

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KOMET YÖNTEMİ İLE 3T3 HÜCRE HATTINDA
POZİTİF KONTROLLERİN İN VİTRO
KARŞILAŞTIRILMASI VE OPTİMİZASYONU**

Seda İPEK

**FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof.Dr. Aylin ÜSTÜNDAĞ**

**Bu araştırma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü'nün
TYL-2022-2356 proje numarası ile desteklenmiştir**

**ANKARA
2022**

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Yüksek lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Komet Yöntemi ile 3T3 Hücre Hattında Pozitif Kontrollerin *in vitro* Karşılaştırılması ve Optimizasyonu” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikri/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Seda İPEK

Tarih:

İmza:

KABUL VE ONAY

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN	ii
KABUL VE ONAY	iii
ÖNSÖZ	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR	viii
ŞEKİLLER	x
ÇİZELGELER	xii
1. GİRİŞ	1
1.1. Deoksiribonükleik asit: DNA.....	1
1.2. DNA hasar türleri ve DNA tamir mekanizmaları	2
1.2.1. Endojen DNA hasarı	5
1.2.2. Ekzojen DNA hasarı.....	8
1.3. DNA hasar yanıtı (DNA Damage Response:DDR)	10
1.4. DNA Hasar Tamir Mekanizmaları.....	11
1.4.1. DNA baz hasarı tamiri.....	12
1.4.2. Çoklu ve hacimli baz hasarının tamiri.....	13
1.4.3. DNA zincir kırıklarının tamiri.....	15
1.5. Genotoksisite tesleri	17
1.5.1. Komet: Tek Hücre Jel Elektroforezi	20
1.6. Pozitif Kontroller	24
1.6.1. Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂).....	27
1.6.2. Metil Metansülfonat (MMS)	29
1.6.3. Etil Metansülfonat (EMS)	30
1.6.4. N-Etil-N-Nitrozoüre (ENU)	31
1.6.5. Etoposid.....	32
1.6.6. Diğer Pozitif Kontroller.....	33
1.7. Fibroblast	35
1.7.1. Fibroblast Hücrelerinin Görevleri	37
1.7.2. 3T3 Hücre Hattı.....	39
1.8. Hücre Kültürü.....	40

1.9. Hücre Pasajı	42
1.10. Tezin Amacı ve Hedefleri	45
2. GEREÇ ve YÖNTEM.....	47
2.1. Gereç	47
2.1.1. Kullanılan Maddeler	47
2.1.2. Kullanılan Aletler ve Malzemeler	48
2.2. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması.....	49
2.3. Hücrelerin Pasajlanması ve Çoğaltılması	50
2.4. Test Materyallerinin Hazırlanması ve Hücrelere Maruziyeti.....	53
2.5. Genotoksik Etkilerin Araştırılması: Komet Testi	54
2.6. İstatistiksel Değerlendirmeler	58
3. BULGULAR.....	59
3.1. Komet Testi Sonuçları.....	59
4. TARTIŞMA.....	70
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	80
ÖZET.....	83
SUMMARY	84
KAYNAKLAR	85
ÖZGEÇMİŞ.....	92

ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasında, komet yönteminde en çok kullanılan ve genotoksik etkisi olduğu bilinen kimyasal bileşiklerden H₂O₂, EMS, MMS, ENU ve etoposidin farklı konsantrasyonlarda ve farklı maruziyet sürelerinde 3T3 fare embriyonik fibroblast hücre hattı üzerindeki etkilerinin in vitro hücre kültürü yöntemi ile test edilerek karşılaştırılması amaçlanmıştır. Bu tez çalışması “Komet Yöntemi ile 3T3 Hücre Hattında Pozitif Kontrollerin in vitro Karşılaştırılması ve Optimizasyonu” konulu TYL-2022-2356 numaralı proje ile Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) tarafından desteklenmiştir. Tez çalışmamın deneysel ve yazım aşamalarında her türlü yardım ve desteğini aldığım, çalışmamın her aşamasında bana kıymetli bilgi birikimini aktaran, çalışma azmini ve özverisini örnek aldığım çok değerli danışmanım, Sayın Hocam Prof. Dr. Aylin ÜSTÜNDAĞ’a teşekkürlerimi sunarım.

Desteklerini ve katkılarını her zaman hissettiğim Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı başkanı Sayın Prof. Dr. Tülay ÇOBAN’a ve tüm kıymetli hocalarıma teşekkürlerimi sunarım.

Bilgi birikiminden ve tecrübesinden her zaman yararlanabildiğim ve bana her konuda danışma imkânı sağlayan, iş disiplini ve çalışmasını örnek olarak aldığım çok kıymetli hocam Sayın Prof. Dr. Yalçın DUYDU’ya teşekkürlerimi sunarım.

Her konuda bana destek olan, yardımlarını hiç esirgemeyen, bu süreçte her anımda yanımda olan canım arkadaşım Arş. Gör. Ayşegül KOÇYİĞİT’e teşekkürlerimi sunarım.

Deneyisel çalışmalarım sırasında bana yardımcı olan, bu süreçte desteğini esirgemeyen çok sevgili arkadaşım Arş. Gör. Ekin ERDOğMUş'a teşekkürlerimi sunarım.

Bu süreçte her zaman yanımda olan anabilim dalımızın çok değerli asistan hocalarından Dr. Ecz. Sezen YILMAZ SARIALTIN'a, Dr. Ecz. Merve DEMİRBGEN Z'e ve Uzm. Ecz. Naile Merve GÜVEN'e teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında desteklerini ve sevgilerini her zaman yanımda hissettiğim, bu süreçte her türlü fedakarlıkta bulunan çok kıymetli canım annem Ayşe İPEK ve canım babam Erkan İPEK'e teşekkürlerimi sunarım.

SİMGELER VE KISALTMALAR

4NQO	4-nitrokinolin-1-oksit
AAF	N-asetil-2-aminofloren
AF	2-aminfloren
AT	Ataksi teleanjiekteazi
BER	Base excision repair (Baz ekzisyon tamiri)
BPDE	(+/-)-anti-B[a]P-7,8-dihidrodiol-9,10-epoksit
CHO	Chinese Hamster Ovary
CS	Cockayne sendrom
DDR2	Discoidin domain reseptör 2
DSBR	Double strand break repair (Çift zincir kırık tamiri)
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
EMS	Etil metansülfonat
EndoIII	Endonükleaz III
ENNG	N-etil-N'-nitro-N-nitrozoguanidin
ENU	N-etil-N-nitrozoüre
FA	Fanconi anemia
FDA	Food and Drug Administration (İlaç ve Gıda Dairesi)
Fpg	Formamidopirimidin DNA glikozilaz
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
HNE	4-hidroksinonenal
HR	Homologous recombination
IARC	International Agency for Research on Cancer (Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı)
ICL	İplikler arası çapraz bağlanma tamiri
IR	İyonize radyasyon

KBr ₃	Potasyum bromat
MDA	Malondialdehit
MGMT	O ⁶ -Metilguanin DNA metil transferaz
MMR	Mismatch repair (Yanlış eşleşme tamiri)
MMS	Metil metansülfonat
MNNG	N-metil-N'-nitro-nitrozoguanidin
MNU	Metil nitrozoüre
MNU	N-metil-N-nitrozoüre
NDMA (DMN)	N-nitrozodimetilamin (dimetil nitrozoamin)
NER	Nucleotide excision repair (Nükleotit ekzisyon tamiri)
NHEJ	Non-homologous end joining (Homolog olmayan uç birleşmesi)
OECD	Organization for Economic Cooperation and Development (Ekonomik İş Birliği ve Kalkınma Örgütü)
OGG1	8-oksoguanin DNA glikozilaz 1
PAH	Polisiklik aromatik hidrokarbonlar
ROS	Reactive oxygen species (Reaktif oksijen türleri)
SAM	S-adenozil metiyonin
SHE	Syrian Hamster Embryos
SSBR	Single strand break repair (Tek zincir kırık tamiri)
XP	Xeroderma pigmentosum

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. DNA hasar türleri	4
Şekil 1.2. DNA hasar tamir mekanizmalarının sınıflandırılması	11
Şekil 1.3. Komet testi ile tespit edilebilen tek ve çift zincir kırıkları ile alkali labil bölgeler	22
Şekil 1.4. 3T3 hücre hattının inverted mikroskop altındaki görüntüsü	39
Şekil 2.1. Hücre pasajında kullanılan cihazlar; inverted mikroskop (sol üst), santrifüj cihazı (sağ üst), TC-20 sayım cihazı (sol alt), laminar akış kabini (sağ orta), CO2 inkübatörü (sağ alt)	52
Şekil 2.2. Tez çalışmamızda pozitif kontrol olarak kullandığımız kimyasallar	53
Şekil 2.3. Tez çalışmamızda komet testinde kullandığımız cihazlar; floresan mikroskop (en üst), elektroforez cihazı (en alt)	57
Şekil 3.1. H ₂ O ₂ 'nin 30 dakika ve 60 dakika maruziyetleri ile 3T3 hücrelerinde ortalama kuyruk yoğunluğu (n=100) ± SEM. #p<0,05, 30 dakika ve 60 dakika sonuçları ile karşılaştırıldığında (Repeated measures One- Way ANOVA).	63
Şekil 3.2. MMS'nin 30 dakika ve 60 dakika maruziyetleri ile 3T3 hücrelerinde ortalama kuyruk yoğunluğu (n=100) ± standart hata değerleri (SEM). #p<0,05, 30 dakika ve 60 dakika sonuçları ile karşılaştırıldığında (Repeated measures One- Way ANOVA).	64
Şekil 3.3. Etoposidin 30 dakika ve 60 dakika maruziyetleri ile 3T3 hücrelerinde ortalama kuyruk yoğunluğu (n=100) ± standart hata değerleri (SEM). #p<0,05, 30 dakika ve 60 dakika sonuçları ile karşılaştırıldığında (Repeated measures One- Way ANOVA).	65
Şekil 3.4. EMS'nin 30 dakika ve 60 dakika maruziyetleri ile 3T3 hücrelerinde ortalama kuyruk yoğunluğu (n=100) ± standart hata değerleri (SEM). #p<0,05, 30 dakika ve 60 dakika sonuçları ile karşılaştırıldığında (Repeated measures One- Way ANOVA).	66

- Şekil 3.5.** ENU'nun 30 dakika ve 60 dakika maruziyetleri ile 3T3 hücrelerinde ortalama kuyruk yoğunluğu ($n=100$) $\pm$ standart hata değerleri (SEM). # $p<0,05$, 30 dakika ve 60 dakika sonuçları ile karşılaştırıldığında (Repeated measures One- Way ANOVA). 67
- Şekil 3.6.** Pozitif kontrol olarak seçilen kimyasalların 30 dakika maruziyetleri ile 3T3 hücrelerinde ortalama kuyruk yoğunluğu ($n=100$) $\pm$ standart hata değerleri (SEM). * $p<0,05$, negatif kontrol ile 30 dakika sonuçları karşılaştırıldığında (Repeated measures One- Way ANOVA). 68
- Şekil 3.7.** Pozitif kontrol olarak seçilen kimyasalların 60 dakika maruziyetleri ile 3T3 hücrelerinde ortalama kuyruk yoğunluğu ($n=100$) $\pm$ standart hata değerleri (SEM). * $p<0,05$, negatif kontrol ile 60 dakika sonuçları karşılaştırıldığında (Repeated measures One- Way ANOVA). 69

ÇİZELGELER

Çizelge 3.1. H ₂ O ₂ 'nin 30 dakika ve 60 dakika maruziyetleri ile 3T3 hücrelerinde ortalama kuyruk yoğunluğu (n=100) ± SEM. #p<0,05, 30 dakika ve 60 dakika sonuçları ile karşılaştırıldığında (Repeated measures One-Way ANOVA).	59
Çizelge 3.2. MMS'nin 30 dakika ve 60 dakika maruziyetleri ile 3T3 hücrelerinde ortalama kuyruk yoğunluğu (n=100) ± SEM. #p<0,05, 30 dakika ve 60 dakika sonuçları ile karşılaştırıldığında (Repeated measures One-Way ANOVA).	60
Çizelge 3.3. Etoposidin 30 dakika ve 60 dakika maruziyetleri ile 3T3 hücrelerinde ortalama kuyruk yoğunluğu (n=100) ± SEM. #p<0,05, 30 dakika ve 60 dakika sonuçları ile karşılaştırıldığında (Repeated measures One- Way ANOVA).	60
Çizelge 3.4. EMS'nin 30 dakika ve 60 dakika maruziyetleri ile 3T3 hücrelerinde ortalama kuyruk yoğunluğu (n=100) ± SEM. #p<0,05, 30 dakika ve 60 dakika sonuçları ile karşılaştırıldığında (Repeated measures One- Way ANOVA).	61
Çizelge 3.5. ENU'nun 30 dakika ve 60 dakika maruziyetleri ile 3T3 hücrelerinde ortalama kuyruk yoğunluğu (n=100) ± SEM. #p<0,05, 30 dakika ve 60 dakika sonuçları ile karşılaştırıldığında (Repeated measures One- Way ANOVA).	61
Çizelge 3.6. Pozitif kontrol olarak seçilen kimyasalların 30 dakika ve 60 dakika maruziyetleri ile 3T3 hücrelerinde ortalama kuyruk yoğunluğu (n=100) ± SEM. *p<0,05, negatif kontrol ile 30 dakika sonuçları karşılaştırıldığında; *p<0,05; negatif kontrol ile 60 dakika sonuçları karşılaştırıldığında (Repeated measures One- Way ANOVA).	62

1. GİRİŞ

1.1. Deoksiribonükleik asit: DNA

DNA'nın yapısı aydınlatılmadan önce birçok bilim insanının görüşü genetik materyalin proteinler olabileceği yönündeydi. Ancak, DNA ile ilgili ilk kanıtlar 1940'lı yıllarda yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur. İlk olarak 1944 senesinde Oswald Avery ve arkadaşları DNA aktarımının bakteriler arasında gerçekleştiğini ve böylece hastalık yapıcı özellikte olmayan bakterilerin hastalık yapıcı özelliğe sahip olabildiklerini göstermiştir. 1952 yılında Alfred Hershey ve Martha Chase viral DNA'nın bakterilere enjeksiyonu ile faz virüslerinin bakterileri enfekte ettiğini gösteren bir çalışma yayınlamıştır. 25 Nisan 1953 senesinde James Watson ve Francis Crick çift heliks terimini bilim dünyasına kazandırarak DNA'nın yapısı hakkında bir görüş ortaya koymuştur. Watson guanin bazının sitozin ile, adenin bazının ise timin ile eşleşen benzer yapılara sahip olduğunu ve böylece bazların DNA'nın heliks yapısına en uygun olacak şekilde yerleştiğini gözlemleyerek, DNA yapısının aydınlatılma süreci devam etmiştir. Watson'ın bu bulgusu Erwin Chargaff'ın bütün türlerin DNA'sında eşit sayıda guanine karşılık sitozin ve eşit sayıda adenin bazına karşılık timin olduğu keşfi ile de desteklenmiştir. 1957 senesinde Crick bir proteindeki aminoasit dizisinin bir baz dizilimi ile kodlandığını öne sürmüştür. Bu durum Brenner isimli araştırmacının proteinlerdeki 20 aminoasitin kodon olarak bilinen üçlü baz dizileri tarafından kodlandığı yönündeki bulgusu ile desteklenmiştir. Crick bu görüşünün yanı sıra bilim dünyasına "santral dogma" terimini kazandırarak bir bilginin nükleik asitlerden proteinlere doğru geçebildiğini ancak bu durumun tam tersi yönde olmasının mümkün olamayacağını belirtmiştir. 1961 yılında Crick ve çalışma

arkadaşları üçlü baz kodonlarının varlığını doğrulamış, bütün kodonların tanımlanması ise 1966 yılında Har Hobind Khorana adlı araştırmacının çalışmaları ile tamamlanmıştır. 1962 senesinde DNA'nın yapısının aydınlatılmasına katkı veren Watson, Crick ve Wilkins'e Nobel Ödülü verilmiştir. DNA'nın çift heliks yapısının aydınlatılması tıp ve biyoloji alanına önemli katkılar sağlamıştır. Kanseri ile ilişkili tümörler ve bunların ilaç tedavilerinde, antibiyotik direncinin belirlenmesinde ve nadir görülen hastalıkların keşfi ve tedavisinde DNA ile ilgili çalışmalar önemli veriler sağlamaktadır (Ferry, 2019).

1.2. DNA hasar türleri ve DNA tamir mekanizmaları

Kalıtımın en temel yapısı olan DNA reaktif bir molekül olup endojen ve ekzojen ajanların neden olduğu yapısal değişikliklere karşı oldukça hassastır. Bütün canlı organizmalar yaşamları boyunca DNA'da değişikliklere neden olan fiziksel, kimyasal ve biyolojik ajanlara maruz kalmaktadır. Ancak organizmanın sağlıklı bir şekilde hayatını sürdürmesi genomik bütünlüğün korunmasına bağlıdır. Organizmalar genomlarında meydana gelebilecek hasarlara karşı birçok koruma stratejisi geliştirmiştir. Canlı sistemlerde bulunan çeşitli DNA tamir mekanizmaları sayesinde DNA hasarı doğrudan ya da dolaylı olarak ortadan kaldırılmakta ve böylece hücre döngüsü devam ettirilmektedir. Bir başka durumda ise organizmalar DNA hasarından kaçarak DNA'nın replikasyonu sırasında hasarsız tamamlayıcı iplik tarafından sağlanan bilginin kullanılması yolu ile hasarın kopyalanmasının önüne geçmektedir (Baynton ve Fuchs, 2000; Chatterjee ve Walker, 2017). Genel olarak bir organizmanın DNA hasarına verdiği yanıtlar; hücre döngüsünün durdurulması, DNA tamiri ile ilişkili genlerin devreye girmesi ve programlanmış hücre ölümü olan apoptozis sürecinin yaşanması şeklinde sıralanmaktadır (Khanna ve Jackson, 2001). Dengenin sağlanamadığı durumlarda ise kanser başta olmak üzere çeşitli hastalık durumları ortaya çıkmaktadır (Baynton ve Fuchs, 2000; Chatterjee ve Walker, 2017).

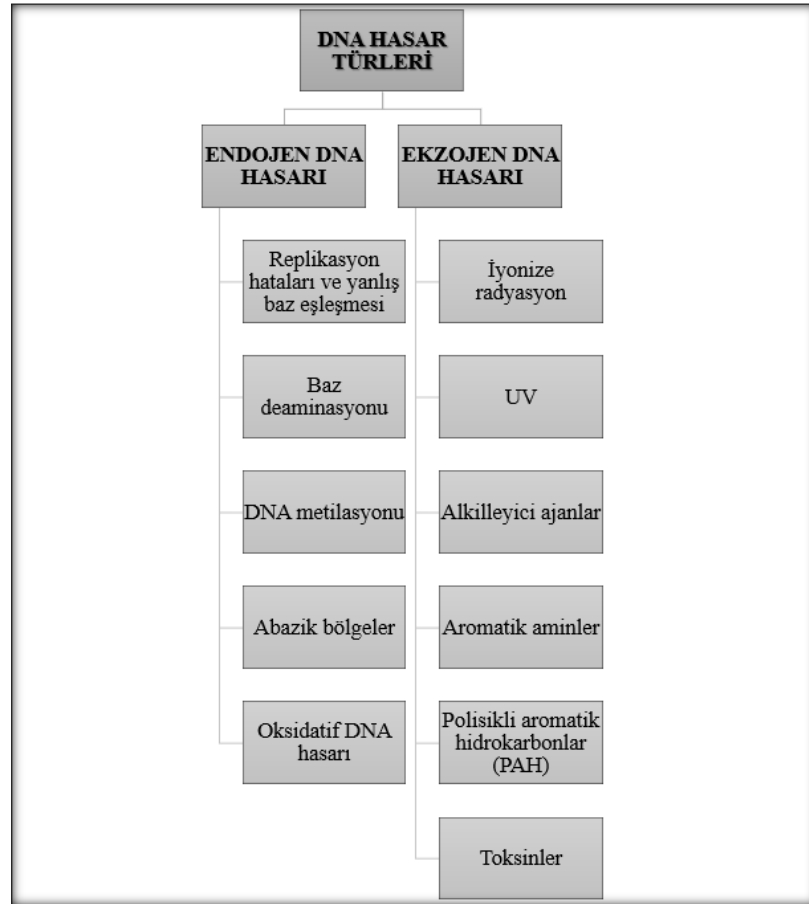
Hücrelerel sistemler DNA’da oluşan hasara karşı DNA tamir mekanizmaları, DNA hasarına karşı geliştirilen tolerans, hücre döngüsü kontrol noktaları ve hücrelerel ölüm yolakları aracılığı ile genomik bütünlüğü korumaya çalışmaktadır. DNA hasarının devam etmesi durumunda programlanmış hücre ölümü olarak bilinen apoptozis durumu devreye genomik dengesizliği gidermek için girmektedir. Bu durum hasara karşı hücrelerin vermiş olduğu düzenleyici bir yanıtıdır (De Boer ve Hoeijmakers, 2000; Chatterjee ve Walker, 2017).

Bugüne kadar 130’dan fazla DNA tamirinden sorumlu olan gen tanımlanmıştır. Meydana gelen DNA hasar türüne bağlı olarak farklı tamir mekanizmaları devreye girmektedir. DNA tamir yolağında meydana gelen herhangi bir defekt çeşitli hastalıklarla ilişkilendirilmiştir. Bunlardan biri Cockayne sendromu (CS), diğeri de ataksi teleanjiektazi (AT) dir. Bu hastalıklar dışında bazı kanser türleri de DNA tamir mekanizmasında meydana gelen hasarlar sonucunda ortaya çıkmaktadır. Örneğin hereditör kolon kanseri yanlış eşleşme tamir mekanizmasında görülen mutasyon sonucunda ortaya çıkmaktadır (Slupphaug ve ark., 2003). DNA hasar sinyal ve tamir mekanizma yolaklarında oluşan defektlerin anlaşılması başta birçok kanser türü olmak üzere, çeşitli hastalıkların aydınlatılmasında önem taşımaktadır (Khanna ve Jackson, 2001).

DNA’nın yapı ve bütünlüğünü etkileyen değişiklikler DNA’daki kimyasal bağların deaminasyon, depürinasyon gibi stabilize problemlerinden kaynaklanabileceği gibi, iyonize radyasyon gibi dış faktörlerden de etkilenebilmektedir. Bu faktörler DNA’da tek ve/veya çift zincir kırıkları, iplik içi ya

da iplikler arası çapraz bağlar ya da kimyasal baz değişiklikleri gibi hasar durumlarını meydana getirmektedir (De Boer ve Hoeijmakers, 2000).

DNA hasarı kaynağına göre endojen ve ekzojen DNA hasarları olmak üzere iki sınıfta toplanır. Endojen DNA hasarı hücrelerin yapısında bulunan su ve reaktif oksijen türlerinin hidrolitik veya oksidatif reaksiyonlar vermesi sonucunda ortaya çıkmaktadır. Ekzojen DNA hasarı ise UV, iyonize radyasyon, alkilleyici ajanlar, çevresel stres gibi çeşitli dış etkenlerin DNA'ya hasar vermesidir (Chatterjee ve Walker, 2017). DNA hasar türlerinin sınıflandırılması Şekil 1.1.'de verilmiştir.



Şekil 1.1. DNA hasar türleri

1.2.1. Endojen DNA hasarı

Endojen kökenli DNA hasarı, ekzojen DNA hasarına kıyasla daha yüksek oranda gerçekleşmektedir. Ancak ekzojen kaynakların endojen DNA hasarını indüklediği bilinmektedir. Özellikle birçok kanser türünün ortaya çıkmasında ekzojen faktörlerin neden olduğu endojen hasarlar rol oynamaktadır. Ayrıca ekzojen faktörler endojen değişimlere neden olarak bazı genlerin ekspresyonunda değişikliklere neden olur. Bu bağlamda endojen faktörlerin neden olduğu DNA hasarlarının anlaşılması, ekzojen faktörlerle olan etkileşimin ve kanser gibi önemli hastalıkların aydınlatılmasında önem taşımaktadır (De Bont ve van Larebeke, 2004).

Endojen DNA hasarına neden olan durumlar: reaktif oksijen türlerinin üretimi (oksidatif stres), lipid peroksidasyon (aldehit türevlerinin oluşumu), östrojen metabolitleri, metilleyici ajanlar (S-adenozil metiyonin gibi), hidroliz, hidrolitik deaminasyon ve karbonil stresidir. Reaktif oksijen türleri (Reactive Oxygen Species: ROS) DNA hasarına neden olan en önemli kaynaktır. En çok bilinen ve araştırılan oksidatif DNA lezyonu ise 8-okso-dGuanindir. ROS dışında lipid peroksidasyonu DNA hasarına yol açmaktadır. Lipid peroksidasyon sonucunda DNA'ya hasar verme potansiyeline sahip olan aldehit türevleri oluşmaktadır. En fazla ortaya çıkan aldehit türevlerinden en toksik olanı 4-hidroksinonenal (HNE) ve en mutajenik olanı ise malondialdehittir (MDA). Bu bileşikler DNA'daki bazların halka dışı yapısında eklentilere neden olur ve ayrıca baz eşleşme bölgelerini bloke eder (De Bont ve van Larebeke, 2004).

Replikasyon hataları ve yanlış baz eşleşmesi: Doğru bir DNA sentezi hücre döngüsünde DNA polimeraz enzimleri tarafından uygun baz eşleşmesi ile

gerçekleştirilir. Polimeraz enzimlerinin uygun bazı eşleştirmesi termodinamik stabilite ve uygun geometrik şekil ve büyüklükteki bazı enzim aktif bölgesine yerleşmesi ile sağlanır. Yanlış eşleşme durumu hem yanlış eşleşme tamir mekanizması hem de 3'-5' deoksinükleotit ekzonükleaz enzimi ile kontrol edilir. Ancak hücrelerde yanlış baz eşleşmesi, tek baz yerleşmesi ya da baz silinmesi durumu gerçekleşebilmektedir. Bu durumun tamir edilememesi durumunda ise bir sonraki replikasyon basamağında mutasyonlar ortaya çıkmaktadır (Chatterjee ve Walker, 2017).

Baz deaminasyonu: Baz deaminasyonu durumunda sitozin, adenin, guanin ve 5-metil-sitozin halka dışı amin yapısını kaybederek sırasıyla urasil, hipoksantin, ksantin ve timine dönüşmektedir (Chatterjee ve Walker, 2017).

DNA metilasyonu: Organizmalarda oksijen dışında DNA'da hasara neden olan başka moleküller de bulunmaktadır. Bunlardan biri de DNA'nın enzimatik metilasyonunda metil grubu donörü olarak görev yapan S-adenozil metiyonindir (SAM). Normal işlevini kaybeden SAM N⁷-metilguanin, sitotoksik DNA lezyonu olan N³-metiladenin ve mutajenik özelliği en fazla olan O⁶-metilguanin yapılarını oluşturmaktadır. Özellikle O⁶-metilguanin ve buna bağlı O⁴-metiltimin ve O⁴-etiltimin mutajenik özellikteki bileşiklerdir. Bu bileşikler G:C→A:T ve T:A→C:G dönüşüm mutasyonlarına neden olmaktadır. SAM tarafından üretilen diğer minör metil lezyon ürünlerine ise N³-metiltimin ve N³-metilsitozin yapıları örnek verilebilir. Organizmada metillenmiş bazlar DNA'dan O⁶-metilguanin DNA metiltransferaz (MGMT) ile ya da baz ekzisyon tamir (BER) yolağı ile kaldırılmaktadır (De Bont ve van Larebeke, 2004; Chatterjee ve Walker, 2017).

