

**YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

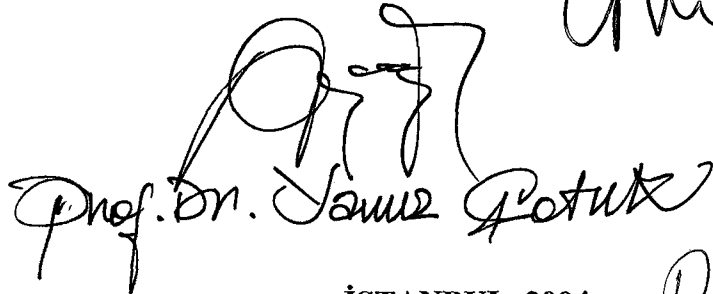
**POLİAKRİLİK ASİT (PAA) VE PAA-Cu²⁺ İKİLİ
KOMPLEKSLERİ VARLIĞINDA RADYASYONUN
LENFOSİT HÜCRELERE ETKİSİNİN MİKRONÜKLEUS
(MN) ANALİZ YÖNTEMİ İLE İNCELENMESİ**

Kimyager Kadriye ATICI


FBE Kimya Ana Bilim Dalı Biyokimya Programında
Hazırlanan

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Mehmet Mustafa AKDESTE


Prof. Dr. Samir Potur

İSTANBUL, 2004


Prof. Dr. Hüseyin Kuzu

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
KISALTMA LİSTESİ.....	v
ŞEKİL LİSTESİ.....	vi
ÇİZELGE LİSTESİ.....	viii
ÖNSÖZ.....	ix
ÖZET.....	x
ABSTRACT.....	xi
1. GİRİŞ	1
2. TEORİK KISIM	3
2.1 Radyasyon ve İyonize Edici Türleri.....	3
2.2 Radyasyon Enerjisinin Transferi.....	4
2.3 Radyasyon Hasarına Karşı Koruma Mekanizması ve Uygulamaları.....	5
2.3.1 Moleküler Seviyede Koruma.....	5
2.3.2 Biyokimyasal-fizyolojik Seviyede Koruma.....	6
2.3.3 Organik Seviye.....	6
2.4 Polielektrolitler.....	11
2.4.1 Doğal Polielektrolit Kompleksleri.....	14
2.4.2 Yapay Polielektrolit Kompleksleri.....	15
2.5 Polimer-Metal Kompleksleri.....	15
2.6 Geçiş Metal İyonları İlavesiyle Oluşan Üçlü Polimer-Protein Kompleksleri.....	19
2.6.1 Asit ortamında kompleksleşme.....	19
2.6.2 Nötral su ortamında kompleksleşme.....	20
2.7 PE Komplekslerin İmmünolojik Aktivitesi.....	22
2.8 PAA ile Yapılan Bazı Çalışmalar.....	24
3. BİYOLOJİK DOZİMETRE.....	28
3.1 İnsan Lenfosit Hücreleri.....	29
3.2 Ökaryotik Hücrelerde Mitoz Bölünme.....	30
3.3 Radyasyonun DNA üzerine etkisi.....	32
3.4 Mikronükleus Analiz Yönteminin Gelişimi ve Özellikleri.....	35
3.4.1 Sayım ve değerlendirmede binükleat (BN) hücrelerin seçim kriterleri.....	36
3.4.2 Mikronükleus sayımı için gerekli olan kriterler.....	37
3.5 Mikronükleus Tekniğinin Avantajları.....	39
3.6 Mikronükleus Tekniğinin Dezavantajları.....	39

4.	DENEYSEL KISIM.....	41
4.1	Kullanılan Cihazlar ve Kimyasal Maddeler.....	41
4.1.1	Kullanılan Cihazlar.....	41
4.1.2	Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	42
4.2	Poliakrilik asit-Cu ²⁺ Komplekslerinin Absorbanslarının İncelenmesi.....	43
4.2.1	Kullanılan Çözeltiler.....	43
4.2.2	Deneyin Yapılışı.....	43
4.3	AAS Analizi.....	44
4.3.1	Kullanılan Çözeltiler.....	44
4.3.2	Deneyin Yapılışı.....	44
4.4	PAA ve PAA-Cu ²⁺ İkili Kompleksleri Varlığında ⁶⁰ Co γ Kaynağı ile Farklı Dozlarda Işınlanmış ve Işınlanmamış Kan Örneklerindeki Lenfosit Hücrelerde Mikronükleus Değişiminin İncelenmesi.....	46
4.4.1	Kullanılan Çözeltiler.....	46
4.4.2	Deneyin Yapılışı.....	48
4.4.2.1	Kan Örneklerinin Elde Edilmesi.....	48
4.4.2.2	PAA ve PAA-Cu ²⁺ İkili Kompleks Çözeltilerinin Kan Örnekleri ile Muamele Edilmesi.....	48
4.4.2.3	Kan Örneklerinin PAA ve PAA-Cu ²⁺ İkili Kompleksleri Varlığında Işınlanması.....	49
4.4.2.4	Hücrelerin Kültüre Alınması.....	49
4.4.2.5	Hücrelerin Fikse (Tesbit) Edilmesi.....	51
4.4.2.6	Mikronükleus Analiz Yönteminin Değerlendirilmesi.....	53
5.	DENEYSEL SONUÇLAR.....	55
5.1	UV / VIS Ölçüm Sonuçları.....	55
5.2	AAS Analiz Sonuçları.....	57
5.3	Mikronükleus Analiz Yöntemi ile Elde Edilen Deneysel Sonuçlar.....	58
5.3.1	Propiyonik Asit (PPA) Konsantrasyonuna Bağlı MN Değişimi.....	58
5.3.2	Farklı Konsantrasyonlarda Kan İle Muamele Edilen Poliakrilik Asit İçin Yapılan Hesaplar.....	59
5.3.3	Poliakrilik Asit (PAA) Konsantrasyonuna Bağlı MN Değişimi.....	60
5.3.4	PAA Varlığında 1 Gy Dozda Işınlanmış Kan Örneklerindeki MN Değişimi.....	61
5.3.5	PAA Varlığında 3 Gy Dozda Işınlanmış Kan Örneklerindeki MN Değişimi.....	62
5.3.6	PAA-Cu ²⁺ İkili Kompleksi İçin Yapılan Hesaplar.....	63
5.3.6.1	CuSO ₄ .5H ₂ O Kullanılarak Oluşturulan İkili Kompleks Hesapları.....	63
5.3.6.2	CuCl ₂ .2H ₂ O Kullanılarak Oluşturulan İkili Kompleks Hesapları.....	64
5.3.6.3	Cu ²⁺ İçin Toksikite Sınırları.....	65
5.3.7	*PAA-Cu ²⁺ İkili Kompleks Konsantrasyonu İle MN Değişimi.....	66
5.3.8	*PAA-Cu ²⁺ İkili Kompleks Varlığında 1 Gy Dozda Işınlanmış Kan Örneklerindeki MN Değişimi.....	68
5.3.9	*PAA-Cu ²⁺ İkili Kompleks Varlığında 3 Gy Dozda Işınlanmış Kan Örneklerindeki MN Değişimi.....	70

6.	SONUÇLAR VE TARTIŞMALAR.....	72
6.1	Polielektrolitlerin Kanda MN Oluşumuna Etkisi.....	72
6.2	Polielektrolitlerin Varlığında Radyasyonun MN Oluşumuna Etkisi.....	76
	KAYNAKLAR.....	82
	ÖZGEÇMİŞ.....	86



KISALTMA LİSTESİ

AAS	Atomik Absorbsiyon Spektrofotometre
BN	Binükleat
BSA	Bovin Serum Albumin
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksinükleik asit
DNP	Deoksiribonükleik proteitler
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
MN	Mikronükleus
NIPAAm	N-izopropilakrilamid
PAA	Poliakrilik asit
PAIGP	Poliakrilik asit-IgG kompleksi
PBS	Phosphate Buffer Saline
PE	Polielektrolit
PEO	Polietilen oksit
PHA	Phytohemaglutinin-A
PMAA	Polimetakrilik asit
PPA	Propiyonik asit
PVP	Polivinilpirolidon
RNA	Ribonükleik asit
RNP	Ribonükleik proteitler
RT	Alıkonma Zamanı
SOD	Süperoksit dismutaz

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1	Radikallerin biyolojik hedef moleküle doğrudan ve dolaylı yoldan etkisi.....	3
Şekil 2.2	Işınlanmamış (A) ve farklı dozlarda ışınlanmış (B-D) PAA-BSA karışımları HPLC sonuçları.....	8
Şekil 2.3	Radyasyonun Cu^{2+} içeren polielektrolit sistemleri üzerine etkisi.....	9
Şekil 2.4	(A) Farklı dozlarda ışınlanmış ve ışınlanmamış (1) PAA- Cu^{2+} -BSA karışımları HPLC sonuçları.....	9
Şekil 2.5	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.....	10
Şekil 2.6	PE çözeltilisinin Strauss-Ander Modeli.....	11
Şekil 2.7	Bazı PE ve PE kompleks örnekleri.....	12
Şekil 2.8	Esnek (oynak) zincir moleküllerinden ve düşük konsantrasyonlarda eklenen uni-univalent elektrolitlerden oluşmuş polimerik asit tuzunun sulandırılmış çözeltilisinin iyon dağılımının şematik olarak gösterimi.....	13
Şekil 2.9	Suda çözünen PE-YAM komplekslerinin çeşitli [YAM] / [PE] oranlarında oluşan yapısı.....	17
Şekil 2.10	Polimer-metal komplekslerinin [Me] / [PE] \ll 1 (I) ve [Me] / [PE] \geq 1 (II) oranlarında oluşan yapısı.....	17
Şekil 2.11	a) Üçlü PAA- Cu^{2+} -protein polikompleksinin yapısı, b) Cu^{2+} iyonu varlığında PAA ve proteinin fonksiyonel grupları arasında oluşan çelat yapısı.....	21
Şekil 2.12	PAA-Cu nanokompozitlerinin a) XRD ve b) TEM analizleri.....	25
Şekil 3.1	Hücre Siklusu.....	30
Şekil 3.2	Mitoz Bölünme.....	31
Şekil 3.3	DNA molekülünün temel yapı şeması.....	32
Şekil 3.4	Memeli Hücre siklusunun değişik fazlarının şematik görünümü.....	33
Şekil 3.5	Radyasyon etkisi ile DNA molekülünün tek veya çift ipliğinde oluşan kopmalar ve bu kopma yerlerinin yeniden bağlanma olasılıkları.....	33
Şekil 3.6	Sitokinez bloklü Mikronükleus (MN) analizinde binükleat (BN) hücreleri seçme kriterleri.....	36
Şekil 3.7	İn vitro koşullarda sitokinez-bloklü mikronükleus (MN) analizinde Binükleat (BN) hücrelerin dışında gözlenen çeşitli hücre tipleri.....	37
Şekil 3.8	Binükleat hücrelerde mikronükleusun tipik görüntüsü ve boyutu.....	38
Şekil 3.9	Mikronükleus olmayan fakat mikronükleusa benzer yapılar içeren binükleat hücreler (veya binükleat benzeri hücreler).....	38
Şekil 3.10	Sitotoksik ve genotoksik ajanlar sonucu sitokinez-bloklü hücre kültüründe gerçekleşebilen çeşitli olasılıklar.....	39
Şekil 4.1	Ekim işleminin şematik olarak gösterimi.....	50
Şekil 4.2	Hücrelerin fikse edilmesinin şematik olarak gösterimi.....	52
Şekil 4.3	Mikronükleus içermeyen tipik binükleat (BN) hücreler.....	53
Şekil 4.4	Mikronükleus (MN) içeren binükleat (BN) hücreler.....	54
Şekil 6.1	Endositoz yöntemi ile hücre içine transfer olabilme.....	73
Şekil 6.2	Kromatin materyali ve DNA molekülü.....	74
Şekil 6.3	Bazların bir arada tutunmasını sağlayan H bağları bölgesinden propiyonik asitin girebileceğini gösteren şekil.....	75
Şekil 6.4	Ökaryotik Hücre.....	79

Şekil 6.5	Radyasyonun indirekt (a) ve direkt (b) etkisi sonucu karışık disülfid yapıların radikallerle reaksiyona girmesi.....	80
Şekil 6.6	Şematik olarak hücre yüzeyine polimer adhezyonu.....	81



ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge 5.1	PAA' nın CuSO_4 ile titrasyonu sonucu UV / VIS ile yapılan absorbans ölçüm değerleri.....	56
Çizelge 5.2	%0.1'lik PAA çözeltisine belirli miktarlarda $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ tuzu ilavesi sonucu değişen $n_{\text{Cu}}/n_{\text{PAA}}$ oranlarında absorbans değerlerinin 400 nm dalga boyunda ölçülmesi.....	55
Çizelge 5.3	PAA- Cu^{2+} ikili kompleksleri ile doğal kanın iki farklı şekilde karıştırılarak muamele edilmesi sonucu kanın alt ve üst fazlarında yapılan bakır tayini.....	57
Çizelge 5.4	PAA- Cu^{2+} ikili kompleksleri ile doğal kanın iki farklı şekilde karıştırılarak muamele edilmesi sonucu kanın alt ve üst fazı için AAS' de yapılan bakır tayini sonucu alınan değerler.....	57
Çizelge 5.5	Propiyonik asit konsantrasyonuna bağlı olarak MN değişim tablosu.....	58
Çizelge 5.6	Poliakrilik asit konsantrasyonuna bağlı olarak MN değişim tablosu.....	60
Çizelge 5.7	Farklı konsantrasyonlardaki Poliakrilik asit varlığında 1 Gy dozda ışınlanan kan örneklerindeki MN değişim tablosu.....	61
Çizelge 5.8	Farklı konsantrasyonlardaki poliakrilik asit varlığında 3 Gy dozda ışınlanan kan örneklerindeki MN değişim tablosu.....	62
Çizelge 5.9	Karaciğer dokusunda, idrarda ve serumdaki Cu^{2+} iyonu toksisite sınırları tablosu.....	65
Çizelge 5.10	$n_{\text{Cu}}/n_{\text{PAA}} = 1/50$ ve $n_{\text{Cu}}/n_{\text{PAA}} = 1/20$ olan PAA- Cu^{2+} ikili komplekslerinin kan ile muamelesi sonucu MN' lerde gerçekleşen değişimin tablosu, * $C_{\text{PAA}} = 0.35$ mg/ml.....	66
Çizelge 5.11	$n_{\text{Cu}}/n_{\text{PAA}} = 1/50$ ve $n_{\text{Cu}}/n_{\text{PAA}} = 1/20$ olan PAA- Cu^{2+} ikili kompleksleri varlığında 1 Gy dozda ışınlanan kan örneklerindeki MN değişim tablosu; * $C_{\text{PAA}} = 0.35$ mg/ml.....	68
Çizelge 5.12	$n_{\text{Cu}}/n_{\text{PAA}} = 1/50$ ve $n_{\text{Cu}}/n_{\text{PAA}} = 1/20$ olan PAA- Cu^{2+} ikili kompleksleri varlığında 3 Gy dozda ışınlanan kan örneklerindeki MN değişim tablosu; * $C_{\text{PAA}} = 0.35$ mg/ml.....	70
Çizelge 6.1	PAA varlığında 1 Gy dozda ışınlanmış ile ışınlanmamış MN değerleri arasındaki farkların gösterildiği fark tablosu.....	74
Çizelge 6.2	PAA varlığında 3 Gy dozda ışınlanmış ile ışınlanmamış MN değerleri arasındaki farkların gösterildiği fark tablosu.....	77
Çizelge 6.3	PAA- Cu^{2+} ikili kompleksleri varlığında 1 Gy dozda ışınlanmış ile ışınlanmamış MN değerleri arasındaki farkların gösterildiği fark tablosu.....	78
Çizelge 6.4	PAA- Cu^{2+} ikili kompleksleri varlığında 3 Gy dozda ışınlanmış ile ışınlanmamış MN değerleri arasındaki farkların gösterildiği fark tablosu.....	78

ÖNSÖZ

Öncelikle tez çalışmalarına yön veren, benden yardımlarını, desteklerini ve bilgisini esirgemeyen değerli hocam Sayın Prof. Dr. Mehmet Mustafaev Akdeste'ye,

Çekmece Nükleer Araştırma Merkezinin Kimya Bölümünde bana deneysel çalışmalarına olanak sağlayan Sayın Dr. Seval Bayülken'e,

Çekmece Nükleer Araştırma Merkezinin Radyo Biyoloji ve Kimya Laboratuvarında bana tüm çalışmalarında yardım eden, destek olan ve bilgisini esirgemeyen Sayın Günay Yüce'ye,

Çekmece Nükleer Araştırma Merkezinin Radyo Biyoloji Bölümünde bana deneysel çalışmalarına olanak sağlayan ve desteklerini esirgemeyen Sayın Dr. Deniz Dalcı, Sayın Dr. Güneş Dörter ve Sayın İnci Güçlü'ye

Ayrıca bana yüksek lisans öğrenimimde maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen sevgili anneme ve babama,

Sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

In vitro koşullarda doğal kanda PE' ler anyonik bir polielektrolit (PE) olan poliakrilik asit (PAA), bu polimerin monomerinin sentetik modeli gibi propiyonik asit (PPA) ve poliakrilik asidin Cu^{2+} iyonu ile oluşturduğu polimer-metal kompleksi varlığında Mikronükleus (MN) analiz yöntemi ile lenfosit hücrelere radyasyonun etkisi incelenmiştir.

Analizler sonucunda, in vitro koşullarda doğal kana propiyonik asit eklenmesi, doğal kan örneklerinde kromozomlarda kırılmalara neden olduğu gözlenmiştir. Ancak propiyonik asit yerine sisteme PAA eklenmesi konsantrasyona bağlı olarak çok değişik sonuçların ortaya çıkmasına neden olmuştur. Monomerden farklı olarak polimerik yapılı örnek varlığında, lenfositlerde daha az hasar oluşmakta ve PAA' nın artan konsantrasyonlarında lenfosit hücrelerini radyasyonun etkisinden koruma (radyoprotektif) özelliği göstermektedir.

PAA'nın Cu^{2+} iyonlarıyla kompleks oluşturulduğu durumda ise, aynı konsantrasyondaki ($C_{\text{PAA}} = 0.35 \text{ mg / ml}$) PAA' ya göre MN oluşumunun daha düşük olduğu saptanmıştır. Ayrıca bakırın miktarı arttıkça radyasyonun etkisiyle kromozomlarda oluşan kırıklardaki bu azalmanın devam ettiği belirlenmiştir.

Deney sonuçlarına dayanarak polimerik yapılı radyoprotektörlerin çalışma mekanizmasının polimer makromoleküllerinin hücre membran yüzeyi ile etkileşimi sonucu düzenlenebilmesi varsayılmaktadır.

Yapılan çalışma, yüksek etkili, düşük toksisiteye sahip, polimerik yapılı radyoprotektif bir maddenin geliştirilmesi yönünde bir çalışma olması nedeni ile güncel ve önemi olan bir çalışmadır.

Anahtar Kelimeler: Polielektrolit (PE), PAA, PAA- Cu^{2+} ikili kompleksi, ^{60}Co γ ışını, Mikronükleus (MN) Analiz Yöntemi

ABSTRACT

Under in vitro conditions, PEs in natural blood, an anionic polyelectrolyte, polyacrylic acid (PAA), propionic acid (PPA) as the synthetic model of this polymer, and under the existence of polymer-metal complex, which is formed by polyacrylic acid and Cu^{2+} ion, the effect of radiation on lymphocyte cells is observed by Micronucleus (MN) analysis method.

In the light of analysis, it is observed that the addition of propionic acid into natural blood yields chromosome aberration in natural blood samples. However the addition of PAA instead of propionic acid into system yielded different results according to concentration. In the existence of polymeric structured sample different than monomer, less damage on lymphocyte is observed, and at increasing concentrations, PAA acts as radioprotective on lymphocyte cells.

Where PAA forms complex Cu^{2+} ions, it is observed that MN formation is lower when compared with PAA in the same concentration ($C_{\text{PAA}} = 0.35 \text{ mg / ml}$). It is also determined that radiation's effect on the aberration of chromosomes is lowered as the amount of copper is increased.

According to experiment results, the interaction of polymer macromolecules' cell membrane surface with polymeric structured radioprotectors' mechanism is considered.

This study is up-to-date and important because it is about the development of a polymeric structured radioprotective substance with high impact and low toxicity.

Key Words: Polyelectrolyte (PE), PAA, PAA- Cu^{2+} binary complex, ^{60}Co γ beam, Micronucleus Analysis Method.

1-GİRİŞ

Hepimiz kaçınılmaz bir şekilde radyoaktif bir dünya içinde yaşıyoruz. Radyasyonlar, enerji üretiminden, askeri amaçlı kullanımlara, endüstriden, tıpta teşhis ve tedaviye, tarımsal araştırmalardan bilimsel çalışmalara kadar hemen her alanda kullanılmaktadır. Bunların sonucu olarak da doğal ve yapay radyasyonların etkisi altında bulunmaktayız.

Doğal radyasyon, insanların katkısı olmaksızın oluşan radyasyonlardır. Dış ve iç kaynaklı olabilirler. Dış kaynaklı olanlar kozmik radyasyon, yeryüzündeki kayalar ve toprakların yapısında bulunan radyoaktif elementlerin yaydığı radyasyonlardır. İç kaynaklı olan ise canlıların vücudunda doğal olarak bulunan potasyum-40 (K-40), karbon-14 (C-14), radyum-226 (Ra-226) gibi radyoaktif izotopların yaydığı radyasyondur. Bütün canlıların etkisi altında olduğu bu radyasyona çevre radyasyonu (back-ground radyasyonu) adı verilmektedir. Yapay Radyasyon ise, insan aktiviteleri sonucu çevreye ilave olan radyoaktif maddeler nedeniyle oluşur. Yapay radyasyonlar bugün endüstride, tarımda, tıpta, sterilizasyon ve gıda koruması gibi bir çok alanda kullanılmaktadır.

Radyasyonlar canlı madde içinden geçerken, etkisi farklı zamanlarda ortaya çıkabilecek bir çok fiziksel, kimyasal ve biyolojik olaylara neden olurlar. Canlı organizmaların temel yapısı hücrelerdir. Hücre çekirdeği içinde genetik bilgileri barındıran DNA, ışınlanmış hücrelerde ana hedeftir. Özellikle hücre bölünmesi sırasında hücre radyasyona karşı en duyarlı evrededir. Bunda mitoz bölünme ile çoğalma sırasında DNA'nın iki katına çıkması ve radyasyonlar için daha fazla ışınlanacak bölge oluşturmasının da payı olduğu kabul edilmektedir. DNA molekülü birbiri çevresinde spiral dönen iki iplikten oluşmuştur. Bu yapıyı bir merdivene benzetirsek, merdivenin kenarlarını fosfat ve şeker gruplarının oluşturduğu bir iskelet ve basamaklarını da birbirlerine hidrojen bağları ile bağlanmış bazlar oluşturur. Biyofiziksel düzeyde, radyasyon etkisi ile DNA'nın bazlarında çeşitli bozukluklar, şeker-fosfat bağlarında kopmalar ve bazların zincirden koparak serbest kalmaları gibi hasarlar oluşabilir.

Radyoprotektif bir madde varlığında dahil tek bir hücre üzerinde oluşan hasarın biyolojik etkileri incelendiğinde, canlı sistemde serbest radikal tabanlı ve diğer kimyasal reaksiyonların ekstrapolasyonunda zorluklar gözlenmektedir (Vaughan, 1991). İyonlaştırıcı radyasyona karşı kimyasal korumalarda kimyasalın tanımlanması, sınıflanması, koruma seviyesi, reaksiyonun

mekanizması ve oluşturduğu toksik etki gibi bazı problemlerle karşılaşılabilir (Maisin, 1989, 1998).

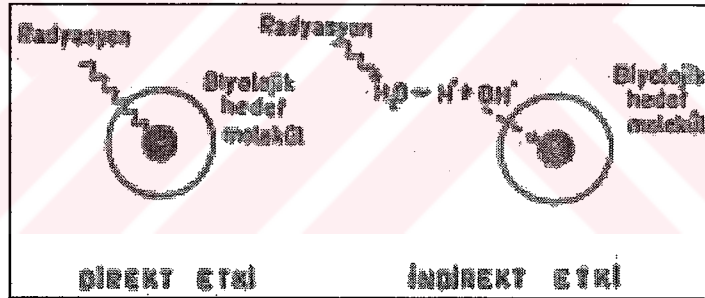
Son zamanlarda sentetik polimerler, biyomedikal malzeme olarak tıbbi ve biyolojik alanlarda yaygın bir kullanıma sahiptir. Özellikle suda çözünen sistemler (polimerler, polikompleksler ve diğer polimer modifikasyonları) fizyolojik aktif maddeler olarak kullanılmasının düşünülmesi, immünolojik açıdan büyük bir kazanç olarak görülmektedir. Bu amaçla fizikokimyasal yöntemler aracılığıyla bu sistemlerin yapısı hakkında geniş bilgi elde edebilmek için çalışmalar sürdürülmektedir. Anyonik yapıli polielektrolitlerin biyoyuymulluk ile ilgili çalışmalarda da ilgi çektiği görülmektedir. Yapılan bazı çalışmalarda, poliakrilik asitin (PAA) bir model polimer olarak immünolojide adjuvant gibi (organizmanın bağışıklığını arttırmak için antijenlerle birlikte organizmaya girebilen yardımcı kimyasal maddeler), tıbbi deneylerde antitrombojenik bir madde gibi (kanın dolaşımını engelleyen tortuların çözülmesi etkisi) ve ilaç salınım sistemlerinde taşıyıcı gibi kullanıldığı bilinmektedir.

