



T.C
SANKO Üniversitesi

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI

KOLOREKTAL KANSER TANISI ALMIŞ HASTALARDA DNA
HASARININ İNCELENMESİ VE DNA HASARI ÜZERİNE BETA
GLUKANIN ONARICI ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI

NİLAY UÇAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GAZİANTEP 2019

**T.C
SANKO ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI**

**KOLOREKTAL KANSER TANISI ALMIŞ HASTALARDA DNA
HASARININ İNCELENMESİ VE DNA HASARI ÜZERİNE BETA
GLUKANIN ONARICI ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Nilay UÇAR

DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi Necla BENLİER

2019

GAZİANTEP

KABUL VE ONAY SAYFASI

Öğrencinin Adı Soyadı	Nilay UÇAR	Tez Savunma Tarihi	28.06.2019
Tez Adı	KOLOREKTAL KANSER TANISI ALMIŞ HASTALARDA DNA HASARININ İNCELENMESİ VE DNA HASARI ÜZERİNE BETA GLUKANIN ONARICI ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI		

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

SANKO Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı, Moleküler Tıp Tezli Yüksek Lisans Programı kapsamında yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıda adı geçen jüri tarafından **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Sınav Jürisi	Unvanı, Adı Soyadı	Üniversitesi/Anabilim Dalı	İmzası
Tez Danışmanı Üye	Dr. Öğr. Üyesi Necla BENLİER	SANKO Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	
Üye	Prof. Dr. Mehtap ÖZKUR	SANKO Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	
Üye	Doç. Dr. Mustafa YILDIRIM	Bahçeşehir Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı	

ONAY

ENSTİTÜ YÖNETİM KURULU KARARI

Tarih :/...../.....

Karar No :/...../.....

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen jüri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu Kararıyla **Yüksek Lisans Tezi** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Ayşen BAYRAM
Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

SANKO Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu, bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Nilay UÇAR

28/06/2019

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim boyunca verdiği emek ve destek için öncelikle Tıp Fakültesi Dekan Yardımcısı ve Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü Prof. Dr. Ayşen BAYRAM'a,

Yüksek Lisans eğitimimde, tez konumun belirlenmesinde, tezimin deneysel ve genel çalışmalarında tecrübelerini, bilgilerini, ilgi ve desteğini esirgemeyen, güven veren, teşvik eden ve moralimi hep yüksek tutmama yardımcı olan Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı ve Moleküler Tıp Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. E. İlker SAYGILI'ya,

Tez konumun belirlenmesinde, çalışmamın her aşamasında yanımda olup destek veren, deneyim ve üstün bilgisinden yararlandığım çok sevdiğim danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Necla BENLİER'e,

Laboratuvar çalışmalarımın başlangıcında bana yardımcı olan Arş. Gör. Sevim Eda ÖĞÜT'e,

çalışmamın istatistiksel hesaplamalarında yardımcı olan Dr. Öğr. Üyesi Pınar GÜNEL KARADENİZ'e,

Eğitimim boyunca bana emek veren tüm hocalarıma,

Gösterdiği sabır, anlayış ve destekleri için Enstitü Sekreteri Duygu ALANGİL'e,

Tez düzenlenmesinde bana destek veren yeğenim Gözde İlksen ŞEN'e,

Tüm hayatım boyunca bana emek veren, maddi ve manevi destek olan, emeklerinin karşılığını ne yapsam ödeyemeyeceğim ve şu anda hayatta olmayan sevgili anne ve babama,

Her zaman yanımda olup hayatımın anlamı olan, her anlamda destek veren canımdan çok sevdiğim sevgili eşim Seçkin UÇAR'a ve sevgili çocuklarım Berat Ege ve Berke Doruk'a çok teşekkür ederim.

Nilay UÇAR

ÖZET

KOLOREKTAL KANSER TANISI ALMIŞ HASTALARDA DNA HASARININ İNCELENMESİ VE DNA HASARI ÜZERİNE BETA GLUKANIN ONARICI ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI

DNA (Deoksiribo Nükleik Asit), organizmaların genetik bilgilerini gelecek kuşaklara taşıyarak devamlılığı sağlayan ve birçok reaktif molekülün etkilemesiyle kolay hasar alabilen bir biyomoleküldür. Hasar, DNA molekülünün fiziksel ve kimyasal yapısındaki değişikliklerle ya da çevresel etkenlerle oluşur. DNA hasarı kromozom anomalilerine ve mutasyona neden olur. DNA hasarının doğru ve hassas bir şekilde ölçülebilmesi için çeşitli teknikler kullanılabilir. Bu yöntemlerden biri de Tek Hücre Jel Elektrofrezisi (SCGE), diğer adıyla “Comet Assay Yöntemi”dir. Bu teknik; birçok canlı çeşidinde DNA hasarını belirlemek için kullanılan non-invaziv, hızlı, hassas ve basit floresan bir mikroskopik yöntemdir. Comet Assay yöntemi; apoptozis, yaşlanma, klinik ve genetik toksikoloji, oksidatif stres- antioksidan çalışmalarında tercih edilmektedir.

Beta glukoz, ekmekek mayası (*Saccharomyces cerevisiae*) hücre duvarından ekstrakte edilen, bağışıklık sistemini güçlendiren, uyarıcı etkisi olan, antioksidan etki yaratan basit bir polisakkarittir. Çalışmamızda, kolorektal kanser tanısı almış hastalardan alınan tam kan örnekleri Comet Assay yöntemi kullanılarak DNA hasarının tespit edilmesi ve hasarın ex vivo ortamda beta glukozun onarıcı rolünün araştırılması amaçlanmıştır. Gaziantep Medical Park Hastanesi Medikal Onkoloji bölümüne ve Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Onkoloji bölümüne gelen ve evre 3-4 kolorektal kanser tanısı almış, tedaviye başlanmamış gönüllü (40- 80) yaş arası toplam 19 yetişkin kadın ve erkek hasta üzerinde ex vivo çalışma yapılmıştır. Araştırmaya katılacak her hastaya çalışmamızın amacı açıklanmış ve gönüllü bilgilendirme formu verilmiştir. Gönüllü hastalardan steril koşullarda aynı gün içerisinde EDTA'lı tüplere 10 cc alınan venöz kan uygun koşullarda laboratuvara getirilip çalışmaya başlanmıştır. Alınan tam kanlara Comet Assay testi uygulanarak DNA hasarına bakılmıştır. Her bir lam örneği 50 µl/ml EtBr (Etidyum bromür) ile boyandıktan sonra floresan mikroskoptaki görüntüleri alınıp fotoğrafları çekilmiştir. Open Comet Assay programı ile her sahada 100 hücre dikkate alarak analiz edilerek sonuçlar alınmıştır. Ayrıca 20 kişiden oluşan sağlıklı gönüllü kontrol grubu oluşturulmuştur. Bu gruba beta glukoz uygulaması yapılmamıştır. Hasta grubun kan örneklerine 50 µl/ml beta glukoz ve antibiyotik olarak 100 U/ml penisilin (Noss, 2012) uygulanıp 12 saat süreyle 37°C'de %5 CO₂ te inkübasyona

birakılmıştır. Beta glukanın etki etme süresini takip etmek için inkübasyonun ilk 40. dakikasından itibaren kontroller yapılmıştır. Beta glukun uygulanmış örnekler Comet Assay yöntemi ile test edilmiştir ve boyanarak floresan mikroskopta lam örnekleri incelenmiştir. Görüntüler fotoğrafları çekilerek kaydedilmiştir. Open Comet görüntülü analizle her sahada 100 hücre dikkate alınarak analizleri yapılmıştır. Beta glukanın DNA hasarı üzerine etkileri izlenmiştir. Hastaların kan örneklerine pozitif kontrol olarak uygun doz (50µmol/L) (Angelie ve diğ., 2006) ve sürede (10 dk.) H₂O₂ uygulanmıştır. Aynı şekilde Comet Assay yöntemi uygulanarak boyanıp mikroskopta görüntüleri alınıp analizi yapılmıştır.

Kolorektal kanser tanısı almış hastaların (tedaviye başlamadan önce) Comet Assay yöntemi ile DNA hasarları (kuyruk DNA yüzdesi, kuyruk momenti ve kuyruk uzunluğu parametreleri bakımından), kontrol grubundaki bireylerin DNA hasarları ile kıyaslanmış olup daha sonra Beta glukanın 50 µl/ml'lik konsantrasyonu ile, kolorektal kanser tanısı almış hastalarda DNA hasarı onarıcı etkisi incelenmiştir. Hasta grubun ortalamaları ile kontrol grubunun ortalamaları arasındaki farkın önemli olup olmadığı t-testi ile kontrol edilmiştir. Kolorektal kanser tanısı almış hastaların DNA'larında meydana gelen hasar, Comet yöntemi ile incelendiğinde; kontrol grubuna göre; kuyruk momenti, kuyruk yüzdesi ve kuyruk uzunluğu değerlerinde istatistiksel olarak önemli ölçüde artış tespit edilmiştir. Kolorektal kanser tanısı almış hastaların kan örneklerine beta glukun ex vivo koşullarda 12 saat uyguladıktan sonra Comet Assay yöntemi ile incelendiğinde oluşan DNA hasarlarının önemli ölçüde azaldığı istatistiksel olarak tespit edilmiştir. Hasta grubunun kan örneklerine beta glukun uygulaması sonrasında elde edilen verilerin değerleri kontrol grubu değerleriyle kıyaslandığında, beta glukun sonuçları kontrol grubu değerlerine göre daha düşük çıkmıştır. Beta glukun etkisinin sonuçları, kontrol grubunda var olabilecek olası hasarları göz önünde tutarsak kontrol grubuna göre daha düşük çıkması düşünülebilir. Sonuç olarak; beta glukun kolorektal kanser hastaları üzerinde antisitotoksik ve antigenotoksik etkilerinden dolayı DNA hasarını onarıcı etkisi olduğu söylenebilir.

Anahtar kelimeler: DNA Hasarı, Beta Glukun, Comet Assay Yöntemi.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF DNA DAMAGE IN PATIENTS WITH COLORECTAL CANCER DIAGNOSIS AND INVESTIGATING THE REPAIRING ROLE OF BETA GLUCAN ON DNA DAMAGE

The DNA (Deoksiribo Nucleic Acid) is a biomolecule that provides continuity by carrying the genetic information of organisms to the next generations and can be easily damaged by the effects of many reactive molecules. The damage is caused by changes in the physical and chemical structure of the DNA molecule or by environmental factors. The DNA damage causes chromosomal abnormalities and mutations. Various techniques can be used to accurately measure the DNA damage. One of these methods is Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE), also known as “The Comet Assay Method”. This technique; is a non-invasive, fast, sensitive and simple fluorescence microscopic method used to detect the DNA damage in many living species. The Comet Assay method is preferred in apoptosis, aging, clinical and genetic toxicology, oxidative stress-antioxidant studies.

Beta-glucan-a simple polysaccharide extracted from the cell wall of yeast- (*Saccharomyces cerevisiae*), strengthens the immune system and creates an antioxidant effect, has a stimulating effect. This study aimed to investigate the restorative role of beta-glucan ex vivo. The ex vivo study was conducted on 19 adult female and male patients (40-80) years of age who were diagnosed with stage 3-4 colorectal cancer and admitted to the Medical Oncology Department of Gaziantep Medical Park Hospital and the Medical Oncology Department of Gaziantep University Medical Faculty. The purpose of our study was explained to each patient who participated in the study and a consent form was given. Venous blood, which was taken 10 cc from EDTA tubes in sterile conditions on the same day, was brought to the laboratory under appropriate conditions and started to work. The DNA damage was observed by applying the Comet Assay test to whole blood samples. After each slide sample was stained with 50 µl / ml EtBr (Ethidium bromide), images were taken on a fluorescence microscope and photographed. The Open Comet Assay program with 100 cells in each field taking into account the results were analyzed. Also, a healthy volunteer control group consisting of 20 people was formed and beta-glucan was not applied to this group. However, 50 µl / ml of beta-glucan and antibiotic 100U / ml of penicillin (Noss, 2012) was applied to the blood samples of the patient group and incubated for 12 hours at 37°C at 5% CO₂. Starting by the first 40 minutes of incubation to monitor the duration of the action of beta-

glucan. controls were performed. Beta-glucan treated samples were tested by the Comet Assay method and the stained samples were examined by fluorescence microscopy. Images were recorded by taking photographs. 100 cells in each field were analyzed by the Open Comet image analysis, and the effects of beta-glucan on DNA damage were monitored. The appropriate dose ($50\mu\text{mol} / \text{L}$) (Angelie et al., 2006) and duration (10 min) of H_2O_2 was administered to the blood samples of the patients as the positive control. In the same way, the Comet Assay method was applied and the images were taken under a microscope and analyzed.

The DNA damage (in terms of tail the DNA percentage, tail moment and tail length parameters) of patients diagnosed with colorectal cancer (before starting treatment) was compared with the DNA damage of individuals in the control group and then with $50\ \mu\text{l} / \text{ml}$ concentration of beta-glucan. The repairing effect of the DNA damage in patients with colorectal cancer was investigated. The difference between the mean values of the patient group and the control group was checked by the t-test. The damage to the DNA of patients with colorectal cancer were examined by the Comet method. According to the control group; tail moment, tail percentage and tail length values were significantly increased. After the application of beta-glucan ex vivo to the blood samples of patients with colorectal cancer for 12 hours, it was found that the DNA damage was significantly reduced when examined by the Comet Assay method. When the values of the data obtained after the application of beta-glucan to the blood samples of the patient group were compared with the control group values, beta-glucan results were lower than the control group values. The effects of beta-glucan may be considered to be lower than the control group, considering the possible damage to the control group. As a result; It can be said that beta-glucan has a restorative effect on the DNA damage due to its anticytotoxic and antigenotoxic effects on the colorectal cancer patients.

Key words: DNA Damage, Beta Glucan, Comet Assay Method.

KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
ETİK BEYAN	iv
TEŞEKKÜR	v
ÖZET	vi
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
TABLolar DİZİNİ	xvi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xvii
RESİMLER DİZİNİ	xviii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kolorektal Kanser	3
2.1.1. Epidemiyoloji.....	3
2.1.1.1. Mortalite.....	3
2.1.2. Etiyolojisi	4
2.1.2.1. Risk faktörleri	4
2.1.2.2. Koruyucu faktörler.....	5
2.1.3. KRK tanısı	6
2.1.4. KRK tarama yöntemleri.....	6
2.1.5. KRK tedavisi.....	6
2.2. Serbest Radikaller	6
2.3. Antioksidanlar	9
2.3.1. Antioksidanların sınıflandırılması	9
2.4. DNA Hasarı	12
2.5. Beta Glukan	14
2.5.1. Beta glukan kaynakları ve yapısı	14

2.5.2. Beta glukanın antioksidan özelliği.....	15
2.5.3. Beta glukanın biyolojik ve immünolojik fonksiyonları	16
2.5.4. Beta glukán-patojen ilişkisi	18
2.5.5. Beta glukánın yan etkisi.....	19
2.6. Comet Assay Yöntemi	19
2.6.1. Tarihçesi.....	19
2.6.2. Alkali Comet ile nötral Comet arasındaki farklılıklar	21
2.6.3. Metodoloji.....	22
2.6.4. Comet Assay uygulama basamakları	22
2.6.5. Comet Assay yönteminin uygulanışı.....	22
2.6.6. Comet Assay yönteminin avantajları ve dezavantajları.....	26
2.6.7. Comet Assay yönteminin kullanıldığı alanlar	26
2.6.8. Comet Assay analizinde DNA hasarını etkileyen sebepler	27
3. GEREÇ VE YÖNTEM	28
3.1. Araştırmanın Türü.....	28
3.2. Araştırmanın Yapıldığı Yer ve Zamanı	28
3.3. Araştırmanın Evren ve Örnekleme	28
3.4. Verilerin Toplanması	29
3.4.1. Veri toplama araçları	29
3.5. Araştırmanın Değişkenleri	29
- Bağımlı değişken.....	29
- Bağımsız değişken.....	29
3.6. Verilerin Değerlendirilmesi	29
3.7. Araştırmanın Sınırlılıkları ve Genellenebilirliği	29
3.8. Araştırmada Etik Kurallar.....	30
3.9. Comet Assay Yönteminde Kullanılan Cihazlar.....	30
3.10. Comet Assay Yönteminde Kullanılan Sarf ve Diğer Malzemeler.....	31

3.11. Comet Assay Yönteminde Kullanılan Kimyasallar.....	32
3.12. Comet Assay Yönteminde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı.....	33
3.13. Comet Assay Protokolü.....	34
4. BULGULAR.....	40
5. TARTIŞMA.....	46
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	49
7. KAYNAKLAR.....	50
8. EKLER.....	62
EK-1 Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu	
EK-2 Etik Kurul Karar Formu	
EK-3 Kurum İzni	
EK-4 Tez İntihal Raporu	
EK-5 Özgeçmiş	

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

β	: Beta
e-	: Elektron
μ l	: Mikrolitre
$^{\circ}$ C	: Santigrat Derece
%	: Yüzde
8-OH-Gua	: 8-hidroksideoksi guanin
ATM/ATR	: Ataxi-telenjiektazi mutasyonu
BG	: Beta glukan
BHA	: Bütillenmiş hidroksi anisol
BHT	: Bütillenmiş hidroksi tolüen
BU	: Baş uzunluğu
BY	: Baş Yoğunluğu
CAT	: Katalaz enzimi
CR3	: Komplement reseptör
DMSO	: Dimetil sülfoksit
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
Et-Br	: Etidyum Brömür
FDA	: Food and Drug Administration (Amerika Birleşik Devletleri Sağlık Bakanlığına bağlı Gıda ve İlaçtan Sorumlu Büro)
GLOBOCAN	: Global Birden of Cancer Study
GP_x	: Glutasyon peroksidaz enzimi
Gras	: Generally recognized as safe (güvenli kabul edilen)
H₂	: Hidrojen molekülü
H₂O₂	: Hidrojen peroksit

HIV	: Human immunodeficiency Virus
IARC	: International Agency for Research on Cancer (Uluslararası Kanser Araştırma Kurumu)
Ig	: Immunglobulin
IgG	: Immunglobulin G
IL	: Interleukin,interlökin
IL-1	: Interlökin 1
KA	: Kromozom Anormallikleri
kDa	: Kilodalton
KM	: Kuyruk Momenti
KMi	: Kuyruk Migrasyonu
KRK	: Kolorektal Kanser
KU	: Kuyruk Uzunluğu
KY	: Kuyruk Yoğunluğu
Lac Cer	: Laktosil Seramid
LDL	: Düşük yoğunluklu lipoprotein
LH	: Yağ asidi
LMPA	: Düşük erime noktalı agar
MN	: Mikronükleus
NF-kB	: Nükleer Faktör kappa

NK	: Natural Killer (Doğal Öldürücü Lenfosit)
O₂[•]	: Süperoksit anyon radikali
O₂	: Oksijen molekülü
O₂^{2•}	: Peroksit radikali
OH[•]	: Hidroksil radikali
PBS	: Phosphate Buffer Salina (Tuzlu fosfat çözeltisi)
PG	: Propil Gallatlar
PRR	: Pattern Recognition Reseptör
RBC	: Red Blood Cell(Kırmızı Kan Hücresi)
ROS	: Reactive Oxygen Species(Reaktif oksijen türleri)
S. cerevisiae	: Saccharomyces cerevisiae
SOR	: Serbest Oksijen Radikalleri
TBHQ	: Tersiyer bütillenmiş hidroksikinin
TLR	: Toll Like Reseptör (Toll benzeri reseptör)
TLR-2	: Toll- like receptor-2 (Toll benzeri reseptör 2)
TLR-6	: Toll-like receptor-6 (Toll benzeri reseptör 6)
TNF	: Tümör Nekrozis Faktör
U	: Ünite (birim)
WBC	: White Blood Cell (Beyaz kan hücresi)
WHO	: World Health Organisation (Dünya Sağlık Örgütü)

Tablo 2.1. Serbest Radikaller ve Reaktif Azot Türleri.....	8
Tablo 2.2. Endojen Antioksidanlar	10
Tablo 2.3. Ekzojen Antioksidanlar	11
Tablo 2.4. Farklı Kaynakların Beta Glukan Örnekleri ve Tanımları.....	14
Tablo 3. Kullanılan Kimyasallar.....	32
Tablo 4.1. Hasta Grubu ve Kontrol Grubunun Demografik Bilgileri.....	40
Tablo 4.2. DNA Fragmanlarının Beta Glukan Uygulama Öncesi Ölçüleri.....	40
Tablo 4.3. Beta Glukan Uygulama Öncesi ve Sonrası DNA Fragmanlarının Ölçüleri	42
Tablo 4.4. Kontrol Grubu ve Beta Glukan Uygulanan Hasta DNA Fragmanlarının Ölçüleri	44

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 2.1. Beta Glukan Etkileri	17
Şekil 2.2. Çift Zincir Kırıklarını Tespit Eden Nötral Metod ile Tek Zincir Kırıklarını Tespit Eden Alkali Metodun Genel Uygulama Protokolü	21
Şekil 4.1. DNA Fragmanlarının Beta Glukan Uygulama Öncesi Ölçülerinin Grafik Gösterimi	41
Şekil 4.2. Beta Glukan Uygulaması Sonrasında DNA Fragmanlarının Ölçülerinin Grafik Gösterimi.....	43
Şekil 4.3. Kontrol Grubu ve Beta Glukan Uygulanan Hasta DNA Fragmanlarının Ölçülerinin Grafik Gösterimi.....	44

RESİMLER DİZİNİ

Sayfa No

Resim 2.1. Kategorize Edilmiş Hasarlı DNA Görüntüleri	25
Resim 3.1.a. Comet Assay Protokolünde Lamaların Hazırlanması	35
Resim 3.1.b. Agar Çözeltilerinin Hazırlanması.....	36
Resim 3.2. Beta Glukan Uygulaması Sonrası DNA Hasarında Meydana Gelen Değişim.....	39



1. GİRİŞ

Kanser birden çok genin ve faktörün etkisi ile hücre döngüsünün bozulması ile oluşan bir hastalıktır. Kanser kompleks bir şekilde gelişmekte olup çevresel faktörlerden etkilenmekte, somatik ve kalıtsal mutasyonlar ve epigenetik mekanizmalar ile meydana gelmektedir (Lichtenstein ve diğ., 2000; Bertram, 2000). Proto-onkogenler ve tümör inhibe edici genlerde oluşan nokta mutasyonlar veya yeniden düzenleme ile normal sağlıklı hücreler kanser hücrelerine dönüşmektedir (Bertram, 2000). Kanser, normal hücrelerin anormal çoğalması ve kanser hücresine dönüşümü, proto-onkogenler de "fonksiyon kazanımı" (Gain of function) ve tümör inhibe edici genlerde "fonksiyon kaybı" (Loss of function) ile gelişir (Olah, 2005; Martinez ve diğ., 2003; Kleinsmith, 2004).

Kanser dünyada morbidite ve mortalitenin en önemli sebeplerinin başında gelir. Kanser 1900'lü yıllarda ölümcül hastalıklar arasında yedinci sırada yer alırken günümüzde dünyada ve Türkiye'de kalp ve damar hastalıklarından sonra ikinci sırada gelmektedir (Detels, 2015). 2014 yılı Uluslararası Kanser Araştırmaları Kurumu (IARC) verilerine göre 14,1 milyon yeni kanser vakasından 8,2 milyonu ölüm ile sonuçlanmıştır.

Kolorektal kanser (KRK) kolon rektum ve apendiks bölgelerinde meydana gelen kanser oluşumlarına denir (Özkaya, 2009). Kolorektal kanserler yaşam kalitesini düşüren, iş-güç kaybına neden olan önemli bir sağlık sorunu olarak günümüzde en sık görülen kanserlerdendir. Kolorektal kanser yaygın malign tümörlerden biri olup insan sağlığı için ciddi bir tehdittir. Morbiditesi ve mortalitesi çok yüksektir (Vermeer ve diğ., 2017). KRK oluşumu ve gelişimi çok gen katılımı ve çok aşamalı birikimin sonucudur. KRK dünyada en çok görülen kanser çeşitleri içerisinde 4. sırada, erkeklerde en çok görülen 3., kadınlarda 2. sırada en çok görülen kanserdir. KRK dünyadaki tüm tümör tüplerinin yüzde 10'unu oluşturur. 2012 yılında bütün kanser türlerine bağlı ölümlerin yüzde 9,8'i yani yaklaşık 693,933 kişinin ölümü KRK nedeniyle olmuştur. Gelişmiş ülkelerde (Kuzey Amerika, Avustralya, Kanada, Yeni Zelanda vb.) insidans oranı yüksek, gelişmekte olan ülkelerde (Batı Afrika, Doğu Avrupa ve Güney Amerika) insidans oranı düşüktür (GLOBOCAN, 2012). Gelişmiş ülkelerde KRK insidansı yüksek olmasına rağmen mortalitesinin düşük olmasının sebebi erken teşhis ve etkili tedavi yöntemlerinin uygulanmasıdır. Gelişmiş ülkelerde beslenme farklılıklarından ve diğer faktörlerden dolayı insidansı yüksektir. KRK'nın yaşa göre görülme oranı değişmektedir. Kırk yaş altı KRK oranı azken; 50-60 yaşta ise risk başlar. Ortalama 60-65 yaş aralığında izlenir. Geleneksel cerrahi kemoterapi,

radyoterapi ve diğer tedavi yöntemleri hastaların iyileşme ve hayatta kalma süresini uzatmak için yeterli değildir. Bu nedenle yeni ve etkili tedaviler bulmak gereklidir. Son yıllarda immünoterapi, kanser terapisi alanında sıcak bir konu haline gelmiştir ve kanser hastalarının geç palyatif tedavisinde dikkate değer sonuçlar elde edilmiştir (Cao ve diğ., 2018).

