



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**KOMET YÖNTEMİNDE TAM KAN VE İZOLE LENFOSİT
SAKLAMA KOŞULLARININ DNA HASARI SONUÇLARINA
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Seniha KERİMOĞLU

FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Aylin ÜSTÜNDAĞ

ANKARA

2025

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KOMET YÖNTEMİNDE TAM KAN VE İZOLE LENFOSİT
SAKLAMA KOŞULLARININ DNA HASARI SONUÇLARINA
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Seniha KERİMOĞLU

FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Aylin ÜSTÜNDAĞ

**Bu araştırma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeler
Koordinatörlüğü'nün TDK-2022-2701 proje numarası ile desteklenmiştir.**

ANKARA

2025

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Komet Yönteminde Tam Kan ve İzole Lenfosit Saklama Koşullarının DNA Hasarı Sonuçlarına Etkisinin Araştırılması” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler ve yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Seniha Kerimoğlu

Tarih: 24.11.2025

İmza:

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı'nda
Seniha KERİMOĞLU tarafından hazırlanan
“Komet Yönteminde Tam Kan ve İzole Lenfosit Saklama Koşullarının DNA Hasarı
Sonuçlarına Etkisinin Araştırılması” adlı
tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul
edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 24/11/2025

Prof. Dr. Tülay Çoban
Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Aylin Üstündağ
Ankara Üniversitesi
Üye

Prof. Dr. Yalçın Duydu
Ankara Üniversitesi
Üye

Prof. Dr. Sevtap Aydın Dilsiz
Hacettepe Üniversitesi
Üye

Prof. Dr. Suna Sabuncuoğlu
Hacettepe Üniversitesi
Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Prof. Dr. Fügen AKTAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

Komet Yönteminde Tam Kan ve İzole Lenfosit Saklama Koşullarının DNA Hasarı Sonuçlarına Etkisinin Araştırılması

DNA hasarı, hücresel genom bütünlüğünü tehdit eden temel biyolojik süreçlerden biridir. Hücreler endojen (reaktif oksijen türleri, metabolik yan ürünler) ve ekzojen (iyonize radyasyon, ultraviyole, kimyasal ajanlar) etkenlerle sürekli DNA hasarına maruz kalmaktadır. Onarım mekanizmalarının yetersizliği mutasyon birikimine ve kanser başta olmak üzere birçok patolojinin gelişimine neden olabilmektedir. Tek hücre düzeyinde DNA kırıklarını yüksek duyarlılıkla saptayan komet testi, bu nedenle yaygın biçimde kullanılmaktadır. Ancak testin güvenilirliği, örneklerin saklama süresi, sıcaklığı ve kullanılan kriyoprotektanlara büyük ölçüde bağlıdır. Bu nedenle uygun saklama koşullarının belirlenmesi, biyomonitorizasyon ve biyobankacılık uygulamaları açısından kritik öneme sahiptir. Bu çalışmada, tam kan ve izole lenfosit örneklerinin farklı sıcaklık ve sürelerde (oda sıcaklığı, +4°C, -20°C, -80°C) saklanması DNA bütünlüğü üzerindeki etkileri komet testiyle incelenmiştir. Kısa vadede (ilk 7 gün) tam kan örneklerinin izole lenfositlere göre daha stabil olduğu, DNA bütünlüğünü daha uzun süre koruduğu saptanmıştır. Oda sıcaklığında 3. günden itibaren DNA hasarı hızla artmış, 5. günden sonra hücre bütünlüğü bozulmuş ve ghost hücreler gözlenmiştir. Buna karşın +4°C’de saklanan tam kan örneklerinde DNA hasarı sınırlı kalmış ve 3 güne kadar analizlerin güvenilir olduğu belirlenmiştir. İzole lenfositlerde ise 3.-4. günden itibaren DNA hasarındaki artış, izolasyon sonrası hücresel duyarlılıkla ilişkilendirilmiştir. Uzun süreli saklamada (1-12 ay), -20°C’de hem tam kan hem de lenfositlerde DNA bütünlüğü bozulurken, -80°C’de %10 DMSO varlığında saklanan lenfositlerde DNA yapısının büyük ölçüde korunduğu görülmüştür. Buna karşın, tam kanda DMSO’nun bazı durumlarda DNA hasarını artırdığı ve bunun olası hemoliz ve oksidatif stresle ilişkili olabileceği düşünülmüştür. Sonuç olarak, kısa vadeli analizler için tam kanın komet testinde daha pratik ve güvenilir olduğu; uzun süreli saklama gerektiren durumlarda ise izole lenfositlerin -80 °C’de %10 DMSO ile korunmasının DNA bütünlüğü açısından en uygun yöntem olduğu belirlenmiştir. Ayrıca ghost hücrelerin, ileri DNA parçalanmasının yanı sıra pre-analitik koşullara bağlı sitotoksiteyi de yansıttığı vurgulanmıştır. Bu bulgular, DNA hasarı analizlerinde saklama koşullarının belirleyici rolünü göstermekte ve biyobankacılık ile toksikoloji alanlarına metodolojik katkı sunmaktadır.

Anahtar Sözcükler: Comet testi, DNA hasarı, izole lenfosit, saklama koşulları, tam kan

SUMMARY

Investigation of The Effects of Storage Conditions of Whole Blood and Isolated Lymphocytes on DNA Damage by Comet Assay

DNA damage is one of the most critical biological processes threatening cellular genomic integrity. Cells are constantly exposed to endogenous factors (reactive oxygen species, metabolic by-products) and exogenous agents (ionizing radiation, ultraviolet light, chemical substances) that induce DNA lesions. Inefficient repair of such damage leads to mutation accumulation and contributes to various pathological processes, particularly cancer. The comet assay, a highly sensitive and widely used method, enables the detection of DNA strand breaks at the single-cell level. However, the reliability of the assay largely depends on sample storage duration, temperature, and the use of cryoprotectants. Therefore, identifying optimal storage conditions is essential for biomonitoring and biobanking applications. In this study, the effects of different storage temperatures and durations (room temperature, +4 °C, -20 °C, -80 °C) on DNA integrity in whole blood and isolated lymphocyte samples were evaluated using the comet assay. In short-term storage (first 7 days), whole blood samples were found to be more stable than isolated lymphocytes, maintaining DNA integrity for a longer period. DNA damage increased rapidly after the third day at room temperature, and cell disintegration accompanied by the appearance of ghost cells was observed after the fifth day. In contrast, DNA damage remained limited in whole blood samples stored at +4 °C, with reliable analysis possible up to three days. Isolated lymphocytes exhibited a significant increase in DNA damage after the third or fourth day, likely due to enhanced cellular fragility following isolation. During long-term storage (1–12 months), both whole blood and lymphocyte samples showed marked DNA degradation at -20 °C, especially in the absence of cryoprotectants. Conversely, isolated lymphocytes preserved at -80 °C with 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) maintained DNA integrity close to control levels. In some cases, DMSO addition to whole blood increased DNA damage, possibly due to hemolysis and oxidative stress mechanisms. Overall, the findings demonstrate that whole blood provides a more practical and reliable matrix for short-term comet assay analyses, whereas isolated lymphocytes stored at -80 °C with 10% DMSO represent the most effective condition for long-term preservation. Additionally, the presence of ghost cells may reflect not only extensive DNA fragmentation but also cytotoxicity and pre-analytical stress. These results highlight the critical role of storage conditions in DNA damage assessment and provide methodological insights for biobanking, toxicology, and biomonitoring studies.

Keywords: Comet assay, DNA damage, isolated lymphocyte, storage conditions, whole blood

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
Özet	iv
Summary	v
İçindekiler	vi
Önsöz	vii
Simgeler ve Kısaltmalar	ix
Şekiller	xi
Çizelgeler	xii
1. GİRİŞ	1
1.1. DNA	1
1.2. DNA Hasar Türleri	2
1.2.1. Endojen DNA Hasarı	5
1.2.2. Ekzojen DNA Hasarı	6
1.3. DNA Tamir Mekanizmaları	8
1.4. DNA Hasar Yanıtı	13
1.5. DNA Hasar Tamir Mekanizmaları	21
1.5.1. DNA Baz Hasarı Tamiri	21
1.5.2. Çoklu ve Hacimli Baz Hasarının Tamiri	22
1.5.3. DNA Zincir Kırıklarının Tamiri	23
1.6. Genotoksisite Testleri	24
1.6.1. Komet Testi	27
1.7. Saklama Koşulları	29
2. GEREÇ VE YÖNTEM	38
2.1. Gereç	38
2.1.1. Kullanılan Maddeler	38
2.1.2. Kullanılan Aletler ve Malzemeler	38
2.2. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	39
2.3. Kan numunelerinin toplanması ve lenfosit izolasyonu	40
2.3.1. Numune toplanması	40
2.3.2. Tam kandan lenfosit izolasyonu	40
2.4. Lenfosit sayımı	42
2.5. Komet Yöntemi İçin Kan ve Lenfositlerin Saklama Koşullarına Göre Hazırlanması	43
2.6. Komet Testi	45
2.7. İstatistiksel değerlendirmeler	46
3. BULGULAR	47
4. TARTIŞMA	56
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	67
KAYNAKLAR	71
EKLER	80
Ek-1. Etik Kurul Onayı	80
ÖZGEÇMİŞ	81

ÖNSÖZ

Komet testi, genotoksisite araştırmalarında hücresele genetik materyalin kararlılığının ölçölmesi için kullanılan güvenilir bir yöntemdir. Özellikle ökaryotik organizmalar üzerinde yapılan araştırmalarda, testin sonuçları oldukça güvenilir olup, hücresele DNA hasarının incelenmesinde kritik bir rol oynamaktadır. Bu doktora tezi, komet yöntemi kullanılarak tam kan ve izole lenfosit örneklerinde farklı sıcaklık ve sürelerde uygulanan saklama koşullarının DNA bütünlüğü üzerindeki etkilerini değerlendirmektedir. Bu çalışma, biyomonitorizasyon, toksikoloji ve biyobankacılık uygulamalarında güvenilir DNA hasar analizleri için en uygun saklama stratejilerinin belirlenmesine katkı sağlamayı amaçlamaktadır.

Bu tez çalışması, “Komet Yönteminde Tam Kan ve İzole Lenfosit Saklama Koşullarının DNA Hasarı Sonuçlarına Etkisinin Araştırılması” konulu TDK-2022-2701 numaralı proje kapsamında, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) birimi tarafından desteklenmiştir.

Doktora sürecim boyunca bilgi birikimi, akademik titizliği ve yönlendirici yaklaşımıyla bana her zaman ışık tutan değerli danışmanım Prof. Dr. Aylin ÜSTÜNDAĞ’a en derin saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Kendisi, yalnızca bilimsel bir rehber değer, aynı zamanda sabrı, desteği ve teşvik edici tutumuyla bana araştırmacı kimliğimi kazandıran bir rol model olmuştur. Çalışmamın her aşamasında gösterdiği özenli ilgisi, yapıcı önerileri ve yol göstericiliği, bu tezin şekillenmesinde belirleyici olmuştur.

Ankara Üniversitesi Eczacılık Faköltesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Tölai ÇOBAN, Prof. Dr. Benay CAN EKE, Prof. Dr. Yalçın DUYDU, Doç. Dr. İlker ATEŞ ve Prof. Dr. Özge ÜLKER’e, doktora eğitimim süresince verdikleri dersler, paylaştıkları bilgiler ve akademik bakış açılarıyla gelişime katkı sağladıkları için teşekkür ederim. Doktora sürecinde sağladıkları bilimsel rehberlik ve destek, araştırma deneyiminin güçlenmesine ve bu çalışmanın olgunlaşmasına değerli katkılar sunmuştur.

Bu süreç boyunca her zaman yanımda olan aileme, sabırları, sevgileri ve destekleri için teşekkür ederim. Varlıkları, en yoğun ve zorlu dönemlerde bana güç ve motivasyon kaynağı olmuştur. Ayrıca, doktora sürecim boyunca desteğini esirgemeyen, anlayışları ve paylaşımlarıyla bu zorlu dönemi daha kolay kılan arkadaşlarıma teşekkür ederim. Birlikte

geçirdiğimiz çalışma saatleri, karşılıklı yardımlaşma ve moral desteği, hem bu sürecin verimli ilerlemesine hem de motivasyonumu korumama büyük katkı sağlamıştır.



SİMGELER VE KISALTMALAR

8-oxo-dG	8-oxo-7,8-dihidro-2'-deoksiguanozin
AAF	N-Asetil-2-Aminofloren
AF	2-Aminofloren
AP	Apurinik/Apirimidinik
AT	Ataksi Telanjiektazi
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
ATP	Adenozin Trifosfat
BER	Baz Ekzisyon Tamiri
CPD	Siklobütan Pirimidin Dimerleri
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DSBR	Çift Zincir Kırık Tamiri
FA	Fanconi Anemisi
γ H2AX	Fosforile Histon H2AX
HNE	4-Hidroksinonenal
HR	Homolog Rekombinasyon
ICL	İplikler Arası Çapraz Bağlanma Tamiri
IR	İyonize Radyasyon
LDH	Laktat Dehidrogenaz
LMA	Low Melting Agarose
LSD	Least Significant Difference
MDA	Malondialdehit
MGMT	O6-Metilguanin DNA Metil Transferaz
MIRCA	Minimum Information for Reporting Comet Assay
MMR	Yanlış Eşleşme Tamiri
MMS	Metil Metansülfonat
MNNG	N-Metil-N'-Nitro-Nitrozoguanidin
MNU	Metilnitrozoüre
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür
Na ₂ EDTA	Disodyum Etilendiamintetraasetik Asit
NER	Nükleotid Eksizyon Onarımı
NHEJ	Homolog Olmayan Uç Birleşmesi
NMA	Normal Melting Agarose
n	Örnek Sayısı
OTM	Olive Tail Moment

PAH	Polisiklik Aromatik Hidrokarbon
PBMC	Periferik Kan Mononükleer Hücreleri
PBS	Phosphate Buffered Saline
p	Probability (Olasılık Değeri)
RNA	Ribonükleik Asit
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium Besi Ortamı
SAM	S-Adenozil Metiyonin
SÇ	Saklama Çözeltisi
SEM	Standard Error of the Mean
TC-20 cihazı	Bio-Rad TC-20™ Automated Cell Counter
TK	Tam Kan
UV	Ultraviyole
XP	Xeroderma Pigmentosum

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. DNA ligaz enzimi tarafından çentiğin onarılması	9
Şekil 1.2. E. Coli' de NER Tamiri	11
Şekil 1.3. BER Tamir Mekanizması	14
Şekil 1.4. E. Coli' de Yanlış Eşleşme Tamir Mekanizması	16
Şekil 1.5. Tek Zincir Kırıklarının Tamiri	17
Şekil 1.6. Homolog Rekombinasyon Tamiri	18
Şekil 1.7. Nonhomolog Uç birleşmesi ile Tamir	19
Şekil 1.8. OGG1 tarafından başlatılan DNA baz eksizyon onarım yolu	20
Şekil 2.1. Lenfosit izolasyon aşamaları	40
Şekil 2.2. Lenfosit içeren tüpün santrifüj edilirken görüntüsü	41
Şekil 2.3. Lenfosit içeren fazın lenfosit izolasyon tüpündeki görüntüsü	41
Şekil 2.4. Son santrifüjden sonra üst faz atıldıktan sonra lenfosit tüpünün görüntüsü	42
Şekil 2.5. Lenfosit canlılığının değerlendirilmesi için izlenen yöntem ve süreç	42
Şekil 2.6. Tripan mavisi yöntemi ile hücre canlılığının belirlenmesi	43
Şekil 2.7. Tezimizde uygulanacak basamaklar	44
Şekil 2.8. Komet testi uygulama basamakları	46
Şekil 3.1. Tam kanın oda sıcaklığı (OS) ve +4°C'de 1 haftalık süreçteki komet testi sonuçlarından kuyruk yoğunlukları	48
Şekil 3.2. İzole lenfositlerin oda sıcaklığı (OS) ve +4°C'de 1 haftalık süreçteki komet testi sonuçlarından kuyruk yoğunlukları	50
Şekil 3.3. Tam kan ve izole lenfositlerin oda sıcaklığı (OS) ve +4°C'de 1 haftalık süreçteki komet testi sonuçlarından elde edilen DNA kuyruk yoğunlukları	51
Şekil 3.4. Tam kan ve izole lenfositlerin 1 ay -20 ve -80 derecede saklama çözeltisi ilavesi ve direkt olarak saklanması sonrasında komet testi ile elde edilen kuyruk yoğunluğu	52
Şekil 3.5. Tam kan ve izole lenfositlerin 3 ay -20 ve -80 derecede saklama çözeltisi ilavesi ve direkt olarak saklanması sonrasında komet testi ile elde edilen kuyruk yoğunluğu	53
Şekil 3.6. Tam kan ve izole lenfositlerin 6 ay -20 ve -80 derecede saklama çözeltisi ilavesi ve direkt olarak saklanması sonrasında komet testi ile elde edilen kuyruk yoğunluğu	54
Şekil 3.7. Tam kan ve izole lenfositlerin 12 ay -20 ve -80 derecede saklama çözeltisi ilavesi ve direkt olarak saklanması sonrasında komet testi ile elde edilen kuyruk yoğunluğu	55

ÇİZELGELER

Çizelge 3.1. 7 günlük oda sıcaklığı ve +4°C komet testi sonuçları	47
Çizelge 3.2. -20°C ve -80°C’de saklama çözeltisi (SÇ) varlığında ve direkt saklanarak çalışılan örneklerdeki komet testi sonuçları	48



1. GİRİŞ

1.1. DNA

Canlı organizmalarda genomik dizinin eksiksiz korunması, organizmanın yaşamını sürdürebilmesi ve sağlıklı kalabilmesi açısından son derece kritiktir. Genetik bilginin taşıyıcısı olan DNA, reaktif bir molekül olup, iç ve dış kaynaklı çeşitli etkenlerin neden olabileceği kimyasal değişikliklere karşı savunmasızdır. DNA, doğal süreçler veya çevresel faktörler nedeniyle sürekli olarak farklı hasarlara maruz kalırken, hücreler de bu zararlardan korunmak ve onarım yapmak için karmaşık savunma mekanizmaları geliştirmiştir. DNA polimeraz enzimleri, DNA'nın replikasyonu ve onarımında önemli roller üstlense de, bu süreçler sırasında zaman zaman hatalar yaparak hücrelere zararlı olabilecek mutasyonları biriktirebilir. Ancak hücreler, DNA hasarının yol açabileceği olumsuz sonuçları sınırlamak ve organizmanın sağlığını korumak amacıyla, hücre döngüsü kontrol mekanizmaları, DNA onarımı, programlanmış hücre ölümü (apoptoz) ve sinyal iletimi gibi çok yönlü stratejiler geliştirmiştir (Ferry, 2019).

DNA hasarları genel olarak iki kategoriye ayrılır: endojen ve ekzojen kaynaklı hasarlar. Endojen DNA hasarları, hücrelerin içindeki doğal biyokimyasal süreçlerin bir yan ürünü olarak ortaya çıkmaktadır. Özellikle hücrelerde doğal olarak bulunan su molekülleri ve serbest radikallerin neden olduğu hidrolitik ve oksidatif reaksiyonlar sonucunda DNA'da kimyasal değişiklikler meydana gelmektedir. Bu endojen etkenler, baz çiftleri arasında yanlış eşleşmelere, baz kayıplarına, kimyasal değişimlere, oksidatif hasarlara ve DNA replikasyon hatalarına yol açabilmektedir. Bu tür hatalar, genomun kararlılığını tehdit edebilir ve eğer doğru şekilde onarılmazlarsa, hücrede kalıcı mutasyonlar oluşmasına neden olabilmektedir.

Ekzojen DNA hasarları ise çevreden gelen faktörlerle ilişkilidir. Çevresel kirleticiler, kimyasallar ve fiziksel ajanlar, DNA yapısını doğrudan veya dolaylı olarak etkileyerek hasar yaratabilmektedir. Bu tür dış kaynaklı DNA hasarlarına örnek olarak, aflatoksin, benzopren, kemoterapi ilaçları ve alkilleyici ajanlar verilebilmektedir. Bu kimyasal ajanlar, DNA yapısında zincir kırılmalarına, baz çiftlerinin yanlış bağlanmasına ve DNA zincirleri arasında çapraz bağların oluşmasına neden olabilmektedir. Özellikle kemoterapötik ilaçlar, DNA'daki zincir kırılmalarını artırarak kanser hücrelerini hedef alırken, sağlıklı hücrelerde de bu etki görülebilir (Onur vd., 2009). Ayrıca çapraz bağlayıcı maddeler, alkile edici maddeler, UV

ışınları ve iyonlaştırıcı radyasyon gibi fiziksel etkenler de DNA üzerinde ciddi hasarlara yol açabilen ekzojen faktörler arasında yer almaktadır (Chatterjee ve Walker, 2017).

İnsan vücudundaki her hücre, günlük olarak on binlerce DNA lezyonuna maruz kalır ve bu lezyonlar, hücrelerin genomik bütünlüğünü tehdit eder. DNA lezyonları, hücre bölünmesi sırasında genetik bilginin doğru bir şekilde kopyalanmasını engelleyerek replikasyon ve transkripsiyon süreçlerini bloke edebilmektedir. Eğer bu lezyonlar zamanında ve doğru bir şekilde onarılmazsa, mutasyonlar birikir ve bu durum hücrelerin işlevini kaybetmesine veya kontrolsüz bir şekilde çoğalmasına yol açabilmektedir. Kanser gibi birçok hastalığın temelinde bu tür genomik instabilite yatmaktadır. Hücreler, DNA hasarına karşı DNA lezyonlarını algılayıp onarım sürecini başlatan karmaşık bir savunma ağına sahiptir. Bu savunma mekanizmaları topluca “DNA hasar yanıtı” olarak adlandırılır ve DNA hasarının saptanması, işaretlenmesi ve onarılması süreçlerini kapsamaktadır. Eğer bir hücre bu mekanizmaları düzgün şekilde çalıştıramazsa, DNA’ya zarar veren ajanlara karşı aşırı hassas hale gelir ve bu da hücrelerin hayatta kalma şansını azaltır.

DNA hasar yanıtı mekanizmaları, aynı zamanda hücrelerin belirli durumlarda hasarlı DNA’ ları onaramadığı zaman programlanmış hücre ölümünü tetikleyerek organizmanın genel sağlığını korur. Bu, potansiyel olarak kanserleşebilecek hücrelerin ortadan kaldırılmasında hayati bir öneme sahiptir. Ayrıca, hücrelerin DNA onarımı sırasında hata yapma olasılığı bulunmasına rağmen, DNA onarım mekanizmaları genellikle son derece etkilidir ve hasarları büyük ölçüde telafi edebilir. Bununla birlikte, onarım sürecinde yapılan küçük hatalar bile bazen önemli mutasyonlara yol açabilir ve bu mutasyonlar, özellikle hücre döngüsünü ve bölünmesini kontrol eden genlerde meydana geldiğinde, kanser riskini artırabilir (Jackson ve Bartek, 2009).

1.2. DNA Hasar Türleri

DNA, kalıtımın en temel yapı taşı olup, organizmaların genetik bilgilerini gelecek nesillere aktarmasında hayati bir rol oynar. Ancak, DNA yapısı son derece hassas bir molekül olduğundan, hem içsel (endojen) faktörler hem de dışsal (ekzojen) etkenler nedeniyle kolayca kimyasal ve yapısal değişikliklere maruz kalabilmektedir. Organizmalarda bu değişiklikler, yaşamın her aşamasında ortaya çıkabilecek fiziksel, kimyasal ve biyolojik faktörlerin bir sonucu olarak gelişir. Ancak, sağlıklı bir yaşam sürdürebilmek için bu değişikliklerin yaratacağı hasarların önlenmesi ve DNA’nın bütünlüğünün korunması gerekmektedir. Genomik bütünlük, hücrelerin hayatta kalabilmesi ve işlevlerini sürdürebilmesi açısından son derece önemlidir. Bu nedenle, canlılar yaşamlarını

sürdürebilmek adına DNA'larında meydana gelebilecek hasarlara karşı çeşitli savunma ve onarım mekanizmaları geliştirmişlerdir (Leem vd., 2024).

Canlı sistemlerinde bulunan DNA onarım mekanizmaları, DNA hasarını tamir etmeye yönelik bir dizi stratejiyi içerir. Bu mekanizmalar sayesinde DNA'da meydana gelen hasarlar doğrudan onarılabilir veya hasarın yol açabileceği olumsuz sonuçlar dolaylı yoldan ortadan kaldırılabilir. DNA tamir mekanizmalarının etkinliği sayesinde hücre döngüsü kesintiye uğramadan devam edebilir ve organizma normal işleyişini sürdürebilir. Bazı durumlarda ise organizmalar, DNA hasarını tamamen ortadan kaldırmak yerine, DNA replikasyonu sırasında hasarlı bölgeden kaçınarak, hasarsız tamamlayıcı iplikten faydalanmaktadır. Bu sayede hasarın kopyalanmasını engelleyerek DNA'nın doğru bir şekilde çoğaltılmasına katkıda bulunmaktadır. Özellikle replikasyon sırasında karşılaşılan bu strateji, organizmaların genomik bütünlüğünü koruma açısından önemli bir savunma mekanizmasıdır (Baynton ve Fuchs, 2000; Chatterjee ve Walker, 2017).

Bir organizmanın DNA hasarına karşı verdiği yanıtlar, belirli aşamalardan oluşur ve bu süreçlerin düzenlenmesi hücresel hayatta kalma ve genetik stabilitenin sürdürülmesi açısından kritik öneme sahip olmaktadır. Genel olarak, DNA hasarına verilen hücresel tepkiler birkaç temel aşamayı kapsar: hücre döngüsünün duraklatılması, DNA onarımı ile ilgili genlerin aktive edilmesi ve tamir edilemeyen hasar durumlarında programlanmış hücre ölümü (apoptozis) sürecinin başlatılmasıdır. Bu mekanizmalar sayesinde hücre, DNA'sında meydana gelen hasarın kontrolsüz bir şekilde yayılmasını engelleyebilir ve genetik kararlılığını koruyabilmektedir. Ancak, bu süreçlerin doğru bir şekilde dengelenememesi durumunda hücrede genomik kararsızlık meydana gelir ve bu kararsızlık, kanser gibi ciddi hastalıklara yol açabilmektedir (Khanna ve Jackson, 2001; Baynton ve Fuchs, 2000; Chatterjee ve Walker, 2017).

Hücreler, DNA hasarına karşı savunma oluşturmak için çeşitli mekanizmalar kullanır. Bu mekanizmalar arasında DNA onarımı, DNA hasarına tolerans geliştirme, hücre döngüsü kontrol noktalarının devreye girmesi ve hasarın kalıcı hale gelmesi durumunda hücre ölüm yollarının başlatılması yer almaktadır. DNA onarım mekanizmaları, hücrelerin genomik bütünlüğünü korumasında en önemli savunma stratejilerinden biridir. Eğer hücre, DNA'sında meydana gelen hataları onaramazsa, apoptozis adı verilen programlanmış hücre ölümü mekanizması devreye girmektedir. Apoptozis, DNA'daki hasarın organizma genelinde yayılmasını önlemek amacıyla hücrelerin düzenli bir şekilde ortadan kaldırılması için başvurulmuş bir süreçtir. Bu süreç, hücredeki hasarın tamir edilemez hale geldiği durumlarda,

genetik dengesizliği önlemek için bir güvenlik mekanizması olarak işlev görmektedir (De Boer ve Hoeijmakers, 2000; Chatterjee ve Walker, 2017).

DNA hasarına karşı geliştirilen tolerans mekanizmaları ise hücrelerin bazı DNA lezyonlarını geçici olarak göz ardı etmesine olanak tanımaktadır. Böylelikle hasarlı bölge tamir edilemezse, hücreler replikasyon sırasında hasarsız bölgelerden bilgi kopyalayarak hayatta kalmaya ve çoğalmaya devam edebilmektedir. Bu mekanizma, DNA onarım kapasitesinin sınırlı olduğu durumlarda hücrelerin yaşamını sürdürmesine yardımcı olmaktadır. Ancak bu tolerans mekanizması uzun vadede, hücrede birikmiş mutasyonların artmasına yol açabilir ve zamanla genomik dengesizliklere neden olabilmektedir. Sonuç olarak, DNA hasarına verilen yanıtların ve onarım mekanizmalarının düzgün bir şekilde çalışmadığı durumlarda, hücresel işleyiş bozulabilir ve bu da kanser gibi istenmeyen patolojik süreçlerin tetiklenmesine yol açabilmektedir (Santella, 1999; Phillips, 2005, 2013; Chatterjee ve Walker, 2017).

Hücre döngüsü kontrol noktaları, DNA hasarına karşı verilen yanıtların önemli bir bileşenidir. Bu kontrol noktaları, hücrelerin DNA hasarını algılayarak hücre döngüsünü geçici olarak durdurmasına olanak tanımaktadır. Böylece hasarın onarılması için zaman kazandırılmış olur. Eğer hasar onarılamayacak kadar büyükse veya onarım mekanizmaları işlevsiz hale gelmişse, hücre ölüm yolları devreye girmektedir. Bu yollardan biri olan apoptozis, genomik kararlılığı bozulan hücrelerin ortadan kaldırılması ve organizmanın genel sağlığının korunması için kritik bir role sahip olmaktadır. Apoptozis, hücrenin hasar düzeyine göre başlatılan düzenleyici bir süreçtir ve bu sayede organizma, hasarlı hücrelerin varlığından kaynaklanabilecek potansiyel tehlikelerden korunmaktadır (Slupphaug vd., 2003; Khanna ve Jackson, 2001; Pratt vd., 2011).

Sonuç olarak, DNA onarımı ve hasara verilen hücresel yanıtlar, organizmanın genetik stabilitesinin korunması ve hastalıkların önlenmesi için son derece önemlidir. Bu mekanizmalar, DNA hasarının tamir edilmesinde, hasarın yayılmasının engellenmesinde ve hücresel sağlığın sürdürülmesinde hayati bir rol oynamaktadır. DNA'daki hasarların etkili bir şekilde giderilememesi durumunda, organizmalar kanser ve diğ er ciddi hastalıkların gelişimine daha yatkın hale gelebilmektedir. Bu nedenle, DNA hasar yanıtı ve onarım mekanizmalarının dengeli ve etkin bir şekilde çalışması, genetik kararlılığı ve organizmanın uzun vadeli sağlığını korumak için vazgeçilmezdir (Brown, 2012; Klaene, Sharma, Glick ve Vouros, 2013; Tretyakova, Villalta ve Kotapati, 2013; Gavina, Yao ve Feng, 2014; Liu ve Wang, 2015).

1.2.1. Endojen DNA Hasarı

Endojen kaynaklı DNA hasarı, ekzojen kaynaklı DNA hasarına kıyasla daha sık ortaya çıkmaktadır, ancak çevresel (ekzojen) faktörlerin endojen DNA hasarını tetiklediği de bilinmektedir. Özellikle çeşitli kanser türlerinin oluşumunda, ekzojen faktörlerin tetiklediği endojen DNA hasarları önemli bir rol oynamaktadır. Bunun yanı sıra, ekzojen faktörler organizmada bazı genlerin ekspresyonunu değiştirerek endojen süreçleri etkileyebilir. Bu bağlamda, endojen kaynaklı DNA hasarlarının daha iyi anlaşılması, ekzojen faktörlerle olan etkileşiminin yanı sıra kanser gibi ciddi hastalıkların mekanizmalarının aydınlatılması açısından büyük önem taşımaktadır.

Endojen DNA hasarına neden olan durumlar arasında reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi, lipid peroksidasyonu (aldehit türevlerinin oluşumu), östrojen metabolitleri, metilleyici ajanlar (S-adenozil metiyonin gibi), hidroliz, hidrolitik deaminasyon ve karbonil stres yer almaktadır. Bu hasarların en önemli kaynağı olan reaktif oksijen türleri, özellikle oksidatif stres koşullarında DNA'da ciddi hasarlara yol açabilmektedir. En çok araştırılan oksidatif DNA lezyonu, 8-okso-dGuadinir olarak bilinen yapıdır. Bunun dışında lipid peroksidasyonu sonucunda DNA'ya zarar verebilen aldehit türevleri de oluşmaktadır. En toksik aldehit türevlerinden biri 4-hidroksinonenal (HNE) iken, en mutajenik olanı ise malondialdehittir (MDA). Bu bileşikler, DNA'daki bazlara eklentiler yaparak baz eşleşmelerini engelleyebilir ve mutasyonlara yol açabilmektedir (De Bont ve van Larebeke, 2004).

Replikasyon sırasında meydana gelen hatalar ve yanlış baz eşleşmeleri, hücre döngüsünde DNA polimeraz enzimlerinin düzgün çalışmaması sonucunda oluşur. DNA polimerazlarının doğru bazları eşleştirmesi, termodinamik stabilite ve uygun geometrik yapının sağlanmasıyla mümkündür. Ancak, bazen bu eşleşme hatalı olabilir ve bu durum genellikle yanlış eşleşme tamir mekanizmaları ve 3'-5' ekzonükleaz enzimleri tarafından kontrol edilir. Ancak tüm hatalar tamir edilemezse, bir sonraki replikasyon döngüsünde mutasyonlar ortaya çıkabilmektedir.

Baz deaminasyonu da endojen DNA hasarının önemli bir bileşenidir. Bu süreçte, sitozin, adenin, guanin ve 5-metil sitozin gibi bazlar, halka dışı amin yapılarını kaybederek sırasıyla urasil, hipoksantin, ksantin ve timine dönüşmektedir. Bu dönüşümler, DNA'nın doğru çalışmasını engelleyerek mutasyonlara neden olabilmektedir (Chatterjee ve Walker, 2017).

