

**YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**RADYOPROTEKTÖR BİYOPOLİMER SİSTEMLERİN
GELİŞTİRİLMESİ**

Yük. Kimyager Günay YÜCE

**FBE Kimya Ana Bilim Dalı Biyokimya Programında
Hazırlanan**

DOKTORA TEZİ

Tez Savunma Tarihi :15 Aralık 2006

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Mehmet Mustafaev AKDESTE (YTÜ)

Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Refiye YANARDAĞ (İÜ)

: Prof. Dr. Münire HACİBEKİROĞLU (İÜ)

: Prof. Dr. Ayşe OGAN (MÜ)

: Doç. Dr. İnci ATAÇ (YTÜ)

İSTANBUL, 2006

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGE LİSTESİ	v
KISALTMA LİSTESİ.....	vi
ŞEKİL LİSTESİ.....	vii
ÇİZELGE LİSTESİ	ix
ÖNSÖZ	xi
ÖZET	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. TEORİK KISIM.....	5
2.1 Radyoprotektör Tanımı ve Özellikleri.....	5
2.1.1 Tarihsel Gelişimi	6
2.1.2 Radyoprotektör Olarak Kullanılan Maddeler	7
2.2 Radyoprotektif Etki Mekanizmaları	13
2.2.1 Moleküler Seviyede Koruma	13
2.2.2 Biyokimyasal-fizyolojik Seviyede Koruma.....	14
2.2.3 Organik Seviyede Koruma.....	14
2.3 Radyasyon ve Özellikleri.....	15
2.3.1 İyonlaştırıcı Radyasyon	15
2.3.2 Radyasyon Dozları ve Doz Birimleri	17
2.3.3 Radyasyonun Biyolojik Etkileri	19
2.3.4 Radyasyonun Etki Kademeleri.....	21
2.3.5 Radyasyonun DNA üzerine etkisi	23
2.3.6 Radyasyonun Proteinler Üzerine Etkisi.....	25
3. SİTOGENETİK YÖNTEMLER	26
3.1 İnsan Lenfosit Hücreleri	26
3.2 Ökaryotik Hücrelerde Mitoz Bölünme	27
3.3 Kromozom Aberasyon Analizi.....	30
3.4 Mikronükleus Analizi	32
3.5 Fluorescence In situ Hibridization (FISH) Analiz Yöntemi	35
3.6 SCE (Kardeş Kromatid Değişimi) Analizi	35
3.7 PCC (Erken Kromozom Yoğunlaşması) Analiz Yöntemi	35
4. POLİELEKTROLİTLER.....	36
4.1 Polianyonlar	36
4.2 Polikasyonlar	37
4.3 Poliamfolitler.....	38
4.4 Polielektrolit Kompleksler (PEC)	38

4.5	Polimer-Metal Kompleksleri (PMC).....	39
4.6	Üçlü Polimer-Metal-Protein Kompleksleri.....	42
4.7	İnterpolimerkompleks Oluşumunda Kooperatiflik ve Biyomedikal Uygulamaları.....	48
4.8	Polimerik Taşıyıcılara Bağlanmış Radyoprotektörler.....	56
4.9	Bazı Biyomedikal Polimerlerin Kullanım Alanları.....	57
5.	DENEYSEL BÖLÜM	58
5.1	Kullanılan Cihazlarlar.....	58
5.2	Kullanılan Kimyasal Maddeler	59
5.3	Kimyasal Çalışmalar.....	63
5.3.1	PMC Oluşumunun Spektrofotometrik İncelenmesi	63
5.3.2	Neokuproin Yöntemi ile İkili Komplekslerde Cu^{1+} Tayini	63
5.3.3	P(AA/VP) Kopolimeri Sentezi.....	64
5.3.3.1	Kopolimerin FT-IR ile Yapı Tayini	64
5.3.3.2	Kopolimerin Elementel Analizi	71
5.3.4	AAS Yöntemi ile Cu^{2+} Tayini.....	72
5.3.5	Işınlama Koşulları	73
5.3.5.1	Fricke Çözeltisi ile Doz Kalibrasyonu.....	73
5.4	Radyobiolojik Çalışmalar	74
5.4.1	Kan Örneklerinin Elde Edilmesi	74
5.4.2	Kan Örneklerinin, Polimer ve Çeşitli Kompleksleri ile Etkileşimi.....	74
5.4.3	Kan Örneklerinin ^{60}Co γ Kaynağı ile Düşük Dozlarda Işınlanması.....	74
5.5	Hücrelerin Kültüre Alınması.....	75
5.5.1	Hücrelerin Tesbit (Fikse) Edilmesi	75
5.5.2	Preparatların Değerlendirilmesi	77
6.	BULGULAR	80
6.1	UV-VIS Ölçüm Bulguları	80
6.1.1	PMC kompleksinin oluşumunda $[Cu^{2+}]$ konsantrasyonunun etkisi	80
6.1.2	Neokuproin Yöntemi ile Cu^{1+} Tayini	80
6.2	AAS Sonuçları.....	81
6.3	PAA- Cu^{2+} ve PAA- Cu^{2+} -BSA Kompleksleri HPLC Sonuçları.....	84
6.4	Preparatların Sitogenetik Olarak İncelenmesi.....	85
6.4.1	Propiyonik Asit (PPA) MN Bulguları	85
6.4.2	PAA (PAA-100, Mw:100 000) MN Sonuçları	85
6.4.3	PAA-100 Varlığında 1 Gy Işınlama ile Kanda Oluşan MN	86
6.4.4	PAA-100 Varlığında 3 Gy Işınlama ile Kanda Oluşan MN	86
6.4.5	Etkileşim Zamanına Bağlı Olarak PAA-100'nin 1 ve 3 Gy Dozda Işınlama ile Kanda Oluşturduğu MN.....	87
6.4.6	PAA (PAA-5, Mw:5.000) MN Bulguları	88
6.4.7	PAA-5 Varlığında 1 Gy Işınlama ile Kanda Oluşan MN	88
6.4.8	PAA- Cu^{2+} İkili Komplekslerinin $n_{Cu^{2+}}/n_{AA}$ Mol Oranına Bağlı Olarak MN Değişimi.....	89
6.4.9	PAA- Cu^{2+} İkili Komplekslerinin $n_{Cu^{2+}}/n_{AA}$ Mol Oranına Bağlı Olarak 1 Gy Işınlama Dozu ile Oluşturdukları MN Değerleri.....	89
6.4.10	PAA- Cu^{2+} -BSA Üçlü Komplekslerinin $n_{Cu^{2+}}/n_{AA}$ Mol Oranına Bağlı Oluşturdukları MN Değerleri	90

6.4.11	PAA-Cu ²⁺ -BSA Üçlü Komplekslerinin n _{Cu2+} /n _{AA} Mol Oranına Bağlı Olarak 1 Gy Işınlama Dozu ile Oluşturdukları MN Değerleri.....	90
6.4.12	P(AA/VP) (75:25, Mw: 80.000) Kopolimerinin Kanda Oluşturduğu MN Değerleri.....	91
6.4.13	P(AA/VP) (75:25, Mw: 80.000) Kopolimerinin 1 Gy Dozda Kanda Oluşturduğu MN Değerleri	91
6.4.14	PVP (PVP-50, Mw:50.000)'nin Kanda Oluşturduğu MN Değerleri	92
6.4.15	PVP-50'nin 1 Gy Dozda Kanda Oluşturduğu MN Değerleri	92
6.5	CA Yöntemi ile Elde Edilen Sonuçlar.....	93
6.5.1	PAA-100 Varlığında 1 Gy'de Işınlama ile Kanda Oluşan CA	93
6.5.2	PAA-100 Varlığında 1 Gy'de Işınlama ile Kanda Oluşan CA	93
6.5.3	Etkileşim Zamanına Bağlı Olarak PAA-100'ün 1 ve 3 Gy Dozda Işınlama ile Kanda Oluşturduğu CA.....	94
6.5.4	PAA-5 Varlığında 1 Gy'de Işınlama ile Kanda Oluşan CA	95
6.5.5	PAA-Cu ²⁺ İkili Komplekslerinin n _{Cu2+} /n _{AA} Mol Oranına Bağlı Olarak 1 Gy Işınlama Dozu ile Oluşturdukları CA	95
6.5.6	PAA-Cu ²⁺ -BSA Üçlü Komplekslerinin n _{Cu2+} /n _{AA} Mol Oranına Bağlı Olarak 1 Gy Işınlama Dozu ile Oluşturdukları CA	96
6.5.7	PVP-50 Varlığında 1 Gy'de Işınlama ile Kanda Oluşan CA.....	96
7.	SONUÇLAR ve TARTIŞMA	97
7.1	Çeşitli Polimerik Sistemlerin Kanda MN Oluşumuna Etkisi	97
7.2	Polimerik Sistemlerin Radyasyon Varlığında MN ve CA Oluşumuna Etkisi	102
	KAYNAKLAR.....	105

SİMGE LİSTESİ

α	Kararsız atomlardan yayınan ışımaya türü
β	Kararsız atomlardan yayınan ışımaya türü
BH	Biyolojik molekül
γ	Kararsız atomlardan yayınan ışımaya türü
Gy	Absorblanma doz birimi
R	Işınlanma birimi
Rad	Absorblanma doz birimi
Rem	Doz eşdeğeri birimi
P1	Sentezlenen polimer
χ	Maksimum stimülasyon katsayısı

KISALTMA LİSTESİ

AAS	Atomik Absorbsiyon Spektrofotometre
As	Asentrik
AET	β -Amino Etil Tiyoronyum
ATP	Adenozine Tri Phosphate
cAMP	Cyclic Adenozine Mono Phosphate
BN	Binükleat
Bq	Becquerel
BSA	Bovin Serum Albumin
CA	Chromosom Aberration
Ci	Curie
Dis	Disentrik
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DNP	Deoksiribo Nükleik Proteit
HBMN	Hücre Başına Mikro Nükleus
ICRU	International Committee of Radiation Units
LET	Linear Energy Transfer
L	Litre
MEG	Merkapto Etil Guanidin
MN	Mikro Nükleus
M _w	Molecular Weight
Mev	Megaelektronvolt
NPEC	Non-Stokiyometrik Polyelectrolyte Complex
OD	Optik Densite
PAA	Poli Akrilik Asit
PA	Poly Acid
PB	Poly Baz
PBS	Phosphate Buffer Saline
PE	Poli Elektrolit
PEC	Poly Electrolyte Complex
PEM	Poly Electrolyte Metal
PHA-M	Phyto Hem Aglutinin-M
PMC	Polymer Metal Complex
PPA	Propiyonik asit
PVP	Poli Vinil Prolidon
P(AA/VP)	Poli Akrilik Asit Vinil Prolidon
RNA	Ribonükleik asit
RPM	Rotate Per Minute
SI	Standart of International
S	Sentez
SOD	Süper Oxide Dismutase
TSH	Toplam Sayılan Hücre
TCR	T Cell Reseptor
UV-Vis	Ultra Viole Visible
WR-2721	[S-2-(3-aminopropilamino)etilfosforotiyolik asit]

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1	β -aminoetil tiyoronyum (AET) ve Merkaptoetil guanidin (MEG) formülü	7
Şekil 2.2	Sistein ve sistamin formülü	7
Şekil 2.3	Mixed disülfid oluşumu ile hedef protein molekülünün hipotetik proteksiyon mekanizması	8
Şekil 2.4	WR-2721(Amifostin, S-2-(3-aminopropilamino)etilfosforotiyoik asit).	9
Şekil 2.5	Prostaglandin F2A butanboronat	10
Şekil 2.6	İnterlökin-1- β	11
Şekil 2.7	Diltiazem ve Nifedipin formülü.....	11
Şekil 2.8	Vitamin A ve C formülü.....	12
Şekil 2.9	Simetidin.....	13
Şekil 2.10	DNA molekülünün temel yapı şeması	23
Şekil 2.11	Radyasyon etkisi ile DNA molekülünün tek veya çift ipliğinde oluşan kopmalar ve bu kopma yerlerinin yeniden bağlanma olasılıkları.....	24
Şekil 3.1	Hücre siklusu	28
Şekil 3.2	Mitoz bölünme.....	29
Şekil 3.4	MN Analiz tekniği kullanılarak hazırlanmış bir preparat üzerinde, ışık mikroskopunda görülmesi muhtemel hücre şekilleri.	34
Şekil 4.1	PAA formülü.....	37
Şekil 4.2	PEVP formülü.....	37
Şekil 4.3	Poliakrilik asit vinilpirolidon kopolimeri	38
Şekil 4.4	Polimer-metal komplekslerinin [Me] / [PE]<1 (I) ve [Me] / [PE] \geq 1 (II) oranlarında oluşan yapısı.....	40
Şekil 4.5	PMC’de kompleks oluşumunun şematik gösterilişi.....	42
Şekil 4.6	a) Üçlü PAA-Cu ²⁺ -protein polikompleksinin yapısı, b) Cu ²⁺ iyonu varlığında PAA ve proteinin fonksiyonel grupları arasında oluşan çelat yapısı.....	44
Şekil 4.7	Işınlanmamış (A) ve farklı dozlarda ışınlanmış (B-D) PAA-BSA karışımları (B=100 Gy; C=300 Gy; D=1200 Gy; C _{BSA} =C _{PAA} =0.01 g/L) HPLC sonuçları.....	45
Şekil 4.8	Radyasyonun Cu ²⁺ içeren polielektrolit sistemleri üzerine etkisi.....	46
Şekil 4.9	SOD enzim sisteminde Me iyonunun rolü	46
Şekil 4.10	Işınlanmış ve ışınlanmamış PAA (A), SOD (B), PAA-SOD (C) çözeltilerinin HPLC sonuçları; 1- ışınlanmamış çözeltiler; 2- 600 Gy, 3- 2500 Gy, 4- 3000 Gy’de ışınlanmış çözeltiler; C _{BSA} =C _{PAA} =0.01 g/L	47
Şekil 4.11.	Farklı dozlarda ışınlanmış (2-5: 2=300 Gy; 3=1200 Gy; 4=2500 Gy; 5=3000 Gy) ve ışınlanmamış (1) PAA-Cu ²⁺ -BSA karışımları HPLC sonuçları C _{BSA} =C _{PAA} =0.01 g/L ; Cu= 1.4x10 ⁻³ g/mol/L(b) farklı n _{BSA} /n _{PAA} oranlarında hazırlanmış 3’lü komp. 1200 Gy ışınlanmış HPLC sonuçları.....	47
Şekil 4.12	İnterpolielektrolit reaksiyonu.....	48
Şekil 4.13	İnterpolimerik kompleksler.	49
Şekil 4.14	İmmün cevabı stimüle eden bazı PE’ler.....	52
Şekil 4.15	Pkat-1’in polimerizasyon derecesinin bir fonksiyonu olarak fare dalağında AFC’nin relatif sayısı(1), Pkat-2(a), ve PAA(b). Antijen dozu (koyun eritrositleri) 5. 10 ⁶ , adjuvant dozu 50 mg/kg (Kabanov, 2004).	53

Şekil 4.16	İn vitro olarak K ⁺ iyonu için B-lemfosit membranlarının geçirgenliği üzerine polielektrolitlerin etkisi .	54
Şekil 4.17	Hücre membranında iyonik geçişi sağlayan porların oluşumu	55
Şekil 4.18	PAA'nın molekül ağırlığına bağlı olarak <i>in vitro</i> koşullarda B-lemfositlerinde K ⁺ iyonu akışı ve buna bağlı olarak <i>in vivo</i> koşullarda immün cevabın artırılması. χ maksimum stimülasyon katsayısı .	56
Şekil 5.1	PAA/PVP mol oranına bağlı olarak PAA intensite değişimi.	65
Şekil 5.2	Yapay olarak hazırlanan PAA/PVP (0 mg PAA+10 mg PVP) FT-IR spektrumu.	66
Şekil 5.3	Yapay olarak hazırlanan PAA/PVP (0.25 mg PAA+0.75 mg PVP) FT-IR spektrumu.	66
Şekil 5.4	Yapay olarak hazırlanan PAA/PVP (0.5 mg PAA+0.5 mg PVP) FT-IR spektrumu.	67
Şekil 5.5	Yapay olarak hazırlanan PAA/PVP (0.75 mg PAA+0.25 mg PVP) FT-IR spektrumu.	67
Şekil 5.6	Yapay olarak hazırlanan PAA/PVP (1.0 mg PAA+ 0 mg PVP) FT-IR spektrumu.	68
Şekil 5.7	Sentetik AA/VP kopolimeri FT-IR spektrumu.	68
Şekil 5.8	Sentetik AA/VP kopolimeri FT-IR spektrumu.	69
Şekil 5.9	Sentez edilen AA/VP kopolimeri FT-IR spektrumu.	69
Şekil 5.10	Sentez edilen AA/VP kopolimeri FT-IR spektrumu.	70
Şekil 5.11	Sentez edilen AA/VP kopolimeri FT-IR spektrumu.	70
Şekil 5.12	Polimer ve çeşitli komplekslerinin kan ile etkileşimi.	77
Şekil 5.13	Kan örneklerinin kültüre alınması ve fiksasyon.	79
Şekil 6.1	$n_{Cu}/n_{Polimer}$ oranına bağlı olarak absorpsiyon değişimi	80
Şekil 6.2	Farklı polimer sistemlerinde radyasyon etkisi ile oluşan [Me ¹⁺]	81
Şekil 6.3	AAS ile Cu ²⁺ Tayini.	82
Şekil 6.4	Çeşitli [Cu ²⁺](mol/L) konsantrasyonlarında ikili ve üçlü komplekslerin HPLC kromatogramları.	84
Şekil 6.5	PAA-100'ün ışınlama dozlarına bağlı olarak MN oluşturması	87
Şekil 7.1	Bazların bir arada tutunmasını sağlayan H-bağları bölgesinden propiyonik asitin girebileceğini gösteren şekil.	100
Şekil 7.2	Biyosistemlerde kooperatif bağlanmayı gösteren şekil.	100
Şekil 7.3	Hasar gözlenmeyen binükleat hücreler.	101
Şekil 7.4	Hasarlı binükleat (a) ve metafaz hücreleri (b) görüntüleri.	103

Çizelge 2.1	Radyasyon türleri.	16
Çizelge 2.2	Radyasyon türlerine ait LET değerleri (Yülek, 1992).....	19
Çizelge 2.3	Radyasyonun direkt ve indirekt etkileri (Özalpan, 1980).	22
Çizelge 4.1	Makromoleküler taşıyıcılar (Hara, 1993).....	57
Çizelge 5.1	Çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler.....	59
Çizelge 5.2	Yapay olarak hazırlanan AA/VP kopolimer karışımlarının FT-IR ile ölçülen intensite değişimleri.	65
Çizelge 5.3	Sentez edilen ve ticari olarak bulunan AA/VP kopolimerlerinin FT-IR ile ölçülen intensite değişimleri.	65
Çizelge 5.4	Sentez edilen kopolimerlerin elementel analiz sonuçları.	71
Çizelge 6.1	Radyasyon dozuna bağlı olarak Cu^{1+} oluşumu.....	81
Çizelge 6.2	PAA- Cu^{2+} ikili kompleksleri ile doğal kanın iki farklı şekilde karıştırılarak muamele edilmesi sonucu kanın alt ve üst fazı için AAS' de yapılan [Cu^{2+}] tayini sonucu alınan değerler.	83
Çizelge 6.3	PPA konsantrasyonuna bağlı olarak MN değişim.	85
Çizelge 6.4	PAA-100 konsantrasyon serisine bağlı MN değişimi.	85
Çizelge 6.5	PAA-100'ün 1 Gy ışınlama ile kanda oluşturduğu MN değerleri.	86
Çizelge 6.6	PAA-100'ün 3 Gy ışınlama ile kanda oluşturduğu MN değerleri.	86
Çizelge 6.8	PAA-5 konsantrasyon serisine bağlı MN değişimi.....	88
Çizelge 6.9	PAA-5'in 1 Gy ışınlama ile kanda oluşturduğu MN değerleri.....	88
Çizelge 6.10	PAA- Cu^{2+} ikili komplekslerinin $n_{Cu^{2+}}/n_{AA}$ mol oranına bağlı olarak MN değerleri.....	89
Çizelge 6.11	PAA- Cu^{2+} ikili komplekslerinin $n_{Cu^{2+}}/n_{AA}$ mol oranına bağlı olarak 1 Gy'deki MN değerleri.....	89
Çizelge 6.12	PAA- Cu^{2+} -BSA üçlü komplekslerinin $n_{Cu^{2+}}/n_{AA}$ mol oranına bağlı olarak MN değerleri.....	90
Çizelge 6.13	PAA- Cu^{2+} -BSA üçlü komplekslerinin $n_{Cu^{2+}}/n_{AA}$ mol oranına bağlı olarak 1 Gy'deki MN değerleri.	90
Çizelge 6.14	P(AA/VP) kopolimerinin kanda oluşturdukları MN değerleri.....	91
Çizelge 6.15	P(AA/VP) kopolimerinin 1 Gy dozda kanda oluşturdukları MN değerleri.	91
Çizelge 6.16	PVP-50'nin kanda oluşturduğu MN değerleri.	92
Çizelge 6.17	PVP'nin 1 Gy dozda kanda oluşturduğu MN değerleri.	92
Çizelge 6.18	PAA-100 varlığında 1 Gy'de ışınlama ile kanda oluşan CA değerleri.....	93
Çizelge 6.19	PAA-100 varlığında 3 Gy'de ışınlama ile kanda oluşan CA değerleri.....	93
Çizelge 6.20	PAA-100 varlığında 24 saat etkileşim ve 1 Gy ışınlama ile kanda oluşan CA değerleri.....	94
Çizelge 6.21	PAA-100 varlığında 24 saat etkileşim ve 3 Gy ışınlama ile kanda oluşan CA değerleri.....	94
Çizelge 6.22	PAA-100'ün 1 ve 3 Gy ışınlama ile zamana bağlı oluşan CA değerleri.....	94
Çizelge 6.23	PAA-5'in 1 Gy ışınlama ile kanda oluşan CA değerleri.	95
Çizelge 6.24	PAA- Cu^{2+} ikili komplekslerinin $n_{Cu^{2+}}/n_{AA}$ mol oranına bağlı olarak 1 Gy'de oluşturdukları CA.....	95
Çizelge 6.25	PAA- Cu^{2+} -BSA üçlü komplekslerinin $n_{Cu^{2+}}/n_{AA}$ mol oranına bağlı olarak 1 Gy'de oluşturdukları CA.	96
Çizelge 6.26	PVP-50'nin 1 Gy ışınlama ile kanda oluşan CA değerleri.....	96

Çizelge 7.1	Çalışmada kullanılan maddelerin MN oranlarını karşılaştırma tablosu.....	99
Çizelge 7.2	Çalışmada kullanılan maddelerin 1 Gy'de MN oranlarını karşılaştırma tablosu.	102
Çizelge 7.3	Çalışmada kullanılan maddelerin 1 Gy'de CA oranlarını karşılaştırma tablosu.	103

ÖNSÖZ

Bu çalışma Yıldız Teknik Üniversitesi Kimya Bölümü, Biyokimya Anabilim Dalında Doktora Tezi olarak yürütülmüştür.

“Radyoprotektör Biyopolimer Sistemlerin Geliştirilmesi” başlıklı tez çalışmalarımın gerek yürütülmesinde gerekse çalışmaları sürdürdüğüm diğer aşamalarda fikirleri ile bana yardımcı olan değerli hocam Sayın Prof. Dr. Mehmet Mustafaev AKDESTE’ye teşekkür ederim.

Gerçekten birçok fedakarlık, sabır ve özveri dolu bu tez çalışmamın birçok aşamasında bana, destek veren, motive eden ve fedakarlık gösteren başta eşim Ömer Faruk Yüce’ye, anneme, babama, ablam Asude Yavuz’a ve tezin son aşamalarında benden ayrı kalmak zorunda kalan oğlum Atalay Yüce’ye, yine tez hazırlığı sebebiyle babasından ayrı kalan 5 aylık kızım Deniz Işıl Yüce’ye ve ailemin adını saymadığım diğer tüm üyelerine manevi katkılarından dolayı sonsuz teşekkür ederim.

Deneysel çalışmalarında Çekmece Nükleer Araştırma Merkezi (ÇNAEM) Kimya Bölümünde bana olanak sağlayan ve bilgileri ile destek olan Sayın Dr. Yılmaz ERKOL’a ve Sayın Dr. Seval BAYÜLKEN’e, bu bölüm araştırmacılarından olan sevgili arkadaşlarım Dr. Elvan BAŞÇETİN’e, Dr. Bektaş KARAKELLE’ye, Dr. Neşet ÖZTÜRK’e ve Dr. Y. Ziya YILMAZ’a yardım ve manevi desteklerinden ötürü teşekkür ederim.

Tezimin Radyobiyojik çalışmalarının ÇNAEM Radyobiyoji Bölümünde yürütülmesinde bana olanak sağlayan Sayın Dr. Güler KÖKSAL’a, E. Muhsin KÖKSAL’a ve Dr. Deniz DALCI’ya, yine bu bölüm araştırmacılarından olan, deneysel çalışmaların tümünü yürüten ve uygulayan değerli arkadaşlarım Dr. Güneş DÖRTER’e ve Dr. İnci GÜÇLÜ’ye özverili yardımları ve manevi desteklerinden ötürü teşekkürü bir borç bilirim. Ayrıca tezin son aşamalarında desteği ve yardımlarıyla katkıda bulunan değerli arkadaşım Türkan ÖZKARA’ya da teşekkür ederim.

Radyobiyojik çalışmaların hücre sayım aşamalarında özverili yardımları ile bana destek olan Yıldız Teknik Üniversitesi Biyomühendislik Anabilim Dalı Araştırma Görevlilerinden değerli arkadaşım Yük. Kimyager Kadriye KIZILBEY’e teşekkürü bir borç bilirim.

Kan örneklerinin tümünün temin edilmesine olanak sağlayan Sayın Doç. Dr. Timuçin AYBERS’e ve ışınlama işlemlerini özveriyle gerçekleştiren SSDL çalışanlarına teşekkürü bir borç bilirim.

Bu doktora tez çalışması Türkiye Atom Enerjisi Kurumu (TAEK) bünyesinde yürütülen DPT/AP.2 no’lu “Sürdürülebilir Kalkınma ve Çevre Korumasında Nükleer Teknikler” konulu projesinin A2 no’lu “İnsan Sağlığında ve Çevre Kirliliğinde Nükleer Tekniklerin Kullanımı” konulu alt projesi kapsamında yürütülmüştür.

ÖZET

“Radyoprotektör” olarak adlandırılan bazı kimyasal maddelerin organizmayı iyonizan radyasyonun zararlı etkilerinden koruyabildiği bulunmuştur. Bu maddeler çok küçük miktarlarda bile organizmayı iyonizan radyasyonun öldürücü etkilerinden koruyabilirler. Günümüze kadar çok çeşitli maddelerin radyoprotektif etkileri üzerine birçok araştırma yapılmış ancak polimerik yapıda bir radyoprotektöre rastlanmamıştır. Radyoprotektif etkisi araştırılan bu maddeler küçük molekül ağırlıkları nedeniyle organizmada kısa süreli biyolojik etki göstermektedirler. Bu nedenle polimerik radyoprotektörlerin geliştirilmesi çok büyük önem taşımaktadır.

Bu amaçla, suda çözünen negatif yüklü poliakrilik asit (PAA) ve akrilik asit vinilpirolidon kopolimerleri (P(AA/VP)), nötral polivinil piroldon (PVP) ve bunların Cu(II) ile iyon koordinasyon bileşenlerinin ve kan proteinleri içerisinde en çok miktarda bulunan protein fraksiyonu Serum Albumini (BSA) ile oluşturdukları çeşitli kompleksler kullanıldı. Radyasyon etkisi ile komplekslerde meydana gelen değişimler kimyasal yöntemlerle (uv-vis, FT-IR spektrofotometri, HPLC, elementel analiz, AAS) incelendi. Bu maddelerin radyasyon varlığında, dolaşan kan lenfositleri üzerinde oluşturdukları etkiler ise sitogenetik yöntemler (mikronükleus analizi (MN), kromozom aberasyon (CA) analizi) kullanılarak araştırılmıştır. Biyolojik etki mekanizmasının anlaşılabilmesi için polimerlerin farklı molekül ağırlıklarının ve konformasyonunun denenmesi ile ilgili çalışmalara ağırlık verilmiştir.

Belirli bir radyasyon dozuna kadar polimer-metal ikili kompleks sisteminde Cu^{2+} 'nin radyasyon etkisi ile Cu^{1+} 'e indirgenmesi, artan radyasyon dozu ile artış göstermiştir. Bu sonuçlar radyasyon enerjisinin ikili kompleksdeki Cu^{2+} iyonları tarafından absorblandığı düşüncesini doğrulamıştır. Sitogenetik çalışmalardan ise molekül ağırlığı ve konformasyon değişiminin hücreye olan etkisinin farklı olduğu gösterilmiştir. PAA ve komplekslerinin hücre ile olan etkileşiminde interpolimer kompleks oluşumu ve kooperatif etkileşimin rolü olduğu gösterilmiştir. PAA'nın belirli bir konsantrasyon aralığında radyoprotektif bir etki gösterdiği belirlenmiştir.

Bu çalışmalar mevcut küçük molekül ağırlıklı, organik radyoprotektif maddelere alternatif olabileceği düşünülen daha etkili, düşük toksisiteye sahip radyoprotektörlerin geliştirilmesine bir başlangıç olması amacı ile yapılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Radyoprotektör, Suda çözünen polimer, PAA, polimer-metal kompleksi, MN, CA.

ABSTRACT

It has been found that some chemical substances, which is taken in organism before exposure to ionizing radiation, protect the organism against lethal and harmful effect of ionizing radiation called as “radioprotector”. They protect the organisms against a lethal dose of ionizing radiations when they are also extremely small amount. Various compounds have been investigated towards on radioprotective effect but polymer containing have not been discovered up to now. Since the organic compounds investigated radioprotective effect have relatively less molecular weight, so that they show biological effect in a short time. That is why it is very important to improve polymeric radioprotector.

In the present work, ion-coordination compounds of some water soluble negatively charged polyacrylic acid (PAA) and copolymer of acrylic acid vinylpyrrolidone (P(AA/VP), neutral polyvinylpyrrolidone (PVP) mediated with Cu(II) and Bovine Serum Albumin (BSA) which is found the highest protein fraction in blood have been used. Chemical methods (uv-vis, FT-IR spectrophotometry, HPLC, elemental analysis, AAS) have been employed to these complexes in order to investigate the effect of irradiation. The effect of radiation on in vitro human peripheral lymphocyte in the presence of these compounds have been researched using cytogenetic methods (micronucleus analysis (MN), chromosome aberration (CA) analysis). My work has been focused on polymers having several different molecular weights and conformations in order to understand the biological effect mechanism.

Until certain radiation doses, reduction of Cu(II) ion to Cu(I)ion in polymer-metal complex system by rising radiation effect has increased. These results have confirmed, the radiation energy was absorbed by Cu(II) ion in polymer-metal complex system. It has been showed that in cytogenetic studies, the effect of molecular and conformational alterations were difference on cell. The role of interpolymer complex formation and cooperative interaction have been pointed out in the interaction of PAA and their complexes with cell. It has been determined that, in specific PAA concentration has radioprotective effect.

The objective of this study is to develop high-effective polymer containing radioprotectors with low toxicity as an alternative to the conventional radioprotectors mentioned before.

Keywords: Radioprotector, water soluble polymer, PAA, polymer-metal complex, MN, CA.

1. GİRİŞ

İnsanlar ve canlı varlıklar yaşamları süresince, uzaydan gelen ve yeryüzünden yayınan iyonizan (iyonlayıcı) bir radyasyon ortamı içinde yaşamaktadırlar. Alman Fizikçi W. C. Röntgen'in 1895'de kendi adıyla bilinen Röntgen Işınlarnını (X-ışınları), Fransız bilim adamı Henry Becqueler'in 1896'da radyoaktiviteyi, Curie'lerin de 1902'de Radyumu keşfi ile iyonlaştırıcı radyasyonlarla tanışılmıştır. Daha sonra doğal radyasyonlara ek olarak insan yapısı cihazlardan ve yine insanlar tarafından radyoaktif hale getirilen maddelerden yayınlanan radyasyonlara da maruz kalınmaya başlanmıştır. Devam eden süre içerisinde nükleer tekniklerin tıbbi, endüstri ve askeri gibi birçok alanda uygulanması radyasyon zararlarını önleyebilecek veya olumsuz etkilerini minimuma indirebilecek radyoprotektif maddelerin güvenli ve etkili bir şekilde kullanılması ihtiyacını gerekli kılmıştır (ÇNAEM Tek. Rap. 32, 1986).

İnsanlığın korunması anlamında, radyoprotektörler iki nedenden dolayı ilgi konusu olmuşlardır:

- 1) Kitle ışınlanmalarının söz konusu olduğu savaş ve nükleer santrallerdeki kazalar,
- 2) Çeşitli nedenlerle radyoterapi gören hastaların sağlam dokularının selektif proteksiyonu, antikanserojen ve antimutajen özelliklere sahip olmaları (Kljajic ve Masic, 1998).

Radyasyon türlerinin ortak özelliklerinden biri duyu organları tarafından algılanamaz olmalarıdır. Ancak özel ölçüm aygıtları ile tespit edilebilirler. Alfa ışını ancak birkaç santimetre ilerleyebilmekte, yoluna tutulan ince bir kağıt bile ışını durdurabilmektedir. Dolayısıyla bu ışının kaynağı olan radyoaktif elementlerin dokularda etkisini gösterebilmesi için insanın gövdesine girmesi gerekmektedir. Gövdeye giriş, zedelenmiş deriyle temas, solunumla akciğere ulaşma ya da yiyecek ve içeceklerle sindirim kanalına girmeleri ile olur (Coggle, 1977).

Gama ışınları metrelerce uzağa ulaşabildikleri gibi belli kalınlıklara kadar kurşun levhalardan da girebilirler. Bu nedenle gama ışınlarının insan vücudu üzerindeki etkileri daha kolay ortaya çıkar. Radyoaktif elementler vücuda girdikten sonra bazı özel organ ve dokularda toplanabilirler. Örneğin; iyot tiroid bezine, stronsiyum kemik dokusuna, sezyum kaslara yerleşir. Elementlerin büyük bölümü kolloidal yapısı yüzünden karaciğerde tutunur ve karaciğer kanserine neden olabilir (Dertinger ve Junk, 1970).

Radyasyon doğrudan DNA ve proteinler gibi biyolojik olarak önemli moleküller ile etkileşime girer. Radyasyon vücudumuzdaki bazı kimyasallarla da dolaylı olarak etkileşime girerek serbest radikaller oluşturmak suretiyle önemli biyolojik moleküllere zarar verebilir. DNA üzerinde etkisi kanser riskini artırır. Eğer kromozomlarda hasar meydana gelecek olursa ortaya çıkan mutasyonun gelecek nesillere aktarılma riski ortaya çıkar. Radyoaktif ışınlar organizmaya girdiği yerlerde hücre yapısını değiştirerek hasar oluşturur. DNA'da oluşan hasarlar genlerde kırılmalara, çapraz bağlanmalara, kopmalara neden olur. Bu durumda gelişme bozuklukları ve kanserleşme görülebilir. Bu etkiler sonucunda saç dökülmesi, solunum sistemi hastalıkları, mide ve bağırsak sistemi kanamaları, kemik iliği baskılanmasına bağlı kanamalar ve kansızlık görülebilir (Bacq ve Alexander,1966; Prasad, 1995).

Radyasyonun doğum öncesi etkileri, embriyo ve fetusun gelişme dönemine göre değişir. Yumurtanın döllenmesinden hemen sonraki hafta içinde alınan ışınlar yumurtanın yaşama olasılığını ortadan kaldırırken, organların oluşma, gelişme dönemlerinde alınan ışınlar, gelişme bozukluğu olasılığını artırır. Düşükler, ölü doğumlar, iskelet, yumuşak doku ve organ malformasyonları, mikrosefali, zeka geriliği, beyin özürleri, gelişme geriliği, trizomi, bağışıklık sistemi hastalıkları, lösemi ve özellikle çocuklarda tiroid kanseri görülür (ÇNAEM Tek. Rap. 32, 1986).

Radyasyona maruz kalan kişinin edindiği 1 joule/kg'lık enerji miktarına uluslararası edinilmiş doz birimi olan Gray (Gy) adı verilir. Radyasyonun etkileri maruz kalınan akut doz miktarına göre değişir; 0-250 mGy arasındaki radyasyonun saptanabilen herhangi bir klinik etkisi yoktur. Düşük bir olasılıkla gecikmiş etki görülebilir. 250-1000 mGy radyasyon tedavi edilebilen küçük yaralara ve bulantıya neden olabilir. Kesin olmamakla birlikte ciddi geç etkileri ortaya çıkabilir. 1000-2000 mGy radyasyonda bulantı ve yorgunluk hissi ile birlikte kusma meydana gelir. Kan hücreleri hasarı görülür, ancak bu durum tedavi edilebilir. 2000-3000 mGy radyasyon maruziyetinde ilk gün bulantı ve kusma gelişir. İki haftalık gelişim süreci sonunda kırgınlık, iştah kaybı, ishal ve kilo kaybı olur. 3000- 6000 mGy dozda, bulantı, kusma ve ishal ilk birkaç saatte gelişir. İştah kaybı, kırgınlık, daha sonra kanama, kilo kaybı ve boğazda yanma görülür. İlk haftada bazı ölümler olabilir, 3500 mGy 'den daha fazla radyasyon etkisinde kalanlardan %50'si yaşamını kaybeder. 6000 mGy ve üzerindeki dozlarda birkaç saat içinde bulantı, kusma ve ishal gelişir; boğazda yanma ve ateş birinci haftanın sonuna kadar ortaya çıkar. Hızlı bir kilo kaybıyla beraber ikinci haftadan itibaren

maruz kalanların hemen hemen tamamı yaşamını kaybeder. 10 Gy ve daha yüksek dozda radyasyon çok yüksek oranda zarara yol açar, sindirim sistemini felce uğratar ve ölüm kesindir. 100 Gy'den fazla akut doza maruz kalma sonucu bütün vücut dokusu hasara uğrar, etki en hızlı beyin ve sinir sisteminde görülür ve saatler içinde ölüm gerçekleşir (Yülek, 1992).