Beta glukanlar doğada mantarlarda, tahıl bitkilerinde, ekmek mayasında ve bakteri gibi bazı mikroorganizmaların hücre duvarının yapısında var olan glikoz zincirlerinden oluşan bağışıklık sistemini güçlendiren uyarıcı etkisi olan antioksidan etki yaratan polisakkarit polimerleridir. Beta glukan, bağışıklık sistemimizin ilk savunmasını yapan, makrofajlar üzerindeki özel yüzeylere bağlanarak, bağışıklık sistemini aktive etmesinden dolayı bağışıklık sistemi düzenleyicisidir (Kim ve diğ., 2006; Sener ve diğ., 2006). Bu çalışmada amacımız fonksiyonel yiyeceklerin içerisinde yer aldığını bildiğiniz beta glukannın DNA hasarını onarıcı etkisinin, kolorektal kanserli hastalarda tedavi öncesi alınan ex-vivo ortamda Comet yöntemi ile beta-glukan inkübasyonu uygulayarak DNA hasarını onarıcı rolünü araştırmayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kolorektal Kanser

KRK; kolon, rektum ve apendiks bölgelerinde meydana gelen kanser oluşumlarını kapsar (Özkaya, 2009).

2.1.1. Epidemiyoloji

2012 yılında Global Burden of Cancer Study (GLOBOCAN)'nin açıkladığı bilgiler doğrultusunda dünyada 14,1 milyon yeni kanser vakası oluşmuş ve kanserden ölenlerin sayısı 8,2 milyona ulaşmıştır (GLOBOCAN, 2014). İnsidansı en fazla olan meme, akciğer, prostat kanseri ve KRK'dır. KRK; ABD'de erkeklerde prostat ve akciğer, kadınlarda meme ve akciğer kanserinden sonra 3.sıradadır (Rieset ve diğ., 2000). Türkiye'de 2015 yılı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü verilerine göre KRK, hem kadınlarda hem de erkeklerde 3. sırada yer almaktadır. Erkeklerde yüz binde 22,8 ve kadınlarda ise yüz binde 13,8 sıklığında görülmektedir. Dünyada her sene bir milyon kişi KRK tanısı alırken 500.000 hasta bu sebepten kaybedilmektedir (Gordon, 2006). Dünyada KRK insidansı açısından diğer kanser türlerine göre erkeklerde üçüncü sırada, kadınlarda ise ikinci sırada gelmektedir. Gastrointestinal sistemin en yaygın görülen kanseri olan KRK tüm kanser vakalarının %10'udur. Kolorektal kanserinde erkek ve kadın vaka sayısı yakın iken rektum kanseri erkeklerde daha çok görülür (Stewart ve Wild, 2014; Jemal ve diğ., 2014).

Kuzey Amerika, Kuzey ve Batı Avrupa, Avustralya, Kanada, Yeni Zelanda, Danimarka, İsveç vb. endüstriyel anlamda gelişmiş batı ülkelerinde en yüksek insidanslar görülürken gelişmekte olan ülkelerde özellikle, Orta Afrika, Hindistan, Asya, Güney Amerika ve Doğu Avrupa'da insidansın düşük olduğu (www.kanser.gov.tr; Eddy, 1990) belirtilmiştir. Bu farklılık genetik, çevresel faktörler ve beslenme alışkanlıklarına bağlıdır (Kelli ve diğ., 2005). KRK'nın az görüldüğü coğrafi bölgelerden yoğun görüldüğü bölgelere yerleşenler de KRK görülme oranı yükselir.

2.1.1.1. Mortalite

ABD ve diğer gelişmiş batı ülkelerinde KRK'nın insidansı yüksek olduğu halde 1980'lerden sonra KRK mortalitesi azalmıştır. Bunun sebebi ise hastalığın erken evrelerde teşhis edilmesi ve etkin tedavinin yapıyor olmasıdır. Sporadik KRK'da ileri yaşlarda risk artar 40 yaşın altında az görülürken 40-50 yaş aralığından itibaren insidans artar (Sayek, 2004; Fry ve diğ., 2008). 50 yaş üzeri insidans yüzde 9'a çıkarken 80 yaş üzeri ise risk en fazladır. Çok

faktörlü etkenlerle meydana gelen bu hastalığın tanı koyma yaşı 62'dir (Skandalakis ve diğ., 1994). K-RAS, p53, APC gibi en çok bilinen onkogen ve tümör baskılayıcı genlerin KRK'de de mutasyona uğrar (Fearon, 2011).

KRK Sınıflandırılması:

- 1- Ailesel fakat sınıflandırılmamış KRK (%20 oranında)
- 2- Sporadik KRK (%75) oranında
- 3- Herediter nonpolipozis KRK (Lynch sendrom) (%3 oranında)
- 4- Ailesel adenomatöz polipozis (%1 oranında)
- 5- Diğer nadir görülen sendromlar (%1 oranında)

2.1.2. Etiyolojisi

2.1.2.1. Risk faktörleri

KRK'nın ortaya çıkmasına sebep olan risk faktörlerini 13 kategoride değerlendirmek mümkündür. Bunlar;

Yaş: KRK için yaş ciddi bir risk faktörüdür olgular genellikle 40 yaş üstünde görülür. Hastalar 50 yaş üstü tanı alırlar. KRK teşhisi 60'lı yaşlarda görülür. 60 ve 79 yaş aralığındakilerin taşıdığı KRK riski 40 yaş altındakilere göre 50 kat daha yüksektir (Ries ve diğ., 2008; American Cancer Society, 2005).

Sigara Tüketimi: Tütün ve sigara kullanımı KRK için bir risk faktörüdür. KRK hastalarının yüzde 12'sinin ölüm nedeni sigara içme faktörüdür (Zisman ve diğ., 2006).

Alkol Kullanımı: 40 yaş altı kişilerde yoğun alkol tüketimi (45 g/gün'den fazla ise) KRK ile özellikle distal kolon tümörleri ile ilişkilendirilmiştir. Alkolün organizmadaki reaktif metabolitlerinden olan asetaldehit karsinojenezden sorumludur (Pöschl ve Seitz, 2004).

Coğrafya: KRK geniş coğrafi alana sahiptir. KRK'nın en sık görüldüğü yerlerden gelişmiş ülkeler Kuzey Amerika, Kuzey ve Batı Avrupa, Avustralya'dır. Gelişmekte olan ülkelere riski daha azdır bu ülkelere Afrika, Orta ve Güney Amerika'yı örnek verebiliriz (GLOBOCAN 2012).

Ailede KRK Hikayesi: Eğer bir kişinin 1. derece akrabasında KRK varsa o kişide kanser gelişme riski 2-4 kat artmaktadır. Eğer 1.dereceden olan KRK'lı akrabanın yaşı 50'nin altında ise o kişi de risk daha da artar (Sadler, 1996).

Genetik Bozukluklar: Spesifik genlerdeki değişiklikler KRK oluşturma riskini artırır. Genetik bozukluklarla KRK ilişkisi %5-10'dur (Jackson-Thompson ve diğ., 2006).

Fiziksel Aktivite ve Obezite: Beslenme tarzında yağlı ve posasız yiyeceklerin tüketimi ve şişmanlık KRK için önemli bir risk faktörüdür (Willet, 1999). Fiziksel aktivitenin azlığı ve sedanter bir yaşam KRK riskini artırmaktadır. Özellikle erkeklerde daha ciddi bir durumdur. Yapılan bir çalışmada fiziksel aktivitenin KRK üzerine koruyucu etkisi kadınlarda daha az olduğu tespit edilmiştir (Howard ve diğ., 2008).

Diyet: İşlenmiş besin kullanımı kırmızı et ve alkol tüketiminin artması kalsiyum ve süt ürünlerinin tüketiminin azlığı, posasız yiyeceklerin kullanımı KRK riskini artırır (Yang ve diğ., 2016).

Diyabet: KRK ile diyabet arasındaki ilişkiyi anlamak için yapılan bir meta analizde diyabetli kişilerde KRK riskinin olmayanlara göre %30 daha fazla olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Diyabetli kişilerde bağırsak düzeninin yavaş olmasından dolayı bağırsak mukozasını tahriş edici maddelere daha çok maruz kalması sebep gösterilebilir (Larsson ve diğ.,2005).

Polipler: Hamartomatöz, juvenil polipozis ve adenomatoz poliplerde KRK riskini artırır. (Desai ve diğ., 1995; Spigelman ve diğ., 1989).

İnflamatuvar Bağırsak Hastalığı: Ülseratif kolit ve Crohn hastalığı gibi iltihabı bağırsak hastalığına sahip kişilerde olmayanlara göre 4 ile 20 kat daha KRK riski yüksektir (Janout ve Kallarova, 2001).

Radyoterapi: Vajinal kanser, serviks ve prostat kanserleri sebebiyle radyasyon tedavisi alanlarda rektum kanserinin 15 yıl içinde oluşma riski vardır (Gönen, 2004).

HIV (Human immunodeficiency Virus): HIV'in bazı türleri kororektal neoplazi riskini oluşturmaktadır (Cross ve diğ., 2010).

2.1.2.2. Koruyucu faktörler

KRK'dan koruyucu bazı faktörler bulunmaktadır. Bunlar:

- 1- Diyet
- 2- Folik Asit Kullanımı
- 3- B6 vitamini (Pridoksin)
- 4- Kalsiyum
- 5- Magnezyum
- 6- Sarımsak
- 7- Balık
- 8- Fiziksel Aktivite
- 9- Aspirin
- 10- Antioksidanlar

11- Postmenopozal Hormon Tedavisi

KRK'de beslenmenin kanser oluşumunun önleminde önemli etkileri bulunmaktadır (Hamilton ve diğ., 2010). Doğru ve sağlıklı beslenme ile KRK vakalarının yüzde 80'i kadarının önlenileceği bildirilmiştir (Gönen, 2004). Birçok girişimsel çalışmada kolorektal adenomlardan korunma konusunda antioksidanların yararlı olduğu bildirilmiştir (Fletcher, 2014).

2.1.3. KRK tanısı

Tanı koyma fizik muayene, hikâye ve tanısal testler ile yapılır. Bulgular primer tümörün bulunduğu yere göre değişmektedir. Karın ağrısı, açıklanamayan demir eksikliği, bağırsak alışkanlıklarındaki değişimler, kabızlık veya ishal, halsizlik, yorgunluk, çarpıntı, anemi, kilokayı, gaitada gizli kan, batında kitle bulgular arasındadır (Heinemann, 1994).

2.1.4. KRK tarama yöntemleri

KRK tanısı koyulabilmesi için çok çeşitli tarama yöntemleri bulunmaktadır. Bunlar;

- 1- Dijital rektal muayene
- 2- Çift kontrastlı baryumlu kolon grafisi
- 3- Kolonoskopi
- 4- Sanal kolonoskopi
- 5- Sigmoidoskopi
- 6- Gaitada gizli kan testi

2.1.5. KRK tedavisi

Tedavi de ilk müdahale cerrahidir. KRK evresine göre kemoterapi, ameliyat öncesi veya sonrası uygulanabilir. Ostomi sürekli veya geçici olarak tümör çıkarımından sonra uygulanabilir. Radyoterapi de uygulanabilecek seçenekler arasında yer almaktadır (Akçal ve Ertürk, 2010).

2.2. Serbest Radikaller

Serbest radikal, bir atomun orbital kısmında bulunan bir ya da daha fazla eşleşmemiş elektron taşıyan, organizmada, metabolizma esnasında meydana gelen ve bağımsız olarak bulunabilme özelliğine sahip reaktif atom veya moleküllerdir (Halliwell, 1994; Young ve Woodside, 2001). Atomlar en dış orbitalleri tam dolu ya da boşken kararlı formdadırlar. Serbest radikaller ise eşleşmemiş elektronlardan dolayı reaktiflerdir ve kararsızlardır. Kimyasal formüllerinin sağ üst kısmına konulan nokta ile serbest radikaller ifade edilirler

(Gutteridge, 1994). Oksijen molekülü (O_2) doğal olarak O_2 şeklinde bulunmaktadır ve stabil değildir. O_2 bir elektron aldığı zaman süperoksit radikali oluşur ve eşleşmemiş bir elektronu olduğundan kararsızlaşarak oksitleyici veya indirgeyici olabilir (Southorn ve Powis, 1998). Serbest Radikaller, bazlarda ve deoksiribozlarda kırılmalar ve hasarlar oluşturmaz. DNA zincirinde kopmalar meydana getirir. Sonuç olarak da mutasyon ve malign değişim potansiyeli meydana gelebilir ve sitotoksikite oluşabilir (Chopineau ve diğ., 1994).

Peroksit radikali (O_2^{2-}) ise O_2 molekülünün iki elektron almasıyla ya da süperoksit radikalının bir elektron almasıyla oluşabilir. Peroksit radikali çok zararlı olmasa da hidrojen peroksit (H_2O_2) dönüşebilmesi sebebiyle tehlikelidir. Hidrojen peroksit, süperoksit radikalının bir elektron ve iki proton alması ya da peroksitin iki proton alması sonucu oluşur. Yüksüz bir molekül olan hidrojen peroksit, radikal olmamasına rağmen çok reaktif olduğu için serbest radikal oluşturan tepkimelere katılır. H_2O_2 , demir (Fe), bakır (Cu) gibi metallerin iyonları ile reaksiyona girerek toksik olan hidroksil radikale (OH^{\cdot}) dönüşmektedir (Kehrer, 2000).

Biyolojik sistemlerde OH^{\cdot} karşılaşılan en reaktif ve toksik maddedir. OH^{\cdot} , lipitler, nükleik asitler, elektronca zengin moleküller ve proteinlerle çok sayıda ara ürün oluşturabilir. Meydana gelen radikaller normal metabolitler olduğu için zarar vermezler, fakat vücutta antioksidan mekanizmaların yeterli olmadığı durumlarda oluşan serbest oksijen radikallerinden kaynaklı hasarlar meydana gelir (Nakazawa ve diğ., 1996). Oksijenli solunum yapan hücrelerde serbest radikaller metabolizmada çok miktarda üretildiklerinde karbonhidrat, protein, DNA ve lipit gibi hücre içi biyomoleküllerin işlevlerinde olumsuz etkilere sebep olurlar. Serbest radikaller dışında biyomoleküllere reaktif oksijen türleri (ROS) ve nitrojen türevleri de etki eder (Lander, 1997).

Serbest radikaller; elektron transferi ile moleküldeki kovalent bağların homolitik kırılması ve dolayısıyla elektronların ayrı ayrı farklı ortamlar üzerinde kalması ile oluşur. İyonize radyasyon da serbest radikal oluşturur. Serbest radikallerin esas kaynağı moleküler oksijendir (Halliwell ve diğ., 1992). Serbest radikallerin organizmada oluşma hızı ile antioksidan sistem tarafından serbest radikallerin bertaraf edilmesi arasında oksidatif bir denge bulunmaktadır. Bu denge olduğu sürece serbest radikallerin zararlı etkileri görülmemektedir. Aksine antioksidan sistemden kaynaklanan savunma sıkıntısı varsa serbest oksijen radikali (SOR) üretimi artar. Meydana gelen doku hasarına ise “oksidatif stres” denir (Chauhan ve diğ., 2011; Serafini ve Del Rio, 2004).

Serbest radikallerin belirli bir limite üretiminde; bağışıklık sisteminde, fagositozda, hücrel sinyal iletiminde, enzim aktivasyonunda, hücrelerin biyogenezinde, kas kasılması

ve kimyasal tepkimelerin takibinde faydaları bulunmaktadır. Üretim fazlalığında ise; doku hasarı, fonksiyon bozuklukları ve inflamasyon oluşturur (Revan, 2007; Singh, 2009). Serbest radikallerin en önemli olanları biyolojik sistemlerde oksijen içerenlerdir ve bunlara "serbest oksijen radikalleri" (SOR), "oksidan molekülleri" veya "reaktif oksijen türleri" (Reaktive Oxygen Species=ROS) da denmektedir (Akkuş, 1995). Serbest radikaller ve reaktif azot türleri tablo 2.1 de gösterilmiştir.

Tablo 2.1. Serbest Radikaller ve Reaktif Azot Türleri (Auroma ve Cuppett, 1997)

Reaktif Oksijen Türleri	
Radikaller	Nonradikaller
Süperoksit-----O ₂ ^{·-} Hidroksi-----OH [·] Peroksi-----RO ₂ [·] Alkoksi-----RO [·] Hidroperoksi--HO ₂ [·]	Hidrojen Peroksit—H ₂ O ₂ Hipoklorik Asit-----HOCl Hipobromik Asit---HOBr Ozon-----O ₃ Singlet Oksijen----- ¹ Δg ¹ O ₂
Reaktif Azot Türleri	
Radikaller	Nonradikaller
Nitrik Oksit----NO Azot dioksit----NO ₂	Nitroz Asit-----HNO ₂ Nitrozil Katyonu-----NO ⁺ Nitroksi Anyonu-----NO [·] Diazot tetraoksit-----N ₂ O ₄ Diazot trioksit-----N ₂ O ₃ Peroksinitrit-----ONOO [·] Peroksinitroz Asit-----ONOOH Nitronyum Katyonu----NO ₂ ⁺ Alkilperoksi nitriller----ROONO

Serbest radikaller endojen ve ekzojen kaynaklı olarak üretilebilirler.

Endojen Kaynaklar:

- Mitokondrideki elektron transfer zincirinden radikallerin sızıntısı primer kaynaktır.
- Radikaller aldehit oksidaz, ksantin oksidaz, nikotinamid adenin dinükleotid fosfat oksidaz enzimlerinin katalitik çevriminde meydana gelebilir.
- Hücre membranına bağlı olan sitokromların oksidasyon reaksiyonlarında oluşmaktadır.
- Peroksizomlardaki birçok enzim hidrojen peroksit üretmektedir.
- Serbest radikaller, araşidonik asit metabolizmasında, düz kas hücreleri ve trombositler tarafından üretilirler.
- Strese bağlı olarak organizmada toksik yan ürün olarak serbest radikaller üretilir.

Ekzojen kaynaklar:

- X ışınları, elektromanyetik radyasyon ışınları, gama ışınları.
- İlaçlar (Kemoterapötik ilaçlar)
- Alkol ve sigara kullanımı, egzoz dumanı,
- Temizlik ürünleri, böcek ilaçları, parfümler

-Su kirleticiler= Trihalometan, kloroform

-Boya, tiner ve tutkal

-Ozon, asbest, toluen, benzen ve karbonmonoksit gibi havayı kirleten maddeler.

2.3. Antioksidanlar

Hücrenin yapısındaki lipid, karbonhidrat, protein, DNA gibi maddelerin oksidasyonunu geciktiren ve engelleyen moleküllere" antioksidanlar " denir. Bu olaya da "Antioksidan Savunma Mekanizması"denir (Valko ve diğ., 2006). Antioksidan moleküller, vücut tarafından üretilen endojen kaynaklı ya da dış ortamdan gıdalar ile alınabilen ekzojen kaynaklı da olabilen, oluşan serbest radikallere ve oksidan moleküllere bir elektron vermesi sayesinde radikalın hasarını engelleyen kararlı bir yapıdırlar. Antioksidan savunma mekanizması ile oksidan ve radikallerin miktarı oksidatif dengede ise organizma sağlıklıdır denilebilir. Bu dengenin bozulması durumunda ise "oksidatif stres" ortaya çıkar (Çavdar ve diğ., 1997).

Antioksidanların etki prensipleri şunlardır;

- 1- Antioksidan koruma kimyasal tepkimelerle, doğrudan ya da enzim aktivitesiyle yapılarak,
- 2- Oksijen içeren molekülleri en az seviyede tutarak,
- 3- Reaktif metabolizma ürünlerinin aktivasyonlarının düşürülmesiyle ve de toksik olmayan ürünlere dönüştürülmesi ile temizleyerek,
- 4- Antioksidan moleküllerin metal iyonlarını bağlayarak oluşturacakları kalıcı zararları engelleyerek,
- 5- Tamir mekanizması ile hasar tamirini gerçekleştirerek,
- 6- Tamiri yapılamayan ürünleri uzaklaştırarak yapılır (Splettstoesser ve Werner, 2002).

2.3.1. Antioksidanların sınıflandırılması:

Antioksidanlar farklı özelliklere göre sınıflandırılmaktadırlar. Çözünürlükleri, yerleşim yerleri, yapıları ve kaynaklarına göre gruplandırılmaktadırlar (Akkuş, 1995). Çözünürlüklerine göre yağda ve suda çözünen; yerleşim yerlerine göre ekstraselüler ve intraselüler yapıda olan, yapılarına göre fenolik, organosülfür bileşikleri ve aromatik yapıda olan, kaynaklarına göre ise ekzojen ve endojen kaynaklı olarak sınıflandırılırlar. Tablo 2.2’de ve Tablo 2.3’de endojen ve ekzojen antioksidanlar gösterilmiştir.

Tablo 2.2. Endojen Antioksidanlar (Bulmuş, 2006)

ENDOJEN ANTIOKSIDANLAR		
1. Enzimatik Antioksidanlar	2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar	
-Süperoksit Dismutaz (SOD) -Katalaz(CAT) -Glutasyon Peroksidaz(GSH-Px) -Glutasyon-S-transferaz(GST) -Mitokondrial sitokrom oksidaz -Hidroperoksidaz	I.Makromoleküller -Seruloplazmin -Transferin -Ferritin -Hemoglobin -Miyoglobin	II.Mikromoleküller -Vitamin E -Vitamin C -Vitamin A -Tiyol içerenler: Glutasyon N-asetil sistein Metyonin Kaptopril -Glukoz -Ürik asit -Bilirubin -Albumin -Ubiquinon -Melatonin -Selenyum -Lipoik asit

Tablo 2.3. Ekzojen Antioksidanlar (İşbir, 1994)

EKZOJEN ANTIOKSİDANLAR		
Vitamin olan ekzojen antioksidanlar:	İlaç olarak kullanılan ekzojen antioksidanlar:	Gıdalardaki ekzojen antioksidanlar:
- α -takoferol(vitamin E) - β -karoten -Askorbik asit (vitamin C) -Folik asit	-Ksatin oksidaz inhibitörleri (allopürinol, oksipürinol, pterin aldehit, Tungsten), -NADPH oksidaz inhibitörleri (adenozin,lokal anestezikler) -Kalsiyum kanal inhibitörleri, nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar (diphenyline iodonium) -Rekombinant süperoksid dismutaz, -Trolox-C(vitamin E analogu) -Endojen antioksidan aktiviteyi artıranlar (GSH-Pxaktivitesini artıran ebselen ve asetilsistein) -Non-enzimatik serbest radikal toplayıcılar (mannitol, albümin) -Demir redoks döngüsüinhibitörleri (desferroksamin), -Nötrofil adezyon inhibitörleri -Sitokinler(TNF ve IL-1), -Barbitüratlar, -Demir şelatörleri.	-Bütıl hidroksi tolüen, -Bütıl hidroksi anizol -Sodyum benzoat -Ethoksikuin, -Propil galat -Fe-süperoksid dismutaz.

Gıda endüstrisinde genellikle bütillenmiş hidroksi tolüen (BHT), propil gallatlar (PG), bütillenmiş hidroksi anizol (BHA) ve tersiyer bütillenmiş hidroksikinon (TBHQ) gibi sentetik antioksidanlar kullanılır. Bu sentetik antioksidanlarla yapılan çalışmalarda, deney hayvanlarına uygulanan düşük dozların kanseri önleme yeteneği görülmüş, fakat yüksek dozlarda ise karaciğer hasarına ve karsinogeneze sebep olduğu ortaya çıkmıştır. Dolayısıyla bu durum göz önüne alınarak doğal antioksidanlara olan yönelme ve ilgi artmıştır (Bobek ve diğ., 1998; Kosanic ve diğ., 2012).

2.4. DNA Hasarı

Deoksiribonükleik asit, organizmalar için yapısı bilinen en önemli biyomoleküldür. DNA bir organizmaya ait tüm genetik bilgiyi içerir ve diğer soylara aktararak devamlılığını sağlar. Organizmaların ve virüslerin genetik bilgilerinin replikasyonu ve transkripsiyonu boyunca enzim ve proteinlerin sentezi önemlidir (Wang, 2000; Gooding, 2002). DNA, tüm başka moleküller gibi çeşitli kimyasal reaksiyonlara maruz kalabilir. Fakat DNA, insan genomunun kalıcı tek kopyası olduğu için, DNA'nın yapısında meydana gelebilecek herhangi bir değişiklik, hücrenin diğer bileşenlerindeki değişikliklerden daha önemli sonuçlar yaratır (Copper, 2016).