Mevcut çalışmalarda, in-vitro koşullarda sentetik bir polielektrolit olan PAA ve Cu^{2+} komplekslerinin sudaki çözeltilerinin protein karışımlarında radyasyon etkisine maruz bırakıldıklarında, belli dozlara kadar gerek polimer gerekse de protein moleküllerinin bozunmadan direnç gösterdiklerini bildirmiştir. Bu çalışma, PAA ve komplekslerinin bir radyoprotektör olarak düşünülmesinden yola çıkılarak yapılmıştır. Bu çalışmamızda PAA ve PAA- Cu^{2+} komplekslerinin radyasyon varlığında ve yokluğunda in-vitro koşullar altında Mikronükleus (MN) oluşumu üzerine etkileri incelenmiş ve ilk kez PAA ve PAA- Cu^{2+} örneklerinin kan hücrelerini radyasyondan koruma özelliği taşıdığı gösterilmiştir. Biyopolimerlerin konsantrasyonunun, propiyonik asit model örneğinin ve reaksiyon koşullarının MN oluşumuna etkisinin incelenmesi elde edilen sonuçların değerlendirilmesini sağlamıştır.

2- TEORİK KISIM

2.1- Radyasyon ve İyonize Edici Türleri

Radyasyonun canlı üzerindeki etkisini doğrudan ve dolaylı etki olarak iki şekilde incelemek mümkündür. Doğrudan etki, bir canlıda radyasyon etkisi ile başlayan olayların, DNA molekülü veya bir enzim molekülü gibi özel bir biyolojik yapıyı etkilemesidir yani enerjinin doğrudan biyolojik bir moleküle transfer edilmesidir. Radyasyon, enerjisini içinden geçtiği ortamın moleküllerine transfer etmişse radyasyonun dolaylı etkisi söz konusu olur. Canlı maddelerin %70-90'ı su olduğu için en çok su moleküllerinin etkilenmesi ve bunun sonucunda vücut için oldukça zehirli olan hidroksil radikalleri (OH⁻) ve hidrojen radikallerinin (H[•]) oluşması beklenir. Bunların birbirleriyle ve biyolojik moleküllerle etkileşmeleri sonucunda yine çok zehirli hidrojen peroksit (H₂O₂) ve süperoksit anyonu oluşabilir.



Şekil 2.1 Radikallerin biyolojik hedef moleküle doğrudan ve dolaylı yoldan etkisi (Özalpan, 1979).

İyonlaştırıcı radyasyonların biyolojik sistemlerde oluşturduğu etkiler radyasyonun cinsine göre farklılık göstermektedir. İnsanların en çok karşılaşabilecekleri radyasyon tipleri:

Alfa (α) radyasyonu, ağır pozitif yüklü iki proton ve iki nötrondan oluşmuş paketler halindedirler. Uranyum, plutonyum, radyum, radon gibi ağır elementlerin atomlarından yayınlanırlar. Havada birkaç cm. den uzağa gidemeyen alfa radyasyonunu bir kağıt kalınlığı veya derinin en dışındaki ölü tabaka bile durdurabilir. Ancak alfa yayınlayan radyoaktif madde vücut içine alınırsa bütün enerjisini çok küçük bir alanda etrafındaki hücrelere boşaltır ve bu nedenle oldukça tahripkar olmaktadır.

Beta (β) radyasyonu, alfa parçacıklarından çok daha küçük olan elektronlardan oluşmuşlardır ve biraz daha derine gidebilirler. Bir metal tabakası, pencere camı ve sıradan giysilerle durdurulabilirler. Derinin sadece üst tabakasına girebilir ve yanıklara yol açabilirler, vücut içinde iç dokuları ışınlatabilirler.

Gama (γ) radyasyonu, elektromanyetik dalga enerjisidir. Havada ulaşabileceği mesafeler oldukça uzundur. Bir madde içine girdiğinde ortam molekülleri ile etkileşmelerde enerjisini gittikçe kaybetmeye başlar. Kurşun ve beton gibi yoğun maddeler bu ışınlarla karşı korunmada kullanılır.

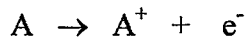
Nötron radyasyonu, nükleer güç elde edilirken oluşurlar, kendileri iyonlaştırıcı değildir. Ancak başka bir atomun çekirdeğine çarparak onu aktif hale getirebilirler ve gama ışınları yayınlanmasına neden olabilirler. Durdurmak için kalın beton, su veya parafin kullanılmaktadır [1].

2.2- Radyasyon Enerjisinin Transferi

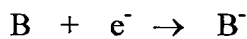
Radyobiyojoloji Bilimi, genel anlamda iyonlaştırıcı radyasyonlarla canlılar arasındaki etkileşimleri incelemektedir. Radyasyonun canlı üzerinde oluşturduğu etkiler incelendiğinde, birbirini izleyen dört etki kademesini sıralamak mümkündür:

a- Fiziksel kademe, enerji radyasyondan maddeye transfer edilir. Bu olay, radyasyonu absorblayan maddenin moleküllerinde uyarılma yada iyonlaşmaya yol açar.

İyonlaşma, bir atom veya molekülden bir elektronun kopmasıdır.



Olay sonunda A atomundan kopan serbest elektron (e^-), bir negatif iyondur ve diğer bir B atomu ile birleşerek onu negatif hale getirebilir.



A^+ ve B^- iyonlarına iyon çifti adı verilir. Ortaya çıkan yeni ürünler, genellikle oldukça instabil dirler ve çok kısa bir süre içinde sekonder iyonlaşma reaksiyon ürünlerinin oluşmasına yol açarlar.

b- Fiziko-kimyasal kademede gerçekleşen olaylar, ya tek reaksiyonlar sonucunda yada karmaşık zincirleme reaksiyonlar sonucunda ortaya çıkarlar.

c- Kimyasal kademede, önceki kademelerde reaksiyon sonunda ortaya çıkan reaktif ürünler (genellikle serbest atom yada radikaller), hem birbirleri ile hem de ortamdaki diğer moleküllerle reaksiyonlara girmeye devam ederler.

d- Biyolojik kademe boyunca canlıda meydana gelen olaylar, radyasyonun son olarak biyolojik etkisinin ortaya çıkmasına neden olur (Özalpan, 1979).

2.3- Radyasyon Hasarına Karşı Koruma Mekanizması ve Uygulamaları

Radyasyona karşı koruma üç (3) seviyede düşünülebilir (Kljajic ve Masic).

2.3.1- Moleküler Seviyede Koruma

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

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

2.3.2- Biyokimyasal-fizyolojik Seviyede Koruma

- Hipotermi
- Hipoksi
- Protein olmayan disulfitin kaybolması
- Biyokimyasal sok

Biyokimyasal-fizyolojik seviyedeki bu dört hipotez, radyasyon indüklü hasar ve ölümlere karşı organizmanın korunmasında gerekli olabilir. Bu da 'radyoprotektif ilaç' tarafından gerçekleştirilen korumalardan tek bir mekanizmanın sorumlu olamayacağı anlamına gelir. Bazı bileşikler esas olarak, kritik dokularda hipotermi veya hipoksi ile sonuçlanan fizyolojik etkilerin sağladığı yöntemlerle işlemektedir. Diğerleri ise esas olarak, hedef molekülün radyasyona karşı gösterdiği hassasiyetini etkileyerek yani, lokal radikal tutuculara neden olarak yada H-atomu vererek işlemektedir. Biyokimyasal sok, hedef molekülde yapısal değişikliklerin indüklenmesi yada DNA sentezindeki gecikmeler ve hücre bölünmesi radyasyona karşı korumada olası mekanizmalardır.

2.3.3- Organik Seviye

- 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, ışınlanmanın 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).

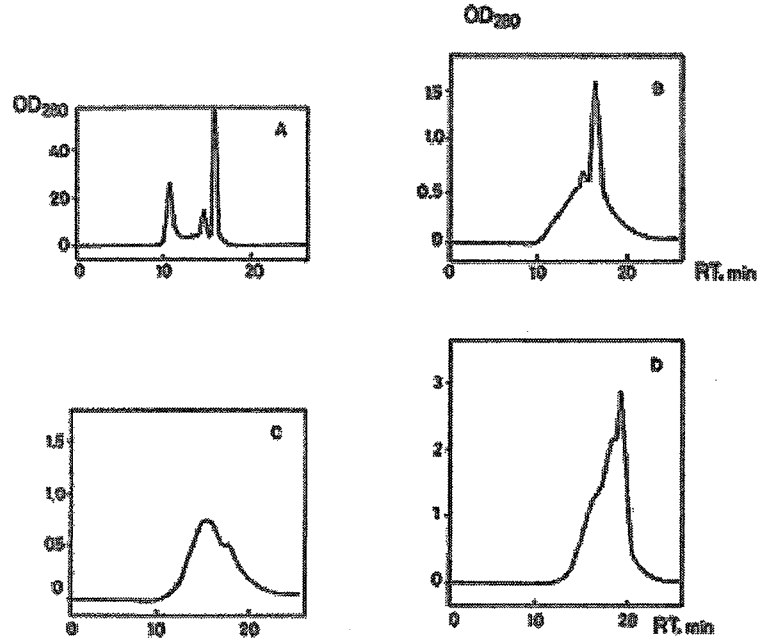
Bu doğrultuda birçok araştırmacı, radyasyon enerjisi ile madde etkileşimi sonucu oluşan serbest radikallere karşı doku ve hücreleri koruyacak radyoprotektif maddelerin geliştirilmesi için çalışmalarını sürdürmektedir. Bu amaç için, radyoprotektif potansiyele sahip birçok farklı kimyasal bileşik denenmektedir. Radyoprotektif etkisi olabileceği düşünülen kimyasallardan bazıları az veya fazla etkili olurken bazıları ise insanların korunması için gerekli karakteristik özellikleri sergilemektedir. Araştırma sonuçlarına bakıldığında birçok bileşik arasından

aminotioller, aminodisulfitler, tiyosulfür, bazı biyojen aminler ve onların türevleri gibi sülfür içerenlerin en fazla radyoprotektif etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (Giambarressi ve Jacobs, 1987). Araştırmalarda sistamin türevleri üzerinde fazlaca durulmuştur.

Yapılan bir çalışmada, Superoksit dismutazın radyoprotektif etkisi, radyobiyojik endpointler, superoksit kaynakları ve radikalın kimyasal reaktivitesi bakımından incelenmiştir. Sonuç olarak enzimlerden radyoprotektif bir etki elde etmede, biyokimyasal ve biyolojik faktörlerin önemli olduğu belirlenmiştir (Petkau, 1977).

Mustafaev ve arkadaşları 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 spektrofotometre kullanarak ölçülmüştür.

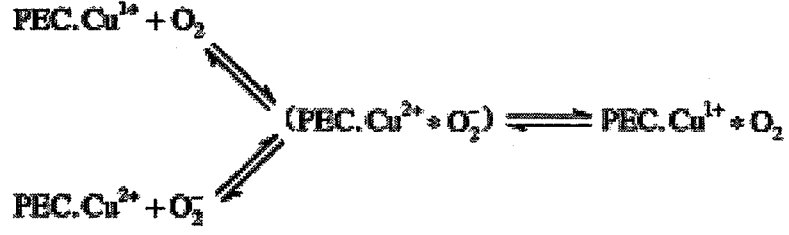
PAA-BSA karışımlarının ışınlanmamış ve ışınlanmış HPLC sonuçları incelendiğinde, ışınlanmamış PAA-BSA karışımı bileşenlerinin çoklu model dağılımı ile karakterize edildiği görülmüştür. Karışımın ve bileşenlerin piklerine bakılarak RT (alınma zamanı) değerlerinde bir kıyaslama yapılmış ve BSA ile PAA arasındaki etkileşimin pH 7.0' de zayıf olduğu görülmüştür. Benzer yüklerle yüklenmiş PAA ve BSA arasındaki itici kuvvetler polikompleks oluşumunu önlemektedir (Mustafaev vd., 1996, 1998).



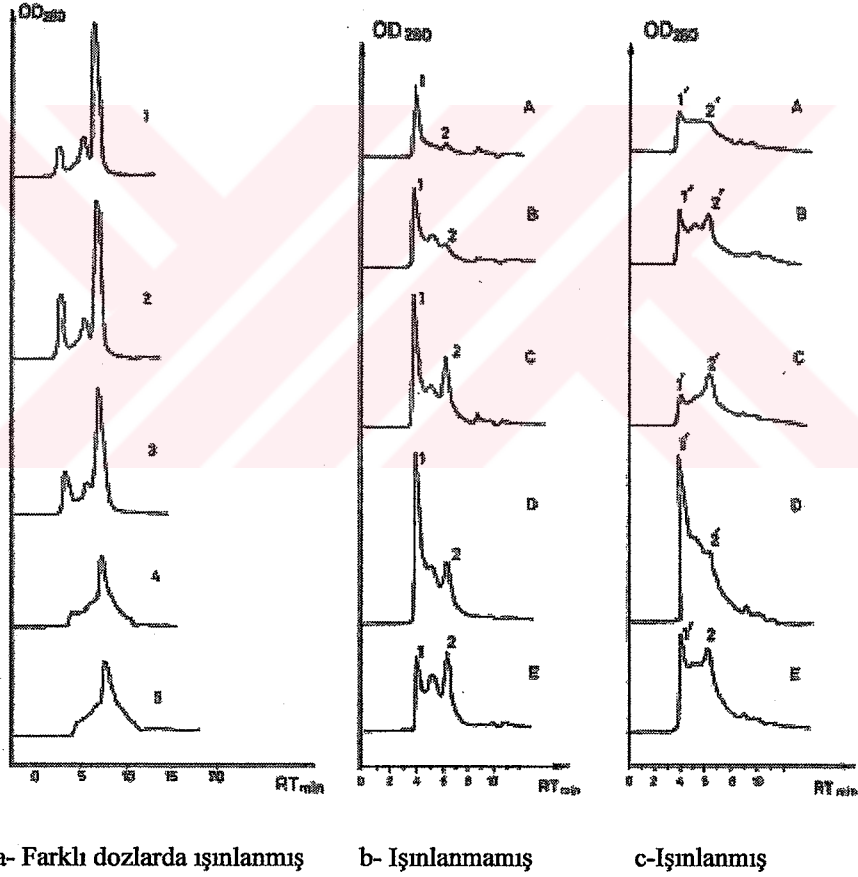
Şekil 2.2 Işınlanmamış (A) ve farklı dozlarda ışınlanmış (B-D) PAA-BSA karışımları (B=100 Gy; C=300 Gy; D=1200 Gy; $C_{BSA}=C_{PAA}=0.01$ g/l) HPLC sonuçları (Mustafaev vd., 2000).

Işınlanmış ve ışınlanmamış PAA-BSA çözeltisinin HPLC sonuçları piklerin birbirinden farklı olduğunu göstermiştir. Burada PAA ve BSA' nın kararlı biyo-konjugasyonu PAA-BSA karışımının ışınlanmasına kadar mevcuttur. 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. Cu^{2+} iyonunun polimer-protein karışımına eklenmesi, polimer ve proteini radyasyon hasarından korumuştur. Bunun nedeni, kompleks içerisindeki Cu^{2+} iyonunun su ortamında radyasyon etkisi ile oluşmuş süperoksit anyonu (O_2^-) ile kompleksleşmesi ve süperoksit anyonunun moleküler O_2 ' ye dönüşmesidir.



Şekil 2.3 Radyasyonun Cu^{2+} içeren polielektrolit sistemleri üzerine etkisi (Mustafaev vd. 2000).



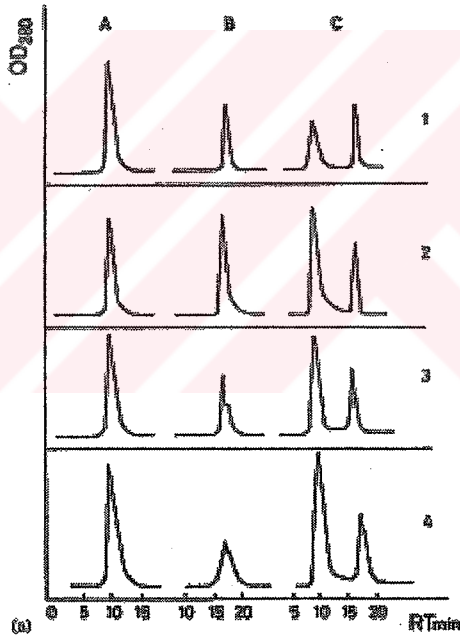
Şekil 2.4 (A) Farklı dozlarda ışınlanmış (2-5: 2 = 300 Gy; 3 = 1200 Gy; 4 = 2500 Gy; 5 = 3000 Gy) ve ışınlanmamış (1) PAA- Cu^{2+} -BSA karışımları HPLC sonuçları
 $C_{\text{BSA}} = C_{\text{PAA}} = 0.01 \text{ g/l}$; $\text{Cu} = 1.4 \times 10^{-3} \text{ gr.mol/l}$ (Mustafaev vd. 2000).

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

Buradaki denge şu şekildedir;



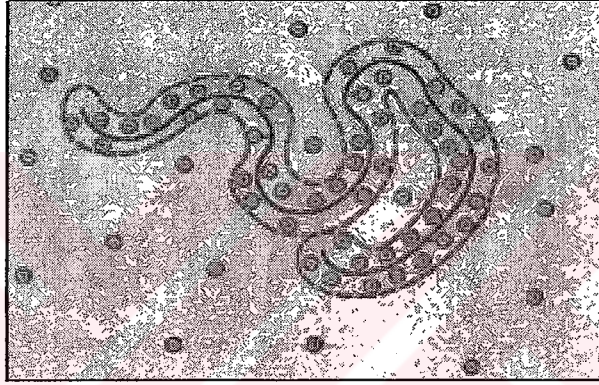
Bu çalışmada da metal iyonlarının, protein kürelerini radyasyon hasarına karşı koruyucu bir ajan gibi görev yaptığı ve PAA makromolekülü ile SOD molekülleri arasında radyasyon indüklü kovalent konjugat oluşumunu engellediği tespit edilmiştir.



Şekil 2.5 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; $C_{\text{BSA}}=C_{\text{PAA}}=0.01$ g/lit (Mustafaev vd., 2000).

2.4- Polielektrolitler

Polielektrolitlerin teorisinin izahı ilk olarak 1951 yılında Fuoss tarafından hazırlanan derlemede yayınlanmıştır. Polielektrolitler, iyonik olmayan polimerlerden farklı olarak, ana zincirine bağlı halde (+) veya (-) yüklü gruplar bulundurlar. Ortamın pH' ına göre (-) veya (+) yük taşıyan polielektrolitler amaca uygun olarak metal iyonları ile iyon-koordinasyon bağıyla yada çeşitli makromoleküller ile elektrostatik etkiyle bağlanıp suda çözünen veya çözünmeyen polikomplekslerin oluşumunu sağlarlar.



Şekil 2.6 PE çözeltisinin Strauss-Ander Modeli. (Morawetz, 1966).

PE çözeltilerinin elektrokimyasal özellikleri genellikle poliyonun zincir boyuna bağlıdır. 1958 yılında Strauss ve Ander tarafından diğer modellere oranla daha gerçekçi bir model önerisi ortaya atılmıştır. Bu modele göre, poliyon bölgesinin bobin şeklindeki poliyonunu bütünüyle saran hacmin küresel bir hacim olmadığı, sosis şeklinde olduğu varsayılmaktadır.

Polielektrolitlerin bir başka özelliği ise, polimerlerde konsantrasyon arttıkça viskozite artarken, polielektrolitlerde konsantrasyon azalırken viskozitenin artmasıdır. Bunun nedeni, azalan konsantrasyon ile (-) veya (+) yüklerin birbirlerini itmeleri ve polielektrolitin şişmesidir. Aşağıdaki şekilde örnek olarak bir sıra model veya pratik uygulamalı sentetik PE'lerin kimyasal yapıları verilmiştir (Şekil 2.7).

Poli-4-vinilpiridin (PVP)



Poli-4-vinil-4-etil-piridinününümü
[PVP(R₂)]



Polyvinylimidazol (PVI)



Poliakrilik asit (FAA)



Akrilik asit (AA) ve 2-metil-

5-vinil-piridin kopolimeri

[CP(AA-MVP)]



Akrilik asit (AA) ve N-vinil
polidin kopolimeri
[VPD] [CP(AA-VPD)]



N-vinylimidazol(VI) VPD kopolimeri
[PVI-VPD]



4-vinilpiridin ve VPD kopolimeri
[P(VP-VPD)]



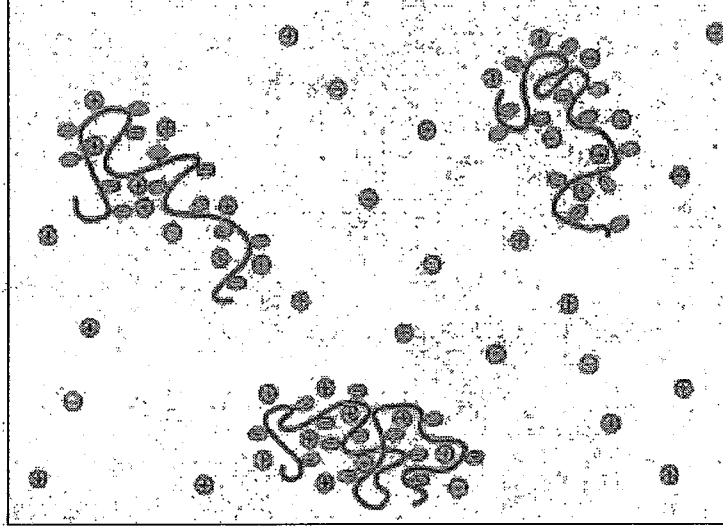
Vinilamin(VA) ve vinilalkol
(VAO) [CP(VA-VAO)]



Maleikanhidrit (MA) ve VPD
kopolimeri
[P(MA-VPD)]



Şekil 2.7 Bazı PE ve PE kompleks örnekleri (Mustafaev, 1996).



Şekil 2.8 Esnek (oynak) zincir moleküllerinden ve düşük konsantrasyonlarda eklenen uni-univalent elektrolitlerden oluşmuş polimerik asit tuzunun sulandırılmış çözeltisinin iyon dağılımının şematik olarak gösterimi. (Morawetz, 1966).

1970'li yılların başlarında immünologların ve kimyacıların ortak çalışmaları ile bazı sentetik polielektrolitlerin (PE) immün cevabına kuvvetli etkisi aydınlatılmış ve sentetik PE'lerin bu gibi amaçlar için daha uygun olduğu tespit edilmiştir. Çünkü PE'lerin sentezi ve modifikasyonu daha basittir, istenilen molekül ağırlığında, elektrik yükünde, konformasyonda veya yüksek moleküler yapıda elde etmek olasıdır, suda iyi çözünürler ve bilinen yapılarda çeşitli komplekslerini sentezlemek mümkündür. PE'lerin molekül ağırlığı, polimerleşme derecesi ile orantılıdır. Polimerleşme derecesinin artması istenilen kompleksin oluşumunu destekleyici yönde etki eder ve polimer ile bağlanma miktarında artış gözlenir. Bunun yanı sıra kompleksin çökmesi de polimerleşme derecesine yani, polimerin uzunluğuna bağlıdır (Mustafaev, 1996).

Polielektrolitlerin kullanım alanları incelendiğinde en önemlilerinden biri, belirli geçirgenliği ve seçiciliği olan yarı-geçirgen zarların yapımıdır (Zezin ve Eltsefon, 1976; Sato vd., 1979). Bu zarlar deniz suyu tuzunun ayrılması işlemi için ters osmoz olarak kullanılabilir. Biyomedikal alanda ise, bu zarlar biyolojik kan sıvılarının (kan, idrar) ultrafiltrasyonu, hemodiyaliz için yapay böbrek ve hemoksijenasyon için yapay karaciğer olarak kullanılır. Polielektrolit komplekslerini iki şekilde inceleyebiliriz.