Abazik (apürinik/apirimidik) bölgeler: N-glikozil bağlarının hidrolize olması ya da DNA glikozilaz enzimi tarafından parçalanması sonucunda ortaya çıkan DNA hasar türüdür. Tamir edilmediğinde mutajenik özellik gösterebilen abazik bölgeler stabil olmayıp β -eliminasyon reaksiyonu ile kolaylıkla tek zincir kırıklarına dönüşme eğilimindedir. Bu bölgeler genellikle endonükleaz enzimi ile baz ekzisyon tamir yoluyla ile tamir edilmektedir (De Bont ve van Larebeke, 2004; Chatterjee ve Walker, 2017).

Oksidatif DNA hasarı: Aerobik solunum yapan canlılarda hücresel solunum sırasında elektron transport zincirinin yan ürünü olarak reaktif oksijen türleri açığa çıkmaktadır. Aynı zamanda katabolik oksidaz, anabolik süreçler ve peroksizomal metabolizma sonucunda da reaktif oksijen türleri ortaya çıkar. Düşük seviyelerde önemli hücresel fonksiyonları bulunan (redoks reaksiyonlarında hücresel mesajcı olarak görev yapma, immün sistemde patojenlerle savaşmada) reaktif oksijen türlerinin seviyesinin organizmada artması sonucunda DNA'da oksidatif baz lezyonları ve 2-deoksiriboz değişiklikleri meydana gelmektedir (Chatterjee ve Walker, 2017). En yaygın olarak görülen oksidatif baz hasar türleri 8-oksoguanin veya 8-oksoG olarak da bilinen 7,8-dihidro-8-oksoguanin ve timin glikoldür (Slupphaug ve ark., 2003). Hücre içerisinde bu durum mitokondride solunumun kısıtlanması, DNA'nın histon yapısı ile korunması, süperoksit dismutaz, katalaz gibi antioksidan enzimlerle reaktif oksijen türlerinin temizlenmesi ile kompanse edilir (Chatterjee ve Walker, 2017). DNA, protein ve lipid gibi makromolekül yapılarına zarar verme potansiyeline sahip reaktif oksijen türleri arasında süperoksit radikalleri, hidrojen peroksit ve hidroksil radikali yer alır (Chatterjee ve Walker, 2017; Slupphaug ve ark., 2003). Organizmada hidrojen peroksitin Fe^{+2} ile Fenton reaksiyonu sonucu açığa çıkan hidroksil radikali, reaktif oksijen türleri arasından en reaktif türdür. Oksidatif DNA hasarı sonucunda okside bazlar ya da zincir kırıkları meydana gelmektedir. Hidroksil radikali elektrofil özellikte olup, DNA'nın çift bağları arasına girerek metil gruplarından hidrojen atomlarını çıkartır ve şeker kalıntıları ile etkileşime girerek DNA yapısını bozmaktadır (Chatterjee ve Walker, 2017). Örneğin hidroksil radikali C5/C6 çift bağlarında yer alan timin bölgesine atakta bulunarak timin glikol

kalıntılarını oluşturmaktadır. Bunun dışında adenin ve guanin yapısındaki imidazol halka yapısını açarak DNA hasarına neden olan formamidopirimidin yapısının oluşumuna neden olmaktadır. Hidroksil radikali guanin bazının C8 kalıntısını hidroksilleyerek doymuş imidazol halkası içeren 7,8 dihidro-8-oksoguanin yapısını oluşturur (Chatterjee ve Walker, 2017; Slupphaug ve ark., 2003). Bu yapı sitozin yerine adenin bazı ile eşleşerek DNA'da mutasyona neden olur (Chatterjee ve Walker, 2017). Oksidatif DNA hasarı baz ekzisyon tamir yolağı ile ya da tek zincir/çift zincir kırık tamir yolları ile düzeltilmektedir (Chatterjee ve Walker, 2017; Slupphaug ve ark., 2003).

1.2.2. Ekzojen DNA hasarı

İyonize radyasyon (IR) sonucu oluşan hasar: Direkt ya da indirekt olarak DNA'ya hasar veren IR; baz lezyonlarını oluşturabilir ya da IR hasarına özgü tek zincir kırık oluşumuna neden olmaktadır (Chatterjee ve Walker, 2017). Ayrıca DNA'da şeker-fosfat yapısında da bozulmalar görülmektedir (Slupphaug ve ark., 2003).

UV ışınlarına maruz kalma sonucu oluşan hasar: UV-C, UV-B ve UV-A olmak üzere 3 farklı gruba ayrılan UV ışınlarının her birinin dalga boyları birbirinden farklı olup, DNA'nın absorblayabildiği UV radyasyon boyu 260 nm'dir. UV ışınları; UV ışınlarının absorblanması halinde moleküllerde fotokimyasal değişiklikler meydana getirmektedir ya da direkt olarak absorblanamayan UV ışınları moleküllerin yakınında bulunan ışık duyarlaştırıcı maddelerin molekülleri etkilemesi ile etkisini

göstermektedir. UV-C ışınları DNA’da siklobütan pirimidin dimerleri ve pirimidin (6-4) pirimidon foto ürünleri oluşturur (Chatterjee ve Walker, 2017).

Alkilleyici ajanların neden olduğu hasar: Sigara dumanı, biyokütle yanması, endüstriyel işlemler ve bazı kematerapötik ajanlar ekzojen DNA hasarına neden olan alkilleyici ajanlardır. Elektrofilik özellikte olan alkilleyici ajanlar nükleofilik bazın halkasındaki nitrojen atomlarına karşı yüksek affinite göstermektedir. Ayrıca bu ajanlar oksijen türlerine karşı da affinite göstermektedir. Komet testi yönteminde de pozitif kontrol olarak kullanılan alkilleyici ajanlara metil metansülfonat (MMS), etil metansülfonat (EMS), N-metil-N'-nitro-nitrozoguanidin (MNNG) ve metilnitrozoüre (MNU) örnek verilebilir. MMS, N⁷-metilguanin ve N³-metiladenin oluştururken, MNNG ve MNU ise timin ile yanlış eşleşme gösteren ve G:C→A:T mutasyonalarına neden olan O⁶-metilguanin yapısı oluşturmaktadır (Chatterjee ve Walker, 2017).

Aromatik aminlerin neden olduğu hasar: Sigara dumanı, yakıt, kömür, endüstriyel boyalar, pestisitler ve yüksek sıcaklıkta pişen besinler aromatik amin içeren ürünlerdir. Aromatik aminlerden en çok bilineni insektisit olarak da kullanılan 2-aminofloren (AF) ve asetillenmiş türevi olan N-asetil-2-aminofloren (AAF) dir. Aromatik amin içeren bileşikler guanin bazının C8 pozisyonuna atak göstererek DNA’da hasar oluşumuna neden olmaktadır (Chatterjee ve Walker, 2017).

Polisiklik aromatik hidrokarbonların (PAH) neden olduğu hasar: Karsinojen kimyasallar olarak bilinen polisiklik aromatik hidrokarbonlar iki ya da daha fazla aromatik halkalar içeren ve genellikle inert özellikteki bileşiklerdir. Yaygın olarak sigara ve tütün dumanında, egzoz dumanında, kömürleşmiş yiyeceklerde bulunur ve

ayrıca organik maddelerin ve fosil yakıtların tam olarak yanmaması sonucunda açığa çıkarlar. Polisiklik aromatik hidrokarbon yapısındaki önemli bileşiklere naftalen, antrasen, piren, 1-hidroksipiren, 1-nitropiren, benzo (a) piren ve dibenzo (a) piren verilebilir. P-450 sistemine bağlı olan PAH'lar DNA ile etkileşime giren ara ürünler oluşturmaktadır. Özellikle karsinojenite açısından insanlarda kansere neden olan dibenzo (a) piren en potent polisiklik aromatik hidrokarbon yapısındaki bileşiktir (Chatterjee ve Walker, 2017).

Toksinlerin neden olduğu hasar: Canlıların toksinlere maruz kalması kontamine olmuş tahıl ürünlerinin, baharatların, fındık ve süt ve süt ürünlerinin tüketimine bağlı olarak gerçekleşmektedir. Toksinlerden özellikle *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus parasiticus* tarafından üretilen Aflatoksinler canlıların sağlığı açısından önem taşımaktadır. Aflatoksinlerden Aflatoksin B1 en potent ve karaciğer kanserine neden olan türdür. Aflatoksin B1 P450 sistemi ile aktif formu olan aflatoksin B1-8,9-epoksit türevine dönüşür. Bu aktif form guanin yapısındaki N7 yapısına eklenerek pozitif yüklü 8,9-dihidro-8-(N7-guanil)-9-hidroksiaflatoksin B1 yapısına dönüşür. Bu yapı DNA'da glikozilik bağları zayıflatarak depürinasyona neden olmaktadır (Chatterjee ve Walker, 2017).

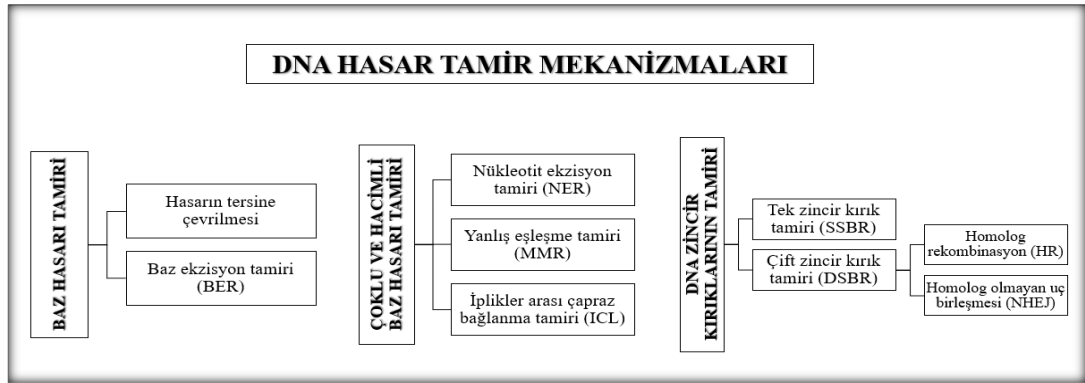
1.3. DNA hasar yanıtı (DNA Damage Response:DDR)

DNA hasar yanıtı; lezyona özgü sensör proteinlerinin hasar yanıtını başlatması, hasar yanıt faktörlerinin hasarlı bölgede toplanması ve ayrıca kromatin yeniden modelleme mekanizmasının devreye girmesini içeren bir mekanizmalar topluluğudur (Chatterjee ve Walker, 2017). Genomik bütünlüğü sağlayan ve genomda meydana gelen defektlerin çözülmesinde etkin olan DNA hasar yanıt mekanizmasının içerisinde

farklı DNA tamir yolları, hasar toleransı ve hücre döngüsü kontrol noktaları yer almaktadır. DNA hasar yanıt mekanizması organizma için önemli biyolojik işlevlere sahiptir. Bu mekanizmada yer alan faktörlerde oluşacak herhangi bir problem sonucunda nörolojik bozukluklar, immün yetmezlik ve farklı kanser türlerine yatkınlık durumu gözlenmiştir. Ayrıca bu mekanizma sisteminde yaşanan herhangi bir aksaklık organizmanın daha hızlı bir şekilde yaşlanma sürecine girmesine neden olmaktadır (Giglia-Mari ve ark., 2011).

1.4. DNA Hasar Tamir Mekanizmaları

DNA hasar tamir mekanizmaları Şekil 1.2.'de verilmiştir.



Şekil 1.2. DNA hasar tamir mekanizmalarının sınıflandırılması

1.4.1. DNA baz hasarı tamiri

Hasarın tersine çevrilmesi: İnsanlarda ve memelilerde iki farklı enzim O- ve N-alkillenmiş baz yapılarını tersine çevirmektedir. O-alkillenmiş baz yapısını tersine çeviren enzim O⁶-alkilguanin-DNA alkiltransferaz iken, N-alkillenmiş baz eklentilerini tersine çeviren enzim ise AlkB-ilişkili α -ketoglutarate-bağlı dioksigenaz (AlkB) dır. Bu enzimler hasarı bazdaki alkil grubunu enzimin katalitik cebinde yer alan sistein kalıntısına transfer eden basit bir reaksiyon ile tersine çevirmektedir (Chatterjee ve Walker, 2017).

Baz ekzisyon tamiri (BER): Çok yönlü bir tamir sistemi olan bu yolak ile oksidatif baz hasarı, deaminasyon, alkilasyon ve abazik tek baz hasarı tamir edilmektedir (Chatterjee ve Walker, 2017; Slupphaug ve ark., 2003). DNA'nın çift heliks yapısında herhangi bir bozulmaya yol açmayan minör kimyasal değişikliklere sahip baz yapıları BER mekanizmasının tamir yolağında substrat görevi görmektedir (Giglia-Mari ve ark., 2011). BER yolağı enzimatik olmayan durumlarla ya da DNA-glikozilaz enzimleri aracılığı ile başlatılmaktadır (Slupphaug ve ark., 2003). Çekirdekte hücre döngüsünün G1 fazında aktif olan bu yolak DNA hasar bölgesinde kromatin yeniden modellenmesini takiben en az 11 farklı ve hasarlı baza özgü DNA glikozilaz enzimlerinin hasarlı bölgeyi tanımlaması ile başlar. DNA glikozilaz enzimleri baz ekzisyon yolağında görevli enzimler olup sadece glikozilaz aktivitesine sahip tek fonksiyonlu enzimler ya da glikozilaz aktivitesine ek olarak β -liyaz aktivitesi ile çift fonksiyonlu olabilmektedir (Chatterjee ve Walker, 2017; Slupphaug ve ark., 2003). Urasil DNA-glikozilaz gibi tek fonksiyonlu enzimler hasarlı bazı ortadan kaldırarak abazik bölge oluştururken, bifonksiyonel olan enzimler ise liyaz aktivitesi ile DNA 3' abazik bölgesini temizlemektedir. Özellikle oksidatif stres sonucu oluşan hasarlı bazların kaldırılmasından bifonksiyonel DNA glikozilaz enzimleri sorumludur (Slupphaug ve ark., 2003).

Kısa ve uzun tamir yolağı bulunan BER mekanizmasında, kısa tamir yolağında tek fonksiyonlu enzimler görev alırken, uzun tamir yolağında ise çift fonksiyonlu glikozilaz enzimleri görev almaktadır (Chatterjee ve Walker, 2017). Kısa tamir yolağında tek nükleotit boşluğu, uzun tamir yolağında ise iki ya da sekiz adet nükleotit arasındaki boşluk giderilmektedir. Her iki yolak tek zincir boşluğunun oluşturulması, DNA sentezi ile oluşan boşluğun giderilmesi ve iki DNA zincirinin fosfat ester bağı ile birleştirilmesi aşamalarını içerir (Slupphaug ve ark., 2003).

1.4.2. Çoklu ve hacimli baz hasarının tamiri

Nükleotit ekzisyon tamiri (NER): NER, DNA’da meydana gelen UV ışınların indüklediği lezyonlar, hacimsel kimyasal eklentiler, alkilleyici ya da oksidasyon ajanlarının neden olduğu baz hasarlarının ortadan kaldırılmasında görev alan bir mekanizmadır (De Boer ve Hoeijmakers, 2000). Özellikle NER mekanizması aktif olarak DNA’da kimyasal değişikliklere ve heliks yapısının bozulmasına neden olan, kemoterapötik ajanların, polisiklik aromatik hidrokarbonların hacimsel eklentilerin giderilmesinde rol almaktadır (De Boer ve Hoeijmakers, 2000; Chatterjee ve Walker, 2017). NER mekanizmasının anlaşılmasında *Escherichia coli* bakterileri üzerinde yapılan çalışmalar önem kazanmıştır. Her ne kadar memeli sisteminde NER mekanizması prokaryotik bir canlıninkinden daha kompleks olsa da temel mekanizma evrimsel olarak prokaryotik canlılardan daha gelişmiş canlılara taşınmıştır. Temel olarak bu mekanizma hasarın tanımlanması, hasar çevresinde DNA heliks yapısının bölgesel olarak açılması, hasarlı iplikteki lezyonun kaldırılması ve iplik uzaması aşamalarını içerir (De Boer ve Hoeijmakers, 2000). Bu tamir yolağında gerçekleşen

mutasyonlara sahip bireylerde Kseroderma pigmentosum (XP), Cockayne Sendromu gibi çeşitli hastalıklara yatkınlık gözlenmektedir (De Boer ve Hoeijmakers, 2000; Chatterjee ve Walker, 2017).

Yanlış eşleşme tamiri (MMR): DNA’da replikasyon hataları sonucunda meydana gelen yanlış baz eşleşmeleri dinükleotit tekrarlarını oluşturmaktadır (Slupphaug ve ark., 2003). Mayotik ve mitotik rekombinasyon, DNA hasar sinyali, apoptozis, somatik hipermutasyon ve üçlü tekrar uzaması gibi birçok çeşitli hücresel süreç içerisinde yer alan yanlış eşleşme tamiri replikasyon boyunca ortaya çıkan yanlış eşleşmeleri, tekrarlayan DNA dizileri içindeki ekleme-silme döngülerinin tamirinden sorumlu mekanizmadır (Chatterjee ve Walker, 2017). Aynı zamanda oksidatif hasar sonucu oluşan 8-oksoguaninin tamirinde de görev almaktadır (Slupphaug ve ark., 2003). MMR mekanizmasında rol alan tamir genlerinin hipoksi, inflamasyon gibi nedenlerden dolayı oluşan çevresel stresi baskılamada rol aldığı gösterilmiştir. Üreme hücrelerinde gerçekleşen MMR mutasyonları bireylerin kolon ve over kanserine olan yatkınlığını artırmaktadır (Chatterjee ve Walker, 2017).

İplikler arası çapraz bağlanma tamiri (ICL): DNA’da çapraz bağlanmaya neden olan ajanların tamamlayıcı ipliklerden iki bazın kovalent olarak bağlanması sonucunda ortaya çıkan durum iplikler arası çapraz bağlanma olarak bilinmektedir. Çapraz bağlanmaya neden olan ajanlara platin bileşikler, nitrojen hardal gazı, alkilleyici ajanlar örnek verilebilir. Fanconi anemia (FA) adıyla bilinen proteinler tarafından iplikler arası çapraz bağlanma hasarı tanımlanmaktadır (Chatterjee ve Walker, 2017).

1.4.3. DNA zincir kırıklarının tamiri

Tek zincir kırık tamiri (SSBR): Tek zincir kırıkları genellikle DNA'nın oksidatif hasarı, abazik bölgeler ve DNA topoizomera-1 enziminin yanlış aktivitesi sonucunda ortaya çıkan durumdur. Tek zincir kırıklarının tamir edilmemesi durumunda DNA replikasyonunun bozulması, transkripsiyonun durması ve hücrel NAD⁺, ATP ve apoptoz indükleyici faktörlerin hücreden salındığı PARP1 aktivasyon durumu gerçekleşir. Uzun ve kısa yolak olmak üzere iki farklı tek zincir tamir kırık mekanizması bulunmaktadır (Chatterjee ve Walker, 2017).

Çift zincir kırık tamiri (DSBR): Hücrelerin yaşamsal fonksiyonlarını etkileyen ve DNA hasar türlerinden en tehlikeli olan DNA çift zincir kırıkları iyonize radyasyon, radyomimetik kimyasallara maruziyet, reaktif oksijen türlerinin oluşumu, kromozomlar üzerindeki mekanik stres, replikasyon çatalının DNA lezyonlarına atak yapması sonucunda ya da rekombinasyon süreci boyunca ara ürün olarak ortaya çıkmaktadır (Khanna ve Jackson, 2001; Slupphaug ve ark., 2003). Çift zincir kırıkları hücre için oldukça toksik bir durum olup tamir edilemediği durumda hücrenin ölümüne neden olmaktadır (Chatterjee ve Walker, 2017; Slupphaug ve ark., 2003). Biyolojik olarak organizma için önem arz eden çift zincir kırıklarının tamiri diğer DNA hasar türlerinin tamirine göre daha zordur. Özellikle çift zincir kırıkları sonucunda bir kromozom bölgesi silinerek tümör baskılayıcı bir gen oluşabilir, ya da başka bir kromozom bölgesi amplifiye olarak onkogenik potansiyele sahip proteinlerin kodlanmasına neden olabilmektedir (Khanna ve Jackson, 2001). DNA'daki çift zincir kırıklarının tamirinde birçok mekanizma görev almaktadır. Hasarın belirlenmesine yardımcı sinyallerin oluşumu ile başlayan sürece homolog rekombinasyon (HR) ve homolog olmayan uç birleşmesi (NHEJ) olan iki farklı tamir mekanizması, hücre döngüsünün durması, apoptoz ve hücre için gerekli olan adaptif yanıtların üretilmesi destek olmaktadır (Chatterjee ve Walker, 2017; Khanna ve Jackson, 2001; Slupphaug ve ark., 2003). Çift zincir kırık tamir mekanizması temelde homolog rekombinasyon

(HR) ve homolog olmayan uç birleşmesi (NHEJ) şeklinde iki yolak içerir (Chatterjee ve Walker, 2017). Farklı mekanizmalar ve farklı proteinler ile tamir sürecinde görev alan bu iki mekanizmanın ortak yönü, hasarın belirlenmesinde ve hasarın tamirinde görevli tamir faktörlerinin devreye sokulmasında görev alan kinaz yapılı ATM proteinine ihtiyaç duymasısıdır. Her iki mekanizma da hücre döngüsünün farklı aşamalarında baskın olmaktadır. HR tamir mekanizması hücre döngüsünün S fazından sonra etkin olarak görev alırken, NHEJ yolağı ise homolog kromozomların meydana geldiği G1 fazında baskın olmaktadır (Slupphaug ve ark., 2003). NHEJ tamir yolağında görevli olan yapı Ku proteinidir. Bu protein DNA'nın serbest uçlarına bağlanmaktadır. Ardından Xrcc4 proteini DNA ligaz IV ile birlikte tamir sürecince görev alır. Tamirin ligasyon öncesi basamağında helikaz ve ekzonükleaz aktivitesi içeren Rad50-Mre11-Nbs1 kompleksi rol oynamaktadır. Homolog rekombinasyon yolağında ise DNA ucuna bağlanan protein Rad52'dir. Bu yolda görev alan bir diğer protein ise sağlam iplik işgaline yardımcı olan Rad51 proteinidir. Sağlam olan iplikten gerekli bilgi alındıktan sonra homolog rekombinasyon sürecinde zincir uzama işlemi DNA polimeraz enzimi ile gerçekleşir. Zincir uçlarının bağlanmasında ise DNA ligaz I enzimi görev yapmaktadır. Homolog rekombinasyon mekanizmasında iki hasarsız ucu birleşmesi söz konusu iken, NHEJ mekanizmasında bu durum geçerli olmamaktadır. Genellikle, NHEJ mekanizması küçük sekans silinmelerine neden olan hatalara daha yatkın bir yoldur. Başlangıçtaki çalışmalar ökaryotik hücrelerde çift zincir kırıklarının tamirinde baskın olan yolağın NHEJ olduğunu bildirirse de günümüzdeki araştırmalar bu hücre türleri için homolog rekombinasyon yolağının da hayati öneme sahip olduğu yönünde sonuçlar bildirmiştir (Khanna ve Jackson, 2001). Bu mekanizmalarda yaşanan herhangi bir defekt sonucunda ataksi teleanjiyektazi (AT) ya da çift zincir kırıklarının tamirinde görev alan BRAC2 genindeki mutasyon sonucu ortaya çıkan meme kanseri gibi durumlar ortaya çıkmaktadır (Slupphaug ve ark., 2003).

1.5. Genotoksisite testleri

Genetik toksisite ya da genotoksisite hücre DNA'sında, kromozomlarda veya DNA replikasyon mekanizmasında meydana gelen değişiklikleri ve oluşan hasarı ifade eden genel bir tanımdır. Genetik toksisiteye neden olan genotoksik etkili bileşiklere ise genotoksin adı verilmektedir (Mouchet ve ark., 2005). Genotoksik ajanlara örnek olarak endüstriyel kimyasallar, pestisitler ve farmasötik bileşikler verilebilir ve bu ajanlar DNA seviyesinde baz eklentileri, yanlış baz eşleşmesi veya baz silinmesi gibi değişikliklere neden olabileceği gibi; mikroçekirdek oluşumu, anöploidi gibi kromozomal hasarlar da meydana getirebilir (Mouchet ve ark., 2005; Umbuzeiro ve ark., 2017). Meydana gelen bu durumlar genotoksisitenin belirteçleri olarak bilinmektedir ve bu belirteçler genotoksisite testleri ile tespit edilmektedir (Mouchet ve ark., 2005).

DNA hasarlarının, gen mutasyonlarının, kromozomal aberasyonlar gibi geri dönüşsüz hasarların tespit edilmesinde kullanılan genotoksisite testleri farmasötiklerden kozmetik ürünlere, endüstriyel kimyasallardan gıda katkı maddelerine kadar birçok maddenin güvenlik değerlendirilmesinde rol alır. Genotoksisite testleri kimyasalların güvenlik değerlendirilmesinin yapılmasını sağlayarak, uluslararası yasalara göre canlı ve çevre sağlığını korumayı amaçlar (Corvi ve Madia, 2017).

Temel in vitro analiz serileri ile belirlenen genotoksik tehlikenin değerlendirilme işlemi gereken durumlarda in vivo hayvan testleri ile devam eder (Corvi ve Madia, 2017). Tehlike değerlendirilmesinde rol alan in vitro genotoksisite testleri hem ileri testlerin hem de risk değerlendirilmesinin yapılmasına yardımcı olur. İn vitro

genotoksisite testleri gen ve kromozomal hasarları belirleyen testleri içerir. Bu testlerdeki en önemli dezavantaj organizmada görülen toksikokinetik süreçlerini (absorbsiyon, dağılım, atılım) değerlendirmede yetersiz olmasıdır. Metabolizma sürecinin değerlendirilmesi yönünden bakıldığında ise, genotoksisite testlerinden biri olan Ames testinde rat karaciğer S9 fraksiyon ilavesi metabolizmaya ilişkin bilgi sağlasa da eklenen bu fraksiyon tüm enzim sistemini temsil etmediği için metabolizmaya ilişkin yeterli bilgi sağlanamaz (Umbuzeiro ve ark., 2017).

OECD kılavuzunda yer alan standart in vitro genotoksisite testleri şunlardır:

- Bakteriyel revers mutasyon testi (OECD TG 471)
- İn vitro memeli kromozomal aberasyon testi (OECD TG 473)
- İn vitro memeli hücresi gen mutasyon testi (OECD TG 476)
- İn vitro memeli hücresi mikroçekirdek testi (OECD TG 487)

Genellikle, in vitro testlerden pozitif bir sonuç elde ediliyorsa, bu ileri in vivo hayvan deneyleri ile doğrulanır. İstenen durum ise in vitro testlerden elde edilen sonuçların hayvan deneyleri ile örtüşmesidir. Bu durumda, in vitro testlerinin optimizasyonunun sağlanması, hayvan deneylerinin gereksiz kullanımına neden olabilecek yanlış pozitif sonuçların önüne geçmesi açısından önemlidir.

