

**FULLEREN NANOPARTİKÜLLERİNİN RADYASYONA
MARUZ BIRAKILAN A549 İNSAN AKCİĞER EPİTEL
HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ KORUYUCU ETKİLERİNİN
MİKRONÜKLEUS VE gH2AX TEST YÖNTEMLERİ
KULLANILARAK ARAŞTIRILMASI**

Mümün COŞKUN



T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FULLEREN NANOPARTİKÜLLERİNİN RADYASYONA MARUZ
BIRAKILAN A549 İNSAN AKCİĞER EPİTEL HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ
KORUYUCU ETKİLERİNİN MİKRONÜKLEUS VE gH2AX TEST
YÖNTEMLERİ KULLANILARAK ARAŞTIRILMASI**

Mümün COŞKUN

Doç. Dr. Tolga ÇAVAŞ
(Danışman)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Bursa – 2013
Her Hakkı Saklıdır

TEZ ONAYI

Mümün COŞKUN tarafından hazırlanan 'Fulleren Nanopartiküllerinin Radyasyona Maruz Bırakılan A549 İnsan Akciğer Epitel Hücreleri Üzerindeki Koruyucu Etkilerinin Mikronükleus ve gH2AX Test Yöntemleri Kullanılarak Araştırılması' adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Doç. Dr. Tolga ÇAVAŞ

Başkan: Doç. Dr. Tolga ÇAVAŞ
Uludağ Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi
Biyoloji Anabilim Dalı

Üye: Doç. Dr. Nilüfer ÇİNKİLİÇ
Uludağ Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi
Biyoloji Anabilim Dalı

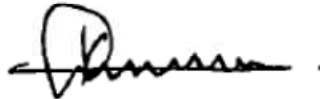
Üye: Doç. Dr. Gülşah ÇEÇENER
Uludağ Ü. Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

İmza

İmza

İmza

Yukarıdaki sonucu onaylarım



Prof. Dr. Kadri ARSLAN
Enstitü Müdürü

08/02/2013

U.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada:

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
 - görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
 - başkalarının eserlerinden yararlanması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
 - atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
 - kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
 - ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı
- beyan ederim.**



08.02.2013

Mümün COŞKUN

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

FULLEREN NANOPARTİKÜLLERİNİN RADYASYONA MARUZ BIRAKILAN A549 İNSAN AKCİĞER EPİTEL HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ KORUYUCU ETKİLERİNİN MİKRONÜKLEUS VE gH2AX TEST YÖNTEMLERİ KULLANILARAK ARAŞTIRILMASI

Mümün COŞKUN

Uludağ Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Tolga ÇAVAŞ

Bu çalışmada, fullerenol nanopartiküllerinin radyasyona maruz bırakılan A549 insan akciğer epitel hücreleri üzerindeki koruyucu etkileri sitokinez bloke mikronükleus ve gH2AX fokus testleri kullanılarak araştırılmıştır.

Çalışmamızda fullerenol ve radyasyonun tek başlarına oluşturdukları sitotoksik etkilerin belirlenmesi amacıyla klonojenik test uygulanmıştır. Çeşitli dozlarda fullerenol (10 – 1600 µg/L) ve radyasyona (0,5 – 8 Gy) maruz bırakılan A549 hücrelerinde hayatta kalış eğrileri hazırlanmıştır. Klonojenik test sonuçlarına göre fullerenol konsantrasyonları (100, 200, 400 µg/L) ve radyasyon dozları (1 Gy ve 2 Gy) belirlenmiştir.

Genotoksisitenin belirlenmesi için kromozomal kırıkları gösteren mikronükleus (MN) ve çift iplik DNA kırıklarını gösteren gH2AX fokus testleri kullanılmıştır. Genotoksisite testleri sonucunda fullerenolün test edilen konsantrasyonlarda herhangi bir toksik etkiye yol açmadığı belirlenmiştir. Radyasyonun ise 1 Gy ve 2 Gy dozlarında hem MN hem de hücre başına düşen ortalama gH2AX fokus sayısını anlamlı düzeyde arttırdığı belirlenmiştir.

Kombine uygulamalarda hücreler 1 Gy ve 2 Gy radyasyona maruz bırakılmadan 1 saat ve 24 saat önce 100, 200 ve 400 µg/L'lik konsantrasyonlardaki fullerenol ile muamele edilmişlerdir. Elde ettiğimiz bulgular radyasyona maruz bırakılmadan önce fullerenol uygulanması durumunda A549 hücrelerinde hem sitotoksik hem de genotoksik etkilerde anlamlı düzeylerde azalmalar olduğunu göstermiştir. Radyasyondan koruma etkisinin 24 saatlik fullerenol uygulamasında daha güçlü olduğu belirlenmiştir. Elde ettiğimiz bulgular fullerenol nanopartiküllerinin radyasyon ile indüklenmiş serbest radikallerin neden olduğu sitotoksisite ve genotoksisiteye karşı koruyucu etki potansiyelini ortaya koymuştur.

Anahtar Kelimeler: Fullerenol, Nanopartiküller, Radyasyon, Sitotoksisite, Genotoksisite, Radyoprotektif etki.

2013, xi + 130 sayfa

ABSTRACT

MSc Thesis

INVESTIGATION OF PROTECTIVE EFFECTS OF FULLEREN NANOPARTICLES IN IRRADIATED A549 HUMAN LUNG EPITHELIUM CELLS USING MICRONUCLEUS AND gH2AX ASSAYS

Mümün COŞKUN

Uludag University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr Tolga ÇAVAŞ

The aim of this study was to investigate the protective effects of fullerene nanoparticles on irradiated A549 human lung epithelium cells using cytokinesis-block micronucleus and gH2AX foci assays.

In this study, clonogenic assay was carried out to determine the cytotoxic effects of fullerene and radiation separately. Surviving fraction curves of A549 cells which treated with various concentrations of fullerene (10 – 1600 µg/L) and exposed to radiation doses (0,5 – 8 Gy) were drawn. Based on the clonogenic assay results, fullerene concentrations (100, 200 and 400 µg/L) and radiation doses (1 Gy and 2 Gy) were established to use in genotoxicity assays.

Micronucleus (MN) assay detecting chromosomal breaks and gH2AX foci assay indicating double strand DNA breaks (DSB) were used to determine genotoxicity. Results of the genotoxicity assays represented that tested concentrations of fullerene didn't cause any toxic effect. On the other hand 1 Gy and 2 Gy radiation doses induced both MN frequency and average number of gH2AX focus per cell significantly.

In the combine test groups, cells were treated with 100, 200 ve 400 µg/L fullerene during 1 and 24 hours before exposure to 1 Gy and 2 Gy irradiation. Results of the assays indicated that fullerene treatment prior to irradiation decreased both cytotoxic and genotoxic effects in A549 cells significantly. Fullerene treatment during 24 hours prior to irradiation exhibited a stronger radioprotection effect. Our findings demonstrate the protective effect potential of fullerene nanoparticles against cytotoxicity and genotoxicity that caused by radiation induced free radicals.

Keywords: Fullerene, Nanoparticles, Radiation, Cytotoxicity, Genotoxicity, Radioprotective effect

2013, xi + 130 pages

TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesi, yürütülmesi ve bütün çalışmalarım boyunca bana rehber olan, ilgi ve yardımlarını esirgemeyen, öğrencisi olmaktan onur ve mutluluk duyduğum Sayın Hocam **Doç. Dr. Tolga ÇAVDAŞ**'a,

Tez deneylerimde, deneyimlerimden ve yardımlarından faydalandığım sevgili hocalarım Doç. Dr. Nilüfer ÇİNKİLİÇ ve Arş. Gör. Özgür VATAN'a,

Deney aşamalarında yardımları ile bana destek olan sevgili arkadaşlarım Arş. Gör. Dilek YILMAZ ve Özgün TEKSOY'a,

Yüksek lisans eğitimim süresince birlikte eğitim gördüğüm ve arkadaşlıkları ile bana moral olan herkese,

Tüm bu zahmetli süreçte destek ve yardımlarını devamlı üzerimde hissettiğim, evlatları olmaktan büyük gurur ve mutluluk duyduğum sevgili aileme,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	3
2.1. Nanoteknoloji ve Nanomateryaller.....	3
2.1.1. Tanımı ve Tarihçesi.....	3
2.1.2. Nanomateryallerin Kullanım Alanları.....	5
2.1.3. Nanomateryallerin Sınıflandırılması.....	7
2.1.4. Nanotoksikoloji.....	9
2.1.5. Nanopartiküllerin Genotoksik Etkileri.....	11
2.1.5.1. Serbest Radikaller, Reaktif Oksijen Türleri ve Oksidatif Stres.....	15
2.1.6. Antioksidanlar ve Nanopartiküllerin Antioksidan Etkileri.....	21
2.2. Fullerenler.....	25
2.2.1. Fullerenlerin Genel Yapısı ve Özellikleri.....	25
2.2.2. Fullerenlerin Türevlendirilmesi.....	28
2.2.2.1. Polihidroksi Fullerenler ve Fullerenol.....	29
2.2.3. C ₆₀ Fullerenlerin Toksikolojisi.....	30
2.2.4. C ₆₀ Fullerenlerin Antioksidan ve Sitoprotektif Etkileri.....	35
2.2.4.1. C ₆₀ Fullerenlerin Antioksidan Etki Mekanizması.....	36
2.2.5. C ₆₀ Fullerenlerin Antiapoptotik Aktivitesi.....	40
2.2.6. C ₆₀ Fullerenlerin Antikarsinojenik Etkileri.....	41
2.3. Radyasyon.....	48
2.3.1. İyonize Edici Radyasyonun Biyolojik Sistemlere Etkileri.....	49
2.3.1.1. Suyun Radyolizisi.....	52
2.3.1.2. İyonize Edici Radyasyonun RNA Molekülüne Etkileri.....	53
2.3.1.3. İyonize Edici Radyasyonun Kromozomlara Etkisi.....	54
2.3.1.4. İyonize Edici Radyasyonun DNA Molekülüne Etkileri.....	56
2.3.1.5. DNA Hasarı Onarım Mekanizmaları.....	59
2.4. Toksisitenin Değerlendirilmesinde Kullanılan Bazı Test Yöntemleri.....	61
2.4.1. Klonojenik Test.....	61
2.4.2. Mikronükleus Testi.....	62
2.4.3. γ -H2AX Fokus Testi.....	66
3. MATERYAL ve METOT.....	70
3.1. Kullanılan Ekipman ve Sarf Malzemeler.....	70
3.2. Fullerenol Çözeltisinin Hazırlanması ve Karakterizasyonu.....	72
3.2.1. Zeta potansiyeli ölçümü.....	72
3.2.2. Dinamik ışık saçılım (DLS) spektrofotometresi analizi.....	72
3.2.3. Transmisyon elektron mikroskopi (TEM) analizleri.....	73
3.3. Kullanılan Hücre Hattı (A549) ve Kültür İşlemleri.....	73
3.4. Hücrelerin ışınlandırılması.....	74

3.5.	Deney Planı.....	75
3.5.1.	Kontrol grupları.....	75
3.5.2.	Klonojenik test grupları.....	76
3.5.3.	Genotoksisite test grupları.....	76
3.6.	Klonojenik Test.....	76
3.7.	Sitokinez Bloke Mikronükleus Testi.....	78
3.8.	γ -H2AX Fokus Testi.....	79
3.9.	İstatistik Analizler.....	81
4.	BULGULAR.....	82
4.1.	Fullerenol Karakterizasyonu.....	82
4.2.	Fullerenolün % Hayatta Kalış (Canlılık) Oranına Etkisi.....	82
4.3.	Radyasyonun % Hayatta Kalış Oranına Etkisi.....	83
4.4.	Fullerenol ve Radyasyon Kombine Uygulamalarının % Hayatta Kalış Oranına Etkisi.....	85
4.5.	Fullerenolün Mikronükleus Oluşumu Üzerindeki Etkisi.....	87
4.6.	Radyasyonun Mikronükleus Oluşumu Üzerindeki Etkisi.....	88
4.7.	Fullerenol ve Radyasyon Kombine Uygulamalarının Mikronükleus Oluşumu Üzerindeki Etkisi.....	91
4.8.	Fullerenolün Çekirdek Bölünme İndeksi (ÇBİ) Üzerindeki Etkisi.....	94
4.9.	Radyasyonun Çekirdek Bölünme İndeksi Üzerindeki Etkisi.....	96
4.10.	Fullerenol ve Radyasyon Kombine Uygulamalarının Çekirdek Bölünme İndeksi Üzerindeki Etkisi.....	97
4.11.	Fullerenolün γ -H2AX Fokuslarının Oluşumu Üzerindeki Etkisi.....	101
4.12.	Radyasyonun γ -H2AX Fokuslarının Oluşumu Üzerindeki Etkileri.....	103
4.13.	Fullerenol ve Radyasyon Kombine Uygulamalarının γ -H2AX Fokuslarının Oluşumu Üzerindeki Etkileri.....	105
5.	TARTIŞMA ve SONUÇ.....	110
	KAYNAKLAR.....	118
	ÖZGEÇMİŞ.....	130

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
ml	Mililitre
mg	Miligram
nm	Nanometre
$\mu\text{g/L}$	Mikrogram / Litre
Gy	Gray
mGy	Miligray
cGy	Santigray
KCl	Potasyum klorür
M	Molar
μM	Mikromolar
nM	Nanomolar
C	Karbon
CeO ₂	Seryum oksit
Co-Cr	Kobalt-Krom alaşımı
O ₂	Oksijen molekülü
¹ O ₂	Singlet oksijen
OH [•]	Hidroksil radikali
O ₂ ^{•-}	Süperoksit anyonu (radikali)
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
-OH	Hidroksil grubu
-COOH	Karboksil grubu
-NH ₂	Amin grubu
-CH	Alken grubu
-C=O	Karbonil grubu
TiO ₂	Titanyum dioksit

Kısaltmalar	Açıklama
A549	İnsan akciğer kanseri epitel hücre hattı
C ₃	Karboksifulleren türevi bir bileşik
C ₆₀	Buckminster fullerene
C ₆₀ *	Uyarılmış C ₆₀ * molekülü
nC ₆₀	C ₆₀ fullerene-Su süspansiyonu
C ₆₀ FWS	Fullerene Water Solution (Sulu Fullerene Çözeltileri)
C ₆₀ HyFn	Hydrated C ₆₀ fullerene (C ₆₀ fullerene hidratları)
C ₆₀ (OH) ₂₄	Polihidroksi fullerene ya da fulleranol
CHO	Çin Hamster Ovaryumu hücre hattı
Cyt-B	Sitokalsin-B
ÇBİ	Çekirdek Bölünme İndeksi
ÇZK	Çift Zincirli DNA Kırığı
DF-1	Dendrofullerene-1
DLS	Dinamik Işık Saçılım Spektrofotometresi
F	Fulleranol konsantrasyonları (F100 = 100 µg/L)
GSH	Glutasyon
H2AX	H2A histon varyantı
γ-H2AX	H2AX histonunun fosforillenmiş hali
İR	İyonize edici radyasyon
MI	Mononükleuslu hücrelerin sayısı
MII	Binükleuslu hücrelerin sayısı
MIII	Trinükleuslu hücrelerin sayısı,
MIV	Tetranükleuslu hücrelerin sayısı
MDA	Malondialdehit
MMC	Mitomisin-C
MN	Mikro Nükleus
MRI	Manyetik Rezonans Görüntüleme

NP	Nanopartikül
PEG	Polietilen glikol
PVP	Polivinil prolidon
ROS	Reactive Oxygen Species (Reaktif Oksijen Türleri)
SOD	Süperoksit dismutaz
TEM	Transmisyon Elektron Mikroskopisi
THF	Tetrahidrofuran
TZK	Tek Zincirli DNA Kırığı
UV	Ultraviyole ışık

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1.	Nanomateriyal içeren ürünler ve sayıları.....	4
Şekil 2.2.	Nanomateriyallerin kullanıldığı bazı alanlar.....	6
Şekil 2.3.	Multifonksiyonel bir nanopartikül modeli.....	7
Şekil 2.4.	Sıklıkla kullanılan bazı nanomateriyaller.....	8
Şekil 2.5.	Bazı nanopartiküllerin nanoskaladaki yeri.....	8
Şekil 2.6.	Nanotoksikoloji ile ilgili başlıca konular.....	11
Şekil 2.7.	Nanopartiküllerin hücre sel alını m mekanizmaları.....	12
Şekil 2.8.	Nanopartiküllerin indire kt genotoksitesitesi.....	13
Şekil 2.9.	Reaktif oksijen türlerini oluşturan faktörler.....	17
Şekil 2.10.	Antioksidan savunma sistemi.....	23
Şekil 2.11.	Karbon atomunun allotropları.....	26
Şekil 2.12.	C ₆₀ 'ın iki boyutlu ve üç boyutlu yapısı.....	26
Şekil 2.13.	R. B. Fuller'in Montreal fuarında yaptığı jeodezik kubbe.....	27
Şekil 2.14.	Bazı modifiye fulleren türevleri.....	28
Şekil 2.15.	Fulleren türevlerinin uygulama alanları.....	29
Şekil 2.16.	Fullerenolün üç boyutlu yapısı.....	30
Şekil 2.17.	C ₆₀ 'ın Tip 1 ve Tip 2 fotokimyasal mekanizmaları.....	31
Şekil 2.18.	Biyolojik çevrelerde fulleren aracılı ROS'ların oluşumu ve olası etkileri.....	32
Şekil 2.19.	Tris – malonik asit C ₃ ve D ₃ türevleri.....	34
Şekil 2.20.	Uzak mesafeli, düzenli su katmanları ile çevrili bir C ₆₀ HyFn modeli.....	38
Şekil 2.21.	Sulu C ₆₀ fulleren etrafında şekillenmiş, uzak mesafeli ve düzenli su katmanlarınca kontrol edilen serbest radikallerin absorpsiyon, toplanma ve rekombinasyon mekanizmalarının olası bir şeması.....	39
Şekil 2.22.	Elektromanyetik spektrum.....	48
Şekil 2.23.	İyonize edici radyasyonun direkt ve indire kt etkisi.....	50
Şekil 2.24.	Radyasyonun canlıdaki etki kademeleri.....	51
Şekil 2.25.	Suyun radyolizisi.....	54
Şekil 2.26.	Tek ve çift zincirde DNA kırılmaları.....	57
Şekil 2.27.	UV radyasyonun neden olduğu baz de ğişikleri.....	59
Şekil 2.28.	Klastojenler ve anojenler tarafından uyarılan hücrelerdeki MN'ler.....	63
Şekil 2.29.	Sitokinezin bloklanması yöntemiyle MN içeren binükleat hücrenin oluşumu.....	64
Şekil 2.30.	Sitokinezi bloklanmış MN yöntemi ile bazı sitogenetik anormalliklerin tayin edilmesi.....	66
Şekil 2.31.	Memelilerde H2AX histonunun fosforilasyonu ve γ-H2AX'in fonksiyonu.....	67
Şekil 2.32.	γ-H2AX fokus testinin temel mekanizması.....	69
Şekil 4.1.	Suda çözülmüş C ₆₀ OH ₍₁₈₋₂₂₎ fullerenol nanopartiküllerinin TEM görüntüleri.....	82
Şekil 4.2.	Çeşitli konsantrasyonlarda fullerenol'e maruz bırakılan A549 hücrelerinde klonojenik test ile belirlenen % hayata kalış oranları.....	83
Şekil 4.3.	Radyasyona maruz bırakılan A549 hücrelerinde koloni oluşumları.....	84

Şekil 4.4.	Çeşitli dozlarda radyasyona maruz bırakılan A549 hücrelerinde klonojenik test ile belirlenen % hayatta kalış oranları.....	84
Şekil 4.5.	Radyasyona maruz bırakmadan 1 saat önce çeşitli konsantrasyonlarda fullerenol ile muamele edilen A549 hücrelerinin % hayatta kalış oranları.....	85
Şekil 4.6.	Radyasyona maruz bırakmadan 24 saat önce çeşitli konsantrasyonlarda fullerenol ile muamele edilen A549 hücrelerinin % hayatta kalış oranları.....	86
Şekil 4.7.	Çeşitli konsantrasyonlarda fullerenole maruz bırakılan A549 hücrelerindeki mikronükleus frekansları (%o).....	87
Şekil 4.8.	Sitokinez bloke A549 hücrelerinin genel görüntüsü.....	88
Şekil 4.9.	Çeşitli dozlarda radyasyona maruz bırakılan A549 hücrelerindeki mikronükleus frekansları (%o).....	89
Şekil 4.10.	2 Gy radyasyon grubunun sitokinez bloke A549 hücrelerinde MN oluşumları.....	89
Şekil 4.11.	Büyük bir MN içeren sitokinez bloke A549 hücresi.....	90
Şekil 4.12.	Orta boy MN içeren sitokinez bloke A549 hücresi.....	90
Şekil 4.13.	1 Gy radyasyon uygulamasından 1 saat ve 24 saat önce fullerenol'e maruz bırakılan A549 hücrelerindeki mikronükleus frekansları (%o).....	91
Şekil 4.14.	2 Gy radyasyon uygulamasından 1 saat ve 24 saat önce fullerenol'e maruz bırakılan A549 hücrelerindeki mikronükleus frekansları (%o).....	92
Şekil 4.15.	1 saat ve 24 saat süresince fullerenol'e maruz bırakılan A549 hücrelerinde 1 Gy radyasyona karşı sağlanan % koruma oranları.....	93
Şekil 4.16.	1 saat ve 24 saat süresince fullerenol'e maruz bırakılan A549 hücrelerinde 2 Gy radyasyona karşı sağlanan % koruma oranları.....	94
Şekil 4.17.	Sitokalsin-B ile muamele edilmiş A549 hücrelerinde çeşitli nükleus formasyonları.....	95
Şekil 4.18.	Fullerenol'e maruz bırakılan A549 hücrelerinde ÇBİ değerleri.....	96
Şekil 4.19.	Radyasyona maruz bırakılan A549 hücrelerinde ÇBİ değerleri.....	97
Şekil 4.20.	Fullerenol ve 1 Gy radyasyona maruz bırakılan A549 hücrelerinde ÇBİ değerleri.....	98
Şekil 4.21.	Fullerenol ve 2 Gy radyasyona maruz bırakılan A549 hücrelerinde ÇBİ değerleri.....	99
Şekil 4.22.	Fullerenol'ün 1 Gy radyasyona maruz bırakılan A549 hücrelerinde ÇBİ koruma oranları.....	99
Şekil 4.23.	Fullerenol'ün 2 Gy radyasyona maruz bırakılan A549 hücrelerinde ÇBİ koruma oranları.....	100
Şekil 4.24.	Foci Counter programı ile γ -H2AX fokus sayılarının belirlenmesi.....	101
Şekil 4.25.	A549 hücrelerinde γ -H2AX fokuslarının DAPI, FITC ve birleştirilmiş görüntüleri.....	102
Şekil 4.26.	Çeşitli konsantrasyonlarda fullerenole maruz bırakılan A549 hücrelerinde hücre başına düşen ortalama γ -H2AX fokus sayıları.....	103
Şekil 4.27.	2 Gy radyasyona maruz bırakılan A549 hücrelerinde γ -H2AX fokuslarının DAPI, FITC ve birleştirilmiş görüntüleri.....	104
Şekil 4.28.	Çeşitli dozlarda radyasyona maruz bırakılan A549 hücrelerinde, hücre başına düşen ortalama γ -H2AX fokus sayıları.....	105

Şekil 4.29. 1 Gy radyasyon uygulamasından 1 saat ve 24 saat önce fullerenol'e maruz bırakılan A549 hücrelerindeki hücre başına düşen ortalama γ -H2AX fokus sayıları.....	106
Şekil 4.30. 2 Gy radyasyon uygulamasından 1 saat ve 24 saat önce fullerenol'e maruz bırakılan A549 hücrelerindeki hücre başına düşen ortalama γ -H2AX fokus sayıları.....	107
Şekil 4.31. 1 saat ve 24 saat süresince fullerenol'e maruz bırakılan A549 hücrelerinde 1 Gy radyasyona karşı sağlanan % koruma oranları.....	108
Şekil 4.32. 1 saat ve 24 saat süresince fullerenol'e maruz bırakılan A549 hücrelerinde 2 Gy radyasyona karşı sağlanan % koruma oranları.....	109

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 2.1. Genotoksisitesi çalışılan bazı nanopartiküller.....	12
Çizelge 2.2. Radikal ve radikal olmayan reaktif oksijen türleri.....	17
Çizelge 2.3. Oksijenin indirgenmesi.....	18
Çizelge 2.4. Bazı antioksidan nanopartikül türleri ve biyolojik etkileri.....	24
Çizelge 2.5. Çeşitli C ₆₀ preperasyonlarının başlıca ROS aracılı biyolojik etkilerine genel bakış.....	44
Çizelge 2.6. Radyasyonun genetik etkileri.....	56
Çizelge 3.1. Çalışmalarda kullanılan ekipman.....	70
Çizelge 3.2. Çalışmalarda kullanılan sarf malzemeler.....	71
Çizelge 3.3. A549 hücrelerinde 1 saat ve 24 saatlik fullerenol uygulaması ve radyasyon ile gerçekleştirilen deney setleri.....	75

1. GİRİŞ

Nobel Fizik Ödülü sahibi Richard Feynman, ilk kez 1959 yılında “nanobilim” kavramını gündeme getirmiştir (Feynman 1999). Drexler 1986 yılında nanoteknolojinin dikkat çekici olanaklara sahip olduğunu belirtmiştir. Zaman içerisinde, nanoteknolojide yaşanan hızlı gelişmelerin insanlar ve ekosistem için büyük yararları olduğu kadar önemli zararları olabileceği konusu tartışılır hale gelmiştir (Seaton ve Donaldson 2005).

C₆₀ fulleren nanopartikülleri ya da diğer adıyla Buckminster fullerenler 1985 yılında Kroto ve ark. tarafından keşfedilmiştir. Karbon (C) atomunun üçüncü doğal allotropu olan Buckminster fullerenler, 60 C atomunun birbirine bağlanarak oluşturduğu bir kafes yapısına sahiptir (Andrievsky ve ark. 2009). Günümüzde C₆₀ fullerenler tüketici ürünlerinde ve tıp alanında yoğun kullanım potansiyeline sahiptir. Fujitani ve ark. (2008) Frontier Carbon adlı firmanın yıllık C₆₀ üretiminin 40 ton olduğunu bildirmiştir. Farre ve ark. (2010)'nın çeşitli atık sularda yaptıkları analizlerde ise 15 – 20 µg/L'ye varan konsantrasyonlarda C₆₀'a rastlanmıştır. Gittikçe artan kullanım potansiyelleri dolayısıyla C₆₀ fullerenlerin toksisitesinin değerlendirilmesi bir zorunluluk haline gelmiştir. Literatürde C₆₀ fullerenlerin toksisiteleri ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar kullanılan test yöntemi, organizma veya hücre hattı, çözücü ve saflık gibi faktörlere bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Bu doğrultuda yapılan bir çok toksisite çalışmasında genelde C₆₀ fullerenlerin toksik olmadığı yönünde bir eğilim vardır. (Nelson ve ark. 1993, Yamago ve ark. 1995, Baiert ve ark. 1996, Moussa ve ark. 1996, Jia ve ark. 2005, Mori ve ark. 2005, Kolosnjaj ve ark. 2007, Baker ve ark. 2008).

Günümüzde canlılar düşük ama sürekli radyasyon ortamı içinde yaşamaktadır (Akın 1981). Doğal radyasyonun yanında konforu arttıran elektronik aletler, tıbbi teşhis ve tedavide kullanılan radyoloji aygıtları ve enerji kaynağı olarak kullanılan nükleer reaktörler gibi yapay radyasyon kaynakları da insan sağlığını tehdit etmektedir (Göksel 1973). Radyasyona maruz kalınması sonucu organizmada birtakım moleküler değişiklikler meydana gelmektedir. İyonize edici radyasyon hücresel düzeyde DNA, RNA, kromozomlar, proteinler ve lipit membran gibi yapılarla etkileşerek hücreyi ölüme sürüklemektedir (Steel 1997, Özalpan 2001). İyonize edici radyasyon DNA'ya

ve kromozomlara doğrudan zarar verebildiği gibi suyun radyolizisi neticesinde oluşan reaktif oksijen türleri (ROS) aracılığıyla indirekt DNA hasarı da oluşturabilmektedir (Lipscomb ve ark. 1992, Kaya ve ark. 1996). İyonize edici radyasyonun DNA molekülünde oluşturduğu hasarların en önemlileri zincir kırılmaları (Olive 1998), baz hasarları, baz kayıpları, denatürasyon bölgelerinin oluşması ve DNA çapraz bağlanmalarıdır (McMillan ve Steel 1997). Kansere tedavisinde halen en etkili yöntemlerden biri olan radyoterapinin normal dokular üzerindeki yukarıda bahsedilen zararlı etkilerini önlemek amacıyla radyasyona karşı koruyucu etki gösteren bazı ajanlar araştırmak gerekli hale gelmiştir (Kalpana ve ark. 2009). Bu anlamda, C₆₀ fulleren türevlerinin antioksidan ve radyoprotektif özellikleri bazı *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarla araştırılmış ve olumlu sonuçlar elde edilmiştir (Rzigalinski 2005, Markovic ve Trajkovic 2008).

Bu tez çalışmasında, hidroksil (-OH) gruplarının eklenmesiyle elde edilen ve polihidroksi fulleren ya da fullerenol (C₆₀(OH)_n (~n = 18–22)) olarak adlandırılan C₆₀ türevinin, radyasyona maruz bırakılan A459 insan akciğer epitel hücre hattı üzerindeki koruyucu etkilerinin, sitokinez bloke mikronükleus ve γH2AX (γ-H2AX) fokus testleri kullanılarak araştırılması amaçlanmıştır. Polihidroksi fulleren nanopartiküllerinin insan hücrelerindeki *in vitro* radyoprotektif etkilerinin ilk kez araştırılacak olması tez çalışmamızın özgünlüğünü oluşturmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI

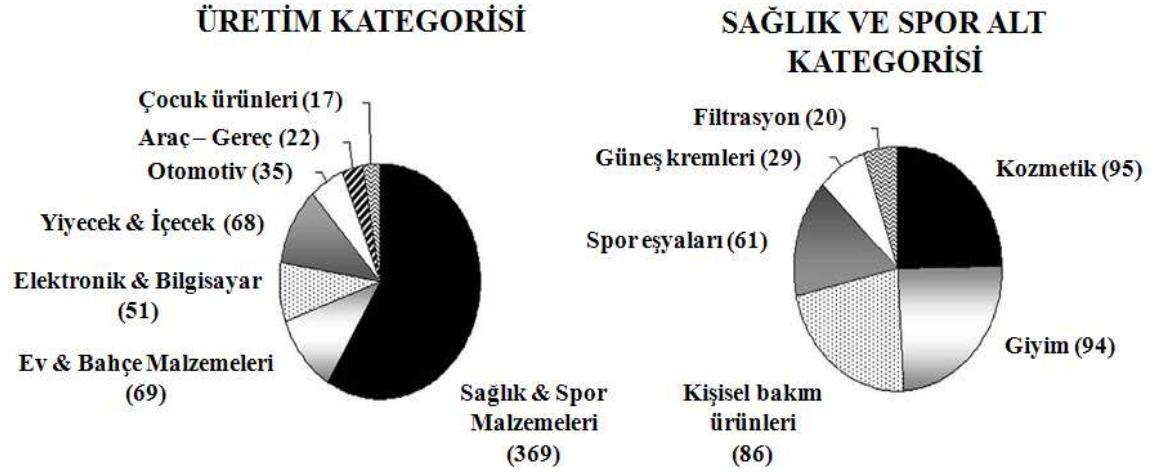
2.1. Nanoteknoloji ve Nanomateryaller

2.1.1. Tanımı ve Tarihçesi

Nano ön eki Yunanca'da cüce anlamına gelen "nanos" kelimesinden türemiştir. Nanoteknoloji terimi ise en az bir boyutu 100 nanometre (nm)'den küçük olan materyallerin tasarımı, üretimi, montajı ve karakterizasyonu gibi süreçleri ifade etmektedir. Bu anlamda nanoteknoloji, nanomateryallerden elde edilen minyatür fonksiyonel sistemlerin uygulamalarını disiplinler arası araştırma – geliştirme faaliyetleri çerçevesinde incelemektedir (Hoyt ve Mason 2008).

Nanoteknoloji endüstrisi, uzay mühendisliğinden nanoelektronığe ve çevre ıslahından medikale kadar birçok alana uygulanabilme potansiyeline sahip olup ekonomi ve bilim alanında önemli avantajlar vaat ederek hızla büyümeye devam etmektedir. Nanomateryallerin bizlere sunduğu yararlı fiziko-kimyasal özellikleri nedeniyle mühendislik ürünü yeni nanomateryallerin tasarlanması ve geliştirilmesi konuları bu endüstride önemli bir yere sahip olmuştur. Bunların arasında çelik benzeri metallere daha sert ve daha dayanıklı materyallerin ısı ve elektrik iletkenliğinin artırılması, katalitik aktivitenin artırılması ve gelişmiş optik özelliklere sahip olma gibi konular yer almaktadır.

2009'da yapılan araştırmalar 800'den fazla tüketici ürününün nanomateryal içerdiğini göstermiştir. Nanomateryal içeren bu ürünler Şekil 2.1'de gösterilmiştir. Bu ürünlerin satılması ile 2007'de yaklaşık 147 milyar dolar gibi bir gelir elde edilirken bu durumun 2015'e kadar 3,1 trilyon dolara ulaşacağı tahmin edilmektedir. Dolayısıyla nanomateryallere olan maruziyetin ileriki yıllarda dramatik bir şekilde artacağı düşünülmektedir (Singh ve ark. 2009).



Şekil 2.1. Nanomateryali içeren ürünler ve sayıları (Singh ve ark. 2009)

Biyoloji dünyası için nanoteknolojinin geçmişi üç milyar yıldan fazladır. Çünkü, ilk canlı hücrenin varlığından bu yana hayatsal faaliyetleri yürütme maksatlı nanometre boyutlarındaki çeşitli fonksiyonel yapılar yani hücrenel komponentler, canlı hücreler içerisinde imal edilmektedir. Bu yapıları anlatılan tanımlara uyarlayacak olursak komponentlerin yani organellerin her birinin hücrenel faaliyetlerde canlılığın devamı için özgün görevleri vardır. Doğada benzer pek çok örnekle karşılaşmak mümkündür (Goorsell 2000, Yılmaz 2006).

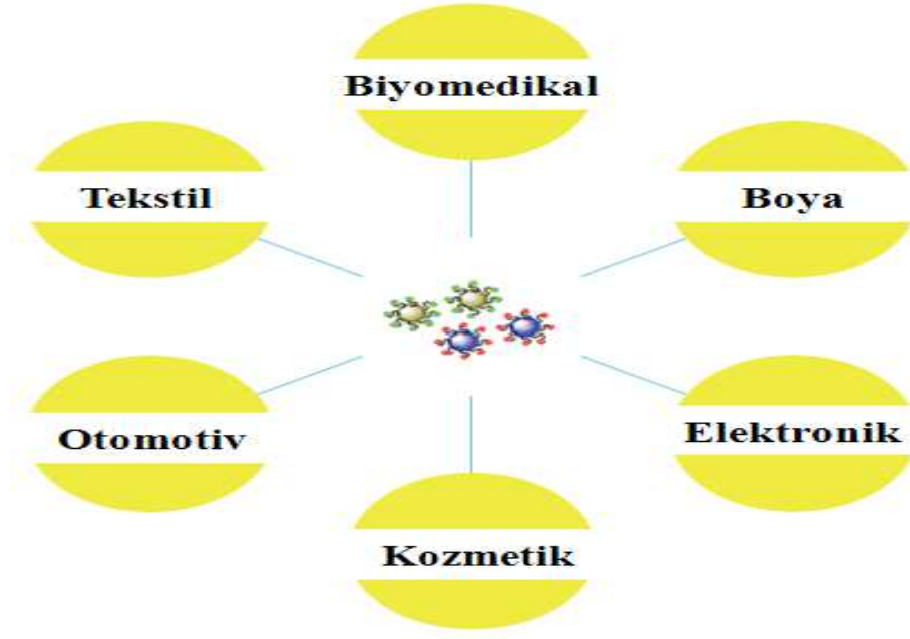
Nanomateryallerin bir türü olan nanopartiküller, genelde modern bilimin keşiflerinden biri olarak düşünülse de aslında çok daha uzun bir geçmişe sahiptir. 9.yy.'da, Mezopotamya'da, sanatkarlar çanak ve çömlekleri parlatmak amacıyla nanopartiküllerden yararlanmışlardır. Orta Çağ ve Rönesans dönemlerinde, çömlekçilikte, altın ve bakır renkli metalik parlaklığı koruma amacıyla cilalama işlemleri yapılmıştır. Cilalama işlemlerinde gümüş ve bakır nanopartikülleri seramik sıranın camsı matriksinde homojen olarak dağılarak ince bir tabaka oluşturmuş ve atmosferik oksidasyonu engellemiştir. Sanatkarlar, bakır ve gümüş tuzlarını oksitlerle birlikte sirke, toprak boyası ve kil karışımına eklemişler ve bu karışımı önceden sırlanmış çömlek yüzeyine uygulamışlardır. Daha sonra bu çömleği 600 °C'de fırınlayarak çömlek yüzeyinde renk veren ve optik özellikler gösteren bu nanopartikülleri elde etmişlerdir (Rawson, 1984).

1970 – 1980’li yıllarda, Amerika ve Japonya’da nanopartiküllerle ilgili ilk esaslı çalışmalar yapılırken, nanopartikül terimi yerine daha çok -çok küçük parçacıklar anlamına gelen- “Ultrafine Particles (UFP)” terimi kullanılmıştır. Bununla birlikte 1990’larda, Amerika’da “Ulusal Nanoteknoloji Girişimi Programı” faaliyete geçmeden önce nanopartikül teriminin kullanımı daha fazla rağbet görmüştür (Kiss ve ark. 1999, Buzea ve ark. 2007).

2.1.2. Nanomateryallerin Kullanım Alanları

Nanomateryaller boyutlarından dolayı, elektronik, fotonik, manyetik, yapısal ve mekanik niteliklerinde makroskopik ölçekten farklılık gösterirler. Bu farklılığın nedenleri ise, yüksek yüzey/hacim oranları ve nano boyutlu yapılarda ortaya çıkan kuantum etkileridir. Bu kuantum özelliklerinden dolayı nanoteknoloji, bilimin tüm alanlarında kullanılmaktadır. Arıtma, remediasyon, nanosensörler gibi çeşitli çevre uygulamalarında da nanoteknoloji son yıllarda hızla ve başarılı bir şekilde uygulanmaktadır (Kaplan, Karanfil ve ark. 2007).

Atmosferde bulunan nanopartiküller doğal ya da insan kaynaklı olarak istenmeden üretilmektedir. Yangın, erozyon ve volkanik faaliyetler gibi doğal olaylar nanopartikül oluşumuna yol açabilmektedir. Airborne Particles Expert Group’un United Kingdom’daki 1996 yılı raporuna göre istenmeden üretilen primer nanopartiküllerin %60’ı karayolu taşımacılığı ile, %23’ü ise endüstriyel ve ticari üretim, enerji üretimi ve evsel ısınma süreçlerinde yanma ürünü olarak ortaya çıkmıştır. Diğer taraftan onlarca endüstri sektörü ticari amaçla birçok nanopartikül üretmekte ve bunlar pigment, reçine ve kozmetik gibi alanlarda kullanılmaktadır. Gün geçtikçe nanopartiküllere dayalı yeni ürünlerin üretimi artmaktadır. Özellikle imal edilen nanopartiküller ve bunlara dayalı ürünler risk analizinin öncül hedefleri olmuşlardır (JA Borm, Robbins ve ark. 2006). Nanoteknoloji ürünü olan nanomateryallerin ve nanopartiküllerin kullanıldığı bazı alanlar Şekil 2.2’de gösterilmiştir.

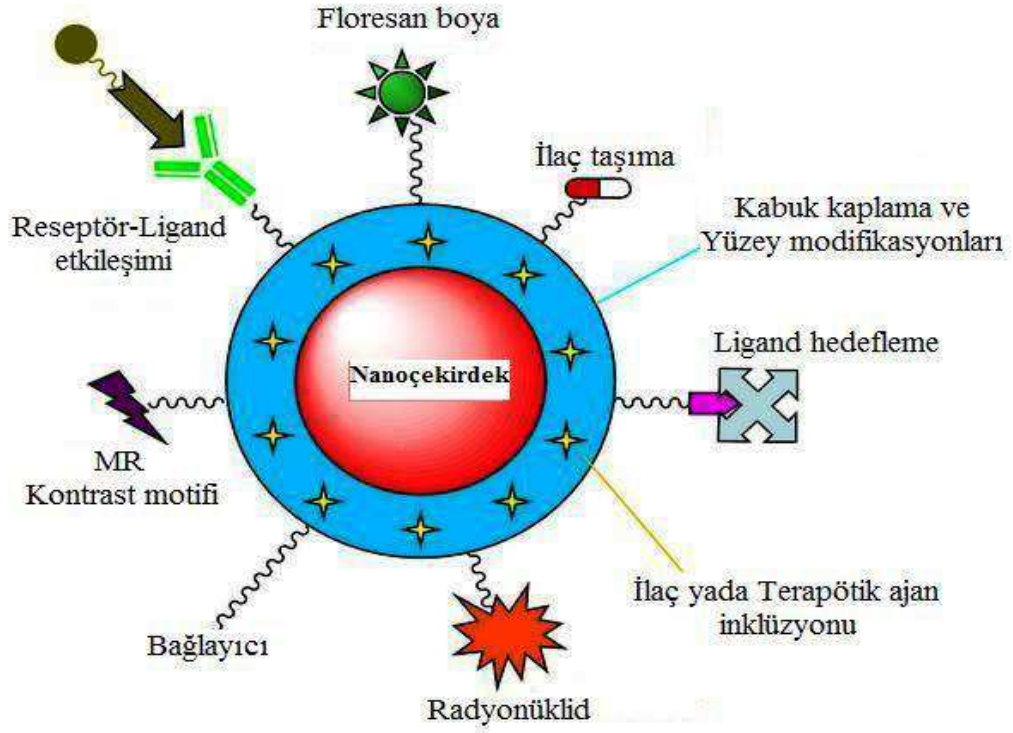


Şekil 2.2. Nanomateryallerin kullanıldığı bazı alanlar

Nanoteknolojinin tıp açısından kullanımı hastalıkların tanısı, tedavisi, ilaç uygulamaları gibi alt başlıkları içermektedir. Tıbbi tanı amacı ile kullanılabilmesi için nanocihazlar ve nanopartiküller; nanotüpler, nanokonsollar ve nanokablolar, nanoelektromekanik transistör ve biosensörler içerisine adapte edilebilmektedirler.

Medikal ve moleküler görüntüleme açısından nanopartiküller, nanomateryaller ve nanocihazların geniş bir şekilde kullanılabilir olması nanoteknolojinin yeni filizlenen bir dalını oluşturmaktadır. Potansiyel görüntüleme ajanlarından en iyi ikisi, kuantum tanecikleri ve manyetik nanopartiküllerdir.

Hastalıkların tedavisi açısından nanoteknolojinin incelenmesi öncelikle nanoterapi terminolojisini ortaya çıkartmaktadır. Nanoterapide hedef ilaç dağılımları, gen terapileri ve antitümör tedavilerdir. Şekil 2.3'te bu amaçla tasarlanan bir multifonksiyonel nanopartikül modeli gösterilmiştir (Türk Nöroşirürji Derneği 2007).



Şekil 2.3. Multifonksiyonel bir nanopartikül modeli (Zhe Liu ve ark. 2010)

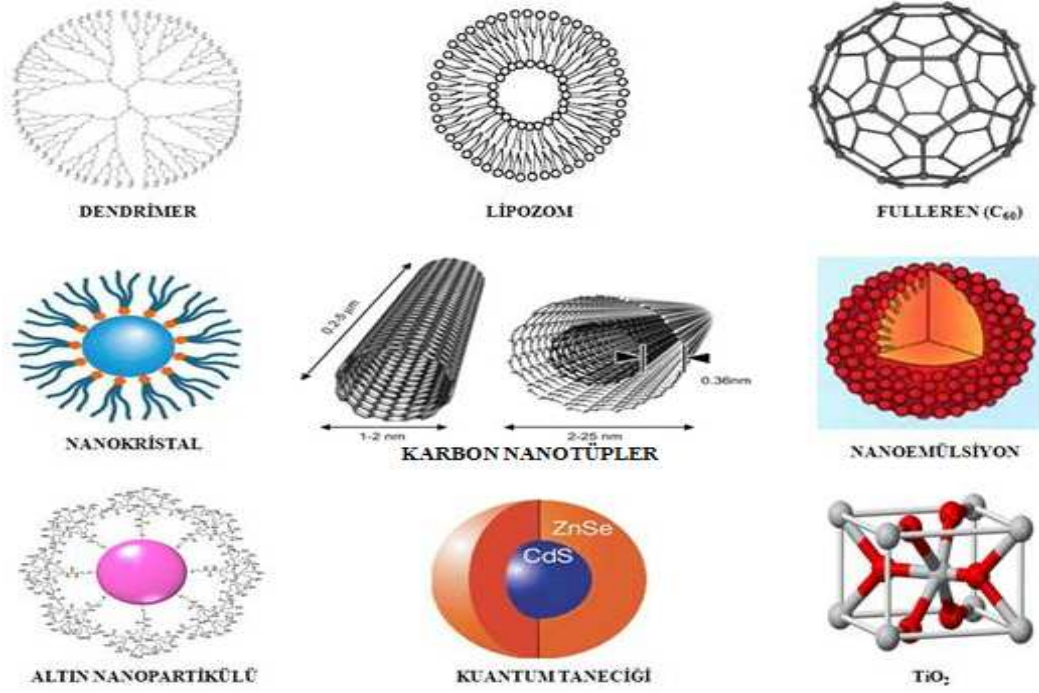
2.1.3. Nanomateryallerin Sınıflandırılması

Nanomateryal terimi, en az bir boyutu 1 – 100 nm aralığında olan materyalleri tanımlamak için kullanılmaktadır. Nanomateryallerin içerisinde nanopartiküller, nanofiberler, nanotüpler ve nanokompozitler yer almaktadır (JA Borm, Robbins ve ark. 2006).

Amerikan Çevre Koruma Örgütü (USEPA) nanomateryalleri,

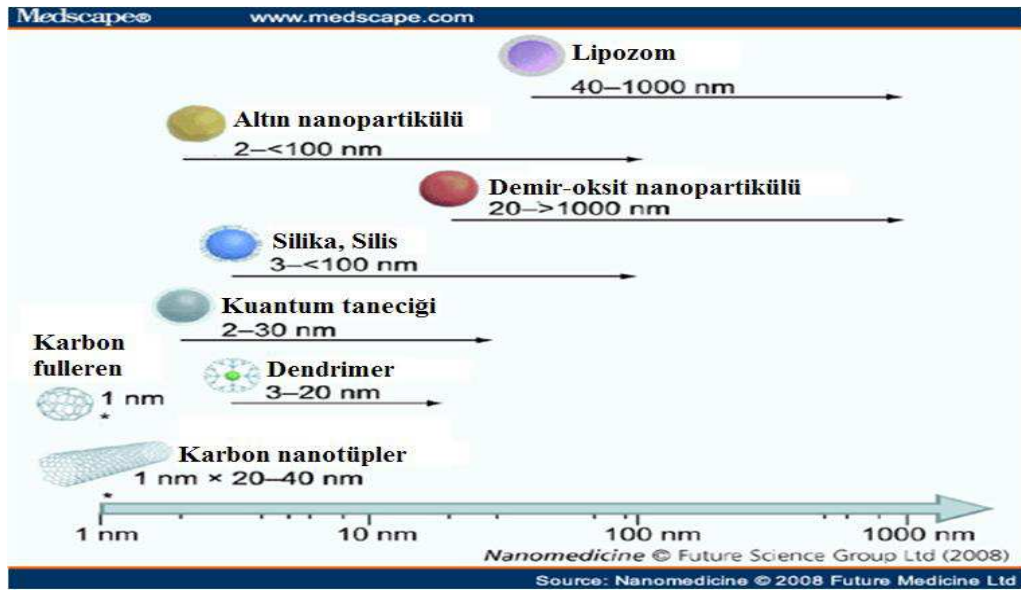
- 1) Karbon bazlı nanomateryaller (karbon nanotüpler ve fullerenler)
- 2) Metal bazlı nanomateryaller (nano-gümüş, nano-altın, TiO₂, metal oksitler)
- 3) Dendrimerler (nano ölçekli polimerler)
- 4) Nanokompozitler olmak üzere 4 ana kısma ayırmıştır.

Belli başlı bazı nanomateryaller Şekil 2.4'te gösterilmiştir.



Şekil 2.4. Sıklıkla kullanılan bazı nanomateryaller

Nanomateryallerin önemli bir kısmını oluşturan nanopartiküller ise 0,1 – 100 nm büyüklüğündeki nanomateryallerdir. Nanopartiküller amorf, kristalin, sferik, iğneli vs. şekillerde olabilirler ve 1 – 100 atom ya da molekülden oluşurlar (EPA Partikül boyutu terminolojisi). Bazı nanopartiküllerin nanoskaladaki yeri ise Şekil 2.5’te gösterilmiştir.



Şekil 2.5. Bazı nanopartiküllerin nanoskaladaki yeri (Nanomedicine, 2008)

2.1.4. Nanotoksikoloji

Nanomateriyallerin kullanımının artması sonucu bu materyallerin çevreye salınımlarının artacağı düşünülmektedir. Bu materyallerin alıcı ortamlarda ve insan sağlığı üzerindeki etkileri konusunda çalışmalara son 10 yılda hız verilmesine rağmen hala cevaplandırılması gereken birçok soru ve literatürde eksik noktalar mevcuttur (Dreher 2004, UK Royal Society Report 2004).

Bir çok araştırmacı nanomateriyallerin toksikolojik etkileri, alıcı ortamlara salınımları, taşınımları, karakterizasyonu, risk değerlendirilmesi konularında çalışmalar yapmıştır ve çalışmalar halen devam etmektedir (Morgan 2005, Thomas ve Sayre 2005).

Nanoteknolojik ürünlerin kullanım alanlarının yaygınlaşması sonucu insanlar, diğer canlılar ve alıcı ortamlar doğrudan veya dolaylı olarak nanomateriyallere maruz kalmaktadır. Çevresel ortamlara salınan nanomateriyallerin çevresel ortamlardaki taşınımı, miktarları, bozunumu, dönüşümü ve nihai akıbetleri tam bilinmemektedir (European Commission 2004).

Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda, alıcı ortamlarda nanomateriyallerin biyolojik olarak bozunma ve birikme, diğer kirleticilerle birlikte taşınma veya bünyelerine daha toksik kirleticileri bağlayarak onların taşınımını artırma, diğer kirleticilerle kimyasal ya da fiziksel reaksiyona girebilme potansiyelleri belirtilmiştir (USEPA 2007).

Nanomateriyallerin davranış modellemelerinde doğal nanopartiküllerin davranışları baz alınmaktadır. Ancak, bu nanomateriyallerin su fazında çözünürlüğünün ve reaktivitesinin artırılması için yüzey kimyaları çeşitli modifikasyon teknikleri ile değiştirilmektedir. Uygulanan yüzey modifikasyonları aynı model yaklaşımlarının uygulanmasını güçlendirmekte ve hatalı sonuçlar verebilmektedir (Wiesner 2006).

Nanopartiküllerin insan sağlığı üzerindeki etkilerini belirlemek için toksikolojik çalışmalar yapılmıştır (Wiesner 2006). Nanomateriyallerin toksik özellikleri kimyasal kompozisyon, miktar, çözünürlük, şekil, yüzey alanı ve yüzey yükü gibi parametrelere

bağlıdır. Ayrıca nanopartiküllerin üretiminden kaynaklanan safsızlıklar da toksisitesini etkilemektedir.