DNA, evren genelindeki tüm canlıların hayatta kalması, gelişimi, devamlılığı ve fonksiyonları için gerekli olan genetik bilgiyi şifreler (Swift ve Golsteyn, 2014). DNA'nın moleküler bütünlüğünde endojen ve ekzojen faktörlerin etkisiyle oluşan tüm değişiklikler "DNA hasarı" olarak ifade edilir (Kulaksız ve Sancar, 2007). İnsan genomunda günlük ortalama 10^5 'den fazla ekzojen ve endojen kaynaklı DNA hasarı oluşmaktadır (Lindahl, 1993).

Endojen kaynaklı sebepler; hücre DNA'sında gelişigüzel oluşan hatalar, metabolizma yan ürünleri olan reaktif oksijen türleri (ROS), lipid peroksidasyon ürünleri, azot ürünleri, alkilasyon ajanları, kolesterol ve östrojen metabolitleri söylenebilir. (De Bont ve Van Larebeke, 2004; Hoeijmakers, 2009; Iyama ve Wilson, 2013).

Ekzojen kaynaklı sebepler ise; kemoterapötik ilaçlar, elektromanyetik dalgalar, kimyasal ajanlar, iyonize radyasyon, UV ışığı, hava kirliliği, ağır metaller, sigara dumanıdır (Hoeijmakers, 2009; Ciccia ve Elledge, 2010, Jepsen ve diğ., 2011; Iyama ve Wilson, 2013).

Endojen ve ekzojen DNA hasarları özetlenirse;

Endojen (spontan) Etkenler:

- Yanlış eşleşmeler (insersiyon/delesyonlar),
- Kimyasal değişiklikler: (deaminasyon, metilasyon),
- Baz kayıpları: (depurinasyon/depurimidinasyon),
- Oksidatif hasar: 100.000/hücre/gün
- Replikasyon hataları

Nokta mutasyonları deamine bir bazın onarılamaması durumunda görülebilir. Depurinizasyon, purin bazlarının (adenin ve guanin) glikozil bağlarının hidrolize olmasından dolayı kaybolmasına denir. Günlük 5000 kadar purin bazı kaybolur. Yine aynı şekilde günde ortalama 100 baz çiftini sitozinin urasil deaminasyonu etkiler. Somatik

mutasyonlar, endojen etkenlerle oluşan hasar onarılmazsa meydana gelir (Yetişmiş; Duguid ve diğ., 1995).

Ekzojen (çevresel) Etkenler:

- Kimyasal ajanlar: Kemoterapi ilaçları, aflatoksin, alkilleyici ajanlar, benzopren, vinil klorid, mustard gazlar vb.

- Fiziksel ajanlar: İyonize radyasyon, UV (Ultraviyole) radyasyon, vb.

Benzopren hücre içerisinde okside olarak kanserojenik etkisi olmadığı halde kanserojenik hale gelir. Benzopren DNA'daki G-C bağlantısının arasına girerek heliks yapısını bozar. Deri kanseri riski ile UV ışınlarının bağlantısı vardır. UV ışınları mutajenik olduğu için pirimidinlerin kovalent bağlanarak dimerlerinin oluşmasına yol açar. En sık görülen dimer T-T'dir. Replikasyonu, Timin dimerleri DNA polimerazın etkinliğini ve DNA konformasyonunu bozarak durdurur (Yetişmiş; Arlet ve diğ.,2006). DNA'da zincir içi çapraz bağların oluşumuna ve çift zincir kırıklarına alkilleyici ajanlar ve sisplatin gibi kemoterapötik ilaçlar sebep olmaktadır. Reaktif oksijen türleri (ROS) oksidatif DNA hasarına sebep olurlar. 8-hidroksideoksiguanin 8-(OH-Gua) mutasyona sebep olmaktadır (Balajee vd., 2000). 8-OH-Gua replikasyon sırasında adeninle baz çifti oluşturduğu için mutajeniktir. 8-OH-Gua, G:C yerine kanserlerde en çok görülen mutasyon olan T:A transversiyonuna yol açar (Yetişmiş, Verjat ve diğ.,2000).

DNA molekülü, onarılabilen tek biyomoleküldür (Friedberg, 1984; Zhang ve diğ.,2009). DNA onarımında ortalama 130 gen vardır ve hasar tamirinde yer alan protein kodlarlar. Protein kinazlar ATM/ATR (ataxi-telenjiektazi mutasyonu/ Rad3-ilişkili) ve p53 sinyal yolu radyasyondan kaynaklanan DNA hasarını tamir eder (Zhang ve diğ., 2009). Organizmada DNA hasarı tespit edildiğinde, sistemdeki proteinler oluşan lezyonu algılayıp, hücre döngüsünün durdurulması, gen ifadesinin değişmesi, DNA tamirinin aktifleştirilmesi, apoptoz, kanser ve yaşlanma gibi adımları izler. (Hopfner ve diğ., 2002).

2.5. Beta Glukan

2.5.1. Beta glukan kaynakları ve yapısı

Beta glukanlar, doğada mantarlarda; buğday, arpa, çavdar, yulaf gibi tahıl bitkilerinde; ekmek mayasında ve bakteri gibi bazı mikroorganizmaların hücre duvarının yapısında var olan glikoz zincirlerinden oluşan ve antioksidan özelliği fazla olan polisakkarit polimerleridir (Kim ve diğ., 2006; Sener ve diğ., 2006).

Turp, havuç, kereviz gibi besinlerin toplam karbonhidrat miktarının %20'si ve kuru soyanın ağırlıkça %0,8'i beta glukan içerir (Babiček ve diğ., 2007).

Glukanlar, glikoz monomerlerinin glikozidik bağlarla bağlanarak β (Beta)(1,3) bağı ile doğrusal bir zincir oluşturması ve bu zincirlere glikoz monomerlerinin β (1,6) bağları ile bağlanarak dallanmalar göstermesi neticesinde meydana gelmektedirler (Babiček ve diğ., 2007).

(1,3)- β doğrusal yapıda olan beta glukanlar bakterilerde bulunur. (1,3)(1,6)- β -D glikoz polimerleri, mantar ve mayaların hücre duvarlarındaki dallanmış beta glukanlardır. (1,3)(1,4)- β -D glukanlar ise dallanmamış olarak tahıllarda mevcuttur (Butt ve diğ., 2008). Farklı kaynakların beta glukan örnekleri ve tanımları tablo 2.4'te gösterilmiştir.

Tablo 2.4. Farklı Kaynakların Beta Glukan Örnekleri ve Tanımları (Volman ve diğ., 2008).

Beta Glukan Tipi	Tanımı
Bakteriyel	Linear β (1,3) glukan (örneğin Kurdlan)
Mantar	Kısa β (1,6) dallı, β (1,3)glukan (örneğin Schizophyllan)
Maya	Uzun β (1,6) dallı, β (1,3)glukan (örneğin WGP β -glukanBetafektin TM)
Tahıl	Linear β (1,3)/ β (1,4)glukan (örneğin çavdar, arpa ve yulaf)

Yulaf ve arpadaki beta glukan, yüksek molekül ağırlığına sahip (6,5 kD) suda çözünen polisakkaritlerdir ve yulaftaki içeriği %2,3-8,5 olup hücre duvarında bulunur. Arpadaki içeriği ise %3-11 olup endosperm hücre duvarında bulunur (Butt, 2008; Theuwissen ve Mensink, 2007; Lyly, 2006).

Ticari olarak satılan beta glukan preparatları *Cerevisiae*'den; *Phellinuslinterus* ve *Sparassis Crispa* gibi mantarlardan elde edilir (Butt ve diğ., 2008). Beta glukanlar ve glikoproteinler

mantar ve mayaların hücre duvarlarının yapısını meydana getirirler (Akramiene ve diğ., 2006). Beta glukun, mantar hücre duvarının kütlece yarısını oluşturur (Chen ve Seviour, 2007). Yan zincirlerinin dallanma yapılarına göre beta glukunlar; epiglukan, kurdlan, şizofilan, pestolotan, lentinan, krestin gibi spesifik isimlendirilirler (Chen ve Seviour, 2007). Makrofaj, T ve B hücreleri, NT hücreleri, monosit, Langerhans hücresi (beyaz kan hücresi çeşidi), alveolarepitel hücre, fibroblast ve eozinofil gibi organizmada immün ve immün olmayan hücreler üzerinde beta glukun reseptör aktivitesi belirlenmiştir (Brown ve Gordon, 2003).

Granülosit, monosit, makrofaj ve dentritik hücre gibi immün hücrelerin fagositoz özelliğini arttıran beta glukun, bu hücrelerin çoğalmalarını aktive ederek immün sistemin savunma etkinliğini artırır. Makrofajlar, dentritik hücreler, nötrofiller, NT (Natural Killer, doğal öldürücü) hücreler ve T hücrelerin yüzeyinde var olan PRR (patern tanıyan reseptör)'lerini beta glukunlar tanırlar ve bağlanırlar.

PRR reseptörleri şunlardır:

- 1- CR 3 (Komplement reseptör, çoğunlukla makrofajlar NT hücreler ve nötrofillerde mevcuttur),
- 2- Dectin-1 reseptörü (Genellikle makrofajlarda mevcuttur),
- 3- Laktosileramid,
- 4- TLR-2 (Toll-benzer reseptör-2)'dir.

CR 3'e bağlanan düşük molekül ağırlıklı beta glukun glomerular filtrasyonla kandan temizlenir. Büyük molekül ağırlığı olan beta glukun polimerleri ise karaciğerde metabolize olmaktadır (Brown ve diğ., 2003; Bedirli ve diğ., 2003).

Beta glukunların immün olmayan ön hipofiz hücreleri, epitelyal hücreler, fibroblastlar, vasküler endotelyal hücrelerde de reseptörlerinin olduğu bilinmektedir. Dolayısıyla bu anlamda beta glukunların organizmada etki alanı büyüktür (Williams ve diğ., 1996; Rice ve diğ., 2005; Novak ve Vervicka, 2008). Hücrelerin yüzeyindeki reseptörlerin beta glukunı tanınmasıyla hücresel aktiviteler başlar (Williams ve diğ., 1996).

2.5.2. Beta glukunın antioksidan özelliği

Bir polisakkarit olan beta glukunın antioksidan özelliği; polimerlerin monosakkaritlerin düzenlenmesi ve onların derişimleri ile ilgilidir. 1 mg/ml derişimdeki tüm karbonhidratlar antioksidan özelliktedir. Anomerik hidrojenin uzaklaştırılmasıyla monosakkaritlerin serbest radikal azaltıcı etkisi meydana gelmektedir (Tsiapali ve diğ., 2001).

Beta glukanın antioksidan özelliğinin etki mekanizması tam net olarak bilinmemekle beraber pozisyonuna ve hidroksil gruplarına sahip olmasından ileri geldiği düşünülmektedir (Tsiapali ve diğ., 2001).

2.5.3. Beta glukanın biyolojik ve immünolojik fonksiyonları

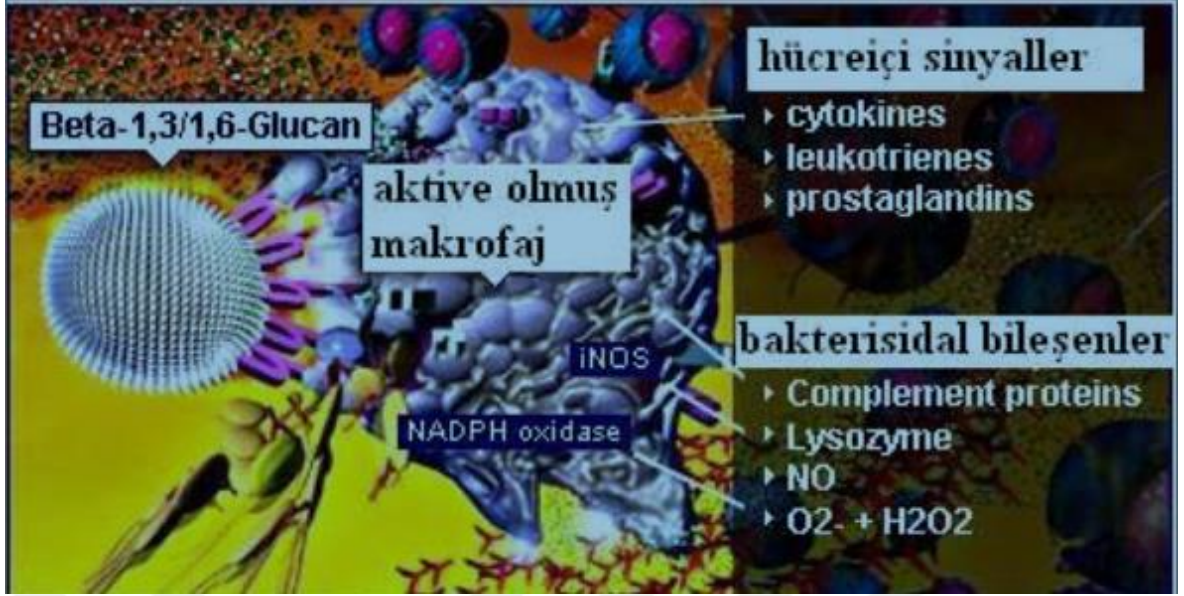
Beta glukun, 1960 yılında Dr. Nicolas Di Luzio tarafından tanımlanmış ve immün sistemi aktive ettiği keşfedilmiştir. Beta glukunun etkinliği molekül dizilişindeki farklılıklardan ileri geldiği tahmin edilmektedir (Rasmussen ve Seljelid, 1991; Abel ve Gzap, 1992).

Beta glukunların farklı bağlantı ve dallanma derecesi, su veya alkalilerdeki solubilitesi, molekül ağırlığı, polimer yükü, üç boyutlu yapısı, izolasyon kaynaklarındaki çeşitlilik, polimerlerin primer, sekonder, tersiyer yapıları biyolojik aktivitelerini etkileyen sebeplerdir (Keser ve Bilal, 2008).

Çeşitli beta glukunların sahip oldukları farklı karakteristik özellikler immün sisteme tesir etmelerinde farklılıklar meydana getirir. Funguslardan izole edilen molekül ağırlığı fazla olan beta glukunlar direkt olarak lökositleri aktive ederlerken, düşük molekül ağırlıklı beta glukunlar ise sadece sitokinler tarafından uyarılan bağışıklıktan sorumlu hücreleri aktive ederler (Volman ve diğ., 2008).

1990'lı yıllara doğru makrofajlarda beta glukun reseptörlerinin var olduğu ve beta glukunun makrofajlar yüzeyinde bulunan spesifik reseptörlere etki ettiği ve bu reseptörlere bağlanarak makrofajların aktivasyonuna sebep olduğu belirlenmiştir (Abel ve czop, 1992; Rasmussen ve Seljelid 1991). (Şekil 2.6.'da gösterilmiştir).

Şekil 2.1. Beta Glukan Etkileri



İnsan metabolizmasında beta glukan sentezlenmediği için vücuda oral olarak ya da intravenöz yolla alınabilir. Beta glukanın vücuda alımıyla immün sistem hücreleri tarafından algılanır (Brown ve Gordon, 2005).

Beta glukan vücuda oral yolla alındığında kemik iliğindeki granüositlere makrofajlar vasıtasıyla ulaşır aktive ederler, intravenöz yolla alındığında ise makrofaj desteği olmadan doğrudan kemik iliğindeki granüositlere ulaşır aktive eder (Hong ve diğ., 2004).

Oral yolla alınan beta glukanlar ortalama 30 dakika içinde gastrointestinal sistemden emilmekte ve bağırsak duvarındaki makrofajlar ile spesifik reseptörlere bağlanmaktadır. Ayrıca beta glukan emilimi dışında bağırsaklardaki lenf nodüllerinden (peyer plağı) bölgelerinden alınarak sitokin salınımını fazlalaştırarak immün sistemi aktive ederler (Bedirli ve diğ., 2003; Chihara, 1992; Zekovic ve diğ., 2005).

Mide asidine dayanıklı olan beta glukan, mideden değişikliğe uğramadan geçer (Bedirli ve diğ., 2003). Beta glukan, bağırsakta (B-(1,3) Glukanaz enzimi var olmadığı için glikoz ve d-glikoza parçalamadığından bağırsak duvarından absorbe edilemez (Bedirli ve diğ., 2003).

Glukan metabolik reaksiyonlarının bitiminde glikoza dönüşür (Adachi ve diğ., 1993). Beta glukanlar hem doğal hem de adaptif immüniteyi etkileyen güçlü immünstimülantlardır (Kim ve diğ., 2011). Beta glukanın immünostimülant olduğunun göstergesi kanser hücre büyümesinin engellenmesiyle ve antimetastatik etki göstermesiyle bakteriyel infeksiyonun baskılanması ve önlenmesiyle açıklanabilir (Gardiner, 2000). Beta glukanın immün sistemi aktive etmesi ve immünoregülatör aktiviteleri onun önemli biyolojik fonksiyonudur. Diğer

özelliklerini bu aktivitelerine göre uygular. Beta glukanın makrofajlardan sitokinlerin salınmasını stimüle etme veya baskılama özelliği immüno-regülatör özelliğidir (Gardiner, 2000).

1960'lı yıllarda, Japonya'da Lentinus edodes mantarından izole edilen bir glukun molekülü olan lentinanın immünomodülatör ve anti-karsinojen etkisi ispatlanmıştır (El Enshasy ve Hatti-Kaul, 2013).

İnsanlar üzerindeki uygulamalarda, beta glukun kullanımının hücrelerdeki glikoz harcamasının yükseldiği ve kan kolesterolünü düşürdüğü gösterilmiştir (Delaney ve diğ., 2002).

İnsanlarda uygulanan diyetle glikoz toleransının %10 beta glukun eklenmesiyle arttığı ifade edilmiştir (Gardiner, 2000).

Beta glukunlar hasarlı dokuları yenileme ve onarımı yetisine de sahiptirler (Kordon 2010).

Beta glukun yaranın iyileşmesine yardımcı olur, miyokardiyal reperfüzyon hasarına karşı vücudu savunur, Ig A salınımını artırır (Sandviv ve diğ., 2007).

Beta glukunlar (LDL, low density lipoprotein) düşük yoğunluklu lipoprotein düzeyini düşürür ve antibiyotiklerin aktivitelerini yükseltir (Kassai ve diğ., 2001).

Beta glukunlar gıda sanayisinde vizkozite artırıcı vasfıyla naturel hidrokloridler olarak kullanılırlar (Byun ve diğ., 2008).

Beta glukunın en önemli aktivitelerinden birisi de hematopoezi stimüle etmesidir (Novak ve Vetvicka, 2008).

Beta glukun kullanımı kabızlık probleminde de etkili bir çözüm olmaktadır. Beta glukunlar merkezi sinir sisteminde mikroglia hücrelerini etkinleştirirler. Mikroglia hücrelerinin AIDS, MS hastalığında ve Alzheimer'da olumlu etkileri vardır (Jaehrig ve diğ., 2008).

2.5.4. Beta glukun-patojen ilişkisi

Beta glukunların temel immüno-farmakolojik aktivitelerinin, konakçının bakteriyel, viral fungal ve parazitik infeksiyonlara direncinin artırılması, karsinogenezden korunma ve antitümör etki, zararlı ışınların etkilerinden korunma, immün sistemi kuvvetlendirme, retiküloendotelial sistemin fagositik ve proliferatif aktivitesinin artırılmasını içermektedir (Carrow, 1996; Browder ve diğ., 1998).

Kozmetik, tıp ve farmakolojik kullanımlar için maya beta glukunları uzun süredir kullanılmaktadır (Herbert, 2008). β -(1,3) Glukunların immünolojik ve farmakolojik etkileri ile ilgili çok fazla sayıda çalışmalar yapılmaktadır (Li ve diğ., 2005).

Beta glukunın infeksiyon düzeyini düşürdüğünü göstermek için bir çalışma yapılmıştır. Bu çalışmada; ağır travma hastalarından oluşan iki gruptan birine sadece antibiyotik ile tedavi,

diğer gruba antibiyotikle beraber beta glukan verilmiştir. Hastalarda oluşabilecek komplikasyonlar ile mortalite insidansı ölçütleri incelenmiştir. Tamamlanan çalışmada antibiyotikle beta glukan tedavisi uygulanan hastalardaki sonuçlar sadece antibiyotik verilen gruba göre değerlerinde anlamlı bir azalış görülmüştür (Felippe ve diğ., 1993).

Jung ve arkadaşları beta glukanın domuz gribi üzerine etkisini araştırdıkları bir çalışmada; beta glukanla tedavi edilen bir grup domuzdaki akciğer lezyonlarında azalma olduğu ve virüsün daha az yayıldığı dolayısıyla bu bileşiğin influenza virüsünün yarattığı infeksiyonlarda tercih edilebileceğini göstermişlerdir (Jung ve diğ., 2004).

2.5.5. Beta glukanın yan etkisi

İmmünoterapi özelliği ve immün sistem uyarıcı özelliği olan beta glukanlar ilaç kategorisinde sınıflandırılırlar (Portera ve diğ., 1997). FDA (Food and Drug Administration, Amerika Birleşik Devletleri Sağlık Bakanlığına bağlı gıda ve ilaçtan sorumlu bürosu)'ya göre GRAS (Generally Recognised As Safe, genellikle güvenli olarak kabul edilir) sınıflandırmasında beta glukanların herhangi bir zararı, toksik ve yan etkisinin olmadığı tespit edilmiştir (Carrow, 1996).

2.6. Comet Assay Yöntemi

2.6.1. Tarihçesi

DNA'ya ve genlere toksik etki göstererek mutasyonlara ve çeşitli kanserlere yol açan kimyasal maddeler ve radyoaktif elemanların (genotoksik) ve hücreye toksik şekilde etki edip hücreyi öldüren ya da fonksiyonunu durduran maddelerin (sitotoksik) etkileri sonucu oluşan DNA hasarlarının seviyelerinin tespit edilmesine yarayan önemli bir yöntemdir. Genotoksik ve sitotoksik etkenler dışında oksidatif stresin de DNA hasarı oluşumunda payı olduğundan bu alandaki çalışmalarda da kullanılan bir metottur. Comet Assay yöntemine (kuyruklu yıldız benzer) Tek Hücre Jel Elektroforez Yöntemi (SCGE) de denilmektedir. Hücrelerde çeşitli türdeki DNA hasarını belirleyebilen hızlı, güvenilir, ucuz, duyarlı, etik, doğru neticeler veren kantitatif bir metottur. Kullanımı çok yaygındır. Moleküler çalışmalarda hücresel bazda birçok biyomarker üzerinde son zamanlarda yer almaktadır. Comet yöntemi de bu çalışmalardan biridir.

1978 yılında Rydberg ve Johanson isimlerinde iki araştırmacı hücre bazında DNA tek sarmal kırıklarının tespiti için ilk kez DNA hasarı çalışması yapmışlardır. Mikroskopik lam üzerine yayılan agaroz jele DNA hasar tespiti yapılacak olan hücreler gömülmüştür. Hafif alkali ortamda bekletilerek DNA sarmalının açılması, hücre zarının parçalanması ve proteinlerden

uzaklaştırılması amaçlanmıştır. Hücrelerin nötralizasyon işlemi sonrasında, hücreler DNA akrininoranj ile boyanmıştır. Fotometre kullanılarak tek sarmal DNA kırıklarına kırmızı floresanın, çift sarmal DNA kırıklarına yeşil floresansın oranına göre DNA hasar oranını belirlemiştirlerdir (Fairbain ve diğ., 1995).

1984 yılında, Ostling ve Johanson, iki İsveçli bilim adamı, nötral yöntemi ilerleterek mikrojel elektroforez yöntemini geliştirmişlerdir. Bu yöntemde, agaroz jel mikroskop lamı üzerine yayılır, hücreler içine gömülür. Konsantre tuz ve deterjandan oluşan lizis çözeltisinde bekletilir. Hücrelerin membranları parçalanır. Kısa süreli olarak DNA'lara nötr pH'da elektroforez işlemi uygulanarak anoda doğru hızla hareket etmeleri amaçlanmıştır. Göç hızı, DNA'daki zincir kırığının miktarına göre artar. Bu göç kuyruklu yıldız benzer. Daha sonra DNA'lar etidyum bromür ile boyanıp yoğunluğunun floresans mikroskopta ölçülmesi ile tespit edilir (Ostling ve diğ., 1984).