OECD kılavuzunda yer alan in vivo test yöntemleri şunlardır:

- Memeli eritrosit mikroçekirdek testi (OECD TG 474)
- Memeli kemik iliği kromozomal aberasyon testi (OECD TG 475)
- Transgenik rodent somatik ve üreme hücresi gen mutasyon testi (OECD TG 488)
- İn vivo memeli alkali komet testi (OECD TG 489)

İn vivo testlerin yapılması hususunda her ülkenin yasal düzenlemeleri dikkate alındığında farklılıklar olduğu görülmektedir. Örneğin Avrupa bölgesinde kozmetik ürünler için in vivo testlerin yapılması yasaklanmıştır. Ancak yine aynı bölgede endüstriyel kimyasallar ve biyolojik ürünler için bir ya da daha fazla in vitro testlerden elde edilen yanıt pozitif ise in vivo hayvan testleri uygulanmaktadır. Eğer in vitro testlerden kesin olarak negatif sonuç alınırsa ileri bir hayvan testi yapılmasına ihtiyaç duyulmamaktadır. Farmasötikler, veteriner hekimlikte kullanılan ilaçlar ve herbisitler gibi ürünlerde ise in vitro genotoksisite test sonuçlarından bağımsız olarak, in vitro testleri takiben in vivo hayvan deneyleri yapılmaktadır (Corvi ve Madia, 2017).

Avrupa Birliği regülasyonuna göre in vitro genotoksisite testlerinin performansı mümkün derecede az hayvan kullanımı veya hiç hayvan kullanmama prensiplerine uygun olacak şekilde artırılmalıdır. İn vivo testlere duyulan ihtiyacın azaltılması için uygun in vitro test kombinasyonları belirlenmeli ve in vitro testlerden elde edilen sonuçların doğruluğunun teyidi için ilave ek testler uygulanmalıdır. Birçok düzenleyici kuruluş in vivo hayvan testlerinin yapılması gerektiği yönünde görüş bildirmektedir. Yine de bu testlerde amaç hayvan kullanımını optimize ederek kullanılan hayvan sayısını azaltmak yönünde olmalıdır. Bunu sağlamak için daha küçük hayvan grupları tercih edilebilir, tek cinsiyet hayvan kullanılabilir, farklı test sonuçları tek bir çalışmaya entegre edilebilir ve elde edilen sonuçlar kısa süreli

tekrarlayan doz toksisite çalışmaları ile birleştirilebilir. Farklı genotoksisite testlerinden elde edilen sonuçların entegrasyonu genotoksisite test bulgularının daha doğru yorumlanmasını sağlamaktadır (Corvi ve Madia, 2017).

1.5.1. Komet: Tek Hücre Jel Elektroforezi

Günümüzde yaygın olarak kullanılan genotoksisite testlerinden biri olan ve tek hücre jel elektroforezi olarak da bilinen komet testi yöntemi ilk olarak 1984 senesinde Ostling ve Johanson adlı iki araştırmacının nötral şartlarda çekirdekten DNA parçalarının göçünü göstermesi ile ortaya çıkmıştır (Bankoglu ve ark., 2021; Lu ve ark., 2017). 1988 yılında Singh ve arkadaşları komet testi yöntemini alkali şartlar altında gerçekleştirmeyi başararak yöntemin spesifikliğini ve yeniden üretilebilirliğini artırmış ve günümüzde en çok kullanılan komet testi şekli haline gelmiştir (Gajski ve ark., 2021; Lu ve ark., 2017). Ancak “komet” terimi ilk kez 1990 yılında Olive ve arkadaşları tarafından agaroz jel üzerinde görülen DNA’nın kuyruklu yıldız şeklindeki görüntüsünü tanımlamak için kullanılmıştır (Møller, 2018).

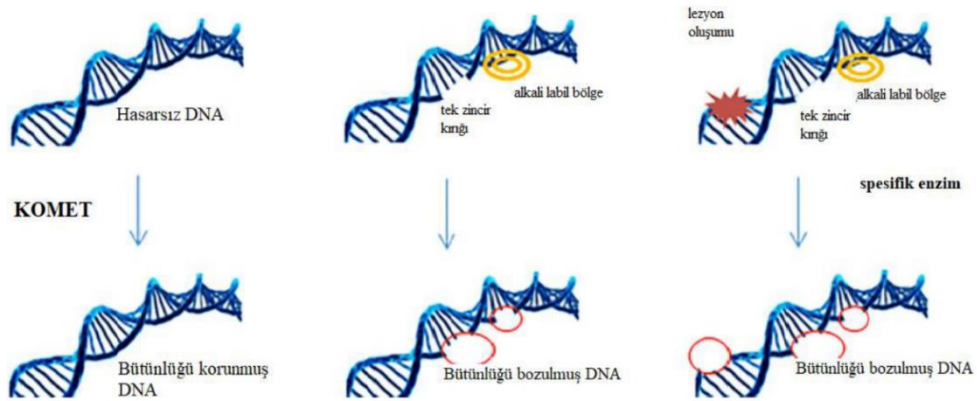
1990’lı yıllar komet testi yönteminin birçok alanda kullanılmaya başladığı zaman dilimidir. 1990 yılının başında komet testi ilk kez sağlıklı bireylerde biyoizlem çalışmalarında kullanılmıştır. Aynı dönemde hayvanlar üzerinde sigarada bulunan nitrozaminlerin DNA hasarına neden olduğunu göstermek için komet testi yöntemi kullanılmıştır. 1990 yılının ortalarında ise mesleki ve çevresel maruziyetin değerlendirilmesinde komet testi yönteminin kullanımı ile ilgili raporlar yayınlanmaya başlamıştır. Bu dönem komet testi yönteminin antioksidan ve fitokimyasal

çalışmalarda da kullanıldığı dönemdir. Nanopartiküllerin neden olduğu DNA hasarının hücre kültürü üzerinde komet testi yöntemi ile belirlenmesi ise 1997 yılına denk gelmektedir. 1990'lı yılların sonuna doğru ise Ulusal Kanser Ajansı'nın monograflarından seçilen 208 farklı kimyasalın fareler üzerinde kapsamlı bir şekilde değerlendirilmesinde komet testi yöntemi kullanılmıştır (Møller, 2018).

Genotoksik ve fiziksel ajanlara ya da endojen faktörlere maruz kalma sonucunda ortaya çıkan DNA hasarı, DNA'nın genomik yapısında meydana gelen kimyasal değişiklikleri kapsayan bir terimdir (Bankoglu ve ark., 2021; Bolognesi ve ark., 2019; Lu ve ark., 2017). Bir hücre yaşam döngüsü boyunca DNA hasarı ile karşı karşıya kalmaktadır (Lu ve ark., 2017). Hücrelerin yaşam döngüsü boyunca karşı karşıya kaldıkları bu durumun teorik olarak tamiri mümkündür ancak DNA tamirinin yanlış yapılması ya da hasarın devam etmesi durumunda bu süreç mutasyonlara, malignant hücre dönüşümlerine ve hücre ölümüne kadar gidebilmektedir (Bankoglu ve ark., 2021). DNA bütünlüğünün bozulduğu bu durum, genotoksisite testlerinden biri olan komet testi yöntemi ile belirlenebilmektedir (Gajski ve ark., 2021). DNA bütünlüğünün bireysel hücre düzeyinde belirlenebildiği bir test yöntemi olan komet, DNA hasarının değerlendirilmesinde kullanılan çok yönlü, hızlı ve hassas bir yöntemdir (Bolognesi ve ark., 2019; Gajski ve ark., 2021). Komet testinin bu özelliklerine ek olarak güvenilir sonuçlar üretmesi, düşük bir maliyete sahip olması ve az ekipman gerektirmesi yöntemin diğer genotoksisite testlerinden farkını ortaya çıkaran özellikleridir (Gajski ve ark., 2021; Møller 2018). Ayrıca, genotoksisite testlerinden olan kardeş kromatit değişim testi ve mikroçekirdek yöntemine göre komet testinin en önemli avantajlarından biri hücre bölünmesine ihtiyaç duyulmamasıdır (Mouchet ve ark., 2005).

Tek hücre ya da hücre süspansiyonlarından elde edilen hücreler üzerine uygulanabilen komet testi genotoksik bir ajanın etki mekanizmasını bilmeye gerek

kalmadan, oluşan DNA lezyonlarını geniş bir aralıkta tespit etmeye olanak sağlar (Bolognesi ve ark., 2019). 1988 yılında Singh ve arkadaşları tarafından alkali komet testinin geliştirilmesini takiben, yöntem üzerinde çeşitli modifikasyonlar yapılarak geniş çapta farklı tür DNA hasarlarının tespiti gerçekleştirilmiştir (Gajski ve ark., 2021). Böylece komet testi sadece DNA zincir kırıklarını belirlemede kullanılan bir yöntem olmaktan öte, çeşitli enzim modifikasyonları ile spesifik DNA lezyonlarının tespit edilmesine de olanak sağlayan bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır. Enzim modifiye komet testi ile farklı enzimler ortama eklenerek farklı tür DNA hasarları (alkillenmiş bazlar, okside pirimidinler ve okside guanin yapıları) tespit edilebilmektedir. Enzim modifiye komet test yöntemi ilk olarak Gedik ve arkadaşları tarafından HeLa hücrelerinin bulunduğu ortama bakteriyel T4 endonükleaz V enziminin ilavesi ile siklobütan pirimidin dimerlerinin tespitinde kullanılmıştır (Møller, 2018). Enzim modifiye komet test yönteminde en fazla kullanılan enzimler şunlardır: endonükleaz III (EndoIII), formamidopirimidin-DNA glikozilaz (Fpg), 8-oksoguanin DNA glikozilaz 1 (OGG1). Lezyona spesifik olan bu enzimlerin kullanılması ile DNA hasarının arkasında yatan mekanizma aydınlatılmaktadır (Gajski ve ark., 2021). Komet testi yöntemi ile aynı zamanda bireysel DNA tamir kapasitesi de ölçülmektedir (Bankoglu ve ark., 2021; Møller 2018). Şekil 1.3.'de komet testi ile tespit edilebilen DNA hasarları verilmiştir.



Şekil 1.3. Komet testi ile tespit edilebilen tek ve çift zincir kırıkları ile alkali labil bölgeler

Komet testi yönteminin prensibi negatif yüklü DNA parçalarının elektrik alanda anota doğru göç ederek kuyruklu yıldıza benzer görüntü oluşturmaya esasına dayanmaktadır. Elektrik alanda anot bölgesine doğru gerçekleşen göç DNA zincirlerinde meydana gelen kırık miktarının belirleyicisidir (Bolognesi ve ark., 2019).

Yöntemde tek hücre süspansiyonu olarak agaroz jel içerisine gömülen hücrelere yüksek tuz ve deterjan madde ile lizis işlemi uygulanır. Bu işlemin amacı DNA'nın histon yapısını bozarak DNA'nın nükleer matrikse süperkoil yapısında bağlanmasını sağlamaktır. Böylece DNA kırıklarının varlığında süperkoil yapı gevşer ve elektroforez aşamasında anota doğru DNA'nın uzaması gerçekleşerek kuyruklu yıldıza benzer görüntü gerçekleşmektedir. DNA'nın nükleoit formuna dönüştüğü lizis aşamasından sonra elektroforez uygulaması yapılır. Ardından nötralizasyon işlemi gerçekleştirilir. Değerlendirme aşamasında ise flüoresans boya ile boyama işlemi gerçekleştirilir ve floresan mikroskop altında DNA'da meydana gelen hasar görüntülenir (Gajski ve ark., 2021). DNA hasarının değerlendirilmesi farklı hasar sınıflarını içeren görsel skorlama yöntemine ya da bilgisayar ortamında görüntüleme analizlerine bağlı olarak yapılmaktadır. Bilgisayar ortamında görüntüleme analizlerine bağlı olarak yapılan hasar değerlendirmesi kuyruk uzunluğu, kuyruğun floresans yüzdesi ve kuyruk momenti gibi farklı parametrelere bağlıdır. Bu parametreler arasında DNA zincir kırıklığının sıklığı ile doğrusal bir ilişkide olan DNA kuyruk yüzdesi en güvenilir parametre olarak kabul edilmektedir (Bolognesi ve ark., 2019). Komet testi yöntemi ile hasar sonucunda meydana gelen kuyruk momentinin hesaplanması ile farklı deney gruplarındaki DNA hasarı karşılaştırılabilmektedir (Lu ve ark., 2017).

Nötral ortamda uygulanan komet testi yönteminde çift zincir kırıklarının tespiti yapılırken, günümüzde en çok tercih edilen alkali komet testinde hem tek hem de çift zincir kırıklarının tespiti yapılabilmektedir. Aynı zamanda alkali komet testi ile alkali-

labil bölgeler, DNA-DNA veya DNA-protein gibi çapraz bağlanmalar, tamamlanmamış ekzisyon tamir bölgelerini içeren tek zincir kırıkları da tespit edilmektedir. Hem nötral hem de alkali komet testinde fragmente DNA görüntülenmekte ve kantitatif olarak DNA hasarı ölçülebilmektedir (Lu ve ark., 2017).

İn vitro ve in vivo genotoksisite çalışmalarında yaygın olarak kullanılan komet test yöntemi prelinik ilaç çalışmalarında, çevresel maruziyetin değerlendirilmesinde, mesleki maruziyet çalışmalarında, biyoizlemede, yaşam tarzının DNA hasarına olan etkisinin değerlendirilmesinde, DNA tamir kapasitesinin belirlenmesinde kullanılmaktadır (Lu ve ark., 2017; Møller ve ark., 2020). Ekotoksikolojik çalışmalarda yaygın olarak kullanılan komet test yöntemi yaygın bir kullanım alanına sahip nanopratiküllerin genotoksisitelerinin değerlendirilmesinde kullanılmaktadır (Bolognesi ve ark., 2019). Aynı zamanda komet testi toksikolojide önemli bir yeri olan risk değerlendirme çalışmalarında kullanım alanına sahiptir. Somatik hücrelerde meydana gelen DNA hasarı hakkında bilgi veren komet testi yöntemi ayrıca üreme hücreleri üzerinde de DNA hasarının değerlendirilmesi ile üreme toksikolojisi açısından bilgi sağlamaya yardımcı olmaktadır (Gajski ve ark., 2021).

1.6. Pozitif Kontroller

Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Örgütü (Organisation for Economic Co-operation and Development-OECD) kılavuzunda yer alan tanıma göre deneysel grup

olarak ifade edilen pozitif kontroller bir test yönteminin belirlenen şekillerde gerçekleşip gerçekleşmediğini belirlemek için kullanılan kimyasal yapıli bileşikler ya da materyallerdir (Møller ve ark., 2020; Petersen ve ark., 2021). Kullanılacak yöntemde test edilmesi planlanan hipoteze uygun şekilde pozitif kontrol grubu seçilmektedir (Stone ve ark., 2009). Örneğin hücre canlılığının belirlendiği sitotoksiste testlerinde pozitif kontrol olarak hücre ölümüne neden olacak bileşikler seçilmelidir (Petersen ve ark., 2021). Bir diğerk örnek de oksidatif stres yolağı ile indükelenen sitotoksiste belirlenirken seçilecek olan pozitif kontrol oksidatif stres durumu oluşturacak bütill hidroperoksit gibi bir ajan olmalıdır (Stone ve ark., 2009). Bu durum esas alınarak komet test yönteminde kullanılacak olan pozitif kontroller direkt ya da indirekt etki mekanizması ile DNA’da hasar oluşturma potansiyeline sahip bileşikler olmalıdır. Genetik toksikolojide hücre kültürü üzerinde yapılan çalışmalarda pozitif kontrollerin kullanımı, deneyin performansı hakkında gerekli bilgiyi sağladığından dolayı zorunludur. Komet testinde kullanılan pozitif kontroller deneyler arası farklılıkları değerlendirmek ve elde edilen sonuçların güvenilir olduğundan emin olmak için kullanılmaktadır (Møller ve ark., 2020).

Pozitif kontrollerden elde edilen sonuçların farklı laboratuvar çalışmalarda benzer olmayışı ve farklı zaman dilimlerinde aynı yöntemden aynı sonuçları elde edememek pozitif kontrollerin kullanıldığı yöntemlerde karşılaşılan sınırlardan biridir (Petersen ve ark., 2021). Laboratuvarlar arası deneylerde oluşan farklılıkları önlemek adına araştırmacılar özellikle in vitro komet testi prosedürünü standart hale getirmek için kullanılacak olan pozitif kontroller ile ilgili optimizasyon yapılmasına dair görüş bildirmişlerdir (Møller ve ark., 2020).

Uygulanan komet test yöntemine bağılı olarak farklı pozitif kontroller kullanılmaktadır. Örneğin, temel alkali komet test yönteminde pozitif kontrol olarak kullanılan materyaller biri hidrojen peroksit veya X-ray ışınıdır. Enzim modifiye

komet test yöntemi olan Fpg Komet ya da oksidatif stres ölçütlerinden biri olan OGG1'e hassas bölgeler için uygulanan komet testi yönteminde ise pozitif kontrol olarak ışığa duyarlılaştırıcı Ro 19-8022 kullanılmaktadır (Collins ve ark., 2014). Bu bileşikler dışında komet testi yöntemi uygulanarak yapılan ekotoksikoloji çalışmalarında pozitif kontrol olarak potansiyel karsinojenik bir etilleyici bileşik olan EMS ve metilleyici ajan olan MMS kullanılmıştır (Mouchet ve ark., 2005). Ancak komet testi ile yapılan insan biyoizlem çalışmalarında etik nedenlerden ve sağlıklı bireylerin kasten genotoksik bir ajana maruz kalmayacağından dolayı pozitif kontrol grubu kullanılmamaktadır (Møller ve ark., 2020).

Canlılar üzerindeki etkiler hakkında bilgi sahibi olmak için yapılan in vitro çalışmalarda seçilecek olan pozitif kontrollerin, planlanan test yönteminin amacına uygun özellikler taşımasının yanı sıra aynı zamanda doz-cevap ilişkisine sahip yanıtlar oluşturması istenmektedir. Bunun dışında pozitif kontrol olarak kullanılacak olan bileşiğin seçiminde aşağıda sıralanan şu özelliklerin dikkate alınması gerekir (Petersen ve ark., 2021) :

- Pozitif kontrolün araştırılacak biyolojik etki mekanizması ile uyumlu olması
- Hazırlama kolaylığı
- Kimyasal saflık oranı
- Tanımlı fiziksel özellikler
- Depolama ve kullanım sırasındaki stabilitesi
- Kullanılan test materyalleri ile fiziksel, kimyasal ve biyolojik geçimliliği

- Yöntemin dinamik aralığını kapsayacak şekilde uygun yanıtlar ortaya koyması
- Ticari olarak satın alınabilirlik/bulunabilirlik
- Tanımlı toksisite profili
- Kullanım sonrası güvenli atılabilir durum

1.6.1. Hidrojen Peroksit (H₂O₂)

Radikal olmayan reaktif oksijen türlerinden biri olan H₂O₂ biyolojik sistemlerde oksidatif fosforilasyon gibi endojen fizyolojik süreçler sonucunda üretilmektedir (Benhusein ve ark., 2010; Halliwell 2006). Reaktif bir molekül olmayan H₂O₂ demir-II (Fe⁺²) ve bakır-II (Cu⁺²) gibi geçiş metalleri aracılığı ile Fenton reaksiyonu sonucunda son derece reaktif bir yapı olan hidroksil radikale dönüşmektedir (Benhusein ve ark., 2010; Halliwell 2006; Senevirathne ve ark., 2010). Hidroksil radikali hızlı bir şekilde DNA, lipidler ve proteinler gibi hücresel makromoleküllere bağlanarak fonksiyonel ve yapısal değişikliklere neden olur (Senevirathne ve ark., 2010).

H₂O₂'nin sistein proteaz enzimlerinden biri olan kaspaz-3'ü aktive ederek apoptozis ve nekroze neden olduğu bilinmektedir (Benhusein ve ark., 2010; Siu ve ark., 2009). Kaspaz-3'ün H₂O₂ ile aktive olması hücre içi Ca⁺² homeostazında bozulmaya neden olmaktadır (Senevirathne ve ark., 2010). Kaspaz bağımlı apoptotik süreçleri indükleyen H₂O₂ aynı zamanda kaspaz bağımlı olmayan apoptotik yollarda

görev alan proteinlerin aktivasyonunu indüklemektedir. Buna ek olarak, bir stres proteini olan HSP70 protein miktarında hücrelerin H_2O_2 'e maruz kalması sonucunda artış gözlemlenmiştir (Siu ve ark., 2009).

H_2O_2 'e maruz bırakılan hücrelerde belirgin bir hücre ölüm gözlenmiştir. Bu durum H_2O_2 'nin sitotoksik potansiyelini ortaya koymaktadır. Sitotoksik hasar potansiyeli olan H_2O_2 özellikle merkezi sinir sistemi hücrelerinin ölümüne neden olan serbest radikal türlerinin oluşumunda rol alan önemli bir kaynaktır. Aynı zamanda hücrelerde oksidatif stres artışına neden olan MDA üretimi ve LDH salımından da sorumludur (Senevirathne ve ark., 2010).

H_2O_2 'nin çeşitli hücrelerde DNA hasarına yol açması komet test yönteminde en yaygın şekilde kullanılan pozitif kontrollerden biri haline getirmiştir (Bankoglu ve ark., 2019; Benhusein ve ark., 2010; Senevirathne ve ark., 2010). DNA'da tek ve çift zincir kırıklarına neden olan H_2O_2 'nin kullanıldığı komet testi çalışmalarında maruziyet süresi ve uygulanan konsantrasyon değerleri arasında farklılıklar gözlemlenmiştir (Bankoglu ve ark., 2019; Benhusein ve ark., 2010). Bu durum H_2O_2 'nin pozitif kontrol olarak kullanıldığı komet testi yönteminden elde edilen sonuçların farklı olmasına neden olmaktadır. Bu duruma ayrıca, H_2O_2 'nin hücre kültürü ve saklama sırasında düşük stabiliteye sahip olmasının etkili olduğu belirtilmiştir (Bankoglu ve ark., 2019).

1.6.2. Metil Metansülfonat (MMS)

DNA’da yanlış baz eşleşmesi ve replikasyon bloklarına neden olan MMS, DNA bazlarındaki nitrojen ve oksijen atomlarını direkt olarak alkilleyen ve DNA’da metilasyona neden olan güçlü bir klastojendir (Chang ve ark., 2002; Fatur ve ark., 2003; Kirkland ve ark., 2016; Lundin ve ark., 2005). IARC Grup 2A sınıfında yer alan MMS, in vivo genotoksik bir bileşiktir (Chang ve ark., 2002; Kirkland ve ark., 2016). MMS, DNA üzerinde guanin bazını toksik ve karsinojenik olmayan 7-metilguanine ve adenin bazını lethal bir lezyon olup DNA sentezini inhibe eden 3-metiladenin’e dönüştürerek yanlış baz eşleşmesi ve replikasyon çatalında ilerleme oranında azalmaya neden olur (Chang ve ark., 2002; Lundin ve ark., 2005). Aynı zamanda MMS, kromozomlar arası ve kromozom içi rekombinasyonu indüklemektedir (Lundin ve ark., 2005). MMS’nin DNA üzerinde neden olduğu hasar bypass tamir mekanizması, baz ekzisyon tamiri ve rekombinasyon tamir yolağı ile düzeltilmektedir. Ayrıca, hücre bölünmesinin S fazında MMS’ye duyarlı olan hücreler, hücre bölünme döngüsü kontrol noktası proteinleri ile de MMS’nin neden olabileceği hasarı durdurma özelliğine sahiptir (Chang ve ark., 2002).

MMS’nin neden olduğu apürinik/apirimidinik bölgelerdeki lezyonlar komet test yöntemi ile tespit edilmektedir (Fatur ve ark., 2003). Hosseinzadeh ve arkadaşları (2008) MMS’nin farelerdeki farklı organlarda neden olduğu DNA hasarını incelemek için komet test yöntemini kullanmıştır. Elde ettikleri sonuçlar MMS’nin fare organlarında % kuyruk DNA oranında belirgin bir artışa neden olduğunu göstermiştir.

1.6.3. Etil Metansülfonat (EMS)

EMS, alkilleyici bir ajan olup yaygın olarak bilinen kimyasal bir mutajendir (Koch ve ark., 2010; Masoabi ve ark., 2018; Shirasawa ve ark., 2016; Di Sotto ve ark., 2010). Genotoksik hasarı indüklemeye potansiyeline sahip olan EMS aynı zamanda mikroçekirdek oluşum sıklığını artırmaktadır (Di Sotto ve ark., 2010). EMS, DNA’da çoğunlukla nokta mutasyonlarına neden olmaktadır (Koch ve ark., 2010; Masoabi ve ark., 2018; Shirasawa ve ark., 2016; Witt ve ark., 2018). EMS’nin en yaygın olarak C/G---T/A dönüşüm mutasyonlarına neden olduğu bildirilmiştir. EMS, DNA’daki guanin bazını alkilleyerek O-6 etilguanin yapısını oluşturur ve timin ile yanlış baz eşleşmesi gerçekleşir. EMS aynı zamanda tek nükleotit varyasyonlarına ve insersiyon/delesyon mutasyonlarına da neden olmaktadır (Shirasawa ve ark., 2016).

Yüksek oranda gen mutasyonlarına, düşük sıklıkta ise kromozomal aberasyonlara neden olan EMS’nin birçok bitkü türü için faydalı özellikler kazanmasına yol açtığı bildirilmiştir (Koch ve ark., 2010; Masoabi ve ark., 2018). Su stresine ve herbisitlere karşı dayanıklı bitki türleri geliştirmede EMS’nin neden olduğu mutasyonlardan yararlanılmıştır (Masoabi ve ark., 2018; Witt ve ark., 2018). Bitkilerde genetik çeşitlilik oluşturmak için kullanılan EMS’nin neden olduğu nokta mutasyonları özellikle, domates, pirinç, muz, pamuk gibi bitkilerde kuruluğa karşı toleransı artırmıştır (Witt ve ark., 2018).

1.6.4. N-Etil-N-Nitrozoüre (ENU)

Alkilleyici ajanlar DNA’da replikasyon sırasında yanlış eşleşmelere neden olabilecek istenmeyen DNA eklentileri oluşturan kimyasallardır (Richardson ve ark., 1987). Alkilleyici kimyasallar sınıfında yer alan ve insanlarda potansiyel karsinojenite riski bulunan N-nitrozo bileşikleri bu sınıf içerisindeki en potent gruptur (Bronstein ve ark., 1991). Bir N-nitrozo bileşiği olan ENU monofonksiyonel alkilleyici bir ajandır (Bronstein ve ark., 1991; Gichner 2003; Nath ve Maiti 2022; Richardson ve ark., 1987). Vücut sıvılarındaki çözünürlüğü iyi olan ENU kolay bir şekilde hücrenin çekirdeğine ulaşarak DNA bazlarına etil grubunu ekler (Nath ve Maiti 2022). DNA’daki oksijen atomu ile etkileşime giren ENU, aynı zamanda adenin ve guanin bazının yapısındaki nitrojen halkası ile de etkileşime girme potansiyeline sahiptir (Bronstein ve ark., 1991). Alkilleyici ajanların neden olduğu ürünler içerisinde özellikle guanin bazının O⁶ ve timin bazının O⁴ konumunun etillenmesi sonucu ortaya çıkan yapılar en mutajenik olanlardır (Bronstein ve ark., 1991; Richardson ve ark., 1987). ENU nükleotit etilasyonu ile yanlış baz eşleşmesi sonucunda DNA’da nokta mutasyonlarının oluşumuna neden olur (Cordes 2005; Nath ve Maiti 2022). Temel olarak DNA’da nokta mutasyonlarına neden olan ENU’nun DNA’da küçük silinmelere de neden olduğu bildirilmiştir (Nath ve Maiti 2022).