Farklı canlı türleri ve bitkiler nanomateryallere farklı hassasiyetler göstermektedir. Yüzey kaplamada ve güneş kremleri gibi kozmetik ürünlerde sıklıkla kullanılan TiO_2 'nin hücrel absorpsiyonunun toksik bir etkisi yoktur. Ancak bu partiküllerin sucul ortamlara karışmaları algler ve su pireleri üzerinde toksik etki yapmaktadır (Oberdörster ve ark. 2004a).

Fulleren nanopartikülünün balıklarda beyin hasarına sebep olduğunu tespit edilmiştir (Oberdörster ve ark. 2004b). Bakterilere karşı çok toksik olan fullerenin balık türleri için yapılan toksikolojik çalışmalarda çelişkili sonuçlar elde edilmiştir (Colvin 2003, Oberdörster ve ark. 2004b).

Saf olmayan karbon nanotüplerin solunumu veya ağız yoluyla alınımı deney hayvanlarında akciğer hasarlarına ve deri tarafından absorblandığında toksik etkiye sebep olduğu gözlenmiştir (Lam ve ark. 2004, Donaldson ve ark. 2006).

Sonuç olarak, literatürde güvenilir ve yeterli sayıda araştırma olmadığından nanopartiküllerin ekolojik yaşama etkileri konusunda daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir (Kaplan, Karanfil ve ark. 2007). Bu anlamda Şekil 2.6'da Nanotoksikoloji alanıyla ilgili önemli konular gösterilmiştir.



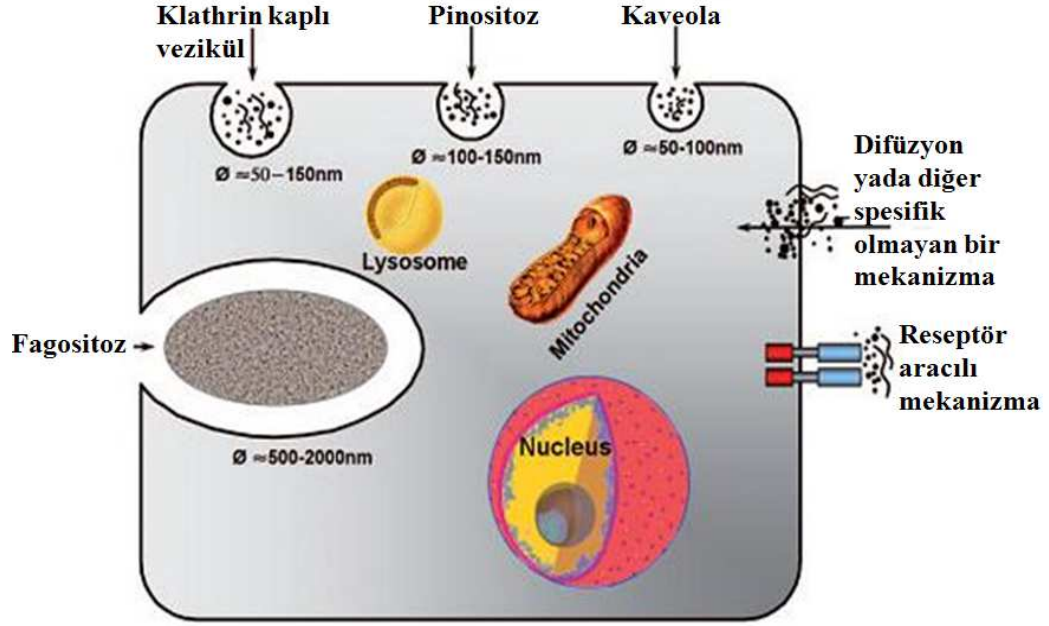
Şekil 2.6. Nanotoksikoloji ile ilgili başlıca konular (Arora ve ark. 2012)

2.1.5. Nanopartiküllerin Genotoksik Etkileri

Genotoksik etki ya da genotoksisite bir hücrenin genetik materyalinin bütünlüğünü etkileyen zararlı bir olayı tanımlamaktadır. Belirli bazı kimyasal bileşikler ve radyasyon tipleri bu tarz zararlı bir etkiye sahiptir. Genotoksik bileşiklerin çoğu DNA ile etkileşme afinitesine sahiptir. Bu durum ise onları canlılar için potansiyel mutajenik ya da karsinojenik ajanlar haline getirmektedir. Bazı bileşikler direkt olarak DNA ile etkileşim içerisine girmese bile çeşitli indirekt mekanizmalarla DNA hasarına ve dolaylı genotoksisiteye neden olabilmektedir (Bal ve ark. 2011).

Nanopartiküller solunum yoluyla, dermal veya oral yolla vücut içerisine girdiklerinde birkaç direkt ya da indirekt mekanizma ile DNA hasarına neden olurlar. Nanopartiküllerin hücre içerisine alınmasında hangi mekanizmaların rol oynadığı Şekil 2.7’de gösterilmiştir.

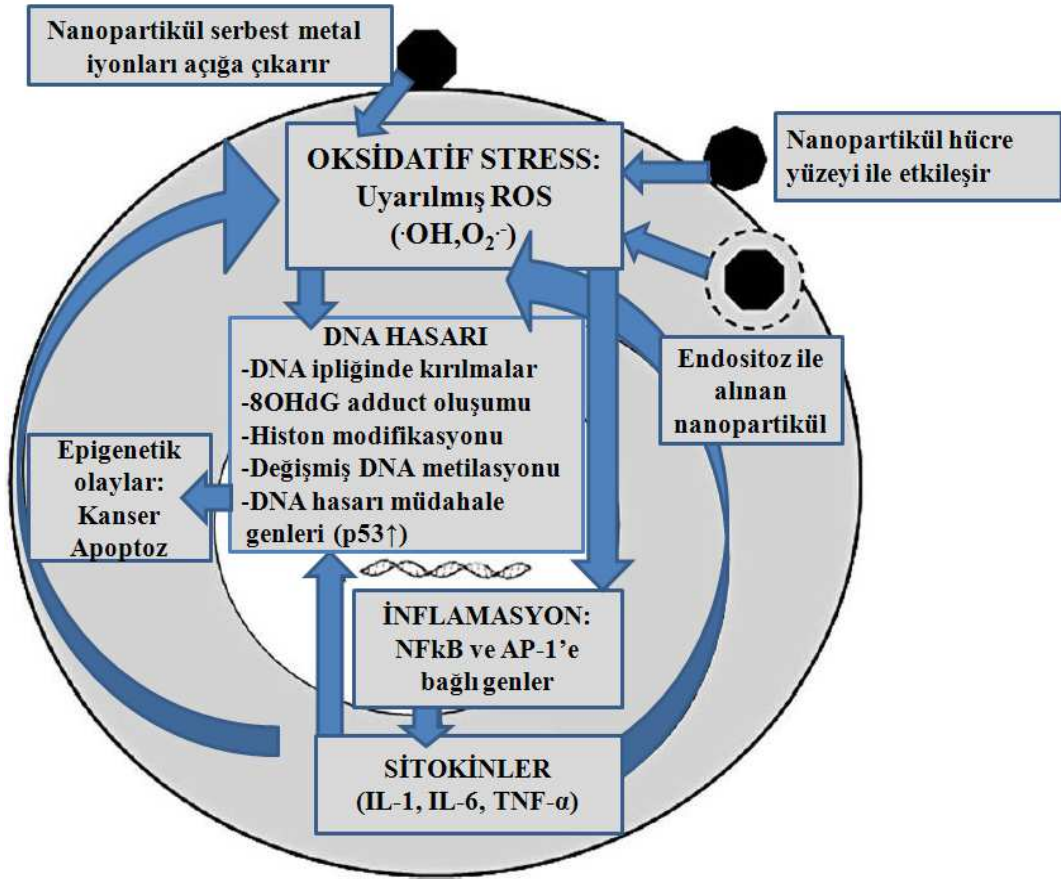
Hücre içerisine giren nanopartiküller yeterince küçük boyutta iseler nüklear membrandan difüzyonla geçerler, nüklear por kompleksleri boyunca taşınırlar ya da mitoz esnasında nüklear membranın çözünmesiyle birlikte nükleusun etrafını sararlar. Nükleus içerisine lokalize olan nanopartiküller ile DNA ya da DNA ilişkili proteinler arasındaki direkt etkileşim genetik materyalin fiziksel olarak hasar görmesine yol açar.



Şekil 2.7. Nanopartiküllerin hüresel alınımları (Krug ve ark. 2006)

Alternatif olarak, nanopartiküllerin DNA molekülü ile fiziksel olarak etkileşimde bulunmadığı fakat hücre bölünmesinde rol oynayan proteinler gibi bazı hüresel proteinlerle etkileşimde bulunduğu indirekt bir mekanizma ile DNA hasarı oluşabilmektedir. Ayrıca bu indirekt etkileşimler, hücreyi genotoksisiteye sürükleyen oksidatif stres, inflamasyon ve anormal sinyal yanıtları gibi diğer hüresel tepkileri indüklemektedir (Şekil 2.8) (Singh, Manshian ve ark. 2009).

Genotoksisitesi çalışılan bazı nanopartiküller; çalışılan organizmalar, kullanılan deneysel sistemler ve elde edilen bulgular ile birlikte Çizelge 2.1’de özetlenmiştir.



Şekil 2.8. Nanopartiküllerin indirekt genotoksitesi (Singh ve ark. 2009)

Çizelge 2.1. Genotoksitesi çalışılan bazı nanopartiküller

Materyal	Organizma	Test yöntemi	Bulgular	Referans
Altın nanopartikülü (AuNP)	İnsan fetal akciğer fibroblast hücre hattı (MRC-5)	8-OHdG ölçmek üzere HPLC	- Oksidatif DNA hasarı - Hücre ölümünde artış yok - Bazı DNA tamir genlerinin down-regülasyonu	Li ve ark. 2008

Materyal	Organizma	Test yöntemi	Bulgular	Referans
Gümüş nanopartikülü (AgNP)	Fare embriyonik kök hücre ve fibroblastları (MES ve MEF)	DNA tamir proteinlerinin ekspresyonu; H2AX fosforilasyonu	Rad51, p53 ve fosfo-H2AX proteinlerinin artan ekspresyonu	Ahamed ve ark. 2008
Kobalt-Krom alaşım nanopartikülü (Co-Cr NP)	Primer insan dermal fibroblastları	- MN testi - Kometi testi - 8-MTT ve LDH testleri	- Önemli miktarda süperoksit ($O_2^{\bullet-}$) ve hidroksil (OH^{\bullet}) radikallerinin oluşumu - Mn frekansı, % komet kuruğu ve sitotoksitede doza bağlı artış	Papageorgiou ve ark. 2007
Titanyum oksit nanopartikülü (TiO_2 NP)	Periferal kan lenfositleri (PBL)	- MN testi - Komet testi	- Hücre viabilitesinde doza ve zamana bağlı düşüş - MN frekansı ve ROS oluşumunda doza bağlı artış	Kang ve ark. 2008

Materyal	Organizma	Test yöntemi	Bulgular	Referans
Su-C ₆₀ fulleren süspansiyonu (nC ₆₀)	Periferik kan lenfositleri (PBL)	- Komet testi	Genotoksik yanıt oluşumunda doza bağlı artış	Dhawan ve ark. 2006
Suda çözünebilen C ₆₀ fulleren nanopartikülü (C ₆₀ (OH) ₂₄)	Çin Hamster Ovaryumu hücre hattı (CHO)	- MN testi	Genotoksisitenin artması (MN frekansındaki artış)	Yasuharu ve Naoharu 2006
Çok katmanlı karbon nanotüpler (MWCNT)	Tip II pnömosit (AT-II) ve meme kanseri hücre hattı (MCF-7)	- <i>Ex vivo</i> ve <i>in vitro</i> MN testi	<i>Ex vivo</i> ve <i>in vitro</i> MN testlerinde doza bağlı olarak MN frekansında önemli ölçüde artış	Muller ve ark. 2008

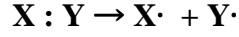
2.1.5.1. Serbest Radikaller, Reaktif Oksijen Türleri ve Oksidatif Stres

Yapılarında eşleşmemiş elektron içeren atom veya moleküller serbest radikaller olarak tanımlanmaktadır. Serbest radikaller hücrede metabolik dengenin bir parçası olarak devamlı yapırlar (Urso ve Clarkson 2003).

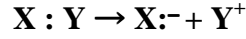
Canlı organizma için önemli olan yapıları, fiziksel ve kimyasal özellikleri, hücrel kaynakları, rol oynadıkları tepkimeler ve etkileri ile çeşitli klinik durumların patogeneğinde rol oynayan serbest radikaller, atomik yörüngelerinde eşleşmemiş elektron bulundurarak, bağımsız olarak varolabilen moleküllerdir. Eşleşmemiş elektronun kazandırdığı en önemli özellik birçok radikal ile bu elektronun paylaşılabilir olmasıdır (Dormandy 1983, Halliwell ve Gutteridge 1989).

Serbest radikaller 3 yolla meydana gelirler (Halliwell ve Gutteridge 1990):

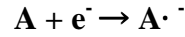
- 1) Kovalent bağı normal bir molekülün, her bir parçasında ortak elektronlardan birisinin kalarak homolitik bölünmesi.



- 2) Normal bir molekülden tek bir elektronun kaybı veya bir molekülün heterolitik bölünmesi. Heterolitik bölünmede kovalent bağı oluşturan her iki elektron atomların birinde kalır. Böylece serbest radikaller değil, iyonlar meydana gelir.

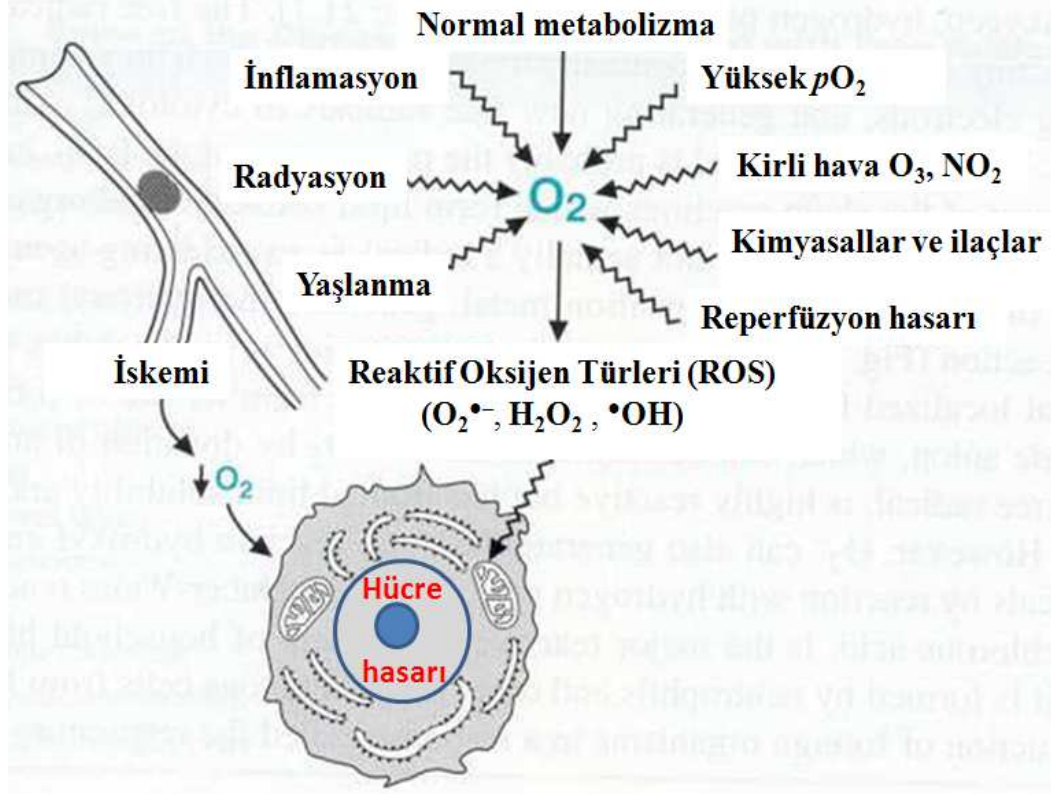


- 3) Normal bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi



Oksidatif stres, hücre içerisinde serbest oksijen radikallerinin ya da reaktif oksijen türlerinin (ROS) artmasına ve antioksidan seviyelerinin düşmesine bağlı olarak bozulan redoks dengesini tanımlamaktadır (Singh, Manshian ve ark. 2009). Organizmada oksidatif strese neden olan radikal yapımı endojen ve çevresel faktörleri içeren çeşitli mekanizmalarla gerçekleşir (Young ve Woodside 2001).

Endojen faktörler mitokondriyal sızıntı, solunumsal patlama, enzim reaksiyonları ve otooksidasyon tepkimeleridir. Çevresel faktörlerin başlıcaları ise sigara dumanı, hava kirliliği, ultraviyole ışınları, iyonize edici radyasyon ve ksenobiotiklerdir (Şekil 2.9) (Young ve Woodside, 2001).



Şekil 2.9. Reaktif oksijen türlerini oluşturan faktörler

Radikal ve radikal olmayan reaktif oksijen türleri ise Çizelge 2.2’de gösterilmiştir.

Çizelge 2.2. Radikal ve radikal olmayan reaktif oksijen türleri

REAKTİF TÜRLERİ	
Radikal	Non-Radikal
Hidroksil (OH^\bullet)	Peroksinitrit (ONOO^-)
Alkoksil (L(R)O^\bullet)	Hipoklorit (^-OCl)
Hidroperoksil (HOO^\bullet)	Hidroperoksit (L(R)OOH)
Peroksil (L(R)OO^\bullet)	Singlet oksijen ($^1\text{O}_2$)
Nitrik oksit (NO^\bullet)	Hidrojen peroksit (H_2O_2)
Süperoksit anyonu ($\text{O}_2^{\bullet-}$)	Ozon (O_3)

Önemli oksidatif stres ajanları olan reaktif oksijen türleri moleküler oksijenin elektron transferiyle suya kadar indirgenmesi sırasında oluşmaktadır. Bu yol 4 elektron gerektirir ve bu yolda oluşan reaktif ara moleküller süperoksit ($\text{O}_2^{\bullet-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve

hidroksil (OH^\bullet) radikalleridir (Fridovich 2001, Nordberg ve Arner 2001). Moleküler oksijenin suya indirgenme basamakları Çizelge 2.3'te gösterilmiştir.

Çizelge 2.3. Oksijenin indirgenmesi

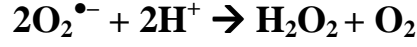
$\text{O}_2 + e + \text{H}^+ \rightarrow \text{HO}_2^\bullet$	Hidroperoksil radikali
$\text{HO}_2^\bullet \rightarrow \text{H}^+ + \text{O}_2^{\bullet-}$	Süperoksit radikali
$\text{O}_2^{\bullet-} + 2 \text{H}^+ + e \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2$	Hidrojen peroksit
$\text{H}_2\text{O}_2 + e \rightarrow \text{OH}^- + \text{OH}^\bullet$	Hidroksil radikali
$\text{OH}^\bullet + e + \text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}$	

Nanopartiküllerin neden olduğu genotoksik etkilerin arasında oksidatif stres mekanizması da yer almaktadır. ROS'lar DNA, protein ve lipitler gibi hücrel makromoleküllerle zararlı bir şekilde etkileşime girerek homeostaziyi bozabilen son derece reaktif moleküllerdir. Tek ve çift iplikteki DNA kırılmaları, 8-hidroksideoksi-guanozin (8-OHdG) adduct oluşumu ve benzeri baz modifikasyonları, DNA çapraz bağlanmaları gibi ROS ile indüklenmiş DNA hasarları tamir edilemez ise karsinogenezin başlamasına ve ilerlemesine neden olabilir (Singh, Manshian ve ark. 2009).

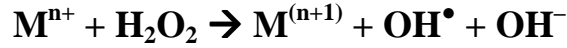
İyonize edici radyasyona maruz kalınması ile oluşan serbest radikaller DNA'yı etkileyerek hücrede mutasyona neden olur. Sitotoksik etki, büyük oranda nükleik asit baz modifikasyonlarından kaynaklanan kromozom değişikliklerine veya DNA'daki diğer değişikliklere bağlıdır. OH^\bullet radikali deoksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyona girer. H_2O_2 zarlardan kolayca geçip hücre çekirdeğine ulaşarak DNA hasarına, hücrede fonksiyon bozukluğuna ve hatta hücre ölümüne neden olabilir (Meram ve Aktaran 2002, Özkan ve Fışkın 2004).

Hücre içerisindeki ROS kaynakları primer ve sekonder olmak üzere iki kısma ayrılır. Primer ROS'lar (Örn. $\text{O}_2^{\bullet-}$, H_2O_2) metabolik olaylar aracılığıyla ya da oksijen aktivasyonu ile açığa çıkabilmektedir. Hücrel koşullarda üretilen $\text{O}_2^{\bullet-}$ anyonu, katalitik aktivitesi çok yüksek bir enzim olan süperoksit dismutaz (SOD) tarafından katalizlenerek H_2O_2 'ye çevrilmektedir.

SOD reaksiyonu aşağıda görüldüğü gibidir:



In vivo ortamda oluşan sekonder ROS'ların (OH^\bullet radikallerinin) çoğu ise H_2O_2 'nin Fenton reaksiyonuna göre metal katalizli bozunmasıyla açığa çıkmaktadır. Fenton reaksiyonu aşağıda gösterilmiştir:



Fenton reaksiyonundaki M harfi bir geçiş metalini temsil etmektedir (Singh, Manshian ve ark. 2009).

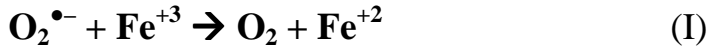
Belirli bazı nanopartiküllerden salınan kadmiyum (Cd), krom (Cr), kobalt (Co), bakır (Cu), demir (Fe), nikel (Ni), titanyum (Ti) ve çinko (Zn) gibi geçiş metali iyonları, H_2O_2 ve $\text{O}_2^{\bullet-}$ gibi hücre metabolik oksijen ürünlerinin OH^\bullet radikaline dönüşmesine neden olabilir. OH^\bullet radikali ise DNA'ya zarar veren en önemli türdür. Ferröz demir (Fe^{+2}) de moleküler oksijenden (O_2) H_2O_2 oluşumuna neden olabilir. Oluşan H_2O_2 hücre ve çekirdek membranından difüzyonla geçerek DNA'ya bağlı Fe ile etkileşir ve OH^\bullet radikallerinin açığa çıkmasına yol açar. Bu durum, kromatindeki DNA ve histon proteinleri arasında Timin – Tirozin çapraz bağlarının oluşmasına neden olur. Ayrıca serbest Fe iyonları OH^\bullet radikali ile indüklenmiş pürin ve pirimidin modifikasyonlarına sebep olabilmektedir. Dolayısıyla Fe bileşeni içeren nanopartiküller, hücre içinde Fenton reaksiyonu ile son derece reaktif OH^\bullet radikallerinin oluşmasını körükleyen ilave kaynaklar niteliğindedir.

Ayrıca H_2O_2 'nin $\text{O}_2^{\bullet-}$ ile tepkimeye girmesi neticesinde yine OH^\bullet radikallerinin oluşumu söz konusudur. Haber – Weiss tepkimesi olarak bilinen bu olay katalizörsüz ortamda oldukça yavaş gerçekleşir ve şu şekilde gösterilmiştir:



Demir katalizörlü tepkimeler ise çok daha hızlıdır. Katalizörlü tepkimede demir önce ferrik formdan (Fe^{+3}) $\text{O}_2^{\bullet-}$ ile ferröz forma (Fe^{+2}) indirgenir. Ferröz form Fenton tepkimesi ile ferrik forma tekrar yükseltgenirken OH^{\bullet} ve OH^- üretilir (Akkuş 1995, Gutteridge 1995).

Demir katalizörlü tepkime şu şekilde gerçekleşmektedir:



Nanopartiküllerin yapılarında geçiş metalleri bulundurmalarına ilave olarak geniş yüzey alanına sahip olmaları da ROS oluşumunu teşvik etmektedir. O nedenle daha küçük boyuttaki nanopartiküller oksidatif stresi daha fazla indüklemektedir. Park ve arkadaşları (2008), yaptıkları bir çalışmada, titanyum dioksit (TiO_2) nanopartiküllerinin perinükleer dağılımı ile aynı bölgede buna bağlı olarak oluşan ROS ilişkisini floresan bir ajan yardımıyla göstermişlerdir.

Yapılan birçok araştırmada, nanopartiküllerin Komet ve Mikronükleus testleri ile belirlenmiş genotoksik etkilerinin oksidatif DNA hasarına bağlı olduğu gösterilmiştir. Ayrıca oksidatif stres, antioksidan savunmanın azalmasına bağlı olarak, mitojen aktif protein kinazı (MAPK) ve nükleer faktör kappa B (NF-kB) transkripsiyon faktörünü içeren spesifik sinyal yollarını aktive ederek pro-inflamatuar sitokinlerin salınmasına yol açmaktadır. Bu sinyalizasyon kaskadı neticesinde bir savunma reaksiyonu olan inflasmayon başlar. İnflamasyonda nötrofil gibi inflamatuvar hücrelerden daha fazla ROS salınımı gerçekleşir. Bu durum ise daha önceden bahsedilen olayların kısır döngü şeklinde devam etmesine ve partikül maruziyetine dayalı patolojik olayların ortaya çıkmasına neden olmaktadır (Singh, Manshian ve ark. 2009).

2.1.6. Antioksidanlar ve Nanopartiküllerin Antioksidan Etkileri

Antioksidan terimi, okside olabilen substrata göre ortamda daha az derişimde bulunan ve bu substratın oksidasyonunu belirgin şekilde geciktiren veya engelleyen madde olarak tanımlanabilir. Bu tanıma göre antioksidanların fizyolojik rolü, serbest radikalleri içeren kimyasal tepkimelerin sonucunda hücrenel bileşenlere gelebilecek zararı önlemektir (Young ve Woodside 2001).

Hunter ve Preedy (2011) ideal bir antioksidanda bulunması gereken özellikleri şu şekilde belirtmiştir:

- 1) Beyin, kalp ve akciğer gibi oksidatif stresin yoğun olduğu bölgelere hızlı bir şekilde yayılabilmek
- 2) Düşük konsantrasyonlarda etkili olabilmek
- 3) ROS üretiminin olduğu bölgelerde güçlü bir etkiye sahip olup uzun süre bozunmadan kalabilmek
- 4) Toksik olmayıp organizmalar, dokular ve hücreler tarafından kolayca tolere edilebilmek

Antioksidanların dört farklı şekilde etki gösterdiği bilinmektedir (Akkuş 1995):

- 1) Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma veya daha zayıf yeni moleküle çevirme **toplayıcı etkidir**. Antioksidan enzimler, trakeobronşiyal mukus ve küçük moleküller bu tip etki gösterirler.
- 2) Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltma veya inaktif şekle dönüştürme **bastırıcı etkidir**. Vitaminler, flavanoidler bu tarz bir etkiye sahiptirler.
- 3) Serbest oksijen radikallerini bağlayarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyici etki **zincir kırıcı etkidir**. Hemoglobin, seruloplazmin ve mineraller zincir kırıcı etki gösterirler.
- 4) Serbest radikallerin oluşturdukları hasarın onarılması **onarıcı etkidir**.

Antioksidanlar, endojen kaynaklı veya eksojen kaynaklı olabilirler (Akkuş, 1995). Endojen antioksidanlar; enzim ve enzim olmayanlar olmak üzere iki sınıfa ayrılırlar.

Enzim olan endojen antioksidanlar şunlardır: Süperoksit dismutaz (SOD), Glutasyon peroksidaz (GSH-Px), Glutasyon S-Transferazlar (GST), Katalaz (CAT), Mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi, Hidroperoksidaz.

Enzim olmayan bazı endojen antioksidanlar ise şunlardır: Melatonin, Seruloplazmin, Transferrin, Miyoglobin, Hemoglobin, Ferritin, Bilirubin, Glutasyon, Sistein, Metiyonin, Ürat, Laktoferrin ve Albümin.

Eksojen antioksidanlar; vitaminler, ilaçlar ve gıda antioksidanları olmak üzere sınıflandırılabilirler.

Vitamin eksojen antioksidanlar şunlardır: α -tokoferol (E vitamini), β -karoten, Askorbik asit (C vitamini), Folik asit (folat).

İlaç olarak kullanılan eksojen antioksidanlar olarak: Ksantin oksidaz inhibitörleri (allopürinol, oksipürinol, pterin aldehit, tungsten), NADPH oksidaz inhibitörleri (adenozin, lokal anestezipler, kalsiyum kanal blokerleri, nonsteroid anti-inflamatuar ilaçlar, diphenylene iodonium), Rekombinant süperoksit dismutaz, Trolox-C (E vitamini analogu), Endojen antioksidan aktiviteyi artıranlar (GSH-Px aktivitesini arttıran ebselen ve asetilsistein), Nonenzimatik serbest radikal toplayıcılar (mannitol, albümin), Demir redoks döngüsü inhibitörleri (desferroksamin), Nötrofil adezyon inhibitörleri, Sitokinler (TNF ve IL-1), Barbitüratlar, Demir şelatörleri örnek olarak verilebilir.

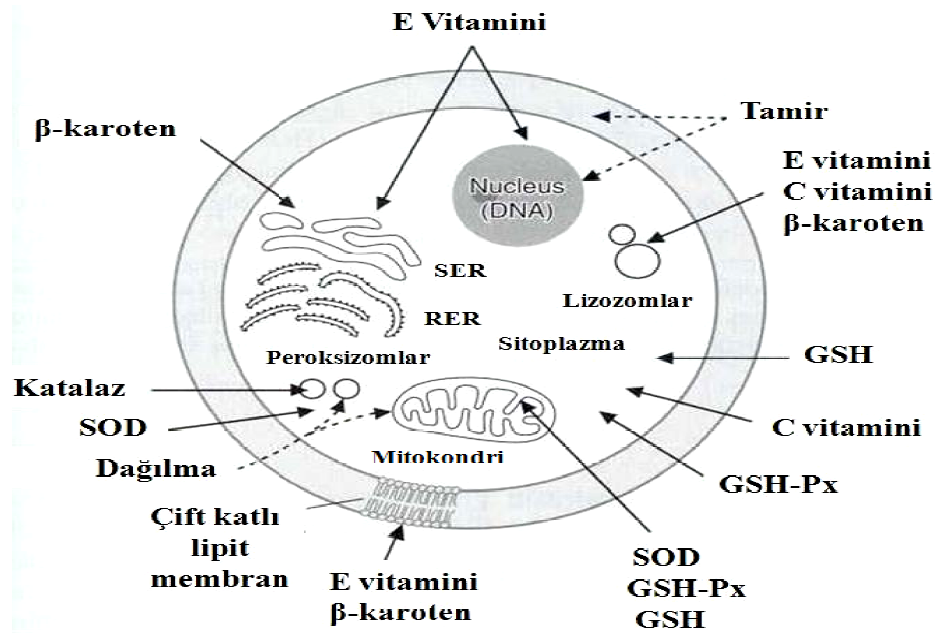
Gıdalardaki eksojen antioksidanlar: Bütil hidroksitoluen (BHT), Bütil hidroksianizol (BHA), Sodyum benzoat, Etoksikuin, Propil gallat ve Fe-süperoksit dismutaz'dır.

Antioksidanlar etki şekillerine göre serbest radikal oluşumunu önleyenler ve zincir kıran ajanlar olarak iki sınıfa ayrılmaktadır (Akkuş, 1995).

Serbest radikal oluşumunu önleyenler şunlardır: Metal bağlayıcılar (transferrin, albumin, seruloplazmin), Süperoksit dismutaz (SOD), Katalaz (CAT), Glutasyon peroksidaz (GSH-Px).

Zincir kırıcı ajanlar suda ve yağda eriyenler olarak 2'ye ayrılmıştır. Suda eriyen zincir kırıcı ajanlar şunlardır: Glutasyon, Ürat, Sistein, Askorbat (C vitamini). Yağda eriyen zincir kırıcı ajanlar ise şunlardır: α -tokoferol (E vitamini), Übikinon, β -karoten.

Antioksidanların serbest radikallere karşı ortaya koyduğu hücresel savunma Şekil 2.10'da gösterilmiştir.



Şekil 2.10. Antioksidan savunma sistemi

Nanotıp; biyomedikal bilimler, fizik ve mühendislik gibi disiplinler arası etkileşimlerle ortaya çıkan en son teknolojiyi insan sağlığını korumak ve iyileştirmek için kullanmaktadır. Antioksidan nanopartiküllerin potansiyel terapötikler olarak ortaya çıkması, bu disiplinler arası hummalı çalışmaların önemli bir sonucudur. Fulleren türevleri, altın, platin ve seryum oksit gibi antioksidan nanopartiküller etkili birer serbest radikal tutucudur. Bu nanopartiküller nörodejeneratif, kardiovasküler, inflamatuvar hastalıklar ve kanser gibi oksidatif stres ile ilgili hastalıkların tedavisinde kullanım potansiyeline sahiptir (Hunter ve Preedy 2011). Çizelge 2.4'te antioksidan etkiye sahip bazı nanopartiküllerin biyolojik faaliyetleri özetlenmiştir.

Çizelge 2.4. Bazı antioksidan nanopartikül türleri ve biyolojik etkileri

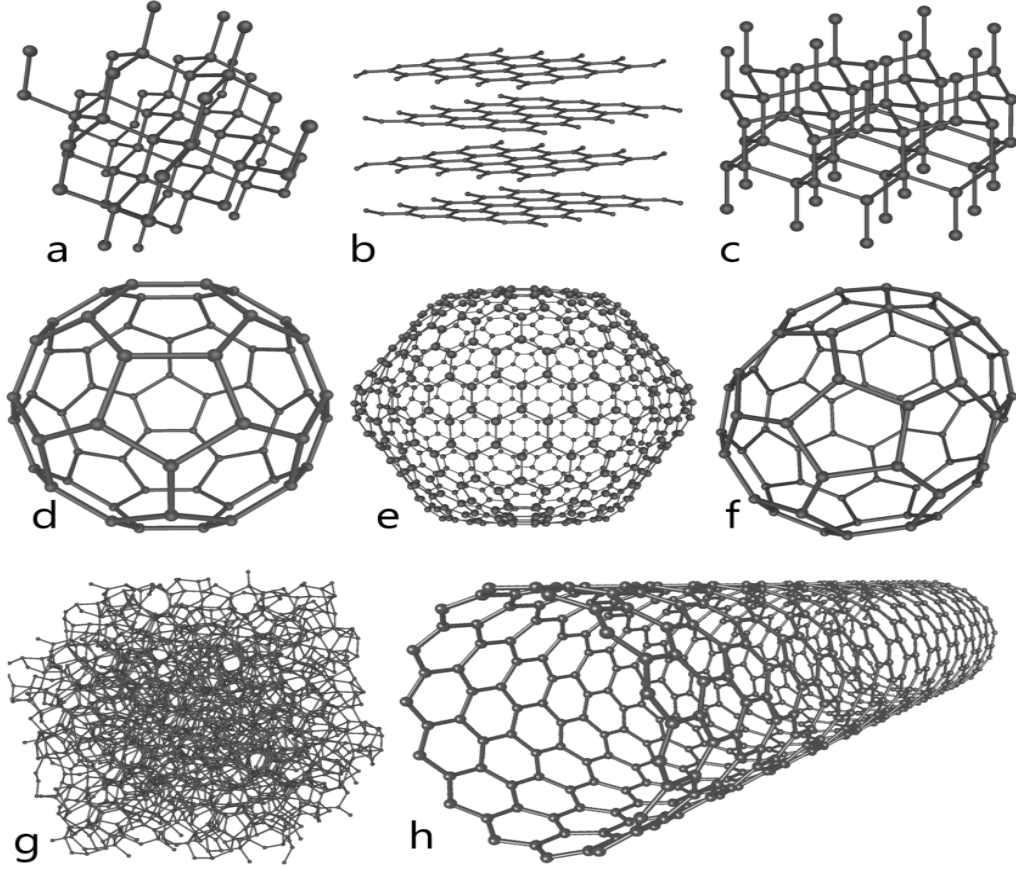
Nanopartikül	Biyolojik faaliyeti	Kaynaklar
Platin	<i>C. elegans</i> 'ın yaşam süresini arttırıcı etki	Kim ve ark. 2008
	Sigara dumanının neden olduğu oksidatif hasarın inhibisyonu	Onizawa ve ark. 2009
	Kanserli hücre gelişiminin inhibisyonu	Saitoh ve ark. 2009
Altın	Farelerde antidiyabetik ajan. Hiperglisemi durumunda oluşan oksidatif stresi ve organ hasarını azaltır	BarathManiKanth ve ark. 2010
	Osteoporozisin azaltılmasında antioksidan etki	Ok-Joo ve ark. 2010
Fulleren ve türevleri	Antioksidan, Nöroprotektif ve Radyoprotektif etki. Ayrıca İskemi – Reperfüzyon yaralanmalarına karşı koruyucu etki	Markovic ve Trajkovic 2008
	Doxorubicin toksisitesine karşı koruyucu etki	Injac ve ark. 2008
	Endotelyal hücreleri NO ile indüklenmiş hasara karşı koruyucu etki	Lao ve ark. 2009
Seryum oksit	Nöronal yaşam süresini ve <i>Drosophila</i> yaşam süresini uzatır	Rzigalinski ve ark. 2006, 2009
	Travmatik beyin yaralanmalarında koruyucu etki	Rzigalinski ve ark. 2009a; Whiting ve ark. 2009
	Alzheimer ve Parkinson hastalıklarında nöroprotektif etki	Rzigalinski ve ark. 2009b; Singh ve ark. 2007

Nanopartikül	Biyolojik faaliyeti	Kaynaklar
Seryum oksit	<i>In vitro</i> nöroprotektif etki	Schubert ve ark. 2006
	<i>In vivo</i> ve <i>in vitro</i> radyoprotektif etki	Rzagalinski 2005; Colon ve ark. 2009
	Mitokondriyal koruyucu	Rzagalinski ve ark. 2009b
	Kardiyoprotektif etki	Niu ve ark. 2007
	Retina hücrelerinin ışıkla indüklenmiş oksidatif stresten korunması	Chen ve ark. 2006
	Anti-inflamatuar faaliyetler	Rzagalinski ve ark. 2006; Rzagalinski ve Clark 2005; Hirst ve ark. 2008

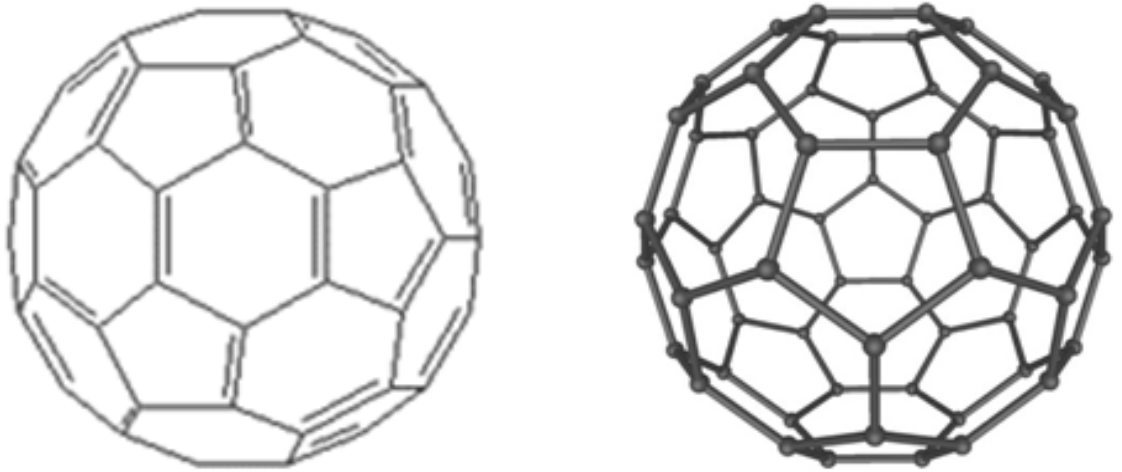
2.2. Fullerenler

2.2.1. Fullerenlerin Genel Yapısı ve Özellikleri

Fullerenler, Karbon (C) atomunun üçüncü doğal allotropları olup kapalı kafes şeklindeki yapılardır. C atomunun allotropları Şekil 2.11’de gösterilmiştir. Kroto ve ark. tarafından 1985 yılında keşfedilen fullerenler inert bir gaz ortamında grafitin buharlaştırılıp yoğunlaştırılması ile elde edilmiştir. Kroto ve arkadaşları, grafitin lazer ile buharlaştırılması neticesinde C_n (n burada 20 den büyük sayılar) kümelerinin oluştuğunu görmüştür (Kroto ve ark. 1985). Elde edilen bu karışımdaki karbon kümelerinin dağılımı uçuş zamanlı kütle spektrometresi ile incelenmiş ve C_{60} ile C_{70} miktarının fazla olduğu gözlenmiştir. Bütün fulleren türleri arasında en fazla bulunan tür ise C_{60} ’tır. Şekil 2.12’de C_{60} ’ın iki ve üç boyutlu yapısı görülmektedir.



Şekil 2.11. Karbon atomunun allotropları **a)** Diamant, **b)** Grafit, **c)** Lonsdaleite, **d)** C_{60} fulleren, **e)** C_{540} fulleren, **f)** C_{70} fulleren, **g)** Amorf karbon, **h)** Tek duvarlı karbon nanotüp (SWCNT)



Şekil 2.12. C_{60} 'ın iki boyutlu (solda) ve üç boyutlu (sağda) yapısı

C₆₀, Amerikalı Mimar Richard Buckminster Fuller'in 1967 Montreal fuarında yaptığı jeodezik kubbenin şekline benzediği için araştırmacılar bu yeni keşfedilen yapıyı, Buckminster Fulleren olarak adlandırmışlardır (Şekil 2.13).



Şekil 2.13. R. B. Fuller'in Montreal fuarında (1967) yaptığı jeodezik kubbe

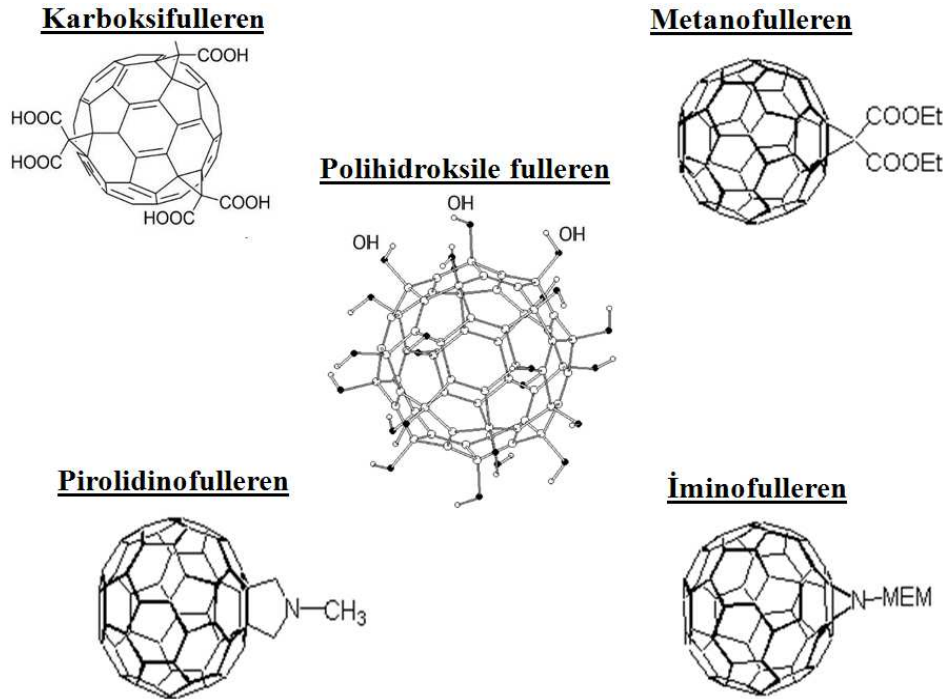
Buckminster fullerenler, 60 C atomunun $sp^{2.5}$ bağlarıyla birbirine bağlanarak oluşturduğu, 20 hegzagon ve 12 pentagondan meydana gelen 32 yüzlü bir yapıya sahip, psuedo-aromatik moleküllerdir. Pentagonlar arasında $C_5 - C_5$ tek bağları, hegzagonlar arasında ise $C_5 = C_6$ çift bağları bulunmaktadır. Buckminster fullerenler yaklaşık olarak 1 nm çapında olup trunkat ikozahedral simetri gösterir ve bu şekliyle bir futbol topuna benzetilir. Buckminster fullerenler futbol topuna benzediği için Buckyballs olarakta adlandırılırlar (Andrievsky ve ark. 2009).

Rusya'daki Shunga – Karelia bölgesi civarında fullerenlerin doğal olarak oluştuğu görülmüştür. Shungit denilen son derece mertamorfoza uğramış bir kömürde ve Fulgurit denilen, yere yıldırım düştüğünde oluşan camı bir taşta bir miktar fulleren bileşiği tespit edilmiştir (Buseck ve ark. 1992, Daly ve ark. 1993). Bunun dışında yaklaşık 65 milyon yıldan 2 milyar yıla kadar uzanan bir süre içerisinde meteor yağmurları ve kuyruklu yıldız çarpışmaları ile dünya dışı fulleren taşınımının olabileceği ve yine çarpışmanın etkisiyle oluşan ortamda fulleren bileşiklerinin meydana gelebileceği gibi bazı görüşler de ileri sürülmektedir (Becker ve ark. 1996).

2.2.2. Fullerenlerin Türevlendirilmesi

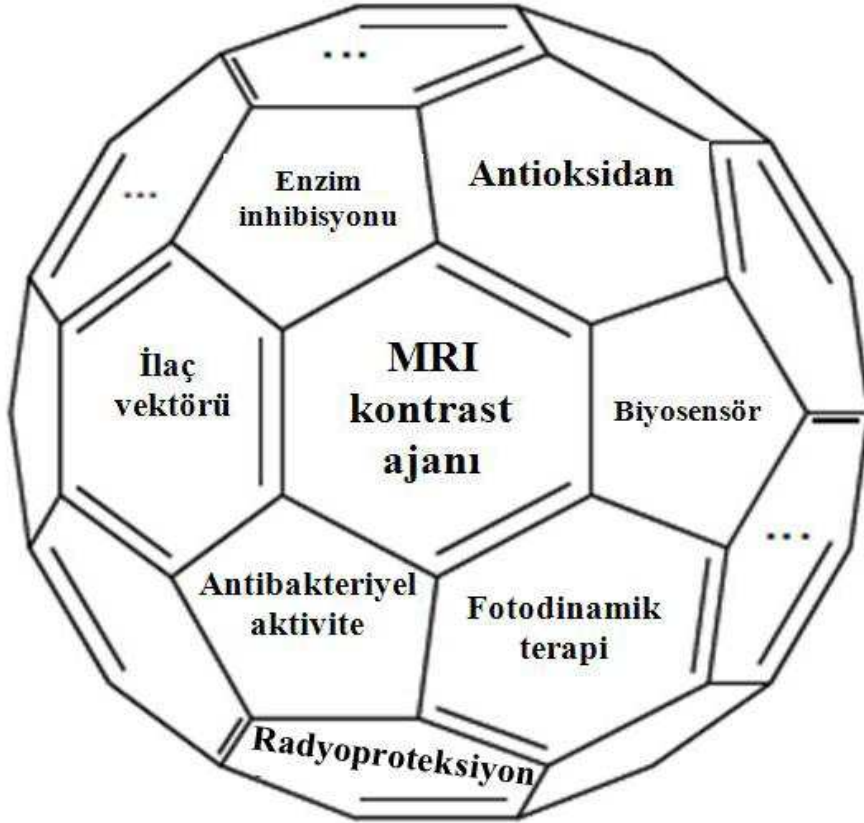
Fullerenlerin 1985 yılında keşfedilmesinden günümüze kadar uzanan süre içerisinde bu bileşikler üzerinde yapılan çalışmalar gittikçe artmıştır. Günümüzde yapılan çalışmalar daha çok fullerene türevlerinin genişletilmesi ile ilgilidir (Cataldo ve ark. 2008).

Fullerenler sahip oldukları yapısal özellikleri itibariyle kimyasal modifikasyonlara uygun bileşiklerdir. Dolayısıyla bunları çeşitli modifikasyonlarla türevlendirerek farklı fiziksel ve kimyasal özellikteki yapılar haline getirmek mümkündür. Örneğin; Fulleren nanopartiküllerinin hidrofilik özelliklerini arttırmak için yüzeylerine hidroksil (-OH), karboksil (-COOH) ve amin (-NH₂) grupları eklenebilir ya da fullerene kafesi içerisine metal atomları sokularak endohedral metallofullerenler elde edilebilir. Bu metal atomları fullerene kafesine elektron verirken kafesin tam merkezinde konumlanmaktadır. Endohedral metallofullerenler Manyetik Rezonans ve X-ışını görüntüleme tekniklerinde (MRI ve XRI) radyoizleyici olarak kullanılabilirler (Bosi ve ark. 2003). Çeşitli fonksiyonel gruplarla modifiye edilmiş bazı fullerene türevleri Şekil 2.14'te gösterilmiştir.



Şekil 2.14. Bazı modifiye fullerene türevleri

Yapısında çeşitli fonksiyonel gruplar bulunduran ve makul elektron ilgisi gösteren fullerenler, homojen olarak çözüldüğünde; nöroproteksiyon, radyoproteksiyon, apoptoz, tümör tedavisi, fotodinamik tedavi ve AIDS tedavisi gibi alanlarda kullanılabilme potansiyeline sahip olmaktadır (Trajkovic ve ark. 2005). Bu anlamda, fulleren türevlerinin kullanıldığı bazı uygulama alanları Şekil 2.15'te gösterilmiştir.

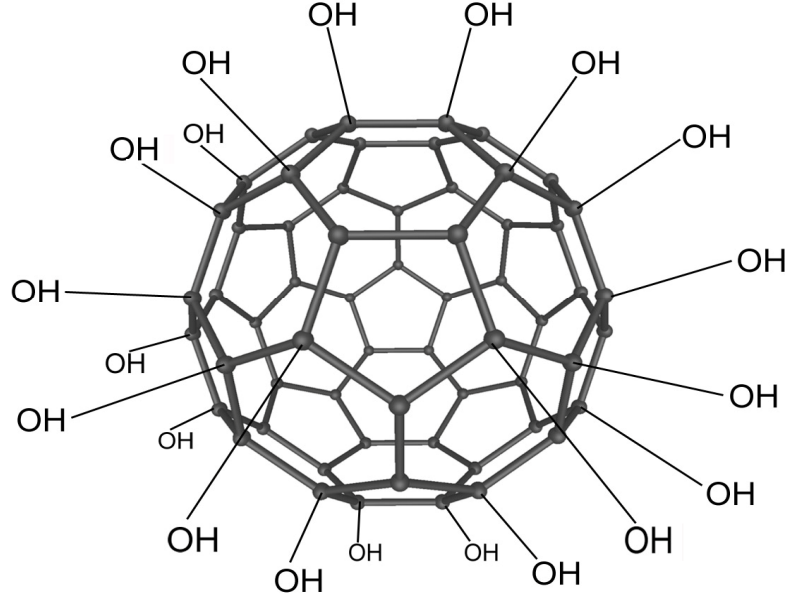


Şekil 2.15. Fulleren türevlerinin uygulama alanları (Cataldo ve ark. 2008)

2.2.2.1. Polihidroksi Fullerenler ve Fullerenol

Polihidroksi fullerenler ya da fullerenol, fulleren yüzeyine belirli sayıda hidroksil grubu (-OH) eklenmesiyle oluşur. Kimyasal formülleri $C_{60}(OH)_n$ 'dir ($n = 18 - 22$). Fullerenolün üç boyutlu yapısı Şekil 2.16'da gösterilmiştir.