2.4.1- Doğal Polielektrolit Kompleksleri

Doğal polielektrolit kompleksleri canlı organizmada geniş bir uygulama alanına sahiptir ve canlı organizmaların değişiminde büyük rol oynamaktadır. Bu konu birçok araştırmacının ilgisini çekmektedir. Doğada kendiliğinden oluşmuş polielektrolit komplekslerinin incelenmesi, yapay polielektrolit kompleksleri oluşturulması bakımından çok önemlidir. Hücre çekirdeğinde nükleoproteinler şeklinde bulunan nükleik asit kompleksleri veya hücre duvarlarının yapısını oluşturan peptido glikanlar doğal PE kompleksler arasında sayılabilir.

Birçok bilim adamı, organizmada protein ve polielektrolitlerin kooperatif yapı ile oluşturdukları biyosistemlerden esinlenmiş ve amaçları doğrultusunda benzer yapay kompleksler oluşturma çabasına girmişlerdir.

Nükleik Asit Kompleksleri'nin en çok incelenmiş kısmı, (+) yüklü proteinler ve polipeptidlerle, (-) yüklü DNA veya RNA'nın yapmış olduğu komplekslerdir. Bu komplekslere deoksiribonükleik proteinler (DNP) veya ribonükleik proteinler (RNP) denir. Kompleksler protein ligantlarının pozitif yüklenmiş amin grupları ile nükleik asitlerin negatif yüklü fosfat grupları arasındaki elektrostatik etkileşimlerden meydana gelmektedir.

Doğal polikomplekslerin yapılarının karakterini ve organizmadaki uyumunun mekanizmasını anlayabilmek için, in-vitro koşullarda doğal PE'lerin model biyopolimerlerle kompleks oluşturması incelenebilir. Bu sistemlerin doğal polikomplekslerle karşılaştırılması çok daha kolaydır. Bu yöndeki araştırmalar, ortam koşulları ile gerçekleşen reaksiyonlar arasındaki ilişkiyi ortaya koymakta ve polifonksiyonel doğal PE'lerin reaksiyonunu ve yapısını öğrenme ihtimalini arttırmaktadır. Sentetik sistemlerde araştırmalar doğal nükleoproteinlerin modelini oluşturmak amacıyla yapılmıştır.

Literatürde nükleik asitlerin globular proteinlerle (SA, Lizozim, RNAaza) oluşturdukları çözünen kompleksleri araştırılmıştır (Goldwosser ve Putnam, 1950; Timasheff ve Kirkwood, 1953; Kretovich vd., 1958). Bu sistemlerde kompleksin oluşmasının, kompleks partiküllerinin asimetrisinin DNA'ya oranla azalmasının ve reaksiyona giren komponentlerin sterik uygunluğunun rolü gösterilmiştir.

2.4.2- Yapay Polielektrolit Kompleksleri

Polielektrolitlerin proteinlerle reaksiyonlarının incelenmesi Morawetz, Stahmann, Katchalski ve diğer bilim adamlarının çalışmalarıyla başlamıştır. Özellikle BSA' nın fraksiyonsuz PAA ve Ba²⁺ varlığındaki çözünebilir kompleksler Morawetz tarafından incelenmiştir (Morawetz, 1952, 1965; Rice vd., 1954; Katchalski vd., 1954). Bu çalışmalardaki esas amaç ve sonuç kompleks oluşumunun belirlenmesi olmuştur. PE' lerin proteinlerle su ortamında kompleks oluşturması genel olarak reaksiyona giren bileşenlerin birbirine zıt yükler taşıması ilkesine dayanmaktadır. Aynı yüklü protein ve polimerlerin birbirine bağlanmasında ise zıt yüklü geçiş metal iyonları ile iyon-koordinasyon bağı oluşturulur.

Yapılan çalışmalar göstermiştir ki, serum albumin (SA), ortamın pH' ının proteinin izoelektrik noktasından daha düşük olduğu zaman, anyonik polielektrolitler olan poliakrilik asit (PAA) veya polimetakrilik asit (PMAA) veya polietilenimin ile suda çözünmeyen kompleksler verirler. Ortamın pH'ının SA'nın izoelektrik noktasından fazla olduğu durumlarda ise, SA (-) yüklenir ve katyonik polielektrolitler ile çökelti verebilir.

Araştırmacılar insan albumini ile onun antikor karışımını, ortamın pH' ını bunların izoelektrik noktasından uzak değerinde PMAA ile karıştırarak incelemek istemişler ancak başarılı olamamışlardır. Buna ek olarak yine de, PAA-(katalaz + SA) karışımına izoelektrik noktaları arasında iki değerli baryum iyonu (Ba²⁺) ilave edilmiş ve katalazın SA' dan seçici olarak ayrılması sağlanmıştır (Mustafaev, 1996).

2.5- Polimer-Metal Kompleksleri

Çok komponentli sistemlerde oluşan makromoleküller arasındaki çarpışma reaksiyonları, canlı organizmada büyük önem taşır. Bu yüzden böyle sistemlerde makromoleküller arasındaki reaksiyonlar ve bu reaksiyon ürünlerinin-polikomplekslerin incelenmesi canlı organizmaya polielektrolitlerin yardımıyla etki etmeye imkan verebilir.

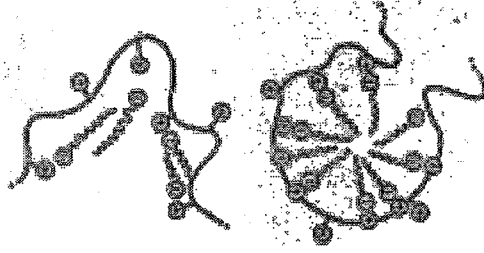
Geçiş metal iyonları, DNA'dan histonların çıkarılması ve ribozom komponentlerinin birbiriyle veya taşıyıcı RNA ile asosiasyonunda olduğu gibi çok önemli biyokimyasal işlevlerin oluşumuna katkıda bulunurlar. Böyle iyonlar reaksiyon partiküllerinin birleşmesiyle beraber onların yapısının korunmasında da aktif rol oynarlar. Metal iyonları, biyopolimerlerin

fonksiyonel etkilerine aktif olarak tesir ederek bunlara yeni ve karakteristik olmayan biyolojik özellikler kazandırabilirler.

Son zamanlarda geçiş metal iyonlarının sentetik polielektrolitlerle oluşturduğu kompleks bileşimleri yoğun bir şekilde incelenmiştir. Polimer-metal komplekslerine (PMK) büyük ilgi her şeyden önce, metal iyonlarının sentetik polielektrolitlerin fizyolojik aktifliğine etkisiyle büyük önem kazanmaktadır. Örneğin akrilik asit ve akroloein kopolimerinin Fe^{2+} nın fazla miktardaki (yaklaşık % 15) PMK' sı antianemik aktifliğe sahiptir ve sürdürme (prolongation) etkisi göstermektedir. %5'lik Fe^{3+} çözeltisi poliakrilik asit bileşimine ilave edildiğinde (Ferakril) elde edilen PMK kana pıhtılaşma özelliği kazandırır. Bunlara ilave olarak polimer-metal kompleksleri doğal polimerin yapısını anlamak ve spesifik etkilerini belirlemek için makromoleküler model olarak kullanılabilir (Mustafaev, 1996).

Metal iyonlarının biyolojik proseslerde çok önemli rolleri vardır (Manko vd., 1991; Kendirch vd., 1992). Polimer-metal komplekslerinin benzersiz özellikleri onların fizikokimyasal özelliklerinin tek başına polimer ve metalden daha farklı olmalarına dayanır. Son zamanlarda çıkan birçok yayın, metal bağlantılı komplekslerden oluşmuş ilaç yapısı, doğal polielektrolit ve antijenlerin biyokonjugatları üzerinedir. Bu modellerin kullanılması ile doğal polimerin mekanizması ve metal iyonları varlığındaki davranışları ile ilgili daha fazla bilgi edinilmiştir. Polimer-metal kompleksleri çok geniş çeşitlilikte biyomedikal malzemelerin yapımında kullanılmıştır. Geçiş metal iyonları, düşük molekül ağırlıklı bileşikler gibi, nötral veya zayıf yüklenmiş suda çözünen polimerleri kendilerine bağlama özelliğine sahiptirler. Böylece polimer bileşenleri yüzeylerle kompleks oluşturma özelliği kazanmış olur. Birçok çalışmada Cu, Zn, Fe gibi metal iyonlarının önemli rolü gösterilmiştir. Demir eksikliği Hemopoiesis ve Lymphopoiesis'in önlenmesinin engellenmesine ve timusta morfolojik değişiklikler ile dalaktaki T ve B bağımlı bölgelerde hücre azalmasına neden olur.

PE moleküllerinin sulu ortamlarda supramoleküler yapısını değiştirmenin yolu bunların hidrofoblaşmasıdır. Yani poliyon zincirlerinin polar olmayan radikallerle (yüzey aktif maddelerle, YAM) yüklenmesi gerekir. Bu polimer molekülünü ya YAM' lar ile kovalent birleştirerek ya da YAM' lar ile PE arasında hareketli elektrostatik bağlarla kompleks oluşturarak elde etmek mümkündür.



Şekil 2.9 Suda çözünen PE-YAM komplekslerinin çeşitli $[YAM] / [PE]$ oranlarında oluşan yapısı (Mustafaev, 1996).

Supramoleküler yapıyı değiştirmenin başka yolu ise, PE'lerin geçiş metal iyonları ile kompleks oluşturmasıdır. Böyle iyonlar az yüklü veya nötral polimer molekülleri ile birleşerek polimer zincirlerinin çözeltide konformasyonunu düzenleme imkanı vermektedir. Örneğin Cu^{2+} iyonlarının yüksek konsantrasyonunda intermakromoleküler agregasyonu oluşur ve partiküller asimetrik yapıya yakın bir formda olurlar (Mustafaev, 1996).



I

II

Şekil 2.10 Polimer-metal komplekslerinin $[Me] / [PE] \ll 1$ (I) ve $[Me] / [PE] \geq 1$ (II) oranlarında oluşan yapısı. (Mustafaev, 1996).

Bu örnek araştırmacılara yardımcı olabilir (iki polimeri metalle bağlayıp agregasyon oluşturabilirler) ve ayrıca polimer ile antijen bağlanıp metal varlığında agregasyonları oluşturularak (yapının çapı ve yüzeyi artar) immunojenliği artırılabilir. Literatürdeki bazı yayınlar, ilaç oluşumunda doğal polielektrolit ve antijenlerin metal merkezli komplekslerinin yer aldığı düşüncesine sadık kalmaktadır (Mustafaev, 1996).

Bileşen oranının sabit olduğu değerlerde oluşan PE komplekslerinin yapısı, polielektrolitin çözeltideki başlangıç konsantrasyonuna bağlıdır. Fazla seyreltilmiş çözeltilerde polimer-metal

kompleksleri kompakt yapıda oluşurlar. Polimerin başlangıç konsantrasyonu arttıkça, metal iyonları ile makromolekül arasında çapraz bağlar oluşur ve asosiye olmuş partiküller meydana gelir. Ancak hidrofob sistemlerde durum farklıdır. Düşük başlangıç konsantrasyonunda polimer yumağa benzer yapıdadır ve konsantrasyon arttıkça yan hidrofob fragmentlerin agregasyonuna göre polimer molekülü belirli miktarlarda çözünürlüğünü yitirmektedir.

Me^{+n} iyonları aynı yüklü iki farklı yapı polimer makromolekülünün bağlanmasında arabulucu olmasının yanı sıra zıt yüklü iki polimer molekülünden oluşan polimer-polimer interkomplekslerine katılarak bu komplekslerin stabilitesini artırabilme özelliği taşımaktadır. Bu çalışmalar bilimsel ve pratik uygulamaları bakımından büyük önem taşımaktadır. Örneğin, interpolimer kompleksler kimyasal kasların yapımında kullanılabilirler (Osada ve Saito, 1975).

Polimer-polimer kompleksleri ile ilgili yapılan çeşitli çalışmalarda, bu olayın genel doğası ile kimyasal ve yapısal bakımdan birbirini tamamlayıcı makromoleküller arasında gerçekleşen karşılıklı etkileşmenin özel nitelikleri araştırılmıştır. Poliakrilik asit, proton çekici polimerler olan polivinilpirolidon (PVP) veya polietilen oksit (PEO) eşit mol oranlarında birbirleri ile hidrojen bağıyla etkileşirler. Bu etkileşmenin sonunda suda çözünmeyen polikompleks oluşur (Bekturov ve Bimendina, 1981).

PAA ve PVP arasında meydana gelen kompleks oluşumunun Cu^{2+} iyonunun katılmasıyla nasıl etkilendiği turbidimetrik ölçümlerle belirlenmiştir (Subotic vd., 1989). PAA ile PVP' nin kompleks oluşturması iki farklı çözücü (su ve etanol-su) ortamında gerçekleştirilip Cu^{2+} iyonunun etkisi turbidimetrik ölçümlerle gözlenmiştir. Her iki çözücü ortamında Cu^{2+} iyonunun katılması kompleksleşme kinetiğini etkilemiştir. Su ile etanol-su çözücülerinde gerçekleşen kompleksleşme hızlarının Cu^{2+} katıldığında artış miktarı suda hidrofobik etkileşmeden dolayı daha yüksektir. Her iki çözücü ortamında da Cu^{2+} iyonu ilavesiyle kompleksleşme hızı zamanla artarak bir dengeye ulaşıyor. Bu sonuçlar Cu^{2+} iyonunun etkileşmenin ilk hızını arttırdığını ve kompleks oluşumuna katıldığını göstermektedir. Turbidimetrik sonuçların incelenmesiyle ilk 5 sn içinde turbitedeki ani artışın iki ortamda da olduğu gözlenmiştir. Bu da PAA ile PVP arasındaki kompleks oluşum hızının Cu^{2+} iyonu tarafından büyük oranda arttırıldığı sonucunu vermektedir.

Polimer-metal komplekslerine ait literatür araştırması metal iyonlarının polielektrolitlerin fonksiyonel grupları seviyesinde karşılıklı etkileşimi ile sınırlandırılmıştır. Çözünen ve çözünmeyen komplekslerin oluşumu metal iyonlarının yüksek konsantrasyonlarında incelenmiştir. Aynı zamanda bağlanma mekanizmasını anlamak ve makromolekül yapısındaki değişimleri izlemek için metal iyonlarının makromoleküller arasındaki dağılımını incelemek çok önemlidir. Karşılıklı etkileşim düşük metal iyonu konsantrasyonunda araştırıldığında, yapısında az miktarda metal olan PMK' ların sentezi için önemli rol oynadığı görülmektedir. Bu tip PMK' larda polielektrolitin yapısı değişmemekte ve biyolojik aktifliği korunmaktadır.

Cu^{2+} iyonunun kompleksleşme üzerine etkisinin anlaşılabilmesi için polimer-metal kompleks yapılarının incelenmesi gerekmektedir. PMK, sentetik polimerler ve metal iyonları içerir. Metal iyonları polimer ligantlara koordine bağlarla bağlıdır (Tsuchida ve Nishide, 1997). Cu^{2+} iyonu polimer ligant çözeltisi ile karıştırılır karıştırılmaz, hemen polimer- Cu^{2+} çelati oluşur. Polimer- Cu^{2+} kompleksinde Cu^{2+} iyonları polimer zinciri tarafından örtülmüş ve kararlı hale geçmiştir. Cu^{2+} iyonlarının bu kompleksten ayrılıp çözelteye geçişi çok zordur.

Son yıllarda, çeşitli sentetik PE' lerin geçiş metalleri ile metal iyonlarının çok düşük konsantrasyonlarında ($[\text{Me}^{+n}]/[\text{PE}] \ll 1$) suda çözünen PMK' lar sentezlenmiş ve oluşma mekanizması incelenmiştir. Düşük yüklü kopolimerler-polibazlar metal iyonları ile kompleks oluşumunda sistemdeki metal iyonları, makromoleküller arasında heterojen olarak dağılırlar. Yani birkaç makromolekül tüm iyonları bağlar, diğerleri ise serbest olarak kalır (Mustafaev vd.,1992).

2.6- Geçiş Metal İyonları İlavesiyle Oluşan Üçlü Polimer-Protein Kompleksleri

2.6.1- Asit ortamında kompleksleşme

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. Yani sistemde çözünen üçlü SA- Cu^{2+} -PVP kompleksinin oluşumu görülür.

Yapısında poliaminler (PVP, polietilenimin) ve PAA bulunan çözünen üçlü polimer metal komplekslerin oluşumunda Cu^{2+} iyonlarının analogik fonksiyon taşıdığı son zamanlarda yapılan araştırmalardan anlaşılmaktadır. Çalışmalarda, üçlü polikomplekslerde bir lineer poliyon yerine bileşen olarak amfoter protein kürecikleri kullanılmıştır.

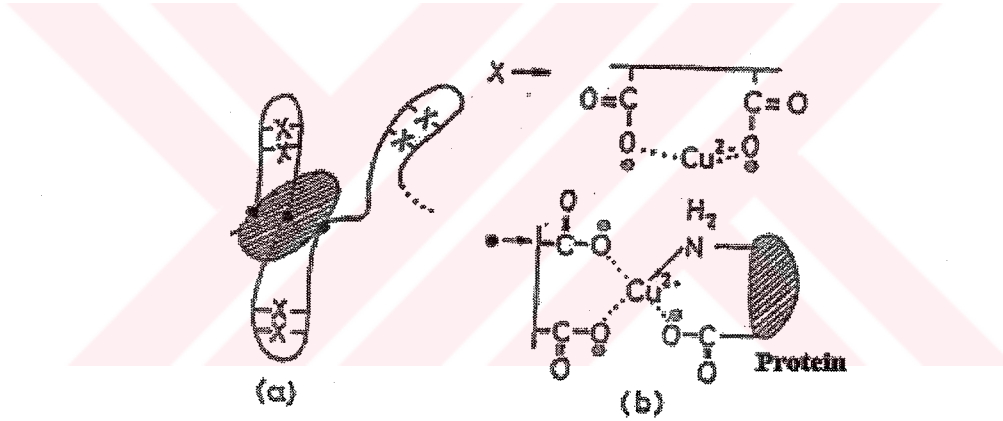
2.6.2- Nötral su ortamında kompleksleşme

Üçlü komplekslerin nötral su ortamlarında oluşması PAA, PVI, akrilamidin 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 basit olmayan karakteri 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. 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 oluşturmayan 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.

Bovine Serum Albumin (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.



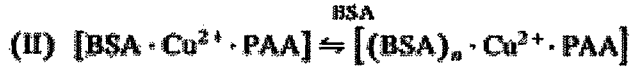
Şekil 2.11 a) Üçlü PAA-Cu²⁺-protein polikompleksinin yapısı, b) Cu²⁺ iyonu varlığında PAA ve proteinin fonksiyonel grupları arasında oluşan çelat yapı (Mustafaev, 1996).

Yine Cu^{2+} iyonları varlığında hemoglobin (Hb) ve globin gibi proteinler de polimere bağlanabilir (Hb- Cu^{2+} -PAA, Gl- Cu^{2+} -PAA). Protein moleküllerinin polimere bağlanması kooperatif karakterlidir. Bu tür bağlanmalar protein ve makromolekül arasında düzensiz dağılımlara liderlik edebilir.

PAA ve BSA arasında Cu^{2+} li kompleks oluşumu nötral suda çalışılmıştır. Cu^{2+} konsantrasyonuna bağlı olarak, PAA- Cu^{2+} ve BSA arasındaki kompleks iki farklı şekilde sonuçlanabilir. Düşük Cu^{2+} konsantrasyonlarında ($n_{\text{Cu}^{2+}}/n_{\text{PAA}} < 0.15$), BSA konsantrasyonundaki fazlalık kompleksin aşağıdaki mekanizma gibi kırılmasına neden olur.



Yüksek Cu^{2+} konsantrasyonlarında ($n_{Cu}/n_{AA} > 0.15$), BSA konsantrasyonundaki fazlalık sitokiyometrik olmayan komplekslerin oluşumuna neden olur (Mustafaev, 1996).



2.7- PE Komplekslerin İmmünolojik Aktivitesi

Bileşenleri kararlı bağlarla bağlanmış komplekslerde polielektrolitlerin model, bakteri ve virüs tabiatlı yapay antijenler için taşıyıcı gibi kullanılması immün cevabı artırır ve immün koruyuculuğun devamını sağlar. Bu, korunulması mümkün olmayan hastalıklara karşı yapay aşı oluşturma imkanı yaratır. Yapılan araştırmalar immünolojide çok önemli genel prensipleri ortaya koyarak immün cevabın gen düzeyinde fenotipik prensibini doğrulamış ve yapay antijenlerden yapay aşılara geçmenin immünolojik yollarını belirtmiştir (Petrov, R. W. ve Mustafaev, M. I., 1992).

Bugüne kadar doğal olmayan polimerlerin, immün modüllü aktifliğinin ve polimer yapılı antijenlerin immünolojenliğinin bunların fizikokimyasal etkilerine bağlılığının incelenmesi konusunda birçok çalışma yapılmıştır. Önceden etkisi belli olan yapay immünojenlerin yapılması ve polimer-antijen sistemlerinin çalışma mekanizmasının fizikokimyasal yönden anlaşılması için polielektrolit kompleksler (PEK) daha fazla bilgi verirler. Komplekslerdeki polimer taşıyıcılar küçük ve büyük molekülü ligantlarla oynak, elektrostatik ve hidrofob bağlarla bağlanmışlardır. Düzenlenebilen yapıya ve bileşime sahip olan polielektrolit komplekslerin sentezi ve incelenmesi, aynı zamanda polikompleks partiküllerinin yapı-kimyasal çevrilmelerinin rolünü immünoloji de analizi bunlara yüksek immünjenli preparatların sentezi için kullanılma imkanı verir. PEK'lerin teorik immünoloji için kimyasal "araç" olduğunu da belirtmek gerekir. Bu alandaki güçlü atılım, çok komponentli biyolojik sistemlerin basit polimer-antijen karışımlarında modellendirilmesinde mümkün olmuştur (Mustafaev, 1996).

Yapılan bir çalışmada, PAA-Cu²⁺ taşıyıcısı antijenik madde ile B-lenfositleri arasındaki etkileşimleri kolaylaştırmak ve stabil bir konuma getirmek için kullanılmıştır. İmmün cevap oluşumunun başladığı gözlenmiştir. Büyük olasılıkla burada Cu²⁺ iyonları, antijenlerin yüzeye bağlanmalarını stabilize etmede en önemli rolü oynamaktadır. Polikompleksler, poliklonal antikörlerin ve aynı zamanda sentetik PE'lerin taşıyıcı olarak kullanılmasıyla monoklonal antikörlerin üretimini desteklemektedir.

Yüklü olmayan veya su ortamında yüklenmeyen polimerlerin (polivinilpirolidon, polietilen glikol), eritrositlerin immün cevabını pratik olarak değiştirmedikleri görülmüştür. Bazı kopolimerlerin yardımcı olarak kullanılması tam zıt etki gösterir. Örneğin akril asitin metilvinil piridin ile kopolimerleri homopolimerden farklı olarak immün cevabını kesin olarak azaltmaktadır (Kabanov ve Mustafaev, 1984).

Bazı polielektrolit kompleksleri güçlü ve kuvvetli immün uyarıcılardır. PEK'leri kompaktlaştırıldığında bunlar ya uyarıcı olmaz ya da immüniteyi yatıştırıcı olarak çalışırlar. PE'lerin immünolojik aktifliklerinin oluşmasında protein faktörü önemli rol oynayabilir, öyle ki kana verildiklerinde, PE makromolekülleri önce burada fazla miktarda olan plazma proteinleri veya hücre yüzeylerindeki reseptör proteinleri ile karşılıklı etkileşimde olmaları gerekir. Oluşmuş çeşitli polimer-protein kompleksleri sonra çeşitli hücrelerin yüzeyleri ile karşılıklı etkide bulunabilirler, makrofajlarla adsorbe olabilirler. Bu hipotezde polielektrolitlerin etki mekanizması bunların kanın proteinleri ile karşılıklı etkide olması ve oluşmuş komplekslerin tabiatında görüldüğü açıklanmıştır. Polikompleksin bileşimi hem polimer zincirinin uzunluğuna hem de onun kompaktlığına bağlıdır.

Elektron mikroskobu metodu ile sığır eritrositlerinin immünolojik etkiye sahip olan polimerlerle ve bunların protein kompleksleri ile karşılıklı etkisinden oluşan polimer-hücre komplekslerinin incelenmesinden alınan sonuçlar verilmiştir. Görüldüğü gibi hem polimerler hem de onların kompleksleri hücre ile interpolimer kompleks oluştururlar ve bunların agregasyonuna neden olurlar.