Radyoprotektörler canlıyı radyasyona karşı olduğundan daha dirençli hale getiren, diğer bir anlamda canlıyı radyasyona karşı koruyan (radyoprotektif) maddelerdir. Bu maddeler çok küçük miktarlarda bile organizmayı iyonizan radyasyonun öldürücü etkilerinden koruyabilirler. Bu maddelerin iyonize radyasyona maruziyet sırasında organizmada bulunması gerekmektedir.

Son zamanlarda sentetik polimerler, biyomedikal malzeme olarak tıbbi ve biyolojik alanlarda yaygın bir kullanım alanı oluşturmuştur. Özellikle suda çözünen sistemlerin (polimerler, polikompleksler ve diğer modifiye polimerler) fizyolojik aktif maddeler olarak kullanılabilmesi, immünolojik açıdan büyük bir kazanç olarak görülmüştür. Bu sistemlerin yapısı hakkında bilgi edinebilmek için fizikokimyasal çalışmalar sürdürülmektedir (Osada ve Saito,1975; Petrov ve Mustafaev, 1992; Mustafaev, 1996;). Anyonik yapılu polielektrolitlerin biyoyumluluk çalışmaları da ilgi çekmiştir. Yapılan bazı çalışmalarda, PAA' bir model polimer gibi immünolojide adjuvant (organizmanın bağışıklığını arttırmak için antijenlerle birlikte organizmaya verilebilen yardımcı kimyasal maddeler) olarak, medikal çalışmalarda antitrombojenik (kan dolaşımını engelleyen tortuların çözülmesini sağlayan) bir madde olarak ve ilaç salınım sistemlerinde taşıyıcı olarak kullanıldığı bilinmektedir (Kabanov, 1986; Mustafaev ve Norimov, 1990; Klauser vd.,1990; Manko vd.,1991; Mustafaev vd.,1992; Hilgers vd.,1998).

Bu çalışmada, suda çözünen bazı zayıf PE özellikli polimerlerin (PAA ve P(AA/VP) değerli Cu^{2+} iyonları ve BSA ile oluşturdukları çeşitli komplekslerin oluşumu, radyasyon etkisi ile komplekslerde meydana gelen değişimler kimyasal yöntemlerle (UV-VIS, FT-IR, HPLC, elementel analiz, AAS) incelenmiştir. Bu maddelerin ve ilave olarak polivinilpirolidon'un (PVP) radyasyon varlığında ve yokluğunda, dolaşan kan lenfositleri üzerinde oluşturdukları etkiler sitogenetik yöntemler (MN veCA analizi) kullanılarak araştırılmıştır ve PE'lerin fizikokimyası ile radyoprotektör özellikleri arasındaki ilişki incelenmiştir.

Literatürde radyoprotektif olduğu düşünölen kimyasal maddelerin biyolojik sistemler üzerindeki etkisi sitogenetik yöntemlerle tayin edilmeye çalışılmıştır (Hofer vd., 1996; Salvadori vd., 1996; Donkor vd., 1997; Krishnamurthy vd., 1997; Dolabela vd., 1998; Gueven vd., 1998; Juchelkova vd., 1998; Kim vd., 1998; Lyubimova vd., 2001; Bakir vd., 2004; Rithidech vd., 2005). Ancak yukarıda adı geöen maddelerin radyoprotektif bir etkiye sahip olup olmadıkları ile ilgili sitogenetik bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle çalışmanın ağırlık noktası adı geöen maddelerin radyoprotektif özelliklerinin MN ve CA analiz yöntemleriyle araştırılması yönünde yoğunlaşmıştır.

Biyolojik sistemlerle veya canlı dokularla çalışmanın zorlukları bir öok araştırmacı tarafından bilinmektedir. Bununla beraber her bir kimyasal maddenin, hücre grupları ile etkileşim mekanizmaları, toksisite değerleri, iyonizan radyasyonlar karşısındaki davranışlarının farklı olması çalışmaların öok kapsamlı olmasını gerektirmektedir. Tahmin edilebileceği gibi bu tür çalışmalar öok uzun zaman ve emek gerektirmektedir. Bu tez çalışması radyoprotektör olabileceği düşünölen maddelerin in vitro koşullarda davranışlarının belirlenmesi ve polimerik yapılı yeni tip radyoprotektörlerin geliştirilmesine bir başlangıç olması amacı ile yapılmıştır.

2. TEORİK KISIM

2.1 Radyoprotektör Tanımı ve Özellikleri

Bazı kimyasalların, ışınlanma öncesinde, belirli aralıklarla alındığında, çok küçük miktarlarda bile canlı varlıklar üzerinde önemli bir proteksiyon (koruma) sağladığı belirlenmiştir. Radyoprotektörler olarak adlandırılan protektif kimyasallar (veya kimyasal protektörler) ışınlamaya maruz kalmadan önce alınmalı, ışınlama esnasında hücre veya canlı sistemde bulunmalıdır. Bu maddeler birbirleri ile kimyasal olarak benzerlik göstermemektedirler. Sülfidril bileşikleri, siyanidler, nitriller, aminler ve antibiyotikler literatürde geçen bazı protektif maddelerdir (Bacq, 1965).

Bir radyoprotektörde olması gereken özellikler;

- Organizmaya verildikten sonra etki etmesi,
- Doku ve organlarda emilimi ve dağılımının hızlı olması,
- Terapötik uygulamasının geniş olması,
- Yan etkilere sahip olmaması,
- Tekrarlayan uygulamalarda artan doz etkisi ile yan etkilerin ortaya çıkmaması,
- Işınlamadan 1 saat sonrasında etki gösterebilmesi,
- Farklı tipteki radyasyonlarda da etkili olabilmesi.

Radyasyon enerjisinin organizma tarafından bir bütün olarak absorblanması mümkün değildir. Bugün kaza sonucu meydana gelen ışınlanmalarda yüksek dozların alınması ile radyasyon sendromları ortaya çıkmıştır ve bunların sadece koruyucu ve semptomatik tedavileri mümkündür. Araştırmacılar radyasyon enerjisi ve madde arasındaki etkileşimin bir sonucu olarak ortaya çıkan serbest radikallerden, hücreleri ve dokuları koruyacak, radyasyon sendromlarının gelişimini önleyecek efektif radyoprotektörleri geliştirmeye çalışmışlardır. Bu amaçla kimyasal radyoprotektör olabileceği düşünülen yüzbinlerce farklı bileşik test edilmiştir. 50 binden fazla maddenin radyoprotektif etkiye sahip olduğu ve bunların bazılarının insanların korunmasında kullanılabileceği gösterilmiştir (Kljajic vd., 1996).

2.1.1 Tarihsel Gelişimi

W. M. Dale (1942) bazı maddelerin (kolloidal sülfür, tiyöüre v.b.) sulu çözeltilerinin enzim ortamına (karboksipeptidaz ve aminopeptidaz) ilave edilmesi ile x-ışınlarının etkisini azalttıklarını göstermiştir. Bu tarihten sonra protektif etki ile ilgili çalışmalar hızla artış göstermiştir.

Latarjet ve Ephrati (1948) bazı maddeleri bakteriofajlar üzerinde test ederek indirekt etki teorisinin temellerini oluşturdu. Tiyoglukolik asit, triptofan, glutatyon, sistin ve sistein ile pozitif sonuçlar aldılar Latarjet ve Ephrati (1948) sistin'in efektif olmadığını belirledi. Başka bir yayında G. Barron ve arkadaşları saf kristalize tiyol enzimlerinin iyonize radyasyona karşı

-SH içermeyen enzimlerden daha duyarlı olduğunu gösterdi.

Sistein ve siyanid 1949'da keşfedilen ilk radyoprotektörlerdendir. Bu tarihten sonra protektif etkisi olan çok sayıda bileşik bulundu. Birkaç yıl sonra Bacq ve Herve (1952) -SH ve -NH₂ gibi grupların önemine işaret ettiler. G. Baron iyonize radyasyonun enzimlere olan temel etki mekanizmasında -SH gruplarının oksitlenerek S-S köprülerine dönüşümü ile inaktive olduklarını ileri sürmüştür. Böylece farelere ışınlanma esnasında oluşan kimyasal lezyonların onarımı için büyük miktarlarda -SH bileşikleri verildi.

1952'de -SH bileşiklerinin tümünün radyoprotektif olmadığı ve amin bileşiklerinin de protektif etkiye sahip oldukları biliniyordu. 1952'den günümüze araştırmalar kimsenin tahmin edemeyeceği kadar yön kazandı.

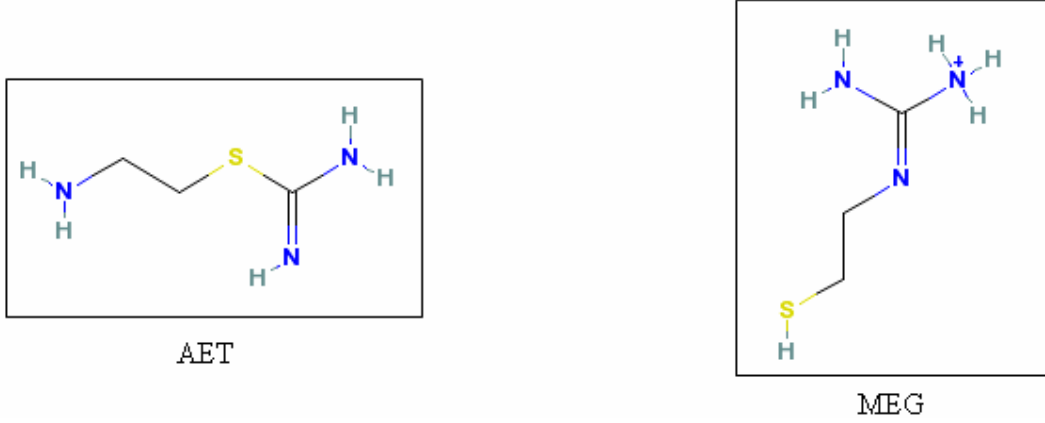
1957'de Doherty ve arkadaşları bir sülfidril bileşiği olan β -aminoetil tiyoronyum'un (Şekil 2.1) (AET) radyoprotektif etkisini belirledi. Bu bileşik nötral pH'da merkaptoetil guanidine (Şekil 2.1) (MEG) dönüşür. Gerçekte MEG temel protektif maddedir. AET'in radyoprotektif etkisi diğer birçok araştırmacı tarafından da onaylandı.

a) 1951-1952 arasında Sistamin (MEA) (Şekil 2.2)'den daha etkili bileşikler sentez edildi. Binlerce bileşik test edilerek çok toksik yada inaktif oldukları bulundu.

b) Radyoprotektörlerin metabolizması, vücutta dağılımı, farmakolojik ve biyokimyasal etkileri araştırıldı.

c) Hücrelerde veya hayvan dokularında ışınlanmış bir hücrede ne olduğuna dair detaylı bilgiler elde edildi (Countryman ve Heddle, 1976; Heddle ve Carrano, 1977; Heddle vd.,1983; Fenech ve Morley, 1985; Köteles ve Bojtor, 1995; Dolabela vd., 1998; Bakir vd., 2004) ve hala edilmeye devam etmektedir.

d) Sonuç olarak, çeşitli protektörlerin etki mekanizmaları hakkında çok büyük ilerleme kaydedildi.

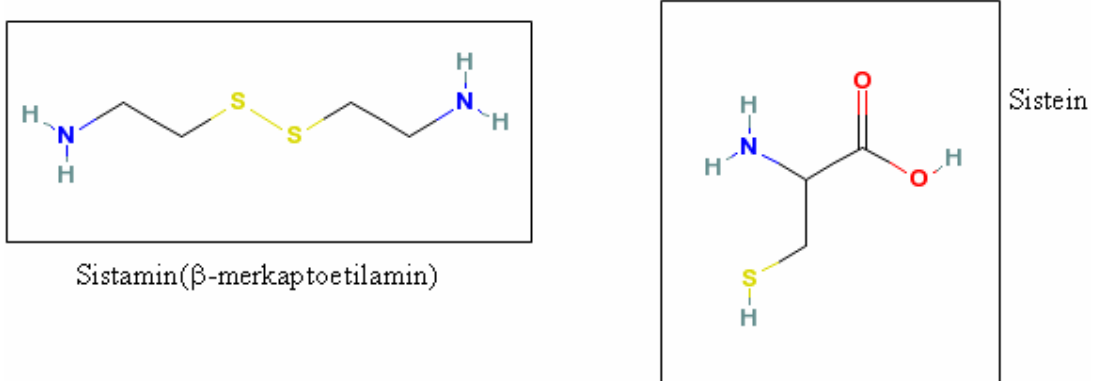


Şekil 2.1 β -aminoetil tiyoronyum (AET) ve Merkaptoetil guanidin (MEG) formülü

2.1.2 Radyoprotektör Olarak Kullanılan Maddeler

Sülfidril (-SH) Bileşikleri

-SH bileşikleri arasında sistein, β -merkaptoetilamin (Şekil 2.2) (MEA, Sistamin) ve AET üzerinde çok sayıda araştırma yapılmıştır (Dolabela vd, 1998, Shumacher vd.,1997)



Şekil 2.2 Sistein ve sistamin formülü

Sistaminin, kültürdeki senkronize Chinese hamster hücrelerini, X-ışınlarının öldürücü etkilerine karşı, hücre siklusunun tüm safhalarında koruduğu gösterilmiştir. Bu tür ve diğer radyoprotektörlerin etki mekanizmaları için 3 hipotez önerilmiştir;

Serbest radikal yakalanması

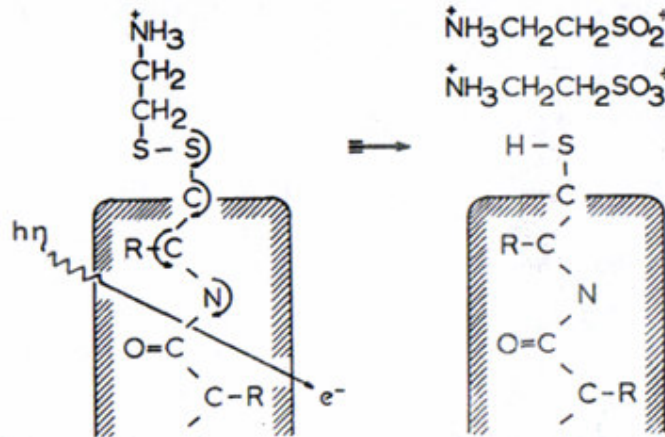
Bazı radyoprotektif -SH bileşikleri iyonize radyasyon etkisi ile oluşan serbest radikalleri yakalayarak memeli hücrelerini korurlar.

Hipoksi

Bazı radyoprotektif -SH bileşikleri çözeltide moleküler oksijeni uzaklaştırır ve böylece ışınlama esnasında hipoksik koşullar meydana gelir. Hipoksinin radyasyon hasarını azalttığı bilinmektedir.

Mixed disülfid mekanizması

Bu mekanizma sistamin ve AET gibi sülfidril bileşikleri için doğruluğu kabul edilen bir mekanizmadır. -SH bileşikleri, hücrelerdeki -SH içeren enzimlerle kalıcı olmayan S-S bağı oluştururlar. Bu bağ, radyasyonun indirekt etkisine karşı enzimin sülfür atomunu korur. Böylece radyasyon etkisi ile enzimin -SH grubu yeniden yapılır. Bu hipotezinin en zayıf noktası hücrede bulunan proteinlerin de radyasyona duyarlı olmasıdır.



Şekil 2.3 Mixed disülfid oluşumu ile hedef protein molekülünün hipotetik proteksiyon mekanizması (Bacq, 1965).

Fizyolojik şok mekanizması

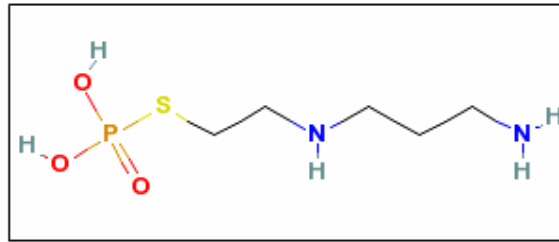
-SH bileşikleri ile proteksiyon mekanizmasından biri de reversibl (geri dönüşümlü) fizyolojik şok oluşumudur. Bu olay, sistamin ile hücrelerin etkileşiminden sonra mitokondrinin şişmesi ile kanıtlanmıştır. Bu yapısal değişim radyasyon hasarına karşı hücrelerin korunduğu esnada meydana gelmiştir.

DNA sentezinin reversibl inhibisyonu

Bazı radyoprotektif ajanlar DNA sentezini inhibe ederler. DNA sentezindeki inhibisyon replikasyonu geciktirerek DNA onarımını arttırabilir. Eğer DNA sentezi planlanan şekilde ilerler ise ışınlama ile bazı noktalardan kırılan DNA zincirlerinde kopmalar meydana gelir. (Prasad, 1995).

Aminotiyoller, iyonize radyasyonun meydana getirdiği akut hasarlara karşı koruyucu bir etkiye sahip olması nedeniyle birçok araştırma konusu olmuştur. Bu maddelerin mutajenik ve karsinojenik etkileri yüzünden tedavi edilen hastalarda ikincil tümörlerin oluşumu bir risk oluşturmuştur.

Aminotiyoller, serbest radikaller tarafından subletal mutajenik ve karsinojenik etkilerin oluşumuna karşı protektif ajan olarak refere edilmiştir. WR-2721[S-2-(3-aminopropilamino)etilfosforotiyoik asit]'in (Şekil 2.4) radyasyon indüklü tümör (sarkoma) oluşumunu inhibe ettiği gösterilmiştir (Milas vd., 1982)



Şekil 2.4 WR-2721(Amifostin, S-2-(3-aminopropilamino)etilfosforotiyoik asit).

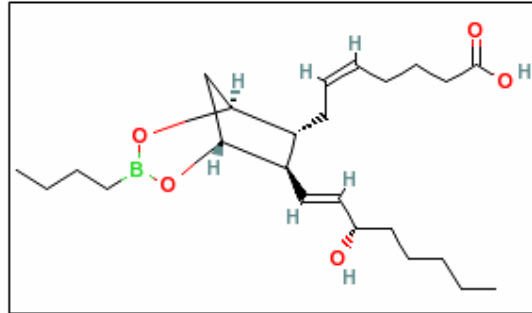
Önceleri radyoprotektif ilaçların sentez edilmiş olası nedeniyle insanlarda kullanımı ile ilgili olarak kısıtlamalar vardı. Daha sonra US Army radyoprotektif potansiyeli olan bileşiklerin sentezine sponsor olarak bir program başlattı. WR-2721 bu bileşiklerden biri olup, radyoprotektif kapasitesi ile üzerine birçok çalışma yapılmıştır (Dolabele vd., 1998).

WR-2721 istenmeyen yan etkilere sahip olmasına rağmen insanlar üzerinde uygulanan radyoprotektif bir maddedir (Kljajic vd., 1996).

Normal ve tümör hücrelerinin radyasyona karşı cevabında siklik nükleotidlerin etkisi olup olmadığı ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Bu maddeler Chinese hamster ovaryum hücreleri üzerinde denenmiş ve X-ışınlarının etkisini azalttıkları tesbit edilmiştir. Siklik (c) AMP (adenozin monofosfat)'nin uyarılmasını sağlayan maddelerin insan böbrek T hücrelerinde ve S-180 tümör hücrelerinde X-ışını indüksiyonu ile mitotik gecikmeyi azalttıkları gösterilmiştir. ATP, ışınlama öncesinde farelere verildiğinde belirgin bir derecede proteksiyon sağladığı rapor edilmiştir. Fakat ATP ve eksojen cAMP'nin hücre membranından geçemeyecekleri bilindiği için protektif etkinin indirekt olabileceği düşünülmektedir (Prasad, 1995).

Eikosanoidler

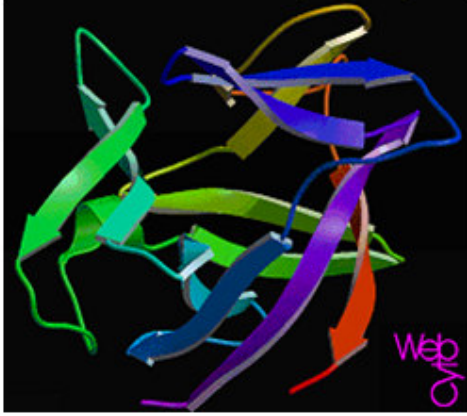
Prostaglandinlere (Şekil 2.5) ek olarak lökotrien-C₄ gibi diğer eikosanoidler çeşitli hücre tiplerini (Chinese hamster fibroblast hücrelerini *in vitro* olarak, fare hematopoetik kök hücrelerini *in vivo* olarak) radyasyon hasarına karşı korurlar. Hipoksi ve serbest radikal yakalanması esasına dayalı bir proteksiyon meydana geldiği düşünülmektedir (Prasad, 1995).



Şekil 2.5 Prostaglandin F2A butanboronat

Sitokinler

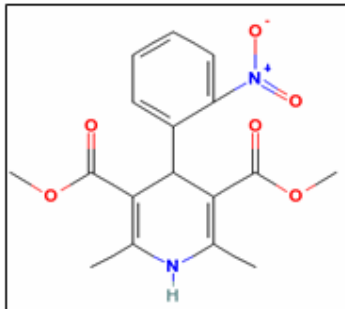
Sitokinler (Şekil 2.6) immün hücreler arasında iletişim çekirdeği olan küçük protein molekülleridir. İnterlökin-1- α uygulanan ve ışınlanan farelerin hayatta kalma sürelerinde artış olduğu gözlenmiştir. Bunun aksine anti-interlökin-1 reseptör antikoru enjekte edilen farelerde bu sürede azalma gözlenmiştir (Prasad, 1995).



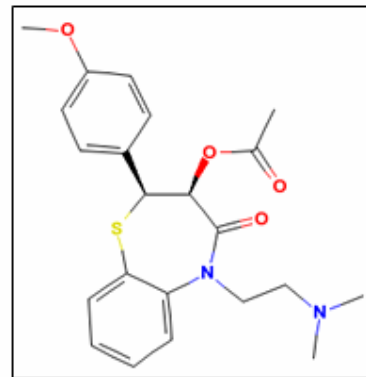
Şekil 2.6 İnterlökin-1- β

Kalsiyum Antagonistleri

Diltiazem(kalsiyum antagonisti) (Şekil 2.7), benzotiyazapen yapısı ile dişi fareler üzerinde iyi bir radyoprotektif etki oluşturduğu görülmüştür. Bu ajan radyasyon terapötik ajanı olarak da etki eder. Işınlanmış farelerin hayatta kalma yüzdesinde %0-%42 artışa sebep olduğu gözlenmiştir. Nifedipin (Şekil 2.7), isradipin ve nitrendipin gibi diğer kalsiyum antagonistleri de radyoprotektif ajan olarak etki eder. Radyasyon indüklü membran hasarını takiben oluşan hücresel kalsiyumun aşırı yüklenmesini inhibe eder. Diltiazem ve nifedipin antioksidanlar gibi etki ederler (Prasad, 1995).



Nifedipin

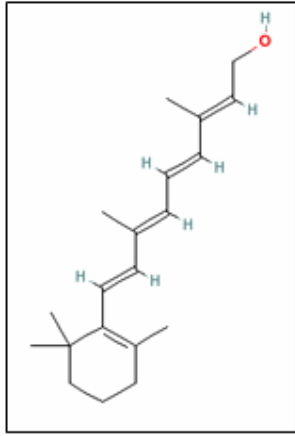


Diltiazem

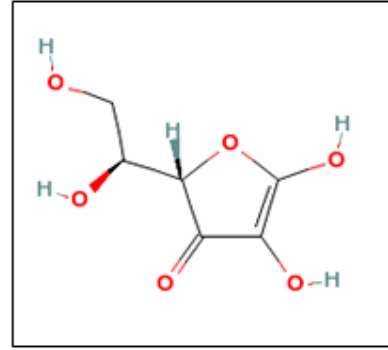
Şekil 2.7 Diltiazem ve Nifedipin formülü.

Antioksidan Vitaminler

C vitamini (Şekil 2.8), β -karoten, A (Şekil 2.8) ve E vitamini gibi antioksidan vitaminler X-ışınlarının etkisini, normal ve tümör hücreler üzerinde ayırıcı bir şekilde azaltır. Bu maddelerin daha önceki verilerde, X-ışınlarının tümör hücreleri üzerindeki inhibisyon etkisini arttırdığı gösterilmiştir, fakat normal dokuları radyasyon hasarına karşı korurlar. Bu vitaminler kişisel olarak yüksek dozlarda kullanıldıklarında genellikle tümör hücreleri için sitotoksik etki gösterirlerken, normal hücreler için göstermezler (Prasad, 1995).



Vitamin A



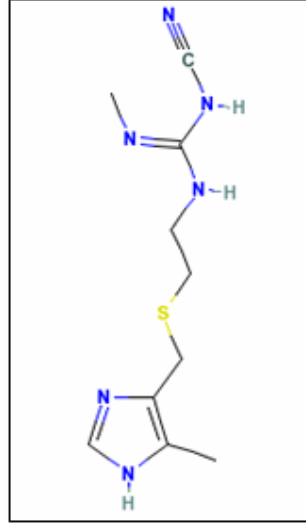
Vitamin C

Şekil 2.8 Vitamin A ve C formülü.

Doğal olarak mevcut olan vitamin E ve Se(selenyum) gibi antioksidanların radyoprotektif etkileri sentetik antioksidanlara kıyasla daha zayıftır. Fakat bunlar öldürücü ve düşük radyasyon dozlarında bir sürelik de olsa koruyucu etki gösterirler. Doğal antioksidanlar uzun süreli radyasyon maruziyetlerinde antimutajenik etkileri de gösterirler. Süperoksit dizmutaz (SOD) spesifik radyoterapi protokollerinde kullanılabilen endojen bir antioksidandır. Nimodipin, propranolol ve metilksantinler gibi ilaçlar antioksidan özelliğe sahip olmaları yanında, fosforitiyoatlarla birlikte veya tek olarak uygulandıklarında radyoprotektif etki göstermişlerdir (Weiss vd., 2000).

Diğer Farmakolojik Ajanlar

Simetidin (Şekil 2.9), fareler için iyi bir radyoprotektör olup, peptik ülser tedavisinde kullanılan H_2 -reseptör antagonistidir. Serbest radikal yakalaması esasına dayalı protekif bir mekanizma önerilmiştir (Prasad, 1995).



Şekil 2.9 Simetidin

2.2 Radyoprotektif Etki Mekanizmaları

Radyoprotektif etki mekanizması, kompleks ve hala yeteri kadar iyi açıklanamayan bir olaydır. Ancak radyoprotektif aktivitenin hücrenin üç özel seviyesi üzerinde farklı mekanizmalara eşlik ettiği bilinmektedir ki bunlar;

- *Moleküler seviyede koruma
- *Biyokimyasal-fizyolojik seviyede koruma
- *Organik seviyede korumadır.

2.2.1 Moleküler Seviyede Koruma

- Serbest radikallerin tutulması
- H-atomu transferi
- Disülfid oluşumu
- Kritik biyolojik hedeflere bağlanma

Bu dört hipotezin her biri kendi içinde belirli kararsızlıklara ve çelişiklere sahip olmalarına rağmen, büyük olasılıkla gerçek koruma mekanizmasının farklı yönlerden ele alınışını tarif etmektedir.

2.2.2 Biyokimyasal-fizyolojik Seviyede Koruma

- Hipotermi
- Hipoksi
- Protein olmayan disülfitin kaybolması
- Biyokimyasal şok

Biyokimyasal-fizyolojik seviyedeki bu dört hipotez, radyasyon etkisi ile oluşan hasar ve ölümlere karşı organizmanın korunmasında gerekli olabilir. Bu da “radyoprotektif ilaç” tarafından gerçekleştirilen korumalardan tek bir mekanizmanın sorumlu olamayacağı anlamına gelir. Bazı bileşiklerin protektif etkisi esas olarak, kritik dokularda hipotermi (ısı düşüşü) veya hipoksi (oksijen düşüşü) ile sonuçlanan fizyolojik etkilerin sağladığı etkilerle işlemektedir. Diğer mekanizmalar ise esas olarak, hedef molekülün radyasyona karşı gösterdiği hassasiyeti etkileyerek yani, lokal radikal tutuculara neden olarak yada H-atomu vererek işlemektedir. Biyokimyasal şok, hedef molekülde yapısal değişikliklerin indüklenmesi ya da DNA sentezindeki gecikmeler ve hücre bölünmesi, radyasyona karşı korumada olası mekanizmalardır.

2.2.3 Organik Seviyede Koruma

- Hücre onarımına teşvik etmek

Organizma bir ünite olarak düşünüldüğünde eğer radyasyon enerjisini absorplamış ise iyonlaştırıcı radyasyonun oluşturacağı hasara karşı koruma pratikte tam anlamıyla mümkün değildir. Daha önceki çalışmalarda, ışınlamanın neden olduğu etkilerin giderilmesinde uygulanabilen bir ilaç geliştirilmemiştir. Bugün ise, radyasyon kazalarında ve radyasyon sendromunun gelişiminde pozitif sonuçlar alınabilecek koruma etkisi düşük koruyucular ve belirli terapiler uygulamak mümkündür (Kljajic vd., 1996).

Bu doğrultuda birçok araştırmacı, radyasyon enerjisi ile madde etkileşimi sonucu oluşan serbest radikallere karşı doku ve hücreleri koruyacak radyoprotektif maddelerin geliştirilmesi için çalışmalarını sürdürmektedir. Bu amaç için, radyoprotektif potansiyele sahip birçok farklı kimyasal bileşik denenmektedir. Radyoprotektif etkisi olabileceği düşünölen kimyasallardan bazıları az veya fazla etkili olurken bazıları ise insanların korunması için gerekli karakteristik özellikleri sergilememektedir. Araştırma sonuçlarına bakıldığında birçok bileşik arasından aminotioller, aminodisülfidler, tiyosülfür, bazı biyojen aminler ve onların türevleri gibi sülfür içerenlerin en fazla radyoprotektif etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (Şengün vd., 1974; Copeland, 1978; Milas vd., 1982; Giambarressi ve Jacobs, 1987; Klauser vd., 1990; Shumacher vd., 1997; Dolabela vd.,1998).

2.3 Radyasyon ve Özellikleri

Radyasyon, bazı atomların çekirdeklerinin kararsız olması sonucu ortaya çıkar. Çekirdekte bulunan proton ve nötronlar birbirleri ile uyum içinde olmadıklarından (n/p oranının sabit olmaması, elektrostatik çekim kuvvetlerinin dengede olmaması) atom çekirdeği kararsızlık gösterir. Kararsız bir nesne kendini bir şekilde dengeleyemezse parçalanma eğilimine giderek radyasyon yayımlar. Genel olarak “radyasyon” teriminin çok geniş bir spektrumu vardır. Ancak radyasyon korunması alanında yeralan radyasyon, iyonlaştırıcı radyasyonları belirtmektedir (Knoll, 1979).

2.3.1 İyonlaştırıcı Radyasyon

İyonlaştırıcı radyasyon veya nükleer radyasyonlar, bir maddeden geçerken onun atomlarını doğrudan veya dolaylı olarak iyonlaştıran ışınlardır (Çizelge 2.1). Radyasyondan korunma açısından önemli olan bu radyasyonlar 3 ayrı grupta toplanmaktadır. Bunlar;

- 1) Yüklü parçacıklar
- 2) Elektromanyetik tabiatlı radyasyonlar
- 3) Yüksüz parçacıklar

Çizelge 2.1 Radyasyon türleri.

Radyasyon Türü	Sembolü	Yükü	İyonlaştırma Şekli
Alfa parçacıkları	α	+2	Doğrudan
Beta parçacıkları	β	-1,+1	Doğrudan
Protonlar	P	+1	Doğrudan
X-Işınları	X	0	Dolaylı
Gama Işınları	γ	0	Dolaylı
Nötronlar	N	0	Dolaylı

Alfa (α) Parçacıkları:

Bunlar esas olarak 2 proton ve 2 nötrondan oluşan partiküllerdir. Yapı olarak He atomu çekirdeğine benzemektedir. 4-9 Mev enerjili α parçacıkları elektronlara göre 7300 kat ağır olmaları nedeniyle havada ancak birkaç cm ilerleyebilirler. Bu parçacıklar enerjilerini çarptıkları atomları doğrudan iyonize ederek veya uyararak azaltırlar.

Havada birkaç cm ilerleyebilmelerine karşın canlı dokular içinde ancak 1-2 μ menzile sahiptirler. Ancak tüm enerjilerini bu kadar kısa bir yol boyunca ve çok yoğun bir şekilde bırakırlar. Eğer hücre içine girecek olurlarsa son derece büyük boyutlu biyolojik tahribatlara yol açarlar.

Beta (β) Parçacıkları:

Kararsız atom çekirdeğinden yayımlanan yüksek enerjili elektron ve pozitronlardır. Yapı ve özellik olarak elektronlara benzeyen, ancak atom çekirdeğinde oluşan partiküllerdir. Çekirdekte normal koşullarda elektron bulunmaz. Ancak radyoaktif bir çekirdeğin kararlı hale geçmesi sırasında çekirdek içinde bir elektron oluşabilir ve bu elektron çekirdekten bir β partikülü olarak dışarı atılır. β ışınları çok giricidir, yani yolları çok uzundur. Çoğu radyoaktif cisim α , β ve γ ışınlarını birlikte verir (Dertinger vd., 1970; Coggle, 1977; Knoll, 1979).

Nötronlar:

Bunlarda atom çekirdeğinin yapısında bulunan yüksüz partiküllerdir.

Protonlar:

Atom çekirdeğinin yapısında bulunan + yüklü partiküllerdir ve kütleleri elektron kütesinin yaklaşık 2000 katı kadardır.

X ve Gama (γ) Işınlari:

X ve Gama ışınları özellikleri bakımından birbirine tamamen benzeyen elektromanyetik tabiatlı ışınlardır. Bu ışınlar kararsız bir atom çekirdeğinden α ve β parçacığı yayınladıktan sonra yayınlanır. α ve β parçacığı yayınlayan kararsız çekirdek uyarılmış halde kalır. Bu enerjinin bir kısmı yüksek enerjili elektromanyetik dalga şeklinde olan fotonlar şeklinde yayınlanır. Bunlar doğrudan iyonlaştırıcı değildirler meydana getirdikleri elektronlarla bunu yaparlar. Oldukça girici olan X ve gama ışınları birkaç cm kurşun levhadan geçerler (Dertinger vd., 1970; Coggle, 1977; Knoll, 1979).

2.3.2 Radyasyon Dozları ve Doz Birimleri

İyonlaştırıcı radyasyon etkisi ile bir ortamda meydana gelen iyonlaşma ne kadar büyük ise iyonlaştırıcı radyasyon etkisinin o kadar büyük olduğu söylenebilir. Bu iyonlaşma da absorblanan radyasyon enerjisine bağlıdır. İyonlaştırıcı radyasyon miktarının ölçülebilmesi için absorblanan radyasyonu ölçebilecek birimlerin bulunması gereklidir. Uluslararası Radyasyon Birimleri Komisyonu (ICRU) absorblanan doz için Rad, ışınlama için Röntgen, aktivite için Curie, doz eşdeğeri için ise Rem'i özel radyasyon birimleri olarak tanımlamıştır. Komisyon daha sonra SI birimlerini tanımlamıştır.

Aktivite Birimi:

Özel birim: Curie (Ci)

SI Birimi: Becquerel (Bq)

Aktivite, birim zamandaki radyoaktif madde miktarını göstermektedir. Radyoaktif madde miktarını ifade eden Curie ise 1 sn'de $3,7 \cdot 10^{10}$ parçalanma gösteren radyoaktif madde miktarının aktivitesi olarak tanımlanmıştır. SI birimlerinde aktivite birimi Becquerel (Bq) olup, 1 sn'de 1 parçalanma gösteren bir maddenin aktivitesi olarak tanımlanmıştır.

Işınlama Birimi:

Özel birim: Röntgen (R)

SI Birimi: Coulomb/kg

Işınlama, X ve γ ışınlarının havayı iyonlaştırma kabiliyetinin bir ölçüsüdür. Röntgen, normal şartlar altında havanın 1 kg'ında $2,58 \cdot 10^{-4}$ Coulomb'luk elektrik yükü değerinde (+) ve (-) yüklü iyonlar oluşturan X ve γ radyasyon miktarıdır. Radyasyonun havayı iyonlaştırma kabiliyetinin bir ölçüsü olup radyasyon demetinin bir özelliğidir.

Absorblanma doz birimi:

Özel Birim: Rad

SI Birimi: Gray (Gy)

İyonlaştırıcı radyasyonun absorblanmış dozu birim kütlede maddeye verilen enerji miktarıdır. Rad, ışınlanan maddenin 1 kg'ına 10^{-2} Joule'lük enerji veren radyasyon miktarıdır. SI birimi olarak kullanılan Gray (Gy) ise ışınlanan maddenin 1 kg'ına 1 Joule'lük enerji veren radyasyon miktarıdır.

Doz Eşdeğeri Birimi:

Özel Birim: Rem

SI Birimi: Sievert (Sv)

Rem, 1 röntgenlik X veya δ ışınının meydana getirdiği aynı biyolojik etkiyi meydana getiren herhangi bir radyasyon miktarıdır. Sievert ise 1 Gy'lık X veya δ ışını ile aynı biyolojik etkiyi meydana getiren herhangi bir radyasyon miktarı olarak tanımlanır.

2.3.3 Radyasyonun Biyolojik Etkileri

Radyasyonun canlı organizma üzerinde biyolojik bir hasar meydana getirebilmesi, radyasyon enerjisinin canlı hücreye ve dokulara aktarılması ile olur.

Radyasyon, içinden geçtiği ortamda rastgele iyonlaşma ve uyarılma olaylarına yol açar. Canlı sistemler gibi çok karmaşık yapıları ortamlarda, radyasyonun yol açtığı bu olaylar da çok karmaşık olur. Bu etki genel olarak radyasyonun yolu boyunca birim uzunlukta kaybedilen enerji (LET) (Çizelge 2.2) kaybına bağlıdır. LET arttıkça biyolojik etki de artar (ÇNAEM Tek. Rap., 1986; Yülek, 1992).