DNA metilasyonu ise S-adenozil metiyonin (SAM) tarafından gerçekleştirilen enzimatik süreçlerle ilgilidir. SAM, normal işlevlerini yerine getirirken bazen N7-metilguanin, sitotoksik DNA lezyonu olan N3-metiladenin ve mutajenik özellik gösteren O6-metilguanin gibi yapılar oluşturabilmektedir. Bu metillenmiş bazlar, genellikle baz ekzisyon tamir (BER) yoluyla veya O6-metilguanin DNA metiltransferaz (MGMT) ile organizmadan kaldırılmaktadır.

Abazik bölgeler (apurinik/apirimidik bölgeler), N-glikozil bağlarının hidrolizi ya da DNA glikozilaz enzimi ile parçalanması sonucu oluşmaktadır. Tamir edilmediğinde bu bölgeler mutajenik özellik gösterebilir ve zamanla tek zincir kırıklarına dönüşebilmektedir. Bu tür hasarlar, genellikle endonükleaz enzimi ve baz ekzisyon tamir yoluyla ile düzeltilenilmektedir (De Bont ve van Larebeke, 2004; Chatterjee ve Walker, 2017).

Oksidatif DNA hasarı, özellikle aerobik organizmaların hücresel solunumu sırasında ortaya çıkan reaktif oksijen türleri (ROS) nedeniyle sıkça karşılaşılan bir sorundur. Katabolik ve anabolik süreçlerin yan ürünleri olan ROS, normal şartlar altında hücresel işlevler için gereklidir. Ancak bu türlerin seviyesi arttığında, DNA'da oksidatif baz lezyonları ve diğer yapısal değişiklikler meydana gelmektedir. Bu hasarlar, en yaygın olarak 8-oksoG ve timin glikol formunda gözlemlenir (Slupphaug vd., 2003). Hücreler, bu oksidatif hasarı önlemek için mitokondrial solunumu sınırlar, histon proteinleri ile DNA'yı korur ve antioksidan enzimlerle ROS'ları temizlemektedir.

Oksidatif DNA hasarının önemli bir kaynağı olan hidroksil radikali, Fe²⁺ ile hidrojen peroksidin Fenton reaksiyonu sonucu oluşur ve en reaktif ROS türlerinden biridir. Bu radikal, DNA'nın çift bağlarına saldırarak yapısal bozulmalara yol açar. Özellikle timin ve guanin bazlarına saldırarak DNA'daki C8 pozisyonunda hidroksil grubu ekleyerek 8-oksoguanin yapısını oluşturur, bu da hatalı baz eşleşmelerine ve dolayısıyla mutasyonlara yol açar. Oksidatif hasar, baz ekzisyon tamir (BER) ya da zincir kırıkları yolları ile tamir edilebilmektedir (Chatterjee ve Walker, 2017).

1.2.2. Ekzojen DNA Hasarı

İyonize radyasyon (IR), DNA üzerinde hem doğrudan hem de dolaylı etkiler yaratarak hasar oluşturur. IR maruziyeti sonucunda DNA bazlarında lezyonlar meydana gelirken, aynı zamanda DNA'nın tek zincirli kırıkları da gözlemlenir. Bu hasarlar, DNA yapısının bozulmasına ve genetik bilgilerin zarar görmesine yol açabilecek kritik değişikliklerdir. DNA'nın şeker-fosfat omurgasında ise IR'nin etkisiyle yapısal bozulmalar ortaya

çıkabilmektedir. Bu durum, hücrel işlevlerin aksamasına ve DNA'nın doğru bir şekilde kopyalanmasının önüne geçebilmektedir (Chatterjee ve Walker, 2017; Slupphaug vd., 2003).

IR'nin yanı sıra, ultraviyole (UV) ışınlarına maruz kalınması da DNA'da farklı türde hasarların meydana gelmesine sebep olabilir. UV ışınları, sahip oldukları dalga boylarına göre UV-C, UV-B ve UV-A olmak üzere üç ana sınıfa ayrılır ve her biri farklı etkiler gösterir. DNA, 260 nm civarında dalga boyuna sahip UV ışınlarını emebilir ve bu enerji DNA yapısında fotokimyasal değişikliklere neden olmaktadır. Özellikle UV-C ışınları, DNA moleküllerinde büyük yapısal değişiklikler meydana getirmektedir. Bu ışınlar, DNA diziliminde siklobütan pirimidin dimerleri (CPD) ve pirimidin (6-4) pirimidon fotoürünleri gibi hasarlı bölgeler oluşturur. Bu yapısal değişiklikler, DNA'nın fonksiyonlarını bozarak hücrel işleyişi aksatır ve potansiyel mutasyonlara yol açabilmektedir.

Alkilleyici ajanlar da DNA'ya ciddi hasarlar veren kimyasal maddeler arasında yer alır. Bu maddeler, çevresel kirlilik, endüstriyel işlemler ve insan kaynaklı aktiviteler sonucunda ortaya çıkmaktadır. Özellikle sigara dumanı, biyokütle yanması ve çeşitli endüstriyel süreçler alkilleyici ajanların başlıca kaynaklarıdır. Alkilleyici ajanlar, DNA bazlarına doğrudan saldırarak çeşitli lezyonların oluşmasına neden olur. Metil metansülfonat (MMS) gibi bazı ajanlar, DNA bazlarında N7-metilguanin ve N3-metiladenin yapılarının oluşmasına yol açmaktadır. Bununla birlikte, N-metil-N'-nitro-nitrozoguanidin (MNNG) ve metilnitrozoüre (MNU) gibi diğer alkilleyiciler, DNA bazlarında G^A mutasyonlarına neden olan O6-metilguanin yapılarını meydana getirmektedir. Bu mutasyonlar, genetik materyalde kalıcı hasara neden olabilir ve hücrelerde mutasyonların birikmesine yol açarak kanser gibi ciddi hastalıklara zemin hazırlayabilir.

Aromatik aminler, DNA üzerinde hasar oluşturan bir başka önemli kimyasal sınıftır. Özellikle guanin bazına C8 pozisyonundan saldırarak DNA yapısında değişikliklere neden olurlar. Aromatik aminler, sigara dumanında, endüstriyel boyalarda ve yüksek sıcaklıkta pişirilen gıdalarda yaygın olarak bulunmaktadır. Bu kimyasallar, DNA ile etkileşime girerek DNA diziliminde mutasyonlara yol açabilir. 2-aminofloren (AF) ve N-asetil-2-aminofloren (AAF) gibi bileşikler, aromatik aminler grubunda öne çıkan maddelerdir ve DNA bazlarında hasar oluşturarak mutasyonların gelişimine katkıda bulunurlar.

Polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH'lar), özellikle sigara dumanı ve kömürleşmiş gıdalarda bol miktarda bulunan kanserojen bileşiklerdir. Bu maddeler, DNA ile etkileşime girerek genetik materyale ciddi zararlar verebilir. PAH'lar, DNA diziliminde yapısal bozulmalara neden olur ve hücrelerde mutasyonların birikmesine zemin hazırlar. Dibenzo (a)

piren, PAH'lar arasında en güçlü kanserojen özelliklere sahip olan bileşiktir ve bu maddeye maruz kalmak, kanser gelişimini tetikleyebilir. PAH'ların DNA üzerindeki zararlı etkileri, uzun süreli maruziyetlerde artış gösterir ve genetik materyalin bütünlüğünü bozarak organizmanın sağlığını tehdit etmektedir.

Son olarak, toksinler de DNA üzerinde ciddi hasarlar oluşturabilen kimyasal maddeler arasında yer alır. Aflatoksinler, özellikle kontamine olmuş tahıl ürünleri ve süt ürünlerinde bulunan güçlü toksinlerdir. Aflatoksin B1, karaciğer kanserine neden olabilen en tehlikeli aflatoksinlerden biridir. P450 enzim sistemi tarafından aktif hale getirilen aflatoksin B1, aflatoksin B1-8,9-epoksit formuna dönüşerek DNA üzerinde depürinasyon ve baz kaybı gibi hasarların meydana gelmesine yol açmaktadır. Bu toksinlerin etkisiyle DNA'nın yapısında kalıcı değişiklikler meydana gelir ve hücresel işlevler ciddi şekilde bozulmaktadır. Aflatoksinlerin DNA üzerinde yarattığı bu hasarlar, kanser başta olmak üzere birçok ciddi hastalığın gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır.

Sonuç olarak, IR, UV ışınları, alkilleyici ajanlar, aromatik aminler, PAH'lar ve toksinler gibi çeşitli faktörler, DNA üzerinde doğrudan veya dolaylı yollarla hasara yol açarak genetik materyalin bozulmasına ve hücresel işlevlerin aksamasına neden olabilmektedir. Bu kimyasalların DNA üzerindeki etkileri, hücrelerde mutasyonlara ve genomik dengesizliklere yol açarak, kanser gibi ciddi hastalıkların gelişmesine neden olabilir. DNA'nın korunması ve hasarların onarılması, hücresel sağlığın sürdürülmesi ve organizmanın uzun vadeli hayatta kalması açısından kritik bir öneme sahiptir (Chatterjee ve Walker, 2017).

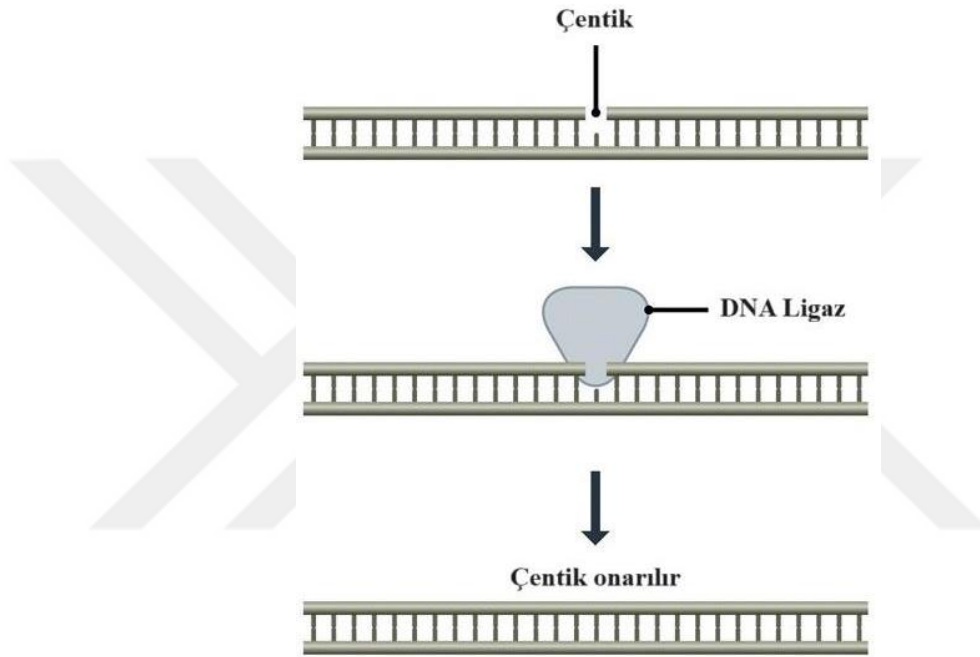
1.3. DNA Tamir Mekanizmaları

Canlı organizmaların hayatta kalabilmesi ve genetik bilgilerini nesilden nesile aktarabilmesi için genomlarının bütünlüğünü korumaları zorunludur. DNA'da oluşan hasarların çeşitliliği nedeniyle, tüm hasarların tamirinde tek bir mekanizmanın etkin olması mümkün değildir. Bu sebeple, her bir tamir mekanizması belirli türdeki hasarları tanıyarak onarmak üzere özelleşmiştir. İnsanlarda DNA tamir sürecinde çok sayıda genin rol aldığı tahmin edilmekte, ancak bu genlerin yalnızca yaklaşık %50'sinin işlevleri tam olarak bilinmektedir (Daniels vd., 2000; Sancar, 2003; Slupphaug vd., 2003).

Direkt tamir mekanizmaları, DNA'da oluşan hasarların onarımı sırasında herhangi bir baz veya nükleotid çıkarımı olmadan gerçekleşir. Bu mekanizma yalnızca sınırlı sayıda

DNA hasarını onarabilmektedir. Direkt tamirle ilişkili üç ana mekanizma bulunmaktadır (Brown vd., 2002; Polosina vd., 2009):

İlki, basit tek zincir kırıklarının ligasyonudur. İyonize radyasyon, DNA'nın tek zincirindeki fosfodiester bağlarını kırarak çentik (nick) oluşumuna yol açar. Bu çentik, DNA ligaz enzimi aracılığıyla onarılır. DNA ligaz, kırılan 5' fosfat grubu ile 3' OH grubu arasında yeni bir fosfodiester bağı oluşturarak DNA'yı eski haline getirir ve onarımı tamamlar (Terence, 2002; Rastogi vd., 2010; Lagerwef vd., 2011).



Şekil 1.1. DNA ligaz enzimi tarafından çentiğin onarılması (Terence, 2002)

Direkt tamir mekanizmasıyla onarılan bir diğer hasar türü alkilizasyon hasarlarıdır. Alkilleyici ajanlarla DNA arasındaki etkileşimler sonucunda meydana gelen bu hasarların tamiri, hasarlı nükleotiddeki metil veya etil gruplarının, belirli enzimler tarafından kendi zincirine aktarılmasıyla gerçekleştirilir. Bu onarım sürecinde insanlarda görevli olan enzim MGMT (O6-metilguanin-DNA metiltransferaz) enzimi, guaninin 6. pozisyonunda bulunan alkil grubunun uzaklaştırılmasını sağlamaktadır. O6-metilguanin, alkilleyici ajanların varlığında oluşan mutajenik bir bileşiktir (Sung vd., 2000; Cromie vd., 2001).

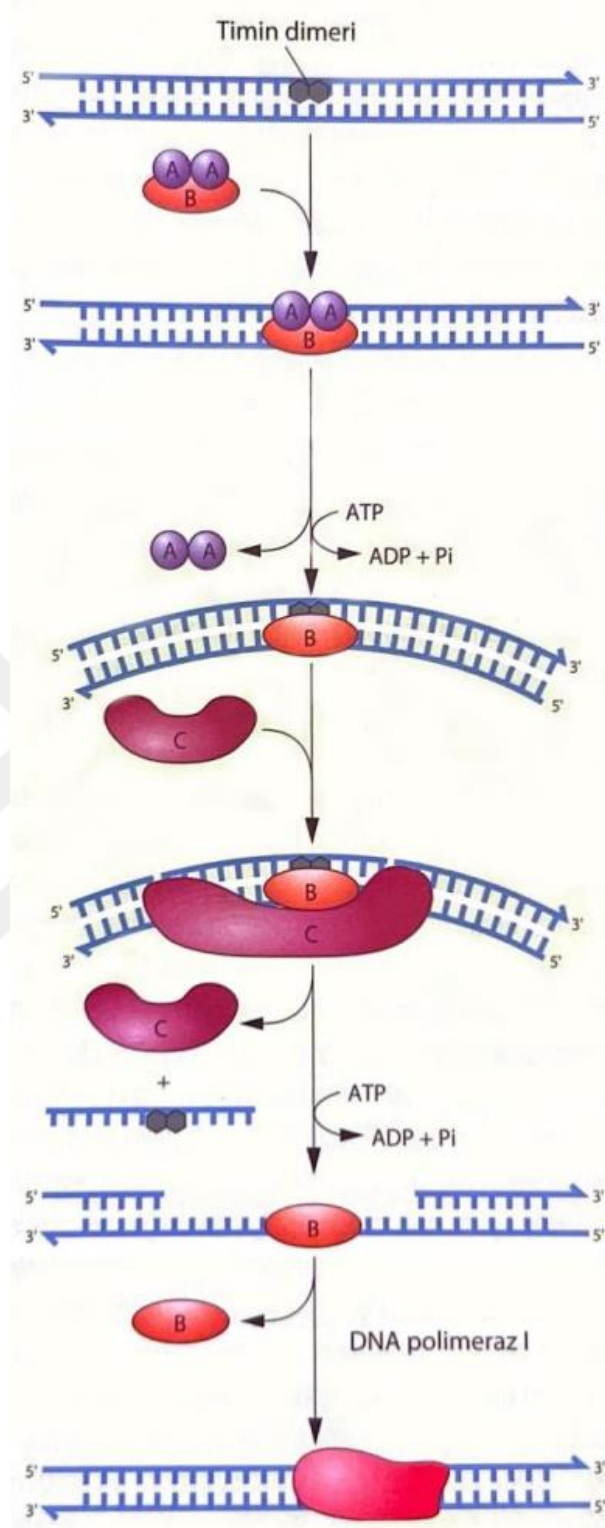
UV ışınlarının etkisiyle oluşan primidin dimerlerinin onarımında ise fotoreaktivasyon tamir mekanizması devreye girer. Bu mekanizma, yalnızca bakterilerde bulunur ve E. Coli'de görev yapan temel enzim DNA fotoliyazdır. İnsanlar ve birçok ökaryotik canlıda bu tamir

sistemi mevcut değildir, dolayısıyla evrensel bir tamir mekanizması olarak kabul edilemez (Onur vd., 2009).

Nükleotid eksizyon onarımı (NER), baz eksizyon tamirine (BER) göre daha spesifik bir tamir sistemidir. NER, hasarlı nükleotidlerin kesilip çıkarılması ve yerlerine yenilerinin sentezlenmesi işlemini gerçekleştirir; bu yönüyle BER'den daha kapsamlıdır. Ökaryotlarda oldukça yaygın bir şekilde kullanılan bu tamir mekanizması, özellikle DNA hasarlarının onarımında önemli bir rol oynamaktadır (Li ve diğ.2006; Mladenov vd., 2013).

NER sisteminin en iyi anlaşılan mekanizması, E. coli'deki "short patch" (kısa yama) tamir sistemidir. Bu mekanizma, yaklaşık 12 nükleotidlik hasarların onarımını gerçekleştirir. Ökaryotlarda ise NER, E. coli'deki "long patch" (uzun yama) tamir sistemine benzer; burada tamir edilen hasar 24-30 nükleotid uzunluğundadır (Agarwal vd., 1999; Zeng vd., 2014; Jelic vd., 2021).

E. coli'deki "short patch" tamir mekanizmasına UvrABC tamir sistemi de denir. Bu sistem, UvrA, UvrB, UvrC ve UvrD olmak üzere dört protein aracılığıyla işlev görmektedir. İki UvrA ve bir UvrB molekülünden oluşan kompleks, DNA'yı tarar ve hasar tespit ettiğinde DNA'ya bağlanır. UvrB, hasarlı bölgenin etrafında tek iplikli bir kabarcık oluşturarak DNA'nın çözülmesini sağlar ve UvrC'nin bağlanmasına olanak tanır. UvrC, hasarın 3' ucundan 4-5 nükleotid, 5' ucundan ise 8 nükleotid uzakta iki çentik meydana getirir. Böylece yaklaşık 12-13 nükleotid uzunluğunda tek iplikli DNA parçası oluşturulur. Bu parça, DNA helikazı olan UvrD tarafından uzaklaştırılır. UvrC bu aşamada ayrılırken, UvrB yerinde kalır ve ipliğin hasar görmesini engelleyerek DNA polimerazın gelmesini sağlar. Oluşan boşluk, DNA polimeraz 1 tarafından doldurulur ve uçlar DNA ligaz ile birleştirilir (Cooke vd., 2003; Valavanidis vd., 2009).



Şekil 1.2. *E. Coli*' de NER Tamiri (Snustad ve Simmons' dan)

Ökaryotik Nükleotid Eksizyon Onarım (NER) sistemi, temel prensipleri *E. coli*'deki mekanizma ile benzerlik gösterse de, hasar görmüş DNA bölgesinin tespit edilmesi,

kesilmesi ve çıkarılması aşamaları açısından daha karmaşık bir yapıya sahiptir. Bu sistemin işleyişinde önemli bir rol oynayan XPC proteini, DNA sarmalındaki bükülmeleri tanıyarak hasarlı alanın bulunmasını sağlar. Hasar tespit edildikten sonra, DNA'nın çift sarmal yapısının açılması sürecinde XPA ve XPD proteinleri devreye girer. Bu proteinler, helikaz aktivitesi göstererek DNA'nın iki ipliğini ayırarak tek iplikli bir kabarcık oluşturur (Lee vd., 1998; Halliwell, 1999; Kasai, 2002).

Bu tek iplikli kabarcık oluşturulduktan sonra, ERCC1-XPF kompleksi hasar görmüş bölgeyi 5' ucundan keserken, XPG proteini ise 3' ucundan kesme işlemini gerçekleştirir. XPG, UvrC'nin işlevini üstlenerek, hasarın tamir sürecinde kritik bir rol oynar. Bu kesim işlemleri sonucunda, genellikle 24-32 nükleotid uzunluğunda bir boşluk oluşur. Oluşan bu boşluk, DNA polimeraz delta veya epsilon enzimleri aracılığıyla doldurulur (Jeong, vd., 2005).

Son olarak, DNA onarım süreci, DNA ligaz enzimi tarafından gerçekleştirilen birleştirme işlemiyle sonlandırılır. Bu adımlar, DNA'nın bütünlüğünü ve fonksiyonelliğini korumak için son derece önemlidir. NER mekanizması, genetik bilgiyi doğru bir şekilde aktarabilmek ve hücrelerin sağlıklı bir şekilde işlev görmesini sağlamak adına kritik bir rol üstlenmektedir. DNA'da hasar görmüş bazların ortadan kaldırılmasında en yaygın yöntemlerden biri, hasarlı bazların kesilip çıkarılması ve yerlerine doğru bazların konulmasıdır. Bu süreç, DNA'nın sarmal yapısını önemli ölçüde bozmayan, küçük baz lezyonlarının tamiri için kullanılan karmaşık olmayan bir sistemdir. Oksidasyon, deaminasyon ve iyonizan radyasyon gibi faktörlerin neden olduğu hasarların onarımı, Baz Eksizyon Onarım (BER) mekanizması aracılığıyla gerçekleştirilir (Cooke vd., 2003).

BER tamir sisteminin işleyişi, hasarlı bazları tanıyan ve baz ile şeker komponenti arasındaki glikozid bağını hidrolizleyerek kesen DNA glikozilazları ile başlamaktadır. Bu enzim, hasarlı nükleotidden bazın ayrılması sonucunda oluşan bölge, AP (apurinik/apirimidinik) bölgesi olarak adlandırılır. AP bölgesi, bazın yokluğunda oluşan bir boşluk alanıdır ve bu alanın onarılması için özel enzimler devreye girmektedir (Marnet, 2000).

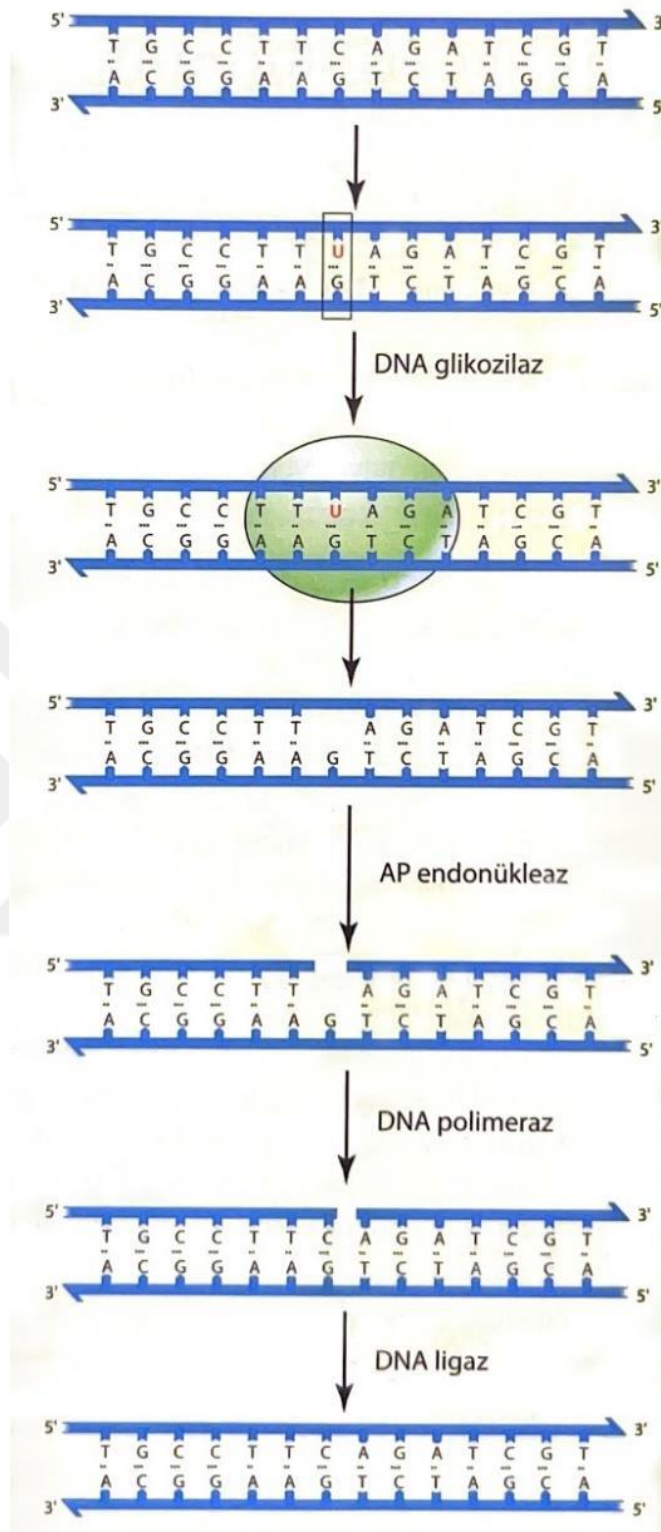
Ardından, AP endonükleaz enzimi, DNA zincirinin 5' yönündeki fosfodiester bağını keserek bu bölgede bir boşluk (gap) meydana getirir. Bu aşamadan sonra, hasar görmüş bölge tamamen yok edildikten sonra buradaki boşluk, DNA polimeraz tarafından doldurulur. Bu noktada, E. coli'de DNA polimeraz I bu onarımda görev alırken, memelilerde DNA polimeraz beta bu işlemi üstlenmektedir (De Martinis, 2002).

Tamamlayıcı bazlar yerleştirildikten sonra, DNA ligaz enzimi aracılığıyla fosfodiester bağ oluşturulur ve aradaki boşluk kapatılmaktadır. Bu sũreç, DNA'nın bũtũnlũęũnũ sağlamak ve genetik bilginin doğru bir şekilde aktarılmasını temin etmek açısından son derece kritik bir ȃneme sahiptir. Ayrıca, bu mekanizma, hũcrelerin sağlıklı işlevlerini sũrdũrebilmesi ve genetik stabilitenin korunması için hayati bir rol oynamaktadır (Dedon vd., 1998).

1.4. DNA Hasar Yanıtı

DNA hasar yanıtı, lezyona ȃzgũ sensȃr proteinlerinin hasar yanıtını başlatması, hasar yanıt faktȃrlerinin hasarlı bȃlgelerde toplanması ve kromatin yeniden modelleme mekanizmasının aktive edilmesi gibi bir dizi mekanizmayı içeren karmaşık bir sistemdir (Chatterjee ve Walker, 2017). Bu mekanizma, genomik bũtũnlũęũ koruyarak ve genomda meydana gelen defektlerin ęȃzũmũnde etkin bir rol oynayarak, ęeřitli DNA tamir yolları, hasar toleransı ve hũcre dȃngũsũ kontrol noktalarını kapsamaktadır.

DNA hasar yanıt mekanizması, organizmanın sağlığı için kritik ȃneme sahiptir. Bu mekanizmada yer alan faktȃrlerden herhangi birinde meydana gelen bir sorun, nȃrolojik bozukluklar, immũn yetmezlik ve ęeřitli kanser tũrlerine yatkınlık durumlarının ortaya ęıkmasına neden olabilir. Ayrıca, bu sistemde yaşanan aksaklıklar, organizmanın daha hızlı bir şekilde yaşlanmasına yol açabilmektedir (Giglia-Mari vd., 2011).



Şekil 1.3. BER Tamir Mekanizması (Snustad ve Simmons'dan)

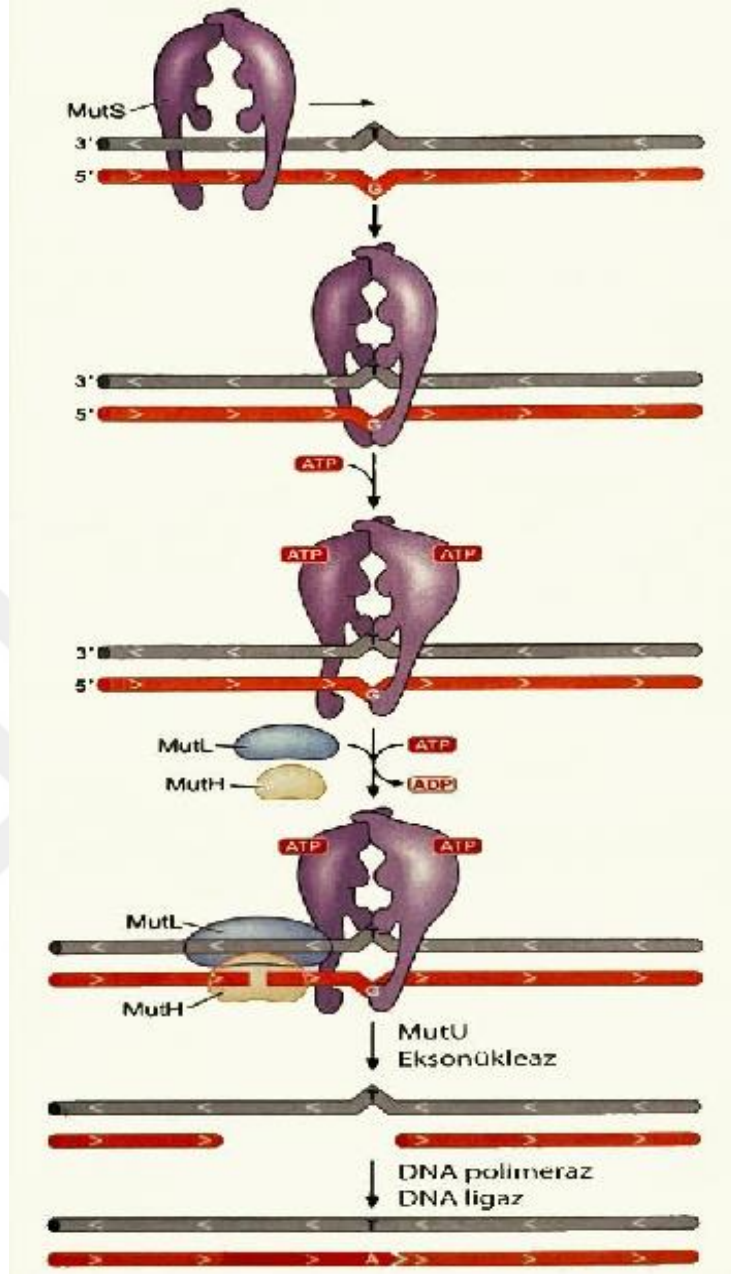
Yanlış eşleşme tamir mekanizması, yüksek oranda korunmuş bir sistem olup, genomik bütünlüğün korunmasında kritik bir rol oynamaktadır. Bu mekanizma, esas olarak DNA

replikasyonu ve rekombinasyonu sırasında meydana gelen baz-baz uyumsuzluklarının ortadan kaldırılmasına odaklanmaktadır. Bu tür hasarların etkin bir şekilde onarılması, bölünen hücrelerde kalıcı hale gelerek mutasyona dönüşme olasılığını önemli ölçüde azaltır. Yanlış eşleşme tamir mekanizması sayesinde DNA replikasyonunun doğruluğu yaklaşık 100 kat artırılabilir, bu da genetik stabilitenin korunması açısından son derece önemlidir.

Bu mekanizma, E. coli üzerinde yapılan araştırmalar sonucunda ortaya çıkarılmıştır. Burada, birkaç proteinden oluşan bir kompleks (Mut proteinleri) sayesinde yanlış eşleşmelerin replikasyon sonrası onarıldığı tespit edilmiştir. Bu sistemin işleyişi şu şekilde gerçekleşir.

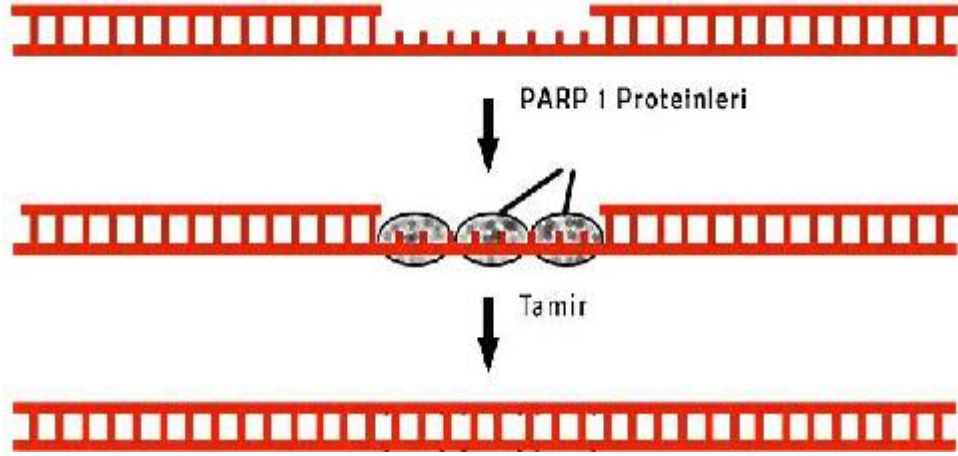
İlk olarak, MutS proteini DNA üzerinde dolaşarak hatalı gördüğü noktada durur. Bu aşamada, MutS-DNA kompleksi oluşur ve onarımda görevli bir diğer protein olan MutL, bu kompleksin içerisine katılır. Bu işlem, ATP tüketimi ile gerçekleşir. MutL proteini, yanlış eşleşmenin bulunduğu yakın bir bölgede çentik oluşturacak olan MutH'nin aktifleşmesini sağlar. MutH, yeni sentezlenmiş iplikteki yanlış eşleşmenin 5' veya 3' ucundan kesme işlemi yaparak burada bir çentik oluşumunu başlatır.