Fullerenoller, suda çok iyi çözünme, kan – beyin bariyerini geçebilme, molekül başına birçok oksijen radikali yakalayabilme ve mükemmel bir antioksidan olma gibi özellikleriyle ön plana çıkmaktadır (Trajkovic ve ark. 2005).



Şekil 2.16. Fullerenolün üç boyutlu yapısı

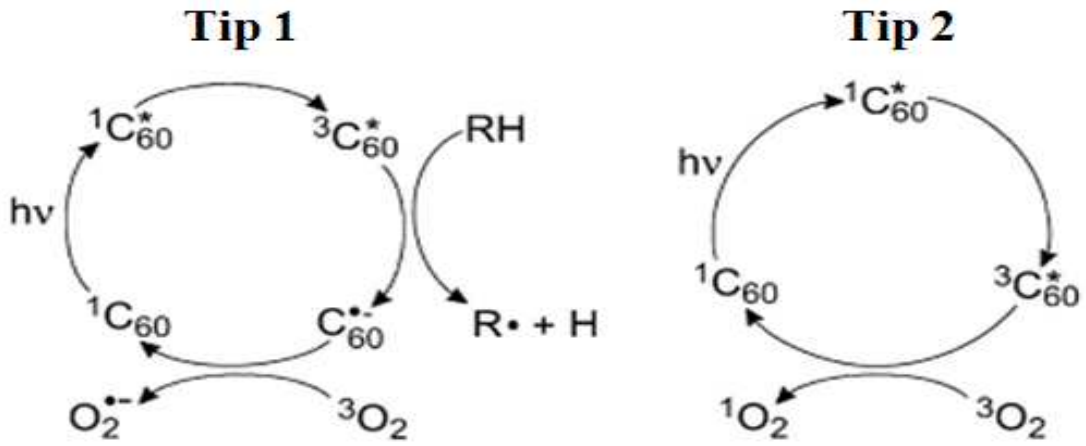
2.2.3. C₆₀ Fullerenlerin Toksikolojisi

Moleküler oksijen (O₂), sahip olduğu benzersiz elektronik konfigürasyon dolayısıyla birbirine enerjik olarak çok yakın üç elektronik formda bulunabilmektedir. Bunlar temel triplet form, uyarılmış triplet ve uyarılmış singlet formlardır. Uyarılmış singlet forma singlet oksijen (¹O₂) denilmektedir. Singlet oksijen, yapısında eşleşmemiş elektron içermediği için serbest radikal değildir fakat sahip olduğu elektronların dönme yönlerinin farklılığından dolayı oksijenden daha reaktif bir moleküldür (Ellis ve Kneser 1933).

En genel anlamda singlet oksijen oluşumu fotosensitizasyon ile gerçekleşmektedir. Fotosensitizasyon olayında, belirli bir dalgaboyu aralığındaki ışığın fotosensitizer

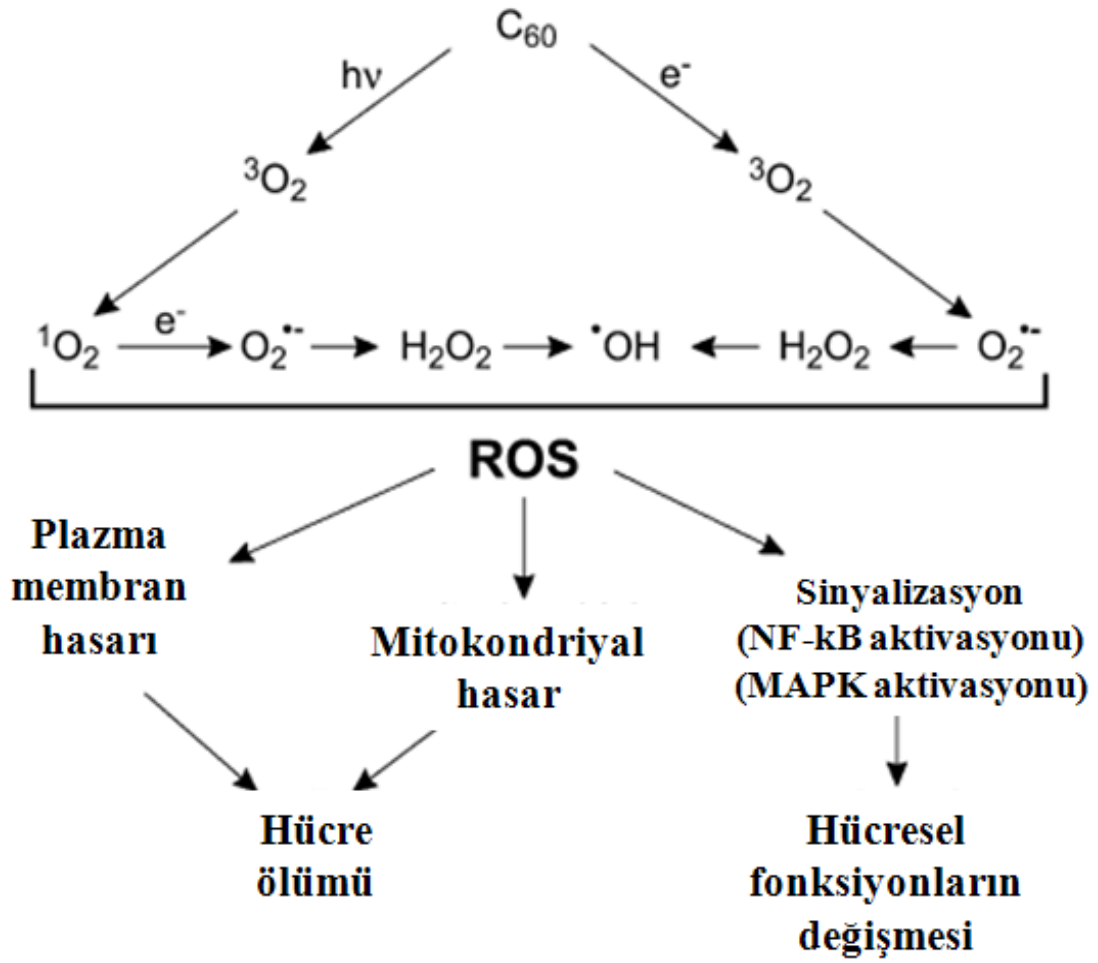
tarafından absorbe edilmesi neticesinde uyarılmış haldeki sensitizlerden oksijenin temel triplet haline enerji transferi gerçekleşmektedir (Clo ve ark. 2007).

C₆₀ fullerenler çok etkili singlet oksijen üreticileridir. Bunlar UV ışınları kuvvetle absorbe ederken görünür bölge ışınlarını kısmen absorbe ederler (Kratschmer ve ark. 1990, Leach ve ark. 1992). Absorplanan ışık enerjisi ile C₆₀ molekülü uyarılmış hale geçmekte (¹C₆₀^{*}) ve Şekil 2.17’de gösterilen Tip 1 ve Tip 2 fotokimyasal mekanizmalarla O₂^{•-} ya da ¹O₂ oluşumuna yol açmaktadır. Hücre içerisinde oluşan ¹O₂, diğer moleküllerle etkileştiğinde ya içerdiği enerjiyi onlara aktarır ya da hücre membranındaki poliansatüre yağ asitleriyle doğrudan tepkimeye girerek lipid peroksitlerin oluşumuna neden olur. (Yamakoshi ve ark. 1998).



Şekil 2.17. Tip 1 (Yük transferi) ve Tip 2 (Enerji transferi) fotokimyasal mekanizmalarının şematik gösterimi (*, C₆₀’ın uyarılmış singlet ve triplet hallerini belirtmektedir)

Tıp alanındaki potansiyel kullanımı ve tüketici ürünleri açısından C₆₀ toksisitesinin değerlendirilmesi kesin bir ön koşuldur. C₆₀ fullerenler muhtemel bir ROS kaynağı olduğu için C₆₀’ın su ekosistemleri ile etkileşimi, endüstriyel seri üretimi ve sulu ortamlarda istenmeyen fulleren agregatlarının oluşması gibi konularda bazı haklı kaygılar ortaya çıkmıştır. Bilindiği üzere aşırı ROS üretimi antioksidan kapasiteyi alt ederek oksidatif strese ve ciddi bir sitotoksik ya da mutasyonel hücre hasarına yol açmaktadır (Nelson ve ark. 1993). Biyolojik çevrelerde C₆₀ fulleren aracılı ROS’ların oluşumuna bağlı olarak gözlenebilecek etkiler Şekil 2.18’de gösterilmiştir.



Şekil 2.18. Biyolojik çevrelerde fulleren aracılı ROS'ların oluşumu ve olası etkileri (NF-kB: Nükleer faktör – kappa B, MAPK: Mitojen – aktif protein kinaz)

C₆₀, güçlü bir ışık kaynağına maruz kalmadığı sürece yeterli ROS üretimi gerçekleştiremez. Bu doğrultuda, yapılan birçok klasik toksisite çalışmasında, geniş konsantrasyon aralıklarında uygulanan çeşitli C₆₀ preparasyonlarının *in vivo* ve *in vitro* sitotoksik veya genotoksik etkilere yol açmadığı belirtilmiştir (Nelson ve ark. 1993, Yamago ve ark. 1995, Baiert ve ark. 1996, Moussa ve ark. 1996, Jia ve ark. 2005, Mori ve ark. 2005, Kolosnjaj ve ark. 2007, Baker ve ark. 2008).

Bununla birlikte C₆₀'ın toksik olmadığı anlayışı Sayes ve arkadaşlarının 2004'te yaptığı bir çalışma ile çelişmektedir. Solvent değiştirme metodu ile hazırlanmış ve türevlendirilmemiş Tetrahidrofuran (THF)/C₆₀ nanopartikülleri, suda çözünebilir fulleren türevlerinden farklı olarak, hazırlanma ve hücrelere uygulanma esnasında ortam

ışığına maruz kaldığı takdirde yüksek miktarda ROS üretmekte ve oldukça düşük konsantrasyonlarda (nM) bile insan hücrelerini öldürmektedir. Sayes ve arkadaşları söz konusu sitotoksik aktivitenin hücre membranının ROS aracılı lipit peroksidasyonu ile gerçekleştiğini göstermişlerdir (Sayes ve ark. 2004).

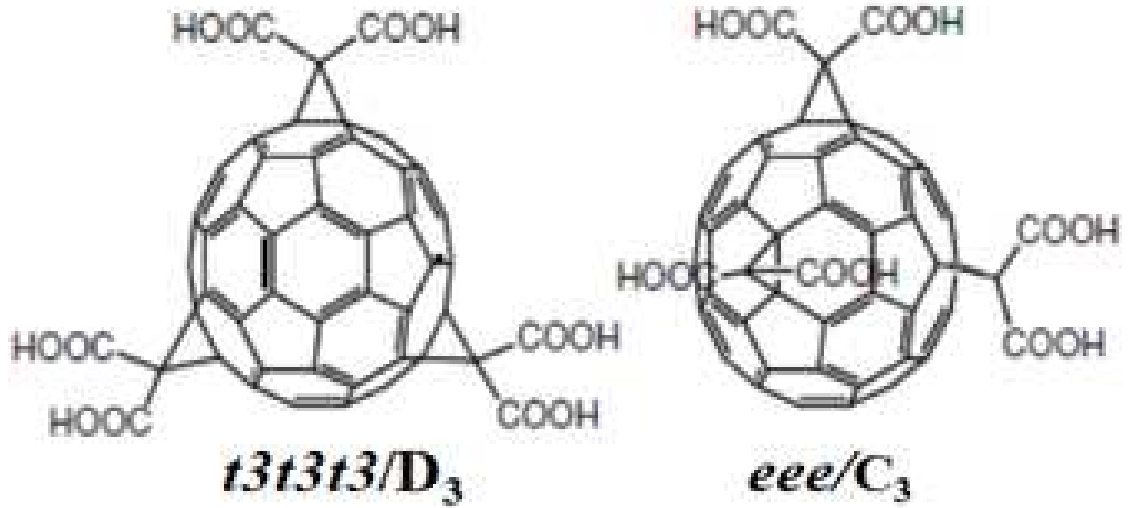
Sayes ve arkadaşları, THF/C₆₀ tarafından üretilen oldukça yüksek miktarlardaki sitotoksik ROS'un, saf C₆₀'ın doğal bir özelliği olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Bununla birlikte fulleren kafesinin türevlendirilmesindeki artışa bağlı olarak ROS oluşumunun ve sitotoksitenin düştüğünü göstererek hipotezlerini desteklemişlerdir (Sayes ve ark. 2004). Bu hipotez aynı zamanda, çeşitli fonksiyonel grupların fulleren çekirdeğine kovalent olarak bağlanmasıyla birlikte C₆₀'ın fotofiziksel özelliklerinin değişmesi ve singlet oksijen oluşturma veriminin düşmesine ilişkin yapılan çalışmalarla tutarlılık göstermektedir (Prat ve ark. 1999, Bensasson ve ark. 2001, Chin ve ark. 2008).

Benzer şekilde, THF ile hazırlanmış C₆₀ ve polihidroksile C₆₀ bileşikleri direkt olarak ROS oluşturma ve sitotoksik kapasiteleri açısından kıyaslandığında, THF ile hazırlanmış C₆₀ sitotoksitesinin intraselüler ROS birikimi ile ilişkili olduğu ve antioksidan uygulama ile önlenebileceği, polihidroksile C₆₀ bileşiğinin gösterdiği düşük toksisitenin ise ROS'tan bağımsız olduğu bulunmuştur (Zhu ve ark. 2006).

Elde edilen sonuçlar saf C₆₀'ın potansiyel toksisitesi hakkındaki bilinçlenmeyi arttırırken, alternatif bir teori de THF/C₆₀'ın ROS aracılı sitotoksitesinin kafes içerisine giren THF kalıntılarının varlığından kaynaklandığını ileri sürmektedir (Andrievsky ve ark. 2005). Son varsayımı destekler nitelikte yapılan bir çalışmada, suda uzun süre karıştırılarak elde edilen saf C₆₀ süspansiyonunun çeşitli akuatik organizmalarda ve memeli hücre kültürlerinde daha az toksik olduğu bulunmuştur (Oberdorster ve ark. 2006, Zhu ve ark. 2006, Markovic ve ark. 2007).

Beuerle ve arkadaşlarının 2007 yılında ortaya koyduğu bir çalışmada, genel olarak pozitif yüklü fulleren türevlerinin negatif yüklü olanlara göre daha yüksek bir toksisite gösterdiği belirlenmiştir. Bununla birlikte Şekil 2.19'da görülen tris – malonik asit

türevleri gibi bazı anyonik bileşiklerin dekarboksilasyona yol açarak toksisiteyi arttırdığı da belirtilmiştir.



Şekil 2.19. Tris – malonik asit C₃ ve D₃ türevleri

C₆₀'ın biyogüvenliğine ilişkin oldukça ikna edici veriler olmasına rağmen, onun potansiyel toksik etkilerini küçümsemek ve dikkate almamak akılsızca bir davranış olacaktır. Buna bağlı olarak, uzun süre suda karıştırılarak hazırlanan C₆₀ nanopartiküllerinin ve suda çözünebilir C₆₀ türevlerinin çeşitli deneysel sistemlerde hala toksik ve mutajenik etkiler gösterdiği ortaya çıkarılmıştır (Rajagopalan ve ark. 1996, Tsuchiya ve ark. 1996, Ueng ve ark. 1997, Chen ve ark. 1998, Bosi ve ark. 2004, Oberdorster 2004, Dhawan ve ark. 2006, Yamawaki ve Iwai 2006, Baun ve ark. 2007, Roberts ve ark. 2008)

Özetle, C₆₀'a bağlı toksisitenin değerlendirilmesinde; kullanılan C₆₀ türevlerinin hazırlanma yöntemleri, fonksiyonel grupları, ışığa duyarlılıkları, diğer kontaminantlarla etkileşimleri ve kullanılan deneysel sistem oldukça önemli kriterlerdir.

C₆₀ türevlerinin farklı sitotoksik etkiler göstermesinde her türevin hücre membranıyla etkileşiminin ve intraselüler boşluğa girişinin farklı şekillerde gerçekleşmesi rol oynamaktadır. Yüksek hidrofobik ya da hidrofilik yüzey alana sahip toksik katyonik türevlerin, toksik olmayan nötral ve anyonik türevlere göre hücre membranına daha kolay girdiği gösterilmiştir (Bosi ve ark. 2004).

2.2.4. C₆₀ Fullerenlerin Antioksidan ve Sitoprotektif Etkileri

C₆₀ fullerenler, sahip olduğu yapısal özellikler ve ROS'lara karşı gösterdiği yüksek reaktivite nedeniyle Krusic ve arkadaşları (1991) tarafından “radikal süngeri” olarak nitelendirilmiştir (Krusic ve ark. 1991).

Suda çözünebilen fullerenoller ve heksasülfobütil fullerenler, O₂^{•-} giderici aktiviteleri çalışılan ilk türevlerdir. Özellikle heksasülfobütil fullerenlerin µM düzeyindeki konsantrasyonlarda kullanıldıklarında bile doza bağılı olarak % 95'e varan oranlarda O₂^{•-} giderici aktivite gösterdiği ortaya konmuştur (Chi ve ark. 1998, 2002). Fullerenollerde bu etkinliğin 1 mM konsantrasyonda % 40 civarında olduğu belirtilmiştir (Chiang ve ark. 1995, Mirkov ve ark. 2004). O₂^{•-} giderici aktivitede gözlenen bu farklılığın karbon kafese eklenen fonksiyonel gruplarla ilişkili olduğu ileri sürülmüştür (Cataldo ve ark. 2008)

Quick ve ark. (2008), fulleren türevlerinin SOD enzimini taklit eden SOD-mimetik özelliklere sahip olduğunu bildirmiştir. O₂^{•-} radikallerini giderme aktivitesi açısından, tris – malonil C₆₀ türevlerinin SOD ile kıyaslanabilir seviyede olduğunu ifade eden Quick ve arkadaşları aynı zamanda bir tris – malonik asit C₆₀ türevi olan C₃ bileşiğinin, O₂^{•-} dismutasyonunu enzim benzeri katalitik bir antioksidan aktivite ile gerçekleştirdiğini ortaya koymuştur (Quick ve ark. 2008). Ayrıca C₃ bileşiğinin fare beynindeki oksidatif stresi düşürdüğü, bilişsel performansı arttırdığı ve farelerin yaşam süresini uzattığı belirtilmiştir (Ali ve ark. 2008).

Son yıllarda C₆₀ fulleren hidratlarının (C₆₀HyFn) antioksidan kapasiteleri kapsamlı bir şekilde çalışılmıştır. Bu bileşiklerin beklenmedik bir şekilde, çok düşük konsantrasyonlarda bile 10³ – 10⁴ civarında OH[•] radikalini nötralize edebildikleri belirtilmiştir. Ayrıca antioksidan kapasiteye sahip olan bu bileşiklerin nöroprotektif, anti-kanser, anti-inflamatuar ve anti-aterojenik etkiler gösterdiği ortaya konmuştur (Andrievsky ve ark. 2005).

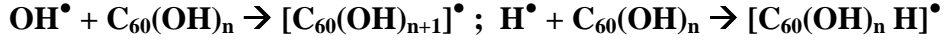
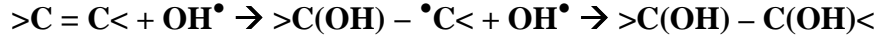
Bogdanovic ve ark. (2008), fullerenolün, hücre tipine ve uygulanan doza bağlı olarak oksidatif strese maruz kalan hücrelerdeki antioksidatif kapasiteyi ve antioksidan enzimlerin aktivitesini arttırdığını belirtmiştir.

Mitokondri ile etkileşime girebilmeleri ve ROS'ları bilinen antioksidanlardan daha etkili bir şekilde gidermeleri dolayısıyla fullerenollerin ve malonik asit – C₆₀ türevleri gibi suda çözünebilen karboksifullerenlerin sitoprotektif antioksidan olarak kullanım potansiyeline sahip olduğu belirtilmiştir. Fullerenol ve karboksifulleren bileşiklerinin ROS deaktivasyonuna bağlı sitoprotektif özellik göstermesinin altında yatan mekanizma genel olarak bu bileşiklerin, apoptotik kaskadın oksidatif stres aracılı indüksiyonu ile olan etkileşimlerine dayanmaktadır. Fulleren ile muamelenin, TNF ya da UV ile tetiklenen kaspaz aktivasyonunu etkili bir şekilde azalttığı ve DNA fragmentasyonunu önlediği bildirilmiştir (Edinger ve Thompson 2004, Chirico ve ark. 2007, Harhaji ve ark. 2008).

İlginç bir şekilde, sitotoksik ROS oluşturan THF/C₆₀ nanopartikülleri γ -ışınına maruz bırakıldığında sitotoksik özelliklerini kaybederek memeli hücrelerini oksidatif strese bağlı ölümden koruyabilmiştir (Isakovic ve ark. 2006). PVP, PEG ya da γ -siklodekstrinle modifiye edilmiş farklı C₆₀ nanopartikülleri ise ROS giderme kapasiteleri ve hedeflenmiş ROS tipleri açısından farklılık göstermektedir (Huang ve ark. 2003, Xiao ve ark. 2005).

2.2.4.1. C₆₀ Fullerenlerin Antioksidan Etki Mekanizması

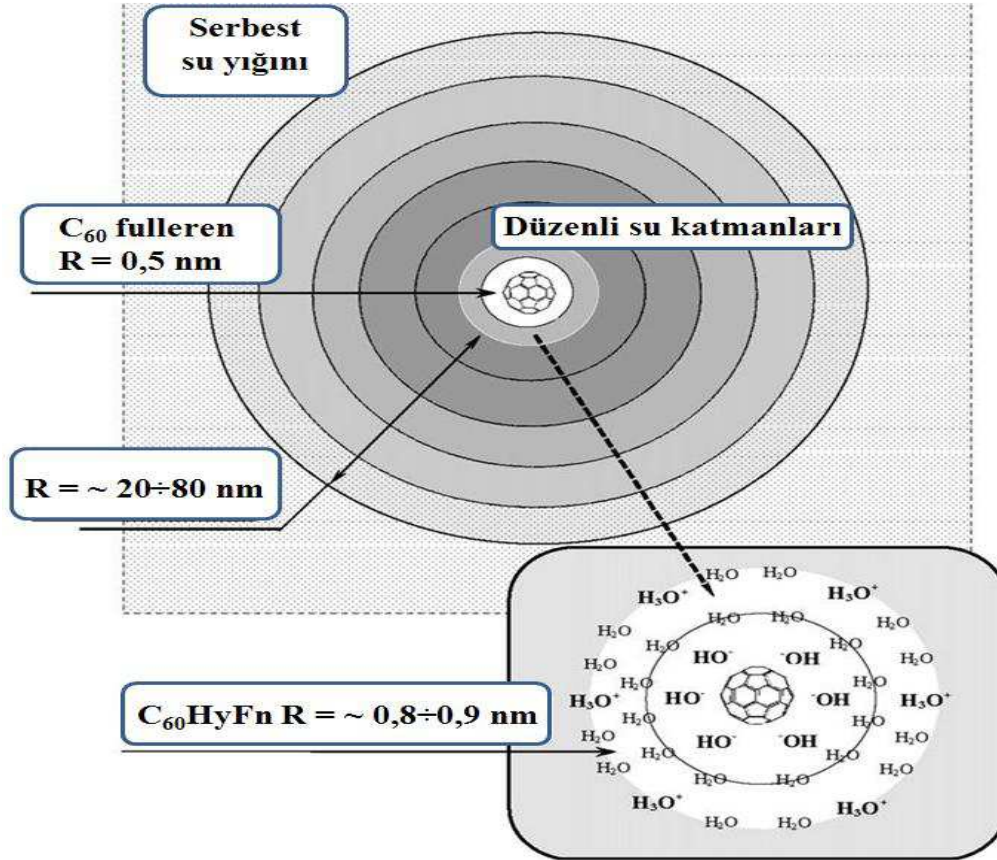
Şimdiye kadar, C₆₀ fullerenlerin yüksek antioksidatif potansiyelleri serbest radikallerin karbon kafesinin çift bağlarına hemen bağlanabilme özelliği ile belirlenmiştir. C₆₀ kafesinin sahip olduğu 30 çift bağ teorik olarak 60 radikal tutabilmektedir. Bu radikal tutma işlemi ise aşağıdaki reaksiyonlara göre gerçekleşmektedir (Wang ve ark. 1999).



Bununla birlikte Andrievsky ve arkadaşlarının 2009'da yaptığı bir çalışma, serbest radikallerin fulleren çekirdeğinin çift bağlarına direkt olarak bağlanma mekanizmasına alternatif olarak C₆₀HyFn'nin farklı bir antiradikal etkiye sahip olduğunu ileri sürmektedir. (C₆₀HyFn = C₆₀@(H₂O)_n'in stabil donör – akseptör kompleksi) C₆₀HyFn'nin radikal giderici etkisi çözeltilerdeki C₆₀ konsantrasyonuyla ters bir ilişki içerisindedir. Buna göre 10⁻⁹ – 10⁻¹¹ M gibi son derece seyreltik C₆₀ çözeltilerindeki her bir C₆₀ molekülü, teorik olarak karbon moleküllerine bağlama kapasitesinin (bir C₆₀ molekülü için 60 OH[•] radikali) çok daha üzerindeki miktarlarda OH[•] radikalini gidermiştir. 10⁻⁹ – 10⁻¹¹ M konsantrasyon aralığındaki oldukça seyreltik sulu fulleren çözeltilerinde (C₆₀FWS) ise bir C₆₀HyFn molekülü yaklaşık olarak 10³ – 10⁴ gibi müthiş miktarlardaki OH[•] radikallerini nötralize edebilme yeteneğindedir.

Andrievsky ve arkadaşlarının yapmış olduğu araştırmanın sonuçları; C₆₀HyFn'nin 10⁻⁶ – 10⁻¹¹ M konsantrasyon aralığında ters orantılı ve stokiometrik olmayan bir antiradikal etki özelliğini ortaya koymuştur. Bu fenomenin, radikallerin C₆₀ moleküllerine direkt olarak bağlanma mekanizmasına dayanarak açıklanması zordur. Bunun için önerilen basit bir mekanizmada düzenli C₆₀ – su kompleksinden bahsedilmektedir. Söz konusu mekanizma Şekil 2.20'de gösterilmiştir.

Eksik elektron içeren C₆₀ çekirdeğinin hidrofobik hidrasyonundan dolayı H₂O dipol bağları tarafından kararlı su katmanları oluşturulur. Radyasyon ile indüklenmiş OH[•] radikallerinin oluşumu ve sonraki ortadan kaldırılma süreci bu heterojen düzenli su katmanlarında gerçekleşmektedir (Andrievsky ve ark. 2002, 2005, Chaplin 2000). Bu kavrama uygun olarak hidrofilik yüzeylere yakın su molekülleri uzun mesafeli, stabil ve düzenli su katmanları oluşturarak 10 – 100 µm mesafelere kadar genişlemekte ve binlerce su katmanı meydana getirmektedir. Benzer şekilde C₆₀HyFn, sulu ortamlarda uzun mesafeli ve düzenli su katmanlarının oluşumunu indüklemektedir.

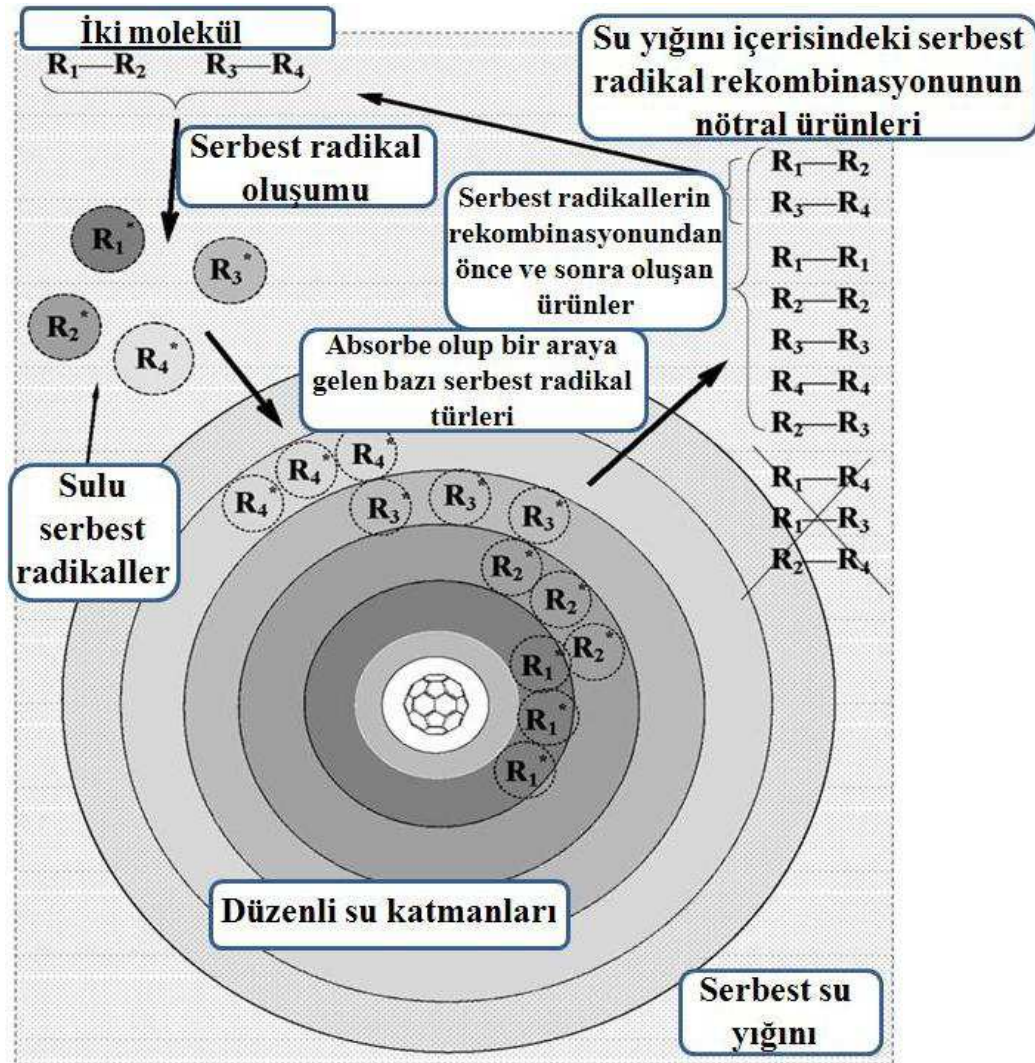


Şekil 2.20. Uzak mesafeli, düzenli su katmanları ile çevrili bir C₆₀HyFn modeli (Andrievsky ve ark. 2009)

Bu durumda, Şekil 2.21’de görüleceği üzere, heterojen ve düzenli su ortamı; suyun radyolizisi ile oluşan sulu serbest radikallerin kendi bölgelerindeki lokalizasyonunu ve konsantrasyonunu düzenlemektedir. Bu düzenlenme ise sulu serbest radikalleri çevreleyen su kabukları ile düzenli su ortamının yapı benzerliğinden ileri gelmektedir. Serbest radikallerin böyle sulu ortamda birikmesi, onların bu ortamda karşılaşma olasılıklarını ve akabinde stabil (radikal olmayan) moleküllerin oluşumu ile sonlanan rekombinasyonlarını (serbest radikallerin kendi kendilerine nötralize olmasını) arttırmaktadır (Andrievsky ve ark. 2005, Crowell ve ark. 2004).

Başka bir deyişle C₆₀HyFn’nin diğer antikoksidanlara göre (tokoferoller, karotinoidler, bioflavonoidler, askorbik asit v.s.) bu sıradışı antiradikal özellikleri; o ve onun nano boyuttaki diğer kümeleri tarafından indüklenen uzun mesafeli ve düzenli su kabukları vasıtasıyla serbest radikallerin birikimini ve deaktivasyonunu katalizleme yeteneğine dayanmaktadır. C₆₀HyFn’nin olası ikinci indirekt antiradikal etki mekanizması ise;

suyun radyolizisi ile oluşan primer ürünlerin C_{60} 'ı saran düzenli ve viskoz su katmanlarında meydana gelmesine dayanmaktadır. Bu viskoz katmanlarda meydana gelen serbest radikallerin difüzyonu ise büyük ölçüde sınırlandırılmaktadır. Bu olası etki mekanizmasına göre fulleren ile düzenlenmiş sulu ortamda serbest radikaller mekansal olarak birbirlerinden ayrılamazlar. Dolayısıyla da serbest radikal oluşumundan hemen sonra hızlıca rekombine olarak bazı moleküler ürünler oluştururlar.



Şekil 2.21. Sulu C_{60} fulleren etrafında şekillenmiş, uzak mesafeli ve düzenli su katmanlarınca kontrol edilen serbest radikallerin absorpsiyon, toplanma ve rekombinasyon mekanizmalarının olası bir şeması (Andrievsky ve ark. 2009)

Şekil 2.21'de görüldüğü gibi suyun radyolizisi ile oluştuğu varsayılan sulu R_1 , R_2 , R_3 ve R_4 radikalleri OH^\bullet , H^\bullet , HO_2^\bullet , $^\bullet CO_2$, $O_2^{\bullet -}$ ve sulu e^- radikalleri ile eşdeğer

düşünülmektedir. Bu serbest radikaller $\text{OH}^\bullet + \text{H}^\bullet \rightarrow \text{H}_2\text{O}$; $\text{OH}^\bullet + \text{OH}^\bullet \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2$; $\text{H}^\bullet + \text{H}^\bullet \rightarrow \text{H}_2$ gibi basit rekombinasyon reaksiyonları ile H_2O , H_2O_2 , H_2 , O_2 ve H_2CO_3 gibi nötral moleküler ürünler oluşmaktadır.

C_{60}HyFn varlığındaki serbest radikal eliminasyonunun bu indirekt ve katalitik benzeri mekanizması bazı deneysel verilerle desteklenmiş ve doğal C_{60} fullerenlerin ROS ile indüklenmiş oksidatif modifikasyona karşı son derece yüksek stabilite gösterdiği ortaya konmuştur. Ultrasonik muamele ile hazırlanan C_{60} – su süspansiyonu, 6 mGy gibi yüksek bir radyasyon dozuna uzun süre maruz bırakılmış ve C_{60} moleküllerinin sadece %5’lik bir kısmının yıkıma uğradığı görülmüştür. Sulu C_{60} çözeltilerinin radyolizisi ile gerçekleşen bu yıkım neticesinde polimerizasyon, karbon iskeletinin parçalanması, alken (-CH) ve karbonil (-C=O) gruplarının oluşması, hidroksil (OH^\bullet) radikallerinin açığa çıkması gibi olaylar gerçekleşmektedir.

Suda çözünebilir fonksiyonel fullerenlerin radyasyon ile indüklenmiş hasarlara karşı göstermiş olduğu yüksek etkinlik onların olası *in vivo* ROS giderme aktiviteleri ile açıklanmaktadır. Bununla birlikte fulleren türevlerinin taşıdıkları fonksiyonel gruplara bağlı olarak ROS giderme kapasiteleri de değişiklik göstermektedir. 4 karboksil grubu (-COOH) taşıyan bir fulleren bileşiminde OH^\bullet radikali giderme aktivitesi gözlenmemiştir. Dolayısıyla karbon kafesine eklenen fonksiyonel gruplara ya da radikallere bağlı olarak OH^\bullet radikalini bağlayabilme yeteneği azalmaktadır. Ayrıca antioksidatif aktivite gösteren sulu C_{60} bileşiklerinin boyut olarak genelde 20 – 200 nm aralığında yer aldığı belirtilmiştir (Andrievsky ve ark. 2009).

2.2.5. C_{60} Fullerenlerin Antiapoptotik Aktivitesi

Apoptozis, 25 kDa ağırlığında dimerik bir protein olan Transforme – edici Büyüme Faktörü β (TGF- β)’nin ana rol oynadığı programlanmış bir hücre ölüm mekanizmasıdır. Bu süreçte ortama ROS salınımı gerçekleşirken bunu durdurmanın ya da en azından azaltmanın tek yolu antioksidan muamelesidir. Önceden kısaca antioksidan özelliklerine değinilen tris – malonik asit C_3 ve D_3 fulleren türevleri, Hep3B hepatik tümör

hücrelerinde TGF- β 'nın indüklediği ROS'ları nötralize ederek apoptozisi önlemiştir (Huang ve ark. 1998).

Ayrıca yapılan bir diğer çalışmada heksasülfobütil fulleren türevinin iskemi – reperfüzyon sonucu oksidatif strese maruz kalan böbrek hücrelerindeki antiapoptotik etkisi ortaya konmuştur (Chien ve ark. 2001). İskemik durumu takip eden organ reperfüzyonu, apoptoziste doruğa ulaşan bir dizi hücrel modifikasyonu beraberinde getirmektedir. Apoptotik hücre ölümünün yoğunluğu hem *in vivo*'da hem de *in vitro*'da ROS'ların nötralizasyonu ile yakından ilişkilidir.

C₃ bileşiği, epitel hücrelerde, hücreler ve matriks arasındaki adezyonun kaybı ve hücrel büzülme ile karakterize anoikia durumunu ve artan substrat ihtiyacı ile indüklenen apoptotik hücre ölümünü azaltmaktadır (Straface ve ark. 1999). Bunun dışında serebellar granül hücrelerinde ve periferel kan mononükleer hücrelerinde de C₃ bileşiğinin etkileri çalışılmıştır (Bisaglia ve ark. 2000, Monti ve ark. 2000).

2.2.6. C₆₀ Fullerenlerin Antikarsinojenik Etkileri

Fullerenlerin, moleküler oksijenin son derece reaktif ROS'a geçişini fotosensitize edebilme potansiyelleri onları kanser hücrelerinin fotodinamik tedavi ile öldürülmesi alanında umut verici adaylar yapmaktadır. Bu terapötik uygulamanın asıl avantajı ise seçiciliktir. Çok iyi odaklanmış bir ışın demetinin vücut yüzeyinden tümör bölgesine ya da optik fiberler yardımıyla dahili tümörlere uygulanması sonucu fotosensitize edici ajanın tümör – spesifik aktivasyonu gerçekleşmektedir (Brown ve ark. 2004).

Çeşitli suda çözünebilen C₆₀ türevlerinin serviks, larinks, akciğer ve kolon karsinomu gibi farklı kanserli hücre kültürlerine karşı gösterdikleri etkili fotodinamik aktivite yapılan birçok çalışma ile ortaya konmuştur (Mroz ve ark. 2007).

C₆₀ fullerenlere porfirin gibi diğer bazı fotosensitizerlerin bağlanması ile oluşan ikililerde benzersiz fotofiziksel özellikler ve redox özellikleri ortaya çıkmaktadır. Bu

özellikleri barından C₆₀ – porfirin ikilisi, oksijenin nisbi yokluğunda bile oldukça yüksek bir ROS – aracılı sitotoksosite kapasitesine sahiptir (Alvarez ve ark. 2006).

Görünüşe göre fulleren türevlerinin antikarsinojenik aktivitesi hem singlet oksijen hem de süper oksit anyonunun oluşumuna bağlı olup (Alvarez ve ark. 2006, Mroz ve ark. 2007) fulleren kafesinin türevlendirilme genişliği ile ters ilişki göstermektedir (Yang ve ark. 2002, Mroz ve ark. 2007). Fulleren kafesine kovalent olarak bağlanan fonksiyonel grup sayısı arttığında fulleren kafesinin türevlendirilme genişliğine bağlı olarak ROS oluşturma kapasitesi azalmaktadır (Prat ve ark. 1999, Bensasson ve ark. 2001, Chin ve ark. 2008).

Ayrıca yapı – aktivite ilişkisi ile ilgili yapılan bir araştırmada -OH grubu gibi daha fazla singlet oksijen yakalayan gruplara sahip C₆₀ türevlerinin, aynı sayıda -CH grubu içeren veya daha az singlet oksijen yakalayan gruplara sahip C₆₀ türevlerine kıyasla daha düşük bir fotodinamik aktivite gösterdiği ortaya çıkmıştır (Mroz ve ark. 2007).

Suda çözünebilir C₆₀ türevlerinin fotodinamik antitümör aktivitesi, programlanmış hücre ölümü olarak bilinen apoptozisin başlamasını gerektirmektedir (Alvarez ve ark. 2006, Mroz ve ark. 2007). Bu tip hücre ölümü, kaspaz enzim ailesinin aktivasyonu ve DNA'nın fragmentasyonu ile karakterize olup plasma membranı yıkıma uğramadan gerçekleşmektedir. Akabinde bir inflamasyonu durumu olmadan apoptotik hücrelerin fagositlerce tanınıp ortadan kaldırılması gerçekleşir (Edinger ve Thompson 2004). Bu durum suda çözünebilir C₆₀ türevlerinin seçici mitokondriyal lokalizasyonu ile tutarlılık göstermektedir (Foley ve ark. 2002, Chirico ve ark. 2007) ve ROS ile indüklenen mitokondriyal disfonksiyonun, apoptozisin mitokondriyal yolağındaki başlatıcı adımı teşkil ettiği düşünülmektedir (Edinger ve Thompson 2004).

Suda çözünebilir C₆₀ türevlerinin aksine SDS, Tween gibi bilinen sürfaktanların eklenmesiyle ya da PEG ve PVP gibi polimerlerle kaplanarak hazırlanan C₆₀ nanopartikülleri gelişigüzel bir şekilde kansere karşı gösterdikleri fotodinamik aktiviteler için test edilmiştir. Şaşırtıcı bir biçimde türevlendirilmemiş C₆₀, fonksiyonelize edilmiş suda çözünebilir fullerenlere kıyasla daha yüksek bir singlet

oksijen kuantum verimi göstermiştir ve dolayısıyla çok daha iyi fotosensitizer özelliğe sahiptir (Prat ve ark. 1999, Bensasson ve ark. 2001, Chin ve ark. 2008).

Ayrıca, tümörlerin anormal genişlikteki vasküler porları nedeniyle artan permeabilite ve tümörlerdeki bozulmuş lenfatik süzülme nedeniyle oluşan birikimden (Modi ve ark. 2006) dolayı birkaç yüz nanometreye kadar değişen boyutlardaki C₆₀ nanopartikülleri büyük olasılıkla yüksek intra tümör konsantrasyonlarına ulaşmaktadır. Aslında PEG/C₆₀ konjugatının tümör dokusunda normal dokuya göre daha fazla birikmesi ve dokuda daha uzun süre kalması, bu konjugatı, bilindik bir fotosensitizer olan porfirine göre daha güçlü tümör baskılayıcı fotodinamik etkiye sahip bir ajan yapmaktadır (Tabata ve ark. 1997).

Çizelge 2.5'te çeşitli C₆₀ türevlerinin ROS aracılı biyolojik etkileri özetlenmiştir.

Çizelge 2.5. Çeşitli C₆₀ preperasyonlarının başlıca ROS aracılı biyolojik etkilerine genel bakış

Fulleren Türevleri		Deneysel Sistem	ROS	Biyolojik Etkiler	Referanslar
Suda çözünebilir C ₆₀ türevleri	C ₆₀ (OH) _n	<i>In vitro</i> eksitotoksik ve apoptotik nöronal ölüm	↓	Nöroproteksiyon	Jin ve ark. 2000, Dugan ve ark. 2006,
		<i>In vitro</i> H ₂ O ₂ ya da Nitrik oksit sitotoksitesi	↓	Hücre ölümünün önlenmesi	Chen ve ark. 2004, Isakovic ve ark. 2006,
		Akciğerde iskemi – reperfüzyon yaralanması	↓	Vasküler hasarın azalması	Chen ve ark. 2004
		<i>In vitro</i> TNF sitotoksitesi	↓	Mitokonriyal depolarizasyonun inhibisyonu, kaspaz aktivasyonu ve apoptotik hücre ölümü	Harhaji ve ark. 2008
		İnsan lens epitel hücrelerinde <i>in vitro</i> uygulama	↑ PS	Sitotoksite (Apoptozis)	Roberts ve ark. 2008
		Bakteriyofaj uygulaması	↑ PS	Bakteriyofaj inaktivasyonu	Badireddy ve ark. 2007
		Mastosit ve bazofillerin <i>in vivo</i>		<i>In vivo</i> ve <i>in vitro</i> histamin	Ryan ve ark. 2007

Suda çözünebilir C ₆₀ türevleri		ve <i>in vitro</i> modellerdeki anafilaksi uygulamaları	↓	salınımının inhibisyonu	
	Malonik asit türevleri	Kanser hücrelerinin <i>in vitro</i> kültürü	↑ PS	Hücre döngüsünün durdurulması, hücre gelişiminin baskılanması	Rancan ve ark. 2002, Yang ve ark. 2002
		Keratinosit ve hepatositlerin UV ya da TGF-β ile indüklenmiş apoptozisi	↓	Mitokonriyal depolarizasyonun azalması, kaspaz aktivasyonu ve apoptotik hücre ölümü	Huang ve ark. 1998, Fumelli ve ark. 2000, Chirico ve ark. 2007
		<i>İn vitro</i> eksitotoksik ve apoptotik nöronal ölüm	↓	Nöroproteksiyon	Dugan ve ark. 1997, Lotharius ve ark. 1999, Bisaglia ve ark. 2000,
		Yaşlanmış sinir sistemi, radyasyon ile indüklenmiş beyin hasarı, kortikal enfarktüs, ALS ve Parkinson hastalıklarının hayvan modelleri	↓	Nöroproteksiyon, yaşam süresinin artması	Dugan ve ark. 1997, Lin ve ark. 2002, Dugan ve ark. 2001, Daroczi ve ark. 2006, Quick ve ark. 2008
	Sülfobütil C ₆₀	Farelerde fokal serebral iskemi	↓	Nöroproteksiyon	Huang ve ark. 2001

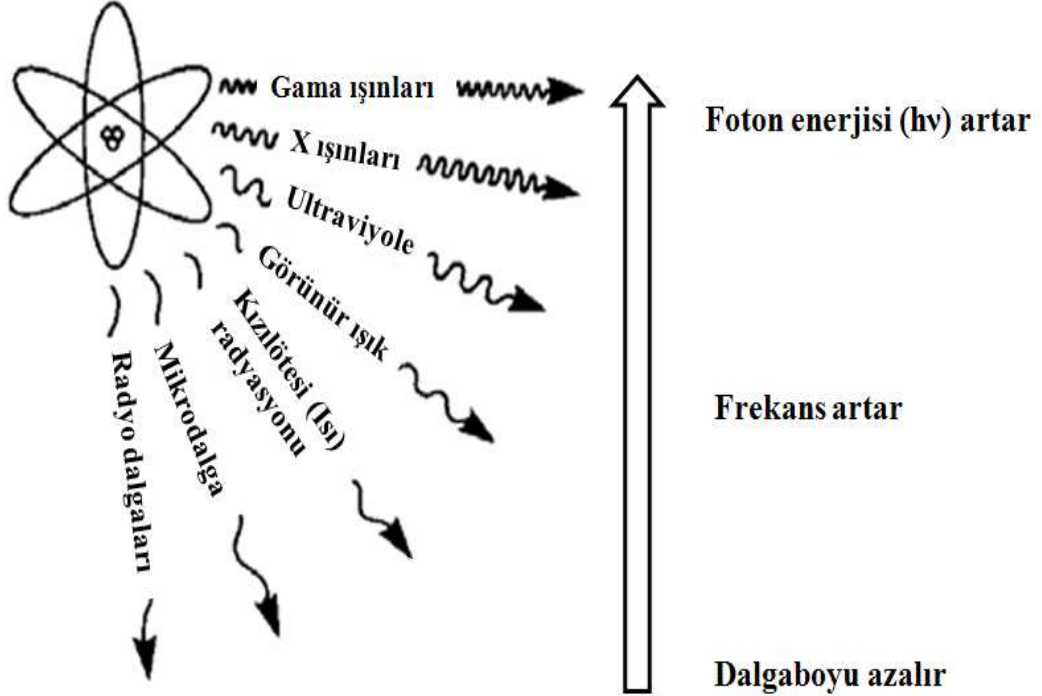
Suda çözünebilir C ₆₀ türevleri	Prolidinyum türevleri	Kanser hücrelerinin <i>in vitro</i> kültürü	↑ PS	Kanserli hücrelerin ölümü (Apoptozis)	Mroz ve ark. 2007a
		Bakterilere <i>in vitro</i> uygulama	↑ PS	Bakteriyel ölüm	Tegos ve ark. 2005
	C ₆₀ -porfirin	Kanser hücrelerinin <i>in vitro</i> kültürü	↑ PS	Kanserli hücrelerin ölümü (Apoptozis)	Alvarez ve ark. 2006
	Şeker türevleri	Kanser hücrelerinin <i>in vitro</i> kültürü	↑ PS	Kanserli hücrelerin ölümü	Mikata ve ark. 2003
Sürfaktan kaplama, solvent değiştirme ya da sonikasyon ile hazırlanmış C ₆₀ nanopartikülleri	PVP/C ₆₀	Keratinositlerin UV ile indüklenmiş ölümü	↓	Hücre ölümünün önlenmesi	Xiao ve ark. 2006
		<i>In vitro</i> kondrosit apoptozisi ve osteoartrit hayvan modeli	↓	<i>In vitro</i> kondrosit apoptozunun ve <i>in vivo</i> kırıldak yıkımının azalması	Yudoh ve ark. 2007
	PEG/C ₆₀	Kanserin <i>in vivo</i> uygulaması	↑ PS	Tümör gerilemesi	Tabata ve ark. 1997, Liu ve ark. 2007,
	Siklodekstrin/C ₆₀	Fare karaciğer mikrozomlarına yerleşme	↑ PS	Lipit peroksidasyonu	Kamat ve ark. 1998
	Tween/C ₆₀	Toksin ile indüklenmiş karaciğer hasarı	↓	Karaciğerin korunması	Gharbi ve ark. 2005

Sümfaktan kaplama, solvent değiştirme ya da sonikasyon ile hazırlanmış C ₆₀ nanopartikülleri	THF/C ₆₀	Normal ve kanserli hücrelerin <i>in vitro</i> kültürü	↑	Membran lipit peroksidasyonu, mitokondriyal depolarizasyon, MAPK aktivasyonu, hücre ölümü (Nekrozis)	Sayes ve ark. 2004, Sayes ve ark. 2005, Isakovic ve ark. 2006, Isakovic ve ark. 2006, Markovic ve ark. 2007
		Kanser hücrelerinin <i>in vitro</i> TNF uygulaması	↑	Mitokondriyal depolarizasyon, kaspaz aktivasyonu, apoptoz/nekroz	Harhaji ve ark. 2008
	THF/C ₆₀	Normal ve kanserli hücrelerin <i>in vitro</i> kültürü	↑	Hücre döngüsünün durdurulması, otofaji; normal hücreler daha az etkilenir	Harhaji ve ark. 2007
		Balık ile <i>in vivo</i> uygulama	↑	Oksidatif beyin hasarı, ölüm	Oberdorster, 2004
	Sonifikasyon ile hazırlanmış C ₆₀	Virüslerin <i>in vitro</i> uygulaması	↑ PS	Virüs inaktivasyonu	Kasermann ve Kempf, 1997

(PS: Fotosensitizasyon, TNF: Tümör nekrozu faktörü, TGF: Transforme edici büyüme faktörü, ALS: Amyotrofik Lateral Skleroz,
MAPK: Mitojen aktif protein kinaz)

2.3. Radyasyon

Radyasyon, yüksek hızda partiküllerin ve elektromanyetik dalgaların enerjisi olarak tanımlanıp, iyonize ve iyonize olmayan radyasyon olarak iki gruba ayrılmaktadır. İyonize radyasyonlar, bir atom ya da molekülden bir elektron kopararak iyonlaşmaya yol açarlar. Kütleli yapıya sahip partiküler radyasyon ve foton enerjili dalga karakterinde elektromanyetik radyasyon olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Alfa (α) ve beta (β) partikülleri, elektron, proton ve nötronlar partiküler iyonize edici radyasyon tiplerini oluşturur. X ve γ ışınları ise, iyonlaştırıcı yeteneğe sahip yüksek enerjili fotonlardan oluşan elektromanyetik radyasyonlardır. Bunlar özellikleri açısından büyük oranda birbirlerine benzerler ancak meydana geliş şekilleri farklıdır. X ışınları çekirdek dışında oluşan elektron kaynaklı ışınlardır. γ ışınları ise, radyoaktif bir çekirdeğin kararlı hale geçmesi esnasında parçalanarak açığa çıkan fazla enerjinin, çekirdekten dışarı atılması sonucunda oluşur (Özalpan 2001, Algüneş 2002). Buna bağlı olarak Şekil 2.22’de elektromanyetik spektrum gösterilmiştir.