Sing vd. 1988 yılında tek sarmal kırıklarını tespit edebilmek için kuvvetli alkali ortamda $pH > 13$ 'te elektroforez yapmışlardır (Singh ve diğ., 1988). Bu teknikte nötral ortamda uzaklaştırılmayan proteinler, kuvvetli alkali ortamda, proteinlerin %95'ten fazlasını uzaklaştırabilmektedir. Bu teknikte lama yayılmış yüksek erime noktalı agarın üzerine düşük erime noktalı agaroz (LMA) içerisinde hazırlanmış hücre süspansiyonu sandviç modelini oluşturur. $pH 10$ 'da yoğun deterjan ve tuzdan oluşan lizis çözeltisinde hücre parçalama işlemi yapılır. Daha sonra alkali ortamda kısa bir süre elektroforez yapılır. Tek zincir kırıklarının tespiti dışında, DNA hasar ve onarım tespiti ve tamir mekanizma çalışmalarında da kullanılabilir (Taylor ve diğ., 2000). Çok küçük hacimlerdeki örnekler uygulanabilmektedir ve bir gün gibi kısa bir sürede sonuçlara ulaşılabilmektedir.

Nötral koşullarda, DNA'daki çift sarmal kırıkları belirlenir, alkali koşullarda ise DNA'daki tek sarmal kırıkları belirlenir. Fakat DNA'ya hasar veren etkenler daha çok tek zincir kırıkları oluşturduğu için alkali yöntemler ($pH > 13$) DNA hasarını tespit etmede daha çok tercih sebebidir (Singh ve diğ., 1988; Ostling ve Johanson, 1984).

Olive vd., 1990'da Ostling ve Johanson'ın uyguladığı nötral yöntemi değiştirerek alkali ortamda hücrelerin membranlarını yok ettikten sonra elektroforezi nötral ya da orta alkali ortamda yaparak tek zincir kırıklarını belirleyebildiklerini söylemişlerdir (Olive ve diğ., 1990). Ancak Singh'in geliştirdiği metod daha hassastır (Rojas ve diğ., 1999).

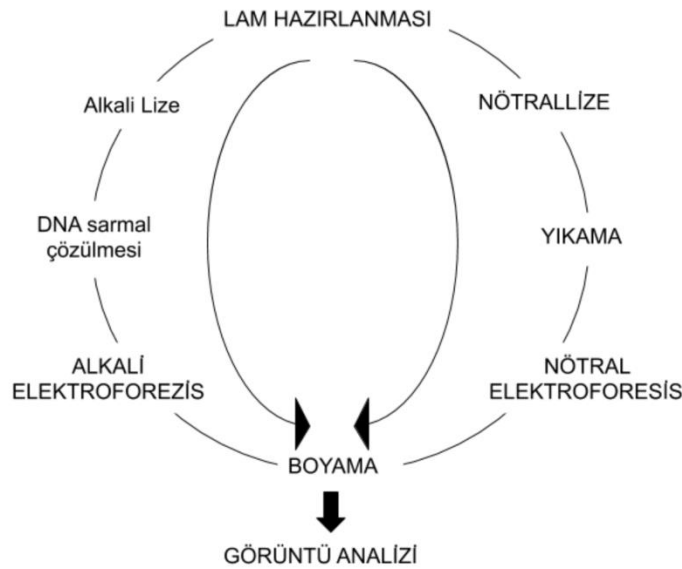
Tek Hücre Jel Elektroforezi protokolü standart olmalıdır. Deneyin uygulanmasında; agarın dozu kullanılan kan veya benzeri örneğin miktarı, Lizing çözeltisindeki tuz ve deterjan konsantrasyonu, pH'sı ve süresi, elektroforezin uygulanmasında; elektroforez çözeltisi konsantrasyonu, pH'sı, süresi, voltajı ve akımı yöntemin sonuçlarını etkiler. Aynı şekilde

floresan boyanın dozu ve parlaklığını yitirmeden hemen görüntülenmesi, mikroskop şartları ve deneyi hep aynı uygulayan kişinin yapması önemlidir (Hartmann ve diğ., 2003). Yöntem alkali ortamda yapıldığı için alkali Comet analizi veya alkali tek hücreli jel elektroforezi adıyla çalışılmaktadır.

Son zamanlarda, (N/N) (Nötr gevşeme/Nötr elektroforez) ve (A/N)(Alkali gevşeme/Nötr elektroforez), (A/A) (Alkali gevşeme/ Alkali elektroforez, pH>13) olarak uygulanmaktadır (Lin ve diğ., 2007; Gichner ve diğ., 1998).

Yine son yıllarda Comet yöntemi, floresan in situ hibridizasyon tekniği ile yapılmaktadır. Bu yöntemde DNA dizi veya genlere özel işaretli problemler kullanılarak hasar tayin edilebilmektedir. FISH Comet olarak isimlendirilir.

Şekil 2.2. Çift Zincir Kırıklarını Tespit Eden Nötral Metod ile Tek Zincir Kırıklarını Tespit Eden Alkali Metodun Genel Uygulama Protokolü (Sardas, 1996).



2.6.2. Alkali Comet ile nötral Comet arasındaki farklılıklar

-Nötral elektroforez sonrasında Comet görüntülerinde kuyruk bir parçadır, alkali elektroforez sonrasında ise Comet görüntüsü etrafına dağılmış durumdadır.

-Alkali ortamda Comet örneklerinin kısa oluşu ve yoğun boyandığı, zayıf alkali ortamda ise uzun halde buldukları belirlenmiştir.

-Nötral ortam, gevşek DNA loplarnın komet görüntüsünü verir, alkali ortam ise serbest kırıklar içeren DNA parçalarının görüntüsünü verir (Klaude ve diğ., 1996).

2.6.3. Metodoloji

Tek hücre jel elektroforezinde canlı dokulardan izole edilen çekirdekdeki DNA'yı düşük molekül ağırlıklı agar içerisine gömerek tek tabakalı oluşturulan preparatı yoğun deterjan ve tuz çözeltilerinden oluşan Lysing çözeltisinde 1 saat bekleterek hücre membranlarının parçalanması sağlanır. Lizis çözeltisine McKelvey-Martin ve diğ., N-Laurilsarkozin ilave etmişler ve bir değişiklik olmadığını bildirmişlerdir. Lizis çözeltisine proteinaz K ilave eden Rojas ve diğ., ise protein kalıntılarının uzaklaştırıldığını belirtmişlerdir (Rojas ve diğ., 1999; McKelvey-Martin ve diğ., 1993).

Hasarlı, kırık içeren DNA molekülleri süper sarmal yapıdan kurtulur. Lizis işleminde DNA açığa çıktığı için ve ışığa duyarlı olmasından dolayı hasar miktarını artırmamak için çalışmalar karanlık ortamda yapılır. DNA moleküllerinin yüksek alkali ortamda (pH>13) elektroforezi yapılır. Elektroforetik ortamda DNA'nın negatif yüklü kırık uçları, elektrik akımının etkisiyle pozitif yüklü uca doğru yani (katottan anoda doğru) hareket ederler. Elektroforezden sonra nötralizasyon işlemi kısa süreli bekletilerek tekrarı yapılır. Sonrasında floresans boyalarla (EtBr, DAPI) gibi boyanan hücrelerin floresans mikroskopunda Comet görüntüleri alınır ve analizleri yapılır. Comet sayımı yapılırken mikroskop lamının orta bölümü ortalama bir sonuç için incelenir. Lamın kenarlarında yüksek hasarlı DNA'lar olduğu için kenarlar dikkate alınmaz (Green ve diğ., 1996).

2.6.4. Comet Assay uygulama basamakları

- Hücrelerin hazırlanması
- Lamların hazırlanması ve hücrelerin agara gömülmesi
- Lizis (Hücresinin membranının eritilmesi), DNA sarmalının çözülmesi
- Elektroforez
- Nötralizasyon
- Boyama (Florasın boyalar ile boyama)
- Değerlendirme

2.6.5. Comet Assay yönteminin uygulanışı

1. Hücrelerin hazırlanması: Materyal olarak tam kan örnekleri, doku örnekleri, sperm hücreleri kullanılabilir. Hücreler yüksek erime noktalı agar ile kaplanmış lamlar üzerine uygulanır.

2. Lamların hazırlanması ve hücrelerin agara gömülmesi: Hücrelerin agara tutunmasını sağlamak için hazırlanmış olan ve 37°C'de su banyosunda bekletilen yüksek erime noktalı

agar, temiz ve numaralandırılmış rodajlı lam üzerine boydan boya yayılarak kaplama yapılır ve 24 mmx60 mm'lik lamel ile hava kabarcığı olmayacak şekilde kapatılıp +4°C'de 25 dakika bekletilir.

Lam üzerinde agar donduktan sonra lamel çekilir ve üzerine düşük erime sıcaklığına sahip olan agar belirli bir miktar hücre ile süspanse edilip tekrar lam üzerine yayılır ve lamel ile kapatılıp soğutulur. Bu şekilde hücrelerin iki agar tabakası arasına gömülmesi sağlanmış olur. Lam üzerine düzgün agar yayma, agar yoğunluğu ve miktarı, hücre konsantrasyonu sonuçları etkiler. Agarın yoğunluğunun ve miktarının fazla olması DNA göç hızını etkileyebilir. Ayrıca fazla hücre yoğunluğu ise DNA göçü esnasında Cometlerin çakışmasına sebep olur (Dinçer, 2010; Green ve diğ., 1996).

3. Lizis işlemi: Sandviç modeli preparatta agarlar iyice donduktan sonra lamel dikkatlice kaldırılır ve yoğun tuz ve deterjandan oluşan lizis solüsyonunda şalede bir saat +4°C'de bekletilir. Bu aşamada kandaki eritrositlerin parçalanması ile çıkan demire bağlı serbest radikal hasarı olmasını engellemek için uygulama öncesinde lizis çözeltisine %10 oranında DMSO eklenir. Lizis işlemi ile hücre membranı parçalanır ve hücre içeriği çekirdekten dışarı çıkar. Süperkoil yapıda DNA az bir miktar non-histon proteinlerle kalır. Lizis işleminden sonra yapılacak çalışmalar DNA ışığa karşı hassaslaştığı için ek hasarlar olmaması adına karanlık bir alanda yapılmalıdır (Dinçer ve diğ., 2010).

4. Elektroforez işlemi: Jele gömülü halde bulunan tek zincirli DNA'ya yoğun alkali ortamda 25V, 300mA akım ve yaklaşık 25 dakikada elektroforez yapılır. İşlem sırasında uygulanan elektrik akımı sayesinde DNA'nın negatif yüklü kırıkları anoda doğru bir kuyruklu yıldız modeli vererek hareket ederler. Bu göçe, görüntü kuyruklu yıldız benzediği için "Comet" adı verilmiştir. Hasarsız DNA'lar nötr oldukları için çekirdekten çıkamaz, göç yapamaz, parlak görünür ve Comet görseli veremez (McKelvey-Martin ve diğ., 1993).

5. Nötralizasyon işlemi: Preparatlar, elektroforez işleminden sonra, jel pH'sının nötrleşmesi için ve ortamdaki tuz, deterjan ve artifağların uzaklaştırılması sebebiyle tris tamponu ile (pH: 7,5) üçer kez onar dakika bekletilerek yıkanır (Rojas ve diğ., 1999).

6. Boyama işlemi: Bu işlemde DNA'nın boyanarak Comet görüntülerinin alınması için bağlayıcı olarak floresan boya seçilir. En tercih edilen floresan boyalar; etidyum bromür (deneyimizde tercih edilmiştir), propidyum iyodür, DAPI, akridinoranj, YOYO-1, Hoechst-3258, Hoechst-33342. Gümüş nitrat da (non-floresan boya) seyrek de olsa tercih edilebiliyor. YOYO-1 ve gümüş yeşili boyaların hassasiyeti artırdığını Singh ve ark. bildirmişlerdir (Singh ve diğ., 1994). Boyama işlemi yapılır ve 4 saat içinde boyarmadde renk verme aktifliğini kaybedeceği için floresan mikroskopunda görüntülere bakılır (Fairbain ve diğ.,

1995; Rojas ve diğ., 1999; McKelvey-Martin ve diğ., 1993). EtBr'ün (Etidyum Bromür) diğer floresans boyalardan farklı olmadığını çalışmalarında açıkladıktan sonra EtBr ile çalışmalarımız yapılmıştır (Gichner ve diğ., 2006).

7. Değerlendirme: Comet yöntemi ile DNA hasarının ölçümü nicel olarak iki şekilde değerlendirilir.

1. Görsel Analiz

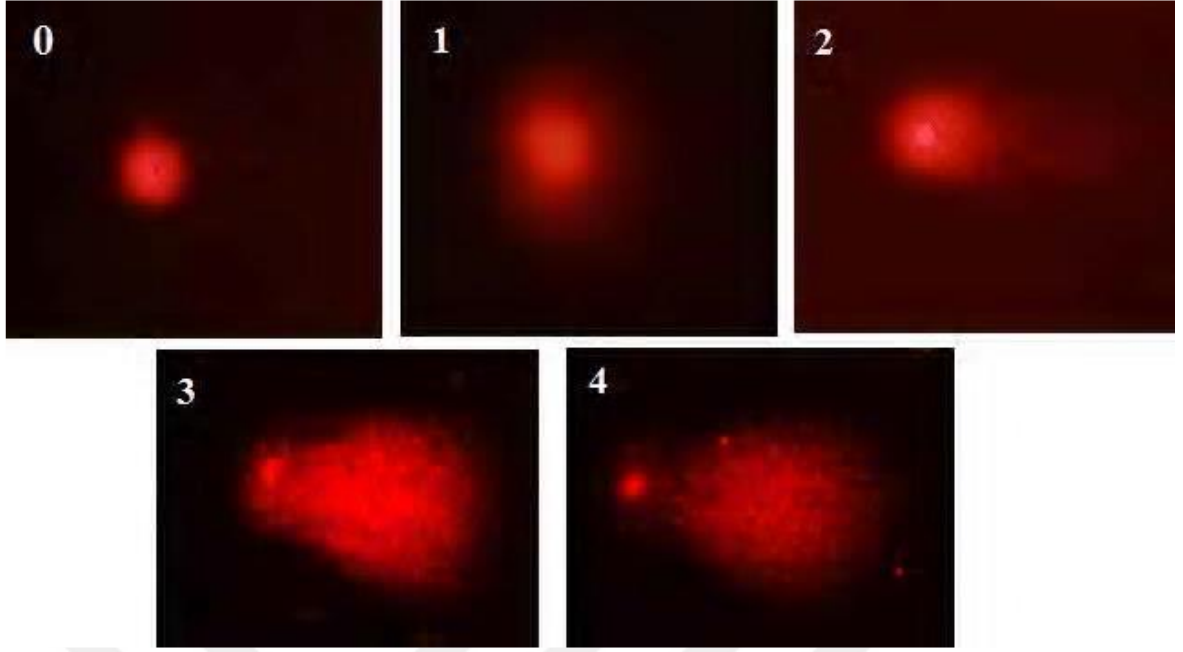
2. Bilgisayarlı Comet Görüntü Analizi

Bu iki yöntem kullanılarak Comet görüntüsünün kuyruk momenti, uzunluğu ve kuyruktaki DNA yüzdesi belirlenebilir (Collins, 2002). Hasarlı DNA hücreleri baş ve kuyruk diye iki ana bölümden oluşur. Çekirdek dışına migrasyon etmeyen kısım baş bölgesi, çekirdek dışına migrasyon oluşturan kısım kuyruğu oluşturur. Yani çekirdekteki sağlam DNA kuyruklu yıldızın baş kısmını, kuyruk kısmını ise yer değiştiren hasarlı DNA oluşturur. DNA hasarının miktarını Comet'in kuyruk uzunluğu ve kuyruk uzunluğundaki DNA yoğunluğu belirler. Kuyruk uzunluğu ne kadar fazla ise DNA o kadar hasarlıdır.

Hasar fazla ise DNA molekülleri elektroforez uygulanırken elektrik akımının etkisiyle net yük, molekül ağırlığı ve elektroforetik ortamın viskozitesine göre belirli bir yol alır (Fidancı, 2010).

Hasarlı DNA'da kırıklar olduğundan floresan görüntüsünde çekirdekten dışarı doğru (katottan anoda) yayılarak kuyrukta DNA yoğunluğu görülür. Çok hasarlı DNA moleküllerinde ise baş ve kuyruk birbirinden ayrı görünür. Az hasarlı DNA molekülleri ise göç yapmazlar, daha çok yayılma yaparlar (Fairbain ve diğ., 1995). DNA hasarsız ise DNA formunu kaybetmediğinden dairesel bir görüntüyle aynı kalır, parlaktır ve kuyruk oluşturmaz. DNA'ları sahip oldukları hasar derecelerine göre 5 grupta kategorize edebiliriz.

Resim 2.1. Kategorize Edilmiş Hasarlı DNA Görüntüleri



0. derecede hasarsız dairesel şekilde olan hiç kuyruk oluşturmamış DNA'lar, 1.derecede çok az hasarlı DNA'lar, 2. derecede az hasarlı DNA'lar, 3.derecede hasarlı DNA'lar, 4. derecede ise çok hasarlı DNA (Collins, 2004; Bowden ve diğ., 2003; Hellman ve diğ., 1995).

Her preparattan 40X'de rastgele 100 Comet sayılır ve 0-4 arasında sınıflandırılarak her sınıftan Comet sayısı tespit edilir. DNA hasarını tespit etmek için elde edilen değerler formülü edilirler.

Bilgisayar ile görüntü analizi, mikroskoba yerleştirilen dijital kamera sistemi ile otomatik yapılır. Teknolojik analiz programlarında;

1. **Baş çapı:** Comet başının piksel cinsinden çapı
2. **Baş alanı:** Baştaki DNA miktarının piksel cinsinden ifadesi
3. **Baştaki DNA:** Baştaki piksel yoğunluğunun miktarı
4. **Baş yoğunluğu (Bastaki DNA %):** Comet başındaki DNA yüzdesi
5. **Kuyruk alanı:** Kuyruktaki DNA miktarının piksel cinsinden ifadesi
6. **Kuyruk DNA'sı:** Kuyruktaki piksel yoğunluğunun miktarı
7. **Kuyruk DNA'sı%:** Comet kuyruğundaki DNA yüzdesi
8. **Kuyruk uzunluğu:** Başın tam uzayan kısmı ile kuyruğun sonu arasındaki mesafenin piksel cinsinden ifadesi (KU, birim Mikrometre)
9. **Comet uzunluğu:** Başın tam kenarı ile kuyruğun son arasındaki kısmın Piksel cinsinden ifadesi
10. **Head mean intensity:** Bastaki ortalama renk dağılımı

11. Tail mean intensiy: Kuyruktaki ortalama renk dağılımı

12. Kuyruk momenti: Kuyruk uzunluğu x kuyruktaki % DNA

Kuyruk uzunluğu x migrasyon yapmış DNA (KM, birim Mikrometre)

13. Migrasyon yapmış DNA %: Migrasyon yapan DNA miktarı

14. Çekirdek kuyruk momenti: Baş ile kuyruktaki DNA yoğunluğunun merkezi arasındaki mesafe gibi parametrelerle ölçülüp hesaplanarak bilgisayar destekli görüntü analiz programında DNA hasarının niceliği hakkında bilgi sağlanabilir (Başaran, 2002).

2.6.6. Comet Assay yönteminin avantajları ve dezavantajları

Alkali Comet Assay yönteminde genotoksisite çalışmalarında, DNA hasarlarının mikroskopik tespitlerle güvenilir, ucuz, basit, hızlı bir şekilde sonuçlandırılabilmesi sebebiyle tercih edilmektedir. Kan ve doku ile yapılan çalışmalarda lökositler, lenfositler ve çeşitli hücreler kullanılarak Comet testleri yapılmaktadır. Comet testinde, çok az miktarda hücre materyalinin uygulamada yeterli olması ve bir gün içinde sonuca ulaşılması bakımından başka bir avantajdır (Vrzoc ve diğ., 1997).

Comet Assay tekniği, insan ve hayvan hücrelerinden sonra bitkilerde ve funguslarda denenmiştir ve olumlu sonuç vermiştir (Vajpayee ve diğ., 2006; Gichner ve diğ., 2009; Rank ve diğ., 2009).

Radyoaktif işaretleme gerektirmemesi nedeniyle DNA hasar ölçümünde tercih edilen bir metottur. Comet yöntemini uygularken kullandığımız agaroz jelin konsantrasyonu ve miktarı, kullanılan hücrenin miktarı, elektroforez pH'sı, voltajı ve süresi, lizis çözeltisinin pH'sı ve preparatın bu çözeltide bekleme süresi, boyama miktarı ve görüntüleme süresi, mikroskop şartları, Comet sayımının deney süresince aynı kişinin gözünden yapılması ve farklılıklarda oluşabilecek istatistiksel yanlışlar bu yöntemin dezavantajlarından (Forchhammer ve diğ., 2008).

2.6.7. Comet Assay yönteminin kullanıldığı alanlar

Comet Assay yöntemi klinik araştırmalarda da kullanılmıştır. Bazı hastalıkların patojenik işleyişlerinin anlaşılması, kansere yatkınlığın tespitinde, kanser tedavisi uygulanırken izleme aşamasında, diyabetus mellitus, katarakt, glokom, bazı kornea hastalıkları bazı genetik hastalıkların prenatal teşhisinde, romatoidartrit, sistemik lupuseritematozus, polikistikoversendromu, Alzheimer, postmenopozal kadınlarda hormon replasman tedavisinde, sigarayı çok tüketenlerde sigaranın DNA üzerine etkilerinde, reproduktif tedavide erkek infertilitesi gibi durumlarda sperm DNA bütünlüğü Comet Assay yöntemi ile

test edilmiştir. İnsan ve hayvan lenfositlerinde oksidatif stresin rolünün araştırılması, iyonizasyon radyasyonunun direkt olarak oluşturduğu lezyonların tespiti ve tamir çalışmalarında Comet testi kullanılan bir yöntemdir.

2.6.8. Comet Assay analizinde DNA hasarını etkileyen sebepler

Yaş, cinsiyet, güneş ışığı, enfeksiyon, hava kirliliği, sigara, egzersiz, diyet ve meslek grupları, sağlıklı ve tedavi almayan kişilerde DNA hasarını etkileyen sebeplerdir (Moller ve diğ., 2000).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Türü

Araştırmanın türü deneyseldir.

3.2. Araştırmanın Yapıldığı Yer ve Zamanı

Araştırma Gaziantep Medical Park Hastanesi Medikal Onkoloji Bölümünde ve Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Onkoloji Bölümünde Nisan 2018-Nisan 2019 tarihleri arasında yapılmıştır.

3.3. Araştırmanın Evren ve Örneklemi

Araştırmanın Gaziantep Medical Park Hastanesinde ve Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Onkoloji Bölümünde yapılmasının sebebi; Gaziantep ilinde bu iki merkez dışında başka Onkoloji bölümü olan hastanenin bulunmamasıdır. Bu iki merkeze gelmiş ve evre 3-4 kolorektal kanser tanısı almış, tedaviye başlanmamış gönüllü (40-80) yaş arası toplam 19 yetişkin kadın ve erkek hasta üzerinde ex vivo çalışma yapılmıştır. Ex vivo, yapılan deneyin veya ölçümün organizma dışında, doğal koşullara mümkün olduğunca benzer bir ortamda gerçekleştirildiğini tarif etmek için kullanılır. Araştırmaya katılmış hasta ve kontrol grubu bireylerine çalışmamızın amacı açıklanmış ve Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu verilmiştir. Ayrıca (40-80 yaş aralığında olan) 20 kişiden oluşan sağlıklı gönüllü kontrol grubu belirlenmiştir. Araştırmanın evrenini Nisan 2018-Nisan 2019 tarihleri arasında Gaziantep Medical Park Hastanesine gelmiş 40 kişi ve Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Onkoloji Bölümüne gelmiş 50 kişi; toplamda 90 kişi oluşturmaktadır. Çalışmaya, hasta grubu olarak (40-80) yaş aralığında olan, kadın-erkek kolorektal kanser evre 3-4 tanısı almış, kanser tedavisine başlanmamış, ve sürekli antioksidan kullanmayanlar dahil edilmiştir. Çalışmaya dahil edilmeme kriterleri ise; 40 yaşından küçük olanlar, gebe olanlar, emzirme döneminde olanlar, çalışmaya katılmak istemeyenler, bulaşıcı hastalığı olanlar, ilaç kullanımı olanlar, siyah ırktan olanlar, böbrek hastalıkları, tansiyon, kardiyak yetmezlik, diyabet hastalığı olanlardır. Kontrol grubuna sigara ve alkol tüketimi olanlar dahil edilmemiştir. Bu iki merkeze başvurmuş 90 hastadan sadece 19 tanesi çalışmaya dahil edilmiştir. Bunun sebebi çalışmaya dahil edilme kriterlerine uymamalarıdır. Başvurmuş 90 hastanın 21 kişisi yaş aralığının uymaması sebebiyle, 15 kişisi ek hastalığa sahip olduğundan, 20 kişisi Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formuna onay vermediğinden ve 15

kişisi tanı almış fakat tedaviye bu merkezlerde devam etmediğinden çalışmaya dahil edilmemiştir. Çalışma, 19 KRK hastası ve 20 kişilik kontrol grubu ile yapılmıştır.