ENU, DNA alkilasyonu yapmasının yanı sıra aynı zamanda proteinlerde genetik olmayan yapısal değişikliklere ve redoks sinyal dengesini bozarak hücre içi oksidatif stresi indüklemeye neden olmaktadır (Nath ve Maiti 2022). Güçlü bir toksin, mutajen ve genotoksik bir ajan olan ENU karsinojenite çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Li ve ark., 2010; Nath ve Maiti 2022). Farelerde yapılan deneyde tek doz ENU maruziyetinin fare karaciğerinde hepatosellüler karsinomayı indüklediği belirtilmiştir (Li ve ark., 2010). ENU’nun karsinojenite çalışmalarında kullanım üstünlüğü, birçok karsinojen maddenin biyolojik etkisi metabolik aktivasyona bağlı iken, ENU’nun metabolik aktivasyona ihtiyaç duymadan nükleotitleri direkt olarak

alkillemesine dayanmaktadır (Li ve ark., 2010; Nath ve Maiti, 2022). Birçok araştırmacı tarafından mutajen bir ajan olarak kullanılan ENU'nun fare spermatogonia hücrelerinde spesifik bölge mutasyonlarını indüklediği gösterilmiştir (Hitotsumachi ve ark., 1985). Aynı zamanda genotoksik bir madde olan ENU'nun DNA hasarını indükleyip indükmediğini komet test yöntemi ile araştıran araştırmacılar doza bağlı olarak ENU'nun DNA hasarına yol açtığını belirtmişlerdir (Gichner, 2003). Bağırsak neoplazisi araştırmalarında model olarak kullanılan ENU, aynı zamanda genetik taramalara katkıda bulunan bir ajandır. Özellikle, memelilerde X inaktivasyonu gibi durumlarda rol alan genleri açığa çıkarmada ENU mutagenezinden yararlanılmıştır (Cordes, 2005).

1.6.5. Etoposid

Hücre döngüsüne spesifik bir ajan olan etoposid farklı kanser türlerinin tedavisinde yaygın olarak kullanılan antikanser etkili bir ajandır (Godard ve ark., 1999; Tammaro ve ark., 2013). Topoizomeraz α ve β olmak üzere iki tane izomer formunu içeren topoizomeraz II etoposidin hücresel hedefidir (Tammaro ve ark., 2013). Her iki izomer formunu ayırt etmeksizin inhibe eden etoposid DNA ile üçlü kompleks bir yapı oluşturarak enzimin fonksiyonunu bozar ve DNA'da tek ve çift zincir kırıklarının oluşmasına neden olur (Godard ve ark., 1999; Tammaro ve ark., 2013). Aynı zamanda etoposid birçok farklı hücre hattında apoptozisi indüklemektedir (Godard ve ark., 1999).

DNA’da zincir kırıkları oluşturan etoposidin genotoksik etkisi hem in vitro hem de in vivo komet test yöntemi ile araştırılmıştır. Etoposidin ratlardaki belirli organlarda DNA hasarını indüklediği, in vitro Chinese Hamster Ovary (CHO) hücre hattında ise 1 saatlik maruziyet sonucunda ve doza bağlı olarak DNA hasarına neden olduğu bildirilmiştir (Godard ve ark., 1999).

1.6.6. Diğer Pozitif Kontroller

Diğer pozitif kontrollere örnek olarak N-nitrosodimetilamin (dimetil nitrozamin) (NDMA; DMN), N-metil-N-nitrozoüre (MNU) ve potasyum bromat (KBr_3) verilebilir (Hartmann ve ark., 2003).

Oksidasyon ajanı olan KBr_3 içme sularının dezenfeksiyonu sırasında bir yan ürün olarak ortaya çıkmaktadır. Gıda katkısı maddesi olarak ve fermente içeceklerin elde edilmesinde kullanılmaktadır (Al-Mareed ve ark., 2022; Zhang ve ark., 2011). Ayrıca farmasötik ve kozmetik ürünlerin yapımında da kullanılmaktadır (Al-Mareed ve ark., 2022). Uzun yıllardan beri Amerika’da ekmek yapımında kullanılan KBr_3 , ekmeğin normal yapım sürecinde daha stabil formu olan potasyum bromide dönüşmektedir (Zhang ve ark., 2011). Potasyum bromide dönüşüm tam olarak gerçekleşmediğinde bu durum insanlarda potansiyel karsinojen riski taşıyan potasyum bromatın ekmekte kalıntı olarak bulunmasına neden olur (Poul ve ark., 2004; Zhang ve ark., 2011). IARC’ye göre KBr_3 insanlar için muhtemel karsinojen (Grup 2B) sınıfında yer almaktadır ve insanlarda çoklu organ toksisitesini indüklemektedir (Ahmad ve ark., 2015; Zhang ve ark., 2011). Çoklu organ toksisitesinde özellikle ilk

hedef böbreklerdir. İn vivo ve in vitro çalışmalar potasyum bromatın potansiyel bir nefrotoksin olduğunu ortaya koymuştur (Al-Mareed ve ark., 2022). Yapılan hayvan deneyleri potasyum bromatın sıçan ve farelerin böbreklerinde tümör oluşumuna neden olduğunu göstermiştir (Al-Mareed ve ark., 2022; Zhang ve ark., 2011).

KBr₃ maruziyeti, DNA ve kromozom hasar oluşumu ile ilişkilendirilmiştir (Al-Mareed ve ark., 2022). Alkali komet testi ile yapılan çalışmalar KBr₃'ün DNA kuyruk yüzdesini arttırdığını göstermiştir (Speit ve ark., 1999; Zhang ve ark., 2011). KBr₃'ün en sık neden olduğu DNA hasar türü 8-oksodeoksiguanozindir (Al-Mareed ve ark., 2022; Speit ve ark., 1999). Bir komet testi türü olan Fpg-komet testi ile KBr₃'ün neden olduğu oksidatif DNA baz hasarının tespiti yapılmaktadır (Speit ve ark., 1999). Çift zincir DNA kırıklarında 3'-OH oluşumunu indükleyen potasyum bromat intestinal hücrelerde DNA-protein çapraz bağlanmasına neden olmaktadır (Ahmad ve ark., 2015; Al-Mareed ve ark., 2022).

Komet testinde pozitif kontrol olarak kullanılan bir diğer pozitif kontrol NDMA ya da DMN' dir. Kısa zincirli bir nitrozamin bileşiği olan NDMA, çevresel birçok bileşen içerisinde yer almaktadır (Murdock ve ark., 2004; Zhang ve ark., 2021). Çin, Japonya, Kanada gibi birçok ülkenin içme sularında saptanan NDMA'nın Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından belirlenen içme suyu konsantrasyonu 100 ng/L'dir. Birçok yoldan maruziyetin gerçekleşebildiği NDMA, insan sağlığı ve ekoloji açısından tehlike oluşturma potansiyeline sahiptir. Özellikle gıdalarda NDMA kontaminasyonunun kolorektal kanser riskinde artışa neden olduğu belirtilmiştir (Zhang ve ark., 2021). Potansiyel olarak DNA hasarını indükleyen NDMA'nın genotoksik etkisi metabolik aktivasyon ile gerçekleşmektedir (Hobbs ve ark., 2015). CYP2E1 biyoaktivasyonuna ihtiyaç duyan NDMA'nın bu geni eksprese eden hücrelerde belirgin derecede hücre canlılığında azalmaya neden olduğu gösterilmiştir. Aynı zamanda Tip I diyabet için risk faktörü olan NDMA'nın insülin sekresyonu

yapan pankreatik β hücrelerinde doza bağlı olarak belirgin bir DNA hasarına yol açtığı gözlemlenmiştir (Murdock ve ark., 2004). Sıçan karaciğerinde yapılan çalışmalarda, komet testinde NDMA maruziyetinin artan DNA göçüne neden olduğu bildirilmiştir (Hobbs ve ark., 2015). CYP2E1 ile biyoaktif olan NDMA, alkilasyon ile DNA'ya alkali eklentiler yapar ve DNA zincir kırıklarını oluşturur (Hobbs ve ark., 2015; Murdock ve ark., 2004).

Monofonksiyonel alkilleyici bir ajan olan MNU direkt etkili bir mutajendir (Diab ve ark., 2022; Menke ve ark., 2001). Mide ve bağırsakta metil ürenin nitrat ile nitrozasyonu sonucu endojen olarak üretilir (Diab ve ark., 2022). Antineoplastik bir ajan olan MNU farklı organ sistemlerinde farklı dozlarda DNA hasarına neden olmaktadır (Diab ve ark., 2022; Kitamoto ve ark., 2015). Sıçanlar ile yapılan komet testinde MNU'nun karaciğer ve kemik iliğinde DNA kuyruk yüzdesini arttırdığı; midede sitotoksik olmayan dozlarda bile DNA hasarını indüklediği gösterilmiştir. MNU DNA hasarını, DNA'nın yapısındaki nitrojen bazlarındaki ve fosfat gruplarındaki nitrojen ve oksijen atomlarına alkil grubu transfer ederek gerçekleştirir. Geniş DNA eklentilerinin oluşumu RNA transkripsiyon sürecindeki hata ile sonuçlanmaktadır (Kitamoto ve ark., 2015).

1.7. Fibroblast

Morfolojik olarak karakteristik bir iğ şeklinde yapısı olan fibroblastlar bağ dokunun temel hücresidir (Ichim ve ark., 2018). Kendi aralarında ve diğer hücrelerle

etkileşim içerisinde kalmaları kurdukları simetrik ve çoklu bağlar sayesinde gerçekleşir (Richard ve ark., 2012).

Fibroblastlar başka hücre türlerine farklılaşma potansiyeline sahiptir. Yapılan çalışmalar fibroblastların kondrojenik hücrelere, endodermal hücre hatlarına farklılaşabildiğini göstermiştir. Aynı zamanda fare fibroblast hücrelerinin insülin üreten hücre agregatlarına dönüşebildiği belirtilmiştir (Ichim ve ark., 2018).

Fibroblastlar bulunduğu doku türünün kökenine göre, farklı proliferasyon ve ekspresyon oranlarına sahip biyolojik belirteçlere sahiptir. Örneğin proliferasyon özelliğine sahip fibroblast hücrelerinde yüksek oranda CD40 ekspresyonu gözlemlenirken, bu oran proliferasyon yeteneğine sahip olmayan fibroblastlarda daha düşük belirlenmiştir. Hücrelere ait C1q reseptör ve Thy-1 gibi antijen ekspresyon miktarı da doku türüne göre değişiklik göstermektedir. Fibroblastların sahip olduğu biyolojik belirteçler aynı zamanda fibroblast hücre miktarının belirlenmesini sağlamaktadır. Fakat bu belirteçler sadece fibroblast hücrelerine özgü olmayıp, diğer hücre türlerinde de bulunabilmektedir. Bu durum fibroblast miktarını belirlemede negatif sonuç vermektedir. Bu belirteçlerden bazıları; Vimentin, Discoidin Domain Reseptör 2 (DDR2), ve CD90 olarak bilinen Thy-1'dir. Vimentin, fibroblastların da içerisinde olduğu birçok hücre türünde bulunan; hücrelerde kontraktilite, migrasyon, proliferasyon, direnç gibi önemli mekanik ve biyolojik işlevlere sahip yapısal bir bileşendir. DDR2 kardiyak doku fibroblast hücrelerinde bulunmaktadır. CD90 ekspresyonu ise fibroblastların apoptoza olan duyarlılığını temsil etmektedir. Bu bağlamda CD90 ekspresyonu yapan fibroblast hücreleri, yapmayanlara göre apoptoza daha duyarlıdır. CD90 ekspresyonu aynı zamanda inflamatuvar bir sitokin olan IL-6 üretimi ile ilişkilidir (Ichim ve ark., 2018).

1.7.1. Fibroblast Hücrelerinin Görevleri

Fibroblastlar birçok biyolojik süreçte önemli görev alır. Bunlardan ilki fibroblastların yara iyileşme sürecinde görev almasıdır. Doku hasarı inflamasyon sürecini başlatan Interlökin-1 β , tümör nekroz faktör gibi birçok biyokimyasalın salgılanması ile başlar (Richard ve ark., 2012). Yara iyileşme süreci ise fibroblast hücrelerinin de içinde yer aldığı kompleks bir fizyolojik süreçtir (Barisic-Dujmovic ve ark.,2010). Bu süreçte fibroblastlar yaranın iyileşmesini granülosit-makrofaj koloni stimüle edici faktör, tip I kolajen salgılama ve dokunun kontraktilitesini artırarak gerçekleştirir (Richard ve ark., 2012).

Yara iyileşme döneminde oluşan skarlı doku fibroblastların yüksek oranda proliferere olması sonucunda meydana gelmektedir. Ancak fibroblastların normalden fazla bir şekilde proliferere olması (hiperproliferasyon), fibroblast hücrelerinin çok daha fazla miktarda hücre dışı matriks bileşenleri salgılamasına ve yüksek miktarda kolejen üretimine neden olur. Bu durum dokularda işlev kaybına neden olarak doku ve organların yaşlanma süreci ile ilişkili kalıcı fibrozis durumunu tetiklemektedir (Ichim ve ark., 2018).

Bağ dokuya mekanik direnç sağlayan fibroblastlar doku homeostazının sürdürülmesinde rol almaktadır. Kontraktilitesini kaybetmiş ve hücre dışı matriks bileşenlerinin salgılanmasında azalma görülen fibroblast hücreleri bağ doku bütünlüğünün bozulmasına neden olarak yaşlanma sürecinin içerisinde yer alır. Bu bağlamda yapılan çalışmalar fibroblastların yaşlanma sürecinin engellenmesinde rejeneratif tıpta alternatif bir seçenek olarak kullanılacağını göstermiştir (Roy ve ark., 2020).

Fibroblastlar özellikle tip I kolajen üretiminden sorumlu olan hücrelerdir (Richard ve ark., 2012). Yapılan çalışmalar normal periferel kanda kolajen üretimi yapan ve hematopoietik hücrelere özgü belirteçleri (kolajen tip-1 a-düz kas aktini, CD IIb, CD 1 3 gibi) eksprese eden fibrosit hücrelerinin varlığını ortaya koymuştur (Barisic-Dujmovic ve ark., 2010).

Fibroblast hücrelerinin vücut için önemli birçok biyolojik süreçte yer alması, onların potansiyel olarak klinikte kullanımını beraberinde getirmiştir. Fibroblastların klinikte potansiyel kullanım alanları şunlardır (Ichim ve ark., 2018):

- İyileşme göstermeyen çeşitli yaraların tedavisinde penis ucu derisindeki fibroblastların ve keratinositlerin beraber kullanımı,

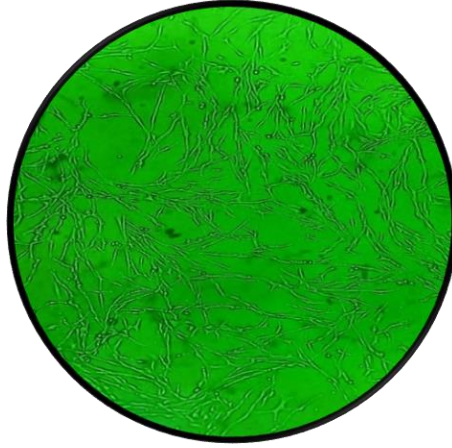
- Diyabetik ayak ülserleri, venöz ayak ülserlerinde yara iyileşmesini hızlandırmak için kullanılan; Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration: FDA) onaylı, insan neonatal fibroblast hücrelerinden köken alan, steril ve biyoabsorbe dermal yapıya sahip Dermagraft,

- Distrofik epidermolizis bulloza klinik tedavisinde,

- Yetişkinlerde nazolabial kıvrım kırışıklarının tedavisinde kullanılan, FDA onaylı otolog fibroblast kaynaklı bir ürün olan LAVIV™ (azficel-T)

1.7.2. 3T3 Hücre Hattı

3T3 hücre hattı 1962 yılında New York Üniversitesi'nde çalışan iki araştırmacı Todaro ve Green tarafından Swiss-albino fare embriyo dokusundan izole edilmiştir (Todaro ve Green 1963). Embriyonik bir fibroblast hücre hattı olan 3T3 tek tabaka olarak çoğalmaktadır. Besi yerinde kolaylıkla çoğalan bu hücre hattının büyümesi hücre döngüsünün G1 fazında durmaktadır (Armelin 1973; Perker ve ark., 2019). Temas engelleme olarak bilinen “contact inhibiton” özelliğine sahip 3T3 hücre hattı birçok biyolojik çalışmada kullanılan önemli bir deneysel modeldir (Armelin, 1973). Şekil 1.4.'de 3T3 hücre hattının mikroskop altındaki görüntüsü verilmiştir.



Şekil 1.4. 3T3 hücre hattının inverted mikroskop altındaki görüntüsü

1.8. Hücre Kültürü

Hücre kültürü; hücrelerin dokulardan, hücre hatlarından veya hücre suşlarında doğrudan ya da enzimatik yollarla izole edilerek, hücreler için gerekli olan besin maddeleri ve büyüme faktörleri içeren bir besi yeri ortamında yapay olarak çoğaltılma işlemidir (Anton ve ark., 2015; Baust ve ark., 2017).

Önemli bir çalışma alanı olan hücre kültürü birçok biyolojik araştırmaya ışık tutmaktadır (Anton ve ark., 2015). Bir hücrenin biyokimyasal ve fizyolojik süreçlerini anlamada önemli model olan hücre kültürü kanser ve kök hücre araştırmalarına, ilaç geliştirme sürecine katkı sağlamaktadır (Anton ve ark., 2015; Jensen ve Teng 2020). İlaç geliştirme sürecinin klinik öncesi aşamasında ilaçla ilgili toksikokinetik parametrelerin değerlendirilmesinde hücre kültürü çalışmalarından yararlanılmaktadır. Ayrıca, hücre kültürü çalışmaları gen terapisine, genomik ve proteomik araştırmalara, karsinojenite ve mutajenite çalışmalarına destek olmaktadır (Anton ve ark., 2015; Baust ve ark., 2017).

Hücre hattı, ilk pasaj işleminden sonraki hücre kültürüne verilen tanımdır (Masters ve Stacey 2007). İlk kez 1951 senesinde agresif serviks adenokarsinomdan hayatını kaybeden 30 yaşındaki Henrietta Lacks isimli hastadan, Dr. George Gey “HeLa” adı ile bilinen insan hücre hattını elde etmiştir. Bir insan kanser hücre hattı olan HeLa, hücre kültürü ortamında hızlı çoğalması ile karakterizedir ve dünyadaki birçok araştırmacı tarafından günümüzde kullanılmaktadır (Lucey ve ark., 2009).

Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan hücreler ölümsüz (devamlı) ya da sınırlı yaşam süresine sahip olmaktadır. Sınırlı yaşam süresine sahip hücreler genellikle 50 jenerasyona kadar yaşayabilen insan diploit fibroblast hücreleridir. Birçok insan hücre hattı, sağlıklı embriyonik, yetişkin veya kanser dokusundan izole edilmektedir (Masters ve Stacey 2007).

Hücre kültüründe hücreler, uygun sıcaklık (37°C), nem ve %5 karbondioksit içeren ortamda; gerekli besin maddelerinin, büyüme faktörlerinin ve hormonların yer aldığı uygun pH'ya sahip besi yeri ortamında çoğaltılmaktadır (Anton ve ark., 2015). Optimum koşulların sağlandığı hücreler bulundukları ortamda adherent/tek tabaka ya da süspande olarak çoğalır (Masters ve Stacey, 2007). Hücre kültüründe hücrelerin çoğalması için gerekli olan besi yerinin içeriği, pH'sı, ozmolaritesi gibi faktörler hücre kültüründe kullanılan hücre türüne göre değişiklik göstermektedir (Baust ve ark., 2017). Ticari olarak piyasada farklı besi yeri bulunmaktadır. Ancak temelde bir besi yeri hücre için gerekli olan amino asitleri, vitaminleri, tuzları ve glikozu içermektedir. Besi yeri ortamı içerisine hücrelerin büyümesine ve tutunmasına destek olan ve besi yeri ortamındaki eksiklikleri tamamlayan ve hayvansal ya da biyolojik kökenli olan serum ilavesi yapılır. Besi yeri ortamına ilave edilen en yaygın serum türü kalf serumdur (Masters ve Stacey, 2007).

Hücre kültürü çalışmaları, bu alanda çalışan araştırmacıların birçok alanda uzmanlığını gerektiren bir alandır (Masters ve Stacey, 2007). Bu alanda en çok karşılaşılan problemlerden biri kontaminasyon riskidir. Kontaminasyona yol açan faktörler bakteri, virüs, mikoplazma gibi mikrobiyal ajanlar ya da serbest radikaller, ağır metaller gibi kimyasal kontaminantlar olabilir (Baust ve ark., 2017). Bu yüzden bu alanda çalışan araştırmacıların, aseptik teknik, mikroskop kullanımı, hücre morfolojisi gibi durumlarda bilgi sahibi olması beklenmektedir (Masters ve Stacey, 2007).

Hücre kültürünün başarılı olması temelde 4 gereksinime bağlıdır. Bunlar:

- 1) İyi ve doğru donanımına sahip ekipmanlar: biyolojik güvenlik kabini, santrifüj, inverted mikroskop, 37°C ve %5 CO₂ inkübatör, sıcak su banyosu, hücre sayım cihazı
- 2) Steril teknikler ve uygulamaları
- 3) Kalite kontrol sürecinden geçmiş uygun kimyasal ajanlar/bileşikler
- 4) Hücre türüne göre gerekli teknikler ve uygulamalar hakkında yeterli bilgi ve donanım (Helgason ve Miller, 2005).

1.9. Hücre Pasajı

Hücrelerin bulunduğu flask içerisinde çoğalma sürecinde geçirdikleri 3 farklı evre vardır. Bu evrelerden ilki hücrelerin yeni bir ortama adaptasyonunun gerçekleştiği gecikme periyodu olarak bilinen “lag periyot”tur. İkinci evre hücrelerin hızlı çoğalma periyodudur. En son evre ise hücrelerin maksimum sayıya ulaştıktan ve hücre yüzeyini tamamen doldurduktan sonraki plato fazıdır. Hücrelerin flask içerisine ekilme oranına bağlı olarak, bulundukları ortamda uygun doluluk oranına ulaştıktan sonra bir başka

ortama transfer edilme işlemine “pasajlama” ya da “alt kültürleme” adı verilmektedir (Masters ve Stacey, 2007).

Hücre pasajının amacı:

- Hücrelerin sağlıklı bir şekilde çoğalmasına olanak sağlamak,
- İleri deneyler için hücreleri saklamak,
- Hücre kültürü çalışmalarında kullanmak (Kwist ve ark., 2016).

Hücre çalışmalarında hücre pasaj sayısı önemli bir faktördür. Farklı hücre hatlarında hücre pasaj sayısının etkisi kültür koşullarına, hücre hattına ve kullanılan hücre türüne bağlıdır (Cao ve ark., 2021). Hücre kültürü çalışmalarında zaman geçtikçe kullanılan hücre tipine bağlı olarak hücrelerin metabolizmasında değişikliklerin meydana geldiği hücre yaşlanma süreci gerçekleşir. Özellikle pasaj sayısı, sınırlı yaşam ömrüne sahip birincil hücrelerde belirli bir pasaj sayısından sonra hücrelerde değişikliğe yol açtığı için önemli bir ölçüttür. Bu durum ölümsüz hücre hatlarında da önem taşımaktadır. Birçok araştırmacı daha tutarlı sonuçlar elde etmek için düşük pasaj sayısına sahip hücreleri kullanmayı tercih etmektedir. Hücrelerin sağlıklı bir şekilde çoğalması için pasaj önemli bir aşamadır. Pasaj sayısı arttıkça hücrelerin biyolojik aktivitelerinde değişiklik olacağı için aynı deney yönteminden elde edilen sonuçlar değişiklik gösterebilmektedir. Aynı zamanda artan pasaj sayısı hücrelerde kontaminasyon riskini artırabilecek bir faktördür (Kwist ve ark., 2016).

Hücrelere uygulanan pasaj sayısının; hücrelerin büyümesi, hücre sayısının iki katı çıkma süresi, flask yüzeyini kaplama verimliliği ve hücrelerin DNA hasarına neden olan bileşiklere verdiği yanıt üzerine etkisi bulunmaktadır. Yapılan bir çalışmada Suriye hamster embriyo (SHE) hücrelerinin pasaj sayısının UV ya da gama radyasyon ışınlarının DNA hasarına ve gen ekspresyonuna etkisi değerlendirilmiştir. Erken pasajlama dönemindeki tam doluluğa ulaşan hücrelerin UV ışınların öldürücü etkisine "log" fazındaki hücrelere göre daha hassas olduğu belirtilmiştir. Geç dönem pasajda eksponansiyel olarak büyüyen hücreler ile tam doluluğa ulaşan hücrelerin bu duruma olan duyarlılığının ise eşit derecede olduğu bildirilmiştir (Chang-Liu ve Woloschak, 1997). Kolorektal kanser çalışmalarında kullanılan HT29 hücre hattında gerçekleştirilen hücre pasaj sayısının fenotipik ve metabolik özelliklere etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, artan hücre pasaj sayısının hücre döngüsünü etkilediği ve HT29 hücrelerinin çoğalma ve göç etme yeteneğini azalttığı bildirilmiştir. Ayrıca hücre pasaj sayısındaki artışın hücrelerin metabolizmasında değişikliğe yol açtığı belirtilmiştir (Cao ve ark., 2021).

Kullanılan hücre türünün özelliğine göre uygulanan pasaj teknikleri farklılık göstermektedir. Pasaj işleminde yüzeye tutunan hücre hatları için belirli bir doluluk oranına ulaşması önemli olmaktadır. Örneğin, primer hücre hattından biri olan fare embriyonik fibroblast hücresi 3T3'e %80-90 doluluk oranına ulaştıktan sonra alt kültürlenme/pasaj işlemi uygulanır. Eğer bu doluluk oranı %100'e ulaşırsa hücrelerin çoğalma potansiyelinde azalma meydana gelmektedir. Bu durum yüzeye tutunmayan/süspand hücreler için ise daha farklıdır. Devamlı büyüyen ve yüzeye tutunmaya hücrelerin sağlıklı bir şekilde çoğalmalarına devam edebilmeleri için rutin olarak besiyeri değişikliği ya da pasaj yapılmalıdır. Hücrelerin eksponansiyel büyüme fazında kalabilmeleri için alt kültürlenme/pasaj işleminin her 2-3 günde bir tekrarlanması gerekir (Helgason ve Miller, 2005).

%80 gibi belirli bir doluluk oranına ulaşan hücreler tümör çalışmalarında, aktif olarak çoğalma evresinde olan hücelere göre daha iyi çalışma modeli olma potansiyeline sahiptir. Örneğin, nekrotik ve apoptotik hücre ölümlerini engelleyen bir stres proteini olan HSP27'nin ekspresyonu %80 oranında doluluğa ulaşan HT-29 ve CaCo-2 hücre hatlarında daha fazladır ve HSP27'nin hücre içerisinde lokalize olduğu bölgelerde başlangıç ve çoğalma evresindeki bölgelere göre farklılık gözlenmiştir. Bu durum, kolorektal kanser hücrelerinin belirli bir doygunluk evresine geldikten sonra kematerapötik ilaçlara olan direncin artması ile sonuçlanmıştır (Garrido ve ark., 1997).

1.10. Tezin Amacı ve Hedefleri

Bu tez çalışmasında, komet yönteminde en çok kullanılan ve genotoksik etkisi olduğu bilinen kimyasal bileşiklerden H₂O₂, EMS, MMS, ENU ve etoposidin farklı konsantrasyonlarda ve farklı maruziyet sürelerinde 3T3 fare embriyonik fibroblast hücre hattı üzerindeki etkilerinin in vitro hücre kültürü yöntemi ile test edilerek karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Bu amaç doğrultusunda tezimizin hedefleri 2 basamaktan oluşmaktadır:

1. Çalışmamızda ilk olarak H₂O₂, EMS, MMS, ENU ve Etoposid'in genotoksisite potansiyeli komet testi uygulanarak 3T3 fare embriyonik

fibroblast hücreleri üzerinde 30 dakika ve 60 dakika maruziyet süreleri boyunca araştırılacaktır.