Şekil 2.22. Elektromanyetik spektrum

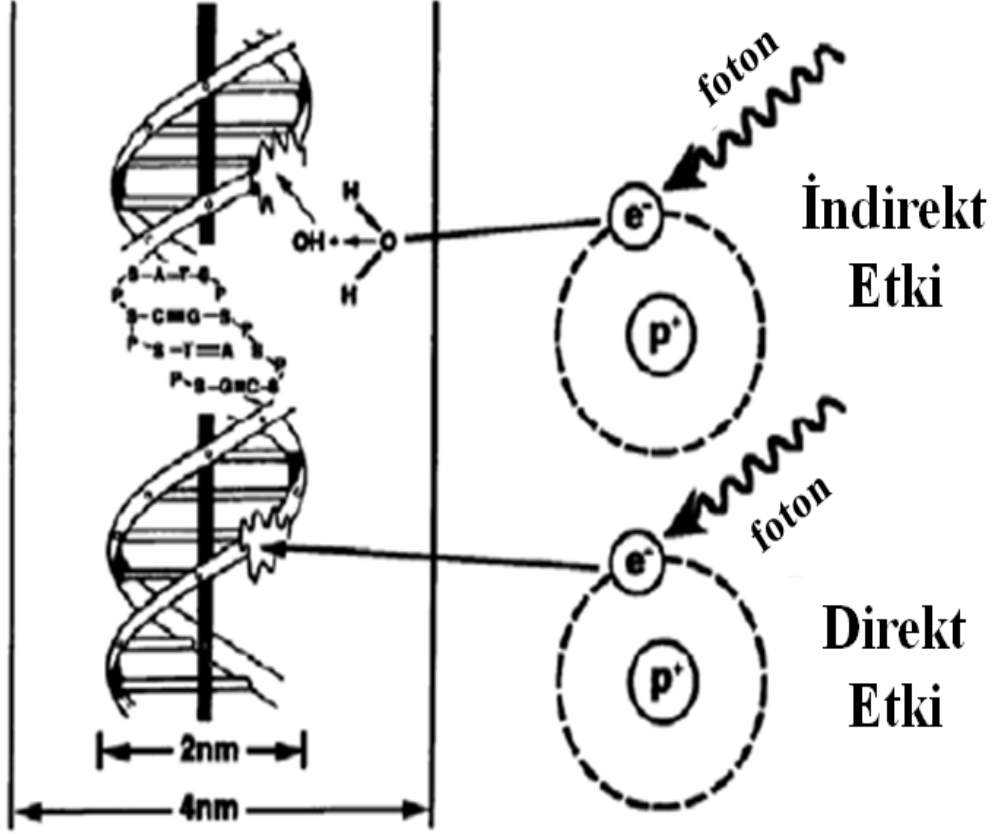
2.3.1. İyonize Edici Radyasyonun Biyolojik Sistemlere Etkileri

İyonize edici radyasyonun bütün şekilleri hücrelerdeki etkilerini çarpıştıkları atom ve moleküllerde elektronların yerini değiştirerek gösterir ve böylece iyonizasyon meydana gelir. Hedeflenen atoma enerji transferi veya herhangi bir kaynaktan gelen ışınal enerji saniyenin çok küçük bir kısmında oluşmasına rağmen, biyolojik etkiler dakikalar içinde değil, yıllar sonra bile ortaya çıkabilir. İyonize edici radyasyonun oluşturduğu hasarlar genellikle suyun radyolizisiyle oluşan serbest radikallerin indüksiyonuyla olabildiği gibi iyonize edici radyasyon DNA'yı doğrudan da zedeleyebilir. Serbest radikaller, hücre membranları ve nükleik asitlerle birleşerek mutasyonlara ya da hücre ölümünü indükleyen otokatalitik reaksiyonun başlamasına neden olurlar (Lipscomb ve ark. 1992, Kaya ve ark. 1996).

İyonize edici radyasyonun canlıda oluşturduğu etkileri üç basamakta sıralamak mümkündür. İyonize edici radyasyon enerjisinin canlı dokuya transferi sonucunda, dokuyu oluşturan atom ve moleküllerde meydana gelen iyonlaşma ve uyarılma, radyasyon etkisinin ilk kademesi olan fiziksel kademeyi oluşturur. Bunu izleyen kimyasal kademedeki, hasar görmüş atom ve moleküller diğer hücre yapıları ile reaksiyona girerek serbest radikallerin ortaya çıkmasına neden olurlar. Organizmada radyasyonun etkisi ile oluşan bu tür moleküler değişiklikler, son kademe olan biyolojik kademeyi başlatır. Bu kademedeki çeşitli hasarlara yol açan enzimatik reaksiyonlar meydana gelir (Özalpın 2001, Steel 1997).

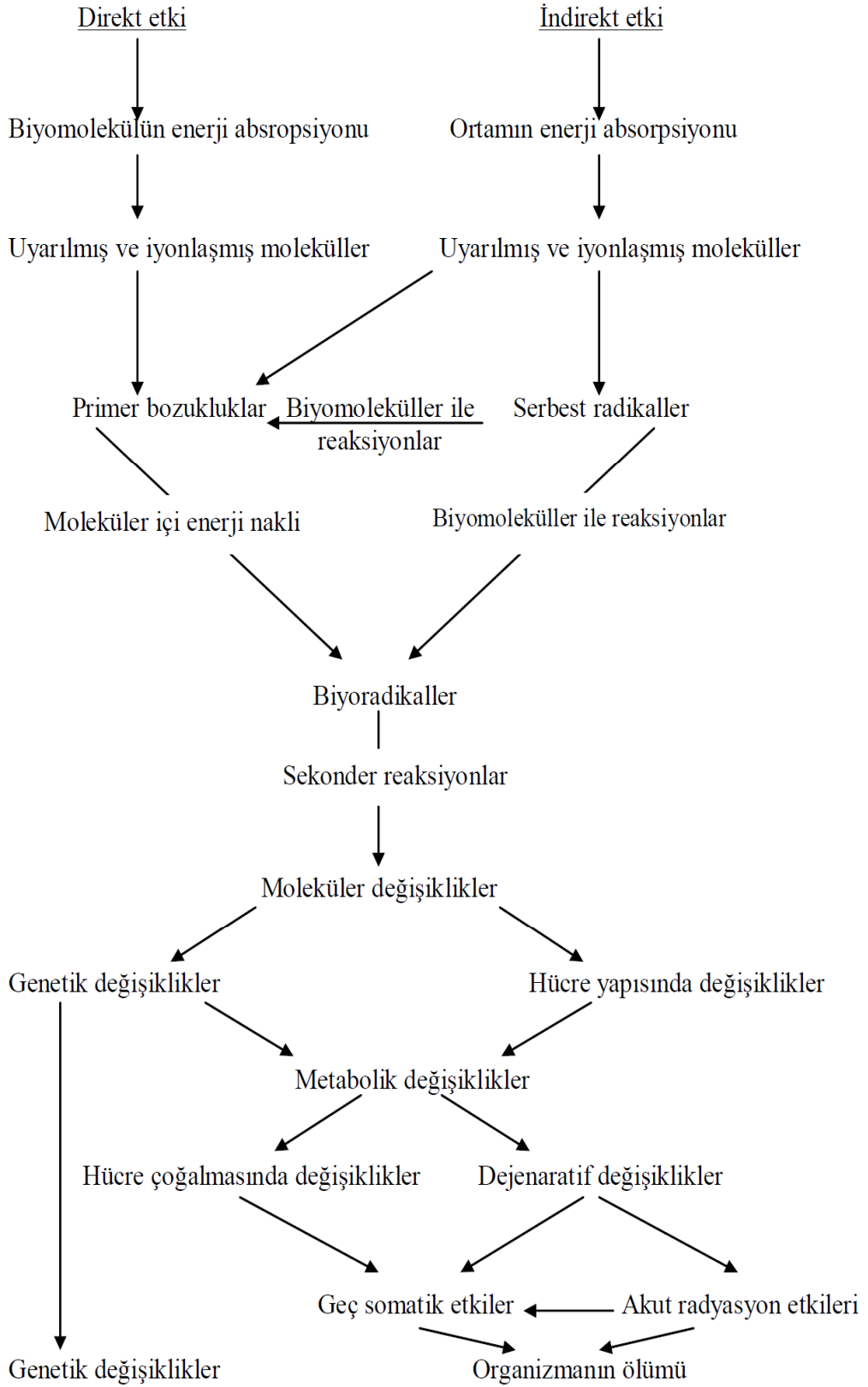
İyonize edici radyasyon, DNA, nükleus ve sitoplazmada değişim yaratır, kromatinlerde hasar oluşturur, mitozu etkiler ve hücreler arası iletişim bozukluğuna neden olur. İyonize radyasyona maruz kalan hücreler tarafından IL-1, IL-6, TNF- β ve PDGF (Platelet orijinli büyüme faktörü) gibi proinflatuar ve profibrotik sitokinler salgınır (Lipscomb ve ark. 1992, Özdemir ve Demiral 2001). İyonize edici radyasyonun biyolojik etkileri arasında; hücre siklusunu durdurulması, apoptozis, kromozomal kırılma, gen amplifikasyonu, delesyon ve mikroçevrede değişime yol açma gibi olaylar yer almaktadır (Bennet 1999).

İyonize edici radyasyonun neden olduğu moleküler değişiklikler; Şekil 2.23'te görüleceği üzere ya radyasyonun kendisi ile direkt olarak ya da yakın moleküllerle etkileşimlerin ve bunun sonucunda ortaya çıkan ikincil reaksiyonların bir sonucu olarak dolaylı yoldan gelişebilmektedir.



Şekil 2.23. İyonize edici radyasyonun direkt ve indirekt etkisi

Tüm moleküller iyonize edici radyasyondan zarar görebilmekte olup, etkileşimler son derece karmaşıktır. Bu etkileşimlerde DNA makromolekülleri en olası hedeflerdir. Radyasyon DNA molekülünün küçük bir bölümünü (örneğin bir tek geni) veya taşınan bilginin bir kısmını tahrip ederek ya da değiştirerek, bir veya pek çok yerinde, DNA'nın tek ya da iki zincirini kırabilir. Zarar; çok defa onarılabilmekle birlikte, bazı durumlarda, hücrenin ölümü veya şekil değiştirmesi tarzında izlenebilir (Taner 2009). Şekil 2.24'te radyasyonun canlıdaki etki kademeleri şematize edilmiştir.



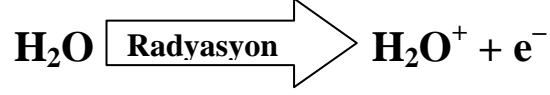
Şekil 2.24. Radyasyonun canlıdaki etki kademeleri (Dertinger ve Jung 1970)

Radyasyon sonrası oluşabilecek üç tür hasar vardır (Kaya ve ark. 1996):

- 1) **Letal Hasarlar:** Onarılamayacak kadar büyük olup, hücreyi hemen ölüme götürür. Bu durum, hücrelerde fonksiyon kaybı ve bölünme yeteneği kaybı şeklinde ortaya çıkar. Bu tip hasarlar genellikle tek bir radyasyon dozunun etkisiyle DNA zincirlerindeki nükleotidlerin bozulması sonucunda gerçekleşir.
- 2) **Subletal Hasarlar:** 2. bir doz eklenmediği sürece, normal şartlar altında saatler içinde hücrenin tamir edebileceği hasarlardır. Bir sonraki bölünmede ya da olumsuz ortam koşullarının devamı halinde gelişebilir ve uygun koşullarda onarılması mümkündür. Bu durumda hücrenin kendini tamir yeteneğine bağlı olarak hasar giderilebilir. Bu daha çok kanserli olmayan hücreler için geçerlidir. Kanserli hücrelerin önemli bir kısmı bu yeteneğe sahip değildir. Bunun sonucunda biriken subletal hasarlar hücrenin ölümüne yol açar. Oluşan bir kısım hasar ise, hücrenin bulunduğu fiziksel veya kimyasal koşullara bağlı olarak, ölüme yol açabilir ya da tamir olayını başlatabilir.
- 3) **Potansiyel Letal Hasarlar:** Bunlar ışınlanmadan sonra hücrenin bulunduğu ortam koşuluna göre değişkenlik gösteren hasarlardır. Normal koşullarda hasar ölümcüldür fakat çevresel etkilerin manipülasyonu ile birlikte hasar tamir edilebilir.

2.3.1.1. Suyun Radyolizisi

İnsan vücudunun % 70 – 80'i sudan oluşmaktadır. Canlı hücre ya da doku ışınlandığında radyasyon enerjisinin büyük oranda su molekülleri tarafından soğurulma olasılığı çok yüksektir. Bu durumda su molekülleri iyonlaşırlar ve pozitif yüklü su molekülü ile hızlı bir serbest elektron oluşur.



Bu serbest elektron, su içinde bir başka su molekülü tarafından yakalanıncaya kadar yol alır ve bu su molekülü ile birleşerek onu negatif bir su molekülü haline getirir.



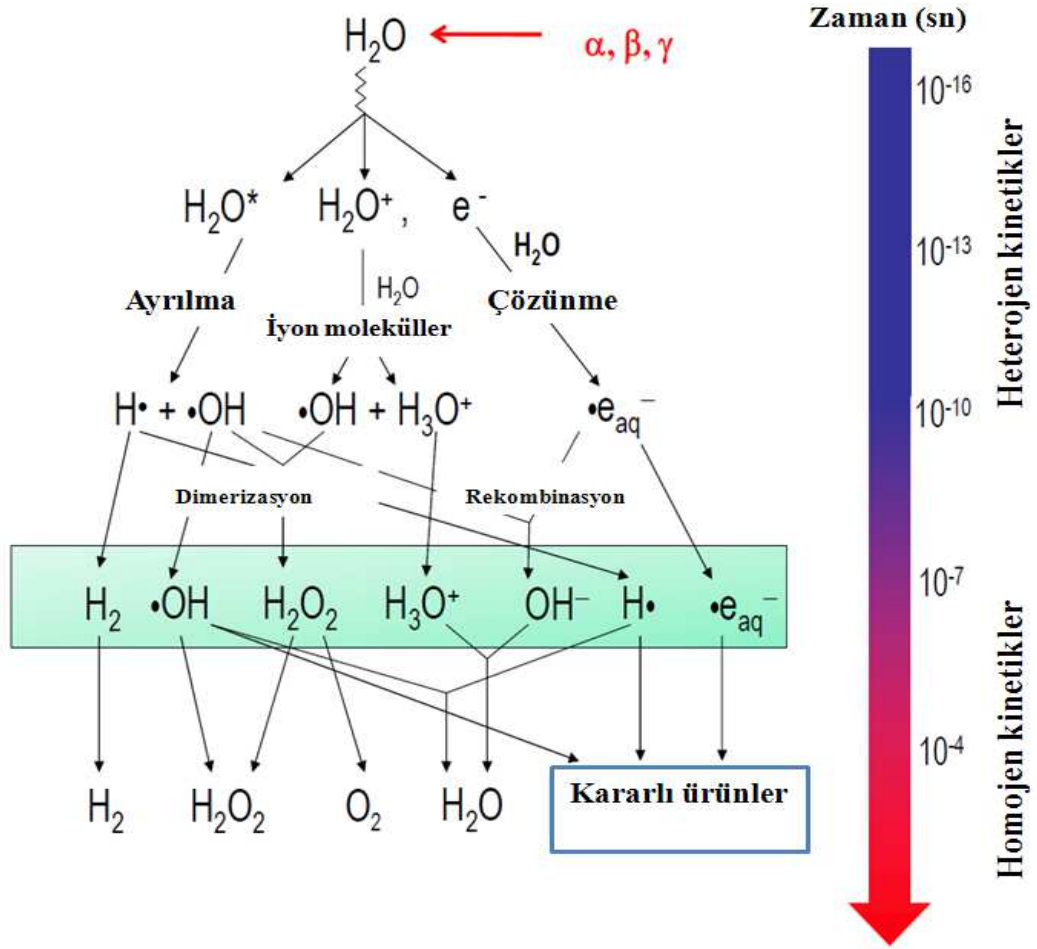
Bu reaksiyonlar sonunda oluşan H_2O^+ ve H_2O^- kararlı değildir ve her biri parçalanarak bir iyon ve bir serbest radikal oluşturur.



Oluşan serbest radikaller çiftleşmemiş elektronları içerirler ve çok etkindirler. Hücre içerisinde birçok reaksiyona neden olabilirler. Örneğin iki OH^\bullet birleşerek H_2O_2 oluşturur. Benzer reaksiyonlar, hücrenin diğer bileşenleriyle de oluşabilir. Bu tür reaksiyonlar; dokularda uyanmış iyonlar, uyarılmış moleküller ve diğer tür serbest radikallerin oluşmasına neden olur (Yıldırım 1985). Şekil 2.25'te suyun radyolizisi şematize edilerek gösterilmiştir.

2.3.1.2. İyonize Edici Radyasyonun RNA Molekülüne Etkileri

RNA molekülleri, DNA molekülünde taşınan genetik bilgilerin protein sistemine aktarılmasını ve protein sentezinin bu bilgilere uygun şekilde gerçekleşmesini sağlarlar. Radyasyonun etkisi ile bu moleküllerin fonksiyonlarında bazı değişikliklerin meydana geldiği saptanmıştır. Radyasyonun RNA sentezine etkileri ile ilgili çalışmaların sayısı DNA'ya oranla daha azdır ve bunların hemen hepsinde total RNA sentezine olan etkileri incelenmiştir. Bu sebeple farklı RNA tiplerinin ayrı ayrı incelenmesi ve karşılaştırılması bakımından yeterli değildir. Bu çalışmalarda elde edilen sonuçlar, genel olarak total RNA sentezinin DNA sentezine oranla daha dirençli olduğunu göstermektedir (Özalpan 2001).



Şekil 2.25. Suyun radyolizisi (H_2O^* : uyarılmış su molekülü, $\bullet\text{e}_{\text{aq}}^-$: akuatik elektron)

2.3.1.3. İyonize Edici Radyasyonun Kromozomlara Etkisi

Kromozomların radyasyon etkisine karşı çok duyarlı oldukları ve 0,1 Gy den daha düşük dozlarda bile bitki, hayvan ve insan kromozomlarında kırılmaların olduğu saptanmıştır. İyonize edici radyasyonların kromozomlara etkileri ışınlamadan sonraki ilk bölünmenin metafaz veya anafaz evrelerinde izlenebilir. Bu evreler kromozom yapılarının belirgin olduğu evrelerdir (Sparrow ve Moses 1952).

Eğer bir hücreye radyasyon uygulanırsa, kromozomlarda kırılmalar oluşur. Kromozomların kırılan uçları yapışkan özellik taşırlar ve diğer bir kırık uca yapışabilirler. Kırılan parçaların yeniden yapışma olasılıkları, oksijen ve ATP varlığında

artar. Kromozom kırılmaları ve bundan sonra meydana gelen yapışma olayları çeşitli şekillerde gerçekleşebilir. Bunları aşağıdaki şekilde sıralamak mümkündür:

- 1) Kırılan parça eski yerine yapışabilir. Bu durumda, sonraki mitozda herhangi bir değişiklik olmaz.
- 2) Kırılan parça yapışmaz ve bu durum sonraki mitozda delesyon olarak adlandırılan bir aberasyon şeklinde saptanır.
- 3) Kırılan parça bir diğer kırık uca yapışabilir. Bu durumda, sonraki mitozda ileri derecede kromozom aberasyonları gözlenir.

Metafaz ve anafazda izlenen aberasyonları iki gruba ayırmak mümkündür. Bunlar kromozom tip ve kromatit tip aberasyonlar olarak adlandırılır (Ahluwalia 2009).

Kromozom tip aberasyonlar S fazından önce radyasyona maruz kalınması sonucu oluşur. Eğer replikasyondan önce hasar tamir edilmezse, kardeş kromatitlerin her ikisi de hasarlı olur. G1 fazında yapılan ışınlamalar sonucu en fazla gözlenen kromozom tipi aberasyonlar: terminal delesyonlar, simetrik parça değişimleri ve asimetrik parça değişimleridir. Kromatit tip aberasyonlar S fazından sonra radyasyona maruz kalınması sonucu oluşur. Eğer hücreler S fazı esnasında radyasyona maruz kalırlarsa her iki tip aberasyon gözlenir. G2 fazında yapılan ışınlamalar sonucu en fazla gözlenen kromatit tip aberasyonlar; terminal delesyon, izoromatit delesyon, simetrik parça değişikliği, asimetrik parça değişikliği ve triradial aberasyondur. Eğer hücreler profaz safhasında radyasyona maruz kalırlarsa kromatitlerin alt ünitelerinde subkromatid aberasyonlar gözlenir (Tubiana ve ark. 1990, Özalpan 2001).

Yapısal kromozom değişiklikleri proto-onkogenlerin aktivasyonuna ve tümör supresör genlerin eliminasyonuna neden olur ve bunların sonucunda tümörögenез olayı başlatılır. Bu yüzden oluşan kromozom aberasyonlarını inceleyerek kanserler hakkında öngörülerde bulunabiliriz (Heim ve Meltman 1996).

Radyasyona maruz kalma sonucu oluşan özel bir kromozom aberasyon tipi de mikronükleus oluşumdur. Bu aberasyon bir asentrik fragment veya tam bir

kromozomun mitoz esnasında kutuplara çekilmeyip nükleus dışında kalması sonucu oluşur. Mikronükleus oluşumunun analizi, radyasyon hasarları ile ilgili basit duyarlı bir test yöntemidir. Ancak bu durum diploit hücreler için geçerlidir. Mikronükleus analizi için, ışınlanmış hücrelerde sitokalsin-B uygulanarak sitoplazma bölünmesi engellenir ve bu yolla iki yavru nükleusun birlikte bulunduğu binükleuslu hücreler ve bu hücrelerin sitoplazmaları içinde yer alan mikronükleuslar değerlendirilir (Prosser ve ark. 1988, Vrhovac-Garaj 1999). Radyasyonun neden olduğu gen ve kromozom mutasyonlarına bağlı olarak gözlenen hastalıklardan bazıları Çizelge 2.6’da verilmiştir.

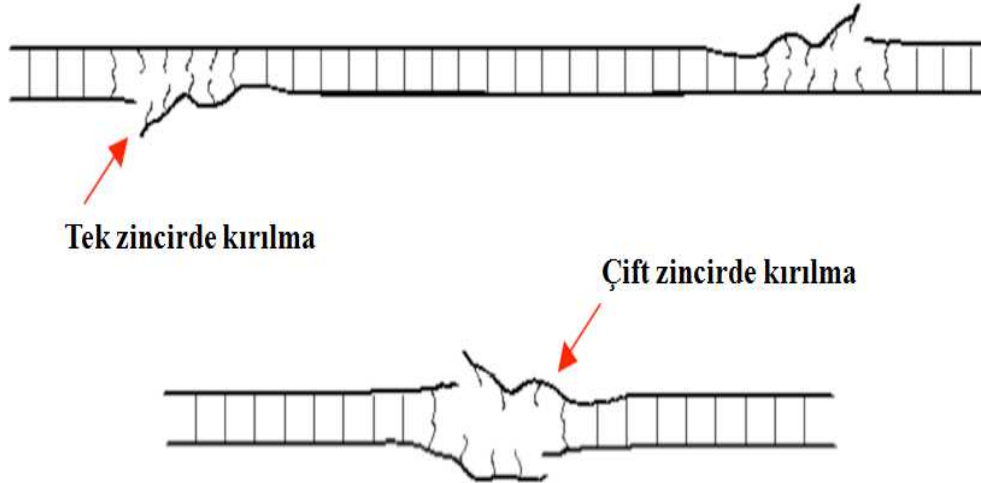
Çizelge 2.6. Radyasyonun genetik etkileri (Coggle 1977)

GENETİK ETKİ	NEDEN OLDUĞU HASTALIK
GEN MUTASYONLARI	
Dominant gen mutasyonları	Polidaktili, Retinoblastoma, Huntington hastalığı
Resesif gen mutasyonları	Orak hücre anemisi, Kistik fibroz, Tay-Sachs
Eşey kromozomuna bağlı gen mutasyonları	Renk körlüğü, Hemofili
KROMOZOM MUTASYONLARI	
Sayısal değişiklikler	Down sendromu, embriyonik ölüm
Yapısal değişiklikler	Embriyonik ölüm, fiziksel bozukluklar, zeka geriliği

2.3.1.4. İyonize Edici Radyasyonun DNA Molekülüne Etkileri

İyonize edici radyasyonun DNA molekülünün yapı, fonksiyon ve sentezine olan etkileri ile ilgili çok sayıda araştırma yapılmıştır. Bu araştırmalar genel olarak radyasyonun DNA’ya etkisinin doza, zamana ve hücrenin siklustaki durumuna bağlı olduğunu göstermektedir. İyonize edici radyasyonun DNA molekülünde oluşturduğu hasarların en önemlileri zincir kırılmaları (Olive 1998), baz hasarları, baz kayıpları, denatürasyon bölgelerinin oluşması ve DNA çapraz bağlanmalarıdır (McMillan ve

Steel 1997). Zincir kırılmalarının DNA molekülünde ortaya çıkan en önemli hasar grubunu oluşturduğu kabul edilmektedir. Bu hasarlar, Şekil 2.26'da görüleceği üzere tek zincir kırılmaları ve çift zincir kırılmaları şeklinde 2 gruba ayrılır. Tek zincir kırılmaları, DNA molekülünün çift zincirlerinden bir tanesinde, şeker – fosfat iskeletinde meydana gelen bir kopma şeklinde oluşurlar. Bu tür kırılmalar, düşük iyonizasyon yoğunluklu radyasyonlar tarafından meydana getirilen en yaygın hasarlardır. Çoğunlukla OH^\bullet radikallerinin etkisi sonucu oluşurlar. Çift zincir kırılmaları ise, her iki zincirdeki şeker – fosfat iskeletinde meydana gelen kopmalar ile ya da iki tek zincir kırılmasının birbirine çok yakın ve karşılıklı bölgelerde oluşması sonucunda ortaya çıkarlar. Bu tip zincir kırılmalarının oluşması için yüksek iyonizasyon yoğunluğuna sahip radyasyonlar gerekmektedir (Friedberg 1995).



Şekil 2.26. Tek ve çift zincirde DNA kırılmaları

DNA molekülünün, iyonize edici radyasyon için ilk hedef olduğu düşünülmektedir ve hücre ölümlerinin ana nedenlerinin başında yanlış onarılan ya da onarılamayan DNA hasarları yer alır. İyonize edici radyasyon, diploid bir hücrede Gy başına yaklaşık 1000 tane tek zincir kırığı (TZK) ve 40 tane çift zincir kırığı (ÇZK) oluşturur (Olive 1998). DNA çift zincir kırıkları, DNA hasarları içerisindeki en sitotoksik hasarlar olarak kabul edilir. İyonize edici radyasyon tarafından indüklenip, tamir edilmeden kalırlarsa hücre ölümüne neden olabilirler. Ayrıca yanlış onarılmış bir DNA çift zincir kırığı genomik kararsızlığa ve kromozomal translokasyonlara neden olabilir (Mehaney ve ark. 2009).

İyonize edici radyasyon dışında, iyonize olmayan UV radyasyonun etkisi ile DNA molekülünde ortaya çıkabilecek diğer yapısal değişiklikler, baz hasarları ve baz kayıplarıdır. Bu hasarlar açısından pirimidinler pürinlere karşı 2 kat daha fazla hassastırlar. En hassas baz ise Timin'dir. Baz hasarları ve baz kayıpları genellikle şeker yapısında kimyasal değişikliklere yol açar. Bu değişiklikler N-glikozit bağının hidrolizi sonucu meydana gelirken, şeker molekülündeki hasarlar genellikle nükleotit zincirinde kırılmalarının oluşmasına sebep olur. Bazların radyosensitivitelerinin artan şekilde sıralanışı şöyledir (McMillan ve Steel 1997): Timin > Sitozin > Adenin > Guanin.

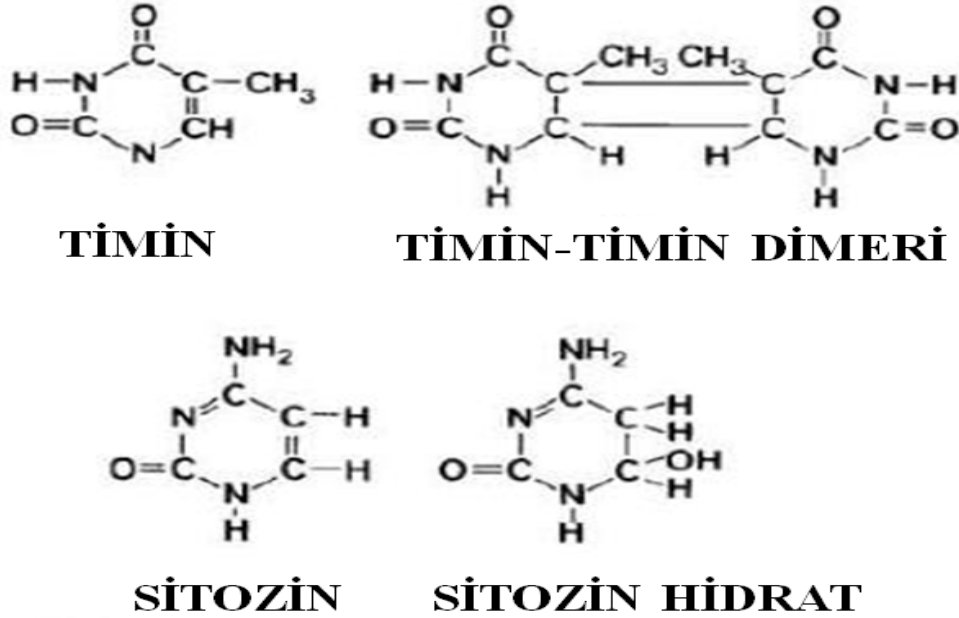
UV radyasyon etkisiyle, tek zincir kırığı olan iki komşu baz, bir kovalent bağ ile bağlanıp aralarında dimer olarak adlandırılan bir siklobütan halka yapısı oluşturabilir ve bu dimerler DNA replikasyonunu engelleyebilirler. En stabil dimerler Timin dimerleridir. Bu dimerler, radyasyona maruz kalan bölgelerde cilt kanserlerinin indüksiyonunda rol oynarlar. Radyasyonun bir başka etkisi de pirimidin bazlarının hidrasyonudur. Pirimidin hidratları genetik kodun değişiminde rol oynarlar. Bu hidratlara bir örnek, sitozin bazının beş ve altıncı bağlarının açılması ve araya su molekülünün eklenmesi ile oluşan sitozin hidrat molekülüdür (Tubiana ve ark. 1990). UV radyasyonun neden olduğu baz değişiklikleri Şekil 2.27'de görülmektedir.

İyonize radyasyonun diğer etkileri; DNA molekülünün fonksiyon kaybı, inhibisyonu ve transformasyon yeteneğinin azalmasıdır. Eğer bu tür etkiler onarılmazsa hücrenin ölümüne yol açarlar (Dertinger ve Jung 1970).

Radyasyonun DNA sentezine etkisinin genel olarak inhibe edici nitelikte olduğunu söylemek mümkündür. Radyasyonun DNA sentezine etkileri ile ilgili olarak aşağıda sıralanan genellemeleri yapmak mümkündür:

- 1) Hızlı ve yavaş bölünen hücrelerde DNA sentezinin başlamasına karşı farklı duyarlılıktadır.
- 2) S fazında yapılan ışınlamalar DNA sentezini inhibe etmektedir.

- 3) G1 fazında yapılan ışınlamalar DNA sentezini bazı hücrelerde inhibe eder, bazı hücrelerde etkilemez.
- 4) DNA sentezi G1 fazındaki ışınlamalardan etkileniyor ise, bu etkiyi S fazına göre daha düşük dozlarda elde etmek mümkündür.



Şekil 2.27. UV radyasyonun neden olduğu baz değişiklikleri

İyonize radyasyonun DNA sentezinde oluşturduğu diğer bir etki de, düzensiz DNA sentezidir. Bu olay, hücre siklusunun G1 ve G2 fazlarında da DNA sentezi yapılması durumudur. Bu sentez S fazındaki senteze göre daha yavaştır ve hasar görmüş hücrelerdeki hasarın onarımı için yapılır (Özalpın 2001).

2.3.1.5. DNA Hasarı Onarım Mekanizmaları

UV radyasyon neticesinde DNA'da oluşan primidin dimerleri; bakterilerde, mantarlarda, bitkilerde ve placentalı memeliler hariç çoğu omurgalı canlıda **fotoreaktivasyon** olayı ile düzeltilmektedir (Friedberg 2003). DNA zincirlerinde fosfodiester bağlarının kopmasına bağlı olarak oluşan basit zincir kırıkları ise **DNA ligaz** enzimi tarafından hemen onarılmaktadır (Klug ve Cummings 2002, Cooper ve

Hausman 2006). Alkilleyici ajanların neden olduğu O⁶-metilguanin yapısı **O⁶-metilguanin DNA metil transferaz** enzimi tarafından normal guanine döndürülür (Onur ve ark. 2009).

Tüm prokaryot ve ökaryot organizmalarda bulunan en önemli onarım mekanizması ise **eksizyon (kesip – çıkarma)** onarımıdır. Eksizyon onarım mekanizmasında DNA'daki hasarlı bazın ya da oligonükleotid parçaların çıkartılıp bu bölgenin doğru bazlarla doldurulması ve oluşan çentiğin ligasyonla kapatılması ana prensiptir. DNA zincirlerinde meydana gelen lezyonlar **baz eksizyon** ve **nükleotid eksizyon** tamir mekanizmaları ile onarılmaktadır (Kulaksız ve Sancar 2007).

Prokaryot ve ökaryotlarda, DNA replikasyonu esnasında normal bazların yanlış eşleşmeleri ile oluşan hata, **hatalı eşleşme eksizyon tamiri** ile düzeltilmektedir (Debeleç ve Kantarcı 2006).

DNA'da oluşan çift zincir kırıkları (ÇZK) ise **homolog rekombinasyon (HR)** veya **homolog olmayan uçların birleştirilmesi (HOUB)** mekanizması ile tamir edilmektedir. HOUB mekanizması homolog rekombinasyondan farklı olarak, onarıma kılavuzluk yapmak için uzun homolog bir diziye gerek duymaz. Çift zincir kırıklarının tamiri için HR'nin mi yoksa HOUB mekanizmasının mı kullanılacağı hücre döngüsünün evresine bağlıdır. Hücre döngüsünün, kardeş kromatitlere kolayca erişilebildiği, S ve G2 evrelerinde HR etkindir. HOUB mekanizması homolog bir diziye gerek duymadığı için hata eğilimli bir mekanizmadır (Shrivastav ve ark. 2008).

Hata eğilimli bir diğer mekanizma ise **SOS tamir mekanizmasıdır**. Bu mekanizma, yüksek oranda DNA hasarının olduğu ve diğer tamir mekanizmalarının başarılı olamadığı durumlarda devreye giren acil cevap sistemidir. DNA sentezi sırasında, DNA polimerazın lezyona rağmen replikasyonu devam ettirmesi sağlanır fakat replikasyonun doğruluğundan fedakarlık edilir (Klug ve Cummings 2002, Cooper ve Hausman 2006).

2.4. Toksisitenin Değerlendirilmesinde Kullanılan Bazı Test Yöntemleri

2.4.1. Klonojenik Test

Klonojenik test, bir hücrenin geniş bir koloni ya da klon oluşturacak şekilde üreme kabiliyetini korumasına ve süresiz olarak proliferasyon olabilmeye dayanmaktadır. Bu şekilde üreyen hücrelere klonojenik hücreler denilmektedir. Diğer taraftan, DNA ve protein sentezleme özelliğini koruyan, 1 – 2 mitoz geçiren fakat yeterli düzeyde proliferasyon olup koloni oluşturamayan hücreler ölü olarak nitelendirilmektedir. Bu nedenle koloni sayımı yapılırken en az 50 hücre içeren koloniler sayılmaktadır.

Eğer bir petriye 50 hücre ekiliyorsa bu petride oluşacak koloni sayısının 0 – 50 arasında değişiklik göstermesi beklenir. Hücreler herhangi bir ajanla muamele edilmediği takdirde ideal olarak beklenen koloni sayısı 50'dir. Fakat büyüme ortamının optimal olarak hazırlanamaması ve hatalı hücre sayımı gibi bazı nedenlerden dolayı çoğu zaman bu ideal sayıya ulaşamaz. Kaplama Etkinliği (KE) ya da Plating Efficiency (PE) terimi ise petriye ekilen hücrelerden proliferasyon olarak koloni oluşturanların %'sini ifade etmektedir. Örneğin; 50 hücre ekilen bir petride sonuç olarak 25 koloni sayılıyorsa PE: %50 olarak hesaplanır.

Hücre sağkalım fraksiyonu (SF), belirli bir konsantrasyonda uygulanan ajan ile buna bağlı olarak üreme yeteneğini koruyabilen ve koloni oluşturan hücre sayısı arasındaki ilişki olarak tanımlanmaktadır. İlk zamanlarda, klonojenik test radyasyonun hücreler üzerindeki etkisinin değerlendirilmesinde kullanılırken şu an daha çok klinik uygulamalardaki çeşitli ajanların sitotoksik etkilerinin incelenmesinde kullanılmaktadır. Bunların arasında çeşitli kemoterapi ajanları ve bunların radyasyon ile kombine uygulamaları yer almaktadır. (Munshi ve ark. 2005).

2.4.2. Mikronükleus Testi

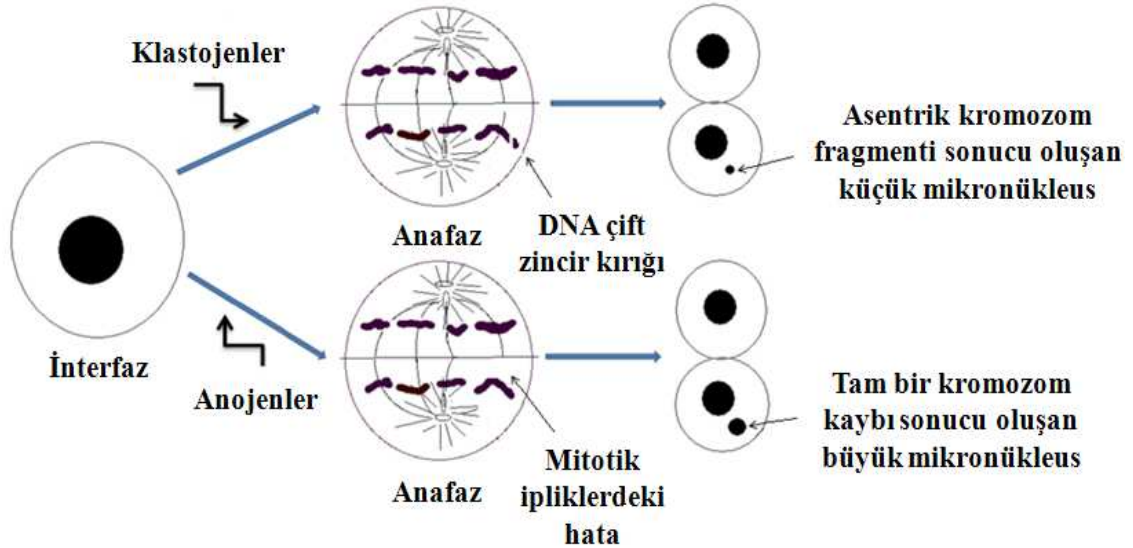
Mikronükleus (MN)'lar hücrenin mitoz bölünmesi sırasında ortaya çıkan, esas çekirdeğe dahil olmayan, tam kromozom veya asentrik kromozom fragmanlarından köken alan oluşumlar olarak tanımlanmaktadır. Bu oluşumlar genellikle hücre siklusunu kontrol eden genlerdeki eksikliklerden, mitotik iğdeki hatalardan, kinetokordan veya mitotik aygıtın diğer parçalarından ve kromozomal hasarlardan kaynaklanmaktadır. MN sayısındaki artış, çeşitli ajanların hücrelerde oluşturduğu sayısal ve yapısal kromozom düzensizliklerinin indirekt göstergesi olarak değerlendirilmektedir. Anöploidiyi uyaran ajanlar, sentromer bölünme hatalarına ve iğ iplikçiklerinde fonksiyon bozukluklarına yol açarak; klastojenler ise kromozom kırıkları oluşturarak MN oluşumuna yol açmaktadırlar. Bu nedenle hücrelerde MN sayısında artış saptanması somatik hücrelerdeki genomik kararsızlığın bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (Vanparys ve ark. 1990, Kirsch-Volders ve ark. 1997, Stopper ve Müler 1997, Choy 2001, Demirel ve Zamani 2002).

MN testi, değerlendirmesi oldukça kolay, ekstra kültür işlemi basamağı olmadan da uygulanabilen ve farklı hücre tiplerinde kullanılabilen bir testtir. MN testi, klastojenik etkili bileşikler tarafından oluşturulan kromozomal hasarların değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılan standart genotoksisite test sistemi içerisinde yer alır ve *in vivo* ve *in vitro* olarak uygulanabilir. MN'ler hücre döngüsü boyunca meydana gelen hasar nerede olursa olsun hücre bölünmesi süresince oluşur. Aksine, kromozomal aberasyonlar, hücre döngüsü aşamalarının herhangi birinde meydana gelebilir (Yırtıcı 2007). Ayrıca, sitogenetik harabiyetin tespitinde, kromozom analizine göre kolay uygulanabilmesi, daha fazla sayıda hücre sayılması ve istatistiksel yönden daha anlamlı sonuçlar elde edilmesi gibi avantajları sayesinde yaygın kullanım alanı bulan bir tekniktir (Schmid 1975, Vanparys ve ark. 1990, Garewal ve ark. 1993, Cheng ve ark. 1996, Duffaud ve ark. 1997, Kirsch-Volders ve ark. 1997, Stopper ve Müler 1997, Fenech 2000, Krishna ve Hayashi 2000, Widell ve ark. 2001, Demirel ve Zamani 2002).

MN testi 1950'lerde bitki hücrelerinde kromozom hasarının ölçülmesinde, 1970'lerde hayvan hücrelerinde ve daha sonra kültüre edilmiş insan lenfositlerinde kimyasal

karsinojenleri belirlemeye yönelik bir test olarak kullanılmaya başlanmıştır (Schmid 1975, Widel ve ark. 2001, Demirel ve Zamani 2002).

Birçok araştırmacı MN testi için çeşitli teknikler kullanmıştır. Bunların başında lenfosit hücre kültürleri ve direkt kemik iliği veya periferel kan hücrelerinin analizi gelmektedir. Bazı araştırmacılar geliştirdikleri modifiye metotlarla anöploidiye yol açan ajanlar ile klastojenleri birbirinden ayırmada MN büyüklük farkından yararlanmışlardır. Klastojenlerce uyarılan hücrelerde asentrik kromozomal fragmentler içeren küçük ebatlı MN'ler oluşmasına rağmen, anojenlerce uyarılan hücrelerde tam kromozom içeren daha büyük ebatlı MN'ler ortaya çıkmaktadır (şekil 2.28) (Von Ledebur ve Schmid 1973, Heddle ve Countryman 1976, Högstedt ve Karlsson 1985). Eastmond ve Tucker aynı amaçla antikinetokor antikorları kullanarak kinetokor pozitif MN'lerin tam bir kromozom, kinetokor negatif MN'lerin ise asentrik kromozom fragmenti iğerdiğini ve bu yöntemin anöploidi uyarıcı ajanları klastojenlerden ayırmada daha kesin bir yol olduğunu vurgulamışlardır (Eastmond ve Tucker 1989).

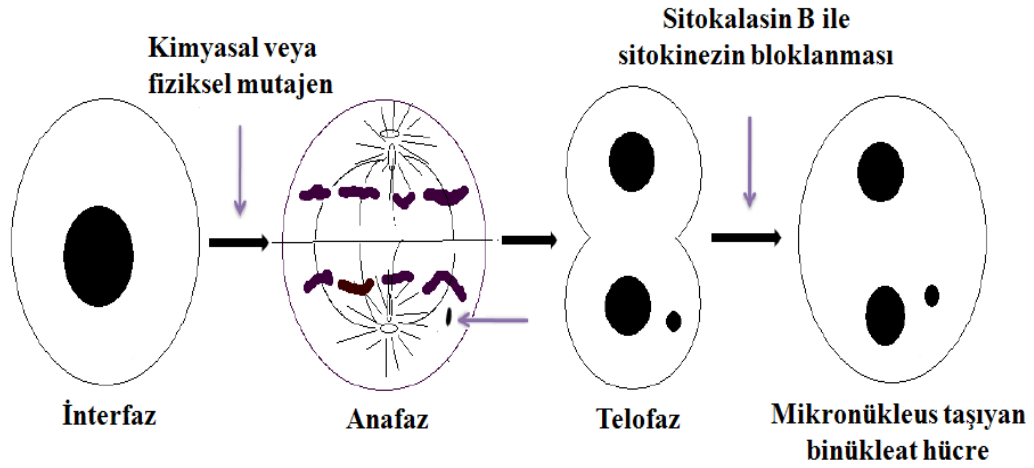


şekil 2.28. Klastojenler ve anojenler tarafından uyarılan hücrelerdeki MN'ler

Daha sonra Fenech ve Morley tarafından, küf mantarlarının metabolitlerinden olan Sitokalsin-B (Cyt-B) ile mitoz geçiren hücrelerde sitokinezi durdurma esasına dayanan ve bir hücre siklusunu tamamlayan hücrelerin binükleer görünümüleriyle ayırt edilmesine olanak sağlayan modifiye bir teknik geliştirilmiştir (Fenech ve Morley 1986).

Cyt-B, bölünen hücrenin ikiye ayrılmasını uyaran mikroflamentleri oluşturacak olan aktin molekülüne bağlanarak aktin polimerizasyonunu inhibe etmektedir. Bu inhibisyondan dolayı aktine bağlı tüm hareketler engellenmekte ve sitokinez inhibe olmaktadır (Şekil 2.29). Sitokinezi bloklama metodu ile bazı kinetik problemler ortadan kalkmış ve *in vitro* MN tekniğinin uygulanmasındaki güvenilirlik artmıştır (Fenech 2000, Aardema ve Kirsch-Volders 2001, Choy 2001, Demirel ve Zamani 2002).

Standart lenfosit kültürlerine uygun konsantrasyonda Cyt-B eklenmesiyle, çekirdek bölünmesini tamamlamış ancak sitoplazmik bölünmesini gerçekleştirememiş çift çekirdekli hücrelerde, MN bulunduran hücrelerin oranı tespit edilmektedir (Fenech ve Morley 1986, Demirel ve Zamani 2002).



Şekil 2.29. Sitokinezin bloklanması yöntemiyle MN içeren binükleat hücrenin oluşumu

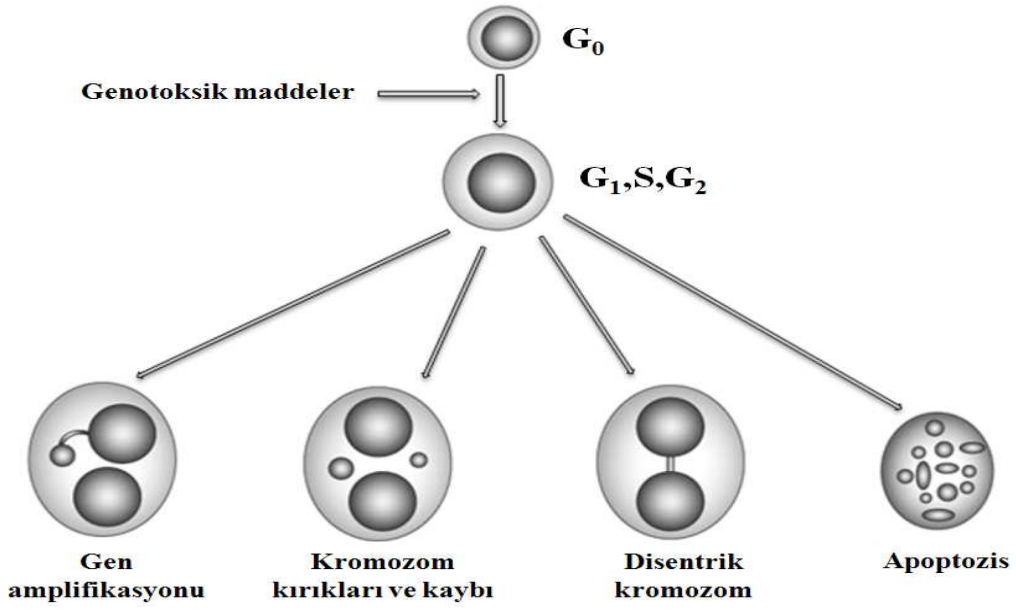
Sitokinezi bloklanmış hücrelerde, binükleat hücrelerde ve MN sayımında şu kriterler kullanılmaktadır (Heddle 1976, Titenko-Holland ve ark. 1997, Fenech 2000):

- 1) Hücreler çift nükleusa sahip olmalıdır ve belirgin sitoplazmasıyla yuvarlak veya oval görünümlü olmalıdır.
- 2) Nükleuslar belirgin nükleus zarıyla çevrili yuvarlak veya oval olmalıdır.
- 3) MN çapı ana nükleusun 1/3'ü kadar veya daha küçük olmalıdır.
- 4) MN'ler yuvarlak ve oval şekillerde olmalıdır.

- 5) MN'ler ana nükleustan açık bir şekilde ayrılmış olmalıdır veya mikronükleer sınırlar nükleer sınırlardan ayırt edilebilir olmalıdır.
- 6) Boya alma yoğunluğu ana nükleus ile aynı olmalıdır.
- 7) Sadece sitokinezi bloke edilmiş çift çekirdekli hücrelerdeki MN'lerin sayılması esas alınmalıdır.

Bu modifiye yöntem ile hücrelerin sadece MN içerip içermediği saptanmakta ve bu sayım işlemi kromozom anormallikleri testine göre daha hızlı gerçekleşmektedir. Bütün halde kromozom şeklinde MN oluşumuna neden olan ve kromozomal anormallik testleriyle çalışılması güç olan anöploidiyi indükleyici ajanlar da bu testle kolaylıkla saptanabilmektedir (Aardema ve Kirsch-Volders 2001, Lorge ve ark. 2007).