3.4. Verilerin Toplanması

Araştırmada veriler, gönüllü hastalardan steril koşullarda aynı gün içinde EDTA'lı tüplere alınmış olan 10 cc venöz kan uygun koşullarda laboratuvara getirilerek toplanmıştır. Veri toplama aracı olarak Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu (EK-1) kullanılmıştır.

3.4.1. Veri toplama araçları

- **Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu:** Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu, çalışmanın adı, çalışmanın konusu ve amacı, çalışma yöntemi, çalışmaya katılmanın olası yararları, soru ve problemler için başvurulacak kişilerin iletişim bilgileri ve çalışmaya katılma onayı için gerekli olan gönüllü, refakatçi, tanık ve araştırmacının iletişim bilgilerinden oluşmaktadır (EK-1).

3.5. Araştırmanın Değişkenleri

- **Bağımlı değişken:** Etkilenen değişken olarak DNA hasarıdır.
- **Bağımsız değişken:** Etkileyen değişken olarak beta glukandır.

3.6. Verilerin Değerlendirilmesi

Tanımlayıcı istatistik olarak; sürekli değişkenler için ortalama ve standart sapma, nitel değişkenler için frekans ve yüzde değerleri verilmiştir. Sürekli değişkenler için; bağımsız grup karşılaştırmalarında bağımsız örneklem t-testi, önce ve sonra değerlendirmelerin karşılaştırmasında eşleşmiş gruplarda t-testi kullanılmıştır. Nitel değişkenlerin grup karşılaştırmaları için ki-kare testi kullanılmıştır. Anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edilmiştir.

3.7. Araştırmanın Sınırlılıkları ve Genellenebilirliği

Bu çalışmanın sonucu sadece Gaziantep Medical Park Hastanesi Medikal Onkoloji Bölümü'ne ve Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Onkoloji Bölümü'ne gelmiş, evre 3-4 KRK tanısı almış, tedaviye başlanmamış, gönüllü (40-80) yaş arası kadın-erkek bireylere genellenebilir.

3.8. Araştırmada Etik Kurallar

SANKO Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan Etik Kurul Karar Formu (EK-2) ve Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Onkoloji Bölümünden Kurum İzni (EK-3) alınmıştır.

Gönüllü hastalardan steril koşullarda aynı gün içerisinde EDTA'lı tüplere 10 cc alınmış olan venöz kan uygun koşullarda laboratuvara getirilip çalışmaya başlanmıştır. Alınan tam kanlardan Comet Assay testi uygulanarak DNA hasarı tespit edilmiştir. Her bir lam örneği 50 µl/ml EtBr ile boyandıktan sonra floresan mikroskoptaki görüntüleri alınıp fotoğrafları çekilmiştir. Open Comet analiz programı ile her sahada 100 hücre dikkate alarak analiz edilerek sonuçlar alınmıştır. Ayrıca 20 kişiden oluşan sağlıklı gönüllü kontrol grubu oluşturulmuştur. Bu gruba beta glukan uygulaması yapılmamıştır. Hasta grubun glukan kan örneklerine 50 µl/ml beta glukan ve antibiyotik olarak 100 U/ml penisilin (Noss, 2012) uygulanıp 12 saat süreyle 37 °C'de %5 CO₂ te inkübasyona bırakılmıştır. Beta glukanın etki etme süresini takip etmek için minimum ilk 40. dakikadan itibaren kontroller yapılmıştır. Beta glukan uygulanmış örnekler Comet Assay yöntemi ile test edilmiştir. Boyanarak floresan mikroskopta lam örnekleri incelenmiş ve görüntüler fotoğrafları çekilerek kaydedilmiştir. Open Comet görüntülü analizle her sahada 100 hücre dikkate alınarak analizleri yapılmıştır. Beta glukanın DNA hasarını tamir etme yeteneği izlenmiştir. Hastaların kan örneklerine pozitif kontrol olarak uygun doz (50 µmol/L) (Angelie ve diğ., 2006) ve sürede (10 dk.) H₂O₂ uygulanmıştır. Aynı şekilde Comet Assay yöntemi uygulanarak boyanıp mikroskopta görüntüleri alınıp analizi yapılmıştır.

3.9. Comet Assay Yönteminde Kullanılan Cihazlar

1. Hassas terazi
2. Mikrodalga fırın
3. Su banyosu
4. Manyetik karıştırıcı
5. Dijital pH metre
6. Kronometre
7. Yatay elektroforez tankı ve güç kaynağı
8. Ev tipi buzdolabı
9. CO₂'li inkübatör
10. Otoklav
11. Floresan mikroskobu (Zeiss)

3.10. Comet Assay Yönteminde Kullanılan Sarf Malzemeler ve Diğer Malzemeler

1. Tartım kabı
2. Spatül
3. Mezür
4. Cam şişe, Beher
5. Cam baget
6. Distile su, otoklavlanmış su
7. Manyetik balık ve tutucusu
8. Mikroskop rodajlı Lamı (76 mmx26 mm)
9. Lamel (Kaplama camları)(24 mmx60 mm)
10. Dikey şale
11. Elektronik pipet
12. Mikropipet
13. Steril pipet ucu (10 mikrolitre, 100 mikrolitre, 1000 mikrolitre)
14. Cam pipet (5 ml,10 ml)
15. Folyo
16. Kurutma kağıdı
17. Sterilependorf tüp (1,5 ml)
18. Steril eldiven

3.11. Comet Assay Yönteminde Kullanılan Kimyasallar

Tablo 3. Kullanılan Kimyasallar

No	Kimyasal Adı	Kullanım Amacı
1.	PBSTablet– PhosphateBufferedSaline	Hücrelerin arındırılması
2.	LMA-LowMeltingAgar (Düşük Erime Noktalı Agar)	Comet uygulamasında hücrelerin içinegömülmesinde ve tutunmasında kullanılır.
3.	HMA-High MeltingAgar (Yüksek Erime Noktalı Agar)	Mikroskopik canlıların kaplanması ve hücrelerin tutulmasında kullanılır.
4.	NaCl -Sodyum Klorür	Hücre duvarından geçerek proteinleri ayırır ve DNA'nın negatif yükünün nötrale olmasını sağlar.
5.	DMSO-Dimetilsülfoksit	Lizing basamağında kullanılır.
6.	Triton X-100	Lipidler arasındaki bağları dejenere ederek hücre içeriğinin DNA'nın izolasyonunu sağlar. Lysing çözeltisini hazırlarken kullanılır.
7.	Trisma Base	Nötralizasyon tampon çözeltisinin ve lizis çözeltisinin hazırlanmasında kullanılır.
8.	EDTA- Etilendiamintetraasetikası	DNA zincirinin uzatılmasında DNA polimeraz enziminin magnezyuma ihtiyacı vardır. EDTA DNA zincirinin uzamasını önlemek için magnezyumu bağlayarak DNAz aktivitesini inhibe eder. Lizis çözeltisi ve elektroforez tampon çözeltisinin hazırlanması için kullanılır.
9.	HCl - Hidroklorik Asit	Elektroforez tampon çözeltisinin pH'sını ayarlamak için kullanılır.
10.	NaOH -Sodyum Hidroksit	Elektroforez tampon çözeltisinin hazırlanması için kullanılır.
11.	EtBr – Etidyum Bromür	Preparatlardaki agaroz jelin içinde gömülü olan DNA'ların arasındaki bağlara tutunarak floresans mikroskopta DNA'ların görünür hale getirilmesi için kullanılır.
12.	dH2O - Distile su	Çözeltileri hazırlarken
13.	Beta Glukan (arpadan)	Beta glukanın antioksidan etkisiyle DNA hasarının onarımını yapmak

3.12. Comet Assay Yönteminde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı

PBS çözeltisi: 10 adet PBS tablet 800 ml dH₂O ile çözülerek pH:7.4 olacak şekilde ayarlanır ve 1 L'ye hacim tamamlanır oda sıcaklığında saklanır.

Yüksek erime noktalı agaroz (HMA): 0.15 g. agar 50 ml distile suda çözülür. Mikrodalga fırında yaklaşık 1 dakika kadar kontrollü bir şekilde ısıtılarak çözelti homojen hale getirilir. Deney yapılırken kullanım süresince akışkanlığını kaybedip donmaması için 37°C'de su banyosunda bekletilir. (Resim 3.2.a'da gösterilmiştir)

Düşük erime noktalı agaroz (LMA): 0.21 g. agar 15 ml PBS çözeltisinde çözülür. Mikrodalga fırında yaklaşık 1 dakika kadar kontrollü bir şekilde ısıtılarak çözelti homojen hale getirilir. Deney yapılırken kullanım süresince akışkanlığını kaybedip donmaması için 37°C'de su banyosunda bekletilir (Resim 3.2.a'da gösterilmiştir).

Lizis tampon çözeltisi:

2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Trisma Base, çözeltiyi oluşturmak için bileşenler 700 ml dH₂O'da 5 dakika ısı verilerek manyetik karıştırıcıda çözelti homojen hale gelinceye kadar karıştırılır. pH:10 oluncaya kadar konsantre HCl veya NaOH ile ayarlanır. Çözelti 1 litreye tamamlanır. Oda sıcaklığında saklanır.

Lysing çözeltisi: Slaytların dikey şalede lizis çözeltisinde bekletilmesinden önce lizis çözeltisine, kullanılacak lizis solüsyonunun %1'i kadar Triton X-100 ve %10'u kadar da DMSO eklenir. Bu şekilde Lysing çözeltisi hazırlanmış olur. Çözelti ve şale kullanılmadan önce en az 30 dakika buzdolabında soğutulmalıdır.

Elektroforez tampon çözeltisi: Elektroforez Tampon çözeltisini hazırlamak için 10 N NaOH ve 200 mM EDTA'dan stok çözeltiler hazırlanır.

10 N NaOH (Stok): 200g. NaOH 500 ml distile suda çözülür.

200 mM EDTA (Stok): 14.89 g EDTA 200 ml distile suda çözülür ve pH'sı 10'a ayarlanır. Stok çözeltiler oda sıcaklığında saklanır. Bu stok çözeltilerin her iki haftada bir taze hazırlanması gerekir. Elektroforez tampon çözeltisi ise elektroforez işleminden hemen önce taze hazırlanır. Stok çözeltilerin den alınan 30 ml NaOH ve 5 ml EDTA 1000 ml'ye tamamlanacak şekilde distile su ile hazırlanır. Tampon çözelti pH> 13 olacak şekilde ayarlanır.

Nötralizasyon tampon çözeltisi:

0,4 M (48,5g.) Trizma Base, distile su ile tamamlanarak çözeltisi hazırlanır. pH'sı 7,5 olacak şekilde konsantre HCl ile ayarlanır.

Boyama çözeltisi: Hazır halde aldığımız EtBr çözeltisi kullanılır.

Beta glukan stok çözeltisinin hazırlanışı:

Arpa beta glukan [Cas no. 9041-22-9], Sigma, USA firmasından > %90 saflıkta ve kuru toz olarak satın alınmıştır. Çözelti, açık bir homojen fazda olduğu için çözünebilir olarak kabul edildi. 1mg arpa beta glukan, 1ml ultra saf suda otoklavlanarak çözülür. (Noss ve diğ., 2012). Beta glukan, daha önceki çalışmalarda en yüksek koruyucu etkiyi verdiği bildirilen 50 µl doz seviyesinde uygulandı (Angeli ve diğ., 2006).

3.13. Comet Assay Protokolü

Gönüllü hastalardan steril koşullarda aynı gün içerisinde EDTA'lı tüplere 10 cc alınmış olan venöz kan uygun koşullarda laboratuvara getirilmiş çalışmaya başlanmıştır. Alınan tam kanlardan Comet Assay testi uygulanarak DNA hasarı tespit edilmiştir. Her bir lam örneği 50 µl/ml EtBr ile boyandıktan sonra floresan mikroskoptaki görüntüleri alınıp fotoğrafları çekilmiştir. Open Comet analiz programı ile her sahada 100 hücre dikkate alarak analiz edilerek sonuçlar alınmıştır. Ayrıca 20 kişiden oluşan sağlıklı gönüllü kontrol grubu oluşturulmuştur. Bu gruba beta glukan uygulaması yapılmamıştır. Hasta grubun glukan kan örneklerine 50 µl/ml beta glukan ve antibiyotik olarak 100 U/ml penisilin (kontaminasyonu önlemek için kullanılmıştır) (Noss, 2012) uygulanıp 12 saat süreyle 37 °C'de %5 CO₂'te inkübasyona bırakılmıştır. Beta glukanın etki etme süresini takip etmek için minimum ilk 40. dakikadan itibaren kontroller yapılmıştır. Beta glukan uygulanmış örnekler Comet Assay yöntemi ile test edilmiştir. Boyanarak floresan mikroskopta lam örnekleri incelenmiş ve görüntüler fotoğrafları çekilerek kaydedilmiştir. Open Comet görüntülü analizle her sahada 100 hücre dikkate alınarak analizleri yapılmıştır. Beta glukanın DNA hasarını tamir etme yeteneği izlenmiştir. Hastaların kan örneklerine negatif kontrol olarak uygun doz (50 µmol/L) (Angeli ve diğ., 2006) ve sürede (10 dk.) H₂O₂ uygulanmıştır. Aynı şekilde Comet Assay yöntemi uygulanarak boyanıp mikroskopta görüntüleri alınıp analizi yapılmıştır.

-Lamların hazırlanması basamağı

Çalışmaya başlamadan önce rodajlı lamların rodajlı kenarına preparatın bilgisi kurşun kalemle yazılır ve silinmemesi için selebant ile kaplanır.(Resim 3.1.a'da gösterilmiştir)

Hücrelerin lama tutunması için, lamlar, distile su ile hazırlanan (yüksek erime ısıları agar) (HMA)-High Melting Agaroz'dan pipet yardımıyla 80 mikrolitre alarak lam üzerine yayılır (Resim 3.1.b'de gösterilmiştir).

Lamın üzerine 24 mmx60mm'lik lamel, 45°C'lik açı oluşturacak ve hava kabarcığı olmayacak şekilde kapatılır.

Lamlar yaklaşık 25 dakika kadar +4°C’de buzdolabında soğutulur.

Soğutulmuş lamların üzerindeki lameller, lama paralel bir şekilde agaroz jele zarar vermeyecek şekilde çekilerek alınır.

1.5 ml’lik bir ependorf tüpe, önce 20 mikrolitre hastanın kan örneği alınır sonra da PBS ile hazırlanmış olan (düşük erime ısıly agar) LMA-Low Melting Agar’dan 80 mikrolitre alarak hızlı bir şekilde pipetaj yapılarak karıştırılır. Bu karışım donmuş olan agarın üzerine pipetle agara zarar vermeden yayılmıştır (Resim 3.2.b’de gösterilmiştir).

Yine lamın üzerine 45°C’lik bir açy oluşturacak ve hava kabarcığı olmayacak şekilde 24 mmx60 mm’lik bir lamel kapatılır.

Lamlar yaklaşık 25 dakika +4°C’de buzdolabında soğutulur.

Lamlar soğutulduktan sonra lamların üzerindeki lameller agaroz jele zarar vermeden dikkatlice alınır.

Bu basamaktaki amacımız; hücrelerin 2 agaroz jel katmanı arasında sabitlenmesini sağlamış olmaktadır.

Resim 3.1.a. Comet Assay Protokolünde Lamların Hazırlanması



Resim 3.1.b. Agar Çözeltilerinin Hazırlanması



-Lizis işlemi basamağı

Hazırlanan preparatlar, etrafı ışık almayacak şekilde alüminyum folyo ile kaplanmış dikey şalelere birbirlerine temas etmeyecek şekilde dikey yerleştirilir.

Şaleye, stok lizis çözeltisinden şale hacmi kadar (84 ml, preparatların üzerini kapatacak kadar yeterli oluyor) alınıp bu hacmin %1'i kadar Triton X-100 ve %10'u kadar DMSO eklenerek oluşturulan lysing solüsyonu (pH:10) ilave edilir.

Lysing solüsyonu ve şale kullanılmadan en az 30 dakika önce buzdolabında +4°C'de soğutulmalıdır.

Preparatları içeren alüminyum folyo ile kaplı ışık almayan şalenin kapağı kapatılır ve +4°C'de buzdolabında 1 saat bekletilir.

Süre dolduktan sonra preparatlar şaleden çıkarılır ve kurutma kâğıdı üzerine dizilir.

Bu basamaktaki amacımız; 2 agaroz jel arasında sabitlenmiş olan hücreler, yoğun deterjan ve tuza sahip lysing çözeltisinde 1 saat bekletilerek hücrelerin membranlarının parçalanması ve çekirdek zarının erimesiyle DNA'ların agaroz jel içerisinde serbestleşerek elektroforeze hazır hale getirilmesi sağlanmıştır.

Bu basamakta serbestleşen DNA ışığa karşı hassas olduğu için ilave DNA hasarlarının oluşmaması için bu ve bundan sonraki çalışmalar karanlıkta yapılmalıdır.

- DNA çift zincirli formun tek zincirli forma dönüşmesi basamağı

Lizis işleminden sonra preparatlar elektroforez tankına dikkatlice yerleştirilerek üzerleri tamamen elektroforez tampon çözeltisiyle (pH>13) örtülmüştür. Preparatlar bu şekilde karanlık ortamda 25 dakika bekletilmiştir.

Bu basamakta amacımız; lizis işlemiyle serbestleşen DNA'nın çift zincir yapısının tek zincirli hale indirgenmesini sağlamaktır. Yüksek alkali ortamda (pH>13) elektroforez tampon çözeltisinde 25 dakika bekletilen DNA fragmentlerinin zincir kırıklarının olduğu noktalarda açılması amaçlanır.

-Elektroforez işlem basamağı

Tek zincirli DNA'lardan oluşan preparatlar, elektroforez tankında, yüksek alkali ortamda (pH>13) (elektroforez çözeltisinde, 25V, 300mA'de 25 dakika karanlık ortamda elektroforezi yapılmıştır.

İşlem tamamlandıktan sonra güç kaynağı kapatılarak preparatlar kurutma kağıdına alınmışlardır.

Bu işlem basamağındaki amacımız; oluşan negatif yüklü tek zincir kırıklarının agaroz jel tabakaları arasında çekirdekten uzaklaşarak katottan anoda doğru (-)→(+) göç ederek (kuyruklu yıldız) Comet görüntülerinin elde edilmesidir.

Negatif yüklü parçacıkların elektroforezde elektrik akımının sebebiyle aldığı yol; net yük ile doğru, elektroforetik ortamın akışkanlığı ve molekül büyüklüğü ile ters orantılıdır (Fidancı, 2010).

-Nötralizasyon işlemi basamağı

Elektroforez işleminden sonra preparatlar elektroforez tankından lamaların rodajlı kısmından tutarak dikkatlice alınırlar ve kurutma kağıdına bırakılırlar.

Işık geçirmemesi için alüminyum folyo ile kaplanmış şalelere preparatlar dikkatlice yerleştirilir.

Şaleye (pH:7.5) olan nötralizasyon tampon çözeltisi lamaların üzerini kapatacak şekilde eklenir.

Şalenin kapağı kapatılarak preparatlar nötralizasyon tampon çözeltisinde 10 dakika bekletilir. (Bu işlem 2 kez daha tekrar edilir).

10 dakika sonrasında şaledeki çözelti boşaltılır yerine yeni nötralizasyon tampon çözeltisi lamaların üzerini kapatacak şekilde eklenir ve 10 dakika daha bekletilir.

3. ve son uygulamada süre dolduktan sonra yine şale içerisindeki nötralizasyon tampon çözeltisi boşaltılır ve yenisi lamaların üzerini kapatacak şekilde ilave edilir ve lamalar son kez 10 dakika nötralizasyon çözeltisinde bekletilir.

Süre dolduktan sonra preparatlar lamaların rodajlı kısımlarından tutulacak şekilde şaleden alınarak kurutma kağıdı üzerine bırakılırlar.

Bu basamaktaki amacımız; elektroforez işlemi esnasında preparatların elektroforetik ortamda bulunan yoğun konsantrasyondaki tuz ve deterjan etkenlerinin ortamdan uzaklaştırılmasını sağlamaktır.

-Boyama işlemleri basamağı

Uygulamada kullandığımız EtBr solüsyon halinde olduğundan çözeltisi hazırlanmamıştır. Nötralizasyon işleminden sonra kurutma kağıdı üzerine bırakılan preparatların üzerine EtBr solüsyonundan pipet yardımıyla 50 mikrolitre çekilir ve preparata zarar vermeden, hava kabarcığı yapmadan yayılır, boyanır.

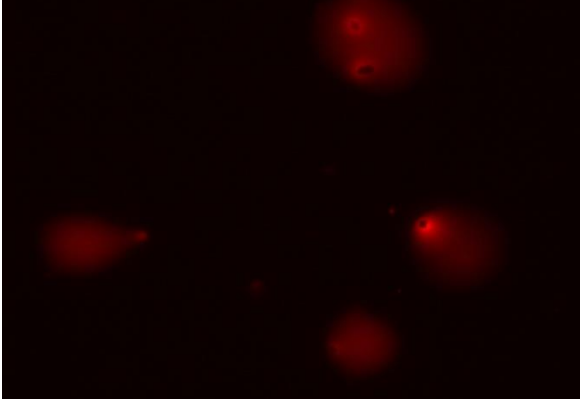
24 mmx60 mm'lik lamel ile preparatın üzerine 45°C'lik açıyla hava kabarcığı olmayacak şekilde kapatılır.

Bu aşamadan sonra preparatlar Comet sayımına hazır hale gelmiştir.

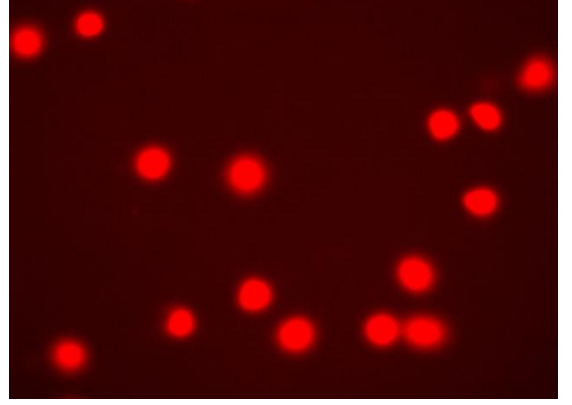
Boyama yapıldıktan sonra floresan boya olan EtBr parlak renk verme yapısını yitireceği için 4 saat içerisinde görüntülemeler, sayımlar ve incelemeler yapılmış olması gerekir (Fairbairn ve diğ., 1995; Rojas ve diğ., 1999; McKelvey ve diğ., 1993).

Hasta grubunun Comet yöntemi ile DNA hasarı sonuçlarını almak için boyama işlemi yapıp floresan mikroskopta görüntüler incelenir, fotoğrafları çekilir, Open Comet programıyla her sahada 100 hücre dikkate alarak analizi yapılır. Beta glukanın DNA hasarının onarıcı özelliğini görmek için hasta grubunun kan örneklerine 50 µl/ml beta glukan ve antibiyotik olarak 100 U/ml penisilin (Noss, 2012) uygulanıp 12 saat süreyle 37°C'de %5 CO₂ 'te inkübasyona bırakılmıştır. Beta glukanın etki etme süresini takip etmek için minimum ilk 40. dakikadan itibaren kontroller yapılmıştır. İnkübasyon sonrası Comet assay yöntemi uygulanır. EtBr ile boyamanın ardından floresan mikroskopta görüntüler incelenir ve fotoğrafları çekilerek kaydedilir. Open Comet programı ile her sahada 100 hücre dikkate alarak analiz hesaplamaları yapılır. Hastaların kan örneklerine negatif kontrol olarak uygun doz (50 µmol/L) (Angelie ve diğ., 2006) ve sürede (10 dk.) H₂O₂ uygulanmıştır. Yine aynı şekilde Comet analizi uygulayarak boyama yapıp floresan mikroskopta görüntüler incelenir, fotoğraflar çekilerek kaydedilir. Open Comet programıyla her sahada 100 hücre dikkate alarak sayma işlemi ve analizleri yapılır. Tüm çalışmaların SPSS 23 ile hesaplamaları yapılarak istatistiksel analiz yapılır.