Çizelge 2.2 Radyasyon türlerine ait LET değerleri (Yülek, 1992).

Radyasyon	LET Değeri
α parçacıkları	95-260
β parçacıkları	
Elektron	0.42-0.25
Pozitron	2.30-12.3
Protonlar	4-92
X-Işınları	0.4-36
Gama Işınları	0.2-2

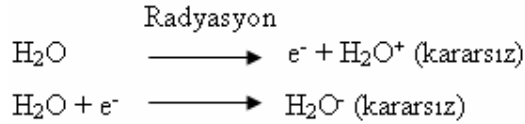
Radyasyonun canlı organizma üzerindeki etkisi direkt ya da indirekt olarak meydana gelir. Direkt etkide radyasyon enerjisi hedef biyomoleküller tarafından absorblanır, indirekt etkide ise biyomolekülün bulunduğu ortam tarafından absorblanır. Canlı organizma %70-80 oranında su içerdiği için radyasyon etkisi ile enerji büyük oranda su molekülleri tarafından absorblanır (Bacq, 1965; Özalpan, 1980).

Direkt Etki:

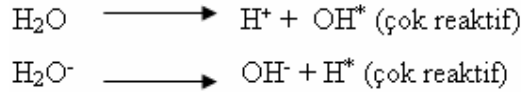
Biyolojik bir sistemde radyasyon etkisi ile oluşan bütün bu olaylar zinciri, radyasyon enerjisinin ilk kademedeki DNA ya da bir enzim molekülü gibi özel bir biyolojik yapı tarafından absorblanması ile başlamışsa buna “Radyasyonun Direkt Etkisi” denir.

İndirekt Etki:

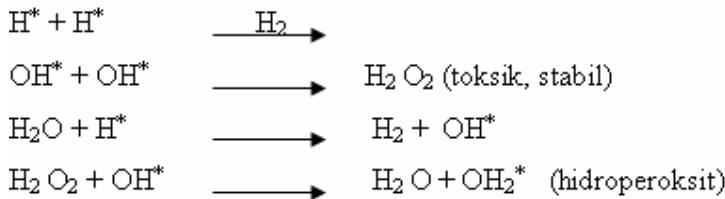
Radyasyonun enerjisi molekülün bulunduğu ortam molekülleri tarafından absorblanmışsa, değişime uğrayan ortam molekülleri biyomolekülü dolaylı olarak değişime uğrattır ki buna “Radyasyonun İndirekt Etkisi” denir (Coggle, 1977 ve Loa, 1946).



Oluşan yüklü haldeki su molekülleri kararlı değildir. Parçalanarak serbest radikalleri ve iyonları oluşturur.



Oluşan radikaller çok reaktifler ya birbirleri ile ya da diğer moleküllerle reaksiyona girerler.



Bu çok reaktif radikaller biyolojik moleküllerdeki (BH) hidrojen atomları ile reaksiyona girerek bu molekülleri de radikalleri haline dönüştürebilirler (ÇNAEM Tek. Rap., 1986).



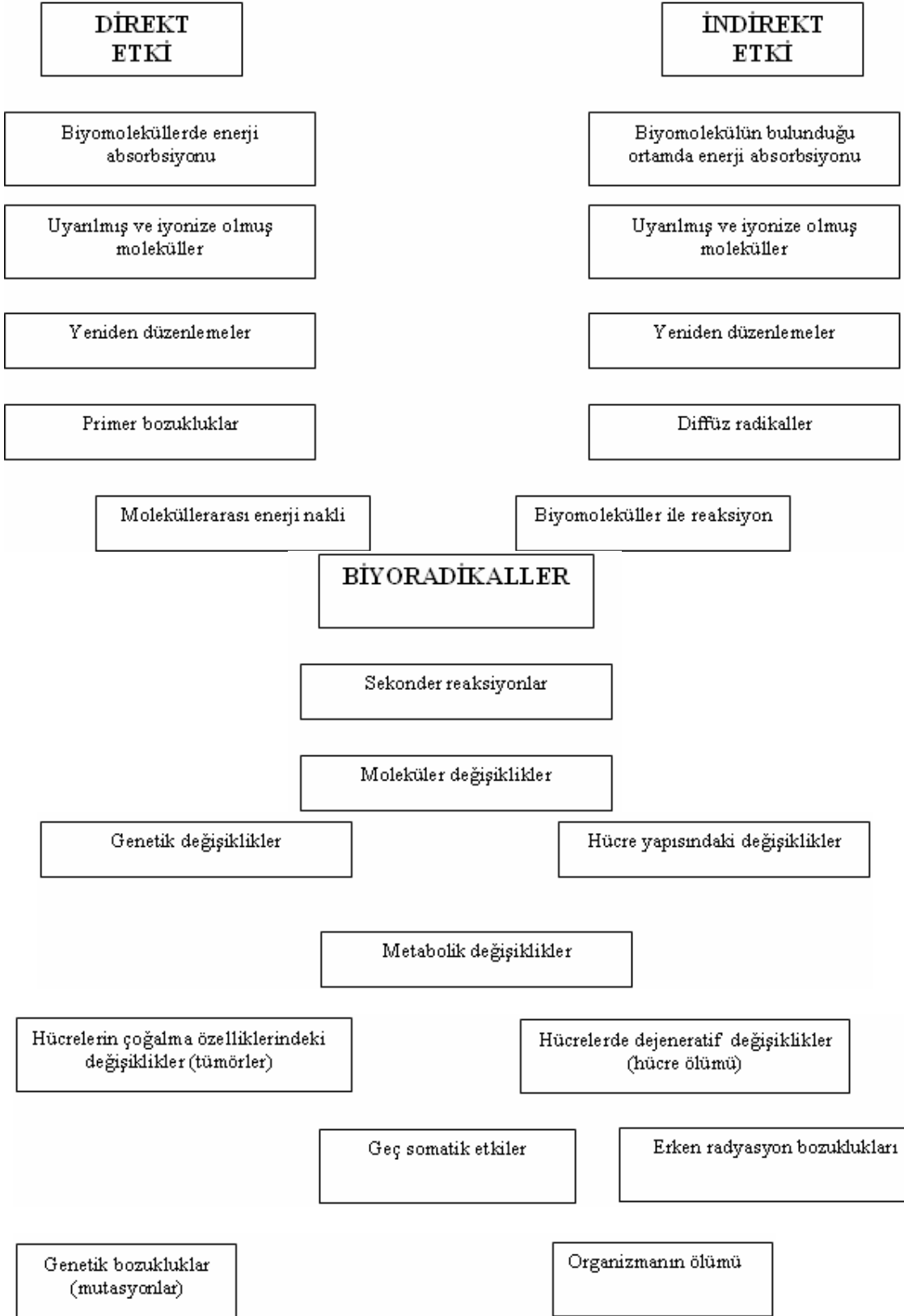
2.3.4 Radyasyonun Etki Kademeleri

Radyasyonun canlıda oluşturduğu etkilerin ayrıntılı bir şekilde incelenmesinde (Çizelge 2.3), radyasyon enerjisinin absorblanması ile biyolojik etkinin ortaya çıkması arasındaki sürede birbirini izleyen dört etki kademesini incelemek mümkündür.

Radyasyon etkisinin ilk kademesi olan “fiziksel kademe” enerjinin maddeye transfer edildiği kademedir. Bu olay, radyasyonu absorblayan maddenin moleküllerinde uyarılma ya da iyonlaşma meydana getirir. Ortaya çıkan yeni ürünler, son derece kararsızdırlar ve çok kısa bir süre içinde sekonder reaksiyonların oluşmasına yol açarlar. Sekonder reaksiyonlar, radyasyon etkisinin ikinci kademesi olan “fizikokimyasal kademe”de oluşur. Fizikokimyasal kademe oluşun olaylar, ya tek reaksiyonlar sonucunda ya da karmaşık zincirleme reaksiyonlar sonucunda ortaya çıkarlar. Üçüncü kademe “kimyasal kademe”dir. Bu kademe, önceki kademelerdeki reaksiyonlardan meydana gelen reaktif ürünler hem birbirleri ile hem de ortamdaki diğer moleküllerle reaksiyona girmeye devam ederler. Oluşun biyoradikaller sonucu moleküler düzeyde değişiklikler meydana gelir. Bu kademe ise “biyolojik kademe” denir.

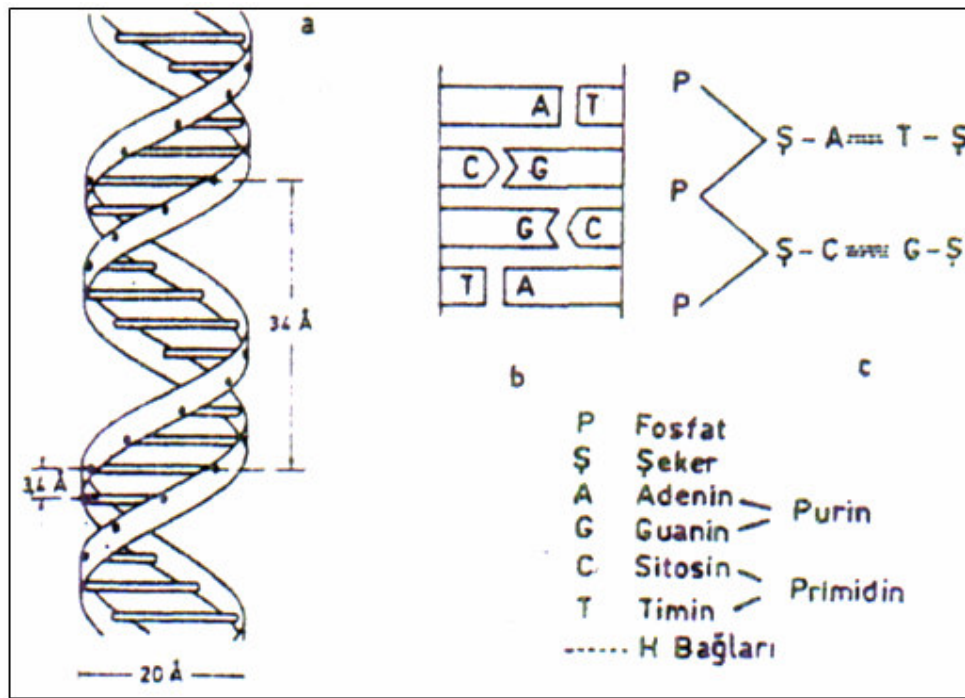
Gerçekte bugün hakkında en az şey bildiğimiz konu, radyasyonun fiziksel etki kademesi ile biyolojik etkiler arasında oluşun ve bu iki kademeyi birbirine bağlayan kimyasal kademedir. Radyasyonun kimyasal etki kademesinde, özellikle canlılık yönünden çok önemli olan iki biyomolekülün radyasyonun biyolojik etkisinin ortaya çıkmasında büyük payları olduğu saptanmıştır. Bu moleküller proteinler ve nükleik asitlerdir (Loa, 1946; Özalpan, 1980).

Çizelge 2.3 Radyasyonun direkt ve indirekt etkileri (Özalpan, 1980).



2.3.5 Radyasyonun DNA üzerine etkisi

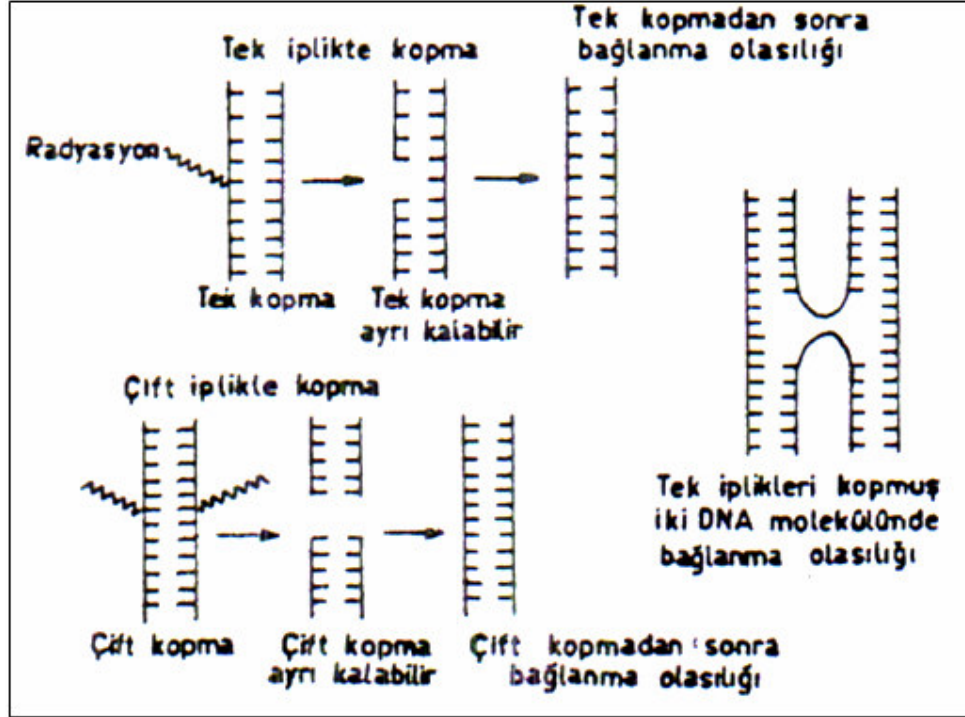
DNA molekülü (Şekil 2.10), birbirinin çevresinde spiral yapacak şekilde dönen iki iplikten oluşmuştur. Bu yapı yaygın olarak “çift heliks” adı ile adlandırılır. İpliklerin herbiri, birbirine bağlı, ard arda sıralanan fosfat grupları ile bunlara bağlı şeker gruplarından oluşan bir iskelet ile bu iskelettteki gruplarına bağlı azotça zengin organik bazlardan oluşmuştur. Herbir iplik, karşılıklı bazları arasında hidrojen bağları ile birbirlerine bağlanmışlardır. Bu şekilde, iki DNA ipliği bir bütün oluştururlar. DNA’ nın yapısında dört çeşit baz bulunur. Bunlardan ikisi pirimidin (timin ve sitozin), diğer ikisinde purin (guanin ve adenin) yapısındadır.



Şekil 2.10 DNA molekülünün temel yapı şeması (Özalpan, 1980)

DNA molekülünün iki ipliği, birbirinin tamamlayıcısı “komplementer” özellik gösterir. Nükleustaki genetik bilgi, bazların sıralanışına göre DNA molekülü tarafından taşınır. Bu bilgi, dört harfli bir alfabe (DNA’ nın dört bazı) şeklindedir ve herbiri; üç harften oluşan sözcükler halinde belirlenir. İplik üzerinde ard arda üç bazın oluşturduğu “kodon” adını alan grupların herbiri, özel bir amino asidin kodlanmasını sağlar.

Buna göre DNA molekülü üzerindeki bazların özel dizilişi, spesifik amino asitlerden oluşmuş bir zincirin yani spesifik bir proteinin oluşumunu denetler. Amino asitlerin dizilişi doğrudan doğruya DNA molekülü üzerinde meydana gelmez. Aslında protein sentezi, sitoplazmada gerçekleşen bir olaydır.



Şekil 2.11 Radyasyon etkisi ile DNA molekülünün tek veya çift ipliğinde oluşan kopmalar ve bu kopma yerlerinin yeniden bağlanma olasılıkları.

DNA üzerinde meydana gelen iyonize radyasyon zararlarını (Şekil 2.11) özet olarak aşağıdaki gibi sıralamak mümkündür;

- Hidrojen bağlarının kırılması,
- Zincir kırılmaları; tek ve çift zincirde kırılmalar veya şeker fosfat iskeletinin kırılması,
- DNA da baz hasarı; Baz değişikliği veya kaybı,
- Çapraz bağlanma.

Radyasyon etkisi ile DNA' nın tek ipliğinde kopma olasılığı, çift iplikte kopma olasılığından daha fazladır. Çok yüksek radyasyon dozlarında DNA molekülünde parçalanmalar da oluşur. Bunun sonucunda çok küçük moleküller ortaya çıkabilir. Bu küçük moleküller tekrar rastgele birleşerek, birçok küçük DNA parçasından oluşan agregasyonlar meydana getirebilir. Radyasyon etkisi ile ortaya çıkan kromozom anormalliklerinin oranı ile doz, doz hızı ve dozların aralıklarla uygulanması arasında bir ilişki olduğu deneysel olarak saptanmıştır

(Köksal vd., 1996). Işınlama sırasında oksijenin varlığı kopmaların oranında bir artışa neden olmaktadır. Yapılan araştırmalar, oksijenin kromozom anormalliklerinin oluşma oranını iki-üç kat arttırdığını göstermiştir. Kırılma bölgesindeki tahribat yada hatalı bir yapışma dominant letal mutasyonlara yol açabilir. Bu da hücreyi ölüme götürür.

Bazların bozulması ve DNA molekülünü oluşturan ipliklerdeki kopmalar, radyasyonun DNA' da oluşturduğu biyofiziksel düzeydeki etkiler ile, DNA sentezinin başlamasının gecikmesi, hücrelerin S fazına geçişlerinin yavaşlaması yada DNA sentezinin azalması gibi biyokimyasal düzeydeki radyasyon etkileri arasında doğrudan bir bağlantı kurmak her zaman mümkün olamamaktadır.

Diğer bir ifadeyle, biyokimyasal etkilerin biyofiziksel bozuklukların bir sonucu olarak ortaya çıktığını söylemek doğru değildir. Çünkü biyokimyasal etkilerin çoğunun, hücrede DNA sentezinin yapılması için gerekli birçok moleküllerde, radyasyon etkisi ile ortaya çıkan tahribatlar sonunda oluştuğunu gösteren birçok kanıtlar vardır (Özalpan, 1980).

2.3.6 Radyasyonun Proteinler Üzerine Etkisi

Radyasyon etkisi ile protein çözeltilerinin fizikokimyasal özelliklerindeki değişimin incelenmesi radyoterapi sırasında, nükleer ve diğer radyasyonlara maruziyet esnasında meydana gelen temel prosesleri anlamak amacıyla büyük önem taşımaktadır. Bu konu aynı zamanda yiyeceklerin korunması ve farmasotik ürünlerin sterilizasyonu sırasında radyasyonun kullanımı ile bağlantılı olarak ayrıca bir önem taşımaktadır. Polimerlere benzer bir şekilde proteinlerin yani biyopolimerlerin de buldukları ortama göre radyasyon etkisi karşısında reaksiyonları farklı olmaktadır.

Radyasyon su ortamında proteinlerde agregasyon, küçük ünitelere disosiasyon veya fragmentasyon meydana getirebilir. Bu değişimler kimyasal olarak aktif gruplarda reaksiyona yatkınlık veya tam tersi bir durum geliştirebilir. Örneğin enzimler aktivitelerini, nükleoproteinler biyolojik fonksiyonlarını yitirebilirler.

3. SİTOGENETİK YÖNTEMLER

3.1 İnsan Lenfosit Hücreleri

İnsan lenfosit hücreleri de alyuvarlar, akyuvarlar, trombositler gibi diğer kan hücrelerinin oluştuğu pluripotent hemopoetik dokuda meydana gelirler. Hemopoetik doku yetişkinlerde kemik iliğinde, fetusta ise karaciğerde yer almaktadır. Lenfositler, T ve B hücreleri olmak üzere iki gruba ayrılmaktadırlar. Memelilerde B hücreleri oluştukları hemopoetik dokuda gelişimlerini tamamlarken, T hücreleri hemopoetik dokuda meydana geldikten sonra kan aracılığıyla timusa taşınırlar ve burada olgun hücrelere dönüşürler.

T ve B hücreleri immünolojik uygulama bakımından farklı ömür ve rollere sahip, hafıza (memory) ve plazma hücrelerinden oluşan bir karışımı temsil ederler. Kan lenfositleri, fiziksel veya kimyasal klastojenlerin biyolojik etkilerinin dedekte edilmesinde kullanılabilir en uygun sistemdir. Dolaşan kandaki lenfosit hücrelerinin % 70' i T-lenfositleridir. Bu hücrelerin % 95 'inin yarı ömrü ortalama 3 yıldır.

T hücrelerinin, B hücrelerinden ayrılmasını sağlayan özellik T hücrelerinin yüzeyinde bulunan CD moleküllerinden ileri gelmektedir. T hücrelerinin esas belirleyicisi ise TCR (T cell antigen reseptor) molekülüdür. Bu reseptörler TCR-1 ve TCR-2 olmak üzere ikiye ayrılır. TCR-2 molekülü iki adet disulfid bağı ile bağlanmış α ve β polipeptitlerinden oluşmaktadır. TCR-1 ise γ ve δ polipeptitlerinden oluşmakta ve yapısal olarak benzerlik göstermektedir. Kanda bulunan T hücrelerinin yaklaşık % 95' i TCR-2' den, % 5' i TCR-1' den oluşmaktadır. TCR-2 taşıyan hücreler birbirleri ile çakışmayan iki alt gruba ayrılmaktadır. Bunlardan biri T_H (helper) CD^{4+} yi taşımaktadır, diğeri ise T_{CS} (cytotoxic, suppressor) CD^{8+} yi taşımaktadır. In vitro çalışmalarda phytohemagglutinin (PHA) ile bölünmeye teşvik edilen ve bir biyolojik dozimetre olan T hücrelerinin bu işlemlerde en çok CD4 ve CD8 alt birimleri kullanılmaktadır (IAEA A Manuel, 2001).

Radyasyon ile ışınlamalarda kişilerin ve toplumun maruz kalacağı dozların radyobiyojik ve istatistiksel olarak hesaplanması çok önemlidir. Ancak doz hesabını zorlaştıran fiziksel ve biyolojik bir çok faktör vardır. Bunlar; radyasyonun cinsi, toplam uygulanan doz, dozun bir kerede yada aralıklı uygulanması, kişinin kısmi veya tüm vücudunun ışınlanması, ışınlama üzerinden geçen zaman, kişisel duyarlılıkların farklı olması şeklinde sıralanabilir. Fiziksel ve kimyasal ajanların etkisini dedekte edebilmek için kullanılan birçok biyolojik indikatör sistem

olmasına rağmen, bunların hiçbirisi biyolojik dozimetre olarak kullanılmaya elverişli değildir. Bunlardan kemik iliği incelemeleri, spermogram, serum analizleri, timidin analizi, idrar aminoasitleri ve metabolitleri, vücut sıvıları, tırnak ve saç dokularının kullanılması üzerine yapılmış pek çok çalışma vardır. Fakat bu tip biyolojik sistemlerin çoğu örnek almadaki güçlükler ve asenkronize popülasyonları olmaları nedeni ile dozimetrik amaçla kullanılmazlar. Ayrıca bu tür hücreler ancak vücudun belirli bir bölgesinden alınacağından tüm vücudu homojen olarak temsil etmezler. Oysa insan dolaşan kan lenfosit hücreleri, kişinin tüm veya kısmi olarak aldığı dozun, radyobiolojik ve istatistiksel olarak değerlendirilmesinde 1960' lardan beri biyolojik dozimetre olarak kullanılan tek biyolojik sistemdir (Moorhead vd., 1960; Heddle ve Carrano, 1977; Countryman ve Heddle, 1976; Heddle vd., 1983; Fenech ve Morley, 1985; Köteles ve Bojtor, 1995; Köksal vd.,1996).

Lenfosit hücrelerinin biyolojik dozimetre olarak kullanılma nedenleri:

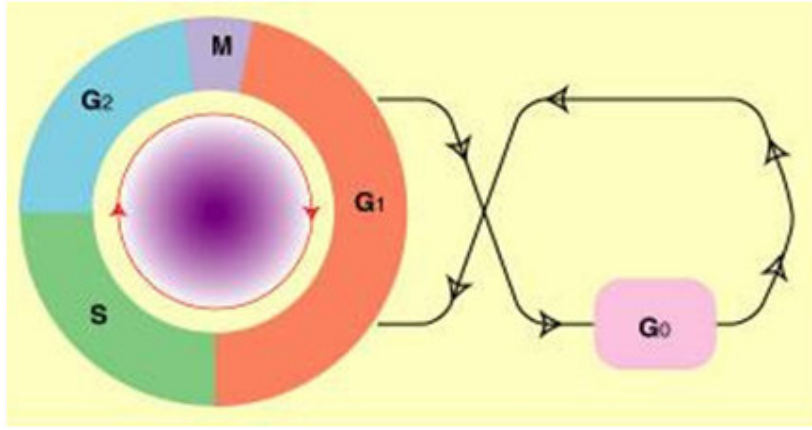
- Örnek almanın kolay olması ve tüm vücudu temsil etmesi,
- Radyasyona karşı çok duyarlı olmaları,
- Vücudun herhangi bir yerinde oluşan hasarı dolayan kana taşınmaları,
- Dolaşımda bölünme olmayan G_0 fazında olmaları,
- Doku kültürü ortamında kolayca bölünebilmeleri,
- Senkronize (aynı anda aynı fazda) hücreler olarak bölünmeye geçebilmeleri.

3.2 Ökaryotik Hürelerde Mitoz Bölünme

Her canlı organizmanın büyümesi ve gelişmesi, hücrelerin çoğalmasıyla olasıdır. Bir hücrelilerde hücre bölünmesi çoğalmayı sağlar. Halbuki çok hücreli organizmalarda yeni birey, dişi ile erkek hücrelerinin birleşmesinden ortaya çıkan zigot adı verilen tek bir hücreden gelişir. Zigotun bölünmesi ile çok sayıda hücreler oluşur. Yani çok hücreli organizmalarda hücre bölünmesi, doku, organ ve sistemlerin büyüüp gelişmesini, yıpranan hücrelerin onarılmasını, ölen hücrelerin yerine yenilerinin yapılmasını sağlar.

Hücrenin yaşamında iki evre vardır. Birincisi interfaz, ikincisi bölünme evreleridir. İnterfaz evresi, hücrenin hacmini genişlettiği evredir. Bölünme hücrenin iki eşit parçaya yani, iki oğul hücreye ayrılmasıdır.

Hücrenin bir bölünme sonundan ikinci bölünme sonuna kadar geçen yaşamına, hücre siklusu (Şekil 3.1) veya hücre devri denir. Hücre devri; mitoz, sitokinez, G_1 , S, G_2 , olmak üzere birbirini izleyen ve farklı sentez olaylarının yer aldığı beş alt evreden oluşmaktadır. Mitozu izleyen interfaz evresi, G_1 , S ve G_2 alt evrelerini kapsamaktadır.

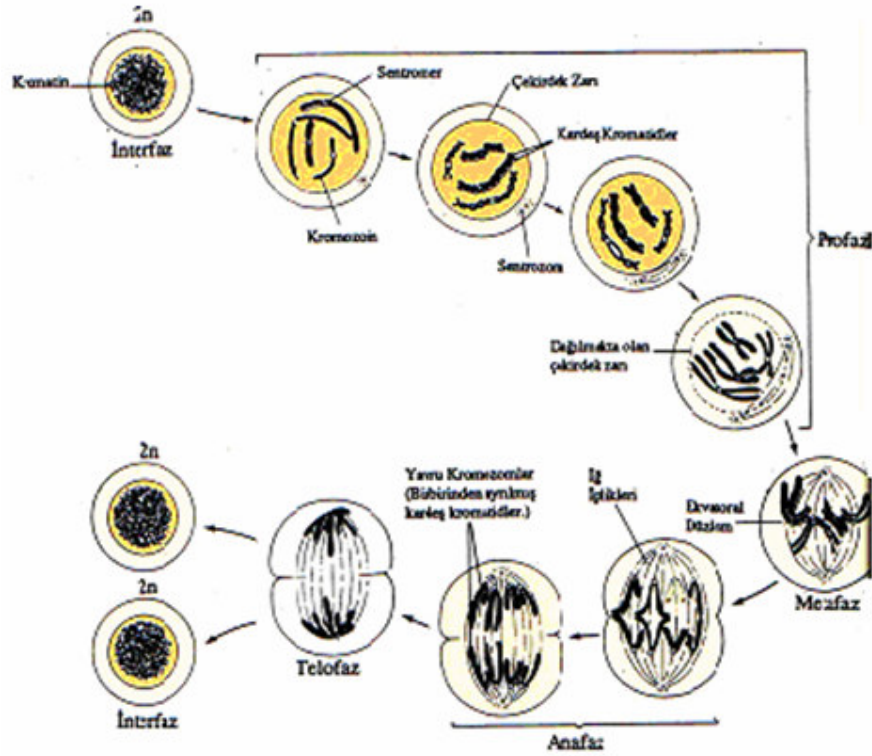


Şekil 3.1 Hücre siklusu

Mitoz hücrenin düzenli olarak bölünmesidir. Bu yolla yeni oluşan iki yavru hücre, tıpkı ata hücrenin sahip olduğu kromozomların sayısı ve çeşidi kadar kromozoma sahip olur. Mitoz bölünmeyle iki yavru hücre arasında kromozomların tam eşit olarak bölünmesi garantilenmektedir. Yeni ve eski kromozomlar yapı ve işlev bakımından birbirinin aynıdır. Her insan hücresinde, mitoz sırasında 46 kromozomun her biri kendisinin tam bir kopyasını oluşturduğundan, bir an için hücrede 92 kromatid bulunur. Sonra hücre bölünmesi tamamlanırken 46'sı bir yavru hücreye 46'sı da öteki yavru hücreye gider.

Mitozun biyolojik önemi; hücre sayısını çoğaltmak, kromozom sayısını ($2n$)'de sabit tutmak ve genetik bilginin (kromozomlar DNA'da şifrelenmiş bilgiler taşırlar) her yavru çekirdeğe tam olarak dağıtılmasını sağlamaktır.

Mitoz bölünme (Şekil 3.2); profaz, metafaz, anafaz, telofaz ve sitokinez olmak üzere beş evrede gerçekleşir.



Şekil 3.2 Mitoz bölünme

Dolaşan kan lenfositlerinde kromozomların sitogenetik analizi, doğrudan somatik hücrelerdeki hasarların belirlenmesine imkan sağlar. Kromozomal analiz için çeşitli metodlar kullanılır. Bunlar; kromozom aberasyon analizi, kardeş kromatid değişimi ve MN sıklığının belirlenmesidir. MN sıklığı dolaşan kan lenfositlerinde olduğu kadar diğer hücre türlerinde de belirlenebilir.

Çevremizde bulunan ve genetik yapıyı bozan toksik maddelerin (genotoksikantların) risk değerlendirmesindeki genel strateji, bu maddelerin insan vücudundaki absorpsiyonun ve genetik materyaldeki toksik aktivitelerinin belirlenmesi şeklindedir. Bu ajanlara maruz kalmanın klinik boyutu epidemiyolojik çalışmalarla ölçülebilir. Genotoksiklik değerlerinin deneysel ve epidemiyolojik olarak belirlenebilmesi, maruz kalmış insanların risk değerlendirmelerinin yapılabilmesi için gereklidir. Çünkü hayvanlar üzerinde bu amaçla yapılan deneylerin sonucunda elde edilen doz-cevap ilişkilerinin insanlara uygulanmasında büyük problemler vardır. Ancak kimyasal maddelere sürekli olarak maruz kalan insanlarda, her bir kimyasal madde için doz - cevap ilişkisini elde etmek amacı ile yapılacak olan

epidemiyolojik çalışmalar, çok uzun zaman, emek ve tekrarlama gerektiren çalışmalardır (Carrano ve Natarajan, 1987; Lauwerys vd., 1992; Anwar, 1994; Köksal vd., 1996).

İnsan popülasyonlarında genotoksikantların etkilerinin test edilebilmesi için kullanılan en uygun sitogenetik metodlar şunlardır:

3.3 Kromozom Aberasyon Analizi

Kromozom sayılarının ve kromozomal hasar kayıtlarının belirlenmesini sağlar. Kromozom aberasyon analizi, dolaşan kanda normalde G₀ fazında olan fakat *in vitro* şartlarda bazı maddelerle bölünmeye teşvik edilen lenfositlerde fiziksel ve kimyasal ajanların yol açtığı kromozom aberasyonlarının, hücre bölünmesinin metafaz evresinde sayılması esasına dayanır. Kimyasalların yol açtığı aberasyonlar, radyasyon kaynaklı aberasyonlardan (disentrik, halka, parçalı veya parçasız translokasyon, inversiyon, uç ve ara parça kayıpları) biraz farklıdır. Kimyasalların yol açtığı aberasyonların büyük kısmı kromatid tipi kol kırıklarındır. Ayrıca iğ ipliği inhibitörü olan bazı kimyasal maddeler görünüşte kromozomda herhangi bir hasara yol açmadığı halde mitotik iğde bazı hatalara neden olur ve bu, hücre bölünmesi evresinde bazı kromozomların kutuplara çekilememesine, dolayısıyla bu kromozomların çekirdek dışında kalmasına sebep olur. Bu nedenle iğ ipliği inhibitörü olan kimyasal ajanların etkisini CA analizi ile tayin etmek çok güçtür.

CA analizi, özellikle iyonizan radyasyonların biyolojik etkilerinin belirlenmesi amacı ile, 60'lı yılların başından beri biyolojik dozimetri olarak başarı ile kullanılmaktadır. Bu yöntemle bir doz-cevap ilişkisi araştırılırken, yüksek dozlar için yaklaşık 200 hücre saymak yeterli olduğu halde, düşük dozlar için binlerce hücre saymak gereklidir. Radyasyonun oluşturduğu kromozom hasarı olan disentrik kromozom aberasyonlarının kendiliğinden oluşma sıklığı, yani doğal sıklığı, yaklaşık 10.000 metafaz hücrede 5 disentrik ve 10.000 metafaz hücrede 30 asentrik aberasyon olarak kabul edilmiştir ((Countryman ve Heddle, 1976; Heddle ve Carrano, 1977; Heddle vd.,1983; Fenech ve Morley, 1985; Köksal vd., 1990; Köteles ve Bojtor, 1995; Dolabela vd., 1998; Bakir vd., 2004).

Metod

- Steril, vakumlu ve heparinle kaplanmış, 5 ml'lik kan tüplerine damardan kan alınır,
- Steril bir kabin altında, medyum, glutamin, antibiyotik, bromodeoksiuridin, serum ve fitohemaglutinin gibi hücrelerin beslenip çoğalmaya teşvik edileceği maddelerin ilavesi ile kan kültür kaplarına ekilir,
- Hücrelerin mitoz bölünmeye geçmesi için 37⁰ C' deki inkübatörde 48 saat bekletilir,
- 45. saatte mitoz bölünmenin metafaz evresinde yani kromozomları en kısa ve en kalın şekilde olduğu evrede Colchmid ilavesi yapılır,
- Santrifüj tüplerine aktarılan hücreler üzerine sırasıyla KCl ve metanol:asetik asit ilaveleri yapılarak hipotonik şok uygulanır,
- Lamlar üzerine ekilen hücreler Giemsa boya ile boyanarak kromozomlar ışık mikroskopunda analiz edilir,
- Kromozomlar incelenerek görülen bütün sayısal ve yapısal kromozom anormallikleri kaydedilir.

Değerlendirme

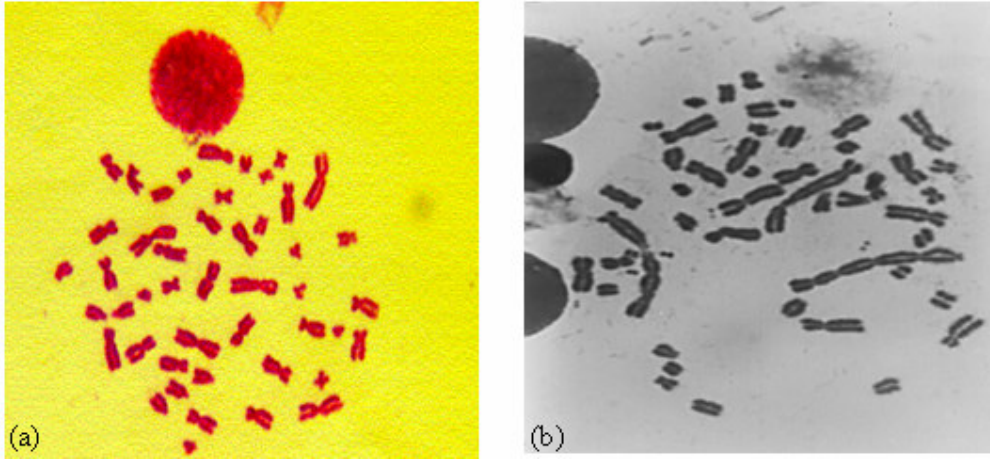
Lenfositlerin *in vivo* ve *in vitro* ışınlanmaları doz başına benzer kromozom hasarı oluşturduğu için, disentriklerin kantitatif miktarı ile absorbe edilen radyasyon dozu arasındaki ilişkiden doz-cevap eğrileri elde edilmektedir. *İn vitro* şartlarda farklı radyasyon türleri, dozları, doz hızlarında elde edilmiş çok sayıda doz-cevap eğrisi rutin ve standart olarak bu tekniği kullanan laboratuarlarda mevcuttur ve radyasyon doz değerlendirmelerinde kullanılmaktadır.

Avantajları

- Duyarlılığı yüksek bir teknik, düşük radyasyon dozlarında bile sonuç alınabilmekte,
- Spontane sıklığı oldukça düşük (2000 metafazda 1-2 disentrik),
- Çok farklı radyasyon türleri, doz ve doz hızları için elde veriler mevcut,
- Işınlama vücutta az çok eşit dağılmışsa ve kan örnekleri kazadan hemen sonra alınmışsa verimi yüksektir.

Dezavantajları

- Analizi uzun zaman alır ve uzman değerlendirci gerektirir,
- Otomasyonu zordur,
- Hasarlı hücrelerin bir kısmı kültür sırasında ölebilir (ya da sadece bölünme kabiliyetini yitirebilir) veya mitoz bölünmeye geçişi gecikebilir,
- Klasik Giemsa boyama ile bütün kromozomlar aynı renkte boyanacağından kromozomlar arasındaki parça değişimlerini görmek mümkün olmaz,
- Disentrik aberasyonlar kararlı değildir (Her bir bölünmede disentrik sayısı %50 azalır) ve bu hataları taşıyan hücreler zamanla yok olabilir. Bu da dozun gerçek değerden daha düşük hesaplanması sonucunu doğurur.