Ayrıca kimyasal bir madde uygulanmış hücrelerden oluşan yavru hücrelerdeki MN'lerin incelenmesi, en az bir hücre bölünmesi yoluyla yavru hücrelere geçen genetik hasarı ifade etmektedir. Yani iki çekirdekli hücrelerdeki MN'lerin sayılması ile hücrenin bir kez bölünmüş olduğu ispatlanmış olur. Sitokinezi bloklanmış hücrelerde MN yöntemi kullanılarak kromozom kırıkları, kromozom kaybı, disentrik kromozom oluşumu gibi yeniden düzenlenmeler ile gen amplifikasyonu ve apoptosis gibi olayların frekansı da değerlendirilebilir. MN içeriğindeki kromozomal fragmentler, direkt DNA kırıklarından veya DNA sentez hatalarından kaynaklanabilir. Onarılmamış kromozom kırıkları, bir disentrik kromozom ve bir asentrik fragment oluşumu ile yeniden düzenlenmelere öncüllük edebilir. Genellikle disentrik kromozomların sentromerleri anafazda nükleuslar arasında nükleoplazmik köprü oluşturur ve asentrik fragment MN'yi oluşturur (Şekil 2.30). Asentrik fragmentlerin ve kromatid veya kromozom kırıklarının ya da tam bir kromozomun anafazda geri kalması sonucu oluşan MN'ler, telofazdaki nükleusların dışında kalan küçük nükleuslar olarak görülmektedir (Surralles ve ark. 1995, Aardema ve Kirsch-Volders 2001).

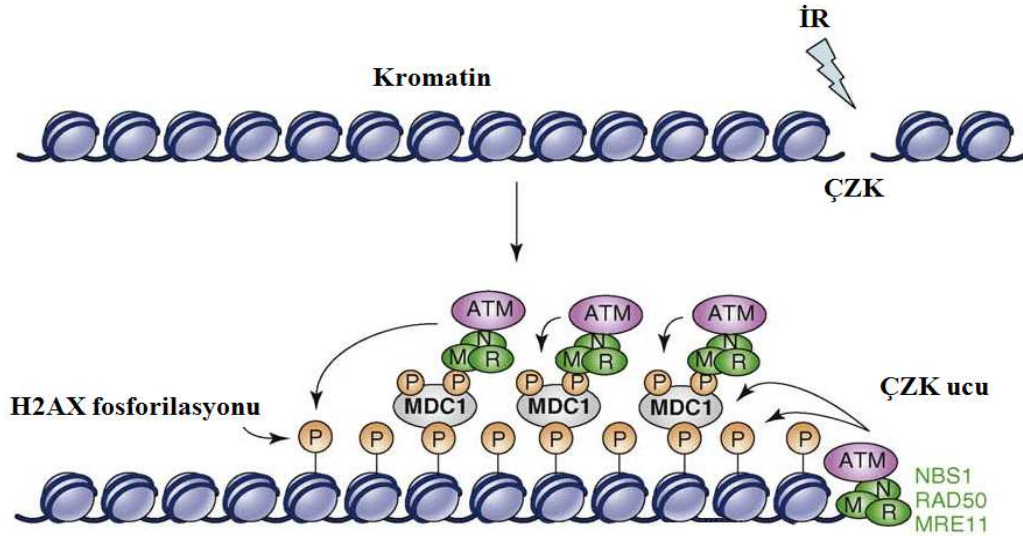


Şekil 2.30. Sitokinezi bloklanmış MN yöntemi ile bazı sitogenetik anormalliklerin tayin edilmesi

2.4.3. γ -H2AX Fokus Testi

H2AX histonu, H2A histon ailesinin spesifik bir varyantı olup ilk kez 1980 yılında West ve Banner tarafından tanımlanmıştır. Banner ve Pantazis, 1981 yılında H2AX histonunun asetile ve fosforile olabileceğini ortaya koymuştur. Daha sonraki yıllarda ise H2AX histonunun birtakım proteinler tarafından asetillenme ve poliubikitasyon olayları sonucu kromatin yapısından çıkarılabildiği anlaşılmıştır. H2AX histonunu H2A ailesinin diğer üyelerinden ayıran özelliği ise evrimsel süreçte korunmuş –KKATQASQEY karboksit terminal motifine sahip olmasıdır. Karboksit terminalin 139. pozisyondaki Serin aminoasidi (Ser139), çift zincirli DNA kırığı (ÇZK) oluşan bölgelerde hızlı bir şekilde fosforilasyona uğramaktadır. H2AX histon fosforilasyonu olarak bilinen bu olay, Fosfatidilinositol-3 kinaz benzeri kinaz (PIKK) ailesi üyeleri; Ataksi Telanjiektazi Mutantı (ATM) kinaz, Ataksi Telanjiektazi Mutantı ve Rad3 ilişkili (ATR) kinaz ve DNA'ya bağımlı protein kinaz tarafından gerçekleştirilmektedir. H2AX histonunun fosforilasyonu, kromatinde ÇZK oluşan bölgenin her iki ucundan başlayarak megabaz çifti uzunluğundaki geniş mesafelere kadar yayılmaktadır (Löbrich ve ark. 2010).

İyonize radyasyonun (İR) veya radyomimetik ajanların etkisiyle meydana gelen ÇZK, hücrede DNA tamiri sürecini başlatan bir dizi olayı tetiklemektedir. Bu süreçte ilk olarak, MRN kompleksi ÇZK olan bölgeyi tanıyarak DNA uçlarına bağlanmaktadır. Aynı zamanda ATM kinazın bu bölgede toplanmasını sağlayarak ATM kinaz ile etkileşmekte ve onu aktive etmektedir. Aktive olan ATM kinaz ise H2AX histonunu ve DNA tamirinde rol oynayan bazı proteinleri fosforile etmektedir. H2AX histonu, fosforilasyon neticesinde γ -H2AX histon molekülüne dönüşmektedir. Daha sonra DNA hasarı kontrol noktası proteini 1'in mediyatörü (MDC1), γ -H2AX molekülünün oluşturduğu sinyali algılayarak γ -H2AX'e bağlanmaktadır. Bir protein kinaz olan CK2, MDC1 proteinini fosforilleyerek daha fazla MRN – ATM kompleksinin fosforile bölgede toplanmasını ve bu bölgeye bağlanmasını sağlamaktadır. Hasarlı bölgeye yeni gelen ATM kinazlar ise hemen yanındaki H2AX histonunu fosforillemektedir. Aynı şekilde tekrarlanan döngü ile hasarlı bölgenin her iki tarafında megabaz büyüklüğünde γ -H2AX domainleri oluşmaktadır. Dolayısıyla, MDC1 – γ -H2AX etkileşimi, DNA tamir proteinlerinin hasarlı bölgede toplanması ve tutulması için bir platform teşkil etmektedir (Şekil 2.31) (Van Attikum ve Gasser 2009).



Şekil 2.31. Memelilerde H2AX histonunun fosforilasyonu ve γ -H2AX'in fonksiyonu (Van Attikum ve Gasser 2009)

DNA tamir proteinlerinin DNA'ya daha kolay ulaşabilmesi amacıyla Histon Asetil Transferazlar (HAT) tarafından kırılma bölgesinde histon değişimi gerçekleşmekte ve γ -H2AX'in yerine H2AZ histonu getirilmektedir. Kırılma bölgesinden megabaz

uzaklıktaki bölgelere kadar PP2A ve PP4C fosfatazları tarafından γ -H2AX'in defosforilasyonu gerçekleşmektedir (Altaf ve ark. 2009).

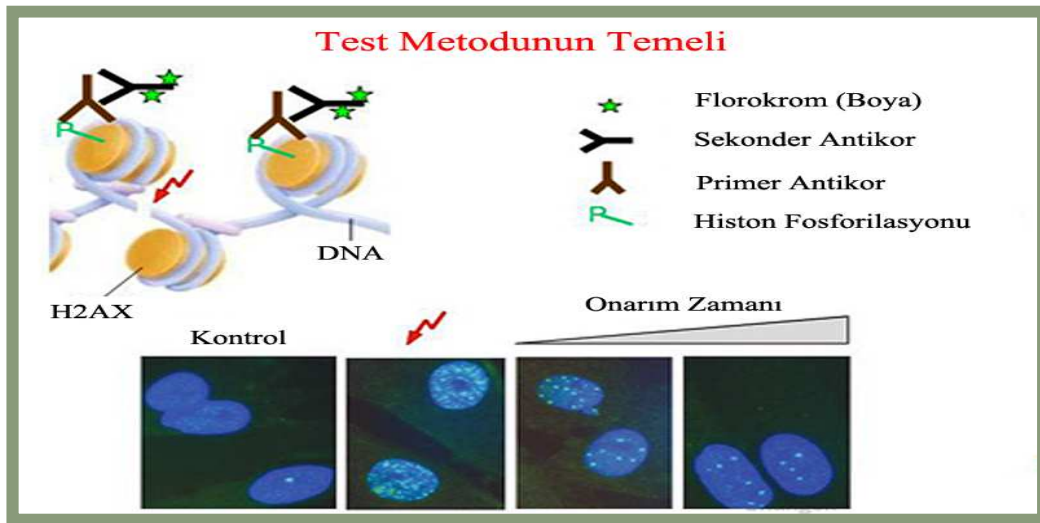
ÇZK tamiri sürecinde; kırılma bölgelerinde, mayotik rekombinasyonda, sınıf değiştirme rekombinasyonunda, V(D)J rekombinasyonunda, apoptotik sindirimde ve uç bölgeleri kapatılmamış telomerlerde H2AX fosforilasyonu görülmektedir. Ayrıca replikasyon çatalının tamir edilmemiş tek zincirli DNA kırığı ile karşılaşarak çökmesi ve neticede basit bir ÇZK oluşması durumunda da H2AX fosforilasyonu gözlenmektedir (Ismail ve Hendzel 2008).

γ -H2AX fokus testinde H2AX histonunun fosforilasyonu ile oluşan γ -H2AX molekülleri, immunofloresan boyama yöntemi kullanılarak hazırlanan preparatlarda, floresan mikroskop altında γ -H2AX odakları olarak görülebilmektedir. Her bir ÇZK için yaklaşık 2000 γ -H2AX molekülü oluşmakta ve bu moleküllerin immunofloresan olarak işaretlenmesiyle bir γ -H2AX odak ortaya çıkmaktadır. Dolayısıyla her γ -H2AX odak bir ÇZK'ya karşılık gelmektedir. Bir ÇZK için binlerce γ -H2AX molekülünün oluşması bu testin ÇZK'nın belirlenmesindeki duyarlılığını ortaya koymaktadır. Ayrıca ÇZK'nın tamir edilmesi ile o bölgedeki γ -H2AX odak ortadan kalkması arasında çok yakın bir ilişki olduğu bilinmektedir. Bu noktadaki bir sınırlama ise düşük sitotoksik dozların kullanımını esas almaktadır. Genomda, 100 – 150 civarı ÇZK oluşturan düşük sitotoksik dozlar (Örn: 1 Gy İR) kullanıldığında oluşan odak sayısı ile ÇZK arasındaki oran çok daha anlamlıdır. γ -H2AX odakları DNA tamir proteinlerine göre çok daha duyarlı bir ÇZK belirteçidir. Çünkü DNA tamir proteinleri hücre içinde sürekli bulunurken γ -H2AX odakları ÇZK oluşan bölgelerde hızlı bir şekilde oluşmakta ve ÇZK tamirine bağlı olarak aynı oranda ortadan kalkmaktadır. (Ismail ve Hendzel 2008).

G1 ve G2 fazlarında iyonize radyasyona (İR) maruz kalan hücrelerde ATM kinaza veya DNA-PK'a bağlı H2AX fosforilasyonu gerçekleşmekte ve oluşan γ -H2AX odakları nükleer bölgede belirgin bir şekilde görülebilmektedir. Eğer hasar çok fazla ise odaklar nükleer bölgenin etrafında hale şeklinde yayılma gösterebilmektedir. Maruz kalınan İR dozuna bağlı olarak odak büyüklüğü ve yoğunluğu da artmaktadır. G1 ve G2 fazlarında oluşan odakların her biri İR ile indüklenmiş DNA hasarını yani ÇZK'yı belirtmektedir.

Bununla birlikte, S fazında, replikasyon çatalı, tamir edilmemiş tek zincirli DNA kırığı (TZK) ile karşılaşarak çökebilme ve bu esnada basit ve tek uçlu bir ÇZK oluşabilmektedir. Bu durumda, yine ATM kinaza bağlı olarak ÇZK bölgesinde γ -H2AX fosforilasyonu gerçekleşmektedir. Dolayısıyla S fazında İR'ye maruz kalan hücrelerde an itibariyle oluşan γ -H2AX odaklarından bazıları İR ile indüklenmiş ÇZK'ları yansıtmayabilmektedir. Replikasyon çatalının çökmesine bağlı olarak oluşan bu tek uçlu ÇZK'lar çok kısa bir süre içerisinde HR ile tamir edilebilmektedir. Bu sebeple yapılan incelemelerde bu ÇZK'ların tamiri için ATR'ye bağımlı ATM aktivasyonunun gerektiği ileri sürülmüştür. İR'den 15 dakika sonra yapılan incelemelerde ise ÇZK'ların tamir sürecinde ATR'den bağımsız ATM aktivasyonunun etkin olduğu anlaşılmıştır. Yani İR'den 15 dk sonra S fazında gözlenen odakların büyük bir çoğunluğu direkt olarak İR'nin oluşturduğu ÇZK'ları belirtmektedir. S fazında oluşan γ -H2AX molekülleri, G1 ve G2 fazlarındaki gibi belirgin ve ayrık odaklar oluşturmamaktadır. Bunun yerine yeşil çayır görünümünü andıran nükleus çapında bir boyanma ile karakterize odaklar oluşmaktadır (Löbrich ve ark. 2010).

Şekil 2.32'de görüleceği üzere γ -H2AX odak testinin temelini immunofloresan boyama yöntemi oluşturmaktadır. Bu yöntemde hücreler, önce anti-fosfo histon H2AX antikoru ile daha sonra da florokrom boya ile işaretlenmiş sekonder antikor ile bir süre inkübe edilmektedir. Böylece ortaya çıkan sinyal/fokus sayılarının belirlenmesi ile ÇZK oranları belirlenebilmektedir.



Şekil 2.32. γ -H2AX odak testinin temel mekanizması

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Kullanılan Ekipman ve Sarf Malzemeler

Tez çalışmalarımız Uludağ Üniversitesi Biyoloji Bölümü bünyesinde bulunan hücre kültürü ve genetik toksikoloji laboratuvarında yürütülmüştür. Deney çalışmalarımızda kullanılan cihazlar Çizelge 3.1’de, sarf malzemelerin adları, markaları ve katalog numaraları ise Çizelge 3.2’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmalarda kullanılan ekipman

Ekipman	Marka / Model
Floresan/Işık mikroskop	NIKON – ECLIPSE 80i
Görüntüleme sistemi	KAMERAM
Radyasyon Işınlama Cihazı	SIEMENS MD2 (M6V FOTON)
-80°C derin dondurucu	ELCOLD
Distile su cihazı	MP MINI PURE – DEST UP
Su banyosu	NÜVEBATH NBS
Ultrasonik su banyosu	BANDELIN – RK 31
Isıtmalı manyetik karıştırıcı	MTOPS – MS300HS
Hassas terazi (Max: 220/82 g)	SHIMADZU – AUW220D
Kaba Terazi (Max: 2000 g)	RADWAG – WTB2000
Azot tankı	INT. CRYOGENICS – IC 20R
pH metre	HANNA – HI 221
-20°C derin dondurucu	ALASKA – ADF 06 V
+4°C cam kapaklı buzdolabı	HORECA – HRS 375 CHL
Soğutmalı santrifüj	SIGMA – 2-16PK
Etüv (37°C ve %5 CO ₂ takviyeli)	BINDER – CB 150
Class II steril kabin (laminar flow)	THERMO
Inverted mikroskop	SOIF
+4°C Standard Buzdolabı	BEKO
Hücre sayım cihazı	ROCHE

Çizelge 3.2. Çalışmalarda kullanılan sarf malzemeler

Sarf Malzeme	Firma / Katalog No
8 kuyucuklu lamalar	BD BIOCOAT – LOT:87501
Steril pipetler (5,10 ve 25 ml’lik)	COSTAR STRIPETTE
Serolojik pipet tabancası	BIOHIT MIDI PLUS
Steril 15 ml lik tüpler	FALCON
Steril flasklar (T-12,5, T-25 ve T-75)	FALCON
Steril petripler (60 ve 100 mm’lik)	FALCON
Etil alkol	AY-KİM
Metanol	MERCK 1060082500
Asetik asit	MERCK 1000632511
Potasyum	MERCK 1049361000
Sitokalsin-B	SIGMA C6762
Giemsa	MERCK 1092040500
Kristal viyole	MERCK 1159400100
Polihidroksi-C ₆₀	BUCKYUSA BD-301
Paraformaldehit	SIGMA – ALDRICH P6148
Triton X-100	GERBU 2000
Bovine Serum Albumin	SIGMA- ALDRICH A9418
Anti-H2AX primer antikor	PIERCE MA-5 15310
Alexa Fluor 488 sekonder antikor	INVITROGEN – A11008
RPMI-1640 (500 ml)	LONZA 12-702F
DPBS (500 ml)	SIGMA 08537
Penisilin – Streptomisin	THERMO SH40003.12
Sodyum piruvat (100 ml)	THERMO SH30239.01
L-Glutamin (100 ml)	SIGMA – ALDRICH G7513
Fetal Bovine Serum	SIGMA – ALDRICH F9665
% 0,25 Tripsin-EDTA	SIGMA – ALDRICH T4049
DPBS/Modified	THERMO SH30028.02
DAPI/antifade boyası	VECTASHIELD H-1200

3.2. Fullerenol Çözeltisinin Hazırlanması ve Karakterizasyonu

Çalışmalarımızda kullandığımız suda çözülebilir fulleren formu olan ve poli-hidroksi fulleren olarak da adlandırılan fullerenol $C_{60}(OH)_n$ (n: 18 – 22) Bucky USA firmasından toz formunda temin edilmiştir. 200 mg toz fullerenol 4 ml steril distile su içerisinde çözüldükten sonra oda sıcaklığında saklanmış ve deneylerden önce istenilen konsantrasyonları elde etmek üzere RPMI besiyeri ile seyreltilmiştir. Fullerenol çözeltisi deneyler esnasında her kullanımdan önce ultrasonik su banyosunda 15 dk boyunca sonifike edilmiştir.

Hazırlanmış olduğumuz fullerenol çözeltisinin karakterizasyon işlemleri ise zeta potansiyeli ölçümü, dinamik ışık saçılım spektrofotometresi (DLS) ve transmisyon elektron mikroskopisi (TEM) analizleri ile gerçekleştirilmiştir.

3.2.1. Zeta potansiyeli ölçümü

Zeta Potansiyeli kısaca tanecikler arasındaki itme veya çekme değeri ölçümü olarak tanımlanabilir (Hunter, 1981). Zeta potansiyeli partikülün yüzey yüküne bağlı olup genellikle 15 mV'dan yüksek ya da -15mV'dan küçük değere sahip partiküller stabil olarak kabul edilirler. Bu yük partiküllerin bir araya gelerek agregat oluşturmalarını engelleyen bir güç olarak görev aldığından dolayı nano çalışmalarında kullanılacak bir çözeltideki partiküllerin zeta potansiyelinin belirlenmesi büyük önem arz etmektedir. Çalışmamızda hazırlanan süspansiyondaki fullerenol partiküllerinin zeta potansiyeli 25 °C'de Zetasizer Nano-ZS90 (Malvern Ins.) cihazı kullanılarak belirlenmiştir.

3.2.2. Dinamik ışık saçılım (DLS) spektrofotometresi analizi

Toksisite çalışmalarında kullanmak üzere hazırlanmış olduğumuz fullerenol çözeltisindeki partiküllerin büyüklükleri Malvern CGS-3 model (Malvern Inst.) dinamik

ışık saçılım spektrofotometresi kullanılarak 25 °C sıcaklıkta ve 90 derece açıda ölçülmüştür.

3.2.3. Transmisyon elektron mikroskopi (TEM) analizleri

Hem fullerenol partiküllerinin büyüklük ve dağılımı hakkında veri elde etmek hem de DLS analizi ile elde edilen verileri konfirme etmek için transmisyon elektron mikroskopik (TEM) analizler gerçekleştirilmiştir. Bunun için hazırlanan çözeltimizden alınan örnekler 300 mesh'lik bakır gridler üzerine damlatıldıktan sonra bir gece boyunca kurumaya bırakılmışlardır (Dhawan ve ark. 2006). Kurutma sonrasında gridler FEI marka Technai Spirit G2 model 120 kV Transmisyon elektron mikroskobu altında incelenmişlerdir. Uygun görüntü alanına rastlanıldığında ise Morada marka 11 megapiksel TEM kamerası (Soft Imaging system) kullanılarak fotoğraf çekimleri yapılmıştır.

3.3. Kullanılan Hücre Hattı (A549) ve Kültür İşlemleri

Çalışmalarımızda insan adenokarsinom alveolar bazal epitel hücreleri (A549) kullanılmıştır. A549 hücreleri filtre kapaklı T-75 flasklarda, RPMI-1640 besiyerinde, % 5 CO₂ takviyeli 37°C'lik etüvlerde kültüre alınmışlardır. Hücreler rutin olarak 2 günde bir beslenmiş ve % 85 doluluğa ulaştıklarında pasajlanmışlardır.

A549 hücrelerinin pasajlanma prosedürü:

Gerekli Sarf Malzemeler

15 ml steril tüpler

Steril serolojik ve pastör pipetleri

T-75 Flasklar

Gerekli Kimyasallar

Steril PBS Çözeltisi

Tripsin-EDTA (% 0,25'lik)

RPMI-1640 Besiyeri

- 1) Pasaj doluluğuna ulaşan T-75 flasksındaki besiyeri aspire edilerek uzaklaştırılmıştır.
- 2) Hücreler uygun 5 ml PBS ile yıkandıktan sonra ve PBS uzaklaştırılmıştır.
- 3) Flasklara daha sonra 3 ml tripsin eklenerek 1 – 2 dk beklenmiştir.
- 4) İvert mikroskop altında hücrelerin zeminden ayrıldığı kontrol edilmiş ve tripsin reaksiyonunu durdurmak için flasklara aynı miktarda besiyeri eklenmiştir.
- 5) Flasktaki hücre süspansiyonu steril serolojik pipet ile toplanarak önceden etiketlenmiş olan 15 ml'lik falcon tüplerine aktarılmıştır.
- 6) Tüp içerisindeki hücreler +4 °C'de, 1000 rpm'de, 5 dk santrifüj edilmiştir.
- 7) Daha sonra süpernatant hücrelerin üzerinde yaklaşık 100 µl kalacak şekilde aspire edildikten sonra kalan pellet 5 ml besiyeri içinde yeniden süspansiyon edilmiştir.
- 8) Hücre sayım cihazı ile süspansiyondaki toplam hücre sayısı belirlendikten sonra yeni flasklara ekilecek hücre miktarını elde etmek için gerekli olan süspansiyon miktarı belirlenmiş ve taze besiyeri içeren flasklara aktarılmıştır.
- 9) Yeni ekim yapılan flasklardaki hücreler 37 °C'lik etüvde inkübe edilmişlerdir.

3.4. Hücrelerin ışınlandırılması

Flaskların ve 8 odacıklı kültür lamalarının içerisindeki hücrelerin ışınlama işlemi, 6-MV X-ışınları kullanılarak, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyoterapi Merkezinde gerçekleştirilmiştir. T-25 flasklarının filtreli kapakları iyice kapatılıp ağız kısımları kontaminasyonun önlemesi amacıyla sıkıca streç film ile sarılmıştır. 8 kuyucuklu kültür lamaları steril petriyer içerisinde, flasklar ile birlikte özel bir steril taşıma kabı içerisinde ışınlamaya götürülmüşlerdir.

Radyasyon uygulama dozları (0.5 – 8 Gy) lineer hızlandırıcı (Siemens Mevatron MD2) kullanılarak dakikada 2 cGy olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Verilen toplam doz, flaskların uygulama pozisyonundaki duruşlarının bilgisayarlı tomografik görüntülerine dayanarak, radyoterapi planlama sistemi (CMS-XIO) ile hesaplanmıştır. Işınlama işlemini takiben örnekler normal olarak *in vivo* gerçekleşen DNA tamirinin oluşmasına izin vermek amacıyla bir saat süresince 37 °C'de inkübe edilmişlerdir.

3.5. Deney Planı

Fullerenol ve radyasyona tek başlarına ve kombine halde maruz bırakılan A549 hücreleri ile yapılan klonojenik, mikronükleus ve γ -H2AX testlerimize ait genel deney planı ve dozlama grupları Tablo 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.3. A549 hücrelerinde 1 saat ve 24 saatlik fullerenol (F) uygulaması ve radyasyon ile gerçekleştirilen deney setleri

Kontrol	Fullerenol $\mu\text{g/L}$		Radyasyon	Fullerenol + Radyasyon	
				1 saat	24 saat
Negatif K.	1 saat	100	1 Gy	F 100 + 1 Gy	F 100 + 1 Gy
		200		F 200 + 1 Gy	F 200 + 1 Gy
		400		F 400 + 1 Gy	F 400 + 1 Gy
Solvent K.	24 saat	100	2 Gy	F 100 + 2 Gy	F 100 + 2 Gy
Pozitif K.		200		F 200 + 2 Gy	F 200 + 2 Gy
		400		F 400 + 2 Gy	F 400 + 2 Gy

3.5.1. Kontrol grupları

Deneylelerimizde negatif, pozitif ve solvent olmak üzere üç tip kontrol grubu kullanılmıştır.

Negatif Kontrol grubu: Herhangi bir ajana maruz kalmayan kontrol grubu.

Solvent Kontrol: Solvent (su) kontrol grubumuzda final konsantrasyonu % 0,05’i geçmeyecek şekilde steril distile su kullanılmıştır.

Pozitif Kontrol: Genotoksisite karşılaşmalarında ve test sistemlerinin doğru çalışıp çalışmadığını kontrol amacıyla 0,05 M’lık H_2O_2 kullanılmıştır.

3.5.2. Klonojenik test grupları

Fullerenol'ün sitotoksik etkilerinin belirlenmesi amacıyla A549 hücreleri 24 saat süresince 10, 50, 100, 200, 400, 800 ve 1600 µg/L konsantrasyonlarında fullerenole maruz bırakılmışlardır. Radyasyonun sitotoksik etkilerinin belirlenmesi amacı ile A549 hücreleri 0,5, 1, 2, 4, 6, 8 ve 10 Gy radyasyona maruz bırakılmışlardır. Klonojenik test sonuçlarına göre %75'den daha yüksek yaşayabilirlik oranı gösteren düşük sitotoksik etkiye sahip değerler seçilerek genotoksisite testleri gerçekleştirilmiştir.

3.5.3. Genotoksisite test grupları

Genotoksisite test grupları klonojenik test sonuçlarına göre seçilen fullerenol (100, 200 ve 400 µg/L fullerenol) ve radyasyon (1 ve 2 Gy) dozları ile belirlenmiştir. Kombine testlerde üç farklı dozda uygulanan fullerenol, radyasyon ışınlandırmalarından 1 saat ve 24 saat önce olmak üzere iki farklı sürede uygulanmıştır.

3.6. Klonojenik Test

Bir toksik etkiye maruz bırakılan hücrelerin tutunma ve bölünebilme yeteneklerini belirlenmesine dayanan klonojenik test, sitotoksik etkilerin belirlenmesinde sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Klonojenik test sonucunda elde edilen bulgular bize genotoksisite testlerinde kullanılacak konsantrasyonların/dozların belirlenmesi esnasında yön göstermektedir (Munshi ve ark. 2005). Klonojenik testte % 75'den daha yüksek hayatta kalış oranı veren (düşük sitotoksik) konsantrasyonlar seçilmektedir.

A549 hücreleri ile yürütülen klonojenik test aşamalarını şöyle sıralayabiliriz:

- 1) Yaklaşık 25 pasaj sayısına sahip olan A549 hücreleri pasajlama prosedüründe anlatıldığı üzere tripsinleme yolu ile 15 ml'lik steril tüplere toplanmışlardır.
- 2) Hücre süspansiyonundan sayım yapılarak tüpteki toplam hücre sayısı belirlenmiştir.

- 3) Tüp içerisindeki hücreler +4 °C'de, 1000 rpm'de, 5 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant aspire edilerek kalan pellet yeniden süspanse edilmiş ve dozlanacak T-25 flasklara 30.000 hücre/flask olacak şekilde ekim yapılmıştır.
- 4) Flasklara ekilen A549 hücreleri yaklaşık iki gün sonra %80 ve üzeri konfluent hale geldiği zaman dozlanmışlar ve 24 saat süresince inkübe edilmişlerdir.
- 5) İnkübasyon süresinden sonra flaskların içindeki besiyeri aspire edilerek uzaklaştırıldıktan sonra hücreler tripsinlenerek etiketlenmiş olan tüplere toplanmışlardır.
- 6) Elde edilen hücre süspansiyonundan trypan blue yöntemiyle canlı hücre sayımı yapıldıktan sonra her konsantrasyon için 60 mm'lik dört adet petriye 500 canlı hücre ekildikten sonra petriyer yaklaşık 10 gün süresince koloni oluşumları için inkübe edilmişlerdir.
- 7) Bu esnada, petriyer invert mikroskopta düzenli aralıklarla incelenerek koloni gelişimi kontrol edilmiş ve hücreler üç günde bir taze besiyeri ile beslenmişlerdir.
- 8) İnkübasyon süresi sonunda kolonilerin oluşmasını takiben petriyerdeki besiyeri uzaklaştırılmış, ardından PBS ile yıkanma işlemi yapıldıktan sonra hücreler absolute etanol ile 10 dk fiske edilmişlerdir.
- 9) Fiksasyon işlemini takiben hücreler 5 dk süresince kristal viyole ile boyanmışlardır.
- 10) Boyama işlemini takiben invert mikroskopta en az 40 hücre içeren koloni büyüklükleri belirlenmiş ve böylece her bir petrideki koloniler sayılarak elde edilen sonuçlar tablo haline getirilmiştir.

Aşağıda belirtilen formül ile yüzde yaşayabilirlik oranı (sitotoksosite) hesaplanmıştır.

$$\text{Yaşayabilirlik (sitotoksosite)} = \frac{\text{Petri başıma düşen ortalama koloni sayısı}}{\text{Kontrol petrisindeki ortalama koloni sayısı}} \times 100$$

3.7. Sitokinez Bloke Mikronükleus Testi

Yapısal ve sayısal kromozom bozuklukların tespit edilmesine olanak sağlayan mikronükleus testi genotoksik etkilerin belirlenmesi amacıyla kullanılmıştır. A549 hücrelerinde Sitokalsin-B ile sitokinez bloke yöntemine dayalı olarak gerçekleştirilen mikronükleus testinin (Fenech ve Morley 1986) aşamalarını şöyle sıralayabiliriz:

- 1) Yaklaşık 25 pasaj sayısına sahip olan A549 hücreleri pasajlama prosedüründe anlatıldığı üzere tripsinleme yolu ile 15 ml'lik steril tüplere toplanmışlardır.
- 2) Hücre süspansiyonundan sayım yapılarak tüpteki toplam hücre sayısı belirlenmiştir.
- 3) Tüp içerisindeki hücreler +4 °C'de, 1000 rpm'de, 5 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant aspire edilerek kalan pellet yeniden süspansiyon edilmiş ve dozlanacak T25 flaslara 30.000 hücre/flask olacak şekilde ekim yapılmıştır.
- 4) Flaslara ekilen A549 hücreleri yaklaşık iki gün sonra %80 ve üzeri konfluent hale geldiği zaman dozlanmışlar ve 24 saat süresince inkübe edilmişlerdir.
- 5) 24 saatlik dozlama işlemini takiben hücreler tekrar beslenmiş ve her bir flaska Sitokalsin-B (5 µg/ml final konsantrasyon) eklenerek 1 gün inkübe edilmişlerdir.
- 6) Sitokalsin-B ile 1gün inkübasyondan sonra flaslara pasajlama prosedüründe tarif edildiği üzere tripsinlenerek önceden etiketlenmiş olan tüplere toplanmışlardır.
- 7) Tüpler +4 °C'de, 1000 rpm'de, 5 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant hücrelerin üzerinde yaklaşık 200 µl kalacak şekilde aspire edilmiştir.
- 8) Tüplere oda sıcaklığındaki taze hazırlanmış hipotonik (0,075 M KCl) çözeltisinden 5 ml eklenerek ~3 dk süresince hücrelerin şişmesi için beklenmiştir.
- 9) Bu süre sonunda tüpler +4 °C'de, 1000 rpm'de, 5 dk santrifüjlendikten sonra hipotonik uzaklaştırılmış ve hücrelerin üzerine yavaşca taze hazırlanmış karnoy fiksatif (3:1 metanol: glasiyel asetik asit) 5 ml oluncaya kadar eklenmiştir.
- 10) Fiksasyon işlemi arka arkaya 2 kez tekrarlandıktan sonra hücreler önceden temizlenmiş lam üzerine yayılarak kurumaya bırakılmışlardır.
- 11) Kuruyan lamın üzerine % 5'lik giemsa boyası ile 15 dk boyandıktan sonra lamın sudan geçirilmiş ve analiz zamanına kadar kurutulmuş olarak saklanmışlardır.
- 12) Hazırlanan preparatlarda mikronükleus taşıyan binükleuslu hücre frekansının yanı sıra tek, çift, üçlü ve dördü nükleus taşıyan hücrelerin sayıları kaydedilmiştir.

Her bir grup için preparatlardan 2000 hücre sayılarak, bu hücreler arasından mikronükleus taşıyan çift nükleuslu hücre frekansları yanında, bir (MI), iki (MII) üç (MIII) ve dört (MIV) nükleus taşıyan hücrelerin sayısı da kaydedilmiştir.

Klonojenik sitotoksisite testi yanında, sitokinez bloke mikronükleus testinde sitokalsin-B uygulaması nedeniyle birikim gösteren çok çekirdekli hücrelerin sayısındaki değişimler incelenerek de sitotoksisite hakkında bilgi sahibi olunabilmektedir. Çekirdek bölünme indeksi (ÇBİ) olarak da adlandırılan ve aşağıdaki formüle göre hesaplanan bu değer bize kimyasal veya fiziksel bir maddenin sitotoksik etkisini göstermede önemli bilgiler sağlar (Kirsh-Volders ve ark. 2003).

$$\text{ÇBİ} = (\text{MI} + 2 \times \text{MII} + 3 \times \text{MIII} + 4 \times \text{MIV}) / \text{N} ; \text{N} = \text{MI} + \text{MII} + \text{MIII} + \text{MIV}$$

Bu çalışmada da farklı doz grupları için ÇBİ değerleri toplam 1000 hücre üzerinden hesaplanmış ve ikincil sitotoksisite verileri elde edilmiştir.

3.8. γ -H2AX Fokus Testi

Fullerenol ve radyasyona maruz bırakılan A549 hücrelerindeki DNA çift iplik kırıklarının tespiti amacıyla kullanılan γ -H2AX fokus testi 8 kuyucuklu kültür lamaları içerisinde gerçekleştirilmiştir (Watters ve ark. 2009). Fokusların sayılması işlemi ise Foci Counter 1.0 (Anna Jucha) yazılımı kullanılarak bilgisayar aracılığı ile gerçekleştirilmiştir.

γ -H2AX testinde kullanılacak olan kimyasallar deneyden önce taze olarak aşağıda belirtildiği şekilde hazırlanmıştır.

% 4 Paraformaldehit

200 mg paraformaldehit 5 ml distile suda ısıtıcılı manyetik karıştırıcıda çözülmüştür.

% 1 BSA

100 mg BSA tartılarak 10 ml distile suda çözülmüştür.

% 0.2'lik Triton X-100

9,98 ml DPBS üzerine 20 µl Triton X-100 eklenmiştir.

Primer Antikor

1/500 primer antikor: 1,3 ml BSA üzerine 4 µl primer antikor eklenmiştir.

Sekonder Antikor

1/500 sekonder antikor: 1,3 ml BSA üzerine 4 µl sekonder antikor eklenmiştir.

γ -H2AX test prosedürü şu şekildedir (Watters ve ark. 2009):

- 1) Yaklaşık 25 pasaj sayısına sahip olan A549 hücreleri pasajlama prosedüründe anlatıldığı üzere tripsinleme yolu ile 15 ml'lik steril tüplere toplanmışlardır.
- 2) Hücre süspansiyonundan sayım yapılarak tüpteki toplam hücre sayısı belirlendikten sonra γ -H2AX testi için kullanılacak olan 8 kuyucuklu kültür lamalarına 8.000 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekim yapılmış ve 750 µl besiyeri eklenmiştir.
- 3) İnkübasyon süresi sonunda hücreler ilgili ajanlarla 24 saat maruz bırakılmışlardır.
- 4) 24 saatlik uygulama süresi sonunda kuyucukların içindeki besiyeri aspire edilerek uzaklaştırıldıktan sonra hücreler 300 µl PBS/kuyucuk ile 2 kez yıkanmışlardır.
- 5) PBS uzaklaştırıldıktan sonra kuyucuklara direkt 100'er µl taze hazırlanmış % 4'lük paraformaldehit eklenerek oda sıcaklığında 10 dk fiksasyon işlemi yapılmıştır.
- 6) Hücreler daha sonra 3 kez, 300 µl PBS ile yıkandıktan sonra kuyucuklara 100'er µl % 0,2 Triton X-100 eklenir ve oda sıcaklığında 10 dk inkübe edilerek hücreler permeabilize hale getirilir.
- 7) Hücreler tekrar 3 kez PBS ile yıkandıktan sonra kuyucuklara 100'er µl % 1'lik BSA eklenmiş ve oda sıcaklığında 20 dk bekletilmiştir.

- 8) Bu süre sonunda BSA uzaklaştırıldıktan sonra her kuyucuğa %1'lik BSA ile 1/500 oranında seyreltilmiş olan primer monoklonal anti-fosfo histon H2AX antikorundan 100'er µl eklenmiş ve oda sıcaklığında 1,5 saat süresince inkübe edilmiştir.
- 9) İnkübasyondan sonra hücreler tekrar 3 kez PBS ile yıkanmış ve bu kez kuyucuklara % 1'lik BSA içerisinde 1/500 oranında seyreltilmiş Alexa-Fluor 488 işaretli sekonder antikor eklendikten sonra ile oda sıcaklığında ve karanlıkta 1 gece boyunca inkübasyona bırakılmıştır.
- 10) Bu süre sonunda PBS ile tekrar yıkama yapıldıktan sonra kuyucuklar çıkarılmış ve lamdaki hücreler antifade/DAPI ile boyandıktan sonra kapatılarak saklanmışlardır.
- 11) Preparatlar fluresoan mikroskopta DAPI filtresi ile incelenmişlerdir. FITC filtresi kullanılarak hücreler fotoğraflanmıştır.
- 12) Fotoğraflanarak seçilen her bir çekirdekteki sinyal/fokus sayıları foci counter yazılımı kullanılarak belirlenmiş ve ardından ortalama fokus/hücre sayısı hesaplanmıştır.
- 13) Her bir doz grubu için 50+50 olmak üzere 100 hücre analiz edilmiş ve deneyler en az iki kez olmak üzere tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

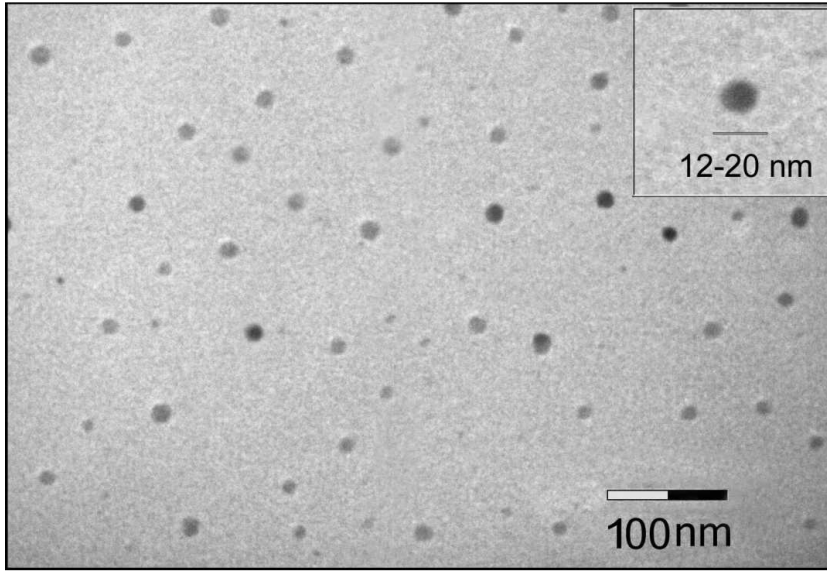
3.9. İstatistik Analizler

Klonojenik sitotoksisite verileri Kruskal-Wallis testi kullanılarak analiz edilmişlerdir. Normal dağılım gösterdiği belirlenen Mikronükleus ve γ -H2AX testlerinden elde edilen verilerin karşılaştırılması için parametrik testler kullanılmıştır. Varyans analizi ANOVA'yı takiben LSD (Least significant difference) testi kullanılarak karşılaştırılmışlardır. Doza bağımlı yanıtların karşılaştırılmasında ise regresyon analizi kullanılmıştır. Tüm istatistik analizler SPSS 11 yazılımı kullanılarak bilgisayarda gerçekleştirilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Fullerenol Karakterizasyonu

Fullerenol karakterizasyonu transmisyon elektron mikroskopi, zeta potansiyel ve DLS analizleri ile gerçekleştirilmiştir. Hazırlanmış olduğumuz fullerenol çözeltisinin zeta potansiyeli değeri -30 mV olarak belirlenmiştir. Bu değer çözeltimizin stabil olduğunu göstermektedir. DLS ve TEM analizlerinden elde edilen bulgular ise partikül boyutlarının 100 nm'den küçük olduğunu göstermiştir. Ortalama fullerenol nanopartikül boyutu 35 ± 15 nm olarak belirlenmiştir. TEM ile çekilmiş olan ve homojen partikül dağılımını gösteren fotoğraf Şekil 4.1'de gösterilmiştir.

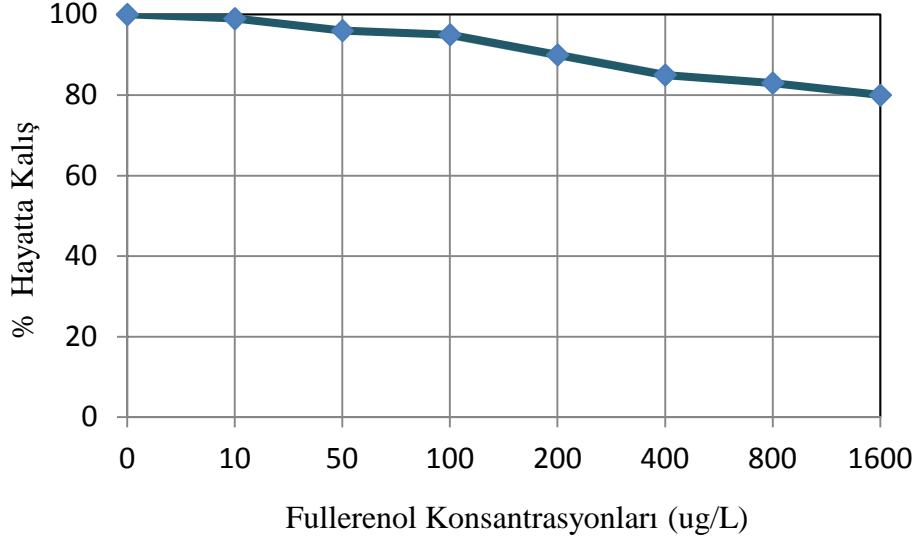


Şekil 4.1. Suda çözülmüş $C_{60}OH_{(18-22)}$ fullerenol nanopartiküllerinin TEM (Transmisyon Elektron Mikroskobik) görüntüleri (x135.000)

4.2. Fullerenolün % Hayatta Kalış (Canlılık) Oranına Etkisi

Tez çalışmamızda kullanılacak fullerenol konsantrasyonlarının belirlenmesi amacıyla A549 hücreleri 10, 50, 100, 200, 400, 800 ve 1600 $\mu\text{g/L}$ konsantrasyonlarındaki fullerenol nanopartiküllerine maruz bırakılarak klonojenik test uygulanmıştır.

Elde edilen sonuçlara göre test gruplarının % hayatta kalış oranları Şekil 4.2’de gösterilmiştir.



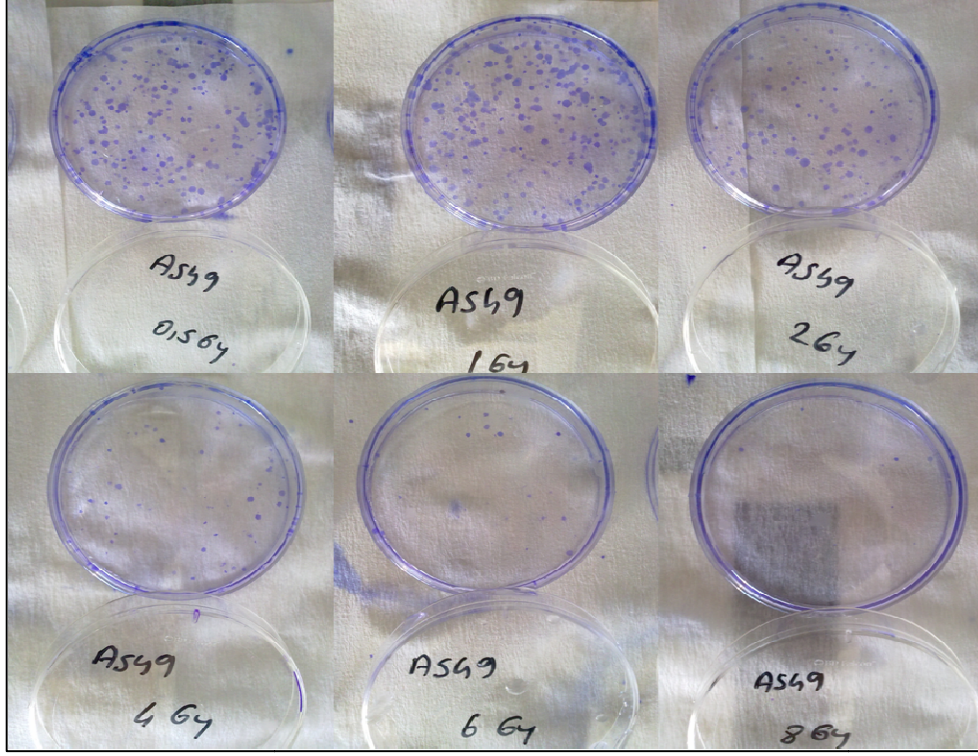
Şekil 4.2. Çeşitli konsantrasyonlarda fullerenol’e maruz bırakılan A549 hücrelerinde klonojenik test ile belirlenen % hayata kalış oranları

Şekil 4.2’de görüldüğü üzere maksimum fullerenol konsantrasyonu olan 1600 $\mu\text{g/L}$, canlılığı % 80’e, 800 $\mu\text{g/L}$ ’lik fullerenol dozu ise canlılığı % 83’e düşürmüştür. 10 ve 50 $\mu\text{g/L}$ ’lik fullerenol konsantrasyonlarında % 95’in üzerinde hayatta kalış gözlenmiştir. 100, 200 ve 400 $\mu\text{g/L}$ ’lik fullerenol konsantrasyonlarında sırasıyla % 95, % 90 ve % 85 hayatta kalış gözlenmiştir. Çalışmamızda esas olarak seçilmesi gereken düşük sitotoksik konsantrasyonların % 75 ve üzeri canlılık göstermesi gerekmektedir. Bu anlamda, 800 ve 1600 $\mu\text{g/L}$ ’lik fullerenol konsantrasyonları, doğada bir canlının maruz kalabileceğinden çok daha fazla fullerenol içermektedir. 10 ve 50 $\mu\text{g/L}$ ’lik fullerenol konsantrasyonlarında ise % 95’in üzerinde hayatta kalış gözlendiği için anlamlı bir sitotoksik etki görülmemiştir. Dolayısıyla genotoksisite testlerimizde kullanılacak fullerenol konsantrasyonları 100, 200 ve 400 $\mu\text{g/L}$ olarak belirlenmiştir.

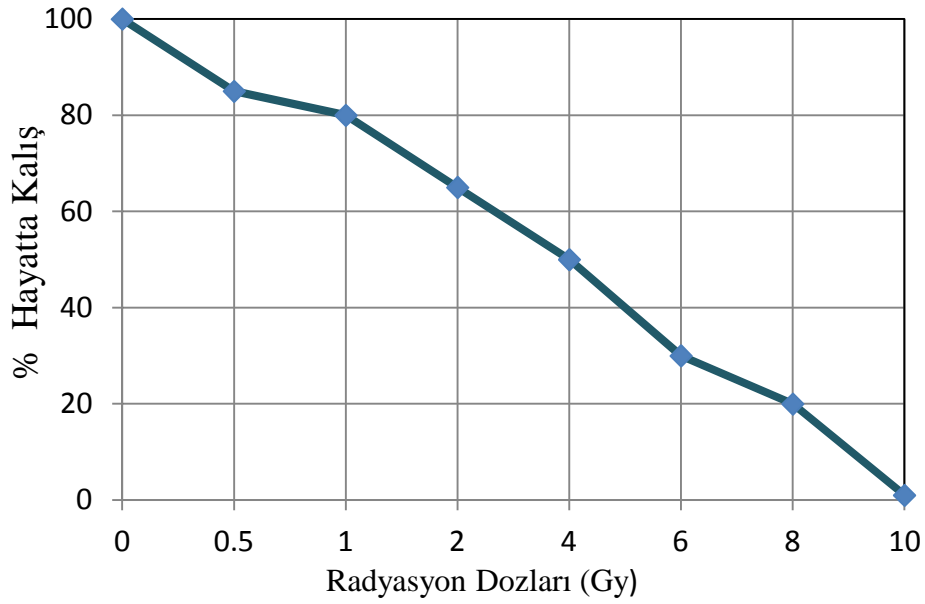
4.3. Radyasyonun % Hayatta Kalış Oranına Etkisi

Tez çalışmamızda kullanılacak radyasyon dozlarının belirlenmesi amacıyla A549 hücreleri 0,5, 1, 2, 4, 6, 8 ve 10 Gy radyasyona maruz bırakılarak klonojenik test

uygulanmıştır (Şekil 4.3). Elde edilen sonuçlara göre test gruplarının % hayatta kalış oranları Şekil 4.4’de gösterilmiştir.