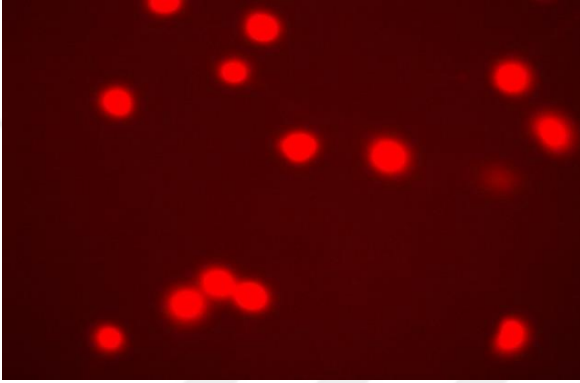
Resim 3.2. Beta Glukan Uygulaması Sonrası DNA Hasarında Meydana Gelen Değişim



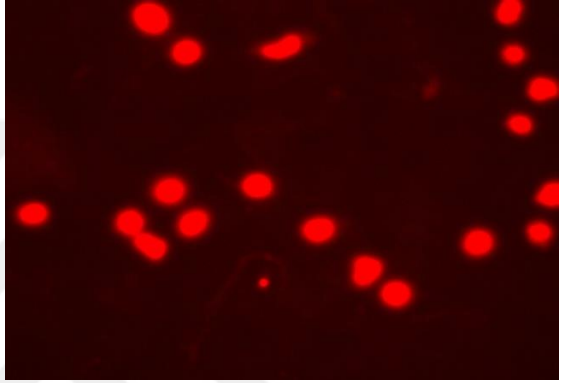
Hasta hasarlı DNA Comet görüntüsü



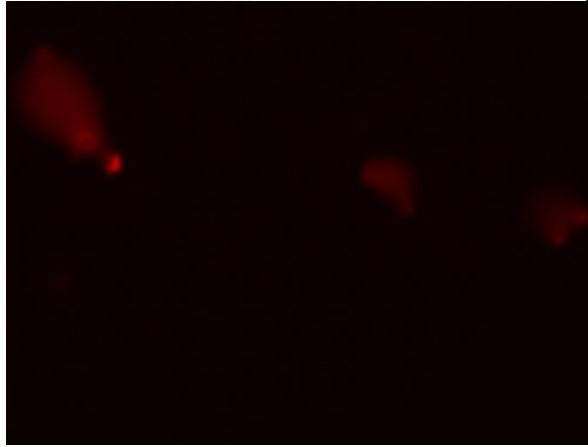
Kontrol grubu DNA Comet görüntüsü



Hasta+Beta glukan Comet görüntüsü
(50 µl/ml)



Hasta+H₂O₂+Beta glukan Comet görüntüsü
(50 µl/ml)



Hasta+H₂O₂ (50 µl/ml) Comet görüntüsü

(Floresan mikroskobunda DNA görüntülerin orijinal Comet fotoğrafları alınmıştır.)

4. BULGULAR

Çalışmamıza evre 3-4 toplam 19 KRK hastası ve 20 sağlıklı gönüllü dahil edilmiştir. Tüm gönüllülerin demografik bilgileri tablo 4.1’de verilmiştir.

Tablo 4.1. Hasta Grubu ve Kontrol Grubunun Demografik Bilgileri

	Yaş	Cinsiyet	Sigara Kullanımı	Ek Hastalık	Evre
Kontrol	60.50±12.378	Erkek:%40 Kadın: %60	-	-	-
Hasta	63.11±13.051	Erkek:%40 Kadın: %60	%15,8	-	Evre 3:%57,9 Evre 4: %42,06

İstatistiksel analizde student t-testi kullanılmıştır.

Kolorektal kanser tanısı almış hastaların (tedaviye başlamadan önce) Comet Assay yöntemi ile DNA hasarları (kuyruk DNA yüzdesi, kuyruk momenti ve kuyruk uzunluğu parametreleri bakımından), kontrol grubundaki (sağlıklı birey) bireylerin DNA hasarları ile kıyaslanmış olup daha sonra beta glukanın 50 µl/ml’lik konsantrasyonu ile, kolorektal kanser tanısı almış hastalarda DNA hasarı onarıcı etkisi aşağıdaki çizelgelerde gösterilmiştir. Hasta grubun ortalamaları ile kontrol grubunun ortalamaları arasındaki farkın önemli olup olmadığı t-testi ile kontrol edilmiştir (Tablo 4.2. ve Şekil 4.1).

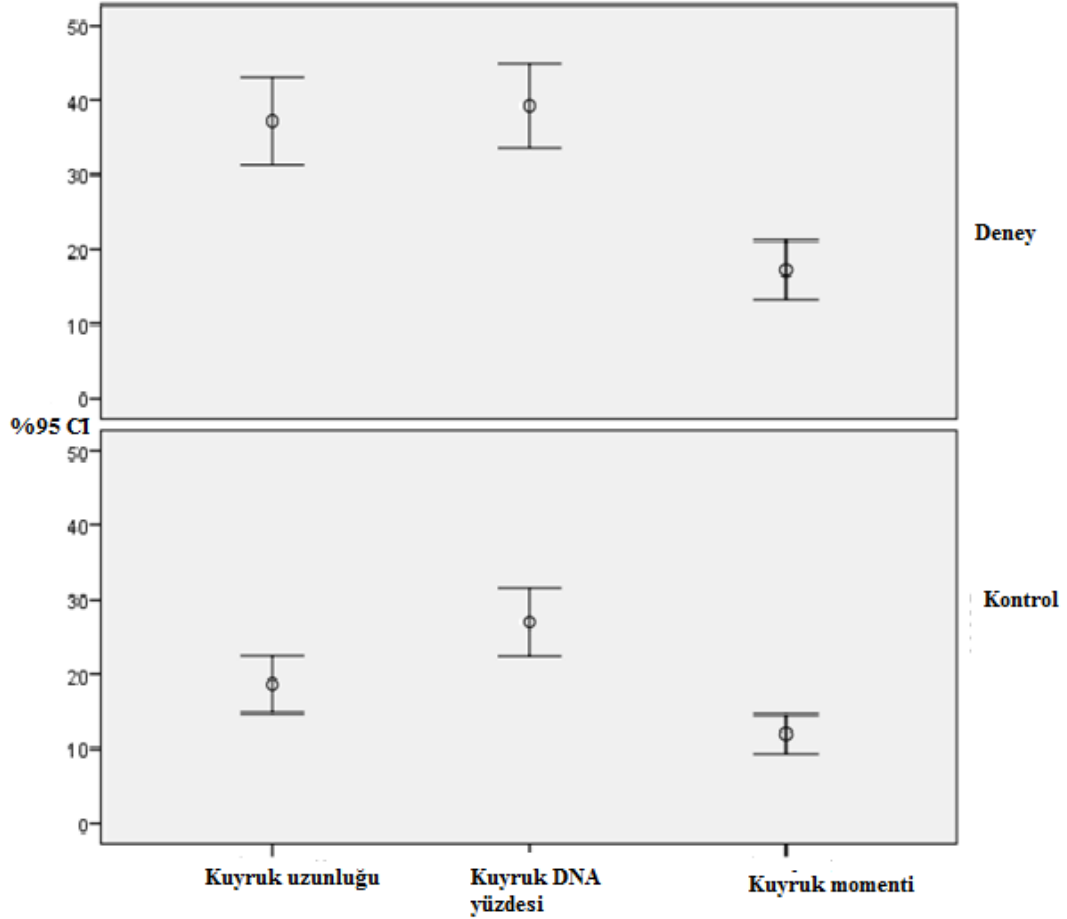
Tablo 4.2. DNA Fragmanlarının Beta Glukan Uygulama Öncesi Ölçüleri

Deney grubu	Muamele süresi (saat)	Konsant.	Kuyruk Momenti	Kuyruktaki DNA %	Kuyruk Uzunluğu
Kontrol	(-)	(-)	11,95±5,65	26,99±9,75	18,63±8,20
KRK’lı hasta	(-)	(-)	17,19±8,24	39,24±11,73	37,21±12,25
p			0,02	0,001	p<0,001

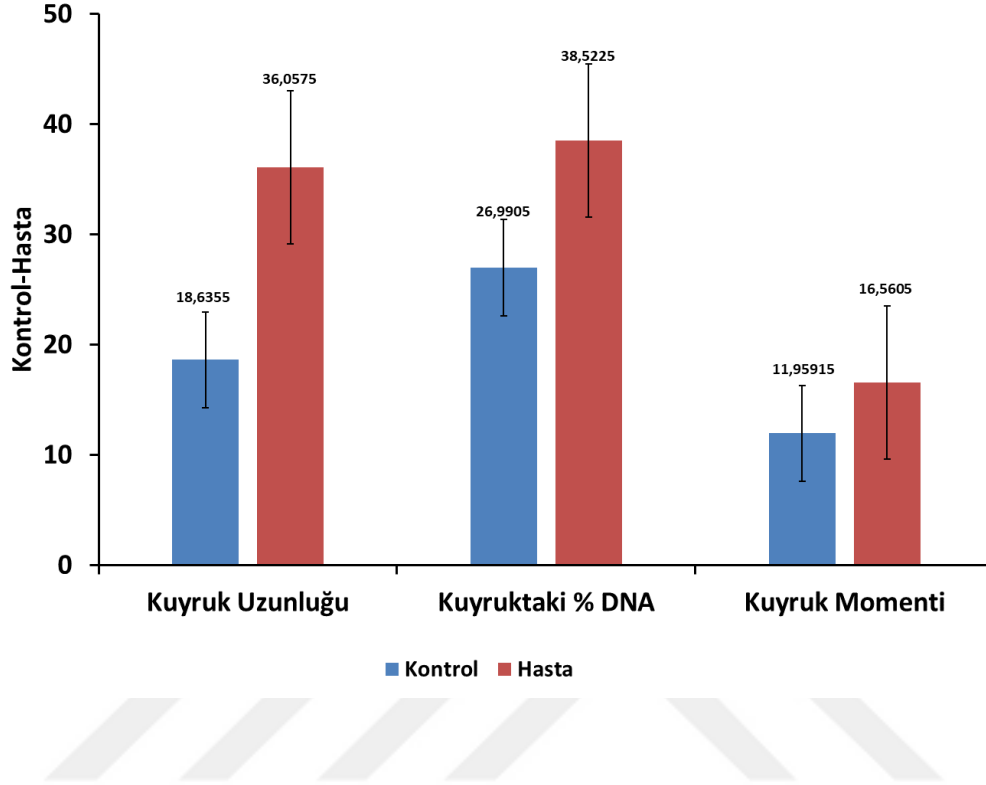
İstatistiksel analizde student t-testi kullanılmıştır.

Kolorektal kanser tanısı almış hastaların DNA'larındaki meydana gelen hasar, Comet yöntemi ile incelendiğinde kontrol grubuna göre; kuyruk momenti, kuyruk yüzdesi ve kuyruk uzunluğu değerlerinde önemli ölçüde artışı ($p=0,02$; $p=0,001$; $p<0,001$) tespit edilmiştir (Tablo 4.2. ve Şekil 4.1.)

Şekil 4.1. DNA Fragmanlarının Beta Glukan Uygulama Öncesi Ölçülerinin Grafik Gösterimi



Şekil 4.1. DNA Fragmanlarının Beta Glukan Uygulama Öncesi Ölçülerinin Grafik Gösterimi (devamı)



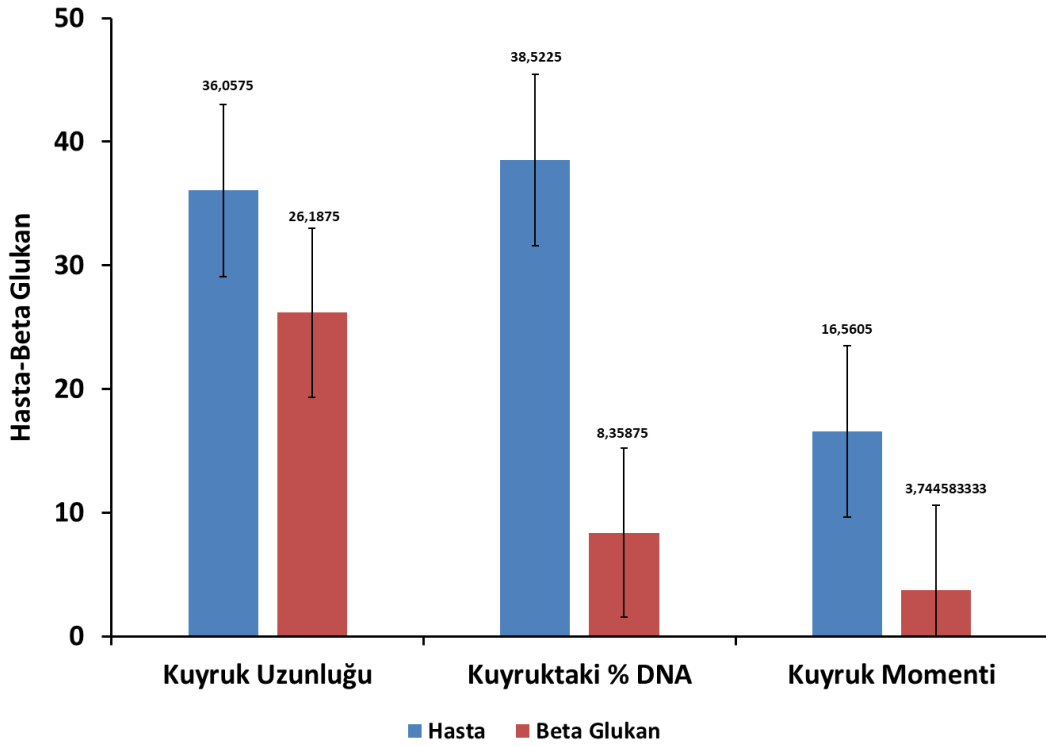
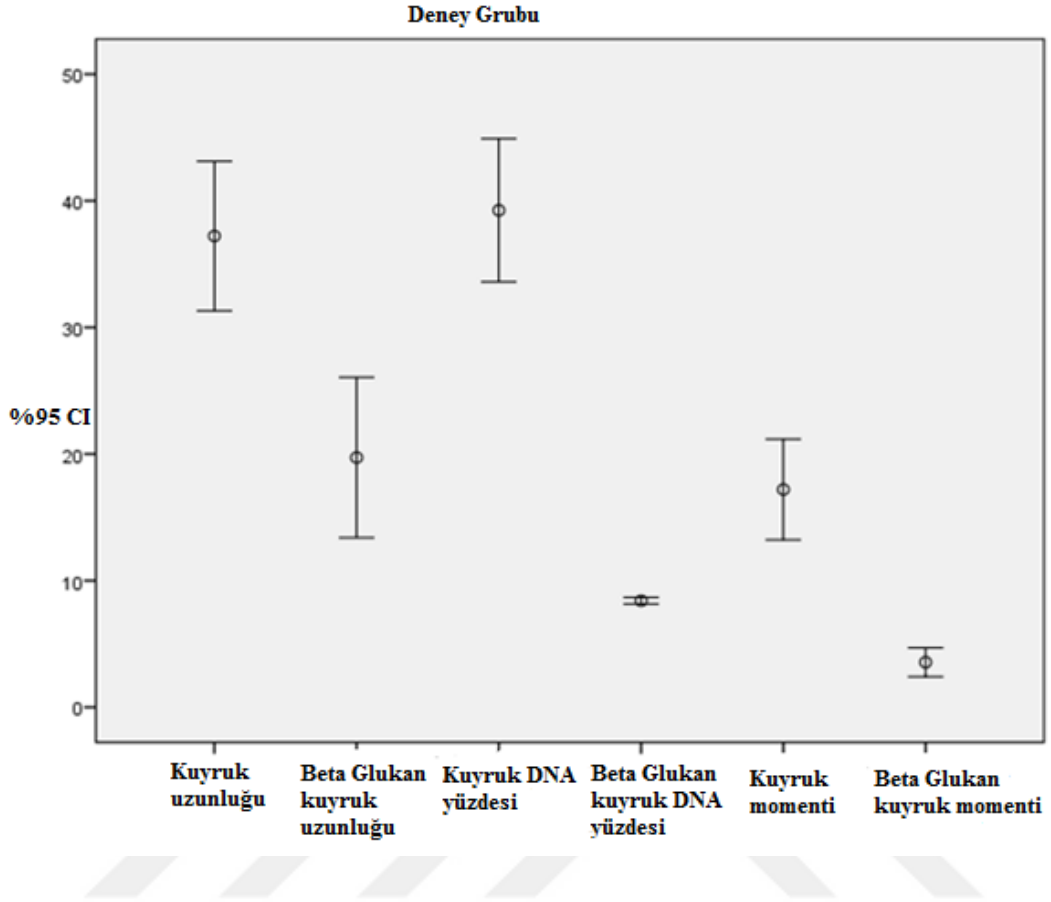
Tablo 4.3. Beta Glukan Uygulama Öncesi ve Sonrası DNA Fragmanlarının Ölçüleri

Deney grubu	Muamele süresi (saat)	Konsantrasyon	Kuyruk Yoğunluğu	Kuyruktaki DNA%	Kuyruk Uzunluğu
KRK'lı Hasta	(-)	(-)	17,19±8,24	39,24±11,73	37,21±12,25
Beta-Glukan	12 Saat	50 µl	3,55±2,36	8,41±0,54	19,72±13,15
p			p<0,001	p<0,001	p<0,001

İstatistiksel analizde student t-testi kullanılmıştır.

Kolorektal kanser tanısı almış hastalara Beta Glukan ex vivo koşullarda 12 saat uyguladıktan sonra Comet Assay yöntemi ile incelendiğinde oluşan DNA hasarlarının önemli ölçüde azaldığı (p<0,001; p<0,001; p<0,001;) tespit edilmiştir.

Şekil 4.2. Beta Glukan Uygulaması Sonrasında DNA Fragmanlarının Ölçülerinin Grafik Gösterimi



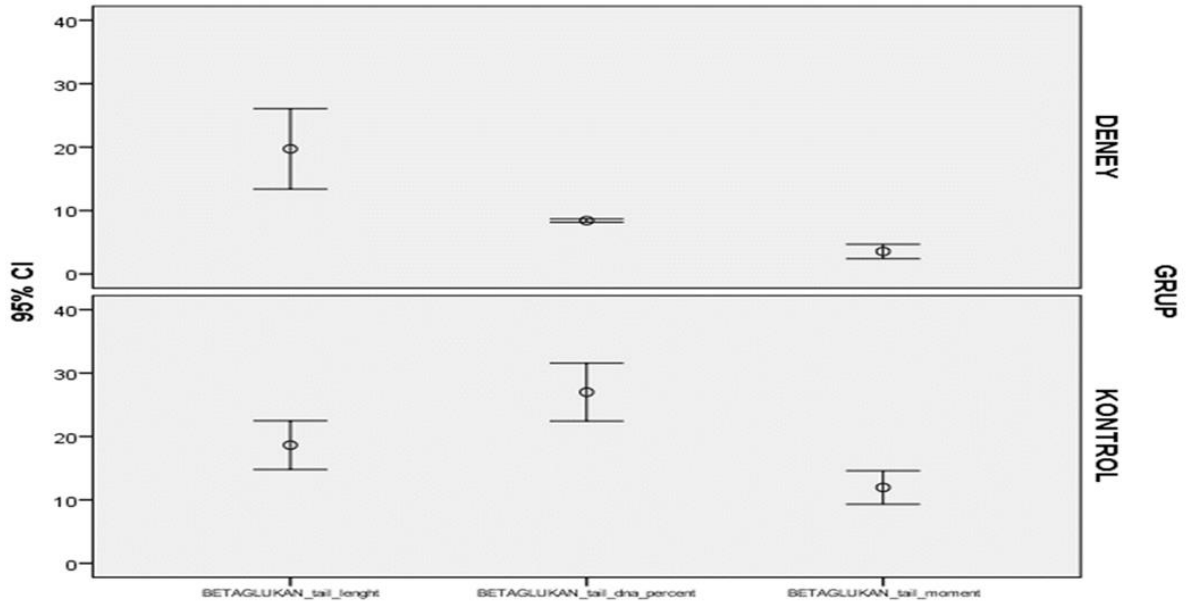
Tablo 4.4. Kontrol Grubu ve Beta Glukan Uygulanan Hasta DNA Fragmanlarının Ölçüleri

Deney grubu	Muamele süresi (saat)	Konsant.	Kuyruk Momenti	Kuyruktaki DNA %	Kuyruk Uzunluğu
Kontrol	(-)	(-)	11,95±5,65	26,99±9,75	18,63±8,20
Beta glukun	(-)	(-)	3,55±2,36	8,41±0,54	19,72±13,15
p			p<0,001	p<0,001	0,761

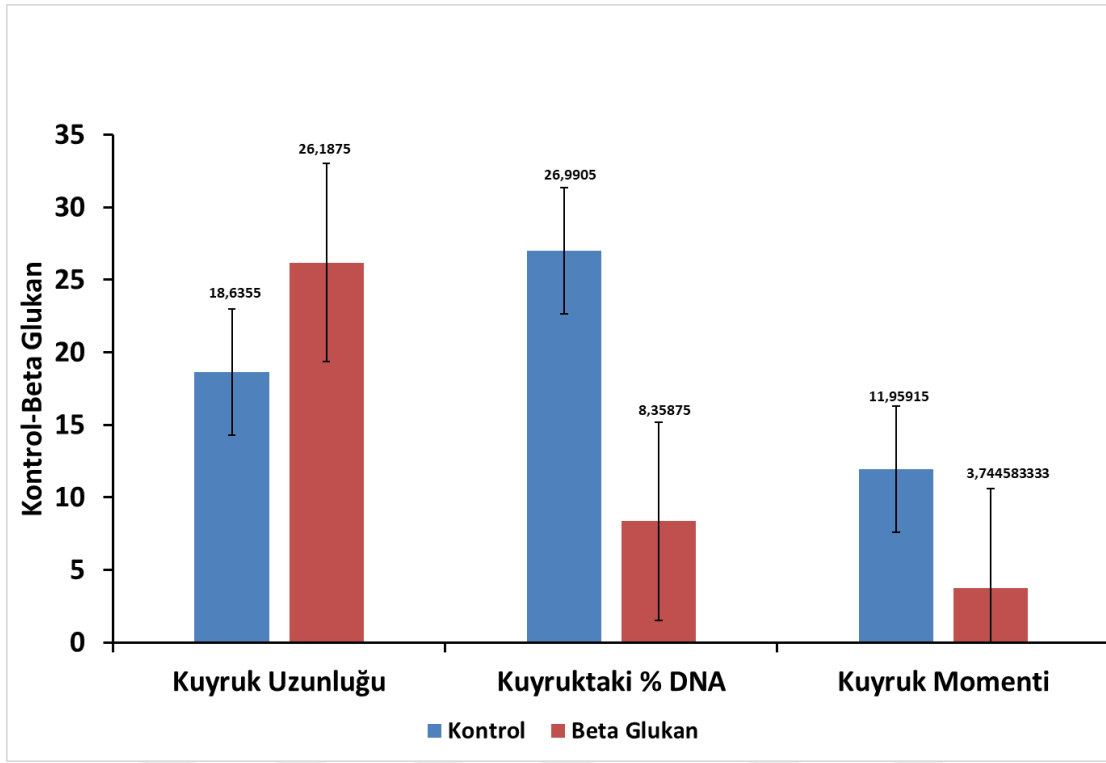
İstatistiksel analizde student t-testi kullanılmıştır.

Kolorektal kanserli hasta grubuna beta glukun uygulandıktan sonra elde ettiğimiz veriler kontrol grubu değerleriyle kıyaslandığında, beta glukun sonuçları kontrol grubu değerlerine göre daha düşük çıkmıştır. Beta glukunun tedavi sonuçları, kontrol grubunda var olabilecek olası hasarları göz önünde tutarsak kontrol grubuna göre daha düşük çıkması düşünülebilir.

Şekil 4.3. Kontrol Grubu ve Beta Glukan Uygulanan Hasta DNA Fragmanlarının Ölçülerinin Grafik Gösterimi



Şekil 4.3. Kontrol Grubu ve Beta Glukan Uygulanan Hasta DNA Fragmanlarının Ölçülerinin Grafik Gösterimi (devamı)



5. TARTIŞMA

Yapılan birçok çalışma antimutajenik ajanların DNA tamir mekanizmalarında etkili rol oynadığını göstermektedir (Kada ve Shimoi, 1987; De Flora, 1998). Antimutajenik ajanlar, sitokrom P450 ailesindeki faz I enzimlerinin inhibe edilip, faz II enzimlerinin aktivasyonunu, apoptozun indüklenmesi ve serbest radikallere karşı koruma gibi farklı mekanizmalarla antimutajenik veya antigenotoksik etki göstermektedirler (Lee ve Park., 2003). DNA onarımının uyarılmasında, immüno stimülatör etkiler, siklooksijenazın inhibisyonu, kalorik kısıtlama ve gastrointestinal kanalda mutajenlerin azaltılmış geçişi gibi bazı mekanizmalar rol alabilmektedir (Ferrari ve Torres., 2003).

Bağışıklık sistemi üzerinde beta glukanın aktif rol oynadığı ve toksik etkisinin gözlemlenmediği ve kuvvetli bir immüno stimülatör olarak tanımlanmış olup, ayrıca antioksidan özelliği bildirilmiştir (Sandvik ve diğ., 2007; Vetvika ve diğ., 2002). Bir glukana reseptörü olan Dectin-1'in T-lenfositlerin çoğalmasında aktif rol oynadığı ortaya konulmuştur (Brown ve Gordon, 2005).

Beta glukana, kanser hücrelerinin ve tümörlerin gelişimlerinde immüno modülatör etkiye sahiptir (Gardier, 2000). Farelerin kullanıldığı bir deneyde lökositlerdeki CR 3 reseptörlerini beta glukana aktive ederek fagositleri stimüle etmiş ve bu yolla tümör %57-90 geri döndürülmüştür (Yan ve diğ., 1999). Beta-glukana bu yolla fagositozu ve NK hücrelerini etkinleştirerek ve interferon yayarak anti-tümör fonksiyonunu ortaya koymuştur (Gardier, 2000).