Sonrasında, özel bir helikaz olan MutU, DNA'nın çift sarmal yapısını çözerek hasarlı bölgenin açılmasını sağlar. Bu aşamadan sonra, meydana gelen boşluk, DNA polimeraz I ve DNA ligaz enzimleri tarafından tamamen kapatılır. Bu onarım süreci, DNA'nın bütünlüğünü sağlamak ve genetik bilginin doğru bir şekilde korunmasını temin etmek açısından kritik bir mekanizmadır (Li, 2007).



Şekil 1.4. E. Coli’ de Yanlış Eşleşme Tamir Mekanizması (Watson ve ark’dan)

Çift zincirli DNA’nın oksidatif stres sonucunda tek bir zincirinde meydana gelen kırığın PARP1 proteini ile doldurularak sağlam zincirin korunması sağlanır.

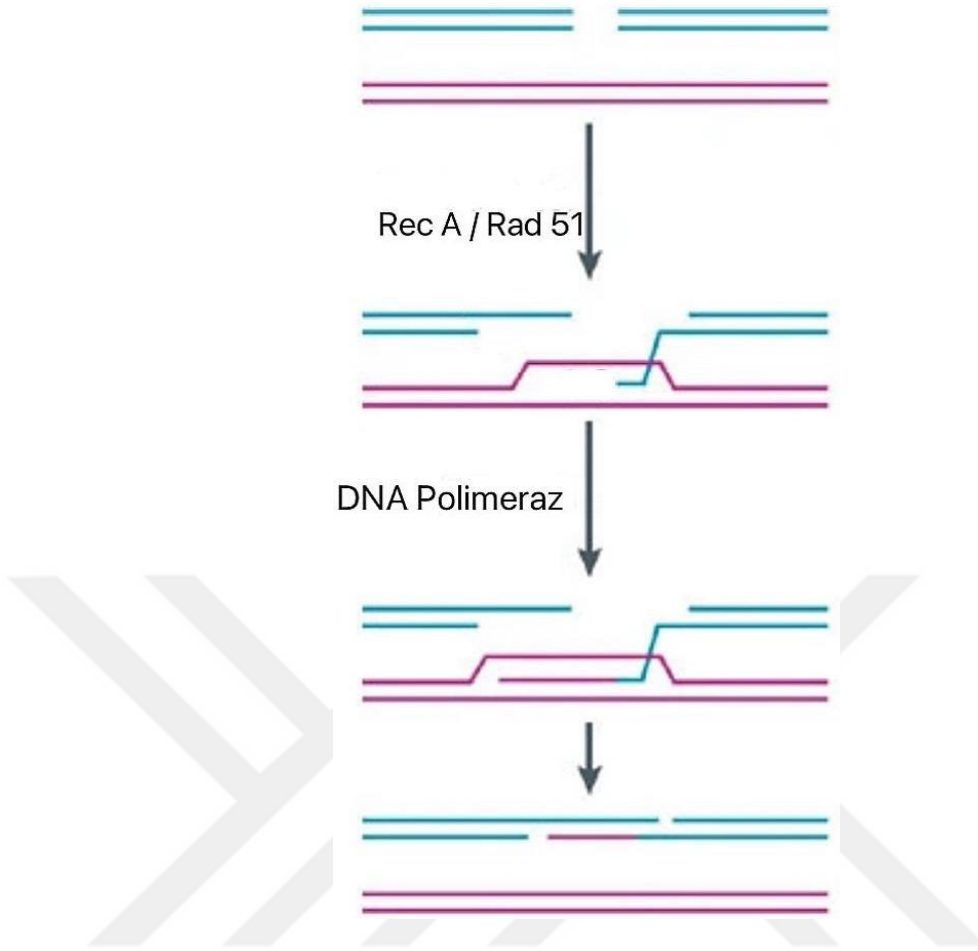


Şekil 1.5. Tek Zincir Kırıklarının Tamiri

Çift zincir kırıkları, iyonizan radyasyon, kimyasal ajanlar veya DNA replikasyon süreçleri sırasında meydana gelen ve genetik materyalde önemli olumsuz sonuçlara yol açabilen hasarlardır. Bu tür hasarların tamir edilmesi, istenmeyen rekombinasyonların ve delesyonların önlenmesi açısından kritik bir öneme sahiptir. Çift zincir kırıklarının onarımında temel olarak iki ana mekanizma bulunmaktadır:

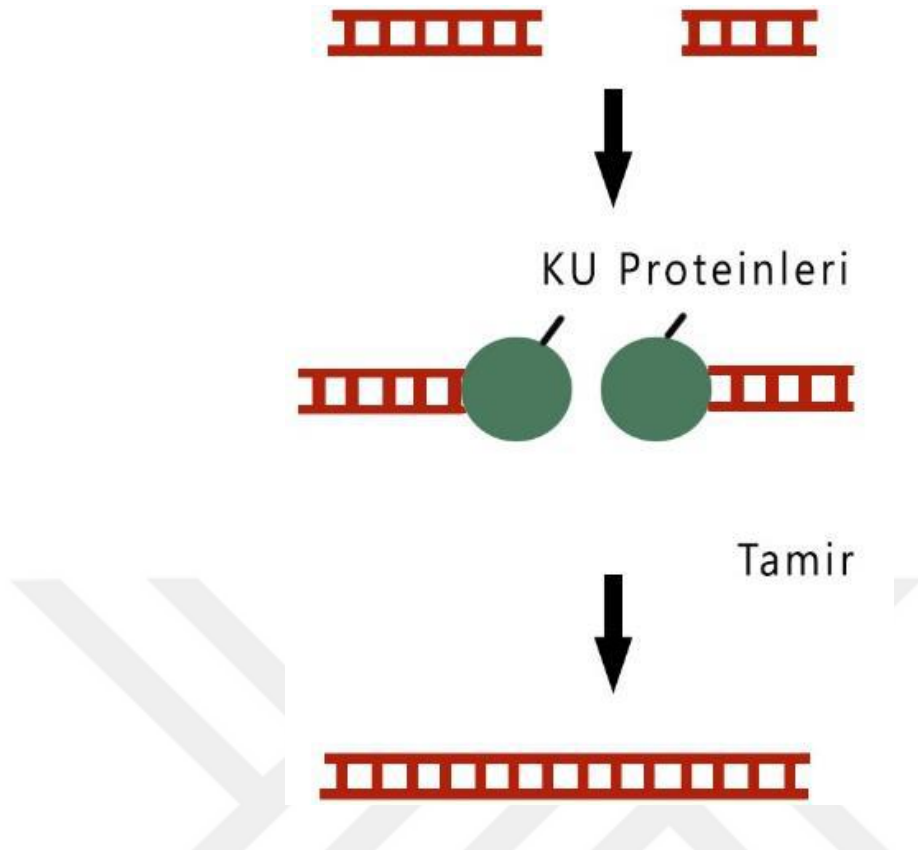
Homolog Rekombinasyon: Bu onarım mekanizmasında, çift iplik kırığı olan DNA zinciri, zarar görmemiş olan bir DNA zinciri kalıp alınarak tamir edilir. Homolog rekombinasyon, genetik çeşitliliği sağlamanın yanı sıra DNA'nın bütünlüğünü korumada da önemli bir rol oynamaktadır. Bu süreçte, RecA ve Rad51 gibi proteinler kritik işlevler üstlenmektedir. RecA proteini, hasarlı DNA ile sağlam DNA arasındaki eşleşmeyi sağlamada önemli bir rol oynarken, Rad51 proteini de DNA ipliklerinin eşleşmesine ve onarım sürecinin ilerlemesine katkı sağlamaktadır.

Bu mekanizmaların etkin bir şekilde işlemesi, hücrelerin genetik bilgilerini korumalarına ve hasar sonrası normal işlevlerine dönmelerine olanak tanımaktadır. Bunun yanı sıra, homolog rekombinasyonun sağlıklı bir şekilde gerçekleşmemesi durumunda, genetik materyalde kalıcı değişiklikler meydana gelebilir ve bu da kanser gibi hastalıklara yol açabilmektedir (Shuman ve Glickman, 2007).



Şekil 1.6. Homolog Rekombinasyon Tamiri

Nonhomolog Uç Birleştirme: Bu mekanizma, genellikle hatalara oldukça eğilimli bir tamir mekanizması olarak bilinmektedir. Çift zincir kırıklarının onarımında, hasarlı DNA'nın kırık uçlarının bir araya getirilmesi gerekmektedir. Bu birleştirme sürecinde Ku proteinleri, özellikle Ku70 ve Ku80, kritik bir rol oynamaktadır. Ku proteinleri, DNA'nın kırık uçları etrafında bağlanarak onları stabilize eder ve onarım sürecinin ilerlemesini sağlamaktadır. Bu bağlanma, DNA kırığının uçlarının doğru bir şekilde hizalanmasını ve bir araya getirilmesini kolaylaştırır. Ku proteinleri, DNA'nın kırık bölgelerinde oluşan boşlukları doldurmak ve hasarın onarılmasını sağlamak için DNA ligaz gibi diğer onarım proteinleriyle etkileşime girmektedir. Ancak, bu mekanizmanın hataya eğilimli olması, doğru dizilimde olmayan veya uyumsuz DNA parçalarının birleştirilmesine yol açabilir. Bu durum, genomda mutasyonların birikmesine ve dolayısıyla hücresel işlevlerin bozulmasına sebep olabilir. Bu nedenle, çift zincir kırıkları onarımındaki bu mekanizmanın dikkatli bir şekilde düzenlenmesi ve yönetilmesi, hücre sağlığı ve genom bütünlüğü açısından büyük önem taşımaktadır (Ba ve Boldogh, 2018).

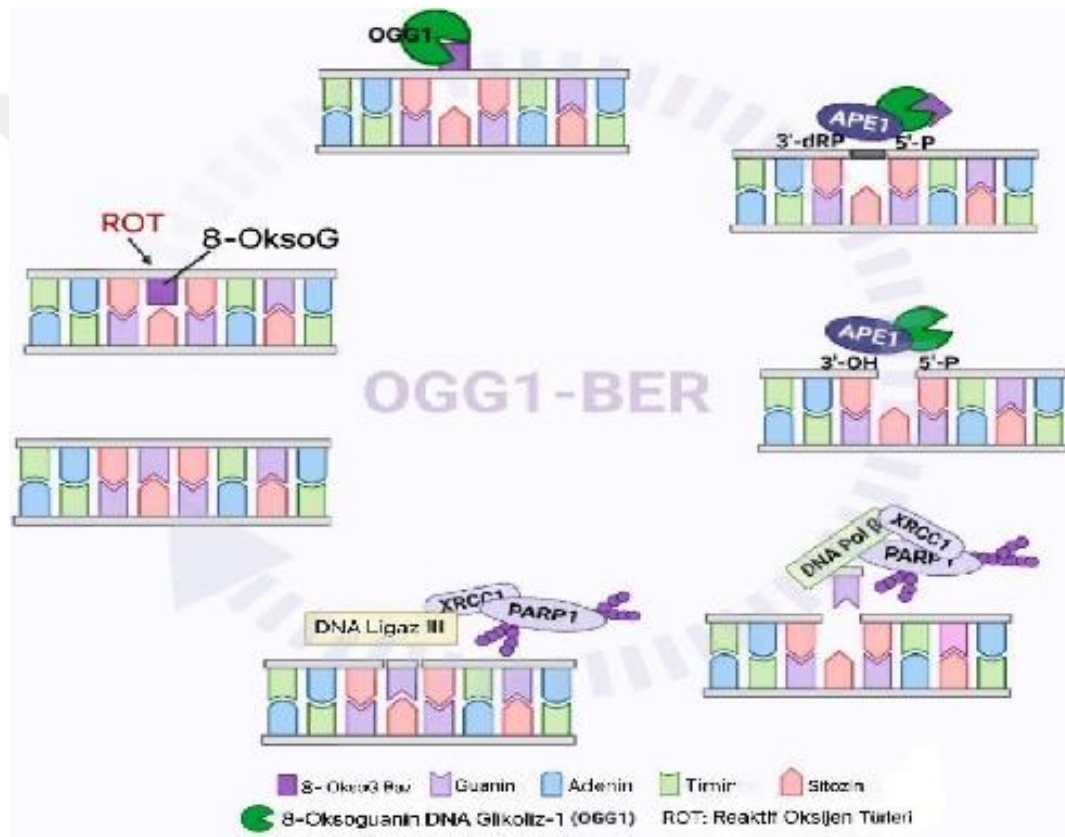


Şekil 1.7. Nonhomolog Uç birleşmesi ile Tamir

Oksidatif stres, hücresel süreçlerin kaçınılmaz bir sonucu olarak genomik DNA'da önemli hasarlara neden olmaktadır. Bu hasarlar, yalnızca endojen fizyolojik süreçlerden kaynaklanmakla kalmayıp, aynı zamanda çevresel maruziyetlere verilen hücresel tepkilerin de etkisiyle artış göstermektedir. ROS olarak adlandırılan reaktif oksijen türleri, DNA'da meydana gelen hasarların başlıca nedenleri arasında yer almaktadır. Özellikle, ROS'ların DNA üzerindeki en yaygın etkilerinden biri, guanin bazının pre-mutajenik bir form olan 8-okso-7,8-dihidroguanine (8-oksoG) oksidasyonudur (Ba ve Boldogh, 2018).

Araştırmalar, hücre başına günlük yaklaşık 100.000 kadar 8-oksoG lezyonunun oluşabileceğini göstermektedir. Bu nedenle, oksidatif stresin bir biyolojik belirteci olarak kabul edilmesi kaçınılmazdır. Ayrıca, yapılan birçok çalışma, idrarda tespit edilen 8-hidroksi-deoksiguanosin (8-OHdG) düzeyinin kanser, Parkinson hastalığı, sistemik lupus eritematosus ve romatoid artrit gibi çeşitli hastalıklarda mevcut DNA hasarının iyi bir biyobelirteci olduğunu ortaya koymuştur. Bu bağlamda, 8-oksoguanin glikozilaz (OGG1), 8-oksoG DNA lezyonlarının tanınması ve uzaklaştırılmasında görev alan bir enzimdir. Bu enzim, baz eksizyon tamiri (BER) mekanizmasının önemli bir parçası olarak işlev görmektedir. İnsan hücrelerinde OGG1 geni, kromozom 3p25 üzerinde lokalize olmuştur.

OGG1 enzimi, esas olarak sitoplazmada bulunmasına rağmen, DNA onarımını gerçekleştirmek ve hücrel hasar anında hücrel homeostaziye düzenlemek amacıyla çekirdeğe ve mitokondriye girebilmektedir. OGG1, insan dokularında geniş bir ifade profiline sahip olup, oksidatif stresle ilişkili hasarların onarılmasında kritik bir rol oynamaktadır. Bu nedenle, OGG1'in işlevselliği, hücrelerin oksidatif strese karşı dayanıklılığını artırmak ve DNA'nın bütünlüğünü sağlamak açısından son derece önemlidir. OGG1 enziminin, DNA hasarının etkilerini azaltmada ve hücrel fonksiyonların korunmasında oynadığı rol, biyomedikal araştırmaların önemli bir konusu olmaya devam etmektedir (Li vd., 2021).



Şekil 1.8. OGG1 tarafından başlatılan DNA baz eksizyon onarım yolu (Li vd., 2021).

BER tamir sürecinde, OGG1, 8-oksoG'yi tanıır ve 8-oksoG'nin N-glikosidik bağını keserek bir apurinik/apirimidinik (AP)-bölge(ler) oluşturur. Apurinik/apirimidinik endonükleaz 1 (APE1), şeker ve fosfat omurgasını keserek bir gap (boşluk) oluşturur. Bu gap, PARP-1, XRCC1 ve DNA polimeraz β ile doldurulur. En son DNA ligaz III işlemi tamamlar (Arkenberg ve Dittmar, 2004).

1.5. DNA Hasar Tamir Mekanizmaları

1.5.1. DNA Baz Hasarı Tamiri

Hasarın tersine çevrilmesi: İnsanlarda ve diğer memelilerde, DNA'daki O- ve N-alkillenmiş baz yapılarını onaran iki farklı enzim önemli bir rol oynamaktadır. O-alkillenmiş baz yapısını geri döndüren enzim O6-alkilguanin-DNA alkiltransferazdır; bu enzim, genetik bilgiyi taşıyan DNA'nın bütünlüğünü korumak için kritik bir öneme sahiptir. Diğer yandan, N-alkillenmiş baz eklentilerini tersine çeviren enzim ise AlkB-ilişkili a-ketoglutarate-bağlı dioksigenaz (AlkB) olarak tanımlanmaktadır. Bu enzimler, DNA üzerindeki hasarı onarmak için oldukça etkili bir mekanizmaya sahiptir. Hasarın geri dönüşümü, bazdaki alkil grubunun, enzimin katalitik cebinde bulunan sistein kalıntısına transfer edilmesi yoluyla gerçekleşir. Bu işlem, hasarın yok edilmesini sağlarken, DNA'nın yapısal bütünlüğünün korunmasına da katkıda bulunmaktadır (Chatterjee ve Walker, 2017).

Baz ekzisyon tamiri (BER): Baz ekzisyon tamiri, çok yönlü bir tamir sistemi olarak, DNA'nın bütünlüğünü koruma konusunda hayati bir işlev üstlenmektedir. Bu yolak, oksidatif baz hasarı, deaminasyon, alkilasyon ve abazik tek baz hasarını etkili bir şekilde tamir etmektedir (Chatterjee ve Walker, 2017; Slupphaug vd., 2003). DNA'nın çift sarmal yapısında meydana gelen küçük kimyasal değişiklikler, BER mekanizmasında substrat olarak kullanılmakta ve bu süreçte birçok enzim tarafından yönetilmektedir. Bu nedenle, BER, DNA onarımında önemli bir rol oynamaktadır.

BER mekanizmasının işleyişi, hücre döngüsünün G1 fazında aktif hale gelmektedir. Hasar tespit edildikten sonra, kromatin yeniden modellenmesi gerçekleşir ve ardından, en az 11 farklı hasarlı baza özgü DNA glikozilaz enzimleri hasarlı alanı tanımak üzere harekete geçmektedir. Bu DNA glikozilaz enzimleri, baz ekzisyon yolunda görev alan özel enzimlerdir ve iki temel tipte sınıflandırılabilirler. Tek fonksiyonlu enzimler, yalnızca glikozilaz aktivitesine sahipken, çift fonksiyonlu enzimler, hem glikozilaz hem de P-liyaz aktivitesi göstermektedir (Chatterjee ve Walker, 2017). Örneğin, urasil DNA-glikozilaz gibi tek fonksiyonlu enzimler, hasarlı bazları ortadan kaldırarak abazik bölgeler oluştururken; bifonksiyonel enzimler ise liyaz aktivitesi ile DNA'nın 3' ucundaki abazik bölgeyi temizlemektedir. Oksidatif stres sonucunda oluşan hasarlı bazların onarımında bu bifonksiyonel DNA glikozilaz enzimleri kritik bir rol üstlenmektedir (Slupphaug vd., 2003).

BER mekanizmasında kısa ve uzun tamir yolları arasında belirgin farklılıklar vardır. Kısa tamir yolunda, yalnızca tek fonksiyonlu enzimler görev alırken, uzun tamir yolunda çift

fonksiyonlu glikozilaz enzimleri işlev görmektedir (Chatterjee ve Walker, 2017). Kısa tamir yolu, genellikle tek nükleotid boşluklarının onarımında kullanılırken, uzun tamir yolu, iki ila sekiz nükleotit arasındaki boşlukları gidermektedir. Her iki yolak da tek zincir boşluğunun oluşturulması, DNA sentezi ile oluşan boşluğun doldurulması ve iki DNA zincirinin fosfat ester bağı ile birleştirilmesi aşamalarını içermektedir (Slupphaug vd., 2003). Bu süreç, hücrenin genetik bilgiyi doğru bir şekilde aktarmasını ve biyolojik işlevlerini sürdürebilmesini sağlamaktadır. DNA hasarlarının onarımı, genetik bütünlüğü korumak ve hücresel işlevlerin devamlılığını sağlamak için hayati öneme sahiptir. BER mekanizması, DNA'nın bütünlüğünü tehdit eden çeşitli hasar türlerini etkili bir şekilde düzeltmekte ve organizmanın sağlığını koruma işlevini yerine getirmektedir.

1.5.2. Çoklu ve Hacimli Baz Hasarının Tamiri

Nükleotit ekzisyon tamiri (NER): Nükleotit ekzisyon tamiri, DNA'da meydana gelen UV ışınları, kimyasal eklentiler, alkilleyici ve oksidasyon ajanları gibi etmenlerin neden olduğu baz hasarlarını ortadan kaldırmak için görev yapan karmaşık bir mekanizmadır (De Boer ve Hoeijmakers, 2000). Özellikle NER mekanizması, kemoterapötik ajanların, polisiklik aromatik hidrokarbonların ve diğer hacimsel kimyasal eklentilerin neden olduğu DNA'daki kimyasal değişikliklere ve heliks yapısının bozulmasına karşı etkili bir savunma mekanizması sunmaktadır.

NER mekanizmasının anlaşılması açısından *Escherichia coli* bakterileri üzerinde gerçekleştirilen araştırmalar büyük önem taşımaktadır. Memeli sisteminde NER mekanizması, prokaryotik canlılardakine kıyasla daha karmaşık bir yapıya sahip olsa da, temel mekanizmanın evrimsel olarak prokaryotik canlılardan daha gelişmiş canlılara taşındığı gözlemlenmiştir. Bu mekanizma, öncelikle hasarın tanımlanması, hasar çevresinde DNA heliks yapısının bölgesel olarak açılması, hasarlı iplikteki lezyonun kaldırılması ve iplik uzaması aşamalarını içerir (De Boer ve Hoeijmakers, 2000). Ayrıca, NER mekanizmasında meydana gelen mutasyonlara sahip bireylerde, Xeroderma pigmentosum (XP), Cockayne sendromu gibi çeşitli genetik hastalıklara yatkınlık gözlemlenmektedir (Chatterjee ve Walker, 2017).

Yanlış eşleşme tamiri (MMR): Yanlış eşleşme tamiri, DNA'da replikasyon hataları sonucunda meydana gelen yanlış baz eşleşmelerini düzeltmeye yönelik bir mekanizmadır. Bu hatalar, dinükleotit tekrarlarını oluşturmakta ve çeşitli hücresel süreçlerde, örneğin mayotik ve mitotik rekombinasyon, DNA hasar sinyali, apoptozis, somatik hipermutasyon ve üçlü tekrar uzaması gibi olaylarda önemli bir rol oynamaktadır (Chatterjee ve Walker, 2017).

Yanlış eşleşme tamiri, aynı zamanda oksidatif hasar sonucu oluşan 8-oksoguanin gibi lezyonların tamirinde de görev almaktadır (Slupphaug vd., 2003).

MMR mekanizmasında rol oynayan tamir genlerinin, hipoksi, inflamasyon gibi çevresel stres faktörlerinin etkilerini baskılamada önemli bir işlevselliğe sahip olduğu gösterilmiştir. Özellikle üreme hücrelerinde gerçekleşen MMR mutasyonları, bireylerin kolon ve over kanserine olan yatkınlığını artırma potansiyeline sahiptir.

İplikler arası çapraz bağlanma tamiri (ICL): DNA'da çapraz bağlanmaya neden olan ajanlar, iki tamamlayıcı ipliğin bazlarının kovalent olarak bağlanmasına yol açar ve bu duruma "iplikler arası çapraz bağlanma" adı verilmektedir. İplikler arası çapraz bağlanmaya yol açan ajanlar arasında platin bileşikleri, nitrojen hardal gazı ve alkilleyici ajanlar örnek verilebilir. Bu tür hasarları tanımlayan ve onaran mekanizmalar, Fanconi anemisi (FA) olarak bilinen proteinler tarafından gerçekleştirilir (Chatterjee ve Walker, 2017). ICL tamiri, DNA'nın bütünlüğünü koruma açısından son derece kritik bir süreçtir ve bu mekanizmada meydana gelen bozulmalar, çeşitli kanser türlerine ve genetik hastalıklara yol açabilmektedir.

1.5.3. DNA Zincir Kırıklarının Tamiri

Tek zincir kırık tamiri (SSBR): Tek zincir kırıkları, genellikle DNA'nın oksidatif hasarı, abazik bölgeler (baz eksiklikleri) ve DNA topoizomerez-1 enziminin yanlış aktivitesi sonucu ortaya çıkmaktadır. Bu tür kırıkların tamir edilmemesi durumunda, DNA replikasyonunun bozulması, transkripsiyonun durması ve hücrel NAD⁺, ATP ve apoptoz indükleyici faktörlerin hücreden salınması gibi olaylar meydana gelmektedir. Özellikle, bu süreç PARP1 (Poli(ADP-riboz) polimeraz 1) aktivasyonu ile ilişkilidir. PARP1, DNA hasarını tanıyan ve onarma mekanizmalarını başlatan bir enzimdir. Tek zincir kırıklarının tamirinde, uzun yolak ve kısa yolak olmak üzere iki farklı mekanizma bulunmaktadır (Chatterjee ve Walker, 2017). Uzun yolakta, hasarlı DNA ipliğinin tamiri için DNA polimeraz ve DNA ligaz gibi enzimler görev alırken; kısa yolakta, hızlı bir şekilde onarım sağlamak için daha basit ve hızlı bir mekanizma kullanılmaktadır.

Çift zincir kırık tamiri (DSBR): Çift zincir kırıkları, hücrelerin yaşamsal fonksiyonlarını etkileyen ve DNA hasar türleri arasında en tehlikeli olanlardandır. Bu hasarlar, iyonize radyasyon, radyomimetik kimyasallara maruziyet, reaktif oksijen türlerinin oluşumu, kromozomlar üzerindeki mekanik stres ve replikasyon çatallının DNA lezyonlarına müdahalesi gibi nedenlerle ortaya çıkabilmektedir (Slupphaug vd., 2003). Çift zincir

kırıkları, hücre için son derece toksik bir durumdur; bu hasar tamir edilmediği takdirde hücrenin ölümüne neden olabilmektedir.

DNA'daki çift zincir kırıklarının tamirinde birçok mekanizma görev almaktadır. Hasarın belirlenmesine yardımcı sinyal oluşumuyla başlayan süreçte, homolog rekombinasyon (HR) ve homolog olmayan uç birleşmesi (NHEJ) olmak üzere iki farklı tamir mekanizması devreye girmektedir. Her iki mekanizma, hücre döngüsünün durması, apoptoz ve hücrenin gerekli adaptif yanıtlarını üretebilmesi için önemlidir (Chatterjee ve Walker, 2017).

Homolog rekombinasyon (HR), çift zincir kırıklarının tamirinde oldukça etkili bir yoldur ve özellikle S fazından sonra etkin hale gelir. Bu mekanizmada, DNA ucuna bağlanan proteinler (örneğin, Rad52) ve sağlam iplikten bilgi alarak onarıma katkıda bulunan Rad51 proteini rol oynamaktadır. Homolog rekombinasyon süreci, DNA polimeraz enzimi ile zincir uzama işlemi gerçekleştirilerek devam eder. Zincir uçlarının bağlanmasında ise DNA ligaz I enzimi görev yapmaktadır. Homolog olmayan uç birleşmesi (NHEJ), G1 fazında baskın olan başka bir tamir mekanizmasıdır. NHEJ'de, Ku proteinleri (Ku70 ve Ku80) DNA'nın serbest uçlarına bağlanır ve ardından Xrcc4 proteini ile birlikte tamir sürecinde yer alır. NHEJ mekanizmasında, tamirin ligasyon öncesi basamağında helikaz ve ekzonükleaz aktivitesi içeren Rad50-Mre11-Nbs1 kompleksi rol oynamaktadır. Homolog rekombinasyon ve NHEJ mekanizmaları, hasarın belirlenmesi ve tamirinde görevli tamir faktörlerinin devreye sokulmasında ortak bir kinaz yapılı ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) proteinine ihtiyaç duyar. Her iki mekanizma da hücre döngüsünün farklı aşamalarında baskın olmaktadır; HR tamir mekanizması, S fazından sonra etkinlik gösterirken, NHEJ yolağı G1 fazında daha aktiftir (Slupphaug vd., 2003).

Başlangıçta yapılan araştırmalar, ökaryotik hücrelerde çift zincir kırıklarının tamirinde baskın olan yolak olarak NHEJ'yi belirtse de, günümüzdeki çalışmalar bu hücre türleri için homolog rekombinasyon yolunun da hayati öneme sahip olduğunu göstermektedir (Khanna ve Jackson, 2001). Bu mekanizmalarda yaşanan herhangi bir defekt sonucunda, ataksi telanjiektazi (AT) veya BRCA2 genindeki mutasyonların yol açtığı meme kanseri gibi durumlar ortaya çıkabilmektedir (Slupphaug vd., 2003).

1.6. Genotoksisite Testleri

Genotoksisite, hücrelerin genetik materyali olan DNA ve RNA'nın yapısını ve bütünlüğünü bozan maddelerin hücreler üzerindeki zararlı etkilerini ifade etmektedir. Bu tür

zararlı maddeler, genellikle kimyasal ya da fiziksel etkenler olup, DNA veya kromozomların yapısını doğrudan etkileyerek, hücre işlevlerinde ciddi bozulmalara yol açabilmektedir (Saks vd., 2017). Genotoksik maddeler, hücre içinde yer alan aminoasitlerle etkileşime girerek DNA üzerinde farklı etkiler göstermektedir. Bu etkiler, tek ve çift zincir kırılmaları, kromozom aberasyonları, nokta mutasyonları, delesyonlar ve mikronükleus oluşumları gibi genetik hasarların çeşitli biçimlerinde kendini gösterebilir (Phillips ve Arlt, 2009). Bu tip hasarlar, DNA onarım mekanizmalarını zayıflatarak hücre içi iletişimi bozar ve bu durum, hücresel işlevlerin aksamasına ve hastalıklara yol açmaktadır (Dusinska vd., 2012).

Genotoksositeye yol açan maddeler iki ana kategoride sınıflandırılabilir: klastojenik ve anojenik ajanlar. Klastojenik ajanlar, DNA'da yapısal hasar oluşturarak kanser gibi ciddi hastalıkların temel nedenlerinden biri olabilirken; anojenik ajanlar, hücre bölünmesi sırasında kromozom sayısını etkileyerek anöploidiye neden olurlar, bu da hücrelerin kromozom sayısındaki anormallikleri ifade etmektedir (Stopper ve Müller, 1997). DNA hasarı hem hücre içindeki (endojen) faktörler hem de çevresel (eksojen) etkenlerle oluşabilmektedir. Endojen faktörlere hücre içi reaktif oksijen türleri ve aminoasit metabolizması gibi biyokimyasal süreçler dahilken, eksojen faktörlere ise çevresel kirleticiler, radyasyon, toksik kimyasallar ve mesleki maruziyetler örnek verilebilir (Hartwig vd., 2020). Hücre içindeki onarım mekanizmalarının bozulması sonucunda DNA'da meydana gelen hasarlar, hücre döngüsünde aksaklıklara neden olur ve bu durum apoptoz, otofaji ve yaşlanma gibi süreçlerin tetiklenmesine yol açmaktadır (Roos vd., 2015).

Genotoksinlerin oluşturduğu DNA hasarları, özellikle somatik ve üreme hücrelerinde genetik materyalin kalıcı bozulmasına neden olabilir ve bu da nesiller boyu aktarılabilecek kalıtsal hastalıklara yol açabilmektedir. Özellikle DNA veya mitokondri üzerinde meydana gelen bu tür hasarlar, nörodejeneratif hastalıklar, kardiyovasküler rahatsızlıklar, üreme sistemi bozuklukları, erken yaşlanma ve metabolik hastalıklar gibi geniş bir yelpazede sağlık sorunlarına yol açabilmektedir (Turkez vd., 2017). Ayrıca, ısı kaynaklı gıda toksinlerine, ağır metallere ve çevresel kirleticilere kronik maruziyet ya da sigara kullanımı gibi zararlı alışkanlıklar da DNA'da oluşan hasar seviyelerini önemli ölçüde artırmaktadır. Bu nedenle, çevresel ve insan sağlığını koruma açısından, kimyasal ajanların in vitro ve in vivo modeller kullanılarak değerlendirilmesi, maruziyetin etkilerinin incelenmesi ve genotoksik maddelerin kinetik profillerinin belirlenmesi büyük önem taşımaktadır (Elmassry vd., 2020).

