1012-1016

- MORROW, J.D., FREI, B., LONGMIRE, A.W., GAZIANO, J.M., LYNCH, S.M., SHYR, Y., STRAUS, W.E., OATES, J.A. (1995). Roberts L.J Increase in circulating products of lipid peroxidation (F2-isoprostanes) in smokers. *N. Engl. J. Med.* **332**: 1198–1203.
- MORTADA, W.I., SOBH, M.A., EL-DEFRAWY, M.M. (2004). The exposure to cadmium, lead and mercury from smoking and its impact on renal integrity. *Med Sci Monit.* **10**: 112-116.
- MOURÓN, S.A., GOLIJOW, C.D., DULOUT, F.N. (2001). DNA damage by cadmium and arsenic salts assessed by the single cell gel electrophoresis assay. *Mutation Research.* **498**: 47–55
- MOZAFFARIEH M, KONIECZKA K, HAUENSTEIN D, SCHOETZAU A, FLAMMER J. (2010). Half a pack of cigarettes a day more than doubles DNA breaks in circulating leukocytes. *Tobacco Induced Diseases.* **8**: 14
- NATASCHA, A., WOLFF, W.K.L, FRANK, T. (2011). Role of Arf1 in endosomal trafficking of protein–metal complexes and cadmium–metallothionein-1 toxicity in kidney proximal tubule cells. *Toxicology Letters.* **203**: 210–218
- Novel and Independent Risk Factor for Early Atherosclerosis Mechanisms and In Vivo Relevance. *Arteriosclerosis, thrombosis and vascular biology.*
- OLSSON, I.-M., BENSRYD, I., LUNDH, T., OTTOSSON, H., SKERFVING, S., OSKARSSON, A.(2002). Cadmium in blood and urine – effect of sex, age, dietary intake, iron status, and former smoking – association of renal effects. *Environ. Health Perspect.* **110**: 1185–1190.
- ONUR, E., TUĞRUL, B., BOZYİĞİT, F.,(2009). DNA Hasarı ve Onarım Mekanizmaları. *Türk Klinik Biyokimya Derg.***7**: 61-70
- OSTLING, O., JOHANSON, K. J. (1984).Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **123**: 291-298.
- PATRA, R. C., AMIYA, K., AND SWARUP, D.(2011). Oxidative Stress in Lead and Cadmium Toxicity and Its Amelioration. *SAGE-Hindawi Access to Research Veterinary Medicine International.***9**: 4061
- PANDEY AK, BAJPAYEE M, PARMAR D, RASTOGI SK, MATHUR N, SETH PK, DHAWAN A. (2005). DNA damage in lymphocytes of rural Indian women exposed to biomass fuel smoke as assessed by the Comet assay. *Environ Mol Mutagen.* **45**: 435-441.