Şekil 3.3 Giemsa yöntemi ile boyanmış (a) normal ve (b) hasarlı metafaz hücresi.

3.4 Mikronükleus Analizi

a- Dolaşan kan lenfositlerinde *in vitro* şartlarda, sitokinezi inhibe eden özel bir teknik kullanılarak oluşturulan binükleat hücrelerdeki kromozom hasarlarının MN olarak analizi, metafaz kromozomlarının analizinden daha avantajlıdır. Preparatların hazırlanması ve sayılması, kromozom analizinden daha hızlı ve doğrudur. Buna ilaveten iğ ipliği inhibitörü olduğu düşünülen mutajenlerin (özellikle kimyasal maddeler) etkilerinin taranmasında da kullanılabilir. MN'ler, hücre bölünmesi sırasında ana çekirdeğin içine giremeyen tüm

kromozomlar ve kromozom parçaları ile ilişkilidir. Bu nedenle MN'nin büyüklüğü, içeriğinin tüm kromozom veya kromozom parçaları olmasına bağlı olarak değişir.

b- Diğer hücre türlerinde MN analizi; Epitel hücre özelliği yani sürekli bölünerek yenilenme özelliği gösteren hücre popülasyonundaki kromozom kırıkları da MN'ye yol açar. Çeşitli kimyasallarla çalışan veya karsinojenlere maruz kalan popülasyonlarda kullanılan bu teknik, karsinojenin hedefi olan dokuda veya gelişmiş olan tümörden alınan dokuda yapılan ve oluşan genotoksik hasar analizi ile doz tayinine imkan veren bir yöntemdir (Anwar, 1994).

Metod

MN analiz metodu disentrikler için anlatılan metotla hemen hemen aynıdır.

- Disentrikler için anlatılan aynı yöntemle alınan ve aynı maddelerin eklendiği kan örnekleri, 37⁰ C'deki inkübatörde 68 saat bekletilir,
- 48. saatte sitoplazma bölünmesini önlemek amacıyla Cytochalasin-B adlı bir madde uygulanır,
- Santrifüj tüplerine aktarılan hücreler üzerine sırasıyla KCl ve metanol : asetik asit ilavesi yapılarak hücrelere hipotonik şok uygulanır,
- Lamlar üzerine ekilen hücreler Giemsa boya ile boyanarak ışık mikroskopunda analiz edilir,
- Sadece iki çekirdekli (binükeat) hücrelerdeki MN' ler değerlendirilir.

Değerlendirme

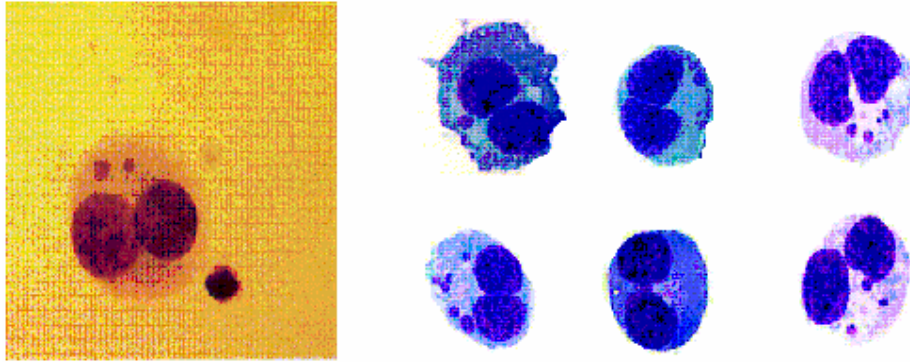
Mikronükleusların kantitatif miktarı ile absorbe edilen radyasyon dozu ilişkisinden doz-cevap eğrileri elde edilmektedir. In vitro şartlarda farklı radyasyon türleri, dozları, doz hızlarında elde edilmiş çok sayıda doz-cevap eğrisi mevcuttur ve radyasyon doz değerlendirmelerinde kullanılmaktadır.

Avantajları

- Analizi kolay, uzman değerlendirci gerektirmeyen, hızlı bir yöntem,
- Genellikle büyük radyasyon kazaları gibi ciddi sağlık problemleri beklenen olaylarda, çok sayıda kişinin hızlı bir şekilde doz düzeylerinin belirlenmesinde,
- Nükleer tesislerde çalışan kişilerin iş öncesi kontrolleri ile klastojenik ajanlara (kromozomlara hasar verme potansiyeli olan) duyarlılığı olanların, önceden saptanmasında,
- Kanserli hastaların tedavisinde radyoterapi ve kemoterapiye karşı kişisel duyarlılık farklılığının belirlenmesinde,
- Radyasyon gibi fiziksel etkenler ile kimyasal olarak kromozomları etkileyen maddelerin etkileşimlerinin araştırılmasında tercih edilmektedir.

Dezavantajları

- Yüksek dozlarda, hücre bölünmesinin gecikmesi, hücre ölümü ve bir MN içine birden çok kromozom parçasının dahil olabilmesi nedeniyle dedeksiyon verimi düşmektedir,
- Radyasyon dışı nedenlerle de oluştuğu için düşük dozlarla ışınlanmalarda ve spontane sıklığının bilinmediği durumlarda verimi düşüktür.



Şekil 3.4 MN Analiz tekniği kullanılarak hazırlanmış bir preparat üzerinde, ışık mikroskobunda görülmesi muhtemel hücre şekilleri.

3.5 Fluorescence In situ Hibridization (FISH) Analiz Yöntemi

Moleküler biyoloji alanındaki gelişmelerden faydalanılarak biyolojik dozimetride geliştirilen yöntemlerden biridir. Rekombinant DNA teknolojisi sayesinde kapsamlı bir yapıya sahip olan DNA molekülü bugün kolayca incelenebilir hale gelmiştir. 1970 lerden beri gelişen bu teknikler sayesinde istenilen DNA parçası sınırsız çoğaltılabilmektedir. FISH tekniğinde kromozomların belirli bölgelerinin tamamlayıcısı olan, laboratuvarında hazırlanmış ve floresan maddelerle işaretlenmiş PROB denilen DNA dizileri kullanılmaktadır.

3.6 SCE (Kardeş Kromatid Değişimi) Analizi

Bu teknik daha çok kimyasal mutajenite testlerinde kullanılan, duyarlı bir tekniktir. Hücre içindeki SCE'lerin belirlenmesi klasik kromozom boyama tekniğine göre daha hızlıdır ve daha az teknik bilgiye ihtiyaç gösterir. Fakat, SCE sıklığını etkileyecek faktörlerin kişisel farklılıklardan çok fazla etkilenmesi (sigara, beslenme, ilaç, kafein ve diyet tatlandırıcı kullanımı gibi) tekniğin dezavantajıdır (Carrano ve Natarajan, 1987).

3.7 PCC (Erken Kromozom Yoğunlaşması) Analiz Yöntemi

Mitoz bölünme evresindeki Çin Hamster ovaryum hücreleri ile insan lenfositlerinin polietilen glikol varlığında biraraya getirilmesi sonucunda, insan lenfosit hücreleri ortamdaki mitozu teşvik eden faktörler nedeniyle profaza benzer reaksiyona başlar. Çekirdek zarı erir ve kromatin materyeli kromozoma benzer yoğunlaşma gösterir. Bu erken yoğunlaşan kromozomlar, tamire zaman kalmadan doğrudan radyasyonun neden olduğu hasarların saptanmasına izin verir. FISH gibi yöntemlerle bir arada kullanılarak kromozom kırıklarının tamir kinetiklerinin araştırılmasında verimli bir yöntemdir.

4. POLİELEKTROLİTLER

Polielektrolitler uygun polar çözücülerde çözüldüklerinde çok sayıda yüklü lineer makromolekül zincirleri olarak tanımlanır.

PAA (Şekil 4.1) tipik sentetik bir polielektrolittir ve makromoleküler zincir üzerinde çok sayıda karboksil grubu içerir. Molekül ağırlığı propiyonik asidin analogu olan PAA, dioksan ve dimetilformamid gibi solventlerde çözünür. Karboksil grupları bu solventlerde iyonlaşmaz. Sulu çözeltilerde ise yüklenmiş makroiyonlar bulundurulur.

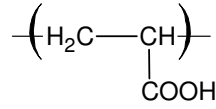
Polielektrolitler 3 sınıfta toplanabilir. Bunlar; doğal makromoleküller, sentetik makromoleküller ve modifiye biyopolimerlerdir. DNA, PAA ve karboksimetil selüloz bu tip polimerlere örnektir. Polielektrolitler lineer, dallanmış ve çapraz bağlı olarak gruplandırılabilir. Elektrokimyasal olarak, polianyonlar, polikasyonlar ve poliamfolitler olarak sınıflandırılabilir.

Polielektrolitlerin biyolojik olarak kullanımındaki temel kriter hem polimerin hem de metabolitlerinin öldürücü toksisiteye sahip olmamalarıdır. Toksik ve terapötik dozlar arasındaki fark kabul edilebilir olmalıdır. Polimer karsinogenik tümörlerin ve histolojik reaksiyonların oluşumuna sebep olmadan organizmadan tamamen atılabilmelidir. Örneğin suda çözünen polielektrolitler plazma arttırıcı olarak klinik anlamda kullanılmıştır. Bu maddelerin ana görevleri osmotik basıncı arttırarak dolaşan kan hacmini düzenlemektir. Burada molekül ağırlığı önemlidir. Böbrek eşiği nedeniyle makromolekülün M_w değeri 50.000'den büyük olmamalıdır. Sonuç olarak çok büyük moleküller eritrosit agregasyonuna ve morfolojik değişimlere neden olduğundan molekül ağırlığı dağılımı ortalama bir molekül ağırlığında olmalıdır (Ottenbrite ve Regelson, 1977; Sato vd.,1979; Urbanski vd., 1997;).

4.1 Polianyonlar

Polianyonlar negatif (-) yüklü polielektrolitlerdir. (-) yükler polimerin ana zincirine bağlı yan gruplar üzerinde yer alır. Doğal (heparin ve heparinoidler) ve sentetik (PAA, pıran) polianyonların her ikisi de çok çeşitli biyolojik aktivitelere sahiptirler. Polianyonlar immün cevabı arttırır, bakteri ve mantarlara karşı direnci (host resistance) arttırır.

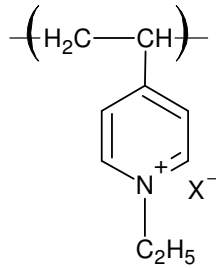
Polianyonlar konukçu moleküllere benzer yapıları ile biyolojik fonksiyonlarda yer almaktadır, konukçu-savunma reaksiyonlarıyla ilgili fungal, bakteriyel ve viral biyolojik cevapları düzenler (Ottenbrite ve Regelson, 1977; Kabanov vd., 1980; Mustafaev vd., 1992; Hara, 1993).



Şekil 4.1 PAA formülü.

4.2 Polikatyonlar

Polikatyonlar, makromoleküler zincir boyunca pozitif (+) yüklerin yoğun bir şekilde yer aldığı yapısal bir özellik gösterirler. Çözünürlükleri ve konformasyonları su ile olan etkileşimlerine ve iyonizasyonlarına bağlıdır. Katyonik fonksiyonel gruplar askıda kalmış (-) yüklü partiküller veya yağ damlalarıyla kuvvetli bir şekilde reaksiyona girer ki bu özellik atıkların iyileştirilmesi ve kağıt yapımında uygulama sağlar.



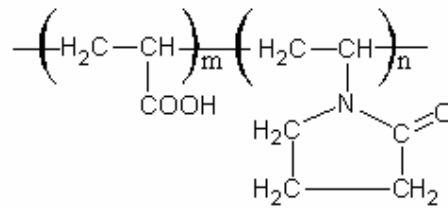
Şekil 4.2 PEVP formülü.

Polikatyonlar antiviral, antibakteriyel aktiviteleri içeren birçok biyomedikal uygulamaya sahiptir. Bu aktiviteler temel olarak (-) yüklü yüzeylere bağlanma yetenekleri ile ilgilidir. Hücre yüzeyleri membran üzerindeki asidik anyon gruplar nedeniyle aşırı miktarda (-) yük içerir. Polivinilamin, polietilenimin, poli (4-vinilpiridin) poli (4-vinil-N-alkil piridinyum) halojenleri (Şekil 4.2) gibi polikatyonlar bunlara örnektir (Mustafaev ve Kabanov, 1979; Kabanov vd., 1980; Mustafaev vd., 1992).

PVP, ikinci dünya savaşında kullanılarak yüzlerce askere hayat vermiş, klinik uygulamalarda plazma artırıcı olarak faydalanılmaktadır ve toksik etkisi yine çok düşüktür. Poli [N-(2-hidroksipropil)metakrilamit] kopolimerleri, son yıllarda yaygın biçimde kullanılmaktadır.

4.3 Poliamfolitler

Poliamfolitler (Şekil 4.3) anyonik ve katyonik yüklerin her ikisini de içeren polimerik sistemlerdir. Betain gibi maddeler aynı zincir üzerinde hem (+) hem de (-) yükleri içeren polimerik “zwitter iyon” şeklinde bulunurlar. Bu tür maddeler (-) ve (+) yüklü zincirler içeren maddelerle “interpolimer kompleks”ler oluştururlar. Betainler eşit sayıda anyonik ve katyonik gruplar içerir. Poliamfolitlerin yük dağılımları eşit ya da birbirinden farklı olabilir. İnterpolimer komplekslerin çözünmemiş halde kalabilmeleri için yük dengelerinin farklı olması gerekir (Osada ve Saito, 1975; Ottenbrite ve Regelson, 1977; Sato vd., 1979).



Şekil 4.3 Poliakrilik asit vinilpirolidon kopolimeri

4.4 Polielektrolit Kompleksler (PEC)

Genellikle inter-polimer kompleksler olarak adlandırılan polielektrolit kompleksler (PEC) zıt yüklü makromoleküllerle etkileşim meydana geldiğinde oluşurlar. Etkileşim, polimerik bir asit [PA] veya onun tuzu ya da polimerik bir baz [PB] veya onun tuzu ile meydana gelir. Böylece sulu çözeltide [PA] ve [PB] makromoleküllerinin iyonlaşabilen grupları arasında etkileşim oluşur.

PEC’ler elektrostatik kuvvetler, hidrofobik etkileşimler, H-bağları, Van der Waals kuvvetleri veya bu tür etkileşimlerin bir kombinasyonu sonucu oluşabilir (Harland vd., 1992). Kompleks oluşumu polimerin çözünürlüğünü, akışkanlığını, iletkenliğini ve türbiditesini etkileyebilir. Bu oluşumdan benzer şekilde polimerik sistemin geçirgenliği ve mekanik özellikleri de büyük ölçüde etkilenir.

PEC’in özellikleri daima başlangıç maddelerinden farklı olarak meydana gelir ve yapısal oluşumu bu özelliklere bağlı olarak incelenir. Potansiyometrik-kondüktometrik titrasyonlar,

türbidimetri, viskometri, kalorimetri, sedimentasyon, ışık saçılması (light scattering), nükleer magnetik rezonans spektroskopisi, kromatografi ve elektron mikroskobu ile yapılan incelemeler kompleks oluşumunu açıklanmasını yardımcı olan yöntemlerdendir.

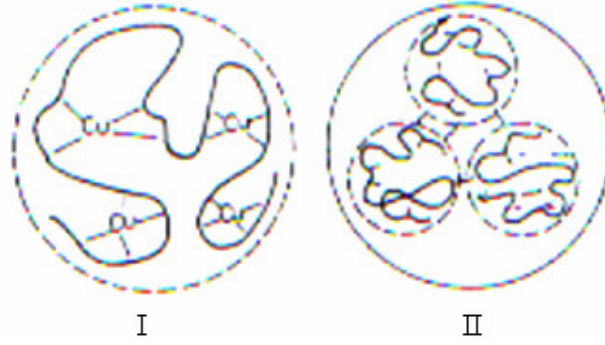
PEC'ler polimerik bileşiklerin özel bir sınıfı olarak düşünülmüştür. Bu tür bileşikler polianyonik ve polikationik çözeltilerin direkt olarak karıştırılması ile elde edilirler. Daha sonra PEC iyon değişiminin bir sonucu olarak oluşur. Eğer zıt yüklü poliyonlar eşit mol oranında ise meydana gelen bileşik genellikle çöker. Stokiyometrik (1:1) PEC sulu çözeltide çözünmez halde kalır ve bu şekilde yarı geçirgen membranlar, piller ve biyomedikal maddelerin eldesi mümkün olur. Bu sistemlere örnek olarak polivinilbenziltrimetil amonyum ile polistren sülfonatu veya polistren ile kuaterner yapıdaki poli (4-vinilpiridin)'i verebiliriz (Michaels, 1969; Kabanov vd., 1980).

Kabanov ve arkadaşlarının (1980) uygun koşullar altında zayıf veya kuvvetli polielektrolitlerden oluşturulabilen, çözünen, non-stokiyometrik (NPEC) kompleksler oluşturdukları rapor edildi. Bu çalışmada oluşan NPEC çözünlüğünün polielektrolitin kimyasal yapısı ile ilgili olmadığı bulundu.

4.5 Polimer-Metal Kompleksleri (PMC)

PMC ile araştırmalara olan ilgi giderek artış göstermiştir. Bunun nedeni metal (Me) iyonlarının sadece biyolojik proseslerde önemli bir role sahip olmaları ile ilgili değil polimer ve Me'nin orijinal bileşenlerden farklı olarak karakteristik bir yapı sergilemesidir (Kabanov vd., 1980). Örneğin CuSO_4 pH:7'de çözünmez halde bulunur fakat PE ile karıştırıldığında aynı pH değerinde çözülmüş hale geçer. Bu olay bize çözülmüş polimer-Me komplekslerinin oluşumu (Şekil 4.4) hakkında fikir verir. Bu gibi modellerin kullanımı birçok doğal polimerin geçiş metal iyonları varlığındaki davranışını anlamaya imkan verir.

PMC'ler çok çeşitli biyomedikal preparatların ve ilaçların tasarlanmasında temel alınmaktadır (Mustafaev vd., 1990; Manko vd., 1991; Mustafaev vd., 1996). Cu, Zn ve Fe gibi geçiş metal iyonları düşük molekül ağırlıklı yüzey aktif maddelerin yanında nötral veya zayıf yüklü suda çözünen polimerlere bağlanma yeteneğine sahiplerdir. Bu özellikleri ile komplementer yüzeylere bağlanarak kompleks oluştururlar. Proteine bağlanma, polimerin yapısında kimyasal bir değişim meydana gelmeden gerçekleşir ve bu şekilde biyolojik aktivitede de bir değişim meydana gelmez.



Şekil 4.4 Polimer-metal komplekslerinin $[Me] / [PE] < 1$ (I) ve $[Me] / [PE] \geq 1$ (II) oranlarında oluşan yapısı (Mustafaev, 1996).

PMC'ler PE ve Me içeren imidazollerde oluşmuş hemproteinleri ve hemokrom modelleridir. Polianyonlar metal iyonları aracılığında proteinlerle iyon-koordine kompleksler oluştururlar. Son yıllardaki çalışmalar Cu, Zn, Fe gibi bazı metallerin immünokompetent hücrelerin fonksiyonel aktivitelerinde önemli rollere sahip olduklarını göstermiştir (Petrov ve Mustafaev 1992).

Doğal PE ve Me temeline dayalı elde edilen ilaçlar için orijinal metotlar mevcut, güncel makalelerde yayınlanmıştır (Manko vd., 1991; Ichimura vd., 1999). Bu yazarlar insanlarda ve hayvanlarda Me iyonları ile desteklenmiş polisakkarit-protein karışımlarının, bazı mikrobiyal enfeksiyonların ve proflaksinin efektif anlamda tedavisini göstermişlerdir. Biyopolimerlerden olan lignin'in hem doğal hem de sentetik olanı virüs kaynaklı immün sistem yetersizliklerinde kullanılmıştır. Lignin fraksiyonları anti-influenza aktivite ve anti-genotoksik aktivite göstererek ilaç uygulamalarında yer almıştır (Ichimura vd., 1999).

Suda çözünen PMC'ler nötral su ortamında polimerin metal ile basit bir şekilde karışımından elde edilir. PMC'nin kompozisyonu ve yapısı, polimerin sabit konsantrasyonundaki sulu çözeltisine Me'nin ilave edilmesi ile kontrol edilebilir (Şekil 4.5). Bu şekilde polimere ilave edilen Me iyonları sıkı bir şekilde bağlanarak stabil çözünür ya da çözünmez PMC oluşumu meydana gelir. PMC'nin kimyasal yapısı ve kompozisyonu çözeltideki Me konsantrasyonuna ve PE'nin kimyasal doğasına bağlıdır. Cu^{2+} 'nin düşük konsantrasyonlarında bu katyonlar polimerler tarafından absorblanarak rastgele dağılmışlardır. Me konsantrasyonundaki artış ile dağılım da değişir. Sistem iki fraksiyondan meydana gelir. Bunlar;

-Me'i aşırı miktarda bağlayan PE kısmı

-Serbest haldeki diğer kısımdır.

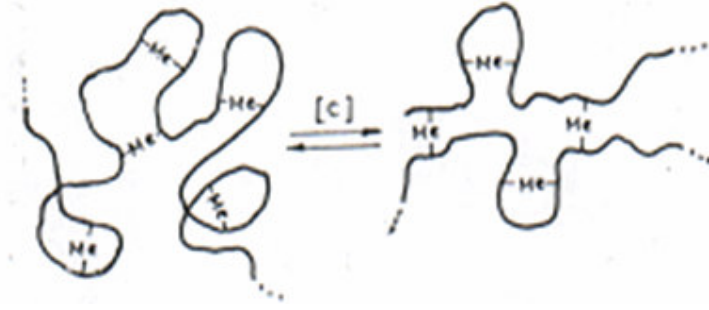
Bu kompleks oluşumu Cu^{2+} 'nin polimerik molekül içinde rastgele olmayan bir şekilde dağılımı sonucu meydana gelir. Cu^{2+} 'nin yüksek konsantrasyonlarında sistem homojenitesini kaybederek makromolekülde çapraz bağlanma meydana gelir.

Proteinin sentetik polielektrolitlerle kooperatif olarak bağlanması esasına dayanarak, enzim immobilizasyonu, stabilizasyonu ve destabilizasyonu, proteinin yüzeyler üzerinde spesifik sorpsiyonu ve polielektrolit fiziksel aktivitesinin değerlendirilmesi ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. Buna ek olarak bazı reaksiyonlar, karmaşık biyolojik sistemlerdeki virüs, kromatin, ribozom zincirleri ve diğer hücre komponentlerinin düzenlenmesini uyarır.

Mustafaev ve Kabanov (1979), kuaternize poli-4-vinilpiridin BSA ile oluşturduğu suda çözünen polimer-protein komplekslerini, sedimentasyon analizi, türbidimetrik titrasyon, viskometri ve UV spektroskopisi yöntemleri ile incelemiştir.

Mustafaev ve arkadaşları (1979, 1990, 1996a, 1996b, 1996c) geçiş metal iyonları varlığında sentetik PE ve proteinlerin kompleks oluşturmaları ile ilgili çalışmalar yapmış, (+) veya (-) yük içeren PE ve protein sistemlerinde eğer metal iyonu bulunmuyorsa bağlanmanın mümkün olmadığını, tam tersi durumda ise metal iyonunun stabil 3'lü kompleks oluşumunu teşvik ederek PE zincirleri ve protein globülleri arasında "fastener" bir rol oynadığını göstermişlerdir.

Fizikokimyasal çalışmalar sonucunda 3'lü PEC'in hipotetik yapısı önerilmiştir (Şekil 4.6). PEC'in her molekülünde protein globülleri lineer PE'ye Cu^{2+} iyonları aracılığında çapraz bağlanmıştır. Cu^{2+} iyonlarının bir kısmı çelat kompleks oluşturur, böylece 3'lü kompleks moleküllerinin agregasyonu meydana gelir. Oysa Cu^{2+} iyonlarının diğer bir kısmı PE'nin serbest bölgelerindeki çapraz bağlanmaları oluşturur, böylece yapı stabilize olur. Kompleks oluşumunda doğrudan yer almayan PE fragmentleri suya ulaşılabilen luplar oluşturur. Me iyonları, seyreltik çözeltilerinde bile PE sarmalının kompaktlaşmasına neden olan birbirine uzak ve yakın zincir fragmentlerinin her ikisi ile de bağ oluşturur. Polimer ve Me'nin başlangıç konsantrasyonunun bir miktar artışı ile intermoleküler çapraz bağlanma meydana gelir. Bu proses makromolekülün agregasyonu ile sonlanır.



Şekil 4.5 PMC’de kompleks oluşumunun şematik gösterilişi (Mustafaev, 1996).

4.6 Üçlü Polimer-Metal-Protein Kompleksleri

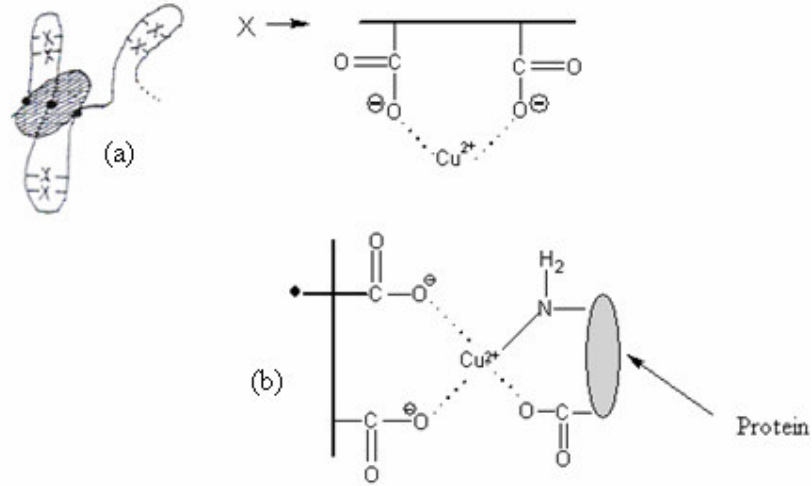
Non-stokiyometrik, çözünen polielektrolit kompleksleri sadece lineer polielektrolitler arasındaki reaksiyonun bir sonucu olarak elde edilmezler. Bunlar polimerik kuaterner amonyum tuzları ve BSA gibi globüler proteinlerle lineer polielektrolitlerin etkileşimi ile de oluşur (Kabanov vd., 1980). Öncelikle asit ortamında yani protein ve polimer bileşenlerinin pozitif yüklendiği ve birbiri ile bağlanmayan şartlarda metalik iyonların katılmasıyla üçlü komplekslerin oluşum şartları ve mekanizması verilmiştir (Mustafaev ve Kabanov, 1981). Sulu asetik asit ortamda, pH 4.2’de serum albumin poli-4-vinil-piridin ile kompleks oluşturmazlar. Bu şartlarda hem protein hem de PVP pozitif yüklüdür. Aynı yüklü küresel ve lineer zincirler arasındaki elektrostatik itme kuvveti kompleks oluşumunu engeller. Polimer-protein karışımına $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ilave edildiğinde sistemde faz geçişi meydana gelir. Protein miktarına bağlı olarak, kritik protein konsantrasyonunda sistem tamamen suda çözülmüş hale gelir. Çökeltiler santrifüj yöntemi ile ayrılarak süzüntü sedimentasyon metodu ile analiz edilir. pH 4.2 değerinde sistemde bakır iyonları yokken polimer ile proteinin bağlanmadığı düşünülerek, Cu^{2+} iyonlarının aynı pozitif yüklü küresel proteinler ile polikasyon zincirleri arasında bağlayıcı görevini üstlendiği söylenebilir.

Üçlü komplekslerin nötral su ortamlarında oluşması PAA, PVI, akrilik asidin vinil piridin ve vinil piroolidon ile kopolimerleri v.b. araştırılmıştır. Protein olarak SA ve veba hastalığının proteini (F1) kullanılmıştır. Geçiş metal iyonu olarak ise Cu^{2+} kullanılmıştır. Yüksek metal konsantrasyonlarında, oluşan PMK’ lar sisteme protein ilave ettikçe, suda çözünmeyen komplekse geçer. Sistemde metalin düşük konsantrasyonlarda olması halinde ise, oluşan

PMK'lar suda çözünen üçlü komplekse, daha sonra protein ilave edildiğinde suda çözünmeyen komplekse geçer. Suda çözünmeyen kompleksin oluşumu basit elektrostatik etkileşim prensibine göre partiküllerin birbiri üzerine agregasyonu ile açıklanabilir. Ancak maksimum çökmeye uygun olan oranlar artarken protein ilave edildiğinde çözünmeyen üçlü komplekslerin kısmen yada tamamen çözünmesi mümkündür. Çökeltinin çözünmesine uygun olan oran, hem metal iyonuna hem de polielektrolitin kimyasal yapısına bağlıdır.

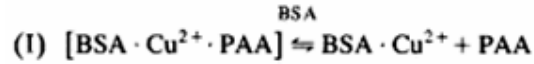
Polimer / protein oranının karmaşık yapısı iki şekilde açıklanabilir. Birincisi, bir polimer molekülü ile çok miktarda protein molekülü bağlanır ve sitokiyometrik yapılmayan polikompleksler oluşur. Bu ise kompleksin suda çözünmesine neden olur. İkincisi, protein molekülünün konsantrasyonu arttıkça, metal iyonları proteine daha kuvvetli adsorblanacakları için çözünemeyen üçlü komplekslerin parçalanması mümkündür. Böylece sistemde, polimer ve protein-metal kompleksi oluşur (Mustafaev vd. (1979, 1990, 1996a, 1996b)). PE' nin kimyasal yapısına bağlı olarak, bu iki faktörün hangisinin etkili olduğunu çeşitli polimerler için incelemişlerdir. Metal iyonları ile kuvvetli polimer-metal kompleksi veren poliasitler ve polibazlar PAA, PMAA, PVP, PVP alkil türevleri, PVI, vb.' dir. Uygun şartlarda birinci faktörün etkisiyle polikompleks oluşur. PE zincirlerinin metal iyonları ile kompleks oluşturmamayan monomerlerle seyreltilmesi ikinci faktörün etkisini daha fazla göstermektedir. Diğer bir deyişle protein/polimer oranının maksimum değeri aşıldığında üçlü kompleks parçalanır. Böylelikle PE' nin kimyasal yapısına, metalin doğasına ve proteinin fonksiyonuna bağlı olmaksızın incelenen tüm sistemlerde üçlü polimer-protein-metal komplekslerinin oluşumu genel karakter taşır. Buna göre incelenen sistemler, biyolojik sistemlerde biyopolimerler arasında metal iyonları ilavesiyle oluşan uygun prosesleri modelleştirebilir.

BSA ve PAA negatif yüklü olduğunda birbirlerine bağlanmada yetersiz durumdadırlar. Böyle bir durumda Cu^{2+} iyonları bağlayıcı görev yaparak suda çözünebilir, kararlı üçlü kompleks oluşumunu sağlar.

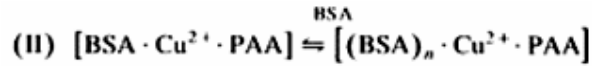


Şekil 4.6 a) Üçlü PAA-Cu²⁺-protein polikompleksinin yapısı, b) Cu²⁺ iyonu varlığında PAA ve proteinin fonksiyonel grupları arasında oluşan çelat yapısı (Mustafaev, 1996).

PAA ve BSA arasında Cu²⁺ li kompleks oluşumu nötral suda çalışılmıştır. Cu²⁺ konsantrasyonuna bağlı olarak, PAA- Cu²⁺ ve BSA arasındaki kompleks iki farklı şekilde sonuçlanabilir. Düşük Cu²⁺ konsantrasyonlarında ($n_{Cu}/n_{AA} < 0.15$), BSA konsantrasyonundaki fazlalık kompleksin aşağıdaki mekanizma gibi kırılmasına neden olur.



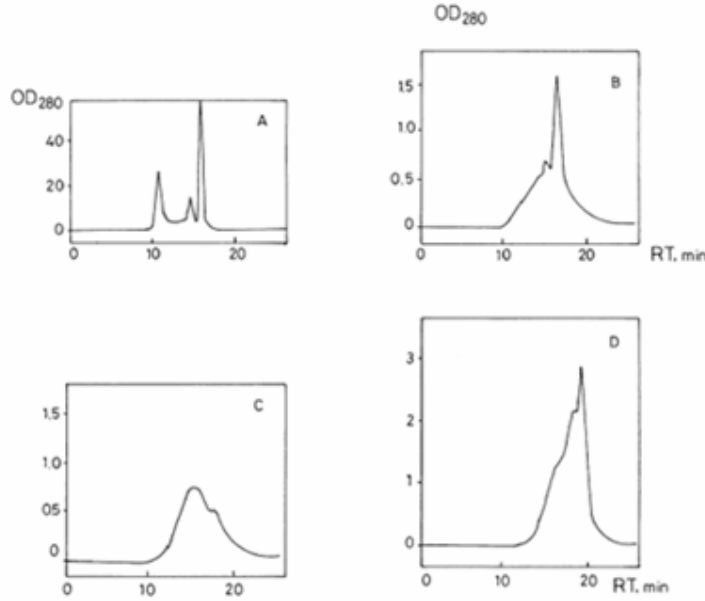
Yüksek Cu²⁺ konsantrasyonlarında ($n_{Cu}/n_{AA} > 0.15$), BSA konsantrasyonundaki artış stokiometrik olmayan komplekslerin oluşumuna neden olur (Mustafaev, 1996).



Mustafaev ve arkadaşları (2001) PAA-BSA, PAA-Cu²⁺-BSA, PAA-SOD çözeltilerini ⁶⁰Co gama kaynağı ile ışınlamışlardır. Birbiriyle paralel olarak yürütülen bu çalışmalarda geçiş metal iyonlarının rolü, suda çözünebilen polimer-protein biyokonjugatının oluşumu ve radyasyon sonucu oluşan değişiklikler yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) ve UV-Vis spektrofotometrik yöntemle ölçülmüştür.

PAA-BSA karışımlarının ışınlanmamış ve ışınlanmış HPLC sonuçları incelendiğinde (Şekil 4.7), ışınlanmamış PAA-BSA karışımı bileşenlerinin çoklu model dağılımı ile karakterize olduğu görülmüştür. Karışımın ve bileşenlerin RT (alınma zamanı) değerleri ve

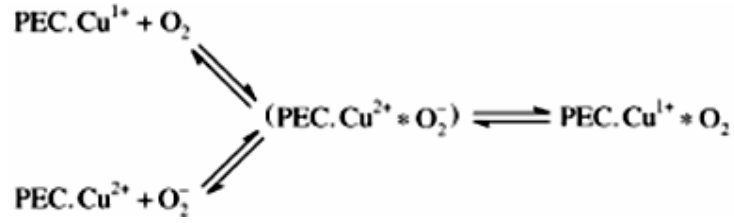
kromatogramdaki piklerin görünümü kıyaslanarak BSA ile PAA arasındaki etkileşimin pH 7.0' de zayıf olduğu görülmüştür. Benzer yüklerle yüklenmiş PAA ve BSA arasındaki itici kuvvetler polikompleks oluşumunu önlemektedir.



Şekil 4.7 Işınlanmamış (A) ve farklı dozlarda ışınlanmış (B-D) PAA-BSA karışımları (B=100 Gy; C=300 Gy; D=1200 Gy; $C_{BSA}=C_{PAA}=0.01$ g/L) HPLC sonuçları (Mustafaev vd., 2001).

Işınlanmış ve ışınlanmamış PAA-BSA çözeltisinin HPLC sonuçları piklerin birbirinden farklı olduğunu göstermiştir. Burada PAA ve BSA' nın kararlı biyo-konjugasyonu PAA-BSA karışımının ışınlanması ile meydana gelmiştir. Saf PAA' nın RT piki kromatogramda yer almazken, ışınlanmış PAA-BSA çözeltisinin RT değerleri, bileşenlerin dağılımı ve piklerin şekilleri ışınlanmamış olandan oldukça farklı olduğu belirtilmiştir. Bu sonuçlara göre, PAA-BSA karışımında belirtilen koşullar altında makromoleküllerin bozunmaya (degradasyon) ve çapraz bağlanmaya (crosslinking) uğradıkları tespit edilmiştir.

Araştırmacılar, bu deneyin yanı sıra suda çözünen üçlü polielektrolit- Cu^{2+} -BSA kompleksleri oluşturmuş ve bu kompleksler üzerine farklı dozlardaki radyasyonun etkisini de HPLC' de incelemiştir (Şekil 4.11). Cu^{2+} iyonunun polimer-protein karışımına eklenmesi ile polimer ve proteinin radyasyon hasarından korunduğu görülmüştür. Bunun nedeni, kompleks yapısındaki Cu^{2+} iyonunun su ortamında radyasyon etkisi ile oluşan süperoksit anyonu (O_2^-) ile kompleksleşmesi ve onu moleküler O_2 ' ye dönüştürmesidir (Şekil 4.8).



Şekil 4.8 Radyasyonun Cu^{2+} içeren polielektrolit sistemleri üzerine etkisi (Mustafaev vd., 2001).

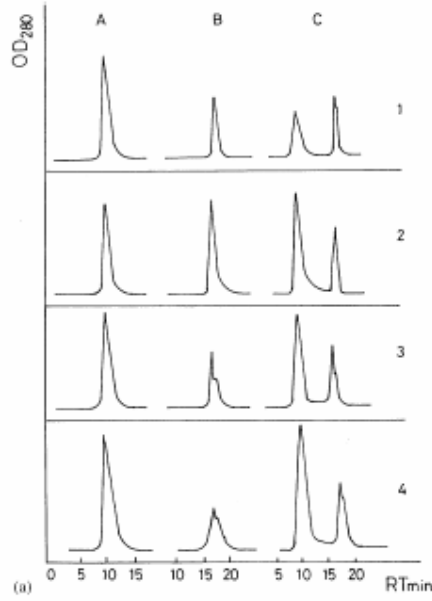
Yine aynı araştırma kapsamında PAA-SOD karışımında Cu-Zn-süperoksit dismutazın, süperoksit anyonunu yakalayıcı olarak görev yaptığı görülmüştür (Şekil 4.9).