Hücre kültürlerinde genotoksositeyi ölçmek amacıyla kullanılan başlıca testler arasında Ames testi, mikronükleus testi, komet testi, kromozom aberasyonu testi ve kardeş kromatit

değişimi testi yer almaktadır. Bu testler, DNA, gen ve kromozom hasarını tespit edebilmek için geliştirilmiş hassas yöntemlerdir (Saks vd., 2017). Özellikle mikronükleus testi, hücrelerin sitoplazmasında, DNA parçacıklarını içeren mikronükleusların oluşumunu tespit etmek için kullanılan etkili bir mutajenite testidir. Bu yöntem, özellikle klastojenik ve anojenik maddelerin etkilerini belirlemek için kullanılır ve hücrelerdeki DNA hasarını değerlendirmede önemli bir rol oynamaktadır (Sioen vd., 2020). Mikronükleus testi, çevresel yönetim ve biyogüvenlik düzenlemelerinde yaygın olarak kullanılan uluslararası kabul görmüş testler arasında yer alır ve 1985 yılında Fenech ve Morley tarafından geliştirilmiştir (Fenech ve Morley, 1985). Kimyasal maddelerin değerlendirilmesinde oldukça hassas bir test olan mikronükleus testi, hücre sitoplazmasında yuvarlak kromatin yapıları olan mikronükleusların varlığını tespit etmektedir. Bu yapıların oluşumu, DNA zincirlerinde veya tamir mekanizmalarında meydana gelen bozulmalara, kromozom ayrılma hatalarına ve hücrel süreçlerdeki aksamalara bağlı olarak gelişebilmektedir (Sommer vd., 2020).

Mikronükleuslar, hücre bölünmesi sırasında DNA zincirlerinde oluşan kopmalar, kromozomlardaki yanlış ayrışmalar veya sentromerlerdeki hasarlar sonucu oluşan asentrik kromozom parçalarından meydana gelmektedir (Palanikumar ve Panneerselvam, 2011; Sommer vd., 2020). Hücre bölünmesinin ilerleyen aşamalarında bu ekstrakromozomal yapılar nükleer zarın dışına göç eder ve mikronükleuslar sitoplazma içinde izole edilmiş bir şekilde gözlemlenebilir hale gelmektedir (Kisurina-Evgenieva vd., 2016). Sitokinezi durdurulmuş mikronükleus testinde, sitokinez evresi sitokalazin B ile durdurularak hücrelerin bir kez bölünmesi sağlamaktadır. Bu süreçte, hücrelerde mikronükleus oluşumu, binükleat hücreler ve nükleoplazmik köprüler gibi DNA hasarı belirtileri değerlendirilmektedir (Fenech, 2007). Bu yöntem, kromozomlardaki kayıpları, DNA kırıklarını ve DNA tamir mekanizmalarındaki bozulmaları incelemek için oldukça etkilidir. Nükleoplazmik köprüler ve nüklear tomurcuklar, hücre bölünmesi sırasında oluşan replikatif stresin bir sonucu olarak ortaya çıkar ve genomik kararsızlıkların belirteci olarak kabul edilmektedir (Fenech ve Crott, 2002). Anafaz evresinde meydana gelen kromozom çekilmesi sırasında oluşan nükleoplazmik köprüler, test edilen kimyasalın genotoksitesini doğrulamada önemli bir role sahiptir (Fenech, 2007). Bu nedenle, sitokinezi durdurulmuş mikronükleus testi, genotoksinlerin hücre düzeyinde yarattığı hasarların tespiti için oldukça hassas ve güvenilir bir yöntemdir.

1.6.1. Komet Testi

Komet testi, DNA’da meydana gelen yapısal bozuklukların ve klastojenlerin neden olduğu DNA hasarının tespiti için kullanılan önemli bir genotoksisite testidir. Hücresel düzeyde yapılan bu test, özellikle kimyasal ajanların DNA üzerindeki etkilerini analiz ederken hücrelerde oluşan kararsız bölgelerin, genomik mutasyonların ve DNA zincirinde meydana gelen kırılmaların hassas bir şekilde değerlendirilmesini sağlamaktadır. Bu yöntemin önemi, kimyasalların genetik materyal üzerindeki etkilerinin belirlenmesi ve hücrelerin kimyasal maddelerle etkileşimi sonucu oluşan genotoksik hasarın izlenmesidir (Langie vd., 2015). Komet testi, genotoksisite araştırmalarında hücresel genetik materyalin kararlılığının ölçülmesi için yaygın olarak kullanılan, güvenilir bir yöntemdir. Özellikle ökaryotik organizmalar üzerinde yapılan araştırmalarda, testin sonuçları oldukça güvenilir olup, hücresel DNA hasarının incelenmesinde kritik bir rol oynamaktadır (Ostling ve Johanson, 1984).

Bu testin temel çalışma prensibi, test edilen kimyasal maddenin DNA üzerindeki çapraz bağları uyarması ve ardından bu bağların bozulması ile DNA’nın elektroforez sırasında agaroz jel içerisinde göç edebilme yeteneğinin azalmasıdır. DNA’daki bu değişiklikler, “kuyruklu yıldız” olarak adlandırılan bir görsel forma neden olur ve bu görüntüden dolayı teste “komet testi” adı verilmiştir (Speit ve Hartmann, 2012). DNA üzerinde kimyasal ajanlar tarafından meydana getirilen hasarın ardından, hasarlı DNA parçaları elektroforez sırasında hücre çekirdeğinden ayrılarak kuyruk şeklinde bir iz bırakır. Bu kuyruğun uzunluğu ve biçimi, DNA üzerindeki hasarın büyüklüğü hakkında bilgi verir ve bu nedenle komet testi, DNA hasarının görsel ve ölçülebilir bir göstergesini sunmaktadır.

Komet testi, sadece DNA üzerindeki hasarı tespit etmekle kalmaz, aynı zamanda DNA onarımını da izlemeye olanak tanır. Kimyasal ajanların DNA’ya verdiği hasar sonrasında, bu ajanların ortamdaki uzaklaştırılması ya da onarıcı bir tedavi uygulanması durumunda, DNA’nın tekrar eski haline gelmesi ve normal hücresel işlevine dönmesi mümkündür. Bu durumda, DNA üzerindeki hasarın azaldığı ya da tamamen onarıldığı gözlemlenir. Dolayısıyla, komet testi genotoksik maddelerin etkilerinin incelenmesi ve bu etkilerin geri döndürülebilirliğinin değerlendirilmesi açısından oldukça değerli bir testtir (Speit ve Hartmann, 2012; Azqueta vd., 2019).

Test edilen kimyasal maddenin hücrelerin DNA’sına verdiği hasar, alkali bir ortamda (pH>13) çözülen DNA çift sarmalının elektroforez sırasında jel ortamında göç etmesiyle ölçülmektedir. Hücrelerdeki DNA hasarının derecesi, elektroforez sonucunda DNA’nın jelde

ne kadar hareket ettiğine bağlı olarak belirlenmektedir. DNA'daki çapraz bağların kopması ve tek ya da çift sarmallı kırıkların oluşması, DNA'nın daha fazla göç etmesine neden olur ve bu göç, "kuyruk" olarak adlandırılan görsel bir etkiyle sonuçlanır (Speit ve Hartmann, 2022). Elektroforez işleminin ardından hücreler, floresan boyalarla boyanır ve DNA hasarının daha net bir şekilde görüntülenmesi sağlanmaktadır. Boya, aynı zamanda hücresel RNA'nın parçalanmasını sağlayarak testin doğruluğunu artırır ve elde edilen sonuçların güvenilirliğini pekiştirir (Singh vd., 1988).

Komet testi sırasında gözlemlenen hücreler, DNA üzerindeki hasarın derecesine bağlı olarak kuyruklu yıldız benzeri yapılar şeklinde görünmektedir. Bu kuyruğun uzunluğu ve yoğunluğu, hücredeki DNA hasarının büyüklüğünü yansıtır. Hasarın derecesine göre hücrelerin kuyruk uzunluğu artabilir veya azalabilir. Komet testinde DNA hasarını değerlendirmek için kullanılan belirli kriterler bulunmaktadır. Bu kriterler arasında, kuyruk uzunluğu, kuyruktaki DNA miktarı, hücre başının çapı ve kuyruk momenti yer almaktadır (Tice, 2015; Langie vd., 2015). Özellikle kuyruk uzunluğu, DNA hasarının derecesi ile doğrudan orantılı olup, DNA üzerindeki hasar arttıkça kuyruk da daha uzun hale gelmektedir. Kuyrukta biriken DNA miktarı, hasarın boyutunu anlamada kritik bir gösterge olarak kabul edilmektedir.

Komet testi, bireysel hücrelerin incelenmesine olanak tanıyan nicel bir yöntemdir. Bu test, DNA zincirinde meydana gelen kırıkların, DNA onarım süreçlerinin ve hücresel düzeyde meydana gelen hasarların detaylı bir şekilde anlaşılmasına yardımcı olmaktadır. Hücre başına düşen DNA göç miktarının değerlendirilmesiyle, her bir hücrenin maruz kaldığı genotoksik stres derecesi ölçülebilir ve bu sayede DNA onarım mekanizmalarının nasıl işlediği hakkında bilgi edinilebilir. Ayrıca, DNA'nın kimyasal ajanlar tarafından ne ölçüde hasar gördüğü ve bu hasarın geri dönüp dönmediği izlenebilir. Bu test, çevresel kirleticiler, kimyasallar, radyasyon gibi dış etkenlerin hücreler üzerindeki genotoksik etkilerini incelemek amacıyla sıklıkla kullanılır. Genotoksisite çalışmalarında DNA hasarının tespiti ve onarım süreçlerinin izlenmesi açısından büyük önem taşıyan komet testi, özellikle kimyasal ajanların genetik materyal üzerindeki etkilerini değerlendirmek için yaygın olarak tercih edilen bir yöntemdir. Testin doğruluğu ve hassasiyeti sayesinde, hücresel düzeydeki DNA hasarı ve onarım mekanizmaları detaylı bir şekilde araştırılabilir, bu da testin genotoksisite araştırmalarında kritik bir yere sahip olmasını sağlamaktadır (Collins, 2004).

1.7. Saklama Koşulları

Komet testi, DNA hasarını tespit etmek için kullanılan önemli bir yöntem olup, çeşitli saklama koşullarının bu hasar üzerindeki etkilerini inceleyen sınırlı sayıda çalışmaya sahiptir. Ancak, bu alandaki bazı öncü araştırmalar, özellikle belirli saklama koşullarının DNA yapısına olan etkilerini kapsamlı bir şekilde değerlendirmiştir.

Anderson vd. (1997), bu alandaki ilk kapsamlı çalışmalardan birini gerçekleştirmiştir. Bu çalışmada, tam kan örneklerinin üç farklı sıcaklıkta (oda sıcaklığı, +4°C ve -196°C) saklanması ve ardından komet testi ile DNA hasarının değerlendirilmesi hedeflenmiştir. Çalışmada elde edilen bulgular, -196°C'de, yani sıvı azot sıcaklığında yapılan saklamanın DNA üzerinde ciddi hasara yol açtığını ve bu ortamın komet testi için uygun olmadığını göstermiştir. Buna karşın, +4°C ve oda sıcaklığında yapılan saklamalar, DNA hasarını önemli ölçüde artırmadan 4 güne kadar saklama süresini tolere edebilmiştir. Bu bulgu, özellikle DNA hasarını minimumda tutmak için saklama koşullarının doğru seçilmesinin önemini vurgulamaktadır. Bu çalışmanın sonucunda, düşük sıcaklıkların ve uygun saklama koşullarının DNA bütünlüğünü korumada kritik bir rol oynadığı sonucuna varılmıştır (Anderson vd., 1997).

Bundan sonra, Al-Salmani vd. (2011) tarafından yapılan bir diğer çalışmada, tam kan hücrelerinin -80°C'de bir aya kadar saklanarak komet testi ile incelenmesi yapılmıştır. Bu çalışmada, koruyucu çözeltiler kullanılmadan yapılan saklamada, DNA hasarında herhangi bir değişiklik gözlemlenmemiştir. Al-Salmani ve ekibinin bulguları, kan örneklerinin küçük hacimlerde (~250 µL) vialler içerisinde saklanmasının DNA hasarını önlemede önemli bir faktör olduğunu ortaya koymuştur. Özellikle, küçük hacimde yapılan saklamanın DNA üzerindeki etkisini minimumda tutma açısından önemli olduğu belirtilmiştir. Bu çalışma, komet testi için örneklerin güvenli bir şekilde saklanabileceğini ve bu saklama yöntemlerinin güvenilir sonuçlar verdiğini göstermektedir. Ayrıca, küçük hacimlerin saklama sırasında DNA hasarını daha iyi koruyarak komet testi için uygun örnekler sağladığı anlaşılmıştır (Al-Salmani vd., 2011).

Akor-Dewu vd. (2014) tarafından yapılan bir diğer araştırma ise, tam kan örneklerinden mononükleer hücrelerin (PBMC) izole edilip -80°C'de saklanmasının, komet testi sonuçları üzerindeki etkisini incelemiştir. Bu çalışmada, dondurulmuş PBMC'lerde herhangi bir ekstra DNA hasarının oluşmadığı ve hücrelerin oksidatif stres gibi çevresel etkenlere duyarlılığında bir değişiklik olmadığı gözlemlenmiştir. Özellikle, bu çalışma, PBMC'lerin düşük sıcaklıklarda saklanmasının komet testi açısından güvenilir sonuçlar

verdiğini ve saklama işleminin DNA hasarını artırmadığını göstermiştir. Akor-Dewu ve ekibi, PBMC'lerin dondurulmuş koşullarda saklanması, hücrelerdeki DNA bütünlüğünü koruduğunu ve bu tür örneklerin güvenle kullanılabileceğini vurgulamıştır. Bu çalışma, farklı hücre türlerinin saklama koşullarındaki farklılıkları ve DNA hasarını koruma kapasitesini anlamada önemli bir katkı sağlamıştır (Akor-Dewu vd., 2014).

Özsait, Özcan, Köksal ve Ünaltuna (2014) tarafından yapılan çalışmada, kriyoprezervasyonun sperm hücrelerinde neden olduğu hasarlar ve DNA hasarının tespitinde kullanılan yöntemler incelenmiştir. Kriyoprezervasyon, özellikle sperm hücrelerinin düşük sıcaklıklarda canlılık ve işlevselliklerini kaybetmeden saklanabilmesini sağlayan bir tekniktir. Bu yöntem, infertilite tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır ve sperm hücrelerinin saklanması konusunda kritik bir öneme sahiptir. Kriyoprezervasyonun temel amacı, bireylerin fertilitayı kaybetme riskine girmemesi için sperm hücrelerini korumaktır. Özellikle kanser tedavisi gibi cerrahi müdahaleler, radyoterapi/kemoterapi gibi tedaviler öncesinde ya da testis hasarına yol açabilecek hastalıklar (örneğin diyabet gibi) gibi durumlarda fertilitenin korunması amacıyla sperm kriyoprezervasyonu yapılmaktadır. Ayrıca, azospermik hastalarda testis biyopsisi ya da epididimal aspirasyonla elde edilen spermlerin saklanması da önemli bir rol oynamaktadır. Ancak kriyoprezervasyon, sperm hücrelerinde bazı yapısal ve fonksiyonel zararlara yol açabilir. Bu zararlardan bazıları arasında motilite kaybı, morfolojik değişiklikler, membran bütünlüğü kaybı, DNA fragmentasyonu ve mitokondri fonksiyon kaybı bulunmaktadır. Bu hasarlar, dondurulmuş sperm hücrelerinin fertilizasyon yeteneklerini olumsuz yönde etkileyebilir ve tüp bebek (IVF) tedavisi gibi yardımcı üreme tekniklerinde istenilen sonuçların alınamamasına yol açabilir. Özellikle sperm DNA'sının bütünlüğü, yalnızca genetik materyalin doğru bir şekilde aktarılması için değil, aynı zamanda kaliteli embriyo gelişimi, fertilizasyon ve gebeliğin sağlanması açısından da kritik öneme sahiptir. Çeşitli çalışmalar, sperm DNA hasarının fertilizasyon potansiyelini, gebelik oranlarını ve canlı doğum oranlarını olumsuz etkileyebileceğini göstermektedir. Sperm DNA hasarının, yenidoğan anomalileri ve çocukluk çağı kanser riskini artırabileceği öne sürülmektedir. Bu nedenle, sperm DNA hasarının tespit edilmesi ve bu hasarın minimuma indirilmesi, klinik uygulamalar için büyük önem taşımaktadır. Çalışmanın bir diğer önemli bulgusu, sperm hücrelerinde DNA hasarının tespitinde kullanılan çeşitli yöntemlerin etkinliğidir. DNA hasarını değerlendirmek için kullanılan en yaygın yöntemlerden biri olan COMET (tek hücre jel elektroforezi) testi, dondurulmuş sperm hücrelerindeki DNA kırılmalarını tespit etmek için güvenilir ve etkili bir yöntem olarak kullanılmaktadır. Özsait ve arkadaşları, kriyoprezervasyon sürecinde sperm DNA'sının maruz kaldığı hasarın tespit edilmesinin, tedavi sonuçlarını iyileştirmek ve klinik

başarı oranlarını artırmak açısından büyük bir öneme sahip olduğunu vurgulamışlardır. Bu bağlamda, sperm DNA hasarının belirlenmesi, yalnızca fertilite tedavilerinin başarı oranlarını artırmakla kalmayıp, aynı zamanda çocukluk çağı kanserleri ve genetik hastalıkların erken teşhis edilmesine de yardımcı olabilir. Ayrıca, dondurulmuş sperm örneklerinin saklanması için kullanılan yöntemlerin geliştirilmesi, sperm hücrelerinin genetik bütünlüğünü korumak için kritik bir adım olarak öne çıkmaktadır (Özsait vd., 2014).

Yıldırım (2016) tarafından yapılan bir başka çalışmada, sperm hücrelerinin dondurulup çözülmesinin ardından ortaya çıkan düşük fertilizasyon oranlarının sebepleri araştırılmıştır. Çalışmada, İzmir DSİ Ürkmez Su Ürünleri Üretim Tesisinden alınan sazan balığı (*Cyprinus carpio*) sperması kullanılarak, çözünme sonrası DNA hasarı analiz edilmiştir. Çalışma, 2-3 yaş arasındaki 3 erkek sazan balığından alınan sperm örneklerinin dondurulup çözülmesinin ardından, sperm DNA hasarını tespit etmek için tek hücre jel elektroforezi (COMET) yöntemiyle analiz yapılmıştır. Sonuçlar, dondurulmuş sperm DNA'sının ortalama %31,8 oranında hasar gördüğünü göstermiştir. Bu bulgu, dondurulmuş sperm hücrelerinde DNA hasarının anlamlı bir şekilde arttığını ve bunun da fertilizasyon oranları üzerinde olumsuz bir etkisi olduğunu göstermektedir. Çalışmada ayrıca, üç farklı COMET tekniği uygulanarak, en uygun yöntemin optimize edilmesi hedeflenmiştir. Uygulanan tekniklerin her biri farklı sonuçlar vermiş ve bu sonuçlar istatistiksel analizle değerlendirilmiştir. Ancak, yapılan analizde gruplar arasındaki farklar anlamlı bulunmamıştır ($P < 0,05$). Bu durum, farklı tekniklerin sperm DNA hasarını tespit etme açısından benzer etkinliğe sahip olduğunu, ancak çözünme sonrası sperm DNA hasarının genel olarak yüksek olduğunu göstermektedir. Yıldırım'ın çalışması, dondurulmuş sperm hücrelerinin çözülmesi sonrasında DNA hasarının fertilizasyon oranları üzerindeki etkisini ortaya koymuş ve bu sorunun çözülmesi için daha etkili sperm koruma ve saklama yöntemlerinin geliştirilmesi gerektiğini vurgulamıştır (Yıldırım, 2016).

Yeni, Avdatek ve Gündoğan (2017) tarafından yapılan bir başka çalışmada ise, başarılı reproduktif sonuçlar elde edebilmek için kaliteli sperma kullanımının önemi ele alınmıştır. Sperm hücrelerinde DNA hasarı, yalnızca doğal metabolizma süreçleri sırasında değil, aynı zamanda sperma alımı, işlenmesi, değerlendirilmesi ve biyoteknolojik manipülasyonlar sırasında da meydana gelebilir. Bu tür DNA hasarı, fertilizasyon şansını ve embriyo gelişimini olumsuz yönde etkileyebilir. Sperma kalitesini belirlemek için kullanılan geleneksel yöntemlerin yanı sıra, teknoloji ilerledikçe yeni yöntemler de geliştirilmiş ve bu yöntemler daha kaliteli sperma seçiminde büyük rol oynamaktadır. Sperm DNA hasarının tespiti, özellikle in vitro fertilizasyon (IVF), intracytoplasmic sperm injection (ICSI) gibi

biyoteknolojik yöntemlerde ve bazı fertilité sorunlarının çözümünde önemli bir rol oynamaktadır. Bu çalışmada, spermatozoon DNA hasarını belirlemede kullanılan COMET analiz yöntemi üzerine yapılan son araştırmalar derlenmiştir. Spermatozoon DNA hasarının belirlenmesi, fertilizasyon şansını tahmin etmek ve embriyonun maruz kalabileceği riskleri belirlemek için giderek daha önemli hale gelmektedir. Özellikle IVF ve ICSI gibi yardımcı üreme tekniklerinde sperm hücrelerinde herhangi bir DNA hasarının varlığı, tedavi başarılarını doğrudan etkileyebilir. Ayrıca, ithal dondurulmuş sperm örneklerinin değerlendirilmesinde COMET analizinin kullanımı, sperm kalitesinin belirlenmesinde önemli bir araç haline gelmiştir. COMET analizi, genetik toksikoloji ve çevre risk analizlerinde giderek daha yaygın olarak kullanılmakta olup, biyolojik araştırmalarda güvenilir, ucuz ve kolay uygulanabilir bir yöntem olarak önemini korumaktadır. Bu bağlamda, sperm DNA hasarının tespiti, yalnızca biyoteknolojik uygulamaların etkinliğini artırmakla kalmayıp, aynı zamanda sperm hücrelerinin genetik bütünlüğünü korumaya yönelik geliştirilecek yeni tekniklerin temelini de atmaktadır (Yeni vd., 2017).

2017 yılında Somel tarafından gerçekleştirilen çalışmada, antik DNA (aDNA) örneklerinin saklama koşullarının DNA hasarı üzerindeki etkileri incelenmiştir. Bu çalışma, özellikle eski DNA örneklerinin uzun süreli saklanması, DNA moleküllerinde deaminasyon ve diğer bozulma süreçlerini hızlandırabileceğini vurgulamaktadır. DNA örneklerinin bozulmaya karşı hassas olduğu bilinen bir gerçektir ve bu bozulmalar, çevresel faktörler, depolama sıcaklığı, nem gibi unsurların etkisiyle meydana gelir. Somel, bu etmenlerin DNA'nın bütünlüğünü bozarak hasar oranlarını artırabileceğini ve bu durumun genetik analizlerin doğruluğunu olumsuz yönde etkileyebileceğini belirtmiştir. Çalışmada, DNA'nın doğru analiz edilebilmesi için saklama koşullarının çok büyük bir öneme sahip olduğu ifade edilmiştir. Özellikle, DNA örneklerinin -80°C gibi çok düşük sıcaklıklarda saklanması gerektiği vurgulanmış ve bu koşullarda saklanan örneklerin daha az DNA hasarına uğradığı gözlemlenmiştir. Düşük sıcaklıklar, DNA'nın bozulma hızını azaltarak örneğin bozulmadan kalmasını sağlayan en etkili yöntem olarak belirlenmiştir. Öte yandan, sıcaklık ve nem gibi değişkenlerin etkisiyle oluşan deaminasyonun, DNA dizileme sonuçlarında hatalı genetik bilgiler üretmesine yol açabileceği belirtilmiştir. Bu nedenle, özellikle eski DNA örneklerinin saklanması sırasında uygun koşulların sağlanması, genetik analizlerin doğruluğu ve güvenilirliği açısından kritik bir öneme sahiptir (Somel, 2017).

2018 yılında Arı ve Yıldız tarafından yapılan çalışmada ise, teke spermasının suni tohumlamada etkin kullanımı için kısa ve uzun süreli saklama koşullarının çok önemli olduğu vurgulanmıştır. Sperma motilitesinin ve canlılığının korunabilmesi için çeşitli

sulandırıcılar ve katkı maddeleri kullanılmakta ve bu katkı maddeleri spermanın korunmasını sağlamaktadır. Ancak, bu katkı maddelerinin bazıları özellikle teke seminal plazmasındaki fosfolipaz A2 enzimiyle etkileşime girerek sperma üzerinde olumsuz etkiler yaratabilmektedir. Bu etkileşimin, döneme, ırka ve hatta aynı tekenin ejakulatları arasında değişkenlik gösterebildiği belirtilmiştir. Çalışmada, teke spermasının saklanması seminal plazmanın ayrılıp ayrılmaması gerektiği konusu tartışılmıştır. Kısa süreli saklama için kullanılan solüsyonlar arasında salin, sodyum sitrat-yumurta sarısı, şeker-yumurta sarısı gibi farklı çözümler yer almaktadır. Bu çözümlerin, spermanın 4°C ile 25°C arasında saklanabilmesi için ortamda antibiyotik ve antifungal bileşenler eklenmesi gerektiği ifade edilmiştir. Ayrıca, spermanın dondurulmadan önce oksidatif strese maruz kaldığı, bu yüzden kısa süreli saklamada antioksidan eklenmesinin faydalı olacağı belirtilmiştir. Suni tohumlamada kullanılacak spermanın en iyi şekilde gün içinde alınıp kullanılması gerektiği, 1-2 günden fazla saklanan spermanın fertilité oranlarını olumsuz etkileyebileceği de bu çalışmanın sonuçları arasında yer almaktadır. Eğer sperma 1 günden uzun süre saklanacaksa, seminal plazmanın ayrılması gerekebileceği vurgulanmıştır (Arı ve Yıldız, 2018).

2018 yılında Küçüktürkmen ve Bozkır tarafından gerçekleştirilen çalışmada ise, soğuk zincir uygulamalarının biyofarmasötik ürünlerin taşınması, saklanması ve dağıtımı sırasında ürün kalitesinin korunabilmesi için ne kadar önemli olduğu ele alınmıştır. Soğuk zincir, biyolojik ürünlerin ve sıcaklığa duyarlı tıbbi ürünlerin üretimden nihai kullanıcıya ulaşana kadar belirli sıcaklık aralıklarında tutulmasını sağlayan özel saklama koşullarını ifade etmektedir. Soğuk zincir, immünomodülatörler, monoklonal antikorlar, hormonlar, enzimler, büyüme faktörleri ve immünolojik ürünler gibi biyofarmasötik maddelerin taşınması ve saklanmasında kritik bir rol oynamaktadır. Soğuk zincir uygulamalarının bozulması durumunda, bu ürünler hastalar için ciddi riskler oluşturabileceği gibi, bozulan ürünlerin atılması da büyük maliyetlere yol açmaktadır. Bu nedenle, biyofarmasötik ürünlerin stabil kalabilmesi için soğuk zincir koşullarına büyük özen gösterilmesi gerektiği ifade edilmiştir. Çalışma, soğuk zincir uygulamalarının biyolojik ve biyoteknolojik ürünlerin taşınmasında ve dağıtılmasında nasıl sağlandığını kapsamlı bir şekilde incelemektedir. Özellikle proteinlerin bozulma süreçleri ve bu bozulmaya yol açan koşullar detaylı bir şekilde ele alınmıştır. Donma ve sıcaklık değişikliklerinin, protein stabilitesi üzerindeki etkileri değerlendirilmiş ve soğuk zincir uygulamalarının biyofarmasötik ürünlerin korunmasındaki rolü açıklanmıştır. Ayrıca, aşılarda gibi biyolojik ürünlerin soğuk zincir uygulamaları ile taşınması ve saklanma koşulları da değerlendirilmiştir. Çalışmanın sonunda, soğuk zincir yönetimi ile ilgili uluslararası düzenlemeler ve kılavuzlar hakkında da bilgi verilmiş, Türkiye'deki uygulamalarla ilgili bilgiler sunulmuştur (Küçüktürkmen ve Bozkır, 2018).

2019 yılında Ladeira ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, kan örneklerinin saklanma koşullarının DNA hasarına etkisi üzerine yapılan bir inceleme gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada, az miktarda saklama çözeltisi kullanılmadan doğrudan dondurulan kan örneklerinin komet testi sonuçları detaylı bir şekilde analiz edilmiştir. Çalışmada, taze örneklerle karşılaştırıldığında, 3 aya kadar saklanan örneklerde ekstra bir DNA hasarının gözlenmediği belirtilmiştir. Bu bulgu, kısa süreli saklamaların DNA hasarını önemli derecede artırmadığını ortaya koymaktadır. Ancak, 3 aydan daha uzun süre saklanan periferik kan mononükleer hücrelerinde (PBMK) hafif de olsa bir DNA hasarının artış gösterdiği gözlemlenmiştir. Bu durum, uzun süreli saklamaların DNA üzerinde küçük, ancak belirgin olumsuz etkiler yaratabileceğini göstermektedir. Ladeira ve çalışma arkadaşları, bu sonuçların saklama sürelerinin uzunluğu ile doğru orantılı olarak DNA'nın bozulma sürecinin hızlandığını ve bu da genetik analizlerin doğruluğunu etkileyebileceğini vurgulamaktadır. Bu bulgu, saklama koşullarının özellikle uzun süreli depolama söz konusu olduğunda büyük önem taşıdığını ve bu tür saklamalarda DNA'nın otantik sinyalinin korunmasına özen gösterilmesi gerektiğini ortaya koymaktadır (Ladeira vd., 2019).

Benzer bir çalışmayı, Milic ve çalışma arkadaşları 2019 yılında gerçekleştirmiştir. Bu araştırmada, küçük miktarlarda saklanan kan örneklerinin bir yıl boyunca saklanmasının ardından komet testine tabi tutulmuş ve taze örneklerle karşılaştırılan sonuçlar incelenmiştir. Çalışma sonucunda, bir yıl boyunca saklanan kan örneklerinde kuyruk yoğunluğu değerlerinde anlamlı bir değişiklik gözlemlenmemiştir. Bu durum, kan örneklerinin küçük hacimlerde güvenli bir şekilde dondurulmasının, uzun süreli saklama koşullarında bile DNA hasarını artırmadığını göstermektedir. Milic ve arkadaşları, saklama koşullarının DNA üzerindeki etkilerini inceledikleri bu çalışmada, küçük hacimli saklamaların genetik bütünlüğü koruma konusunda daha verimli olduğunu ve uzun süreli depolama süreçlerinde DNA'nın zarar görmediğini ortaya koymuşlardır (Milic vd., 2019).

Özcan tarafından 2019 yılında yapılan bir diğer çalışmada, sperma örneklerinin farklı sıcaklık koşullarında ve iki farklı ortam sıvısında (normal semen ve gradient işlemlili) 24 saat boyunca saklanarak sperm kalitesindeki değişiklikler incelenmiştir. Çalışma, 25 normal sperm örneği kullanılarak gerçekleştirilmiş ve sperma örneklerinin üç farklı sıcaklık (oda sıcaklığı, 4°C, 37°C) altında 24 saat süreyle saklanmasının ardından hareketlilik, ölü hücre oranı ve DNA fragmentasyon oranları ölçülmüştür. Farklı saklama koşulları incelendiğinde, özellikle oda sıcaklığında sperm hareketliliği ve DNA yapısının daha iyi korunduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca, gradient işlemine tabi tutulmuş örneklerin kalitesi, normal örneklere kıyasla daha iyi sonuçlar vermiştir. Bu bulgular, sperm saklama koşullarının,

özellikle sıcaklık gibi faktörlerin, sperm kalitesi üzerinde doğrudan etkisi olduğunu göstermektedir. Özellikle oda sıcaklığında yapılan saklamanın, sperm kalitesini en iyi şekilde koruduğu ve hareketlilik ile DNA yapısını daha stabil tuttuğu sonucuna varılmıştır. Bu çalışma, sperm saklama koşullarının genetik materyalin korunmasında ne kadar kritik bir rol oynadığını bir kez daha ortaya koymaktadır (Özcan, 2019).

2021 yılında Bankoglu ve ekibi, tam kan ve periferik kan mononükleer hücrelerinin (PBMC) farklı saklama yöntemlerinin DNA hasarı üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Çalışmada, saklama çözeltisi içinde ve doğrudan dondurularak saklanan örneklerin komet testi ve FPG komet testlerine tabi tutulması sonucunda, PBMC'lerin saklama çözeltisi olmadan doğrudan dondurulmasının uygun olduğu belirtilmiştir. Ancak, çözeltiden çıkarıldıktan sonra komet testinin hemen yapılmaması gerektiği vurgulanmıştır. Bankoglu ve çalışma arkadaşları, çözeltiden çıkarılan örneklerin en az 16 saat bekletilerek test edilmesinin daha güvenilir sonuçlar verdiğini rapor etmişlerdir. Bu bulgular, saklama koşullarının ve örneklerin toparlanma sürecinin test sonuçları üzerinde doğrudan etkisi olduğunu göstermektedir. Özellikle örneklerin çözeltiden çıkarıldıktan sonra belirli bir toparlanma sürecinden geçmesi gerektiği ve bu sürecin test sonuçlarının doğruluğunu artıracığı ifade edilmiştir (Bankoğlu vd., 2021).