2.8- PAA ile Yapılan Bazı Çalışmalar

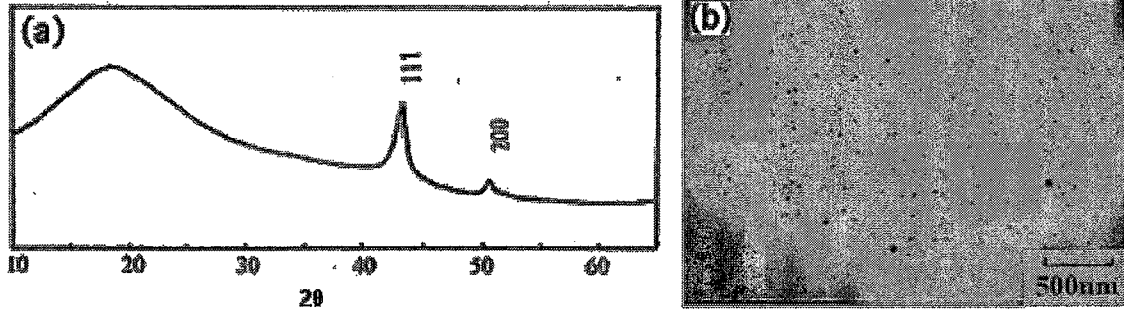
Poliakrilik asit iyonlaşma derecesi, pH ve sulu çözeltinin iyonik gücüne bağlı olan zayıf bir polielektrolittir. PAA, düşük pH'da ($\text{pH} \leq 4$) hemen hemen disosiyeye olmamasına karşın, $\text{pH} \geq 8$ ' de tamamen yüklü bir zincire sahiptir. Poliakrilik asit, proton alabilen iyonik olmayan çeşitli polimerler, onların türevleri ve katyonik polielektrolitlerle sulu yada organik çözelti ortamında interpolimer kompleks oluşturur.

Kompleks oluşumunda, ortamda karşısındaki ile etkileşim içerisinde bulunan polimerin doğası ve molekül ağırlığı gibi bazı parametrelerin yanı sıra çözücü, pH, çözeltinin iyonik gücü, sıcaklık ve polimerin konsantrasyonu önemli etkiye sahiptir. Bunun için metal iyonlarının yüklü makromoleküller ile ilişkisi, herhangi bir ortamda ve biyolojik sistemlerde sergiledikleri fizikokimyasal davranışları anlamak bakımından önemlidir (Mori vd., 2003).

Nano boyutlu metal parçacık ve organik polimerlerin kompozitleri büyük bir ilgi çekmektedir. Bu kompozitler, metal ve polimerin yararlı özelliklerini bir araya getirmenin yanı sıra birçok yeni karakteristik özelliğin oluşmasını da sağlarlar. Xiangling Xu ve arkadaşları, poliakrilik asit-metal nano kompozitlerini içinde metal iyonları (Ag^+ , Cu^{2+} , Ni^{2+} gibi) olan akrilik asit monomer çözeltilerinin γ ışını ile ışınlanması sonucu oluşturmuşlardır. Ürünler XRD ve TEM ile karakterize edilmiştir. Bunun sonucunda nanometre boyundaki metal partiküllerinin poliakrilik asit içerisinde iyi bir dağılım gösterdiği tespit edilmiştir. Bu çalışmada, nano yapılu gümüş, bakır ve nikel partikülü içeren PAA kompozitleri yeni bir yöntem kullanılarak hazırlanmıştır. Bu yöntemle göre, organik monomerler ve metal bileşikler moleküler seviyede homojen olarak karıştırılmıştır. Çözelti oda sıcaklığında normal basınç altında ^{60}Co γ kaynağıyla ışınlandığında, nano kristal metal parçacıkların oluşumu ve monomerlerin polimerleşmesi tamamlanmıştır.

Çalışmanın sonuçları incelendiğinde; PAA-Cu nano kompozitleri, CuSO_4/PAA çözeltilerinin ışınlanması ve kompleksleştirici ajan olarak EDTA' nın kullanılmasıyla oluşur.

Şekil 2.12.(a)' da PAA içerisindeki nano yapılu bakır partiküllerinin XRD analizlerinde 2 karakteristik pik görülmüştür. Bakır parçacıklarının boyları XRD'deki örneklerde 22 nm olarak bulunmuştur. Şekil 2.12.(b)' de 7-55 nm boyut aralığında olan metalik bakır parçacıklarının dağılımı görülmektedir.



Şekil 2.12 PAA-Cu nanokompozitlerinin a) XRD ve b) TEM analizleri; $\text{CuSO}_4 / \text{EDTA} / \text{PAA} = 0.1 \mu\text{mol/ml}$; absorbe edilen doz: $3.6 \times 10^4 \text{ Gy}$ (Xu vd., 1998).

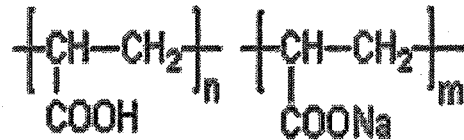
Xiangling Xu ve ark tarafından yapılan bu çalışmada, yeni yöntem kullanılmış ve γ -radyasyonla ışınlayarak PAA-metal nano kompozitleri oluşturulmuştur. Bu metot oda sıcaklığında normal basınç altında uygulanabilen basit ve hızlı bir yöntemdir. Çünkü daha önce de bahsedildiği gibi, metal iyonlarının redüksiyonu ve akrilik asit monomerlerinin polimerizasyonu bir basamakta gerçekleşir. Metal parçacıkları nano kompozitler içinde iyi bir şekilde dağılmıştır ve bu parçacıkların ortalama boyutu oldukça küçüktür. Bu metot inorganik-polimer nano kompozitler hazırlamada gelecek vaat eden bir yöntem olarak düşünülmektedir (Xu vd., 1998).

Poliakrilik asitler (PAA's) birçok ticari isim halinde (Karbopol, Karbomer, vb.) karşımıza çıkmasının yanı sıra kozmetik, ev ürünleri ve farmasotik preparatlarda da kullanılmaktadır. Bunlara ek olarak PAA' lar veteriner uygulamalarda kullanılan aşılarda yardımcı olarak görev yapmaktadır. PAA' nın tavuklarda aktif olmayan New Castle virüsüne karşı immün yanıtı arttırdığı görülmüştür. PAA' nın yardımcı rolü uzun yıllar önce tarif edilmiş olmasına karşın araştırmacılar tarafından yakın bir zamanda kabul görmüştür. Bunun yanı sıra proteinlerin PAA' ya kovalent olarak bağlanması antijenlerin immünojenliğini artırır. PAA' nın karboksil grubu oktanol ve bütanol ile esterleşme reaksiyonu vererek PAA-alkil esterlerini meydana getirirler. Buna benzer çalışmaları da yürüten Hilgers ve arkadaşları PAA-alkil esterlerini tavuklar üzerinde uygulayarak bu yardımcıları (adjuvant) sayesinde oluşan ikinci immün cevabı ölçmüşlerdir. Günümüzde PAA alkil esterlerinin kümes hayvanları aşılarında kullanılan W/O yardımcılarına alternatif olarak gösterilebileceği ileri sürülmektedir (Hilgers vd., 1998).

Polielektrolitler medikal ve veteriner uygulamalarda pratikte aşı olarak tanıtılmadan önce çözülmesi gereken bazı problemler vardır. Bu gibi çalışmalarda en önemlisi seçilen PE'nin toksik olmaması, biyo-bozunur olması ve düşük molekül ağırlığına sahip olması gerekir. Toksikite incelendiğinde PAA toksik olmasına rağmen, gerçekte polimer taşıyıcıları toksik değildirler. Hatta PAA zincirine, NIPAAm ünitelerinin katılması bu gibi PE'lerin toksisitelerini azaltmaktadır (Mustafaev, 1998).

Yine bir virüse karşı, E. De Clereq ve P. De Somer tarafından yapılan başka bir araştırmada *vesicular stomatitis* (ağız mukozasının iltihabı) virüsü ile letal dozda enfekte olmuş yeni doğan fareye interferon ve poliakrilik asit interperitoneal olarak enjekte edilmiş ve bunların virüse karşı koruyucu etkisi tespit edilmiştir. Hayatta kalma süresi ve hayatta kalan farelerin sayısında enfeksiyonla bir artış olduğu gözlenmiştir. İnterferonun ve poliakrilik asidin antiviral aktivitesi virüsün dozuyla ters orantılıdır. Poliakrilik asit (virüs ile enfekte edilmiş farelerde) ölüm oranını %50 azaltmıştır. In-vivo virüs enfeksiyonlarının profilaksisinde (hastalığa tutulmamak için alınan tedbirler) poliakrilik asidin uygun olabileceğine karar verilmiştir (E. De Clereq vd., 1968).

Protein ve peptid ilaçlarının, gastro-intestinal bölgedeki değişik bariyerler tarafından inaktive edilmelerini engellemek ve absorplanmalarını sağlamak amacıyla L-laktat dehidrogenazın taşıyıcı olarak görev yaptığı aljinat mikro parçacıklar püskürterek kurutma (spray-drying) tekniği ile geliştirilmiştir. Spray-drying tekniği mikro kapsül hazırlama metodu olarak raporlanmıştır. Fakat aljinat oluşumu ve spray-drying koşulları enzim aktivitesinde kayba neden olduğu için, karboksimetil selülozun sodyum tuzu, poliakrilik asidin sodyum tuzu ve laktoz gibi bazı koruyucuların ilavesi söz konusudur.



PAA' nın sodyum tuzu

Bu koruyucular aljinat ve deney koşullarıyla etkileşime girerek enzim inaktivasyonunu engellemektedir. Burada taşıyıcı olarak nötral polimer hidrojeller seçilmiştir. Çünkü polimer

hidrojelleri biyo-emniyetlidir (biosafe) ve organik çözücülere ihtiyaç duymazlar. Bu çalışmada Scanning Electron Mikroskobu (SEM)'de yapılan analizler, spray-drying yöntemi ile mikro partikül yapının sadece Na-PAA varlığında sağlanabileceğini açığa çıkarmıştır. Bunun nedeni Na-PAA' nın mikro partikül oluşumunu engelleyen fizyolojik solüsyonlardaki NaCl etkisini nötralize edebilme yeteneğine sahip olmasıdır. Koruyucu maddeler aktivite kaybını azaltmak için kullanılabilirler. Ayrıca çalışılan maddeler arasında, Na-PAA uyumlu, biyoaktivite korumasında bütünleştirici ve morfolojiyi koruyucu olarak düşünülmektedir (Coppi vd., 2002).

Birçok tıbbi alanda olduğu gibi göz ile ilgili de çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmaların bir bölümü göze uygulanan ilaçlarla ilgili olmuştur. Göz için yapılan ilaçların göz içine iyi bir şekilde absorplanabilmeleri için, tedavide aktif rol oynayan maddelerin daha uzun süreli göz tabakasında bulunabilmeleri üzerine deneyler yapılmıştır. Yapılan bir çalışmada ayrı ayrı kullanılan polimerler mukoz tabakayla bağ kurarak göz yüzeyinde çözünür, kolloidal ve partikül halde bulunan materyali yakalayabilmektedir. Bu çalışmada kullanılan polimerlerden biri de poliakrilik asittir (Greaves, 1993).

Klauser ve arkadaşları IgG ve PAA' yı bağlayarak yapay immün kompleks oluşturmuşlardır. Bu kompleksin doğal immün kompleksi taklit edip etmediğini araştırmışlardır. PAIGP insan periferik polimorfonüveli lökositlerde kemilüminesans bir cevap oluşturmaktadır. Bu cevap, serum varlığı ile yokluğunda ve tam kanda ortaya çıkmaktadır. Bu cevabın lökositler için serum yokluğunda tam kana oranla daha düşük olduğunu ortaya koymuşlardır. PAIGP doğal antijen-antikör kompleksi oluşmasına neden olarak birçok biyolojik reaksiyonu indüklemektedir (Klauser vd., 1990).

Farklı boyutlara sahip PAA' nın, DNA'nın yapısı ve özellikleri üzerine etkisi David G. Brown ve Donald S. Coffey tarafından incelenmiştir. Poliakrilik asidin izole edilmiş sıçan karaciğer hücresinden veya çözünmüş kromatinden kesilmiş DNA parçasını ayırma özelliğine sahip olduğu görülmüştür. Bahsedilen bu ayırma yeteneği (kapasitesi) onun boyutuna bağlıdır. Poliakrilik asidin tüm boyutları saflaştırılmış, fraksiyonlanmamış dana timus histonlarını çöktürme özelliğine sahiptir. Fakat, en küçük polimer büyük olanlara göre 2 kat daha etkilidir. Poliakrilik asidin büyük boyutluları, çekirdek hacminde artışa ve izole edilmiş hücrenin optik temizlenmesine neden olmuştur.

Büyük boyutta olan poliakrilik asidin, çekirdekte olan yüksek molekül ağırlıklı DNA'nın degradasyonunu önlediği ve histonlarla inhibe olmuş DNA parçasının eski özelliklerini kazandığı görülmüştür (Brown ve Coffey, 1973).

3- Biyolojik Dozimetre

Radyasyon ile ışınlamalarda kişilerin ve toplumun maruz kalacağı dozların radyobiolojik 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 dolasan 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.

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 dolasan kana taşınmaları,
- Dolaşımında bölünme olmayan G₀ fazında olmaları,
- Doku kültürü ortamında kolayca bölünebilmeleri,
- Senkronize (aynı anda aynı fazda) hücreler olarak bölünmeye geçebilmeleri.

3.1- İnsan Lenfosit Hücreleri

İnsan lenfosit hücreleri de alyuvarlar, akyuvarlar, trombositler gibi diğer kan hücrelerinin olduğu pluripotent hemopiotik 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 hücelere 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. Dolayan kandaki lenfosit hücrelerinin % 70' i T-lenfositleridir. Bu hücrelerin % 95 ' inin yarı ömrü ortalama 3 yıldır.

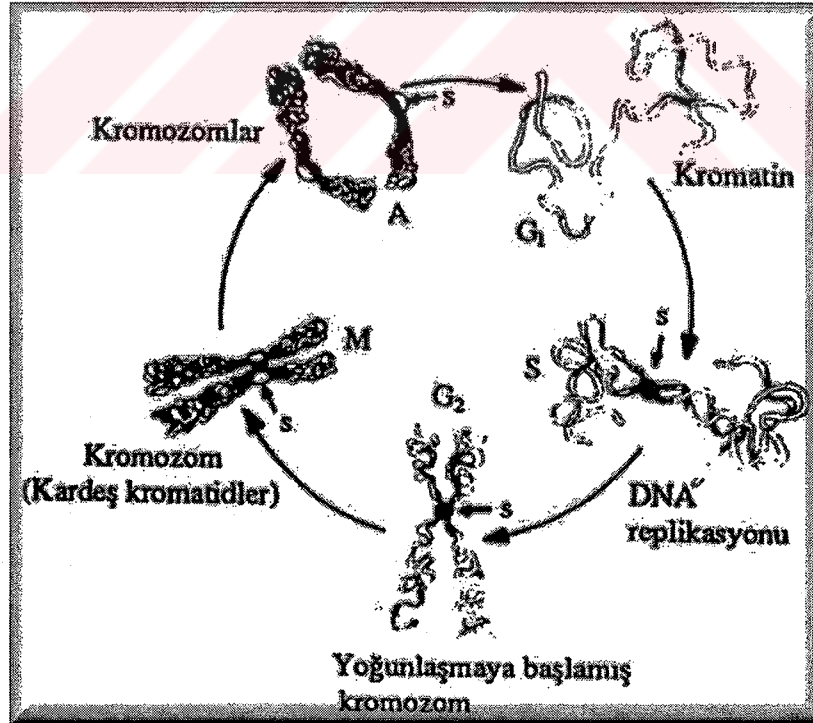
T hücrelerinin, B hücrelerinden ayrılmasını sağlayan özellik T hücrelerinin yüzeyinde bulunan CD moleküllerinden ileri gelmektedir. T hücrelerinin esas belirleyicisi ise TCR (T cell antigen reseptor) molekülüdür. Bu reseptörler TCR-1 ve TCR-2 olmak üzere ikiye ayrılır. TCR-2 molekülü iki adet disulfit bağı ile bağlanmış α ve β polipeptitlerinden oluşmaktadır. TCR-1 ise γ ve δ polipeptidlerinden 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 $T_{C/S}$ (cytotoxic, suppressor) CD^{8+} yi taşımaktadır. In vitro çalışmalarda phytohemaglutinin (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).

3.2- Ökaryotik Hücrelerde 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 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.

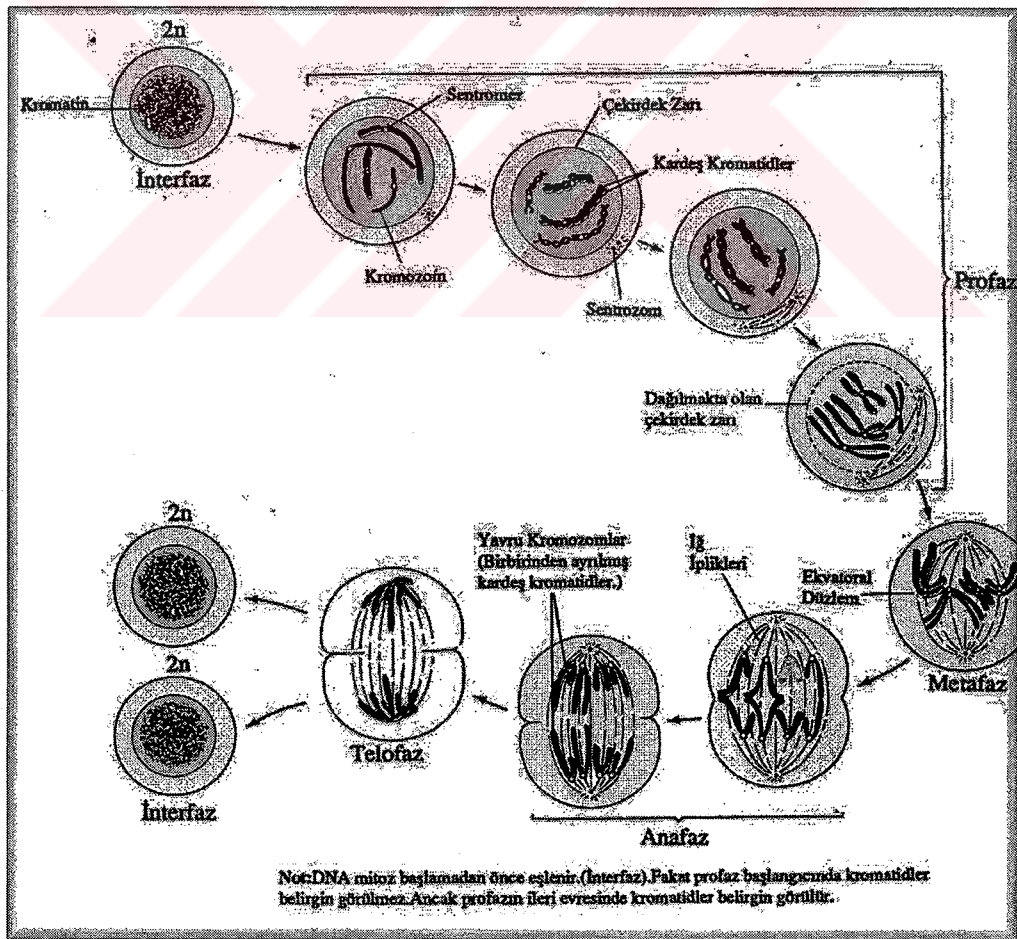


Şekil 3.1 Hücre Siklusu

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 kromozomlar tam eşit olarak bölünmesi garantilenmektedir. Yeni ve eski kromozomların yapı ve işlev bakımından birbirinin aynısıdır. 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.

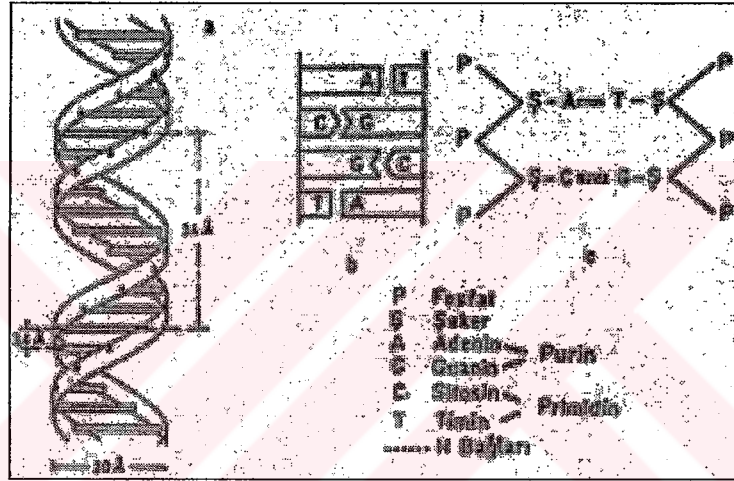
Mitoz bölünme; profaz, metafaz, anafaz, telofaz ve sitokinez olmak üzere beş evrede gerçekleşir.



Şekil 3.2 Mitoz Bölünme

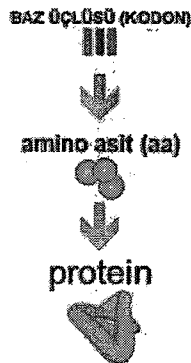
3.3- Radyasyonun DNA üzerine etkisi

DNA molekülü, 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 biriskelet ile bu iskeletteki 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 pürin (guanin ve adenin) tipindedirler.

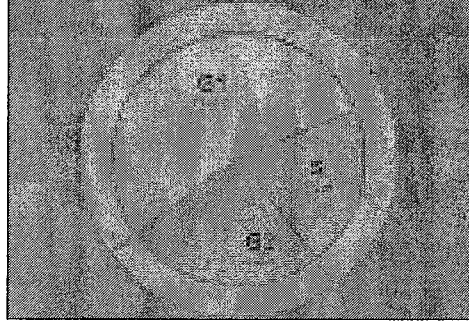


Şekil 3.3 DNA molekülünün temel yapı şeması (Özalpan, 1979)

DNA molekülünün iki ipliği, birbirinin tamamlayıcısı “komplementer” özellik gösterirler. 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.

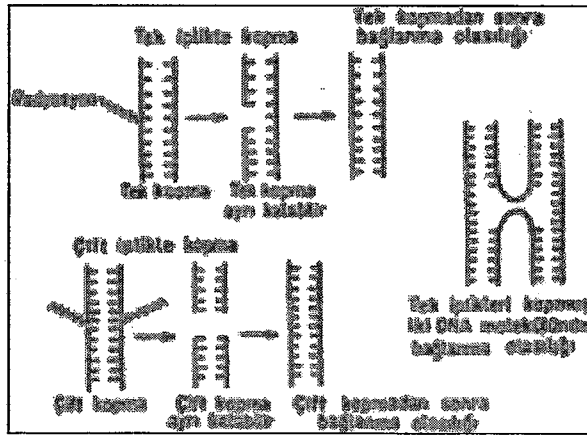


Buna göre DNA molekülü üzerindeki bazların özel dizilişi, spesifik amino asitlerden oluşmuş bir zincirin yani spesifik bir proteinin oluşumunu denetler. Amino asitlerin dizilişi doğrudan doğruya DNA molekülü üzerinde meydana gelmez. Aslında protein sentezi, sitoplazmada gerçekleşen bir olaydır.



Şekil 3.4 Memeli Hücre siklusunun değişik fazlarının şematik görünümü.

Hücre siklusunda, S fazından önce G1 fazı, S fazından sonra da G2 fazı bulunur. G1 fazı boyunca protein ve RNA sentezi yapılır. Bu arada S fazına hazırlık üzere bazı özel proteinler de sentez edilir. M fazında büyük oranda DNA' dan oluşan kromozomlar, kısalıp kalınlaşarak görülebilir hale geçmişlerdir. Mitoz hücrenin radyasyona karşı en duyarlı olduğu evreyi oluşturur. Biyofiziksel düzeyde, radyasyon etkisi ile DNA' nın bazlarında çeşitli bozukluklar, şeker fosfat bağlarında kopmalar ve bazların zincirden koparak serbest kalmaları gibi olaylar saptanmıştır.



Şekil 3.5 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 özet olarak aşağıdaki gibi sıralamak mümkündür;

- Hidrojen bağlarının kırılması,
- Zincir kırılmaları; tek ve çift zincirde kırılmalar veya şeker fosfat iskeletinin kırılması,
- DNA da baz zararı; 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 ortaya çıkabilir. Radyasyon etkisi ile ortaya çıkan kromozom anormalliklerinin oranı ile doz, doz hızı ve dozların aralıklarıyla 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 dorudan bir bağlantı kurmak her zaman mümkün olamamaktadır.

Diğer bir ifadeyle, biyokimyasal etkilerin biyofiziksel bozuklukların bir sonucu olarak ortaya çıktığını söylemek doğru değildir. Çünkü bu biyokimyasal etkilerin çoğunun hücrede DNA sentezinin yapılması için gerekli birçok moleküllerde radyasyon etkisi ile ortaya çıkan tahribatlar sonunda oluştuğunu gösteren birçok kanıtlar vardır (Özalpan, 1979).