2. Çalışmamızın ikinci kısmında pozitif kontrol olarak kullanılan farklı kimyasallardan elde edilen sonuçlar karşılaştırılacaktır.

Tez çalışmamızdan elde edeceğimiz bütün bulgular değerlendirildikten sonra komet yönteminde tartışmalı bir konu olan in vitro hücre kültürü üzerinde hangi pozitif kontrolün hangi konsantrasyonda ve ne kadar sürede DNA hasarını ne oranda artırdığı yorumlanacaktır. Yapılacak yorumlar doğrultusunda hangi pozitif kontrolün in vitro komet yöntemi için uygunluğu değerlendirilecektir. Komet testi OECD tarafından in vivo memeli hücrelerinde 2014 senesinde valide bir yöntem olarak kabul edilmesine rağmen in vitro olarak kullanılan bu test yöntemi ise daha valide olma aşamasındadır. Bu nedenle in vitro yöntemlerden elde edilecek sonuçlar bu validasyon aşamasına destek olma özelliği taşımaktadır. Tez çalışmamızdan elde edeceğimiz veriler in vitro komet yönteminde kullanılan pozitif kontroller ile ilgili eksik olan bu validasyon sürecine katkı sağlayacak özelliktedir. Ayrıca tezimizden elde edilen bulgular komet testinde yaygın olarak kullanılan pozitif kontrollerin genotoksisite profilleri hakkında literatürlere katkı sağlamış olacaktır.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. Kullanılan Maddeler

DMEM (Biological Industries, İsrail)
Trypsin-EDTA (Sigma, ABD)
L-Glutamin-Penisilin-Streptomisin (Sigma, ABD)
Fötal Bovin Serum (FBS) (Sigma, ABD)
Fosfat tamponu çözeltisi (PBS) (Sigma, ABD)
Na₂EDTA (Amresco, ABD)
Dimetilsülfoksit (DMSO) (Sigma, ABD)
Hidroklorik asit (Merck, Almanya)
Sodyum hidroksit (Merck, Almanya)
Sodyum klorür (Amresco, ABD)
Sodyum lauril sarkosinat (Amresco, ABD)
Tris (Merck, Almanya)
Triton x-100 (Merck, Almanya)

Normal erime noktalı agar (NMA) (Sigma, ABD)
Düşük erime noktalı agar (LMA) (Sigma, ABD)
Etidium bromür (Sigma, ABD)
H₂O₂ (Sigma, ABD)
MMS (Sigma, ABD)
EMS(Sigma, ABD)
Etoposid (Cayman Chemical, ABD)
ENU (Sigma, ABD)

2.1.2. Kullanılan Aletler ve Malzemeler

Steril çalışma kabini (Esco, Class II Biological Safety Cabinet, Singapur)
Karbondiyoksit inkübatörü (Heal Force HF240, Çin)
Hücre sayım cihazı (Bio-Rad TC20, Singapur)
İnverted Mikroskop (Micros MCX 7600, Avusturya)
Fluoresan Mikroskop (komet testi yazılım programı-Comet Assay IV ile)
pH metre cihazı (WTW pH 330i, Almanya)
Su banyosu (Boeco, Ultraterm BWT-U, Almanya)
Sterilizatör (Sanyo MAC 235EX, Japonya)
Derin Dondurucu (-20°C) –(-80°C), (Scancool, Almanya)
Hassas terazi (Sartorius CP225D, Türkiye)
Buz makinası (Hoshizaki, Avrupa)
Vorteks (Nüve NM110, Türkiye)
Sıvı azot tankı (International Cryogenics, ABD)
Santrifüj (Hettich, Almanya)

2.2. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

DMEM besi yeri: DMEM içersine %10 FBS, %1 Penisilin-streptomisin ilave edildi ve +4°C’de saklandı. Deney esnasında 37°C’ye getirilerek kullanıldı.

Stop medyum çözeltisi: %60 DMEM ve %40 FBS karıştırılarak hazırlandı ve +4°C’de saklandı. Deney esnasında 37°C’ye getirilerek kullanıldı.

Nötralizasyon çözeltisi: 0,4 M Tris tartılarak distile suda çözüldü ve pH=10’a ayarlandı. Ardından çözelti oda sıcaklığı koşullarında saklandı.

Lizing çözeltisi: 100 mM Na₂EDTA, 2,5 M NaCl, 10 mM Tris tartılarak distile suda çözüldü ve pH=10’a ayarlandı. pH ayarından sonra üzerine %1 sodyum lauril sarkosinat ilave edilerek 1-2 gün boyunca tam bie karışım elde edilinceye kadar karıştırıldı. Stok olarak hazırlanan bu çözeltiye kullanılacağı gün taze olarak %1 triton ve %10 DMSO ilavesinden sonra +4°C’de soğutularak kullanıldı.

Elektroforez çözeltisi: 1 mM Na₂EDTA ve 300 mM NaOH tartılarak distile suda çözüldü. Deney günü taze olarak hazırlanması gereken bu çözelti karıştırılarak pH>13 olacak şekilde ayarlandı ve +4°C’de soğutulduktan sonra kullanıldı.

Normal erime noktalı agar (NMA): %1'lik çözeltisi PBS ile çözülerek hazırlanan bu çözelti henüz sıcak iken lamlar bu çözeltinin içine daldırılarak ön yüzlerinin agar ile kaplanması sağlandı ve oda sıcaklığında kurutulduktan sonra lam saklama kutularında saklandı.

Düşük erime noktalı agar (LMA): %0,75'lik çözeltisi PBS ile çözülerek hazırlandıktan sonra +4°C'de saklandı. Deney sırasında agarın mikrodalgada çözülmesi sağlandıktan sonra 37°C'ye getirilerek kullanıldı.

PBS çözeltisi: Hazır tabletler distile suda çözülerek hazırlandı.

Etidium bromür çözeltisi: 200 µg/ml stok çözeltisi distile suda çözülerek hazırlanan stok çözelti oda sıcaklığında saklandı. Lamaların boyanması sırasında 1:10 seyreltildi ve 20 µg/ml olacak şekilde hazırlandı. Mikroskop altında hücre sayımı sırasında her bir lam üzerine 60 µl damlatılıp lamın üzerine lamel kapatıldı.

2.3. Hücrelerin Pasajlanması ve Çoğaltılması

3T3 fare embriyonik fibroblast hücresi (3T3-Swiss albino, ATCC, Almanya) - 80°C'den çıkarıldı.

- -80°C'den çıkarılan hücreler 37 °C'de hızlıca çözündü.

- Laminar akış kabini altında 15 ml'lik steril santrifüj tüpündeki 10 ml (37 °C) DMEM besi yeri içerisine aktarıldıktan sonra, 1300 rpm'de, oda sıcaklığında 5 dakika santrifüj edildi.

- Üst faz pastör pipeti yardımıyla steril koşullarda atıldıktan sonra alt fazdaki hücrelerin üzerine yaklaşık 5-6 ml DMEM medyum ilave edildi. Hücreler DMEM içerisinde pipetle çek-bırak yöntemiyle homojen olarak dağıtılarak 25 cm²'lik flasklara ekildi ve 37°C, % 5 CO₂ inkübatörüne kaldırıldı.

- -80°C'den çıkan hücrelerin ürememe ve çoğalmama olasılığına karşı pasajlama işlemini birkaç kez tekrarladıktan sonra hücrelerin düzenli çoğalıp çoğalmadığı kontrol edildi. 3-4 günde bir hücreler tripsin ile bulundukları yüzeyden kaldırılarak yeni besiyeri ortamına aktarıldı. Hücrelerin düzenli şekilde çoğalmaları kontrol edildikten sonra deneyler yapıldı. Hücreleri pasajlama işlemi tüm deneyler bitene kadar devam etti.

3T3 hücresinin pasaj işlemi:

- Flasktaki DMEM besi yeri aspire edildi.
- 2 ml tripsin/EDTA (37°C) konulduktan sonra 37°C'de 3-4 kadar dakika bekletildi.

- Trypsinin çalışmasını durdurmak için 2 ml stop medyum çözeltisi ilave edildi ve hafifçe çalkalandı.

- Bu 4 ml'lik hücre suspansiyonu pastör pipet ile 15ml'lik tüpe aktarıldı.

- 1300 rpm oda sıcaklığında 5-6 dak santrifüj edildi.

- Üst faz tüpün dibinde görünen pellete dokunmadan pastör pipet ile alındı.

- Pelletin üzerine yaklaşık 2 ml DMEM ilave edildi.

- Pastör pipet ile çek-bırak şeklinde karıştırılarak TC-20 cihazında hücre sayımı yapıldı.

- Yeni pasaj için 5 ml DMEM medyum içerisinde 300.000-400.000 hücre olacak şekilde T25 flask içerisine aktarıldı.

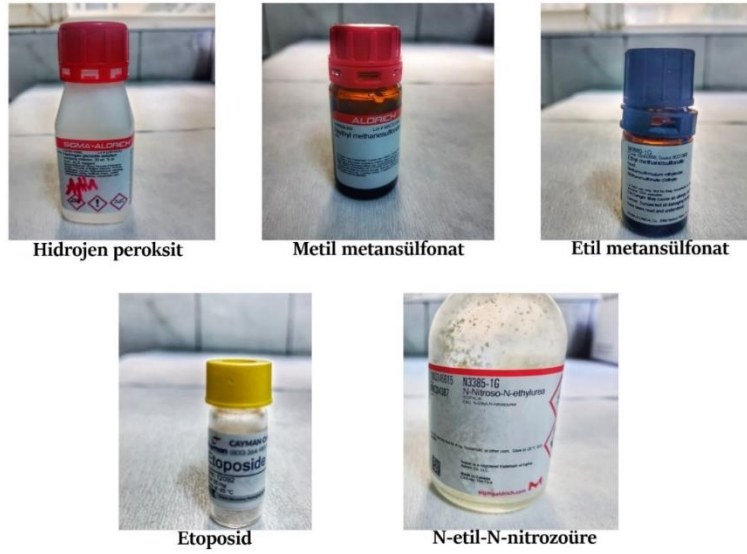
Şekil 2.1.'de hücre pasajında kullanılan araçlar gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Hücre pasajında kullanılan cihazlar; inverted mikroskop (sol üst), santrifüj cihazı (sağ üst), TC-20 sayım cihazı (sol alt), laminar akış kabini (sağ orta), CO₂ inkübatörü (sağ alt)

2.4. Test Materyallerinin Hazırlanması ve Hücrelere Maruziyeti

Tezimizde hücreler üzerinde potansiyel genotoksik etkileri test edilen ve pozitif kontrol olarak kullanılan materyaller H_2O_2 , MMS, EMS, etoposid ve ENU Şekil 2.2.'de verilmiştir.



Şekil 2.2. Tez çalışmamızda pozitif kontrol olarak kullandığımız kimyasallar

Tez çalışmamızda kullandığımız kimyasalların hazırlanışı ve hücrelere maruziyeti:

H_2O_2 çözeltisi: 1 Molar H_2O_2 stok çözeltisi steril distile su içerisinde taze olarak hazırlandı. 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 200 mM seyreltmeler yapıldıktan sonra hücrelere %0,1 maruziyet ile 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100 ve 200 μ M konsantrasyonlar test edildi.

MMS çözeltisi: 1 Molar MMS stok çözeltisi steril DMSO içerisinde hazırlandı. 1, 5, 10, 50, 100 ve 500 mM seyreltmeler yapıldıktan sonra hücrelere %0,1 maruziyet ile 1, 5, 10, 50, 100 ve 500 μ M konsantrasyonlar test edildi.

EMS çözeltisi: 1000 mM EMS stok çözeltisi steril DMSO içerisinde hazırlandı. 5, 10, 20, 50, 100, 200 mM seyreltmeler yapıldıktan sonra hücrelere %1 maruziyet ile 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1 ve 2 mM konsantrasyonlar test edildi.

ENU çözeltisi: 1000 mM ENU stok çözeltisi steril DMSO içerisinde hazırlandı. 2.5, 5, 10, 20, 40 ve 200 mM seyreltmeler yapıldıktan sonra hücrelere %1 maruziyet ile 0.025, 0.05, 0.01, 0.2, 0.4 ve 2 mM konsantrasyonlar test edildi.

Etoposid çözeltisi: 5 mM stok etoposid çözeltisi steril DMSO içerisinde hazırlandı. 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 ve 1 mM seyreltmeler yapıldıktan sonra hücrelere %1 maruziyet ile 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5 ve 10 μ M konsantrasyonlar test edildi.

2.5. Genotoksik Etkilerin Araştırılması: Komet Testi

DNA hasarına neden olan kimyasal bileşiklere maruz kalmanın biyogöstergesi genotoksisite testleri ile gerçekleştirilmektedir. Genotoksisite testlerinden nötral ya da

alkali pH'da elektroforez işleminin yapıldığı Komet testi (Single Cell Gel Electrophoresis, Tek Hücre Jel Elektroforezi) en sık kullanılan yöntemlerden biridir. Komet yönteminden elde edilen veriler biyoizleme çalışmalarında maruz kalınan kimyasal bileşiğin genetik materyali etkileyebildiğini göstermesi açısından yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Çeşitli hücre türlerinde in vivo ve in vitro olarak uygulanabilen komet testi ile DNA hasarının belirlenmesinin yanı sıra ve DNA onarımını araştırmak amacıyla da sık kullanılan yöntemlerden biridir. Diğer yöntemlere kıyasla bu test yöntemi hızlı ve hassas olup maliyet açısından daha ucuzdur. Komet tekniği, 1978 yılında ilk olarak Rydberg ve Johanson adlı araştırmacılar tarafından DNA'daki kırıkların tayin edilmesi amacıyla kurulmuştur. Sonraki yıllarda bu teknik, 1984 senesinde Östling ve Johanson tarafından geliştirilerek, nötral pH'daki lizing ve elektroforez şartlarında uygulanabilir hale getirilmiştir.

Yöntem “komet” adını, mikroskop altında bakıldığında DNA'daki kuyruğun kuyruklu yıldıza benzetilmesi sebebiyle almıştır. 1988 yılında Singh ve arkadaşları tarafından komet test protokolünde değişiklikler yapılmış ve yöntem alkali pH'da gerçekleştirilmeye başlanmıştır. Günümüzde de yapılan küçük değişikliklerle, bu test yöntemi dünya genelinde en yaygın kullanılan genotoksisite test protokollerinden biri haline gelmiştir.

Komet testinin yapılışı:

Hücreleri agara alma: T25 flaskta çoğalan hücreler TC-20 sayım cihazında sayıldı. Uygun konsantrasyonda (150.000/2 ml DMEM) 6'lı kuyucuklu plakalara

ekildi. İnkübatörde 1 gün boyunca çoğalmaları için bekletildi. Testin 3. gününde hücreler, pozitif kontrol olarak seçilen test kimyasallarına 30 dakika ve 1 saat olmak üzere maruz bırakıldı. Hücreler plakalardan tripsinlenerek tüplere aktarıldı. Her bir örneğe ait lamda yaklaşık 20.000 hücre olacak şekilde hesaplama yapılarak bir eppendorfta 100 µl hücre süspansiyonu ile 200 µl LMA (37°C'de) karıştırıldıktan sonra önceden NMA ile bir yüzleri kaplanmış ve kurutulmuş lamlara yayıldı. Daha sonra agarlar donmadan üzerine lamel kapatıldı. Daha sonra altında buz kalıpları bulunan metal bir satıh üzerinde bekletilerek agarın tamamen donması sağlandı.

Lizing işlemi: Agarın içeresine hücrelerin gömülerek hazırlandığı lamlar, deney günü taze hazırlanıp buzdolabında bekletilen bir şale içerisindeki soğuk lizing çözeltisine daldırılarak yaklaşık 1-1,5 saat boyunca +4°C'de bekletildi. Bekleme süresinin sonunda lamlar lizing çözeltisinden çıkarılarak agarla kaplanan yüzeyleri üste gelecek şekilde elektroforez tankının içeresine dizildi.

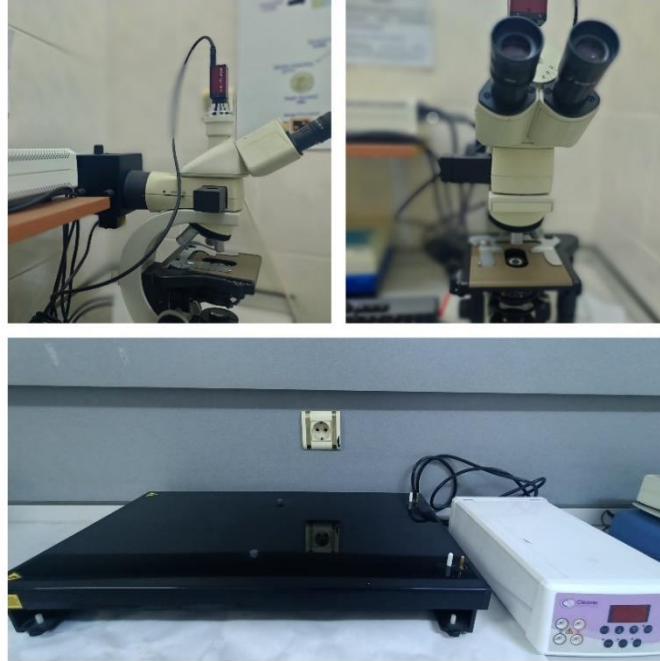
Alkali pH'da elektroforez aşaması: Komet testine uygun özel koyu renkli malzemeden yapılan elektroforez tankı pH>13 olarak ayarlanan soğuk elektroforez tampon çözeltisi ile tank için hesaplanan miktarda dolduruldu. Lamlar dizildi ve ardından önce akım uygulamaksızın 20 dakika bu tampon çözeltisi içerisinde bekletildi. Daha sonra, 20 dakika boyunca 25 V ve 300 mA akım uygulayarak elektroforez aşaması gerçekleştirildi.

Nötralizasyon aşaması: Toplam 40 dakikalık alkali uygulaması ve elektroforez aşamasından sonra lamlar elektroforez tankından çıkarılıp şalelere dizildi. Şale içerisindeki lamlar nötralizasyon çözeltisi ile 5'er dakika süreler şeklinde toplam 15

dakika yıkandı. Hücreleri lamlara fikse etmek amacıyla sırasıyla %50, %70 ve %99 alkol ile 5'er dakika sürelerle bekletilen lamlar okuma yapılıncaya kadar oda sıcaklığında lam kutusu içerisinde saklandı.

Boyama ve mikroskopta değerlendirme: Lamların üzerine 60 µl etidium bromür çözeltisi ilave edildi ve üzeri lamel kapatıldı. En az 10 dakika bekleme süresinden sonra mikroskopta okuma işlemi gerçekleştirildi. Her lam için toplam 100'er hücre sayıldı ve floresan mikroskopunda değerlendirildi. "Comet assay IV" programı kullanılarak hücreler işaretlendi ve hücre sayımı yapıldı.

Şekil 2.3.'de komet testinde kullanılan cihazlar gösterilmiştir.



Şekil 2.3. Tez çalışmamızda komet testinde kullandığımız cihazlar; floresan mikroskop (en üst), elektroforez cihazı (en alt)

2.6. İstatistiksel Değerlendirmeler

İstatistiksel değerlendirmeleri, SPSS programı (SPSS Windows Release 23,0) kullanılarak yapılmıştır. Komet testi sonuçlarının değerlendirilmesinde her bir numune için tüm 100 sayıma ait DNA kuyruk yoğunluğu (Tail Intensity) değerleri kontrol ve test kimyasalları grupları olarak kullanılmıştır. Tüm testlerden edilen sonuçlar, 30 dakika ve 1 saatin karşılaştırmaları, Repeated measures ANOVA testi ile yapılmıştır. İstatistiksel olarak anlamlılık sınırı $p<0,05$ olarak alınmıştır.

3. BULGULAR

3.1. Komet Testi Sonuçları

Fluoresan mikroskop altında her bir numuneye denk gelen slaytlarda rastgele seçilen 100'er hücreye ait Comet assay IV programı ile elde edilen sonuçlar Ortalama Kuyruk Yoğunluğu (Mean Tail Intensity) değerleri $\pm$ standart hata (SEM:Standart Sapma/n; n=100) şeklinde verilmiştir. Her bir numune için ikişer kez okuma yapılmıştır. Komet testinde pozitif kontrol olarak belirlenen konsantrasyonlarda H₂O₂, MMS, EMS, Etoposid ve ENU kullanılmıştır. Seçilen pozitif kontroller 3T3 hücre hattı üzerinde 30 dakika ve 60 dakika boyunca maruz bırakılmıştır. Her bir numunenin 3T3 hücre hücrelerindeki 30 dakika ve 60 dakika maruziyet sonucunda elde edilen ortalama kuyruk yoğunluğu (n=100) $\pm$ SEM Çizelge 3.1., Çizelge 3.2., Çizelge 3.3., Çizelge 3.4. ve Çizelge 3.5.'te sunulmuştur.

Çizelge 3.1. H₂O₂'nin 30 dakika ve 60 dakika maruziyetleri ile 3T3 hücrelerinde ortalama kuyruk yoğunluğu (n=100) $\pm$ SEM. #p<0,05, 30 dakika ve 60 dakika sonuçları ile karşılaştırıldığında (Repeated measures One-Way ANOVA).

	Konsantrasyon (μ M)	Ort.Kuyruk Yoğ. $\pm$ SEM	
		30 dakika	60 dakika
H ₂ O ₂	1 μ M	3,8234 $\pm$ 0,0624	5,5953 $\pm$ 0,081
	5 μ M	6, 1709 $\pm$ 0,1296	4,9339 $\pm$ 0,071
	10 μ M	6, 7026 $\pm$ 0,1072	7,1507 $\pm$ 0,1046
	25 μ M	12,1924 $\pm$ 0,1548 #	6,5413 $\pm$ 0,097
	50 μ M	46, 3480 $\pm$ 0,2412 #	10,8708 $\pm$ 0,1230
	75 μ M	-	16,7375 $\pm$ 0,1710
	100 μ M	-	30,5565 $\pm$ 0,1865
	200 μ M	-	-

Çizelge 3.2. MMS'nin 30 dakika ve 60 dakika maruziyetleri ile 3T3 hücrelerinde ortalama kuyruk yoğunluğu (n=100) $\pm$ SEM. #p<0,05, 30 dakika ve 60 dakika sonuçları ile karşılaştırıldığında (Repeated measures One-Way ANOVA).

	Konsantrasyon (μ M)	Ort.Kuyruk Yoğ. $\pm$ SEM	
		30 dakika	60 dakika
MMS	1 μ M	4,3328 $\pm$ 0,0556	12,6061 $\pm$ 0,1489 #
	5 μ M	4,0847 $\pm$ 0,0659	6,5479 $\pm$ 0,0634
	10 μ M	3,3337 $\pm$ 0,0469	12,1521 $\pm$ 0,1412 #
	50 μ M	3,8766 $\pm$ 0,0484	8,0549 $\pm$ 0,0769 #
	100 μ M	4,4620 $\pm$ 0,0623	8,6792 $\pm$ 0,1087 #
	500 μ M	8,2192 $\pm$ 0,0863	27,0370 $\pm$ 0,1888 #

Çizelge 3.3. Etoposidin 30 dakika ve 60 dakika maruziyetleri ile 3T3 hücrelerinde ortalama kuyruk yoğunluğu (n=100) $\pm$ SEM. #p<0,05, 30 dakika ve 60 dakika sonuçları ile karşılaştırıldığında (Repeated measures One- Way ANOVA).

	Konsantrasyon (μ M)	Ort.Kuyruk Yoğ. $\pm$ SEM	
		30 dakika	60 dakika
ETO.	0,05 μ M	5,3122 $\pm$ 0,1027	6,4068 $\pm$ 0,0640
	0,1 μ M	9,5257 $\pm$ 0,1133 #	5,6827 $\pm$ 0,0573
	0,5 μ M	7,7108 $\pm$ 0,1060	8,8790 $\pm$ 0,1098
	1 μ M	11,5927 $\pm$ 0,1360 #	4,7213 $\pm$ 0,0563
	5 μ M	23,9108 $\pm$ 0,2589 #	12,7499 $\pm$ 0,1428
	10 μ M	33,8460 $\pm$ 0,2517 #	12,1012 $\pm$ 0,1389

Çizelge 3.4. EMS'nin 30 dakika ve 60 dakika maruziyetleri ile 3T3 hücrelerinde ortalama kuyruk yoğunluğu (n=100) $\pm$ SEM. #p<0,05, 30 dakika ve 60 dakika sonuçları ile karşılaştırıldığında (Repeated measures One- Way ANOVA).

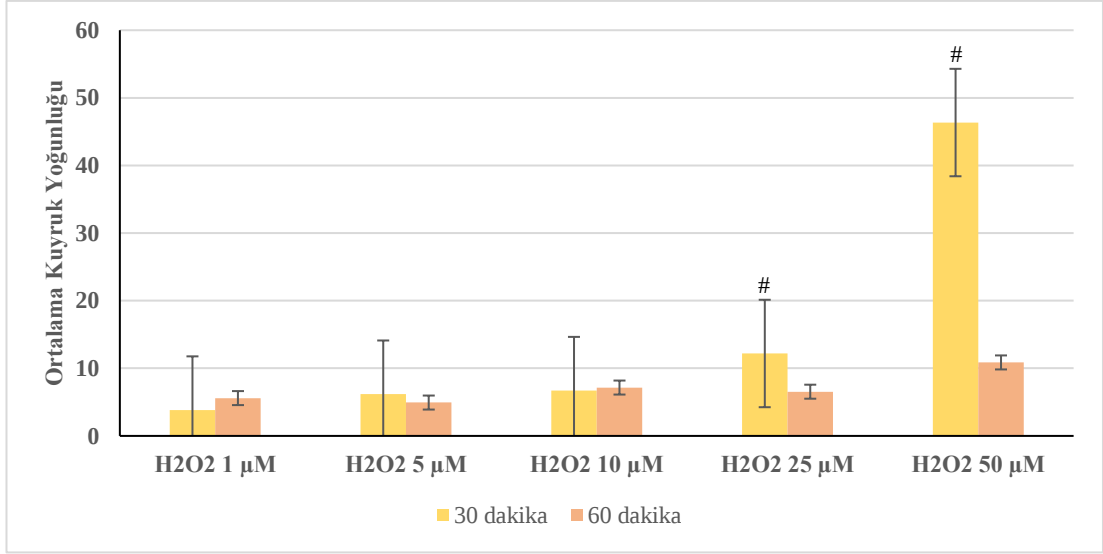
	Konsantrasyon (μ M)	Ort.Kuyruk Yoğ. $\pm$ SEM	
		30 dakika	60 dakika
EMS	0,05 mM	5,7787 $\pm$ 0,0593	4,4627 $\pm$ 0,0505
	0,1 mM	6,5104 $\pm$ 0,0655	5,7101 $\pm$ 0,0513
	0,2 mM	7,5441 $\pm$ 0,0732 #	3,4654 $\pm$ 0,0439
	0,5 mM	5,6808 $\pm$ 0,0751	6,1033 $\pm$ 0,0547
	1 mM	6,2001 $\pm$ 0,0800	5,5505 $\pm$ 0,0576
	2 mM	7,8550 $\pm$ 0,0776	10,5401 $\pm$ 0,1111

Çizelge 3.5. ENU'nun 30 dakika ve 60 dakika maruziyetleri ile 3T3 hücrelerinde ortalama kuyruk yoğunluğu (n=100) $\pm$ SEM. #p<0,05, 30 dakika ve 60 dakika sonuçları ile karşılaştırıldığında (Repeated measures One- Way ANOVA).