Aynı yıl, Baydaş ve arkadaşları da benzer bir çalışmayı gerçekleştirmiştir. Çalışmada, kan ve lenfosit örnekleri +4°C, -20°C ve -80°C gibi farklı sıcaklıklarda ve çeşitli sürelerde saklanarak komet testi uygulanmıştır. Çalışma sonucunda, taze örneklerle saklanan örnekler arasında DNA hasarı açısından anlamlı bir fark olmadığı ortaya çıkmıştır. Farklı sıcaklıklarda saklanan örneklerin DNA hasarına yol açmadan güvenli bir şekilde saklanabileceği sonucuna ulaşılmıştır. Baydaş ve arkadaşları, bu bulgularla birlikte, kan ve lenfosit örneklerinin farklı sıcaklık koşullarında uzun süre saklanmasının DNA hasarı üzerinde anlamlı bir etkisi olmadığını göstermiştir (Baydaş vd., 2021).

2023 yılında Ulaş Pınar tarafından yapılan bir çalışmada ise, travmaya bağlı hemoraji ve kan kaybının önlenabilir ölümler arasında önemli bir yer tuttuğu ve travmatik koagülopati ile birlikte mortalite oranlarını artırdığı vurgulanmıştır. Çalışmada, kanamanın kontrol altına alınması için sistematik bir yaklaşım gerekliliği üzerinde durulmuş, hastaneye kabul sonrası uygulanan laboratuvar testleriyle hedefe yönelik kan ürünlerinin verilmesinin başarı şansını artırdığı belirtilmiştir. 1970'li yıllardan bu yana askeri travma hastalarında kullanılan tam kanın, eritrosit süspansiyonu, plazma ve platelet gibi komponent kan ürünlerine yerini bıraktığı ifade edilmiştir. Son yıllarda PROPPR gibi çalışmaların etkisiyle travma

hastalarında kan ürünlerinin 1:1:1 oranında kullanılmasının faydalı olabileceği düşünülmektedir. Çalışmada, tam kanın 14-21 gün saklanabilmesi ve içeriğinde hematokrit, platelet, koagülasyon faktörleri gibi bileşenler bulunması üzerine değerlendirmeler yapılmış; bununla birlikte, tam kan temin etme ve saklama koşullarının zorlukları ve ek maliyetler gibi faktörlerin, tam kan kullanımını sınırladığı vurgulanmıştır. Bu araştırma, kan ürünlerinin saklama koşullarının, özellikle tam kan ve komponent ürünleri arasında, mortaliteyi azaltmadaki etkisini ele almıştır (Ulaş Pınar, 2023).

Genel olarak, literatür taramaları, komet testi uygulamalarında kullanılan biyolojik örneklerin, uygun saklama koşullarına ve uygun süreler boyunca depolandığında, DNA üzerindeki olumsuz etkilerden kaçınılabileceğini ve bu durumun komet testinin doğruluğu ile güvenilirliğini büyük ölçüde koruyacağını açıkça ortaya koymaktadır. Komet testi, özellikle genetik hasarın, örneğin DNA kırılmalarının tespiti için yaygın bir şekilde kullanılan güçlü bir biyomarker analiz tekniğidir. Bu test, hücrelerdeki DNA hasarının miktarını ve tipini değerlendirmede çok önemli bir rol oynar ve yapılan çalışmalar, testin sonucunun doğruluğunun büyük ölçüde örneklerin doğru bir şekilde saklanmasına bağlı olduğunu vurgulamaktadır. Bu nedenle, biyolojik örneklerin saklanma koşullarının ve saklanma süresinin dikkatle kontrol edilmesi, test sonuçlarının güvenilirliğini ve doğruluğunu sağlamak adına kritik bir öneme sahiptir.

Saklama koşullarının ve sürelerinin doğru bir şekilde ayarlanması, örneklerin biyolojik bileşenlerinin bozulmasını önler ve bu sayede komet testinin hassasiyetini korur. Yapılan pek çok çalışma, biyolojik örneklerin, özellikle kan ve hücrel örneklerin, farklı sıcaklık ve ortam koşullarında saklandığında, genetik yapılarında meydana gelen değişikliklerin etkilerini incelemiştir. Örneğin, taze örneklerle karşılaştırıldığında, uzun süreli dondurma ve belirli saklama çözeltileri kullanarak yapılan saklama işlemlerinin, DNA hasarını artırmadan güvenli bir şekilde örneklerin depolanmasına olanak tanıdığına dair önemli bulgular elde edilmiştir. Bununla birlikte, yapılan araştırmalar, saklama sürelerinin uzaması durumunda, özellikle 3 aydan daha uzun süreli saklama işlemlerinde, bazı durumlarda DNA hasarının belirgin bir şekilde arttığını da ortaya koymuştur. Ancak, bu artışlar genellikle sınırlı bir düzeyde kalmakta ve uzun süreli saklama koşullarının titizlikle kontrol edilmesi halinde, bu tür etkiler minimize edilebilmektedir.

Özellikle küçük hacimlerde saklama yapılması, DNA hasarını azaltma konusunda önemli bir strateji olarak karşımıza çıkmaktadır. Küçük hacimlerde yapılan saklamaların, örneğin hücrel yapıları daha az bozarak, DNA üzerinde daha az stres oluşturduğu ve

genetik hasarı engellediği gösterilmiştir. Bu, biyolojik örneklerin saklanması sırasında daha etkili ve güvenli bir yöntem olarak öne çıkmaktadır. Ayrıca, saklama çözeltilerinin ve örneklerin çıkarılmasından sonra, belirli bir toparlanma sürecinin gerektiği de önemli bir bulgu olarak literatürde yer almaktadır. Örnekler, çözeltiden çıkarıldıktan sonra, DNA'nın yapısal bütünlüğünü yeniden kazanabilmesi için belirli bir süre boyunca ortam koşullarına adapte olmalıdır. Bu toparlanma sürecinin doğru bir şekilde yönetilmesi, testin güvenilirliğini artırarak, saklama ve taşıma sırasında oluşabilecek olası hataların önüne geçilmesini sağlar.

Bu literatür taraması, hem teorik hem de pratik açıdan biyolojik örneklerin saklanma süreçlerine yönelik değerli rehberler sunmaktadır. Saklama koşulları, biyolojik örneklerin kalitesini ve test sonuçlarının doğruluğunu etkileyen temel faktörlerden biridir. Bu faktörlerin göz önünde bulundurulması, sadece araştırmaların güvenilirliğini artırmakla kalmaz, aynı zamanda klinik ve laboratuvar uygulamalarında da örneklerin daha etkin bir şekilde kullanılmasını sağlar. Sonuç olarak, biyolojik örneklerin doğru bir şekilde saklanması, genetik analizler için önemli bir ön koşul olup, komet testi gibi hassas testlerde doğru ve güvenilir sonuçlar elde edilmesini sağlayan temel bir adım olarak karşımıza çıkmaktadır.

Bu çalışmanın temel amacı, komet testiyle değerlendirilen DNA hasar düzeylerinin örnek saklama koşullarına bağlı olarak nasıl değiştiğini bilimsel olarak ortaya koymaktır. Özellikle tam kan ve izole lenfosit örneklerinin farklı sıcaklık (oda sıcaklığı, +4°C, -20°C, -80°C) ve sürelerdeki saklama koşullarının DNA bütünlüğü üzerindeki etkileri sistematik biçimde karşılaştırılmıştır. Böylece, kısa vadeli analizlerde hangi örnek tipinin daha kararlı olduğu ve uzun süreli biyobanka saklamalarında DNA hasarını en az artıran koşulların belirlenmesi hedeflenmiştir. Çalışma, komet testinin güvenilirliğini etkileyen pre-analitik faktörleri tanımlayarak, hem biyomonitorizasyon çalışmalarında kullanılacak örneklerin uygun saklama stratejilerinin geliştirilmesine hem de biyobankacılıkta standardizasyonun sağlanmasına katkı sunmayı amaçlamaktadır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. Kullanılan Maddeler

Tripan mavisi (Sigma, Almanya)
Hidrojen peroksit (H_2O_2) (Sigma, Almanya)
Sodyum hidroksit (NaOH) (Merck, Almanya)
Hidroklorik asit (HCl) (Merck, Almanya)
Sodyum klorür (NaCl) (Zag Kimya, Türkiye)
Na₂EDTA (VWR Chemicals, ABD)
Tris (VWR Chemicals, ABD)
Sodyum lauril sarkosinat (Amresco, ABD)
Triton x-100 (Merck, Almanya)
Etanol (Merck, Almanya)
Etidyum bromür (Amresco, ABD)
Düşük erime noktalı agar (LMA) (Sigma, Almanya)
Normal erime noktalı agar (NMA) (Amresco, ABD)
Dimetilsülfoksit (DMSO) (Serva, ABD)
Fosfat tamponu çözeltisi (PBS) (Sigma, Almanya)
Lökosep ayırma tüpü 12 ml(Grenier Bio-One, Avusturya)

2.1.2. Kullanılan Aletler ve Malzemeler

Karbondioksit inkübatörü (Heal Force HF240, Çin)
Santrifuj cihazı (Hettich Rotina 90, Almanya)
pH metre cihazı (WTW pH 330i, Almanya)
Hücre sayım cihazı (Bio-Rad TC20, Singapur)
İnverted Mikroskop (Micros MCX 7600, Avusturya)
Fluoresan Mikroskobu (Leica DM 1000, Almanya)
COMET Assay IV yazılımı (Perceptive Instruments, UK)
Plaka çalkalayıcı (Heidolph Titramax 101, Almanya)
Su banyosu (Boeco, Ultraterm BWT-U, Almanya)
Derin Dondurucu (-20°C) –(-80°C), (Scancool, Almanya)

Steril çalışma kabini (Esco, Class II Biological Safety Cabinet, Singapur)
Sterilizatör (Sanyo MAC 235EX, Japonya)
Hassas terazi (Sartorius CP225D, Türkiye)
Sıvı azot tankı (International Cryogenics, ABD)
Vorteks (Nüve NM110, Türkiye)
Multiplaka okuyucu (Thermo Scienific Mutiskan Co., Finlandiya)
Buz makinası (Hoshizaki, Avrupa)

2.2. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

Lizing çözeltisi: 2,5 M NaCl, 10 mM Tris, 100 mM Na₂EDTA tartılarak ve distile suda çözüldükten sonra pH:10'a ayarlandı. Ph ayarlandıktan sonra %1 sodyum lauril sarkosinat ilave edilerek 1-2 gün süresince karıştırıldı ve oda sıcaklığında saklandı. Kullanılacağı gün bu çözeltiye taze olarak %1 triton ve %10 DMSO ilave edildi ve +4°C'de soğuması sağlanarak kullanıldı.

Nötralizasyon çözeltisi: 0,4 M Tris distile suda çözüldü ve pH=10'a ayarlanarak oda sıcaklığında saklandı.

Elektroforez çözeltisi: Bu çözeltinin deney günü taze hazırlanarak kullanılması gerekmektedir. 1 mM Na₂EDTA ve 300 mM NaOH distile suda çözülerek pH>13 olacak şekilde ayarlandı ve +4°C'de soğutulduktan sonra kullanıldı.

Etidium bromür çözeltisi: 200 µg/ml stok çözeltiden 100 ml hazırlanarak oda sıcaklığında saklandı. Bu stok çözeltiden boyama esnasında 20 µg/ml hazırlanarak her bir lama 60 µl damlatılarak kullanıldı.

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

Normal erime noktalı agar (NMA): %1'lik çözeltisi PBS ile çözülerek hazırlandı. Çözelti henüz sıcak iken lamalar bu çözeltinin içine daldırılarak agar ile kaplanarak oda sıcaklığında kurutuldu.

2.3. Kan numunelerinin toplanması ve lenfosit izolasyonu

2.3.1. Numune toplanması

Çalışma grubundaki gönüllülerin araştırmaya dahil edilme ölçütleri:

- 25 ile 60 yaş arasında olmak
- Son 4 hafta içinde herhangi bir ilaç kullanmamak
- Son 4 hafta içinde alkol veya sigara kullanmamak
- Akut veya kronik herhangi bir hastalığı olmamak
- Kadın veya erkek (Cinsiyet ayrımı yapılmayacaktır.)

Çalışma grubundaki gönüllülerin araştırmadan hariç tutulma ölçütleri:

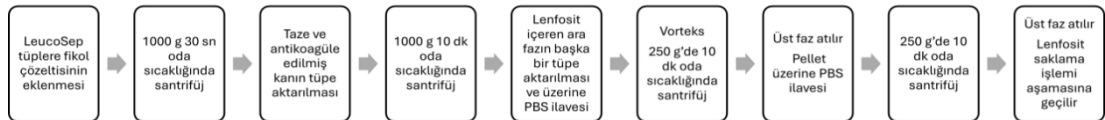
- 25 yaşından küçük, 60 yaşından büyük olmak
- Son 4 hafta içinde herhangi bir ilaç kullanmak
- Son 4 hafta içinde alkol veya sigara kullanmak
- Akut veya kronik herhangi bir hastalığı olmak

34 yaşında sağlıklı ve ilaç kullanmayan 1 kadın gönüllüden toplam 10 ml kan örneği heparinli bir tüpe alınarak çalışmamıza başlanmıştır. 10 ml kanın 5 ml'si ile LeucoSep (Greiner bio-one, 12 ml) tüpler kullanılarak lenfosit izolasyonu yapılmıştır. Hücrelerin sayım işlemi TC20 Otomatik Hücre Sayım Cihazı (Bio-Rad TC20, Singapur) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Alınan kanın diğer 5 ml'si tam kan çalışmasında kullanılmıştır.

Çalışmanın yapılması için gerekli onay 09.06.2022 tarihinde Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İnsan Araştırmaları Etik Kurulu'ndan alınmıştır. Onay numarası: 2022000325-1(2022/325)

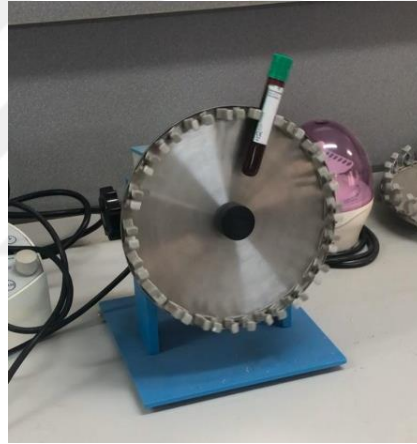
2.3.2. Tam kandan lenfosit izolasyonu

Lenfositlerin izolasyon işlemi Şekil 2.1.'de gösterilmiştir.

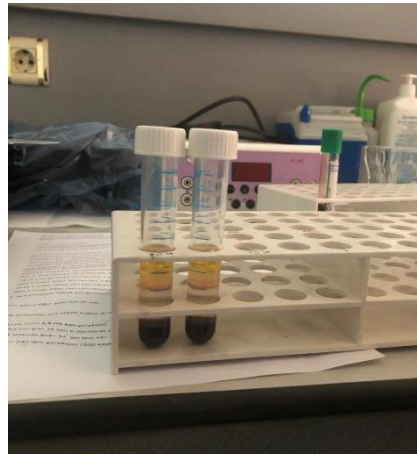


Şekil 2.1. Lenfosit izolasyon aşamaları

Heparinli tüplere alınan 10 mL kan ile LeucoSep (Greiner, 15 mL) tüpler kullanılarak lenfosit izolasyonu yapıldı. Öncelikle lenfosit ayırma çözeltisi (histopak) ışıktan korunarak oda sıcaklığına getirildi. 15 ml'lik LeucoSep tüplere 2 mL histopak konuldu. 1000 g'de 30 saniye oda sıcaklığında santrifüj edildi (histopak çözeltisinin tüpteki filtrenin alt kısmına geçebilmesi amacıyla) ve santrifüjden sonra 1.5-2 mL kan tüpe aktarıldı, ardından 1000 g'de 10 dakika oda sıcaklığında santrifüj edildi. Santrifüjden sonra tüpteki fazların sıralaması yukarıdan aşağıya plazma-lenfosit içeren arafaz-histopak-filtre-histopak-pellet (eritrositler ve granüositler) şeklindedir. Lenfosit içeren disk üzerinde tüm fazlar başka bir tüpe aktarıldı (Bu aşamada tüpte bulunan filtre, eritrositler ve granüositleri içeren pellet ile kontaminasyonu önlemektedir). Diğer bir tüpe aktarılan lenfositli fazın üzerine 2 mL PBS ilave edildi. Vorteksledikten sonra 250 g'de 10 dakika oda sıcaklığında santrifüj edildi. Santrifüjden sonra üst faz atıldı ve bu yıkama işlemi 1 kez daha tekrarlandı. Son santrifüjden sonra üst faz atıldı ve pelletin üzerine yaklaşık 2 mL RPMI ilave edilerek iyice karıştırıldı.



Şekil 2.2. Lenfosit içeren tüpün santrifüj edilirken görüntüsü



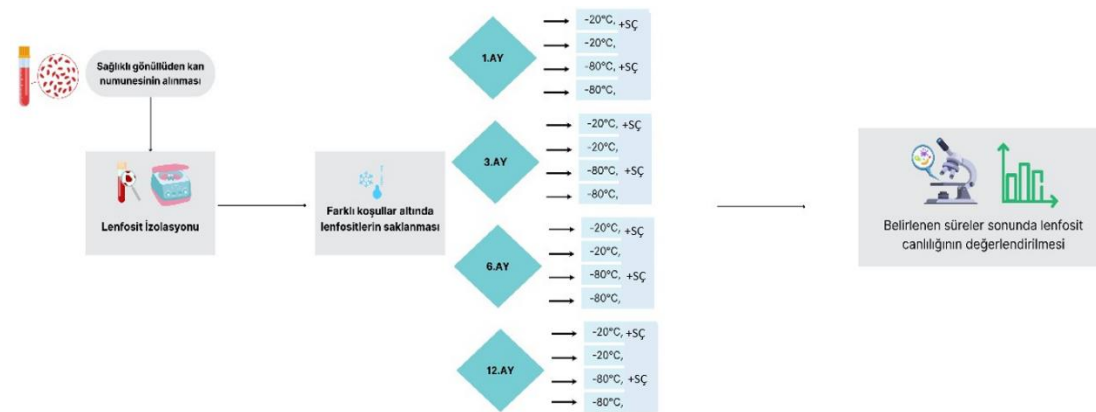
Şekil 2.3. Lenfosit içeren fazın lenfosit izolasyon tüpündeki görüntüsü



Şekil 2.4. Son santrifüjden sonra üst faz atıldıktan sonra lenfosit tüpünün görüntüsü

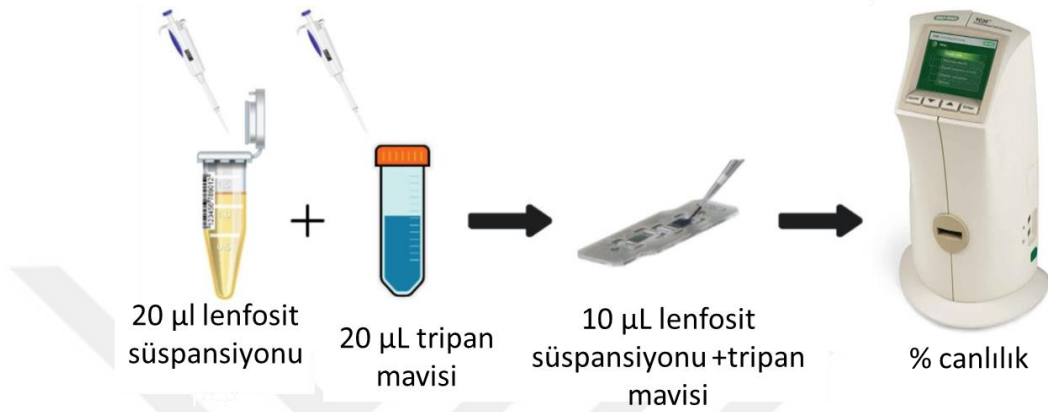
2.4. Lenfosit sayımı

Lenfosit hücreleri sayımı TC-20 cihazında tripan mavisi yöntemiyle yapılmıştır. Negatif yüklü bir boya olan tripan mavisi, hücre ölümü durumunda bozulan membran bütünlüğü nedeniyle hücre içine girerek hücrenin boyanmasına neden olur; canlı hücrelere giremediğinden boyanma olmaz. Bu yöntemle lenfosit süspansiyonu, tripan mavisi boyası ile karıştırıldı ve sayım lamına damlatıldı. TC-20 sayım cihazı (BioRad) kullanılarak tripan mavisi yöntemiyle hücre sayısı ve %canlılık belirlenmiştir. Ayrıca komet testinde her bir lam üzerinde en az 20.000 hücre olacak şekilde (deneyimizde 25.000 olarak ayarlanmıştır) lenfosit hücrelerinin sayımı ve saklama tüplerinde paylaştırılarak saklanmaları yapılmıştır.



Şekil 2.5. Lenfosit canlılığının değerlendirilmesi için izlenen yöntem ve süreç (Ç: %10 DMSO içeren kriyoprezervasyon çözeltisi). Sağlıklı gönüllüden alınan tam kandan lenfosit izolasyonu Şekil 2.1'e göre gerçekleştirilmiştir. Lenfositlerin saklanması farklı koşullar olarak süre (1, 3, 6 ve 12 ay), sıcaklık (-20°C ve -80°C) ve %10 DMSO içeren kriyoprezervasyon çözeltisi ve doğrudan saklama lenfosit canlılığının değerlendirilmesi için seçilen parametrelerdir.

Tripan mavisi yönteminde, 20 µl lenfosit süspansiyonu 20 µl tripan mavisi çözeltisi içerisine ilave edilmiştir. Hazırlanan tripan mavisi + lenfosit süspansiyonundan 10 µl alınarak hücre sayım lamı üzerine yayılmıştır. Hücre sayım lamı TC20 otomatik hücre sayım cihazına yerleştirildikten sonra % canlı hücre sayısı cihaz ekranında okunan değer ile belirlenmiştir (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Tripan mavisi yöntemi ile hücre canlılığının belirlenmesi. TC20 otomatik hücre sayım cihazı ile, cihaza özgü hücre sayım lamı yerleştirilerek hücre süspansiyonundaki % canlılık değerleri elde edilmiştir. Sayım cihazının ekranında 1 ml'deki toplam hücre sayısı, canlı hücre sayısı ve % canlılık verileri gösterilmektedir

2.5. Komet Yöntemi İçin Kan ve Lenfositlerin Saklama Koşullarına Göre Hazırlanması

Komet testi taze olarak alınan tam kan ve izole edilen lenfositler ile uygulanmıştır. Aynı gün hem tam kan örnekleri (5 mL) hem de izole lenfositler (diğer 5 mL kandan izole edilen) saklanmak üzere küçük miktarlarda (200-250 µL) ependorflara ayrılmış ve saklanmıştır. Bu aşamada tam kan ve lenfositler hem direkt olarak saklanmış, hem de saklama çözeltisi (%10 DMSO içeren besi yeri) içerisinde viallere konularak saklanmıştır.

2.6. Komet Testi

Komet testinde pozitif kontrol olarak 50 µM H₂O₂ kullanılmıştır.

Hücreleri agara alma işlemi: Tam kan ve izole edilen lenfositler TC-20 sayım cihazından sayılarak her bir lamda 20.000-30.000 arasında hücre olacak şekilde hesaplanarak 50 µl hücre süspansiyonu ile 37 °C’de eritilmiş 100 µl % 0.5’lik LMPA, karıştırıldıktan sonra önceden % 1’lik NMPA çözeltisine daldırılıp agar ile kaplanmış lamlara yayılır ve üzerine lamel kapatıldıktan sonra buzlu metal yüzey üzerinde yaklaşık olarak 5 dakika bekletilerek agarın katılaşması sağlanır.

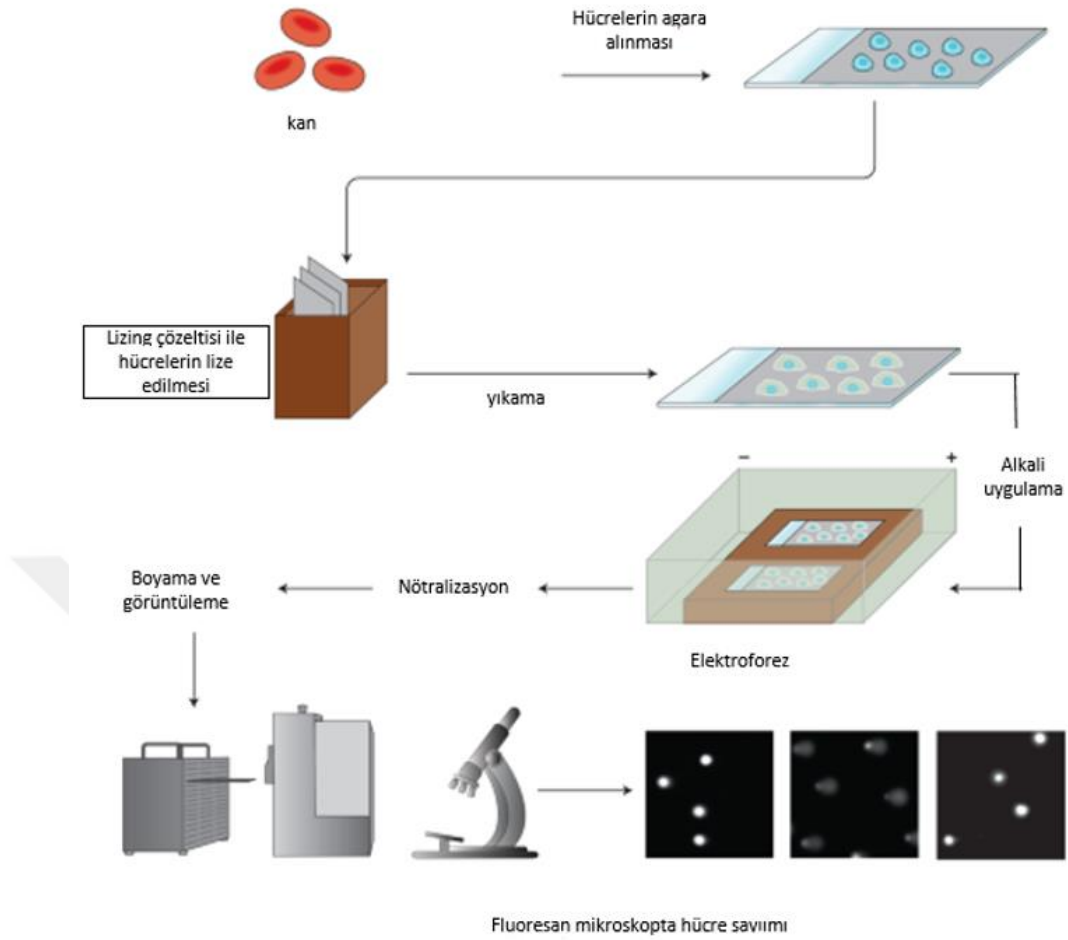
Lizing: Lamlar daha önceden hazırlanıp buzdolabında bekletilen soğuk lising çözeltisine daldırılarak en az 1 saat süreyle buzdolabında bekletilir.

Alkali uygulaması ve elektroforez: Elektroforez tankı soğuk elektroforez çözeltisi ile uygun miktarda doldurulur (Bu tampon çözelti, lamların üzerini 0,5-1 cm geçecek kadar olmalıdır). Lysing çözeltisinden çıkarılan lamlar agar yayılan kısımları üste gelecek şekilde elektroforez tankının içine yerleştirilir. Lamlar, 20 dakika akım uygulamadan bu çözeltide bekletildikten sonra, 25 V ve 300 mA akım uygulayarak 20 dakika elektroforez uygulanır.

Nötralizasyon: Elektroforez aşaması bittikten sonra elektroforez tankından çıkarılan lamlar üç kez nötralizasyon çözeltisi ile yıkanır. Hücreleri lamlara fiks etmek amacıyla alkol içerisine daldırılan lamlar okuma yapıncaya kadar nemli ortamda saklanır.

Boyama ve mikroskopta değerlendirme: Lamların üzerine 60 µl (20 µg/ml) etidium bromür çözeltisi ilave edilir ve en az 10 dakika beklenip mikroskopta okuma yapılır. Her lamda 100 hücre, floresan mikroskopunda değerlendirilir ve Comet assay IV programı kullanılarak hücreler sayılır.

Komet testinin uygulama basamakları Şekil 2.8.’de gösterilmiştir.



Şekil 2.8. Komet testi uygulama basamakları

2.7. İstatistiksel değerlendirmeler

Çalışmamızda lenfositlerin canlılık değerleri bir sitotoksisite test yöntemi olan tripan mavisi yöntemi ile belirlenmiş ve istatistiksel analizi IBM SPSS programı (SPSS WindowsMRelease 22.0) t-test kullanılarak yapılmıştır. İstatistiksel olarak anlamlılık sınırı $p < 0.05$ kabul edilmiştir.

Komet testi ile elde edilen DNA kuyruk yoğunluğu (Mean Tail Intensity) değerleri, her bir lamdan rastgele seçilen 100 hücre üzerinden hesaplanmış ve kontrol ile test grupları arasında karşılaştırmalar yapılmıştır. Veriler ortalama $\pm$ standart hata (SEM) şeklinde sunulmuş, gruplar arası farkların istatistiksel anlamlılığı One-Way ANOVA testi ile analiz edilmiştir. Anlamlı fark tespit edilen durumlarda post-hoc karşılaştırmalar Fisher's Least Significant Difference (LSD) testi ile yapılmıştır. Tüm analizlerde $p < 0.05$ değeri istatistiksel anlamlılık sınırı olarak kabul edilmiştir.

3. BULGULAR

Bu çalışmada, komet testi ile elde edilen DNA hasarı düzeyleri, farklı saklama koşulları ve sürelerine göre değerlendirilmiştir. Oda sıcaklığı ve +4 °C’de saklanan tam kan ve izole lenfosit örneklerine, kan alımını takip eden ilk 7 gün boyunca her gün komet testi uygulanmıştır. Bu gruplara ait veriler çizelge 3.1’de sunulmuştur. İlk gün elde edilen sonuçlar, hem tam kan hem de izole lenfositler için kontrol grubu olarak kabul edilmiştir. Ayrıca, -20 °C ve -80 °C’de saklanan numunelere 1., 3., 6. ve 12. aylarda komet testleri uygulanmış ve analizler Tablo 3.2.’de sunulmuştur. Her bir örnek için hazırlanan lamalar üzerinde Comet Assay IV programı kullanılarak rastgele seçilen 100 hücreye ait ortalama kuyruk yoğunluğu (Mean Tail Intensity) değerleri $\pm$ standart hata (SEM) ile ifade edilmiştir. Bu bulgular, DNA hasarının zamana ve saklama koşullarına bağlı olarak nasıl değiştiğini ortaya koymaktadır.

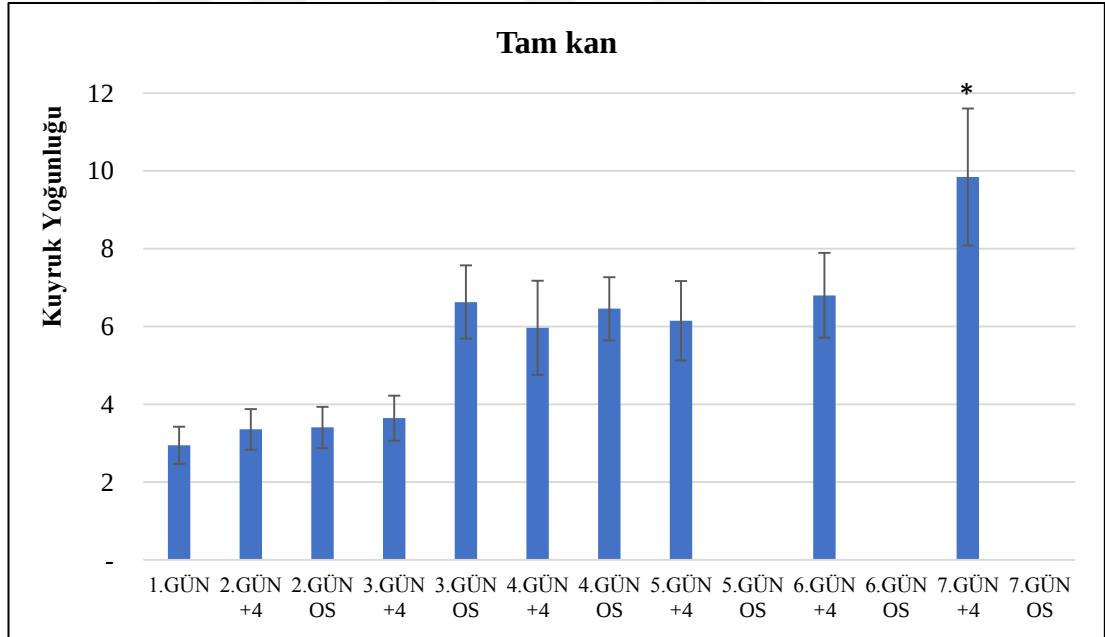
Çizelge 3.1. 7 günlük oda sıcaklığı ve +4°C komet testi sonuçları

Gün	Tam Kan (+4°C)	Tam Kan (Oda Sıc.)	İzole Lenfosit (+4°C)	İzole Lenfosit (Oda Sıc.)
1. Gün	2,95 $\pm$ 0,447	2,95 $\pm$ 0,447	3,14 $\pm$ 0,418	3,14 $\pm$ 0,418
2. Gün	3,36 $\pm$ 0,515	3,41 $\pm$ 0,526	3,44 $\pm$ 0,525	6,78 $\pm$ 1,275
3. Gün	3,65 $\pm$ 0,579	6,63 $\pm$ 0,942	6,71 $\pm$ 1,231	7,86 $\pm$ 1,439
4. Gün	5,97 $\pm$ 1,213	6,46 $\pm$ 0,808	11,96 $\pm$ 2,087	14,42 $\pm$ 2,438
5. Gün	6,15 $\pm$ 1,02	x	11,85 $\pm$ 1,765	x
6. Gün	6,80 $\pm$ 1,09	x	17,79 $\pm$ 2,516	x
7. Gün	9,84 $\pm$ 1,763	x	18,93 $\pm$ 2,209	x

Oda sıc. ve +4°C’de saklanan numunelerin 1,2,3,4,5,6 ve 7. günlerde komet uygulamaları yapılmış ve çizelge 3.1’de sonuçları verilmiştir. Kan alındıktan sonraki ilk 1 hafta her gün komet testi uygulanmıştır. İlk gün uygulanan komet testi sonuçları hem tam kan hem izole lenfositler için (1.gün) kontrol olarak kullanılacaktır.