- PFEIFER, G.F., DENISSENKO, M.F., OLIVIER, M., TRETYAKOVA, N., HECHT, S.S., HAINAUT, P. (2002). Tobacco smoke carcinogens, DNA damage and p53 mutations in smoking-associated cancers. *Oncogene*. **21**: 7435 – 7451
- POLI P, BUSCHINI A, SPAGGIARI A, RIZZOLI V, CARLO-STELLA C, ROSSI C. 1999. DNA damage by tobacco smoke and some antitubercular drugs evaluated using the Comet assay. *Toxicol Lett.* **108**: 267-276.
- RAVANAT J.L. (1999). Guicherd P., Tuce Z. ve Cadet J., Simultaneous determination of five oxidative DNA lesions in human urine. *Chem. Res. Toxicol.* **12**: 802-808,
- ROSEN, B. P. (2002). Transport and detoxification systems for transition metals, heavy metals and metalloids in eukaryotic and prokaryotic microbes. *Compar. Biochem. Physiol.* **133**: 689-693.
- PRYOR, W.A., STONE K. (1993). Oxidants in cigarette smoke. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **686**: 12–28.
- PRYOR, W.A., STONE, K, ZANG, L.Y. (1998). Bermudez E. Fractionation of aqueous cigarette tar extracts: fractions that contain the tar radical cause DNA damage. *Chem. Res. Toxicol.* **11**: 441–448.
- PRYOR, W. A. (1987). Cigarette smoke and the involvement of free radical reactions in chemical carcinogenesis. *Br. J. Cancer.* **55**: 19-23.
- PRYOR, W.A., PRIER, D.G., CHURCH, D.F. (1983). An electron-spin resonance study of mainstream and sidestream cigarette smoke: nature of the free radicals in gas-phase smoke and in cigarette tar. *Environ. Health Perspect.* **47**: 345-355.
- RYDBERG, B., JOHANSON, K. J. (1978) in DNA Repair Mechanism (Hanawalt, P. C., and Friedberg, E. C., Eds), pp. 465-468, Academic Press, New York.
- SATARUG, S., UJJIN, P., VANAVANITKUN, Y., BAKER, J.R., MOORE, M.R. (2004). Influence of body iron store status and cigarette smoking on cadmium body burden of healthy Thai women and men. *Toxicol. Lett.* **148**: 177–185.
- SANCAR, A., LAURA, A., LINDSEY-BOLTZ, ÜNSAL-KAÇMAZ, K., LINN, S. (2004). Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage. *Annu. Rev. Biochem.* **73**: 39–85
- SHERRILL, D. L., LEBOWITZ, M. D., KNUDSON, R. J., BURROWS, B. (1993) Longitudinal methods for describing the relationship between pulmonary function, respiratory symptoms and smoking in elderly subjects: the Tucson study. *Eur. Respir.* **6**: 342-348.

- SINGH NP, DANNER DB, TICE RR, BRANT LJ, SCHNEIDER EL. (1990). DNA damage and repair with age in individual human lymphocytes. *Mutat. Res.* **237**: 123–130.
- SINGH NP, DANNER DB, TICE RR, PEARSON JD, BRANT LJ, MORRELL CH, SCHNEIDER EL. (1991). Basal DNA damage in individual human lymphocytes with age. *Mutat. Res.* **256**: 1–6.
- SINGH NP, MCCOY MT, TICE RR, SCHNEIDER EL. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* **175**: 184–191.
- STOHS, S. J. AND D. BAGCHI. (1995). Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic. Biol. Med.* **18**: 321–336.
- STABBERT R, VONCKEN P, RUSTEMEIER K, HAUSSMANN HJ, ROEMER E, SCHAFFERNICHT H, PATSKAN G. (2003). Toxicological evaluation of an electrically heated cigarette. Part 2: chemical composition of mainstream smoke. *J. Appl. Toxicol.* **23**: 329–339
- SPEIT G, MERK O, ROTHFUSS A. (2002). The comet assay as a biological monitoring test. In Angerer J, Weiß T (eds). Deutsche Forschungsgesellschaft. Biological Monitoring. *WILEY-VCH. Weinheim*: 130–139.
- TSUTSUMI, R., HIROI, H., MOMOEDA, M., HOSOKAWA, Y., NAKAZAWA, F., YANO, T., TSUTSUMI, O., TAKETANI, Y., (2009). Induction of early decidualization by cadmium, a major contaminant of cigarette smoke. *Fertil. Steril.* (Epub ahead of print)
- TICE, RR., AGURELL E., ANDERSON, D., BURLINSON, B., HARTMANN, A., KOBAYASHI, H., MIYAMAE, Y., ROJAS, E., RYU, JC., SASAKI, YF. (2000). Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.* **35**: 206–221.
- THOMPSON, J., BANNIGAN, J., (2008). Cadmium: Toxic effects on the reproductive system and the embryo. *Reproductive Toxicology.* **25**: 304–315
- TICE R., SETLOW RB. (1985). DNA repair and replication in aging organisms and cells. In Finch CE, Schneider EL (eds). *Handbook of the Biology of Aging, Van Nostrand-Reinhold, New York*: 173–224.
- TICE, RR. (1995). The single cell gel/comet assay: a microgel electrophoretic technique for the detection of DNA damage and repair in individual cells. In Phillips DH, Venitt S (eds). *Environmental Mutagenesis. Bios Scientific Publishers. Oxford*: 315–339.
- WAISBERG, M., JOSEPH, P., HALE, B., BEYERSMANN, D. (2003). Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology.* **192**: 95–117.