3.4- Mikronükleus Analiz Yönteminin Gelişimi ve Özellikleri

Radyasyon sitogenetiği yöntemlerinin kullanıldığı biyolojik dozimetrede, çok sayıda kişinin absorbladıkları doz düzeylerini hızlı ve güvenilir olarak belirleyebilen, son yıllarda dikkatleri çeken yöntemlerden biri de çift nükleuslu hücrelerde Mikronükleus Analizi Yöntemidir. Mikronükleuslar, sitoplazma içinde, ana nükleusun (çekirdek) dışında, fakat nükleusun şekil, yapı ve boyanma özelliklerini yansıtan küçük küresel yapılar olarak tanımlanır (Thierens, 1991). Radyasyon veya başka bir nedenle hasar gören ve yavru nükleuslara dahil olamayan lenfosit kromozomları ve onların parçaları sitoplazma içinde yoğunlaşarak mikronükleusları oluştururlar (Heddle vd., 1983; Prosser, 1988; Migliore vd., 1991).

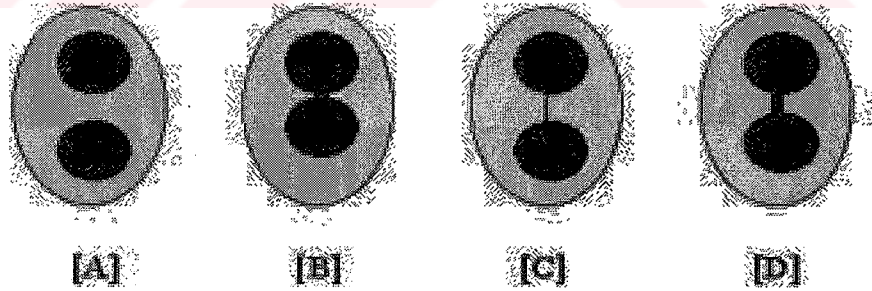
Sitogenetik hasarların göstergesi olarak mikronükleuslar ilk defa 1959 yılında A. Evans tarafından bitkilerde yapılan bir çalışmada kullanılmıştır (Evans, 1988). Daha sonralarda, lenfositlerde mikronükleus oluşum kinetikleri ve hücre siklus karakteristikleri ilk kez Obe ve arkadaşları tarafından yayınlanmıştır. 1964 yılında ise, Flinder ve arkadaşları, radyasyon kazası geçiren kişilerin kemik iliği hücrelerinde, sitoplazmada kromatin materyaline rastladıklarını bildirmişlerdir. Mikronükleuslar ilk olarak sitoplazma içinde, nükleusa benzer yapılar olarak gözlenerek, bunların oluşumu radyasyonun neden olduğu kromozom hasarlarına bağlanmıştır (Flinder vd., 1964). İnsanın dolaşan kanındaki lenfosit popülasyonlarında radyasyonun neden olduğu mikronükleusların analizini ilk gösterenler ise 1976-1977 yıllarında Countryman ve arkadaşları olmuştur (Countryman vd., 1976; Heddle vd., 1977).

Lenfositlerde bir klastojen nedeni ile meydana gelen hasar en erken I. Mitoz bölünme sonunda mikronükleus olarak görülebilir. Bu nedenle kültür zamanı iyi seçilmelidir. Pincu ve arkadaşları 1983 yılında kültür ortamına Bromodeoksiuridin ilave ederek I. ve II. Mitoz bölünmedeki mikronükleusları saptamışlardır (Pincu vd., 1984). Daha sonra yöntemi standartlaştırmak için çalışmalar devam etmiş, Fenech ve Morley bugün bazı değişikliklerle kullanılan Cytochalasin-Blok (CB) yöntemini geliştirmişlerdir (Fenech ve Morley, 1985). Bu yöntemin esası, lenfosit kültürüne I. mitozdan sonra (48. saatte) Cytochalasin-B ilave edilerek sitokinezin durdurulması ve iki nükleus içeren (binükleat) hücrelerde klastojenin oluşturduğu mikronükleusların sayılmasıdır.

3.4.1- Sayım ve değerlendirmede binükleat (BN) hücrelerin seçim kriterleri :

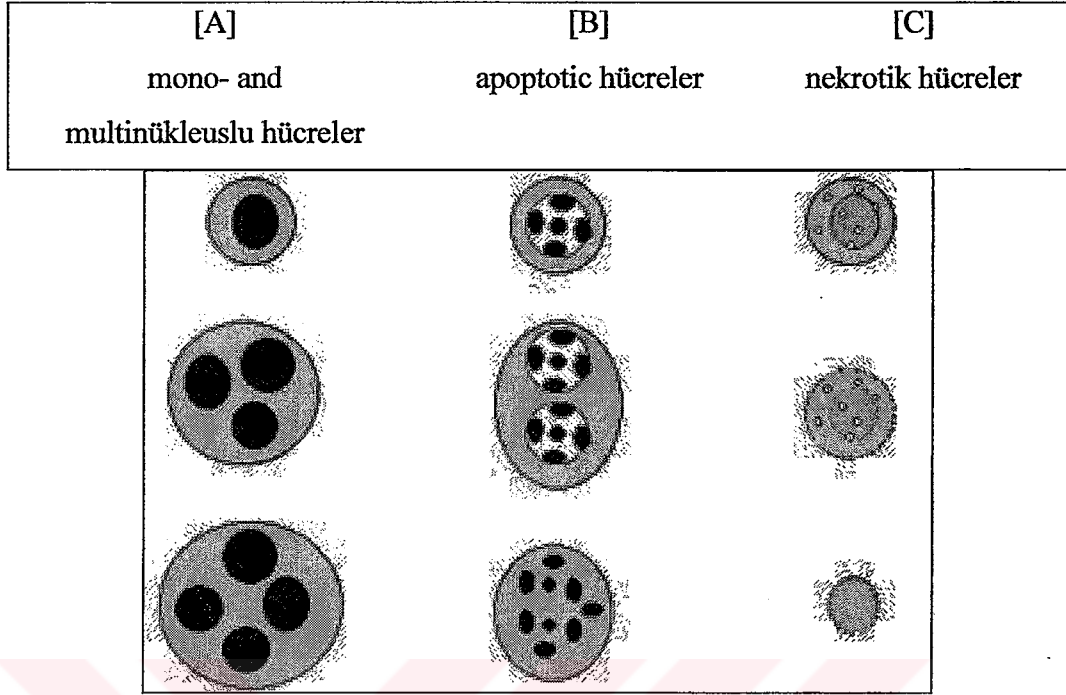
Mikronükleus sıklığında değerlendirilecek sitokinez blok hücreleri aşağıdaki karakteristik özelliklere sahip olmalıdır :

- Hücreler binükleat (BN) olmalıdır.
- BN hücre içindeki iki nükleus, hasar görmemiş çekirdek zarına sahip olmalı ve sitoplazmada bir düzende bulunmalıdır.
- BN hücredeki iki nükleus aynı ebatlarda, modelde ve aynı yoğunlukta boyanmış olmalıdır.
- BN hücre içindeki iki nükleus birbirleriyle bağlantılı olmamalıdır veya birbirlerine çekirdek çapının $\frac{1}{4}$ ünden geniş olmayan düzgün köprülerle bağlanmış olmalıdır.
- BN hücredeki iki ana nükleus birbirine değebilir ama ideal olarak birbirinin üzerine geçmiş şekilde olmamalıdır.
- BN hücrenin sitoplazma sınırları yada membranı (zarı) hasar görmemiş olmalı ve birbiriyle çakışan hücrelerin sitoplazma sınırlarından net olarak ayrılmalıdır [2].



Şekil 3.6 Sitokinez bloklu Mikronükleus (MN) analizinde binükleat (BN) hücreleri seçme kriterleri: A- İdeal binükleat (BN) hücre; B- Nükleusları birbirine temas eden BN hücre; C- Nükleusları arasında dar nükleoplazmik köprü olan BN hücre; D- Geniş nükleoplazmik köprü içeren BN hücre (Not: Birden çok nükleoplazmik köprü içeren binükleat hücreler gözlenmiştir)

[2].



Şekil 3.7 İn vitro koşullarda sitokinez-bloklı mikronükleus (MN) analizinde Binükleat (BN) hücrelerin dışında gözlenen çeşitli hücre tipleri. Bu tip hücreler MN frekansı olarak dikkate alınmamalıdır: [A]- Bir, üç ve dört nükleuslu hücreler; [B]- Apoptosis'in erken aşamasında olan mono- ve binükleat hücreler. Bu hücrelerde kromatin kısalması gerçekleşmiştir fakat çekirdek zarı parçalanmamıştır. Geç seviyedeki apoptotik hücreler, çekirdeksiz ve apoptotik kromatinler sitoplazma içerisindedir; [C]- Nekrozun çeşitli aşamalarında olan hücreler. Son evrelerinde sitoplazma kısmı yada tamamen kaybolur. Çekirdek zarı hasar görür ve çekirdeksel materyal kalan nükleustan akmaya başlar [2].

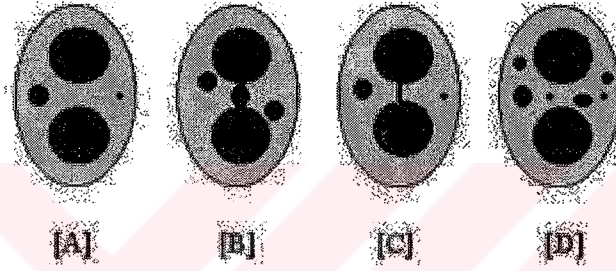
3.4.2- Mikronükleus sayımı için gerekli olan kriterler :

Mikronükleuslar morfolojik olarak fark edilebilir özelliktedirler fakat ana çekirdekten daha küçüktürler. Mikronükleus tekniği ile değerlendirme sayım kriterleri çok önemlidir. Sadece sitoplazması korunmuş binükleat hücreler ve bunlardaki mikronükleuslar sayılmalıdır. Bir mikronükleusun sahip olması gereken karakteristik özellikler şunlardır :

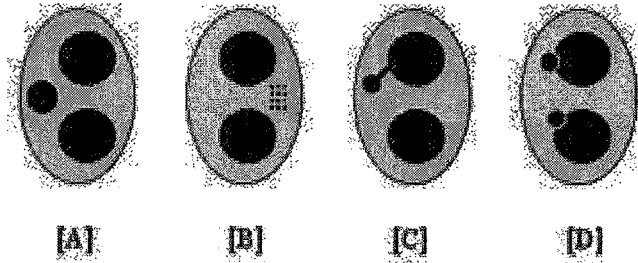
- İnsan lenfositlerindeki mikronükleus çapı, ana nükleusun (çekirdek) $\frac{1}{3}$ ' ü ile $\frac{1}{16}$ ' sı arasında değişiklik gösterebilir.
- Mikronükleus (MN), ana nükleus ile aynı yapı ve boyanma özelliklerine sahip olmalıdır. Parlama yapmamalıdır.

- c) MN , ana nükleus ile bağlantılı olmamalıdır.
- d) MN, ana nükleusa değebilir fakat ana nükleus ile çakışmamalıdır ve sınırları belirgin olmalıdır.
- e) Yuvarlak veya yuvarlağa çok yakın bir şekilde olmalıdır.

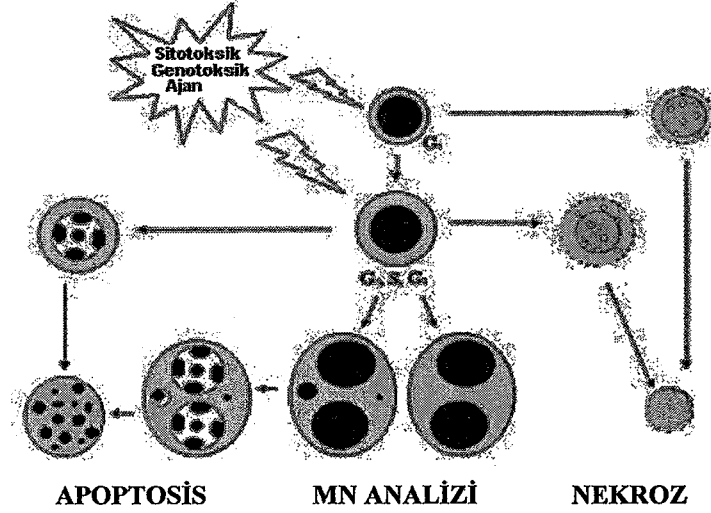
Mikronükleus tekniği, lenfosit kültüründe yaygın olarak kullanılmaktadır. İnsan kanının, özellikle lenfosit hücrelerinin iyonizan radyasyonlara karşı hassas olduğu ve doz-cevap ilişkilerinin kurulabileceği 20 yıldan daha uzun bir süredir bilinmesine rağmen çevresel mutajenlerin etkisinin tespitinde de güvenle kullanılabileceği son yıllarda kabul edilmiştir.



Şekil 3.8 Binükleat hücrelerde mikronükleusun tipik görüntüsü ve boyutu: [A]- Biri, ana çekirdeğin 1/3' ü diğeri 1/9' u kadar büyüklüğe sahip çift nükleuslu hücre; [B]- Ana çekirdeğe değen fakat üzerine çıkmayan mikronükleus; [C]- Çift nükleuslu ve ana çekirdekleri arasında nükleoplazmik köprü olan binükleat hücre; [D]- Değişik boylarda altı mikronükleuslu binükleat hücre; bu tip hücreler nadiren görülür [2].



Şekil 3.9 Mikronükleus olmayan fakat mikronükleusa benzer yapılar içeren binükleat hücreler (veya binükleat benzeri hücreler): [A]- Biri diğerlerinden daha küçük olan üç nükleuslu hücre; [B]- Sitoplazmada farklı bir yoğunluğa sahip olan bölge; [C]- Ana çekirdekten dışarı çıkan ve dar bir nükleoplazmik köprüyle ana çekirdeğe bağlı olan mikronükleus benzeri nükleus materyali; [D]- Ana çekirdeğe bariz bir şekilde nükleoplazmik bağlantısı olan çekirdeksel çıkıntılar [2].



Şekil 3.10 Sitotoksik ve genotoksik ajanlar sonucu sitokinez-bloklu hücre kültüründe gerçekleşebilen çeşitli olasılıklar [2].

3.5- Mikronükleus Tekniğinin Avantajları :

- Analizi kolay, 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 zarar verme potansiyelinde 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.

3.6- Mikronükleus Tekniğinin Dezavantajları :

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

Sonuç olarak, dolaşan kan lenfositlerinde MN tekniği, sitogenetik etkilerin araştırılmasında oldukça kolay ve hassas bir yöntem olarak literatürde yerini almıştır (Al-Sabti vd., 1992; Lynch ve Parry, 1993; Berces vd., 1993; Anwar, 1994; Köteles ve Bojtor, 1995).



4. DENEYSEL KISIM

4.1 Kullanılan Cihazlar ve Kimyasal Maddeler

4.1.1 Kullanılan Cihazlar

- Shimadzu UV-2401 PC UV-Visible Recording Spectrofotometre
- AAS Variant Spectra AA200
- Eppendorf Mikro Pipet Seti
- WTW Microprocessor pH 537 pH Metre
- Mettler Toledo AT201 Terazii
- Heidolph MR 3001 Magnetik Karıştırıcı
- Nüve ST 402 Çalkalayıcı 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

4.1.2 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Poliakrilik Asit	Bromo deoksiuridin
PBS	Glutamin
Potasyum hidrojen fosfat	Penisilin-Streptomisin
Potasyum dihidrojen fosfat	Azur lösin metilen blue
Sodyum klorür	Asetik asit
Bakır sülfat	Metanol
Bakır klorür	Formaldehit
PHA	F-10
Cytochalin-B	Fosfat Bovin Serum
Normal Salin	Heparin
DMSO	Nitrik asit
Sodyum Bikarbonat	Hidrojen peroksit
Potasyum klorür	

4.2 Poliakrilik asit-Cu²⁺ Komplekslerinin Absorbanslarının İncelenmesi

4.2.1 Kullanılan Çözeltiler

A- PBS Tamponu (pH : 7.2)

52.2 gr K₂HPO₄ 600 ml suda çözüldükten sonra üzerine 400 ml suda çözülmüş 27.2 gr KH₂PO₄ ilave edilerek karıştırıldı (pH: 7.2-7.4). Böylece fosfat tamponu hazırlanmış oldu. 8.4 gr NaCl' nin 20 ml fosfat tamponu ve 980 ml destile suda çözünmesiyle PBS tamponu hazırlandı.

B- Poliakrilik Asit Polimer Çözeltisi

1 mg polimerin 1 ml PBS tamponunda çözülmesiyle hazırlandı.

C- CuSO₄ Çözeltisi

CuSO₄.5H₂O çözeltisinin konsantrasyonu % 5'lik olacak şekilde destile su ile hazırlandı.

4.2.2 Deneyin Yapılışı

1 mg/1 ml olarak hazırlanan PAA çözeltisi ilk önce UV-visible spektrofotometre' de absorbans değerlerini okumak üzere küvete konur. Daha sonra metal tuzundan bu küvete 20 µl' den başlayarak eklenir (çökelti oluşuncaya kadar). Böylelikle bu küvet içerisindeki PAA bakır (Cu) tuzu ile bir nevi titre edilerek absorbansı, 400 nm dalga boyunda ölçülmüştür.

4.3 AAS Analizi

4.3.1 Kullanılan Çözeltiler

A- PBS Tamponu (pH : 7.2)

52.2 gr K_2HPO_4 600 ml suda çözüldükten sonra üzerine 400 ml suda çözülmüş 27.2 gr KH_2PO_4 ilave edilerek karıştırıldı (pH: 7.2-7.4). Böylece fosfat tamponu hazırlanmış oldu. 8.4 gr NaCl' nin 20 ml fosfat tamponu ve 980 ml destile suda çözünmesiyle PBS tamponu hazırlandı.

B- Poliakrilik Asit Polimer Çözeltisi

1 mg polimerin 1 ml PBS tamponunda çözülmesiyle hazırlandı.

C- $CuSO_4$ Çözeltisi

$CuSO_4 \cdot 5H_2O$ çözeltisinin konsantrasyonu % 5'lik olacak şekilde destile su ile hazırlandı.

4.3.2 Deneyin Yapılışı

$n_{Cu}/n_{AA}=1/50$ ve $n_{Cu}/n_{AA}=1/20$ oranlarında olacak şekilde hazırlanan PAA- Cu^{2+} ikili kompleksleri çözeltilerinden 0.5 ml olmak üzere sağlıklı insanlardan alınan 5 ml' lik kan örneklerine enjektör vasıtasıyla klasik yöntemle karıştırılarak ve vorteks kullanarak ilave edildi. Daha sonra $37^{\circ}C$ ' de 1 saat bekletildi ve süre sonunda 2000 rpm' de 5 dk santrifüj edilip tüplerdeki her bir faz ayrıldı. Atomik Absorbsiyon Spektrofotometre (AAS) cihazında yapılacak analiz için alt (pellet kısmı) ve üst faz (serum kısım) çözme sistemine alındı. Bu işlem için her 1 ml örnek için 2.5 ml d. HNO_3 ve 1 ml H_2O_2 kullanılarak mikrodalga ısıtma programına konuldu. Burada teflon kaplar kullanılmıştır.

Örnekler çözüldükten sonra kodlanan balon jöjelere aktarılıp 1+1 HNO_3 ile tamamlanarak AAS analizleri yapıldı.

Aşama	Maks. Güç	% Güç	Ramp (min)	Basınç (psi)	Sıcaklık (°C)	Hold (min)
(1)	600 W 1200 W	100	25:00	175	210	05:00

Analizi yapılacak örnek (sıvı), kapiler vasıtasıyla emdirilmektedir. Sistemde ısıyla (alevle) moleküller atomları haline dönüşmektedir. AAS analizi esasına göre, oyuk katot lambadan yayımlanan ışığın bir kısmı atom tarafından absorplanıyor ve çıkan ışık dedekte ediliyor.



Her elemente özgü katot lambalar bulunmaktadır. Lambalar en iyi değerleri verebilmesi için işlem öncesinde optimize edilmektedir. Analizi yapılan Cu için kendine özgü olan oyuk katot lambadan 324.8 nm dalga boyunda bir ışık yayılmaktadır. Bu deneyi yapmaktaki amaç her iki fazda bulunan bakır miktarını tayin etmektir.

4.4 PAA ve PAA-Cu²⁺ İkili Kompleksleri Varlığında ⁶⁰Co γ Kaynağı ile Farklı Dozlarda Işımlanmış ve Işımlanmamış Kan Örneklerindeki Lenfosit Hücrelerde Mikronükleus Değişiminin İncelenmesi

4.4.1 Kullanılan Çözeltiler

A- PBS Tamponu (pH : 7.2)

52.2 gr K₂HPO₄ 600 ml suda çözüldükten sonra üzerine 400 ml suda çözülmüş 27.2 gr KH₂PO₄ ilave edilerek karıştırıldı (pH: 7.2-7.4). Böylece fosfat tamponu hazırlanmış oldu. 8.4 gr NaCl' nin 20 ml fosfat tamponu ve 980 ml destile suda çözünmesiyle PBS tamponu hazırlandı.

B- Poliakrilik Asit Polimer Çözeltisi

1 mg polimerin 1 ml PBS tamponunda çözülmesiyle hazırlandı.

C- CuSO₄ Çözeltisi

CuSO₄.5H₂O çözeltisinin konsantrasyonu % 5'lik olacak şekilde destile su ile hazırlandı.

D- CuCl₂ Çözeltisi

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

E- PHA Çözeltisi

20 mg PHA (Roche) üzerine 100 ml steril destile su ilave edilerek 0,2mg / ml olacak şekilde hazırlanır.

F- Kompleks Medyum

10 gr F-10 tartılarak 1 L' ye tamamlanıp üzerine 0.5 g Heparin, 10 ml penisilin-streptomisin ve 10 ml de L-Glutamin ilave edilir. Gül kurusu renk oluşana kadar NaHCO_3 çözeltisi (8 gr NaHCO_3 alınarak 100 ml çift destile suda çözülerek hazırlanır) eklenir.

Çözelti 0.2 μm çapındaki milipor filtreden (Schleicher ve Schuell marka, 1 tanesi için yaklaşık 100 ml süzölebilecek şekilde) süzülerek steril edilir. Bu işlemden sonra 1 L' sine 250 ml steril Foetal Bovin Serum ilave edilerek hazırlanır.

G- DMSO Çözeltisi

Stok DMSO çözeltisinden 0.1 ml alınıp, 0.9 ml salin çözeltisi ile 1 ml' ye tamamlanarak hazırlanır.

H- Cytochalasin-B Çözeltisi

1 mg cytochalasin-B' yi çözmek için hazırlanan DMSO çözeltisinden 0.5 ml ilave edilir ve 5 ml destile su ile tamamlanır. Böylelikle 0.2 mg/ml cytochalasin-B çözeltisi hazırlanmış olur.

I- Bromo Deoksiüridin (BrdU) Çözeltisi

6.14 mg bromo deoksiüridin 10 ml destile suda çözülür. Deneylerde 100 ml medyuma 1 ml BrdU stok çözeltisinden ilave edilir.

J- Propiyonik Asit

% 99.7' lik propiyonik asit çözeltisinden %0.1'lik propiyonik asit çözeltisi hazırlayabilmek için, 0.1003 g propiyonik asit tartılarak 100 ml' ye tamamlandı. 100 ml' ye tamamlamadan önce pH 7'ye ayarlandı.

4.4.2 Deneyin Yapılışı

Bu deneyde %0.1' lik propiyonik asit çözeltisi, 0.5 ml' sinde 0.25 , 0.35 , 0.50 mg PAA olan çözeltiler ve $n_{Cu}/n_{PAA}=1/50$ ve $n_{Cu}/n_{PAA}=1/20$ ($c_{AA}= 0.35mg/0.5ml$) oranlarında olacak şekilde hazırlanan steril (56°C'de 30 dak. tutularak) PAA-Cu²⁺ ikili kompleks çözeltileri kullanıldı. Propiyonik asitin kullanılmasının nedeni, poliakrilik asitin bir monomeri olarak düşünülmesidir. Bu çözeltiler pH~7'de hazırlanmış ve in-vitro koşullarda kan ortamına verildi. Kullanılan kanlar, sağlıklı insanlardan 5 ml' lik heparinli vakumlu tüplere alındı.

Daha sonra Mikronükleus (MN) yöntemiyle lenfosit hücrelerde propiyonik asitin, PAA' nın ve PAA-Cu²⁺ ikili komplekslerinin kültür ortamındaki davranışları ve meydana gelen değişimler incelendi. Bu deneylerde ışık mikroskobu kullanılarak lenfosit hücrelerde incelemeler yapılarak, polimerin ve ikili komplekslerinin hücreler üzerine etkisi değerlendirildi. İkinci aşamada ise PAA ve PAA-Cu²⁺ ikili kompleksleri kan ortamına verildikten sonra 1 ve 3 Gy radyasyon dozlarında ışınlanarak radyasyonun etkisi yine MN yöntemiyle incelendi ve sonuçlar karşılaştırıldı.