Şekil 4.3. Radyasyona maruz bırakılan A549 hücrelerinde koloni oluşumları

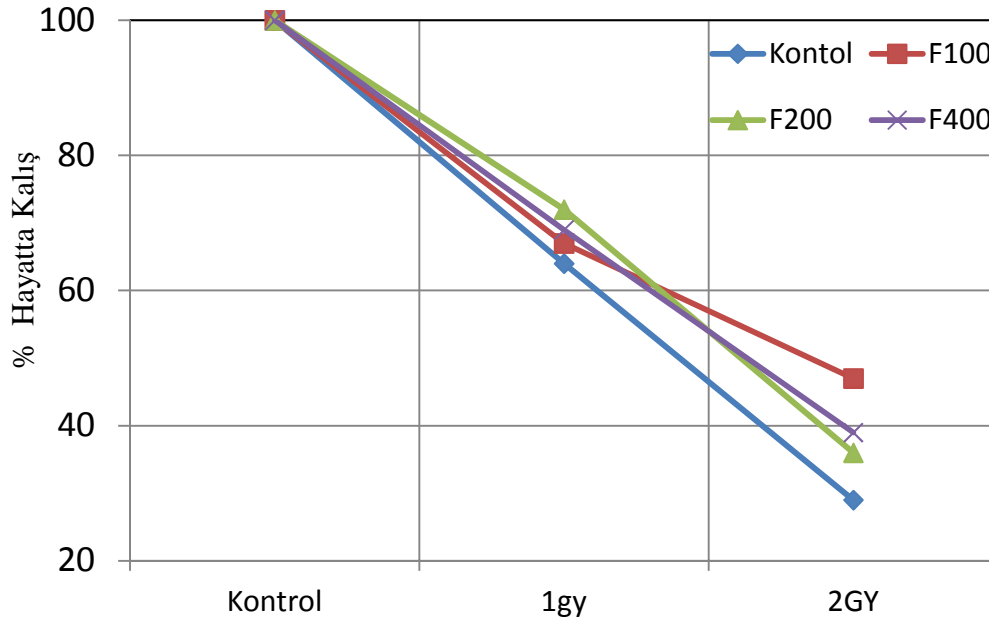


Şekil 4.4. Çeşitli dozlarda radyasyona maruz bırakılan A549 hücrelerinde klonojenik test ile belirlenen % hayatta kalış oranları

Şekil 4.4'de görüldüğü üzere 4 Gy ve üzerindeki radyasyon dozları canlılığı % 50'nin altına düşürmüştür, 10 Gy'de ışınlandırılan tüm hücreler ise ölmüştür. 0,5 Gy'de canlılık % 83'e, 1 Gy'de ise % 80'e inmiştir. 2 Gy'de ise canlılık % 65'e kadar düşmüştür. Radyasyonun neden olduğu sitotoksosite açısından 0,5 ile 1 Gy dozları arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Bu nedenle genotoksosite testlerimizde kullanılacak radyasyon dozları 1 ve 2 Gy olarak belirlenmiştir.

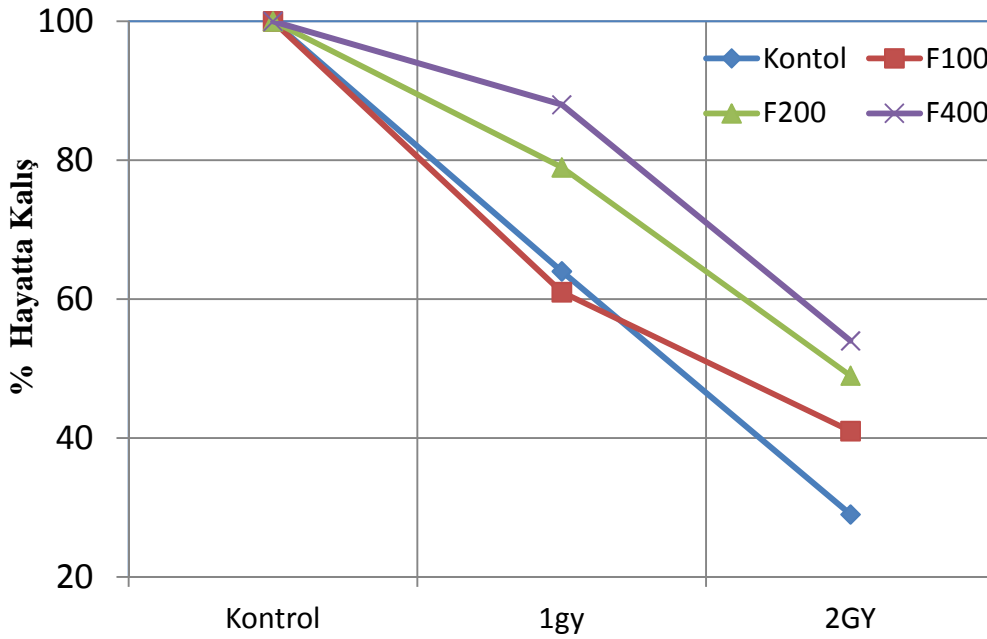
4.4. Fullerenol ve Radyasyon Kombine Uygulamalarının % Hayatta Kalış Oranına Etkisi

Kombine uygulamalarda, A549 hücreleri radyasyona maruz bırakılmadan 1 saat ve 24 saat önce fullerenolün 100, 200 ve 400 µg/L'lik konsantrasyonları ile muamele edilmiştir. Daha sonra hücreler tek başlarına ve kombine olarak 1 Gy ve 2 Gy radyasyona maruz bırakılmış ve klonojenik test prosedürü uygulanmıştır. Klonojenik test sonuçlarının değerlendirilmesiyle ortaya çıkan % hayatta kalış oranları Şekil 4.5 ve 4.6'de gösterilmiştir.



Şekil 4.5. Radyasyona maruz bırakmadan 1 saat önce çeşitli konsantrasyonlarda fullerenol ile muamele edilen A549 hücrelerinin % hayatta kalış oranları

Şekil 4.5'te görüldüğü gibi 1 Gy radyasyona maruz bırakılan Kontrol grubunda % 62 canlılık gözlenmiştir. Bununla birlikte, 1 Gy radyasyona maruz bırakılmadan 1 saat önce 100 µg/L'lik fulleranol ile muamele edilen gruptaki (F100) hücreler % 65'lik bir hayatta kalış sergilemişlerdir. Aynı şekilde 200 µg/L'lik fulleranol ile muamele edilen grupta (F200) bu canlılık oranı, Kontrol ve F100 grubuna göre artarak % 73'e kadar çıkmıştır. F400 grubundaki hücrelerin hayatta kalış oranı ise % 70'tir. 2 Gy radyasyona maruz bırakılan Kontrol grubundaki hayatta kalış oranı % 28'e kadar düşüş gösterirken F100 grubunda bu oran yaklaşık % 47'dir. F200 ve F400 gruplarında, % hayatta kalış oranları 2 Gy Kontrol grubuna göre artış göstermekle birlikte F100 grubunun sahip olduğu değere ulaşamamıştır. 2 Gy radyasyona maruz bırakılan F200 ve F400 gruplarının % hayatta kalış oranları sırasıyla % 36 ve % 39'dur.



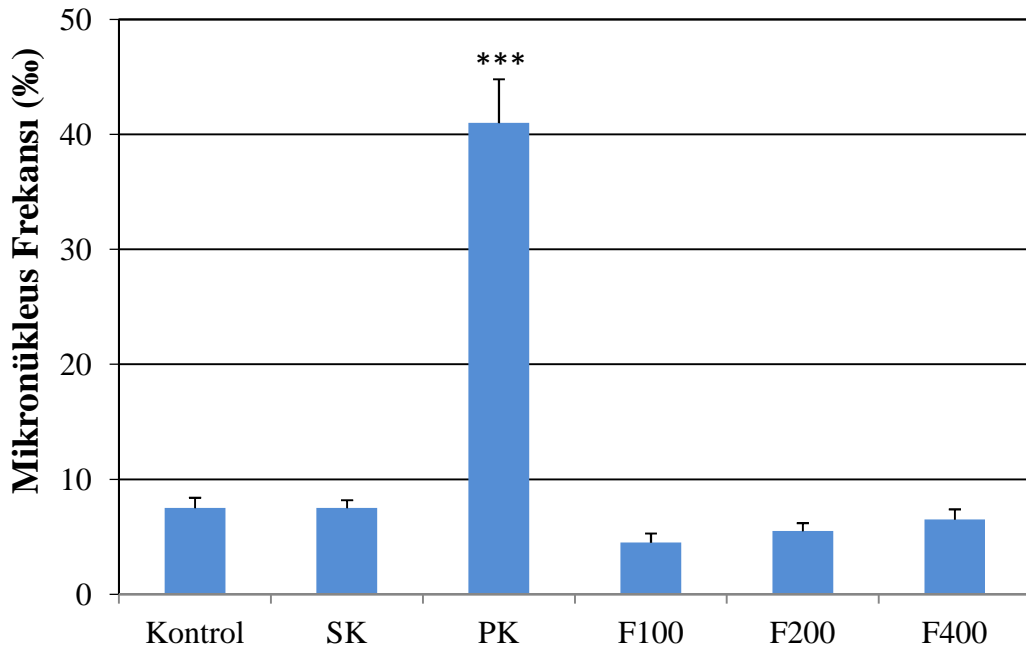
Şekil 4.6. Radyasyona maruz bırakmadan 24 saat önce çeşitli konsantrasyonlarda fulleranol ile muamele edilen A549 hücrelerinin % hayatta kalış oranları

Şekil 4.6'da, 1 Gy radyasyona maruz bırakılan Kontrol grubu % 63 canlılık gösterirken 1 Gy radyasyona maruz bırakılmadan 24 saat önce 100 µg/L'lik fulleranol ile muamele edilen grupta (F100) bu oran % 60'a kadar düşmüştür. 1 Gy radyasyona maruz bırakılan F200 ve F400 gruplarındaki canlılık, Kontrol ve F100 gruplarına göre artış göstermiştir. F200 grubunda % 80 ve F400 grubunda % 90 hayatta kalış gözlenmiştir. 2 Gy radyasyona maruz bırakılan gruplardan, Kontrol grubundaki canlılık % 30'a kadar

düşerken 24 saatlik fullerenol gruplarındaki canlılık Kontrol grubuna göre doza bağlı olarak artış göstermiştir. Hayatta kalış oranları F100 için % 42, F200 için % 50 ve F400 için % 55 olarak belirenmiştir. Regresyon analizi sonuçları fullerenol'ün 24 saatlik uygulamasının radyasyonun yol açtığı sitotoksik etkileri doza bağlı olarak azalttığını göstermiştir ($R^2=0,90$, $p<0,001$).

4.5. Fullerenolün Mikronükleus Oluşumu Üzerindeki Etkisi

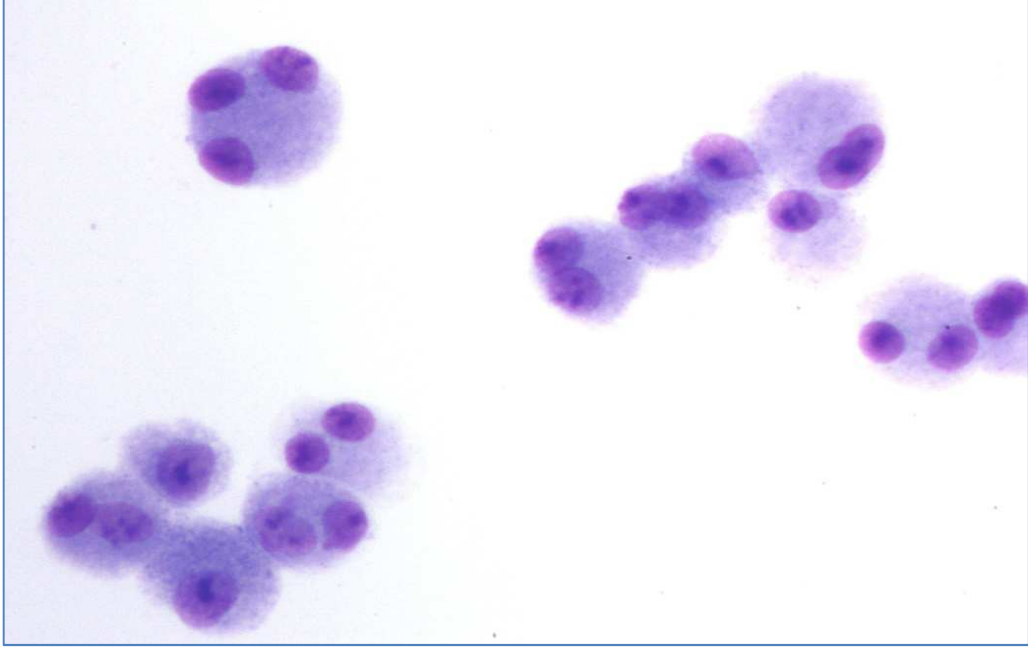
Tez çalışmamızda kullanılan fullerenol konsantrasyonlarının mikronükleus oluşumu üzerindeki etkisini araştırmak amacıyla A549 hücreleri 100, 200 ve 400 $\mu\text{g/L}$ fullerenole 24 saat süresince maruz bırakılmış ve MN testi prosedürü uygulanmıştır. Her test grubu için oluşan ‰ mikronükleus (MN) frekansı Şekil 4.7'de verilmiştir.



Şekil 4.7. Çeşitli konsantrasyonlarda fullerenole maruz bırakılan A549 hücrelerindeki mikronükleus frekansları (‰) (***) $p<0,001$)

Şekil 4.7'de, Kontrol ve Solvent Kontrol (SK) gruplarının MN frekansı ‰ 8 iken fullerenol gruplarının MN frekansları; F100 için ‰ 5, F200 için ‰ 6 ve F400 için ‰ 7 şeklindedir. Pozitif Kontrol (PK) grubu ise ‰ 41'lik MN frekansı ile $p<0,001$

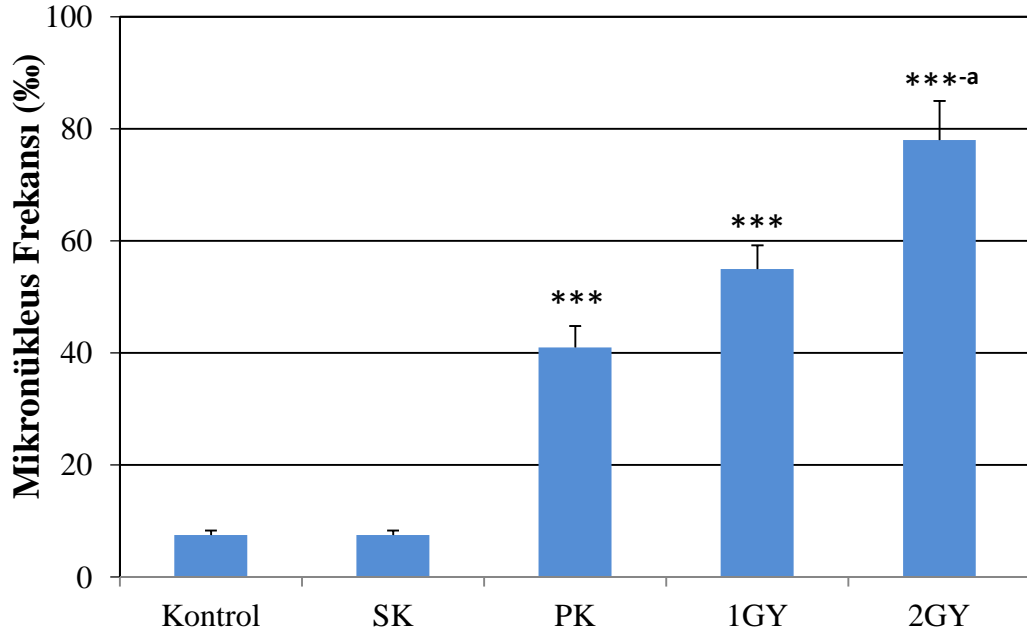
düzeyinde anlamlı bir artış göstermiştir. Hasarsız sitokinez bloke hücelere ait fotoğraf Şekil 4.8’de gösterilmiştir.



Şekil 4.8. Sitokinez bloke A549 hücrelerinin genel görüntüsü (Büyütme x400)

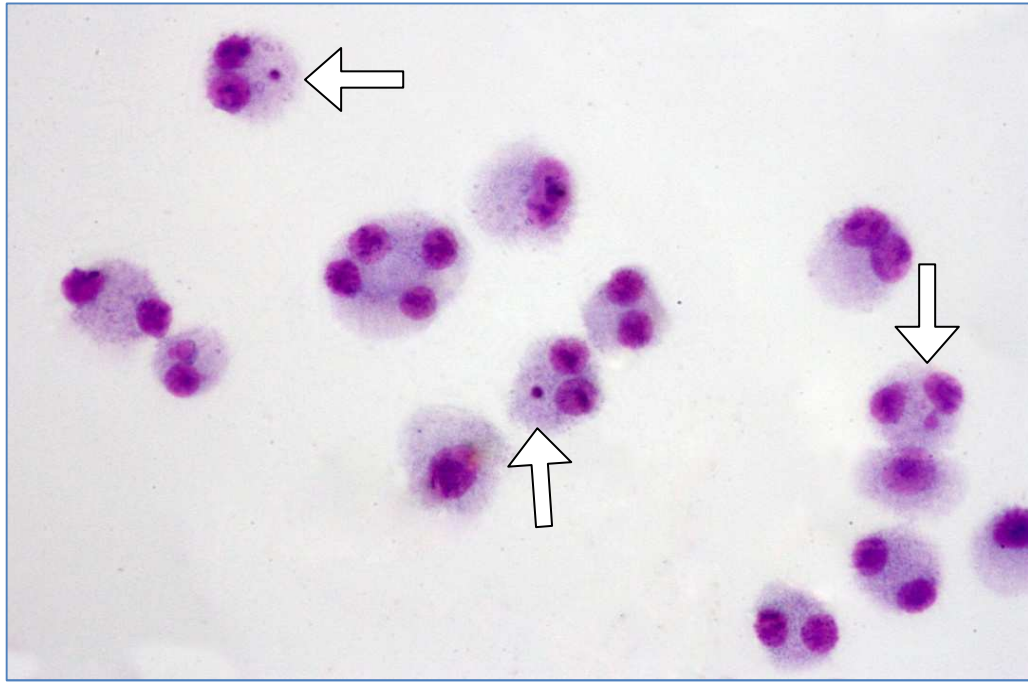
4.6. Radyasyonun Mikronükleus Oluşumu Üzerindeki Etkisi

Tez çalışmamızda kullanılacak radyasyon dozlarının mikronükleus oluşumu üzerindeki etkisini araştırmak amacıyla A549 hücreleri 1 Gy ve 2 Gy radyasyona maruz bırakılmıştır. MN testi ile yapılan incelemeler sonucunda her test grubu için oluşan % MN frekansı Şekil 4.9’da verilmiştir. Şekil 4.9’da, Kontrol ve SK gruplarının MN frekansı % 8 olarak görülmektedir. PK grubu ile 1 Gy ve 2 Gy radyasyon gruplarının MN frekansları, Kontrol ve SK gruplarına göre $p < 0,001$ düzeyinde anlamlı bir artış göstermiştir. PK grubunun MN frekansı % 41 iken bu değer 1 Gy radyasyon için % 55 ve 2 Gy radyasyon için % 78’dir.

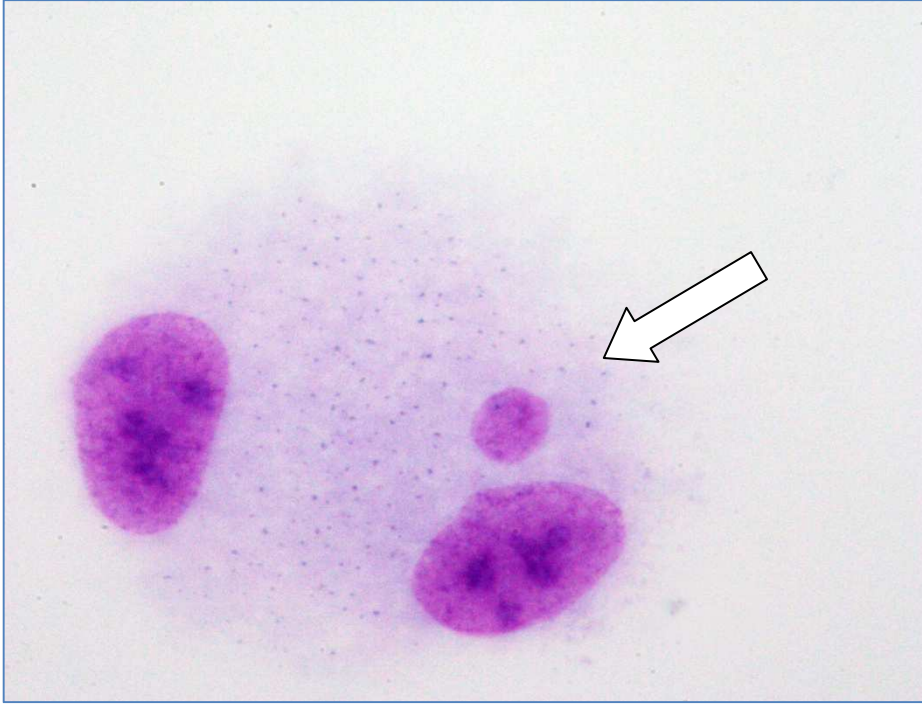


Şekil 4.9. Çeşitli dozlarda radyasyona maruz bırakılan A549 hücrelerindeki mikronükleus frekansları (%) (***)Kontrolle fark $p < 0,001$, ***-a 1 Gy'e fark $p < 0,05$)

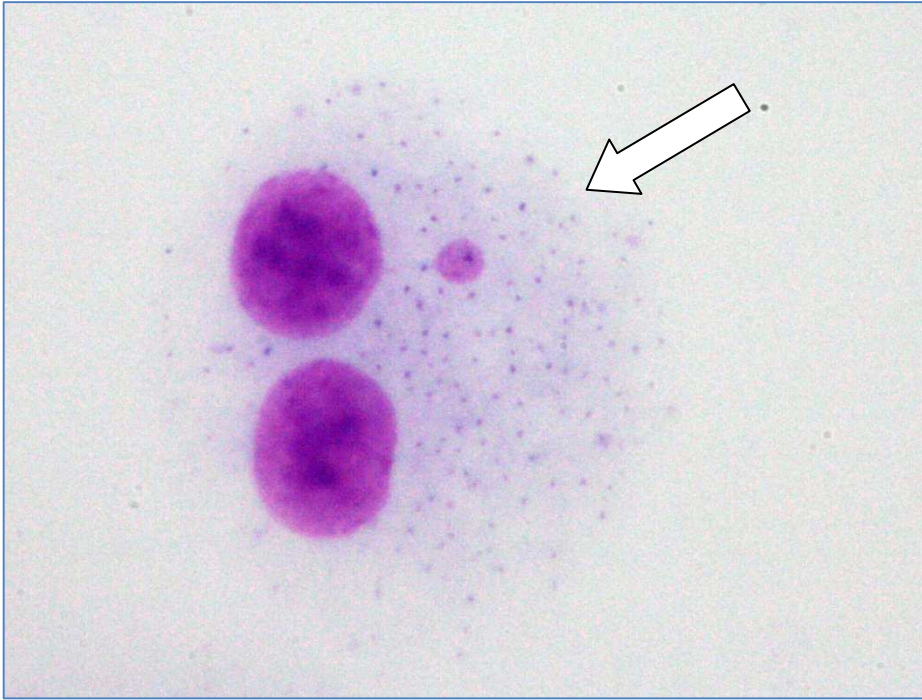
Radyasyona maruz bırakılan A549 hücrelerinde MN oluşumları Şekil 4.10, 4.11 ve 4.12'de gösterilmiştir.



Şekil 4.10. 2 Gy radyasyon grubunun sitokinez bloke A549 hücrelerinde MN oluşumları (Büyütme x400)



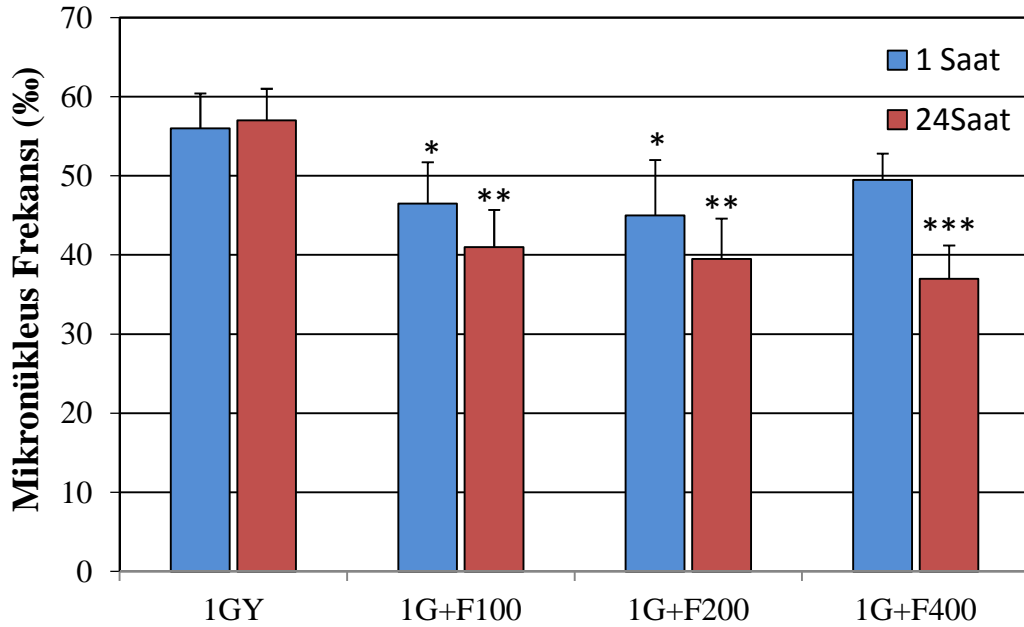
Şekil 4.11. Büyük bir MN içeren sitokinez bloke A549 hücresi (Büyütme x1.200)



Şekil 4.12. Orta boy MN içeren sitokinez bloke A549 hücresi (Büyütme x1.200)

4.7. Fullerenol ve Radyasyon Kombine Uygulamalarının Mikronükleus Oluşumu Üzerindeki Etkisi

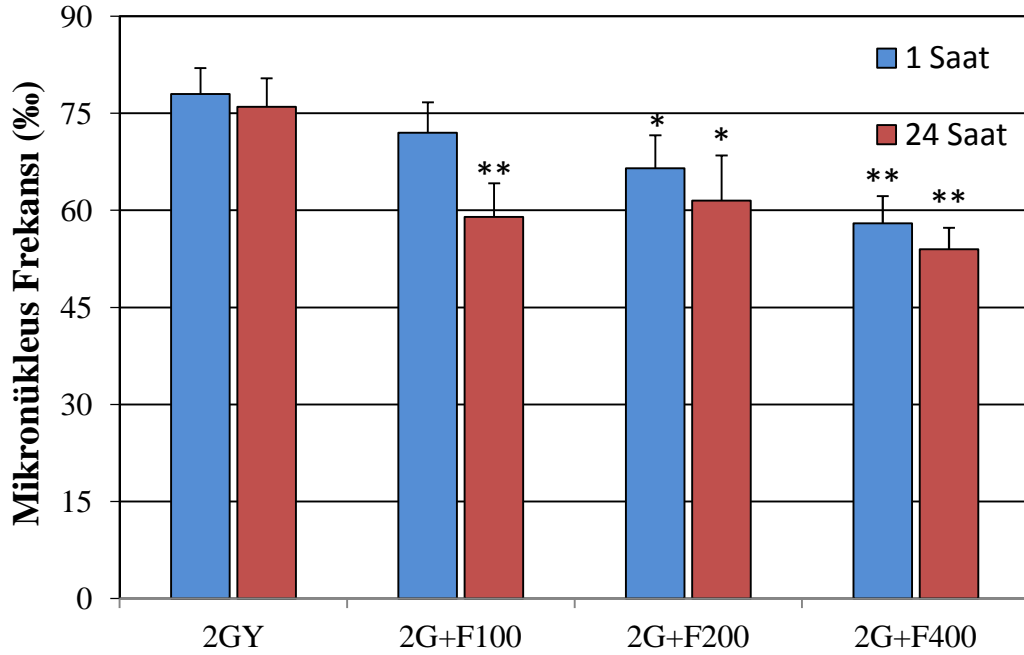
Fullerenol ve radyasyon kombine uygulamalarının mikronükleus oluşumu üzerindeki etkisinin araştırılması amacıyla A549 hücreleri, 100, 200 ve 400 µg/L'lik fullerenol konsantrasyonları ile radyasyona maruz bırakma işleminden 1 saat ve 24 saat önce dozlanmıştır. Daha sonra hücreler tek başlarına ve kombine olarak 1 Gy ve 2 Gy radyasyona maruz bırakılmış ve MN test prosedürü uygulanmıştır. MN testi sonuçlarının değerlendirilmesiyle her test grubu için ortaya çıkan % MN frekansları Şekil 4.13 ve 4.14'te gösterilmiştir.



Şekil 4.13. 1 Gy radyasyon uygulamasından 1 saat ve 24 saat önce fullerenol'e maruz bırakılan A549 hücrelerindeki mikronükleus frekansları (%) (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001)

Şekil 4.13'te, 1 Gy radyasyon grubunun MN frekansı % 56 olarak görülmektedir. 1 Gy radyasyona maruz bırakılan fullerenol gruplarından; 1 saatlik F100 grubunun MN frekansı p<0,05 düzeyinde anlamlı bir azalma göstererek % 47'ye ve 24 saatlik F100 grubunun MN frekansı ise p<0,01 düzeyinde anlamlı bir azalma göstererek % 41'e düşmüştür. 1 saatlik F200 grubunun MN frekansı % 45'e düşerken bu düşüş, p<0,05 düzeyinde anlamlıdır. 24 saatlik F200 grubunun MN frekansı p<0,01 düzeyinde anlamlı

bir azalma göstererek % 39'a düşmüştür. 1 saatlik F400 grubunun MN frekansı % 49 olmakla birlikte 1 Gy radyasyon grubuna göre gözlenen bu düşüş anlamlı değildir. 24 saatlik F400 grubunun MN frekansı $p<0,001$ düzeyinde anlamlı bir azalma göstererek % 37'ye düşmüştür.

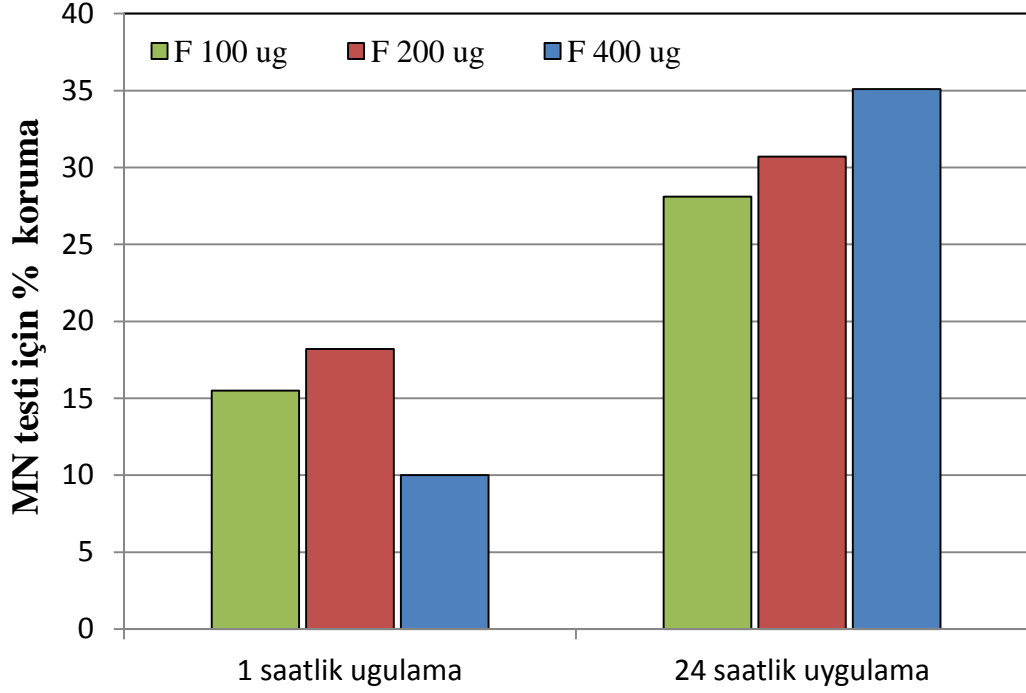


Şekil 4.14. 2 Gy radyasyon uygulamasından 1 saat ve 24 saat önce fullerenol'e maruz bırakılan A549 hücrelerindeki mikronükleus frekansları (%) (* $p<0,05$, ** $p<0,01$)

Şekil 4.14'te, 2 Gy radyasyon grubunun MN frekansı % 76 olarak görülmektedir. 2 Gy radyasyona maruz bırakılan fullerenol gruplarından; 1 saatlik F100 grubunun MN frekansı % 67 olmakla birlikte 2 Gy radyasyon grubuna göre gözlenen bu düşüş anlamlı değildir. 24 saatlik F100 grubunun MN frekansı % 59'a düşmüştür ve bu azalma $p<0,01$ düzeyinde anlamlıdır. 1 saatlik F200 grubunun MN frekansı $p<0,05$ düzeyinde anlamlı bir azalma göstererek % 64'e, 24 saatlik F200 grubunun MN frekansı ise yine $p<0,05$ düzeyindeki anlamlı bir azalma ile % 61'e düşmüştür. 1 saatlik F400 grubunun MN frekansı % 58'e, 24 saatlik F400 grubunun MN frekansı ise % 56'ya düşmüştür ve bu azalmalar $p<0,01$ düzeyinde anlamlıdır.

Fullerenol ve radyasyon kombine uygulamalarının radyasyon dozlarına göre MN frekansında anlamlı azalmalara neden olması fullerenol konsantrasyonlarının

radasyona karşı gösterdiği koruyucu etki olarak değerlendirilmiştir. 1 saatlik ve 24 saatlik kombine uygulamaların 1 Gy ve 2 Gy radasyona karşı gösterdiği % koruma oranları Şekil 4.15 ve 4.16'da verilmiştir.

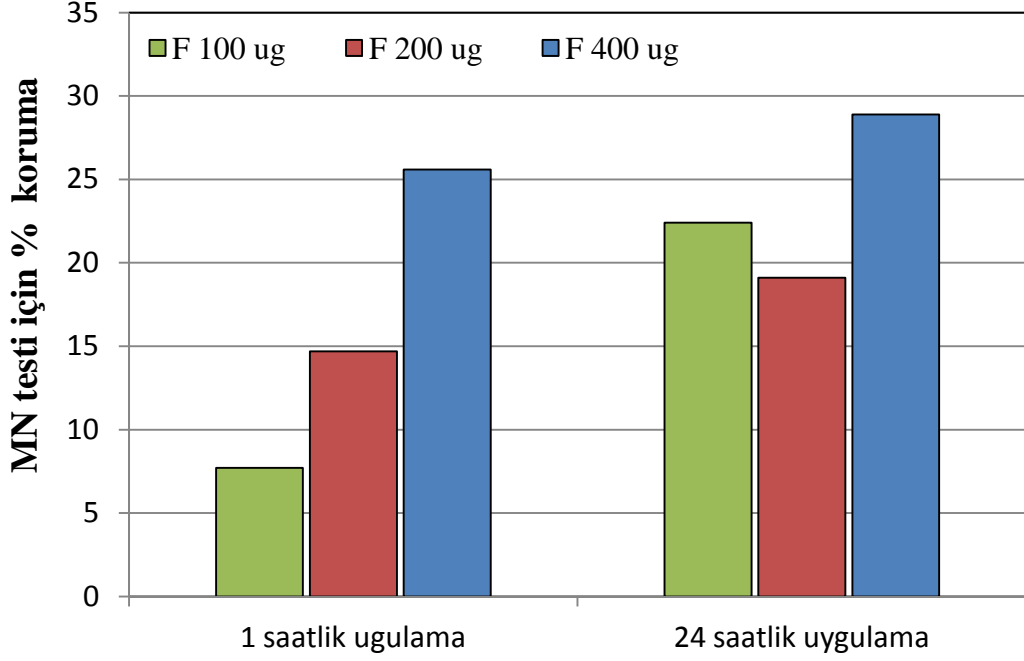


Şekil 4.15. 1 saat ve 24 saat süresince fullerenol'e maruz bırakılan A549 hücrelerinde 1 Gy radasyona karşı sağlanan % koruma oranları

Şekil 4.15'te, 1 Gy radasyona maruz bırakılan 1 saatlik fulleren gruplarından; F100 grubu % 15, F200 grubu % 18 ve F400 grubu % 10 oranında radasyona karşı koruma sağlamıştır. 24 saatlik fulleren gruplarından; F100 grubu % 27, F200 grubu % 31 ve F400 grubu ise % 35 oranında radasyona karşı koruma sağlamıştır. Regresyon analizi sonuçları fullerenol'ün 24 saatlik uygulamasının 1 Gy radyasyonun yol açtığı genetik hasar oranını doza bağlı olarak azalttığını göstermiştir ($R^2 = 0,92$, $p < 0,001$).

Şekil 4.16'da 2 Gy radasyona maruz bırakılan 1 saatlik fulleren gruplarından; F100 grubu % 7, F200 grubu % 15 ve F400 grubu % 25 oranında radasyona karşı koruma sağlamıştır. 24 saatlik fulleren gruplarından; F100 grubu % 22, F200 grubu % 19 ve F400 grubu ise % 28 oranında radasyona karşı koruma sağlamıştır.

Regresyon analizi sonuçları fullerenol'ün 1 saatlik ($R^2 = 0,92$, $p < 0,001$) ve 24 saatlik ($R^2 = 0,88$, $p < 0,01$) uygulamalarının 2 Gy radyasyonun yol açtığı genetik hasar oranını doza bağlı olarak azalttığını göstermiştir.



Şekil 4.16. 1 saat ve 24 saat süresince fullerenol'e maruz bırakılan A549 hücrelerinde 2 Gy radyasyona karşı sağlanan % koruma oranları

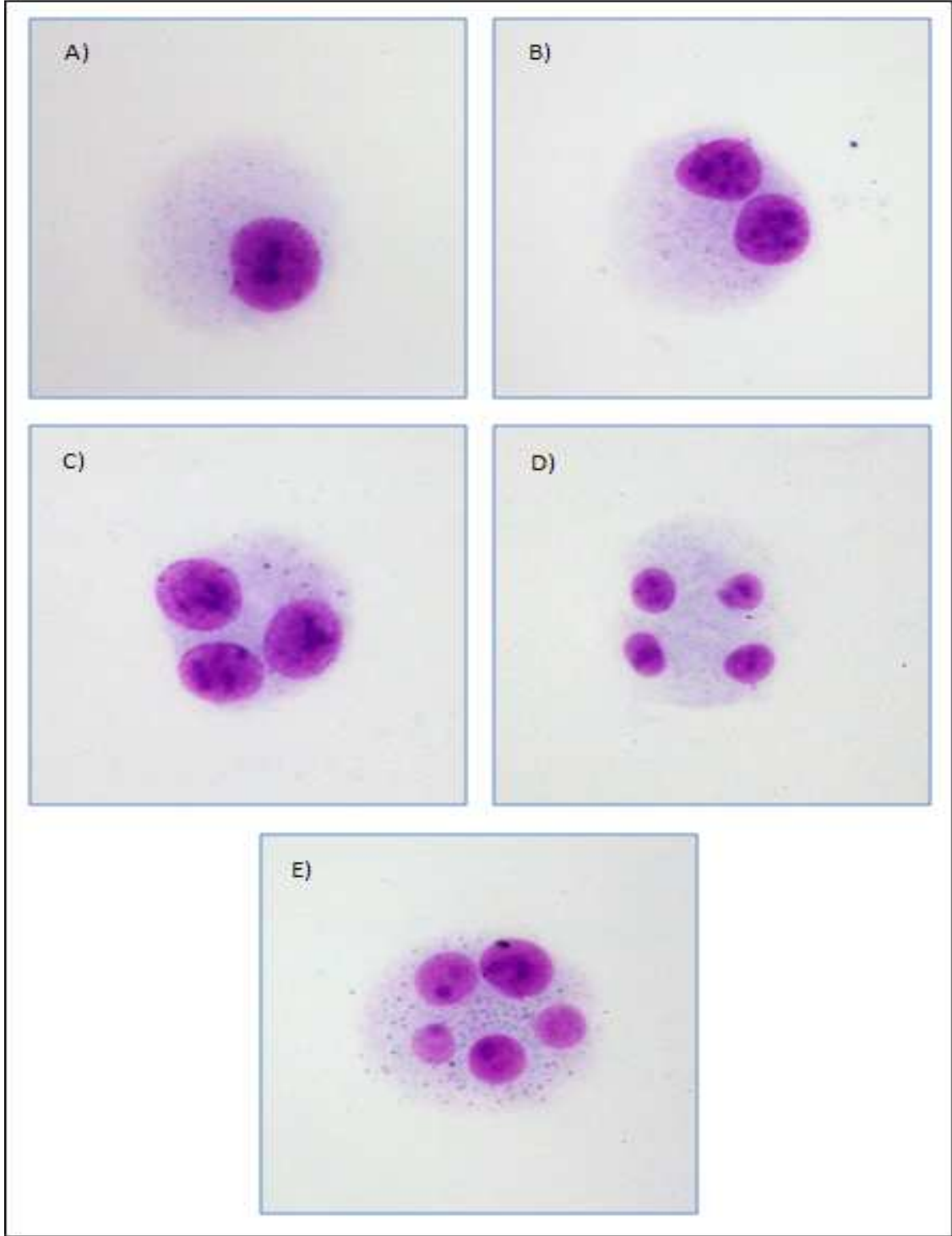
4.8. Fullerenolün Çekirdek Bölünme İndeksi (ÇBİ) Üzerindeki Etkisi

Çalışmamızda kullanılan fullerenol konsantrasyonlarının herhangi bir sitotoksik etkisinin olup olmadığını belirlemek amacıyla, MN testi sonucunda aşağıdaki formüle göre ÇBİ değerleri hesaplanmıştır.

$$\text{ÇBİ} = (\text{MI} + 2 \times \text{MII} + 3 \times \text{MIII} + 4 \times \text{MIV}) / \text{N} ; \text{N} = \text{MI} + \text{MII} + \text{MIII} + \text{MIV}$$

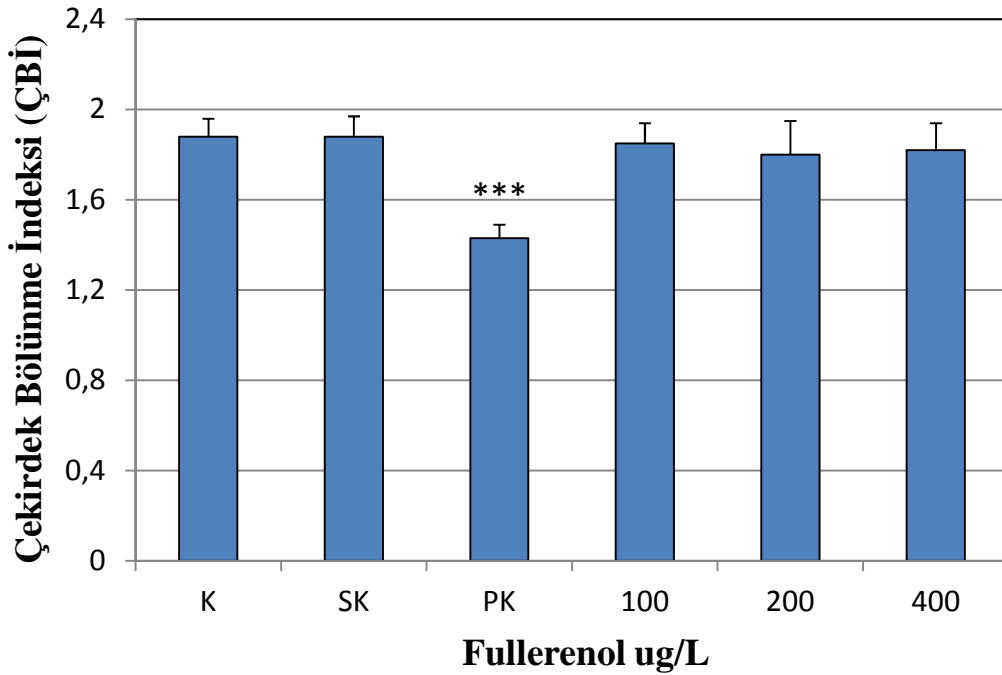
(MI: Mononükleuslu hücrelerin sayısı, MII: Binükleuslu hücrelerin sayısı
MIII: Trinükleuslu hücrelerin sayısı, MIV: Tetranükleuslu hücrelerin sayısı)

Hesaplama göz önüne alınan çoklu çekirdek yapıları ise Şekil 4.17'de gösterilmiştir.



Şekil 4.17. Sitokalasin-B ile muamele edilmiş A549 hücrelerinde çeşitli nükleus formasyonları. A) Mononükleat, B) Binükleat, C) Trinükleat, D) Tetranükleat ve E) Pentanükleat hücreler (Büyütme x1.000)

100, 200 ve 400 $\mu\text{g/L}$ fullerenol ile 24 saat süresince muamele edilen test gruplarının ÇBİ değerleri Şekil 4.18’de verilmiştir.

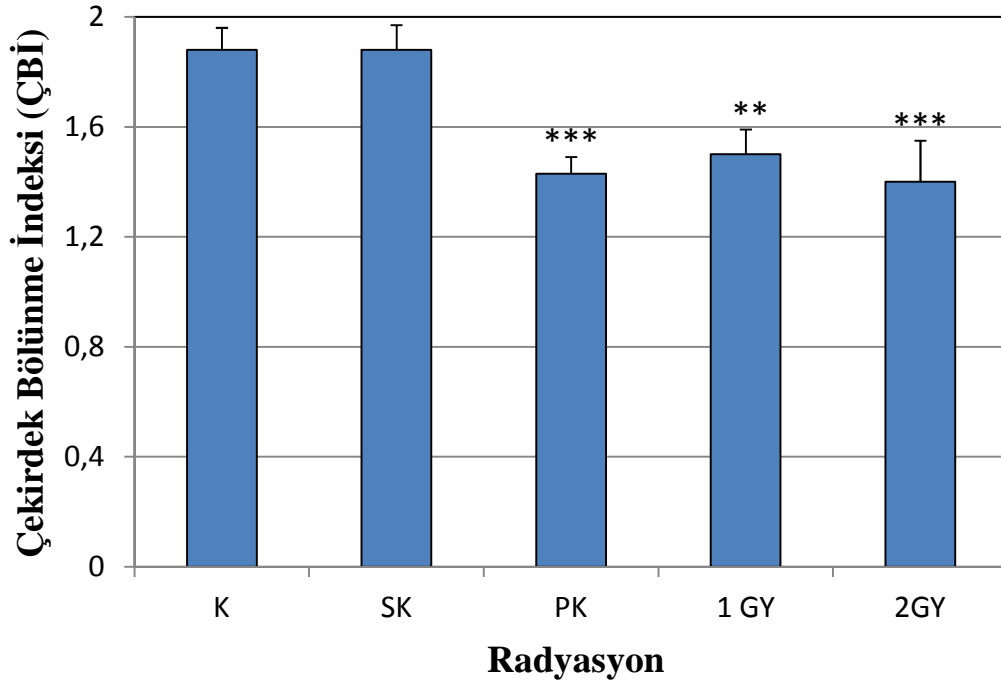


Şekil 4.18. Fullereneol'e maruz bırakılan A549 hücrelerinde ÇBİ değerleri (***p<0,001)

Şekil 4.18'de görüldüğü üzere Kontrol ve Solvent Kontrol gruplarının ÇBİ değeri aynı olup 1,9 olarak belirlenmiştir. PK grubunun ÇBİ değeri kontrol grubuna göre p<0,001 düzeyinde anlamlı bir azalma göstererek 1,4'e düşmüştür. Fullereneol gruplarının ÇBİ değerleri sırasıyla; F100 için 1,9, F200 ve F400 için 1,8 olup kontrol grubuna göre anlamlı bir düşüş göstermemiştir.

4.9. Radyasyonun Çekirdek Bölünme İndeksi Üzerindeki Etkisi

Çalışmamızda kullanılan radyasyon dozlarının klonojenik test ile belirlenmiş sitotoksik etkilerini doğrulamak amacıyla, MN testi sonucunda ÇBİ değerleri hesaplanmıştır. 1 Gy ve 2 Gy radyasyona maruz bırakılan test gruplarının ÇBİ değerleri Şekil 4.19'da verilmiştir. Şekil 4.19'da görüldüğü üzere Kontrol ve SK gruplarının ÇBİ değeri aynı olup 1,9 olarak belirlenmiştir. PK grubunun ÇBİ değeri kontrol grubuna göre p<0,001 düzeyinde anlamlı bir azalma göstererek 1,4'e düşmüştür. 1 Gy radyasyon grubunun ÇBİ değeri p<0,01 düzeyinde anlamlı bir azalma ile 1,5'e ve 2 Gy radyasyon grubunun ÇBİ değeri p<0,001 düzeyinde anlamlı bir azalma ile 1,4'e düşmüştür.



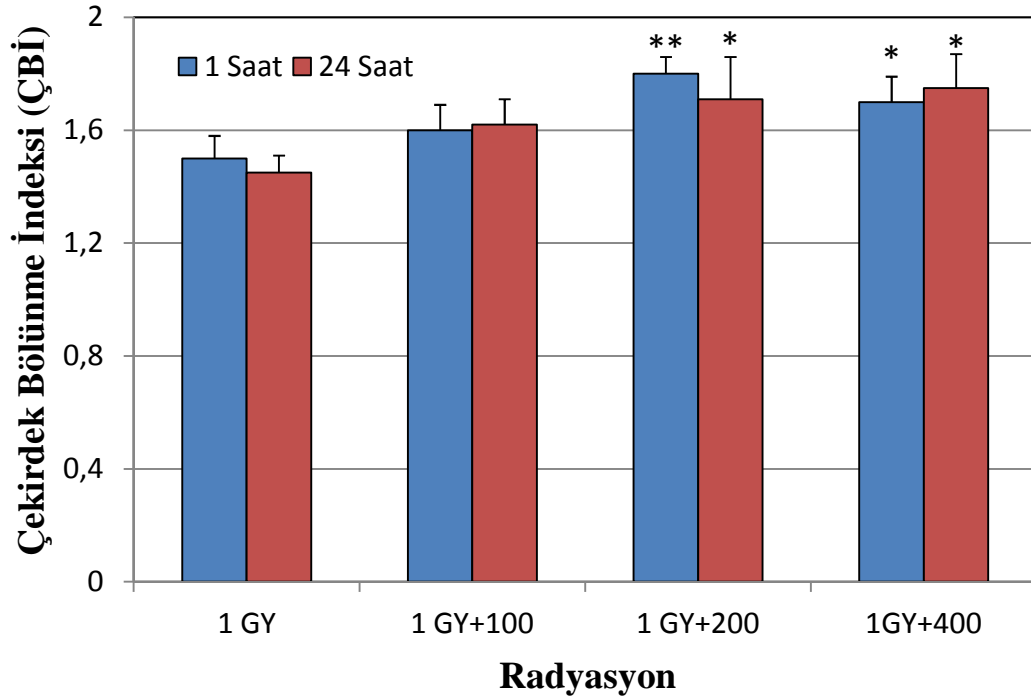
Şekil 4.19. Radyasyona maruz bırakılan A549 hücrelerinde ÇBİ değerleri (**p< 0,01, ***p<0,001)

4.10. Fullerenol ve Radyasyon Kombine Uygulamalarının Çekirdek Bölünme İndeksi Üzerindeki Etkisi

Fullerenol ve radyasyon kombine uygulamalarının ÇBİ üzerindeki etkisinin araştırılması amacıyla A549 hücreleri radyasyona maruz bırakılmadan 1 saat ve 24 saat önce 100, 200 ve 400 µg/L'lik fullerenol konsantrasyonları ile muamele edilmiştir. Daha sonra hücreler tek başlarına ve kombine olarak 1 Gy ve 2 Gy radyasyona maruz bırakılmış ve MN test prosedürü uygulanmıştır. MN testi sonuçlarının değerlendirilmesiyle ortaya çıkan ÇBİ değerleri Şekil 4.20 ve 4.21'de gösterilmiştir.