- WETSCHER, GL., BAGCHI, M., BAGCHI, D., PERDIKIS, G., HINDER, PR., GLASER, K., HINDER, RA. (1995). Free radical production innicotine treated pancreatic tissue. *Free Radic. Biol. Med.* **18**: 877–882.
- WHO.(1992). Cadmium.Geneva. *Environmental Health Criteria.* 134.
- YENİ, D., FİDAN, A.F., GÜNDÖĞAN,M.(2010). Spermatozoon’da Tek Hücre Jel Elektroforezi (SCGE) ile DNA Hasarı Tespiti. *F.Ü.Sağ.Bil.Vet.Derg.* **24**: 167- 173

EKLER

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

BAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL KODU	
	PROTOKOL ADI	Aterosklerotik kardiyovasküler hastalığı olan bireylerin bazı metal düzeyleri ile mitokondrial ve nükleer DNA hasarı arasındaki ilişkinin araştırılması
	SORUMLU ARAŞTIRICI ÜNVANI / ADI	Prof.Dr.Halil Gümüş
	ARAŞTIRMA MERKEZİ	Ankara Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü
	DESTEKLEYİCİ FİRMA	

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

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

KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 147-4532	Tarih: 23 Şubat 2009
	Araştırma protokolüne tamamen uyulmak, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul Yönergesinde belirtilen hususlar yerine getirilmek ve Yönergenin 11/h maddesi gereği sorumluluk araştırmacılara ait olmak üzere bütçesi temin edildiği takdirde laboratuvar çalışmasının yürütülmesinde etik sakınca bulunmadığına toplantıya katılan öğretim üyelerinin oybirliği ile karar verildi.	

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

Bünyamin KARATAŞOĞLU
A.Ü. Tıp Fakültesi
Akademik Bursiyer



03 Mart 2009

ASLI GİBİDİR

Benjamin KARATAŞ GLU
A.Ü. Tıp Fakültesi
Akademiik Büro Şefi

03 Mar 2009

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı: Esmâ

Soyadı: SÖYLEMEZ

Doğum Tarihi ve Yeri: 1986, ANKARA

Uyruğu: T.C.

Medeni Durumu: Bekar

İletişim Adresi ve Telefonu: A.Ü. Adli Bilimler Enstitüsü Tıp Fakültesi

Cebeci Kampüsü Dikimevi/ANKARA

Tel:0(312) 319 27 34

II- Eğitimi

2004 – 2008 Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Fak. Biyoloji Bölümü

2000 – 2003 Abidinpaşa Lisesi-ANKARA

1997 – 2000 Ortatepe İlköğretim Ortaokulu-ANKARA

1992 – 1997 Şehitlik İlköğretim İlkokulu-ANKARA

Yabancı Dili: İngilizce

III-Mesleki Deneyimi

Uluslararası Kongre

Poster

Z. Kayaaltı, D. Tekin, S. Yalçın, V. Aliyev, **E. Söylemez**, G. Kurtay, T. Söylemezoğlu. (2010). XII International Congress of Toxicology, 17 July, 2010, Barcelona, Spain. **Poster özeti Toxicology Letters, 196: 161-162, Supplement 1’de yayınlanmıştır. doi:10.1016/j.toxlet.2010.03.555 (ISI).**

T. Söylemezoğlu, **E.Söylemez**, Z. Kayaalti, V. Aliyev.(2011).The effect of cigarette smoking according to eight comet assay parameters. XIII International Congress of Toxicology, 28 August., 2011, Paris, France.**Poster özet**i **Toxicology Letters**, **205:135**, **Supplement 1**'de yayınlanmıştır. doi:10.1016/j.toxlet.2011.05.482(ISI).