Buradaki denge şu şekildedir;

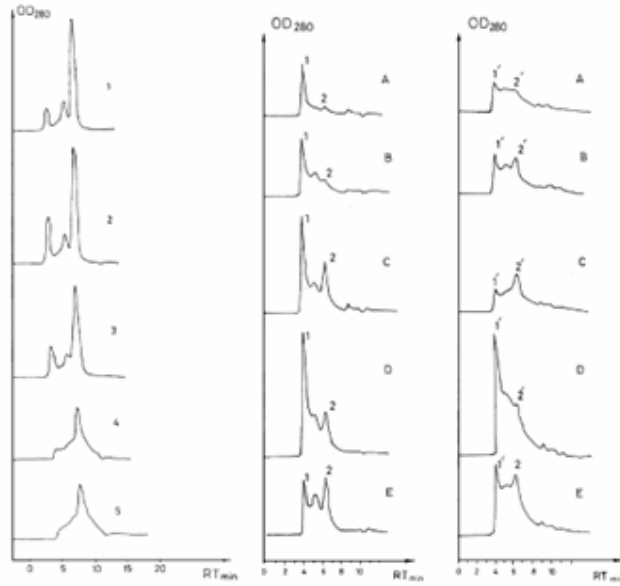


Şekil 4.9 SOD enzim sisteminde Me iyonunun rolü (Mustafaev vd., 2001).

Bu çalışmada da metal iyonlarının, protein kürelerini radyasyon hasarına karşı koruyucu bir ajan gibi görev yaptığı ve PAA makromolekülü ile SOD molekülleri arasında radyasyon indüklü kovalent konjugat oluşumunu engellediği tespit edilmiştir (Şekil 4.10).



Şekil 4.10 Işınlanmış ve ışınlanmamış PAA (A), SOD (B), PAA-SOD (C) çözeltilerinin HPLC sonuçları; 1- ışınlanmamış çözeltiler; 2- 600 Gy, 3- 2500 Gy, 4- 3000 Gy'de ışınlanmış çözeltiler; $C_{BSA}=C_{PAA}=0.01$ g/L (Mustafaev vd., 2001).



a- Farklı dozlarda ışınlanmış b- Işınlanmamış c- Işınlanmış

Şekil 4.11. Farklı dozlarda ışınlanmış (2-5: 2= 300 Gy; 3= 1200 Gy; 4= 2500 Gy; 5= 3000 Gy) ve ışınlanmamış (1) PAA-Cu²⁺-BSA karışımları HPLC sonuçları $C_{BSA}=C_{PAA}=0.01$ g/L ; Cu= 1.4×10^{-3} g/mol (b) farklı n_{BSA}/n_{PAA} oranlarında hazırlanmış 3'lü komp. 1200 Gy ışınlanmış HPLC sonuçları (Mustafaev vd. 2001).

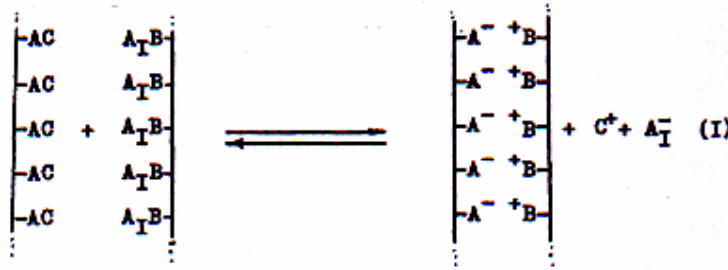
4.7 İnterpolimerkompleks Oluşumunda Kooperatiflik ve Biyomedikal Uygulamaları

Makromoleküllerin kooperatif bağlanma sabiti \underline{n} 'in üstel bir fonksiyonu olduğu bilinmektedir ve ilk yaklaşımda aşağıdaki gibi ifade edilebilir:

$$K = \exp[-\Delta G_m \cdot n / (RT)] \quad (4.1)$$

ΔG_m zincirin her bir ünitesi için Gibbs serbest enerjisidir. Buna uygun olarak, bağlanma derecesi \underline{n} 'in bir fonksiyonu olarak, \underline{n} 'in oldukça dar bir aralığında sıfırdan 1'e yakın bir değere keskin bir artış gösterir. Böylece olayın kritik bir durum olduğu ortaya çıkar. Bundan dolayı, zincir uzunluğunun PE'nin immünostimüle edici etkisine bağlı olan kritik bir özellik olduğu yukarıda vurgulanan hipotezin güvenilirliğini değerlendirmede şüphesiz bir önem taşımaktadır.

Bu hipotezin fizikokimyasal temelleri, interpolielektrolit komplekslerin oluşumu ile sonuçlanan komplementer (tamamlayıcı) yüklü PE'lerin kendi aralarındaki kooperatif reaksiyonları ile ilgili çalışmalardan ortaya çıkmıştır. Bazı komplekslerde zıt yüklü poliyonlar çok bölgeli(multisite) ardışık tuz bağları ile birbirlerine bağlanırlar. İnterpolielektrolit reaksiyonu Şekil 4.12'de gösterilmiştir:

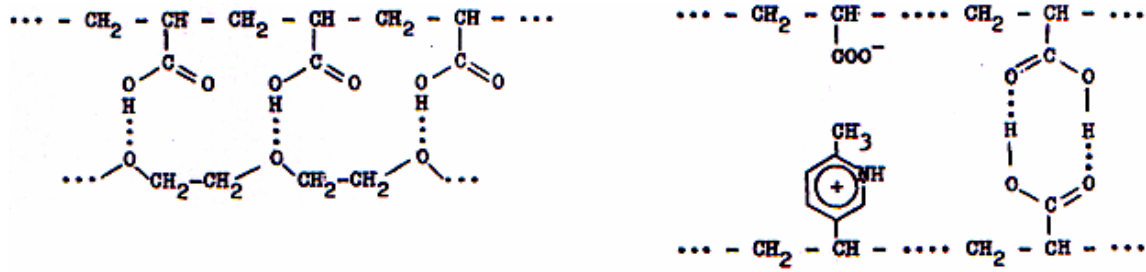


Şekil 4.12 İnterpolielektrolit reaksiyonu.

-AC poliasit veya onun tuzu, -BA polibaz veya onun tuzu, C^+ kation(bazı durumlarda proton), A ise anyon (bazı durumlarda hidroksil iyonu) dur. Bileşenlerinin çok bölgeli etkileşime girdiği bazı polimer komplekslerinde bu etkileşimin H-bağlarından dolayı oluştuğuna inanılmaktadır.

PAA (veya polimetakrilik asit)-polietilen oksit, PAA (veya polimetakrilik asit)-PVDP kompleksleri gibi. Aynı şekilde, interpolimerik kompleksler PAA'nın akrilik asit ve 2-metil-5

-vinilpiridin kopolimeri (Şekil 4.13) örneğinde olduğu gibi tuz ve H-bağlarını içeren çok bölgeli etkileşim üniteleri olarak bilirler.



Şekil 4.13 İnterpolimerik kompleksler.

Verilen durumda polikompleksdeki kopolimer makromolekülü PAA homopolimerinin tersine heterofonksiyonel kooperatif bir partner rolü oynar.

Son yıllarda bazı suda çözünen komplekslerin ki bunlar katyonik (PVP-C₂H₅ ve diğer kuaterner PVP tuzları) ve anyonik (PAA, polimetakrilik asit, polistirosülfonik asit) gibi lineer sentetik PE'lerin globüler proteinler ve kan serum proteinleri (albumin, gama globülin) ile oluşturdukları komplekslerin yapıları ve özellikleri hakkında detaylı araştırmalar yapılmıştır. Polianyonlarla protein bağlanmasının kooperatif özellikte olduğu açıkça vurgulandı. Kooperatif bir partnerin rolü lineer bir polimere göre protein globülünün yüzeyinde bütün fonksiyonel grupları ile hareket etmesidir. Çok bölgeli kooperatif etkileşim teriminde, protein globülünün yüzeyi heterofonksiyonel bir sorbenttir. Örneğin BSA pH'da polikasyonlarla, bazı polianyonlarla ve bazı lineer polielektrolitler ile kompleks oluşturur. BSA'nın pH:7'de PVP-C₂H₅ ile kompleksleşmesi I. tip reaksiyonlardandır ve reaksiyon tuz bağlarının oluşumu ile devam eder. Ayrıca, lineer partner zincirinin kimyasal kompozisyonu ve doğası ile birlikte kompleksin stabilizasyonunda tuz bağlarının, H-bağlarının katkısı, hidrofobik etkileşimi de beraberinde getirebilir. Lineer PE'ler ile proteinlerin kompleksleşmesi gerçekte, protein globülünün yüzeyine az ya da çok genişlemiş moleküler zincirlerin yapışmasından meydana gelir. Polimerizasyonun derecesi arttıkça, bir molekül kendisi ile veya birkaç globül ile yapışabilir. Son durumda, bir kompleks partikülü, lineer poliiyona dolanmış protein globülünün topaklanmış bir görünümünü sergiler. Bu durumda protein molekülleri birbirleri ile bağlanabilir. Önemle üzerinde durulmalıdır ki, protein molekülleri ile kompleks oluşturan lineer bir PE zinciri, ünitelerinin tümü ile bağlanmaz. Bir kompleks partikülü hala yeterince

uzun bir lineer zincire sahiptir ki bu zincir diğer tamamlayıcı türler ile ilave çok bölgeli bağlanmayı sağlayan serbest uçlar ve kıvrımlar içerir.

Kolloidal partiküllerin yüzeyinde PE'lerin çok bölgeli adsorbsiyonu, interpolimerik kompleks oluşumuna benzer olan genel özellikler ile kooperatif kategorideki bir olayla da ilgilidir. Polikasyonların negatif yüklü kolloidal partiküllerin yüzeyinde kuvvetle absorblandığı bilinmektedir. Benzeri, pozitif yüklü kolloidlerle ilgili olarak polianyonlara uygulanır. İmmün sistem hücrelerinin boyutları 10 µm civarındadır, tipik organik ve inorganik solvent partiküllerinin boyut bölgesindedirler. Polimerik zincir kısımları, membran yüzeyinin oldukça büyük bir kısmını temsil eden glikolipid ve glikoprotein fragmentleri ile polisakkaritler üzerinde olduğu kadar membran proteinleri üzerinde de adsorblanabilir. Lipid polar uçları ki bunlar çift tabakanın dıştaki yüzeyini oluşturur, adsorbsiyon merkezi olarak görev yapabilmeleri yanında H-bağı oluşturma kapasitesine sahip olan anyonik ve katyonik gruplar içerirler. Trombositlerin ve eritrositlerin polibazlar ile fizikokimyasal anlamda yapışma olayı, PE'lerin canlı olmayan solventlerdeki alışılmış yumaklanma olayı ile tamamen benzerdir. Bu nedenle hücrelerin yüzeyi dış membranlardan oluşmuş, genel olarak PE'ler için çok bölgeli heterofonksiyonel bir sorbenttir. B-lemfositlerinin adsorblanmış lineer PE'ler ile spesifik olmayan aktivasyonlarına ait varsayım son zamanlarda yapılan deneysel veriler ile uyumludur. İn vivo olarak yapılan fare dalak hücre kültüründe PAA veya PVP'nin hücre bölünmesini 2.5-3.5 kat artırdığı gösterilmiştir. PAA'nın B-lemfositleri ile zenginleştirilmiş fare dalak hücre fraksiyonlarını seçici olarak aktive ettiği ve T-hücreleri üzerinde mitojenik bir aktivite göstermediği bulunmuştur. B-lemfositlerinde DNA sentezinin aktivasyonu PAA polianyonunun girişinden sonra 24 saat içinde başlar. Bunun aksine polikasyonlar çok büyük mitojenik etki ile karakterize olurlar.

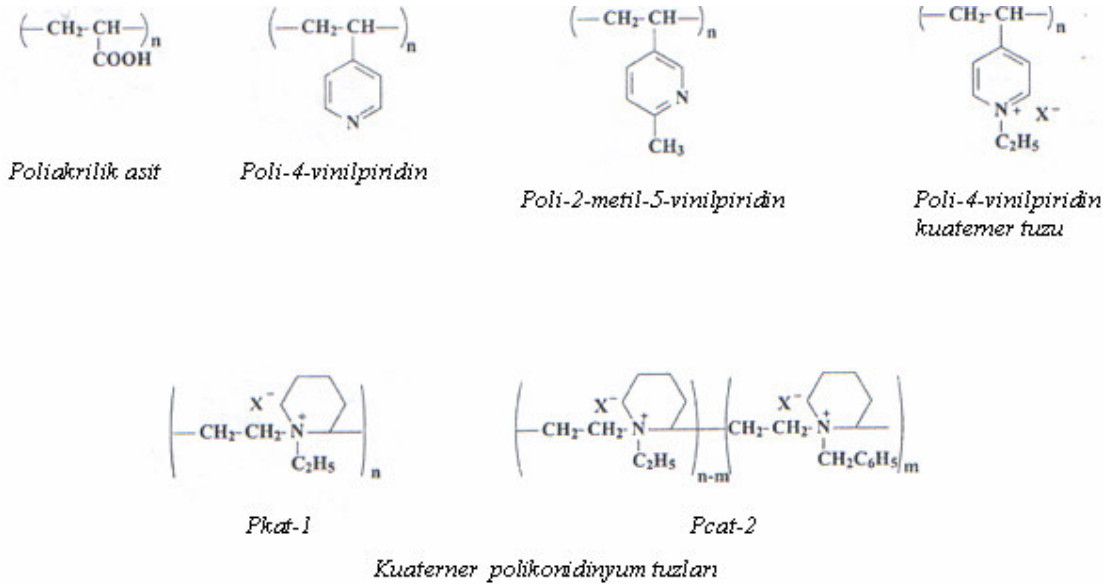
İmmün sistem hücrelerinin iyonojenik makromoleküllerle aktivasyon mekanizması neden meydana gelir? Biz daha önce hücre membranı üzerinde adsorblanmış zincir segmentlerinin, iyonların ve diğer düşük molekül ağırlıklı maddelerin membrandan geçişi, lipid matris akışkanlığı ve lipid tabakasında faz geçişine neden olan özellikleri bile değiştirebildiğini ileri sürmüştük. Herhangi bir değişim mitojenik sinyal için bir kaynak vazifesi görebilir. Son zamanlarda yapılan araştırma sonuçları bu durum üzerindeki yargıyı kesinleştirmiştir. Sulu çözeltide lenfosit süspansiyonu içeren ortama poliyon ilavesi yapıldığında ortamdaki K⁺ iyonu konsantrasyonu potansiyometrik olarak ölçülmüş ve hücreden dış ortama K⁺ iyonu

akışının meydana geldiği gösterilmiştir. Aynı zamanda hücre içinde Ca^{2+} iyonu akışı da gözlenmiştir. Bu etkinin tamamen farklı yapıdaki polianyon ve polikasyonlar için yaygın bir özellik olduğu görülür. Fark sadece kantitatifdir. Bahsedilen polimer dozunun akış hızını etkilediği vurgulanmıştır. Araştırılan PE'ler gerçekte çok efektif spesifik olmayan iyonoforlardır (hücre membranından iyonik geçişi kolaylaştıran organik bileşik grubu).

İyonik geçirgenliğin oluşum mekanizması nedir? Genelde söylenen, iyonojenik makromoleküllerin kooperatif sorpsiyonunun potansiyel merkezi ya çift tabakalı lipid yüzeyinde ya da membran proteinleri üzerinde olabilir. Gerçekte, protein içermeyen model lipid membranı polianyonları adsorblar. Bu olay PE çözeltisi ortama ilave edildiğinde membran elektrik potansiyelindeki değişimle gösterilir. PE'lerin bu durumdaki adsorbsiyonu, çift tabakanın iyonik geçirgenliği nedeniyle ortaya çıkmaz. Bu yüzden lipid matriks içinde dağılmış olan membran proteinleri çok büyük olasılıkla polimerle etkileşime girmesi nedeniyle spesifik olmayan iyonik kanalların oluşumuna katkıda bulunur. Önerilerden biri, poliiyonların bir membran üzerinde adsorbsiyonun sanki çözeltide kompleksleşmenin oluşumu gibi kümeleşmiş protein globüllerinin oluşumu ile sonuçlanmasıdır. Bu hipotez daha önce polikasyonlarla muamele edilen membranın uzunlama olarak elektronik mikrofotografının alınması ile onaylanmıştır. İyonik geçirgenlikten sorumlu kanallar muhtemelen birleşmiş protein globüllerinin sınırları üzerinde görünür.

Lemfositler nonspesifik PE'ler ile nasıl etkileşir? İyonik geçirgenliğin görünümü (K^+ , Na^+)-ve Ca^{2+} -ATPaz inaktivasyonu ile gösterilmiştir. Bu olay selektif inhibisyon analizi ile ispatlanmıştır. Toplam ATPaz aktivitesi hermetik polarografik hücre içine yerleştirilmiş O_2 elektrod ile B-hücrelerinin O_2 tüketim hızının ölçülmesi ile saptanmıştır. Hücre vasıtası ile sabit bir konsantrasyonda O_2 tüketim hızının toplam ATP üretim hızına eşit olduğu görüldü. Lemfositlerle yapılan O_2 tüketim kinetiği deneyleri iyonofor yokluğunda, daha sonra da mitojenik konsantrasyonda (K^+ , Na^+)-ATPaz veya Ca^{2+} -ATPaz inhibitörleri ilave edilerek ölçüldü. Sonuçlar aktive olmamış lemfositlerin O_2 tüketiminin %20'den daha az kısmını (K^+ , Na^+)-ATPaz fonksiyonu için, %5'den daha az kısmını da Ca^{2+} -ATPaz fonksiyonu için kullandığını göstermiştir. Membran aktif PE ilavesi ve bunun hücre membranında adsorbsiyonu toplam O_2 tüketiminde %30-50 civarında şiddetli bir artışa neden olmuştur (Kabanov, 1986).

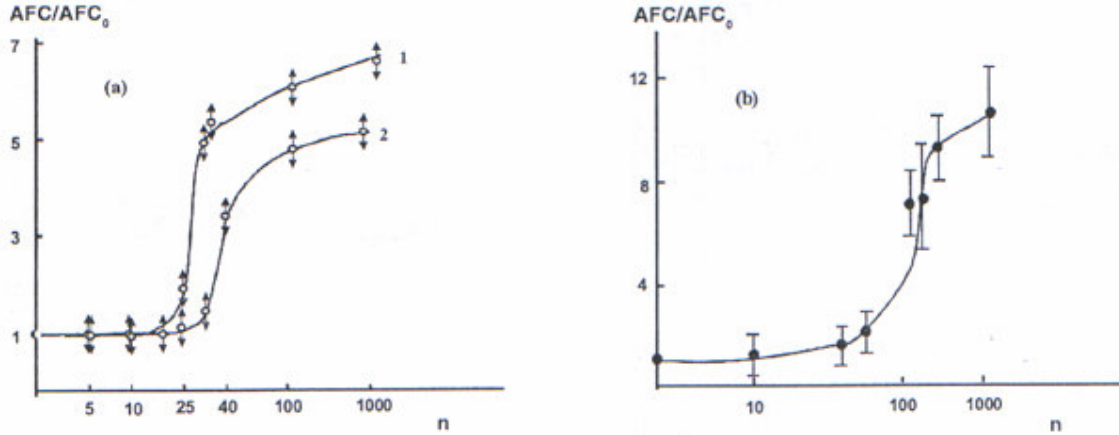
Biz vinil serisinin iki basit PE'leri ile başladık: Bunlar PAA ve PVP. İlk polimer sulu çözeltide polianyonlar oluşturmak için disosiyasyon olabilir, ikincisi ise uygun polikasyonlar oluşturmak için protonlara eklenebilir. Kan içine yukarıda bahsedilen polimerlerin sulu çözeltilerinin verilmesi kök hücre (immün sistemin tüm fonksiyonel hücrelerinin öncüsü) olarak bilinen hücrelerin kemik iliğinde oluşumunu, migrasyonunu ve organizmada yayılmalarını kuvvetlendirdiği gözlenmiştir. İlave olarak PAA ve PVP'nin her ikisinin de antijen olmayan koyun eritrositleri ile birlikte uygulandığında immün cevabı birkaç kat arttırdığı, bu hücrelerin de immünoestimulan olarak hizmet ettiği özel bir antijen testi ile gösterilmiştir. Gerçekte, PAA'nın *in vivo* olarak adjuvant etkisi daha önce sayısız doğal polianyonlar ile birlikte PAA'yı test eden Diamenstein ve arkadaşları tarafından gösterildi. Bu gerçek, yazarın hak etmediği bir ilgisizlikle karşılandı. Bizim sonuçları analiz ettiğimizde sürpriz bir gerçeği farkettilik ki bu da PAA ve PVP anyon zincirlerinin farklı kimyasal yapıları ve farklı yükleri ile monomerik birimler oluşturduğu ve yaklaşık eşit derecede immün cevabı stimüle ettikleri farkedildi. PAA ve PVP'ye benzer etkideki diğer birçok kimyasal yapılar vardı ki bunlar bizi PE alanının genişlemesine ikna etti. Bunların bazılarını ait formüller Şekil 4.14'de gösterilmiştir:



Şekil 4.14 İmmün cevabı stimüle eden bazı PE'ler.

Bu beklenmedik sonuç, farklı PE'lerin polimerik doğaları ile ilgili olarak immün sistemi genel bir mekanizmaya göre etkilediklerini önermiş oldu. Şekil 4.15 *in vivo* testlerde aktivite

göstermeyen düşük molekül ağırlıklı PE stimulan analoglarını gösterir. Etki sadece yeterince yüksek derecede polimerizasyonun gerçekleştiği durumda görülür.

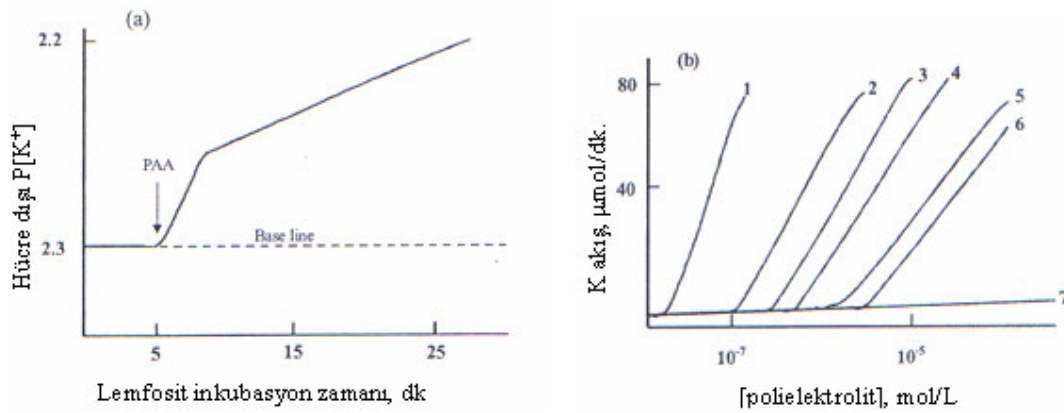


Şekil 4.15 Pkat-1'in polimerizasyon derecesinin bir fonksiyonu olarak fare dalağında AFC'nin relatif sayısı(1), Pkat-2(a), ve PAA(b). Antijen dozu (koyun eritrositleri) $5 \cdot 10^6$, adjuvant dozu 50 mg/kg (Kabanov, 2004).

Organizmada doğal antibody üretim prosesinin başlaması için bazı immün hücre türlerinin oldukça komplike olan spesifik etkileşimlerine (kooperatif) ihtiyaç vardır. Bu kooperasyonun ana katılımcıları T-lemfositleri (helper, Th), antijen sunan hücreler (APC, mikrofaqlar bunlardan biridir) ve B-lemfositleridir (antibody üreten hücreler). B- ve T-helper hücrelerinin reseptörleri oldukça farklıdır. İlk reseptör kendisini yapısal olarak tamamlayan antijenin belirteçidir. İkinci reseptör tanıma için bir ön katılımcıya ihtiyaç duyar ki bu kesin yapılı bir peptiddir. Bu yapı temel histokompatibil (herhangi bir red söz konusu olmadan kan veya greftlerin girişine izin verilen, immünolojik olarak girişimin olmadığı durum) kompleksin kompozisyonunda olan immün cevap genlerinde (Ir-genleri) programlanmıştır.

Bir gerçek daha in vitro deneylerde sürpriz bir şekilde ortaya çıkarıldı. Çok küçük miktardaki PE, izole edilmiş B-lemfosit süspansiyonuna ilave edildiğinde DNA sentezinde aktivasyon, hücre bölünmesinde indüksiyon, antijen varlığında hücrelerin antijene bağlı olmadan farklılaşması örneğin immün cevabın immün sistemin diğer hücrelerinin yardımı olmaksızın doğrudan bir tüp içinde başlaması gibi.

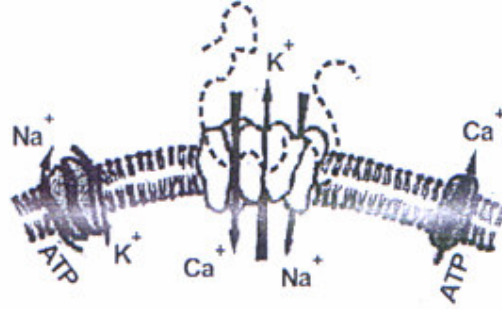
Makul yorum PE'ler ile B-lemfositlerinin muamele edilmesi sonucunda fizikokimyasal ve biyokimyasal çalışmalar ile bulundu. PAA'nın sulu çözeltisi B-lemfosit süspansiyonuna ilave edildiğinde dış hücresel membranın iyon geçirgenliğinde belirgin bir artış olduğu belirlendi. Temelde K^+ iyonu akışı hücreden çevredeki çözeltilere hızlı bir şekilde olur, yani K^+ iyonu hücre içi konsantrasyondan daha düşük olduğu konsantrasyona doğru akar (Şekil 4.16). Diğer suda çözünen SPE'ler benzer şekilde etki ederler. Bunlardan farklı olan suda çözünür elektronötral polimerler aktivite göstermezler. Çevre çözeltilerde yüksek konsantrasyonda olan Ca^{2+} iyonları tersine hücre içine akar.



Şekil 4.16 İn vitro olarak K^+ iyonu için B-lemfosit membranlarının geçirgenliği üzerine polielektrolitlerin etkisi (a) hücre kültürüne PAA çözeltisinin ilavesi ile artan sabit akışın kinetiğinin saptanması; (b) sabit K^+ iyonu akışına farklı polielektrolit konsantrasyonlarının etkisi: 1, PEP; 2, %3 $C_{16}H_{33}$ substitüentlerini içeren PEP; 3, poli-L-lizin; 4, PAA; 5, dimetilaminoetil metakrilat; 6, dekstran sülfat; 7, poli-4-vinilpiridinyum-N-oksit (kıyaslama amaçlı noniyonojenik polimer olarak gösterilmiştir (Kabanov, 2004).

Diğer bir deyişle PE'ler hücre membranında nanopolar porların oluşumunu indükler ve iyonlar konsantrasyon gradienti boyunca porların içine doğru difüze olmaya başlarlar. Membranın küçük bir parçasının elektronik mikrofotografı PE'ler ile muamele edilen B-hücrelerinin membran proteinlerinin agregasyonunun meydana geldiğini gösterdi. Sulu çözeltilerde lineer polielektrolitlerle bağlanan protein küreciklerinin kümeleşmesi olayları bilinmektedir ve iyi araştırılmıştır. Bağlanma bölgeleri, öncelikle PE yüklerine zıt yüklü olan küresel yüzeylerdeki iyon gruplarıdır. Ayrıca, poliyon ve proteinin kimyasal yapısına bağlı olarak bağ, alış-veriş veya hidrofobik etkileşim ile meydana gelir. Bu yüzden bu bölgeler hücrenin dış membranında PE sorpsiyon bölgeleri olarak görev yaparlar ve membran proteinleri sulu çözeltilerde meydana geliş şekline benzer bir mekanizma yolu ile iki boyutlu

kümeler oluşturmak üzere poliyonla etkileşirler. Kümeleşmiş protein kürecikleri arasındaki boşluklar da muhtemelen por (gözenek) olarak davranırlar (Şekil 4.17).



Şekil 4.17 Hücre membranında iyonik geçişi sağlayan porların oluşumu (Kabanov, 2004).

Canlılığı sürdürmek için gerekli enerjinin aynı evrensel bir kaynak olan hücrelerle elde edildiği bilinir: ATP'nin oksidasyonu ve hücre içindeki doğal dengesi membran enzimleri (K^+ , Na^+)- ve Ca^{2+} -ATPaz'lar ile sağlanır. Herbir ATPaz tarafından ATP'nin kısmi tüketimi, hücre kültürüne inhibitör ilavesi ile tahmin edilebilir: (K^+ , Na^+)-ATPaz için stropantin(ouabain), Ca^{2+} -ATPaz için $LaCl_3$ eklenir.

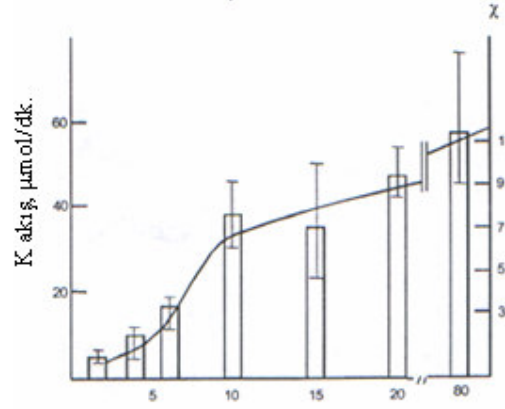
PAA'nın B-lemfositleri içeren sulu süspansiyona girişimi hücreler tarafından ATP'nin nispi yüketimini oldukça arttırmıştır ve inhibitör analizi bu artışın her iki tür ATPaz'ların ilave aktivasyonuna neden olmuştur (Şekil 4.18). Yani K^+ iyonu akışı ve içte fazla miktarı Ca^{2+} iyonları sebebiyle hücrenin doğal halinin bozulması, moleküler pompanın bunu telafi eden kilitlenmesiyle sonuçlanır ve bu diğer hücre içi sistemlerin harekete geçmesi için sinyal vazifesi görür. B-lemfositler, antijenlerin bulunması için reseptörleri sentezleyerek farklılaşmaya ve bölünmeye başlar ve böylece bunlar antikör üretimine giderler.

Çalışan immün sistemin standart mekanizması boyunca immün hücrelerin reaksiyonu için gerekli olan siklaz enzimlerinin hemen hemen aktive olmadığı açıktır.

Yukarıda sunulan deneysel gerçekler bizi şu önemli sonuca ulaştırır: immün hücre ile temasta, PE bilinmeyen hücreye bir bağlantı faktörü gibi davranır ve bunun hareketi immün cevabın şiddetinin genetik kontrolüne karşı yönelir. Gerçekten, yukarıda açıklanan *in vitro* sistemlerde Ir-genlerinden sorumlu Th-lemfositleri mevcut değildir. Bu sonuç T-hücreleri olmayan farelerle yapılan *in vivo* deneylerde elde edilen sonuçlarla tamamen uyumludur.

Böyle fareler, sıradan antijenlerin yönetimine cevap vermez. Aynı zamanda, B-lemfositler çoğunlukla farelerde halen vardır ve farklılaşabilir. Aynı antijenler PE ile karışımında bulunduğu B-lemfositler aktive olur ve böylece normal farelerin özellikleri gibi aynı şiddetli immün cevabı göstererek dalakta antikor üretirler.

Böylece, PE'ler sadece *in vitro* değil *in vivo* olarak da kontrol edilen Ir-genlerini kabul ederek alternatif mekanizma yolu ile immün reaksiyonların gelişmesini teşvik eder (Kabanov, 2004).



Şekil 4.18 PAA'nın molekül ağırlığına bağlı olarak *in vitro* koşullarda B-lemfositlerinde K^+ iyonu akışı ve buna bağlı olarak *in vivo* koşullarda immün cevabın artırılması. χ maksimum stimülasyon katsayısı (Kabanov, 2004).

4.8 Polimerik Taşıyıcılara Bağlanmış Radyoprotektörler

Tümör hücreleri, genetik mutasyona uğrayarak kontrolsüz biçimde büyüyen ve enerji ihtiyacını karşılamak üzere normal hücelere göre büyük miktarda hücre dışından madde alan hücrelerdir. Bu sebepten dolayı, tümör hücrelerinde, normal hücelere göre daha büyük miktarda aktif taşıma olmaktadır, zira makromoleküller, hücre duvarını aşamayacağından aktif taşımayla hücreye alınırlar. Tümör hücrelerindeki mutasyonlar doğal sebeplerle (ırsi olabilir) veya dış etkenlere (radyasyon gibi) bağlı olarak meydana gelir. Antikanser ilaçlarının büyük kısmı düşük molekül ağırlığına sahiptir ve hücre duvarından kolayca girebilir. Bu durum ilaçların yarı ömrünü azalttığı gibi tümör hücreleri yanında diğer hücrelerin de zarar görmesine sebep olur. 1975 yılında, Helmut Ringsdorf hedeflenmiş bir makromoleküle (sentetik bir polimer) böyle bir ilacın bağlanmasıyla (Çizelge 4.1), ilacın kontrollü olarak tümör hücresine verilebileceğini ve etkisinin artırılması yanında istenmeyen yan etkilerinin de azaltılacağını öne sürmüştür. Ringsdorf bu bağlamda polimer üzerine ilaçların, taşıyıcının ve

çözünürleştirici ajanların kovalent olarak bağlanmasını öne sürmüştür (Hara, 1993).

Çizelge 4.1 Makromoleküler taşıyıcılar (Hara, 1993).

Makromoleküler Taşıyıcılar	Örnekler
<i>Biyolojik Makromoleküller</i>	
<i>Proteinler</i>	Antibodyler, serum proteinleri
<i>Polisakkaridler</i>	Dekstran, hiyaluronik asit
<i>Lektinler</i>	Konkanavalin A
<i>Peptidler</i>	Büyüme faktörleri, sitokinler
<i>Nükleik Asitler</i>	DNA
<i>Sentetik Makromoleküller</i>	Polilizin, poliaspartik asit
<i>Poli(aminoasit)ler</i>	Stren-maleik asit anhidrid kopolimeri(SMA)
<i>Kopolimerler</i>	Divinileter-maleik asit anhidrid kopolimeri
<i>Polimerler</i>	Polietilen glikol(PEG), polivinil alkol(PVA)

4.9 Bazı Biyomedikal Polimerlerin Kullanım Alanları

Polimer Tipi

Silikonlar

Poli(vinil piroolidon)

lensler

Poli(etilen)

Poli(metil metakrilat)

yapıştırıcılar

Poli(vinil klorür)

Poli(2-hidroksi etil metakrilat)

Poliüretanlar

Polisiyanoakrilatlar

Kullanım Alanları

*Yumuşak doku, kan ve sıvı boruları,
destek cihazları, lensler, kontrollü ilaç
sahmı

*Kan hacmini arttırıcı, yumuşak kontakt

*Eklemler

*Lensler(sert), diş dolguları, kemik

*Kan damarları, kalp kapakçık halkası örtüsü,
tıbbi borular, sıvı ve kan torbaları

*Lensler(yumuşak), yanık örtüleri,
biyoelektrodlar, kontrollü ilaç sahmanı

*Kalp destek cihazları, kanla temas yüzeyleri

*Yumuşak ve sert doku yapıştırıcıları

5. DENEYSEL BÖLÜM

5.1 Kullanılan Cihazlarlar

- Shimadzu UV-2401 PC UV-Visible Recording Spectrofotometre
- AAS Variant Spectra AA200
- HPLC Waters 501 Model
- Eppendorf Mikro Pipet Seti
- WTW Microprocessor pH 537 pH Metre
- Mettler Toledo AT201 Terazı
- Heidolph MR 3001 Magnetik Karıştırıcı
- Nüve ST 402 Çalkalayıcılı su banyosu
- Jouan CR 412 Santrifüj
- Sigma G- 10 Santrifüj
- Sanyo CO₂ İnkübatör
- Snijders Press-to-Mix 34524 Vorteks
- Olympus CH-30 Mikroskop
- Carl Zeiss Jena Laboval 4 Mikroskop
- Sanyo Fully Automatic Mac-500 EX Otoklav
- Kerman Laminar Flow Chamber
- Electrothermal Slide Drying Bench
- Gallenkamp Mantolu Isıtıcı
- Ultrasonic Banyo
- Termomix Termostatlı Karıştırıcı
- Freeze Dryer
- Cem Mars Mikrodalga Çözme Sistemi

5.2 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çizelge 5.1 Çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler.

Madde	Katalog No	Marka
PAA Mw: 100.000	52 392-5	Sigma
Bakır sülfat	2787	Merck
Bakır klorür	2733	Merck
BSA	05488	Fluka
Potasyum hidrojen fosfat	5100	Merck
Potasyum dihidrojen fosfat	9023716	Merck
Sodyum klorür	106400	Merck
Neokuproin	N-1501	Sigma
Akrilik Asit	800181	Merck
Vinil pirolidon	V340-9	Sigma
Metanol	1.06008	Merck
Aseton	1.00014	Merck
Toluen	8325	Merck
Kobalt naftanat	C-9051	Sigma
Benzoil peroksit	801641	Merck
PVP Mw: 90.000	İ.Ü' de sentez edilmiş	
P(AA/VP) Mw: 80.000	İnterLab	Poly ACP-1042
PHA-M	1082132	Roche
Cytochalasin-B	C 6762	Sigma
Colchmid	23014-020	GibcoBRL
Sodyum Bikarbonat	6329	Merck
DMSO (Dimetil sülfoksit)	15488	Fluka
Ham's Nutrient Mix. F-10	81200	Roche
Glasiyel Asetik asit	1.00056	Merck

Potasyum klorür	104935	Merck
Hidrojen peroksit	108597	Merck
Formaldehit	4002	Merck
Bromo deoksiuridin	B-9285	Sigma
L-Glutamin	25030-032	GibcoBRL
Penisilin-Streptomisin	15070-089	GibcoBRL
%2 GİEMSA	9204	Merck
Heparin	25.000I.U/5 ml	Roche
Entellan	107961	Merck
Foetal Bovine Serum	10106-169	GibcoBRL
Nitrik Asit	100452	Merck
Hidroksil Amonyum klorür	4614	Merck
Sodyum sitrat	106431	Merck
Kloroform	102431	Merck
Mutlak Etanol	32241	Riedel
Potasyum bromür	60090	Fluka

Hazırlanan Çözeltiler

PBS Tamponu

52.2 g K_2HPO_4 600 mL destile suda çözüldükten sonra üzerine 400 ml destile suda çözülmüş 27.2 g KH_2PO_4 ilave edilerek pH'ın 7.2-7.4 arlığında olması sağlanır. Bu stok çözeltiden 20 mL alınıp 8.4 g NaCl ilavesi yapıldıktan sonra destile su ile 1 L'ye tamamlanır.