4.4.2.1- Kan Örneklerinin Elde Edilmesi

Bu çalışmada kullanılan kan örnekleri genç, sağlıklı ve sigara içmeyen kişilerden elde edildi. 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. Kan örnekleri hazırlanan çözeltiler ile muamele edilmeden önce 1 saat, 37 °C' de dinlenmeleri için bekletildi.

4.4.2.2- PAA ve PAA-Cu²⁺ İkili Kompleks Çözeltilerinin Kan Örnekleri ile Muamele Edilmesi

Her bir kan tüpüne 4,5 ml kan örneği alınmıştır. Kan örnekleri 1 saat dinlendirildikten sonra, denenecek farklı konsantrasyonlardaki PAA ve PAA-Cu²⁺ ikili kompleks çözeltilerinden 0,5 ml kan tüpüne ilave edildi ve hafifçe çalkalanarak kan ile çözeltilerin karışması sağlandı. Çözeltilerin ilavesinden sonra kan örnekleri, etkileşim için 24 saat 37°C' lik çalkalamalı su banyosuna bırakıldı.

Bu süre sonunda kan örnekleri 2000 RPM' de 5 dk. santrifüj edildi. Üst kısımda kalan süpernatant (serum) enjektörle çekilerek atıldı. Daha sonra, her tüpe aynı seviyede olacak şekilde kültür medyumu eklendi. Kompleks kültür medyumu ile yıkama yapıldıktan sonra 2000 RPM' de 5 dk santrifüj edildi. Bu yıkama işlemi 3 defa tekrarlandı ve kalan hücreler kültüre alındı.

4.4.2.3 Kan Örneklerinin PAA ve PAA-Cu²⁺ İkili Kompleksleri Varlığında Işınlanması

PAA ve PAA-Cu²⁺ ikili kompleksleri varlığında radyasyonun etkisinin incelenmesi amacı ile yeni bir deney serisi hazırlandı. Bunun için yukarıda anlatılan şekilde kan örnekleri alınıp yine aynı konsantrasyonlardaki PAA ve PAA-Cu çözeltileri ile muamele edilerek, 60 dk' lık bekleme süresi sonunda 1 ve 3 Gy' lik dozlarda ışınladı. Daha sonra kan örnekleri aynı koşullarda santrifüj edildi ve serum atılarak kalan hücreler kültüre alındı.

Işınlama Koşulları :

Işınlamalar Çekmece Nükleer Araştırma ve Eğitim Merkezi' nde bulunan Sekonder Standart Dozimetri Laboratuvarı (SSDL) ışınlama ünitesinde ⁶⁰Co γ ışını kaynağı ile yapıldı. Kan örnekleri, kaynaktan uzaklığı 100 cm' de, doz hızı 348.57 mGy / 2dk olan kaynak karşısında 1 Gy' lik ışınlama için 5 dk. 45 sn , 3 Gy' lik ışınlama için ise 17 dk. 16 sn bekletildi.

4.4.2.4- Hücrelerin Kültüre Alınması

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

Her bir kan örneğinden mikronükleus analizi için 2 paralel hazırlandı. Herhangi bir kontaminasyona sebep vermemek için buraya kadar yapılan bütün kültür işlemleri, UV lambası ile steril hale getirilen bir doku kültür laboratuvarında, Laminar Flow Chamber (hepa filtrelerinden hava üfleli kabin) içinde gerçekleştirildi. Gereken madde ilavelerinde ve sulandırmalarda steril ve bir kullanımlık (disposable) enjektörler, çözeltilerin steril olarak

hazırlanabilmesi için ise milipor filtreler ve kırmızı kapaklı, gama ile steril edilmiş 50 ml' lik polietilen kültür şişeleri kullanıldı.

Kültür şişelerine, lenfositleri bölünmeye teşvik etmek için 0.4 – 0.5 ml Phytohemaglutinin (PHA, Roche 20 mg), 5 ml kompleks medyum ve 0.7- 1 ml kan örneği ilave edilerek 37 °C' deki inkübatöre konuldu.

Mikronükleus Analiz Yöntemi için yukarıda anlatılan şartlarda hazırlanan kan örneklerini içeren kültür şişelerine, mitoz bölünmenin interfaz evresinde biriktirilebilmeleri amacı ile 48. saatte 0,15 - 0,20 ml Cytochalsin-B (Sigma) ilave edildi. Cytochalsin-B ilavesinden sonra kültür şişeleri 20 saat daha 37°C' deki su banyosuna bırakıldı. Toplam kültür süresi 68 saat olan mikronükleus analiz yönteminde kültür şişelerinin bekletildiği ortamın sıcaklığı 37°C' de sabittir. Bu süre sonunda fiksasyon işlemine geçildi.

~ 1 ml Örnek (Kan + PAA çözeltisi)



5 ml KOMPLEKS MEDIUM

+

0.4 – 0.5 ml PHA



37 °C' lik inkübatöre alındı



48. saatte

~ 0.2 ml Cytochalsin-B
ilave edildi

68. saat kültür süresinin sonu

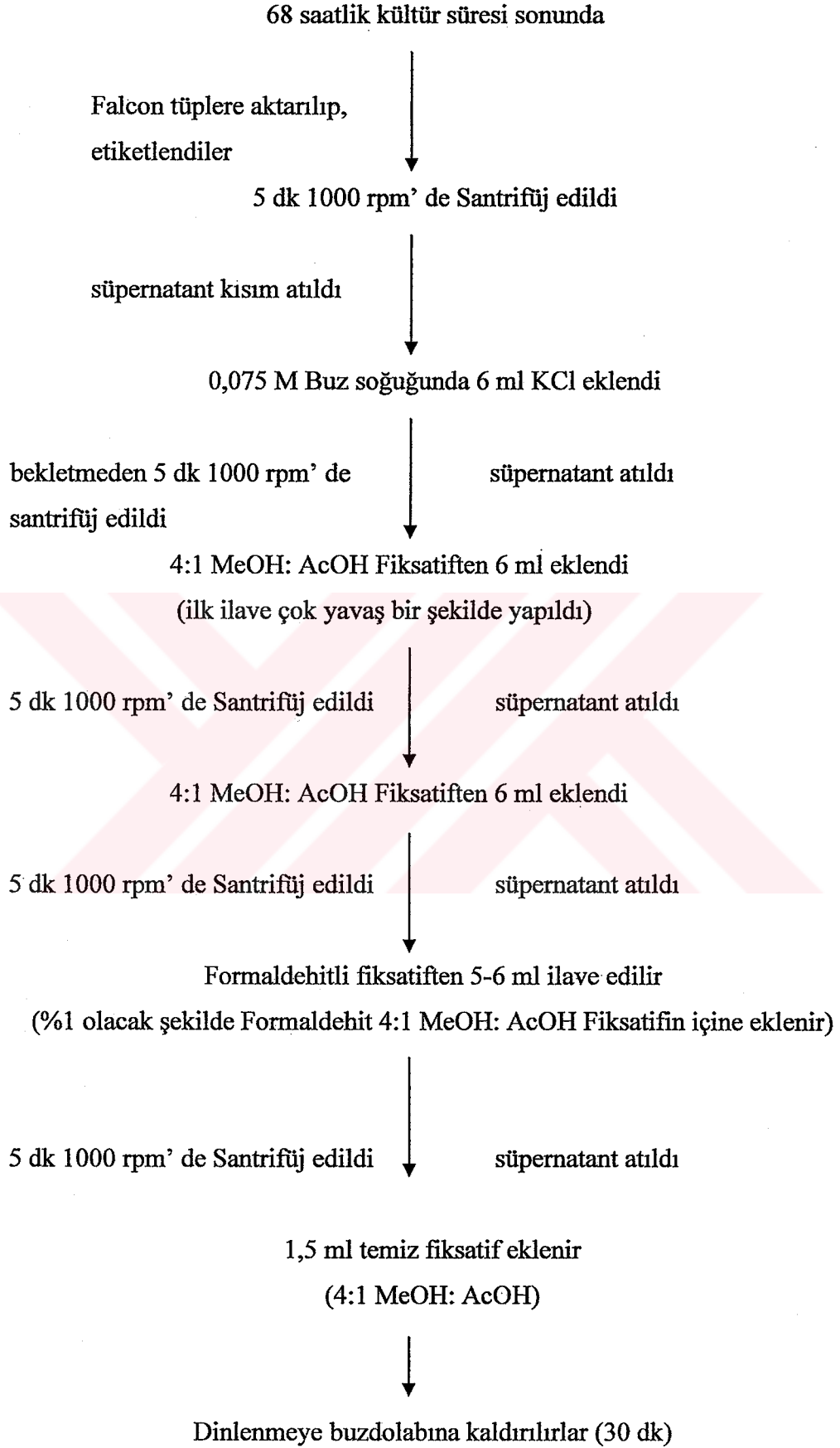
Şekil 4.1 Ekim işleminin şematik olarak gösterimi.

4.4.2.5- Hücrelerin Fikse (Tesbit) Edilmesi

Mikronükleus yöntemi için 68 saat' lik kültür süresi tamamlandıktan sonra fiksasyon işlemine başlandı. İlk olarak, kültür şişelerinin kapakları açılarak kan örnekleri 10 ml' lik santrifüj tüplerine (Falcon tüp) aktarıldı. 1000 RPM' lik 5 dk santrifüj işleminden sonra üstte kalan süpernatant (serum) kısmı atıldı. Çöken kan, bir vorteks karıştırıcı yardımıyla karıştırılırken üzerine hipotonik şok için 0,075 M buz soğuşunda (4°C) KCl (Merck) çözeltisinden 6 ml ilave edildi. Bu işlem sonrasında bekletme yapılmadan santrifüj edildi ve süpernatant kısım atıldı. Vorteks mikserde karıştırılırken her bir tüpe taze hazırlanmış fiksatif çözeltisinden 6 ml yavaş bir şekilde damla damla ilave edilerek hücreler fikse 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. Tüplerin kapakları kapatılarak 4°C' de 1 saat bekletildi.

Bu süre sonunda elde edilen hücreler, temiz, kodlanmış ve dondurulmuş lamlar üzerine çok yakından damlatılıp, yayılarak oda sıcaklığında düz bir zemin üzerinde kurumak üzere bırakıldı. Lamlar kurduktan sonra %4' lük Giemsa (Gibco) ile boyandılar. Boya içinde 8 dk bırakıldıktan sonra destile suyla çalkalanarak kurutuldu.



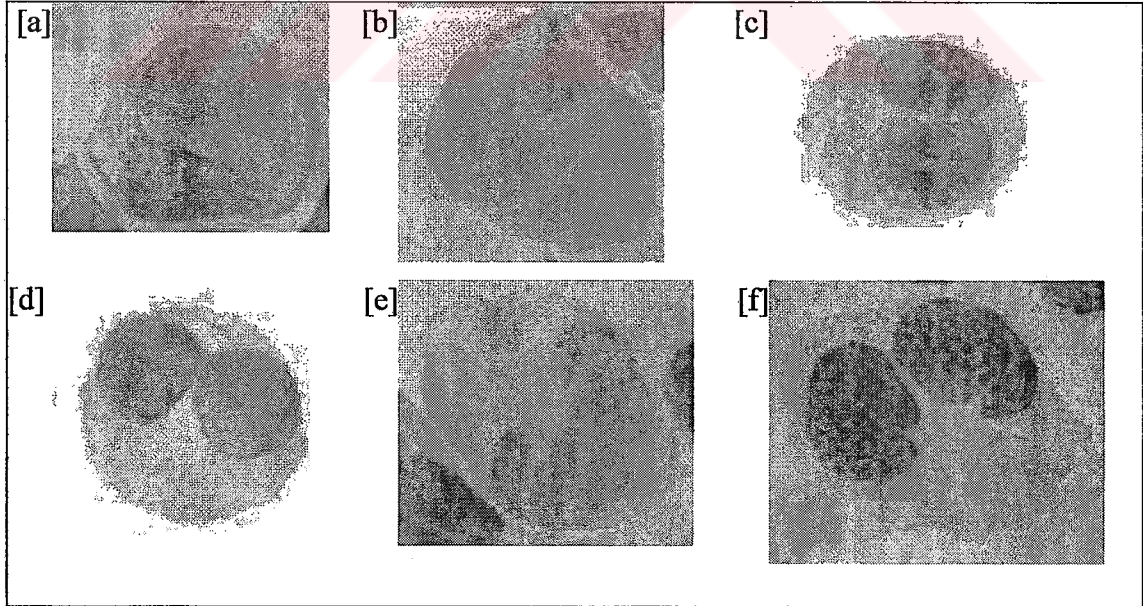
Şekil 4.2 Hücrelerin fikse edilmesinin şematik olarak gösterimi.

4.4.2.6- Mikronükleus Analiz Yönteminin Değerlendirilmesi

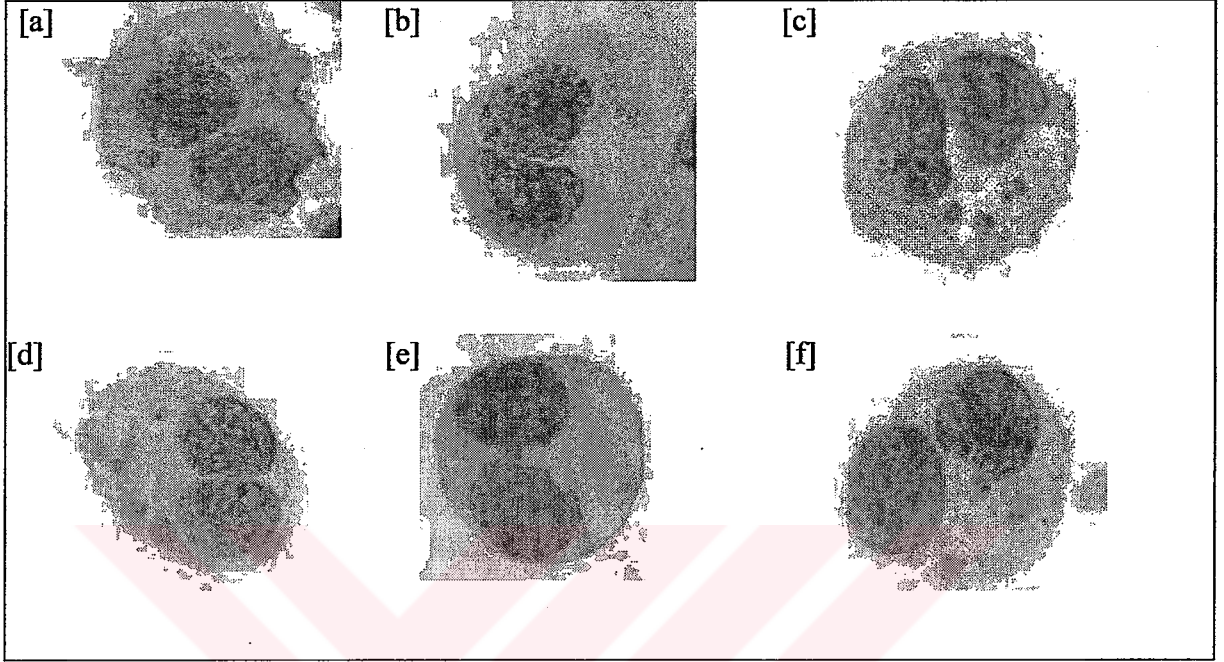
Giemsa boya ile boyandıktan sonra hazırlanan preparatlar ışık mikroskopunda x250 ve x1000 büyütmede analiz edildi. Değerlendirmede, Countryman ve Heddle tarafından geliştirilmiş sayım kriterleri kullanıldı. Bu kriterlere göre, sitoplazmaları korunmuş binükleat hücreler içinde nükleusla aynı yoğunlukta ve özellikte boyanan, ışığı yansıtmayan, düzgün şekilli ve nükleusun yarısından daha küçük boyutlu mikronükleuslar sayılmalıdır. Bunun için, analiz işleminde I. mitoz bölünmesini tamamlamış, Cytochalasin-B ilavesi ile sitoplazma bölünmesi engellenmiş olan, iki nükleuslu (çekirdek) binükleat hücreler ve bu hücrelerin sitoplazmalarında bulunan küçük nükleuslar (mikronükleus) değerlendirildi.

Sayım işlemi sırasında, mikronükleuslar saptandığında değerlendirme formu üzerine normal hücrelerle, mikronükleuslu hücrelerin koordinatları ve içerdikleri mikronükleus sayıları kaydedilir.

Mikronükleus içermeyen binükleat hücreler



Şekil 4.3 Mikronükleus içermeyen tipik binükleat (BN) hücreler. (d) ve (e) benzer şekilli çekirdekleri olan hücreler; bu tip hücreler zaman zaman gözlenir ve normal binükleat hücreler olarak düşünülebilir [2].

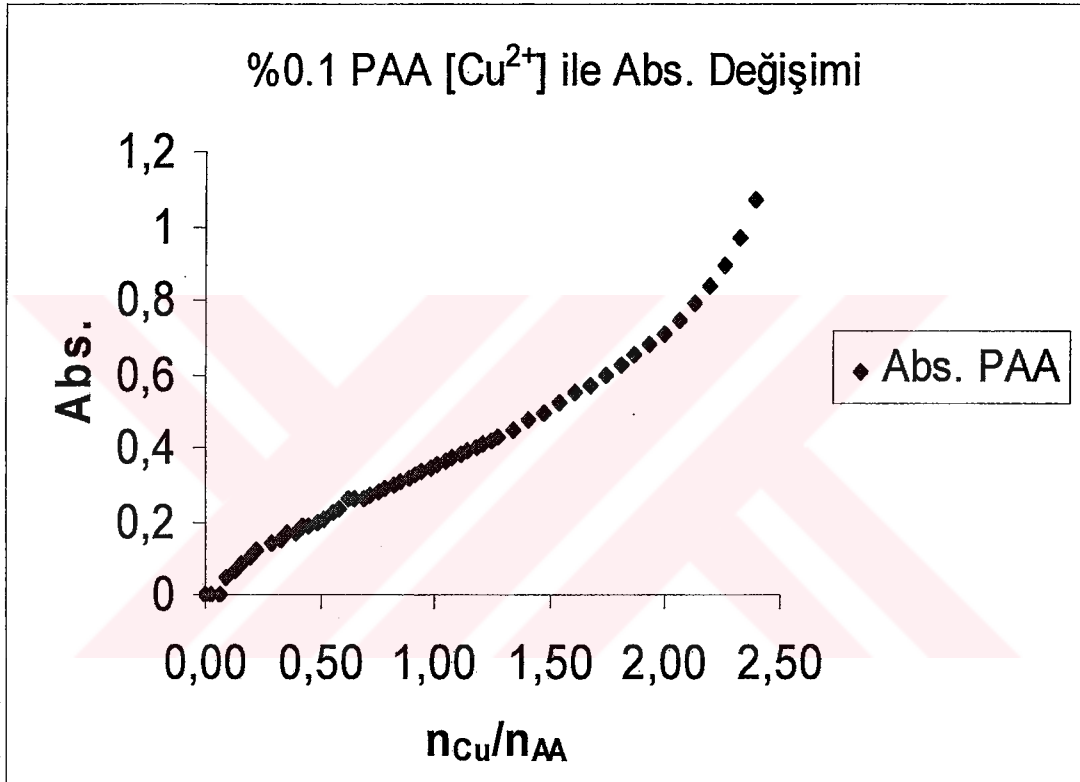
Mikronükleus içeren binükleat hücreler

Şekil 4.4 Mikronükleus (MN) içeren binükleat (BN) hücreler. (d) MN her iki nükleusa da değmektedir [2].

5- DENEYSEL SONUÇLAR

5.1- UV / VIS Ölçüm Sonuçları

Çizelge 5.1 %0.1'lik PAA çözeltisine belirli miktarlarda $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ tuzu ilavesi sonucu değişen $n_{\text{Cu}}/n_{\text{PAA}}$ oranlarında absorbans değerlerinin 400 nm dalga boyunda ölçülmesi.

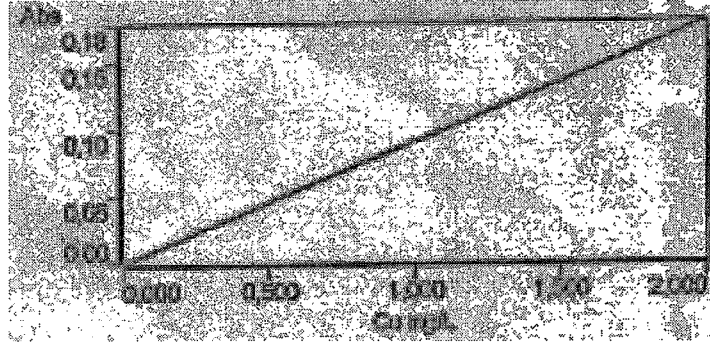


Çizelge 5.2 PAA' nın CuSO_4 ile titrasyonu sonucu UV / VIS ile yapılan absorbans ölçüm değerleri.

10 ml %0.1 PAA	μl %5 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	mg $[\text{Cu}^{2+}]$	$n_{\text{Cu}}/n_{\text{AA}}$	Abs. PAA
AC0	0	0	0,00	0
AC1	20	0,256	0,03	0
AC2	40	0,512	0,07	0
AC3	60	0,768	0,10	0,047
AC4	80	1,024	0,13	0,067
AC5	100	1,28	0,16	0,087
AC6	120	1,536	0,20	0,105
AC7	140	1,792	0,23	0,121
AC8	180	2,304	0,29	0,136
AC9	200	2,56	0,33	0,151
AC10	220	2,816	0,36	0,164
AC15	320	4,096	0,52	0,209
AC20	420	5,376	0,69	0,263
AC25	520	6,656	0,85	0,307
AC30	620	7,936	1,02	0,353
AC35	720	9,216	1,18	0,401
AC40	860	11,008	1,41	0,474
AC45	1060	13,568	1,74	0,591
AC50	1260	16,128	2,06	0,747
AC51	1300	16,64	2,13	0,788
AC52	1340	17,152	2,20	0,834
AC53	1380	17,664	2,26	0,892
AC54	1420	18,176	2,33	0,965
AC55	1460	18,688	2,39	1,066

5.2- AAS Analiz Sonuçları

Çizelge 5.3 PAA-Cu²⁺ ikili kompleksleri ile doğal kanın iki farklı şekilde karıştırılarak muamele edilmesi sonucu kanın alt ve üst fazlarında yapılan bakır tayini.



Çizelge 5.4 PAA-Cu²⁺ ikili kompleksleri ile doğal kanın iki farklı şekilde karıştırılarak muamele edilmesi sonucu kanın alt ve üst fazı için AAS' de yapılan bakır tayini sonucu alınan değerler.

Örnek	Konsantrasyon mg/ml	% RDS	Abs
Blank	0.007 m	60.5	0.0006
Standart 0.5 ppm	0.504 m	0.6	0.0452
Blank üst faz	0.182 m	2.1	0.0164
Blank alt üst	0.180m	0.5	0.0162
1/20 Vorteks üst	0.611m	0.4	0.0547
1/20 Vorteks alt	0.381m	0.2	0.0343
1/20 Klasik üst	0.566m	0.3	0.0507
1/20 Klasik alt	0.492m	0.9	0.0441

AAS ile yapılan bu deneylerde alınan bu sonuçlar vorteks ile yapılan karıştırmada kanın üst fazında (atılan faz) kalan bakırın, klasik yöntemle yapılan karıştırmadaki kanın üst fazına oranla daha fazla bakır içerdiğini göstermiştir.

5.3- Mikronükleus Analiz Yöntemi ile Elde Edilen Deneysel Sonuçlar

5.3.1- Propiyonik Asit (PPA) Konsantrasyonuna Bağlı MN Değişimi

Çizelge 5.5 Propiyonik asit konsantrasyonuna bağlı olarak MN değişim tablosu.

		Toplam Sayılan Hücre	Toplam Mikronükleus	Hücre Başına Mikronükleus
	Kontrol (0.00)	2500	2	0.0008
C_{PPA} (mg/5 mL Kan)	0.25	2501	5	0.002
	0.35	2508	15	0.006
	0.50	2505	19	0.008

Üç farklı konsantrasyonda PPA kullanıldı. PPA kan ile muamele edildiğinde oluşan MN değerleri yukarıdaki gibidir. Her bir konsantrasyonda oluşan MN değerleri birbirleriyle karşılaştırma yapabilmek için kontrole oranlandı ve aşağıdaki sonuçlar elde edildi.

- **Kontrol (K) = 0.0008**
- **C_{PPA} = 0.25 mg / 5 ml için;**

$$MN_{PPA} / MN_K = 0.002 / 0.0008 = 2.5$$

- **C_{PPA} = 0.35 mg / 5 ml için;**

$$MN_{PPA} / MN_K = 0.006 / 0.0008 = 7.5$$

- **C_{PPA} = 0.50 mg / 5 ml için;**

$$MN_{PPA} / MN_K = 0.008 / 0.0008 = 10$$

5.3.2- Farklı Konsantrasyonlarda Kan İle Muamele Edilen Poliakrilik Asit İçin Yapılan Hesaplar

Deneylerde ana özelti (A..) olarak %35'lik PAA özeltisi kullanılarak stok çözelti hazırlandı.