1975'te Peter W. Mansell ve arkadaşlarının beta glukana kanser vakalarındaki rolünü incelemek için yaptıkları bir çalışmada; (1,3) beta glukana deri kanseri hastalarının malign nodüllerine verilmiş ve çok kısa bir sürede lezyonlarda ciddi bir şekilde azalma görülmüştür (<http://www.betaglucan.org/history.htm>). Li ve arkadaşları beta glukana kanser tedavisinde etkinliğini ölçmek için bir çalışma yapmışlar. Bu çalışmada hastalara antitümör ilaçları ile birlikte beta glukana verilmiş. Zaman içerisinde tümör gelişiminin inhibe edildiğini belirlemişler. Beta glukana nötrofillerdeki CR3 reseptörüne bağlanarak fagositozu etkin hale getirmesinden dolayı olduğu kanısına varmışlar (Li ve diğ., 2006).

1985'te Patchen ve arkadaşları, β (1,3) glukana çok yüksek dozda ağız yoluyla sıçanlara bir kez uyguladıkları bir deneysel çalışma yapmışlardır. Deney sonucunda sıçanların %70'inin radyasyonun zararlı etkilerinden beta glukana sayesinde korunduğunu ispatlamışlardır (<http://www.betaglucan.org/history.htm>).

Suzuki ve arkadaşlarının yaptığı bir fare deneyinde; akciğerlerinde tümör metastaz yapmış bir gruptaki farelerin tümör hücrelerine ağız yoluyla ya da intravenoz yolla beta glukan uygulanmasıyla metastazın engellendiği görülmüştür. Uygulanan beta-glukan sayesinde farelerin kemoterapi tedavisine pozitif cevap verdiğini ve farelerin karaciğerlerinde yapılan deneylerde antitümör ve antimetastatik rolü ortaya konmuştur (Jung ve diğ., 2004).

Yapmış olduğumuz çalışmada, kolorektal kanser hastalarına exvivo koşullarda beta glukan ile muamele sonucunda DNA kuyruk uzunluğu, DNA kuyruk yüzdesi ve kuyruk momenti parametrelerinde istatistiksel olarak önemli ölçüde azalttığı saptanmıştır.

Benzer şekilde, Angeli ve diğ., (2009), Agaricus brasiliensis mantarından elde ettikleri beta glukanın farklı konsantrasyonlarını (1 mg/mL, 5 mg/mL, 25 mg/mL, 100 mg/mL ve 200 mg/mL) in vitro koşullarda 40 dakika boyunca muamele etmiş ve düşük konsantrasyonlarda antigenotoksik etki gösterdiğini ancak yüksek konsantrasyonlarda (>200 mg/mL) sitotoksik ve genotoksik etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Angeli ve diğ., (2006), sağlıklı sigara kullanmayan bir erkek ve bir bayandan elde ettikleri lenfosit kültürüne in vitro koşullardaki Agaricus brasiliensis mantar türünden elde ettikleri beta glukanın antigenotoksik etkilerini incelemiş ve DNA hasarını doza bağlı olarak azalttığını tespit etmişlerdir.

Beta glukanların aynı zamanda serbest radikal azaltıcı özelliği vardır. Serbest radikal ajanları kanser gelişiminde, yaşlanma hızında ve hastalıkların belirlenmesinde rol oynarlar (Patchen ve diğ.,)

Bayrak ve arkadaşları ratlarla yaptıkları bir çalışmada ağız yoluyla ratlara beta glukan uygulamışlar ve böbrek iskemi-reperfüzyon hasarında beta glukanın oksidan maddeleri azalttığını ve antioksidan enzimleri artırdığını göstermişlerdir (Bayrak ve diğ., 2008).

Züllü ve arkadaşları 1995 yılında beta glukanın oksidatif strese karşı insan deri hücrelerini koruma faktörü üzerinde çalışmışlardır (Züllü ve diğ., 1995).

B-(1,3) glukan, serbest oksijen radikallerinden kaynaklanan lipit peroksidasyonunu inhibe ederek oluşan membran hasarını iyileştirici ve oksidatif hasara karşı önleyici bir davranış gösterir. Beta glukan lipit peroksidasyonunu kontrol edebilmek için indikatörü olan malondialdehit oranındaki artışı baskılar (Sener ve diğ., 2005).

Çalışmamızda güçlü bir antioksidan olarak bilinen beta glukanın KKK hastalarda DNA hasarını onarıcı rolünün olup olmadığını araştırdık. Yaptığımız çalışma sonunda, hasta grubunun beta glukan uygulaması öncesi kuyruk yoğunluğu $17,19 \pm 8,24$ iken beta glukan uygulaması ile $3,55 \pm 2,36$ olarak bulundu. Kuyruktaki DNA %'si hastada $39,24 \pm 11,73$ iken beta glukan uygulaması ile $8,41 \pm 0,54$ olarak tespit edildi. Kuyruk uzunluğu ise hastada $37,21 \pm 12,25$ iken beta glukan uygulama sonrası $19,72 \pm 13,15$ olarak saptandı. Yapmış

olduğumuz çalışmada, KRK hastalarına exvivo koşullarda beta glukan ile muamele sonucunda DNA kuyruk uzunluğunda, DNA kuyruk yüzdesi ve kuyruk momenti parametrelerinde istatistiksel olarak önemli ölçüde azalttığı saptanmıştır ($p<0,001$). Ayrıca Beta glukan uygulanmış hastalar ile kontrol grup arasında yaptığımız bir diğer karşılaştırmada kuyruk momenti, beta glukan uygulanmış hastalarda $3,55\pm 2,36$, kontrol grubunda $11,95\pm 5,65$, kuyruktaki DNA %'si beta glukan uygulanmış hastalarda $8,41\pm 0,54$, kontrol grubunda $26,99\pm 9,75$ olarak saptandı. Kuyruk uzunluğu bakımından ise her iki grupta herhangi bir fark olmadığı tespit edildi ($p=0.7$). Kuyruk uzunlukları kontrol grubu ile herhangi bir farklılık gözlenmemesi beklenen bir sonuç iken beta glukan uygulanmış hastalarda kuyruktaki DNA yüzdesi ve kuyruk momentinde kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalma olduğu saptandı ($p<0,001$). Bu durumun, güçlü bir antioksidan olan beta glukanın DNA hasarını yüksek derecede azalttığı sonucuna varabiliriz. Ancak, bu çalışmanın sonucunun desteklenmesi için beta glukan ile farklı konsantrasyonlarda farklı sürelerde yeni çalışmalar yapılması önerilebilir.

Özetle, elde ettiğimiz sonuçlar daha önce beta glukan ile ilgili yapılan farklı doku ve canlı türlerindeki çalışmaları destekler yöndedir. Beta glukanın kolorektal kanser hastalarında meydana gelen DNA hasarını büyük ölçüde azalttığı ve antimutajenik etki gösterdiği tespit edilmiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmada DNA hasarını belirlemek için; hasar tespit yöntemlerinden biri olan Comet Assay yöntemine göre DNA fragmanlarının parametreleri (KU, KM ve kuyruktaki DNA %'si) ölçülmüş ve beta glukanın onarıcı etkisi gözlemlenmiştir. Beta glukanın antisitotoksik ve antigenotoksik olduğu sonucuna varılabilir.

Bu çalışmaya ek olarak farklı DNA hasar tespit yöntemleri ile ve de farklı kanser türleri ile yeni çalışmalar yapılması önerilebilir.



7. KAYNAKLAR

Abel, G. ve Czop, J.K. (1992). Stimulation of human monocyte β -glucan receptors by glucan particles induces production of tnf-alpha and $\text{il-1 } \beta$. *Int j immunopharmacol*, 14: 1363-1373

Adachi, Y., Ohno, N. ve Yadomae T. (1993). Inhibitory effect of beta-glucans on zymosanmediated hydrogen peroxide production by murine peritoneal macrophages in vitro. *Biol Pharm Bull.* 16(5):462-7.

Akçal, T. ve Ertürk, S. (2010). Kolon ve Rektum Kanserleri. Adil Baykan (Ed.) (s.235-48). Türk Kolon ve Rektum Cerrahisi Derneği.

Akkuş İ. (1995). Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Konya Mimoza Yayınları, 1. Baskı, 1- 84.

Akramiene, D., Kondrotas, A., Didziapetriene, J., Kevelaitis, E. (2006). Effects of betaglucans on the immune system, *Medicina*, 43 (8): 597-606.

American Cancer Society Colorectal Cancer (2009). *Fats&Figures Special Edition 2005.* Oklahoma City, OK:American Cancer Society; 200526

Babíček, K., Čechová, I., Simon, R.R., Harwood, M., Cox, D.J., (2007). Toxicological assessment of a particulate yeast (1,3/1,6)- β -D-glucan in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 45, 1719–1730

Balajee, A.S. ve Bohr, V.A. (2000). Genomic heterogeneity of nucleotide excision repair. *Gene.* 250: 15-30.

Başaran, A.A. (2002). Farmakognozide Tek Hücre Jel Elektrofrezisi Uygulamaları, Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Bildiriler, Eskişehir, ISBN 975-940772-8.

Bayrak, Ö., Turgut, F., Karataş, O.F., Çimentepe, E., Bayrak, R., Çatal, F.vd. (2008). Oral betaglucan protects kidney against ischemia/reperfusion injury in rats. *Am J Nephrol.* 28(2): 190- 196.

Bedirli, A., Gokahmetoglu, S., Sakrak, O., Ersoz, N., Ayangil, D., Esin, H. (2003). Prevention of intraperitoneal adhesion formation using beta-glucan after ileocolic anastomosis in a rat bacterial peritonitis model. *Am J Surg.* 185:339-343.

Bertram J. S. (2000). The molecular biology of cancer. *Molecular aspects of medicine.* 21(6):167-223.

Bobek, P., Ozdín L. ve Galbavý Š. (1998). Dose-and time-dependent hypocholesterolemic effect of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) in rats, *Nutrition*, 14, (3): 282- 286.

Bowden, R.D., Buckwalter, M.R., McBride, J.F., Johnson, D.A., Murray, B.K. O'Neill, K.L. (2003). Tail profile: a more accurate system for analyzing DNA damage using the comet assay, *Mutat. Res.*, 537: 1-9.

Browder, W., Wiliams, D., Peter, L., Pretus, H., Jones, E. ve McNamee, R. (1998). Effect of enhanced macrophage function on early wound healing. *Surgery*. 104: 224-230.

Brown, G.D. ve Gordon, S. (2005). Immune recognition of fungal β -glucans. *Cell Micr.* 7:471-479

Brown, G.D. ve Gordon, S. (2003).Fungal beta glucans and mammalian immunity.19(3):311-315.

Brown, G.D., Herre, J., Williams, D.L., Willmwnt, J.A., Marshall, A.S., Gordon, S. (2003).Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans. *J Exp Med.*197(9): 11191124.

Bulmuş G.F. (2006).Kronik hiperhomosisteinemi olusturulan ratlarda alfa-lipoik asidin plazma ve çeşitli dokularda oksidan antioksidan sistem üzerine etkilerinin araştırılması. Doktora Tezi, Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Elazığ.

Butt, M.S., Tahir-Nadeem, M., Khan, M.K., Shabir, R., Butt, M.S. (2008). Oat: Unique Among the Cereals. *Eu J Nutr.* 47:68-79.

Byun, E.H., Kim, J.H., Sung, N.Y., Choi, J., Lim, S.T., Kim, K.H., Yook, H.S., Byun, M.W., Lee, J.W. (2008). Effects of gamma irradiation on the physical and structural properties of β -glucan. *Radiation Physics and Chemistry*, 77, 781- 786.

Cao, Y., Cao, T., Zhao, W. vd.(2018).Expression of B7-H₂ on CD8(+)T cells in colorektal cancer microenvironment and its clinical significance. *Int Immunopharmacol.* 56:128-134.

Carrow, D.J. (1996).Beta 1,3-Glucan as a primary immune activator. *Townsend Letter for Doctors and Patiens.* 84-91.

Chauhan, S.S., Ojha S. ve Mahmood A. (2011). Modulation of lipid peroxidation and antioxidation defense systems in rat intestine by subchronic flutide and ethanol administration. *Alcohol* 2011; 45: 663-72.

Chen, J. ve Seviour, R. (2007). Medicinal importance of fungal β -(1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 6)glucans, *Mycological Research*, 111 (6): 635-652.

Chihara, G. (1992). Recent progress in immunopharmacology and therapeutic effects of polysaccharides. *Dev Biol Stand.* 77: 191–197.

Chopineau, J., Sommier M. F, Sautou, V. (1994). Evaluation of free radical production in an ischaemia-reperfusion model in the rabbit using a tourniquet. *J Pharm Pharmacol.* 46:519-520.

Ciccia, A. ve Elledge S. J. (2010). The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Molecular cell*, 40 (2): 179-204.

Collins A.R. (2002). The comet assay. Principles, applications, and limitations. *Methods Mol Biol*, 203: 163-177.

Collins A.R. (2004). The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol*, 26: 249-261.

Cross A.J., Ferrucci, L.M, Risch, A. (2010). A large prospective study of meat consumption and colorectal cancer risk: an investigation of potential mechanisms underlying this association. *Cancer Res*;70:2406.

Çavdar, C., Sifil, A., ve Çamsarı, T. (1997). Reaktif oksijen partikülleri ve antioksidan savunma, *Türk Nefroloji Diyaliz ve Trasplantasyon Dergisi*, 3-4:92-95.

Delaney, B., Carlson, T., Frazer, S., Zheng, T., Hess, R., Ostergren, K., Kierzek, K., Haworth, J., Knutson, N., Junker, K., Jonker, D. (2002). Evaluation of The Toxicity of Concentrated Barley -glucan in a 28-day Feeding Study in Wistar Rats. *Food and Chemical Toxicology.* 41, 477– 487.

Desai, D.C, Neale, K.F, Talbot, I.C., vd. (1995). Juvenile polyposis. *Br J Surg*, 82:14-7.

Detels, R. (2015). Epidemiology: the foundation of public health. In: Detels R., Gulliford M., Karim Q.A., Tan C.C. (Eds). *Oxford Textbook of Global Public Health*, Sixth ed. U.K: Oxford University Press; p.403-404.

Dinçer, Y. (2010). DNA Hasarının Belirlenmesinde Comet Assay. *Türkiye Klinikleri*,30(4): 1365- 73.

Green, M.H., et al., (1996). Comet assay to detect nitric oxide-dependent DNA damage in mammalian cells. *Methods Enzymol*, 269: 243-66.

Duguid, J.R., Eble, J.N., Wilson, T.M., Kelley M.R. (1995). Differential cellular and subcellular expression of the human multifunctional apurinic/aprimidinic endonuclease (APE/ref-1) DNA repair enzyme. *Cancer Res.* 55: 6097-102.

Eddy, D.M. (1990). Screening for colorectal cancer. *Ann Intern Med*, 113(5):373- 384.

El Enshasy, H.A. ve Hatti-Kaul, R. (2013). Mushroom immunomodulators: unique molecules with unlimited applications, *Trends in Biotechnology*, 31 (12), 668- 677.

Fairbain, D.W., Olive, P.L. ve O'Neill, K.L. (1995). The Comet Assay, A Comprehensive Review, Mutation Research, 339: 37-59.

Fearon, E.R. (2011).Molecular genetics of colorectal cancer. Annual review of pathology.6:479-507.

Felippe, J., Silva, M. R., Maciel F.M.B., Scares A. M., Mendes, N.E. (1993). Infection prevention in patients with severe multiple trauma with the immunomodulator beta 1-3 polyglucose (glucan). Gynecology and Obst. 177: 383-389

Fidancı, V. (2010). Elektroforez Uygulamaları ve Klinik Laboratuvar, (2010), 80.251.40.59/veterinary.ankara.edu.tr/fidanci/.../Elektroforez_2010.pdf, (Erişim tarihi: 21/01/2014).

Fletcher, R.H. (2014). Screening for colorectal cancer: Strategies in patients at average risk, www.uptodate.com. (Erişim tarihi: 29.11.2014).

Forchhammer, L., Bräuner, E.V., Folkmann, J.K., Danielsen, P.H., Nielsen, C. ve Jensen, A. (2008).Variation in assessment of oxidatively damaged DNA in mononuclear blood cells by the comet assay with visual scoring, Mutagenesis 23 (3):2, pp. 23-31.

Friedberg, E.C. (1984).DNA Repair, s:1-2. Freeman WH and Company, New York.

Fry, R.D., Mahmoud, N., Maron, D.S., Ross H.M., Rombeau, J. (2008).Colon and Rektum.In:Towswnd C.M. (Ed.). Sabiston Text Book of Surgery, 18th Ed. Philadelphia: Elsevier. p-1348-1432.

Gardiner, T. (2000). A Review: Beta-glucan Biological Activities. GlycoScience 1 (32): 1-6.

Gichner, T. ve Plewa, M.J. (1998).Induction of somatic DNA damage as measured by single cell gel electrophoresis and point mutation in leaves of tobacco plants. Mutation Research, 401:143-152.

Gichner, T., Znidar, I., Wagner,E.D. ve Plewa, M.J. (2009). The use of higher plants in the comet assay. In: The Comet Assay in Toxicology, Edited by Alok Dhawan and Diana Anderson, Royal Society of Chemistry, pp. 98-119,

Gichner, T., Mukherjee A. ve Veleminsky, J. (2006).DNA staining with the fluorochromes EtBr, DAPI and YOYO-1 in the comet assay with tobacco plants after treatment with ethylmethanesulphonate, hyperthermia and DNase-I, Mutation Research, 605: 17-21.

Global Cancer Observatory [GLOBOCAN].(2012). website <http://gco.iarc.fr/>

GLOBACAN (2012). All cancers estimated incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012. http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx. (Erişim tarihi: 18 Haziran 2014).

Gooding, J.J. (2002). Electrochemical DNA hybridization biosensors. *Electroanalysis*, 14: 1149- 1156.

Gordon, P.H. (2006). Malignant Neoplasms of the Colon.In: Gordon P.H., Nivatvongs S. (Eds). *Neoplasms of the Colon, Rectum, and Anus*.2nd Ed. New York: Informa Healthcare USA, Inc; p.52-53.

Gönen, Ö. (2004). Kolorektal Kanser Epidemiyolojisi, Türkiye Klinikleri Cerrahi Dergisi Kolorektal Kanser Özel Sayı, Cilt 9, Sayı 1, s. 11-14.

Gutteridge, J.M. (1994).Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. *Chem Biol Intact*. 91:133-140.

Hahn, P.Y., Evans, S.E., Kottom, T.J., Standing, J.E., Pagano, R.E., Limper, A.H. (2003). Pneumocystis carini cell wall beta-glucan induced release of macrophage inflammatory protein-2 from alveolar epithelial cells via a lactosylceramide-mediated mechanism. *J Biol Chem*. 278:2043-2050.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M., Cross, C.E. (1992). Free radicals, antioxidants and human disease: Where are we now? *JLab. ClinMed*. 119:598-620.

Halliwell, B. (1994).Free radicals and antioksidants: a personal view. *Nutr Rev.*, 52, 8-1, 253-265.

Halliwell, B., (2012).Free radicals and antioxidants: updating a personal view, *Nutrition reviews*, 70, 5, 257-265.

Hamilton, S.R., Bosman, F. T., Boffetta, P., et al. (2010).Carcinoma of The Colon Rectum(2010) WHO Classification of Tumors of the digestive System, 4th edition, p. 132-173.

Hartmann, A., Agurell, E. and Beevers, C. (2003).4th International Comet Assay Workshop. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. *Mutagenesis*, 18, 45-51.

Heinemann, E.F., Zahm, S.H., McLaughlin, J.K., Vaught, J.B. (1994).Increased risk of colorectal carcinoma among smokers: Results of a 26-year follow up of US veterans and a review. *Int. J.Cancer*, 59:728-734.

Hellman, B., Vaghef, H. and Bostrom, B. (1995).The concepts of tail moment and tailinertia in the single cell gel electrophoresis assay, *Mutat. Res.*, 336: 12313,

Herbert, T., Alexander R.M., (2008).Inflammatory mechanisms in regulation of insulin resistance, *Tilg and Moschan Med April*, 14(3-4), 222-231.

Hoeijmakers, J.H. (2009).DNA damage, aging, and cancer. *New England Journal of Medicine*, 361, 15, 1475-85.-15.

Hong, F., Yan, J., Baran J.T, Allerdorf, D.J. et al. (2004).Mechanism by which orally administered beta 1.3-glucans enhance the tumoricidal activity of antitumor monoclonal antibodies in murine tumor models. *J. Immunol.* 173(2):797-806

Hopfner, K.P., Putnam, C.D, Tainer J.A. (2002).DNA double-strand break repair from head to tail. *Current opinion in structural biology*, 12, (1), 115-22.

Howard, R.A., et al. (2008).Physical activity, sedentary behavior, and the risk of colon and rectal cancer in the NIH-AARP Diet and Health Study. *Cancer causes&control* 19 (9):939-953.

Jackson-Thompson, J., Ahmed, F., German, R.R, Lai, S.M., Friedman, C. (2006).Descriptive epidemiology of colorectal cancer in the United States, 1998-2001. *Cancer.*107(5):1103-11.

Jaehrig, S.C., Rohn, S., Kroh, L.W., Wildenauer,F.X., Lisdat, F., Fleischer,L.G., Kurz,T., (2008)Antioxidative activity of (1-3), (1-6)- β -D-glucan from *Saccharomyces cerevisiae* grown on different media. *LWT Food Science and Technology*, 41,868-877.

Janout, V. ve Kollarova, H. (2001).Epidemiology of colorectal cancer. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacku Olomovc Czech Repub.*145:5-10.

Jemal, A., Vineis, P., Bray, F., Torre, L. ve Forman, D. (2014).Kanser Atlası. 2. Baskı. Atlanta, GA: Amerikan Kanser Derneği; 2014; ch 10,36-7.

Jeppesen, D. K., Bohr, V. A. ve Stevnsner, T. (2011).DNA repair deficiency in neurodegeneration. *Progress in neurobiology*, 94 (2), 166-200.

Jung, K., Ha, Y., Ha, S.K., Han. D. U., Kim, D.W., Moon, W. K.vd. (2004).Antiviral effect of *Saccharomyces cerevisiae* beta-glucan to swine influenza virus by increased production of interferon-gamma and nitric oxide. *J Vet Med B.* 51(2): 72–76.

Iyama, T. ve Wilson, D.M. (2013). DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. *DNA repair*, 12, (8), 620-636.

İşbir, T. (1994).Antioksidan Sistemler. Endotel. İzmir Tabip Odası Tıpta Temel Bilimler Kolu Sonbahar Okulu. 92- 98.

Karaduman D. (2006).Beta-Glukan ve Taksol Etkisiyle Fare (Mus musculus) Karaciğerinde Oluşan Histolojik Değişikliklerin Işık Mikroskobu Düzeyinde Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun.

Kassai, Z., Bauerová, K., Koprda V., Šandula, J., Harangozó, M. (2001). Penetration of radionuclides across the skin: Glucans as possible inhibitors of metals permeation. Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry, 250(1), 189- 191.

Kehrer J.P. (2000).The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. Toxicology.149(1):43-50.

Kelli M., Rothenberg, B., Rothenberg, D.A. (2005).Colon, Rectum, and Anus. In: Brunicaudi F.C. (Ed.) Schwartz's Principles Of Surgery 8th Ed. Houston: McGraw-Hill Companies; p.1057-1119.

Keser, O. ve Bilal, T. (2008). Beta-Glukanın Hayvan Beslemede Bağışıklık Sistemi ve Performans Üzerine Etkisi. Erciyes Üniv Vet Fak Derg. 5:107- 119.

Khatua, S., Paul, S., & Acharya, K., (2013).Mushroom as the potential source of new generation of antioxidant: a review, Research Journal of Pharmacy and Technology, 6, (5): 496-505.

Kim, H.S., Hong J.T., Kim, Y., Han, S.B. (2011). Stimulatory effect of β glucan on Immune cells, Immune Network, 11 (49): 191-194.

Kim, S.Y., Song, H.J., Lee, Y.Y, vd.(2006).Biomedical Issues of Dietary fiber beta glucan.J Korean Med Sci. 21:781-789.

Klaude, M., Ericson, S., Nygren, J., Ahnstrom, G. (1996).The Comet Assay Mechanisms and Technical Considerations, Mutation Research, 363: 89-96.

Kleinsmith, L.J. (2004).Principles of Cancer Biology. University of Michigan: Benjamin Cummings.

Kordon, A.Ö. (2010).Deneyisel tıkanma sarığında beta-glukanın akut akciğer hasarına etkisi. Uzmanlık tezi. Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi Anabilim Dalı.

Kulaksız, G. ve Sancar, A. (2007). Nükleotid Eksizyon Onarımı ve Kanser Türk Biyokimya Dergisi, 32 (3); 104-111.