	Konsantrasyon (μ M)	Ort.Kuyruk Yoğ. $\pm$ SEM	
		30 dakika	60 dakika
ENU	0,025 mM	3,9862 $\pm$ 0,0570	7,9230 $\pm$ 0,1036 #
	0,05 mM	4,5751 $\pm$ 0,0562	5,7590 $\pm$ 0,0540
	0,1 mM	6,1930 $\pm$ 0,0712	6,5215 $\pm$ 0,0585
	0,2 mM	9,2160 $\pm$ 0,1070 #	4,2736 $\pm$ 0,0504
	0,4 mM	10,5466 $\pm$ 0,1157 #	3,9352 $\pm$ 0,0497
	2 mM	14,8610 $\pm$ 0,1356 #	5,1676 $\pm$ 0,0625

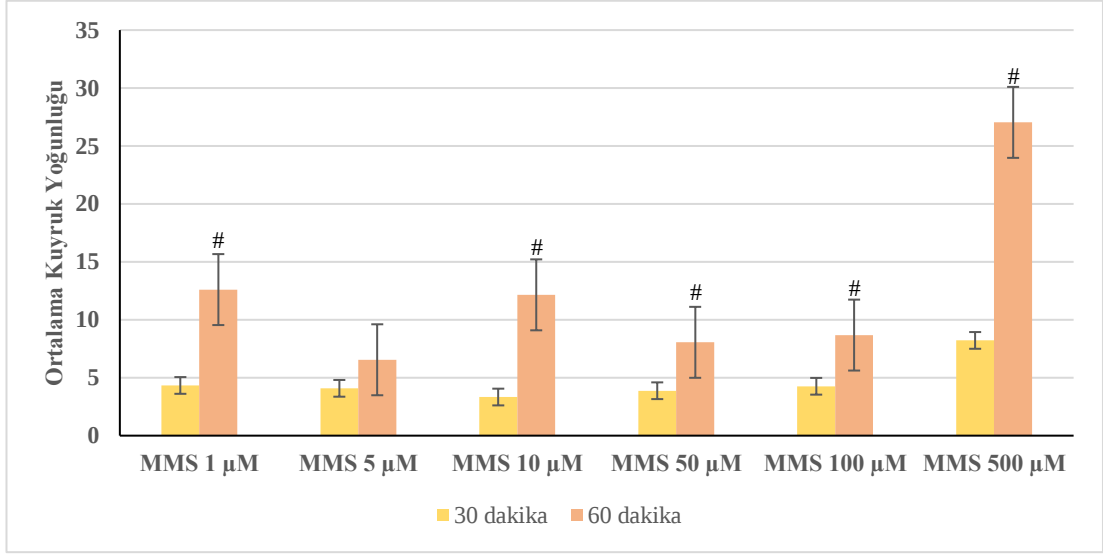
Çizelge 3.6. Pozitif kontrol olarak seçilen kimyasalların 30 dakika ve 60 dakika maruziyetleri ile 3T3 hücrelerinde ortalama kuyruk yoğunluğu ($n=100$) $\pm$ SEM. * $p<0,05$, negatif kontrol ile 30 dakika sonuçları karşılaştırıldığında; * $p<0,05$; negatif kontrol ile 60 dakika sonuçları karşılaştırıldığında (Repeated measures One- Way ANOVA).

	Konsantrasyon	Ort.Kuyruk Yoğ. $\pm$ SEM	
		30 dakika	60 dakika
Kontrol		2,6352 $\pm$ 0,0431	3,2916 $\pm$ 0,048
H₂O₂	1 μ M	3,8234 $\pm$ 0,0624	5,5953 $\pm$ 0,081
	5 μ M	6,1709 $\pm$ 0,1296 *	4,9339 $\pm$ 0,071
	10 μ M	6,7026 $\pm$ 0,1072 *	7,1507 $\pm$ 0,1046 *
	25 μ M	12,1924 $\pm$ 0,1548 *	6,5413 $\pm$ 0,097 *
	50 μ M	46,3480 $\pm$ 0,2412 *	10,8708 $\pm$ 0,1230 *
	75 μ M	-	16,7375 $\pm$ 0,1710 *
	100 μ M	-	30,5565 $\pm$ 0,1865 *
MMS	200 μ M	-	-
	1 μ M	4,3328 $\pm$ 0,0556	12,6061 $\pm$ 0,1489 *
	5 μ M	4,0847 $\pm$ 0,0659	6,5479 $\pm$ 0,0634 *
	10 μ M	3,3337 $\pm$ 0,0469	12,1521 $\pm$ 0,1412 *
	50 μ M	3,8766 $\pm$ 0,0484	8,0549 $\pm$ 0,0769 *
	100 μ M	4,4620 $\pm$ 0,0623	8,6792 $\pm$ 0,1087 *
ETO.	500 μ M	8,2192 $\pm$ 0,0863 *	27,0370 $\pm$ 0,1888 *
	0,05 μ M	5,3122 $\pm$ 0,1027	6,4068 $\pm$ 0,0640 *
	0,1 μ M	9,5257 $\pm$ 0,1133 *	5,6827 $\pm$ 0,0573
	0,5 μ M	7,7108 $\pm$ 0,1060 *	8,8790 $\pm$ 0,1098 *
	1 μ M	11,5927 $\pm$ 0,1360 *	4,7213 $\pm$ 0,0563
	5 μ M	23,9108 $\pm$ 0,2589 *	12,7499 $\pm$ 0,1428 *
EMS	10 μ M	33,8460 $\pm$ 0,2517 *	12,1012 $\pm$ 0,1389 *
	0,05 mM	5,7787 $\pm$ 0,0593	4,4627 $\pm$ 0,0505
	0,1 mM	6,5104 $\pm$ 0,0655 *	5,7101 $\pm$ 0,0513
	0,2 mM	7,5441 $\pm$ 0,0732 *	3,4654 $\pm$ 0,0439
	0,5 mM	5,6808 $\pm$ 0,0751	6,1033 $\pm$ 0,0547 *
	1 mM	6,2001 $\pm$ 0,0800 *	5,5505 $\pm$ 0,0576
ENU	2 mM	7,8550 $\pm$ 0,0776 *	10,5401 $\pm$ 0,1111 *
	0,025 mM	3,9862 $\pm$ 0,0570	7,9230 $\pm$ 0,1036 *
	0,05 mM	4,5751 $\pm$ 0,0562	5,7590 $\pm$ 0,0540
	0,1 mM	6,1930 $\pm$ 0,0712 *	6,5215 $\pm$ 0,0585 *
	0,2 mM	9,2160 $\pm$ 0,1070 *	4,2736 $\pm$ 0,0504
	0,4 mM	10,5466 $\pm$ 0,1157 *	3,9352 $\pm$ 0,0497
	2 mM	14,8610 $\pm$ 0,1356 *	5,1676 $\pm$ 0,0625



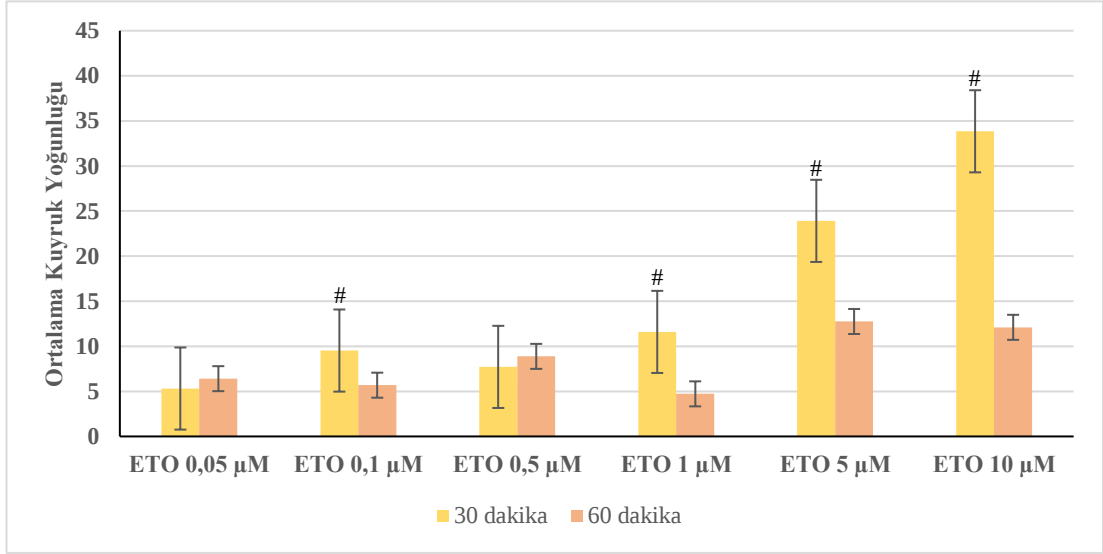
Şekil 3.1. H₂O₂'nin 30 dakika ve 60 dakika maruziyetleri ile 3T3 hücrelerinde ortalama kuyruk yoğunluğu (n=100) ± SEM. #p<0,05, 30 dakika ve 60 dakika sonuçları ile karşılaştırıldığında (Repeated measures One- Way ANOVA).

H₂O₂'nin 30 dakika ve 60 dakika maruziyetleri ile 3T3 hücrelerinde ortalama kuyruk yoğunluğu (n=100) ± SEM Şekil 3.1'de verilmiştir. Tez çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular, H₂O₂'nin 25 µM ve 50 µM 30 dakika maruziyet sonucunda ortaya çıkan DNA hasarının aynı konsantrasyon değerinin 60 dakikalık süre sonunda neden olduğu DNA hasarına göre istatistiksel olarak anlamlı olduğunu göstermiştir (p<0,05). 75 µM, 100 µM ve 200 µM H₂O₂ konsantrasyon değerlerinin 3T3 hücreleri üzerinde 30 dakikalık maruziyeti sonucunda hücreler “hayalet” olarak adlandırılan “ghost” hücre durumunda oldukları için lamaları okuma sırasında sayılamamıştır. Aynı durum 200 µM H₂O₂ konsantrasyon değerinin 3T3 hücreleri üzerindeki 60 dakikalık maruziyeti sonucunda da gözlemlendiği için bu konsantrasyon değerine ait DNA hasar bulguları elde edilememiştir.



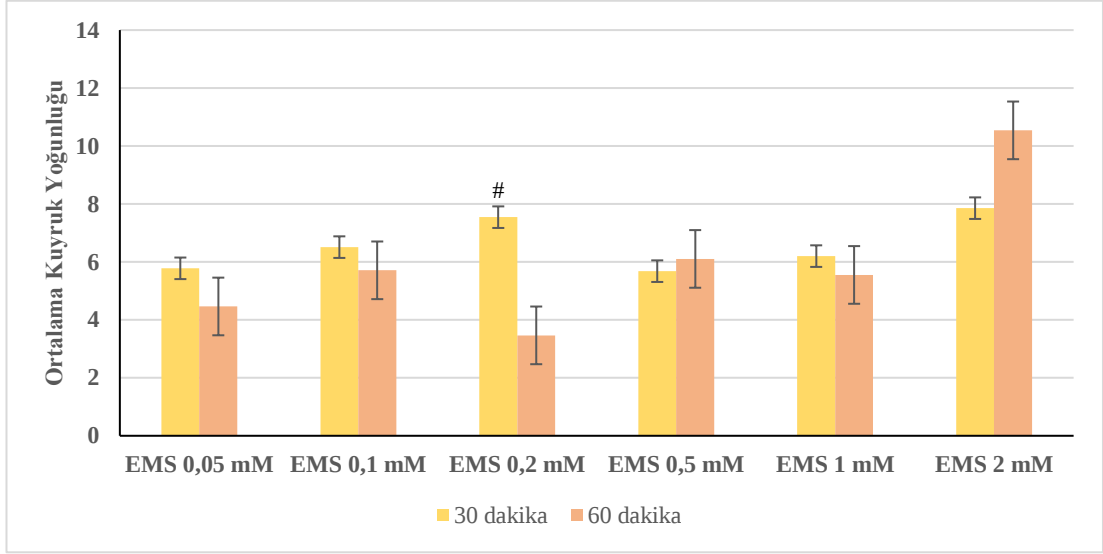
Şekil 3.2. MMS'nin 30 dakika ve 60 dakika maruziyetleri ile 3T3 hücrelerinde ortalama kuyruk yoğunluğu (n=100) $\pm$ standart hata değerleri (SEM). #p<0,05, 30 dakika ve 60 dakika sonuçları ile karşılaştırıldığında (Repeated measures One- Way ANOVA).

MMS'nin 30 dakika ve 60 dakika maruziyetleri ile 3T3 hücrelerinde ortalama kuyruk yoğunluğu (n=100) $\pm$ SEM Şekil 3.2'de verilmiştir. Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgulara göre 1 µM, 10 µM, 50 µM, 100 µM ve 500 µM MMS konsantrasyon değerlerinin 3T3 hücreleri üzerindeki 60 dakikalık maruziyeti, aynı konsantrasyon değerlerinin 30 dakikalık maruziyet bulgularına göre istatistiksel olarak anlamlı çıkmıştır (p<0,05).



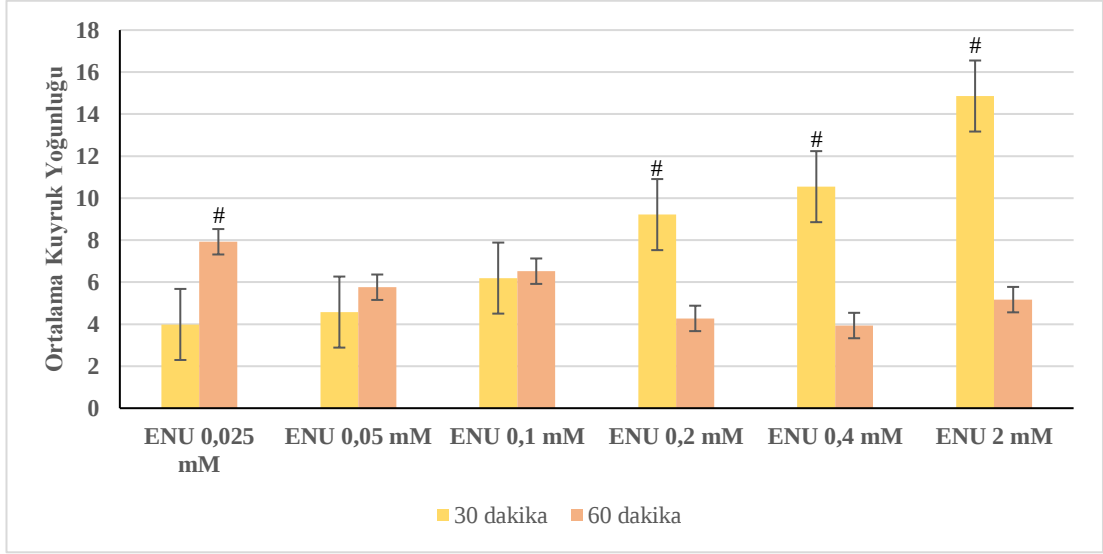
Şekil 3.3. Etoposidin 30 dakika ve 60 dakika maruziyetleri ile 3T3 hücrelerinde ortalama kuyruk yoğunluğu (n=100) ± standart hata değerleri (SEM). #p<0,05, 30 dakika ve 60 dakika sonuçları ile karşılaştırıldığında (Repeated measures One- Way ANOVA).

Etoposidin 30 dakika ve 60 dakika maruziyetleri ile 3T3 hücrelerinde ortalama kuyruk yoğunluğu (n=100) ± SEM Şekil 3.3'te verilmiştir. Elde ettiğimiz bulgular 30 dakika 0,1 µM, 1 µM, 5 µM ve 10 µM Etoposid maruziyetinin, 60 dakika maruziyet sonucunda elde ettiğimiz verilere göre istatistiksel olarak anlamlı olduğunu göstermiştir (p<0,05).



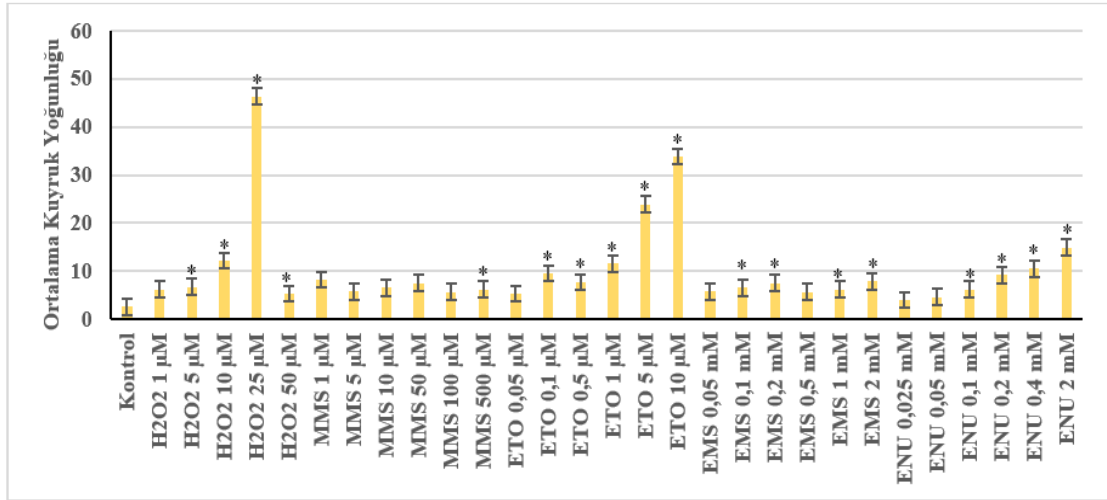
Şekil 3.4. EMS'nin 30 dakika ve 60 dakika maruziyetleri ile 3T3 hücrelerinde ortalama kuyruk yoğunluğu ($n=100$) $\pm$ standart hata değerleri (SEM). # $p<0,05$, 30 dakika ve 60 dakika sonuçları ile karşılaştırıldığında (Repeated measures One- Way ANOVA).

EMS'nin 30 dakika ve 60 dakika maruziyetleri ile 3T3 hücrelerinde ortalama kuyruk yoğunluğu ($n=100$) $\pm$ SEM Şekil 3.4'te verilmiştir. Tez çalışmamızda elde ettiğimiz bulgulara göre EMS'nin 0,2 mM 30 dakika 3T3 hücreleri üzerindeki maruziyeti, aynı konsantrasyon değerinin 60 dakika maruziyetine göre istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$).



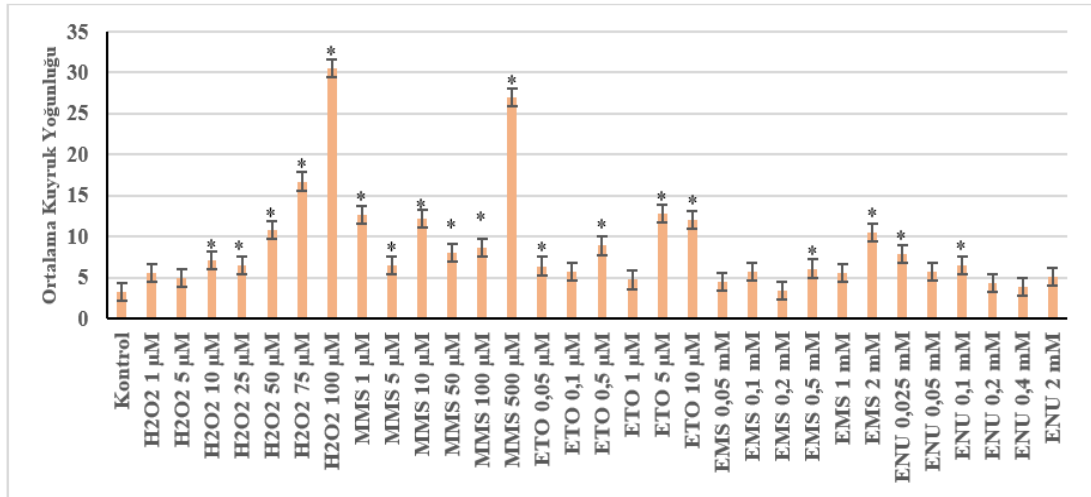
Şekil 3.5. ENU'nun 30 dakika ve 60 dakika maruziyetleri ile 3T3 hücrelerinde ortalama kuyruk yoğunluğu ($n=100$) $\pm$ standart hata değerleri (SEM). # $p<0,05$, 30 dakika ve 60 dakika sonuçları ile karşılaştırıldığında (Repeated measures One- Way ANOVA).

ENU'nun 30 dakika ve 60 dakika maruziyetleri ile 3T3 hücrelerinde ortalama kuyruk yoğunluğu ($n=100$) $\pm$ SEM Şekil 3.5'te verilmiştir. Buna göre 0,025 mM ENU'nun 3T3 hücrelerindeki 60 dakikalık maruziyet sonucu aynı konsantrasyon değerinin 30 dakikalık maruziyet sonucuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). 0,2 mM, 0,4 mM ve 2 mM ENU 30 dakika maruziyeti ise aynı konsantrasyon değerlerinin 60 dakika maruziyetine göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).



Şekil 3.6. Pozitif kontrol olarak seçilen kimyasalların 30 dakika maruziyetleri ile 3T3 hücrelerinde ortalama kuyruk yoğunluğu (n=100) ± standart hata değerleri (SEM). *p<0,05, negatif kontrol ile 30 dakika sonuçları karşılaştırıldığında (Repeated measures One- Way ANOVA).

Pozitif kontrol olarak seçilen kimyasalların 30 dakika maruziyetleri ile 3T3 hücrelerinde ortalama kuyruk yoğunluğu (n=100) ± SEM Şekil 3.6.'da verilmiştir. Tez çalışmamızda pozitif kontrol olarak seçilen kimyasallardan 5 µM H₂O₂, 10 µM H₂O₂, 50 µM H₂O₂; 500 µM MMS; 0,1 µM ETO, 0,5 µM ETO, 1 µM ETO, 5 µM ETO, 10 µM ETO; 0,1 mM EMS, 0,2 mM EMS, 1 mM EMS, 2 mM EMS; 0,1 mM ENU, 0,2 mM ENU, 0,4 mM ENU ve 2 mM ENU'nun 3T3 hücreleri üzerindeki 30 dakika maruziyeti negatif kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p<0,05).



Şekil 3.7. Pozitif kontrol olarak seçilen kimyasalların 60 dakika maruziyetleri ile 3T3 hücrelerinde ortalama kuyruk yoğunluğu ($n=100$) $\pm$ standart hata değerleri (SEM). * $p<0,05$, negatif kontrol ile 60 dakika sonuçları karşılaştırıldığında (Repeated measures One- Way ANOVA).

Pozitif kontrol olarak seçilen kimyasalların 60 dakika maruziyetleri ile 3T3 hücrelerinde ortalama kuyruk yoğunluğu ($n=100$) $\pm$ SEM Şekil 3.7.'de verilmiştir. Tez çalışmamızda pozitif kontrol olarak seçilen kimyasallardan 10 μM H_2O_2 , 25 μM H_2O_2 , 50 μM H_2O_2 , 75 μM H_2O_2 , 100 μM H_2O_2 ; 1 μM MMS, 5 μM MMS, 10 μM MMS, 50 μM MMS, 100 μM MMS, 500 μM MMS; 0,05 μM ETO, 0,5 μM ETO, 5 μM ETO, 10 μM ETO; 0,5 mM EMS, 2 mM EMS; 0,025 mM ENU ve 0,1 mM ENU'nun 3T3 hücreleri üzerindeki 60 dakika maruziyeti negatif kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).

4. TARTIŞMA

Kalıtımın en temel yapısı olan DNA reaktif bir molekül olup endojen ve ekzojen ajanların neden olduğu yapısal değişikliklere karşı oldukça hassastır. Bütün canlı organizmalar yaşamları boyunca DNA’da değişikliklere neden olan fiziksel, kimyasal ve biyolojik ajanlara maruz kalmaktadır. Ancak organizmanın sağlıklı bir şekilde hayatını sürdürmesi genomik bütünlüğün korunmasına bağlıdır. Organizmalar genomlarında meydana gelebilecek hasarlara karşı birçok koruma stratejisi geliştirmiştir. Canlı sistemlerde bulunan çeşitli DNA tamir mekanizmaları sayesinde DNA hasarı doğrudan ya da dolaylı olarak ortadan kaldırılmakta ve böylece hücre döngüsü devam ettirilmektedir. Bir başka durumda ise organizmalar DNA hasarından kaçarak DNA’nın replikasyonu sırasında hasarsız tamamlayıcı iplik tarafından sağlanan bilginin kullanılması yolu ile hasarın kopyalanmasının önüne geçmektedir (Baynton ve Fuchs, 2000; Chatterjee ve Walker, 2017).

Hücrelerin DNA’sında, kromozomlarında veya DNA replikasyon mekanizmasında meydana gelen değişiklikler ve oluşan hasar genetik toksisite veya genotoksisite olarak ifade edilmektedir (Mouchet ve ark., 2005). Genetik toksisiteye neden olan genotoksik kimyasal bileşiklere örnek olarak endüstriyel kimyasallar, pestisitler ve farmasötik bileşikler verilebilir ve bu kimyasallar DNA seviyesinde bazı eklentileri, yanlış baz eşleşmesi veya baz silinmesi gibi değişikliklere neden olabileceği gibi; mikroçekirdek oluşumu, anöploidi gibi kromozomal hasarlar da meydana getirebilir (Mouchet ve ark., 2005; Umbuzeiro ve ark., 2017). Meydana gelen bu durumlar genotoksisitenin belirteçleri olarak bilinmektedir ve bu belirteçler genotoksisite testleri ile tespit edilmektedir (Mouchet ve ark., 2005).

DNA hasarlarının, gen mutasyonlarının, kromozomal aberasyonlar gibi geri dönüşsüz hasarların tespit edilmesinde kullanılan genotoksisite testleri farmasötiklerden kozmetik ürünlere, endüstriyel kimyasallardan gıda katkı maddelerine kadar birçok maddenin güvenlik değerlendirilmesinde rol alır. Genotoksisite testleri kimyasalların güvenlik değerlendirilmesinin yapılmasını sağlayarak, uluslararası yasalara göre canlı ve çevre sağlığını korumayı amaçlar (Corvi ve Madia, 2017).

Genotoksisite testlerinden en sık kullanılan yöntemlerden biri alkali ya da nötral şartlar altında elektroforez tekniğinin uygulanması esasına dayanan “Tek Hücre Jel Elektroforezi (Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE))” olarak bilinen komet testidir. Biyoizlem çalışmalarında önemli bir yeri olan komet testi in vivo ve in vitro olarak gerçekleştirilebilmektedir. Hızlı, hassas ve maliyet açısından uygun bir yöntem olan komet testi ile DNA hasarının tespit edilmesinin yanı sıra DNA onarımı da ölçülebilmektedir (Ostling ve Johanson, 1984; Rydberg ve Johanson, 1978).

Komet yönteminde hücreler daha önceden NMA ile kaplanmış lamlara düşük LMA ile süspande edilerek yayılır. Daha sonra hücrelerin lizise uğraması için yüksek tuz konsantrasyonlu yüzey aktif bir madde ile muamele edilir. Alkali ya da nötral şartlar altında DNA sarmalı gevşer ve ardından elektroforez tekniği uygulanır. Test kimyasalı DNA’da hasar oluşturmadıysa, çekirdekte yer alan matriks proteinleri ile DNA bir bütün halinde gözüktür. DNA hasarının meydana geldiği durumlarda ise DNA zincirleri bütünlüğünü kaybederek, kuyruklu yıldız görüntüsü oluşturacak şekilde agar içerisindeki boşluklara yayılır (Üstündağ ve ark., 2014).