Kullanılan A..' nin 1 ml' sinde 350 mg PAA vardır.

1 ml (\approx 1 g) A.C. + 349 ml PBS = 350 ml Stok özelti

- $V_T = 0.25 \text{ mg A..} + 0.25 \text{ ml PBS} = 0.50 \text{ ml}$

$$C = 0.5 \text{ mg / ml}$$

- $V_T = 0.35 \text{ mg A..} + 0.15 \text{ ml PBS} = 0.50 \text{ ml}$

$$C = 0.7 \text{ mg / ml}$$

- $V_T = 0.50 \text{ mg A..} + 0.00 \text{ ml PBS} = 0.50 \text{ ml}$

$$C = 1 \text{ mg / ml}$$

$V_T = 0.5 \text{ ml}$ olarak hazırlanan ve farklı konsantrasyonlarda poliakrilik asit içeren bu çözelti 5 ml kan ile muamele edildi.

5.3.3- Poliakrilik Asit (PAA) Konsantrasyonuna Bağlı MN Değişimi

Çizelge 5.6 Poliakrilik asit konsantrasyonuna bağlı olarak MN değişim tablosu.

		Toplam	Toplam	Hücre Başına
		Sayılan Hücre	Mikronükleus	Mikronükleus
	<i>Kontrol</i> (0.00)	2500	2	0.0008
C_{PAA} (mg/5 mL Kan)	0.25	2500	3	0.0012
	0.35	2500	4	0.0016
	0.50	2500	8	0.0032

Üç farklı konsantrasyonda PAA kullanıldı. PAA çözeltileri kan ile muamele edildiğinde oluşan MN değerleri yukarıdaki gibidir. Her bir konsantrasyonda oluşan MN değerleri birbirleriyle karşılaştırma yapabilmek için kontrole oranlandı ve aşağıdaki sonuçlar elde edildi.

- **Kontrol (K) = 0.0008**
- **$C_{PAA} = 0.25$ mg / 5 ml için;**

$$MN_{PAA} / MN_K = 0.0012 / 0.0008 = 1.5$$

- **$C_{PAA} = 0.35$ mg / 5 ml için;**

$$MN_{PAA} / MN_K = 0.0016 / 0.0008 = 2$$

- **$C_{PAA} = 0.50$ mg / 5 ml için;**

$$MN_{PAA} / MN_K = 0.0032 / 0.0008 = 4$$

5.3.4- PAA Varlığında 1 Gy Dozda Işınlanmış Kan Örneklerindeki MN Değişimi

Çizelge 5.7 Farklı konsantrasyonlardaki Poliakrilik asit varlığında 1 Gy dozda ışınlanan kan örneklerindeki MN değişim tablosu.

		Toplam Sayılan Hücre	Toplam Mikronükleus	Hücre Başına Mikronükleus
	Kontrol (0.00)	1526	46	0.03
C_{PAA} (mg/5 mL Kan)	0.25	1000	65	0.065
	0.35	1003	43	0.043
	0.50	1000	28	0.028

Üç farklı konsantrasyonda PAA kullanıldı. PAA çözeltileri kan ile muamele edildikten sonra 1 Gy dozda ⁶⁰Co γ ile ışınlandı. Oluşan MN değerleri yukarıdaki gibidir. Her bir konsantrasyonda oluşan MN değerleri birbirleriyle karşılaştırma yapabilmek için kontrole oranlandı ve aşağıdaki sonuçlar elde edildi. (Kullanılan kanlar farklı bir bireyden alındığı için kontrolün MN değeri değişti.).

- **Kontrol (K) = 0.03**
- **C_{PAA} = 0.25 mg / 5 ml için;**

$$MN_{PAA} / MN_K = 0.065 / 0.03 = 2.17$$

- **C_{PAA} = 0.35 mg / 5 ml için;**

$$MN_{PAA} / MN_K = 0.043 / 0.03 = 1.43$$

- **C_{PAA} = 0.50 mg / 5 ml için;**

$$MN_{PAA} / MN_K = 0.028 / 0.03 = 0.93$$

5.3.5- PAA Varlığında 3 Gy Dozda Işınlanmış Kan Örneklerindeki MN Değişimi

Çizelge 5.8 Farklı konsantrasyonlardaki poliakrilik asit varlığında 3 Gy dozda ışınlanan kan örneklerindeki MN değişim tablosu

		Toplam	Toplam	Hücre Başına
		Sayılan Hücre	Mikronükleus	Mikronükleus
	Kontrol (0.00)	1519	163	0.11
C_{PAA} (mg/5 mL Kan)	0.25	500	77	0.154
	0.35	540	48	0.089
	0.50	510	42	0.082

Üç farklı konsantrasyonda PAA kullanıldı. PAA çözeltileri kan ile muamele edildikten sonra 3 Gy dozda ⁶⁰Co γ ile ışınlandı. Oluşan MN değerleri yukarıdaki gibidir. Her bir konsantrasyonda oluşan MN değerleri birbirleriyle karşılaştırma yapabilmek için kontrole oranlandı ve aşağıdaki sonuçlar elde edildi. (Kullanılan kanlar farklı bir bireyden alındığı için kontrolün MN değeri değişti.).

- **Kontrol (K) = 0.11**
- **C_{PAA} = 0.25 mg / 5 ml için;**

$$MN_{PAA} / MN_K = 0.154 / 0.11 = 1.4$$

- **C_{PAA} = 0.35 mg / 5 ml için;**

$$MN_{PAA} / MN_K = 0.089 / 0.11 = 0.81$$

- **C_{PAA} = 0.50 mg / 5 ml için;**

$$MN_{PAA} / MN_K = 0.082 / 0.11 = 0.75$$

5.3.6- PAA-Cu²⁺ İkili Kompleksi İçin Yapılan Hesaplar

Üç farklı PAA konsantrasyonlarından ikili kompleks için $C_{PAA} = 0.35$ mg/ml alındı.

$$0.5 \text{ ml} \quad 0.35 \text{ mg PAA}$$

$$\underline{100 \text{ ml} \quad x \text{ mg PAA}}$$

$$x = C_{PAA} = 0.07 \text{ mg} / 100 \text{ ml}$$

%5'lik iki farklı bakır tuzu kullanılarak mol oranları $n_{Cu}/n_{PAA} = 1/50$ ve $n_{Cu}/n_{PAA} = 1/20$ olacak şekilde PAA-Cu²⁺ ikili kompleksleri oluşturuldu.

5.3.6.1- CuSO₄.5H₂O Kullanılarak Oluşturulan İkili Kompleks Hesapları

$$\bullet \quad n_{Cu^{2+}} / n_{PAA} = (C_{CuSO_4} \times M_{PAA}) / (C_{PAA} \times M_{CuSO_4}) = 1 / 50$$

$$n_{Cu^{2+}} / n_{PAA} = (C_{CuSO_4} \times 70) / (0.07 \times 160) = 1 / 50$$

$$C_{CuSO_4} = 3.2 \times 10^{-3} \text{ g} / 100 \text{ ml}$$

$$\begin{array}{r} 250 \text{ g CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} \quad 160 \text{ g CuSO}_4 \\ \underline{x} \quad \quad \quad \quad \quad \quad 3.2 \times 10^{-3} \text{ g CuSO}_4 \end{array}$$

$$x = 0.005 \text{ g CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} / 100 \text{ ml}$$

$$\% 5' \text{ lik için; } x = 0.1 \text{ ml} / 100 \text{ ml}$$

- $n_{\text{Cu}^{2+}} / n_{\text{PAA}} = (C_{\text{CuSO}_4} \times M_{\text{PAA}}) / (C_{\text{PAA}} \times M_{\text{CuSO}_4}) = 1 / 20$

$$n_{\text{Cu}^{2+}} / n_{\text{PAA}} = (C_{\text{CuSO}_4} \times 70) / (0.07 \times 160) = 1 / 20$$

$$C_{\text{CuSO}_4} = 8 \times 10^{-3} \text{ g} / 100 \text{ ml}$$

250 g CuSO ₄ .5H ₂ O	160	g CuSO ₄
x	8 x 10 ⁻³	g CuSO ₄

$$x = 0.0125 \text{ g CuSO}_4.5\text{H}_2\text{O} / 100 \text{ ml}$$

% 5'lik için; $x = 0.25 \text{ ml} / 100 \text{ ml}$

5.3.6.2- CuCl₂.2H₂O Kullanılarak Oluşturulan İkili Kompleks Hesapları

- $n_{\text{Cu}^{2+}} / n_{\text{PAA}} = (C_{\text{CuCl}_2} \times M_{\text{PAA}}) / (C_{\text{PAA}} \times M_{\text{CuCl}_2}) = 1 / 50$

$$n_{\text{Cu}^{2+}} / n_{\text{PAA}} = (C_{\text{CuCl}_2} \times 70) / (0.07 \times 134.5) = 1 / 50$$

$$C_{\text{CuCl}_2} = 2.69 \times 10^{-3} \text{ g} / 100 \text{ ml}$$

170.5 g CuCl ₂ .2H ₂ O	134.5	g CuCl ₂
x	2.69 x 10 ⁻³	g CuCl ₂

$$x = 3.41 \times 10^{-3} \text{ g CuCl}_2.2\text{H}_2\text{O} / 100 \text{ ml}$$

% 5'lik için; $x = 0.0682 \text{ ml} / 100 \text{ ml}$

$$\bullet \quad n_{\text{Cu}^{2+}} / n_{\text{AA}} = (C_{\text{CuCl}_2} \times M_{\text{AA}}) / (C_{\text{AA}} \times M_{\text{CuCl}_2}) = 1 / 20$$

$$n_{\text{Cu}^{2+}} / n_{\text{AA}} = (C_{\text{CuCl}_2} \times 70) / (0.07 \times 134.5) = 1 / 20$$

$$C_{\text{CuCl}_2} = 6.725 \times 10^{-3} \text{ g} / 100 \text{ ml}$$

$$\begin{array}{r} 170.5 \text{ g CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O} \quad 134.5 \text{ g CuCl}_2 \\ \underline{\quad x \quad} \quad \quad \quad 6.725 \times 10^{-3} \text{ g CuCl}_2 \end{array}$$

$$x = 8.525 \times 10^{-3} \text{ g CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O} / 100 \text{ ml}$$

$$\% 5'lik \text{ için; } x = 0.1705 \text{ ml} / 100 \text{ ml}$$

5.3.6.3- Cu^{2+} İçin Toksikite Sınırları

Çizelge 5.9 Karaciğer dokusunda, idrarda ve serumdaki Cu^{2+} iyonu toksisite sınırları tablosu.

[Cu^{2+}]	YETİŞKİN	ÇOCUK
Karaciğer dokusu	3.2-9.9 $\mu\text{g/g}$ Wilson Hastalığı >80	---
İdrar	3-35 $\mu\text{g}/24$ saat Wilson Hastalığı >100	---
Serum	70-140 $\mu\text{g/dl}$	90-190 $\mu\text{g/dl}$
Serumda min.	70 $\mu\text{g/dl} = 70\mu\text{g}/100\text{ml}$ 0.7 $\mu\text{g/ml} = 0.7$ ppm	---

5.3.7- *PAA-Cu²⁺ İkili Kompleks Konsantrasyonu İle MN Değişimi

Çizelge 5.10 $n_{Cu}/n_{PAA} = 1/50$ ve $n_{Cu}/n_{PAA} = 1/20$ olan PAA-Cu²⁺ ikili komplekslerinin kan ile muamelesi sonucu MN' lerde gerçekleşen değişimin tablosu, * C_{PAA} = 0.35 mg/ml.

		Toplam Sayılan Hücre	Toplam Mikronükleus	Hücre Başına Mikronükleus
	<i>Kontrol</i> (0.00)	2716	7	0.0026
n_{Cu}/n_{PAA} CuSO₄	1/50	2546	11	0.0043
	1/20	2503	10	0.0039
n_{Cu}/n_{PAA} CuCl₂	1/50	2725	14	0.0051
	1/20	2574	13	0.0051

Her iki tuz için de $n_{\text{Cu}}/n_{\text{PAA}} = 1/50$ ve $n_{\text{Cu}}/n_{\text{PAA}} = 1/20$ olarak hazırlanan PAA-Cu²⁺ ikili kompleksleri kullanıldı. Her bir çözelti için, oluşan MN değerlerini birbirleriyle karşılaştırma yapabilmek için kontrole oranlandı ve aşağıdaki sonuçlar elde edildi.

- **Kontrol (K) = 0.0026**

- **$n_{\text{Cu}}/n_{\text{PAA}} (\text{CuSO}_4) = 1 / 50$ için;**

$$\text{MN} / \text{MN}_K = 0.0043 / 0.0026 = 1.65$$

- **$n_{\text{Cu}}/n_{\text{PAA}} (\text{CuSO}_4) = 1 / 20$ için;**

$$\text{MN} / \text{MN}_K = 0.0039 / 0.0026 = 1.5$$

- **$n_{\text{Cu}}/n_{\text{PAA}} (\text{CuCl}_2) = 1 / 50$ için;**

$$\text{MN} / \text{MN}_K = 0.0051 / 0.0026 = 1.96$$

- **$n_{\text{Cu}}/n_{\text{PAA}} (\text{CuCl}_2) = 1 / 20$ için;**

$$\text{MN} / \text{MN}_K = 0.0051 / 0.0026 = 1.96$$

5.3.8- *PAA-Cu²⁺ İkili Kompleks Varlığında 1 Gy Dozda Işınlanmış Kan Örneklerindeki MN Değişimi

Çizelge 5.11 $n_{Cu}/n_{PAA} = 1/50$ ve $n_{Cu}/n_{PAA} = 1/20$ olan PAA-Cu²⁺ ikili kompleksleri varlığında 1 Gy dozda ışınlanan kan örneklerindeki MN değişim tablosu; * C_{PAA} = 0.35 mg/ml.

		Toplam Sayılan Hücre	Toplam Mikronükleus	Hücre Başına Mikronükleus
	<i>Kontrol</i> (0.00)	<i>1526</i>	<i>46</i>	<i>0.03</i>
n_{Cu}/n_{PAA} CuSO ₄	1/50	1006	35	0.04
	1/20	1503	47	0.03
n_{Cu}/n_{PAA} CuCl ₂	1/50	1000	50	0.05
	1/20	1006	79	0.08

Her iki tuz için de $n_{Cu}/n_{PAA} = 1/50$ ve $n_{Cu}/n_{PAA} = 1/20$ olarak hazırlanan PAA-Cu²⁺ ikili kompleksleri kullanıldı. Her bir çözelti için, oluşan MN değerlerini birbirleriyle karşılaştırma yapabilmek için kontrole oranlandı ve aşağıdaki sonuçlar elde edildi.

- **Kontrol (K) = 0.03**

- **n_{Cu}/n_{PAA} (CuSO₄) = 1 / 50 için;**

$$MN / MN_K = 0.04 / 0.03 = 1.17$$

- **n_{Cu}/n_{PAA} (CuSO₄) = 1 / 20 için;**

$$MN / MN_K = 0.03 / 0.03 = 1.03$$

- **n_{Cu}/n_{PAA} (CuCl₂) = 1 / 50 için;**

$$MN / MN_K = 0.05 / 0.03 = 1.67$$

- **n_{Cu}/n_{PAA} (CuCl₂) = 1 / 20 için;**

$$MN / MN_K = 0.08 / 0.03 = 2.63$$

5.3.9- *PAA-Cu²⁺ İkili Kompleks Varlığında 3 Gy Dozda Işınlanmış Kan Örneklerindeki MN Değişimi

Çizelge 5.12 $n_{Cu}/n_{PAA} = 1/50$ ve $n_{Cu}/n_{PAA} = 1/20$ olan PAA-Cu²⁺ ikili kompleksleri varlığında 3 Gy dozda ışınlanan kan örneklerindeki MN değişim tablosu; * C_{PAA} = 0.35 mg/ml.

		Toplam Sayılan Hücre	Toplam Mikronükleus	Hücre Başına Mikronükleus
	<i>Kontrol</i> (0.00)	<i>1519</i>	<i>163</i>	<i>0.11</i>
n_{Cu}/n_{PAA} CuSO ₄	1/50	505	64	0.126
	1/20	260	49	0.19
n_{Cu}/n_{PAA} CuCl ₂	1/50	512	74	0.144
	1/20	256	75	0.292

Her iki tuz için de $n_{\text{Cu}}/n_{\text{PAA}} = 1/50$ ve $n_{\text{Cu}}/n_{\text{PAA}} = 1/20$ olarak hazırlanan PAA-Cu²⁺ ikili kompleksleri kullanıldı. Her bir çözelti için, oluşan MN değerlerini birbirleriyle karşılaştırma yapabilmek için kontrole oranlandı ve aşağıdaki sonuçlar elde edildi.

- **Kontrol (K) = 0.11**
- **$n_{\text{Cu}}/n_{\text{PAA}}$ (CuSO₄) = 1 / 50 için;**

$$\text{MN} / \text{MN}_K = 0.126 / 0.11 = 1.18$$

- **$n_{\text{Cu}}/n_{\text{PAA}}$ (CuSO₄) = 1 / 20 için;**

$$\text{MN} / \text{MN}_K = 0.19 / 0.11 = 1.75$$

- **$n_{\text{Cu}}/n_{\text{PAA}}$ (CuCl₂) = 1 / 50 için;**

$$\text{MN} / \text{MN}_K = 0.144 / 0.11 = 1.27$$

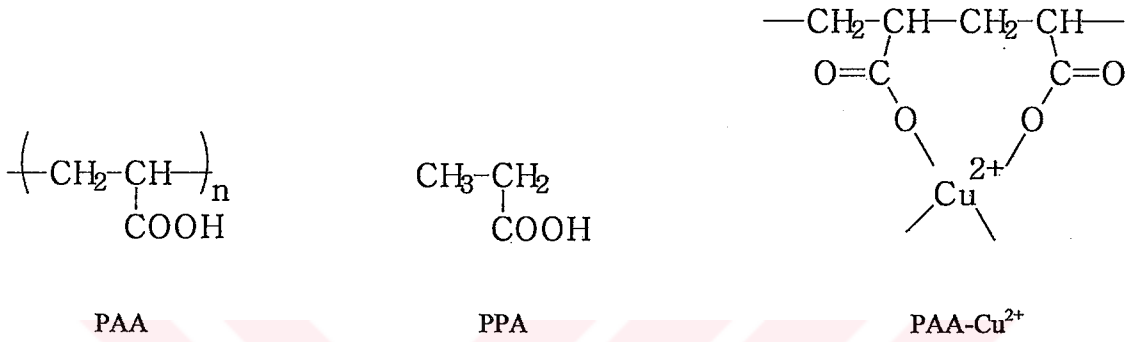
- **$n_{\text{Cu}}/n_{\text{PAA}}$ (CuCl₂) = 1 / 20 için;**

$$\text{MN} / \text{MN}_K = 0.292 / 0.11 = 2.64$$

6. SONUÇLAR VE TARTIŞMALAR

6.1- Polielektrolitlerin Kanda MN Oluşumuna Etkisi

Araştırmalarımız için anyonik bir polielektrolit (PE) olan poliakrilik asit (PAA), bu polimerin monomerinin sentetik modeli gibi propiyonik asit ve poliakrilik asidin Cu^{2+} iyonu ile oluşturduğu polimer-metal kompleksi seçilmiştir.



Doğal kanda PE' ler varlığında lenfosit hücrelere radyasyonun etkisinin in vitro koşullarda incelenmesi için Mikronükleus (MN) analiz yöntemi kullanıldı. Deneyleerin yapımında aşağıdaki metodoloji gerçekleştirildi:

- I- Işınlanmamış kan örneklerine farklı konsantrasyonda PE' ler eklenerek lenfosit hücrelerin yapılarındaki bozukluklara bakıldı.
- II- Çeşitli konsantrasyonlardaki kimyasal örneklerle muamele edilmiş kan farklı dozlarda ışınlanarak lenfosit hücrelerin yapılarındaki bozukluklar ve hasarlar incelendi.

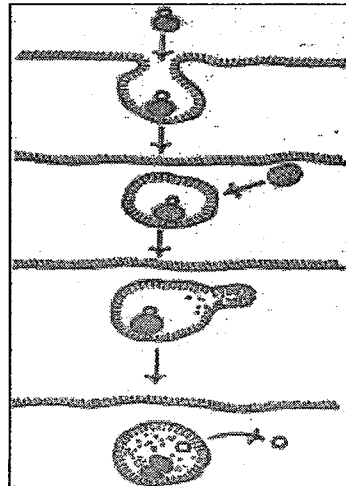
Çizelge 5.5' de propiyonik asit varlığında lenfosit hücrelerde oluşan mikronükleus (MN) değerleri verilmiştir. Deneyleerde elde edilen MN sayısının (MN_{PPA}) kontrolden alınan sonuçlara (MN_{K}) oranı, $\text{MN}_{\text{PPA}} / \text{MN}_{\text{K}} = 2.5 - 10$ değerleri arasında ve kan ile muamele edilen propiyonik asitin konsantrasyonu arttıkça değişmektedir. Doğal kana propiyonik asit eklenmesi kontrole kıyaslandığında çok daha fazla MN oluşturmaktadır. Bu sonuçlar propiyonik asitin doğal kan örneklerinde in vitro şartlarda kromozomlarda kırılmalara neden olduğunu göstermektedir.

Ancak propiyonik asit yerine sisteme PAA eklenmesi konsantrasyona bağı olarak çok değişik sonuçların ortaya çıkmasına neden olmaktadır (Çizelge 5.6). PAA varlığında MN oluşumu kontrolde oluşan MN' den fazla olmasına rağmen, monomer modelinin etkisinden çok daha az olduğu gözlenmiştir.

$C_{PAA} = 0.25-0.50$ mg / ml konsantrasyonları aralığında $MN_{PAA}/MN_K = 1.5'$ dan $4'$ e kadar artmaktadır. Monomerden farklı olarak polimerik yapılı örnek varlığında lenfositlerde yaklaşık 2.5 kat daha az hasar oluşmaktadır.

Poliakrilik asit Cu^{2+} iyonlarıyla kompleks oluşturulduğu durumda ise aynı konsantrasyondaki ($C_{PAA} = 0.35$ mg / ml) PAA' ya göre MN oluşumunun daha düşük olduğu gözlenmektedir (Çizelge 5.10). Ayrıca bakırın miktarı arttıkça MN' deki bu azalma devam etmektedir. Alınan sonuçları polielektrolitlerin hücre bileşenleri ile etkileşime girme yetenekleri açısından değerlendirebiliriz.

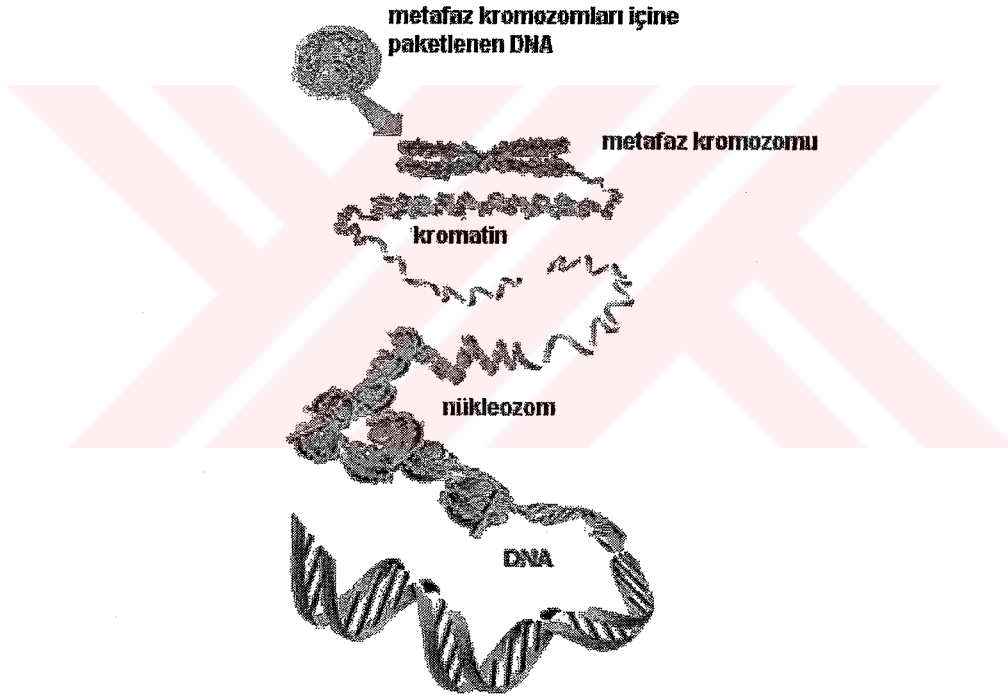
PE-kan karışımının mitoz işlevleri başlatılmadan 24 saatlik bir zaman aralığında bekletilmesini göz önüne alarak polimerik örneklerin (PAA ve PAA- Cu^{2+}) önce hücre yüzeyi ile elektrostatik interpolimer kompleks oluşturduklarını, sonra ise endositoz yöntemi ile hücre içerisine transfer olabileme ihtimalini düşünebiliriz. Bu tür geçişlerin endositoz yöntemiyle gerçekleştiğine dair görüşler ve kaynaklar mevcuttur. PAA' nın kromozomla etkileşime girebilmesi için polimerin hücre membranından geçmesi gerekmektedir. Hücre içine transfer olmuş gerek PE' ler gerekse de küçük moleköl ağırlıklı propiyonik asit kromatin partikülleri ile etkileşime girerek MN oluşumunda önemli etki gösterebilirler. Fakat, gerçekleşen olayların daha iyi anlaşılabilmesi için daha fazla deneylerin yapılmasına ihtiyaç vardır.