Çizelge 3.2. -20°C ve -80°C’de saklama çözeltisi (SÇ) varlığında ve direkt saklanarak çalışılan örneklerdeki komet testi sonuçları -20°C ve -80°C’de saklanan numuneler ile komet analizleri tamamlanmış 1., 3., 6. ve 12. aylarda komet testi uygulamaları çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlar çizelge 3.2 te verilmiştir. X ile gösterilen alanlarda ghost hücrelerdir, Comet Assay IV Software ile sayılamayacak kadar hasarlı hücrelerdir.

Grup	1. Ay	3. Ay	6. Ay	12. Ay
Tam Kan (-20°C SÇ)	16,10±1,42	18,35±1,83	16,97±1,5	20,86±1,5
Tam Kan (-20°C)	7,77±1	12,93±1,37	10,92±1,24	10,06±1,19
Tam Kan (-80°C SÇ)	7,37±1,1	6,84±0,91	9,56±1,06	9,22±1,13
Tam Kan (-80°C)	8,65±0,97	7,61±1,1	10,36±1,05	8,60±1,04
Lenfosit (-20°C SÇ)	8,02±0,87	17,05±1,37	x	x
Lenfosit (-20°C)	24,64±1,94	x	x	x
Lenfosit (-80°C SÇ)	4,07±0,50	3,91±0,57	4,97±0,7	6,71±0,76
Lenfosit (-80°C)	28,81±1,62	42,24±1,48	x	x



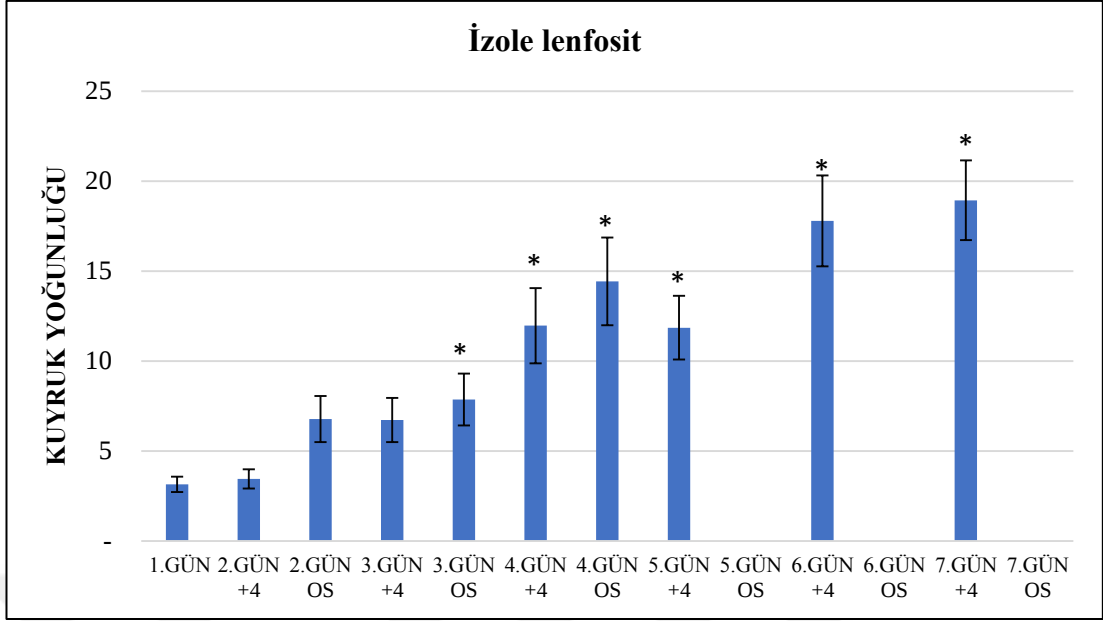
Şekil 3.1. Tam kanın oda sıcaklığı (OS) ve +4°C’de 1 haftalık süreçteki komet testi sonuçlarından kuyruk yoğunlukları. (n=100) ± SEM. * Kontrolle karşılaştırıldığında (Kontrol TK 1. gün olarak alınmıştır) (p<0.05 , One- Way ANOVA).

Tam Kan Örneklerinin Kısa Süreli Saklanması Elde Edilen Bulgular

Tam kan örneklerine ait DNA hasarı düzeyleri, 1 hafta boyunca her gün yapılan komet testi ile değerlendirilmiş ve elde edilen bulgular grafiklerle gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, 3. günden itibaren DNA hasarında 1. güne kıyasla artış gözlemlenmiş, ancak bu artış yalnızca 7. gün sonunda 4°C'de saklanan örneklerde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). Oda sıcaklığında saklanan tam kan örneklerinde ise 5. günden itibaren hücresel yapıların bozulduğu (ghost hücre oluşumu) ve floresan mikroskoba bağlı Comet Assay IV Software tarafından değerlendirilemeyecek düzeyde tahribat meydana geldiği belirlenmiştir.

Ghost/hedgehog/cloud olarak adlandırılan bu hücreler, DNA'nın neredeyse tamamının kuyruğa göç ettiği, nükleer "baş"ın silikleştiği ve yoğun DNA parçalanmasıyla karakterize bir morfoloji göstermektedir. Bu görünüm çoğunlukla ileri sitotoksikite veya apoptoz/nekroz ile ilişkilidir; ancak literatür, aynı morfolojinin aşırı genotoksik maruziyet, yüksek alkali koşullar veya pre-analitik hatalar sonucunda da oluşabileceğini vurgulamaktadır (Lorenzo vd., 2013).

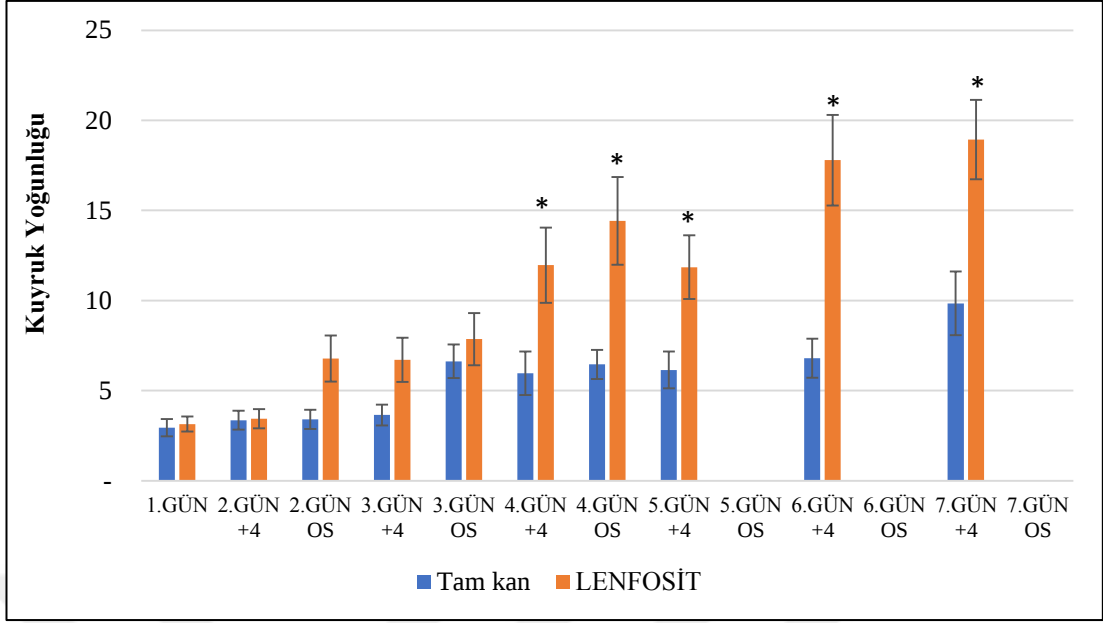
Bu bulgular doğrultusunda, oda sıcaklığında saklama süresinin maksimum 4 gün ile sınırlı olduğu, DNA hasarının 3. günden itibaren belirgin şekilde arttığı göz önünde bulundurularak komet testi için yalnızca ilk 2 gün boyunca kullanılmasının daha uygun olduğu düşünülmektedir. Öte yandan şekil 3.1 de görüldüğü gibi, 4°C'de saklanan örneklerde DNA hasarı zamanla artmakla birlikte, bu artışın 7. güne kadar istatistiksel olarak anlamlı olmadığı, ancak en uygun kullanım süresinin 3 gün ile sınırlı olduğu düşünülmektedir.



Şekil 3.2. İzole lenfositlerin oda sıcaklığı (OS) ve +4°C’de 1 haftalık süreçteki komet testi sonuçlarından kuyruk yoğunlukları . (n=100)±SEM. * Kontrolle karşılaştırıldığında (Kontrol TK 1. gün olarak alınmıştır) (p<0.05 , One- Way ANOVA).

İzole Lenfosit Örneklerinin Kısa Süreli Saklanması Elde Edilen Bulgular

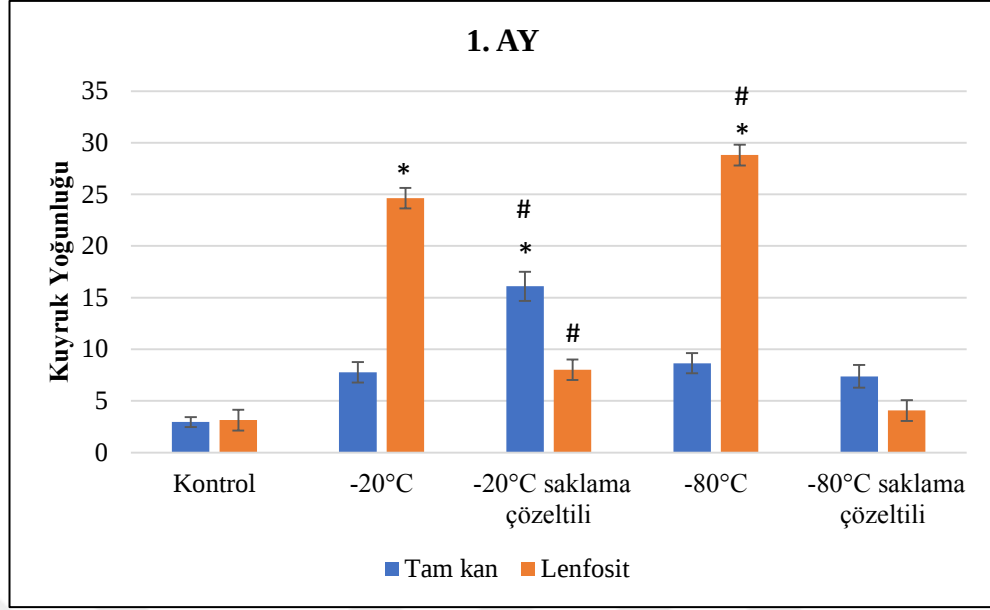
İzole lenfosit örneklerinde DNA hasarı düzeyleri kısa süreli (1 haftalık) saklama süresince değerlendirilmiştir. Yapılan analizler sonucunda, oda sıcaklığında saklanan örneklerde DNA hasarının 3. günden itibaren istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı belirlenmiştir (p<0.05). Benzer şekilde, 4°C’de saklanan örneklerde ise DNA hasarında anlamlı artış 4. günden itibaren gözlenmiştir. Bu bulgular doğrultusunda, izole lenfositlerin komet testi için oda sıcaklığında en fazla 2 gün, 4°C’de ise en fazla 3 gün süreyle saklanması uygun olduğu düşünülmektedir.



Şekil 3.3. Tam kan ve izole lenfositlerin oda sıcaklığı (OS) ve +4°C’de 1 haftalık süreçteki komet testi sonuçlarından elde edilen DNA kuyruk yoğunlukları (n=100) ± SEM. * Tam kan ile izole lenfositler karşılaştırıldığında (p<0.05 , One- Way ANOVA).

Tam Kan ve İzole Lenfosit Örneklerinin Kısa Süreli Saklanması DNA Hasarına İlişkin Bulguların Karşılaştırılması

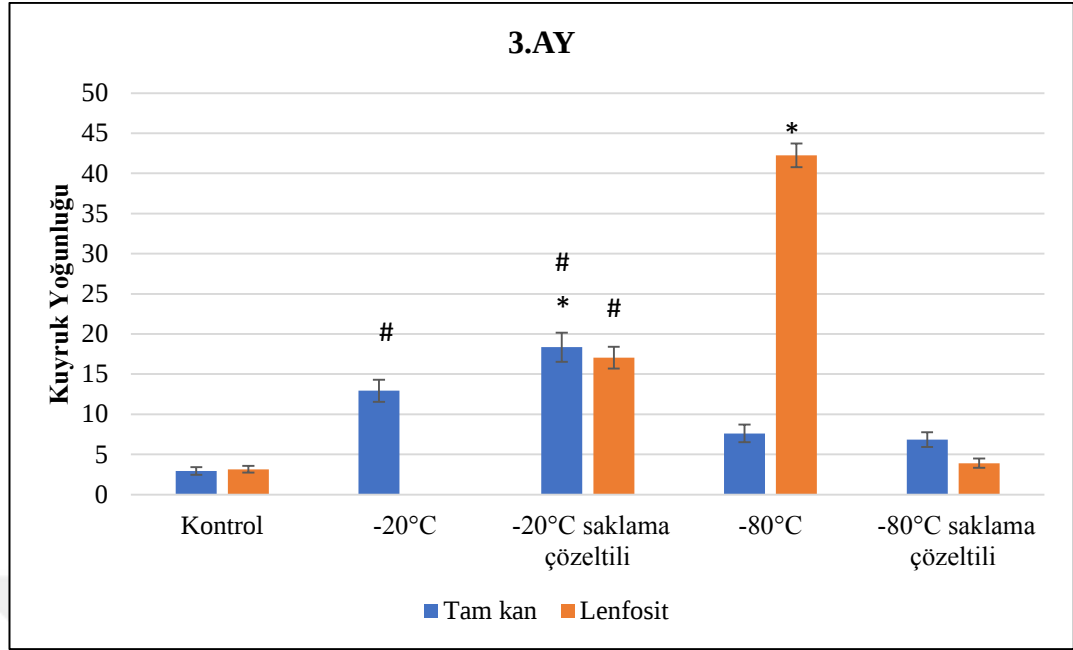
Tam kan ve izole lenfosit örneklerinin oda sıcaklığı ve +4°C’de 1 haftalık süre boyunca saklanmasına ilişkin komet testi sonuçlarına göre, her iki grupta da 1. ve 2. günlerde DNA hasarı düşük düzeyde bulunmuştur. 2. günden itibaren izole lenfosit örneklerinde DNA hasarında artış gözlemlenmiş olsa da, bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. 4. günden itibaren ise izole lenfositlerin DNA hasar düzeyi, tam kana kıyasla anlamlı şekilde yüksek bulunmuş ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0.05). Tam kan örneklerinde de zamanla DNA hasarında artış görülmüş, bu durum olası hemoliz ile ilişkilendirilebilir. Ancak genel değerlendirme sonucunda, kısa vadeli saklamalarda (1–7 gün) tam kanın izole lenfositlere kıyasla daha stabil olduğu ve komet testi için daha uygun olduğu belirlenmiştir. Özellikle sadece 2 gün saklama yapılacaksa, izolasyon işlemi uygulanmadan tam kanın doğrudan kullanımı yeterli olabileceği düşünülmektedir. Öte yandan, uzun süreli saklamalarda izole lenfositlerin saklama çözeltisi eklenerek -80°C gibi uygun koşullarda muhafaza edilmesi, DNA bütünlüğünü yüksek oranda koruduğundan, komet testi için daha avantajlı bir yöntem olarak değerlendirilmektedir.



Şekil 3.4. Tam kan ve izole lenfositlerin 1 ay -20°C ve -80°C’de saklama çözeltisi ilavesi ve direkt olarak saklanması sonrasında komet testi ile elde edilen kuyruk yoğunluğu (DNA hasarı) sonuçları. *saklama çözeltisi ilavesi ile direkt saklamanın dna hasarı üzerine etkisi, #-20°C ve -80°C’de saklamanın dna hasarı üzerine etkisi (p<0.05, one-way Anova)

1.Ay Sonunda Tam Kan ve İzole Lenfosit Örneklerinde Saklama Koşullarına Göre DNA Hasarının Karşılaştırılması

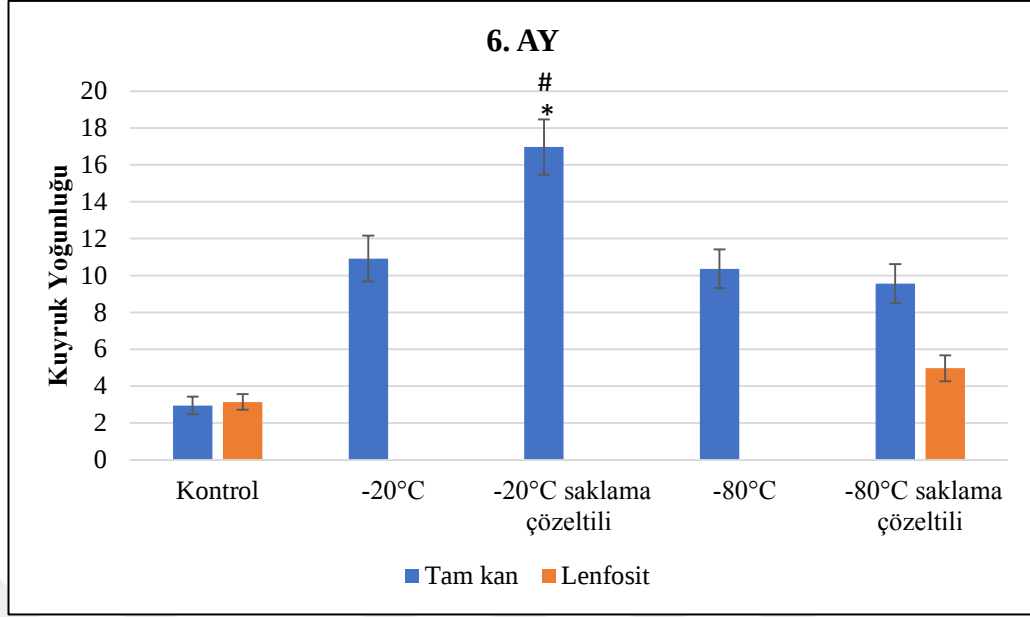
Şekil 3.4’te, tam kan ve izole lenfosit örneklerinin -20°C ve -80°C’de, bir kısmı saklama çözeltisi (SÇ) ilave edilerek, bir kısmı ise doğrudan (SÇ’siz) saklanması sonucunda 1 ay sonunda yapılan Komet testi bulguları sunulmaktadır. Elde edilen kuyruk yoğunluğu değerlerine göre, saklama çözeltisinin tam kan örnekleri için uygun olmadığı görülmüştür. Saklama çözeltisi ilavesiyle saklanan tam kan örneklerinde, doğrudan saklananlara kıyasla DNA hasarı istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek bulunmuştur (p<0.05). Buna karşılık, izole lenfositlerde saklama çözeltisi kullanımı DNA hasarını anlamlı şekilde azaltmıştır; bu durum, izole lenfositlerin uzun süreli saklanması saklama çözeltisinin koruyucu etkisini ortaya koymaktadır. Ayrıca, -20°C ve -80°C koşulları karşılaştırıldığında, izole lenfositlerin saklama çözeltisi eşliğinde -80°C’de muhafaza edilmesinin DNA bütünlüğünü en iyi şekilde koruduğu ve DNA hasarının istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha düşük olduğu belirlenmiştir.



Şekil 3.5. Tam kan ve izole lenfositlerin 3 ay -20°C ve -80°C’de saklama çözeltisi ilavesi ve direkt olarak saklanması sonrasında komet testi ile elde edilen kuyruk yoğunluğu (DNA hasarı) sonuçları. *saklama çözeltisi ilavesi ile direkt saklamanın dna hasarı üzerine etkisi, #-20°C ve -80°C’de saklamanın dna hasarı üzerine etkisi (p<0.05, one-way Anova)

3.Ay Sonunda Tam Kan ve İzole Lenfosit Örneklerinde Saklama Koşullarına Göre DNA Hasarının Karşılaştırılması

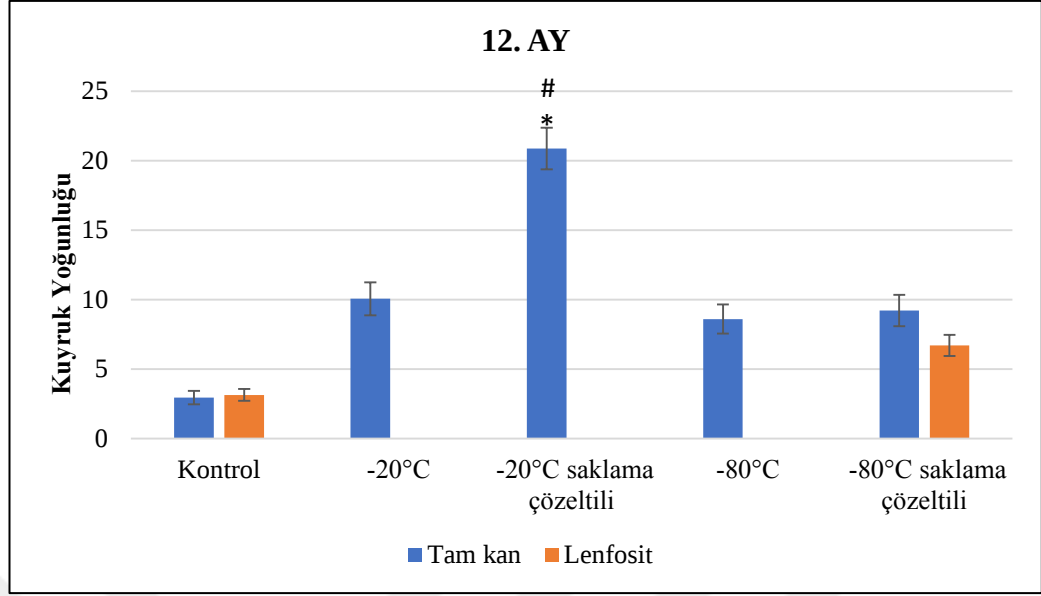
Şekil 3.5’de, tam kan ve izole lenfosit örneklerinin 3 ay boyunca -20°C ve -80°C’de, saklama çözeltisi (SÇ) ilave edilerek veya doğrudan (SÇ’siz) saklanması sonrasında uygulanan Komet testi sonuçlarına göre elde edilen kuyruk yoğunluğu (% DNA in tail) değerleri sunulmuştur. Saklama çözeltisinin varlığı açısından değerlendirildiğinde, tam kan örneklerinde SÇ ilavesi DNA hasarını artırmış ve bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p<0.05). Buna karşılık, izole lenfosit örneklerinde SÇ ilavesi ile DNA hasarının anlamlı düzeyde azaldığı ve hücresel bütünlüğün daha iyi korunduğu görülmüştür. Özellikle -20°C’de, SÇ ilave edilmeden saklanan izole lenfositlerde ciddi düzeyde DNA hasarı meydana gelmiş ve bu örneklerde ghost hücre oluşumu nedeniyle hücreler Comet Assay analiz yazılımı tarafından değerlendirilememiştir. Buna karşın, -80°C’de SÇ ile saklanan izole lenfositlerde DNA hasarı, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermemiştir. Bu sonuç, uygun koşullarda (SÇ + -80°C) izole lenfositlerin uzun süreli saklanması DNA bütünlüğü açısından kontrol düzeyine yakın koruma sağladığını göstermektedir.



Şekil 3.6. Tam kan ve izole lenfositlerin 6 ay -20°C ve -80°C’de saklama çözeltisi ilavesi ve direkt olarak saklanması sonrasında komet testi ile elde edilen kuyruk yoğunluğu (DNA hasarı) sonuçları. *saklama çözeltisi ilavesi ile direkt saklamanın dna hasarı üzerine etkisi, #-20°C ve -80°C’de saklamanın dna hasarı üzerine etkisi (p<0.05, one-way Anova)

6.Ay Sonunda Tam Kan ve İzole Lenfosit Örneklerinde Saklama Koşullarına Göre DNA Hasarının Karşılaştırılması

Şekil 3.6’da, tam kan ve izole lenfosit örneklerinin -20°C ve -80°C’de, saklama çözeltisi (SÇ) ilavesiyle veya doğrudan (SÇ’siz) 6 ay süreyle saklanması sonrasında yapılan Komet testi ile elde edilen DNA hasarı (kuyruk yoğunluğu) sonuçları sunulmaktadır. Bu analizde, bazı gruplarda ghost hücre oluşumu nedeniyle ölçüm yapılamamış, bu durum ilgili gruplarda grafik sütununun yer almamasıyla gösterilmiştir. Özellikle -20°C’de hem doğrudan saklanan hem de SÇ ilavesiyle saklanan izole lenfosit örneklerinde ciddi hücresel bozulma meydana gelmiş ve bu örnekler Comet Assay analiz yazılımı tarafından değerlendirilememiştir. Benzer şekilde, -80°C’de SÇ ilavesi olmadan doğrudan saklanan izole lenfositlerde de ghost hücre oluşumu gözlenmiştir. Buna karşın, -80°C’de SÇ ilavesi ile saklanan izole lenfosit örneklerinde DNA hasarı düşük düzeyde kalmış ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir (p>0.05). Bu durum, 6 ay boyunca optimum DNA bütünlüğü korunmasının yalnızca SÇ varlığında -80°C koşulunda sağlandığını göstermektedir. Tam kan örneklerinde ise tüm gruplar analiz edilebilir nitelikte kalmış, ghost hücre oluşumu gözlenmemiştir. Bu bulgular, genel olarak tam kanın izole lenfositlere kıyasla daha dayanıklı olduğunu; ancak uzun süreli saklamalarda saklama çözeltisi ilavesiyle birlikte izole lenfositlerin daha etkin korunabildiğini ortaya koymaktadır.



Şekil 3.7. Tam kan ve izole lenfositlerin 12 ay -20°C ve -80°C’de saklama çözeltisi ilavesi ve direkt olarak saklanması sonrasında komet testi ile elde edilen kuyruk yoğunluğu (DNA hasarı) sonuçları. *saklama çözeltisi ilavesi ile direkt saklamanın dna hasarı üzerine etkisi, #-20°C ve -80°C’de saklamanın dna hasarı üzerine etkisi (p<0.05, one-way Anova)

12.Ay Sonunda Tam Kan ve İzole Lenfosit Örneklerinde Saklama Koşullarına Göre DNA Hasarının Karşılaştırılması

Şekil 3.7’da, tam kan ve izole lenfosit örneklerinin -20°C ve -80°C’de, saklama çözeltisi (SÇ) ilavesiyle veya doğrudan (SÇ’siz) 12 ay süreyle saklanması sonrasında yapılan komet testi ile elde edilen DNA hasarı (kuyruk yoğunluğu) sonuçları sunulmaktadır. Bu analizde, bazı gruplarda ghost hücre oluşumu nedeniyle ölçüm yapılamamış, bu durum ilgili gruplarda grafik sütununun yer almamasıyla gösterilmiştir. Özellikle -20°C’de hem doğrudan saklanan hem de SÇ ilavesiyle saklanan izole lenfosit örneklerinde ciddi hücresel bozulma meydana gelmiş ve bu örnekler Comet Assay analiz yazılımı tarafından değerlendirilememiştir. Benzer şekilde, -80°C’de SÇ ilavesi olmadan doğrudan saklanan izole lenfositlerde de ghost hücre oluşumu gözlenmiştir. Buna karşın, -80°C’de SÇ ilavesi ile saklanan izole lenfosit örneklerinde DNA hasarı düşük düzeyde kalmış ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir (p>0.05). Bu durum, 12 ay boyunca optimum DNA bütünlüğü korunmasının yalnızca SÇ varlığında -80°C koşulunda sağlandığını göstermektedir. Tam kan örneklerinde ise tüm gruplar analiz edilebilir nitelikte kalmış, ghost hücre oluşumu gözlenmemiştir. Bu bulgular, genel olarak tam kanın izole lenfositlere kıyasla daha dayanıklı olduğunu; ancak uzun süreli saklamalarda saklama çözeltisi ilavesiyle birlikte izole lenfositlerin daha etkin korunabildiğini ortaya koymaktadır.

4. TARTIŞMA

Komet testi (alkali tek hücre jel elektroforezi), hücrelerde meydana gelen DNA tek ve çift zincir kırıklarını saptamak için kullanılan hassas ve güvenilir bir biyobelirteç analiz yöntemidir. İlk kez Singh ve arkadaşları (1988) tarafından tanımlanan bu yöntem, DNA hasarının nicel ve nitel değerlendirilmesini sağlayan düşük maliyetli ve hızlı bir analiz tekniğidir (Singh vd., 1988). Komet testi, genellikle periferik kan lenfositlerinde kullanılsa da, sperm hücreleri, doku kültürü hücreleri, organoidler ve çeşitli hayvansal dokularda da başarıyla uygulanabilmektedir. Yöntem hem çevresel maruziyetin biyomarker analizi, hem de genotoksikite ve DNA onarım kapasitesinin değerlendirilmesinde yaygın biçimde kullanılmaktadır (Collins, 2004; Azqueta & Collins, 2013).

Yöntemin özgünlüğü ve tekrarlanabilirliği, analiz edilen hücre tipine, elektroforez koşullarına, görüntü analiz yazılımına ve örnek hazırlama prosedürlerine göre değişebilmektedir. Bu nedenle “Minimum Information for Reporting on the Comet Assay” (MIRCA) gibi standart protokol önerileri geliştirilmiştir. MIRCA, komet testinde metodolojik varyasyonu azaltmayı ve veri kalitesini artırmayı hedefleyen bir raporlama sistemidir (Møller vd., 2020).

Özellikle insan biyomonitorizasyon çalışmalarında DNA hasarı düzeylerinin değerlendirilmesinde en yaygın kullanılan metotlardan biri olan komet testi, düşük düzeyde DNA bozulmalarını bile saptayabildiği için erken dönemde genotoksik etkilere karşı oldukça duyarlıdır (Fairbairn vd., 1995; Collins vd., 2014). Collins ve vd. (2014) çalışması özellikle çok merkezli insan biyomonitorizasyon çalışmalarında komet testinin standardizasyonu ve kullanımına odaklanarak yöntemin güvenilirliğini vurgulamaktadır. Buna ek olarak, DNA onarım kapasitesini değerlendirmek üzere “challenge comet assay” gibi modifiye protokoller geliştirilmiştir. Bu protokoller, hücrelerin DNA hasarına karşı verdiği yanıtı değerlendirme açısından önemli katkılar sunmaktadır (Valdiglesias vd., 2020). Böylece sadece hasarın varlığı değil, hücrenin hasarı tamir etme kapasitesi de analiz edilebilmektedir. Sonuç olarak, komet testi, genetik toksisite değerlendirmeleri, maruziyet analizleri ve DNA onarım dinamiklerinin anlaşılmasında temel bir araç haline gelmiştir. Ancak elde edilen verilerin güvenilirliği, yöntemin doğru uygulanması ve örnek koşullarının dikkatli biçimde standartlaştırılmasına bağlıdır.

Hem tam kan hem izole lenfositlerin birlikte değerlendirilmesi, farklı örnek tiplerinin karşılaştırmalı analizine olanak tanımış ve çalışmanın kapsamını güçlendirmiştir. Marino ve arkadaşları (2021), tam kan ve PBMC'lerin uzun dönem saklama koşullarına tepkilerini karşılaştırarak benzer şekilde örnek tipine özgü farklılıkların önemli olduğunu vurgulamışlardır (Marino vd., 2021).

Uzun süreli saklama koşullarının sistematik incelenmesi, -20°C ve -80°C ortamlarının DMSO içeren ve içermeyen koşullarda kıyaslanmasını mümkün kılarak literatürdeki önemli bir boşluğu doldurmuştur. Marino vd. (2021), -80°C 'de 12 aya kadar saklamanın genel olarak DNA stabilitesini koruduğunu, ancak özellikle PBMC örneklerinde 6. aydan itibaren DNA hasarında hafif fakat anlamlı bir artış izlendiğini bildirmiştir. Bu bulgular, çalışmamızdaki uzun dönem gözlemleri destekler niteliktedir.

Küçük hacimli örneklerin saklanabilmesinin doğrulanması, komet testi uygulamalarında hem pratiklik hem de kaynak kullanımında tasarruf sağlamıştır. Al-Salmani (2011), yalnızca 250 μL tam kan örneğinin herhangi bir kriyoprotektan eklenmeden -80°C 'de bir ay boyunca saklanabileceğini ve bu sürenin sonunda komet testi için geçerli sonuçlar verdiğini göstermiştir. Bu bulgu, çalışmamızda küçük hacimli örneklerin tercih edilmesi yönündeki metodolojik yaklaşımı desteklemektedir.