Negatif yüke sahip DNA kırık uçları moleköl ağırlıklarına ve elektrik yüklerine göre elektroforez uygulaması ile pozitif yüklü anot bölgesine doğru göç eder. Elektroforezden sonra nötralizasyon işlemi uygulanır ve DNA spesifik boya ile mikroskop altında görüntüleme işlemi gerçekleştirilir. Genotoksik etkiye sahip bileşikler DNA moleküllerinin farklı hızlarda çekirdek dışına çıkmasına neden olarak kuyruklu yıldız görüntüsü oluştururlar (Singh ve ark., 1988; Üstündağ ve ark., 2014).

Kantitatif olarak DNA hasarının tespit edildiği komet testi alkali ya da nötral pH ortamında yapılabilir. Kuyruk momenti, kuyruktaki DNA yüzdesi ve kuyruk uzunluğu parametreleri DNA hasarının kantitatif olarak hesaplanmasında kullanılan parametrelerdir. Komet testinde ortam pH'sına bağlı olarak tespit edilen DNA hasar türü farklılık göstermektedir. Nötral pH'da gerçekleştirilen komet testinde DNA'da oluşan çift zincir kırıkları belirlenebilirken, alkali pH'da ise çift zincir kırıklarının yanı sıra tek zincir kırıkları, alkali labil bölgeler, oksidatif baz hasarı, DNA-DNA, DNA-protein ya da DNA-ilaç çapraz geçişleri saptanabilmektedir (Üstündağ ve ark., 2014).

Pozitif kontroller OECD'nin kılavuzunda yer alan tanıma göre bir test yönteminin belirlenen şekillerde gerçekleşip gerçekleşmediğini belirlemek için kullanılan kimyasal yapıli bileşikler ya da materyallerdir (Møller ve ark., 2020; Petersen ve ark., 2021). Pozitif kontroller kullanılacak yöntemin hipotezine uygun şekilde seçilmelidir (Stone ve ark., 2009). Komet test yönteminde de kullanılacak olan pozitif kontroller direkt ya da indirekt etki mekanizması ile DNA'da hasar oluşturma potansiyeline sahip bileşikler olmalıdır. Genetik toksikolojide hücre kültürü üzerinde yapılan çalışmalarda pozitif kontrollerin kullanımı, deneyin performansı hakkında gerekli bilgiyi sağladığından dolayı zorunludur. Komet testinde kullanılan pozitif

kontroller deneyler arası farklılıkları değerlendirmek ve elde edilen sonuçların güvenilir olduğundan emin olmak için kullanılmaktadır (Møller ve ark., 2020).

Pozitif kontrollerden elde edilen sonuçların farklı laboratuvar çalışmalarında benzer olmayışı ve farklı zaman dilimlerinde aynı yöntemden aynı sonuçları elde edememek pozitif kontrollerin kullanıldığı yöntemlerde karşılaşılan sınırlardan biridir (Petersen ve ark., 2021). Laboratuvarlar arası deneylerde oluşan farklılıkları önlemek adına araştırmacılar özellikle in vitro komet testi prosedürünü standart hale getirmek için kullanılacak olan pozitif kontroller ile ilgili optimizasyon yapılmasına dair görüş bildirmişlerdir (Møller ve ark., 2020).

Uygulanan komet test yöntemine bağlı olarak farklı pozitif kontroller kullanılmaktadır. Örneğin, temel alkali komet test yönteminde pozitif kontrol olarak kullanılan materyallerden biri hidrojen peroksit diğeri ise X-ray ışınıdır. Enzim modifiye komet test yöntemi olan Fpg Komet ya da oksidatif stres ölçütlerinden biri olan OGG1'e hassas bölgeler için uygulanan komet testi yönteminde ise pozitif kontrol olarak ışığa duyarlılaştırıcı Ro 19-8022 kullanılmaktadır (Collins ve ark., 2014). Bu bileşikler dışında komet testi yöntemi uygulanarak yapılan ekotoksikoloji çalışmalarında pozitif kontrol olarak potansiyel karsinojenik bir etilleyici bileşik olan EMS ve metilleyici bir kimyasal bileşik olan MMS kullanılmıştır (Mouchet ve ark., 2005). Ancak komet testi ile yapılan insan biyoizlem çalışmalarında etik nedenlerden ve sağlıklı bireylerin kasten genotoksik bir kimyasal maddeye maruz kalmayacağından dolayı pozitif kontrol grubu kullanılmamaktadır (Møller ve ark., 2020).

Komet testinde en yaygın şekilde kullanılan pozitif kontrollerden biri hücrelerde DNA hasarına neden olan H_2O_2 'dir (Bankoglu ve ark., 2019; Benhusein ve ark., 2010; Senevirathne ve ark., 2010). H_2O_2 Fe^{+2} geçiş metalinin aracılık ettiği Fenton reaksiyonu ile yüksek reaktif özelliğe sahip hidroksil radikali ve diğer reaktif oksijen türlerine dönüşür. Bu durum hücre DNA'sında tek ve çift zincir kırıklarının oluşması ile sonuçlanır (Andersson ve ark., 2007). DNA'da tek ve çift zincir kırıklarına neden olan H_2O_2 'nin kullanıldığı komet testi çalışmalarında maruziyet süresi ve uygulanan konsantrasyon değerleri arasında farklılıklar gözlemlenmiştir (Bankoglu ve ark., 2019; Benhusein ve ark., 2010). Bu durum H_2O_2 'nin pozitif kontrol olarak kullanıldığı komet testi yönteminden elde edilen sonuçların farklı olmasına neden olmaktadır (Bankoglu ve ark., 2019). Andersson ve ark. (2007) yaptığı bir çalışmada uzun süre kültür edilmiş insan lenfositlerini farklı sürelerde H_2O_2 'ye maruz bırakmıştır. 0.25 mmol/L H_2O_2 konsantrasyonu 10 dakikalık maruziyet sonucunda en yüksek hasara neden olurken, 30 dakikalık DNA tamirinden sonra H_2O_2 'nin neden olduğu DNA hasarında düşüş gözlemlenmiştir. Benhusein ve ark. (2010) HepG2 hücrelerinde H_2O_2 'nin DNA hasar kapasitesini belirlemek için komet testi yöntemini kullanmıştır. H_2O_2 'nin DNA hasar kapasitesini belirlemek için 25 ve 50 μM H_2O_2 'i 5 dak., 30 dak., 40 dak., 1 sa. ve 24 sa. süre ile HepG2 hücrelerine maruz bırakılmıştır. Sonuçlar H_2O_2 'nin neden olduğu DNA hasarının 1 saate kadar olan maruziyette her iki konsantrasyon için de yüksek olduğunu, 24 saatlik maruziyette ise bir artışın olmadığı yönünde olmuştur. Rosignoli (2001), H_2O_2 'nin neden olduğu DNA hasarını komet testi kullanarak insan normal kolonosit hücrelerinde ve HT29 ile HT29 19A insan kolon tümör hücre hatları üzerinde değerlendirmiştir. H_2O_2 , DNA hasarını normal kolonosit hücrelerinde doza bağlı olarak artırmıştır. 30 dakika üzeri inkübasyon süresinde 15 mM H_2O_2 konsantrasyonunda ise DNA hasarında azalma gözlenmiştir. İnsan lenfosit hücreleri üzerinde H_2O_2 'yi farklı doz ve maruziyet sürelerinde uygulayan Gasiorowski ve Brokos (2001) 20 μM H_2O_2 konsantrasyonunun 5 dakika maruziyet süresinde daha fazla DNA hasarına neden olduğunu ancak 2 saat maruziyet süresinde ise DNA hasarında belirgin bir azalma gözlemlendiğini belirtmiştir. Sistematik bir derleme makalesinde Bankoglu ve ark. (2019) pozitif kontrol olarak kullanılan H_2O_2 'nin araştırmacılar tarafından yaygın şekilde 75 μM konsantrasyonda ve 5 dakika buz üzerinde uygulandığı yönünde olduğunu belirtmiştir. Tez çalışmamızda 1 μM , 5 μM ,

10 μM , 25 μM , 50 μM , 75 μM , 100 μM ve 200 μM H_2O_2 'nin 3T3 hücreleri üzerinde 30 dakika ve 60 dakika maruziyeti sonucunda neden olduğu DNA hasarları karşılaştırılmıştır. Tez çalışmamızdan elde ettiğimiz veriler 25 μM ve 50 μM H_2O_2 'nin hücreler üzerindeki 30 dakikalık maruziyet sonucunda görülen DNA hasarının 60 dakikalık maruziyete göre daha fazla olduğunu göstermiştir. H_2O_2 'nin 25 ve 50 μM konsantrasyon değerlerinin 30 dakikalık maruziyetlerinde ve 50, 75 ve 100 μM konsantrasyon değerlerinin 60 dakikalık maruziyetlerinde belirgin bir DNA artışının meydana gelmesi in vitro komet testinde H_2O_2 'nin uygun bir pozitif kontrol olduğunu göstermektedir. Bu bağlamda belirtilen bu konsantrasyon değerlerinde ve maruziyet sürelerinde in vitro olarak gerçekleştirilen komet testinde H_2O_2 'nin pozitif kontrol olarak kullanılması uygun olacaktır.

IARC Grup 2A sınıfında yer alan MMS DNA'da yanlış baz eşleşmesine, replikasyon bloklarına neden olan ve DNA bazlarındaki nitrojen ve oksijen atomlarını direkt olarak alkilleyen güçlü bir klastojendir (Chang ve ark., 2002; Fatur ve ark., 2003; Kirkland ve ark., 2016; Lundin ve ark., 2005). MMS, DNA üzerinde guanin bazını toksik ve karsinojenik olmayan 7-metilguanine ve adenin bazını lethal bir lezyon olan ve DNA sentezini inhibe eden 3-metiladenin'e dönüştürerek yanlış baz eşleşmesine ve replikasyon çatalında ilerleme oranında azalmaya neden olur (Chang ve ark., 2002; Lundin ve ark., 2005). Aynı zamanda MMS, kromozomlar arası ve kromozom içi rekombinasyonu indüklemektedir (Lundin ve ark., 2005). MMS'nin neden olduğu apürinik/apirimidinik bölgelerdeki lezyonlar komet test yöntemi ile tespit edilmektedir (Fatur ve ark., 2003). Hosseinzadeh ve ark. (2008) MMS'nin farelerdeki farklı organlarda neden olduğu DNA hasarını incelemek için komet test yöntemini kullanmıştır. Elde ettikleri sonuçlar MMS'nin fare organlarında %kuyruk DNA oranında belirgin bir artışa neden olduğunu göstermiştir. de Andrade ve ark. (2004) sucul biyoçevrede genotoksik kirliliği MMS'nin farklı konsantrasyonlarını (2, 4 ve 8×10^{-5} Molar) farklı maruziyet zamanlarında (1, 2, 6 ve 24 saat) insan lökosit hücreleri üzerinde komet testi ile araştırmışlardır. MMS'nin artan konsantrasyonlarında ve artan maruziyet süresi ile meydana gelen DNA hasarında artış

gözlemlemişlerdir. MMS'nin en yüksek konsantrasyonunda 6 ve 24 saatlik maruziyette hiçbir canlı hücre bulunmadığı bildirilmiştir. Artan maruziyet süresi ve artan konsantrasyona bağlı olarak DNA hasarında artış gözlemlenmiştir. MMS'nin neden olduğu DNA hasarı tamirinde rol alan baz ekzisyon ve homolog rekombinasyon tamir yollarında görülen polimorfizmin MMS-maruziyet zamanları ile ilişkisinin incelendiği bir çalışmada, MMS maruziyetinin neden olduğu DNA hasarının 2 saatten sonra tamamlanmadığı bildirilmiştir (Ryk ve ark., 2008). Bausinger ve Speit (2014) yaptıkları bir çalışmada insan tam kan ve periferik mononükleer kan hücreleri üzerinde MMS, potasyum bromat, (+/-)- anti-B[a]P-7,8-dihidrodiol-9,10-epoksit (BPDE), 4-nitrokinolin-1-oksit (4NQO) kimyasallarının yol açtığı DNA hasarı farklı konsantrasyonlarda ve farklı zaman dilimlerinde komet testi ile ölçülmüştür. 2 saatlik maruziyet sonucunda 80 µM MMS'nin en yüksek DNA hasarına neden olduğu, 18 saatlik inkübasyon sonrasında ise 80 µM MMS'nin neden olduğu DNA hasarında azalma meydana geldiği belirtilmiştir. Yapılan bir çalışmada fare periferik kan hücreleri kullanılarak komet testi gerçekleştirilmiştir. Genotoksik kimyasal bileşik olarak MMS kullanılmıştır. Farklı zamanlarda hücrelere maruz bırakılan MMS'nin neden olduğu DNA hasarında farklılıklar gözlenmiştir. 3 saatlik maruziyet sonucunda DNA hasarında artış, 16 saatin sonunda DNA hasarında pik ve ardından bir düşüş süreci gözlenmiştir (Ellahueñe ve ark., 2004). Biz de tez çalışmamızda MMS'nin 1 µM, 5 µM, 10 µM, 50 µM, 100 µM ve 500 µM konsantrasyon değerlerinin 3T3 hücreleri üzerinde 30 dakika ve 60 dakika maruziyet sonunda neden olduğu DNA hasarını karşılaştırdık. Elde ettiğimiz veriler 30 dakikalık 500 µM MMS maruziyetinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde DNA hasarında artışa neden olduğunu gösterirken, 60 dakika maruziyet sonucunda ise meydana gelen DNA hasarında MMS'nin tüm konsantrasyon değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı olduğunu göstermiştir. 1 µM, 10 µM, 50 µM, 100 µM ve 500 µM MMS'nin 60 dakika maruziyet süresi sonunda neden olduğu DNA hasarı 30 dakikalık süre sonundaki DNA hasarına göre daha yüksek bulunmuştur. MMS'nin en yüksek konsantrasyon değerinin 30 dakikalık maruziyet sonunda DNA hasarını negatif kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artırdığını gözlemlese bile, bu artışın negatif kontrole oldukça yakın bir değer olması bu konsantrasyon değerinin in vitro komet testinde pozitif kontrol olarak kullanılması sonuçların doğru yorumlanması açısından problem oluşturabilir. 60 dakikalık

maruziyette MMS'nin tüm konsantrasyon değerlerinde negatif kontrole göre anlamlı bir artış gözlemlenmesine rağmen, bu artışın düzgün bir şekilde olmaması yine bu maruziyet süresinde tez çalışmamızda seçtiğimiz konsantrasyon değerlerinde MMS'nin in vitro komet testinde pozitif kontrol olarak kullanılması MMS'yi uygun bir pozitif kontrol adayı yapmamaktadır.

EMS, alkilleyici bir kimyasal bileşik olup yaygın olarak bilinen kimyasal bir mutajendir (Koch ve ark., 2010; Masoabi ve ark., 2018; Shirasawa ve ark., 2016; Di Sotto ve ark., 2010). EMS'nin en yaygın olarak C/G---T/A dönüşüm mutasyonlarına neden olduğu bildirilmiştir. EMS, DNA'daki guanin bazını alkilleyerek O-6 etilguanin yapısını oluşturur ve timin ile yanlış baz eşleşmesi gerçekleşir. EMS aynı zamanda tek nükleotit varyasyonlarına ve insersiyon/delesyon mutasyonlarına da neden olmaktadır (Shirasawa ve ark., 2016). Gichner ve ark., (2000) yaptıkları bir çalışmada komet testi uygulayarak tütün bitkisinden izole edilen hücrelerin çekirdeklerine EMS, ENU ve gama ışınları maruz bırakarak farklı zaman dilimlerindeki DNA tamir kinetiğini belirlemişlerdir. 3 mM EMS maruziyetinden sonra 4 haftalık DNA tamiri ölçülmüştür. 72 saate kadar DNA hasarında bir azalma meydana gelmemiş, kuyruk momentindeki azalma 1 hafta ve 4 haftanın sonunda gözlemlenmiştir. Yapılan bir başka çalışmada TX1 tütün hücre hattında EMS maruziyet süresindeki değişimin DNA hasarı ile ilişkisi komet testi ile belirlenmiştir. TX1 hücreleri 30 mM EMS'ye 0, 30, 60, 90, 120, 150 ve 180 dakika süre boyunca maruz bırakılmıştır. 15 dakika üzeri maruziyet zamanlarında kuyruk momentinde belirgin bir artış gözlemlenirken, 3 saatlik süre sonunda ise hücre canlılığında belirgin bir azalma saptanmıştır. Araştırmacılar EMS maruziyet süresindeki artış ile artan kuyruk momenti arasında direkt bir ilişki olduğunu belirtmiştir (Stavreva ve ark., 1998). Tez çalışmamızdan elde ettiğimiz verilere göre 30 dakika 0,2 mM EMS maruziyeti sonunda görülen DNA hasarı 60 dakika maruziyet süresi sonunda görülen DNA hasarına göre daha yüksek bulunmuştur. EMS her ne kadar DNA artışına neden olmuş olsa da bu artış negatif kontrole oldukça yakın seviyelerde gerçekleşmiştir. Bu yüzden EMS'nin in vitro komet testinde pozitif

kontrol olarak seçilmesi tez çalışmamızdan elde ettiğimiz bulgulara göre uygun gözükmemektedir.

Alkilleyici bileşikler DNA’da replikasyon sırasında yanlış eşleşmelere neden olabilecek istenmeyen DNA eklentileri oluşturan kimyasallardır (Richardson ve ark., 1987). Alkilleyici kimyasallar sınıfında yer alan ve insanlarda potansiyel karsinojenite riski bulunan N-nitrozo bileşikleri bu sınıf içerisindeki en potent gruptur (Bronstein ve ark., 1991). Bir N-nitrozo bileşiği olan ENU monofonksiyonel alkilleyici bir kimyasal bileşiktir (Bronstein ve ark., 1991; Gichner, 2003; Nath ve Maiti, 2022; Richardson ve ark., 1987). Güçlü bir toksin, mutajen ve genotoksik bir kimyasal madde olan ENU karsinojenite çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Li ve ark., 2010; Nath ve Maiti, 2022). Birçok araştırmacı tarafından mutajen bir bileşik olarak kullanılan ENU’nun fare spermatogonia hücrelerinde spesifik bölge mutasyonlarını indüklediği gösterilmiştir (Hitotsumachi ve ark., 1985). Aynı zamanda genotoksik bir madde olan ENU’nun DNA hasarını indükleyip indüklediğini komet test yöntemi ile araştıran araştırmacılar doza bağlı olarak ENU’nun DNA hasarına yol açtığını belirtmişlerdir (Gichner, 2003). Fortini ve ark. (1996) CHO hücre hattı üzerinde ENU ve N-etil-N’-nitro-N-nitrozoguanidin (ENNG) alkilleyici bileşiklerinin farklı maruziyet zamanlarındaki DNA hasar onarımını araştırmışlardır. ENNG ile ENU’nun, DNA hasarı ve tamirinde benzer sonuçlar gösterdiği, 24 saatlik süre sonunda DNA hasarının tamamen tamir edildiği belirtilmiştir. Çalışmamızda 0,025 mM ENU konsantrasyon değerinin 60 dakikalık süre sonunda neden olduğu DNA hasarı 30 dakika sonunda görülen DNA hasarına göre daha yüksek çıkarken; ENU’nun daha yüksek konsantrasyonlarının 30 dakika maruziyet süresi sonunda neden olduğu DNA hasarı, 60 dakikalık süre sonunda görülen hasara göre daha fazla bulunmuştur. 30 dakikalık yüksek konsantrasyon değerlerindeki ENU maruziyetinde görülen DNA hasarı, tez çalışmamızda seçtiğimiz pozitif kontroller arasından ENU’nun uygun bir aday olduğunu göstermiştir.

Hücre döngüsüne spesifik bir bileşik olan etoposid farklı kanser türlerinin tedavisinde yaygın olarak kullanılan antikanser etkili bir kimyasaldır (Godard ve ark., 1999; Tammaro ve ark., 2013). Topoizomeraz α ve β olmak üzere iki tane izomer formunu içeren topoizomeraz II etoposidin hücresel hedefidir (Tammaro ve ark., 2013). Her iki izomer formunu ayırt etmeksizin inhibe eden etoposid DNA ile üçlü kompleks bir yapı oluşturarak enzimin fonksiyonunu bozar ve DNA'da tek ve çift zincir kırıklarının oluşmasına neden olur (Godard ve ark., 1999; Tammaro ve ark., 2013). DNA'da zincir kırıkları oluşturan etoposidin genotoksik etkisi hem in vitro hem de in vivo komet test yöntemi ile araştırılmıştır. Etoposidin ratlardaki belirli organlarda DNA hasarını indüklediği, in vitro CHO hücre hattında ise 1 saatlik maruziyet sonucunda ve doza bağlı olarak DNA hasarına neden olduğu bildirilmiştir (Godard ve ark., 1999). İnsan periferik kan hücrelerinde fungusitlerin DNA hasarına olan etkisinin komet testi yöntemi ile araştırıldığı ve etoposidin pozitif kontrol olarak seçildiği bir çalışmada, 1 saatlik etoposid maruziyeti sonucunda sitotoksik olmayan etoposid dozlarında doza bağlı olarak DNA hasarının arttığı, 24 saatlik süre sonunda ise DNA hasarının normale döndüğü bildirilmiştir (Lebailly ve ark., 1997). Schonn ve ark. (2010) yaptıkları bir çalışmada etoposidin insan adenokarsinom hücresi olan HT29 hücre hattında DNA hasarı ve tamirinin doza ve zamana bağlı olarak değişimi komet testi kullanılarak incelenmiştir. Çalışmada hücreler 10 μ M etoposid/ 1 ve 24 saat ve 100 μ M etoposid/1 saat olacak şekilde maruz bırakılmıştır. Çalışmanın sonucu 10 μ M etoposidin 1 saatlik maruziyet sonucunda 100 μ M/1 saat ve 10 μ M/24 saat etoposid maruziyetine göre yaklaşık 1.5 kat daha fazla DNA hasarına neden olduğunu göstermiştir. Biz de çalışmamızda 30 dakikalık etoposid maruziyetinin yol açtığı DNA hasarının 60 dakikalık maruziyete kıyasla daha yüksek çıktığını bulduk. Özellikle etoposid 30 dakikalık maruziyet süresi boyunca düşük konsantrasyonda bile negatif kontrole kıyasla belirgin bir DNA hasarına yol açmıştır. Bu yüzden in vitro komet testi için tercih edilmesi uygun pozitif kontroller arasında etoposid yer almaktadır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez çalışmamızda, komet testinde pozitif kontrol olarak sıklıkla kullanılan kimyasal bileşiklerden H_2O_2 , MMS, EMS, ENU ve Etoposid'in farklı konsantrasyon değerlerinde ve farklı maruziyet sürelerinde 3T3 fare embriyonik fibroblast hücreleri üzerindeki genotoksisite profilleri değerlendirilmiştir.

Bu tez çalışmasında her bir pozitif kontrol için aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir:

1. H_2O_2 'nin genotoksik etkilerinin komet testi ile değerlendirdiğimiz çalışmamızda 5 μM , 10 μM , 25 μM ve 50 μM konsantrasyon değerlerinde 30 dakikalık maruziyet sonuçları negatif kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. 60 dakikalık maruziyet sonuçlarına göre ise 5 farklı konsantrasyon değerlerinde (10 μM , 25 μM , 50 μM , 75 μM , 100 μM) negatif kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. 30 dakika 25 μM ve 50 μM H_2O_2 'nin neden olduğu DNA hasarı 60 dakikalık maruziyete göre daha yüksek çıkmıştır. H_2O_2 'nin 75 μM , 100 μM ve 200 μM konsantrasyon değerlerinde 30 dakikalık maruziyet sonuçlarına ait %kuyruk yoğunluğu verileri elde edilememiştir. 200 μM H_2O_2 konsantrasyon değerinin 60 dakikalık maruziyetine ait DNA hasarının göstergesi olan %kuyruk yoğunluk verisi elde edilememiştir.

2. MMS'nin 30 dakika ve 60 dakika maruziyetleri ile 3T3 hücreleri üzerindeki genotoksik etkileri komet testi ile değerlendirilmiştir. 30 dakikalık maruziyette sadece en yüksek MMS konsantrasyon değerinde meydana gelen DNA hasarı negatif kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. 60 dakikalık maruziyette MMS'nin bütün konsantrasyonlarının 3T3 hücreleri üzerinde neden olduğu DNA hasarı negatif kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı çıkmıştır. Ancak bu anlamlılık düzgün bir şekilde gerçekleşmemiştir. 30 dakikalık ve 60 dakikalık maruziyet sonuçlarının karşılaştırıldığı çalışmamızda 1 μ M, 10 μ M, 50 μ M, 100 μ M ve 500 μ M MMS konsantrasyon değerlerinde 30 dakikalık maruziyet sonucunda gözlemlenen DNA hasarı daha yüksek bulunmuştur.

3. Etoposidin genotoksik etki profilinin farklı maruziyet sürelerinde komet testi ile değerlendirildiği çalışmamızda, etoposidin en düşük konsantrasyon değeri hariç diğer bütün konsantrasyon değerlerinde 30 dakikalık maruziyet verileri negatif kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

4. EMS'nin genotoksik etki profilinin komet testi ile aydınlatıldığı tez çalışmamızda EMS'nin 0,2 mM 30 dakika 3T3 hücreleri üzerindeki maruziyetinin neden olduğu DNA hasarı, aynı konsantrasyon değerinin 60 dakika maruziyetine göre daha yüksek çıkmıştır. EMS'nin 30 dakika ve 60 dakika maruziyet sonuçları ayrı ayrı değerlendirildiğinde negatif kontrole göre anlamlı sonuçlar elde edilmesine rağmen, EMS'nin 3T3 hücrelerinde meydana getirdiği %kuyruk yoğunluğu verileri negatif kontrole yakın değerler olarak elde edilmiştir.

5. 0,025 mM ENU'nun 3T3 hücrelerindeki 60 dakikalık maruziyet sonucunun neden olduğu DNA hasarı aynı konsantrasyon değerinin 30 dakikalık

maruziyet sonucuna göre daha yüksek çıkmıştır. 0,2 mM, 0,4 mM ve 2 mM ENU 30 dakika maruziyeti ise aynı konsantrasyon değerlerinin 60 dakika maruziyetine göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Tezimizden elde ettiğimiz bütün veriler ışığında H₂O₂, Etoposid ve ENU'nun in vitro alkali komet test yönteminde pozitif kontrol olarak kullanımının uygun olduğunu göstermektedir.

İn vitro komet testininin standardizasyonunun sağlanması için başka hücre hatlarında ve diğer pozitif kontrollerin de kullanıldığı araştırmalara ihtiyaç vardır. Ayrıca tercih edilecek olan pozitif kontrolleri komet yönteminin türlerine göre belirlemek daha doğru olacaktır.

ÖZET

Komet Yöntemi ile 3T3 Hücre Hattında Pozitif Kontrollerin *in vitro* Karşılaştırılması ve Optimizasyonu

Hücre düzeyinde DNA hasarını belirlemek için kullanılan Komet (Tek Hücre Jel Elektroforez) yöntemi bir genotoksitesite testi olup, hassas, hızlı ve güvenilir sonuçlar vermesi ile ön plana çıkmaktadır. Bu test yöntemi sayesinde tek ya da çift DNA zincir kırıkları, baz çifti hasarları, alkali labil bölgeler, apoptotik çekirdekler belirlenebilmektedir. Komet testinde pozitif kontrol olarak uygulanan kimyasallar DNA hasarını indüklediği bilinen genotoksik maddelerdir. Pozitif kontroller hem *in vitro* hem de *in vivo* araştırmalarda bir maddenin genotoksik hasarının olup olmadığını ve DNA hasar/onarım kapasitesinin belirlenmesi açısından önemlidir. Bu yüzden komet yönteminde uygun pozitif kontrolün belirlenmesi son derece önemlidir.