T. Söylemezoğlu, Z. Kayaalti, **E.Söylemez**, A. Bacaksız, E. Tutkun.(2011).Evaluation of DNA damage by comet assay in metal exposed Turkish population. XIII International Congress of Toxicology, 28 August., 2011, Paris, France.**Poster özet**i **Toxicology Letters**, **205:196**, **Supplement 1**'de yayınlanmıştır. doi:10.1016/j.toxlet.2011.05.677. (ISI).

Z. Kayaalti, **E.Söylemez**, V. Aliyev, T. Söylemezoğlu.(2011).The achievement of comet assay through analyzing relationship between fish consumption and dental amalgam fillings in detection of Hg toxicity. XIII International Congress of Toxicology, 28 August., 2011, Paris, France.**Poster özet**i **Toxicology Letters**, **205:296**,**Supplement 1**'de yayınlanmıştır.doi:10.1016/j.toxlet.2011.05.1000 (ISI).|

Z. Kayaalti, **E.Söylemez**, S. Yalçın, T. Söylemezoğlu.(2011).Validation of comet assay for detecting DNA damage in whole blood samples. XIII International Congress of Toxicology, 28 August., 2011, Paris, France.**Poster özet**i **Toxicology Letters**.**205:204**, **Supplement 1**'de yayınlanmıştır.doi:10.1016/j.toxlet.2011.05.702 (ISI).

V. Aliyev, Z. Kayaalti, **E.Söylemez**, T. Söylemezoğlu.(2011).The determination of cadmium and mercury in blood of smokers and non-smokers. XIII International Congress of Toxicology, 28 August., 2011, Paris, France.**Poster özet**i **Toxicology Letters**.**205:191**,**Supplement1**'de yayınlanmıştır. doi:10.1016/j.toxlet.2011.05.662 (ISI).

A. Bacaksız, Z. Kayaaltı, **E. Söylemez**, E. Tutkun, T. Söylemezoğlu. Metallerle Maruz Kalan Bireylerde Lenfosit DNA Hasarının Belirlenmesi. 18-20 Mayıs, 2011, Kayseri, Türkiye (**SÖZLÜ SUNUM**).

Proje

Aterosklerotik kardiyovasküler hastalığı olan bireylerin bazı metal düzeyleri ile mitokondrial ve nükleer DNA hasarı arasındaki ilişkinin araştırılması, 09B5150001 numaralı Ankara Üniversitesi BAP projesi, Araştırmacı, 2009.

IV- Aldığı Kurslar ve Sertifikalar

2008- ICR Uluslararası Belgelendirme Hizmetleri Tic.Ltd.Şti . ISO 17025 Laboratuvar Teknik Yeterlilik Eğitimi.

2007- World Food Safety. ISO 22000 Gıda Güvenliği Yönetim Sistemi.

2007- SDÜ Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü- Su Ürünleri Fak (Göller yöresi, İçanadolu Bölgesi Gölleri, ve Sorunları Kongresi)

2005-M.E.B. Bilgisayar Meslek Dalı Eğitim programları sertifikası.

V-ÇALIŞTIĞI KONULAR

PCR ile amplifikasyon.

Elektroforez teknikleri (Agarose, SDS-PAGE jel, polyacrilamide jel).

Biyolojik örneklerin ön serolojik analizlerinin yapılması.

Biyolojik örneklerden DNA ekstraksiyonunun yapılması (organik, cheleks, qiagen kitleri, EZ1, M48).

Biyolojik örneklerden ekstrakte edilen DNA'ların amplifikasyonunun yapılması (PCR ve RFLP ile sekans teknikleri).

DNA mutasyon ve polimorfizm çalışmaları.

Genetik Toksikoloji.

Comet Assay çalışması.