Lander, H.M. (1997).An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. FASEB J.11:118-124.

Larsson, S.C., Orsini, N. ve Wolk, A. (2005).Diabetes Mellitus and risk of colorectal cancer: a meta-analysis." Journal of the National Cancer Institute, 97 (22):1679-1687.

- Li, B., Allendorf, D.J., Hansen, R., Marroquin J., Ding, C., Cramer, D.E. ve ark. (2006).** Yeast β glucan amplifies phagocyte killing of IC3b -opsonized tumor cells via complement receptor 3-syk-phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J Immunol.* 177: 1661-1669.
- Li, J., Xing, J.J., Li, D., Wang X., Zhao, L., Lv, S., Huang, D. (2005).** Effects of β glucan extracted from *Saccharomyces cerevisiae* on humoral and cellular immunity in weaned piglets, *Arhiv Animal Nutr*, 59, 303-312.
- Lin, A., Zhang, X., Chen, M., Cao, Q. (2007).** Oxidative stress and DNA damages induced by cadmium accumulation. *Journal of Environmental Science*, 19:596-602.
- Lichtenstein, P., Holm, N.V., Verkasalo, P.K.vd.(2000).** Environmental and heritable factors in the causation of cancer-analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *The New England journal of medicine.* 343(2):78-85.
- Lindahl, T.(1993).** Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*, 362, 6422- 709.
- Lyly, M. (2006).** Added β -glucan as a Source of Fibre for Consumers. VTT Publications 594.
- Martinez, J.D., Parker, M.T., Fultz, K.E., Ignatenko, N.A., Gerner, E.W.(2003).** *Molecular Biology of Cancer*, Chapter One.
- McKelvey-Martin, V.J., Green, M.H., Schmezer, P., Pool-Zobel, B.L., DeMeo, M.P., Collins, A. (1993).** The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a European review. *Mutat Res*, 288: 47- 63.
- Moller, P. vd. (2000).** The comet assay as a rapid test in biomonitoring occupational exposure to DNA-damaging agents and effect of confounding factors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 9(10): 1005-15.
- Nakazawa, H., Genka, C., Fujishima, M. (1996).** Pathological aspects of active oxygens/free radicals. *Jpn J Physiol.* 46(1):15-32.
- Novak, M. ve Vetvicka, V. (2008).** β -Glucans, History, and the Present: Immunomodulatory Aspects and Mechanisms of Action. *Journal of Immunotoxicology*, 5, 47- 57.
- Olah, E. (2005).** Basic Concepts of Cancer: Genomic Determination. *EJIFCC.* 16(2): 10-15.
- Olive, P.L, Banath, J.P., Durand, R.E. (1990).** Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay. *Radiat Res.* 122: 86- 94.

Ostling, O. ve Johanson, K.J. (1984). Microelectrophoretic Study Of Radiation İnduced DNA Damage In Individual Mammalian Cells, Biochemical And Biophysical Research Communications,123: pp. 291- 298.

Özkaya, A.B. (2009). Hct-116 kolon kanser hücre hattında yeşil çay etken maddesi olan (-)-epigallokatekin-3 gallat'ın apoptoz üzerine etkisinin incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir.

Portera C.A., Love, E.J., Memore L., et al.(1997). Effect of macrophage stimulation on collagen biosynthesis in the healing wound. 63: 125- 131.

Pöschl, G. ve Seitz, H.K. (2004). Alcohol and cancer. Alcohol Alcohol.39(3):155- 165.

Rank, J., Syberg, K. ve Jensen, K. (2009). Comet assay on tetraploid yeast cells, Mutation Research, 673: 53-58.

Rasmussen,L.T. ve Seljelid, R. (1991). Novel immunomodulators with pronounced in vivo effects caused by stimulation of cytokine release. J Cell Biochem, 46: 60-68.

Revan, S. (2007). Farklı dayanıklılık antrenmanlarının oksidatif stres oluşumu ve antioksidan düzeyleri üzerine etkisi. Yüksek Lisans Tezi. Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü; Ankara.

Rice, P.J, Adams E.L, Ozment-Skelton, T.et al.(2005). Oral delivery and gastrointestinal absorption of soluble glucans stimulate increased resistance to infectious challenge. J. Pharmacol. Exp. Ther. 314: 1079- 1086.

Rieset, L.A., Wingo, P.A.et al.(2000). The annual report to the nation on the status of cancer, 1973-1997, with a special section on colorectal cancer. Cancer. 88(10):2398-424.

Ries, L.A., Melbert, D., Krapcho, M.et al.(2008). SEER cancer statistics review, 1975-2005. Bethesda, MD.

Rojas, E., Lopez, M.C., Valverde, M. (1999). Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. J. Chromatogr, 722: 225- 254.

Sadler, T.W. (1996). Sindirim Sistemi. Langman's Medikal Embriyoloji. Edit:Basaklar A.C.7. Baskı. Ankara:Palme Kitapevi, 231-259.

Sağlık Bakanlığı Kanserele Savaş Dairesi Başkanlığı verileri (www.kanser.gov.tr).

Sancar, A., Lindsey-Boltz, L.A., Ünsal-Kaçmaz, K., Linn, S.(2004). Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. Annual review of biochemistry, 73 (1), 39-85.

Sandvik, A., Wang, Y.Y., Morton, H.C., Aasen, A.O., Wang, J.E., Johansen, F.E., (2007). Oral and systemic administration of β -glucan protects against lipopolysaccharide induced shock and organ injury in rats. *Clinical and Experimental Immunology*, 148, 168-177.

Sayek, İ. (2004). Kolon-Rektum Kanserleri. (Ed.: Sayek İ.). *Temel Cerrahi 3.Ed.*, Ankara:Güneş Kitapevi;1243-1250.

Sener, G., Toklu, H., Ercan, F. et al.(2005). Protective effect of beta-glucan against oxidative organ injury in a rat model of sepsis. *Int. Immunopharmacol.* 5: 1387- 1396.

Sener, G., Sert, G., Özer, S.A., Arbak, S., Uslu, B., Gedik, N., Ayanoglu, D.G. (2006). Pressure ulcer-induced oxidative organ injury is ameliorated by β -glucan treatment in rats. *International immunopharmacology.* 6(5):724- 732.

Serafini, M. ve Del Rio, D. (2004). Understanding the association between dietary antioxidants, redox status and disease: is the total antioxidant capacity the right tool? *Redox Rep.* 9(3):145- 152.

Singh, B.N.vd.(2009). Oxidative DNA damage protective activity, antioxidant and anti-quorum sensing potentials of *Moringa oleifera*. *Food Chem Toxicol.* 47: 1109- 16.

Singh, N.P. vd.(1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res,* 175(1): 184- 191.

Singh, N.P., Stephens, R.E., Schneider, E.L. (1994). Modifications of alkaline microgel electrophoresis for sensitive detection of DNA damage. *Int J Radiat Biol,* 66: 23- 28.

Skandalakis, J.E, Gray, S.W., Ricketts, R. (1994). The Colon and Rectum.In: Skandalakis JE, Gray SW, eds. *Embryology for Surgeons: the embryological basis for the treatment of congenital anomalies.* Baltimore: Williams& Wilkins; p.242-281.

Spigelman, A., Murray, V., Phillips, R. (1989). Cancer and the Peutz-Jeghers Syndrome. *Gut.* 30 (11):1588- 1590.

Splettstoesser, W.D., Werner, S.P. (2002). Oxidative stress in phagocytes 'The Enemy Within'. *Microscopy Research And Technique.* 57:44-55.

Stewart B.W. ve Wild, C.P. (2014). 2014 World Cancer Report. Lyon: Naturaprint:16-50.

Swift, L.H.ve Golsteyn, R.M.(2014). Genotoxic anti-cancer agents and their relationship to DNA damage, mitosis, and checkpoint adaptation in proliferating cancer cells. *International journal of molecular sciences,* 15 (3): 3403-3431

Sardas, S. (1996). Microgel Electrophoresis Assay (Comet Test) for Detecting DNA Damage in Individual Cells, *J Fac Pharm Gazi,* 13: s. 65-73.

Taylor, R.M. vd.(2000). A cell cycle-specific requirement for the XRCC1 BRCT II domain during mammalian DNA strand break repair. *Mol Cell Biol*, 20(2): p. 735- 740.

Theuwissen, E. ve Mensink, R.P. (2007). Simultaneous Intake of β -Glucan and Plant Stanol Esters Affects Lipid Metabolism in Slightly Hypercholesterolemic Subjects. *J Nutr*. 137:583- 588

Tsiapali, E., Whaley, S., Kalbfleisch, J., Ensley, H.E., Browder, I.W., Williams, D.L. (2001). Glucans Exhibit Weak Antioxidant Activity, But Stimulate Macrophage Free Radical Activity. *Free Radical Biology & Medicine*, 30(4), 393- 402.

Vajpayee, P., Dhawan A. ve Shanker, R. (2006). Evaluation of the alkaline comet assay conducted with the wetlands plant *Bacopamonnieri L.* as a model for ecogenotoxicity assessment, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 47: 483-489.

Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact*, 160 (1):1-40.

Verjat, T., Dhenaut, A., Radicella, J.P., Araneda, S. (2000). Detection of 8-oxoG DNA glycosylase activity and OGG1 transcripts in the rat CNS. *Mutat Res*, 460 (2): 127-138.

Vermeer, N.C., Scijders, H.S., Holman, F.A. vd.(2017). Colorectal cancer screening: Systematic review of screen-related morbidity and mortality, *Cancer Treat Rev*. 54:87-98.

Volman, J.J., Ramakers, J.D., Plat, J., (2008). Dietary modulation of immune function by β -glucans. *Physiology & Behavior*, 94, 276- 284.

Wrzoc, M. ve Petras, M. (1997). Comparison of DNA Damage in Peripheral Blood and spleen Lymphocytes Using the Single-Cell Gel Assay, *Mutation Research*, 379: 263-269.

Wang, J. (2000). Flux-averaging analysis of type Ia supernova Data. *The Astrophysical Journal*, 536: 531-539.

Williams, D.L., Mueller, A., Browder, W. (1996). Glucan-based macrophage stimulators: A review of their anti – infective potential. *Clin. Immunother.* (5): 392-399.

Yang, K., Fard, S. vd.(2016). Risk factors for colorectal cancer in man induce aberrant crypt foci in rats: Preliminary findings. *Nutrition and cancer*, 68 (1):94-104.

Yetişmiş, M.R. DNA Onarım Mekanizmaları. Bitirme Tezi. Celal Bayar Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü. Danışman: Yard. Doç. Dr. Erdal Balcan

Young, I.S. ve Woodside J.V. (2001). Antioksidants in health and disease. *J Clin Pathol*, 54, 176-186.

Zekovic, D.B., Kwiatkowski, S., Vrvic, M.M., Jakovljevic, D., Moran, C.A. (2005). Natural and modified (1→3)-β-D-Glucans in health promotion and disease alleviation. *Crit Rev Biotechnol*, 25(4): 205- 230.

Zhang, Y., Rohde, L.H., Wu, H. (2009). Involvement of Nucleotide Excision and Mismatch Repair Mechanisms *Current Genomics*, Vol. 10, No. 4.

Zisman, A.L., Nickolov, A., Brand, R.E., Gorchow, A., Roy, H.K. (2006). Associations between the age at diagnosis and location of colorectal cancer and the use of alcohol and tobacco: implications for screening. *Arch Intern Med*. 166:629- 634.

Züllli, F., Applegate, L.A., Frenk, E. and Suter, F. (1995). Photoprotective effects of CM-Glucan on cultured human skin cells. *Eurocosmetics* 11, 46- 50.



8. EKLER



EK- 1 Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu

SANKO Üniversitesi Etik Kurul Yönergesi
Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu

Ek-3
Lahika-3

SANKO ÜNİVERSİTESİ ETİK KURULU BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Bir araştırma çalışmasına katılmayı istenmektedir. Çalışmaya katılıp katılmama kararı tamamen size aittir. Katılmak isteyip istemediğinize karar vermeden önce araştırmanın neden yapıldığını, bilgilerinizin nasıl kullanılacağını, çalışmanın neleri içerdiğini ve olası yararlarını, risklerini ve rahatsızlık verebilecek konuları anlamanız önemlidir. Lütfen aşağıdaki bilgileri dikkatlice okumak için zaman ayırınız ve eğer istiyorsanız özel veya aile doktorunuzla konuyu değerlendiriniz. Çalışmaya katılmaya karar verirsiniz imzalamanız için size bu Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu verilecektir. Çalışmadan herhangi bir zamanda ayrılmakta özgürsünüz. Eğer isterseniz, bu çalışmaya katılımınızla ilgili olarak hekiminiz / aile doktorunuz bilgilendirilecektir. Çalışma amacıyla yapılan normal muayeneniz sırasında istenilen tetkikleriniz dışındaki tüm laboratuvar testleri çalışma destekleyicisi tarafından karşılanacak; size veya bağlı bulunduğunuz özel sigorta veya resmi sosyal güvenlik kurumuna ödetilmeyecektir.

Çalışmanın Adı: Kolorektal kanser tanısı almış hastalarda DNA hasarının incelenmesi ve in vitro ortamda DNA hasarı üzerine beta glukanın onarıcı rolünün araştırılması. (Kolorektal kanserli hastaların DNA hasarının tespiti ve beta glukana onarımının araştırılması).

Çalışmanın Konusu ve Amacı:

Kolorektal kanser, yaygın tümörlerden biri olan insan sağlığı için ciddi bir tehdittir. Kolon kanseri ya da kolorektal kanser; kolon, rektum ve apandis bölgelerinde meydana gelen kanser oluşumlarının tamamını kapsar. Bizim bu çalışmadaki amacımız; fonksiyonel yiyeceklerin içerisinde yer aldığını bildiğimiz beta glukana adındaki bağışıklık sistemini güçlendiren antioksidan glikoz molekülünün DNA hasarını onarıcı etkisinin, kolorektal kanserli hastalardan alınan kanlarda uygulanarak lökositler araştırılması.

Çalışma Yöntemi: Araştırmamızda sizlerden steril koşullarda yaklaşık olarak 5 ml kan alınacaktır. Bu kandan izole edilen beyaz kürelerimiz laboratuvar koşullarında ayrıştırılacaktır. Ayrıştırılan beyaz kürelerde DNA mızda hasara ve eş zamanlı olarak beta glukanın hasarı onarıcı etkisi olup olmadığına bakılacaktır. Bu çalışmaya katılmamız için sizden herhangi bir ücret istenmeyecektir. Çalışmaya katıldığımız için size herhangi bir ödeme yapılmayacaktır.

Çalışmaya Katılmayı Olası Yararları: Klinik denemeler çok ciddi ve ayrıntılı bir izleme gerektirir. Hasta gönüllüler çok iyi bir klinik bakım alırlar ve denenen yeni üründen tedavisi için yararlanabilirler. Sosyal sorumluluk ile yeni tedavilerin bulunmasına verdiği katkı ile başka hastaların da bu tedaviden yararlanabileceği hazzını duyarlar. Araştırmanın türüne göre böyle bir çalışmaya katılmak, kendi sağlık sorunlarını iyileştirme, yeni tedavilere önceden ulaşma gibi yararlar yanında bazen de sadece başkalarına veya topluma yararlı bilgiler sağlama amacını taşıyabilir. Şu anda bu çalışmanın hemen size veya çocuğunuza bir fayda olarak dönüp dönmeyeceğini bilmiyoruz. Ancak böyle bir analiz hastalığın daha iyi bilinmesine ve tedavisi için yeni ilaçlar geliştirilmesine katkı sağlayabilir. Bu çalışmaya katılmayı reddedebilirsiniz. Bu araştırmaya katılmak tamamen isteğe bağlıdır ve reddettiğiniz takdirde size uygulanan tedavide herhangi bir değişiklik olmayacaktır.

Soru ve Problemler İçin Başvurulacak Kişiler:

Doç. Dr. Mustafa YILDIRIM (0342)2111663
Dr. Havva Yeşil ÇINKIR (0342)3601200

Çalışmaya Katılma Onayı

Yukarıdaki bilgileri doktorumla ayrıntılı olarak tartıştım ve kendisi bütün sorularımı cevapladı. Bu bilgilendirilmiş olur belgesini okudum ve anladım. Bu araştırmaya katılmayı kabul ediyorum ve bu onay belgesini kendi hür irademle imzalıyorum. Bu onay, ilgili hiçbir kanun ve yönetmeliği geçersiz kılmaz. Doktorum saklamam için bu belgenin bir kopyasını çalışma sırasında dikkat edeceğim noktaları da içerecek şekilde bana teslim etmiştir.

Gönüllü Adı Soyadı:	Tarih ve İmza:
Adres ve Telefon:	

EK- 1 Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu (Devamı)

SANKO Üniversitesi Etik Kurul Yönergesi
Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu

Ek-3
Lahika-3

Veli / Vasinin Adı Soyadı:		Tarih ve İmza:
Adres ve Telefon:		
Tanık Adı Soyadı:		Tarih ve İmza:
Adres ve Telefon:		
Araştırmacı Adı Soyadı:	Nilay UÇAR	Tarih ve İmza:
Adres ve Telefon:	SANKO Üniversitesi, (0342)2116500	

EK-2 Etik Kurul Karar Formu

SANKO ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

BAŞVURU BİLGİLERİ	Araştırmannın Başlığı	Kolorektal Kanseri Tanısı Almış Hastalarda DNA Hasarının İncelenmesi ve DNA Hasarı Üzerine Beta Glukanın Onarıcı Rolünün Araştırılması
	Sorumlu Araştırmacı	Dr. Öğr. Üyesi Necla BENLİER
	Kurumu	SANKO Üniversitesi Tıp Fakültesi
	Başvuru Tarihi	26.03.2018
	Araştırmannın Türü	Kan, idrar, doku vb. biyokimya, mikrobiyoloji, patoloji materyalleriyle yapılacak araştırma
	Katılan Merkezler	Çok Merkez
	Varsa Protokol No	-

İLETİŞİM BİLGİLERİ	Adres	SANKO Üniversitesi İncilipınar Mahallesi Gazi Muhtar Paşa Bulvarı No:36 27090 Şehitkamil / GAZİANTEP
	Telefon	0 342 211 65 63
	Fax	0 342 211 65 66
	E-posta	etikkurul@sanko.edu.tr

KARAR	Oturum No: 2018/02	Karar No: 11	Tarih: 29.03.2018
	Yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma dosyası; araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, etik açıdan gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.		

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyeti		Araştırma İle İlişkisi		Oturuma Katılım		İmza
			E	K	Var	Yok	Var	Yok	
Prof. Dr. Vildan SÜMBÜLOĞLU Başkan	Biyostatistik	SANKO Üniversitesi Tıp Fakültesi		X		X	X		
Prof. Dr. Mehmet BAŞTEMİR Başkan Yardımcısı	Endokrinoloji ve Metabolizma	SANKO Üniversitesi SB Fakültesi	X			X	X		
Yrd. Doç. Dr. Necla BENLİER Üye	Farmakoloji	SANKO Üniversitesi Tıp Fakültesi		X	X			X	Katılmadı
Yrd. Doç. Dr. Tuba DENKÇEKEN Üye	Biyofizik	SANKO Üniversitesi Tıp Fakültesi		X		X	X		
Yrd. Doç. Dr. Elif PALA Üye	Tıbbi Biyoloji	SANKO Üniversitesi Tıp Fakültesi		X		X	X		
Yrd. Doç. Dr. Neriman AYDIN Üye	Halk Sağlığı	Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi		X		X	X		
Av. M. Murat GÜNERİ Üye	Hukuk	Serbest Avukat	X			X	X		
Naci BORAN Üye		Sani Konukoğlu Vakfı	X			X	X		

EK- 3 Kurum İzni

Evrak Tarih ve Sayısı: 27/09/2018-E.18028



T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
Şahinbey Araştırma ve Uygulama Hastanesi
Başhekimliği

Sayı :91786782/302.08.01/E.18028
Konu :Nilay UÇAR 'a ait çalışma Hk.

27/09/2018

SANKO ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜNE

Gazi Muhtar Pasa Blv. No:36 PK:27090
Şehitkamil/GAZİANTEP

İlgi :25/09/2018 tarihli, 103 sayılı ve "Nilay UÇAR'a ait tez çalışması." konulu yazı

Sanko Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsünün ilgi yazısına istinaden; Moleküler Tıp Yüksek Lisans öğrencisi Nilay UÇAR "Kolonorektal Kanseri Tanısı Almış Hastalarda DNA Hasarının İncelenmesi ve DNA Hasarı Üzerine Beta Glukanın Onarıcı Rolünün Araştırılması" konulu tez çalışmasını Hastanemiz İç Hastalıkları Anabilim Dalı Dr. Öğr. Üyesi Havva YEŞİL ÇINKIR 'ın gözetiminde 2018-2019 yılı içinde yürütmesi uygun mütalaa edilmiştir.

Bilgilerinize arz/rica ederim.

e-imzalıdır

Doç.Dr. Suat ZENGİN
Başhekim

DAĞITIM

Gereği:

SANKO ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜNE

Bilgi:

TIBBİ ONKOLOJİ BİLİM DALINA

Evrakı Doğrulamak İçin : <https://ebys.gantep.edu.tr/enVision/Dogrula/LS41CUS>


Üniversite Bulvarı P.K. 27310 Şehitkamil / Gaziantep, TÜRKİYE
Tel: : 0 (342) 360 12 00 Faks: 0 (342) 360 10 13
E-Posta: : bilgi@gantep.edu.tr Elektronik ağı: <http://www.gantep.edu.tr/>

Ayrıntılı bilgi için İrtibat:



Bu belge 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununun 5. Maddesi gereğince güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

EK- 4 Tez İntihal Raporu

 SANKO UNİVERSİTESİ	T.C. SANKO ÜNİVERSİTESİ LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ NİHAİ TEZ İNTİHAL RAPORU FORMU	TEZ FORM 2b
---	---	--

I- ÖĞRENCİ BİLGİLERİ

Adı : Nilay **Anabilim Dalı** : Moleküler Tıp
Soyadı : UÇAR **Programı** : Moleküler Tıp Tezli
Öğrenci No : 151102001 **Statüsü** : Yüksek Lisans Doktora

II- TEZ BİLGİLERİ

Tez Danışman Adı Soyadı : Dr. Öğr. Üyesi Necla BENLİER
Tez Adı : Kolorektal Kanser Tanısı Almış Hastalarda Dna Hasarının İncelenmesi ve DNA Hasarı Üzerine Beta Glukanın Onarıcı Rolünün Araştırılması

III- İNTİHAL RAPOR BİLGİLERİ

	<u>Benzerlik Oranı (%)</u>	<u>Tarih</u>
<input checked="" type="checkbox"/> Tez Savunması Öncesi	8	17/06/2019
<input checked="" type="checkbox"/> Tez Savunması Sonrası	9	19/07/2019

Yukarıda belirtilen tez çalışmasının kapak sayfası, giriş, ana bölümler ve sonuç kısımlarından oluşan toplam 49 sayfalık kısmına ilişkin, TURNITIN adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezin benzerlik oranı alıntılar dahil %9'dur.

Uygulanan filtrelemeler:

- Tez Ön Sayfaları (onay, etik beyan, teşekkür, özet ve dizin sayfaları) hariç,
- Kaynaklar hariç,
- Ekler hariç,
- Beş kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç.

ENSTİTÜ ONAYI

UYGUNDUR



Duygu ALANGİL
Enstitü Sekreteri

ACIKLAMA

*Enstitü söz konusu teze ilişkin intihal yazılım programı (TURNITIN) raporunu alarak tez danışmanına ve jüri üyelerine gönderir.

*Rapordaki verilerde gerçek bir intihalin tespiti halinde gerekçesi ile birlikte karar verilmek üzere tez, Enstitü Yönetim Kuruluna gönderilir.

EK-5 Özgeçmiş

Adı Soyadı: Nilay UÇAR

Doğum Tarihi/Yeri: 14.11.1975/İstanbul

Ünvanı: Kimyager

Öğrenim Durumu: Yüksek Lisans

Yabancı Dil: İngilizce (İleri Seviye)

Almanca(Orta Seviye)

Eğitim Durumu: İSTEK Vakfı Özel Florya Bilge Kağan Ortaokulu

İSTEK Vakfı Özel Florya Bilge Kağan Lisesi

Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü

Cab Air Uçuş Okulu

Hezarfen Uçuş Okulu

Anadolu Üniversitesi Açıköğretim Fakültesi İşletme Bölümü (Devam)

SANKO Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Moleküler Tıp

Anabilim Dalı

Kurs/Sertifika: Flow Sitometri Kursu (Çukurova Üniversitesi)

Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası (Kahramanmaraş Sütçü İmam
Üniversitesi)

TANDEM Kütle Spektrofotometri ve DNA Hasarı Kursu (9 Eylül
Üniversitesi)

İş Deneyimi: Alfa Kimya (İstanbul)

THY(İstanbul)

Özel Seçkin Koleji (Gaziantep)

SANKO Üniversitesi Tıp Fakültesi (Laboratuvar Bölümü) (Devam)