PAA Çözeltisi

%35'lik PAA çözeltisi kullanılarak 1 mL'sinde 1 mg PAA olan ana stok çözeltisi PBS içinde hazırlandı ve pH:7.0'a ayarlandı. Ara stok çözeltileri bu çözeltiden seyreltme yapılarak hazırlandı.

P(AA/VP) Kopolimer Çözeltisi

Sentez edilerek elde edilen kopolimerden istenen miktarlarda tartılarak uygun konsantrasyondaki çözeltiler PBS içinde hazırlandı pH:7.0'a ayarlandı.

CuSO₄ Çözeltisi

Bu çözelti CuSO₄.5H₂O kullanılarak konsantrasyonu % 5 olacak şekilde destile su ile hazırlandı. Hazırlanan çözelti pH:7.0'de bulanık olduğundan HCl ile çözeltinin pH'ı 2.0'ye ayarlanıp berrak bir çözelti elde edildi.

CuCl₂ Çözeltisi

CuCl₂.2H₂O çözeltisinin konsantrasyonu % 5'lik olacak şekilde destile su ile hazırlandı.

Neokuproin Çözeltisi

Neokuproin çözeltisi %0.1'lik olacak şekilde mutlak etanolde taze olarak hazırlandı.

PHA-M Çözeltisi

20 mg PHA-M üzerine 100 ml steril destile su ilave edilerek 0.2 mg / mL olacak şekilde hazırlandı ve -20°C'de saklandı.

Kültür Medyumu

10 g F-10 tartıldı ve 1L'ye destile su ile tamamlanırken 0.5 g Heparin, 1 ml Penisilin-streptomisin ve 10 mL L-Glutamin eklendi. Çözelti rengi gül kurusu olana dek %8'lik NaHCO₃ (steril edilmiş) koyuldu. Çözelti 0.2 µm çapındaki milipor filtreden geçirildi(filtrenin 1 adedi ~100 mL çözelti süzebilir). Bu işlemde sonra 1L'ye 250 mL olacak şekilde Foetal Serum eklendi ve -20°C'de saklandı.

Colchmid Çözeltisi

(10 mg) 1 L destile suda çözülüp pH:7.0'a ayarlandı ve milipor filtreden geçirildi. 20 mL'lik şişelere bölünerek -20°C'de saklandı.

Cytochalsin-B Çözeltisi

1 mg cytochalsin-B' yi çözmek için hazırlanan DMSO çözeltisinden 0.5 ml ilave edildi ve 5 ml destile su ile tamamlandı. Hazırlanan 0.2 mg/ml konsantrasyonundaki cytochalsin-B çözeltisi -20°C'de saklandı.

Bromo Deoksiüridin (BrdU) Çözeltisi

6.14 mg bromo deoksiüridin 10 mL steril destile suda çözüldü. Hazırlanan çözelti -20°C'de saklandı. Deneylerde 100 mL medyuma 1 mL BrdU stok çözeltisinden ilave edildi.

Dimetil sülfoksid Çözeltisi

Stok DMSO çözeltisinden 0.1 mL alınıp, 0.9 mL tuz çözeltisi ile 1 mL' ye tamamlanarak hazırlandı.

PPA Çözeltisi

% 99.7' lik propiyonik asit çözeltisinden %0.1'lik propiyonik asit çözeltisi hazırlayabilmek için, yoğunluğu 0.993 olan PPA'dan 0.075 mL alınarak 100 mL' ye tamamlandı. 100 mL' ye tamamlamadan önce pH 7.0'ye ayarlandı.

Polimer-Metal İkili Kompleks Çözeltileri

PAA'nın %0.1'lik çözeltisi PBS içinde hazırlanır (sigma %35 lik PAA,sudaki çözeltisi) ve birkaç damla 1 N NaOH ile pH:7.0'a ayarlanır. Suda çözünen polimer-metal kompleksleri için polimer çözeltisi suda hazırlanan %5'lik $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ile farklı miktarkarda karıştırılarak elde edilir. Sistem homojenitesini kaybedene kadar sabit konsantrasyondaki polimer çözeltisine çeşitli konsantrasyonlardaki metal çözeltisi ilave edilir. Her metal ilavesinde pH ayarlaması yapılmalıdır. Farklı mol oranlarında Cu^{2+} içeren ikili kompleks oluşturmak için aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplama yapılır.

$$\frac{n_{\text{Cu}}}{n_{\text{AA}}} = \frac{C_{\text{Cu}} \cdot M_{\text{AA}}}{C_{\text{AA}} \cdot M_{\text{CuSO}_4}} \quad (5.1)$$

Polimer-Metal-BSA Üçlü Kompleks Çözeltileri

Polimer-metal-protein karışımı elde etmek sabit konsantrasyondaki polimer-metal kompleksine pH:7.0 PBS tamponunda hazırlanmış % 0.1'lik BSA çözeltisi değişen konsantrasyonlarda ilave edilir.

% 4'lük GİEMSA Çözeltisi

Ticari olarak bulunan GİEMSA çözeltisi (suda) destile suda seyreltilerek kullanılır.

% 10'luk Hidroksilamin Hidroklorür Çözeltisi

Hidroksilamin hidroklorür'ün destile sudaki çözeltisi ağırlıkça (w/w) %10 olacak şekilde hazırlanır.

%30'luk Na-sitrat Çözeltisi

Na-sitrat.3H₂O kullanılarak ağırlıkça (w/w) %30 olacak şekilde destile sudaki çözelti hazırlanır.

Frickle Çözeltisi

0.28 g FeSO₄.7H₂O, 0.06 g NaCl ve 22 ml %98'lik H₂SO₄, destile suda çözülerek 1 L'ye tamamlandı.

5.3 Kimyasal Çalışmalar**5.3.1 PMC Oluşumunun Spektrofotometrik İncelenmesi**

% 0.1'lik PAA ve 75:25 P(AA/VP) kopolimerinin pH: 7.0'de PBS içinde hazırlanan çözeltilerinden 10 mL alındı. Başlangıç absorbansları ölçüldükten sonra µl mertebesinde Cu²⁺ (CuSO₄.5H₂O kullanılarak hazırlanmış) çözeltisi ilave edildi. Her ilave sonrasında absorbansdaki değişimler UV-VIS spektrofotometrik olarak takip edildi.

5.3.2 Neokuproin Yöntemi ile İkili Komplekslerde Cu¹⁺ Tayini

Neokuproin (2,9-dimetil-1,10 fenantrolin) bazı koşullar altında Cu¹⁺ için spesifik bir maddedir. Kloroformda çözülmüş olan kompleksin 457 nm'de absorbansı ölçülerek tayin yapılır (Bassett vd., 1978).

10 mL ~200µg Cu²⁺ içeren çözelti ayırma hunisine konur. 5 mL %10'luk hidroksilamin hidroklorür eklenerek Cu²⁺'nin Cu¹⁺'ya indirgenmesi sağlanır. %30'luk Na-sitrat ilavesi yapılarak (ortamdaki diğer istenmeyen metallerle kompleks oluşmasını sağlamak için) pH:4.0 oluncaya dek NH₃ ilave edilir. 10 mL %0.1'lik Neokuproin ve 10 mL kloroform eklenerek ~30 sn süre ile çalkalanır. Fazlar ayrıldıktan sonra ekstraksiyon 5 mL kloroform ile tekrarlanır.

Kloroform fazının UV-VIS spektrofotometrik yöntemi ile 457 nm'deki absorpsiyon değerinden Cu^{1+} tayini yapılır.

5.3.3 P(AA/VP) Kopolimeri Sentezi

Polimerizasyon 40-50°C'da 3 boyunlu balon ve magnetik karıştırıcı kullanılarak azot atmosferinde uygulandı. Akrilik asit ve vinilpirolidon toluen ile karıştırılıp uygun sıcaklığa ulaşıldığında başlatıcı (benzoil peroksit) ve katalizör (kobalt naftanat) ekledi. 3 saat sonra polimerizasyon sonlandırıldı. Çöken kopolimer metanolde çözülüp, asetonda tekrar çöktürülerek eterle yıkandı ve 30-35°C'de vakum altında kurutuldu (Uelzmann., 1958).

5.3.3.1 Kopolimerin FT-IR ile Yapı Tayini

Literatüre göre sentez edilen kopolimerlerin yapı tayini ve mol oranlarının belirlenmesi için Fourier Transform Infrared Spektrofotometresi (FT-IR) ile spektrumları alındı. Elde edilen kopolimerleri kıyaslamak amacıyla yapay kopolimer sistemleri oluşturuldu. Bunun için %35'lik PAA (Mw:100.000) içeriğindeki suyu kaybetmesi için freeze dryer'da kurutuldu. PVP (Mw:90.000) sentez edilmiş olarak İstanbul Üniversitesi Fiziksel Kimya laboratuvarından temin edildi. 5 farklı miktarda PAA ve PVP'nin metanoldeki çözeltileri hazırlanarak, 10 Torr basınç altında tablet haline getirilen (700 mg) KBr üzerine uygulandı ve spektrumları alındı.

FT-IR Sonuçları

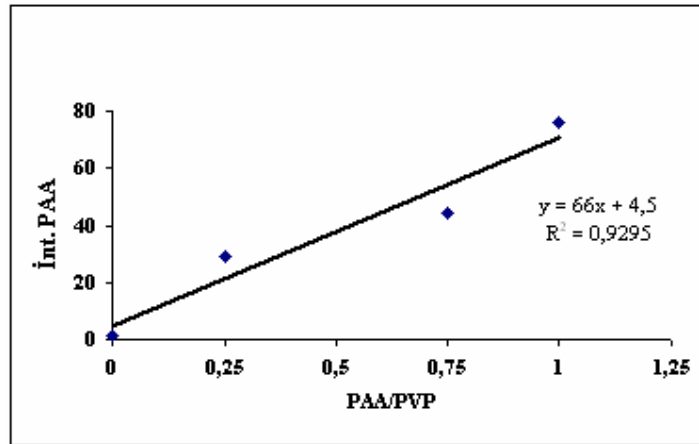
Literatüre göre sentez edilen çeşitli mol oranlarındaki AA/VP kopolimerlerinin, mol oranlarının belirlenmesi ve yapılarının aydınlatılabilmesi için FT-IR ile spektrumları alındı. Bunun için öncelikle yapay olarak karıştırılarak elde edilen PAA-PVP kopolimerlerinin spektrumları alındı. 1727 (asit) ve 1651 (amin) cm^{-1} 'deki fonksiyonel gruplara ait intensite değerleri (Çizelge 5.2), değişen mol oranlarındaki yapay kopolimerlerin intensiteleri ile kıyalandı. (I_{1727}/I_{1651}) İntensite oranına bağlı olarak kalibrasyon eğrisi (Şekil 5.1) oluşturuldu. Sentez edilen kopolimerlerin aynı şekilde hesaplanan intensite değerleri (Çizelge 5.3) bu değerlerle kıyaslanarak mol oranları yaklaşık olarak tespit edildi.

Çizelge 5.2 Yapay olarak hazırlanan AA/VP kopolimer karışımlarının FT-IR ile ölçülen intensite değişimleri.

Örnek	I ₁₇₂₇	I ₁₆₅₁	I ₁₇₂₇ / I ₁₆₅₁	PAA/PVP
1 (0 mg PAA+1.0 mg PVP)	0	68	0	0
2 (0.25 mg PAA+0.75 mg PVP)	18	59	0.31	0.25
3 (0.5 mg PAA+0.5 mg PVP)	29	37	0.78	0.50
4 (0.75 mg PAA+0.25 mg PVP)	44	30	1.47	0.75
5 (1.0 mg PAA+0 mg PVP)	76	0	76	1

Çizelge 5.3 Sentez edilen ve ticari olarak bulunan AA/VP kopolimerlerinin FT-IR ile ölçülen intensite değişimleri.

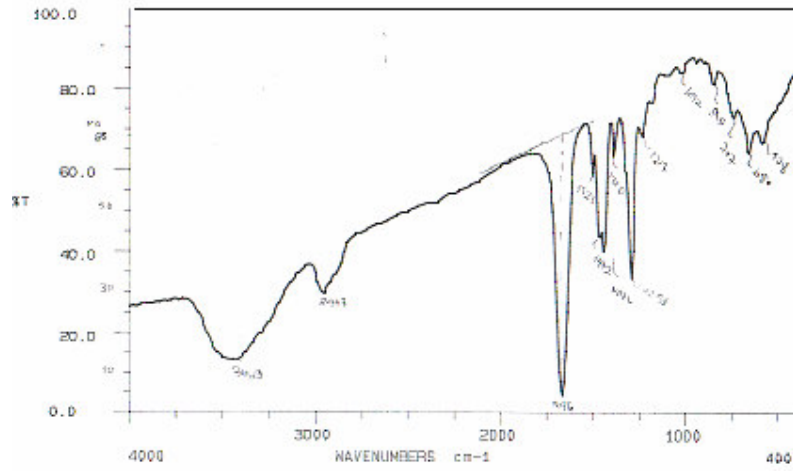
Örnek	I ₁₇₂₇	I ₁₆₅₁	I ₁₇₂₇ / I ₁₆₅₁
M _w :80.000 75/25 AA/VP	44	27	1.63
M _w :250.000 75/25 AA/VP	34	24	1.42
Sentez 1	38	35	1.09
Sentez 2	29	30	0.97
Sentez 3	38	39	0.97



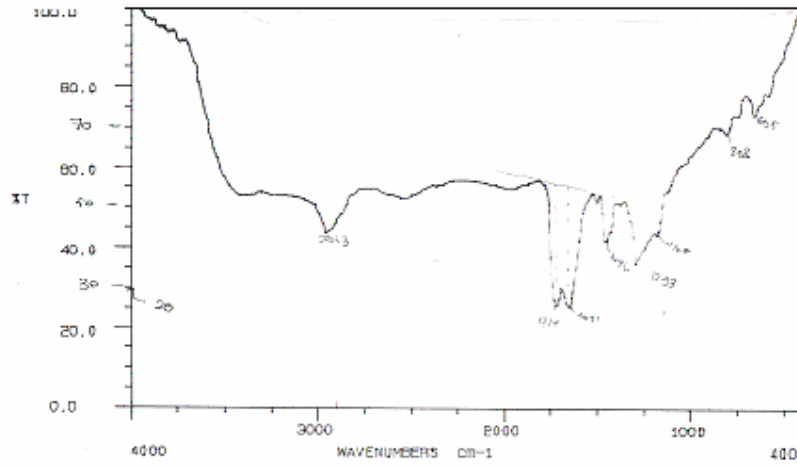
Şekil 5.1 PAA/PVP mol oranına bağlı olarak PAA intensite değişimi.

Eğrinin denkleminde sentez edilen kopolimere ait 1725 cm⁻¹'deki intensite değeri yerine koyularak mol oranı hesaplanır. Tüm maddelere ait FT-IR spektrumları aşağıda verilmiştir:

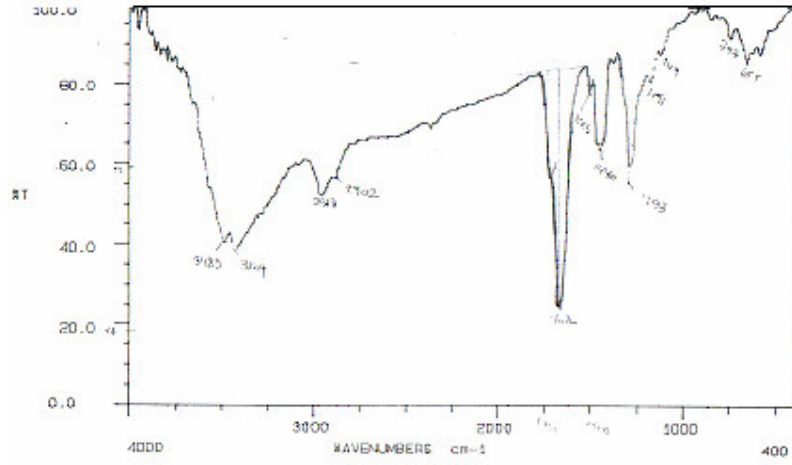
Yapay Olarak Hazırlanan PAA/PVP FT-IR Spektrumları



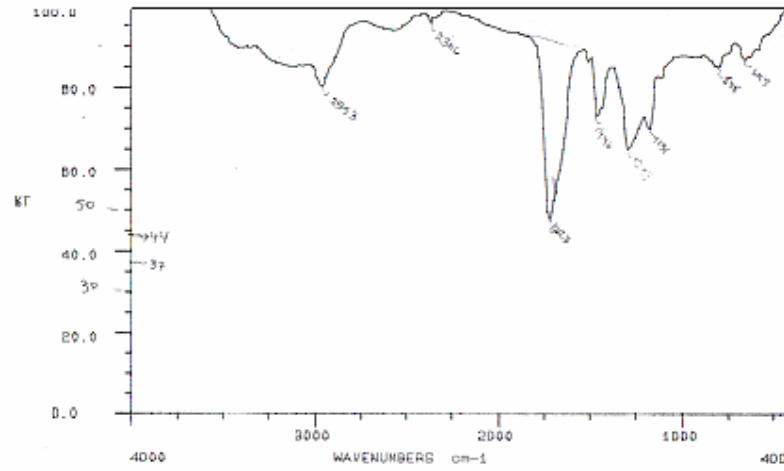
Şekil 5.2 Yapay olarak hazırlanan PAA/PVP (0 mg PAA+10 mg PVP) FT-IR spektrumu.



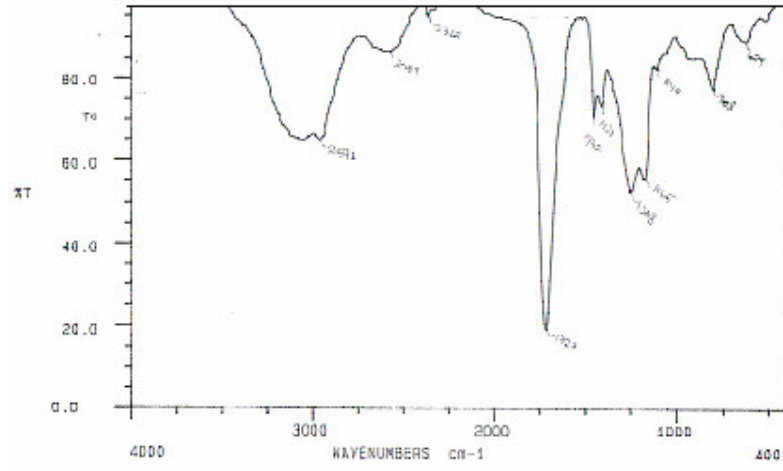
Şekil 5.3 Yapay olarak hazırlanan PAA/PVP (0.25 mg PAA+0.75 mg PVP) FT-IR spektrumu.



Şekil 5.4 Yapay olarak hazırlanan PAA/PVP (0.5 mg PAA+0.5 mg PVP) FT-IR spektrumu.

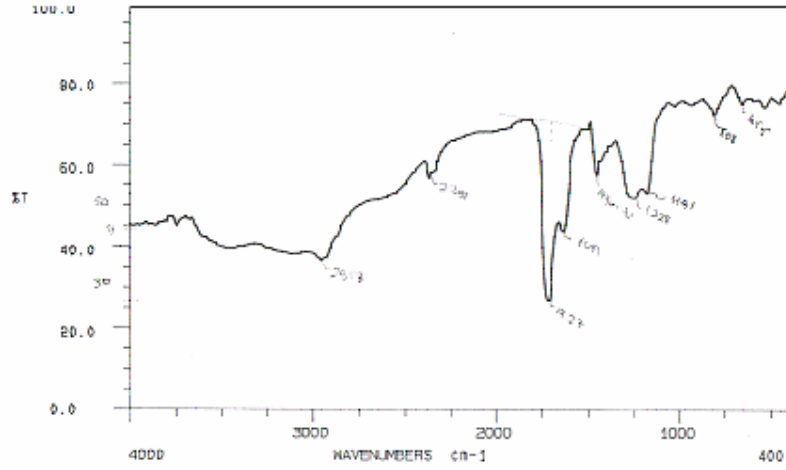


Şekil 5.5 Yapay olarak hazırlanan PAA/PVP (0.75 mg PAA+0.25 mg PVP) FT-IR spektrumu.

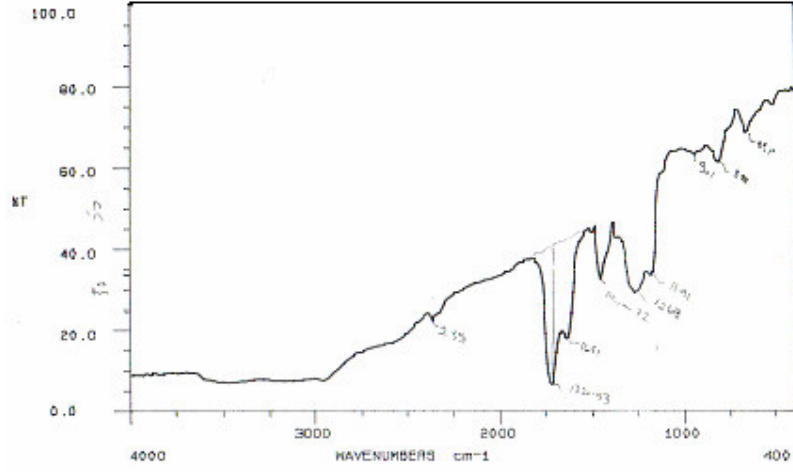


Şekil 5.6 Yapay olarak hazırlanan PAA/PVP (1.0 mg PAA+ 0 mg PVP) FT-IR spektrumu.

Sentetik AA/VP Kopolimeri FT-IR Spektrumları

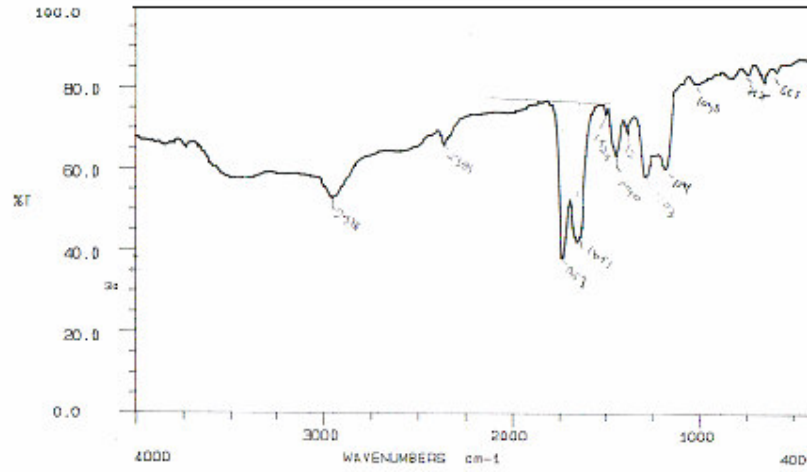


Şekil 5.7 Sentetik AA/VP kopolimeri FT-IR spektrumu.

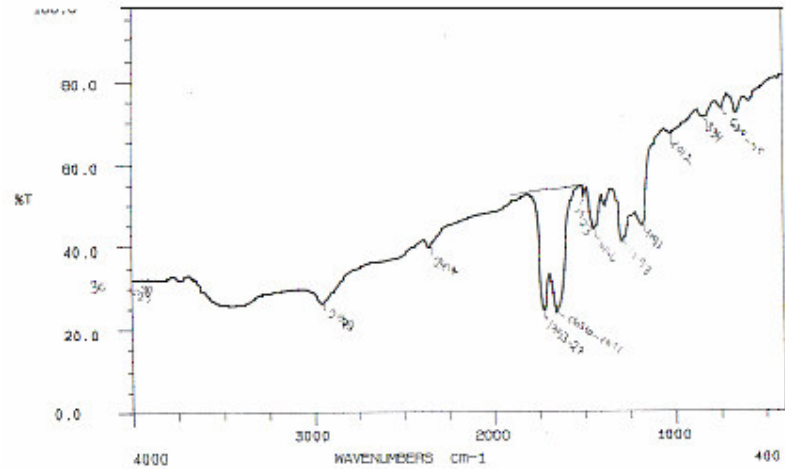


Şekil 5.8 Sentetik AA/VP kopolimeri FT-IR spektrumu.

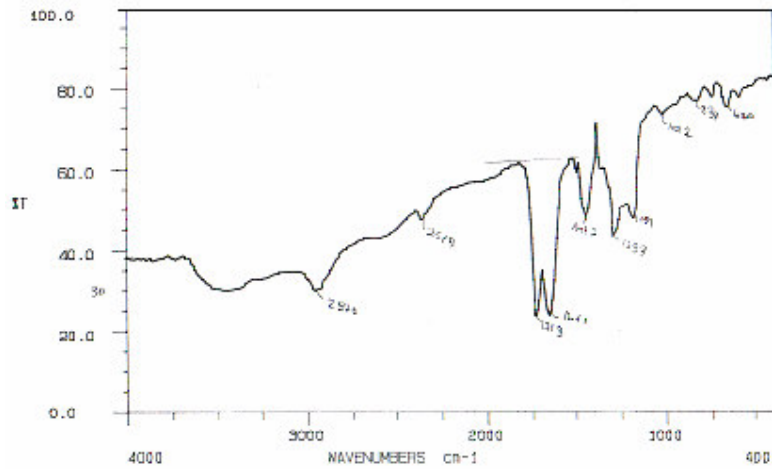
Sentez Edilen AA/VP Kopolimeri FT-IR Spektrumları



Şekil 5.9 Sentez edilen AA/VP kopolimeri FT-IR spektrumu.



Şekil 5.10 Sentez edilen AA/VP kopolimeri FT-IR spektrumu.



Şekil 5.11 Sentez edilen AA/VP kopolimeri FT-IR spektrumu.

5.3.3.2 Kopolimerin Elementel Analizi

Sentez edilen 2 adet AA/VP kopolimer numunesinde TÜBİTAK-MAM'da bulunan Carlo Erba 1106 Elementel Analiz cihazında C, H, N tayini yapılmıştır.

Elementel Analiz Sonuçları

Sentez edilen 2 adet AA/VP kopolimer numunesinde TÜBİTAK-MAM'da bulunan Carlo Erba 1106 Elementel Analiz cihazında C, H, N tayini yapılmıştır.

Çizelge 5.4 Sentez edilen kopolimerlerin elementel analiz sonuçları.

Numune	C	H	N
P1(1:1)	55.46	7.88	5.46
P2(1.2)	50.36	6.72	4.31

Hesaplamalar

P1 AA/VP

$$\begin{array}{l}
 \text{C: } 55.46 \longrightarrow \left(55.46 / 12.06 = 4.62 / 0.39 = 11.8 \right. \\
 \text{H: } 7.88 \longrightarrow \left. 7.88 / 1.008 = 7.82 / 0.39 = 20.1 \right) \cong \text{C}_{12} \text{H}_{20} \text{NO}_5 \\
 \text{N: } 5.46 \longrightarrow \left(5.46 / 14.01 = 0.39 / 0.39 = 1 \right. \\
 \text{O: } 31.2 \longrightarrow \left. 31.2 / 16.00 = 1.95 / 0.39 = 5 \right)
 \end{array}$$

P2 AA/VP

$$\begin{array}{l}
 \text{C: } 50.36 \longrightarrow \left(\begin{array}{l} 50.36 / 12.06 = 4.19 / 0.31 = 13.5 \\ 6.72 / 1.008 = 6.67 / 0.31 = 21.5 \\ 4.31 / 14.01 = 0.31 / 0.31 = 1 \\ 38.6 / 16.00 = 2.41 / 0.31 = 7.8 \end{array} \right) \\
 \text{H: } 6.72 \longrightarrow \\
 \text{N: } 4.31 \longrightarrow \\
 \text{O: } 38.6 \longrightarrow
 \end{array}
 \cong \text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{NO}_8$$

5.3.4 AAS Yöntemi ile Cu^{2+} Tayini*PAA- Cu^{2+} ve 75:25 P(AA/VP)- Cu^{2+} Komplekslerinde Cu^{2+} Tayini*

5 mL %0.1'lik 75/25 mol oranındaki AA/VP kopolimerinin PBS tamponundaki çözeltisine 690 μL %5'lik $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 'ın sudaki çözeltisinden ilave edilip pH:7.0'a ayarlandı. Meydana gelen çökelti santrifüj edildikten sonra der. HNO_3 'de çözülerek çökeltideki Cu^{2+} tayin edildi.

Kan ile Muamele edilen PAA- Cu^{2+} Sisteminde Cu^{2+} Tayini

$n_{\text{Cu}}/n_{\text{AA}}=1/20$ mol oranında hazırlanan PAA- Cu^{2+} ikili kompleks çözeltisinin 0.5 mL'si sağlıklı bir insandan alınan 5 mL kan örneği iki farklı şekilde (klasik elle, vorteks yardımı ile) karıştırılarak 37°C' deki çalkalamalı su banyosunda 1 saat bekletildi ve süre sonunda 2000 rpm' de 5 dk santrifüj edilip tüplerdeki her bir faz alt ve üst olarak ayrıldı. AAS cihazında analiz yapılmadan önce alt (pellet kısmı) ve üst faz (serum kısım) mikrodalga çözme sisteminde çözüldü. Bu işlem mikrodalga çözme sistemi prosedürüne göre 1 mL örnek için 2.5 mL der. HNO_3 ve 1 mL H_2O_2 kullanılarak yapıldı. Örnekler çözüldükten sonra kodlanan balon jöjelere aktarılıp 1+1 HNO_3 ile tamamlanarak Cu^{2+} tayini yapıldı.

5.3.5 Işınlama Koşulları

PAA, AA/VP kopolimeri çözeltileri ve Cu^{2+} ile oluşturulan ikili kompleks çözeltilerinin yüksek dozlarda ışınlanması için ÇNAEM, Endüstriyel Uygulama Bölümünde bulunan ^{60}Co γ kaynağı kullanıldı. Hazırlanan çözeltiler ışınlanmadan önce Frickle çözeltisi ile absorblanan dozlar hesaplandı ve çözeltiler için istenen dozlarda ışınlamalar yapıldı.

5.3.5.1 Frickle Çözeltisi ile Doz Kalibrasyonu

Hazırlanan Frickle çözeltisinin ~10 mL'si 90 dk. ^{60}Co γ kaynağı ile ışındandıktan sonra UV-VIS spektrofotometrik olarak 304 nm'deki absorbansı ölçüldü. Aşağıdaki eşitlikten absorblanan doz hesaplandı:

$$\begin{aligned}
 28.516 \times 10^3 \times \text{Abs.}(304 \text{ nm}) &= \dots\dots\dots \times 0.87 \text{ Rad} && (5.2) \\
 &= \dots\dots\dots / 100 \text{ Gy} \\
 &= \dots\dots\dots \text{Gy}/90 \text{ dk.}
 \end{aligned}$$

5.4 Radyobiyojik Çalışmalar

5.4.1 Kan Örneklerinin Elde Edilmesi

Bu çalışmada kullanılan kan örnekleri genç, sağlıklı ve sigara içmeyen tek bir kişiden elde edildi. Böylece kişisel farklılıklardan doğabilecek ilave problemler elimine edilmiş oldu. Kanın alındığı tüpler (Vacutainer, Becton Dickison) 5 mL hacminde, steril ve vakumlu olup, içleri kanın pıhtılaşmasını önleyecek şekilde Lityum-Heparin ile kaplıdır. Bu nedenle kan tüpe alındıktan sonra hafifçe çalkalanarak, kanın lityum-heparinle etkileşimi sağlandı.

5.4.2 Kan Örneklerinin, Polimer ve Çeşitli Kompleksleri ile Etkileşimi

5 mL'lik bir kan tüpüne ~4.5 mL kan örneği alınarak 0.5 mL ilave edilecek çözeltiler için bırakılmıştır. Kan örnekleri 1 saat süre ile karanlık bir odada dinlendirildikten sonra, denenecek farklı konsantrasyonlarda ve farklı mol oranlarındaki çözeltilerden 0.5 mL ilave edildi, hafifçe çalkalanarak kan ile çözeltilerin karışması sağlandı. Çözeltilerin ilavesinden sonra kan örnekleri, 24 saat ve 37°C' lik çalkalamalı su banyosunda etkileşime bırakıldı.

Bu süre sonunda kan örnekleri 2000 rpm' de 5 dk. santrifüj edildi. Üst kısım(süpernatant) enjektörle çekilerek atıldı. Daha sonra, her tüpe eşit miktarlarda olacak şekilde kültür medyumunu eklendi. Bu yıkama işlemi 3 defa tekrarlanarak etkileşime girmeden ortamda kalan çözelti fazlası atıldı ve kalan hücreler kültüre alındı.

5.4.3 Kan Örneklerinin ⁶⁰Co γ Kaynağı ile Düşük Dozlarda Işınlaması

Düşük dozardaki ışınlamalar için Çekmece Nükleer Araştırma ve Eğitim Merkezi'nde bulunan Sekonder Standart Dozimetri laboratuvarındaki (SSDL) ⁶⁰Co γ ışınlama ünitesi kullanıldı. Kan örnekleri ışınlamadan önce yukarıda anlatıldığı şekilde çeşitli çözeltilerle 1 saat süre ile etkileşime bırakıldıktan sonra, kaynaktan uzaklığı 100 cm ve ışınlama alanı 10x10 cm²'de sabit tutularak, istenen dozlarda ışınlama yapıldı.

5.5 Hücrelerin Kültüre Alınması

Hazırlanan kan örnekleri Moorhead ve arkadaşları tarafından yayınlanmış olan mikrokültür tekniği kullanılarak kültüre alındı (Moorhead vd., 1960).

Her bir kan örneğinden MN ve CA analizi için 2 paralel hazırlandı. Bütün kültür işlemleri herhangi bir kontaminasyona sebep vermemek için, UV lambası ile steril hale getirilen doku kültür laboratuvarında, Laminar Flow Chamber (hepa filtrelerinden hava üflemeli kabin) içinde gerçekleştirildi. Gereken madde ilavelerinde ve seyreltmelerde steril, tek kullanımlık (disposable) enjektörler, çözeltilerin steril olarak hazırlanabilmesi için ise milipor filtreler ve steril 50 mL' lik polietilen kültür şişeleri kullanıldı.

Kültür şişelerine, lenfositleri bölünmeye teşvik etmek için 0.4 – 0.5 mL Phytohemagglutinin-M (PHA-M, Roche 20 mg), 5 mL kompleks medyum ve 0.7- 1 mL kan örneği ilave edilerek 37 °C' deki inkübatöre konuldu. CA Analizi yapılacak örnekler ilave olarak 0.15 mL bromodeoksiüridin koyuldu. Kan örnekleri analiz yöntemleri için gerekli olan kültür sürelerine bağlı olarak MN Analizi için 70 saat süre ile CA Analizi için ise 48 saat süre ile inkubatörde bekletildi.

MN Analiz Yöntemi için yukarıda anlatılan şartlarda hazırlanan kan örneklerini içeren kültür şişelerine, kültür süresinin 48. saatinde 0,15 - 0,20 mL Cytochalasin-B (Sigma) ilave edildi. Bu ilaveden sonra kültür şişeleri 20 saat daha 37°C' deki inkubatöre bırakıldı. Bu süre sonunda fiksasyon işlemine geçildi. Benzer şekilde CA Analizi için 45. saatte 0.15-0.20 mL Colchmid (GibcoBRL) eklenip 48 saatlik kültür süresini tamamlamak üzere 37°C' deki inkubatöre bırakıldı.

5.5.1 Hücrelerin Tesbit (Fikse) Edilmesi

MN Analizi için Fiksasyon

MN Analiz yöntemi için 70 saat'lik kültür süresi tamamlandıktan sonra fiksasyon işlemine başlandı. İlk olarak, kültür şişelerinin kapakları açılarak kan örnekleri 10 mL' lik kapaklı

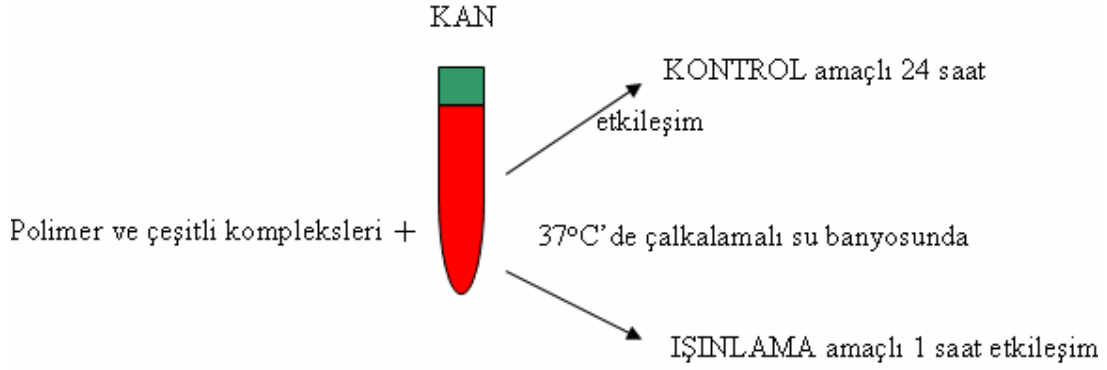
santrifüj tüplerine (Falcon tüp) aktarıldı. 1000 rpm’de 5 dk santrifüj işleminden sonra üstte kalan süpernatant atıldı. Çöken kısım, bir vorteks karıştırıcı yardımıyla karıştırılırken üzerine hipotonik şok için 0,075 M buzlu KCl (Merck) çözeltisinden 6 mL ilave edildi. Bu işlem sonrasında bekletme yapılmadan santrifüj edildi ve süpernatant kısmı atıldı. Vorteks mikserde karıştırılırken her bir tüpe taze hazırlanmış fiksatif çözeltisinden (1:4 Asetik asit/Metanol) 6 mL damla damla ilave edildi. Bu işlem 3 defa tekrarlandı. Son fiksatife (3. fiksatif) sitoplazmanın dağılmasını, akmasını ve kırışmasını önlemek amacıyla 1/100 oranında formaldehit (Merck) ilave edildi. Daha sonra kalan hücreler santrifüj edildi ve üstte kalan formaldehitli fiksatif atılarak üzerlerine temiz fiksatiften yaklaşık 1,5 mL ilave edildi.