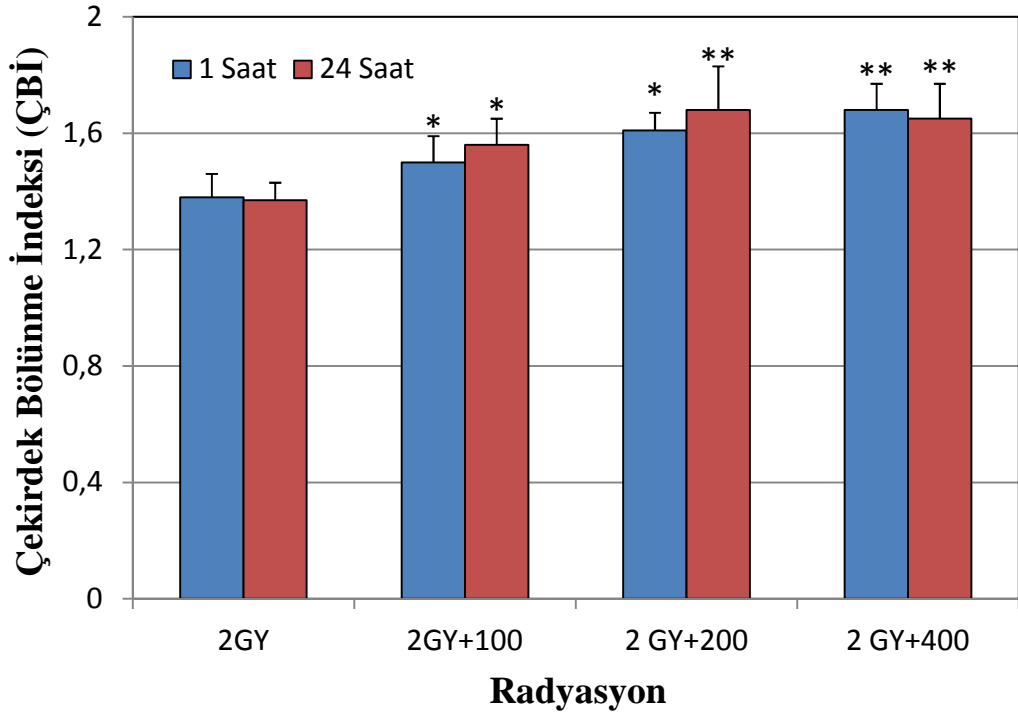
Şekil 4.20'te 1 Gy radyasyon grubunun ÇBİ değeri 1,5 olarak görülmektedir. 1 Gy radyasyona maruz bırakılan 1 saatlik ve 24 saatlik F100 gruplarının ÇBİ değerlerinde 1 Gy radyasyon grubuna göre anlamlı bir artış gözlenmemiş olup her iki grup için bu değer 1,6 olarak belirlenmiştir. 1 Gy radyasyona maruz bırakılan 1 saatlik F200 grubunun ÇBİ değeri p<0,01 düzeyinde anlamlı bir artış ile 1,8'e ve 24 saatlik F200

grubunun ÇBİ değeri $p<0,05$ düzeyinde anlamlı bir artış ile 1,7'ye yükselmiştir. 1 saatlik ve 24 saatlik F400 gruplarının ÇBİ değeri aynı şekilde $p<0,05$ düzeyinde anlamlı bir artış ile 1,7'ye çıkmıştır.

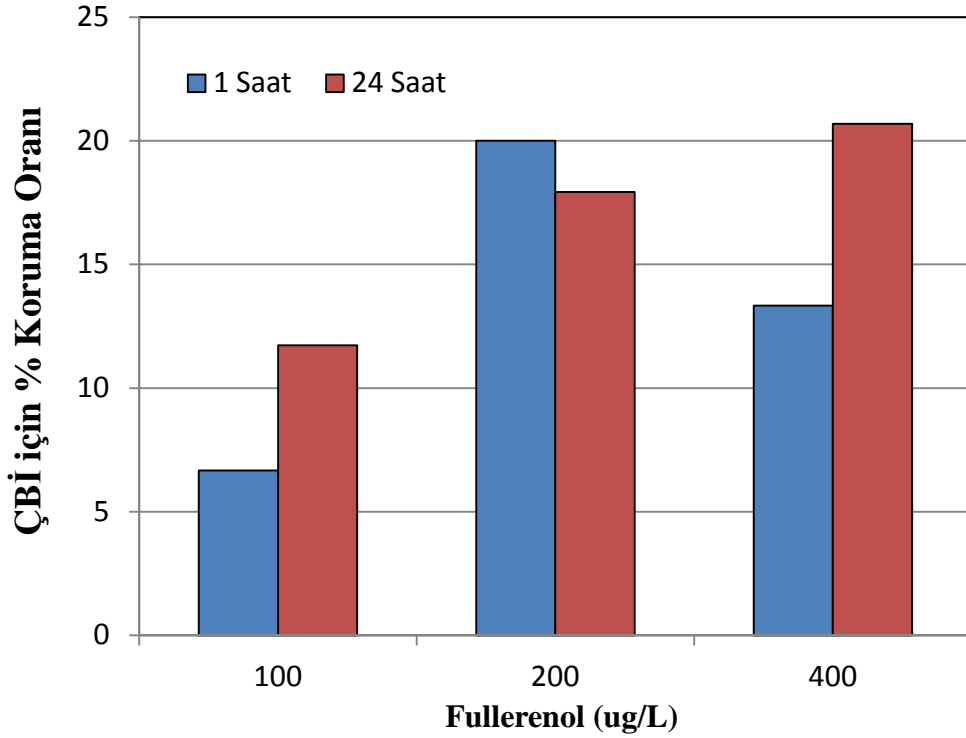


Şekil 4.20. Fullerenol ve 1 Gy radyasyona maruz bırakılan A549 hücrelerinde ÇBİ değerleri (* $p<0,05$, ** $p<0,01$)

Şekil 4.21'de 2 Gy radyasyon grubunun ÇBİ değeri 1,3 olarak görülmektedir. 2 Gy radyasyona maruz bırakılan 1 saatlik ve 24 saatlik F100 gruplarının ÇBİ değerleri 2 Gy radyasyon grubuna göre $p<0,05$ düzeyinde anlamlı bir artış ile 1,5'e ulaşmıştır. 2 Gy radyasyona maruz bırakılan 1 saatlik F200 grubunun ÇBİ değeri $p<0,05$ düzeyinde anlamlı bir artış ile 1,6'ya ve 24 saatlik F200 grubunun ÇBİ değeri ise $p<0,01$ düzeyinde anlamlı bir artış ile 1,7'ye yükselmiştir. 2 Gy radyasyona maruz bırakılan 1 saatlik ve 24 saatlik F400 gruplarının ÇBİ değerleri aynı şekilde $p<0,01$ düzeyinde anlamlı bir artış ile 1,7'ye çıkmıştır. Regresyon analizi sonuçları fullerenol'ün 24 saatlik uygulamasının 1 Gy radyasyonun yol açtığı sitotoksik etki oranını doza bağlı olarak azalttığını göstermiştir ($R^2 = 0,91$, $p<0,001$).



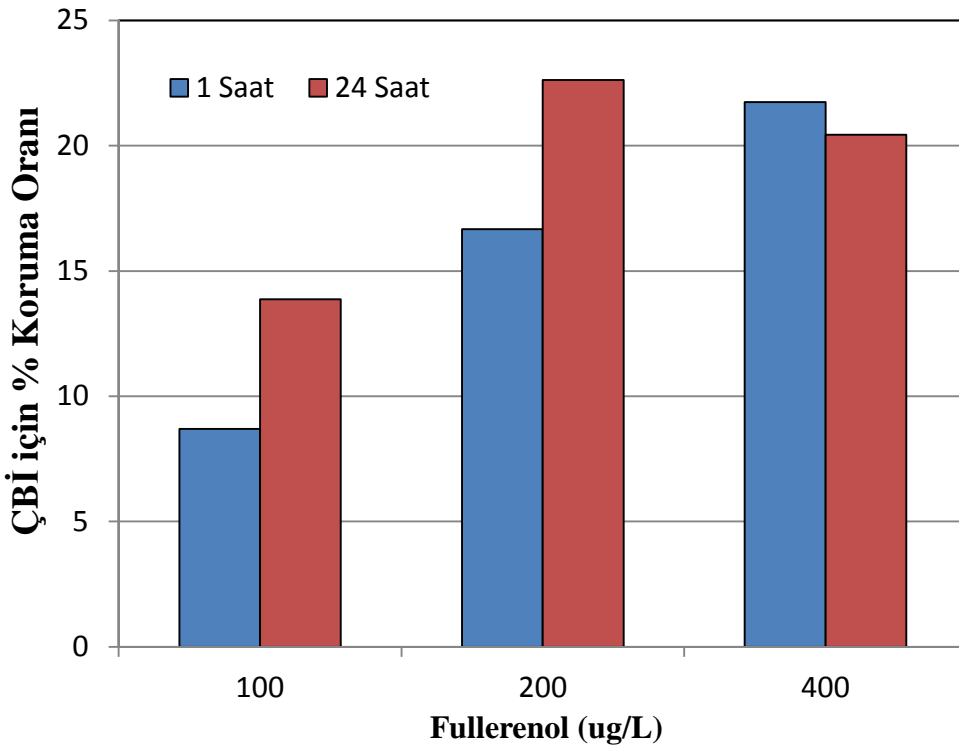
Şekil 4.21. Fullerenol ve 2 Gy radyasyona maruz bırakılan A549 hücrelerinde ÇBİ değerleri (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$)



Şekil 4.22. Fullerenol'ün 1 Gy radyasyona maruz bırakılan A549 hücrelerinde ÇBİ koruma oranları

Şekil 4.22’de görüleceği üzere 1 Gy radyasyona maruz bırakılan 1 saatlik F100 grubu radyasyona karşı % 7, 24 saatlik F100 grubu ise % 12 koruma sağlamıştır. 1 saatlik F200 grubu 1 Gy radyasyona karşı % 20 koruma sağlarken 24 saatlik F200 grubu % 18 koruma sağlamıştır. 1 saatlik F400 grubu 1 Gy radyasyona karşı % 14 koruma sağlarken 24 saatlik F400 grubu % 21 oranında koruma sağlamıştır.

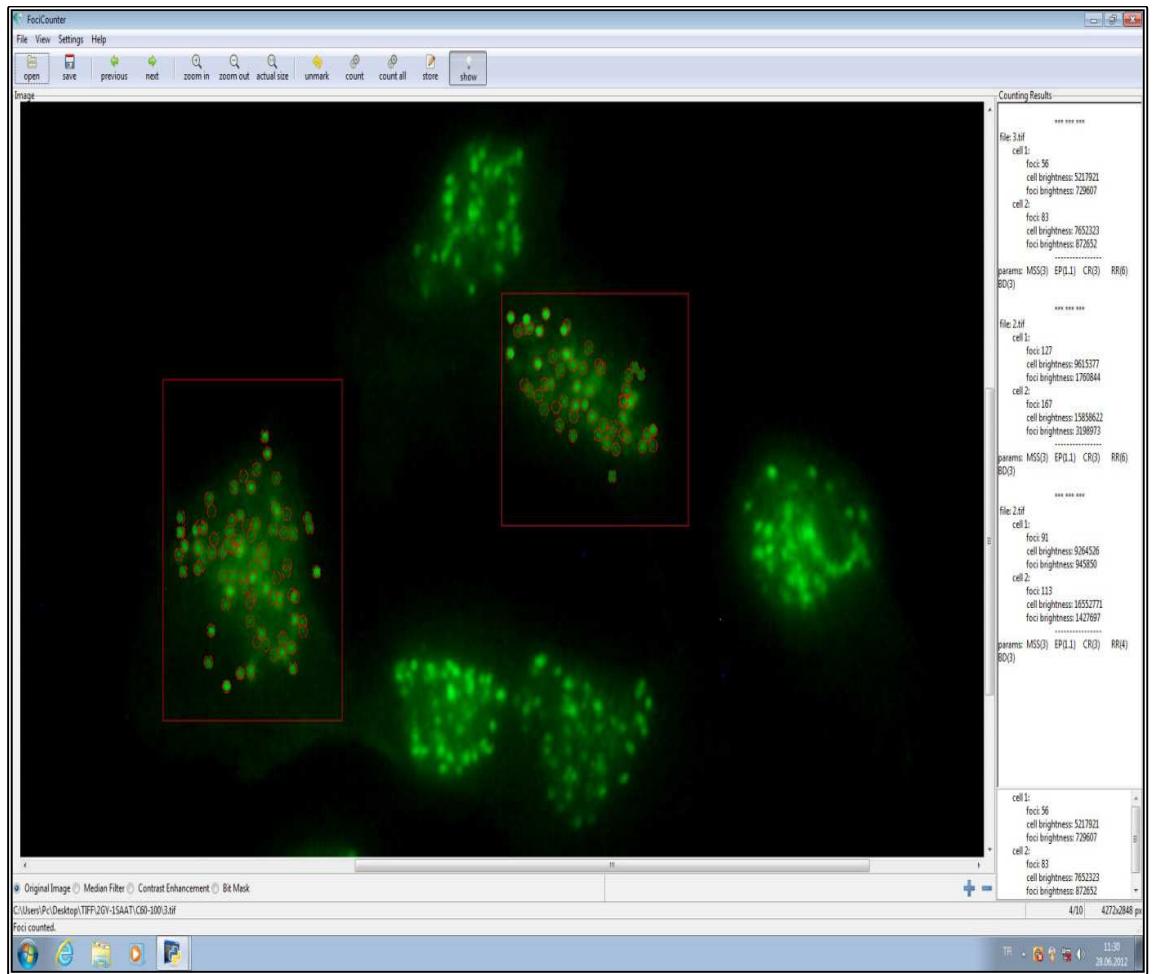
Şekil 4.23’te görüldüğü üzere 2 Gy radyasyona maruz bırakılan 1 saatlik F100 grubu radyasyona karşı % 8, 24 saatlik F100 grubu ise % 14 koruma sağlamıştır. 1 saatlik F200 grubu 2 Gy radyasyona karşı % 16 koruma sağlarken 24 saatlik F200 grubu % 23 koruma sağlamıştır. 1 saatlik F400 grubu 2 Gy radyasyona karşı % 22 koruma sağlarken 24 saatlik F400 grubu % 20 oranında koruma sağlamıştır. Regresyon analizi sonuçları fullerenol’ün 1 saatlik ($R^2 = 0,87$, $p<0,01$) ve 24 saatlik ($R^2 = 0,89$, $p<0,01$) uygulamalarının 2 Gy radyasyonun yol açtığı genetik hasar oranını doza bağlı olarak azalttığını göstermiştir.



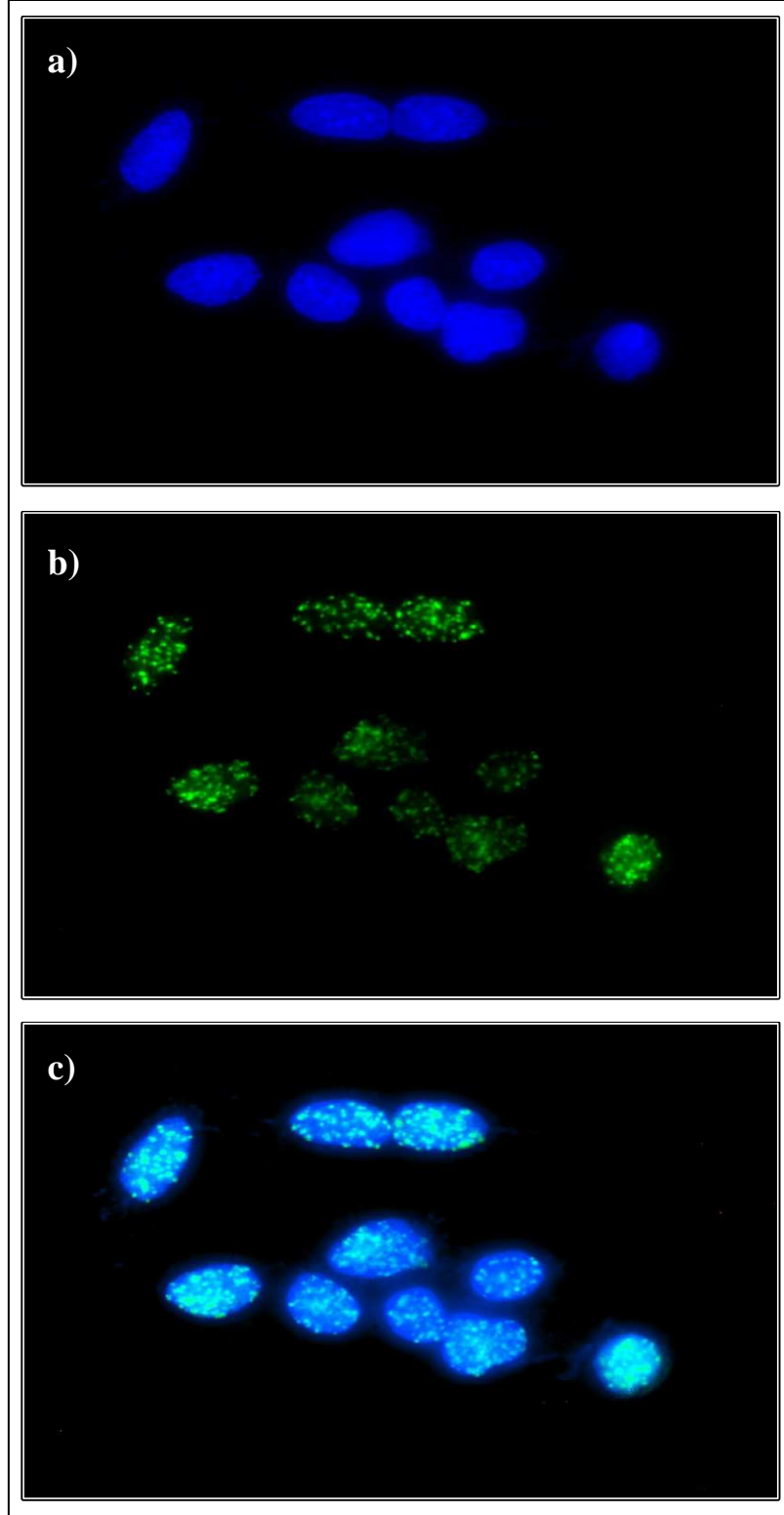
Şekil 4.23. Fullerenol’ün 2 Gy radyasyona maruz bırakılan A549 hücrelerinde ÇBİ koruma oranları

4.11. Fullerenolün γ -H2AX Fokuslarının Oluşumu Üzerindeki Etkisi

Tez çalışmamızda kullanılan fullerenol konsantrasyonlarının γ -H2AX fokuslarının oluşumu üzerindeki etkilerini araştırmak amacıyla A549 hücreleri 100, 200 ve 400 $\mu\text{g/L}$ 'lik fullerenol konsantrasyonlarına 24 saat süresince maruz bırakılmış ve γ -H2AX fokus testi prosedürü uygulanmıştır. Fokus sayım işlemleri "Foci Counter" adlı yazılım kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.24). A549 hücrelerindeki fokus oluşumları ise Şekil 4.25'te gösterilmiştir.

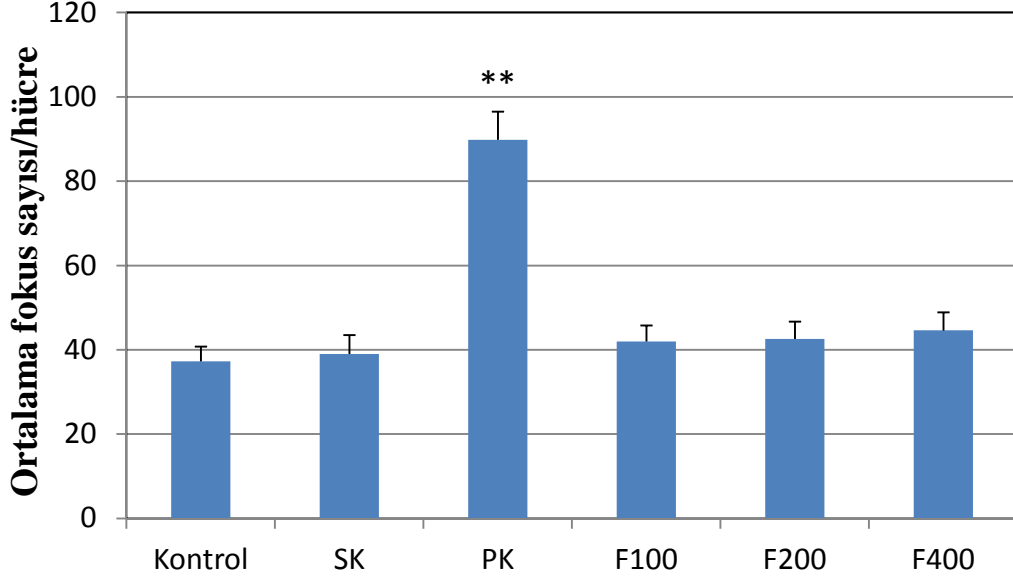


Şekil 4.24. Foci Counter programı ile γ -H2AX fokus sayılarının belirlenmesi



Şekil 4.25. A549 hücrelerinde γ -H2AX fokus oluşumları (Büyütme x400)
a) DAPI boyalı çekirdekler, b) FITC işaretli γ -H2AX fokusları, c) Birleştirilmiş görüntü

Test sonuçlarının değerlendirilmesiyle birlikte her test grubu için hücre başına düşen ortalama fokus sayıları Şekil 4.26’da gösterilmiştir.

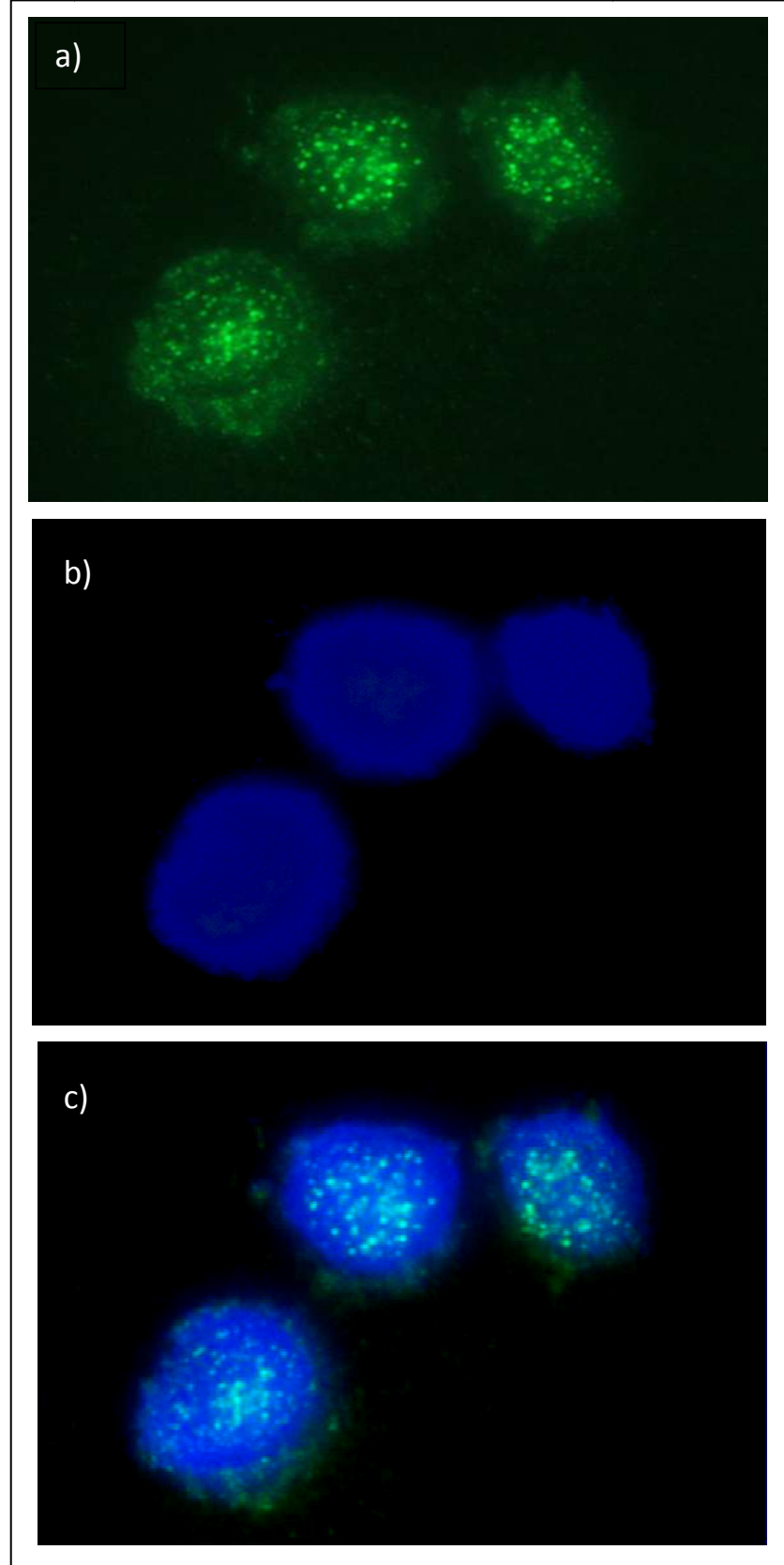


Şekil 4.26. Çeşitli konsantrasyonlarda fullerenole maruz bırakılan A549 hücrelerinde hücre başına düşen ortalama γ -H2AX fokus sayıları (** $p < 0,01$)

Şekil 4.26’da görüldüğü üzere Kontrol ve SK gruplarının hücre başına düşen ortalama fokus sayıları arasında anlamlı bir fark yoktur. Kontrol grubu için ortalama fokus sayısı 37 iken SK grubu için bu değer 39’dur. Benzer şekilde fullerenol grupları arasında hücre başına düşen ortalama fokus sayısı açısından anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. Fullerenol gruplarının hücre başına düşen ortalama fokus sayıları F100 ve F200 için 41, F400 için 43’tür. PK grubunda, hücre başına düşen ortalama fokus sayısı $p < 0,01$ düzeyinde anlamlı bir artış göstererek 90’a çıkmıştır.

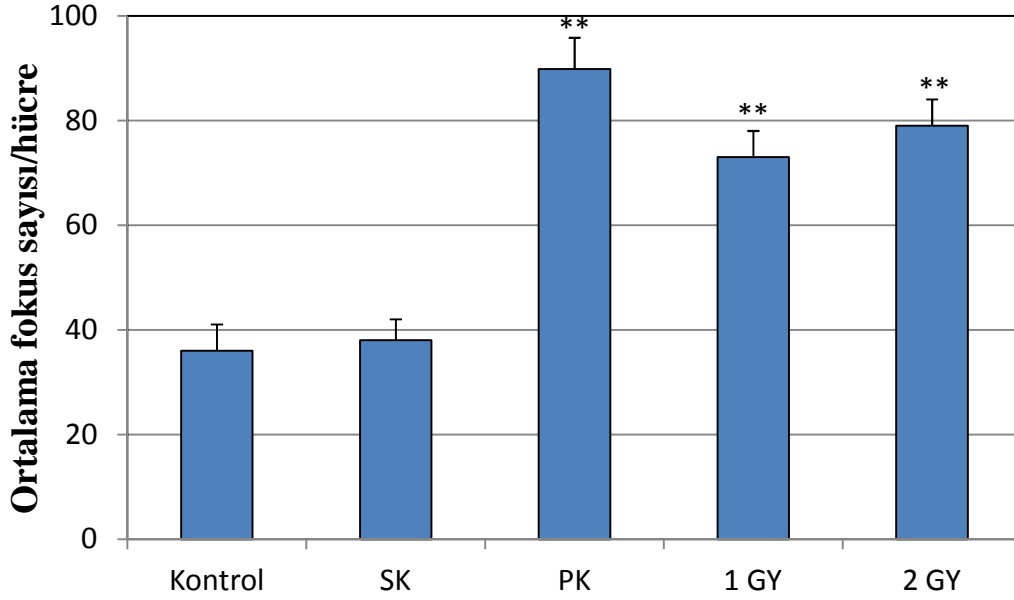
4.12. Radyasyonun γ -H2AX Fokuslarının Oluşumu Üzerindeki Etkileri

Tez çalışmamızda kullanılan radyasyon dozlarının γ -H2AX fokuslarının oluşumu üzerindeki etkilerini araştırmak amacıyla A549 hücreleri 1 Gy ve 2 Gy radyasyona maruz bırakılmış ve γ -H2AX fokus testi prosedürü uygulanmıştır (Şekil 4.27).



Şekil 4.27. 2 Gy radyasyona maruz bırakılan A549 hücrelerinde a) FITC filtresi ile γ -H2AX fokusları b) DAPI filtresi ile çekirdek c) Birleştirilmiş görüntü

Test sonuçlarının değerlendirilmesiyle birlikte her doz grubunda, hücre başına düşen ortalama fokus sayıları Şekil 4.28’de gösterilmiştir.



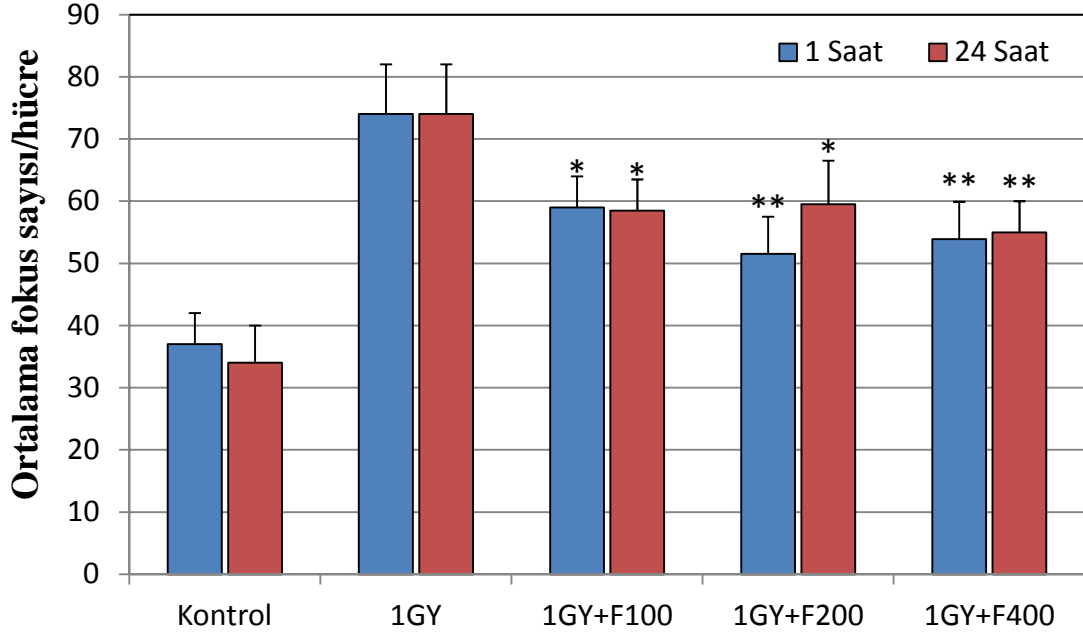
Şekil 4.28. Çeşitli dozlarda radyasyona maruz bırakılan A549 hücrelerinde, hücre başına düşen ortalama γ -H2AX fokus sayıları (** p<0,01)

Şekil 4.28’de Kontrol ve SK grupları arasında hücre başına düşen ortalama fokus sayıları açısından anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Kontrol grubu için hücre başına düşen ortalama fokus sayısı 37 iken SK grubu için 39’dur. 1 Gy radyasyon grubu için hücre başına düşen ortalama fokus sayısı 73’e, 2 Gy radyasyon grubu için ise 80’e çıkmıştır. Her iki grupta da p<0,01 düzeyinde anlamlı bir artış gözlenmiştir. PK grubunun hücre başına düşen ortalama fokus sayısı 90 olup aynı şekilde gözlenen bu artış p<0,01 düzeyinde anlamlıdır.

4.13. Fullerenol ve Radyasyon Kombine Uygulamalarının γ -H2AX Fokuslarının Oluşumu Üzerindeki Etkileri

Fullerenol ve radyasyon kombine uygulamalarının γ -H2AX fokuslarının oluşumu üzerindeki etkilerini araştırmak amacıyla A549 hücreleri radyasyona maruz bırakılmadan 1 saat ve 24 saat önce 100, 200 ve 400 μ g/L’lik fullerenol konsantrasyonları ile muamele edilmiştir. Daha sonra hücreler tek başlarına ve kombine

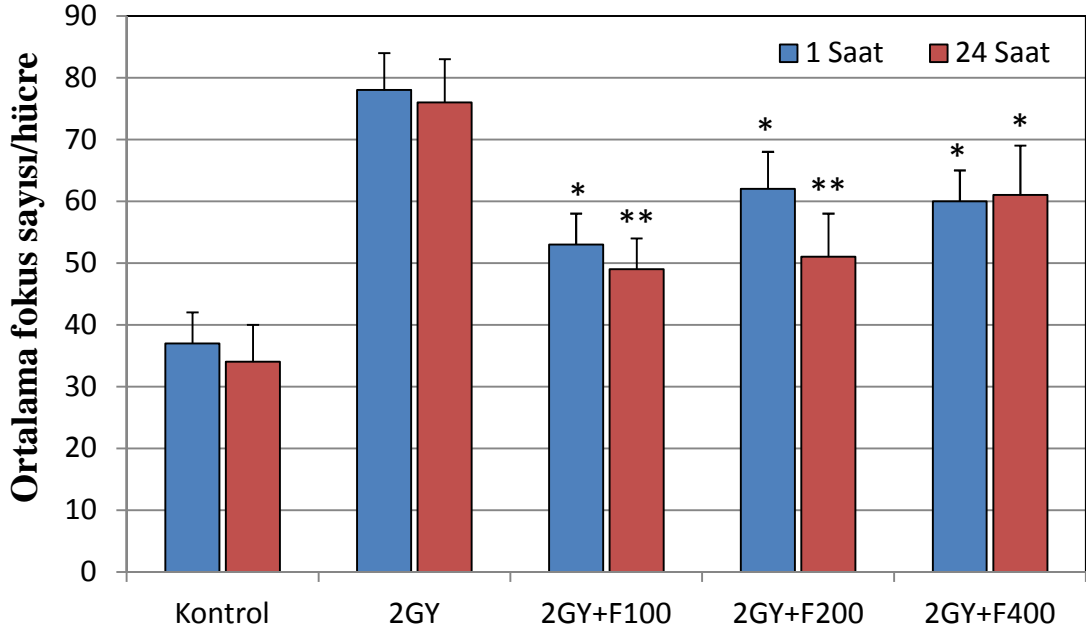
olarak 1 Gy ve 2 Gy radyasyona maruz bırakılmış ve sonrasında γ -H2AX fokus testi prosedürü uygulanmıştır. Test sonuçlarının değerlendirilmesiyle birlikte her test grubunda, hücre başına düşen ortalama fokus sayıları Şekil 4.29 ve 4.30'da gösterilmiştir.



Şekil 4.29. 1 Gy radyasyon uygulamasından 1 saat ve 24 saat önce fullerenol'e maruz bırakılan A549 hücrelerindeki hücre başına düşen ortalama γ -H2AX fokus sayıları (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$)

Şekil 4.29'da görüldüğü üzere Kontrol grubunun hücre başına düşen ortalama fokus sayısı 37 iken 1 Gy grubunda bu değer 73'e kadar çıkmıştır. 1 Gy radyasyona maruz bırakılan fullerenol gruplarından; 1 saatlik F100 grubunun hücre başına düşen ortalama fokus sayısı 60'a, 24 saatlik F100 grubunun ise 59'a düşmüştür. Her iki grupta $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı bir azalma gözlenmiştir. 1 saatlik F200 grubunun hücre başına düşen ortalama fokus sayısı $p < 0,01$ düzeyinde anlamlı bir azalma göstererek 51'e düşmüştür. 24 saatlik F200 grubu için bu değer 60'tır ve $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı bir azalma görülmüştür. 1 saatlik F400 grubunun hücre başına düşen ortalama fokus sayısı 53, 24 saatlik F400 grubunun hücre başına düşen ortalama fokus sayısı ise 54'tür. Her iki grupta gözlenen düşüşler $p < 0,01$ düzeyinde anlamlıdır.

Şekil 4.30'da görüldüğü üzere Kontrol grubunun hücre başına düşen ortalama fokus sayısı 37 iken 2 Gy radyasyon grubunda bu değer 78'e çıkmıştır.

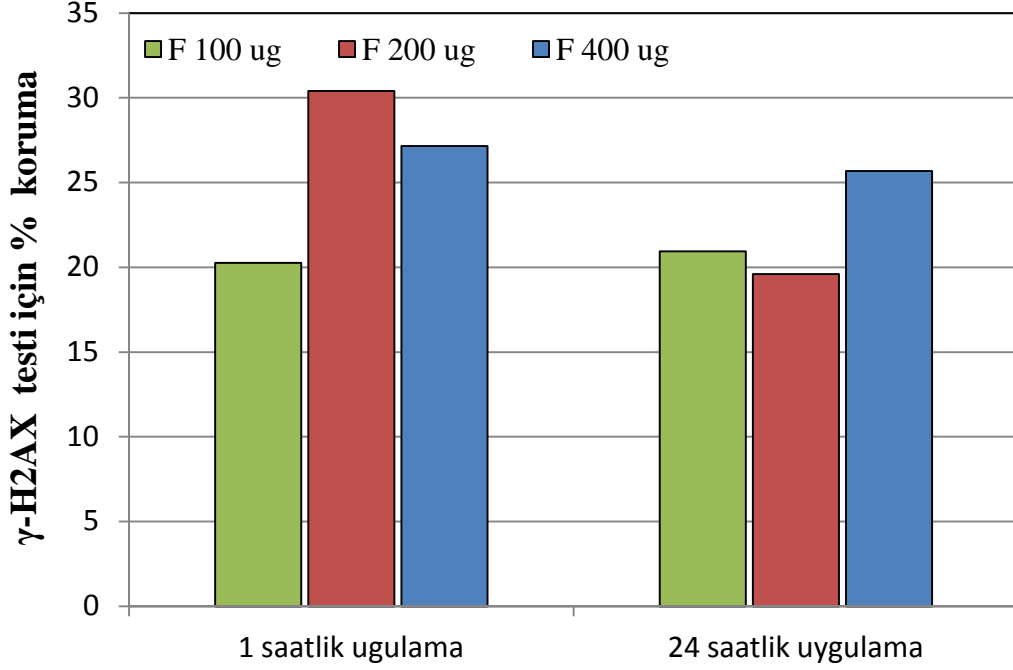


Şekil 4.30. 2 Gy radyasyon uygulamasından 1 saat ve 24 saat önce fullerenol'e maruz bırakılan A549 hücrelerindeki hücre başına düşen ortalama γ -H2AX fokus sayıları (* $p<0,05$, ** $p<0,01$)

2 Gy radyasyona maruz bırakılan fullerenol gruplarından; 1 saatlik F100 grubunun hücre başına düşen ortalama fokus sayısı $p<0,05$ düzeyinde anlamlı bir azalma göstererek 52'ye, 24 saatlik F100 grubunun hücre başına düşen ortalama fokus sayısı ise $p<0,01$ düzeyinde anlamlı bir azalma göstererek 49'a düşmüştür. 1 saatlik F200 grubunda hücre başına düşen ortalama fokus sayısı $p<0,05$ düzeyindeki anlamlı bir azalma ile 61'e ve 24 saatlik F200 grubunda $p<0,01$ düzeyindeki anlamlı bir azalma ile 50'ye düşmüştür. 1 saatlik F400 grubunun hücre başına düşen ortalama fokus sayısı 60, 24 saatlik F400 grubunun ise 61'dir. Her iki grubun hücre başına düşen ortalama fokus sayısında $p<0,05$ düzeyinde anlamlı bir azalma görülmüştür.

Fullerenol ve radyasyon kombine uygulamalarının radyasyon dozlarına göre hücre başında düşen ortalama fokus sayısında anlamlı azalmalara neden olması fullerenol konsantrasyonlarının radyasyona karşı gösterdiği koruyucu etki olarak

değerlendirilmiştir. 1 saatlik ve 24 saatlik kombine uygulamaların 1 Gy ve 2 Gy radyasyona karşı gösterdiği % koruma oranları Şekil 4.31 ve 4.32’de verilmiştir.

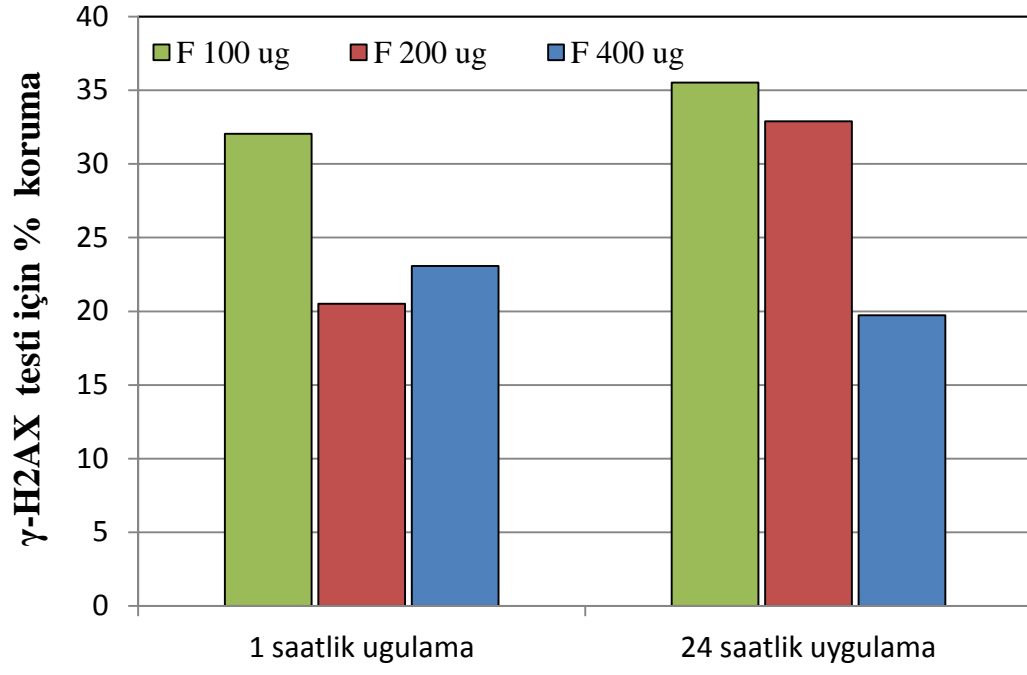


Şekil 4.31. 1 saat ve 24 saat süresince fullerenol’e maruz bırakılan A549 hücrelerinde 1 Gy radyasyona karşı sağlanan % koruma oranları

Şekil 4.31’de, 1 Gy radyasyona maruz bırakılan 1 saatlik fullerenol gruplarından; F100 grubu % 20, F200 grubu % 30 ve F400 grubu % 27 oranında radyasyona karşı koruma sağlamıştır. 24 saatlik fullerenol gruplarından F100 grubu % 21, F200 grubu % 19 ve F400 grubu ise % 26 oranında radyasyona karşı koruma sağlamıştır.

Şekil 4.32’de ise 2 Gy radyasyona maruz bırakılan 1 saatlik fullerenol gruplarından; F100 grubu % 32, F200 grubu % 20 ve F400 grubu % 23 oranında radyasyona karşı koruma sağlamıştır. 24 saatlik fullerenol gruplarından F100 grubu % 35, F200 grubu % 33 ve F400 grubu da % 20 oranında radyasyona karşı koruma sağlamıştır.

Regresyon analizi sonuçları fullerenol’ün 1 ve 24 saatlik uygulamasının 1 Gy ve 2 Gy radyasyonun yol açtığı ve γ -H2AX testi ile belirlenen genetik hasar oranını konsantrasyondan bağımsız olarak azalttığını göstermiştir ($R^2 = 0,70$).



Şekil 4.32. 1 saat ve 24 saat süresince fullerenol'e maruz bırakılan A549 hücrelerinde 2 Gy radyasyona karşı sağlanan % koruma oranları

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

İyonize edici radyasyonun bütün şekilleri hücrelerdeki etkilerini çarpıştıkları atom ve moleküllerde elektronların yerini değiştirerek göstermekte ve böylece iyonizasyon meydana gelmektedir (Lipscomb ve ark. 1992, Kaya ve ark. 1996). İyonize edici radyasyonun biyolojik etkileri arasında, lipid membranın peroksidasyonu, hücre siklusunu durdurulması, apoptozis, kromozomal kırılmalar, kromozomal ve kromatid tip aberasyonlar, delesyonlar ve gen amplifikasyonları gibi olaylar yer almaktadır (Bennet 1999). İyonize edici radyasyona maruz kalınması sonucunda oluşan serbest radikaller sitotoksik ve genotoksik etkilere yol açmaktadırlar. Örneğin OH^\bullet radikali; deoksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyona girerek, H_2O_2 ise zarlardan kolayca geçip hücre çekirdeğine ulaşarak DNA hasarına, hücrede fonksiyon bozukluğuna ve hatta hücre ölümüne neden olabilmektedir (Meram ve Aktaran 2002, Özkan ve Fıfşkın 2004).

Radyoterapi, günümüzde kanser vakalarının bir çoğunda ya tek başına ya da cerrahi ve kemoterapi kombinasyonları ile küratif olarak kullanılan bir tedavi yöntemidir. Radyoterapide; tanımlanmış tümör hacmine, tümörü çevreleyen sağlıklı dokuya en az zarar verecek şekilde, yüksek doğrulukla ölçülmüş radyasyon dozunu vermek esastır (Perez ve Brady 1998). Bu çerçevede, radyoterapinin sağlam dokular üzerindeki zararlı etkilerini önlemek amacıyla radyoprotektif ajanlar olarak da adlandırılan ve radyasyonda karşı koruyucu etkiye sahip olan kimyasalların araştırılması ve kullanılması gerekli hale gelmiştir (Kalpana ve ark. 2009).

Radyoprotektif ajanların en iyi bilinen grubu Sülfidril (-SH) bileşikler ve amifostindir (Priyadarsini 1997). Son zamanlarda ise curcumin (Srinivasan ve ark. 2006) ve sesamol (Prasad ve ark. 2005) gibi çeşitli fenolik bileşiklerin, bazı doğal flavonoid türlerinin (Devipriya ve ark. 2008) yanında seryum oksit (Colon ve ark. 2009) ve fulleren türevleri (Rzigalinski 2005, Markovic ve Trajkovic 2008) gibi bazı nanopartiküllerin de potansiyel radyoprotektif, antioksidan ajanlar olarak etkileri araştırılmıştır.

Sülfidril radyoprotektörleri ve benzer şekilde geliştirilen bazı sentetik bileşiklerin hücre içerisinde kısa sürede bozunması ve toksik etkileri dolayısıyla sınırlı bir kullanıma sahip

olduğu bilinmektedir (Maisin 1998, Capizzi ve Oster 2000). Bununla birlikte, son yıllarda nanobilim ve nanoteknolojideki hızlı gelişmelere paralel olarak nanopartiküllerin bu alanda kullanılabilme potansiyellerinin araştırılması gündeme gelmiştir (Bosi ve ark. 2003). Bu gelişmelere bağlı olarak; dokular ve hücreler tarafından kolayca tolere edilebilme, oksidatif stresin yoğun olduğu bölgelere hızlı bir şekilde yayılabilme, düşük konsantrasyonlarda etkili olabilme ve hücre içerisinde uzun süre bozunmadan aktif kalabilme gibi ideal antioksidan özelliklere sahip nanopartiküller tasarlanmanın mümkün olabileceği bildirilmiştir (Hunter ve Preedy 2011). Buradan hareketle bu tez çalışmasında C₆₀ fullerenerin suda çözünebilen bir formu olan polihidroksi fulleren (fullerenol) nanopartiküllerinin radyoprotektif etki potansiyelinin insan akciğer epitelyum hücrelerinde *in vitro* olarak araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla ilk olarak fullerenol'un olası sitotoksik ve ardından genotoksik etkileri araştırılmıştır.

Bizim çalışmamızda yürütülen sitotoksisite deneylerimizde fullerenol'un test edilen konsantrasyonlarda herhangi bir sitotoksik etkiye sahip olmadığını belirlenmiştir. Fullerenol sitotoksisitesi ile ilişkili olarak yürütülen sınırlı sayıdaki çalışmada da benzer bulgular elde edilmiştir. Örneğin; Su ve ark (2010) fullerenol'un çeşitli hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkilerini incelemişler ve fullerenol'un sitotoksik etkilerinin hücre hattına bağımlı olarak değişebileceğini bildirmişlerdir. XTT testi ile yürütülen bu sitotoksisite çalışmasında fullerenolün Çin hamsteri ovaryum (CHO) ve akciğer (CHL) hücrelerinde yüksek oranda sitotoksik etki gösterirken, L929 hücre hattı üzerinde neredeyse hiçbir etki göstermediği bildirilmiştir. Bununla birlikte adı geçen çalışmada kullanılan konsantrasyonlar incelendiğinde, bizim çalışmamızda kullandığımız aralığa eş değer olan konsantrasyonlarda herhangi bir sitotoksik etkinin gözlenmediği tespit edilmiştir. Bir diğer çalışmada ise fullerenol yapısındaki hidroksil grubu sayısının hepatositlerde oluşacak olası sitotoksisiteye katkıda bulunabileceği, böylece yüksek sayıda (24) -OH grubu içeren fullerenollerin düşük sayıda (12) -OH içeren formlara göre daha toksik olabileceği gösterilmiştir (Nakagawa ve ark. 2011).

Fullerenolün genotoksik etkileri hakkında ise son derece sınırlı sayıda çalışma yapılmıştır. Zakharenko ve ark. (1997), milimolar ve mikromolar

konsantrasyonlarındaki fullerenolün *Escherichia coli* ve *Drosophila melanogaster* modellerinde herhangi bir genotoksik etkiye neden olmadığını bildirmiştir. Niwa ve Iwai (2006), uzun süre nanomolar konsantrasyonlarındaki fullerenole maruz bırakılan hücre hatlarında MN frekansının arttığını belirtmiştir. Buna karşın fullerenol ile indüklenen mikronükleus oluşumunun kromozomal DNA hasarına bağlı olarak değil, hücre döngüsünün M fazında kromozomal DNA'nın başarısız bir şekilde bölünmesine bağlı olarak gerçekleştiği ileri sürülmüştür. Bizim sitotoksisite çalışmalarından elde ettiğimiz test sonuçlarına göre genotoksisite çalışmalarımızda kullanmak üzere düşük sitotoksik etkiye sahip olan 100, 200 ve 400 µg/L'lik fulleren konsantrasyonları seçilmiştir. Mikronükleus ve γ-H2AX genotoksisite testleri sonucunda fullerenolün test edilen konsantrasyonlarda A549 hücreleri üzerinde herhangi bir etkiye sahip olmadığı belirlenmiştir. Benzer bulgular fullerenolün Çin hamsteri ovaryumu hücre hattı (CHO-K1) üzerindeki genotoksik etkilerini sitokinez bloke mikronükleus testi aracılığıyla inceleyen Mrdanovic ve ark. (2009) tarafından da rapor edilmiştir. Bu araştırmacılar fullerenol ile muamele edilen CHO-K1 hücrelerindeki MN frekanslarının, doza bağımlı olarak azaldığını ve kontrol grubuna oranla da anlamlı şekilde düştüğünü bildirmiştir.

Bu çalışmadan elde ettiğimiz bulgular fullerenolün sitotoksik ve genotoksik etkiye sahip olmadığı göstermiş olup radyoprotektif ajan olarak kullanılabilirliği çalışmamıza olanak sağlamıştır. Nitekim, yakın bir geçmişte yürütülen çalışmaların sonuçları, C₆₀ fulleren nanopartikül türevlerinin antioksidan etki gösterdiklerini ve radyasyondan koruma alanında da umut vaat ettiklerini ortaya koyar niteliktedir (Rzigalinski 2005, Markovic ve Trajkovic 2008).