Kriyoprezervasyon sonrası DNA hasarı ve onarım kapasitesinin değerlendirilebilmesi, farklı örnek tiplerinde güvenilir ölçüm yapılmasına olanak tanımış ve uzun dönem saklama koşullarının etkilerinin daha kapsamlı incelenmesini mümkün kılmıştır. Bankoğlu ve arkadaşları (2021), insan kanı, buffy coat ve PBMC örneklerinin dondurulup çözöldükten sonra komet testiyle hem DNA hasarının hem de onarım kapasitelerinin güvenle ölçülebildiğini göstermiştir. Bu bulgu, çalışmamızda izole lenfositlerin uzun dönem boyunca DMSO varlığında korunabildiğine dair sonuçlarla örtüşmektedir (Bankoğlu vd., 2021).

Çalışmamızda ghost hücrelerin ve sayılamayan hücrelerin raporlanması, komet testi analizlerinde çoğu araştırmada ihmal edilen ancak sonuçların güvenilirliği için kritik bir ayrıntıdır. Karbaschi ve arkadaşları (2019), lizis süresi, tampon çözeltinin tazeliği ve ışığa maruz kalma gibi protokol adımlarındaki farklılıkların DNA hasarı sonuçlarını doğrudan etkilediğini ve bu nedenle bu tür metodolojik ayrıntıların raporlanmasının zorunlu olduğunu vurgulamışlardır.

Bu çalışmada kan alımını takiben ilk yedi gün boyunca tam kan ve izole lenfosit örnekleri oda sıcaklığı (OS) ve $+4^{\circ}\text{C}$ koşullarında komet testi ile değerlendirilmiştir. Elde

edilen bulgular, kısa vadede tam kan örneklerinin daha stabil kaldığını, buna karşılık izole lenfositlerde 3.–4. günlerden itibaren DNA hasarının anlamlı biçimde arttığını göstermiştir. Ayrıca, oda sıcaklığında saklanan tam kan örneklerinde 5. günden sonra hücresel bütünlük bozulmuş ve ghost hücrelerin yoğunluğu nedeniyle analiz yapılamamıştır. Bu durum, izole lenfositlerin tam kana kıyasla kısa sürede daha hassas olduğunu ortaya koymuştur.

Baydaş ve arkadaşları (2021), tam kan ve lenfosit örneklerinin +4°C’de 1–7 gün saklanması DNA hasarı üzerinde anlamlı bir etki yaratmadığını ve genotoksisite sonuçlarının minimal düzeyde kaldığını bildirmiştir. Bu bulgu, çalışmamızda tam kanın +4°C’de görece düşük DNA hasarı göstermesiyle uyumludur. Ancak izole lenfositlerde 3.–4. günden itibaren görülen DNA hasar artışı, Baydaş’ın verilerinden kısmen farklılık göstermektedir. Bu farklılık donör özellikleri, izolasyon sürecinde oluşabilecek hücresel stres ve saklama çözeltisinin kullanılıp kullanılmaması gibi faktörlerle açıklanabilir (Baydaş vd., 2021).

Volobaev ve arkadaşları (2021), hem insan periferik kan lökositlerinde hem de fibroblast hücrelerinde yalnızca 6–24 saatlik kısa süreli saklamanın bile DNA göçünü artırdığını rapor etmiştir. Bu sonuç, komet testinin sadece günler değil, saatler içinde bile DNA hasarındaki değişimleri yakalayabildiğini göstermektedir. Çalışmamızda izole lenfositlerde 3. günden itibaren gözlenen DNA hasar artışı, Volobaev’in kısa süreli duyarlılık bulgularının gün ölçeğine yansımış hali olarak yorumlanabilir.

Marino ve arkadaşları (2021), tam kan ve PBMC örneklerini değerlendirerek kısa süreli saklamalarda DNA hasarının sınırlı kaldığını, ancak uzun süreli koşullarda PBMC’lerin daha hassas olduğunu bildirmiştir. Bizim çalışmamızda da kısa vadede tam kanın ölçülebilir ve daha stabil kalması, izole lenfositlerin ise daha erken bozulmaya başlaması bu literatür bulgularıyla uyumludur.

Ayrıca, MIRCA kılavuzunda (Møller vd., 2020) belirtildiği üzere, gecikme süresi, saklama sıcaklığı, tamponların tazeliği ve lizis koşulları gibi pre-analitik değişkenler laboratuvarlar arası varyasyonu artırmaktadır. Özellikle agaroz konsantrasyonu, alkali inkübasyon süresi ve elektroforez parametrelerinin sıkı kontrol altında tutulması gerektiği vurgulanmıştır (Collins, 2014). Çalışmamızda oda sıcaklığında 5. günden itibaren görülen ghost hücre oluşumları, pre-analitik koşulların komet sonuçlarını doğrudan etkileyebileceğine dair önemli bir göstergedir.

Sonuç olarak, kısa süreli saklamalarda tam kanın izole lenfositlere kıyasla daha stabil olduğu, özellikle ilk 48 saat içinde güvenilir sonuçlar verdiği söylenebilir. İzole lenfositlerin ise oda sıcaklığında en fazla 2 gün, +4 °C’de ise en fazla 3 gün boyunca kullanılabilir olduğu değerlendirilmektedir. Daha uzun süreli saklamalarda DNA hasarındaki artış ve ghost hücre oluşumu nedeniyle analizlerin güvenilirliği azalmaktadır.

Bu çalışmada –20 °C ve –80 °C’de hem doğrudan (saklama çözeltisi olmaksızın) hem de DMSO içeren koşullarda saklanan tam kan ve izole lenfosit örnekleri 1., 3., 6. ve 12. aylarda komet testi ile değerlendirilmiştir. Bulgular, özellikle izole lenfositlerde –80 °C ve DMSO kombinasyonunun DNA bütünlüğünü en iyi koruduğunu, buna karşın –20 °C’de, özellikle kriyoprotektansız koşullarda ghost hücre oluşumunun belirginleştiğini göstermiştir. Tam kan örneklerinde ölçümler yapılabilmiş olsa da bazı noktalarda DMSO eklenmesi DNA göçünü artırmıştır. Bu durum, örnek tipine göre saklama çözeltisinin farklı etkiler gösterebileceğine işaret etmektedir.

Marino ve arkadaşları (2021), tam kan ve PBMC örneklerini 12 aya kadar –80 °C’de saklamış; 4 aya kadar DNA hasarında anlamlı değişiklik saptanmazken, 6. aydan itibaren DNA hasarının belirginleştiğini rapor etmiştir. Ayrıca tam kan örneklerinde bazal DNA hasarının PBMC’lere göre daha yüksek olabileceği de belirtilmiştir. Bu bulgular, bizim çalışmamızda özellikle 6–12. aylarda izlenen DNA hasarı artışlarıyla uyumludur.

Møller ve arkadaşları (2021), farklı kan fraksiyonlarının (tam kan, buffy coat, PBMC) uygun protokollerle saklanması halinde DNA hasarında yalnızca minimal düzeyde artış gözlemlendiğini, ayrıca DNA onarım kapasitelerinin güvenilir biçimde değerlendirilebildiğini vurgulamışlardır. Bu bilgi, çalışmamızda –80 °C’de DNA stabilitesinin büyük ölçüde korunmasıyla örtüşmektedir.

Baydaş ve arkadaşları (2021), kısa ve uzun süreli saklama koşullarını değerlendirdikleri çalışmalarında özellikle izole hücrelerde –20 °C’nin DNA bütünlüğünü korumada yetersiz olduğunu bildirmiştir. Çalışmamızda –20 °C’de saklanan izole lenfositlerde görülen ghost hücreler de bu bulguyu destekler niteliktedir.

Bankoğlu ve arkadaşları (2021) ise tam kan, buffy coat ve PBMC’lerin kriyoprezervasyon sonrası komet testi ile DNA hasarının ve DNA onarımının güvenilir biçimde ölçülebildiğini göstermiştir. Bununla birlikte, protokol ayrıntılarının (dondurma–çözme hızı, DMSO konsantrasyonu) belirleyici olduğu özellikle vurgulanmıştır. Bu sonuç,

bizim çalışmamızda DMSO'nun izole lenfositlerde koruyucu etki sağlarken tam kanda her zaman aynı faydayı göstermemesini açıklayabilir.

Sonuç olarak, uzun süreli saklamalarda izole lenfositlerin -80°C + DMSO kombinasyonu ile korunması DNA bütünlüğünü sağlamada en uygun koşul olarak öne çıkmaktadır. Tam kan örnekleri kısa vadede daha dayanıklı görünse de uzun süreli saklamalarda DNA hasarı artmaktadır ve saklama çözeltisinin olası yan etkileri dikkate alınmalıdır. -20°C koşulları uzun dönem saklama için uygun değildir; özellikle izole lenfositlerde ghost hücre artışı nedeniyle analizler güvenilir şekilde gerçekleştirilememektedir.

Bu çalışmada kullanılan DMSO içeren saklama çözeltisinin etkileri örnek tipine göre farklılık göstermiştir. Bulgular, izole lenfositlerde DMSO'nun özellikle -80°C koşullarında DNA bütünlüğünü koruduğunu, buna karşılık tam kan örneklerinde bazı zaman noktalarında DNA hasarını artırabildiğini göstermektedir. Bu durum, literatürdeki bulgularla da desteklenmektedir.

Bankoğlu ve arkadaşları (2021), PBMC'lerin dondurulmasında %10 DMSO kullanımının DNA bütünlüğünü koruduğunu, çözündürme sonrası kısa bir toparlanma (recovery) süresi ile güvenilir komet analizleri yapılabildiğini rapor etmiştir. Bu bulgu, çalışmamızda izole lenfositlerde DMSO ile DNA hasarındaki azalmanın gözlenmesiyle uyumludur.

Pu ve arkadaşları (2016) da insan kanında yaptıkları çalışmada, %10 DMSO ile -80°C koşullarında saklanan örneklerin hem alkali hem de Fpg-modifiye komet testi için uygun olduğunu göstermiştir. Bu çalışma, izole lenfositlerde DMSO'nun koruyucu mekanizmasını desteklemektedir. Buna karşılık, Ladeira ve arkadaşları (2019) tam kan, buffy coat ve PBMC'lerde kriyoprezervasyonun DNA hasarı üzerine etkilerini karşılaştırmış; tam kanın bazı koşullarda kriyoprotektansız da güvenle saklanabileceğini belirtmiştir. Benzer şekilde Koppen ve arkadaşları (2018) de tam kan için uygun protokollerle kriyoprotektansız koşullarda komet analizinin güvenilir yapılabileceğini rapor etmiştir. Bu çalışmalar, çalışmamızda tam kanda DMSO eklenmesiyle gözlenen DNA hasarı artışını açıklamakta; tam kan matriksinde DMSO'nun her zaman koruyucu etki göstermediğini teyit etmektedir. Bu farklılığın mekanizması kısmen DMSO'nun eritrositler üzerindeki etkileriyle açıklanabilir. Yi ve arkadaşları (2017), DMSO'nun eritrositlerde geçirgenliği değiştirdiğini, düşük konsantrasyonlarda bile hemolizi artırabildiğini ve buna bağlı oksidatif stres oluşturabileceğini göstermiştir. Benzer şekilde, Gironi ve arkadaşları (2020) DMSO'nun

biyolojik membranların mekanik ve yapısal özelliklerini değiştirdiğini bildirmiştir. Bu mekanizmalar, tam kan örneklerinde DMSO'nun bazen DNA hasarını artırabilmesinin olası nedenlerindendir. Sonuç olarak, DMSO izole lenfositlerde $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ koşullarında DNA bütünlüğünü koruyan etkili bir kriyoprotektandır. Ancak tam kan örneklerinde eritrosit-plazma matrisi nedeniyle DMSO'nun etkisi daha karmaşık olup, bazı durumlarda DNA göçünü artırabilmektedir. Bu nedenle, izole lenfositlerde $-80\text{ }^{\circ}\text{C} + \%10$ DMSO önerilirken, tam kan için DMSO'suz saklama protokollerinin de güvenilir olabileceği dikkate alınmalıdır.

Bu çalışmada bazı gruplarda (özellikle $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ve kriyoprotektansız koşullarda uzun süreli saklamada) ghost hücre oluşumu nedeniyle Comet Assay yazılımının hücreleri sayamadığı gözlenmiştir. Skorlama ve raporlama ilkeleri açısından, güncel kılavuz ve validasyon çalışmalarında ghost/hedgehog hücrelerin standart DNA hasarı parametrelerine (%Tail DNA, OTM) dahil edilmemesi, bunun yerine ayrı bir son nokta olarak raporlanması önerilmektedir. Örneğin bir OECD (2016) doğrulama çalışmasında, hücreler “skorlanabilir”, “skorlanamaz” ve “hedgehog” olarak sınıflandırılmış; hedgehog hücreler kaydedilmiş ancak istatistiksel analize dahil edilmemiştir. Benzer biçimde MIRCA kılavuzu (Møller vd., 2020) ve görsel skorlama rehberi (Møller vd., 2023) ghost hücre oranlarının mutlaka açıkça raporlanmasını ve bu hücrelerin DNA hasarı metriklerinden ayrı tutulmasını önermektedir.

Ghost hücrelerin artışı çoğunlukla sitotoksosite artışıyla paralel seyretmektedir. Bu nedenle komet testi ile birlikte mutlaka viabilite/sitotoksosite testleri (örn. Trypan blue, MTT, LDH, koloni oluşumu) uygulanmalıdır. Azqueta ve arkadaşları (2022), komet testinde yanlış-pozitif sonuçların önlenmesi için sitotoksosite düzeyinin kontrol edilmesi gerektiğini ve yaklaşık %25 canlılık kaybının pratik bir eşik değeri olarak kullanılabileceğini önermektedir. Cordelli ve arkadaşları (2021) da benzer şekilde nanomalzeme çalışmalarında sitotoksositeye yol açan dozlardan kaçınılması gerektiğini belirtmiştir.

Bu çalışmada $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de (özellikle kriyoprotektansız koşullarda) saklanan izole lenfositlerde ghost hücre artışı gözlenmiştir. Bu durum, buz kristali oluşumu ve osmotik stresin hücre zarını ve çekirdek bütünlüğünü bozmasıyla açıklanabilir. Buna karşılık $-80\text{ }^{\circ}\text{C} + \%10$ DMSO koşullarında saklanan izole lenfositlerde DNA bütünlüğünün korunduğu görülmüştür. Bu bulgu, literatürde DMSO'nun buz kristali oluşumunu azaltarak DNA yapısını koruduğuna dair raporlarla uyumludur. Sonuç olarak ghost hücreler, yalnızca aşırı DNA hasarının değil, aynı zamanda sitotoksosite ve pre-analitik stresin göstergesi olarak değerlendirilmelidir. Bu nedenle laboratuvarlar arası karşılaştırmalarda ghost hücrelerin ayrı

bir parametre olarak raporlanması ve MIRCA standartlarına uygun biçimde kayıt altına alınması büyük önem taşımaktadır (Møller vd., 2020; Møller vd., 2023).

Bu çalışmada kısa süreli (+4 °C ve oda sıcaklığı) ve uzun süreli (-20 °C/-80 °C) saklama koşullarında tam kan ile izole lenfositlerin komet testi sonuçları karşılaştırıldığında, kısa vadede tam kanın analitik olarak daha stabil kaldığı (ghost hücre oluşumunun daha geç başladığı), uzun vadede ise izole lenfositlerin doğru kriyoprotektan ve sıcaklık kombinasyonu (özellikle -80 °C + DMSO) altında DNA bütünlüğünü daha iyi koruyabildiği görülmüştür (Marino vd., 2021; Koppen vd., 2018; Ladeira vd., 2019; Bankoğlu vd., 2021; Møller vd., 2021).

Kısa süreli saklama koşullarında (ilk 1–7 gün), izole lenfositlerde hücre izolasyonunun mekanik/osmotik yükü ve tampon değişimi nedeniyle erken dönemde DNA göçü artışı ve ghost hücre eğilimi daha çabuk ortaya çıkarken; tam kanın plazma ve eritrosit içeriği, ilk 48–72 saatte kısmi tamponlama etkisi oluşturabilmektedir. Volobaev ve arkadaşları (2021), yalnızca saatler ölçeğinde bile (6–24 saat) saklama/işleme gecikmelerinin komet metriklerini etkilediğini; Baydaş ve arkadaşları (2021) ise +4 °C’de ilk hafta için DNA hasarındaki değişimlerin sınırlı kaldığını bildirmiştir. Bu bulgular, çalışmamızda kısa vadede tam kanın ölçülebilirliği ve izole lenfositlerin kırılabilirliği yönündeki gözlemlerimizle örtüşmektedir (Volobaev vd., 2021; Baydaş vd., 2021).

Uzun süreli saklama koşullarında ($\geq$ 1–12 ay), uygun şekilde korunmuş izole lenfositler/PBMC’ler -80 °C + %10 DMSO ile DNA bütünlüğünü daha iyi korumaktadır. Buna karşın -20 °C saklama, özellikle kriyoprotektansız koşullarda, buz kristali ve osmotik stres nedeniyle nükleer yapı bozulmasına ve ghost hücre artışına yol açmaktadır. Bankoğlu ve arkadaşları (2021), tam kan, buffy coat ve PBMC’lerin kriyoprezervasyon sonrası Comet Assay yazılımı ile güvenilir biçimde değerlendirilebildiğini; ancak protokol ayrıntılarının (dondurma-çözme hızı, DMSO kullanımı) belirleyici olduğunu göstermiştir. Møller ve arkadaşları (2021) ise farklı kan fraksiyonlarının biyobanka materyali olarak küçük/orta düzey bazal etkilerle saklanabildiğini, fakat ayrıntılı raporlama gerektirdiğini vurgulamıştır (Bankoğlu vd., 2021; Møller vd., 2021).

Bazal hasar düzeyi açısından bakıldığında, Marino ve arkadaşları (2021), 12 aylık izlemede tam kan örneklerinde hem taze hem donmuş durumda PBMC’ye kıyasla bazal DNA hasarının daha yüksek olduğunu ve özellikle 6. aydan itibaren hasar artışının belirginleştiğini rapor etmiştir. Bu bulgu, çalışmamızda uzun vadede tam kanda DNA hasarının daha fazla olmasına ilişkin gözlemlerle uyumludur (Marino vd., 2021).

Tam kanın pratik üstünlüğü ile izolasyonun getirisi karşılaştırıldığında, Koppen ve arkadaşları (2018), tam kan için optimize edilmiş kriyoprezervasyon protokolleriyle düşük hacimli örneklerden güvenilir komet ölçümleri yapılabileceğini göstermiştir. Ladeira ve arkadaşları (2019) ise farklı kan fraksiyonlarında (tam kan, buffy coat, PBMC) kriyoprezervasyonun DNA hasarına etkilerini karşılaştırarak örnek tipine özgü protokol gerekliliğini vurgulamıştır (Koppen vd., 2018; Ladeira vd., 2019).

Örnek tipine bağlı farklılıkları doğru yorumlamak için ise standartlaştırma ve karşılaştırılabilirlik önemlidir. MIRCA kılavuzu, pre-analitik değişkenlerin (gecikme süresi, sıcaklık, lizis/alkali koşulları, elektroforez parametreleri, DMSO yüzdesi, dondurma/çözme hızı) ayrıntılı biçimde raporlanmasını önermektedir. Çok merkezli çalışmalar için dondurulmuş PBMC/buffy coat örneklerinin kullanımı ve yöntemsel tutarlılık önemlidir (Møller vd., 2021; Bankoğlu vd., 2022; Collins, 2014).

Sonuç olarak kısa vadeli ölçümler ($\leq 48-72$ saat) için tam kan pratik ve güvenilir bir seçenek sunarken; uzun vadeli saklama ihtiyacında izole lenfosit/PBMC örneklerinin $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ve DMSO ile korunması DNA stabilitesi açısından daha uygundur.

Bu çalışmada elde edilen bulgular, komet testi ile DNA hasarının örnek tipi (tam kan vs. izole lenfosit), saklama sıcaklığı (oda sıcaklığı, $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$) ve saklama çözeltisinin varlığına bağlı olarak farklılık gösterdiğini ortaya koymuştur. Literatürde yapılan benzer çalışmalarla karşılaştırıldığında, elde edilen sonuçların büyük ölçüde uyumlu olduğu, ancak bazı koşullarda çelişkili bulguların da yer aldığı görülmektedir.

Kısa süreli saklama koşullarına bakıldığında, çalışmamızda $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de kısa süreli saklamada DNA hasarının görece düşük düzeyde kaldığı, ancak izole lenfositlerde 3–4. günden itibaren anlamlı artış gözleendiği tespit edilmiştir. Baydaş ve arkadaşları (2021), $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de hem tam kan hem de izole lenfositlerde 1 haftaya kadar DNA hasarının sınırlı kaldığını bildirmiştir. Bizim çalışmamızda izole lenfositlerde daha erken artışın gözlenmesi, muhtemelen izolasyon işleminden kaynaklanan ek stresle açıklanabilir (Baydaş vd., 2021).

Uzun süreli saklama koşullarına bakıldığında, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de DMSO ilavesiyle saklanan izole lenfositlerde DNA bütünlüğünün büyük ölçüde korunduğu sonucumuz, Bankoğlu ve arkadaşlarının (2021) ve Marino ve arkadaşlarının (2021) bulgularıyla uyumludur. Her iki çalışma da $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de DMSO varlığında uzun süreli saklamanın DNA hasarını minimal düzeyde tuttuğunu rapor etmiştir. Buna karşın $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de kriyoprotektansız saklama

koşullarında ghost hücre oluşumunun artışı, bizim çalışmamızda da gözlenmiş ve literatürde de bu durum DNA bütünlüğünü bozucu bir faktör olarak tanımlanmıştır (Ladeira vd., 2019).

Tam kan ve PBMC karşılaştırıldığında, Marino ve arkadaşları (2021), tam kan örneklerinde bazal DNA hasarının PBMC'lere kıyasla daha yüksek olduğunu, ancak kısa süreli saklamada bu farkın sınırlı kaldığını belirtmiştir. Bizim bulgularımız da kısa vadede tam kanın daha stabil olduğunu, fakat uzun vadede izole lenfositlerin DMSO ile daha iyi korunduğunu göstermektedir. Koppen ve arkadaşları (2018) ise tam kanın uygun protokollerle kriyoprezervasyona uygun olduğunu, ancak PBMC'lerin araştırma amaçlı uzun dönem saklama için daha elverişli olduğunu vurgulamıştır.

Ghost hücre oluşumu açısından değerlendirildiğinde, çalışmamızda -20°C koşullarında izole lenfositlerde gözlenen ghost hücreler, Lorenzo ve arkadaşlarının (2013) komet testinde "hedghog/ghost" morfolojilerinin sıklıkla ileri sitotoksositeye işaret ettiğini bildiren çalışmalarıyla uyumludur. Bu da DNA hasarının yalnızca genotoksosite değil, aynı zamanda sitotoksosite parametreleri ile birlikte değerlendirilmesi gerektiğini ortaya koymaktadır.

Çelişkili bulgular açısından bakıldığında, literatürde bazı çalışmalar tam kanın daha yüksek bazal hasara sahip olduğunu (Marino vd., 2021), bazıları ise kısa süreli saklamada tam kanın daha güvenilir olduğunu (Baydaş vd., 2021) göstermiştir. Bu farklılıklar, büyük olasılıkla donör özellikleri, örnek işleme hızları, kullanılan tamponlar ve elektroforez koşullarındaki farklılıklardan kaynaklanmaktadır. Bu nedenle çalışmamızın sonuçları, genel eğilimi desteklemekle birlikte, metodolojik farklılıklar nedeniyle bazı noktalarda ayrılmaktadır.

Sonuç olarak, bulgularımız literatürle büyük ölçüde örtüşmekte; özellikle -80°C + DMSO kombinasyonunun DNA bütünlüğünü koruyucu etkisi evrensel olarak teyit edilmektedir. Ancak kısa vadede tam kan ve izole lenfositler arasındaki farklılıkların, izolasyon işlemleri ve laboratuvarlar arası metodolojik değişkenlerden etkilendiği unutulmamalıdır.

Bu çalışma, örnek tipi (tam kan ve izole lenfosit), saklama süresi ve sıcaklığı ile saklama çözeltisinin (DMSO) komet testi sonuçlarını anlamlı biçimde etkilediğini ortaya koymuştur. Kısa vadede ($\leq 48-72$ saat) tam kan örnekleri, analiz edilebilirlik ve hücrel morfolojik bütünlük açısından izole lenfositlere kıyasla daha stabil kalmıştır. Buna karşılık

uzun vadede ($\geq 1-12$ ay), izole lenfositlerin -80°C 'de DMSO varlığında saklandığında DNA bütünlüğünü daha iyi koruduğu doğrulanmıştır (Bankoğlu vd., 2021; Marino vd., 2021).

Klinik ve biyomonitorizasyon uygulamaları açısından, pre-analitik aşamadaki gecikme ve saklama sıcaklığı en kritik belirleyicilerdir. Çok merkezli araştırmalar, kısa süreli saklamalarda $+4^{\circ}\text{C}$ 'nin DNA hasarını minimal düzeyde tuttuğunu, buna karşın oda sıcaklığında özellikle izole hücrelerde erken dönemde DNA hasarının belirginleştiğini göstermektedir. Uzun süreli saklama için -80°C ve uygun kriyoprotektan kullanımı önerilmektedir. Buna karşılık -20°C 'nin özellikle kriyoprotektansız koşullarda ghost/hedgehog hücre artışına yol açtığı ve DNA bütünlüğünü bozduğu bildirilmiştir (Baydaş vd., 2021; Volobaev vd., 2021).

DMSO'nun etkisinin örnek tipine bağlı olduğu görülmektedir. PBMC ve izole lenfositlerde %10 DMSO kullanımı, buz kristali oluşumunu azaltarak nükleer bütünlüğün korunmasına katkıda bulunurken, tam kan örneklerinde eritrosit ve plazma komponentleri nedeniyle farklı sonuçlar elde edilmektedir. Eritrositlerde membran geçirgenliğini değiştiren ve hemoliz eğilimini artırabilen DMSO, dolaylı olarak lökositlerde DNA göçünü de artırabilir. Bu nedenle tam kan için DMSO kullanımı zorunlu değildir (Yi vd., 2017).

Ghost/hedgehog hücreler, ileri düzey DNA parçalanması ve/veya sitotoksosite ile ilişkilendirilmektedir. Bu nedenle bu hücreler %Tail DNA ve OTM gibi nicel sonuç analizlerine dahil edilmemeli, ayrı bir parametre olarak raporlanmalıdır. Sitotoksosite eşiklerinin uygulanması (yaklaşık %25 canlılık kaybı) yanlış pozitif yorum riskini azaltmaktadır. Bu yaklaşım, güncel yöntem çalışmaları ve kılavuzlarla da desteklenmektedir (Azqueta vd., 2022; Collins vd., 2023). Ayrıca, raporlamada MIRCA ilkelerinin (ör. gecikme süresi, saklama sıcaklığı, lizis ve alkali koşullar, elektroforez parametreleri, DMSO yüzdesi, dondurma-çözme hızı) titizlikle uygulanması, laboratuvarlar arası karşılaştırılabilirliği artırmaktadır (Møller vd., 2020).

Biyobanka ve saha araştırmaları açısından, dondurulmuş kan fraksiyonlarında (tam kan, buffy coat, PBMC) DNA hasarı ve onarım ölçümleri uygun protokollerle güvenilir şekilde yapılabilir. Bununla birlikte, kullanılan kriyoprotektan, dondurma-çözme hızları ve çözme sonrası toparlanma süresi gibi metodolojik ayrıntılar, sonuçların güvenilirliğini doğrudan etkilemektedir. EPIC-Heidelberg kohortu üzerine yapılan çalışmada komet testinin kısa ve uzun vadeli tekrarlanabilirliği değerlendirilmiş ve özellikle PBMC/buffy coat örneklerinde zaman noktaları arasında değişkenlikler rapor edilmiştir (Bankoğlu vd., 2022).

Regülasyon ve translasyon boyutunda, OECD TG-489 kılavuzu, in vivo memeli komet testi uygulamalarında istatistiksel analiz ve tarihsel kontrol verilerinin önemini vurgulamaktadır. Klinik ve adli uygulamalarda komet testinin güvenilirliğinin artırılması için protokol şeffaflığı ve kalite göstergeleri kritik önemdedir (OECD, 2016).

Sonuç olarak, kısa vadeli ölçümlerde tam kanın pratik ve güvenilir bir seçenek olduğu; uzun vadeli saklamada ise izole lenfosit veya PBMC örneklerinin -80 °C’de DMSO ile korunmasının DNA stabilitesi açısından en uygun yaklaşımı sunduğu görülmüştür. Komet testinin klinik ve adli bilimlerde daha yaygın kullanılabilmesi için harmonize edilmiş protokoller, sitotoksosite eşiklerinin uygulanması ve ghost hücre raporlamasının standardize edilmesi, gelecekte uluslararası düzeyde mutlaka sağlanmalıdır.



5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, tam kan ve izole lenfosit örneklerinin kısa ve uzun süreli farklı saklama koşullarında DNA hasarı üzerine etkileri komet testi ile sistematik olarak incelenmiştir. Bulgular, örnek tipinin (tam kan/izole lenfosit), sıcaklığın ve saklama çözeltisinin DNA bütünlüğü açısından kritik öneme sahip olduğunu ortaya koymuştur. Özellikle kısa vadede (≤ 72 saat) tam kan örneklerinin daha stabil olduğu, uzun vadede ($\geq 1-12$ ay) ise izole lenfositlerin -80°C ve DMSO ile birlikte saklandığında DNA bütünlüğünü daha iyi koruduğu görülmüştür.

Çalışmamızda $+4^{\circ}\text{C}$ koşullarında saklanan tam kan örneklerinde DNA hasarının ilk hafta boyunca sınırlı kaldığı, buna karşın oda sıcaklığında saklanan örneklerde 5. günden itibaren ghost hücrelerin artması nedeniyle analizlerin yapılamaz hale geldiği saptanmıştır. İzole lenfositlerde ise DNA hasarının oda sıcaklığında 3. günden, $+4^{\circ}\text{C}$ 'de ise 4. günden itibaren anlamlı düzeyde arttığı belirlenmiştir. Bu bulgular, kısa vadeli analizlerde tam kanın daha güvenilir bir materyal olduğunu göstermektedir. Uzun süreli saklama koşullarında -20°C 'nin yetersiz kaldığı, özellikle kriyoprotektansız izole lenfositlerde ghost hücre oluşumunun belirginleştiği saptanmıştır. Buna karşılık -80°C koşulunda ve DMSO varlığında saklanan örneklerde DNA bütünlüğünün büyük ölçüde korunduğu görülmüştür. Ayrıca, tam kanda DMSO varlığının bazı koşullarda DNA hasarını artırdığı, bunun muhtemelen eritrositlerde hemoliz ve oksidatif stres mekanizmaları ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışma, komet testi metodolojisine ve biyomonitorizasyon araştırmalarına önemli katkılar sağlamaktadır. Literatürde sınırlı sayıda yer alan karşılaştırmalı çalışmaların ötesine geçerek, hem tam kan hem izole lenfositlerin farklı saklama koşullarına verdikleri yanıtlar sistematik şekilde analiz edilmiştir. Araştırmanın bilimsel katkıları şu şekilde özetlenebilir: Kısa vadeli analizlerde tam kanın pratik ve güvenilir bir seçenek olduğunun gösterilmesi, uzun vadeli biyobanka çalışmalarında izole lenfositlerin -80°C ve DMSO ile birlikte saklanması en uygun koşul olduğunun ortaya konması, ghost hücrelerin yalnızca genotoksisite değil, aynı zamanda sitotoksisite ve pre-analitik faktörlerle ilişkili olabileceğinin vurgulanması ve tam kan ile PBMC'ler arasındaki farklılıkların donör özellikleri, örnek hazırlama hızları ve kullanılan protokollerle açıklanabileceğinin gösterilmesi bu çalışmanın öne çıkan yönleridir. Bu bağlamda çalışmamız, hem bilimsel

araştırmalar hem de biyobankacılık, adli tıp ve klinik toksikoloji uygulamaları açısından önemli bir metodolojik referans niteliği taşımaktadır.

Çalışmamız, komet testinin güvenilirliği açısından saklama koşullarının kritik rolünü vurgulamaktadır. Bulgulara göre, kısa süreli analizlerde (+4 °C, ≤72 saat) tam kan örneklerinin izolasyona gerek kalmadan kullanılabileceği; uzun süreli saklamalarda (≥1–12 ay) izole lenfositlerin –80 °C ve %10 DMSO ile saklanması DNA bütünlüğünü korumak için zorunlu olduğu anlaşılmaktadır. Ayrıca –20 °C koşullarının özellikle kriyoprotektansız saklamalarda DNA hasarını hızla artırdığı ve ghost hücre oluşumunu tetiklediği belirlenmiştir. Tam kanda DMSO kullanımının her zaman faydalı olmadığı, eritrositlerin ve plazma proteinlerinin etkisiyle DNA hasarının artabileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Bununla birlikte MIRCA kılavuzunda önerildiği şekilde tüm pre-analitık koşulların (tamponların tazeliği, elektroforez koşulları, dondurma-çözme hızı vb.) raporlanmasının zorunlu olduğu vurgulanmaktadır. Bu çıkarımlar, saha örnekleme, biyobanka yönetimi, toksikoloji testleri ve klinik araştırmalar için doğrudan uygulanabilir sonuçlar sunmaktadır.