Bu süre sonunda elde edilen hücreler, temiz, kodlanmış ve dondurulmuş lamalar üzerine yakın mesafeden damlatılıp, yayılarak oda sıcaklığında düz bir zemin üzerinde kuruması için bırakıldı. Kuruduktan sonra %4’ lük Giemsa (Gibco) boya içinde 8 dk bekletildikten sonra destile suyla çalkalanarak kurutuldu. Kuruması tamamlanan lamalar, lamel ile kapatılarak mikroskopta sayım yapılmak üzere hazırlandı. Kalan hücreler -30°C’ deki derin dondurucuya kaldırıldı.

CA Analizi için Fiksasyon

CA Analiz yöntemi için 48 saat’lik kültür süresi tamamlandıktan sonra MN Analiz yöntemindeki işlemlere benzer şekilde santrifüj işlemlerinden sonra hipotonik şok için 0,075 M KCl çözeltisinden 6 mL ilave edildi. Bu işlem sonrasında 37°C’ deki inkubatörde 20 dk. bekletildi, santrifüj edildi ve süpernatant kısmı atıldı. Vorteks mikserde karıştırılırken her bir tüpe taze hazırlanmış fiksatif çözeltisinden(1:3 Asetik asit/Metanol) 6 mL damla damla ilave edildi. Bu işlem 3 defa tekrarlandı. Daha sonra kalan hücreler santrifüj edildi ve üstte kalan kısım atılarak üzerlerine temiz fiksatiften yaklaşık 1,5 mL ilave edildi.

Bu süre sonunda elde edilen hücreler, temiz, kodlanmış lamalar üzerine uzak mesafeden damlatıldı. Hot plate üzerinde kurutularak uygulama işlemi birkaç kez tekrarlandı. Kuruduktan sonra %2’ lik Giemsa (Gibco) boya içinde 8 dk bekletildikten sonra destile suyla çalkalanarak kurutuldu. Kuruması tamamlanan lamalar, lamel ile kapatılarak mikroskopta sayım yapılmak üzere hazırlandı. Kalan hücreler -30°C’ deki derin dondurucuya kaldırıldı.



Şekil 5.12 Polimer ve çeşitli komplekslerinin kan ile etkileşimi.

5.5.2 Preparatların Değerlendirilmesi

Her iki yöntem için hazırlanan preparatlar Giemsa boya ile boyanıp ışık mikroskopunda analizleri yapıldı.

Kromozom Aberasyon Analizi için hazırlanan preparatlar ışık mikroskopunda x1.000 büyütmede incelendi. Kromozomları birbirinden ayrılmış, görünümleri düzgün ve iyi boyanmış metafaz hücreleri değerlendirmeye alındı. Kromozom sayıları 46 ve daha fazla olan hücreler incelendi, 46'dan az sayıda kromozom taşıyan hücreler dikkate alınmadı. Sayılan hücrede kararsız aberasyonlar bulunduğu (disentrik, halka, asentrik gibi) sayılan kromozom parçaları ile gözlenen aberasyonların dengelenmesine dikkat edildi (Örneğin, hücrede bir disentrik aberasyon gözlendiğinde, ona eşlik eden bir asentrik ile sayının 46'da tutulması veya bir asentrik ile sayının 47 olması).

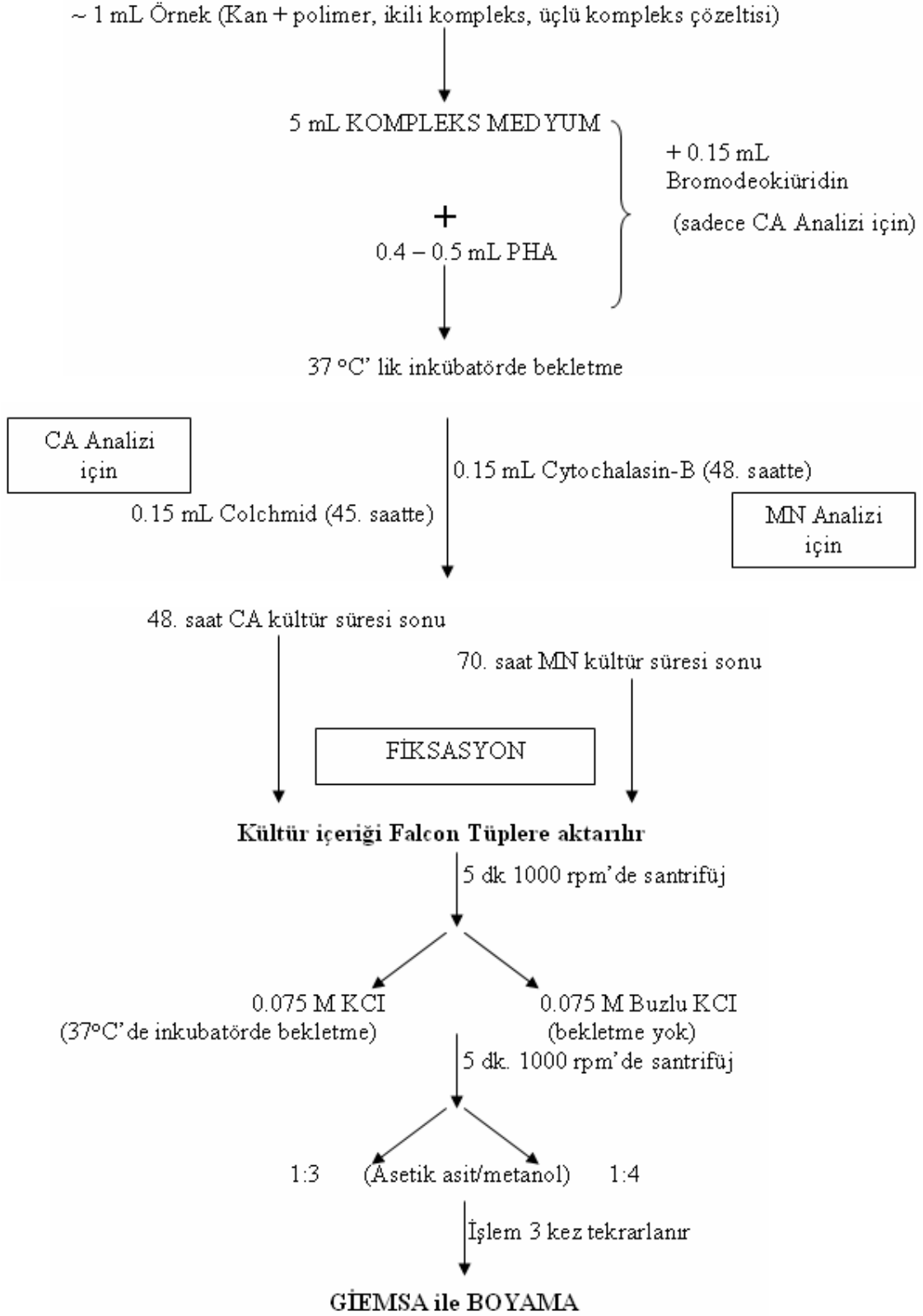
MN Analiz Yöntemi için hazırlanan preparatlar da yine ışık mikroskopunda x250 ve x1.000 büyütmede analiz edildi. Analiz sırasında 1. mitoz bölünmesini tamamlamış, Cytochalasin-B ile sitoplazma bölünmesi engellendiği için, iki yeni nükleusun bir arada bulunduğu (binükleat) hücreler ve bu binükleatların sitoplazmaları içinde yer alan küçük nükleuslar (mikronükleus) değerlendirildi.

Değerlendirmede, Countryman ve Heddle tarafından geliştirilen sayım kriterleri kullanıldı. Bu kriterler uyarınca, sitoplazması korunmuş binükleat hücrelerde nükleusla aynı boyanma

özelliklerini gösteren, ışık yansıması yapmayan, düzgün şekilli, nükleusla aynı yapıda fakat yarısından daha küçük boyutta olan mikronükleuslar sayıldı.

Analiz sonucunda mikronükleusların sayısı, toplam binükleat sayısına oranlanarak hücre başına mikronükleus saptandı.

YAPILAN İŞLEM



Şekil 5.13 Kan örneklerinin kültüre alınması ve fiksasyon.

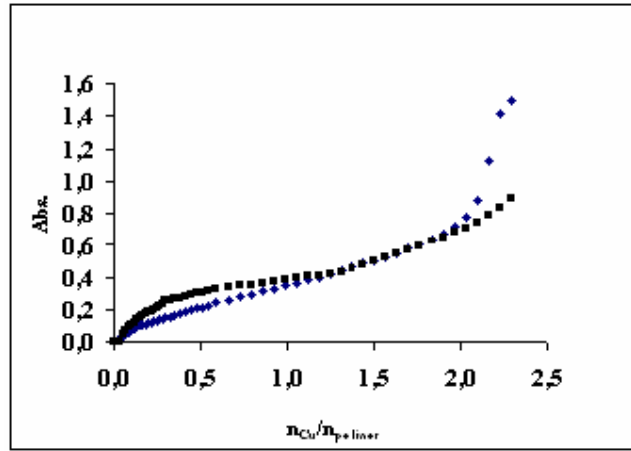
6. BULGULAR

Bu bölümde kimyasal ve radyobiolojik çalışmaların her ikisine ait sonuçlar bir arada verilecektir.

6.1 UV-VIS Ölçüm Bulguları

6.1.1 PMC kompleksinin oluşumunda $[Cu^{2+}]$ konsantrasyonunun etkisi

Şekil 6.1 %0.1'lik PAA ve 75:25 AA/VP kopolimerinin PBS'de hazırlanan pH: 7.0'deki çözeltisine belirli miktarlarda $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ tuzu ile hazırlanan %5'lik çözeltinin ilavesi sonucu değişen n_{Cu}/n_{PAA} oranlarına bağlı olarak absorbans değerlerinin 230 nm dalga boyunda ölçülmesi ile elde edildi. $n_{Cu}/n_{Polimer} < 0.3$ olduğu mol oranlarında çözülmüş kompleks elde edilirken tersi durumda metal konsantrasyonunun artmasıyla kolloidal partiküller oluşmakta, dolayısıyla absorbans değeri artmaktadır.

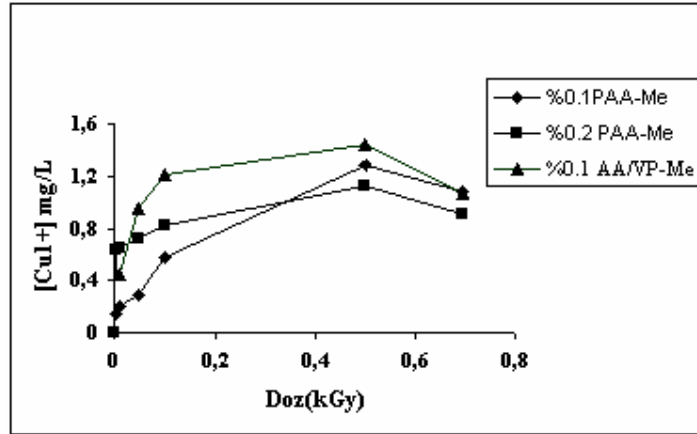


Şekil 6.1 $n_{Cu}/n_{Polimer}$ oranına bağlı olarak absorbans değişimi: (◆) PAA/PVP kopolimeri; (■) PAA.

6.1.2 Neokuproin Yöntemi ile Cu^{1+} Tayini

Bu yöntemde PMC sisteminde farklı radyasyon dozları ile oluşan $[Cu^{1+}]$ (Me) tayin edilmiştir. Belirli bir doza kadar PMC ikili kompleks sistemindeki Cu^{2+} 'nın radyasyon etkisi ile Cu^{1+} 'e indirgenmesi belirli bir doza kadar artan radyasyon dozu ile artış göstermiştir. Bu sonuçlar

bize PMC sistemindeki metal iyonunun radyasyon enerjisini öncelikli olarak absorbladığını göstermiştir. Ölçümler 430 nm’de UV-VIS spektrofotometrik olarak yapılmıştır.



Şekil 6.2 Farklı polimer sistemlerinde radyasyon etkisi ile oluşan [Me¹⁺]: (▲)%0.1 PAA/PVP-Me; (◆) %0.1 PAA-Me [Cu²⁺]: 0.6905x10⁻³; (■) %0.2 PAA-Me [Cu²⁺]: 1.3915x10⁻³.

Çizelge 6.1 Radyasyon dozuna bağlı olarak Cu¹⁺ oluşumu.

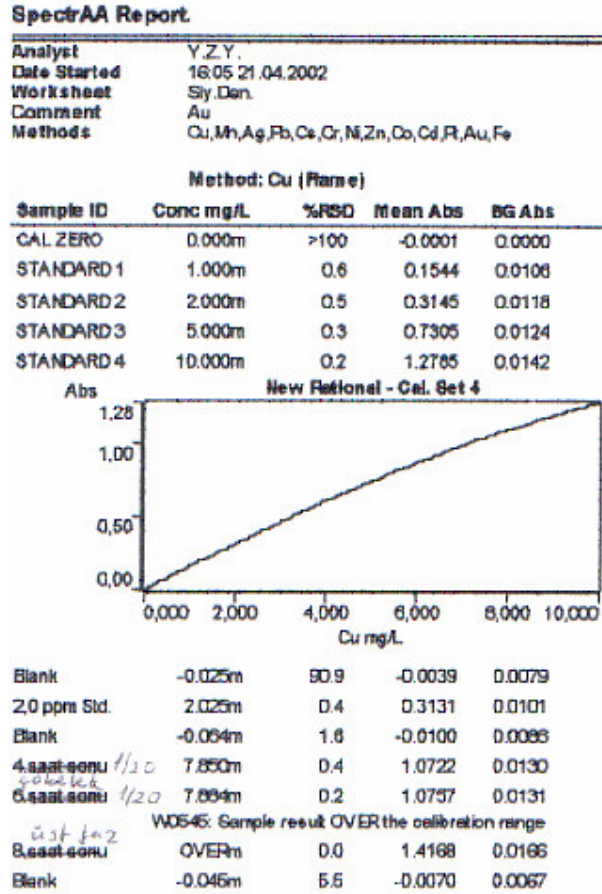
Doz (kGy)	%0.1 PAA-Me	%0.2 PAA-Me	%0.1 AA/VP-Me
0	0	0	0
0,005	0,15	0,641	0,324
0,01	0,2	0,65	0,445
0,05	0,294	0,727	0,945
0,1	0,57	0,82	1,215
0,5	1,28	1,127	1,44
0,695	1,08	0,904	1,06

6.2 AAS Sonuçları

75:25 P(AA/VP)-Cu²⁺ Kompleksinde Cu²⁺ Tayini

5 ml %0.1’lik 75/25 mol oranındaki AA/VP kopolimerinin PBS tamponundaki çözeltisine 690µL %5’lik CuSO₄.5H₂O’ın sudaki çözeltisinden ilave edilip pH:7.0’a ayarlandı. Meydana gelen çökelti santrifüj edildikten sonra der. HNO₃’de çözülerek çökeltideki Cu²⁺ tayin edildi. Yapılan hesaplama göre ilave edilen Cu²⁺ miktarı 8832 µg/ml’dir, 1 ml der. HNO₃ ilavesi ile; 8832 µg/ml(ppm) 50 ml’ye tamamlandı. Konsantrasyon 176.5 µg/ml oldu. Bu çözeltiden 2.5 ml alınıp 50 kat seyreltilince konsantrasyon 8.825 µg/ml’e ayarlandı. AAS ile yapılan

ölçümde ise $7.884\mu\text{g/ml}$ Cu^{2+} bulundu. Bu sonuca göre başlangıçta ilave edilen Cu^{2+} 'nın tamamının artan $n_{\text{Cu}}/n_{\text{polimer}}$ ile çöken çözeltide olduğu tespit edildi.



Şekil 6.3 AAS ile Cu^{2+} Tayini.

Kan ile Muamele edilen PAA- Cu^{2+} Sisteminde Cu^{2+} Tayini

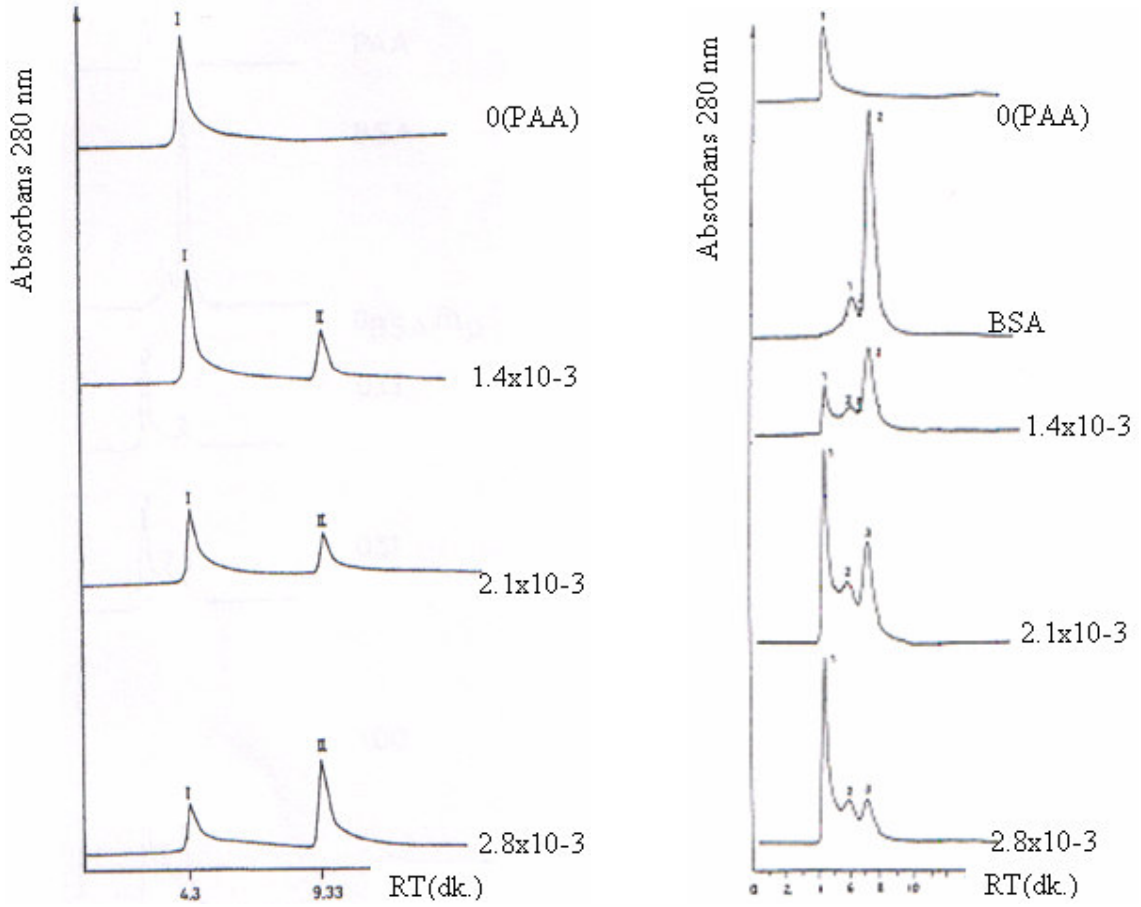
$n_{\text{Cu}}/n_{\text{AA}}=1/20$ mol oranında hazırlanan PAA- Cu^{2+} ikili kompleks çözeltisinin 0.5 ml'si sağlıklı bir insandan alınan 5 ml kan örneği iki farklı şekilde (klasik elle, vorteks yardımı ile) karıştırılarak 37°C ' deki çalkalamalı su banyosunda 1 saat bekletildi ve süre sonunda 2000 rpm' de 5 dk santrifüj edilip tüplerdeki her bir faz alt ve üst olarak ayrıldı. AAS cihazında analiz yapılmadan önce alt (pellet kısmı) ve üst faz (serum kısım) mikrodalga çözme sisteminde çözüldü. Bu işlem mikrodalga çözme sistemi prosedürüne göre 1 ml örnek için 2.5 ml der. HNO_3 ve 1 ml H_2O_2 kullanılarak yapıldı. Örnekler çözüldükten sonra kodlanan balon jöjelere aktarılıp 1+1 HNO_3 ile tamamlanarak Cu^{2+} tayini yapıldı.

Çizelge 6.2 PAA-Cu²⁺ ikili kompleksleri ile doğal kanın iki farklı şekilde karıştırılarak muamele edilmesi sonucu kanın alt ve üst fazı için AAS' de yapılan [Cu²⁺] tayini sonucu alınan değerler.

Örnek	Konsantrasyon mg/ml	Abs
Blank	0.007	0.0006
Standart 0.5 ppm	0.504	0.0452
Blank üst faz	0.182	0.0164
Blank alt faz	0.180	0.0162
1/20 Vorteks üst	0.611	0.0547
1/20 Vorteks alt	0.381	0.0343
1/20 Klasik üst	0.566	0.0507
1/20 Klasik alt	0.492	0.0441

Bu çalışma hücre kültürüne kan ile etkileşim sonrasında uygulanacak maddelerin iki farklı karıştırma şekli ile herhangi bir madde kaybının olup olmadığını tespit etmek amacıyla yapılmıştır. Alınan sonuçlar vorteks ile yapılan karıştırmada kanın üst fazında (atılan faz) kalan bakırın, klasik yöntemle yapılan karıştırmada elde edilen üst faza oranla daha fazla bakır içerdiğini göstermiştir. Bu nedenle kültüre uygulanacak maddeler klasik yöntemle karıştırarak kültüre uygulanmıştır.

6.3 PAA-Cu²⁺ ve PAA- Cu²⁺ -BSA Kompleksleri HPLC Sonuçları



Şekil 6.4 Çeşitli [Cu²⁺](mol/L) konsantrasyonlarında ikili ve üçlü komplekslerin HPLC kromatogramları.

Bu çalışmada Waters 501 model HPLC cihazı kullanılmıştır. Mobil faz 0.067 M KH₂PO₄ ve 0.067 M Na₂HPO₄.2H₂O içerir ve pH: 7.0'a ayarlanır. Elüsyon izokratiktir ve akış hızı 1 mL/dk.dır. Mobil faz ve örnekler prefiltrasyon işlemi uygulandı (por boyutu 0.45 µm filtre). 25 µ L örnek analiz için enjekte edildi. Tüm örnekler BSA'nın maksimum absorbanst gösterdiği 280 nm dalga boyunda takip edildi.

6.4 Preparatların Sitogenetik Olarak İncelenmesi

TSH: Toplam sayılan binükleat hücre, **TMN:** Toplam MN, **HBMN:** Hücre başına MN

6.4.1 Propiyonik Asit (PPA) MN Bulguları

Çizelge 6.3 PPA konsantrasyonuna bağlı olarak MN değişim.

Kontrol		TSH	TMN	HBMN	ORAN (HBMN/Kontrol)
		2500	2	0.0008	1
C _{PPA} (µg/5 mLkan)	0.25	2501	5	0.002	2.5
	0.35	2508	15	0.006	7.5
	0.50	2505	19	0.008	10

Üç farklı konsantrasyonda PPA asit kullanıldı. Her bir konsantrasyona karşı gelen MN değerleri karşılaştırma yapabilmek için kontrole oranlandı. Bu değerlere bakıldığında artan konsantrasyon ile oluşan MN arasında bir artış olduğu gözlemlendi. Bu değerler yapılan diğer çalışmalardaki MN değerleri ile kıyaslandığında 0.35 ve 0.50 µg/5 mL kan konsantrasyonlarında oldukça yüksek değerlerdeki MN dikkat çekmiştir (Çizelge 6.3).

6.4.2 PAA (PAA-100, Mw:100 000) MN Sonuçları

Çizelge 6.4 PAA-100 konsantrasyon serisine bağlı MN değişimi.

µg PAA-100 / 5 mL kan	TSH	TMN	HBMN	ORAN
0	7321	22	0.0030	1
0.10	2060	6	0.0030	1
0.25	2076	6	0.0030	1
0.35	2069	9	0.0044	1.46
0.50	2640	11	0.0042	1.4
0.75	2312	13	0.0056	1.86
1.00	3825	21	0.0055	1.83
1.50	2865	16	0.0056	1.86

Çizelge 6.4'deki sonuçlara bakıldığında PAA-100'ün kan ile etkileşimi sonucu oluşan MN değerlerinin belirli bir konsantrasyon (0-0.25) aralığında sabit kalırken artan konsantrasyon ile MN oluşumunda bir miktar artış gözlenmiştir.

6.4.3 PAA-100 Varlığında 1 Gy Işınlama ile Kanda Oluşan MN

Çizelge 6.5 PAA-100'ün 1 Gy ışınlama ile kanda oluşturduğu MN değerleri.

$\mu\text{g PAA-100/}$ 5 mL kan	TSH	TMN	HBMN	ORAN
0	4041	178	0.044	1
0.10	2485	122	0.049	1.11
0.25	2593	114	0.044	1.00
*0.35	3064	102	0.033	0.75
*0.50	2530	86	0.034	0.77
*0.75	2580	80	0.031	0.70
*1.00	2565	100	0.039	0.89
1.50	2511	132	0.053	1.20

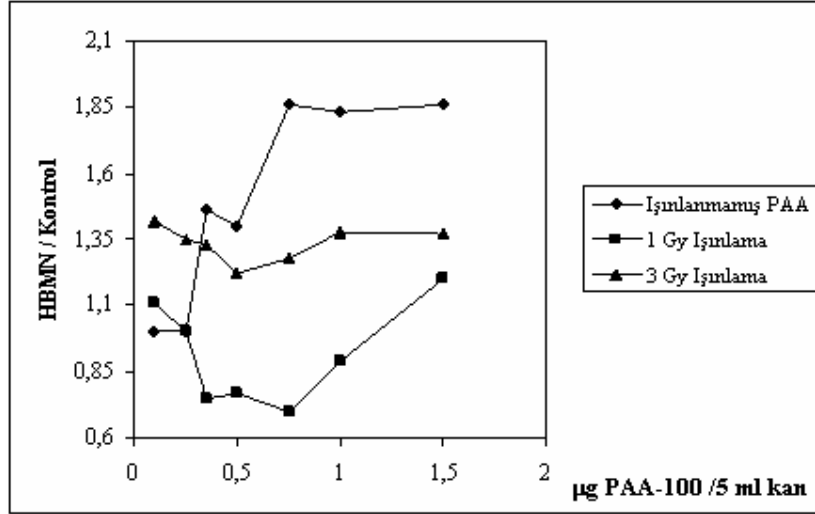
Işınlama öncesi kan ile etkileşim süresi 1 saat olarak uygulandı. Kontrol (0) değeri ile kıyaslandığında 0.35-1.00 $\mu\text{g PAA-100/5 mL kan}$ konsantrasyon aralığında radyoprotektif bir etki gözlemlendi (Çizelge 6.5).

6.4.4 PAA-100 Varlığında 3 Gy Işınlama ile Kanda Oluşan MN

Çizelge 6.6 PAA-100'ün 3 Gy ışınlama ile kanda oluşturduğu MN değerleri.

$\mu\text{g PAA-100/}$ 5 mL kan	TSH	TMN	HBMN	ORAN
0	2000	291	0.146	1
0.10	1000	207	0.207	1.42
0.25	1000	197	0.197	1.35
0.35	1500	291	0.194	1.33
0.50	1500	268	0.178	1.22
0.75	1500	281	0.187	1.28
1.00	1000	202	0.202	1.38
1.50	1000	200	0.200	1.37

Çizelge 6.6'ya göre 3 Gy ışınlama sonrasında PAA'nın konsantrasyon artışına bağlı olarak herhangi bir protektif etki gözlenmemiştir. Bu çalışmada da etkileşim süresi 1 saat olarak uygulanmıştır. Bundan sonra yapılacak çalışmalar için 1 Gy ışınlama dozu uygulanmasına karar verilmiştir. Bu sonuçlar Şekil 6.5'de bir grafik üzerinde incelendiğinde aşağıdaki gibidir;



Şekil 6.5 PAA-100'ün ışınlama dozlarına bağlı olarak MN oluşturmaları

6.4.5 Etkileşim Zamanına Bağlı Olarak PAA-100'nin 1 ve 3 Gy Dozda Işınlama ile Kanda Oluşturduğu MN

Çizelge 6.7 PAA-100'ün 1 ve 3 Gy ışınlama ile zamana bağlı oluşan MN değerleri.

µg PAA-100 / 5 mL kan	1 Gy Işınlama MN		3 Gy Işınlama MN	
	1 saat	24 saat	1 saat	24 saat
	ORAN		ORAN	
0.25	1	1.14	1.35	1.94
0.75	0.70	1.20	1.28	2.16

Çizelge 6.7'deki sonuçlara göre PAA-100'ün kan ile etkileşim süresi uzadıkça kimyasal etki ön plana çıkarak MN oluşumunu arttırmış. Bu artış konsantrasyon artışı ile kendini daha belirgin bir şekilde göstermiştir.

6.4.6 PAA (PAA-5, Mw:5.000) MN Bulguları

Çizelge 6.8 PAA-5 konsantrasyon serisine bağlı MN değişimi.

µg PAA-5 / 5 mL kan	TSH	TMN	HBMN	ORAN
0	2500	7	0.0028	1
0.10	2500	11	0.0044	1.6
0.25	2500	23	0.0092	3.3
0.35	2500	21	0.0084	3.0
0.50	3307	28	0.0085	3.0
0.75	2500	22	0.0088	3.1
1.00	2500	24	0.0096	3.4
1.50	2500	20	0.0088	3.1

Çizelge 6.8'e göre PAA-5'in kanda oluşturduğu MN değerleri PAA-100'e göre kıyaslanarak incelendiğinde PAA-100'ün 3 katı kadar daha fazla sayıda MN oluşturduğu gözlenmiştir.

6.4.7 PAA-5 Varlığında 1 Gy Işınlama ile Kanda Oluşan MN

Çizelge 6.9 PAA-5'in 1 Gy ışınlama ile kanda oluşturduğu MN değerleri.

µg PAA-5 / 5 mL kan	TSH	TMN	HBMN	ORAN
0	2500	67	0.0268	1
0.10	2500	104	0.0416	1.6
0.25	2500	107	0.0428	1.6
0.35	1572	90	0.0573	2.1
0.50	1154	93	0.0806	3.0
0.75	2500	73	0.0292	1.1
1.00	2500	73	0.0292	1.1
1.50	1627	80	0.0492	1.8

Çizelge 6.9'dan elde edilen sonuçlara göre PAA-100'ün 1 Gy'de oluşturduğu MN değerleri ile kıyaslandığında, PAA-5'in herhangi bir protektif etki oluşturmadığı gözlenmiştir.

6.4.8 PAA-Cu²⁺ İkili Komplekslerinin $n_{Cu^{2+}}/n_{AA}$ Mol Oranına Bağlı Olarak MN Değişimi

Çizelge 6.10 PAA-Cu²⁺ ikili komplekslerinin $n_{Cu^{2+}}/n_{AA}$ mol oranına bağlı olarak MN değerleri.

		TSH	TMN	HBMN	ORAN
<i>Kontrol</i>		5000	36	0.0072	1
n_{Cu}/n_{AA} CuSO ₄	1/50	2540	18	0.0072	1.00
	1/20	2500	21	0.0084	1.17

$C_{PAA} = 0.35 \mu\text{g}/5 \text{ mL kan}$, PAA Mw: 100.000

Çizelge 6.10'daki sonuçlara göre herhangi bir ışınlama olmadan ikili komplekslerin kanda oluşturduğu MN değeri Cu²⁺ miktarı arttıkça yani mol oranı arttıkça hafif bir artış göstermiştir. Bu değerler PAA-Cu²⁺ ikili komplekslerinin kana olan etkisini göstermektedir.

6.4.9 PAA-Cu²⁺ İkili Komplekslerinin $n_{Cu^{2+}}/n_{AA}$ Mol Oranına Bağlı Olarak 1 Gy Işınlama Dozu ile Oluşturdukları MN Değerleri

Çizelge 6.11 PAA-Cu²⁺ ikili komplekslerinin $n_{Cu^{2+}}/n_{AA}$ mol oranına bağlı olarak 1 Gy'deki MN değerleri.

		TSH	TMN	HBMN	ORAN
<i>Kontrol</i>		2538	90	0.0354	1
n_{Cu}/n_{AA} CuSO ₄	1/50	2509	194	0.0773	2.18
	1/20	4127	190	0.0460	1.30

$C_{PAA} = 0.35 \mu\text{g}/5 \text{ mL kan}$, PAA Mw: 100.000

Çizelge 6.11'deki sonuçlara bakıldığında, artan Cu²⁺ miktarı ile ikili komplekste meydana gelen kompaktlaşma, radyasyonun indirekt etkisi ile oluşan serbest radikalleri ve istenmeyen diğer yan ürünlerin oluşumunu engelleyerek MN oluşumunu da azaltmıştır. Ancak bu azalma ile protektif bir etkiden söz edilemez. PAA-Cu²⁺ ikili kompleksleri hazırlanırken PAA

konsantrasyonu 0.35 µg/5 ml kan yerine daha yüksek konsantrasyonlar seçilerek bu çalışma tekrarlanabilir.

6.4.10 PAA-Cu²⁺-BSA Üçlü Komplekslerinin n_{Cu2+}/n_{AA} Mol Oranına Bağlı Oluşturdukları MN Değerleri

Çizelge 6.12 PAA-Cu²⁺-BSA üçlü komplekslerinin n_{Cu2+}/n_{AA} mol oranına bağlı olarak MN değerleri.

		TSH	TMN	HBMN	ORAN
<i>Kontrol</i>		5000	36	0.0072	1
$\frac{n_{Cu}}{n_{AA}}$ CuSO ₄	1/50	2500	18	0.0073	1.01
	1/20	2500	19	0.0076	1.06

n_{BSA}/n_{AA} = 1, C_{PAA} = 0.35 µg/5 mL kan, PAA Mw: 100.000

Çizelge 6.12'ye göre PAA-Cu²⁺-BSA üçlü komplekslerinin n_{Cu2+}/n_{AA} mol oranına bağlı oluşturdukları MN değerinde Cu²⁺ miktarı artmış olmasına rağmen herhangi bir artış gözlenmemiştir.

6.4.11 PAA-Cu²⁺-BSA Üçlü Komplekslerinin n_{Cu2+}/n_{AA} Mol Oranına Bağlı Olarak 1 Gy Işınlama Dozu ile Oluşturdukları MN Değerleri

Çizelge 6.13 PAA-Cu²⁺-BSA üçlü komplekslerinin n_{Cu2+}/n_{AA} mol oranına bağlı olarak 1 Gy'deki MN değerleri.

		TSH	TMN	HBMN	ORAN
<i>Kontrol</i>		2538	90	0.0354	1
$\frac{n_{Cu}}{n_{AA}}$	1/50	905	44	0.0486	1.37
	1/20	1012	62	0.0613	1.73

n_{BSA}/n_{AA} = 1, C_{PAA} = 0.35 µg/5 mL kan, PAA Mw: 100.000

6.4.12 P(AA/VP) (75:25, Mw: 80.000) Kopolimerinin Kanda Oluşturduğu MN Değerleri

Çizelge 6.14 P(AA/VP) kopolimerinin kanda oluşturdukları MN değerleri

$\mu\text{g AA:VP} / 5 \text{ mL kan}$	TSH	TMN	HBMN	ORAN
0	5000	36	0.0072	1
0.35	2500	26	0.0104	1.44
0.75	2800	34	0.0121	1.68
1.50	2500	35	0.0140	1.94

Bu çalışmada seçilen konsantrasyonlar PAA ile yapılan çalışmadaki konsantrasyona eşit olacak şekilde hazırlandı. Akrilik asit (AA) mol sayıları herbir konsantrasyonda PAA ile aynı olan konsantrasyonlarda eşit tutuldu. Bu şekilde kopolimerden gelecek olan AA kaybına bağlı olarak deneylerde meydana gelebilecek değişimler önlenmiş oldu. Sonuçlar kıyaslandığında PAA'ya benzer şekilde konsantrasyon artışı ile artan MN oluşumu gözlemlendi (Çizelge 6.14).

6.4.13 P(AA/VP) (75:25, Mw: 80.000) Kopolimerinin 1 Gy Dozda Kanda Oluşturduğu MN Değerleri

Çizelge 6.15 P(AA/VP) kopolimerinin 1 Gy dozda kanda oluşturdukları MN değerleri.

$\mu\text{g AA:VP} / 5 \text{ mL kan}$	TSH	TMN	HBMN	ORAN
0	2538	90	0.0354	1
0.35	1503	85	0.0566	1.60
0.75	1500	74	0.0493	1.39
1.50	1500	54	0.0360	1.02

Sonuçlar (Çizelge 6.15) PAA-100'ün 1 Gy'de ışınlama ile elde edilen MN sonuçları ile kıyaslandığında kopolimerde MN oluşumundaki azalma daha yüksek konsantrasyonlara kayarak kendini gösterdi. Bu çalışma kopolimerin daha yüksek konsantrasyonları ile tekrarlanabilir.

6.4.14 PVP (PVP-50, Mw:50.000)'nin Kanda Oluşturduğu MN Değerleri

Çizelge 6.16 PVP-50'nin kanda oluşturduğu MN değerleri.

$\mu\text{g PVP-50} / 5 \text{ mL kan}$	TSH	TMN	HBMN	ORAN
0	2500	16	0.0064	1
0.10	2500	17	0.0068	1.1
0.25	2500	17	0.0068	1.1
0.35	2500	16	0.0064	1
0.50	2500	18	0.0072	1.1
0.75	2500	19	0.0076	1.2
1.00	2500	18	0.0072	1.1
1.50	2500	20	0.0080	1.3

Çizelge 6.16'dan da görüldüğü gibi PVP'nin herhangi bir kromozom hasarı oluşturmadığı, yani hiç madde içermeyen kana eşdeğer bir etki oluşturduğu gözlenmiştir.