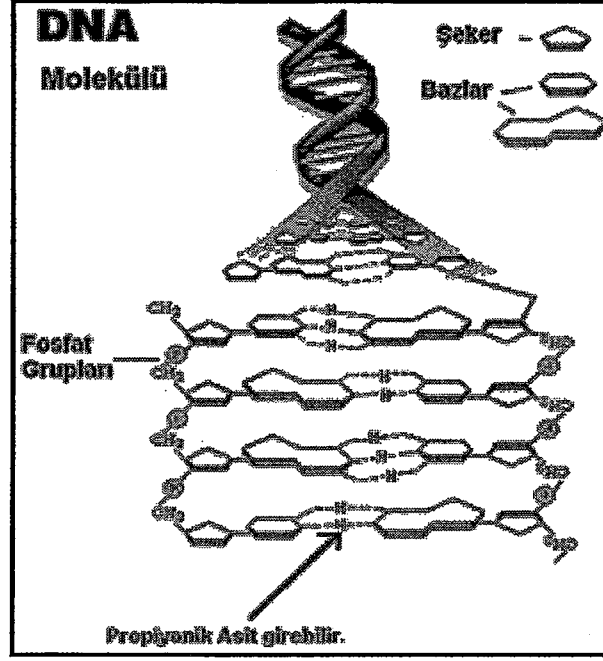
Şekil 6.1 Endositoz yöntemi ile hücre içine transfer olabileme.

Poliakrilik asit propiyonik asitten farklı olarak biyokomponentlerle kooperatif etkileşime girerek interpolimer kompleks oluşturma özelliği gösterebilir. Bazı araştırmacılar genetik materyale PAA' nın etkisini inceleyerek benzer etkilerin varolduğunu göstermişlerdir. Bizim çalışmalarımızda ise, bu tür etkileşimlerin polimerin doğrudan doğal hücreyle olan etkileşimi sırasında gelebileceği düşünülmektedir.

Ancak, küçük molekül ağırlığa sahip PPA ile büyük molekül ağırlığa sahip PAA' nın kromatinle etkileşiminde önemli farklılıklar söz konusu olabilir. PPA, DNA' da varolan hidrojen bağlarını oluşturan nükleotidlerle rekabet içerisine girerek etkisini gösterirken, PAA' nın etkisinin kromozom yapısında yer alan pozitif (+) yüklü proteinlerle interpolimer kompleks oluşturduğu düşünülebilir.



Şekil 6.2 Kromatin materyali ve DNA molekülü.



Şekil 6.3 Bazların bir arada tutunmasını sağlayan H bağları bölgesinden propiyonik asitin girebileceğini gösteren şekil.

Bu tür etkileşimler kromatin ve/veya DNA yapısında bir takım değişiklikler oluşturmakla DNA' nın bölünmesi sırasında MN olarak tanımlanan bozuk yapılar meydana getirirler. Propiyonik asitin doğrudan DNA ile etkileşime girmesi ve ikili sarmal yapısını destabilize ve kimyasal olarak modifiye etmesi ise bu monomerik asidin PAA' ya kıyasla çok daha büyük bozukluklar oluşmasına neden olduğunu varsayabiliriz.

Polimer-metal kompleksi varlığındaki MN sayılarının serbest PAA' ya göre daha düşük olmasını polimer-kromatin etkileşim seviyesinin azalmasıyla anlamak mümkündür. Söyle ki, metal iyonlarının polimerle bağlanması polimerik zincirleri daha kompakt bir hale getirmektedir. Bundan dolayı kompaktlaşmış bu partikülün serbest PAA' ya kıyasla, daha az sayıda fonksiyonel gruplarının kompleks oluşumuna katılmasıyla izah edilebilir.

6.2- Polielektrolitlerin Varlığında Radyasyonun MN Oluşumuna Etkisi

Kan örnekleri çeşitli konsantrasyonda PAA ve PAA-Cu²⁺ kompleksleri ile karıştırıldıktan sonra farklı dozlarda ışınlama yapılarak MN analizi yapıldı ve alınan sonuçlar Çizelge 5.7, 5.8, 5.11, 5.12' de verilmiştir. Sonuçların değerlendirilmesi için aşağıdaki formül kullanıldı.

$$\text{Fark} = [(\text{Işınlanan kandaki MN sayısı}) - (\text{Işınlanmamış kandaki MN sayısı})]$$

Elde edilen fark değerleri, her bir örnek için kendi kontrolü ile kıyaslanmıştır. Pratikte bu formül hücrelerde MN oluşum derecesini göstermektedir. Bu parametre değerleri Çizelge 6.1, 6.2, 6.3, 6.4' de verildi. Çizelgede verilen değerlerde görüldüğü gibi PAA' nın radyasyon ile ışınlamada MN oluşumuna etkisi ışınlanmamış örneklerle mukayese edildiğinde çok farklı sonuçlar ortaya koymaktadır.

Çizelge 6.1- PAA varlığında 1 Gy dozda ışınlanmış ile ışınlanmamış MN değerleri arasındaki farkların gösterildiği fark tablosu; (* Karşılaştırılan değer = 0.03).

C _{PAA} (mg/ml)	1 Gy dozda Işınlanmış	Işınlanmamış	*Fark
0.25	0.065	0.0012	0.0638 radyosensitif
0.35	0.043	0.0016	0.0414 radyosensitif
0.50	0.028	0.0032	0.0312 etkisiz

Çizelge 6.2 PAA varlığında 3 Gy dozda ışınlanmış ile ışınlanmamış MN değerleri arasındaki farkların gösterildiği fark tablosu; (** Karşılaştırılan değer = 0.11).

C_{PAA} (mg/ml)	3 Gy dozda Işınlanmış	Işınlanmamış	**Fark
0.25	0.154	0.0012	0.153 radyosensitif
0.35	0.089	0.0016	0.087 radyoprotektif
0.50	0.082	0.0032	0.079 radyoprotektif

PAA varlığında 1 ve 3 Gy dozda ışınlanmış ile ışınlanmamış kan örneklerindeki MN değerleri arasındaki fark radyasyonun dozuna bağlı olarak birbiriyle tümüyle zıt olan iki sonuç göstermektedir. 1 Gy dozda ışınlanmış örneklerde PAA' nın 0.25 - 0.35 mg / ml konsantrasyonlarda radyosensitif (kontrole kıyasla daha fazla MN oluşturmakta) özellik gösterdiği görülmektedir. Ancak 0.50 mg / ml konsantrasyonda ise hiçbir etki göstermemektedir. Bu sonuçlar ışınlanmamış normal kandaki sonuçlarla benzerlik taşımaktadır.

Bunlardan farklı olarak PAA' nın daha yüksek dozda (3 Gy) ışınlanmasında ise, 0.25 mg /ml konsantrasyonda çok zayıf radyosensitif, daha yüksek konsantrasyonlarda (0.35 - 0.50 mg /ml) ise radyoprotektif özellik görünmektedir. Yani kontrole kıyasla polimer varlığında 3 Gy dozda ışınlamada daha az sayıda MN oluşmaktadır.

Çizelge 6.3 PAA-Cu²⁺ ikili kompleksleri varlığında 1 Gy dozda ışınlanmış ile ışınlanmamış MN değerleri arasındaki farkların gösterildiği fark tablosu; (* Karşılaştırılan değer = 0.03).

n_{Cu}/n_{PAA}	1 Gy dozda Işınlanmış	Işınlanmamış	*Fark
1/50 CuCl ₂	0.05	0.0051	0.045 az radyosensitif
1/20 CuCl ₂	0.08	0.0051	0.075 radyosensitif
1/50 CuSO ₄	0.04	0.0043	0.036 az radyosensitif
1/20 CuSO ₄	0.03	0.0039	0.026 radyoprotektif

Çizelge 6.4 PAA-Cu²⁺ ikili kompleksleri varlığında 3 Gy dozda ışınlanmış ile ışınlanmamış MN değerleri arasındaki farkların gösterildiği fark tablosu; (** Karşılaştırılan değer = 0.11).

n_{Cu}/n_{PAA}	3 Gy dozda Işınlanmış	Işınlanmamış	**Fark
1/50 CuCl ₂	0.144	0.0051	0.139 az radyosensitif
1/20 CuCl ₂	0.292	0.0051	0.287 radyosensitif
1/50 CuSO ₄	0.126	0.0043	0.122 az radyosensitif
1/20 CuSO ₄	0.190	0.0039	0.186 radyosensitif

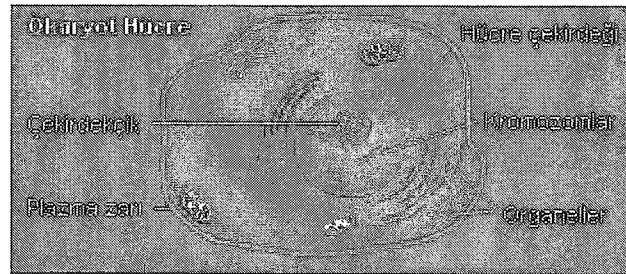
Çizelge 6.3 ve 6.4' den görüldüğü gibi, PAA' nın Cu tuzları ile kompleks oluşumu (gerek CuCl_2 gerekse de CuSO_4 bağlanması ile) polimerin hücreleri radyasyonun etkisinden koruma özelliğini engellemektedir. Araştırılmış şartlarda bakır varlığında polimer-metal kompleksi farklı derecede radyosensitif özelliğiyle karakterize olmaktadır.

Akril asit monomeri sayısına göre bakır miktarının artması yani polimer yumaklarının daha kompakt hale gelmesi genelde saf polimere kıyasla radyosensitifliğin artışına neden olmaktadır.

Işınlanmamış ve ışınlanmış deneylerde iki farklı yöntem uygulandı. Birincisinde, ışınlanmamış örneklerde PE çözeltilerinin kan ile muamelesi 24 saat sürerken, ikincisinde ışınlanmış örneklerde 1 saattir. Bu, kan ile muamele zaman farkını göz önüne alarak ışınlanmış ve ışınlanmamış örneklerden alınmış sonuçların değerlendirilmesinde iki farklı mekanizmanın olduğunu varsayabiliriz.

24 saatlik muamele sırasında PE makromolekülleri hücre yüzeyi ile etkileşime girmektedir. Daha sonra endositoz yöntemi ile hücre içine transfer olarak hücre içindeki kromatin materyali ile kompleks oluşturmakta ve bu yöntemle MN oluşumuna etki göstermektedir.

PE' lerle kanın 1 saatlik muamelesinde ise, PE makromolekülleri hücre yüzeyi ile interpolimer kompleks oluşturarak hücre yüzeyine bağlanır. Ancak hücre içine girebilmesi için yeterli zaman olmadığından bu şekilde radyasyon ısınlara maruz kalmakta olduklarını varsayabiliriz.

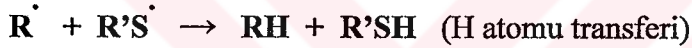
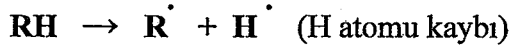


Şekil 6.4 Ökaryotik Hücre.

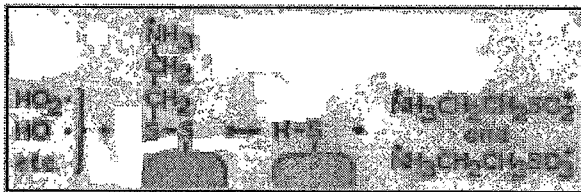
Suyun ilkel radyoliz ürünleri H^+ , OH^- radikalleri ve (e^-) elektrondur.



Küçük moleküllü organik radyoprotektörlerin örneğin merkaptoetilamin, pentametilen diguanidin, bisguanido etil disülfid ve benzerlerinin protektif etki mekanizması hakkında farklı hipotezler ileri sürülmüştür. Bu hipotezlerden birisi ortamda oluşan serbest radikallerin radyoprotektörler (tutucular) ile gerçekleştirildiğinin varsayılmasıdır. Burada hidroksil radikallerinin rolü öne çıkarılmaktadır. Diğer bir mekanizma, H atomunun transferidir. Bu mekanizmanın reaksiyonu aşağıdaki gibidir.



En yaygın hipotez ise karışık disülfid hipotezidir. Bu hipoteze göre radyoprotektörlerin sistein sistamin gruplarının doku bileşenlerinin SH ve SS grupları ile reaksiyona girerek karışık disülfidler oluşturduğu varsayılmaktadır. Oluşan bu karışık disülfidler suyun radyolizinden ortaya çıkan radikallerle ve e^- ile reaksiyona girerek biyomoleküllerin yapısını yeniden tamir etmesi demektir.



(a)



(b)

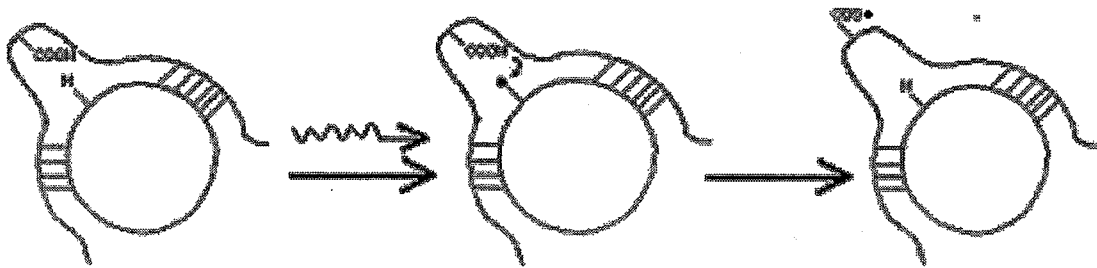
Şekil 6.5 Radyasyonun indirekt (a) ve direkt (b) etkisi sonucu karışık disülfid yapıların radikallerle reaksiyona girmesi. (Copeland, 1978).

Bir başka hipotez de eksojen sülfidril radyoprotektif bileşenler hücreyle reaksiyona girerek glutatyon ve diğer protein olmayan sülfidrilleri doğal karışık disülfid yapılarıyla yer değiştirme reaksiyonuna girerler ve sonuç olarak bunlar radikalleri tutabilirler.

Bunların dışında başka bir mekanizma radyoliz sırasında oluşan süperoksit anyonunun indirgenmesi ve normal oksijene çevrilme reaksiyonudur. Bu fikirler süperoksit dismutaz enziminin radyoprotektör özelliği taşıdığına gösterilmesinden sonra ortaya konmuştur. Bu tür kimyasal mekanizmaların yanı sıra diğer biyokimyasal fizyolojik reaksiyonlar da (Hipotermia, hipoksia, biyokimyasal şok, vb.) vardır. (Copeland, 1978).

Literatürde polimerik yapıly radyoprotektörlerin çalışma mekanizması hakkında ayrıntılı bilgi bulunmaktadır. Yukarıda sıralanan küçük moleköl ağırlıklı radyoprotektörler için farklı mekanizmaları göz önüne alarak elde edilen sonuçların izahının aşağıdaki hipotezle gerçekleştiğini varsayabiliriz.

PAA kan ile karıştırıldığında hücre membran yüzeyleri ile elektrostatik etkileşimle ve hidrojen bağları oluşturarak interpolimer kompleks meydana getirebilir. Hücre yüzeyine adsorbe olmuş polimer zinciri, hücre bileşenleri ile özellikle membranda varolan proteinlerle veya hücre membranına bağlanmış polisakkaritlerle yakın bir çevrede bulunurlar. Radyasyon enerjisi ile hücre bileşenlerindeki radikal oluşumu polimerin yapısındaki karboksil gruplarının devreye girmesiyle tamir edilme imkanı içerirler (Hidrojen transferi, hidroksil ve diğer radikallerin tutulması vb.). Örnek olarak, proteinden hidrojen radikali ayrıldıktan sonra oluşan protein radikalinin polimerden gelen H radikali ile rekombinasyon reaksiyonuna girmesi verilebilir. Bu kimyasal olayların verimi polimer konsantrasyonu ve ışınlama dozu arttıkça artış göstermektedir. Bunlar deneylerden aldığımız sonuçlarla bağdaşmaktadır. (Çizelge 6.1, 6.2)



Şekil 6.6 Şematik olarak hücre yüzeyine polimer adhezyonu.

KAYNAKLAR

- Al-Sabti, K., Lloyd, D.C., Edwards, A.A., Stegnar, P., (1992), "A Survey of Lymphocyte Chromosomal Damage in Slovenian Workers Exposed to Occupational Clastogens", *Mutation Research*, 280: 215-223.
- Anwar, W.A., (1994), "Assessment of Cytogenetic Changes in Human Populations at Risk in Egypt", *Mutation Research*, 313: 183-191.
- Berces, J., Otos, M., Szirmai, S., (1993), "Using the Micronucleus assay to Detect Genotoxic Effects of Metal Ions", *Environmental Health Perspectives Supplements*, 101: 11-13.
- Brown, D.G. ve Coffey, D. S., (2003), "Effect of different sizes of polyacrylic acid on the structure and DNA template properties of isolated rat liver nuclei and soluble chromatin", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Nucleic Acids and Protein Synthesis*, 294: 74-86.
- Clereq, E. De ve Somer, P. De, (2002), "Protective effect of interferon and polyacrylic acid in newborn mice infected with a lethal dose of vesicular stomatitis virus", *Life Sciences*, 7: 925-933.
- Copeland, E. S., (1978), "Mechanisms of radioprotection-A review" , *Photochemistry and Photobiology*, 28: 839-844.
- Coppi, G., Iannuccelli, V., Bernabei, M. T. ve Camerini, R., (2002), "Alginate microparticles for enzyme peroral administration", *Int. J. of Pharmaceutics*, 242: 263-266.
- Countryman, P.I., Heddle, J.A., (1976), "The Production of Micronuclei from Chromosome Aberrations in Irradiated Cultures of Human Lymphocytes", *Mutation Research*, 41: 321-332.
- "Cytogenetic Analysis for Radiation Dose Assessment: A Manual", (2001), Technical Reports Series No:405, International Atomic Energy Agency, Vienna.
- Dörter, G., (1998), "Ağır Metallerin ve Radyasyonun Biyolojik Etkilerinin Karşılaştırılması", İ.Ü. Fen Bilimleri Enst. Kimya Anabilim Dalı, Doktora Tezi.
- Evans, H.J., (1988), "Mutation Cytogenetics: Past, Present and Future", *Mutation Research*, 204: 355-363.
- Fenech, M., Morley, A.A., (1985), "Measurement of Micronuclei in Lymphocytes", *Mutation Research*, 147: 29-36.
- Flinder, T.M., Andrews, G.A., Crokite, E.P., Bond, V.P., (1964), "Early and Late Cytogenetic Effects of Wholebody Irradiation on Humans Marrow", *Blood*, 23: 471-478.
- Giambarressi, L. and Jacobs, J. A., (1987), "Radioprotectants", Academic Press, 265-301, Orlando.
- Greaves, J. L. ve Wilson, C. G., (1993), "Treatment of diseases of the eye with mucoadhesive delivery systems", *Advanced Drug Delivery Reviews*, 11: 349-383.

Heddle, J.A., 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., Kirkhart, B., (1983), "The Induction of Micronuclei as Measure of Genotoxicity. 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.

Kendrich, M. J., May, M. T., Philshica M. J. ve Dobinson, K. D., (1992), "Metal in biological systems", Ellis Harwood, N. Y.

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., Masic, Z. S., "Application of radioprotectors in radiation protection", Scientific Veterinary Institute, Yugoslavia.

Kljajic, R. R., Masic, Z. S., Petrovic, B. and Ciganovic P., (1996), "Manifestation of radiation syndrome in pigs", 9th Int. Cong. of the int. radiation protection association (IRPA9), 4: 73-75.

Koksal, G., Dalci, 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.,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.

Lynch, A.M., Parry, J.M., (1993), "The Cytochalasin-B Micronukleus/ Kinetochore Assay In Vitro: Studies with 10 Suspected Aneugens", *Mutation Research*, 287: 71-86.

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.

Migliore, L., Parrini, M., Sbrana, I., (1991), "Micronucleated Lymphocytes in People Occupationally Exposed to Potential Environmental Contaminants: the Age Effect", *Mutation Research*, 256: 13-20.

- Moorhead, P. S., Nowell, P. C., Hungerford, C., (1960), "Chromosome Preparations of Leukocytes Cultured from Human peripheral Blood", *Experimental Cell Research*, 20: 613-616.
- Morawetz, H., (1966), "Macromolecules In Solution", Polytechic Institute of Brooklyn, NY.
- Mori, H., Müller, A.H.E., (2003), "New polymeric architectures with (meth)acrylic acid segments", *Prog. Polym. Sci.*, 28: 1403-1439.
- Mustafaev, M. I., Norimov, A. S. ve Petrov, R. V., (1992), "Synthetic immunomodulators", Nauka, Moskova.
- Mustafaev, M., (1996), "Biyopolimerler", TUBITAK-Marmara Araştırma Merkezi, Gebze.
- 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.
- Mustafaev, M., Çirakoğlu, B., Saraç, S., Öztürk, S., Yücel, F. ve Bermek, E., (1996), "Soluble and Insoluble Ternary Complexes of Serum Proteins with polyanions in the presence of Cu^{2+} in water", *J. Appl. Polymer Sci.*, 62: 99-109.
- Mustafaev, M., Mustafaeva, Z., Bermek E. ve Y. Osada, (1998), "New amphiphilic immunogens by Cu^{2+} -mediated complexes of water-born poly(N-isopropylacrylamide) and Bovine serum albumin", *J. Bioactive and compatible polymers*, 13: 33-49.
- Mustafaev, M., Saraç, S., Erkol, A. Y., Bayülken, S., Dinçer, B. ve Sezer, E., (1996), "Effects of Cu^{2+} 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., Çirakoğlu, B. ve Bermek E., (1996), "Immune response to progesteron involved in Cu^{2+} -mediated polyanion-protein complex-antigen specificity and affinity of hybridoma clones", *Immunology Letters*, 52: 63-68.
- Mustafaev, M., Yücel, F.Ş., Öztürk, S., Çirakoğlu, B. ve Bermek, E., (1996), " Cu^{2+} - mediated complex Formation between Polyacrylic acid (PAA) and bovine Serum Albumin Systems", *Journal of Immunological Methods*, 197: 31-37.
- Özalpan, A., (1979), "Radyobioloji", T.C. İstanbul Üniversitesi Yayınlarından, sayı: 2739, no:152, İstanbul.
- Petkau, A. and Chuaqui, C. A., (1977), "Superoxide dismutase as a radioprotector", *Radiation physics and chemistry*, 24: 307-319.
- Petrov, R. W. ve Mustafaev, M. I., (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., Norman, A., (1984), "An Improved Micronuclear Assay in Lymphocytes", *Mutation Research*, 139: 61-65.

Prosser, J.S., (1988), "Micronuclei Origins: Applications and Methodologies", Report of an HSE Sponsored Workshop Held at ICI Aderley, London.

Subotic, D. V., Fergusson, T. ve Warren, B. C. H., (1989), Eur. Polm. J., 25: 1233.

Thierens, H., (1991), "Biological Dosimetry using the Micronucleus Assay for Lymphocytes: Interindividual Differences in Dose Response", Health Physics, 61, 5: 623-630.

Vaughan, A. T. M., Allan, I. M., Gordon D. J., Grdina, D. J. and A. M. Milner, "Analysis of free radical damage within single cells using flow cytometry", Molecular aspects of medicine, 12: 129-135.

Xu, X., Yin, Y., Ge, X., Wu, H. ve Zhang, Z., (1998), "γ-Radiation synthesis of poly(acrylic acid)-metal nanocomposites" , Materials Letters, 37: 354-358.

INTERNET KAYNAKLARI

[1] www.nukleer.gov.tr

[2] <http://ehs.sph.berkeley.edu/holland/humn>

Doğum Tarihi 03.12.1978

Doğum Yeri İstanbul

Lise 1993-1996 Özel Ortadoğu Lisesi

Lisans 1997-2001 Yıldız Teknik Üniversitesi
Kimya Lisans Bölümü

Yüksek Lisans 2001-2004 Yıldız Teknik Üniversitesi
Kimya Lisans Bölümü
Biyokimya Anabilim Dalı

Çalıştığı Kurumlar

2003-Devam ediyor

Y.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü
Araştırma Görevlisi