Dünyada birçok farklı laboratuvarlarda komet testi yaygın olarak kullanılmaktadır. Fakat, yapılan her çalışmada farklı pozitif kontrollerden farklı konsantrasyonlardan alınan yanıtların değişiklik gösterdiği bilinmektedir. Bu nedenle tez çalışmamızda komet yönteminde en çok kullanılan ve genotoksik etkisi olduğu bilinen kimyasal maddelerden hidrojen peroksit (H_2O_2), etil metansülfonat (EMS), metil metansülfonat (MMS), N-etil-N-nitrozüre (ENU) ve etoposid farklı konsantrasyonlarda 3T3 fare embriyonik fibroblast hücresi üzerinde test edilmiştir. Ayrıca tez çalışmamızda komet testinde hücre kültürü üzerinde pozitif kontrol olarak kullanılan farklı kimyasalların DNA hasarını indükleyici etkileri maruziyet süreleri 30 dakika ve 60 dakika olmak üzere karşılaştırılmıştır.

Tezimizden elde ettiğimiz sonuçlara göre H_2O_2 , Etoposid ve ENU'nun *in vitro* alkali komet test yönteminde kullanılması uygun pozitif kontrollerdir. MMS ve EMS için elde edilen sonuçlar negatif kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı olmasına rağmen, elde edilen değerler negatif kontrole yakın sonuçlar olduğu için *in vitro* alkali komet testinde pozitif kontrol olarak kullanımı uygun değildir.

Anahtar Sözcükler: Genotoksitesite, Hücre Kültürü, Komet, Pozitif Kontrol, Tek Hücre Jel Elektroforez

SUMMARY

Comparison and Optimization of Positive Controls Using Comet Assay in 3T3 Cell Line *in vitro*

Comet (Single-Cell Gel Electrophoresis) assay is a genotoxicity test used to determine DNA damage at the cell level and comes into prominence as giving sensitive, fast and reliable results. By using this test method, single or double DNA strand breaks, base pair damages, alkali labile regions, and apoptotic nuclei can be determined. In this method, chemicals applied as positive controls have genotoxic features, which are known to induce DNA damage. Positive controls are important for determining whether a substance causes genotoxic damage and DNA damage/repair capacity in both *in vitro* and *in vivo* studies. Therefore, it is highly important to determine the appropriate positive control in the 'Comet' assay.

The comet assay is widely used in many different laboratories around the world. However, it is known that the responses obtained from different positive controls at different concentrations vary in each study. Therefore, in our thesis study, hydrogen peroxide (H₂O₂), ethyl methanesulfonate (EMS), methyl methanesulfonate (MMS), N-ethyl-N-nitrosourea (ENU) and etoposide, which are the most commonly genotoxic chemicals in the comet assay, were tested on 3T3 embryonic fibroblast cells at different concentrations. In addition, in our thesis study, the DNA damage-inducing effects of different chemicals used as a positive control on cell culture in the comet test were compared, with exposure times of 30 minutes and 60 minutes.

According to the results we obtained from our thesis, the use of H₂O₂, Etoposide and ENU in the *in vitro* alkaline comet test method are suitable positive controls. Although the results obtained for MMS and EMS are statistically significant compared to the negative control, they are not suitable for use as a positive control in the *in vitro* alkaline comet test as the results are close to the negative control.

Keywords: Cell Culture, Comet, Genotoxicity, Positive Control, Single-Cell Gel Electrophoresis

KAYNAKLAR

- AHMAD MK, KHAN AA, ALI SN, MAHMOOD R (2015). Chemoprotective effect of taurine on potassium bromate-induced DNA damage, DNA-protein cross-linking and oxidative stress in rat intestine. *PLoS ONE*, **10** (3): 1–16.
- AL-MAREED AA, FARAH MA, AL-ANAZI KM, HAILAN WAQ, ALI MA (2022). Potassium bromate-induced oxidative stress, genotoxicity and cytotoxicity in the blood and liver cells of mice. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, **878**: 503481.
- ANDERSSON M, STENQVIST P, HELLMAN B (2007). Interindividual differences in initial DNA repair capacity when evaluating H₂O₂-induced DNA damage in extended-term cultures of human lymphocytes using the comet assay. *Cell Biology and Toxicology*, **23** (6): 401–411.
- ANTON D, BURCKEL H, JOSSET E, NOEL G (2015). Three-dimensional cell culture: A breakthrough in vivo. *International Journal of Molecular Sciences*, **16** (3): 5517–5527.
- ARMELIN HA (1973). Pituitary extracts and steroid hormones in the control of 3T3 cell growth (mouse fibroblasts/growth factor). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **70** (9): 2702–2706.
- BANKOGLU EE, KODANDARAMAN G, STOPPER H (2019). A systematic review of the use of the alkaline comet assay for genotoxicity studies in human colon-derived cells. *Mutation Research -Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, **845**: 402976.
- BANKOGLU EE, SCHUELE C, STOPPER H (2021). Cell survival after DNA damage in the comet assay. *Archives of Toxicology*, **95** (12): 3803–3813.
- BARISIC-DUJMOVIC T, BOBAN I, CLARK SH (2010). Fibroblasts/myofibroblasts that participate in cutaneous wound healing are not derived from circulating progenitor cells. *Journal of Cellular Physiology*, **222** (3): 703–712.
- BAUSINGER J, SPEIT G (2014). Induction and repair of DNA damage measured by the comet assay in human T lymphocytes separated by immunomagnetic cell sorting. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, **769** (9): 42–48.

- BAUST JM, BUEHRING GC, CAMPBELL L, ELMORE E, HARBELL JW, NIMS RW, PRICE P, REID YA, SIMIONE F (2017). Best practices in cell culture: an overview. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal*, **53** (8): 669–672.
- BAYNTON K, FUCHS RP (2000). Lesions in DNA: hurdles for polymerases. *Trends in Biochemical Sciences*, **25** (2): 74–79.
- BENHUSEIN GM, MUTCH E, ABURAWI S, WILLIAMS FM (2010). Genotoxic effect induced by hydrogen peroxide in human hepatoma cells using comet assay. *Libyan Journal of Medicine*, **5** (1): 1–6.
- BOLOGNESI C, CIRILLO S, CHIPMAN JK (2019). Comet assay in ecogenotoxicology: Applications in *Mytilus* sp. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, **842**: 50–59.
- BRONSTEIN SM, COCHRANE JE, CRAFT TR, SWENBERG JA, SKOPEK TR (1991). Toxicity, Mutagenicity, and Mutational Spectra of N-Ethyl-N-Nitrosourea in Human Cell Lines with Different DNA Repair Phenotypes. *Cancer Research*, **51**(19): 5188–5197.
- CAO J, WU X, QIN X, LI Z (2021). Uncovering the Effect of Passage Number on HT29 Cell Line Based on the Cell Metabolomic Approach. *Journal of Proteome Research*, **20**(3): 1582–1590.
- CHANG-LIU CM, WOLOSCHAK GE (1997). Effect of passage number on cellular response to DNA-damaging agents: cell survival and gene expression. *Cancer Letters*, **113**(1–2): 77–86.
- CHANG M, BELLAOUI M, BOONE C, BROWN GW (2002). A genome-wide screen for methyl methanesulfonate-sensitive mutants reveals genes required for S phase progression in the presence of DNA damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**(26): 16934–16939.
- CHATTERJEE N, WALKER GC (2017). Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **58**(5): 235–263.
- COLLINS AR, EL YAMANI N, LORENZO Y, SHAPOSHNIKOV S, BRUNBORG G, AZQUETA A (2014). Controlling variation in the comet assay. *Frontiers in Genetics*, **5**: 1–6.
- CORDES SP (2005). N -Ethyl- N -Nitrosourea Mutagenesis: Boarding the Mouse Mutant Express. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **69**(3): 426–439.
- CORVI R, MADIA F. (2017). In vitro genotoxicity testing—Can the performance be enhanced? *Food and Chemical Toxicology*, **106**: 600–608.
- de ANDRADE VM, de FREITAS TRO, da SILVA J (2004). Comet assay using mullet (*Mugil* sp.) and sea catfish (*Netuma* sp.) erythrocytes for the detection of genotoxic pollutants in aquatic environment. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, **560**(1): 57–67.
- DE BOER J, HOEIJMAKERS JHJ (2000). Nucleotide excision repair and human syndromes. *Carcinogenesis*, **21**(3): 453–460.
- DE BONT R, van LAREBEKE N (2004). Endogenous DNA damage in humans: A review of quantitative data. *Mutagenesis*, **19**(3): 169–185.
- DI SOTTO A, MAZZANTI G, CARBONE F, HRELIA P, MAFFEI F (2010). Inhibition by β -caryophyllene of ethyl methanesulfonate-induced clastogenicity in cultured human lymphocytes. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, **699**(1–2): 23–28.

- DIAB KA, FAHMY MA, HASSAN EM, EL-TOUMY SA (2022). Evaluation of the cytotoxic, anticancer, and genotoxic activities of *Acacia nilotica* flowers and their effects on N-methyl-N-nitrosourea-induced genotoxicity in mice. *Molecular Biology Reports*, **49**(9): 8439–8448.
- ELLAHUEÑE MF, PÉREZ-ALZOLA LP, FARFÁN-URZUA M, GONZÁLEZ-HORMAZABAL P, GARAY M, OLMEDO MI, LAST JA (2004). Preliminary Evaluation of DNA Damage Related with the Smoking Habit Measured by the Comet Assay in Whole Blood Cells. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, **13**(7): 1223–1229.
- FATUR T, LAH TT, FILIPIČ M (2003). Cadmium inhibits repair of UV-, methyl methanesulfonate- and N-methyl-N-nitrosourea-induced DNA damage in Chinese hamster ovary cells. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, **529**(1–2): 109–116.
- FERRY G (2019). 10 extraordinary papers. Genetics: The structure of DNA. *Nature*, **575**: 35–36.
- FORTINI P, RASPAGLIO G, FALCHI M, DOGLIOTTI E (1996). Analysis of DNA alkylation damage and repair in mammalian cells by the comet assay. *Mutagenesis*, **11**(2): 169–175.
- GAJSKI G, RAVLIĆ S, GODSCHALK R, COLLINS A, DUSINSKA M, BRUNBORG G (2021). Application of the comet assay for the evaluation of DNA damage in mature sperm. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, **788**: 108398.
- GARRIDO C, OTTAVI P, FROMENTIN A, HAMMANN A, ARRIGO AP, CHAUFFERT B, MEHLEN P (1997). HSP27 as a mediator of confluence-dependent resistance to cell death induced by anticancer drugs. *Cancer Research*, **57**(13): 2661–2667.
- GASIOROWSKI K, BROKOS B. (2001). DNA repair of hydrogen peroxide-induced damage in human lymphocytes in the presence of four antimutagens. A study with alkaline single cell gel electrophoresis (comet assay). *Cellular and Molecular Biology Letters*, **6**(4): 897-912.
- GICHNER T (2003). Differential genotoxicity of ethyl methanesulphonate, N-ethyl-N-nitrosourea and maleic hydrazide in tobacco seedlings based on data of the Comet assay and two recombination assays. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, **538**(1–2): 171–179.
- GICHNER T, PTÁČEK O, STAVREVA DA, WAGNER ED, PLEWA MJ (2000). A comparison of DNA repair using the comet assay in tobacco seedlings after exposure to alkylating agents or ionizing radiation. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, **470**(1): 1–9.
- GIGLIA-MARI G, ZOTTER A, VERMEULEN W (2011). DNA damage response. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, **3**(1): 1–19.
- GODARD T, FESSARD V, HUET S, MOUROT A, DESLANDES E, POTTIER D, HYRIEN O, SICHEL F, GAUDUCHON P, POUL JM (1999). Comparative in vitro and in vivo assessment of genotoxic effects of etoposide and chlorothalonil by the comet assay. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, **444**(1): 103–116.
- HALLIWELL B (2006). Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology*, **141**(2): 312–322.
- HARTMANN A, AGURELL E, BEEVERS C, BRENDLER-SCHWAAB S, BURLINSON B, CLAY P, COLLINS A, SMITH A, SPEIT G, THYBAUD V, TICE RR (2003). Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. *Mutagenesis*, **18**(1): 45–51.
- HELGASON CD, MILLER CL (2005). BASIC CELL CULTURE PROTOCOLS (3th Ed.)

- HITOTSUMACHI S, CARPENTER DA, RUSSEL WL (1985). Dose-repetition increases the mutagenic effectiveness of N-ethyl-N-nitrosourea in mouse spermatogonia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **82**(19): 6619–6621.
- HOBBS CA, RECIO L, STREICKER M, BOYLE MH, TANAKA J, SHIGA A, WITT KL (2015). Comet assay evaluation of six chemicals of known genotoxic potential in rats. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, **786–788**(1): 172–181.
- HOSSEINZADEH H, ABOOTORABI A, SADEGHNIA HR (2008). Protective effect of Crocus sativus stigma extract and crocin (trans-crocin 4) on methyl methanesulfonate-induced DNA damage in mice organs. *DNA and Cell Biology*, **27**(12): 657–664.
- ICHIM TE, O'HEERON P, KESARI S (2018). Fibroblasts as a practical alternative to mesenchymal stem cells. *Journal of Translational Medicine*, **16**(1): 1–9.
- JENSEN C, TENG Y (2020). Is It Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cell Culture? *Frontiers in Molecular Biosciences*, **7**: 1–15.
- KHANNA KK, JACKSON SP (2001). DNA double-strand breaks: Signaling, repair and the cancer connection. *Nature Genetics*, **27**(3): 247–254.
- KIRKLAND D, KASPER P, MARTUS HJ, MULLER L, van BENTHEM J, MADIA F, CORVI R. (2016). Updated recommended lists of genotoxic and non-genotoxic chemicals for assessment of the performance of new or improved genotoxicity tests. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, **795**: 7–30.
- KITAMOTO S, MATSUYAMA R, UEMATSU Y, OGATA K, OTA M, YAMADA T, MIYATA K, FUNABASHI H, SAITO K (2015). Optimal dose selection of N-methyl-N-nitrosourea for the rat comet assay to evaluate DNA damage in organs with different susceptibility to cytotoxicity. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, **786–788**: 129–136.
- KOCH AC, RAMGAREEB S, RUTHERFORD RS, SNYMAN SJ, WATT MP (2010). An in vitro mutagenesis protocol for the production of sugarcane tolerant to the herbicide imazapyr. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, **27**(4): 417–427.
- KWIST K, BRIDGES WC, BURG KJL (2016). The effect of cell passage number on osteogenic and adipogenic characteristics of D1 cells. *Cytotechnology*, **68**(4): 1661–1667.
- LEBAILLY P, VIGREUX C, GODARD T, SICHEL F, BAR E, LeTALAËR J, HENRY-AMAR M, GAUDUCHON P (1997). Assessment of DNA damage induced in vitro by etoposide and two fungicides (carbendazim and chlorothalonil) in human lymphocytes with the comet assay. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, **375**(2): 205–217.
- LEES MURDOCK DJ, BARNETT YA, BARNETT CR (2004). DNA damage and cytotoxicity in pancreatic β -cells expressing human CYP2E1. *Biochemical Pharmacology*, **68**(3): 523–530.
- LI Z, BRANHAM WS, DIAL SL, WANG Y, GUO L, SHI L, CHEN T (2010). Genomic analysis of microRNA time-course expression in liver of mice treated with genotoxic carcinogen N-ethyl-N-nitrosourea. *BMC Genomics*, **11**(1): 1–14.
- LU Y, LIU Y, YANG C (2017). Evaluating In Vitro DNA Damage Using Comet Assay. *Journal of Visualized Experiments*, **128**: 2–7.

- LUCEY BP, NELSON-REES WA, HUTCHINS GM (2009). Historical Perspective Henrietta Lacks, HeLa Cells, and Cell Culture Contamination. *Arch Pathol Lab Med*, **133**(9): 1463-1467
- LUNDIN C, NORTH M, ERIXON K, WALTERS K, JENSSEN D, GOLDMAN ASH, HELLEDAY T (2005). Methyl methanesulfonate (MMS) produces heat-labile DNA damage but no detectable in vivo DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Research*, **33**(12): 3799–3811.
- MASOABI M, LLOYD J, KOSSMANN J, van der VYVER C (2018). Ethyl Methanesulfonate Mutagenesis and In Vitro Polyethylene Glycol Selection for Drought Tolerance in Sugarcane (*Saccharum* spp.). *Sugar Tech*, **20**(1): 50–59.
- MASTERS JR, STACEY GN (2007). Changing medium and passaging cell lines. *Nature Protocols*, **2**(9): 2276–2284.
- MENKE M, CHEN IP, ANGELIS KJ, SCHUBERT I (2001). DNA damage and repair in *Arabidopsis thaliana* as measured by the comet assay after treatment with different classes of genotoxins. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, **493**(1–2): 87–93.
- Møller P (2018). The comet assay: Ready for 30 more years. *Mutagenesis*, **33**(1): 1–7.
- MØLLER P, AZQUETA A, BOUTET-ROBINET E, KOPPEN G, BONASSI S, MILIĆ M, GAJSKI G, COSTA S, TEIXEIRA JP, COSTA PEREIRA C, DUSINSKA M, GODSCHALK R, BRUNBORG G, GUTZKOW KB, GIOVANNELLI L, COOKE MS, RICHLING E, LAFFON B, VALDIGLESIAS V, BASARAN N, DEL BO C, ZEGURA B, NOVAK M, STOPPER H, VODICKA P, VODENKOVA S, de ANDRADE VM, SRAMKOVA M, GABELOVA A, COLLINS A, Langie SAS (2020). Minimum Information for Reporting on the Comet Assay (MIRCA): recommendations for describing comet assay procedures and results. *Nature Protocols*, **15**(12): 3817–3826.
- MØLLER P, MURUZABAL D, BAKURADZE T, RICHLING E, BANKOGLU EE, STOPPER H, LANGIE SAS, AZQUETA A, JENSEN A, SCAVONE F, GIOVANNELLI L, WOJEWÓDZKA M, KRUSZEWSKI M, VALDIGLESIAS V, LAFFON B, COSTA C, COSTA S, TEIXEIRA JP, MARINO M, DEL BO C, RISO P, SHAPOSHNIKOV S, COLLINS A (2020). Potassium bromate as positive assay control for the Fpg-modified comet assay. *Mutagenesis*, **35**(4): 341–348.
- MOUCHET F, GAUTHIER L, MAILHES C, FERRIER V, DEVAUX A (2005). Comparative study of the comet assay and the micronucleus test in amphibian larvae (*Xenopus laevis*) using benzo(a)pyrene, ethyl methanesulfonate, and methyl methanesulfonate: Establishment of a positive control in the amphibian comet assay. *Environmental Toxicology*, **20**(1): 74–84.
- NATH P, MAITI D (2022). A review of the mutagenic potential of N-ethyl-N-nitrosourea (ENU) to induce hematological malignancies. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, e23067.
- OSTLING O, JOHANSON KJ (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **123**(1): 291–298.
- PERKER MC, ORTA YILMAZ B, YILDIZBAYRAK N, AYDIN Y, Erkan M (2019). Protective effects of curcumin on biochemical and molecular changes in sodium arsenite-induced oxidative damage in embryonic fibroblast cells. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, **33**(7): 1–8.
- PETERSEN EJ, NGUYEN AD, BROWN J, ELLIOTT JT, CLIPPINGER AJ, GORDON J, KLEINSTREUER N, ROESSLEIN M (2021). Characteristics to consider when selecting a positive control material for an in vitro assay. *Altex*, **38**(2): 365–376.

- POUL JM, HUET S, GODARD T, SANDERS P (2004). Lack of genotoxicity of potassium iodate in the alkaline comet assay and in the cytokinesis-block micronucleus test. Comparison to potassium bromate. *Food and Chemical Toxicology*, **42**(2): 203–209.
- RICHARD L, TOPILKO P, MAGY L, DECOUVELAERE AV, CHARNAY P, FUNALOT B, VALLAT JM (2012). Endoneurial Fibroblast-Like Cells. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, **71**(11): 938–947.
- RICHARDSON KK, RICHARDSON FC, CROSBY RM, SWENBERG JA, SKOPEK TR (1987). DNA base changes and alkylation following in vivo exposure of *Escherichia coli* to N-methyl-N-nitrosourea or N-ethyl-N-nitrosourea. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **84**(2): 344–348.
- ROSIGNOLI P (2001). Protective activity of butyrate on hydrogen peroxide-induced DNA damage in isolated human colonocytes and HT29 tumour cells. *Carcinogenesis*, **22**(10): 1675–1680.
- ROY B, YUAN L, LEE Y, BHARTI A, MITRA A, SHIVASHANKAR GV (2020). Fibroblast rejuvenation by mechanical reprogramming and redifferentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **117**(19): 10131–10141.
- RYDBERG B, JOHANSON KJ (1978). ESTIMATION OF DNA STRAND BREAKS IN SINGLE MAMMALIAN CELLS. In *DNA Repair Mechanisms* (p.: 465–468).
- RYK C, ROUTLEDGE MN, ALLAN JM, WILD CP, KUMAR R, LAMBERT B, HOU S (2008). Influence of DNA repair gene polymorphisms on the initial repair of MMS-induced DNA damage in human lymphocytes as measured by the alkaline comet assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **49**(9): 669–675.
- SCHONN I, HENNESEN J, DARTSCH DC (2010). Cellular responses to etoposide: cell death despite cell cycle arrest and repair of DNA damage. *Apoptosis*, **15**(2): 162–172.
- SENEVIRATHNE M, KIM SH, JEON YJ (2010). Protective effect of enzymatic hydrolysates from highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) against hydrogen peroxide-induced oxidative damage in Chinese hamster lung fibroblast cell line . *Nutrition Research and Practice*, **4**(3): 183.
- SHIRASAWA K, HIRAKAWA H, NUNOME T, TABATA S, ISOBE S (2016). Genome-wide survey of artificial mutations induced by ethyl methanesulfonate and gamma rays in tomato. *Plant Biotechnology Journal*, **14**(1): 51–60.
- SINGH NP, McCOY MT, TICE RR, SCHNEIDER EL (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, **175**(1): 184–191.
- SIU PM, WANG Y, ALWAY SE (2009). Apoptotic signaling induced by H₂O₂-mediated oxidative stress in differentiated C2C12 myotubes. *Life Sciences*, **84**(13–14): 468–481.
- SLUPPHAUG G, KAVLI B, KROKAN HE (2003). The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, **531**(1–2): 231–251.
- SPEIT G, HAUPTER S, SCHUTZ P, KREIS P (1999). Comparative evaluation of the genotoxic properties of potassium bromate and potassium superoxide in V79 Chinese hamster cells. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, **439**(2): 213–221.

- STAVREVA DA, PTÁČEK O, PLEWA MJ, GICHNER T (1998). Single cell gel electrophoresis analysis of genomic damage induced by ethyl methanesulfonate in cultured tobacco cells. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, **422**(2): 323–330.
- STONE V, JOHNSTON H, SCHINS RPF (2009). Development of in vitro systems for nanotoxicology: Methodological considerations in vitro methods for nanotoxicology Vicki Stone et al. *Critical Reviews in Toxicology*, **39**(7): 613–626.
- TAMMARO M, BARR P, RICCI B, Yan H (2013). Replication-dependent and transcription-dependent mechanisms of DNA double-strand break induction by the topoisomerase 2-targeting drug etoposide. *PLoS ONE*, **8**(11): 1–14.
- TODARO GJ, GREEN H (1963). Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *Journal of Cell Biology*, **17**(2): 299–313.
- UMBUZEIRO GDA, HERINGA M, ZEIGER E (2017). In Vitro Genotoxicity Testing: Significance and Use in Environmental Monitoring. In *Adv Biochem Eng Biotechnol* **157**: 59–80.
- ÜSTÜNDAĞ A, BEHM C, FOLLMANN W, DUYDU Y, DEGEN GH (2014). Protective effect of boric acid on lead- and cadmium-induced genotoxicity in V79 cells. *Archives of Toxicology*, **88**(6): 1281–1289.
- WITT TW, ULLOA M, PELLETIER MG, MENDU V, RITCHIE GL (2018). Exploring ethyl methanesulfonate (EMS) treated cotton (*Gossypium hirsutum* L.) to improve drought tolerance. *Euphytica*, **214**(7): 123.
- ZHANG Y, ZHANG B, XU T, YANG X, WEI S, YIN D (2021). Developmental and neurobehavioral assessment of low-dose N-nitrosodimethylamine (NDMA) using zebrafish embryo bioassay. *Science of The Total Environment*, **770**: 144748.
- ZHANG Y, JIANG L, GENG C, LI L, SHAO J, ZHONG L (2011). Possible involvement of oxidative stress in potassium bromate-induced genotoxicity in human HepG2 cells. *Chemico-Biological Interactions*, **189**(3): 186–191.

ÖZGEÇMİŞ

I – Bireysel Bilgiler

Adı: Seda

Soyadı: İPEK

Doğum yeri: İsviçre

Doğum tarihi: 15/02/1994

Uyruğu: Türkiye

Medeni durumu: Bekar

Telefonu: 0546 603 15 94

Adres: Emniyet Mahallesi, Döğol Caddesi, Ankara Üniversitesi Eczacılık
Fakültesi Yenimahalle/Ankara

II – Eğitimi

Temmuz 2019 – Aralık 2022: Farmasötik Toksikoloji (Yüksek Lisans), Ankara
Üniversitesi

Eylül 2014 – Haziran 2019: Eczacılık (Lisans), Ankara Üniversitesi

Yabancı dili: İngilizce

III- Ünvanları:

Eylül 2020 – (devam ediyor): Araştırma görevlisi

IV – Mesleki Deneyimi

Görevler:

Ankara ‘Erşen Eczanesi’ yardımcı eczacılık görevi

Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji ABD-Araştırma
Görevlisi (devam ediyor)

V – Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

Türk Toksikoloji Derneği (TTD)

VI- Bilimsel Etkinlikleri

Makaleler:

- 1- **İpek, S.**, Üstündağ, A., & Can Eke, B. (2022). Three-dimensional (3D) cell culture studies: a review of the field of toxicology. *Drug and Chemical Toxicology*, 1-11.
- 2- Sarialtın, S. Y., Üstündağ, A., Chinheya, R. M., **İpek, S.**, & Duydu, Y. (2022). Cytotoxicity, genotoxicity, oxidative stress, apoptosis, and cell cycle arrest in human Sertoli cells exposed to boric acid. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 70, 126913.
- 3- **İpek S.**, İyigünoğlu, İ., Üstündağ, A., & Duydu, Y. (2022). Evaluation of the Cytotoxic Effect of Bisphenol A and Its Analogs in MCF-7 and HSeC Cell Lines in vitro. *Fabad Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1(47), 13-22.
- 4- CHINHEYA, R. M., YILMAZ, M., ÜSTÜNDAĞ, A., **İPEK, S.**, DUYDU, Y., & AYDIN, C. (2021). In vitro investigation of the cytotoxic, apoptotic and genotoxic effects of pulp capping materials on L929 mouse fibroblast cells. *Journal of research in pharmacy (online)*, 25(5), 616-625.

VII- Diğer Bilgiler

Katıldığı eğitim seminerler:

Risk Assessment Summer School (RASS)-IUTOX-23-27 Mayıs 2022
İstanbul/Türkiye