6.4.15 PVP-50'nin 1 Gy Dozda Kanda Oluşturduğu MN Değerleri

Çizelge 6.17 PVP'nin 1 Gy dozda kanda oluşturduğu MN değerleri.

$\mu\text{g PVP-50} / 5 \text{ mL kan}$	TSH	TMN	HBMN	ORAN (HBMN/Kontrol)
0	1628	44	0.0270	1
0.10	2056	45	0.0219	0.9
0.25	2500	49	0.0196	0.8
0.35	2376	44	0.0176	0.7
0.50	2500	36	0.0152	0.6
0.75	2500	56	0.0224	0.9
1.00	2500	54	0.0216	0.9
1.50	2500	55	0.0220	0.9

PVP'nin kontrole göre daha düşük değerde gözlenen MN değerleri (Çizelge 6.17) CA sonuçları ile desteklendiğinde herhangi bir protektif etki oluşturmadığı gözlenmiştir.

6.5 CA Yöntemi ile Elde Edilen Sonuçlar

6.5.1 PAA-100 Varlığında 1 Gy'de Işınlama ile Kanda Oluşan CA

TSH: Toplam sayılan metafaz hücresi, **Dic:** Disentrik kromozom, **Ac:** Asentrik kromozom

Çizelge 6.18 PAA-100 varlığında 1 Gy'de ışınlama ile kanda oluşan CA değerleri.

µg PAA-100 / 5 mL kan	TSH	Dis.	As.	Dis./TSH	ORAN (Dis./Kontrol)
0	671	36	29	0.054	1
0.25	500	28	19	0.056	1.04
*0.75	500	19	24	0.038	0.70

Çizelge 6.18'e göre konsantrasyon artışı ile radyasyona özgü disentrik aberasyonların (hasar) oluşumunda azalma gözlenmiştir.

6.5.2 PAA-100 Varlığında 1 Gy'de Işınlama ile Kanda Oluşan CA

Çizelge 6.19 PAA-100 varlığında 3 Gy'de ışınlama ile kanda oluşan CA değerleri.

µg PAA-100 / 5 mL kan	TSH	Dis.	As.	Dis./TSH	ORAN
0	185	95	46	0.514	1
0.25	193	100	45	0.518	1.01
*0.75	227	101	61	0.445	0.87

1 Gy ışınlama ile elde edilen sonuçlara benzer şekilde artan konsantrasyon ile disentrik oluşumunda azalma gözlenmiştir (Çizelge 6.19).

6.5.3 Etkileşim Zamanına Bağlı Olarak PAA-100'ün 1 ve 3 Gy Dozda Işınlama ile Kanda Oluşturduğu CA

Çizelge 6.20 PAA-100 varlığında 24 saat etkileşim ve 1 Gy ışınlama ile kanda oluşan CA değerleri.

µg PAA-100 / 5 ml kan	TSH	Dis.	As.	Dis./TSH	ORAN
0	671	36	29	0.054	1
0.25	490	28	22	0.057	1.06
*0.75	470	14	13	0.030	0.56

Çizelge 6.21 PAA-100 varlığında 24 saat etkileşim ve 3 Gy ışınlama ile kanda oluşan CA değerleri.

µg PAA-100 / 5 ml kan	TSH	Dis.	As.	Dis./TSH	ORAN
0	185	95	46	0.514	1
0.25	304	100	56	0.329	0.64
*0.75	291	70	36	0.241	0.47

Çizelge 6.22 PAA-100'ün 1 ve 3 Gy ışınlama ile zamana bağlı oluşan CA değerleri.

µg PAA /5 ml kan	1 Gy Işınlama CA		3 Gy Işınlama CA	
	1 saat	24 saat	1 saat	24 saat
	ORAN		ORAN	
0.25	1.04	1.06	1.01	0.64
*0.75	0.70	0.56	0.87	0.47

6.5.4 PAA-5 Varlığında 1 Gy'de İşnlama ile Kanda Oluşan CA

Çizelge 6.23 PAA-5'in 1 Gy işnlama ile kanda oluşun CA değeri.

$\mu\text{g PAA-5/}$ 5 mL kan	TSH	Dis.	As.	Dis./TSH	ORAN
0	482	22	10	0.0456	1
0.10	298	14	11	0.0369	0.81
0.25	500	25	22	0.0500	1.10
0.35	482	24	15	0.0498	1.09
0.50	500	26	25	0.0520	1.14
0.75	450	23	14	0.0510	1.12
1.00	500	27	32	0.0540	1.18
1.50	231	6	9	0.0259	0.57

6.5.5 PAA-Cu²⁺ İkili Komplekslerinin $n_{\text{Cu}^{2+}}/n_{\text{AA}}$ Mol Oranına Bağlı Olarak 1 Gy İşnlama Dozu ile Oluşturdukları CA

Çizelge 6.24 PAA-Cu²⁺ ikili komplekslerinin $n_{\text{Cu}^{2+}}/n_{\text{AA}}$ mol oranına bağlı olarak 1 Gy'de oluşturdukları CA.

$n_{\text{Cu}}/n_{\text{PAA}}$	TSH	Dis.	As.	Dis./TSH	ORAN
Kontrol	442	10	10	0.0611	1
1/50 CuSO ₄	537	25	29	0.0466	0.76
1/20 CuSO ₄	392	34	17	0.0870	1.42

$C_{\text{PAA}} = 0.35 \mu\text{g}/5 \text{ ml kan}$

6.5.6 PAA-Cu²⁺-BSA Üçlü Komplekslerinin n_{Cu2+}/n_{AA} Mol Oranına Bağlı Olarak 1 Gy Işınlama Dozu ile Oluşturdukları CA

Çizelge 6.25 PAA-Cu²⁺-BSA üçlü komplekslerinin n_{Cu2+}/n_{AA} mol oranına bağlı olarak 1 Gy'de oluşturdukları CA.

n _{Cu} /n _{PAA}	TSH	Dis.	As.	Dis./TSH	ORAN
Kontrol	442	10	10	0.0611	1
1/50 CuSO ₄	250	11	10	0.0440	0.72
1/20 CuSO ₄	323	15	10	0.0464	0.76

n_{BSA}/n_{AA} = 1, C_{PAA} = 0.35 µg/5 mL kan

İkili ve üçlü komplekslere ait CA sonuçları birarada (Çizelge 6.24, 6.25) değerlendirildiğinde üçlü kompleksde radyasyon etkisi ile oluşan disentrik aberasyon değerlerinin daha düşük olduğu gözlemlendi. Bu değer artan bakır miktarına rağmen ikili kompleksin aynı mol oranına karşı gelen değerinden daha düşük olduğu belirlendi.

6.5.7 PVP-50 Varlığında 1 Gy'de Işınlama ile Kanda Oluşan CA

Çizelge 6.26 PVP-50'nin 1 Gy ışınlama ile kanda oluşan CA değerleri.

µg PVP-50/ 5 mL kan	TSH	Dis.	As.	Dis./TSH	ORAN
0	500	22	22	0.044	1
0.10	500	22	14	0.044	1
0.25	500	27	15	0.054	1.23
0.35	374	17	12	0.045	1.02
0.50	270	14	6	0.052	1.18
0.75	260	15	10	0.058	1.32
1.00	378	12	13	0.032	0.73
1.50	167	11	4	0.066	1.5

Sonuçlar incelendiğinde (Çizelge 6.26) PAA-100'e benzer şekilde belli bir konsantrasyon aralığında herhangi bir protektif etki gözlenmemiştir.

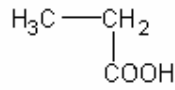
7. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

Deneysel çalışmalardan elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

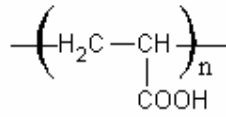
7.1 Çeşitli Polimerik Sistemlerin Kanda MN Oluşumuna Etkisi

Bu çalışmada anyonik bir PE olan PAA'nın iki farklı molekül ağırlığındaki (Mw:5.000, PAA-5, PAA-100, 100.000,) homopolimerle, P(AA/VP) kopolimeri (75:25, Mw: 80.000), PVP (Mw: 50.000, PVP-50) ile PAA-100'ün Cu^{2+} iyonu ve BSA ile oluşturduğu ikili ve üçlü kompleksler ile monomer modeli olarak propiyonik asit kullanılmıştır.

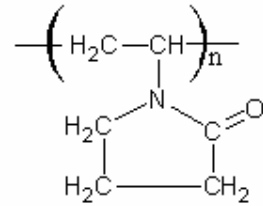
Propiyonik asit (PPA)



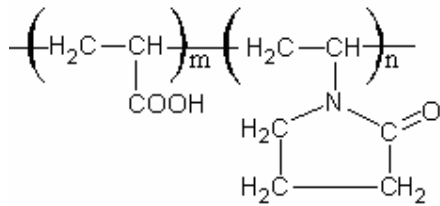
Poliakrilik asit (PAA)



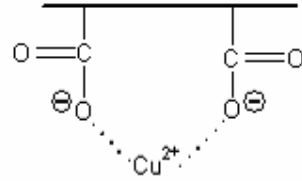
Polivinilrolidon (PVP)



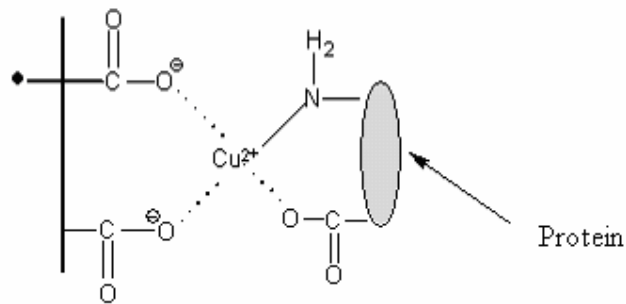
Akrilik asit vinilpirolidon kopolimeri (AA/VP)



İkili kompleks (PAA- Cu^{2+})



Üçlü kompleks (PAA- Cu^{2+} -BSA)



Kimyasal çalışmalar öncelikli olarak yapıldığından bu çalışmalarda PAA-100 ve P(AA/VP) kopolimerinin iki değerli Cu^{2+} iyonları ve ile aynı PAA'nın ek olarak BSA ile oluşturduğu ikili ve üçlü komplekslerin oluşumu, radyasyon etkisi ile komplekslerde meydana gelen değişimler çeşitli yöntemlerle (UV-VIS, FT-IR, viskozimetrik, elementel analiz, AAS) incelenmiştir. Biyolojik çalışmalarda ise hücreye olan etki mekanizmalarını aydınlatmak amacı ile ilave madde grupları da denenmiştir. Yukarıda adı geçen maddelerin tümü biyolojik çalışmalarda kullanılmıştır. İki farklı sitogenetik yöntem kullanılarak (MN ve CA analizi) yapılan çalışmalarda yukarıda adı geçen tüm maddelerin varlığında ve yokluğunda, insan periferel kan lenfositleri üzerine radyasyonun etkisi araştırılmıştır. Çalışmanın ağırlık noktası adı geçen maddelerin biyolojik sistemlerdeki davranışının belirlenmesi, hücre ile etkileşim mekanizmalarının aydınlatılması ve radyoprotektif etkisinin araştırılması amacıyla sitogenetik çalışmalar üzerinde yoğunlaşmıştır.

Başlangıçta iki farklı radyasyon dozu (1, 3 Gy) uygulaması planlanmış. Bu uygulama ilk olarak PAA-100'e yapılmış, ancak elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde radyoprotektif etki sadece 1 Gy'lik doz uygulamasında görülmüş ve daha sonraki çalışmalar sadece 1 Gy'lik ışınlamalar ile uygulanmıştır.

Bu çalışmalar sırası ile aşağıda verilmiştir;

1- Kan örnekleri çeşitli konsantrasyondaki PAA-5, PAA-100, PVP-50, AA/VP (75:25) kopolimeri ve PPA ile farklı mol oranlarındaki ($n_{\text{Cu}^{2+}}/n_{\text{AA}}$) PAA- Cu^{2+} , PAA- Cu^{2+} -BSA çözeltileri ile muamele edilerek periferel kan lenfositleri üzerinde oluşturdukları etkiler MN analiz yöntemi ile incelendi,

2- Aynı kan örnekleri bahsedilen maddelerle muamele edildikten sonra 1 Gy'lik ışınlama dozunda ışınlanarak periferel kan lenfositleri üzerinde oluşturdukları etkiler hem MN hem de CA analiz yöntemi ile incelendi. PAA-100'e ait optimum radyoprotektif etki aralığı belirlendi,

3- Kanın madde ile etkileşim süresinin radyoprotektif etkiyi değiştirebileceği düşüncesi ile ışınlama öncesinde iki farklı etkileşim süresi (1 ve 24 saat) uygulanarak MN ve CA değişimleri kıyaslandı.

Çizelge 7.1 Çalışmada kullanılan maddelerin MN oranlarını karşılaştırma tablosu.

Maddeler		A/B
PPA		7.5
PAA-5.000		3
PAA-100		1.46
P(AA/VP) Kopolimeri (75:25, Mw: 80.000)		1.44
PVP-50		1
PAA-Cu ²⁺ , n _{Cu2+} /n _{AA}	1/50	1
	1/20	1.17
PAA-Cu ²⁺ -BSA, n _{Cu2+} /n _{AA}	1/50	1.01
	1/20	1.06

c: 0.35 µg/5 ml kan

A: Maddenin kanda oluşturduğu MN

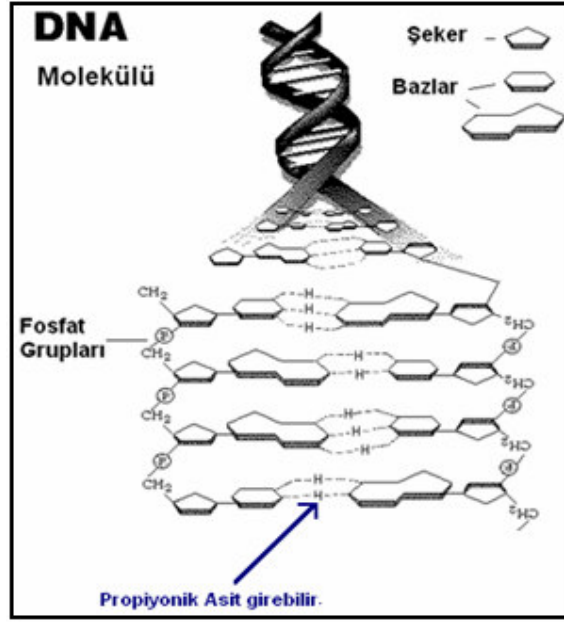
B: Kullanılan kanın oluşturduğu MN (Kontrol)

n_{BSA}/n_{AA}: 1

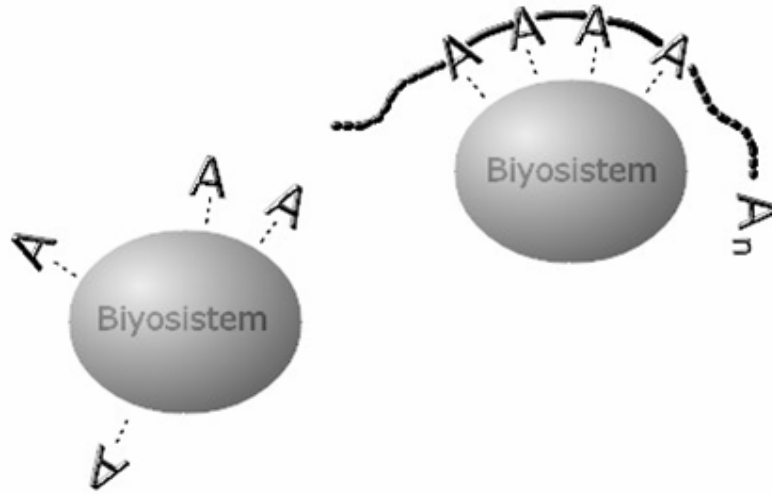
Çizelge 7.1’de çalışmada kullanılan tüm maddelerin tek bir konsantrasyon değerinde kanda oluşturdukları MN değerleri verilmiştir.

Çizelge 7.1’de görüldüğü gibi alınan sonuçları iki gruba ayırdığımızda 1. grupta kontrol seviyesinde alınan sonuçlar, 2. grupta kontrolden fazla olan sonuçlar.

Monomer PPA en yüksek seviyede MN oluşturmuştur. PAA-5 ise PAA-100’e göre yaklaşık 3 kat fazla MN oluşturmaktadır. Monomerik asit ve oligomerik asit yapısının hücrenin içine kolaylıkla girerek (Şekil 7.1) kromozomlarda kimyasal olarak uygun bölgelerde reaksiyon oluşturarak hasar meydana getirdiği düşünülmektedir. Diğer sistemlerin etkileşim mekanizmasının kooperatif bağlanma yeteneğinden dolayı böyle tahripler göstermediği düşünülmektedir.



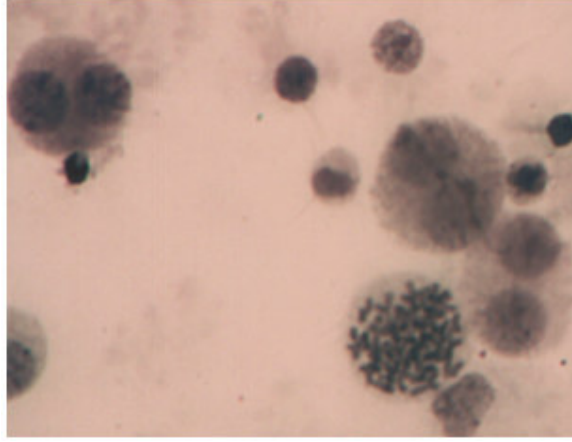
Şekil 7.1 Bazların bir arada tutunmasını sağlayan H-bağları bölgesinden propiyonik asitin girebileceğini gösteren şekil.



Şekil 7.2 Biyosistemlerde kooperatif bağlanmayı gösteren şekil.

Küçük molekül ağırlığına sahip PPA ile büyük molekül ağırlığına sahip PAA' nın kromatinle etkileşiminde önemli farklılıklar söz konusu olabilir. PPA, DNA' da varolan hidrojen bağlarını oluşturan nükleotidlerle rekabet içerisine girerek etkisini gösterirken, pH:7'de (-) yüklü olan PAA' nın etkisini kromozom yapısında yer alan pozitif (+) yüklü proteinlerle interpolimer kompleks oluşturarak gösterdiği düşünülebilir.

Bu tür etkileşimler kromatin ve/veya DNA yapısında bir takım değişiklikler oluşturarak hücrenin bölünmesi sırasında MN olarak tanımlanan bozuk yapılar meydana getirirler. Mw'si küçük olan PPA'nın doğrudan DNA ile etkileşime girmesi ve ikili sarmal yapısını destabilize ve kimyasal olarak modifiye etmesi ise bu monomerik asidin Mw'si büyük olan PAA' ya kıyasla çok daha fazla hasar oluşturmaya neden olduğunu varsayabiliriz.



Şekil 7.3 Hasar gözlenmeyen binükleat hücreler.

7.2 Polimerik Sistemlerin Radyasyon Varlığında MN ve CA Oluşumuna Etkisi

Kan örnekleri yukarıda verilen maddelerin çeşitli konsantrasyonlarında hazırlanan çözeltiler ile muamele edildikten sonra 1 Gy radyasyon dozunda ışınıldıktan sonra MN ve CA analizi için kültüre alınmıştır. Elde edilen sonuçlar tek bir konsantrasyon değerinde birleştirilerek Çizelge 7.2’de MN sonuçları olarak Çizelge 7.3’de ise CA sonuçları olarak verilmiştir.

Çizelge 7.2 Çalışmada kullanılan maddelerin 1 Gy’de MN oranlarını karşılaştırma tablosu.

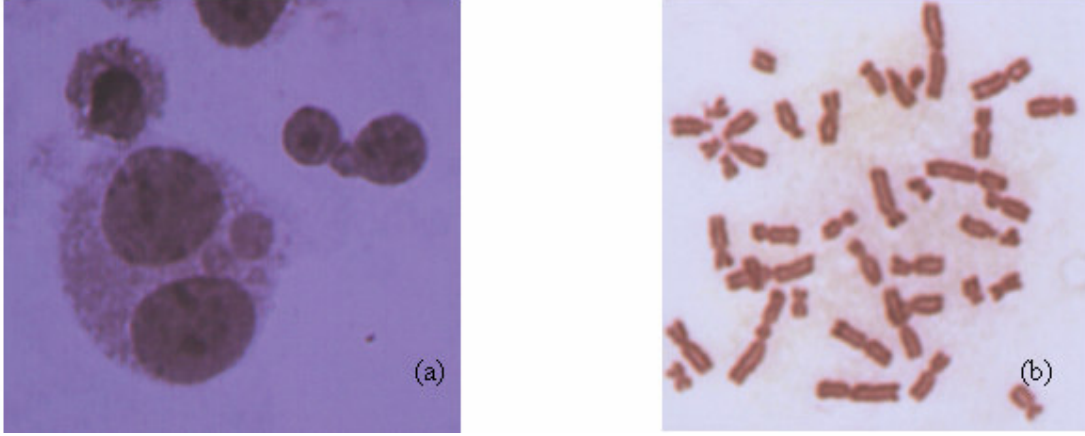
Maddeler		C/D
PPA		-
PAA-5.000		2.1
PAA-100		0.75
P(AA/VP) Kopolimeri (75:25, Mw: 80.000)		1.60
PVP-50		0.7
PAA-Cu ²⁺ , n _{Cu2+} /n _{AA}	1/50	2.18
	1/20	1.30
PAA-Cu ²⁺ -BSA, n _{Cu2+} /n _{AA}	1/50	1.37
	1/20	1.73

c: 0.35 µg/5 ml kan

C: Maddenin 1 Gy’de kanda oluşturduğu MN

D: Kullanılan kanın 1 Gy’de oluşturduğu MN (Kontrol)

n_{BSA}/n_{AA}: 1



Şekil 7.4 Hasarlı binükleat (a) ve metafaz hücreleri (b) görüntüleri.

Çizelge 7.3 Çalışmada kullanılan maddelerin 1 Gy'de CA oranlarını karşılaştırma tablosu.

Maddeler		C/D
PPA(Propiyonik Asit)		-
PAA-5.000(Poliakrilik asit)		1.09
PAA-100 .000		*0.70
AA/VP Kopolimeri (75:25, akrilik asit vinilpirolidon)		-
PVP-50(Polivinil pirolidon)		1.02
PAA-Cu ²⁺ , n _{Cu2+} /n _{AA}	1/50	0.76
	1/20	1.42
PAA-Cu ²⁺ -BSA, n _{Cu2+} /n _{AA}	1/50	0.72
	1/20	0.76

c: 0.35 µg/5 ml kan

C: Maddenin 1 Gy'de kanda oluşturduğu CA

D: Kullanılan kanın 1 Gy'de oluşturduğu CA (Kontrol)

n_{BSA}/n_{AA}: 1, * : 0.75 µg/5 ml kan

Işınlamada alınan sonuçlar biraz farklılıklar göstermiştir. Kanın polimerik sistemle etkileşimi sonrasında ışınladığımızda ışınlanmamış sisteme göre daha farklı sonuçlar alınmıştır. Öyle ki Mw:100.000 ve Mw:50.000 olan yapılar kontrole göre daha az MN oluşumu göstermişlerdir. Benzer sonuçlar sadece PAA-100 için CA sonuçlarında da görülmektedir. PAA-Cu²⁺ ve PAA-Cu²⁺-BSA sistemlerinde $n_{Cu^{2+}}/n_{AA}$: 1/20 mol oranındaki kompleksler radyasyon etkisi ile kontrole göre daha fazla hasar oluşturmuştur, bunun nedeni artan Cu²⁺ miktarıdır.

Yapılan bu çalışmada ilk kez Mw: 100.000 olan PAA'nın belirli bir konsantrasyon aralığında lenfosit hücrelerini radyasyon hasarına karşı koruma özelliği gösterdiği belirlenmiştir ve bu etkinin mekanizması kooperatif etkileşim yeteneğinden ortaya çıktığı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Anwar, W.A. (1994) Assessment of Cytogenetic Changes in Human Populations at Risk in Egypt. *Mutation Research*, 313: 183-191.
- Bacq, Z. M. ve Alexander, P. (1966), *Fundamentals of Radiation Biology*, Pergamon Pres, New York.
- Bacq, Z. M. (1965), *Chemical Protection Against Ionizing Radiation*, Springfield, U.S.A.
- Bakir, M. A., Alya, G., Mohammad, A., Azroony, R. ve Kasies, F., (2004), "Radio-Protective Effects of Selenium in Rats", *J. Radioanal. Nuc. Chem.*, 266, 2: 165-170.
- Bassett, J. (1978), *Vogel's Textbook of Quantitative Inorganic Analysis*, Longman, London and New York.
- Bayülgen, S., Yüce, G., Erkol, A. Y., Mustafaeva, Z. ve Mustafaev, M., (2004), "Effect of Copper Ions on the Stability of Protein-Polyelectrolyte Mixture", *J. Radioanal. Nuc. Chem.*, 259, 2: 315-319.
- Broams, R., (1967), "Rate Constants of Hydrated Electron Reactions with Peptides and Proteins", *Radiat. Res.*, 31, 8-26.
- Carrano, A.V. ve Natarajan, A.T., (1987), "Considerations for Population Monitoring using Cytogenetic Techniques", *Mutation Research*, MTR04381: 1-28.
- ÇNAEM Teknik Rapor 32, (1986), "Tıp ve Biyolojik Bilimlerde Radyasyon Korunması", İstanbul.
- Coggle, J. E. (1977), *Biological Effect of Radiation*, Wykham Publ. Ltd., London.
- Copeland, E. S., (1978), "Mechanisms of Radioprotection-A Review", *Photochemistry and Photobiology*, 28: 839-844.
- Countryman, P.I. ve Heddle, J.A., (1976), "The Production of Micronuclei from Chromosome Aberrations in Irradiated Cultures of Human Lymphocytes", *Mutation Research*, 41: 321-332.
- International Atomic Energy Agency Technical Reports Series No:405, (2001), "Cytogenetic Analysis for Radiation Dose Assessment", Vienna.
- Dertinger, H. ve Junk, H. (1970), *Molecular Radiation Biology*, Springer-verlag, Haidelerg, Berlin.
- Dolabela, M. F., Pereira, M. T., Salas C. E., Steffani, G. M., Nelson, D. . L., Veleso, P., ve Lopes, M. T., (1998), "The Radioprotective Effect of a New Aminothioliol (20-PRA)", *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 31: 1095-1098.

- Draganic, I. G., ve Draganic, Z. D. (1971), *The Radiation Chemistry of Water*, Academic Pres, New York.
- Evans, H.J., (1988), "Mutation Cytogenetics: Past, Present and Future", *Mutation Research*, 204: 355-363.
- Fenech, M. ve Morley, A.A., (1985), "Measurement of Micronuclei in Lymphocytes", *Mutation Research*, 147: 29-36.
- Giambarressi, L. ve Jacobs, J. A. (1987), *Radioprotectans*, Academic Press, Orlando.
- Hara, M. (1993), *Polyelectrolytes Science and Tecnology*, Marcel Dekker, Inc.
- Harland, R. S., ve Prud'homme, R. K., (1992), "Polyelectrolyte Gel Properties, Preparation and Applications", *American Chemical Society (ACS) Symposium 480 Series*, Washington.
- Heddle, J.A. ve Carrano, A.V., (1977), "The DNA Content of Micronuclei Induced in Mouse Bone Marrow by γ -Irradiation: Evidence that Micronuclei Arise from Acentric Chromosomal Fragments", *Mutation Research*, 44: 63-69.
- Heddle, J.A., Hite, M. ve Kirkhart, B., (1983), "The Induction of Micronuclei as Measure of Genetoxicity. A Report of the U.S. Environmental Protection Agency", *Mutation Research*, 123: 61-118.
- Hilgers, L. A. Th., Nicolas, I., Lejeune, G., Dewil, E. ve Strebelle, M., (1998), "Alkyl-Esters of Polyacrylic Acid as Vaccine Adjuvants", *Vaccine*, 16: 1575-1581.
- Ichimura, T., Otake, T., Mori, H. ve Maruyama, S., (1999), "HIV-1 Protease Inhibition and Anti-HIV Effect of Natural and Synthetic Water-Soluble Lignin-Like Substances", *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 63: 2202-2204.
- Kabanov, V. A., Zezin, A. B., Mustafaev, M. I., ve Kasain, V. A. (1980), *Soluble Interpolymer Complexes of Polyamines and Polyammonium Salts*, New York.
- Kabanov, V.,(1986), "Synthetic Membrane Active Polyelectrolytes in Design of Artificial Immunogens and Vaccines", *Macromol. Chem., Macromol. Symp.*
- Kabanov, V.,(2004) "From Synthetic Polyelectrolytes to Polymer-Subunit Vaccines", *Pure Appl. Chem.*, 76: 1659-1677.
- Kanokporn, R. N., Montree, T. ve Elbert, W. B., (2005), "Protective Effect of Apigenin on Radiation-Induced Chromosomal Damage in Human Lymphocytes", *Mutation Research*, 585: 96-104.
- Kendrich, M. J., May, M. T., Philshica M. J. ve Dobinson, K. D. (1972), *Metal in Biological Systems*, Ellis Harwood, New York.

Klauser, R. J., Schmer, G., Chandler, W. L. ve Muller, W., (1990), "Consumption of Complement and Activation of Human Neutrophils by an Artificial Immun Complex: Polyacrylic Acid-IgG-Polymer", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1052: 408-415.

Kljajic, R. R., Breyer, B., Horsic, E. ve Milosevic, Z., (1986), "Dosimetry of Radiation During Homogenous Experimental Irradiation of Animals", *Acta Physica Hungarica*, 59: 111-115.

Kljajic, R. R., Masic, Z. S., Petrovic, B. ve Ciganovic P., (1996), "Manifestation of Radiation Syndrome in Pigs", 9th Int. Cong. of the International Radiation Protection Association (IRPA9), Vienna, Austria.

Kljajic, R. R. ve Masic, Z. S. (1998), *Application of Radioprotectors in Radiation Protection*, Scientific Veterinary Institute, Yugoslavia.

Knoll, G. F. (1979), *Radiation Detection and Measurement*, New York.

Köksal, G., Dalcı, D. O. ve Pala, F. S., (1996), "Micronuclei in Human Lymphocytes: the Co-60 Gamma-Ray Dose-Response", *Mutation Research*, 359: 151-157.

Köteles, G.J. ve Bojtor, I., (1995), "Radiation-Induced Micronucleus Frequency Alterations in Lymphocytes from Individuals of an Urban Population", *Cent. European J. Occup. Environmental Medicine*, 1/3: 187-198.

Loa, D. E. (1946), *Action of Radiation of Living Cells*, Cambridge University Press.

Lauwerys, R.R., Bernard, A. ve Roels, H., (1992), "Health Risk Assesment of Long Term Exposure to Chemicals: Application to Cadmium and Manganese", *Arch. Toxicol Suppl.*, 15: 97-102.

Maisin, J. R., (1989), "Chemical Protection Against Ionizing Radiation", *Advances in Space Research*, 9: 205-212.

Maisin, J. R., (1998), "Chemical Radioprotection: Past, Present and Future Prospects", *Int. J. Radiat. Biol.*, 73: 443-450.

Manko, B. M., Sokolava, E. A., Gajiev, P. J. ve Mustafaev, M. I., (1991), "THA Role of Two Types of Supramolecular Structure of Polyelectrolyte Complexes in Their Immunomodulating Activity", *Immunologiya*, 1: 75.

Michaels, A.S. (1969), *Polyelectrolyte Complexes*, *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*, 10: 765-780.

Milas, L., Hunter, B., Reid, B O., ve Thames H. D., (1982), "Protective Effect of S-2-(3-aminopropylamino)-ethylphosphorothioic acid Against Radiation Damage of Normal Tissues and a Fibrosarcoma in Mice", *Cancer Research*, 42: 1888-1897.

- Moorhead, P. S., Nowell, P. C. ve Hungerford, C., (1960), "Chromosome Preparations of Leukocytes Cultured from Human Peripheral Blood", *Experimental Cell Research*, 20: 613-616.
- Mustafaev, M. ve Kabanov, V. A., (1979), "A Water-Soluble Ternary Poly-4- Vinylpyridine-Bovine Serum Albumin-Cu²⁺ Complex", *Vysokomolekulyarniye Soyedineniya High Molecular Weight Compounds*, 23A: 275-2271.
- Mustafaev, M. ve Norimov, A. S., (1990), "Immunogenicity and Protective Activity of Protein Antigenic Water-Soluble Polymer-Metal Complexes", *Biomedical Science*, 1: 274-278.
- Mustafaev, M., Norimov, A. S. ve Petrov, R. V., (1992), *Synthetic Immunomodulators*, Nauka, Moskova.
- Mustafaev, M. (1996), *Biyopolimerler*, TUBITAK-Marmara Araştırma Merkezi, Gebze.
- Mustafaev, M., Çırakoğlu, B., Saraç, S., Öztürk, S., Yücel, F. ve Bermek, E., (1996a), "Soluble and Insoluble Ternary Complexes of Serum Proteins with Polyanions in the Presence of Cu²⁺ in Water", *J. Appl. Polymer Sci.*, 62: 99-109.
- Mustafaev, M., Saraç, S., Erkol, A. Y., Bayülken, S., Dinçer, B. ve Sezer, E., (1996b), "Effects of Cu²⁺ on Stability and Composition of Water Soluble Ternary Polyacrylic Acid-Cu-Protein Complexes Against Radiation Damage", *Polymer Bulletin*, 36: 623-627.
- Mustafaev, M., Yücel, F.Ş., Öztürk, S., Çırakoğlu, B. ve Bermek, E., (1996c), "Cu²⁺-Mediated Complex Formation between Polyacrylic Acid (PAA) and Bovine Serum Albumin Systems", *Journal of Immunological Methods*, 197: 31-37.
- Mustafaev, M., Bayülken, S., Ergen, E., Erkol, A. Y. ve Ardagil, N., (2001), "Radiation-Induced Formation of Polyacrylic Acid-Protein Covalent Conjugates", *Radiation Physics and Chemistry*, 60: 567-575.
- Osada, Y. ve Saito, Y., (1975), "Macromolecules", *Macromol. Chem.*, 176: 2761.
- Ottenbrite, R. M. ve Regelson, W., (1977), *Water Soluble Polymers*, *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*, 111-128.
- Özalpan, A. (1980), *Radyobioloji*, İstanbul Üniversitesi Yayınları, 2739, İstanbul.
- Özban, N. (1982), *Hücre*, İstanbul Üniversitesi Yayınları, 2995, İstanbul.
- Petkau, A. ve Chuaqui, C. A., (1977), "Superoxide Dismutase as a Radioprotector", *Radiation Physics and Chemistry*, 24: 307-319.
- Petrov, R. W. ve Mustafaev, M. (1992), *Narimow A. Physica Chem. Criteria for the Construction of Artificial Immunomodulators and Immunogens on THA Basis of Polyelectrolyte Complexes*, Harwood Acad. Publ. GmbH, London.

- Pincu, M., Bass, D. ve Norman, A., (1984), "An Improved Micronuclear Assay in Lymphocytes", *Mutation Research*, 139: 61-65.
- Pizzarello, D. J., ve Colombetti, L. G. (1960), *Radiation Biology*, CRC Pres., Inc., Florida.
- Prasad, K. N. (1995), *Handbook of Radiobiology*, CRC Pres., London.
- Prosser, J.S., (1988), "Micronuclei Origins: Applications and Methodologies", Report of an HSE Sponsored Workshop Held at ICI Aderley, London.
- Salvadori, D. M. F., Riberio, L., Xiao, Y., Boei, J. ve Natarajan, A. T., (1996), "Radioprotection of β -Carotene Evaluated on Mouse Somatic and Germ Cells", *Mutation Research*, 356: 163-170.
- Sato, H., Meada, M. ve Nakaj, M. A. A., (1979), "Polyelectrolyt", *J. Appl. Polym. Sci.*, 23: 1759.
- Shumacher, C., Paul, K., Robbe, Y., Sıcart, M. T. ve Chanal, J. L., (1997), "Mice's Rectum Radioprotection: Comparative Efficacy of a Series of Aminohiols and Aminothioliol Precursors", *IL Farmaco*, 52: 1-3.
- Şengün, A., Bölükbaşı, E., Üçer, E. ve Anıl, D., (1974), "Radioprotective and Metabolic Effects of AET on Rat Embryonic Cells in Culture", ÇNAEM-R-127.
- Thierens, H., (1991), "Biological Dosimetry using the Micronucleus Assay for Lymphocytes: Interindividual Differences in Dose Response", *Health Physics*, 61, 5: 623-630.
- Tubiana, M., Dutreix, J., ve Wambersie, A. (1990), *Introduction to Radiobiology*, Taylor and Francis, New York.
- Urbanski, J., Czenwinski, W., Janicka, K., Majewska, F. ve Zowall, H. (1997), *Handbook of Analysis of Synthetic Polymers and Plastics*, Halsted Pres., NewYork.
- Uelzmann, H., (1958), "Copolymers of Acrylic Acid and N-Vinylpyrrolidone-2", *Journal of Polymer Science*, 33: 377-379.
- Yülek, G. G. (1992), *Radyasyon Fiziği ve Radyasyondan Korunma*, SEK Yayınları, Ankara.
- Weiss, J. F. ve Landauer, M., (2000), "Radioprotection by Antioksidantsa", *Reactive Oxygen Species: From Radiation to Molecular Biology Annals of the New York Academy of Science*, 899: 44-60.

ÖZGEÇMİŞ

Doğum Tarihi	02.06.1968	
Doğum Yeri	Gölcük/İzmit	
Lise	1983-1985	Küçükçekmece Lisesi
Lisans	1987-1991	Yıldız Teknik Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü
Yüksek Lisans	1991-1994	Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Organik Kimya Programı
Doktora	2000-	Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Programı

Çalıştığı Kurumlar

1993-2001	Yıldız Teknik Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü, Biyokimya A.B.D.	Araştırma Görevlisi
2001-2005	Çekmece Nükleer Araştırma Merkezi Kimya Bölümü	Yük. Kimyager
2005-	Çekmece Nükleer Araştırma Merkezi Radyobiyojoloji Bölümü	Yük. Kimyager