Her bilimsel araştırmada olduğu gibi bu çalışmanın da bazı sınırlılıkları bulunmaktadır. Örnek sayısının sınırlı olması, farklı yaş, cinsiyet ve sağlık durumuna sahip bireylerde doğrulama yapılmasını gerektirmektedir. Komet testi yalnızca DNA kırıklarının ölçmektedir; DNA hasarının daha kapsamlı değerlendirilmesi için ̳H2AX, mikronükleus testi ve 8-oxo-dG gibi ek biyobelirteçlerin entegrasyonu gereklidir. Çalışmamızda sadece DMSO kriyoprotektanı kullanılmıştır. Alternatif kriyoprotektanların (trehaloz, hidroksietil nişasta, antioksidan katkıları vb.) araştırılması ileriki çalışmalar için gereklidir. Ayrıca ghost hücrelerin standardizasyonu henüz uluslararası düzeyde sağlanmamıştır; bu nedenle laboratuvarlar arası karşılaştırmalarda farklılıklar görülebilir.

Bu çalışmanın sonuçları, saklama koşullarının DNA hasar düzeyleri üzerinde belirleyici olduğunu göstermektedir. Ancak komet testi metodolojisi hâlâ bazı sınırlılıklar içermekte ve bu alanın daha ileriye taşınabilmesi için çeşitli iyileştirmelere ihtiyaç vardır. Gelecek araştırmalara yönelik öneriler şu şekildedir: Daha geniş örneklem ve çok merkezli doğrulama gereklidir. Çalışmamız tek bir gönüllüden alınan örneklerle yürütölmüştür. Gelecek çalışmalarda farklı yaş, cinsiyet ve sağlık durumlarını temsil eden daha geniş örneklemeler üzerinde çalışılmalı, ayrıca çok merkezli (multisite) alışmalar ile protokol varyasyonlarının sonuçlara etkisi araştırılmalıdır. Özellikle MIRCA (Minimum Information for Reporting on the Comet Assay) kılavuzunun önerdiği şekilde, pre-analitık değişkenlerin

(ör. gecikme süresi, saklama sıcaklığı, lizis koşulları) sistematik raporlanması, çalışmaların karşılaştırılabilirliğini artıracaktır (Møller vd., 2020).

Çoklu biyobelirteçlerin entegrasyonu önemlidir. Komet testi tek başına DNA kırıklarını göstermektedir, ancak DNA hasarı ve onarımı hakkında daha kapsamlı bilgi elde etmek için farklı biyobelirteçlerle desteklenmesi gereklidir. Örneğin γ H2AX, mikronükleus testi ve 8-oxo-dG gibi ek parametrelerle komet verilerinin birlikte değerlendirilmesi, genomik instabiliteyi daha kapsamlı şekilde ortaya koyabilir (Valdiglesias vd., 2013).

Alternatif kriyoprotektanların araştırılması da gelecekte önem taşımaktadır. Bu çalışmada izole lenfositlerde DMSO'nun koruyucu etkisi açıkça gözlenmiştir. Ancak DMSO'nun eritrositler ve endotel hücreleri üzerinde olası toksik etkileri rapor edilmiştir (Yi vd., 2017). Bu nedenle, trehaloz, hidroksietil nişasta gibi alternatif kriyoprotektanların ya da antioksidan katkılı çözeltilerin test edilmesi, daha biyoyumlu saklama koşullarının geliştirilmesine katkı sağlayacaktır (Baust vd., 2009).

Ghost hücrelerin standardize edilmesi gerekmektedir. Çalışmamızda -20°C koşullarında sık gözlenen ghost hücreler, ileri düzey DNA bozulmasının göstergesi olarak kabul edilmiştir. Ancak literatürde bu morfolojilerin sitotoksosite ve genotoksosite ayırımında dikkatle yorumlanması gerektiği vurgulanmaktadır. Gelecek çalışmalarda ghost hücreler için nicel eşğin tanımlanması ve farklı toksik ajanlara veya saklama koşullarına bağlı değişimlerin sistematik incelenmesi gerekmektedir (Azqueta vd., 2022).

Biyobanka protokollerinin harmonizasyonu da büyük önem taşımaktadır. Biyomonitorizasyon ve epidemiyolojik araştırmalarda komet testi kullanımı artmaktadır. Bu nedenle, biyobankalarda saklanan kan örneklerinin DNA hasarı analizine uygunluğunu sağlamak amacıyla standart protokollerin geliştirilmesi ve uygulanması büyük önem taşımaktadır. Bu konuda Møller ve arkadaşlarının (2021) önerdiği gibi, farklı kan fraksiyonlarının (tam kan, buffy coat, PBMC) saklama ve çözündürme koşulları net biçimde tanımlanmalı ve raporlanmalıdır.

Klinik ve adli uygulamalara entegrasyon da gelecekteki önemli bir hedef olarak görülmektedir. Komet testi, çevresel toksin maruziyetlerinin biyobelirteci olarak kullanılmakta, aynı zamanda adli tıp alanında DNA hasarının retrospektif incelenmesine olanak sağlamaktadır. Ancak klinik ve adli uygulamalarda Komet'in güvenilirliği, saklama koşullarının standartlaştırılması ile doğrudan ilişkilidir. Bu bağlamda referans hücrelerin ve

ploidinin kontrolü, testin doğru yorumlanması açısından kritik görülmektedir (Brunborg vd., 2015).

Bu tez çalışması, DNA hasarı analizlerinde örnek saklama koşullarının belirleyici rolünü kapsamlı biçimde ortaya koymuştur. Bulgular, kısa vadede tam kanın pratik ve güvenilir bir seçenek olduğunu; uzun vadede ise izole lenfositlerin -80°C ve DMSO kombinasyonu ile DNA bütünlüğünü en iyi şekilde koruduğunu göstermiştir. Elde edilen sonuçlar yalnızca akademik araştırmalar için değil, aynı zamanda biyobankacılık, çevresel biyomonitörizasyon, klinik toksikoloji ve adli tıp uygulamaları için de doğrudan uygulanabilir metodolojik öneriler sunmaktadır. DNA hasarı analizlerinde güvenilirliğin sağlanması, yalnızca komet testi tekniğine değil, aynı zamanda örneklerin doğru koşullarda saklanması, pre-analitik değişkenlerin kontrolüne ve raporlama standartlarının uygulanmasına bağlıdır. Gelecekte yapılacak araştırmaların MIRCA kılavuzuna uygun olarak tasarlanması, çok merkezli ve geniş örneklemli çalışmalarla desteklenmesi, komet testinin bilimsel, klinik ve adli değerini daha da artıracaktır.

KAYNAKLAR

- Agarwal, B., Rao, C. V., Bhendwal, S., Ramey, W. R., Shirin, H., Reddy, B. S., & Holt, P. R. (1999). Lovastatin augments sulindac-induced apoptosis in colon cancer cells and potentiates chemopreventive effects of sulindac. *Gastroenterology*, 117(4), 838–847. [https://doi.org/10.1016/s0016-5085\(99\)70342-2](https://doi.org/10.1016/s0016-5085(99)70342-2)
- Akor-Dewu, M. B., Yamani, N. E., Bilyk, O., Holtung, L., Tjelle, T. E., Blomhoff, R., & Collins, A. R. (2013). Leucocytes isolated from simply frozen whole blood can be used in human biomonitoring for DNA damage measurement with the comet assay. *Cell Biochemistry and Function*, 32(3), 299–302. <https://doi.org/10.1002/cbf.3016>
- Al-Salmi, K., Abbas, H. H., Schulpen, S., Karbaschi, M., Abdalla, I., Bowman, K. J., So, K. K., Evans, M. D., Jones, G. D., Godschalk, R. W., & Cooke, M. S. (2011). Simplified method for the collection, storage, and comet assay analysis of DNA damage in whole blood. *Free Radical Biology and Medicine*, 51(3), 719–725. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.05.020>
- Anderson, D., Yu, T. W., Dobrzyńska, M. M., Ribas, G. and Marcos, R. (1997). Effects in the Comet assay of storage conditions on human blood. *Teratog. Carcinog. Mutagen.* 17, 115–125.
- Arı, U. Ç. ve Yıldız, S. (2018). Teke spermasının saklanması. *Türkiye Klinikleri*, 8-18.
- Arkenberg, P., & Dittmar, M. (2023). The 24-h profile of the DNA repair enzyme 8-oxoguanine glycosylase 1 (OGG1) is associated with age, TNF- α , and waist circumference in healthy adults. *GeroScience*, 46(2), 2489–2502. <https://doi.org/10.1007/s11357-023-01012-z>
- Azqueta, A., & Collins, A. R. (2013). The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. *Archives of Toxicology*, 87(6), 949–968. <https://doi.org/10.1007/s00204-013-1070-0>
- Azqueta, A., Muruzabal, D., Boutet-Robinet, E., Milic, M., Dusinska, M., Brunborg, G., Møller, P., & Collins, A. R. (2019). Technical recommendations to perform the alkaline standard and enzyme-modified comet assay in human biomonitoring studies. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 843, 24–32. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2019.04.007>
- Azqueta, A., Stopper, H., Zegura, B., Dusinska, M., & Møller, P. (2022). Do cytotoxicity and cell death cause false positive results in the in vitro comet assay? *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 881, 503520. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2022.503520>
- Bankoglu, E. E., Mukama, T., Katzke, V., Stipp, F., Johnson, T., Kühn, T., Seyfried, F., Godschalk, R., Collins, A., Kaaks, R., & Stopper, H. (2022). Short- and long-term reproducibility of the COMET assay for measuring DNA damage biomarkers in frozen blood samples of the EPIC-Heidelberg cohort. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 874–875, 503442. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2022.503442>

- Bankoglu, E. E., Stipp, F., Gerber, J., Seyfried, F., Heidland, A., Bahner, U., & Stopper, H. (2021). Effect of cryopreservation on DNA damage and DNA repair activity in human blood samples in the comet assay. *Archives of Toxicology*, 95(5), 1831–1841. <https://doi.org/10.1007/s00204-021-03012-4>
- Baust, J. G., Gao, D., & Baust, J. M. (2009). Cryopreservation. *Organogenesis*, 5(3), 90–96. <https://doi.org/10.4161/org.5.3.10021>
- Baydaş, Z., Bacanlı, M., & Başaran, N. (2021). Does storage conditions of whole blood or blood cells effect genotoxicity assessment by comet assay? *Food and Chemical Toxicology*, 152, 112163. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112163>
- Baynton, K., & Fuchs, R. P. (2000). Lesions in DNA: hurdles for polymerases. *Trends in Biochemical Sciences*, 25(2), 74–79. [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(99\)01524-8](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(99)01524-8)
- Brown, K. (2011). Methods for the detection of DNA adducts. *Methods in Molecular Biology*, 207–230. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-421-6_11
- Brown, K. D., Rathi, A., Kamath, R., Beardsley, D. I., Zhan, Q., Mannino, J. L., & Baskaran, R. (2002). The mismatch repair system is required for S-phase checkpoint activation. *Nature Genetics*, 33(1), 80–84. <https://doi.org/10.1038/ng1052>
- Brunborg, G., Collins, A., Graupner, A., Gutzkow, K. B., & Olsen, A. (2015). Reference cells and ploidy in the comet assay. *Frontiers in Genetics*, 6. <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00061>
- Chatterjee, N., & Walker, G. C. (2017). Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 58(5), 235–263. <https://doi.org/10.1002/em.22087>
- Collins, A. R. (2004). The Comet Assay for DNA Damage and Repair: Principles, applications, and limitations. *Molecular Biotechnology*, 26(3), 249–261. <https://doi.org/10.1385/mb:26:3:249>
- Collins, A. R., Yamani, N. E., Lorenzo, Y., Shaposhnikov, S., Brunborg, G., & Azqueta, A. (2014). Controlling variation in the comet assay. *Frontiers in Genetics*, 5. <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00359>
- Cooke, M. S., Evans, M. D., Dizdaroglu, M., & Lunec, J. (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *The FASEB Journal*, 17(10), 1195–1214. <https://doi.org/10.1096/fj.02-0752rev>
- Cordelli, E., Bignami, M., & Pacchierotti, F. (2021). Comet assay: a versatile but complex tool in genotoxicity testing. *Toxicology Research*, 10(1), 68–78. <https://doi.org/10.1093/toxres/tfaa093>
- Cromie, G. A., Connelly, J. C., & Leach, D. R. (2001). Recombination at Double-Strand breaks and DNA ends. *Molecular Cell*, 8(6), 1163–1174. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(01\)00419-1](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(01)00419-1)
- Daniels, D. S. and Tainer, J. A. (2000). Conserved structural motifs governing the stoichiometric repair of alkylated DNA by O(6)-alkylguanine-DNA alkyltransferase, *Mutat Res.* 2000 Aug 30; 460.

- De Boer, J., & Hoeijmakers, J. H. (2000). Nucleotide excision repair and human syndromes. *Carcinogenesis*, 21(3), 453–460. <https://doi.org/10.1093/carcin/21.3.453>
- De Bont, R. (2004). Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. *Mutagenesis*, 19(3), 169–185. <https://doi.org/10.1093/mutage/geh025>
- De Martinis, B. S., & De Lourdes Pires Bianchi, M. (2002). Methodology for urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine analysis by hplc with electrochemical detection. *Pharmacological Research*, 46(2), 129–131. [https://doi.org/10.1016/s1043-6618\(02\)00080-4](https://doi.org/10.1016/s1043-6618(02)00080-4)
- Dedon, P. C., Plataras, J. P., Rouzer, C. A., & Marnett, L. J. (1998). Indirect mutagenesis by oxidative DNA damage: Formation of the pyrimidopurinone adduct of deoxyguanosine by base propenal. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(19), 11113–11116. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.19.11113>
- Dusinska, M., Rundén-Pran, E., Carreira, S. C., Saunders, M. (2012), Critical Evaluation of, Toxicity Tests, Adverse Effects of Engineered Nanomaterials, 63–83.
- Elmassry, M. M., Zayed, A., & Farag, M. A. (2020). Gut homeostasis and microbiota under attack: impact of the different types of food contaminants on gut health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(3), 738–763. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1828263>
- Fairbairn, D. W., Olive, P. L., & O'Neill, K. L. (1995). The comet assay: a comprehensive review. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 339(1), 37–59. [https://doi.org/10.1016/0165-1110\(94\)00013-3](https://doi.org/10.1016/0165-1110(94)00013-3)
- Fenech, M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*, 2(5), 1084–1104. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.77>
- Fenech, M., & Crott, J. W. (2002). Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes—evidence for breakage–fusion–bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 504(1–2), 131–136. [https://doi.org/10.1016/s0027-5107\(02\)00086-6](https://doi.org/10.1016/s0027-5107(02)00086-6)
- Ferry, G. (2019). The structure of DNA. *Nature*, 575(7781), 35–36. <https://doi.org/10.1038/d41586-019-02554-z>
- Gavina, J. M., Yao, C., & Feng, Y. (2014). Recent developments in DNA adduct analysis by mass spectrometry: A tool for exposure biomonitoring and identification of hazard for environmental pollutants. *Talanta*, 130, 475–494. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.06.050>
- Giglia-Mari, G., Zotter, A., & Vermeulen, W. (2010). DNA damage response. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(1), a000745. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000745>
- Gironi, B., Kahveci, Z., McGill, B., Lechner, B., Pagliara, S., Metz, J., Morresi, A., Palombo, F., Sassi, P., & Petrov, P. G. (2020). Effect of DMSO on the mechanical and structural properties of model and biological membranes. *Biophysical Journal*, 119(2), 274–286. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2020.05.037>

- Halliwell, B. (1999). Oxygen and nitrogen are pro-carcinogens. Damage to DNA by reactive oxygen, chlorine and nitrogen species: measurement, mechanism and the effects of nutrition. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 443(1-2), 37-52.
- Hartwig, A., Arand, M., Epe, B., Guth, S., Jahnke, G., Lampen, A., Martus, H., Monien, B., Rietjens, I. M. C. M., Schmitz-Spanke, S., Schriever-Schwemmer, G., Steinberg, P., & Eisenbrand, G. (2020). Mode of action-based risk assessment of genotoxic carcinogens. *Archives of Toxicology*, 94(6), 1787–1877. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02733-2>
- Jackson, S. P., & Bartek, J. (2009). The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*, 461(7267), 1071–1078. <https://doi.org/10.1038/nature08467>
- Jelic, M. D., Mandic, A. D., Maricic, S. M., & Srdjenovic, B. U. (2019). Oxidative stress and its role in cancer. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 17(1), 22–28. https://doi.org/10.4103/jcrt.jcrt_862_16
- Jeong, Y. C., Nakamura, J., Upton, P. B. and Swenberg, J. A. (2005). Pyrimido [1, 2-a]-purin-10 (3 H)-one, M1G, is less prone to artifact than base oxidation. *Nucleic acids research*, 33: 6426-6434
- Karbaschi, M., Ji, Y., Abdulwahed, A. M. S., Alohal, A., Bedoya, J. F., Burke, S. L., Boulos, T. M., Tempest, H. G., & Cooke, M. S. (2019). Evaluation of the major steps in the conventional protocol for the alkaline comet assay. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(23), 6072. <https://doi.org/10.3390/ijms20236072>
- Kasai, H. (2002). Chemistry-based studies on oxidative DNA damage: formation, repair, and mutagenesis. *Free Radical Biology and Medicine*, 33(4), 450-456.
- Khanna, K. K., & Jackson, S. P. (2001). DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nature Genetics*, 27(3), 247–254. <https://doi.org/10.1038/85798>
- Kisurina-Evgenieva, O. P., Sutiagina, O. I., & Onishchenko, G. E. (2016). Biogenesis of micronuclei. *Biochemistry (Moscow)*, 81(5), 453–464. <https://doi.org/10.1134/s0006297916050035>
- Klaene, J. J., Sharma, V. K., Glick, J., & Vouros, P. (2012). The analysis of DNA adducts: The transition from 32P-postlabeling to mass spectrometry. *Cancer Letters*, 334(1), 10–19. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.08.007>
- Koppen, G., De Prins, S., Jacobs, A., Nelen, V., Schoeters, G., & Langie, S. a. S. (2017). The comet assay in human biomonitoring: cryopreservation of whole blood and comparison with isolated mononuclear cells. *Mutagenesis*, 33(1), 41–47. <https://doi.org/10.1093/mutage/gex034>
- Küçüktürkmen, B., & Bozkır, A. (2018). Özel saklama koşulu gerektiren veya soğuk zincire tabi ilaçlar ve uygulamalar açısından değerlendirmeler. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 75(3), 305-322.
- Ladeira, C., Koppen, G., Scavone, F., & Giovannelli, L. (2019). The comet assay for human biomonitoring: Effect of cryopreservation on DNA damage in different blood cell preparations. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 843, 11–17. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2019.02.002>

- Lagerwerf, S., Vrouwe, M. G., Overmeer, R. M., Fousteri, M. I., & Mullenders, L. H. (2011). DNA damage response and transcription. *DNA Repair*, 10(7), 743–750. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2011.04.024>
- Langie, S. a. S., Azqueta, A., & Collins, A. R. (2015). The comet assay: past, present, and future. *Frontiers in Genetics*, 6. <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00266>
- Lee, B. M., Lee, S. K., & Kim, H. S. (1998). Inhibition of oxidative DNA damage, 8-OHdG, and carbonyl contents in smokers treated with antioxidants (vitamin E, vitamin C, β -carotene and red ginseng). *Cancer Letters*, 132(1–2), 219–227. [https://doi.org/10.1016/s0304-3835\(98\)00227-4](https://doi.org/10.1016/s0304-3835(98)00227-4)
- Leem, J., Lee, C., Choi, D. Y., & Oh, J. S. (2024). Distinct characteristics of the DNA damage response in mammalian oocytes. *Experimental & Molecular Medicine*, 56(2), 319–328. <https://doi.org/10.1038/s12276-024-01178-2>
- Li, G. (2007). Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Research*, 18(1), 85–98. <https://doi.org/10.1038/cr.2007.115>
- Li, L., Yu, X., Liu, J., Wang, Z., Li, C., Shi, J., Sun, L., Liu, Y., Zhang, F., Chen, H., & Zheng, W. (2021). Neutrophil extracellular traps promote aberrant macrophages activation in Behçet's disease. *Frontiers in Immunology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.590622>
- Li, W., & Ma, H. (2006). Double-stranded DNA breaks and gene functions in recombination and meiosis. *Cell Research*, 16(5), 402–412. <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7310052>
- Liu, S., & Wang, Y. (2015). Mass spectrometry for the assessment of the occurrence and biological consequences of DNA adducts. *Chemical Society Reviews*, 44(21), 7829–7854. <https://doi.org/10.1039/c5cs00316d>
- Lorenzo, Y., Costa, S., Collins, A. R., & Azqueta, A. (2013). The comet assay, DNA damage, DNA repair and cytotoxicity: hedgehogs are not always dead. *Mutagenesis*, 28(4), 427–432. <https://doi.org/10.1093/mutage/get018>
- Marino, M., Gigliotti, L., Møller, P., Riso, P., Porrini, M., & Del Bo, C. (2021). Impact of 12-month cryopreservation on endogenous DNA damage in whole blood and isolated mononuclear cells evaluated by the comet assay. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79670-8>
- Marnett, L. J. (2000). Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis*, 21(3), 361–370. <https://doi.org/10.1093/carcin/21.3.361>
- Mladenov, E., Magin, S., Soni, A. and Iliakis, G. (2013). DNA double-strand break repair as determinant of cellular radiosensitivity to killing and target in radiation therapy, *Front Oncol*, 3, 1-18.

- Møller, P., Azqueta, A., Boutet-Robinet, E., Koppen, G., Bonassi, S., Milić, M., Gajski, G., Costa, S., Teixeira, J. P., Pereira, C. C., Dusinska, M., Godschalk, R., Brunborg, G., Gutzkow, K. B., Giovannelli, L., Cooke, M. S., Richling, E., Laffon, B., Valdiglesias, V., . . . Langie, S. a. S. (2020). Minimum Information for Reporting on the Comet Assay (MIRCA): recommendations for describing comet assay procedures and results. *Nature Protocols*, 15(12), 3817–3826. <https://doi.org/10.1038/s41596-020-0398-1>
- Møller, P., Azqueta, A., Sanz-Serrano, J., Bakuradze, T., Richling, E., Bankoglu, E. E., Stopper, H., Bastos, V. C., Langie, S. a. S., Jensen, A., Scavone, F., Giovannelli, L., Wojewódzka, M., Kruszewski, M., Valdiglesias, V., Laffon, B., Costa, C., Costa, S., Teixeira, J. P., . . . Collins, A. (2023). Visual comet scoring revisited: a guide to scoring comet assay slides and obtaining reliable results. *Mutagenesis*, 38(5), 253–263. <https://doi.org/10.1093/mutage/gead015>
- Møller, P., Bankoglu, E. E., Stopper, H., Giovannelli, L., Ladeira, C., Koppen, G., Gajski, G., Collins, A., Valdiglesias, V., Laffon, B., Boutet-Robinet, E., Perdry, H., Del Bo, C., Langie, S. a. S., Dusinska, M., & Azqueta, A. (2021). Collection and storage of human white blood cells for analysis of DNA damage and repair activity using the comet assay in molecular epidemiology studies. *Mutagenesis*, 36(3), 193–212. <https://doi.org/10.1093/mutage/geab012>
- Onur E, Tuğrul B, Bozyiğit F. (2009). DNA hasarı ve Onarım mekanizmaları. *Türk Klinik Biyokimya Derg.* 7(2):61-70.
- Ostling, O., & Johanson, K. (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 123(1), 291–298. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(84\)90411-x](https://doi.org/10.1016/0006-291x(84)90411-x)
- Özcan, H. A. (2019). *Farklı koşullarda muhafaza edilen sperm örneklerinde sıcaklık ve seminal plazmanın rolü* (Yüksek lisans tezi). Biruni Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Özsait, B., Özcan, T., Köksal, G., & Erginel Ünaltuna, N. (2014). Sperm kriyoprezervasyonu: Kriyo-hasar ve DNA fragmentasyonu ilişkisi. *Erkek Üreme Sağlığı*, 264-268.
- Phillips, D. H. (2005). DNA adducts as markers of exposure and risk. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 577(1–2), 284–292. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2005.03.008>
- Phillips, D. H. (2012). On the origins and development of the 32P-postlabelling assay for carcinogen–DNA adducts. *Cancer Letters*, 334(1), 5–9. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.11.027>
- Phillips, D. H., Arlt, V. M., (2009). Genotoxicity: damage to DNA and its consequences, *Experientia Supplementum*, 87–110.
- Pınar, H. U. (2023). Travmatik resüsitasyonda kan yönetimi. *Turkish Journal of Resuscitation*, 2(2), 46-61.
- Polosina, Y. Y., Mui, J., Pitsikas, P., & Cupples, C. G. (2009). The Escherichia coli Mismatch Repair Protein MutL Recruits the Vsr and MutH Endonucleases in Response to DNA Damage. *Journal of Bacteriology*, 191(12), 4041–4043. <https://doi.org/10.1128/jb.00066-09>

- Pratt, M. M., John, K., MacLean, A. B., Afework, S., Phillips, D. H., and Poirier, M. C. (2011). Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) exposure and DNA adduct semi-quantitation in archived human tissues. *International journal of environmental research and public health*, 8(7), 2675-2691.
- Pu, X., Wang, Z., & Klaunig, J. E. (2016). Cryopreservation of human blood for alkaline and Fpg-modified comet assay. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 26(3), 196–201. <https://doi.org/10.3109/15376516.2016.1144126>
- Rastogi, R. P., Richa, N., Kumar, A., Tyagi, M. B., & Sinha, R. P. (2010). Molecular mechanisms of Ultraviolet Radiation-Induced DNA damage and repair. *Journal of Nucleic Acids*, 2010(1). <https://doi.org/10.4061/2010/592980>
- Roos, W. P., Thomas, A. D., & Kaina, B. (2015). DNA damage and the balance between survival and death in cancer biology. *Nature Reviews. Cancer*, 16(1), 20–33. <https://doi.org/10.1038/nrc.2015.2>
- Sancar, A. (2003). Structure and function of DNA photolyase and cryptochrome Blue-Light photoreceptors. *Chemical Reviews*, 103(6), 2203–2238. <https://doi.org/10.1021/cr0204348>
- Santella, R. M. (1999). Immunological methods for detection of carcinogen-DNA damage in humans. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 8(9), 733-739.
- Shuman, S., & Glickman, M. S. (2007). Bacterial DNA repair by non-homologous end joining. *Nature Reviews Microbiology*, 5(11), 852–861. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1768>
- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., Schneider, E. L., (1988), A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Experimental Cell Research*, 175(1), 184–191.
- Sioen, S., Cloet, K., Vral, A., & Baeyens, A. (2020). The Cytokinesis-Block micronucleus assay on human isolated fresh and cryopreserved peripheral blood mononuclear cells. *Journal of Personalized Medicine*, 10(3), 125. <https://doi.org/10.3390/jpm10030125>
- Slupphaug, G. (2003). The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 531(1–2), 231–251. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2003.06.002>
- Somel, M. (2017). *Niğde Tepecik-Çiftlik ve Konya Çatalhöyük kazılarında ait insan kemiklerinden antik DNA eldesi ve genom dizilemesi yoluyla Orta Anadolu Neolitik Çağ insan popülasyonlarının karakterizasyonu*. Ankara.
- Sommer, S., Buraczewska, I., & Kruszewski, M. (2020). Micronucleus assay: the state of art, and future directions. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(4), 1534. <https://doi.org/10.3390/ijms21041534>
- Speit, G., Hartmann, A., (2012), The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage, *Methods in Molecular Biology*, 314, 275-186.

- Stopper, H., & Müller, S. (1997). Micronuclei as a biological endpoint for genotoxicity: A minireview. *Toxicology in Vitro*, 11(5), 661–667. [https://doi.org/10.1016/s0887-2333\(97\)00084-2](https://doi.org/10.1016/s0887-2333(97)00084-2)
- Sung, P., Trujillo, K. M., & Van Komen, S. (2000). Recombination factors of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 451(1–2), 257–275. [https://doi.org/10.1016/s0027-5107\(00\)00054-3](https://doi.org/10.1016/s0027-5107(00)00054-3)
- Terence A Brown, (2002), Genomes, 2nd edition.
- Test No. 489: In vivo mammalian alkaline comet assay. (2016). In *OECD guidelines for the testing of chemicals. Section 4: Health effects*. <https://doi.org/10.1787/9789264264885-en>
- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hasrtmann, A., Kobayashi, H., iyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F., (2015), Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35(3).
- Tretyakova, N., Villalta, P. W., & Kotapati, S. (2013). Mass spectrometry of structurally modified DNA. *Chemical Reviews*, 113(4), 2395–2436. <https://doi.org/10.1021/cr300391r>
- Turkez, H., Arslan, M. E., & Ozdemir, O. (2017). Genotoxicity testing: progress and prospects for the next decade. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 13(10), 1089–1098. <https://doi.org/10.1080/17425255.2017.1375097>
- Valavanidis, A., Vlachogianni, T., & Fiotakis, C. (2009). 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHDG): a critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. *Journal of Environmental Science and Health Part C*, 27(2), 120–139. <https://doi.org/10.1080/10590500902885684>
- Valdiglesias, V., Giunta, S., Fenech, M., Neri, M., & Bonassi, S. (2013). γ H2AX as a marker of DNA double strand breaks and genomic instability in human population studies. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 753(1), 24–40. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2013.02.001>
- Valdiglesias, V., Sánchez-Flores, M., Fernández-Bertólez, N., Au, W., Pásaro, E., & Laffon, B. (2020). Expanded usage of the Challenge-Comet assay as a DNA repair biomarker in human populations: protocols for fresh and cryopreserved blood samples, and for different challenge agents. *Archives of Toxicology*, 94(12), 4219–4228. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02881-5>
- Volobaev, V., Bach, S., Shchetnikova, E., Vdovina, E., Rosinskiy, A., & Larionov, A. (2021). Short/long-term cryopreservation prior to comet assay of whole-blood leukocytes and in vitro-cultured lung fibroblasts. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 31(7), 531–537. <https://doi.org/10.1080/15376516.2021.1933286>
- Yeni, D., Avdatek, F., & Gündoğan, M. (2017). Spermatozoon DNA hasarının belirlenmesinde comet analiz yöntemi. *Turkiye Klinikleri J Reprod Artif Insemin-Special Topics*, 3(2), 105–113.

Yi, X., Liu, M., Luo, Q., Zhuo, H., Cao, H., Wang, J., & Han, Y. (2017). Toxic effects of dimethyl sulfoxide on red blood cells, platelets, and vascular endothelial cells in vitro. *FEBS Open Bio*, 7(4), 485–494. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12193>

Yıldırım, N. (2016). *Dondurulmuş sazan sperma hücrelerinde DNA hasarının tek hücre jel elektroforezi (comet) yöntemi ile belirlenmesi* (Yüksek lisans tezi). Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Muğla.

Zeng, L., Zhen, Y., Chen, Y., Zou, L., Zhang, Y., Hu, F., Feng, J., Shen, J., & Wei, B. (2014). Naringin inhibits growth and induces apoptosis by a mechanism dependent on reduced activation of NF- κ B/COX-2-caspase-1 pathway in HeLa cervical cancer cells. *International Journal of Oncology*, 45(5), 1929–1936. <https://doi.org/10.3892/ijo.2014.2617>



EKLER

Ek-1. Etik Kurul Onayı

İNSAN ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU			
ETİK KURULUN ADI	ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ İNSAN ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU		
AÇIK ADRES			
TELEFON			
FAKS			
E-POSTA			
BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Komet yönteminde tam kan ve izole lenfosit saklama koşullarının DNA hasarı sonuçlarına etkisinin araştırılması - Başvuru No: 2022000325-1(2022/325)	
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. Aylin ÜSTÜNDAĞ	
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için)		
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Farmasötik Toksikoloji	
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:106-330-22	Tarih: 09 Haziran 2022
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.	

İNSAN ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU	
ÇALIŞMA ESASI	İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof.Dr.Hakan ERGÜN

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Araştırma ile ilişkisi
Prof.Dr.Hakan ERGÜN	Tıbbi Farmakoloji	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ H ☒
Prof.Dr.Berna ARDA	Tıp Tarihi ve Etik	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ H ☒
Prof.Dr.Serenay ELGÜN ÜLKAR	Tıbbi Biyokimya	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ H ☒
Prof.Dr.Hatice İLGİN RUHİ	Tıbbi Genetik	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ H ☒
Prof.Dr.Sevim AYDIN	Histoloji ve Embriyoloji	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ H ☒
Prof.Dr.Berna SAVAŞ	Tıbbi Patoloji	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ H ☒
Prof.Dr.Yasemin YAVUZ	Biyoistatistik	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ H ☒
Prof.Dr.M.Kürşat GÖKCAN	Kulak, Burun ve Boğaz Hastalıkları	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ H ☒
Prof.Dr.Nuray HALILOĞLU	Radyoloji Anabilim Dalı	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ H ☒
Doç.Dr.Yüksel ÜRÜN	Tıbbi Onkoloji	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ H ☒
Doç.Dr.Cihangir AKYOL	Genel Cerrahi	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ H ☒
Doç.Dr.Başak Ceyda MEÇO	Anesteziyoloji ve Reanimasyon	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ H ☒
Doç.Dr.Halil ÖZDEMİR	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ H ☒
Doç.Dr.Emel OKULU	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ H ☒
Doç.Dr.Mustafa Volkan KAVAS	Tıp Tarihi ve Etik	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ H ☒