Bu çalışmada A549 hücre hattı üzerinde yürüttüğümüz fullerenol + radyasyon kombine testlerinde üç farklı dozda uygulanan fullerenol, radyasyon ışınlandırmalarından 1 saat ve 24 saat önce olmak üzere iki farklı sürede verilmiştir. Fullerenolün radyasyona maruz bırakılan A549 hücre hatlarındaki genotoksik ve/veya koruyucu etkileri klonojenik test, sitokinez bloke mikronükleus testi ve γ-H2AX fokus testi kullanılarak araştırılmıştır. Sitotoksisitenin değerlendirilmesinde % hayatta kalış oranları ve ÇBİ değerleri kullanılarak sonuçlar doğrulanmıştır. Genotoksisitenin değerlendirilmesinde ise MN frekansları ve hücre başına düşen ortalama γ-H2AX fokus sayıları göz önüne

alınmıştır. Çalışmamız bu yönleriyle literatürdeki diğer çalışmalardan farklı olup özgün bir değere sahiptir.

Fullerenol türevleri ile yürütülen çalışmalar *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar incelendiğinde genel olarak radyasyonun sitotoksik etkilerine karşı koruyucu potansiyele sahip oldukları belirlenmiştir. Örneğin Cai ve ark. (2010), fullerenolün fareler üzerindeki *in vivo* radyoprotektif etkisini belirlemek amacıyla radyasyona maruz bırakılmadan önce belli aralıklarla, intraperitoneal yoldan fullerenol'e maruz bırakılan farelerde 30 günlük % hayatta kalış oranlarını incelemişlerdir. Elde edilen verilere göre; sadece radyasyona maruz bırakılan gruptaki farelerin 30 günlük yaşam süresini tamamlayamadığı, ancak fullerenol uygulanan gruptaki farelerin % 70'inin 30 gün boyunca hayatta kaldığı belirlenmiştir. Bu araştırmacılar fullerenol ile ön muamele işleminin, farelerde immün ve mitokondriyal fonksiyonları arttırmak, oksidatif hasarı ise azaltmak suretiyle yaşam süresini arttırıcı etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Brown ve ark. (2010), C₆₀ dendrofulleren (DF-1) bileşiğinin fareler üzerindeki *in vivo* radyoprotektif etkisini incelemiş ve radyasyon öncesi DF-1 bileşiği ile muamele edilen gruplarda 30 günlük % hayatta kalış oranlarının doza bağımlı olarak artış gösterdiği bildirilmiştir. Yine aynı çalışmada, DF-1 bileşiğinin prostatik adenokarsinom (DU145) hücre hattı üzerindeki *in vitro* radyoprotektif etkisini uygulama zamanına bağlı olarak incelenmiş ve DF1 uygulamasının hücrelerin hayatta kalış oranlarını anlamlı düzeyde artırdığı gözlenmiştir

Daroczi ve ark. (2006) tarafından, DF-1 bileşiğinin, radyasyona maruz bırakılan zebra balığı embriyoları üzerindeki etkileri incelenmiş ve radyasyon öncesi DF-1 bileşiği ile ön muamele işleminin, radyasyon hasarını amifostine kıyasla ciddi bir şekilde azalttığı ifade edilmiştir. Buna karşılık radyasyondan 30 dakika sonra DF-1 ile muamelenin etkili olmadığı ve dolayısıyla söz konusu bileşiğin radyasyona maruziyet esnasında oluşan ROS'ları yakalayarak koruyucu özellik gösterdiği belirtilmiştir. Lin ve ark. (2000), karboksifulleren C₃ bileşiğinin insan serviks kanseri hücre hattı (HeLa) üzerindeki radyoprotektif etkisini incelemiştir. Radyasyona maruz bırakılmadan önce C₃ bileşiği ile muamele edilen grupların % hayatta kalış oranlarının doza bağımlı olarak artış göstermiştir. C₃ bileşiğinin, radyasyon ile indüklenmiş O₂^{•-} ve OH[•] radikallerini giderici etkisi dolayısıyla radyoprotektif etki gösterdiği bildirilmiştir.

Bizim çalışmamızda 1 Gy radyasyona maruz bırakılmadan 1 saat ve 24 saat önce fullerenol ile muamele edilen gruplarda; 200 ve 400 µg/L'lik fullerenol dozları % hayatta kalış oranını kontrol grubuna göre anlamlı şekilde arttırmıştır. 2 Gy radyasyona maruz bırakılmadan 1 saat ve 24 saat önce fullerenol ile muamele edilen gruplarda; uygulanan tüm dozlar % hayatta kalış oranını kontrol grubuna göre anlamlı şekilde arttırmıştır. Her iki radyasyon dozunda, 24 saatlik fullerenol uygulamasının 1 saatlik uygulamaya göre daha yüksek % hayatta kalış sağladığı tespit edilmiştir.

Sitotoksisite testlerinden elde ettiğimiz bu koruyucu özelliğin diğer fullerenol türevlerinde olduğu gibi ROS giderici etkiden kaynaklandığı düşünülmektedir. Örneğin C₃ bileşiğinin ROS giderici özelliğinin yanı sıra lipid membranlar içerisine daha iyi lokalize olarak etkili bir sitoprotektif özellik gösterdiği bildirilmiştir. (Dugan ve ark. 1997, Huang ve ark. 1998). Mirkov ve ark. (2004), fullerenolün NO[•] serbest radikalının direkt olarak giderilmesinde etkili olduğunu bildirmiştir. Polivinilprolidon (PVP) / Polietilen glikol (PEG) gibi polimerlerde ya da γ-siklodekstrinde çözülmüş C₆₀ türevlerinin, *in vitro* sistemlerde intraselüler ROS miktarını azalttığı ifade edilmiştir. (Xiao ve ark. 2005, Takada ve ark. 2006).

Fullerenol ve radyasyon kombine uygulamalarında genotoksisite testlerinde elde ettiğimiz bulgular da sitotoksisite verilerini destekler niteliktedir. Radyasyon uygulaması A549 hücrelerindeki MN ve hücre başına düşen ortalama γ-H2AX fokus sayısını yüksek oranda arttırmıştır. Bununla birlikte 1 Gy radyasyona maruz bırakılmadan 1 saat önce fullerenol ile muamele edilen gruplarda; 100 ve 200 µg/L'lik fullerenol konsantrasyonları ‰ MN frekansını anlamlı şekilde azaltarak, radyasyona karşı, sırası ile % 15 ve % 18 koruma sağlamıştır. 24 saatlik fullerenol uygulamasında ise tüm konsantrasyonlar ‰ MN frekansını anlamlı şekilde azaltmış ve sırası ile % 27, % 31 ve % 35 koruma sağlamıştır. 2 Gy radyasyona maruz bırakılmadan 1 saat önce fullerenol ile muamele edilen gruplarda; 200 ve 400 µg/L'lik fullerenol konsantrasyonları ‰ MN frekansını anlamlı şekilde azaltarak sırası ile % 15 ve % 25 koruma sağlamıştır. 24 saatlik fullerenol uygulamasında ise tüm konsantrasyonlar

% MN frekansını anlamlı şekilde azaltmış ve sırası ile % 22, % 19 ve % 28 koruma sağlamıştır.

100, 200 ve 400 µg/L'lik fullerenol konsantrasyonları ile muamele edilen gruplar ve kontrol grubu arasında ÇBİ değeri açısından anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. 1 Gy ve 2 Gy radyasyon gruplarının ÇBİ değerleri ise kontrol grubuna göre anlamlı şekilde azalmıştır. Fullerenol ve radyasyon kombine uygulamalarında, 1 Gy radyasyona maruz bırakılan 1 saatlik fullerenol gruplarında; 200 ve 400 µg/L'lik fullerenol konsantrasyonları ÇBİ değerini 1 Gy radyasyon grubuna göre anlamlı şekilde arttırarak sırası ile % 20 ve % 14 oranında koruma sağlamıştır. 24 saatlik fullerenol gruplarında aynı şekilde 200 ve 400 µg/L'lik fullerenol konsantrasyonları ÇBİ değerini anlamlı şekilde arttırarak sırası ile % 18 ve % 21 oranında koruma sağlamıştır. 2 Gy radyasyona maruz bırakılan 1 saatlik fullerenol gruplarında; tüm konsantrasyonlar ÇBİ değerini 2 Gy radyasyon grubuna göre anlamlı şekilde arttırarak sırası ile % 8, % 16 ve % 22 oranında koruma sağlamıştır. 24 saatlik fullerenol gruplarında aynı şekilde tüm konsantrasyonlar ÇBİ değerini anlamlı şekilde arttırarak sırası ile % 14, % 16 ve % 20 oranında koruma sağlamıştır. Her iki radyasyon dozunda, 24 saatlik fullerenol uygulamasının 1 saatlik uygulamaya göre gerek MN frekansı gerekse ÇBİ açısından daha yüksek koruma sağladığı tespit edilmiştir. Benzer bir çalışmada Mrdanovic ve ark. (2009), fullerenolün MMC ile indüklenmiş mikronükleus oluşumuna etkisini *in vitro* olarak incelemiş ve MN frekansının fullerenol dozuna bağımlı olarak azaldığını bildirmiştir. Bizim çalışmamızda ise 1 Gy radyasyona maruz bırakılmadan 24 saat önce ve 2 Gy radyasyona maruz bırakılmadan 1 saat önce fullerenol ile muamele edilen gruplarda; MN frekansının doza bağımlı olarak azaldığı ve bu azalmaya bağımlı olarak radyasyona karşı sağlanan korumanın doza bağımlı olarak artış gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca 1 Gy radyasyona maruz bırakılmadan 24 saat önce ve 2 Gy radyasyona maruz bırakılmadan 1 saat ve 24 saat önce fullerenol ile muamele edilen gruplarda ÇBİ'nin ve radyasyona karşı sağlanan korumanın doza bağımlı olarak artış gösterdiği tespit edilmiştir.

γ-H2AX testi ile yürüttüğümüz çalışmalarımızda da mikronükleus testinde olduğu gibi 1 Gy radyasyona maruz bırakılmadan 1 saat önce ve 24 saat önce fullerenol ile muamele

edilen gruplarda; tüm fullerenol konsantrasyonları hücre başına düşen ortalama γ -H2AX fokus sayısını anlamlı şekilde azaltmıştır. 1 saatlik fullerenol uygulamasında 100, 200 ve 400 $\mu\text{g/L}$ 'lik fullerenol konsantrasyonları radyasyona karşı sırası ile % 20, % 30 ve % 27 oranında koruma sağlamıştır. 24 saatlik fullerenol uygulamasında ise sırası ile % 21, % 19 ve % 26 oranında koruma sağlanmıştır. 2 Gy radyasyona maruz bırakılmadan 1 saat ve 24 saat önce fullerenol ile muamele edilen gruplarda; tüm fullerenol konsantrasyonları hücre başına düşen ortalama fokus sayısını anlamlı şekilde azaltmıştır. 1 saatlik fullerenol uygulamasında 100, 200 ve 400 $\mu\text{g/L}$ 'lik fullerenol konsantrasyonları, radyasyona karşı, sırası ile % 32, % 20 ve % 23 oranında koruma sağlamıştır. 24 saatlik fullerenol uygulamasında ise sırası ile % 35, % 33 ve % 20 oranında koruma sağlanmıştır. 1 Gy radyasyon için 1 saatlik fullerenol uygulamasının, 2 Gy radyasyon için ise 24 saatlik fullerenol uygulamasının daha yüksek koruma sağladığı tespit edilmiştir. Brown ve ark. (2010) tarafından yürütülen benzer bir çalışmada fulleren türevlerinden biri olan DF-1 bileşiğinin *in vitro* radyoprotektif etkisini incelenmiş ve DF-1 bileşiğinin doza bağımlı olarak γ -H2AX fokus sayısını azalttığı belirtilmiştir. Bizim çalışmamızda, radyasyona maruz bırakılmadan 1 saat ve 24 saat önce fullerenol ile muamele edilen grupların hücre başına düşen ortalama γ -H2AX fokus sayısının anlamlı şekilde azaldığı tespit edilmiştir.

Fullerenol'ün etkilerine dair yürütülen çeşitli enzimatik çalışmalar da bulunmaktadır. Örneğin, Cai ve ark. (2010), radyasyona maruz bırakılmadan önce belli aralıklarla, intraperitoneal yoldan fullerenol uygulanan farelerin karaciğerlerindeki hücre içi ROS, H_2O_2 , SOD, GSH ve MDA miktarlarını incelemişlerdir. Elde edilen sonuçlara göre; radyasyon öncesi fullerenol ile muamele edilen farelerde oksidatif stres belirteçlerinden ROS, H_2O_2 ve MDA miktarlarının, fullerenol uygulanmayan gruplara göre daha düşük olduğu bildirilmiştir. Diğer taraftan radyasyon uygulaması öncesi fullerenol ile muamele edilen farelerdeki SOD ve GSH miktarlarının radyasyona maruz bırakılmayan kontrol grubunun SOD ve GSH miktarları ile aynı düzeyde olduğu belirtilmiştir. Böylece fullerenolün, radyasyon ile indüklenmiş ROS'ları giderici etkisi olduğu dolayısıyla da hücre içi antioksidan enzimlerin aktivitelerini arttırıcı etki gösterdiği ifade edilmiştir

Fulleren türevlerinin göstermiş olduğu koruyucu etki temel olarak iki farklı mekanizma ile açıklanmaktadır. Direkt mekanizmada, C₆₀ kafesinin yapısında bulunan 30 çift bağın teorik olarak 60 radikal tutabildiği belirtilmiştir (Wang ve ark. 1999). Anderson ve Barron (2005), fullerenolün poli-anyonik karbon kafesinin proton donörü ya da akseptörü olarak davranabildiğini ve bu özelliği ile reaktif oksijen türlerine karşı yüksek afinite gösterdiğini bildirmiştir. Andrievsky ve ark. (2009), C₆₀ fulleren hidratlarının (C₆₀HyFn) çok daha etkili indirekt bir antiradikal mekanizmaya sahip olduğunu bildirmiştir. Andrievsky ve ark. (2009)'na göre; C₆₀HyFn hidrofilik özelliği sayesinde sulu ortamlarda uzun mesefali ve düzenli su katmanları oluşturmaktadır. Suyun radyolizisi ile oluşan serbest radikallerin difüzyonu büyük ölçüde bu düzenli ve viskoz su katmanları tarafından sınırlandırılmaktadır. Dolayısıyla C₆₀HyFn ile düzenlenmiş sulu ortamda oluşan serbest radikaller mekansal olarak birbirlerinden ayrılamamakta ve hızlıca rekombine olarak bazı nötral moleküllere dönüşmektedir. 10⁻⁹ – 10⁻¹¹ M konsantrasyon aralığındaki oldukça seyreltik sulu fulleren çözeltilerinde bir C₆₀HyFn molekülünün yaklaşık olarak 10³ – 10⁴ gibi müthiş miktarlardaki OH• radikalini nötralize edebilme yeteneğinde olduğu belirtilmiştir.

Kanser ve diğer bazı hastalıkların tedavisinde halen en etkili olan yöntemlerden biri radyoterapidir. Radyoterapinin amacı özetle, normal dokuya minimum hasar vererek kanserli hücrelerin yok edilmesidir (Perez ve Brady 1998). Bu anlamda, normal dokunun radyasyondan korunmasına yönelik çeşitli çalışmalar yapılmış ve radyasyona karşı koruyucu etki gösteren bazı ajanlar bulunmuş olmakla birlikte bu ajanların çoğunun yüksek toksisitelerine dayalı yan etkileri nedeniyle sınırlı kullanım alanına sahip olduğu belirtilmiştir (Maisin 1998, Capizzi ve Oster 2000, Kalpana ve ark. 2009). Çalışmamızda kullanılan fullerenol nanopartikülü ise uygulanan üç farklı dozda herhangi bir genotoksik etki göstermemiştir. Bunun yanında, fullerenol nanopartikülünün üç farklı dozunu ve iki farklı uygulama süresini kullanarak yaptığımız *in vitro* çalışmalarda radyasyona karşı % 35'e varan oranlarda koruma sağlanmıştır. Gerek *in vivo* gerekse *in vitro* modellerle yapılan çalışmalarda, herhangi bir toksik etkisinin gözlenmemesi ve serbest radikalleri etkili bir şekilde gidermesi dolayısıyla fullerenol nanopartiküllerinin radyoterapide koruyucu ya da genel antioksidan olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Aardema, J.M., Kirsch-Volders, M. 2001.** The *in vitro* micronucleus assay. In Choy WN, eds. Genetic toxicology and cancer risk assesment. New York. Marcel Dekker: 163 – 186
- Ahmad, A., Robinson, A.R., Duensing, A., Van Drunen, E., Beverloo, H.B., Weisberg, D.B., Hasty, P., Hoeijmakers, J.H., Niedernhoffer, L.J. 2008.** ERCC1-XPF endonuclease facilitates DNA doublestrand break repair. Mol Cell Biol; 28: 5082 – 5092
- Akn, A. 1981.** Temel Nükleer Tıp. A.Ü. Tıp Fakültesi yayını: 476 – 519
- Akkuş, İ. 1995.** Serbest Oksijen Radikalleri ve Fizyopatolojik Etkileri. Mimoza Basım Yayın ve Dağıtım, Konya: 1 – 15
- Algüneş, Ç. 2002.** Radyasyon Biyofiziği.1. Basım. Trakya Üniversitesi Yayınları, Edirne No: 51: 59 – 62
- Ali, S.S., Hardt, L.L., Dugan, L.L. 2008.** SOD activity of carboxyfullerenes predicts their neuroprotective efficacy: a structure-activity study. Nanomedicine xx: 1 – 12 doi:10.1016/j.nano.2008.05.003; 2008.
- Altaf, M., Auger, A, Covic, M., Cote, J. 2009.** Connection between histone H2A variants and chromatin remodeling complexes. Biochem Cell Biol; 87: 35 – 50
- Anderson, R., Barron, A.R. 2005.** Reaction of hydroxyfullerene with metal salts: a route to remediation and immobilization, J. Am. Chem. Soc. 127: 10458 – 10459
- Andrievsky, G.V., Klochkov, V.K., Derevyanchenko, L.I. 2005.** Is C₆₀ fullerene molecule toxic?! Fullerenes, Nanotubes Carbon Nanostruct 13: 363 – 376.
- Andrievsky, G.V., Bruskov, V.I., Tykhomyrov, A.A., Gudkov, S.V. 2009.** Peculiarities of the antioxidant and radioprotective effects of hydrated C₆₀ fullerene nanostructures *in vitro* and *in vivo*. Free Radical Biology & Medicine 47: 786 – 793
- Arora, S., Rajwade, J.M., Paknikar, K.M. 2012.** Nanotoxicology and *in vitro* studies: The need of the hour, Toxicology and Applied Pharmacology 258: 151 – 165, Şekil 1
- Bal, W., Protas, A.M., Kasprzak, K.S. 2011.** Chapter 13. Genotoxicity of metal ions: chemical insights. Metal ions in toxicology: effects, interactions, interdependencies. Metal Ions in Life Sciences. 8. RSC Publishing: 319 – 373
- Batty, D.P., Wood, D.W. 2000.** Damage recognition in the nucleotide excision repair of DNA. Gene 241: 193 – 204

- Becker, L., Poreda, R.J., Bada, J.L. 1996.** *Science* 272: 249 – 252
- Bennett, L.M. 1999.** Breast cancer: genetic predisposition and exposure to radiation. *Mol Carcinog* 26: 143 – 149
- Berroud, A., Le Roy, A., Voisin, P. 1996.** Membrane Oxidative Damage Induced by Ionizing Radiation Detected by Fluorescence Polarization. *Radiat. Environ. Biophysics*, 35: 289 – 295
- Bogdanovic, V., Stankov, K., Icevic, I., Zikic, D., Nikolic, A., Solajic, S., Djordjevic, A., Bogdanovic, G. 2008.** Fullerenol C₆₀(OH)₂₄ effects on antioxidative enzymes activity in irradiated human erythroleukemia cell line, *J. Radiat. Res.* 49: 321 – 327
- Bohr, V.A., Smith, C.A., Okumoto, D.S., Hanawalt, P.C. 1985.** DNA repair in an active gene: removal of pyrimidine dimers from the DHFR gene of CHO cells is much more efficient than in the genome overall. *Cell* 40: 359 – 369
- Bollum, F.J., Andregg, J.W., Mcelya, A.B., Potter, V.R. 1960.** Nucleic Acid Metabolism in Regenerating Rat Liver VII. Effect of X-Radiation on Enzymes of DNA Synthesis. *Cancer Research.* 20: 138 – 143
- Bosi, S., Da Ros, T., Spalluto, G., Prato, G. 2003.** Invited Review: Fullerene derivatives: an attractive tool for biological applications. *European Journal of Medicinal Chemistry* 38: 1 – 3
- Brant, J.A., Labelle, J., Robichaud, C.O., Wiesner, M. 2007.** Fullerenol cluster formation in aqueous solution. Implication for environmental release, *J. Colloids Interface Sci.* 314: 281 – 288
- Brown, A.P., Chung, E.J., Urick, M.E., Shield, W.P., Sowers, A.L., Thetford, A., Shankavaram, U.T., Mitchell, J.B., Citrin, D.E. 2010.** Evaluation of the fullerene compound DF-1 as a radiation protector. *Radiation Oncology* 2010, 5(34): 1 – 9
- Buseck, P.R., Tsipursky, S.J., Hettich, S. 1992.** *Science* 257: 215 – 217
- Buzea, C., Pacheco, I., Robbie, K. 2007.** Nanomaterials and Nanoparticles: Sources and Toxicity. *Biointerphases* 2(4): 17 – 71
- Cai, X., Hao, J., Zhang, X., Yu, B., Ren, J., Luo, C., Li, Q., Huang, Q., Shi, X., Li, W., Liu, J. 2010.** The polyhydroxylated fullerene derivative C₆₀(OH)₂₄ protects mice from ionizing-radiation-induced immune and mitochondrial dysfunction. *Toxicology and Applied Pharmacology* 243: 27 – 34
- Capizzi, R.L., Oster, W. 2000.** Chemoprotective and radioprotective effects of amifostine: an update of clinical trials. *Int. J. Hematol.* 72, 425 – 435

- Cataldo, F., Da Ros, T., Milani, P. 2008.** Carbon Materials: Chemistry and Physics. Volume 1: Medicinal Chemistry and Pharmacological Potential of Fullerenes and Carbon Nanotubes: 11 – 15, Şekil 1.1, 64
- Cheng, T.J., Christiani, D.C., Xu, X., Wain, J.C., Wiencke, J.K., Kelsey, K.T. 1996.** Increased micronucleus frequency in lymphocytes from smokers with lung cancer. *Mutat Res*; 349: 43 – 50
- Chi, Y., Bhonsle, J.B., Canteenwala, T., Huang, J-P., Shiea, J., Chen, B-J., Chiang, L.Y. 1998.** Novel watersoluble hexakis(4-sulfobutyl)fullerenes as potent free radical scavengers. *Chem. Lett.* 465 – 466
- Chi, Y., Canteenwala, T., Chen, H.H.C., Jeng, U.S., Lin, T-L., Chiang, L.Y. 2002.** Free radical scavenging and photodynamic functions of micelle-like hydrophilic hexa(sulfobutyl)fullerene (FC4S). *Perspect. Fullerene Nanotechnol.* 165 – 183
- Chiang, L.Y., Lu, F-J., Lin, J-T. 1995.** Free radical scavenging activity of water-soluble fullerenols. *Chem. Commun.* 1: 1283 – 1284
- Choy, W.N. 2001.** Genetic toxicology and cancer risk assessment. New York: Marcel Dekker: 163 – 186
- Church, D.F., Pryor, W.A. 1985.** Free Radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. *Environ. Health Perspect*; 64: 111 – 126
- Cighetti, G., Duca, L., Bortone, L., Sala, S., Nava, I., Fiorelli, G, Cappellini, M.D. 2002.** Oxidative Status and Malondialdehyde in β -thalassaemia Patients. *European Journal of Clinical Investigation*; 32: 55 – 601
- Clarkson, P.M., Thompson, H.S. 2000.** Antioxidants: What role do they play in physical activity and health ?. *Am J Clin Nutr*; 72: 637 – 646
- Coggle, J.E. 1977.** Biological Effects of Radiation. Wykeham Pubs. Ltd. London: 29 – 100
- Colon, J., Hsieh, N., Ferguson, A., Kupelian, P., Seal, S., Jenkins, D.W., Baker, C.H. 2010.** Cerium oxide nanoparticles protect gastrointestinal epithelium from radiation-induced damage by reduction of reactive oxygen species and upregulation of superoxide dismutase 2. *Nanomedicine* 6: 698 – 705
- Cooper, G.M., Hausman, R.E. 2006.** Hücre Moleküler Yaklaşım. Türkçe Çeviri. Üçüncü Baskı. İzmir Tıp Kitabevi, İzmir: 80 – 85, 192 – 230
- Çıracı, S. 2005.** Bilkent Ulusal Nanoteknoloji Araştırma Merkezi, Bilim ve Teknik Eki Yeni Ufuklar, 38(453): 1 – 10
- Daly, T.K., Buseck, P.R., Williams, P., Lewis, C.F. 1993.** *Science* 259: 1599 – 1601

- De Boer, J., Hoeijmakers, J.H. 2000.** Nucleotide excision repair and human syndromes. *Carcinogenesis* 21: 453 – 460
- Debelec, B.B., Kantarcı, G. 2006.** Mutasyon, DNA Hasarı, Onarım Mekanizmaları, ve Kanserle İlişkisi. *J Fac Pharm*; 35(2): 149 – 170
- Demirel, S., Zamani, A. 2002.** MN tekniği ve kullanım alanları. *Genel Tıp Dergisi*; 12(3): 123 – 127
- Devipriya, N., Sudheer, A.R., Srinivasan, M., Menon, V.P. 2008.** Quercetin Ameliorates Gamma Radiation-Induced DNA Damage and Biochemical Changes in Human Peripheral Blood Lymphocytes. *Mutation Research* 654: 1 – 7
- Dizdaroğlu, M., Jaruga, P., Birincioğlu, M., Rodriguez, H. 2002.** Free Radical-Induced Damage To DNA: Mechanisms and Measurement. *Free Radical Biology & Medicine*, Vol. 32(11): 1102 – 1115, Şekil: 2
- Dormandy, T.L. 1983.** An approach to free radicals. *Lancet*; 322: 1010 – 1013
- Duffaud, F., Orsiere, T., Villani, P., Pelissier, A.L., Volot, F., Favre, R. et al. 1997.** Comparison between micronucleated lymphocytes rates observed in healthy subject and cancer patients. *Mutagenesis*; 12: 227 – 231
- Eastmond, D.A., Tucker, J.D. 1989.** Identification aneuploidy inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody. *Environ Mol Mutagen*; 13: 34 – 43
- Farré, M., Pérez, S., Gajda-Schranz, K., Osorio, V., Kantiani, L., Ginebreda, A., Barceló, D. 2010.** First determination of C₆₀ and C₇₀ fullerenes and N-methylfulleropyrrolidine C₆₀ on the suspended material of wastewater effluents by liquid chromatography hybrid quadrupole linear ion trap tandem mass spectrometry. *Journal of Hydrology* 383: 44 – 51
- Fenech, M., Morley, A.A. 1986.** Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: Effect of in vivo ageing and dose X-irradiation. *Mutat Res*; 161: 193 – 198
- Fenech, M. 2000.** The in vitro micronucleus technique. *Mutat Res*; 455: 81 – 95
- Feyman, R.P. 1999.** The pleasure of finding things out. Helix Books Perseus Publishing, ISBN: 0-7382-0349-1 Cambridge, Massachusetts, 151 – 170
- Fridovich, I. 2001.** Oxidative Stres. *Encyclopedia of Life Sciences*. Nature Publishing Group
- Friedberg, E.C., Walker, G.C., Siede, W. 1995.** DNA Repair and Mutagenesis. ASM Press, Washington: 91 – 453

- Friedberg, E. C. 2003.** DNA damage and Repair. *Nature*. 23(421): 436 – 440
- Fujitani, Y., Kobayashi, T., Arashidanib, K., Kunugitab, N., Suemurac, K. 2008.** Measurement of the Physical Properties of Aerosols in a Fullerene Factory for Inhalation Exposure Assessment. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene* 5(6): 380 – 389
- Garewal, H.S., Ramsey, L., Kaugars, G., Boyle, J. 1993.** Clinical experience with the micronucleus assay. *Cellular Biochem*; 17: 206 – 212
- Goorsell, D., Çıracı, S. 2000.** *Biomol. and Nanotech., American Scientist*, 88(3): 230
- Göksel, A. 1973.** Radyasyonun Biyolojik Etkileri ve Radyasyon Korunması. İTÜ Matbaası: 126 – 184.
- Griffiths, Anthony, J.F. et al. 1999.** "8: Chromosome Mutations: Chromosomal Rearrangements". *Modern Genetic Analysis*. W. H. Freeman and Company. ISBN 0-7167-3118-5
- Gutteridge, J.M.C. 1995.** Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chemistry*; 41: 1819 – 1828
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. 1984.** Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J.*(219): 1 – 14
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. 1989.** *Free radicals in biology and medicine*. 2th Ed. Oxford: Clarendon Pres; 125
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. 1990.** Role of Free Radicals and Catalytic Metal İons in Human Disease: An overview. *Methods Enzymol.*; 49(3): 577 – 587
- Heddle, J.A., Countryman, R.I. 1976.** The production of micronuclei from chromosome aberration in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutat Res*; 41: 321 – 332
- Hoeijmakers, J.H. 1993.** Nucleotide excision repair II: from E.coli to yeast. *Trends Genet* 9: 211 – 217
- Hoyt, V.W., Mason, E., 2008.** Nanotechnology: emerging health issues. *J. Chem. Health Saf.* 15: 10 – 15
- Högstedt, B., Karlsson, A. 1985.** The size of micronuclei in human lymphocytes varies according to inducing agent used. *Mutat Res*; 156: 229 – 232
- Hunter, R.J., Preedy, V.R. 2011.** *Nanomedicine in Health and Disease*: 101 – 103, 214
Şekil 1

International Atomic Energy Agency, 2001. Cytogenetic analysis for radiation dose assessment - a manual, in: Technical Reports Series; 405: 81 – 86

Ismail, I.H., Hendzel, M.J. 2008. Review: The γ -H2A.X: Is It Just a Surrogate Marker of Double-Strand Breaks or Much More ? Environmental and Molecular Mutagenesis; 49: 73 – 82

Ja Borm, P., Robbins, D., Haubold, S., Kuhlbusch, T., Fissan, H., Donaldson, K., Schins, R., Stone, V., Kreyling, W., Lademann, J., Krutmann, J., Warheit, D., Oberdorster, E., 2006. The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC: 2 – 5

Kaplan, Ş.Ş., Karanfil, T., Kitiş, M. 2007. Nanomateriyallerin Potansiyel Çevresel Etkileri, 7. Ulusal Çevre Mühendisliği Kongresi (Yaşam Çevre Teknoloji): 2 – 3

Kaya, T., Adapınar, B., Özkan, R. 1996. Radyasyon Sağlığı ve Radyasyondan Korunma. Temel Radyoloji Tekniği. Eskişehir: Güneş & Nobel Tıp Kitabevi: 118 – 137

Keeney, S. et al. 1997. "Meiosis-specific DNA double-strand breaks are catalyzed by Spo11, a member of a widely conserved protein family". Cell 88(3): 375 – 384

Kinnula, V.L., Paakko, P., Soini, Y. 2004. Antioxidant enzymes and redox regulating thiol proteins in malignancies of human lung. FEBS: 1 – 6

Kirsch-Volders, M., Elhajouji, A., Cundari, E., Van Hummelen, P. 1997. The in vitro micronucleus test: a multi-endpoint assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosome breakage, chromosome loss and non-disjunction. Mutat Res; 392(1-2): 19 – 30

Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, M.J., Kirchner, S., Lorge, E., Morita, T., Norppa, H., Surrallés, J., Vanhauwaert, A., Wakata, A. 2003. Report from the in vitro micronucleus assay working group, Mutat. Res.; 540: 153 – 163

Kiss, L.B., Söderlund, J., Niklasson, G.A., Granqvist, C.G. 1999. New approach to the origin of lognormal size distributions of nanoparticles. Nanotechnology 10: 25 – 28

Klug, W.S., Cummings, M.R. 2002. Genetik Kavramlar. Altıncı Baskıdan Türkçe Çeviri. Palme Yayıncılık. Ankara: 477 – 481

Krishna, G., Hayashi, M. 2000. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. Mutat Res; 455: 155 – 166

Krug, H.F., Kern, K., Wrle-Knirsch, J.M. 2006. Diabate in Nanomaterials - Toxicity, Health and Environmental Issues, (Ed.: C. Kumar), Wiley-VCH, Weinheim, (5)200: 153 – 185

- Krusic, P.J., Wasserman, E., Keizer, P., Morton, J.R., Preston, K.F. 1991.** Radical reactions of C₆₀. *Science* 254: 1183 – 1185
- Kulaksız, G., Sancar, A. 2007.** Nükleotid Eksizyon Onarımı ve Kanser. *Türk Biyokimya Dergisi*; 32(3): 104 – 111
- Kurutaş, B.E., İnanç, G.F., Kılınc, M. 2004.** Serbest Radikaller. *Arşiv*; 13: 113 – 120
- Li, G.M. 2008.** Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Res*; 18: 85 – 98
- Lin, H.S., Lin, T.S., Lai, R.S., D’Rosario, T., Luh, T.Y. 2000.** Fullerenes as a new class of radioprotectors. *Int. J. radiat. Biol*; 77(2): 235 – 239
- Lipscomp, M., Cotran, R., Robbins, S. 1992.** Environmental Diseases. Basic pathology. 5th ed. Philadelphia; W. B. Saunders: 217 – 274
- Liu, Z., Kiessling, F., Gatjens, J. 2010.** Advanced Nanomaterials in Multimodal Imaging: Design, Functionalization and Biomedical Applications. Hindawi Publishing Corporation *Journal of Nanomaterials*: 6 – 7, Şekil 3 – 4
- Lodish, H. et al. 2000.** "12.5: Recombination between Homologous DNA Sites: Double-Strand Breaks in DNA Initiate Recombination". *Molecular Cell Biology*. W. H. Freeman and Company. ISBN 0-7167-3136-3
- Lorge, E., Lambert, C., Gervais, V., Becourt-Lhote, N., Delongas, L., Claude, N. 2007.** Genetic toxicity assessment: employing the best science for human safety evaluation. Part II: Performances of the *in vitro* micronucleus test compared to the mouse lymphoma assay and the *in vitro* chromosome aberration assay. *Toxicol Sci*; 96(2): 214 – 217
- Löbrich, M., Shibata, A., Beucher, A., Fisher, A., Ensminger, M., Goodarzi, A.A., Barton, O., Jeggo, P.A. 2010.** γ -H2AX foci analysis for monitoring DNA double-strand break repair. Strengths, limitations and optimization. *Landes Bioscience 2010, Cell Cycle* 9(4): 662 – 669
- Maisin, J.R. 1998.** Bacq and Alexander Award lecture – chemical radioprotection: past, present, and future prospects. *Int. J. Radiat. Biol.* 73, 443 – 450
- Marcon, E., Moens, P.B. 2005.** "The evolution of meiosis: recruitment and modification of somatic DNA-repair proteins". *Bioessays* 27(8): 795 – 808
- Markovic, Z., Trajkovic, V. 2008.** Review: Biomedical potential of the reactive oxygen species generation and quenching by fullerenes (C₆₀). *Biomaterials* 29: 1 – 13
- Martin, L.J. 2008.** DNA Damage and Repair: Relevance to Mechanisms of Neurodegeneration. *J Neuropathol Exp Neurol*; 67(5): 377 – 387

- Meram, İ., Aktaran, Ş. 2002.** Serbest Radikallerin Biomoleküller Üzerine Etkileri. Arşiv;11: 299
- Mirkov, S.M., Djordjevic, A.N., Andric, N.L., Andric, S.A., Kostic, T.S., Bogdanovic, G.M., Vojinovic-Miloradov, M.B., Kovacevic, R.Z. 2004.** Nitric oxide-scavenging activity of polyhydroxylated fullereneol, C₆₀(OH)₂₄. Nitric Oxide 11: 201 – 207
- Mrdanovic, J., Solajic, S., Bogdanovic, V., Stankov, K., Bogdanovic, G., Djordjevic, A. 2009.** Effects of fullereneol C₆₀(OH)₂₄ on the frequency of micronuclei and chromosome aberrations in CHO-K1 cells. Mutation Research 680: 25 – 30
- Munshi, A., Hobbs, M., Meyn, R.E. 2005.** Clonogenic Cell Survival Assay. Methods in Molecular Medicine, vol. 110: Chemosensitivity: Vol. 1: In Vitro Assays Edited by: R.D. Blumenthal © Humana Press Inc., Totowa, NJ
- Müftüoğlu, M. 2003.** DNA Tamiri ve Erken Yaşlanma Sendromları. Türk Biyokimya Dergisi; 28(1): 20 – 24, Şekil: 1
- Niwa, Y., Iwai, N. 2006.** Genotoxicity in cell lines induced by chronic exposure to water-soluble fullerenes using micronucleus test, Environ. Health Prev. Med. 11: 292 – 297
- Norbury, C.J., Hickson, I.D. 2001.** Cellular responses to DNA damage. Annu Rev Pharmacol Toxicol 41: 367 – 401
- Nordberg, J., Arner, E.S.J. 2001.** Reactive Oxygen Species, Antioxidants and The Mammalian Thioredoxin System. Free Radical Biology and Medicine; 31(11): 1287 – 1317
- Olive, P.L., 1998.** The Role of DNA Single and Double Strand Breaks in Cell Killing by Ionizing Radiation. Radiation Research. 150: 42 – 51
- Onur, E., Tuğrul, B., Bozyiğit, F. 2009.** DNA Damage and Repair Mechanisms. Türk Klinik Biyokimya Dergisi; 7(2): 61 – 70
- Özalpan, A. 2001.** Temel Radyobioloji. Haliç Üniversitesi Yayınları, İstanbul ISBN: 975-8574-00-0: ?
- Özdemir, T., Demiral, A. 2001.** Radyasyonun akciğer üzerine etkileri. Türk Onkoloji Dergisi 16: 36 – 41
- Özkan, A., Fışkın, K. 2004.** Serbest Oksijen Radikalleri, Karsinogenez ve Antioksidant Enzimler. Türk Hematoloji Onkoloji Dergisi; 14: 52 – 60
- Pandey, B.N., Mishra, K.P. 2003.** Oxidative Membrane Damage and Its Involvement in Gamma Radiation- induced Apoptotic Cell Death. Iran. J. Radiat. Res, 1(1): 17 – 22

- Peltomaki, P. 2001.** DNA mismatch repair and cancer. *Mutat Res*; 488: 77 – 85
- Perez, A.C., Brady, L.W. 1998.** Principles and Practice of Radiation Oncology (3rd)
- Prasad, N.R., Menon, V.P., Vasudev, V., Pugalendi, K.V. 2005.** Radioprotective Effect of Sesamol on γ -Radiation Induced DNA Damage, Lipid Peroxidation and Antioxidants Levels in Cultured Human Lymphocytes. *Toxicology* 209: 225 – 235
- Priyadarsini, K.I. 1997.** Free radical reactions of curcumin in membrane models. *Free Radic Biol Med* 1997(23): 838 – 843
- Prosser, J.S., Moquet, J.E., Lloyd, D.C., Edwards, A.A. 1988.** Radiation Induction of micronuclei in human lymphocytes. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 199(1): 37 – 45
- Quick, K.L., Ali, S.S., Arch, R., Xiong, C., Wozniak, D., Dugan, L.L.A. 2008.** Carboxyfullerene, S. O. D. mimetic improves cognition and extends the lifespan of mice. *Neurobiol. Aging* 29: 117 – 128.
- Rawson, P.S. 1984.** Ceramics. University of Pennsylvania Press. ISBN 0-8122-1156-1
- Riboni, R.E., Botta, E., Stefanini, M., Numata, M., Yasui, A. 1992.** Identification of the eleventh complementation group of UV-sensitive excision repair defective rodent mutants. *Cancer Res* 52: 605 – 607
- Rzagalinski, B.A. 2005.** Nanoparticles and cell longevity. *Technol Cancer Res Treat* 2005; 4(6): 651 – 659
- Salles, B., Calsou, P., Mirey, G. 2011.** DNA-PK, a Pharmacological Target in Cancer Chemotherapy and Radiotherapy? *J Cancer Sci Ther* S8(001): 3, Şekil 2
- Schmid, W. 1975.** The micronucleus test. *Mutat Res*; 31: 9 – 15
- Seaton, A., Donaldson, K. 2005.** Nanoscience, nanotoxicology, and the need to think small. *Lancet*; 365: 923 – 924
- Shrivastav, M. et al. 2008.** "Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice". *Cell Research* 18: 134 – 147
- Singh, N., Manshian, B., Jenkins, G.J.S., Griffiths, S.M., Williams, P.M., Maffei, T.G.G., Wright, C.J., Doak, S.H. 2009.** NanoGenotoxicology: The DNA damaging potential of engineered nanomaterials, *Biomaterials* 30: 3891 – 3914, Şekil 3
- Sluphaug, G., Kavli, B., Krokan, H.E. 2003.** The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. *Mutat Res*; 531: 231 – 251

- Srinivasan, M., Prasad, N.R., Menon, V.P. 2006.** Protective effect of curcumin on γ -radiation induced DNA damage and lipid peroxidation in cultured human lymphocytes. *Mutation Research*. 611: 96 – 103
- Stopper, H., Mler, O.S. 1997.** Micronuclei as a biological endpoint for genotoxicity: A Minireview. *Toxicol In Vitro*; 11: 661 – 667
- Sung, P., Klein, H. 2006.** "Mechanism of homologous recombination: mediators and helicases take on regulatory functions". *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7(10): 739 – 750
- Surralles, J., Xamena, N., Creus, A., Catalan, J., Norppa, H., Marcos, R. 1995.** Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures. *Mutat Res*; 341: 169 – 184
- ekeroğlu, V., Zlal Atlı-ekeroğlu, Z. 2011.** Derleme: Genotoksik hasarın belirlenmesinde mikronükleus testi. *Turk Hij Den Biyol Derg*, 2011; 68(4); Syf: 241 – 252, ekil: 50 – 54
- Taketo, M.M., Edelman, W. 2009.** Mouse Models of Colon Cancer. *Gastroenterology*. Volume 136, Issue 3: 780 – 798, ekil: 5
- Taner, A.C. 2009.** İyonlaştırıcı Radyasyonların Biyolojik Etki Mekanizmaları. *Türkiye Atom Enerjisi Kurumu 2009*. <http://www.taek.gov.tr/bilgi-kosesi/radyasyondan-korunma/283-iyonlastirici-radyasyonun-biyolojik-etkileri.html>
- Titenko-Holland, N., Windham, G., Kolachana, P., Reinisch, F., Parvarham, S., Osorio, A.M. et al. 1997.** Genotoxicity of malathion in human lymphocytes assessed using the micronucleus assay *in vitro* and *in vivo*: a study of malathion-exposed workers. *Mutat Res*; 388(1): 85 – 95
- Trajkovic, S., Dobric, S., Djordjevic, A., Dragojevic-Simic, V., Milovanovic, Z. 2005.** Radioprotective Efficiency of Fullerenol in Irradiated Mice. *Materials Science Forum* Vol. 494: 549 – 554
- Troelstra, C., Van Gool, A., De Wit, J., Vermeulen, W., Bootsma, D., Hoeijmakers, J.H. 1992.** ERRC6, a member of a subfamily of putative helicases, is involved in Cockayne's syndrome and preferential repair of active genes. *Cell* 71: 939 – 953
- Tsurimoto, T. 1998.** PCNA, a multifunctional ring on DNA. *Biochim Biophys Acta* 1443; 23 – 39
- Tubiana, M., Dutreix, J., Wambersie, A. 1990.** An Introduction to Radiobiology. Taylor & Francis Ltd, London: 270

- Türk Nöroşirürji Derneği, 2007.** Nanoteknoloji ve Nöroşirürji, Ocak 2007(14): 53, <http://www.turknorosirurji.org.tr/pdf/nanotekn.pdf>
- Urso, M.L., Clarkson, M.P. 2003.** Oxidative stres, exercise, and antioxidant supplemetation. *Toxicology*; 189: 41 – 54
- Van Attikum, H., Gasser, S.M. 2009.** Review: Crosstalk between histone modifications during the DNA damage response. *Trends in Cell Biology*; 19(5): 1 – 11, Şekil 2
- Van Gant, D., Hoeijmakers, J.H., Kanaar, R. 2001.** Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. *Nature Rev. Genet.* 2: 196 – 205, Şekil 3
- Vanparys, P., Vermeiren, ., Sysmans, M., Temmerman, R. 1990.** The micronucleus assay as a test for the detection of aneugenic activitiy. *Mutat Res*; 244: 95 – 103
- Von Ledebur, M.M., Schmid, W. 1973.** The micronucleus test: Methodological aspects. *Mutat Res*; 19: 109 – 117
- Wang, J.X., Zhang, L.A., Li, B.X. 2002.** Cancer incidence and risk estimation among medical x-ray workers in China, 1950 – 1995. *Health Phys* 82: 455 – 466
- Wang, Z. 2001.** Translesion synthesis by the UmuC family of DNA polymerases. *Mutation Research/DNA Repair. Volume 486(2):* 59 – 70, Şekil 2
- Watters, G.P., Smart, D.J., Harvey, J.S., Austin, C.A. 2009.** H2AX phosphorylation as a genotoxicity endpoint. *Mutation Research*; 679: 50 – 58
- Widel, M., Kolosza, Z., Jedrus, S., Lukaszczyk, B., Raczek-Zwierzycka, K., Swierniak, A. 2001.** Micronucleus assay in vivo provides significant prognostic information in human cervical carcinoma: The updated analysis. *Int J Radiat Biol*; 77: 631 – 636
- Wilstermann, A.M., Osheroff, N. 2001.** Base Excision Repair Intermediates as Topoisomerase II Poisons. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* 276(49); Issue of December 7: 2, Şekil 1
- Witte, P., Beuerle, F., Hartnagel, U., Lebovitz, R., Savouchkina, A., Sali, S., Guldi, D., Chronakis, N., Hirsch, A. 2007.** Water-solubility, antioxidant activity and cytochrome C binding of four families of exohedral adducts of C₆₀ and C₇₀. *Org. Biomol. Chem.* 5: 3599 –3613
- Yıldırım, H. 1985.** Biyofizik. Anadolu Üniversitesi Basımevi, Eskişehir: 321 – 324
- Yılmaz, A. 2006.** Proteinlerin Yürüdüküklerini Keşfeden Bir Yıldızımız, *Bilim ve Teknik*, 460: 66 – 69

Yırtıcı, Ü. 2007. Tartrazinin *Cyprinus carpio*'daki genotoksik etkisinin MN yöntemi ile araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2007.

Young, I.S., Woodside, J.V. 2001. Antioxidants in health and disease, *J Clin Pathol*; 54: 176 – 186

Zakharenko, L.P.I., Zakharov, K., Vasyunina, E.A., Karamysheva, T.V., Danilenko, A.M., Nikiforov, A.A. 1997. Determination of genotoxicity of fullerene C₆₀ and fullerol by the somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster* and SOS chromotest, *Russ. J. Genet.* 33: 327 – 330

Zhang, Y., Rohde, L.H., Emami, K., Hammond, D., Casey, R., Mehta, S.K., Jeevarajan, A.S., Pierson, D.L., Wu, H. 2008. Suppressed expression of non-DSB repair genes inhibits gamma-radiation induced cytogenetic repair and cell cycle arrest. *DNA Repair (Amst)*; 7: 1835 – 1845

Zhang, Y., Rohde, L.H., Wu, H. 2009. Involvement of Nucleotide Excision and Mismatch Repair Mechanisms *Current Genomics*; 10(4)

<http://www.epa.gov/apti/bces/module3/category/category.htm>

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Mümün COŞKUN

Doğum Yeri ve Tarihi : Kırcaali/BULGARİSTAN – 27.08.1985

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Bursa Erkek Lisesi / 2000 – 2004

Lisans : E.Ü. F.E.F. Biyoloji Bölümü Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji/ 2005 – 2009

Yüksek Lisans : U.Ü. F.B.E. Biyoloji A.B.D. Genel Biyoloji B.D./ 2009 – 2013

SCI ve SCI Expanded Kapsamında Taranan Dergilerde Yayınlanmış Makaleler:

Cavaş, T., Cinkilic, N., Vatan, O., Yilmaz, D., Coşkun, M. 2012. *In vitro* Genotoxicity Evaluation of Acetamiprid in CaCo2 Cells Using the Micronucleus, Comet and Gamma-H2AX Foci Assays. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 104: 212-217

Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabında Özeti Basılan Bildiriler:

Cinkilic, N., Cavas, D., Yilmaz, D., VATAN, O., Tuzun, E., Coskun, M. 2010. Evaluation of River Water Genotoxicity in Cultured Human Lymphocytes Using the Micronucleus Test and The Comet Assay. *Genotoxicity in aquatic systems; Causes, effects and future needs. 3 rd International Symposium. 22-24 September 2010 Freiburg im Breisgau, Germany.*

Ulusal Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabında Özeti Basılan Bildiriler:

Çavaş, T., Çinkılıç, N., Vatan, Ö., Coşkun, M. 2011. Nano C₆₀ Sulu Süspansiyonlarının *In vitro* Genotoksik Etkilerinin İnsan Akciğer Fibroblast Hücre Hattı IMR 90 Üzerinde İncelenmesi. 12. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi 27-30 Ekim 2011 Antalya, Türkiye.

T.C
YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
ULUSAL TEZ MERKEZİ

TEZ VERİ GİRİŞİ VE YAYIMLAMA İZİN FORMU

Referans No	459495
İşlem Türü	İşlemede
Yazar Adı / Soyadı	mümün coşkun
Uyruğu / T.C.Kimlik No	T.C. 18520695736
Telefon / Cep Telefonu	0536 562 2682
e-Posta	mumincoskun@gmail.com
Tezin Dili	Türkçe
Tezin Özgün Adı	Fulleren nanopartiküllerinin radyasyona maruz bırakılan A549 insan akciğer epitel hücreleri üzerindeki koruyucu etkilerinin mikronükleus ve gH2AX fokus testleri kullanılarak araştırılması
Tezin Tercümesi	Investigation of protective effects of fullereneol nanoparticles on irradiated A549 human lung epithelium cells using micronucleus and gH2AX foci assays
Konu Başlıkları	Biyoloji
Üniversite	Uludağ Üniversitesi
Enstitü / Hastane	Fen Bilimleri Enstitüsü
Bölüm	Biyoloji Bölümü
Anabilim Dalı	Genel Biyoloji Anabilim Dalı
Bilim Dalı / Bölüm	Genel Biyoloji Bilim Dalı
Tez Türü	Yüksek Lisans
Yılı	2013
Sayfa	141
Tez Danışmanları	Doç. Dr. Tolga ÇAVAŞ
Dizin Terimleri	
Önerilen Dizin Terimleri	Fulleren = Fullerene, Fullerenol = Fullerenol, Nanopartikül = Nanopartide, gama-H2AX = gamma H2AX, Mikronükleus = Micronucleus, Radyoprotektif = Radioprotective, A549
Yayımlama İzni	<input checked="" type="checkbox"/> Tezimin yayımlanmasına izin veriyorum <input checked="" type="checkbox"/> Ertelemesini istiyorum [3 Yıl]

b. Tezimin Yükseköğretim Kurulu Tez Merkezi tarafından çoğaltılması veya yayımının 05.02.2016 tarihine kadar ertelenmesini talep ediyorum. Bu tarihten sonra tezimin, internet dahil olmak üzere her türlü ortamda çoğaltılması, ödünç verilmesi, dağıtımı ve yayımı için, tezimle ilgili fikri mülkiyet haklarım saklı kalmak üzere hiçbir ücret (royalty) talep etmeksizin izin verdiğimi beyan ederim.

NOT: (Erteleme süresi formun imzalandığı tarihten itibaren en fazla 3 (üç) yıldır.)

06.02.2013

İmza: 